

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali



Tesi di Laurea in Scienze Biologiche

**Studi di citotossicità del peptide β -amiloide (1-40)
implicato nel morbo di Alzheimer su protisti
utilizzati come organismi modello.**

Candidata

Annalisa Galletti

Relatore

Dott.ssa Antonella Sgarbossa

Anno Accademico 2006/2007

Ad Alessio

Indice

| | |
|---|----|
| Riassunto | 4 |
| Abstract | 6 |
| INTRODUZIONE | 8 |
| 1. Breve storia delle fibrille amiloidi | 9 |
| 2. La neurodegenerazione | 10 |
| 3. Il Morbo di Alzheimer..... | 15 |
| 3.1. <i>Il processamento di APP e la genesi dei peptidi βA</i> | 17 |
| 3.2. <i>I peptidi β-amiloidi</i> | 20 |
| 3.3. <i>Le fibrille amiloidi</i> | 22 |
| 3.4. <i>Il misfolding</i> | 26 |
| 3.5. <i>La cinetica di aggregazione</i> | 30 |
| 4. Gli inibitori | 34 |
| 4.1. <i>L'ipericina: struttura e proprietà</i> | 37 |
| 5. La citotossicità..... | 40 |
| 6. Protisti come sistema modello..... | 42 |
| 6.1. <i>Biologia di Euglena gracilis</i> | 44 |
| 6.2. <i>Biologia di Dunaliella salina</i> | 47 |
| 6.3. <i>Biologia di Blepharisma japonicum</i> | 50 |
| MATERIALI E METODI | 54 |
| 1. Materiali | 55 |
| 2. Preparazione dei campioni | 55 |
| 3. Strumentazione | 56 |
| 3.1 <i>Misure di assorbimento</i> | 56 |

| | |
|---|------------|
| 3.2 Misure di fluorescenza e scattering..... | 58 |
| 3.3 Misure di dicroismo circolare | 60 |
| 4. Metodi di coltura dei protisti..... | 61 |
| 4.1. <i>Euglena gracilis</i> | 61 |
| 4.2. <i>Dunaliella salina</i> | 62 |
| 4.3. <i>Blepharisma japonicum</i> | 63 |
| RISULTATI E DISCUSSIONE | 67 |
| RISULTATI DI SPETTROSCOPIA..... | 68 |
| 1. Cinetica di aggregazione del peptide β -amiloide (1-40)..... | 68 |
| 2. Effetto dell'ipericina sulla cinetica di aggregazione..... | 71 |
| 2.1 Misure della variazione di fluorescenza nel tempo..... | 72 |
| RISULTATI DI CITOTOSSICITÀ..... | 76 |
| 1. Effetti del peptide β -amiloide ₍₁₋₄₀₎ su <i>Euglena gracilis</i> | 76 |
| 2. Effetti del peptide β -amiloide ₍₁₋₄₀₎ su <i>Dunaliella salina</i> | 80 |
| Analisi con Ecotox..... | 80 |
| Analisi con Eukatrack..... | 83 |
| 2.1. Effetti di βA in forma fibrillare..... | 84 |
| 2.2. Effetti di βA in forma monomerica..... | 88 |
| 2.3. Effetti di βA in presenza di ipericina..... | 90 |
| 3. Effetti del peptide β -amiloide ₍₁₋₄₀₎ sul ciliato <i>Blepharisma japonicum</i> | 95 |
| CONCLUSIONI..... | 98 |
| RINGRAZIAMENTI..... | 100 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 102 |

Riassunto

Molte malattie neurodegenerative, tra cui il Morbo di Alzheimer, il Morbo di Parkinson, l'Encefalopatia Spongiforme e la Corea di Huntington, sono caratterizzate dalla presenza di grosse strutture filamentose dette fibrille amiloidi derivanti dall'aggregazione ordinata di specifiche proteine o polipeptidi, diversi a secondo della patologia. Questi aggregati presentano delle caratteristiche chimico-fisiche comuni: morfologia fibrillare, predominanza di struttura secondaria β -sheet, estrema stabilità e insolubilità nei comuni solventi organici, resistenza alle proteasi. La comprensione dei processi molecolari che sono alla base della fibrillogenesi, essenziale per capire l'origine di queste patologie, potrebbe contribuire a mettere a punto nuove strategie terapeutiche e preventive. Di recente, è stata posta in discussione l'idea che la tossicità sia dovuta alle fibrille insolubili, le quali rappresenterebbero, invece, una struttura molecolare di minima energia per le proteine aggregate, mentre si è rafforzata l'ipotesi che siano gli intermedi oligomerici i veri agenti citotossici.

Nel mio lavoro di ricerca, svolto presso l'Istituto di Biofisica del CNR di Pisa, l'attenzione è stata focalizzata sul peptide β -amiloide₍₁₋₄₀₎, responsabile del Morbo di Alzheimer, che forma grossi aggregati fibrillari nel parenchima cerebrale, noti come placche senili. Sono stati effettuati studi spettroscopici *in vitro* con cui è stata analizzata la cinetica di aggregazione del peptide, in modo da capire come avvenga il processo di fibrillogenesi ed, eventualmente, come possa essere perturbato. Quindi, gli stessi studi spettroscopici sono stati eseguiti in presenza di un potenziale inibitore, l'ipericina. Questa è una molecola aromatica policiclica estratta dall' *Hypericum perforatum* (noto come Erba di San Giovanni), la quale è in grado di interagire con i residui aromatici del peptide, perturbandone il processo di aggregazione. Parallelamente, è stato affrontato il problema di quale sia la forma citotossica patologica (oligomero intermedio o fibrilla matura) così come

il suo meccanismo d'azione (alterazione della membrana cellulare). Recentemente, test innovativi di citotossicità *in vitro* su protisti, usati come cellule-organismi modello, stanno riscuotendo un crescente interesse perché in grado di correlare le modifiche del comportamento motorio dei microorganismi a un eventuale danno cellulare anche non letale. Nel mio lavoro di tesi, quindi, è stato effettuato uno studio volto a comprendere se e come il peptide β -amiloide₍₁₋₄₀₎, in differenti fasi di fibrillogenesi, possa alterare le risposte comportamentali di alcuni protisti delle quali siano noti i meccanismi molecolari e fisiologici come, per esempio, l'apertura/chiusura di specifici canali di membrana. In particolare, tre sono stati i protisti presi in esame, essendo il loro comportamento motorio a lungo studiato e ben caratterizzato dal gruppo di ricerca con cui lavoro: il ciliato *Blepharisma japonicum*, e le microalghe *Euglena gracilis* e *Dunaliella salina*. Utilizzando due sofisticati sistemi di analisi d'immagine computerizzata, Ecotox e Matrox Odyssey Image System, e ponendo particolare attenzione alla scelta dei parametri più significativi nel rivelare gli effetti citotossici, sono state monitorate la motilità e la velocità media di popolazioni cellulari incubate, per tempi diversi, con la forma monomeric/oligomeric e fibrillare del peptide β -amiloide₍₁₋₄₀₎. I risultati di questi esperimenti innovativi pongono le basi per esperimenti futuri volti alla migliore comprensione del meccanismo di azione del peptide β -amiloide e alla ricerca di terapie alternative per la cura del morbo di Alzheimer.

ABSTRACT

Many neurodegenerative disorders, including Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's Diseases, are characterized by the presence of bulky filamentous structures, termed Amyloid fibrils, resulting from the aggregation of specific proteins or peptides. These fibrils are different in the various pathologies, but exhibit several common physico-chemical features: fibrillar morphology, predominantly β -sheet secondary structure, very high stability, insolubility in common solvents and protease-resistance. The comprehension of the molecular basis of fibrillogenesis, essential to understand the origin of these pathologies, could also contribute to envisage new therapeutic and preventive strategies. Recently, the idea that toxicity is due to the insoluble fibrils has been questioned and the hypothesis has been put forward that the oligomeric intermediates are the real cytotoxic agents. In my research work, performed at the Biophysics Institute of CNR in Pisa, the attention has been focused on the Beta Amyloid (1-40) peptide, responsible for Alzheimer's Disease, that gives rise to fibrillar aggregates in the brain parenchyma, referred to as senile plaques. We have performed spectroscopic studies *in vitro* to analyze the kinetic of peptides aggregation, to understand how the process of fibrillogenesis occurs and, ultimately, if and how this process can be perturbed by a polycyclic aromatic molecule, hypericin that is able to interact with aromatic residues of the peptide, possibly affecting the aggregation process. We also started setting up and verifying the reliability of a novel *in vitro* cytotoxicity test: the dependence of the behavioural motile responses of selected protists (the ciliate *Blepharisma japonicum* and the microalgae *Euglena gracilis* and *Dunaliella salina*) on the presence of monomeric/oligomeric and fibrillar form of the β A peptide. By means of two sophisticated computerized imaging analysis systems, Ecotox and Matrox Odyssey Image System, we have carefully analyzed the motility and the average velocity of cellular populations incubated, for different times, with monomeric/

oligomeric and fibrillar form of the β A peptide. The results of our experiments seem to support the hypothesis that the oligomeric intermediates are the real cytotoxic agents and allow planning future experiments for a deeper understanding of the action mechanism of β A.

Introduzione

1. Breve storia delle fibrille amiloidi

Nel 1854, il fisico tedesco Rudolph Virchow rivolse i suoi studi su macroscopiche anomalie nel cervello umano (descritte per la prima volta nel fegato nel 1639, *lardaceous liver*), presenti sotto forma di corpuscoli, a strati concentrici, somiglianti a grani di amido, i *corpora amylacea*.

Questi corpuscoli, come l'amido, reagivano positivamente alla colorazione con iodio, tingendosi di blu mentre tutti gli altri tessuti si coloravano di giallo. Invece, trattamenti con iodio e acido solforico, utilizzati come test per la cellulosa nella membrana cellulare delle piante (Unger, Goldmann, 1847), rivelavano il caratteristico colore violetto della cellulosa. Ipotizzando sostanze "cellulosa-simile", Virchow coniò il termine "amiloide" (Cohen, 1986).

Studi successivi (Friedreich e Kekulé, 1859) dimostrarono invece la presenza, in queste masse amiloidi, di materiale proteico, di una significativa quantità di azoto e, soprattutto, l'assenza di carboidrati, per cui si pensò che l'"amiloide" fosse una proteina o una classe di proteine che formavano ammassi strutturalmente amorfi.

Studi di microscopia con luce polarizzata (Divry e Florkin, 1927) hanno dimostrato che gli accumuli di amiloide in un gran numero di tessuti, non colorati e colorati con Congo-red, esibivano una birifrangenza positiva rispetto all'asse longitudinale dei depositi. La colorazione con Congo-red impartiva una marcata anisotropia alla birifrangenza "verde mela" delle fibrille amiloidi *in situ*. Pertanto, la birifrangenza dopo colorazione con Congo Red fu il primo criterio adottato per definire l'amiloide.

Nel 1959, Cohen e Calkins, tramite studi di microscopia elettronica, dimostrarono che depositi amiloidi di diversa origine esibivano tutti una comparabile ultrastruttura fibrillare in sezioni fissate di tessuto: fasci di fibrille rigide e lineari, di larghezza compresa tra 60 e

130 Å e lunghezza tra 1000 e 16000 Å. La morfologia fibrillare fu, dunque, il secondo criterio tramite cui veniva definito l'amiloide.

Infine, analisi tramite diffrazione a raggi X di fibrille amiloidi isolate (Bonar *et al.*, 1969; Glenner *et al.*, 1974) rivelarono che esse erano ordinate in una struttura secondaria detta Cross- β . In tale struttura, lo scheletro del polipeptide assume la conformazione β -sheet e, mentre i β -strands si orientano in modo perpendicolare all'asse fibrillare, la faccia del foglietto β (antiparallela) è parallela all'asse fibrillare. Questo è l'ultimo criterio che viene usato per definire l'amiloide.

2. La neurodegenerazione

Il morbo di Alzheimer, come molte altre gravi malattie neurodegenerative, tra cui la Corea di Huntington, il Morbo di Parkinson e l'Encefalopatia Spongiforme, è caratterizzato dalla formazione e dall'accumulo di aggregati proteici nel cervello, che formano depositi fibrillari altamente stabili e insolubili, le fibrille amiloidi (Glenner and Wong, 1984).

Si conoscono oggi almeno venti diverse patologie a cui ci si riferisce usualmente come "malattie da disordine conformazionale proteico" (PCD, Protein Conformational Disease) o "amiloidosi". Queste condizioni patologiche si manifestano quando una proteina nativa subisce un riarrangiamento conformazionale (misfolding) che, spesso, la porta ad assumere una struttura tridimensionale errata. Ciò porta alla formazione di intermedi parzialmente avvolti, che espongono al solvente zone idrofobiche normalmente nascoste all'interno della struttura tridimensionale della proteina; in tal modo, si creano le condizioni per una eventuale aggregazione delle catene polipeptidiche in strutture organizzate (Kelly, 1998).

La presenza di questi aggregati contenenti proteine in uno stato di folding non-nativo induce un danno alla cellula, determinato da una perdita di funzione fisiologica (assenza di

proteina attiva) e/o da un aumento di citotossicità, in quanto gli aggregati sono tossici *per se* (Temussi *et al.*, 2003).

Gli aggregati fibrillari tossici di specifici peptidi, proteine o di loro frammenti, vengono ritrovati nei tessuti o nei compartimenti cellulari; ciò suggerisce fortemente l'esistenza di un legame fra la formazione dell'aggregato e la comparsa della patologia. Tuttavia, sebbene la correlazione esistente fra l'accumulo della proteina misfolded e la patologia sia indiscutibile, i meccanismi che stanno alla base della citotossicità sono ancora poco chiari.

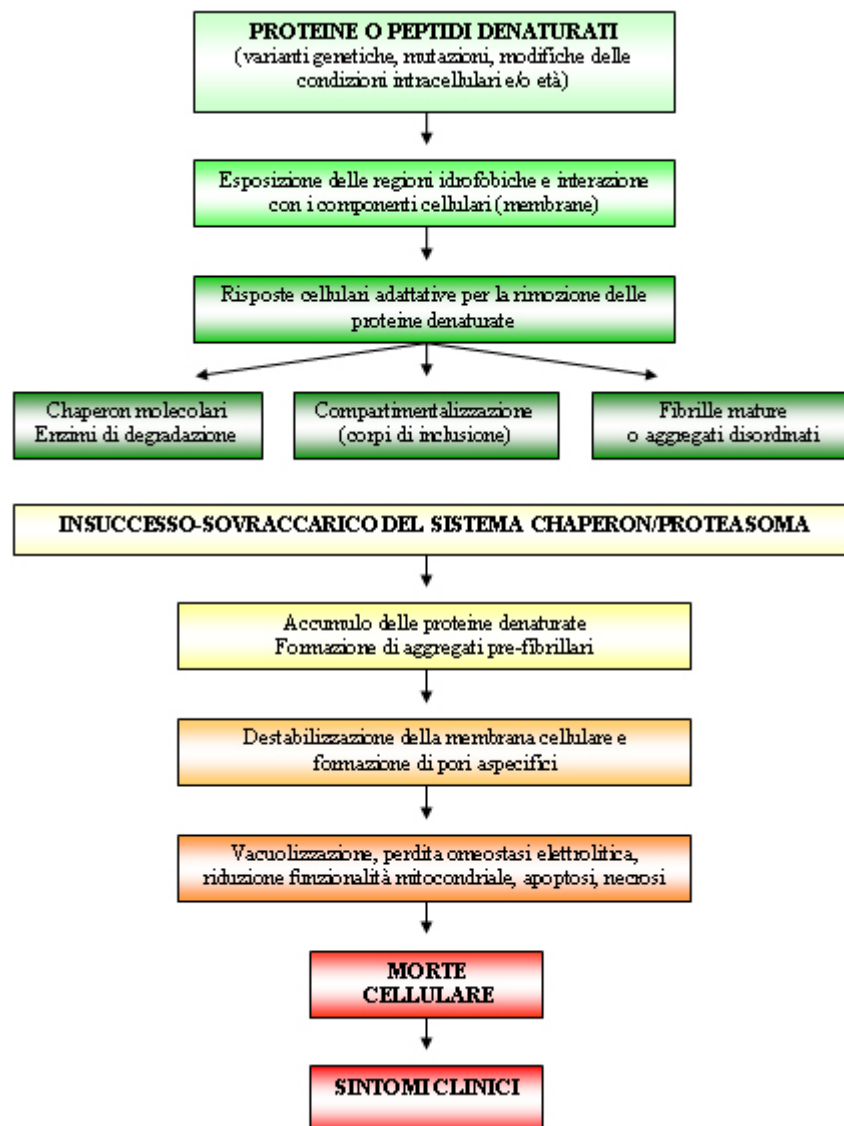


Fig. 1 In determinate condizioni la capacità del macchinario di controllo della qualità delle proteine viene saturata e le proteine non ripiegate si accumulano, determinando disfunzioni di vario genere (Muchowsky *et al.* Wacker, 2005).

Fino a pochi anni fa, l'idea comune era che i principali agenti patologici fossero le fibrille amiloidi. In supporto a questa ipotesi, numerosi studi hanno dimostrato che gli aggregati β A sono tossici *in vitro* (Pike *et al.*, 1993) e la tossicità è stata imputata alla specifica morfologia fibrillare (Seilheimer *et al.*, 1997). La co-localizzazione degli aggregati proteici con i tessuti degenerati e l'associazione della loro presenza coi sintomi della malattia sono un forte indizio del coinvolgimento dei depositi amiloidi nella patogenesi (Soto, 2001).

Recentemente, è emersa una visione alternativa secondo cui non gli aggregati insolubili, ma piuttosto gli intermedi oligomerici solubili sono la principale specie tossica. Studi su cavie hanno mostrato come danni significativi ai tessuti e sintomi clinici appaiano prima che sia individuato alcun aggregato, il che implica la presenza di un intermedio nel pathway amiloidogenico che potrebbe essere la causa reale della patogenicità (Zerovnick, 2002).

A conferma di ciò, placche amiloidi sono state trovate anche in individui che non mostrano i sintomi clinici dell'Alzheimer (Katzmann *et al.*, 1988) e, negli individui affetti, la gravità della patologia non sembra direttamente associabile alla densità delle placche (Terry *et al.*, 1981). Pertanto, è stato ipotizzato che l'aggregazione delle proteine in fibrille possa rappresentare un evento protettivo che "libera" la cellula dalle specie tossiche prefibrillari, quindi le fibrille non sarebbero altro che riserve finali stabili e "innocue" di tali forme tossiche (Roher *et al.*, 2000).

Il peptide, nel corso della fibrillogenesi, assembla in piccoli aggregati prefibrillari metastabili e solubili. Questi oligomeri solubili, definiti anche ligandi diffusibili β A-derivati, o ADDLs (A β -Derivates Diffusible Ligands), includono particelle sferiche di 2.7-4.2 nm di diametro, che si formano precocemente, e strutture curvilinee dette protofibrille, derivanti dall'unione delle particelle sferiche a formare "stringhe" (Hartley *et al.*, 1999).

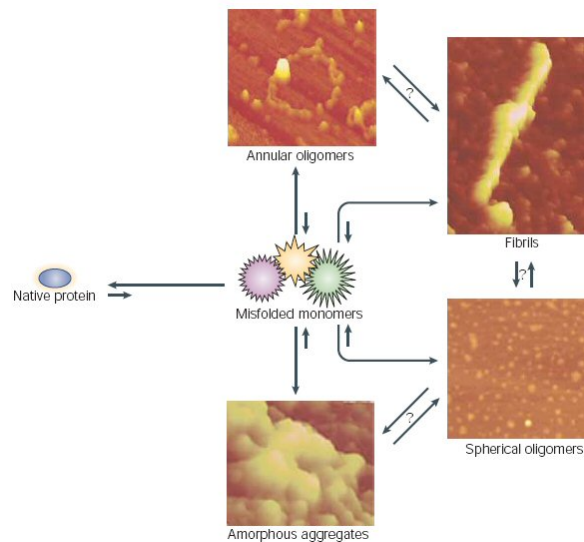


Fig. 2 Modello generale di aggregazione di proteine denaturate. Le diverse strutture degli aggregati sono state osservate al microscopio a forza atomica (Muchowsky *et al.*, 2005).

Poichè β A è un peptide anfipatico, gli oligomeri solubili possono organizzarsi in micelle proteiche la cui formazione mostra una dipendenza critica dalla concentrazione (Kayed *et al.*, 2003). Gli oligomeri solubili sono stati ritrovati anche nel fluido cerebrospinale dei pazienti affetti da Alzheimer (Pitschke *et al.*, 1998) e la loro presenza, piuttosto che quella delle placche, nel cervello umano è meglio correlata alla severità della patologia (Kayed *et al.*, 2003).

Di particolare interesse è il recente studio condotto da Kayed e collaboratori (Kayed *et al.*, 2003) che ha dato risultati piuttosto sorprendenti: un anticorpo (da siero policlonale ottenuto tramite vaccinazione di coniglio) che riconosce in modo specifico gli intermedi oligomerici solubili di β A, è in grado di legare sia le particelle sferiche, che compaiono precocemente durante la fibrillogenesi, sia le protofibrille, presenti in tempi successivi, indicando che entrambe mostrano, almeno in parte, una stessa struttura, riconosciuta dall'anticorpo. Inoltre, lo stesso anticorpo è capace di reagire con gli aggregati oligomerici e protofibrillari di molte altre proteine amiloidogeniche (α -sinucleina, IAPP, poliglutamina, lisozima, insulina umana e peptide del prione 106-126), riconoscendo

quindi un epitopo conformazionale comune che è indipendente dalla sequenza aminoacidica. Infine, saggi su colture cellulari di neuroblastoma umano (SH-SY5Y cells) hanno rivelato che l'incubazione con tale anticorpo degli oligomeri di β A, e di tutte le altre proteine sopra citate, portava ad una inibizione della tossicità, per cui tutte queste proteine amiloidogeniche possiedono una analoga struttura che può mediare la tossicità tramite un meccanismo comune.

Sembra che i piccoli oligomeri solubili possano interferire coi sistemi di trasduzione del segnale, probabilmente legandosi ad una tirosina-chinasi importante nello sviluppo della memoria (potenziamento sinaptico a lungo termine) e nella fosforilazione delle proteine tau (Klein *et al.*, 2001).

Le protofibrille isolate si sono rivelate tossiche poichè causano stress ossidativo alle membrane e, in più, sembrano alterare l'attività elettrica dei neuroni e indurli a morte, attraverso rapidi aumenti in EPSPs (Excitatory Post-Synaptic Potentials), nei potenziali d'azione e nella depolarizzazione delle membrane (Hartley *et al.*, 1999).

Secondo l'"Ipotesi canale", gli aggregati oligomerici tossici formerebbero "pori" aspecifici nelle membrane delle cellule bersaglio, con profondi squilibri nell'omeostasi ionica (soprattutto del calcio), che condurrebbero le cellule a morte (Arispe *et al.*, 1993).

Infine, molti autori concordano sul fatto che le caratteristiche strutturali degli aggregati amiloidi, sia a livello di protofibrille che di fibrille, si riflettano in modificazioni biochimiche precoci nelle cellule che li "ospitano", che si traducono in un indebolimento o in un sovraccarico dei meccanismi di difesa (chaperone molecolari e via dell'ubiquitina-proteasoma) e conseguente morte cellulare per necrosi o apoptosi. Inoltre, specifiche mutazioni inattivanti o condizioni ambientali sfavorevoli (shock da calore o stress ossidativi, per esempio) possono causare il malfunzionamento dei macchinari di controllo

cellulari, con incremento del numero di proteine misfolded o unfolded e loro eventuale aggregazione (Bucciantini et al., 2002).

3. Il Morbo di Alzheimer

Nel 1906, Alois Alzheimer, giovane neurologo tedesco, descrisse in una donna di cinquant'anni una insolita patologia, che le aveva provocato perdita di memoria, disorientamento, allucinazioni e l'aveva infine condotta a morte.

Nel 1907, lo scienziato espose il caso alla Convenzione psichiatrica di Tübingen, sottolineando che l'autopsia del cervello della paziente aveva mostrato una scarsità di neuroni nella corteccia cerebrale e la presenza di due distinti tipi di lesioni cerebrali: depositi extracellulari e fasci intracellulari di grovigli neurofibrillari. Queste lesioni oggi sono considerate le caratteristiche patologiche invariabili del Morbo di Alzheimer (Temussi *et al.*, 2003).

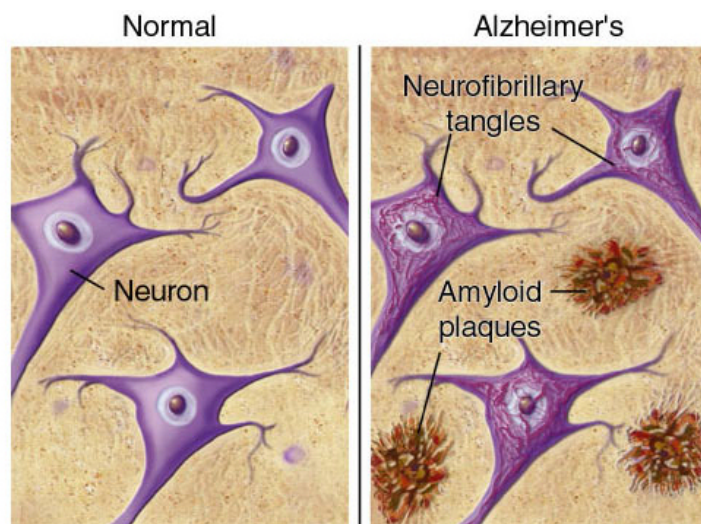


Fig.3 Rappresentazione schematica di un confronto fra neuroni sani e neuroni con le caratteristiche patologiche del morbo di Alzheimer (<http://w3.uokhsc.edu>).

Il Morbo di Alzheimer viene oggi definito come un disordine neurodegenerativo progressivo, caratterizzato da perdita di memoria e cambiamenti nella personalità. Poiché

le cause della perdita di memoria possono essere diverse, nel cervello dei pazienti affetti devono essere presenti in notevoli quantità i “marker” patologici dell’Alzheimer, cioè le placche senili (i depositi extracellulari individuati da Alzheimer) e i grovigli neurofibrillari intracellulari (NFTs, NeuroFibrillary Tangles) (Mattson, 2004).

Le placche senili sono depositi extracellulari, nel parenchima cerebrale, di fibrille e aggregati amorfi del peptide β -amiloide, presente prevalentemente nelle forme β A(1-40) e β A (1-42), costitutivamente prodotte dal taglio proteolitico della proteina precursore dell’amiloide, (APP, Amyloid Precursor Protein) (Wogulis *et al.*, 2004).

NFTs sono aggregati fibrillari intracellulari di microtubuli iperfosforilati e con modificazioni ossidative, associati a proteine tau, che si assemblano in filamenti ad elica accoppiati gli uni con gli altri (Kirkitadze and Kowalska, 2004).

La fibrillogenesi di β A è associata ad una cascata di eventi neuropatogenici che determinano una degenerazione cerebrale tale da condurre, alla fine, al caratteristico declino cognitivo e comportamentale del Morbo di Alzheimer.

La cosiddetta "Ipotesi amiloide" (Hardy and Higgins, 1992) postulava che le fibrille β A insolubili svolgessero un ruolo centrale nella patogenesi della malattia e che i tangles fossero solo un evento secondario nella sequenza temporale della progressione della malattia, essendo una conseguenza della formazione delle placche amiloidi (Hardy and Selkoe, 2002). Se le lesioni cerebrali sono costituite solo da “fasci” di proteine tau auto-assemblate, senza accumulo di β A sotto forma di placche, le patologie sono distinte da AD (Alzheimer Disease) e sono definite tauopatie (Temussi *et al.*, 2003).

Le placche e i grovigli sono principalmente presenti in quelle regioni del cervello coinvolte nei processi di apprendimento e memoria e nei comportamenti emozionali, inclusi i lobi temporale e frontale, la cortex entorinale, il prosencefalo, l’ippocampo e l’amigdala, che risultano ridotti in dimensione nei pazienti affetti, come conseguenza della degenerazione

sinaptica e della morte dei neuroni. Le regioni dove sono presenti le placche esibiscono, di solito, un ridotto numero di sinapsi e i neuriti associati alle placche sono spesso danneggiati; in particolare, i neuroni che usano glutammato o acetilcolina come neurotrasmettitori appaiono particolarmente colpiti, sebbene danni notevoli si riscontrino anche in neuroni che utilizzano serotonina e norepinefrina (Mattson, 2004).

L'accettazione unanime dell'ipotesi amiloide e la presenza costante di fibrille βA sotto forma di placche amiloidi, diffuse nel parenchima cerebrale, ha portato inizialmente a sottovalutare, una fonte potenzialmente importante di danno neuronale, cioè le forme non fibrillari o prefibrillari del peptide βA (Hartley *et al.*, 1999); queste, come accennato precedentemente, sembrano essere fortemente implicate nella patogenesi, ad esempio tramite formazione di "pori-canale" nella membrana (Stefani and Dobson, 2003) o alterazione dell'attività elettrica neuronale (Hartley *et al.*, 2003) e della trasmissione sinaptica (Ting *et al.*, 2007).

Il Morbo di Alzheimer è oggi, a cento anni dalla sua scoperta, la forma prevalente di demenza senile nel mondo, in quanto colpisce circa il 2% della popolazione nei paesi industrializzati e si prevede che triplicherà nei prossimi cinquant'anni (Mattson, 2004). Aspettative di vita più lunghe e invecchiamento della popolazione lo rendono un serio problema di salute pubblica per il futuro. Negli ultimi trenta anni molti farmaci sono stati approvati per ritardare la progressione della malattia ma, ad oggi, non esistono ancora trattamenti preventivi o curativi.

3.1. Il processamento di APP e la genesi dei peptidi βA

La proteina precursore dell'amiloide, o APP, è una glicoproteina integrale di membrana di tipo I, avente un largo dominio glicosilato N-terminale sul versante extracellulare e un dominio C-terminale più piccolo intracellulare. E' codificata dal gene APP, sul braccio

lungo del cromosoma 21, e abbondantemente espressa in una ampia varietà di tessuti (Kirkitadze and Kowalska, 2005); esistono diverse isoforme di APP ma la forma predominante nel cervello umano è APP695, prodotta principalmente dai neuroni (Mattson, 2004).

Il ruolo di questa proteina non è ancora del tutto chiaro ma sembra importante nel regolare la sopravvivenza dei neuroni, lo sviluppo dei neuriti, la plasticità sinaptica e l'adesione cellulare. Poichè, dopo la sintesi, una cospicua frazione delle molecole di APP viene trasportata lungo l'assone fino al terminale presinaptico, una sua possibile funzione è quella di recettore di superficie, che dà inizio alla via di trasduzione del segnale intracellulare a seguito del legame con un ligando extracellulare (Mattson, 2004). Inoltre, l'espressione di APP è up-regolata durante la maturazione e il differenziamento dei neuroni (Zheng and Koo, 2006).

APP è soggetta, in condizioni fisiologiche, a due pathway di processamento, uno non-amiloidogenico (via dell' α -secretasi) e uno amiloidogenico (via della β -secretasi), che porta alla produzione dei peptidi β A.

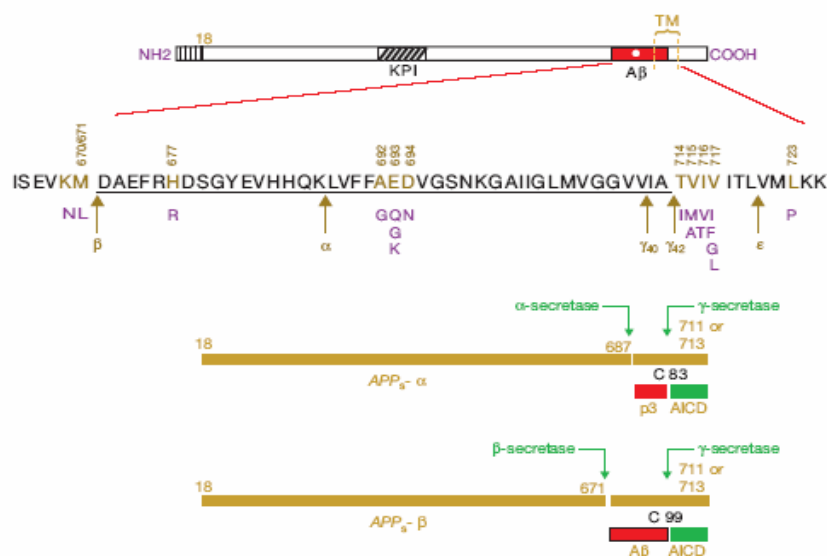


Fig. 4 Nella figura è mostrata la sequenza amminoacidica dei peptidi amiloidi; il sito β 40 indica il punto di taglio enzimatico che origina i peptidi amiloidi 1-40, dal taglio sul sito β 42 si sviluppano invece i peptidi 1-42.

Nella prima via, il taglio dell' α -secretasi sul versante extracellulare genera il frammento solubile sAPP α , che viene secreto e il frammento C83, che rimane ancorato alla membrana ed è soggetto alla successiva azione della γ -secretasi, con formazione del frammento p3, rilasciato dalla membrana. Questa via è non-amiloidogena poiché l' α -secretasi taglia all'interno della sequenza del peptide β A.

Nella via amiloidogena, invece, il taglio proteolitico da parte della β -secretasi (una aspartil-proteasi, detta BACE, β site-APP Cleaving Enzyme) sul versante extracellulare avviene a livello dell'estremo N-terminale della sequenza β A, con formazione del frammento sAPP β , secreto, e di C99, che rimane nella membrana. Quest'ultimo viene poi attaccato dalla γ -secretasi (complesso di varie proteine, tra cui neprilisina, nicastrina, Aph-1 e Pen-2) che taglia in posizioni diverse a livello dell'estremo C-terminale della sequenza β A. Il risultato è la formazione di frammenti β -amiloidi di lunghezza tra 39 e 43 aminoacidi, di cui i più abbondanti sono β A40 e β A42, che vengono secreti, e un "dominio intracellulare di APP" (AICD, APP Intracellular Domain), il quale avrebbe un ruolo nella regolazione dei segnali mediati dal calcio e, una volta traslocato nel nucleo, funziona come fattore di trascrizione (Mattson, 2004; Zheng and Koo, 2006; Kirkitadze and Kowalska, 2005; Ma *et al*, 2007).

In individui sani e giovani, i peptidi β A vengono del tutto catabolizzati poco dopo esser stati secreti dalle cellule, prima che possano accumularsi mentre, con l'avanzare dell'età, l'intensificata produzione e la loro ridotta clearance possono determinarne la deposizione e la successiva aggregazione, con degenerazione neuronale (Kirkitadze and Kowalska, 2005).

La maggior parte dei casi di Alzheimer sono sporadici, non ereditari; tuttavia, sembrano esserci molti geni che determinano una certa suscettibilità alla malattia. Il primo tra questi è il gene per l'apolipoproteina E, per la quale ci sono tre alleli che codificano le isoforme

E2, E3 ed E4; gli individui che producono E4 sono ad alto rischio di malattia, poichè questa isoforma sembra, da un lato, intensificare la via amiloidogena del processamento di APP e, dall'altro, favorire l'aggregazione dei peptidi β A e ridurre la clearance (Roses, 1997). Ciò promuove patologie cerebrovascolari, aumento di stress ossidativo e perdita di plasticità sinaptica.

I casi di Alzheimer familiare (ereditario) rappresentano il 5-10% dei casi totali e sono principalmente dovuti al cambiamento di uno o due aminoacidi, all'interno della sequenza β A o adiacenti ad essa, che favoriscono la via amiloidogena di taglio proteolitico, e/o a mutazioni nei geni della PreSenilina 1 (PS1) e PreSenilina 2 (PS2), che alterano l'attività della γ -secretasi (Hardy, 1997).

3.2. I peptidi β -amiloidi

Come accennato sopra, dal doppio taglio proteolitico catalizzato da β - e γ -secretasi, si generano peptidi β A di lunghezza variabile ma i principali costituenti delle placche amiloidi sono i peptidi β A (1-40) e β A (1-42) (Kim and Hecht, 2005).

Ad eccezione dei due aminoacidi C-terminali, Ile⁴¹ e Ala⁴², la sequenza dei due peptidi è identica. Nonostante l'alto grado di omologia, β A40 e β A42 mostrano un comportamento profondamente diverso sia *in vivo* che *in vitro*. La concentrazione di β A42 secreto è circa il 10% di quella di β A40, eppure β A42 è la componente principale delle placche e la sua neurotossicità si rivela essere molto maggiore (Bitan *et al.*, 2002).

Inoltre, il processo di aggregazione di β A42 è significativamente più rapido *in vitro* rispetto a quello di β A40 e i due peptidi seguono vie di fibrillogenesi molto diverse. Il comportamento dei due peptidi sembra divergere nello stadio precoce dell'assemblaggio, probabilmente a causa della presenza dei due aminoacidi "aggiuntivi"; infatti, β A40 è presente, *in vivo*, sotto forma di monomeri, dimeri, trimeri e tetrameri in equilibrio tra loro,

mentre $\beta A42$ è inizialmente presente sotto forma di monomeri non strutturati che tendono precocemente ad oligomerizzare in pentameri ed esameri, anch'essi prevalentemente non strutturati, detti paranuclei. Sembra che il residuo critico per la loro formazione sia Ile⁴¹, la cui catena laterale promuoverebbe anche l'autoassemblaggio dei paranuclei in oligomeri più grandi (Bitan *et al.*, 2003; Kirkitadze and Kowalska., 2005).

Malgrado la neurotossicità conseguente al loro accumulo, i peptidi βA , in condizioni fisiologiche, sembrano avere un potenziale ruolo legato al mantenimento della plasticità sinaptica e alla sopravvivenza neuronale. In particolare, dosi picomolari di βA possono stimolare la fosforilazione della tirosina nei neuroni e portare all'attivazione di specifiche chinasi (Luo *et al.*, 1995). Recentemente, è stato osservato che βA non altera il metabolismo del calcio in condizioni basali ma esso determina un rapido aumento della concentrazione di calcio intracellulare se le cellule neuronali sono trattate con inibitori della tirosina fosfatasi (Luo *et al.*, 1995).

Poichè la proteina APP viene trasportata lungo l'assone fino al terminale presinaptico, e qui processata, le sinapsi sono i siti dove l'oligomero βA può accumularsi in alte quantità; essendo βA secreto nello spazio presinaptico, gli effetti derivanti da un suo possibile accumulo si esplicano sull'integrità e sulla funzionalità di entrambi i terminali pre- e post-sinaptici, che rappresentano, quindi, i siti da cui ha inizio l'eventuale morte del neurone, sia per necrosi che per apoptosi (Chan *et al.*, 2002).

Se non è efficiente il macchinario cellulare deputato allo smaltimento di βA , si ha inibizione del potenziamento a lungo termine (una forma di plasticità sinaptica correlata alla memoria) e perdita di memoria anche in assenza di depositi amiloidi o evidente degenerazione neuronale (Mattson, 2004; Oddo *et al.*, 2003; Mucke *et al.*, 2000).

I meccanismi di degenerazione neuronale promossi dal peptide βA sembrano essere correlabili principalmente a stress ossidativo di proteine, DNA e lipidi di membrana. La

perossidazione lipidica indotta da β A riduce la funzionalità di molte ATPasi ioniche, dei trasportatori di glutammato e glucosio e di proteine GTP-binding (Smith *et al.*, 1997; Mattson, 1997).

Come conseguenza, si ha una perturbazione dell'omeostasi ionica e dei principali soluti cellulari; in particolare, sembra che β A alteri significativamente l'omeostasi del calcio tramite stress ossidativi che disabilitano le pompe per il calcio sulla membrana e favoriscono il flusso di questo ione attraverso canali voltaggio dipendenti o recettori ionotropici per il glutammato; studi più recenti suggeriscono anche che questo peptide promuova in modo diretto il flusso del calcio, formando esso stesso dei canali aspecifici nella membrana o attivando recettori di superficie accoppiati al passaggio del calcio (Mattson and Chan, 2003; Le *et al.*, 2001).

Una aumentata concentrazione di calcio intracellulare può indurre iperattivazione di proteasi o chinasi calcio-dipendenti e, quest'ultime, possono causare iperfosforilazione, e quindi aggregazione, delle proteine tau (Saito *et al.*, 1993; Selkoe, 2001). A conferma di questa ipotesi, è stato osservato che i neuroni contenenti *tangles* neurofibrillari mostrano un alta quantità di Ca^{2+} al loro interno.

L'incapacità dei neuroni di regolare l'omeostasi dello ione calcio, il cui ruolo è fondamentale per i processi di apprendimento e memoria, è un aspetto della patogenesi dell' Alzheimer che appare essere intimamente correlato alla disfunzione sinaptica e alla morte neuronale (Gabuzda *et al.*, 1994).

3.3. Le fibrille amiloidi.

L'accumulo di proteine sotto forma di fibrille amiloidi è comune ad un gran numero di disordini neurodegenerativi. Sebbene le proteine coinvolte in queste patologie non siano in relazione tra loro né per struttura né per funzione, gli aggregati amiloidi insolubili

possiedono caratteristiche sorprendentemente simili. Infatti, tutti mostrano morfologia fibrillare, struttura secondaria predominante β -sheet, insolubilità nei comuni solventi e detergenti, alta resistenza alle proteasi, birifrangenza verde dopo colorazione con Congo red e capacità di legarsi alla Tioflavina T (Murphy, 2002).

Le fibrille amiloidi sono strutture semi-flessibili, tipicamente lineari e larghe circa 6-12 nm; sono formate da un numero variabile, da 3 a 6 di solito, di estesi filamenti (protofilamenti) di circa 1-2 nm di diametro, arrotolati a formare una struttura “a fune” (Stefani, 2004; Serpell *et al.*, 2000).

La crescita di ciascun protofilamento procede in modo bidirezionale, per apposizione di nuove unità oligomeriche mentre l’associazione laterale di più protofilamenti origina le larghe fibrille amiloidi (Murphy, 2002).

Come accennato prima, l’ordinato “core” delle fibrille amiloidi è rappresentato da una struttura cross- β , dove ciascun protofilamento è costituito da una doppia fila di β -sheet; questa è la struttura secondaria in cui si organizza ciascun monomero, i cui β -strands corrono paralleli l’uno all’altro e perpendicolari all’asse principale della fibrilla (Stefani, 2004)

La struttura cross- β del “core” è la caratteristica strutturale invariante delle fibrille amiloidi ed è stato ipotizzato essere un minimo energetico per tutte le proteine aggregate (Makin *et al.*, 2004) oltre che il probabile responsabile delle loro proprietà ottiche (Stefani, 2004).

Studi piuttosto recenti di diffrazione hanno permesso di chiarire ulteriormente l’architettura del core amiloide. I β -strands sono uniti da ponti H in un riarrangiamento antiparallelo in direzione della fibrilla, formando lunghi “nastri” β -sheet, i quali, a loro volta, sono paralleli e in registro e sono arrangiati in modo sfalzato in direzione della catena principale. I β -sheet sono tenuti insieme dalle interazioni, soprattutto elettrostatiche, tra le catene laterali degli aminoacidi. L’N-terminale di un β -strand si associa col C-terminale di un altro β -

strand, permettendo alle catene laterali aromatiche di interagire in modo stretto (Makin *et al.*, 2004).

Una caratteristica stringente della similarità tra i peptidi amiloidi è l'alta ricorrenza di residui aromatici, che stabilizzano l'impaccamento degli strati tramite interazioni di stacking π - π . In particolare, il residuo Phe-19 della proteina β -amiloide sembra particolarmente importante nella formazione delle fibrille. Se Phe-19 viene rimpiazzata con un altro aminoacido, ad esempio Ala, viene persa del tutto la capacità di formare fibrille (Gazit, 2005).

Le tecniche più comuni per l'identificazione delle fibrille si basano sull'utilizzo di due coloranti: il Congo Red e la Tioflavina T. Anche se entrambi sono noti come coloranti istologici, si sono rivelati utili anche per studi *in vitro* di depositi amiloidi isolati e fibrille in soluzione. In presenza di fibrille, entrambi subiscono modifiche specifiche delle loro caratteristiche spettroscopiche (LeVine, 1999).

Le fibrille amiloidi colorate con Congo Red esibiscono una intensa birifrangenza verde mela in luce polarizzata; il meccanismo di interazione tra le due molecole rimane però ancora poco chiaro. Sebbene sia stata la prima tecnica utilizzata per rivelare la presenza di fibrille, il suo utilizzo esclusivo può risultare in falsi negativi; infatti, è stato recentemente osservato che il Congo Red può legare non solo le fibrille insolubili ma anche gli oligomeri solubili e che il "core" amiloide non mostra birifrangenza dopo la colorazione (Nillson, 2004).

La Tioflavina T (Th T) è un colorante benzotiazolico che mostra una intensa fluorescenza quando legato alle fibrille amiloidi e costituisce la tecnica più comunemente utilizzata per diagnosticare la presenza di fibrille sia *ex vivo* che *in vitro* (Khurana *et al.*, 2005).

La struttura della Th T, mostrata sotto, ha un terminale idrofobico con un gruppo dimetilamminico attaccato ad un gruppo fenolico, a sua volta legato ad un gruppo benzotiazolico, più polare perchè contiene N e S.

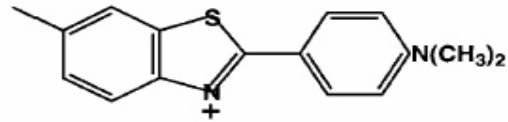


Fig. 5 Struttura molecolare della sonda fluorescente Tioflavina T (LeVine, 1997).

Questa combinazione di regioni polari e idrofobiche dà la possibilità alle molecole di Th T di formare micelle in soluzione acquosa, con l'interno idrofobico e l'N carico positivamente che si affaccia al solvente. Ciò può indicare che l'azoto tiazolico del pigmento e un gruppo idrossilico nei campioni formino legami H che danno origine allo specifico legame tra la Th T e le fibrille amiloidi (Kelényi, 1967; Khurana *et al.*, 2005).

In soluzione acquosa Th T, se eccitata a $\lambda=342$ nm, ha un picco di fluorescenza a 430 nm; eccitando a lunghezze d'onda maggiori, $\lambda=442$ nm o $\lambda=450$ nm, il pigmento ha una emissione di fluorescenza molto bassa ma, in presenza di fibrille, lo spettro di emissione si sposta verso il rosso e ha un picco intenso a 482 nm (LeVine, 1999).

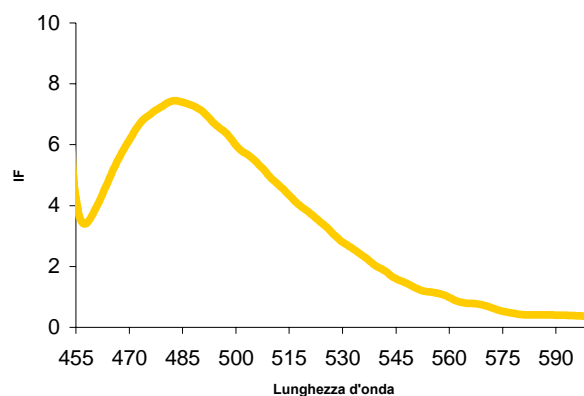


Fig. 6 Spettro di fluorescenza della tioflavina T in presenza di fibrille amiloidi ($\lambda_{exc} = 442$ nm).

Una possibile causa del basso rendimento quantico di fluorescenza di Th T in soluzione acquosa sembra essere la rottura dei legami coniugati, a causa del riorientamento reciproco degli anelli benzotiazolico e benzoaminico. Infatti, se la molecola non è eccitata, la sua configurazione è piuttosto planare ma, in seguito a eccitazione, si ha un trasferimento di cariche tra gli anelli aromatici, che porta ad uno stato di non-equilibrio, in cui le cariche sono separate. Tale stato può essere stabilizzato se il sistema di legami π -coniugati viene rotto e uno degli anelli ruota di 90° rispetto all'altro; in questa situazione, le cariche non possono tornare alla loro originaria distribuzione e ciò spiega come l'emissione di fluorescenza abbia una così bassa efficienza. A seguito del legame con le fibrille amiloidi, dovuto principalmente ad interazioni di carica, si verifica una restrizione sterica della rotazione dei due anelli della Th T, dovuta alla rigidità del microambiente, e questa sembra essere la causa dell'alto rendimento quantico di fluorescenza (Voropai *et al.*, 2003). Un'altra possibile causa sta nel fatto che le cariche positive delle micelle di Th T, esposte al solvente, possono formare legami H specifici con le fibrille amiloidi, inducendo cambiamenti nello spettro di eccitazione che si riflettono in un incremento nell'emissione di fluorescenza (Khurana *et al.*, 2005).

3.4. Il misfolding

Come già detto in precedenza, molte patologie, non solo di tipo neurodegenerativo, sono caratterizzate dall'accumulo di proteine sotto forma di aggregati amiloidi. Numerosi studi hanno chiarito che alla base di questa aggregazione c'è un "misfolding", più o meno parziale, delle proteine coinvolte nella patogenesi ma le basi molecolari di questo processo rimangono poco chiare (Lyubchenko *et al.*, 2006).

C'è un numero crescente di evidenze a supporto dell'idea che l'abilità di formare fibrille sia una proprietà intrinseca della maggior parte delle catene polipeptidiche, pur non

possedendo alcuna omologia di sequenza, cioè molte proteine, o forse tutte, sarebbero potenzialmente capaci di formare fibrille amiloidi in appropriate condizioni destabilizzanti (Dobson, 2004).

Come discusso in un paragrafo precedente, saggi immunologici con anticorpi specifici indicano che, all'interno di una stessa proteina, ci sono epitopi conformazionali diversi, legati ad una specifica forma di aggregazione mentre proteine diverse, nella loro forma fibrillare, possiedono un epitopo strutturale comune e ciò può spiegare, almeno in parte, le caratteristiche condivise da tutte le fibrille amiloidi.

Dagli studi su diverse proteine amiloidogeniche si è giunti ad una generale ipotesi sulla fibrillogenesi: la transizione strutturale di una catena polipeptidica verso una forma parzialmente ripiegata rappresenta un prerequisito importante nella fibrillogenesi (Uversky and Fink, 2004).

Sono state individuate parecchie condizioni che possono determinare un misfolding patologico delle proteine (Lyubchenko *et al.*, 2006):

- La proteina può avere una propensione intrinseca ad assumere una conformazione patologica, che può divenire evidente con l'età;
- Una sostituzione aminoacidica, come nel caso delle amiloidosi ereditarie, può aumentare la tendenza di una proteina al misfolding;
- Modificazioni post-traduzionali alterate (fosforilazione, glicosilazione, racemizzazione, ecc.) possono modificare la conformazione della proteina, facilitandone il misfolding e l'eventuale aggregazione;
- La digestione proteolitica di una proteina precursore può produrre un frammento amiloidogenico;
- Una interazione errata con alcuni fattori endogeni (chaperones, matrice intra- o extracellulare, altre proteine, ecc.) può cambiare la conformazione di una

proteina patogena e aumentare la sua tendenza al misfolding e all'aggregazione;

- Il malfunzionamento dei sistemi di difesa anti-ossidanti può determinare un aumento nella quantità di radicali liberi, con eventuali modificazioni ossidative della proteina patogena o dei suoi target;
- La compromessa funzionalità del sistema ubiquitina-proteasoma o di altri sistemi di proteolisi può risultare in un drammatico incremento della concentrazione locale della proteina patogena.

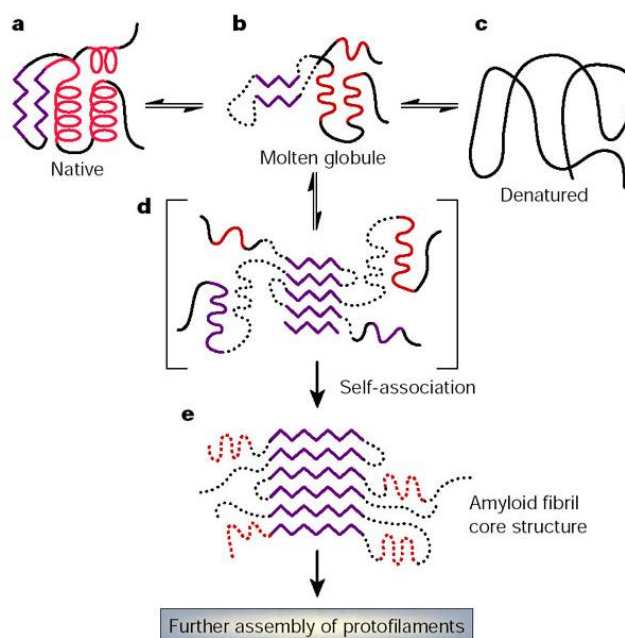


Fig. 7 Una tappa fondamentale del processo di aggregazione è rappresentata dalla destabilizzazione della rigida struttura nativa della proteina, con conseguente raggiungimento di una conformazione parzialmente denaturata (intermedio amiloidogenico).

Per spiegare la base molecolare dell'aggregazione delle proteine, è stato proposto che la fibrillogenesi abbia luogo quando la rigida struttura nativa di una proteina sia in qualche modo destabilizzata, e quindi soggetta a parziale misfolding, poichè perde la sua struttura tridimensionale strettamente "impaccata". In queste condizioni "non native", la struttura della proteina diviene lassa e le sue regioni idrofobiche si ritrovano esposte al solvente; ciò

favorisce la tendenza alla “nucleazione”, ossia alla formazione di assemblati oligomerici iniziali dove è generalmente aumentato il contenuto di β -sheet. Questi “nuclei di aggregazione” forniscono una sorta di "template", in grado di reclutare altre molecole parzialmente ripiegate, aumentando così le dimensioni dei filamenti in crescita e dando origine, eventualmente, ad aggregati fibrillari (Stefani, 2004).

In altri termini, se le fibrille amiloidi hanno tutte in comune una stessa struttura, devono verificarsi dei notevoli riarrangiamenti conformazionali nelle proteine prima che abbia luogo l'aggregazione. Tali cambiamenti, però, non possono verificarsi entro la struttura nativa della proteina, a causa degli ingombri sterici della struttura terziaria. Pertanto, è necessaria la formazione di una struttura meno rigida che renda possibili specifiche interazioni intermolecolari, quali attrazioni elettrostatiche, legami H e interazioni idrofobiche, necessari per l'oligomerizzazione e la fibrillogenesì. I peptidi β -amiloidi possiedono una conformazione nativa non strutturata in condizioni fisiologiche, cioè i monomeri non presentano né strutture ad elica né β -sheet, ma sono prevalentemente random coil. Pertanto, i primi stadi della fibrillogenesì sono rappresentati da un parziale refolding (Uversky and Fink, 2004).

Le evidenze sperimentali mostrano che l'aggregazione proteica è un comportamento comune delle catene polipeptidiche, possibilmente correlato alla struttura dei loro scheletri peptidici. A questo riguardo, le fibrille amiloidi potrebbero esser viste come il prodotto di una ancestrale generica tendenza delle catene ad andare incontro ad interazioni intermolecolari, basate sulla struttura β , promosse dal loro scheletro peptidico. L'evoluzione avrebbe dunque selezionato specifiche sequenze aminoacidiche, che in condizioni fisiologiche subiscono dei ripiegamenti capaci non solo di svolgere con efficienza le funzioni biologiche ma anche di segregare al loro interno la catena principale, in modo che non interagisca con altre catene polipeptidiche e, quindi, non si verifichi

aggregazione. L'aggregazione proteica è oggi considerata un pathway alternativo al folding dove sono favorite interazioni intermolecolari piuttosto che intramolecolari (Stefani, 2004).

3.5. La cinetica di aggregazione

La fibrillogenesi di β A è un processo di polimerizzazione il cui andamento nel tempo è rappresentato da una curva sigmoide, caratteristica di tutte le cinetiche di aggregazione nucleazione-dipendenti (Jarrett and Lansbury, 1993).

La cinetica di questo tipo di processi è caratterizzata da due parametri chiave: la velocità di nucleazione e la velocità di allungamento degli aggregati fibrillari (Lomakin *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 1997). L'auto-assemblaggio iniziale è lento e procede fino a quando gli aggregati non raggiungono una dimensione critica; una volta che il "nucleo" si è formato, la crescita degli aggregati per apposizione di nuovi monomeri procede rapidamente (Murphy, 2002).

Nella fase iniziale (lag phase o fase di nucleazione) non si osserva aggregazione ma ha inizio il processo, entropicamente sfavorito, di associazione dei monomeri liberi, che procede fino alla formazione dei "nuclei" (Nillson, 2004), cioè di oligomeri di dimensioni variabili che favoriscono il processo di aggregazione. Questi "nuclei" (seeds) forniscono una sorta di "template" in grado di reclutare ulteriori monomeri, aumentando così le dimensioni degli aggregati in crescita (Stefani, 2004). Da questo punto in poi, la cinetica procede in modo rapido (log phase o fase di polimerizzazione), fino alla formazione di aggregati metastabili con morfologia fibrillare (protofibrille). L'ultima fase della cinetica di aggregazione (plateau) è caratterizzata dalla formazione delle fibrille mature, molto stabili.

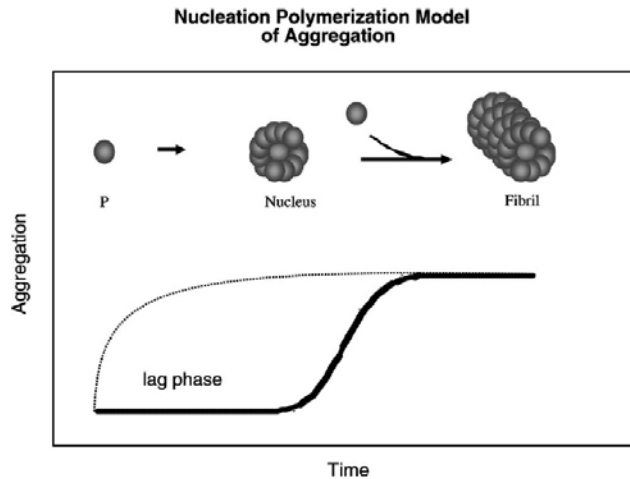


Fig. 8 La cinetica di aggregazione del processo fibrillogenico ha un andamento sigmoidale tipico delle polimerizzazioni nucleazione-dipendenti caratterizzate da una fase di latenza, una fase di polimerizzazione e una saturazione. La presenza di impurità o aggregati pre-esistenti può modificare l'andamento della curva, dando luogo a cinetiche non riproducibili dal punto di vista sperimentale, in cui la fase di latenza potrebbe essere notevolmente ridotta od addirittura assente (linea tratteggiata) (Nillson, 2004).

La fase lag non indica tanto il tempo necessario per la nucleazione, quanto il tempo richiesto per la crescita di aggregati sufficientemente grandi (Murphy, 2002). Riguardo alla polimerizzazione di βA , questa fase rappresenta il punto critico dell'intero processo, poichè una eventuale presenza di pre-aggregati può determinarne una drastica riduzione nella durata, o addirittura la scomparsa.

Saggi immunologici e radiochimici hanno confermato l'idea che la polimerizzazione sia un processo in cui βA oligomerizza, attraverso una serie di intermedi a breve vita, a formare protofibrille, che agiscono da fulcri per la crescita delle fibrille mature. Infatti, sono stati osservati oligomeri di dimensioni intermedie tra i monomeri e le protofibrille ma nessuno di loro si accumula in quantità significative. Inizialmente, i monomeri si associano a formare dimeri che si accumulano durante la fibrillogenesi; poi, il decremento tempo-dipendente della quantità di dimeri risulta parallelo ad un incremento nella quantità di protofibrille (Walsh *et al.*, 1997).

Le protofibrille sono intermedi relativamente stabili, che hanno origine dai nuclei e sono le prime particelle di morfologia fibrillare che è possibile individuare (Goldsbury *et al.*, 2000). Esse appaiono di lunghezza circa 200 nm e diametro 4-10 nm, flessibili e

leggermente curve e sono visibili solo transientemente durante la fibrillogenesi di βA , confermando l'ipotesi che possano essere i reali precursori delle fibrille mature, piú lunghe e piú rigide (Walsh *et al.*, 1999).

Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare la transizione da protofibrille a fibrille. Il piú semplice prevede l'associazione delle protofibrille "end-to-end" ma questo è piuttosto improbabile poiché, essendo un processo sostanzialmente di diffusione controllata, è assai difficile che le estremità protofibrillari si incontrino e si allineino correttamente. Le protofibrille potrebbero, invece, associarsi lateralmente a formare "auto-template", ai quali i precursori (monomeri e dimeri) possono legarsi e polimerizzare, oppure l'associazione laterale potrebbe accelerare l'associazione "end-to-end" (Walsh *et al.*, 1997).

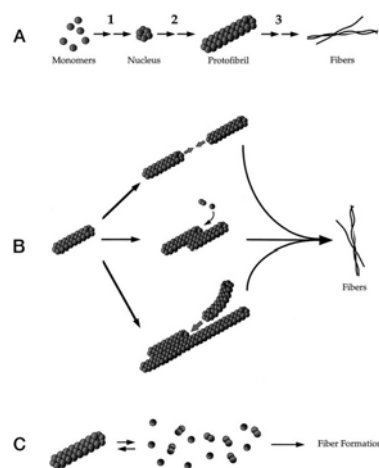


Fig. 9 A) La fibrillogenesi del βA è un processo di polimerizzazione nucleazione-dipendente in cui i monomeri, inizialmente, si aggregano a formare dei nuclei (*step 1*). Dai nuclei si originano poi le protofibrille (*step 2*), la cui estensione dà luogo infine alle fibre mature (*step 3*). B) Le protofibrille danno origine alle fibre mature. Ciò può avvenire attraverso meccanismi diversi. Le protofibrille per esempio potrebbero allinearsi l'una con l'altra ed associarsi attraverso le estremità. Una seconda possibilità è che le protofibrille possano associarsi lateralmente formando degli "stampi" sui quali i monomeri/dimeri potrebbero accumularsi. In alternativa, l'associazione laterale delle protofibrille potrebbe facilitarne l'allineamento e quindi le interazioni fra le estremità C) E' possibile infine che le protofibrille siano incapaci di dar luogo alle fibrille, ma rappresentino una riserva di precursori delle fibrille (Walsh *et al.*, 1997).

Le fibrille mature, analizzate al microscopio elettronico, appaiono piú rigide rispetto alle protofibrille ma di morfologia piuttosto eterogenea. Si presentano lunghe, lineari, costituite da cinque o sei "protofilamenti" (Serpell, 1999) avvolti a formare eliche β e presentano

ripetizioni ogni 115 Å o 250 Å, che riflettono l' avvolgimento dei protofilamenti. Le fibrille più lunghe, nelle quali probabilmente l'avvolgimento e l'allineamento hanno raggiunto il massimo grado, compaiono sotto due forme differenti: le fibrille di "tipo I" più sottili, e le fibrille di "tipo II" di dimensioni maggiori e più tardive nella comparsa (Zerovnik, 2002).

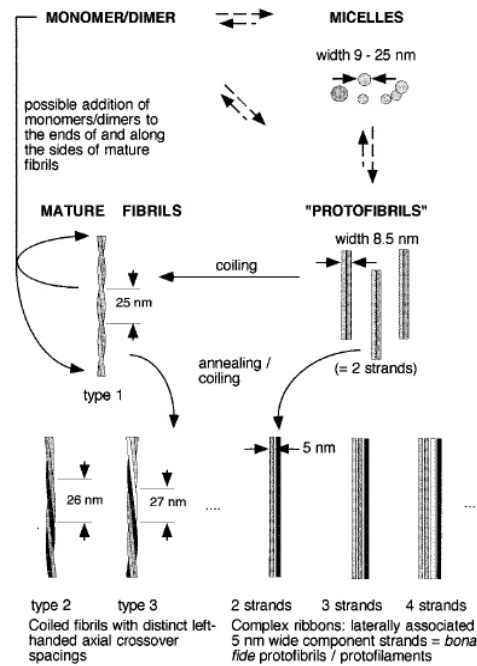


Fig. 10 Interpretazione schematica dello sviluppo morfologico e dei polimorfismi strutturali delle fibrille di β A (Goldsbury *et al.*, 2000).

Misure di dicroismo circolare indicano che le protofibrille hanno un contenuto di strutture β (β -sheet e β -turn, >50%), random coil (40%), e α -elica (10%) praticamente equivalente a quello delle fibrille mature (Walsh *et al.*, 1999). Il modesto contenuto in α -elica nelle protofibrille rende interessante il fatto che, durante la fibrillogenesi dei peptidi a basso peso molecolare (LMW-A β , Low molecular weight-A β), si verifichi un cambiamento conformazionale da una struttura iniziale prevalentemente random coil ad una finale ricca in β -sheet, passando per intermedi transitori ad α -elica (Walsh *et al.*, 1999).

4. Gli inibitori.

Negli ultimi anni numerosi studi sono stati indirizzati alla ricerca di molecole naturali o di nuova sintesi, capaci di inibire l'aggregazione di βA e, quindi, di ridurre gli effetti citotossici. Tali ricerche potrebbero rappresentare un punto di partenza per la progettazione di terapie farmacologiche di prevenzione o cura, oltre a fornire un contributo per la comprensione dei dettagli molecolari che regolano la fibrillogenesi.

Un inibitore può interferire nel processo di aggregazione di βA in tre modi differenti. La molecola inibitrice può agire precocemente, durante la fase di nucleazione, determinando un aumento nella durata della fase di latenza. Altrimenti, l'effetto può interessare la fase di polimerizzazione, con diminuzione della velocità di allungamento delle fibrille o, infine, può provocare una riduzione del livello di saturazione, che riflette una riduzione nella formazione di fibrille mature (Findeis *et al.*, 1999).

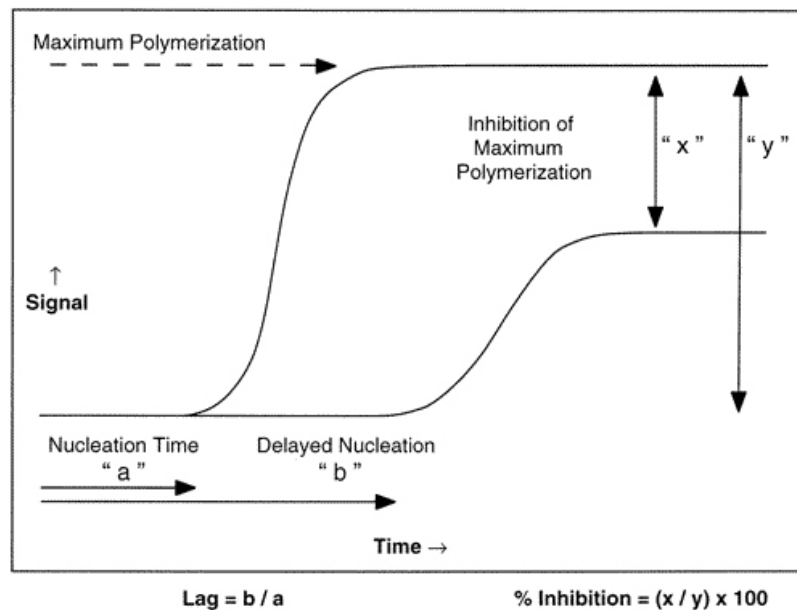


Fig.11 Schematizzazione dei potenziali effetti di una molecola inibitrice sulla cinetica di aggregazione dei peptidi βA . L'inibizione può essere osservata attraverso un prolungamento della fase di nucleazione (*delayed time*), una riduzione nella velocità di crescita delle fibrille, un abbassamento del numero di fibrille mature in grado di formarsi (*maximum polymerization*) o una combinazione di questi effetti (Findeis *et al.*, 1999).

Diversi studi hanno dimostrato che un certo numero di composti aromatici, molti dei quali sono noti antiossidanti, sembrano capaci di influire in modo significativo sulla cinetica di aggregazione dei peptidi β A (Shoval *et al.*, 2007). Tra queste, ricordiamo la curcumina e l'acido tannico (Ono *et al.*, 2004), le tetracicline (Forloni *et al.*, 2001), la melatonina (Pappolla *et al.*, 1998), le vitamine A, C, E ed il β -carotene (Ono *et al.*, 2004) e i polifenoli del vino (Ono *et al.*, 2003).

Gli anelli aromatici tendono a formare clusters altamente ordinati di tre tipi principali:

- 1) struttura parallela, in cui gli anelli sono sovrapposti l'uno sull'altro e perfettamente allineati;
- 2) struttura parallela sfalzata, dove gli anelli aromatici sono ancora sovrapposti ma non allineati, che partecipa a stabilizzare la struttura terziaria delle proteine e la struttura a doppia elica del DNA;
- 3) struttura a T, in cui l'estremità di un anello interagisce con la faccia di un altro (Waters, 2002).

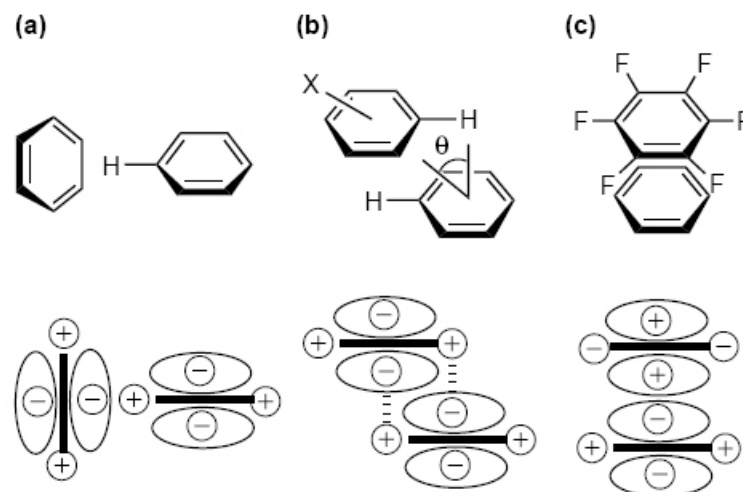


Fig. 12 Interazioni tra anelli aromatici planari: a) Struttura a T b) Struttura parallela sfalsata c) Struttura parallela (Waters, 2002).

Le interazioni attrattive tra anelli aromatici planari sono definite interazioni π - π o π -stacking. Poichè la formazione delle fibrille amiloidi è, soprattutto, un processo di

riconoscimento intermolecolare e di auto-assemblaggio, il π -stacking può fornire due elementi chiave per tale processo: 1) un contributo energetico: lo stesso stacking, può termodinamicamente guidare l'auto-assemblaggio; 2) un contributo sterico: un preciso pattern di stacking può garantire direzionalità e orientamento specifici, guidando la formazione di strutture sopramolecolari ordinate (Gazit, 2002).

La frequenza relativa di aminoacidi aromatici nelle proteine è, in genere, piuttosto bassa ma, allo stesso tempo, questi sono i residui più altamente conservati, poichè una sostituzione all'interno di una proteina di un aminoacido aromatico con uno non aromatico può causare profonde modificazioni sia di tipo strutturale che funzionale (Altschul, 1991).

Sebbene peptidi o proteine amiloidogenici non mostrino una evidente omologia di sequenza, essi possiedono brevissimi frammenti funzionali in cui ricorrono con alta frequenza residui aminoacidici aromatici. Nel peptide β A esistono brevi frammenti (come il frammento QKLVFF) contenenti due fenilalanine (FF), in grado di promuovere interazioni intermolecolari ed aggregare, formando fibrille del tutto simili a quelle dei peptidi. Inoltre, questi frammenti sono tutti capaci di legarsi al peptide β A intero e di inibirne la fibrillogenesi (Tjernberg *et al.*, 1996). Pertanto, il motivo FF sembra costituire l'elemento di "riconoscimento" molecolare all'interno del peptide β A, necessario perché il processo di fibrillogenesi possa avvenire (Gazit, 2002).

Il meccanismo di aggregazione del peptide β A, quindi, si baserebbe sull'assemblaggio guidato da questi brevi elementi di riconoscimento al suo interno, contenenti i due aminoacidi aromatici. Inizialmente, due di tali elementi formano una struttura bimolecolare, limitata dalla geometria permessa dal π -stacking; questa è seguita dall'aggiunta di nuovi monomeri, aventi lo stesso elemento di riconoscimento e l'organizzazione strutturale di tutto il processo è diretta proprio dalla limitata geometria delle interazioni di stacking (Gazit, 2002).

In questa ottica, molecole aromatiche capaci di riconoscere ed interagire con gli aminoacidi presenti nei peptidi/proteine amiloidi, rappresentano quindi dei potenziali inibitori della fibrillogenesi. Esse, infatti, potrebbero impedire l'aggregazione dei peptidi creando un ingombro sterico o, se cariche, attraverso una repulsione elettrostatica (Gazit, 2002).

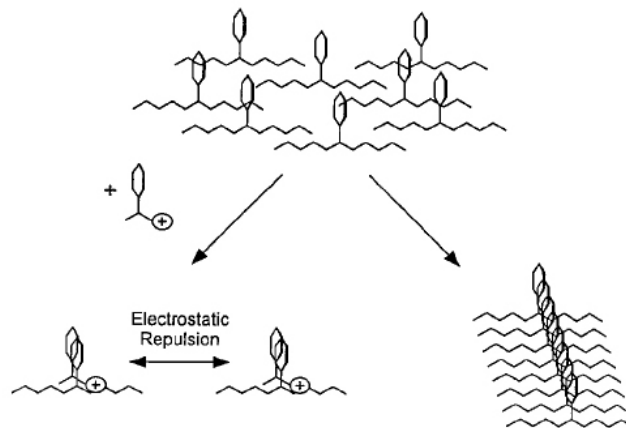


Fig. 13 Modello per l'inibizione della formazione delle fibrille amiloidi. In assenza di un inibitore le interazioni di stacking tra gli anelli dei peptidi aromatici guidano l'aggregazione e la transizione strutturale che porta alla formazione delle fibrille amiloidi. Un inibitore costituito da un elemento di riconoscimento aromatico e da uno capace di inibire l'aggregazione (*fibril breaker*) potrebbe legare il monomero ed impedire la formazione di aggregati (Gazit, 2002).

Uno di questi potenziali inibitori è rappresentato dall'ipericina, estratta dall' *Hypericum perforatum*, con proprietà blandamente antidepressive e, di recente scoperta, anche neuroprotettive (Silva *et al.*, 2004).

4.1. L'ipericina: struttura e proprietà

L'ipericina (Hyp) è un pigmento naturale fotoattivo, con struttura policiclica aromatica, anfifilico, estratto dall' *Hypericum perforatum*, noto anche come Erba di San Giovanni, pianta ampiamente distribuita nel mondo.

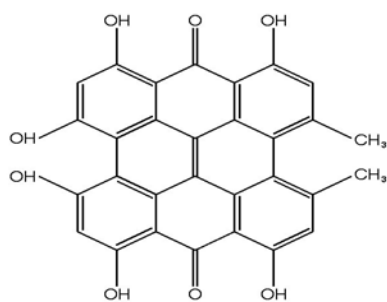


Fig. 14 Struttura molecolare dell'ipericina (Lavie *et al.*, 1989).

Questo estratto viene utilizzato già da tempo come rimedio naturale per le depressioni di modesta entità ma, per le sue proprietà fotochimiche e fotofisiche, l'ipericina è stata oggetto di numerosi studi negli ultimi anni. Infatti, se non irraggiata, essa non viene metabolizzata dall'organismo e non ha effetti citotossici. Dopo eccitazione con luce visibile, Hyp produce una elevata quantità di ossigeno singoletto e di superossido come principali ossidanti (Miccoli *et al.*, 1998). Essendo una molecola anfifilica, si localizza nel plasmalemma e nelle membrane degli organelli cellulari, i quali rappresentano i principali target dell'ipericina fotoattivata (Lukšienė and de Witte, 2003).

Per questa sua proprietà foto-sensibilizzante, molti studi la propongono come potente antivirale (Meruelo *et al.*, 1988) e ne rivelano una significativa attività antitumorale *in vivo*, sebbene la sua efficacia dipenda dall'origine istologica del tumore (Lukšienė and De Witte, 2003).

L'ipericina assorbe la luce sia nella regione dell'ultra-violetto che nel visibile, fino a lunghezze d'onda di circa 600 nm. In soluzione acquosa, Hyp è presente sotto forma di aggregati polidispersi e, se irraggiata, presenta due picchi di assorbimento nel visibile, uno più grande intorno a 550 nm e uno leggermente inferiore intorno a 600 nm. Quando disciolta in un solvente organico (etanolo, DMSO, ecc..) o in presenza di un substrato anfifilico, come le membrane o certe proteine, l'ipericina monomerizza e il suo spettro di

assorbimento subisce modifiche significative. Infatti, i picchi aumentano di intensità e si invertono: quello a 600 nm diviene maggiore rispetto a quello a 550 nm.

Anche le proprietà di fluorescenza dell'ipericina sono interessanti. In soluzione acquosa, se eccitata a lunghezze d'onda intorno a 550 nm, non emette fluorescenza mentre in forma monomeric, se eccitata alla stessa lunghezza d'onda, emette un intenso segnale di fluorescenza, con un picco massimo a 600 nm e uno più piccolo a 650 nm.

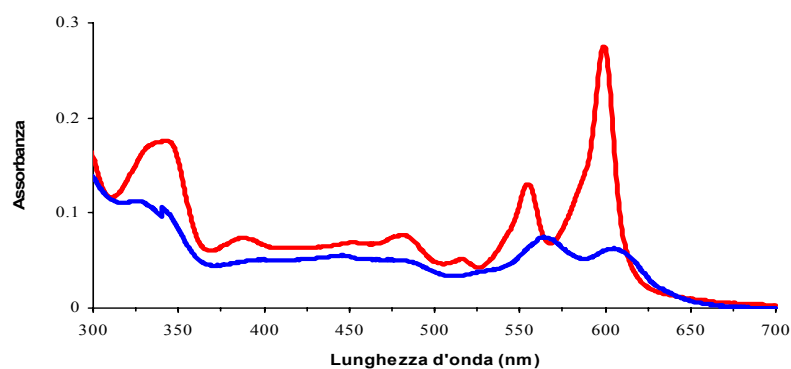


Fig. 15 Spettro d'assorbimento dell'ipericina sotto forma di aggregati polidisersi (spettro blu) e in forma monomeric (spettro rosso).

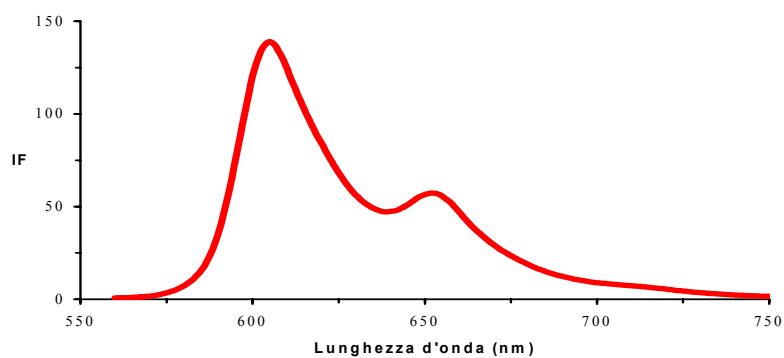


Fig. 16 Spettro di fluorescenza dell'ipericina in forma monomeric ($\lambda_{exc} = 550$ nm).

Queste caratteristiche spettroscopiche rendono l'ipericina particolarmente adatta ad essere utilizzata come sonda fluorescente.

5. La citotossicità

Gli effetti citotossici del peptide β -amiloide sono ad oggi oggetto di numerosi lavori di ricerca.

Come già detto, a lungo si è attribuita la tossicità alla forma fibrillare del peptide, tuttavia, studi recenti sembrano conferire tale proprietà agli intermedi oligomerici.

Da un punto di vista strutturale, le proteine specifiche delle patologie neurodegenerative sono coinvolte in un processo di denaturazione che causa l'esternalizzazione dei siti idrofobici i quali, in condizioni fisiologiche, sono interni alla proteina e lontani dall'ambiente acquoso. Quando si affacciano nel citosol, tendono ad interagire con altre strutture cellulari come, per esempio, le membrane cellulari, anch'esse idrofobiche, danneggiandole (Kourie e Henry, 2002). Un legame di questo tipo può rompere completamente l'equilibrio cellulare e soprattutto destabilizzare processi essenziali per la vita della cellula fra i quali l'omeostasi del calcio (Fig. 17).

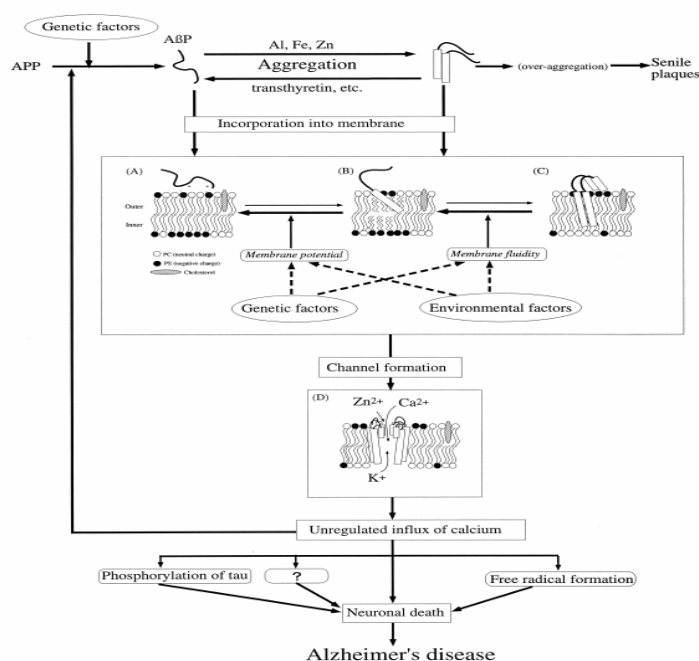


Fig. 17 Ipotesi della formazione di canali per il calcio per la citotossicità del β -amiloide.

Gli studi sulla citotossicità perciò, si occupano di comprendere in quale forma e con quale meccanismo la proteina studiata esplica un effetto tossico sulle cellule.

Il lavoro di ricerca si può avvalere di metodi e colture cellulari diverse; di seguito sono riassunti alcuni esempi di indagine.

La maggior parte dei gruppi di ricerca sceglie di lavorare con neuroni di ippocampo di origine murina; le loro caratteristiche, simili a quelle presenti nei neuroni umani, rendono infatti queste cellule un buon sistema modello per gli studi di citotossicità del β -amiloide.

Nel caso in cui si lavori con linee cellulari neuronali, gli effetti di una sostanza tossica possono andare ad agire su diverse funzioni e caratteristiche della cellula come, ad esempio, la secrezione di un ormone, la quantità di enzimi presenti, la concentrazione di ioni al suo interno o le variazioni del potenziale di membrana. Tutti questi parametri possono essere controllati nel tempo durante un periodo di incubazione delle cellule con la sostanza da testare ed una loro variazione, non reversibile, può essere indice di un effetto tossico.

I metodi di studio usati per queste ricerche dipendono, quindi, dal parametro cellulare scelto: si può eseguire un saggio sull'attività della lattato deidrogenasi (LDH) per stabilire la percentuale di cellule vive oppure si possono incubare le cellule con sonde fluorescenti sensibili al calcio e stimare la variazione di concentrazione intracellulare di tale ione con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza.

Il saggio della lattato deidrogenasi, probabilmente per la sua semplicità, è uno dei metodi più usati negli esperimenti di citotossicità; nel lavoro di Fezoui (Fezoui *et al.*, 2000) sia neuroni dell' ippocampo sia cellule della glia murine sono incubate per 2-3 giorni in presenza di β -amiloide e poi separate in aliquote per saggiare l'attività della lattato deidrogenasi ed eseguire la conta delle cellule morte.

Taylor e collaboratori (Taylor *et al.*, 2003) accompagnano il saggio della LDH, su neuroni di ippocampo murini, con un sistema di monitoraggio che impiega una sonda fluorescente, la SYTOX Green Fluorescence, capace di legarsi solo alle membrane cellulari integre. Analizzando le cellule trattate con questo metodo al microscopio è possibile correlare l'intensità di fluorescenza emessa alla percentuale di cellule vive.

L'esperimento eseguito da Kuroda e Kawahara (Kuroda and Kawahara, 2000) invece analizza, sempre in neuroni di topo, le variazioni intracellulare del calcio mediante l'uso di sonde fluorescenti specifiche per questo ione. Questo tipo di analisi ha riportato che la formazione di canali cationici sulla membrana si ha dopo circa trenta minuti di incubazione delle colture con la proteina.

Un altro test adatto a questo tipo di ricerca è quello del MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue); esso è usato da Dahlgren nei suoi lavori (Dahlgren *et al.*, 2002) ed utilizza un reagente che in presenza di deidrogenasi mitocondriali attive varia il suo spettro di assorbanza, rivelando, quindi, la percentuale di cellule vive.

6. Protisti come sistema modello

Negli ultimi anni, i saggi biologici che utilizzano i protisti come organismi modello stanno riscuotendo un interesse crescente, legato soprattutto alla loro relativa semplicità e ad un buon grado di riproducibilità. I protisti sono eucarioti unicellulari, quindi racchiudono all'interno di una sola cellula tutte le caratteristiche e le funzioni di un organismo e, parallelamente, offrono una serie di vantaggi che li rendono preferibili a colture cellulari di metazoi: grandi quantità di cellule geneticamente uguali, sincronizzabili e con brevi cicli cellulari, colture più "naturali" e un gran numero di habitat diversi, non solo acquatici (Ricci, 1989).

La sensibilità dei protisti ai cambiamenti ambientali e alla presenza di sostanze tossiche li rende ottimi bioindicatori. Per l'analisi di sostanze potenzialmente citotossiche, i parametri che vengono analizzati sono preferenzialmente di tipo biochimico (attività dell'ATPasi o delle deidrogenasi), fisiologico (ritmo di crescita, mortalità, morfologia, potenziale di membrana) e comportamentale (motilità, velocità, risposte sensoriali a stimoli chimico-fisici).

Il ciliato *Tetrahymena pyriformis* è stato a lungo utilizzato per valutare gli effetti di svariate sostanze tossiche, compresi farmaci e metalli pesanti (Nicolau *et al.*, 2001) mentre, più di recente, sono stati sviluppati test *in vitro* con *Tetrahymena thermophila*, ancora indirizzati alla valutazione della potenziale tossicità di specifiche sostanze. I parametri ritenuti significativi sono le risposte chemosensoriali negative, il ritmo di proliferazione cellulare e la velocità di nuoto; quest'ultima, in particolare, è importante perché riflette possibili alterazioni della struttura lipidica della membrana e deregolazione dei canali ionici causate da una certa sostanza.

Pertanto, i parametri di tipo comportamentale possono essere monitorati direttamente durante il saggio (motilità, velocità, forma) ed essendo legati direttamente all'integrità strutturale della membrana, forniscono preziose indicazioni su eventuali danni cellulari. Sulla base di questa logica, i nostri studi si sono rivolti al monitoraggio di questi parametri, effettuando test di incubazione del peptide βA con tre diversi tipi di protisti: se, come citato in letteratura, il peptide βA è in grado di formare "pori" nella membrana, un'alterazione dell'omeostasi ionica dovrà riflettersi sul comportamento motorio dei nostri organismi modello.

6.1. *Biologia di Euglena gracilis*

Euglena gracilis è un protista flagellato fotosintetico, quindi autotrofo, che in determinate situazioni è capace di sopravvivere anche in condizioni di eterotrofia; è inoltre in grado di percepire la presenza di stimoli luminosi e di reagire ad essi con alterazioni del proprio pattern motorio. Per queste sue caratteristiche, *E. gracilis* è uno degli organismi unicellulari più studiati..



Fig. 18 Immagine di *Euglena gracilis*

La posizione tassonomica del genere *Euglena* è stata oggetto di numerose modifiche negli ultimi anni, in linea con la continua evoluzione della sistematica dei protisti. Pertanto, studi ultrastrutturali e ricerche di filogenetica molecolare hanno permesso di proporre un nuovo schema di classificazione, basato su gruppi tassonomici che non rispecchiano la vecchia nomenclatura (Adl *et al.*, 2005).

Nella tabella sottostante sono riportate la classificazione vecchia e la nuova.

| <u>Vecchia classificazione</u> | <u>Nuova classificazione</u> |
|--------------------------------|------------------------------|
| Regno PROTISTA | Super group EXCAVATA |
| Phylum EUGLANOZOA | Firts rank EUGLENOZOA |
| Classe EUGLENOIDEA | Second rank EUGLENIDA |
| Ordine EUGLENACES | Third rank EUGLENEA BUTSCHLI |
| Genere <i>Euglena</i> | |
| Specie <i>gracilis</i> | |

Euglena gracilis vive negli stagni o in pozze d'acqua poco profonde. Ha corpo sottile e allungato (fino a 100 μm), con una tipica forma lanceolata mantenuta costante da un rivestimento di natura glicoproteica. Questo conferisce, nello stesso tempo, un certo grado di rigidità e di plasticità, che permette alla cellula di contrarsi e allungarsi in risposta a stimoli di natura diversa.

Struttura peculiare di *E.gracilis* è una tasca, o reservoir, posta nell'estremità anteriore in posizione subapicale. Dal reservoir fuoriesce, di norma, un solo lungo flagello, dotato di funzioni locomotorie; nel reservoir è inoltre presente un secondo flagello che, essendo molto più corto, non fuoriesce dal canale ed è perciò indicato come flagello non emergente. I flagelli possiedono una struttura 9+2. Il flagello emergente presenta sottili appendici laterali dette mastigonemi.

All'interno della tasca è presente una macula fotorectrice che permette al microorganismo di percepire la luce e, quindi, di spostarsi verso di essa per poter compiere la fotosintesi. Appena al di sopra della macula è presente una struttura ricca di pigmenti che, probabilmente, è collegata funzionalmente con il fotorecettore; tale struttura prende il nome di stigma.

E.gracilis può vivere sia come organismo autotrofo, se è disponibile luce per la fotosintesi, sia come eterotrofo, se è coltivata al buio in presenza di sorgenti di carbonio organico; è fotodipendente per il differenziamento del proplastidio a cloroplasto ed è in grado di compiere il processo inverso se posta al buio. E' quindi dotata di una notevole plasticità metabolica

Essendo in grado di "scegliere" il modo più appropriato di alimentarsi (tramite fotosintesi, ingestione di nutrienti o entrambi), *E. gracilis* è fornita di un vacuolo contrattile, posto all'interno della tasca anteriore e contenente enzimi, atti a digerire le sostanze fagocitate. Il

vacuolo contrattile assolve anche un ruolo importante per la regolazione osmotica. Il nucleo, singolo, è situato solitamente nella metà inferiore del corpo dell'animale.

E. gracilis si orienta nella colonna d'acqua in risposta a stimoli esterni, come la luce e la gravità; è stato ipotizzato che la cellula abbia una distribuzione asimmetrica della massa e sia passivamente orientata nella colonna d'acqua. D'altronde, questo microorganismo cambia il proprio orientamento gravitattico in base all'età: le cellule giovani (fino a quattro giorni dopo l'inoculo) mostrano una gravitassi positiva, quelle più vecchie una gravitassi negativa (Häder, 1997).

Recentemente, sono state trovate forti evidenze che l'orientamento nella gravitassi dei flagellati sia mediato da un gravirecettore fisiologico attivo piuttosto che da un allineamento passivo della cellula nella colonna d'acqua. L'attività di questo recettore sarebbe legata all'apertura/chiusura di specifici canali ionici, principalmente per gli ioni calcio, come dimostrato dal fatto che la gravitassi è bloccata se viene bloccata la calcio-ATPasi sulla membrana plasmatica e i conseguenti cambiamenti del potenziale di membrana sembrano essere l'innescò per il riorientamento del flagello (Häder *et al.*, 2003).

6.2. *Biologia di Dunaliella salina.*

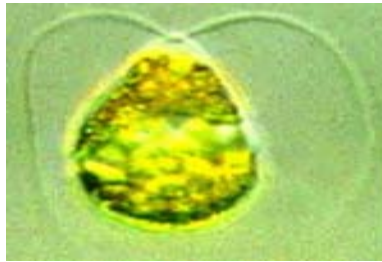


Fig. 19 Immagine di *Dunaliella salina*

Dunaliella salina è un protista verde unicellulare con il seguente inquadramento tassonomico:

Vecchia classificazione

Regno PROTISTA
Phylum CHLOROPHYTA
Classe CHLOROPHYCEAE
Ordine VOLVOCALES
Famiglia DUNALIELLACEAE
Genere *Dunaliella*
Specie *salina*

Nuova classificazione

Super-gruppo ARCHAEPLASTIDA
First Rank CHLOROPLASTIDA
Second Rank CHLOROPHYTA
Third Rank CHLOROPHYCEAE

Le specie appartenenti al genere *Dunaliella* sono molto simili a quelle del genere *Chlamydomonas*, a parte l'assenza di parete cellulare e la presenza di uno strato esterno alla cellula, di natura mucillacinosa.

La cellula ha forma ovoidale, con la zona apicale appuntita e la zona basale più larga. Sono presenti due flagelli uguali, inseriti nella parte anteriore della cellula, con struttura microtubulare del tipo 9+2.

Il nucleo, singolo, si trova nella parte anteriore della cellula in posizione centrale.

I vacuoli, che compaiono in gran quantità nella fase finale della crescita, contengono per lo più porzioni di membrana.

Il cloroplasto occupa quasi tutta la porzione posteriore della cellula, coi tilacoidi densamente impilati durante la fase di crescita.

Nella cellula è presente un unico grande stigma, posto nella regione subapicale, a livello del quale si accumulano gocce lipidiche che aumentano di numero con la crescita. (Hoshaw and Maluf, 1981).

Quasi tutte le specie appartenenti al genere *Dunaliella* sono molto tolleranti nei confronti delle variazioni di salinità e/o di pH. Esse rappresentano una componente ubiquitaria della flora acquatica (sia dolce che salata) e, nelle acque ipersaline, alcune specie di *Dunaliella*, tra cui *D. salina*, danno origine a fioriture algali di dimensioni massicce.

Questa capacità di tollerare un alto contenuto ambientale di sale, e le sue eventuali e rapide variazioni, è dovuta all'accumulo intracellulare di glicerolo, che funziona da osmoregolatore.

In particolare, *D. salina* risponde a condizioni di ipersalinità tramite up-regolazione di enzimi chiave nella fissazione fotosintetica di CO₂ e nel metabolismo energetico, con sintesi massiccia di glicerolo.

Lo stress salino altera la solubilità di ioni e di molti substrati essenziali e destabilizza le membrane biologiche, con deregolazione del trasporto di sodio, alterazione dell'organizzazione lipidica e attivazione di protein chinasi di membrana. L'adattamento allo stress salino può riorganizzare il proteoma membranale, con stabilizzazione ed aumento dei trasportatori ionici e accumulo di specifiche proteine, tra cui due tipi di anidrase carbonica e una proteina transferrina-simile, che presumibilmente compensano l'alterata disponibilità di bicarbonato e ferro in presenza di alte quantità di sale. Pertanto, la riorganizzazione della struttura e della composizione della membrana plasmatica è alla base del meccanismo molecolare responsabile della risposta alla salinità (Katz *et al.*, 2007).

Il glicerolo è un alcool particolarmente solubile che causa minor inibizione dei processi metabolici rispetto a qualsiasi altra soluzione testata (Borowitzka *et al.*, 1988). Alcuni studi hanno dimostrato che l'accumulo di glicerolo in *D. salina* sia dipendente dalla qualità e dalla quantità di luce fornita durante la sua crescita. In particolare, l'esposizione ad una luce intensa riduce notevolmente il contenuto intracellulare di glicerolo, mentre l'esposizione a luce blu riduce la crescita cellulare (Jones and Galloway, 1978).

Il genere *Dunaliella* contiene clorofilla *a* e *b*, i pigmenti fotosintetici, e una serie di carotenoidi e xantofille, tra cui β -carotene, α -carotene, luteina, neoxantina e violaxantina, che funzionano da antiossidanti.

Questi microorganismi sono in grado di rispondere a cambiamenti di luce nell'ambiente in cui crescono. E' stato osservato che il contenuto di clorofilla, in alcune specie di *Dunaliella*, diminuisce in seguito a forte illuminazione mentre aumenta la velocità di crescita (Falkowsky *et al.*, 1994). Di contro, l'esposizione ad un eccesso di luce visibile danneggia la cellula; questo fenomeno, noto come fotoinibizione, è caratterizzato da un minore tasso di crescita e da un più basso tasso di luce-saturata e di rendimento fotosintetico (Smith *et al.*, 1990)

6.3. *Biologia di Blepharisma japonicum*



Fig. 20 Immagine di *Blepharisma japonicum*. Sono ben visibili le ciglia e i vacuoli contrattili nella parte posteriore

Blepharisma japonicum è un ciliato eterotrico, la cui posizione tassonomica è stata riesaminata e modificata negli ultimi anni, riportiamo, quindi, la vecchia e la nuova nomenclatura (Adl *et al.*, 2005):

Vecchia classificazione

Regno PROTISTA
Phylum CILIOPHORA
Classe POLYMENOPHOREA
Ordine HETEROTRICHIDA
Famiglia SPIROSTOMIDE
Genere *Blepharisma*
Specie *japonicum*

Nuova classificazione

Super-gruppo CHROMALVEOLATA
First Rank ALVEOLATA
Second Rank CILIOPHORA
Third Rank POSTCILIODESMATOPHORA

B. japonicum possiede un corpo piriforme, con la parte posteriore più larga di quella anteriore, di dimensioni comprese tra 300 e 750 μm , a seconda del regime alimentare a cui è sottoposto. Tipico per i ciliati spirotrichi sono le ciglia formanti membranelle disposte ad elica destrorsa attorno al citostoma.

Le ciglia sono disposte su file longitudinali: sulla parte superiore, leggermente curva, corrono circa 40 file di ciglia di varia lunghezza in direzione obliqua rispetto all'asse della cellula. Sulla faccia inferiore, piana, vi sono 30 file di ciglia che servono allo spostamento. Il movimento delle ciglia di una fila avviene in modo coordinato. Tutte le ciglia presentano la tipica struttura 9+2, cioè 2 microtubuli centrali, circondati da 9 coppie di microtubuli laterali disposte in circolo.

Le membranelle della zona adorale sono organuli a forma di ventaglio, originati dalla fusione di ciglia e associati con la zona del citostoma o con la parte circostante la regione boccale. Parallelamente a queste membranelle scorre una sottile membrana in continuo movimento ondulatorio, anch'essa generata dalla fusione di ciglia e sottesa ad un flagello detto ricorrente, la quale consente movimenti più efficaci in materiali vischiosi e genera correnti alimentari.

Tra le membranelle e la membrana ondulatoria c'è il peristoma, che si allarga e termina in un orifizio: il citostoma (o "bocca cellulare"). Annessi a tale orifizio si trovano i vacuoli alimentari, vescicole contenenti il cibo ingerito le quali, man mano che si spostano lungo il citoplasma, si rigonfiano gradualmente per secrezione all'interno di varie sostanze chimiche ed enzimi. Dalla membrana vacuolare si formano piccole vescicole, contenenti materiale digerito, che si distaccano e si riversano nel citoplasma, dove avverrà l'assorbimento dei nutrienti mentre il materiale non digerito verrà espulso dalla cellula.

Verso la parte posteriore del microorganismo c'è il vacuolo pulsante, un organulo cellulare che si ritrova in molti protozoi e la cui funzione è quella di espellere acqua dalla cellula controllandone l'osmosi. Tale funzione è confermata dal fatto che i protozoi che vivono in ambienti a loro isosmotici non possiedono tale organulo. Minore è la concentrazione ionica dell'ambiente e maggiore è la velocità con cui il vacuolo pulsante espelle acqua e

viceversa. Ancora nella parte posteriore è localizzato il citopige che espelle quanto non è stato digerito.

B. japonicum, come tutti i ciliati, possiede due tipi di nucleo: un micronucleo, con funzione riproduttiva, e un macronucleo, con funzione vegetativa, che controlla il funzionamento generale della cellula. Il macronucleo, lungo e a forma di nastro, si riconosce bene quando il citoplasma è povero di vacuoli alimentari pieni. Al macronucleo sono addossati più micronuclei, che però devono venir evidenziati e colorati per essere visibili.

La colorazione rossa di *B. japonicum* è dovuta alla presenza di un pigmento fotosensibilizzante, la blefarismina, implicato nel meccanismo di fotorisposta. Ciò che rende interessante questo ciliato è che lo stesso pigmento endogeno è fototossico per il ciliato stesso, svolge un ruolo difensivo contro i predatori ed agisce come cromoforo fotorecettore. Infatti, se *B. japonicum* si trova esposto ad una luce relativamente forte, in presenza di ossigeno, la blefarismina produce radicali liberi e ossigeno singoletto che portano rapidamente a morte la cellula. Per questo motivo, questo microorganismo vive al buio sul fondo di pozze di acqua dolce stagnante, mantenendosi in questo ambiente grazie alla sua capacità di percepire lo stimolo luminoso e di reagire ad esso (risposta fotofobica di step-up, fotocinesi positiva) (Lenci, Ghetti, Pill-Soon Song, Photomovements in ciliates).

La risposta fotofobica di step-up consiste in un arresto del movimento in avanti, seguito da uno swimming retrogrado lungo una traiettoria curva, cosicchè l'asse longitudinale della cellula cambia la sua direzione.

In condizioni di luce continua, la “manovra” effettuata per evitarla è costituita da una alternanza di tumbling e di nuoto su traiettoria rettilinea in direzione casuale, che si ripetono fino a che la cellula non si ritrova in aree non illuminate. Matsuoka e Taneda riportano che cellule di *B. japonicum* adattate alla luce sono capaci di percepire una

riduzione nella densità del flusso di fotoni, a cui reagiscono con una transiente soppressione dell'inversione ciliare e un incremento nella velocità di nuoto, spesso accompagnati da un allungamento della cellula (Lenci, Ghetti, Pill-Soon Song, Photomovements in ciliates).

Le variazioni del moto ciliare sono causate da un flusso in ingresso di ioni calcio nella cellula. In altri ciliati (ad esempio *Stentor coeruleus*) è stato proposto un meccanismo ionico delle risposte comportamentali: la fotoeccitazione del pigmento porterebbe all'attivazione di una proteina G eterotrimerica (la subunità α si stacca dalle subunità β e γ) la quale, a sua volta, renderebbe attiva una fosfodiesterasi che riduce i livelli di cGMP nella cellula. Questo farebbe aprire i canali calcio e di conseguenza provocherebbe la risposta fotofobica di step-up. Il temporaneo aumento della velocità di nuoto è causato, invece, da un'iperpolarizzazione della membrana dovuta ad un aumento della conduttanza per il potassio e, quindi, ad un'uscita di questo ione.

Materiali e Metodi

1. Materiali

I peptidi sintetici β -amiloidi 1-40 ed 1-42 (purezza >95%) sono stati forniti dalla Biopeptide Co. (San Diego, CA), l'ipericina dalla Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, Germany), l'etanolo dalla Baker, i sali per la preparazione del PBS e la tioflavina T (ThT) dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Tutti i prodotti sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione, al di fuori di quanto specificato nel paragrafo successivo.

2. Preparazione dei campioni

Uno degli inconvenienti di maggior rilievo durante lo studio dei peptidi amiloidogenici è costituito dalla possibile presenza, nel prodotto iniziale liofilizzato, di aggregati in grado di accelerare la cinetica di aggregazione. Questi possono, infatti, costituire dei centri di nucleazione ai quali si aggregano altri monomeri (o probabilmente anche oligomeri) imponendo forte variabilità e accelerazione al processo di fibrillogenesi. Se i peptidi liofilizzati vengono solubilizzati in una soluzione tampone a pH fisiologico, questi aggregati non si sciolgono e si distribuiscono in maniera disomogenea nelle provette, determinando per ciascun campione una variabilità nelle condizioni iniziali che, come accennato sopra, si traduce in una bassa riproducibilità sperimentale (Nilsson, 2004).

I peptidi venivano pertanto disciolti in una soluzione acquosa di NaOH a pH = 10.5 e sonicati per 10 minuti a 35 kHz in un bagno ad ultrasuoni (Elma, D). Il campione era poi suddiviso in aliquote di volume noto, centrifugato per 12 ore sotto vuoto e mantenuto a -20°C

Al momento della misura, a ciascuna provetta eppendorf contenente il β A veniva aggiunta una quantità di PBS (pH = 7.4, NaCl 120mM, K_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 10mM, KCl 2,7mM) opportuna, a seconda della concentrazione finale che si voleva ottenere. Per ridurre al minimo la presenza di impurità e aggregati di grandi dimensioni prima di

ciascuna misura veniva, inoltre, effettuata un'ultrafiltrazione centrifugando per 10 minuti a 5000g con filtri Nanosep con porosità di 0.2 μm (Pall).

Per quanto riguarda le misure su campioni in presenza di ipericina, poiché questa è una molecola anfifilica con una bassa solubilità in soluzione acquosa, dove forma aggregati polidispersi, veniva preparata una soluzione madre in cui l'ipericina era disciolta in etanolo, a una concentrazione di 5×10^{-4} M. Piccole aliquote venivano aggiunte al campione in modo da ottenere una concentrazione finale di 5×10^{-6} M in cui il rapporto tra etanolo e PBS era 1% (vol/vol). Misure di controllo hanno permesso di escludere un effetto dell'etanolo, a queste concentrazioni, sulla cinetica di aggregazione dei peptidi β -amiloidi.

3. Strumentazione

3.1 Misure di assorbimento

Per le misure di assorbimento è stato utilizzato uno spettrofotometro JASCO modello V550, collegato ad un PC per l'impostazione delle misure e per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati. Questo strumento permette di effettuare misure di assorbimento per lunghezze d'onda che vanno dalla regione dell'ultravioletto a quella del vicino infra-rosso (190 nm - 900 nm): la sorgente di luce per la regione dell'ultravioletto (190 nm - 350 nm) è una lampada al deuterio e per la regione spettrale dal visibile al vicino infra-rosso (330 nm - 900 nm) è una lampada alogena. Il cammino ottico del fascio di luce proveniente dalla sorgente è illustrato in figura 21.

La luce viene indirizzata ad un monocromatore, dove viene dispersa da un reticolo, passa attraverso una fenditura e raggiunge uno specchio semiriflettente che la suddivide in due fasci, uno che attraversa il campione (Sam) e l'altro il riferimento (Ref). I due fasci, alternativamente, vanno a incidere su di un fotomoltiplicatore. Ciò permette di ottenere con una sola misura l'assorbanza del soluto eliminando quella del solvente.

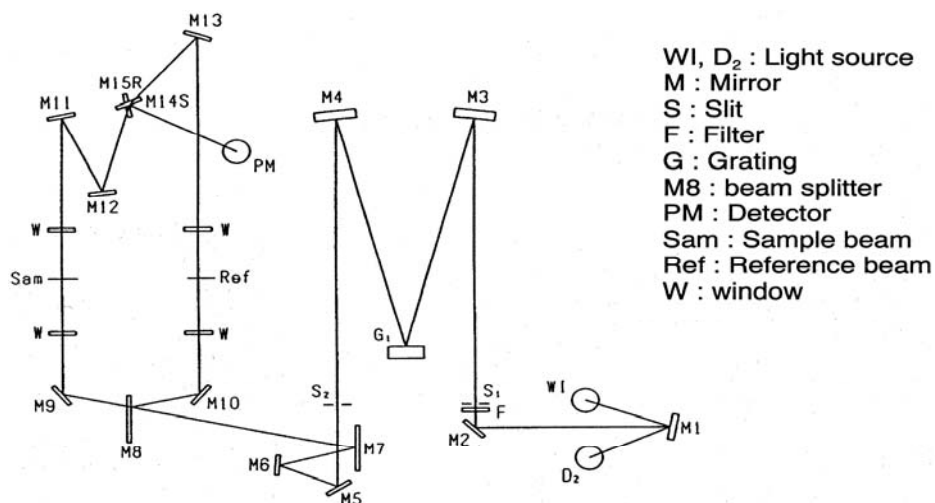


Fig 21. Schema dello spettrofotometro Jasco V-550.

Le eventuali differenze nei cammini ottici dei due fasci e altre diversità nella parte ottica (diversa riflettività degli specchi, diversa geometria delle cuvette) vengono eliminate misurando e memorizzando lo spettro del solvente rispetto al solvente (linea di base).

La luce incidente sul fotomoltiplicatore viene convertita in un segnale elettrico e questo, a sua volta, viene convertito in un valore digitale successivamente fornito al computer. I dati digitalizzati che arrivano all'unità principale vengono trasformati in valori di trasmittanza ($T\%$) o assorbanza tramite le seguenti operazioni aritmetiche:

$$T\% = \frac{(D_c - D_b) \cdot 100}{D_r - D_b}$$

$$A = \text{Log}_{10} \frac{100}{T\%}$$

dove D_c è il segnale digitale proveniente dal campione, D_b è quello del buio e D_r è quello proveniente dal riferimento. I dati forniti dal costruttore riportano un errore sulla lunghezza d'onda di ± 0.3 nm, uno sull'assorbanza compreso tra lo 0.002% e lo 0.004% e uno sulla trasmittanza dello 0.3%.

3.2 Misure di fluorescenza e di scattering

Per le misure di fluorescenza e di scattering è stato utilizzato uno spettrofluorimetro PERKIN-ELMER modello LS 50B, che, come lo spettrofotometro, è collegato ad un PC. Esso è dotato di una lampada allo Xenon a scarica di 7.5 W di potenza media, in grado di produrre impulsi intensi (fino a 15 kW di picco) e di breve durata (larghezza temporale a metà altezza minore di 10 μ s) in un intervallo di lunghezze d'onda che va da 200 nm a 900 nm.

Il cammino percorso dal fascio di eccitazione e da quello di fluorescenza è mostrato in figura 22. La geometria di illuminazione del campione usata è quella di osservazione ad angolo retto dal centro per illuminazione centrale della cuvetta (contenitore di quarzo per le soluzioni da analizzare, a forma di parallelepipedo).

Gli intervalli di lavoro dei due monocromatori sono: da 200 nm a 800 nm per quello di eccitazione, da 200 nm a 900 nm per quello di emissione.

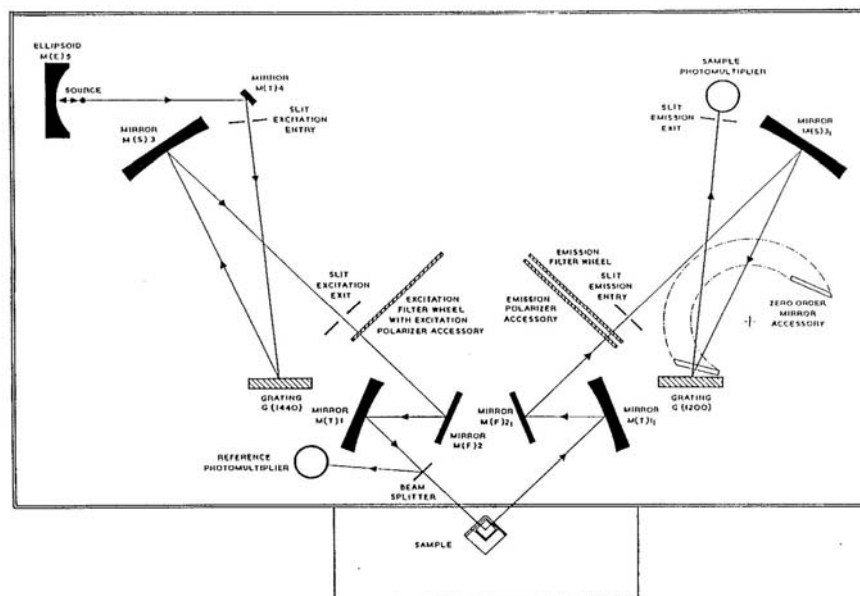


Fig 22. Schema del fluorimetro LS 50B.

Le bande passanti delle fenditure dei monocromatori possono essere variate da 2.5 a 15 nm per quello posto sul fascio di eccitazione e da 2.5 a 20 nm per quello posto sul fascio di emissione; ambedue possono essere selezionate con incrementi di 0.1 nm. Regolando

opportunamente la larghezza delle fenditure possiamo cercare di ottenere il miglior compromesso tra un rapporto segnale/rumore alto e la migliore risoluzione spettrale. Ad esempio, misurando uno spettro di emissione, mantenendo fissa la fenditura di eccitazione, un'ampiezza maggiore della banda passante della fenditura di emissione comporta un rapporto segnale/rumore maggiore ma peggiore risoluzione spettrale, mentre stringendo la fenditura, si peggiora il rapporto segnale/rumore, ma si ottiene una migliore risoluzione spettrale.

Questo strumento è dotato di due dispositivi a disco che, ruotando, possono porre lungo il cammino ottico filtri o polarizzatori: uno è posto dopo l'uscita del monocromatore di eccitazione, l'altro prima del monocromatore di emissione.

Per tener conto delle variazioni di sensibilità dello strumento ed eventualmente correggerle è stato utilizzato uno standard di rodamina in polimetilmetacrilato fornito dalla PerkinElmer stessa.

Lo stesso spettrofluorimetro è stato utilizzato per determinare la cinetica di aggregazione dei peptidi tramite misure di luce diffusa (scattering). La fibrillogenesi è, infatti, un processo di polimerizzazione la cui cinetica può essere seguita *in vitro* misurando l'andamento nel tempo dell'intensità della luce diffusa da parte degli aggregati molecolari che si vanno formando. La quantità di luce diffusa è proporzionale al raggio idrodinamico (raggio di un'ipotetica particella sferica con lo stesso coefficiente di diffusione) e quindi alle dimensioni delle particelle in soluzione (Walsh *et al.*, 1997). Il monocromatore di eccitazione e quello di emissione devono essere posizionati alla stessa lunghezza d'onda in una regione spettrale in cui il sistema che deve essere analizzato non assorbe. Nel caso dei nostri campioni, le misure sono state effettuate a 405 nm (Stege *et al.*, 1999).

Sia durante le misure di fluorescenza che di scattering i campioni sono stati tenuti alla temperatura costante di 60°C mediante un termostato a liquido (Pharmacia Biotech)

collegato allo strumento per mezzo di tubicini di silicone. A differenza di quanto avviene a temperatura ambiente, alla quale la cinetica di aggregazione, alle concentrazioni utilizzate, impiega giorni per avvenire completamente, a 60° essa ha luogo in poche ore.

3.3. Misure di dicroismo circolare

Gli spettri di dicroismo circolare (CD) sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO J-500°, il cui schema semplificato è riportato in figura 23.

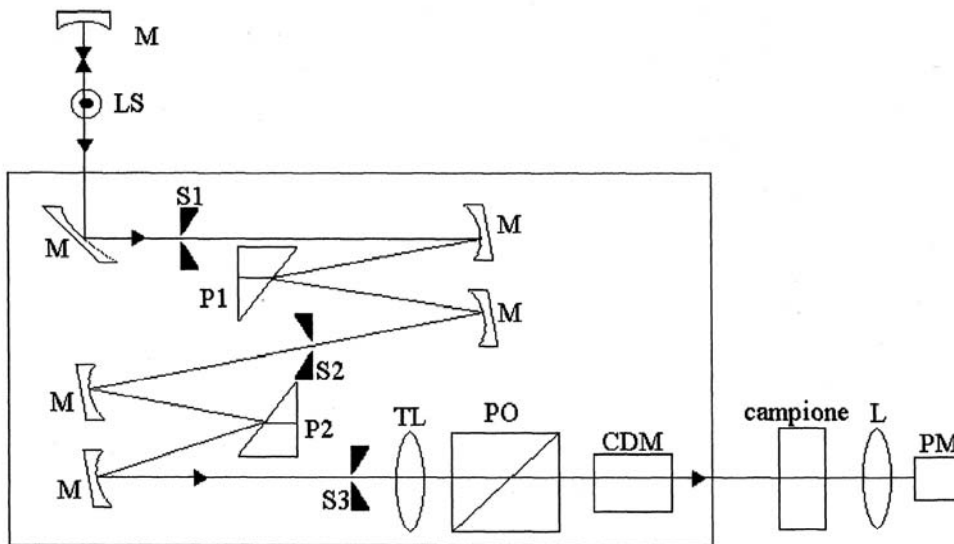


Fig 23. Schema semplificato di uno spettropolarimetro: S1, S2 ed S3, fenditure; P1 e P2, prismi; LS, sorgente di luce; M, specchi concavi; L, lente; CDM, modulatore di dicroismo circolare; PO, polarizzatore; PM, fotomoltiplicatore; TL, sistema fra lenti.

Le intensità sono espresse in termini di ellitticità molare, Θ , che è proporzionale alla differenza di assorbanza della soluzione per la luce polarizzata circolarmente a destra e per quella polarizzata circolarmente a sinistra (ΔA), all'ellitticità osservata sperimentalmente e registrata direttamente dallo strumento, Θ_{obs} , ed inversamente proporzionale al cammino ottico della cella porta-campione ed alla concentrazione della soluzione in esame.

4. Metodi di coltura dei protisti.

4.1. *Euglena gracilis*

La coltura di *Euglena gracilis* viene eseguita in mezzo minerale a pH 3,4, con temperatura e illuminazione costanti (25°C). La composizione del terreno è riportata nella tabella sottostante:

| Reagenti | g/l |
|--|-----------------------|
| (Na) ₂ HPO ₄ | 1 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,2 |
| CaCl ₂ | 0,02 |
| Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2 H ₂ O | 0,8 |
| Acido succinico | 5 |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·nH ₂ O | 0,003 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0,0018 |
| CoSO ₄ ·7H ₂ O | 0,0015 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,0004 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,0002 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,00002 |
| Vit B ₁ | 0,0001 |
| Vit B ₁₂ | 0,5x 10 ⁻⁶ |

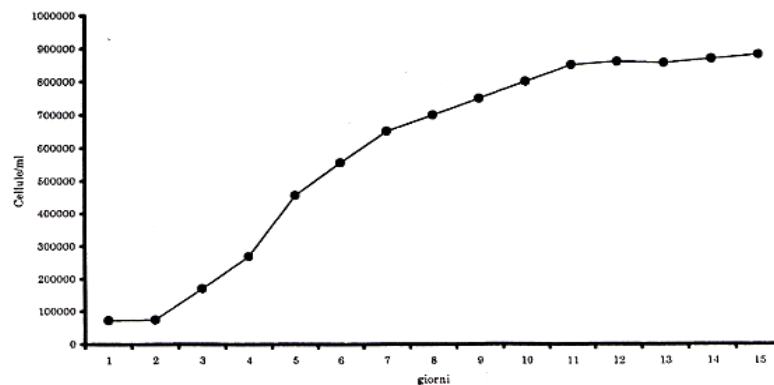


Fig 24: Curva di crescita di *E. gracilis*

4.2. *Dunaliella salina*

La composizione del terreno di coltura di *D. salina* è quella suggerita da Johnson (1968):

| Reagenti | g/l |
|------------------------------|--------|
| Sali d'acquario Istant Ocean | 33,3 |
| NaCl | 58,4 |
| KNO ₃ | 1 |
| HPO ₄ | 0,04 |
| NaHCO ₃ | 0,04 |
| Fe-EDTA | 0,2 ml |
| TRIS | 2,45 |

Questi sali vengono sciolti in acqua deionizzata.

Vengono poi aggiunti metalli in tracce come segue:

| | |
|---|------------|
| ZnCl ₂ | 0,41 mg/l |
| H ₃ BO ₃ | 0,61 mg/l |
| CoCl ₂ x 6H ₂ O | 0,015 mg/l |
| CuSO ₄ x 5H ₂ O | 0,06 mg/l |
| MnCl ₂ x 4H ₂ O | 0,41 mg/l |
| (NH ₂) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O | 0,38 mg/l |

Inoltre, sono state aggiunte vitamine del gruppo B (B₁ e B₁₂).

Il pH del terreno viene regolato a valori prossimi a 7,5 mediante aggiunta di HCl 1 N.

Le colture di *Dunaliella salina* sono tenute in beute della capacità di 1 l alla temperatura di 23 °C; nelle colture viene fatta gorgogliare aria immessa attraverso filtri sterili Sartorius con pori del diametro di 0,2 micron.

Vengono ripetuti nuovi inoculi periodicamente: si preleva in modo sterile una certa quantità di terreno contenente *Dunaliella* e si trasferisce in un'altra beuta che contiene una quantità proporzionata di terreno fresco. La coltura da cui si effettua il prelievo deve avere un colore verde brillante.

4.3. *Blepharisma japonicum*

Il ciliato *Blepharisma japonicum* viene coltivato nel nostro laboratorio secondo le procedure descritte da Miyake e collaboratori (Miyake *et al.*,1990), in condizioni monoxeniche in un mezzo a base di succo di lattuga inoculato con *Enterobacter aerogenes*, alla temperatura di 23°C ed al buio.

La preparazione del succo viene fatta a partire da foglie di lattuga coltivata senza l'uso di fertilizzanti artificiali e di antiparassitari, nocivi per *B. japonicum*. Dopo rimozione delle parti più interne ed accurato lavaggio prima in acqua di fonte e poi deionizzata, la lattuga è bollita per circa 15-20 minuti, centrifugata e filtrata. Il succo, diluito ad un volume doppio di quello iniziale, viene conservato a 20°C.

Il succo viene quindi utilizzato per la preparazione del mezzo di coltura (pH 6,8) secondo la seguente formula:

- 4% di succo di lattuga
- 1% di tampone fosfato 200 mM
- 95% di acqua deionizzata

Il terreno di coltura viene suddiviso in beute e sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti, in seguito viene inoculato con *E. aerogenes* 1-2 giorni prima dell'uso. A questo punto il contenuto della beuta viene versato in una di pari volume contenente una coltura di *B. japonicum*; il volume totale viene quindi nuovamente suddiviso nelle due beute. Queste operazioni di raddoppio delle colture vengono eseguite ogni 7 giorni in condizioni sterili sotto cappa a flusso laminare.

Le cellule vengono raccolte per mezzo di una serie di centrifugazioni a circa 100xg per 4-5 minuti, lavate con un mezzo salino di mantenimento (SMB, Saline Medium for *Blepharisma*) e filtrate con un filtro di nylon a maglie di 60 µm, per eliminare i detriti che si sono accumulati nel terreno di crescita; infine le cellule vengono risospese in SMB.

L'SMB è costituito da: 1% tampone fosfato 200 mM – 1% di soluzione salina contenente NaCl 150 mM, CaCl₂·2H₂O 40 mM, KCl 5 mM, MgCl₂·6H₂O 5 mM, MgSO₄·7H₂O 5 mM – 98% di acqua deionizzata.

5. Strumentazione per le analisi di immagine

Durante i nostri esperimenti, eseguiti per valutare la tossicità del β-amiloide su *E. gracilis*, *D. salina* e *B. japonicum* sono stati utilizzati due diversi sistemi di analisi d'immagine: Ecotox e Matrox Odyssey Image System.

Ecotox è un sistema per il monitoraggio della motilità di microrganismi unicellulari. Il principio di monitoraggio è semplice: le cellule in movimento sono riprese da una telecamera munita di obiettivo e le immagini sono trasferite ad un computer e visualizzate in una finestra sul monitor. Un apposito software analizza i parametri della motilità (percentuale delle cellule mobili, velocità, orientamento) e la forma delle cellule, riportandoli in grafico.

Questa misura viene effettuata su un campione di controllo e successivamente su campioni cellulari sottoposti alla sostanza che si intende testare. Il riempimento della cuvetta di misura con i diversi campioni è dovuto ad alcune pompe peristaltiche programmabili via computer.

Nel caso specifico Ecotox è stato utilizzato per studiare le eventuali variazioni dei suddetti parametri di moto di *E. gracilis* e *D. salina* in presenza di peptidi amiloidi in forma di monomero o di fibrilla.

I campioni venivano monitorati per diverse ore, controllando le variazioni di tutti i parametri rilevati dal sistema.

Per gli studi condotti su *B. japonicum* non è stato possibile invece utilizzare Ecotox in quanto le dimensioni di questo microorganismo sono troppo grandi per consentire una buona analisi con tale strumento; tutti gli esperimenti eseguiti su *B. japonicum*, infatti, sono stati monitorati con Matrox Odyssey Image System, un sistema di analisi di immagine dotato anch'esso di telecamera con obiettivo che trasmette le immagini ad un computer ad esso collegato dove un software dedicato, Eukatrack, li analizza.

Il funzionamento della Matrox, seppur simile a quello di Ecotox, si differenzia principalmente per una caratteristica peculiare del programma: la capacità di acquisizione dell'immagine in real time è decisamente più veloce (40 ms x immagine) e può essere condotta per tempi dell'ordine dei minuti, in questo modo la traccia di dati è molto più lunga e la capacità di analisi è nettamente superiore a quella di Ecotox. Inoltre, è di rilevante importanza il fatto che in questo sistema di analisi non sono presenti pompe peristaltiche che aspirano il campione e che, una volta analizzato, lo riportano in un becker con il resto delle cellule, sottoponendolo a un non trascurabile stress meccanico. Lo stesso campione, invece, può essere controllato anche per giorni, se accuratamente conservato. La telecamera è all'interno di una camera buia dove viene posto il vetrino con i microrganismi e, una volta fatta la misura, questo può essere tolto senza problemi e rianalizzato in seguito. Come sarà discusso meglio nel capitolo Risultati e Discussione, anche nel caso di *D. salina*, abbiamo preferito utilizzare Matrox Odyssey Image System perchè, grazie a queste sue caratteristiche, ci permetteva di fare misure più affidabili rispetto a quelle effettuate con Ecotox

I nostri studi su *B. japonicum* sono stati condotti, monitorando tre vetrini in contemporanea: uno era il campione di controllo dove si trovavano i microrganismi nel

proprio mezzo di mantenimento, SMB, gli altri avevano in aggiunta un'opportuna aliquota del peptide β -amiloide in forma monomerica e in forma fibrillare.

L'esperimento è stato impostato nel seguente modo: inizialmente tutti e tre i vetrini contenenti solamente le cellule in SMB, venivano monitorati per circa mezz'ora in modo da assicurarsi un inizio dell'esperimento con tre situazioni identiche; in seguito venivano aggiunte dosi uguali di fibrille, di monomero e di SMB e venivano monitorati tutti e tre i vetrini per diverse ore.

Risultati e Discussione

RISULTATI DI SPETTROSCOPIA

1. Cinetica di aggregazione del peptide β -amiloide₍₁₋₄₀₎

In accordo con quanto riportato in letteratura (*Nucleation-Elongation Model*, Murphy, 2002), le cinetiche di aggregazione del peptide β -amiloide₍₁₋₄₀₎ da noi misurate mostrano tutte un andamento sigmoideale, tipico dei processi di polimerizzazione nucleazione-dipendenti. Inizialmente, l'auto-assemblaggio del peptide è estremamente lento per cui, in questa fase di latenza, i valori di scattering sono piuttosto bassi e rimangono sostanzialmente costanti. Una volta che gli aggregati hanno raggiunto una dimensione critica, ossia si è formato un "nucleo", la polimerizzazione procede rapidamente, per aggiunta di nuovi monomeri al "template", e i valori di scattering aumentano proporzionalmente. Nella fase conclusiva della cinetica, si sono formate le fibrille mature e i livelli di scattering si assestano di nuovo su valori all'incirca costanti (saturazione).

Il principale problema da risolvere è stato quello di individuare condizioni sperimentali tali da ottenere cinetiche di aggregazione complete e compatibili coi tempi di misura imposti dalle tecniche spettroscopiche da noi utilizzate. Queste condizioni le abbiamo ottenute mantenendo, con un termostato, i campioni a $T=60^{\circ}\text{C}$ per tutta la durata della cinetica e utilizzando una ancoretta magnetica (stirrer) che ne permette la continua agitazione e favorisce il processo di aggregazione. In tal modo, e con la procedura di preparazione dei campioni già descritta in precedenza, abbiamo potuto limitare le incertezze alla durata della fase di latenza, la cui permanente lieve variabilità è un fattore intrinseco, dovuto alla presenza nel campione iniziale di pre-aggregati difficilmente eliminabili.

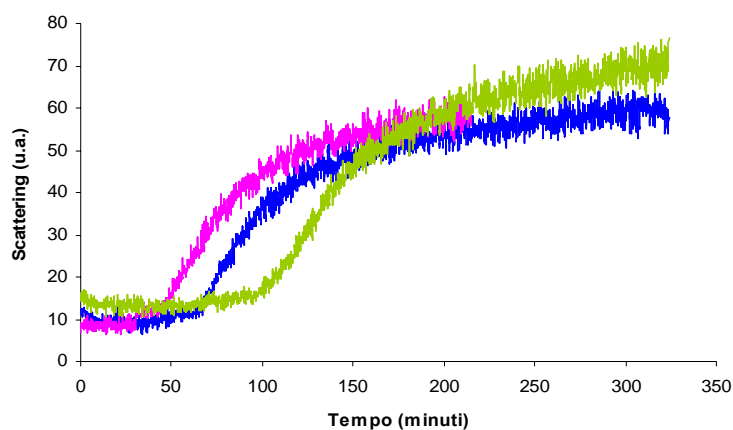


Fig. 25 La cinetica di aggregazione del peptide βA_{1-40} è stata seguita misurando la luce diffusa (*scattering*) nel tempo ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 405 \text{ nm}$). I peptidi ($150 \mu\text{M}$) sono stati disciolti in PBS ($\text{pH} = 7.4$) e filtrati prima della misura (Nanosep $0.2 \mu\text{M}$, 5000g). Durante la cinetica i campioni venivano tenuti in continua agitazione e alla temperatura costante di 60° .

Traslando le curve in modo da far coincidere l'inizio della fase di salita, i grafici risultavano ben sovrapponibili, indicando una soddisfacente ripetibilità dei risultati per quanto riguarda la cinetica dall'inizio della fase di polimerizzazione in poi.

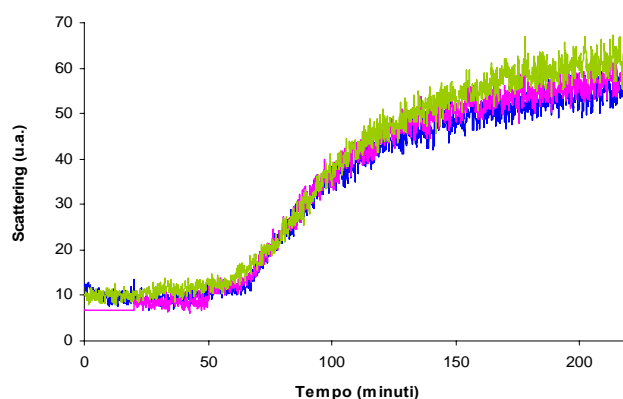


Fig. 26 Cinetiche di aggregazione ottenute traslando le curve in modo da far coincidere i punti di inizio salita.

Per avere informazioni sulla struttura secondaria del nostro sistema durante la sua evoluzione, abbiamo integrato le misure di scattering statico con misure di dicroismo circolare (CD) prelevando, nelle diverse fasi della cinetica, delle aliquote di campione. I prelievi ($200 \mu\text{l}$) sono stati eseguiti all'inizio della fase di latenza (t_0), all'inizio (t_1) e alla fine (t_2) della fase di polimerizzazione, e nella fase di saturazione (t_3).

Le misure di CD sono state eseguite sia presso il nostro Istituto, sia presso il Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale dell'Università degli Studi di Pisa, in collaborazione con il Prof. Lorenzo Di Bari e il Dott. Rino Pescitelli. Inoltre, grazie all'aiuto di un software dedicato, i colleghi di Chimica ci hanno fornito un aiuto prezioso nel determinare le percentuali di struttura secondaria utilizzando due set di riferimento (SMP50 e SDP48) e due distinte procedure sperimentali (CDSStr e CONTINN-LL)

In t_0 , i peptidi si trovano in soluzione soprattutto sotto forma di monomeri e di piccoli oligomeri e i valori di ellitticità molare (θ) indicano che, in questa fase, il sistema ha una struttura in prevalenza random coil (3% α -elica, 41% β -sheet, 56% random coil; CONTINN-LL). Al tempo t_1 , sebbene i “nuclei” si siano formati e si abbia l'avvio della fase di polimerizzazione, θ non rivela cambiamenti apprezzabili nella struttura secondaria mentre, a t_2 , quando le fibrille mature si sono formate, la struttura secondaria presenta un cambiamento radicale. Infatti, lo spettro CD presenta una banda negativa intorno a 215 nm, caratteristica della conformazione β -sheet e anche a t_3 , quando ormai il sistema si è stabilizzato, non si hanno più variazioni dal punto di vista qualitativo ma solo un lieve incremento del segnale (11% α -elica, 56% β -sheet, 33% random coil; CONTINN-LL).

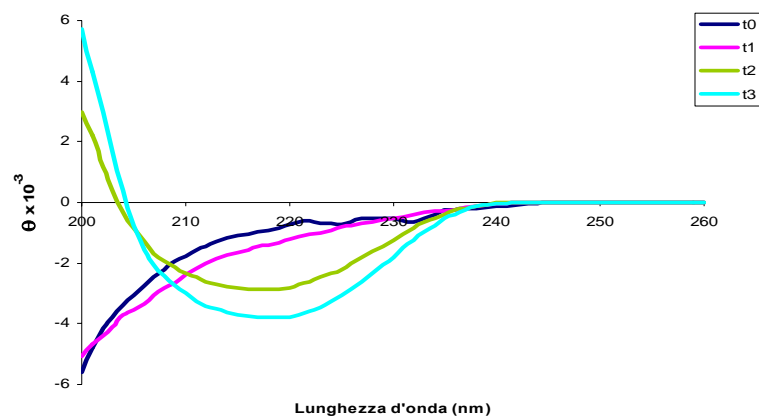


Fig. 27 Spettri di dicroismo circolare di campioni di βA_{1-40} 75 μM in PBS (pH = 7.4) prelevati in diverse fasi della cinetica di aggregazione (t_0 , inizio della fase di latenza: spettro blu; t_1 , inizio della fase di polimerizzazione: spettro viola; t_2 , fine della fase di polimerizzazione: spettro verde; t_3 , saturazione: spettro celeste). Da t_1 a t_2 il sistema subisce un cambiamento radicale. In t_2 l'ellitticità molare presenta un piccolo minimo intorno ai 215 nm tipico dei sistemi a struttura secondaria prevalentemente β -sheet.

La determinazione della struttura secondaria con il metodo CONTINN-LL indica che i peptidi passano, durante la fibrillogenesi, da una conformazione casuale, il random coil, ad una molto più ordinata e stabile, il foglietto β , che costituisce la struttura finale delle fibrille mature, a minor energia.

2. Effetto dell'ipericina sulla cinetica di aggregazione

L'ipericina è una molecola aromatica policiclica in grado di formare complessi macromolecolari con membrane, proteine e DNA e sembra essere un buon candidato come inibitore della fibrillogenesi del peptide βA . Per queste sue proprietà, l'ipericina è stata utilizzata nei nostri esperimenti per valutare tale potenziale effetto inibitorio. Quando l'ipericina viene aggiunta a t_0 , cioè ad inizio cinetica, l'inibizione del processo di aggregazione è pressoché totale e i valori di scattering rimangono bassi e costanti per tutta la durata dell'esperimento (300 minuti).

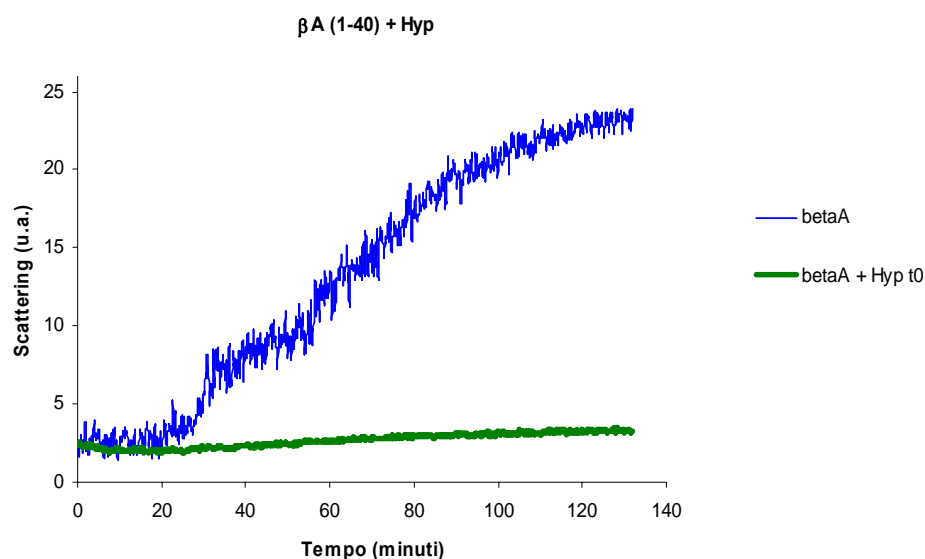


Fig. 28 Effetto dell'Hyp ($5\mu M$) aggiunta all'inizio della fase di latenza (curva verde) sulla cinetica di aggregazione del βA_{1-40} ($150\mu M$).

Per verificare se, in effetti, il legame dell'ipericina al peptide β A inibisce completamente la formazione delle fibrille, abbiamo eseguito il test della tioflavina T (Th T), le cui proprietà di sonda fluorescente, specifica per le fibrille amiloidi, sono ben note. La Th T, se eccitata in soluzione acquosa con una luce visibile, a lunghezze d'onda di 442 nm o 450 nm, non emette fluorescenza. In presenza di fibrille, invece, si osserva un intenso spettro di emissione con un massimo a 480nm; il vantaggio dell'utilizzo di questa sonda è dovuto al fatto che il suo legame al peptide non ne altera in alcun modo la struttura secondaria.

Inizialmente, per escludere possibili artefatti causati dalla formazione di complessi fluorescenti tra Th T e Hyp, ad una soluzione di PBS/Th T (5 μ M) abbiamo aggiunto un'aliquota di Hyp 5 μ M ed eccitato alle lunghezze d'onda di 442 nm, 450nm e 550nm. Come ci aspettavamo, né Th T né Hyp emettono fluorescenza in queste condizioni.

Quindi, abbiamo aggiunto ad una nuova soluzione PBS/Th T una aliquota del campione di β A incubato con l'ipericina, prelevata al tempo t_0 della cinetica di aggregazione ed eccitato alle stesse lunghezze d'onda. In queste condizioni, Th T non emette fluorescenza (perché non sono presenti fibrille).

Lo stesso esperimento è stato condotto aggiungendo alla soluzione PBS/Th T una aliquota di Hyp+ β A prelevati alla fine del processo di fibrillogenesi, t_2 . Anche in questo caso, Th T non emette fluorescenza quando eccitata a 442 nm a ulteriore dimostrazione del fatto che l'ipericina ha impedito la formazione delle fibrille di β A.

2.1 Misure della variazione di fluorescenza nel tempo

Per ottenere informazioni sull'andamento temporale dell'interazione tra l'ipericina e il peptide β -amiloide, abbiamo aggiunto Hyp al peptide al tempo t_0 e misurato la variazione della fluorescenza di Hyp nel tempo.

Ricordiamo che, in soluzione acquosa, Hyp è presente sotto forma di aggregati polidispersi e, se eccitata con luce visibile a 550 nm, in queste condizioni non emette fluorescenza. Invece, quando disciolta in un solvente organico o in presenza di un substrato, l'ipericina assume una forma monomericamente e, se eccitata alla stessa lunghezza d'onda, dà un intenso segnale di fluorescenza, con un picco massimo a 600 nm e un picco più piccolo a 650 nm. Nei campioni esaminati, il segnale di fluorescenza dell'ipericina tende ad aumentare di intensità sin dall'inizio, per poi assestarsi su un valore costante. Ciò indica che Hyp inizia da subito ad interagire coi peptidi in forma monomericamente/oligomericamente e, una volta che tutti i complessi cromoforo-proteina si sono formati, il segnale si stabilizza ad un valore fisso.

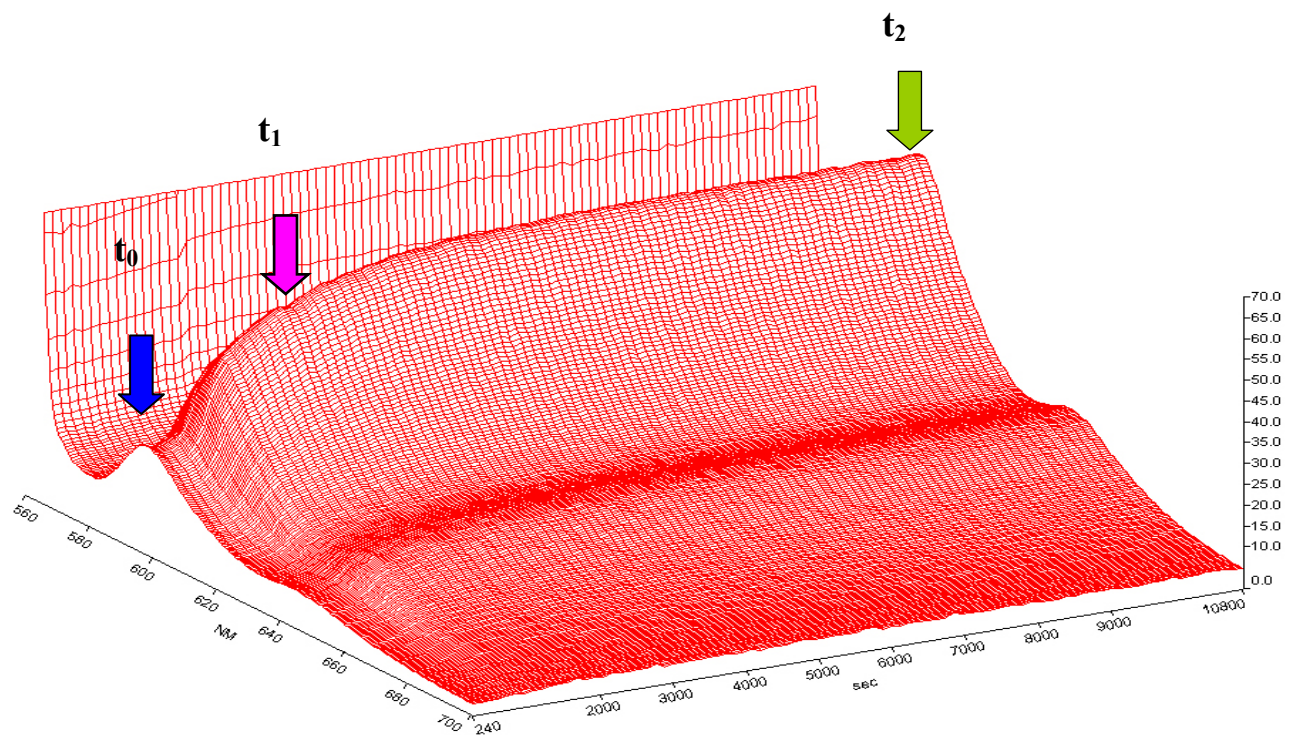


Fig. 29 Fluorescenza dell'Hyp nel tempo ($\lambda_{exc} = 550$ nm) aggiunta a t_0 . L'Hyp inizia subito ad interagire con un "indefinito" oligomero di βA . Le frecce indicano i punti in cui sono stati effettuati i prelievi per le misure di CD.

Durante il monitoraggio della fluorescenza nel tempo del sistema Hyp- βA , abbiamo prelevato aliquote di campione per eseguire misure di dicromismo circolare e verificare così

la struttura secondaria del sistema. Anche in questo caso, abbiamo effettuato misure sia nel nostro Istituto che in collaborazione col Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale.

A t_0 , lo spettro ha un picco a 200 nm, tipico di una struttura in prevalenza random coil, simile allo spettro registrato in assenza di Hyp. Invece, a t_1 , quando l'intensità del segnale di fluorescenza inizia a stabilizzarsi, lo spettro CD è centrato attorno ai 220 nm. Si può ipotizzare quindi che, in questa fase, il peptide βA sia presente in massima concentrazione nella struttura secondaria più affine al legame con Hyp. A t_2 , il sistema presenta un nuovo cambiamento di struttura secondaria, con prevalenza di struttura β -sheet, come indicato dal fatto che lo spettro CD è centrato intorno ai 215 nm.

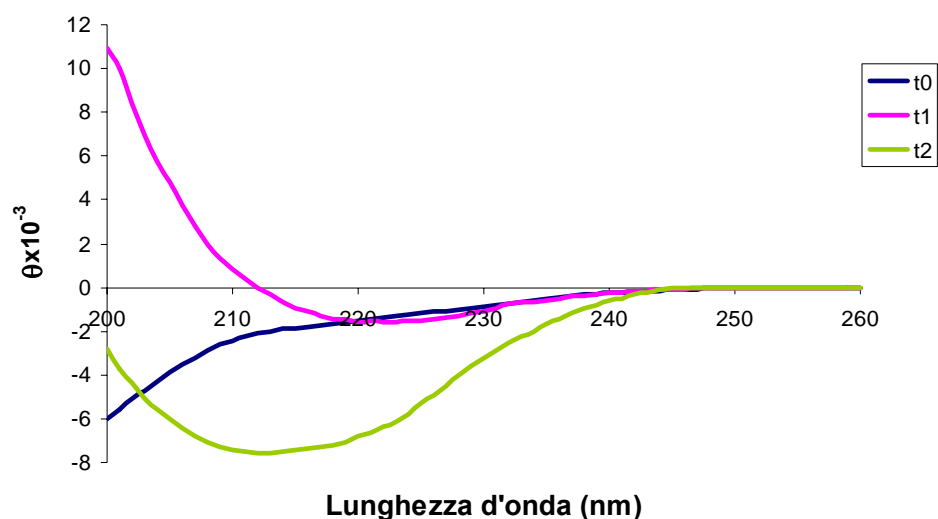


Fig. 30 βA con Hyp aggiunta dall'inizio. A t_0 il sistema ha una struttura secondaria prevalentemente random coil (spettro blu). A t_1 , la fluorescenza dell'Hyp inizia a stabilizzarsi (spettro viola). Dopo 180 minuti la struttura cambia nuovamente e diventa prevalentemente β -sheet (spettro verde).

L'analisi qualitativa degli spettri CD del peptide βA , la cui fibrillogenesi è stata studiata in presenza e in assenza di Hyp ci mostra che, almeno ad inizio e a fine cinetica, non si hanno variazioni sostanziali nella struttura secondaria dei due sistemi. I valori di scattering, indicano, però, che la struttura β -sheet osservata nella fase finale non è associata alla presenza di fibrille quando l'“aggregazione” del peptide ha luogo in presenza di ipericina.

Si può, dunque, ipotizzare che Hyp legghi, e forse stabilizzi, preferenzialmente oligomeri i quali rappresentano un intermedio fondamentale nel normale processo di fibrillogenesì, come già riportato in letteratura. L'effetto di tale interazione sembra essere una sorta di inibizione della formazione dei "nuclei" e, quindi, degli aggregati di più grandi dimensioni che da questi originano. Questo, d'altra parte, non impedisce l'evoluzione del sistema verso una struttura secondaria prevalentemente β -sheet che, probabilmente, costituisce la forma più stabile e a minor energia, come riportato in letteratura.

RISULTATI DI CITOTOSSICITÀ

1. Effetti del peptide β -amiloide₍₁₋₄₀₎ su *Euglena gracilis*.

Gli effetti del peptide β -amiloide₍₁₋₄₀₎ sui parametri del moto di *E. gracilis* sono stati studiati con il sistema di analisi di immagine Ecotox. I nostri esperimenti sono stati eseguiti su campioni di cellule nel proprio mezzo di mantenimento, come controllo, e in presenza del peptide in forma di fibrille e in forma monomeric.

Il primo punto critico in questo tipo di esperimenti è l'opportuna concentrazione di microorganismi che il sistema è in grado di analizzare.

Per questo motivo, prima di ogni esperimento, sono state eseguite delle prove di monitoraggio su aliquote di cellule nel terreno di mantenimento, molto concentrate, e in seguito sono state fatte, se necessarie, le opportune diluizioni. Una giusta concentrazione cellulare all'interno della celletta determina, infatti, il corretto funzionamento del sistema di analisi di immagine poiché un numero troppo alto di cellule non permette di seguire le traiettorie distintamente le une dalle altre, portando così ad ottenere risultati artefatti. Una volta determinata la concentrazione ottimale di cellule, un'aliquota di questa sospensione cellulare è stata pompata nella celletta di analisi.

Tutti i peptidi erano in PBS e avevano una concentrazione iniziale di 75 μM ; venivano diluiti cinque volte nelle sospensioni cellulari, raggiungendo, quindi, una concentrazione finale di 15 μM . La misura di controllo è stata effettuata allo stesso modo, aggiungendo una quantità equivalente di PBS, invece del peptide.

In Fig. 31 è riportato l'istogramma della motilità in funzione del tempo del campione di controllo e di quelli trattati col peptide in forma di monomero e di fibrilla.

La motilità è calcolata come percentuale di cellule che si muovono con una velocità al di sopra di un limite minimo che nel nostro caso è 10 $\mu\text{m/s}$. La scelta di questo valore tiene

conto sia del comportamento motorio del microorganismo sia dell'intervallo di confidenza del sistema di analisi il cui limite minimo è stato dimostrato essere 7 $\mu\text{m/s}$.

Nel caso del campione di controllo e di quello trattato con le fibrille non sembra possibile osservare variazioni significative della motilità, anche dopo 24 ore. I valori del controllo fluttuano tra 47% e 71%, mentre quelli delle cellule con fibrille sono compresi tra 55% e 71%.

L'aggiunta del monomero, invece, sembra provocare una diminuzione immediata, anche se transiente, del numero di cellule che si muovono. Dopo 2 ore, infatti, la motilità appare completamente recuperata, raggiungendo un valore del 72%.

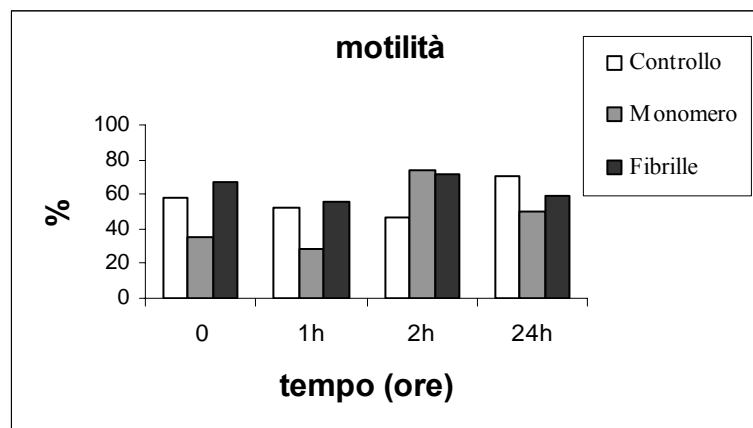


Fig. 31 Motilità delle cellule di *E. gracilis* a vari tempi dopo l'esposizione a soluzioni di controllo, oppure contenenti il monomero o le fibrille del peptide β -amiloide (1-40) (concentrazione finale: 15 μM).

In Fig. 32 è riportato l'istogramma della velocità media dei campioni. Nel caso del controllo le cellule si muovono con velocità che fluttuano tra i 21 e i 40 $\mu\text{m/s}$, con un valor medio nell'arco delle 24 ore di 30.5 $\mu\text{m/s}$. Il campione col monomero subisce un drastico e immediato calo della velocità che raggiunge valori inferiori ai 20 $\mu\text{m/s}$. Dopo 1 ora, sorprendentemente, si ha un aumento pronunciato della velocità che raggiunge 43 $\mu\text{m/s}$ per

poi ritornare a valori inferiori ai $30\mu\text{m/s}$. Anche le fibrille sembrano influenzare significativamente la velocità dei microorganismi che fluttuano tra i 13 e i $30\mu\text{m/s}$.

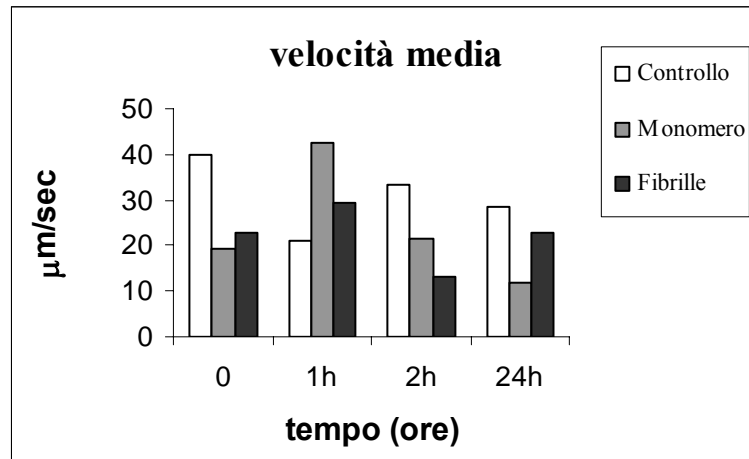


Fig. 32 **Variazioni delle velocità medie ($\mu\text{m/sec}$) di *E. gracilis* nelle tre condizioni sperimentali usate per i dati nella Fig. 31.**

Poiché la cuvetta di analisi dove sono collocate le cellule è in posizione verticale, le cellule morte cadono per forza di gravità verso il basso e possono essere considerate, dal software che le analizza, come cellule vive che si muovono. Per tentare di capire meglio i dati sulla velocità media, abbiamo analizzato le velocità delle cellule sia verso l'alto (spostamento eseguito solo dai microorganismi vivi) sia verso il basso (direzione in cui si muovono sia le cellule vive che quelle morte).

Nel caso della velocità verso l'alto ("Top Velocity") le misure mostrano velocità il cui valor medio nel tempo è $40\mu\text{m/s}$, nel caso del controllo, $32\mu\text{m/s}$ nel caso del monomero e $28\mu\text{m/s}$ in quello delle fibrille (Fig. 1.3.). In tutti e tre i casi non è possibile osservare variazioni significative in funzione del tempo.

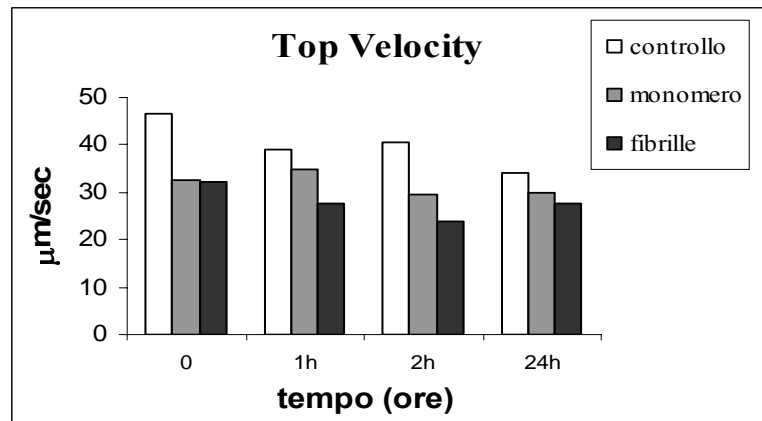


Fig. 33 Variazioni delle velocità medie ($\mu\text{m}/\text{sec}$) verso l'alto (Top Velocity) di *E. gracilis* nelle tre condizioni sperimentali usate per i dati nella Fig. 31.

Nel caso della velocità verso il basso ("Bottom Velocity") i valori delle velocità del controllo e delle cellule con fibrille sono piuttosto bassi, tra 12 e 28 $\mu\text{m}/\text{s}$, e si mantengono tali nell'arco delle 24 ore, mentre nel campione con monomero si ha un drastico aumento della velocità dopo 1 ora (45 $\mu\text{m}/\text{s}$) che poi ritorna a valori comparabili a quelli dei campioni nelle altre due condizioni sperimentali (Fig. 34).

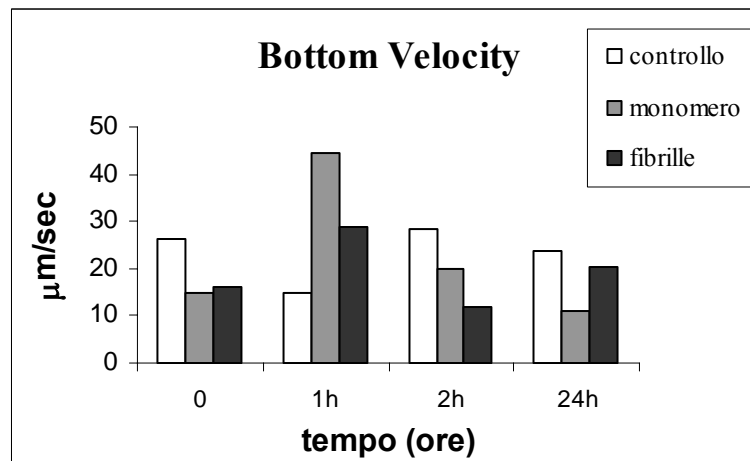


Fig. 34 Variazioni delle velocità medie ($\mu\text{m}/\text{sec}$) verso il basso (Bottom Velocity) di *E. gracilis* nelle tre condizioni sperimentali usate per i dati nella Fig. 31.

Questi ultimi risultati devono essere letti tenendo presente che *E. gracilis*, in natura, per posizionarsi correttamente nella colonna d'acqua, è in grado di compiere gravitassi negativa. Nella celletta verticale del nostro sistema di analisi, quindi, i microorganismi

orientano il proprio moto prevalentemente verso l'alto e questo può spiegare perchè abbiano una "Top Velocity" più elevata rispetto alla "Bottom Velocity". In questo contesto, l'incremento della velocità media (Fig. 32) dopo 1 ora con il monomero sembra attribuibile quasi del tutto all'aumento della "Bottom Velocity" (Fig. 34).

Da ulteriori osservazioni al microscopio è stato visto che molti microorganismi, anche nel campione non trattato col β A, già dopo 1 ora di esperimento avevano perso il flagello. Ciò è stato attribuito allo stress meccanico che subiscono le cellule a causa della pompa peristaltica. Quindi, i risultati di queste misure sono stati considerati poco attendibili. Inoltre, anche la posizione verticale della celletta di analisi rende problematica e difficoltosa l'interpretazione dei dati.

2. Effetti del peptide β -amiloide₍₁₋₄₀₎ su *Dunaliella salina*.

Analisi con Ecotox.

Sospese le misure su *E. gracilis* per i motivi sopra citati, abbiamo rivolto la nostra attenzione a *D. salina*, in quanto questo microorganismo ha dimensioni molto più piccole di *E. gracilis* e, secondo quanto riportato in letteratura, è più resistente allo stress meccanico.

Anche con questo microorganismo, prima di ogni esperimento, sono state effettuate prove preliminari per trovare una concentrazione di cellule ottimale, in modo che il sistema potesse calcolarne bene le singole traiettorie. Poichè il volume finale ottimale era ancora 5 ml, abbiamo preparato ogni volta tre distinte sospensioni di *D. salina* nel suo terreno da 4 ml ciascuna, a cui veniva aggiunto, rispettivamente, 1 ml di PBS per il controllo, 1 ml di β A 75 μ M sotto forma di monomero e 1 ml di β A 75 μ M sotto forma fibrillare. La concentrazione finale del peptide era, quindi, 15 μ M.

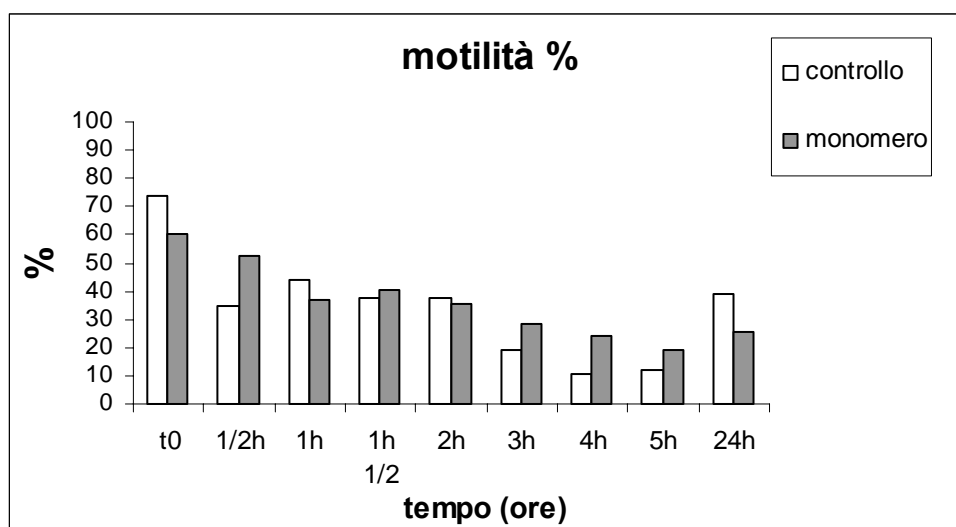


Fig. 35 Motilità di *D. salina* a vari tempi in una soluzione di controllo e in una contenente il peptide β -amiloide (1-40) in forma monomerica (concentrazione finale: 15 μ M).

In Fig. 35 osserviamo che, a t_0 , il controllo ha una percentuale di motilità buona, intorno al 70%, ed anche il campione di cellule incubate col peptide β A ha valori iniziali di motilità intorno al 60%. Come visibile chiaramente in figura, la percentuale delle cellule mobili, sia di controllo sia trattate col monomero, tende a ridursi significativamente col procedere delle misure nel tempo, fino a scendere intorno al 10%. Anche dopo 24 h, la motilità del controllo è circa la metà di quella iniziale.

Gli stessi esperimenti sono stati ripetuti col peptide β A in forma fibrillare ottenendo anche in questo caso un marcato decremento della motilità del controllo.

In queste condizioni, quindi, non è possibile formulare alcuna ipotesi su quali possano essere gli effetti del peptide sulle cellule, in quanto, come nel caso di *E. gracilis*, molto probabilmente l'azione della pompa peristaltica danneggia la cellule, rendendole temporaneamente immobili in alcuni casi o uccidendole in altri.

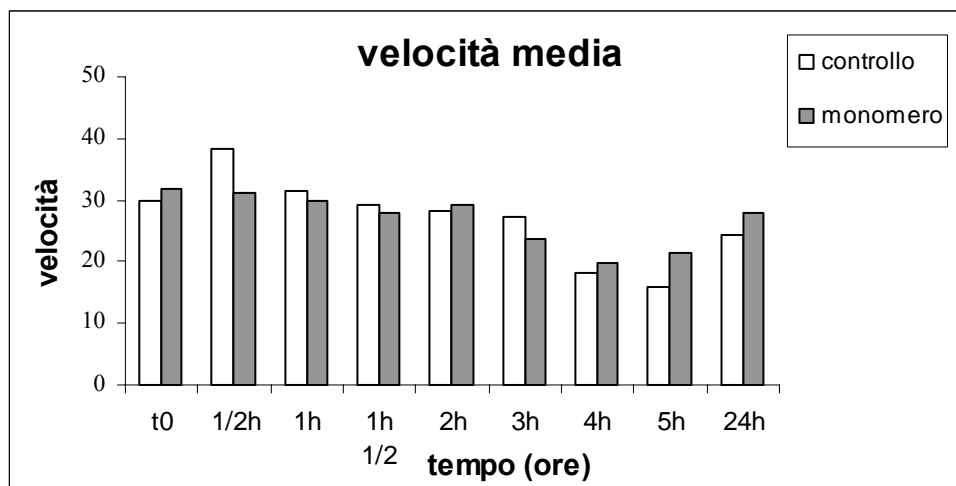


Fig. 36 **Variazioni delle velocità medie ($\mu\text{m/s}$) di *D. salina* nelle due condizioni sperimentali usate per i dati nella Fig. 35.**

Analizzando la velocità media della popolazione cellulare, nelle stesse condizioni riportate in Fig. 35, osserviamo che i valori si mantengono piuttosto costanti sia per il controllo che per il campione in presenza di monomero.

Se, ancora una volta, si considera che la celletta d'analisi è posta in verticale, tutte le cellule che hanno subito un danno dall'azione della pompa peristaltica e che sono in caduta libera, per gravità, verso il basso sono analizzate come se fossero vive e libere di muoversi in questa direzione. I valori iniziali, più alti, sono pertanto la risultante dei movimenti attivi, in tutte le direzioni, delle cellule non ancora danneggiate dalla pompa mentre i valori finali di velocità, dopo alcune ore, sono più bassi perchè risultato di movimenti sostanzialmente passivi, per gravità verso il basso, di cellule immobili o morte.

Quindi, dai risultati ottenuti con *D. salina* abbiamo ipotizzato che forse il sistema d'analisi d'immagine Ecotox non è lo strumento adatto per questo tipo di misure, poichè la pompa aspirante determina una variabilità sperimentale troppo alta e difficilmente controllabile

Analisi con Eukatrack.

Per una analisi più approfondita ed affidabile, gli effetti del peptide $\beta A_{(1-40)}$ su *D. salina* sono stati studiati anche con il sistema di analisi di immagine Matrox Image System, capace di monitorare la velocità delle singole cellule di una popolazione, e, tramite un software sviluppato *ad hoc*, Eukatrack, di ricavare la velocità media. Con questo sistema viene eliminato il problema dell'aspirazione, poichè le cellule sono poste su un vetrino orizzontale e osservate direttamente col microscopio.

Poichè questo sistema di analisi è estremamente sensibile, sia il mezzo di coltura di *D. salina* che i vetrini su cui venivano poste le cellule dovevano essere perfettamente puliti e privi di residui.

Prima di ogni esperimento, abbiamo fatto monitoraggi su aliquote di cellule mantenute nel loro terreno di coltura molto concentrate e, quando necessario, abbiamo effettuato progressive diluizioni, in modo da trovare quella concentrazione ottimale che permettesse al sistema di poter seguire correttamente tutte le traiettorie cellulari.

I prelievi di *D. salina* erano eseguiti il giorno stesso dell'esperimento, in modo da avere un controllo con velocità cellulare piuttosto elevata e poter rilevare senza troppe difficoltà eventuali effetti del peptide sul comportamento motorio delle cellule.

Da un campione di cellule mantenuto nel proprio mezzo di coltura erano prelevate, di volta in volta, due aliquote a cui venivano aggiunte, rispettivamente, una quantità di PBS, da utilizzare come controllo, e una identica quantità di $\beta A_{(1-40)}$ in forma monomerica/oligomerica o fibrillare. Esperimenti preliminari, effettuati con quantità crescenti di PBS, hanno confermato che *D. salina* tollera bene questo tampone.

2.1. Effetti di βA in forma fibrillare

Abbiamo effettuato saggi dose-effetto del peptide βA sotto forma di fibrille mature su cellule di *D. salina* prelevate la mattina stessa dell'esperimento.

Sono state utilizzate concentrazioni crescenti di βA in PBS e ogni volta è stato monitorato contemporaneamente il controllo di cellule con una stessa quantità di PBS da solo. Il monitoraggio è stato eseguito ogni mezz'ora per le prime 2 ore, per osservare eventuali rapidi cambiamenti del comportamento motorio delle cellule, poi ogni ora ed il giorno successivo è stata eseguita una nuova misura per valutare gli effetti a lungo termine.

Le prime misure sono state effettuate con 50 μl di βA fibrillare sciolto in PBS, aggiunto ad una sospensione di 900 μl di cellule e, ugualmente, è stato fatto per il controllo. La concentrazione di βA è scesa da 150 μM iniziale a 7.5 μM .

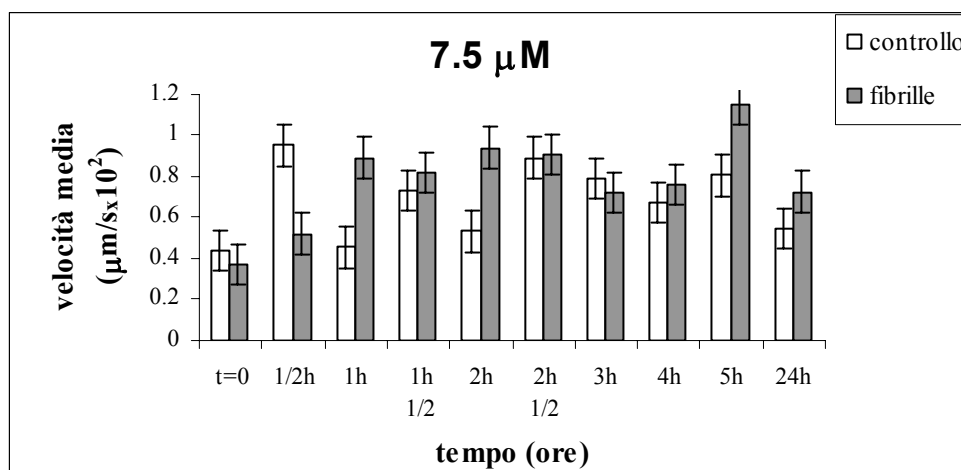


Fig. 37 Effetto di βA 7.5 μM , sotto forma di fibrille, sulla velocità di *D. salina*.

A concentrazioni così basse di peptide, il comportamento motorio di *D. salina* non sembra subire effetti significativi.

Abbiamo, quindi, aumentato la concentrazione del peptide incubato con le cellule a 15 μM

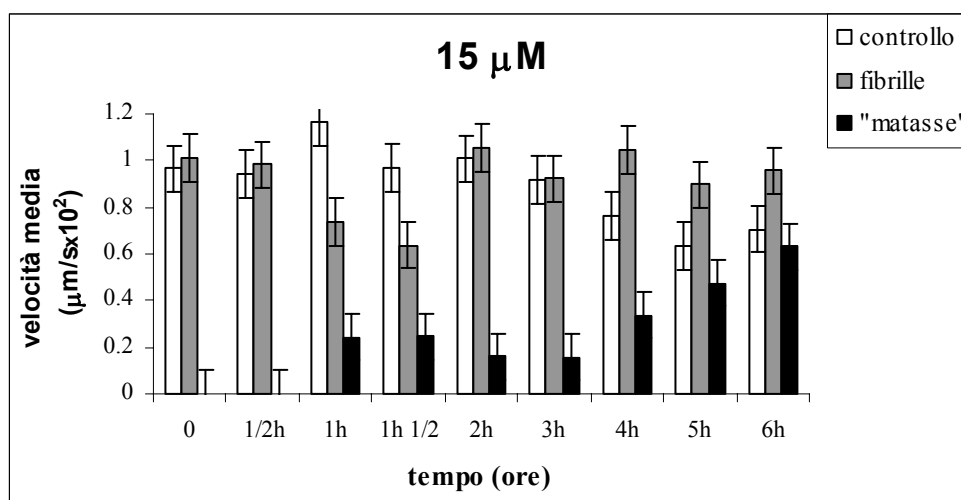


Fig. 38 Effetto di βA 15 μM , sotto forma di fibrille, sulla velocità di *D. salina*.

Come si vede dagli istogrammi nel grafico in Fig. 38, le cellule non sembrano aver risentito particolarmente della presenza del peptide e, anche dopo 24 ore, le velocità medie delle popolazioni di controllo e in presenza di fibrille sono quasi paragonabili.

Dalle immagini girate in tempo reale si nota però che, già dopo 1 ora di incubazione con le fibrille, iniziano a formarsi nel mezzo di coltura dei grossi aggregati, simili a “matasse”, al cui interno molte cellule rimangono intrappolate. Come visibile in grafico, il monitoraggio delle “matasse” dà risultati molto diversi rispetto a quello delle cellule in grado di muoversi liberamente, le quali hanno ancora velocità paragonabili al controllo. Si può quindi ipotizzare che, pur non conoscendo la natura di questi aggregati, il βA in rapporto 1:10 non sia dannoso per le singole cellule poichè quelle che riescono a sfuggire all'intrappolamento si muovono piuttosto bene.

Abbiamo quindi ripetuto gli esperimenti con concentrazioni maggiori di peptide, di 30 μM e di 50 μM . Di seguito, vengono riportati i risultati di misure effettuate cercando di monitorare solo cellule libere.

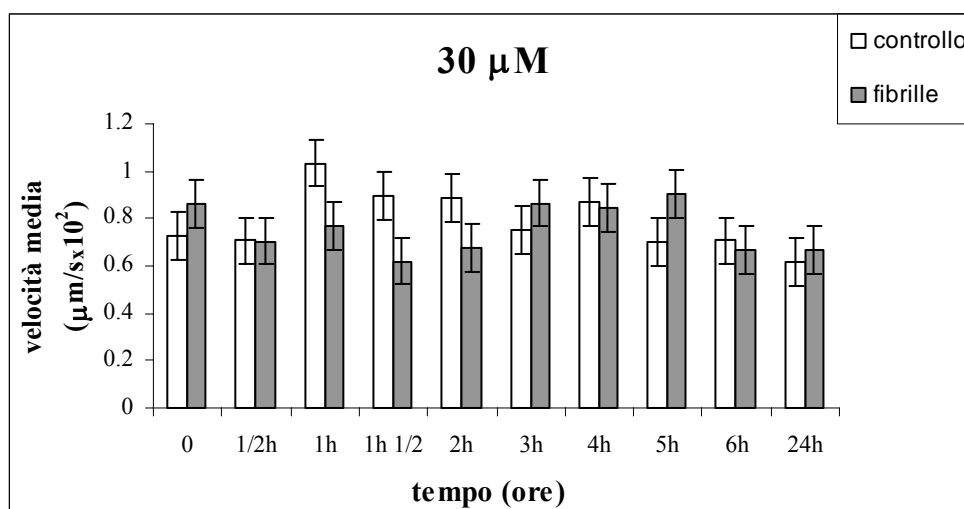


Fig. 39 Effetto di βA 30 μM, sotto forma di fibrille, sulla velocità di *D. salina*.

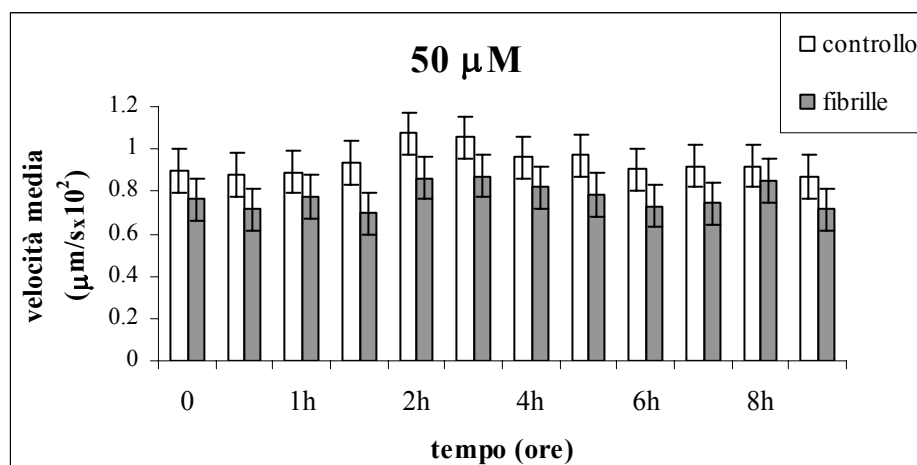


Fig. 40 Effetto di βA 50 μM, sotto forma di fibrille, sulla velocità di *D. salina*.

Ad entrambe le concentrazioni, le cellule incubate col peptide βA mantengono velocità piuttosto alte e costanti per tutta la durata dell'esperimento anche se all'aumentare della concentrazione del peptide aumenta la presenza delle "matasse" e, di conseguenza, il numero di cellule "sequestrate".

Abbiamo, infine, condotto l'esperimento incubando 500 μl di cellule e 500 μl di fibrille (concentrazione finale di βA=75 μM).

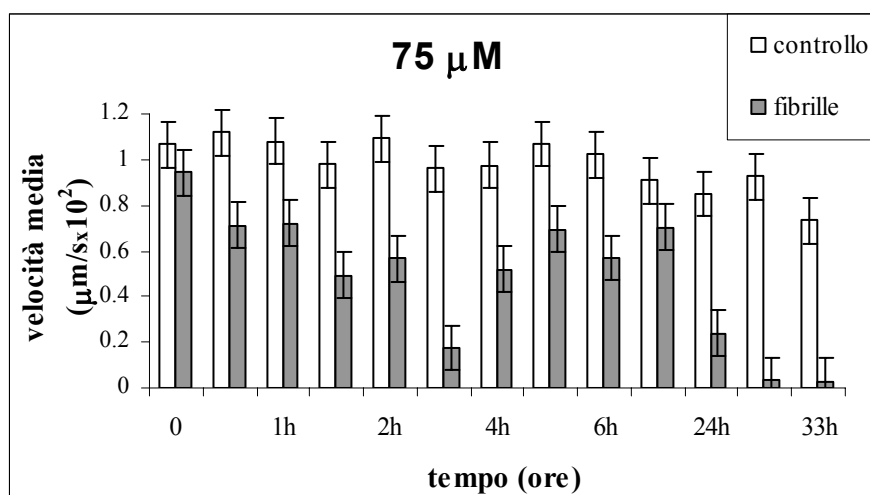


Fig. 41 Effetto di βA 75 μM , sotto forma di fibrille, sulla velocità di *D. salina*.

In questo caso il comportamento motorio di *Dunaliella* è influenzato in modo significativo dal peptide βA .

Questi dati indicano che le fibrille mature del βA inducono nelle colture di *D. salina* la formazione di aggregati extracellulari che sembrano aumentare in numero e dimensioni, all'aumentare della concentrazione del peptide e che, almeno a basse dosi, sembrano più un impedimento “fisico” al movimento delle cellule piuttosto che essere causa di veri e propri danni a livello cellulare; le cellule che riescono a “sfuggire” non sembrano modificare in modo rilevante il loro comportamento motorio. Alla concentrazione di 75 μM , invece, anche le cellule libere hanno una velocità media significativamente più bassa di quella del controllo e ciò può indicare un effetto diretto del peptide βA sul microorganismo.

2.2. Effetti di βA in forma monomerica.

I primi esperimenti sono stati condotti con un rapporto 1:5 tra il volume di βA /PBS (e di PBS nel controllo) e il volume di *D. salina* nel suo terreno, cioè ad 800 μl di alghe presenti nel loro terreno abbiamo aggiunto, rispettivamente, 200 μl di PBS e 200 μl di βA in forma monomerica, ottenendo quindi due campioni da 1 ml ciascuno. Il peptide aveva una concentrazione iniziale di 150 μM che, dopo la diluizione, è scesa a 30 μM .

Come già discusso precedentemente, è bene tenere presente che la definizione di "monomero" è comprensiva di tutte le possibili forme di pre-aggregati oligomerici di dimensioni indefinite presenti nel campione iniziale e difficilmente eliminabili, essendo il peptide βA una molecola estremamente instabile.

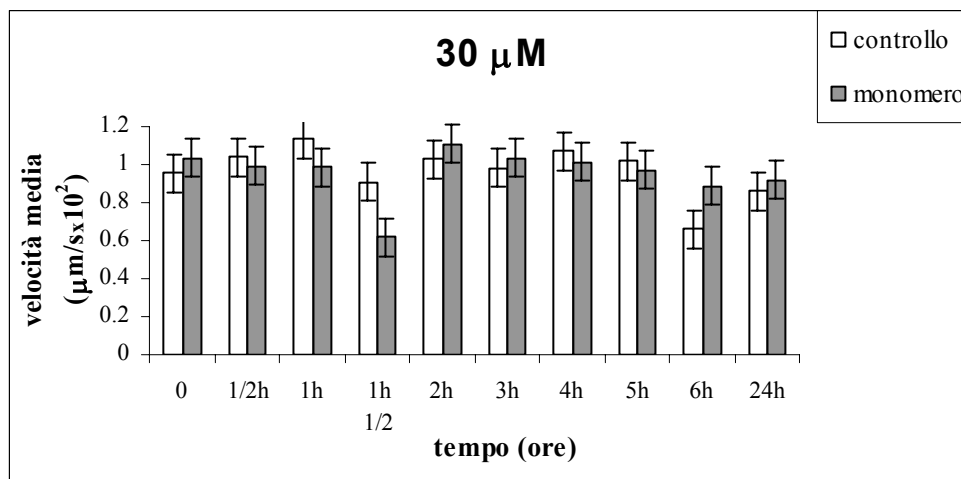


Fig. 42 Effetto di βA 30 μM , sotto forma di monomero, sulla velocità di *D. salina*.

Come osservabile dal grafico, l'effetto del monomero a queste concentrazioni non sembra apprezzabile; i lievi decrementi osservabili sono dovuti probabilmente ad una variabilità intrinseca al sistema. Anche dopo 24h, il monomero a questa concentrazione non sembra influenzare il comportamento motorio dei microorganismi.

Siamo quindi passati ad una concentrazione finale del peptide di 50 μM .

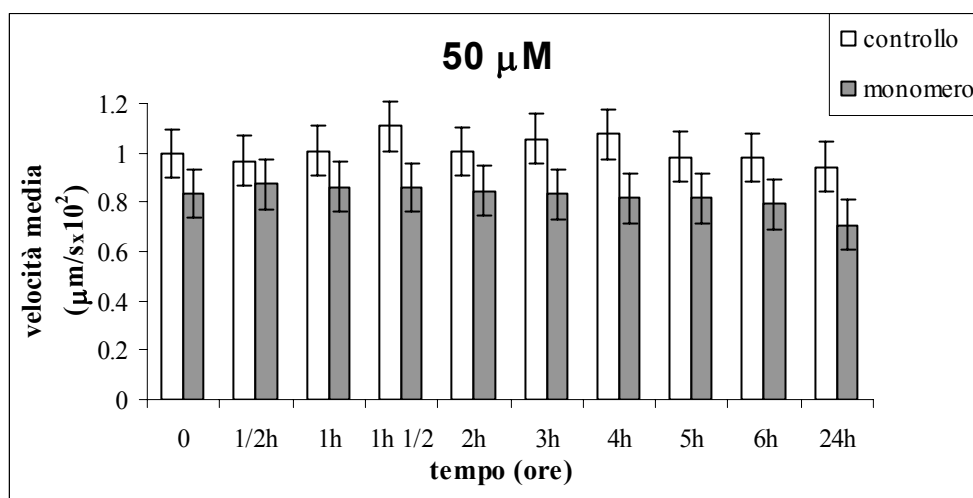


Fig. 43 Effetto di βA 50 μM, sotto forma di monomero, sulla velocità di *D. salina*.

Anche in questo caso non si osservano particolari effetti del monomero sulla velocità delle cellule a parte un leggero ma costante decremento.

Infine, abbiamo utilizzato un rapporto 1:2, cioè a 500 μl di *D. salina* sono stati aggiunti, rispettivamente, 500 μl di PBS e 500 μl di monomero. In questo caso, la concentrazione iniziale del peptide è scesa da 150 μM a 75 μM.

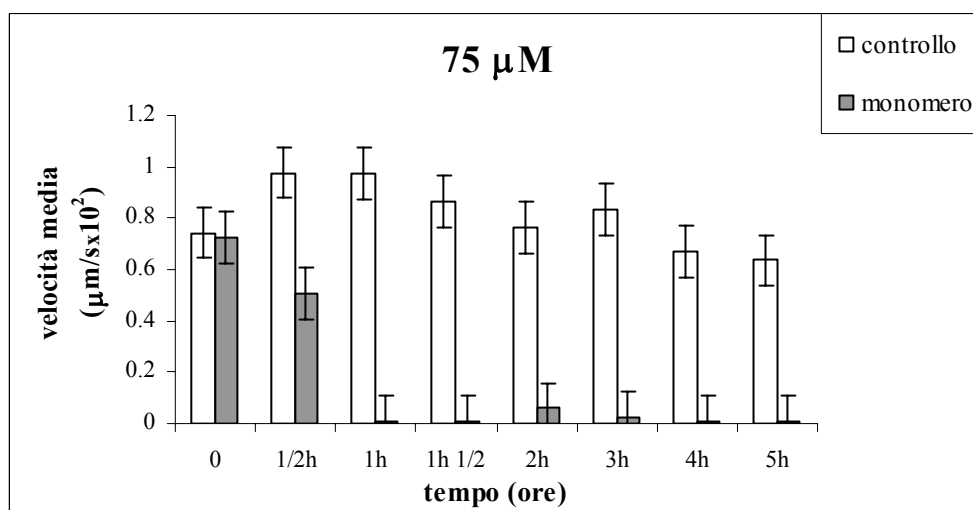


Fig. 44 Effetto di βA 75 μM, sotto forma di monomero, sulla velocità di *D. salina*.

In questa condizione, eccetto a t_0 dove la velocità iniziale delle cellule incubate col peptide è praticamente uguale a quella del controllo, la velocità media della popolazione cellulare diminuisce in modo significativo già dopo 30 minuti, per poi ridursi drasticamente a valori prossimi a zero per tutta la successiva durata dell'esperimento.

Dai filmati che abbiamo realizzato, possiamo notare che, già dopo 30 minuti, le cellule iniziano a roteare su se stesse (fanno "tumbling"), segno di una certa "sofferenza" e si nota ancora, come nel caso delle fibrille, la presenza di "matasse" viscosi che intrappolano le cellule. Queste "matasse" aumentano man mano che l'esperimento procede nel tempo ed è sempre più difficile prelevare aliquote "pulite".

2.3. Effetti di βA in presenza di ipericina

Vista la capacità dell'ipericina di inibire la formazione delle fibrille amiloidi, ci è sembrato opportuno condurre gli esperimenti di citotossicità del peptide βA su *D. salina* in presenza di ipericina, per valutare un suo potenziale effetto "protettivo" nei confronti dei microorganismi.

Essendo una sostanza fortemente fotosensibilizzante, gli esperimenti non potevano essere condotti alla luce poichè le cellule andavano rapidamente incontro a morte, per rottura della loro membrana cellulare, causata dalle specie reattive dell'ossigeno prodotte dall'azione fotodinamica del pigmento. Quindi, abbiamo posto sul microscopio un filtro che taglia la luce visibile, facendo passare solo l'infrarosso e il laboratorio in cui abbiamo condotto gli esperimenti è stato mantenuto al buio per tutta la durata dell'esperimento.

Tramite esperimenti preliminari di controllo ci siamo assicurati che l'ipericina non potesse influire negativamente sul movimento delle cellule.

Poichè, dai precedenti risultati, avevamo osservato effetti significativi del peptide ad una concentrazione di 75 μM , per entrambe le forme di βA monomerica e fibrillare, gli esperimenti con l'ipericina sono stati effettuati utilizzando il βA a questa concentrazione. Pertanto, gli esperimenti sono stati condotti su campioni costituiti da 500 μl di *D. salina* nel suo terreno piú 500 μl di PBS per il campione di controllo e 500 μl di βA +Hyp in PBS all'inizio (t_0 +ipericina) e alla fine della cinetica ($t=5\text{ore}$ +ipericina).

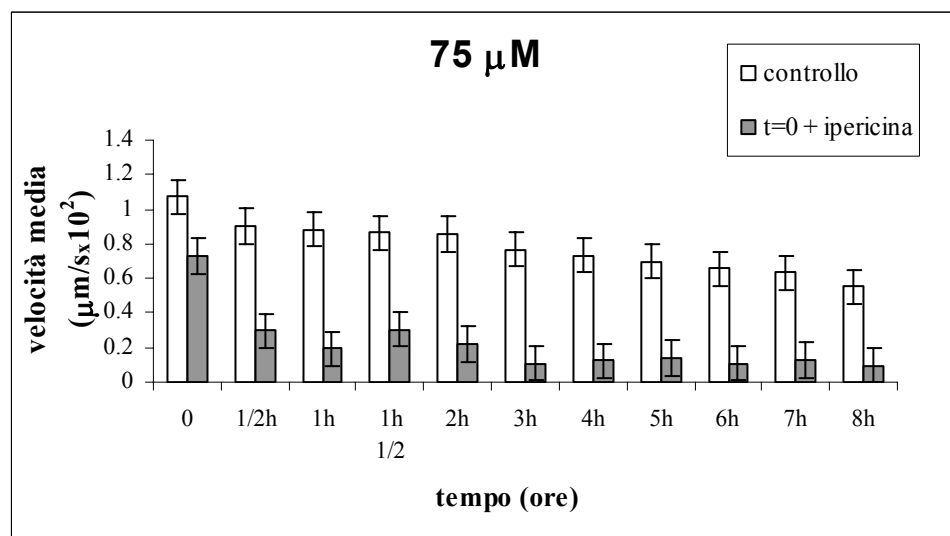


Fig. 45 Effetto di βA (75 μM)+Hyp (5×10^{-6} M), prelevati all'inizio della cinetica di aggregazione, sulla velocità di *D. salina*.

Nello stesso giorno in cui veniva condotta la cinetica di aggregazione del peptide βA in presenza di Hyp o ne veniva monitorato l'andamento della fluorescenza nel tempo, veniva prelevata al tempo t_0 , quindi all'inizio della misura spettroscopica, una aliquota di 500 μl di βA +Hyp e subito incubata con *D. salina*.

In fig. 45, è possibile notare un significativo decremento della velocità media della popolazione sin dall'inizio dell'esperimento, che si assesta su valori molto bassi e costanti anche in tutte le successive misure. In questo caso, però, a differenza di quanto accade in presenza del monomero da solo, l'effetto non sembra essere letale, ossia le cellule

diminuiscono notevolmente la loro velocità di nuoto e sembrano "disorientate" ma per la maggior parte sono vive.

Sebbene in misura minore e non in tutti gli esperimenti, si è comunque ritrovata spesso la presenza di "matasse", molto simili a quelle viste col peptide da solo.

Abbiamo quindi effettuato esperimenti analoghi prelevando una aliquota di $\beta A + Hyp$ a fine cinetica (dopo 5 ore).

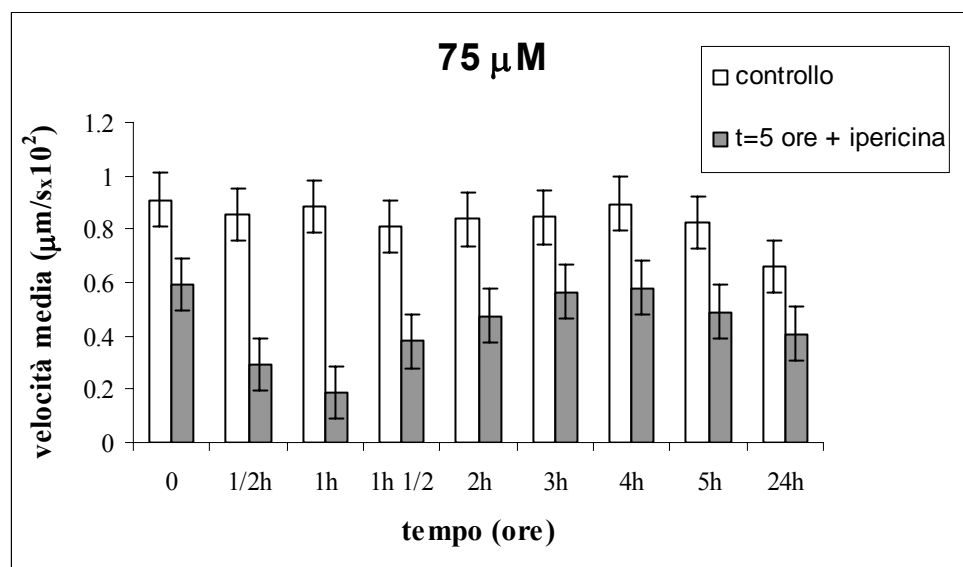


Fig. 46 Effetto di βA ($75 \mu\text{M}$)+Hyp ($5 \times 10^{-6} \text{ M}$), prelevati alla fine della cinetica di aggregazione, sulla velocità di *D. salina*.

Come riportato in fig. 46, l'effetto sembra essere piuttosto netto nelle prime fasi dell'incubazione, con un forte senso di disorientamento e "tumbling" ma entro le due ore, le cellule riacquistano una buona velocità e l'effetto di "tumbling" sembra diventare trascurabile.

Dai risultati ottenuti, possiamo dire che il peptide βA non sembra provocare effetti significativi alle cellule di *D. salina* quando presente a concentrazioni relativamente basse mentre, a concentrazione $75 \mu\text{M}$, si osserva un effetto significativo del βA in entrambe le forme, sia "monomero" che fibrilla.

E' importante ribadire il fatto che questi esperimenti, a differenza delle cinetiche di aggregazione, sono stati condotti a temperatura ambiente, il che implica dei tempi molto lunghi perchè il processo di fibrillogenesi si completi; essendo βA , però, una molecola instabile, può tendere nel corso degli esperimenti a formare dei piccoli aggregati, quindi il termine monomero è comprensivo anche di queste forme.

βA in forma monomerică, a concentrazione 75 μM , determina i più profondi cambiamenti nel pattern motorio di *D. salina* e, dai filmati girati in tempo reale, si osserva che le cellule non solo rallentano drasticamente il loro moto già poco tempo dopo l'incubazione col peptide, ma la maggior parte di esse muore entro breve tempo.

Gli effetti del peptide βA 75 μM in forma fibrillare sono piuttosto variabili, anche se non così drastici come quelli provocati dal "monomero". Sebbene la velocità tenda anche in queste condizioni a diminuire, si osserva quasi sempre una ripresa della motilità cellulare e un nuovo aumento della velocità; questo implica, come visibile dai filmati, che le fibrille non inducono la morte delle cellule, ma uno stress temporaneo più o meno forte.

Gli effetti del peptide con l'ipericina sono piuttosto interessanti. Nel caso in cui la soluzione Hyp- βA venga incubata subito con le cellule, si osserva una diminuzione significativa della velocità, che rimane molto bassa e pressochè costante per tutta la durata dell'esperimento. Questo ci porta ad ipotizzare che l'effetto protettivo dell'ipericina in queste condizioni non sia molto efficace. Probabilmente, ciò è dovuto al fatto che molti complessi Hyp- βA non sono ancora del tutto formati, come indicato anche dai bassi valori di fluorescenza dell'Hyp a t_0 , quindi il peptide non ancora "sequestrato" è in grado di esercitare un danno sulle cellule.

Invece, l'incubazione di *D. salina* con Hyp- βA prelevata a fine cinetica, quando molti complessi Hyp- βA si presuppone si siano formati, provoca una diminuzione solo transiente nella velocità delle cellule, come indicato in figura 46. Infatti, nella maggior parte di

queste misure, si osserva un recupero della velocità cellulare dopo circa due ore dall'inizio dell'esperimento e spesso tale velocità ritorna a valori paragonabili a quelli iniziali. Pertanto, l'effetto protettivo dell'ipericina sembra essere efficace in queste condizioni, perchè molti peptidi sono, almeno in teoria, "sequestrati" e si osserva solo un effetto temporaneo.

Nella figura riportata sotto, sono riassunti gli effetti del β A nelle diverse condizioni sperimentali sulla velocità media normalizzata con quella del proprio controllo.

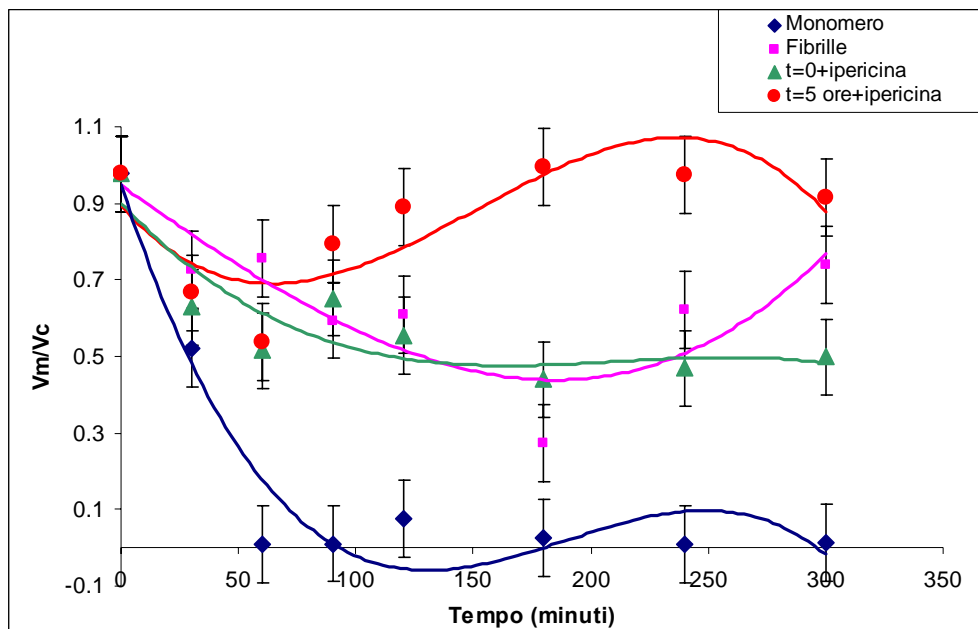


Fig. 47 Effetti del β A ($75 \mu\text{M}$) sulla velocità media di *D. salina* normalizzata a quella del proprio controllo (V_m/V_c) con e senza Hyp ($5 \times 10^{-6} \text{ M}$)

3. Effetti del peptide β -amiloide₍₁₋₄₀₎ sul ciliato *Blepharisma japonicum*.

Per avere ulteriori informazioni sui possibili effetti del peptide β -amiloide(1-40) sui protisti, abbiamo deciso di effettuare delle misure a scopo preliminare sul ciliato *B. japonicum*, analizzandone il comportamento motorio con il sistema di analisi di immagine Matrox Image System.

I nostri esperimenti sono stati eseguiti su campioni di cellule in SMB come controllo e in presenza del peptide β -amiloide(1-40) in forma di fibrille e in forma monomerica.

L'utilizzo di un tampone diverso dal PBS è stato imposto dal fatto che il PBS, avendo una concentrazione di sali piuttosto alta, non veniva tollerato bene da *B. japonicum*. Infatti, le cellule passavano dal tipico colore rosso al bianco, la forma da tondeggiante diveniva allungata con una “coda”, che indicava l’estrusione dei granuli, e si notavano movimenti di rotazione su sè stesse (tumbling).

Anche in questo caso, prima di ogni esperimento sono state effettuate misure di prova su aliquote di cellule in SMB opportunamente diluite per individuare la concentrazione di microorganismi ottimale per l'analisi. Una volta determinata, un'aliquota di questa sospensione cellulare veniva posta nella celletta di analisi e controllata per 30 minuti, dopodichè veniva aggiunto il peptide nella forma monomerica o fibrillare

La misura di controllo era stata effettuata allo stesso modo, ma dopo mezz’ora veniva aggiunto SMB invece del peptide.

In tutti e tre i casi il volume finale del campione all’interno della celletta era lo stesso, aggiungendo, rispettivamente, le stesse dosi di SMB, e β -amiloide in forma monomerica o di fibrille. I peptidi avevano una concentrazione finale di 15 μ M.

I dati ottenuti nei nostri esperimenti sono riportati nei grafici delle figure seguenti:.

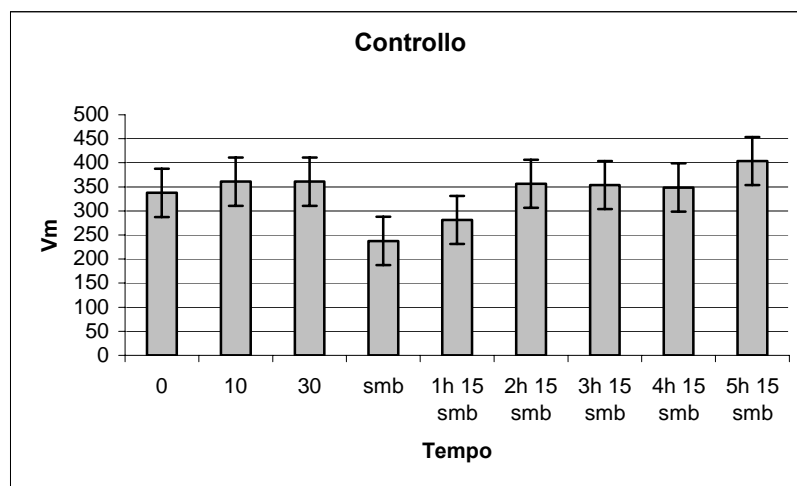


Fig. 48 Variazioni nel tempo delle velocità medie ($\mu\text{m}/\text{sec}$) di *B. japonicum* nella soluzione di controllo SMB.

L'istogramma di Fig. 48 riporta le misure di velocità delle cellule di controllo, misurate in funzione del tempo. Queste variano da 240 a 400 $\mu\text{m}/\text{s}$ con un valor medio di 340 $\mu\text{m}/\text{s}$. E' importante osservare che l'aggiunta di SMB determina una leggera diminuzione della velocità che, comunque, nell'arco di 2 ore ritorna ai valori iniziali.

Dagli esperimenti condotti aggiungendo a *B. japonicum* le fibrille, si nota una diminuzione transiente della velocità media del tutto simile a quella osservata nel controllo dopo l'aggiunta di SMB (Fig. 49).

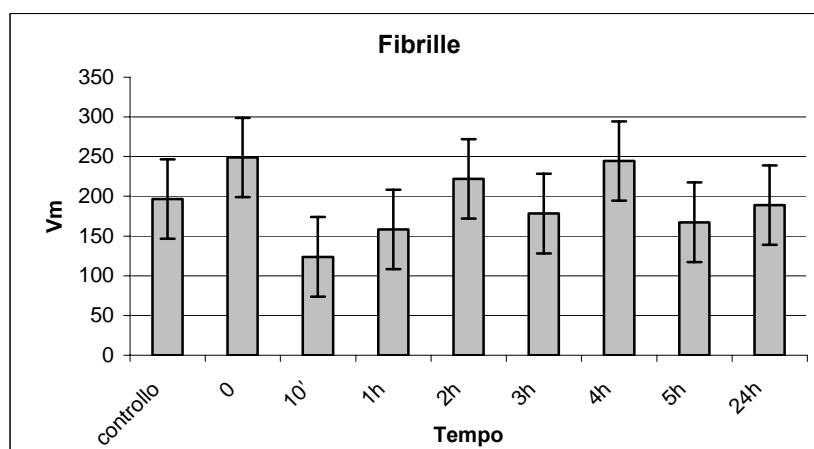


Fig 49. Variazioni nel tempo delle velocità medie ($\mu\text{m}/\text{sec}$) di *B. japonicum* in presenza di fibrille del peptide $\beta\text{A}(1-40)$ sciolte in SMB.

In presenza di monomero, invece, le cellule subiscono un forte abbassamento della velocità e anche a distanza di sei ore non si osserva alcun recupero (Fig. 50).

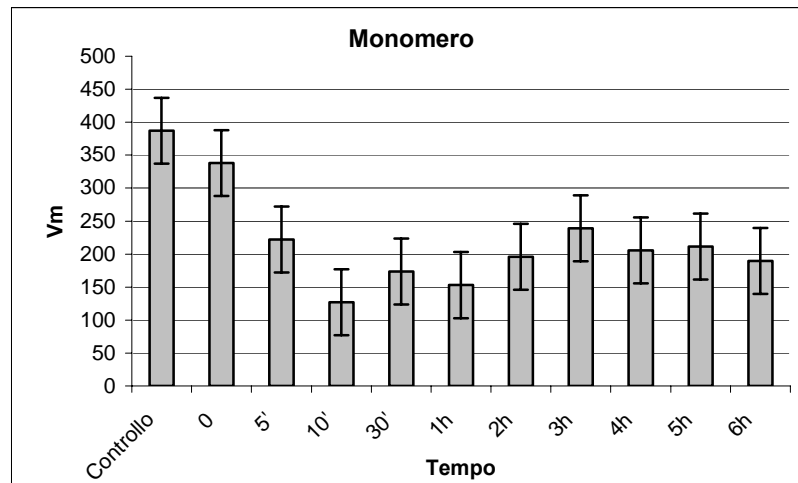


Fig. 50 Variazioni nel tempo delle velocità medie ($\mu\text{m}/\text{sec}$) di *B. japonicum* in presenza di monomeri del peptide βA (1-40) sciolti in SMB.

È bene precisare che questi dati, essendo il risultato di uno studio preliminare, non possono essere assunti come definitivi. È comunque interessante notare che, nelle nostre condizioni sperimentali, le fibrille non sembrano perturbare la velocità delle cellule né tanto meno provocarne la morte. Per quanto riguarda il monomero, invece, sembra che abbia un effetto tossico su *B. japonicum* e sono in corso ulteriori ricerche per chiarire questo risultato.

Conclusioni

I risultati ottenuti con *D. salina* e con *B. japonicum* (anche se preliminari) sembrano confermare che la citotossicità non sia dovuta prevalentemente alle fibrille mature, quanto piuttosto a forme molecolari prefibrillari.

Infatti, l'effetto del "monomero" è sostanzialmente letale e si manifesta precocemente dopo l'incubazione del peptide con le cellule. Le fibrille, invece, sembrano avere un effetto subletale e transitorio, con riduzione significativa della velocità ed alterazione del pattern motorio nelle prime ore dell'esperimento (di solito le prime due ore), ma con un recupero più o meno parziale nelle ore successive.

E', inoltre, interessante notare nel caso di *D. salina* come il peptide, in entrambe le forme monomeriche e fibrillare, abbia effetto solo a concentrazioni al di sopra di un "valore-soglia": a concentrazioni di βA minori di $75 \mu M$, non sono visibili effetti significativi sul comportamento motorio delle cellule mentre per concentrazioni maggiori di $75 \mu M$ si osservano sempre effetti più o meno importanti.

Per quanto riguarda l'ipericina, questa sembra in grado non solo di inibire la formazione delle fibrille, ma anche di dar luogo a complessi peptide-ipericina "stabilizzati" e con minore citotossicità. Negli esperimenti nei quali Hyp è stata appena aggiunta al peptide βA ed entrambi sono stati subito incubati con *D. salina*, la formazione dei complessi ipericina-peptide non è completa e ci sarà, quindi, un'alta concentrazione di peptide "libero" in grado di danneggiare le cellule. Di contro, nei campioni di *D. salina* incubati con aliquote di Hyp- βA prelevate a fine cinetica (condotta alla temperatura costante di $60 \text{ }^\circ C$), quando il complesso peptide-ipericina è completamente e stabilmente formato, si osserva solo una leggera e transitoria diminuzione della velocità media delle cellule con un recupero più o meno significativo nelle ultime fasi dell'esperimento.

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto la Dott. Antonella Sgarbossa, che mi ha permesso di svolgere questo internato di Tesi e, oltre ad avermi fornito un aiuto valido e costante, ha reso le condizioni di lavoro più che piacevoli.

Ringrazio poi tutto il Personale dell'Istituto di Biofisica del CNR di Pisa per avermi consentito di svolgere l'intero lavoro in un ambiente amichevole e collaborativo; in particolare, Giovanni Checcucci, Francesco Ghetti, Giuliano Colombetti, Sabina Lucia e Nicola Messina per la loro gentile e costante disponibilità.

Desidero, inoltre, ringraziare Alessandro Puntoni per la risoluzione dei problemi relativi al computer da me utilizzato, Alberto Pietrangeli, Laura Barsanti e Vincenzo Passarelli per avermi fornito le colture dei microorganismi.

Un ringraziamento sentito al Prof. Nicola Di Bari e al Dott. Rino Pescitelli del Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale dell'Università degli Studi di Pisa per averci permesso di integrare le nostre misure di dicroismo circolare con quelle da loro effettuate e per i preziosi aiuti forniti nell'interpretazione dei risultati.

Ringrazio i miei genitori, mia sorella Ilenia e tutte le persone che mi hanno accompagnato in questi anni di Università, soprattutto Roberta Tartarini, Miriam Petri, Margherita Ripepe, Elisabetta Camellini, Samantha Sbrana, Moira Trivella, Alessandro Cerri e Laura Taccini, il loro piccolo gioiello Leonardo, Michele Barbieri, Mario Lanza, Lorenza Capantini ed infine Irene e Rosalba.

Un ringraziamento particolare a Daniele Cassarri per il supporto morale e per tutti consigli relativi sia allo svolgimento della Tesi che "extra-università".

Ringrazio, infine, con tutto il cuore Alessio Lucchesi, per essermi stato accanto, in questi ultimi cinque anni, sempre con forte entusiasmo e con amore. Grazie per aver creduto in me in ogni momento.

Bibliografia

Adl S. M., Simpson A. G. B., Farmer M. A., Andersen R. A., Anderson, Barta J. R., Bowser S. S., Brugerolle G., Fensome R. A., Fredericq S., James T. Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C. E., Lewis L. A., Lodge J., Lynn D. H., Mann D. G., McCourt R. M., Mendoza L., Moestrup Ø., Mozley-Standridge S. E., Nerad T. A., Shearer C. A., Smirnov A. V., Spiegel F. W., Taylor M. F. J. R. (2005), *The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists*, **The Journal of eukaryotic microbiology**, **52**: 399-451.

Altschul S. (1991), *Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective*, **Journal of Molecular Biology**, **219(3)**: 555-65.

Arispe N., Rojas E., Pollard H.B. (1993), *Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum*, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **90(2)**: 567-71.

Balbach J.J., Ishii Y., Antzutkin O.N., Leapman R.D., Rizzo N.W., Dyda F., Reed J., Tycko R. (2000), *Amyloid fibril formation by A beta 16-22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR*, **Biochemistry**, **39**: 13748-13759.

Bitan G., Kirkitadze M.D., Lomakin A., Vollers S.S., Benedek G.B., Teplow D.B. (2003), *Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways*, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **100(1)**: 330-5.

Bitan G., Vollers S.S., Teplow D.B. (2003), *Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid beta-protein oligomerization.*, **Journal of Biological Chemistry**, **278(37)**: 34882-9

Borowitska M.A., Borowitska L.J. (1988), *Dunaliella*, **Microalgal biotechnology**, Cambridge University Press.

Bucciantini M., Giannoni E., Chiti F., Baroni F., Formigli L., Zurdo J., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M., Stefani M. (2002), *Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases*, **Nature**, **416(6880)**: 507-11.

Chan S.L., Furukawa K., Mattson M.P. (2002), *Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*, **Neuromolecular medicine**, **2(2)**: 167-96.

Cohen A.S. (1986), *General introduction and a brief history of the amyloid fibril*, in: J. Marrink and M. H. Van Rijswijk, (Editors), **Amyloidosis**, 3–19, Nijhoff, Dordrecht

Colasanti A., Kisslinger A., Liuzzi R., Quarto M., Riccio P., Roberti G., Tramontano D., Villani F. (2000), *Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate*, **Journal of Photochemistry and Photobiology**, **54**: 103-107.

Dahlgren K.N., Manelli A.M., Stine W.B. Jr., Baker L.K., Krafft G.A., LaDu M.J. (2002), *Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability* **Journal of Biological Chemistry**, **277(35)**: 32046-53

Divry P., Florkin M. (1927), *Sur les propriétés optiques de l'amyloïde*, **Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales**, **97**: 1808–1810.

Dobson C.M. (2004), *Experimental investigation of protein folding and misfolding*, **Methods**, **34(1)**: 4-14.

Falkowski P.G., Green R., Kolber Z., (1994), *Light utilization and photoinhibition of photosynthesis in marine phytoplankton*, **Photoinhibition of Photosynthesis**, a cura di Baker N.R., Bowyer J.R., Bioscience Scientific Publisher, UK.

Fezoui Y., Hartley D. M., Harper J. D., Khurana R., Walsh D. M., Condron M. M., Selkoe D. J., Lansbury P. T. Jr., Fink A. L., Teplow D. B. (2000), *An improved method of preparing the amyloid β -protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments*, **Amyloid: International Journal of Experimental Clinical Investigation**, **7**: 166-178.

Findeis M.A., Musso G.M., Arico-Muendel C.C., Benjamin H.W., Hundal A.M., Lee J.J., Chin J., Kelley M., Wakefield J., Hayward N.J., Molineaux S.M. (1999), *Modified-peptide inhibitors amyloid β -protein polymerization*, **Biochemistry**, **38**: 6791-6800.

Forloni G., Colombo L., Girola., Tagliavini F., Salmona M., (2001), *Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro*, **Federation of European Biochemical Societies**, **487**: 404-407.

Gabuzda D., Busciglio J., Chen L.B., Matsudaira P., Yankner B.A.(1994), *Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative*, **Journal of Biological Chemistry**, **269(18)**: 13623-8.

Gazit E. (2002), *A possible role for π -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils*, **Federation of American Societies for Experimental Biology**, **16**: 77-83.

Gazit E. (2005), *Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition. Model short peptides as a key research tool*, **The FEBS journal**, **272(23)**: 5971-8.

Glennner G.G., Wong C.W. (1984), *Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein*, **Biochemical and biophysical research communications**, **122(3)**: 1131-5.

Goldmann, J. (1847), *Ueber die Verdickung der vegetabilischen Zellmembrans umsd der Spiralfasens*, **Bot. Ztg**, **5**: 121.

Goldsbury C.S., Wirtz S., Muller S.A., Sunderji S., Wicki P., Aebi U., Frey P. (2000), *Studies on the in vitro assembly of A β 1-40: implications for the search for A β beta fibril formation inhibitors*, **Journal of Structural Biology**, **130**: 217-231.

Häder D.P. (1997), *Gravitaxis in Flagellates*, **The Biological Bulletin**, **192**: 131-133.

Häder D.P., Lebert M., Richter P., Ntefidou M. (2003), *Gravitaxis and graviperception in flagellates*, **Advances in space research: the official journal of the Committee on Space Research**, **31(10)**: 2181-6.

Hardy J. (1997), *Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease*, **Trends in neurosciences**, **20(4)**:154-9

Hardy J.A., Higgins G.A. (1992), *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. **Science**, **256(5054)**: 184-5.

Hardy J., Selkoe D.J. (2002), *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*, **Science**, **297 (5580)**: 353-6.

Hartley D.M., Walsh D.M., Ye C.P., Diehl T., Vasquez S., Vassilev P.M., Teplow D.B., Selkoe D.J. (1999), *Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons*, **Journal of Neuroscience**, **19(20)**: 8876-84.

Hoshaw R.W., Maluf Y. (1981), *Ultrastructure of the green flagellate Dunaliella terctiolecta with comparative notes on three other species*, **Phycologia**, **20**: 199-206.

Jarrett J.T., Berger E.P., Lansbury P.T. Jr. (1993), *The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*, **Biochemistry**, **32**: 4693-4697.

Jones T., Galloway R. A. (1978), *Effect of light quality and intensity on glycerol content in Dunaliella tertiolecta (Chlorophyceae) and the relationship to cell growth/osmoregulation*, **Journal of Phycology**, **15**: 101-106.

Katz A., Waridel P., Shevchenko A., Pick U.(2007), *Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga Dunaliella salina as revealed by Blue-Native gel electrophoresis and nanoLC-MS/MS analysis*. **Molecular and Cellular Proteomics**, **14**: [Epub ahead of print].

Katzman R., Terry R., De Teresa R., Brown T., Davies P., Fuld P., Renbing X., Peck A. (1988), *Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques*, **Annals Neurology**, **23**: 138-144.

Kawahara M., Kuroda Y. (2000), *Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis*, **Brain Research Bulletin**, **53**: 389-97.

Kayed R., Head E., Thompson J.L., McIntire T.M., Milton S.C., Cotman C.W., Glabe C.G. (2003), *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis*, **Science**, **300**: 486-489.

Kelenyi G. (1967), *Thioflavin S fluorescent and Congo red anisotropic stainings in the histologic demonstration of amyloid*, **Acta neuropathologica (Berl)**, **7(4)**: 336-48.

Kelly J.W. (1998), *The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways*, **Current opinion in structural biology**, **8(1)**: 101-6

Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Carter S.A., Krishna V., Grover R.K., Roy R., Singh S. (2005), *Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils*, **Journal of Structural Biology**, **151(3)**: 229-38

Kim W., Hecht M.H.(2005), *Sequence determinants of enhanced amyloidogenicity of Alzheimer A β 42 peptide relative to A β 40*, **Journal of Biological Chemistry**; **280(41)**: 35069-76.

Kirkitadze M.D., Condron M.M., Teplov D.B. (2001), *Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid β -protein fibrillogenesis*, **Journal of Molecular Biology**, **312**: 1103-1119.

Kirkitadze M.D., Kowalska A.(2005), *Molecular mechanisms initiating amyloid beta-fibril formation in Alzheimer's disease*, **Acta biochimica Polonica**, **52(2)**: 417-23.

Klein W.L., Krafft G.A., Finch C.E. (2001), *Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?*, **Trends in neurosciences**, **24(4)**: 219-24.

Kourie J.I., Henry C.L. (2002), *Ion channel formation and membrane-linked pathologies of misfolded hydrophobic proteins: the role of dangerous unchaperoned molecules*, **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, **29**: 741-753.

Lavie G., Valentine F., Levin B., Mazur Y., Gallo G., Lavie D., Weiner D., Meruelo D. (1989), *Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin*, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **86**: 5963-5967.

Lenci F., Ghetti F., Pill-Soon Song (2001), **Photomovement** (Eds. Hader D.P. and Lebert M.)

LeVine H. (1997), *Stopped-flow kinetics reveal multiple phases of Thioflavin T binding to Alzheimer $\beta(1-40)$ amyloid fibrils*, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **342**: 306-316.

LeVine H. (1999), *Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with Thioflavine T*, **Methods Enzimology**, **309**: 274-284.

Lin H., Bhatia R., Lal R. (2002), *Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology*, **Federation of American Societies for Experimental Biology**, **15**: 2433-2444.

Lomakin A., Chung D.S., Benedek G.B., Kirschner D.A., Teplow D.B.(1996), *On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants*, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **93(3)**: 1125-9.

Lomakin A., Teplow D.B., Kirschner D.A., Benedek G.B., (1997), *Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid beta-protein*, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **94(15)**: 7942-7.

Luksiene Z., de Witte PA.(2003), *Hypericin as novel and promising photodynamic therapy tool: studies on intracellular accumulation capacity and growth inhibition efficiency*, **Medicina (Kaunas)**, **39(7)**: 677-82.

Luo Y.Q., Hirashima N., Li Y.H., Alkon D.L., Sunderland T., Etcheberrigaray R., Wolozin B. (1995), *Physiological levels of beta-amyloid increase tyrosine phosphorylation and cytosolic calcium*, **Brain Research**, **681**: 65-74.

Luo Y., Sunderland T., Wolozin B.(1996), *Physiologic levels of beta-amyloid activate phosphatidylinositol 3-kinase with the involvement of tyrosine phosphorylation*, **Journal of Neurochemistry**, **67(3)**: 978-87.

Lyubchenko Y.L., Sherman S., Shlyakhtenko L.S., Uversky V.N.(2006), *Nanoimaging for protein misfolding and related diseases*, **Journal of cellular biochemistry**; **99(1)**: 52-70.

Ma H., Lesne S., Kotilinek L., Steidl-Nichols J.V., Sherman M., Younkin L., Younkin S., Forster C., Sergeant N., Delacourte A., Vassar R., Citron M., Kofuji P., Boland L.M., Ashe K.H.(2007), *Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent*

synaptic plasticity, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **104(19)**: 8167-72.

Makin O.S., Atkins E., Sikorski P., Johansson J., Serpell L.C.(2005), *Molecular basis for amyloid fibril formation and stability*, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **102(2)**: 315-20.

Mattson P.M. (1997), *Cellular actions of β -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives*, **Physiological Review**, **77**: 1081-1132.

Mattson P.M. (2004), *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*, **Nature**, **430**: 631-639.

Mattson P.M., Chan S.L. (2003), *Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease*, **Cell Calcium**, **34(4-5)**: 385-97.

Meruelo D., Lavie G., Lavie D. (1988), *Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin*, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **85(14)**: 5230-4.

Miccoli L., Beurdeley-Thomas A., De Pinieux G., Sureau F., Oudard S., Dutrillaux B., Poupon M.F. (1998), *Light-induced photoactivation of hypericin affects the energy metabolism of human glioma cells by inhibiting hexokinase bound to mitochondria*. **Cancer Research**; **58(24)**: 5777-86.

Mucke L., Yu G.Q., McConlogue L., Rockenstein E.M., Abraham C.R., Masliah E.(2000), *Astroglial expression of human alpha(1)-antichymotrypsin enhances alzheimer-like pathology in amyloid protein precursor transgenic mice*, **The American journal of pathology**; **157(6)**: 2003-10.

Muchowski P.J., Wacker J.L. (2005), *Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones* **Nature Review | Neuroscience**, **6**: 11-22.

Murphy R.M. (2002), *Peptide aggregation in neurodegenerative disease*, **Annual review of biomedical engineering**, **4**: 155-74.

Nicolau A., Dias N., Mota M., Lima N. (2001), *Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment*, **Research in microbiology**, **152(7)**: 621-30.

Nilsson M.R. (2004), *Techniques to study amyloid fibril formation in vitro*, **Methods**, **34**: 151-160.

Oddo S., Caccamo A., Kitazawa M., Tseng B.P., LaFerla F.M. (2003), *Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease*, **Neurobiology of aging**, **24(8)**: 1063-70.

Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M. (2004), *Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro*, **Journal of Neuroscience Research**, **75**: 742-750.

Ono K., Yoshiike Y., Takashima A., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M. (2003), *Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease*, **Journal of Neurochemistry**, **87**: 172-181.

Pappolla M., Bozner P., Soto C., Shao H., Robakis N.K., Zagorski M., Frangione B., Ghiso J. (1998), *Inhibition of Alzheimer β -fibrillogenesis by melatonin*, **Journal of Biological Chemistry**, **273**: 7185-7188.

Pike C.J., Burdick D., Walencewicz A.J., Glabe C.G., Cotman C.W. (1993), *Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state*, **Journal of Neuroscience**, **13(4)**: 1676-87.

Pitschke M., Prior R., Haupt M., Riesner D. (1998), *Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy*, **Nature medicine**, **4(7)**: 832-4.

Puchtler H., Sweat F. (1966), *A review of early concepts of amyloid in context with contemporary chemical literature from 1839 to 1859*, **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, **14(2)**:123-34.

Quist A., Doudevski I., Lin H., Azimova R., Ng D., Frangione B., Kagan B., Ghiso J., Lal R.(2005), *Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease*, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **102(30)**: 10427-32.

Ricci N. (1989), *Lezioni di Protozoologia*, **Edizioni Libreria Baroni Pisa**.

Roher A.E., Baudry J., Chaney M.O., Kuo Y.M., Stine W.B., Emmerling M.R. (2000), *Oligomerization and fibril assembly of the amyloid-beta protein*, **Biochimica et Biophysica Acta**, **1502(1)**: 31-43.

Roses A.D. (1997), *A model for susceptibility polymorphisms for complex diseases: apolipoprotein E and Alzheimer disease*, **Neurogenetics**; **1(1)**: 3-11.

Saito K., Elce J.S., Hamos J.E., Nixon R.A.(1993), *Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration*, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **90(7)**: 2628-32.

Seilheimer B., Bohrmann B., Bondolfi L., Muller F., Stuber D., Dobeli H. (1997), *The toxicity of the Alzheimer's beta-amyloid peptide correlates with a distinct fiber morphology*, **Journal of structural biology**, **119(1)**: 59-71.

Selkoe D.J. (2001), *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*, **Physiological Reviews**, **81**: 741-766.

Serpell L.C., Fraser P.E., Sunde M.(1999), *X-ray fiber diffraction of amyloid fibrils*, **Methods in enzymology**, **309**: 526-36

Serpell L.C. (2000), *Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly*, **Biochimica et Biophysica Acta**, **1502(1)**:16-30.

Shoval H., Lichtenberg D., Gazit E.(2007), *The molecular mechanisms of the anti-amyloid effects of phenols*, **Amyloid**, **14(1)**: 73-87..

Silva B.A., Dias A.C., Ferreres F., Malva J.O., Oliveira C.R. (2004), *Neuroprotective effect of *H. perforatum* extracts on β -amyloid-induced neurotoxicity*, **Neurotoxicity Research**, **6**: 119-130.

Sipe J.D., Cohen A.S. (2000), *Review: history of amyloid fibril*, **Journal of Structural Biology**, **130**: 88-98.

Smith B.M., Morrissey P.J., Guenther J.E., Nemson J.A., Harrison M.A., Allen J.F., Melis A. (1990), *Response of the Photosynthetic Apparatus in *Dunaliella salina* (Green Algae) to Irradiance Stress*, **Plant Physiology**, **93(4)**: 1433-1440.

Smith M.A., Perry G. (1997), *The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis*, **Journal of neuropathology and experimental neurology**, **56(2)**: 217.

Soto C. (2001), *Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy*, **FEBS letters**, **498(2-3)**: 204-7.

Stefani M., Dobson C.M. (2003), *Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution*, **Journal of molecular medicine**, **81(11)**: 678-99.

Stefani M. (2004), *Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world*, **Biochimica et Biophysica Acta**, **1739**: 5-25.

Taylor B. M., Sarver R. W., Fici G., Poorman R., S. Lutze B., Molinari A., Kawabe T., Kappenman K., Buhl A., Epps D. (2003), *Spontaneous Aggregation and Cytotoxicity of the β -Amyloid $A\beta_{1-40}$: A Kinetic Model*, **Journal of Protein Chemistry**, **22**: 31-40.

Temussi P. A., Masino L., Pastore A., (2003), *From Alzheimer to Huntington: why is a structural understanding so difficult?*, **The EMBO Journal**, **22(3)**: 355-361.

Terry R.D., Peck A., De Teresa R., Schechter R., Horoupian D.S. (1981), *Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type*, **Annals Neurology**, **10**: 184-192.

Ting J.T., Kelley B.G., Lambert T.J., Cook D.G., Sullivan J.M. (2007), *Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both*

presynaptic and postsynaptic mechanisms, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **104(1)**: 353-8.

Tjernberg L.O., Lilliehook C., Callaway D.J., Naslund J., Hahne S., Thyberg J., Terenius L., Nordstedt C.(1997), *Controlling amyloid beta-peptide fibril formation with protease-stable ligands*. **Journal of Biological Chemistry**, **272(19)**: 12601-5.

Unger, D.D. (1847), *Die Instercellularsubstanz und ihr Verhaltnis zur Zellmembran bei Pflanzten*, **Bot. Ztg. 5**: 289.

Uversky V.N., Fink A.L. (2004), *Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded*, **Biochimica et Biophysica Acta**, **1698**: 131-153.

Voropai E.S., Samtsov M.P., Kaplevskii K.N., Maskevich A.A., Stepuro V.I., Povarova O.I., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Fink A.L., Uverskii V.N. (2003), *Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils*, **Journal of Applied Spectroscopy**, **70**: 868-874.

Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condron M.M., Lomakin A., Benedek G.B., Selkoe D.J., Teplow D.B. (1999), *Amyloid β -protein fibrillogenesis (structure and biological activity of protofibrillar intermediates)*, **Journal of Biological Chemistry**, **274**: 25945-25952.

Walsh D.M., Lomakin A., Benedek G.B., Condron M.M., Teplow D.B. (1997), *Amyloid β -protein fibrillogenesis (detection of a protofibrillar intermediate)*, **Journal of Biological Chemistry**, **272**: 22364-22372.

Waters M.L. (2002), *Aromatic interactions in model systems*, **Current Opinion in Chemical Biology**, **6**: 736-741.

Wogulis M., Wright S., Cunningham D., Chilcote T., Powell K., Rydel R.E. (2005), *Nucleation-dependent polymerization is an essential component of amyloid-mediated neuronal cell death*, **Journal of Neuroscience**, **25(5)**: 1071-80

Zerovnik E.(2002), *Amyloid-fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease*, **European Journal of Biochemistry**, **269(14)**: 3362-71.

Zheng H., Koo E.K. (2006), *The amyloid precursor protein. beyond amyloid*, **Molecular Neurodegeneration**, **3**: 1:5.

