

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE



Scuola di Dottorato in
SCIENZE E TECNOLOGIE BIOMOLECOLARI E MORFOLOGICHE

Tesi di Dottorato di Ricerca in
“**BIOCHIMICA E BIOLOGIA APPLICATA**”

XXI ciclo
SSD BIO/10

Dipartimento di Scienze Biochimiche

**ANALISI DEI POLIFENOLI QUALI INIBITORI *in vitro*
DELL'AGGREGAZIONE DI TIPO AMILOIDE**

Coordinatore:
Prof. GIANNI CAPPUGI

Docente guida:
Prof.ssa DONATELLA DEGL'INNOCENTI

Dottorando:
STEFANO GESTRI

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

Tesi di Dottorato di Ricerca in “**BIOCHIMICA E BIOLOGIA APPLICATA**”
XXI ciclo - **SSD BIO/10**

Titolo della tesi: “**ANALISI DEI POLIFENOLI QUALI INIBITORI *in vitro*
DELL’AGGREGAZIONE DI TIPO AMILOIDE**”

Dottorando:
STEFANO GESTRI

Coordinatore:
Prof. GIANNI CAPPUGI
Docente guida:
Prof.ssa DONATELLA DEGL’INNOCENTI

ABSTRACT DELLA TESI

Amyloidosis encompasses a large group of diseases characterized by tissue deposition of proteins assembled in regular, normally antiparallel β -strands. Several proteins can form amyloid fibrils *in vitro*, suggesting that this aggregation process should be considered a general feature of polypeptides. Over twenty human proteic molecules, intact or fragmented, have resulted amyloidogenic *in vivo*, and connected with disorders such as Alzheimer’s, Parkinson’s and type II diabetes diseases. Amyloidoses are often divided into neurodegenerative disorders, non-neuropathic localized amyloidoses and systemic amyloidoses (due, for instance, to immunoglobulin light chains).

Human lysozyme is a bacteriolytic protein of 130 residues present in external secretions and in polymorphs and macrophages. There are five variants of this enzyme, and four of them have been associated with familial non-neuropathic systemic amyloidoses in which large quantities, sometimes kilograms, of aggregated protein accumulate in organs such as liver, kidney, and spleen.

Available at low cost, HEWL (*hen egg white lysozyme*, 129 amino acids) is a good model for studies on amyloid fibril formation. Identical to human form in a considerable part (40%) of its sequence, it can be easily fragmented in peptides prone to amyloid aggregation (for instance incubating its solutions 1 mM at pH 2.0 and 65 °C for about a week). In this study the HEWL and its 49-64 synthetic, slightly modified peptide (S in 64, instead of C) were used as model proteins to test *in vitro* the anti-amyloidogenic property of some polyphenols.

Polyphenols are nutraceuticals widely diffused in the human diet (wine, tea, nuts, berries, cocoa, etc), and used in the phytopharmaceutical industry for their antioxidant properties. Their absorption is generally fast (antocyanidins can be absorbed also at gastric level), and often they pass the blood-brain barrier carried by proteic transporters. According to their structure, they are divided in phenolic acids, flavonoids, stilbenes, and lignans. Recently several works pointed out

polyphenols are able to exert a neuroprotective effect not simply connected to their antioxidant power. Some of these compounds were described as efficient *in vitro* inhibitors of amyloid fibril formation, especially using the human A β -peptide as experimental model. In any case up to date polyphenols anti-amyloidogenic effects were never studied on HEWL or its 49-64 peptide.

For these reasons we selected from local plants and vegetal foods twenty-four phenolic acids, flavonoids or stilbenes, trying to correlate their structural features with the inhibitory effects, at equimolar concentrations, on the amyloid aggregation of the proteic models. Using the HEWL peptide, diluted solutions (0.2 mM) were incubated at pH 4.0 and 37 °C for about a day.

Generally fibrils formation was assessed by fluorescence (tioflavin T assay) and confirmed by atomic force microscopy (AFM). The effects of the most active polyphenols were investigated also by means of other analytical techniques (Congo red assay, circular dichroism or CD, dynamic light scattering or DLS...). When necessary substances were solubilized using small amounts of dimethyl sulfoxide. The chemical stability of the molecules was verified, by HPLC/DAD/MS, in the applied experimental conditions.

The kinetics of HEWL amyloid aggregation resembled a sigmoidal curve with a lag phase of 2-3 days. The 49-64 peptide showed an exponential kinetics of about 10 hours. Tannic acid revealed as the most active molecule in both proteic models. The first part of the kinetic curve was in any case conserved. Using the HEWL, a high inhibition was also obtained by means of anthocyanins such as keracyanin. Anthocyanins are flavonoids which had never been tested against amyloidosis. AFM verified the absence of oligomeric species, generally referred to as cytotoxic. The presence of two distinct benzene rings, with generally two phenolic groups in adjacent positions, revealed the main requisite for the anti-amyloidogenic activity.

In order to investigate the importance of hydrogen bonds in this field, a study of molecular modeling was conducted on a large part of the tested substances. These simulations confirmed the role of the two phenolic rings as hydrogen donors and pointed out the importance of a third central group acting as proton acceptor in another hydrogen bond. Also the distance between one of the donor groups and the acceptor group revealed itself essential for the anti-amyloidogenic effect.

We also tested the anti-amyloidogenic activity of mixtures of two polyphenols (each of them 1 mM) on HEWL. Globally this pointed out additive effects between molecules belonging to different chemical classes (for instance hydroxycinnamic acids and flavonoids).

According to these results, we selected also hydroalcoholic or alcoholic vegetable extracts containing some of the studied polyphenols or molecules with a similar structure. When tested on HEWL amyloid aggregation they showed high additive effects of different phenolic compounds. In particular there was a strong inhibition of the process when we used extracts containing anthocyanins (cherry and red chicory extracts).

Our results suggest possible future uses of polyphenols, in nutraceutical or pharmaceutical forms, for amyloidosis prevention or treatment.

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1. L'AGGREGAZIONE AMILOIDE DELLE PROTEINE	3
1.1.1. <i>Folding e misfolding</i> proteico	4
1.1.2. Caratterizzazione delle strutture amiloidi	6
1.1.3. Intermedi nella formazione di fibrille amiloidi	10
1.1.4. Citotossicità di intermedi e fibrille amiloidi	11
1.2. LE PATOLOGIE DA MISFOLDING PROTEICO E LE AMILOIDOSI	13
1.3. IL LISOZIMA NEL PROCESSO AMILOIDOGENICO	15
1.3.1. Il lisozima di pollo	16
1.4. I POLIFENOLI	19
1.4.1. Classificazioni	19
1.4.2. Funzioni e biosintesi nelle piante	22
1.4.3. Metodi di analisi	24
1.4.4. Assunzione con gli alimenti	25
1.4.5. Assorbimento	26
1.4.6. Metabolismo	28
1.4.7. Attività biologiche dei polifenoli	30
1.4.7.1. <i>Attività anti-amiloidogeniche</i>	34
1.4.8. Interazioni con proteine, glicidi, vitamine e minerali	37
1.4.9. Tossicità	38
1.5. SCOPO DELLA TESI	39
2. MATERIALI	40
3. METODI	43
3.1. DOSAGGIO DELLE PROTEINE (METODO BRADFORD)	43
3.2. ELETTROFORESI IN CONDIZIONI DENATURANTI	43
3.3. FORMAZIONE DI FIBRILLE AMILOIDI	45
3.4. VALUTAZIONE DELLA COMPARSA DI FIBRILLE AMILOIDI	46
3.4.1. Dosaggio fluorimetrico tramite tioflavina T	46
3.4.1.1. <i>Leggi cinetiche</i>	47
3.4.2. Test del Congo red	47
3.4.3. Dicroismo circolare	48
3.4.4. Dynamic light scattering	50
3.5. ANALISI MORFOLOGICA DELLE FIBRILLE AMILOIDI	51
3.6. SOLUBILIZZAZIONE DEI POLIFENOLI E LORO STUDIO PRELIMINARE	53
3.7. VERIFICA DELLA STABILITÀ DEI POLIFENOLI NELLE CONDIZIONI D'IMPIEGO	53
3.8. AGGREGAZIONE AMILOIDE IN PRESENZA DI POLIFENOLI	53
3.9. VALUTAZIONE DELLA DOSE-DIPENDENZA DEGLI EFFETTI ANTI-AMILOIDOGENICI	54
3.10. TEST DI DISAGGREGAZIONE DELLE FIBRILLE AMILOIDI	54

3.11. MOLECULAR MODELING	54
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	57
4.1. AGGREGAZIONE AMILOIDE DELL'HEWL E DEL PEPTIDE 49-64	57
4.2. ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DI MOLECOLE POLIFENOLICHE	64
4.2.1. Tannini	64
4.2.2. Acidi idrossicinnamici e derivati	70
4.2.3. Flavonoli	76
4.2.4. Flavoni e biflavoni	77
4.2.5. Isoflavoni e derivati	80
4.2.6. Antocianine	82
4.2.7. Flavanoli	84
4.2.8. Stilbeni	87
4.3. ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DI ASSOCIAZIONI DI POLIFENOLI	88
4.4. ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DI ESTRATTI VEGETALI	90
4.4.1. Estratto di radicchio rosso	90
4.4.2. Estratto di rosmarino	93
4.4.3. Estratto di carciofo	96
4.4.4. Estratto commerciale di carciofo	98
4.4.5. Estratto di ciliegia dolce	99
4.4.6. Estratto di ciliegia acida	101
4.5. SIMULAZIONI DI MOLECULAR MODELING	106
4.5.1. Conferme sperimentali	109
5. CONCLUSIONI	112
5.1. ASPETTI GENERALI DELL'ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DEI POLIFENOLI	112
5.2. PROSPETTIVE FUTURE	120
6. BIBLIOGRAFIA	121

ABSTRACT

Amyloidosis encompasses a large group of diseases characterized by tissue deposition of proteins assembled in regular, normally antiparallel β -strands. Several proteins can form amyloid fibrils *in vitro*, suggesting that this aggregation process should be considered a general feature of polypeptides. Over twenty human proteic molecules, intact or fragmented, have resulted amyloidogenic *in vivo*, and connected with disorders such as Alzheimer's, Parkinson's and type II diabetes diseases. Amyloidoses are often divided into neurodegenerative disorders, non-neuropathic localized amyloidoses and systemic amyloidoses (due, for instance, to immunoglobulin light chains).

Human lysozyme is a bacteriolytic protein of 130 residues present in external secretions and in polymorphs and macrophages. There are five variants of this enzyme, and four of them have been associated with familial non-neuropathic systemic amyloidoses in which large quantities, sometimes kilograms, of aggregated protein accumulate in organs such as liver, kidney, and spleen.

Available at low cost, HEWL (*hen egg white lysozyme*, 129 amino acids) is a good model for studies on amyloid fibril formation. Identical to human form in a considerable part (40%) of its sequence, it can be easily fragmented in peptides prone to amyloid aggregation (for instance incubating its solutions 1 mM at pH 2.0 and 65 °C for about a week). In this study the HEWL and its 49-64 synthetic, slightly modified peptide (S in 64, instead of C) were used as model proteins to test *in vitro* the anti-amyloidogenic property of some polyphenols.

Polyphenols are nutraceuticals widely diffused in the human diet (wine, tea, nuts, berries, cocoa, etc), and used in the phytopharmaceutical industry for their antioxidant properties. Their absorption is generally fast (antocyanidins can be absorbed also at gastric level), and often they pass the blood-brain barrier carried by proteic transporters. According to their structure, they are divided in phenolic acids, flavonoids, stilbenes, and lignans. Recently several works pointed out polyphenols are able to exert a neuroprotective effect not simply connected to their antioxidant power. Some of these compounds were described as efficient *in vitro* inhibitors of amyloid fibril formation, especially using the human A β -peptide as experimental model. In any case up to date polyphenols anti-amyloidogenic effects were never studied on HEWL or its 49-64 peptide.

For these reasons we selected from local plants and vegetal foods twenty-four phenolic acids, flavonoids or stilbenes, trying to correlate their structural features with

the inhibitory effects, at equimolar concentrations, on the amyloid aggregation of the proteic models. Using the HEWL peptide, diluted solutions (0.2 mM) were incubated at pH 4.0 and 37 °C for about a day.

Generally fibrils formation was assessed by fluorescence (tioflavin T assay) and confirmed by atomic force microscopy (AFM). The effects of the most active polyphenols were investigated also by means of other analytical techniques (Congo red assay, circular dichroism or CD, dynamic light scattering or DLS...). When necessary substances were solubilized using small amounts of dimethyl sulfoxide. The chemical stability of the molecules was verified, by HPLC/DAD/MS, in the applied experimental conditions.

The kinetics of HEWL amyloid aggregation resembled a sigmoidal curve with a lag phase of 2-3 days. The 49-64 peptide showed an exponential kinetics of about 10 hours. Tannic acid revealed as the most active molecule in both proteic models. The first part of the kinetic curve was in any case conserved. Using the HEWL, a high inhibition was also obtained by means of anthocyanins such as keracyanin. Anthocyanins are flavonoids which had never been tested against amyloidosis. AFM verified the absence of oligomeric species, generally referred to as cytotoxic. The presence of two distinct benzene rings, with generally two phenolic groups in adjacent positions, revealed the main requisite for the anti-amyloidogenic activity.

In order to investigate the importance of hydrogen bonds in this field, a study of molecular modeling was conducted on a large part of the tested substances. These simulations confirmed the role of the two phenolic rings as hydrogen donors and pointed out the importance of a third central group acting as proton acceptor in another hydrogen bond. Also the distance between one of the donor groups and the acceptor group revealed itself essential for the anti-amyloidogenic effect.

We also tested the anti-amyloidogenic activity of mixtures of two polyphenols (each of them 1 mM) on HEWL. Globally this pointed out additive effects between molecules belonging to different chemical classes (for instance hydroxycinnamic acids and flavonoids).

According to these results, we selected also hydroalcoholic or alcoholic vegetable extracts containing some of the studied polyphenols or molecules with a similar structure. When tested on HEWL amyloid aggregation they showed high additive effects of different phenolic compounds. In particular there was a strong inhibition of the process when we used extracts containing anthocyanins (cherry and red chicory extracts).

Our results suggest possible future uses of polyphenols, in nutraceutical or pharmaceutical forms, for amyloidosis prevention or treatment.

1. INTRODUZIONE

1.1. L'AGGREGAZIONE AMILOIDE DELLE PROTEINE

Negli ultimi anni un numero sempre maggiore di patologie è stato correlato al fenomeno dell'aggregazione amiloide delle proteine. Tale processo consiste nella deposizione tissutale, all'interno o all'esterno delle cellule, di strutture proteiche supramolecolari organizzate in foglietti β . In genere il tutto si evolve fino alla formazione di fibrille mature, il cui asse risulta perpendicolare ai filamenti β allineati (Fig. 1.1). Data la specifica posizione dei filamenti si parla nel complesso di strutture *cross β* .

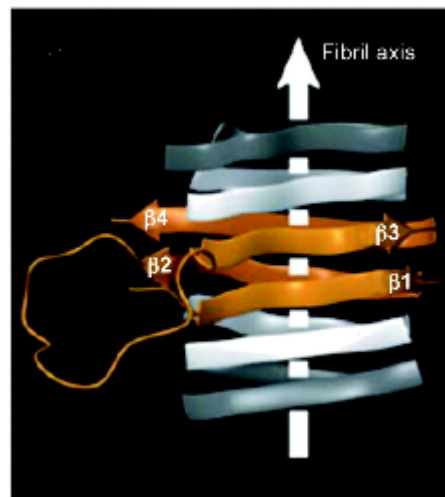


Figura 1.1. Fibrilla derivante dal dominio C-terminale 218-289 della proteina prionica fungina HET-s [riadattamento da Chiti F *et al.* 2006].

Il termine amiloide fu introdotto nel 1854 dal medico tedesco Rudolph Virchow, che notò come anomali corpi tissutali del cervello si colorassero in blu pallido se trattati con iodio, e in violetto dopo la successiva aggiunta di acido solforico. Lo studioso pensò si trattasse di cellulosa o amido (a quei tempi la distinzione fra le due sostanze non era chiara). La parola amido deriva dal latino “*amylum*”, che, traducendo il termine greco “*amylon*”, indica un materiale “non macinato”. Nel 1959 Friederich e Kekulé dimostrarono, valutandone l’alto contenuto in azoto, che la sostanza amiloide contiene proteine [Sipe JD *et al.* 2000]. In effetti, *in vivo* gli aggregati amiloidi risultano costituiti da proteine unite ad apprezzabili quantità di glicidi.

Oggi è ormai accertato che tutte le fibrille amiloidi, per quanto originate da proteine o peptidi anche molto diversi fra loro, hanno notevoli somiglianze

morfologiche e strutturali. Poiché inoltre si conoscono anche aggregati amiloidi apparentemente non connessi a patologie (né animali, né vegetali), si è già ipotizzato che la capacità di formare fibrille sia una proprietà generale di peptidi e proteine, dovuta sostanzialmente agli stabili ponti a idrogeno che possono instaurarsi fra le catene contenenti i legami peptidici [Vendruscolo M *et al.* 2005]. Solo sequenze ricche in prolina avrebbero difficoltà ad aggregare, poiché tale aminoacido non può fornire un legame a idrogeno con un gruppo accettore. Negli ultimi anni sono stati elaborati anche algoritmi specifici per il calcolo della propensione ad aggregare di una qualsiasi sequenza aminoacidica [Pawar AP *et al.* 2005]. Il computo si basa su idrofobicità, tendenza a dare struttura secondaria α o β ed eventuale carica dei singoli aminoacidi, ciascuno rapportato però a un contesto molecolare che comprende i tre aminoacidi precedenti e i tre successivi. Il principale parametro proposto in letteratura è detto Z_{agg} , e generalmente indica una marcata propensione all'aggregazione amiloide quando risulta superiore a 1. Un ulteriore parametro recentemente presentato, S^{agg} , sembra inoltre correlare abbastanza bene con la velocità del processo, dato che esalta il contributo degli *stretch* d'aminoacidi maggiormente amiloidogenici [Lashuel HA *et al.* 2002].

1.1.1. *Folding e misfolding proteico*

Durante il normale processo di folding una proteina neosintetizzata dai ribosomi assume la sua struttura nativa, che corrisponde alla struttura biologicamente funzionale con maggiore stabilità. Il fenomeno può talora iniziare prima che la sintesi proteica sia finita [Dobson CM 2003], e si parla in questo caso di folding cotraduzionale. Nella cellula eucariota il folding si sviluppa dal reticolo endoplasmatico (ER) fino all'apparato del Golgi, dove si hanno anche glicosilazioni e deglicosilazioni di controllo [Kaufman RJ 2002]. Esso è guidato da proteine o complessi multiproteici ausiliari detti chaperonine [Hartl FU *et al.* 2002]. Ne è prova il fatto che alcune di queste molecole, note come *heat shock proteins* (Hsps), risultino più abbondanti in caso di stress cellulare. Oggigiorno si conoscono chaperonine in grado addirittura di rendere di nuovo solubili alcuni aggregati proteici. Nonostante le molteplici informazioni disponibili, frutto di un ventennio di intensa ricerca, il folding proteico è stato indicato, in un editoriale del 2005 della rivista *Science*, come uno dei cento grandi problemi irrisolti in campo scientifico. Da tempo si parla comunque di codice di folding, a indicare che la struttura tridimensionale di una proteina è insita nella sua sequenza aminoacidica, e in particolare dipende dalle possibili interazioni idrofobiche [Anfinsen CB 1973]. Recentemente è stato proposto anche un nucleo di base del folding, detto foldone, e costituito da due filamenti β connessi a un' α -elica [Lindberg MO *et al.* 2007]. Sul piano

cinetico invece è ancora da chiarire il paradosso di Levinthal (1968), secondo il quale una proteina che per raggiungere la sua forma nativa passasse attraverso tutte le possibili conformazioni necessiterebbe di un tempo superiore all'età dell'universo.

Il mancato folding corretto di una proteina prende il nome di misfolding o aggregazione [Dobson CM 2004]. Il processo, che attraverso tutta una serie di intermedi può condurre alla formazione di fibrille amiloide, è attualmente descritto, nella cosiddetta "nuova visione del folding", attraverso il modello dell'*energy landscape* [Matagne A *et al.* 1998]. Si tratta di una frastagliata superficie energetica la cui forma globale ricorda quella di un imbuto. Al fondo di tale struttura si trova appunto la fibrilla amiloide, oramai ampiamente caratterizzata (Fig. 1.2).

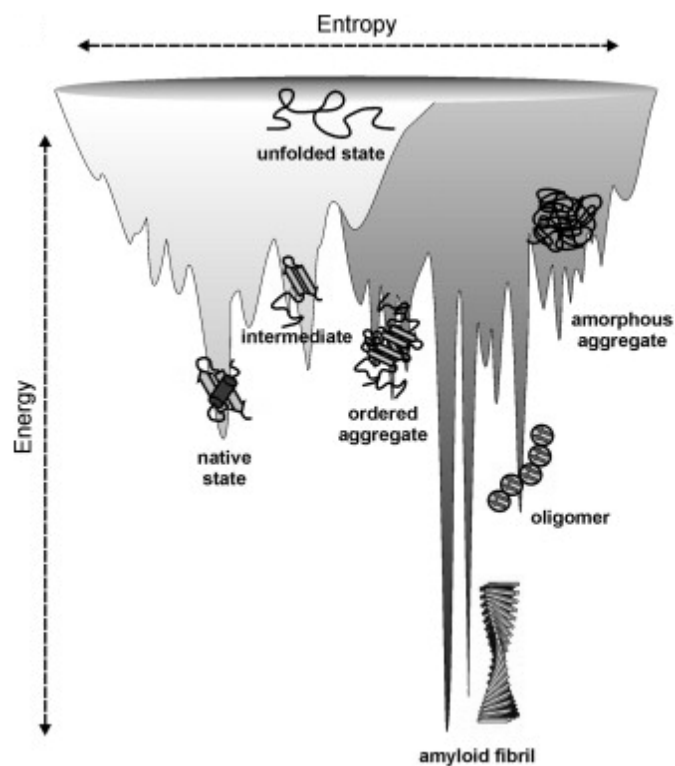


Figura 1.2. Esempio di moderno modello termodinamico per il folding e l'aggregazione delle proteine [riadattamento da Jahn TR *et al.* 2007].

In realtà esistono altre possibili rappresentazioni di *energy landscape*: per esempio in un sistema di tre assi cartesiani si riporta spesso in verticale l'energia libera e lungo le altre due direzioni il numero dei contatti nativi all'interno dei domini α e β [Dinner AR *et al.* 2000].

1.1.2. Caratterizzazione delle strutture amiloidi

In generale vi sono tre condizioni che, se soddisfatte, permettono di definire un aggregato proteico fibrilla amiloide: la birifrangenza in verde dopo la colorazione con *Congo red* (CR), la morfologia fibrillare (cioè molto allungata) e la struttura secondaria con predominanza di foglietti β [Nilsson MR 2004]. Dal punto di vista sperimentale, comunque, le tecniche analitiche che possono condurre a questa classificazione sono svariate.

L'interazione con il *Congo red* è stata descritta oltre cinquanta anni fa [Missmahl HP *et al.* 1954]. Più recentemente essa è stata sfruttata anche in assenza di polarizzazione della luce incidente, poiché i legami a ponte d'idrogeno che s'instaurano determinano un *red-shift* (da 490 a 540 nm) nello spettro d'assorbimento del colorante. Anche il fluoroforo tioflavina T (ThT) è in grado di legarsi selettivamente alle fibrille amiloidi: ne deriva un *red-shift* nel massimo del suo spettro di eccitazione, e la comparsa del relativo picco di emissione a 485 nm.

La morfologia delle fibrille amiloidi è stata osservata per la prima volta al microscopio elettronico negli anni '50. Sono state così descritte strutture filamentose con diametri intorno a 10 nm. Studi successivi su fibrille *ex vivo* hanno evidenziato la presenza, in strutture di 7,5-8 nm di diametro e con lunghezza micrometrica, di 5-6 protofilamenti (con diametri di 2,5-3,5 nm). Un'immagine di tali lavori è riportata in Fig. 1.3. La microscopia elettronica, e in particolare quella a trasmissione (TEM), in cui un fascio d'elettroni accelerati in uno spazio vuoto passa attraverso una sottile sezione del preparato, e poi subisce deviazioni ad opera di due campi magnetici laterali, fornendo così un'immagine ingrandita in bianco e nero, ha un ottimo potere risolutivo (0,2 nm). Una variante ancora più recente di questa tecnica è stata la *scanning transmission electron microscopy* (STEM). L'aggregazione amiloide è stata talora indagata anche tramite la crio-microscopia elettronica (*cryo-EM*).

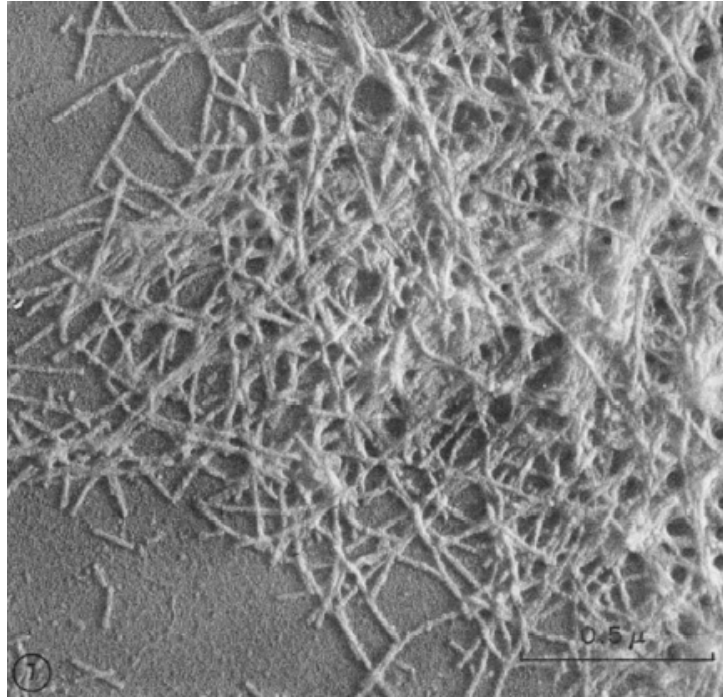


Figura 1.3. Esempio di fibrille amiloidi osservate tramite il microscopio elettronico [riadattamento da Shirahama T *et al.* 1967].

Negli ultimi anni un altro tipo di microscopia, quella a forza atomica (AFM), è stata adattata allo studio delle strutture amiloidi. La tecnica, nata nel 1986 con il microscopio a scansione di sonda (SPM) di Binnig, Quate e Gerber, ha un potere risolutivo appena superiore alla TEM, ma in molti casi ha offerto immagini particolarmente nitide dei vari aggregati amiloidi, e soprattutto ne ha permesso un'attendibile misura in altezza (ovvero in diametro), e quindi la relativa classificazione in fibrille, protofilamenti o altro. In alcuni casi, per esempio con il peptide-A β , coinvolto nella genesi del morbo di Alzheimer, si sono potute ottenere immagini anche delle specie oligomere solubili che iniziano il processo di aggregazione amiloide [Mastrangelo IA *et al.* 2006]. Informazioni meno dettagliate sul diametro delle varie particelle presenti possono ottenersi anche dal *dynamic light scattering* (DLS), tecnica che sfrutta la diffusione della luce da parte del materiale in dispersione colloidale.

Per la determinazione della struttura secondaria delle fibrille amiloidi la tecnica più importante usata in passato è stata la diffrazione dei raggi X. In questo caso il campione (solido) viene esposto ad un fascio di raggi X con direzione perpendicolare all'asse della fibrilla. Le riflessioni ottenute si distinguono in meridionali (se giacciono parallele all'asse fibrillare) o equatoriali (se a 90°). Le fibrille amiloidi presentano riflessioni meridionali a distanze di 4,7 Å e riflessioni equatoriali ripetute ogni 8-11 Å [Sunde M *et al.* 1997]. La ripetizione strutturale dei 4,7 Å circa corrisponde alla

distanza tra i filamenti β adiacenti, mentre l'altra spaziatura rappresenta la distanza tra i foglietti β all'interno di ogni protofilamento (Fig. 1.4).

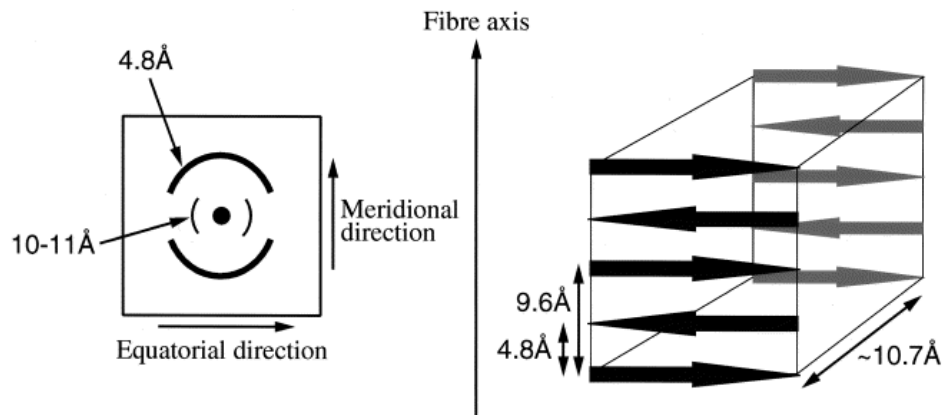


Figura 1.4. Correlazioni di base fra diffrazione dei raggi X e distanze fra filamenti e foglietti β in una fibrilla amiloide. La spaziatura di 9,6 Å è ricavabile solo dai pattern di diffrazione più nitidi [Serpell LC 2000].

In genere i foglietti β contengono una mescolanza di filamenti β antiparalleli e paralleli. In anni più recenti nuove tecniche hanno contribuito alla caratterizzazione strutturale delle fibrille amiloidi: la risonanza magnetica allo stato solido (SSNMR) e lo *spin labeling* sito-specifico accoppiato alla risonanza paramagnetica elettronica (SDSL-EPR). Il primo metodo d'indagine sfrutta le interazioni fra spin nucleari e campi magnetici, che allo stato solido sono strettamente influenzate dall'anisotropia del campione: i campi magnetici generati dai nuclei in rotazione possono entrare in risonanza o meno, a seconda del proprio intorno molecolare, con campi d'intensità variabile applicati esternamente. La seconda tecnica sfrutta invece i piccoli campi magnetici originati dallo spin elettronico: in pratica si aggancia al campione, in punti predeterminati, una sonda (*probe*) paramagnetica, e si osserva poi la risonanza con deboli campi magnetici esterni. Queste indagini ad alta risoluzione hanno permesso di costruire modelli ben precisi della struttura di alcune proteine amiloidi. Un esempio di queste rappresentazioni tridimensionali è riportato in Fig. 1.5.

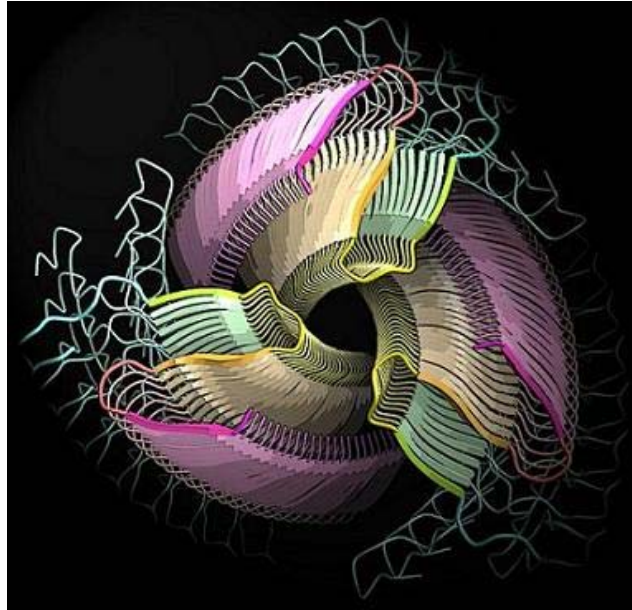


Figura 1.5. Struttura ipotizzata per l'amilina umana, nota anche come *human islet amyloid polipeptide* (hIAPP), e coinvolta nella genesi del diabete mellito di tipo II (non insulino-dipendente). I tre filamenti β sono costituiti dagli aminoacidi 12-17, 22-27 e 31-37.

In pratica si è visto che ogni fibrilla amiloide ha un diametro di circa 7-13 nm, ma deriva dal superavvolgimento di due-sei protofilamenti di 2-5 nm di diametro. I vari protofilamenti sono a loro volta costituiti da uno o più foglietti β che si estendono parallelamente all'asse fibrillare. Gli strand β sono collegati fra loro da *loop* di un ridotto numero di aminoacidi. A livello quali-quantitativo la graduale comparsa di struttura β negli aggregati proteici può comunque essere valutata anche con altre apparecchiature meno costose. Ad esempio può essere sfruttato il dicroismo circolare (*circular dichroism* o CD): uno spettropolarimetro invia sul campione proteico (otticamente attivo per la presenza di centri chirali) luce polarizzata, analizzandone poi il diverso assorbimento in termini di componenti polarizzate circolarmente. Fra le varie informazioni ottenibili si ricorda il segnale a 216 nm (nel *far UV*, cioè la regione compresa fra 190 e 250 nm), che evidenzia il progressivo incremento percentuale di struttura β nelle molecole che stanno aggregando. Qualora si disponga di maggiori quantitativi di proteina (intorno al mg), può essere utilizzata la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), che valuta l'assorbimento in campi energetici coinvolgenti gli stati vibrazionali del sistema: in questo caso il raggio incidente passa attraverso un interferometro (anziché un monocromatore), e poi si ha l'interazione con il campione, purché questo abbia vibrazioni che modificano il proprio momento dipolare, permettendo così la risonanza con il campo elettromagnetico delle radiazioni selezionate. La zona dello spettro fra 1700 e 1600 cm^{-1} , detta amide I e generata

sostanzialmente dallo *stretching* dei carbonili dello scheletro (*backbone*) proteico, può essere sottoposta a opportuna deconvoluzione tramite software [Zandomenighi G *et al.* 2004]. In alcuni casi, per risparmiare campione, si possono registrare spettri sfruttando la tecnica della riflessione totale interna attenuata (ATR).

1.1.3. Intermedi nella formazione di fibrille amiloidi

Tutte queste metodiche analitiche hanno permesso di chiarire anche la struttura di alcuni degli intermedi che conducono le proteine native alla formazione di fibrille amiloidi. In tale settore si sono rivelati assai utili esperimenti di aggregazione amiloide *in vitro*. Da vari anni, infatti, non solo si è riusciti a ricreare condizioni analoghe a quelle che conducono *in vivo* ad aggregati amiloidi, ma si sono scoperte proteine che, pur non risultando correlate a patologie, possono essere spinte alla formazione di fibrille. I primi studi in proposito, con la subunità proteica PI3-SH3 (si veda il secondo rigo della Tab. 1.1), risalgono a circa un decennio fa [Guijarro JI *et al.* 1998].

Domain/protein
SH3 domain p85 phosphatidyl inositol-3-kinase (bovine)
Fibronectin type III module (murine)
Acylphosphatase (equine)
Monellin (<i>Dioscoreophyllum camminsii</i>)
Phosphoglycerate kinase (yeast)
B1 domain of IgG binding protein (<i>Staphylococcus</i>)
Apolipoprotein CII (human)
ADA2H (human)
Met aminopeptidase (<i>Pyrococcus furiosus</i>)
Apocytochrome <i>c</i> (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)
HypF N-terminal domain (<i>Escherichia coli</i>)
Apomyoglobin (equine)
Amphoterin (human)
Curlin CgsA subunit (<i>Escherichia coli</i>)
V1 domain (murine)
Fibroblast growth factor (<i>Notophthalmus viridescens</i>)
Stefin B (human)
Endostatin (human)

Tabella 1.1. Alcune proteine non connesse ad amiloidosi che possono originare fibrille in opportune condizioni sperimentali [riadattamento da Stefani M *et al.* 2003].

Abbastanza recentemente sono state prodotte fibrille amiloidi anche da poli-L-lisina, poli-L-treonina e poli-L-acido glutammico [Fändrich M *et al.* 2002]. In genere

nelle proteine globulari la formazione di fibrille diviene possibile quando le catene laterali idrofobiche vengono in parte esposte al solvente: l'aggregazione sembra pertanto richiedere delle condizioni di parziale *unfolding* [Monti M *et al.* 2004]. In alcuni casi è addirittura necessaria una frammentazione preliminare. Fra gli agenti più usati per innescare la produzione di fibrille vi è il pH acido: lo si impiega ad esempio con la PI3-SH3, il lisozima e la transtiretina (proteina associata ad amiloidosi sistemiche umane). Nel caso della PI3-SH3, le cui fibrille si formano a pH 2, a temperatura ambiente o anche a 4 °C, si ottiene inizialmente uno stato monomero abbastanza destrutturato (*A state*), ma che contiene ancora un nucleo (*core*) idrofobico. In ogni modo l'aggregazione amiloide può coinvolgere anche proteine o peptidi che nel loro stato nativo sono *unfolded*: è quanto accade ad esempio con i peptidi A β , l' α -sinucleina (connessa al morbo di Parkinson), la proteina tau (implicata nella genesi dell'Alzheimer) e il frammento costitutivo dell'amilina. Con quest'ultimo peptide si assiste alla formazione di un intermedio transiente simile agli stati parzialmente destrutturati detti *molten globule* [Kayed R *et al.* 1999]. La Fig. 1.6 offre un quadro generale delle varie specie da cui possono originarsi le fibrille amiloidi.

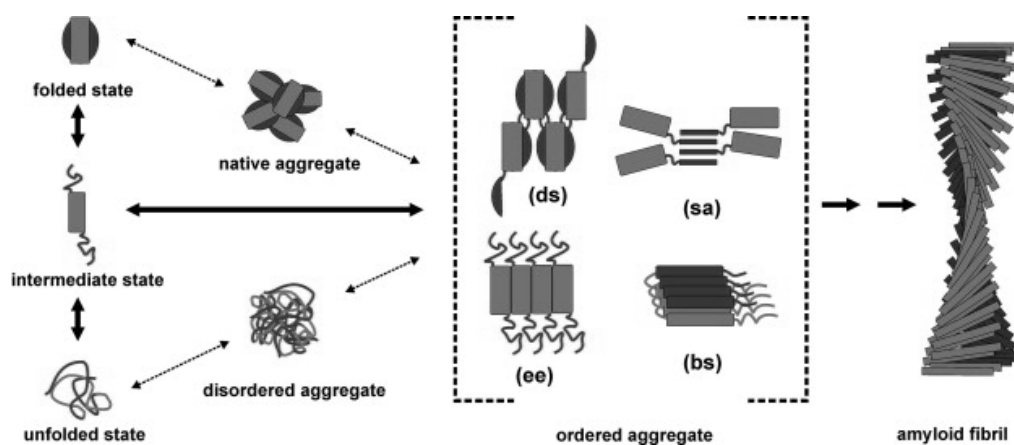


Figura 1.6. Precursori e intermedi coinvolti nell'amiloidogenesi. (ds) = *domain swapping*; (sa) = *strand association*; (ee) = *edge-edge association*; (bs) = *β -strand stacking* [riadattamento da Jahn TR *et al.* 2007].

1.1.4. Citotossicità di intermedi e fibrille amiloidi

Indubbiamente il meccanismo di formazione delle fibrille amiloidi è abbastanza complesso e variegato. Spesso la fase d'accrescimento esponenziale è preceduta da una fase di latenza (*lag phase*), la cui durata dipende dalla concentrazione del campione: essa è determinata dalle frammentazioni preliminari (ove presenti) e da processi di nucleazione analoghi a quelli dell'ottenimento di cristalli in ambiente

sovrasaturo (e infatti si accorcia o scompare per effetto di semina con aggregati precostituiti). Successivamente si assiste alla comparsa di oligomeri solubili: si tratta di strutture a perlina che possono unirsi a formare catene, già con struttura cross β . In alcuni casi queste catene, che sono dette protofibrille e che hanno un diametro di 2-5 nm, assumono una forma anulare [Lashuel HA *et al.* 2002]. Esempi di protofibrille si possono osservare nell'aggregazione amiloide di α -sinucleina, amilina, transtiretina [Conway KA *et al.* 2000; Kaye R *et al.* 2004; Quintas A *et al.* 2001]. Lavorando con i peptidi $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$ sono state identificate specie oligomeriche costituite rispettivamente da 2-4 e 5-6 molecole [Bitan G *et al.* 2003].

Già da alcuni anni è noto come, almeno nel morbo di Alzheimer e in quello di Parkinson, gli aggregati solubili (aggregati amorfi, oligomeri, protofibrille) che precedono la formazione di fibrille rappresentino le specie maggiormente citotossiche in campo amiloide [Walsh DM *et al.* 2004; Townsend M *et al.* 2007]. Poiché questi aggregati espongono al solvente regioni prone ad aggregare, è probabile che essi riescano a interagire con il doppio strato fosfolipidico (di spessore compreso fra 3 e 8 nm) delle membrane cellulari, scompaginandone la funzionalità [Stefani M *et al.* 2003; Malisauskas M *et al.* 2005]. Si è ad esempio ipotizzato che alcune di queste specie vengano a formare canali responsabili di un abnorme ingresso di calcio nelle cellule, dando così il via a processi di stress ossidativo che conducono in genere all'apoptosi. Del resto gli oligomeri in taluni esperimenti hanno determinato una netta attivazione delle caspasi [Gharibyan AL *et al.* 2007]. Va inoltre messo in evidenza come l'invecchiamento cellulare comporti in genere una minore protezione dai vari precursori amiloidi. Sulla base di queste osservazioni la formazione di fibrille potrebbe anche essere vista, almeno *in vivo*, come una specifica strategia dei tessuti per sequestrare specie citotossiche. Qualche recente lavoro ha comunque messo in luce effetti citotossici anche a livello di fibrille mature [Gharibyan AL *et al.* 2007].

1.2. LE PATOLOGIE DA MISFOLDING PROTEICO E LE AMILOIDOSI

Il termine amiloidosi raggruppa un elevato numero di patologie facenti capo al misfolding proteico, ma caratterizzate nella fattispecie dalla degenerazione amiloide di una o più molecole, che formano le fibrille (il termine è usato per lo più se la localizzazione è extracellulare) oppure le cosiddette "inclusioni intracellulari". Altri tipi di misfolding sono responsabili di ridotta disponibilità proteica (si veda il caso della fibrosi cistica, dove compare una variante del canale del cloro o CFTR) o di un anomalo *trafficking* (come accade ad esempio nell'enfisema polmonare a insorgenza precoce, in cui l' α_1 -antitripsina polimerizza e non si sposta dal fegato ai polmoni per inibirne l'elastasi). Negli ultimi anni le amiloidosi sono state suddivise in tre categorie: neurodegenerative, localizzate non-neuropatiche e sistemiche non-neuropatiche. Nel primo gruppo rientrano patologie a notevole impatto sociale, quali il morbo di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), le encefalopatie spongiformi, la sclerosi amiotrofica laterale (ALS) o malattia di Lou Gehrig, la corea di Huntington. Nel secondo gruppo si ritrovano il diabete di tipo II, la cataratta ecc. Nel terzo gruppo abbiamo infine l'amiloidosi correlata all'emodialisi, l'amiloidosi da lisozima, l'amiloidosi da catene leggere delle immunoglobuline (AL) [Comenzo RL 2007]. Di fatto più di quaranta patologie umane sono state associate all'amiloidosi. Un elenco delle principali è riportato in Tab. 1.2. Data la notevole incidenza sociale di questo gruppo di malattie, negli ultimi anni la ricerca nel settore, anche a livello di terapie sperimentali, ha registrato un notevole sviluppo [Gillmore JD *et al.* 2006]. Forse i maggiori sforzi sono stati indirizzati, anche se con modesto successo, verso la cura del morbo di Alzheimer [Hamaguchi T *et al.* 2006].

Fra le proteine che, intere o frammentate, risultano coinvolte in patologie amiloidi alcune sono state da tempo impiegate come sistemi modello per studiare il fenomeno, sia *in vitro* che su cellule o animali: il peptide A β , l' α -sinucleina, l'amilina.

Proteina Amiloide	Precursore	Sistemica/ Localizzata	Sindrome o tessuto coinvolto	Organi coinvolti
AL	Catena leggera delle immunoglobuline	S, L	Primaria Associata a mieloma	Rene, cuore, fegato, SNP, SNA
ATTR	Transtiretina	S	Sistemica senile	SNP, Cuore, SNA
A β 2M	β 2-microglobulina	S	Emodialisi cronica	Articolazioni, ossa
AA	(Apo)AA sierica	S	Secondaria, reattiva a flogosi cronica	Rene, fegato, SNA
AApoA-I	Apolipoproteina A-I	S	Familiare	Fegato, rene, cuore, testicolo
AApoA-II	Apolipoproteina A-II	S	Familiare	Rene, cuore
AGel	Gelsolina	S	Familiare	SNP, nervi cranici, cute
ALys	Lisozima	S	Familiare	Rene, fegato e milza
AFib	Catena- α del fibrinogeno	S	Familiare	Rene
ACys	Cistatina C	S	Familiare	SNC
ABri	ABriPP	L	Demenza familiare	SNC
ADan	ADanPP	L	Demenza familiare	SNC
A β	Proteina precursore A β (A β PP)	L	Malattia di Alzheimer, senilità, angiopatia cerebrale amiloide	SNC
AprP	Proteina prionica	L	Encefalopatia spongiforme	SNC
ACal	(Pro)calcitonina	L	Tumori della tiroide a cellule C	Tiroide
AIAPP	Islet amyloid polypeptide	L	Isole di Langerhans, Insulinomi	Pancreas
AANF	Fattore natriuretico atriale	L	Atri cardiaci	Cuore
Apro	Prolattina	L	Invecchiamento ipofisario, Prolattinoma	Ipofisi
Alns	Insulina	L	latrogena	Sedi di iniezione
Amed	Lactaderina	L	Senile aortica, media	Aorta
Aker	Cherato-epitelina	L	Cornea; Familiare	Cornea
A(tbn)	<i>da denominare</i>	L	Tumori di Pindborg	
ALac	Lattoferrina	L	Cornea; Familiare	Cornea

SNA, sistema nervoso autonomo; SNP, sistema nervoso periferico; SNC, sistema nervoso centrale.

Tabella 1.2. Principali amiloidosi umane e proteine o peptidi coinvolti.

1.3. IL LISOZIMA NEL PROCESSO AMILOIDOGENICO

Il lisozima umano è un enzima batteriolitico (EC 3.2.1.17) scoperto casualmente nel 1922 da Alexander Fleming. Lo studioso coniò il termine lisozima per indicarne contemporaneamente la capacità di lisare i batteri (di fatto idrolizza i legami β -1,4 glicosidici fra acido N-acetilmuramico e N-acetilglucosamina del peptidoglicano) e la natura enzimatica. La proteina in questione è presente nelle secrezioni delle mucose e in alcuni tipi di globuli bianchi (granulociti, monociti e macrofagi). Essa è costituita da 130 aminoacidi, organizzati in quattro α -eliche (A-D), un'elica 3_{10} e un foglietto β antiparallelo [Merlini G *et al.* 2005]. Il dominio α e il dominio β sono collegati da uno dei quattro ponti disolfuro, quello 77-95 (Fig. 1.7).

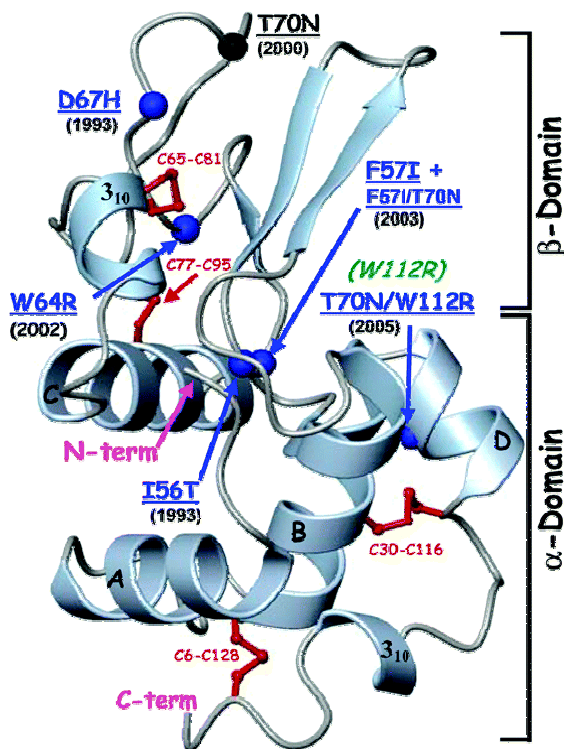


Figura 1.7. Struttura tridimensionale del lisozima, con indicate tutte le mutazioni naturali e l'anno della loro scoperta. La variante in nero non è associata ad amiloidosi. La mutazione W112R, da sola, non è stata ancora rilevata. I ponti disolfuro sono evidenziati in rosso [Dumoulin M *et al.* 2006].

Il gene del lisozima si trova sul cromosoma 12. Già nei primi anni '90 sono state descritte due varianti enzimaticamente attive della proteina (I56T e D67H) responsabili d'amiloidosi non-neuropatiche sistemiche [Pepys MB *et al.* 1993]. In queste patologie grossi quantitativi d'aggregati amiloidi (talvolta anche chilogrammi) si depositano in vari organi, compresi il fegato, la milza e i reni [Wain R *et al.* 2005]. Più recentemente sono state trovate altre varianti amiloidogeniche (F57I, F57I/T70N, W64R e T70N/W112R) e una non associata ad amiloidosi (T70N), sebbene abbastanza diffusa – è presente ad esempio nel 5% della popolazione britannica [Booth DR *et al.* 2000]. Tranne W112R, tutte queste mutazioni sono localizzate nel dominio β dell'enzima. Esse sono state studiate in dettaglio, in alcuni casi anche dal punto di vista conformazionale [Liu HL *et*

al. 2007]. I pazienti che soffrono di amiloidosi da lisozima sono tutti eterozigoti. La patologia si sviluppa lentamente, ma porta in genere a morte entro i 50 anni. L'unico trattamento efficace, anche se non risolutivo, risulta il trapianto degli organi danneggiati, come ad esempio i reni [Hawkins PN 2003].

Il lisozima umano costituisce una buona proteina modello per lo studio delle amiloidosi. Infatti in opportune condizioni sperimentali (bassi valori di pH, alta temperatura, moderate concentrazioni di denaturanti) anche la proteina WT (*wild type*), così come la variante non amiloidogena T70N, forma fibrille amiloidi. Sempre *in vitro* le varianti patogenetiche I56T e D67H aggregano ancora più facilmente. La termodinamica e la cinetica del processo di aggregazione amiloide sono in questo caso abbastanza note, così come la struttura delle fibrille generate [Frare E *et al.* 2006].

In ogni modo anche il lisozima proveniente da altre specie animali (ad esempio dal cavallo o dal pollo) può essere spinto *in vitro* a formare fibrille amiloidi [Malisauskas M *et al.* 2005; Frare E *et al.* 2004].

1.3.1. Il lisozima di pollo

Il lisozima di albume di uovo di pollo (*hen egg white lysozyme*, o HEWL) è una proteina globulare costituita da 129 aminoacidi (peso molecolare 14,3 kDa), che si strutturano in 4 α -eliche, A, B, C, e D, e 3 filamenti β , di cui i primi due antiparalleli (Fig. 1.8).

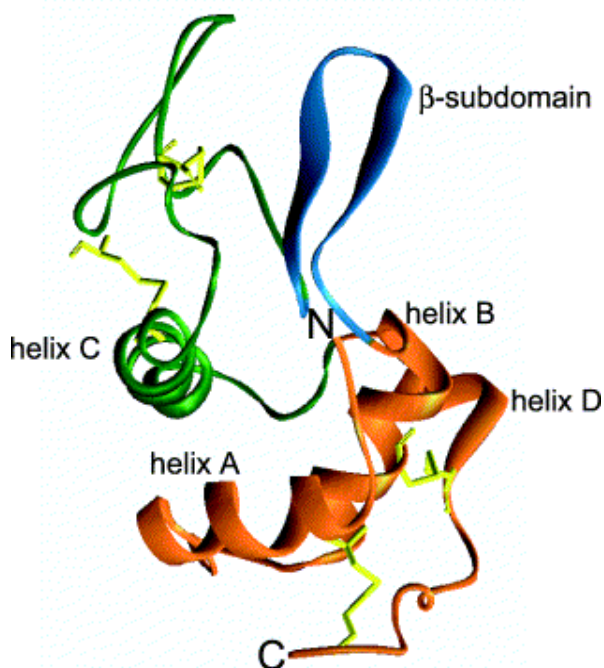


Figura 1.8. Rappresentazione tridimensionale dell'HEWL. I quattro ponti disolfuro sono colorati in giallo [Frare E *et al.* 2004].

La molecola è identica al lisozima umano per una discreta percentuale della sua sequenza (40%). Essa non forma fibrille amiloidi *in vivo* [Sethuraman A *et al.* 2005]. Tuttavia può essere facilmente frammentata in peptidi con notevole tendenza all'aggregazione amiloide. Infatti ad alte temperature e bassi valori di pH nelle sue soluzioni compaiono peptidi corrispondenti a parti del suo dominio β e all'intera elica C (Fig. 1.9). Tali frammenti, originati per lo più da rottura di legami Asp-X, sono tra l'altro simili alle regioni delle varianti Ile56Thr e Asp67His del lisozima umano che formano aggregati amiloidi, e nel giro di pochi giorni si riorganizzano in fibrille mature. Lavorando a pH 2,0 e 65 °C le fibrille risultano costituite prevalentemente da peptidi della regione 49-101 della proteina nativa.

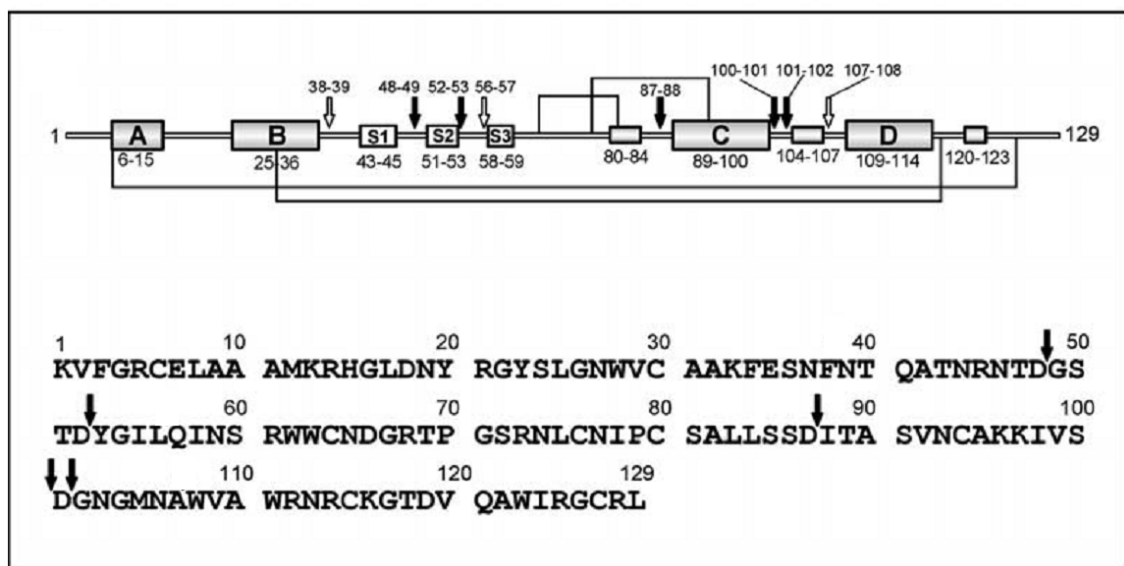


Figura 1.9. Rappresentazione schematica della struttura secondaria dell'HEWL. S₁, S₂ e S₃ sono i tre filamenti β . I tre box senza lettere indicano invece eliche 3₁₀. Le frecce nere evidenziano i punti di rottura in soluzione acida a 65 °C [riadattamento da Frare E *et al.* 2004].

La formazione di fibrille può essere ottenuta anche a pH neutro in presenza di agenti denaturanti quali il trifluoroetano o l'etano [Cao A *et al.* 2004]. In opportune condizioni si potrebbe utilizzare anche un'alta pressione idrostatica. In generale la riduzione dei quattro ponti disolfuro accelera il processo amiloidogenico. Cinetiche più rapide, in cui si osserva una drastica riduzione della fase di latenza iniziale, possono essere ottenute tramite semina con fibrille preformate [Krebs MR *et al.* 2004].

Fibrille amiloidi possono formarsi anche a partire da frammenti sintetici di HEWL che contengano il β -hairpin della proteina nativa [Krebs MR *et al.* 2000]. Tali peptidi mostrano infatti una propensione ad aggregare particolarmente elevata.

In ogni modo il processo di aggregazione amiloide dell'HEWL, per quanto complesso, è ormai abbastanza noto (Fig. 1.10).

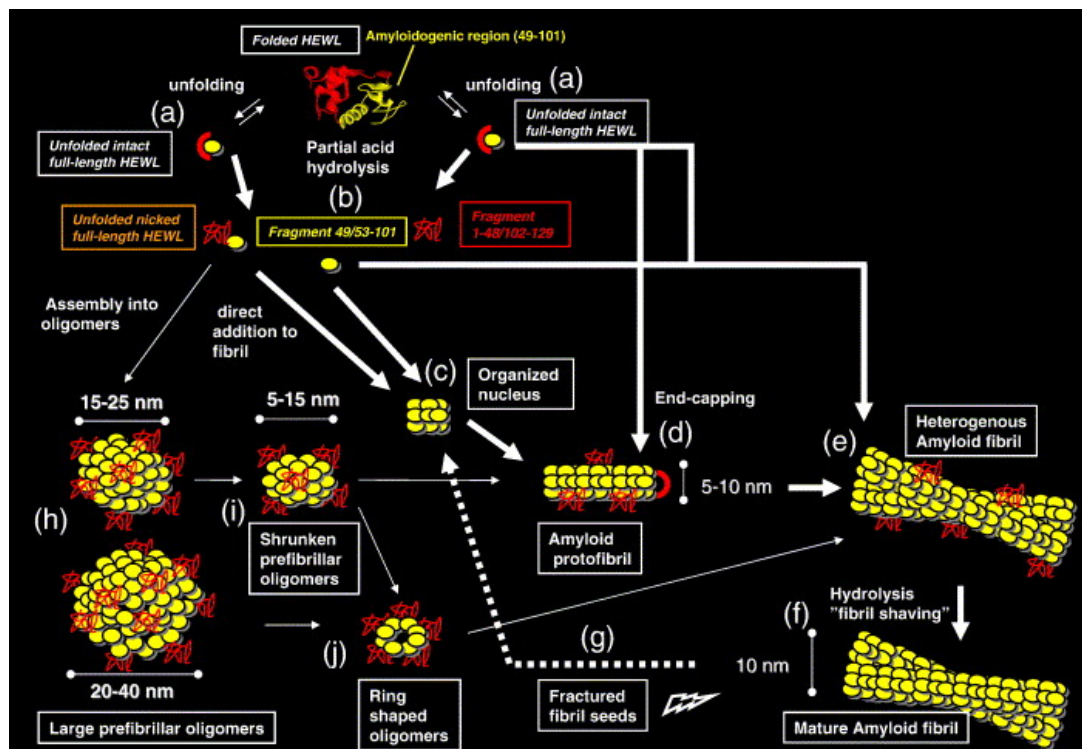


Figura 1.10. Le diverse vie e i diversi intermedi che possono portare alla formazione di fibrille amiloidi di HEWL a pH acido e a elevata temperatura [Mishra R *et al.* 2007].

Pertanto, in considerazione anche dei suoi bassi costi e della modesta tossicità di tutti i reattivi coinvolti, l'HEWL rappresenta un ottimo modello per lo studio delle fibrille amiloidi [Arnaudov LN *et al.* 2005].

1.4. I POLIFENOLI

Negli ultimi anni contro l'aggregazione amiloide sono state testate varie molecole, soprattutto *in vitro*, facendo uso di diverse proteine modello [Taniguchi S *et al.* 2005; Masuda M *et al.* 2006; Stains CI *et al.* 2007]. Molti degli sforzi si sono concentrati sulle sostanze ampiamente diffuse in natura [Kim H *et al.* 2005]. Fra questi composti sono stati presi in considerazione anche alcuni polifenoli, generalmente di provenienza vegetale [Porat Y *et al.* 2006].

1.4.1. Classificazioni

I polifenoli naturali, oltre 8000, sono metaboliti secondari di un elevato numero di piante [Sakakibara H *et al.* 2003]. Essi rientrano fra i gruppi di sostanze vegetali biologicamente attive (Fig. 1.11).

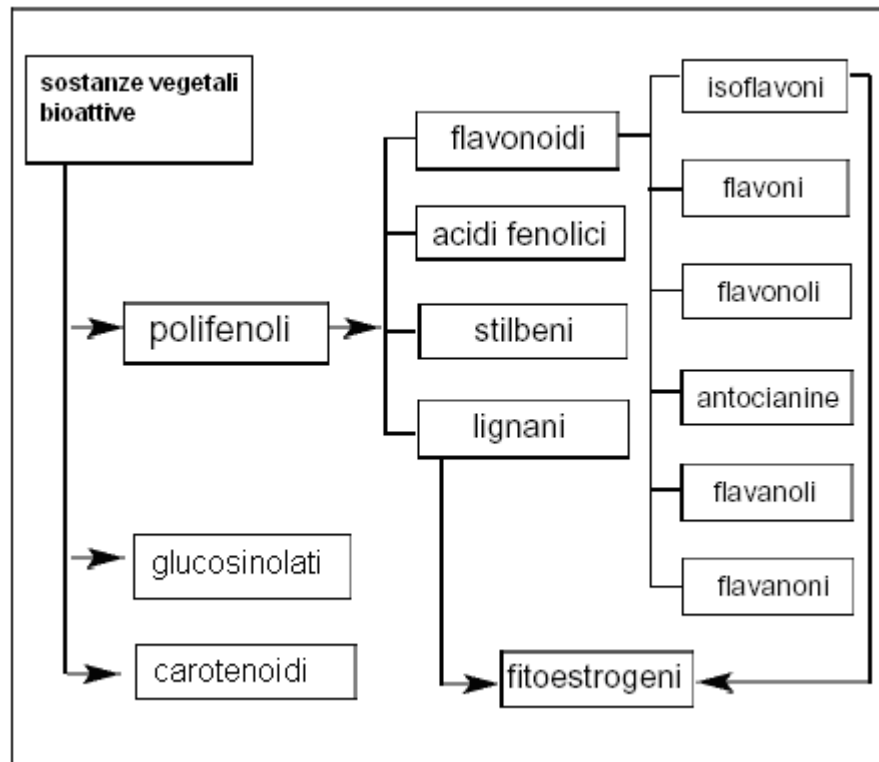
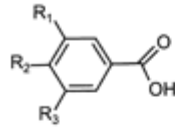


Figura 1.11. Principali classi di composti vegetali con attività biologica [riadattamento da Carratù B *et al.* 2005].

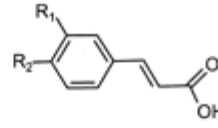
Strutturalmente sono caratterizzati dalla presenza di uno o più anelli fenolici. La classificazione chimica più diffusa risale agli anni '80 del secolo scorso, ed è opera sostanzialmente di Jeffrey B. Harborne [Urquiaga I *et al.* 2005]. Si distinguono anzitutto quattro classi principali di composti: acidi fenolici, flavonoidi, stilbeni e lignani. Gli acidi fenolici comprendono a loro volta acidi benzoici e acidi idrossicinnamici (Fig. 1.12).

Hydroxybenzoic acids



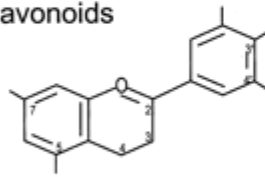
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: Protocatechuic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids

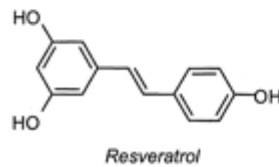


$R_1 = OH$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = OH$: Caffeic acid
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ferulic acid

Flavonoids



Stilbenes



Lignans

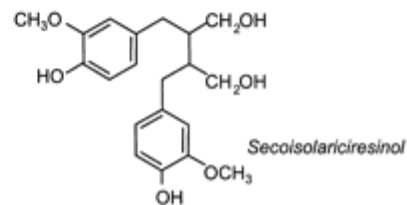


Figura 1.12. Principali classi di polifenoli, con indicati alcuni composti specifici [riadattamento da Manach C *et al.* 2004].

I flavonoidi presentano due anelli aromatici: l'anello A, condensato con un eterociclo ossigenato (anello C), e l'anello B, legato di solito in posizione 2 dell'eterociclo, o meno frequentemente in posizione 3, come avviene per gli isoflavoni. I flavonoidi sono in genere divisi in sei sottoclassi sia in funzione dello stato di ossidazione degli atomi della struttura C che della posizione dei sostituenti sugli anelli: flavonoli, flavoni, isoflavoni, flavanoni, antocianine e flavanoli (catechine e proantocianine). Le proantocianine, responsabili del carattere astringente dei cibi, sono flavanoli complessi con un grado di polimerizzazione medio di 4-11. Come schema riassuntivo si veda la Fig. 1.13.

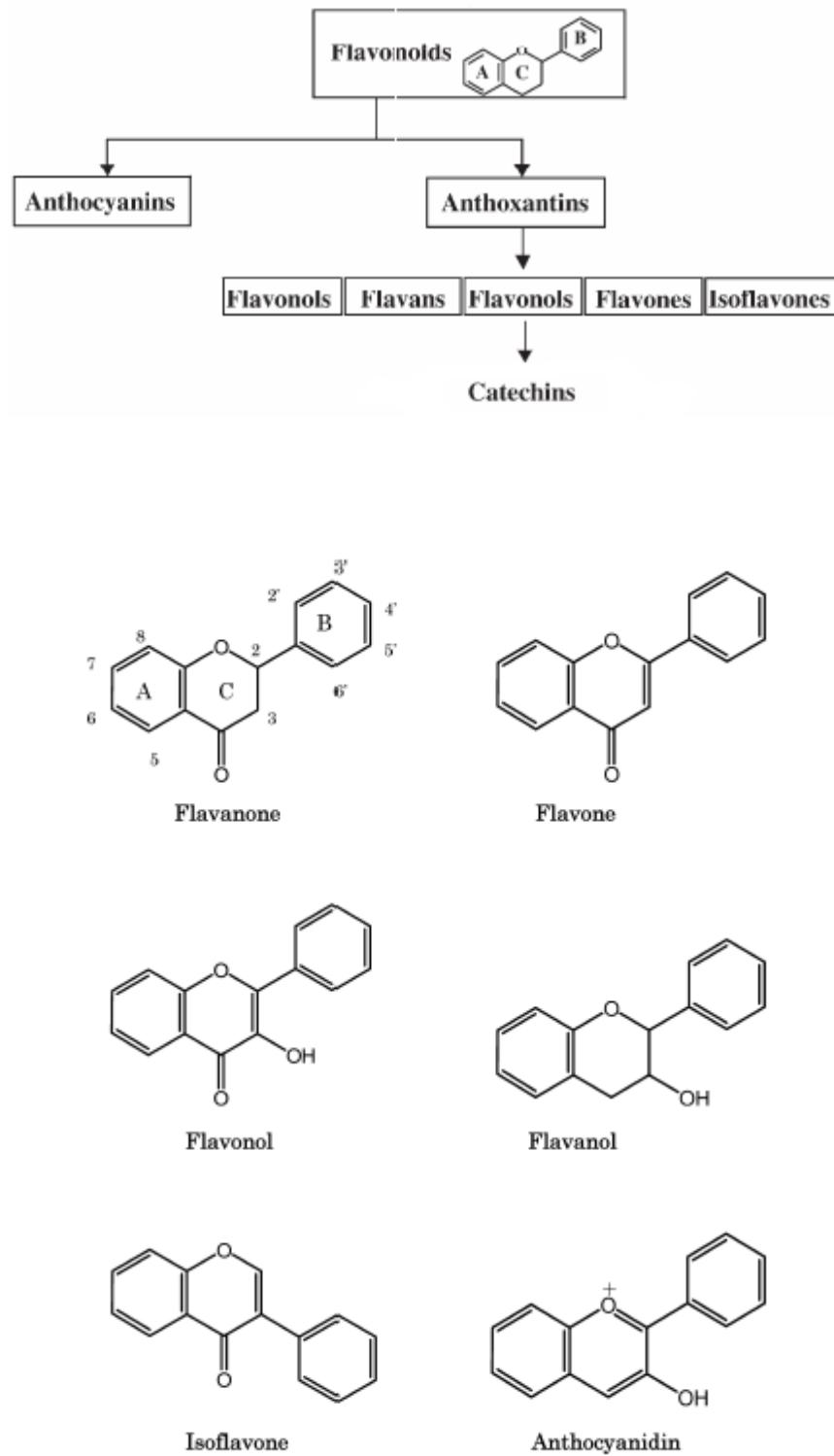


Figura 1.13. Le varie sottoclassi che fanno capo ai flavonoidi [riadattamento da Ramassamy C 2006].

I flavonoidi sono i polifenoli più importanti, sia a livello di diffusione nelle piante che a livello di distribuzione nella dieta umana. Se ne conoscono oltre 4000. Sono pigmenti idrosolubili (gialli, arancio o rossi) delle piante con fiore. Contengono un fenilcromanone con uno o più gruppi ossidrilici. Fra i pigmenti più comuni nelle piante si ricordano le antocianine (oltre 200), responsabili dei colori rosso-violetti.

1.4.2. Funzioni e biosintesi nelle piante

I derivati fenolici rientrano fra i metaboliti secondari delle piante, e tuttavia sono essenziali per la crescita e la riproduzione delle medesime, nelle quali agiscono come antipatogeni, antibiotici, pesticidi, fungicidi (ad esempio gli stilbeni e i glicosidi dei flavonoli), antivirali (si vedano i lignani). Essi sono inoltre importanti per l'instaurarsi di simbiosi nelle micorrize, nella protezione dai raggi ultravioletti, nell'isolamento delle cellule da gas e acqua (assieme ad acidi carbossilici e alcoli con 14-30 carboni vengono infatti a costituire suberina e cutina). I lignani hanno in genere funzione difensiva (il pinoselinolo si forma quando la pianta subisce lesioni), e rappresentano anche la struttura di base della lignina, sostanza che si lega alla cellulosa delle pareti cellulari conferendo stabilità, nonché resistenza alla digestione da parte degli animali erbivori.

Dal punto di vista biosintetico i polifenoli derivano dalla fenilalanina e, in alcuni casi, dalla tirosina [Shahidi FS *et al.* 2003]. Dalla fenilalanina, tramite un'opportuna liasi (PAL), si libera ammoniaca, e si forma così acido cinnamico. Da questo si ottengono poi i fenilpropanoidi, precursori di lignani, lignina, suberina, cutina, stilbeni, flavonoidi e tannini.

I tannini sono sostanze complesse suddivisibili principalmente in polimeri dei flavan-3-oli (tannini condensati, con peso molecolare di 2000-4000 Da) e acidi gallici glicosilati (tannini idrolizzabili, con peso molecolare di 500-2800 Da). Uno schema riassuntivo sulla classificazione dei tannini è riportato in Tab. 1.3.

Tannin subclasses common to foods

Subclass name	Characteristics
Condensed tannins (proanthocyanidins)	Oligomers and polymers of flavanols, also may contain gallates In foods, primarily linked by 4→6 or 4→8 C—C bonds (B linkages) or 4→8 C—C bond and 2→7 ether bond (A linkage) Acid catalyzed depolymerization of 'interior' monomers converted to corresponding anthocyanidins; hence polymers named proanthocyanidins Examples: 1) (epi)catechin monomers→cyanidin therefore named procyanidins, 2) (epi)gallocatechin monomers→delephinidin therefore named prodelphinidins
Derived tannins	Compounds formed during processing of plant material and absent, or nearly so, in healthy, intact tissue Definitive structures often unknown and trivial names given as a result of isolation procedure or plant source. Example: Thearubigins, a heterogeneous mixture of relatively large molecular weight compounds formed during production of oolong and black teas Systematic naming applied to elucidated and well-defined structures Examples: 1) Theaflavin = flavanol derived benzotropolone (EC + EGC), 2) Theaflavin-3,3'-digallate = flavanol derived benzotropolone (ECG + ECG)
Hydrolyzable tannins	Esters of gallic acid (gallotannins) or ellagic acid (ellagitannins) and a nonaromatic polyol (sugar, quinic acid, etc.) Gallo- and ellagitannins may be further linked by C—C and C—O—C bonds to form dimers, trimers, etc.

Tabella 1.3. Principali tipi di tannini presenti nella dieta umana [riadattamento da Beecher GR 2003].

Per azione della luce flavonoli e flavoni possono dare glicosidi. Nel caso dei flavonoli possiamo avere monoglicosidi (soprattutto 3-O-glicosidi), diglicosidi (con zuccheri in posizioni diverse o meno) e triglicosidi: alcuni risultano talora acilati con acidi fenolici. I flavanoni sono spesso glicosilati in posizione 7 con un disaccaride. Le antocianine sono in genere mono o diglicosidi, ma in alcune matrici (patate, melanzane, vari fiori, ecc.) si ritrovano anche derivati glicosilati e ampiamente acilati con acidi fenolici. Sono noti anche alcuni C-glicosilflavonoidi. In generale gli zuccheri più frequenti nei polifenoli sono il glucosio e il ramnosio. I lignani possono esistere anche in forma ciclizzata. I derivati dell'acido benzoico si ottengono sempre dai fenilpropanoidi per perdita di un frammento bicarbonioso. Le principali vie biosintetiche dei polifenoli sono riassunte in Fig. 1.14.

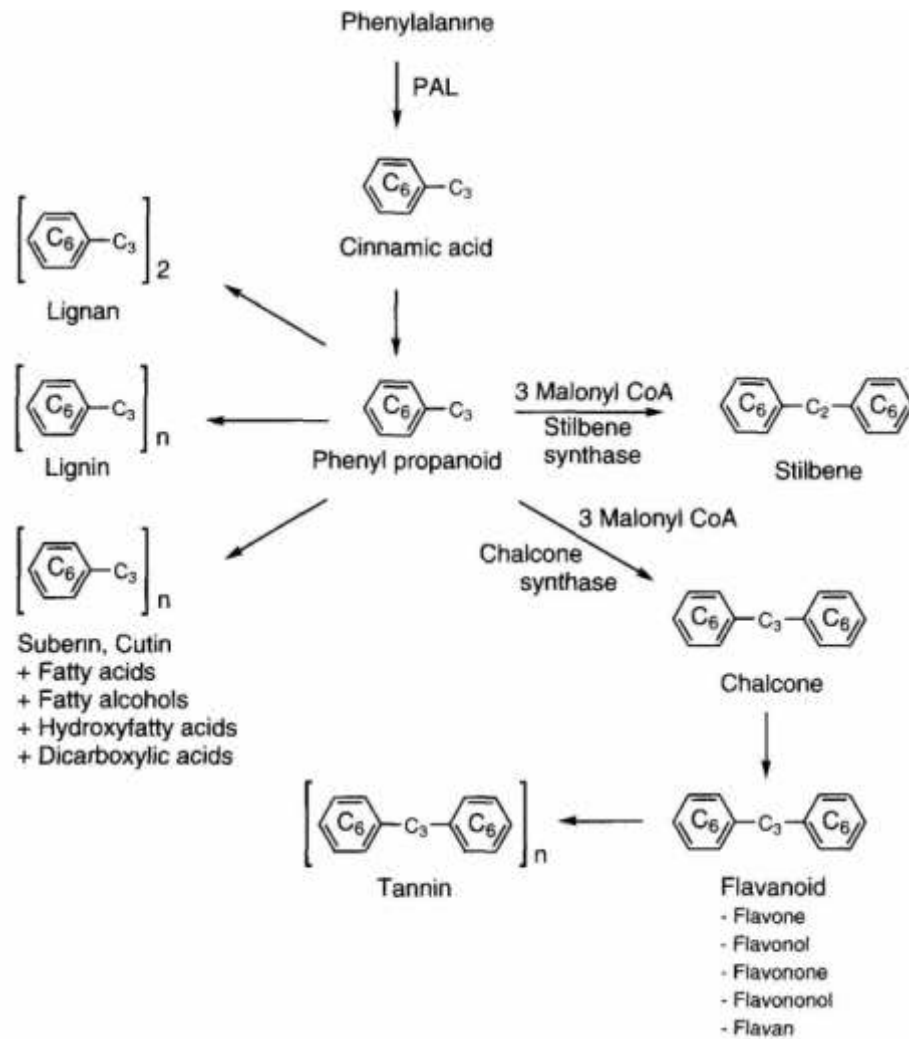


Figura 1.14. Principali vie biosintetiche di fenoli e sostanze vegetali correlate [riadattamento da Shahidi FS *et al.* 2003].

1.4.3. Metodi di analisi

Negli ultimi quindici anni l'interesse dei ricercatori e delle industrie nei confronti dei polifenoli è molto aumentato. Essi si sono rivelati ad esempio degli ottimi antiossidanti per preparati farmaceutici o alimentari. Di conseguenza, per monitorare la presenza di queste molecole nelle varie matrici vegetali, sono state messe a punto diverse tecniche analitiche, facenti capo soprattutto alla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelatori a fotodiodi (*diode array detector* o DAD) o a fluorescenza spesso accoppiati a rivelatori in spettrometria di massa (MS) [Sakakibara H *et al.* 2003].

In passato (ed ancora oggi in molti lavori) il titolo in polifenoli totali è stato fornito anche tramite la riduzione del reagente di Folin-Ciocalteu, che prevede l'espressione del dato quantitativo come acido gallico. Questa determinazione in presenza di polimeri o di forme ossidate è ancora più accurata dell'HPLC, ma è comunque soggetta a

interferenze da parte di molti composti (acido ascorbico, anidride solforosa, ammine aromatiche, zuccheri, acidi organici).

1.4.4. Assunzione con gli alimenti

La frutta e i relativi succhi rappresentano le fonti principali di polifenoli per l'uomo, anche perché le porzioni consumate sono abbastanza consistenti (100-200 g). Ad esempio una mela contiene circa 400 mg di polifenoli (espressi come acido gallico). 100 g di prugne possono fornire fino a 1-2 g di polifenoli. Anche gli ortaggi contengono le sostanze in questione: ne sono particolarmente ricche le cipolle, gli spinaci e i broccoli. Fra le bevande che apportano sostanze fenoliche si ricordano il tè, soprattutto quello verde, in cui i polifenoli sono il 10-30% del peso secco, il caffè, la cioccolata, il vino rosso e la birra. Ad esempio 200 ml di tè nero forniscono 150-250 mg di sostanze fenoliche, 200 ml di vino rosso 200-500 mg. Il tè verde, prodotto dalle foglie dell'alberello sempreverde *Camellia sinensis* L. senza l'intervento di processi fermentativi, rappresenta la seconda bevanda al mondo dopo l'acqua [Bonoli M *et al.* 2003]. In diversi paesi esso costituisce anzi la fonte più cospicua di polifenoli dell'alimentazione [Hertog MG *et al.* 1993; Arts IC *et al.* 2001]. Per quanto riguarda il tè nero, il paese con il suo più alto consumo (3,16 Kg all'anno pro capite) è l'Irlanda del Nord; seguono a ruota Regno Unito e Kuwait.

Come già suggerito una trentina d'anni fa, si stima che mediamente un individuo assuma con la dieta 1 g di polifenoli al giorno [Lotito SB *et al.* 2006]. In genere un terzo è rappresentato da acidi fenolici, e il resto sostanzialmente da flavonoidi (soprattutto flavanoli e antocianine). Fra gli acidi fenolici più abbondanti nei cibi si possono ricordare l'acido caffeico (nella frutta e negli ortaggi spesso esterificato ad acido clorogenico) e l'acido ferulico, presente nel frumento. Nei paesi occidentali la dieta fornisce circa 50 mg di flavonoidi, di cui il 61% tramite il tè nero. Gli isoflavoni sono contenuti soprattutto nella soia, i flavanoni negli agrumi, i flavonoli (ad esempio la quercetina) nella cipolla gialla o rossa, i flavoni (meno comuni nella dieta) nel pepe rosso, i flavanoli, e in particolare le catechine, nel tè verde, ma anche nei vinaccioli e nelle mele, le antocianine nelle uve rosse, nei frutti di bosco, nelle ciliegie e in alcune varietà a polpa pigmentata di patate. Le antocianine assunte ogni giorno variano dai 25 ai 1000 mg. Gli stilbeni sono poco diffusi; fra questi il resveratrolo è il più noto, e se ne stimano concentrazioni pari a 0,3-2 mg/l nel vino rosso. I lignani, alcuni dei quali sono noti per la loro attività di fitoestrogeni, sono presenti nel plasma e nelle urine, ma a livello di cibo si trovano in pochi prodotti (per lo più nei semi di lino). Recentemente sono stati individuati anche negli oli extra vergini di oliva. Probabilmente è grazie all'azione della microflora intestinale che si formano i cosiddetti "lignani del mammifero"

[Scalbert A *et al.* 2000]. Una sintesi delle principali fonti di polifenoli è riportata in Tab. 1.4.

Chemical classes		Examples	Sources	References	
POLYPHENOLS	Phenolic acids	Hydroxybenzoic acids	- TANNIC ACID	Fruits (raspberry etc.); nuts; tea; red wine	Manach C. et al., 2005
		Hydroxycinnamic acids	- ROSMARINIC ACID - CURCUMIN - CICHORIC ACID - CYNARIN - VERBASCOSIDE - CAFFEIC ACID - CHLOROGENIC ACID	Root vegetables (potato etc.); fruits (cherry, plum, blueberry etc.); greens (chicory, artichoke etc.); coffee	Manach C. et al., 2004 Sakakibara H. et al., 2003
	Flavonoids	Flavonols	- RUTIN - QUERCETIN - QUERCETIN-3-GALACTOSIDE	Leaf vegetables (curly kale, broccoli etc.); yellow onion; apricot	Manach C. et al., 2004 Sakakibara H. et al., 2003
		Flavones	- HINOKIFLAVONE - AMENTOFLAVONE - SCUTELLAREIN	Leaf vegetables	Sakakibara H. et al., 2003
		Isoflavones	- GENISTEIN - DAIDZEIN	Soybeans	Manach C. et al., 2004 Sakakibara H. et al., 2003 Scalbert A. et al., 2000
		Anthocyanidins	- KERACYANIN - KUROMANIN - MALVIN	Magenta coloured foods (aubergine, cherry, blueberry, black currant etc.); red wine	Manach C. et al., 2004 Sakakibara H. et al., 2003 Scalbert A. et al., 2000
		Flavanols	- EPIGALLOCATECHIN GALLATE - (-)EPICATECHIN - (+)CATECHIN	Green tea; beans; chocolate; apricot	Manach C. et al., 2004 Sakakibara H. et al., 2003 Scalbert A. et al., 2000
	Stilbenes		- RESVERATROL	Red wine; peanut	Burns J. Et al., 2002
			- COUMESTROL	Soybeans	Horn-Ross P. L. et al., 2000

Tabella 1.4. Alcuni esempi di fonti vegetali dei vari tipi di polifenoli. Hinokiflavone e amentoflavone sono dei biflavoni. Il cumestrol è un fitoestrogeno che proviene da una struttura isoflavonica.

1.4.5. Assorbimento

L'assorbimento dei polifenoli dipende molto dalla loro struttura chimica, ma normalmente è poco marcato. La maggior parte dei polifenoli ingeriti (75-99%) non si ritrova nelle urine. Questo può indicare a seconda dei casi scarso assorbimento, attacco da parte della flora microbica intestinale, metabolismo tissutale e/o eliminazione attraverso la bile (Fig. 1.15).

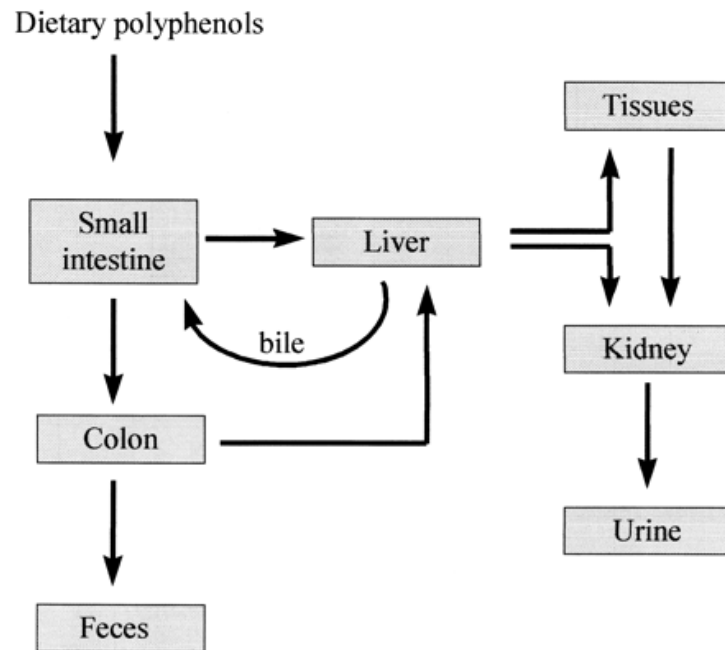


Figura 1.15. Possibili destini metabolici dei polifenoli introdotti con la dieta [Scalbert A *et al.* 2000].

Complessivamente la maggiore biodisponibilità si registra forse per la naringina del pompelmo (fino al 57% può comparire immodificata nelle urine). Fra i polifenoli meglio assorbiti si ricordano anche l'acido gallico e gli isoflavoni (questi ultimi hanno una biodisponibilità compresa fra il 13 e il 35%). Modesto assorbimento si registra invece per proantocianidine, catechine galloilate e antocianine [Manach C *et al.* 2005]. I polifenoli glicosilati possono essere assorbiti come tali o dopo idrolisi enzimatica, anche ad opera della microflora intestinale. Ad esempio la rutina, un ramnoglicoside della quercetina, viene assorbita dalla mucosa del colon solo dopo deglicosilazione ad opera della flora batterica locale [Hollman PC *et al.* 1998]. Il colon contiene circa 10^{12} microrganismi/cm³. *Lactobacilli*, *Bacteriodes* e *Bifidobacteria* possiedono sicuramente attività β -glicosidasiche. Attività glicosidasiche possono manifestarsi anche durante le lavorazioni cui i cibi sono sottoposti. Dopo un pasto le massime concentrazioni ematiche di polifenoli variano da 0,1 a 10 μ M [Kroon PA *et al.* 2004]. Per quanto concerne in particolare i flavonoidi, le loro concentrazioni nel plasma raramente sono superiori a 1 μ M, ma vengono raggiunte in tempi abbastanza brevi (spesso entro 1-2 h dall'assunzione). Per esempio nei ratti le antocianine possono essere assorbite attivamente già a livello gastrico mediante il coinvolgimento di una bilitranslocasi, e nel giro di pochi minuti riescono a passare, grazie a *carrier* di membrana, anche la barriera ematoencefalica [Passamonti S *et al.* 2005].

1.4.6. Metabolismo

Nel corpo umano i polifenoli vanno incontro a vari processi metabolici. In sostanza le strutture fenoliche che raggiungono il sangue e i tessuti non sono identiche a quelle assunte con la dieta. Solo nel caso delle catechine del tè verde le biotrasformazioni sono un po' più semplici, e le forme in circolo risultano direttamente gli agliconi.

Generalmente il primo passaggio del metabolismo dei polifenoli è comunque la rimozione enzimatica delle eventuali molecole zuccherine presenti, in modo da facilitare la diffusione passiva attraverso le membrane biologiche (solo nel caso dei flavonoli i glicosidi sono assorbiti meglio degli agliconi; le antocianidine inoltre sembrano essere assorbite esclusivamente glicosilate). Sull'orletto a spazzola delle cellule dei villi intestinali è presente la lattasi-floridizin-idrolasi (LPH), una β -glicosidasi i cui substrati fisiologici sarebbero i glucosilceramidi e i lattosilceramidi del latte (ed anche il lattosio stesso una volta assorbito). Il 5% degli europei e il 90% degli africani e degli asiatici, da adulti, hanno carenze di quest'enzima. Nell'interno delle cellule della mucosa intestinale e soprattutto in quelle epatiche si ritrova invece una β -glicosidasi citosolica (CBG). Il fegato è in genere il sito dove i glicosidi assorbiti come tali (alcune antocianine, alcuni flavonoli ecc.) sono comunque idrolizzati. Il ramnosio non è un substrato delle β -glicosidasi umane, e può essere staccato solo dalle α -ramnosidasi della microflora del colon.

I flavanoli della dieta risultano spesso acilati, soprattutto con acido gallico (si vedano ad esempio le gallocatechine del tè verde). Tale fatto non modifica però in modo sostanziale la loro capacità di diffusione passiva. Solo l'epigallocatechina gallato sembra subire degalloylizzazione nella saliva [Yang CS *et al.* 1999].

Molti acidi fenolici sono esterificati con zuccheri, acidi organici e lipidi. Spesso l'organismo umano non possiede esterasi in grado di idrolizzare tali derivati (per esempio per liberare acido caffeico dall'acido clorogenico).

Viceversa, almeno nel ratto, gli ellagitannini sono idrolizzati (forse anche a livello gastrico), con comparsa nelle urine di acido ellagico.

Le proantocianidine, strutture polimeriche, sembrano essere assorbite solo se in forma di dimeri o trimeri. Tra l'altro a livello di stabilità gastrica i dimeri risultano spesso le forme favorite [Spencer JP *et al.* 2000]. Questi dati devono comunque essere confermati *in vivo*.

Alcuni polifenoli possono essere assorbiti non solo per diffusione passiva, ma anche tramite trasporto attivo, ad esempio sodio-dipendente, come nel caso dell'acido caffeico nell'intestino tenue. Per i glicosidi dei flavonoidi è stata addirittura proposta l'interazione con il trasportatore-1, sodio-dipendente, di glucosio (SULT-1).

Le massime concentrazioni ematiche dei polifenoli si raggiungono a 1,5-5,5 h dall'assunzione [Manach C *et al.* 2005]. I tempi più lunghi sono tipici di quelle molecole il cui aglicone è rilasciato ad opera della microflora intestinale (ad esempio la rutina, l'esperidina e la naringina).

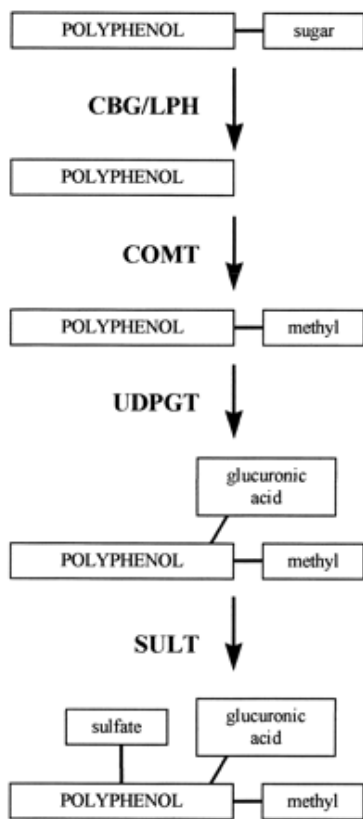
Gli agliconi dei polifenoli subiscono per lo più coniugazioni (metilazioni, solfatazioni, glucuronidazioni o combinazioni delle stesse). Questo avviene soprattutto con le catechine [Donovan JL *et al.* 2001]. Solo l'1,68% delle catechine del tè nero si ritrova immodificato nel plasma, nelle urine e nelle feci [Warden BA *et al.* 2001]. Piccoli quantitativi di polifenoli sono trasformati già nell'intestino; con dosi più alte entra in gioco il fegato, e talora anche il rene. A pH fisiologico i glucuronati e i solfati presentano carica negativa. La catecolamin-O-metiltransferasi (COMT), enzima polimorfico con un ruolo chiave nel metabolismo della dopamina, è in grado di metilare alcuni degli ossidrili dei polifenoli. La reazione avviene a livello di vari tessuti. La coniugazione con acido glucuronico è catalizzata invece dalla uridindifosfato glucuronosil transferasi (UDPGT o UGT). Con questo nome si intende in realtà una vasta famiglia di enzimi del reticolo endoplasmatico (UGT1A1, UGT1A3 ecc.) presenti soprattutto nel fegato, nell'intestino e nel rene. I farmaci, l'alcol e il fumo inducono il gruppo di enzimi UGT1A. Fra i polifenoli che subiscono maggiormente la glucuronidazione si ricordano gli isoflavoni. Le fenol sulfotransferasi (P-PST o SULT) sono un gruppo di enzimi citosolici ad ampia distribuzione aventi come substrati elettivi le iodotironine, ma in grado di solfatore anche fenoli, 4-nitrofenoli e idrossiarilamine. SULT1A1 è presente soprattutto nel fegato, SULT1A3 nel colon.

Alcuni polifenoli possono essere coniugati anche con una, due o tre molecole di glutatione. È quanto accade alle catechine in presenza di tirosinasi o di altri complessi enzimatici con funzioni ossidative [Moridani MY *et al.* 2001].

A livello degli enterociti la maggior parte dei metaboliti dei polifenoli è comunque ritrasportata nel lume intestinale tramite carrier proteici della famiglia delle *ATP-binding cassette/multidrug resistance proteins* (ABC/MDR). Nell'intestino le molecole fenoliche vengono definitivamente degradate dalla flora batterica [Biasutto L *et al.* 2007]. In alcuni casi si assiste comunque a riciclo enteropatico. L'escrezione urinaria dei polifenoli e dei relativi metaboliti varia infatti dallo 0,3 al 43%.

Complessivamente le emivite dei polifenoli sono abbastanza brevi, dell'ordine di poche ore. Del resto il loro elevato numero di ossidrili pone già i presupposti per un'efficace eliminazione per via renale.

Uno schema riassuntivo del metabolismo dei polifenoli è riportato in Fig. 1.16.



CBG = Cytosolic beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)
 LPH = Lactase-phlorizin hydrolase (EC 3.2.1.108)
 COMT = Catechol-O-methyltransferase (EC 2.1.1.6)
 UDPGT = UDP glucuronosyl transferase (EC 2.4.1.17)
 SULT = Phenol sulfotransferase (EC 2.8.2.1)

Figura 1.16. Principali biotrasformazioni cui vanno incontro i polifenoli nell'uomo [riadattamento da Scalbert A *et al.* 2000].

1.4.7. Attività biologiche dei polifenoli

I polifenoli sono spesso classificati come nutraceutici. Il termine fu coniato nel 1989 dal medico Stephen DeFelice, che unì le parole “nutrizione” e “farmaceutico” per indicare qualsiasi sostanza che fosse un alimento o parte d'alimento e che apportasse benefici medici o alla salute. DeFelice diede anche vita alla Fondazione per l'innovazione in medicina (FIM), Cranford, NJ (USA). Talvolta si parla anche di alimenti funzionali, cioè cibi che, se consumati regolarmente, esercitano una specifica azione benefica sulla salute che va oltre le loro proprietà nutrizionali [Espín JC *et al.* 2007].

Le attività biologiche dei polifenoli sono molteplici, anche in relazione alla loro tendenza a reagire, in forma ossidata, con aminoacidi e proteine, e a formare complessi con altre molecole biologiche o sali minerali. Uno schema generale degli effetti di queste sostanze sull'organismo umano è riportato in Fig. 1.17.

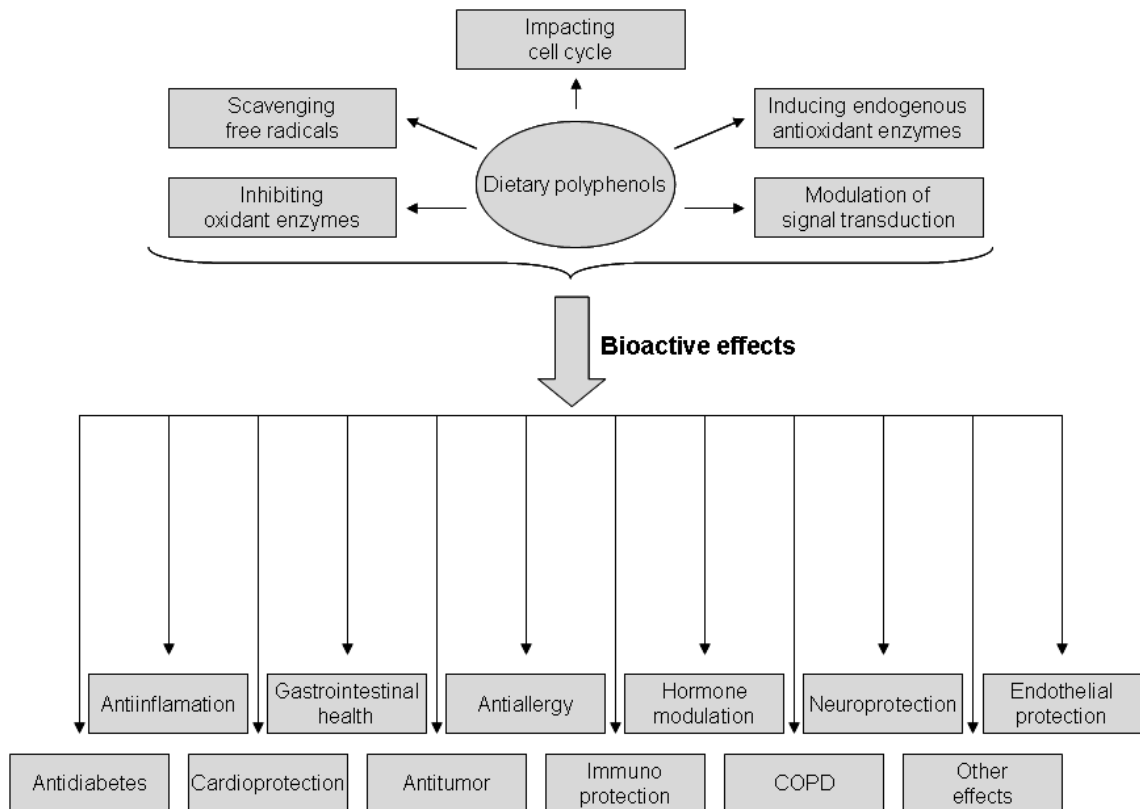


Figura 1.17. Principali effetti biologici dei polifenoli dell'alimentazione [riadattamento da Han XH *et al.* 2007].

La capacità antiossidante dei polifenoli è strettamente connessa al numero e alla posizione degli ossidrili presenti. Per esempio nel caso delle catechine essa risulta superiore a quella dell'ascorbato. Anche il metodo di indagine può influenzare la scala dei potenziali registrata [De la Lastra CA *et al.* 2007]. A seconda del loro meccanismo d'azione gli antiossidanti possono essere infatti classificati come terminatori di radicali liberi, chelanti ioni metallici in grado di catalizzare la perossidazione lipidica o infine *scavengers* dell'ossigeno [Shahidi F *et al.* 1993].

Negli ultimi anni sono stati proposti più metodi per determinare l'attività antiossidante dei vari alimenti. Tuttavia non sempre i risultati di queste analisi correlano fra loro [Prior RL *et al.* 2005]. Una buona parte delle tecniche usate fa capo alla chemiluminescenza. Si possono ricordare il *total reactive antioxidant potential assay* o *TRAP test*, l'*oxygen radical absorbance capacity assay* od *ORAC test*, e il *ferric reducing ability assay* o *FRAP test* [Pulido R *et al.* 2000]. Recentemente è stato proposto il metodo CUPRAC (*cupric reducing antioxidant capacity*) [Apak R *et al.* 2004]. In base a quest'ultima tecnica analitica le sostanze polifenoliche con maggior potere antiossidante risultano l'epicatechina gallato, l'epigallocatechina gallato, la quercetina. Per molti alimenti si parla comunque di potere antiossidante globale (AOP),

o anche d'attività antiossidante totale (TAA) [Brenna OV *et al.* 2001; López-Vélez M *et al.* 2003]. Alcuni dati sul potere antiossidante degli alimenti sono presentati in Fig. 1.18.

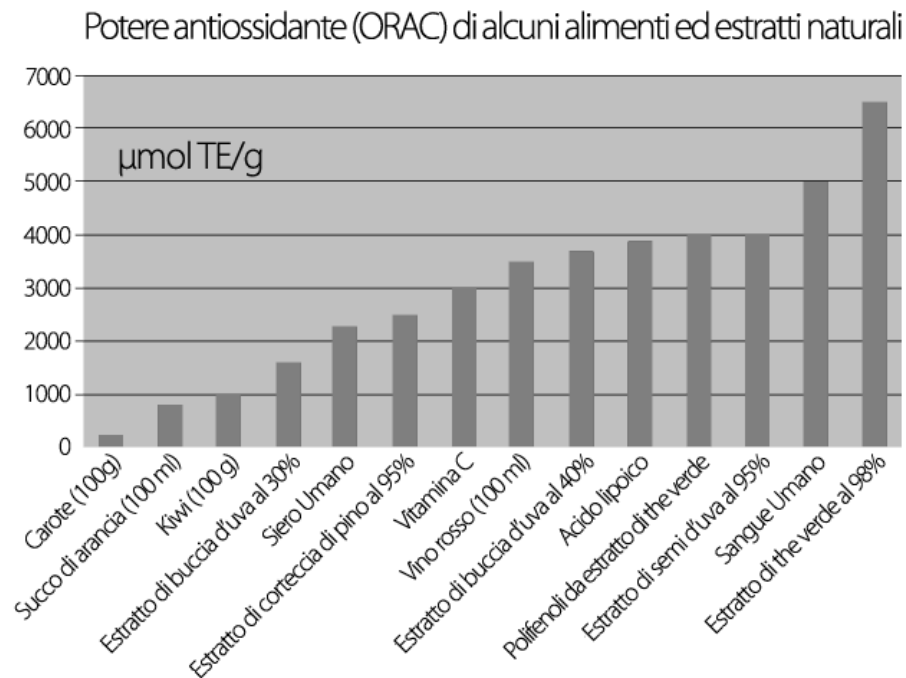


Figura 1.18. Esempi di potere antiossidante di alcuni alimenti o estratti naturali. TE = equivalenti Trolox®, che è un analogo idrosolubile (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) della vitamina E (riadattamento dal sito *web* www.zuccari.com).

Mediamente la deidratazione di frutta e vegetali non sembra alterarne in maniera sostanziale il potere antiossidante [Mea GM *et al.* 2004].

L'attività antiossidante dei polifenoli può in parte spiegare il loro effetto benefico su alcune patologie umane, soprattutto quelle di natura degenerativa. Per esempio il rischio di malattie cardiovascolari sembra legato, più che alla semplice ipercolesterolemia, a un alterato rapporto colesterolo/vitamine antiossidanti. *In vitro* i polifenoli sono in grado di modulare l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL), e ciò in misura maggiore dell' α -tocoferolo, che rappresenta ancora oggi il più importante antiossidante lipidico [Frankel EN *et al.* 1993]. L'ossidazione delle LDL sembra essere un fenomeno aterogenetico [Reed J 2002]. D'altra parte le sostanze fenoliche sono in grado di bloccare i radicali liberi dell'ossigeno o RLO (radicale idrossido, radicale perossido e radicale superossido). Queste specie, che si generano ordinariamente nella respirazione cellulare, nel metabolismo delle purine o per azione di lipossigenasi e ciclossigenasi, sono in grado di perossidare gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) delle membrane cellulari: i PUFA perossidati vengono distaccati ad opera della

fosfolipasi A₂, con alterazione della fluidità di membrana e necrosi cellulare, punto di partenza per la comparsa di lesioni ateromatose. Questo può in parte spiegare il cosiddetto “paradosso francese”, fenomeno per il quale alcune regioni del sud della Francia in cui si consumano molti grassi saturi (per esempio burro) presentano una bassa mortalità per malattie cardiovascolari [Renaud S *et al.* 1992]. In queste zone si ha infatti la contemporanea assunzione di vino rosso e, sebbene in quantità molto minori, d’olio extravergine d’oliva. Nell’olio in questione il contenuto di polifenoli oscilla fra i 150 e i 500 mg/kg. Non si deve poi dimenticare che alcune sostanze polifenoliche possiedono anche altre attività correlabili alla diminuzione del rischio cardiovascolare: per esempio hanno azione antiaggregante, inducono il rilascio di ossido nitrico da parte dell’endotelio, con conseguente vasodilatazione, inibiscono la sintesi degli acidi grassi (FAS) ecc. [Rein D *et al.* 2000; Fitzpatrick DF *et al.* 2001; Tian WX 2006].

Molti altri studi sono stati condotti sui polifenoli, e soprattutto sui flavonoidi, come agenti anticancro. Per esempio i fenoli del vino sono stati testati nella terapia del melanoma [Gómez-Cordovés C *et al.* 2001]; i polifenoli isolati dal tè verde hanno invece mostrato una notevole capacità di inibire la formazione di metastasi nel tumore della prostata e del seno [Adhami VM *et al.* 2003; Nakachi K *et al.* 1998]. Di nuovo in molti casi l’effetto anticancro sembra correlato alla capacità di bloccare i radicali liberi dell’ossigeno, o, più in generale, i cosiddetti ROS (*reactive oxygen species*). Infatti vari agenti tumorali, quali ad esempio il benzene e i suoi metaboliti, o anche le semplici radiazioni ionizzanti, determinano la formazione di alcune di queste specie, in grado a loro volta di ossidare gli zuccheri o le basi azotate del DNA, provocandone anche la rottura [Lee SF *et al.* 1996]. I polifenoli si affiancano dunque a quegli enzimi del nostro organismo (superossido-dismutasi, catalasi, glutatione-perossidasi) che normalmente provvedono all’eliminazione dei ROS. In futuro, comunque, alcuni flavonoidi potrebbero essere impiegati come antitumorali per le loro capacità di ridurre la resistenza multipla alla chemioterapia (MDR): sostanze come l’epigallocatechina gallato e la cianidina cloruro inibiscono infatti la glicoproteina-P (P-gp), trasportatore di membrana ATP-dipendente responsabile dell’efflusso dalle cellule d’alcuni tipi di chemioterapici, ad esempio della daunorubicina [Kitagawa S 2006].

Vasta è la letteratura che si occupa delle proprietà antimicrobiche dei polifenoli. Per esempio alcuni alchilgallati si sono rivelati buoni antifungini in test contro *Saccharomyces cerevisiae*. L’attività fungicida si è manifestata anche a concentrazioni di pochi mg/l [Kubo I *et al.* 2002]. Diversi acidi idrossicinnamici e flavonoidi sono risultati inibitori della crescita di lieviti, muffe e altre specie fungine. Da oltre 30 anni si sono poi accumulate evidenze sperimentali dell’azione antibatterica di vari acidi idrossicinnamici, acidi benzoici e flavonoidi. Per esempio le proantocianidine del mirtillo

rosso sembrano inibire l'adesione di alcuni ceppi di *Escherichia Coli* alle mucose delle vie urinarie e di *Helicobacter pylori* alle cellule gastriche coltivate *in vitro* [Howell AB 2002; Burger O *et al.* 2002]. I polifenoli del tè di fatto inibiscono la crescita dei batteri cariogeni *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* [Hamilton-Miller JM 2001]. La formazione della placca dentaria è inibita anche dai polifenoli delle mele e del succo di mirtillo rosso. L'adesione dei batteri ai denti può infine essere prevenuta dai componenti fenolici del caffè [Daglia M *et al.* 2002].

Per alcuni polifenoli sono state descritte anche attività antivirali. La quercetina e altri flavonoidi del vino rosso e della frutta sono stati oggetto di studi in tal senso già diversi decenni addietro. Lo stesso può dirsi di alcuni tannini. Si sono rilevate attività soprattutto contro i virus erpetici [Zhang J *et al.* 1996]. I polifenoli del tè sembrano prevenire l'adsorbimento dei virus influenzali sulle cellule [Nakayama M *et al.* 1993]. Alcuni derivati idrossicinnamici si sono rivelati inibitori selettivi dell'integrasi del virus dell'immunodeficienza HIV-1 [King PJ *et al.* 1999].

1.4.7.1. Attività anti-amiloidogeniche

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che diversi polifenoli (per esempio le catechine del tè) esercitano un'azione neuroprotettiva in diversi modelli di tossicità [Esposito E *et al.* 2002; Simonyi A *et al.* 2005]. I polifenoli di alcuni vini bianchi (Champagne) si sono rivelati fattori protettivi nei confronti del danno da perossinitrito in colture primarie di neuroni corticali [Vauzour D *et al.* 2007]. Analogamente, alcuni biflavonoidi sono risultati in grado di contrastare la morte cellulare in colture neuroniche sottoposte a vari stress ossidativi, compreso il trattamento con aggregati amiloidi di peptide A β . [Kang SS *et al.* 2005]. Per alcuni flavonoidi la neuroprotezione correla bene anche con la loro attività estrogenica [Zhu JT *et al.* 2007]. In generale gli effetti neuroprotettivi dei polifenoli non sembrano dovuti al solo potere antiossidante, ma probabilmente coinvolgono attività modulatorie sulla trasduzione del segnale [Bastianetto S *et al.* 2006]. Per esempio il resveratrolo protegge le cellule ippocampali dalla tossicità delle fibrille amiloidi di peptide A β attivando la proteinchinasi C [Han YS *et al.* 2004]. Siti di legame per il resveratrolo triziato sono stati identificati nelle frazioni membranali del cervello di ratto. Anche gli esteri delle catechine con l'acido gallico e altri polifenoli sembrano competere per tali siti [Han YS *et al.* 2006]. In altri studi su cellule di ratto anche l'acido rosmarinico, contenuto ad esempio nelle foglie di *Salvia officinalis*, e in altre piante aromatiche come il *Rosmarinus officinalis*, risulta proteggere dalla tossicità del peptide A β con vari meccanismi [Iuvone T *et al.* 2006].

Negli ultimi anni diversi gruppi di ricerca hanno messo in luce un ruolo più generale dei composti fenolici come inibitori *in vitro* della formazione di fibrille amiloidi:

si tratta in questo caso di un effetto distinto dalla semplice protezione contro la citotossicità degli aggregati amiloidi, generalmente correlata allo stesso potere antiossidante degli anelli fenolici [Kocisko DA *et al.* 2003; Kim H *et al.* 2005; Taniguchi S *et al.* 2005]. Fra le molecole capostipite in questi studi si può ricordare la curcumina, uno dei principali componenti del curry [Ono K *et al.* 2004a; Yang F *et al.* 2005].

Alcuni dati relativi all'effetto anti-amiloidogenico di vari polifenoli nei confronti delle tre principali proteine modello sino a oggi impiegate sono riportati in Tab. 1.5.

compound	IC ₅₀ (μM)		
	Aβ	α-synuclein	tau
polyphenols			
apigenin	>40	>80	>200
baicalein	4.5	8.2	2.7
(+)-catechin	>40	>80	>200
(-)-catechin gallate	5	21.4	>200
chlorogenic acid	>40	>80	>200
curcumin	1.7	>80	>200
cyanidin	4	10.3	33.3
daidzein	>40	>80	>200
delphinidin	3	6.5	6.9
2,2'-dihydroxybenzophenone	>40	>80	>200
4,4'-dihydroxybenzophenone	>40	>80	>200
dopamine chloride	28.6	7.1	>200
(-)-epicatechin	>40	29.9	>200
(-)-epicatechin 3-gallate	3	14.5	4.5
epigallocatechin	7	10.6	8.4
epigallocatechin gallate	2	9.8	9.6
exifone	0.7	2.5	3.3
(-)-galocatechin	7	8.9	13.3
(-)-galocatechin gallate	1.5	3.6	1
gingerol	25	>80	>200
gossypetin	1.3	5.6	2
hinokiflavone	5	8.1	>200
hypericin	0.9	7.5	26.8
kaempferol	8	>80	>200
luteolin	3	28	>200
myricetin	0.9	13.3	1.2
naringenin	25	>80	>200
2,3,4,2',4'-pentahydroxybenzophenone	2.8	28.3	2.4
procyanidin B1	14	7.3	27.5
procyanidin B2	>40	4.3	>200
purpurogallin	0.5	12.9	5.6
quercetin	5	20	>200
rosmarinic acid	12	4.8	16.6
rutin	32	>80	>200
(+)-taxifolin	>40	>80	>200
2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone	>40	>80	>200
theaflavine	2	5.8	7.9
(+)-α-tocopherol	>40	10.9	107.7
2,3,4-trihydroxybenzophenone	3.1	18.6	12.2

Tabella 1.5. Esempi di effetti anti-amiloidogenici di polifenoli espressi come IC₅₀ (*inhibitory concentration*), cioè concentrazioni alle quali si ha un'inibizione del 50% [riadattamento da Masuda M *et al.* 2006].

Sulla base di ricerche mirate qualche autore ha anche proposto una suddivisione delle varie sostanze in “inibitori poco attivi”, “inibitori molto attivi” e “inibitori selettivi” [Shoval H *et al.* 2007].

Due studi epidemiologici indicano il tè verde come un mezzo per ridurre del 30-60% il rischio di morbo di Parkinson e di demenza senile [Tan EK *et al.* 2003; Commenges D *et al.* 2000]. Nelle catechine del tè l’esterificazione dell’ossidril in posizione 3 con acido gallico sembra giocare un ruolo fondamentale per l’attività anti-amiloidogena. Alcuni composti fenolici (per esempio l’acido rosmarinico, l’acido tannico, la quercetina e la curcumina) destabilizzano in modo dose-dipendente fibrille amiloidi preformate [Zhu M *et al.* 2004; Ono K *et al.* 2006; Hamaguchi T *et al.* 2006]. Fra gli effetti positivi del resveratrolo sul morbo di Alzheimer è stata ipotizzata inoltre una maggiore degradazione del peptide A β via proteosoma [Marambaud P *et al.* 2005].

Recentemente è stata anche proposta una suddivisione generale dei composti in grado di inibire l’aggregazione amiloide del peptide A β_{42} : I) sostanze che inibiscono l’oligomerizzazione; II) sostanze che inibiscono sia l’oligomerizzazione che la formazione di fibrille; III) sostanze che inibiscono solo la formazione di fibrille [Necula M *et al.* 2007]. Tutti questi effetti sull’aggregazione amiloide sono stati correlati a un meccanismo generale basato su vincoli strutturali e interazioni aromatiche che indirizzano l’inibitore polifenolico verso il core amiloidogenico [Porat Y *et al.* 2006]. Qui il composto può esercitare la sua azione sugli oligomeri amiloidi o sulle fibrille già formate [Hirohata M *et al.* 2007]. L’importanza delle interazioni fra strutture aromatiche per gli inibitori dell’aggregazione amiloide era già stata messa in luce alcuni anni fa [Porat Y *et al.* 2004]. Per la curcumina e alcuni analoghi strutturali è stato anche proposto un modello d’interazione con le fibrille amiloidi (Fig. 1.19).

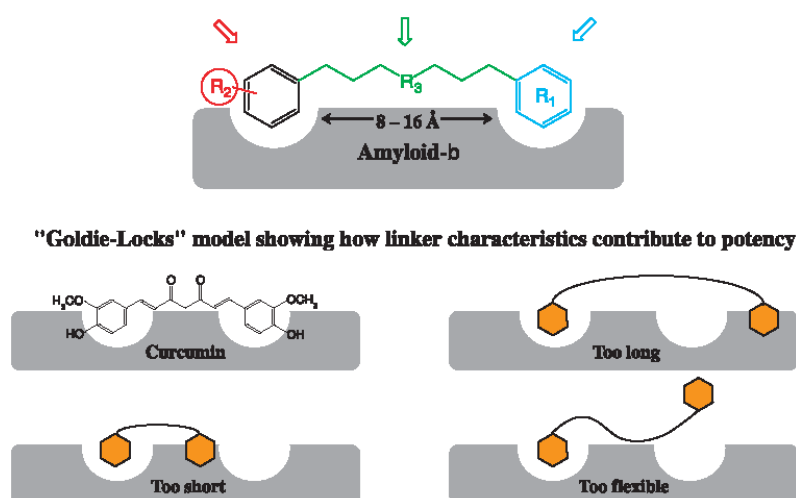


Figura 1.19.

Correlazioni fra attività e struttura per curcumina e derivati quali inibitori della formazione di fibrille amiloidi [riadattamento da Reinke AA *et al.* 2007].

1.4.8. Interazioni con proteine, glicidi, vitamine e minerali

Da diversi decenni è noto che i polifenoli possono legarsi alle proteine, in modo reversibile prevalentemente tramite legami a ponte di idrogeno, o talvolta in modo irreversibile, qualora abbiano subito ossidazione a chinoni. La reazione con gli ϵ -aminogruppi delle lisine o gli $-S-CH_3$ delle metionine può contribuire a rendere i tessuti vegetali indigeribili per gli animali monogastrici. La formazione di questi complessi sembra favorita in ambiente neutro e basico. L'interazione con le proteine può essere responsabile anche di alcuni effetti inibitori sugli enzimi digestivi (α -amilasi, lipasi, tripsina) [McDougall GJ *et al.* 2005; McDougall GJ *et al.* 2006]. Nel caso dell'amido la ridotta digeribilità può comunque derivare anche da interazioni dirette con le molecole fenoliche.

Osservazioni particolari possono essere fatte per i tannini, che con le proteine formano complessi solubili o insolubili. La loro affinità per le molecole proteiche può variare di quattro ordini di grandezza o più. Le proteine che si legano maggiormente ai tannini sembrano essere ricche di prolina e altri aminoacidi idrofobici. La presenza di oligosaccaridi può facilitare le interazioni mantenendo le molecole proteiche in una conformazione aperta. Del resto con le proteine globulari i tannini riescono ad interagire pochissimo. Sembra anche esistere una correlazione inversa fra la solubilità in acqua dei tannini e la loro capacità di precipitare le proteine. È stato poi provato che per avere un buon effetto precipitante i tannini condensati devono presentare tre subunità flavanoliche. Anche i galloilesteri del D-glucosio si legano maggiormente alle proteine se possiedono un elevato numero di residui di acido gallico [Kawamoto H *et al.* 1996]. In generale, con i tannini si ha prima un rivestimento della superficie proteica che sfrutta attrazioni idrofobiche, e poi un *cross linking* mediato dai polifenoli adesi [Charlton AJ *et al.* 2002]. Eventuali legami covalenti possono instaurarsi fra gruppi fenolici ossidati dei tannini e residui nucleofili delle proteine ($-SH$, $-OH$, $-NH_2$). Dai dati sperimentali raccolti con l'albumina serica bovina (BSA) e la gelatina è stato anche sviluppato un modello quantitativo [Silber ML *et al.* 1998]. Nel caso del lisozima la massima precipitazione in presenza di tannini si ha a pH superiore a 8,0. I complessi proteina-tannino possono essere dissociati tramite solventi organici quali il metanolo e la dimetilformammide.

I polifenoli si legano facilmente anche con i carboidrati, come si può osservare ad esempio nelle colonne cromatografiche di Sephadex: in questo caso oltre alla penetrazione negli interstizi sembrano operare anche interazioni fra ossigeni, o fra elettroni fenilici e gruppi idrossido dei gel. Affinità si hanno anche fra polifenoli e ciclodestrine. Le molecole fenoliche che si legano maggiormente ai glicidi sono i tannini e le catechine, come è stato provato ad esempio con l'amido.

Riguardo alle interazioni con le vitamine, è stato segnalato un effetto anti-tiamina da parte dell'acido caffeico e dei flavonoidi del tè. Il fenomeno sembra legato alla comparsa di prodotti d'ossidazione della tiamina, poiché non si manifesta in presenza di acido ascorbico [Somogyi JC 1978]. L'acido tannico sembra invece precipitare la vitamina B₁₂ [Carrera G *et al.* 1973].

Con i minerali, infine, si conoscono da anni diversi complessi polifenolici. I più noti sono quelli tannici, che nelle piante costituiscono forse una forma di difesa dagli attacchi dei microrganismi, e che hanno avuto varie applicazioni industriali (nel trattamento delle acque di scarico, nella produzione di inchiostri ecc.). Vari polifenoli del tè, dei vegetali, del vino e del caffè si sono inoltre rivelati inibitori dell'assorbimento del ferro (III): particolarmente efficaci sono risultati l'acido tannico e l'acido gallico. I flavonoidi del tè, se assunti assieme ai cibi, possono ridurre l'assorbimento del ferro dal 63 al 91% [Brune M *et al.* 1990]. Invece bere del tè nero lontano dai pasti inibisce tale assorbimento solo per il 20%. L'acido ascorbico può contenere quest'effetto antinutrizionale riducendo il ferro (III) a ferro (II) [Siegenberg D *et al.* 1991].

1.4.9. Tossicità

Alcuni decenni fa sono state ipotizzate correlazioni fra il cancro esofageo e l'uso di bevande ricche di tannini (tè, succhi di mela, sidro ecc.). I tannini potrebbero di fatto irritare le cellule epiteliali dell'esofago e anche danneggiarne il DNA. Questo soprattutto se tali composti fenolici vengono assunti ad alte dosi: in tal caso infatti le capacità di detossificazione dell'organismo sarebbero sopraffatte, con in più un netto calo dei gruppi metilici e glucuronato a disposizione per il metabolismo ordinario [Singleton VL 1982]. Quantitativi elevati di polifenoli potrebbero del resto inibire enzimi chiave delle cellule [Skibola CF *et al.* 2001].

Di fatto comunque i polifenoli sembrano dare tossicità a lungo termine solo quando rappresentano l'1-5% dell'alimentazione. Per esempio non si sono osservati effetti tossici in ratti nutriti per 90 giorni con estratti d'uva contenenti meno del 5,5% di catechine monomero [Wren AF *et al.* 2002].

Complessivamente sino ad oggi non sono emersi casi di tossicità o rischi correlati all'assunzione di molecole polifenoliche con la dieta ordinaria. Anche l'utilizzo di integratori alimentari arricchiti in composti fenolici non si è rivelato per il momento problematico.

1.5. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro sperimentale è stato quello di valutare, in uno *screening in vitro*, l'effetto anti-amiloidogenico di diversi polifenoli vegetali opportunamente purificati e di alcuni estratti (idroalcolici o alcolici) di piante a composizione nota. Molte delle sostanze utilizzate sono presenti normalmente nella dieta mediterranea, e hanno talora applicazioni in campo erboristico o farmaceutico (ad esempio come antiossidanti).

Le proteine modello impiegate sono state l'HEWL e un suo frammento (aminoacidi 49-64) prodotto per sintesi in forma leggermente modificata. L'aggregazione amiloide è stata in genere seguita con una tecnica fluorimetrica (test della ThT) e con l'AFM (per la caratterizzazione morfologica delle fibrille). In alcuni casi i dati raccolti sono stati confermati con altre metodiche di indagine (CD, DLS, saggio del Congo red, modellistica molecolare o *molecular modeling*...).

Sono state testate oltre venti sostanze pure e sei estratti. I polifenoli, appartenenti a diverse classi chimiche (tannini, acidi idrossicinnamici, flavonoli, flavoni, isoflavoni, antocianine, flavanoli e stilbeni), sono stati selezionati con criterio, in modo da poter ricavare alcune semplici correlazioni attività-struttura. Alcuni di essi, quali ad esempio l'acido tannico, la curcumina e il resveratrolo, già testati contro l'aggregazione amiloide d'altre proteine (peptide A β , α -sinucleina...), sono serviti da molecole di riferimento [Ono K *et al.* 2004b; Reinke AA *et al.* 2007; Rivière C *et al.* 2008]. Uno degli obiettivi principali dei test sugli estratti è stato invece l'identificazione di possibili sinergie fra le varie classi di polifenoli, punto di partenza per la loro valorizzazione come nutraceutici o come veri e propri farmaci.

2. MATERIALI

Nelle attività sperimentali sono sempre stati impiegati solventi e reattivi con purezza di grado analitico. Essi sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Anche l'HEWL è stato reperito in forma liofilizzata presso la Sigma-Aldrich. La sua purezza, pari a circa il 95%, è stata ottenuta tramite ripetute ricristallizzazioni e dialisi. Il frammento di HEWL 49-64 è stato sintetizzato dalla Sigma-Aldrich, e purificato tramite cromatografia in fase liquida (HPLC) fino a un titolo minimo dell'80%. Tale peptide ha la stessa sequenza dei residui 49-64 dell'HEWL (GSTDYGILQINSRWWC), fatta eccezione per l'aminoacido in posizione 64, che è stato cambiato in serina per prevenire la dimerizzazione attraverso il gruppo sulfidrico libero, coinvolto, nella proteina nativa, in un legame disolfuro intramolecolare [Krebs MR *et al.* 2000]. La purezza e l'integrità del peptide è stata controllata anche da dei gruppi di ricerca dell'Ateneo fiorentino tramite HPLC e spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray (ESI-MS). La massa molecolare del prodotto è risultata 1883 ($\pm 0,1$) Da. HEWL e peptide 49-64 sono rappresentati in Fig. 2.1.

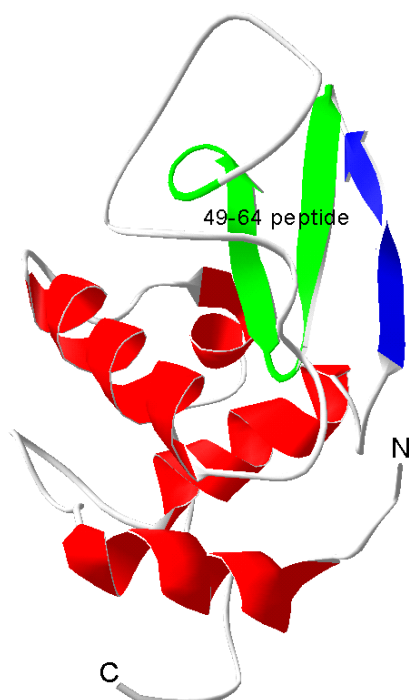


Figura 2.1. Struttura tridimensionale dell'HEWL e della porzione corrispondente al peptide 49-64 (in verde). In quest'ultimo sono visibili due filamenti β legati da un β -turn (contenente una glicina), e una regione *random*.

I composti polifenolici testati sono stati acquistati dall'Extrasynthese (Genay Cedex, France), fatta eccezione per l'acido cicorico, il verbascoside e la cinarina, isolati

dal gruppo di ricerca della Professoressa N. Mulinacci del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Ateneo fiorentino rispettivamente dalle foglie di *Cichorium intybus* [Romani A *et al.* 2000], dai residui solidi di olive frante [Mulinacci N *et al.* 2004] e dalle foglie di carciofo [Innocenti M *et al.* 2005]. La Tab. 2.1 riporta tutti i composti fenolici impiegati, suddivisi per classe chimica di appartenenza.

<i>Chemical classes</i>		<i>Compounds</i>	
POLYPHENOLS	Phenolic acids	Hydroxybenzoic acids	- TANNIC ACID
		Hydroxycinnamic acids	- ROSMARINIC ACID - CURCUMIN - CICHORIC ACID - CYNARIN - VERBASCOSIDE - CAFFEIC ACID - CHLOROGENIC ACID
	Flavonoids	Flavonols	- RUTIN - QUERCETIN - QUERCETIN-3-GALACTOSIDE
		Flavones	- HINOKIFLAVONE* - AMENTOFLAVONE* - SCUTELLAREIN
		Isoflavones	- GENISTEIN - DAIDZEIN - COUMESTROL**
		Anthocyanidins	- KERACYANIN - KUROMANIN - MALVIN
		Flavanols	- EPIGALLOCATECHIN GALLATE - (-)EPICATECHIN - (+)CATECHIN
	Stilbenes		- RESVERATROL
	* Biflavones		
	** Phytoestrogen coming from an isoflavonic structure		

Tabella 2.1. Elenco dei polifenoli testati e delle relative classi chimiche di appartenenza.

La purezza di queste molecole, saggiata tramite HPLC/DAD o HPLC/MS, è risultata sempre superiore al 90%.

Gli estratti idroalcolici o alcolici delle varie piante (radicchio rosso, rosmarino, carciofo, ciliegia dolce, ciliegia acida) sono stati preparati, sempre dal gruppo della Professoressa N. Mulinacci, secondo metodiche leggermente diverse da caso a caso. In genere si è proceduto alla frantumazione sotto azoto liquido (T = -198 °C) del

materiale vegetale fresco, trattando poi la polvere per tre volte con alcol azeotropico o con una soluzione etanolica al 70% v/v, acida per acido formico (pH = 2,0-2,5). Per alcuni campioni (per esempio di rosmarino) si è fatto anche ricorso ad ultrasuoni. Al processo estrattivo, condotto a freddo, è in genere seguito *defatting* con esano, evaporazione e ridiscioglimento in soluzione alcolica acidificata di nuovo con acido formico. Uno degli estratti di carciofo è stato reperito in forma liofilizzata dall'Indena (Milano, Italia). Il contenuto in polifenoli è stato determinato tramite HPLC/DAD e HPLC/MS.

Tutte le soluzioni sono state preparate con acqua milliQ, ottenuta tramite impianti della Millipore (Billerica, USA).

Per la maggior parte degli esperimenti sono stati utilizzati contenitori in plastica monouso. La vetreria impiegata ha in genere subito lavaggi con detergenti specifici e successivi risciacqui con acqua deionizzata.

3. METODI

3.1. DOSAGGIO DELLE PROTEINE (METODO BRADFORD)

Il dosaggio proteico secondo Bradford sfrutta una reazione colorimetrica che permette di rilevare quantitativi minimi di proteine (μg). Il colorante Coomassie G-250 in ambiente acido (soluzione acquosa contenente anche acido fosforico e metanolo) si lega alle proteine (Fig. 3.1), mostrando un massimo di assorbimento a 595 nm [Bradford MM 1976]. La retta di calibrazione viene in genere costruita utilizzando come standard l'albumina di siero bovino (BSA), in quantitativi compresi fra 0 e 8 μg .

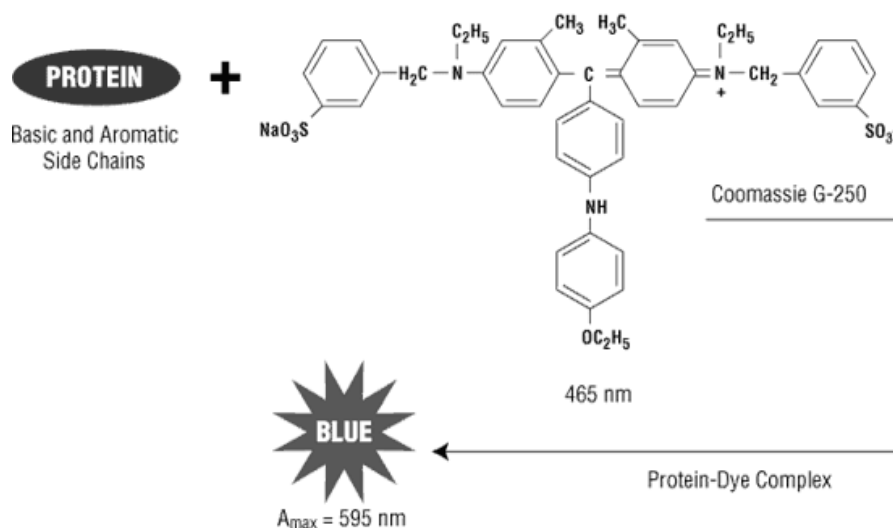


Figura 3.1. Schema della reazione alla base del dosaggio proteico secondo Bradford.

Durante l'aggregazione amiloide dell'HEWL il contenuto proteico della miscela di reazione e di alcune sue frazioni è stato valutato più volte, sempre secondo la metodica di Bradford. I campioni sono stati diluiti 1:10 con acqua.

L'analisi è stata effettuata tramite lo spettrofotometro UV-vis Lambda 4B della PerkinElmer (Waltham, USA), utilizzando cuvette monouso con un cammino ottico di 10 mm.

3.2. ELETTROFORESI IN CONDIZIONI DENATURANTI

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (*Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* o SDS-PAGE) permette la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare (Fig. 3.2). Infatti il detergente anionico

introdotto (dodecilsolfato di sodio o SDS), oltre a denaturare, conferisce a tutte le strutture proteiche una carica negativa netta (in media ogni due aminoacidi si lega una molecola di SDS). La migrazione verso l'anodo (polo positivo del campo elettrico applicato) delle particelle risulta pertanto determinata solo dalla loro forma e dimensione, e quindi in sostanza dalla loro massa molecolare [Laemmli UK 1970].

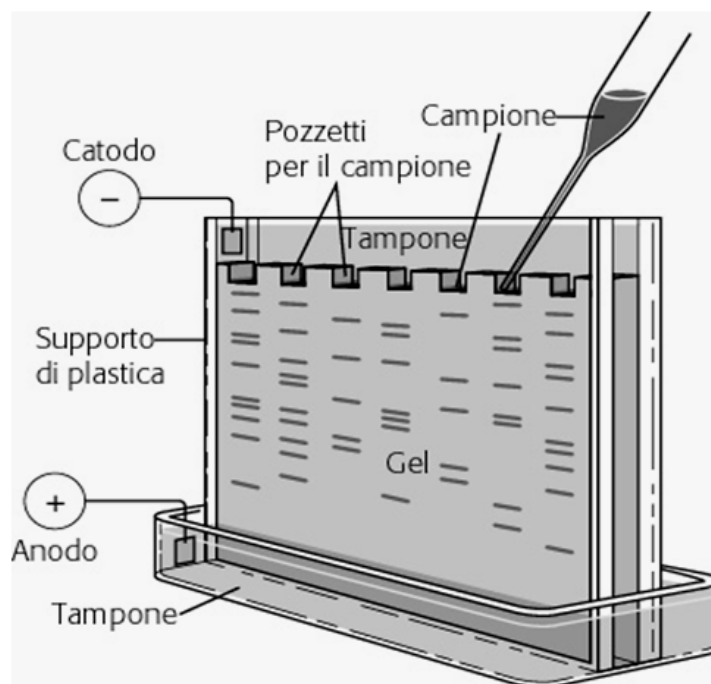


Figura 3.2. Rappresentazione schematica di una cella elettroforetica.

A tempi predeterminati, durante la formazione di fibrille amiloidi sono stati prelevati campioni di HEWL per corse elettroforetiche. Tali campioni hanno subito diluizioni 1:10 o 1:20 con una soluzione a pH 2,0 per HCl, e sono stati poi uniti ad un equal volume di *Laemmli sample buffer 2x*, contenente o meno β -mercaptoetanolo, in grado di ridurre i ponti disolfuro presenti nelle proteine a gruppi $-SH$ liberi. Dopo aver bollito per 5 min a bagnomaria, si è passati alla deposizione nei pozzetti dello *stacking gel* (gel con bassa reticolazione della poliacrilammide, utile per allineare tutti i materiali ad inizio corsa). Le quantità di campione depositate variavano fra 1 e 8 μg . La successiva migrazione elettroforetica è stata realizzata su gel di poliacrilammide al 15%, usando correnti di 400 mA per 50 min in TGS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v, pH 8,3) come tampone di corsa (*running buffer*).

L'apparecchiatura impiegata è stata il modello Mini-PROTEAN 3 Cell della BIO-RAD (Hercules, USA).

I gel sono stati poi colorati tramite Coomassie R-250, che all'1% in una soluzione acquosa contenente un 40% v/v di metanolo e un 10% v/v di acido acetico

tende a legarsi ai legami peptidici nel giro di 40 min circa [Southern EM 1970]. Alla colorazione sono seguiti almeno due trattamenti da 20 minuti, sempre sotto agitazione, con una miscela decolorante (acqua, 40% v/v di metanolo e 10% v/v di acido acetico).

L'acquisizione delle immagini è stata fatta tramite l'apparecchio Chemi Doc della BIO-RAD stessa.

3.3. FORMAZIONE DI FIBRILLE AMILOIDI

Dopo alcune prove preliminari a diversi valori di pH e in presenza di solventi quali l'etanolo o il 2,2,2-trifluoroetanolo (TFE), si è scelto di far formare fibrille amiloidi di HEWL tramite incubazione a 65 °C in soluzioni acquose di HCl a pH 2,0, come del resto già descritto in letteratura [Krebs MR *et al.* 2000]. Sono state impiegate concentrazioni di proteina pari a 1 mM, seguendo il processo per 10 giorni.

L'incubazione è avvenuta in bagnetto a secco modello 2091 della Lab-Line Instruments (Melrose Park, USA).

L'aggregazione amiloide del peptide 49-64 (Cap. 2) è stata realizzata, anche qui dopo alcune prove iniziali, incubando a 37 °C in soluzioni di HCl a pH 4,0 per 20-30 ore. La concentrazione proteica è stata in questo caso ridotta a 0,2 mM, valore rivelatosi ottimale per gli studi di cinetica. In alcuni casi il processo è stato condotto anche a pH 2,0 e seguito fino a 48 ore. Nella Tab. 3.1 è offerta una panoramica delle prove che sono state fatte con il peptide 49-64 prima della scelta delle condizioni operative finali.

Concentrazione (mM)	Temperatura (°C)	pH (con HCl)	Solventi (% v/v)	Altre condizioni
1	37	4	-	-
0,1	37	4	-	-
0,2	37	4	-	-
0,2	37	4	-	Peptide scongelato
0,2	37	2	-	-
0,2	37	7,2 (con NaOH)	-	-
0,2	37	4	DMSO 1%	-
0,15	37	4	-	-
0,2	37	4	DMSO 0,2%	-
0,2	37	4	-	EDTA 1 mM*
0,2	37	4	DMSO 1%	Peptide pre-dissolto in DMSO**

* Chelante impiegato per escludere interferenze a carico d'impurezze di cationi metallici
 ** Solvente talvolta utilizzato per la conservazione degli stock di peptide

Tabella 3.1. Schema riassuntivo dei principali parametri variati per ottimizzare l'aggregazione amiloide del peptide 49-64.

Tutti i risultati rappresentano la media di almeno tre distinti esperimenti.

3.4. VALUTAZIONE DELLA COMPARSA DI FIBRILLE AMILOIDI

La progressiva comparsa di fibrille amiloidi nel corso dell'incubazione delle proteine modello è stata monitorata sia sul piano qualitativo che su quello quantitativo, facendo uso, come raccomandato da tutta la letteratura specialistica, di varie tecniche d'indagine, la maggior parte delle quali di tipo spettroscopico.

3.4.1. Dosaggio fluorimetrico tramite tioflavina T

La cinetica dell'aggregazione amiloide dell'HEWL e del peptide 49-64, in presenza o meno di polifenoli, è stata monitorata attraverso il test della ThT. Questa sostanza si lega specificatamente alle fibrille amiloidi (Fig. 3.3), innalzando la propria fluorescenza a 485 nm in seguito a eccitazione a 440 nm [LeVine H 1993]. Il legame non sembra avvenire né con il monomero proteico, né con gli intermedi oligomerici, necessitando della presenza di vari β -strand contigui (identificabili invece sia nei protofilamenti che nelle fibrille amiloidi).

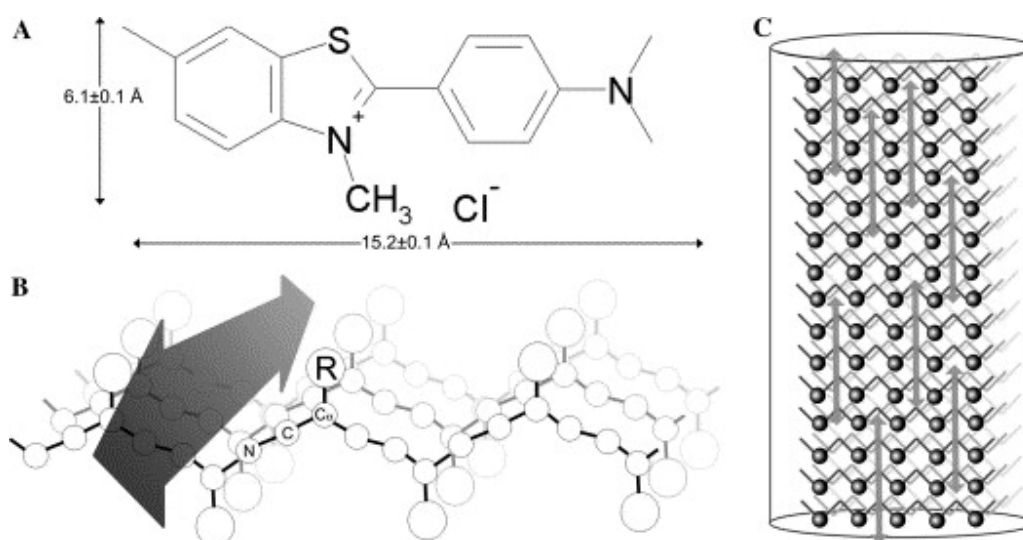


Figura 3.3. Modello della disposizione della ThT sulla superficie delle fibrille amiloidi [Krebs MR *et al.* 2005].

A tempi predeterminati i campioni sono stati agitati tramite vortex, vista l'importanza del movimento nel processo di formazione delle fibrille amiloidi [Lieu VH *et al.* 2007]. Soluzioni 2,5 mM di ThT in tampone fosfato di sodio 25 mM a pH 6,0, preparate ogni 2 settimane, sono state diluite 100 volte nei giorni di impiego, usando lo stesso tampone fosfato. 460 μ l di tali soluzioni diluite sono stati uniti a 40 μ l di

campione, agitati su vortex e osservati al fluorimetro alla temperatura di 25 °C. I segnali dei campioni sono stati corretti tramite letture della fluorescenza di base delle soluzioni diluite di ThT e di HCl. Un sensibile incremento della fluorescenza nel corso dell'incubazione è stato considerato indicativo della progressiva comparsa di fibrille amiloidi. Durante il procedere dell'aggregazione i quantitativi di campione sono stati opportunamente ridotti, verificando la linearità della risposta dell'apparecchiatura nell'intervallo delle concentrazioni considerate.

La fluorescenza è stata misurata tramite fluorimetri PerkinElmer (Waltham, USA), modelli 650-10S o LS 55, o Shimadzu (Kyoto, Giappone), modello RF-5000, usando fessure di 5 nm sia in eccitazione che in emissione. I campioni sono stati posti in cuvette Hellma (Müllheim, Germania) con cammini ottici di 2 x 10 mm.

3.4.1.1. Leggi cinetiche

Le cinetiche ottenute per l'HEWL sono risultate curve di tipo sigmoidale. Un soddisfacente *fitting* è stato infatti possibile tramite l'equazione:

$$F = A_0 + \frac{A}{1 + e^{(t_{1/2}-t)k_{agg}}}$$

dove A_0 rappresenta la fluorescenza iniziale, A la fluorescenza finale, t il tempo d'incubazione, $t_{1/2}$ il tempo necessario per avere metà aggregazione e k_{agg} la costante di velocità apparente d'aggregazione [Nielsen L *et al.* 2001]. In genere i segnali sono stati normalizzati a 240 h e su di essi è stato applicato un filtro di *smoothing* mediando i valori in un intorno di 24 h.

Usando il peptide 49-64 il *fitting* dei dati è stato realizzato tramite la seguente equazione di una curva esponenziale:

$$F = Ae^{-k_{agg}t} + q$$

dove A rappresenta la variazione complessiva di fluorescenza fra il tempo 0 e un tempo infinitamente lungo, t il tempo d'incubazione, k_{agg} la costante di velocità apparente d'aggregazione e q la fluorescenza a $t = \infty$. In questo caso i segnali sono stati generalmente normalizzati a 24 h e su di essi è stato applicato un filtro di *smoothing* mediando i valori in un intorno di 2 h.

3.4.2. Test del Congo red

Anche il colorante rosso Congo si lega selettivamente alle fibrille amiloidi, modificando così il proprio spettro di assorbimento nel visibile [Klunk WE *et al.* 1989]. L'interazione sembra instaurarsi grazie alla presenza di ripetuti foglietti β (Fig. 3.4). Il

test può quindi supportare quello della tioflavina, soprattutto nella valutazione degli effetti di eventuali inibitori dell'aggregazione amiloide.

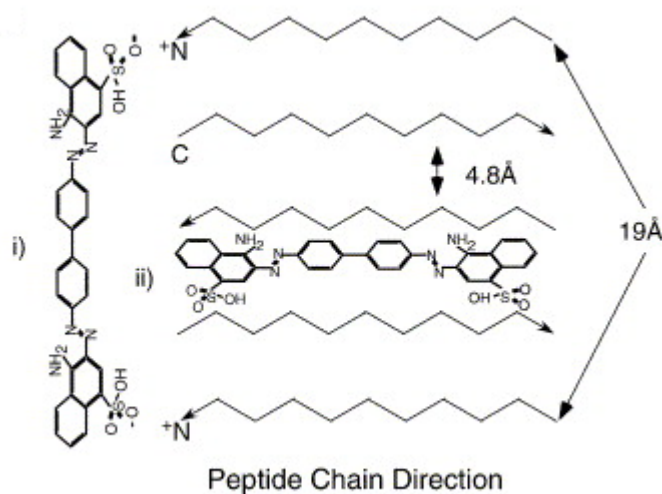


Figura 3.4. Doppia ipotesi d'interazione fra Congo red e fibrille amiloidi [riadattamento da Frid P *et al.* 2006].

Una soluzione di Congo red 50 mM in tampone a pH 7,4 (150 mM in NaCl e 5 mM in fosfato di sodio) è stata preparata il giorno d'impiego, filtrata attraverso pori di 0,2 μm e poi diluita 50 volte nello stesso tampone cloruro di sodio-fosfato di sodio. Si sono poi registrati gli spettri d'assorbimento di: 1) tampone (440 μl) unito alla soluzione delle fibrille amiloidi (60 μl ; nel caso dell'HEWL dopo diluizione 1:20 in HCl a pH 2,0); 2) soluzione diluita di Congo red (440 μl) unita alla soluzione di HCl in cui sono state prodotte le fibrille (60 μl); 3) soluzione diluita di Congo red (440 μl) unita alla soluzione delle fibrille (60 μl). Dopo aver corretto tutti questi spettri sottraendo lo spettro del solo tampone, si è determinato lo spettro differenza 3) - 2) - 1): un tipico red-shift nel massimo d'assorbanza del colorante e la comparsa di un picco a 540 nm sono stati considerati indicativi della formazione d'aggregati amiloidi con struttura a foglietto β .

I vari spettri sono stati acquisiti tramite uno spettrofotometro UV-visibile Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 (Uppsala, Svezia), usando una cuvetta Hellma (Müllheim, Germania) con un cammino ottico di 4 x 5 mm.

3.4.3. Dicroismo circolare

L'analisi al CD, assieme alla spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier, permette una valutazione della tipologia di struttura secondaria (random, ad α -elica o a foglietto β) delle proteine [Johnson WC 1990]. I carboni α di tutti gli aminoacidi ad

eccezione della glicina (molecola non chirale) assorbono in modo disomogeneo i due raggi polarizzati circolarmente in verso opposto da cui può considerarsi costituito un fascio di luce sottoposto a polarizzazione lineare. Questo è dovuto ai diversi angoli diedri che ogni C forma con l'azoto precedente e il carbonio successivo. L'ellitticità del segnale, ossia la differenza dell'assorbimento destro e sinistro, viene espressa in milligradi. Talora si riportano le differenze fra i coefficienti di estinzione molare ($\Delta\epsilon$) delle componenti destra e sinistra del raggio incidente (Fig. 3.5). Programmi specifici permettono di deconvolvere gli spettri CD e risalire quindi alle percentuali di struttura α , β ecc. nella proteina in esame [Greenfield NJ 1996].

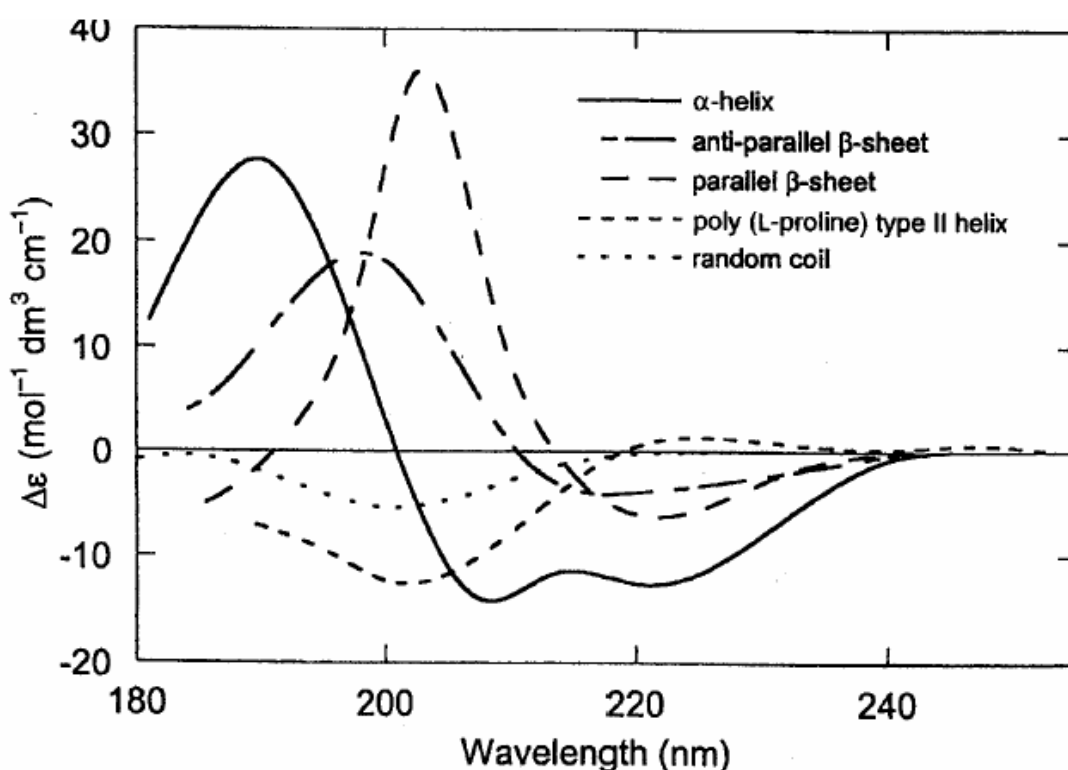


Figura 3.5. Tipici spettri CD di strutture secondarie "pure" [Brahms S *et al.* 1980].

L'aggregazione amiloide del peptide 49-64, in presenza o meno di sostanze polifenoliche, è stata seguita anche tramite dicroismo circolare. Gli spettri nel lontano ultravioletto (190-250 nm) sono stati registrati usando una velocità di scansione di 50 nm/min, con *step* di 0,5 nm, e una fessura nella selezione del raggio incidente di 1 nm. Ogni spettro è stato mediato su cinque scansioni e corretto per sottrazione dello spettro del solvente. I campioni contenevano 0,13 mg/ml di peptide in HCl a pH 4,0. La temperatura (25 °C) è stata regolata tramite un termostato.

Gli spettri sono stati acquisiti su uno spettropolarimetro J-810 della Jasco (Hachioji, Giappone), usando una cuvetta della Hellma (Müllheim, Germania) con un cammino ottico di 1 x 10 mm.

3.4.4. Dynamic light scattering

L'analisi al DLS di una dispersione colloidale permette di determinare il diametro idrodinamico apparente dei vari tipi di particelle presenti. La grandezza in oggetto rappresenta il diametro di un sistema di particelle sferiche che darebbe lo stesso tipo di diffusione della luce incidente del campione analizzato. In pratica sul colloide viene inviato un raggio laser pulsante, osservandone da un'angolazione prefissata le variazioni in dispersione della luce (*scattering*) causate nel tempo dalla fase discontinua in moto browniano (Fig. 3.6). Si ricava così il coefficiente di diffusione delle particelle, a sua volta correlato dall'equazione di Stokes-Einstein al loro diametro idrodinamico (questo in caso di sfere) [Schmitz KS 1990].

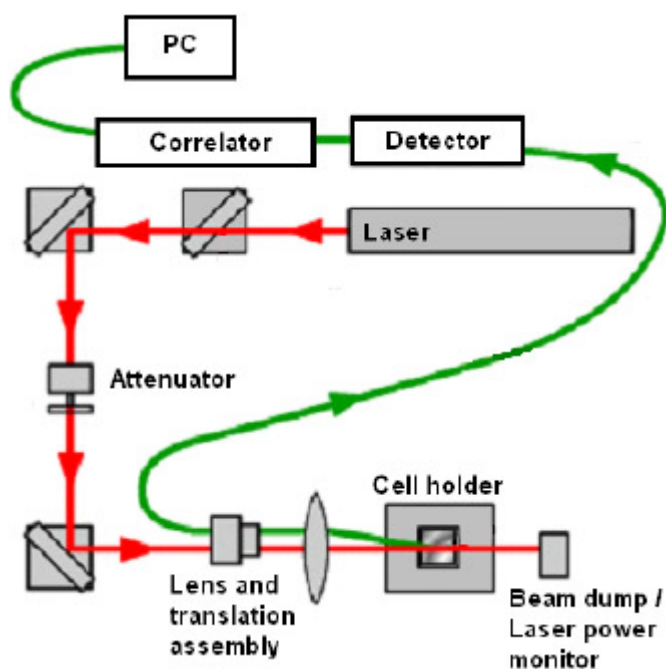


Figura 3.6. Schema di apparecchiatura per DLS (Zetasizer Nano-S della Malvern Instruments).

Le soluzioni iniziali di HEWL (0,41 mg/ml; pH 2,0 per HCl) sono state fatte passare attraverso un filtro da 0,02 μm e studiate a 25°C. Durante la formazione delle fibrille amiloidi i campioni sono stati diluiti fino a una concentrazione finale in proteina pari a 10 μM .

Il peptide 49-64 è stato osservato a una concentrazione iniziale di 0,38 mg/ml in HCl a pH 4,0, sempre previa filtrazione. Di nuovo si è lavorato a 25 °C. Le fibrille corrispondenti sono state analizzate a una concentrazione pari a 100 µM. Le analisi sono state condotte anche in presenza di alcuni polifenoli.

Tutte le indagini di scattering sono state effettuate su un apparecchio Zetasizer Nano-S della Malvern Instruments (Malvern, Regno Unito), utilizzando cuvette monouso con un cammino ottico di 10 mm. Nello strumento il laser a He-Ne generava una luce monocromatica con lunghezza d'onda pari a 633 nm. Un attenuatore ne lasciava poi passare in automatico dallo 0,0003% al 100%. La diffusione veniva osservata con un angolo di 173° rispetto al raggio incidente.

3.5. ANALISI MORFOLOGICA DELLE FIBRILLE AMILOIDI

L'analisi morfologica delle fibrille amiloidi è attualmente effettuata, oltre che con la microscopia elettronica, con quella a forza atomica. La tecnica sfrutta le interazioni elettrostatiche che s'instaurano tra una piccolissima punta ed il campione, permettendo di risolvere strutture, anche con dimensioni nanometriche, senza mai penetrare nel materiale. La sonda è una microleva (*cantilever*) alla cui estremità si trova una piccola punta piramidale in silicio. Essa è messa in oscillazione alla sua frequenza di risonanza, e una volta avvicinata alla superficie in analisi segue la sua topografia con un movimento a scansione nel piano (x, y) e in z, movimento generato da un attuatore piezo-elettrico. I suoi spostamenti sono controllati e rivelati tramite un sistema ottico: un laser è focalizzato sulla microleva ed il raggio riflesso è inviato ad un foto-rivelatore. Un sistema di *feedback* tra la microleva ed il meccanismo di movimentazione permette di ricostruire l'andamento della superficie studiata in immagini tridimensionali (Fig. 3.7).

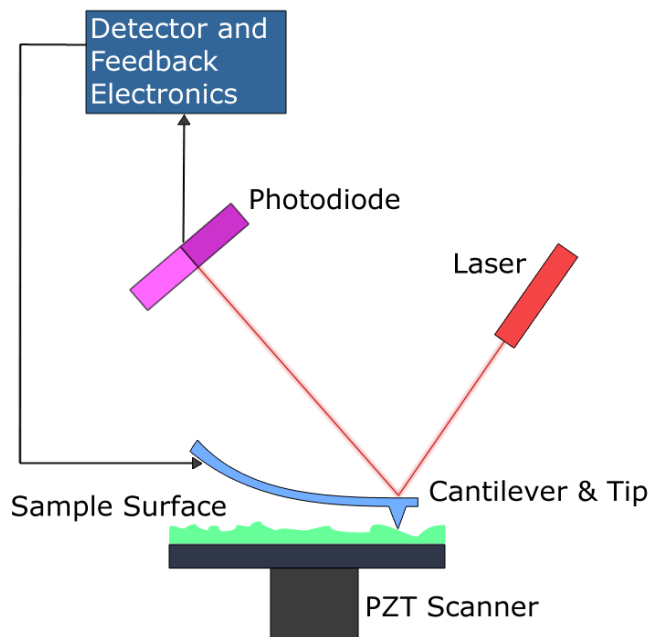


Figura 3.7. Schema di un'apparecchiatura per AFM.

Per l'analisi in AFM, effettuata dal Dottor B. Tiribilli, del Consiglio Nazionale delle ricerche - Istituto dei Sistemi Complessi, Sezione di Firenze, le soluzioni di HEWL o del peptide 49-64, in presenza o meno di polifenoli, sono state scongelate e diluite con acqua fino a concentrazioni proteiche pari a 20 o 10 μM . Circa 5 μl di tale materiale sono stati agitati gentilmente e poi depositati su un dischetto di mica la cui superficie era stata appena rinnovata in seguito a sfaldamento tramite nastro adesivo. Il materiale proteico è stato fatto aderire alla mica, ricca di cariche negative, per circa 2 min, poi lavato per due volte con acqua e quindi asciugato tramite un leggero flusso di azoto.

Le scansioni AFM sono state effettuate all'aria in modalità di contatto dinamico usando un microscopio PicoSPM equipaggiato con un ACC-Mode controller, dell'Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Sono state usate *non-contact cantilever* in silicio modello NGS-01 della NT-MDT (Mosca, Russia), con una tipica frequenza di risonanza di 150 kHz. La calibrazione dello scanner è stata effettuata periodicamente tramite una griglia di riferimento TGZ02 della MikroMash (Tallinn, Estonia), di passo 3 μm e altezza 104 nm. I campi osservati avevano dimensioni variabili dai 450 x 450 nm^2 ai 30 x 30 μm^2 . Le immagini acquisite sono state processate e analizzate tramite il software WSxM, versione 3.0 Beta 10.0, della Nanotec Electronica S. L. (Madrid, Spagna) [Horcas I *et al.* 2007]. In particolare le dimensioni degli aggregati proteici sono state ricavate dall'applicazione di specifiche funzionalità del software ai profili in altezza delle varie immagini topografiche, avendo cura di considerare un numero significativo

(diverse decine) di particelle. Normalmente questi calcoli statistici hanno coinvolto campi di osservazione di $3 \times 3 \mu\text{m}$.

3.6. SOLUBILIZZAZIONE DEI POLIFENOLI E LORO STUDIO PRELIMINARE

Poiché scarsamente solubili, alcuni polifenoli sono stati preventivamente disciolti in dimetilsolfossido (DMSO), procedendo così a incubazioni in presenza di quantitativi finali di tale solvente pari allo 0,2-5%. L'impiego di queste ridotte concentrazioni di DMSO non ha rivelato nessun effetto degno di nota sui processi di aggregazione studiati. Sulle problematiche di solubilizzazione dei polifenoli con attività anti-amiloidegenica non erano del resto disponibili molti lavori scientifici.

Nel caso dell'estratto di rosmarino è stato necessario portare a secco, riprendere con un minimo volume di DMSO (solvente risultato pari al 5% v/v nei campioni incubati con la proteina modello) e diluire infine con una soluzione d'acido cloridrico a pH 2,0. Talvolta si è proceduto anche a centrifugazioni, che comunque non hanno alterato la composizione globale in polifenoli, come controllato tramite HPLC/DAD dal gruppo di ricerca della Professoressa N. Mulinacci.

Prima dell'impiego nei test contro l'aggregazione amiloide, sono state verificate, per ciascun polifenolo, eventuali interferenze con il saggio della ThT: in pratica sono stati acquisiti gli spettri d'emissione fra 450 e 500 nm delle varie molecole a fronte di un'eccitazione costante a 440 nm.

3.7. VERIFICA DELLA STABILITÀ DEI POLIFENOLI NELLE CONDIZIONI D'IMPIEGO

Visti i dati un po' frammentari disponibili in letteratura, la stabilità a pH acido (fino a 2,0) e a caldo (fino a 65 °C) delle principali sostanze fenoliche impiegate è stata monitorata tramite apparecchiature HPLC/DAD e HPLC/MS, accertandosi della presenza o meno d'eventuali prodotti di degradazione. Anche in questo caso il controllo è stato eseguito dal gruppo di lavoro della Professoressa N. Mulinacci.

3.8. AGGREGAZIONE AMILOIDE IN PRESENZA DI POLIFENOLI

La formazione di fibrille di HEWL o del peptide 49-64 è stata studiata in presenza di quantità per lo più stechiometriche dei vari polifenoli.

Negli esperimenti con HEWL e miscele di due polifenoli, ciascuno di questi è stato usato in genere alla concentrazione 1 mM.

Lavorando con gli estratti, normalmente portati a secco in rotavapor e ripresi con una soluzione di acido cloridrico a pH 2,0, sono state usate concentrazioni in polifenoli totali pari di nuovo a 1 mM.

3.9. VALUTAZIONE DELLA DOSE-DIPENDENZA DEGLI EFFETTI ANTI-AMILOIDOGENICI

La dose-dipendenza dell'effetto anti-amiloidogenico di alcuni polifenoli è stata valutata tramite l'incubazione assieme all'HEWL o al peptide 49-64 a concentrazioni diverse dall'equimolare (5:1, 4:1, 2:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:7, 1:10, 1:20), sempre monitorando il processo tramite il test della ThT. Lavorando con il peptide 49-64 si è in genere ritenuto opportuno abbassare la concentrazione a 150 μ M, in modo da dilatare un po' i tempi della sua aggregazione amiloide.

Il fitting dei dati è stato in ogni caso realizzato tramite la funzione:

$$y = \frac{Bx}{K + x}$$

dove B rappresenta l'inibizione massima ottenibile nel processo di aggregazione amiloide e K la concentrazione polifenolica alla quale l'effetto inibitorio risulta metà di quello massimo.

3.10. TEST DI DISAGGREGAZIONE DELLE FIBRILLE AMILOIDI

Gli studi sull'effetto disaggregante di alcune sostanze polifenoliche sono stati eseguiti sempre tramite il test fluorimetrico della ThT. Campioni di proteina modello sono stati incubati per varie ore e addizionati poi di quantità equimolari di polifenoli. L'incubazione è stata quindi monitorata per qualche altro giorno.

3.11. MOLECULAR MODELING

Gli studi preliminari di molecular modeling sono stati eseguiti dal Professor F. Melani, del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Ateneo fiorentino. Sono state scelte diciassette delle molecole testate. Ciascuna di esse è stata sottoposta ad analisi conformazionale con la metodica denominata *simulated annealing*. Questa è una tecnica che si basa sulla simulazione dei moti molecolari con i principi della dinamica

molecolare. Il simulated annealing è stato condotto nel vuoto ad una temperatura massima di 900 K.

A tale scopo si è utilizzato il *force-field* CFF91 implementato nel programma DISCOVER, versione 2006, dell'Accelrys (San Diego, USA).

Il simulated annealing usato prevedeva un rapido riscaldamento simulato fino alla temperatura di 900 K; le molecole sono state tenute a questa temperatura per 10 ps e successivamente lasciate raffreddare per 3 ps, ed infine rilasciate (con minimizzazione dell'energia conformazionale) con l'algoritmo *conjugate gradient* fino a quando il valore massimo del gradiente d'energia fosse risultato minore di 0,05 kcal/Å. Questo ciclo di riscaldamento-raffreddamento-minimizzazione è stato ripetuto 200 volte, ed ad ogni ciclo è stata raccolta una conformazione. Si sono pertanto ottenute duecento conformazioni per molecola, raggruppate poi in *cluster* con un RMS (*root mean square*) relativo ai gruppi farmacoforici (atomi donatori - Do - o accettori - Ac - d'idrogeno) inferiore a 2 Å. Come gruppi donatori sono stati considerati solo gli ossidrilici fenolici, indispensabili per l'attività anti-amiloidegenica. Per ogni composto sono state considerate, nelle elaborazioni successive, almeno il 50% delle conformazioni ottenute. Per ogni cluster è stata calcolata la conformazione media. Nelle conformazioni medie sono state poi cercate le combinazioni di farmacofori comuni a tutte le molecole. Per tale ricerca è stata presa come molecola di riferimento il cumestrolo, sostanza assai attiva contro l'aggregazione amiloide del peptide 49-64 e con pochi gruppi farmacoforici ed elevata rigidità strutturale. Fra tutte le possibili soluzioni ne sono state scelte due, entrambe con un gruppo accettore e due gruppi donatori (Fig. 3.8). Tali soluzioni avevano come riferimenti i due -OH fenolici (donatori di legame a idrogeno Do1 e Do2) e i due ossigeni del gruppo lattonico (accettori di legame a idrogeno Ac(a) e Ac(b)).

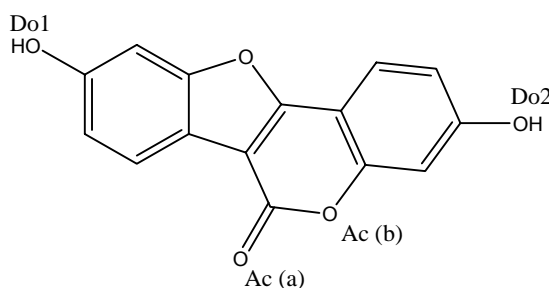


Figura 3.8. Struttura chimica del cumestrolo. Le lettere (a) e (b) mettono in evidenza gli ossigeni del gruppo lattonico utilizzati come accettori di legame a idrogeno nelle due soluzioni prescelte.

Sono state misurate le distanze fra i tre farmacofori. Infine è stato verificato attraverso un'opportuna analisi statistica se le distanze osservate nelle molecole attive fossero significativamente diverse da quelle rilevate nei composti inattivi. In questo

caso sono state considerate attive le sostanze in grado di inibire l'aggregazione amiloide del peptide 49-64 per almeno il 30%. Per verificare le differenze tra i due gruppi (molecole attive e inattive) è stato effettuato il *t-test* per comparare le medie e calcolato il relativo *p* per verificare se l'ipotesi dell'uguaglianza dei due gruppi fosse da ritenersi nulla ($p < 0,05$). Poiché il calcolo del *t* di Student prevede che la varianza delle due popolazioni a confronto sia significativamente uguale ($p > 0,05$), sono state comparate le deviazioni standard dei due gruppi attraverso l'*F-test* e la valutazione della probabilità *p*. Per visualizzare le differenze tra i due gruppi è stato costruito il "*Box-and-Whisker Plot*".

I calcoli relativi al *t-test* e all'*F-test* e i grafici "*Box-and-Whisker*" sono stati realizzati con il programma d'elaborazione statistica STATGRAPHICS Plus della Manugistics (Rockville, USA).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. AGGREGAZIONE AMILOIDE DELL'HEWL E DEL PEPTIDE 49-64

Le cinetiche di aggregazione amiloide dell'HEWL e del peptide di sintesi 49-64 sono state ricostruite tramite un numero notevole di prove (alcune decine), lavorando in genere in duplicato o triplicato, e monitorando i processi tramite il test della ThT (Par. 3.4.1). Le curve di fitting (Par. 3.4.1.1) ottenute sono riportate in Fig. 4.1.

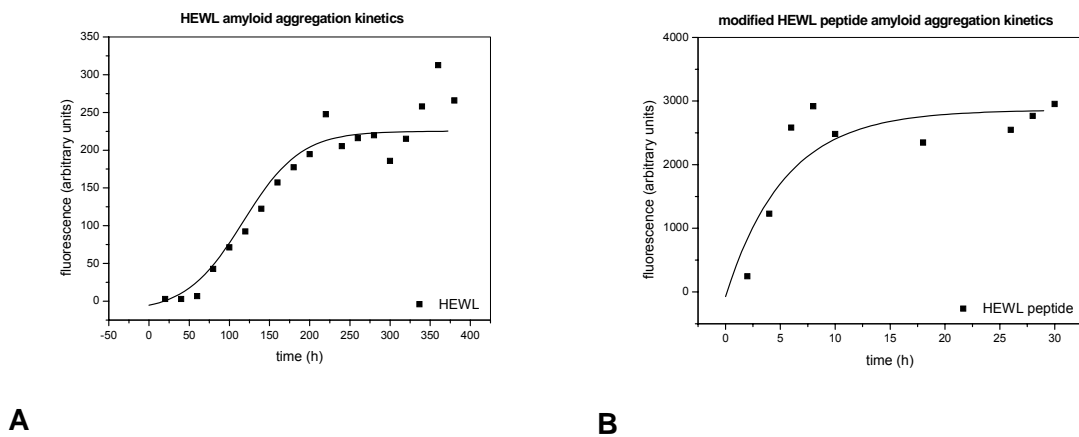


Figura 4.1. Cinetiche di aggregazione amiloide dell'HEWL (A) e del peptide 49-64 (B), monitorate tramite il test della ThT.

Utilizzando l'SDS-PAGE (Par. 3.2) è stato possibile confermare la correlazione fra la fase di latenza di 2-3 giorni mostrata dalla curva A della Fig. 4.1 e la proteolisi cui va incontro l'HEWL in ambiente acido a caldo (Fig. 4.2). La banda più scura della seconda *lane* da sinistra nel gel, corrispondente alla proteina nativa, è risultata gradualmente scomparire al procedere dell'incubazione, lasciando il posto a vari frammenti di peso molecolare inferiore a 10 kDa. Dopo 65 h di riscaldamento il fenomeno può considerarsi già in fase avanzata. Anche in questo caso, oltre che alla proteolisi, lo stadio di latenza deve essere correlato ai fenomeni di nucleazione preliminari all'accrescimento delle strutture β -amiloidi. Dopo la fase di elongazione, il processo ha raggiunto rapidamente un *plateau* (intorno al settimo giorno). I valori di fluorescenza registrati a questo livello sono risultati abbastanza dispersi. Ciò può essere imputato sia alle difficoltà di prelievo delle fibrille (del tutto insolubili) che alla graduale comparsa di fenomeni di scattering. Utile si è comunque rivelato l'impiego di punte per pipette opportunamente tagliate all'estremità.

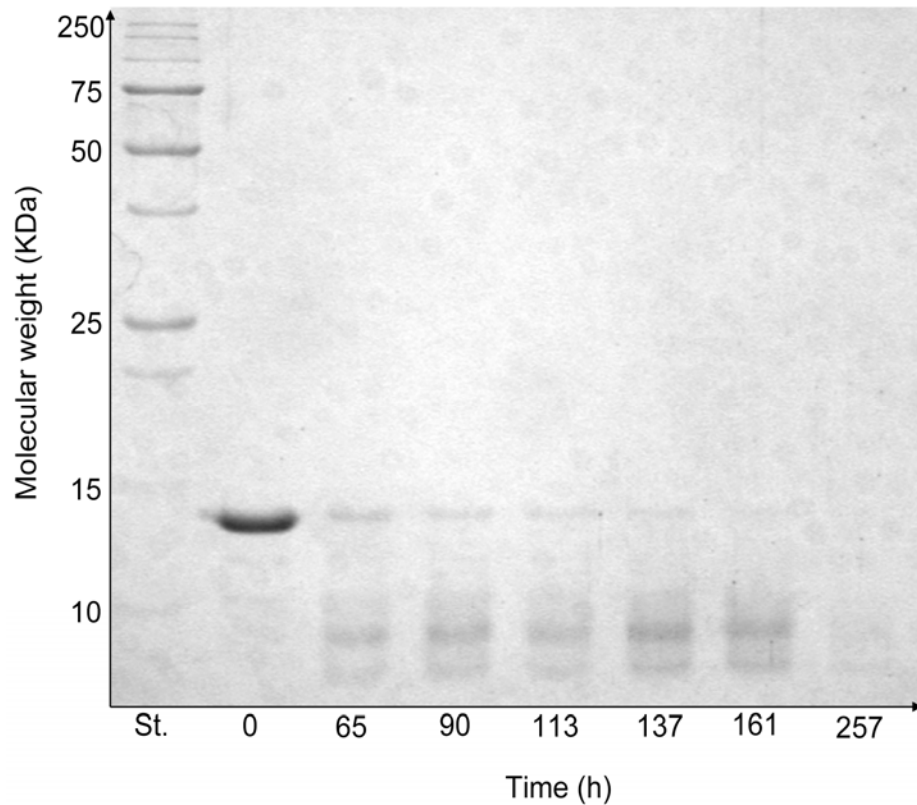


Figura 4.2. SDS-PAGE di soluzioni di HEWL in vari momenti della sua aggregazione amiloide. In ogni pozzetto sono stati depositati 2 μg di proteina. La corsa elettroforetica ha avuto una durata di 50 min.

Nel caso del peptide 49-64 (curva B) il processo di aggregazione è apparso molto più breve (si è giunti ad un plateau abbastanza definito già dopo 8-12 h). La lag phase è risultata praticamente assente (non si ha infatti la necessità della frammentazione iniziale), per cui la cinetica complessiva dell'aggregazione è stata riprodotta con una curva esponenziale.

La progressiva formazione di fibrille amiloidi mature è stata successivamente indagata tramite AFM (Par. 3.5), in genere su campioni precongelati (Fig. 4.3). Dal confronto fra le immagini di preparati freschi o conservati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ è emerso che il congelamento non ha praticamente influenza su questo tipo di analisi. Le strutture fibrillari di HEWL (sul piano statistico circa il 7% degli aggregati presenti nel campo A3) sono risultate lunghe da 0,3 a 3 μm e con un diametro di 4-8,5 nm.

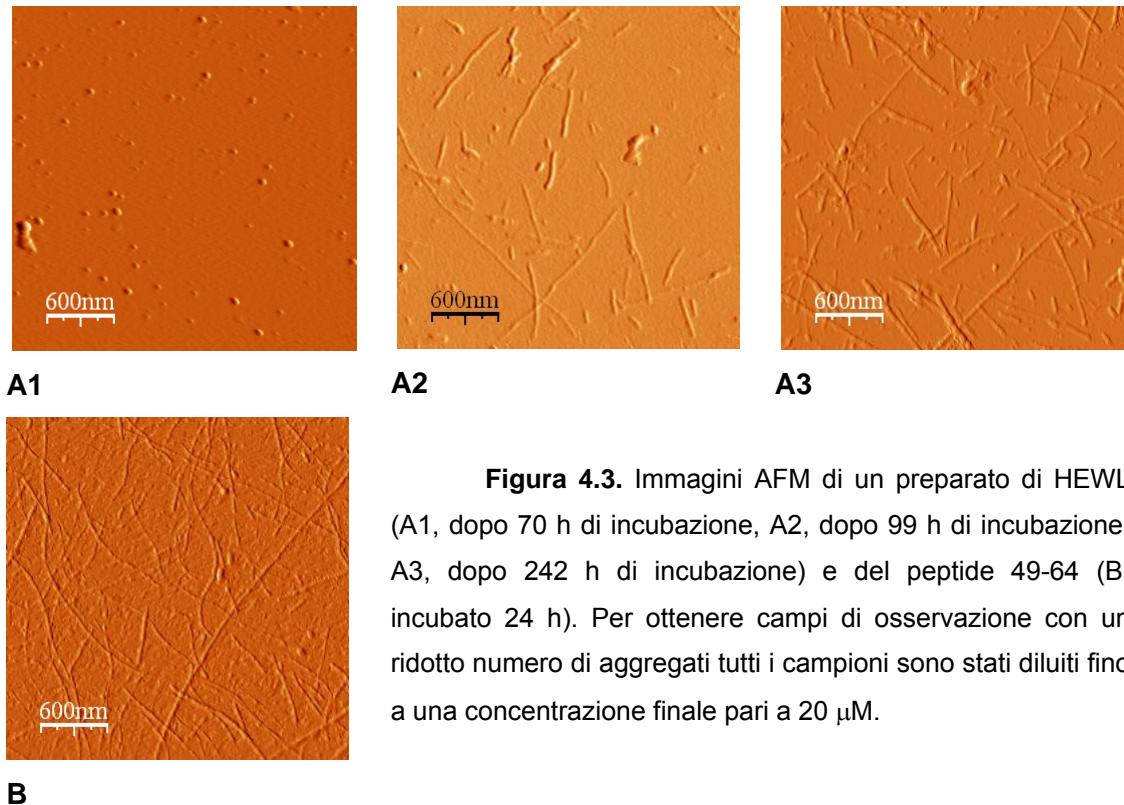


Figura 4.3. Immagini AFM di un preparato di HEWL (A1, dopo 70 h di incubazione, A2, dopo 99 h di incubazione, A3, dopo 242 h di incubazione) e del peptide 49-64 (B, incubato 24 h). Per ottenere campi di osservazione con un ridotto numero di aggregati tutti i campioni sono stati diluiti fino a una concentrazione finale pari a 20 μM .

Questi valori possono considerarsi in buon accordo con altri dati già riportati in letteratura: diametri di circa 4 nm e lunghezze di oltre 5 μm nelle fibrille di HEWL formatesi in 69 h a pH 2,0 e 57 °C [Arnaudov LN *et al.* 2005]. D'altra parte proprio quest'ultimo lavoro sottolinea come i tempi e i prodotti dell'aggregazione amiloide siano fortemente influenzati dal pH e dalla temperatura. Le fibrille amiloidi ottenute dal peptide 49-64 (oltre il 19% degli aggregati presi in considerazione) hanno rivelato dimensioni (lunghezza: 0,1-6,5 μm ; diametro: 6-8,5 nm) paragonabili a quelle già descritte (lunghezza superiore a 1 μm e diametro di 10 nm) tramite la microscopia elettronica [Krebs MR *et al.* 2000].

L'organizzazione spaziale degli aggregati ottenuti dall'HEWL e dal peptide 49-64 è stata confermata anche dal test del Congo red (Par. 3.4.2). Questi risultati sono raccolti nella Fig. 4.4. La presenza di una "spalla" intorno a 540 nm nello spettro 3 e di un corrispondente massimo nello spettro differenza (di colore blu) hanno indicato la formazione di materiale con struttura β . Prove ulteriori hanno mostrato come tali segnali si possano ritrovare anche nelle soluzioni preparate a fresco, ma in misura minore (spettri non riportati). Nel caso dell'HEWL potrebbero formarsi aggregati con struttura β già nel corso della sua purificazione e/o liofilizzazione; nel caso del peptide 49-64 la presenza di tale materiale è di fatto imputabile all'elevata propensione all'aggregazione amiloide in ambiente acquoso. L'impiego di campioni congelati o meno non è sembrato influenzare l'indagine spettrofotometrica in questione.

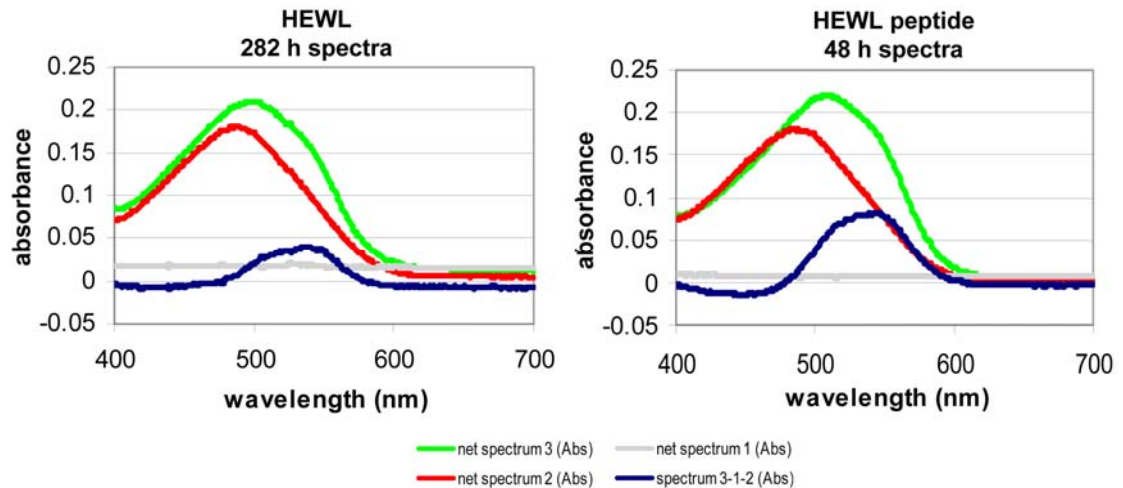


Figura 4.4. Spettri di assorbimento di preparati di HEWL e di peptide 49-64 giunti al termine delle rispettive incubazioni.

Un ulteriore supporto strumentale all'analisi dell'aggregazione amiloide dell'HEWL e del peptide 49-64 è venuto dal DLS (Par. 3.4.4). Anche in questo caso sono stati presi in considerazione preparati provenienti o meno da scongelamento, senza notare sostanziali differenze. Nel caso dell'HEWL, dopo filtrazione il diametro idrodinamico apparente è risultato di pochi nm, come prevedibile per una proteina globulare. Dopo 123 h di incubazione a pH = 2,0 e a 65 °C tale diametro è salito a circa 100 nm (Fig. 4.5).

Per il peptide 49-64 il DLS ha mostrato una popolazione abbastanza eterogenea già al momento dell'allestimento dei preparati (dimensioni a partire da circa 1 nm), probabilmente a causa della rapidità con cui si innescano in questo caso i processi di aggregazione amiloide. Tuttavia dopo poche ore di incubazione, quando il segnale della ThT si è innalzato notevolmente, il diametro idrodinamico medio delle particelle è risultato spostato verso valori superiori ai 100 nm (Fig. 4.6).

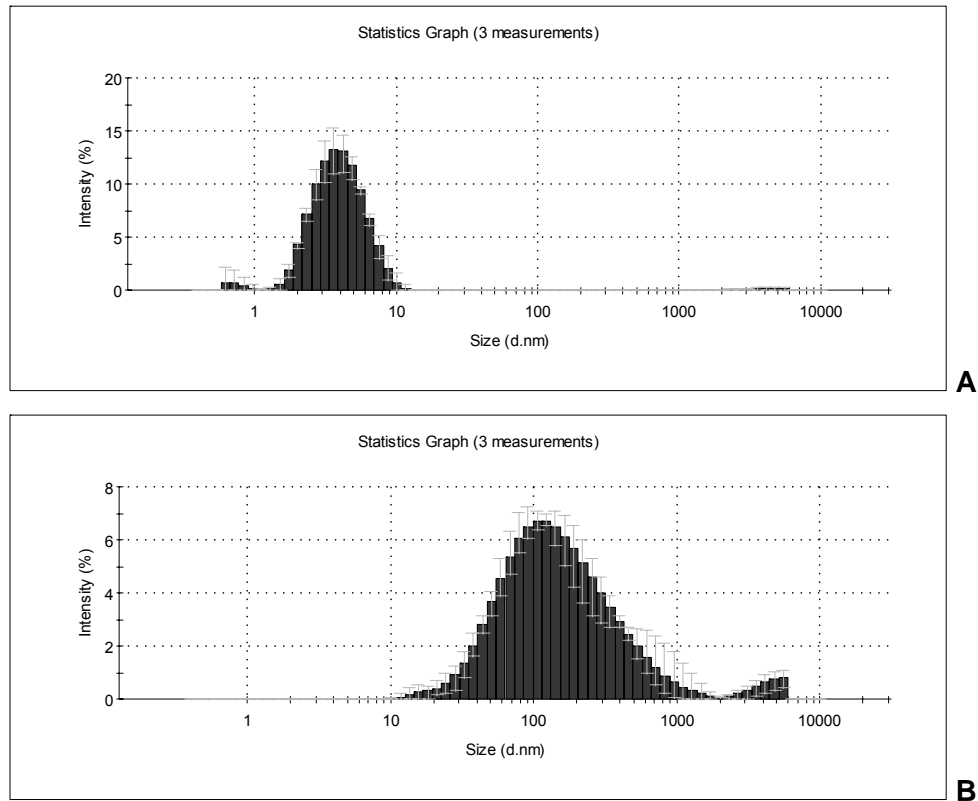


Figura 4.5. Distribuzione statistica delle popolazioni di particelle di HEWL nativo (A, concentrazione finale 50 μM) e sottoposto a prolungata incubazione (B, concentrazione finale 10 μM).

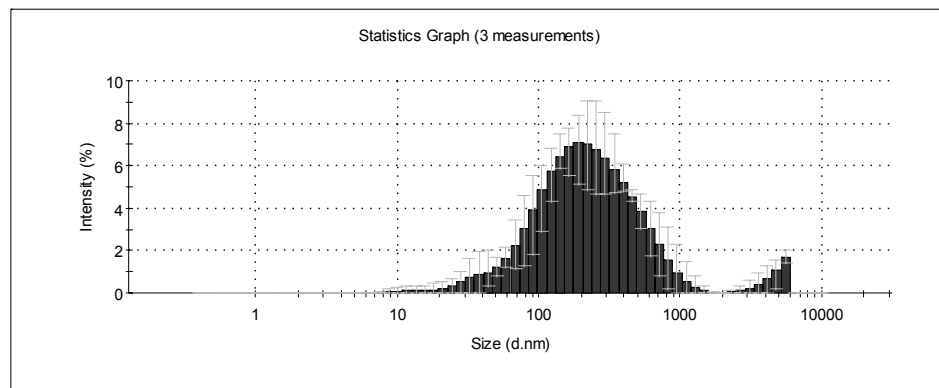


Figura 4.6. Distribuzione dei diametri idrodinamici degli aggregati di peptide 49-64 dopo 7 h di incubazione (concentrazione utilizzata: 200 μM).

Nel caso del peptide 49-64 la cinetica di aggregazione amiloide è stata seguita anche tramite CD, acquisendo spettri a tempi diversi e procedendo alla loro deconvoluzione tramite opportuno software (Par. 3.4.3). I dati raccolti hanno mostrato il progressivo evolversi del sistema da una condizione prevalentemente destrutturata

(*random*) a una ricca di strutture β , come desumibile anche dal profilo generale degli spettri della Fig. 4.7.

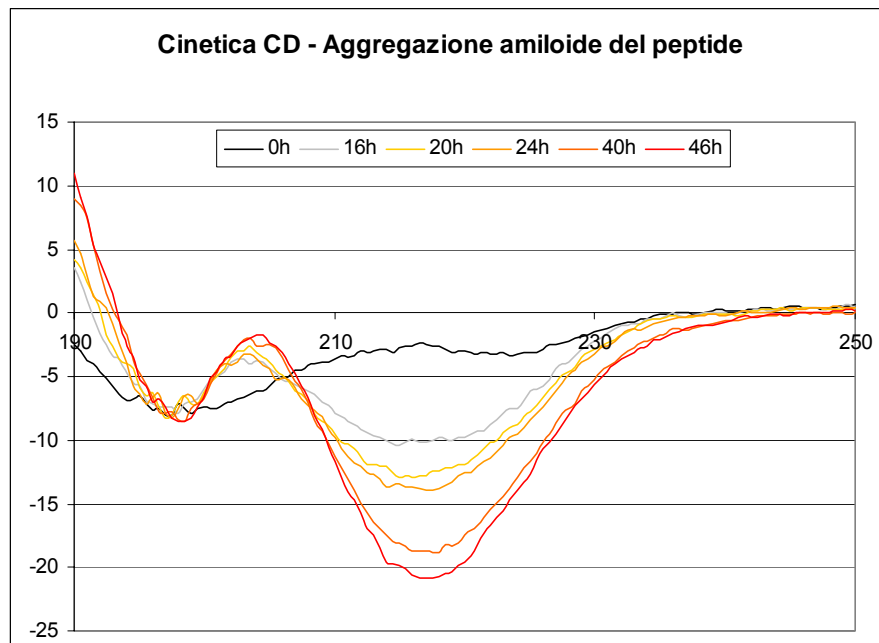


Figura 4.7. Spettri CD del peptide 49-64 durante il processo di aggregazione amiloide. Concentrazioni usate: 0,067 mM.

In particolare l'incremento del segnale a 216 nm è stato considerato indicativo della comparsa di struttura β . In relazione al tempo tale parametro è risultato seguire una legge di tipo esponenziale (Fig. 4.8).

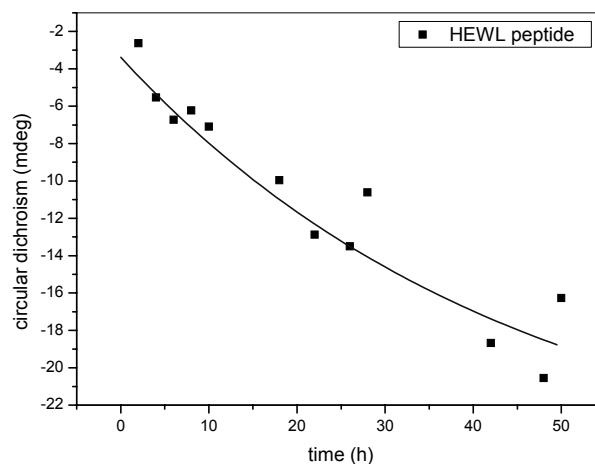


Figura 4.8. Aumento del valore assoluto di ellitticità in campioni 0,067 mM di peptide 49-64 al procedere dell'aggregazione amiloide.

In previsione del ricorso al DMSO per disciogliere preliminarmente i polifenoli con più elevata lipofilia, sono state eseguite prove di aggregazione amiloide dell'HEWL e del peptide 49-64 in presenza di varie concentrazioni del solvente in oggetto. Con l'HEWL si sono testate concentrazioni di DMSO pari anche al 5% v/v; con il peptide 49-64, per il quale erano necessarie concentrazioni dei reattivi cinque volte minori, si è arrivati fino all'1%. Nel caso dell'HEWL non si sono notate sostanziali variazioni nella cinetica dell'aggregazione amiloide (Fig. 4.9).

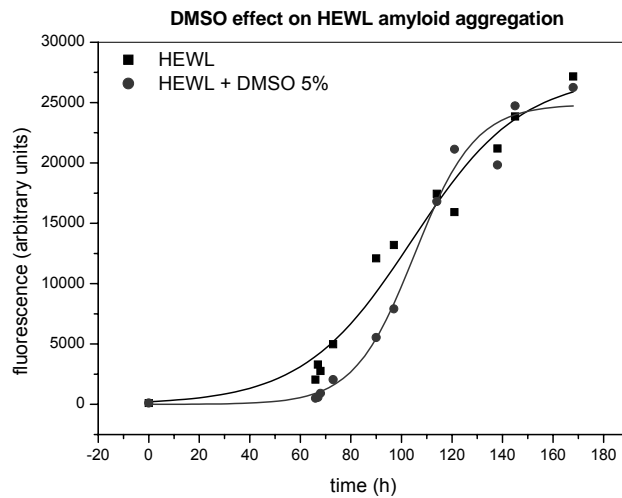


Figura 4.9. Effetto della presenza di un 5% di DMSO sull'aggregazione amiloide dell'HEWL.

Anche lavorando con il peptide 49-64, in genere più sensibile alle variazioni del mezzo, l'andamento del processo di aggregazione amiloide (curva esponenziale) non è risultato alterato, sebbene si siano registrati valori di fluorescenza leggermente più alti. Ogni attività anti-amiloidogenica è stata comunque normalizzata usando come controlli soluzioni di proteina modello contenenti le stesse quantità di DMSO dei preparati polifenolici testati.

4.2. ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DI MOLECOLE POLIFENOLICHE

La selezione dei composti fenolici da sottoporre a screening ha tenuto conto sia della loro distribuzione negli alimenti e nelle piante medicinali che della struttura chimica. Rifacendosi alla tradizionale classificazione di J. B. Harborne sono stati pertanto testati acidi tannici e idrossicinnamici, composti appartenenti a diverse sottoclassi dei flavonoidi (flavonoli, flavoni, isoflavoni, antocianidine e flavanoli) e un derivato stilbenico. Nessuna di queste molecole era stata precedentemente impiegata nello studio dell'aggregazione amiloide dell'HEWL. Le varie sostanze sono state testate in entrambi i sistemi modello, o, in caso di solubilità molto bassa (si vedano ad esempio i flavoni e gli isoflavoni), solo su quello peptidico.

Per tutti i composti gli studi preliminari di stabilità non hanno evidenziato, nei *range* di temperatura e di pH di impiego, processi di degradazione degni di nota. D'altra parte è noto da tempo che le soluzioni acide dei polifenoli sono mediamente assai stabili, tanto da poter essere sottoposte in alcuni casi a decozione.

Tutti i dati raccolti sono stati via via presentati in alcuni congressi scientifici, come "SIB 2006 – 51° Congresso nazionale", Riccione (RN), 28-30 settembre 2006, "2nd Verona International Meeting on Food, Phytotherapeutic Compounds and Health", Verona, 29-30 settembre 2007 e "Fitomed 2008 – III Congresso Intersocietà sulle Piante Medicinali", Salerno, 25-27 giugno 2008. Prossimo alla pubblicazione è anche un lavoro specifico sull'argomento.

4.2.1. Tannini

I tannini costituiscono i polifenoli a più elevato peso molecolare, e quindi presentano molteplici possibilità di interazione con le molecole proteiche. Sulla base di queste considerazioni l'acido tannico, un tannino idrolizzabile, miscela di esteri del glucosio con una o più molecole di acido gallico, è stata una delle prime sostanze testate (Fig. 4.10).

L'acido tannico è ampiamente diffuso nell'alimentazione umana: si ritrova infatti in frutta, tè, vino rosso.

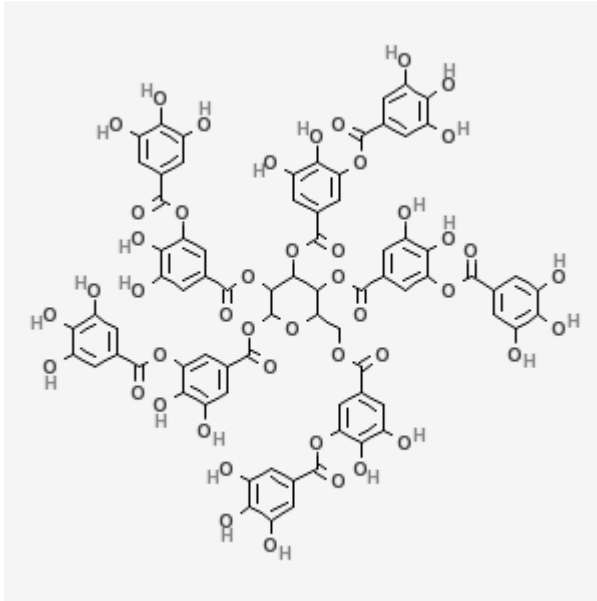


Fig. 4.10. Struttura di una delle molecole polimeriche che costituiscono l'acido tannico (PM = 1701 g/mol).

Data la sua buona solubilità, il prodotto è stato testato sull'aggregazione amiloide sia dell'HEWL che del peptide 49-64.

Prima di essere utilizzato in prove da monitorare con il test della ThT il polifenolo è stato disciolto negli opportuni solventi, eccitato a 440 nm e osservato in fluorescenza intorno ai 485 nm. Questo per accertarsi che un suo eventuale segnale non interferisse con quello della ThT. Di fatto nelle soluzioni di acido tannico, HCl e ThT si sono registrati segnali leggermente superiori a quelli dei solventi di controllo (Fig. 4.11). La sottrazione di volta in volta del bianco correlato ha in ogni modo reso le singole misure corrette e riproducibili.

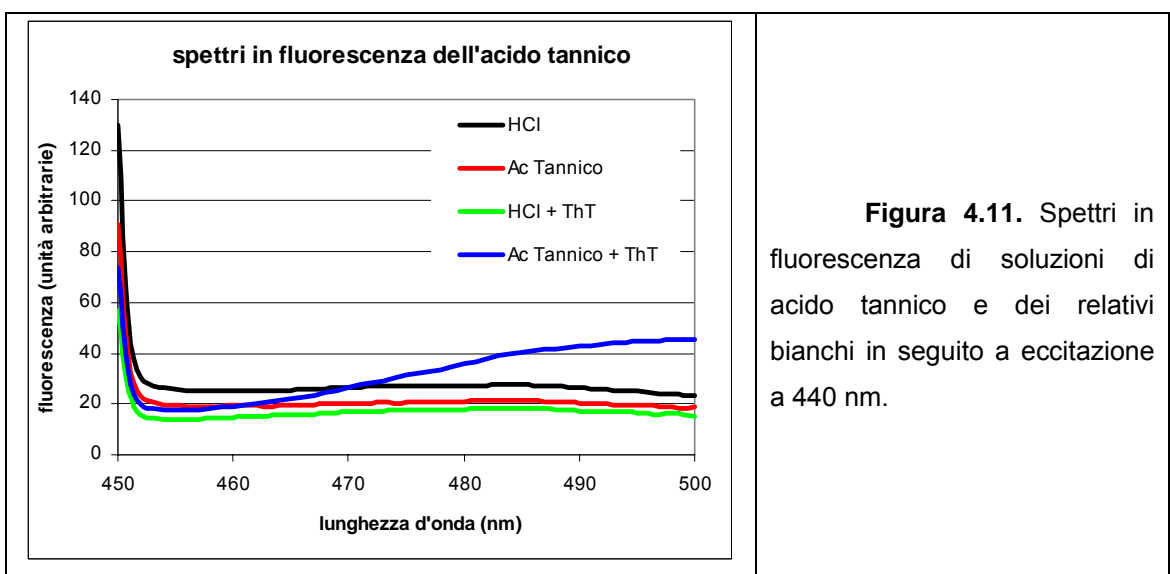


Figura 4.11. Spettri in fluorescenza di soluzioni di acido tannico e dei relativi bianchi in seguito a eccitazione a 440 nm.

Nei saggi con ThT questo polifenolo è risultato uno degli inibitori più efficaci dell'aggregazione amiloide dell'HEWL e del peptide 49-64. I valori di fluorescenza sono

stati normalizzati rispetto ai segnali dei controlli al termine della formazione di fibrille. A processo completato le percentuali di inibizione si sono attestate su valori di oltre l'80% (Fig 4.12). Nel caso dell'HEWL il polifenolo non ha modificato sostanzialmente la prima parte della cinetica di aggregazione (fase di latenza e inizio della fase esponenziale): si veda a tale proposito la parte A della figura.

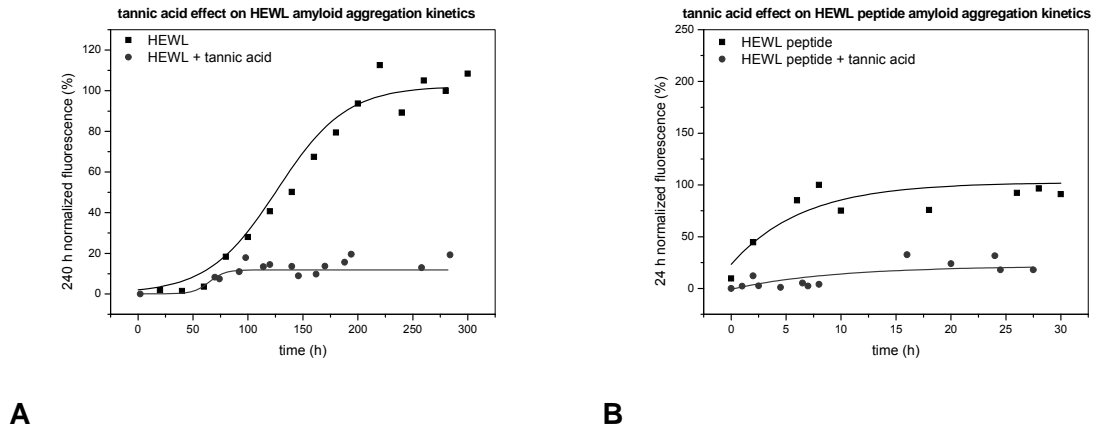


Figura 4.12. Cinetiche di aggregazione amiloide dell'HEWL (A) e del peptide 49-64 (B) in assenza o in presenza di acido tannico.

Per valutare quali specie molecolari potevano essere responsabili dell'attività residua nel test della ThT, e soprattutto per escludere la presenza di oligomeri, in genere citotossici, sono state acquisite anche immagini AFM dei campioni di HEWL e di peptide 49-64 incubati in presenza del polifenolo in analisi (Fig. 4.13). Sul piano statistico un 20-40% delle particelle presenti nei campi osservati sono risultate fibrille mature (diametri fino a 8-11 nm e lunghezze di alcuni μm). Si è così ipotizzato che l'acido tannico si leghi fin dall'inizio dell'incubazione ai precursori amiloidi e ne blocchi l'allungamento, come ampiamente testimoniato dal test della ThT, ma che alcune molecole proteiche riescano comunque a sfuggire all'inibitore, trasformandosi con il tempo in entità fibrillari.

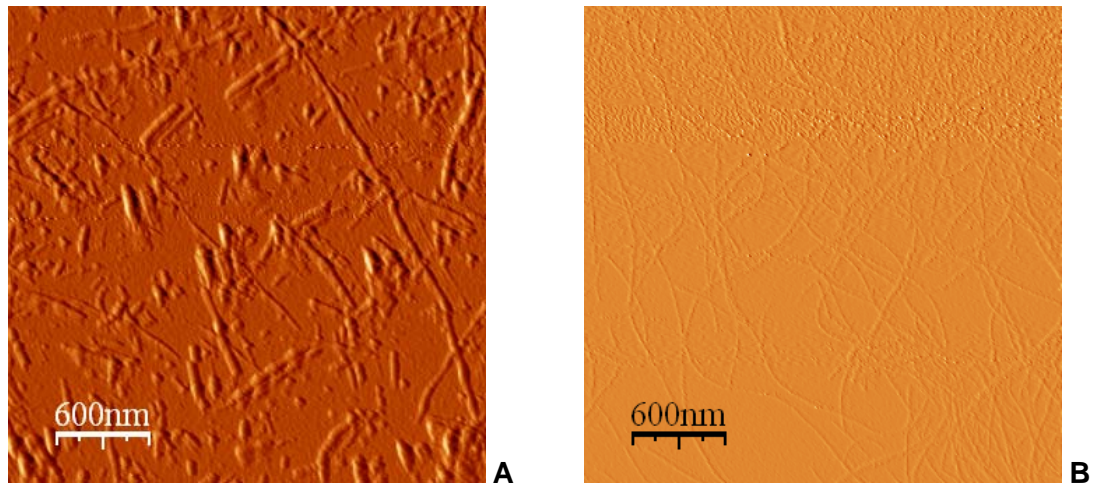


Figura 4.13. Immagini AFM di fibrille amiloidi ottenute dall'HEWL (A) e dal peptide 49-64 (B) in presenza di acido tannico. I campioni di HEWL sono stati incubati per 282 h, quelli di peptide 49-64 24 h. Per l'osservazione al microscopio sono stati poi diluiti rispettivamente 100 e 10 volte.

La residuale presenza di materiale proteico con struttura a foglietti β in campioni di HEWL o peptide 49-64 incubato con acido tannico è stata confermata anche dal test del Congo red (Fig 4.14). Gli spettri differenza (in blu) hanno infatti evidenziato un caratteristico picco intorno a 540 nm.

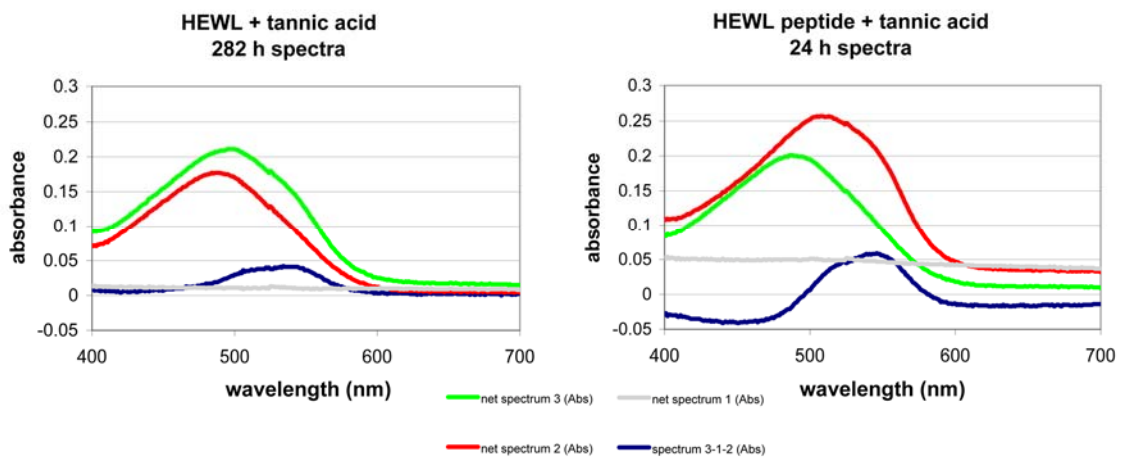


Figura 4.14. Test del Congo red per l'HEWL e il peptide 49-64 incubati in presenza di acido tannico.

Nel caso del peptide 49-64 anche il DLS ha fornito ulteriori indicazioni circa la progressiva comparsa di strutture macromolecolari in campioni incubati con acido tannico (Fig. 4.15).

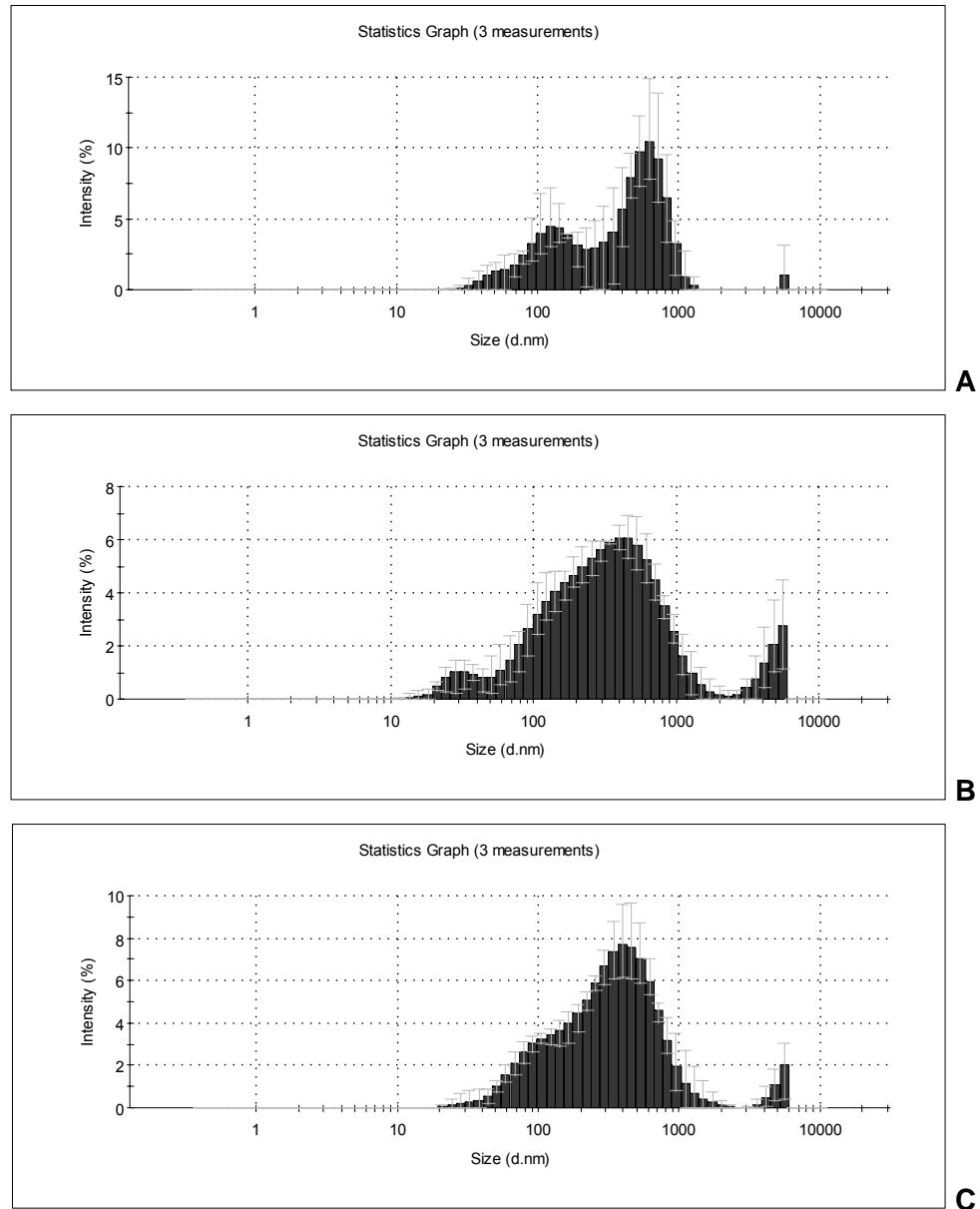


Figura 4.15. Distribuzione dei diametri idrodinamici degli aggregati di peptide 49-64 dopo 2 (A), 6 (B) e 24 h (C) di incubazione con acido tannico. Prima dell'analisi a 24 h il campione è stato diluito 1:2 con acqua.

Sempre con il peptide 49-64 sono state effettuate anche alcune analisi in dicroismo circolare. La tipologia degli spettri acquisiti ha messo in luce un progressivo aumento della percentuale di struttura β nel corso dell'incubazione. Tale incremento è

stato comunque inferiore a quello osservabile durante l'aggregazione amiloide del peptide 49-64 da solo, come testimoniato del resto dal segnale a 216 nm (Fig 4.16).

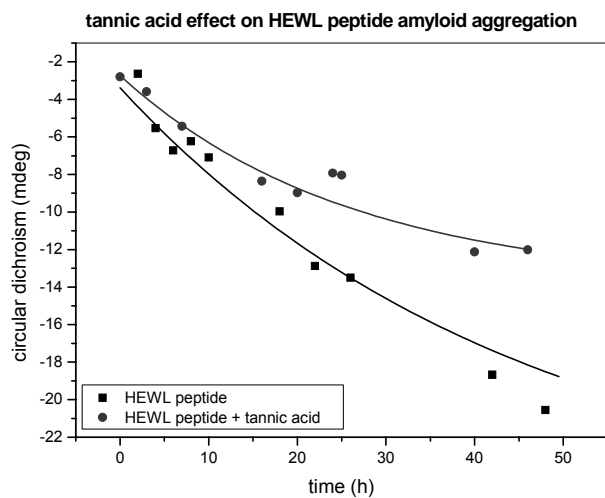
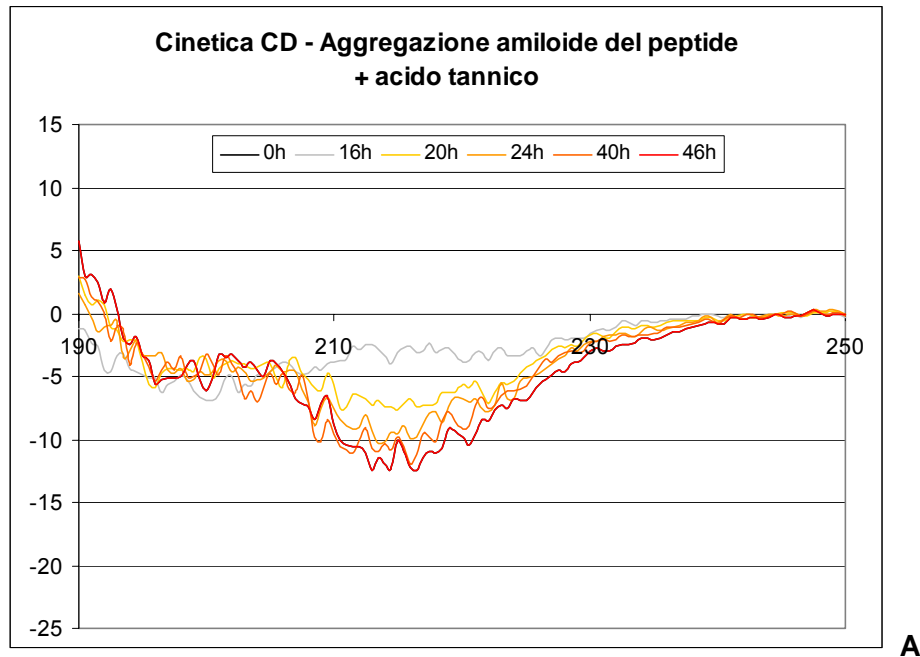


Figura 4.16. Spettri CD del peptide 49-64 durante l'incubazione in presenza di acido tannico (A). Concentrazioni usate: 0,067 mM. Nell'immagine B la variazione di ellitticità a 216 nm è stata messa a confronto con quella del peptide 46-64 da solo: entrambi i tracciati ottenuti hanno mostrato un decadimento esponenziale del segnale.

La dose-dipendenza dell'effetto anti-amiloidogenico dell'acido tannico è stata saggiata lavorando con il peptide 49-64 a concentrazioni leggermente inferiori a quelle ordinarie (150 μ M anziché 200 μ M). Rallentando un po' il processo si è probabilmente

dato modo al polifenolo di prendere contatto, anche quando molto diluito, con le nascenti strutture amiloidi. L'andamento iperbolico dell'inibizione osservata è riportato nella Fig. 4.17. La concentrazione alla quale il processo di aggregazione amiloide risulta inibito per il 50% (IC₅₀, Par. 3.9) è in questo caso pari a 12,7 μ M.

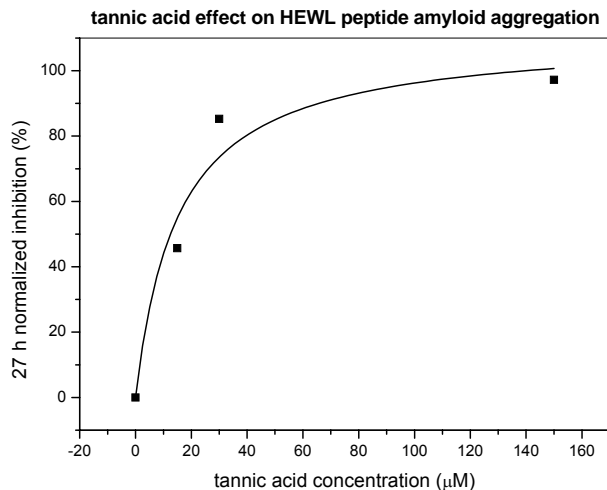


Figura 4.17. Dose - dipendenza dell'effetto inibitorio dell'acido tannico sull'aggregazione amiloide del peptide 49-64. A 27 h tale processo è risultato pressoché completo.

4.2.2. Acidi idrossicinnamici e derivati

All'interno di questa classe di polifenoli sono stati testati l'acido rosmarinico, la curcumina, l'acido cicorico, l'acido caffeico, la cinarina, il verbascoside e l'acido clorogenico. (Fig. 4.18).

I due fenoli semplici, l'acido caffeico e l'acido clorogenico, sono stati scelti perché ampiamente diffusi in vegetali e frutta [Herrmann K 1990]. Fra le sostanze con due anelli fenolici l'acido rosmarinico può considerarsi caratteristico di piante aromatiche mediterranee quali il rosmarino e la salvia [Petersen M *et al.* 2002]; l'acido cicorico risulta presente sia nel radicchio rosso che in quello verde [Innocenti M *et al.* 2005]; la cinarina costituisce uno dei più importanti composti ottenibili dal carciofo [Mulinacci N *et al.* 2004]; il verbascoside, con una struttura fenilpropanoide esterificata con l'idrossitirosolo, si ritrova in molte varietà di olive [Servili M *et al.* 2004]. La curcumina, invece, pur non essendo molto diffusa nella dieta mediterranea, è stata inserita nello screening in quanto capostipite storico dei polifenoli con attività anti-amiloidogena [Ono K *et al.* 2004a].

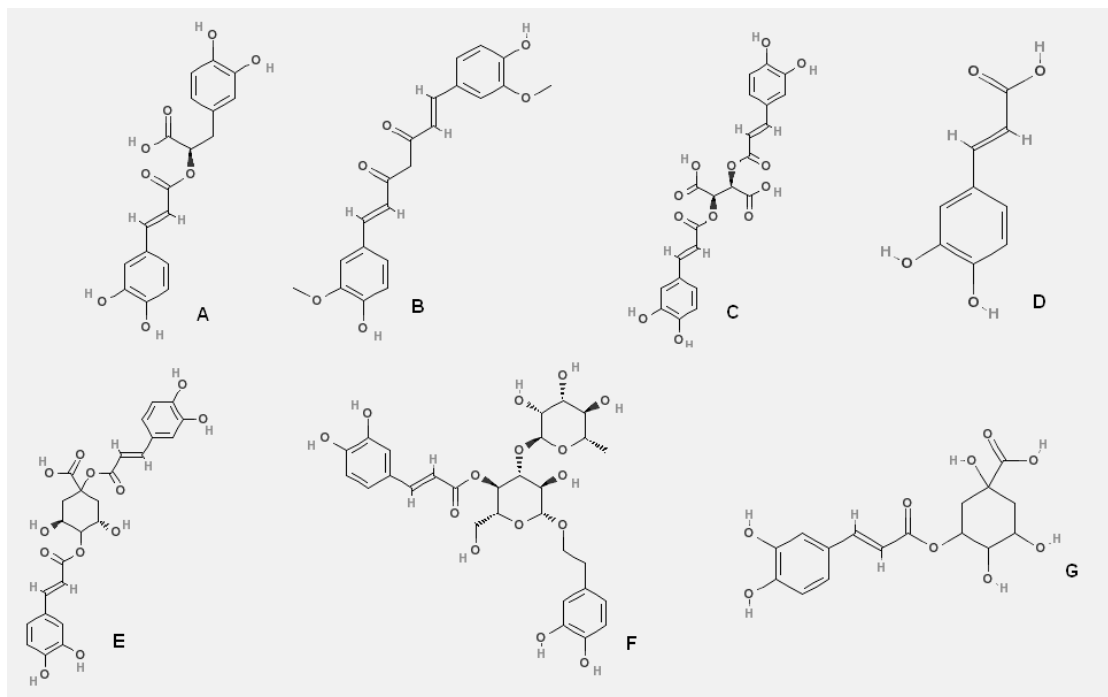


Figura 4.18. Strutture dei vari composti idrossicinnamici impiegati: acido rosmarinico (A), curcumina (B), acido cicorico (C), acido caffeico (D), cinarina (E), verbascoside (F), acido clorogenico (G).

L'impiego di questo gruppo di sostanze nello studio dell'aggregazione amiloide dell'HEWL e del peptide 49-64 non è risultato sempre facile. Per motivi di solubilità la cinarina è stata testata solo con il peptide 49-64, e anche in questo caso dopo una prima dissoluzione in DMSO. Il quantitativo finale del solvente nella miscela incubata è risultato pari all'1% v/v. Anche nel caso della curcumina, ben poco solubile in ambiente acquoso, si è fatto ricorso al DMSO (l'1% lavorando con l'HEWL e lo 0,2% lavorando con il peptide 49-64).

Nessuno dei composti ha mostrato un comportamento in fluorescenza in grado di interferire con il test della ThT.

Usando tale metodo di indagine il derivato idrossicinnamico più attivo contro la formazione di fibrille amiloidi è risultato l'acido rosmarinico (percentuali di inibizione pari all'84% nel caso dell'HEWL e al 63% nel caso del peptide 49-64). L'aggregazione amiloide dell'HEWL è stata in parte frenata anche dalle altre sostanze: per l'82% dall'acido cicorico, per il 58% dal verbascoside, per il 46% dalla curcumina, per il 28% dall'acido caffeico e per il 20% dall'acido clorogenico. Di nuovo in presenza di polifenoli la prima parte della cinetica dell'aggregazione non si è discostata molto da quella dei controlli. Nelle prove sul peptide 49-64 l'effetto anti-amiloidogenico è risultato generalmente più basso: la curcumina ha inibito il processo per il 60%, l'acido cicorico per il 33%, la cinarina per l'1%, mentre acido caffeico, verbascoside e acido

clorogenico si sono rivelati completamente inefficaci. Esempi di curve di fitting relative a tali cinetiche di inibizione sono riportati nella Fig. 4.19.

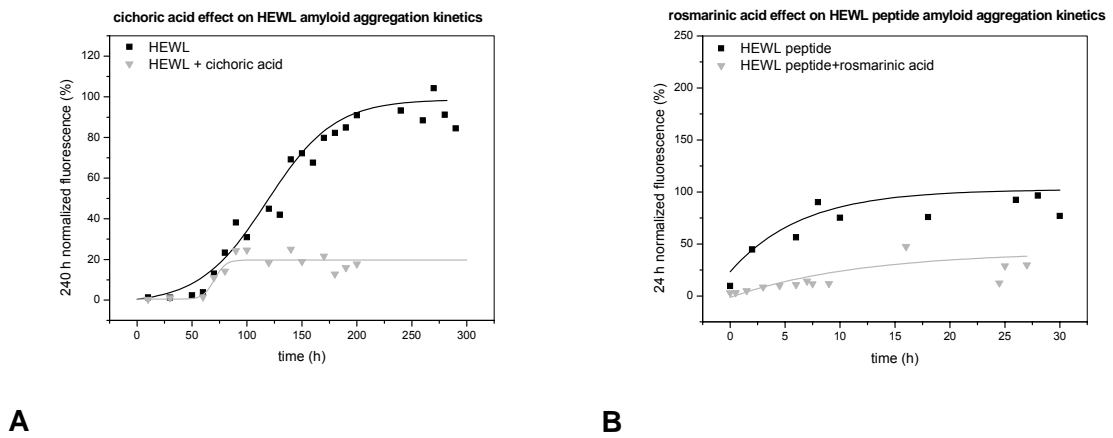


Figura 4.19. Cinetiche di aggregazione amiloide dell'HEWL e del peptide 49-64 in assenza e in presenza, rispettivamente, di acido cicorico (A) o di acido rosmarinico (B).

La scarsa attività dell'acido caffeico e dell'acido clorogenico sull'aggregazione di entrambi i sistemi modello ha fatto subito pensare che la presenza di due distinti anelli fenolici costituisca un requisito importante per un buon effetto inibitorio.

La maggior parte dei campioni contenenti le sostanze idrossicinnamiche (in particolare quelle risultate più attive) al termine del periodo di incubazione è stata diluita e osservata in AFM, in modo da caratterizzare sul piano morfologico le strutture presenti. A seconda dei casi sono state identificate particelle abbastanza diverse tra loro. Non sono comunque risultate presenti protofibrille raggruppate in strutture anulari, che rappresentano alcune delle formazioni più sospette dal punto di vista della citotossicità. Nel caso dell'HEWL incubato con acido rosmarinico le specie predominanti (sul piano statistico il 95% circa di quelle presenti nei campi osservati) sono risultate con diametri inferiori ai 4 nm, ma con forma allungata (0,8 μm circa); in presenza di acido cicorico è comparso un 80% circa di protofilamenti, sebbene con lunghezza inferiore al μm . Il peptide 49-64 in presenza di acido rosmarinico è sembrato formare alcune strutture con diametro di 10 nm, lunghe però solo 0,2 μm ; in presenza poi di curcumina sono comparse specie protofibrillari o più piccole (complessivamente il 98%), di lunghezza di nuovo intorno agli 0,2 μm . Anche una sostanza inefficace, secondo il test della ThT, nell'inibire l'aggregazione amiloide del peptide 49-64 (l'acido clorogenico) è stata oggetto di indagine AFM: il dato interessante che ne è emerso è la comparsa non tanto di fibrille, ma mediamente di aggregati con diametri inferiori ai 5 nm e lunghezze massime di 0,2-0,3 μm . Tutto ciò lascia presupporre che anche questo

polifenolo interagisca con il peptide 49-64, modificandone in qualche modo il processo di aggregazione amiloide, sebbene non impedendo la formazione di materiale strutturato (positivo al test della ThT). Alcuni esempi di immagini AFM raccolte sono presentati in Fig. 4.20.

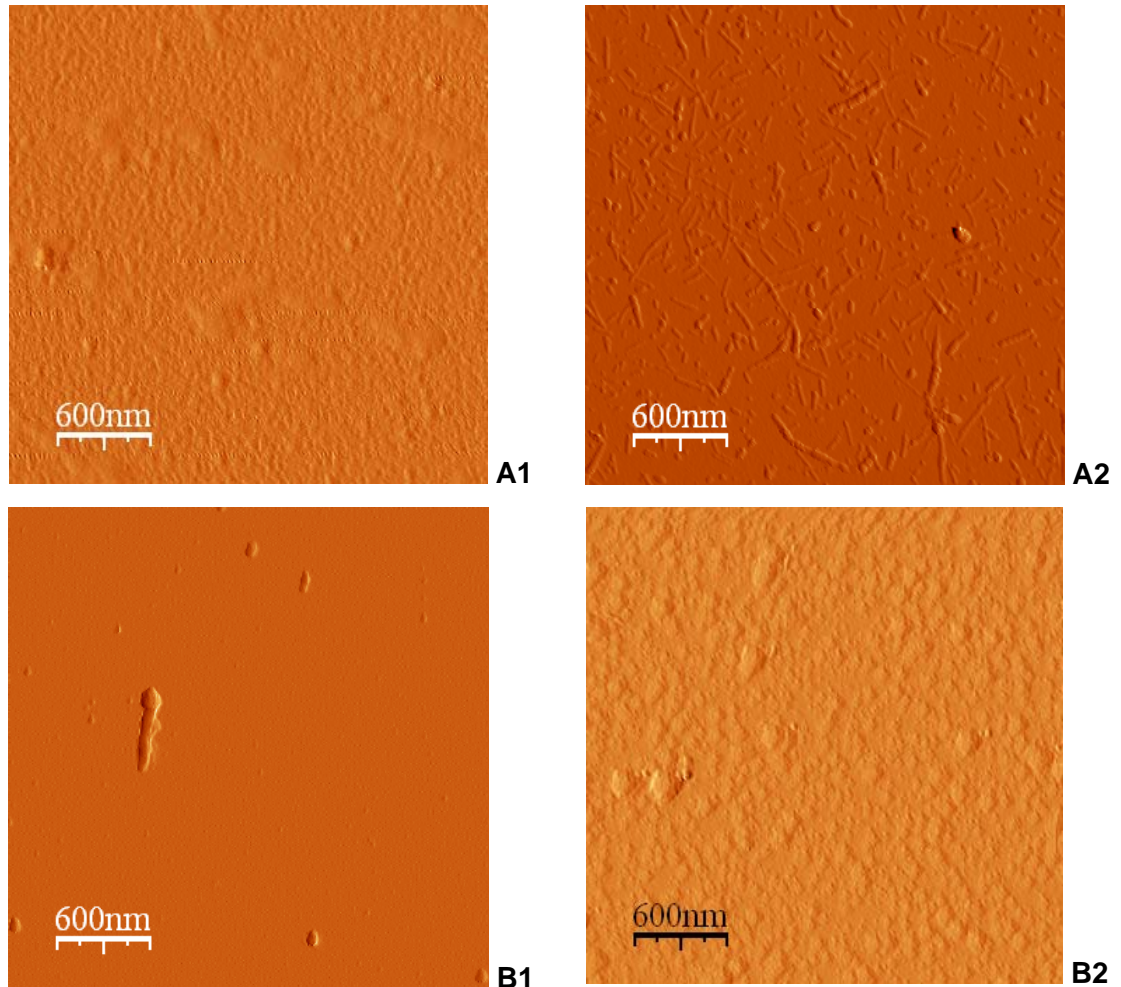


Figura 4.20. Scansioni AFM di preparati di HEWL (immagini A) o del peptide 49-64 (immagini B) contenenti acido rosmarinico (A1), acido cicorico (A2), curcumina (B1) o acido clorogenico (B2). I campioni di HEWL sono stati incubati rispettivamente per 282 e 233 h, quelli di peptide 49-64 48 o 32 h. Prima dell'osservazione al microscopio la proteina nativa è stata diluita 100 o 200 volte, il peptide di sintesi 40 o 20 volte.

L'effetto anti-amiloidogenico dei derivati idrossicinnamici più interessanti è stato indagato anche tramite il test del Congo red. Sono stati presi in considerazione acido rosmarinico e acido cicorico incubati con HEWL, e acido rosmarinico, curcumina e acido clorogenico incubati con il peptide 49-64. In genere il test ha rivelato la presenza di aggregati con struttura β . Solo nel caso del campione contenente peptide 49-64 e acido rosmarinico il caratteristico picco a 540 nm è venuto a mancare (Fig. 4.21),

attestando così una predominanza del materiale amorfo (o almeno senza foglietti β). Questo sembra indicare l'acido rosmarinico come uno dei polifenoli più promettenti e sicuri, dal punto di vista della citotossicità, nell'inibizione dell'amiloidosi.

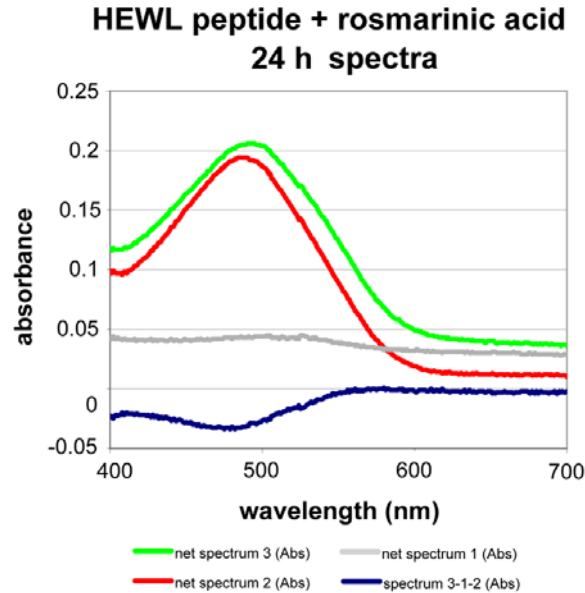


Figura 4.21. Test del Congo red sul peptide 49-64 incubato per 24 h in presenza di acido rosmarinico.

Nel caso del peptide 49-64 incubato con curcumina il picco a 540 nm è risultato presente, ma poco intenso. Di nuovo è stato ipotizzato un parziale reindirizzamento del processo amiloidogenico verso la formazione di materiale amorfo.

Per quanto concerne le analisi al DLS, si è ritenuto opportuno controllare solo l'aggregazione amilode dell'HEWL in presenza o meno del derivato idrossicinnamico più attivo, l'acido rosmarinico. Mentre in fase iniziale le dimensioni medie delle particelle sono risultate praticamente indistinguibili nei controlli e nei campioni addizionati di polifenolo, al procedere dell'incubazione i diametri idrodinamici sono apparsi maggiori nei preparati contenenti la sola proteina (Fig. 4.22).

Con il peptide 49-64 sono state effettuate anche alcune analisi al CD, sempre nel corso dell'incubazione con l'acido rosmarinico (Fig 4.23). La tipologia degli spettri acquisiti ha indicato un aumento della percentuale di struttura β nel corso dell'incubazione sensibilmente minore rispetto a quello rilevato per l'acido tannico (si veda la Fig. 4.16).

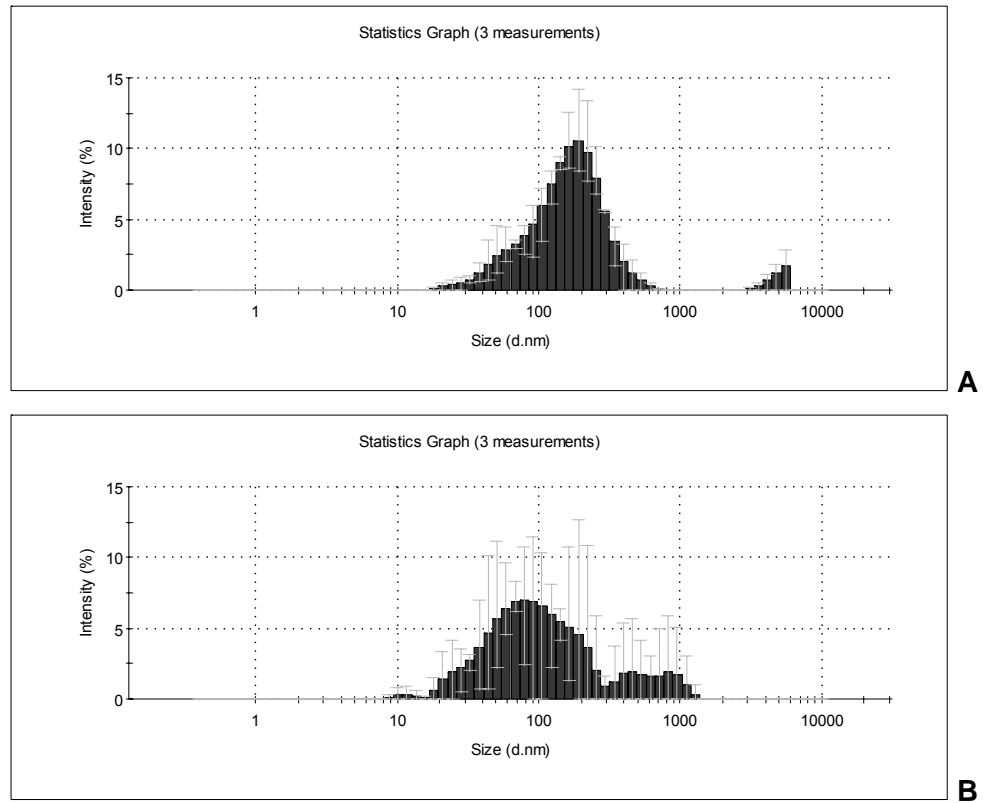


Figura 4.22. Distribuzione dei diametri idrodinamici degli aggregati di HEWL dopo 114 h di incubazione in assenza (A) o in presenza di acido rosmarinico (B). Prima dell'analisi i campioni sono stati diluiti 1:100 con acqua.

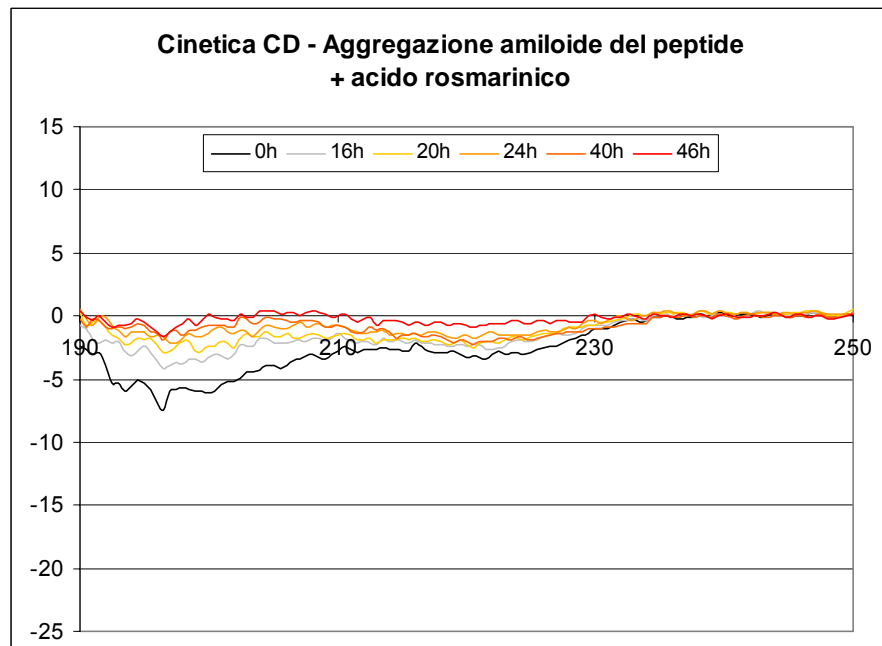


Figura 4.23. Spettri CD del peptide 49-64 durante l'incubazione in presenza di acido rosmarinico. Concentrazioni usate: 0,067 mM.

L'incremento è stato per altro assai meno consistente di quello osservabile durante l'aggregazione amiloide del peptide 49-64 da solo, come testimoniato del resto dal segnale a 216 nm.

4.2.3. Flavonoli

Fra i primi flavonoidi a essere testati si ricordano i flavonoli rutina, quercetina e quercetina-3-galattoside o iperoside (Fig. 4.24).

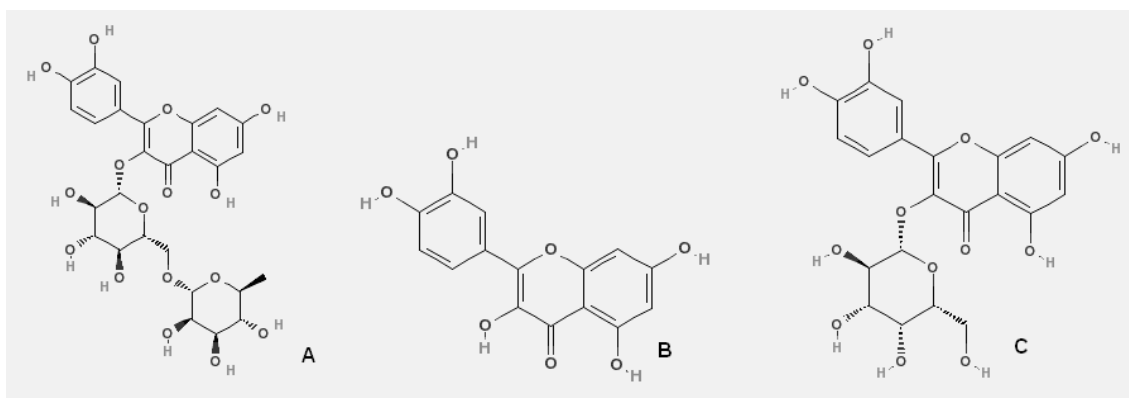


Figura 4.24. Strutture dei tre flavonoli impiegati: rutina (A), quercetina (B) e quercetina-3-galattoside (C).

La quercetina e i suoi mono e diglicosidi (rutina) sono stati introdotti nello studio in quanto presenti in una grande varietà di frutti e vegetali [Erlund I *et al.* 2006]. Del resto la quercetina era già stata scelta in vari lavori come uno dei capostipiti delle sostanze fenoliche attive contro la formazione di fibrille amiloidi [Hirohata M *et al.* 2007; Zhu JT *et al.* 2007].

Dato il loro carattere abbastanza idrofobico, i tre composti sono stati disciolti preliminarmente in DMSO. Nonostante questo, nelle condizioni di impiego delle prove con l'HEWL solo la quercetina-3-galattoside è risultata solubile. Il quantitativo di DMSO presente nelle miscele incubate è stato pari al 5% v/v. Nelle cinetiche con il peptide 49-64 il solvente organico è stato invece usato, nel caso di tutti e tre i flavonoli, alla concentrazione dell'1%.

Gli spettri registrati al fluorimetro di varie soluzioni delle tre sostanze hanno escluso la possibilità di interferenze nel test della ThT.

Dai saggi con tale fluoroforo è emersa una media attività della quercetina-3-galattoside contro la formazione di fibrille amiloidi di HEWL (effetto inibitorio pari al 50%); lavorando con il peptide 49-64 tale attività si è ridotta al 15%. Rutina e

quercetina hanno inibito il processo di aggregazione amiloide della molecola peptidica rispettivamente del 40 e del 39%. Un esempio di cinetica di inibizione è riportato in Fig. 4.25.

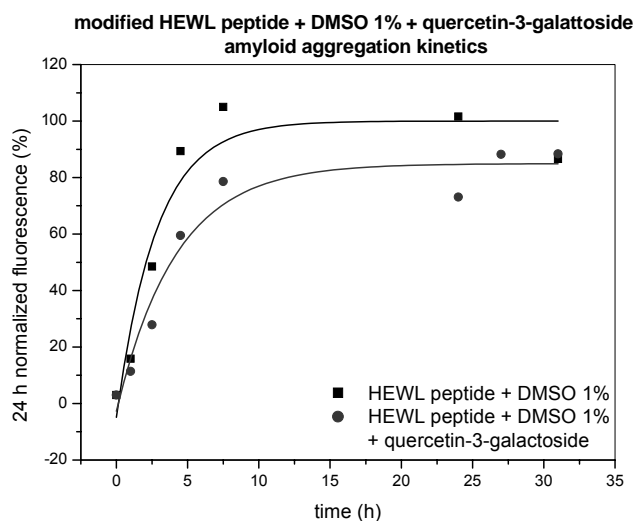


Figura 4.25. Effetto anti-amiloidogenico della quercetina-3-galattoside incubata con il peptide 49-64.

4.2.4. Flavoni e biflavoni

Un secondo gruppo di flavonoidi sottoposto a screening contro l'aggregazione amiloide è stato quello dei flavoni. A rigore si sono testati un unico flavone, la scutellareina, e due analoghi strutturali in forma dimera, l'hinokiflavone e l'amentoflavone (Fig. 4.26).

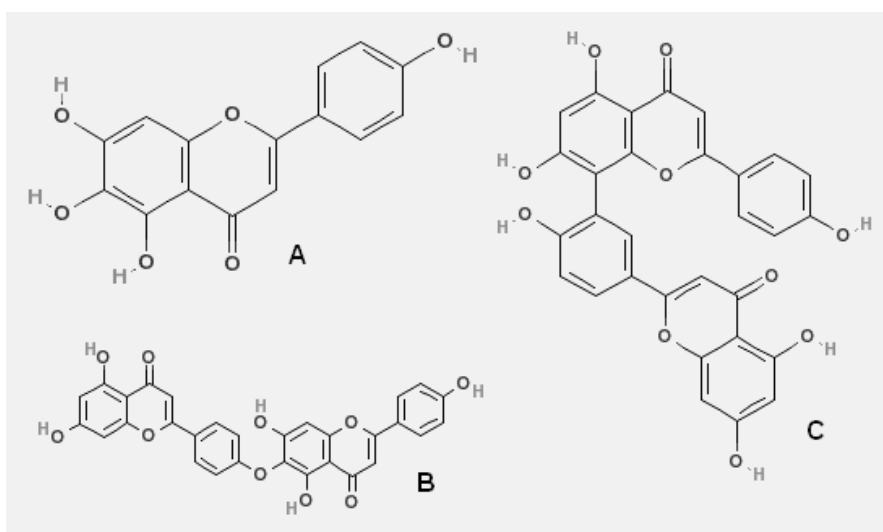


Figura 4.26. Strutture del flavone e dei biflavoni testati: scutellareina (A), hinokiflavone (B) e amentoflavone (C).

La scutellareina è presente nelle foglie di varie piante, soprattutto del genere *Scutellaria*, ed è già stata oggetto di molti studi nel campo della medicina cinese. L'hinokiflavone si ritrova invece nelle bacche di ginepro [Innocenti M *et al.* 2007]. L'amentoflavone, infine, è stato isolato dalle foglie di *Ginkgo biloba* [Van Beek TA 2002]. I due biflavoni sono stati selezionati per estendere lo screening ad altri composti ad alto peso molecolare oltre all'acido tannico.

A causa della loro scarsa idrofilia, scutellareina, hinokiflavone e amentoflavone sono stati testati solo sul peptide 49-64, e anche in questo caso dopo una prima dissoluzione in DMSO. Nei campioni incubati tale solvente è risultato pari allo 0,2%.

Mentre la scutellareina non ha mostrato un comportamento in fluorescenza in grado di interferire con il test della ThT, nelle soluzioni di amentoflavone, e soprattutto di hinokiflavone, assieme a HCl e ThT si sono registrati segnali leggermente superiori a quelli dei solventi di controllo. Nuovamente la sottrazione caso per caso degli opportuni bianchi ha reso le singole misure corrette e riproducibili. Un esempio di spettro in fluorescenza con possibili interferenze con la ThT è riportato nella figura 4.27.

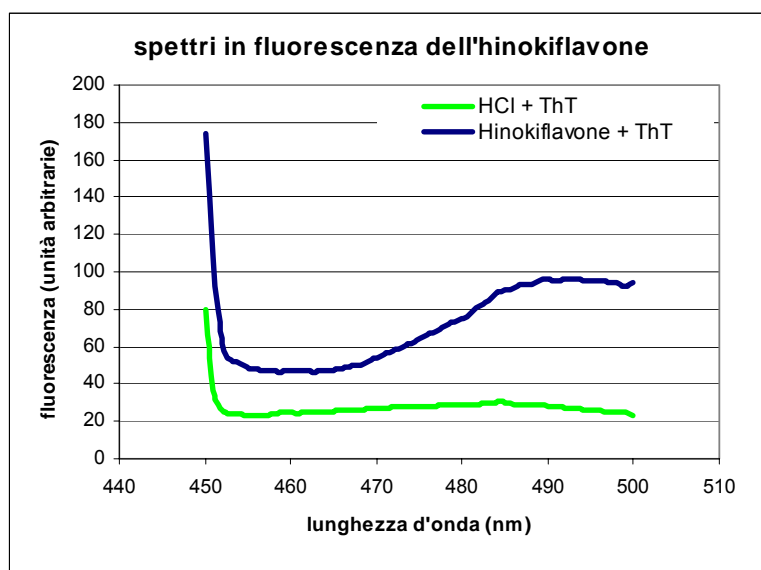


Figura 4.27. Fluorescenza di soluzioni di hinokiflavone e del relativo bianco in seguito a eccitazione a 440 nm.

Dalle misure effettuate tramite ThT è emersa una notevole attività anti-amiloidogena da parte dell'hinokiflavone (66% di inibizione). L'effetto è risultato inferiore nel caso dell'amentoflavone e della scutellareina (rispettivamente 39% e 32% di inibizione). Questi dati hanno fornito un'ulteriore indicazione dell'importanza del numero di anelli fenolici e del loro reciproco orientamento ai fini dell'interazione con le proteine amiloidogeniche. La Fig. 4.28 riporta un esempio delle cinetiche di inibizione ottenute.

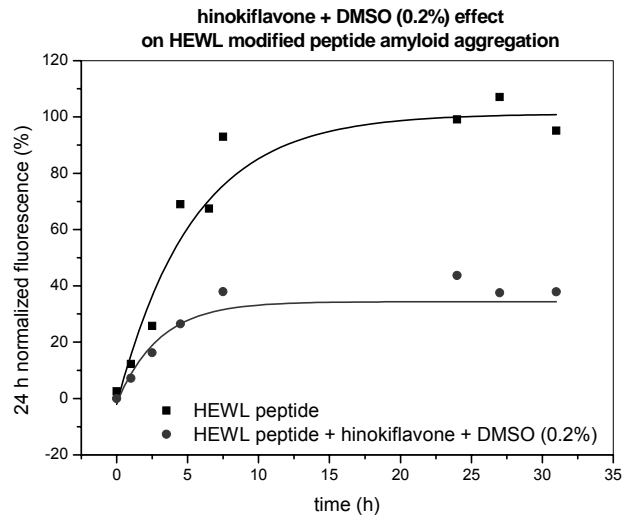


Figura 4.28. Cinetica di aggregazione amiloide del peptide 49-64 in assenza e in presenza di hinokiflavone.

Nel caso dell'hinokiflavone, la sostanza più attiva, l'interferenza con l'aggregazione amiloide è stata oggetto anche di indagini morfologiche tramite AFM. Anche in questo caso si è registrata la presenza, a fine processo, di aggregati assai diversi dalle fibrille amiloidi, ma comunque con dimensioni superiori a quelle delle protofibrille e dei protofilamenti (Fig. 4.29).

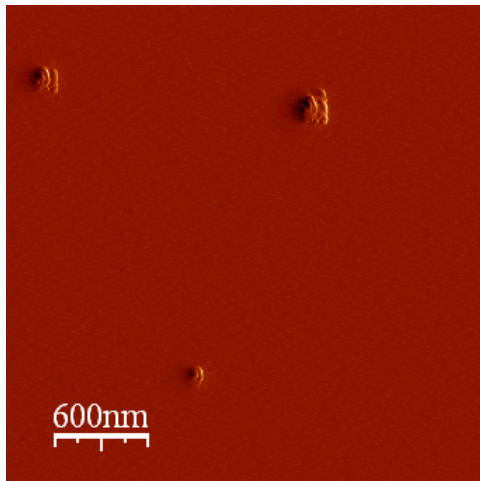


Figura 4.29. Scansione AFM di preparato di peptide 49-64 in presenza di hinokiflavone. Il campione è stato incubato per 48 h. Prima dell'osservazione al microscopio si è proceduto a diluire 40 volte.

Sul piano statistico, infatti, il 75% delle particelle presenti nei campi osservati ha mostrato diametri superiori ai 5 nm (e lunghezze medie intorno agli 0,3 μm).

Il carattere strutturato di tali specie ha ricevuto conferma dal test del Congo red. Lo spettro di assorbimento registrato presentava infatti il picco a 540 nm tipico delle strutture β , in accordo con la fluorescenza residua nel test della ThT.

4.2.5. Isoflavoni e derivati

All'interno del gruppo degli isoflavoni sono state prese in considerazione due molecole abbastanza simili, la genisteina e la daidzeina. A queste è stato poi affiancato un fitoestrogeno, il cumestrolo, che rappresenta un cumestano derivante dalla struttura isoflavonica. D'altra parte attività estrogeniche risultano da tempo descritte anche per la genisteina e la daidzeina [Valachovicova T *et al.* 2004; Moutsatsou P 2007]. Le formule delle tre sostanze sono riportate in Fig. 4.30.

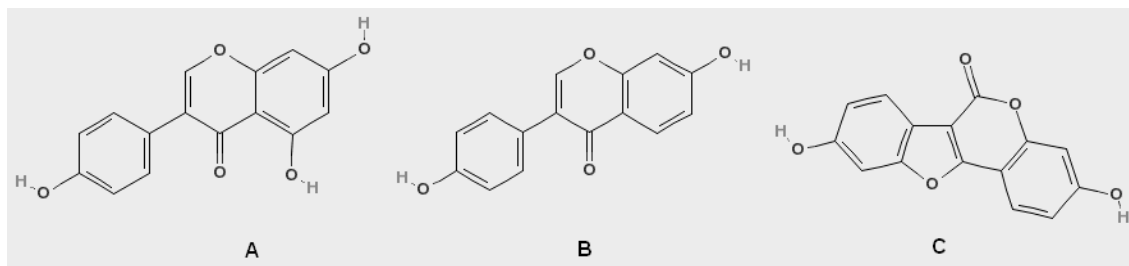


Figura 4.30. Strutture degli isoflavoni e derivati sottoposti allo screening: genisteina (A), daidzeina (B) e cumestrolo (C).

Le fonti principali di questi composti sono le leguminose. In particolare la soia e i suoi derivati ne apportano un quantitativo rilevante [Nielsen IL *et al.* 2007]. In ogni modo le tre molecole sono state introdotte nello screening soprattutto per valutare se la posizione di attacco dell'anello B al corpo del flavonoide sia in grado di modularne l'attività anti-amiloidogena.

Questi flavonoidi sono risultati poco solubili in ambiente acquoso, per cui si è potuto testarli solo sull'aggregazione amiloide del peptide 49-64, e solo dopo averli inizialmente disciolti in DMSO. Il solvente organico è risultato pari, nella miscela di incubazione, allo 0,2% nel caso della genisteina e della daidzeina, e all'1% nel caso del cumestrolo.

Dal punto di vista del comportamento in fluorescenza solo la daidzeina ha mostrato una sia pur modesta capacità di interferire con il test della ThT (dati non riportati). In ogni modo lavorando con tale molecola le letture fluorimetriche fatte sono state sistematicamente corrette sottraendo i segnali dei vari bianchi.

Dai dati raccolti tramite il saggio della ThT il cumestrolo è risultato una delle sostanze più attive contro la formazione di fibrille amiloidi del peptide 49-64 (64% di inibizione, come facilmente rilevabile dalla Fig. 4.31).

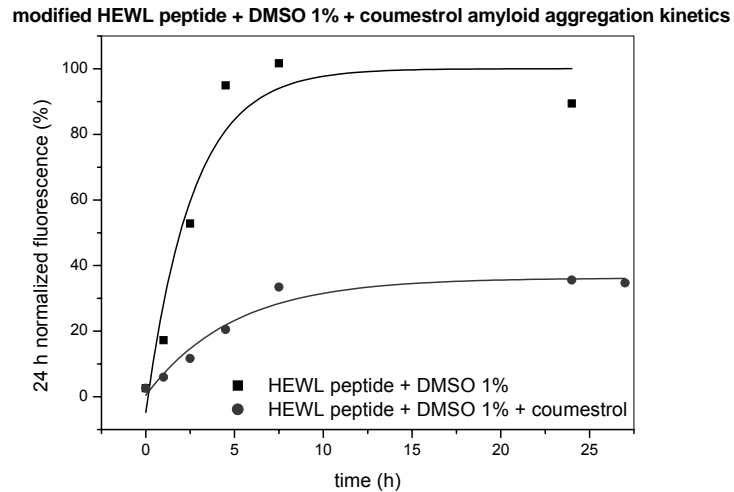


Figura 4.31. Effetto anti-amiloidogenico del cumestrol incubato con il peptide 49-64.

Del tutto inefficaci sono risultate invece la genisteina e la daidzeina.

Il preparato contenente peptide 49-64 e cumestrol al termine dell'incubazione è stato osservato in AFM (Fig. 4.32).

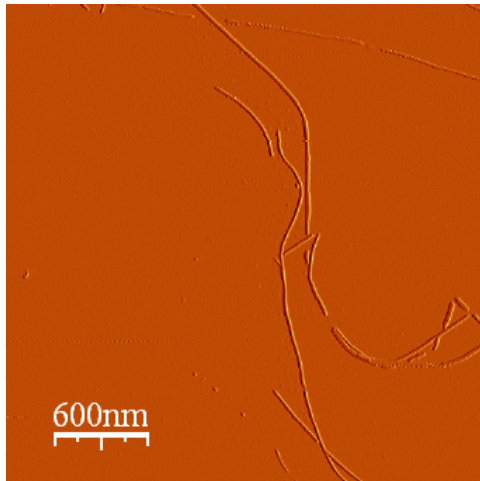


Figura 4.32. Immagine AFM di fibrille amiloidi ottenute dal peptide 49-64 in presenza di cumestrol. Il campione è stato incubato per 48 h. Prima dell'osservazione al microscopio si è proceduto a diluire 40 volte.

Le strutture allungate presenti nei campi osservati (mediamente di $1,9 \mu\text{m}$) hanno rivelato per la maggior parte (in oltre il 90% dei casi) diametri tipici di protofilamenti e protofibrille. In qualche zona tuttavia l'analisi delle immagini topografiche ha indicato la presenza di vere e proprie fibrille. Come nel caso dell'acido tannico si può pertanto ipotizzare che il segnale residuo nel test della ThT sia dovuto non tanto a oligomeri, ma a materiale maggiormente strutturato, e quindi con una presunta minore citotossicità.

4.2.6. Antocianine

Le antocianidine e i relativi glicosidi (antocianine) rappresentano dei polifenoli ancora poco studiati, soprattutto nel campo delle malattie amiloidi. Per tale motivo nel presente screening ne sono state inserite ben tre: la keracianina, la kuromanina e la malvina, tutte impiegate nella forma di cloruri (Fig. 4.33).

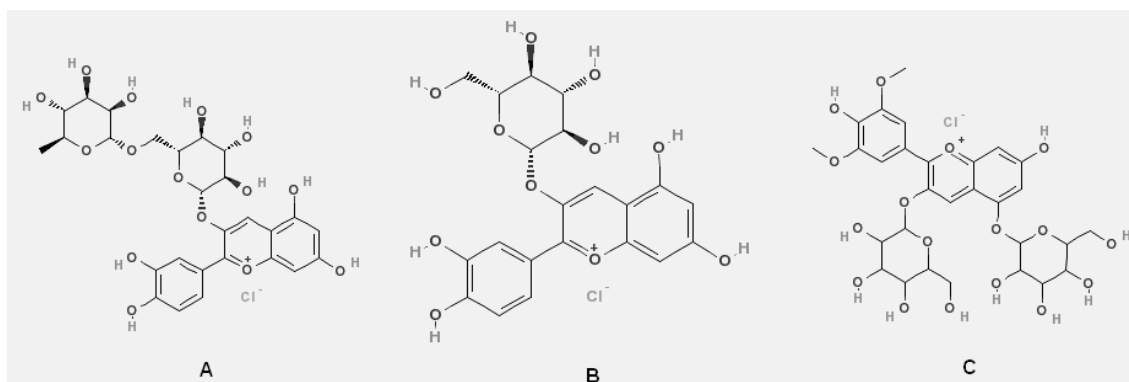


Figura 4.33. Strutture delle tre antocianine impiegate: keracianina (A), kuromanina (B) e malvina (C).

Si tratta di pigmenti fenolici largamente diffusi nel mondo vegetale, responsabili del colore rosso di bacche, uva e vino [McGhie TK *et al.* 2007]. Differiscono fra loro per la struttura dell'aglicone o per il grado di glicosilazione, ma tutte contengono il caratteristico ione flavilio, con una carica positiva sul sistema coplanare di queste molecole. Tale carica sull'atomo di ossigeno assicura la solubilità in ambiente acquoso. Queste molecole sono assai stabili a pH acido, come richiesto nell'incubazione dell'HEWL e del peptide 49-64.

Gli spettri in fluorescenza dei tre polifenoli non hanno mostrato interferenze con il test della ThT.

Globalmente le antocianine studiate hanno mostrato una buona attività anti-amiloidogena nei confronti dell'HEWL: 82% di inibizione nel caso della keracianina, 57% in quello della kuromanina e 15% in quello della malvina. Lavorando sul peptide 49-64, invece, solo la keracianina ha rivelato un sia pur modesto effetto inibitorio (9%). Un esempio di cinetica di inibizione è riportato in Fig. 4.34.

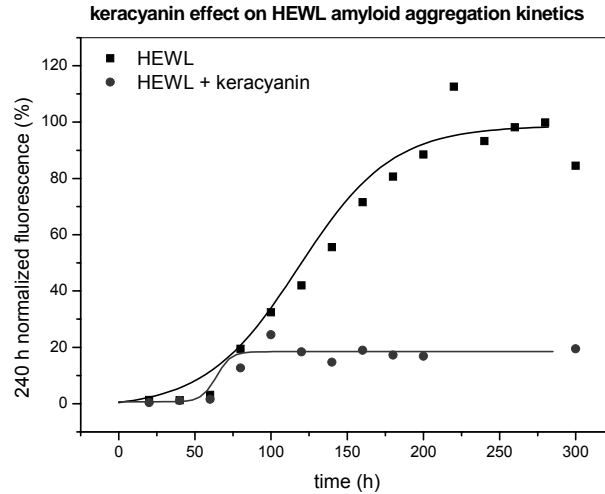


Figura 4.34. Cinetica di aggregazione amiloide dell'HEWL in assenza e in presenza di keracianina.

Per la keracianina e la malvina la cinetica di aggregazione amiloide è stata studiata anche a pH 2,0, cioè in condizioni di indubbia stabilità dello scheletro antocianidinico (cinetiche non riportate). Questo al fine di escludere la possibilità che una così forte diminuzione del loro effetto anti-amiloidogenico nel passare dai test sull'HEWL a quelli sul peptide 49-64 fosse dovuta a eventuali decomposizioni della struttura flavonoidica a pH 4,0. Di fatto entrambi i polifenoli si sono rivelati sostanzialmente inattivi anche a pH 2,0.

Per quanto concerne la proteina intera, l'effetto anti-amiloidogenico della keracianina e della kuromanina è stato investigato anche tramite l'AFM (Fig. 4.35).

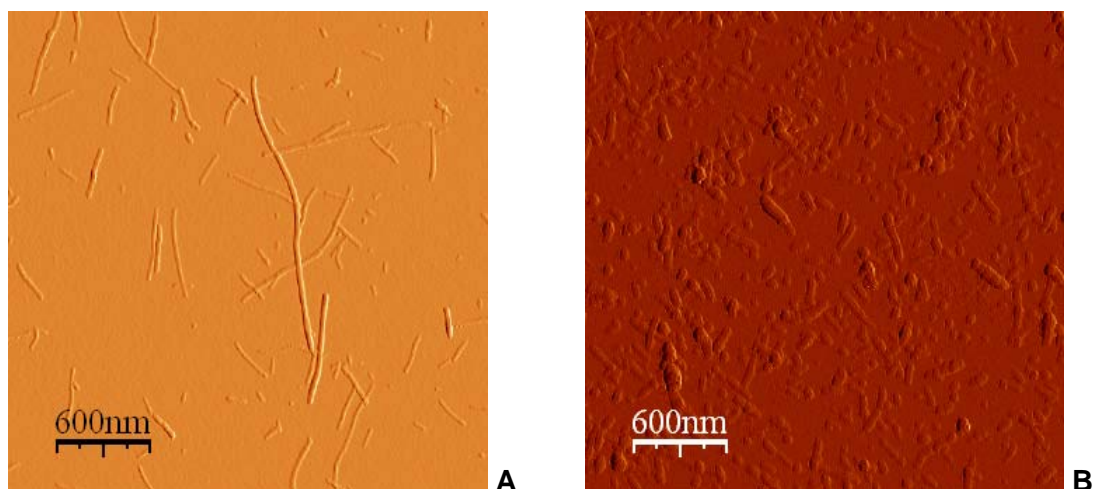


Figura 4.35. Immagini AFM di soluzioni di HEWL contenenti keracianina (A) o kuromanina (B), dopo incubazione, rispettivamente, per 233 e 240 h. Prima dell'osservazione al microscopio entrambi i campioni sono stati diluiti 200 volte.

Nel caso della keracianina il 76% delle formazioni presenti nei campi osservati è apparso allungato (0,8 μm), e con diametro tipico dei protofilamenti e delle profibrille. Una piccola percentuale del materiale è risultata classificabile come fibrilla amiloide matura. Il campione contenente kuromanina ha rivelato strutture con diametri mediamente più grandi (per l'8% superiori ai 7 nm), e con lunghezze di circa 0,5 μm . Tutto questo materiale ha fornito una spiegazione del segnale residuo nel test della ThT, ed è risultato di dimensioni sostanzialmente superiori a quelle degli oligomeri considerati più citotossici (in particolare i solubili).

Nel caso della kuromanina la presenza di aggregati con struttura β è stata confermata anche dal test del Congo red.

4.2.7. Flavanoli

All'interno delle strutture flavanoliche, così diffuse in natura e nell'alimentazione umana, sono state sottoposte a screening l'epigallocatechina gallato, la (+)catechina e la (-)epicatechina (Fig. 4.36).

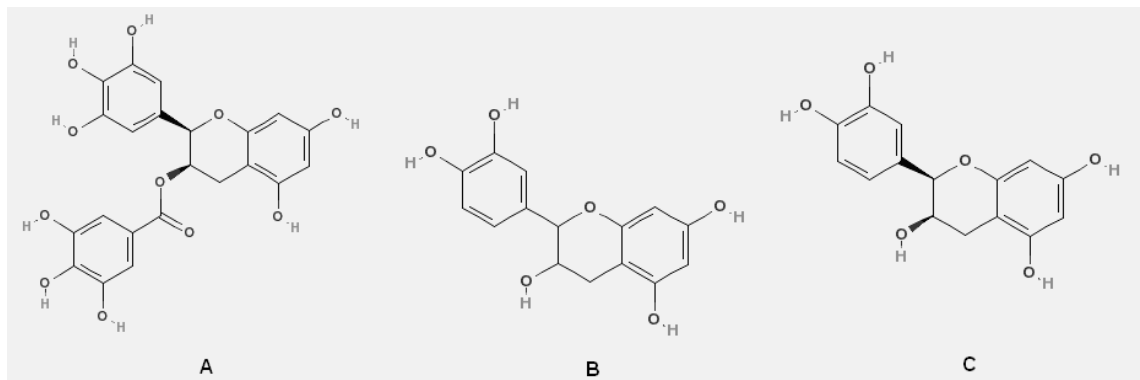


Figura 4.36. Strutture dei flavanoli testati: epigallocatechina gallato (A), (+)catechina (B) e (-)epicatechina (C).

Si tratta di flavonoidi caratterizzati da una non perfetta coplanarità degli anelli A, B e C, e quindi interessanti dal punto di vista delle possibili correlazioni attività-struttura. Essi rappresentano i principali fenoli bioattivi del tè verde [Ramassamy C 2006]. D'altra parte l'epigallocatechina è già stata oggetto di diversi studi nel campo delle malattie amiloidi [Bastianetto S *et al.* 2006; Hirohata M *et al.* 2007].

Durante il lavoro sperimentale nessuna delle tre sostanze ha creato problemi di solubilizzazione.

Anche gli spettri registrati al fluorimetro delle loro soluzioni hanno escluso la possibilità di interferenze con il test della ThT.

Come nel caso degli antociani, le misure fluorimetriche in presenza di ThT hanno rivelato per i fenoli in questione un buon effetto anti-amiloidogenico negli esperimenti con l'HEWL, e attività pressoché trascurabili in quelli con il peptide 49-64. In particolare l'effetto inibitorio sulla formazione di fibrille amiloidi di HEWL è risultato pari all'86% nel caso dell'epigallocatechina gallato, al 46% in quello della (+)catechina e al 37% in quello della (-)epicatechina. Lavorando con il peptide 49-64 solo l'epigallocatechina gallato ha mostrato una qualche inibizione, sebbene modesta (6%). Un esempio degli effetti anti-amiloidogenici registrati si trova in Fig. 4.37.

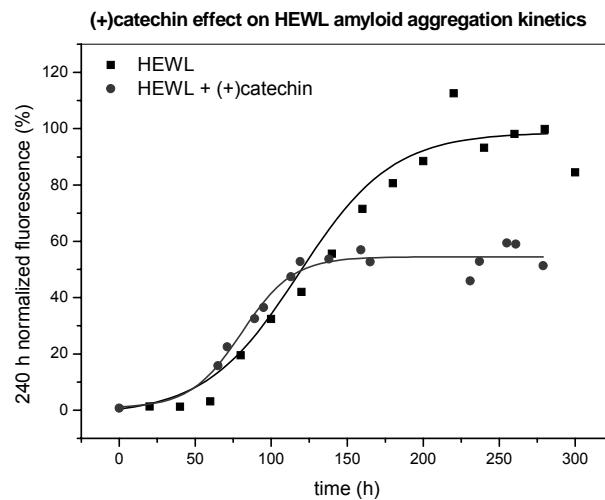


Figura 4.37. Cinetica di aggregazione amiloide dell'HEWL in assenza o in presenza di (+)catechina.

Per la sostanza più attiva fra i flavanoli testati, l'epigallocatechina gallato, si sono raccolti anche alcuni dati morfologici (tramite AFM), in modo da interpretare meglio il suo modesto effetto sull'aggregazione amiloide del peptide 49-64 (Fig. 4.38).

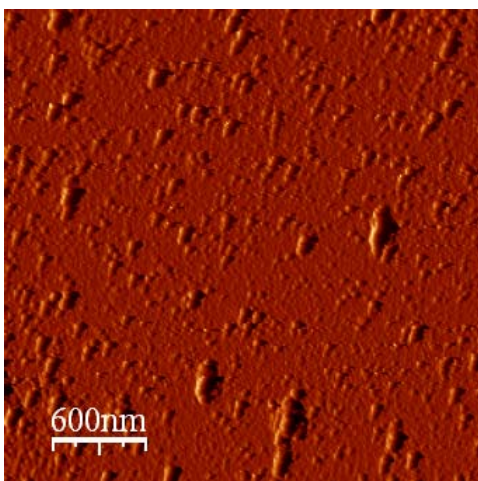


Figura 4.38. Scansione AFM di una miscela di peptide 49-64 ed epigallocatechina gallato incubata 31 h. Prima dell'osservazione al microscopio si è proceduto a diluire 20 volte.

Dal punto di vista statistico nei campi AFM osservati la maggior parte degli aggregati presenti (82%) sono risultati con diametri compresi fra 2 e 5 nm, e lunghi mediamente 0,7 μm .

Tale materiale, pur non potendo venire classificato come fibrillare, ha mostrato di possedere già una certa quota di struttura β : ne è venuta infatti conferma dal test del Congo red (oltre che ovviamente dai saggi stessi con ThT). Per poter escludere ogni possibile effetto di citossicità da parte degli aggregati osservati sarebbero stati necessari opportuni test su cellule. In ogni modo in recenti esperimenti con l' α -sinucleina e il peptide A β l'epigallocatechina gallato è sembrata inibire la fibrillogenesi reindirizzando il processo verso la formazione di oligomeri non strutturati, ma comunque stabili e atossici [Ehrnhoefer DE *et al.* 2008].

L'analisi con il DLS è stata effettuata solo sui preparati di HEWL ed epigallocatechina gallato, la molecola più promettente fra le tre studiate. Anche in questo caso è emersa la progressiva formazione, nei giorni, di strutture macromolecolari insolubili, ragionevolmente più grandi di eventuali oligomeri con sospetta citotossicità (Fig. 4.39).

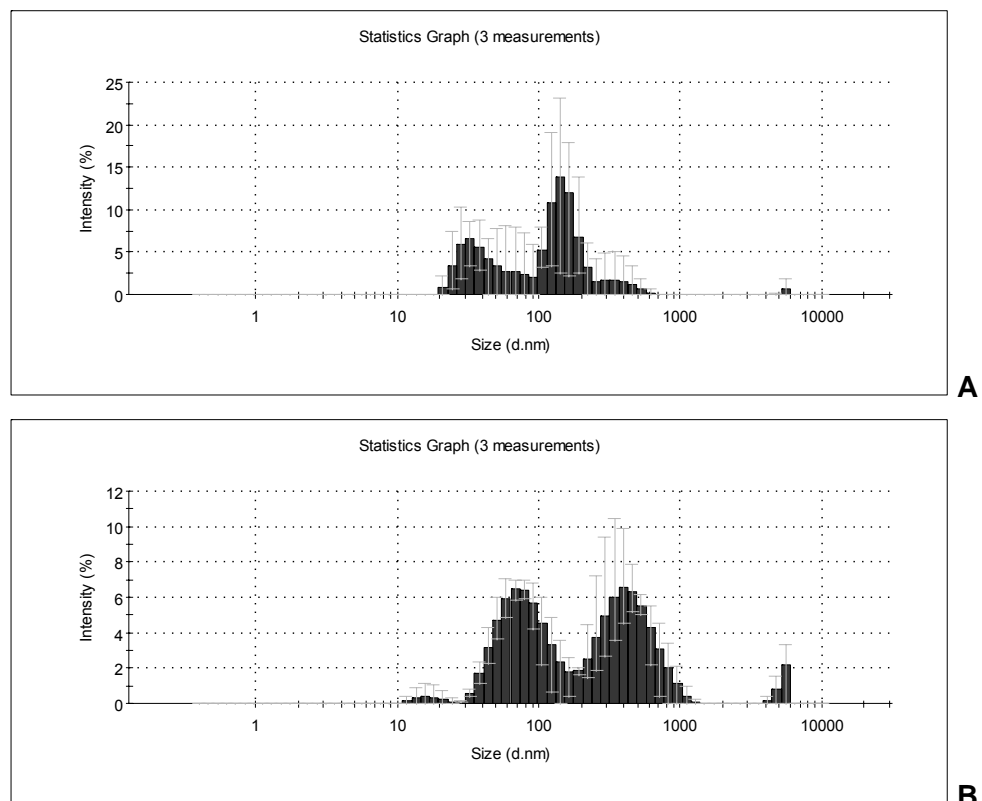


Figura 4.39. Distribuzione dei diametri idrodinamici degli aggregati di HEWL dopo 68 (A) e 162 h (B) di incubazione con epigallocatechina gallato. Prima dell'analisi i campioni sono stati diluiti 1:100 con acqua.

4.2.8. Stilbeni

In questa categoria di sostanze, meno rappresentate nella dieta umana rispetto agli acidi fenolici e ai flavonoidi, è stato preso in considerazione solo l'isomero *trans* del resveratrolo (Fig. 4.40).

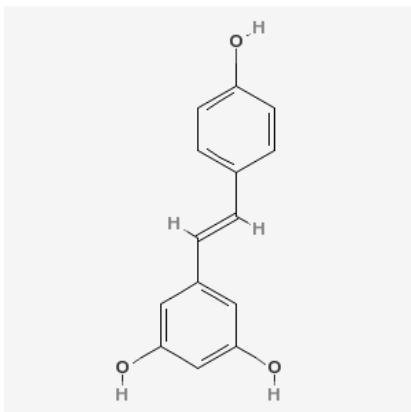


Figura 4.40. Struttura chimica del resveratrolo (isomero *trans*).

Il *trans*-resveratrolo è presente principalmente nell'uva e nel vino rosso [Baur JA *et al.* 2006]. Essendo già stato testato con buoni risultati contro la formazione di materiale amiloide (soprattutto tramite il peptide A β), può considerarsi uno stilbene di riferimento in questo settore [Marambaud P *et al.* 2005].

Sul piano pratico la ridotta solubilità in acqua del polifenolo in questione ha costretto di nuovo all'impiego preliminare del DMSO. Tale solvente è risultato l'1% v/v nelle soluzioni di HEWL sottoposte a incubazione, e lo 0,2% v/v in quelle del peptide 49-64.

Gli spettri registrati al fluorimetro di varie soluzioni di resveratrolo hanno escluso la possibilità di interferenze del composto nel test della ThT.

Sia nelle prove con l'HEWL che in quelle con il peptide 49-64 il polifenolo stilbenico non ha mostrato alcun effetto anti-amiloidogenico. Questo ha messo in luce anzitutto la specificità della proteina modello nell'interazione con i possibili inibitori dell'aggregazione amiloide, fatto non del tutto scontato, data la somiglianza morfologica e strutturale di tutte le fibrille fino a oggi studiate. La mancata attività, inoltre, ha di nuovo confermato l'importanza nelle molecole oggetto dello screening di altri punti di interazione oltre ai due anelli fenolici già individuati. Il che ovviamente è stato di stimolo per programmare alcune simulazioni di molecular modeling.

4.3. ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DI ASSOCIAZIONI DI POLIFENOLI

Prima di saggiare l'effetto anti-amiloidogenico di estratti vegetali, in genere con all'interno una miscela assai complessa di sostanze fenoliche, si è ritenuto opportuno incubare l'HEWL con alcune associazioni di due dei polifenoli testati. Si sono scelte coppie di molecole appartenenti o meno alle stesse classi chimiche. Lo scopo di queste prove preliminari è stato quello di verificare se le attività anti-amiloidogeniche dei singoli composti presentassero caratteristiche additive o addirittura sinergiche a livello di miscela, e se l'eventuale azione combinata fosse correlabile all'appartenenza a specifiche categorie chimiche. Ciò anche nell'ottica di ricavare utili indicazioni su quali estratti vegetali già caratterizzati dal punto di vista analitico sottoporre a screening contro l'aggregazione amiloide.

All'interno del medesimo raggruppamento chimico (quello degli acidi idrossicinnamici e derivati) si sono testate le seguenti coppie di sostanze:

- 1) verbascoside / acido clorogenico;
- 2) verbascoside / acido caffeico.

Lavorando invece con classi diverse di composti si sono provate le associazioni:

- 1) (+)catechina (flavanolo) / verbascoside (derivato idrossicinnamico);
- 2) (+)catechina (flavanolo) / acido caffeico (derivato idrossicinnamico);
- 3) (+)catechina (flavanolo) / acido clorogenico (derivato idrossicinnamico);
- 4) acido clorogenico (derivato idrossicinnamico) / malvina (antocianina).

Mediamente da questi studi preliminari è emerso un incremento di attività anti-amiloidogenica solo per le associazioni di polifenoli appartenenti a classi chimiche diverse. Ad esempio all'interno dei derivati idrossicinnamici l'acido clorogenico (responsabile di un 20% di inibizione quando usato da solo) e il verbascoside (fonte di un 58% di inibizione in analoghe condizioni) hanno rivelato un'attività in miscela pari a circa il 40%; analogamente verbascoside (per l'attività si veda sopra) e acido caffeico (responsabile di un'inibizione del 28%) quando impiegati assieme hanno mostrato un effetto anti-amiloidogenico globale del 50% circa.

Viceversa il derivato idrossicinnamico acido clorogenico (si veda sopra) e il flavonoide malvina (sostanza in grado di frenare l'aggregazione amiloide solo per il 15%) hanno fornito un'attività inibitoria complessiva pari a oltre il 50% (Fig. 4.41).

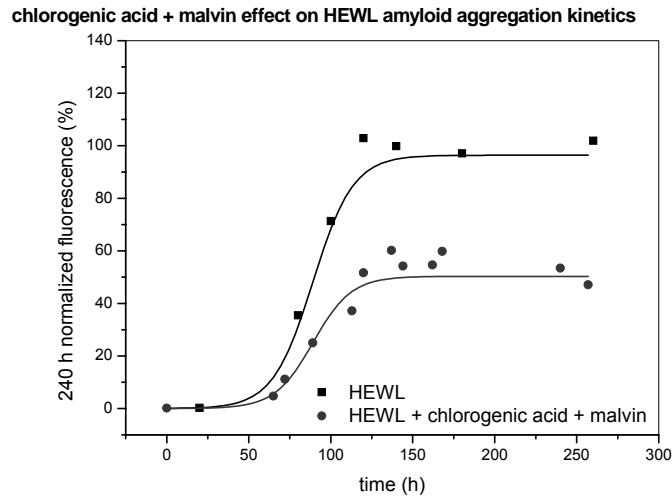


Figura 4.41. Effetto di un'associazione equimolare di acido clorogenico e malvina sull'aggregazione amiloide dell'HEWL.

Negli altri casi studiati non sono emerse sinergie, ma se mai parziali additività degli effetti. Per esempio il flavonoide (+)catechina (effetto inibitorio pari al 46%) e il derivato idrossicinnamico verbascoside (si veda sopra) sono risultati in grado di ridurre di oltre il 65% la formazione di fibrille di HEWL.

Per quanto il fenomeno in oggetto non sia stato studiato in modo sistematico in funzione di concentrazioni crescenti dei singoli polifenoli, i dati raccolti hanno fatto ipotizzare che classi diverse di sostanze non agiscano in modo competitivo fra loro.

Tutti queste considerazioni hanno perciò spinto a testare estratti contenenti possibilmente sia derivati idrossicinnamici che flavonoidi (in particolare antociani).

4.4. ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DI ESTRATTI VEGETALI

Sono stati sottoposti a screening sei estratti vegetali preparati e analizzati dal gruppo di ricerca della Professoressa N. Mulinacci: estratto idroalcolico di radicchio rosso, estratto etanologico di rosmarino, estratto idroalcolico di carciofo, estratto commerciale (in polvere) di carciofo, estratto idroalcolico di ciliegia dolce ed estratto idroalcolico di ciliegia acida. Come si può notare sono stati scelti preparati provenienti da piante o frutti tipici dell'alimentazione italiana. Il loro contenuto in polifenoli è risultato notevole, e ha visto rappresentate molte delle sostanze attive contro l'aggregazione amiloide dell'HEWL (o quanto meno alcuni loro analoghi strutturali). Le principali molecole fenoliche presenti nelle miscele si sono rivelate acidi cinnamici, antociani, flavoni e flavonoli.

I dati raccolti hanno un valore di studio preliminare, ma sono importanti, vista la scarsa letteratura attualmente reperibile sugli estratti vegetali e i loro impieghi nel campo delle amiloidosi. In particolare fino ad oggi mancano studi specifici sull'azione diretta del materiale ottenuto da estrazioni di piante sul processo di formazione delle fibrille amiloidi. D'altra parte va considerato che con l'alimentazione vengono continuamente assunti polifenoli, in quantitativi non elevati, ma sempre in miscela fra loro. Le informazioni raccolte dai nostri primi esperimenti sono già state presentate ad un convegno di chimica degli alimenti ("VII Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti, Perugia, 23-26 giugno 2008), i cui atti andranno in stampa a breve.

4.4.1. Estratto di radicchio rosso

Questo estratto è stato ottenuto a partire dalle foglie fresche di radicchio rosso di Treviso o *Cichorium intybus silvestre* [Innocenti M *et al.* 2005].

La miscela idroalcolica ha mostrato un contenuto totale di polifenoli pari a 0,7 mmol/l. Le analisi HPLC/DAD e HPLC/MS hanno inoltre individuato come predominanti due acidi idrossicinnamici, l'acido cicorico e l'acido clorogenico, ed un'antocianina, la cianidina malonil-glucoside (Fig. 4.42). Per le determinazioni quantitative sono stati usati i seguenti standard esterni: acido clorogenico (per gli acidi idrossicinnamici, curva a 330 nm) e keracianina (per gli antociani, curva a 520 nm).

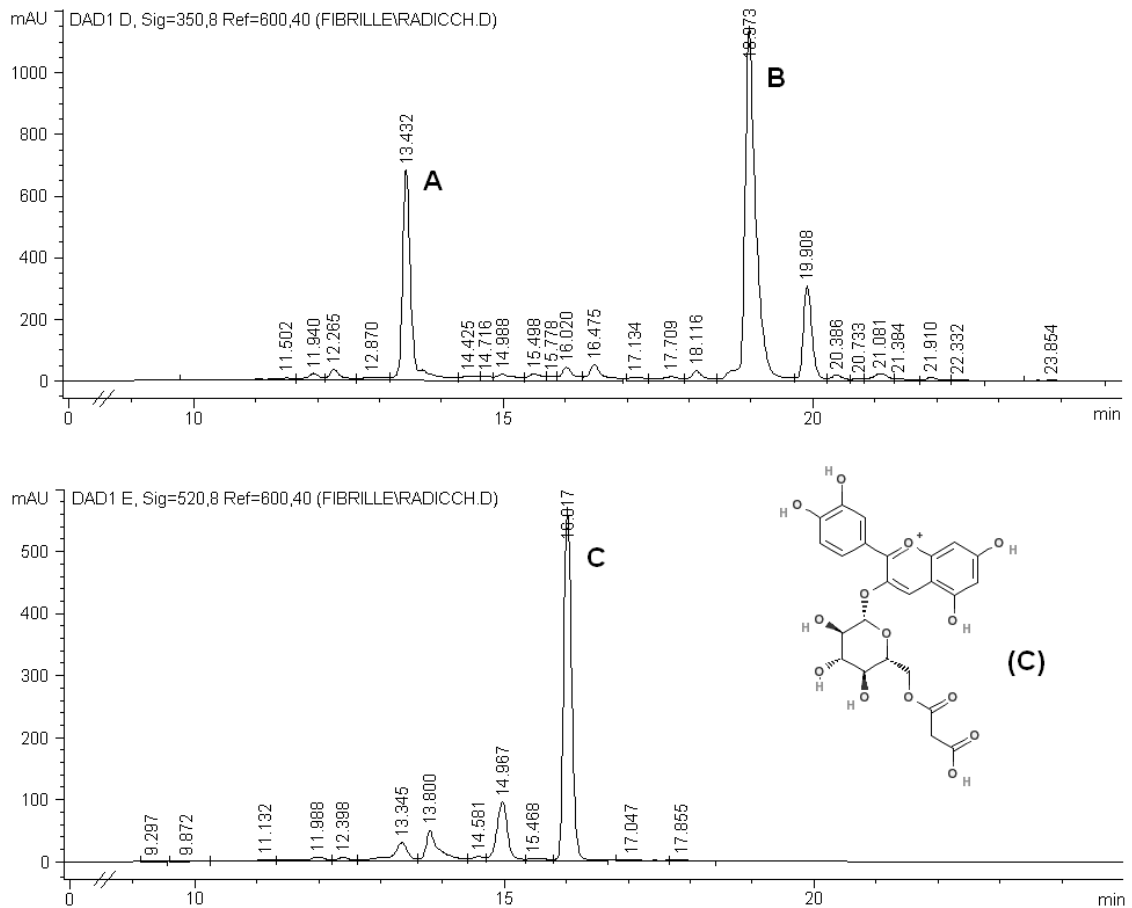


Figura 4.42. Analisi HPLC/DAD d'estratto idroalcolico di radiccio rosso. Nel cromatogramma sono stati evidenziati i picchi corrispondenti all'acido clorogenico (A), all'acido cicorico (B) e alla cianidina malonil-glucoside (C, di cui è stata riportata anche la formula chimica).

La presenza d'acido cicorico e di antociani, molecole mediamente con spiccata attività anti-amiloidogena nei test con l'HEWL, è stata alla base della selezione di questo preparato fra i vari disponibili.

Prima dell'impiego con l'HEWL, l'estratto è stato portato a secco e ripreso con una soluzione d'acido cloridrico a pH 2,0.

Gli spettri in fluorescenza di quest'ultima miscela non hanno mostrato interferenze con il test della ThT.

Pertanto si è passati ad incubare preparato polifenolico e HEWL in quantità equimolari (calcoli riferiti ai polifenoli totali), seguendo il processo con ThT. Anche in questo caso i valori di fluorescenza sono stati normalizzati rispetto ai segnali dei controlli al termine della formazione di fibrille. N'è emersa un'ottima attività anti-amiloidogena (89% d'inibizione della comparsa di fibrille). La cinetica dell'aggregazione amiloide è risultata di nuovo sigmoidale, ma rispetto alla curva di controllo solo la lag phase è apparsa immodificata, mentre la pendenza della fase

esponenziale ha evidenziato una notevole riduzione. Come con molti polifenoli puri l'effetto inibitorio sull'aggregazione amiloide del peptide 49-64 si è rivelato un po' più basso, pari al 75% (Fig. 4.43).

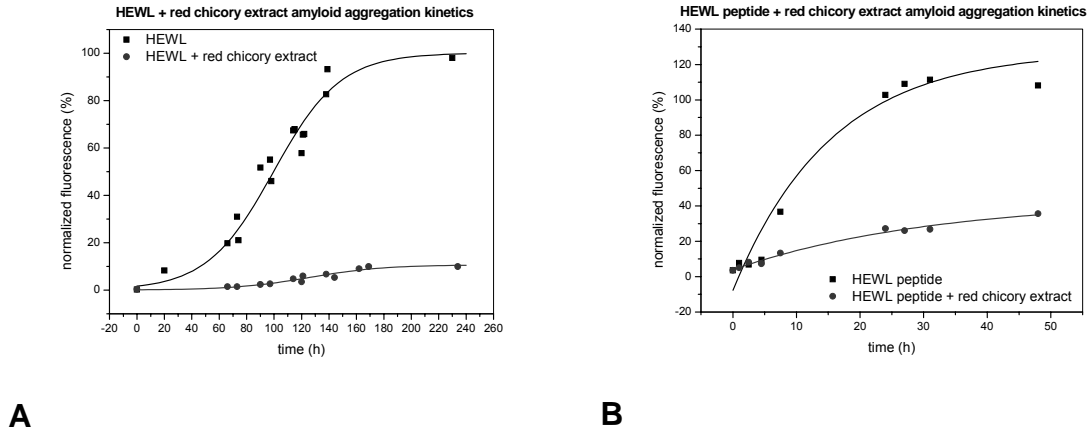


Figura 4.43. Cinetiche d'aggregazione amiloide dell'HEWL (A) e del peptide 49-64 (B) in assenza e in presenza d'estratto di radicchio rosso.

Gli elevati valori d'inibizione emersi da queste prove hanno confermato l'ipotesi di possibili effetti additivi fra le varie componenti polifenoliche presenti in un estratto vegetale. Nel caso specifico, tra l'altro, i principali fenoli in gioco sono risultati appartenere ad almeno due classi chimiche diverse.

L'attività anti-amiloidogena del radicchio rosso è stata oggetto anche d'indagini tramite AFM. Al termine dell'incubazione i preparati di HEWL ed estratto idroalcolico hanno rivelato, nei campi osservati, la presenza di una vasta gamma di particelle, una buona parte delle quali (a livello statistico oltre il 25%) con diametri superiori ai 2 nm, classificabili indicativamente come protofibrille, protofilamenti o fibrille amiloidi mature (Fig. 4.44). Molti degli aggregati sono risultati comunque di forma allungata (assi mediamente di 0,7 μm). Queste osservazioni si sono rivelate in buon accordo con quelle fatte testando l'acido cicorico da solo.

La formazione di materiale con struttura β è stata confermata anche dalla positività al test del Congo red.

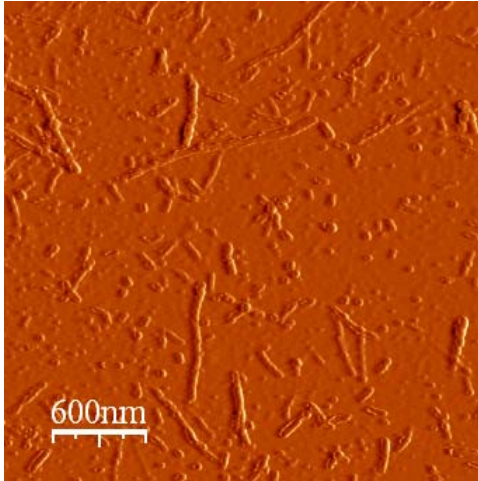


Figura 4.44. Immagine AFM di preparato di HEWL ed estratto di radicchio rosso dopo 260 h d'incubazione. Prima dell'analisi microscopica la miscela è stata diluita 1:100 con acqua.

Il notevole effetto anti-amiloidogenico dell'estratto di radicchio rosso è stato infine oggetto di prove di dose-dipendenza. L'andamento iperbolico dell'inibizione osservata è riportato nella Fig. 4.45.

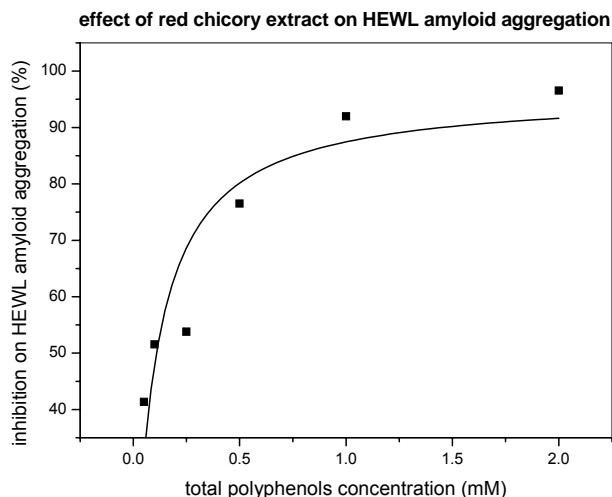


Figura 4.45. Dose - dipendenza dell'effetto inibitorio dell'estratto di radicchio rosso sulla formazione di fibrille amiloidi di HEWL. La normalizzazione delle fluorescenze dei vari campioni su quelle dei rispettivi controlli è stata effettuata a 138 h, quando in pratica il processo d'aggregazione amiloide aveva già raggiunto un plateau.

L' IC_{50} è risultata in questo caso pari a 110 μ M.

4.4.2. Estratto di rosmarino

Questo estratto etanolicco è stato preparato a partire dalle foglie di *Rosmarinus officinalis* L., tipica pianta aromatica della macchia mediterranea (Giaccherini C *et al.* in "Atti del 6° Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti", a cura di Coisson J.D., Arlorio M., Martelli A., Alba, (CN), 7-10 Novembre 2006).

La miscela ottenuta ha rivelato un contenuto totale di polifenoli pari a 1,5 mmol/l. Le analisi HPLC/DAD e HPLC/MS hanno mostrato come predominante l'acido rosmarinico (Fig. 4.46). L'altro grande picco presente sulla destra del cromatogramma

è risultato ascrivibile al carnosolo, fenolo complesso, con spiccato carattere lipofilo. Per le determinazioni quantitative è stato usato come standard esterno l'acido rosmarinico (curva a 330 nm).

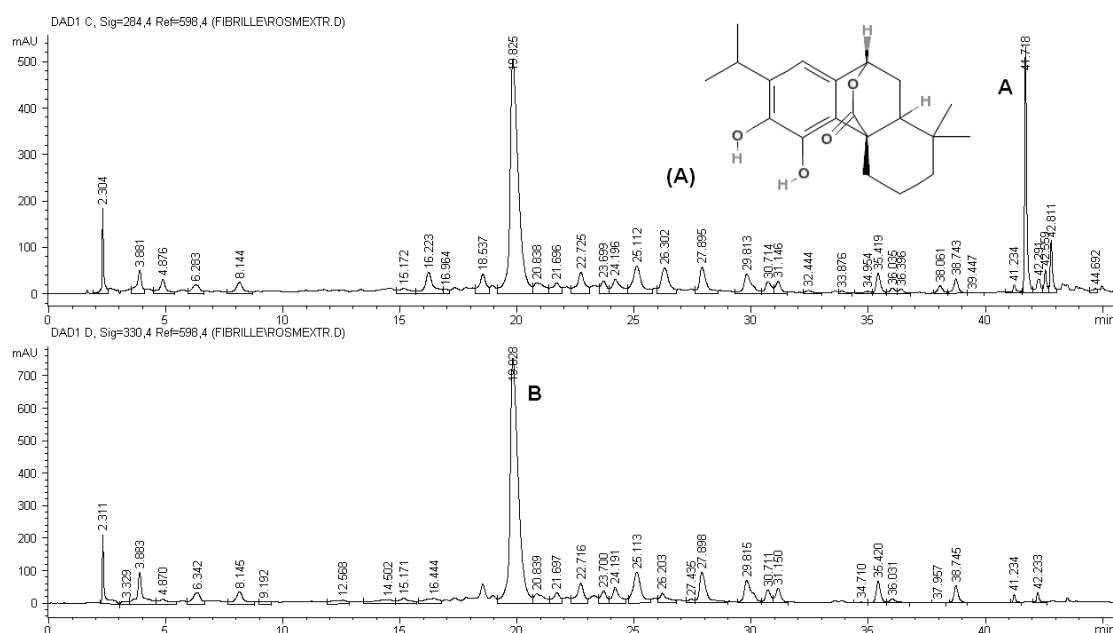


Figura 4.46. Analisi HPLC/DAD d'estratto alcolico di rosmarino. Nel cromatogramma sono stati indicati i picchi corrispondenti al carnosolo (A, di cui è stata riportata anche la formula chimica) e all'acido rosmarinico (B).

L'elevato contenuto in acido rosmarinico, ottimo inibitore dell'aggregazione amiloide dell'HEWL e del peptide 49-64, è stato fondamentale per la scelta di questa miscela.

Prima dell'impiego con la proteina modello l'estratto è stato portato a secco e ripreso con DMSO. Alla successiva aggiunta di acido cloridrico a pH 2,0 è comparso un precipitato, che ulteriori analisi HPLC/DAD hanno rivelato essere quasi esclusivamente carnosolo (cromatogrammi non riportati). Tale fase insolubile è stata pertanto allontanata per centrifugazione.

Gli spettri registrati al fluorimetro della soluzione rimasta, contenente un 5% v/v di DMSO, non hanno mostrato sostanziali interferenze con il test della ThT.

Incubato con l'HEWL, l'estratto in analisi ha rivelato una discreta attività anti-amiloidogena (46% di inibizione della comparsa di fibrille). La classica cinetica sigmoidale del processo, monitorata tramite ThT, è riportata in Fig. 4.47.

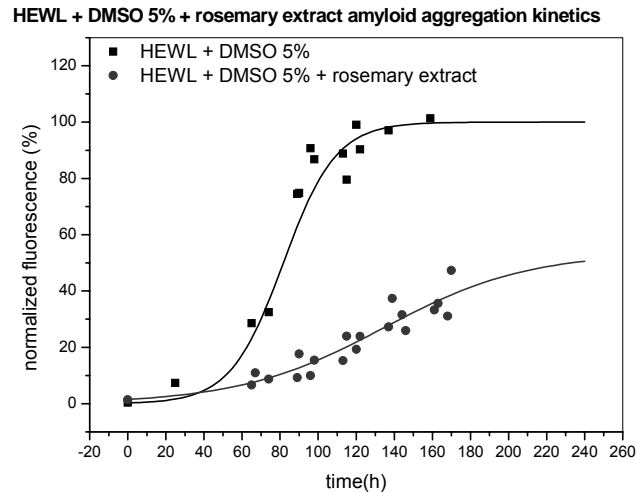


Figura 4.47. Cinetiche di aggregazione amiloide dell'HEWL in assenza e in presenza di estratto di rosmarino.

Anche in questo caso si è ritenuto opportuno verificare il tipo di aggregati presenti nei campioni al termine dell'incubazione. A tale scopo sono state fatte anzitutto scansioni in AFM dei preparati (Fig. 4.48).

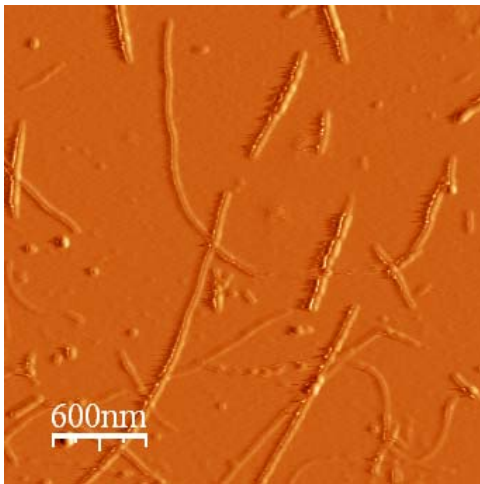


Figura 4.48. Scansione AFM di preparato di HEWL ed estratto di rosmarino dopo 257 h di incubazione. Prima dell'analisi il campione è stato diluito 1:100 con acqua.

Sul piano statistico, nonostante le immagini AFM acquisite non fossero sempre nitide, si sono potuti osservare di nuovo vari tipi di particelle allungate (assi mediamente di 1,4 μm), oltre il 25% delle quali con diametri superiori ai 2 nm, classificabili in linea di massima come protofibrille, protofilamenti o anche fibrille amiloidi mature. Tale materiale strutturato è comunque apparso meno abbondante rispetto a quello presente in analoghi preparati di HEWL incubato da solo (Fig. 4.3, immagine A3).

La presenza di struttura β nei prodotti d'incubazione di estratto di rosmarino e HEWL è stata confermata anche dal test del Congo red.

4.4.3. Estratto di carciofo

Questo prodotto è stato ottenuto da capolini di carciofo empoiese o *Cynara scolymus* L. [Pinelli PP *et al.* 2007].

La miscela ha mostrato un contenuto totale di polifenoli pari a 47,75 mg/g di peso secco di matrice vegetale. Le analisi HPLC/DAD e HPLC/MS hanno inoltre individuato come predominanti due derivati idrossicinnamici, l'acido clorogenico e l'acido 1,5-di-caffeoilchinico. Sono risultati presenti anche alcuni flavonoidi, come ad esempio l'apigenina 7-O-glucuronide, ma in quantità molto minori (Fig. 4.49). Per le determinazioni quantitative si sono impiegati i seguenti standard: acido clorogenico (per i derivati idrossicinnamici, curva a 330 nm) e luteolina 7-O-glucoside (per i flavonoidi, curva a 350 nm).

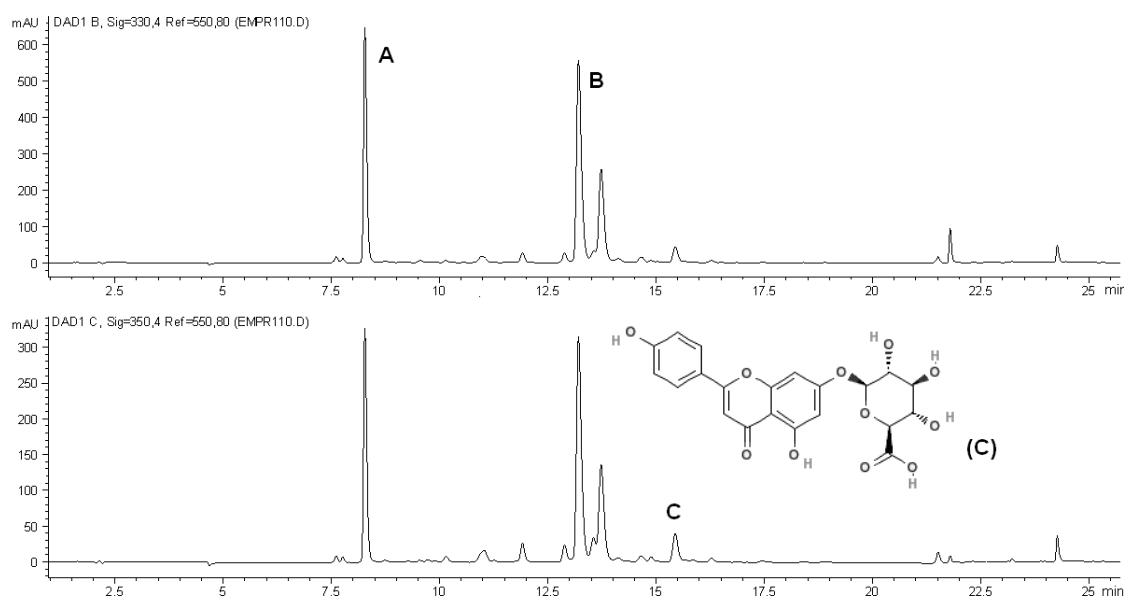


Figura 4.49. Analisi HPLC/DAD di estratto idroalcolico di carciofo. Nel cromatogramma sono stati evidenziati i picchi corrispondenti all'acido clorogenico (A), all'acido 1,5-di-caffeoilchinico (B) e all'apigenina 7-O-glucuronide (C, di cui è stata riportata anche la formula chimica).

L'elevata presenza di acidi di-idrossicinnamici è stata l'elemento principale che ha guidato nella scelta di preparati a base di carciofo. Del resto era anche noto che le loro componenti di-caffeoilchiniche a caldo danno vita, per isomerizzazione, ad un altro derivato di-caffeoilchinico già testato, la cinarina (si veda Par. 4.2.2).

Prima dell'impiego con l'HEWL l'estratto è stato portato a secco e ridissolto in una soluzione di acido cloridrico a pH 2,0.

Gli spettri in fluorescenza di quest'ultima miscela non hanno mostrato interferenze con il test della ThT.

L'incubazione con l'HEWL, monitorata appunto tramite ThT, ha rivelato una buona attività anti-amiloidogena (46% di inibizione della comparsa di fibrille). In Fig. 4.50 è riportata la consueta cinetica sigmoideale del processo.

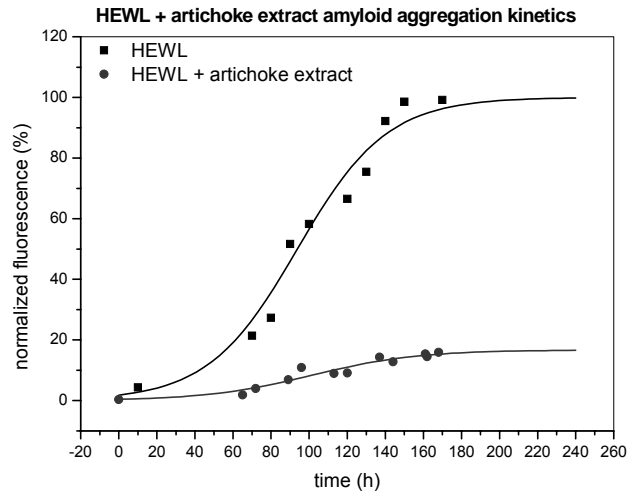


Figura 4.50. Cinetiche di aggregazione amiloide dell'HEWL in assenza o in presenza di estratto di carciofo.

L'effetto anti-amiloidogenico del carciofo è stato oggetto anche di indagini in AFM. Al termine dell'incubazione i preparati osservati hanno rivelato la presenza di una vasta gamma di particelle, l'82% delle quali con diametri compresi fra 2 e 5 nm, classificabili presumibilmente come protofibrille o protofilamenti (Fig. 4.51). Gli aggregati sono comunque risultati di forma allungata (assi mediamente di 0,7 μm). È stato possibile identificare anche alcune fibrille amiloidi mature.

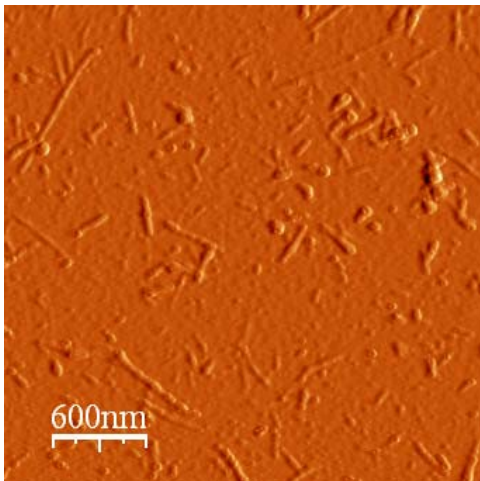


Figura 4.51. Scansione AFM di preparato di HEWL ed estratto di carciofo dopo 264 h di incubazione. L'analisi microscopica è stata preceduta da una diluizione 1:100 con acqua.

Anche il test del Congo red ha confermato la presenza di materiale con struttura β .

4.4.4. Estratto commerciale di carciofo

Oltre all'estratto idroalcolico di carciofo empoiese è stato preso in considerazione un analogo prodotto commerciale in forma purificata e liofilizzata. Questo al fine di valutare anche la variabilità di composizione e/o di effetti biologici di campioni differenti degli stessi fitopreparati.

Il prodotto è stato rianalizzato tramite HPLC/DAD e HPLC/MS. La miscela ha rivelato un contenuto totale di polifenoli pari a 0,524 mmol/g di estratto. Sono stati individuati come predominanti due acidi idrossicinnamici, l'acido clorogenico e l'acido 1,5-di-caffeoilchinico. Sono risultati presenti anche alcuni flavonoidi, come ad esempio la luteolina 7-O-glucoside, sebbene in quantità minori (Fig. 4.52). Per le determinazioni quantitative sono stati usati i seguenti standard esterni: acido clorogenico (per i derivati idrossicinnamici, curva a 330 nm) e luteolina 7-O-glucoside (per i flavonoidi, curva a 350 nm).

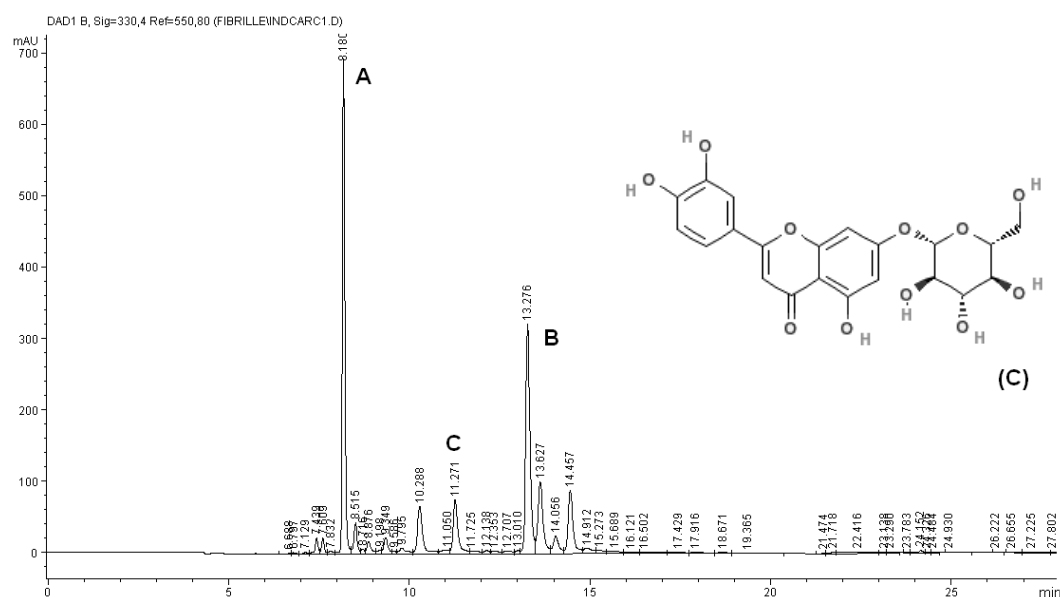


Figura 4.52. Analisi HPLC/DAD di estratto commerciale di carciofo. Nel cromatogramma sono stati evidenziati i picchi corrispondenti all'acido clorogenico (A), all'acido 1,5-di-caffeoilchinico (B) e alla luteolina 7-O-glucoside (C, di cui è stata riportata anche la formula chimica).

Per poter procedere con il test *in vitro* contro la formazione di fibrille amiloidi, l'estratto è stato sospeso in una soluzione d'acido cloridrico a pH 2,0. Il materiale è stato poi completamente chiarificato tramite centrifugazione, senza per altro modificare il contenuto in polifenoli, come confermato da ulteriori analisi HPLC/DAD (dati non riportati).

Gli spettri in fluorescenza della miscela ottenuta non hanno mostrato interferenze con il test della ThT.

Incubato con l'HEWL, l'estratto in questione ha rivelato una buona attività anti-amiloidegenica (83% di inibizione della comparsa di fibrille). La cinetica del processo di aggregazione amiloide è risultata di nuovo sigmoideale, anche se con una variabilità dei dati un po' maggiore. Il tratto di lag phase non è apparso modificato.

La presenza, al termine dell'incubazione, di materiale con struttura β è stata in questo caso confermata solo tramite il test del Congo red.

In conclusione l'estratto commerciale di carciofo, per quanto sottoposto a poche analisi, ha confermato un comportamento analogo a quello del preparato proveniente dalla varietà empoiese della pianta. Ciò è risultato per altro in buon accordo con la composizione in polifenoli, molto simile nei due estratti, soprattutto a livello di derivati idrossicinnamici.

4.4.5. Estratto di ciliegia dolce

Questo prodotto è stato ottenuto dalla polpa fresca del frutto del *Prunus avium*, pianta largamente diffusa in Italia (Mulinacci N. et al. in "Polyphenols Communications", Helsinki, 2004, 309-310).

La miscela idroalcolica ha mostrato un contenuto totale di polifenoli pari a 8,33 mmol/l. Le analisi HPLC/DAD e HPLC/MS hanno individuato come predominanti gli antociani, e in particolare la keracianina e la cianidina 3-O-glucoside (Fig. 4.53). Per le determinazioni quantitative si è fatto uso, come standard esterno, della keracianina (curva a 520 nm).

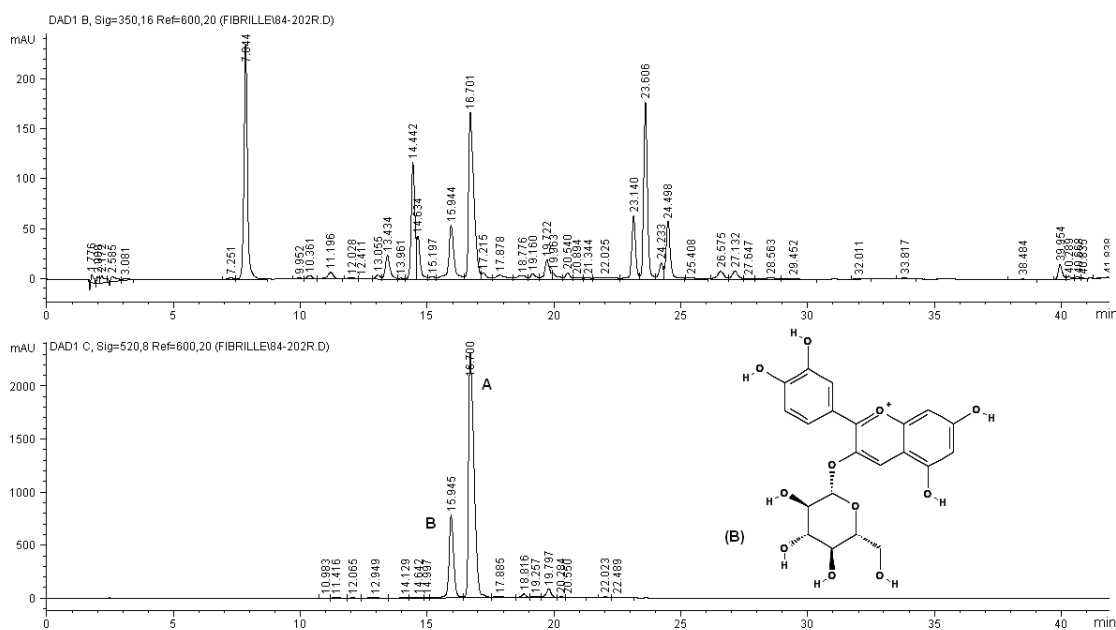


Figura 4.53. Analisi HPLC/DAD di estratto idroalcolico di ciliegia dolce. Nel cromatogramma sono stati evidenziati i picchi corrispondenti alla keracianina (A) e alla cianidina 3-O-glucoside (B, di cui è stata riportata anche la formula chimica).

Prima dell'impiego con l'HEWL l'estratto è stato portato a secco e ridissolto in una soluzione d'acido cloridrico a pH 2,0.

Gli spettri in fluorescenza di quest'ultima miscela non hanno manifestato interferenze con il test della ThT.

L'incubazione con l'HEWL, monitorata appunto tramite ThT, ha rivelato un'ottima attività anti-amiloidogena (97% di inibizione della comparsa di fibrille). In Fig. 4.54 è riportata la consueta cinetica sigmoideale del processo.

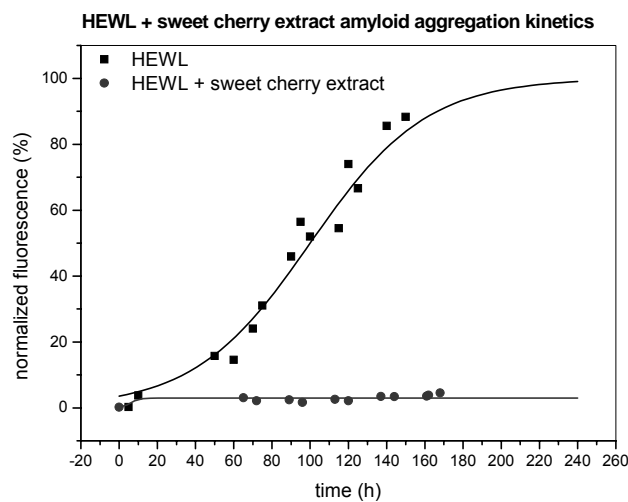


Figura 4.54. Cinetiche di aggregazione amiloide dell'HEWL in assenza e in presenza di estratto di ciliegia dolce.

In questo caso l'inibizione è risultata così pronta da far quasi sparire la fase di latenza iniziale. Sicuramente si può parlare di additività fra gli effetti dei singoli antociani presenti. La rapidità dell'azione è emersa soprattutto dal confronto con la cinetica di inibizione dell'estratto di radicchio rosso, di per sé già molto efficace: i livelli massimi di fluorescenza sono stati raggiunti nell'arco di poche ore.

Di fronte a un preparato così attivo è risultato particolarmente importante indagare la natura delle particelle presenti al termine dell'incubazione con l'HEWL. Il loro aspetto morfologico è stato messo in luce, al solito, tramite l'AFM (Fig. 4.55). Nei campi osservati è risultata presente una vasta gamma di strutture, oltre il 33% delle quali con diametri superiori ai 2 nm, classificabili indicativamente come protofibrille, protofilamenti o, in qualche caso, fibrille amiloidi mature. Molte delle particelle sono

risultate comunque di forma allungata (assi mediamente di 1 μm). Inoltre il loro numero complessivo è apparso assai inferiore a quello evidenziato da analoghi preparati di controllo (Fig. 4.3, immagine A3), in linea per altro con la fluorescenza registrata nel saggio della ThT. Queste osservazioni si sono rivelate abbastanza in accordo con quelle fatte testando la keracianina da sola.

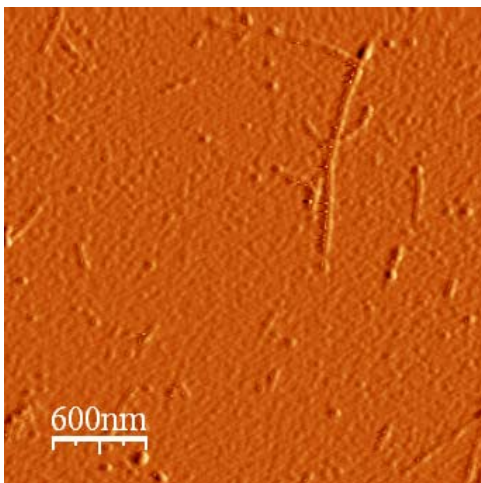


Figura 4.55. Immagine AFM di preparato di HEWL ed estratto di ciliegia dolce dopo 257 h di incubazione. Prima dell'analisi il campione è stato diluito 1:100 con acqua.

Anche il test del Congo red ha confermato la presenza, al termine dell'incubazione, di materiale con struttura β .

4.4.6. Estratto di ciliegia acida

Quest'ultima miscela sottoposta a screening è stata preparata dalla drupa del *Prunus cerasus*, pianta abbastanza diffusa in Italia, anche se tipica per lo più dell'Europa settentrionale (Mulinacci N. et al. in "Polyphenols Communications", Helsinki, 2004, 309-310).

L'estratto idroalcolico ha rivelato un contenuto totale di polifenoli pari a 2,61 mmol/l. Le analisi HPLC/DAD e HPLC/MS hanno di nuovo mostrato come predominanti gli antociani, e in particolare la cianidina 3-O-glucosilrutinoside e la keracianina (Fig. 4.56). Per le determinazioni quantitative si è utilizzata, come standard esterno, la keracianina (curva a 520 nm).

Prima di procedere all'incubazione con l'HEWL l'estratto è stato portato a secco e ripreso con una soluzione di acido cloridrico a pH 2,0. Il materiale è stato poi completamente chiarificato tramite centrifugazione, senza per altro modificarne il contenuto in polifenoli, come confermato da ulteriori analisi HPLC/DAD (dati non riportati).

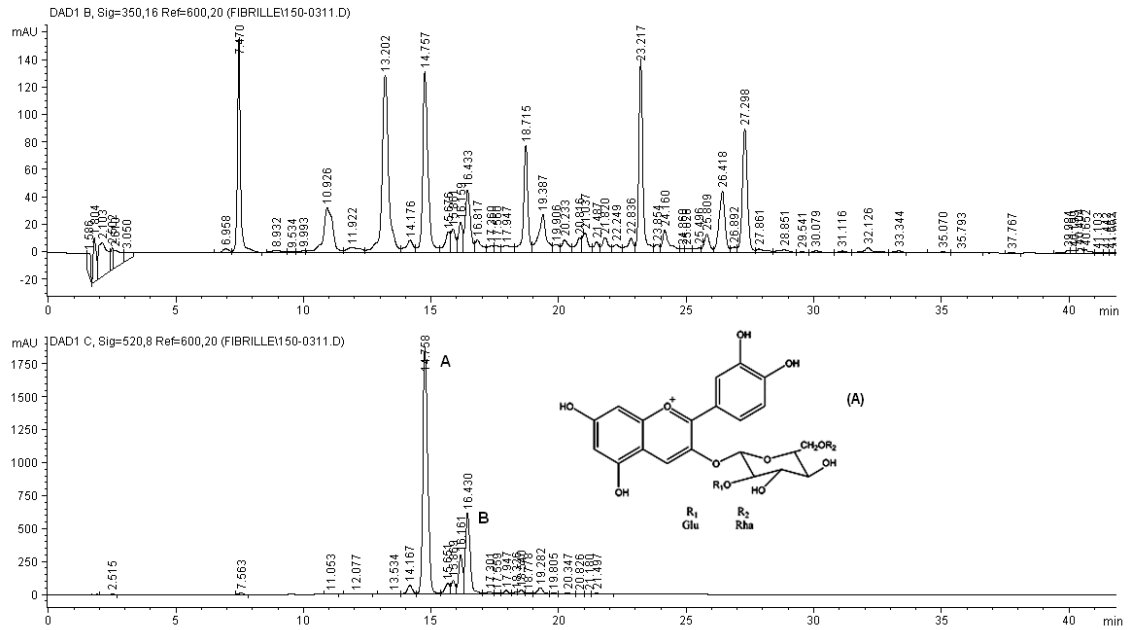


Figura 4.56. Analisi HPLC/DAD di estratto idroalcolico di ciliegia acida. Nel cromatogramma sono stati indicati i picchi corrispondenti alla cianidina 3-O-glucosilrutinoside (A, di cui è stata riportata anche la formula chimica) e alla keracianina (B).

Gli spettri in fluorescenza della miscela recuperata non hanno mostrato interferenze con il test della ThT.

L'incubazione con l'HEWL, monitorata tramite il classico saggio della ThT, ha indicato un'attività anti-amiloidegenica veramente notevole (98% di inibizione della comparsa di fibrille). La cinetica del processo è riportata in Fig. 4.57.

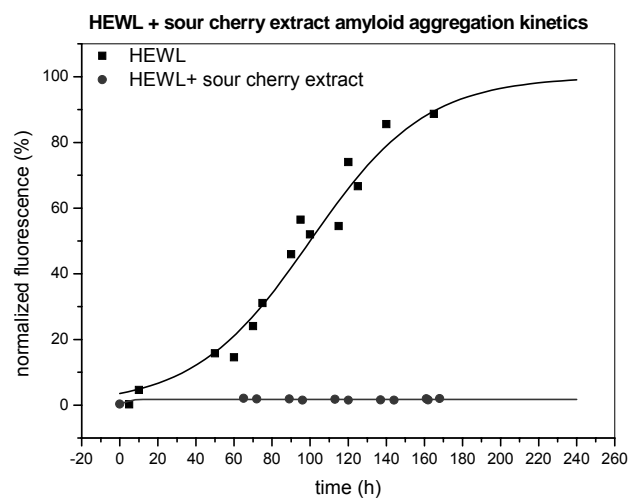


Figura 4.57. Cinetiche di aggregazione amiloide dell'HEWL in assenza e in presenza di estratto di ciliegia acida.

In questo caso l'effetto è risultato così rapido e intenso da far in pratica scomparire la fase di latenza. Questi dati, assieme a quelli relativi alla ciliegia dolce e, anche se in modo meno evidente, a quelli del radicchio rosso, confermano come gli antocianosidi, fino a oggi non impiegati nella ricerca contro le amiloidosi (né *in vitro* né *in vivo*), potrebbero costituire molecole molto promettenti per il futuro.

Vista l'entità dell'effetto inibitorio, si è ritenuto opportuno analizzare a fondo le particelle presenti in campioni di HEWL incubati per tempi diversi con la miscela polifenolica. A tale scopo sono state anzitutto acquisite alcune immagini AFM (Fig. 4.58).

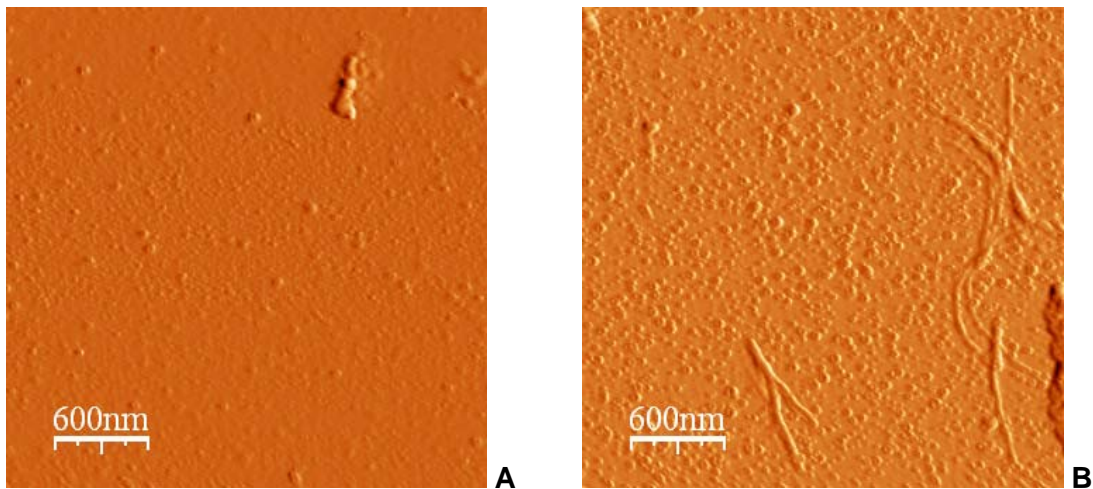


Figura 4.58. Scansioni AFM di preparati di HEWL ed estratto di ciliegia acida: (A) campione addizionato di estratto alla settantesima ora di incubazione e osservato al microscopio dopo altre 29 h; (B) campione addizionato di estratto alla novantanovesima ora e poi subito sottoposto alla scansione. In entrambi i casi l'analisi microscopica è stata preceduta da una diluizione 1:100 con acqua.

Nella prima immagine non sono state identificate strutture fibrillari, e da un punto di vista statistico solo un 8% circa delle particelle è risultato classificabile come protofilamento e/o protofibrilla. La lunghezza media degli aggregati è apparsa pari a 0,3 μm . Nella seconda immagine sono state rilevate alcune fibrille amiloidi mature e un certo numero protofilamenti e/o protofibrille (oltre metà degli aggregati presenti). Inoltre le dimensioni medie delle particelle sono apparse decisamente maggiori (circa 1 μm). Questi dati nel loro insieme hanno dimostrato l'importanza del fattore tempo per l'efficacia della miscela polifenolica contro la formazione di materiale amiloide.

Il test del Congo red eseguito al termine dell'incubazione ha confermato la presenza, sebbene con un picco a 540 nm non molto intenso, di aggregati con struttura β .

Il notevole effetto anti-amiloidogenico dell'estratto di ciliegia acida è stato oggetto anche di studi di dose-dipendenza. L'andamento iperbolico dell'inibizione osservata è riportato nella Fig. 4.59.

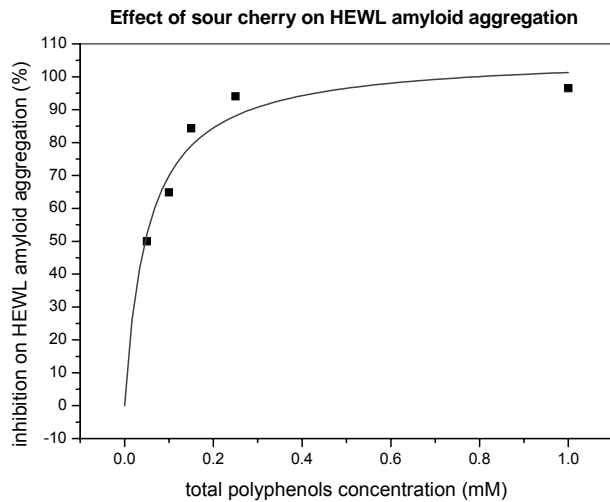


Figura 4.59. Dose - dipendenza dell'effetto inibitorio dell'estratto di ciliegia acida sulla formazione di fibrille amiloidi di HEWL. La normalizzazione delle fluorescenze dei vari campioni su quelle dei rispettivi controlli è stata effettuata a 138 h.

L' IC_{50} ricavata dal grafico in questione è pari a 50 μ M.

Un'ultima serie di studi effettuati sull'estratto di ciliegia acida ha permesso di evidenziarne il potere disaggregante nei confronti del materiale amiloide. L'aggiunta di miscela polifenolica a tempi diversi del processo di formazione delle fibrille di HEWL ha determinato infatti una rapida caduta del segnale della ThT (Fig. 4.60). Nel caso dell'aggiunta a 70 h, abbastanza precoce, la formazione di fibrille è sembrata arrestarsi alla fase iniziale. L'effetto disaggregante dell'aggiunta a 99 h ha trovato conferma anche nei dati morfologici. A tale proposito sono state infatti confrontate l'immagine B della Fig. 4.59 e l'immagine A2 della Fig. 4.3: in presenza d'antociani gli aggregati di piccole dimensioni sembrano essere aumentati di numero. Anche i dati relativi all'aggiunta a 259 h sono apparsi chiari, nonostante la variabilità delle letture fluorimetriche in genere associate al plateau della cinetica di aggregazione amiloide dell'HEWL: il segnale della ThT si è rapidamente abbassato.

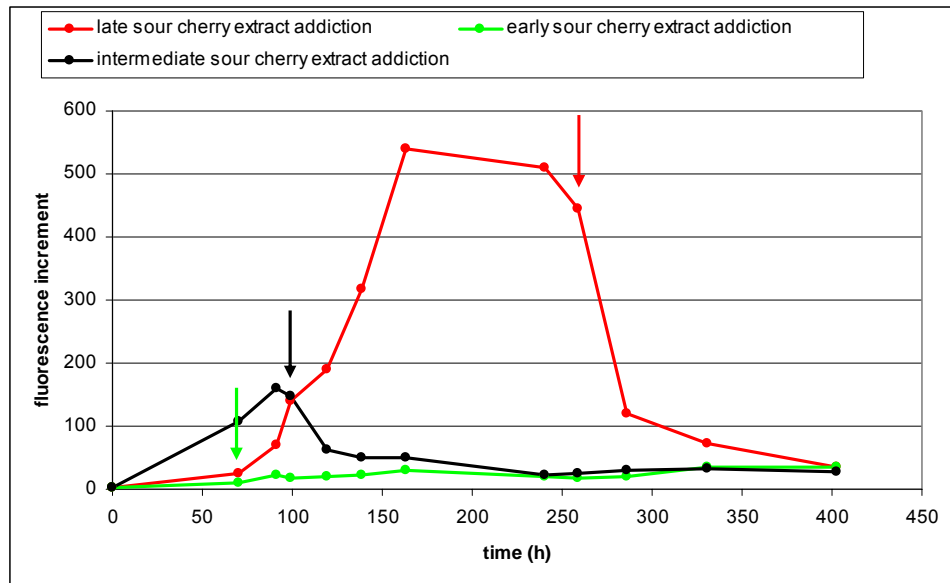


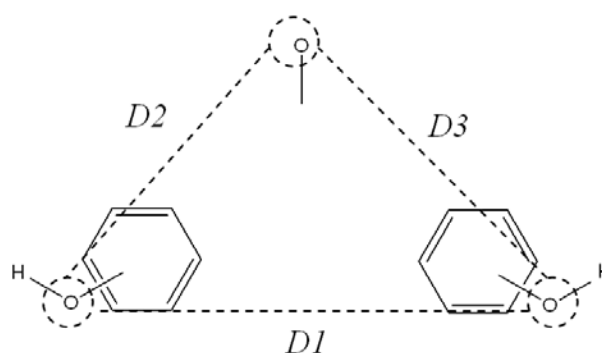
Figura 4.60. Andamento del segnale della ThT in campioni di HEWL addizionati di estratto di ciliegia acida. Le frecce indicano il momento dell'aggiunta della componente polifenolica (concentrazione finale: 1 mM).

4.5. SIMULAZIONI DI MOLECULAR MODELING

I dati già presenti in letteratura sull'effetto anti-amiloidogenico di alcuni polifenoli su proteine modello quali il peptide A β e l' α -sinucleina hanno già messo in luce l'importanza, per l'attività in oggetto, di due donatori di protone in legami a ponte d'idrogeno posizionati a 8-16 Å fra loro. Sull'HEWL e sul peptide 49-64, tuttavia, il resveratrolo, fenolo in grado di contrastare la formazione di fibrille amiloidi da peptide A β , si è dimostrato completamente inefficace.

Questa evidenza sperimentale è stata alla base della ricerca a livello teorico d'altri gruppi farmacoforici comuni alla maggior parte delle molecole studiate e in grado di spiegare i dati raccolti (soprattutto quelli relativi al peptide 49-64). Nella fattispecie è emersa la necessità, per l'effetto biologico, di possedere anche un accettore di protone in un legame a idrogeno. Alcuni composti sono stati esclusi da questo studio o perché privi di uno degli anelli fenolici (ad esempio l'acido caffeico e l'acido clorogenico) o per motivi di complessità (ad esempio l'acido tannico), o, infine, per la presenza di una carica esplicita (si vedano a questo proposito le antocianine). I polifenoli presi in considerazione sono stati pertanto i seguenti: acido rosmarinico, acido cicorico, verbascoside, curcumina, quercetina-3-galattoside, epigallocatechina gallato, (+)catechina, (-)epicatechina, cinarina, rutina, quercetina, hinokiflavone, amentoflavone, scutellareina, cumestrololo, genisteina e daidzeina.

In pratica per tutte le conformazioni molecolari medie generate via software sono state calcolate le distanze fra i tre farmacofori (Do1, Do2 e Ac), ottenendo due serie di misure, una per l'accettore in posizione (a) e una per l'accettore in posizione (b), come indicato nel Par. 3.11. I dati raccolti sono presentati in Fig. 4.61.



Molecole attive sul peptide 49-64				Molecole inattive sul peptide 49-64			
mol	D1	D2	D3	mol	D1	D2	D3
CUM-a	11,44	7,08	7,05	CAT-a	10,47	6,82	7,33
CUM-b	11,44	4,79	8,03	CAT-b	10,47	4,76	6,39
ROS-a	9,4	6,95	8,47	GEN-a	12,16	6,39	6,49
ROS-b	8,86	5,73	8,5	GEN-b	12,16	4,76	7,86
CUR1-a	6,56	8,34	9	CIN1-a	4,53	7,61	7,75
CUR1-b	6,56	7,98	9,34	CIN1-b	4,53	7,39	8,58
CUR2-a	11,43	7,87	9,14	VER1-a	12,52	6,93	7,52
CUR2-b	11,43	7,4	9,38	VER1-b	12,52	5,55	8,34
HIN-a	10,95	6,52	8,82	VER2-a	16,68	7,98	9,68
HIN-b	11,87	4,9	7,71	VER2-b	16,68	7,98	9,68
CIC1-a	17,42	7,77	10,26	VER3-a	14,41	7,58	7,72
CIC1-b	17,42	7,77	10,26	VER3-b	14,41	6,5	9,47
CIC2-a	11,82	7,61	8,22	DAI-a	12,15	6,44	6,43
CIC2-b	11,82	7,52	8,53	DAI-b	12,15	4,77	7,86
QUE-a	10,92	6,28	7,84	EGG-a	10,81	6,4	6,55
QUE-b	10,92	6,28	7,84	EGG-b	10,77	4,76	8,01
SCU-a	12,05	5,57	6,49	ECA-a	10,45	6,41	7,07
SCU-b	12,05	5,29	8,82	ECA-b	10,45	4,75	6,43
RUT1-a	10,84	6,67	7,47	QUG-a	10,87	6,71	6,83
RUT1-b	10,91	6,2	7,82	QUG-b	10,96	6,21	7,84
RUT2-a	10,94	6,26	7,84				
RUT2-b	10,88	5,69	8,16				
AME-a	11	6,16	7,06				
AME-b	11,29	4,89	8,67				

Figura 4.61. Distanze medie fra i tre farmacofori dei composti polifenolici studiati: in alto le definizioni grafiche e in tabella i valori numerici in Å. Il nome delle varie molecole polifenoliche è stato abbreviato con una sigla di tre lettere seguite da un numero progressivo che indica il cluster preso di volta in volta in considerazione.

Per verificare se le due popolazioni (sostanze attive o inattive sull'aggregazione amiloide del peptide 49-64) fossero significativamente diverse è stato effettuato il t-test, per i due gruppi, sulle varie distanze. Tale test ha permesso di determinare se la

differenza tra le due medie di valori delle distanze fosse uguale a 0 contro l'ipotesi alternativa che non lo fosse.

Le distanze D1 (fra i due gruppi donatori di protone in legami a ponte d'idrogeno) e D2 (fra un gruppo donatore e il gruppo accettore) non sono risultate statisticamente diverse tra le due popolazioni (sostanze attive o inattive sull'aggregazione amiloide del peptide 49-64). Per D1, con varianze dei due gruppi significativamente uguali ($F = 0,616845$, $p\text{-value} = 0,268724$), l'ipotesi che la differenza delle distanze tra i raggruppamenti atomici fosse significativa non ha trovato conferma nel calcolo del t-value, che è risultato molto basso ($-0,301817$), con una probabilità elevata ($p\text{-value} = 0,764281$). In questo caso l'ipotesi che la media delle distanze delle molecole attive fosse uguale alla media delle molecole inattive (ipotesi nulla) non ha potuto essere considerata falsa (e quindi tale ipotesi è risultata vera), in quanto il valore del p non era inferiore a 0,05 (95% del livello di confidenza).

Per D2 valgono le stesse affermazioni fatte a proposito delle distanze D1: $t = 0,692835$, $p\text{-value} = 0,492227$ (per un $F = 0,922$ $p\text{-value} = 0,84363$).

La distanza D3 si è rivelata invece significativamente diversa nei due gruppi di molecole. Infatti, a fronte di una varianza significativamente uguale ($F = 0,780863$, $p\text{-value} = 0,566657$), il valore di t ($2,23004$) e della probabilità p inferiore a 0,05 ($p\text{-value} = 0,0311458$) ha confermato che l'ipotesi nulla (uguaglianza delle medie) poteva essere respinta.

La Fig. 4.62 riassume in modo grafico l'analisi statistica. Nel Box-and-Whisker Plot i valori sono divisi in quattro aree uguali di frequenza (quartili). Il box contiene il 50% dei valori mediani. La mediana è rappresentata dalla linea verticale all'interno del box. Le linee orizzontali (whiskers) sono disegnate nel seguente modo: quella a sinistra (o più bassa) a partire dal quartile più basso fino al punto con valore minore; quella a destra a partire dal quartile più alto fino al punto con valore maggiore.

Collocando i composti verbascoside ed epigallocatechina gallato, attivi sull'HEWL e inattivi sul peptide 49-64, nel gruppo delle molecole attive la differenza per le distanze D3 è risultata più significativa. Di contro D1 e D2 hanno continuato a apparire statisticamente non diverse nelle due popolazioni, anche se in modo meno marcato. I grafici relativi a queste rielaborazioni non sono stati riportati.

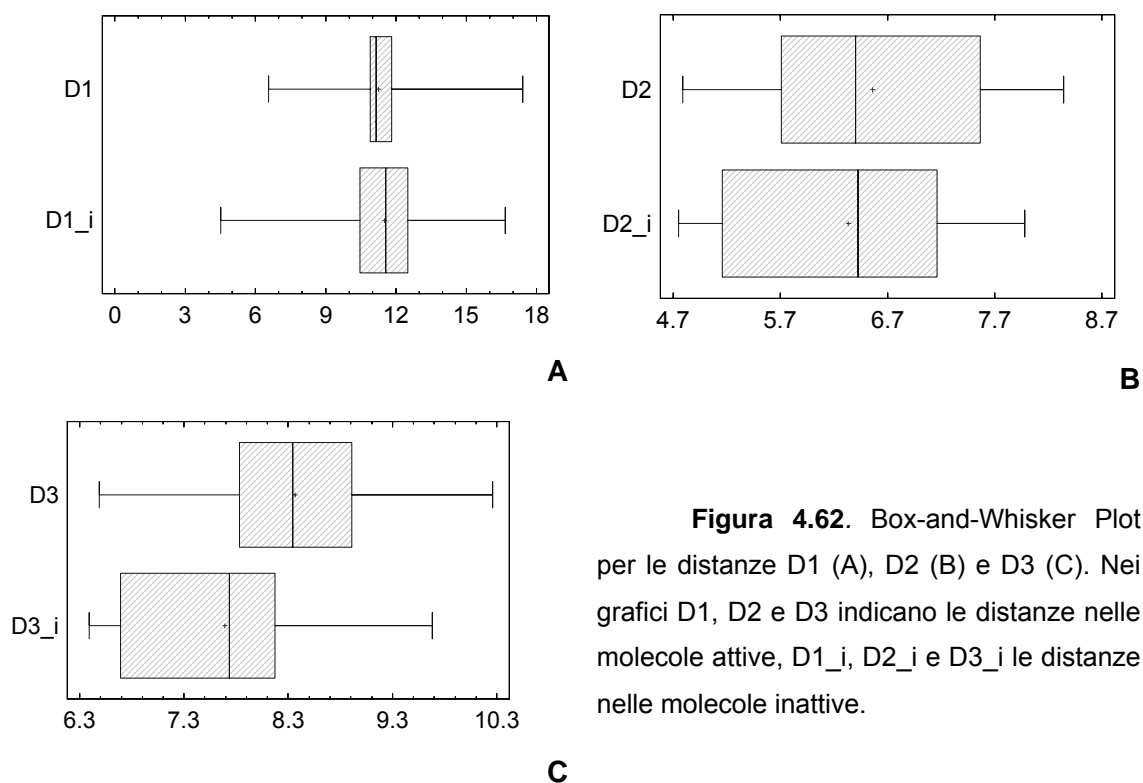


Figura 4.62. Box-and-Whisker Plot per le distanze D1 (A), D2 (B) e D3 (C). Nei grafici D1, D2 e D3 indicano le distanze nelle molecole attive, D1_i, D2_i e D3_i le distanze nelle molecole inattive.

Il lavoro di molecular modeling ha dunque sottolineato l'importanza per l'attività anti-amiloidogena dei legami a ponte di idrogeno instaurabili con le proteine modello. Nel caso specifico la distanza fra i farmacofori donatori non è risultata discriminante, e compresa fra 10 e 13 Å. Analoghe conclusioni sono state tratte per D2, mediamente compresa fra 4,5 e 8 Å. Un ruolo più importante è stato invece attribuito alla distanza D3, distanza tra un gruppo donatore (-OH fenolico) e un gruppo accettore, che è risultata significativamente maggiore nelle molecole attive che in quelle inattive (7,6-8,9 Å contro i 6,5-7,9 Å). Questo dato suggerisce che un gruppo accettore di legame a idrogeno sia basilare per l'attività anti-amiloidogena nei confronti dell'HEWL e del peptide 49-64.

4.5.1. Conferme sperimentali

A parziale conferma delle correlazioni attività-struttura ricavate tramite il molecular modeling è stato testato sull'HEWL e sul peptide 49-64 un altro polifenolo scelto *ad hoc*, l'acido nordiidroguaiaretico (Fig. 4.63).

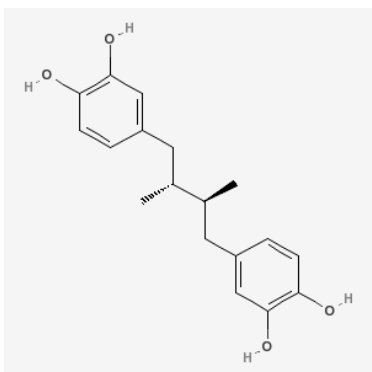


Figura 4.63. Struttura chimica dell'acido nordiidroguaiaretico.

Questo composto può essere isolato ad esempio dalla *Larrea tridentata*, pianta originaria dell'America settentrionale [Arteaga S *et al.* 2005]. Si tratta di un derivato fenolico che, come il resveratrolo, non presenta il gruppo accettore di protoni Ac. Nonostante la sua minore rigidità strutturale rispetto al derivato stilbenico, la molecola si è rivelata sostanzialmente inattiva nei confronti dell'aggregazione amiloide dell'HEWL e del peptide 49-64.

Data la sua ridotta solubilità, la sostanza è stata disciolta inizialmente in DMSO. Tale solvente è risultato l'1% nelle prove di incubazione con l'HEWL e lo 0,2% in quelle con il peptide 49-64.

Gli spettri registrati al fluorimetro di varie soluzioni di acido nordiidroguaiaretico hanno escluso la possibilità di interferenze del composto nel test della ThT.

Monitorata tramite la ThT, l'aggregazione amiloide dell'HEWL in presenza del polifenolo è risultata inibita solo per il 9% circa. Nel caso del peptide 49-64 l'effetto inibitorio è apparso ancora più piccolo, praticamente nullo (Fig. 4.64).

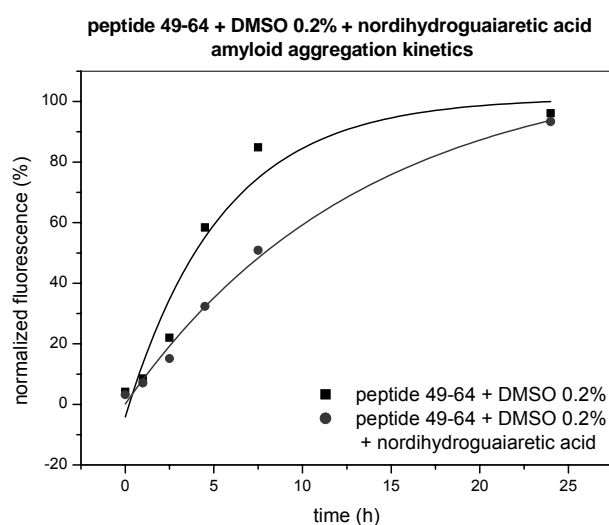


Figura 4.64. Cinetiche di aggregazione amiloide del peptide 49-64 in assenza e in presenza di acido nordiidroguaiaretico.

Questi dati confermano dunque come per l'attività inibitoria studiata non siano sufficienti i due gruppi donatori di protoni Do1 e Do2 (gli ossidrili fenolici), ma risulti invece determinante la presenza di un terzo farmacoforo, l'accettore Ac.

5. CONCLUSIONI

Il presente progetto sperimentale è nato da alcune considerazioni preliminari sulla ricerca nel campo delle amiloidosi. In primo luogo si è osservato come negli ultimi anni l'aggregazione amiloide delle proteine sia risultata coinvolta in un elevato numero di patologie, apparentemente molto diverse fra loro. Una buona parte di queste malattie si è per altro rivelato di tipo sistemico. Pertanto, parallelamente al crescere dell'interesse scientifico e dei finanziamenti nel settore, si è andata sempre più affermando l'esigenza di trovare sostanze in grado di contrastare alla base, o meglio ancora di prevenire, un fenomeno così rilevante di misfolding delle proteine.

I polifenoli sono apparsi un buon soggetto di studio in proposito, sia per la loro notevole distribuzione nel mondo vegetale e nei cibi e nelle bevande stesse consumate dall'uomo (fatto quest'ultimo che ne attesta di per sé la non tossicità), sia per le evidenze sperimentali accumulate negli anni dei loro effetti protettivi e anti-invecchiamento a livello dei vari tessuti (in particolare di quello nervoso). Del resto l'assunzione di tali molecole con l'alimentazione rappresenta già un buon presupposto per un loro eventuale impiego anche in patologie di tipo sistemico.

Pertanto mediante collaborazioni con più gruppi di ricerca universitari è stata valutata l'attività anti-amiloidogena di vari composti polifenolici o di loro miscele ampiamente rappresentate nelle piante dell'area mediterranea.

5.1. ASPETTI GENERALI DELL'ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DEI POLIFENOLI

Nello screening effettuato sono stati scelti come sistemi modello l'HEWL e il peptide 49-64 per un discreto numero di motivi. Anzitutto l'HEWL è reperibile con facilità, a un elevato grado di purezza, a costi molto contenuti. Inoltre l'uso di questa proteina o del peptide 49-64 comporta rischi molto minori per il ricercatore rispetto all'impiego di peptide A β o α -sinucleina, le molecole maggiormente usate negli studi *in vitro* sull'amiloidosi. A livello operativo va poi considerato che con entrambi i modelli si è potuto lavorare in ambiente acido, nel quale la maggior parte dei polifenoli ha una buona stabilità, anche se riscaldata a medie temperature.

Anche dal punto di vista della selezione dei polifenoli si è tenuto conto di alcuni rilevanti fattori. Anzitutto della loro solubilità, alle volte assai ridotta (da cui l'importanza, in questi casi, di una pre-dissoluzione in solventi organici quali il DMSO). Tenendo presente questo si è cercato di scegliere, fra i polifenoli in commercio o disponibili

presso altri gruppi di ricerca universitaria, sostanze che rappresentassero le quattro seguenti categorie strutturali:

- 1) molecole con un anello fenolico semplice (acido caffeico, acido clorogenico);
- 2) molecole con due anelli fenolici (acido rosmarinico, curcumina, acido cicorico, cinarina, verbascoside, resveratrolo);
- 3) molecole con due anelli fenolici appartenenti ad un sistema flavonoidico (cumestrololo, genisteina, daidzeina, rutina, quercetina, quercetina-3-galattoside, scutellareina, keracianina, kuromanina, malvina, epigallocatechina gallato, (-)epicatechina, (+)catechina);
- 4) molecole con più di due anelli fenolici (acido tannico, hinokiflavone, amentoflavone).

Ogni sostanza è stata comunque impiegata solo se reperibile ad un elevato grado di purezza.

Lavorando con l'HEWL i composti più attivi come inibitori dell'aggregazione amiloide sono risultati l'acido tannico e l'acido rosmarinico fra gli acidi fenolici, e l'epigallocatechina gallato e la keracianina fra i flavonoidi. L'acido tannico è stato considerato rappresentativo della cinetica dell'inibizione, nonché fra i casi più lineari a livello di morfologia degli aggregati ottenuti. Un quadro sinottico dell'attività dei vari polifenoli testati sull'HEWL è riportato nella Tab. 5.1, dove sono stati messi in evidenza altri interessanti parametri cinetici o strutturali.

Lavorando con il peptide 49-64 le sostanze più attive sono risultate di nuovo l'acido tannico e l'acido rosmarinico fra gli acidi fenolici, e l'hinokiflavone e il cumestrololo fra i derivati flavonoidici (Tab. 5.2).

			DMSO (%)	Inibizione con HEWL (%)	Time course completo (h)	Anelli benzenici in grado di ruotare	Donatori per ponti idrogeno	Accettori per ponti idrogeno	
POLIFENOLI	Acidi fenolici	Tannini	ACIDO TANNICO		88%	91	n	x	y (n)
		Acidi idrossicinnamici	ACIDO ROSMARINICO		84%	67	2	5	8
			ACIDO CICORICO		82%	79	2	6	12
			VERBASCOSIDE		58%	164	2	9 (5)	15 (10)
			CURCUMINA	1%	46%	106	2	2	6
			ACIDO CAFFEICO		28%	218	1	3	4
			ACIDO CLOROGENICO		20%**	280	1	6	9
	Flavonoidi	Flavonoli	QUERCETINA-3-GALATTOSIDE	5%	50%**	168	1	8 (4)	12 (8)
		Antocianidine	KERACIANINA		82%	82	1	10 (6)	15 (10)
			KUROMANINA		57%	114	1	8 (4)	10 (6)
			MALVINA		15%	258	1	10 (8)	17 (12)
		Flavanoli	EPIGALLOCATECHINA GALLATO		86%	66	2	8	11
			(+)CATECHINA		46%	151	1	5	6
			(-)EPICATECHINA		37%	237	1	5	6
	Stilbeni		RESVERATROLO	1%	-	232	2	3	3

* I numeri in parentesi indicano -OH in porzioni glicidiche
** Calcolato senza fitting

Tabella 5.1. Effetti inibitori dei polifenoli testati sull'aggregazione amiloide dell'HEWL. Le sostanze più attive sono state evidenziate in grigio.

			DMSO (%)	Inibizione con peptide 49-64 (%)	Time course completo (h)	Anelli benzenici in grado di ruotare	Donatori per ponti idrogeno *	Accettori per ponti idrogeno *		
POLIFENOLI	Acidi fenolici	Tannini	ACIDO TANNICO		80%	28	n	x	y (n)	
		Acidi idrossicinnamici	ACIDO ROSMARINICO		63%	27	2	5	8	
			CURCUMINA	0.2%	60%	22	2	2	6	
			ACIDO CICORICO		33%	12	2	6	12	
			ACIDO CAFFEICO		-	21	1	3	4	
			CINARINA	1%	1%	18	2	7	12	
			VERBASCOSIDE		-	27	2	9 (5)	15 (10)	
			ACIDO CLOROGENICO		-	16	1	6	9	
	Flavonoidi	Flavonoli	RUTINA	1%	40%	9	1	10 (6)	16 (10)	
			QUERCETINA	1%	39%	11	1	5	7	
			QUERCETINA-3-GALATTOSIDE	1%	15%	23	1	8 (4)	12 (8)	
		Flavoni	HINOKIFLAVONE***	0.2%	66%	11	2	5	10	
			AMENTOFLAVONE***	0.2%	39%	9	2	6	10	
			SCUTELLAREINA	0.2%	32%	12	1	4	6	
		Isoflavoni	CUMESTROLO****	1%	64%	20	-	2	5	
			GENISTEINA	0.2%	-	29	1	3	5	
			DAIDZEINA	0.2%	-	28	1	2	4	
		Antocianidine	KERACIANINA		9%**	25	1	10 (6)	15 (10)	
			KUROMANINA		-	20	1	8 (4)	10 (6)	
			MALVINA		-**	8	1	10 (8)	17 (12)	
		Flavanoli	EPIGALLOCATECHINA GALLATO		6%	8	2	8	11	
			(-)EPICATECHINA		-	16	1	5	6	
			(+)CATECHINA		-	15	1	5	6	
		Stilbeni		RESVERATROLO	0.2%	-	19	2	3	3

* I numeri in parentesi indicano -OH in porzioni glicidiche
** Calcolato senza fitting
*** Biflavoni
**** Fitoestrogeno derivante da struttura isoflavonica

Tabella 5.2. Effetti inibitori dei polifenoli testati sull'aggregazione amiloide del peptide 49-64. Le sostanze più attive sono state evidenziate in grigio.

In linea generale gli effetti inibitori sono risultati più bassi sul peptide 49-64 che non sull'HEWL (si vedano ad esempio la keracianina e l'epigallocatechina gallato). D'altra parte nel caso del peptide 49-64 l'aggregazione amiloide è stata assai più rapida (la nucleazione ha avuto luogo in pochi minuti, tanto che la cinetica del processo è risultata più di tipo esponenziale che di tipo sigmoidale). Pertanto, nonostante alcune analisi ESI-MS abbiano dimostrato una rapida interazione peptide-polifenolo (dati non riportati), si è ipotizzato che negli esperimenti fatti non tutte le molecole fenoliche avessero avuto il tempo di legarsi con gli oligomeri, i protofilamenti o le fibrille amiloidi, impedendone poi l'allungamento. Inoltre è possibile che gli aggregati amiloidi derivanti dall'HEWL presentino un maggior numero di siti d'interazione con le molecole polifenoliche che non le strutture pre-fibrillari e fibrillari generate dal peptide 49-64.

Dal punto di vista delle correlazioni attività-struttura sono emersi i seguenti elementi. I composti con un unico anello fenolico hanno mostrato un effetto anti-amiloidogenico poco significativo, addirittura nullo nel caso del peptide. La coesistenza di più di una struttura fenolica è sembrata essere pertanto un requisito indispensabile per l'inibizione studiata. Tale osservazione è stata confermata anche dagli studi di molecular modeling. D'altra parte l'acido tannico, miscela di molecole con vari anelli fenolici, ha rivelato un'ottima attività anti-amiloidogenica nei confronti sia dell'HEWL che del peptide 49-64.

Nel gruppo di sostanze con due anelli fenolici, che includeva alcune fra le molecole più attive, l'effetto inibitorio è apparso correlato alla presenza di:

- 1) due anelli fenolici;
- 2) almeno un gruppo ossidrilico in ciascuno di essi (preferibilmente in posizione *para* rispetto al legame con il resto della molecola);
- 3) una catena flessibile di 6-10 carboni fra gli anelli fenolici stessi, catena contenente almeno un atomo accettore di legami a ponte d'idrogeno, secondo quanto emerso dagli studi di molecular modeling.

Resveratrolo e curcumina hanno mostrato un comportamento un po' particolare. Per il resveratrolo è già stata descritta un'elevata attività contro l'aggregazione amiloide del peptide A β , sia *in vitro* che su cellule [Rivière C *et al.* 2006; Marambaud P *et al.* 2005]. Dato che nel caso dei nostri modelli proteici non si sono osservati effetti inibitori, è ragionevole ipotizzare che ciò sia dovuto alla peculiarità del *linker* carbonioso della molecola: abbastanza corto e rigido, e soprattutto privo di possibili punti d'aggancio per legami a ponte d'idrogeno. Nel caso della curcumina la ridotta attività sull'aggregazione amiloide dell'HEWL è apparsa più difficile da spiegare.

Ciò che si è potuto notare è che nelle prove con l'HEWL si è lavorato ai limiti della solubilità della sostanza.

Nel gruppo dei composti flavonoidici l'effetto anti-amiloidogenico è risultato maggiore in presenza di:

- 1) due anelli fenolici;
- 2) due ossidrili (preferibilmente in *meta* fra loro) nell'anello A e un ossidrile in quello B (per lo più in posizione para rispetto alla connessione con il resto della molecola).

Gli studi di molecular modeling non hanno individuato le posizioni degli ossidrili come parametri determinanti per l'attività inibitoria. Tuttavia è apparsa fondamentale la presenza di due donatori di protone in legami a ponte d'idrogeno collocati ad una distanza non del tutto vincolante, ma comunque compresa in un certo range (10-13 Å). Per questo la coesistenza sugli anelli aromatici di più di un gruppo -OH (ciascuno libero di ruotare intorno al legame C-O) è sembrata condurre a conformazioni più idonee all'interazione con la proteina modello. D'altra parte più ossidrili sullo stesso ciclo aromatico permettono di modulare anche le distanze con il gruppo accettore d'idrogeno previsto dal molecular modeling stesso. Una di queste distanze è infatti risultata discriminante fra polifenoli attivi e polifenoli inattivi contro l'aggregazione amiloide studiata.

In generale l'attività anti-amiloidogenica è dunque apparsa correlata, soprattutto a livello di HEWL, al numero d'accettori e donatori di protone disponibili nel polifenolo per la formazione di legami a idrogeno con l'aggregato proteico. Questo escludendo comunque i punti d'aggancio presenti nell'eventuale porzione glicidica del fenolo (magari importante invece a livello di solubilizzazione del sistema).

La coesistenza d'anelli fenolici e di possibilità di formare legami a ponte d'idrogeno è apparsa dunque come la condizione più importante per assicurare alle molecole polifenoliche testate attività anti-amiloidogenica. Il che ha trovato per altro conferma nell'elevato effetto inibitorio mostrato dai composti appartenenti al quarto gruppo della schematizzazione precedentemente proposta (in particolare dall'acido tannico, complesso derivato galloïdico).

Nel loro insieme tutti questi dati possono considerarsi in accordo con l'ipotesi già formulata secondo cui i legami a ponte d'idrogeno risultano fondamentali nello stabilizzare le interazioni idrofobiche che s'instaurano fra anelli fenolici e residui aminoacidici delle fibrille amiloidi, inibendo la loro formazione [Rivière C *et al.* 2008; Reinke AA *et al.* 2007; Richard T *et al.* 2006].

Ovviamente ulteriori conferme delle correlazioni attività-struttura codificate dal molecular modeling potranno in futuro derivare da uno screening mirato su altre

molecole prive di almeno uno dei gruppi ritenuti fondamentali o caratterizzate da distanze non ottimali fra di loro (in particolare fra donatori e accettore di protoni in legami a ponte d'idrogeno).

I test eseguiti sugli estratti vegetali hanno fatto impiego quasi esclusivamente dell'HEWL. In media tutti i preparati hanno mostrato una buona attività anti-amiloidogena. In particolare sono risultati molto promettenti gli estratti di ciliegia e di radicchio rosso, come sintetizzato nella Tab. 5.3, dove sono indicate anche le quantità delle varie frazioni fenoliche coinvolte.

estratti	derivati fenolici o cinnamici	flavonoidi	µmoli/ml estratto		effetti su HEWL*	effetti su HEWL**
RRC (radicchio rosso)	acido clorogenico; acido cicorico	cianidina-3-O-glucoside; cianidina-malonil-glucoside; quercetina-3-O-glucuronide	antociani totali	0,05	89	240
			caffeoil derivati	0,65		
RF (rosmarino foglie)	acido rosmarinico	vari in tracce	acido rosmarinico	1,5	46	240
CC (carciofo capolini)	mono e dicaffeoil derivati dell'acido chinico	luteolina-7-O-rutinoside; luteolina-7-O-glucoside	derivati caffeoil chinici	4,5	83	228
			flavonoidi	$6,7 \times 10^{-2}$		
CCc (carciofo capolini commerciale)	mono e dicaffeoil derivati dell'acido chinico	luteolina-7-O-rutinoside; luteolina-7-O-glucoside	derivati caffeoil chinici	2,58	83	94
			flavonoidi	4×10^{-2}		
CD (ciliegie dolci)	acidi fenolici	keracianina; cianidina-3-O-glucoside	antociani totali	8,3	97	16
CA (ciliegie acide)	acidi fenolici	keracianina; cianidina-3-O-glucosilrutinoside	antociani totali	2,6	98	12
* inibizione % nel ThT test						
** h prima dell'arrivo a plateau						

Tabella 5.3. Effetti inibitori degli estratti testati sull'aggregazione amiloide dell'HEWL. Le miscele più attive sono state evidenziate in grigio.

Questi dati hanno complessivamente confermato l'effetto inibitorio di alcune sostanze già testate da sole (ad esempio la keracianina e l'acido cicorico).

A livello di classi chimiche è senz'altro emerso il ruolo significativo che le antocianine potrebbero in futuro svolgere in questo settore in così forte espansione. La stessa attività dell'estratto di radicchio rosso potrebbe infatti dipendere oltre che dai derivati idrossicinnamici, e in particolare dall'acido cicorico, dalle non trascurabili quantità di glicosidi della cianidina che lo caratterizzano.

L'impiego di miscele di polifenoli è sembrato senza dubbio promettente, e questo per svariate ragioni. Anzitutto gli effetti complessivi delle sostanze anti-amiloidogeniche sono risultati più pronti, nonché notevolmente amplificati. In secondo luogo l'impiego diretto di fitocomplessi al posto delle sostanze purificate potrebbe ridurre sensibilmente i costi di produzione di eventuali integratori alimentari, preparati nutraceutici o farmaci a base polifenolica. Infine, l'utilizzo alle volte secolare di alcuni estratti o decotti vegetali costituisce senza dubbio un buon punto di partenza per la razionalizzazione dei loro effetti, e soprattutto per la conferma della loro sicurezza biologica. Del resto queste considerazioni sono ormai alla base delle direttive nazionali e internazionali (in particolare europee) per l'immissione in commercio di prodotti terapeutici di origine naturale.

5.2. PROSPETTIVE FUTURE

L'aggregazione amiloide è un processo che sembra essere coinvolto in un numero di patologie di giorno in giorno crescente.

I polifenoli, così diffusi nel mondo vegetale e anche nella dieta umana, si sono ormai rivelati, in test su varie proteine modello, dei buoni inibitori della formazione di fibrille amiloidi.

L'HEWL e il peptide 49-64 possono costituire validi ed economici strumenti per testare l'attività anti-amiloidogena delle molecole fenoliche e ricavarne alcune semplici correlazioni attività-struttura (quali il ruolo dei potenziali legami a ponte d'idrogeno e/o delle interazioni fra anelli aromatici). Lavorando con questi modelli proteici si usano concentrazioni, temperature e pH che permettono di saggiare anche molecole con scarsa solubilità o stabilità.

Affiancata ai classici metodi fluorimetrici (test della ThT), l'analisi morfologica dei preparati tramite AFM fa luce su alcuni importanti aspetti dell'inibizione polifenolica. In particolare essa permette di verificare la presenza o meno di strutture proteiche oligomeriche, normalmente citotossiche. Gli studi di molecular modeling possono inoltre fornire un valido aiuto nella scelta di sostanze da sottoporre a screening biologico.

Queste considerazioni sono molto importanti per un futuro impiego dei preparati fenolici, in campo nutraceutico o anche farmaceutico, contro l'aggregazione amiloide. In particolare gli antociani, stabili a livello gastrico, dove sono in parte già assorbiti, e in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, costituiscono una categoria di sostanze assai promettenti a livello di prevenzione e terapia delle amiloidosi, comprese quelle di tipo sistemico.

Ovviamente le varie molecole polifenoliche, anche quando utilizzate da tempo in medicina popolare, dovranno essere sottoposte a opportuni test su cellule (per valutarne ad esempio l'effettiva tossicità), e più in generale *in vivo* su animali da laboratorio.

6. BIBLIOGRAFIA

Adhami VM, Ahmad N and Mukhtar H, **2003**. "Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention". *J. Nutr.* 133(7 Suppl): 2417S-2424S.

Anfinsen CB, **1973**. "Principles that govern the folding of protein chains". *Science* 181(96): 223-30.

Apak R, Güçlü K, Ozyürek M and Karademir SE, **2004**. "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method". *J. Agric. Food Chem.* 52(26): 7970-81.

Arnaudov LN and de Vries R, **2005**. "Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme". *Biophys. J.* 88(1): 515-26.

Arteaga S, Andrade-Cetto A and Cárdenas R, **2005**. "Larrea tridentata (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid". *Journal of ethnopharmacology* 98(3): 231-9.

Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB and Kromhout D, **2001**. "Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women". *European journal of clinical nutrition* 55(2): 76-81.

Bastianetto S, Yao ZX, Papadopoulos V and Quirion R, **2006**. "Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced toxicity". *Eur. J. Neurosci.* 23(1): 55-64.

Baur JA and Sinclair DA, **2006**. "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence". *Nature reviews. Drug discovery* 5(6): 493-506.

Beecher GR, **2003**. "Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake". *J. Nutr.* 133(10): 3248S-3254S.

Biasutto L, Marotta E, De Marchi U, Zoratti M and Paradisi C, **2007**. "Ester-based precursors to increase the bioavailability of quercetin". *J. Med. Chem.* 50(2): 241-53.

Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB and Teplow DB, **2003**. "Amyloid beta -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(1): 330-5.

Bonoli M, Colabufalo P, Pelillo M, Gallina Toschi T and Lercker G, **2003**. "Fast determination of catechins and xanthines in tea beverages by micellar electrokinetic chromatography". *J. Agric. Food Chem.* 51(5): 1141-7.

Booth DR, Pepys MB and Hawkins PN, **2000**. "A novel variant of human lysozyme (T70N) is common in the normal population". *Hum. Mutat.* 16(2): 180.

Bradford MM, **1976**. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 72(72): 248-54.

Brahms S and Brahms J, **1980**. "Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism". *J. Mol. Biol.* 138(2): 149-78.

Brenna OV and Pagliarini E, **2001**. "Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines". *J. Agric. Food Chem.* 49(10): 4841-4.

- Brune M**, Rossander L and Hallberg L, **1990**. "Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures". *European journal of clinical nutrition* 43(8): 547-57.
- Burger O**, Weiss E, Sharon N, Tabak M, Neeman I and Ofek I, **2002**. "Inhibition of Helicobacter pylori adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice". *Critical reviews in food science and nutrition* 42(3 Suppl): 279-84.
- Cao A**, Hu D and Lai L, **2004**. "Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme". *Protein Sci.* 13(2): 319-24.
- Carratù B** and Sanzini E, **2005**. "Biologically-active phytochemicals in vegetable food". *Ann. Ist. Super. Sanita* 41(1): 7-16.
- Carrera G**, Mitjavila S and Derache R, **1973**. "Effect of tannic acid on vitamin B 12 absorption in rats". *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.* 276(2): 239-42.
- Charlton AJ**, Baxter NJ, Khan ML, Moir AJ, Haslam E, Davies AP and Williamson MP, **2002**. "Polyphenol/peptide binding and precipitation". *J. Agric. Food Chem.* 50(6): 1593-601.
- Chiti F** and Dobson CM, **2006**. "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease". *Annu. Rev. Biochem.* 75(75): 333-66.
- Comenzo RL**, **2007**. "Systemic immunoglobulin light-chain amyloidosis". *Clinical lymphoma & myeloma* 7(3): 182-5.
- Commenges D**, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P and Dartigues JF, **2000**. "Intake of flavonoids and risk of dementia". *Eur. J. Epidemiol.* 16(4): 357-63.
- Conway KA**, Harper JD and Lansbury PT, **2000**. "Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid". *Biochemistry* 39(10): 2552-63.
- Daglia M**, Tarsi R, Papetti A, Grisoli P, Dacarro C, Pruzzo C and Gazzani G, **2002**. "Antiadhesive effect of green and roasted coffee on Streptococcus mutans' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads". *J. Agric. Food Chem.* 50(5): 1225-9.
- De la Lastra CA** and Villegas I, **2007**. "Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications". *Biochem. Soc. Trans.* 35(Pt 5): 1156-60.
- Dinner AR**, Sali A, Smith LJ, Dobson CM and Karplus M, **2000**. "Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment". *Trends Biochem. Sci.* 25(7): 331-9.
- Dobson CM**, **2003**. "Protein folding and misfolding". *Nature* 426(6968): 884-90.
- Dobson CM**, **2004**. "Principles of protein folding, misfolding and aggregation". *Semin. Cell Dev. Biol.* 15(1): 3-16.
- Donovan JL**, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A and Rémésy C, **2001**. "Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats". *J. Nutr.* 131(6): 1753-7.
- Dumoulin M**, Kumita JR and Dobson CM, **2006**. "Normal and aberrant biological self-assembly: Insights from studies of human lysozyme and its amyloidogenic variants". *Acc. Chem. Res.* 39(9): 603-10.
- Ehrnhoefer DE**, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, Engemann S, Pastore A and Wanker EE, **2008**. "EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers". *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15(6): 558-66.

- Erlund I**, Freese R, Marniemi J, Hakala P and Alfthan G, **2006**. "Bioavailability of quercetin from berries and the diet". *Nutrition and cancer* 54(1): 13-7.
- Esposito E**, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M and Algeri S, **2002**. "A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes". *Neurobiol. Aging* 23(5): 719-35.
- Espín JC**, García-Conesa MT and Tomás-Barberán FA, **2007**. "Nutraceuticals: facts and fiction". *Phytochemistry* 68(22-24): 2986-3008.
- Fitzpatrick DF**, Fleming RC, Bing B, Maggi DA and O'Malley RM, **2001**. "Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds". *J. Agric. Food Chem.* 48(12): 6384-90.
- Frankel EN**, Kanner J, German JB, Parks E and Kinsella JE, **1993**. "Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine". *Lancet* 341(8843): 454-7.
- Frare E**, Mossuto MF, Polverino de Laureto P, Dumoulin M, Dobson CM and Fontana A, **2006**. "Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis". *J. Mol. Biol.* 361(3): 551-61.
- Frare E**, Polverino De Laureto P, Zurdo J, Dobson CM and Fontana A, **2004**. "A highly amyloidogenic region of hen lysozyme". *J. Mol. Biol.* 340(5): 1153-65.
- Frid P**, Anisimov SV and Popovic N, **2006**. "Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases". *Brain research reviews* 53(1): 135-60.
- Fändrich M** and Dobson CM, **2002**. "The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation". *EMBO J.* 21(21): 5682-90.
- Gharibyan AL**, Zamotin V, Yanamandra K, Moskaleva OS, Margulis BA, Kostanyan IA and Morozova-Roche LA, **2007**. "Lysozyme amyloid oligomers and fibrils induce cellular death via different apoptotic/necrotic pathways". *J. Mol. Biol.* 365(5): 1337-49.
- Gillmore JD** and Hawkins PN, **2006**. "Drug Insight: emerging therapies for amyloidosis". *Nature clinical practice. Nephrology* 2(5): 263-70.
- Greenfield NJ**, **1996**. "Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data". *Anal. Biochem.* 235(1): 1-10.
- Guijarro JI**, Sunde M, Jones JA, Campbell ID and Dobson CM, **1998**. "Amyloid fibril formation by an SH3 domain". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(8): 4224-8.
- Gómez-Cordovés C**, Bartolomé B, Vieira W and Virador VM, **2001**. "Effects of wine phenolics and sorghum tannins on tyrosinase activity and growth of melanoma cells". *J. Agric. Food Chem.* 49(3): 1620-4.
- Hamaguchi T**, Ono K and Yamada M, **2006**. "Anti-amyloidogenic therapies: strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease". *Cell. Mol. Life Sci.* 63(13): 1538-52.
- Hamilton-Miller JM**, **2001**. "Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*)". *J. Med. Microbiol.* 50(4): 299-302.
- Han XH**, Shen TS and Hongxiang LH, **2007**. "Dietary polyphenols and their biological significance". *Int.J.Mol.Sci.* 8(9): 894-1012.
- Han YS**, Zheng WH, Bastianetto S, Chabot JG and Quirion R, **2004**. "Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C". *Br. J. Pharmacol.* 141(6): 997-1005.

- Han YS**, Bastianetto S, Dumont Y and Quirion R, **2006**. "Specific plasma membrane binding sites for polyphenols, including resveratrol, in the rat brain". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318(1): 238-45.
- Hartl FU** and Hayer-Hartl M, **2002**. "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein". *Science* 295(5561): 1852-8.
- Hawkins PN**, **2003**. "Hereditary systemic amyloidosis with renal involvement". *J. Nephrol.* 16(3): 443-8.
- Herrmann K**, **1990**. "Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods". *Critical reviews in food science and nutrition* 28(4): 315-47.
- Hertog MG**, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB and Kromhout D, **1993**. "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study". *Lancet* 342(8878): 1007-11.
- Hirohata M**, Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Ohhashi Y, Ookoshi T, Ono K, Yamada M and Naiki H, **2007**. "The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure". *Biochemistry* 46(7): 1888-99.
- Hollman PC**, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH and Katan MB, **1998**. "Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man". *FEBS Lett.* 418(1-2): 152-6.
- Horcas I**, Fernández R, Gómez-Rodríguez JM, Colchero J, Gómez-Herrero J and Baro AM, **2007**. "WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology". *The Review of scientific instruments* 78(1): 013705.
- Howell AB**, **2002**. "Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health". *Critical reviews in food science and nutrition* 42(3 Suppl): 273-8.
- Innocenti M**, Gallori S, Giaccherini C, Ieri F, Vincieri FF and Mulinacci N, **2005**. "Evaluation of the phenolic content in the aerial parts of different varieties of *Cichorium intybus* L". *J. Agric. Food Chem.* 53(16): 6497-502.
- Innocenti M**, Michelozzi M, Giaccherini C, Ieri F, Vincieri FF and Mulinacci N, **2007**. "Flavonoids and biflavonoids in Tuscan berries of *Juniperus communis* L.: detection and quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS". *J. Agric. Food Chem.* 55(16): 6596-602.
- Iuvone T**, De Filippis D, Esposito G, D'Amico A and Izzo AA, **2006**. "The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317(3): 1143-9.
- Jahn TR** and Radford SE, **2007**. "Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways". *Arch. Biochem. Biophys.* 469(1): 100-17.
- Johnson WC**, **1990**. "Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide". *Proteins* 7(3): 205-14.
- Kang SS**, Lee JY, Choi YK, Song SS, Kim JS, Jeon SJ, Han YN, Son KH and Han BH, **2005**. "Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15(15): 3588-91.
- Kaufman RJ**, **2002**. "Orchestrating the unfolded protein response in health and disease". *J. Clin. Invest.* 110(10): 1389-98.
- Kawamoto H**, Nakatsubo F and Murakami K, **1996**. "Stoichiometric studies of tannin-protein co-precipitation". *Phytochemistry* 41(5): 1427-31.
- Kayed R**, Bernhagen J, Greenfield N, Sweimeh K, Brunner H, Voelter W and Kapurniotu A, **1999**. "Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro". *J. Mol. Biol.* 287(4): 781-96.

- Kayed R**, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE and Glabe CG, **2004**. "Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases". *J. Biol. Chem.* 279(45): 46363-6.
- Kim H**, Park BS, Lee KG, Choi CY, Jang SS, Kim YH and Lee SE, **2005**. "Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid". *J. Agric. Food Chem.* 53(22): 8537-41.
- King PJ**, Ma G, Miao W, Jia Q, McDougall BR, Reinecke MG, Cornell C, Kuan J, Kim TR and Robinson WE, **1999**. "Structure-activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication". *J. Med. Chem.* 42(3): 497-509.
- Kitagawa S**, **2006**. "Inhibitory effects of polyphenols on p-glycoprotein-mediated transport". *Biol. Pharm. Bull.* 29(1): 1-6.
- Klunk WE**, Pettegrew JW and Abraham DJ, **1989**. "Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation". *J. Histochem. Cytochem.* 37(8): 1273-81.
- Kocisko DA**, Baron GS, Rubenstein R, Chen J, Kuizon S and Caughey B, **2003**. "New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products". *J. Virol.* 77(19): 10288-94.
- Krebs MR**, Morozova-Roche LA, Daniel K, Robinson CV and Dobson CM, **2004**. "Observation of sequence specificity in the seeding of protein amyloid fibrils". *Protein Sci.* 13(7): 1933-8.
- Krebs MR**, Wilkins DK, Chung EW, Pitkeathly MC, Chamberlain AK, Zurdo J, Robinson CV and Dobson CM, **2000**. "Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the beta-domain". *J. Mol. Biol.* 300(3): 541-9.
- Krebs MR**, Bromley EH and Donald AM, **2005**. "The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications". *J. Struct. Biol.* 149(1): 30-7.
- Kroon PA**, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C and Williamson G, **2004**. "How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?". *Am. J. Clin. Nutr.* 80(1): 15-21.
- Kubo I**, Xiao P, Nihei K, Fujita K, Yamagiwa Y and Kamikawa T, **2002**. "Molecular design of antifungal agents". *J. Agric. Food Chem.* 50(14): 3992-8.
- Laemmli UK**, **1970**. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lashuel HA**, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T and Lansbury PT, **2002**. "Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils". *J. Mol. Biol.* 322(5): 1089-102.
- LeVine H**, **1993**. "Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution". *Protein Sci.* 2(3): 404-10.
- Lee SF**, Liang YC and Lin JK, **1996**. "Inhibition of 1,2,4-benzenetriol-generated active oxygen species and induction of phase II enzymes by green tea polyphenols". *Chem. Biol. Interact.* 98(3): 283-301.
- Lieu VH**, Wu JW, Wang SS and Wu CH, **2007**. "Inhibition of amyloid fibrillization of hen egg-white lysozymes by rifampicin and p-benzoquinone". *Biotechnol. Prog.* 23(3): 698-706.

- Lindberg MO** and Oliveberg M, **2007**. "Malleability of protein folding pathways: a simple reason for complex behaviour". *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17(1): 21-9.
- Liu HL**, Wu YC, Zhao JH, Liu YF, Huang CH, Fang HW and Ho Y, **2007**. "Insights into the conformational changes of several human lysozyme variants associated with hereditary systemic amyloidosis". *Biotechnol. Prog.* 23(1): 246-54.
- Lotito SB** and Frei B, **2006**. "Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?". *Free Radic. Biol. Med.* 41(12): 1727-46.
- López-Vélez M**, Martínez-Martínez F and Del Valle-Ribes C, **2003**. "The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine". *Critical reviews in food science and nutrition* 43(3): 233-44.
- Missmahl HP** and Hartwig M, **1954**. "Optical polarization studies of amyloid substance.". *Virchows Arch.* 324(4): 489-508.
- Malisauskas M**, Ostman J, Darinskas A, Zamotin V, Liutkevicius E, Lundgren E and Morozova-Roche LA, **2005**. "Does the cytotoxic effect of transient amyloid oligomers from common equine lysozyme in vitro imply innate amyloid toxicity?". *J. Biol. Chem.* 280(8): 6269-75.
- Manach C**, Scalbert A, Morand C, Rémésy C and Jiménez L, **2004**. "Polyphenols: food sources and bioavailability". *Am. J. Clin. Nutr.* 79(5): 727-47.
- Manach C**, Williamson G, Morand C, Scalbert A and Rémésy C, **2005**. "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies". *Am. J. Clin. Nutr.* 81(1 Suppl): 230S-242S.
- Marambaud P**, Zhao H and Davies P, **2005**. "Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides". *J. Biol. Chem.* 280(45): 37377-82.
- Mastrangelo IA**, Ahmed M, Sato T, Liu W, Wang C, Hough P and Smith SO, **2006**. "High-resolution atomic force microscopy of soluble A β 42 oligomers". *J. Mol. Biol.* 358(1): 106-19.
- Masuda M**, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga S, Goedert M and Hasegawa M, **2006**. "Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly". *Biochemistry* 45(19): 6085-94.
- Matagne A** and Dobson CM, **1998**. "The folding process of hen lysozyme: a perspective from the 'new view'". *Cell. Mol. Life Sci.* 54(4): 363-71.
- McDougall GJ**, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A and Stewart D, **2005**. "Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase". *J. Agric. Food Chem.* 53(7): 2760-6.
- McDougall GJ** and Stewart D, **2006**. "The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes". *Biofactors* 23(4): 189-95.
- McGhie TK** and Walton MC, **2007**. "The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding". *Mol Nutr Food Res* 51(6): 702-13.
- Mea GM**, Bacchiocca MB, Biagiotti EB and Ninfali PN, **2004**. "Retention of antioxidant capacity in dehydrated fruits and vegetable products". *It.J.Biochem.* 53(3): 161.
- Merlini G** and Bellotti V, **2005**. "Lysozyme: a paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding". *Clin. Chim. Acta* 357(2): 168-72.
- Mishra R**, Sörgjerd K, Nyström S, Nordigården A, Yu YC and Hammarström P, **2007**. "Lysozyme amyloidogenesis is accelerated by specific nicking and fragmentation but decelerated by intact protein binding and conversion". *J. Mol. Biol.* 366(3): 1029-44.

- Monti M**, Garolla di Bard BL, Calloni G, Chiti F, Amoresano A, Ramponi G and Pucci P, **2004**. "The regions of the sequence most exposed to the solvent within the amyloidogenic state of a protein initiate the aggregation process". *J. Mol. Biol.* 336(1): 253-62.
- Moridani MY**, Scobie H, Salehi P and O'Brien PJ, **2001**. "Catechin metabolism: glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome p450". *Chem. Res. Toxicol.* 14(7): 841-8.
- Moutsatsou P**, **2007**. "The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding". *Hormones (Athens)* 6(3): 173-93.
- Mulinacci N**, Prucher D, Peruzzi M, Romani A, Pinelli P, Giaccherini C and Vincieri FF, **2004**. "Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 34(2): 349-57.
- Nakachi K**, Suemasu K, Suga K, Takeo T, Imai K and Higashi Y, **1998**. "Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients". *Jpn. J. Cancer Res.* 89(3): 254-61.
- Nakayama M**, Suzuki K, Toda M, Okubo S, Hara Y and Shimamura T, **1993**. "Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols". *Antiviral Res.* 21(4): 289-99.
- Necula M**, Kayed R, Milton S and Glabe CG, **2007**. "Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct". *J. Biol. Chem.* 282(14): 10311-24.
- Nielsen L**, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, Uversky VN and Fink AL, **2001**. "Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism". *Biochemistry* 40(20): 6036-46.
- Nielsen IL** and Williamson G, **2007**. "Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans". *Nutrition and cancer* 57(1): 1-10.
- Nilsson MR**, **2004**. "Techniques to study amyloid fibril formation in vitro". *Methods* 34(1): 151-60.
- Ono K**, Hasegawa K, Naiki H and Yamada M, **2004**. "Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro". *J. Neurosci. Res.* 75(6): 742-50. a
- Ono K** and Yamada M, **2006**. "Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro". *J. Neurochem.* 97(1): 105-15.
- Ono K**, Hasegawa K, Naiki H and Yamada M, **2004**. "Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro". *Biochim. Biophys. Acta* 1690(3): 193-202. b
- Passamonti S**, Vrhovsek U, Vanzo A and Mattivi F, **2005**. "Fast access of some grape pigments to the brain". *J. Agric. Food Chem.* 53(18): 7029-34.
- Pawar AP**, Dubay KF, Zurdo J, Chiti F, Vendruscolo M and Dobson CM, **2005**. "Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases". *J. Mol. Biol.* 350(2): 379-92.
- Pepys MB**, Hawkins PN, Booth DR, Vigushin DM, Tennent GA, Soutar AK, Totty N, Nguyen O, Blake CC and Terry CJ, **1993**. "Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis". *Nature* 362(6420): 553-7.
- Petersen M** and Simmonds MS, **2002**. "Rosmarinic acid". *Phytochemistry* 62(2): 121-5.

Pinelli PP, Agostini FA, Comino CC, Lanteri SL, Portis EP and Romani AR, **2007**. "Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves". *Food Chem.* 105(4): 1695-1701.

Porat Y, Abramowitz A and Gazit E, **2006**. "Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism". *Chemical biology & drug design* 67(1): 27-37.

Porat Y, Mazor Y, Efrat S and Gazit E, **2004**. "Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation: a potential role for heteroaromatic interactions". *Biochemistry* 43(45): 14454-62.

Prior RL, Wu X and Schaich K, **2005**. "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements". *J. Agric. Food Chem.* 53(10): 4290-302.

Pulido R, Bravo L and Saura-Calixto F, **2000**. "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay". *J. Agric. Food Chem.* 48(8): 3396-402.

Quintas A, Vaz DC, Cardoso I, Saraiva MJ and Brito RM, **2001**. "Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants". *J. Biol. Chem.* 276(29): 27207-13.

Ramassamy C, **2006**. "Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets". *Eur. J. Pharmacol.* 545(1): 51-64.

Reed J, **2002**. "Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health". *Critical reviews in food science and nutrition* 42(3 Suppl): 301-16.

Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R and Keen CL, **2000**. "Cocoa inhibits platelet activation and function". *Am. J. Clin. Nutr.* 72(1): 30-5.

Reinke AA and Gestwicki JE, **2007**. "Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: influence of linker length and flexibility". *Chemical biology & drug design* 70(3): 206-15.

Renaud S and de Lorgeril M, **1992**. "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease". *Lancet* 339(8808): 1523-6.

Richard T, Lefeuvre D, Descendit A, Quideau S and Monti JP, **2006**. "Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation". *Biochim. Biophys. Acta* 1760(6): 951-8.

Rivière C, Richard T, Vitrac X, Mérillon JM, Valls J and Monti JP, **2008**. "New polyphenols active on beta-amyloid aggregation". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18(2): 828-31.

Rivière C, Richard T, Quentin L, Krisa S, Mérillon JM and Monti JP, **2006**. "Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro". *Bioorg. Med. Chem.* 15(2): 1160-7.

Romani A, Mulinacci N, Pinelli P, Vincieri FF and Cimato A, **2000**. "Polyphenolic content in five tuscan cultivars of *Olea europaea* L". *J. Agric. Food Chem.* 47(3): 964-7.

Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H and Kanazawa K, **2003**. "Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas". *J. Agric. Food Chem.* 51(3): 571-81.

Scalbert A and Williamson G, **2000**. "Dietary intake and bioavailability of polyphenols". *J. Nutr.* 130(8S Suppl): 2073S-85S.

- Schmitz KS, 1990.** "An introduction to dynamic light scattering by macromolecules". Boston : Academic Press.
- Serpell LC, 2000.** "Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly". *Biochim. Biophys. Acta* 1502(1): 16-30.
- Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, Montedoro G and Morozzi G, 2004.** "Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil". *Journal of chromatography. A* 1054(1-2): 113-27.
- Sethuraman A and Belfort G, 2005.** "Protein structural perturbation and aggregation on homogeneous surfaces". *Biophys. J.* 88(2): 1322-33.
- Shahidi FS and Naczsk MN, 2003.** "Phenolics in food and nutraceuticals". (): PAGES.
- Shahidi F and Wanasundara PK, 1993.** "Phenolic antioxidants". *Critical reviews in food science and nutrition* 32(1): 67-103.
- Shirahama T and Cohen AS, 1967.** "High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril". *J. Cell Biol.* 33(3): 679-708.
- Shoval H, Lichtenberg D and Gazit E, 2007.** "The molecular mechanisms of the anti-amyloid effects of phenols". *Amyloid* 14(1): 73-87.
- Siegenberg D, Baynes RD, Bothwell TH, Macfarlane BJ, Lamparelli RD, Car NG, MacPhail P, Schmidt U, Tal A and Mayet F, 1991.** "Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption". *Am. J. Clin. Nutr.* 53(2): 537-41.
- Silber ML, Davitt BB, Khairutdinov RF and Hurst JK, 1998.** "A mathematical model describing tannin-protein association". *Anal. Biochem.* 263(1): 46-50.
- Simonyi A, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY and Sun GY, 2005.** "Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection". *Mol. Neurobiol.* 31(1-3): 135-47.
- Singleton VL, 1982.** "Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods". *Advances in food research* 27(27): 149-242.
- Sipe JD and Cohen AS, 2000.** "Review: history of the amyloid fibril". *J. Struct. Biol.* 130(2-3): 88-98.
- Skibola CF and Smith MT, 2001.** "Potential health impacts of excessive flavonoid intake". *Free Radic. Biol. Med.* 29(3-4): 375-83.
- Somogyi JC, 1978.** "Natural toxic substances in food". *World review of nutrition and dietetics* 29(29): 42-59.
- Southern EM, 1970.** "Base sequence and evolution of guinea-pig alpha-satellite DNA". *Nature* 227(5260): 794-8.
- Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS, Srari SK, Debnam E and Rice-Evans C, 2000.** "Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272(1): 236-41.
- Stains CI, Mondal K and Ghosh I, 2007.** "Molecules that target beta-amyloid". *ChemMedChem* 2(12): 1674-92.
- Stefani M and Dobson CM, 2003.** "Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution". *J. Mol. Med.* 81(11): 678-99.
- Sunde M and Blake C, 1997.** "The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction". *Adv. Protein Chem.* 50(50): 123-59.

- Tan EK**, Tan C, Fook-Chong SM, Lum SY, Chai A, Chung H, Shen H, Zhao Y, Teoh ML, Yih Y, Pavanni R, Chandran VR and Wong MC, **2003**. "Dose-dependent protective effect of coffee, tea, and smoking in Parkinson's disease: a study in ethnic Chinese". *J. Neurol. Sci.* 216(1): 163-7.
- Taniguchi S**, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M and Hasegawa M, **2005**. "Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins". *J. Biol. Chem.* 280(9): 7614-23.
- Tian WX**, **2006**. "Inhibition of fatty acid synthase by polyphenols". *Curr. Med. Chem.* 13(8): 967-77.
- Townsend M**, Cleary JP, Mehta T, Hofmeister J, Lesne S, O'Hare E, Walsh DM and Selkoe DJ, **2007**. "Orally available compound prevents deficits in memory caused by the Alzheimer amyloid-beta oligomers". *Ann. Neurol.* 60(6): 668-76.
- Urquiaga I** and Leighton F, **2005**. "Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress". *Biol. Res.* 33(2): 55-64.
- Valachovicova T**, Slivova V and Sliva D, **2004**. "Cellular and physiological effects of soy flavonoids". *Mini reviews in medicinal chemistry* 4(8): 881-7.
- Van Beek TA**, **2002**. "Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts". *Journal of chromatography. A* 967(1): 21-55.
- Vauzour D**, Vafeiadou K, Corona G, Pollard SE, Tzounis X and Spencer JP, **2007**. "Champagne wine polyphenols protect primary cortical neurons against peroxynitrite-induced injury". *J. Agric. Food Chem.* 55(8): 2854-60.
- Vendruscolo M** and Dobson CM, **2005**. "Towards complete descriptions of the free-energy landscapes of proteins". *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 363(1827): 433-50; discussion 450-2.
- Wain R**, Smith LJ and Dobson CM, **2005**. "Oxidative refolding of amyloidogenic variants of human lysozyme". *J. Mol. Biol.* 351(3): 662-71.
- Walsh DM** and Selkoe DJ, **2004**. "Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration". *Protein Pept. Lett.* 11(3): 213-28.
- Warden BA**, Smith LS, Beecher GR, Balentine DA and Clevidence BA, **2001**. "Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day". *J. Nutr.* 131(6): 1731-7.
- Wren AF**, Cleary M, Frantz C, Melton S and Norris L, **2002**. "90-day oral toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats". *J. Agric. Food Chem.* 50(7): 2180-92.
- Yang CS**, Lee MJ and Chen L, **1999**. "Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies". *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8(1): 83-9.
- Yang F**, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kayed R, Glabe CG, Frautschy SA and Cole GM, **2005**. "Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo". *J. Biol. Chem.* 280(7): 5892-901.
- Zandomeneghi G**, Krebs MR, McCammon MG and Fändrich M, **2004**. "FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils". *Protein Sci.* 13(12): 3314-21.
- Zhang J**, Zhan B, Yao X, Gao Y and Shong J, **1996**. "Antiviral activity of tannin from the pericarp of Punica granatum L. against genital Herpes virus in vitro". *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 20(9): 556-8, 576, inside backcover.
- Zhu JT**, Choi RC, Chu GK, Cheung AW, Gao QT, Li J, Jiang ZY, Dong TT and Tsim KW, **2007**. "Flavonoids possess neuroprotective effects on cultured

pheochromocytoma PC12 cells: a comparison of different flavonoids in activating estrogenic effect and in preventing beta-amyloid-induced cell death". *J. Agric. Food Chem.* 55(6): 2438-45.

Zhu M, Rajamani S, Kaylor J, Han S, Zhou F and Fink AL, **2004**. "The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils". *J. Biol. Chem.* 279(26): 26846-57.

ADDENDA ET CORRIGENDA

- Pag. 1, riga 11: "immunoglobulin" anziché "immuniglobulin".
- Pag. 3, riga 23: "1859 Friedereich" anziché "1959 Friedereiche".
- Pag. 12, riga 1: "sovrassaturo" anziché "sovrasaturo".
- Pag. 19, riga 23: "idrossibenzoici" anziché "benzoici".
- Pag. 26, riga 31: "et" anziché "Et".
- Pag. 38, riga 37: "SGLT-1" anziché "SULT-1".
- Pag. 70, riga 15: "clorogenico" anziché "clorogenico.".
- Pag. 83, riga 5: "amiloide del peptide 49-64 è" anziché "amiloide è".
- Pag. 93, riga 21: "Alba" anziché "Alba,".
- Pag. 97, riga 4: "83%" anziché "46%".
- Pag. 123, riga 40: "polyphenols" anziché "polyphenlos".