

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA
IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI
CICLO XXVI

**Polifenoli naturali: indagine *"in vitro"*
sul loro ruolo protettivo come inibitori della
amiloidogenesi da transtiretina umana**

PAOLA FLORIO

Coordinatore:
Prof. Furio Brighenti

Tutor:
Prof. Rodolfo Berni

Indice

| | | |
|-------|--|-----------|
| | Capitolo 1: Introduzione | 1 |
| 1.1 | Amiloidosi | 3 |
| 1.2 | Amiloidosi da Transtiretina | 7 |
| 1.3 | Transtiretina e sue proprietà di riconoscimento molecolare | 13 |
| 1.4 | Polifenoli | 23 |
| 1.4.1 | Flavonoidi | 27 |
| 1.4.2 | Stilbenoidi | 32 |
| 1.5 | Metabolismo dei polifenoli | 37 |
| | Capitolo 2: Scopo della ricerca | 41 |
| | Capitolo 3: Materiali e metodi | 47 |
| 3.1 | Reagenti e soluzioni | 49 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2 | Espressione della proteina mutante hTTR I84S | 49 |
| 3.3 | Crescita ed induzione | 50 |
| 3.4 | Lisi cellulare | 51 |
| 3.5 | Purificazione della proteina hTTR wt e mutante I84S | 51 |
| 3.5.1 | Cromatografia ad esclusione dimensionale su matrice AcA44 (gel filtrazione) | 51 |
| 3.5.2 | Cromatografia a scambio ionico su matrice Q-sefariosio | 53 |
| 3.5.3 | Cromatografia ad interazione idrofobica su matrice Fenil Sefariosio | 55 |
| 3.6 | Legame dei composti naturali alla TTR I84S | 56 |
| 3.6.1 | Misure fluorimetriche | 56 |
| 3.6.1.1 | Interazione tra composti naturali e TTR I84S | 58 |
| 3.7 | Prove di stabilità della TTR I84S | 60 |
| 3.8 | Inibizione della fibrillogenesi del mutante TTR I84S a pH moderatamente acido | 61 |
| 3.9 | Prove di legame alla TTR I84S in presenza di T4 marcata radio attivamente | 62 |
| 3.10 | Prove di legame competitivo “ex vivo” | 63 |
| 3.11 | Selettività di legame dei ligandi per la TTR plasmatica mediante tecnica di immunoaffinità | 63 |

| | | |
|--|---|----|
| Capitolo 4: Risultati e discussione | 67 | |
| 4.1 | Espressione della proteina mutante hTTR I84S | 69 |
| 4.2 | Purificazione della proteina mutante hTTR I84S | 70 |
| 4.2.1 | Cromatografia ad esclusione dimensionale su matrice AcA44 (gel filtrazione) | 70 |
| 4.2.2 | Cromatografia a scambio ionico su matrice Q-sefariosio | 72 |
| 4.2.3 | Cromatografia ad interazione idrofobica su matrice Fenil-Sefariosio | 73 |
| | | |
| Capitolo 5: Risultati e discussione (parte prima: Flavonoidi) | 75 | |
| 5.1 | Interazione tra composti naturali (flavonoidi) e TTR I84S | 77 |
| 5.2 | Effetto stabilizzante dei flavonoidi su TTR I84S in presenza di urea | 80 |
| 5.3 | Inibizione della fibrillogenesi del mutante TTR I84S a pH moderatamente acido | 81 |
| 5.4 | Legame dei flavonoidi alla TTR I84S evidenziato mediante competizione con T4 marcata radio attivamente | 83 |
| 5.5 | Analisi della selettività di legame dei ligandi alla TTR plasmatica mediante la tecnica di immunoaffinità | 85 |
| 5.6 | Prove di legame competitivo “ex vivo” | 86 |

| | |
|---|------------|
| Capitolo 6: Risultati e discussione (parte seconda: Stilbeni) | 91 |
| 6.1 Interazione tra Stilbeni e TTR I84S | 93 |
| 6.2 Effetto stabilizzante degli stilbeni su TTR I84S in presenza di urea | 94 |
| 6.3 Inibizione della fibrillogenesì del mutante TTR I84S a pH moderatamente acido da parte degli stilbeni | 95 |
| 6.4 Legame del Resveratrolo alla TTR I84S mediante competizione con T4 marcata radioattivamente | 97 |
| Capitolo 7: Conclusioni | 101 |
| Bibliografia | 109 |

1. Introduzione

1.1 Amiloidosi

Le amiloidosi rappresentano un grande gruppo di malattie in cui il “misfolding” e “misassembly” di specifiche proteine, chiamate amiloidogeniche; in sede extracellulare svolge un ruolo fondamentale. Questo processo, che interviene in parallelo o in alternativa al folding fisiologico oppure avviene a folding completato, genera nei tessuti aggregati proteici, prevalentemente insolubili, prodotti dalle proteine amiloidogeniche. I prodotti di aggregazione solubili sono generalmente tossici, ed insieme agli aggregati insolubili sono responsabili delle alterazioni patologiche tissutali con conseguente compromissione di importanti funzioni nell'organismo. I depositi amiloidi avvengono sottoforma di fibrille ordinate, costituite da foglietti β organizzati strutturalmente per dare il motivo strutturale “cross-beta”, caratterizzato da filamenti β perpendicolari all'asse della fibrilla (Fig. 1). Questo motivo strutturale è comune alle diverse proteine amiloidogeniche, benché queste siano tra loro dissimili strutturalmente nel loro stato nativo (Fig. 1).

I depositi amiloidi vengono evidenziati sulla base della loro birifrangenza verde mediante microscopia in luce polarizzata dopo colorazione con Rosso Congo, mentre la presenza di fibrille rigide, non ramificate aventi diametro compreso fra 7,5 e 10 nm viene rivelata mediante microscopia elettronica. Le amiloidosi sono patologie che hanno un enorme impatto sociale e medico. La più nota fra le amiloidosi è la malattia di Alzheimer determinata dalla deposizione di fibrille amiloidi nel tessuto cerebrale, e colpisce più di 12 milioni di persone in tutto il mondo. Il sistema nervoso centrale è anche il bersaglio di proteine prioniche che sono la causa di un gruppo di rare condizioni neurodegenerative ereditarie o acquisite.

Le due forme più comuni di amiloidosi sistemica sono le amiloidosi causate dalle catene leggere degli anticorpi (AL), con un'incidenza di circa 1 caso per 100.000 persone-anno nei paesi occidentali, e le amiloidosi reattive dovute a malattie infiammatorie croniche (l'artrite reumatoide e infezioni croniche).

Fino ad oggi, sono state identificate 30 differenti proteine amiloidogeniche, di cui le più diffuse sono riportate in tabella 1. Nella malattia amiloidotica il misfolding delle proteine potenzialmente patogene può avere origine diversa:

- le proteine amiloidogeniche possono avere un'intrinseca propensione ad assumere una conformazione patologica, che diventa evidente con l'invecchiamento (ad esempio, transtiretina wild type in pazienti con amiloidosi sistemica senile)
- la propensione all'amiloidogenesi può essere indotta o accentuata a seguito di sostituzione di un singolo amminoacido nella proteina, come avviene nel caso delle amiloidosi ereditarie.
- la propensione all'amiloidogenesi può essere indotta da rimodellamento proteolitico del precursore proteico, come nel caso della proteina precursore dell'amiloide (APP) nella malattia di Alzheimer.

Questi meccanismi possono agire in modo indipendente o in associazione tra loro. Oltre al potenziale intrinseco amiloidogenico della proteina patogena, altri fattori possono agire sinergicamente nella deposizione amiloide, ad esempio la proteina precursore deve raggiungere una concentrazione locale critica per innescare la formazione di fibrille, ed inoltre il processo può essere favorito da fattori ambientali locali e da interazioni con matrici extracellulari (Merlini et al. 2003).

| Amyloid Protein | Precursor | Distribution | Type | Syndrome or Involved Tissues |
|-----------------|----------------------------------|------------------------|------------------------|---|
| A β | A β protein precursor | Localized Localized | Acquired Hereditary | Sporadic Alzheimer's disease, aging Prototypical hereditary cerebral amyloid angiopathy, Dutch type |
| APrP | Prion protein | Localized Localized | Acquired Hereditary | Sporadic (iatrogenic) CJD, new variant CJD (alimentary?) Familial CJD, GSSD, FFI |
| ABri | ABri protein precursor | Localized or systemic? | Hereditary | British familial dementia |
| ACys | Cystatin C | Systemic | Hereditary | Icelandic hereditary cerebral amyloid angiopathy |
| A β 2M | Beta ₂ -microglobulin | Systemic | Acquired | Chronic hemodialysis |
| AL | Immunoglobulin light chain | Systemic or localized | Acquired | Primary amyloidosis, myeloma-associated |
| AA | Serum amyloid A | Systemic | Acquired | Secondary amyloidosis, reactive to chronic infection or inflammation including hereditary periodic fever (FMF, TRAPS, HIDS, FCU, and MWS) |
| ATTR | Transthyretin | Systemic Systemic | Hereditary Acquired | Prototypical FAP Senile heart, vessels |
| AApoAI | Apolipoprotein A-I | Systemic | Hereditary | Liver, kidney, heart |
| AApoAII | Apolipoprotein A-II | Systemic | Hereditary | Kidney, heart |
| AGel | Gelsolin | Systemic | Hereditary | Finnish hereditary amyloidosis |
| ALys | Lysozyme | Systemic | Hereditary | Kidney, liver, spleen |
| AFib | Fibrinogen A α chain | Systemic | Hereditary | Kidney |

Tabella 1. Proteine amiloidi e loro precursori. (Merlini et al. 2003)

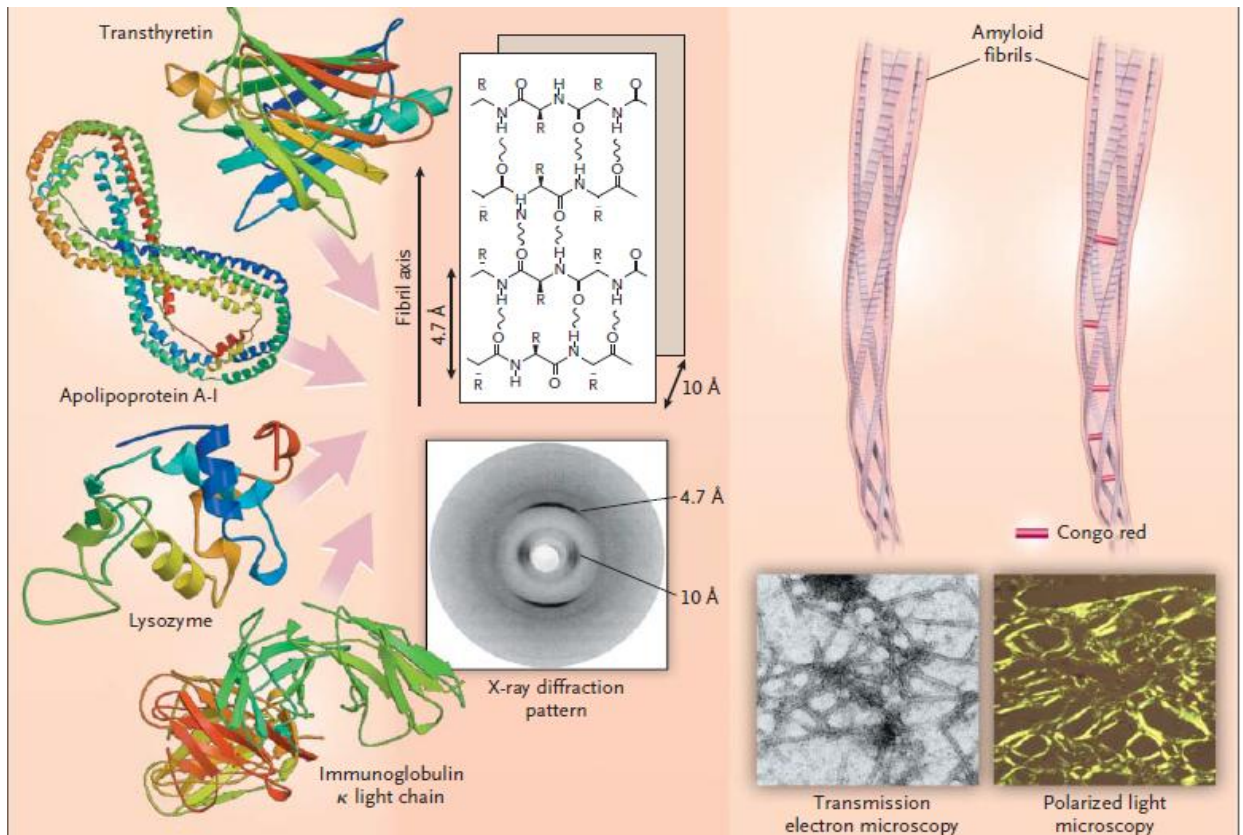


Figura 1. Esempi di strutture amiloidi (Merlini et al. 2003)

A sinistra sono mostrate le strutture tridimensionali di lisozima, transtiretina, apolipoproteina A1 e catene leggere delle immunoglobuline k. Come si osserva nel pannello centrale, tutte queste catene polipeptidiche convergono in una struttura cross-beta super-secondaria che è stata ben caratterizzata mediante diffrazione dei raggi X, con interstrand prototipici e distanze intersheet di 4,7 e da 10 a 13 Å, rispettivamente. Filamenti β contigui nella catena polipeptidica costituiscono un protofilamento. Come mostrato sulla destra, diversi protofilamenti (da quattro a sei) sono avvolti uno intorno all'altra per formare una fibrilla amiloide, avente diametro che varia da 7,5 a 10 nM, visibile mediante microscopia elettronica a trasmissione. L'ultrastruttura della fibrilla permette l'intercalazione regolare del colorante Congo Rosso, che conferisce una proprietà ottica diagnostica dell' amiloide tramite birifrangenza verde-mela visibile mediante microscopia in luce polarizzata.

1.2 Amiloidosi da Transtiretina

La Transtiretina (TTR) è una delle numerose proteine che sono note per il “misfolding” e il “misassembly” *in vivo* (Figura 2). Tale processo per la TTR provoca patologie che compromettono il sistema nervoso periferico (nervi periferici) e / o il cuore. Sulla base di studi *in vitro* si è ipotizzato che nell’uomo i tetrameri della TTR, sia wild-type (wt) che varianti genetiche amiloidogeniche della proteina, possano dissociare, generando monomeri relativamente instabili, che a causa di “misassembly” diano origine al processo di amiloidogenesi, portando alla degenerazione del tessuto postmitotico. La deposizione extracellulare di fibrille di TTR wild-type (wt) è causa dell’amiloidosi sistemica senile (SSA), una cardiomiopatia sporadica a esordio tardivo che colpisce ben il 15% della popolazione dagli 80 anni ed un numero significativo di soggetti già a partire da 50-60 anni (Steven et al. 2012)

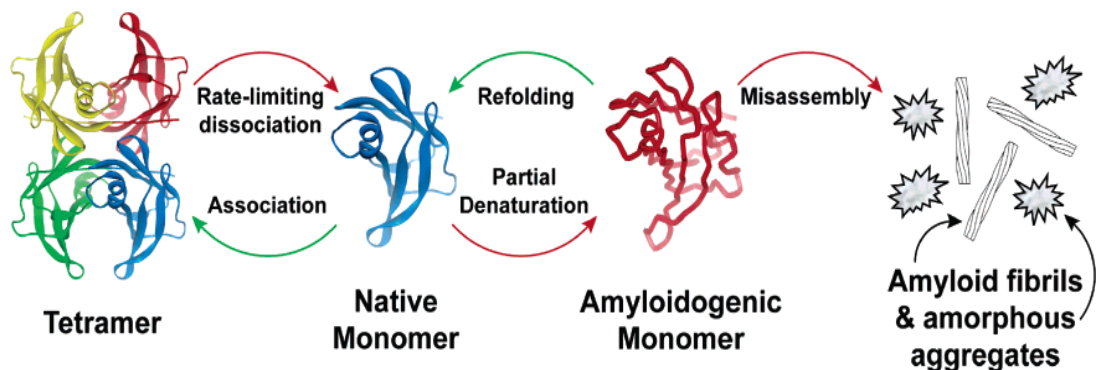


Figura 2. Ipotetico pathway di amiloidogenesi della TTR.

Le varianti genetiche amiloidogeniche della TTR costituiscono gli agenti causali più frequenti delle amiloidosi ereditarie (Pepys et al. 2006). Più di 100 mutazioni puntiformi sono state finora descritte per la TTR umana, la maggior parte delle quali è responsabile di amiloidosi ereditarie, clinicamente molto più aggressive della SSA, denominate polineuropatia (FAP) e cardiomiopatia (FAC) amiloidotiche familiari (Benson et al. 2007), che in assenza di

interventi terapeutici risultano fatali. Singole mutazioni puntiformi aumentano considerevolmente l'amiloidogenicità della TTR, così che i pazienti manifestano una più rapida progressione della malattia e la comparsa precoce dei sintomi rispetto alla SSA. Tra le diverse mutazioni patogene della TTR finora identificate ha particolare rilievo la mutazione V122I, che causa la insorgenza di FAC in circa il 4% della popolazione afro-americana al di sopra dei 50-60 anni (Jacobson et al. 1997).

L'amiloidosi familiare FAP è invece causata da varie mutazioni amiloidogeniche della TTR, tra le quali quella più diffusa, soprattutto in Portogallo, Svezia e Giappone, è la mutazione V30M.

Ad oggi il solo trattamento della FAP causata da tale variante, consiste nella terapia genica mediata dal trapianto del fegato, che permette la sostituzione della variante amiloidogenica in circolo con la proteina wild-type (Holmgren et al. 1993). Il trapianto si è dimostrato in grado di far diminuire nelle FAP i livelli della variante patogena di TTR nel plasma fino a meno del 5% dei livelli pre-trapianto, arrestando la progressione della malattia nella maggior parte dei pazienti, almeno inizialmente. Sfortunatamente, le amiloidosi cardiache da TTR spesso progrediscono nei pazienti anche in seguito al trapianto, a causa della continua deposizione di TTR wild type (Olofsson et al. 2002). Nonostante l'incapacità del trapianto di fegato di prevenire la deposizione della TTR wild type, esso ha fornito importanti conoscenze in termini di dimostrazione che le amiloidosi della TTR possono essere trattate riducendo la concentrazione plasmatica di TTR amiloidogenica.

SSA.

L'amiloidosi correlata alla transtiretina wt è comunemente riconosciuta come amiloidosi sistemica senile. Nonostante venga definita come malattia sistemica, il cuore è il principale organo affetto da amiloidosi e l'unica ulteriore manifestazione clinica della SSA è la sindrome del tunnel carpale.

L'SSA tipicamente colpisce le persone anziane che presentano insufficienza cardiaca, ma piccole quantità di amiloide da transtiretina wt sono state ritrovate anche in persone che

non manifestavano i segni clinici tipici dell'SSA o di malattie cardiache. L'esito dell'ecocardiografia di individui affetti da SSA è simile a quello delle altre forme di cardiomiopatia amiloidotica. Generalmente i pazienti con SSA presentano un ispessimento della parete ventricolare sinistra ed una diminuzione della frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF).

SSA mostra un lento decorso ed il trattamento è normalmente limitato alla terapia convenzionale per insufficienza cardiaca (Rapezzi et al. 2010).

FAP.

La polineuropatia amiloidotica familiare da TTR è una malattia multi-sintomo che può manifestarsi come neuropatia periferica sensoriale e motoria, con coinvolgimento dei nervi periferici, e neuropatia autonoma, con coinvolgimento del sistema nervoso autonomo, ma può anche essere associata a danni dell'apparato gastrointestinale, cardiomiopatia, nefropatia, e deposizione amiloide a livello oculare.

Nello specifico induce una neuropatia periferica con un particolare decorso a partire dalle fasi iniziali. Inizialmente sono interessati gli arti inferiori ed i sintomi includono generalmente intorpidimento e dolore spontaneo agli arti. In questa fase, tipicamente vengono colpite prima le piccole fibre nervose che alterano la percezione del dolore e della temperatura. Un esame clinico può effettivamente rilevare un'alterata sensibilità termica nei piedi, con una diminuzione della sensibilità verificata con la puntura di uno spillo. La forza muscolare e i riflessi tendinei sono normali. Questa manifestazione neuropatica riflette tipicamente il coinvolgimento di piccole fibre mieliniche e mieliniche dei nervi periferici. Dopo pochi mesi, la perdita di sensibilità si estende sopra le caviglie in entrambe le gambe. Il deficit neurologico poi progredisce inesorabilmente, con l'estensione della perdita di sensibilità degli arti inferiori. Infatti, appare un deficit motorio negli arti inferiori distali che indica il coinvolgimento delle fibre nervose sensoriali e motorie più grandi, camminare diventa sempre più difficile con perdita di equilibrio e difficoltà nell'andatura. Il dolore neuropatico si

manifesta sotto forma di bruciore che peggiora nel corso della notte e può essere associata con l'allodinia. Con il passare dei mesi e degli anni, il deficit sensoriale si estende alle cosce, agli arti superiori, agli avambracci, alle dita coinvolgendo infine anche il tronco anteriore e camminare diventa sempre più difficile. In questa fase a causa della disfunzione autonoma subentra il pericolo di vita. La perdita della percezione del dolore porta allo sviluppo di traumi indolori e alla formazione di ulcere plantari e del piede e "osteoartropatia" che coinvolge le articolazioni di Charcot..

A causa della distribuzione casuale di fibre amiloidi nel sistema nervoso periferico questi depositi possono accumularsi a livello locale e indurre un deficit focale dei nervi cranici e del tronco o plesso nervoso.

La sindrome del tunnel carpale è una delle prime, ma non specifica, manifestazioni della FAP. Va notato che per molti pazienti con FAP viene erroneamente diagnosticata la semplice sindrome del tunnel carpale; sintomi progressivi o la mancanza di miglioramento dopo l'intervento chirurgico del tunnel carpale spesso portano alla diagnosi corretta.

FAC.

Nei pazienti con FAC, l'amiloide può infiltrarsi in tutte le strutture cardiovascolari, compreso il sistema di conduzione, il miocardio atriale e ventricolare, il tessuto valvolare e le arterie coronarie e di grandi dimensioni.

Quando è influenzato il sistema di conduzione, si verifica un blocco della branca atrio-ventricolare e un blocco seno-atriale. I risultati dell'infiltrazione nel miocardio sono dati da un progressivo aumento dello spessore delle pareti ventricolari sinistra e destra e del setto interatriale (Figura 3), associato ad un peggioramento del sistema emodinamico .

In uno studio su 38 pazienti affetti da cardiomiopatia da TTR, solo un paziente (3%) ha mostrato un "dip plateau" nel profilo della curva della pressione del ventricolo destro, 13 pazienti (34%) hanno riportato un innalzamento della pressione capillare polmonare e 14 (47%) hanno mostrato un Doppler con un pattern di riempimento restrittivo. La cosa

interessante è che in 11 dei pazienti (29%) non venivano visualizzate eventuali anomalie in funzione diastolica, almeno non quando si trovavano in condizione di riposo (Rapezzi et al. 2009). Nei pazienti con cardiomiopatia ATTR, l'LVEF è generalmente normale o solo lievemente ridotta, tuttavia le anomalie nella funzione di entrambi i ventricoli sono frequenti nel Doppler tissutale. Tali anomalie possono precedere un danneggiamento della funzione circonferenziale ventricolare e sono sproporzionatamente severe rispetto a quelle osservate in altre forme di cardiomiopatia e ad altre forme di riduzione della frazione di eiezione.

L'infiltrazione di amiloide nelle valvole cardiache porta alla formazione di noduli accompagnata da gradi variabili (generalmente lievi) di rigurgito valvolare. Lo spettro clinico delle malattie cardiovascolari è ampio, passando dalla patologia atrioventricolare asintomatica ad una grave e progressiva insufficienza cardiaca a causa di cardiomiopatie restrittive. Nei pazienti che presentano malattie cardiache, ma non palesi manifestazioni neurologiche (o con danno neurologico di eziologia sconosciuta), la diagnosi di FAC è particolarmente impegnativa. Tali pazienti possono presentare un'un'ampia varietà di sintomi, inclusa la fatica da insufficienza cardiaca, aritmie, sincope, ipotensione ortostatica, o anomalie elettrocardiografiche e / o ecocardiografiche asintomatiche. I pazienti con ipertensione sistemica arteriosa e aumento dello spessore della parete ventricolare sinistra, in assenza di qualsiasi segno di compromissione neurologica rappresentano un problema diagnostico particolare, e l'ATTR in tali individui è spesso non diagnosticata. Nei pazienti afro-americani con ipertensione, la possibilità di ATTR associata alla mutazione Ile122Leu viene presa sempre in considerazione. Un primo passo logico è la ricerca di segni di infiltrazione amiloide ecocardiografica e la valutazione della massa ventricolare sinistra tramite eco/elettrocardiografia.

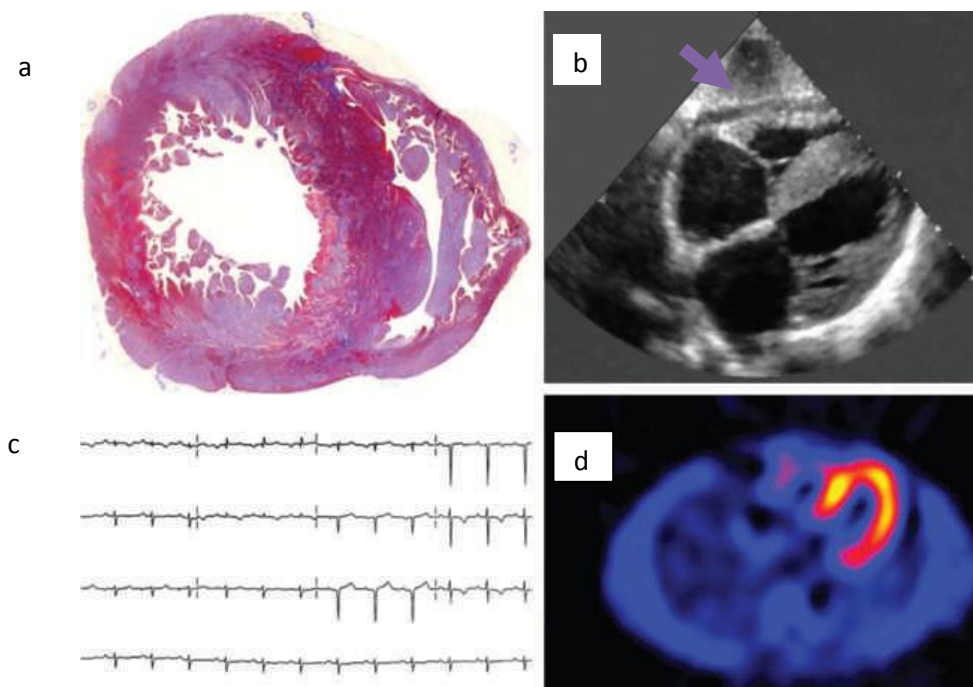


Figura 3. Risultati rappresentativi di pazienti affetti da cardiomiopatia da ATTR.

a| Sezione trasversale medio - ventricolare di un cuore intero espantato da un paziente con ATTR durante trapianto combinato cuore- fegato. L'amiloide (rosa pallido con colorazione tricromica) ha diffusamente infiltrato il miocardio, ed in molte zone ha completamente sostituito il normale tessuto miocardico.

b| ecocardiogramma - vista sub costale- spessore maggiore evidente nel setto interventricolare, nella parete posteriore del ventricolo sinistro, nella parete ventricolare anteriore destra e nel setto interatriale. Il piccolo versamento pericardico (indicato con la freccia) è tipico della FAC. c | Caratteristica traccia elettrocardiografia di un paziente con cardiomiopatia amiloidotica causato da ATTR.

d | Scintigrafia miocardica 3 ore dopo iniezione endovenosa di ^{99}Tc - dicarbossipropano difosfonato per rilevare la deposizione amiloide. (Rapezzi et al. 2010).

I risultati dell'ecocardiogramma sopra descritti dovrebbero far sorgere il sospetto di un'eziologia amiloidotica se è stato riconosciuto un ispessimento della parete ventricolare (Rapezzi et al. 2010).

1.3 Transtiretina e sue proprietà di riconoscimento molecolare

La TTR è un omo-tetramero di circa 55 kDa la cui struttura cristallina è conosciuta ad alta risoluzione (Blake et al. 1978; Hornberg et al., 2000) è composta da quattro monomeri identici di 14 kDa caratterizzati dalla presenza di 127 residui aminoacidici ciascuno (Figura 4). In ciascun monomero della TTR sono presenti due foglietti β formati ciascuno da quattro filamenti β antiparalleli, mentre una breve alfa elica unisce due degli otto filamenti β . Due monomeri formano un dimerò tramite la formazione di legami H tra i filamenti F-F e H-H dei due monomeri (Figura 4), in modo tale che si ha continuità tra i foglietti dei due monomeri del dimerò. Due dimeri così formati interagiscono tra loro secondo la modalità "back to back", mediante poche interazioni prevalentemente idrofobiche (Fig. 6 A). Uno dei tre assi binari di simmetria del tetramero coincide con un lungo canale che attraversa l'intera molecola e che contiene in ciascuna delle sue metà due siti di legame per gli ormoni tiroidei, principalmente tiroxina (T4) ed in minor misura triiodotironina (T3) (Fig. 6 A e 6 B). Mentre nell'uomo la TTR non è il principale trasportatore plasmatico della tiroxina, che è invece rappresentato dalla "thyroxine binding globulin" (TBG), la TTR è invece il principale trasportatore dell'ormone nel liquido cerebrospinale; in particolare, la TTR è secreta a livello plasmatico dal fegato a concentrazioni di 1.8-3.6 μM e a livello del liquido cerebro-spinale dal plesso corioideo a concentrazioni di 0.04-0.4 μM (Johnson et al. 2005).

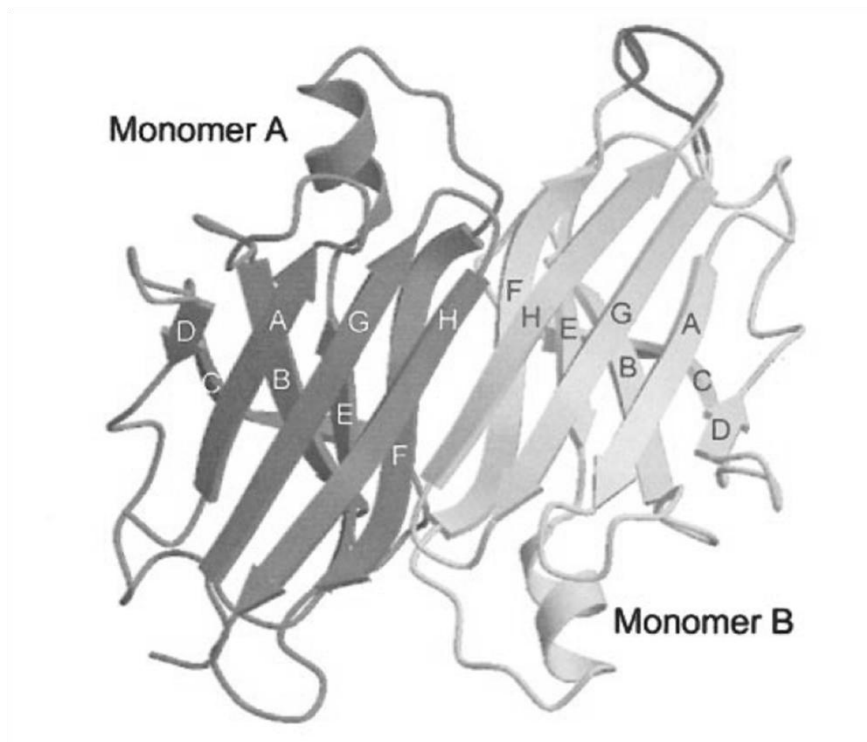


Figura 4. Diagramma a nastro della struttura del dimero della TTR. (Hornberg et al. 2000).

Nella TTR, ognuno dei due siti di legame per la T4, che si trova all'interfaccia tra due monomeri appartenenti a due distinti dimeri è caratterizzato da tre paia di depressioni simmetriche che costituiscono le tasche di legame degli alogeni (HBP), in cui risiedono gli atomi di iodio della T4 (Figura 5).

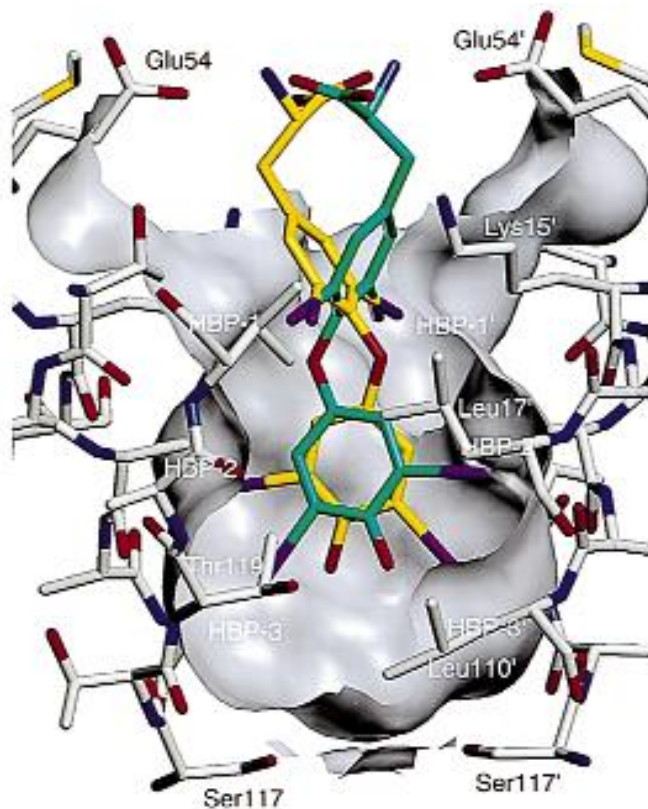


Figura 5. Complesso TTR-T4
 Sono evidenziate le regioni HBP1,2 e 3. (Klabunde et al. 2000)

La T4 si lega a questi due siti con cooperatività negativa, che secondo alcuni autori sarebbe attribuibile al fatto che il legame della T4 al primo sito, ad alta affinità di legame, causa cambiamenti conformazionali che rendono il secondo sito molto meno affine per il legame (Stockigt et al. 2001; Neumann et al. 2001; Miroy et al. 1996). Tuttavia questi cambiamenti conformazionali non sono direttamente evidenziabili nel confronto della TTR in presenza ed assenza di ligando. Sono state progettate centinaia di piccole molecole organiche che si legano con alta affinità ai siti di legame della T4 all'interno della TTR (Klabunde et al. 2000; Johnson et al. 2005; Connelly et al. 2010). I piccoli ligandi sono tipicamente composti da due anelli aromatici separati da un linker. L'attenzione è stata focalizzata sulle piccole molecole che si legano e stabilizzano lo stato nativo della TTR ostacolando così la

formazione dello stato di transizione per il processo della dissociazione del tetramero. Questa strategia terapeutica è efficace poiché previene il processo di amiloidogenesi dall'inizio. Anche se molti analoghi degli ormoni tiroidei legano i siti di legame della T4 non occupati e impongono una stabilizzazione cinetica sulla TTR tetrameric, si desiderano ligandi ad alta affinità che non sono né agonisti né antagonisti degli ormoni tiroidei per escluderne un'interferenza con l'attività biologica degli ormoni.

T4 e, in limitata quantità nell'uomo, T3 vengono secreti dalle cellule follicolari della tiroide in risposta all'ormone ipofisario tireotropina (TSH); essi regolano lo sviluppo cerebrale del feto e del lattante, sono necessari per lo sviluppo dello scheletro fetale, sono indispensabili per il normale accrescimento corporeo del bambino e per la maturazione dei vari apparati, soprattutto quello scheletrico, e regolano l'attività metabolica dell'adulto, influenzando la funzione di ogni organo e tessuto. La transtiretina è una proteina multifunzionale in quanto oltre a legare la tiroxina, essa forma nel sangue un complesso macromolecolare con la "retinol-binding protein" (Figura 6) (Zanotti and Berni. 2004) ossia la proteina implicata nel trasporto della vitamina A (retinolo) nel plasma. Il retinolo è un micronutriente essenziale, i cui derivati attivi, come l'11-cis-retinale, l'acido retinoico tutto trans e l'acido retinoico 9-cis, rivestono un ruolo chiave in una grande varietà di processi biologici, inclusi la visione, la crescita e la differenziazione cellulare, lo sviluppo embrionale e la morfogenesi. Il retinolo è un composto chimicamente instabile e, a causa della sua natura apolare, fortemente insolubile nel mezzo acquoso. Di conseguenza, è cruciale la sua interazione con proteine di legame che lo proteggano e lo solubilizzino. Nel plasma e all'interno della cellula, la molecola del retinolo è legata a proteine di trasporto distinte: la proteina extracellulare plasmatica (RBP, retinol-binding protein) e le proteine intracellulari (CRBP, cellular retinol-binding protein). Quando è complessato con i suoi trasportatori, il retinolo è legato all'interno di una profonda cavità, quasi completamente protetto dall'ambiente esterno, acquisendo così una stabilità drasticamente maggiore di quella del retinolo libero.

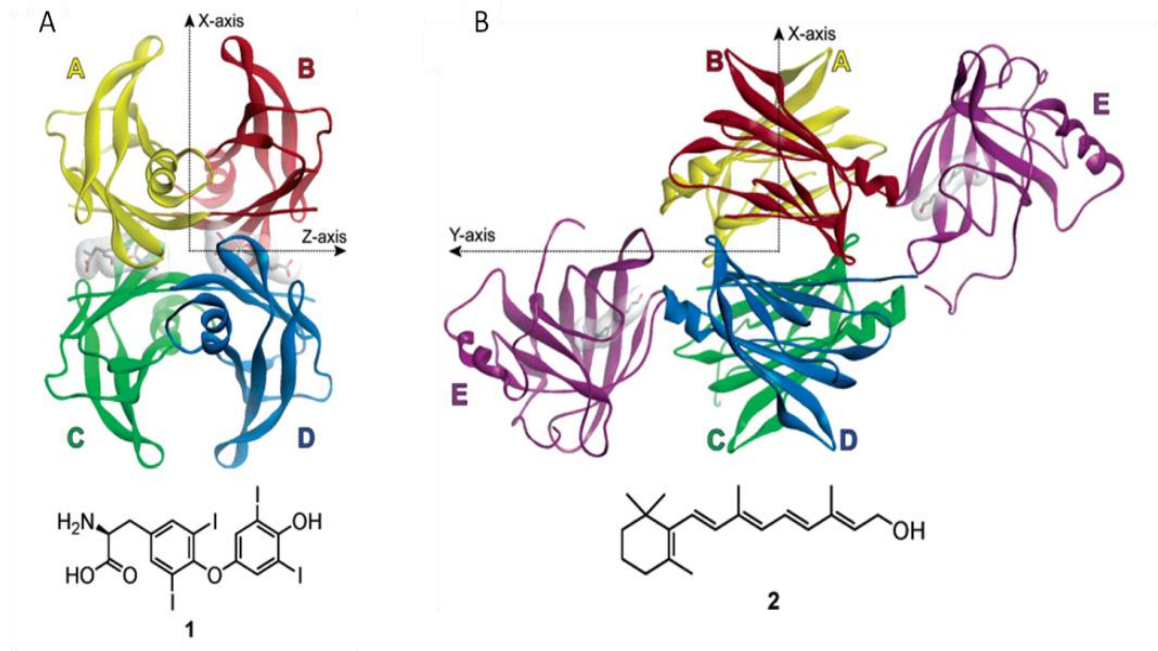


Figura 6. Struttura a nastro TTR wt in presenza dei ligandi fisiologici

A) diagramma a nastro della struttura cristallina del complesso TTR umana wild type (hTTR wt, subunità A,B,C,D)-(T₄)₂. (La formula di struttura della T₄ è indicata con 1). B) Diagramma a nastro della struttura cristallina del complesso hTTR wt-(olo-RBP umana)₂. La olo-RBP umana è mostrata in colore violetto. (La formula di struttura del retinolo trans è indicata con 2). (Johnson et al. 2005).

L'RBP è una proteina a singolo dominio di 21 kDa, che contiene un sito di legame per il retinolo trans. Essa è costituita da un coil N-terminale, otto filamenti β antiparalleli (A-H) e una corta α -elica in prossimità dell'estremità C-terminale (Figura 7). Il core della proteina è la cavità interna di un barile β , costituito da otto filamenti β antiparalleli (topologia "up and down"). La molecola della vitamina è ospitata all'interno della cavità del barile β : l'anello del β -ionone occupa la parte più interna, la catena polienica è completamente distesa e il gruppo ossidrilico terminale è pressoché esposto al solvente, nella regione dei loop che

collegano i filamenti β A e B, C e D, E e F e che circondano l'entrata del barile β all'estremità aperta della cavità (Zanotti and Berni, 2004).

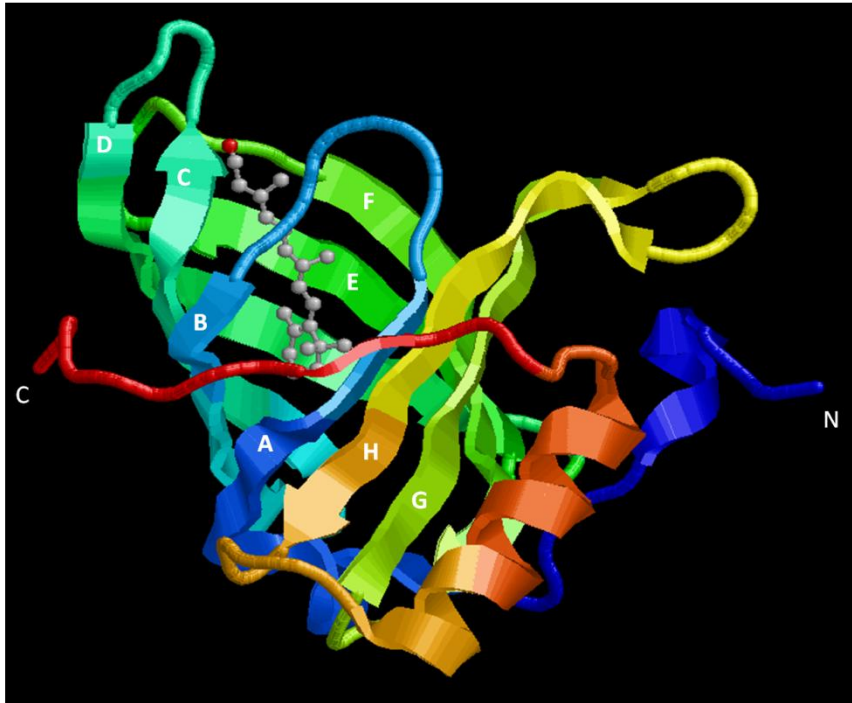


Figura 7. Diagramma a nastro della struttura del complesso retinolo-RBP .(Calderone et al. 2003, riferimento PDB 1KT3).

Sia la RBP che la TTR sono principalmente prodotte a livello epatico. La disponibilità del retinolo riveste un ruolo cruciale nella secrezione dell'RBP da parte degli epatociti. Infatti, la secrezione dell'RBP è specificamente bloccata dalla deficienza di retinolo ed è rapidamente ristabilita dalla sua presenza. L'RBP rilascia la molecola di vitamina alle cellule target (Goodman et al. 1984; Zanotti and Berni, 2004), dove è presente un recettore di membrana della RBP, che rappresenta il principale mediatore dell'assorbimento della vitamina A (Kawaguchi et al. 2007). Dopo la secrezione da parte degli epatociti, nel circolo sanguigno

l'RBP si trova legata alla TTR. L'associazione dell'RBP alla TTR aumenta la stabilità del complesso retinolo-RBP (Goodman et al. 1972; Folli et al. 2005) e, in accordo con varie linee di evidenza (Episkopou et al. 1993; Quadro et al. 1999; van Bennekum et al. 2001), riduce la filtrazione glomerulare della molecola di RBP, che è relativamente piccola e quindi ultrafiltrabile a livello renale. Inoltre, la stabilità del complesso RBP-TTR risente fortemente della presenza del retinolo legato all'RBP all'interno del complesso, una caratteristica che si crede abbia un significato fisiologico. L'affinità della forma olo dell'RBP per la TTR è significativamente più alta di quella della forma apo (Fex et al. 1979; Malpeli et al. 1996). Ciò è in accordo con il fatto che l'oloRBP viene conservata nel circolo come complesso proteina-proteina e con il fatto che la molecola apoRBP non complessata, risultante dal rilascio del retinolo, è selettivamente rilasciata dalla circolazione mediante filtrazione glomerulare. In particolare, il gruppo ossidrilico terminale del retinolo prende contatti con la TTR, partecipando alla formazione del complesso macromolecolare grazie a un legame a idrogeno con il carbonio carbonilico del legame peptidico della glicina 83 (Monaco et al. 1995; Zanotti et al. 2008). L'evidenza strutturale disponibile indica che il gruppo ossidrilico terminale del retinolo partecipa ad una rete di legami a idrogeno nell'oloRBP non complessata e che questa rete è distrutta nel complesso oloRBP-TTR, nel quale, invece, viene formato il suddetto legame a idrogeno (Zanotti and Berni, 2004). Inoltre, l'osservazione che l'apertura della cavità del barile β e il retinolo sono totalmente "sepolti" all'interno del complesso proteina-proteina è in accordo con la stabilizzazione del legame del retinolo legato all'RBP a seguito della formazione del complesso RBP-TTR (Goodman et al. 1984) e con la facilitazione del legame del retinolo all'apoRBP non complessata, rispetto al legame del retinolo all'apoRBP complessata con la TTR (Folli and Berni, dati non pubblicati). Riguardo a quest'ultima proprietà, chiaramente, l'accessibilità della cavità di legame dell'apoRBP appare drasticamente ostacolata, su base strutturale, nel complesso apoRBP-TTR. Invece, i dati in soluzione hanno indicato che non esiste interdipendenza per il legame della T4 e dell'RBP alla TTR (Goodman et al. 1984). I dati strutturali sono

pienamente in accordo. Infatti, l'RBP è legata nel complesso proteina-proteina in modo tale che le due aperture del canale centrale della TTR, che accolgono gli ormoni tiroidei, non sono coinvolte nelle interazioni proteina-proteina (Zanotti and Berni, 2004).

Sono state descritte le strutture cristalline ad alta risoluzione della TTR (Blake et al. 1978; Wojtczak et al. 1997; Hornberg et al. 2000) e dell'RBP di mammiferi (Cowan et al. 1990; Zanotti et al. 1993; Zanotti et al. 1993; Zanotti et al. 1998; Calderone et al. 2003) e sono state determinate anche le strutture cristalline dei complessi TTR-oloRBP (Monaco et al. 1995; Naylor and Newcomer 1999; Zanotti et al. 2008). Queste strutture hanno stabilito che la massima stechiometria per il complesso è di due molecole di RBP per ogni molecola di TTR. Inoltre, in tale complesso, ogni molecola di RBP legata alla TTR interagisce simultaneamente con tre subunità della TTR (Figura 8) (Monaco et al. 1995; Naylor and Newcomer 1999).

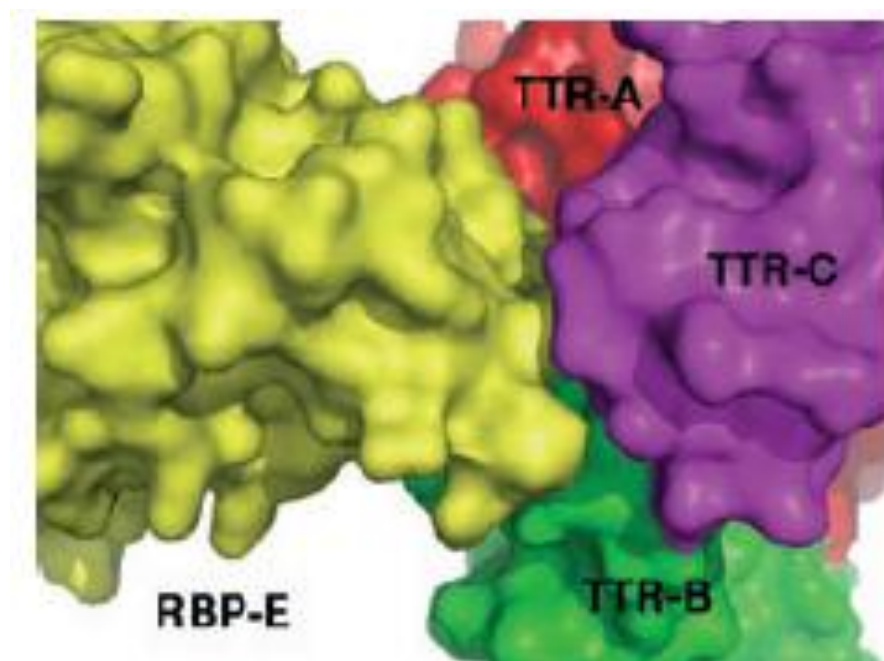


Figura 8. Dettaglio del contatto tra le tre subunità della TTR (A, B e C) e l'RBP. (Zanotti et al. 2008).

A causa della risoluzione piuttosto bassa (3.1-3.2 Å), le strutture cristalline disponibili dei complessi RBP-TTR non forniscono una descrizione dettagliata delle interazioni proteina-proteina a livello atomico. Comunque, le informazioni derivanti dalla struttura di questi complessi hanno permesso la descrizione della maggior parte delle caratteristiche delle interazioni proteina-proteina. Nonostante l'alta simmetria della TTR, che è un omotetramero che possiede quattro identici siti di legame per la RBP, gli studi in soluzione hanno indicato una stechiometria di due molecole di RBP per ogni tetramero di TTR (Berni et al. 1994; Trägårdh et al. 1980) complessate con la TTR (Figura 9). In accordo con questi risultati, di fatto, il legame di una molecola di RBP ad un tetramero di TTR non complessato occupa parzialmente il potenziale sito di legame adiacente, limitando quindi la possibile interazione con la TTR tetrameric a due molecole di RBP. La situazione *in vitro* non è, però, rappresentativa di quella presente *in vivo* dove la concentrazione plasmatica della TTR, infatti, è più di due volte più alta di quella dell'RBP (Goodman et al. 1984), così che fisiologicamente nel plasma è presente il complesso RBP-TTR con rapporto di 1:1 e un eccesso di TTR in forma libera.

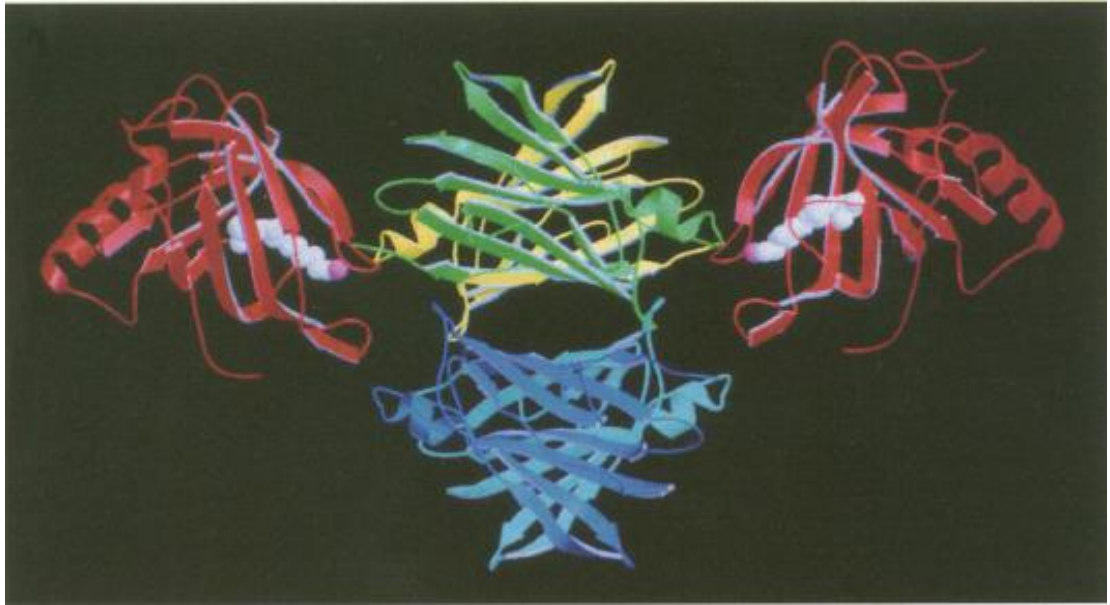


Figura 9. Modello della struttura del complesso esamerico RBP₂-TTR determinato mediante analisi ai raggi x (Monaco et al. 1995).

I tre loop di entrata del ligando nell'RBP (residui 31-38, 63-67, 93-99) sono le porzioni principalmente coinvolte nell'interazione con la TTR. Di fatto, pressoché tutti i residui amminoacidici dell'RBP coinvolti più direttamente nell'interazione con la TTR, in accordo con la struttura del complesso RBP-TTR eterologo ed omologo (Monaco et al. 1995; Zanotti et al. 2008), si trovano in questi tre loop. In accordo con l'evidenza strutturale, mediante analisi mutazionale, è stato stabilito che le specifiche sostituzioni amminoacidiche nei loop di entrata del retinolo riducono notevolmente o aboliscono l'abilità della RBP di interagire con la TTR (Sivaprasadarao et al. 1994; Zanotti et al. 2008). Come conseguenza della partecipazione dei loop di entrata dell'RBP all'interazione con la parte corrispondente nella TTR, l'area di apertura della cavità (incluso il gruppo ossidrilico del retinolo), che è accessibile al solvente nell'oloRBP non complessata, resta "sepolta" all'interno del complesso RBP-TTR. Le interazioni tra RBP e TTR sono principalmente, ma non esclusivamente, idrofobiche. In particolare, è stato trovato *in vitro* che il legame tra l'RBP umana e la TTR è pressoché abolito in presenza della mutazione amiloidogena I84S nella

TTR umana (Berni et al. 1994). Questo risultato rivela il ruolo cruciale di I84 nell'interazione proteina-proteina. Conformemente, può essere segnalato che il residuo I84 presente in due distinti monomeri del tetramero di TTR umana partecipa simultaneamente all'interazione con una molecola di RBP (Monaco et al. 1995; Zanotti et al. 2008). Pertanto, la sostituzione nella TTR di una catena laterale idrofobica (I) con una idrofilica (S) alla posizione 84 porta alla perdita di due contatti significativi tra il residuo I84 e due residui idrofobici presenti nella controparte dell'RBP. È interessante l'osservazione che, negli individui che presentano la mutazione amiloidogenica I84S della TTR, la concentrazione plasmatica dell'RBP è notevolmente più bassa se confrontata con quella di individui normali (Waits et al. 1995). La diminuzione della RBP plasmatica è attribuibile alla perdita dell'RBP circolante, causata dall'assenza di affinità per la TTR mutante I84S, mediante filtrazione glomerulare. Si ritiene che non vi sia nessuna relazione tra le amiloidosi e l'alterazione dell'interazione della TTR con l'RBP. Infatti, in generale, né l'interazione della TTR con l'RBP (Berni et al. 1994; Zanotti et al. 2008), né la concentrazione nel plasma della RBP (Waits et al. 1995) sono significativamente influenzate da diverse mutazioni amiloidogeniche nella TTR, ad eccezione della mutazione I84S, come sopra riportato.

1.4 Polifenoli

Si è visto finora come la dissociazione della proteina tetramericata transtiretina in monomeri e l'aggregazione patologica dei monomeri in fibrille rappresentano passaggi cruciali nelle amiloidosi da TTR. Piccoli composti organici di sintesi interagiscono specificamente con i siti di legame della tiroxina della TTR, stabilizzandone lo stato tetramericato nativo e conseguentemente inibendo la fibrillogenesi *in vitro*. Alcuni fra i polifenoli naturali possiedono una struttura molecolare idonea al legame con la TTR, in riferimento alle formule di struttura ipotizzate essere adatte per il "binding" e alla conseguente

stabilizzazione dello stato nativo della transtiretina, secondo quanto affermato da (Johnson et al. 2005).

I polifenoli costituiscono una famiglia di circa 5000 molecole organiche naturali, largamente presenti nel regno vegetale. Sono caratterizzati, come indica il nome, dalla presenza di molteplici gruppi fenolici associati in strutture più o meno complesse generalmente di alto peso molecolare. Il numero e le caratteristiche di tali strutture fenoliche sottolineano le uniche proprietà fisiche, chimiche, e biologiche (metaboliche, tossiche, terapeutiche, ecc) di membri particolari della classe di polifenoli. Questi composti sono spesso il prodotto del metabolismo secondario delle piante.

I polifenoli sono i composti più abbondanti antiossidanti nella dieta. La loro assunzione alimentare totale potrebbe essere alta come 1 g/giorno, superiore a quella di tutte le altre classi di composti fitochimici antiossidanti dietetici conosciuti. In particolare, questo dosaggio è 10 volte superiore rispetto quello della vitamina C e 100 volte superiore a quello della vitamina E e dei carotenoidi. Le loro principali fonti alimentari sono frutta, bevande di origine vegetale come succhi di frutta, tè, caffè e vino rosso, nonché ortaggi, cereali, cioccolato, frutta secca e legumi. Nonostante la loro ampia distribuzione nelle piante, gli effetti sulla salute dei polifenoli naturali hanno attirato l'attenzione dei nutrizionisti solo piuttosto recentemente. Infatti, fino alla metà degli anni '90, i più studiati antiossidanti erano le vitamine ed i carotenoidi. La ricerca su flavonoidi e altri polifenoli, sulle loro proprietà antiossidanti, e sui loro effetti nella prevenzione delle malattie ha avuto inizio solo dopo il 1995 (Figura 10). Prima di tale data, i flavonoidi erano appena accennati nei libri di testo sugli antiossidanti.

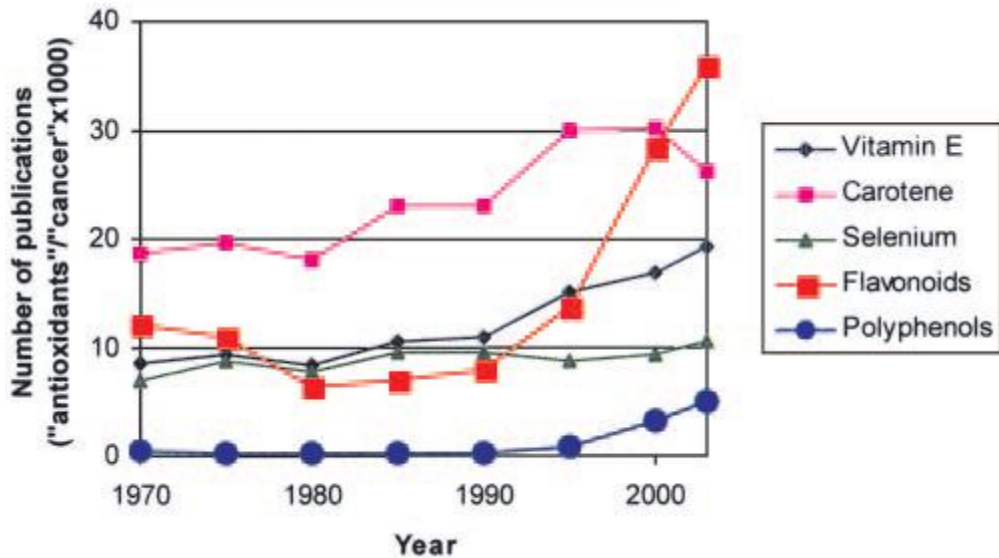


Figura 10. Aumento del numero di pubblicazioni riguardanti vari antiossidanti negli ultimi 30 anni.
 Queste pubblicazioni sono state quelle registrate nella banca dati Medline. (A.Scalbert et al. 2005)

Il fattore principale che ha ritardato la ricerca sui polifenoli è la notevole diversità e la complessità della loro struttura chimica. L'evidenza attuale rafforza la nozione del contributo dei polifenoli nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, tumori e osteoporosi e suggerisce un loro ruolo nella prevenzione di malattie neurodegenerative e del diabete mellito (Scalbert et al. 2005).

Gran parte delle osservazioni sulla prevenzione delle malattie, da parte dei polifenoli, sono derivate da esperimenti in vitro o su animali, che sono spesso eseguiti con dosi più elevate rispetto a quelle a cui l'uomo è esposto attraverso la dieta. In particolare, si è trovato che i polifenoli migliorano chiaramente lo stato dei diversi biomarcatori di stress ossidativo (Williamson et al. 2005).

Molta incertezza persiste, tuttavia, sia per quanto riguarda la rilevanza di questi biomarcatori come predittori di rischio di malattia che per quanto riguarda l'adeguatezza dei diversi metodi utilizzati (Collins et al. 2005). Notevoli progressi sono stati compiuti nel campo delle malattie cardiovascolari, ed oggi si sa che alcuni polifenoli, somministrati come

integratori o con il cibo, migliorano lo stato di salute, come indicato da vari biomarcatori strettamente associati a rischio cardiovascolare (Vita et al. 2005; Keen et al. 2005; Sies et al. 2005). Studi epidemiologici tendono a confermare gli effetti protettivi del consumo di polifenoli contro le malattie cardiovascolari (Arts et al. 2005) .

Una delle maggiori difficoltà di chiarire gli effetti sulla salute di polifenoli è il gran numero di composti fenolici presenti negli alimenti. I composti attivi potrebbero non essere i polifenoli nativi presenti negli alimenti, che sono più spesso testati ma con più probabilità potrebbe trattarsi dei loro metaboliti. Molto poco attualmente si sa per quanto riguarda le attività biologiche di questi coniugati metabolici. Ad esempio, i glucuronidi di isoflavoni ed epicatechina hanno mostrato avere un'attività estrogenica molto più debole rispetto ai relativi agliconi e questi risultati suggeriscono che molti studi in vitro pubblicati finora, devono essere rivalutati alla luce delle nuove conoscenze sulla biodisponibilità dei polifenoli. Per molti anni, è stato attribuito ai polifenoli ed altri antiossidanti il ruolo di *scavenging* di radicali liberi per proteggere i costituenti cellulari dal danno ossidativo. Tuttavia, questo concetto ora sembra essere una visione semplicistica del loro meccanismo di azione. Più probabilmente, le cellule rispondono ai polifenoli principalmente attraverso interazioni dirette con i recettori o enzimi coinvolti nella trasduzione del segnale, che può comportare la modifica dello stato redox della cellula e può innescare una serie di reazioni redox -dipendenti (Halliwell et al 2005S; Forman et al. 2002) . Sono stati descritti entrambi gli effetti antiossidanti e pro-ossidanti dei polifenoli con effetti contrastanti sui processi fisiologici cellulari.

Come antiossidanti, i polifenoli possono migliorare la sopravvivenza delle cellule, come proossidanti, possono indurre apoptosi e prevenire lo sviluppo del tumore. Tuttavia, gli effetti biologici dei polifenoli possono estendersi ben oltre la modulazione dello stress ossidativo. Uno degli esempi più noti comporta l'interazione di isoflavoni di soia con i recettori degli estrogeni e gli effetti di questi composti sulla funzione endocrina. Questi effetti potrebbero spiegare la prevenzione da parte degli isoflavoni sul riassorbimento osseo in donne post-

menopausa (Morabito et al. 2002). Una comprensione dettagliata degli eventi molecolari alla base di questi diversi effetti biologici è essenziale per la valutazione dell'impatto complessivo di questi composti naturali sul rischio delle malattie e la loro progressione. L'evidenza attuale degli effetti protettivi dei polifenoli contro le malattie ha generato nuove aspettative di miglioramento della salute, con grande interesse verso il cibo e gli integratori alimentari. Tuttavia, sono necessarie ulteriori integrazioni rispetto ai risultati ottenuti fino ad oggi tramite indagini multidisciplinari che comprendono biochimica, biologia cellulare, fisiologia, fisiopatologia, epidemiologia e chimica degli alimenti, discipline necessarie per identificare i polifenoli più efficaci, per determinarne i livelli ottimali di assunzione, e per ottenere effetti benefici sulla salute (Scalbert et al. 2005).

1.4.1 Flavonoidi

I flavonoidi, pigmenti delle piante sintetizzati a partire dalla fenilalanina, costituiscono il gruppo più comune di polifenoli vegetali e la maggior parte di essi è responsabile del sapore e del colore di frutta e verdura. Ad oggi sono state descritte più di 5000 diverse molecole di flavonoidi. Le sei principali sottoclassi di flavonoidi includono flavonoli, flavononi, flavoni, flavanoli, flavan-3-oli e isoflavoni secondo le posizioni dei sostituti presenti sulla molecola madre (tabella 2). Molti di questi composti si ritrovano in frutta, verdura e bevande (tè, caffè, birra, vino e bevande di frutta). I flavonoidi hanno suscitato un notevole interesse di recente a causa dei loro potenziali effetti benefici sulla salute umana. Essi sono stati riconosciuti per avere un effetto antivirale, antiallergico, antiaggregante, antinfiammatorio, antitumorale ed attività antiossidante. Alcuni studi hanno dimostrato anche la correlazione fra consumo di flavonoidi ed effetto protettivo sulle malattie cardiovascolari ed il cancro. I flavonoidi sono polifenoli bioattivi di basso peso molecolare che giocano un ruolo chiave nella fotosintesi delle cellule. Le prime ricerche sui flavonoidi ebbero inizio nel 1936, quando uno scienziato ungherese "Albert Szent Gyorgi" scoprì una sinergia tra la vitamina C e co-fattori delle

bucce di limoni non ancora identificati, che dapprima chiamò "Citrin", e solo più tardi, "vitamina P". I flavonoidi sono molecole polifenoliche solubili in acqua contenenti 15 atomi di carbonio, composti da due anelli benzenici uniti insieme da un linker e da un terzo anello centrale che contiene un ponti di ossigeno (Beenu et al. 2012).

| Flavonoid subclass | Prominent food flavonoids | Food sources |
|--------------------|--|---|
| Flavan-3-ols | (+)-Catechin, (+)-gallo catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate | Black and green teas, red wine, cocoa products |
| Flavanones | Eriodictyol, hesperetin, naringenin | Oranges, grapefruits, citrus fruits |
| Flavones | Apigenin, luteolin | Green leafy vegetables, spices and herbs |
| Isoflavones | Daidzein, genistein, glycitein, biochanin A, formononetin | Soybeans, tofu, soy products, miso, legumes |
| Flavonols | Isorhamnetin, kaempferol, myricetin, quercetin | Apples, onions, kale, leeks, broccoli |
| Anthocyanins | Cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, petunidin, peonidin | Strawberries, blueberries, cranberries, blackcurrants |

Tabella 2. Sottoclassi dei Flavonoidi e loro fonti alimentari (Toh et al. 2013)

Apigenina.

L'apigenina (Figura 11) è un flavone presente nelle foglie di sedano e prezzemolo ed è l'aglicone di numerosi glicosidi naturali, come la roifolina e l'isovitexina. Un'altra buona fonte naturale è costituita dalle foglie di camomilla, di cui costituisce il maggior principio attivo responsabile delle sue proprietà spasmolitiche. Si presenta come un solido cristallino giallo. L'apigenina è un potente inibitore dell'isoforma CYP2C9 del citocromo P450, (Dayong et al 2009) responsabile del metabolismo di molti farmaci. Nell'ultimo decennio, inoltre, è stato scoperto come l'apigenina possa condizionare l'attività di altri enzimi:

- la 5'-nucleotidasi, che idrolizzando l'AMP genera adenosina, modulatore endogeno pleiotropico.

- l'aromatasi, enzima umano responsabile della sintesi degli estrogeni (ormoni femminili);
- possiede inoltre effetto inibitorio sulla fosfolipasi A2, enzima che scinde i lipidi di membrana per generare precursori di mediatori dell'infiammazione come le prostaglandine;
- è anche provata l'azione inibitoria dell'apigenina su certe protein-chinasi della famiglia delle tirosine chinasi come il recettore del PDGF, coinvolte nella proliferazione cellulare e nella genesi di certi tumori;
- assieme al caempferolo (un altro flavonoide), è un naturale inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina (Angiotensin Converting Enzyme o ACE), bersaglio dei cosiddetti farmaci ACE-inibitori usati nella terapia corrente dell'ipertensione arteriosa;
- al pari del flavonoide crisina è capace di interferire con l'attività enzimatica dell'isoforma 1 dell'adenilato ciclasi.

Quali di questi enzimi una volta modulati sia responsabile della sua nota attività spasmolitica intestinale non è noto. È sicuro tuttavia che la sua azione sull'aromatasi, sulle tirosina chinasi e sulla fosfolipasi A2, si correla bene con le sue proprietà di interferenza sulle cellule tumorali in coltura, come riportato dalla letteratura scientifica (Dayong et al 2009).

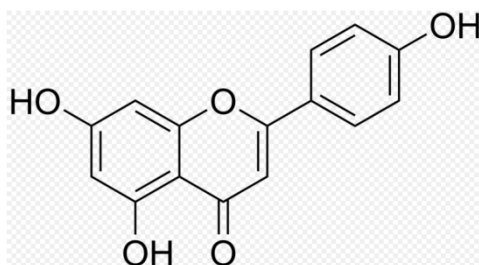


Figura 11. Formula di struttura dell'apigenina.

Genisteina e Daidzeina.

La Genisteina e la Daidzeina appartengono alla sottoclasse degli isoflavoni. A differenza di molti altri flavonoidi la struttura degli isoflavoni risiede nel legame in posizione 3 anziché 2 dell'anello B sull'anello C (Figura 12).

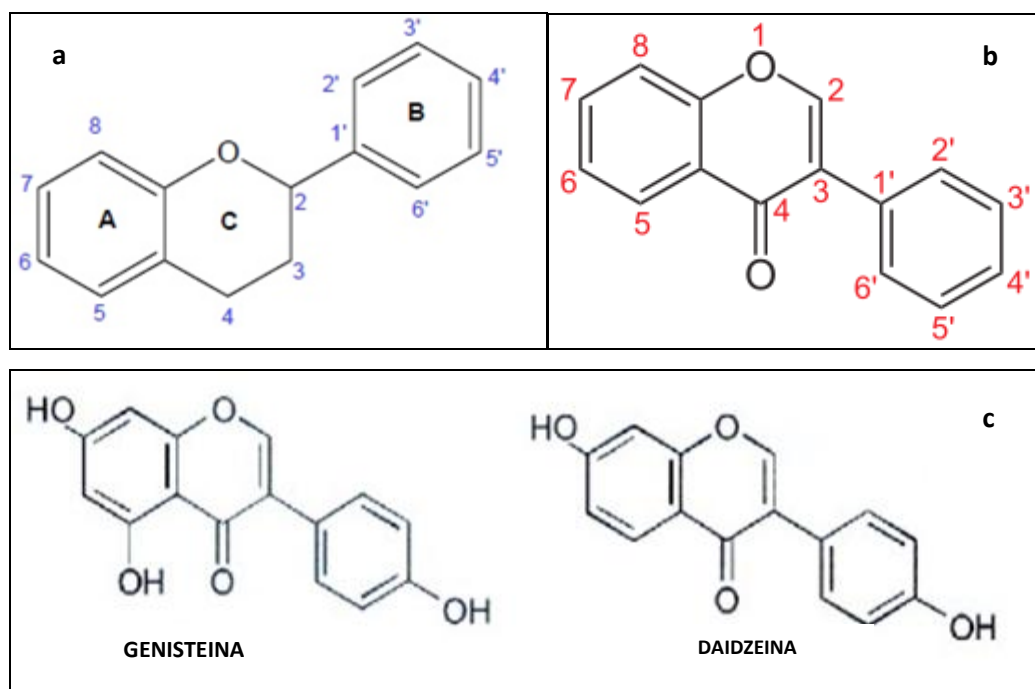


Figura 12. Formule di struttura Flavonoidi.

a.Struttura molecolare generica della classe dei Flavonoidi. b.Struttura molecolare generica della sottoclasse degli Isoflavoni

c.Struttura molecolare della Genisteina (a sinistra) e della Daidzeina (a destra).

Gli isoflavoni hanno una limitata distribuzione nel regno vegetale in particolare abbondano solo in specie leguminose. Questi composti, sono noti per la loro attività estrogenica e proprio per la loro capacità di legarsi ai recettori per gli estrogeni hanno ricevuto molta attenzione in quanto hanno manifestato un ruolo putativo nella prevenzione del cancro al seno e dell'osteoporosi (Barnes at al. 2003). Sul territorio mondiale, la soia (*Glycine max*)

rappresenta quasi l'unica fonte alimentare degli isoflavoni Genisteina e Daidzeina, sebbene a bassa livelli siano presenti anche nei fagioli neri (*Phaseolus vulgaris*) e nei Piselli verdi (*Pisum sativum*). Nelle piante gli isoflavoni sono presenti prevalentemente come glucosidi β (genistina, daidzina), o come acetil - β -glucosidi e malonil - β - glucosidi, composti pertanto polari e quindi solubili in acqua. Questa classe di composti è anche sottoposta a varie modifiche chimiche, come metilazione, idrossilazione, o polimerizzazione che portano alla formazione di isoflavonoidi semplici come: isoflavanoni, isoflavani e isoflavanoli, così come a strutture complesse tra cui: rotenoidi, pterocarpani e cumestani (Beenu et al. 2012).

Le principali fonti alimentari degli isoflavoni sono i prodotti a base di soia. Ad esempio, un grammo di patate di soia liofilizzate contiene circa 800 μg di daidzeina e oltre 500 μ di genisteina (principalmente come glicosidi), mentre un grammo di proteine di soia presentano un contenuto di circa 150 μg di daidzeina e 250 μg di genistein. I prodotti di soia trasformati come il miso e la salsa di soia contengono livelli più bassi di genisteina del tofu, la principale fonte di isoflavoni nella dieta asiatica. Nell'uomo con una dieta ricca di soia i livelli di isoflavoni ingeriti possono essere molto elevati, come determinato dall' escrezione urinaria. Infatti i livelli di equolo (intermedio metabolico degli isoflavoni) urinario può essere di circa 100 volte superiore a quello osservato negli adulti che consumano pochi prodotti a base di soia con la dieta. Un elevato consumo alimentare di genisteina e daidzeina sono stati ricollegati ad una serie di potenzialità benefiche per la salute umana (Dixon et al. 2002). Le maggiori potenzialità studiate sono riassunte nella figura 13.

Inoltre questi due isoflavoni sono stati valutati in studi preliminari per il trattamento di amiloidosi da transtiretina (Green et al. 2005).

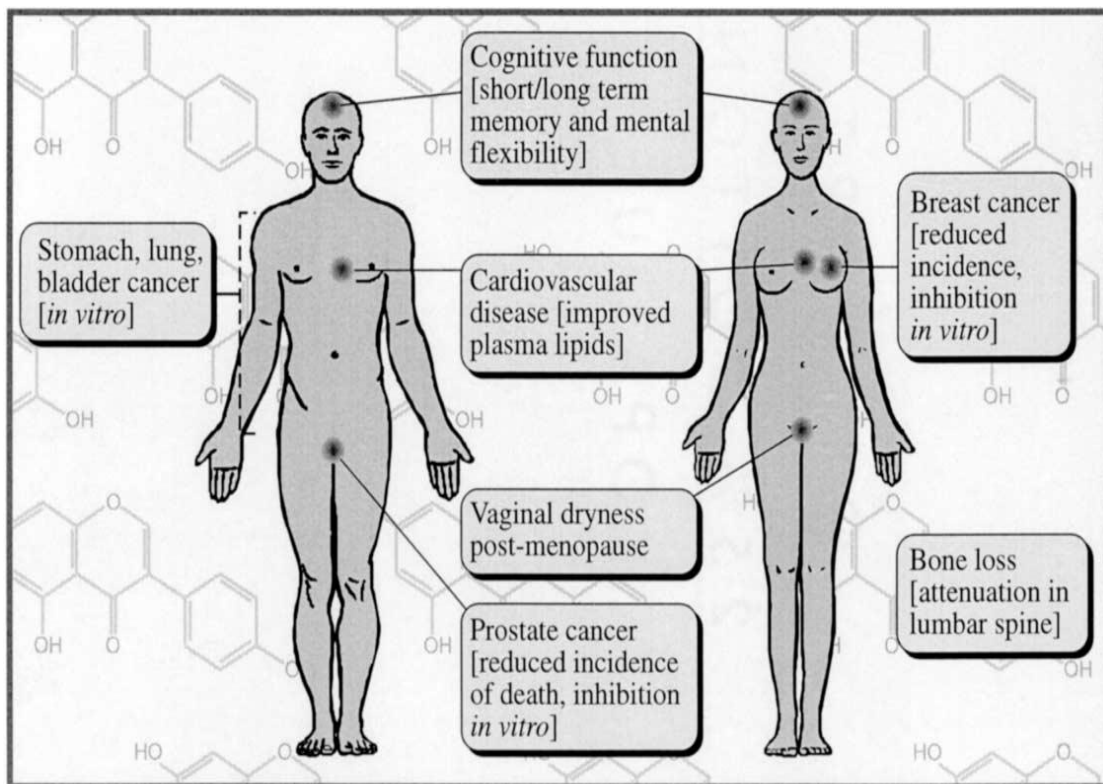


Figura 13. Effetti benefici derivanti da una dieta ricca di soia. (Dixon et al. 2002).

1.4.2 Stilbenoidi

Il termine " stilbenoidi " è stato proposto da Gorham nel 1980. Questo si riferisce ad un classe di polifenoli vegetali con un nucleo di 1,2- difeniletilene o 1,2- difeniletano nella loro struttura (Shen et al. 2013). A seconda delle loro caratteristiche strutturali gli stilbenoidi sono principalmente divisi in cinque categorie: stilbeni, oligostilbeni, bibenzili, bisbibenzili e fenantreni.

Gli stilbeni sono composti naturali prodotti da diverse famiglie di piante come *Pinaceae*, *Mirtaceae*, *Fagaceae*, *lilliacae*, *Moraceae*, *Papilionaceae* e *Vitaceae*. All'interno della

famiglia delle Vitaceae esistono molte specie in grado di produrre questi composti tra cui *Vitis vinifera L.*

Questa classe di composti fenolici presentano un basso peso molecolare e sono presenti nei tessuti legnosi della pianta come prodotti costitutivi e nei tessuti carnosi come prodotti in risposta a stress di tipo abiotico e biotico. Questa proprietà ha permesso di includere gli stilbenoidi in una classe di antibiotici di origine vegetale denominati *fitoalessine*. Le molecole responsabili della sintesi delle fitoalessine sono chiamate *elicitori*. Gli elicitori possono essere agenti abiotici o biotici; mentre quest'ultimi sono direttamente coinvolti nell'interazione ospite-patogeno, i primi funzionano attivando gli elicitori biotici che sono normalmente inattivi quando la pianta non è infettata (Pazzi F. 2003.)

Ad oggi si conoscono più di 1.000 composti appartenenti alla classe degli stilbenoidi. Recenti progressi nelle tecniche analitiche e spettroscopiche, in particolare i metodi NMR, hanno permesso di accelerare la scoperta e di definire le strutture molecolari degli stilbenoidi (Fig.14).

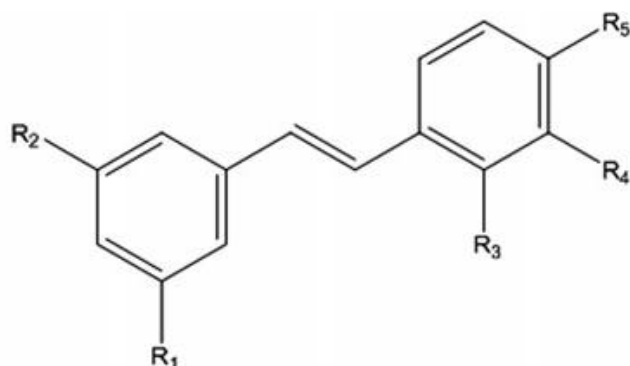


Fig.14 Struttura molecolare dei principali stilbeni

| Compound Name | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | R ⁵ |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Resveratrol | OH | OH | H | H | OH |
| Piceid | OGlc | OH | H | H | OH |
| Piceatannol | OH | OH | H | OH | OH |
| Resveratrolside | OH | OH | H | H | OGlc |
| Pterostilbene | OMe | OMe | H | H | OH |
| Oxyresveratrol | OH | OH | OH | H | OH |
| Gob C | OH | OH | H | H | OGlc |
| Gob D | OH | OH | H | OMe | OGlc |

A seconda delle loro caratteristiche strutturali gli stilbenoidi sono principalmente divisi in cinque categorie: stilbeni, oligostilbeni, bibenzili, bisbibenzili e fenantreni.

L'impulso per i numerosi studi di ricerca volti alla caratterizzazione chimica degli stilbenoidi nasce dalle loro promettenti e molteplici attività biologiche con particolare riferimento a quelle del Resveratrolo.

Il ruolo biologico del resveratrolo, e dei suoi derivati, include la prevenzione o l'azione diretta su numerosi processi degenerativi quali malattie neurodegenerative, azione antitumorale, antimicrobica, effetti antiossidanti, aggregazione antiaggregante, citotossicità e molte altre (Tao Shen et al. 2013). Alcune di queste proprietà sono sotto descritte.

Attività Antitumorale

Il Resveratrolo, come composto rappresentativo degli stilbeni, possiede una diversificata attività farmacologica. L'ipotesi che questo composto potesse avere proprietà antitumorali è nata da uno studio condotto sui topi per la valutazione del suo effetto preventivo sul cancro della pelle (Tao Shen et al. 2013). Successivamente sono stati condotti molti esperimenti in vivo sull'uomo per valutare gli effetti terapeutici degli stilbeni sui tumori ed i risultati dimostrano che il resveratrolo sicuramente è in grado di inibire, o comunque possiede funzioni chemio preventive sui tumori differenti, compreso il cancro al seno, cancro al fegato, cancro gastrico, cancro colonrettale, cancro alla prostata, leucemia, cancro del polmone, neuroblastoma. (Vang et al. 2011).

Attività antiossidante.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) come il superossido, il perossido di idrogeno ed i radicali idrossilici, generati come sottoprodotto naturale del metabolismo dell'ossigeno, possono creare un danno ossidativo mediante interazione con biomolecole.

Ad esempio è frequentemente associato allo stress ossidativo un ruolo di iniziatore della serie di reazioni a cascata nei processi d'infiammazione.

Inoltre, il perossido di idrogeno nonostante possa controllare e stimolare, se presente in basse concentrazioni, la proliferazione cellulare; in concentrazioni più elevate può determinare apoptosi ed in quantità molto elevate può portare alla necrosi. Finora, è ben documentato il ruolo dei ROS nel danneggiamento e nella morte cellulare, coinvolgendo una vasta gamma di alterazioni degenerative ad esempio cancerogenesi, invecchiamento e malattie correlate allo stress ossidativo (OSRDs). Il Resveratrolo, gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, le statine, il nebivololo ed il carvedilolo, il tetranitrato di pentaeritrite, gli antiossidanti mitocondriali e farmaci di origine vegetale (da soli o in combinazione) sono i mezzi potenziali che possono essere utilizzati per controllare le OSRD (Soodabeh et al. 2013).

Attività antimicrobica.

Le proprietà antimicrobiche di diverse sostanze associate al regno vegetale, come i flavonoidi, i tannini, e gli oli essenziali hanno ricevuto molta attenzione nel corso degli ultimi anni come potenziali conservanti, disinfettanti e agenti terapeutici (Mattson et al. 2011). Una delle sostanze maggiormente studiate in questi anni è l' (E) -resveratrolo (3,4',5 - triidrossistilbene), un composto presente prevalentemente nell'uva rossa e nei frutti di bosco (Lyons et al. 2003). Esso ha sia proprietà antifungine che antibatteriche, per questo motivo è stato suggerito come antimicrobico (Montero et al. 2003).

Sono state riportate in letteratura, inoltre, le attività antimicrobiche e citotossiche dell' (E)-pinosylvin (3,5- dihydroxystilbene, PS), uno stilbene naturale derivante dal resveratrolo, presente in particolare nel tronco degli alberi della famiglia Pinus (Välilmaa et al. 2007). L' PS risulta essere attivo contro batteri sia Gram - negativi (Salmonella, Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens) che Gram - positivi come il Bacillus cereus, Listeria monocytogenes e Staphylococcus aureus (Carne Plumed-Ferrer et al. 2013).

Stilbenoidi e malattie neurodegenerative

In seguito all'allungamento della vita media, le malattie neurodegenerative coinvolgono una sempre crescente percentuale della popolazione. Questi disturbi, che derivano dal deterioramento dei neuroni, sono classificati in due classi patologiche: disturbi del movimento identificati con il morbo di Parkinson (PD), deterioramento cognitivo e demenza rappresentati ad esempio dalla malattia più nota come morbo di Alzheimer (AD).

AD è il tipo più comune delle malattie neurodegenerative, rappresenta il 65 % di tutte le demenze, con una prevalenza stimata tra 1 e il 5 % tra le persone di età pari a 65 anni e più anziane (Ritchie et al. 2002).

Le valutazioni istopatologiche rivelano che una delle principali caratteristiche di AD è l'eccessivo accumulo

di due tipi di proteine: proteina tau ed il peptide β -amiloide (β A).

β A deriva da tagli proteolitici della proteina transmembrana amiloide precursore (APP) (Selkoe et al. 2001), un accumulo di β A porta alla formazione di placche, depositi di amiloidi ed ammassi neurofibrillari che promuovono l'infiammazione ed attivano percorsi neurotossici, portando alla disfunzione ed alla morte delle cellule cerebrali (Pereira *et al.* 2005).

Recentemente, numerosi studi hanno dimostrato che una vasta gamma di polifenoli hanno effetti neuro protettivi sia in vitro che in vivo. Tra questi polifenoli, il resveratrolo e molti dei suoi derivati hanno dimostrato le più promettenti attività anti-neurodegenerative (Riviere et al. 2010; Riviere et al. 2009; Ono et al. 2003; Tristan et al. 2011).

1.5 Metabolismo dei polifenoli

I Polifenoli alimentari, come si è visto in precedenza, sono presenti nella frutta, nella verdura, e nelle erbe aromatiche. Le assunzioni giornaliere dei polifenoli sono diverse nella popolazione mondiale. Ad esempio, nel nord-est asiatico nei paesi come la Cina ed il Giappone, la principale fonte di polifenoli è rappresentata dagli isoflavoni presenti nella soia insieme ad altri flavonoidi derivanti dal tè. Nei paesi del sud-est asiatico come l' India, vengono assunte notevoli quantità di curcumina grazie all'ingestione di curcuma. Nei paesi europei, invece, si introducono con la dieta molti lignani a seguito del consumo di crusca, cereali o di olio di semi di lino. La maggioranza della popolazione, quindi, si potrebbe dire che assuma sufficienti quantità di polifenoli alimentari godendo presumibilmente dei loro effetti benefici. Effettivamente, grazie alle ricerche scientifiche effettuate in quest'ultima decade sui polifenoli naturali ed il loro effetto sulla prevenzione sul cancro, invecchiamento della pelle e malattie cardiovascolari, è aumentato drasticamente il consumo di nutraceutici. Tuttavia, i composti polifenolici sono noti per la loro scarsa biodisponibilità. Questo concetto è di estrema importanza dal momento che finora sono stati condotti studi soprattutto sugli agliconi (cioè le molecole dei polifenoli tal quali) determinandone le loro attività già discusse precedentemente, mentre solo pochi studi sono stati effettuati sui loro metaboliti per constatare la conservazione delle peculiarità di tali composti (Ming Hu 2007).

Si è posta quindi la seguente questione sulla base degli studi scientifici condotti finora: questi polifenoli sono efficaci come si crede, oppure la loro bassa biodisponibilità ne condiziona drasticamente l'azione *in vivo* ?

Per far sì che i polifenoli diventino maggiormente biodisponibili, dovrebbero essere superate le seguenti barriere: solubilità, permeabilità attraverso le membrane biologiche, metabolismo, escrezione, assorbimento tissutale e disponibilità (Fig. 16).

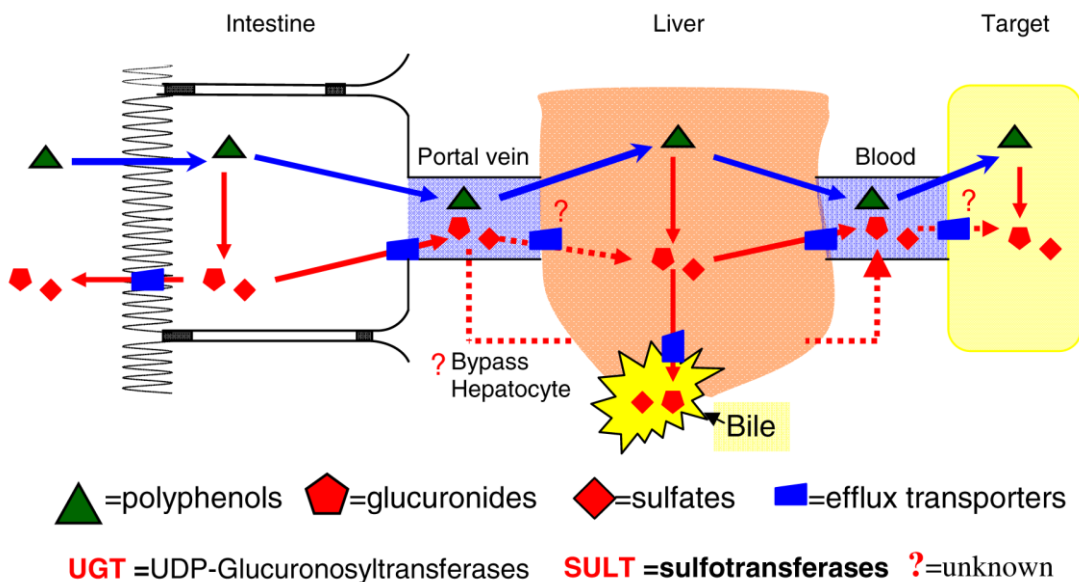


Figura 16. Barriere d'organo alla biodisponibilità dei polifenoli (Ming Hu et al. 2007)

Se si considerano i polifenoli idrofili, che sono tipicamente glicosidati, questi sono troppo polari oppure possono essere troppo grandi per penetrare rapidamente attraverso la mucosa intestinale (Liu et al. 2002). Tuttavia questi glicosidi subiscono spesso l'azione di enzimi intestinali o più probabilmente l'azione della microflora che permette il rilascio dello zucchero rendendo così i polifenoli disponibili come agliconi e quindi maggiormente assorbibili (Liu et al. 2003). Gli agliconi sono altamente permeabili nelle cellule Caco -2 e nei modelli di perfusione intestinale del ratto e sono presumibilmente rapidamente assorbiti (Chen et al. 2005). Tuttavia, la biodisponibilità non è alta perché le forme agliconiche hanno

una scarsa solubilità, spesso meno di 20 µg/ml in acqua. Questa bassa solubilità può provocare tassi di dissoluzione lenti, che possono rallentare l'assorbimento. Inoltre, prima del passaggio nel flusso sanguigno, gli agliconi sono soggetti al metabolismo di fase II dando origine a solfati, glucuronidi, e / o metaboliti metilati attraverso l'azione rispettivamente delle sulfotransferasi (ST), uridina - 5' - difosfato glucuroniltransferasi (UGT), e catetol - O- metiltransferasi (COMTs). Durante questa fase c'è anche un rientro di alcuni metaboliti nel lume dell'intestino tenue, in cui si pensa siano coinvolti i membri della famiglia di trasportatori "ATP - binding cassette" (ABC), tra cui la "multidrug resistance protein" (MRP) e la glicoproteina-P. Il trasportatore del glucosio GLUT2 e le proteine MRP - 3 sono coinvolte nell'efflusso di metaboliti dalla membrana basolaterale degli enterociti (Manzano et al. 2010). Una volta nel circolo portale, metaboliti raggiungono rapidamente il fegato, dove possono essere sottoposti ad ulteriore metabolismo di fase II, e, concomitantemente, grazie al circolo enteroepatico ed escrezione biliare si può avere il rientro di alcuni composti nel piccolo intestino (Donovan et al. 2006).

L'analisi del fluido ileale raccolto dagli ileostomi dopo l'ingestione di vari alimenti ha dimostrato che anche quando i polifenoli sono assorbiti nel tratto gastro intestinale (GIT) prossimale, sostanziali quantità riescono comunque a passare dal piccolo al grande intestino dove i microbioti del colon idrolizzano i composti coniugati, e gli agliconi risultanti subiscono la rottura enzimatica degli anelli aromatici che porta alla produzione di molecole più piccole, compresi gli acidi fenolici e idrossicinnammici. Questi possono essere assorbiti e sottoposti al metabolismo nel fegato prima di essere escreti nelle urine in quantità che, nella maggior parte dei casi, sono ben superiori ai metaboliti che entrano nel sistema circolatorio attraverso l'intestino tenue (Del Rio et al. 2012).

Dal momento che gli agliconi sono assorbiti rapidamente come coniugati glucuronidati attraverso UGT e ST,

nell'intestino e nel fegato è estremamente necessario condurre studi più mirati per determinare le attività di questi coniugati di fase II.

2 Scopo della ricerca

La dissociazione della proteina tetramericata transtiretina in monomeri e l'aggregazione patologica dei monomeri in fibrille rappresentano passaggi cruciali nelle amiloidosi da TTR. Piccole molecole organiche di sintesi interagiscono specificamente con i siti di legame della tiroxina della TTR, stabilizzandone lo stato tetramericato nativo e conseguentemente inibendo la fibrillogenesi *in vitro* e presumibilmente anche *in vivo*. Tra queste molecole, alcuni polifenoli naturali sono stati testati *in vitro* per il loro legame alla TTR e per la loro capacità di stabilizzare lo stato tetramericato della transtiretina e di inibire la formazione di fibrille amiloidi (Klabunde et al., 2000; Green et al. 2005; Trivella et al. 2010; Trivella et al. 2012.) Nonostante questi composti naturali mostrino caratteristiche promettenti come potenziali agenti terapeutici, la loro biodisponibilità è molto scarsa e nel plasma possono raggiungere concentrazioni più basse di quelle testate per verificarne l'attività biologica *in vitro*.

Infatti, i polifenoli sono presenti nelle fonti alimentari come agliconi o derivati O- glucosidici che vengono ridotti, dalle attività delle glucosidasi prima dell'assorbimento intestinale, nelle forme di aglicone più assorbibili; gli agliconi assorbiti vengono poi rapidamente modificati per ottenere derivati glucuronidati, solfati e metilati che sono i principali metaboliti ritrovabili nel plasma.

Ad oggi solo pochi studi hanno tentato di verificare l'attività biologica di questi derivati metabolici.

Lo scopo di questa indagine è confrontare la capacità di legame e dell'effetto stabilizzante, sulla TTR wt e sul suo mutante I84S, di flavonoidi naturali come Apigenina, Genisteina, Daidzeina con quello dei metaboliti 7-glucuronidati di Genisteina e Daidzeina, nonché degli stilbeni Resveratrolo, Pterostilbene, Piceatannolo, Trimetossi-Resveratrolo con quello dei principali metaboliti del Resveratrolo: Resveratrolo - 3- Solfato, Resveratrolo - 3- Glucuronide, Resveratrolo - 4'- Glucuronide.

Questi derivati metabolici, piuttosto che i composti naturali iniziali, potrebbero quindi svolgere un ruolo protettivo nelle amiloidosi da TTR. Inoltre, composti di sintesi

corrispondenti a questi composti, qualora svolgessero un ruolo protettivo, potrebbero essere usati per la terapia farmacologica delle amiloidosi da TTR.

3. Materiali e metodi

3.1 Reagenti e soluzioni

- **IPTG** (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside), Inalco S.p.a
- **Tampone di lisi** (NaH_2PO_4 50 mM, pH 8, NaCl 0.3 M, β mercaptoetanol 1mM, Glicerolo 10%, inibitori delle proteasi: pepstatina 1 μ M, leupeptina 1 μ M, PMSF 100 μ M)
- **PBS buffer** (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 2 mM), pH 7.4.
- **Apigenina, Genisteina, Daidzeina, Resveratrolo, Piceatannolo, Pterostilbene, Trimetossiresveratrolo**, Sigma Aldrich. Le polveri sono state sciolte in una soluzione di DMSO 99.5%. Solo il Resveratrolo è stato sciolto in etanolo al 96%.
- **Genisteina 7-glucuronide, Daidzeina 7-glucuronide, Resveratrolo -3- solfato; Resveratrolo-3-glucuronide; Resveratrolo-4'- glucuronide**, ci sono stati gentilmente forniti dal prof. D. Del Rio (Università di Parma, Dipartimento di Scienze degli Alimenti).
- **T4**, Sigma Aldrich (L-thyroxine). La T4 viene sciolta in NaOH 10 mM.
- **T4 marcata** , Perkin Elmer (Thyroxine, ([125I]-T4)

3.2 Espressione della proteina mutante hTTR I84S

La proteina che si vuole esprimere e, successivamente, purificare è il mutante della transtiretina umana I84S coinvolto nella patogenesi della polineuropatia amiloidotica familiare (FAP). Per l'espressione viene usato il ceppo di *E. coli* BL21cp (codon plus), grazie al quale si possono esprimere efficientemente proteine eterologhe. La produzione efficiente di proteine eterologhe in *E. coli*, infatti, è spesso limitata dalla rarità di alcuni tRNA che sono abbondanti nell'organismo da cui si origina la proteina. Le cellule di *E. coli* BL21cp sono

ingegnerizzate in modo da possedere più copie dei geni che codificano per i tRNA che frequentemente limitano la traduzione delle proteine eterologhe in *E. coli*, localizzati su un plasmidio che possiede la resistenza all'antibiotico cloramfenicolo. Questo ceppo è stato trasformato in precedenza nel nostro laboratorio, con il vettore PET11b contenente l'insero codificante la proteina hTTR I84S.

3.3 Crescita ed induzione

Si inocula una singola colonia batterica in 100 ml di terreno LB contenente ampicillina (0.1 mg/mL) e cloramfenicolo (0.034 mg/mL). La coltura viene mantenuta a 37°C per tutta la notte in vigorosa agitazione, (preparazione del "pre-inoculo").

Dal pre-inoculo vengono prelevati 25 ml ed aggiunti ad ogni litro di terreno LB, sempre addizionata di ampicillina e cloramfenicolo. La crescita avviene a 37°C in continua agitazione fino ad ottenere un valore di assorbanza a 600 nm compreso tra 0.6 e 0.8 (fase esponenziale della curva di crescita batterica). Dopo aver prelevato 1 ml di non indotto da ogni crescita, si effettua l'induzione con IPTG (analogo del lattosio che porta all'espressione dei geni posti sotto il controllo dell'operone LAC in *E. coli*) a concentrazione finale 1 mM.

Trascorse le 4 ore di incubazione a 28°C, si preleva 1 ml da ogni beuta (campioni indotti) e, successivamente, si centrifuga a 7500 rpm per 15 minuti a 4°C. Le cellule vengono lavate con 20 ml di TE (Tris HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8) per ogni 100 ml di crescita batterica. Si risospende il pellet, si centrifuga per 15 minuti a 7500 rpm e si elimina il surnatante. L'avvenuta induzione della TTR si verifica mediante elettroforesi su gel di acrilamide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE).

3.4. Lisi cellulare

Per la lisi delle cellule si utilizzano 60 ml di tampone di lisi per ogni litro di terreno. Dopo aver centrifugato le cellule, queste ultime si risospendono nel suddetto tampone di lisi. La sospensione si sottopone a 20 cicli di sonicazione della durata di 30 secondi ciascuno, intervallati da un minuto di riposo in ghiaccio. Il lisato cellulare viene centrifugato a 7500 rpm per 15 minuti a 4°C. Si estrae il surnatante e si risospende il pellet in acqua distillata (con un volume pari al volume del tampone di lisi) per verificare successivamente la solubilità della proteina d'interesse.

3.5 Purificazione della proteina hTTR wt e mutante I84S

Il surnatante, dopo lisi cellulare, viene concentrato mediante ultrafiltrazione in cella Amicon (membrana con cut-off di 10000 Dalton). Il concentrato, ulteriormente centrifugato, viene purificato mediante tre step di cromatografia che coinvolgono:

1. Esclusione dimensionale
2. Scambio ionico
3. Interazione idrofobica

3.5.1 Cromatografia ad esclusione dimensionale su matrice AcA44 (gel filtrazione)

Nella cromatografia ad esclusione dimensionale la fase stazionaria è costituita da microsfere idratate di polimero poroso. Quando l'eluente (fase mobile) fluisce attraverso la

fase stazionaria, le proteine più piccole possono penetrare più o meno facilmente, a seconda delle loro dimensioni, nei pori delle microsferi della fase stazionaria, mentre quelle più grandi ne sono escluse. Più grande è la proteina, minore è la diffusibilità nei pori in cui essa può entrare e quindi minore è il percorso che compie attraversando la colonna e più rapida è la sua eluzione. Più una molecola proteica è piccola e maggiore è la sua diffusibilità nei pori, e più è lungo il percorso che compie e maggiore sarà il suo tempo di eluzione (o di ritenzione) (Fig.17).

È stata utilizzata la resina AcA44 (Ultrogel AcA 44, Pall Italia), volume della resina impaccata in colonna di 500 ml. Questa resina ha un range di separazione compreso tra 10000 e 100000 Dalton ed è equilibrata con il tampone Tris HCl 50 mM pH 7.5. Dopo aver caricato il campione, si effettua un'eluizione con il tampone Tris HCl 50 mM pH 7.5, con flusso di 0.2 ml/minuto, raccogliendo frazioni con volume di circa 5 ml. Il profilo di eluzione si segue determinando l'assorbanza a 260 e 280 nm, con scansione tra 250 nm e 320 nm. Le frazioni proteiche che mostrano un valore di assorbanza significativo, vengono esaminate mediante analisi SDS-PAGE. Dopo l'osservazione del gel, si decide quali frazioni riunire per poi proseguire con la successiva fase di purificazione cromatografica.

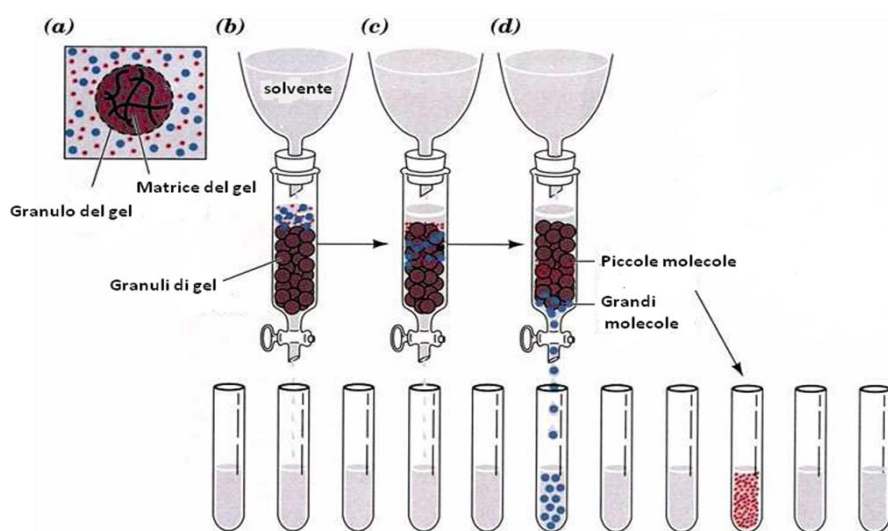


Figura 17. Modalità di purificazione per gel filtrazione

3.5.2 Cromatografia a scambio ionico su matrice Q-sefarosio

La cromatografia a scambio ionico (Figura 18), si basa su interazioni elettrostatiche tra gruppi con cariche opposte. Nel caso specifico della cromatografia a scambio ionico da noi usata, si stabiliscono forze attrattive tra le cariche negative superficiali della proteina e i gruppi carichi positivamente con cui è derivatizzata la matrice cromatografica. Le proteine che non presentano affinità per la matrice vengono rimosse nella fase di lavaggio della colonna, mentre quelle che mostrano affinità si adsorbono alla resina e vengono separate durante l'eluizione a gradiente crescente di forza ionica. Il tampone di eluizione contiene infatti un controione inorganico, ad esempio Na^+ o Cl^- a seconda che si tratti di cromatografia a scambio cationico o anionico rispettivamente, di carica opposta a quella dei gruppi con cui è derivatizzata la matrice cromatografica e che quindi si sostituisce ai legami proteina-resina quando la sua concentrazione è sufficientemente elevata. Generalmente le proteine presentano un diverso grado di affinità per la matrice, a seconda della composizione amminoacidica e, di conseguenza, della distribuzione delle cariche superficiali; questo dà origine a diversi tempi di eluizione per proteine differenti. Nel corso dell'eluizione si applica un gradiente crescente di forza ionica, aumentando gradualmente la concentrazione del controione (tampone A: TRIS HCl pH 7.5 20mM; tampone B: TRIS HCl pH 7.5 20mM NaCl 0.5 M), in modo tale da ottenere l'eluizione differenziata delle proteine. A bassa concentrazione del controione vengono rilasciate dalla matrice le proteine con minore affinità per essa, mentre per ottenere l'eluizione di proteine a maggiore affinità è necessario raggiungere concentrazioni più elevate di controione.

Per la separazione cromatografica della proteina umana TTR I84S, è stata utilizzata la resina Q-SEPHAROSE (GE Healthcare), volume della resina circa 10 ml. Questa resina è derivatizzata con gruppi di ammonio quaternario carichi positivamente. Prima di caricare il campione è necessario equilibrare la colonna con TRIS HCl 20mM pH 7.5. Dopo aver caricato il campione (circa 2 ml), si effettua una eluizione a gradiente crescente di NaCl da 0 a 0.5 M in tampone TRIS HCl 20mM pH 7.5, con flusso di 0.2 ml/minuto, raccogliendo

frazioni con volume di 2 ml. Il profilo di eluizione si segue determinando l'assorbanza a 260 e 280 nm, con scansione tra 250 nm e 320 nm. Le frazioni proteiche che mostrano un significativo valore di assorbanza a 280 nm, vengono ulteriormente analizzate mediante SDS-PAGE su gel di acrilamide al 15%. Le frazioni selezionate sono state concentrate mediante ultrafiltrazione in cella Amicon e, successivamente, sottoposte all'ultima fase di purificazione mediante cromatografia ad interazione idrofobica.

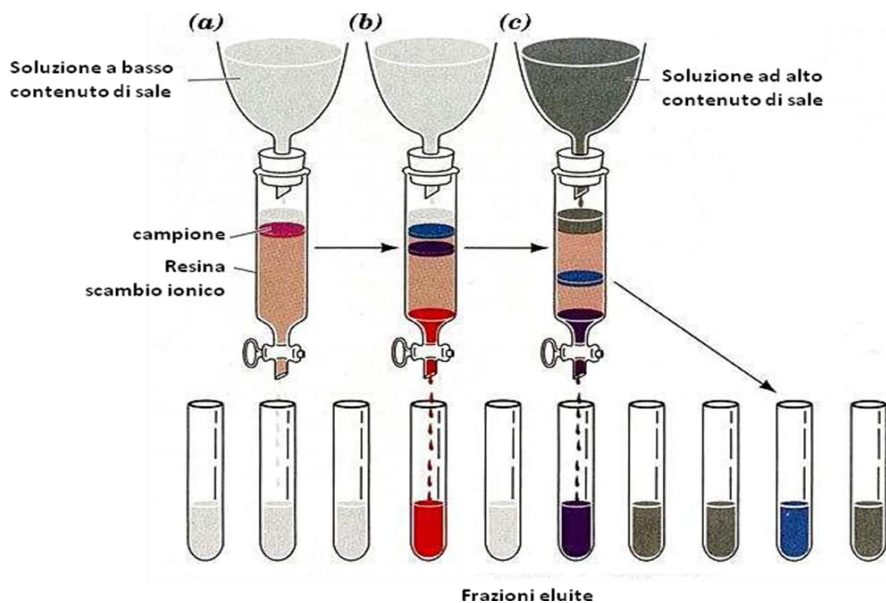


Figura 18. Modalità di purificazione per cromatografia a scambio ionico.

3.5.3 Cromatografia ad interazione idrofobica su matrice Fenil Sefarosio

Il passaggio finale di purificazione è basato sulla cromatografia ad interazione idrofobica. Questo tipo di cromatografia separa le proteine sulla base della loro idrofobicità di superficie. I sali ad alta concentrazione riescono ad esporre le regioni idrofobiche superficiali proteiche, sottraendo acqua di solvatazione dalla superficie proteica e favorendo le interazioni idrofobiche intermolecolari. In effetti, la precipitazione di proteine in presenza di alte concentrazioni saline sfrutta questo fenomeno ed è conosciuta come "salting out". Nella cromatografia ad interazione idrofobica le regioni così esposte delle proteine tendono ad interagire con una fase stazionaria derivatizzata con gruppi idrofobici. In particolare, è stata utilizzata la resina Fenil-Sefarosio (GE Healthcare), che è derivatizzata con gruppi fenilici, equilibrata con il tampone TRIS-HCl 30 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6M, pH7.5. Si è quindi applicata la soluzione di proteina contenente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ alla stessa concentrazione (0.6 M). Infatti, per favorire l'interazione delle proteine con la matrice inizialmente si ha un'alta concentrazione salina, la stessa con cui viene equilibrata la colonna. Per questo passaggio cromatografico è stato sufficiente lavare la colonna con l'applicazione della soluzione contenente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6 M in TRIS-HCl 30 mM pH 7.5, dopo aver caricato in colonna il campione contenente la proteina d'interesse. Erano raccolte frazioni con volume di circa 1 ml, che erano analizzate esaminando lo spettro di assorbimento fra 250 e 320 nm. Le frazioni proteiche che mostravano un significativo valore di assorbanza a 280 nm, erano sottoposte a SDS-PAGE su gel di acrilamide al 15%. Le frazioni più significative erano concentrate mediante filtrazione in Vivaspin (membrana con cut-off di 10000 Dalton). La proteina purificata, contenuta nella soluzione concentrata in Vivaspin, è stata infine quantificata spettrofotometricamente utilizzando il coefficiente di estinzione molare a 280 nm ($\epsilon_{280} = 1.43$ mg/ml), determinato sulla base della sequenza amminoacidica della proteina. Noti l' ϵ della

proteina e l'assorbanza a 280 nm, se ne determina la concentrazione molare (C) applicando la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon C l,$$

dove l è il cammino ottico della cuvetta (l=1 cm)

3.6 Legame dei composti naturali alla TTR I84S

3.6.1 Misure fluorimetriche

Quando radiazioni elettromagnetiche colpiscono un campione, esse possono attraversarlo senza interagire con esso (la sostanza si dice trasparente alla radiazione), oppure possono essere assorbite aumentando così l'energia posseduta dalle molecole del campione. Fenomeni noti come fluorescenza e fosforescenza, invece, si verificano nel caso in cui l'energia apportata dai fotoni assorbiti dalle molecole sia in parte riemessa come radiazione, quindi con energia minore rispetto alla radiazione assorbita (frequenza più bassa, corrispondente a lunghezza d'onda maggiore). La differenza tra le lunghezze d'onda della radiazione di eccitazione e della radiazione di emissione è nota come Shift di Stokes.

Generalmente, a temperatura ambiente l'emissione delle radiazioni da parte delle molecole fotoluminescenti avviene col meccanismo della fluorescenza. La spettroscopia di fluorescenza riguarda lo studio della luce emessa da un campione in seguito ad assorbimento di una radiazione luminosa. Quando un campione fotoattivabile è colpito da una radiazione luminosa, si verifica una transizione elettronica a causa della quale la molecola passa dal livello vibrazionale di equilibrio dello stato fondamentale ad un qualsiasi livello vibrazionale di uno stato eccitato. La frequenza (ν) della radiazione elettromagnetica

in grado di permettere la transizione tra due stati a diversa energia E_1 ed E_2 è ottenibile dall'equazione di Bohr:

$$\nu = (E_2 - E_1) / h$$

dove h rappresenta la costante di Planck ($6,624 \times 10^{-34}$ js).

In un tempo dell'ordine di 10^{-12} - 10^{-13} secondi, si ha il passaggio della molecola da tale livello vibrazionale a quello a più bassa energia dello stato eccitato: tale processo prende il nome di rilassamento vibrazionale. In questa fase si ha dissipazione di energia sottoforma di calore. Successivamente, la molecola emette energia sottoforma di radiazioni responsabili della fluorescenza associata alla discesa dell'elettrone al livello elettronico dello stato fondamentale, fino a raggiungere quello che presenta l'energia minima compatibile con la temperatura del sistema. A causa della dissipazione termica associata al rilassamento vibrazionale, come detto sopra la luce emessa ha minore energia, cioè lunghezza d'onda (λ) maggiore rispetto a quella di eccitazione.

Oltre al rilassamento vibrazionale, altri processi competono con l'emissione di luce fluorescente, quali la conversione interna, la fosforescenza e i fenomeni di quenching. Il quenching è lo spegnimento dell'intensità di fluorescenza, la quale può diminuire a causa di molti fattori. In generale, la diminuzione dell'emissione di fluorescenza avviene per effetto di vari processi: reazioni chimiche che avvengono quando il fluoroforo è nello stato eccitato, formazione di complessi tra il fluoroforo ed una seconda specie presente in soluzione, trasferimento di energia e collisioni. I meccanismi più frequenti sono il trasferimento di energia e il quenching collisionale.

Per le proteine può essere sfruttata la fluorescenza degli amminoacidi aromatici, in particolare triptofano e in minor misura tirosina.

Essi presentano rendimenti quantici, η_f , e massimi di emissione diversi:

| AMMINOACIDI | λ_{max} di emissione | Hf |
|--------------------|---|-----------|
| Fenilalanina | 282 nm | 0.05 |
| Tirosina | 303 nm | 0.11 |
| Triptofano | 350 nm | 0.14 |

Si definisce rendimento quantico di fluorescenza per un fluoroforo, riferito all'unità di tempo, il rapporto tra il numero dei fotoni emessi per fluorescenza e il numero di fotoni assorbiti. Gli spettri di fluorescenza permettono di avere informazioni sul microambiente in cui si trovano i triptofani nelle proteine, in quanto la lunghezza d'onda del massimo di emissione si sposta verso il rosso o verso il blu quando l'intorno chimico di questi amminoacidi è più o meno polare, rispettivamente. Le proteine hanno un massimo dello spettro di emissione compreso tra 325 e 350 nm: la lunghezza d'onda più piccola corrisponde all'emissione del triptofano in un microambiente apolare, prevalente per le proteine folded, mentre la lunghezza d'onda maggiore corrisponde all'emissione del triptofano in un microambiente polare ed è tipico delle proteine denaturate.

3.6.1.1 Interazione tra composti naturali e TTR I84S

Al fine di studiare l'interazione fra il mutante TTR I84S ed i composti naturali oggetto di studio, sono state eseguite misure sfruttando il segnale di fluorescenza intrinseca del Resveratrolo. Questo composto se eccitato alla lunghezza d'onda di 320 nm presenta un massimo di emissione a 390 nm. Inoltre, il composto in assenza della proteina presenta un debole segnale di fluorescenza ma quando si lega alla TTR mostra un'alta intensità di fluorescenza, fenomeno tipico di diversi composti fluorescenti la cui intensità di fluorescenza aumenta drasticamente quando essi sono legati rigidamente in una tasca prevalentemente idrofobica di una proteina. Si sono eseguite prove di legame competitivo sfruttando la

fluorescenza del segnale emesso dal complesso Resveratrolo-TTR, la cui intensità subisce una drastica diminuzione nel caso in cui si verifichi l'interazione della proteina di interesse con gli altri composti naturali in grado di indurre il rilascio del Resveratrolo in forma libera in soluzione (effetto di spiazzamento del probe fluorescente). Al campione contenente 100 μ l di tampone di legame (50 mM KP pH 7.5, 150 mM NaCl) ed 1 μ M di TTR I84S preincubata con il Resveratrolo, usato come probe fluorescente alla concentrazione di 2 μ M, sono state aggiunte quantità stechiometriche di ciascun ligando naturale e tramite l'analisi degli spettri di fluorescenza è stato possibile valutare la capacità di ogni flavonoide di interagire con la TTR grazie alla competizione col legame del resveratrolo. Inoltre, sempre sfruttando il segnale d'intensità di fluorescenza del complesso TTR-Resveratrolo, nelle stesse condizioni sperimentali sopra descritte, è stata effettuata una titolazione per tutti i flavonoidi mediante l'aggiunta di aliquote crescenti di ciascun ligando naturale al campione contenente 100 μ l di buffer di legame (50 mM KP pH 7.5, 150 mM NaCl) ed 1 μ M di TTR I84S preincubata con il Resveratrolo alla concentrazione di 5 μ M. Il valore dell'intensità di fluorescenza del Resveratrolo libero alla concentrazione di 5 μ M nel tampone sopra descritto, è stato usato per determinare il punto finale della curva di competizione. Il valore IC50, è stato calcolato per ogni ligando, in riferimento alla concentrazione di ligando capace di ridurre del 50% il segnale di fluorescenza del complesso TTR I84S-Resveratrolo.

Per gli stilbeni le competizioni non sono state valutate nei confronti del Resveratrolo ma, dal momento che ogni composto appartenente alla sottoclasse degli stilbenoidi presenta una propria fluorescenza intrinseca quando legato alla transtiretina, è stata valutata la capacità della T4 di ridurre il segnale di fluorescenza dei complessi TTR-stilbeni. Anche in questo caso al campione contenente 100 μ l di buffer di legame (50 mM KP pH 7.5, 150 mM NaCl) ed 1 μ M di TTR I84S preincubata con i diversi stilbeni alla concentrazione di 5 μ M, sono state aggiunte aliquote crescenti di T4, e per ciascun campione è stato calcolato il valore di IC50.

Le misure di intensità di fluorescenza sono state eseguite con uno spettrofluorimetro Perkin Elmer LS-50B

3.7 Prove di stabilità della TTR I84S

Per valutare la stabilità della TTR I84S in presenza dei polifenoli naturali, la proteina è stata incubata in presenza di urea, agente denaturante, e successivamente è stato eseguito il crosslinking con la glutaraldeide la quale lega covalentemente i monomeri della TTR. La glutaraldeide è una dialdeide che forma prevalentemente legami covalenti crociati con i gruppi amminici dei residui di lisina (cross-linking). Questa tecnica si basa sul seguente principio: se la proteina è tetramericica e quindi, pur essendo presente l'urea è ancora stabile, in presenza di glutaraldeide si crea il crosslinking tra i quattro monomeri. Se essa si è dissociata in monomeri, mostrando così una minore stabilità, questi non interagiscono più tra loro per cui, in seguito all'esposizione alla glutaraldeide non si formano i legami covalenti tra le subunità. Mediante l'SDS-PAGE, che separa le proteine in base al peso molecolare, si è potuto stabilire se il tetramero o suoi prodotti di dissociazione fossero presenti nei diversi campioni trattati con urea.

Nei campioni (volume di 20 μ l) erano presenti la proteina alla concentrazione di 10 μ M, Urea 5M ed i vari composti studiati a concentrazioni molari doppie rispetto alla proteina. In ciascuna prova un campione di controllo consisteva in proteina in presenza di urea ma in assenza di ligandi, ed un altro campione di controllo consisteva in proteina incubata in condizioni denaturanti in presenza del farmaco antinfiammatorio non steroideo "Diflunisal" (proposto per la terapia farmacologica dell'amiloidosi da TTR). Una volta preparati, i campioni erano lasciati in incubazione per 24 ore a 4°C. La TTR è stata quindi sottoposta a "cross-linking" in presenza di glutaraldeide al 2.5% per 15 minuti, trascorsi i quali la reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di 3 μ L di sodioboroidruo al 7% (p/V) (Pullakhandam et al. 2009). I campioni sono stati poi sottoposti a SDS-PAGE. L'intensità delle bande

elettroforetiche corrispondenti al monomero della TTR I84S è stata quantificata mediante l'uso del sensitometro GS-800 (BIO-RAD). L'effetto stabilizzante esercitato dai ligandi nei confronti della proteina amiloidogena, è stato stimato sulla base della quantificazione della forma monomerica della TTR in presenza ed in assenza dei composti di interesse. I valori, per tutti i campioni, sono stati riportati come percentuale d'intensità rispetto al valore registrato per il monomero di TTR determinato nel gel in assenza di ligandi.

3.8 Inibizione della fibrillogenesi del mutante TTR I84S a pH moderatamente acido

La fibrillogenesi "*in vitro*" del mutante TTR I84S a pH moderatamente acido (4.3) è stata monitorata valutando l'incremento della torbidità dei campioni, mediante misure spettrofotometriche condotte a 400nm, secondo una metodica descritta precedentemente (Miller et al. 2004). La TTR I84S 7.2 μ M è stata preincubata in presenza di un eccesso molare di 3 equivalenti di ciascun composto naturale. Sono stati inoltre preparati controlli negativi per i solventi usati per la solubilizzazione dei composti (DMSO ed EtOH (96%)), ed un controllo positivo in presenza di Diflunisal. I campioni sono stati preparati in tampone a pH neutro (10 mM Na phosphate buffer, pH 7, 100 mM KCl, 1 mM EDTA), ed incubati con la TTR per 3 ore a temperatura ambiente prima dell'incubazione a pH acido ottenuta con l'aggiunta ai campioni sopra descritti di un egual volume di 100 mM sodium acetate, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 4.2 (pH finale 4.3). I campioni sono stati poi mantenuti a 37° C per promuovere la fibrillogenesi.

3.9 Prove di legame alla TTR I84S in presenza di T4 marcata radioattivamente

Per analizzare in modo più approfondito il legame dei composti naturali alla TTR I84S, usando un metodo diverso da quello della competizione col Resveratrolo, si sono eseguite prove di legame competitivo sfruttando il segnale fornito da T4 marcata radioattivamente (contenente il radioisotopo ^{125}I). I campioni sono stati incubati con T4 ^{125}I (Perkin Elmer, attività specifica di 125-25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) per un'ora a temperatura ambiente. Successivamente si è valutata la capacità dei diversi ligandi di competere con la T4 radioattiva, a diverse concentrazioni. Tale capacità è indicativa della maggiore o minore affinità dei composti per la TTR. La competizione tra T4 "calda" (marcata radioattivamente) e T4 "fredda" (non marcata radioattivamente) fungeva da controllo positivo. Le stesse analisi sono state effettuate anche per lo studio del legame dei composti naturali alla TTR presente nel plasma.

I campioni costituiti da 19 μl di una soluzione di PBS contenente la proteina d'interesse alla concentrazione di 3 μM sono stati incubati con 1 μl di T4 ^{125}I usata come tracciante (a concentrazione molto più bassa di quella della TTR). A questa soluzione sono state aggiunte diverse concentrazioni dei vari ligandi (da 1 a 100 μM), per osservare la competizione per il legame tra T4 marcata e proteina. Il primo campione corrispondeva al controllo senza competitore, per cui erano presenti solo la TTR, la T4 marcata e il tampone PBS. I campioni erano lasciati in incubazione per un'ora, trascorsa la quale sui campioni era effettuata un'analisi PAGE in condizioni native. Terminata la corsa elettroforetica si esponeva il gel O/N ad uno schermo sensibile alle radiazioni emesse dallo ^{125}I (Super Resolution Screen, Perkin Elmer). L'immagine era acquisita mediante Cyclone Storage Phosphor Screen (Packard) e la sua analisi eseguita usando il software Quantity One.

3.10 Prove di legame competitivo “ex vivo”

Le prove di legame competitivo alla TTR presente nel plasma, sfruttando il segnale della T4 marcata radioattivamente, sono state condotte per valutare la capacità dei composti di interesse di legare selettivamente la TTR nel plasma. 10 µl di plasma sono stati incubati con 1 µl di T4^{125I}, in presenza o in assenza di concentrazioni crescenti dei differenti composti di interesse (da 1 a 100 µM). I campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente O/N e poi sottoposti a PAGE non denaturante. L'acquisizione dell'immagine e la sua analisi sono state effettuate come sopra descritto.

3.11 Selettività di legame dei ligandi per la TTR plasmatica mediante tecnica di immunoaffinità.

Un ulteriore approccio per la valutazione della selettività di legame dei polifenoli naturali nei confronti della TTR plasmatica, è stato l'impiego di biglie magnetiche (Dynabeads Protein G, Invitrogen) funzionalizzate con anticorpi anti-TTR umana (Figura 19). I polifenoli studiati ed il Diflunisal, usato come controllo, sono stati aggiunti al campione di plasma umano ad una concentrazione finale di 6.9 µM, ad eccezione dei composti glucuronidati che sono stati aggiunti in concentrazione di 13.8 µM. Tale analisi, ha previsto un' incubazione preliminare delle Protein G–Dynabeads (Invitrogen) per 30 min. a 4° C con anticorpi policlonali anti-TTR umana (DAKO), in tampone fosfato (10 mM Na-K phosphate, pH 7.4, 0.16 M NaCl) ed in presenza di 0.02% TWEEN 20, in accordo con il protocollo Invitrogen. Le immunobeads così ottenute, sono state lavate con il tampone fosfato e, successivamente, incubate per 30 min. a 4° C con 400 µl di tampone fosfato contenente 25 µl di ciascun campione di plasma precedentemente addizionato di ciascun ligando oggetto di studio, in modo da consentire l'isolamento dal plasma della TTR per immunoaffinità (interazione specifica della TTR con gli anticorpi presenti sulla superficie delle biglie). Le biglie sono state poi lavate con

tampone fosfato e, per indurre il rilascio dei ligandi dalla TTR, sono stati usati 40 μ l di etanolo (96%). L'identificazione e la quantificazione dei ligandi è stata ottenuta mediante l'uso di RP-HPLC-LTQ ORBITRAP XL. Dopo l'estrazione con solvente organico, le biglie sono state risospese in Sample Buffer SDS-PAGE per 10 min. at 60 ° C, per indurre il rilascio della TTR plasmatica dalla superficie delle biglie e permetterne la quantificazione mediante SDS-PAGE. La quantificazione per ogni campione del ligando adsorbito dalla TTR plasmatica e della TTR plasmatica stessa aveva lo scopo di determinare le stechiometrie di legame dei composti di interesse con la TTR plasmatica.

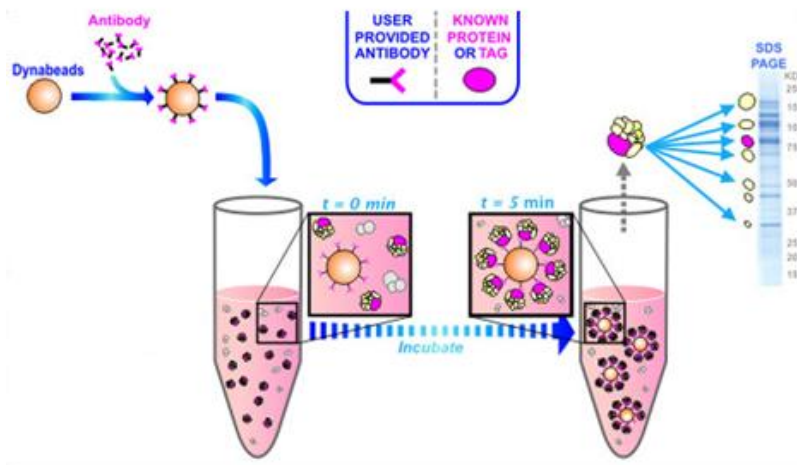


Figura 19. Rappresentazione schematica della procedura adottata per l'isolamento della TTR dal plasma mediante immuno-dynabeads.

4. Risultati e Discussione

4.1 Espressione della proteina mutante hTTR I84S

Mediante analisi SDS-PAGE delle proteine cellulari totali prodotte da colture del ceppo di *E. coli* BL21cp trasformato con il vettore PET11b per la produzione del mutante hTTR I84S, si è evidenziata, utilizzando TTR wt (55 kDa) come marker (M), nei campioni indotti, la presenza di una banda attribuibile alla TTR I84S, assente invece nei campioni non indotti. La lisi cellulare delle colture indotte ha permesso di ottenere il mutante della transtiretina in forma solubile. Mediante SDS-PAGE è stata infatti accertata la presenza della proteina nel surnatante del prodotto di lisi, pur essendo essa presente in parte anche nel pellet (Figura 20).

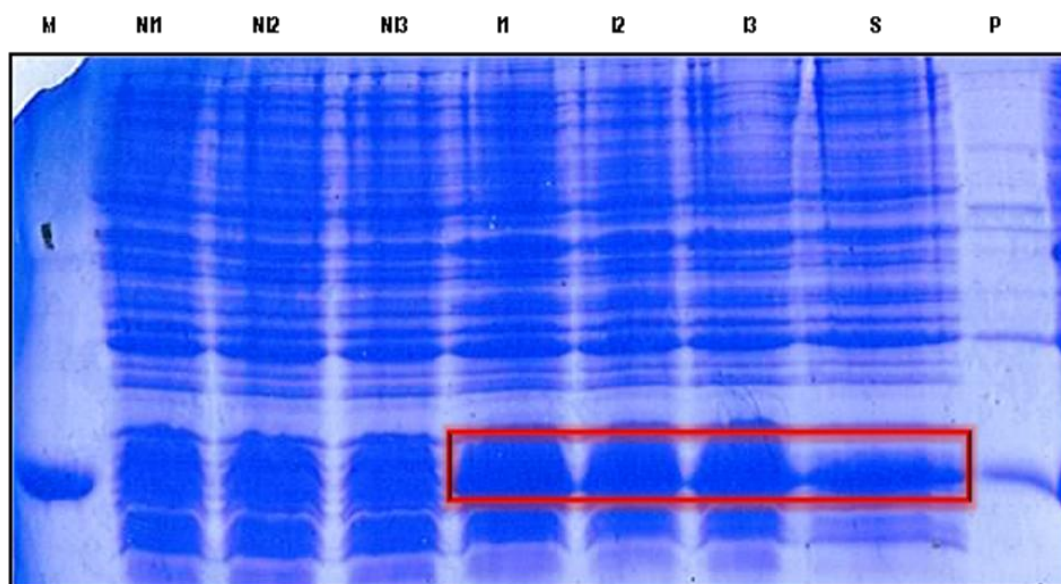


Figura 20. Analisi elettroforetica in gel denaturante (SDS-PAGE) della coltura batterica non indotta NI1-NI2-NI3 e indotta I1- I2- I3 nelle tre diverse beute e delle relative frazioni, solubile (S, surnatante) ed insolubile (P, pellet) ottenute dopo lisi cellulare.

4.2 Purificazione della proteina mutante hTTR I84S

Il surnatante ottenuto dopo lisi cellulare viene concentrato mediante ultrafiltrazione in cella Amicon (membrana con cut-off di 10000 Dalton). Il concentrato ottenuto viene sottoposto a separazione cromatografica, che come citato precedentemente si compone di tre step:

- I. Cromatografia ad esclusione dimensionale
- II. Cromatografia a scambio ionico
- III. Cromatografia ad interazione idrofobica

4.2.1 Cromatografia ad esclusione dimensionale su matrice AcA44 (gel filtrazione)

Il profilo di eluizione si è seguito determinando spettrofotometricamente l'assorbanza delle diverse frazioni a 260 e 280 nm, con scansione tra 250 nm e 320 nm. In questo passaggio nelle varie frazioni eluite vi è la presenza di DNA batterico, in quanto il campione caricato deriva direttamente dal lisato cellulare, per questo motivo vengono prese in considerazione le frazioni che mostrano un segnale di assorbanza significativo anche a 260 nm. Considerando che il volume della colonna è di 500 mL e la resina permette una separazione delle molecole aventi dimensioni comprese fra 10 e 100 kDa, ci aspettiamo che la proteina d'interesse venga eluita all'incirca verso la metà della corsa cromatografica. Dal momento che, circa i primi 167 mL sono rappresentati dal volume escluso, vengono prese in considerazione le frazioni eluite dopo tale volume. Tali frazioni sono state analizzate mediante SDS-PAGE, su gel di acrilamide al 15%, per verificare la presenza della proteina d'interesse nelle diverse frazioni eluite a circa metà del volume della colonna cromatografica (Figura 21). Dopo l'osservazione del gel, si è deciso di riunire e concentrare mediante ultrafiltrazione in cella Amicon le frazioni comprese tra la lane 1 e la 4 eluite circa dopo il

passaggio di circa 300 mL di tampone. Il concentrato è stato scambiato esaustivamente in TRIS HCl 30 mM pH 7.5, in modo da poter eseguire il successivo passaggio di purificazione.

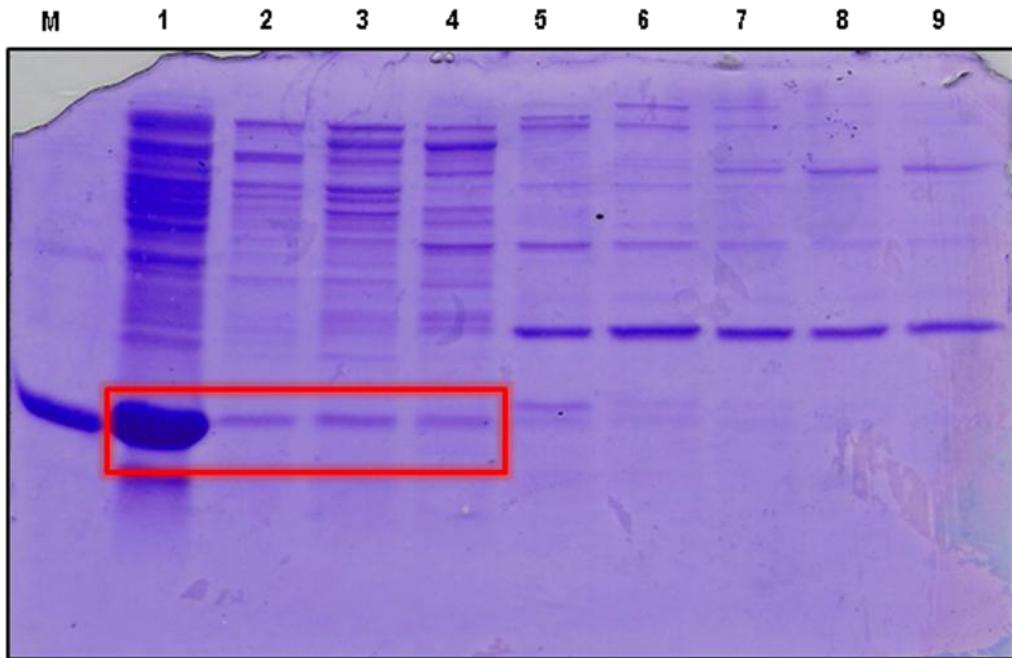


Figura 21. Risultato della purificazione della hTTR I84S in seguito a cromatografia ad esclusione dimensionale.

SDS-PAGE delle frazioni eluite (M, marker TTR wt \approx 55kDa).

4.2.2 Cromatografia a scambio ionico su matrice Q-sefarosio

Le frazioni che hanno mostrato un significativo valore di assorbanza a 280 nm, sono state verificate mediante SDS-PAGE su gel di acrilamide al 15%, (Figura 22). Osservando il gel, dalla lane 1 si nota la presenza di una banda corrispondente a quella del marker. Si è proceduto, quindi, a riunire le frazioni comprese fra la lane 1 e la 8 visibili sul gel sottostante, corrispondenti alle frazioni eluite a circa l'85-100% di forza ionica applicata alla resina durante la corsa cromatografica (la forza ionica applicata andava da 0 a 100% del tampone TrisHCl 30 mM+NaCl 0.5 M). Le frazioni selezionate sono state concentrate mediante ultrafiltrazione in cella Amicon per poter passare al successivo step di purificazione mediante cromatografia ad interazione idrofobica.

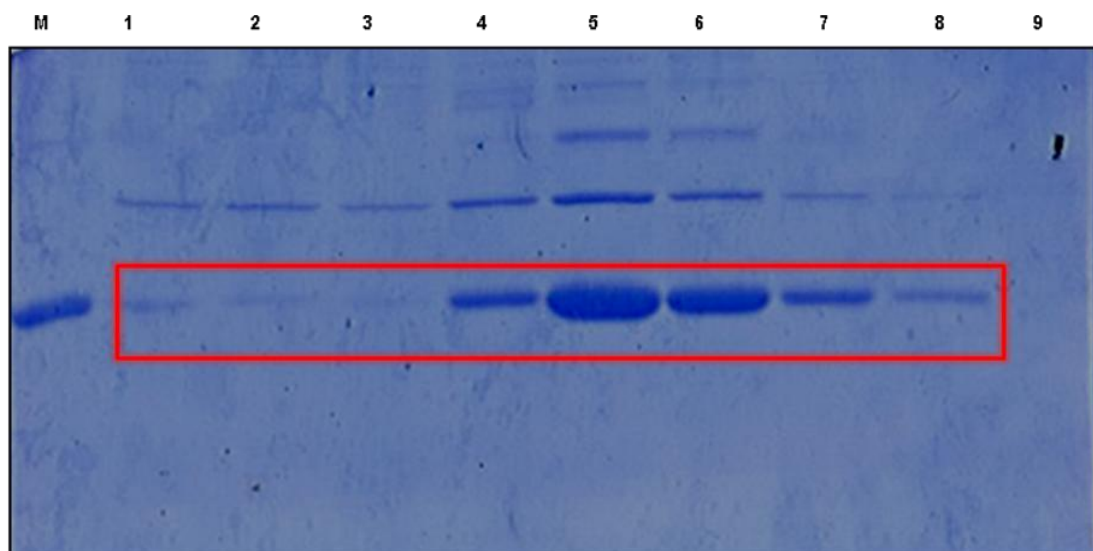


Figura 22. Risultato della purificazione della hTTR I84S in seguito a cromatografia a scambio ionico.

Analisi elettroforetica in gel denaturante (SDS-PAGE) delle frazioni raccolte; M= marker hTTR wt \approx 55 kDa; lanes 1-3 frazioni eluite al 50% del gradiente applicato (0-0.5M NaCl); lanes 4-8 frazioni eluite all'85-100% del gradiente di forza ionica applicato.

4.2.3 Cromatografia ad interazione idrofobica su matrice Fenil-Sefarosio

Le proteine ottenute dalla cromatografia a scambio ionico, come descritto precedentemente, sono state applicate su una piccola colonna di Fenil Sefarosio, che permette di eseguire una cromatografia ad interazione idrofobica. La TTR I84S è stata separata effettuando un semplice lavaggio della colonna con Ammonio Solfato 0.6 M. Come nei casi descritti precedentemente, le frazioni cromatografiche vengono analizzate allo spettrofotometro e, successivamente, viene eseguita una analisi SDS-PAGE delle frazioni più significative (Figura 23). Le frazioni comprese fra la lane 1 e la 9, eluite durante il lavaggio con 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sono state concentrate mediante ultrafiltrazione in Vivaspin (membrana con cut-off di 10 kDalton).

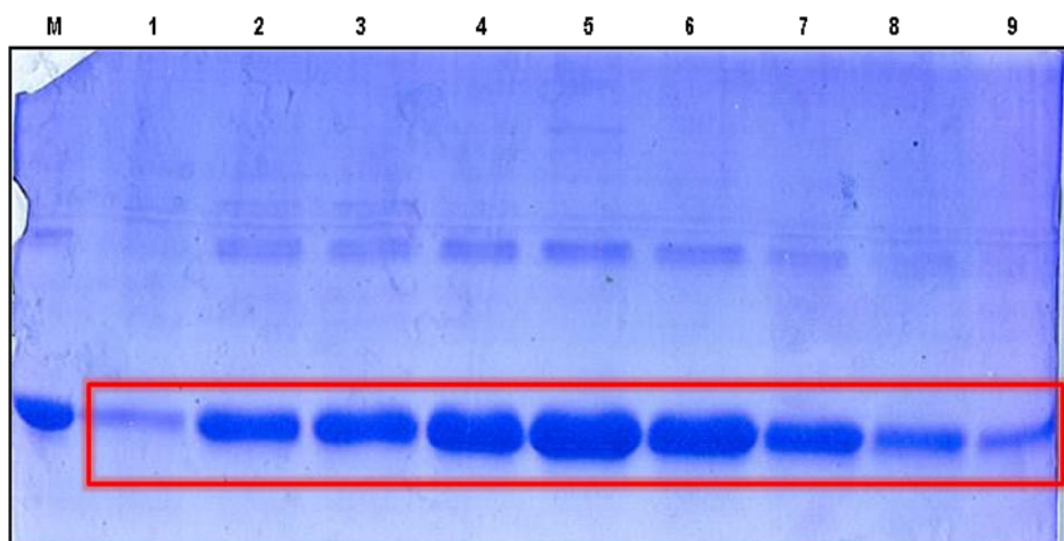


Figura 23. Risultato della purificazione della TTR I84S in seguito a cromatografia ad interazione idrofobica.

SDS-PAGE delle frazioni eluite: M= marker TTR wt \approx 55kDa; le lane 1 e 9 corrispondono alle frazioni contenenti TTR pura eluita mediante semplice lavaggio della colonna col tampone di equilibrio (contenente Ammonio Solfato 0.6 M).

5. Risultati e discussione (parte prima: Flavonoidi)

5.1 Interazione tra composti naturali (flavonoidi) e TTR I84S

Il Resveratrolo è un ligando specifico della TTR, come dimostrato dagli studi strutturali (Klabunde et al., 2000) che hanno evidenziato la sua capacità di occupare le due cavità di legame della T4 nella TTR, ed è inoltre un forte ligando, come dimostrato dal fatto che il ligando naturale T4 riesce solo a perturbare lo spettro di fluorescenza dello stilbene legato alla TTR (Fig. 23 A). Tramite la valutazione della diminuzione del segnale di fluorescenza del complesso TTR-Resveratrolo in presenza di alcuni flavonoidi e loro principali metaboliti, si è potuto fare una stima comparativa dell'affinità relativa dei diversi flavonoidi per la TTR. Dagli spettri di fluorescenza si può notare come sia l'Apigenina che la Genisteina siano in grado di abolire il segnale del Resveratrolo legato alla TTR quando sono aggiunti al campione a concentrazioni equimolari (vedi capitolo 3) rispetto allo stilbene (Fig. 23 B e D). Questo risultato non è stato riscontrato per la daidzeina che invece riesce a spiazzare solo in parte il Resveratrolo dal sito di legame della TTR nelle stesse condizioni sperimentali (Fig. 23 E), mentre non è stata osservata una significativa riduzione della fluorescenza del complesso TTR-Resveratrolo in presenza dei metaboliti 7-glucuronidati dei flavonoidi (Figura 23, C e F). Si è quindi voluto verificare in modo più quantitativo, mediante titolazioni (vedi capitolo 3), il grado di competizione dei flavonoidi per il Resveratrolo legato alla TTR (Fig. 24). L'aggiunta di Genisteina ed Apigenina al complesso TTR-Resveratrolo induce un quasi completo spiazzamento del Resveratrolo legato. Di contro, una competizione non significativa è stata riscontrata per la Daidzeina ed i derivati metabolici 7-glucuronidati, che non causano un sostanziale spiazzamento del Resveratrolo legato alla proteina. Considerando l'intensità di fluorescenza del Resveratrolo libero come punto finale della curva di competizione, è stato possibile calcolare un valore di IC50 di circa 2 μ M sia per la Genisteina che per l'Apigenina.

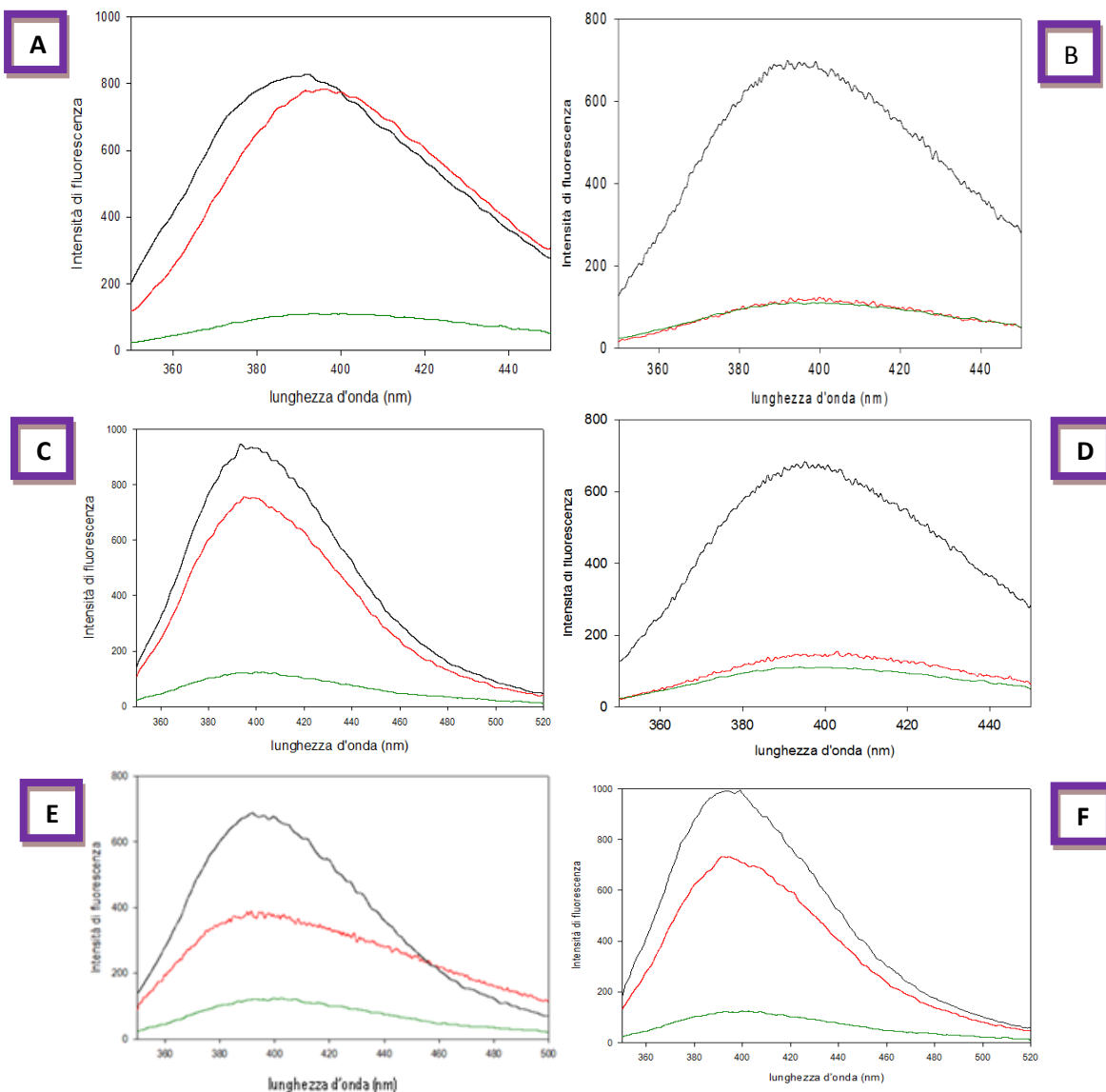


Figura 24. Spiazzamento competitivo da parte dei flavonoidi del Resveratrolo legato alla TTR mediante analisi degli spettri di fluorescenza.

In questi esperimenti la concentrazione della TTR era di $1 \mu\text{M}$ e quella del resveratrolo aggiunto alla TTR era di $2 \mu\text{M}$. Tutti i composti per i quali si voleva valutare il legame competitivo erano aggiunti al complesso TTR-Resveratrolo ad una concentrazione di $2 \mu\text{M}$.

Per tutti i ligandi della TTR, lo spettro di fluorescenza del Resveratrolo libero è riportato in verde, il complesso TTR-Resveratrolo in nero e lo spettro di fluorescenza del complesso TTR-Resveratrolo in presenza dei diversi

ligandi in rosso. **A.** Competizione verso il complesso TTR-Resveratrolo da parte della T4; **B.** Competizione verso il complesso TTR-Resveratrolo da parte della Genisteina; **C.** Competizione verso il complesso TTR-Resveratrolo da parte della Daidzeina 7-glucuronide; **D.** Competizione verso il complesso TTR-Resveratrolo da parte della Apigenina; **E.** Competizione verso il complesso TTR-Resveratrolo da parte della Daidzeina; **F.** Competizione verso il complesso TTR-Resveratrolo da parte della Genisteina 7-glucuronide.

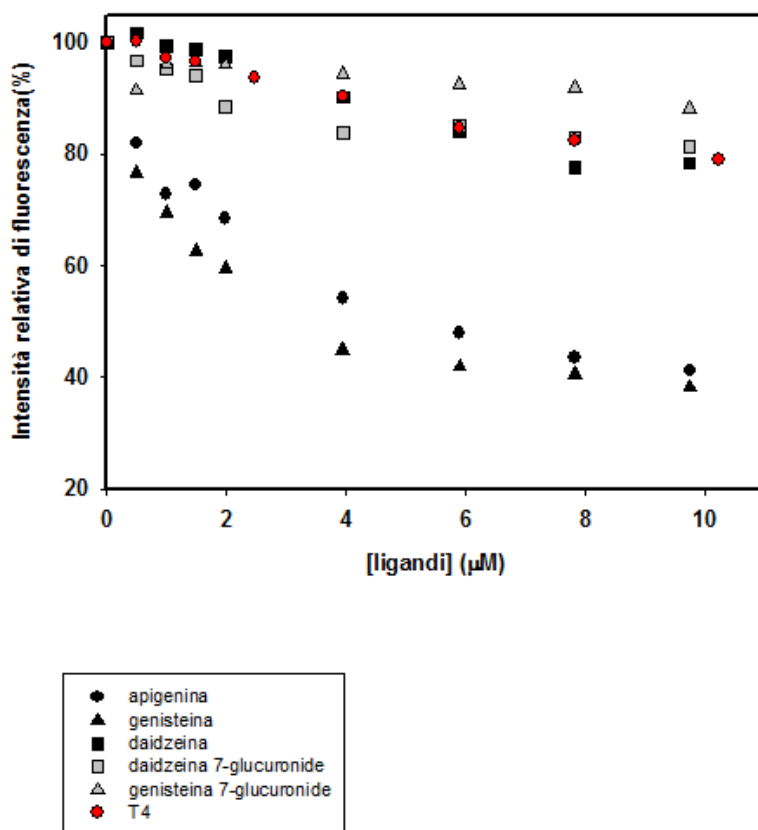


Figura 25. Analisi dello spiazzamento competitivo da parte dei flavonoidi del Resveratrolo legato alla TTR mediante titolazioni (eccitazione a 320 nm ed emissione a 390 nm).

In questi esperimenti la concentrazione della TTR era di 1 μM e quella del Resveratrolo aggiunto alla TTR era di 5 μM.

5.2 Effetto stabilizzante dei flavonoidi su TTR I84S in presenza di urea

I flavonoidi ed i loro metaboliti 7-glucuronidati sono stati testati per valutare la loro capacità di stabilizzare la TTR I84S in presenza di urea 5M. La quantità di TTR monomericamente evidenziata mediante SDS-PAGE con gel di acrilamide al 15% è rappresentativa della proteina denaturata presente nei campioni in assenza ed in presenza dei ligandi studiati, dopo incubazione dei campioni in condizioni denaturanti (urea 5 M) e successivo cross-linking con glutaraldeide (Fig. 25). La Genisteina e l'Apigenina mostrano un significativo effetto stabilizzante sulla TTR, simile a quello determinato per il Diflunisal usato come controllo positivo. La Daidzeina ed i metaboliti 7-glucuronidati mostrano uno scarso effetto stabilizzante, in accordo con la loro bassa affinità di legame per la TTR.

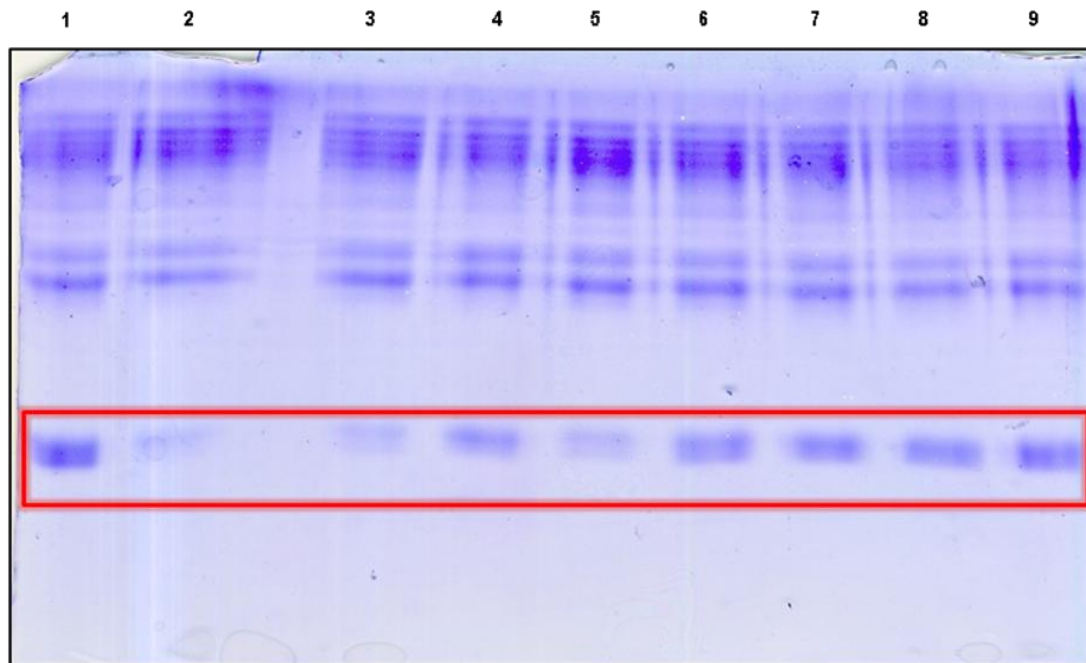


Figura 26. Effetto stabilizzante dei flavonoidi sulla TTR I84S in presenza di urea 5M.

Da sinistra a destra: TTR I84S, controllo in assenza di ligandi (1), TTR + Diflunisal (2 equivalenti molar, eq.) (2), TTR + Apigenina (2 eq.) (3), TTR + Daidzeina (2 eq.) (4), TTR + Genisteina (2 eq.) (5), TTR + Genisteina-7-glucuronide (2 eq.) (6), TTR + Genisteina-7-glucuronide (10 eq.) (7), TTR + Daidzeina-7-glucuronide (2 eq.) (8), TTR + Daidzeina-7-glucuronide (10 eq.) (9).

La concentrazione della TTR nei campioni prima del trattamento con urea era 10 μ M.

5.3 Inibizione della fibrillogenesi del mutante TTR I84S a pH moderatamente acido

Gli esperimenti condotti per verificare l'abilità dei flavonoidi testati, di interferire con la fibrillogenesi della TTR, hanno messo in luce un forte effetto inibitorio esercitato dalla Genisteina e dall'Apigenina. Gli altri composti studiati, hanno rivelato un moderato o del tutto assente effetto di inibizione della fibrillogenesi (Figura 27).

Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti nelle prove di legame e di stabilizzazione della TTR I84S, “*in vitro*”, in cui la Genisteina e l’Apigenina risultano i composti più efficaci. Nella Tabella 3 sono riportate le percentuali di formazione di fibrille amiloidi in presenza dei diversi ligandi, alla concentrazione finale di 10.8 μ M, al tempo di incubazione di 72 ore, considerando che nel campione usato come controllo (in assenza di ligandi) vi sia il 100% di formazione di fibrille.

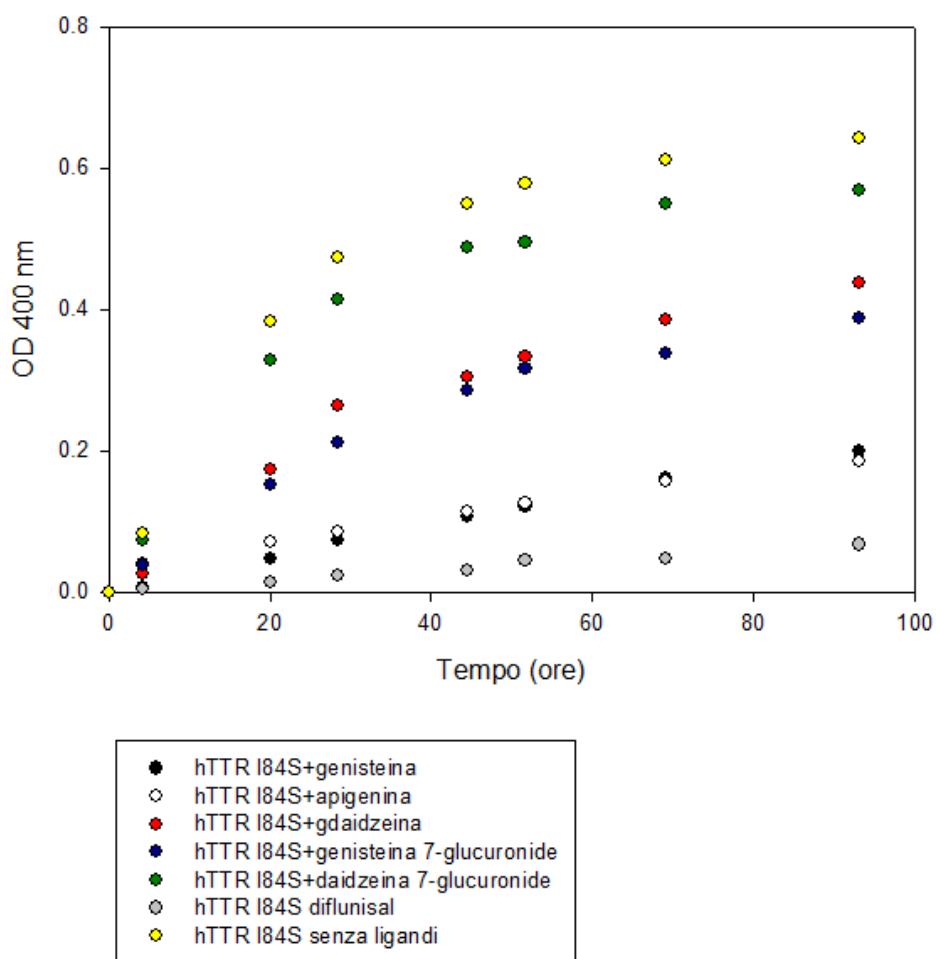


Figura 27. Cinetiche di fibrillogenesi del mutante TTR I84S in presenza ed in assenza di ligandi.

| Composto | I84S (in assenza di ligando) | Genisteina | Apigenina | Daidzeina | Genisteina 7- glucuronide | Daidzeina 7- glucuronide | Diflunisal |
|-----------------|--|------------|-----------|-----------|------------------------------|-----------------------------|------------|
| Percentuale (%) | 100% | 26.3 | 25.6 | 63.0 | 55.2 | 89.8 | 7.4 |

Tabella 3. Percentuali di formazione di fibrille in presenza ed in assenza dei diversi flavonoidi studiati dopo 72h di incubazione.

5.4 Legame dei flavonoidi alla TTR I84S evidenziato mediante competizione con T4 marcata radioattivamente

Per confermare l'affinità relativa del legame dei flavonoidi alla TTR, si è proceduto con prove di competizione che sfruttassero, invece del segnale di fluorescenza intrinseco del Resveratrolo, il segnale di radioattività emesso dalla T4 marcata con ¹²⁵I usata come tracciante (quindi a concentrazione molto più bassa rispetto alla concentrazione proteica). Il primo campione, in tutte le figure, rappresenta il controllo senza competitore, in cui sono presenti nel campione solo la TTR, la 0T4 marcata radioattivamente e il tampone di legame (PBS).

I risultati delle prove sono mostrati in Fig. 28 e 29. Come si vede dalle immagini, in presenza di T4 non marcata radioattivamente (T4 "fredda") il segnale di radioattività della T4 marcata mostra un dimezzamento già a concentrazione equimolare rispetto alla TTR, presente nel mezzo ad una concentrazione di 3 μM, dell'ormone non marcato (Fig. 28 A e 29 A). Tra i flavonoidi testati, si può osservare buona capacità di legame competitivo per la Genisteina (Fig. 28 B e 29 B), e minor capacità competitiva per Apigenina (Fig. 28 D e 29 D) e

Daidzeina (Fig. 28 E e 29 E). Per quanto riguarda i metaboliti 7-glucuronidati, non appare invece capacità di legame competitivo rispetto alla T4.

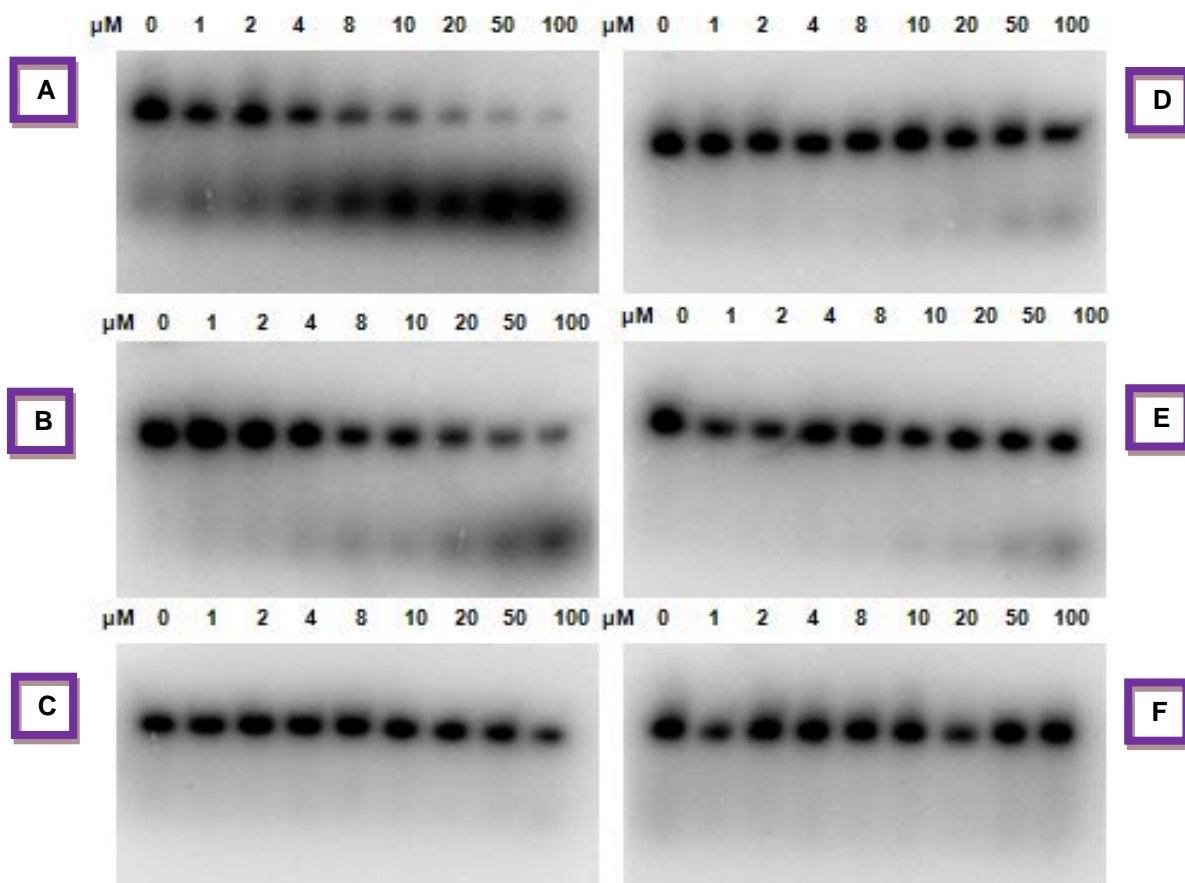


Figura 28. Competizioni di legame alla TTR I84S (3μM) utilizzando T4 (¹²⁵I) come probe.

- A: competizione fra T4 marcata e T4 fredda alle concentrazioni comprese fra 0 e 100 μM
- B: competizione fra T4 marcata e Genisteina alle concentrazioni comprese fra 0 e 100 μM
- C: competizione fra T4 marcata e Genisteina 7-glucuronide alle concentrazioni comprese fra 0 e 100 μM
- D: competizione fra T4 marcata e Apigenina alle concentrazioni comprese fra 0 e 100 μM
- E: competizione fra T4 marcata e Daidzeina alle concentrazioni comprese fra 0 e 100 μM
- F: competizione fra T4 marcata e Daidzeina 7-glucuronide alle concentrazioni comprese fra 0 e 100 μM

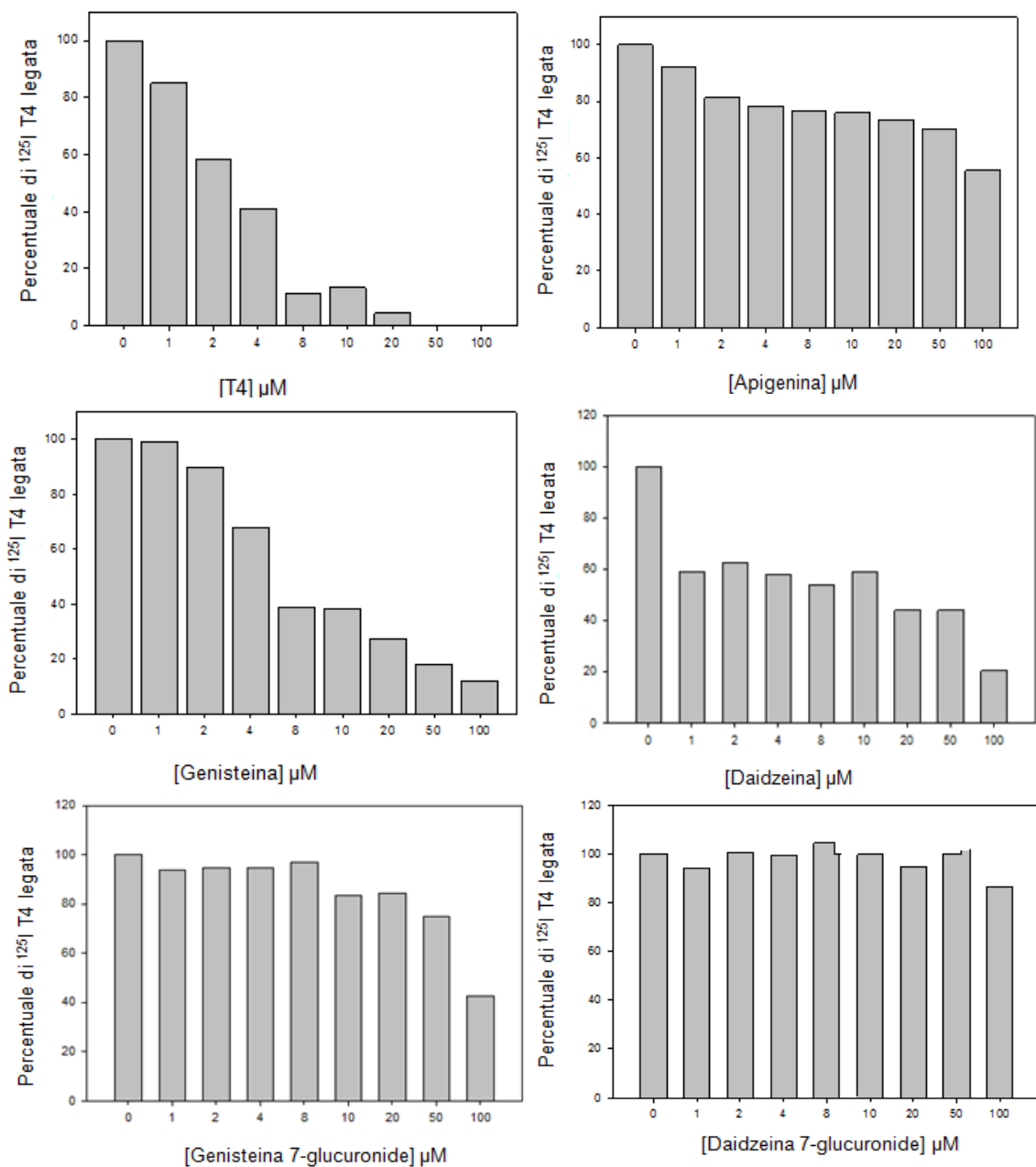


Figura 29. Istogrammi delle competizioni di legame alla TTR I84S mostrate in Fig. 28.

Nei grafici sono riportate le percentuali del segnale di radioattività della tiroxina marcata in funzione delle concentrazioni dei ligandi aggiunti al campione in concentrazioni crescenti, calcolate considerando come 100% del segnale di radioattività quello emesso dal campione in presenza della proteina ricombinante e della T4 marcata radioattivamente.

5.5 Analisi della selettività di legame dei ligandi alla TTR plasmatica mediante la tecnica di immunoaffinità

Mediante l'uso di questa tecnica, descritta in Materiale e Metodi, è stato possibile determinare la stechiometria di legame dei flavonoidi, aggiunti ad una concentrazione di 6.9 μM a campioni di plasma umano, alla TTR plasmatica. I flavonoidi studiati hanno mostrato una significativa selettività di legame per la TTR, ad eccezione dei composti glucuronidati (tabella 4). La stima dei rapporti molar di legame ligando/TTR si è basata sulla determinazione delle concentrazioni dei ligandi presenti nei campioni di plasma dopo loro estrazione con solvente organico e successiva analisi mediante strumentazione RP-HPLC-LTQ/ORBITRAP XL, e sulla determinazione mediante SDS-PAGE delle quantità di TTR estratte per immunoaffinità (immuno-dynabeads) dai campioni di plasma (Figura 30).

| LIGANDO | LIGANDO/TTR (MOLE/MOLE) |
|--------------------------|-------------------------|
| Genisteina | ≈ 0.8 |
| Apigenina | ≈ 0.7 |
| Diflunisal | ≈ 0.7 |
| Daidzeina-7-glucuronide | ≈ 0 |
| Genisteina-7-glucuronide | ≈ 0 |

Tabella 4. Rapporti stechiometrici Flavonoide/TTR plasmatica determinati mediante la tecnica di immunoaffinità.

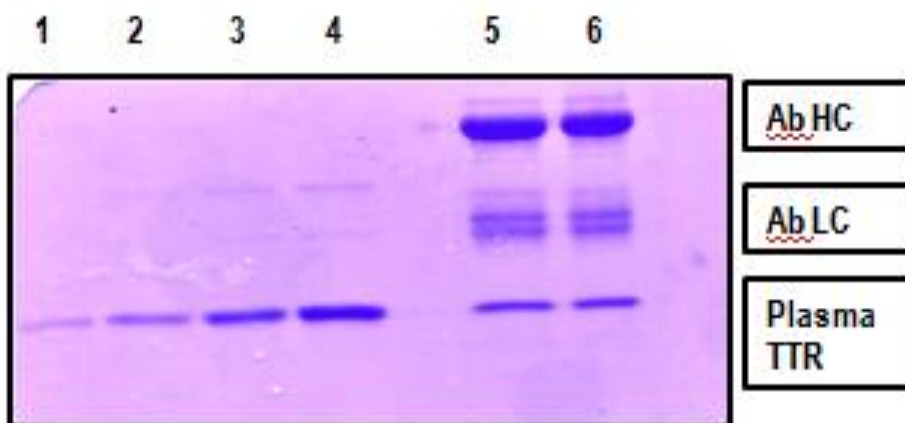


Figura 30. Analisi SDS-PAGE della TTR estratta dai campioni di plasma e trattenuta sulla superficie delle Immuno-Dynabeads prima del trattamento con Sample Buffer.

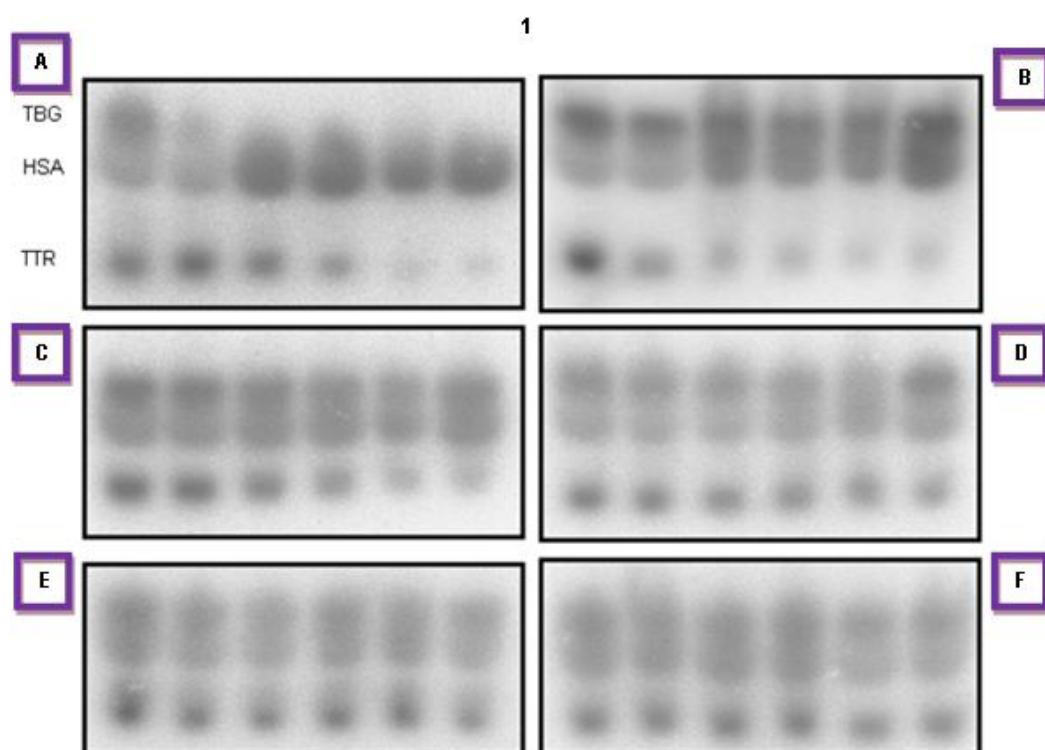
LANES: 1.Marker TTR 1 µg; 2.Marker TTR 2 µg; 3.Marker TTR 3 µg; 4.Marker TTR 4 µg; 5 e 6. Dynabeads trattate con Sample Buffer per 10 min. a 60 °C.

Ab HC (Heavy Chain TTR Antibody); **Ab LC** (Light Chain TTR Antibody); **Plasma TTR** (TTR plasmatica).

5.6 Prove di legame competitivo “ex vivo”

Tenendo conto dell’alto contenuto proteico, costituito da una molteplicità di proteine, del plasma umano, è stato importante valutare la capacità dei flavonoidi e dei loro principali metaboliti di legare selettivamente la TTR presente nel plasma. Il metodo consisteva nella valutazione del legame competitivo dei flavonoidi alla TTR, evidenziato grazie allo spiazzamento della T4-¹²⁵I aggiunta ai campioni di plasma. E’ noto che nel plasma umano la T4 si lega a 3 proteine di trasporto, separabili mediante PAGE nativo: la TBG, la HSA e la TTR, la cui velocità di migrazione aumenta passando dalla TBG alla TTR (Fig. 31). Per la valutazione dei risultati di legame competitivo di Apigenina, Genisteina, Daidzeina e dei loro metaboliti 7-glucuronidati rispetto alla T4-¹²⁵I, abbiamo testato il grado di spiazzamento della T4 marcata, proporzionale alla diminuzione del segnale di radioattività, dalla TTR. La Genisteina è risultata essere un ottimo competitore per il legame alla TTR plasmatica,

mentre l'Apigenina ha mostrato selettività apparentemente molto bassa (Figura 31), nonostante l'alta affinità rispetto al Resveratrolo (Figura 24 e 25) evidenziata nelle prove "in vitro" di fluorescenza con TTR ricombinante. La Daidzeina, che non appare competere significativamente col Resveratrolo per il legame alla TTR "in vitro", ha mostrato una, seppur bassa, abilità di legare selettivamente la TTR plasmatica (Figura 31). Genisteina e Daidzeina 7-glucuronidi in questo esperimento non sono state in grado di interferire significativamente col segnale della T4 legata alla TTR.



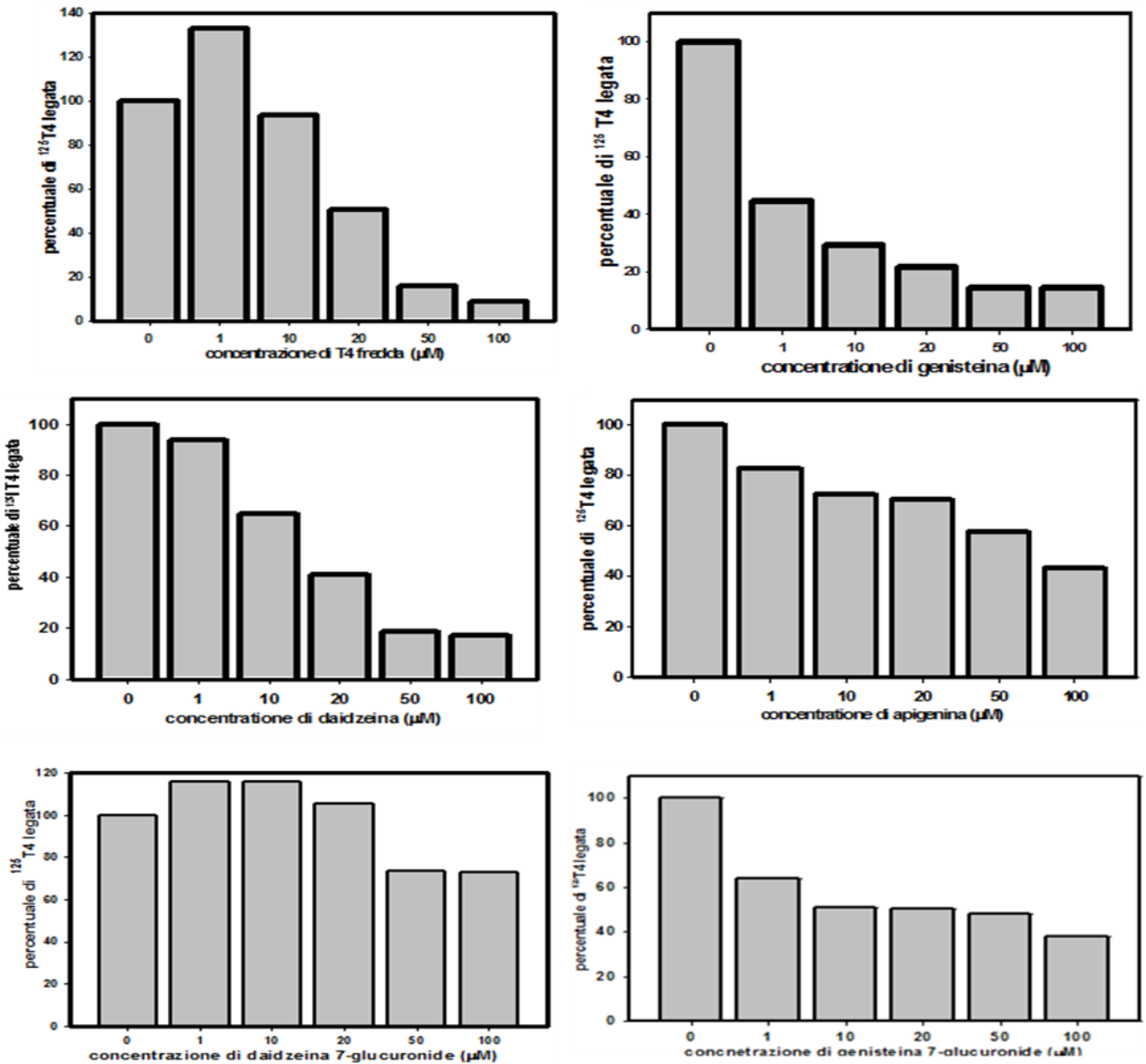


Figura 31. Analisi del legame competitivo di flavonoidi alla TTR plasmatica usando T4-¹²⁵I come probe.

Nel pannello I sono riportate le immagini acquisite su schermo sensibile alle radiazioni emesse da T4-¹²⁵I).

TBG (Thyroxine Binding Globuline); **HSA** (Human Serum Albumin); **TTR** (Trasthyretin). **A.** T4 fredda; **B.** Genisteina; **C.** Daidzeina; **D.** Apigenina; **E.** Daidzeina 7-glucuronide; **F.** Genisteina 7-glucuronide.

Nel pannello II sono riportati gli istogrammi che si riferiscono ai segnali di radioattività relativi alla sola TTR. In ascissa sono riportati le concentrazioni dei diversi ligandi aggiunti al plasma (0-10-20-50-100 μM), in ordinata

la percentuale del segnale di T4-¹²⁵I, calcolata considerando come 100% del segnale di radioattività quello emesso dal campione in presenza di T4-¹²⁵I in assenza di flavonoidi.

6. Risultati e Discussione

(parte seconda: Stilbeni)

6.1 Interazione tra Stilbeni e TTR I84S

E' noto che il Resveratrolo possiede una fluorescenza intrinseca che aumenta in seguito al legame con la TTR, infatti eccitando il composto alla lunghezza d'onda di 320 nm si ha un massimo di emissione a 390 nm. Di conseguenza si è voluta testare questa proprietà anche per alcuni degli altri componenti della sottoclasse degli stilbeni studiati, mantenendo gli stessi parametri di eccitazione e di emissione utilizzati per il Resveratrolo stesso. Come si nota dalla Figura 32 anche per gli altri stilbeni in esame, è ben visibile un incremento di fluorescenza in seguito al legame con la TTR, a dimostrazione che tutti questi composti sono in grado di legare la proteina oggetto d'indagine.

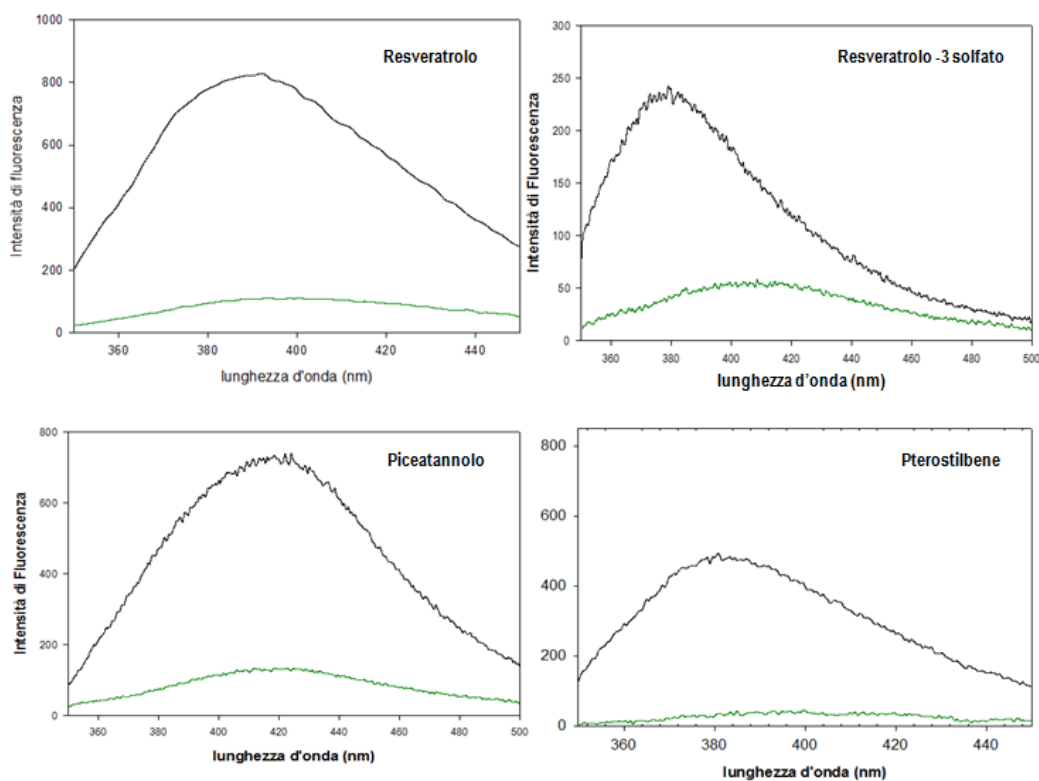


Figura 32. Spettri di fluorescenza degli stilbeni legati alla TTR I84S

Negli esperimenti la concentrazione della TTR era 1 μM e quella degli stilbeni era 2 μM .

In **nero**: complesso TTR-Stilbene; in **verde**: Stilbene libero.

6.2 Effetto stabilizzante degli stilbeni su TTR I84S in presenza di urea

Gli stilbeni ed alcuni metaboliti del Resveratrolo sono stati testati per valutare la loro capacità di stabilizzare la TTR I84S in presenza di urea 5M. La quantità di TTR monomericamente evidenziata mediante SDS-PAGE con gel di acrilamide al 15% è rappresentativa della proteina denaturata presente nei campioni in assenza ed in presenza dei ligandi studiati, dopo incubazione dei campioni in condizioni denaturanti (urea 5 M) e successivo cross-linking con glutaraldeide (Fig. 31). In queste prove un composto naturale che ha mostrato un significativo effetto stabilizzante nei confronti della TTR è stato il Resveratrolo-3-solfato, il metabolita principale del Resveratrolo, che ha effetto simile a quello del suo aglicone Resveratrolo. Quindi, benchè il Resveratrolo-3-solfato sembri avere, sulla base delle precedenti prove di legame competitivo con la T4, una minore affinità per la TTR se confrontato con il Resveratrolo, esso sembra possedere un effetto stabilizzante simile a quello del Resveratrolo stesso.

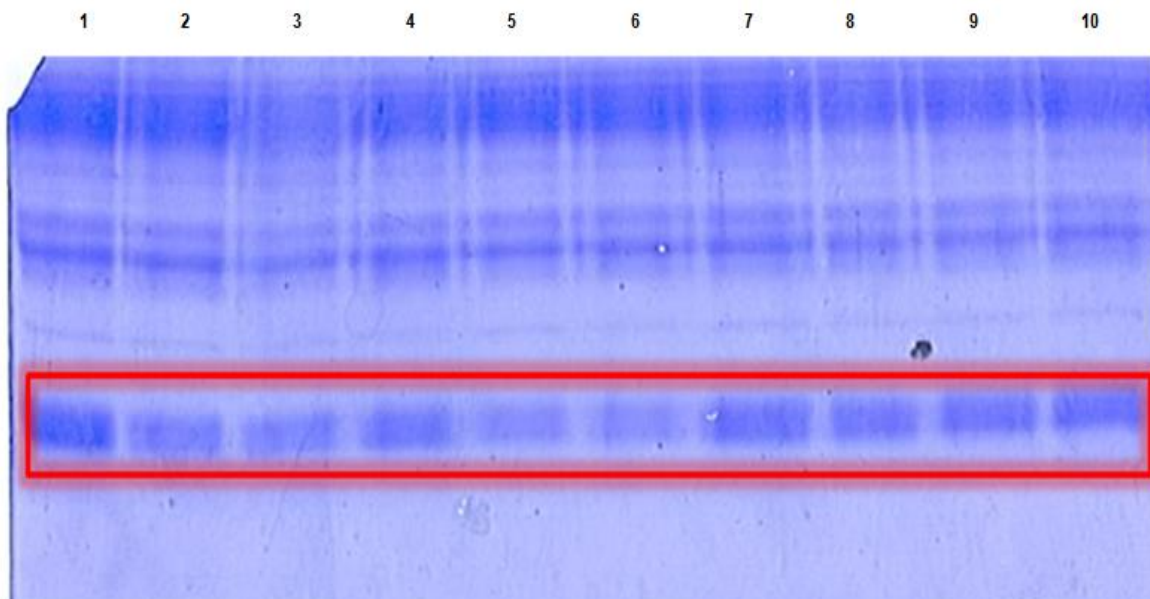


Figura 33. Effetto stabilizzante degli stilbeni sulla TTR I84S in presenza di urea 5M.

Da sinistra a destra: TTR I84S, controllo in assenza di ligandi (1), TTR + Resveratrolo (2 equivalenti molari, eq.) (2), TTR + Pterostilbene (2 eq.) (3), TTR + Piceatannolo (2 eq.) (4), TTR + Resveratrolo-3-solfato (2 eq.) (5), TTR + Resveratrolo-3-solfato (10 eq.) (6), TTR + Resveratrolo-4'glucuronide (2 eq.) (7), TTR + 4'glucuronide (10 eq.) (8), TTR + Resveratrolo-3'glucuronide (2 eq.) (9), Resveratrolo-3'glucuronide (10 eq.) (10). Nei campioni la concentrazione della TTR era 10 μM e quella dei ligandi 20 μM , solo per i metaboliti sono state testate concentrazioni anche pari a 100 μM .

6.3 Inibizione della fibrillogenesi del mutante TTR I84S a pH moderatamente acido da parte degli stilbeni

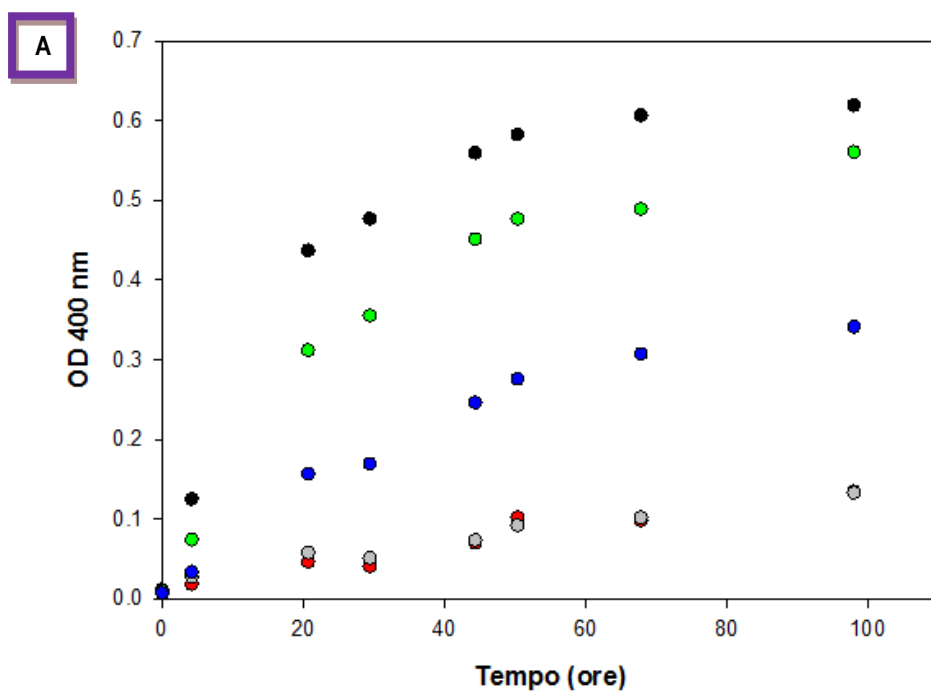
Gli esperimenti condotti per verificare l'abilità degli stilbeni testati di interferire con la fibrillogenesi della TTR, hanno messo in luce un forte effetto inibitorio esercitato dal Resveratrolo e dal Resveratrolo-3-solfato (Figura 34 e Tabella 5), nonché dallo Pterostilbene ed in minima parte anche dal Piceatannolo. Questi risultati sono abbastanza in accordo con quelli ottenuti nella prova di valutazione dell'effetto stabilizzante "in vitro" in presenza di urea 5M, ad eccezione dello Pterostilbene che in questa prova mostra un effetto inibente sulla

fibrillogenesi molto marcato. Il Trimetossi-resveratrolo ed i metaboliti glucuronidati del Resveratrolo hanno mostrato un effetto inibente sulla fibrillogenesi molto basso se confrontato con gli altri stilbeni studiati.

| Composto | I84S | RSV | RSV 3- solfat o | RSV 3gluc. | RSV 4'gluc. | Pterostilb ene | Piceatan nolo | Trimetoss iresveratr olo |
|-----------------|------|------|--------------------------|---------------|----------------|-------------------|------------------|--------------------------------|
| Percentuale (%) | 100 | 14.6 | 15.9 | 80.4 | 50.3 | 16 | 40 | 101.7 |

Tabella 5. Percentuali di formazione di fibrille in presenza ed in assenza dei diversi stilbeni studiati, dopo 72h di incubazione.

Il composto Resveratrolo è indicato con l'abbreviazione RSV.



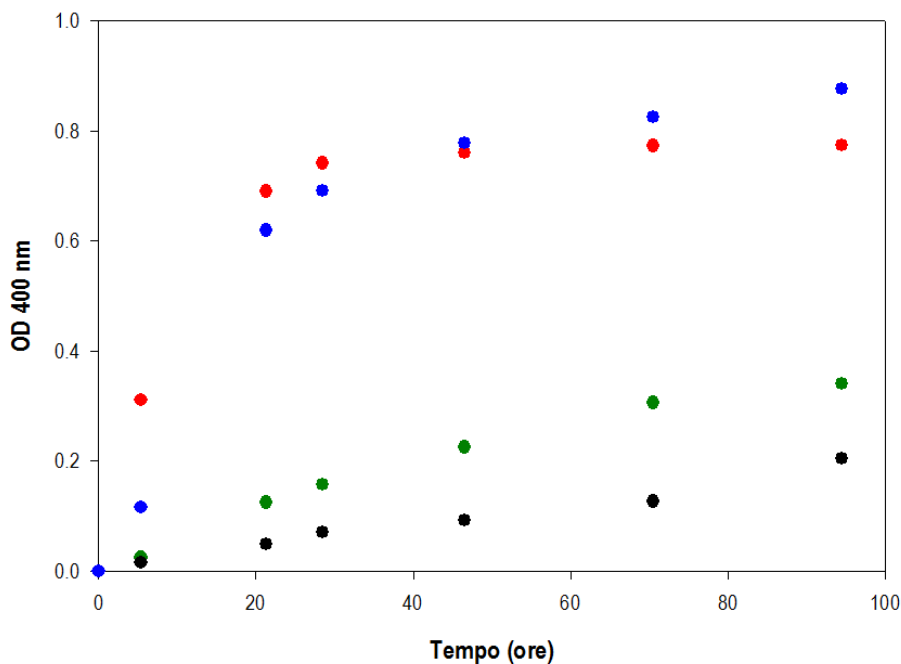
B

Figura 34. Cinetiche della fibrillogenesi del mutante TTR I84S in presenza ed in assenza di stilbeni.

A. Cerchio nero: TTR I84S in assenza di ligandi; cerchio rosso: TTR I84S+ Resveratrolo; cerchio grigio: TTR I84S+ Resveratrolo-3solfato; cerchio blu: TTR I84S+ Resveratrolo-4'glucuronide; cerchio verde: TTR I84S+ Resveratrolo-3 glucuronide.

B. Cerchio rosso: TTR I84S in assenza di ligandi; cerchio blu: TTR I84S+Trimetossiresveratrolo; cerchio verde: TTR I84S+ Piceatannolo; Cerchio nero: TTR I84S+ Pterostilbene.

6.4 Legame del Resveratrolo alla TTR I84S mediante competizione con T4 marcata radioattivamente

Per verificare ulteriormente la capacità degli stilbeni di legare la TTR, si è proceduto con prove di competizione che sfruttassero in questo caso non più il segnale di fluorescenza intrinseco dello stilbene ma il segnale di radioattività emesso dalla tiroxina marcata con ^{125}I ($\text{T4-}^{125}\text{I}$). Per questa prova di legame competitivo ci siamo limitati al solo Resveratrolo,

perché il risultato ottenuto con questo stilbene, che sembra essere il più affine alla TTR tra gli stilbeni testati, ha messo in evidenza il sostanziale mancato spiazzamento della T4 radioattiva dalla TTR, anche a concentrazioni di Resveratrolo particolarmente elevate ($\approx 50 \mu\text{M}$) (Fig. 35). Il comportamento del Resveratrolo in questa prova è risultato particolarmente informativo dal momento che nelle prove di legame competitivo in fluorescenza descritte precedentemente questo composto aveva dimostrato di rimanere legato alla TTR dopo l'aggiunta di una concentrazione equimolare di T4 (Fig. 24 A) e di subire solo un parziale spiazzamento in presenza di elevate concentrazioni di T4 (Fig. 31 A). Complessivamente, i risultati delle nostre indagini sul legame competitivo tra T4 e Resveratrolo alla TTR forniscono una sostanziale evidenza della presenza nella TTR di un sito di legame ad alta affinità per la T4, dal quale la T4 non sembra poter essere rimossa dal Resveratrolo (Fig. 35 B), ed un secondo sito ad alta affinità per il Resveratrolo, dal quale questo composto non sembra poter essere rimosso dalla T4 (Fig. 31 A). In particolare, nella Fig. 35 A si mostra lo spiazzamento di ($\text{T4-}^{125}\text{I}$) usata come tracciante legata alla TTR da parte di T4 fredda già a concentrazioni relativamente basse, e nella Fig. 35 B si mostra la incapacità del Resveratrolo di competere con ($\text{T4-}^{125}\text{I}$) legata alla TTR anche a concentrazioni di $50 \mu\text{M}$. Per confermare la interpretazione dei dati di legame che abbiamo formulato, nel nostro laboratorio verranno eseguite ulteriori indagini usando anche Resveratrolo marcato radioattivamente (disponibile commercialmente) come ulteriore probe. Questo probe radioattivo verrà anche usato per una indagine sulla selettività di legame di questo stilbene alla TTR plasmatica.

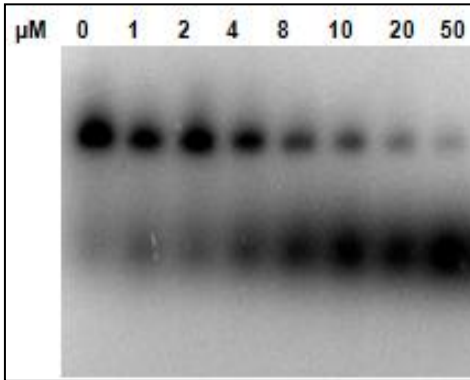
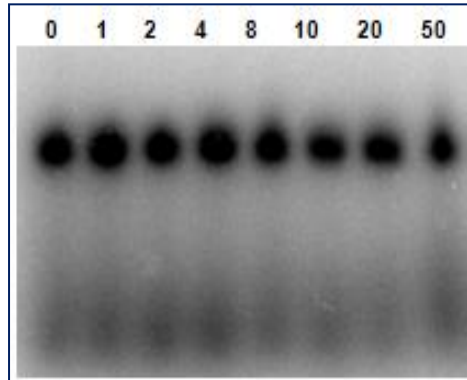
A**B**

Figura 35. Competizioni di legame alla TTR I84S utilizzando (T4-¹²⁵I) come probe.

Alla TTR 3 μM era aggiunta T4-¹²⁵I come probe, prima dei test di competizione. La lane 0, nelle due figure, rappresenta il controllo senza competitore, per cui sono presenti nel campione solo la TTR, la T4 marcata radioattivamente e il tampone PBS.

A: competizione fra T4 marcata e T4 fredda alle concentrazioni comprese fra 0 e 50 μM

B: competizione fra T4 marcata e Resveratrolo alle concentrazioni comprese fra 0 e 50 μM

7. Conclusioni

Le amiloidosi sono malattie degenerative che colpiscono l'uomo con esito letale, non essendo state individuate per essere efficaci terapie risolutive. L'unica eccezione sembra essere rappresentata dalle amiloidosi da TTR, per le quali è stata recentemente prospettato l'impiego a fini terapeutici di farmaci in grado di legare la proteina, stabilizzandone lo stato nativo e prevenendo le alterazioni strutturali alla base del suo "misfolding" e "misassembly" (Connelly S. et al., *Curr. Opin. Struct. Biology*, 2010). Questi composti di potenziale interesse come farmaci sono composti di sintesi aventi grandezza molecolare e somiglianza strutturale con il ligando naturale T4, proprietà che ne consente l'interazione con i due siti di legame della T4 nella TTR, risultandone la stabilizzazione del suo stato nativo. In questo studio abbiamo voluto verificare la capacità di alcune molecole naturali rappresentate da polifenoli, che hanno origine da fonti alimentari, e dei loro principali metaboliti fisiologici, di legare la TTR producendo così un effetto stabilizzante su questa proteina. Per affrontare questo studio, infatti, abbiamo focalizzato le nostre indagini su polifenoli che presentano struttura e grandezza molecolare simili a quelle della T4 e di composti di sintesi candidati per la terapia farmacologica dell'amiloidosi da TTR.

Stilbeni:

L'analisi fluorimetrica degli stilbeni e di alcuni loro metaboliti, ha rivelato la loro capacità di interagire con la TTR ricombinante resa visibile dall'incremento dell'intensità della fluorescenza intrinseca di ciascun composto quando legato alla TTR. Dopo questa osservazione, ci siamo rivolti allo studio delle interazioni della TTR con lo stilbene prototipo Resveratrolo. Un primo riscontro è stato che lo spettro di emissione del Resveratrolo legato alla TTR, viene solo perturbato in presenza di due equivalenti di T4 rispetto al Resveratrolo, suggerendo un forte legame di quest'ultimo composto alla TTR. Si è quindi proceduto con una competizione che sfruttasse in questo caso il segnale della T4 marcata radioattivamente in prove di legame competitivo col Resveratrolo. Il risultato interessante di questa analisi è stato che il Resveratrolo, il quale non riesce ad interferire con il segnale di

radioattività della T4 marcata, anche quando aggiunto a concentrazioni molto elevate. Questo dato è stato interpretato come presenza nella TTR di due siti di legame preferenziali per le due molecole leganti: un sito ad alta affinità per il Resveratrolo, che non subisce spiazzamento in presenza di un eccesso di T4, ed un sito ad alta affinità per la T4, che non subisce spiazzamento in presenza di un eccesso di Resveratrolo.

I risultati delle prove di stabilizzazione in urea, ma soprattutto di inibizione della fibrillogenesi acida, hanno messo in evidenza un marcato effetto stabilizzante per Resveratrolo, Resveratrolo-3 solfato (principale metabolita del Resveratrolo) e Pterostilbene.

Meno evidente, ma comunque presente è l'effetto stabilizzante del Piceatannolo, mentre i metaboliti glucuronidati del Resveratrolo sembrano avere un effetto protettivo trascurabile nei confronti della TTR.

Quindi concludendo, i nostri esperimenti "in vitro" mostrano che tutti gli stilbeni studiati possiedono un'affinità di legame per la TTR. Tutti gli stilbeni, ad eccezione dei metaboliti glucuronidati del Resveratrolo ed il Trimetossiresveratrolo, hanno mostrato l'abilità di stabilizzare lo stato nativo tetramericco della TTR e di inibirne l'aggregazione e la formazione di fibrille.

Riguardo all'interazione dello stilbene prototipo Resveratrolo con la TTR, la sua interazione è specifica, come dimostrato dai dati strutturali cristallografici (Klabunde et al. 2000) e dall'effetto di stabilizzazione prodotto sulla TTR. Ulteriori indagini, mediante l'uso di Resveratrolo marcato radio attivamente, verranno condotte nel nostro laboratorio per confermare l'esistenza nella TTR di due siti preferenziali, uno per la T4 ed uno per gli stilbeni.

Riguardo ad un effetto protettivo "in vivo" degli stilbeni sulla TTR, che potrebbe essere sfruttato a fini terapeutici nelle amiloidosi da TTR, occorre però considerare che l'assunzione di questi composti con la dieta è generalmente basso, non sufficiente per ottenere le concentrazioni plasmatiche necessarie per un effetto stabilizzante nei confronti della TTR. Dati in letteratura (Burkon et al. 2008) dimostrano infatti che dopo un'ora

dall'assunzione nell'uomo, di 85 mg di Resveratrolo la concentrazione nel plasma di Resveratrolo 3-solfato è pari a $0.95 \pm 0.16 \mu\text{M}$, metabolita principale che nel nostro studio è risultato fra i più promettenti nella stabilizzazione della TTR rispetto anche al Resveratrolo stesso, che invece si ritrova a concentrazioni molto più basse (5ng/mL) dopo un'ora dalla somministrazione. Quindi, aumentando l'assunzione di Resveratrolo si potrebbe raggiungere a livello plasmatico una concentrazione di Resveratrolo 3-solfato adatta per l'interazione di questo composto con la TTR, tale da prevenirne l'aggregazione patologica.

E' interessante l'osservazione che lo Pterostilbene, che ha mostrato oltre all'affinità di legame anche un buon effetto stabilizzante sulla TTR, risulta avere nei ratti una biodisponibilità circa quattro volte superiore a quella riscontrata per il Resveratrolo (Kapetanovic et al. 2010).

Per poter ottenere dei possibili benefici per la prevenzione dell'amiloidosi da TTR, si potrebbe somministrare formulati nutraceutici contenenti gli stilbeni, o loro metaboliti, a dosi sufficientemente elevate per ottenere le concentrazioni plasmatiche necessarie per un effetto protettivo sulla TTR.

Flavonoidi:

Le analisi fluorimetriche effettuate per questi composti hanno evidenziato la capacità di due soli flavonoidi (Apigenina e Genisteina) di legarsi alla TTR in presenza del competitore Resveratrolo, usato come probe fluorescente, spiazzandolo da uno dei due siti di legame della T4 della TTR. La Daidzeina ha mostrato di poter competere solo debolmente con il Resveratrolo, e trascurabile è apparso il legame competitivo da parte dei metaboliti 7-glucuronidati.

Per approfondire lo studio dell'interazione di questi flavonoidi con la TTR, si è proceduto con una competizione con la T4 marcata radioattivamente, valutando la diminuzione del segnale di radioattività in presenza dei flavonoidi. In questa prova si è messa in evidenza l'incapacità dell'Apigenina di competere con la T4, in contrasto con la competizione marcata

riscontrata in presenza del Resveratrolo (nelle prove di fluorescenza). Questo ci ha indotto a pensare alla possibile presenza di due siti di legame preferenziale nella TTR, uno per la T4 ed uno per l'Apigenina (così come osservato per il Resveratrolo). Poiché la Genisteina appare in grado di ridurre il segnale di radioattività della T4 legata alla TTR, presumibilmente essa è in grado di legare la proteina in entrambi i siti. Anche la Daidzeina ha mostrato questa abilità ma solo ad alte concentrazioni.

Nelle prove di stabilizzazione della TTR in presenza di urea 5M ed in condizioni moderatamente acide (pH 4.2) è stato possibile verificare che, i composti naturali più promettenti sono rappresentati dall'Apigenina e dalla Genisteina, in accordo con il loro più forte legame alla TTR. Questi composti naturali, se confrontati con il Diflunisal (farmaco proposto per la terapia farmacologica dell'amiloidosi da TTR), in presenza di urea 5M sembrano mostrare un effetto protettivo più marcato. Meno evidente, ma comunque presente è l'effetto stabilizzante della Daidzeina, mentre i metaboliti Genisteina e Daidzeina 7-glucuronide non sembrano avere un effetto protettivo sulla TTR.

I dati dell'analisi "ex-vivo" con plasma umano dell'interazione dei flavonoidi con la TTR plasmatica, usando la metodologia dell'immunoaffinità, effettuata per valutare il comportamento e la selettività di legame di tali composti naturali in un contesto fisiologico, rappresentato da una molteplicità di proteine plasmatiche, hanno permesso di mettere in luce, una buona e simile selettività di legame per i due flavonoidi (Apigenina e Genisteina) che legano con maggior affinità la TTR ricombinante,, in accordo con quanto riportato in letteratura (Green et al. 2005). Invece per i composti glucuronidati non si è riscontrata la capacità di legare la TTR plasmatica.

Un altro approccio di studio "ex-vivo" per la valutazione della selettività del legame, da parte dei flavonoidi, per la TTR plasmatica è stato l'uso della T4 marcata radioattivamente e la valutazione della diminuzione del suo segnale di radioattività in presenza dei diversi ligandi aggiunti a diverse concentrazioni. La selettività più evidente è stata mostrata per i composti Genisteina e Daidzeina. La differenza è stata che il primo mostra un'alta selettività nel

legame verso la TTR in quanto è in grado di spiazzare la T4 marcata già a basse concentrazioni ($\approx 1 \mu\text{M}$), mentre la seconda mostra capacità di legame solo ad alte concentrazioni ($\approx 20 \mu\text{M}$).

Per gli altri composti oggetto di studio non è stata riscontrata selettività nel legame alla TTR plasmatica.

Poiché i diversi flavonoidi potrebbero avere diversa affinità per il supposto sito preferenziale della T4, i suddetti risultati dei test “ex-vivo” usando come probe la T4 marcata radioattivamente non sono conclusivi riguardo alle proprietà di selettività di legame alla TTR. Saranno quindi necessarie ulteriori indagini per stabilire definitivamente le proprietà di selettività di legame, come nel caso del Resveratrolo.

Tuttavia, risulta evidente che solo gli agliconi dei flavonoidi, cioè le specie naturali da noi studiate, mostrano una forte o discreta affinità di legame ed effetto stabilizzante nei confronti della TTR. Purtroppo però, l'*intake* di questi composti attraverso la dieta risulta essere relativamente basso e non sufficiente per ottenere le concentrazioni necessarie per avere un effetto stabilizzante sulla TTR (Mitsuyoshi et al. 2006; Fanti et al. 2003). E' interessante l'osservazione che il metabolismo dei flavonoidi porta alla formazione di derivati prevalentemente glucuronidati, che abbiamo verificato (in particolare nel caso di Genisteina e Daidzeina) non legare la TTR ricombinante e la TTR plasmatica, molto probabilmente a causa dell'ingombro sterico della porzione glucuronica.

Sarebbe quindi necessario trovare un modo per aumentare la biodisponibilità dei composti sotto forma di agliconi in modo da poterli impiegare come potenziali “farmaci naturali” per la prevenzione dell' amiloidosi da TTR. A questo riguardo sono in corso studi sul potenziale aumento della biodisponibilità dei flavonoidi mediante l'uso di nano particelle (Yran et al.2012).

Bibliografia

Arts ICW, Hollman PCH. *"Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies"*. Am J Clin Nutr (2005) 81 (suppl):317S–25S

Barnes S. *"Phyto-oestrogens and osteoporosis: What is a safe dose?"*. Br J Nutr. (2003) 89:101-108.

Beenu Tanwar, Rajni Modgil, Chaudhary Sarwan Kumar Himachal Pradesh Krishi Vishwavidyalaya, Palampur, Himachal Pradesh. *"Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits"*. Spatula DD (2012) 2 (1) 58-68

Benson M.D. and Kincaid J.C. *"The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy"*. Muscle Nerve (2007) 36, 411-23

Berni R, Malpeli G, Folli C, Murrell JR, Liepnieks JJ, Benson MD. *"The Ile-84-->Ser amino acid substitution in transthyretin interferes with the interaction with plasma retinol-binding protein"*. J Biol Chem. (1994)269(38):23395-8

Blake C.C., Geisow M.J., Oatley S.J., Rerat B. and Rerat C. *"Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å"*. J. Mol. Biol. (1978) 121, 339-356

Burkon Alexander and Veronika Somoza. *"Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O.conjugated diglucuronides- Two novel resveratrol metabolites in human plasma"*. Mol. Nutr. Food Res. (2008) 52,549-557

Calderone V, Berni R & Zanotti G. "High-resolution structures of retinol-binding protein in complex with retinol: pH-induced protein structural changes in the crystal state". J Mol Biol (2003) 329, 841–850

Carlsen H, Myhrstad MCW, Blomhoff R. "Polyphenols and glutathione synthesis regulation". Am J Clin Nutr (2005) 81 (suppl):277S– 83S

Carme Plumed-Ferrer, Kati Väkeväinen, Heli Komulainen, Maarit Rautiainen, Annika Smeds, Jan-Erik Raitanen, Patrik Eklund, Stefan Willför, Hanna-Leena Alakomi, Maria Saarela, Atte von Wright. "The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms". International Journal of Food Microbiology (2013) 164 99–107

Chen J, Lin H, Hu M. "Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model". Cancer Chemother Pharmacol (2005) 55 (2):159–69

Collins AR. "Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols". Am J Clin Nutr (2005) 1 (suppl):261S–7S

Connelly, S., Choi, S., Johnson, S.M., Kelly, J.W. and Wilson, I.A. "Structure-based design of kinetic stabilizers that ameliorate the transthyretin amyloidoses". Curr. Opin. Struct. Biol. (2010) 20, 54–62

Cowan SW, Newcomer ME & Jones TA. "Crystallographic refinement of human serum retinol binding protein at 2Å resolution". Proteins (1990) 8, 44–61

Dayong Si, Wang Y, Zhou Y-H, Guo Y, Wang J, Zhou H, Li Z-S, Fawcett JP. "Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols". *Drug Metabolism and Disposition* (2009) **37**: 629-634.

Del Rio Daniele, Ana Rodriguez-Mateos, Jeremy P.E. Spencer, Massimiliano Tognolini, Gina Borges and Alan Crozier. "Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Disease" *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* (2012) Volume 00, Number 00

Dixon Richard A., Daneel Ferreira. "Molecules of Interest Genistein". *Phytochemistry* (2002) **60** 205–211

Donovan JL, Manach C, Faulks RM, and Kroon PA. Absorption and metabolism of dietary secondary metabolites. " *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*". edited by Crozier A, Clifford MN, and Ashihara H. Oxford: Blackwell Publishing (2006) pp. 303–351

Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, Shimada K, Gaitanaris GA, Gottesman ME & Robertson EJ. "Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone". *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) **90**, 2375–2379

Fanti P, Stephenson TJ, Kaariainen IM, Rezkalla B, Tsukamoto Y, Morishita T, Nomura M, Kitiyakara C, Custer LJ, Franke AA. "Serum isoflavones and soya food intake in Japanese, Thai and American end-stage renal disease patients on chronic haemodialysis". *Nephrol Dial Transplant.* (2003) Sep;**18**(9):1862-8.

Fex G, Albertsson PA & Hansson B. "*Interaction between prealbumin and retinol-binding protein studied by affinity chromatography, gel filtration and two-phase partition*". Eur J Biochem (1979) 99, 353–360

Folli C, Viglione S, Busconi M & Berni R. "*Biochemical basis for retinol deficiency induced by the I41N and G75D mutations in human plasma retinol-binding protein*". Biochem Biophys Res Commun (2005) 336, 1017–1022

Forman HJ, Torres M, Fukuto J. "*Redox signaling*". Mol Cell Biochem (2002) 234 –235:49–62

Goodman DS & Raz A. "*Extraction and recombination studies of the interaction of retinol with human plasma retinol-binding protein*". J Lipid Res (1972) 13, 338–347

Goodman DS. "*Plasma retinol-binding protein. In The Retinoids*". (Sporn MB, Roberts AB & Goodman DS, eds), (1984) pp. 41–88. Academic Press, New York, NY

Green Nora S., Ted R. Foss, and Jeffery W. Kelly. "*Genistein, a natural product from soy, is a potent inhibitor of transthyretin amyloidosis*". PNAS (2005) vol. 102 n. 41 14545–14550

Halliwell B, Rafter J, Jenner A. "*Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?*". Am J Clin Nutr (2005) 81 (suppl):268S–76S

Hornberg A, Eneqvist T, Olofsson A, Lundgren E & Sauer-Eriksson A.E. "*A comparative analysis of 23 structures of the amyloidogenic protein transthyretin*". J Mol Biol (2000) 302, 649–669

Jacobson DR, Pastore RD, Yaghoubian R, Kane I, Gallo G, Buck FS, Buxbaum JN. "Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late-onset cardiac amyloidosis in black Americans". *N Engl J Med.* (1997) 336:466-473

Johnson SM, Wiseman RL, Sekijima Y, Green NS, Adamski-Werner SL, Kelly JW. "Native state kinetic stabilization as a strategy to ameliorate protein misfolding diseases: a focus on the transthyretin amyloidoses". *Acc Chem Res.* (2005) 38:911-921

Johnson Steven M., Stephen Connelly, Colleen Fearn, Evan T. Powers and Jeffery W. Kelly. "The Transthyretin Amyloidoses: From Delineating the Molecular Mechanism of Aggregation Linked to Pathology to a Regulatory-Agency-Approved Drug". *J. Mol. Biol.* (2012) 421, 185–203)

Kapetanovic Izet M., Miguel Muzzio, Zhihua Huang, Thomas N. Thompson, David L. McCormick. "Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats". Springer-Verlag (2010)

Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D & Sun H. "A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A". *Science* (2007) 315, 820–825

Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. "Cocoa antioxidants and cardiovascular health". *Am J Clin Nutr* (2005) 81 (suppl):298S– 303S;

Klabunde T, Petrassi HM, Oza VB, Raman P, Kelly JW, Sacchettini JC. "Rational design of potent human transthyretin amyloid disease inhibitors". *Nat Struct Biol.* (2000)7(4):312-21

Liu Y, Hu M. "Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model". *Drug Metab Dispos* (2002) 30 (4):370–7

Liu Y, Liu Y, Dai Y, Xun L, Hu M. "Enteric disposition and recycling of flavonoids and ginkgo flavonoide". *J Altern Complement Med* (2003) 9 (5):631–40

Lyons, M., Yu, C., Toma, R., Cho, S., Reiboldt, W., Lee, J., Van Breemen, R. "Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003) 51, 5867–5870

Malpeli G, Folli C & Berni R. "Retinoid binding to retinol-binding protein and the interference with the interaction with transthyretin". *Biochim Biophys Acta* (1996) 1294, 48–54

Manzano S and Williamson G. "Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells". *Mol Nutr Food Res* (2010) 54: 1773–1780

Masanori Miyata, Takashi Sato, Miyuki Kugimiya, Misato Sho, Teruya Nakamura, Shinji Ikemizu, Mami Chirifu, Mineyuki Mizuguchi, Yuko Nabeshima, Yoshiaki Suwa, Hiroshi Morioka, Takao Arimori, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, Yasuhiro Sako, Mamiko Momohara, Tomoaki Koga, Saori Morino-Koga, Yuriko Yamagata, and Hirofumi Kai. "The Crystal Structure of the Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin Gallate-Transthyretin Complex Reveals a Novel Binding Site Distinct from the Thyroxine Binding Site". *Biochemistry* (2010) 49, 6104–6114

Mattson, T.E., Johny, A.K., Amalaradjou, M.A.R., More, K., Schreiber, D.T., Patel, J., Venkitanarayanan, K. *"Inactivation of Salmonella spp. on tomatoes by plant molecules"*. International Journal of Food Microbiology (2011) 144, 464–468

Merlini Giampaolo, Rapezzi Claudio, Candida C. Quarta, Letizia Riva, Simone Longhi, Ornella Leone , Fabrizio Salvi, Paolo Ciliberti, Francesca Pastorelli, Elena Biagini, Fabio Coccolo, Robin M.T. Cooke, Letizia Bacchi-Reggiani, Diego Sangiorgi, Alessandra Ferlini, Michele Cavo, Elena Zamagni, Maria Luisa Fonte, Giovanni Palladini, Francesco Salinaro, Francesco Musca, Laura Obici, Angelo Branzi and Stefano Perlini. *"Systemic cardiac amyloidoses. Disease profiles and clinical courses of the three main types. Circulation"*. (2009) 120, 1203–1212

Miller Sean R., Yoshiki Sekijima and Jeffery W. Kelly. *"Native state stabilization by NSAIDs inhibits transthyretin amyloidogenesis from the most common familial disease variants"*. Laboratory investigation (2004) 84, 545-552.

Ming Hu. *"Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms"*. Mol Pharm. (2007) 4 (6): 803–806

Miroy GJ, Lai Z, Lashuel HA, Peterson SA, Strang C, Kelly JW. *"Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization"*. Proc Natl Acad Sci U S A. (1996) 93(26):15051-6

Mitsuyoshi Kano, Tomomi Takayanagi, Katsuhisa Harada, Seigo Sawada, and Fumiyasu Ishikawa. *"Bioavailability of Isoflavones after Ingestion of Soy Beverages in Healthy Adults"*. J. Nutr. (2006) 136: 2291–2296.

Monaco HL, Rizzi M & Coda A. "Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein". *Science* (1995) 268, 1039–1041

Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, et al. "Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study". *J Bone Miner Res* (2002) 17:1904 –12

Moskaug JØ, Holmgren G, Ericzon BG, Groth CG, Steen L, Suhr O, Andersen O, Wallin BG, Seymour A, Richardson S, Hawkins PN. "Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis". *Lancet*. (1993) 341:1113-1116

Naylor HM & Newcomer ME. "The structure of human retinol-binding protein (RBP) with its carrier protein transthyretin reveals an interaction with the carboxy terminus of RBP". *Biochemistry* (1999) 38, 2647–2653

Neumann P, Cody V, Wojtczak A. "Structural basis of negative cooperativity in transthyretin". *Acta Biochim Pol*. (2001) 48(4):867-75

Olofsson, B. O.; Backman, C.; Karp, K.; Suhr, O. B. "Progression of cardiomyopathy after liver transplantation in patients with familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type". *Transplantation* (2002) 73, 745-751

Ono, K., Y. Yoshiike, A. Takashima. "Potent antiamyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease". *J. Neurochem*. (2003) 87: 172–181

Pazzi Francesco. “*Gli Stilbeni*”. Fondazione Diritti Genetici (2003)

Pepys M.B. “*Amyloidosis*”. *Annu. Rev. Med.* (2006) 57, 223-241)

Pereira, C., P. Agostinho, P. I. Moreira. “*Alzheimer’s disease-associated neurotoxic mechanisms and neuroprotective strategies*”. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord* (2005) 4: 383–403

Pullakhandam, R., Srinivas, P.N.B.S., Nair, M.K., Reddy, G.B. “*Binding and stabilization of transthyretin by curcumin*”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2009) 485, 115-119.

Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantedosi R, Gouras P, Freeman S, Cosma MP, Colantuoni V & Gottesman ME. “*Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein*”. *EMBO J* (1999) 18, 4633–4644

Rapezzi C, C. Quarta, L. Riva, S. Longhi, I. Gallelli, M. Lorenzini, P. Ciliberti, E. Biagini, F. Salvi and A. Brandi. “*Transthyretin-related amyloidoses and heart: a clinical overview*”. *Nat.Rev.Cardiol.* (2010) 7; 398-408

Radovic Branislav, Birgit Mentrup and Josef Kohrle. “*Genistein and other soya isoflavones are potent ligands for transthyretin in serum and cerebrospinal fluid*”. *British Journal of Nutrition* (2006), 95, 1171–1176

Richardson SJ, Monk JA, Shepherdley CA, Ebbesson LO, Sin F, Power DM, Frappell PB, Kohrle J & Renfree MB. “*Developmentally regulated thyroid hormone distributor proteins in*

marsupials, a reptile, and fish". Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol (2005) 288, R1264–R1272

Ritchie, K. & S. Lovestone. "*The dementias*". The Lancet (2002) 360: 1759–1766

Riviere, C., J.C. Delaunay, F. Immel. "*The polyphenol piceid destabilizes preformed amyloid fibrils and oligomers in vitro: hypothesis on possible molecular mechanisms*". Neurochem. Res.(2009) 34: 1120–1128

Riviere, C., Y. Papastamoulis, P. Y. Fortin. "*New stilbene dimers against amyloid fibril formation*". Bioorg. Med. Chem. Lett. (2010) 20: 3441–3443

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. "*Dietary polyphenols and the prevention of diseases*". Crit Rev Food Sci Nutr (2005)

Scalbert Augustin, Ian T Johnson, and Mike Saltmarsh. "*Polyphenols: antioxidants and beyond*". Am J Clin Nutr (2005) 81 (suppl):215S–7S

Selkoe, D.J. "*Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*". Physiol. Rev (2001) 81: 741–766.

Shen Tao, Chun-Feng Xie, Xiao-Ning Wang, and Hong-Xiang Lou K.G. Ramawat, J.M. Mé rillon. "*Stilbenoids*". (eds.), Natural Products Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2013)

Sies H, Schewe T, Heiss C, Kelm M. "*Cocoa polyphenols and inflammatory mediators*". Am J Clin Nutr (2005) 81 (suppl):304S–12S

Sivaprasadarao A, Findlay JB. "Structure-function studies on human retinol-binding protein using site-directed mutagenesis". *Biochem J.* (1994) 300 (Pt 2):437-42

Soodabeh Saeidnia, Mohammad Abdollahi. "Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases". *Toxicology and Applied Pharmacology* (2013) article in press

Stockigt JR. "Free thyroid hormone measurement. A critical appraisal". *Endocrinol Metab Clin North Am.* Jun (2001) 30(2):265-89. Review

Toh J. Y. & Verena M. H. Tan & Paul C. Y. Lim & S. T. Lim & Mary F. F. "Flavonoids from Fruit and Vegetables: A Focus on Cardiovascular Risk Factors". *Chong Curr Atheroscler Rep* (2013) 15:368

Trägårdh L, Anundi H, Rask L, Sege K, Peterson PA. "On the stoichiometry of the interaction between prealbumin and retinol-binding protein". *J Biol Chem.* (1980)255(19):9243-8

Tristan Richard, Alison D. Pawlus, Marie-Laure Igl' esias, Eric Pedrot, Pierre Waffo-Teguo, Jean-Michel M' erillon, and Jean-Pierre Monti. "Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2011) 1215 103–108.

Trivella Daniela B.B., Lucas Bleicher, Leonardo de Castro Palmieri, Helton José Wiggers, Carlos Alberto Montanari, Jeffery W. Kelly, Luís Mauricio T.R. Lima, Débora Foguel, Igor Polikarpov. "Conformational differences between the wild type and V30M mutant transthyretin modulate its binding to genistein: Implications to tetramer stability and ligand". *Journal of Structural Biology* (2010) 170 522–531

Trivella, D.B.B., dos Reis, C.V., Lima, L.M.T.R., Foguel, D., Polikarpov, I. "*Flavonoid interactions with human transthyretin: Combined structural and thermodynamic analysis*". Journal of Structural Biology (2012) 180, 143-153

Välilmaa, A., Honkalampi-Hämäläinen, U., Pietarinen, S., Willför, S., Holmbom, B., von Wright, A. "*Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms*". International Journal of Food Microbiology (2007) 115, 235–243

Van Bennekum AM, Wei S, Gamble MV, Vogel S, Piantedosi R, Gottesman M, Episkopou V & Blaner WS. "*Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice*". J Biol Chem (2001) 276, 1107–1113

Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, Das DK, Delmas D, Gottfried C, Lin H-Y, Ma Q-Y, Mukhopadhyay P, Nalini N, Pezzuto JM, Richard T, Shukla Y, Y-JSurh ST, Szkudelski T, Walle T, Wu JM. "*What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol*". PLoS One (2011)

Vita JA. "*Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function*". Am J Clin Nutr (2005) 81 (suppl):292S–7S;

Waits RP, Yamada T, Uemichi T, Benson MD. "*Low plasma concentrations of retinol-binding protein in individuals with mutations affecting position 84 of the transthyretin molecule*". Clin Chem. (1995) 41(9):1288-91

Williamson G, Manach C. *"Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II".* Review of 93 intervention studies. Am J Clin Nutr (2005) 81 (suppl):243S–55S

Wojtczak A. *"Crystal structure of rat transthyretin at 2.5 Å resolution: first report on a unique tetrameric structure".* Acta Biochim Pol (1997) 44, 505–517

Zanotti G, Berni R & Monaco HL. *"Crystal-structure of liganded and unliganded forms of bovine plasma retinol-binding protein".* J Biol Chem (1993) 268, 10728–10738

Zanotti G, Folli C, Cendron L, Alfieri B, Nishida SK, Gliubich F, Pasquato N, Negro A, Berni R. *"Structural and mutational analyses of protein-protein interactions between transthyretin and retinol-binding protein".* FEBS J. (2008) 275(23):5841-54

Zanotti G, Ottonello S, Berni R & Monaco HL. *"Crystal-structure of the trigonal form of human plasma retinol-binding protein at 2.5-angstrom resolution".* J Mol Biol (1993) 230, 613–624

Zanotti G. and Berni R. *"Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin".* Vitam. Horm. (2004) 69, 271-295