



Caratterizzazione strutturale in microscopia crio-elettronica di fibrille di un gatto affetto da Amiloidosi AA

Melissa Milazzo¹, Antonio Chaves-Sanjuan^{1,2}, Luca Broggin³, Filippo Ferri^{4,5,6}, Carlo Palizzotto⁴, Silvia Ferro⁷, Eric Zini^{4,5,8}, Stefano Ricagno^{1,3}

¹Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Italia.

²CRC Fondazione Romeo e Enrica Invernizzi and NOLIMITS, Università degli Studi di Milano, Italia.

³Istituto di Cardiologia Molecolare e Trasazionale, IRCCS, Policlinico San Donato, Milano, Italia.

⁴AniCura Istituto Veterinario Novara, Novara, Italia.

⁵Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute, Università di Padova, Padova, Italia.

⁶Studio Veterinario Associato Vet2Vet di Ferri e porporato, Orbassano, Torino, Italia.

⁷Dipartimento di Biomedicina Comparativa e Scienze del Cibo, Università di Padova, Padova, Italia.

⁸Clinic for Small Animal Internal Medicine, Vetsuisse Faculty, Università di Zurigo, Svizzera

Contatti: melissa.milazzo@unimi.it, stefano.ricagno@unimi.it



Lo sapevi che.... Disfunzioni renali nei gatti potrebbero essere associate ad Amiloidosi AA? Purtroppo, però, si conosce ancora poco questa patologia e la diagnosi avviene solo dopo la morte dell'animale stesso. Ma di che si tratta?

L'amiloidosi AA è una patologia definita sistemica, in quanto colpisce più organi dell'individuo affetto. Nello specifico, il fegato, i reni e la milza sono tra gli organi più compromessi. La principale causa che porta allo sviluppo dell'amiloidosi AA è un'iperproduzione della proteina Siero Amiloide A (SAA). Tale proteina è normalmente espressa durante l'infiammazione. Di conseguenza, infiammazioni croniche causate da alcune patologie, quali il Diabete Mellito di Tipo II, portano ad una espressione eccessiva di SAA. Lo sviluppo di Amiloidosi AA, tuttavia, coincide con la perdita della struttura nativa della proteina SAA, la quale aggrega formando delle grandi strutture elicoidali, chiamate fibrille amiloidi, che si depositano negli organi, ostacolando la loro funzione fisiologica fino ad arrivare alla rottura dell'organo stesso. Sintomi associati all'Amiloidosi AA possono essere disfunzioni renali e spleniche. Nonostante l'incidenza della malattia sia notevolmente diminuita in concomitanza al decremento di casi di Tuberculosis, l'incidenza di Amiloidosi AA sale se si considerano i pazienti affetti da alcune infiammazioni croniche (come Artrite reumatoide, Diabete Mellito di Tipo II). Inoltre, Ferri et al. hanno identificato un'alta prevalenza di Amiloidosi AA in popolazioni di gatti che vivono in rifugi. Allo stesso modo, Zhang et al. Hanno osservato una netta prevalenza della patologia in ghepardi in cattività. In questo progetto, si pone particolare attenzione sull'Amiloidosi AA nei gatti, studiando la forma delle fibrille amiloidi per svelare il mistero della loro formazione e per trovare nuovi farmaci in grado di curare gli individui affetti dalla patologia. Sfruttando la diagnosi post-mortem della malattia, lo studio viene eseguito su organi di gatto post-mortem, lasciando il gatto libero di vivere la sua vita con il suo padrone o nel suo rifugio.

Il metodo: la Microscopia Crio-Elettronica

La Microscopia Crio-Elettronica (o Cryo-EM) è utilizzata per ottenere strutture tridimensionali di proteine più statisticamente vicine alla loro forma fisiologica. Grazie alla Cryo-EM è possibile ottenere risoluzioni elevate (fino a 1 Ångstrom, ovvero 10⁻¹⁰ metri!), le quali ci permettono di identificare le singole componenti che formano la proteina (residui amminoacidici) e gli atomi che formano tali residui (per questo si parla di risoluzione atomica).

Il funzionamento del microscopio crio-elettronico comprende una sorgente di elettroni che vengono indirizzati verso il campione il quale genera un'immagine bidimensionale. Perché si utilizzano gli elettroni? Perché particelle piccole interagiscono con oggetti piccoli (come indicato nella Fig.1).

Il processamento dei dati ottenuti dal microscopio viene eseguito al computer con Relion o CryoSPARC (due sistemi informatici).

Grazie ad essi è possibile scomporre le immagini bidimensionali ottenute con il microscopio crio-elettronico ed utilizzare le loro proiezioni per ricostruire un'immagine tridimensionale della nostra proteina.

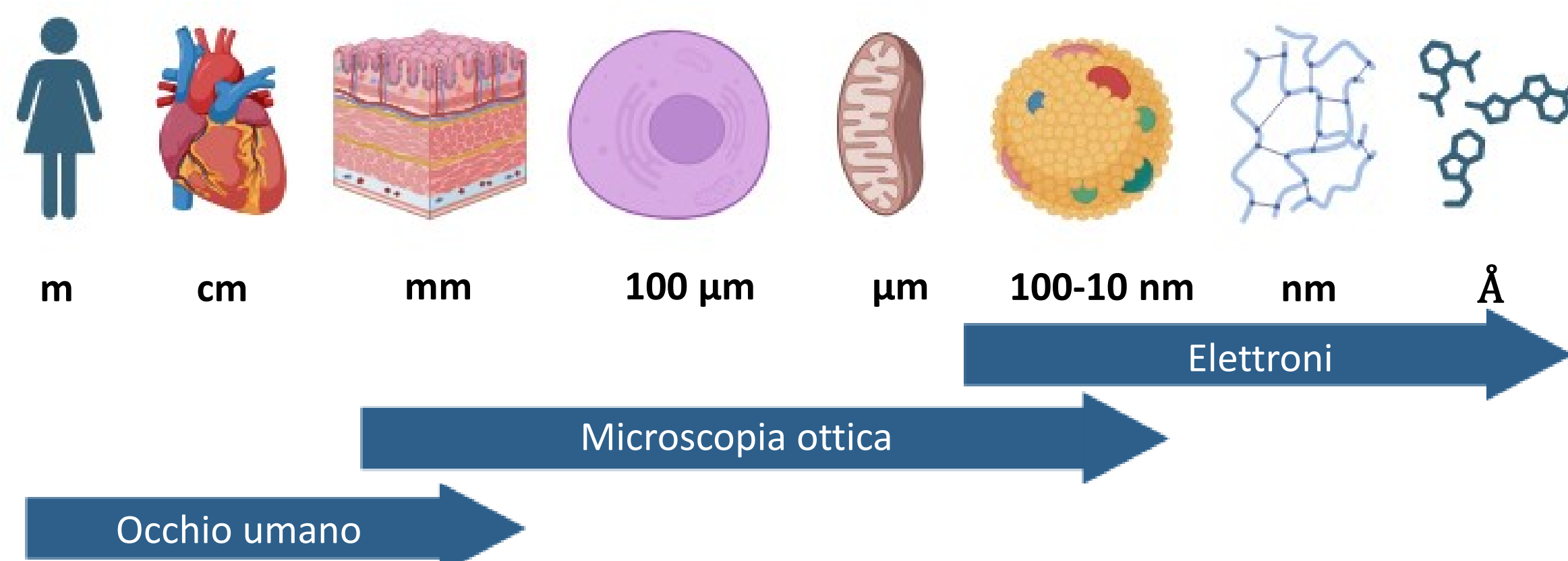


Fig.1 Schema rappresentativo dei limiti di osservazione a partire da diverse sorgenti: dai nostri occhi (ovvero il range della luce visibile), fino agli elettroni (quindi ad oggetti molto piccoli, come gli amminoacidi e gli atomi).

Preparazione del campione

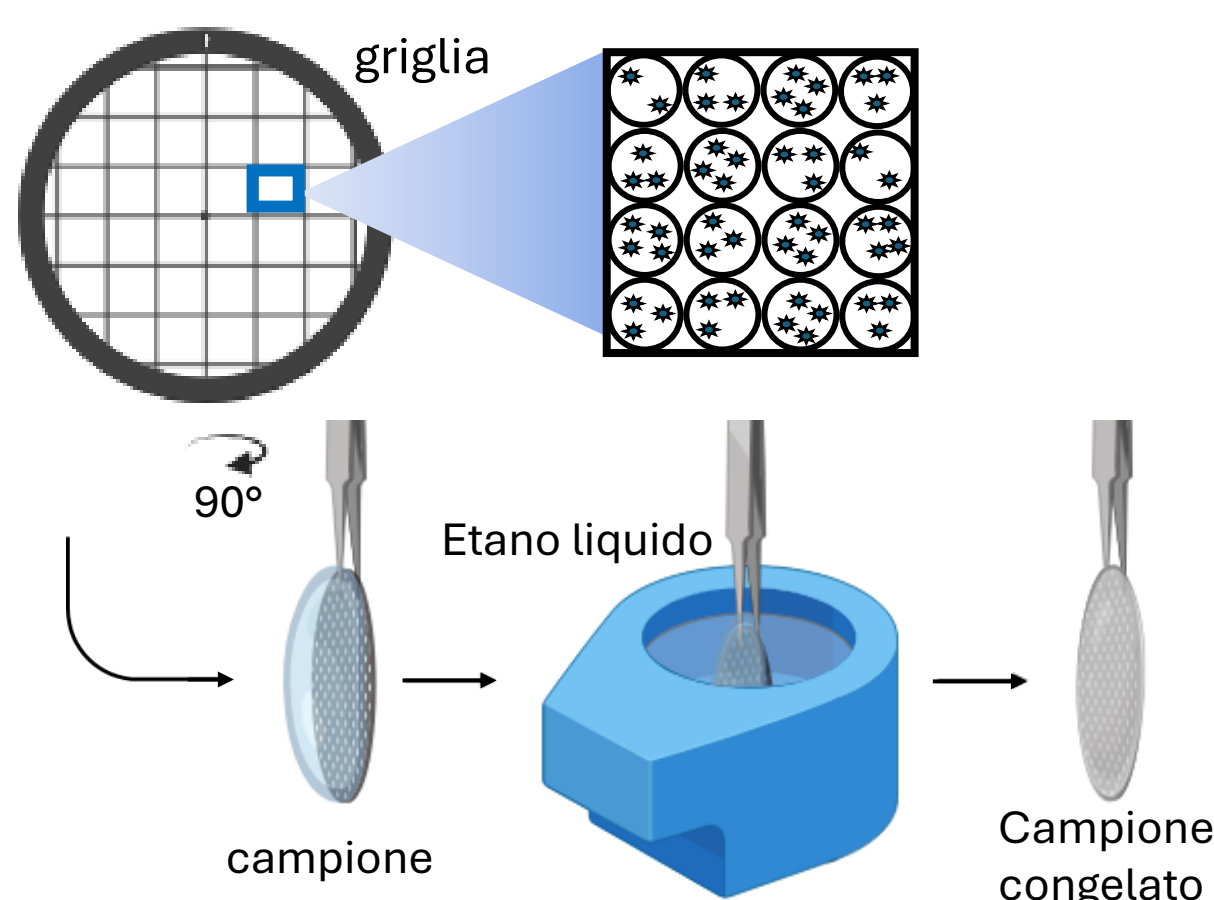


Fig.2 Il campione (ovvero la proteina di nostro interesse in soluzione acquosa) viene prelevato (qualche µl, ovvero 10⁻³ ml) e messo su una griglia. Qui, esso si deposita in piccolissimi buchetti dentro alla griglia. Tale supporto viene quindi congelato in etano liquido.

Analisi al microscopio

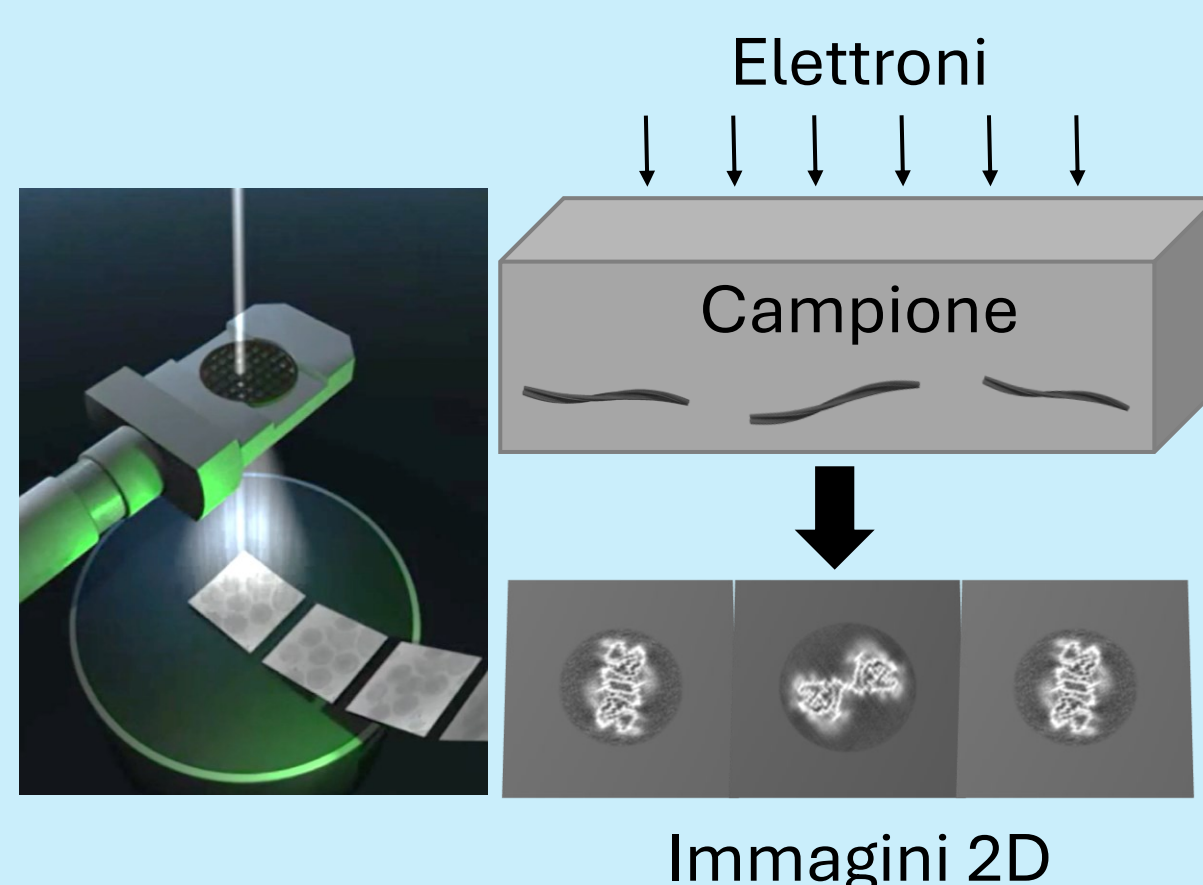


Fig.3 La griglia congelata viene caricata sul microscopio crio-elettronico. Il fascio di elettroni colpisce i singoli buchetti della griglia, imprime un'immagine del campione (quindi delle proteine presenti in ogni singolo buchetto).

Processamento dei dati



Fig.4 Le immagini bidimensionali vengono processate ed utilizzate per costruire il modello tridimensionale della proteina. Il processo di acquisizione del dato è riassunto nel video osservabile scannerizzando il codice QR!

Il risultato: mappe di densità elettronica e strutture di proteine

Alla fine del processamento dei dati ottenuti dall'analisi al microscopio (eseguito con sistemi bioinformatici, quali Relion e CryoSPARC), si ottiene una mappa tridimensionale per ciascun tipo di proteina che era presente nel campione di partenza analizzato al microscopio. Tale mappa indica lo spazio occupato dagli atomi della proteina, permettendoci di identificare i suoi singoli componenti (amminoacidi). Di conseguenza, a seconda della risoluzione della mappa, è possibile inserire i vari amminoacidi all'interno, componendo così la struttura tridimensionale della proteina (come mostrato nella Fig. 5). Questo passaggio viene definito «Costruzione del modello» (o Model building).

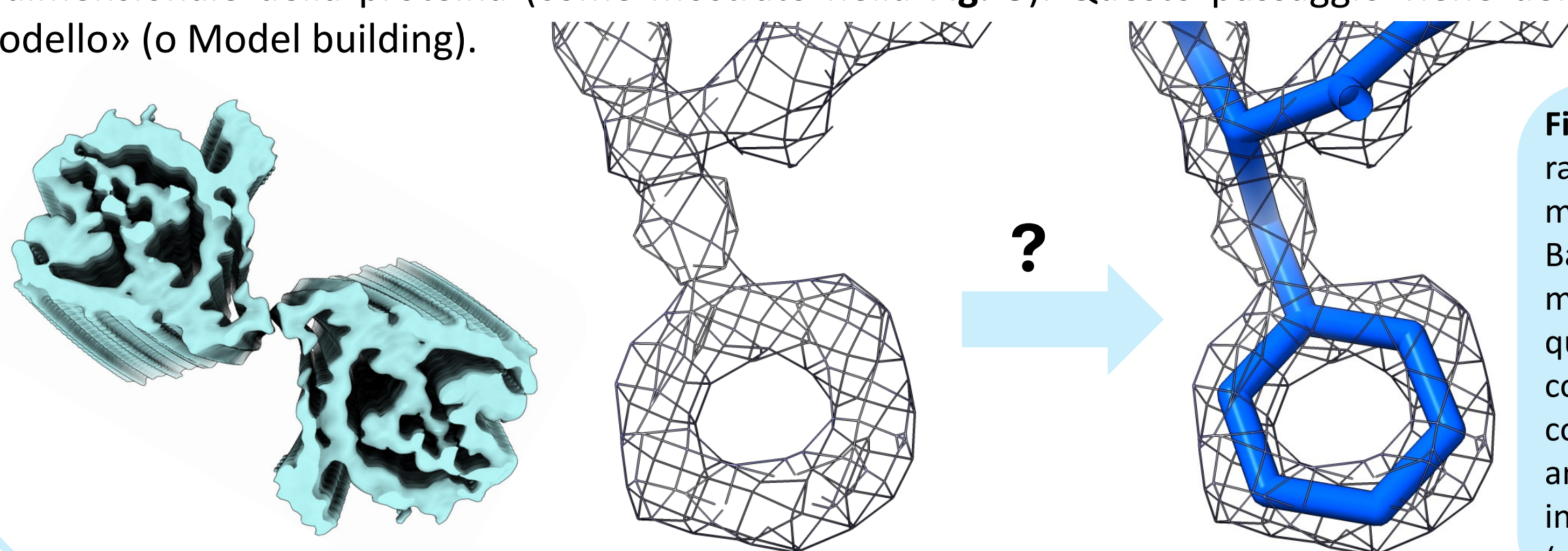


Fig.5 Sulla sinistra, la rappresentazione di una mappa di fibrilla AA. Basandosi sulla forma della mappa, si può intuire a quale tra i 20 amminoacidi corrisponde la densità. Il corrispondente amminoacido viene poi inserito nella mappa (destra).

Perché studiare le strutture delle proteine?

Le strutture e le mappe di densità elettronica delle proteine vengono depositate in un database accessibile a tutti (Protein Data Bank, PDB). Ma a cosa serve tutto ciò? Un esempio potrebbe essere costituito proprio dalla proteina oggetto di questo studio, la SAA, in quanto è stato suggerito che forme diverse di fibrille AA, con sequenza e struttura diverse, porterebbero a sintomatologie differenti di Amiloidosi AA. Di conseguenza, l'analisi delle diverse strutture di fibrille ci permette di scoprire i meccanismi ignoti che portano allo sviluppo della malattia.

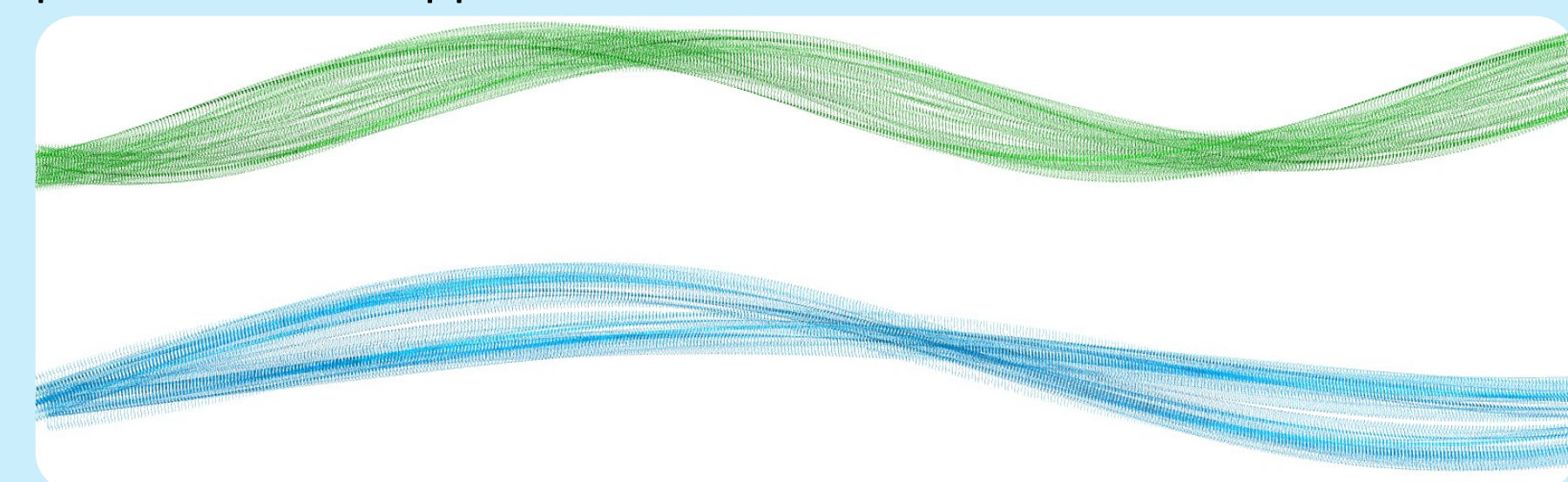


Fig.6 Strutture tridimensionali di fibrille amiloidi AA di gatto.

Bibliografia

- Zhang B, Une Y, Fu X, Yan J, Ge F, Yao J, Sawashita J, Mori M, Tomozawa H, Kametani F, Higuchi K. Fecal transmission of AA amyloidosis in the cheetah contributes to high incidence of disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 May 20;105(20):7263-8. doi: 10.1073/pnas.0800367105. Epub 2008 May 12. PMID: 18474855; PMCID: PMC2377313.
- Ferri F, Ferro S, Porporato F, Callegari C, Guglielmetti C, Mazza M, Ferrero M, Crinò C, Gallo E, Drigo M, Coppola LM, Gerardi G, Schulte TP, Ricagno S, Vogel M, Storni F, Bachmann MF, Vogt AC, Caminito S, Mazzini G, Lavatelli F, Palladini G, Merlini G, Zini E. AA-amyloidosis in cats (Felis catus) housed in shelters. PLoS One. 2023 Mar 29;18(3):e0281822. doi: 10.1371/journal.pone.0281822. PMID: 36989207; PMCID: PMC10057811.