

## Relazione Scientifica Short-term mobility (2010)

**Proponente: Dr. Giuseppe Pappalardo**

**Beneficiario: Dr. Francesco Attanasio**

**Titolo Programma: “*Studio delle proprietà antiaggreganti di peptidi coniugati con trealosio e loro interazioni con l’amiloide  $\beta$  1-42*”**

**Periodo Soggiorno:** 8 -29 Ottobre 2010.

**Sede Soggiorno:** Department of Animal Cell Biochemistry (head – Prof. Vladimir Muronetz ) of A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Russia

Durante il periodo di studio trascorso presso il Dipartimento di Biochimica dell’ Istituto Belozersky di Chimica–Fisica Biologica della Lomonosov Moscow State University, il Dott. Francesco Attanasio ha frequentato il laboratorio del Prof. Vladimir Muronetz per svolgere il programma di ricerca dal titolo: “Studio delle proprietà antiaggreganti di peptidi coniugati con trealosio e loro interazioni con l’amiloide  $\beta$  1-42”. La malattia di Alzheimer è una malattia degenerativa caratterizzata dalla presenza di depositi neuro fibrillari e placche amiloidi nel cervello. I costituenti principali delle placche sono 2 peptidi della lunghezza di 40 e 42 amminoacidi , i peptidi  $\beta$  amiloidi A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42. Recenti studi sulle cause della malattia hanno spostato l’attenzione dalle fibrille amiloidi agli aggregati  $\beta$  amiloidi solubili di piccole dimensioni, reputati come i principali agenti citotossici. Ad oggi il progettare molecole che possano prevenire il self-assembly dei monomeri di A $\beta$  è diventato l’obiettivo primario delle strategie terapeutiche.

Nell’ambito del programma di mobilità breve durata del dott. Attanasio sono state effettuate misure di Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Ultracentrifugazione analitica, Dynamic Light Scattering (DLS), allo scopo di studiare l’interazione di A $\beta$  (1-42) con frammenti peptidici (beta

sheet breaker) coniugati con il disaccaride trealosio, precedentemente sintetizzati presso l'Istituto di Biostrutture e Bioimmagini di Catania. Il disaccaride era covalentemente attaccato a siti differenti della catena del peptide LPFFD. In particolare sono stati studiati i seguenti frammenti peptidici:

- 1) LPFFD
- 2) Ac-LPFFD-Th
- 3) Th-Succinyl- LPFFD-NH<sub>2</sub>

Attraverso questi esperimenti è stato possibile osservare il grado di protezione dei singoli peptidi nei confronti del self-assembling di A $\beta$ .

Per lo svolgimento del suddetto progetto, campioni di A $\beta$  (1-42) allo stato monomero sono stati incubati da soli ed in presenza dei peptidi in eccesso molare (20 volte) per 5 giorni a 37°C.

#### **Preparazione dei campioni:**

*Processo di monomerizzazione:* Aliquote di A $\beta$  (1-42) sono state solubilizzate in acido tricloroacetico (TFA). Dopo aver sonicato la soluzione a bassa potenza per 10min a 37 gradi, si elimina il TFA sotto cappa e flusso di N<sub>2</sub>. Il sottile film di A $\beta$  (1-42) formatosi dopo l'eliminazione del TFA viene solubilizzato in HFIP ed incubato per 1h a 37°C.

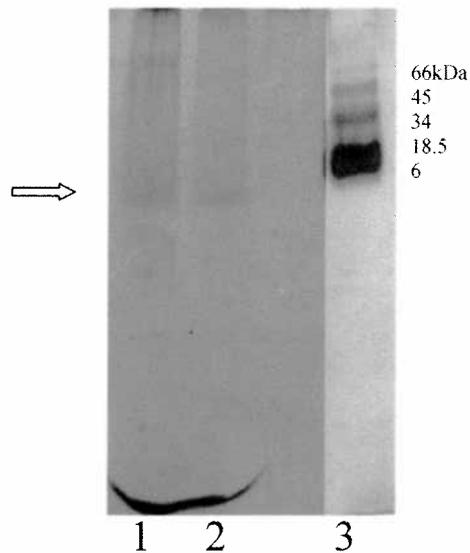
Eliminato l'HFIP sotto cappa e flusso di N<sub>2</sub>, si scioglie nuovamente il film di A $\beta$  in un volume noto di HFIP e quindi si liofilizza.

*Incubazione dei campioni:* 200 $\mu$ g di A $\beta$  (1-42) sono stati sciolti nel minor volume possibile di NaOH 5M ed aliquote di 20 $\mu$ l sono state aggiunte a 380  $\mu$ l di soluzione tampone (fosfato 20mM) pH=7.4 contenente i 3 peptidi in esame. I campioni sono stati lasciati in un incubatore a temperatura controllata di 37°C per 5 giorni.

#### **Risultati**

Allo scopo di verificarne lo stato monomero, un'aliquota del campione contenente A $\beta$  (1-42) è stato caricato in un gel nativo (Native Tricine PAGE 4-16.5% w/v). La Fig.1 mostra una gel

elettroforesi del campione immediatamente dopo essere stato portato a pH= 7.4. La presenza di una banda di circa 5000 dalton conferma lo stato monomero del campione.



*Fig. 1: Gradient Native Tricine PAGE 4% - 16,5%.  
1. Amyloid 20 µl, 2. Amyloid 10 µl, 3. Marker 6 µl*

Per valutare l'efficienza dei peptidi rispetto all'inibizione dell'aggregazione di A $\beta$  (1-42) e quale tra questi fosse il pi $\dot{u}$  promettente, sono state effettuate misure di ELISA e di DLS. Il vantaggio di queste tecniche  $\grave{e}$  quello di utilizzare quantit $\grave{a}$  minime di prodotto senza compromettere la sensibilit $\grave{a}$  del metodo.

L'ELISA  $\grave{e}$  un metodo sperimentale di riconoscimento molecolare. Prevede l'immobilizzazione della molecola da investigare su di un supporto solido e successivamente l'aggiunta della molecola interagente. Il successivo uso di anticorpi specifici per l'una o l'altra molecola danno l'informazione sulla entit $\grave{a}$  dell' interazione.

Nel nostro caso l'interazione dei peptidi con l'A $\beta$  dovrebbe impedirne il riconoscimento da parte dell'anticorpo 6E10, specifico per A $\beta$ , o da parte della GADPH (gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi) in forma denaturata, che  $\grave{e}$  noto interagire con A $\beta$ .

Per l'ELISA  $\grave{e}$  stato seguito il seguente protocollo sperimentale:

100µl di campione (Aβ monomero; Aβ dopo 5gg di incubazione a 37°C in assenza e presenza di peptidi) sono stati lasciati interagire con la superficie delle piastre Strip Plate Microlon 600 (Greiner Bio-one) per 30'.

Lavaggio con PBST (tampone fosfato + Triton)

Aggiunta di 100 ml di "milk solution 3%" per bloccare i siti reattivi delle piastre che sono rimasti liberi, 30'.

Lavaggio con PBST (tampone fosfato + Triton)

Aggiunta di 100ml di soluzione contenente i peptidi in rapporto 20/1 con l'Aβ (solo nei pozzetti contenenti campioni non pre-incubati con peptidi), 30'.

Lavaggio con PBST (tampone fosfato + Triton)

Aggiunta di 100ml di anticorpo anti Aβ, 6E10, 24h. N.B.: a questo step in un pozzetto si esegue l'esperimento con la GAPDH, aggiungendo prima l'enzima (30') e poi l'anticorpo specifico (24h)

Lavaggio con PBST (tampone fosfato + Triton)

Aggiunta di 100ml di anticorpo secondario, 3h

Lavaggio con PBST (tampone fosfato + Triton)

Lavaggio con PBS (tampone fosfato)

Colorazione e determinazione dei valori di assorbanza mediante Stat Fax-2100, Microplate reader, Awareness Technology.

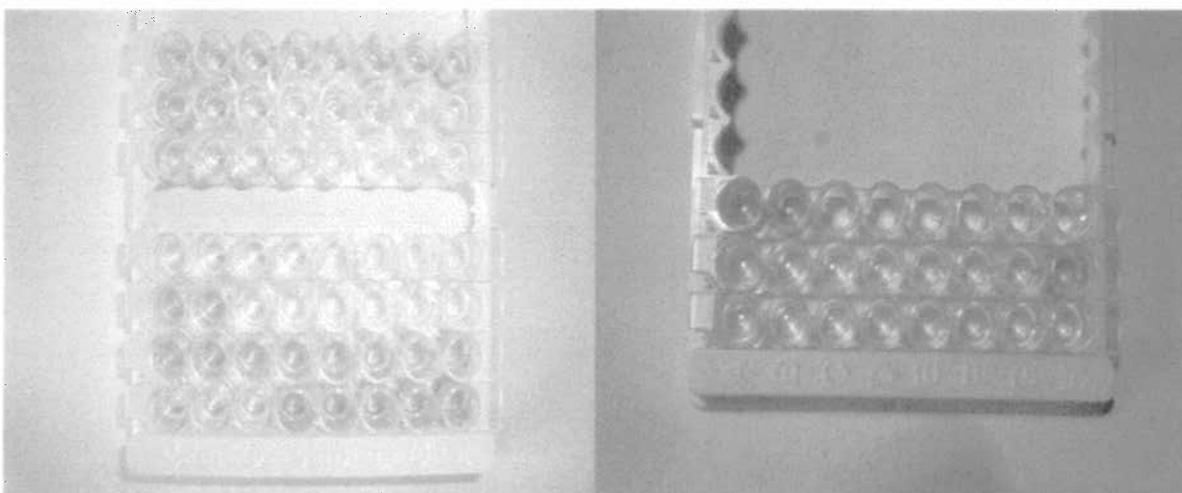


Fig.2 : Misure di ELISA

a)

b)

In Fig.2, a) e b) sono mostrati gli esperimenti di ELISA (misure effettuate in triplicato). Il diagramma di Fig. 3 mostra come non vi sia interazione da parte dei peptidi verso l' A $\beta$  monomero immobilizzato, in quanto sia l'anticorpo anti-A $\beta$  sia la GAPDH interagiscono con l' A $\beta$  (fig.2a). Risultati diversi si sono ottenuti immobilizzando l' A $\beta$  incubata in soluzione per 5gg in assenza e presenza di peptidi (fig. 2b). Una diminuzione della colorazione in presenza dei peptidi indicherebbe una minore interazione dell'anticorpo 6E10 nei confronti di A $\beta$  e di quindi di un effetto protettivo dei peptidi nei confronti dell'aggregazione; inoltre ciò lascerebbe supporre che l'immobilizzazione iniziale di A $\beta$  monomero sulla superficie dei pozzetti potesse influire negativamente sulla successiva interazione dei peptidi..

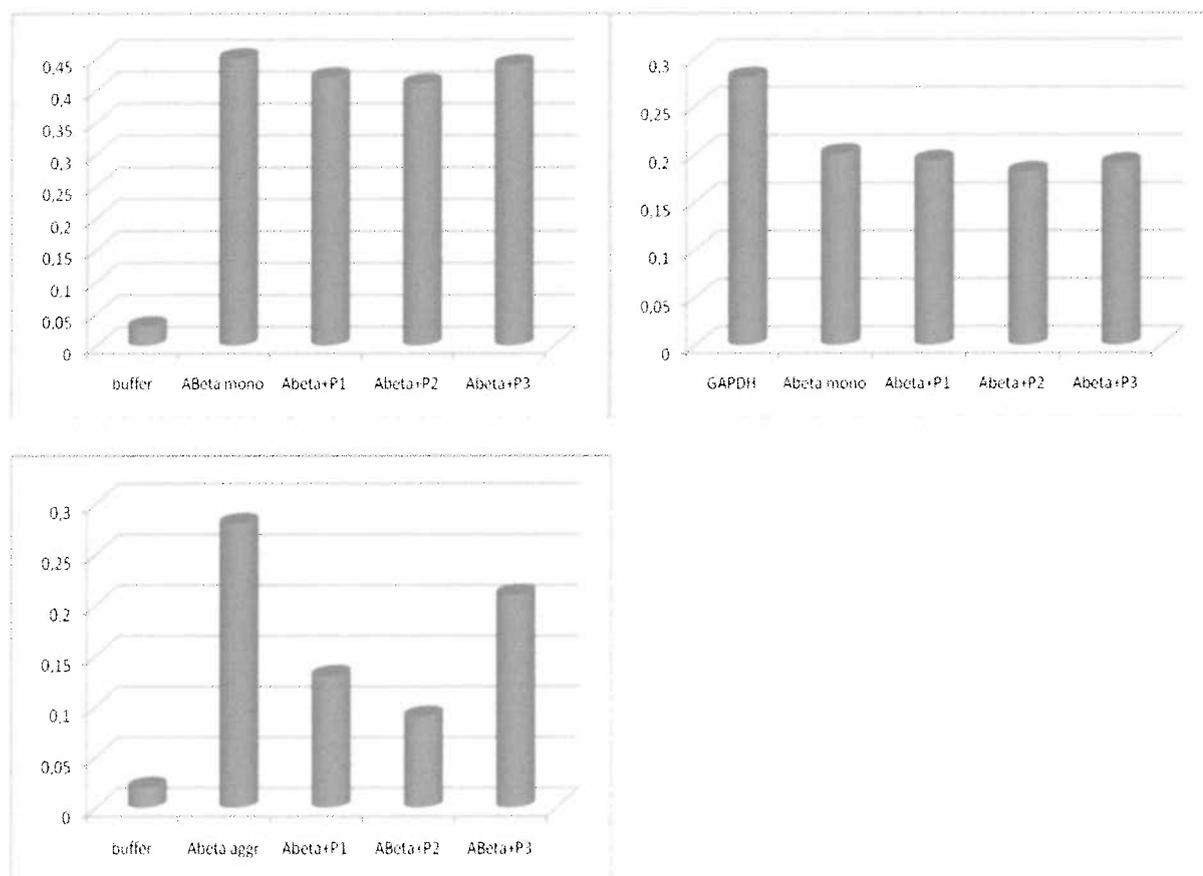
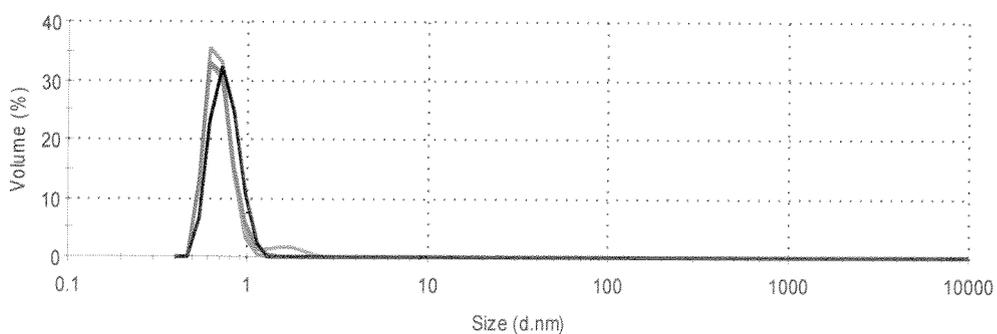


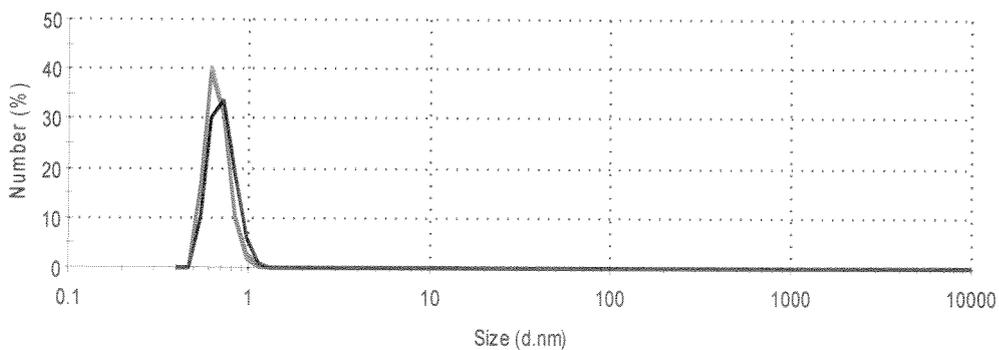
Fig.3: Istogrammi relativi alle misure di ELISA.

Per avvalorare quest'ipotesi sono state effettuate misure di DLS (Zetasizer nanoZS, Malvern Instruments, Malvern, U.K., equipaggiato con ottica 173° e laser con lunghezza d'onda 633 nm (He-Ne), 4 mW). Ogni misura era una media di 5 determinazioni ogni 30 sec. I campioni sono stati incubati per 5 giorni, secondo la procedura precedentemente descritta; la fig.3 mostra i profili DLS al tempo 0 h e dopo 5 giorni di incubazione a 37°C; l'analisi dei profili ha evidenziato una notevole capacità dei peptidi studiati nell'inibire il processo di self-assembling di A $\beta$ . In particolare i peptidi 1 e 2 hanno mostrato una maggiore efficienza nei confronti dell'aggregazione.

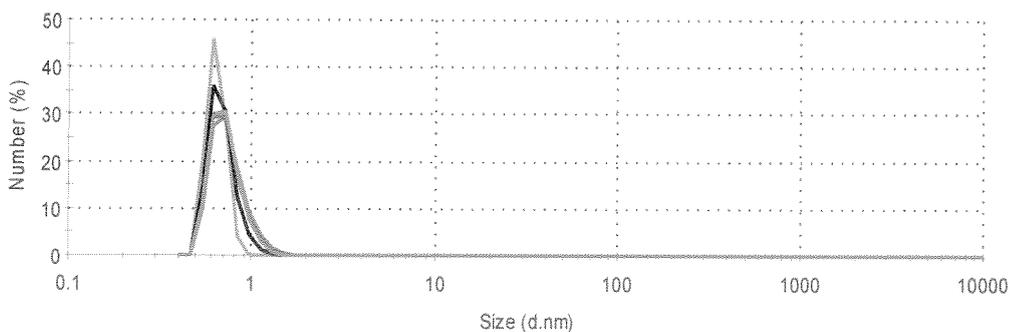
A $\beta$  t=0 h



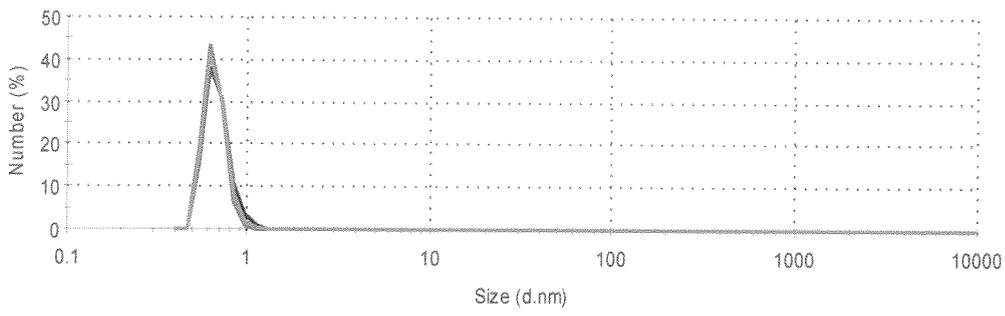
A $\beta$  + peptide 1 t=0 h



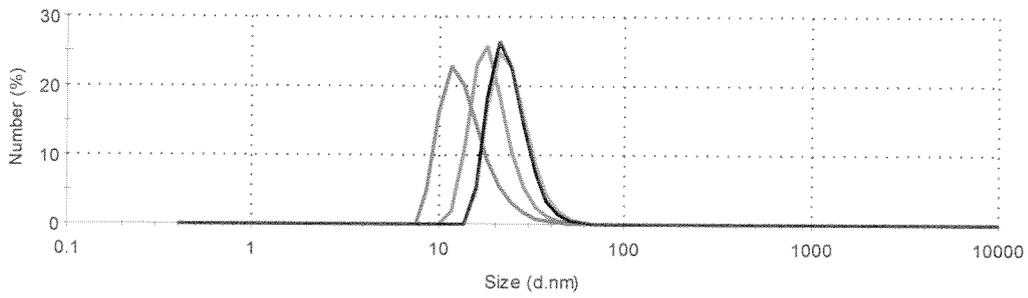
A $\beta$  + peptide 2 t=0 h



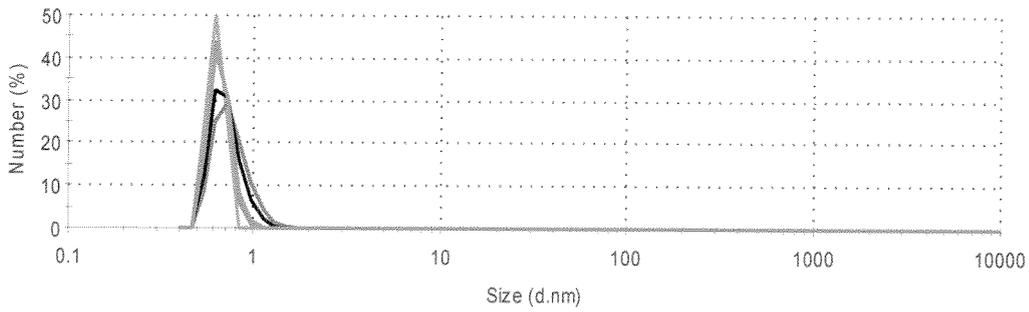
A $\beta$  + peptide 3 t=0h



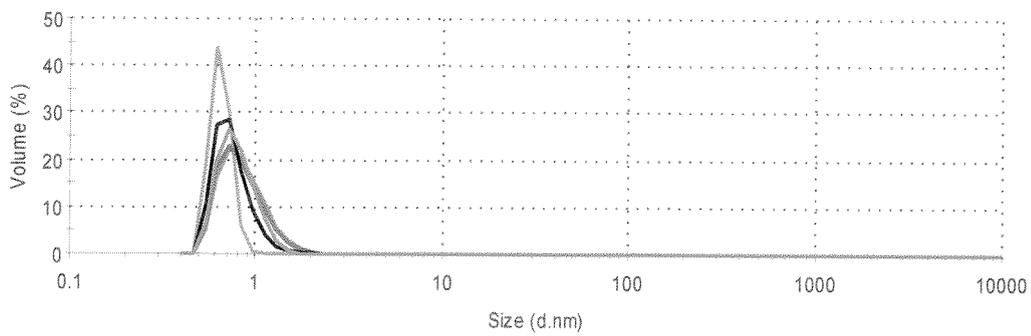
A $\beta$  dopo 5 gg di incubazione a 37 °C



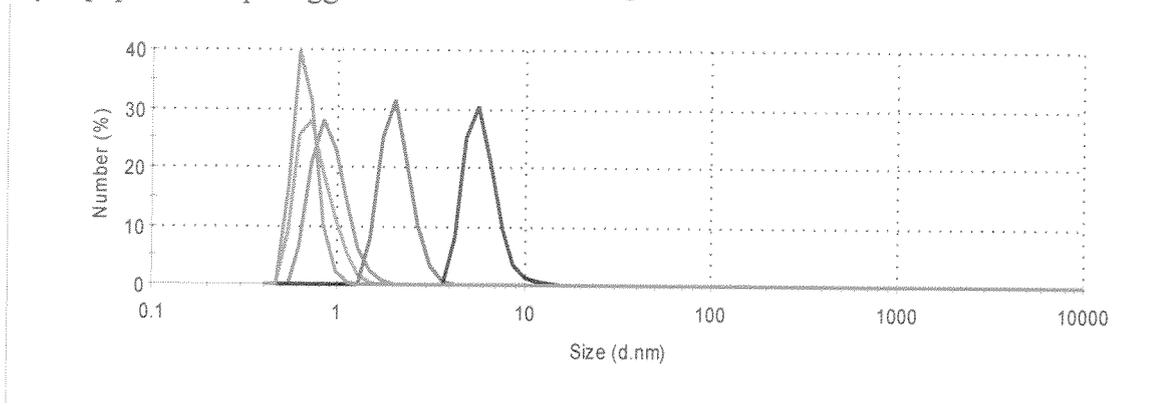
A $\beta$  + peptide 1 dopo 5 gg di incubazione a 37 °C



A $\beta$  + peptide 2 dopo 5 gg di incubazione a 37 °C



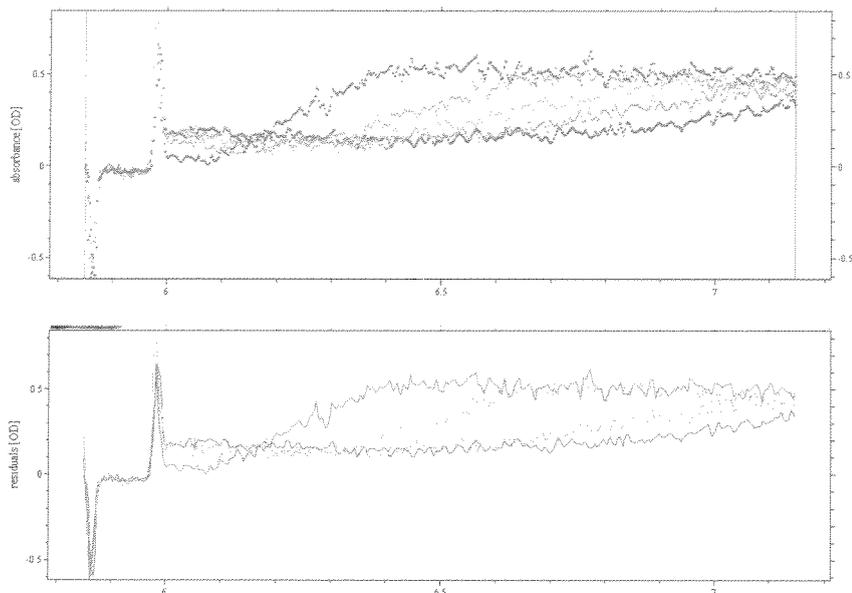
A $\beta$  + peptide 3 dopo 5 gg di incubazione a 37 °C



*Fig.3: Misure di dynamic light scattering effettuate su campioni di A $\beta$  in presenza dei peptidi, al tempo 0h e dopo 5 gg di incubazione a 37 °C.*

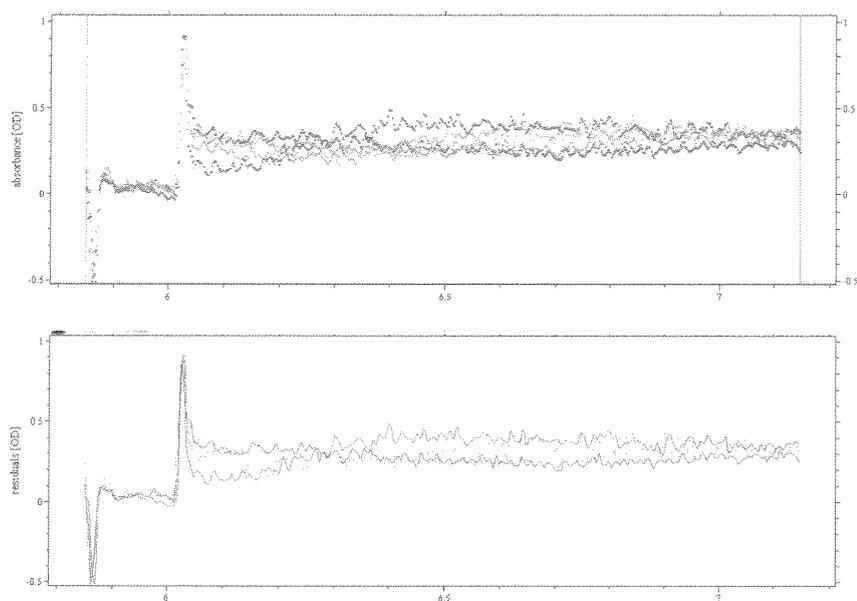
Una ulteriore conferma dell'effetto inibitorio è stata fornita anche dalle misure di Ultracentrifugazione Analitica ; le misure sono state effettuate su campioni di A $\beta$  da solo ed in presenza del peptide 2 (il peptide coniugato sembrava inibire meglio il self-assembling di A $\beta$ ) utilizzando una ultracentrifuga analitica Beckman Spinco E equipaggiata con un adattatore di scansione fotoelettrico. Le velocità di rotazione del rotore, del tipo AnF, erano 4000 and 56000 rpm, l'assorbanza settata a 237nm.

I profili di velocità di sedimentazione in fig.4 mostrano come il peptide 2 inibisca la formazione di oligomeri di A $\beta$ . Infatti dopo 5 gg di incubazione, fig.4 A, il valore di S (coefficiente di sedimentazione) calcolato per le misure effettuate a 4000 RPM per A $\beta$  era di 50.000, evidenziando la presenza di grossi aggregati, mentre a 56000 RPM nessun variazione di assorbanza veniva registrata, indice della assenza di specie di piccole dimensioni .



*Fig. 4 A: Analisi della velocità di sedimentazione, 4000 RPM di  $A\beta(1-42)$   $50 \mu M$  in tampone fosfato  $20mM$   $pH= 7.4$  dopo 5 gg di incubazione a  $37^\circ C$*

In presenza del peptide 2, fig.4 B, nessun variazione di assorbanza veniva registrata per le misure effettuate a 4000 RPM, mentre a 56000 RPM il valore di  $S$  era circa uguale ad 1, indice della presenza di specie di piccole dimensioni. I pesi molecolari ricavati dai valori di  $S$  erano dell'ordine di  $10^{10}$  Da per quanto concerne i valori di  $50.000S$  e di circa 10 kDa per i valori di  $1S$ .



*Fig. 4 B: Analisi della velocità di sedimentazione, 56000 RPM di  $A\beta(1-42)$   $50 \mu M$  in presenza del peptide 2 (20 volte in eccesso) in tampone fosfato  $20mM$   $pH= 7.4$  dopo 5 gg di incubazione a  $37^\circ C$*

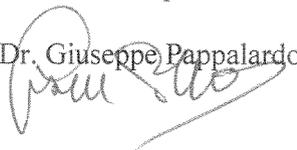
I presenti risultati saranno utili al proseguimento dell'attività di ricerca inerente alla Commessa dal titolo :” Basi molecolari della fibrillogenesi di proteine e peptidi amiloidi: studi per la diagnosi e la terapia.” che ha come obiettivo principale lo sviluppo di un nuove molecole in grado di inibire la formazione di aggregati tossici di A $\beta$ .

Pertanto la permanenza all'Università di Mosca si è conclusa con un risultato positivo, sia in quanto il beneficiario durante il suo soggiorno è venuto a conoscenza e si è impadronito di nuove tecniche analitiche, sia perché i risultati scientifici ottenuti si integrano e supportano i dati ottenuti presso i nostri laboratori.

Catania, 11 Gennaio 2011

Firma del Proponente

Dr. Giuseppe Pappalardo



Firma del Beneficiario

Dr. Francesco Attanasio

