

Relazione scientifica sull'attività svolta **Programma Short-Term Mobility anno 2015**

Il fruitore: Alessia Riccio

Istituto di afferenza: Istituto di Bioscienze e BioRisorse, CNR, UOS Napoli, via P. Castellino 111, 80131, Napoli.

Con qualifica: Borsista associato CNR

Descrizione dettagliata dell'Istituzione ospitante: Universidad Católica del Norte, Faculty of Medicine, Department of Biomedical Sciences, Laboratory of Environmental Neurotoxicology Coquimbo, Chile.

Titolo del programma: Potenziamiento cognitivo a seguito dell'inibizione dell'enzima acilpeptide idrolasi (APEH).

Le patologie neurodegenerative costituiscono un gruppo di malattie ad eziologia sconosciuta che hanno la caratteristica comune di essere croniche e di mostrare un andamento progressivo dei sintomi, che riflette una simmetrica e selettiva perdita dei neuroni coinvolti nei sistemi sensoriali e cognitivi (Jellinger 2008). Il morbo di Alzheimer è il più chiaro esempio di malattia neurodegenerativa associata alla demenza, corrispondente al 50-70% dei casi. Sono, tuttavia, note anche altre patologie tra cui il morbo di Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica e la malattia di Huntington. Ad oggi, l'Alzheimer risulta ancora una malattia ad eziologia sconosciuta, pur essendo state formulate, negli ultimi anni, un gran numero di ipotesi tra cui la formazione di placche extracellulari di β -amiloide, che è considerato un elemento centrale nello sviluppo di questa patologia. Le strategie terapeutiche in uso vanno dall'uso di inibitori delle β - e γ -secretasi, gli enzimi responsabili della produzione di β -amiloide, alla ricerca di composti anti-aggreganti per tale peptide. Il gruppo di ricerca della Prof.ssa Pancetti ha già da alcuni anni identificato nell'enzima acilpeptide idrolasi (APEH) un interessante e promettente target per lo sviluppo di trattamenti farmacologici per questa malattia ed in generale per le patologie a base neurodegenerativa. L'APEH è un enzima appartenente alla famiglia delle prolil-oligopeptidasi che catalizza l'idrolisi di peptidi acetilati all'estremità N-terminale. È stato recentemente riportato che tale enzima è in grado di degradare il peptide β -amiloide *in vitro* (Yamin et al. 2007). Inoltre, il gruppo della Prof.ssa Pancetti ha recentemente riportato che, in una specifica finestra di dosaggio e tempo di esposizione, questo enzima è inibito dal diclorvos (DDVP), un farmaco con effetto anticolinergico che rappresenta il principio attivo del metrifonato, utilizzato per lungo tempo per il trattamento di deficit cognitivo associato al morbo di Alzheimer.

L'uso del DDVP in pazienti affetti dal morbo di Alzheimer ha prodotto effetti positivi durante gli stadi iniziali della terapia, proprio nella finestra di dosaggio specifica per l'inibizione dell'APEH, per poi determinare il declino cognitivo, aggravato da ulteriori effetti collaterali, nei pazienti soggetti al trattamento. L'APEH è stata, quindi, identificata come target del DDVP che, modulando l'attività dell'enzima, contribuisce alla regolazione dell'omeostasi dei peptidi coinvolti nell'eziologia della malattia (Olmos et al. 2009).

Alla luce di quanto scritto, l'attività di ricerca svolta nel periodo compreso tra il 19 maggio e l'8 giugno 2015 è consistita nell'ottimizzazione di un protocollo di purificazione dell'APEH proveniente da

sangue e da cervello di ratti di un mese, a cui sono stati somministrati quotidianamente differenti quantitativi di DDVP (0,03 e 0,1 mg/kg ratto), e nella caratterizzazione della sua attività eso-peptidasica. La stessa procedura è stata svolta anche per ratti non trattati con DDVP, usati come controllo. Inoltre, è stato messo a punto un saggio per il dosaggio dell'attività endo-proteasica dell'APEH su proteine ossidate.

L'attività di ricerca svolta, quindi, si è articolata in due fasi:

1. Inizialmente, è stato messo a punto un protocollo di purificazione basato sull'utilizzo di due diversi *step*: una cromatografia a scambio ionico (colonna DEAE) ed una ad esclusione molecolare (colonna Superdex200). In seguito alla preparazione degli estratti ottenuti da campioni di sangue e cervello di ratti sottoposti o meno al trattamento con diverse dosi di DDVP (0,03 e 0,1 mg/kg ratto), è stata dosata l'attività eso-peptidasica dell'APEH che ha mostrato valori simili per l'isoforma purificata da entrambi i tessuti. A titolo d'esempio, sono riportati i dati relativi agli emolisati, in cui si può notare una netta diminuzione dell'attività specifica dell'APEH nei campioni trattati (**Fig. 1**), in accordo con quanto riportato in letteratura per studi *in vitro* condotti su estratti di cervello (Cardona et al. 2013).

I dati ottenuti risultano particolarmente interessanti in quanto consentiranno di studiare l'effetto del trattamento con DDVP sul comportamento dell'animale, evitandone il sacrificio.

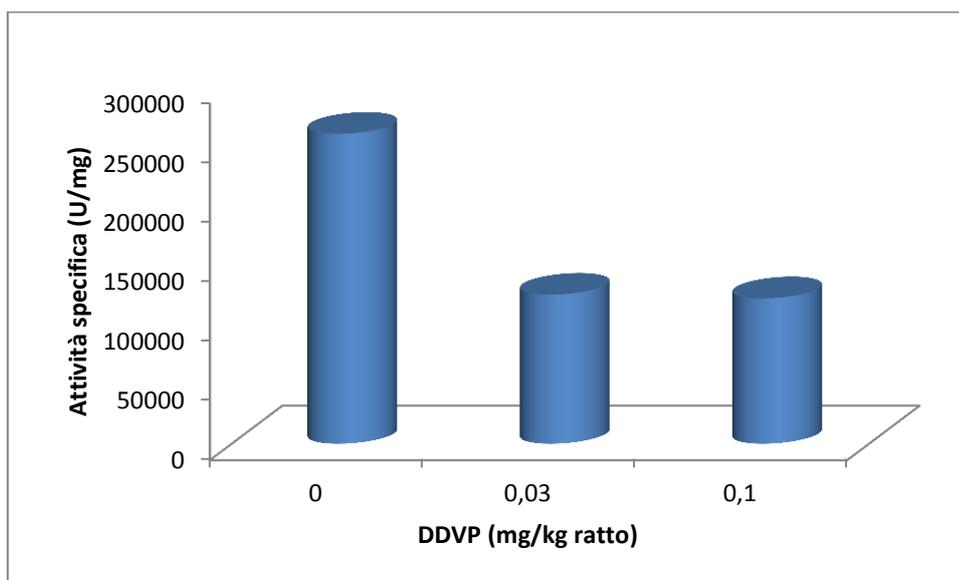


Fig 1: Attività specifica dell'APEH proveniente da emolisati di ratti trattati con 0, 0,03 e 0,1 mg/kg ratto

2. Successivamente, è stata saggiata l'attività endo-proteasica dell'APEH proveniente da entrambi i tessuti di ratti non trattati. I campioni sono stati incubati per 48 h a 37 °C con l'albumina di siero bovino (BSA) ossidata e non ed analizzati mediante SDS-PAGE. I risultati hanno evidenziato una diminuzione dell'intensità della banda corrispondente alla BSA ossidata e la comparsa di bande a bassa massa molecolare, indicando l'insacco di un processo di degradazione ad opera dell'APEH, diversamente da quanto osservato con la BSA non ossidata.

Ulteriori esperimenti saranno effettuati su campioni di ratti sottoposti a trattamento con il DDVP.

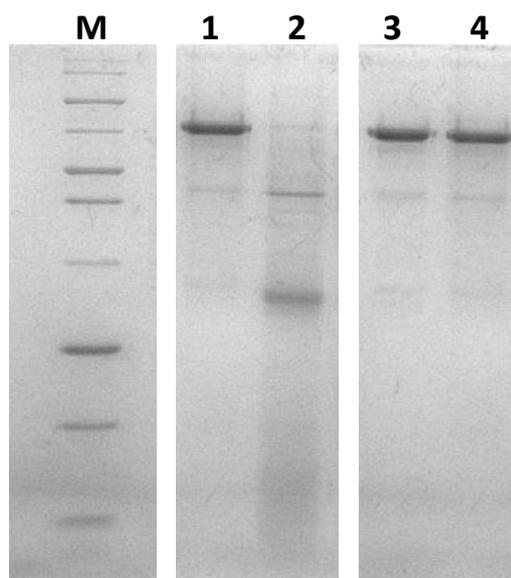


Fig. 2: Analisi SDS-PAGE delle miscele di reazione contenenti: BSA ossidata (1); BSA ossidata incubata con APEH (2); BSA non ossidata (3); BSA non ossidata incubata con APEH (4). **M:** markers di massa molecolare.

Jellinger et al 2008 J Alzheimers Dis 14: 107-23

Yamin et al 2007 J Neurochem 100: 458-467

Olmos et al 2009 Toxicol Appl Pharmacol 238: 37-46

Cardona et al 2013 J Toxicol Sci 38: 193-203

Napoli, 21/07/15

FIRMA DEL FRUITORE

Alessia Riccio