

Programma STM 2015

Fruitore: Dott. Francesco Bellia

Istituto di afferenza: Istituto di Biostrutture e Bioimmagini (IBB)

Qualifica Ricercatore livello III

Relazione scientifica finale

L'obiettivo del lavoro di ricerca all'interno del programma STM 2015, di cui il sottoscritto è stato fruitore, è stato quello di indagare l'effetto che alcuni di peptidi endogeni e i loro glicoconiugati hanno su modelli di disordini neurologici. In particolare, è stato studiato l'effetto che questi sistemi peptidici hanno nella disomeostasi dell'amiloide-beta e di ioni metallici come rame(II) e zinco(II).

Il programma è stato svolto presso il *Florey Institute of Neuroscience and Mental Health*, a Melbourne (Australia), uno dei primi sei centri di ricerca nel mondo sui disordini cerebrali. Il supervisore della ricerca svolta è stato il Prof. Ashley Bush, direttore dell'unità di *Oxidation Biology* all'interno dell'istituto, nonché docente di patologia presso l'Università di Melbourne, di Psichiatria alla *Harvard Medical School* e di Neuroscienze presso la *Cornell University*. Quale uno dei massimi esperti nello studio dell'effetto che la disomeostasi di ioni metallici ha nella progressione di diversi disordini neurodegenerativi, quali la malattia di Alzheimer, all'interno di questo breve progetto di ricerca ha dato un apporto fondamentale per la programmazione degli esperimenti e la valutazione dei risultati ottenuti.

Il principale peptide utilizzato è stato la carnosina, un dipeptide endogeno, abbondante in diversi tessuti animali. Questo composto multifunzionale (antiossidante, antiaggregante, antiglicante, chelante di ioni metallici, modulatore enzimatico, etc) ed altri oligopeptidi contenenti istidina sono ampiamente utilizzati in campo nutraceutico. Le possibili applicazioni farmaceutiche sono limitate dalla loro scarsa stabilità nel plasma. La glicoconiugazione è un metodo promettente per superare questa limitazione, migliorare le proprietà multifunzionali del peptide e facilitarne il *targeting*. A tal fine, nei laboratori di Catania il peptide è stato precedentemente coniugato a diversi glucidi, tra cui il trealosio. Il composto così ottenuto, insieme alle relative specie complesse con il rame (II), sono stati caratterizzati strutturalmente attraverso diverse tecniche spettroscopiche e spettrometriche.

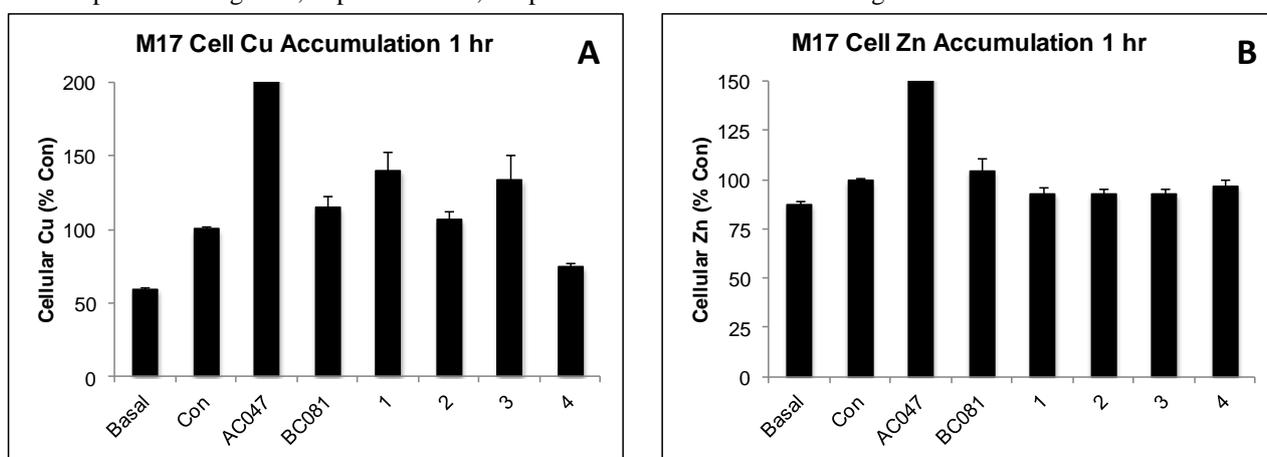
Essendo noto dalla letteratura che la somministrazione di carnosina riduce l'accumulo di aggregati di Amiloide beta in modelli *in vivo* della malattia di Alzheimer, abbiamo progettato investigare l'attività della carnosina e del relativo glicoconiugato in modelli sperimentali *in vitro* della malattia di Alzheimer e altri disordini neurodegenerativi. Tra i fattori coinvolti nell'insorgenza e/o nella progressione di queste malattie. la disomeostasi di ioni metallici come rame(II) e zinco(II) sembra svolgere un ruolo chiave. L'attività di composti inonofori potrebbe dunque avere una importanza specifica nella cura di tali disordini. È stato per questo esaminato il possibile effetto che il peptide in oggetto e il suo glico-coniugato hanno nella internalizzazione cellulare di rame(II) e zinco (II).

Gli stessi esperimenti riguardanti l'utilizzo della L-Carnosina (indicato come *Compound 1* o *FB1*) e del suo coniugato con il trealosio (*Compound 2* o *FB2*), sono stati condotti con la D-carnosina (*Compound 3* o *FB3*), l'enantiomero del peptide naturale che, a differenza di quest'ultimo, non viene degradato dalle proteasi plasmatiche (principalmente la carnosinasi) e mantiene molte proprietà della L-Carnosina, tra cui la capacità complessante nei confronti degli ioni metallici. Un

altro composto investigato mediante questi esperimenti è stato il GHK (*Compound 4* o *FB4*), un tripeptide naturale endogeno contenente istidina e avente diverse attività fisiologiche protettive. La capacità coordinante, soprattutto nei confronti del rame(II) è di gran lunga maggiore rispetto a quella della carnosina.

Una serie di esperimenti ha riguardato la valutazione dell'attività dei peptidi endogeni e dei loro glico-coniugati come ionofori di rame(II) e zinco(II) in colture cellulari. A tal fine sono state utilizzate cellule delle linee SH-SY5Y ed M17, derivanti da neuroblastoma umano, nonché cellule astrocitarie e della microglia (BV2) di ratto. I livelli intracellulari di rame e zinco, a seguito del trattamento dei loro complessi con le molecole di interesse, sono stati misurati mediante ICP-MS sui listati cellulari. I risultati sono stati riportati in Figura 1.

Figura 1. Livelli intracellulari di Cu(II) (A) e Zn(II) (B) a seguito del trattamento della linea M17 con gli ioni metallici (10 μ M) e i composti di interesse (1,2,3,4) (100 μ M) per 1h, prima della lisi cellulare. AC047 e BC081 rappresentano i controlli positivo e negativo, rispettivamente, del processo di internalizzazione degli ioni metallici.



Questi primi risultati dimostrano che i vari composti saggiati hanno tra loro un effetto diverso nell'accumulo di rame(II) intracellulare (Figura 1A), mentre tutti appaiono completamente inattivi nel promuovere l'internalizzazione di zinco(II). Tale differenza permane anche nel caso in cui viene aumentata sia la concentrazione di tutti i composti investigati (500 μ M) (Figura 2A,B), sia il tempo di incubazione dei complessi nel mezzo di coltura cellulare (Figura 2C,D). La differenza nella capacità di promuovere l'accumulo i ioni rame(II) e zinco(II) all'interno delle cellule utilizzate può essere attribuita a vari fattori, ma quello che sembra più ragionevole e conforme con quanto riportato in letteratura per sistemi simili è la diversa capacità complessante nei confronti di questi ioni metallici, maggiore per lo ione rameico e assai minore lo zinco(II).

Il mancato effetto sull'internalizzazione dello zinco ha indotto a continuare l'indagine su questi composti solo relativamente agli ioni rame(II). Anche nel caso in cui sono state utilizzate cellule astrocitarie (Figura 3A) e della microglia (BV2) (Figura 3B) di ratto, l'andamento relativo alla funzione ionoforica dei composti studiati sembra essere simile a quella riscontrata con l'utilizzo delle cellule M17: il trealosio-coniugato della carnosina ha sempre l'attività più alta, uguale (in alcuni esperimenti) a quella della D-carnosina. Per questo motivo, l'idrolisi enzimatica potrebbe inficiare negativamente il potenziale effetto che la carnosina può avere nel processo di internalizzazione del rame(II). La minore attività del tripeptide GHK potrebbe inoltre essere dovuta alla sua elevata capacità complessante nei confronti del rame(II), che gli impedirebbe di poter essere trasportato nell'area intracellulare ed essere ivi rilasciato.

Figura 2. Livelli intracellulari di Cu(II) (A,C) e Zn(II) (B,D) a seguito del trattamento della linea M17 con gli ioni metallici (10 μ M) e i composti di interesse (1,2,3,4) (500 μ M) per 1h (A,B) o 24 h (C,D), prima della lisi cellulare. AC047 e BC081 rappresentano i controlli positivo e negativo, rispettivamente, del processo di internalizzazione degli ioni metallici.

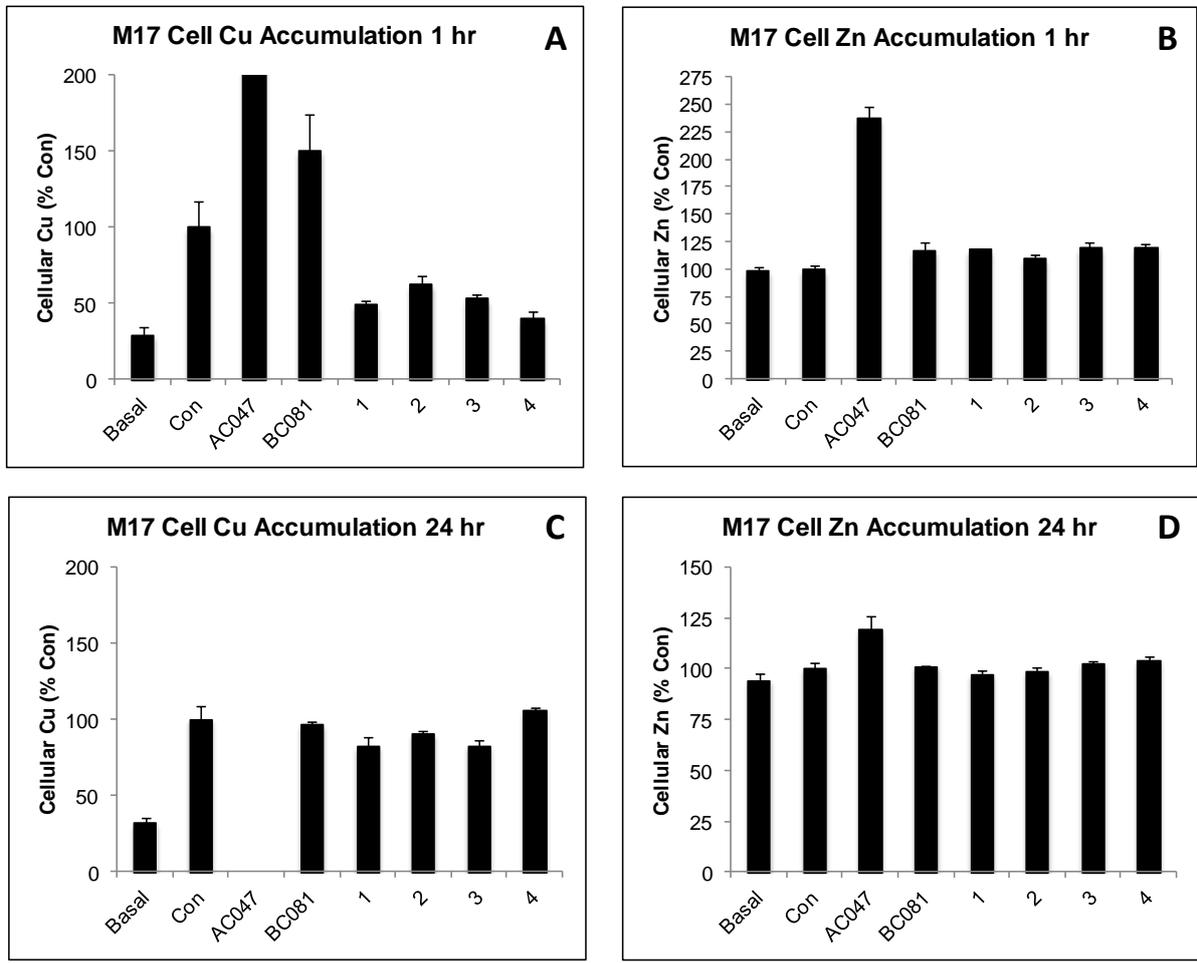
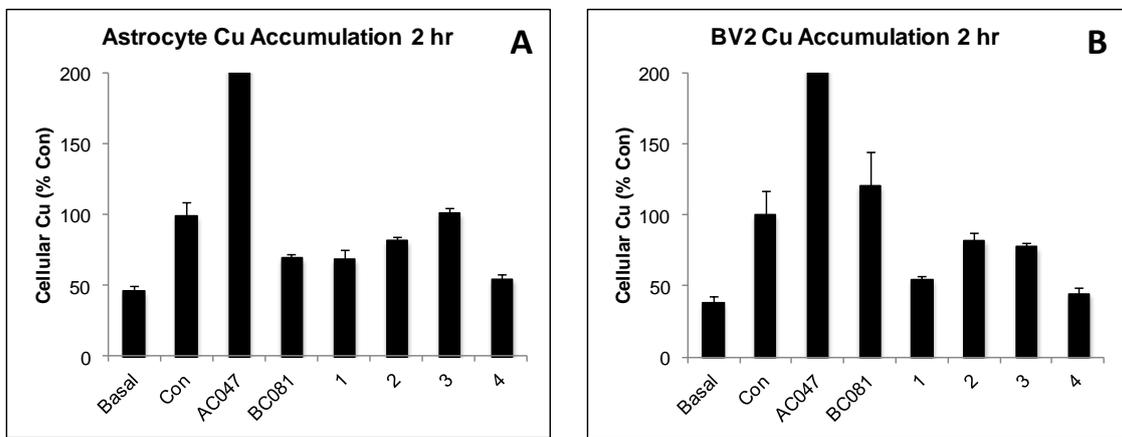


Figura 3. Livelli intracellulari di Cu(II) a seguito del trattamento di cellule astrocitarie (Figura 3A) e della microglia (BV2) (Figura 3B) di ratto con gli ioni metallici (10 μ M) e i composti di interesse (1,2,3,4) (500 μ M) per 2h, prima della lisi cellulare. AC047 e BC081 rappresentano i controlli positivo e negativo, rispettivamente, del processo di internalizzazione del rame(II).



Nonostante alcuni dei composti utilizzati mostrano una certa attività ionoforica nei confronti del rame(II), l'accumulo del metallo non può che essere esiguo rispetto a quanto osservato per altri sistemi utilizzati come controlli positivi per processo. Al fine di indurre un maggior accumulo intracellulare di rame(II), mimando così le condizioni patologiche intracellulari, le linee SH-SY5Y (Figura 4) ed M17 (Figura 5) di neuroblastoma umano hanno subito un trattamento opportuno (*Chelation treatment*) al fine di privare maggiormente di rame(II) il comparto intracellulare, per poi esporlo ai complessi rameici dei composti esaminati. Rispetto al trattamento 'normale' (Figura 4A), la deprivazione del metallo endogeno intracellulare non ha un effetto significativo sui dati ottenuti per i vari composti analizzati.

Figura 4. Livelli intracellulari di Cu(II) a seguito del trattamento della linea SH-SY5Y con Cu(II) (10 μ M) e i composti di interesse (1,2,3,4) (500 μ M) per 2h (A, 'normal' treatment), prima della lisi cellulare. Nel caso del 'chelation' treatment (B), le cellule sono state trattate con BCS (150 μ M) per 24h e successivamente per 2h Cu(II) (10 μ M) e i composti di interesse (1,2,3,4), aventi concentrazione 500 μ M o maggiore (2x: 1mM; 4x: 2mM). CQ è stato utilizzato come controllo positivo del processo di internalizzazione del Cu(II).

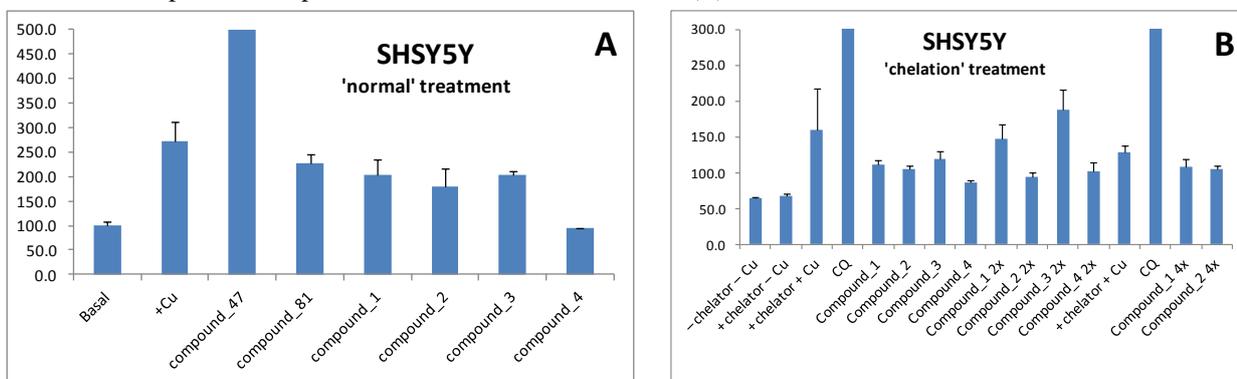
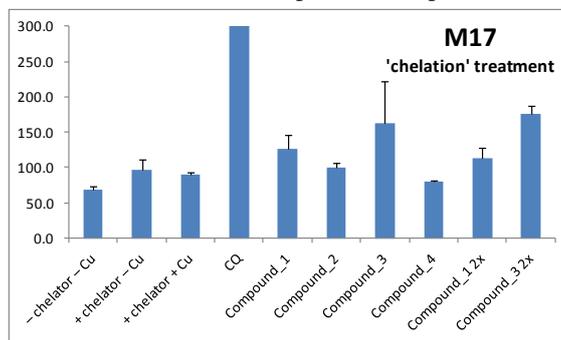


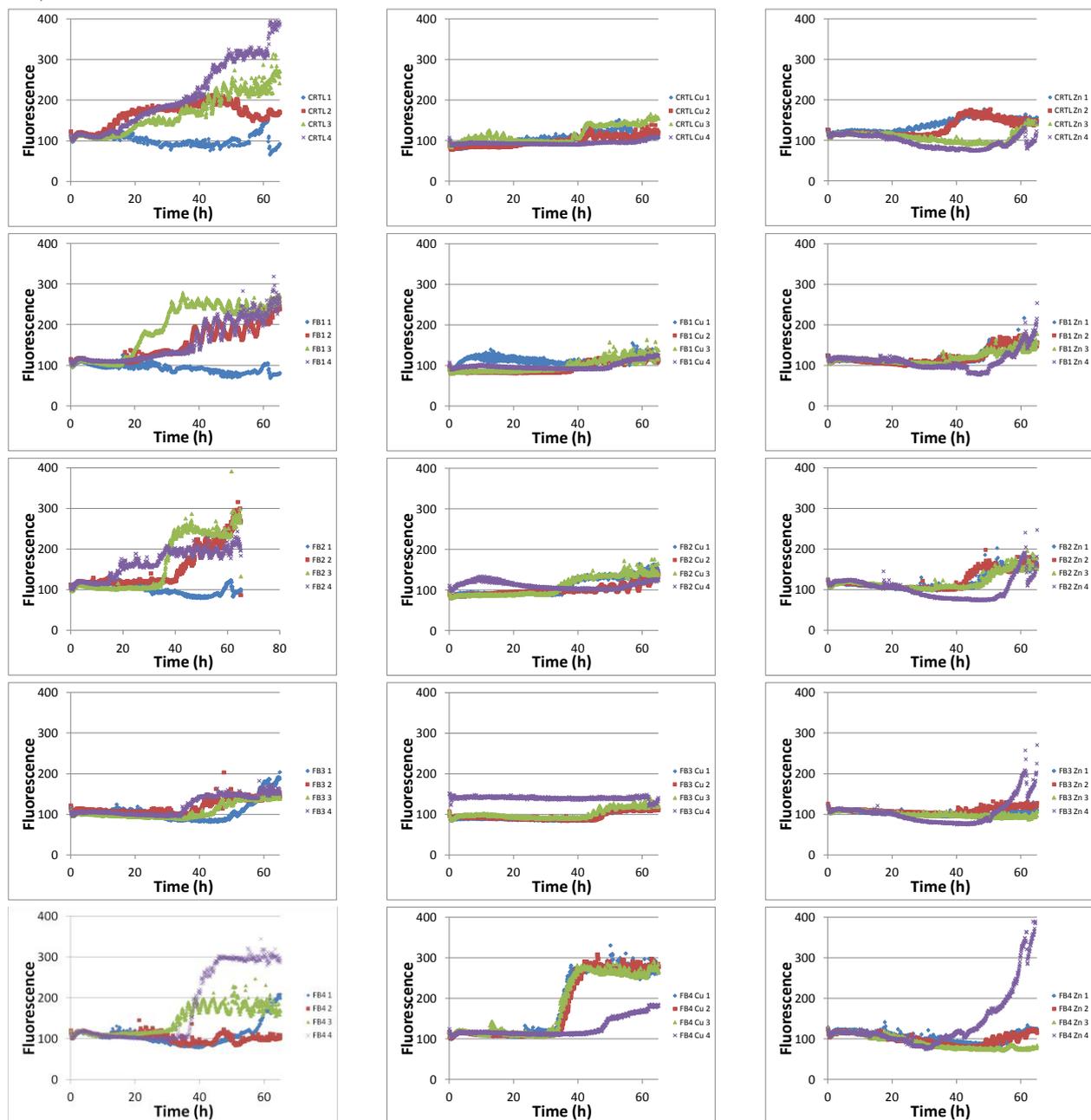
Figura 5. Livelli intracellulari di Cu(II) (A) e Zn(II) (B) a seguito del trattamento della linea M17 con BCS (150 μ M) per 24h e successivamente per 2h con Cu(II) (10 μ M) e i composti di interesse (1,2,3,4), aventi concentrazione 500 μ M o maggiore (2x: 1mM). CQ è stato utilizzato come controllo positivo del processo di internalizzazione del Cu(II).



Parallelamente agli studi di accumulo intracellulare di rame(II) e zinco (II), è stato valutato l'effetto dei peptidi e dei loro glicoconiugati sull'aggregazione dell'amiloide-beta *in vitro*, sia oligomerica che fibrillare, monitorata con gli agenti fluorescenti bis-ANS e Tioflavina-T, rispettivamente, con e in assenza di ioni rame e zinco(II).

La formazione di fibrille amiloidi in presenza dei composti di interesse (Figura 6), con e senza ioni metallici, ha prodotto dei risultati piuttosto complessi, la cui interpretazione necessita di ulteriori studi che nel prossimo futuro, sempre in collaborazione con l'ente ospitante del programma STM, intendiamo continuare a realizzare.

Figura 6. Cinetiche di aggregazione dell'amiloide-beta (1-42) (15 μ M), in presenza di ThT (30 μ M) e dei composti di interesse (100 μ M) a 37°C per 35 h. La fluorescenza è stata misurata utilizzando come lunghezza d'onda di eccitazione 450 nm, e quella di emissione pari a 480 nm. (FB1: L-Carnosine; FB2: D-Carnosine; FB3: trealosio-Carnosina; FB4: GHK)



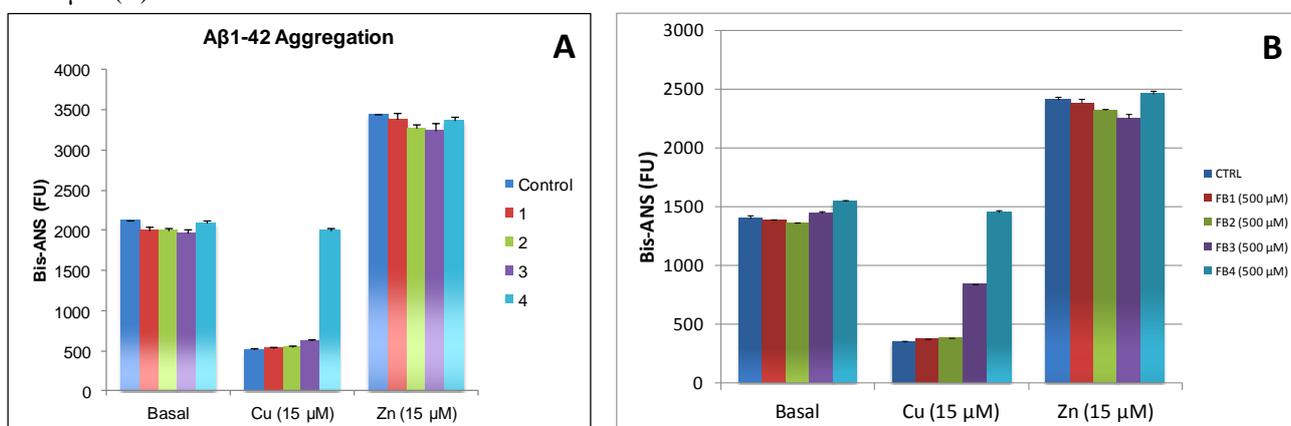
Nonostante il processo di aggregazione del peptide amiloide sia principalmente monitorato mediante ThT, la formazione di fibrille nella progressione della malattia di Alzheimer ha decisamente perso di interesse rispetto alla formazione e/o dissoluzione degli oligomeri solubili dell'amiloide-beta. Questi ultimi, infatti, sembrano essere molto più tossici delle fibrille amiloidi e,

dunque, l'inibizione della loro formazione, ovvero la possibilità di aumentarne la velocità di dissoluzione sembra essere una delle strategie più efficaci per la prevenzione e/o il trattamento della patologia di Alzheimer.

La formazione di specie oligomeriche solubili dell'amiloide-beta viene monitorata mediante il fluoroforo bis-ANS, la cui interazione con le superfici idrofobiche di tali oligomeri porta ad una variazione dello spettro di fluorescenza.

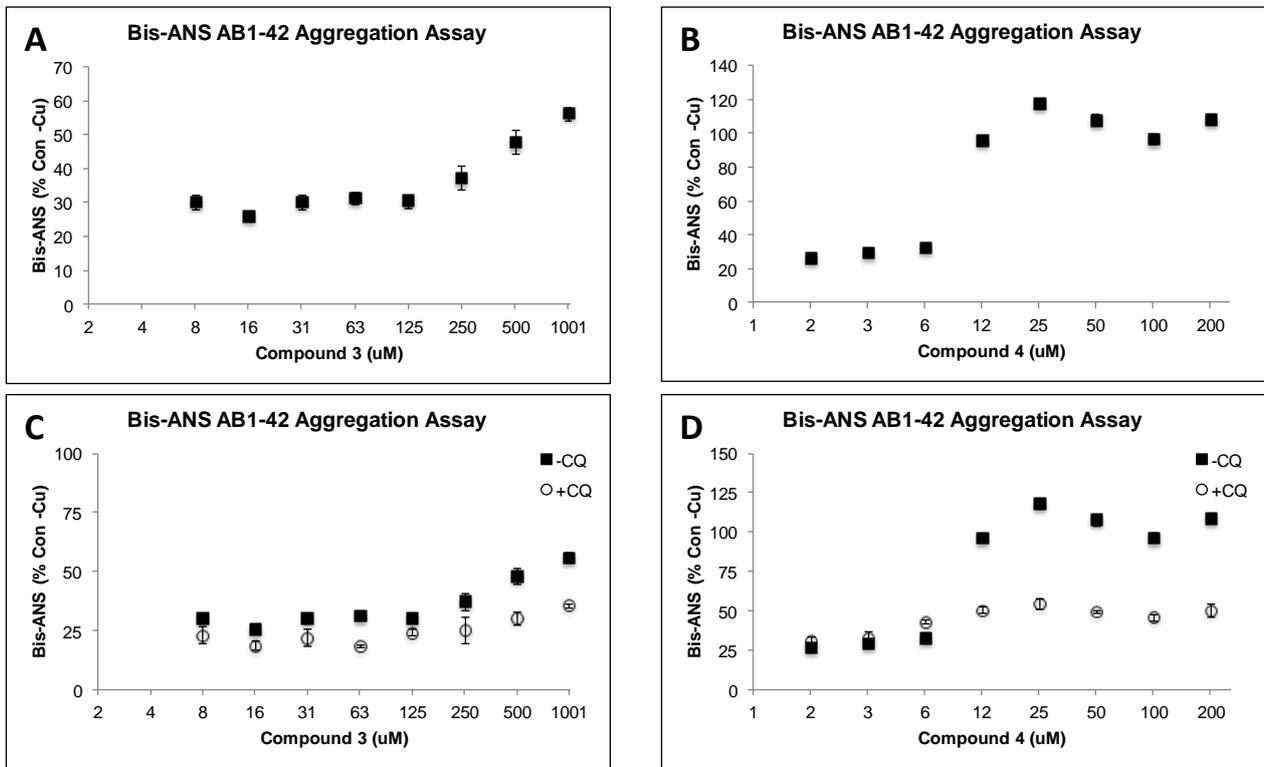
Come si vede chiaramente dalla Figura 7A, la fluorescenza del bis-ANS co-incubato con l'amiloide-beta (non monomerizzato), con e senza i composti di interesse, ha un valore che in presenza di rame(II) diminuisce, mentre gli ioni zinco(II) inducono un aumento di fluorescenza, rispetto alle condizioni basali. Questo effetto è dovuto alla ben nota capacità che hanno gli ioni rame(II) di dissolvere gli oligomeri solubili di amiloide-beta, mentre lo zinco ne produce un aumento. La scarsa capacità chelante dei peptidi utilizzati e dei loro glicocongiugati per lo zinco(II) è alla base dell'assenza di alcuna variazione di fluorescenza del sistema amiloide-beta/zinco(II) all'aggiunta dei sovra citati composti, mentre il composto che ha maggiore capacità coordinante nei confronti del rame(II) (GHK) ripristina il valore basale di fluorescenza del sistema amiloide-beta-bis-ANS. Tale effetto è concentrazione-dipendente, come si osserva chiaramente dai dati riportati in Figura 7B.

Figura 7. Misure di fluorescenza della sonda bis-ANS (10 μM) in presenza di amiloide-beta 1-42 (15 μM) e dei composti di interesse (1:L-Carnosina; 2:D-Carnosina; 3:trealosio-carnosina; 4:GHK) aventi concentrazione 100 μM (A) e 500 μM (B).



Considerando i risultati riportati in Figura 7, è possibile ricavare i valori di IC_{50} per i due composti più attivi (3:trealosio-L-carnosina; 4:GHK). Dai diagrammi riportati in Figura 8, si evince che il GHK mostra un valore di IC_{50} pari a 6.2 μM , mentre quello del derivato trealosio-carnosina supera il valore di 500 μM . Che sia la diversa attività complessante nei confronti degli ioni rame(II) ad generare questo risultato lo si evince dalle misure di competizione effettuate con il clioquinol (CQ), capace di coordinare fortemente lo ione rameico e competere con i composti testati.

Figura 8. Misure di fluorescenza della sonda bis-ANS (10 μM) in presenza di amiloide-beta 1-42 (15 μM), di L-Carnosina (A,C), trealosio-L-carnosina (B,D), questi ultimi aventi concentrazione da 2 μM a 1 mM, e del clioquinol (CQ) (10 μM) (C,D).



Catania, 28/01/2016

Francesco Bellia