



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA (DIMIS)

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia del Metabolismo: Lipidi e Lipoproteine

**Generazione di una banca di peptidi plasmatici.  
Applicazione di una strategia High-throughput  
screening per l'analisi della loro interazione  
con il sistema lipoproteina LDL-recettore LDL**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/10

TESI DI

**DOTT.SSA ROSALINDA TODARO**

COORDINATORE DEL DOTTORATO  
**Prof. M. Averna**

TUTOR  
**DOTT. DAVIDE NOTO**

XXIII CICLO A.A. 2011/2012

---

DOTTORATO



## *Introduzione*

## **1 Funzioni biologiche dei peptidi**

Per decenni, molti ricercatori hanno indirizzato i loro studi verso quei messaggeri biochimici che entrano a far parte di tutti i processi di regolazione metabolica dell'organismo umano, tra cui gli ormoni peptidici e i neuropeptidi, implicati nella comunicazione cellula-cellula (*Jurgens M, 2002*). Queste molecole mettono in contatto diverse cellule specializzate ed il loro trasporto è molto spesso garantito dai fluidi biologici.

Particolare attenzione è stata inoltre rivolta verso i peptidi presenti all'interno di specifici organi, tessuti, cellule e compartimenti subcellulari direttamente coinvolti in patologie e per questo sono molto utili come possibili biomarcatori specifici.

I peptidi giocano un ruolo centrale in molti processi fisiologici. I Neuropeptidi influenzano l'alimentazione e la regolazione del peso corporeo, i ritmi circadiani, sonno, dolore, paura, ansia, apprendimento e memoria. Gli ormoni peptidici sono coinvolti anche in diversi processi, compresi i meccanismi omeostatici di regolazione del plasma, dei livelli di glucosio, la ritenzione idrica, l'assunzione di cibo, e molti altri.

L'analisi peptidomica è in continua evoluzione alla scoperta di peptidi umani rilevanti come biomarkers o drug target.

L'identificazione delle proteine è facilitata dalla costituzione d'importanti databases, che integrano le informazioni raccolte nel campo della proteomica e della genomica.

I peptidi sono definiti piccole proteine con un peso molecolare inferiore a 20 kDa; poiché possiedono proprietà chimico-fisiche differenti da quelle delle proteine che hanno di contro una dimensione media nel range da 10 a 200 kDa e un punto isoelettrico tra 4 e 10, strategie analitiche, differenti dall'elettroforesi bidimensionale, vengono utilizzate per la loro identificazione e separazione. Si tratta principalmente di tecnologie innovative come le metodiche per la separazione multi-dimensionale in fase liquida (*Cravatt, B. F et al 2000*).

Nonostante i continui progressi, numerose sono le sfide tecnologiche e biologiche nell'analisi di proteomi complessi come quello del siero.

Il sangue contiene l'insieme più rappresentativo di peptidi, proteine e frammenti proteici prodotti nell'intero organismo. I nuovi approcci sperimentali si propongono di abbattere il grande ostacolo del range dinamico di concentrazione proteica. Infatti, l'isolamento dei peptidi plasmatici è difficile perché si trovano a basse concentrazioni e in una miscela complessa in cui le proteine housekeeping del plasma, come l'albumina, il fibrinogeno, le immunoglobuline e altre sono presenti in grandi concentrazioni (*Schrader M. et al 2001*).

## 1.1 Ormoni polipeptidici

Gli ormoni polipeptidici sono sostanze naturali che fungono da "messaggeri" all'interno dell'organismo e determinano la produzione di altri ormoni endogeni, fra cui il testosterone, altri ormoni sessuali ed i corticosteroidi .

Gli ormoni peptidici esplicano la loro azione interagendo con recettori specifici della membrana cellulare.

Il dominio N-terminale di questi recettori si espande verso l'esterno della cellula mentre la zona C-terminale si trova immersa nel citoplasma. I segmenti intermedi, idrofobici o idrofilici che siano, fluttuano attraverso la membrana. Quando un ormone peptidico si lega al suo recettore, il segnale viene trasmesso al citoplasma da proteine G, interruttori biologici comandati dalla trasformazione reversibile GTP-GDP.

Nella posizione "acceso", ossia quando legano il GTP, le proteine G attivano le protein-chinasi che alterano i processi cellulari fosforilando determinati enzimi.

La tabella1 elenca gli ormoni polipeptidici noti, distinguendoli in base al numero di residui amminoacidici e al peso molecolare.

Tra tutti questi ormoni, una parte trovano applicazioni mediche molto interessanti.

**Tabella1: Ormoni Peptidici**

Ormone	Residui amminoacidici	Peso molecolare
Ormone di rilascio della tiotropina	3	363
Tuftsina	4	501
Met-enkefalina	5	645
Angiotensina II	8	1.031
Ossitocina	8	986
Vasopressina	8	1.029
Peptide del sonno	9	992
Bradichina	9	1.069
Ormone di rilascio della gonadotropina	10	1.182
Sostanza P	11	1.527
Somatostatina	14	1.876
Gastrina	17	2.110
Secretina	27	2.876
Ser-Leu-Arg-Arg-Atriopeptina III	28	3.547
Peptide intestinale vasoattivo	28	3.809
Glucagone	29	3.374
$\beta$ -Endorfina	31	3.476
Calcitonina	32	3.415
Colecistochinina	33	4.492
Corticotropina	39	4.600
Fattore di rilascio della corticotropina	41	5.400
Fattore di rilascio dell'ormone della crescita	44	5.800
Relassina	48	5.500
Insulina	51	5.700
Ormone paratiroideo	83	8.500
$\beta$ -Lipotropina	91	10.000
Fattore di crescita dei nervi	115	14.000
Ormone della crescita	191	21.000
Prolattina	198	22.800

### ***Somatostatina***

Dall'ipotalamo è stato isolato e sintetizzato un 14-peptide, la somatostatina, che inibisce la secrezione dall'ipofisi dell'ormone della crescita. Questo ormone, presente anche nello stomaco, nell'intestino e nel pancreas, inibisce anche la secrezione di insulina, glucagone, gastrina, secretina e altri enzimi. In medicina viene usato come farmaco per la cura dell'acromegalia.

### ***Vasopressina***

Il lobo posteriore della ghiandola pituitaria (neuroipofisi) contiene due importanti peptidi, l'ossitocina e la vasopressina. La vasopressina (ADH, ormone antidiuretico) agisce sulla membrana dei tubuli distali e dei dotti collettori del rene, rendendola permeabile all'acqua. L'osmosi quindi richiama acqua all'interno della membrana dove c'è una maggiore concentrazione di elettroliti.

La vasopressina inoltre è un vasocostrittore che agisce sulla muscolatura liscia; recentemente sono stati condotti degli studi per comprendere l'azione neuronale di questo ormone a livello cardiovascolare, renale e termoregolatore.

L'ossitocina intensifica le contrazioni uterine durante il parto ed induce la lattazione, può anche svolgere un certo ruolo a livello di SNC.

Ciascun ormone partecipa seppure in misura modesta all'attività dell'altro; l'ossitocina, infatti, ha una certa attività antidiuretica mentre la vasopressina può esercitare un'azione tonica sull'utero, seppur a concentrazioni elevate.

La liberazione di questi ormoni da parte della neuroipofisi avviene con un meccanismo riflesso: da una parte la dilatazione del canale genitale al termine della gravidanza e la stimolazione dei capezzoli mediante suzione provocano la secrezione di ossitocina; dall'altra un aumento della pressione osmotica del sangue causa liberazione di vasopressina.

Quest'ultima viene impiegata nel trattamento del diabete insipido caratterizzato da un flusso eccessivo di urina diluita.

## Angiotensina

Se si riduce l'apporto di sangue al rene, questo organo libera una peptidasi, la renina, di peso molecolare di 40.000 dalton, che agendo su una  $\alpha$ -globulina (angiotensinogeno) del plasma, libera un decapeptide, l'angiotensina.

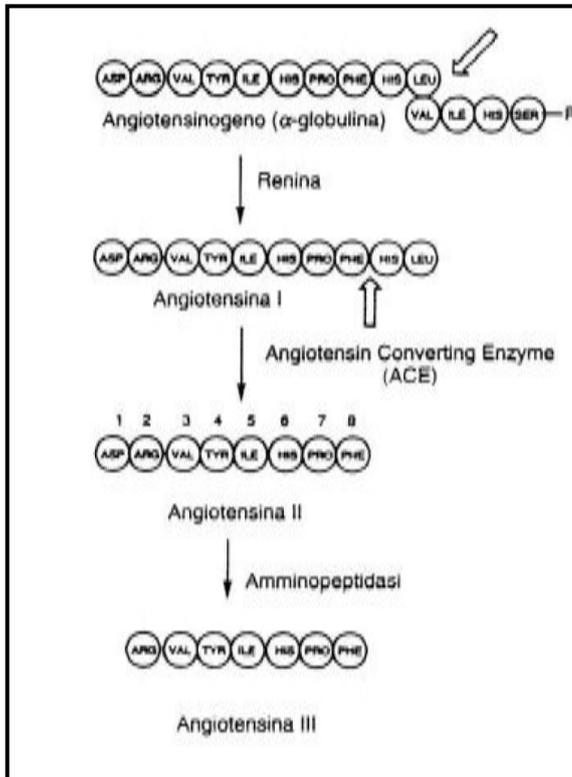


Fig1 Conversione dell'Angiotensina in Angiotensina II

## Ormoni pancreatici-Insulina

L'isolamento dell'insulina dal pancreas ha rappresentato un capitolo importante della storia della medicina. L'Insulina viene liberata come risposta ad aumento del glucosio, acidi grassi e aminoacidi nel sangue.

Questo ormone favorisce inoltre l'assorbimento e l'immagazzinamento di questi metaboliti nelle cellule. La somministrazione di insulina allevia i sintomi del diabete mellito (iperglicemia, lipemia, ecc) proprio perché questi sono causati da una insufficiente produzione di insulina da parte del pancreas.

L'angiotensina è inattiva ma viene successivamente convertita da un'altra peptidasi in un octapeptide, l'angiotensina II, dotata di una potente attività pressoria.

L'angiotensina funge da substrato per una amminopeptidasi, da cui viene convertita in angiotensina III, un peptide che presenta molte somiglianze con l'attività dell'angiotensina II; intervengono poi altri enzimi metabolici (amminopeptidasi, carbossipeptidasi ed endopeptidasi) che frammentano ed inattivano la molecola.

Il sistema renina-angiotensina è di grande interesse per il suo coinvolgimento nell'ipertensione.

Il glucagone stimola la glicogenolisi incrementando il glucosio ematico e favorisce il catabolismo delle proteine. Viene usato negli stati ipoglicemici dovuti a un iperdosaggio di insulina oppure nelle malattie genetiche caratterizzate da un'iperproduzione di insulina.

## **1.2. Neuromediatori e neuromodulatori**

### ***Met-enkefalina***

La met-enkefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) è presente nell'intestino e nel cervello: ha azione morfino-simile in quanto si lega allo stesso recettore ed ha azione analgesica. Per questo, insieme alle endorfine, alle dinorfine ed alla Leu-enkefalina, viene classificata negli oppioidi endogeni. La Met-enkefalina deriva da due peptidi di dimensioni maggiori, la proenkefalina e la proopiomelanocortina e viene usato come modello per la progettazione di agenti analgesici.

Un interessante esempio è dato dal composto in cui la glicina è sostituita dall'alanina, l'azoto della Phe è metilato e la metionina è trasformata nel solfossido dell'alcool corrispondente. Questo è circa 30.000 volte più attivo come analgesico della Met-enkefalina e 1.000 volte più della morfina quando viene somministrato per via intracerebroventricolare; è anche attivo per via orale, cosa inconsueta per un peptide.

## **2. Biomarcatori**

Molti messaggeri biochimici sono peptidi coinvolti nei sistemi di regolazione del nostro corpo e sono necessari nella comunicazione tra cellule. L'analisi metabolica costituisce uno strumento potente per la scoperta di biomarcatori correlati ad una risposta fisiologica e alla diagnosi di fenotipi complessi. Un biomarcatore rappresenta un indicatore misurabile di uno specifico stato biologico così come della presenza, o stadio, di una patologia.

I biomarcatori possono quindi essere utilizzati per diagnosticare o monitorare l'attività di una malattia, per guidare terapie molecolari mirate o per saggi di risposta terapeutica. Esistono differenti peptidi nel nostro corpo e una consistente parte può essere potenzialmente utile ai fini diagnostici e terapeutici.

### **2.1 I peptidi natriuretici**

I peptidi natriuretici sono ormoni vaso-attivi che intervengono nella regolazione della diuresi e della natriuresi ed esercitano un'azione antagonista degli effetti vasocostrittori del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone.

Le varie famiglie di peptidi natriuretici (ANP Atrial Natriuretic Peptide; BNP Brain o Btype Natriuretic Peptide; CNP Ctype Natriuretic Peptide; DNP Dtype Natriuretic Peptide Urodilatina) presentano tutti la stessa conformazione strutturale, una catena peptidica chiusa da un ponte cisteinico, questa porzione della molecola si lega ai recettori specifici

(NPR-A NPR-B) mentre le residue porzioni delle catene peptidiche si differenziano notevolmente tra le varie famiglie di peptidi ormonali sia per lunghezza che per la tipologia di aminoacidi contenuti.

La clearance di questi ormoni segue due vie principali :una degradazione enzimatica ad opera di un endopeptidasi oppure un processo di endocitosi, ad opera del recettore di tipo C, seguita dalla lisi da parte degli enzimi lisosomiali.

I peptidi natriuretici svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi cardiovascolare che, attraverso azioni complementari delle varie famiglie di peptidi, intervengono nella regolazione del tono della muscolatura liscia dei vasi, nel bilancio elettrolitico e sulla morfologia del miocardio.

Gli studi che recentemente hanno portato alla scoperta delle funzioni secretorie dei miocardiociti, hanno rivoluzionato le conoscenze di fisiopatologia cardiaca, la determinazione degli ormoni cardiaci è stata proposta come un valido strumento nella diagnosi e nella valutazione prognostica dello scompenso cardiaco

## **BNP**

IL BNP nell'uomo è prevalentemente prodotto a livello dei miocardiociti ventricolari. In base alle attuali conoscenze è il parametro che dimostra il maggiore potere informativo nella valutazione diagnostica dello scompenso cardiaco.

## **Secrezione e funzione dei peptidi natriuretici**

I peptidi ANP E BNP sono entrambi sintetizzati e secreti sia a livello dell'atrio che del ventricolo anche se in modo quantitativo differente : l'ANP prevale a livello dell'atrio mentre il BNP nel ventricolo. Il principale stimolo che provoca la secrezione dei peptidi natriuretici è la distensione delle pareti, quindi situazioni in cui vi è un aumento del ritorno venoso, per esempio l'attività fisica o le variazioni di postura che determinano un incremento del volume atriale, determinano una secrezione prevalente di ANP. Al contrario, l'ipertrofia e la fibrosi, che provocano uno stiramento delle pareti ventricolari, stimolano la sintesi e la secrezione del BNP.

Sia il sistema neuro-ormonale che il sistema immunitario intervengono, attraverso un complesso meccanismo di interazioni, nella regolazione della sintesi e del rilascio dei peptidi natriuretici. D'altra parte il sistema dei peptidi natriuretici cardiaci svolge un'azione inibitrice sul sistema neuroendocrino ed immunitario.

Molti autori hanno dimostrato che il sistema dei peptidi natriuretici cardiaci, oltre a svolgere una potente azione diuretica, natriuretica, vasodilatatrice e controregolatoria nei confronti del sistema neuro-ormonale, possiede anche un'azione che contrasta i fenomeni

del rimodellamento ventricolare e vascolare. L'azione dei peptidi natriuretici cardiaci si contrappone alla disfunzione endoteliale a livello del microcircolo, infatti l'endotelio produce il CNP che svolge soprattutto un'azione paracrina a livello vasale. Poiché agiscono tramite gli stessi recettori, ANP e BNP producono effetti biologici simili: provocano natriuresi, diuresi, vasodilatazione, inibizione della sintesi dell'aldosterone ed hanno un effetto antimitogenico sulle cellule dell'endotelio e della muscolatura liscia. L'effetto ipotensivo di questi peptidi è dovuta anche ad un'azione a livello centrale dove inibiscono la secrezione di ADH e ACTH ed hanno un effetto simpaticolitico.

I peptidi natriuretici svolgono un'importante azione cardioprotettiva intervenendo nel controllo della crescita delle cellule endoteliali e della muscolatura liscia dei vasi, quindi hanno un ruolo rilevante nel moderare la mitogenesi fisiologicamente e limitare l'ipertrofia ed il rimodellamento del miocardio negli stati di ipertensione cronica (Clerico A 1999). In base alle attuali conoscenze, la principale indicazione alla richiesta della determinazione del BNP è la diagnosi differenziale tra lo scompenso cardiaco ed l'insufficienza respiratoria nelle dispnee acute. In queste situazioni la dimostrazione di bassi livelli di BNP permette di escludere l'origine cardiogena della dispnea. La determinazione del BNP, pur non sostituendo le indagini strumentali ha una validità anche come indagine di primo livello nella valutazione dell'insufficienza cardiaca (Ruskoaho H. 2003)

### **3. Peptidi esogeni**

#### **3.1. Peptidi bioattivi del latte**

Molti degli oligopeptidi originati dalla degradazione delle proteine alimentari sono stati caratterizzati come biologicamente attivi. Si tratta di molecole che risultano inattive quando sono presenti nella sequenza della proteina nativa, ma che assumono attività farmacologica nel momento in cui vengono rilasciati.

Da questo punto di vista le proteine del latte rappresentano una fonte molto importante di peptidi bioattivi. Le proteine del latte con attività biologica sono rappresentate da tre grandi famiglie: le caseine ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ), le sieroproteine (immunoglobuline,  $\beta$ -lattoglobuline,  $\alpha$ -lattalbumine, lattoferrina e lisozima) i fattori di crescita (prolattina, transforming growth factor [TGF], insulin-like growth factor [IGF]).

Le attività che sono state riconosciute ai peptidi derivanti da tali proteine sono svariate: agoniste e antagoniste degli oppiacei, antiaggreganti e antipertensive, immunomodulanti, trasporto di minerali etc. Tali peptidi si liberano per digestione enzimatica a livello gastrointestinale o per utilizzo di enzimi in laboratorio, e sono di svariata natura. (Meisel, H. et al 1999)(Meisel, H. 1998)

## **Attività dei peptidi del latte:**

### **Attività oppioide-simile e anti-oppioide**

Si tratta di esorfine che si liberano durante la digestione di diverse proteine presenti nel latte. I peptidi ad azione oppioide simile (caseomorfine e lattorfine), una volta assorbite dalla mucosa gastro-intestinale, esplicano un effetto regolatore delle funzioni gastro-intestinali (rallentando il transito nel lume intestinale e favorendo il riassorbimento di acqua ed elettroliti sono utili nel caso di sindromi diarroiche). Un effetto di tali analoghi degli oppioidi si osserva anche sugli apparati respiratori e cardiovascolare e sui sistemi nervosi centrale e periferico (azione soporifera, analgesica, calmante). Tra i peptidi ad azione anti oppioide il più rappresentato e più studiato è la casoxina.

### **Attività antipertensiva (Casochinine- lattochinine)**

Si tratta di inibitori dell'enzima ACE (enzima di conversione dell'angiotensina) che, non permettendo la conversione dell'angiotensina I in angiotensinaII, ne annullano l'effetto vasocostrittore responsabile dell'innalzamento pressorio.

Una riduzione significativa della pressione arteriosa è stata registrata in persone che hanno assunto latte fermentato in capsule. Si pensa di riuscire ad ottenere un risultato analogo a quello dei farmaci antipertensivi con l'assunzione di prodotti privi di attività tossica o avversa in genere.

### **Attività immunomodulatrice**

Tali peptidi stimolano la risposta immunitaria e sono stati descritti effetti positivi nel caso di immunodeficienza umana ad eziologia virale. Non sono chiari i meccanismi con cui ciò avviene, ma è stato dimostrato che alcuni derivati della caseina e delle proteine del siero sono in grado di stimolare sia l'attività cellulo-mediata che quella umorale.

Tra i fattori di crescita vi è il TGF dotato di chemiotassi per i neutrofilo e in grado di stimolare la migrazione delle cellule epiteliali sul sito delle lesione.

### **Attività antimicrobica**

La lattoferrina oltre a favorire l'assorbimento del ferro ha un ruolo in qualità di antimicrobico, antivirale e antitumorale. Per esempio è stato dimostrato che la presenza di lattoferrina addizionata al latte inibisce l'infezione di cellule bersaglio da parte del virus HIV, limitando la trasmissione verticale del virus al neonato.

Dalla lattoferrina deriva la lattoferricina che ha dimostrato la propria attività anti-*Helicobacter pylori*. Alcuni ricercatori stanno valutando l'ipotesi di accrescere la sicurezza alimentare addizionando gli alimenti con peptidi ad azione antimicrobica.

### **Attività antitrombotica (Caseoplateline)**

Tali peptidi, derivanti dal caseinoglicomacropeptide che si forma durante la caseificazione, hanno una sequenza caratterizzata dalla presenza di alcuni residui aminoacidici (Ile-108, Lys-112, Asp-115) analoga a quella presente nella sequenza della catena del fibrinogeno. Si pensa quindi che questi peptidi svolgano la loro azione anticoagulante competendo con il fibrinogeno per il legame alle piastrine. Impedendo la formazione del coagulo tali peptidi possono risultare di interesse nel prevenire alcuni disturbi a livello cardiaco e cerebrale.

### **Attività fissante dei minerali**

Sono fosfopeptidi che favoriscono l'assorbimento del calcio e impediscono la formazione di sali insolubili, aumentando così la biodisponibilità. Tra i dimostrati effetti positivi si riscontrano l'attività anticariogena con inibizione delle lesioni dovute a carie e ricalcificazione dello smalto dentale. Risultati promettenti sono già stati ottenuti con l'assunzione di tali peptidi da parte di pazienti con osteoporosi affetti da rachitismo. Anche per quanto riguarda i folati nel latte è presente un componente che li lega, facilitandone l'assorbimento e aumentandone la biodisponibilità.

### **Attività ipocolesterolemizzante**

Sono stati condotti degli studi sul meccanismo d'azione ipocolesterolemizzante dell'idrolizzato triptico delle b-lactoglobuline (LTH), questi suggeriscono una possibile inibizione della solubilità micellare del colesterolo, con conseguente soppressione dell'assorbimento per interazione diretta tra le micelle miste di colesterolo e LTH a livello dell'epitelio del digiuno

Sono stati identificati 4 tipi di peptidi che inibiscono l'assorbimento del colesterolo in vitro: IIAEK, GLDIQK, ALPMH, and VYVEELKPTPEGDLEILLQK (*Nagaoka S. 2001*). La lactostatina è un nuovo pentapeptide (IIAEK), derivato dalla  $\beta$ -lactoglobulina del latte bovino, avente un'attività ipocolesterolemica superiore al  $\beta$ -sitosterolo e che ha mostrato di influenzare i livelli sierici del colesterolo negli studi sugli animali. . La lactostatina induce la degradazione del colesterolo tramite l'attivazione dell'espressione del gene (CYP7A1) che codifica l'enzima colesterolo 7 alfa idrossilasi, responsabile dell'utilizzo del colesterolo epatico per la sintesi dell'acido colico (*Morikawa K et al 2007*). Un'analisi approfondita ha evidenziato che la lactostatina promuove la fosforilazione di ERK (extracellular signal-regulated kinase) e la concentrazione intracellulare di calcio, questi si sono dimostrati essenziali per l'attivazione del gene CYP7A1, infatti il trattamento con inibitori MAPK (mitogen-activated-protein-kinase) sopprime i livelli di ERK fosforilato e blocca l'attivazione del gene.

#### **4. Dislipidemie genetiche**

Le dislipidemie sono spesso considerate disturbi metabolici dovuti a disordini alimentari e/o comportamentali in grado di causare un aumento del rischio cardiovascolare. La classificazione delle alterazioni del metabolismo lipidico integra sia gli aspetti metabolici che i determinanti genetici vi è una grande eterogeneità delle basi molecolari di queste alterazioni metaboliche. Infatti, accanto a forme che riconoscono la loro causa in difetti localizzati in un unico gene e che possono essere trasmessi con modalità autosomica dominante o recessiva (dislipidemie monogeniche), ne sono state descritte altre che mostrano difetti genetici complessi, probabilmente legati alla combinazione di più geni, la cui trasmissione è influenzata da un elevato livello di variabilità nella penetranza (dislipidemie a genetica complessa).

Esiste infine un terzo gruppo di dislipidemie causate dall'interazione tra difetti genetici in numerosi geni, funzionalmente modesti, e fattori ambientali, prevalentemente dietetici. Queste vengono definite dislipidemie multigeniche,

##### **4.1 Le Ipocolesterolemie Primitive**

La distribuzione dei livelli plasmatici di colesterolo nelle popolazioni occidentali è regolato da interazioni complesse tra geni e fattori ambientali. Soggetti con valori di colesterolo totale (CT), LDL-colesterolo (LDL-C) ed apoB inferiori al 5°percentile (inferiori rispettivamente a 128mg/dl, 90mg/dl e 50mg/dl), in assenza di altre patologie che determinano bassi livelli di colesterolo, sono affetti da Ipocolesterolemia primitiva. Esistono tre tipi di deficit lipoproteici su base ereditaria, caratterizzati da ipocolesterolemia: a) Sindrome di Anderson o “ Chylomicron Retention Disease”; b) Sindrome di Bassen-Konzweig o Abetalipoproteinemia ; c) Ipobetalipoproteinemia Familiare (FHBL).

La malattia di Anderson è la forma di ipobetalipoproteinemia con assenza selettiva di apoB-48. Sino ad oggi sono stati descritti 35 casi. I soggetti affetti sono tutti in età pediatrica e mostrano delle manifestazioni che consistono in una sindrome da malassorbimento, steatorrea e ritardo di crescita. L'endoscopia mostra generalmente alterazioni tipiche della mucosa intestinale. Nel plasma dei soggetti affetti si nota assenza di lipoproteine contenenti apoB-48 e assenza di chilomicroni in fase postprandiale, mentre è possibile rilevare la presenza di lipoproteine contenenti apoB-100, sebbene in quantità ridotte. Inoltre risultano ridotti i livelli plasmatici di HDL, come i livelli totali di lipidi, colesterolo, fosfolipidi, carotenoidi e vitamine liposolubili. Appare normale l'assorbimento degli acidi grassi e la loro esterificazione da parte delle cellule epiteliali. Studi istologici condotti su biopsie intestinali hanno rilevato che i villi

sono normalmente rappresentati e con lunghezza normale ma gli enterociti sono carichi di vacuoli contenenti materiale adiposo. Se viene somministrata una dieta a basso tenore di lipidi, integrata con vitamine liposolubili (A ed E) ed acidi grassi essenziali si osserva una ripresa della crescita ed una attenuazione dei sintomi gastrointestinali. Recentemente sono state definite le basi molecolari responsabili della sindrome di Anderson; mutazioni del gene SARA2, nel cromosoma 5q31.1, codificante per la proteina Sar1b sono state associate a questo fenotipo. Sar1b è una proteina regolatrice legante il GTP impegnata nel trasporto intracellulare dei chilomicroni.

#### **4.1.1 Abetalipoproteinemia**

Descritta da Bassen e da Konzweig è una malattia autosomica recessiva caratterizzata da livelli estremamente bassi di colesterolo totale (20-50mg/dl), LDL-C ed apoB con malassorbimento dei grassi, retinite pigmentosa, atassia, neuropatia ed acantocitosi. Nel plasma dei soggetti affetti si osserva assenza di lipoproteine contenenti apoB, lipoproteine a bassissima densità (VLDL) e lipoproteine a bassa densità (LDL). Inoltre si ha un ridotto trasporto e assorbimento di grassi che ha come conseguenza un bassissimo livello di colesterolo nel plasma (*Kane J.P et al., 1995*). Nei bambini si presenta con steatorrea ed assenza della crescita, in giovani adulti vi può essere un declino neurologico con perdita dei riflessi tendinei. I problemi neurologici più gravi sono dovuti ad un concomitante deficit nell'assorbimento di vitamina E (*Kayden HJ et al., 1993*) e possono essere revertiti dalla somministrazione della stessa vitamina (*Kayden HJ et al., 1983; Muller DPR et al., 1985*). I difetti a carico della retina sono invece dovuti all'assenza combinata delle vitamine A ed E. Il trattamento con la vitamina A nel primo stadio della malattia può ripristinare le funzioni della retina ma non ne può bloccare la graduale e progressiva degenerazione.

Studi recenti hanno indicato che il difetto molecolare risiede nel gene codificante per la "Trygliceride Microsomal Transfer Protein" (MTP) localizzato nel cromosoma 4q22-24 ed è organizzato in 18 esoni (*Sharp D et al., 1994*). Il complesso MTP è un eterodimero di una proteina specifica di 97kDa e di una proteina ubiquitaria (Protein Disulfate Isomerase, PDI). L'MTP viene espressa ad elevati livelli negli enterociti e negli epatociti, che nel lume del reticolo endoplasmico e nell'apparato di Golgi; la sua principale funzione è quella di catalizzare il trasferimento dei lipidi dalla loro sede di sintesi all'apoproteina B.

#### 4.1.2 Ipobetalipoproteinemia Familiare

L'ipobetalipoproteinemia familiare (FHBL) è una malattia genetica a trasmissione autosomica co-dominante caratterizzata da bassi livelli plasmatici di colesterolo ed apolipoproteina B (*Kayden H.J. et al., 1985; Linton M.F. et al., 1993*)

Il fenotipo FHBL può derivare da due tipi di difetti molecolari: difetti legati al gene apo B o indipendenti da questo gene. L' FHBL dovuta a mutazioni del gene apo B può essere associata alla presenza (forme visibili) o assenza (forme invisibili) di forme troncate di apoB evidenziabili nelle lipoproteine plasmatiche. La presenza nel plasma di apo B troncate è funzione della loro lunghezza.

Le forme troncate di apoB vengono identificate secondo la nomenclatura in centili; la proteina matura costituita da 4536 amminoacidi è denominata apoB-100 e le forme tronche vengono identificate con il numero percentuale di amminoacidi che le costituiscono rispetto alla proteina matura. ApoB troncate di dimensioni inferiori ad apo B-25/B-27 (cioè con dimensioni corrispondenti al 25-27% dell'apo B-100) non sono evidenziabili nel plasma in quanto non secrete in forma di lipoproteine (*Kane J.P. et al., 1995*).

Tutte le mutazioni, eccetto una, del gene dell'apoB riportate fino ad ora (circa 40 diverse mutazioni) in soggetti con FHBL determinano la sintesi di forme troncate dell'apoB (*Linton M.F. et al., 1993; Schonfeld G., 2003*).

La possibilità di forme di FHBL non legate al gene apoB trova inoltre riscontro, nell'osservazione che in alcune grandi famiglie l'analisi dell'aplotipo ha dimostrato una assenza di co-segregazione del fenotipo FHBL con il gene apoB. Queste forme di FHBL possono essere dovute a difetti di altri geni che controllano l'assemblaggio, la secrezione o il catabolismo delle lipoproteine contenenti apoB.

Un "wide genome scan" condotto per la ricerca di nuovi loci di suscettibilità per FHBL è stato (*Pulai J.I. et al., 1998*) ha permesso di descrivere un aplotipo comune nel cromosoma 3(3p); (*Yuan B. et al., 2000*); successive analisi di linkage hanno mostrato l'esistenza di questa associazione in altre sei famiglie con FHBL. Nei soggetti affetti da FHBL, eterozigoti per mutazioni del gene dell'apoproteina B, circolano nel plasma almeno due popolazioni di particelle lipoproteiche contenenti apoB, quelle di sintesi epatica normali (VLDL, IDL e LDL) contenenti apoB-100, e lipoproteine contenenti le forme di apoB troncate di sintesi epatica o epatica ed intestinale (*Kane J.P. et al., 1995; Krul E.S. et al., 1992*). Le forme troncate di apo B più corte dell'apo B 48 sono sintetizzate sia dal fegato che dall'intestino, mentre le forme troncate più lunghe dell'apoB-48 vengono probabilmente sintetizzate soltanto dal fegato. Inoltre, in pazienti

con FHBL , sono state rilevate concentrazioni plasmatiche di apoB-100 minori dell'atteso 50% (*Huang et al., 1991; Parhofer et al., 1996; Welty et al., 1997*). Diversi studi hanno evidenziato che questa minore secrezione possa essere dovuta ad una ridotta sintesi (*Krul E.S. et al., 1992; Parhofer K.G. et al., 1996; Srivastava N. et al., 1999; Welty FK et al., 1997*), e che la minore sintesi di apoB troncate possa essere dovuta sia ad una maggiore degradazione dell'mRNA mutato (*Srivastava R.A. et al., 1999*), sia anche ad un meccanismo che elimina molto più rapidamente le forme troncate di apoB rispetto alle particelle che presentano la proteina matura (*Krul E.S. et al., 1992; Gabelli C. et al., 1996; Parhofer K.G. et al., 1992; Parhofer K.G. et al., 1990*).

Clinicamente i soggetti eterozigoti sono solitamente asintomatici; i soggetti omozigoti possono essere asintomatici o possono presentare caratteristiche fenotipiche e cliniche molto simili ai soggetti con abetalipoproteinemia.

#### **4.2 Malattie cardiovascolari e colesterolo**

Le malattie cardiovascolari nella loro globalità, e la cardiopatia ischemica (CHD), in particolare, rappresentano la principale causa di morte nella maggior parte dei paesi industrializzati. Evidenze epidemiologiche e sperimentali suggeriscono che, tra i vari fattori di rischio implicati, l'ipercolesterolemia svolge un ruolo preponderante, influenzando non soltanto lo sviluppo di malattia coronarica ma aumentando altresì il rischio di eventi cerebrovascolari e di arteriopatie periferiche. L'accumulo patologico di colesterolo nei vasi sanguigni può portare alla formazione di placche aterosclerotiche che possono ostruire i vasi originando un infarto del miocardio. Le lipoproteine a bassa densità (LDL) rappresentano la quota maggiore delle lipoproteine che trasportano colesterolo nel sangue umano e sono anche la causa di diverse affezioni coronariche. Le LDL sono rimosse dal torrente circolatorio con elevata efficienza e specificità per mezzo dell'endocitosi mediata dal recettore delle LDL (LDLR) Fig2, un recettore di membrana che ha un'elevata affinità di legame per le apoproteine ApoB e ApoE presenti sulla superficie delle lipoproteine LDL. Il recettore per il fenomeno denominato "riciclaggio e riutilizzo del recettore LDLR" si localizza nuovamente sulla superficie della cellula, in tal modo i recettori presenti possono internalizzare una grande quantità di LDL.

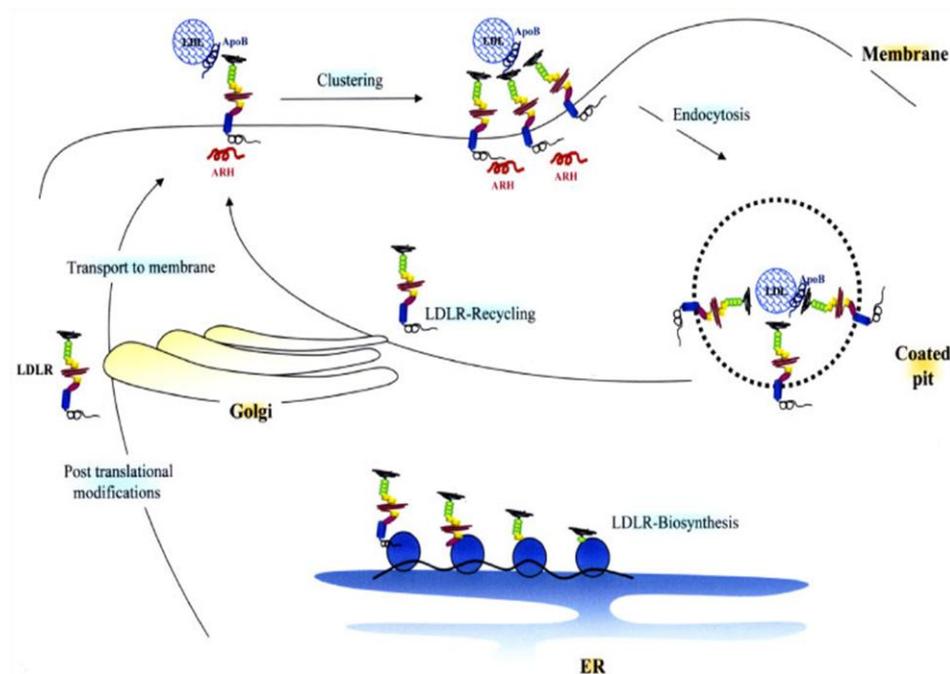


Fig.2: Rappresentazione schematica del recycling del recettore delle LDL

Il meccanismo di captazione ed internalizzazione delle LDL è stato dedotto, conducendo degli studi su pazienti affetti da una malattia ereditaria nota come Ipercolesterolemia Familiare (FH). Le mutazioni che causano tale patologia sono di due tipi: mancato legame delle LDL al loro recettore oppure l'impossibilità d'internalizzare il complesso LDL-LDLR. L'ipercolesterolemia autosomica dominante (ADH) è una delle malattie genetiche più frequenti ed è caratterizzata clinicamente da elevati livelli plasmatici di LDL-colesterolo. L'ADH può essere causata da mutazioni nel recettore delle LDL (Ipercolesterolemia Familiare o FH) oppure da mutazioni nel gene dell'Apo B (Familial Defective ApoB o FDB). Recentemente sono stati associati due nuovi loci a questa malattia: il locus PCSK9 associato alla forma d'ipercolesterolemia denominata FH3 ed un nuovo locus non ancora ben identificato associato al FH4. La FH in eterozigosi è una delle sindromi monogeniche più comuni. La forma omozigote, la cui espressione fenotipica ha caratteristiche d'estrema gravità, è molto rara. I soggetti affetti da FH in eterozigosi presentano livelli plasmatici di colesterolo totale e di LDL-colesterolo compresi tra 300 e 500 mg/dl. Negli omozigoti i livelli sono sensibilmente più alti, con concentrazioni comprese tra 600 mg/dl e 1200 mg/dl. Nei soggetti con FH, il colesterolo in eccesso veicolato dalle LDL si deposita preferenzialmente in alcuni tessuti quali cute, tendini e arterie, dando origine a lesioni caratteristiche (xantelasmi a livello cutaneo, xantomatosi tendinea e placche). La gravità di queste lesioni, soprattutto quelle a carico della parete arteriosa, è direttamente correlata sia ai livelli plasmatici di LDL-colesterolo che al tempo d'esposizione ad elevati livelli di LDL-colesterolo. In eterozigosi la FH

comporta livelli plasmatici di LDL-colesterolo elevati fin dalla nascita, anche se i soggetti affetti rimangono solitamente asintomatici per decenni fino allo sviluppo di sintomi correlati soprattutto alla coronaropatia su base aterosclerotica. I soggetti eterozigoti per FH presentano anche una maggiore probabilità di sviluppare cardiopatia ischemica ed infarto miocardico acuto prima dei 60 anni. Gli omozigoti mostrano invece caratteristiche cliniche molto più uniformi: xantelasmi e xantomatosi sono presenti nei primi anni di vita e le manifestazioni cliniche della malattia coronarica su base aterosclerotica sono evidenti già nella prima infanzia e non sono rari i casi di decesso per infarto miocardico acuto prima dei 20 anni. Dal punto di vista clinico è possibile distinguere i soggetti affetti da Ipercolesterolemia Familiare in: a) Ipercolesterolemia Familiare definita e b) Ipercolesterolemia Familiare probabile. La forma definita è caratterizzata da livelli plasmatici di colesterolo totale (CT) > 290 mg/dl negli adulti o > 260 mg/dl nei bambini sotto i 16 anni, oppure livelli di LDL-colesterolo > di 190 o 155 mg/dl rispettivamente negli adulti o nei bambini, associata alla presenza di xantomi tendinei nella famiglia. La forma probabile è caratterizzata da livelli di colesterolo come i precedenti, ma è anche associata ad una storia familiare d'infarto miocardico in assenza di xantomatosi tendinea nella famiglia. Gli elevati livelli di LDL colesterolo riscontrati in soggetti FH sono dovuti ad una mancata o ridotta rimozione delle LDL dal circolo sanguigno, il che può essere dovuto ad un deficit di sintesi o ad una funzione alterata del recettore delle LDL causati da mutazioni del gene codificante il recettore delle LDL. Le mutazioni nel gene per il recettore delle LDL note fino a ora sono più di 700. L'ipercolesterolemia autosomica recessiva (ARH) presenta caratteristiche cliniche simili alla forma dominante tuttavia la gravità clinica è in genere inferiore.

Le alterazioni genetiche interessano:

- il gene *ARH* localizzato sul cromosoma 1 (1p35) che codifica per una proteina di 308 aminoacidi contenente un dominio di 170 aminoacidi denominato “Phosphotyrosine binding domain” (PTB).

Domini PTB sono presenti in varie proteine “adaptors”, si legano alla sequenza NPXY presente nella coda citoplasmatica di molti recettori cellulari di superficie, incluso l'LDL-R. Studi in vitro suggeriscono che la proteina ARH gioca un ruolo tessuto-specifico; essa è implicata nella stabilizzazione del legame LDL-recettore e nel trasferimento intracellulare delle LDL legate al recettore (*Garcia CK et al., 2001*). I pazienti omozigoti e doppi eterozigoti per mutazioni del gene ARH presentano caratteristiche cliniche simili a quelle degli omozigoti FH (la gravità clinica dell'ARH è comunque inferiore

all'omozigosi FH), invece gli eterozigoti presentano livelli di colesterolo nella norma o, in alcuni casi, solo lievemente aumentati.

Mutazioni del gene ARH sono state identificate principalmente in Sardegna ed in altri paesi del bacino del Mediterraneo. Al momento attuale due sole mutazioni del gene ARH (Trp22>Stop e 432insA>Fs>Stop170) sono risultate responsabili di tutti i casi di ARH in Sardegna, dove solo la frequenza degli eterozigoti ARH è di 1:120 mentre quella degli omozigoti e dei doppi eterozigoti composti ARH (1:38.000) risulta circa 20 volte superiore a quella (1:1.000.000) degli omozigoti FH in Italia e nel mondo occidentale (Arca M et al.,2002).

- i geni *ABCG5* (Sterolina 1) ed *ABCG8* (Sterolina 2) localizzati sul cromosoma 2p21 ed appartenenti alla famiglia dei trasportatori transmembrana ATP-binding cassette. Mutazioni in questi geni inducono alterazioni dell'eliminazione degli steroli vegetali a livello enterocitario;
- il gene *CYP7A1* codificante per l'enzima *colesterolo-7 $\alpha$ -idrossilasi*, che catalizza la prima tappa del catabolismo del colesterolo e della formazione degli acidi biliari;

## **5 Peptidi sintetici ad attività ipocolesterolemizzante**

### **5.1 Ruolo di PCSK9 nella regolazione dei livelli di LDL-C**

PCSK9 è una proproteina convertasi coinvolta sia nella differenziazione neuronale (Seidah N.G. et al.,2003) che nella regolazione dei livelli sierici di LDL-C attraverso la degradazione dell' LDL-R (Abifadel M. et al.,2003).

Esperimenti condotti in vitro e su modelli animali, al fine di valutare l'attività biologica di PCSK9, indicano un ruolo della proteina nel controllare i livelli di LDL-R; è stato dimostrato, infatti, che l'overespressione di PCSK9 "wild-type" umana e murina in fegato di topi mediata da adenovirus, determina un raddoppio dei livelli di colesterolo totale per incremento specifico di 5 volte di LDL-C (Maxwell KN. et al., 2004; Park SW. et al., 2004).

L'incremento dei livelli di LDL-C sembrano dipendere da un meccanismo mediato dall'LDL-R poiché l'overespressione della proteina PCSK9 in topi knock-out per l'LDL-R non si associa all'incremento dei livelli di LDL-C (Benjannet S et al., 2004; Maxwell KN et al., 2004; Park SW et al., 2004). Recenti studi hanno fornito spunti circa il sito e la modalità di azione della proteina PCSK9. L'aggiunta di PCSK9 ricombinante nel mezzo di coltura di epatociti determina un aumento dei livelli di LDL-C, una drastica riduzione nel numero di molecole LDL-R senza variare i livelli di mRNA dell'LDL-R. Questi risultati suggeriscono una regolazione post-trascrizionale di PCSK9 sull'LDL-R e che

PCSK9 agisce principalmente sul processo di internalizzazione e riciclaggio dell'LDL-R, senza interferire con la sua sintesi (Lagace TA et al., 2006). Al contrario topi knockout *Pcsk9*<sup>-/-</sup> mostrano un incremento dei livelli di LDL-R nel fegato e una riduzione delle concentrazioni di colesterolo plasmatico (Rashid S. et al., 2005). L'effetto di PCSK9 sull'LDL-R appare inoltre essere cellula-specifico; come dimostrato da vari esperimenti, l'overespressione di PCSK9 riduce il numero di LDL-R nel fegato e nelle cellule intestinali, ma non nei fibroblasti (Park SW et al., 2004). Ulteriori studi dimostrano che l'attività catalitica è necessaria per la maturazione e la secrezione della proteina ma sembra non essere coinvolta nella degradazione dell'LDL-R (McNutt M.C et al., 2007). PCSK9 interagisce con l'LDL-R mediante la formazione di specifiche interazioni molecolari con il dominio EGF-A del recettore (Kwon J.H et al., 2007)(Fig3); questo legame e la successiva internalizzazione del complesso nel comparto endosomiale sono necessari affinché la proteina esogena possa ridurre i livelli di LDL-R.

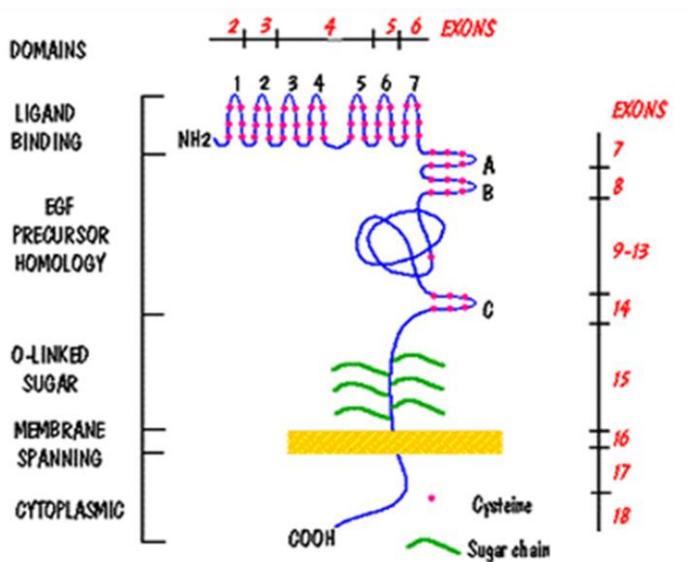


Fig.3: Struttura della proteina LDL-R

E' stato osservato che PCSK9 agisce principalmente con un meccanismo extracellulare, tuttavia differenti studi suggeriscono anche un'attività intracellulare della proteina sebbene questo meccanismo non sia ancora ben noto (Park S. et al., 2004).

A supporto del ruolo esogeno di PCSK9, Lagace et al mediante uno studio in vivo condotto su due topi in parabiosi, hanno dimostrato che PCSK9 umana secreta dal fegato di un topo transgenico (LDL<sup>-/-</sup>) è in grado di ridurre l'espressione epatica di LDL-R e quindi determinare l'aumento dei livelli di LDL-C nel topo wild-type (Lagace et

*al.,2006*). L'attività fisiologica di PCSK9 nella regolazione dei livelli di LDL-C attraverso l'attivazione del pathway degradativo del recettore può, tuttavia, essere alterata dalla presenza di mutazioni distribuite nei vari esoni del gene. Ad oggi le mutazioni individuate nel gene PCSK9 sono state suddivise in due categorie a secondo del loro effetto sulla funzione proteica. Distinguiamo mutazioni con perdita di funzione di PCSK9 “*Loss of function*” che determinano riduzione dell'LDL-C plasmatico e si associano ad ipocolesterolemia e mutazioni con guadagno di funzione “*Gain of function*” associate ad un aumento di LDL-C plasmatici e conseguente ipercolesterolemia (*Ipercolesterolemia familiare tipo 3*) E' stato riportato che mutazioni in PCSK9 con guadagno di funzione determinano una riduzione del 23% dei recettori espressi sulla superficie cellulare e un decremento del 38% di internalizzazione delle LDL. Invece, mutazioni in PCSK9 con perdita di funzione sono associate all'incremento del 16% dei livelli di LDL-R espressi sulla superficie cellulare e all'aumento del 35% di internalizzazione delle LDL (*Cameron J. et al., 2006*).

## **5.2 Modalità di interazione di PCSK9 con il recettore LDL-R**

L'importante ruolo fisiologico svolto dalla proteina PCSK9 nel regolare i livelli di LDL-C, attraverso la degradazione dell'LDL-R, è possibile grazie a specifiche interazioni molecolari calcio-dipendenti che si instaurano fra il dominio EGF-A del recettore e specifici residui aminoacidici della regione N-terminale del dominio catalitico di PCSK9 (*Kwon H.J. et al., 2007*).L'integrità del dominio EGF è essenziale per il normale turnover dell'LDL-R (*Davis C.G et al. 1987*), così come l'integrità del repeat EGF-A è fondamentale per l'attività della proteasi PCSK9 nella regolazione dell'espressione della proteina recettoriale sulla superficie cellulare (*Zhang D.W et al., 2007*).

Fino ad oggi sono state identificate più di 1000 mutazioni associate alla ipercolesterolemia familiare (FH) e alcune di queste ricadono proprio nella regione EGF dell'LDLR.

Al fine di comprendere al meglio il meccanismo d'azione di PCSK9, è stato ipotizzato un ulteriore modello cellulare in cui il dominio EGF-A, contenente una sequenza segnale indispensabile per l'interazione con una proteina endosomiale, consente al recettore delle LDL di ritornare sulla superficie cellulare. Il legame di PCSK9 potrebbe interferire con la sequenza segnale impedendo il recycling del recettore delle LDL. In alternativa, PCSK9 potrebbe contenere un diverso segnale di smistamento che direziona il complesso recettore LDL-PCSK9 verso i lisosomi (*Qian W.Y et al.,2007*) (Fig4).

### **5.3 Possibile ruolo del peptide sintetico EGF-A come molecola inibitoria dell'attività catalitica della proteasi PCSK9 sull' LDL-R**

Considerata l'importanza del dominio EGF-A nel favorire l'interazione sito-specifica di PCSK9 e la conseguente degradazione della proteina recettoriale, per la prima volta uno studio in vitro condotto da Shan L. e collaboratori ha dimostrato in che modo l'impiego di una forma sintetica del peptide EGF-A possa inibire la degradazione dell'LDL-R da parte di PCSK9 e ripristinare, quindi, l'uptake delle LDL, competendo con il dominio EGF-A dell' LDL-R per il legame di PCSK9 (*Shan L. et al.,2008*). Gli autori, impiegando come modello sperimentale le cellule epatiche HepG2, hanno prima trattato le cellule con PCSK9 ricombinante e successivamente con concentrazioni crescenti di peptide sintetico EGF-A.

I dati sperimentali ottenuti, dimostrano che l'incubazione con il PCSK9 ricombinante, effettivamente, incrementa la degradazione della proteina matura dell' LDL-R in cellule HepG2. Tuttavia, l'aggiunta del peptide EGF-A nel mezzo di coltura inibisce questo effetto e determina, invece, un incremento della componente proteica dell' LDL-R nelle cellule HepG2 incubate con PCSK9 per 6 o 18 h. Questo effetto appare minimo ad una concentrazione di 1.5µM di EGF-A ma mostra un chiaro incremento alla concentrazione di 15 µM di peptide sintetico.

In particolare, la detection dei livelli totali della proteina LDL-R, mediante analisi western-blot, su lisati di cellule HepG2 dopo incubazione con PCSK9 per 18 h e lo studio dell'uptake delle LDL-marcate con Dil, mediante un saggio di binding, hanno evidenziato un effetto dose-dipendente del peptide EGF-A sull'inibizione della degradazione dell' LDL-R e un conseguente recupero dell'uptake delle LDL, suggerendo il possibile ruolo di questo peptide come molecola inibitoria dell'attività catalitica della proteasi PCSK9 sull' LDL-R (*Shan L. et al.,2008*).

Nel laboratorio di ricerca di Biologia Molecolare delle dislipidemie (DIMIS) di Palermo sono attualmente in corso degli esperimenti in vitro che hanno riportato significativi risultati riguardo l'impiego della molecola sintetica, il peptide EGF-A, come nuova strategia ipocolesterolemizzante.

E' stata valutata l'efficacia del peptide EGF-A nell'inibizione del pathway di degradazione dell' LDL-R (Fig.5) mediato dal mutante PCSK9-D374Y (variante associata ad un severo fenotipo ipercolesterolemico).

La funzione del peptide è stata testata su due differenti linee cellulari di epatoma umano, HepG2 e HuH7, sulle quali sono stati condotti esperimenti di Western-Blot e saggi di internalizzazione che hanno evidenziato un significativo ruolo di inibizione del peptide

EGF-A sull'attività catalitica del mutante PCSK9-D374Y. Infatti, in entrambe le linee cellulari trattate con EGF-A sintetico è stato osservato sia un significativo ripristino della componente proteica dell' LDL-R che un totale recupero dell'efficienza di internalizzazione delle LDL mediata dal recettore

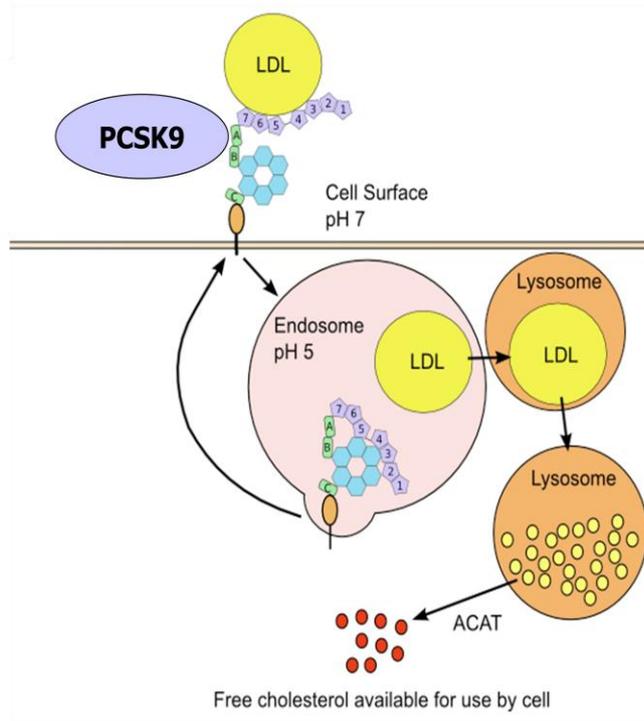


Fig4 Meccanismo d'azione di PCSK9 su LDLR

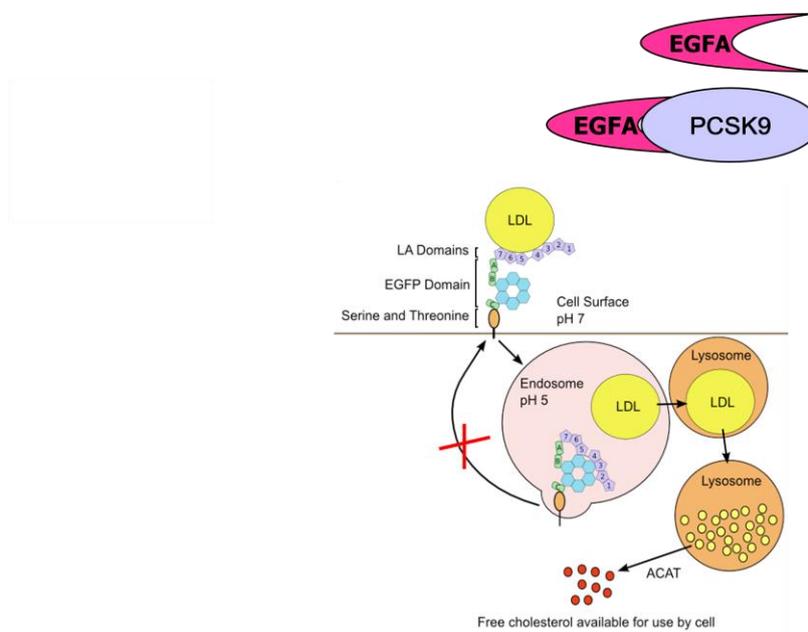


Fig5 Meccanismo d'azione del peptide EGF-A

*Obiettivi*

## **Scopo dello studio**

E' ormai noto che i peptidi possiedono funzioni importanti, soprattutto di regolazione di vari pathways metabolici; quindi l'interesse scientifico per queste molecole sta crescendo nel tentativo di trovare nuovi biomarkers associati a patologie o anche nuovi farmaci con effetti ridotti di tossicità. Questi presupposti pongono le basi per la scoperta di nuovi farmaci, che possano permettere un controllo dei livelli di colesterolo e prevenire l'aterosclerosi. Lo scopo dello studio descritto in questa tesi è stato quello di preparare una banca di peptidi plasmatici concentrati, in modo da avere disponibile un insieme rappresentativo dei peptidi prodotti nell'intero organismo e facilitarne il loro screening biologico. Considerando la complessità della matrice biologica, è stato necessario valutare quali modifiche apportare al materiale di partenza per ridurre il contenuto delle proteine housekeeping del plasma ad elevata abbondanza, come l'albumina (il 99% della quantità totale). Inoltre per operare un isolamento quantitativo di tutti i peptidi plasmatici, sono state affrontate le problematiche connesse all'estrema variabilità delle loro proprietà chimico-fisiche, mettendo a punto l'utilizzo di più sistemi cromatografici multidimensionali ad alta risoluzione, che consentano la loro separazione in sottogruppi dalle caratteristiche simili, in tempi ragionevoli e con elevata selettività e sensibilità. Il fine ultimo dello studio è stato la realizzazione di un High-throughput-screening (uno screening ad alta capacità su piastre da 96 pozzetti) dei peptidi isolati per valutare il loro effetto sul sistema LDL-LDL recettore in cellule di epatoma in coltura.

.

.

## *Materiali e Metodi*

## **1 Campione**

### **1.1 Plasma**

Al fine di creare una banca di peptidi plasmatici umani, per la preparazione in larga scala, il campione di scelta iniziale è stato il plasma.

Poiché il plasma risulta essere una miscela complessa di proteine e in particolare data l'elevata abbondanza dell'albumina, il primo obiettivo è stato quello di ottenere un arricchimento della frazione peptidica presente a basse concentrazioni.

A tale scopo è stato utilizzato come metodo di pre-frazionamento la concentrazione con Centriprep 30 (Centriprep YM-30 Amicon millipore Product) raccogliendo la componente proteica sotto i 30.000 Da. Una sacca di plasma anticoagulato circa 100 ml è stata ultrafiltrata con il recupero del volume della camera superiore (top <30kDa).

A causa della complessità del materiale biologico di partenza, si sono avute perdite per adsorbimento di membrana, inoltre la ritenzione può essere maggiore per una molecola globulare rispetto a una molecola lineare con lo stesso peso molecolare nominale. L'albumina ha continuato a contaminare il filtrato come viene dimostrato dall'analisi del campione condotta tramite SDS-PAGE al 12% (Fig.7).

Una prima purificazione è stata effettuata con il processo di dialisi su membrana a cut-off 1000Da (Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO 1,000), successivamente tramite il processo di gel-filtrazione su Superdex 75 prep grade (paragrafo 2.1.1) si è ulteriormente provato ad escludere dal campione le proteine ad alto peso molecolare residue.

Dalle prove sperimentali eseguite è emersa l'impossibilità di allontanare efficacemente l'albumina dal plasma con le tecniche impiegate; pertanto è nata la necessità di cambiare il materiale biologico di partenza, è stato scelto l'emofiltrato con una concentrazione di albumina ridotta a circa 25mg/l (**Richter R et al.1999**) e un maggiore contenuto di peptidi

### **1.2 Emofiltrato**

#### **1.2.1 Preparazione del campione**

Sono state utilizzate sacche di 5L di emofiltrato (HF), ottenute in larga quantità dal trattamento di pazienti affetti da malattie renali croniche, di cui si è avuto il consenso informato.

Il campione di 5L di emofiltrato, subito conservato a 4°C, è stato suddiviso in aliquote da 1L e sottoposto a una prima purificazione tramite dialisi seriale di 48 h, con una membrana a cut-off 1000 (Spectra/Por) in 10 L di acqua distillata (cambio di buffer

dopo 6 h), successivamente è stato acidificato a pH 3 con HCl per evitare contaminazioni batteriche.

## **2 Separazione mediante Cromatografia bidimensionale**

Per le varie tecniche cromatografiche si è fatto uso della strumentazione FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography System LKB, Amersham Pharmacia).

L'estrazione in fase solida su Sep-pack plus è stata invece condotta su un sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Beckman).

I buffer usati sono stati filtrati mediante un filtro di 0,22-0,45 micron (Millex –HA Millipore Malsheim France) e degassati, mentre il campione, prima del caricamento in gel filtrazione, è stato filtrato con filtro di 0,22 micron oppure centrifugato al fine di eliminare eventuali particellati.

### **2.1 Tecniche della prima dimensione cromatografica**

#### **2.1.1 Gel-filtrazione su colonna Hiload 16/60 Superdex 75 prep grade**

Al fine di allontanare l'albumina dal nostro campione di plasma, è stata utilizzata come prima separazione cromatografica il processo di gel filtrazione.

Tale tecnica, sfruttando la diversa forma e il diverso peso molecolare delle molecole, utilizza le proprietà di setaccio molecolare che sono proprie di numerosi materiali porosi. Queste matrici funzionano sotto forma di gel idratato; la scelta di tali resine dipende dalle molecole che si intendono separare, poiché il loro peso molecolare deve ricadere nell'intervallo di separazione relativo allo specifico gel.

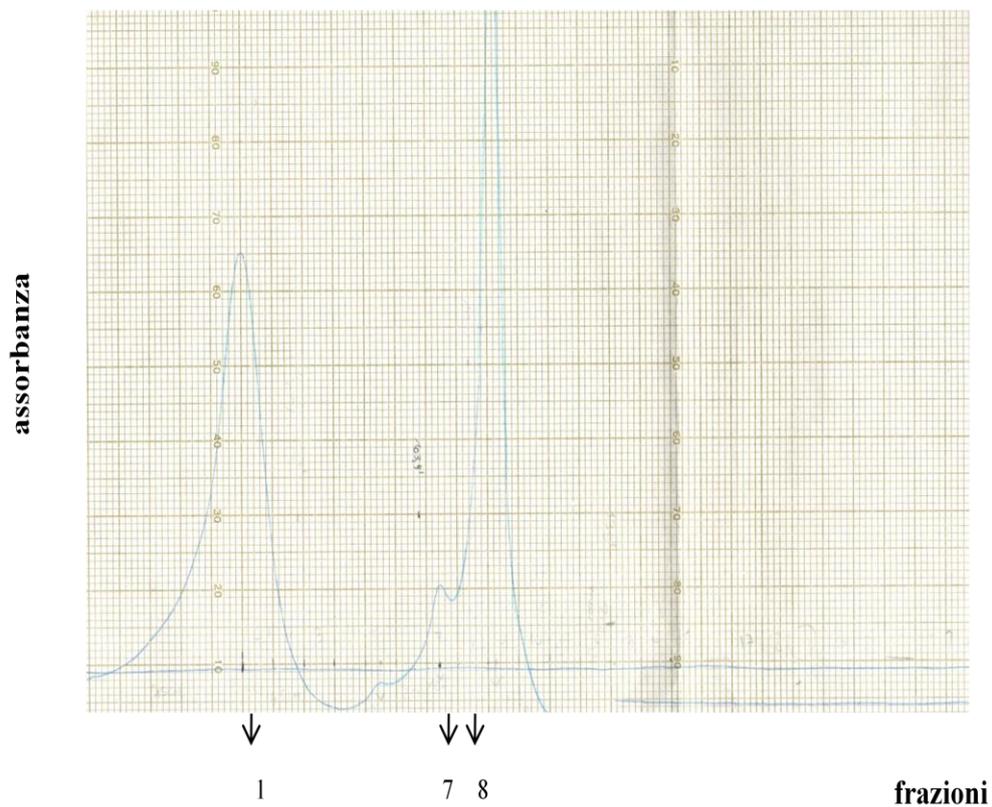
Infatti è stata scelta la colonna Hiload 16/60 Superdex 75 prep grade (Amersham Pharmacia letto della colonna 120ml), poiché consente la separazione ottimale delle proteine nell'intervallo di 3.000-70.000 Da

La colonna è stata equilibrata con l'etanolamina 20mM pH9,5 (in modo che le frazioni in uscita siano pronte per un eventuale seconda dimensione cromatografica in colonna Mono Q).

È stato caricato un campione di plasma di 6mg/3,5ml con flusso 1ml/min e AU0,02. La raccolta è stata programmata ogni 5min, dal min 75 al min 300 per un totale di 45 frazioni da 5ml (Fig.6). La durata complessiva della corsa cromatografica è stata di 320min.

La calibrazione della colonna è stata fatta con gli standards costituiti da albumina 67.000 Da,  $\beta$  lactoglobulina 18400Da e insulina 5734 Da, che ci hanno permesso di stabilire i tempi di raccolta della componente peptidica.

L'analisi del profilo elettroforetico delle frazioni, mediante gel SDS-PAGE al 12% e colorazione Silver Staining,(Fig.7), ci ha permesso di valutare la qualità della separazione e la contaminazione ancora presente di proteine ad alto peso molecolare.



**Fig.6 Cromatogramma della gel filtrazione su Superdex75 prep grade di un campione di plasma, sono indicate le frazioni caricate in SDSPAGE12%**

### **Marcatori**



200 kDa miosina  
116 kDa galattosidasi  
97kDa fosforilasi b  
66,2kDa albumina di siero bovino(BSA)  
45kDa ovo-albumina  
31 kDa anidrasi carbonica  
21,5 kDa inibitore della tripsina di soia  
14,4 kDa Lisozima

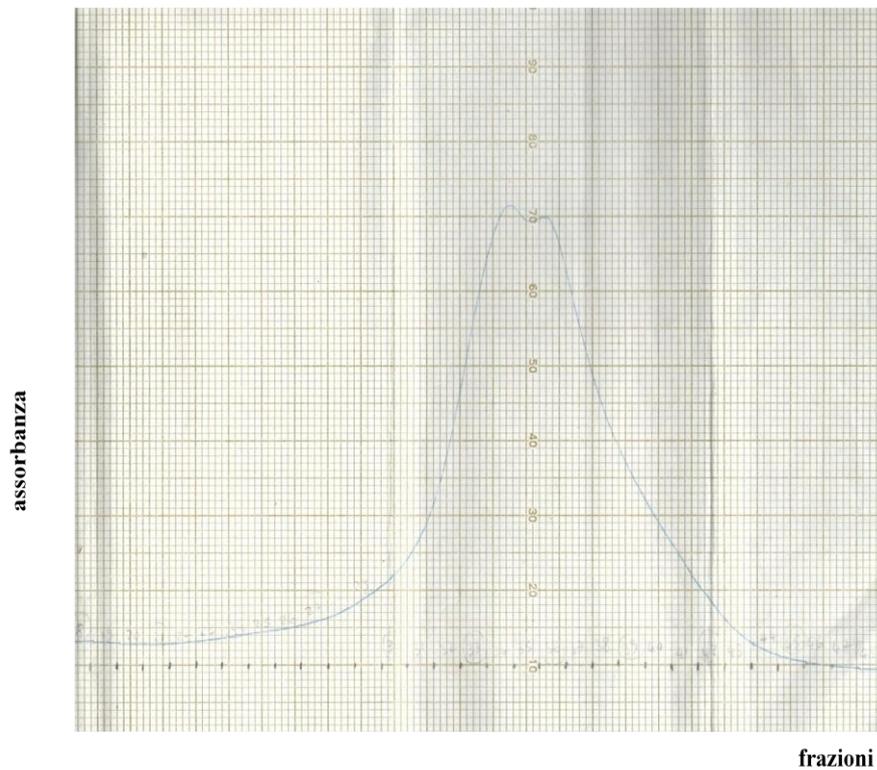
**fraz1 fraz7 fraz8 fraz19**

**Fig 7 profilo elettroforetico della gel -filtrazione in Superdex75 prep grade**

### **2.1.2 Gel filtrazione in serie con colonne Sephacryl S-200 e Superdex 75 prep grade**

Per ottenere una separazione migliore, sempre in base alle dimensioni molecolari, l'emofiltrato è stato sottoposto ad una gel filtrazione basata sull'associazione di due colonne collegate in serie (per aumentare l'altezza efficace del letto), Sephacryl S-200 HR (GE healthcare life science) e Hiloal 16/60 Superdex 75 prep grade. La colonna introdotta, Sephacryl S-200, possiede come limiti di esclusione un range di 5-250 kDa. Per la calibrazione sono stati usati gli standard Mioglobina 14.000Da e albumina 67.000Da .

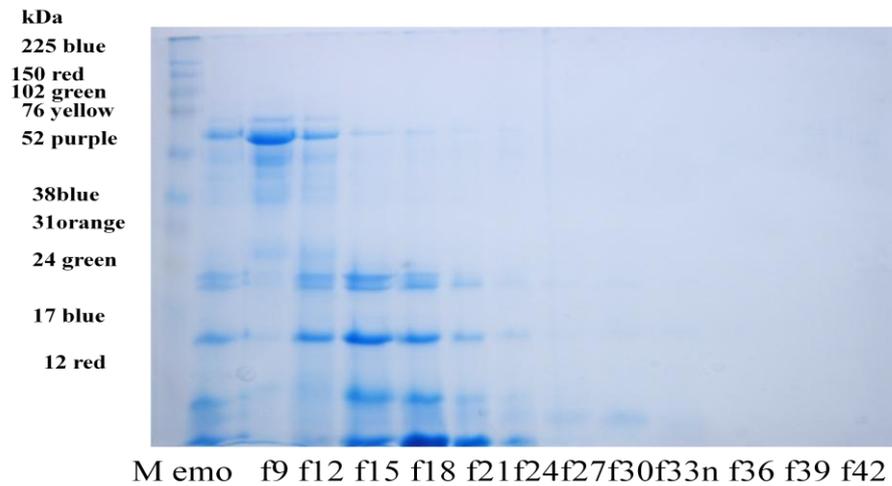
E' stata fatta una prima corsa cromatografica (Fig.8) con un campione di 5,5mg/3,5ml di emofiltrato, concentrato mediante liofilizzazione (paragrafo3.1.3), utilizzando come tampone di equilibrio l'etanolamina 20mM ph9,5. La raccolta è stata programmata ogni 4min, dal min 100 al min 300 per un totale di 50 frazioni da 4ml, con flusso di 1ml/min e AU 0,2



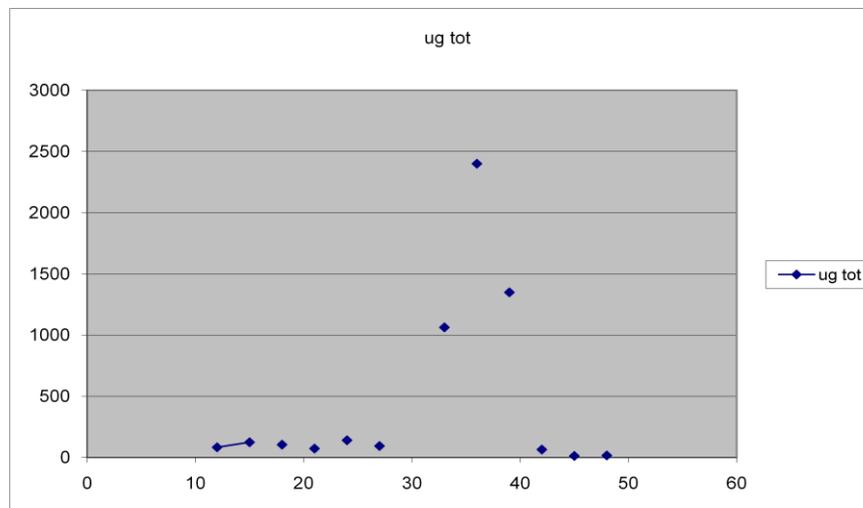
**Fig 8 Cromatogramma della gel filtrazione con le colonne in serie Sephacryl S-200 Superdex75 prep grade**

Le frazioni ottenute sono state liofilizzate e concentrate fino ad un volume di 100 $\mu$ l e caricate su un gel SDS-page al 12%; per valutare l'efficienza della separazione. L'analisi delle proteine visualizzate mediante colorazione Comassie Brilliant Blue G25 (Fig.9), ha evidenziato ancora la presenza di proteine ad alto peso molecolare mentre vi sono solo proteine a basso peso molecolare a partire dalla frazione 15.

Al fine di valutare l'efficienza del recupero proteico di tale tecnica, le proteine delle frazioni sono state dosate tramite il test del BCA (Fig10).



**Fig9** Profilo elettroforetico SDS-PAGE al 12% della gel filtrazione Sephacryl 200Sephadex75 prep grade , si evidenziano frazioni aventi bande rilevanti <30.000Da.



**Fig 10** Rappresentazione grafica del dosaggio proteico delle frazioni della gel filtrazione Sephacryl 200Sephadex75 prep grade, per la valutazione della qualità del recupero

Le frazioni raccolte sono state ulteriormente separate nella colonna Mono Q (paragrafo 2.2.1.)

### 2.1.3 Cromatografia a scambio cationico su colonne Hitrap SP FF

La tecnica di separazione dei peptidi su scambio ionico si basa sulle differenze di carica netta che esistono tra i singoli peptidi; in generale il tempo di ritenzione è direttamente proporzionale alla carica, ed i fenomeni di ritenzione e di eluzione coinvolgono la sostituzione di certe specie ioniche sulla fase stazionaria da parte di altre.

Nella cromatografia a scambio ionico della miscela di peptidi dell'emofiltrato, è stato opportuno prediligere l'utilizzo di uno scambiatore cationico forte come la colonna Hitrap SP FF (SCX Strong Cation Exchange Amersham Biosciences GE Healthcare). Poiché il campione è più stabile a valori di pH acidi, rispetto alla crescita batterica e alla proteolisi, si è operata un'acidificazione a pH 3.

I peptidi esposti a un pH inferiore al loro pI caricandosi positivamente si legano allo scambiatore cationico (SCX); come start buffer ed eluent buffer sono stati usati rispettivamente Hcl 0,001M (buffer A) e acetato d'ammonio 0,5M/Hcl 0,001M (buffer B). L'acetato d'ammonio è un tampone volatile e facilmente allontanabile. E' stato utilizzato un gradiente lineare che varia da 0 al 100% di buffer B con un volume pari a 6 volte il letto della colonna, incrementando gradualmente le condizioni favorevoli alla dissociazione delle proteine di interesse, di seguito è stato stabilito uno step al 100%B della durata pari a due letti della colonna. Quando la capacità di scambio della resina si è esaurita, si è passati ad un lavaggio con lo stesso tampone per la rimozione di eventuali sedimenti che avessero intasato la colonna e quindi alla rigenerazione della resina.

Sono state fatte delle prove preliminari con più Hitrap SP FF per verificare se i siti di legame della resina potessero andare a saturazione; i tempi di programmazione della corsa sono stati allungati in modo proporzionale al numero di colonne impiegato. Le corse cromatografiche sono risultate riproducibili e hanno portato all'allestimento del metodo finale, in cui adoperando un sistema composto da 5 Hitrap SPFF(SCX5), le proteine rimaste attaccate alla colonna sono state eluite in un gradiente lineare di acetato d'ammonio 0,5M/Hcl 0,001M da 0 al 100% in 75 minuti, il distacco completo si è ottenuto con una permanenza del 100% dell'eluent buffer di 25minuti. Sulla base degli esperimenti di ottimizzazione, la raccolta delle frazioni è stata programmata dal minuto 3 al minuto 104; ogni frazione esce con un intervallo di 2.5 minuti e un volume di 5 ml ad un flusso di 2ml/min. Sono state eseguite cinque corse cromatografiche, ciascuna con 1L di emofiltrato, dializzato e acidificato, per cui da una sacca di 5L di campione sono state isolate in totale 40 frazioni dal volume complessivo di 25ml. Tali frazioni sono state concentrate e sottoposte alla gel-filtrazione su Superdex30 prep grade (paragrafo2.2.2).Il campione non legatosi di contro è stato testato su Sep Pack Plus C18 Cartridges (paragrafo2.1.4)

#### **2.1.4 Estrazione in fase solida su Sep Pack Plus C18 Cartridges**

E' stata condotta sull'emofiltrato una cromatografia ion pair su Sep-Pak Plus C18(Waters letto della cartridge 2ml); il meccanismo di separazione è basato sull'instaurarsi di interazioni idrofobiche tra i peptidi e la fase stazionaria apolare; l'eluizione dei peptidi, da quelli di minore idrofobicità a quelli più idrofobici, viene garantita dal flusso della fase mobile, costituita da due eluenti miscelati in proporzioni che variano nel tempo secondo un particolare gradiente: il primo eluente, molto polare, è costituito da H<sub>2</sub>O/TFA0,1%,(buffer A) il secondo, con un maggiore carattere idrofobico, al fine di permettere l'eluizione dei peptidi via via più apolari, è rappresentato dal solvente

organico acetonitrile/TFA 0,1% (Buffer B). L'acido trifluoroacetico (TFA) non assorbe nel campo dell'UV, è un eccellente solvente per i polipeptidi ed è un potente generatore di coppie ioniche. Il campione è stato acidificato con l'acido forte TFA 0,1% per cui si mantiene in una forma ionica ben definita. La separazione è realizzata a  $\text{pH} < 3$ ; l'acido aggiunto alla fase mobile forma con i peptidi coppie ioniche neutre, con conseguente incremento della risoluzione cromatografica: a pH acido, infatti, i gruppi amminici N-terminali e quelli presenti nelle catene laterali di residui basici (istidina, lisina e arginina) sono protonati, e la base coniugata dell'acido è in grado di formare coppie ioniche strette con tali gruppi carichi positivamente.

Per ottimizzare le condizioni sperimentali e testare il legame della miscela di peptidi è stato fatto uno studio preliminare. L'estrazione dei peptidi è stata effettuata utilizzando aliquote di 100ml di emofiltrato con TFA 0,1%, sono stati esaminati diversi gradienti di Acetonitrile(ACN) per ottenere il desorbimento degli analiti. L'eluizione è avvenuta con un gradiente discontinuo del buffer B nell'ordine di 10%-20%-25%-30%35%40%45%50%70%100% della durata pari a un letto della cartridge. Le frazioni di 2ml per step, sono state concentrate sotto flusso costante di azoto (Essiccatore N-EVAP 112 Nitrogen Evaporator). Prima di ogni prova, ogni cartuccia è stata attivata e condizionata rispettivamente con Acetonitrile/TFA0,1% e H<sub>2</sub>O/TFA0,1%.

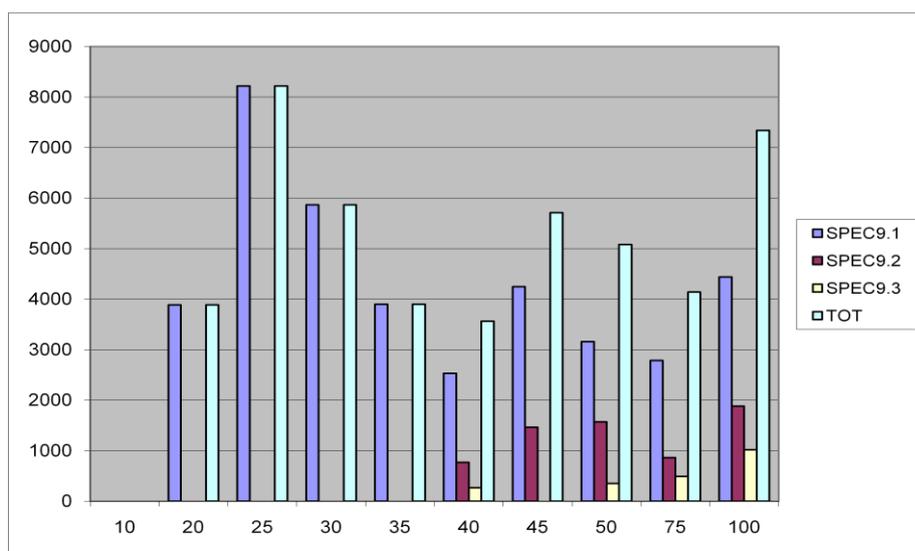
Per avere un riscontro pratico sulla qualità degli analiti eluiti alle varie percentuali di acetonitrile, 50 $\mu\text{g}$  delle frazioni sono stati caricati in SDS PAGE al 12%(Fig12). Dall'analisi del gel è emerso come dal 10% al 25% di ACN siano state eluite le frazioni con peso molecolare  $< 12.000\text{Da}$ , non visibili nel profilo elettroforetico sebbene confermate dal dosaggio proteico. Dal 30 al 35% di ACN sono state eluite proteine a peso molecolare  $< 24.000\text{Da}$ , mentre dal 40% al 45% anche proteine a più alto peso molecolare.

I test effettuati hanno dato conferma dell'efficacia del metodo studiato per la separazione della miscela di peptidi, per cui è stato sviluppato un sistema composto da 9 Sep pak Plus C18 collegate in serie (SPE9) per le separazione su scala preparativa di 1L di emofiltrato dializzato a cut-off 1000Da.

L'analisi tramite dosaggio proteico delle frazioni, raccolte dopo 3 estrazioni SPE, (SPEC9.1, SPEC9.2, SPEC9.3) ripetute sullo stesso campione di emofiltrato (Fig11), ha permesso di stabilire che non si ottiene un arricchimento ulteriore della frazione peptidica con il ricircolo del campione.

La determinazione dei peptidi nell'emofiltrato ha richiesto, data l'elevata complessità della matrice, la combinazione di 2 diverse tecniche di prima dimensione cromatografica

per recuperare la vasta gamma di peptidi con diverse proprietà fisico-chimiche. A tale scopo nella metodica finale messa a punto, il campione non legatosi alla SCX5, dopo acidificazione con TFA 0,1%, viene caricato nel sistema SPE9 tramite una pompa peristaltica (Peristaltic pump Watson Marlow 101U/R). Il protocollo adottato per la SPE9 consta di una fase isocratica iniziale di 18 minuti in H<sub>2</sub>O/TFA 0.1% seguita da un gradiente lineare di 144 minuti, da 0% a 50%, di ACN /TFA 0.1% . Al termine del gradiente, viene eseguito un lavaggio con ACN/TFA 0.1% per 9 minuti, poi la colonna è riportata nelle condizioni iniziali ed, infine, nuovamente equilibrata per 18 minuti in H<sub>2</sub>O/TFA 0.1% . La durata di ciascuna corsa è stata di 189 minuti. Le frazioni raccolte sono state 32 con un volume di 4,5ml; la raccolta è stata effettuata dal minuto 19 al minuto 162. Da una sacca di 5L di emofiltrato sono state isolate 32 frazioni ciascuna dal volume complessivo di 22,5ml , dopo aver messo insieme le frazioni corrispondenti delle cinque corse cromatografiche eseguite con 1L di emofiltrato.



**Fig11 Andamento del dosaggio proteico delle frazioni raccolte dopo 3 estrazioni SPE, ripetute sullo stesso campione di emofiltrato**

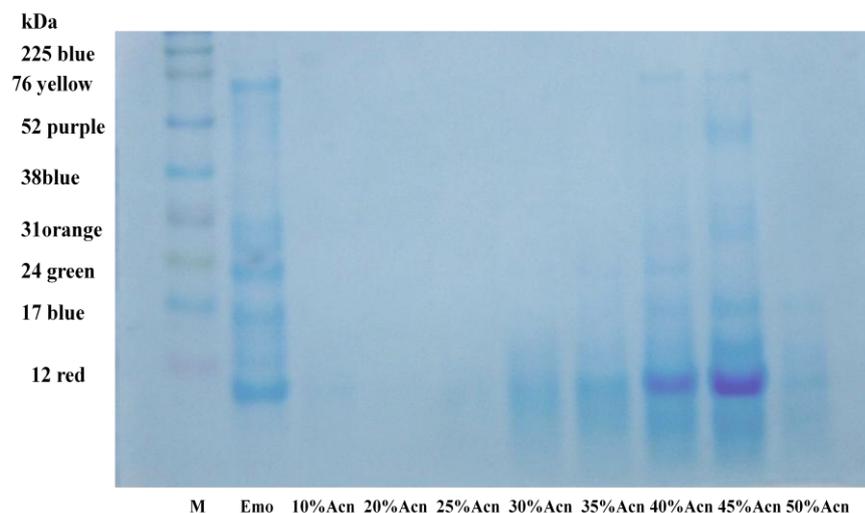


Fig 12 Profilo elettroforetico SDS PAGE al 12% delle SPE a varie percentuali di acetonitrile su Sep-Pak Plus C18

## 2.2 Tecniche della seconda dimensione cromatografica

### 2.2.1 Cromatografia a scambio anionico forte su MonoQ HR5/5

Una colonna a scambio anionico forte preimpaccata Mono Q HR5/5 (column Amersham Biosciences GE Healthcare letto della colonna 5ml) è stata utilizzata basandosi su dati presenti in letteratura (**Kosciarz E. et al.1998**).

L'etanolamina 20mM pH9,5 è stata scelta come buffer A iniziale, un solvente volatile facilmente allontanabile per evaporazione; in queste condizioni le proteine si dovrebbero caricare negativamente in modo da potersi legare alla resina.

L'eluizione è avvenuta usando un gradiente di NaCl 1M in etanolamina 20mM pH 9,5 e si è studiata l'influenza della pendenza del gradiente sulla separazione dei peptidi.

Le frazioni dell'emofiltrato provenienti dalla prima separazione in Sephacryl 200-Superdex 75prep grade sono state analizzate nella colonna Mono Q ed eluite con il gradiente discontinuo seguente 2,5% 5% 10% 20% 30% 40% 60% 80% 100%; ciascuno step ha la durata di 15 minuti; sono state raccolte 25 frazioni da 5ml a partire dal minuto 40 al minuto 175, con flusso 1ml/min AU0,02.

Nei cromatogrammi si è reso evidente che una notevole quantità non viene trattenuta dalla resina come mostrato in Fig13, inoltre le condizioni di lavoro per l'utilizzo della MonoQ comportano l'uso di un ph basico che non preserva il campione dalla crescita batterica e dalla proteolisi; è stato evitato l'uso di conservanti come il thimerosal, in quanto è stato provato che interferisce con il meccanismo di separazione.

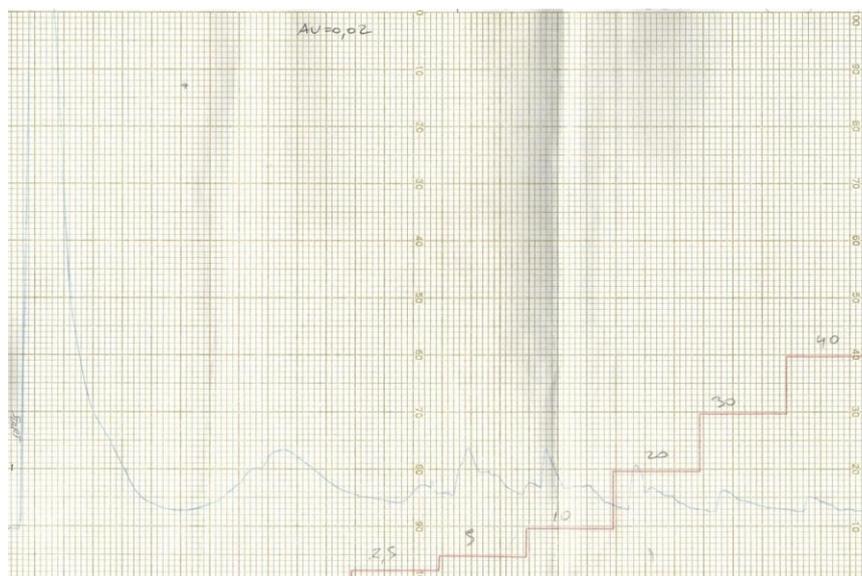


Fig13 Cromatogramma della separazione 2D su Mono Q della Fraz29 della 1D su Sephacryl S200-Sephadex 75prep grade

### 2.2.2 Gel-filtrazione su colonna Hiload 16/60 Superdex30 prep grade

La resina Superdex30 prep grade scelta (GE Healthcare Bio-Sciences) offre una riuscita ottimale della gel filtrazione con una risoluzione maggiore per i pesi molecolari inferiori a 10.000Da.

La colonna è stata testata in Tris/Hcl 20mM ph7,4 con delle frazioni di prova separate in SCX. Questa tecnica dunque è stata adottata come seconda separazione cromatografica su scala preparativa delle 72 frazioni totali della 1D, 40 frazioni dalla SCX5 e 32 frazioni dalla SPE9. Durante la corsa cromatografica con flusso di 1ml/min la raccolta è stata programmata ogni 2min, dal min 40 al min 200 per un totale di 80 frazioni da 2ml, conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$

Per preparare il campione alla separazione in gel filtrazione, le 40 frazioni della SCX5 di 25ml sono state ridotte a 5ml mediante l'ultrafiltrazione su cella ad agitazione magnetica con membrana a cut-off 1000 Da (Stirred Cells paragrafo3.1.1) in modo che il volume non sia superiore al 5% del letto della colonna.

La calibrazione della colonna è stata effettuata con 2mg di emofiltrato ed è stato stabilito così il programma di raccolta della componente peptidica. In questo caso, la raccolta è

stata programmata dall'inizio della corsa in Tris/HCl 20mM pH7,4 fino a 300min, per un volume di 4ml a frazione con un flusso 1ml/min

### **3. Altre tecniche**

#### **3.1 Tecniche di concentrazione del campione**

##### **3.1.1 Ultrafiltrazione su membrana**

Il sistema di ultrafiltrazione (Series 8000 Stirred Cells), composto da una cella di 50 ml corredata di una membrana con cut-off 1.000 Da ( Ultrafiltration Membranes Ultracel Pl diametro 44,5 della Amicon), è stato adoperato sotto la pressione di azoto tecnico per la concentrazione delle frazioni della 1D SCX5 da 25ml a 5ml

##### **3.1.2 Concentrazione con Speed vacuum**

Il concentratore centrifugo Speed vacuum (Jouan Model RC10.10 Centrifugal Evaporator) mediante il vuoto e la centrifugazione ha permesso l' evaporazione rapida del solvente contenuto nei campioni biologici.

La centrifugazione elimina i fenomeni di ebollizione e schiuma, permettendo il recupero totale degli analiti.

La presenza di una trappola fredda permette anche l'allontanamento di solventi organici.

##### **3.1.3 Liofilizzazione**

Il campione è stato congelato ed il solvente allontanato mediante sublimazione sotto vuoto con il liofilizzatore Labconco Lyph-Lock 4.5 Freeze Dry Syst

#### **3.2 Quantificazione del campione**

Per quantificare il campione è stato utilizzato il BCA Protein Assay kit (Pierce), che sfrutta il metodo colorimetrico dell'Acido Bicinconinico, attraverso l'ausilio di un autoanalizzatore ILab 300 Plus clinical chemistry system.

Le misure sono state effettuate in duplicato e calibrate in base ad una scala standard di albumina sierica bovina come da protocollo consigliato dalla ditta fornitrice.

### **3.3 SDS PAGE 12%**

La qualità del recupero della separazione cromatografica è stata valutata dall'analisi, mediante gel SDS-PAGE al 12% di aliquote delle frazioni raccolte (20µl di campione); il detergente anionico SDS fornisce alla proteina una quantità di carica negativa costante per unità di massa permettendo così la separazione proteica esclusivamente in base alla massa molecolare.

L'elettroforesi è stata realizzata utilizzando dei "minigel homemade", costituiti da minicassette da 8 x 8 cm (Invitrogen) con uno spessore di 1,5mm, in un sistema elettroforetico Invitrogen (X cell sure lock); La corsa elettroforetica ha avuto una durata di 42 min. a 200 W, in un tampone di corsa costituito dal Mes 1X(Invitrogen).

Quando l'esperimento ha richiesto l'impiego di 50ul di campione sono stati utilizzati dei gel più grandi, in una Cella per elettroforesi vert. Hoefer in running buffer Tris-glicina-SDS. Ciascun campione, trattato precedentemente con Sample Buffer non riducente (1:1) e DTT (0,3 µl/10 µl), è stato preventivamente denaturato mediante riscaldamento (100°C per 5 minuti).

Come standard di pesi molecolari è stato utilizzato il kit full range rainbow molecular weight marker (GE healthcare Amersham).

Le proteine dopo separazione sono state visualizzate mediante colorazione con Blue di Comassie R 250 o per una maggiore sensibilità con la colorazione Silver Staining (Silver Staining Kit Protein, GE-Healthcare).

Il marcatore per la colorazione Silver Staining contiene le seguenti proteine di peso molecolare noto: miosina (200 kDa), -galattosidasi (116 kDa), fosforilasi b (97kDa)albumina di siero bovino (BSA) (66,2 kDa), ovo-albumina (45 kDa), anidrasi carbonica (31 kDa), inibitore della tripsina di soia (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa).

## **4. High-throughput screening dell'attività dei peptidi isolati**

### **4.1 isolamento delle lipoproteine LDL e marcatura con il fluorocromo Dil**

Le LDL plasmatiche sono state preparate a partire dal plasma di donatori, mediante ultracentrifugazione sequenziale (L90 K Optima Beckman-Coulter-Ultracentrifuge, Fullerton, CA, U.S.A.) ad una densità di 1.063 g/ml; la densità corretta è stata ottenuta mediante l'aggiunta di bromuro di potassio.

Le LDL sono state prima dializzate per 48h contro il buffer PBS1 X, poi sono stati aggiunti alla soluzione, per un'ottimale conservazione, il cocktail antiproteasico (ROCHE complete, quantità consigliate) e un protettivo antiossidante BHT(**Butylated hydroxytoluene**) alla concentrazione di 50nM.

Prima della coniugazione con il fluoro cromo, le LDL sono state dosate con il metodo BCA (BCA protein assay kit, PIERCE) e per una concentrazione ottimale alla quale marcare (almeno 1 mg/ml) sono state concentrate con il centriprep 30 (Millipore).

Le LDL sono state dunque coniugate con il fluorocromo lipofilo Dil (di-octadecyl-indo-carbocyanine iodide) avente  $\lambda$  di eccitazione 520nm e con  $\lambda$  di emissione di 570nm. Per ogni milligrammo di lipoproteina sono stati aggiunti 5  $\mu$ L di una soluzione stock di Dil 15 mg / ml preparata in DMSO.

E' stata condotta una incubazione a 37° C per 16 ore e per eliminare la quota di Dil non legato è stato realizzato un "buffer exchange" con una colonna di Sephadex G25 (Boehringer Mannheim), eluendo in PBS 1x.

La concentrazione proteica delle LDL è stata valutata con un saggio BCA (PIERCE); sono state preparate aliquote di LDL-Dil per il congelamento a -80° contenenti il 10% di saccarosio come crio-protettivo (*Rumsey et al. JLR1992*).

Il saccarosio è stato addizionato alla soluzione di LDL da una soluzione stock (50% sucrose, 150 mM NaCl, 0.24 mM EDTA, pH 7.4).

Al momento dello scongelamento, per l'esperimento di binding, le Dil-LDL sono state dializzate a 4° C contro PBS1x (2000x il volume campione) per 24 ore, cambiando il buffer almeno 3 volte, al fine di rimuovere il saccarosio.

Le Dil -LDL sono state di nuovo quantizzate ed è stata valutata la relativa fluorescenza su piastra nera, mediante lettore di piastra VICTOR™ (PerkinElmer Life Sciences), al fine di stabilire la corretta concentrazione per l'esperimento in vitro di internalizzazione delle stesse nelle cellule Hep-G2 poste nelle piastre da 96-wells.

#### **4.2 Colture Cellulari**

Le HepG2, una linea cellulare di epatoblastoma umano, sono state coltivate in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> a 37° C, in ambiente saturo al 5% di CO<sub>2</sub>, in DMEM Glutamax (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, United States) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FCS), sodio piruvato (GIBCO), 100U/mL di penicillina e 100  $\mu$ g/mL di streptomycin (Gibco BRL), 1% di aminoacidi non essenziali. Le cellule sono state cresciute a subconfluenza e poste in piastre da 96 pozzetti (Corning Life Sciences, MA, USA).

Al fine di effettuare lo screening dell'attività dei peptidi isolati, è stato messo a punto l'esperimento di internalizzazione delle LDL nelle piastre da 96 pozzetti. E' stata costruita una curva di binding utilizzando varie concentrazioni di Dil-LDL da 0 a 100 $\mu$ g, in modo da scegliere una concentrazione fissa di Dil-LDL che ci permettesse di valutare meglio eventuali up o down regolazioni indotte dai peptidi; è stata testata anche

la capacità dell'insulina (Actrapid lilly) a 50 e a 100nM di stimolare l'internalizzazione delle Dil-LDL nel nostro sistema; sono state testate diverse variabili del sistema come il volume di buffer di lisi idoneo per avere una lettura di fluorescenza tale da superare il background elevato indotto dalla presenza dell'SDS nel tampone o anche il volume di campione da utilizzare nel dosaggio proteico.

#### **4.3 Eperimento di binding delle LDL-Dil in cellule Hepg2**

Le cellule HepG2 sono state coltivate in piastre da 96 pozzetti ( $4 \times 10^4$  cellule per pozzetto) in un volume di 100 $\mu$ l di terreno di crescita e cresciute a sub confluenza (all'incirca 3 giorni). E' stata creata una piastra di 96 pozzetti di "loading solution," nella quale in ogni pozzetto sono stati preparati 200  $\mu$ l di terreno di crescita contenenti una singola frazione (20% del volume totale cioè 40 $\mu$ l) delle 80 delle seconda dimensione cromatografica in Superdex30 prep grade (paragrafo 2.2.2). Sono state testate le 80 frazioni di una singola corsa per ciascuna piastra da 96 pozzetti. Sono stati inoltre preparati 5 pozzetti non contenenti le frazioni ma il buffer delle frazioni sempre al 20% cioè il Tris-HCl ph 7.4 (3 per il non condizionato e 2 per l'autofluorescenza delle cellule.)

Tutti i pozzetti sono stati normalizzati nel loro contenuto di terreno di crescita e di buffer Tris-HCl ph 7.4; 100  $\mu$ l di tali soluzioni sono stati pipettati con il multipipettatore( per ridurre al minimo l'errore di pipettata) nella piastra delle cellule allestita.

Il giorno dopo, per ogni pozzetto sono stati aggiunti 30  $\mu$ l di Dil-LDL ai 100 $\mu$ l di terreno già esistenti nel pozzetto, in modo tale da avere una concentrazione di Dil-LDL di 30 $\mu$ g/ml. Nei pozzetti di autofluorescenza vengono aggiunti 30 $\mu$ l del buffer delle Dil-LDL. Le cellule sono state incubate per 3 ore a 37C° con le Dil-LDL, per valutare la loro internalizzazione da parte delle cellule e se i peptidi contenuti nelle frazioni testate possono influenzarla, determinandone sia una up-che una down regolazione.

Dopo l'incubazione, i pozzetti sono stati lavati tre volte con PBS freddo con 2mM CaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, e le cellule lisate in 250  $\mu$ l di una soluzione contenente 0,1 N di NaOH e 1% SDS per 30 minuti a 37°C; 150 $\mu$ l dei lisati cellulari sono stati trasferiti in una piastra nera Optiplat<sup>TM</sup> (Perkin elmer) e in essi è stata letta la fluorescenza incorporata del Dil mediante lettore di piastra VICTOR e tramite saggio BCA ne è stato effettuato un dosaggio proteico. E' stata determinata una scala di calibrazione delle Dil-LDL nel buffer di lisi e i risultati di fluorescenza sono stati calcolati come ng di Dil-LDL incorporato / mg di proteine cellulari. I valori ottenuti sono stati poi elaborati eliminando i dati non congrui e quelli non aderenti alla media delle proteine delle

piastre; i pozzetti delle cellule non condizionate dai peptidi hanno rappresentato sia un controllo della bontà dell'esperimento sia i controlli interpiastra, utili per mettere in rapporto piastre differenti, allestite per lo screening delle frazioni di ciascuna corsa. I dati sono stati elaborati mediante analisi statistica; considerando il pool dei pozzetti, la media è stata posta uguale a zero e la deviazione standard uguale ad 1; i valori dei vari pozzetti sono stati considerati come multipli in positivo ed in negativo della deviazione standard, da + o -1 a + o -3; i pozzetti considerati più interessanti e che potrebbero contenere peptidi di interesse appartengono agli estremi della distribuzione

## **5 Statistica**

I dati di internalizzazione provenienti da ogni singola piastra sono stati normalizzati per permettere un confronto omogeneo dei risultati provenienti da piastre differenti. A tale scopo è stato utilizzato Microsoft Office Excel 12, con la funzione di normalizzazione, che in presenza di una distribuzione gaussiana dei valori ha modificato ogni singolo valore in modo da ottenere una media uguale a 0 ed una deviazione standard uguale a 1. In questo modo l'unità di misura è rappresentata dalla deviazione standard ed è stato così possibile eliminare le variabili inter-assay, quali la confluenza delle cellule, la fluorescenza intrinseca delle LDL ed altri fattori che possano modificare la quantità assoluta di fluorescenza rilevabile. Dato che le tecniche cromatografiche non presentano una risoluzione ottimale, è da attendersi che un effetto biologico di un peptide possa estendersi per più frazioni limitrofe sia in prima che in seconda dimensione, per cui sono state identificate tecniche di visualizzazione tridimensionale per isolare le aree di interesse, cioè aree presentanti valori di internalizzazione molto bassi o molto alti rispetto la media. Anche queste visualizzazioni grafiche sono state ottenute tramite Microsoft Excel 12. La riduzione delle oscillazioni nei risultati legata alla imprecisione del saggio biologico è stata ottenuta con la tecnica dello smoothing bilineare. In questo caso, ogni risultato è inserito nella tabella bidimensionale che rappresenta la 1D (asse delle x) e la 2D (asse delle y). Il valore di ogni cella è stato ricalcolato come la media della cella stessa più le 8 celle limitrofe

## *Risultati*

La generazione di una banca di peptidi plasmatici comporta come punto di partenza la scelta del campione da cui isolare tali molecole. L'isolamento dei peptidi dal plasma è difficile perché si trovano a basse concentrazioni.

Il siero ha un contenuto proteico molto elevato (in genere 60-80 mg/ml), essendo una miscela complessa di proteine plasmatiche tra cui l'albumina. I tentativi di purificazione condotti, utilizzando il plasma, non hanno prodotto risultati soddisfacenti.

Sulla base dei lavori presenti in letteratura e degli esperimenti realizzati, è stato opportuno ricorrere all'uso dell'emofiltrato (HF). L'emofiltrato è ottenuto mediante un'ultrafiltrazione, ad un cut-off di 20000Da, del plasma di pazienti affetti da malattie renali croniche; ne deriva un arricchimento dei peptidi dell'ordine di 50-70mg/L ed una riduzione di 1000 volte del valore di 70g/L del contenuto proteico del plasma. L'albumina continua ad essere presente nel filtrato ma soltanto alla concentrazione di circa 25mg/l (*Richter R et al.1999*). La costituzione di un database di massa e sequenze dell'emofiltrato umano (*Richter R et al.1999*) suggerisce che esso riflette la composizione peptidica del plasma per la coesistenza di frammenti peptidici processati, peptidi biologicamente attivi e precursori di peptidi. Il 5% del contenuto proteico di HF rappresenta peptidi nuovi, di cui alcuni mostrano omologie con peptidi e famiglie di proteine conosciute.

Per realizzare una preparazione in larga scala di peptidi umani circolanti sono state impiegate sacche da 5L di emofiltrato (HF).

### **1. Preparazione del campione di emofiltrato**

Il campione di 5L di emofiltrato, subito conservato a 4°C, è stato suddiviso in aliquote da 1L e poi sottoposto a una dialisi seriale con una membrana a cut-off 1000 per una prima purificazione.

L'emofiltrato dializzato è stato acidificato a pH 3 per preservarlo dalla crescita batterica e dalla proteolisi.

### **2 Separazione mediante Cromatografia bidimensionale :**

È stato sviluppato un metodo in larga scala per separare i peptidi; la procedura è stata standardizzata in 2 step: una separazione in prima dimensione che si divide a sua volta in una cromatografia a scambio cationico su colonne Hitrap SP FF (SCX5 Strong Cation exchange) e in una estrazione Ion Pair in fase inversa (SPE9 Phase Solid Phase Extraction) su Sep Pack Plus C18 Cartridges del non legato; segue una purificazione in una seconda dimensione cromatografica, rappresentata da una gel-filtrazione su colonna Hiload 16/60 Superdex30 prep grade delle 40 frazioni dalla SCX5 e 32 dalla SPE9.

Si ottengono in totale 5760 frazioni di 2ml che rappresentano la banca di peptidi finale. L'estrazione Ion Pair in fase inversa dei peptidi, effettuata in presenza di un modificatore organico, l'acetonitrile, e di un reattivo di accoppiamento ionico (ion-pairing reagent), il TFA, permette di separare peptidi con una vasta gamma di proprietà fisico-chimiche. I peptidi con meno di 30-40 aminoacidi sono separati sulla base dell'idrofobicità, in quanto il TFA 0,1% neutralizza la formazione di cariche elettriche nei peptidi con il contro ione trifluoroacetato.

La tecnica è però limitata per peptidi estremamente idrofili, che si possono legare solo molto debolmente o per niente alle colonne, inoltre anche i peptidi estremamente idrofobici possono essere recuperati solo in bassa resa.

Per questi motivi è stata dunque combinata una separazione cromatografia SCX5 insieme a una SPE9 in modo da ottenere il massimo recupero dei peptidi dell'emofiltrato.

## **2.1 Prima dimensione Cromatografica(1D)**

### **2.1.1 Cromatografia a scambio cationico su colonne Hitrap SP FF (SCX5)**

Nel lavaggio iniziale della colonna con Start Buffer HCL 0,001M pH3, si verifica l'eluizione delle proteine che non hanno interagito con la fase stazionaria a pH acido, il campione non legato viene convogliato nelle Sep-pack Plus C18. Le proteine che sono rimaste attaccate alla colonna eluiscono in gradiente lineare di acetato d'ammonio 0,5M/Hcl 0,001M da 0 al 100% (Fig14), per un tempo pari a 6 volte il letto della colonna, il distacco completo si ha prolungando il 100% dell'eluent buffer per una durata pari a due letti della colonna (la descrizione completa del metodo è stata affrontata nella sezione materiali e metodi).

La quantità totale di proteine caricata in SCX5 per ciascun campione è pari 109mg mentre i recuperi medi sono del 56% .

Le condizioni operative sono state scelte in considerazione della miscela complessa costituita dall'emofiltrato. E' stato infatti fondamentale controllare il pH e la forza ionica del mezzo usato, in quanto il legame alla resina SCX dipende dal pI delle proteine, ma non del tutto, quello che conta è la carica e la densità di carica superficiale, questa dipende dal pKa degli aminoacidi in grado di scambiare rapidamente ioni con il solvente. Il tempo di ritenzione del campione è influenzato sia dalla quantità di campione che viene ionizzata che dalla forza ionica del tampone a molarità crescente, che sposta gli ioni del campione più fortemente attratti dallo scambiatore.

Il sistema sperimentale è stato allestito su una strumentazione FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography System), in cui un rivelatore UV effettua delle letture di assorbanza alla lunghezze d'onda di 280 nm, in corrispondenza della quale le proteine mostrano dei picchi di assorbanza dovuti agli anelli indolici e benzilici del triptofano e della tirosina. Nelle prove sperimentali svolte, per avere un segnale stabile e sensibile, ha avuto notevole importanza la scelta del giusto valore di AU (Absorbance Unit), l'unità di misura dell'assorbanza. I risultati migliori si sono avuti con AU 0,2.

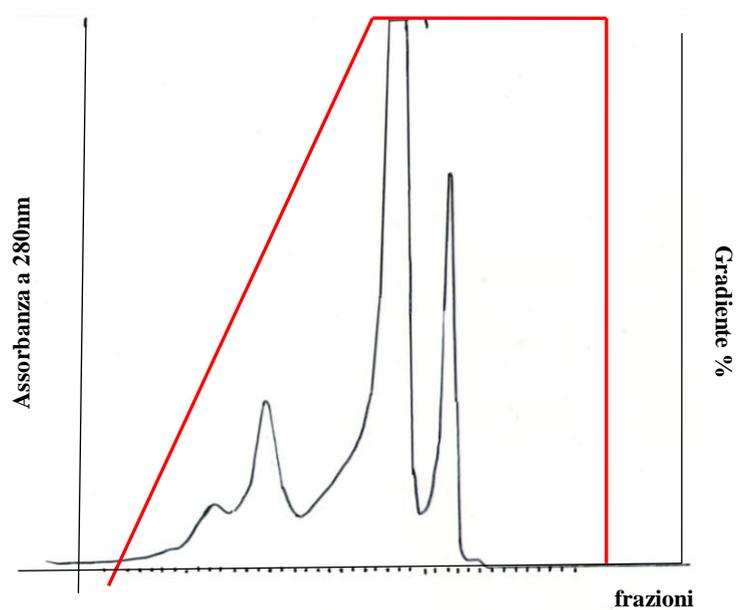


Fig 14 Profilo cromatografico della separazione SCX5

### 2.1.2 Estrazione in fase solida su Sep-Pak Plus C18 Reverse Phase Cartridges

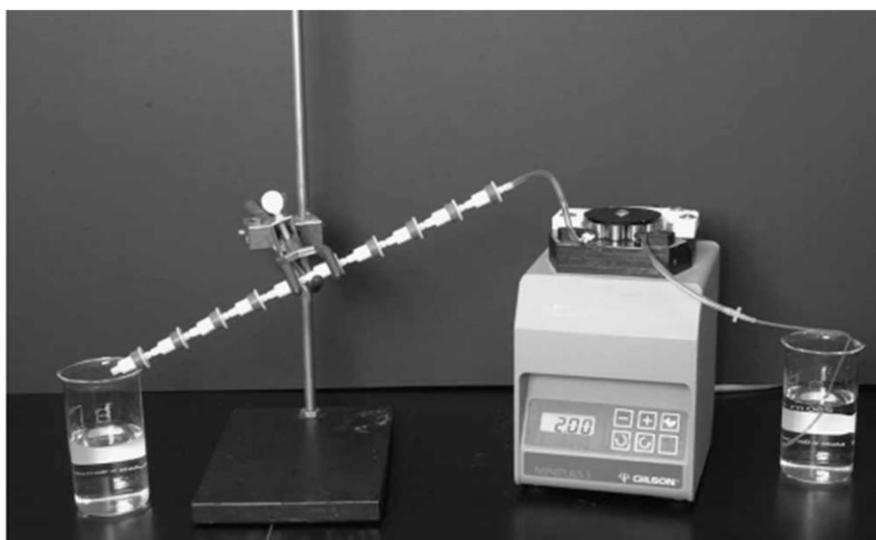
L'emofiltrato dopo il passaggio in SCX5 viene convogliato nelle Sep pack Plus C18 collegate in serie, caricato mediante l'ausilio di una pompa peristaltica.

La fase di eluizione è avvenuta dopo l'inserimento delle cartridges in un sistema HPLC, secondo tale il protocollo: una fase isocratica iniziale in H<sub>2</sub>O/TFA 0.1% seguita da un gradiente lineare da 0% a 50% di ACN /TFA 0.1%, al termine del gradiente, segue un lavaggio con ACN/TFA 0.1% , la colonna è riportata nelle condizioni iniziali ed, infine, è nuovamente equilibrata in H<sub>2</sub>O/TFA 0.1%.(La descrizione completa del metodo è stata affrontata nella sezione materiali e metodi). Il

profilo di assorbanza è registrato a 215 nm.(Fig16) Le frazioni raccolte sono 32 e hanno un volume di 4,5ml, vengono raccolte dal minuto 19 al minuto 162 e sono conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$  prima delle successive analisi.

La quantità totale di proteine caricata in SPE9 per ciascun campione è pari 56mg, mentre i recuperi medi sono del 33%. La resa totale della prima dimensione cromatografica è stata stimata del 71%

Sono state usate più cartucce collegate in serie come mostrato in Figura15 per aumentare la capacità di legame ed evitare un sovraccarico di campione che porterebbe alla perdita di peptidi.



**Figura 15 Concentrazione e parziale purificazione dell'emofiltrato su più Sep-Pak Plus C18 cartridges connesse in serie**

Mediante la tecnica di estrazione descritta si è ottenuta la concentrazione dei peptidi biologicamente attivi e una parziale purificazione. La cromatografia in fase inversa è infatti il metodo di scelta per la purificazione di peptidi e piccole proteine ( $< 10.000$  Da) in quanto è applicabile ad una vasta gamma di peptidi con diverse proprietà fisico-chimiche.

Le Condizioni di eluizione in gradiente sono state preferite all' eluizione isocratica per facilitare la nitidezza del picco, sono stati necessari gradienti lievi per risolvere la miscela complessa.

Uno dei passaggi critici della procedura di estrazione in fase solida è stato il condizionamento della fase stazionaria, costituita da adsorbenti non polari. Per

garantire una ritenzione ottimale dell'analita e ottenere risultati riproducibili, è stato necessario condizionare la resina con il solvente organico acetonitrile. Senza questa procedura, il solvente acquoso non potrebbe penetrare nei pori e bagnare la superficie, di conseguenza solo una piccola frazione della superficie sarebbe disponibile per l'interazione con l'analita. Per un completo condizionamento è stata operata la solvatazione con un solvente a bassa resistenza come l'acqua, inoltre è stato importante mantenere idratate le SEP-Pack cartridges prima del caricamento del campione.

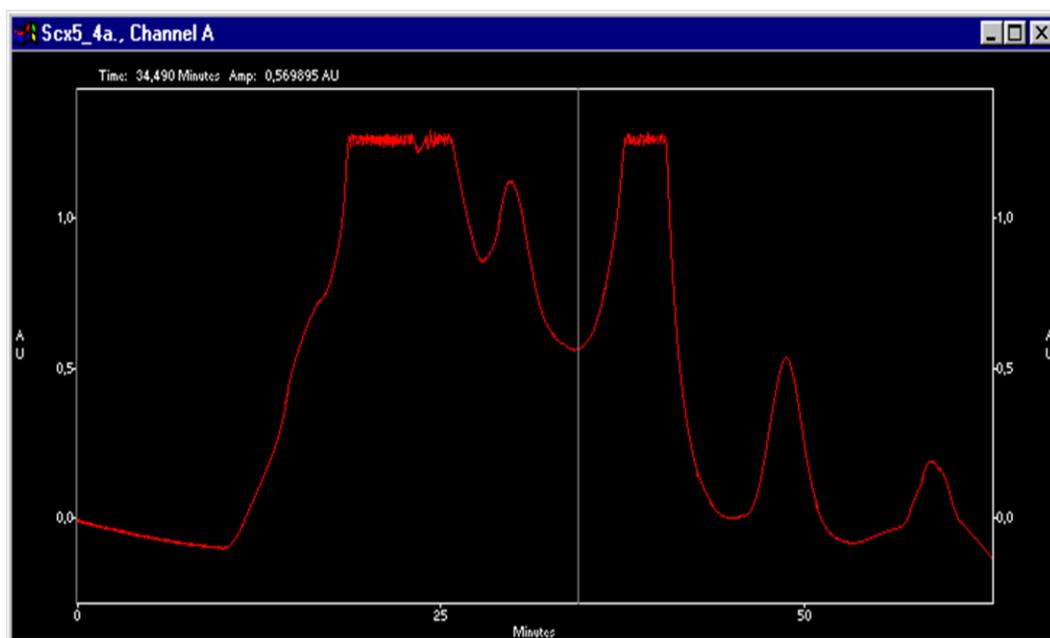


Fig16 Profilo cromatografico della separazione SPE9

## 2.2 Preparazione del campione per la seconda separazione cromatografica

Per porre il campione nelle condizioni idonee per la seconda separazione cromatografica, ogni frazione di prima dimensione è stata concentrata in modo che ciascuna abbia un volume < al 5% del letto della colonna.

La tecnica di concentrazione adoperata è stata l' ultrafiltrazione su cella ad agitazione magnetica (Stirred Cells ) con membrana a cut-off 1000 Da, in modo da avere una rimozione non totale del solvente e preservare il mantenimento della conformazione dei peptidi, importante ai fini dell'attività biologica.

Non è stata praticata la liofilizzazione del campione, in quanto la rimozione completa dell'acqua determina "unfolding" e denaturazione delle proteine, con formazione di aggregati per le interazioni idrofobiche tra gli aminoacidi apolari, questo problema è stato riscontrato nelle frazioni più idrofobiche ottenute con SPE (a maggiore %ACN, >40%).

Dopo la concentrazione le proteine tendono ad aggregare per cui è stato necessario riacidificare il campione a pH 3 con HCl

### **2.3 Seconda dimensione cromatografica (2D):**

#### **Gel-Filtrazione su colonna Hiload 16/60 Superdex 30 prep grade**

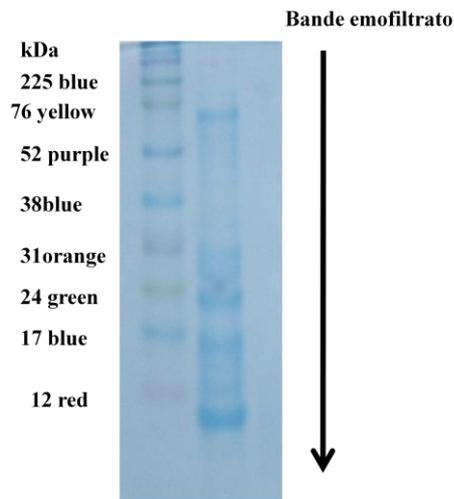
Le frazioni provenienti dalla prima dimensione cromatografica sono state ulteriormente frazionate tramite gel-filtrazione; la raccolta è stata programmata ogni 2min, dal min 40 al min 200, per un totale di 80 frazioni da 2ml. È stata utilizzata la colonna Hiload 16/60 Superdex30 prep grade, equilibrata con TrisHCl 20mM pH7,4, un buffer compatibile con lo screening biologico finale su colture cellulari.

Questo tipo di resina ha separato con una migliore risoluzione i peptidi con peso molecolare fino a 10.000Da, inoltre ha effettuato una desalificazione delle frazioni peptidiche raccolte in SCX.

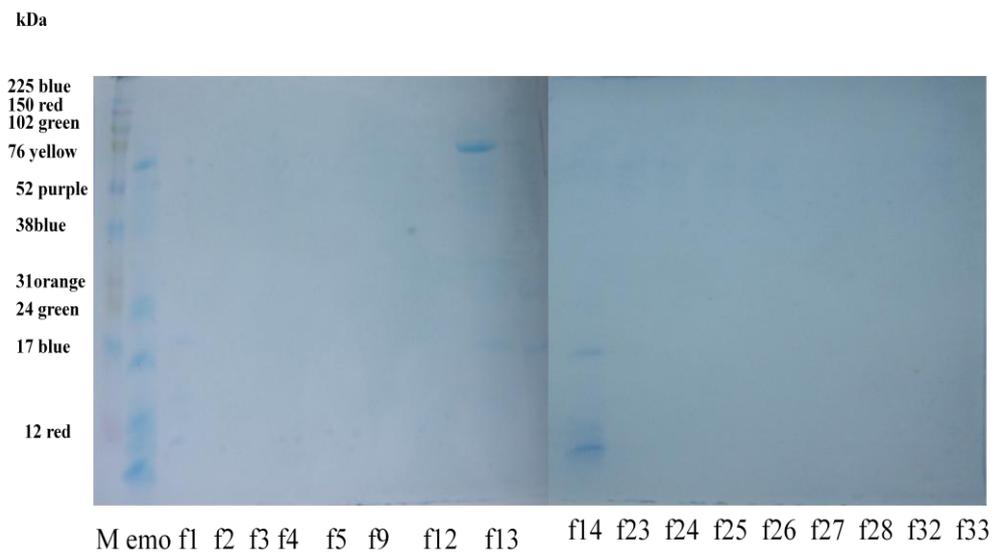
La calibrazione della colonna è stata effettuata con 2mg di emofiltrato, liofilizzato e risospeso con l'aggiunta di TFA 0,1% per favorirne la solubilizzazione, la raccolta è stata programmata dall'inizio della corsa in Tris/HCl 20mM pH7,4 fino a 300min, per un volume di 4ml a frazione, con flusso 1ml/min (Fig.20). Poiché il campione di emofiltrato contiene tutta la miscela di peptidi (Fig17), ogni  $V_r$  è associato a un determinato peso molecolare riscontrabile nelle frazioni della seconda separazione cromatografica. Le frazioni da raccogliere nella 2D sono state dedotte considerando che si ha un dosaggio apprezzabile delle proteine (Fig19) con il metodo del BCA fino alla frazione 45 ( $V_r$ 180ml).

In aggiunta mediante SDS-PAGE al 12% (Fig18) si può individuare la presenza dell'albumina nella fraz13 ( $V_r$  52ml), ma per non perdere i peptidi con peso molecolare >10.000Da la raccolta è stata programmata a partire da 40 min.

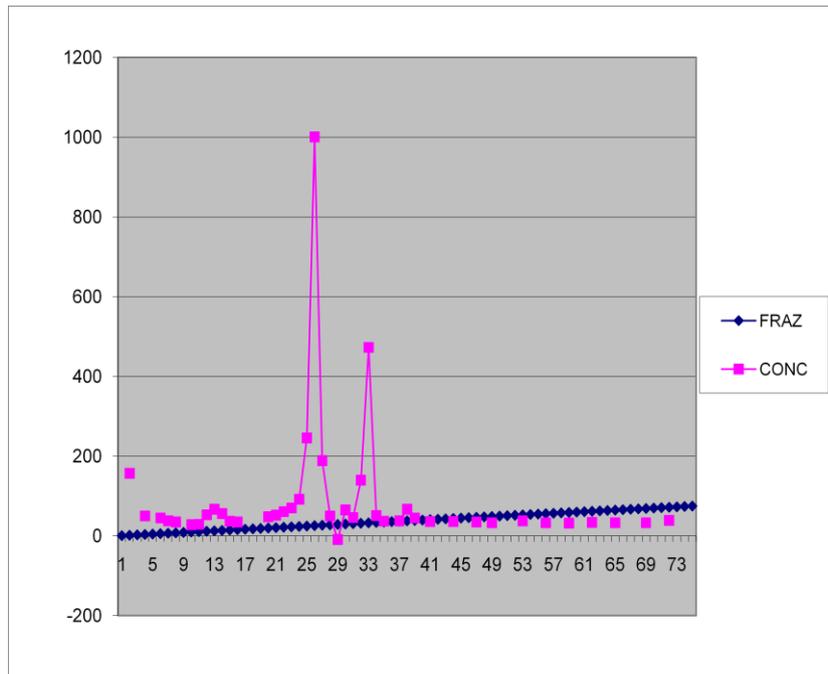
Le specie con peso molecolare < 10.000Da non risultano visibili dal profilo elettroforetico.



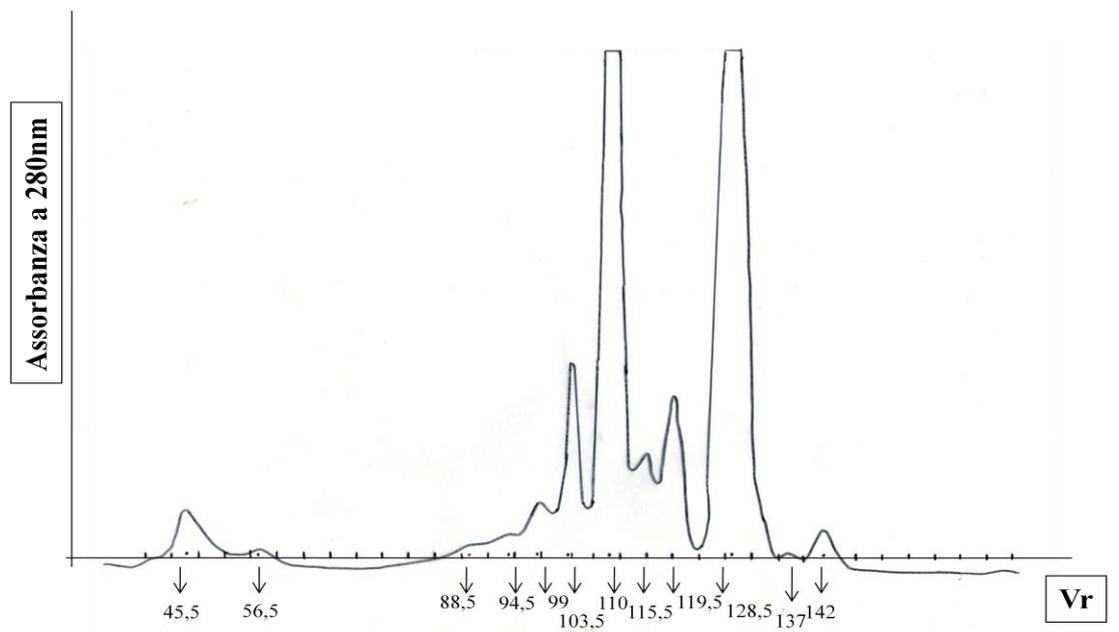
**Fig17 SDS PAGE al 12% di un campione di emofiltrato, è evidente l'abbondanza delle bande sotto 20kDa insieme alla presenza dell'albumina a basse concentrazioni**



**Fig18 SDS PAGE al 12%: frazioni raccolte dalla gel filtrazione Superdex30 prep grade su un campione di emofiltrato, particolare in cui si evidenzia la presenza di albumina (fraz13)**



**Fig19** Rappresentazione grafica del dosaggio proteico: frazioni raccolte dalla gel filtrazione Superdex30 prep grade di un campione di emofiltrato



**Fig20** Cromatogramma della gel filtrazione Superdex 30 prep-grade di un campione di emofiltrato, rappresentativo dell'intera miscela di peptidi. Ciascuna frazione ha un Vr che corrisponde a un diverso peso molecolare.

Nel lavoro svolto sono state isolate le 72 frazioni della prima dimensione cromatografica, ma solo una parte delle 40 frazioni della SCX5 sono state già purificate nella seconda dimensione cromatografica (dalla frazione 15 alla 30) le restanti frazioni sono in attesa di essere trattate per costituire la banca finale di peptidi contenente le 5760 frazioni di 2ml.

Per costruire un profilo complessivo di separazione delle frazioni, per ciascun campione raccolto dopo 1D e successivamente caricato in 2D, è stata creata una mappa tridimensionale (Fig.22 ) che riporta le coordinate Y corrispondenti alle frazioni della 1D, X corrispondenti alle frazioni della 2D e Z corrispondenti alle altezze dei cromatogrammi delle frazioni della 2D.

Nella Fig. 21 sono rappresentate schematicamente le tappe della separazione bidimensionale, per una migliore comprensione della mappa tridimensionale sopra descritta.

Le frazioni della SCX5 si sono arricchite della componente peptidica riscontrabile nel cromatogramma della gel-filtrazione dell' emofiltrato; infatti nella 2D si osservano le concentrazioni maggiori nelle zone comprese nell'intervallo di frazioni da 1 a 10 ( corrispondente al Vr 45,5ml e Vr 56,5ml dell'emofiltrato ) e minori tra la frazione 27 e la 30 (corrispondente al Vr 94,5ml e Vr99ml dell'emofiltrato) e 32-33(corrispondente al Vr 103,5ml dell'emofiltrato). Di particolare rilievo è la zona che si estende dalle frazioni 67 a 75, in cui si sono concentrati i peptidi a più basso peso molecolare, presenti nell'emofiltrato a concentrazioni troppo basse per essere rilevate dal detector.

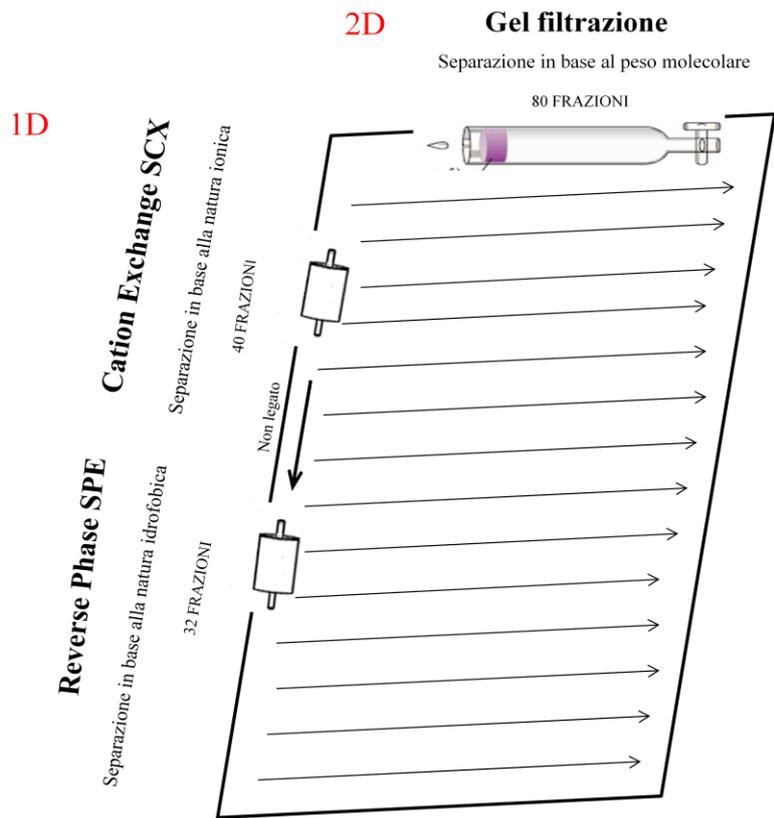
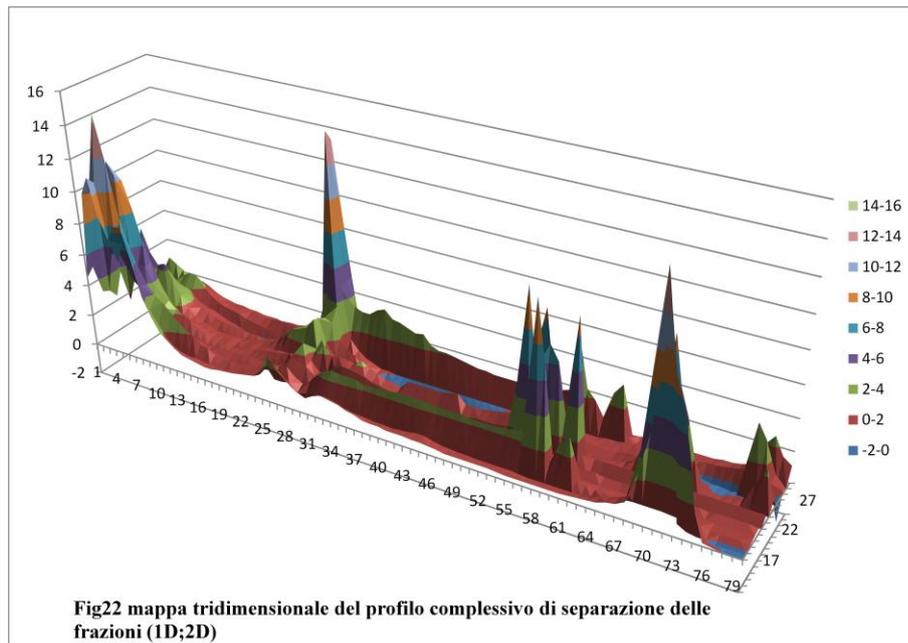


Fig21 Schema del metodo di separazione mediante cromatografia bidimensionale



### **3. Conservazione del campione**

La stabilità delle proteine durante la conservazione è molto importante, per tale motivo il campione è stato acidificato a pH 3 per preservarlo dalla crescita batterica e dalla proteolisi.

È stato evitato l'uso di conservanti, come il thimerosal che interferisce con le tecniche di separazione e non è compatibile con test biologici su colture cellulari.

L'emofiltrato acidificato può essere conservato a 4°C per pochi giorni, mentre può essere usato un congelamento a -20°C per un breve periodo e a -80°C per periodi a lungo termine, in quanto la congelazione rapida favorisce la formazione di microcristalli meno dannosi.

Il campione è stato suddiviso in aliquote corrispondenti al volume da caricare in ciascuna prima dimensione, per evitare ripetuti scongelamenti che possono ridurre l'attività biologica.

I peptidi contengono un basso grado di struttura terziaria, il loro stato nativo è dominato dalla strutture secondaria, stabilizzato principalmente da legami a idrogeno. Per questo motivo, i peptidi tollerano una gamma molto più ampia di condizioni di purificazione rispetto alle proteine. Questa differenza di base nella struttura nativa si riflette anche sul fatto che i peptidi spesso hanno una rinaturazione spontanea mentre le proteine non sono facilmente rinaturate.

### **4 Saggio di binding**

Sono stati condotti esperimenti di binding, utilizzando piastre cellulari da 96 pozzetti, per valutare l'effetto biologico della banca di peptidi sull'internalizzazione delle Dil-LDL da parte degli epatociti umani. L'uso di un lettore di piastra quale il VICTOR, permette di valutare contemporaneamente e in un tempo ridotto l'attività di diversi peptidi plasmatici. Si tratta di tecnologie ad alta processività, che sono sempre più utilizzate e impiegate per diversi approcci, che vanno dal genotyping all'espressione genica alla proteomica e ora alla peptidomica. Poiché ogni frazione 1D produce altre 80 frazioni 2D, ci riferiremo a ogni frazione finale come F(1D,2D).

Le frazioni ottenute dalla 2D delle frazioni 1D (dalla 16 alla 24, 28 e 29) in Cation Exchange SCX5 dell'emofiltrato sono state testate in singolo in cellule di epatoblastoma umano, Hep-G2. Le cellule sono state condizionate per 24h a 37° con le frazioni al 20% nel terreno di crescita, ed il giorno successivo incubate con LDL marcate alla concentrazione di 30µg per ml per circa 3 h. L'uptake delle LDL è stato misurato come descritto in materiali e metodi.

I dati raccolti, relativi allo screening dell'attività delle 880 frazioni 2D sono stati elaborati e rappresentati mediante una mappa tridimensionale (Fig.23); in essa sono riportate come coordinata Y le frazioni 1D, come coordinata X le frazioni 2D, e come coordinata Z l'attività delle frazioni, espressa come multiplo della deviazione standard posta uguale a 1 (vedi la sezione statistica in materiali e metodi), rispetto alla media totale del pool dei pozzetti posta uguale a zero. Dal grafico si possono distinguere picchi di up e down regolazione, che si estendono tridimensionalmente comprendendo frazioni prossime sia dell' 1D che della 2D.

Poiché la risoluzione delle tecniche cromatografiche non permette di isolare un peptide in una singola frazione, è lecito attendersi il riscontro di una frazione di concentrazione massima con frazioni limitrofe a concentrazione decrescente con modalità gaussiana in entrambe le dimensioni. Pertanto le aree che mostrano un effetto biologico attribuibile ad un peptide dovranno presentare tali caratteristiche, per essere correlabili alla presenza di tale peptide che eserciti la sua funzione con modalità dose-dipendente. La possibilità di identificare aree che presentino tali caratteristiche è limitata dalle oscillazioni dei risultati, legati alla imprecisione del metodo di rilevazione della internalizzazione delle LDL. Per ovviare al riscontro di tale "rumore di fondo", è stato fatto un rimodellamento dei dati tramite un lavoro di "smoothing", nel quale operando una media tra valori contigui emergono dal background i segnali significativi. Dopo riduzione del rumore con la tecnica dello smoothing bi-lineare (vedi sezione di statistica in materiali e metodi) le aree di interesse appaiono con maggiore evidenza in una rappresentazione bidimensionale.

Il dato ottenuto è stato graficato in una visualizzazione semplificata del grafico 3D. In questo grafico bi-dimensionale l'intensità del segnale non è rappresentato da una terza dimensione ma dall'intensità del colore della cella che riporta anche il valore numerico dei dati corretti tramite "smoothing". In tale grafico emergono almeno quattro aree di interesse (indicate da un cerchio in Fig 24 intorno alle frazioni F(1D,2D).); tre aree colorate nelle diverse intensità di rosso che denotano la presenza di un possibile peptide down-regolatore, con un picco di attività nelle frazioni centrali in corrispondenza delle F(24,10) e F(28,10) nella prima area, della F(22,16) nella seconda area e della F(20,72) nella terza area; vi è almeno un'area colorata nelle diverse sfumature di verde che indica la possibile presenza di un peptide up-regolatore con un picco di attività in corrispondenza della F(22,40)

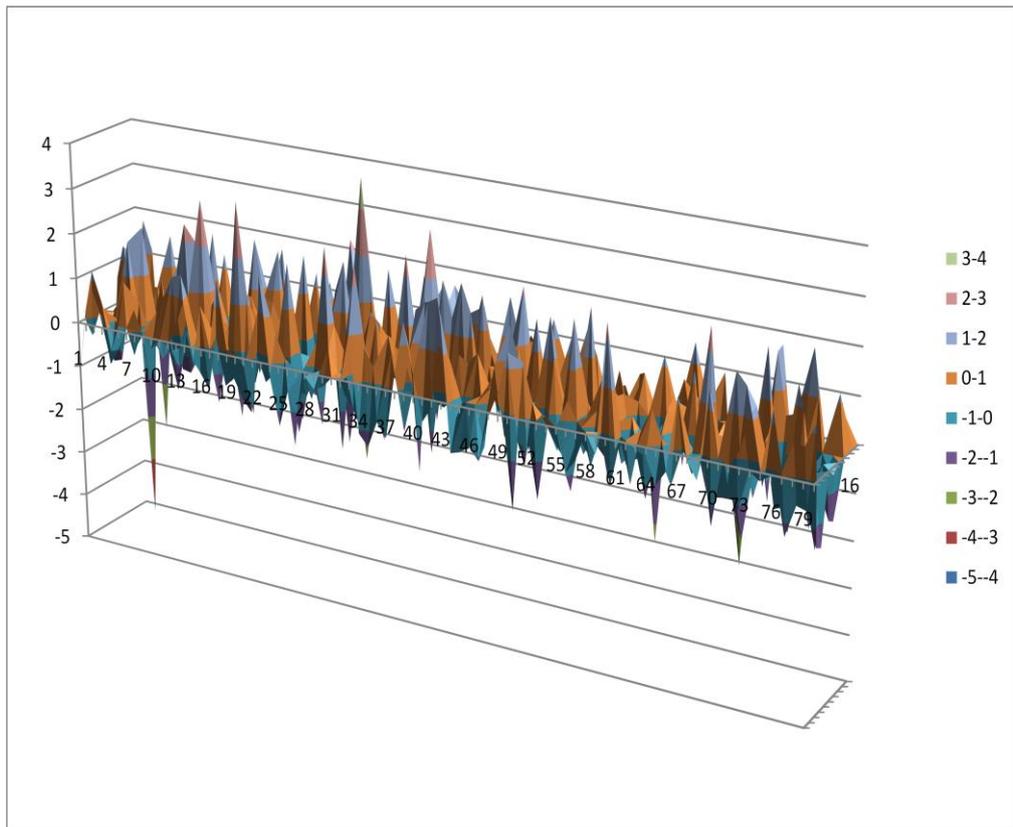


Fig23 mappa tridimensionale dell'attività delle frazioni (1D,2D)

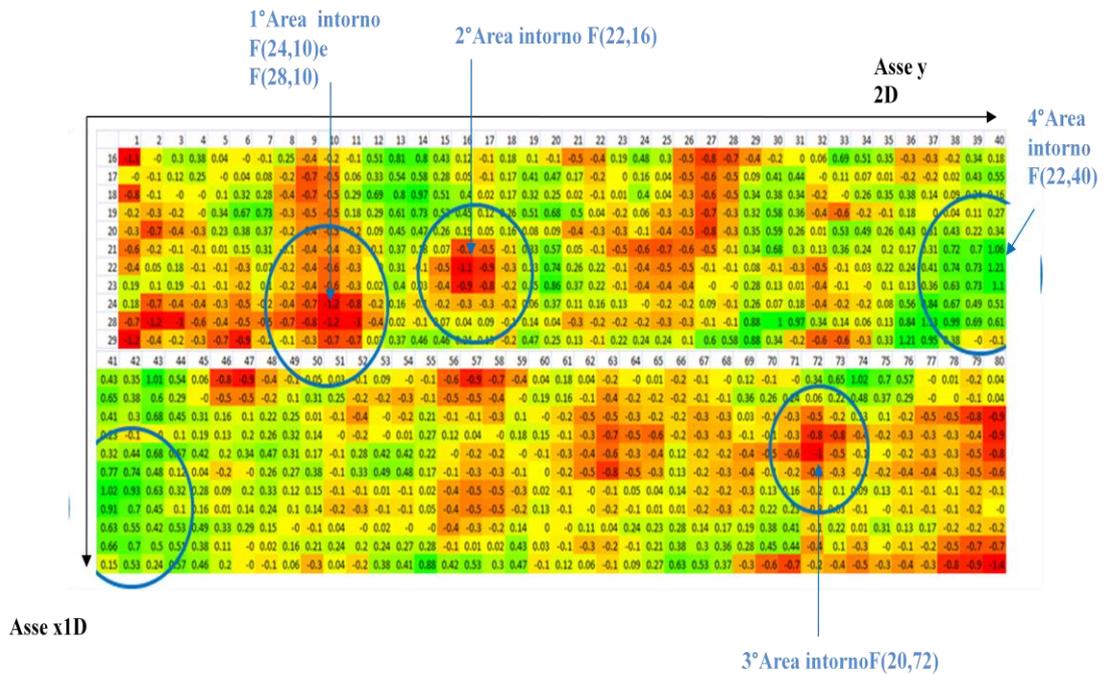


Fig24 Grafico bi-dimensionale della separazione 1D e 2D, in cui l'intensità del segnale di internalizzazione delle LDL è rappresentato dall' intensità del colore rosso nel caso di una down regolazione e dal colore verde per una up regolazione

## ***Conclusioni***

## Conclusioni

Nello studio condotto l'emofiltrato umano si è rivelato la sorgente primaria per l'isolamento dei peptidi plasmatici; è facilmente reperibile in larga quantità dall'ultrafiltrazione, con membrane a cut-off 20.000Da, del plasma di pazienti con malattie renali croniche. L'emofiltrato è dunque un materiale biologico ottimale, poiché ha subito già una vantaggiosa prima purificazione a favore della componente peptidica a basso peso molecolare.

Mediante la messa a punto di una strategia, basata sull'uso della cromatografia bidimensionale, è stato possibile operare una raccolta selettiva della complessa miscela peptidica del plasma.

Da una prima separazione cromatografia, che ha sfruttato la loro diversa natura ionica e idrofobica, è stato ottenuto un pool totale di 72 frazioni da 5L originari di emofiltrato. La seconda separazione cromatografica di queste frazioni, in gel filtrazione, è in corso e allo stato attuale sono disponibili 1280 frazioni della 2D, ricavate dalla frazione 15 alla 30 della 1D cation exchanger SCX5.

La costituzione della banca di peptidi dalla preparazione su larga scala dell'emofiltrato è rappresentativa di un esteso spettro di peptidi plasmatici nella loro forma bioattiva e ne permette l'analisi biochimica e funzionale.

Sono state già testate 880 frazioni ( frazioni della 2D ricavate dalle frazioni 1D da 16 alla 24 , 28 e 29) in cellule di epatoblastoma umano per la loro capacità di interferire sull'uptake delle LDL, mediante un saggio High-throughput screening su piastre da 96 pozzetti.

Alcune frazioni analizzate sembrano contenere peptidi in grado di influenzare sia in positivo che in negativo l'attività dell'LDL recettore. Si possono distinguere tre aree che denotano la presenza di un possibile peptide down-regolatore con un picco di attività nelle frazioni(1D,2D) centrali seguenti: F(24,10) e F(28,10) nella prima area, F(22,16) nella seconda area e F(20,72) nella terza area; vi è almeno un area che indica la possibile presenza di un peptide up-regolatore con un picco di attività in corrispondenza della F(22,40).

Una volta terminata l'intera banca di peptidi plasmatici, che conta di 5760 frazioni, si potrà ultimare la valutazione dell'attività biologica sul recettore LDL e procedere a ulteriori studi per chiarire il tipo di effetto.

La caratterizzazione dei peptidi attivi tramite spettrometria di massa e il loro sequenziamento amminoacidico permetterà di costruirne anche copie sintetiche per una indagine più approfondita della loro funzione. Un esempio è costituito dai lavori presenti in letteratura sull'azione del peptide sintetico EGF-A, che hanno offerto importanti informazioni sul meccanismo d'azione del PCSK9 e riportato significativi risultati riguardo l'impiego della molecola sintetica come nuova strategia ipocolesterolemizzante.

## *Bibliografia*

.

**Abifadel M., Varret M., Rabes J.P., Allard D., Ouguerram K., Devillers M., Cruaud C., Benjannet S., Wickham L., Erlich D., Derre A., Villegier L., Farnier M., Beucler I., Bruckert E., Chambaz J., Chanu B., Lecerf J.M., Luc G., Moulin P., Weissenbach J., Prat A., Krempf M., Junien C., Seidah N.G, Boileau C. Mutation in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia.** Nature Genetic 2003, 34:154-156.

**Arca M., Zuliani G., Wilund K., Campagna F., Fellin R., Bertolini S., Calandra S., Ricci G., Glorioso N., Maioli M., Pintus P., Carru C., Cossu F., Cohen J., Hobbs H.H. Autosomal recessive hypercholesterolemia in Sardinia, Italy, and mutation in ARH: a clinical and molecular genetic analysis.** Lancet 2002, 359:841-847.

**Benjannet S., Rhainds D., Essalmani R., Mayne J., Wickham L., Jin W., Asselin M.C., Hamelin J., Varret M., Allard D., Trillard M., Abifadel M., Tebon A., Attie A.D., Rader D.J., Boileau C., Brissette L., Chretien M., Prat A., Seidah N.G. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the LDLR and LDL-cholesterol.** J Biol Chem 2004, 279:48865-48875.

**Boswell E.J., Jeon H., Blacklow S.C., Downing A.K. Global defects in the expression and function of the low density lipoprotein receptor (LDLR) associated with two familial hypercholesterolemia mutations resulting in misfolding of the LDLR epidermal growth factor-AB pair.** J. Biol. Chem. 2004, 279(29): 30611-21

**Burke MA, Cotts WG. Interpretation of B-type natriuretic peptide in cardiac disease and other comorbid conditions.** Heart Fail Rev 2007;12:23-36

**Cameron J., Holla O.L., Ranheim T., Kulseth M.A., Berge K.E., Leren T.P. Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors.** Hum. Mol. Genet. 2006, 15:1551-1558.

**Clerico A, Iervasi G, Mariani G. Clinical relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptide hormones in humans.** Horm Metab Res 1999;31:487-98

**Conlon JM. Purification of naturally occurring peptides by reversed-phase HPLC.** *Nat Protoc.* 2007;2(1):191-7.

**Corthals, G. L.; Wasinger, V. C.; Hochstrasser, D. F.; Sanchez, J. C. (2000) The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research.** *Electrophoresis* **21**, 1104-1115

**Cravatt, B. F.; Sorensen, E. J. (2000) Chemical strategies for the global analysis of protein function.** *Curr. Op. Chem. Biol.* **4**, 663-668

**Davis C.G., Goldstein J.L., Sudhof T.C., Anderson R.G., Russell D.W., Brown M.S. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region.** *Nature* 1987, 326:760-765.

**De Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease(Review)** *Lancet.*2003;362:316-22

**Gabelli C, Bilato C, Martini S, Tennyson GE, Zech LA, Corsini A, Albanese M, Brewer HB Jr, Crepaldi G, Baggio G. Homozygous familial hypobetalipoproteinemia. Increased LDL catabolism in hypobetalipoproteinemia due to a truncated apolipoprotein B species, apo B-87**Padova. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1189-1196.

**Garcia C.K., Wilund K., Arca M., Zuliani G., Fellin R., Maioli M., Calandra S., Bertolini S., Cossu F., Grishin N., Barnes R., Cohen J.C., Hobbs H.H. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein.** *Science* 2001, 292:1394-1398.

**Hobbs H.H., Russell D.W., Brown M.S., Goldstein J.L. The LDL receptor locus and familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein.** *Annu. Rev. Genet.* 1990, 24:133-170.

**Jürgens M, Schrader M. Peptidomic approaches in proteomic research** BioVision AG, Hannover, Germany. *Curr Opin Mol Ther.* 2002 Jun;4(3):236-41.

**Kane JP, Havel RJ. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins.** In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D., eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol. II. 7th ed. New York, McGraw Hill, 1995; 1853-1885

**Kayden HJ, Hatam LJ, Traber MG, 1983. The measurement of nanogram of tocopherol from needle aspiration biopsies of adipose tissue: normal and abetalipoproteinemic subject.***J lipid Res* 24: 652-656

**Kayden HJ, Traber MG, 1993. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentration of vitamin E in humans.** *J Lipid Res* 34: 343-358.

**Kosciarz E., Rouïdal F., Dossou-Yovo I., Vercaigne-Marko D.,\* Nedjar-Arroume N., Dhulster P, Guillochon D. Fractionation at Pilot-Plant Scale of an Haemoglobin Hydrolysate by Strong Anionic Exchange Chromatography: Application to the Preparation of an Amphiphilic Peptide** *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1998, 71, 35-42

**Krul ES, Kinoshita M, Talmud P, Humphries SE, Turner S, Goldberg AC, Cook K, Boerwinkle E, Schonfeld G. Two distinct truncated apolipoprotein B species in a kindred with hypobetalipoproteinemia.** *Arteriosclerosis.* 1989;9:856-868.

**Krul ES, Parhofer KG, Barrett PHR, Wagner RD, Schonfeld G. ApoB-75, a truncation of apolipoprotein B associated with familial hypobetalipoproteinemia: genetic and kinetic studies.** *J Lipid Res.* 1992;33:1037-1350.

**Krul ES. Tang J. Kettler TS. Clouse RE. Schonfeld G. Lengths of truncated forms of apolipoprotein B (apoB) determine their intestinal production.** *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 189(2):1069-76, 1992

**Kwan G, Isakson SR, Beede J, Clopton P, Maisel AS, Fitzgerald RL. Short-term serial sampling of natriuretic peptides in patients presenting with chest pain.** *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1186-1192

**Kwon H.J.**, Lagace T.A., McNutt M.C., Horton J.D., Deisenhofer J. Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *PNAS* 2008, 105(6):1820-1825.

**Lagace T.A.**, Curtis D.E., Garuti R., McNutt M.C., Wook S., Prather H.B., Anderson N.N., Ho Y.K., Hammer R.E., Horton J.D. **Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in liver of parabiotic mice.** *J. Clin. Invest.* 2006, 116:2995-3005.

**Linton MF, Farese RV Jr, Young SG.**1993. Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 34:521-541.

**Maxwell K.N.**, Soccio R.E., Duncan E.M., Sehayek E., Breslow J.L. **Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice.** *Js. Lipid. Re.* 2003, 44(11):2109-19.

**McNutt M.C.**, Lagace T.A., Horton J.D. **Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells.** *J. Biol. Chem.* 2007, 282(29):20799-20803

**Meisel H.,**Bockelmann<sup>2</sup> Wilhelm, **Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties** *Antonie van Leeuwenhoek*1999. **76:** 207–215,

**Meisel H. Biochemical Properties of Regulatory Peptides Derived from Milk Proteins** Federal Dairy Research Centre, Institute for Chemistry and Physics, D-24121 Kiel, P.O. Box 6069, Germany

**Morikawa K,** Kondo I, Kanamaru Y, Nagaoka S **A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jan 19;352(3):697-702. Epub 2006 Nov 27

**Muller DPR, Lloyd JK, Wolff OH,** 1985. **the role of vitamin E in the treatment of the neurological features of abetalipoproteinaemia and other disorders of fat absorption.** *J Inherit Metab Dis* 8 ( Suppl 1): 88-92

**Nagaoka S**, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K, and Tamotsu K. **Identification of Novel Hypocholesterolemic Peptides Derived from Bovine Milk b-Lactoglobulin** *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Feb16;281(1):11-7.

**Parhofer KG**, Barret PHR, Aguilar-Salinas CA, Schonfeld G. 1996. **Positive linear correlation between the length of truncated apolipoprotein B and its secretion rate: in vivo studies in human apoB-89, apoB-75, apoB-54.8, and apoB-31 heterozygotes.** *J Lipid Res* 37:844-852

**Park S.W.**, Moon Y.A., Horton J.D. **Post-transcriptional regulation of LDL receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a (PCSK9) in mouse liver.** *J. Biol. Chem.* 2004, 279:50630-50638.

**Pulai JI**, Latour MA, Kwok P-Y, Schonfeld G. **Diabetes mellitus in a new kindred with familial hypobetalipoproteinemia and an apolipoprotein B truncation (apoB-55).** *Atherosclerosis.* 1998;136:289-295.

**Pulai JI**, Zakeri H, Kwok P-Y, Kim JH, Wu J, Schonfeld G. **Donor splice mutation (665+1G-T) in familial hypobetalipoproteinemia with no detectable apoB truncation.** *Am J Med Genet.* 1998;80:218-220.

**Pulai JI**, Neuman RJ, Groenewegen AW, Wu J, Schonfeld G. **Genetic heterogeneity in familial hypobetalipoproteinemia: linkage and non-linkage to the apoB gene in Caucasian families.** *American Journal of Medical Genetics.* 76(1):79-86, 1998.

**Qian Y.W.**, Schmidt R.J., Zhang Y., Chu S., Lin A., Wang H., Wang X., Beyer T.P., Bensch W.R., Li W., Ehsani M.E., Lu D., Konrad R.J., Eacho P.I., Moller D.E., Karathanasis S.K., Cao G. **Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis.** *J. Lipid Res.* 2007, 48:1488-1498.

**Rashid S.**, Curtis D. E., Garuti R., Anderson N.N, Bashmakov Y., Ho Y.K., Hammer R.E, Moon Y.A., Horton J.D. **Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking PCSK9.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005,102:5374-5379.

**Richter R, Schulz-Knappe P, Schrader M, Ständker L, Jürgens M, Tammen H, Forssmann WG** **Composition of the peptide fraction in human blood plasma: database of circulating human peptides** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999 Apr 16;726(1-2):25-35.

**Rumsey SC, Galeano NF, Arad Y, Deckelbaum RJ** **Cryopreservation with sucrose maintains normal physical and biological properties of human plasma low density lipoproteins.** *J Lipid Res.* 1992 Oct;33(10):1551-61.

**Ruskoaho H.** **cardiac hormone as diagnostic tool in heart failure**(Review)*Endocr Rev* 2003;24:341-56

**Schrader M, Schulz-Knappe P.** **Peptidomics technologies for human body fluids.** *Trends Biotechnol.* 2001 Oct;19(10 Suppl):S55-60. Review

**Schulz-Knappe P, Schrader M, Ständker L, Richter R, Hess R, Jürgens M, Forssmann WG.** **Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides.** *J Chromatogr A.* 1997 Jul 25;776(1):125-32.

**Seidah N.G., Benjannet S., Wickham L., Marcinkiewicz J., Jasmin S.B., Stifani S., Basak A., Prat A., Chretien M.** **The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003;100:928-933.

**Shan L., Pang L., Zhang R., Murgolo N.J., Lan H., Hedrick J.A.** **PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide.** *Bioch. and Biophys. Res. Com.* 2008, 375:69-73.

**Sharp D, Ricci B, Kiennzle B, Lin MC, Wetterau JR,** 1994. **Human microsomal triglyceride transfer protein large subunit gene structure.** *Biochemistry* 33: 9057-9061.

**Srivastava N, Noto D, Averna M, Pulai J, Srivastava RAK, Cole TG, Latour MA, Patterson BW, Schonfeld G.** **A new apolipoprotein B truncation (apoB-43.7) in familial hypobetalipoproteinemia: genetic and metabolic studies.** *Metabolism.* 1996;45:1296-1304

**Srivastava RA.** Srivastava N. Averna M. Cefalù AB. Schonfeld G. **Molecular bases of low production rates of apolipoprotein B-100 and truncated apoB-82 in a mutant HepG2 cell line generated by targeted modification of the apolipoprotein B gene.** *Journal of Lipid Research.* 40(5):901-12, 1999.

**Welty FK,** Lichtenstein AH, Barret PHR, DolniKowski GG, Ordovas JM, Schaefer EJ. 1997. **Decreases production and increased catabolism of apolipoprotein B-100 in apolipoprotein B-67/B-100 heterozygotes.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:881-888.

**Yuan B,** Neuman R, Duan SH, Weber JL, Kwok PY, Saccone NL, Wu JS, Liu KY, Schonfeld G. 2000. **Linkage of a gene for familial hypobetalipoproteinemia to chromosome 3p21.1-22.** *Am J Hum Genet* 66:1699-1704.

**Zhang D.W.,** Lagace A.T, Garuti R., Zhao Z., McDonald M., Horton J.D., Cohen J.C., Hobbs H.H. **Binding of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation.** *J. Biol. Chem.* 2007, 282:18602-18612.