



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

*CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA*

**STRUTTURA E AGGREGAZIONE MEDIANTE DLS, SAXS E FTIR DEL  
*PEPTIDE BETA-AMILOIDE 1-42* PRODOTTO MEDIANTE TECNICHE  
RICOMBINANTI E DEL CORRISPONDENTE DEPSI-PEPTIDE**

**STRUCTURE AND AGGREGATION BY DLS, SAXS AND FTIR OF THE  
*AMYLOID-BETA PEPTIDE 1-42* PRODUCED BY RECOMBINANT  
TECHNIQUES AND OF THE CORRESPONDING DEPSI-PEPTIDE**

Tesi di Laurea Magistrale di:  
**Marco Radi**

Relatore: Chiar.mo Prof.  
**Francesco Spinozzi**

**Sessione Autunnale  
Anno Accademico 2022/2023**



# Sommario

<i>Scopo della Tesi</i> .....	6
<i>1. Introduzione</i> .....	9
<i>1.1 Il precursore del peptide <math>\beta</math>-amiloide</i> .....	9
<i>1.2 Il peptide <math>\beta</math>-amiloide 1-42</i> .....	13
<i>2. Materiali e Metodi</i> .....	17
<i>2.1 Produzione di A<math>\beta</math>42 ricombinante</i> .....	17
<i>2.1.1 Preparazione dei terreni di coltura e pre-coltura</i> .....	18
<i>2.1.2 Raccolta delle cellule</i> .....	20
<i>2.1.3 Purificazione e Dialisi</i> .....	22
<i>2.1.4 Cromatografia a scambio ionico</i> .....	28
<i>2.1.5 Quantificazione della Proteina</i> .....	29
<i>2.1.6 Elettroforesi su gel (SDS-PAGE)</i> .....	30
<i>2.2 Dynamic Light Scattering (DLS)</i> .....	33
<i>2.2.1 Introduzione al DLS</i> .....	33
<i>2.2.2 Zetasizer pro</i> .....	38
<i>2.3 Depsi-A<math>\beta</math>(1-42)</i> .....	41

2.4	<i>Diffusione a piccolo angolo dei raggi X (SAXS)</i> .....	42
2.4.1	<i>Introduzione ai raggi X</i> .....	42
2.4.2	<i>La tecnica SAXS</i> .....	43
2.4.3	<i>Il principio dello scattering</i> .....	45
2.4.4	<i>Sistemi di particelle omogenee in soluzione</i> .....	48
2.4.5	<i>Legge di Guinier</i> .....	49
2.4.6	<i>Particelle sferiche</i> .....	49
2.4.7	<i>Particelle cilindriche</i> .....	51
2.4.8	<i>La luce di sincrotrone</i> .....	53
2.4.9	<i>Preparazione dei campioni</i> .....	55
2.5	<i>Spettroscopia IR a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR)</i> .....	56
2.5.1	<i>La spettroscopia infrarossa</i> .....	56
2.5.2	<i>La riflettanza totale attenuata (ATR)</i> .....	60
2.5.3	<i>Preparazione dei campioni e strumentazione</i> .....	64
3.	<i>Risultati</i> .....	68
3.1	<i>Produzione e purificazione del peptide A<math>\beta</math>42</i> .....	68
3.2	<i>Dynamic Light Scattering (DLS)</i> .....	74

<b>3.3 SAXS</b> .....	<b>83</b>
<b>3.4 Spettroscopia ATR-FTIR</b> .....	<b>93</b>
<b>4. Conclusioni</b> .....	<b>98</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>104</b>

## *Scopo della Tesi*

Questo lavoro di tesi riguarda lo studio del peptide  $\beta$ -amiloide 42 ( $A\beta_{42}$ ) responsabile dell'insorgenza della malattia di Alzheimer. Il peptide  $A\beta_{42}$  origina tramite due tagli proteolitici della proteina APP (proteina precursore della  $\beta$ -amiloide). In condizioni fisiologiche, il peptide contribuisce alla plasticità sinaptica e alla sopravvivenza neuronale. In condizioni patologiche dovute a mutazioni su determinati geni, il peptide viene prodotto in abbondanza, si accumula a livello dello spazio sinaptico, tende ad aggregare quasi immediatamente e a formare delle strutture fibrillari chiamate placche senili o amiloidi. Informazioni riguardanti sia la cinetica di aggregazione del peptide sia i fattori che innescano il processo e favoriscono il passaggio dalla forma monomerica alla forma fibrillare sono fondamentali per individuare un *target* da inibire per impedire la formazione delle placche amiloidi (Sokolov et al., 2022).

Numerosi studi sull'aggregazione sono stati eseguiti sul peptide sintetizzato per via chimica, che può essere facilmente ottenuto in forma monomerica. Tuttavia, la sintesi chimica è piuttosto costosa e deve essere seguita da un protocollo per rimuovere eventuali oligomeri che possono formarsi in seguito alla risospensione del liofilizzato.

Al contrario, nella produzione del peptide per via ricombinante la purificazione avviene mediante cromatografia di affinità, utilizzando un *tag* di istidine. Questo metodo permette di produrre il peptide con una buona percentuale di purezza. Tuttavia, è necessario rimuovere il *tag*, il quale potrebbe modificare la struttura e le proprietà di aggregazione. Per effettuare il taglio, oltre alla presenza di un sito di riconoscimento, sono necessari ulteriori *step* di purificazione, durante i quali una parte del peptide può essere persa (Stephens et al., 2020).

Questo studio di tesi è focalizzato sull'ottimizzazione di un semplice e rapido protocollo per produrre il peptide  $\beta$ -amiloide 42 per via ricombinante. Sono stati utilizzati ceppi di *E. coli* BL21 trasformati con il plasmide contenente il gene per il peptide, sotto il controllo di un promotore molto forte (T7). In questo modo, sono state ottenute importanti quantità di peptide, racchiuso all'interno di corpi di inclusione. Tale confinamento ha il vantaggio di facilitare l'isolamento del peptide e la sua purificazione semplicemente rompendo i corpi di inclusione.

Con questo protocollo si ottiene un peptide che rimane in forma monomerica per un tempo che, seppure breve, può essere sufficiente per studiare gli stadi precoci di aggregazione. In questo lavoro sono stati

analizzati campioni di peptide  $\beta$ -amiloide 42 con la tecnica della diffusione dinamica della luce (Dynamic Light Scattering, DLS) per osservare il cambiamento dell'aggregazione in funzione della temperatura. Inoltre, con gli stessi campioni sono stati effettuati studi di diffusione a piccolo angolo dei raggi X (*Small-angle X-ray scattering*, SAXS) presso il sincrotrone europeo ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) di Grenoble. Infine, sfruttando la tecnologia del depsi-peptide, è stato possibile studiare la struttura del peptide in forma monomericamente tramite SAXS e spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR).

In sintesi, in questo lavoro di tesi si è studiata la struttura del peptide  $\beta$ -amiloide, ottenuto per via ricombinante, in funzione di varie condizioni chimico-fisiche e si è indagata la cinetica di formazione delle fibrille al fine di individuare possibili strategie per inibire tale aggregazione.



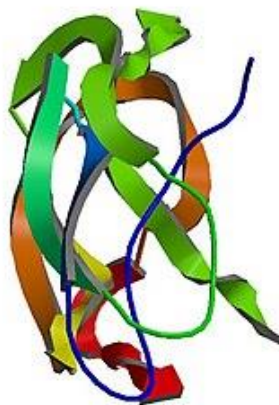
# ***1. Introduzione***

## ***1.1 Il precursore del peptide $\beta$ -amiloide***

Il peptide  $\beta$ -amiloide è il principale responsabile della formazione delle placche senili implicate nella malattia di Alzheimer (*Alzheimer's disease, AD*).

Il peptide deriva da una proteina transmembrana chiamata APP (*Amyloid Precursor Protein*).

La proteina APP è costituita da 770 aminoacidi, è codificata da un gene situato sul cromosoma 21 ed è espressa da diversi tipi di tessuti (Kirkitadze e Kowalska, 2005).



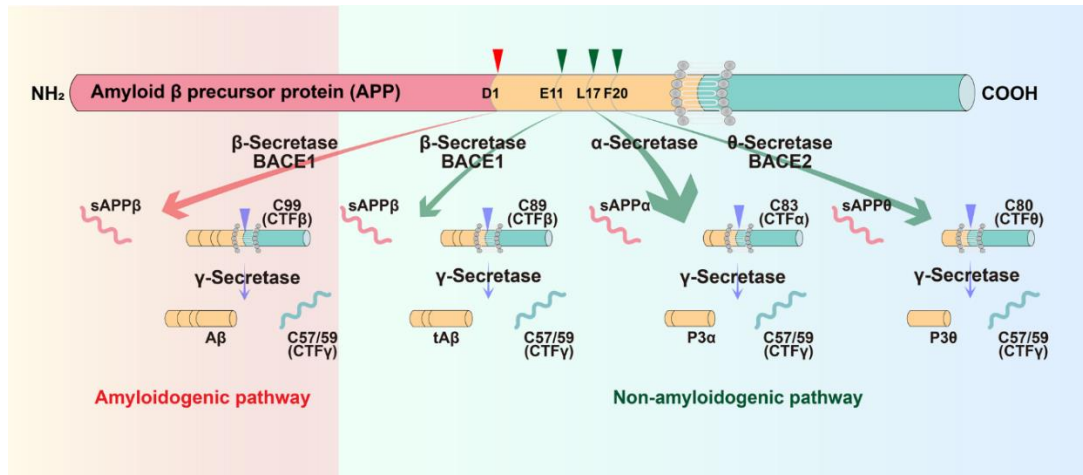
**Figura 1.** *Struttura 3D della proteina APP (Wikipedia)*

Ci sono diverse isoforme della proteina APP e le più diffuse, a livello del sistema nervoso centrale, sono le APP695, APP751 e APP770, prodotte soprattutto dai neuroni (Mattson, 2004).

La funzione della proteina APP non è ancora del tutto chiara, ma sembra avere un ruolo nella crescita cellulare, nella plasticità sinaptica, nella sopravvivenza neuronale e nell'adesione cellulare (Ludewig e Korte, 2017).

Fisiologicamente, la proteina APP segue un *pathway* non-amiloidogenico, subendo un taglio da due proteasi. La  $\alpha$ -secretasi taglia solitamente la proteina in corrispondenza dell'aminoacido 697 generando un frammento solubile chiamato sAPP $\alpha$  che viene secreto e un frammento C83 che viene successivamente tagliato dalla  $\gamma$ -secretasi formando il frammento p3 che viene rilasciato dalla membrana. In questo *pathway*, non si forma il peptide A $\beta$  perché la  $\alpha$ -secretasi taglia all'interno della sua sequenza.

Invece nel processo amiloidogenico, entra in gioco la  $\beta$ -secretasi che taglia la proteina APP a livello della regione N-terminale del peptide A $\beta$ , formando un frammento sAPP $\beta$  (secreto) e un frammento C99.



**Figura 2.** Pathway amiloidegenico e non della proteina APP (Zhang et al., 2023)

Quest'ultimo frammento può essere tagliato dalla  $\gamma$ -secretasi in differenti posizioni formando diversi frammenti di  $\beta$ -amiloide, aventi una lunghezza compresa tra 39 e 43 aminoacidi. Le forme più abbondanti sono i peptidi  $A\beta(1-40)$  e  $A\beta(1-42)$ , più sinteticamente indicati come  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$ . In Figura 2 possiamo osservare tutti i possibili prodotti dei due diversi *pathway*.

Per tanti anni si è pensato che la causa della produzione del peptide  $A\beta$  fosse un'errata scissione del suo precursore. Invece oggi è noto che il peptide  $A\beta$  è un normale catabolita della proteina APP, presente anche in soggetti sani. Nei soggetti giovani e sani infatti, il peptide  $A\beta$  viene metabolizzato subito dopo esser secreto. Con l'avanzare dell'età, l'iperproduzione del peptide e una sua ridotta *clearance* portano alla formazione di depositi con successiva aggregazione e degenerazione neuronale (Kirkitadze e Kowalska, 2005).

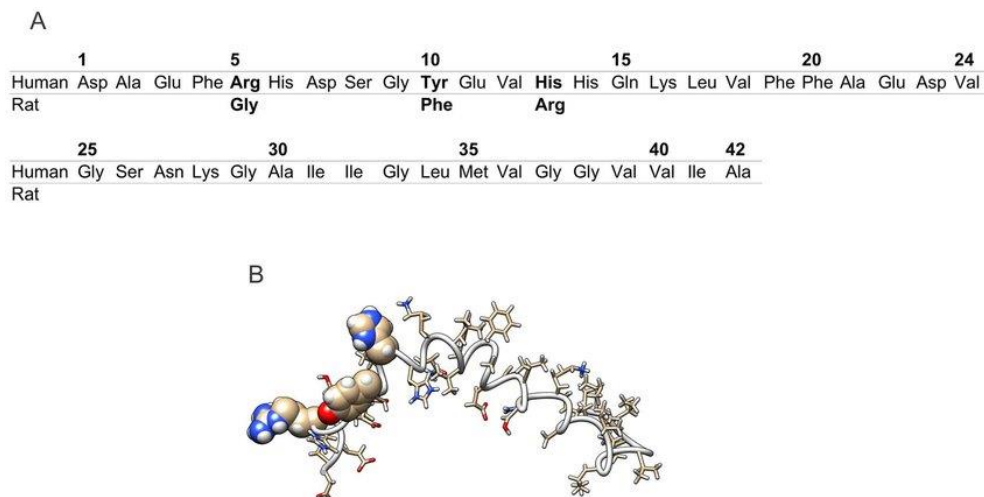
Ci sono diversi geni la cui mutazione porta alla suscettibilità della malattia. Tra questi c'è il gene per l'apolipoproteina E con i suoi 3 alleli: E2, E3 ed E4 e 19 isoforme. L'apolipoproteina E è il principale trasportatore di colesterolo e lipidi al cervello e ha un ruolo critico nel metabolismo del peptide A $\beta$ . Si è visto come l'isoforma APOE $\epsilon$ 4 sia un fattore di rischio perché porta ad una minor efficienza nella sua *clearance* (Wildsmith et al., 2013).

Inoltre, le forme precoci di Alzheimer sono correlate con una mutazione della proteina APP o una mutazione della presenilina-1 (PS1) o presenilina-2 (PS2), che fungono da subunità catalitica della  $\gamma$ -secretasi. In queste condizioni, si crea una sovrapproduzione del peptide A $\beta$  e un aumento del rapporto A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ (1-40) (Kirkitadze e Kowalska, 2005).

Solo il 5-10% dei casi di Alzheimer sono ereditari e dovuti o al cambiamento di pochi aminoacidi all'interno della sequenza del peptide A $\beta$  o ad una mutazione della presenilina 1 o presenilina 2. Ciò favorisce il *pathway* amiloidogenico e un'alterazione dell'attività della  $\gamma$ -secretasi.

## ***1.2 Il peptide $\beta$ -amiloide 1-42***

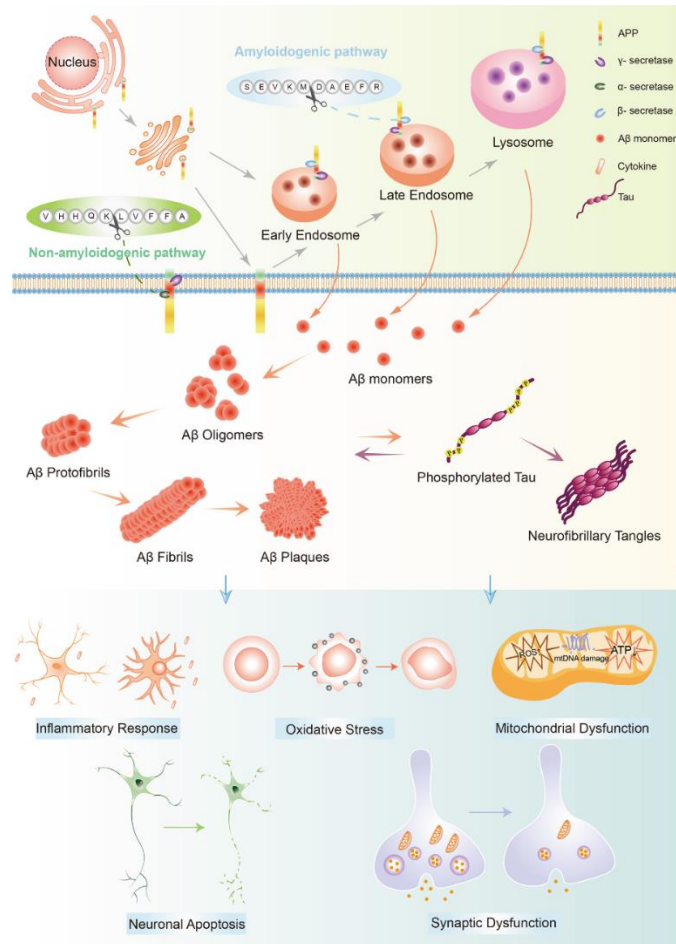
Come riportato nel precedente paragrafo, dalla proteina APP si possono ottenere peptidi A $\beta$  di lunghezza diversa. In condizioni fisiologiche questi peptidi sembrano avere una funzione di salvaguardia della plasticità sinaptica e della sopravvivenza neuronale. I peptidi più abbondanti sono A $\beta$ (1-40) e A $\beta$ (1-42) e ciò che li differenzia sono solo i due residui aminoacidici a livello della regione C-terminale: Ile41 e Ala42. Nonostante i due peptidi siano molto simili, si comportano diversamente sia *in vivo* che *in vitro*. Infatti, il peptide A $\beta$ 42 viene secreto in misura molto inferiore rispetto al peptide A $\beta$ 40. Inoltre, A $\beta$ 42 risulta essere più neurotossico e la sua aggregazione *in vitro* molto più veloce. Infatti, mentre il peptide A $\beta$ 40 può essere presente in forma monomerica, dimerica, trimerica e tetramericamente in equilibrio termodinamico tra loro, il peptide A $\beta$ 42 con la sua struttura monomerica non ordinata tende irreversibilmente a oligomerizzare in pentameri ed esameri, anche chiamati paranuclei. In questo comportamento giocano un ruolo fondamentale i due residui e in particolare il residuo Ile41, che sembra promuovere anche l'autoassemblaggio dei paranuclei in oligomeri più grandi.



**Figura 3.** Sequenza aminoacidica del peptide beta amiloide 42 (Kříž et al., 2013)

Si è osservato che sia la solubilità sia la quantità di A $\beta$  nei diversi *pool* sono strettamente correlate con la malattia di Alzheimer. Infatti questi depositi amiloidi inducono disfunzione sinaptica, interrompono la connettività neurale fino ad arrivare alla morte neuronale, soprattutto a livello encefalico (Murphy e LeVine, 2010).

Siccome la proteina APP viene trasportata lungo l'assone fino al bottone pre-sinaptico, è proprio nelle sinapsi che si formano i depositi amiloidi. Infatti il peptide A $\beta$  viene secreto nello spazio pre-sinaptico e, accumulandosi, porta a gravi conseguenze sulla funzionalità del bottone pre e post-sinaptico. In questo modo si interrompe il segnale di comunicazione tra due neuroni, provocando apoptosi.

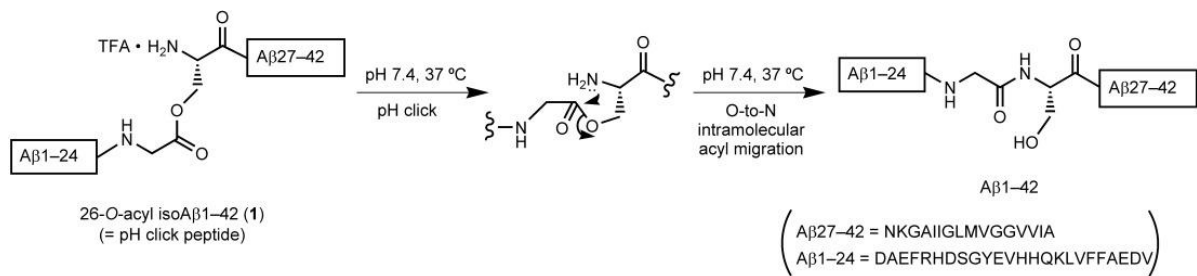


**Figura 4.** Formazione, aggregazione e funzioni patologiche del peptide Aβ42 (Zhang et al., 2023)

Dal momento che il peptide Aβ42 aggrega quasi immediatamente quando viene posto in soluzione, risulta complicato analizzarlo in forma monomerica. Per risolvere questo, si può utilizzare il depsi-peptide della Aβ42.

Questa molecola è un O-acil isopeptide, ovvero ha la stessa struttura aminoacidica della Aβ42 in cui però un legame ammidico è stato isomerizzato in un legame estere. In questo caso il legame estere è tra i

residui Gly-25 e Ser-26 della sequenza aminoacidica. Questo costrutto permette di avere un peptide stabile a bassi valori di pH e di inibire l'auto-aggregazione della molecola. Poi per convertire il depsipeptide nella proteina nativa è necessario uno switch di pH a valori di 7.4 o superiori.



**Figura 5.** *Formazione di un peptide A $\beta$ 1-42 dal 26-O-acil isoA $\beta$ 1-42 attraverso una migrazione intramolecolare di un gruppo acile da O a N innescata dalla variazione del pH (Taniguchi, 2009)*



## 2. Materiali e Metodi

### 2.1 Produzione di A $\beta$ 42 ricombinante

Il peptide è stato prodotto da cellule di *E. coli* BL21 già trasformate con il plasmide contenente il gene per il peptide A $\beta$ 42 sotto il controllo di un promotore forte. Il plasmide in questione è il *pET-Sac-Abeta (M1-42)* acquistato presso l'azienda Addgene.

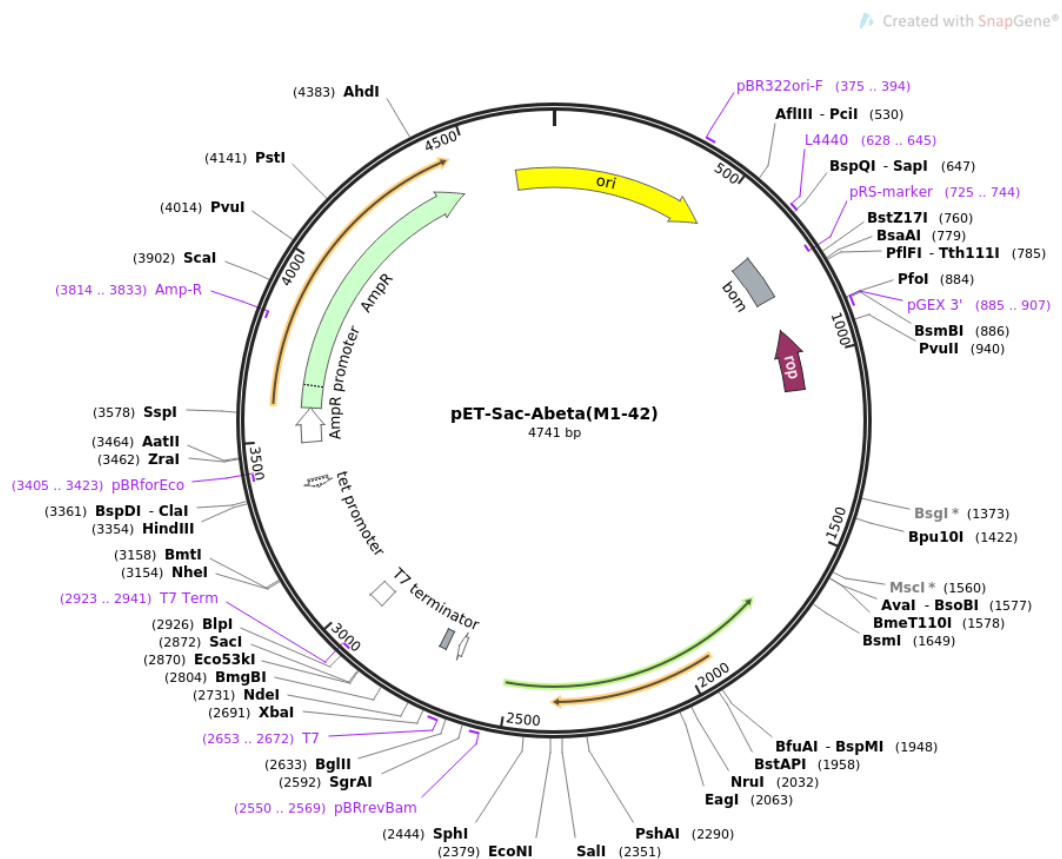


Figura 6. Il plasmide *pET-Sac-Abeta(M1-42)* che contiene il gene per il peptide A $\beta$ 42 sotto il controllo di un promotore forte (Walsh et al., 2009)

Queste cellule sono state divise in più stock e conservate in glicerolo a -80 °C. Inoltre, è stato possibile confermare l'espressione del peptide e la posizione della banda su gel tramite un precedente sequenziamento<sup>(1)</sup>.

Il protocollo è stato eseguito numerose volte in modo da poterlo ottimizzare e prevedeva diversi step: *Preparazione dei terreni di coltura e pre-coltura; Raccolta cellule, purificazione e dialisi; Cromatografia a scambio anionico; Quantificazione delle proteine; Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE).*

### ***2.1.1 Preparazione dei terreni di coltura e pre-coltura***

Le cellule sono state fatte crescere in un terreno di coltura LB (Luria Bertani) liquido. Sono stati preparati due terreni LB (500 ml) e un terreno LB (100 ml) per le pre-culture. Il terreno LB è costituito da Triptone, estratto di lievito e NaCl.

Composizione terreno LB da 500 ml:

- 5 g Triptone 1% (w/v)
- 2,5 g estratto di lievito 0,5% (w/v)
- 5 g NaCl 1% (w/v)

Composizione terreno LB da 100 ml:

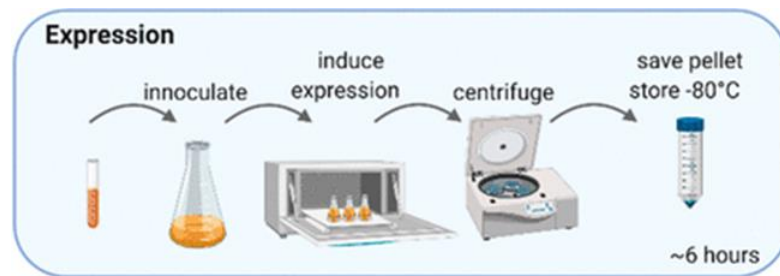
- 1 g Triptone
- 0,5 g estratto di lievito
- 1 g NaCl

Una volta realizzati i terreni, questi vengono lasciati in autoclave per la sterilizzazione, per due ore a 4 bar.

Per la preparazione della pre-coltura, si lavora sotto cappa: all'interno di due Falcon si mettono 10 ml di coltura, 10  $\mu$ l di cloramfenicolo (conc. 1:1000), 10  $\mu$ l di ampicillina (conc. 1:1000) e 500  $\mu$ l di ceppo *E. coli* BL21. I due antibiotici vengono utilizzati per selezionare le colonie di *E. coli* contenenti il plasmide. Queste due Falcon vengono poste a incubare a 37°C a 220 rpm overnight.

Successivamente, sempre sotto cappa si aggiungono 500  $\mu$ l di ogni antibiotico alle due beute contenenti il terreno LB e poi, in ogni beuta, si versa il contenuto di una Falcon di pre-coltura e si lascia ad incubare per 2 ore a 37°C a 180 rpm, finché non si raggiunge la densità ottica ottimale ( $OD_{600}$ ) di 0.4 – 0.6, che viene misurata attraverso lo spettrofotometro. La densità ottica raddoppia ogni 30 minuti.

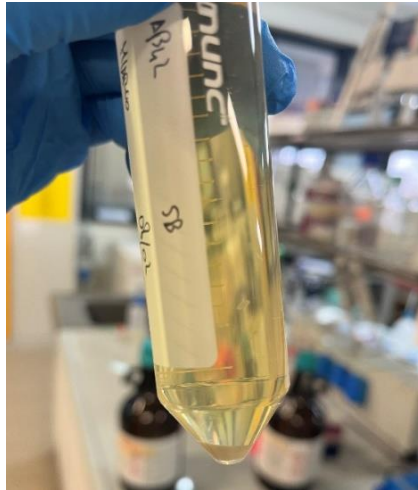
Raggiunto l'OD ottimale, si aggiungono 250  $\mu$ l di IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalattopiranoside) per indurre l'espressione del peptide e si lascia incubare a 20°C overnight. L'IPTG è importante per indurre l'espressione della proteina poiché reprime il repressore dell'operone *lac* nei batteri.



**Figura 7.** *Inoculo della pre-coltura nel terreno principale, induzione con IPTG e successiva raccolta delle cellule (Stephens et al., 2020)*

### ***2.1.2 Raccolta delle cellule***

Successivamente si versano le colture dentro le Falcon da 50 ml per raccogliere le cellule, centrifugandole a 4000 rpm a 4°C per 15 minuti. Poi si svuota il surnatante in una beuta per gli scarti.



**Figura 8.** Pellet depositato sul fondo della Falcon e surnatante limpido

Al termine della centrifugazione, il pellet viene lavato aggiungendo 15 ml di Tris-HCl 0,1 M a pH 8 e poi centrifugato a 4000 rpm per 15 minuti; dopo la seconda centrifugazione, si elimina il surnatante. Il pellet così ottenuto può essere congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

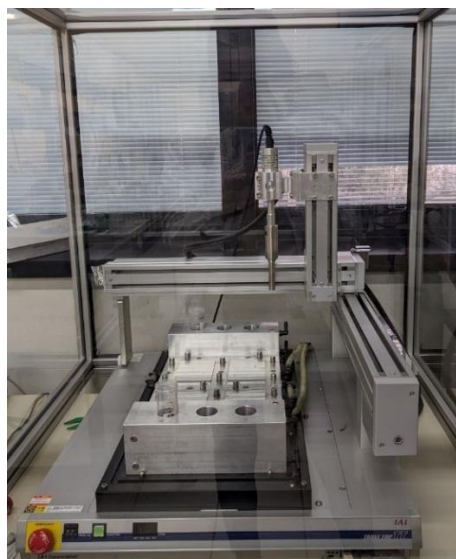


**Figura 9.** Pellet di cellule dopo lavaggio e rimozione del surnatante. Il pellet così ottenuto può essere congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$

### ***2.1.3 Purificazione e Dialisi***

Per quanto riguarda la purificazione, sono stati seguiti due protocolli diversi: nel primo si utilizza l'urea, nell'altro il cloruro di guanidinio (GuHCl). Entrambi prevedono l'utilizzo di un buffer di lisi (Buffer A) contenente Tris-HCl 10 mM a pH 9, EDTA 1 mM. Per tutto il protocollo di purificazione e successive analisi, la proteina viene mantenuta in ghiaccio o a 4 °C per ridurre l'aggregazione del peptide A $\beta$ 42.

Protocollo con urea: Dopo aver scongelato il pellet, si aggiungono 12 ml di Buffer di lisi e si effettua una sonicazione (3 volte in serie) per rompere le cellule. Ogni serie di sonicazione prevede un programma che comprende 30 s on e 30 s off ripetuto 5 volte.



**Figura 10.** *Sonicatore mantenuto in camera fredda*

Successivamente si effettua una ultracentrifugazione a 10.000 rpm per 15 minuti a 4°C. Poi si rimuove il surnatante. Tutto questo viene ripetuto tre volte. Dopo il primo step si può aggiungere la benzonasi (25 U/μL) per rimuovere l'eventuale DNA o RNA che può rimanere legato alla proteina.

Dopo il terzo step si ottengono i corpi d'inclusione all'interno dei quali è presente il peptide Aβ42. In questo step i corpi d'inclusione possono anche essere congelati a -80 °C.

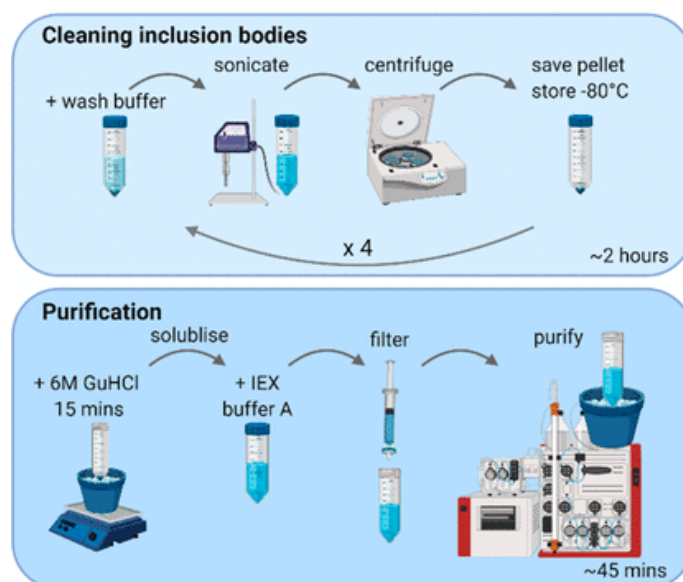
Dopo aver tolto il surnatante, si aggiungono al pellet 6 ml di un secondo buffer (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, urea 8 M) per rompere i corpi d'inclusione. Si effettua una sonicazione seguita da una centrifugazione e si preleva il surnatante nel quale è presente il peptide.

Protocollo cloruro di guanidinio: questo protocollo prevede 4 step di sonicazione seguita da centrifugazione. In ogni step vengono usati dei wash buffer diversi (descritti nella tabella 1) che vengono aggiunti al buffer di lisi (10 mM Tris 1 mM EDTA pH 9).

Wash 1	Wash 2	Wash 3	Wash 4
protease inhibitors	protease inhibitors		
1 M GuHCl	1 M GuHCl		
1% Triton X-100	1% Triton X-100	1% Triton X-100	No additives

**Tabella 1.** Sostanze aggiunte al buffer di lisi per il lavaggio dei corpi d'inclusione (Stephens et al., 2020)

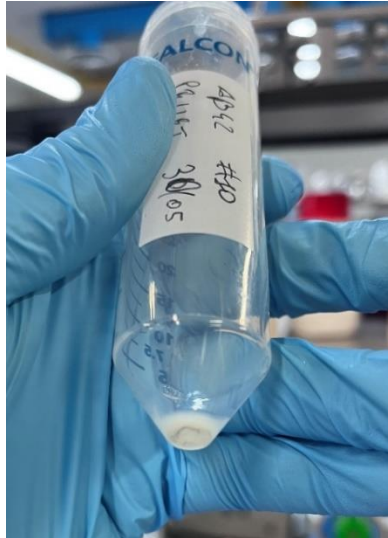
Gli inibitori di proteasi sono utilizzati per ridurre il taglio del peptide da parte di agenti proteolitici; il cloruro di guanidinio (1 M) aiuta a migliorare il lavaggio dei corpi d'inclusione eliminando le altre proteine; il Triton X-100 (1%) serve per rimuovere eventuali lipidi legati ai corpi d'inclusione. Anche in questo protocollo, dopo il primo step, si possono usare Benzonasi (25 U/ $\mu$ L) per rimuovere il DNA che può rimanere legato alla proteina.



**Figura 11.** Protocollo di purificazione con cloruro di guanidinio e separazione tramite cromatografia (Stephens et al., 2020)



Dopo il quarto step si ottengono i corpi d'inclusione (pellet di colore bianco) che possono esser congelati a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



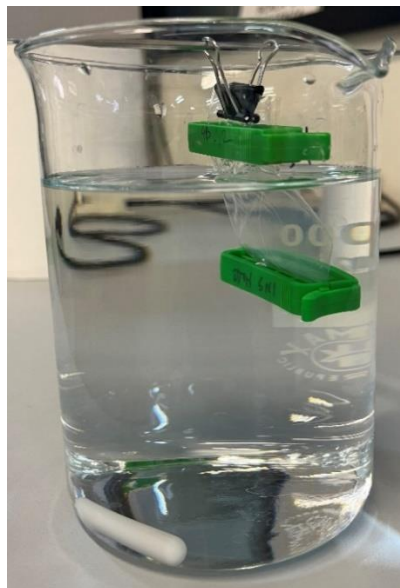
**Figura 12.** Pellet dei corpi d'inclusione di colore bianco

Per rompere i corpi d'inclusione si utilizza una soluzione di cloruro di guanidinio 6 M che viene lasciata in agitazione con ancoretta magnetica per 15 minuti. Successivamente si aggiunge il buffer A per diluire il cloruro di guanidinio. A questo punto si può passare alla dialisi oppure si può utilizzare la cromatografia a scambio ionico, sfruttando la capacità della proteina di rimanere legata ad una colonna carica positivamente.

Quest'ultimo protocollo risulta più efficiente, in quanto si isola al meglio il peptide. Inoltre, si preferisce l'utilizzo del cloruro di guanidinio al posto dell'urea, poiché questa col passare del tempo si converte in acido isocianico

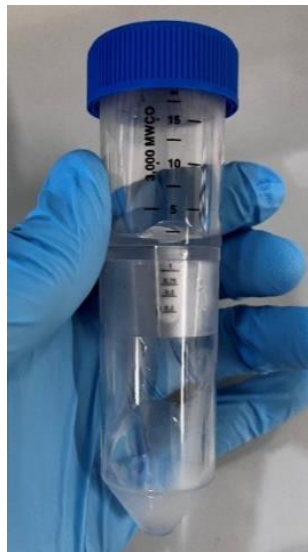
che provoca la carbamilazione dell'N-terminale del peptide con conseguente aggregazione. Perciò il peptide non può stare a contatto con l'urea per più di 12 ore, altrimenti viene favorita la sua aggregazione.

La dialisi è necessaria per eliminare l'agente denaturante aggiunto precedentemente che serviva per rompere i corpi di inclusione nei quali si trova la proteina da voler estrarre. Si utilizza una membrana semipermeabile con cut-off 3.5 kDa, in quanto la proteina è di 4.5 kDa. Vengono preparati 2 litri di buffer di dialisi in due Becker da 1 L, ognuno contenente Tris HCl 10 mM a pH 9 (100 ml), EDTA 1 mM (10 ml), H<sub>2</sub>O (890 ml); si inserisce il campione nella membrana che viene immersa nel Becker da 1 L e tenuto in frigo a 4°C, in agitazione overnight.



**Figura 13.** *Dialisi con membrana semipermeabile con cut-off di 3.5 kDa*

Il giorno dopo si sostituisce il buffer con uno nuovo per circa 2 ore e poi si preleva il campione da dentro la membrana attraverso una pipetta Pasteur. Infine, la proteina viene concentrata utilizzando dei concentratori (Amicon Ultra centrifugal filters) prima con cut-off di 50 kDa e poi quello da 3 kDa. Il concentratore viene lavato con acqua per assicurarsi che la membrana non sia rotta mediante centrifugazione a 3500 rpm per 15 minuti a 4°C, con membrana del concentratore possibilmente posizionata perpendicolarmente alla forza centrifuga. Dopo aver fatto questa verifica, si inserisce il campione con la proteina nel concentratore da 50 kDa nel quale la proteina scenderà sul fondo. Poi in quello da 3 kDa nel quale la proteina si troverà sopra la membrana poiché è più grande del cut-off.



**Figura 14.** *Concentratore con cut-off di 3 kDa*

Alla fine, la proteina, prelevata dalla membrana tramite una Pasteur, può essere conservata a 4 °C solo per pochi giorni, oppure a -80 °C per periodi più lunghi.

#### **2.1.4 Cromatografia a scambio ionico**

In alternativa alla dialisi, si può utilizzare la cromatografia liquida (FPLC, Fast Protein Liquid Chromatography) per separare e isolare al meglio il peptide A $\beta$ 42. Lo strumento utilizzato è chiamato ÄKTA Pure FPLC nel quale si utilizza una colonna a scambio anionico



**Figura 15.** ÄKTA Pure FPLC con colonna a scambio anionico tenuto a 4 °C

Dopo aver rotto i corpi d'inclusione, la soluzione viene filtrata con un filtro da 0.22  $\mu\text{m}$  per rimuovere eventuali residui di precipitato. L'intero sistema di cromatografia è mantenuto a 4 °C per ridurre l'aggregazione della proteina.

Prima di tutto, la colonna viene equilibrata con il Buffer A (10 mM Tris, 1 mM EDTA) a bassa forza ionica. Successivamente il campione in soluzione con il Buffer A viene caricato nella colonna ed eluito contro un gradiente lineare di Buffer B (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.75 M NaCl, pH 9) su sette volumi di colonna seguiti da due volumi di colonna al 100% di Buffer B. Durante l'eluizione, viene monitorata l'assorbanza a 280 nm ed il peptide dovrebbe eluire intorno al 40% di Buffer B.

### **2.1.5 Quantificazione della Proteina**

La proteina dializzata è stata quantificata per via spettrofotometrica attraverso lo strumento NanoDrop (DeNovix DS-11), leggendo l'assorbanza  $A$  a 280 nm che è proporzionale alla concentrazione  $c$  (in mg/ml), in base alla relazione  $A = \varepsilon cl/M_w$ , dove  $\varepsilon$  è il coefficiente di estinzione molare (1490  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ),  $M_w$  è il peso molecolare (4514 Da) e  $l$  è il cammino ottico dello strumento.

Lo strumento rileva anche l'assorbanza a 260 nm relativa alla presenza di acidi nucleici eventualmente presenti, quindi, si tiene conto del rapporto A260/A280 per determinare la purezza. Per ridurre il più possibile questo rapporto e ottenere una buona purezza, occorre utilizzare la Benzoni durante gli step di purificazione.



**Figura 16.** *Nanodrop (DeNovix DS-11) utilizzato per quantificare la proteina attraverso metodi spettrofotometrici*

### **2.1.6 Elettroforesi su gel (SDS-PAGE)**

Per poter verificare l'effettiva presenza del peptide, il campione viene fatto migrare su un gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). Sono state provate diverse concentrazioni e, per un peptide così piccolo, si è

verificato che la migliore concentrazione del gel di poliacrilammide è 17%. In tabella 2 sono riportati i componenti per il gel.

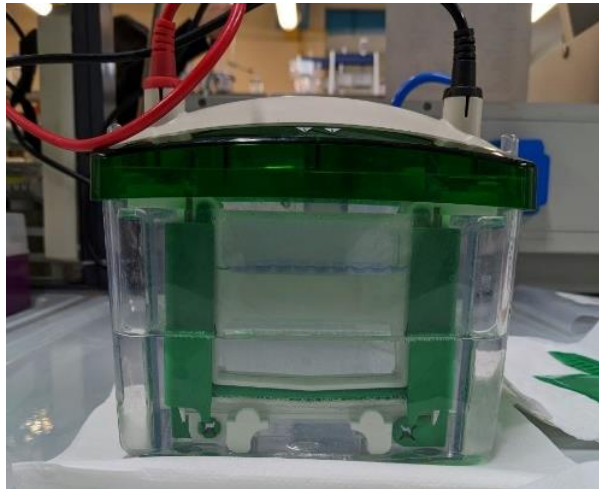
	RUNNING GEL 17%	STACKING GEL 4%
ACQUA	671 $\mu$ l	1.5 ml
ACRILAMMIDE 30%	2.27 ml	350 $\mu$ l
TRIS-HCl 1.5M pH 8.8	1 ml	/
TRIS-HCl 0.5M pH 6.8	/	625 $\mu$ l
SDS 10%	40 $\mu$ l	25 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
APS 10%	20 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Volume totale	4 ml	2.5 ml

**Tabella 2.** Componenti del gel di poliacrilammide al 17%

Una volta ottenuto il gel, dopo circa un'ora, questo viene caricato sull'apposito supporto e si inserisce il pettine sulla sommità per creare i pozzetti dove verranno caricati i campioni. In particolare, il campione si prepara con 10  $\mu$ l di proteina dializzata e 10  $\mu$ l di Sample Buffer e lo si mette per 5 minuti nel bagnetto termico a 98°C. Successivamente, si prepara la

camera elettroforetica aggiungendo il TGS 1X, ossia il buffer di corsa per l'elettroforesi.

In seguito, si caricano i campioni nei pozzetti (10  $\mu$ l) e il Ladder (VWR Protein Marker IV peqGOLD), ossia una serie di proteine a peso molecolare noto che funge da marker per individuare la proteina di interesse. Inizialmente i campioni vengono fatti correre a 90 V finché non si raggiunge la fine dello stacking, per poi aumentare a 120 V.



**Figura 17.** Corsa elettroforetica dei campioni in TGS 1X

Una volta conclusa la corsa elettroforetica, il gel viene colorato con *Coomassie Blue* sotto cappa chimica, per ottenere le bande colorate, e infine viene decolorato per poter essere osservato attraverso lo strumento di acquisizione immagini Biorad ChemiDoc.

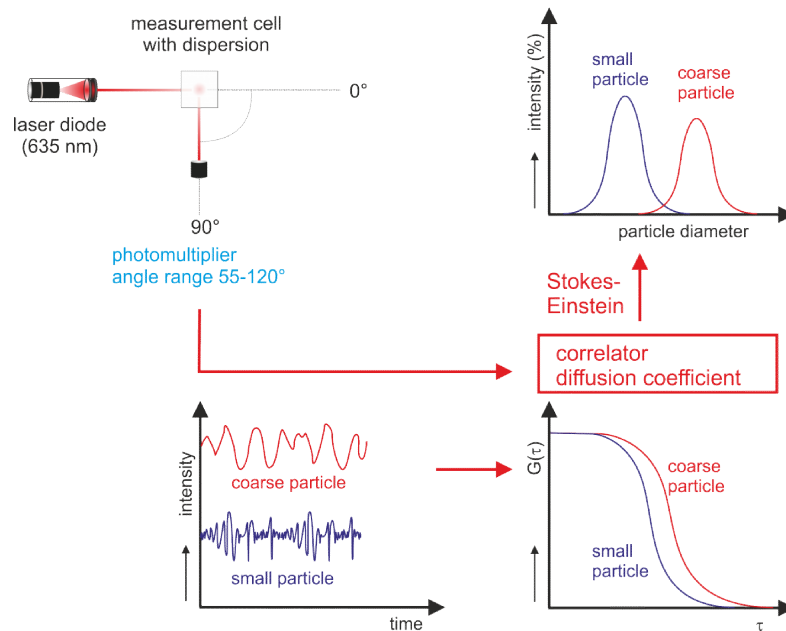


## ***2.2 Dynamic Light Scattering (DLS)***

### ***2.2.1 Introduzione al DLS***

I campioni ottenuti sono stati analizzati attraverso il Dynamic Light Scattering, una tecnica che sfrutta la diffusione dinamica della luce per determinare le dimensioni di particelle in soluzione. Il range ottimale di questa tecnica va da particelle di pochi nanometri di dimensione fino all'ordine dei micrometri.

Il campione viene colpito da un laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) e lo strumento rileva le variazioni dell'intensità della luce diffusa in funzione del tempo. Queste fluttuazioni di intensità nel tempo sono dovute al moto browniano delle particelle. Perciò, a parità di intensità della luce incidente, particelle più piccole muovendosi più rapidamente, creano fluttuazioni più rapide di scattering; particelle più grandi invece, creano variazioni di scattering più lente.



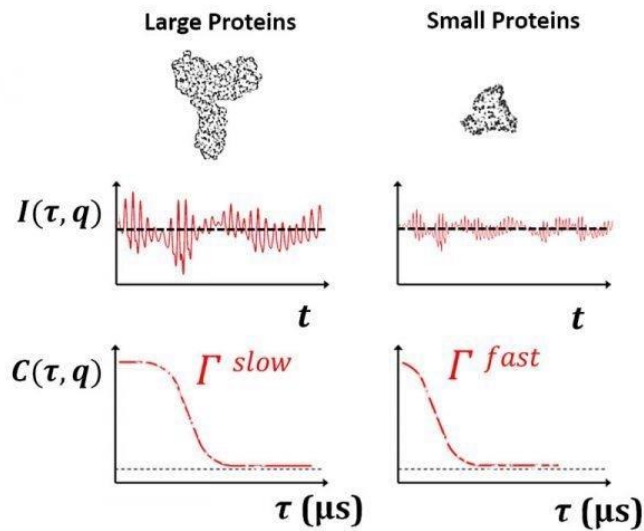
**Figura 18.** Principio di misura DLS (fonte Norlab)

L'intensità della luce diffusa dalle particelle è definita dalla seguente funzione

$$I = I_0 \left( \frac{1 + \cos^2(\theta)}{2R^2} \right) \left( \frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \left( \frac{d}{2} \right)^6$$

in cui:  $\theta$  è l'angolo di scattering con il quale viene diffusa la luce;  $I_0$  è l'intensità della luce incidente;  $R$  è la distanza campione rivelatore;  $d$  è il diametro della particella;  $n$  è l'indice di rifrazione della particella.

Dallo strumento si ricava una funzione di correlazione dell'intensità della luce diffusa ( $I$ ) in funzione del tempo.



**Figura 19.** Fluttuazioni di intensità della luce diffusa: le particelle più piccole diffondono la luce più rapidamente, perciò il tempo di decadimento ( $\tau$ ) sarà minore; mentre quelle più grandi più lentamente, perciò il tempo di decadimento sarà maggiore. Il modulo del vettore di scattering è una funzione dell'angolo di scattering:  $q = (4\pi/\lambda)n_0 \sin(\theta/2)$ , dove  $n_0$  è l'indice di rifrazione del mezzo; il fattore  $\Gamma$  è definito dall'espressione  $\Gamma = q^2 D$

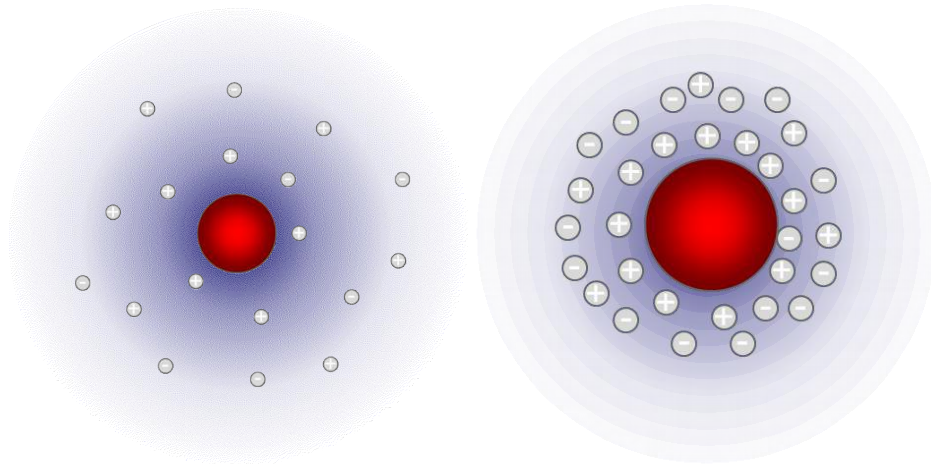
Attraverso l'analisi della funzione di correlazione dell'intensità di scattering (denominata correlogramma),  $g_2(\tau) = \frac{\langle I(t+\tau)I(t) \rangle}{\langle I(t)^2 \rangle}$ , si può ricavare il coefficiente di diffusione delle particelle da cui mediante l'equazione di Stokes-Einstein si può derivare il diametro idrodinamico delle particelle  $d_H$

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

$$g_2(\tau) - 1 = e^{-2Dq^2\tau}$$

dove  $k_B$  è la costante di Boltzmann;  $T$  è la temperatura alla quale viene svolto l'esperimento;  $\eta$  è la viscosità del solvente;  $D$  è il coefficiente di diffusione traslazionale delle particelle che determina la velocità del loro moto browniano.

Il diametro idrodinamico consiste nel diametro di una sfera che diffonde la luce alla stessa velocità delle particelle esaminate. Esso risulta un po' più grande della dimensione media delle particelle e soprattutto dipende fortemente da diversi fattori come la forza ionica, la struttura e la forma della superficie. Per esempio, particelle in una soluzione a bassa forza ionica saranno circondate da una più ampia superficie di cariche elettriche, conferendo così un diametro idrodinamico apparentemente maggiore; viceversa, particelle in una soluzione ad alta forza ionica, si presenteranno più piccole perché circondate da una superficie più compatta di cariche elettriche.



**Figura 20.** Particella a bassa forza ionica occupa una superficie maggiore (a sinistra); Particella ad alta forza ionica occupa una superficie minore (a destra) (Malvern Panalytical, 2019)

Nel caso in cui le dimensioni delle particelle siano distribuite su  $n$  distinti valori (campione polidisperso), la funzione di autocorrelazione è determinata dalla somma del contributo dei decadimenti esponenziali delle singole particelle,

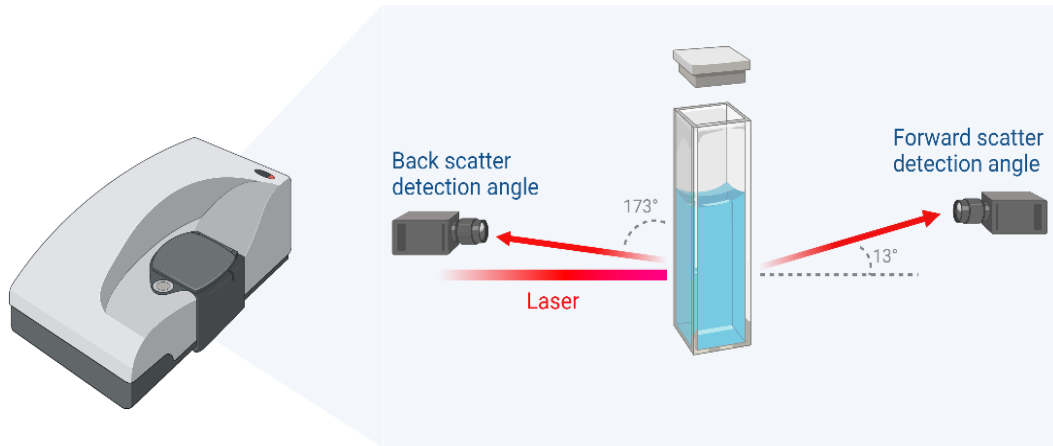
$$g_2(\tau) - 1 = \sum_{i=1}^n w_i e^{-2D_i q^2 \tau}$$

dove  $w_i$  è il peso relativo della  $i$ -esima particella ( $\sum_{i=1}^n w_i = 1$ ). Se le dimensioni delle particelle sono distribuite in modo continuo, la funzione di autocorrelazione può essere analizzata mediante una elaborata procedura basata sul metodo dei cumulanti. Come risultato è possibile ottenere la funzione di distribuzione delle dimensioni,  $p(d_H)$  (*size distribution function*),

che descrive la probabilità di trovare nel campione particelle aventi diametro idrodinamico  $d_H$ . Da questa funzione è possibile ricavare il valore medio del diametro idrodinamico ( $\langle d_H \rangle$ ) e l'indice di polidispersità (polydispersion index, PDI). È possibile convertire la funzione di distribuzione  $p(d_H)$  (basata sull'intensità della luce diffusa) in una funzione di distribuzione del volume delle particelle (*size distribution by volume*) o del loro numero (*size distribution by number*) dividendo, rispettivamente, per  $d_H^3$  o per  $d_H^6$ .

### ***2.2.2 Zetasizer pro***

In questo progetto di tesi i campioni ottenuti con i due diversi protocolli di purificazione sono stati analizzati con lo strumento Zetasizer pro (Malvern Panalytical). Lo strumento utilizza un laser He-Ne con  $\lambda = 633 \text{ nm}$  che colpisce il campione all'interno della cuvetta e può rilevare la luce diffusa attraverso un fotorilevatore sia a  $173^\circ$  (back scattering), sia a  $13^\circ$  (forward scattering) rispetto alla direzione di propagazione del raggio incidente.



**Figura 21.** Schema del funzionamento di una misura al DLS

In questa tesi, si è osservato come cambia l'aggregazione del peptide in funzione della temperatura: da  $20^\circ\text{C}$  a  $70^\circ\text{C}$ . Entrambi i campioni sono stati prima filtrati tramite un filtro da  $0.22\ \mu\text{m}$ . In seguito è stata pulita la cuvetta di quarzo (ZEN2112). Per assicurarsi che non ci siano residui all'interno è stato misurato il segnale dell'acqua microfiltrata.



**Figura 22.** Cuvetta di quarzo ZEN2112 (Malvern)

Successivamente, sono stati inseriti 80  $\mu\text{l}$  di campione nella cuvetta e sono stati analizzati attraverso uno scan di temperatura effettuata dallo strumento.



**Figura 23.** *Dynamic Light Scattering Zetasizer pro (Malvern Panalytical)*



### ***2.3 Depsi-A $\beta$ (1-42)***

Per poter studiare il peptide in forma monomerica, è stato utilizzato il depsipeptide della A $\beta$ 42. Questa molecola ha una struttura identica del peptide A $\beta$ 42, ma un legame ammidico è stato isomerizzato in un legame estere tra i residui Gly-25 e Ser-26. In questo modo la molecola è stabile a bassi valori di pH e non permette l'aggregazione del peptide. Subito prima della misurazione, il pH viene portato a valori superiori a 7.4, una condizione che promuove la idrolisi del legame estereo, portando il peptide nella sua forma monomerica nativa.

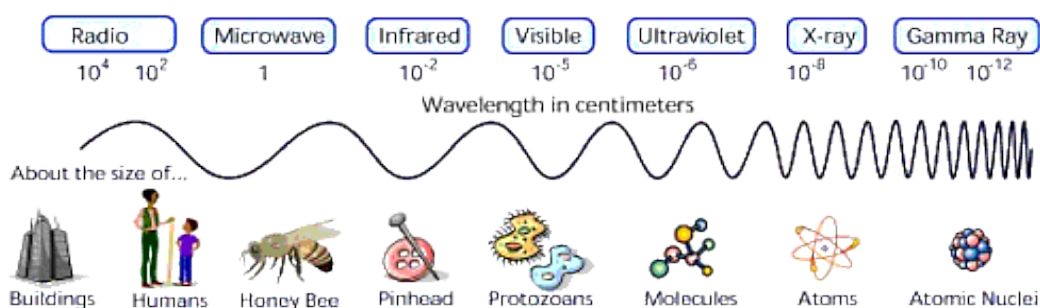
Il depsipeptide è stato acquistato presso l'azienda GenScript Biotech Corporation. Essendo venduto in forma liofilizzata, il campione è stato disciolto in acido trifluoroacetico 0.02% (TFA, pH <3). Il depsipeptide così può essere conservato per 2 giorni a 4°C, altrimenti a -80°C per più giorni.

Prima delle misure SAXS e IR, sono stati aggiunti 3  $\mu$ L di una soluzione 0.5 M di NaOH e idrossido d'ammonio in un rapporto 1:3 (pH ~10.5) per ottenere la forma nativa del peptide.

## 2.4 Diffusione a piccolo angolo dei raggi X (SAXS)

### 2.4.1 Introduzione ai raggi X

I raggi X sono onde elettromagnetiche con lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) compresa tra 0.1 e 100 Å. Proprio perché sono dell'ordine degli Ångstrom possono essere utilizzati per determinare la struttura atomica della materia.



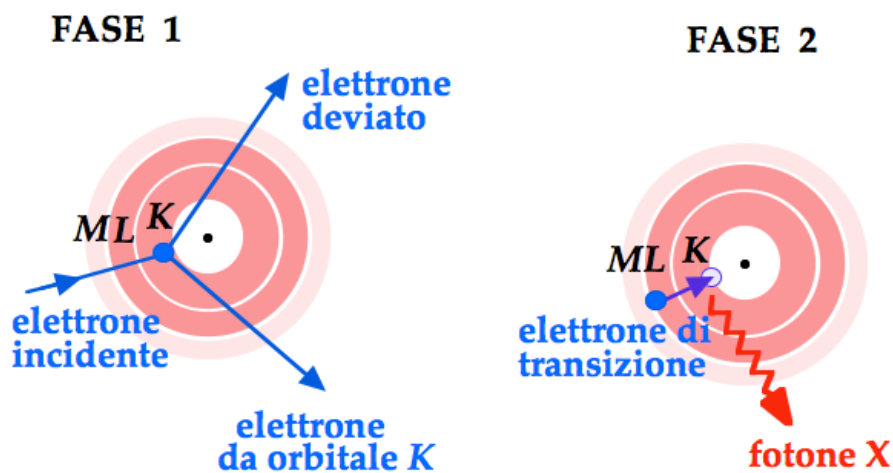
**Figura 24.** Spettro della radiazione elettromagnetica dalle microonde ai raggi  $\gamma$  (fonte NASA's *Imagine the Universe*)

Negli strumenti di laboratorio, i raggi X vengono generati bombardando una targhetta di metallo di Cu o Mo con degli elettroni accelerati da un intenso campo elettrico. Questi urtano contro gli elettroni dei gusci più interni dell'atomo, causando una loro espulsione e creando una vacanza (instabilità). Questo effetto provoca un fenomeno di transizione di un elettrone dallo strato più esterno (L o M) a quello più interno (K), con conseguente rilascio di un fotone, associato alla radiazione elettromagnetica, con energia pari a  $E = h\nu = hc/\lambda$ , dove  $h$  è la costante di Planck,  $c$  è la

velocità della luce nel vuoto e  $\nu$  è la frequenza della radiazione. La lunghezza d'onda ( $\lambda_K$ ) di questa radiazione X dipenderà dalla differenza di energia tra i gusci che partecipano alla transizione:

$$\lambda_K = \frac{hc}{E_L - E_K}$$

$$\lambda_K = \frac{hc}{E_M - E_K}$$



**Figura 25.** Emissione di una radiazione X per fenomeno di transizione di un elettrone da un guscio elettronico più esterno (M o L) ad un guscio più interno (K) (Scannicchio, 2007)

#### 2.4.2 La tecnica SAXS

La diffusione di raggi X a piccolo angolo (Small Angle X-ray Scattering, SAXS) è una tecnica analitica non distruttiva che permette di ricavare informazioni riguardanti la forma e la dimensione di particelle in soluzione. Tra le tecniche

di scattering (cristallografia e diffrazione a raggi X), la tecnica SAXS, pur essendo quella a più bassa risoluzione, ha il vantaggio di poter determinare la struttura delle proteine direttamente in soluzione senza doverle cristallizzare. In questo modo si possono ottenere informazioni strutturali di proteine che non risultano alterate da questo processo e soprattutto informazioni di proteine non cristallizzabili (come le proteine di membrana).

Con la tecnica SAXS è possibile:

- Determinare il folding di una proteina in soluzione o la sua struttura quaternaria;
- Identificare le variazioni conformazionali di un enzima dovute alle interazioni con il substrato;
- Ottenere informazioni sulla struttura dell'acqua intorno alla superficie della proteina;
- Validare i modelli di strutture derivanti da tecniche bioinformatiche.

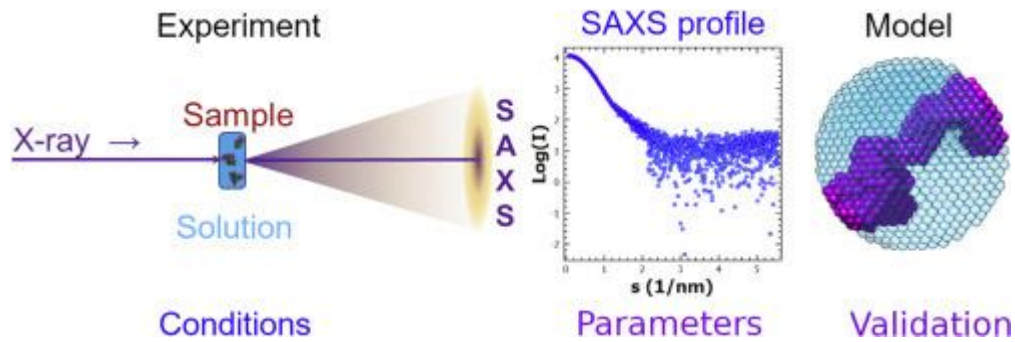


Figura 26. Esempio di esperimento SAXS (Da Vela e Svergun, 2020)

### 2.4.3 Il principio dello scattering

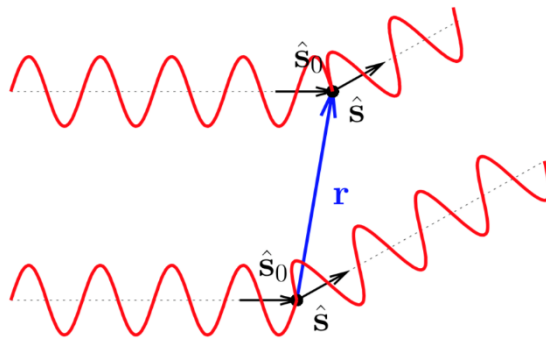
Quando il fascio di raggi X incontra la nube elettronica di un atomo, si genera un “urto” definito elastico poiché si conserva l’energia cinetica delle particelle e dei fotoni incidenti. Perciò gli elettroni cominciano ad oscillare producendo onde elettromagnetiche con frequenza pari a quella del raggio X incidente.

Considerando due elettroni che vengono investiti da un fascio di raggi X, posti alla distanza  $r$  molto piccola tra loro tale che le due direzioni di propagazione dei raggi incidenti siano considerate parallele (stesso versore  $\hat{s}_0$ ); considerando inoltre che la distanza  $r$  sia molto più piccola della distanza tra elettroni e il rivelatore tale che i raggi diffusi possano considerarsi paralleli (stesso versore  $\hat{s}$ ); si definisce il vettore di scattering  $\mathbf{q}$  come la

quantità di moto trasferita dal raggio incidente al campione ed espressa dalla seguente equazione:

$$\mathbf{q} \equiv \frac{2\pi}{\lambda} (\hat{\mathbf{s}} - \hat{\mathbf{s}}_0)$$

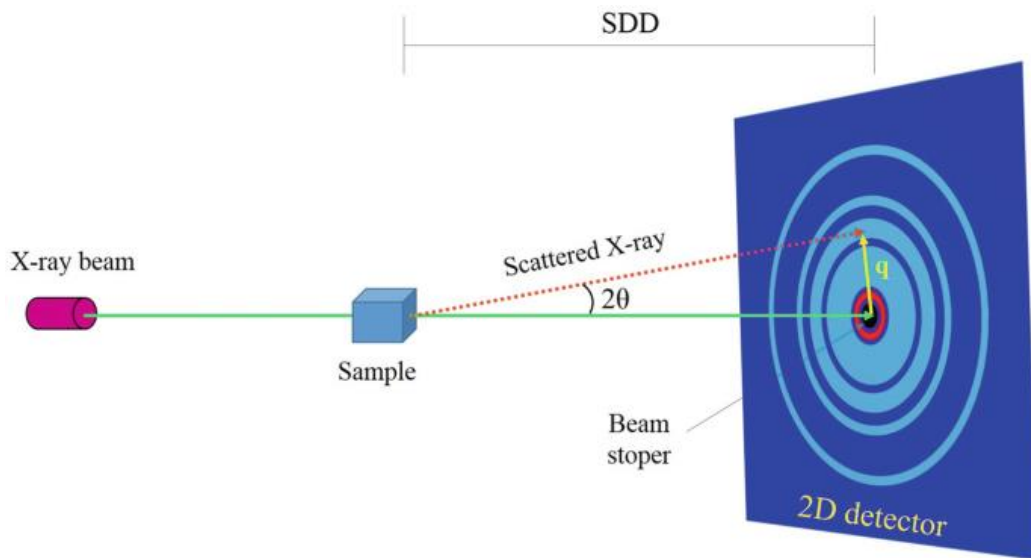
in cui  $(\hat{\mathbf{s}} - \hat{\mathbf{s}}_0)$  è la differenza di cammino tra l'onda diffusa e l'onda incidente;  $\lambda$  è la lunghezza d'onda che è la stessa sia per l'onda incidente che quella diffusa;  $\theta$  l'angolo di diffrazione.



**Figura 27.** Fenomeno di scattering di due elettroni

Quindi il vettore  $\mathbf{q}$  dipende da tutti i parametri che possiamo modificare durante l'esperimento. Il modulo di  $\mathbf{q}$  risulta

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta$$



**Figura 28.** Raggio X diffuso con un piccolo angolo  $2\theta$  che raggiunge il detector (Londoño et al., 2018).

Il segnale che si ottiene da una misura SAXS è denominato sezione d'urto macroscopica differenziale, indicato con  $d\Sigma/d\Omega(\mathbf{q})$ . Essa è il rapporto tra l'energia che viene diffusa per unità di tempo e per unità di volume di campione e l'energia del raggio incidente per unità di tempo e di superficie ed è espressa dalla seguente legge:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(\mathbf{q}) = \frac{1}{V} r_0^2 \left\langle \left| \int_V d^3\mathbf{r} \rho(\mathbf{r}) e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} \right|^2 \right\rangle$$

dove  $V$  è il volume del campione investito dal fascio X;  $r_0$  è il raggio classico dell'elettrone ( $r_0 = 0.28 \cdot 10^{-12}$  cm),  $\mathbf{r}$  è il vettore posizione,  $\rho(\mathbf{r})$  è la densità elettronica del campione irraggiato in  $\mathbf{r}$  e  $\mathbf{q}$  è il vettore di scattering. Si può

notare che la grandezza  $d\Sigma/d\Omega(\mathbf{q})$ , la quale ha dimensioni del reciproco di una lunghezza (tipicamente si misura in  $\text{cm}^{-1}$ ), corrisponde al modulo quadrato della trasformata di Fourier della densità elettronica del campione.

#### ***2.4.4 Sistemi di particelle omogenee in soluzione***

Nell'ipotesi che il campione sia una dispersione diluita di particelle identiche, orientate casualmente e aventi al loro interno una densità elettronica costante e diversa da quella del solvente, la sezione d'urto macroscopica differenziale dipende soltanto dal modulo del vettore di scattering,  $q$ , e si può esprimere nella forma:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = n_p r_0^2 (\Delta\rho)^2 V_P^2 P(q)$$

dove:  $n_p$  è la concentrazione del campione;  $\Delta\rho$  rappresenta il contrasto, ovvero la differenza tra la densità elettronica della particella e quella del solvente;  $V_P$  rappresenta il volume della particella;  $P(q)$  è il fattore di forma, ovvero il quadrato della trasformata di Fourier calcolata nel volume della singola particella,

$$F(\mathbf{q}) = \frac{1}{V_P} \int_{V_P} d^3\mathbf{r} e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}$$



mediato su tutte le possibili orientazioni (espresse dagli angoli polari  $\alpha_q$  e  $\beta_q$ ) del vettore  $\mathbf{q}$ :

$$P(q) = \langle F^2(\mathbf{q}) \rangle_{\alpha_q, \beta_q}$$

#### **2.4.5 Legge di Guinier**

Per piccoli valori di  $q$ , il fattore di forma può essere approssimato dalla legge di Guinier,

$$P(q) \approx e^{-q^2 R_g^2 / 3}$$

dove  $R_g$  è il raggio di girazione della particella, un parametro che esprime la sua dimensione media, essendo definito dall'espressione

$$R_g^2 = \frac{1}{V_P} \int_{V_P} d^3\mathbf{r} r^2$$

#### **2.4.6 Particelle sferiche**

Il modello più semplice per descrivere, a bassa risoluzione, la forma delle particelle è quello di una sfera omogenea. Il fattore di forma di una sfera di raggio  $R$  è dato dall'equazione analitica

$$P(q) = [\Phi(qR)]^2 = \left[ 3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right]^2$$

Nel caso di un sistema costituito da particelle sferiche omogenee con raggi distribuiti su un insieme continuo di valori, si ha

$$P(q) = \frac{\int_0^\infty dR R^6 p(R) [\Phi(qR)]^2}{\int_0^\infty dR R^6 p(R)}$$

dove  $p(R)$  è la funzione di distribuzione dei raggi ( $\int_0^\infty dR p(R) = 1$ ). Si noti che il volume medio delle particelle è dato dall'espressione  $\overline{V_p} = \frac{4}{3} \pi \int_0^\infty dR R^3 p(R)$ , un'equazione utile per calcolare il numero medio di particelle per unità di volume,  $\overline{n_p}$ , qualora si conosca la frazione volumica  $\eta$  delle particelle,  $\overline{n_p} = \eta / \overline{V_p}$ . È anche utile esprimere la media del quadrato del volume delle particelle in base alla  $p(R)$ ,  $\overline{V_p^2} = \left(\frac{4}{3} \pi\right)^2 \int_0^\infty dR R^6 p(R)$ . Si noti, infatti che i due fattori  $\overline{n_p}$  e  $\overline{V_p^2}$  devono essere calcolati per esprimere  $\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q)$  di particelle polidisperse. Le tre funzioni  $p(R)$ ,  $R^3 p(R)$  e  $R^6 p(R)$  sono denominate funzione di distribuzione numerale (*size distribution by number*), funzione di distribuzione volumica (*size distribution by volume*) e funzione di distribuzione di intensità (*size distribution by intensity*), rispettivamente.

Nel caso di raggi distribuiti su più decadi (ampia polidispersità), una procedura standard è descrivere  $p(R)$  come combinazione lineare di  $n_B$  funzioni *spline* B cubiche, definite in una griglia logaritmica,

$$p(R) = \frac{n_B + 3}{R_M - R_m} \sum_{i=1}^{n_B} c_i B_{3,i}(\log R)$$

dove  $B_{3,i}(x)$  è l' $i$ -esima di  $n_B$  funzioni a campana definite in una griglia di  $n_B + 3$  nodi equamente distribuiti nell'intervallo  $[\log R_m, \log R_M]$  e  $c_i \geq 0$  (con condizione di normalizzazione  $\sum_{i=1}^{n_B} c_i = 1$ ) è il corrispondente coefficiente peso della  $i$ -esima funzione a campana.

#### 2.4.7 Particelle cilindriche

Nel caso di particelle omogenee di forma cilindrica, una semplice geometria che può essere usata per approssimare strutture fibrillari formate da proteine amiloidi è il cilindro, il cui fattore di forma risulta

$$P(q) = \int_0^{\frac{\pi}{2}} d\beta \sin \beta \frac{\sin^2\left(\frac{1}{2}qL \cos \beta\right)}{\left(\frac{1}{2}qL \cos \beta\right)^2} \frac{4J_1^2(qR_c \sin \beta)}{(qR_c \sin \beta)^2}$$

dove  $R_c$  è il raggio del cilindro,  $L$  la sua lunghezza,  $J_1(x)$  è la funzione di Bessel di primo ordine e  $\beta$  è l'angolo formato tra il vettore  $\mathbf{q}$  e l'asse del cilindro. Per cilindri molto allungati ( $L \gg R_c$ ) e quando e per valori di  $q$  tali che  $qL \gg 1$ , il fattore di forma si può approssimare con la relazione

$$P(q) = \frac{4J_1^2(qR_c)}{(qR_c)^2}$$

e pertanto non dipende da  $L$ . Se il raggio del cilindro è distribuito su più valori, distribuiti sulla base di una funzione di distribuzione  $p(R_c)$ , si ha

$$P(q) = \int_0^{\infty} dR_c p(R_c) \frac{4J_1^2(qR_c)}{(qR_c)^2}$$

Si fa notare che la funzione di distribuzione dev'essere normalizzata, sulla base della condizione

$$\int_0^{\infty} dR_c p(R_c) = 1$$

Tra i modelli che si possono adottare per descrivere la  $p(R_c)$ , uno dei più semplici è la funzione log-normale, la quale, rispetto alla distribuzione Gaussiana, ha il vantaggio di essere definita soltanto per una variabile positiva, come dev'essere il raggio del cilindro. L'espressione della funzione log-normale è la seguente,

$$p(R_c) = \frac{1}{R_c [2\pi \log(1 + \xi_{R_c}^2)]^{1/2}} \exp \left\{ -\frac{\log^2 [(R_c/R_{c,0})(1 + \xi_{R_c}^2)^{1/2}]}{2 \log(1 + \xi_{R_c}^2)} \right\}$$

I due parametri che caratterizzano tale funzione sono il valor medio  $R_{c,0}$  definito da

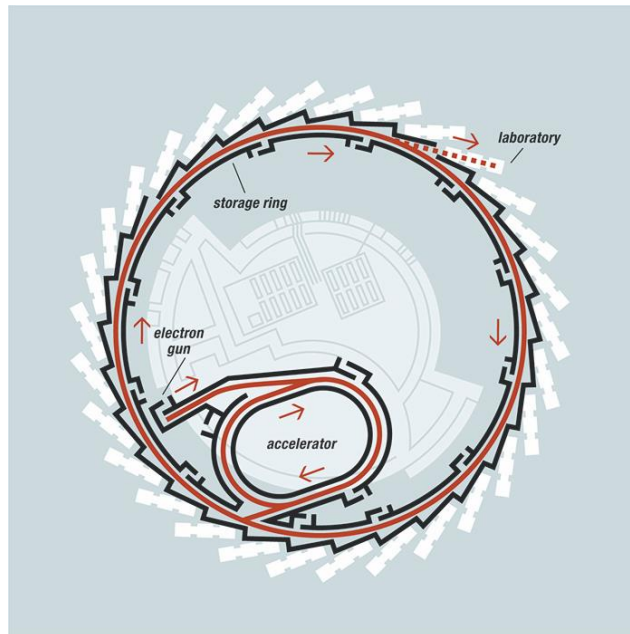
$$R_{c,0} = \int_0^{\infty} dR_c R_c p(R_c)$$

e la dispersione  $\xi_{R_c}$ , definita dall'equazione

$$\xi_{R_c}^2 = \frac{1}{R_{c,0}^2} \int_0^{\infty} dR_c (R_c - R_{c,0})^2 p(R_c)$$

#### ***2.4.8 La luce di sincrotrone***

Per generare il fascio molto intenso di raggi X, necessario per studiare con la tecnica SAXS soluzioni diluite di proteine, si usa un sincrotrone, ovvero una struttura ad anello dentro la quale vengono accelerati elettroni che raggiungono velocità prossime a quella della luce. Questi elettroni vengono deviati attraverso dei magneti e questa deviazione porta ad una perdita di energia che viene rilasciata sotto forma di luce a diverse lunghezze d'onda, tra cui i raggi X.



**Figura 29.** *Struttura di un sincrotrone*

Questi raggi passano attraverso un monocromatore per selezionare la lunghezza d'onda d'interesse, poi attraverso un collimatore dirigendo il raggio contro il campione con una determinata direzione  $\hat{s}_0$ .

Le misure di scattering di raggi X a piccolo angolo sono state effettuate presso la beamline ID02 dell'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) di Grenoble (Francia).



**Figura 30.** Immagine dall'alto del sincrotrone ESRF di Grenoble (ESRF/D. Morel)

#### ***2.4.9 Preparazione dei campioni***

Con questa tecnica, sono stati analizzati i campioni del peptide ottenuto per via ricombinante con entrambi i protocolli. Quello purificato con urea aveva concentrazione 2,5 mg/ml, mentre quello in cloruro di guanidinio aveva concentrazione 4 mg/ml.

Inoltre, è stato misurato il campione di depsipeptide alla concentrazione di 2 mg/ml in TFA (0.02%). È stata eseguita una misura del depsipeptide senza cambio di pH. Successivamente sono stati aggiunti 3  $\mu$ l di soluzione di NaOH e idrossido d'ammonio (0.5 M) e messa in agitazione, per ottenere il peptide in forma monomerica ed è stata seguita la sua cinetica per 30 minuti, effettuando la misurazione ogni 30 secondi.

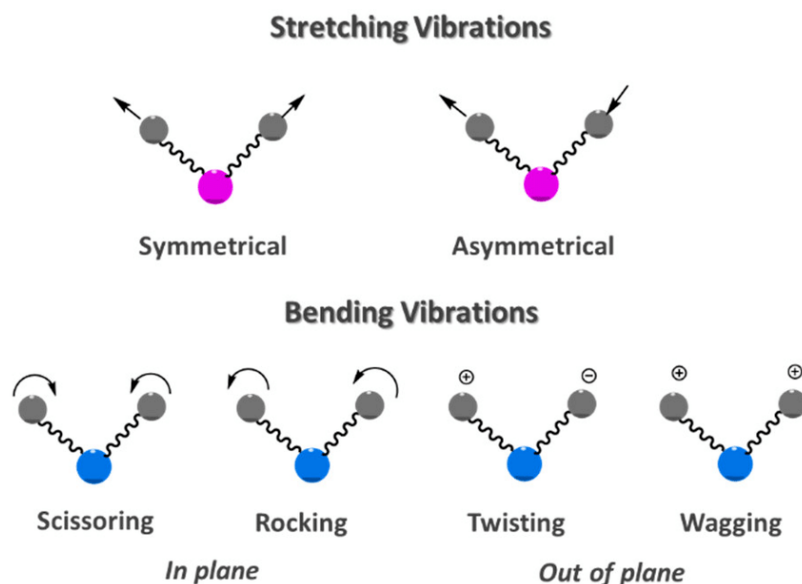
## ***2.5 Spettroscopia IR a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR)***

### ***2.5.1 La spettroscopia infrarossa***

La spettroscopia infrarossa (IR) è una tecnica spettroscopica di assorbimento comunemente utilizzata in chimica analitica ed in chimica fisica per studiare i legami chimici e per la caratterizzazione dei materiali.

Quando una molecola assorbe una radiazione IR, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. Adottando il modello dell'oscillatore armonico, si può considerare il legame chimico come una molla che permette agli atomi di vibrare intorno alla loro posizione di equilibrio. In base alle frequenze di vibrazione tipiche dei legami, si possono individuare i gruppi funzionali presenti in una molecola. I fenomeni di vibrazione possono essere di due tipi: *stretching*, ovvero uno stiramento del legame chimico, e *bending*, ovvero una deformazione dell'angolo di legame; entrambi possono essere di tipo simmetrico o asimmetrico (Figura 31).





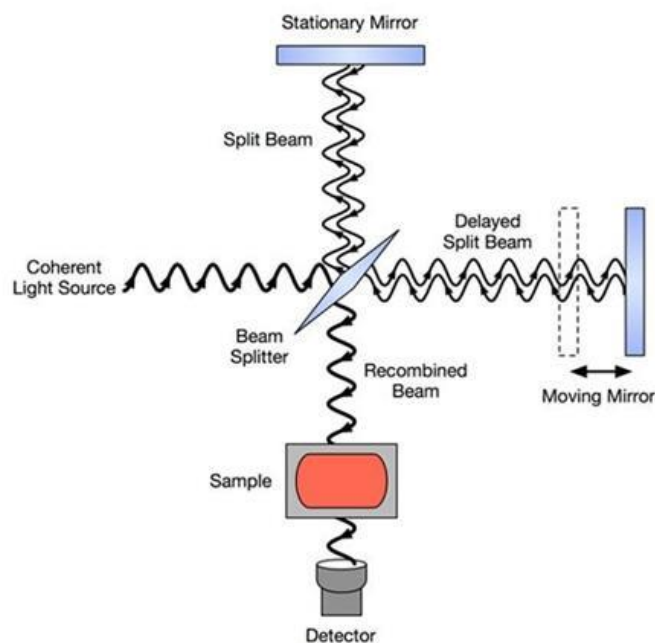
**Figura 31.** *Vibrazioni di stretching e di bending molecolare (Mendes e Duarte, 2021)*

I gruppi funzionali vibrano in una zona dello spettro elettromagnetico i cui numeri d'onda,  $\bar{\nu} = 1/\lambda$ , sono compresi tra 4000 e 200  $\text{cm}^{-1}$ , in quella regione dell'infrarosso chiamata MID IR (o MIR).

Gli spettrofotometri possono essere di tipo dispersivo, ovvero effettuano una scansione delle lunghezze d'onda nel tempo; oppure possono essere a Trasformata di Fourier (FTIR) in cui il segnale acquisito in funzione del tempo viene trasformato in un segnale in funzione di tutte le frequenze di vibrazione, ottenendo così uno spettro di assorbimento infrarosso. Quest'ultimo presenta dei vantaggi tra cui maggior risoluzione e tempi di

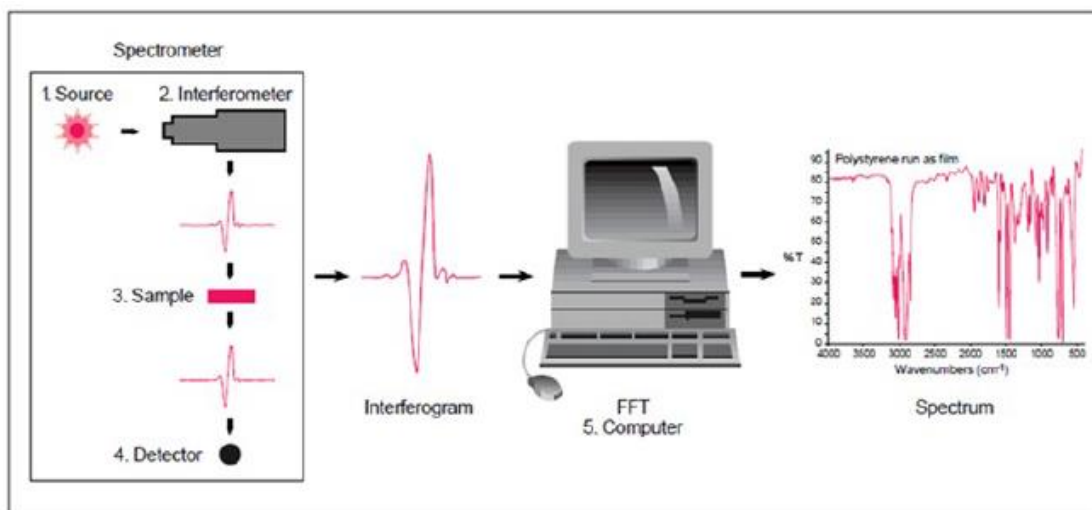
analisi ridotti poiché tutte le lunghezze d'onda sono rilevate contemporaneamente.

La spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIR) sfrutta l'interferometro di Michelson, ovvero un sistema di specchi costituito da uno specchio fisso, uno specchio mobile ed uno specchio semiriflettente che divide la luce in due fasci di uguale intensità. I due raggi di luce, dopo aver compiuto un percorso diverso, vengono riflessi di nuovo verso lo specchio semiriflettente che li indirizza facendoli ricongiungere verso il campione e poi verso uno schermo fisso dove possono dare fenomeni di interferenza (Figura 31).



**Figura 32.** *Rappresentazione di un interferometro di Michelson*

L'insieme delle interferenze costruttive e distruttive dà origine ad un interferogramma che viene poi convertito in uno spettro IR da un computer tramite l'uso della Trasformata di Fourier.



**Figura 33.** Principi base della spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (Br, 2018)

Lo spettro IR ha sull'ascissa la frequenza espressa in numero d'onda ( $\bar{\nu}$ ) e sull'ordinata la percentuale di trasmittanza (T). La posizione di ogni picco indica la frequenza alla quale avviene l'assorbimento di energia. Nella regione dei gruppi funzionali, compresa tra 1350 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , possiamo trovare dei picchi che possiamo identificare con esattezza e che si possono associare ad un determinato tipo di legame. La regione detta *fingerprint* compresa tra 600 e 1350  $\text{cm}^{-1}$ , contiene dei picchi che sono specifici per ogni

molecola. Per cui confrontando uno spettro IR di una molecola sconosciuta con uno spettro già noto, possiamo risalire alla molecola sulla base dei picchi caratteristici in questa regione. Attraverso lo spettro IR è possibile studiare anche le strutture secondarie  $\alpha$ -elica e  $\beta$ -sheet delle proteine.

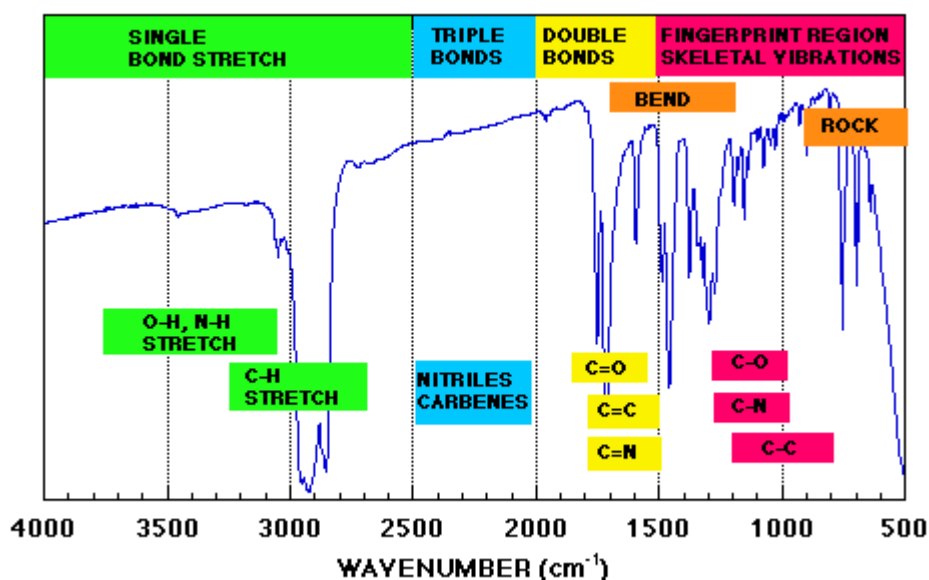


Figura 34. Tipico spettro IR con regione dei gruppi funzionali e regione fingerprint

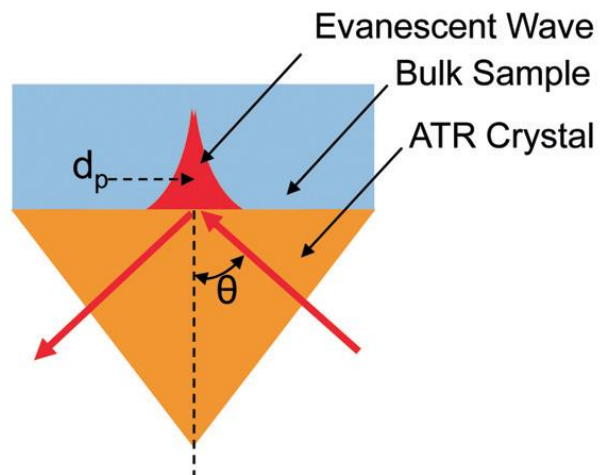
### 2.5.2 La riflettanza totale attenuata (ATR)

Nella spettroscopia IR tradizionale utilizzata per analizzare solidi, liquidi e gas, viene utilizzata una radiazione infrarossa che passa direttamente attraverso il campione. Soprattutto per campioni liquidi e solidi, l'intensità delle bande spettrali è fortemente dipendente dallo spessore del campione che al massimo può essere di poche decine di micron. Per ovviare questa

forte limitazione, si può utilizzare la tecnica della riflettanza totale attenuata (ATR) che ha rivoluzionato la tradizionale spettroscopia IR. Infatti, questa tecnica permette di ottenere dati spettrali di maggior qualità, più riproducibilità nell'esperimento e maggior rapidità nel *sampling*.

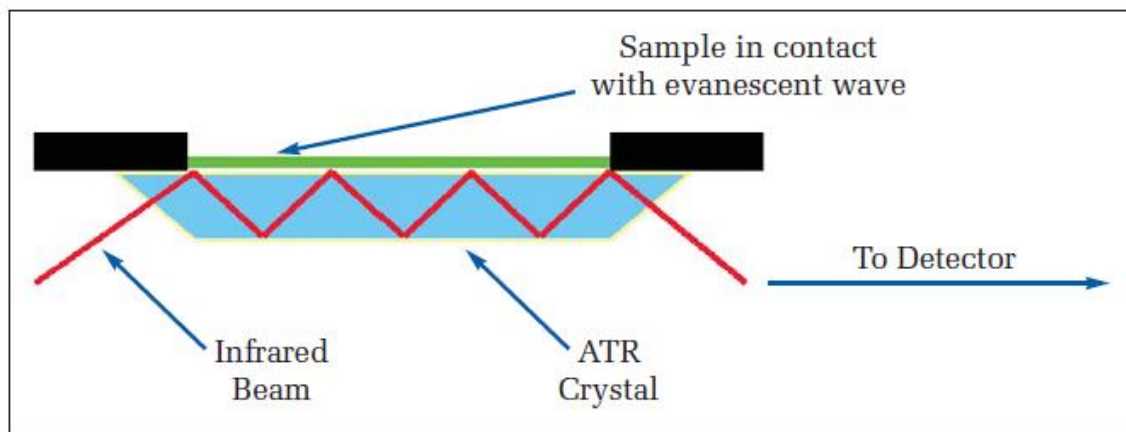
In questa tecnica, la radiazione infrarossa passa attraverso un cristallo con un alto indice di rifrazione e con un determinato angolo sfruttando il fenomeno della riflessione totale. Questo fenomeno avviene quando l'angolo di incidenza è maggiore dell'angolo critico. Ciò porta ad avere una riflessione interna del cristallo che produce un'onda evanescente che si estende nel campione posto sulla superficie del cristallo.

L'onda evanescente si estende per pochi micron ( $0.5\mu\text{m} - 5\mu\text{m}$ ) oltre la superficie del cristallo. Perciò il campione ed il cristallo devono essere a stretto contatto tra di loro. Il campione assorbe parte dell'energia dell'onda evanescente e l'onda riflessa (che ora sarà attenuata) esce dall'altra estremità del cristallo e viene rilevata dal detector da cui poi viene generato uno spettro infrarosso.



**Figura 35.** Rappresentazione di una singola riflessione ATR (PIKE Technologies)

All'interno del cristallo si verificano riflessioni multiple, che dipendono dall'angolo di incidenza e da lunghezza e spessore del cristallo.



**Figura 36.** Sistema ATR con riflessioni multiple all'interno del cristallo (PerkinElmer)

Per ottenere un buon risultato, è molto importante che l'indice di rifrazione del cristallo sia molto più grande di quello del campione, altrimenti non si verificherebbe una riflessione interna al cristallo. Per avere una riflessione totale, occorre che l'angolo di incidenza sia maggiore dell'angolo critico che viene espresso dalla seguente equazione:

$$\theta_c = \sin^{-1} \left( \frac{n_2}{n_1} \right)$$

Dove  $n_2$  è l'indice di rifrazione del campione;  $n_1$  è l'indice di rifrazione del cristallo e  $\theta_c$  è l'angolo critico.

Normalmente i cristalli ATR hanno indici di rifrazione compresi tra 2.38 e 4.01 a  $2000 \text{ cm}^{-1}$ . I più utilizzati sono i cristalli in diamante per la loro robustezza e la lunga durata. Dopo l'esperimento, il cristallo può esser pulito con acqua, metanolo o isopropanolo.

Un altro aspetto importante è la profondità di penetrazione ( $d_p$ ) della radiazione IR all'interno del campione. Questo parametro è espresso dalla seguente equazione:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi(n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{1/2}}$$

Dove  $\lambda$  è la lunghezza d'onda della radiazione e  $\vartheta$  è l'angolo di incidenza del raggio IR rispetto alla normale della superficie del cristallo. Solitamente il raggio IR si estende da 0.5  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  all'interno del campione.

Per analizzare le diverse componenti all'interno di un campione è importante aumentare l'effettiva lunghezza del percorso (*EPL*) che compie il raggio IR all'interno del cristallo e quindi avere un maggior numero di riflessioni all'interno del cristallo. Questa grandezza viene espressa dalla seguente equazione:

$$EPL = N \times d_e$$

dove  $d_e$  è la profondità di penetrazione e  $N$  è il numero di riflessioni all'interno del cristallo ATR.

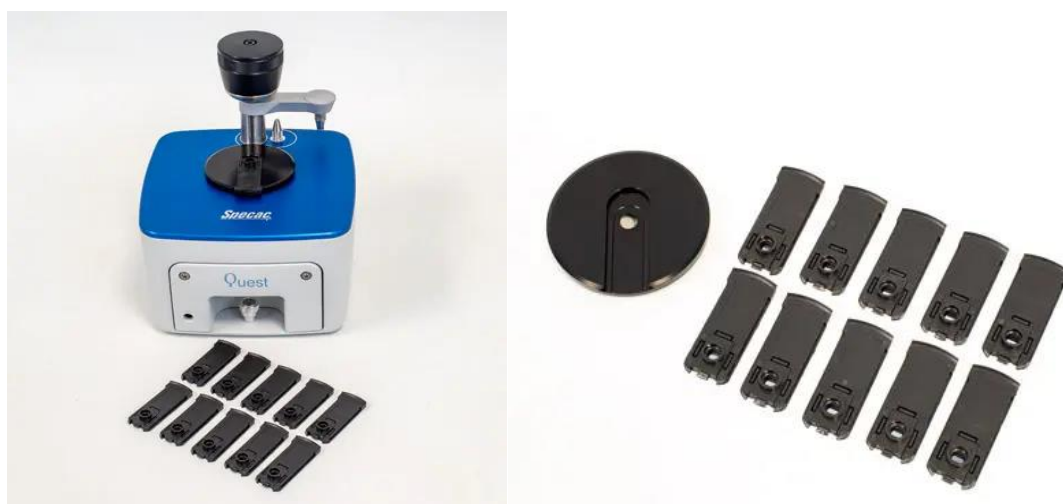
### ***2.5.3 Preparazione dei campioni e strumentazione***

Inizialmente sono stati pesati 260  $\mu\text{g}$  di depsipeptide, sciolti in 115  $\mu\text{L}$  di TFA (0.02%), ottenendo una concentrazione di 2,25 mg/ml (500  $\mu\text{M}$ ). È stata preparata un'aliquota da attivare al momento della misurazione ( $t_1 = 0$  min.). Successivamente sono stati aggiunti 3  $\mu\text{L}$  di soluzione NaOH e idrossido d'ammonio (0.5 M) allo stock madre e sono stati inseriti su cristalli ATR



monouso in silicio (Arrow™ Si ATR, Specac Ltd, Orpington, Regno Unito) stratificando 3 aliquote da 5  $\mu$ l ed essiccandole mediante flussaggio con azoto. Quest'ultimo passaggio è stato realizzato in tempi diversi (fino a 30 min.) per studiare come cambia la struttura secondaria del peptide nel tempo.

Le misurazioni ATR-FTIR sono state eseguite utilizzando un accessorio ATR Quest Single Reflection (Specac Ltd) montato su un interferometro INVENIO-R e dotato di un detector di Triglicina Solfato Deuterato (DTGS) (Bruker Optics, Ettlingen, Germania).



**Figura 37.** Vetrini Arrow™ Silicon ATR e disco dedicato montati sul dispositivo Specac Quest ATR

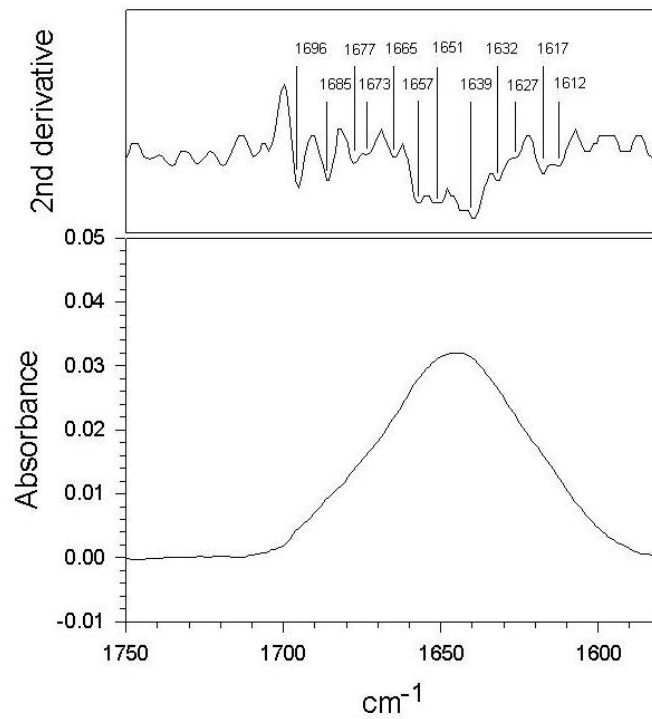
Per ciascun campione, sono stati ottenuti gli spettri ATR-FTIR a temperatura ambiente nell'intervallo  $4000-600\text{ cm}^{-1}$  (256 scansioni, con risoluzione spettrale  $4\text{ cm}^{-1}$ ).

Prima di ogni acquisizione, è stato acquisito lo spettro del background con il cristallo in silicio pulito e nelle stesse condizioni. Gli spettri grezzi sono stati poi processati attraverso il software OPUS 7.5 (*Bruker Optics*) come segue:

- Correzione per l'eliminazione dei contributi spettrali di anidride carbonica atmosferica e vapore acqueo;
- Taglio nell'intervallo spettrale di interesse,  $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ;
- Normalizzazione vettoriale per standardizzare le bande IR in tutto l'intervallo spettrale, rimuovendo così eventuali errori dovuti al diverso spessore del campione (diverso cammino ottico);
- Correzione della linea di base, allineando così i punti con assorbanza più bassa.

I profili spettrali sono stati analizzati sia in assorbanza che in derivata seconda, con particolare attenzione all'altezza e alla posizione centrale di alcuni picchi di interesse. Il calcolo della derivata seconda permette di visualizzare sotto forma di minimi i picchi presenti all'interno di una banda

convoluta. Questa trasformazione aumenta la risoluzione spettrale, ma determina la perdita di informazioni di tipo semi-quantitativo sull'intensità delle bande.

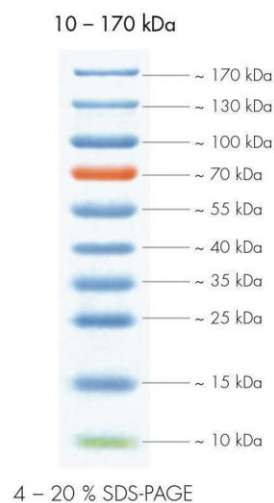


**Figura 38.** Esempio analisi in derivata seconda di una banda IR di lisozima: la derivata seconda ci permette di individuare i singoli picchi di cui è composta la banda IR

## 3. Risultati

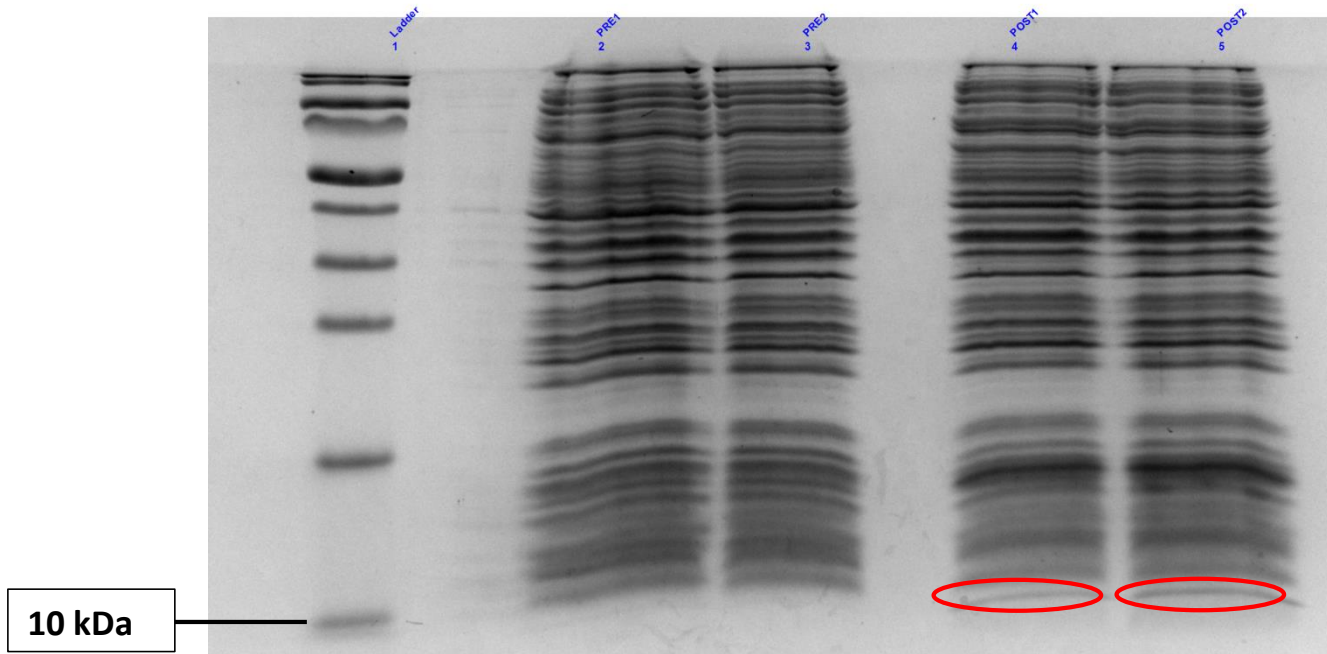
### 3.1 Produzione e purificazione del peptide A $\beta$ 42

I protocolli di produzione e purificazione del peptide A $\beta$ 42 sono stati eseguiti numerose volte al fine di ottimizzare il processo e ottenere il peptide il pi $\dot{u}$  isolato possibile. Prima di ogni purificazione  $\grave{e}$  stata verificata l'effettiva espressione del peptide attraverso una corsa elettroforetica SDS-PAGE di un campione della coltura pre-induzione e post-induzione con IPTG. Come ladder di riferimento  $\grave{e}$  stato utilizzato il *peqGOLD protein marker IV pre-stained* (figura 39).



**Figura 39.** *peqGOLD protein marker IV (pre-stained)*

In figura 40 si può notare la banda al di sotto del marker da 10 kDa nel campione post-indotto, assente invece in quello pre-indotto. Ciò significa che la coltura batterica esprimeva il peptide.



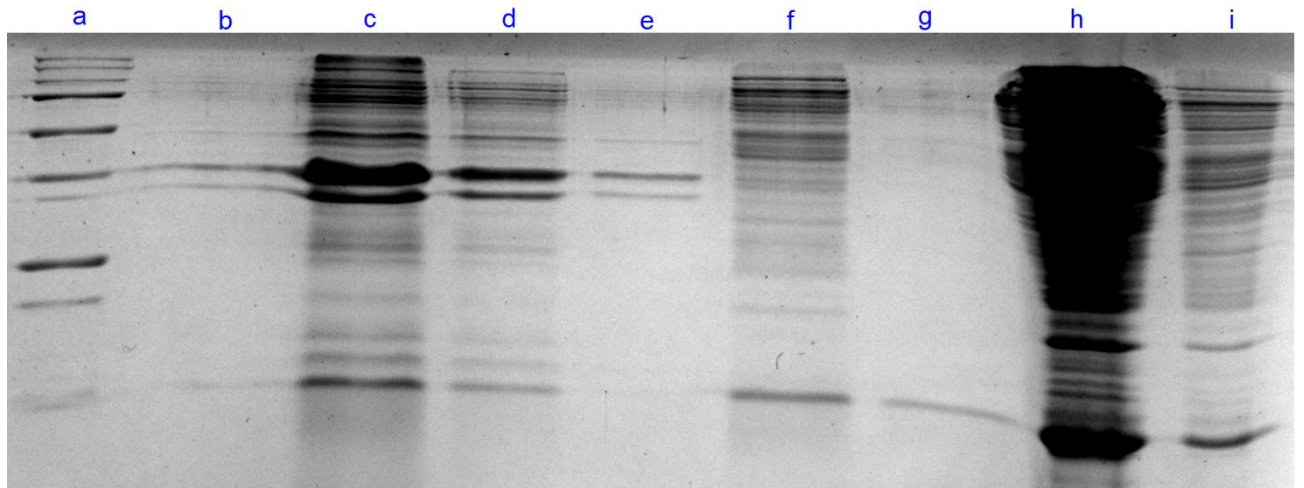
**Figura 40.** Gel SDS-PAGE del pre e post indotto

Durante il processo di purificazione sono stati raccolti diversi campioni per comprendere dove si disperde in parte la proteina: oltre ad essere persa nei diversi surnatanti scartati ad ogni step del protocollo, la riduzione della sua resa è anche causata dalle successive tecniche di dialisi e concentrazione. Infatti, sembra che attraverso queste tecniche una frazione del peptide

possa rimanere legata alla membrana semipermeabile e che l'eccessiva centrifugazione provochi l'aggregazione del peptide.

Inoltre, per ottenere il peptide meno aggregato possibile, occorre evitare l'utilizzo di urea durante il processo di rottura dei corpi di inclusione, in quanto quest'ultima è nota per far aggregare i componenti biologici.

Nella figura 41 è riportato un gel di poliacrilammide al 17% dei campioni raccolti seguendo il protocollo che utilizza l'urea come agente denaturante (a-e) e quelli raccolti seguendo il protocollo che utilizza il cloruro di guanidinio (f-i). Si può notare come il peptide sia già agli stadi iniziali di aggregazione utilizzando il primo protocollo, poiché la banda di interesse (in b e in c) si trova allineata con il marker da 10 kDa. Questo è dovuto alla presenza di urea, che convertendosi in acido isocianico tende a far aggregare il peptide. Questo non si apprezza nelle bande (h e i) dove si è utilizzato il cloruro di guanidinio, dove si nota che la banda d'interesse risulta al di sotto del marker.



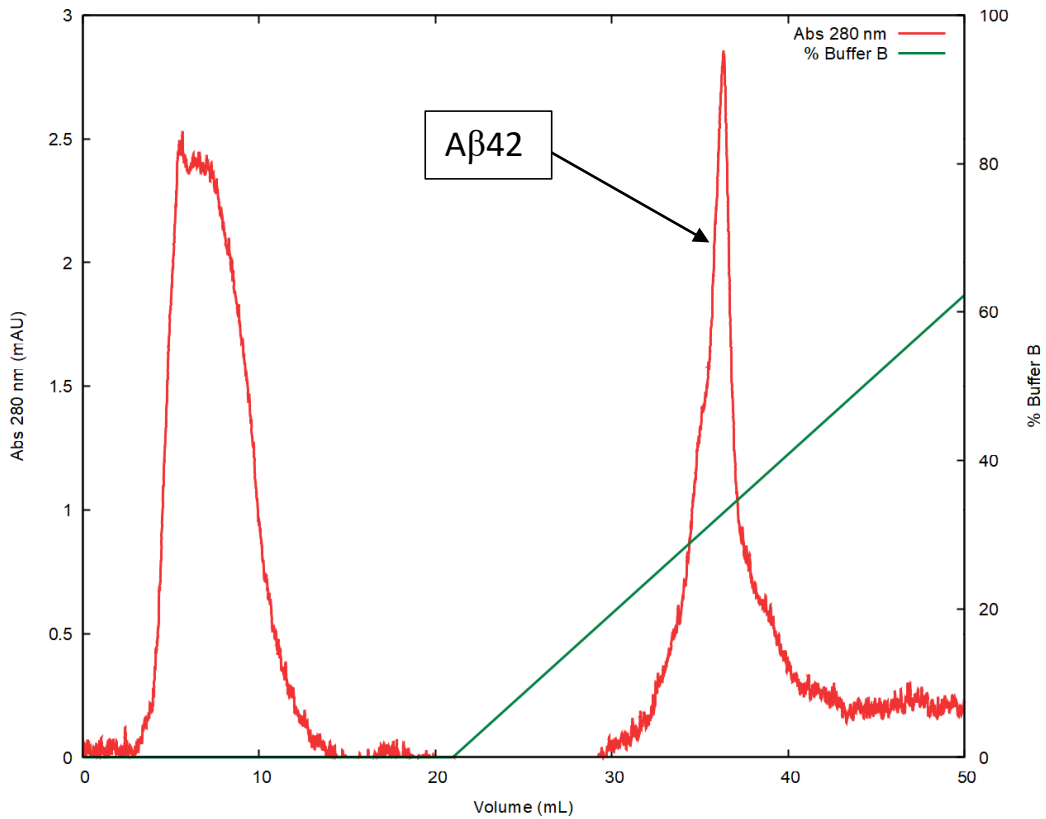
**Figura 41.** (a) *peqGOLD protein marker IV (pre-stained)*; (b) *Aβ42 dopo concentrazione con cut-off 30 kDa*; (c) *Aβ42 prima della concentrazione*; (d) *Aβ42 con urea*; (e) *pellet con i corpi d'inclusione*; (f) *Aβ42 dializzata*; (g) *surnatante con GuHCl*; (h) *pellet solubilizzato con GuHCl*; *Aβ42 dopo rottura dei corpi d'inclusione con GuHCl*

Al termine di ogni protocollo si può raggiungere una concentrazione di proteina di circa 1 mg/ml.

Successivamente è stata effettuata la cromatografia a scambio ionico per isolare al meglio il peptide. Come possiamo notare dalla figura 41, il peptide inizia ad eluire dalla colonna dopo circa 25-30% di gradiente di Buffer B, in accordo con la letteratura (Stephens et al., 2020).

Il grafico in rosso rappresenta l'assorbanza a 280nm, mentre in verde il gradiente di Buffer B. Il primo picco rappresenta l'eluizione di tutto ciò che non si è legato alla colonna. Invece il secondo picco rappresenta il peptide

che eluisce solo dopo una determinata concentrazione di sale che lo fa rimuovere dalla colonna.



**Figura 42.** Cromatogramma con eluizione del peptide A $\beta$ 42 (picco a destra)

Dopo numerosi tentativi, possiamo definire delle procedure che permettono di ottenere il peptide della  $\beta$ -amiloide in forma isolata e meno aggregata possibile:

- Svolgere tutti i processi in ghiaccio o a 4°C per evitare l'aggregazione;



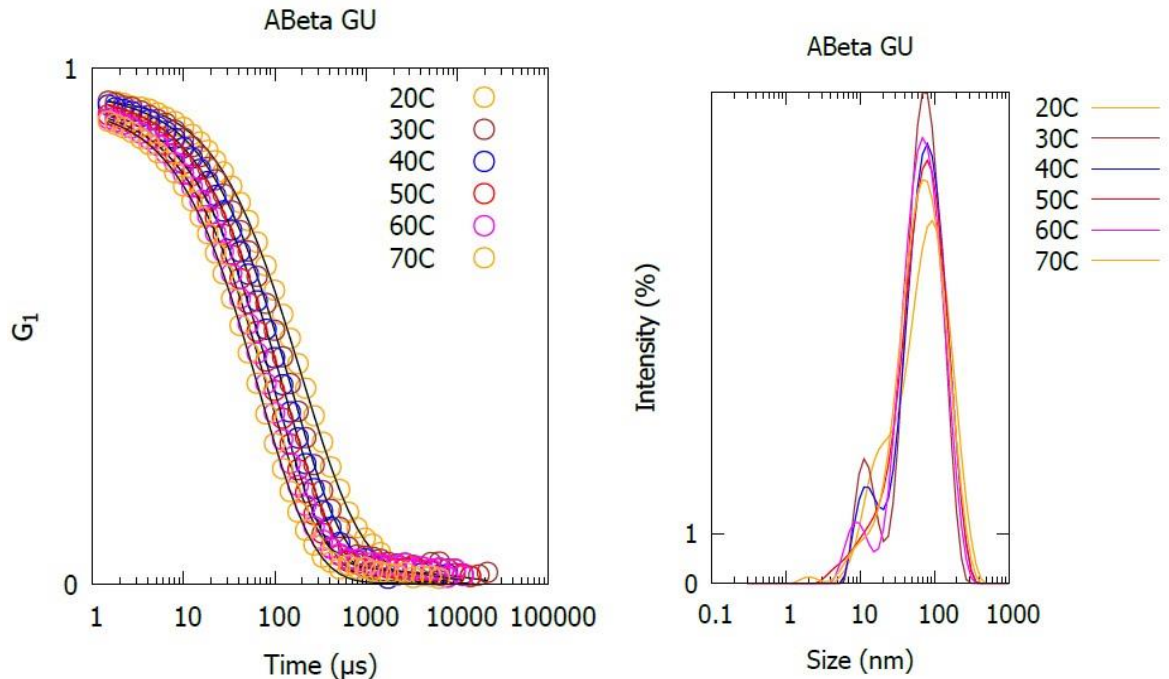
- Utilizzare l'enzima Benzonasi per ridurre la presenza di acidi nucleici che possono rimanere legati alla proteina;
- Utilizzare inibitori di proteasi per ridurre l'azione di agenti proteolitici ed il Triton X-100 per rimuovere eventuali lipidi legati ai corpi d'inclusione;
- Usare il cloruro di guanidinio come agente denaturante;
- Limitare il più possibile il numero di centrifugazioni che potrebbero far aggregare il peptide;
- Utilizzare la cromatografia a scambio ionico per isolare il peptide in minor tempo;

Un'ulteriore criticità è dovuta alle piccole dimensioni della molecola in forma monomeric, una condizione che limita l'utilizzo del gel di poliacrilammide per la sua identificazione. Al suo posto si potrebbe utilizzare un gel di Tris-Tricina che è ideale per la separazione di peptidi e piccole proteine con peso molecolare inferiore a 10 kDa.

### 3.2 *Dynamic Light Scattering (DLS)*

Attraverso il Dynamic Light Scattering sono stati analizzati i campioni ottenuti con i due diversi protocolli. In particolare, è stato studiato come cambia l'aggregazione del peptide in funzione della temperatura, partendo da 20 °C fino a 70 °C effettuando una nuova misurazione ogni 10 °C.

Dallo strumento sono state ricavate le curve dei correlogrammi ( $G1 = \sqrt{g_2(\tau) - 1}$ ) e della distribuzione delle dimensioni per intensità (*size distribution by intensity*), ottenuta mediante il metodo dei cumulanti. La funzione di distribuzione di intensità è ponderata in base all'intensità di scattering di ciascuna popolazione di particelle. Di seguito è riportato il correlogramma e la *size distribution by intensity* del campione purificato con il cloruro di guanidinio.

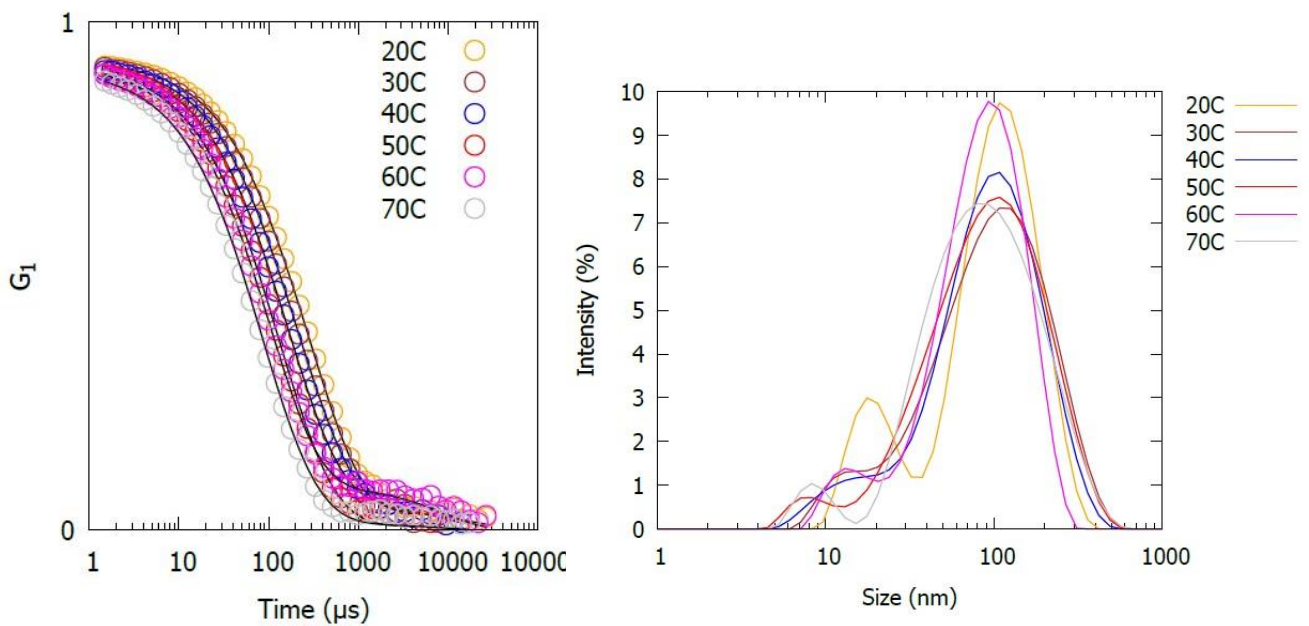


**Figura 43.** Correlogramma (a sinistra) e size distribution by intensity (a destra) del peptide purificato con il cloruro di guanidinio (GuHCl)

Dal correlogramma si osserva una tendenza della curva a spostarsi verso sinistra con l'aumento della temperatura, suggerendo una conseguente diminuzione delle dimensioni delle particelle. Occorre tuttavia considerare che questo effetto potrebbe anche essere dovuto al cambiamento della viscosità dell'acqua con la temperatura. Pertanto, nell'analisi dei dati attraverso la legge di Stokes, si sono impiegati i noti valori della viscosità dell'acqua per ciascuna delle temperature a cui gli esperimenti sono stati svolti. Per quanto riguarda la *size distribution by intensity*, si osserva un

leggero spostamento della curva verso destra, indicante un aumento delle dimensioni medie delle particelle in funzione della temperatura che potrebbe indicare un processo di fibrillazione.

Di seguito sono riportati il correlogramma e la *size distribution by intensity* del campione purificato con urea.

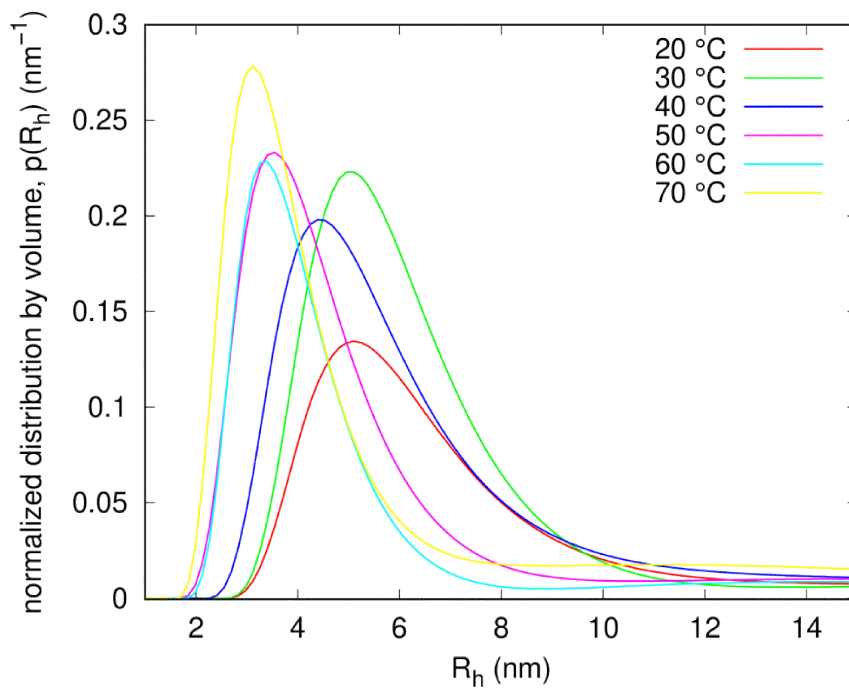


**Figura 44.** Correlogramma (a sinistra) e *size distribution by intensity* (a destra) del peptide purificato con urea

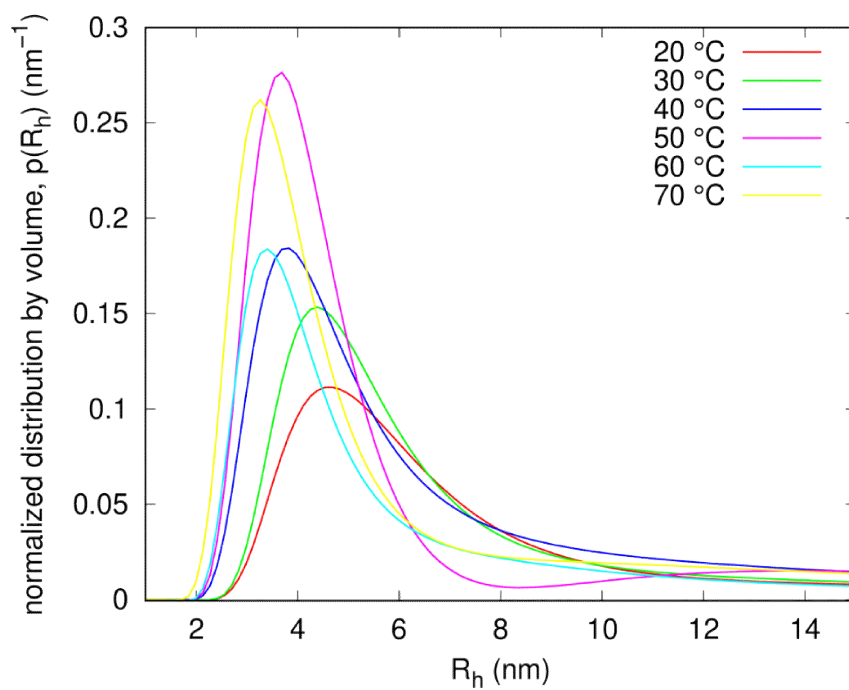
Per entrambi i grafici, valgono le stesse osservazioni dei risultati ottenuti con per i campioni purificati con cloruro di guanidinio. Anche per i campioni

purificati in presenza di urea, infatti, la *size distribution by intensity* indica un aumento delle dimensioni medie delle particelle in soluzione con l'aumento della temperatura.

La *size distribution by intensity* fornisce un peso molto rilevante alle particelle di grandi dimensioni, poiché l'intensità della luce diffusa dipende dalla sesta potenza del loro diametro. Quindi la presenza di poche particelle molto grandi può mascherare il contributo di quelle più piccole. Per questo motivo è stato necessario valutare anche la funzione di distribuzione volumica (*size distribution by volume*) per entrambi i campioni. Quest'ultima tiene conto delle proporzioni relative delle particelle all'interno di un campione basandosi sul loro volume. Nei grafici che seguono, vengono mostrate le *size distribution by volume* dei due campioni. Si fa notare che le curve sono state normalizzate in modo che il loro integrale sia unitario. Inoltre, le curve sono state riportate in funzione del raggio idrodinamico.



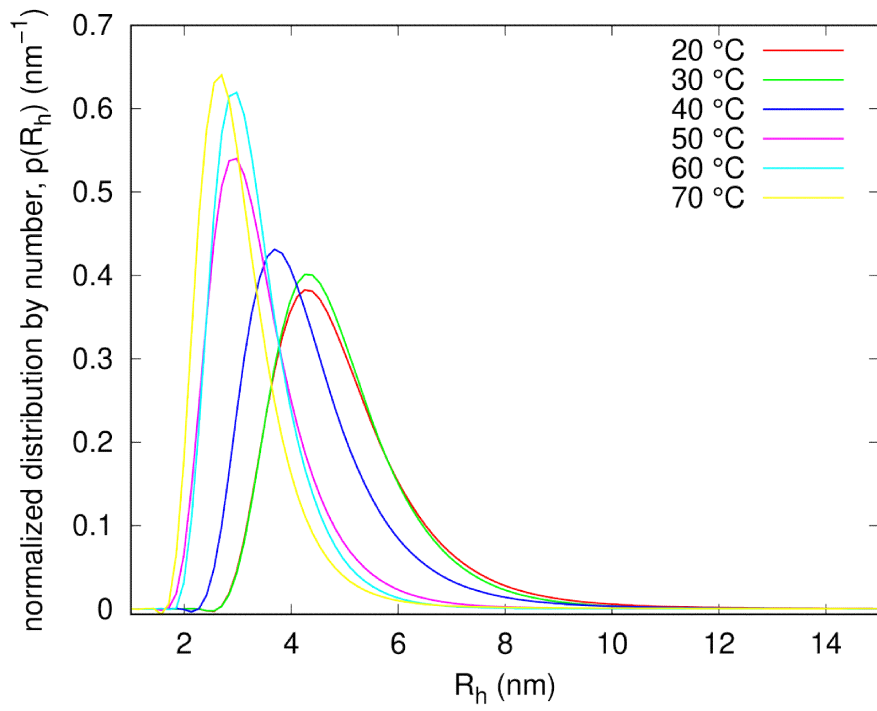
**Figura 45.** Funzione di distribuzione volumica del campione purificato in cloruro di guanidinio



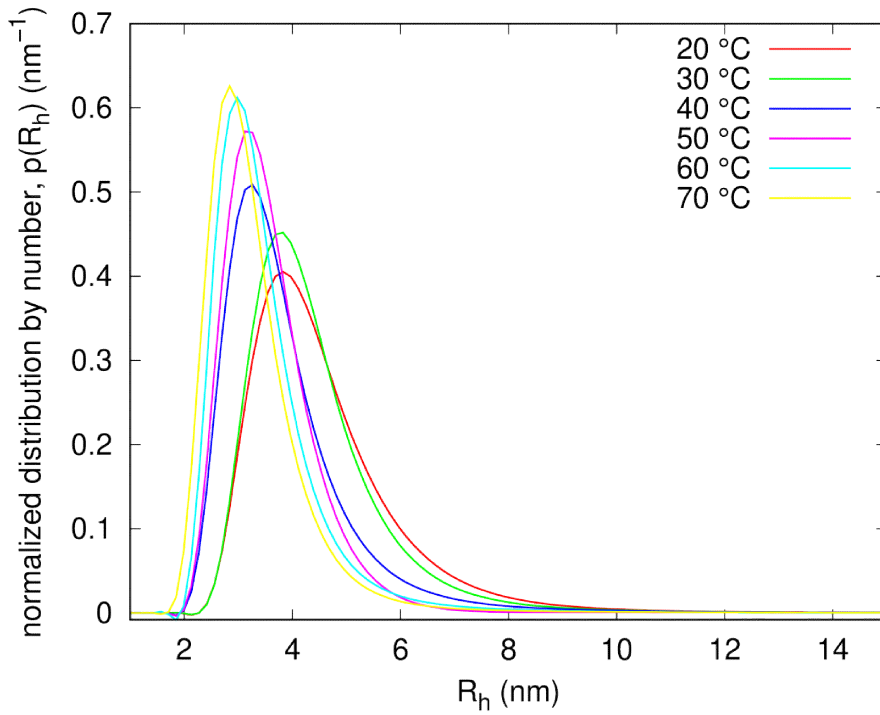
**Figura 46.** Funzione di distribuzione volumica del campione purificato in urea

Come si può osservare da entrambi i grafici, il contributo delle particelle con raggio idrodinamico superiore a 15 nm ha un peso del tutto trascurabile rispetto al contributo delle altre particelle. Tutte le curve, sia per la purificazione in cloruro di guanidinio sia per quella in urea, mostrano un massimo nell'ordine di 5 nm, che si sposta leggermente verso valori più bassi con l'aumento della temperatura. Probabilmente entrambi i campioni avevano già un buon grado di aggregazione alla temperatura di 20 °C per cui l'effetto dell'innalzamento della temperatura è di provocare una loro parziale disaggregazione.

Infine è stata ricavata la funzione di distribuzione numerale (*size distribution by number*), che tiene conto del numero di particelle con dimensioni diverse. Anche in questo caso, le curve sono state normalizzate per rendere unitario il loro integrale e sono riportate in funzione del raggio idrodinamico al fine di rendere più semplice il confronto con i risultati ottenuti mediante gli esperimenti SAXS (paragrafo 3.3).



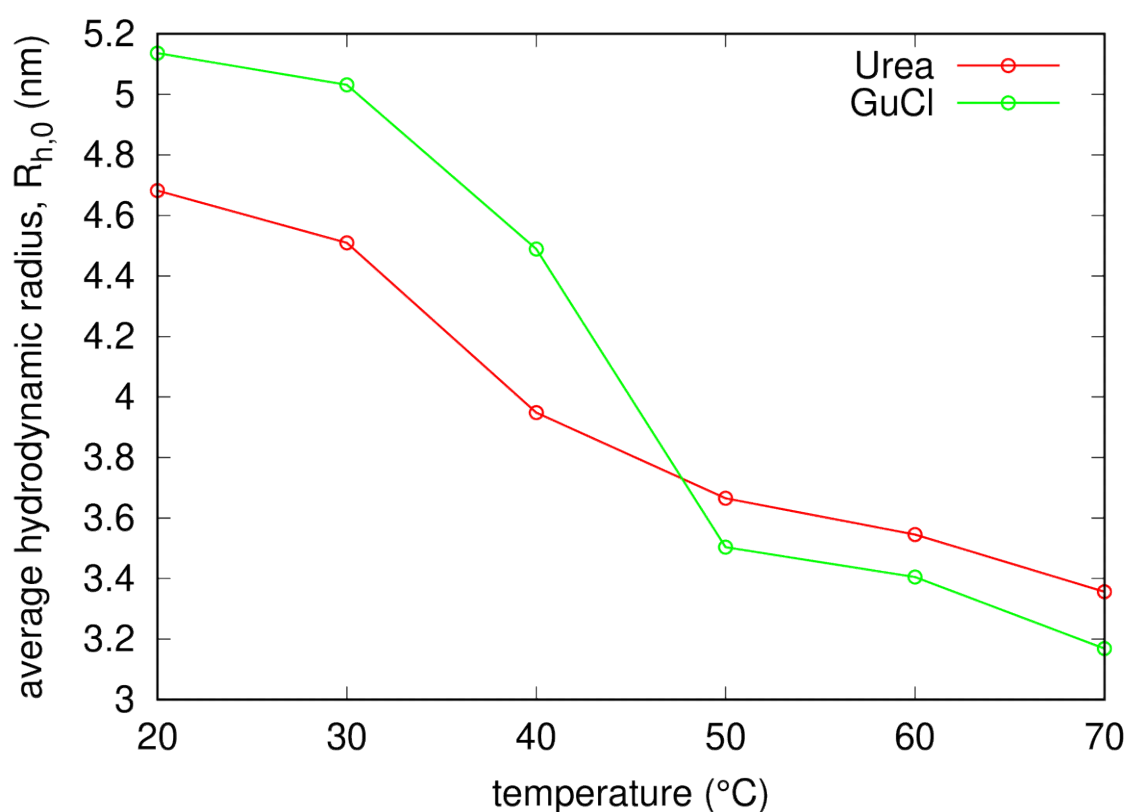
**Figura 47.** Funzione di distribuzione numerale del campione purificato in cloruro di guanidinio



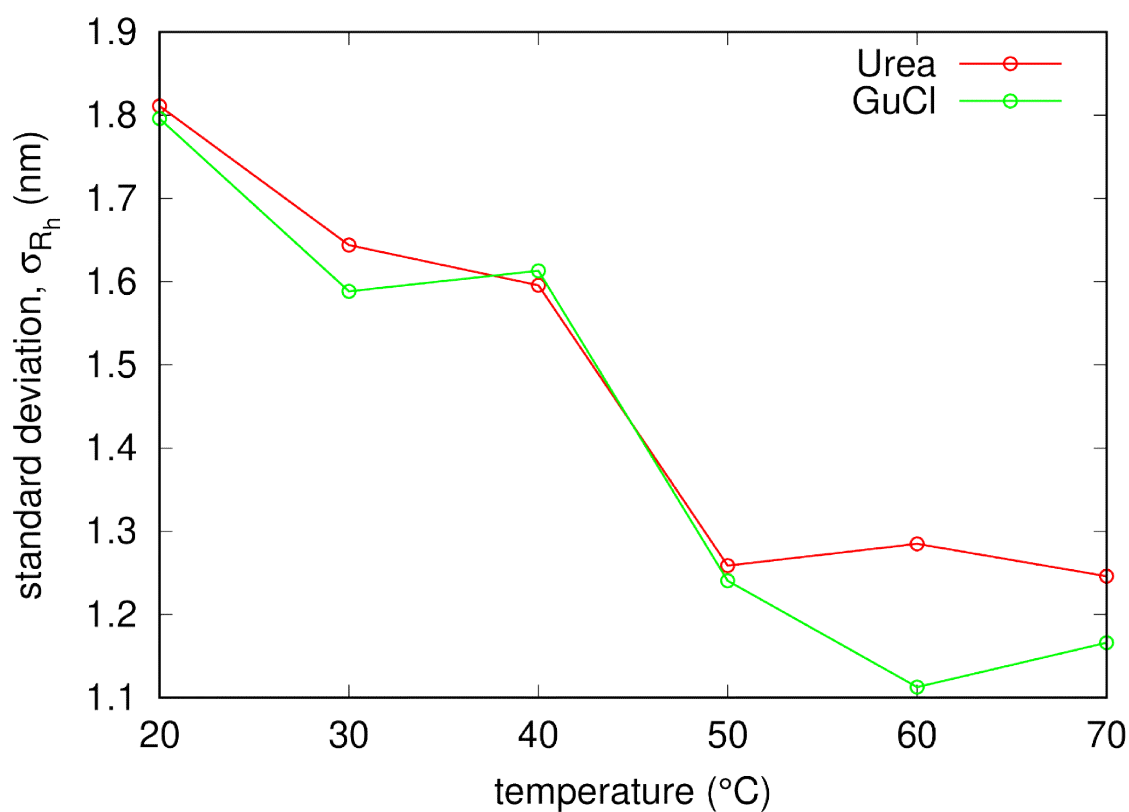
**Figura 48.** Funzione di distribuzione numerale del campione purificato in urea



Anche in questo tipo di rappresentazione, le curve di entrambi i campioni mostrano una leggera tendenza a spostare il massimo verso valori inferiori del raggio con la temperatura. Nei grafici seguenti vengono riportati sia i raggi idrodinamici medi sia la loro deviazione standard, calcolati dalle *size distribution by number*, in funzione della temperatura per entrambi i campioni.



**Figura 49.** Raggio medio dei campioni purificati in urea e cloruro di guanidinio in funzione della temperatura



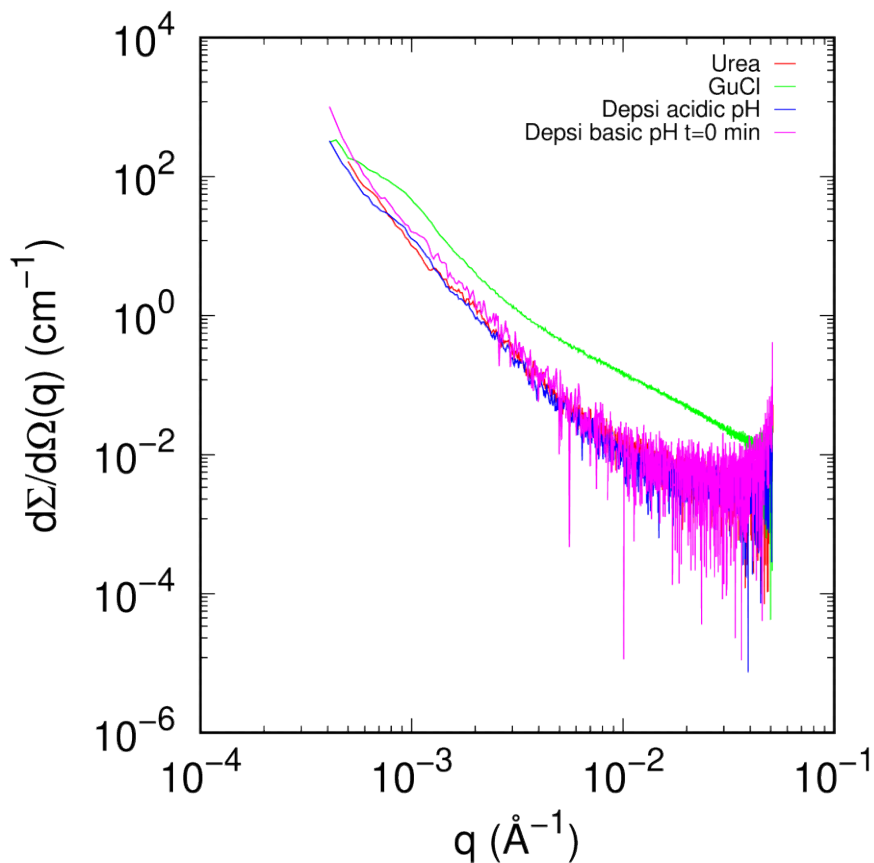
**Figura 50.** Deviazione standard del raggio dei campioni purificati in urea e cloruro guanidinio in funzione della temperatura

I risultati confermano che l'aumento di temperatura provoca una parziale disgregazione del peptide, che risulta già aggregato a 20 °C, e una parziale diminuzione della deviazione standard della distribuzione pesata per il numero di particelle.

### 3.3 *SAXS*

Le misure SAXS sono state condotte presso la linea di luce ID02 del sincrotrone europeo ESRF (Grenoble, Francia). Sono stati misurati i campioni del peptide ottenuto per via ricombinante con i due diversi protocolli (purificazione in urea o in cloruro di guanidinio) e i campioni del depsipeptide, prima e dopo la variazione di pH, seguendo così la sua cinetica.

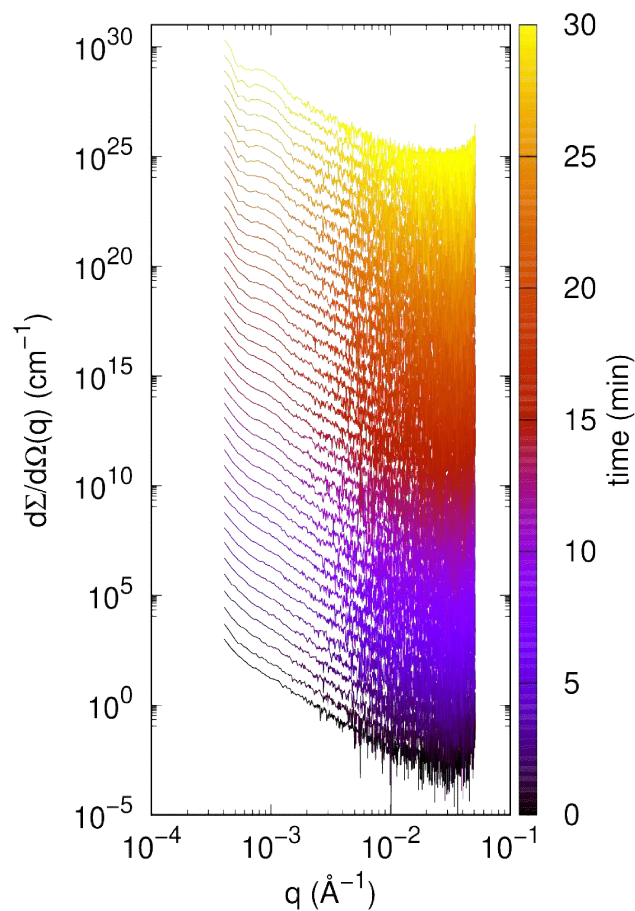
Sono di seguito riportate le curve dei primi due campioni, del depsipeptide prima della variazione del pH e immediatamente dopo la variazione di pH.



**Figura 51.** Curve SAXS dei campioni di A $\beta$ 42

Si può osservare come la curva del peptide purificato in urea (in rosso) ed entrambe le curve del depsi-peptide (in viola e blu) siano molto simili e indicanti un peptide molto aggregato. Si discosta notevolmente la curva del peptide purificato in cloruro di guanidinio (curva verde), la quale presenta una minore pendenza media, compatibile con un minore grado di aggregazione del peptide, sebbene la concentrazione del peptide sia maggiore di quello purificato in urea.

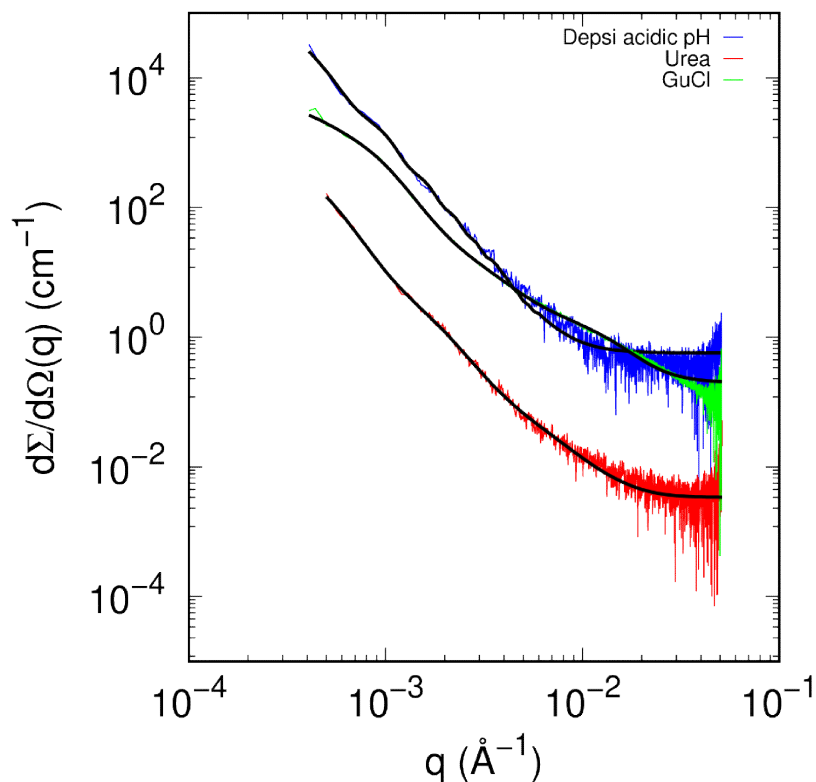
Di seguito sono riportate le curve della cinetica del depsiptide registrate per 30 minuti.



**Figura 52.** Curve SAXS della cinetica del depsiptide. Le curve sono scalate di un fattore 5 una rispetto all'altra per maggiore chiarezza.

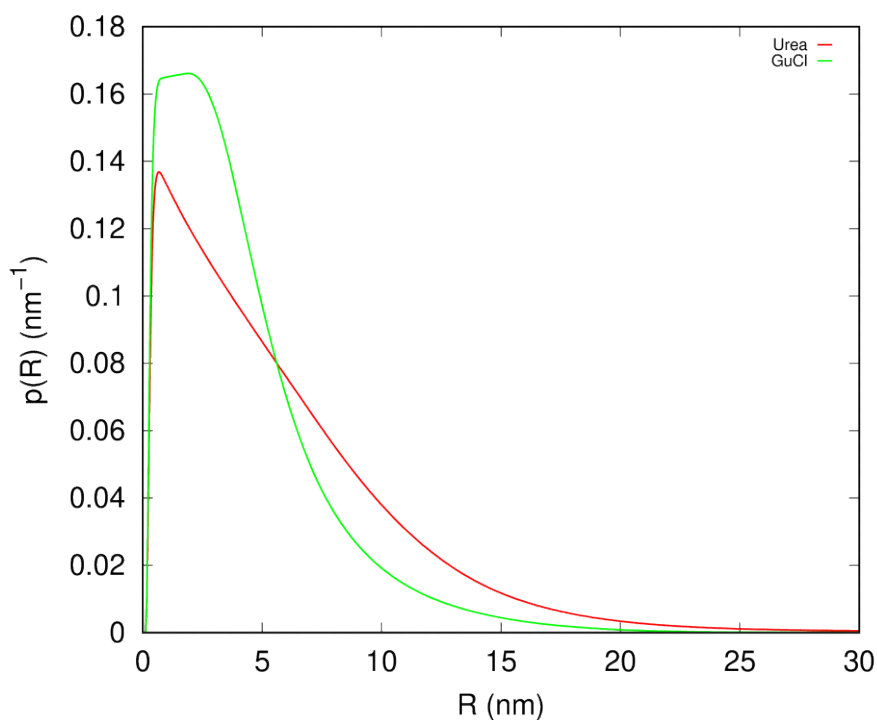
Si può osservare una modifica di queste curve in funzione del tempo. Si nota, in particolare, l'insorgenza di una banda larga centrata intorno a  $q \approx 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ , che diventa sempre più marcata con l'aumento del tempo.

Le curve SAXS del peptide ottenuto per via ricombinante in urea e in cloruro di guanidinio sono state analizzate con il modello più semplice, quello delle sfere polidisperse, introdotto nella sezione 2.4.6, nel quale la funzione di distribuzione dei raggi delle sfere è descritta con una combinazione di funzioni *spline B* cubiche. Le migliori curve di *fit* ottenute sono mostrate in figura (curva rossa e curva verde). Si può osservare un accordo molto buono con i dati sperimentali.



**Figura 53.** Analisi delle curve SAXS dei campioni di A $\beta$ 42 (linee nere). La curva rossa e quella verde sono state analizzate con il modello delle sfere polidisperse. La curva blu è stata analizzata con il modello del cilindro con raggio polidisperso. Le curve sono state scalate per un fattore 10 per maggiore chiarezza.

Le funzioni di distribuzione sono mostrate nella figura seguente.



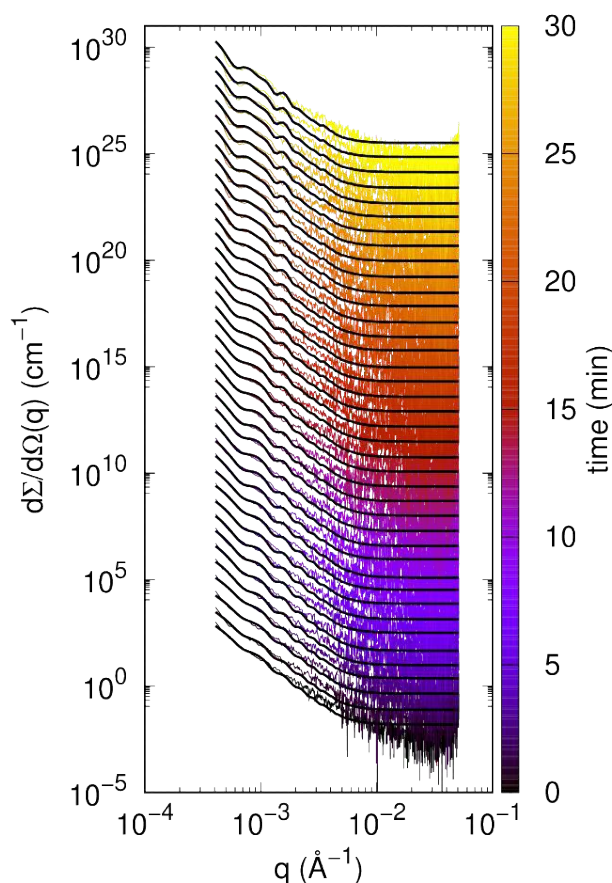
**Figura 54.** Funzioni di distribuzione del raggio della sfera ottenute dall'analisi dei dati SAXS del peptide purificato in urea (curva rossa) e in cloruro di guanidinio (curva verde)

Come già evidenziato in precedenza, i risultati mostrano che il campione purificato in cloruro di guanidinio ha una distribuzione dei raggi raccolta intorno a valori più bassi rispetto alla distribuzione ottenuta per il campione purificato in urea. Più in dettaglio, per quanto riguarda il campione in urea in valore medio del raggio è 5.9 nm, con una deviazione standard di 5.6 nm, la mediana della distribuzione risulta 5.8 nm e il primo e il terzo quartile sono 3.1 nm e 10.2 nm, rispettivamente. Per quanto riguarda il campione in

cloruro di guanidinio, il raggio medio è 4.2 nm, la deviazione standard è di 3.4 nm, la mediana della distribuzione risulta 4.1 nm e il primo e il terzo quartile sono 2.4 nm e 7.1 nm, rispettivamente. Si fa notare che il modello delle sfere polidisperse è maggiormente compatibile con la formazione di aggregati globulari del peptide, nei quali potrebbero non essere presenti strutture cross beta.

Non sono stati ottenuti dei *fit* di qualità accettabile con il modello delle sfere polidisperse per il depsipeptide né a pH acido, né a pH basico. Buoni risultati sono stati invece ottenuti con il modello del cilindro avente raggio polidisperso, introdotto nella sezione 2.4.7. Il fit del campione a pH acido è mostrato in Figura 47 (curva blu). I fit dei campioni a pH basico misurati nei 30 minuti successivi all'innalzamento del pH sono mostrati nella seguente figura.

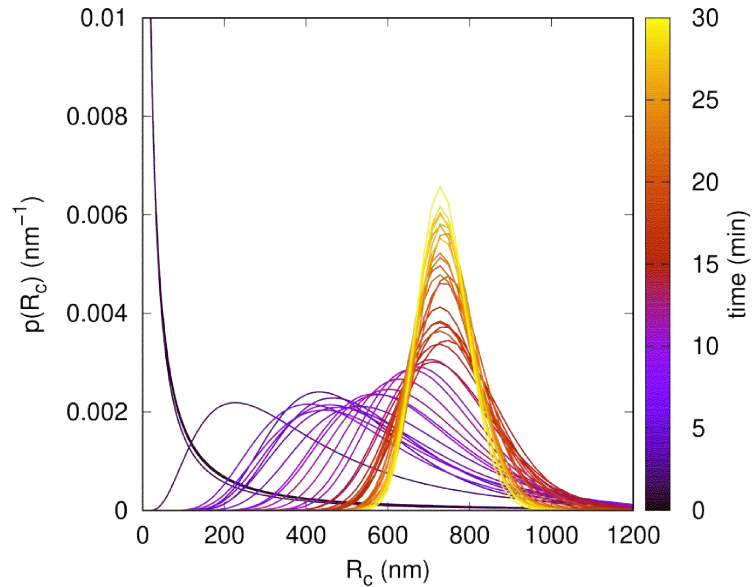




**Figura 55.** Analisi delle curve SAXS del depsiptide a pH basico raccolte in funzione del tempo.

La qualità di tutti fit è piuttosto buona, soprattutto per i più bassi valori di  $q$ . Essendo il peptide già aggregato, il cilindro è la più semplice forma geometrica con la quale si possono approssimare le fibre formate da proteine amiloidi. Per tutte le curve, si è ottenuta una lunghezza del cilindro molto più grande del raggio  $R_c$ . Inoltre, dal fit delle curve SAXS si è determinata la funzione di distribuzione log-normale  $p(R_c)$ , ovvero la

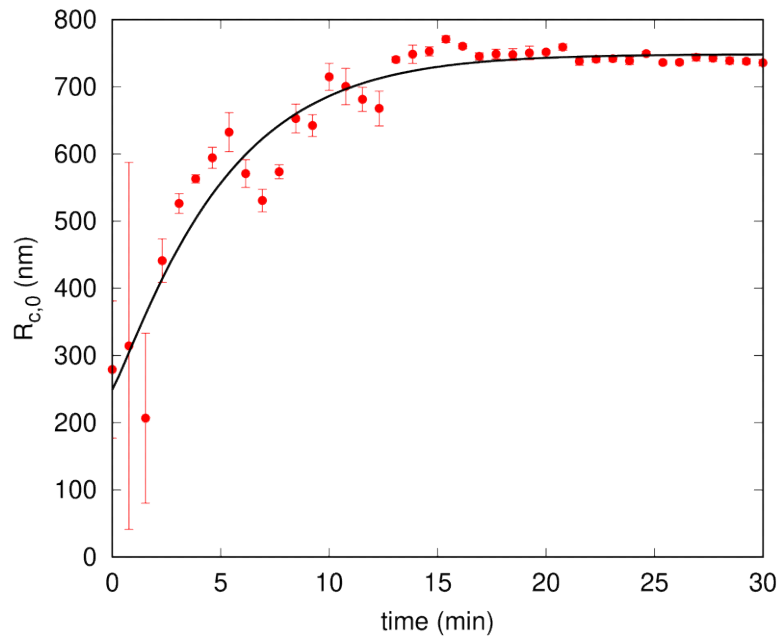
distribuzione della probabilità di ottenere un determinato raggio in funzione del tempo. I risultati sono mostrati nel seguente grafico.



**Figura 56.** Funzione di distribuzione log-normale del raggio medio del cilindro in funzione del tempo

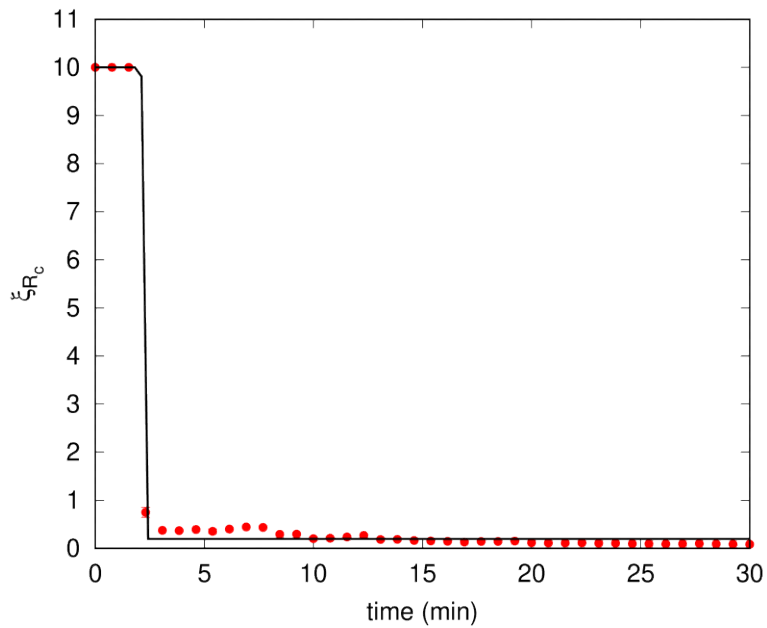
Come si può notare il raggio cresce in funzione del tempo fino a circa 700 nm. Questo raggio è estremamente grande, perciò il depsipeptide risulta essere un aggregato fra un elevato numero di fibrille.

Calcolando il raggio medio della fibrilla nel tempo, si può osservare come già dopo 15 minuti ha raggiunto il suo plateau intorno ai 700 nm.



**Figura 57.** *Raggio medio del cilindro in funzione del tempo*

In seguito è stato calcolato l'indice di dispersione dei valori presenti nella distribuzione del raggio medio.



**Figura 58.** *Indice di dispersione dei valori presenti nella distribuzione del raggio medio*

È interessante notare come il depsipeptide risulti aggregato ancora prima di cambiare il pH. Potrebbe essersi formato un coacervato di depsipeptide, ovvero un'aggregazione sferica di molecole tenute insieme da interazioni elettrostatiche che vanno a formare un sistema colloidale. Questo farebbe sì che quando si cambia pH, innescando così la reazione, il raggio medio diventa ancora più grande fino a raggiungere i 700 nm al quale poi tende ad un plateau. Probabilmente questa aggregazione precoce è dovuta alle condizioni a cui è stato sottoposto il depsipeptide nelle fasi di preparazione. Possono aver influenzato il pH della soluzione in cui è stato disciolto, la forza ionica della soluzione o l'agitazione meccanica eseguita prima della misura. Un altro motivo potrebbe essere l'elevata concentrazione del peptide all'interno della soluzione.

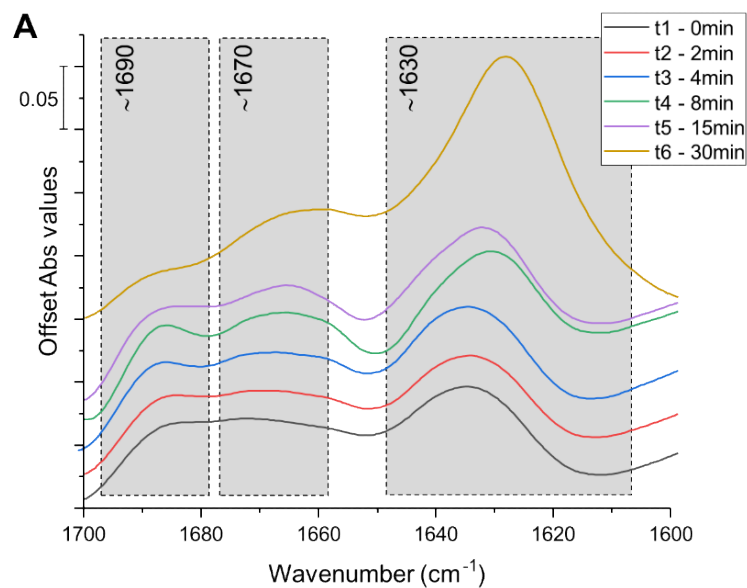
### ***3.4 Spettroscopia ATR-FTIR***

Per studiare le variazioni della struttura secondaria del peptide nel tempo, sono stati analizzati attraverso spettroscopia ATR-FTIR, 6 campioni a tempi diversi. In particolare sono stati misurati i campioni al t1 (0 min) e dopo 2, 4, 8, 15 e 30 minuti dallo switch di pH del depsipeptide.

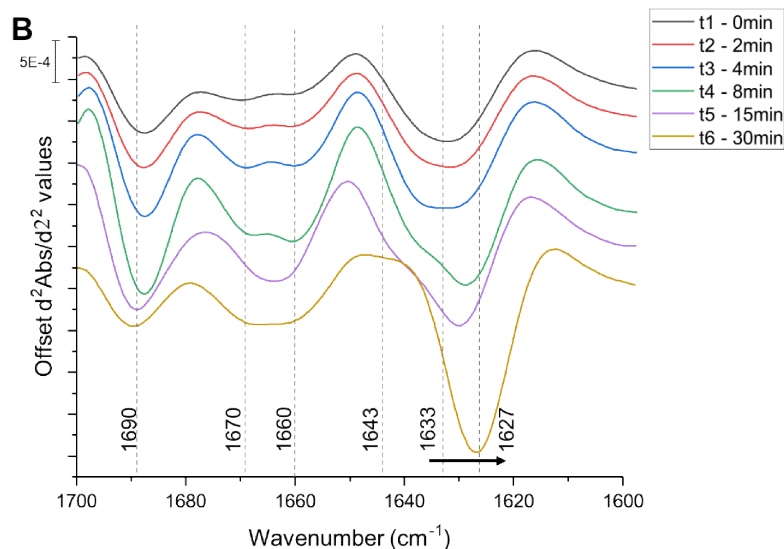
I profili spettrali infrarossi dei campioni da t1 (0 min) a t6 (30 min) sono visualizzati nelle Figure 59 e 60 nell'intervallo  $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ . Questa zona dello spettro è chiamata Ammide I, poiché riflette la presenza dei legami peptidici delle proteine e dalla quale si può ricavare informazioni riguardo alla loro struttura secondaria.

Le Figure 59 e 60 mostrano rispettivamente gli spettri in assorbanza e in derivata seconda dei gruppi sperimentali in esame. Gli spettri in derivata seconda permettono di identificare la precisa posizione di alcuni sotto-picchi di interesse che compongono le bande IR convolute degli spettri di assorbanza. Il confronto di questi picchi con quelli riportati in letteratura, ha permesso di correlarli alle strutture secondarie della proteina beta amiloide. In particolare la banda a  $\sim 1690\text{ cm}^{-1}$  rappresenta il filamento- $\beta$  aggregato; quella a  $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$  rappresenta i turn intermolecolari tra foglietti- $\beta$ ; a

~1660  $\text{cm}^{-1}$  le  $\alpha$ -eliche; a ~1643  $\text{cm}^{-1}$  i random coil; a ~1630  $\text{cm}^{-1}$  i foglietti- $\beta$  intermolecolari (Piccirilli et al., 2017).



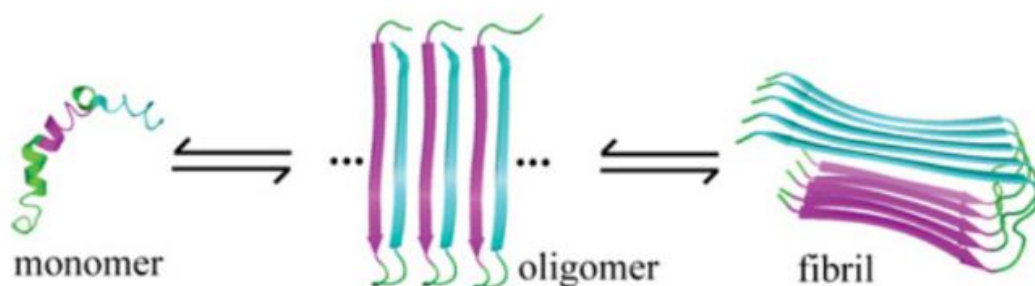
**Figura 59.** Spettro ATR-FTIR dei campioni da t1 a t6 visualizzati in assorbanza nell'intervallo 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ . I rettangoli in grigio indicano l'intervallo delle bande di interesse



**Figura 60.** Spettro FTIR-ATR dei campioni da t1 a t6 visualizzati in modalità derivata seconda nell'intervallo 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ . Le linee e le etichette indicano la posizione centrale dei picchi di interesse

Il profilo spettrale del peptide A $\beta$ 42 nei 30 minuti di analisi è coerente con quello riportato in letteratura, nel quale si può osservare l'inizio del processo di formazione delle fibrille. In particolare, si osserva un massimo di assorbimento a  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$  nella regione dell'Amide I che è indicativo dei foglietti- $\beta$  paralleli. Inoltre, si è notato che il picco relativo ai foglietti- $\beta$  si restringe in funzione del tempo, indicando la presenza di filamenti- $\beta$  stabili e forti legami idrogeno, che sono caratteristici delle fibrille amiloidi estremamente stabili (Cerf et al., 2009).

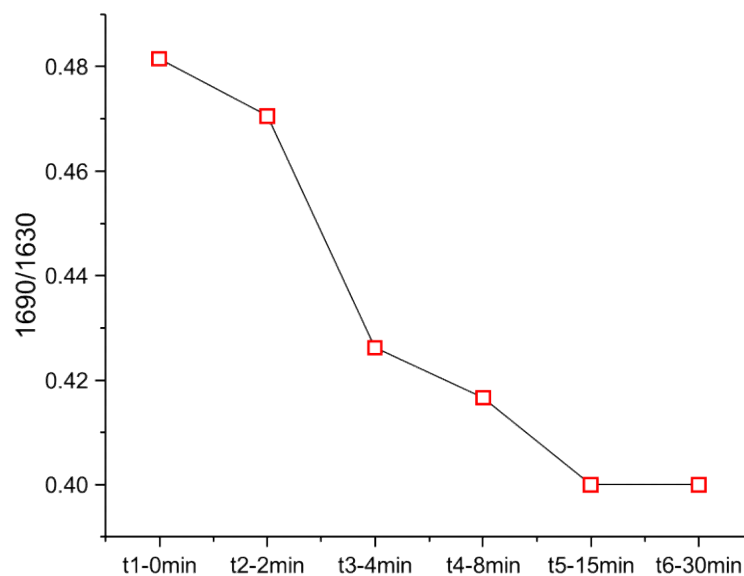
Fino a 15 minuti ( $t_5$ ) è possibile rilevare una spalla a  $\sim 1643\text{ cm}^{-1}$ , suggerendo una perdita della quantità di strutture random coil durante la formazione delle fibrille (Cordeiro et al., 2006).



**Figura 61.** *Rappresentazione schematica del processo di formazione delle fibrille amiloidi (Cerf et al., 2009)*

Il picco a  $\sim 1690\text{ cm}^{-1}$ , assegnato ai filamenti- $\beta$  aggregati, diminuisce durante il tempo di formazione delle fibrille. Ciò è coerente con le attuali conoscenze sui profili IR delle strutture di foglietti- $\beta$  paralleli e antiparalleli: è stato dimostrato che il rapporto di intensità 1690/1630 è proporzionale alla percentuale di organizzazione antiparallela dei filamenti- $\beta$  all'interno dei foglietti- $\beta$  (Sarroukh et al., 2013). La diminuzione di questo rapporto suggerisce una transizione da filamenti- $\beta$  antiparalleli a foglietti- $\beta$  paralleli (Agrawal et al., 2019).

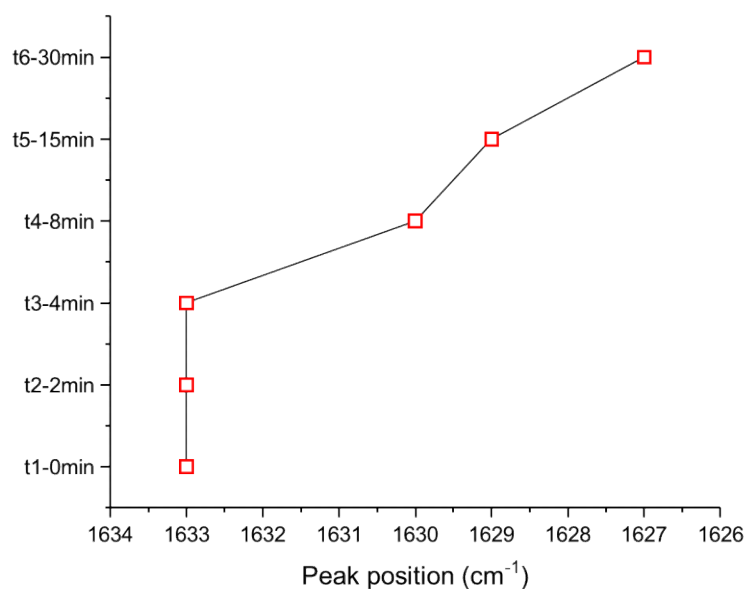
La Figura 62 mostra il trend di diminuzione del rapporto di intensità 1690/1630 lungo i punti temporali esaminati.



**Figura 62.** Trend di diminuzione del rapporto di intensità 1690/1630



Infine, è interessante notare che il picco relativo alle strutture dei foglietti- $\beta$ , oltre ad aumentare in intensità, subisce anche uno spostamento significativo da  $\sim 1633 \text{ cm}^{-1}$  nell'intervallo t1-t3, a  $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$  a t4 e t5, fino ad arrivare a  $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$  al t6 finale. È stato riportato che, durante la formazione di fibrille da varie proteine native, questo picco si sposta verso numeri d'onda inferiori, suggerendo la formazione di foglietti- $\beta$  estesi e planari (Agrawal et al., 2019). La Figura 63 mostra lo spostamento del picco relativo ai foglietti- $\beta$  lungo i punti temporali esaminati.



**Figura 63.** *Spostamento del picco relativo ai foglietti- $\beta$  lungo i punti temporali esaminati*

## ***4. Conclusioni***

Lo scopo di questa tesi è proporre e ottimizzare un semplice metodo per produrre la proteina  $\beta$ -amiloide per via ricombinante, al fine di studiarne i processi precoci di aggregazione mediante tecniche DLS e SAXS. Inoltre, grazie alla tecnologia del depsi-peptide, è stata svolta un'analisi strutturale del peptide con tecniche SAXS e ATR-FTIR.

La produzione del peptide per via ricombinante è stata ottenuta a partire da ceppi di *E. Coli* BL21 trasformati con il plasmide contenente il gene per la proteina. Attraverso una corsa elettroforetica dei campioni prima e dopo l'induzione con IPTG, è stata verificata l'espressione del peptide. Quest'ultimo rimane confinato all'interno dei corpi d'inclusione, con il vantaggio di facilitare il suo isolamento. Tramite il protocollo di purificazione, è stato possibile ottenere una buona quantità di peptide in una precoce forma di aggregazione. Un aspetto fondamentale è stato l'impiego della tecnica di cromatografia a scambio ionico, che ha permesso di ottenere il peptide isolato in minor tempo, con un minor numero di fasi di purificazione, e quindi riducendo il grado di aggregazione del peptide. Sono stati identificati tre accorgimenti molto importanti nelle fasi di purificazione: tenere sempre il peptide a 4 °C, limitare quanto più possibile la

centrifugazione e preferire l'uso del cloruro di guanidinio come agente denaturante. Questi accorgimenti permettono di limitare l'aggregazione del peptide. Per aumentare la purezza del prodotto finale e rimuovere eventuali acidi nucleici legati alla proteina, risulta efficace utilizzare l'enzima benzonasi nelle prime fasi di purificazione. Inoltre, per evidenziare al meglio l'effettiva presenza del peptide, risulta ottimale utilizzare un gel che sia specifico per la separazione di peptidi o piccole proteine. Un buon candidato potrebbe essere il gel di tris-tricina, che è specifico per la separazione di peptidi con peso molecolare inferiore ai 10 kDa.

Attraverso le misure di Dynamic Light Scattering dei campioni ottenuti per via ricombinante, si è osservato come cambia l'aggregazione del peptide in funzione della temperatura. Osservando la funzione di distribuzione pesata per il numero di particelle, si è notata una lieve diminuzione del raggio medio del peptide in funzione dell'aumento di temperatura. Questo risultato è compatibile con la presenza di un elevato grado di aggregazione del peptide prima dell'aumento della temperatura.

Sfruttando la luce di sincrotrone presso l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) di Grenoble, è stato possibile misurare questi campioni tramite la tecnica SAXS. Dall'analisi delle curve è emerso che il campione

purificato in cloruro di guanidinio è leggermente meno aggregato rispetto a quello purificato in urea. Il raggio medio ricavato dalla tecnica SAXS è in ottimo accordo con il raggio idrodinamico ottenuto, in funzione della temperatura, dalla tecnica DLS.

È interessante notare come il modello delle sfere polidisperse, con cui si sono analizzate le curve SAXS, sia il modello maggiormente compatibile con la formazione di aggregati globulari del peptide, nei quali potrebbero non essere presenti strutture cross beta.

Successivamente, si è condotta un'analisi strutturale del depsipeptide sia con la tecnica SAXS sia con ATR-FTIR. Il depsipeptide della A $\beta$ 42 ha la stessa struttura primaria del peptide ad eccezione di un legame ammidico isomerizzato a legame estere tra i residui Gly-25 e Ser-26. Questo costrutto, in seguito ad una rapida variazione di pH, permette di ottenere il peptide in forma monomericamente e quindi di controllare il successivo processo di aggregazione. Tuttavia, le curve ottenute tramite analisi SAXS suggeriscono che il depsipeptide fosse aggregato già prima della sua attivazione. Ciò ha portato, in seguito alla variazione di pH, alla formazione di un iper-aggregato costituito da un elevato numero di fibrille fino al raggiungimento di un raggio medio di 700 nm. Perciò risulta molto importante la fase di preparazione del

depsipeptide. È probabile che, durante la risospensione del liofilizzato, si sia formato un coacervato di depsipeptide che, alla bassa temperatura di conservazione (-80 °C), si è addensato maggiormente.

Poiché il peptide A $\beta$ 42 ha una struttura intrinsecamente disordinata ed altamente sensibile a diverse condizioni chimico-fisiche, possono aver influenzato altri fattori, quali la forza ionica, l'agitazione meccanica eseguita prima della misura o l'elevata concentrazione del peptide. Perciò è importante trovare le condizioni favorevoli per ottenere la forma monomerica del peptide al momento dell'analisi.

In seguito alla risospensione del depsipeptide e immediatamente prima della misura, potrebbe esser necessario filtrare la soluzione per eliminare la parte aggregata. Sebbene questo possa portare ad una riduzione della quantità di depsipeptide in soluzione, aumenterebbe la probabilità di trovare il peptide in forma monomerica.

L'aggregazione del peptide è stata studiata nel tempo anche attraverso la tecnica di spettroscopia ATR-FTIR. Lo spettro di assorbanza nei 30 minuti di analisi è coerente con quello riportato in letteratura, dove si può osservare l'inizio del processo di formazione delle fibrille. Infatti, si è osservato un

massimo di assorbanza a  $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$  che è indicativo della presenza di foglietti- $\beta$  paralleli. Questo picco si restringe in funzione del tempo, indicando la presenza di filamenti- $\beta$  stabili e forti legami idrogeno, caratteristici delle fibrille amiloidi. Grazie allo spettro in derivata seconda, è stato possibile osservare i sotto-picchi all'interno delle bande convolute. In questo modo si è rilevata una spalla a  $\sim 1643 \text{ cm}^{-1}$  che non è più presente dopo 15 minuti, suggerendo una perdita della quantità di strutture random coil a favore della formazione delle fibrille amiloidi. Inoltre, sembra che i filamenti- $\beta$  aggregati (picco a  $\sim 1690 \text{ cm}^{-1}$ ) diminuiscono durante il tempo di formazione delle fibrille. Perciò, in funzione del tempo, diminuisce il rapporto di intensità 1690/1630, suggerendo una transizione dai filamenti- $\beta$  antiparalleli ai foglietti- $\beta$  paralleli. Anche questo risultato riflette il processo di formazione delle fibrille. Infine, si è osservato uno spostamento del picco dei foglietti- $\beta$  da  $\sim 1633 \text{ cm}^{-1}$  iniziale a  $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$  finale. Questo spostamento può essere dovuto alla formazione di foglietti- $\beta$  estesi e planari.

In conclusione, nonostante l'estrema sensibilità alle condizioni chimico-fisiche, risulta possibile produrre il peptide  $\beta$ -amiloide 42 per via ricombinante in quantità sufficienti per di studiarne gli stadi precoci di

aggregazione. Inoltre, è possibile utilizzare il depsipeptide per seguire la cinetica di aggregazione del peptide  $\beta$ -amiloide 42. In futuro, sarà necessario individuare le condizioni chimico-fisiche ottimali in cui preparare una soluzione di depsipeptide in forma non aggregata a partire dalla quale, attraverso una rapida variazione di pH, si possa seguire, mediante misure SAXS, tutti gli stadi di aggregazione del monomero di A $\beta$ 42 fino alla formazione delle fibrille e delle fibre mature. Tali studi saranno di importanza cruciale per individuare possibili strategie di inibizione del processo di formazione delle fibre amiloidi.

## ***Bibliografia***

- Agrawal, S., Kuo, P.-H., Chu, L.-Y., Golzarroshan, B., Jain, M., e Yuan, H. S. (2019). RNA recognition motifs of disease-linked RNA-binding proteins contribute to amyloid formation. *Scientific Reports*, 9(1), 6171. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42367-8>
- Cerf, E., Sarroukh, R., Tamamizu-Kato, S., Breydo, L., Derclaye, S., Dufrêne, Y. F., Narayanaswami, V., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., e Raussens, V. (2009). Antiparallel  $\beta$ -sheet: A signature structure of the oligomeric amyloid  $\beta$ -peptide. *Biochemical Journal*, 421(3), 415–423. <https://doi.org/10.1042/BJ20090379>
- Cordeiro, Y., Kraineva, J., Suarez, M. C., Tempesta, A. G., Kelly, J. W., Silva, J. L., Winter, R., e Foguel, D. (2006). Fourier Transform Infrared Spectroscopy Provides a Fingerprint for the Tetramer and for the Aggregates of Transthyretin. *Biophysical Journal*, 91(3), 957–967. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.085928>
- Kirkitadze, M. D., e Kowalska, A. (2005). *Molecular mechanisms initiating amyloid  $\beta$ -fibril formation in Alzheimer's disease*. 52.
- Ludewig, S., e Korte, M. (2017). Novel Insights into the Physiological Function of the APP (Gene) Family and Its Proteolytic Fragments in Synaptic



- Plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00161>
- Mattson, M. P. (2004). *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*. 430.
- Murphy, M. P., e LeVine, H. (2010). Alzheimer's Disease and the Amyloid- $\beta$  Peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1), 311–323.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1221>
- Piccirilli, F., Plotegher, N., Spinozzi, F., Bubacco, L., Mariani, P., Beltramini, M., Tessari, I., Militello, V., Perucchi, A., Amenitsch, H., Baldassarri, E., Steinhart, M., Lupi, S., e Ortore, M. G. (2017). Pressure effects on  $\alpha$ -synuclein amyloid fibrils: An experimental investigation on their dissociation and reversible nature. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 627, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.06.007>
- Sarroukh, R., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., e Raussens, V. (2013). ATR-FTIR: A “rejuvenated” tool to investigate amyloid proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(10), 2328–2338. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.012>
- Sokolov, P. A., Rolich, V. I., Vezo, O. S., Belousov, M. V., Bondarev, S. A., Zhouravleva, G. A., e Kasyanenko, N. A. (2022). Amyloid fibril length

distribution from dynamic light scattering data. *European Biophysics Journal*, 51(4–5), 325–333. <https://doi.org/10.1007/s00249-022-01600-5>

Stephens, A. D., Lu, M., Fernandez-Villegas, A., e Kaminski Schierle, G. S. (2020). Fast Purification of Recombinant Monomeric Amyloid- $\beta$  from *E. coli* and Amyloid- $\beta$ -mCherry Aggregates from Mammalian Cells. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(20), 3204–3213. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00300>

Walsh, D. M., Thulin, E., Minogue, A. M., Gustavsson, N., Pang, E., Teplow, D. B., e Linse, S. (2009). A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid  $\beta$ -peptide: Expression and purification of the amyloid  $\beta$ -peptide. *FEBS Journal*, 276(5), 1266–1281. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06862.x>

Wildsmith, K. R., Holley, M., Savage, J. C., Skerrett, R., e Landreth, G. E. (2013). Evidence for impaired amyloid  $\beta$  clearance in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 5(4), 33. <https://doi.org/10.1186/alzrt187>

<sup>(1)</sup> Tesi di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata di Sofia Ventura (2021 - 2022). Università Politecnica delle Marche –

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente. "Produzione ricombinante, caratterizzazione mediante diffusione a piccolo angolo dei raggi X e saggi funzionali della proteina beta-amiloide". Relatore: Professore Francesco Spinozzi; Correlatore: Lucia Silvestrini