

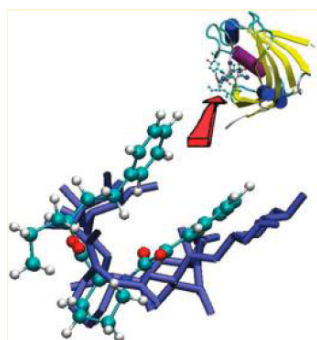
NANOSTRUTTURE PER LA DIAGNOSTICA DI PROTEINE COINVOLTE IN AMILOIDOSI DEGENERATIVE

Eleonora Mercatelli

Relatore: *Dott.ssa Gabriella Caminati*

gabriella.caminati@unifi.it

Questo lavoro di tesi si inserisce in un progetto che riguarda nuovi leganti inibitori della FKBP12, una proteina della famiglia delle immunofiline, coinvolta in molte patologie neurodegenerative quali sindrome di Alzheimer e morbo di Parkinson e sovra espressa negli stadi precoci di tali malattie. In questo lavoro di tesi è stata investigata la possibilità di costruire nanostrutture che incorporino efficacemente leganti ad alta affinità per la FKBP12. La realizzazione di trasduttori così funzionalizzati apre la strada alla possibilità di rilevazione della proteina in bassissima concentrazione. In particolare sono stati esaminati tre possibili leganti, FK506, Elte421 e Rifaximina, sia commerciali che di nuova sintesi come l'Elte421.



Interazione FKBP12-legante

Il processo di “binding” dei diversi inibitori specifici selezionati è stato studiato tramite misure fotofisiche determinando la variazione di intensità di fluorescenza del residuo di triptofano nella *binding pocket* della proteina per aggiunta di concentrazioni crescenti del legante in soluzione. Lo studio ha mostrato un’ottima efficacia anche del nuovo legante con costanti di binding, K_D , dell’ordine di 44 nM, solo due volte inferiore alla K_D per FK506.

Per l’immobilizzazione dei leganti è stata seguita una strategia biomimetica selezionando varie nano-architetture a base fosfolipidica che si differenziano in termini di composizione lipidica, fluidità, numero di strati e metodo di ottenimento. Sono stati esaminati i seguenti sistemi nanostrutturati: mono- bistrati di *Langmuir-Blodgett* (LB) e *Supported Lipid Bilayers* (SLB) ai quali è stato incorporato il legante o per incubazione o durante il processo di preparazione del monostrato. I sistemi sono stati preparati sia su superfici di quarzo per permette la caratterizzazione fotofisica sia direttamente su sensori per bilancia microgravimetrica, QCM-Z, con la quale si procederà in studi successivi alla determinazione della proteina stessa.

Lo studio di incorporazione per incubazione in mono e bistrati LB di solo DPPG e di miscele di POPG/DPPC dei leganti FK506 e Rifaximina ha mostrato come ambedue penetrino all’interno della matrice lipidica sia come monomeri che come aggregati per concentrazioni di legante superiori a $1 \times 10^{-5} M$. Lo studio fotofisico ha mostrato anche una dipendenza di intensità emissiva dall’ orientamento della molecola di FK506 all’interno del film LB.

Sistemi a bistrato fosfolipidico sono stati anche ottenuti per adsorbimento diretto su sensori microgravimetri ricoperti di SiO_2 di liposomi di una miscela di DPPC/DOPG, poichè una tale composizione di gruppi polari era stata selezionata in lavori precedenti come ottimale per l’inserimento di FK506. I risultati hanno escluso la formazione di bistrati supportati planari, SLB, mostrando invece la presenza di *Supported Vesicular Layers*, SVL, stabili che potranno essere impiegati come matrice funzionalizzante del sensore per la determinazione di FKBP12.