



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche Fisiche e
Naturali

Corso di Laurea in
Chimica

***Studio elettrochimico
dell'interazione dei polipeptidi
CSF114 e CSF114(Glc) con
membrane biomimetiche.***

***An electrochemical approach
to the study of the interaction
of CSF114 and CSF114(Glc)
polypeptides with biomimetic
membranes.***

Relatore

Maria Luisa Foresti

Correlatore

Lucia Becucci

Candidato

Stefano Benci

Indice

Capitolo 1: Introduzione.....	4
1.1 Sclerosi multipla.....	4
1.2 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS).....	6
1.2.1 Gruppi protettivi.....	9
1.2.2 Supporto solido.....	10
1.2.3 Reagenti attivanti.....	11
1.3 Sintesi dei glicopeptidi.....	13
1.3.1 Metodo convergente.....	13
1.3.2 Metodo dei building-block.....	14
1.4 Sonde antigeniche sintetiche specifiche per la sclerosi multipla.....	14
1.5 Membrane biomimetiche.....	16
1.6 Tecniche elettrochimiche.....	20
1.6.1 Voltammetria ciclica.....	20
1.6.2 Voltammetria AC con risoluzione di fase.....	22
1.6.3 Spettroscopia d'impedenza elettrochimica.....	23
1.6.4 Cronocoulombometria.....	26
1.7 Scopo della tesi.....	27
Capitolo 2: Parte sperimentale.....	28
2.1 Sintesi e purificazione dei peptidi CSF114 e CSF114(Glc).....	28
2.1.1 Metodi e materiali.....	28
2.1.2 Procedura generale per la sintesi peptidica in fase solida su sintetizzatore manuale.....	29
2.1.3 Procedura di deprotezione del residuo glucosilato.....	30
2.1.4 Procedura generale per il cleavage dei peptidi dalla resina.....	30
2.1.5 Pre-purificazione dei peptidi mediante Solid Phase Extraction (SPE).....	30
2.1.6 Procedura generale del RP-HPLC semipreparativa.....	31
2.2 Caratterizzazione elettrochimica dei peptidi CSF114 e CSF114(Glc).....	31
2.2.1 Assetto sperimentale.....	31
2.2.1.1 Cella elettrochimica.....	31
2.2.1.2 Camera di lavoro.....	34
2.2.2 Preparazione e caratterizzazione di monostrati lipidici supportati da mercurio.....	35
2.2.3 Preparazione e caratterizzazione di bistrati lipidici supportati da mercurio.....	37
2.2.4 Reagenti.....	38
Capitolo 3: Risultati.....	39
3.1 CSF114 e CSF114(Glc) su monostrati supportati da Hg.....	39
3.1.1 Monostrati di DOPS.....	42
3.1.1.1 Misure a pH 3.....	42
3.1.1.2 Misure a pH 5,4.....	43
3.1.1.3 Misure a pH 7.....	45
3.1.2 Monostrati di DOPC.....	46
3.1.2.1 Misure a pH 3.....	46
3.1.2.2 Misure a pH 5,4.....	49
3.1.2.3 Misure a pH 7.....	51
3.1.3 Monostrati di DOPC/SM 2:1.....	53
3.2 CSF114 e CSF114(Glc) su bistrati supportati da Hg.....	57
3.2.1 Monostrato distale di DOPS.....	59
3.2.1.1 Misure a pH 7.....	59
3.2.2 Monostrato distale di DOPC.....	60
3.2.2.1 Misure a pH 3.....	60
3.2.2.2 Misure a pH 5,4.....	62

3.2.2.3 Misure a pH 7.....	65
3.2.3 Monostrato distale di DOPC/SM 2:1.....	65
Capitolo 4: Discussione.....	70
Capitolo 5: Conclusioni.....	73
Capitolo 6: Sigle e abbreviazioni.....	75
Capitolo 7: Bibliografia.....	76

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Sclerosi multipla

La sclerosi multipla (SM) è la più nota patologia neurologica, infiammatoria, demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC) la cui eziopatogenesi rimane tuttora sconosciuta.

La patologia colpisce principalmente la sostanza bianca dei nervi con distruzione della guaina mielinica, mentre il cilindrasse e la cellula nervosa rimangono abbastanza integri^[1,2]. La mielina costituisce il materiale che riveste i nostri nervi permettendo la trasmissione rapida ed integra degli impulsi nervosi; *essa è costituita per l'80% da lipidi come fosfatidilcolina, fosfatidilserina e sfingomielina, e per il restante da proteine.*

Le proteine più abbondanti, presenti nella mielina, sono la proteina proteolipidica (PLP, 50%) e la proteina basica della mielina (MBP, 30%). Altre proteine sono presenti in percentuali inferiori tra cui la glicoproteina associata alla mielina (MAG), la glicoproteina oligodendrocitica della mielina (MOG, 0.01-0.05%) e la glicoproteina Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein (OMgp). La MOG appartiene alla famiglia delle immunoglobuline, e a differenza della PLP, è localizzata sulla superficie esterna della mielina. A livello fisiologico si suppone che rappresenti un segnale di stop per la formazione della mielina, o un elemento utile per mantenerne l'integrità. Nel corso della malattia la distruzione delle guaine mieliniche causa il blocco o rallentamento degli impulsi che vanno dal sistema nervoso centrale verso le diverse parti del corpo e viceversa. Le aree in cui la mielina è stata danneggiata vengono anche dette placche. Da qui l'altro nome della malattia, "sclerosi a placche".

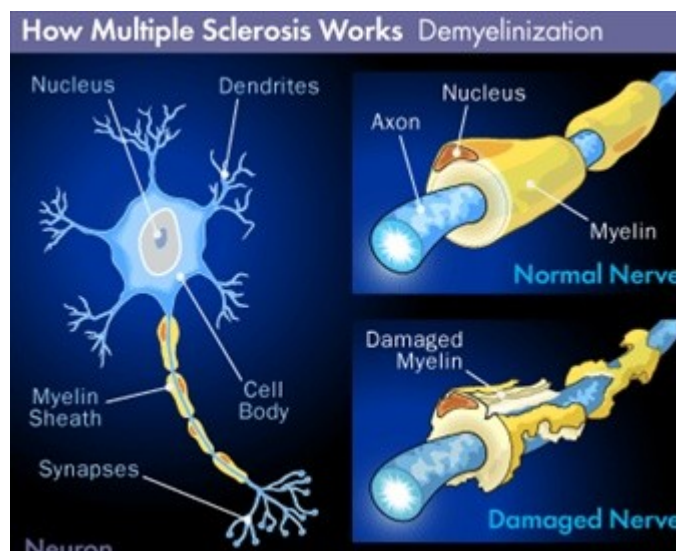


Figura 1: Degenerazione mielinica

Se in uno stato di normalità le informazioni nei nervi sono trasmesse a 100 m/s, in un individuo affetto dalla sclerosi multipla la velocità scende gradualmente a 5 m/s. Le strutture nervose più colpite dalla patologia sono i nervi ottici, il chiasma e il midollo spinale.

Non si riesce ad identificare in un solo agente la causa determinante la sclerosi multipla, ma alcuni dati epidemiologici devono essere tenuti in considerazione: la sclerosi multipla colpisce circa tre milioni di persone nel mondo, mezzo milione in Europa e più di 50.000 in Italia. La malattia si presenta primariamente in età compresa tra i 14 e i 40 anni, con un picco verso i 30 anni. È invece poco frequente sopra i 50 anni. Colpisce le donne con una frequenza di 2,5:1 rispetto agli uomini. L'incidenza è inferiore a 1/100.000 nelle aree equatoriali, varia da 6 a 14/100.000 nel sud degli Stati Uniti e nell'Europa meridionale e da 30 a 80/100.000 in Canada, nell'Europa settentrionale e nel nord degli Stati Uniti. Attualmente si ritiene che possano esistere fattori ereditari, in seguito alla scoperta che alcuni antigeni di istocompatibilità (HLA) sono più frequenti nei pazienti affetti da sclerosi multipla rispetto ai soggetti di controllo; questa ipotesi tuttavia non spiegherebbe perché emigrando da una zona a bassa incidenza verso una ad alta incidenza, si tende ad assumere lo stesso rischio dell'area di arrivo, prescindendo dai caratteri genetici della popolazione da cui si proviene. Ad ogni modo la componente ereditaria della malattia è evidente visto che il rischio di ammalarsi risulta maggiore nei parenti stretti di persone affette da sclerosi multipla. I sintomi tipici della malattia, il cui decorso è lento ma progressivo, riguardano soprattutto: vista, coordinazione spaziale e perdita di equilibrio, debolezza e diminuzione del tono muscolare, perdita di sensibilità, disfunzioni dell'apparato urinario e digerente oltreché a disturbi delle funzioni cognitive ed emotive. Non esiste ancora una terapia specifica. I trattamenti sono mirati agli episodi acuti, alla prevenzione delle ricadute e al miglioramento generale del quadro sintomatologico. La degenerazione del tessuto nervoso è da attribuire all'azione di numerose cellule del sistema immunitario quali CD4(+), CD8(+), Th1, cellule B, macrofagi e microglia^[3] che esplicano la loro azione verso le cellule della mielina, le quali non vengono più riconosciute come self e vengono così distrutte. Si ha la cosiddetta perdita della tolleranza, alterazioni della quale sono alla base di moltissime malattie autoimmuni^[4].

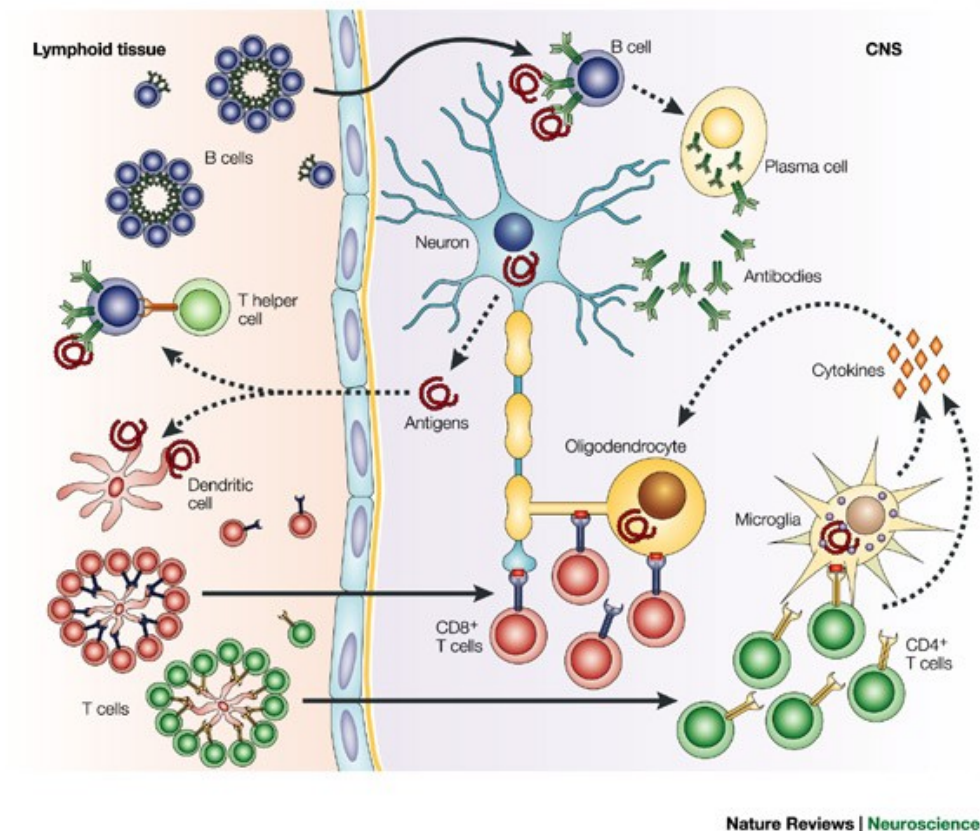


Figura 2: Meccanismo della degradazione mielinica

Il target biologico verso cui si espleta la risposta anticorpale da parte del sistema immunitario è come detto in precedenza la mielina. La presenza di proteine caratteristiche in questo tessuto insieme al ruolo ricoperto dalla glicosilazione che è considerata un evento fondamentale del sistema immunitario, ha determinato un vivo interesse in questo lavoro di tesi nell'approfondire il ruolo delle glicoproteine nella risposta anticorpale nell' sclerosi multipla^[5].

1.2 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)

La sintesi peptidica su fase solida (SPPS *solid phase peptide synthesis*) è una tecnica che fu introdotta da Merrifield nel 1963. Nasce dall'idea di poter accrescere una catena peptidica fissandone una estremità ad un supporto inerte e insolubile, in modo tale da rendere il processo sintetico più agevole e efficiente.

Questo metodo si compone di una serie di passaggi^[6] [Figura 3]:

1. ancoraggio del primo amminoacido alla resina tramite un *linker*;
2. inizio vero e proprio della sintesi mediante una sequenza ciclica che si ripete a seconda

- del numero di unità di cui è composto il peptide;
3. infine distacco dal supporto.

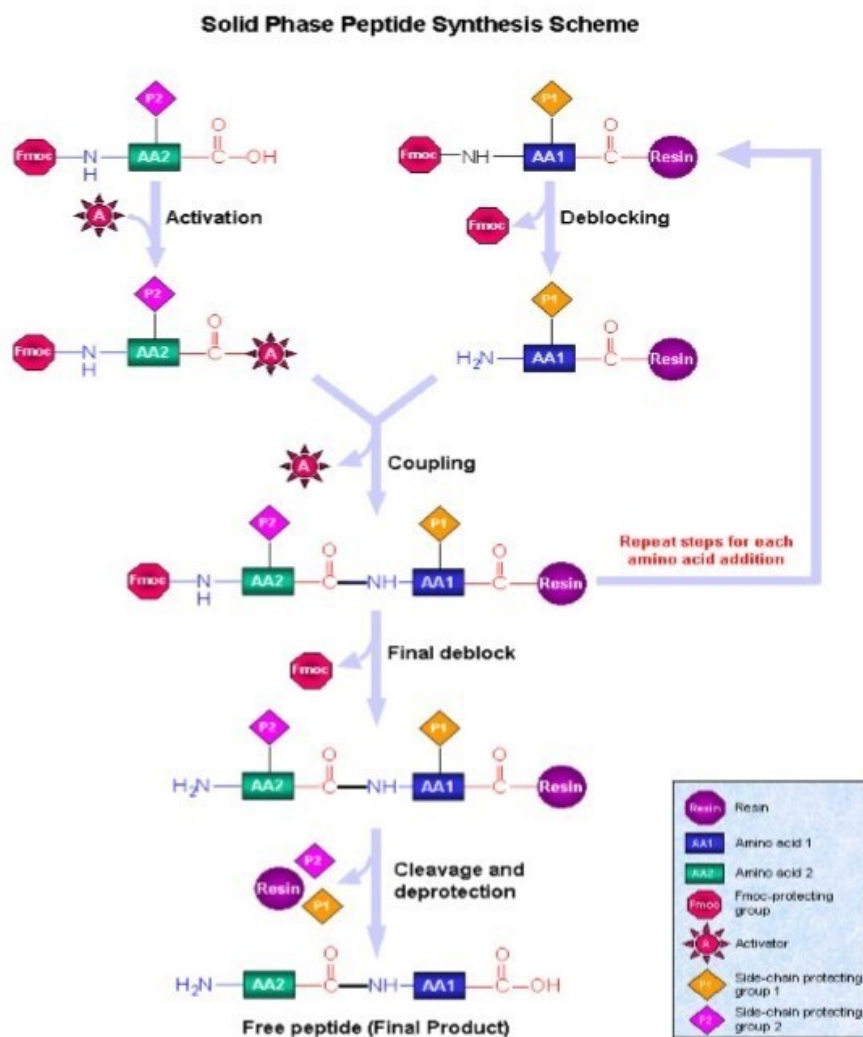


Figura 3: Schema generale SPPS

L'accrescimento della catena peptidica avviene secondo la cosiddetta *strategia C → N*, partendo cioè dalla funzione carbossilica terminale verso la funzione amminica terminale, ovvero esattamente al contrario di quanto avviene nella biosintesi dei peptidi nei ribosomi.

Tutte le operazioni di allungamento avvengono in fase eterogenea in modo tale da rendere possibile la rimozione di prodotti secondari senza dover isolare tramite purificazione ogni intermedio di sintesi.

Per quanto riguarda i *building blocks* introdotti, essi saranno dotati di gruppi protettivi opportuni sull' α -ammina e all'occorrenza sulla catena laterale, nel nostro caso sono stati usati rispettivamente il 9H-fluorenil-9metilossicarbonile (Fmoc) per la funzione amminica, il ter-butile (t-Bu), il trifenilmetile (Trt), il ter-butilossicarbonile (t-Boc) ed il 2,2,4,6,7-

pentametildiidrobenzofurano-5-sulfonile (Pbf) per la catena laterale a seconda del gruppo funzionale da proteggere. Il gruppo protettore Fmoc è ortogonale a tutti gli altri protettori usati, per cui è possibile rimuoverlo senza compromettere la protezione delle catene laterali.

La sintesi è stata condotta manualmente.

Ogni ciclo di allungamento inizia con la deprotezione dell' α -ammina seguita da lavaggi con dimetilformammide (DMF), si passa poi al vero e proprio processo di coupling in cui l'amminoacido terminale del peptide ancorato viene fatto reagire con il successivo amminoacido protetto sulla funzione amminica in α con Fmoc ed eventualmente sulla catena laterale con l'opportuno gruppo protettore ortogonale. L'accoppiamento viene facilitato tramite attivazione *in situ* della funzione carbossilica dell'amminoacido entrante utilizzando 1-[Bis(dimetilammino)metilene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio 3-ossido esafluorofosfato (HATU) o *N,N,N',N'*-Tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazo-1-ile)uronio esafluorofosfato (HBTU).

La reazione è stata effettuata in un reattore di Teflon contenente la resina precedentemente rigonfiata in DMF, la soluzione sempre in DMF dello Fmoc-amminoacido e degli attivatori in presenza di *N,N*-diisopropil-*N*-etilammina (DIPEA).

Se si ritiene necessario controllare l'esito della reazione di *coupling*, viene effettuato il *test di Kaiser* che può portare ai seguenti risultati:

- colorazione gialla della soluzione e della resina: assenza di gruppi amminici liberi e quindi un'elevata resa del *coupling*;
- colorazione blu della soluzione e della resina: presenza di gruppi amminici liberi in quantità superiore al 5%, occorre quindi ripetere l'accoppiamento;
- situazioni intermedie: presenza di gruppi amminici liberi in quantità inferiore al 5%, per precauzione è consigliato ripetere l'accoppiamento.

Questo test si basa sulla reazione della ninidrina con le ammine, le soluzioni sono:

- Soluzione 1: 5g di ninidrina in 100 mL di etanolo
- Soluzione 2: 80g di fenolo in 20 mL di etanolo
- Soluzione 3: 2mL di soluzione 0,001 M di KCN in 98 mL di piridina

Si preleva qualche granello di resina e si pone in un test tube, si aggiungono 2-3 gocce di ogni soluzione e si inserisce tale tubicino in un bagno di sabbia a 100°C per 5 min.

Onde evitare falsi positivi è opportuno essiccare accuratamente la resina con diclorometano (DCM) per eliminare ogni traccia di DMF.

Una volta completata la sintesi, si procede alla deprotezione di tutte le catene laterali contemporaneamente ed alla idrolisi acida (*cleavage*) del peptide dal supporto solido.

1.2.1 Gruppi protettori

La sintesi peptidica è un'operazione molto complessa in quanto gli amminoacidi hanno diverse zone reattive che potrebbero portare ad un numero molto elevato di prodotti finali, abbassando così notevolmente la resa del processo.

Per ovviare a questo inconveniente vengono adottati specifici gruppi protettori che disattivano momentaneamente i gruppi funzionali non coinvolti direttamente nella formazione del legame ammidico; molti amminoacidi infatti contengono gruppi reattivi in catena laterale come acidi carbossilici, alcoli, tioli e ammine, i quali potrebbero reagire con i successivi *building blocks*.

Una caratteristica fondamentale dei gruppi protettori è la loro *ortogonalità*, cioè la possibilità di essere rimossi in condizioni di reazione specifiche e soprattutto indipendentemente l'uno dall'altro.

Esistono due principali strategie di protezione ortogonale per la sintesi peptidica in fase solida: la strategia Boc/Bzl nella quale il gruppo α -amminico è protetto come *tert*-butilossicarbonile (t-Boc), rimovibile con acido trifluoroacetico (TFA) 25-50% in DCM, mentre la protezione delle catene laterali viene effettuata con gruppi benzili (Bzl) che vengono poi rimossi in condizioni acide drastiche, di solito acido fluoridrico liquido contemporaneamente al distacco della catena dalla resina. L'altra è la strategia Fmoc/tBu in cui la funzione α -amminica viene protetta temporaneamente con il gruppo Fmoc, il quale viene rimosso facilmente con una soluzione di piperidina 20% in DMF.

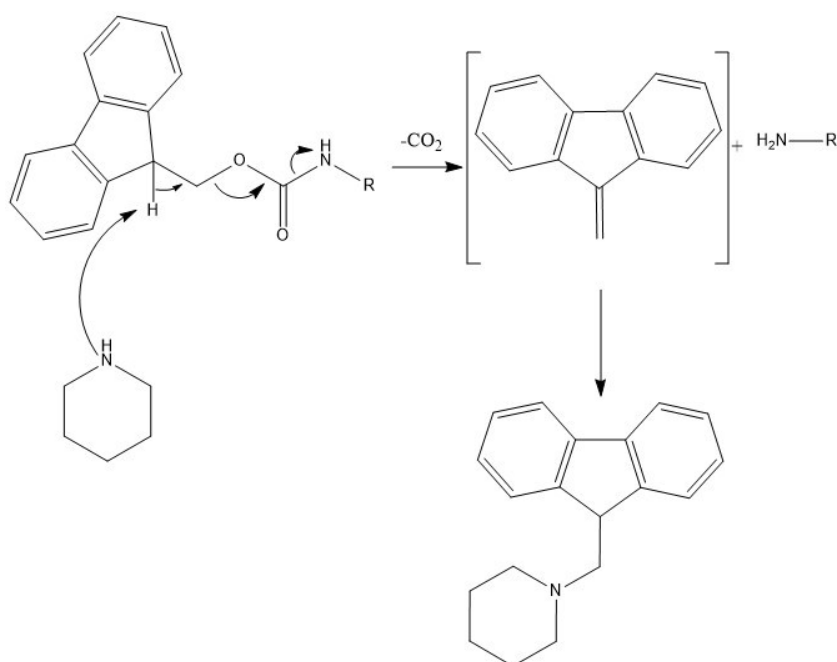


Figura 4: Meccanismo di deprotezione dello Fmoc con piperidina

Per quanto riguarda i gruppi funzionali presenti nelle catene laterali degli amminoacidi, devono essere necessariamente protetti con gruppi stabili ai trattamenti di rimozione dello Fmoc. Tale protezione è effettuata con gruppi protettori acido-labili t-Bu e suoi derivati, cioè facilmente rimovibili tramite trattamento acido, nel nostro caso acido trifluoroacetico (TFA), alla fine del processo di sintesi durante il distacco dal supporto.

In questo lavoro di tesi è stata usata la strategia Fmoc/tBu.

1.2.2 Supporto solido

La sintesi su fase solida necessita di supporti polimerici inerti e stabili sia chimicamente che meccanicamente e che, una volta legati all'amminoacido C-terminale, si possano rimuovere in condizioni tali da non danneggiare il peptide appena prodotto. L'insolubilità di questi materiali permette anche la possibilità di automatizzare i vari *steps* di sintesi in quanto i processi di purificazione degli intermedi sono semplificati proprio grazie a questa caratteristica del supporto.

Le resine per SPPS devono necessariamente essere caratterizzate da una rapida diffusione, dall'avere siti facilmente accessibili a tutti i reagenti e dalla possibilità di legare molecole di *linker* che permettono il fissaggio al supporto polimerico del peptide in crescita.

I *linker* sono ideati in modo tale da permettere facilmente il distacco del peptide dalla resina mediante condizioni specifiche, così da poter ottenere il prodotto libero.

Dato lo straordinario sviluppo della tecnica su fase solida, sono state messe a punto varie tipologie di resine polimeriche funzionalizzate. Molte di queste sono derivate dal supporto polistirenico (PS) originariamente usato da Merrifield, costituito da polistirene copolimerizzato con l' 1-2% di divinilbenzene e contenente come gruppo reattivo il benzilcloruro [Figura 5].

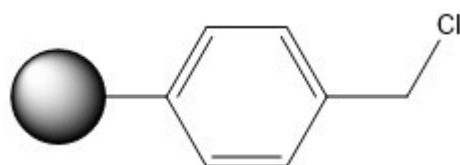


Figura 5: Resina di Merrifield

Nella sintesi del CSF114(Glc) è stata usata la resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang [Figura 6], che porta già il primo amminoacido della sequenza legato.

Le resine Wang sono costituite da un supporto clorometilpolistirenico a cui sono legate molecole di 4-idrossibenzilalcol che ha funzione di *spacer*, cioè di spaziatore. La funzione

dello *spacer* è quella di separare i siti attivi dalla matrice polistirenica della resina, in modo da renderli completamente solvatati durante le fasi di accoppiamento e rendendo possibile anche l'esecuzione di test in soluzione (*test di Kaiser*). Ovviamente gli spaziatori sono legati alla resina in modo da permettere il distacco del peptide alla fine della sintesi.

All'estremità dello spaziatore è legato un residuo, detto *handle*, che permette la formazione del legame estereo fra l'amminoacido e la resina che in questo caso è l'acido 4-idrossimetilfenossiacetico.

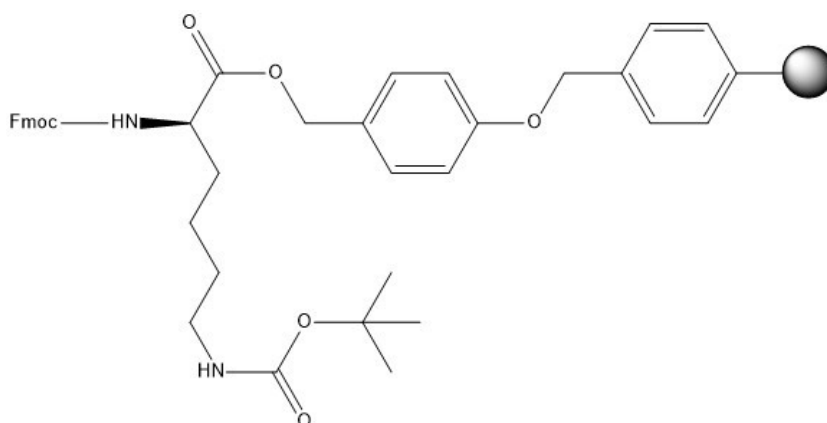




Figura 7: DCC e DIPCDI

Successivamente sono stati sviluppati nuovi attivanti come l' HATU e l' HBTU, questi sono i composti usati in questo lavoro di sintesi.

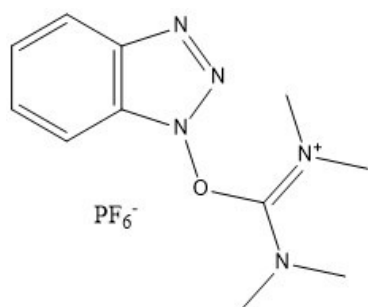


Figura 8: HBTU

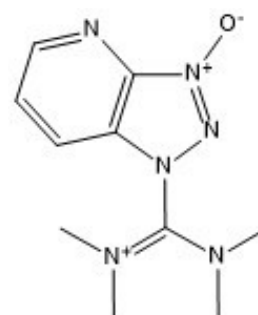


Figura 9: HATU

Questi due composti reagiscono allo stesso modo, di seguito è riportato il meccanismo dell' HATU

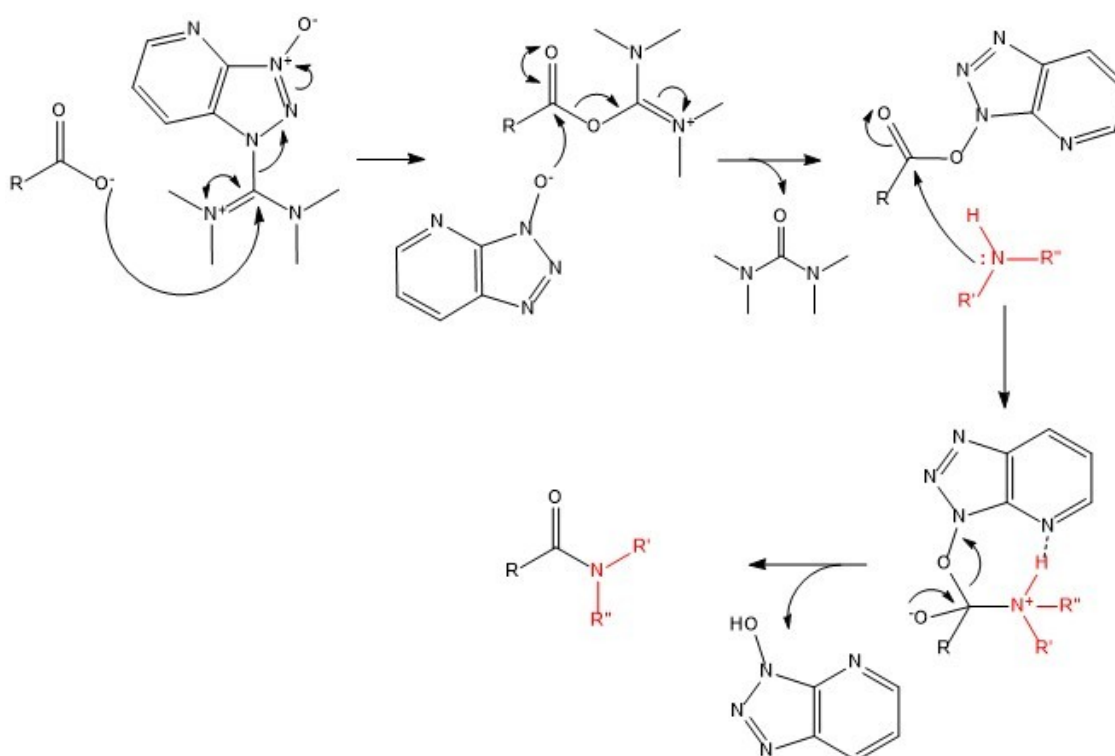


Figura 10: Meccanismo di reazione dell' HATU

La reazione di attivazione è catalizzata da una base, generalmente N-metilmorfolina (NMM) o

N,N-diisopropil-N-etilammina (DIPEA). In questo lavoro è stata usata la DIPEA.

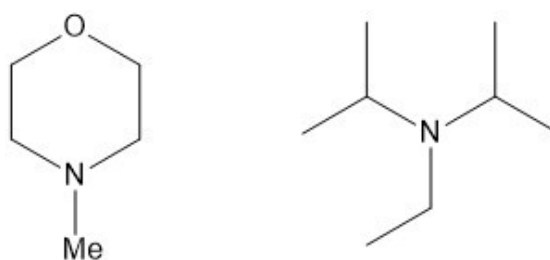


Figura 11: Basi attivanti NMM e DIPEA

1.3 Sintesi dei glicopeptidi

L'importanza della presenza del residuo glicosidico nel processo di riconoscimento anticorpale^[7], ha contribuito ad accrescere l'interesse sullo studio riguardo a tali derivati e di conseguenza ha contribuito ad analizzare i vari aspetti che contraddistinguono la sintesi dei glicopeptidi presso il laboratorio di Chimica e Biologia di Peptidi e Proteine (*PeptLab*) dell'Università di Firenze. La produzione di peptidi glicosilati mediante *Solid-Phase-Peptide-Synthesis* (SPPS) viene ottenuta utilizzando due principali metodi di sintesi: il metodo convergente e il metodo del *building-block*.

1.3.1 Metodo convergente

L'approccio convergente^[8], prevede la sintesi indipendente della catena peptidica e del carboidrato, che viene inserito mediante formazione del legame ammidico sul peptide, o su parte di esso. Tuttavia, l'approccio convergente può non risultare competitivo e funzionale per i seguenti motivi:

- la reazione di glicosilazione sul peptide è più lenta e difficoltosa che non sul singolo amminoacido ed è fortemente dipendente dall'ingombro sterico prodotto dalle catene laterali della sequenza peptidica
- l'attivazione della funzione carbossilica in catena laterale di un residuo di Asp può dar luogo a reazioni competitive
- deve essere predisposto un opportuno schema di protezione tridimensionale per la sintesi del peptide, in modo da non toccare i gruppi funzionali degli altri amminoacidi.

Tali problematiche tendono a limitare l'uso di questo approccio sintetico.

1.3.2 Metodo dei *building-block*

Questo metodo^[9,10,11] prevede la sintesi dell'amminoacido modificato e, successivamente, il suo inserimento nella catena peptidica.

In questo modo la reazione di funzionalizzazione del residuo è più rapida e meno difficoltosa, in quanto non è presente l'ingombro sterico dovuto alle catene laterali degli altri residui del peptide e inoltre le reazioni competitive sono ridotte notevolmente.

Mediante l'approccio del *building-block* il legame ammidico tra il carboidrato e l'amminoacido viene formato prima della sintesi del peptide, e l'amminoacido glicosilato viene introdotto nella sintesi peptidica in fase solida (SPPS) come un normale amminoacido. Quest'approccio richiede pertanto un opportuno schema di protezione ortogonale delle funzioni amminica e carbossilica degli amminoacidi e delle funzioni ossidriliche degli zuccheri. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato Fmoc-L-Asn(GlcOAc4)-OH come *building-block* per la SPPS.

1.4 Sonde antigeniche sintetiche specifiche per la sclerosi multipla

Fino ad oggi gli autoanticorpi presenti nel siero di pazienti affetti da patologie autoimmuni, come *biomarker* di malattia, vengono ricercati mediante l'uso di antigeni proteici nativi (supposti essere coinvolti nei meccanismi patogenetici) mediante semplici *test* immunoenzimatici. Il limite di questa strategia risiede nella difficoltà di identificare e produrre tali antigeni.

In quest'ottica, presso il laboratorio di Chimica e Biologia di Peptidi e Proteine (PeptLab) dell'Università di Firenze, è stato effettuato uno studio con il quale è stata dimostrata l'attività del glucopeptide [Asn(Glc)hMOG(30-50)]^[12] (l'analogo glucosilato dell'epitopo immunodominante della MOG) come sonda antigenica capace di rivelare autoanticorpi nel siero di pazienti affetti da SM tramite un semplice saggio immunoenzimatico. Tale peptide è stato modificato sinteticamente introducendo la funzione β -D-glucopiranosilica (Glc) sulla catena laterale di Asn31, legata mediante legame *N*-glicosidico^[15] ed è stato il primo esempio riportato in letteratura di peptide portante una modifica aberrante e usato in un test ELISA su fase solida messo a punto per seguire l'evoluzione della malattia.

Partendo dallo studio conformazionale della sonda antigenica [Asn³¹(Glc)hMOG(30- 50)] è stata sintetizzata una libreria di glicopeptidi, aventi la stessa composizione aminoacidica della

sonda e opportunamente scelti in maniera tale da esporre al meglio la funzione glicosidica. Tra i prodotti sintetizzati è stato scelto il prodotto denominato CSF114(Glc)^[13,15] caratterizzato da una conformazione a β -hairpin [Figura 12].

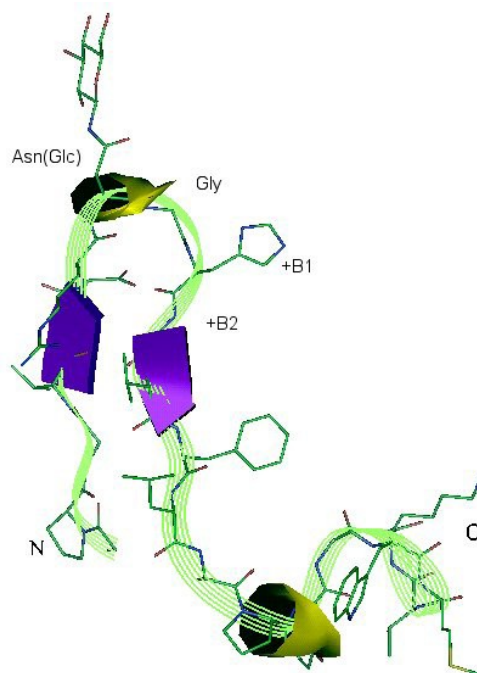


Figura 12 Struttura del conformero a più bassa energia di CSF114(Glc).

Tabella 1 Struttura primaria della sonda antigenica CSF114(Glc).

Struttura primaria di CSF114(Glc)
H-Thr ¹ -Pro ² -Arg ³ -Val ⁴ -Glu ⁵ -Arg ⁶ -Asn ⁷ (Glc)-Gly ⁸ -His ⁹ -Ser ¹⁰ -Val ¹¹ -Phe ¹² -Leu ¹³ -Ala ¹⁴ -Pro ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -Gly ¹⁷ -Trp ¹⁸ -Met ¹⁹ -Val ²⁰ -Lys ²¹ -OH

Il peptide CSF114(Glc) nella conformazione a β -hairpin espone Asn(Glc), epitopo minimo per il riconoscimento anticorpale, al centro di un β -turn che coinvolge Asn⁷-Gly⁸ ^[15].

Sono stati studiati i titoli degli anticorpi IgG e IgM di pazienti affetti da SM riconosciuti da [Asn³¹(Glc)hMOG(30-50)], CSF114(Glc) e dei corrispondenti non glicosilati [Figura 13]. Nessun titolo anticorpale è stato individuato dalla sequenza non glicosilata, mentre il CSF114(Glc) ha rivelato il più alto titolo di autoanticorpi proponendo così lo stesso comportamento, in termini qualitativi, visto per [Asn³¹(Glc)hMOG(30-50)].

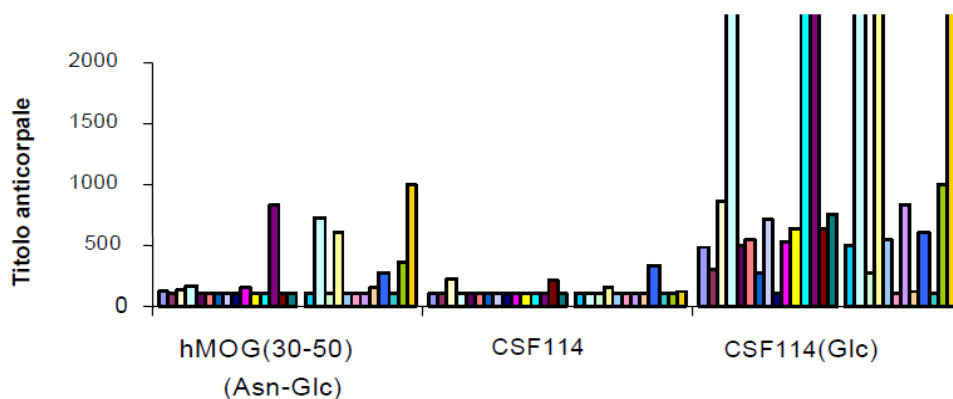


Figura 13 Titolo anticorpale in pazienti affetti da SM.

Questo risultato, insieme all'osservazione che asparagina *N*-glucosilata è fondamentale per il riconoscimento di autoanticorpi correlati con la SM in *test* ELISA competitivi effettuati in soluzione, hanno portato all'identificazione del glicopeptide CSF114(Glc) come sonda antigenica in grado di riconoscere con buona specificità gli autoanticorpi della SM^[15].

1.5 Membrane biomimetiche

Le membrane biologiche svolgono un ruolo chiave in tutti i processi di vita della cellula; a causa della loro complessità, sono stati messi a punto modelli sperimentali semplificati per permettere lo studio delle funzioni che esse svolgono. Questi modelli prendono il nome di membrane biomimetiche.

È possibile suddividere questi modelli in due grandi gruppi: self-assembled monolayers (SAMs) e bilayer lipid membranes (BLMs).

I monostrati lipidici supportati da mercurio sono i più semplici e facili modelli di biomembrane ottenibili per auto-assemblaggio; vengono realizzati spandendo sulla superficie di una soluzione acquosa il lipide e immergendovi l'elettrodo a goccia stazionaria di mercurio. Questo procedimento dà luogo ad un monostrato lipidico auto-assemblato avente le code idrocarburiche rivolte verso la superficie del mercurio e le teste polari rivolte verso la soluzione. Questa disposizione, che si genera automaticamente, è possibile grazie alla natura idrofobica del mercurio. Inoltre, grazie allo stato liquido del supporto, questi semplici modelli di membrane hanno un'elevata fluidità che permette alle molecole di lipide di muoversi sopra la superficie del mercurio. I monostrati lipidici però non sono adatti allo studio delle proteine intrinseche, che necessitano della struttura di un bistrato per essere incorporate in forma

funzionalmente attiva. Tuttavia sono utili per indagare le interazioni di peptidi o piccole proteine con la parte esterna delle membrane biologiche. I SAMs fosfolipidici possono essere impiegati per esaminare il comportamento di piccole biomolecole lipofile incorporate nel film lipidico e anche proteine adsorbite sulla superficie del film.

Un altro modello molto utilizzato è la Bilayer Lipid Membrane, BLM. Questo tipo di membrana è preparata usando una cella contenente una soluzione elettrolitica, divisa in due comparti da un setto in Teflon recante un piccolo foro. Depositando su questo foro una goccia di soluzione contenente il lipide in un solvente adeguato, si genera un film bimolecolare di spessore di circa 10 nm, nel quale le molecole di fosfolipide assumono la stessa disposizione che hanno nelle membrane biologiche, ovvero con le code idrofobiche rivolte verso l'interno e le teste polari rivolte verso la soluzione acquosa. Otteniamo così un bistrato lipidico inserito fra due soluzioni acquose.

Gran parte delle funzioni che le membrane biologiche svolgono dipendono dalla differenza di potenziale, $\Delta\phi$, che si genera fra le due superfici del bistrato fosfolipidico; infatti la distribuzione di cariche elettriche sulle due superfici è asimmetrica. Queste densità di carica presenti su ambo i lati del bistrato generano due strati diffusi nelle soluzioni che si trovano in contatto con il bistrato stesso. Ciò nonostante, la densità di carica presente su ogni lato della membrana non viene necessariamente controbilanciata da una carica uguale ed opposta nello strato diffuso corrispondente. È possibile affermare quindi che non siamo in presenza di due interfasi indipendenti; se così fosse la differenza di potenziale transmembrana sarebbe costantemente nulla. La condizione di elettroneutralità si verifica solo considerando l'intero sistema, costituito dalla membrana e dai due strati diffusi adiacenti.

Piccole variazioni del potenziale transmembrana all'interno di membrane biologiche sono all'origine del funzionamento dei canali ionici. La possibilità di variare e misurare la differenza di potenziale transmembrana è essenziale per poter capire il funzionamento di molti processi cellulari; inoltre con queste ammissioni è possibile considerare le membrane biologiche ed i loro modelli come interfasi elettrificate.

Le BLMs possono essere modificate inserendo proteine in grado di formare canali ionici che possono essere voltaggio-dipendenti o non; nel primo caso, sottoponendo il sistema ad una variazione di potenziale transmembrana, queste proteine sono in grado di cambiare conformazione rendendo il bistrato permeabile agli ioni e alle molecole di acqua, mentre nel secondo, il bistrato è reso permeabile permanentemente. Questo tipo di membrane biomimetiche hanno grande fragilità meccanica ed elettrica; infatti collassano per $\Delta\phi$ superiori a $\pm 100-150$ mV e sono fortemente sensibili alle vibrazioni meccaniche.

Le Tethered Bilayer Lipid Membranes, tBLMs, sono un'evoluzione delle BLMs, in cui il

bistrato fosfolipidico è ancorato ad una superficie che ne garantisce quindi una maggior robustezza. Per misure elettrochimiche il supporto è necessariamente un conduttore, generalmente un metallo.

Un supporto con caratteristiche particolarmente vantaggiose è il mercurio, che grazie alla sua superficie perfettamente liscia ed alla sua natura liquida a temperatura ambiente, permette la formazione di un bistrato particolarmente uniforme e fluido, praticamente assente da difetti che possono fornire un cammino preferenziale per il passaggio degli ioni.

Un altro metallo adatto a fungere da supporto è l'oro; esso consente la formazione di bistrati lipidici meno fluidi e meno omogenei, ma ha il vantaggio di poter essere utilizzato anche con tecniche di analisi superficiale e inoltre si presta per applicazioni come biosensore proprio per la sua natura solida.

Per far sì che le proteine che si inseriscono nella membrana siano in grado di formare canali, è necessario che il bistrato sia in contatto con una soluzione acquosa su entrambe le superfici.

Per questa ragione si utilizza uno spaziatore idrofilico posizionato fra la superficie dell'elettrodo e la membrana; esso è generalmente costituito da una catena peptidica o poliossoetilenica che da un lato termina con un gruppo disolfuro o solfidrilico. Lo zolfo contenuto in questi due gruppi ha alta affinità con mercurio e oro, e tende così a formare legami covalenti con la superficie del metallo.

Le dimensioni dello spaziatore dovranno essere tali da permettere l'alloggiamento della porzione extramembrana della proteina, e per creare un serbatoio per gli ioni che attraversano la membrana.

Allo spaziatore sono legate covalentemente due catene fitaniliche che costituiscono il monostrato interno. Su questo si auto-organizza un secondo monostrato con procedure sperimentali diversificate per i due metalli. La procedura utilizzata per la formazione di un bistrato lipidico su mercurio è schematicamente riportata di seguito:

- autoassemblaggio del tiolipide sulla superficie dell'elettrodo, realizzando un monostrato lipidico ancorato al metallo e con le code idrofobiche rivolte verso l'esterno
- creazione di un secondo monostrato autoassemblato sul precedente con la procedura usata per i monostrati su Hg, ottenendo una tBLM.

Il tiolipide utilizzato per questo progetto è il DPTL, la cui struttura è riportata in figura:

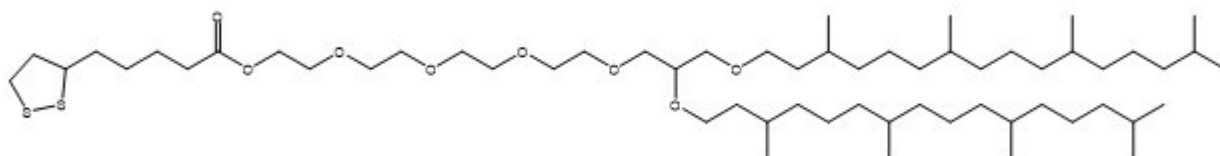


Figura 14: Struttura primaria del DPTL.

Il DPTL è costituito da un gruppo disolfuro inserito in un anello a cinque termini facente parte di un residuo dell'acido lipoico, connesso tramite legame estereo ad una catena idrofila tetraossoetilenica, a sua volta legata a due catene fitaniliche per mezzo di due legami eterei. In questa molecola lo spaziatore è rappresentato dalla catena tetraossietilenica e le due catene fitaniliche simulano le code idrofobiche di un fosfolipide. Una volta che esso si sia auto-organizzato sulla superficie del mercurio, abbiamo di fatto ottenuto metà bistrato.

La funzionalizzazione della superficie del mercurio si ottiene per auto-assemblaggio, immergendo l'elettrodo nella soluzione del tiolipide in etanolo per 20 minuti. La grande affinità dello zolfo per il mercurio permette di ottenere monostrati auto-assemblati stabili e riproducibili.

I bistrati assemblati con questa tecnica sono stabili in un ampio arco di potenziali, tipicamente oltre un Volt.

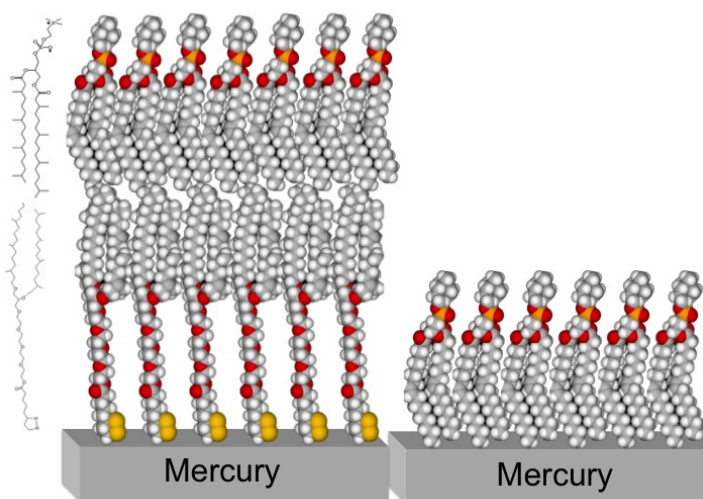


Figura 15: Bistrato fosfolipidico auto-organizzato su Hg (a sinistra) e monostrato fosfolipidico auto-organizzato su Hg (a destra).

1.6 Tecniche elettrochimiche

1.6.1 Voltammetria ciclica

La voltammetria è una tecnica elettrochimica in cui si registra una corrente in funzione del potenziale applicato; nella voltammetria ciclica il potenziale viene fatto variare linearmente da un valore iniziale V_i fino ad un valore finale V_f con una certa velocità, e poi riportato al valore iniziale V_i con la medesima velocità. Si realizza così un'onda triangolare.

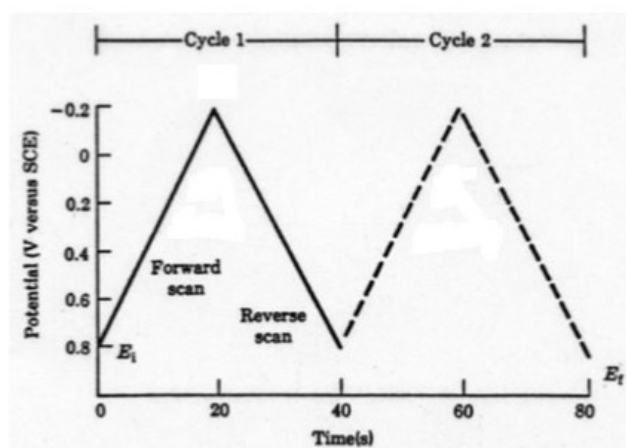


Figura 16: Onda triangolare di E contro il tempo.

Questa tecnica è molto utilizzata nello studio di specie elettroattive, in quanto fornisce numerose informazioni sulla cinetica del processo redox in esame, il numero di elettroni in gioco, gli eventuali stadi di cui è composta la reazione, il potenziale formale della coppia.

Il potenziale formale, E° , della coppia redox è definito come il potenziale che assume l'elettrodo in condizioni di equilibrio, quando la concentrazione della specie ridotta, Red, è uguale a quella della specie ossidata, Ox.

Prendiamo un sistema in cui è presente solo la specie Ox. Il potenziale di partenza V_i è sufficientemente positivo da non determinarne l'elettroriduzione; quando inizia la scansione da V_i a V_f , si registra un contributo alla corrente di tipo capacitivo dovuto al caricamento del doppio strato presente all'interfase elettrodo/soluzione, doppio strato assimilabile ad un condensatore; nel momento in cui si giunge in prossimità del potenziale formale della coppia, inizia il processo di trasferimento elettronico, caratterizzato da una sua velocità, in cui la specie Ox acquista elettroni per ridursi a Red determinando un'ulteriore corrente detta corrente faradica. Via via che il potenziale assume valori più negativi, *la velocità con cui Ox si riduce aumenta, e conseguentemente la corrente cresce*. La corrente massima viene raggiunta quando tutta la specie presente in prossimità della superficie elettrodica reagisce

istantaneamente, creando in questo modo un gradiente di concentrazione che richiama altri ioni elettroattivi dalla soluzione massiva; a questo punto la velocità del processo elettrodico è controllata dalla velocità con cui Ox diffonde verso l'elettrodo, la corrente risultante quindi diminuisce e tende ad un valore limite detto corrente di diffusione. Man mano che Ox reagisce, lo spessore dello strato di diffusione aumenta, determinando una diminuzione graduale della corrente.

Una volta terminata la scansione di andata, inizia quella di ritorno da V_f a V_i .

Otteniamo così un grafico di corrente i contro il potenziale V chiamato voltammogramma ciclico.

Nel suo insieme il processo di elettroriduzione (o di elettrossidazione) può essere controllato da due contributi: la diffusione della specie dalla soluzione massiva alla superficie dell'elettrodo e viceversa o lo stadio di trasferimento elettronico.

Se la velocità di trasferimento elettronico è molto superiore alla velocità di diffusione, allora siamo in una situazione di quasi-equilibrio rispetto a tale trasferimento e il potenziale dell'elettrodo è dato dall'equazione di Nernst. In questo caso il processo è detto reversibile. In un voltammogramma reversibile la separazione ΔV fra il potenziale di picco di riduzione V_r e il potenziale di picco di ossidazione V_o , è pari a $59 \text{ mV}/n$, con n numero di elettroni scambiati nel processo redox. Inoltre la corrente di picco catodico e quella di picco anodico sono uguali in valore assoluto e pari a:

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot c \cdot v^{1/2}$$

secondo l'equazione di Randles-Sevcik, in cui i_p è la corrente di picco in Ampère, n è il numero di elettroni scambiati, A è l'area dell'elettrodo in cm^2 , D è il coefficiente di diffusione della specie elettroattiva in cm^2s^{-1} , c è la concentrazione della specie nella soluzione massiva in mol cm^{-3} e v è la velocità di scansione in Vs^{-1} .

Se invece la velocità di trasferimento elettronico è inferiore o confrontabile a quella di diffusione, siamo in una situazione di non-equilibrio e pertanto il potenziale dell'elettrodo è “in ritardo” rispetto a quello previsto dall'equazione di Nernst. Il processo viene definito irreversibile, il corrispondente voltammogramma appare deformato e in alcuni casi è assente la curva di una delle due semireazioni.

In assenza di processi faradici, come nel caso dei monostrati e bistrati fosfolipidici auto-assemblati su mercurio, la corrente registrata è solamente capacitiva. Questa corrente è dovuta al fatto che all'interfase elettrodo/soluzione si genera un doppio strato carico assimilabile ad un condensatore elettrico, con una sua capacità differenziale C che dipende dal potenziale applicato V .

Come è noto, variando il potenziale si ha una variazione della carica Q presente sulle armature

del condensatore con cui rappresentiamo l'interfase in esame. La capacità differenziale è definita come $C = dQ/dV$. Si può considerare in prima approssimazione che C sia indipendente dal potenziale; in tal caso la corrente capacitiva i_c dovuta alla variazione di potenziale V nel tempo con una velocità costante $v = dV/dt$, sarà data da:

$$i_c = \frac{dQ}{dt} = \frac{d(CV)}{dt} = C \frac{dV}{dt} = Cv$$

Quindi, in assenza di processi faradici, la curva di andata e quella di ritorno del voltammogramma ciclico sono parallele e la loro separazione è pari a $2Cv$. Nel caso di monostrati e bistrati supportati su mercurio, il voltammogramma risulta inclinato con una pendenza pari a $1/R$ (dalla legge di Ohm, $i = V/R$).

In questo lavoro di tesi le misure di voltammetria ciclica sono state effettuate in presenza di ioni elettroattivi, sia prima che dopo l'aggiunta di CSF114 e CSF114(Glc). Questa procedura è stata adottata per verificare se il monostrato e il bistrato, impermeabili agli ioni inorganici elettroattivi in assenza di specie interagenti, presentavano una qualche permeabilità a seguito all'aggiunta del peptide.

1.6.2 Voltammetria AC con risoluzione di fase

Questa tecnica voltammetrica differisce dalla classica voltammetria in quanto alla scansione lineare del potenziale di base viene sovrapposto un potenziale sinusoidale di frequenza opportuna e piccola ampiezza, generalmente 5-10 mV picco-picco. L'ampiezza è piccola volutamente, altrimenti il potenziale di base verrebbe perturbato e la risposta in corrente non sarebbe lineare con il potenziale.

In questo lavoro le misure di voltammetria AC sono state effettuate con un potenziale sinusoidale di frequenza 75 Hz e ampiezza 10 mV, sovrapposto ad un potenziale di base che varia nell'intervallo in cui il sistema è stabile.

La corrente che si registra è anch'essa sinusoidale ed ha la stessa frequenza del potenziale alternato, ma è sfasata di un certo angolo rispetto al segnale di potenziale detto angolo di fase, φ .

L'angolo di fase della corrente risultante è caratteristico del tipo di elemento circuitale a cui può essere assimilato il sistema in esame; ad esempio un elemento puramente resistivo produce una corrente sfasata di un angolo di 0° , detta in fase rispetto al potenziale applicato, mentre un elemento puramente capacitivo produce una corrente sfasata di -90° rispetto al potenziale applicato, detta corrente in quadratura.

Nelle misure effettuate è stata registrata la sola componente in quadratura della corrente, che è

direttamente proporzionale alla capacità del sistema e quindi alla capacità del monostrato/bistrato, potendo trascurare a questa frequenza i contributi resistivi.

La conversione corrente-capacità è stata effettuata mediante un fattore di conversione determinato preventivamente tramite una taratura del sistema con l'uso di un condensatore di precisione.

1.6.3 Spettroscopia d'impedenza elettrochimica

La spettroscopia d'impedenza è una tecnica nella quale si misura una corrente in funzione di un potenziale di base al quale viene sovrapposto un potenziale alternato a frequenza, f , variabile. Il potenziale alternato è anche in questo caso di piccola ampiezza (5-10 mV, picco-picco) per avere una risposta lineare.

La corrente registrata ha la stessa frequenza del potenziale alternato, e uno specifico angolo di fase, ϕ , rispetto a tale potenziale. Si possono effettuare campionamenti per un vasto intervallo di frequenze, da 10^5 Hz a 10^{-3} Hz, variando anche il potenziale di base. Il software dello strumento converte i valori di corrente in valori di impedenza, Z , che non è altro che la generalizzazione della resistenza nel caso di correnti alternate; pertanto ha le sue stesse dimensioni (dalla legge di Ohm $V=iR$).

La successione di strati dielettrici del sistema elettrodo/monostrato (o bistrato)/soluzione può essere schematizzata come una serie di maglie RC costituite ciascuna da un condensatore di capacità C in parallelo ad una resistenza, R , ed ognuna rappresentante uno strato con diverse proprietà dielettriche.

Un monostrato supportato da mercurio in contatto con una soluzione elettrolitica può essere descritto tramite l'utilizzo di un circuito equivalente di questo tipo:

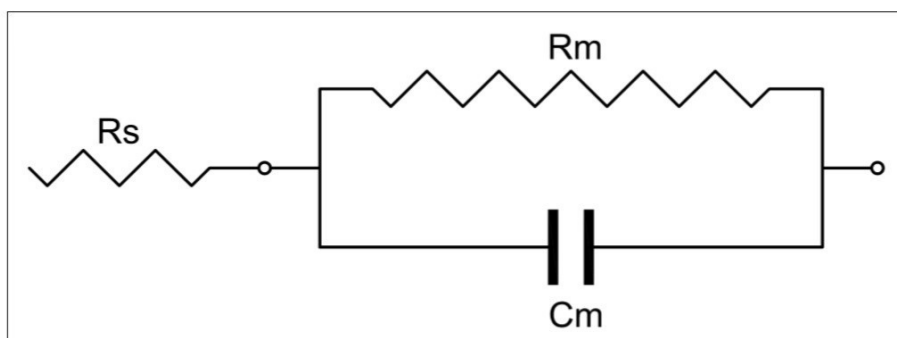


Figura 17: Schema di circuito equivalente semplificato usato per rappresentare un monostrato/bistrato fosfolipidico: R_s è la resistenza della soluzione; R_m e C_m sono rispettivamente la resistenza e la capacità della membrana.

L'impedenza totale è espressa dalla combinazione delle impedenze dei singoli elementi circuitali applicando le regole di elementi in serie e parallelo.

$$Z_{tot} = Z_s + Z_m$$

- Z_s è l'impedenza della soluzione. Essendo essa assimilabile ad un elemento puramente resistivo, la sua impedenza è uguale alla sua resistenza, quindi è un numero reale e risulta in fase con il potenziale applicato ($\varphi=0^\circ$). Per cui $Z_s = R_s$.
- Z_m è l'impedenza della maglia del monostrato (o bistrato). Per due elementi in parallelo abbiamo:

$$\frac{1}{Z_m} = \frac{1}{Z(R_m)} + \frac{1}{Z(C_m)}$$

Sapendo che l'impedenza di un elemento resistivo è uguale alla sua resistenza, mentre l'impedenza di un elemento capacitivo ha solo componente immaginaria ed è sfasata di -90° ; otteniamo:

$$Z(R_m) = R_m$$

$$Z(C_m) = \frac{-i}{\omega C_m}$$

dove ω è la frequenza angolare del segnale sinusoidale pari a $2\pi f$.

Sostituendo nell'impedenza della maglia abbiamo:

$$\frac{1}{Z_m} = \frac{1}{R_m} + i \omega C_m$$

$$Z_m = \frac{R_m}{1 + i \omega R_m C_m}$$

e l'impedenza totale sarà:

$$Z_{tot} = R_s + \frac{R_m}{1 + i \omega R_m C_m}$$

$$Z_{tot} = R_s + \frac{R_m(1 - i \omega R_m C_m)}{(1 + i \omega R_m C_m)(1 - i \omega R_m C_m)}$$

$$Z_{tot} = R_s + \frac{R_m}{1 + \omega^2 R_m^2 C_m^2} - i \frac{\omega R_m^2 C_m}{1 + \omega^2 R_m^2 C_m^2} \quad (1)$$

Come si vede, l'impedenza totale è costituita da una parte reale, data dalla somma dei primi due addendi, e da una parte immaginaria.

I risultati delle misure di spettroscopia d'impedenza possono essere riportati in vari modi a seconda del tipo di informazioni che si vogliono ricavare. Per informazioni di tipo qualitativo si utilizza generalmente il diagramma di Bode. In questo grafico vengono riportati il logaritmo

del modulo dell'impedenza totale, $\log Z$, e l'angolo di fase ϕ , in funzione del logaritmo della frequenza, $\log f$. Il grafico dell'angolo di fase ha una tipica forma a campana nel caso si stiano effettuando misure su un monostrato (o bistrato) supportato su mercurio.

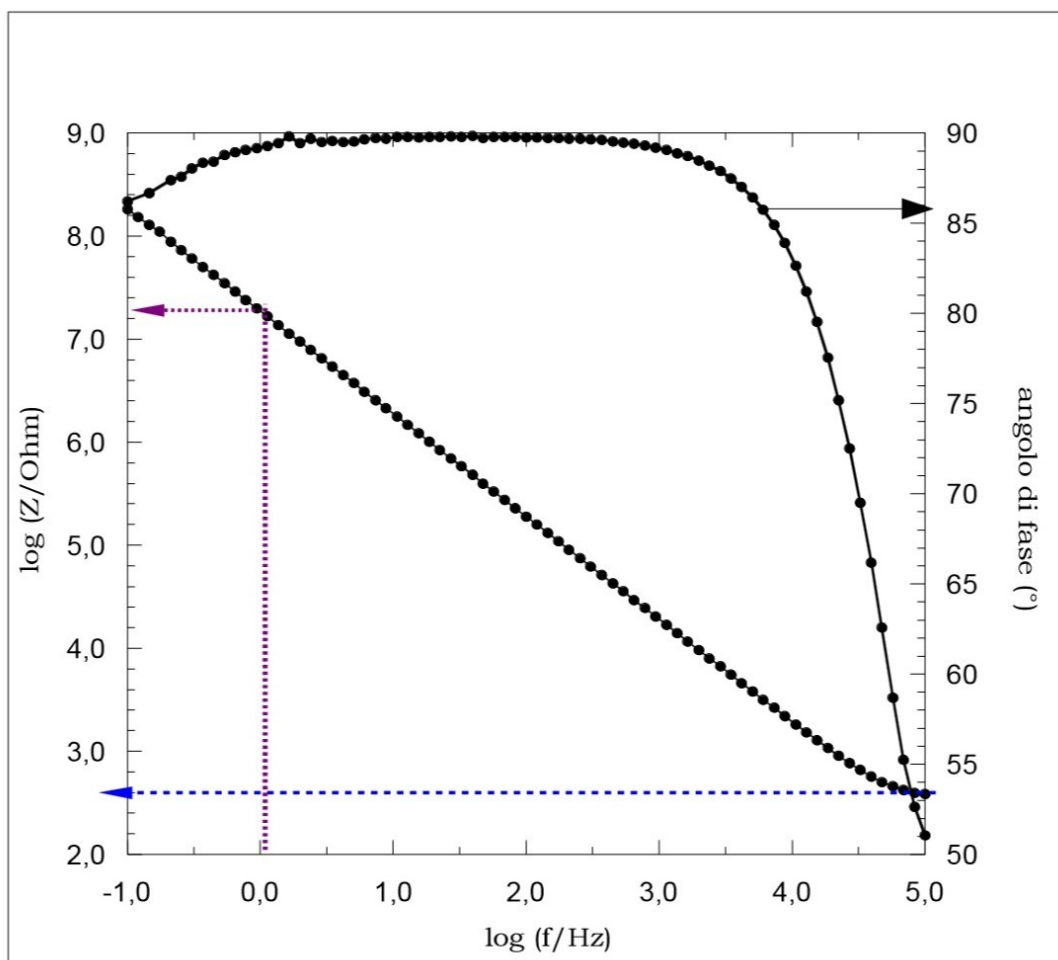


Figura 18: Diagramma di Bode per un bistrato DPTL/DOPC al potenziale base di $-0,4V$.

Nella zona delle alte frequenze, a destra del grafico ($\log f=5$), i contributi all'impedenza totale della maglia del bistrato possono essere trascurati a causa della presenza della frequenza angolare al quadrato, ω^2 , (e quindi di f^2) al denominatore di entrambi gli addendi di equazione 1. L'impedenza totale coincide quindi con la resistenza della soluzione R_s ; a conferma di ciò vediamo che l'angolo di fase è basso. Per un sistema ideale si può dimostrare che, se vige il controllo resistivo, l'andamento di $\log Z$ vs $\log f$ è una retta parallela all'asse delle ascisse; si può così estrapolare il valore di R_s tracciando la retta tangente al tratto terminale della curva di $\log Z$ vs $\log f$ e parallela all'asse (freccia blu).

Per frequenze inferiori non è più possibile trascurare i termini relativi alla maglia. Siccome nella maglia la resistenza è in parallelo con il condensatore, la corrente fluirà attraverso l'elemento a minor impedenza, che quindi determinerà il profilo del diagramma. Un

monostrato/bistrato è caratterizzato da un'elevata resistenza, e quindi la corrente passerà attraverso l'elemento capacitivo nell'arco di frequenze compreso fra 10^4 e 1 Hz. Dal grafico è possibile osservare che l'angolo di fase è circa 90° in questo intervallo di frequenze. In un sistema ideale, quando siamo sotto controllo capacitivo, l'andamento di $\log Z$ vs $\log f$ è una retta con pendenza -1. Si può dimostrare che alla frequenza di 1 Hz ($\log f=0$) l'impedenza totale è proporzionale al reciproco della capacità. Si può quindi ricavare il valore della capacità della membrana C_m . (freccia viola).

A basse frequenze (minori di 1 Hz) l'impedenza resistiva della maglia diventa progressivamente minore di quella capacitiva (il contributo capacitivo è inversamente proporzionale a ω), e quindi la corrente fluirà preferenzialmente attraverso la resistenza. Il valore di R_m può essere ottenuto estrapolando il valore di $\log Z$ alle basse frequenze.

In questo lavoro le misure di spettroscopia d'impedenza sono state effettuate su monostrati o bistrati supportati da mercurio prima e dopo l'aggiunta di CSF114 o di CSF114(Glc). Da queste misure è possibile valutare il corretto assemblaggio della membrana e la formazione di canali ionici o di ulteriori strati dielettrici.

1.6.4 Cronocoulombometria

La cronocoulombometria consiste nell'effettuare un salto di potenziale da un valore iniziale V_i , al quale il sistema è stabile, ad un valore finale V_f , e misurare la carica Q che passa nel tempo t .

La carica che viene rilevata è dovuta a diversi fattori:

- corrente capacitiva: è dovuta al fatto che variando il potenziale applicato, il doppio strato schematizzabile come un condensatore, si carica. Infatti, una variazione della differenza di potenziale V fra le armature di un condensatore determinerà un caricamento delle due armature di una quantità pari a $Q = CV$, dove C è la capacità del condensatore. Il flusso di tale carica produce una corrente che si esaurisce in tempi rapidissimi, in genere di millisecondi;
- corrente faradica dovuta a specie elettroattive in soluzione;
- corrente faradica dovuta a specie elettroattive adsorbite sulla superficie dell'elettrodo.

In questo lavoro le misure cronocoulombometriche sono state effettuate sul bistrato fosfolipidico supportato su goccia di mercurio, prima e dopo l'aggiunta del peptide. Nel sistema da noi analizzato non sono presenti correnti faradiche in quanto non sono state aggiunte specie elettroattive né in soluzione, né adsorbite sul mercurio.

Oltre alla corrente capacitiva dovuta al caricamento dell'interfase, si può avere una corrente generata dal movimento di ioni dalla soluzione alla superficie dell'elettrodo nel caso in cui siano presenti canali ionici nella membrana. Questo flusso di ioni è compensato da uno spostamento di cariche di segno opposto nel circuito esterno dello strumento, in quanto la differenza di potenziale all'interfase deve rimanere costante. Generalmente questo tipo di corrente si protrae per tempi più lunghi rispetto alla corrente prodotta dal caricamento del doppio strato, e quindi è ben distinguibile nel grafico di Q contro t .

1.7 Scopo della tesi

Il mio lavoro di tesi si è basato sulla sintesi dei peptidi CSF114 e CSF114(Glc) e lo studio elettrochimico dell'interazione che questi composti instaurano con vari modelli di membrane biomimetiche.

Il progetto di ricerca ha coinvolto i seguenti aspetti:

1. La sintesi dei peptidi CSF114 e CSF114(Glc) mediante sintesi peptidica su fase solida, presso il laboratorio di Chimica e Biologia di Peptidi e Proteine (PeptLab) dell'Università di Firenze;
2. La caratterizzazione del tipo di interazioni che tali composti hanno nei confronti di membrane biomimetiche, presso il laboratorio di Bioelettrochimica dell'Università di Firenze. Questo perché il CSF114(Glc) è capace di riconoscere anticorpi presenti nel siero di pazienti affetti da sclerosi multipla, e pertanto questo peptide è mimetico di vari epitopi prodotti in proteine mieliniche native. Per questa ragione abbiamo deciso di studiarne il comportamento in un ambiente che riproducesse le caratteristiche della membrana cellulare. Tramite misure elettrochimiche dell'attività del glicopeptide in modelli di membrana, potrebbe essere possibile ottenere informazioni dettagliate riguardo all'azione che questo esplica quando si trova nel suo ambiente.

Lo studio dell'analogo non glucosilato ha lo scopo di elucidare eventuali differenze di attività che, pertanto, sarebbero dovute alla presenza della funzione β -D-glucopiranosilica.

Abbiamo quindi verificato l'influenza della composizione del film lipidico e del pH del sistema sull'efficacia e il meccanismo d'azione dei due peptidi.

Capitolo 2: Parte sperimentale

2.1 Sintesi e purificazione dei peptidi CSF114 e CSF114(Glc)

2.1.1 Metodi e materiali

Il diclorometano è stato anidrificato per distillazione a pressione atmosferica sotto N_2 su CaH_2 . Il metanolo anidro (Aldrich, USA), la dimetilformammide per sintesi peptidica (Scharlau, Spagna) e l'acetonitrile per HPLC (Carlo Erba, Italia) sono stati utilizzati senza ulteriori trattamenti.

Gli amminoacidi e le resine Fmoc-protetti sono stati acquistati da Calbiochem-Novabiochem AG (Laufelfingen, Svizzera), gli attivanti HBTU e HATU sono della ditta Iris-Biotech GmbH, mentre la DIPEA è della ditta ACROS ORGANICS.

Le sintesi peptidiche in fase solida sono state effettuate sia con sintetizzatore manuale PLS 4x4 (Advanced ChemTech) in reattori da 20 mL (100-1000 mg di resina) provvisti di filtro in Teflon.

Per verificare se gli accoppiamenti erano stati eseguiti con successo si è proceduto con il *test* di Kaiser.

Il distacco dei peptidi dalla resina è stato effettuato con una miscela di TFA/ H_2O /EDT/TIS (97:1:1:1) mentre per la de-esterificazione si è usata una soluzione di idrazina in MeOH (4:1).

I prodotti sono stati analizzati mediante HPLC in fase inversa, si è utilizzato un apparecchio Waters Alliance (modello 2695) equipaggiato con rivelatore a schiera di diodi e singolo quadrupolo ESI-MS (Micromass ZQ), colonna Phenomenex Kinetex (2.6 μm , C18, 100 $\times$ 3.0 mm di diametro interno) ad un flusso di 0.6 mL/min di una miscela di eluenti a composizione variabile nel tempo di: (A) 0.1% TFA in H_2O (MilliQ) e (B) 0.1% TFA in CH_3CN (84%). Per la purificazione dei peptidi sono state utilizzate due tecniche:

- desalatura mediante *Solid-Phase Extraction* (SPE) con strumento Armen Instrument usando come fase stazionaria gel di silice Merck LiChroprep RP-18 (40-63 μm) e come eluente una miscela a composizione variabile di H_2O (MilliQ) e CH_3CN .
- HPLC semipreparativa in fase inversa con strumento Waters modello 600 su colonna Varian Polaris di tipo Aqua (5 μm , C18, 250 $\times$ 10 mm), ad un flusso di 4 mL/min.

Per la liofilizzazione è stato utilizzato un liofilizzatore Edwards mod. Modulyo.

2.1.2 Procedura generale per la sintesi peptidica in fase solida su sintetizzatore manuale

Per la sintesi del glicopeptide CSF114(Glc) e del suo corrispondente non glucosilato, è stato utilizzato il sintetizzatore manuale PLS 4x4 (Advanced ChemTech) con reattori da 10 mL provvisti di filtro in Teflon, a partire dalla resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang (grado di sostituzione: 0.24 mmol/g), Fmoc-amminoacidi, HBTU/HATU come attivanti ed DIPEA come base.

Una volta pesata la resina (500 mg), e aggiunta nel rispettivo reattore, sono state necessarie le seguenti operazioni:

- **swelling**: rigonfiamento della resina mediante lavaggio con DMF per 30 min (1 mL di DMF per ogni 100 mg di resina);
- **deprotezione della resina**: due lavaggi (1 da 5 min ed uno da 20 min) con una soluzione di piperidina al 20% in DMF (1 mL di DMF per ogni 100 mg di resina);
- **lavaggio della resina**: tre lavaggi in DMF (5 min x 1 mL di DMF per ogni 100 mg di resina);
- **accoppiamento**: è stata aggiunta una soluzione di Fmoc-aa e di attivanti in DMF, preparata nel seguente modo: 5 eq (rispetto al grado di sostituzione della resina) di Fmoc-amminoacido, 5 eq di HATU o HBTU e 6 equivalenti di DIPEA. La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione per 45 min. Per l'inserimento del *building block* *Fmoc-L-Asn(GlcOAc₄)-OH*, si sono usate quantità dimezzate dei reagenti: 2,5 eq di Fmoc-amminoacido, 2,5 eq di HATU e 3 equivalenti di DIPEA. La reazione è stata portata avanti nelle condizioni sopra descritte per il medesimo tempo. La scelta di dimezzare la quantità di amminoacido è dettata dal costo del prodotto, il quale viene sintetizzato manualmente al momento del bisogno direttamente in laboratorio.
- **lavaggio ed essiccamento della resina**: tre lavaggi con DMF (5 min x 1 mL di DMF per ogni 100 mg di resina), due lavaggi con DCM (5 min x 1 mL di DMF per ogni 100 mg di resina). Infine la resina è stata essiccata per poter effettuare il test di *Kaiser* e valutare così l'esito della reazione di accoppiamento;
- **test di Kaiser**: sono stati raccolti alcuni granelli di resina essiccata in una *vial*, aggiungendovi 3 gocce di una soluzione di ninidrina in etanolo, 3 gocce di una soluzione di fenolo in etanolo, 3 gocce di una soluzione di KCN in piridina. La *vial* è stata poi posta in un bagno di sabbia preriscaldato a 100°C per 5 min.

Se il *test* di *Kaiser* ha esito negativo si procede con l'allungamento della sequenza, aggiungendo il successivo amminoacido secondo i passaggi descritti in precedenza, se invece risulta positivo si deve effettuare nuovamente l'accoppiamento.

2.1.3 Procedura di deprotezione del residuo glucosilato

I gruppi acetili utilizzati per la protezione delle funzioni ossidriliche del glucosio vengono rimossi usando una soluzione di idrazina in MeOH (4:1), lasciando in agitazione per 2 ore. L'eccesso di idrazina è rimosso con MeOH (4 lavaggi, 1 minuto di agitazione per lavaggio) e DCM (4 lavaggi, 1 minuto di agitazione per lavaggio)^[14].

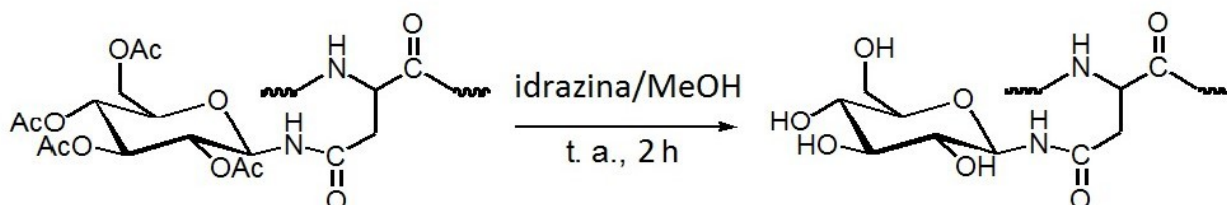


Figura 19: Deacetilazione del residuo glucosilato.

2.1.4 Procedura generale per il *cleavage* dei peptidi dalla resina

Per il distacco del peptide dalla resina e la contemporanea deprotezione delle catene laterali è stato effettuato il *cleavage* con una miscela di TFA/H₂O/EDT/TIS (97:1:1:1) (1 mL ogni 100 mg di resina), mantenendo il tutto sotto continua agitazione a temperatura ambiente per circa 4 ore. Successivamente è stata filtrata la sospensione, la resina è stata lavata con TFA (0.5 mL), la soluzione risultante è stata quindi concentrata sotto flusso di N₂ fino a ridurne il volume del 95%. Il peptide è stato precipitato con diisopropil etere freddo ottenendo un solido bianco che è stato lavato e centrifugato per tre volte con etere. La soluzione surnatante è stata eliminata, il peptide è stato sciolto in H₂O (5 mL) e quindi liofilizzato.

2.1.5 Pre-purificazione dei peptidi mediante Solid Phase Extraction (SPE)

I peptidi sono stati desalati mediante SPE, utilizzando lo strumento automatico Armen Instrument. È stata usata una colonna impaccata con silice C18 (40 g) e come eluente un gradiente crescente di H₂O/CH₃CN. Le principali operazioni sono state:

- condizionare la colonna con H₂O per 14 minuti;
- iniettare il peptide, solubilizzato in H₂O (7 mL), controllando che il pH sia neutro;
- eluire con H₂O per 10 minuti ad un flusso di 25 mL/min;
- in 30 secondi si passa ad una composizione di 5% CH₃CN/95% H₂O;
- eluire in gradiente di concentrazione fino a H₂O/CH₃CN 40-60% in 30 minuti con flusso di 20 mL/min;

- lavare la colonna con 100% di CH₃CN.

I solventi sono tutti addizionati di TFA in concentrazione 0.1%.

Le frazioni sono state analizzate con RP-HPLC-MS e liofilizzate.

2.1.6 Procedura generale del RP-HPLC semipreparativa

I peptidi desalati sono stati ulteriormente purificati mediante RP-HPLC semipreparativa in fase inversa su colonna Varian Polaris di tipo Aqua (5 µm, C18, 250 × 10 mm), ad un flusso di 4 mL/min.

Le frazioni sono state raccolte manualmente e caratterizzate tramite HPLC-MS.

I tempi di ritenzione del CSF114 e CSF114(Glc) sono riportati in tabella 2:

Composto	Tempo di ritenzione (min)
CSF114	5,16 (Metodo 1)
CSF114(Glc)	4,21 (Metodo 2)

Tabella 2: Tempi di ritenzione del CSF114 e del CSF114(Glc) ottenuti all' HPLC analitica.

Metodi di separazione:

- Metodo 1: eluizione in gradiente di concentrazione da H₂O/CH₃CN 90/10 a 40/60 in 5 minuti;
- Metodo 2: eluizione in gradiente di concentrazione da H₂O/CH₃CN 75/25 a 50/50 in 5 minuti.

Le frammentazioni che si ottengono nell'analisi di massa sono:

- per il CSF114: [M+H]⁺ 2445,86 [M+2H]²⁺ 1223,43 [M+3H]³⁺ 815, 9
- per il CSF114(Glc): [M+H]⁺ 2608,01 [M+2H]²⁺ 1304,51 [M+3H]³⁺ 870,00

2.2 Caratterizzazione elettrochimica dei peptidi CSF114 e CSF114(Glc)

2.2.1 Assetto sperimentale

2.2.1.1 Cella elettrochimica

Le misure elettrochimiche sono state condotte in una cella di vetro Pyrex avente cinque coni a smeriglio: tre sono necessari per alloggiare gli elettrodi e due per effettuare le aggiunte nel corso delle misure.

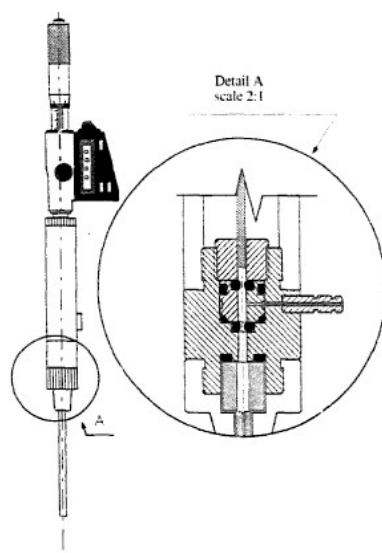


Figura 20: Schema dell'elettrodo di lavoro a goccia stazionaria di mercurio (HMDE).

Per eseguire le misure si è usato un sistema potenziostatico a tre elettrodi:

- 1) elettrodo di lavoro (Working Electrode, WE) a goccia stazionaria di mercurio (Hanging Mercury Drop Electrode, HMDE). E' costituito da un capillare di vetro (Metrohm 6.1209.010) attraverso il quale il mercurio fuoriesce a seguito dell'avanzamento di un pistone rettificato (del diametro di 1 mm) all'interno di un pozzetto contenente mercurio, posizionato sopra il capillare stesso. L'avanzamento del pistone è regolato da una vite micrometrica con display digitale (Mitutoyo Digimatic 350-341) posta in testa all'elettrodo, in modo tale da consentire una misura precisa dell'avanzamento richiesto per la formazione di una goccia di mercurio di area predeterminata, previa taratura. Nel nostro caso tutte le misure sono state effettuate su gocce ottenute con avanzamento di 0.200 mm, corrispondente ad un'area di $14 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$.
- 2) elettrodo di riferimento (Reference Electrode, RE) Ag/AgCl/KCl 0,1M, costituito da un filo di argento ricoperto elettrochimicamente da AgCl, immerso in una soluzione di KCl a concentrazione nota, in questo caso 0,1M. Il potenziale di un elettrodo così costituito è costante e noto, in quanto dipende solo dalla concentrazione di ioni cloruro in soluzione.

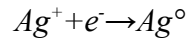
Per la generica reazione: $a \text{ Ox} + n\text{e}^- \rightarrow b \text{ Rid}$ è riportata l' equazione di Nernst considerando l'attività di ogni specie approssimabile con la sua concentrazione.

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Rid}]^b}{[\text{Ox}]^a}$$

Dove: E° rappresenta il potenziale di riduzione standard della coppia, R è la costante

universale dei gas, T è la temperatura assoluta, n è il numero di elettroni scambiati nella reazione, F è la costante di Faraday.

Per il caso specifico:



$$E = E^{\circ}_{Ag^+/Ag} - \frac{RT}{F} \ln \frac{1}{[Ag^+]}$$



$$E = E^{\circ}_{Ag^+/Ag} - \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]}{K_{ps}} = E^{\circ}_{AgCl/Ag} - \frac{RT}{F} \ln [Cl^-]$$

Equazione di Nernst per la reazione in esame $AgCl + e^- \rightarrow Ag + Cl^-$

- 3) controelettrodo o elettrodo ausiliario (Auxiliary Electrode, AE) costituito da un filo di platino avvolto attorno ad un gorgogliatore a due vie. Quest'ultimo serve disareare la soluzione e a mantenerla disareata durante il corso delle misure. Ciò perchè l'ossigeno disciolto in soluzione darebbe interferenza elettroreducendosi nel campo di potenziali in esame. La disareazione si realizza facendo gorgogliare azoto in cella per circa mezz'ora e poi mantenendo un battente dello stesso al di sopra della soluzione.

La cella con gli elettrodi e gli altri componenti è riportata in figura 21:

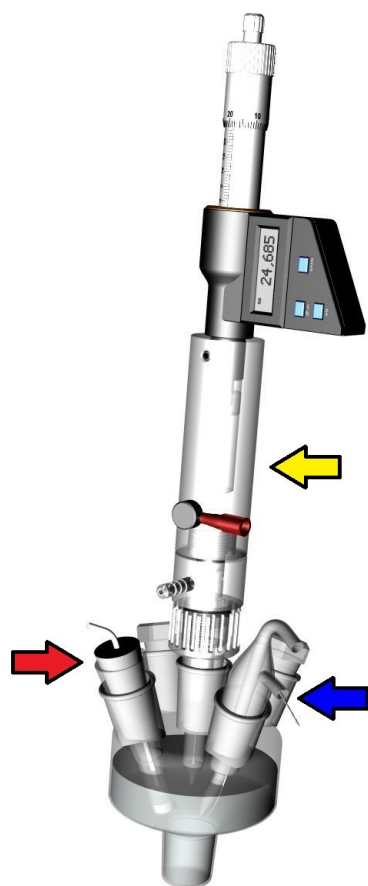


Figura 21: Cella elettrochimica con elettrodo di lavoro HMDE (freccia gialla), elettrodo di riferimento Ag/AgCl (freccia rossa), controelettrodo di Pt avvolto intorno al gorgogliatore (freccia blu) e dietro due coni per le aggiunte.

2.2.1.2 Camera di lavoro

Il sistema è posto in una camera termostata alla temperatura di $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ per evitare variazioni del volume della goccia dovute alla dilatazione termica. La camera è munita di un sistema oleopneumatico per lo spostamento dell'elettrodo di lavoro, necessario per garantire un movimento regolare, evitando così la caduta della goccia durante l'immersione dell'elettrodo nella soluzione. L'intero sistema è posto sopra un tavolo antivibrante al fine di diminuire il rumore nelle misure, dovuto a vibrazioni meccaniche.

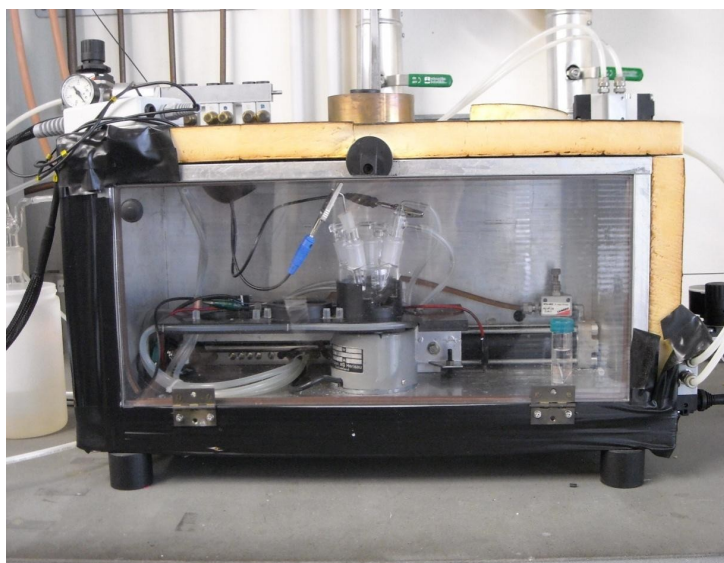


Figura 22: Camera di lavoro termostata e cella elettrochimica.

2.2.2 Preparazione e caratterizzazione di monostrati lipidici supportati da mercurio

I monostrati lipidici sono stati preparati con la seguente procedura:

- la soluzione elettrolitica (KCl 0,1M) viene disareata facendo gorgogliare azoto tramite l'apposito gorgogliatore, e termostata in camera di lavoro a 25°C per un'ora. Successivamente si interrompe il flusso di gas in soluzione e si mantiene solo un suo battente sulla superficie della soluzione stessa durante tutto il corso delle misure;
- si procede allo spandimento di 50 μ L di una soluzione del lipide in pentano (1 mg/mL) sulla superficie della soluzione elettrolitica in cella. Data l'elevata volatilità del solvente, in pochi minuti si ha la sua completa evaporazione e la conseguente formazione di uno strato lipidico organizzato con le teste polari rivolte verso la soluzione e le code idrofobiche rivolte verso la fase gassosa. Le soluzioni lipidiche sono preparate per diluizione di soluzioni stock di 10 mg/mL in cloroformio;
- si forma una goccia di mercurio ad area nota e si abbassa l'elettrodo mediante il sistema oleopneumatico finché la punta del capillare non è immersa. Così facendo si permette la formazione spontanea di un monostrato lipidico auto-organizzato sulla goccia di mercurio, con le code alchiliche rivolte verso la superficie del metallo.

I passaggi per la realizzazione di un self-assembled monolayer (SAM) supportato da mercurio sono schematicamente riportate in [Figura 23]:

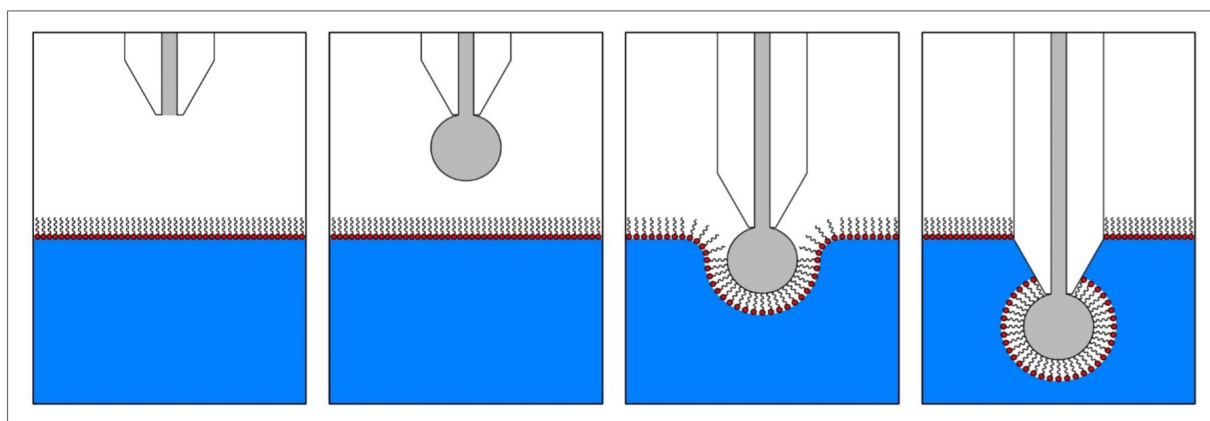


Figura 23: Formazione di un monostrato fosfolipidico auto-organizzato.

La caratterizzazione del monostrato lipidico avviene mediante voltammetria AC con risoluzione di fase e spettroscopia d'impedenza elettrochimica.

Vengono effettuate scansioni di voltammetria AC per determinarne la capacità nel campo di potenziali compreso fra -0,2 V e -0,8 V. Sono necessarie poche scansioni, una decina generalmente, in quanto la stabilizzazione del SAM è praticamente immediata. L'ottenimento di curve corrente contro potenziale stabili e riproducibili è indice di un monostrato ben formato. La capacità si ottiene misurando la corrente nel minimo della curva, $i_{min}(A)$:

$C(\mu F) = i_{min}(A) \cdot 0,21 \cdot 10^6$ $C_{spec}(\mu F/cm^2) = C(\mu F)/S(cm^2)$ S = area della superficie della goccia
I valori ottimali sono intorno a 1,70-1,75 $\mu F/cm^2$.

Una volta verificato che il monostrato abbia un buon valore di capacità, si procede con la spettroscopia d'impedenza.

Le misure vengono effettuate in un arco di frequenze comprese fra 10^5 e 10^{-1} Hz del potenziale alternato (ampiezza 10 mV), mentre il potenziale di base varia fra -0,3 V e -0,8 V. Il grafico di Bode fornisce un'informazione qualitativa sulla bontà del monostrato; infatti, se ben formato, esso presenta un angolo di fase di circa 90° nell'arco di frequenze comprese fra 10^3 e 1 Hz e un'elevata resistenza. Il valore della resistenza si estrapola tracciando una retta parallela all'asse delle ascisse tangente alla curva di $\log Z$ vs $\log f$ alle basse frequenze. In questo progetto sono stati preparati monostrati di DOPC, DOPS e DOPC/SM (2:1), dove gli acronimi DOPC, DOPS e SM denotano dioleoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilserina e sfingomielinea, rispettivamente.

2.2.3 Preparazione e caratterizzazione di bistrati lipidici supportati da mercurio

I bistrati fosfolipidici sono stati preparati con il seguente procedimento:

- la soluzione elettrolitica (KCl 0,1M) viene disareata facendo gorgogliare azoto e contemporaneamente viene termostata a 25°C nella camera di lavoro per un'ora. Trascorso questo tempo, viene interrotta la disareazione e viene lasciato un battente di gas sopra la soluzione per tutto il corso delle misure;
- vengono spanti sulla superficie della soluzione 50 μL di una soluzione lipidica in pentano (1 mg/mL);
- immersione della goccia di mercurio in una soluzione di DPTL in etanolo (0,50 mg/mL) per venti minuti. Con questa operazione il tiolipide si lega covalentemente alla superficie del mercurio, dando luogo ad un monostrato auto-organizzato avente le code alchiliche rivolte verso l'esterno. Si lascia quindi asciugare il monostrato di DPTL sotto flusso di azoto;
- immersione della goccia ricoperta da DPTL attraverso il film lipidico presente sulla superficie della soluzione di lavoro. L'immersione dell'elettrodo avviene tramite il sistema oleopneumatico. Il monostrato del lipide precedentemente spanto si auto-organizza sul DPTL in modo da rivolgere le code alchiliche verso le catene fitaniliche del tiolipide e le teste polari verso la soluzione. Si viene così a creare un bistrato ancorato a mercurio.

Le fasi di realizzazione del bistrato sono schematicamente riportate di seguito in Figura 24:

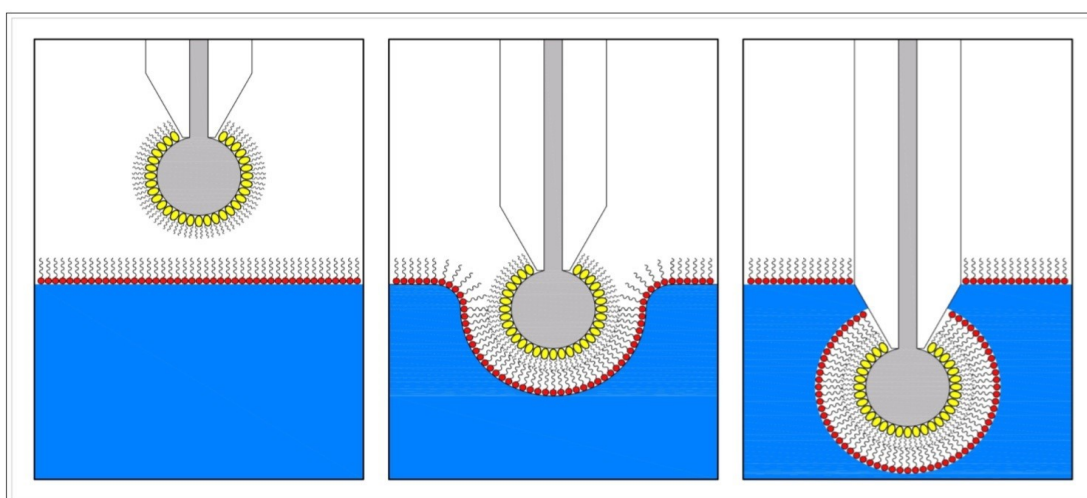


Figura 24: Formazione di un bistrato fosfolipidico auto-organizzato.

Il bistrato necessita di essere stabilizzato tramite scansioni successive di voltammetria AC con

risoluzione di fase; infatti eseguendo scansioni successive di potenziale nel campo di stabilità del bistrato, se ne permette una migliore organizzazione e compattezza. Si effettuano almeno 15 scansioni nell'arco di potenziali compresi fra $-0,2$ V e $-1,2$ V, registrando la corrente i contro il potenziale applicato V . Se il bistrato è ben formato, procedendo con le scansioni si ottiene un

profilo di corrente contro il potenziale praticamente costante; questa corrente è proporzionale alla capacità del sistema e varia in funzione della composizione lipidica in maniera analoga ai monostrati. I bistrati lipidici su mercurio del tipo DPTL/lipide sono caratterizzati da bassi valori di capacità, tipicamente dell'ordine di $0,55$ - $0,65$ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Una volta verificato che il bistrato ha una buona capacità, si procede alle misure di spettroscopia d'impedenza. Le misure di spettroscopia d'impedenza vengono eseguite in un campo di frequenze compreso fra 10^5 e 10^{-1} Hz, mentre il potenziale di base varia da $-0,3$ V a $-1,0$ V. Anche in questo caso si utilizza il diagramma di Bode per una valutazione qualitativa del bistrato.

2.2.4 Reagenti

- Estere 2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol-1-tetraetile-glicole-D,L- α dell'acido lipoico (DPTL), fornito dal Prof. Adrian Schwan (University of Guelph, Canada), in etanolo ($0,5$ mg/mL);
- Dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), in cloroformio (10 mg/mL);
- Dioleoilfosfatidilserina (DOPS), Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), in cloroformio (10 mg/mL);
- Sfingomieline (SM), Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), in cloroformio (10 mg/mL);
- CSF114 e CSF114(Glc), forniti dalla Prof.ssa Anna Maria Papini (Università degli studi di Firenze);
- $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, Merck;
- TlNO_3 , Sigma-Aldrich;
- KCl Suprapur Merck, trattato in muffola a 500°C per eliminare le impurezze organiche;
- HCl, Merck;
- KH_2PO_4 , Merck;
- K_2HPO_4 , Merck;

- Miscela cromica, preparata sciogliendo a caldo 16 g di $K_2Cr_2O_7$ in 600 mL di H_2SO_4 concentrato, per il lavaggio della cella e della vetreria. Alla fine di ogni giornata, la cella elettrochimica e i suoi accessori in vetro vengono lavati in miscela cromica a caldo e dopo sciacquati abbondantemente con acqua bidistillata. Dopo la pulizia, vengono avvolti con pellicola d'alluminio per evitare contaminazioni e asciugati in stufa a $150^\circ C$. Una volta asciugati, devono essere conservati in alluminio e scartati solo prima dell'utilizzo;
- H_2O bidistillata. Si tratta l'acqua deionizzata prima con una distillazione per ridurre ulteriormente il contenuto di sali e successivamente si distilla in permanganato per rimuovere eventuali residui organici.

Tutte le misure elettrochimiche sono state eseguite con un potenziostato Autolab PGSTAT 12 (Echo Chemie) munito di modulo FRA2 per le misure di spettroscopia d'impedenza elettrochimica e GPES 4.9007.

Capitolo 3: Risultati

3.1 CSF114 e CSF114(Glc) su monostrati supportati da Hg

Per caratterizzare le interazioni che il CSF114 e l'analogo glucosilato contraggono con la superficie esterna della membrana cellulare, vengono usati monostrati di dioleoilfosfatidilcolina, DOPC, dioleoilfosfatidilserina, DOPS, e dioleoilfosfatidilcolina in miscela 2:1 con sfingomieline, SM, supportati da un elettrodo a goccia stazionaria di mercurio. L'uso di monostrati con le composizioni indicate è giustificato dal fatto che la DOPC è un modello di fosfolipide zwitterionico sostanzialmente neutro in tutto l'arco di pH investigato che va da pH 3 a pH 7^[17,18]. La DOPS, invece, passa da una forma carica negativamente a pH 7 ad una zwitterionica a pH 5 ed infine diventa carica positivamente a pH 3^[17,18].

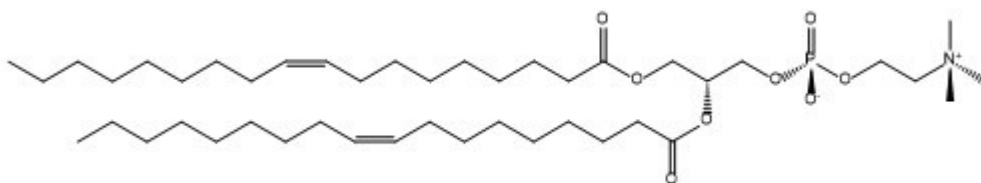


Figura 25: Dioleoilfosfatidilcolina (DOPC)

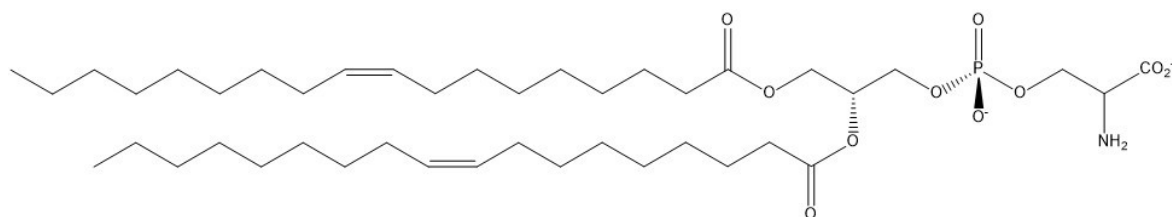


Figura 26: Dioleoilfosfatidilserina (DOPS)

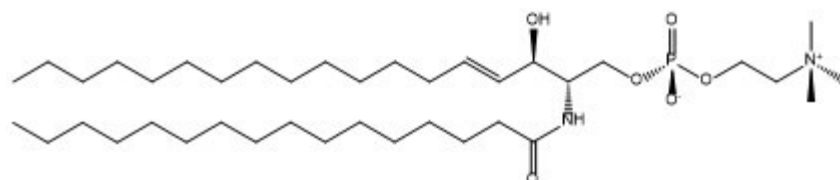


Figura 27: Sfingomielina

Il campo di pH è scelto in modo tale da coprire tutti i pH che possono sussistere in ambito fisiologico, partendo da quello più acido dello stomaco a quello sostanzialmente neutro, diffuso nelle varie parti dell'organismo. La comparazione fra i risultati ottenuti sui due tipi di monostrato ci ha permesso una valutazione sull'effetto della densità di carica superficiale sulle modalità di interazione. L'uso della miscela 2:1 DOPC/SM, invece, ha avuto come obiettivo la valutazione dell'effetto di disomogeneità di fase nella struttura del monostrato sulla capacità del peptide di interagire con un sistema auto-organizzato^[15]. In particolar modo, viene usata sfingomielina con lo scopo di creare un monostrato con caratteristiche simili a quelle della membrana mielinica che è di particolare interesse nello studio del CSF114, peptide coinvolto nel sistema di riconoscimento antigene-anticorpo della sclerosi multipla, malattia che riguarda il sistema nervoso centrale (SNC).

Il CSF114, in base alle pK dei singoli amminoacidi [tabella 3], presenta una carica totale di +4 a pH 3, due localizzate sui residui argininici, una sul residuo istidinico e una sul residuo lisinico. A pH 5,4, invece, ha una carica complessiva di +3, in quanto il carbossile presente nel residuo glutammico si trova in forma deprotonata. A pH 7 la carica è +2 perché il residuo istidinico è deprotonato.

Amminoacido	pK catena laterale
Arginina (Arg)	12,48
Acido glutammico (Glu)	4,07
Istidina (Hys)	6,40
Tirosina (Tyr)	10,46

Tabella 3: pK dei gruppi in catena laterale degli amminoacidi del CSF114.

Lo studio è stato condotto mediante le tecniche elettrochimiche della voltammetria AC, della voltammetria ciclica e della spettroscopia d'impedenza.

Le misure di spettroscopia d'impedenza sono state effettuate nella regione di potenziale in cui il monostrato è stabile. È stato possibile valutare quindi l'effetto dell'aggiunta del peptide sui valori della capacità e dell'ammettenza al variare del potenziale. La capacità, C , del film lipidico è da considerarsi proporzionale alla sua compattezza e l'ammettenza in fase, Y' , è una misura della permeabilità agli ioni dello stesso; questi due parametri sono quindi da ritenersi significativi nell'analisi della natura delle interazioni che il peptide instaura con il monostrato, ossia con la regione esterna della membrana.

3.1.1 Monostrati di DOPS

Le misure sono state effettuate con una concentrazione di peptide di 2 $\mu\text{g/mL}$ nella soluzione di lavoro in cella.

3.1.1.1 Misure a pH 3

La soluzione di lavoro a pH 3 è stata ottenuta mediante aggiunta di HCl 0,1M ad una soluzione di KCl 0,1M.

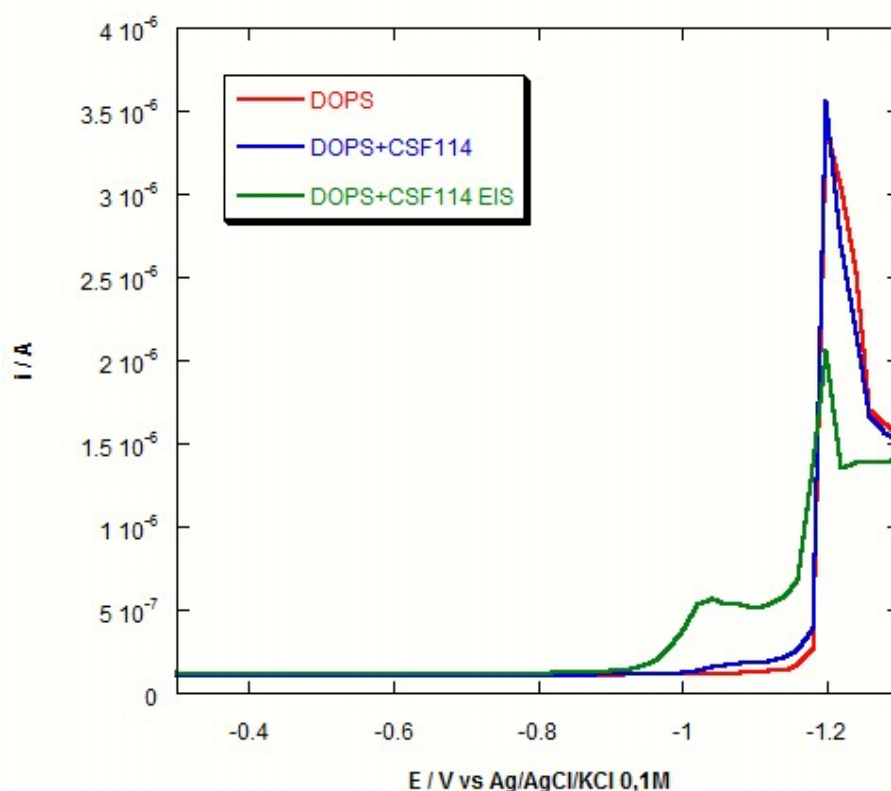


Figura 28: Voltammogramma AC su monostrato di DOPS a pH 3. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la scansione successiva all'aggiunta del CSF114 e quella verde la scansione dopo una spettroscopia d'impedenza.

Le misure di voltammetria AC sono effettuate in un arco di potenziali che vanno da -0,3 V a -1,3V per monostrati di DOPS.

L'effetto dell'aggiunta del CSF114 sulla regione di minimo di capacità, la zona in cui il film è compatto e ben organizzato, è decisamente ridotto; solo dopo una scansione di spettroscopia di impedenza completa, si osserva un restringimento di questa regione, associato alla diminuzione di intensità dell'unico picco di riorientamento. Si presume dunque che l'interazione con le teste, ottenuta con un'incorporazione lenta e graduale, sia più efficace.

3.1.1.2 Misure a pH 5,4

Questo valore di pH è quello assunto da una soluzione di KCl 0,1 M non tamponata.

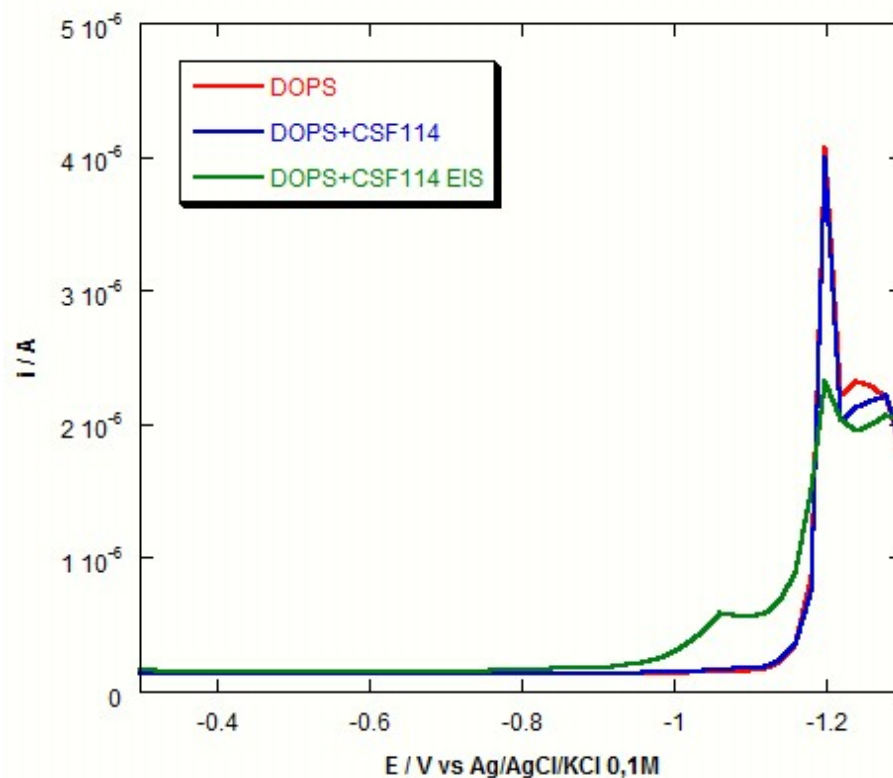


Figura 29: Voltammogramma AC su monostrato di DOPS a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la scansione successiva all'aggiunta del CSF114 e quella verde la scansione dopo una spettroscopia d'impedenza.

Dal voltammogramma è possibile verificare che il comportamento del CSF114 è analogo a quanto visto nel caso a pH 3. Infatti, anche in questo caso solo un'incorporazione lenta e graduale, ottenuta mediante una scansione completa di spettroscopia d'impedenza, riesce a determinare una interazione apprezzabile con la regione delle teste.

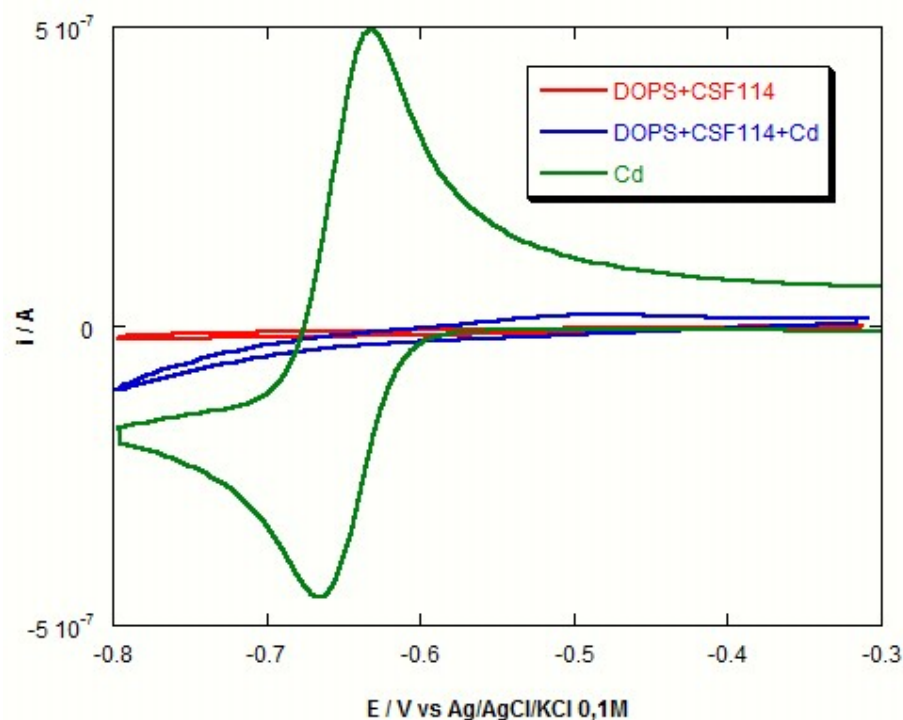


Figura 30: Voltammogramma ciclico su monostrato di DOPS a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul monostrato in presenza di CSF114, quella blu la scansione successiva all'aggiunta dello ione elettroattivo Cd^{2+} e quella verde l'onda del Cd^{2+} direttamente su Hg.

La voltammetria ciclica è stata utilizzata per mettere in evidenza un effetto di permeabilizzazione da parte del peptide sulla membrana, nei confronti dello ione Cd^{2+} . Le scansioni sono effettuate nel range di potenziale che va da -0,2 V a -0,8 V con velocità di scansione di 50 mV/s per tutte le misure riportate in questo lavoro. Questo ione non riesce ad attraversare il monostrato fosfolipidico compatto nella regione di minimo, quindi si può supporre che il peptide non sia in grado di formare canali ionici.

3.1.1.3 Misure a pH 7

La soluzione a pH 7 è ottenuta mediante l'uso di un tampone $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ (1:1).

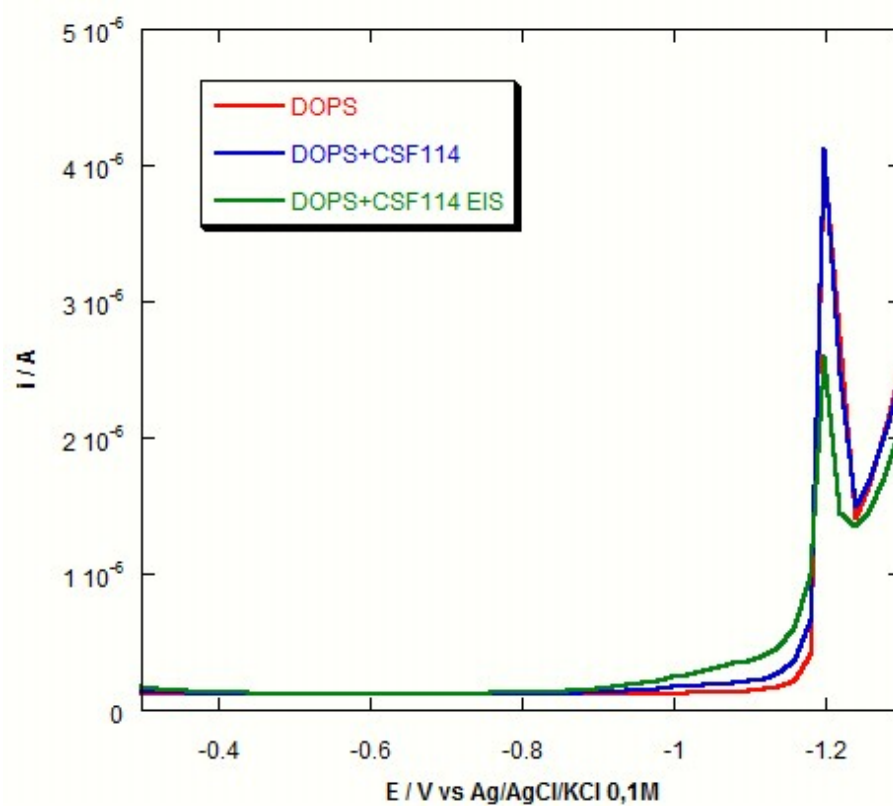


Figura 31: Voltammogramma AC su monostrato di DOPS a pH 7. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la scansione successiva all'aggiunta del CSF114 e quella verde la scansione dopo una spettroscopia d'impedenza.

Le misure condotte a questo pH mostrano un effetto molto ridotto anche sul profilo dei picchi, persino dopo graduale incorporazione mediante scansione completa di spettroscopia d'impedenza. Si osserva comunque un restringimento della regione di minimo.

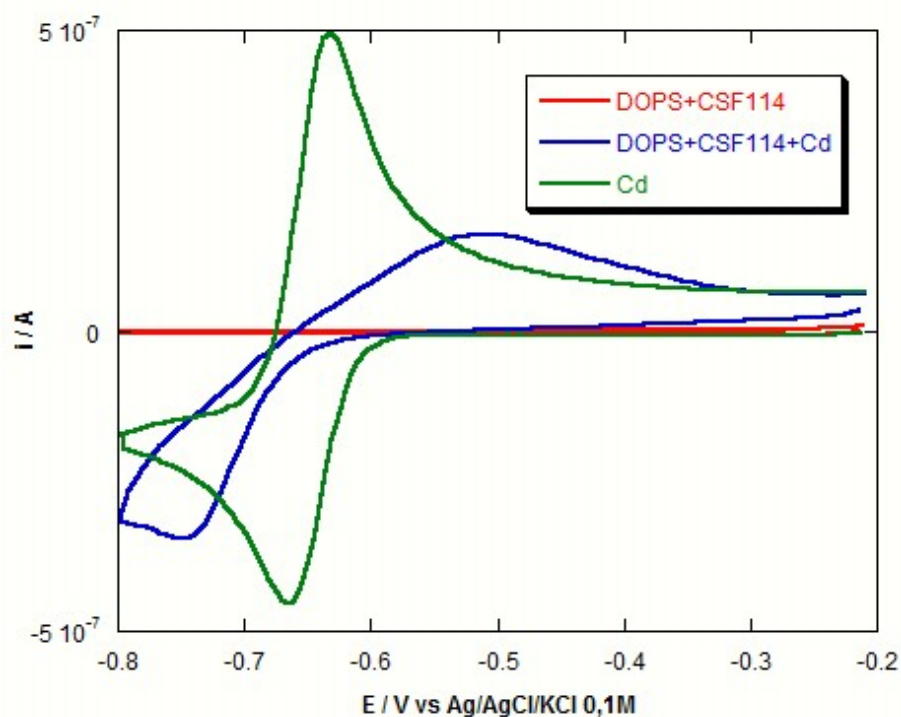


Figura 32: Voltammogramma ciclico su monostrato di DOPS a pH 7. La curva rossa identifica la scansione sul monostrato in presenza di CSF114, quella blu la scansione successiva all'aggiunta dello ione elettroattivo Cd^{2+} e quella verde l'onda del Cd^{2+} direttamente su Hg.

Le misure di voltammetria ciclica mostrano una maggiore permeabilizzazione rispetto al caso a pH 5,4, nonostante l'effetto nella regione delle teste polari sia minore rispetto al medesimo caso. Le voltammetrie cicliche sono effettuate nella regione di minimo, pertanto non sono necessariamente associabili ad un effetto sulle teste polari.

Il processo di riduzione resta comunque fortemente inibito anche in questo caso.

Le misure di spettroscopia d'impedenza, condotte in tutte le condizioni di pH, non hanno evidenziato alcuna interazione significativa del CSF114 e del CSF114(Glc) con la regione delle code alchiliche. Si evita pertanto di riportare i grafici relativi a tali misurazioni.

3.1.2 Monostrati di DOPC

Le misure sono state effettuate con una concentrazione di peptide di 2 $\mu\text{g/mL}$ nella soluzione di lavoro in cella.

3.1.2.1 Misure a pH 3

Come per le misure sulla DOPS, la soluzione a questo pH è stata ottenuta mediante aggiunta di un volume opportuno di HCl 0,1M alla soluzione elettrolitica di KCl 0,1M.

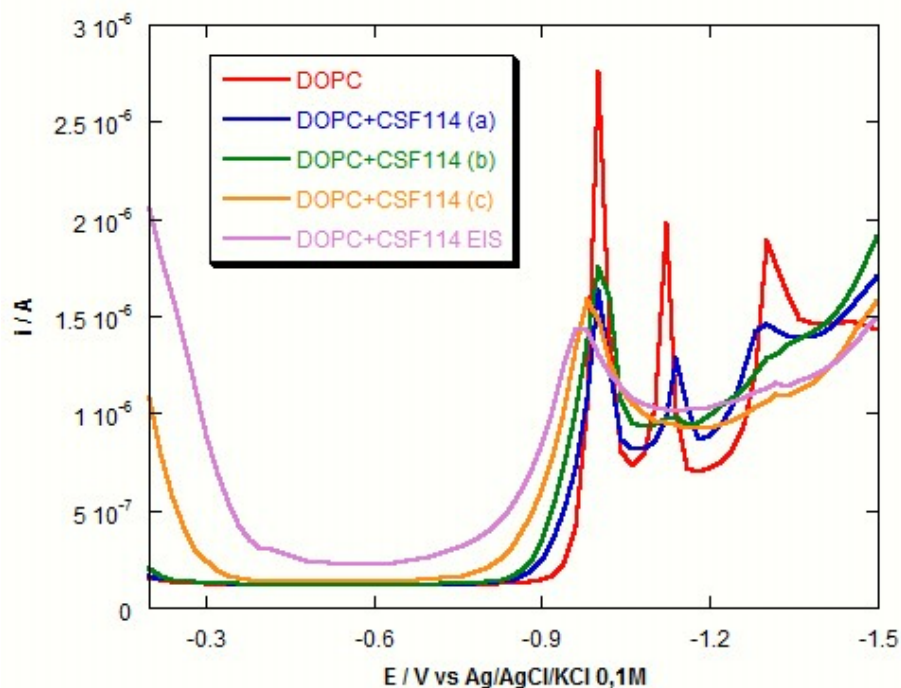


Figura 33: Voltammogramma AC su monostrato di DOPC a pH 3. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu, verde e gialla le scansioni successive all'aggiunta del CSF114 e quella viola la scansione dopo una spettroscopia d'impedenza.

Le misure di voltammetria AC sono effettuate in un arco di potenziali che va da -0,2 V a -1,5 V per monostrati di DOPC e DOPC/SM 2:1.

I monostrati di DOPC a pH 3 risentono sensibilmente dell'aggiunta del CSF114. La regione di minimo è visibilmente alterata, specialmente dopo una lenta incorporazione a seguito di una scansione completa di spettroscopia d'impedenza, in tutto l'arco di potenziali in cui il film lipidico è compatto, con un aumento del valore di capacità. Come si può notare, l'incorporazione del peptide nella membrana è più rapida; si notano infatti differenze sul profilo della corrente anche per scansioni successive di voltammetria AC (curva celeste, verde e nera); la procedura prevede di effettuare cinque scansioni di voltammetria AC successivamente all'aggiunta del peptide in soluzione, nell'arco di potenziali che comprende anche i picchi di riorientamento. Nei voltammogrammi precedenti/successivi sono riportate solo tre scansioni (sul solo monostrato, l'ultima delle cinque dopo l'aggiunta e dopo una scansione di spettroscopia d'impedenza) perché non si nota una variazione significativa del profilo di corrente nelle cinque scansioni successive all'aggiunta.

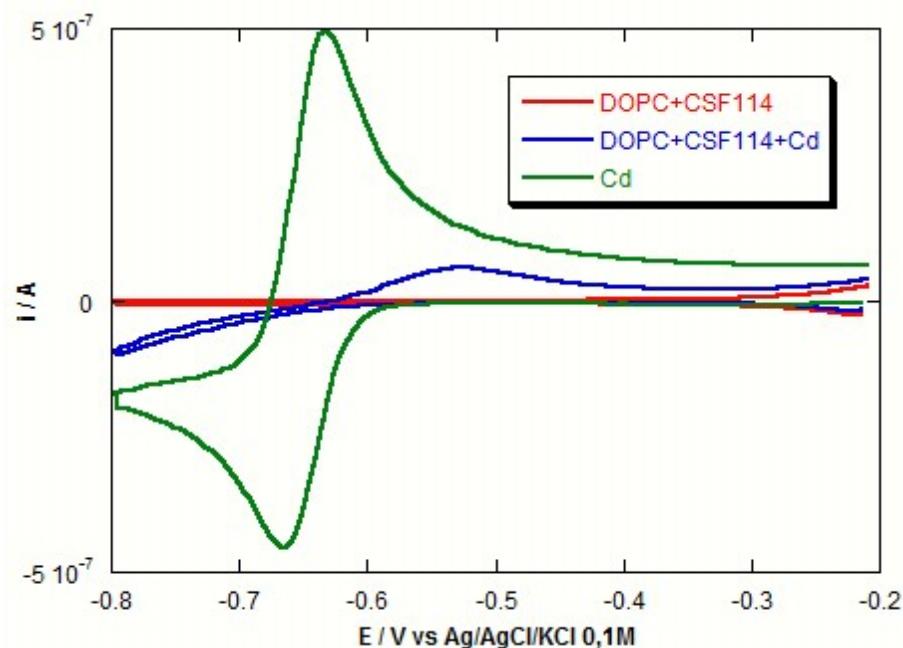


Figura 34: Voltammogramma ciclico su monostrato di DOPC a pH 3. La curva rossa identifica la scansione sul monostrato in presenza di CSF114, quella blu la scansione successiva all'aggiunta dello ione elettroattivo Cd^{2+} e quella verde l'onda del Cd^{2+} direttamente su Hg.

L'effetto di permeabilizzazione nei confronti dello ione Cd^{2+} è comunque minimo.

Anche in questo caso si sono effettuate misure di spettroscopia d'impedenza nella regione di stabilità del monostrato (da $-0,3$ V a $-0,8$ V).

Si riporta il grafico di $-\omega Z''$ vs $\omega Z'$ al potenziale di -400 mV:

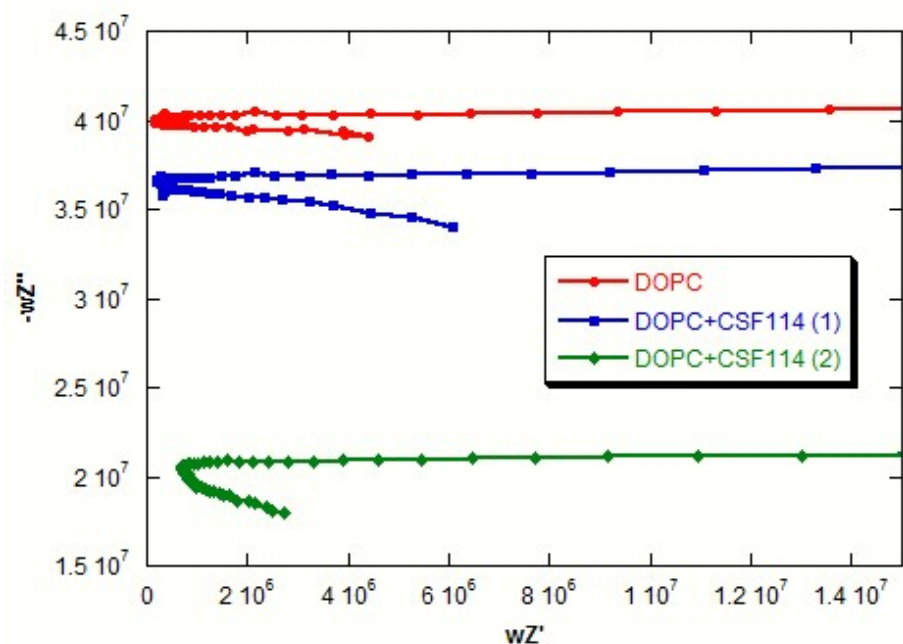


Figura 35: Grafico del modulo su monostrato di DOPC a pH 3. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114 e la verde la seconda scansione.

Da questo tipo di grafico, detto grafico del modulo, è possibile osservare gli strati dielettrici del sistema in esame, ognuno dei quali è rappresentato da un semicerchio le cui dimensioni dipendono dalle proprietà di tale materiale dielettrico.

Prima dell'aggiunta del peptide, il sistema è composto solo da due strati dielettrici: il monostrato lipidico e la soluzione. Questi sono visibili nella scansione in rosso: il semicerchio più grande rappresenta la soluzione, mentre quello più piccolo il monostrato.

Si può notare che nella seconda scansione dopo l'aggiunta (in verde), compare un ulteriore semicerchio, parzialmente sovrapposto al successivo, che mette in evidenza la formazione di un nuovo strato dielettrico.

3.1.2.2 Misure a pH 5,4

Anche in questo caso, la soluzione contiene solamente KCl in concentrazione 0,1 M.

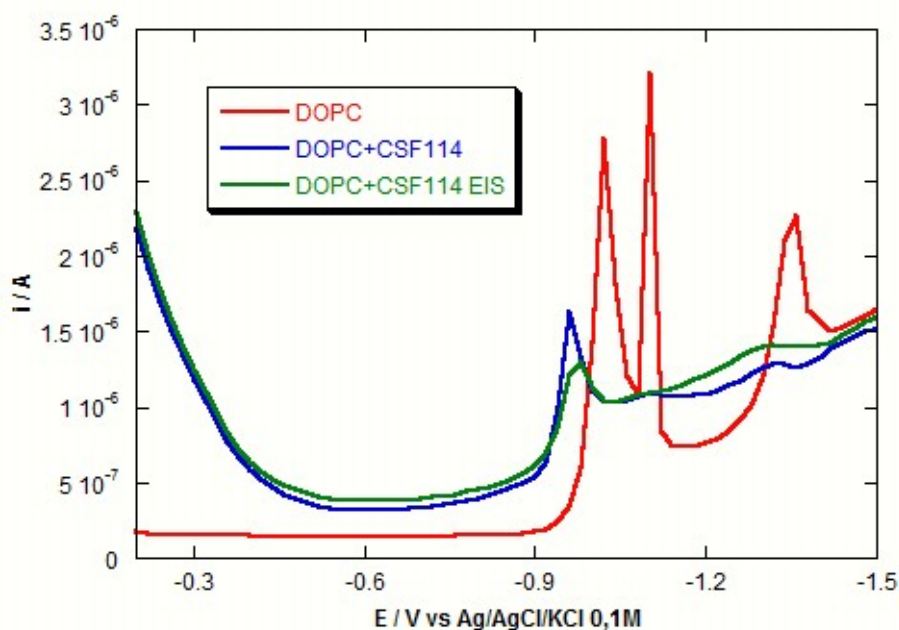


Figura 36: Voltammogramma AC su monostrato di DOPC a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la scansione successiva all'aggiunta del CSF114 e quella verde la scansione dopo una spettroscopia d'impedenza.

Come è possibile osservare, la situazione è analoga alla misura condotta a pH 3. I profili di corrente sono visibilmente alterati sia dopo l'aggiunta di CSF114 che dopo la spettroscopia d'impedenza.

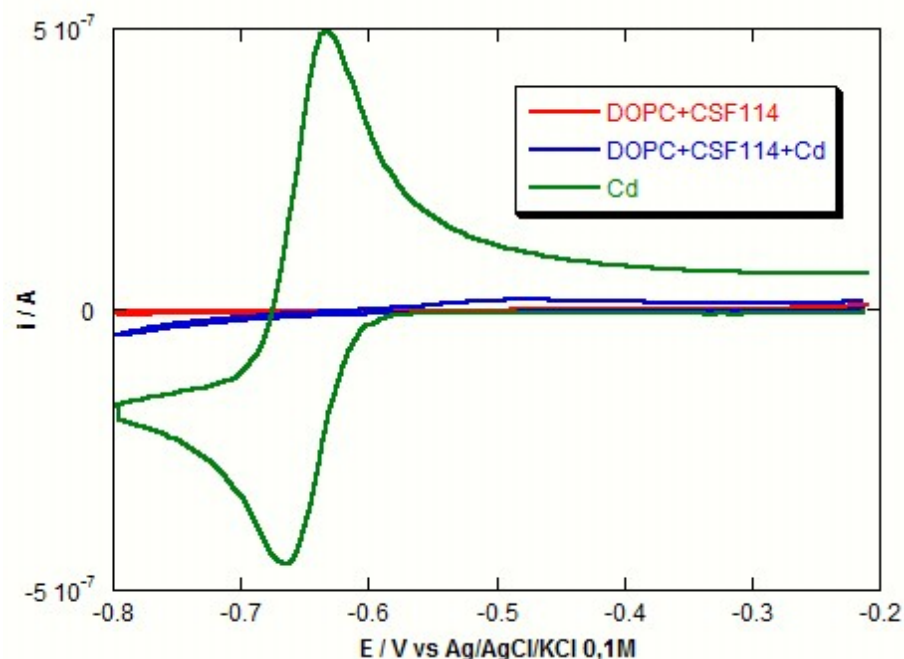


Figura 37: Voltammogramma ciclico su monostrato di DOPC a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul monostrato in presenza di CSF114, quella blu la scansione successiva all'aggiunta dello ione elettroattivo Cd^{2+} e quella verde l'onda del Cd^{2+} direttamente su Hg.

Da misure di VC, si nota che l'effetto di permeabilizzazione è minore rispetto alle misure condotte nelle condizioni precedenti.

Anche in questo caso, riportando il grafico di $-\omega Z''$ vs $\omega Z'$, è possibile notare la formazione di un nuovo strato dielettrico.

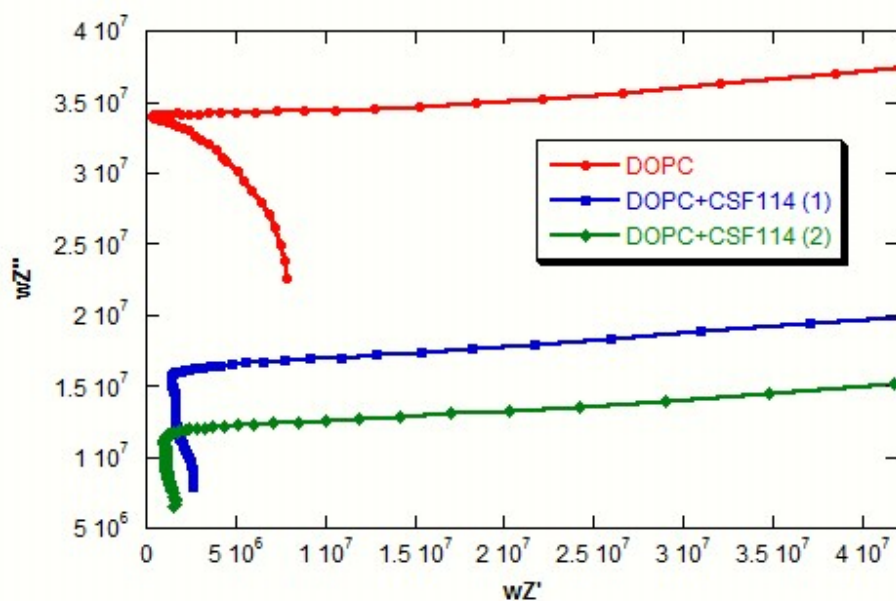


Figura 38: Grafico del modulo su monostrato di DOPC a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114 e la verde la seconda scansione.

Ciò che si nota in questo caso è la comparsa del terzo semicerchio subito alla prima scansione successiva all'aggiunta del CSF114.

3.1.2.3 Misure a pH 7

Come le analoghe misure su DOPS, la soluzione è ottenuta mediante l'uso di un tampone $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ (1:1).

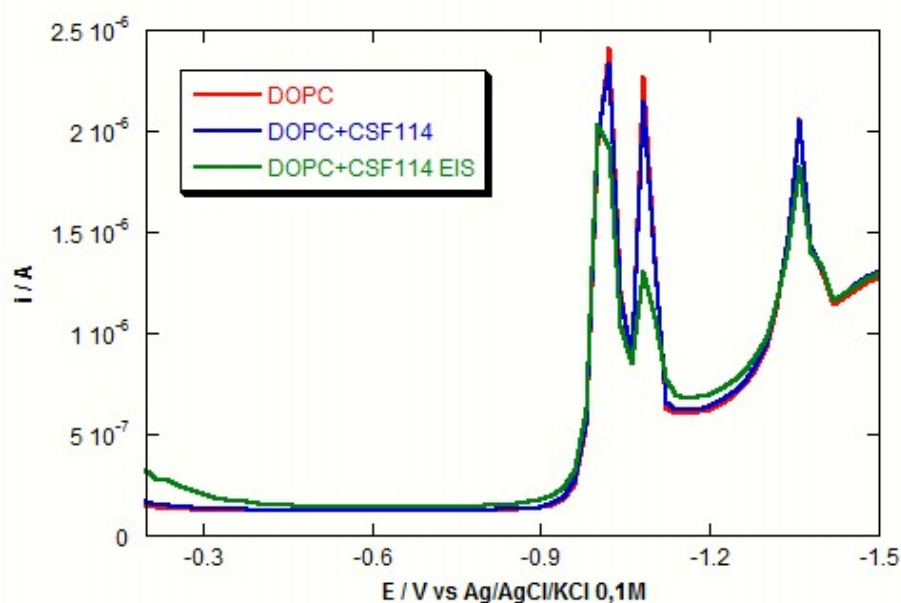


Figura 39: Voltammogramma AC su monostrato di DOPC a pH 7. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la scansione successiva all'aggiunta del CSF114 e quella verde la scansione dopo una spettroscopia d'impedenza.

Misure condotte a questo pH mostrano un effetto molto ridotto. Una lieve alterazione del profilo di corrente si ha solo dopo una scansione completa di spettroscopia d'impedenza.

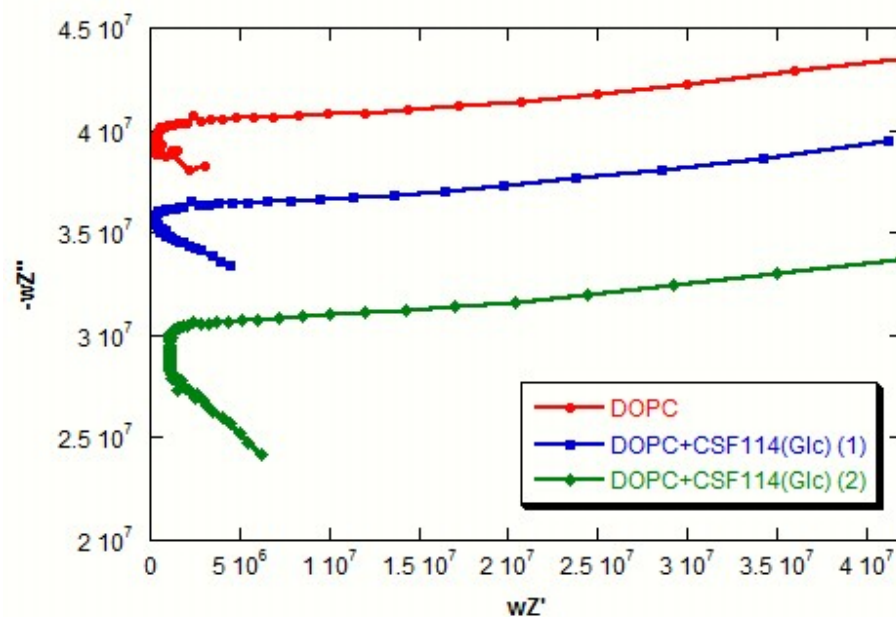


Figura 40: Grafico del modulo su monostrato di DOPC a pH 7. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114 e la verde la seconda scansione.

Come nei casi precedenti, compare un ulteriore strato dielettrico.

Nel caso di monostrati formati in presenza di CSF114 l'effetto sui picchi è più evidente, ma solo in un caso si determina un'alterazione significativa nella regione di minimo.

Formando poi una goccia direttamente in soluzione contenente il peptide, si verifica che il CSF114 non ha forte tendenza ad adsorbirsi su Hg.

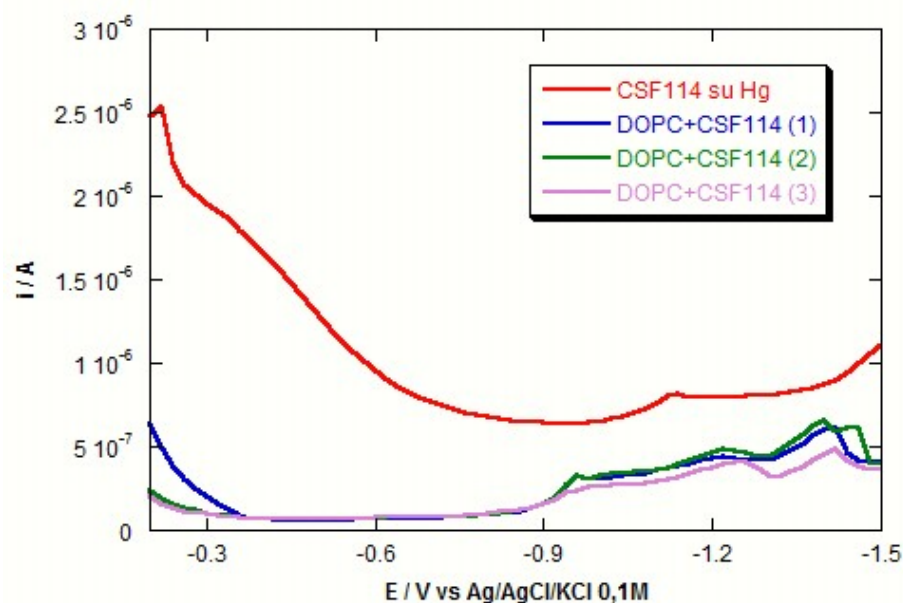


Figura 41: Voltammogramma AC del CSF114 direttamente su Hg (curva rossa) e di monostrati di DOPC formati in presenza del peptide (curva blu, verde e viola).

3.1.3 Monostrati di DOPC/SM 2:1

Le misure con questa composizione del monostrato fosfolipidico sono state effettuate solo a pH 5,4; la concentrazione di peptide è, come nei casi precedenti, di 2 $\mu\text{g/mL}$ nella soluzione di lavoro in cella.

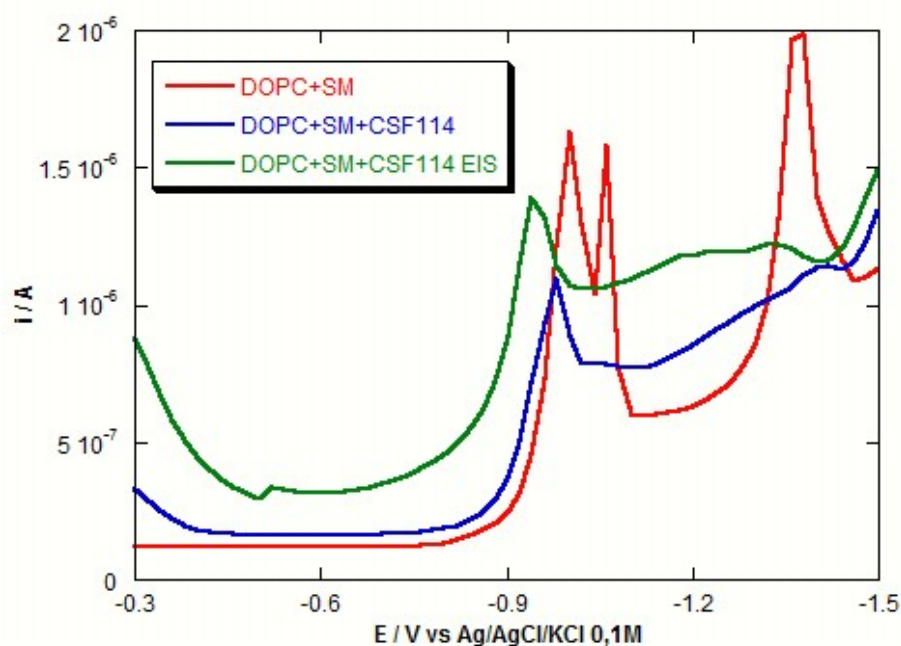


Figura 42: Voltammogramma AC su monostrato misto di DOPC/SM 2:1 a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la scansione successiva all'aggiunta del CSF114 e quella verde la scansione dopo una spettroscopia d'impedenza.

In presenza di microdomini di fase gel nel monostrato, l'incorporazione del peptide è più rapida ed efficace (curva blu). Dopo una scansione di spettroscopia d'impedenza, l'alterazione è significativa.

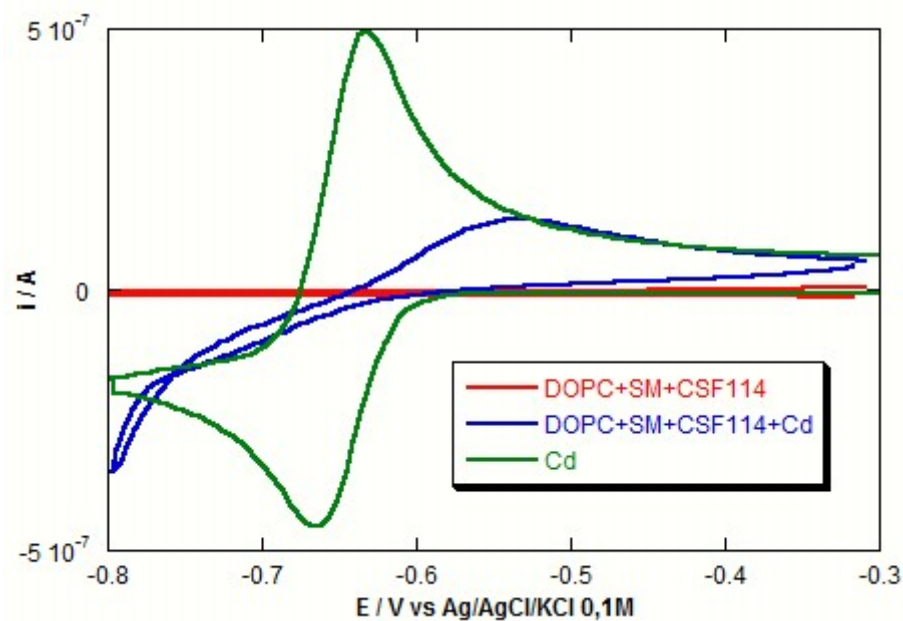


Figura 43: Voltammogramma ciclico su monostrato misto di DOPC/SM 2:1 a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul monostrato in presenza di CSF114, quella blu la scansione successiva all'aggiunta dello ione elettroattivo Cd^{2+} e quella verde l'onda del Cd^{2+} direttamente su Hg.

L'effetto di permeabilizzazione nei confronti dello ione elettroattivo Cd^{2+} è leggermente più marcato, ma resta comunque un processo visibilmente irreversibile.

Di seguito si riportano i grafici, acquisiti tramite spettroscopia d'impedenza, della capacità contro il potenziale con entrambi i peptidi.

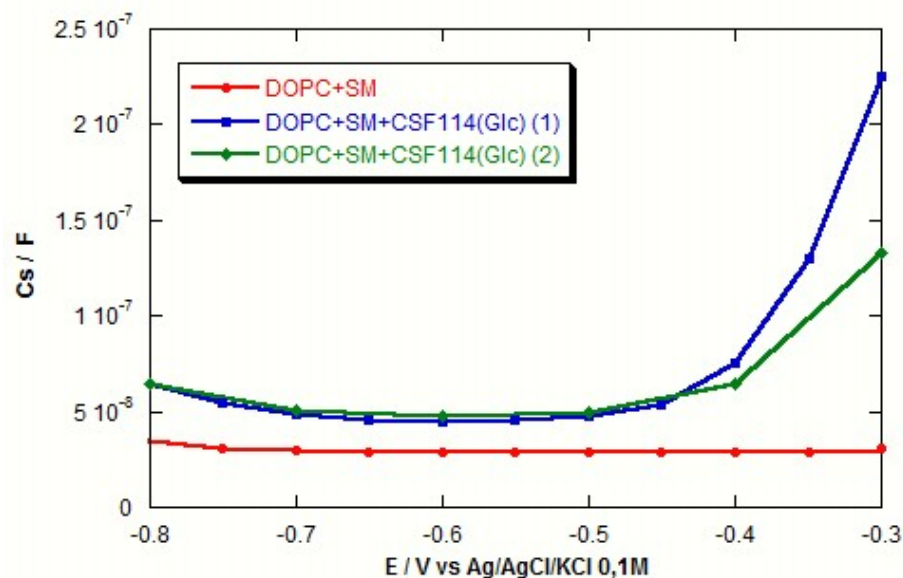


Figura 44: Grafico della capacità contro il potenziale su monostrato misto di DOPC/SM 2:1 a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114(Glc) e quella verde la seconda.

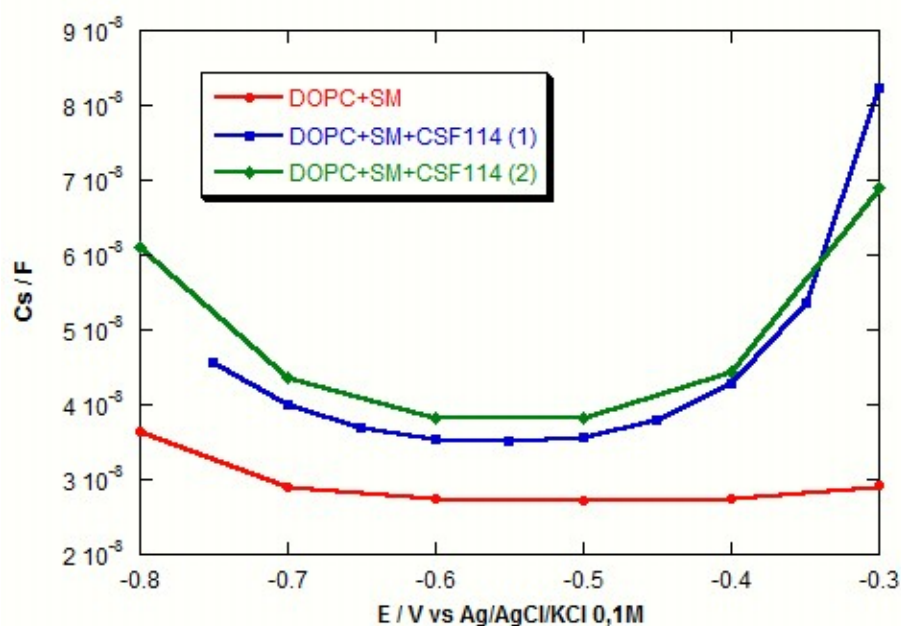


Figura 45: Grafico della capacità contro il potenziale su monostrato misto di DOPC/SM 2:1 a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114 e quella verde la seconda.

Si riportano inoltre i grafici dell'ammettenza in fase, Y' , contro il potenziale, sempre per entrambi i composti.

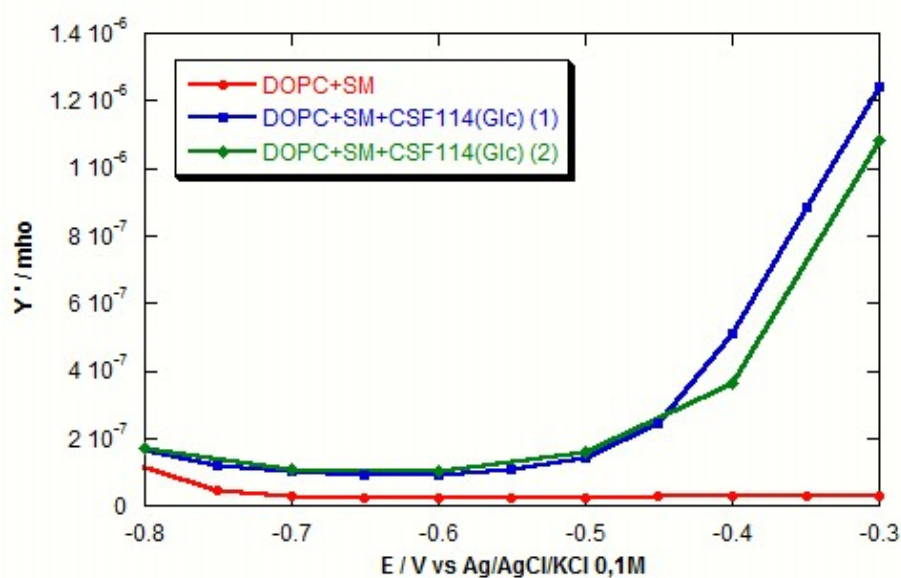


Figura 46: Grafico dell'ammettenza in fase contro il potenziale su monostrato misto di DOPC/SM 2:1 a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114(Glc) e quella verde la seconda.

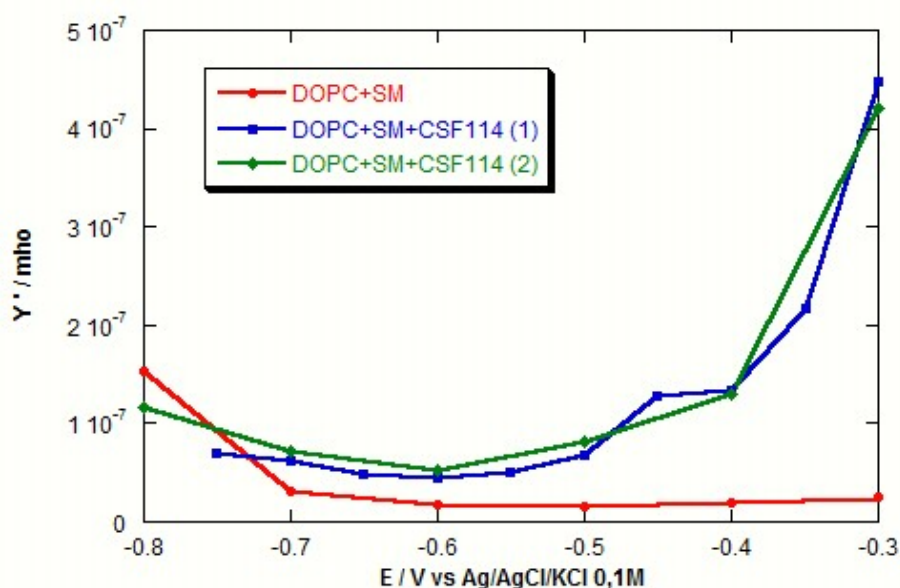


Figura 47: Grafico dell'ammittenza in fase contro il potenziale su monostrato misto di DOPC/SM 2:1 a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114 e quella verde la seconda.

Come si può notare, la spettroscopia d'impedenza conferma un'interazione non trascurabile ai potenziali più positivi dell'arco di stabilità del film per entrambi i composti.

Adesso si riportano grafici dell'andamento di $-\omega Z''$ vs $\omega Z'$ a -400 mV per il composto glucosilato e non.

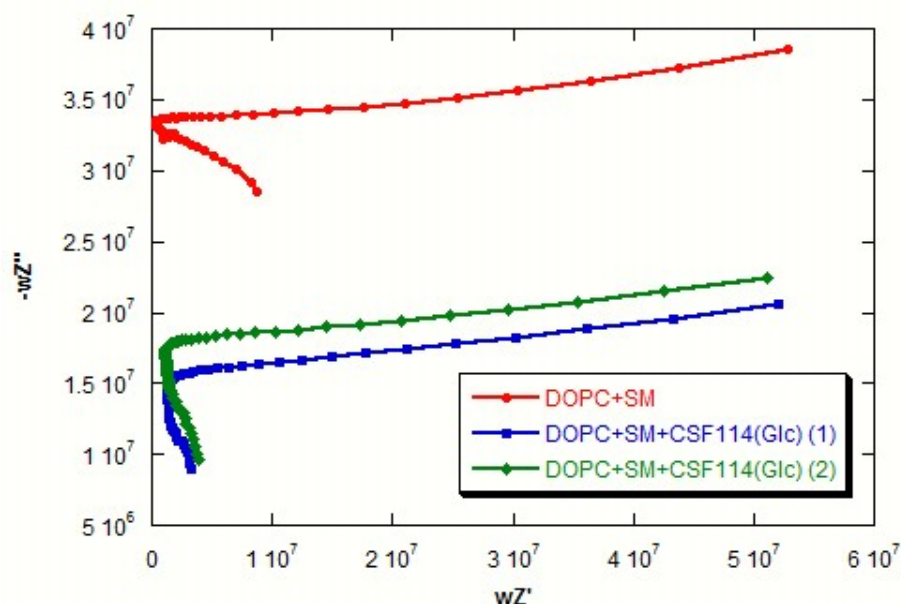


Figura 48: Grafico del modulo su monostrato misto di DOPC/SM 2:1 a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114(Glc) e la verde la seconda scansione.

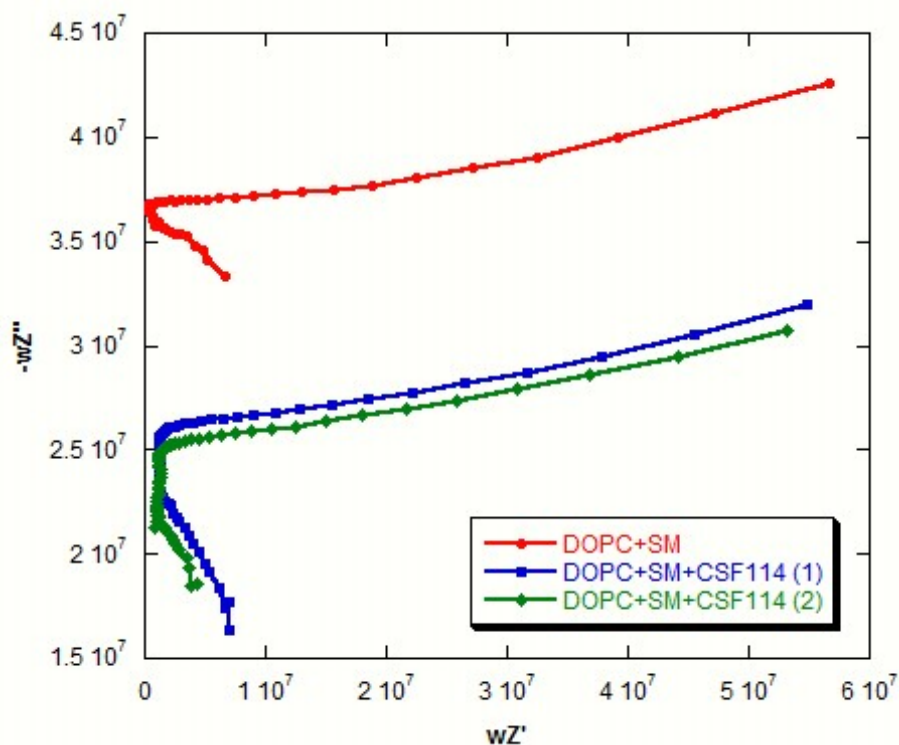


Figura 49: Grafico del modulo su monostrato misto di DOPC/SM 2:1 a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo monostrato, quella blu la prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114 e la verde la seconda scansione.

Quello che si nota è che con monostrati misti abbiamo una risposta più rapida e stabile.

3.2 CSF114 e CSF114(Glc) su bistrati supportati da Hg

Le tecniche della voltammetria ciclica, della spettroscopia d'impedenza elettrochimica e della cronocoulombometria sono state utilizzate anche per lo studio di bistrati supportati e delle loro interazioni con i peptidi CSF114 e CSF114(Glc), in funzione della composizione del monostrato esterno e del pH della soluzione. Infatti, come descritto nella parte sperimentale, un bistrato lipidico supportato da mercurio si compone di due monostrati contrapposti. Il primo monostrato è ancorato alla superficie del metallo dalla quale è separato da una regione idrofilica detta spaziatore ed è costituito da catene fitaniliche. Il secondo monostrato si auto-organizza sul primo per immersione della goccia di mercurio coperta dal primo monostrato in una soluzione elettrolitica alla cui interfase è presente un film lipidico collassato la cui composizione è nota e può essere variata. Sulla base di misure condotte in precedenza su monostrati a composizione mista^[15, 16], si può ragionevolmente ammettere che la composizione del monostrato trasferito sulla goccia sia la stessa presente all'interfase soluzione/N₂. Il secondo monostrato è detto monostrato distale.

Abbiamo utilizzato bistrati nei quali il monostrato distale è costituito da:

- ^{1.} DOPC: le cui teste polari sono zwitterioniche in un arco di valori di pH compresi tra 3

e 7^[17, 18].

2. DOPS: le cui teste polari contengono un gruppo amminico, un gruppo carbossilico ed un gruppo fosforico. Anche in questo caso le costanti di protonazione dei gruppi protonabili presenti sulle teste polari della DOPS in forma auto-organizzata su mercurio, sono state determinate^[17]. Nonostante i valori ottenuti siano stati strettamente associati alla forma di autoaggregazione del lipide nel monostrato, è ragionevole supporre che non varino in maniera significativa nel caso dei bistrati. Possiamo quindi affermare che la carica sulle teste polari di un monostrato distale di DOPS passi da un valore positivo a pH 3, a neutro per un valore del pH intorno a 5, per essere poi carica negativamente per un pH di 7. Questa proprietà la rende particolarmente indicata per lo studio dell'effetto della densità di carica superficiale di una membrana cellulare sulla sua capacità di interagire con molecole esterne;
3. DOPC + SM in rapporto 2/1: utilizzando questa composizione si è inteso avvicinarci alla composizione della membrana mielinica pur in forma semplificata. Inoltre, da lavori precedenti, siamo in grado di affermare che questa miscela lipidica permette la formazione di domini a composizione preferenziale, la cui presenza spesso influenza l'incorporazione di proteine all'interno di una biomembrana^[15]

La variazione di composizione del monostrato distale è stata quindi accompagnata da una variazione del pH della soluzione di lavoro, in modo da evidenziarne l'effetto sulla densità di carica superficiale del monostrato dovuta ad un diverso grado di protonazione delle teste polari, nonché sulla carica presente sulla catena peptidica. Per quanto riguarda quest'ultima, sulla base dei valori delle pK dei gruppi protonabili presenti [tabella 3], come già descritto per il caso di un monostrato, si può ammettere che passi da +2 a +3 laddove il pH vari da 7 a 5,4 e da +3 a +4 nel caso si abbia variazione di pH da 5,4 a 3.

La concentrazione dei peptidi usata è stata di 2-3 µg/mL. E' stata ottenuta per aggiunta in cella di un'opportuna aliquota di una soluzione stock del peptide in esame in dimetilsolfossido o metanolo.

3.2.1 Monostrato distale di DOPS

Nel caso di un monostrato distale di DOPS, abbiamo effettuato misure analoghe a quelle riportate per il caso della DOPC. Non si osservano differenze significative tra i due tipi di monostrati distali. Anche in questo caso, l'effetto maggiore dovuto all'aggiunta del peptide si ha a pH 3. Dobbiamo tenere conto però che, mentre il monostrato di DOPC non cambia significativamente densità di carica superficiale nell'intervallo di pH investigato, il monostrato distale di DOPS a pH 3 ha una densità di carica superficiale positiva, a pH 5 è sostanzialmente neutro, mentre a pH 7 è carico negativamente^[17,18].

3.2.1.1 Misure a pH 7

Su bistrati in cui il monostrato distale è costituito da DOPS a contatto con una soluzione tamponata a pH 7, misure di spettroscopia d'impedenza di cui si riportano i grafici di C ed Y' contro il potenziale alla frequenza di 10 Hz mostrano un leggero effetto iniziale dovuto all'aggiunta del CSF114, che però è solo transitorio e scompare per scansioni successive.

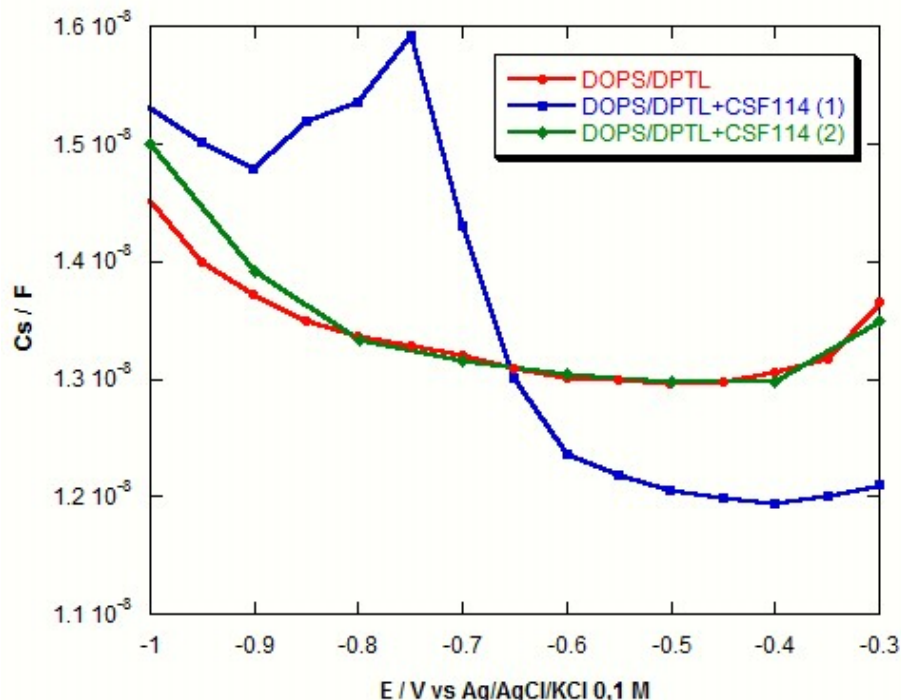


Figura 50: Grafico della capacità contro il potenziale su bistrato di DOPS su DPTL a pH 7. La curva rossa identifica la scansione sul solo bistrato, quella blu la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114 e quella verde la seconda.

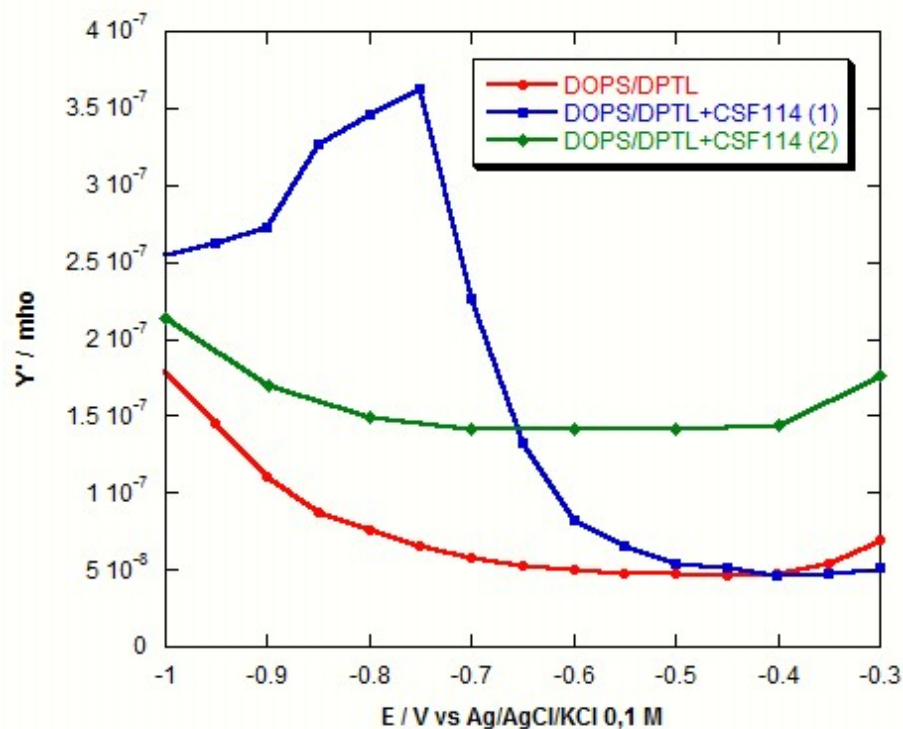


Figura 51: Grafico dell'ammittenza in fase contro il potenziale su bistrato di DOPS su DPTL a pH 7. La curva rossa identifica la scansione sul solo bistrato, quella blu la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114 e quella verde la seconda.

3.2.2 Monostrato distale di DOPC

3.2.2.1 Misure a pH 3

Misure di spettroscopia d'impedenza elettrochimica effettuate su bistrati in cui il monostrato distale è costituito da DOPC mostrano un effetto di alterazione progressiva, sia del profilo della capacità che dell'ammittenza in fase a 10 Hz contro il potenziale applicato, a seguito dell'aggiunta del CSF114. Va però sottolineato che, a questo valore di pH, i bistrati risultano meno compatti ed hanno una maggiore tendenza ad alterarsi nel tempo.

Qui di seguito sono riportati i grafici di Y' e C vs E alla frequenza di 10 Hz. Un effetto di alterazione è già visibile sulla seconda scansione condotta sul solo bistrato.

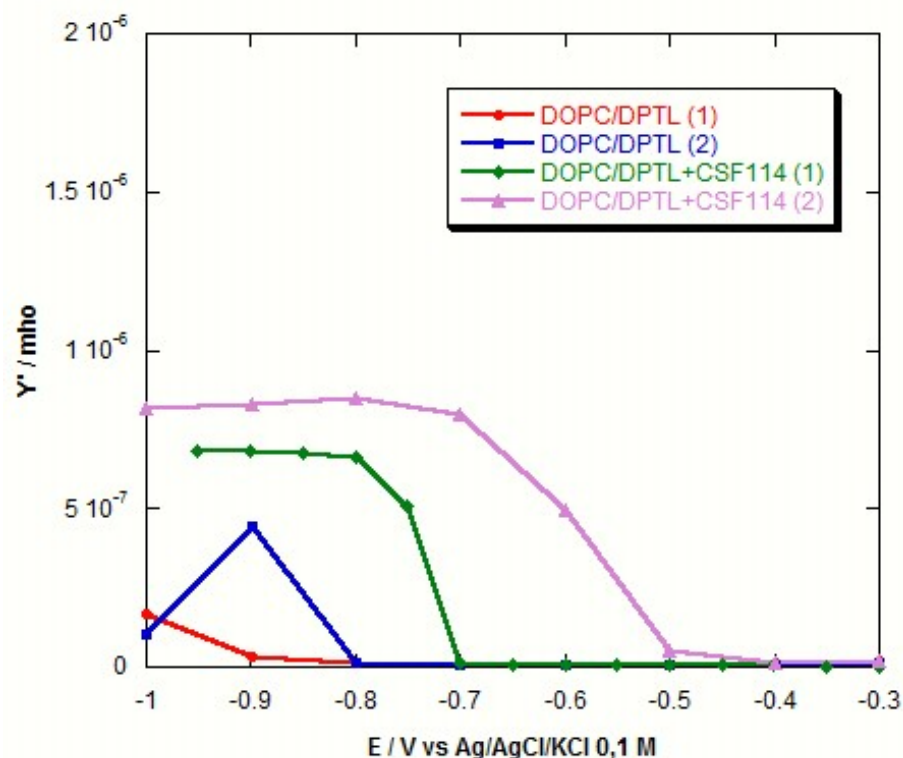


Figura 52: Grafico dell'ammettenza in fase contro il potenziale su bistrato di DOPC su DPTL a pH 3. La curva rossa e blu identificano rispettivamente la prima e la seconda scansione sul solo bistrato, quella verde la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114 e quella viola la seconda.

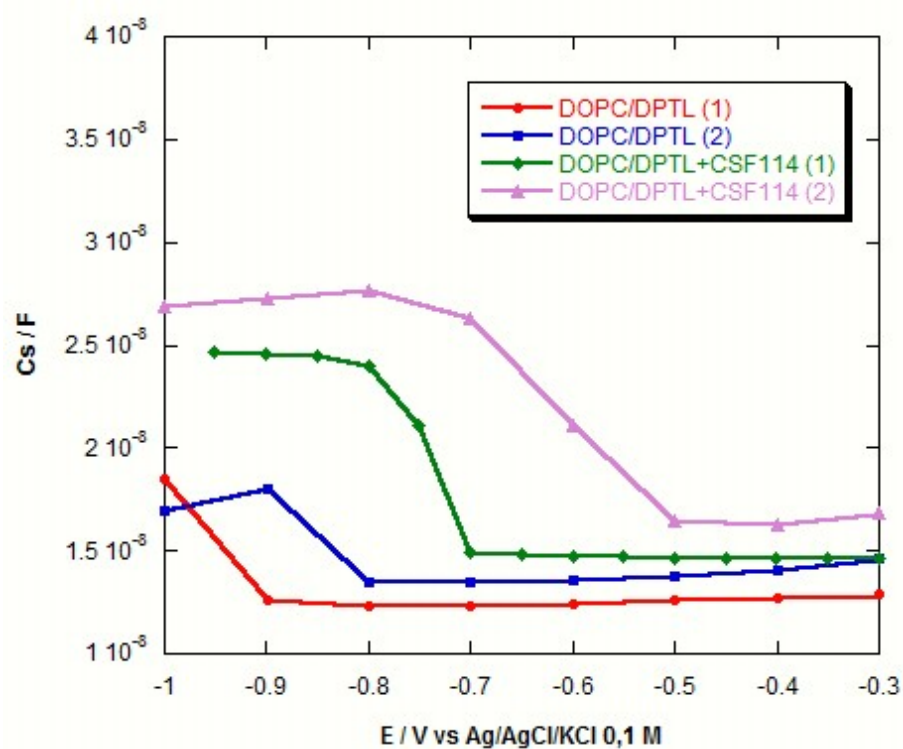


Figura 53: Grafico della capacità contro il potenziale su bistrato di DOPC su DPTL a pH 3. La curva rossa e blu identificano rispettivamente la prima e la seconda scansione sul solo bistrato, quella verde la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114 e quella viola la seconda.

Nella figura seguente sono riportati i profili delle voltammetrie cicliche ottenute a pH 3 su bistrati di DOPC nelle stesse condizioni sperimentali delle soprastanti curve di spettroscopia d'impedenza. Aggiunte di ioni elettroattivi quali Cd^{2+} o Tl^+ non hanno effetto, ad indicare quindi una permeabilizzazione del bistrato decisamente ridotta.

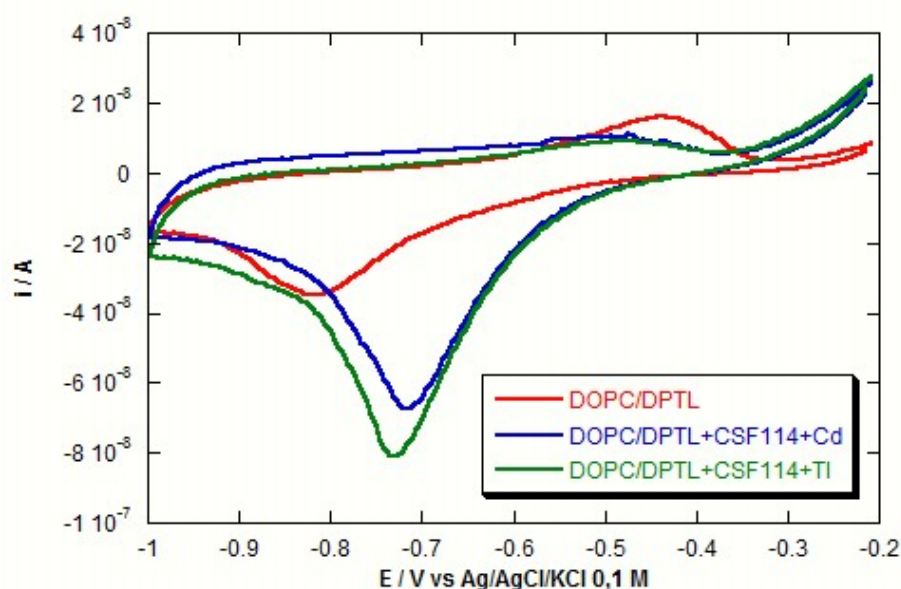


Figura 54: Voltammogramma ciclico su bistrato di DOPC su DPTL a pH 3. La curva rossa identifica la scansione sul bistrato in presenza di CSF114, quella blu la scansione successiva all'aggiunta dello ione elettroattivo Cd^{2+} e quella verde la scansione dopo l'aggiunta dello ione elettroattivo Tl^+ .

3.2.2.2 Misure a pH 5,4

Bistrati in cui il monostrato distale è costituito da DOPC a pH 5,4 sono neutri, e le teste polari sono in forma zwitterionica. L'effetto dell'aggiunta di CSF114 e CSF114(Glc) determinato con misure di spettroscopia d'impedenza elettrochimica è assolutamente trascurabile. I consueti profili della capacità, C , e dell'ammettenza in fase, Y' , alle frequenze di 10 ed 1 Hz contro il potenziale applicato, non sono alterati a seguito dell'aggiunta del peptide. Una loro alterazione, infatti, indicherebbe la penetrazione del peptide aggiunto nella struttura compatta del bistrato. In figura 55 e 56 si riportano a titolo esemplificativo i dati relativi all'andamento dell'ammettenza in fase e della capacità di un bistrato, il cui monostrato distale è costituito da DOPC alla frequenza di 10 Hz. Dopo l'aggiunta di CSF114(Glc) si sono fatte due scansioni, ma l'effetto è trascurabile in entrambi i casi.

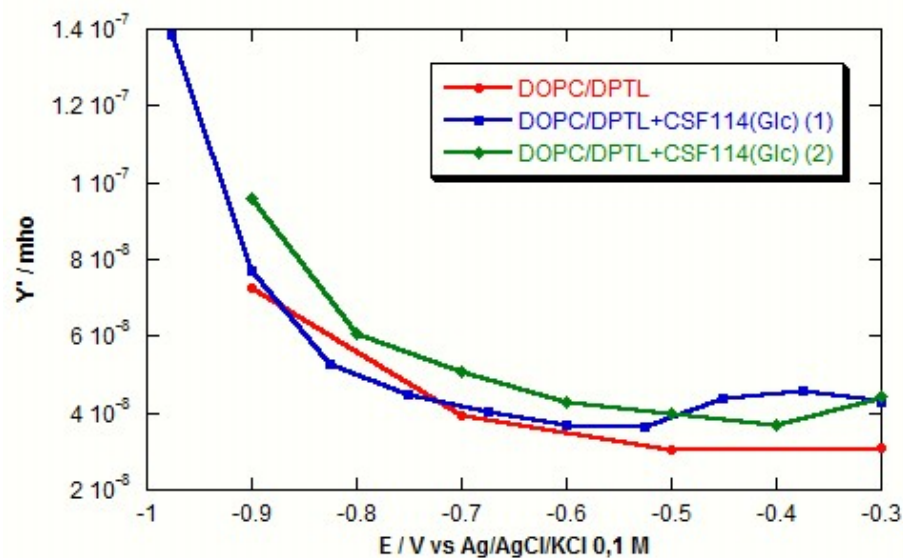


Figura 55: Grafico dell'ammettenza in fase contro il potenziale su bistrato di DOPC su DPTL a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo bistrato, quella blu la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114(Glc) e quella verde la seconda.

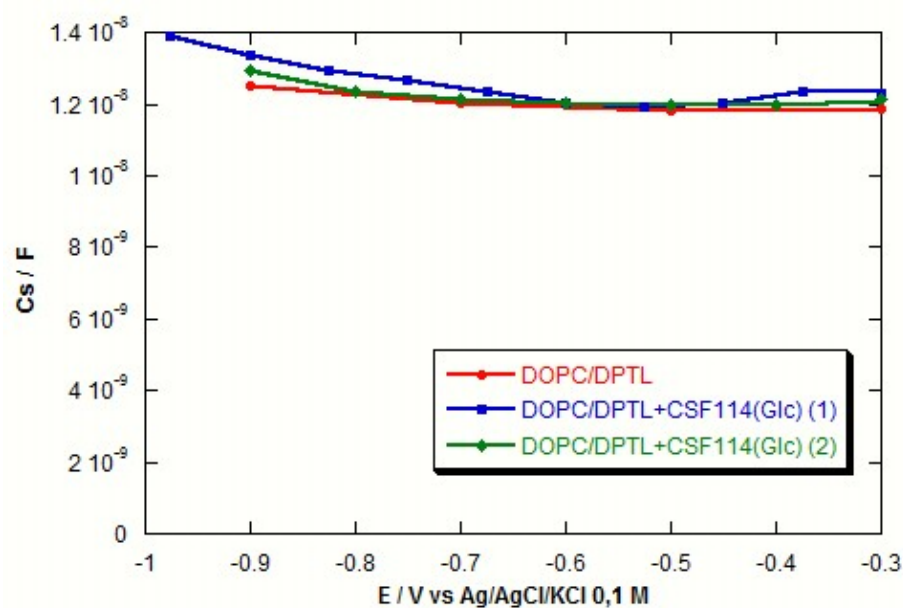


Figura 56: Grafico della capacità contro il potenziale su bistrato di DOPC su DPTL a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo bistrato, quella blu la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114(Glc) e quella verde la seconda.

Sono state effettuate nelle stesse condizioni sperimentali anche misure cronocoulombometriche. Si sono effettuati salti di potenziale da un valore iniziale, E_i , pari a -0.3 V, a potenziali finali, E_f , progressivamente crescenti verso valori più negativi e si sono registrate la corrente e la carica che fluiscono nel sistema a seguito della variazione del

potenziale finale applicato. In tal modo, laddove si formi un canale ionico, lo studio della dipendenza della forma della curva della carica contro il tempo può darci indicazioni sulle modalità di formazione del canale stesso^[19]. In questo caso, per pH 3 o 5 si osserva un passaggio di corrente la cui carica corrispondente cresce col crescere del valore negativo del potenziale finale. Non si osserva nessun effetto legato ad una variazione del tempo di permanenza, t_i , al potenziale iniziale prima di ogni salto. Le curve hanno la concavità rivolta verso il basso ad indicare una carica crescente fino alla saturazione dello strato idrofilico a contatto con la superficie del metallo, le cui dimensioni sono finite.

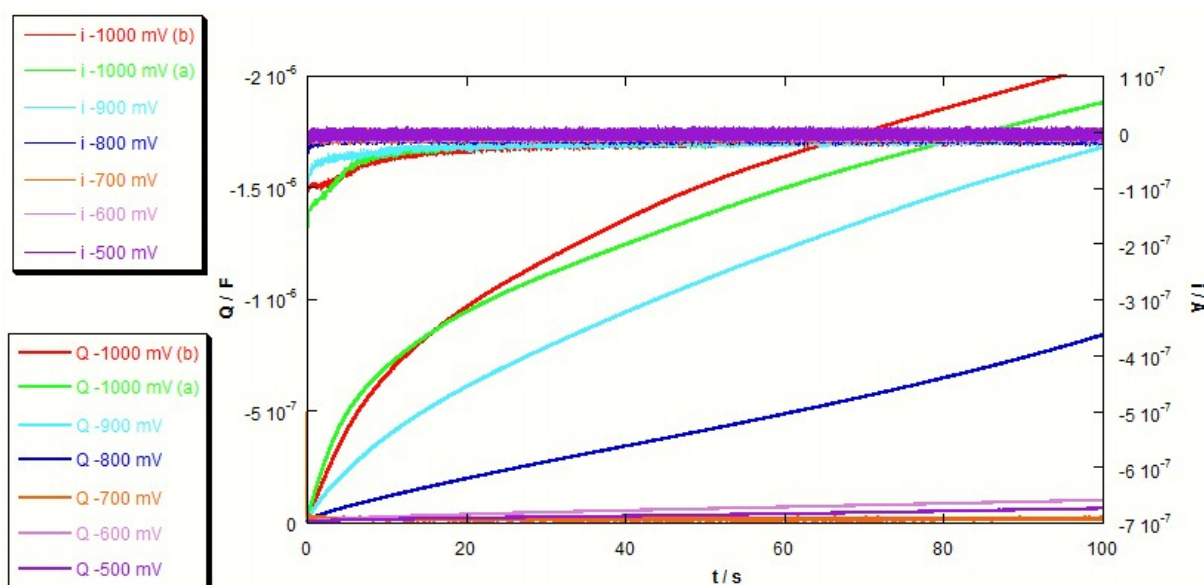


Figura 57: Grafico cronocoulombometrico di un bistrato di DOPC su DPTL a pH 5,4. Le curve che salgono repentinamente e poi hanno andamento circa costante rappresentano la corrente, mentre le altre la capacità.

Misure di voltammetria ciclica condotte in presenza di un monostrato distale di DOPC a pH non tamponato pari a 5,4 confermano un effetto dell'aggiunta di quantità che vanno da 1 a 3 $\mu\text{g/mL}$ di CSF114 in DMSO. La permeabilizzazione nei confronti dello ione Cd^{2+} è decisamente bassa ed il processo irreversibile e spostato ai potenziali più negativi dell'intervallo di stabilità del film. Per inciso, misure indipendenti ci hanno permesso di definire l'arco dei potenziali applicati che corrispondono a potenziali transmembranari fisiologici. Questo corrisponde ad un intervallo di 500 mV centrato sul potenziale di -0.5 V

[20]

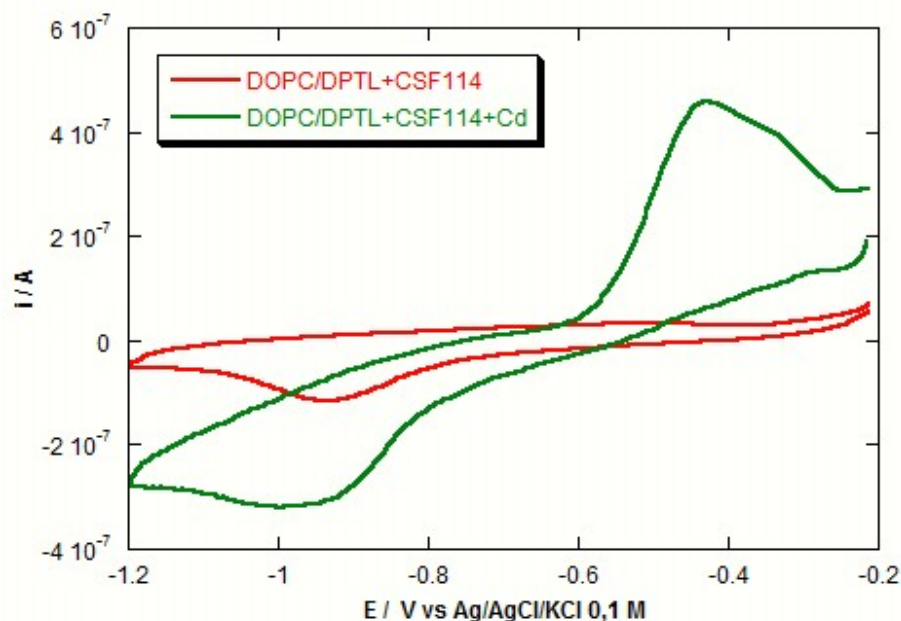


Figura 58: Voltammogramma ciclico su bistrato di DOPC su DPTL a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul bistrato in presenza di CSF114, quella verde la scansione successiva all'aggiunta dello ione elettroattivo Cd^{2+} .

3.2.2.3 Misure a pH 7

Misure effettuate con monostrati distali di DOPC a pH 7 non mostrano differenze significative rispetto a quelle effettuate a pH 5,4.

3.2.3 Monostrato distale di DOPC/SM 2:1

Abbiamo utilizzato bistrati in cui il monostrato distale fosse costituito da una miscela 2:1 di DOPC/SM in modo da avvicinare la composizione del nostro modello biomimetico a quella della membrana mielinica. Nessuno dei due peptidi, CSF114 e CSF114(Glc), determina alcun effetto su questo tipo di bistrato a pH 5,4.

Si riportano a titolo esemplificativo i grafici di C ed Y' alla frequenza di 10 Hz contro il potenziale per entrambi i peptidi.

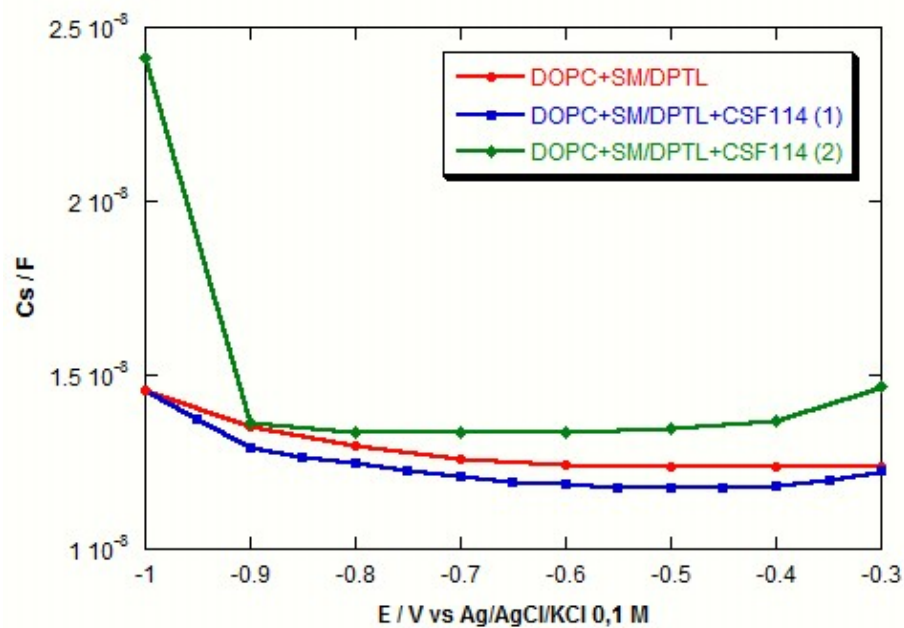


Figura 59: Grafico della capacità contro il potenziale su bistrato misto di DOPC/SM 2:1 su DPTL a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo bistrato, quella blu la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114 e quella verde la seconda.

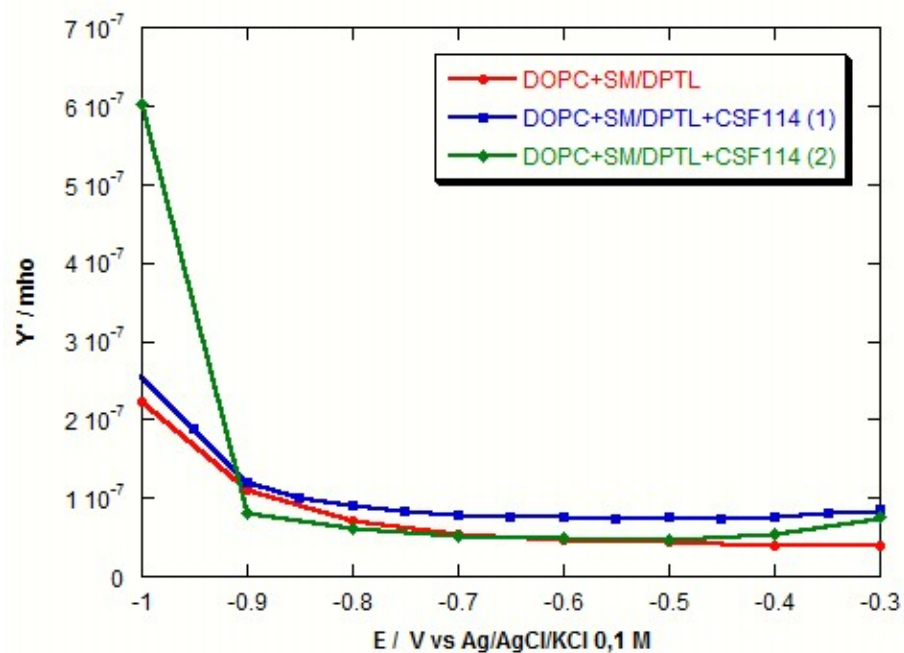


Figura 60: Grafico dell'ammettenza in fase contro il potenziale su bistrato misto di DOPC/SM 2:1 su DPTL a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo bistrato, quella blu la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114 e quella verde la seconda.

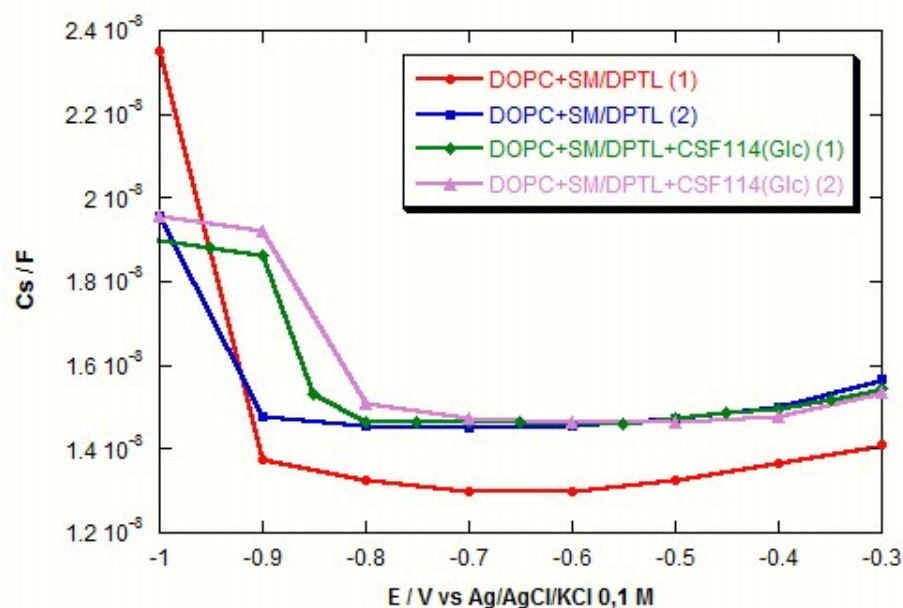


Figura 61: Grafico della capacità contro il potenziale su bistrato misto di DOPC/SM 2:1 su DPTL a pH 5,4. La curva rossa e blu identificano rispettivamente la prima e la seconda scansione sul solo bistrato, quella verde la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114(Glc) e quella viola la seconda.

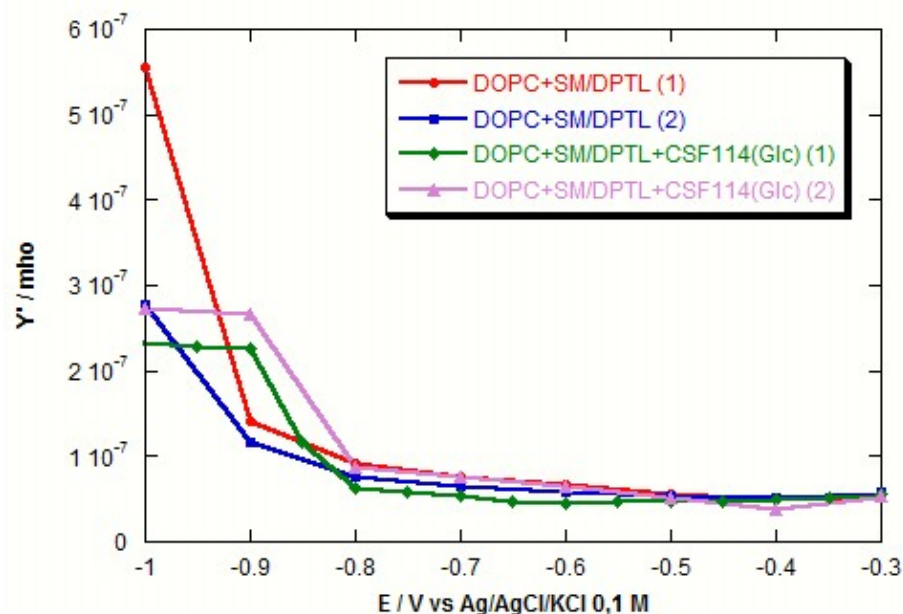


Figura 62: Grafico dell'ammettenza in fase contro il potenziale su bistrato misto di DOPC/SM 2:1 su DPTL a pH 5,4. La curva rossa e blu identificano rispettivamente la prima e la seconda scansione sul solo bistrato, quella verde la prima scansione successiva all'aggiunta di CSF114(Glc) e quella viola la seconda.

Osservando inoltre i cosiddetti grafici del modulo, ossia i grafici di $-\omega Z''$ contro $\omega Z'$, dove $\omega=2\pi f$, con f frequenza del segnale sinusoidale, mentre Z' e Z'' sono l'impedenza in fase ed in

quadratura rispettivamente, non si osservano semicerchi aggiuntivi la cui presenza indica la formazione di ulteriori strati dielettrici^[21] a seguito dell'aggiunta dei peptidi, come si è visto invece su monostrati supportati di uguale composizione. Evidentemente, le caratteristiche del bistrato non permettono di mettere in evidenza lo strato che si forma alla superficie laddove il peptide interagisca con le teste polari come evidenziato su monostrato.

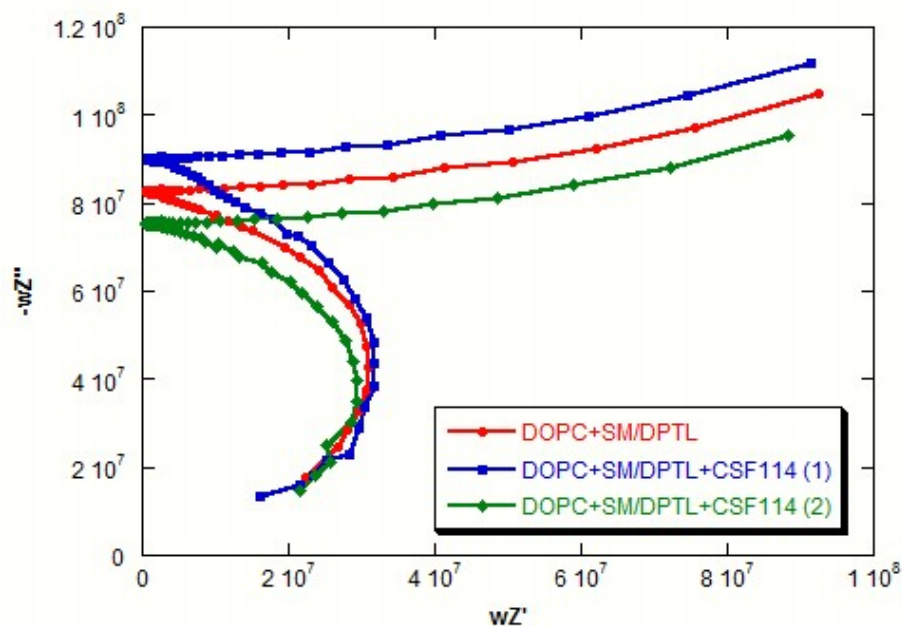


Figura 63: Grafico del modulo su bistrato misto di DOPC/SM 2:1 su DPTL a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo bistrato, quella blu la prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114 e quella verde la seconda scansione.

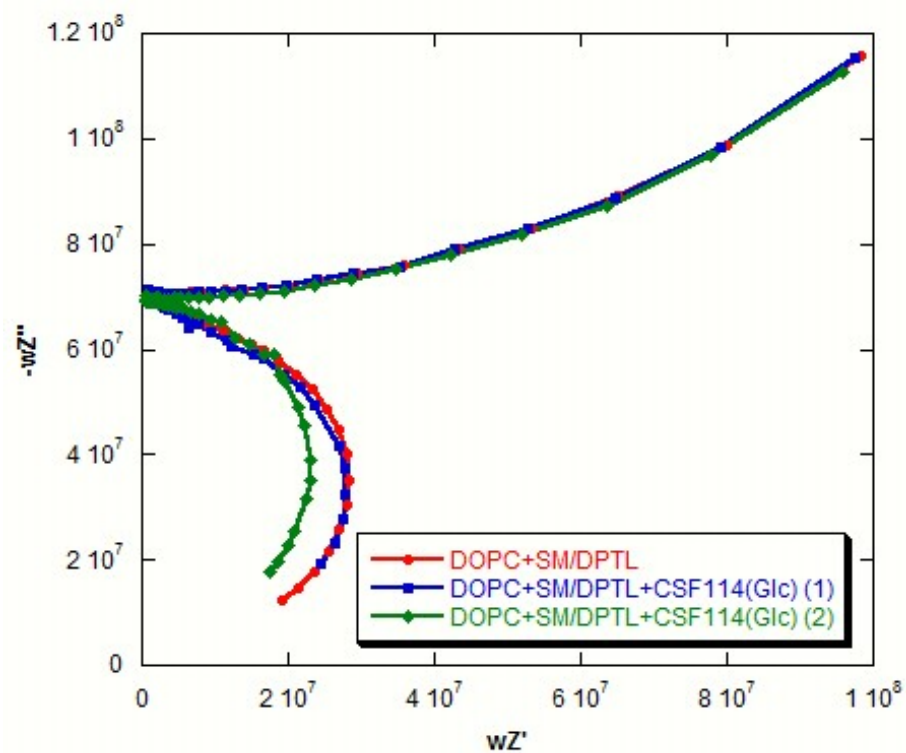


Figura 64: Grafico del modulo su bistrato misto di DOPC/SM 2:1 su DPTL a pH 5,4. La curva rossa identifica la scansione sul solo bistrato, quella blu la prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114(Glc) e quella verde la seconda scansione.

Capitolo 4: Discussione

I risultati ottenuti possono essere così riassunti:

- Monostrati:
 1. CSF114 e CSF114(Glc) interagiscono maggiormente con monostrati di DOPC a pH 3; l'interazione è comunque limitata perlopiù alla regione delle teste polari e diventa significativa solo con una lenta incorporazione;
 2. L'uso di un monostrato a composizione mista DOPC/SM 2:1 determina un'interazione maggiore, più rapida e più stabile con il sistema auto-organizzato;
 3. I due peptidi non sono differenziabili sulla base della natura delle loro interazioni con i monostrati;
 4. Tramite un'analisi dei dati di spettroscopia d'impedenza si evince che, nel caso del monostrato composto di DOPC, e maggiormente in quello del monostrato composto dalla miscela DOPC/SM, si ha la formazione di un ulteriore strato dielettrico con capacità elevata e resistenza bassa;
 5. La permeabilizzazione nei confronti di ioni elettroattivi come il Cd^{2+} è comunque minima e il processo di riduzione è assolutamente irreversibile.
- Bistrati:
 1. CSF114 e CSF114(Glc) interagiscono debolmente con i bistrati supportati, indipendentemente dalla natura del monostrato distale;
 2. i due peptidi non sono differenziabili sulla base della natura delle loro interazioni con i modelli biomimetici in nostro possesso;
 3. l'effetto più significativo, evidenziato sia con misure di spettroscopia d'impedenza elettrochimica che con misure voltammetriche, si ha per un valore 3 del pH della soluzione di lavoro sia su bistrati in cui il monostrato distale è costituito da DOPS che da DOPC;
 4. un'analisi puntuale dei dati di spettroscopia d'impedenza ai diversi potenziali di lavoro non evidenzia nessuna variazione nella forma del grafico del modulo a seguito dell'aggiunta dei peptidi;
 5. l'uso di un monostrato distale a composizione mista DOPC/SM 2:1 non determina una maggiore interazione dei peptidi in esame con il sistema auto-organizzato né un effetto di variazione della forma del grafico del modulo;
 6. la permeabilizzazione nei confronti di cationi elettroattivi è sempre scarsa e spostata a potenziali molto negativi, al di fuori dell'intervallo fisiologico. I

processi redox sono sempre completamente irreversibili;

7. misure cronocoulombometriche sono rappresentative di un processo di permeabilizzazione aspecifico e non forniscono informazioni aggiuntive.

Sulla base di questi risultati, associati a quelli ottenuti su monostrati auto-organizzati su mercurio, si può ipotizzare che entrambi i peptidi si dispongano sulla superficie dei vari modelli biomimetici, dando una interazione limitata perlopiù alla regione delle teste polari, evidenziata soprattutto dalla alterazione dei picchi di riorientamento su monostrati fosfolipidici auto-organizzati. Questo risultato è peraltro in accordo con quanto riportato in S. Pandey, M. C. Alcaro, M. Scrima, E. Peroni, I. Paolini, S. Di Marino, F. Barbetti, A. Carotenuto, E. Novellino, A. M. Papini, A. M. D'Ursi e P. Rovero "*Designed glucopeptides mimetics of myelin protein epitome as synthetic probes for the detection of autoantibodies, biomarkers of multiple sclerosis*", J. Medicinal Chem. 55, **2012**, 10437-10447. In questo lavoro, infatti, misure di fluorescenza su micelle di DPC/SDS in presenza del CSF114(Glc) mostrano che il peptide si dispone sulla superficie delle micelle senza penetrarne l'interno. In presenza di bistrati supportati i due peptidi mostrano una maggiore capacità di interazione con il modello biomimetico a pH acido. In queste condizioni le teste polari della DOPC sono debolmente cariche mentre quelle della DOPS sono significativamente protonate e cariche positivamente. La catene peptidica peraltro presenta una carica positiva di +4. Non è ragionevole quindi pensare ad una maggiore interazione di natura elettrostatica, quanto piuttosto si può immaginare che la debole interazione con la regione delle teste polari a pH acidi sia accompagnata da una minore compattezza del bistrato ai potenziali più negativi dell'arco di stabilità del bistrato stesso. Questa maggiore fragilità del bistrato lo rende più facilmente oggetto di interazioni aspecifiche che ne aumentano la permeabilità. E' possibile quindi che, sotto l'azione di un campo elettrico negativo in direzione della superficie elettrodica, sia il CSF114 che il CSF114(Glc) carichi positivamente tendano a penetrare all'interno del monostrato inducendo una maggiore permeabilità in regioni limitate del bistrato. Questa permeabilizzazione non può essere in alcun modo associata alla formazione di canali. A seguito però della carica positiva presente sia sulle teste polari che sulle molecole peptidiche, è ragionevole pensare ad una permeabilizzazione lievemente selettiva nei confronti degli anioni dell'elettrolita. Ciò è confermato anche dalla scarsa permeabilizzazione nei confronti dei cationi elettroattivi quali cadmio e tallio.

Su bistrati, indipendentemente dalla loro composizione, non si riesce ad apprezzare, come accade invece per i monostrati, la comparsa di semicerchi aggiuntivi sul grafico del modulo. Tali semicerchi, laddove compaiano a seguito dell'aggiunta di una specie in grado di

interagire con la regione delle teste polari del monostrato distale, indicano la formazione di strati dielettrici aggiuntivi con ben precise proprietà dielettriche differenziate dalla struttura del bistrato sottostante^[15, 21]. Si può pensare che in questo caso siano determinati dalla formazione di uno strato più o meno ordinato di CSF114 o CSF114(Glc) sulla superficie del monostrato. Le caratteristiche dielettriche del sistema nel suo insieme, nel caso del bistrato, sono tali da non permettere di differenziare questo ulteriore strato, che ragionevolmente verrà a formarsi anche in questo caso come accade per i monostrati di uguale composizione. Possiamo pertanto affermare che nel caso di strutture molecolari come il CSF114 ed il CSF114(Glc), il monostrato fosfolipidico rappresenti un modello biomimetico più adeguato del bistrato, anche se più limitato da un punto di vista biomimetico. Questo conferma anche come un'analisi in parallelo sui due diversi sistemi biomimetici permetta di trarre informazioni complementari e significative per lo studio delle interazioni di una particolare struttura molecolare con una modello sperimentale di membrana biologica.

Capitolo 5: Conclusioni

Il nostro obiettivo iniziale è stato quello di caratterizzare eventuali interazioni tra i peptidi CSF114 e CSF114(Glc) con modelli biomimetici quali mono- e bi-strati supportati da mercurio mediante l'uso di tecniche elettrochimiche. L'interesse per queste strutture molecolari è legato al fatto che il CSF114(Glc) è una sonda antigenica sintetica in grado di interagire con gli autoanticorpi presenti nel siero di pazienti affetti da sclerosi multipla. Presumibilmente esso riproduce l'effetto di una N-glucosilazione aberrante di proteine mieliniche fondamentale per il riconoscimento di autoanticorpi ^[22, 23]. L'affinità strutturale del CSF114 [S. Pandey et al] con una porzione di una proteina mielinica coinvolta nel decorso della malattia ha fatto ipotizzare la possibilità di una interazione specifica del peptide con la membrana cellulare. La caratterizzazione di tale interazione può rappresentare il punto di partenza per la comprensione dell'attività funzionale della proteina stessa.

L'approccio sperimentale che abbiamo utilizzato ha previsto lo studio in parallelo delle interazioni che il CSF114 e la sua forma glucosilata contraggono con i modelli biomimetici in nostro possesso in funzione della loro composizione fosfolipidica. Non abbiamo evidenziato alcun tipo di interazione che implicasse una penetrazione dei peptidi all'interno dei nostri modelli e quindi la formazione di canali di membrana. Al contempo, però, abbiamo osservato una significativa interazione con la superficie dei modelli biomimetici, ossia con la regione delle teste polari del materiale fosfolipidico auto-organizzato. In quest'ottica è stata di fondamentale importanza la possibilità di utilizzare monostrati supportati, il cui ottenimento è permesso esclusivamente da un supporto elettrodico idrofobico come il mercurio. Nonostante i monostrati siano un modello biomimetico più rudimentale rispetto ai più utilizzati bistrati, essi offrono in questo caso la possibilità di evidenziare le interazioni con le teste polari e quindi con la porzione esterna della membrana cellulare, peculiarità non condivisa dai corrispondenti bistrati.

Abbiamo così potuto evidenziare che CSF114 e CSF114(Glc) interagiscono con la superficie di monostrati di DOPC, ma tale interazione è più veloce ed efficace in presenza di sfingomieline. Questo risultato era del resto prevedibile, dal momento che questo sfingolipide è presente nella membrana mielinica delle cellule del sistema nervoso centrale, laddove è attiva la proteina nativa della quale il CSF114 costituisce l'epitopo minimo.

L'uso della spettroscopia d'impedenza elettrochimica ci ha permesso di caratterizzare questa interazione mettendo in luce la formazione di uno strato dielettrico aggiuntivo sulla superficie della membrana, costituito da molecole di CSF114 presumibilmente associate alle teste polari

del materiale lipidico.

Questa conclusione può essere la base per lo sviluppo futuro di questo lavoro. Possiamo, infatti, pensare di verificare come l'aggiunta di autoanticorpi specifici influenzi le proprietà dielettriche dello strato aggiuntivo differenziando tra composto glucosilato e non. Laddove le caratteristiche del sistema prima e dopo l'aggiunta dell'auto-anticorpo siano riproducibili, esso può rappresentare la base per lo sviluppo di un biosensore specifico.

Capitolo 6: Sigle e abbreviazioni

BLMs	Bilayer lipid membranes
Boc	Ter-Butilossicarbonile
Bzl	Benzile
DCM	Diclorometano
DIPEA	N,N-Diisopropiletilammina
DMF	N,N-Dimetilformammide
DOPC	Dioloilfosfatidilcolina
DOPS	Dioloilfosfatidilserina
EDT	Etanditiolo
EIS	Electrochemical impedance spectroscopy
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESI-MS	Electro spray ionization mass spectroscopy
EtOH	Etanolo
Fmoc	9-Fluorenilmetilossicarbonile
Glc	Glucosio
HATU	1-[Bis(dimetilammino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo(4,5)piridinio esafluorofosfato
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HPLC	High performance liquid chromatography
IgG/IgM	Immonoglobuline G/M
MOG	Glicoproteina oligodendrocitica della mielina
NMM	N- Metilmorfolina
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildiidrobenzofuran-5-sulfonile
PLP	Proteina Proteolipidica
RP-HPLC	Reverse phase-high performance liquid chromatography
SAMs	Self-assembled monolayers
SM	Sclerosi multipla
SNC	Sistema nervoso centrale
SPE	Solid phase extraction
SPPS	Solid phase peptide synthesis
t-BLMs	Tethered bilayer lipid membranes
t-Bu	Ter-Butile
TFA	Acido trifluoroacetico
Trt	Trifenilmetile

Capitolo 7: Bibliografia

- 1 Lucchinetti C, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. *Brain Pathol* **1996**, 6, 259-274.
- 2 Lassmann H. *Multiple Sclerosis* **1998**, 4, 93-98.
- 3 Dhib, S. Jalbut. *Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis*. **2007**, 68(22 Suppl 3):S13-21; discussion S43-54.
- 4 *Studio di epitopi peptidici coinvolti nel riconoscimento di autoanticorpi anti-CSF114(Glc) nella Sclerosi Multipla*, laura di tesi di Francis Ciolli, **2006**.
- 5 M. A. Daniels, K. A. Hogquist, S. C. Jameson, *Nature Immunology*, **2002**, 10, 903.
- 6 R. Merrifield, *Science*, **1986**, 232, 341-347.
- 7 (a) F. Lolli, B. Mulinacci, A. Carotenuto, B. Bonetti, G. Sabatino, B. Mazzanti, A.M. D'Ursi, E. Novellino, M. Pazzagli, L. Lovato, M.C. Alcaro, E. Peroni, M.C. Pozo-Carrero, F. Nuti, L. Battistini, G. Borsellino, M. Chelli, P. Rovero, and A.M. Papini. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **2005**, 102(29), 10273-10278; (b) A. M. Papini. *Simple test for Multiple Sclerosis*, *Nature Medicine*, **2005**, 11(1), 13; (c) "Glycopeptides, their preparation and use in the diagnosis or therapeutic treatment of Multiple Sclerosis". *Inventors*: A.M. Papini, P. Rovero, M. Chelli, F. Lolli. *Applicant*: University of Florence, Italy. PCT International application (**2003**) WO 03000733 A2. Italian Patent n. 0001327122 (27/04/2005). Granted USA Patent (02/08/2005).
- 8 B.G. Davies, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 579-601.
- 9 M. Meldal, Y.C. Lee, R.T. Lee, *Academic Press, Orlando*, **1994**, 145-198.
- 10 M. Meldal, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1994**, 4, 710-718.
- 11 M. Meldal, K. Bock, *Glycoconjugate J.*, **1994**, 11, 59-63.
- 12 A. Carotenuto, AM. D'Ursi, E.Nardi, A.M.Papini, P.Rovero, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 2378-2381.

- 13 F. Lolli, B. Mazzanti, M. Pazzagli, E. Peroni, M.C. Alcaro, R. Lanzillo, V. Brescia Morra, L. Santoro, C. Gasperini, S. Galgani, M.M. D' Elios, V. Zipoli, S. Sotgiu, M. Pugliatti, P. Rovero, M. Chelli, and A.M. Papini. *J. Neuroimmunol.* **2005**, 167(1-2), 131-137.
- 14 R. Polt, L. Szabo, J. Treiberg, Y. Li, V. J. Hruby, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10249-10258.
- 15 L. Becucci, S. Martinuzzi, E. Monetti, R. Mercatelli, F. Quercioli, D. Battistel, R. Guidelli. *Electrochemical impedance spectroscopy and 2P-FLIM images of lipid mixtures self-assembled on mercury*, *Soft Matter*, 6 ,**2010**, 2733-2741.
- 16 L. Becucci, F. Scaletti, R. Guidelli. *Gel-phase microdomains and lipid rafts in monolayers affect the redox properties of ubiquinone-10* *Biophys. J.* 101(1), **2011**, 134-143.
- 17 M. R. Moncelli, L. Becucci, R. Guidelli. *The intrinsic pK_a values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes*. *Biophys. J.*, 66, **1994**,1969-1980.
- 18 M. R. Moncelli, L. Becucci. *The intrinsic pK_a values for phosphatidic acid in monolayers deposited on mercury electrodes*, *J. Electroanal. Chem.*, 385, **1995**, 183-189.
- 19 L. Becucci, R. Guidelli. *Mercury-Supported Biomimetic Membranes for the Investigation of Antimicrobial Peptides*. *Pharmaceuticals*, **2014**, 7, 136-168.
- 20 L. Becucci, M.R. Moncelli, R. Guidelli. *Ion carriers and channels in metal-supported lipid bilayers as probes of transmembrane and dipole potential*, *Langmuir*, 19, **2003**, 3386-3392.
- 21 L. Becucci, R. Guidelli: *Kinetics of channel formation in bilayer lipid membranes (BLMs) and tethered BLMs: monazomycin and melittin*. *Langmuir*. 23, **2007**, 5601-5608.
- 22 F. Nuti, I. Paolini, F. Cardona, M. Chelli, F. Lolli, A. Brandi, A. Goti, P. Rovero, A. M.

- Papini. *FMOC-protected iminosugar modified asparagine derivatives as building blocks for glycomimetics-containing peptides*, Bioorg. Med. Chem. 15, **2007**, 3965-3973.
- 23 . Nuti, E. Peroni, F. Real-Fernandez, M.A. Bonache, A La Chavalier-Isaad, M. Chelli, N. Lubin-Germain, J. Uziel, P. Rovero, F. Lolli et al. *Post-translationally modified peptides efficiently mimicking neo-antigens: A challenge for theragnostic of autoimmune diseases*, Biopolymers (Pept. Sci.), 94, **2010**, 791-799.