



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in
Chimica

Studio elettrochimico dell'effetto del lipodepsipetide siringomicina, SRE, su monostrati lipidici supportati

Electrochemical investigation of the effect of the lipodepsipeptide syringomycin, SRE, on supported lipid monolayer

Relatore

Massimo Innocenti

Correlatore

Lucia Becucci

Candidato

Vania Tramonti

Anno Accademico 2012/2013

Indice

Capitolo 1

Introduzione

3

- 1.1 Lipodepsipeptidi 3
- 1.2 Siringomicina E (SRE) 6
- 1.3 Membrane Biomimetiche 14
- 1.4 Scopo della tesi 18

Capitolo 2

Parte sperimentale

19

- 2.1 Tecniche elettrochimiche 19
 - 2.1.1 Voltammetria AC con risoluzione di fase 19
 - 2.1.2 Spettroscopia di impedenza elettrochimica, EIS 21
 - 2.1.3 Voltammetria ciclica 25
- 2.2 Assetto sperimentale 30
 - 2.2.1 Cella elettrochimica 30
 - 2.2.2 Camera di lavoro 32
- 2.3 Preparazione e caratterizzazione di monostrati lipidici supportati da mercurio 33
 - 2.3.1 Preparazione di monostrati lipidici 33
 - 2.3.2 Caratterizzazione di monostrati lipidici 34
- 2.4 Reagenti 36

Capitolo 3

Risultati sperimentali

37

- 3.1 Effetto di una variazione dell'area della superficie elettrodica a disposizione del monostrato auto-organizzato sul profilo dei picchi di riorientamento 37
- 3.2 Effetto della presenza di steroli, colesterolo, Chol, ed ergosterolo, Erg, su monostrati lipidici 41

3.3	Effetto della siringomicina, SRE, su monostrati fosfolipidici supportati da mercurio	43
3.3.1	Effetto della siringomicina, SRE, su monostrati di dioleoilfosfadilcolina, DOPC	43
3.3.2	Effetto della siringomicina, SRE, su monostrati di dioleoilfosfadilserina, DOPS	49
3.3.3	Effetto della presenza di steroli, colesterolo, Chol, ed ergosterolo, Erg, sulle interazioni tra siringomicina, SRE, e monostrati fosfolipidici	53
Capitolo 4		
Discussione dei risultati		57
Capitolo 5		
Conclusioni		66
Bibliografia		68
Ringraziamenti		71

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Lipodepsipeptidi

I lipodepsipeptidi (LDPs) sono molecole anfipatiche aventi una testa polare, costituita da una catena peptidica lineare o ciclica, ed una coda apolare, costituita da un acido grasso di lunghezza variabile^[1]. Vengono prodotti da diversi ceppi del batterio *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, un batterio Gram negativo che infetta le cellule vegetali di vari tipi di piante (fra cui il mais, le piante di fagiolo o di limone), provocandone la rapida morte dei tessuti o macchie sulle loro parti verdi (ad esempio fusti, foglie, piccioli e frutti)^[2], come esemplificato in fig. 1.1a ed in fig.1.1b.



Fig. 1.1 (a) Macchie su una foglia di fagiolo; **(b)** Macchie su un albero da frutto.

I lipodepsipeptidi possono essere suddivisi in due gruppi a seconda della lunghezza della loro catena peptidica^[3]: il gruppo dei nonapeptidi, che include le siringomicine, la siringostatine, le siringotossine e le pseudomicine; il gruppo delle siringopeptine, che contengono 22 o 25 amminoacidi (SP₂₂ o SP₂₅).

Le molecole appartenenti al gruppo dei nonapeptidi presentano un acido grasso di lunghezza variabile recante un gruppo ossidrilico in posizione 3 e differiscono tra loro per la

sequenza amminoacidica, come mostrato in figura 1.1c. L'acido grasso è legato ad un residuo di serina in posizione N-terminale tramite un legame ammidico. Tale residuo di serina è legato, a sua volta, al C-terminale di una 4-clorotreonina attraverso un legame estereo, formando un anello lattonico. Inoltre i quattro nonapeptidi hanno a comune tre amminoacidi non naturali sul carbonio terminale (l'acido 2,3-deidroamminobutirrico, l'acido 3-idrossi aspartico e la 4-clorotreonina), ma anche la presenza di isomeri D della serina edell'acido 2,4-amminoburrico. La lunghezza dell'acido grasso può invece variare all'interno dello stesso sottogruppo di nonapeptidi; ad esempio, le siringomicine, SRA₁, SRE e SRG presentano nella loro struttura un acido grasso rispettivamente decanoico, dodecanoico e tetradecanoico^[2].

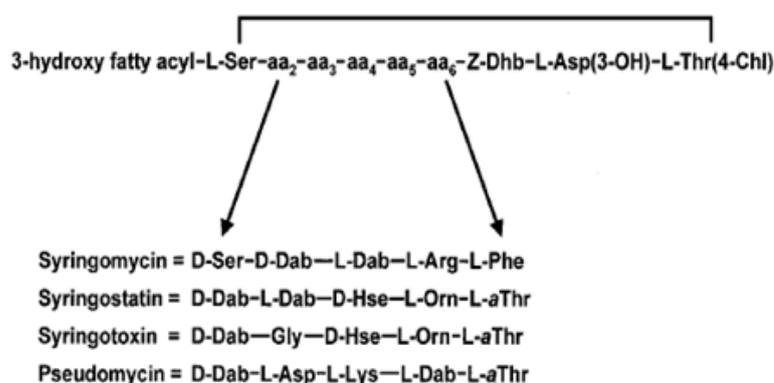
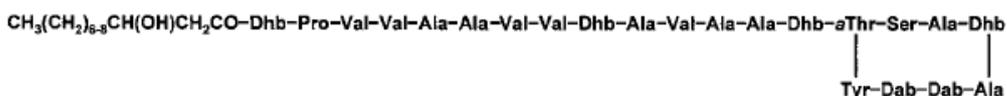


Fig.1.1c Struttura dei LDP siringomicina, siringostatina, siringotossina e la pseudomicina. I quattro LDP differiscono nella sequenza amminoacidica nelle posizioni 2 e 6. Asp(3-OH), acido 3-idrossi aspartico; Dab, acido 2,4-diamminobutirrico; Dhb, acido 2,3-deidroamminobutirrico; Hse omoserina; Orn, ornitina; Thr(4-Chl), 4-clorotreonina; aThr, *allotreonina*^[2].

Le siringopeptine, SP₂₂ e SP₂₅, presentano un catena peptidica con un alto contenuto di residui idrofobici^[4] e differiscono nelle sequenza degli amminoacidi, oltre che per il loro numero. La catena peptidica è ciclizzata nella parte C-terminale, formando un anello di 8 residui, ed è acilata all'estremità N-terminale da un acido grasso, che può essere 3-idrossidecanoico o 3-idrossidodecanoico, come esemplificato in figura 1.1d.

SP22



SP25

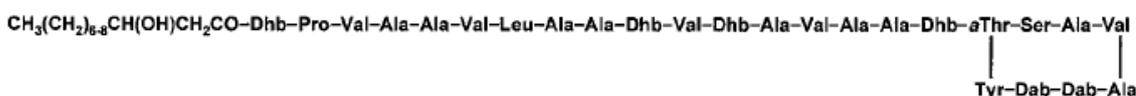


Fig. 1.1d Struttura delle siringopeptine SP₂₂ e SP₂₅. L'acido grasso può essere sia un acido 3-idrossidecanoico o 3-idrossidodecanoico Dab, acido 2,4-diamminobutirrico; Dhb, acido 2,3-deidroamminobutirrico; aThr, *allotreonina*^[2].

Nonostante le differenze strutturali, entrambi i gruppi di lipodepsipeptidi presentano un meccanismo d'azione ed un'attività biologica molto simili: formano canali ionici transmembrana nella membrana cellulare delle piante e presentano attività fitotossica ed antifungina^[3].

I lipodepsipeptidi sono coinvolti direttamente nella patogenicità del batterio *Pseudomonas syringae*, ma allo stesso tempo difendono le piante e lo stesso batterio da eventuali organismi competitori, come i funghi ed i lieviti^[5]. Inoltre le siringomicine e le siringopeptine possiedono anche un'attività antibatterica, in particolare possono essere usate contro il batterio *M.tuberculosis*, costituendo quindi una fonte di cura per le malattie umane^[1].

In questo lavoro di tesi è stata studiata l'interazione della siringomicina E (SRE) con monostrati lipidici supportati da mercurio. Questo composto ha destato il nostro interesse perché non sono ancora state chiarite le modalità della sua interazione con le membrane cellulari. Comunque, prima di parlare di questo argomento, è bene fornire una descrizione più dettagliata della SRE.

1.2 Siringomicina E (SRE)

La siringomicina E (SRE) è un lipopeptide appartenente alla classe dei nonapeptidi.

La sua struttura è stata determinata per la prima volta nel 1989 da A. Segre ad altri^[6] mediante l'utilizzo principale delle tecniche FAB-MS, 1D e 2D ¹H-NMR, 1D e 2D ¹³C-NMR: presenta una catena peptidica ciclizzata in un anello lattonico con il residuo N-terminale acilato dall'acido grasso 3-idrossidodecanoico (fig.1.2a).

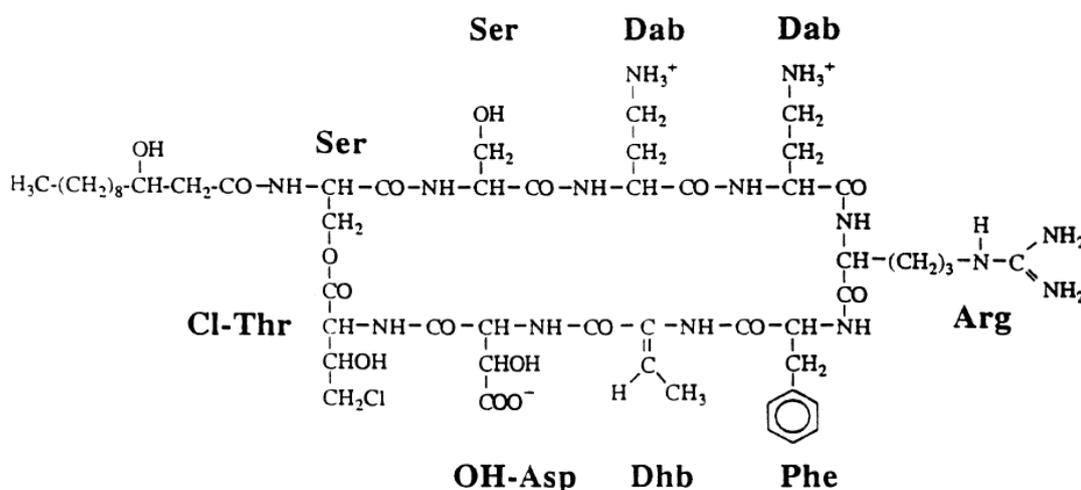


Fig.1.2a Siringomicina E (forma zwiterionica). Arg, arginina; OH-Asp acido 3-idrossiaspartico; Dab acido 2,4-diamminobutirrico; Dhb, acido deidro-2-amminobutirrico; Cl-Thr, 4-clorotreonina; Ser, serina; Phe, fenilalanina.

Una possibile conformazione tridimensionale della siringomicina E è stata recentemente fornita da M. Anselmi ed altri^[7]. Per avere un'idea della conformazione assunta dalla SRE nell'ambiente della membrana cellulare, è stata studiata la conformazione che assume quando è legata a micelle di sodio dodecil solfato SDS, considerate appunto come modello delle membrane cellulari. Sono stati così ottenuti spettri simili di dicroismo circolare sia per la SRE legata a bistrati lipidici sia per la SRE legata a micelle di SDS; entrambi gli spettri sono molto diversi dallo spettro ottenuto per l'SRE in soluzione acquosa. Ciò dimostra che la SRE cambia conformazione una volta legata a membrane cellulari. È stata così determinata la conformazione tridimensionale della SRE legata alle micelle di SDS mediante misure NMR combinate a calcoli di dinamica molecolare.

La conformazione tridimensionale della SRE è stabilizzata da sette legami ad idrogeno. Di questi, tre sono fissi: il primo è formato tra i residui NH-Dab³ e CO-zDhb⁷ e determina la curvatura della catena peptidica, mentre gli altri due ne definiscono la struttura del loop e sono formati tra NH-Arg⁵ e CO-Dab³ e tra NH-Ser¹ e CO-Thr(4-Cl)⁹, come mostrato in figura 1.2(a e b).

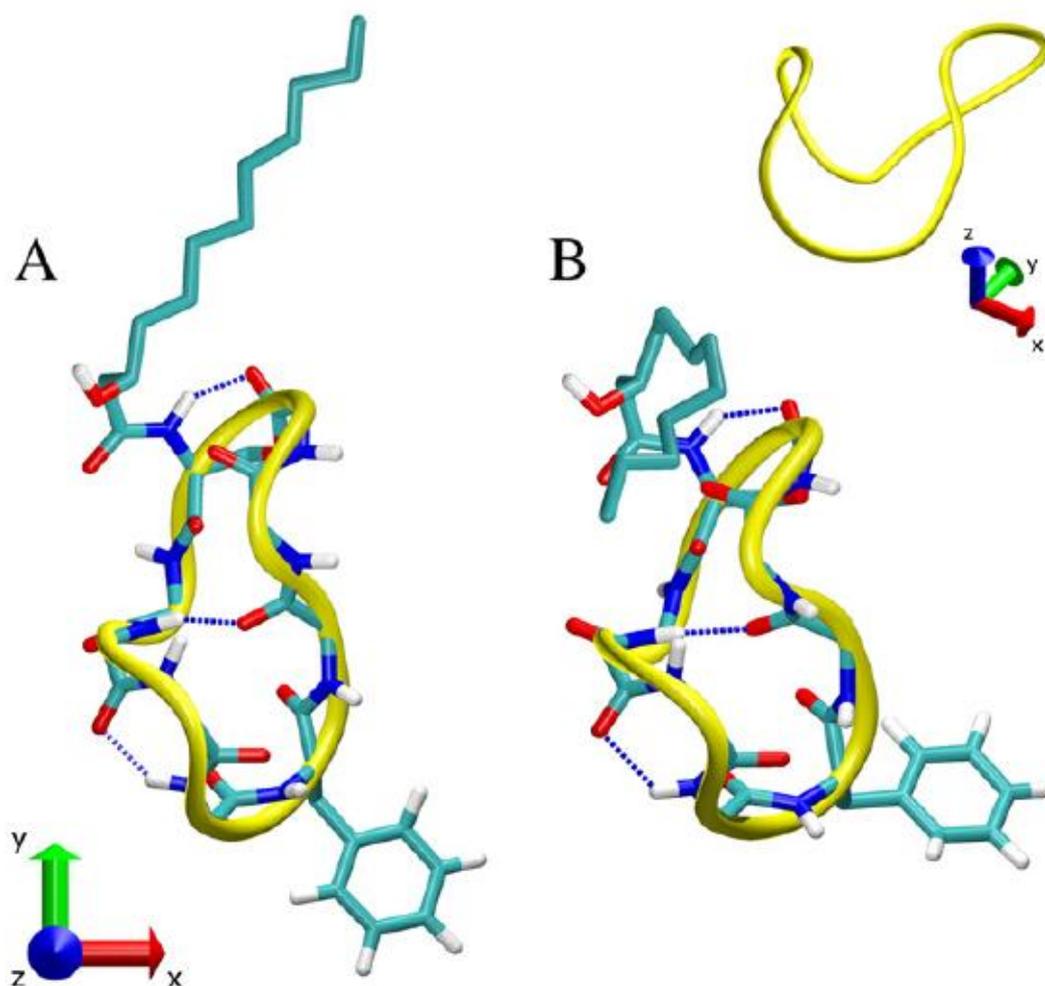


Fig. 1.2 Conformazione della SRE in ottano **(a)** Conformazione estesa **(b)** Conformazione ripiegata. Le linee tratteggiate rappresentano i legami ad idrogeno. L'immagine in alto a destra mostra la conformazione di backbone, che somiglia alla cucitura di una pallina da tennis.

Gli altri quattro legami ad idrogeno sono invece meno stabili e coinvolgono alcuni residui delle catene laterali degli amminoacidi: OH-Ser² e CO-Phe⁶, OH-Ser² e Arg⁵, Dab³ e CO-Asp(3-OH)⁸, Dab³ ed il gruppo ossidrilico dell'acido grasso.

Inoltre nella struttura della SRE sono presenti quattro β -turns consecutivi coinvolgenti i seguenti residui: Ser¹-Ser²-Dab³, Dab³-Dab⁴-Arg⁵, Arg⁵-Phe⁶-zDhb⁷, e infine i residui compresi tra Ser¹ e Thr(4-Cl)⁹. La conformazione completa è mostrata in figura 1.2c.

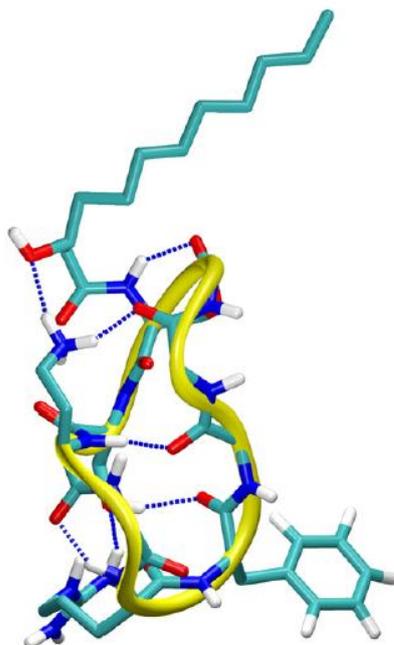


Fig. 1.2c Struttura tridimensionale della SRE. I legami tratteggiati sono legami a idrogeno.

È stata anche determinata una distribuzione approssimata della carica sulle molecole di SRE legate alle micelle di SDS (fig.1.2d): è presente una piccola regione carica negativamente e una più grande carica positivamente. Entrambe sono legate ad una regione neutra, di cui fa parte anche la catena laterale dell'acido grasso.

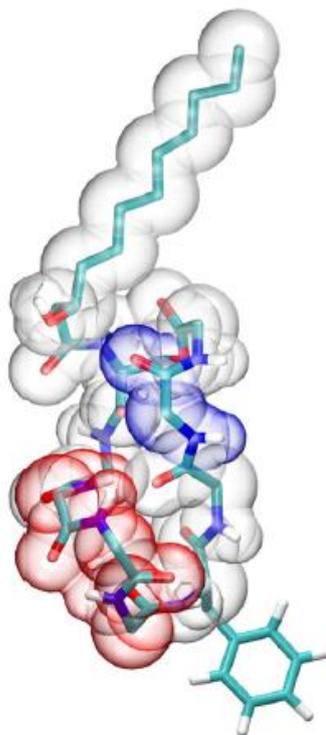


Fig.1.2d Superficie di van der Waals della SRE in ottano determinata da una simulazione di dinamica molecolare. I residui carichi sono colorati con diversi colori: i residui neutri sono bianchi, i residui positivi rossi ed i residui negativi sono blu.

La SRE presenta attività fitotossica, antifungina, antibatterica, induce la necrosi dei tessuti cellulari ed ha anche una spiccata attività emolitica^[7]. La sua attività antifungina si esplica verso molti funghi filamentosi^[8,9] e verso alcuni funghi che sono causa di malattie umane, come la *Candida* spp.^[5]. Tuttavia, a causa della sua spiccata attività emolitica^[2,5], non è possibile usarla come agente antifungino per uso medico, almeno che non si apportino opportune modifiche strutturali, che non sono ancora state determinate.

Oltre alle caratteristiche sopraelencate, la siringomicina E è anche un forte agente antimicobatterico^[10]: ciò è molto importante perché un numero sempre maggiore di ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* mostrano resistenza ai trattamenti standard finora usati, evidenziando appunto la necessità di nuovi antibiotici^[1]. Tuttavia, questo aspetto della SRE è tuttora oggetto di studio e non è stato pienamente sviluppato.

Prima di esporre i risultati raggiunti in questo lavoro di tesi è bene esporre quanto studiato in precedenza sulla SRE. Come è già stato accennato, ancora non è stato ben chiarito il meccanismo d'interazione della SRE con le membrane cellulari. Una linea comune agli studi riguardanti la SRE condotti finora è la conclusione che essi formano canali ionici transmembrana. Questi determinano un flusso di ioni che provoca la morte della cellula, costituendo pertanto la causa principale della tossicità della SRE stessa.

Il principale target d'azione della SRE è dunque la membrana cellulare, in cui questa si inserisce formando canali ionici. Hutchison ed altri, studiando l'interazione tra la SRE ed i bistrati lipidici planari, hanno ipotizzato che l'inserimento della SRE nella membrana cellulare fosse favorito dalla sua natura anfipatica^[11]. Non a caso, è stato osservato che la SRE forma canali ionici in vescicole lipidiche, in bistrati lipidici planari e nei globuli rossi, che tuttavia non sono un suo target biologico. Su bistrati lipidici planari, i canali ionici transmembrana si formano in modo molto efficiente: infatti la conduttanza aumenta di molto anche aggiungendo quantità nanomolari di SRE^[11]. La formazione di canali in grandi vescicole unilamellari (LUVs) è stata osservata da Dalla Serra ed altri^[3]: aggiungendo la SRE in una soluzione contenente LUVs riempite con calceina, è stato registrato un aumento di fluorescenza della soluzione, indice del fatto che è stata rilasciata calceina in seguito alla formazione di canali. Inoltre, da misure di conduttanza in sistemi siffatti, è stato determinato che l'entità della permeabilizzazione da parte della SRE dipende dalla sua concentrazione e dalla composizione della vescicola lipidica^[3].

Anche l'attività emolitica della SRE fornisce un'ulteriore conferma della formazione di canali^[11,3]. Saggi volti a misurare la lisi degli eritrociti mediante il metodo "del peso della goccia" hanno mostrato che la SRE induce l'emolisi quando raggiunge la concentrazione di soglia di 500 ng/ml^[11]. Inoltre interagisce con gli eritrociti in modo reversibile: infatti, nella sospensione in cui sono stati condotti i saggi volti a misurare la lisi degli eritrociti, sono stati

aggiunti nuovi eritrociti ed una quantità di SRE tale da determinare una concentrazione in soluzione minore di 500 ng/ml. Dal momento che è stata sempre osservata la lisi degli eritrociti, è stato ipotizzato che l'associazione della SRE con i globuli rossi sia reversibile^[11].

Un'altra conferma della formazione di canali da parte della SRE è stata fornita da successivi studi di protezione osmotica: aggiungendo zuccheri di notevoli dimensioni (che sono appunto protettori osmotici) in una soluzione contenente SRE e globuli rossi, l'emolisi dei globuli rossi cessa^[3]. Quest'ultima esperienza può quindi essere considerata una prova effettiva dell'attività emolitica della SRE.

L'attività emolitica della SRE, insieme alla sua capacità di formare canali in bistrati lipidici artificiali o in LUVs, ha portato a supporre che la SRE fosse in grado di formare canali ionici transmembrana anche senza un recettore; così è stata studiata l'interazione tra l'SRE ed i monostrati lipidici, che costituiscono appunto un modello molto semplice della membrana cellulare^[3]. Misurando la pressione superficiale sui monostrati lipidici una volta aggiunta l'SRE, è stato osservato che la SRE occupa uno spazio minore quando è inserita nel monostrato rispetto a quando è isolata: ciò è indice di un'interazione favorevole tra la SRE ed i lipidi costituenti il monostrato^[3]. Un cambio conformazionale della SRE nella sua interazione con le vescicole di SDS è stato osservato recentemente anche da M. Anselmi ed altri^[7].

I canali non presentano una selettività spiccata verso particolari tipi di ioni. Misure di conduttanza su un bistrato lipidico planare hanno dimostrato che tali canali sono permeabili sia a cationi monovalenti che bivalenti (come Ca^{2+} , Zn^{2+} ed H^+)^[11], ma allo stesso tempo sembrano presentare una debole selettività verso gli anioni^[12]. La spiegazione più probabile di questo fatto potrebbe essere la presenza di una carica positiva sull'apertura del canale, appartenente ai gruppi amminici protonati della catena peptidica della SRE (due residui di acido diamminobutirrico e un residuo di arginina); è stato così ipotizzato il seguente modello: la testa peptidica polare della siringomicina E è situata sulla superficie della membrana cellulare, mentre la parte lipofila è all'interno del bistrato^[12].

I canali formati dalla SRE sembrano avere inoltre una struttura molto particolare. Da Hutchison ed altri è stato supposto che tali canali abbiano una struttura oligomerica, in quanto la lisi degli eritrociti aumenta aumentando la concentrazione di SRE^[11]. Infatti in studi successivi, condotti su bistrati lipidici planari, è stato osservato che la conducibilità indotta dalla SRE cresce con la sesta potenza della sua concentrazione, suggerendo che sono necessari almeno sei monomeri di SRE per formare un canale^[12]. Inoltre, sembra che i canali oligomerici siano stabilizzati dall'interazione tra le porzioni cariche delle molecole di SRE ed i lipidi costituenti la membrana^[13], dando conferma dell'ipotesi precedente^[12]: infatti da misure di conduttanza in bistrati lipidici planari è stato osservato che la probabilità di formare canali diminuisce con l'aumentare della concentrazione dell'elettrolita nella soluzione in cui

vengono condotte le misure, suggerendo la presenza di un'interazione tra i residui carichi positivamente dei monomeri di SRE e le teste polari dei lipidi costituenti il canale^[13]. Tale interazione porterebbe alla stabilizzazione dei canali stessi, quindi se viene aumentata la concentrazione di elettrolita, si avrà uno schermaggio del campo elettrico prodotto dall'SRE ed una conseguente diminuzione della stabilità dei canali così formati.

Dalla Serra ed altri^[3], da studi di fluorescenza su LUVs con all'interno la calceina, hanno anche fornito un possibile meccanismo sulla formazione dei canali da parte della SRE. Dato che il tempo con cui viene rilasciata la calceina dipende dalla concentrazione di SRE in soluzione, è stato ipotizzato il seguente meccanismo, che si articola in tre step principali: (i) i monomeri di SRE vengono incorporati nel bistrato lipidico in modo reversibile, (ii) i monomeri si aggregano in oligomeri di grandezza via via crescente, (iii) gli oligomeri che raggiungono una grandezza critica formano un canale attraverso il quale è rilasciata la calceina.

I canali formati dalla SRE sembrano possedere un comportamento voltaggio-dipendente. Da misure di conduttanza su bistrati lipidici planari è stato osservato che il canale aumenta la conduttanza a potenziali positivi, mentre questa decresce passando a potenziali sempre più negativi^[12]: ciò ha suggerito che i canali si aprano a potenziali positivi, mentre si chiudano a potenziali negativi. Una possibile spiegazione di questo fatto potrebbe essere che i monomeri di SRE formanti il canale abbiano la parte lipofila, costituita dall'acido grasso, inserita insieme ai lipidi all'interno del canale, mentre le teste peptidiche idrofiliche si trovano vicino alla superficie della membrana. Un potenziale positivo sul lato cis della membrana sembra mantenere i monomeri di SRE all'interno della membrana stessa, mentre un potenziale negativo sembra provocare un cambiamento conformazionale dello stesso canale, spingendo le teste polari della SRE al di fuori della membrana.

La struttura dei canali non è comunque ancora chiara con certezza, ma nonostante ciò ci sono fattori che sembrano favorirne la formazione: la presenza di steroli (fig. 1.2e) ed un pH basso^[11].

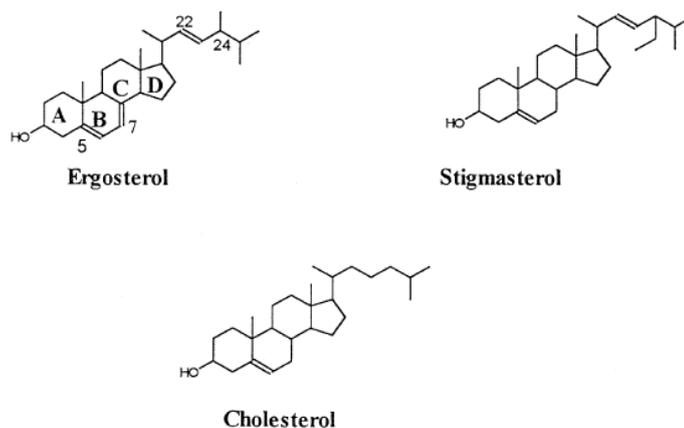


Fig. 1.2e Struttura di ergosterolo, sigmasterolo e colesterolo.

Dal momento che gli steroli hanno un ruolo fondamentale nella formazione di canali e sono essenziali per l'attività fitotossica di altre citotossine che formano canali ionici, come ad esempio l'iturin A^[14], un analogo ruolo degli steroli nella formazione di canali è stato proposto per la siringomicina E. Infatti sembra che gli steroli influenzino la formazione di canali della siringomicina E^[15], anche se non sono parte integrante della loro struttura^[16]. Da misure di conduttanza in bistrati lipidici planari è stato osservato che l'ergosterolo favorisce l'inserimento della siringomicina nella membrana plasmatica^[11]. Anche mediante misure di conduttanza su LUVs è stato osservato che la SRE è poco attiva in bistrati costituiti solamente da fosfolipidi, mentre diventa attiva in presenza di steroli, in particolare con colesterolo e ancor più con l'ergosterolo^[3]. Tuttavia non è ancora ben chiaro quali steroli influenzino effettivamente la formazione di canali; infatti, da misure di conduttanza in bistrati lipidici planari, è stato osservato che la siringomicina forma rapidamente canali anche in bistrati che non presentano steroli e che l'aggiunta di una soluzione al 50 mol% di ergosterolo, stigmasterolo o colesterolo (che sono rispettivamente gli steroli più abbondanti rispettivamente in cellule fungine, vegetali e animali) a bistrati non altera significativamente le proprietà conduttive dei canali formati dalla siringomicina E^[16]; quindi, secondo questi studi, sembra che gli steroli non partecipino direttamente alla formazione di canali; in particolare, sembra che il colesterolo la sfavorisca^[10].

In studi precedenti si è anche cercato anche di stimare il raggio del canale formato dalla SRE usando metodi differenti. In generale, si può affermare che il raggio dei canali è di circa 1 nm^[11,13,17], ma sembra che la dimensione dei pori formati dall'SRE dipenda dalla quantità di SRE aggiunta^[3]. Usando come protettori osmotici zuccheri o glicoli polietilenici su eritrociti in una soluzione elettrolitica è stato dedotto che la SRE forma pori di raggio compreso tra 0.6 nm ed 1 nm^[11]. Invece, da misure di conduttanza su bistrati lipidici planari in una soluzione con polietilenglicoli, il raggio dei canali formati dalla SRE è stato stimato essere di circa 1 nm^[13]. È stato inoltre ipotizzato che il canale possa avere una forma conica, dal momento che il raggio teorico, calcolato supponendo che il canale abbia una forma cilindrica, non corrisponde a quello sperimentale^[13]. Dall'analisi di Renkin dei globuli rossi è stato osservato che aumentando la concentrazione di SRE da 0.6 μ M a 3.5 μ M il raggio dei canali varia da 0,7 nm a 1,7 nm, suggerendo che essi non abbiano una struttura fissa, ma che tale struttura vari al variare della concentrazione di SRE in soluzione^[3].

In studi più recenti, da misure di conduttanza condotte su bistrati lipidici planari, è stato poi ipotizzato che anche i lipidi stessi della membrana siano coinvolti nella struttura del canale. Sembra infatti che le molecole di SRE siano incorporate in modo asimmetrico insieme ai lipidi nella struttura di un canale a forma di cono^[18,19]. La struttura ipotizzata è riportata in fig. 1.2f.

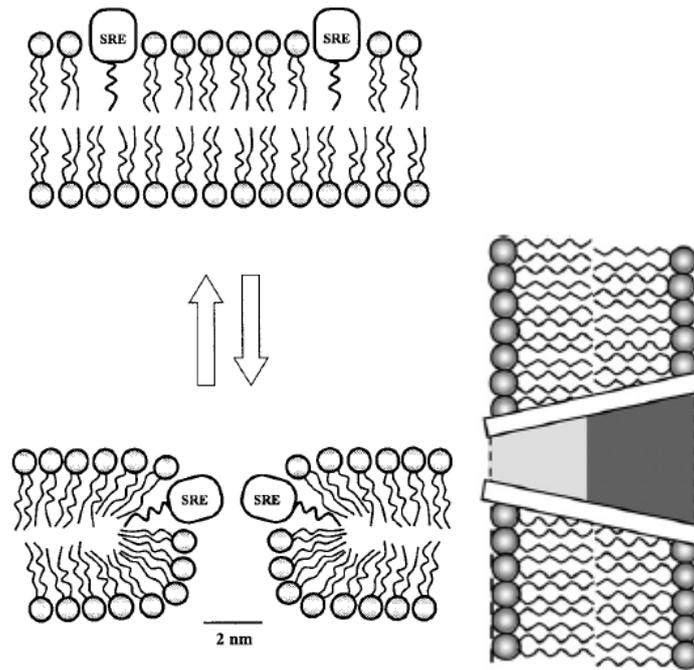


Fig. 1.2f Modello che mostra il coinvolgimento delle molecole di lipide nella formazione del canale. È un poro lipidico stabilizzato da un anello di molecole di SRE (con almeno 6 o 7 molecole). Il canale è asimmetrico e sembra avere una forma conica.

Si può capire da quanto esposto che la modalità d'interazione della SRE nelle membrane cellulari non è ancora stata ben chiarita: ciò ha stimolato la nostra curiosità ed abbiamo così deciso di intraprendere questo lavoro di tesi per studiare l'interazione della SRE con i sistemi biomimetici in nostro possesso.

1.3 Membrane biomimetiche

Le membrane biologiche hanno un ruolo fondamentale nei processi della vita cellulare. Sono costituite da un bistrato fosfolipidico con le code apolari rivolte verso l'interno del bistrato e le teste polari verso l'esterno del bistrato, in cui sono inserite proteine, steroli ed altre molecole (fig. 1.3a).

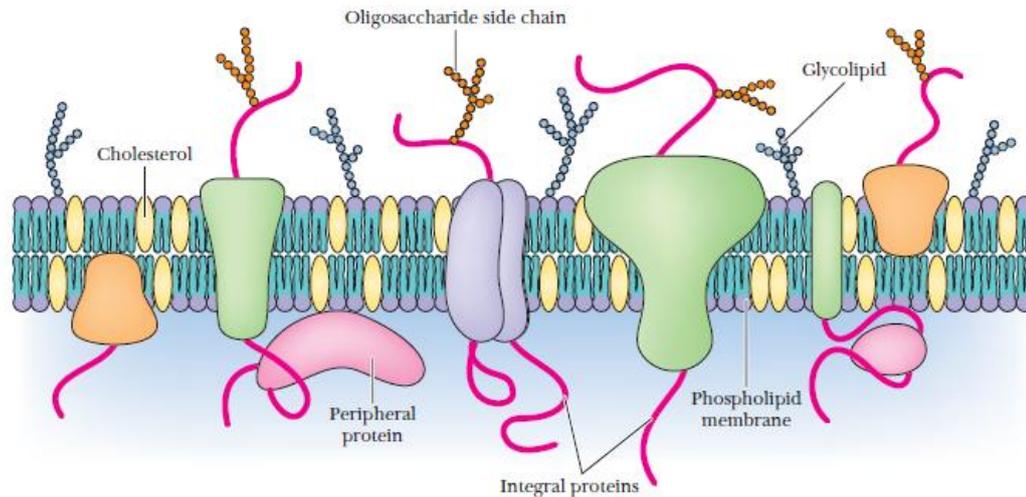


Fig 1.3a. Modello a mosaico fluido della membrana proposto da S. J. Singer e G. L. Nicholson. In questo modello semplificato si assume che i lipidi e le proteine si muovono nel piano laterale della membrana.

Come si può notare dalla figura, le membrane biologiche sono sistemi molto complessi ed è difficile studiare le loro funzioni. A questo scopo sono stati sviluppati dei modelli sperimentali semplificati, ovvero le membrane biomimetiche. La BLM (Bilayer Lipid Membrane), la tBLM (Tethered Bilayer Lipid Membranes) e il SAM (Self Assembled Monolayer) sono esempi di membrane biomimetiche.

La BLM è un modello che finora è stato molto usato. È stato proposto da M. Montal e P. Müller^[20]. Le BLMs si preparano usando una cella contenente una soluzione elettrolitica, divisa in due compartimenti da un setto in teflon avente un piccolo foro. Deposando una goccia di lipide nel solvente opportuno sul foro, lo strato di soluzione lipidica diventa progressivamente più sottile. Si forma così un film bimolecolare di dimensioni pari a circa 10 nm, nel quale le molecole di lipide assumono lo stesso orientamento che hanno nelle membrane biologiche, ovvero con le code rivolte verso l'interno del bistrato e le teste polari verso la soluzione acquosa. Si ottiene così un bistrato lipidico interposto tra due soluzioni acquose (Fig. 1.3b).

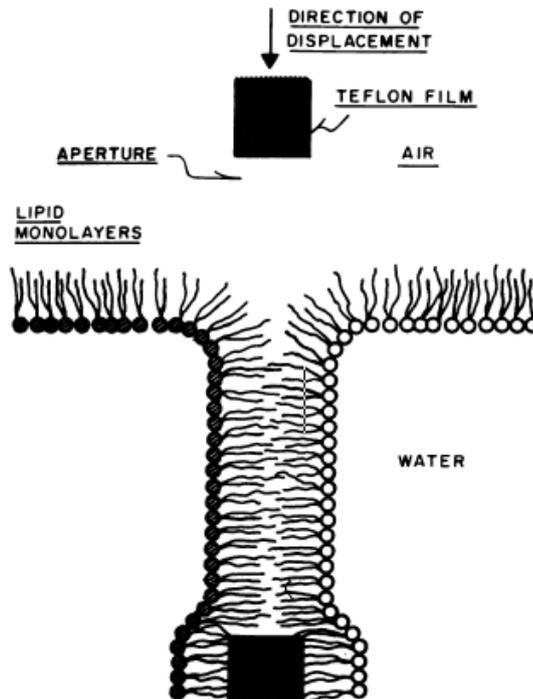


Fig. 1.3b Formazione del bistrato mediante sovrapposizione di due monostrati di due monostrati lipidici all'interfaccia soluzione/aria. Figura non in scala.

Molte delle funzioni svolte dalle membrane biologiche dipendono dalla differenza di potenziale, $\Delta\phi_b$, che sussiste tra i due lati del bistrato fosfolipidico. Infatti, la distribuzione di cariche elettriche sui due lati della membrana è asimmetrica, ovvero la densità di carica su una superficie in genere è diversa da quella presente sulla superficie opposta. Le diverse densità di carica presenti sulle due superfici del bistrato fosfolipidico danno origine, sulle rispettive soluzioni che bagnano i due lati opposti della membrana, a due diversi strati diffusi. Inoltre la densità di carica presente su ogni lato della membrana non è necessariamente controbilanciata da una carica uguale ed opposta presente nel rispettivo strato diffuso. Ciò significa che le due interfasi non sono indipendenti: infatti, 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 sui suoi lati.

Le lievi variazioni del potenziale transmembrana nelle membrane biologiche permettono il funzionamento dei canali ionici. Il poter misurare e variare la differenza di potenziale transmembrana sono quindi punti chiave per capire molti processi cellulari. Inoltre sulla base di queste considerazioni, si possono considerare interfasi elettrificate le membrane biologiche ed i loro modelli sperimentali. In questo senso le BLMs possono essere modificate e studiate per via elettrochimica introducendo delle proteine capaci di formare canali ionici voltaggio-dipendenti. Queste proteine sono in grado di cambiare conformazione e rendere il

bistrato permeabile al passaggio di ioni e molecole d'acqua se viene variato opportunamente il potenziale transmembrana.

Uno svantaggio dell'uso delle BLMs sta nel fatto che presentano fragilità meccanica ed elettrica: questo tipo di membrana collassa per $\Delta\phi_b$ superiori a $\pm 100-150$ mV ed è sensibile alle vibrazioni meccaniche.

Per migliorare la robustezza delle membrane biomimetiche sono state proposte le tBLMs in cui il bistrato lipidico è ancorato ad una superficie solida garantendo appunto una minore fragilità meccanica ed una maggiore robustezza rispetto alle BLMs. Come supporto per condurre misure elettrochimiche è usato un materiale conduttore, spesso un metallo.

Il mercurio è un metallo molto adatto a questo scopo: infatti grazie alla sua natura liquida ed alla sua superficie perfettamente liscia, consente la formazione di un bistrato molto omogeneo e uniforme con assenza dei cosiddetti "fori di spillo", ovvero delle imperfezioni del bistrato che possono fornire un cammino preferenziale al passaggio di ioni; garantisce inoltre una certa fluidità al bistrato ancorato. Anche l'oro è molto usato come supporto a cui ancorare il bistrato fosfolipidico, però questo metallo porta alla formazione di bistrati lipidici meno fluidi e meno omogenei rispetto a quelli ottenuti usando come supporto il mercurio; tuttavia, ha il vantaggio di poter essere utilizzato anche nelle tecniche di analisi superficiale e si presta molto bene nelle applicazioni come biosensore, proprio grazie alla la sua natura solida.

Affinché la membrana biomimetica possa incorporare proteine o peptidi in grado di formare canali ionici allo stato funzionalmente attivo, è necessario che sia a contatto su entrambi i lati con un mezzo acquoso o almeno idrofilico^[21]. Bisogna quindi fare in modo di rendere idrofilico lo spazio interposto tra la superficie del supporto metallico (l'elettrodo) ed il bistrato lipidico. In genere l'ambiente viene reso idrofilico ancorando all'elettrodo uno spaziatore idrofilico, costituito da una catena polipeptidica^[22] o poliossoetilenica^[23,24] terminante ad un'estremità con un gruppo solfidrico o disolfuro in grado di legarsi in modo covalente alla superficie del mercurio^[22,23] o dell'oro^[24]. Lo spaziatore deve avere una lunghezza sufficientemente elevata (5-8 nm) per fungere da serbatoio per gli ioni che attraversano il bistrato e per ospitare la porzione extramembrana della proteina. Per formare un bistrato lipidico sopra lo spaziatore idrofilico auto-organizzato e ancorato sul mercurio^[22,23] o sull'oro^[24] sono state adottate varie procedure. Se l'estremità dello spaziatore idrofilico opposta al gruppo contenente zolfo è legata in modo covalente alle catene idrocarburiche, si ottengono supramolecole dette tiolipidi^[25,26]. Quando si autoassembla il tiolipide sulla superficie metallica si ottiene un monostrato lipidico ancorato al metallo tramite lo spaziatore idrofilico; su questo si auto-organizza un secondo monostrato, ottenendo così una tBLM^[26].

I SAMs sono monostrati lipidici auto-organizzati su mercurio. Le molecole lipidiche in questo caso si dispongono con le code idrofobiche rivolte verso la superficie idrofobica del metallo e le teste polari verso la soluzione.

I SAMs usati in questo lavoro di tesi sono costituiti da dioleoilfosfadilserina (DOPS) e da dioleoilfosfadilcolina (DOPC). Abbiamo scelto questi lipidi perché la DOPC e la DOPS sono fosfolipidi presenti nelle membrane biologiche. La DOPC porta alla formazione di un monostrato fosfolipidico neutro, mentre la DOPS porta alla formazione di un monostrato fosfolipidico la cui carica può essere modulata variando il pH della soluzione. Le loro strutture sono mostrate in figura 1.3c.

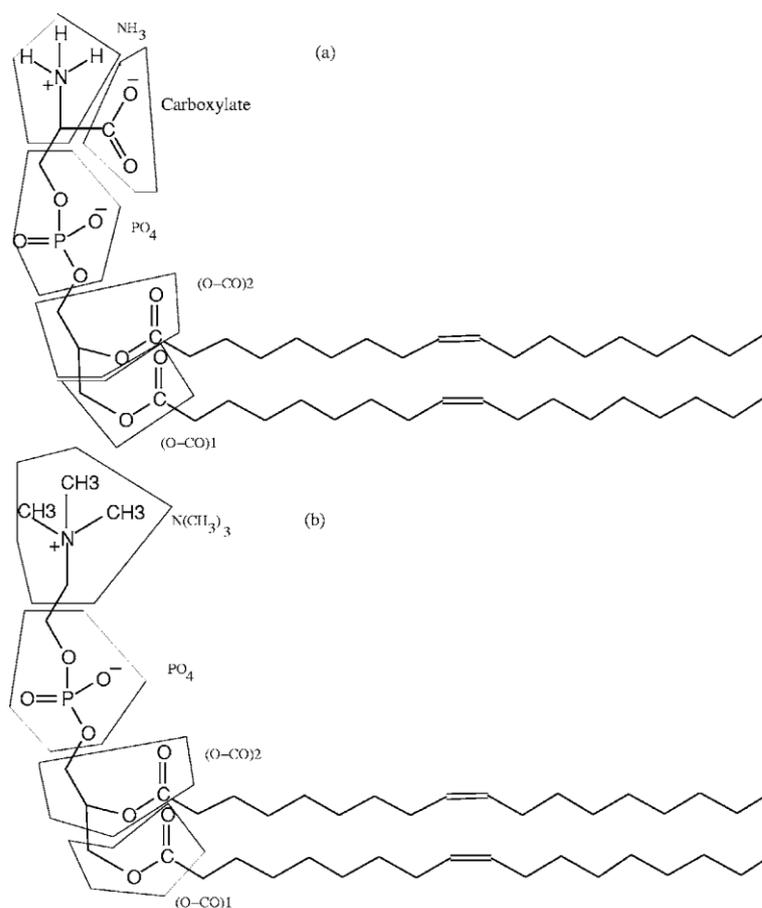


Fig 1.3c. (a) DOPS; (b) DOPC

1.4 Scopo della tesi

Questo lavoro di tesi si inserisce nel contesto precedentemente descritto ed ha lo scopo di valutare l'effetto della SRE su monostrati fosfolipidici al variare della composizione del monostrato stesso e del pH della soluzione elettrolitica.

Come modello di membrana biomimetica è stato utilizzato il SAM su mercurio, ottenuti assemblando su di esso la DOPC e la DOPS. Sono stati aggiunti poi steroli (ergosterolo e colesterolo) insieme alla DOPC ed alla DOPS, per valutare se effettivamente avessero qualche effetto sulla permeabilizzazione del monostrato con e senza SRE.

Ergosterolo e colesterolo sono steroli, un tipo di lipidi caratterizzati dall'aver nella loro struttura il cosiddetto nucleo steroideo, costituito da quattro anelli fusi, di cui tre a sei atomi di carbonio ed uno a cinque atomi di carbonio. Il colesterolo è presente nella membrana plasmatica della cellule animali: è anfipatico, con una testa polare (il gruppo ossidrilico sull'atomo C-3) ed un gruppo idrocarburico non polare (il nucleo steroideo e la catena laterale sull'atomo C-17). L'ergosterolo è invece presente nella membrana plasmatica di funghi e dei lieviti. I due steroli hanno una struttura molto simile; l'ergosterolo possiede in più rispetto al colesterolo due doppi legami tra C-7 e C-8 e tra C-22 e C-23 (fig. 1.4a).

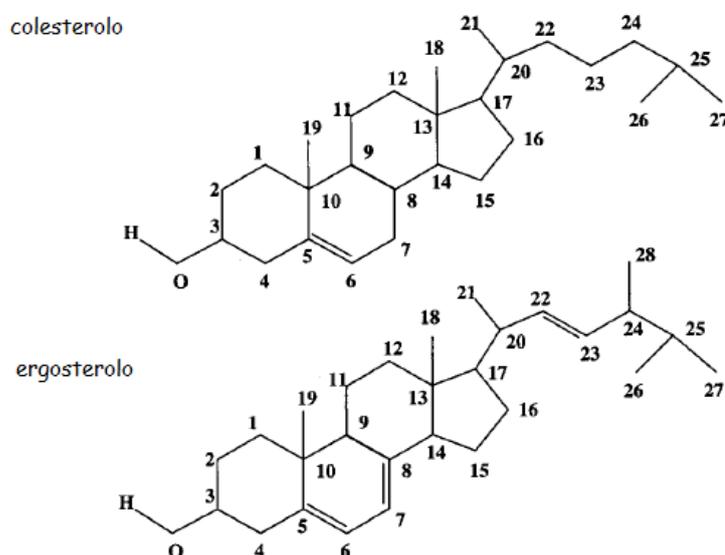


Fig. 1.4a Struttura del colesterolo e dell'ergosterolo

Oggetto di studio in questo lavoro di tesi è stato anche l'effetto della variazione dell'area della superficie elettrodica a disposizione del monostrato sull'orientamento dei lipidi, costituenti il monostrato stesso, al fine di correlare l'effetto dell'aggiunta di molecole interferenti alla variazione del profilo dei picchi di riorientamento nella voltammetria AC. In tal modo è possibile capire se una modifica dei picchi, dovuta ad eventuali agenti interferenti, è dovuta alla variazione dell'area occupata sull'elettrodo dallo stesso monostrato.

Capitolo 2

Parte sperimentale

2.1 Tecniche elettrochimiche

In tutte le tecniche esposte di seguito è stato utilizzato un sistema potenziostatico a tre elettrodi: un elettrodo di riferimento Ag/AgCl 0.1 M, un contro elettrodo di platino ed un elettrodo di lavoro a goccia stazionaria di mercurio (HMDE, Hanging Mercury Drop Electrode).

2.1.1 Voltammetria AC con risoluzione di fase

La voltammetria AC con risoluzione di fase è una tecnica che consiste nel sovrapporre un potenziale sinusoidale, di frequenza fissata ed ampiezza piccola (5-10 mV picco-picco), ad un potenziale di base, che viene variato linearmente nel tempo.

In risposta alla perturbazione del sistema, si registra una corrente alternata avente la stessa frequenza del potenziale sinusoidale applicato e sfasata di un dato angolo rispetto a questo. È importante che l'ampiezza del potenziale sinusoidale sia piccola: infatti ciò consente di non perturbare il potenziale di base in modo significativo e garantisce una risposta lineare della corrente con il potenziale.

Se il sistema in esame è costituito da un elemento puramente resistivo, la corrente registrata è in fase rispetto al potenziale applicato; se invece il sistema è costituito da un elemento puramente capacitivo, la corrente registrata è in quadratura, cioè sfasata di $-\pi/2$ rispetto al potenziale applicato.

In questo lavoro di tesi, le misure di voltammetria AC con risoluzione di fase sono state effettuate su un monostrato lipidico auto-organizzato sulla superficie di un elettrodo a goccia

stazionaria di mercurio immerso in una soluzione elettrolitica; il potenziale di base è variato nell'intervallo di stabilità del sistema in esame, mentre il potenziale sinusoidale, sovrapposto a quello di base, ha ampiezza di 10 mV e frequenza di 75 Hz. È stata scelta la frequenza di 75 Hz perché a tale frequenza si può considerare solo il contributo capacitivo del monostrato alla corrente registrata.

In generale, però, la soluzione ed il monostrato danno un certo contributo alla corrente registrata, la quale non è esclusivamente in quadratura rispetto al potenziale applicato, ma ha generalmente anche una componente in fase.

Si è scelto di registrare soltanto la componente della corrente in quadratura. Il contributo in quadratura infatti è una misura della capacità C del monostrato, il cui profilo al variare del potenziale è caratteristico per ogni fosfolipide. In particolare il voltammogramma AC, ottenuto in presenza di un monostrato auto-organizzato, è costituito da due regioni: la regione di minimo, in cui il monostrato è più compatto e varia di poco la sua capacità al variare del potenziale, e la regione dei picchi, in cui il monostrato è meno compatto e si hanno processi di riorientamento molecolare caratteristici che ne aumentano la permeabilità. Un esempio è riportato in figura 2.1.1a per il caso di un monostrato di DOPC in contatto con una soluzione di KCl 0.1 M.

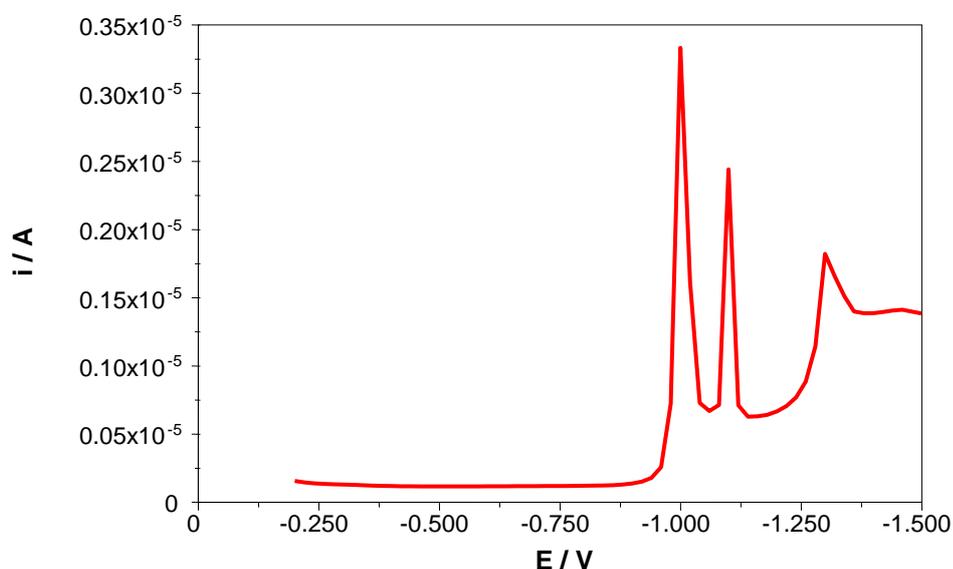


Fig. 2.1.1a Voltammogramma AC di un monostrato di DOPC auto-organizzato su mercurio in una soluzione di KCl 0.1 M a pH 3. Dal potenziale -0.2 V a -0.8 V possiamo vedere la regione di minimo, mentre da -0.8 V a -1.5 V possiamo vedere la regione dei picchi

Dal momento che la componente della corrente in quadratura è direttamente proporzionale alla capacità del monostrato, è possibile monitorare con questa tecnica la variazione di quest'ultima dovuta all'aggiunta della SRE. Il valore della capacità si è ricavato a partire dalla corrente misurata previa taratura con un condensatore di precisione.

2.1.2 Spettroscopia di impedenza elettrochimica, EIS

Nella spettroscopia di impedenza vengono applicati, tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo di riferimento, un potenziale di base (E) ed un potenziale sinusoidale di frequenza variabile in un intervallo prefissato. Quest'ultimo viene sovrapposto al potenziale di base E . Si misura poi sia la corrente risultante (I), che fluisce con la stessa frequenza f del potenziale sinusoidale applicato, sia l'angolo di sfasamento (φ) di questa rispetto al potenziale sinusoidale. Si opera variando la frequenza del potenziale sinusoidale applicato in un campo che va da 10^{-1} Hz a 10^5 Hz, per ogni valore del potenziale E , che è stato variato da -0.3 V a -0.8 V con un passo di 100 mV.

Il software dello strumento, usato per effettuare misure di spettroscopia di impedenza, converte i valori della corrente in valori di impedenza. L'impedenza, Z , ha le dimensioni di una resistenza.

In generale, si può considerare l'interfase elettrodo-soluzione come una successione di strati caratterizzati da proprietà dielettriche diverse, ognuno dei quali può essere rappresentato schematicamente da una maglia RC , costituita da una resistenza R e da una capacità C collegate in parallelo tra loro. La successione di strati dielettrici diversi può essere rappresentata con delle maglie RC collegate in serie tra loro. La resistenza R di ogni strato dielettrico fornisce una misura della sua permeabilità agli ioni, mentre la sua capacità C misura la tendenza ad accumulare ioni al confine tra questo e gli strati adiacenti.

Nell'analizzare lo spettro di impedenza di un monostrato, si può ammettere che l'interfase elettrodo-soluzione equivalga ad un circuito costituito da una maglia $R_m C_m$ e da una resistenza R_s posta in serie alla maglia: la maglia $R_m C_m$ rappresenta il monostrato (che darà quindi all'impedenza totale un contributo resistivo R_m e un contributo capacitivo C_m), mentre la resistenza R_s rappresenta lo strato di soluzione adiacente alla superficie elettrodica (fig.2.1.2a).

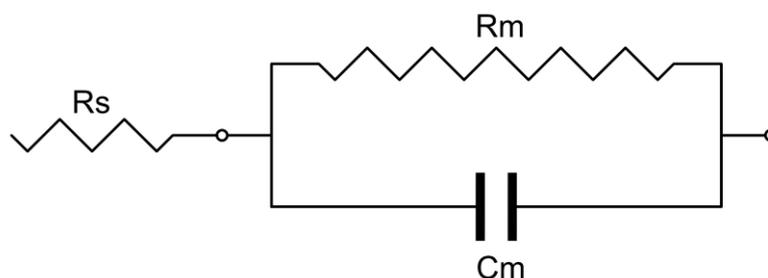


Fig.2.1.2a Schema del circuito equivalente usato per rappresentare un monostrato lipidico: R_s e la resistenza della soluzione; R_m e C_m esprimono il contributo resistivo e capacitivo del monostrato.

Per ricavare l'impedenza totale Z_{tot} , si applicano le regole generali dei circuiti volte a calcolare il contributo dei vari elementi circuitali collegati in serie o in parallelo. L'impedenza totale sarà infatti data dalla seguente espressione

$$Z_{tot} = Z_s + Z_m \quad (1)$$

in cui compaiono l'impedenza della soluzione Z_s e l'impedenza della maglia associata al monostrato, Z_m .

L'impedenza della soluzione Z_s è l'impedenza di un elemento resistivo: è pari quindi alla sua resistenza, ha solo la parte reale R_s e non è sfasata rispetto al potenziale sinusoidale applicato ($\varphi = 0^\circ$).

$$R = \frac{E}{I} \rightarrow Z = \frac{E_0 e^{i\omega t}}{I_0 e^{i\omega t}} = \frac{E_0}{I_0} = R \quad (2)$$

E_0 è l'ampiezza del segnale sinusoidale di potenziale, I_0 è l'ampiezza della corrente risultante, ω è la frequenza angolare sia del potenziale che della corrente ($\omega = 2\pi f$), i è l'unità immaginaria.

Ne consegue che:

$$Z_s = R_s \quad (3)$$

L'impedenza della maglia associata al monostrato Z_m è dovuta a due contributi: l'impedenza Z_{C_m} dell'elemento capacitivo C_m e l'impedenza Z_{R_m} dell'elemento resistivo R_m .

L'impedenza di un elemento puramente resistivo, come appena esposto, è uguale alla sua resistenza. L'impedenza di un elemento capacitivo, invece, si ricava mediante il ragionamento seguente. La capacità C dell'ipotetico condensatore dipende dalla carica Q sulle armature e dal potenziale applicato E , secondo la seguente relazione

$$C = \frac{Q}{E} = \frac{\int I dt}{E} \rightarrow E = \frac{\int I dt}{C} \rightarrow \frac{dE}{dt} = \frac{I}{C} \quad (4)$$

Da cui

$$\frac{d(E_0 e^{i\omega t})}{dt} = \frac{I_0 e^{i\omega t}}{C} \rightarrow E_0 e^{i\omega t} i\omega = \frac{I_0 e^{i\omega t}}{C} \quad (5)$$

$$E_0 = \frac{I_0}{i\omega C} = \frac{iI_0}{i^2 \omega C} = -\frac{iI_0}{\omega C} \quad (6)$$

Qui, E_0 è l'ampiezza del segnale sinusoidale di potenziale, I_0 è l'ampiezza della corrente risultante, ω è la frequenza angolare di potenziale e corrente ($\omega=2\pi f$) ed i è l'unità immaginaria. Da queste relazioni si può calcolare l'impedenza capacitiva Z_{C_m}

$$Z_{C_m} = \frac{E}{I} = \frac{E_0 e^{i\omega t}}{I_0 e^{i\omega t}} = \frac{E_0}{I_0} = -\frac{i}{\omega C_m} \quad (7)$$

L'impedenza di un elemento capacitivo ha allora solo la componente immaginaria ed è sfasata di $-\pi/2$ rispetto al potenziale sinusoidale applicato.

Riassumendo, abbiamo ricavato che i contributi di Z_{C_m} e Z_{R_m} all'impedenza Z_m della maglia associata al monostrato lipidico supportato da mercurio sono dati da:

$$Z_{R_m} = R_m \quad (8)$$

$$Z_{C_m} = \frac{-i}{\omega C_m} \quad (9)$$

Dal momento che Z_{C_m} e Z_{R_m} sono in parallelo tra loro, l'impedenza totale è tale che il suo reciproco è uguale alla somma dei reciproci delle singole impedenze e sarà data dalla seguente espressione:

$$\frac{1}{Z_m} = \frac{1}{Z_{R_m}} + \frac{1}{Z_{C_m}} \quad (10)$$

Si può allora ricavare l'impedenza totale della maglia a cui è associato il monostrato:

$$\frac{1}{Z_m} = \frac{1}{R_m} + \frac{1}{Z_{C_m}} = \frac{1}{R_m} - \frac{\omega C_m}{i} = \frac{1}{R_m} + i\omega C_m \quad (11)$$

Da cui

$$Z_m = \frac{R_m}{1 + i\omega C_m R_m} \quad (12)$$

L'impedenza totale Z_{tot} è data da

$$Z_{tot} = Z_s + Z_m = R_s + \frac{R_m}{1 + i\omega C_m R_m} \quad (13)$$

$$Z_{tot} = R_s + \frac{R_m (1 - i\omega C_m R_m)}{(1 + i\omega C_m R_m)(1 - i\omega C_m R_m)} \quad (14)$$

$$Z_{tot} = R_s + \frac{R_m}{1 + \omega^2 C_m^2 R_m^2} - i \frac{\omega C_m R_m^2}{1 + \omega^2 C_m^2 R_m^2} \quad (15)$$

Si può così ben notare che l'impedenza totale è data dalla somma di una componente reale (detta componente in fase) e di una componente immaginaria (detta componente in quadratura).

I risultati di una misura di spettroscopia di impedenza si possono riportare in vari modi a seconda del tipo di informazione che ci interessa. Per le analisi qualitative è molto usato il grafico di Bode, in cui si riportata l'angolo di sfasamento della corrente, φ , ed il logaritmo del modulo dell'impedenza totale, $\log Z_{tot}$, in funzione del logaritmo della frequenza, $\log f$.

Per un monostrato supportato da mercurio il grafico di Bode ha una tipica forma a campana.

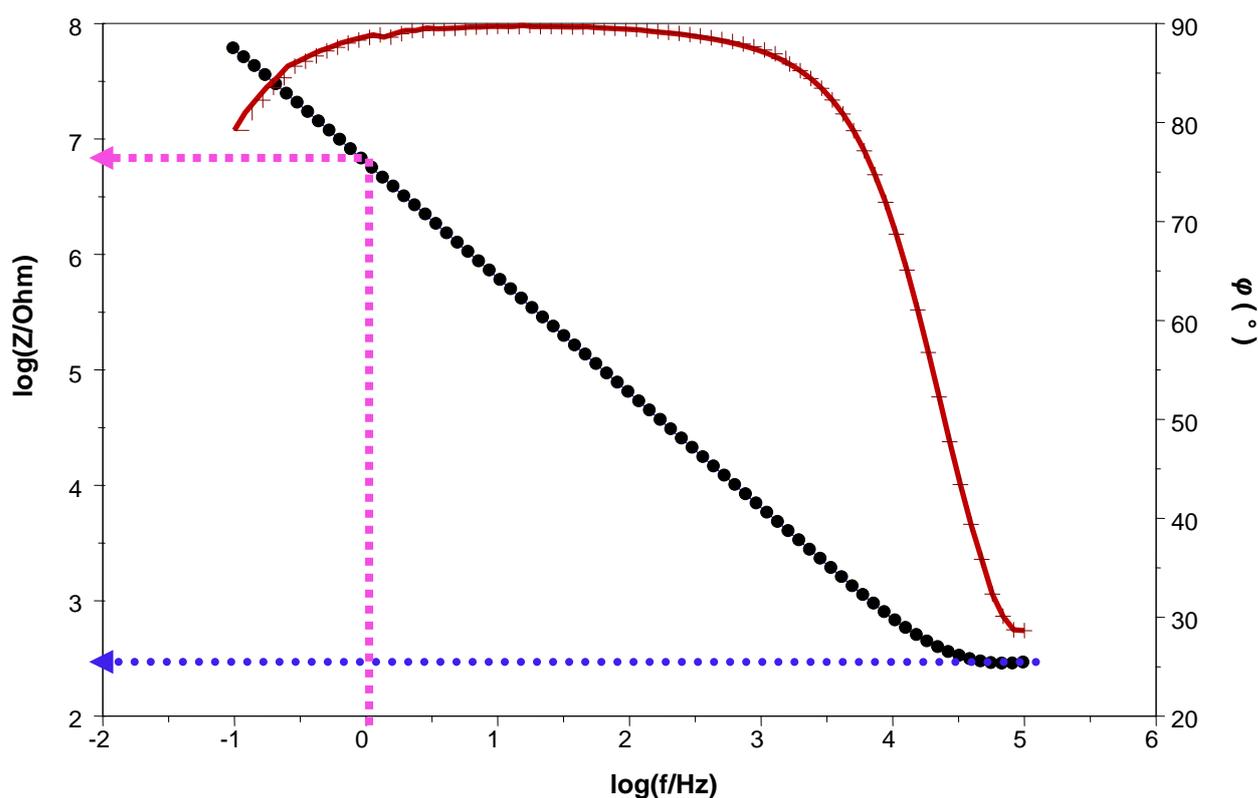


Fig 2.1.2b Grafico di Bode di un monostrato con DOPC al potenziale di -0.3 V. La curva rossa è relativa al grafico φ vs $\log f$, la curva nera è relativa al grafico $\log Z$ vs $\log f$.

Nella zona delle alte frequenze (10^5 Hz) si può trascurare il contributo all'impedenza totale della maglia associata al monostrato. Infatti, considerando l'equazione (15), si vede che il secondo ed il terzo termine, derivanti dal contributo della maglia associata al monostrato,

sono inversamente proporzionali a ω ed a ω^2 (quindi a f ed f^2); quindi, per le alte frequenze saranno molto piccoli ed è lecito trascurarli. All'impedenza totale resta così il solo contributo della resistenza R_s associata alla soluzione. Infatti, se due elementi sono collegati in serie, prevale il contributo di quello maggiore, che determinerà il profilo del grafico di Bode. Ciò implica che nella zona delle alte frequenze, il grafico di Bode mostri un basso valore dell'angolo di sfasamento φ : infatti φ di un elemento resistivo è nullo. Inoltre per valori alti della frequenza, Z_{tot} risulta direttamente proporzionale a R_s , il cui valore si può estrapolare dal grafico di Bode tracciando una retta parallela all'asse delle ascisse e tangente nella zona delle alte frequenze (freccia blu nella fig. 2.1.2b). Infatti se in un sistema si ha un controllo puramente resistivo, l'andamento di $\log Z$ vs $\log f$ è una retta parallela all'asse delle ascisse. Per frequenze inferiori a 10^5 Hz i termini relativi alla maglia associata al monostrato non si possono più trascurare. Inoltre, nella maglia associata al monostrato, gli elementi capacitivo e resistivo sono in parallelo. Nel caso di due impedenze in parallelo la corrente fluisce attraverso quello ad impedenza più bassa, le cui caratteristiche determineranno il profilo del grafico di Bode.

Un monostrato ben organizzato presenta una resistenza molto elevata. Questo implica, sulla base della formula (11), che per frequenze comprese tra 10^4 Hz e 1 Hz è l'elemento capacitivo a dare il contributo minore all'impedenza totale e quindi predominante sul grafico di Bode.

L'angolo di fase assume un valore molto vicino a $\pi/2$ nell'intervallo di frequenze compreso tra 10^4 Hz e 1 Hz. Inoltre l'andamento di $\log Z$ vs $\log f$ è una retta con pendenza negativa unitaria e l'impedenza è proporzionale al reciproco della capacità della maglia associata al monostrato alla frequenza unitaria, come previsto nel caso di un elemento puramente capacitivo.

È possibile ricavare il valore di C_m dal reciproco di Z alla frequenza unitaria, cioè per $\log f=0$ (freccia rosa nella fig. 2.1.2b).

Nell'intervallo di frequenze comprese tra 1 Hz e 10^{-1} Hz il contributo resistivo all'impedenza della maglia associata al monostrato diventa confrontabile con quello capacitivo, che è inversamente proporzionale a ω , quindi a f . Allora anche il contributo resistivo influenzerà il profilo del grafico di Bode. In questo caso, in prima approssimazione, Z_{tot} sarà uguale a R_m , il cui valore si può ricavare estrapolando il valore di $\log Z_{tot}$ alle frequenze più basse.

Le misure di spettroscopia d'impedenza sono state effettuate su monostrati supportati da mercurio prima e dopo l'aggiunta della siringomicina E. Da questo tipo di misure si può valutare inizialmente la corretta formazione del monostrato, premessa fondamentale per lo studio di monostrati lipidici auto-organizzati su mercurio, ed in seguito l'effetto che l'aggiunta di SRE ha sulle proprietà caratteristiche del monostrato.

2.1.3 Voltammetria ciclica

Nella voltammetria ciclica viene applicata un'onda triangolare di potenziale (Fig. 2.1.3a), che varia da un potenziale iniziale V_i ad un potenziale finale V_f per poi ritornare a V_i , e viene registrata la corrente i risultante sul sistema a seguito della perturbazione.

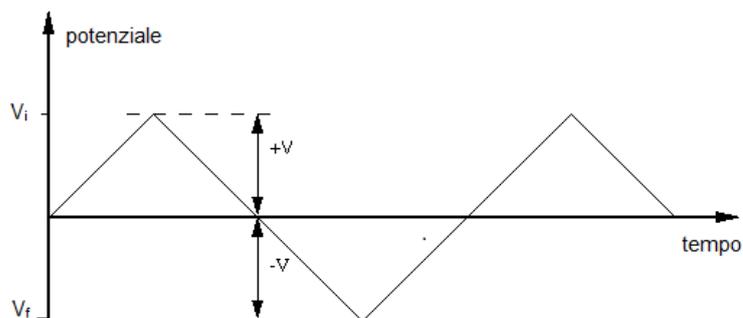


Fig. 2.1.3a Esempio di un'onda triangolare di potenziale

Al termine della registrazione, viene fornito un grafico della corrente contro il potenziale applicato. Un esempio è riportato in fig. 2.1.3b per la riduzione del catione Cd^{2+} su mercurio.

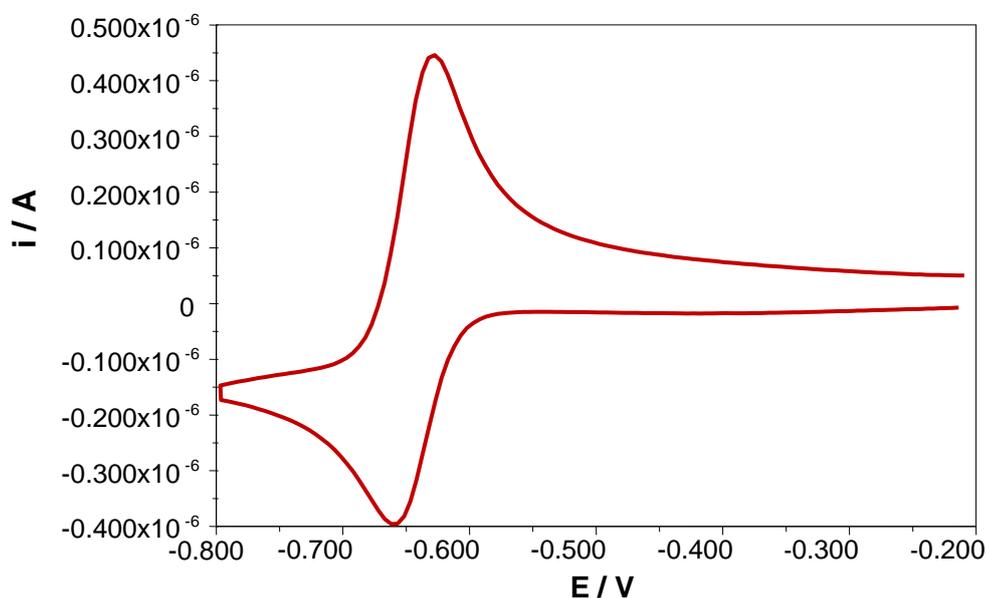


Fig. 2.1.3b Voltammogramma, registrato con voltammetria ciclica, mostrandone la riduzione del Cd^{2+} su Hg.

Il potenziale varia linearmente nel tempo da un valore iniziale (V_i) ad uno finale (V_f), con una data velocità di scansione; poi procede in senso inverso, da V_f a V_i , con una velocità di scansione uguale a quella data precedentemente, in modo da completare un ciclo. Si possono fare più scansioni.

La voltammetria ciclica è usata in genere per studiare interfasi elettrificate o per studiare i processi redox. Nel caso che sia usata nello studio di specie elettroattive, i potenziali V_i e V_f si scelgono in modo da coprire l'arco di potenziale in cui è attiva la coppia redox in esame.

Consideriamo per semplicità il caso in cui inizialmente in soluzione è presente soltanto la specie ridotta. Prima di trattare questo caso è bene definire il potenziale formale di una coppia redox. Si definisce "potenziale formale", E^0 , della coppia redox il potenziale di equilibrio che assume l'elettrodo quando nella massa della soluzione sono presenti alla stessa concentrazione sia la forma ossidata (Ox) che la forma ridotta (Red) della coppia redox in esame. Quindi, se all'inizio è presente in soluzione soltanto la specie Red, è necessario fissare il potenziale iniziale V_i , da cui parte la scansione, ad un valore sufficientemente negativo tale da non determinare l'elettro-ossidazione della specie Red. Una volta fissato V_i e V_f si dà il via alla scansione di potenziale. Quando il potenziale arriva ad un valore vicino a quello di E^0 , la specie Red inizia a cedere elettroni all'elettrodo, convertendosi alla specie Ox e determinando di conseguenza un flusso di elettroni nel circuito esterno, che viene registrato come una corrente faradica i_f , ovvero una corrente dovuta ad un trasferimento elettronico.

La corrente registrata è controllata generalmente da due fattori: la velocità del trasferimento elettronico e la velocità di diffusione. La prima è la velocità con cui gli elettroni vengono trasferiti all'elettrodo da parte delle molecole di Red sulla superficie elettrodica, la seconda riguarda la velocità con cui Red diffonde dalla massa della soluzioni verso la superficie elettrodica. Se la velocità del trasferimento elettronico è molto superiore alla velocità di diffusione, allora alla superficie dell'elettrodo sussiste una situazione di quasi-equilibrio ed è possibile applicare l'equazione di Nernst. Inoltre, in una situazione di quasi-equilibrio, la curva voltammetrica di i vs V si definisce reversibile. In un voltammogramma reversibile il potenziale del picco di ossidazione, V_o , ed il potenziale del picco di riduzione, V_r , sono separati di un valore $\Delta V = 59 \text{ mV}/n$, nel caso che le misure siano condotta a temperatura $T = 25^\circ \text{ C}$ (298 K), dove n è il numero di elettroni trasferiti dalla specie Red all'elettrodo.

La corrente del picco di ossidazione, i_o , e la corrente del picco di riduzione, i_r , sono uguali ma di segno opposto. Grazie all'equazione di Randles-Sevcik è possibile calcolare il loro valore assoluto

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

in cui

i_p : corrente di picco misurata in Ampere;

A : area dell'elettrodo misurata in cm^2 ;

c^* : concentrazione della specie reagente espressa in mol cm^{-3} nella massa della soluzione;

D :coefficiente di diffusione espresso in $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ della specie reagente
 v :velocità di scansione del potenziale in V s^{-1} .

In monostrati fosfolipidici auto-assemblati su mercurio, la corrente che passa è solamente di tipo capacitivo. La corrente capacitiva è dovuta al fatto che l'interfase elettrodo/soluzione si comporta come un condensatore elettrico, avente una capacità differenziale C dipendente dal potenziale applicato V . Una variazione di quest'ultimo comporta una variazione della carica Q accumulata sulle armature del condensatore ipotetico che rappresenta l'interfase elettrodo/soluzione.

La capacità differenziale è definita dalla relazione

$$C = \frac{dQ}{dV}$$

Se consideriamo in prima approssimazione C indipendente dal potenziale, si può calcolare la corrente capacitiva i_c dovuta alla variazione nel tempo, con velocità costante v , del potenziale V . La velocità costante v è data da

$$v = \frac{dV}{dt}$$

La corrente capacitiva i_c è dunque data in prima approssimazione dalla relazione

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

Da ciò consegue che in assenza di processi faradici, la curva di andata e quella di ritorno del voltammogramma sono parallele e la loro separazione è pari a $2Cv$.

I monostrati supportati da mercurio sono caratterizzati da un'elevata resistenza ed il voltammogramma risulta inclinato con pendenza pari ad $1/R$; infatti, dalla legge di Ohm si ha che $i = V/R$.

Abbiamo effettuato misure di voltammetria ciclica su monostrati lipidici auto-organizzati su mercurio; l'onda triangolare di potenziale è stata fatta variare da -0.2 V a -0.8 V e viceversa con velocità di scansione di 0.05 V/s .

Come ione elettroattivo è stato aggiunto il Cd^{2+} durante la scansione di potenziale. Quando non è presente la specie elettroattiva, abbiamo già detto che la corrente su monostrati è esclusivamente di tipo capacitivo; il voltammogramma ciclico fornisce quindi una valutazione

approssimativa dei valori di resistenza e capacità del monostrato stesso. Una volta aggiunta una specie elettroattiva, quando questa raggiunge la superficie dell'elettrodo, il contributo capacitivo diventa trascurabile rispetto alla corrente faradica registrata.

2.2 Assetto sperimentale

2.2.1 Cella elettrochimica

Le misure elettrochimiche sono state condotte in una cella in vetro pirex appositamente costruita. La cella è dotata di cinque coni a smeriglio, di cui tre sono usati per alloggiare i tre elettrodi, due per effettuare eventuali aggiunte in soluzione durante le misure.

Per condurre le misure finalizzate a questo lavoro di tesi, è stato utilizzato un sistema potenziostatico a tre elettrodi: un elettrodo di riferimento Ag/AgCl 0.1 M, un controelettrodo di platino ed un elettrodo di lavoro a goccia stazionaria di mercurio (HMDE, Hanging Mercury Drop Electrode). La cella elettrochimica con in suoi componenti è mostrata in Fig. 2.2.1a.



Fig.2.2.1a Cella elettrochimica: (1) elettrodo di riferimento Ag/AgCl, (2) filo di Pt avvolto intorno al gorgogliatore, (3) elettrodo di lavoro HMDE, (4) coni usati per le aggiunte.

L'elettrodo di riferimento Ag/AgCl (KCl 0.1 M) è costituito da un filamento d'argento su cui è stato depositato elettrochimicamente AgCl. Il suo potenziale dipende solamente dall'attività degli ioni cloruro in soluzione, ovvero dalla loro concentrazione. È importante che l'attività del cloruro resti costante affinché l'elettrodo di riferimento sia tale; per questo si immerge

l'elettrodo in una soluzione di cloruro. In questo lavoro sono stati usati come elettroliti KCl 0.1 M e CaCl_2 0.05 M.

Il controlettrodo di platino è costituito da un filo di Pt avvolto intorno ad un gorgogliatore a due vie, attraverso il quale si fa gorgogliare azoto per mantenere disaerata la soluzione, in particolare per allontanare l' O_2 atmosferico. È infatti fondamentale condurre misure in una soluzione priva di O_2 perché questo potrebbe elettroridursi nel campo di potenziale investigato, interferendo con le misure. Per effettuare la disaerazione, è stato fatto gorgogliare N_2 per circa mezz'ora in cella prima di effettuare la misura, poi è stato mantenuto un battente di N_2 al di sopra della soluzione durante l'intera misura.

L'elettrodo di lavoro a goccia stazionaria di mercurio (HMDE, Hanging Mercury Drop Electrode) è stato perfezionato in questo laboratorio^[30]. È costituito da un capillare di vetro appuntito (Metrohm 6.1209.010) posto sotto ad un pozzetto contenente del mercurio.

La fuoriuscita del mercurio attraverso il capillare è regolata dall'avanzamento di un pistone rettificato, del diametro di 1 mm, posto all'interno del pozzetto. L'avanzamento del pistone è regolato a sua volta da una vite micrometrica con display digitale (Mitutoyo Digimatic 350-341), posta in testa all'elettrodo. La vite micrometrica consente di misurare precisamente l'avanzamento richiesto per formare una goccia di mercurio di una certa area, previa taratura.

L'interazione tra la siringomicina E ed i monostrati è stata studiata effettuando tutte le misure su gocce ottenute con un avanzamento del pistone di 0.200 mm, a cui corrisponde una goccia di area $14 \cdot 10^{-3} \text{cm}^2$.

2.2.2 Camera di lavoro

Tutto il sistema è stato alloggiato all'interno di una camera termostata alla temperatura di $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, che è riportata in figura 2.2.2a.

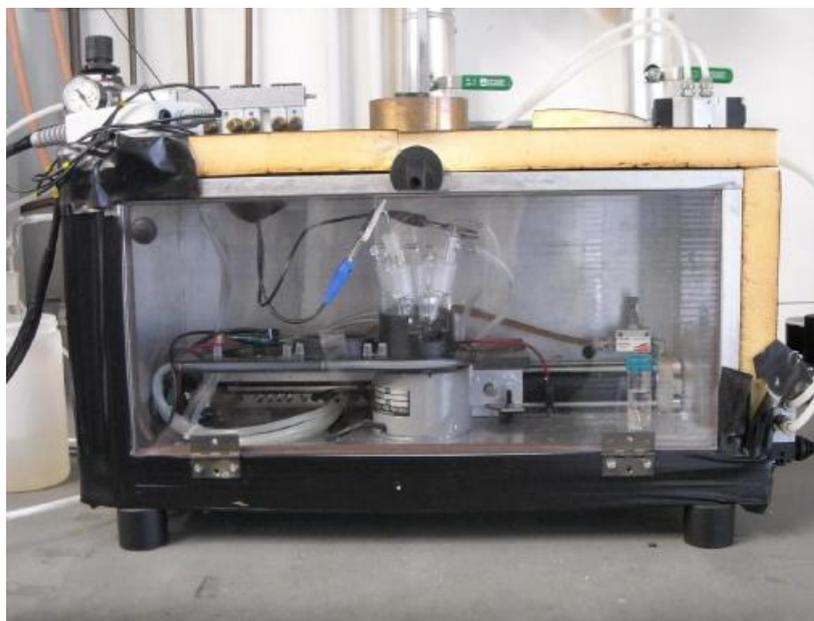


Fig.2.2.2a Assetto sperimentale: camera termostata e cella elettrochimica.

È fondamentale operare in condizioni termostate per evitare variazioni della dimensione della goccia in seguito ad eventuali variazioni di temperatura.

La camera è posta sopra un tavolo antivibrante allo scopo di diminuire il rumore di fondo dovuto a vibrazioni meccaniche. Inoltre è munita di un sistema oleopneumatico che consente uno spostamento privo di scosse dell'elettrodo di lavoro a goccia stazionaria di mercurio. È infatti necessario spostare quest'ultimo con un movimento regolare, per evitare la caduta della goccia.

2.3 Preparazione e caratterizzazione di monostrati lipidici supportati da mercurio

2.3.1 Preparazione di monostrati lipidici

Per preparare monostrati lipidici supportati da mercurio bisogna prima di tutto disaerare la soluzione elettrolitica facendo gorgogliare N_2 attraverso il gorgogliatore.

Contemporaneamente si porta a $25^\circ C$ la temperatura della camera di lavoro per mezzo di un sistema di circolazione ad acqua regolato da un termostato. La termostattizzazione va effettuata per circa un'ora. In questo lavoro di tesi come elettrolita di supporto sono stati usati KCl 0.1 M o $CaCl_2$ 0.05 M.

Una volta raggiunta la temperatura di $25^\circ C$ si interrompe il flusso di gas in soluzione e si mantiene soltanto un battente di N_2 al di sopra della soluzione durante tutto il corso delle misure.

A questo punto si spargono, goccia a goccia mediante una siringa Hamilton, $50 \mu L$ di soluzione lipidica in pentano all'interfaccia soluzione/battente di N_2 ; si aspetta poi 5 minuti circa per far evaporare tutto il pentano.

All'interfaccia soluzione/battente di N_2 si forma così un film lipidico collassato, attraverso il quale si fa passare la goccia di mercurio. In tal modo su quest'ultima si forma spontaneamente un monostrato lipidico auto-organizzato, con le code alchiliche rivolte verso la superficie idrofobica del metallo e le teste polari verso la soluzione acquosa.

Le fasi di realizzazione di un monostrato supportato da mercurio si possono allora riassumere nel modo seguente:

- 1) Disaerazione della soluzione
- 2) Formazione della goccia di mercurio
- 3) Passaggio della goccia attraverso il film lipidico
- 4) Formazione del monostrato auto-organizzato

Le quattro fasi sono riportate in figura 2.3.1

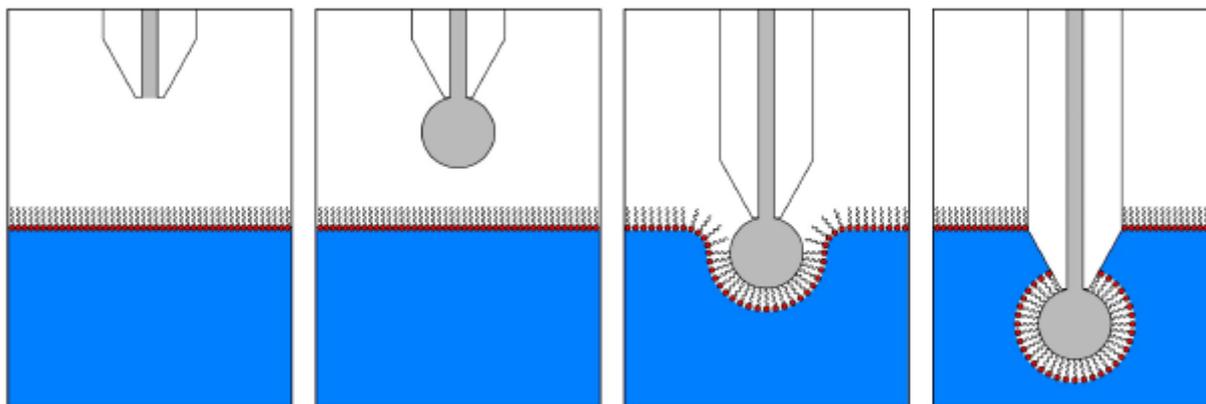


Fig. 2.3.1 Formazione di un monostrato lipidico su una goccia di mercurio.

2.3.2 Caratterizzazione di monostrati lipidici

Il monostrato lipidico, preparato secondo la modalità appena descritta, viene caratterizzato per via elettrochimica mediante due tecniche: la voltammetria AC con risoluzione di fase e la spettroscopia d'impedenza.

La voltammetria AC con risoluzione di fase consente di stabilizzare il monostrato e di determinarne la capacità. Per stabilizzare il monostrato si effettuano scansioni successive di potenziale nel campo in cui il monostrato è compatto e la capacità ha un minimo. Il valore ottimale della capacità di un monostrato auto-organizzato su mercurio è di circa $1.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

L'intervallo di stabilità del monostrato nel potenziale applicato dipende dalla composizione lipidica. In questo lavoro di tesi sono state usate DOPS e DOPC. Con DOPS si è usata la voltammetria AC con risoluzione di fase in un campo di potenziali compreso tra -0.3 V e -0.9 V , mentre con DOPC in un campo compreso tra -0.2 V e -0.8 V .

Al termine delle scansioni viene registrato il profilo della corrente I contro il potenziale E in un più ampio arco di potenziali, compreso tra -0.2 V e -1.5 V per la DOPC e tra -0.3 V e -1.3 V per la DOPS. Il monostrato è correttamente organizzato se vengono ottenute curve di corrente stabili e riproducibili. Il profilo del voltammogramma è caratteristico per ogni fosfolipide.

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

Il potenziale sinusoidale, di ampiezza pari a 10 mV , viene applicato in un arco di frequenze compreso tra 10^5 Hz e 10^{-1} Hz , mentre il potenziale di base viene applicato in un campo compreso tra -0.3 V e -0.8 V .

In genere si usa il grafico di Bode per una valutazione qualitativa del monostrato.

Un monostrato ben formato è caratterizzato da un angolo di fase di circa 90° nel campo di frequenze comprese tra 1 Hz e 10^3 Hz.

Dall'analisi del grafico di Bode si ottengono i valori della resistenza e della capacità del monostrato. Il valore della resistenza si estrapola dall'intercetta del grafico di $\log(Z)$ vs $\log(f)$ alle frequenze più basse, mentre il valore della capacità viene ricavato dal reciproco dell'impedenza Z alla frequenza di 1 Hz (vedi sezione 2.1.2). Si tratta infatti l'intero sistema nei termini del suo circuito equivalente $R_s(R_mC_m)$, dove R_s è la resistenza della soluzione, mentre R_mC_m rappresenta la maglia del bistrato (Fig.2.1.2a). Tale trattazione fornisce un ottimo fitting della curva con valori di capacità e resistenza rispettivamente pari a circa $1.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ e qualche decina di $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^2$ sia per monostrati di DOPC che per monostrati di DOPS.

In generale i monostrati di DOPC sono risultati qualitativamente migliori per resistenza e capacità, inoltre sono risultati maggiormente impermeabili verso gli ioni elettroattivi.

2.4 Reagenti

- ◆ Dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), in cloroformio (10 mg/mL).
- ◆ Dioleoilfosfatidilserina (DOPS), Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), in cloroformio (10 mg/mL).
- ◆ Ergosterolo, Sigma Aldrich.
- ◆ Colesterolo, Sigma Aldrich.
- ◆ Siringomicina E (SRE), fornita dal Dott. A. Scaloni(IABBAM Consiglio Nazionale delle Ricerche, via Argine 1085, I-80147 Napoli), stock in DMSO 1 mg/ml.
- ◆ $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, Merck.
- ◆ KCl Suprapur Merck, trattato in muffola a 500°C per eliminare le impurezze organiche.
- ◆ HCl, Merck.
- ◆ K_2HPO_4 , Merck.
- ◆ KH_2PO_4 , Merck.
- ◆ CaCl_2 , Merck.
- ◆ H_2O bidistillata. L'acqua deionizzata viene distillata una prima volta, per ridurre ulteriormente il contenuto salino, e successivamente distillata su permanganato per rimuovere eventuali residui organici.
- ◆ miscela cromica, preparata sciogliendo a caldo 16 g di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ in 600 ml di H_2SO_4 concentrato. È stata usata per il lavaggio della cella e della vetreria. Dopo ogni giornata di misure la cella elettrochimica è stata lavata con miscela cromica a caldo per poi essere sciacquata con abbondante acqua bidistillata. Dopo essere stata pulita è stata incartata in alluminio per evitare eventuali contaminazioni all'aria ed è stata posta in stufa a 150°C . Una volta asciugata, deve essere conservata sempre in carta di alluminio, che deve essere tolta solamente prima dell'utilizzo.

Tutte le misure elettrochimiche sono state eseguite con un potenziostato Autolab PGSTAT 12 (Echo Chemie) munito di modulo FRA2 per le misure di impedenza elettrochimica e GPES 4.9007 software per le misure di voltammetria AC con risoluzione di fase e di voltammetria ciclica.

Capitolo 3

Risultati sperimentali

3.1 Effetto di una variazione dell'area della superficie elettrodica a disposizione del monostrato auto-organizzato sul profilo dei picchi di riorientamento

Al fine di correlare l'effetto dell'aggiunta di molecole interferenti alla variazione del profilo dei picchi di riorientamento nel voltammogramma AC di un monostrato fosfolipidico, abbiamo studiato come un'alterazione dei picchi può essere indotta, ad esempio, da una variazione dell'area della superficie dell'elettrodo a disposizione del monostrato auto-organizzato. In tal modo è possibile valutare quanto i parametri voltammetrici siano associabili alla compattezza ed all'organizzazione del monostrato.

Sia nel caso di monostrati di DOPC che di DOPS, sono state effettuate espansioni e contrazioni della goccia coperta dal monostrato registrando, a seguito di ognuna di esse, la curva di voltammetria AC fino alla regione dei picchi. La riproducibilità è ottima in entrambi i casi.

Espansioni dell'area della goccia sulla quale si trova un monostrato di DOPC mostrano una progressiva crescita della capacità sul minimo. Al contempo si osserva un effetto praticamente trascurabile sul secondo e terzo picco di riorientamento. Il primo picco, invece, si riduce progressivamente e tende a diventare una spalla arrotondata. Ciò è mostrato in figura 3.1a.

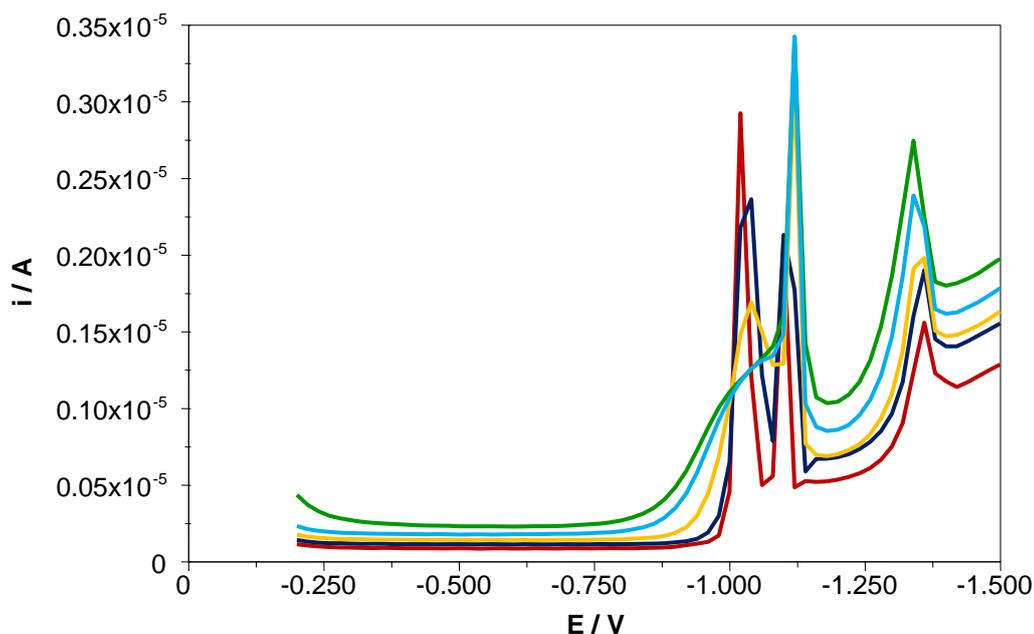


Fig.3.1a Voltammogrammi AC su monostrati di DOPC per espansioni dell'area della goccia. Curva rossa: area della goccia di 0.014 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.200 mm del pistone dell'elettrodo; curva blu: area della goccia di 0.018 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.260 mm del pistone dell'elettrodo; curva gialla: area della goccia di 0.022 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.300 mm del pistone dell'elettrodo; curva azzurra: area della goccia di 0.024 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.350 mm del pistone dell'elettrodo; curva verde: area della goccia di 0.028 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.400 mm del pistone dell'elettrodo.

Invece, sullo stesso tipo di monostrato, l'effetto di contrazioni dell'area è debole, si può notare solo che la riduzione del secondo picco di riorientamento della DOPC è più significativa rispetto a quella degli altri due (fig. 3.1b). Inoltre bisogna notare che l'entità delle contrazioni è necessariamente inferiore a quella delle espansioni, dal momento che la goccia ha dimensioni iniziali finite.

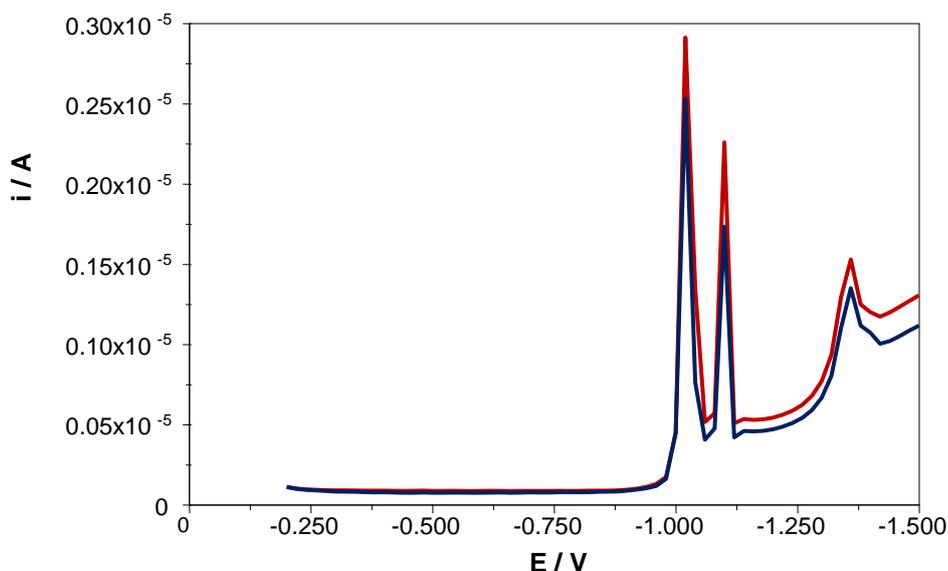


Fig.3.1b Voltammogrammi AC su monostrati di DOPC per contrazioni dell'area della goccia. Curva rossa: area della goccia di 0.014 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.200 mm del pistone dell'elettrodo; curva blu: area della goccia di 0.011 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.160 mm del pistone dell'elettrodo.

Nel caso di monostrati di DOPS, invece, espansioni consecutive della goccia determinano solo lievi effetti, con un graduale aumento della capacità della curva lungo tutto il suo profilo. L'aumento della capacità sul minimo è più ridotta di quanto visto sulla DOPC. La spalla che segue al picco principale si riduce ed i due picchi sembrano fondersi progressivamente. Da notare che l'arco di potenziali accessibile in questo caso è più ridotto di quanto non sia nel caso della DOPC. Si può vedere quanto esposto in fig.3.1c.

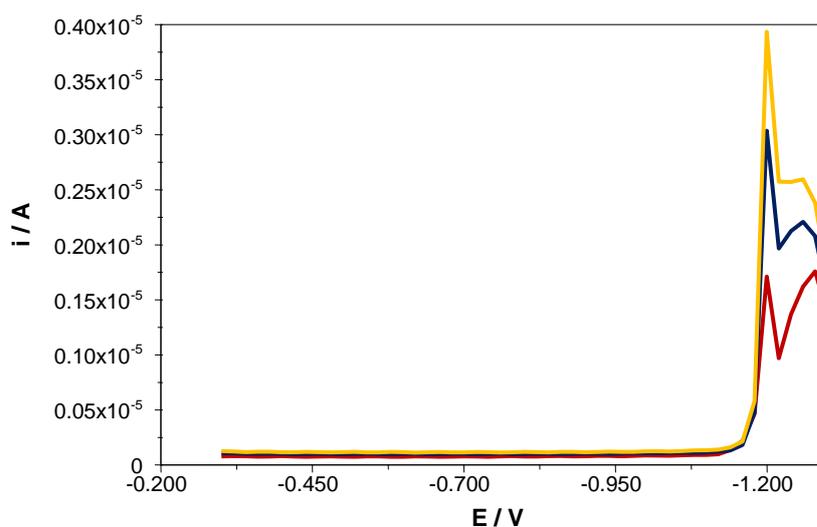


Fig.3.1c Voltammogrammi AC su monostrati di DOPS per espansioni dell'area della goccia. Curva rossa: area della goccia di 0.014 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.200 mm del pistone dell'elettrodo; curva blu: area della goccia di 0.018 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.260 mm del pistone dell'elettrodo; curva gialla: area della goccia di 0.022 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.300 mm del pistone dell'elettrodo.

Contrazioni dell'area della goccia nel caso di un monostrato supportato di DOPS, hanno un effetto simmetrico rispetto alle espansioni: il secondo picco aumenta rispetto al primo, mentre la capacità sul minimo decresce debolmente (fig. 3.1d).

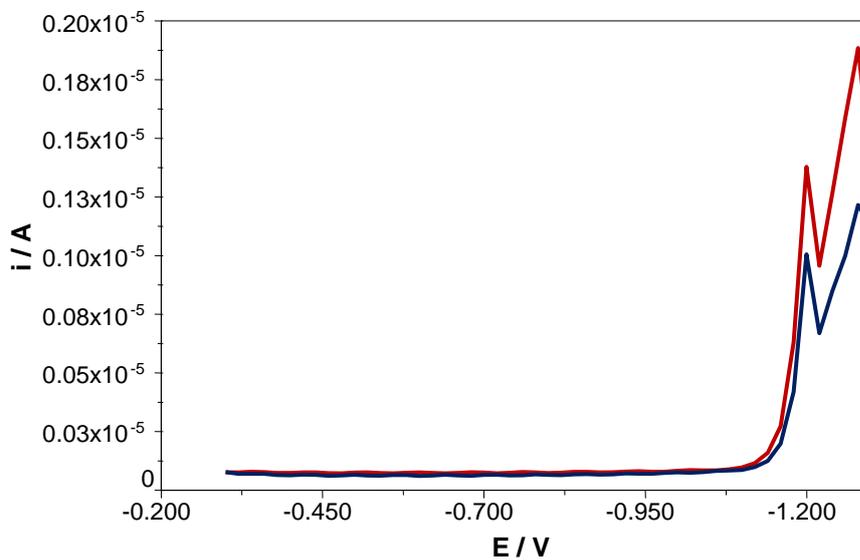


Fig.3.1d Voltammogrammi AC su monostrati di DOPS per contrazioni dell'area della goccia. Curva rossa: area della goccia di 0.014 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.200 mm del pistone dell'elettrodo; curva blu: area della goccia di 0.011 cm^2 , corrispondente ad un avanzamento di 0.160 mm del pistone dell'elettrodo.

3.2 Effetto della presenza di steroli, colesterolo, Chol, ed ergosterolo, Erg, su monostrati lipidici

Le misure in monostrati di DOPC e DOPS con steroli, aggiunti con un rapporto 1/2 col materiale fosfolipidico, sono state tutte eseguite a pH 7. Il loro scopo è la caratterizzazione degli stessi monostrati prima dell'aggiunta della SRE.

Gli steroli utilizzati sono colesterolo (Chol) ed ergosterolo (Erg). Questi possono avere un ruolo nell'attività antimicotica della SRE. Entrano a far parte della membrana cellulare animale e vegetale, rispettivamente, e sono noti per entrare a far parte del monostrato interagendo con le code alchiliche dello stesso in virtù della loro natura idrofobica.

Nel caso della DOPC, il profilo dei cui picchi ha un valore diagnostico più noto sulla base della nostra esperienza, abbiamo valutato l'effetto che su di esso ha l'aggiunta al monostrato sia del colesterolo che dell'ergosterolo. Sono state studiate le variazioni del profilo dei picchi su un monostrato di DOPC in presenza di entrambi i due steroli usati, come riportato in figura 3.2a e 3.2b.

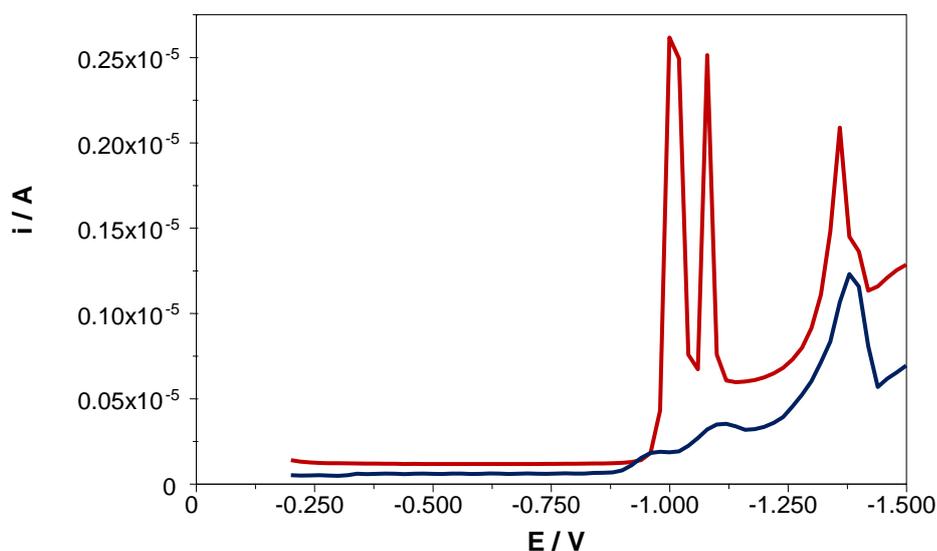


Fig. 3.2a Voltammogrammi AC su monostrati di DOPC. Curva rossa: monostrato di DOPC a pH 7; curva blu: monostrato di DOPC + Chol

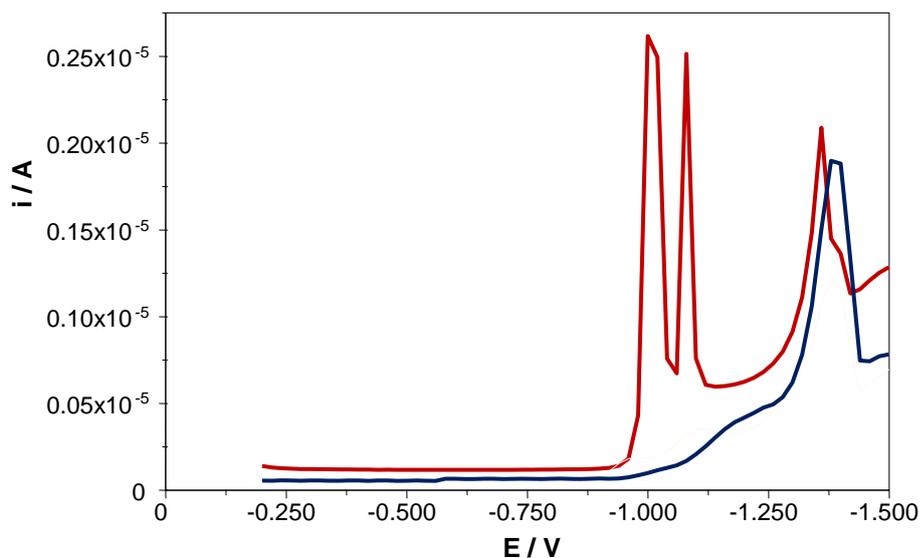


Fig. 3.2b Voltammogrammi AC su monostrati di DOPC. Curva rossa: monostrato di DOPC a pH 7; curva blu: monostrato di DOPC + Erg

In entrambi i casi i due steroli causano una diminuzione della capacità sul minimo ed una riduzione dei primi due picchi di riorientamento. Solo il terzo permane anche se parzialmente alterato.

Nel caso di monostrati di DOPS, invece, è stato valutato solo l'effetto dell'aggiunta di colesterolo. La presenza di colesterolo in monostrati di DOPS cancella il picco spostandolo forse a potenziali più negativi ed abbassa in maniera significativa la capacità sul minimo (fig. 3.2c)

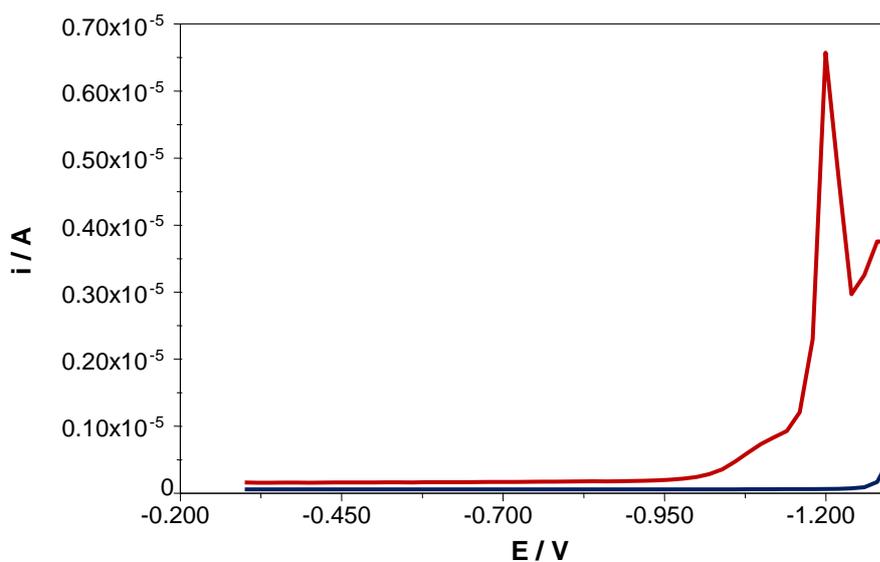


Fig.3.2c Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPS. Curva rossa: monostrato di DOPS a pH 7; curva blu: monostrato di DOPS con Chol.

3.3 Effetto della siringomicina, SRE, su monostrati fosfolipidici supportati da mercurio

L'effetto dell'aggiunta della SRE su monostrati lipidici auto-organizzati supportati da mercurio, è stato studiato con la voltammetria AC con risoluzione di fase, con la voltammetria ciclica e con la spettroscopia d'impedenza elettrochimica.

Le misure di voltammetria AC sono state effettuate per capire come la SRE interagisca con il monostrato, monitorando la variazione della capacità di quest'ultimo nelle varie condizioni sperimentali. La voltammetria AC con risoluzione di fase risulta infatti efficace nel determinare la capacità di un monostrato, potendo convertire, previa taratura, la corrente in quadratura registrata in capacità.

I monostrati utilizzati sono costituiti dalla DOPC e dalla DOPS, a cui è stata aggiunta la SRE. In ogni caso si sono aggiunti alla soluzione di lavoro 15 μl di SRE in 25 ml di soluzione elettrolitica (stock in DMSO 1 mg/ml), raggiungendo la concentrazione finale di 0.6 $\mu\text{g/ml}$.

Da misure di spettroscopia d'impedenza, si può valutare inizialmente la corretta formazione del monostrato, premessa fondamentale per lo studio di monostrati lipidici auto-organizzati su mercurio, ed in seguito l'effetto che l'aggiunta di SRE ha sulle proprietà caratteristiche del monostrato, ma tale effetto è risultato essere di lieve entità.

La voltammetria ciclica è stata utilizzata allo scopo di verificare la permeabilizzazione dei monostrati incorporanti la SRE nei confronti dello ione elettroattivo Cd^{2+} , rispetto al quale risultano impermeabili semplici monostrati fosfolipidici, ovvero costituiti soltanto dalla DOPC e dalla DOPS in l'assenza di specie interagenti con essi.

In particolar modo, è stato evidenziato l'effetto della composizione del monostrato e del pH della soluzione sulla entità delle interazioni.

3.3.1 Effetto della siringomicina, SRE, su monostrati di dioleoilfosfadilcolina, DOPC

L'interazione tra la SRE ed i monostrati di DOPC supportati da mercurio è stata studiata a pH 3, a pH 5.4, ed a pH 7 in una soluzione elettrolitica di KCl 0.1 M, mentre in una soluzione di CaCl_2 0.05 M si è operato a pH 5.6.

Una variazione del pH e della composizione della soluzione di lavoro non altera il profilo della curva voltammetrica di un monostrato di DOPC. A titolo esemplificativo si riportano in figura i profili ottenuti a pH 3 e 5.4 in KCl 0.1 M (fig.3.3.1a).

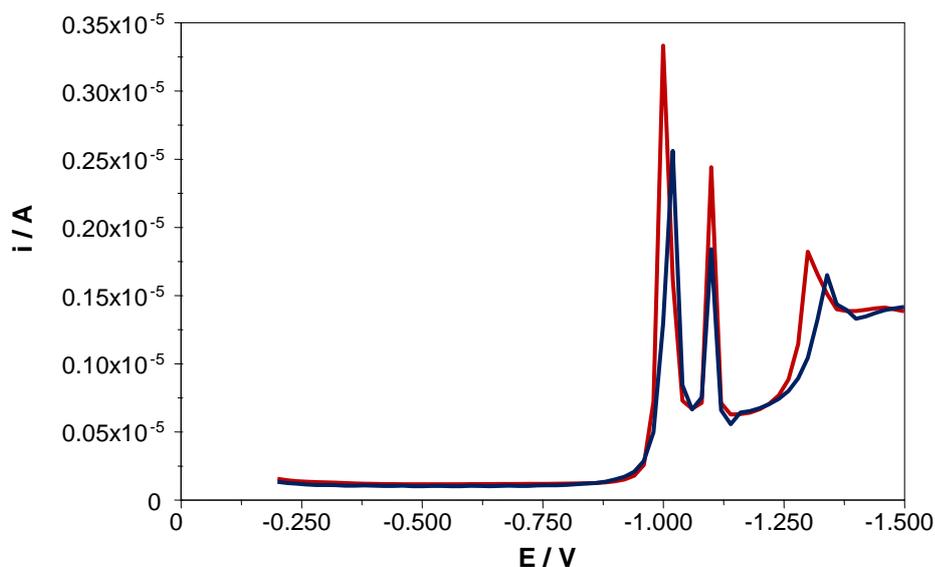


Fig. 3.3.1a Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPC. Curva rossa: pH 3; curva blu: pH 5.4

Scansioni voltammetriche effettuate su entrambe le soluzioni a pH 3 e 5.4 subito dopo l'aggiunta della SRE, non mostrano alterazioni apprezzabili né sul profilo dei picchi, né nella regione di minimo (fig. 3.3.1b).

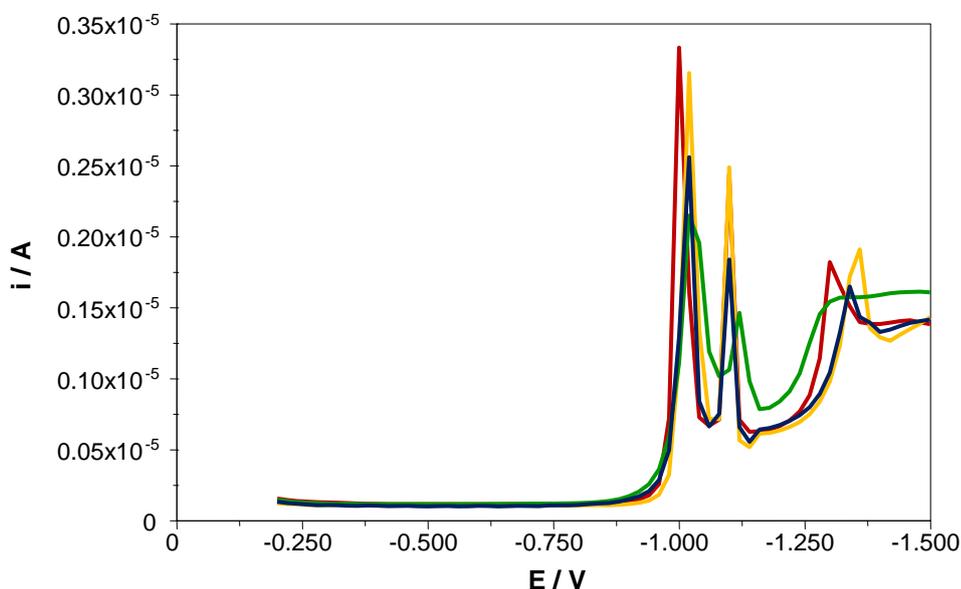


Fig. 3.3.1b Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPC. Curva rossa: monostrato di DOPC a pH 3; curva gialla: monostrato di DOPC a pH 5.4; curva verde: monostrato di DOPC con SRE a pH 3 subito dopo l'aggiunta; curva blu: monostrato di DOPC con SRE a pH 5.4 subito dopo l'aggiunta.

Se però si effettua una registrazione voltammetrica nelle stesse condizioni sperimentali, ma dopo una scansione di spettroscopia d'impedenza in tutta la regione di minimo, l'alterazione

è maggiore: la capacità della regione di minimo aumenta ed i picchi sono praticamente soppressi. In fig. 3.3.1c sono riportate le misure effettuate a pH 3 ed in fig. 3.3.1d sono riportate le misure effettuate a pH 5.4 in una soluzione di KCl 0.1 M.

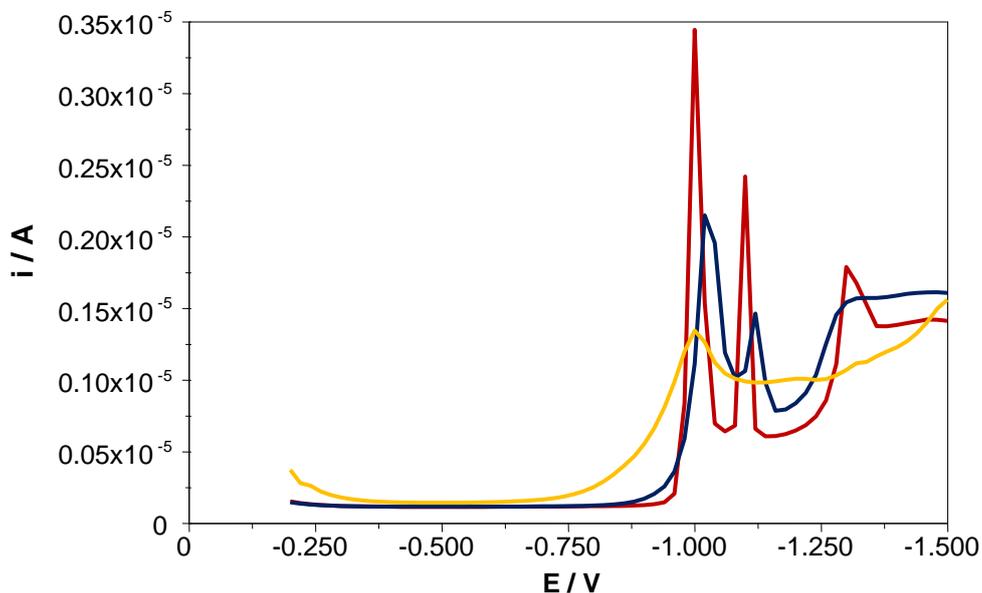


Fig. 3.3.1c Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPC a pH 3 in KCl 0.1 M. Curva rossa: monostrato di DOPC; curva blu: monostrato di DOPC con SRE subito dopo l'aggiunta; curva gialla: monostrato di DOPC con SRE dopo misure di spettroscopia d'impedenza complete.

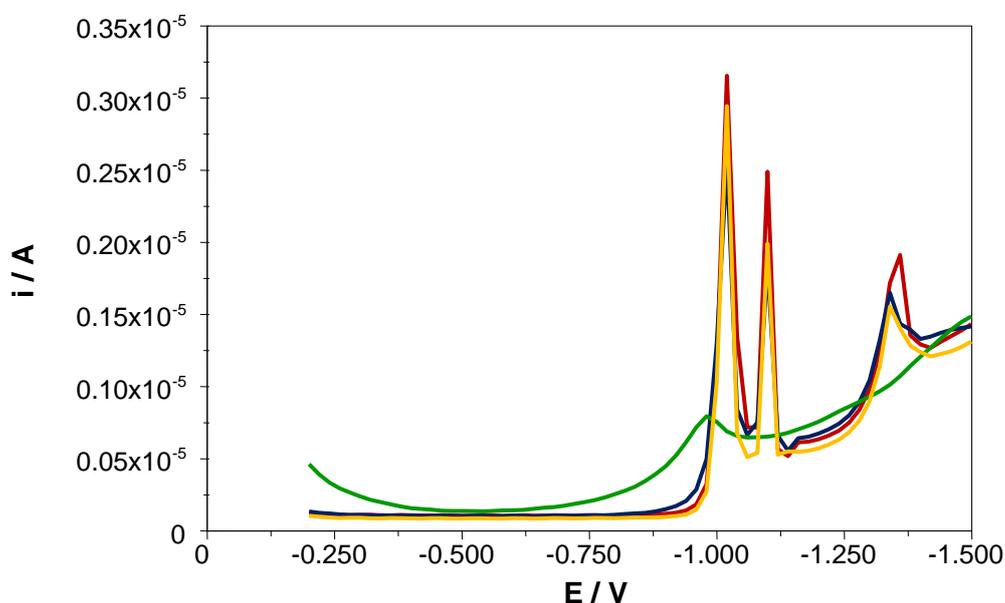


Fig. 3.3.1d Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPC a pH 5.4 in KCl 0.1 M. Curva rossa: monostrato di DOPC; curva blu: monostrato di DOPC con SRE subito dopo l'aggiunta; curva verde: monostrato di DOPC con SRE dopo misure di spettroscopia d'impedenza complete; curva gialla: monostrato formato in presenza di SRE

Voltammetrie AC ottenute per un pH della soluzione pari a 7 in tampone fosforico 1/1 mostrano un effetto analogo anche se di minore entità (fig. 3.3.1 e).

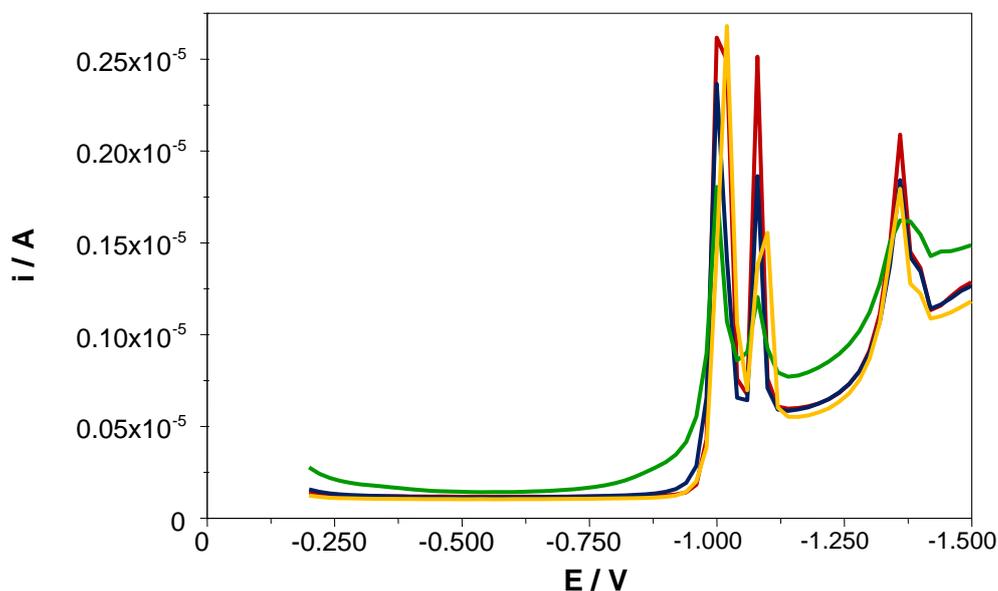


Fig. 3.3.1e Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPC a pH 7 in KCl 0.1 M. Curva rossa: monostrato di DOPC; curva blu: monostrato di DOPC con SRE subito dopo l'aggiunta; curva verde: monostrato di DOPC con SRE dopo misure di spettroscopia d'impedenza complete; curva gialla: monostrato formato in presenza di SRE

Misure di voltammetria AC condotte su monostrati di DOPC in una soluzione di CaCl_2 0.05 M mostrano che l'effetto dell'aggiunta della SRE è poco evidente immediatamente dopo l'aggiunta del depsi-peptide. Infatti l'incorporazione della SRE ricalca quella in KCl 0.1 M ed è apprezzabile solo dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza. Inoltre nuovi monostrati formati in presenza di SRE, non mostrano alterazioni significative dovute alla presenza della SRE (fig. 3.3.1f).

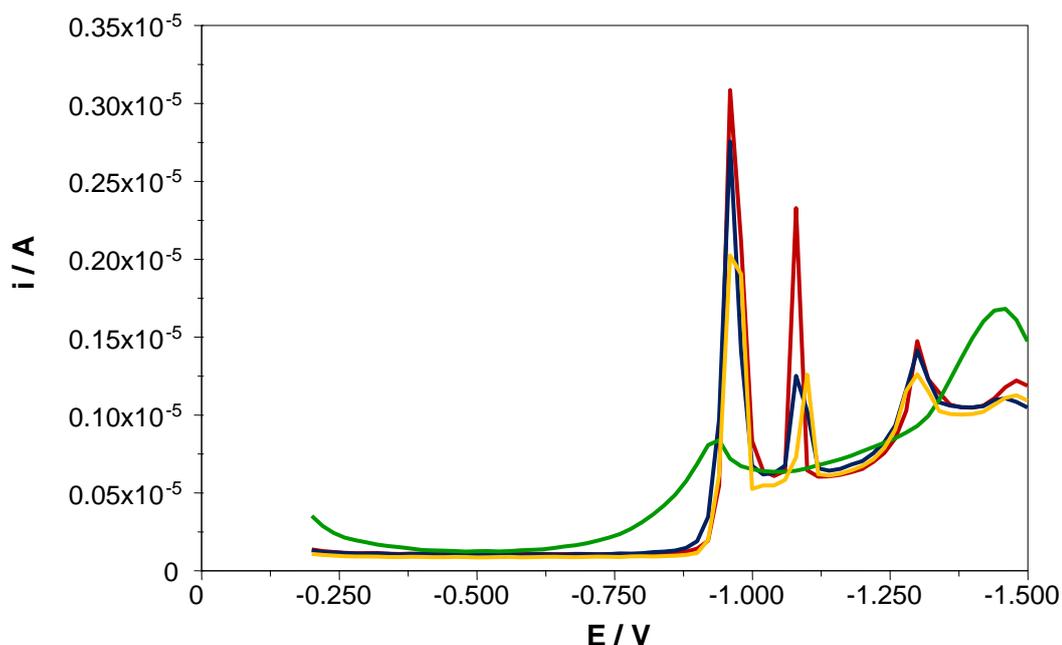


Fig. 3.3.1f Voltammogramma AC di un monostrato di DOPC in una soluzione di CaCl_2 0.05 M. Curva rossa: monostrato di DOPC; curva blu: monostrato di DOPC con SRE subito dopo l'aggiunta; curva verde: monostrato di DOPC con SRE dopo aver fatto la spettroscopia d'impedenza; curva gialla: monostrato formato in presenza di DOPC e SRE.

Per i vari pH indagati, le misure di spettroscopia d'impedenza condotte nella regione di minimo, ovvero tra -0.300 V e -0,800 V, dove il monostrato è stabile e compatto, non hanno dato molte informazioni aggiuntive. Per i valori del pH 3 e 5.4 l'effetto sull'ammettenza in fase, Y' , e sulla capacità, C , misurate entrambe alla frequenza di 10 Hz, è ridotto ed aumenta solo lievemente per scansioni successive.

Da un confronto dell'effetto al variare del pH non si osservano differenze significative e comunque sia Y' che C risentono della presenza della SRE quasi esclusivamente ai potenziali più negativi, come riportato in fig. 3.3.1g ed in fig. 3.3.1h per i pH 3 e 5.4. L'effetto è troppo esiguo per poter elaborare i dati utilizzando un circuito equivalente.

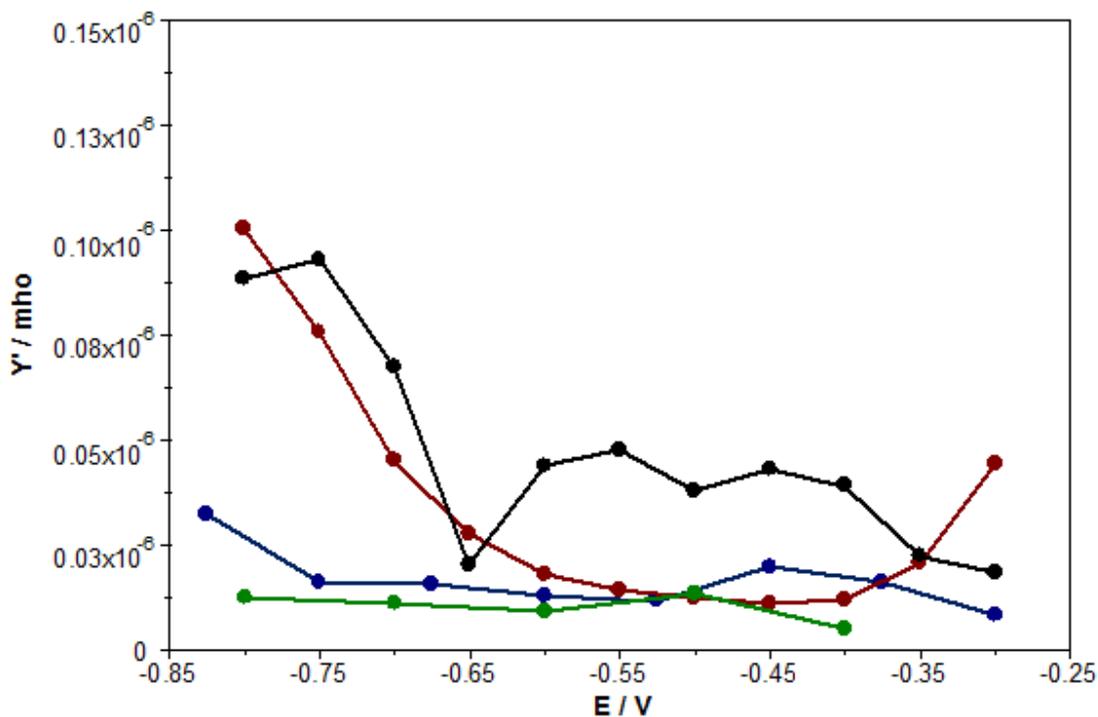


Fig. 3.3.1g Grafico, ottenuto mediante spettroscopia di impedenza, di Y' vs E alla frequenza 10 Hz. Curva blu: monostrato di DOPC a pH 3; curva verde: monostrato di DOPC a pH 5.4; curva rossa: monostrato di DOPC con SRE a pH 3; curva nera: monostrato di DOPC con SRE a pH 5.4.

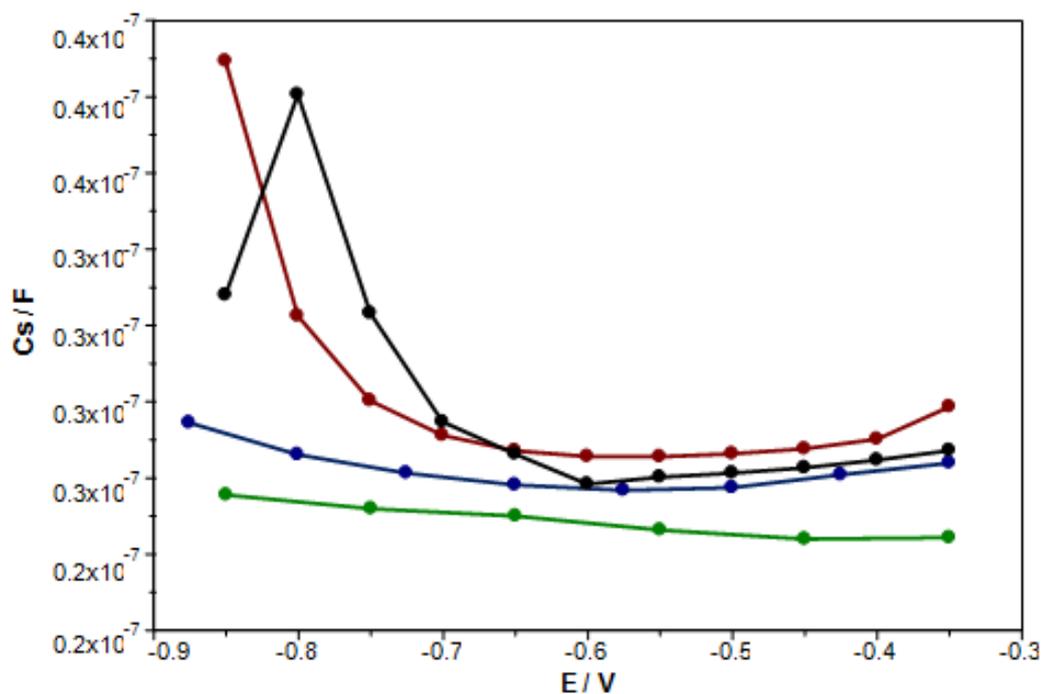


Fig. 3.3.1h Grafico, ottenuto mediante spettroscopia di impedenza, di C vs E alla frequenza di 10 Hz. Curva blu: monostrato di DOPC a pH 3; curva verde: monostrato di DOPC a pH 5.4; curva rossa: monostrato di DOPC con SRE a pH 3; curva nera: monostrato di DOPC con SRE a pH 5.4.

Una volta verificata l'incorporazione della SRE nel monostrato abbiamo utilizzato la voltammetria ciclica per valutare l'effetto permeabilizzante dovuto alla presenza del depsipeptide nei confronti dello ione Cd^{2+} . L'effetto permeabilizzante è ridotto, ed è tanto maggiore, quanto più alto è il pH della soluzione elettrolitica. La corrente che si osserva è comunque molto più bassa di quella osservata nelle stesse condizioni sperimentali su una goccia di mercurio nudo.

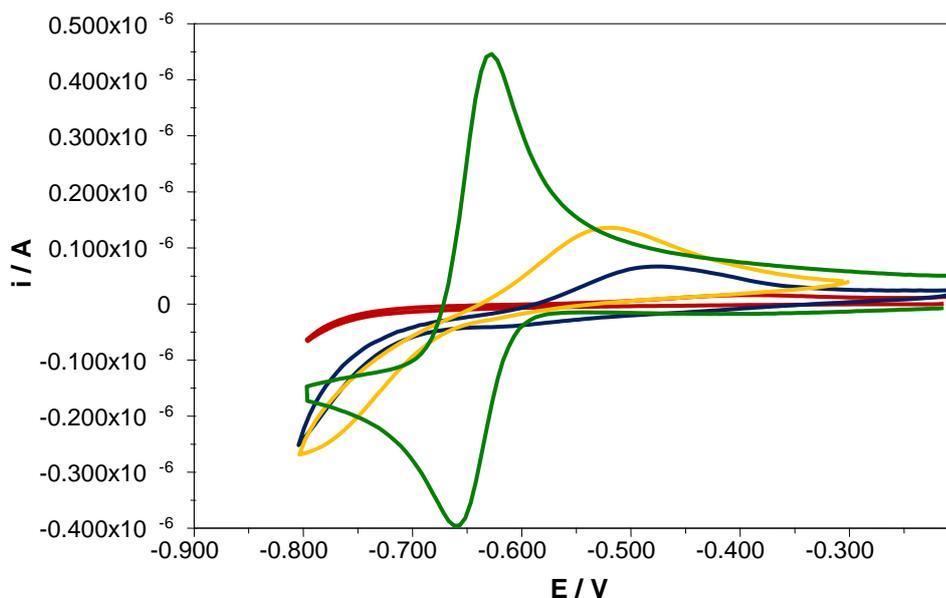


Fig. 3.3.1i Voltammogrammi, ottenuti con voltammetria ciclica, di monostrati di DOPC in soluzioni di KCl 0.1 M in presenza di Cd^{2+} alla velocità di scansione 50 mV/s. Curva rossa: monostrato di DOPC con SRE a pH 3; curva blu: monostrato di DOPC con SRE a pH 5.4; curva gialla: monostrato di DOPC con SRE a pH 7; curva verde: curva di riduzione di Cd^{2+} su Hg.

3.3.2 Effetto della siringomicina, SRE, su monostrati di dioleoilfosfadilserina, DOPS

Anche nel caso di monostrati di DOPS supportati da mercurio abbiamo investigato l'effetto della siringomicina a pH 3, a pH 5.4, ed a pH 7 in una soluzione elettrolitica di KCl 0.1 M, mentre in una soluzione di CaCl_2 0.05 M si è operato a pH 5.6.

L'effetto a pH 5.4, in soluzione di KCl 0.1 M, è significativo subito dopo l'aggiunta di SRE e diventa più marcato dopo la spettroscopia d'impedenza nella regione di minimo. Fin da subito dopo l'aggiunta di SRE, il minimo di capacità è alterato e soprattutto ristretto. Il sistema è molto riproducibile. Inoltre i monostrati formati in presenza di SRE mostrano un effetto molto scarso nella regione di minimo, ma più forte nella regione dei picchi, che sono completamente soppressi. Ciò è mostrato in fig. 3.3.2a.

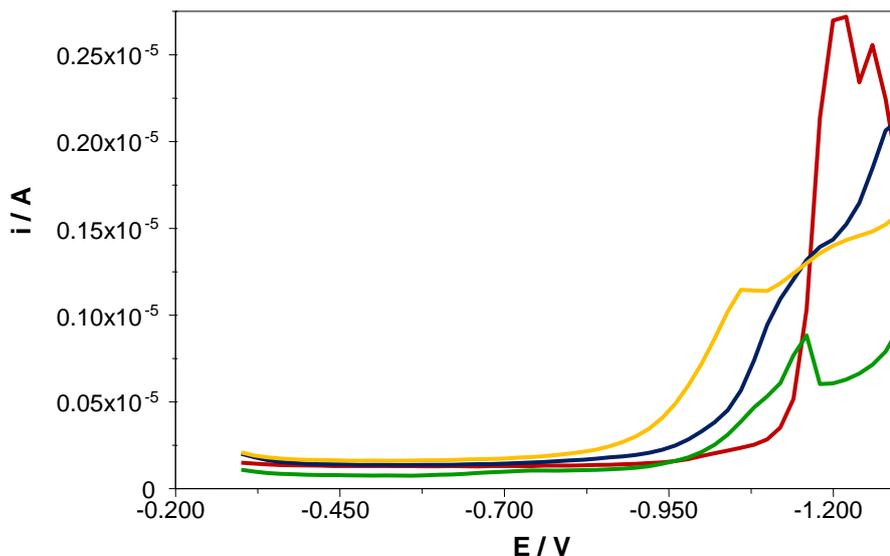


Fig. 3.3.2a Voltammogrammi, ottenuti con voltammetria AC, di un monostrato di DOPS in una soluzione di KCl 0.1 M a pH 5.4. Curva rossa: monostrato di DOPS; curva blu: monostrato di DOPS con SRE subito dopo l'aggiunta; curva gialla: monostrato di DOPS con SRE dopo aver fatto la spettroscopia d'impedenza; curva verde: monostrato formato in presenza di SRE.

Lo stesso tipo di analisi è stato effettuato a pH=3. Anche in questo caso l'effetto è immediato non tanto nella regione di minimo, che si mantiene piatta, quanto sul profilo dei picchi di riorientamento, che arrivano ad essere totalmente assenti su monostrati formati in presenza di SRE nella soluzione di lavoro (fig. 3.3.2b).

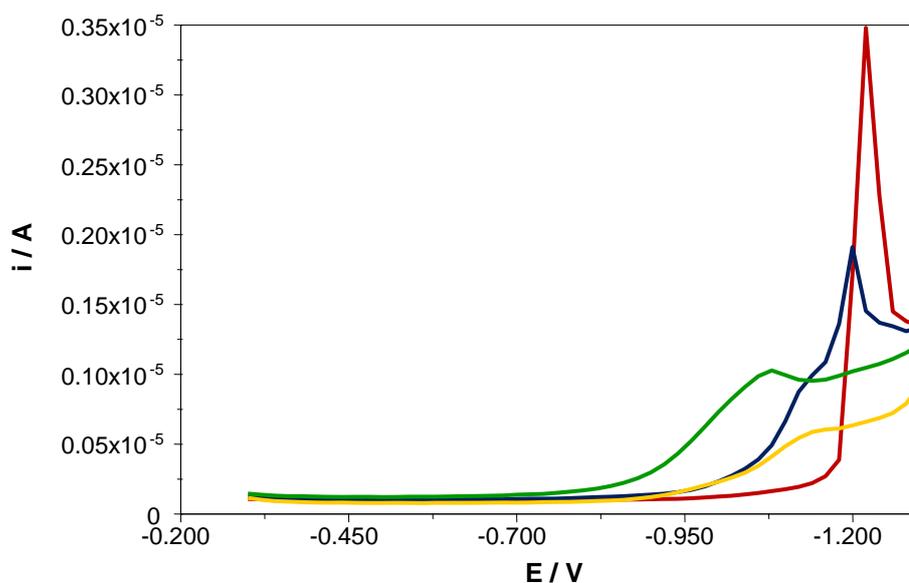


Fig. 3.3.2b Voltammogrammi AC di un monostrato di DOPS in una soluzione di KCl 0.1 M a pH 3. Curva rossa: monostrato di DOPS; curva blu: monostrato di DOPS con SRE subito dopo l'aggiunta; curva verde: monostrato di DOPS con SRE dopo aver fatto la spettroscopia d'impedenza; curva gialla: monostrato formato in presenza di SRE.

Se confrontiamo i risultati ottenuti ai valori di pH 3 e 5.4, si può notare che in entrambi i casi, l'effetto dell'aggiunta della SRE è immediato ed aumenta dopo una scansione completa di spettroscopia d'impedenza.

Anche a pH 7 l'effetto dell'aggiunta della SRE è significativo fin da subito e diventa ancora più marcato dopo la spettroscopia d'impedenza, determinando anche un significativo aumento di capacità sul minimo. Tuttavia, monostrati formati in presenza di SRE non sembrano risentire della sua presenza, in quanto il profilo dei picchi di riorientamento è simile a quello del monostrato di solo DOPS (fig. 3.3.2c).

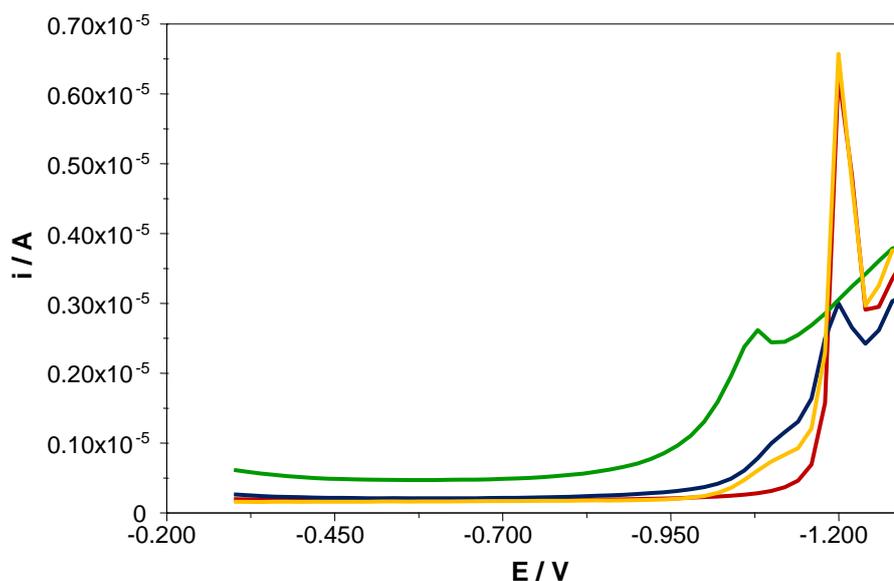


Fig. 3.3.2c Voltammogrammi AC di un monostrato di DOPS in una soluzione di KCl 0.1 M a pH 7. Curva rossa: monostrato di DOPS; curva blu: monostrato di DOPS con SRE subito dopo l'aggiunta; curva verde: monostrato di DOPS con SRE dopo aver fatto la spettroscopia d'impedenza; curva gialla: monostrato formato in presenza di SRE.

L'effetto osservato a pH acidi è confrontabile con quello che si ottiene se si sostituisce alla soluzione di KCl 0.1 M una soluzione di CaCl_2 0.05 M, il cui pH è 5.6. Anche in questo caso si osserva infatti una totale soppressione dei picchi di riorientamento (Fig. 3.3.2d).

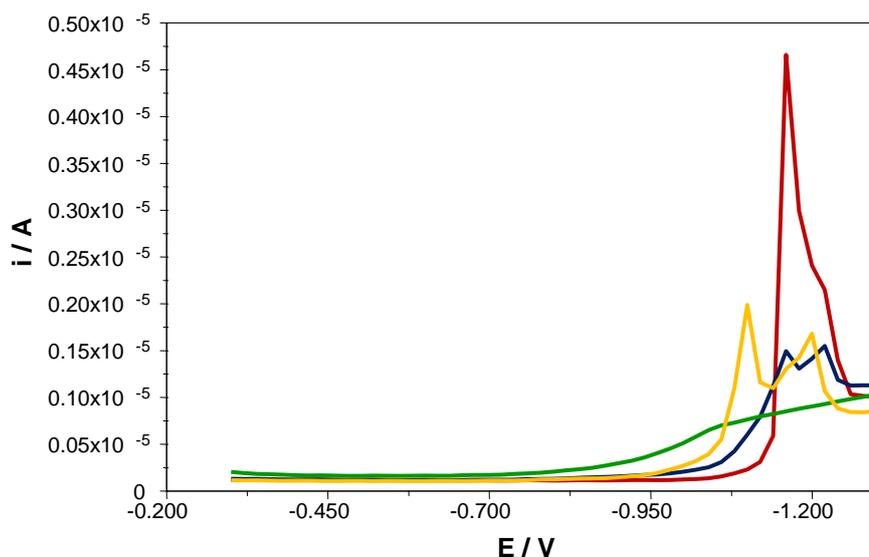


Fig. 3.3.2d Voltammogrammi AC di monostrati di DOPS in soluzioni di CaCl_2 0.05 M. Curva rossa: monostrato di DOPS; curva blu: monostrato di DOPS con SRE subito dopo l'aggiunta; curva verde: monostrato di DOPS con SRE dopo aver fatto la spettroscopia d'impedenza; curva gialla: monostrato formato in presenza di SRE.

La permeabilizzazione nei confronti dello ione Cd^{2+} è ridotta, ma sempre maggiore a pH più alti rispetto ai pH più acidi dell'intervallo investigato (fig. 3.3.2e), in accordo con le misure di spettroscopia d'impedenza, dove l'effetto dell'aggiunta della SRE è risultato lievemente maggiore a pH 5.4 rispetto alle misure condotte a pH 3.

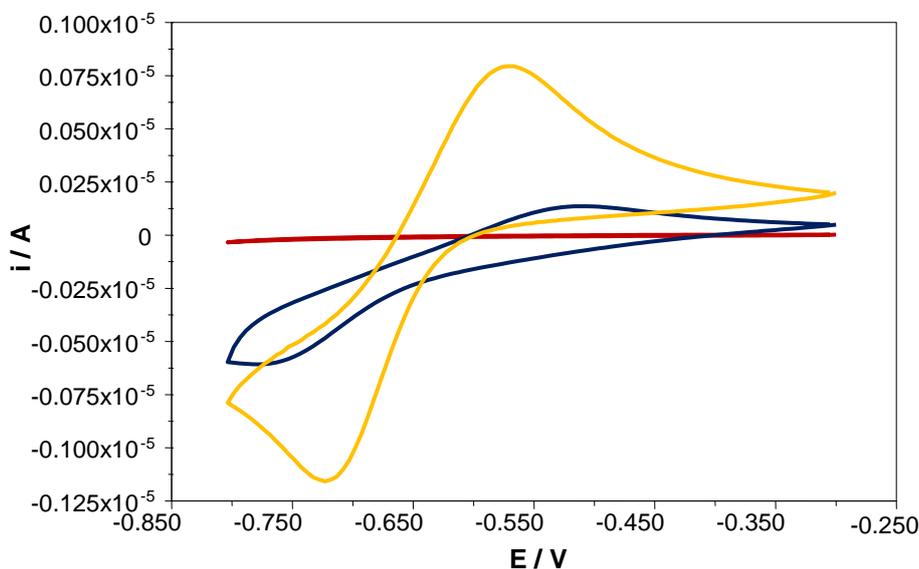


Fig. 3.3.2e Voltammogrammi, ottenuti con voltammetria ciclica, di monostrati di DOPS in soluzioni di KCl 0.1 M in presenza di Cd^{2+} alla velocità di scansione 50 mV/s. Curva rossa: monostrato di DOPS con SRE a pH 3; curva blu: monostrato di DOPS con SRE a pH 5.4; curva gialla: monostrato di DOPS con SRE a pH 7.

La permeabilizzazione a pH 3 è scarsa, ma è un po' maggiore su monostrati formati in presenza di SRE e Cd^{2+} in soluzione come riportato in fig. 3.1.2f.

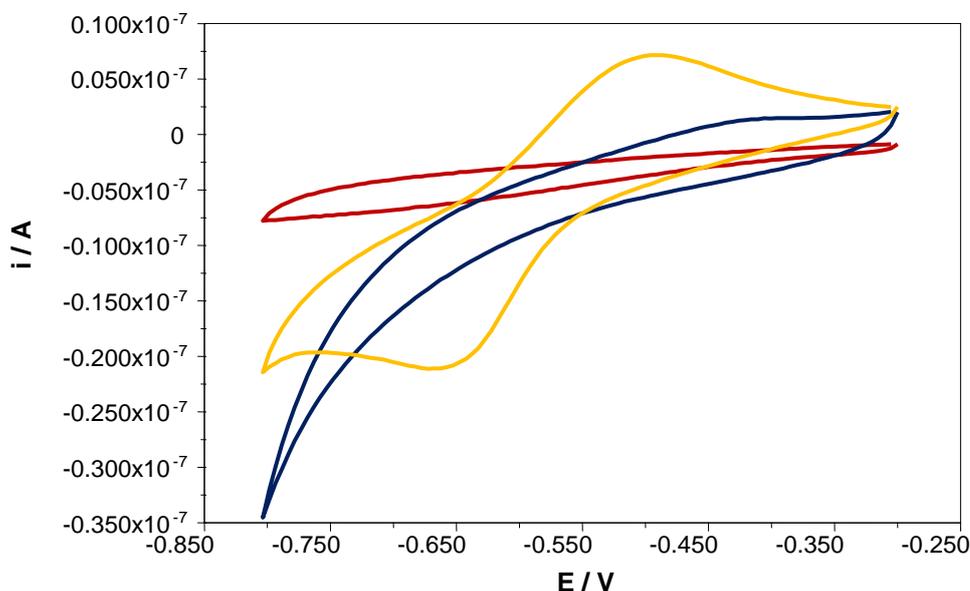


Fig. 3.3.2f Voltammogrammi, ottenuti con voltammetria ciclica, di monostrati di DOPS in soluzioni di KCl 0.1 M a pH 3 in presenza di Cd^{2+} alla velocità di scansione 50 mV/s. Curva rossa: monostrato di DOPS prima di aggiungere il Cd^{2+} ; curva blu: monostrato di DOPS con SRE; curva gialla: monostrato formato in presenza di SRE.

I dati di spettroscopia d'impedenza elettrochimica ottenuti su monostrati di DOPS e riportati come ammettenza in fase, Y' , e capacità, C , alla frequenza di 10 Hz non hanno dato risultati significativi. Inoltre la riproducibilità è inferiore a quella osservata con la voltammetria AC.

Le misure di spettroscopia d'impedenza condotte a pH 3 sono risultate molto più riproducibili di quella condotte a pH 5.4.

3.3.3 Effetto della presenza di steroli, colesterolo, Chol, ed ergosterolo, Erg, sulle interazioni tra siringomicina, SRE, e monostrati fosfolipidici

Misure di voltammetria ciclica mostrano che l'effetto dell'aggiunta di SRE è del tutto trascurabile sia in monostrati di DOPC con Chol ed Erg, che di DOPS con Chol. In fig. 3.3.3a sono riportati i voltammogrammi ottenuti con la DOPC a titolo esemplificativo.

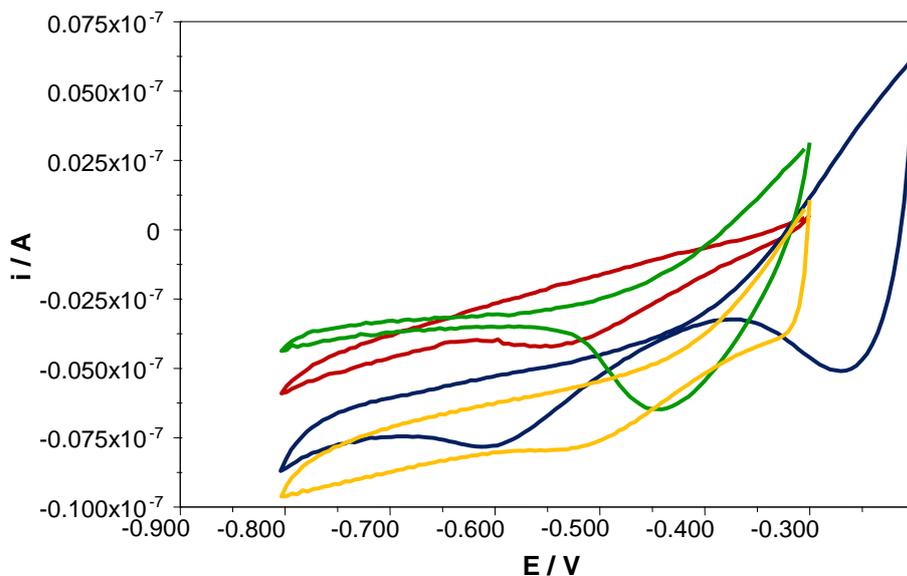


Fig. 3.3.3a Voltammogrammi ottenuti con voltammetria ciclica prima di aggiungere Cd^{2+} , alla velocità di scansione 50 mV/s. Curva rossa: monostrato di DOPC con Chol; curva blu: monostrato di DOPC con Erg; curva verde: monostrato di DOPC con Chol e SRE; curva gialla: monostrato di DOPC con Erg e SRE.

L'effetto di permeabilizzazione nei confronti dello ione Cd^{2+} in presenza di steroli è maggiore di quanto visto in assenza degli stessi. A titolo esemplificativo è riportato in fig. 3.3.3b quanto osservato per monostrati di DOPC con Chol.

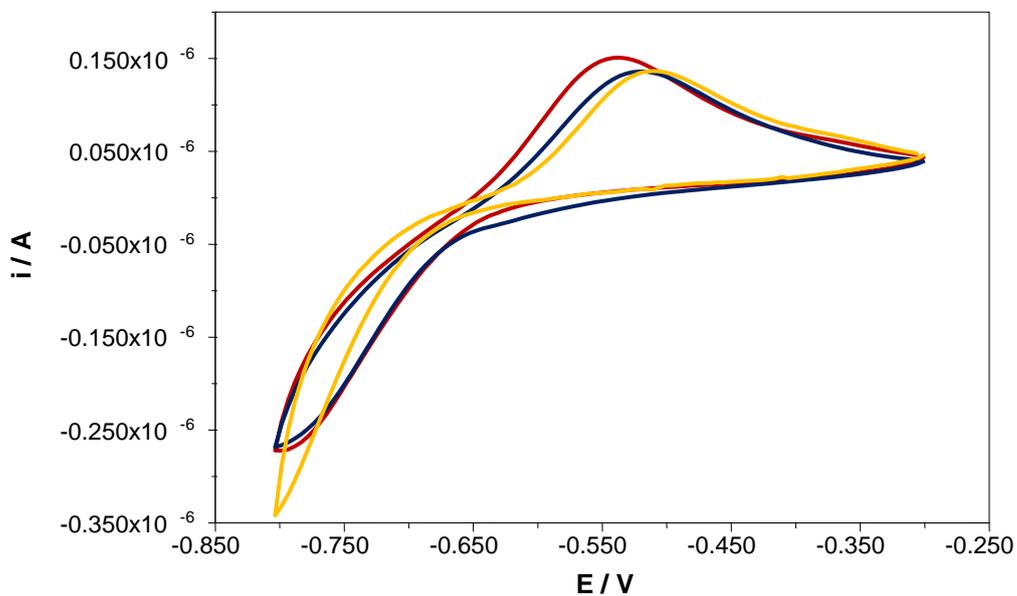


Fig. 3.3.3b Voltammogrammi ottenuti con voltammetria ciclica in presenza di Cd^{2+} su monostrati di DOPC e Chol a pH 7 in soluzione di KCl 0.1 M, alla velocità di scansione 50 mV/s. Curva blu: monostrato di DOPC con SRE a pH 7; curva gialla: monostrato di DOPC con Chol; curva rossa: monostrato DOPC con Chol e SRE.

Misure di spettroscopia d'impedenza, effettuate su monostrati di DOPC in presenza di Chol ed Erg, mostrano un effetto dell'aggiunta di SRE, che può essere considerato non trascurabile solo in presenza di ergosterolo e per valori più positivi del potenziale applicato. Nelle figure seguenti sono riportati il grafico dell'ammettenza in fase Y' contro il potenziale applicato E (fig. 3.3.3c) ed il grafico della capacità C contro il potenziale applicato E (fig. 3.3.3d).

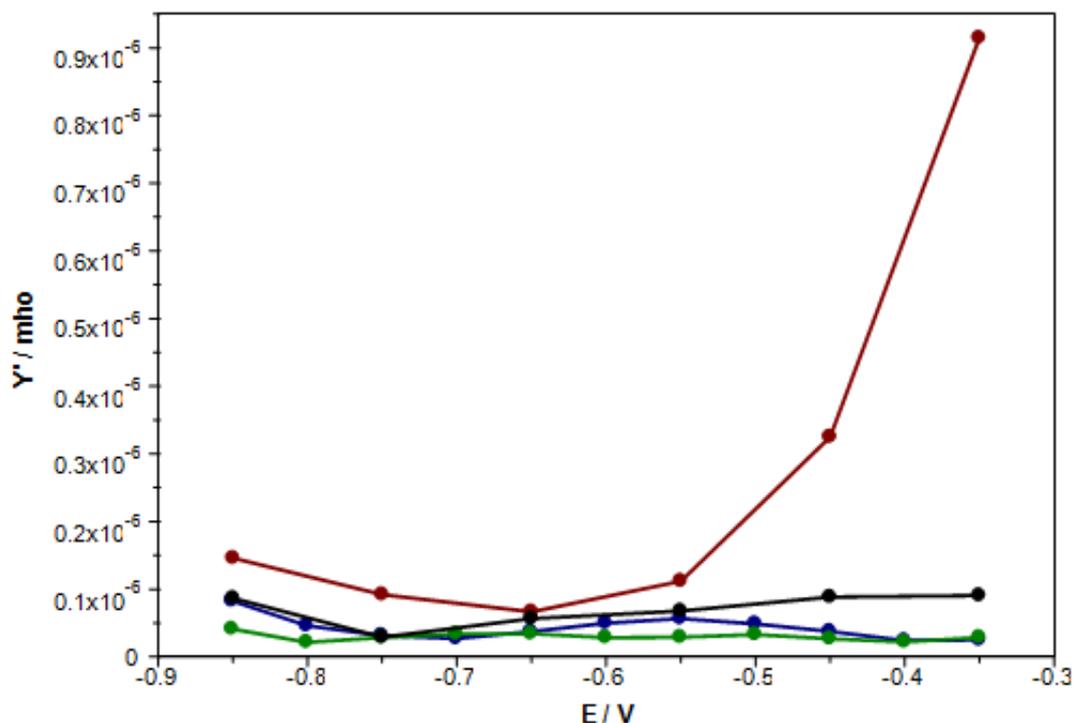


Fig.3.3.3c Grafico di Y' vs E alla frequenza di 10 Hz. Curva blu: monostrato di DOPC con Erg; curva rossa: monostrato di DOPC con Erg e SRE; curva verde: monostrato di DOPC con Chol; curva nera: monostrato di DOPC con Chol ed SRE.

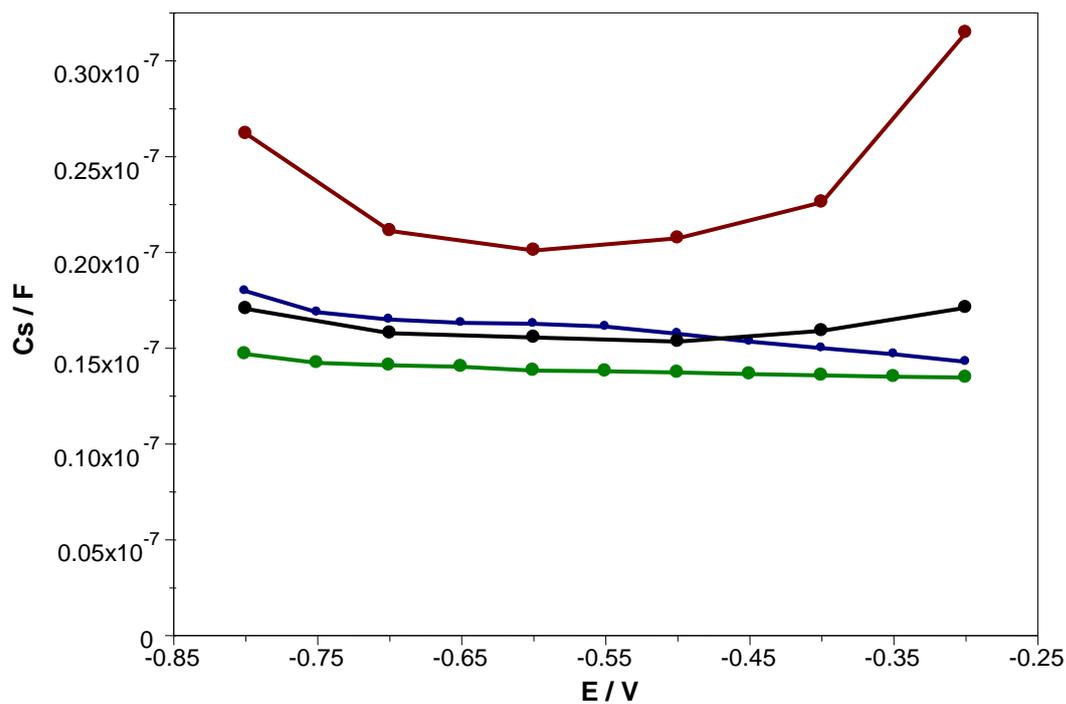


Fig. 3.3.3d Grafico di Cs vs E alla frequenza di 10 Hz. Curva blu: monostrato di DOPC con Erg; curva rossa: monostrato di DOPC con Erg e SRE; curva verde: monostrato di DOPC con Chol; curva nera: monostrato di DOPC con Chol ed SRE.

Capitolo 4

Discussione dei risultati

Le misure preliminari effettuate su monostrati di DOPC e DOPS variando l'area della superficie elettrodica a disposizione del materiale auto-organizzato ci hanno permesso di correlare i parametri voltammetrici alla densità del materiale lipidico impaccato. Dobbiamo sottolineare che il valore della capacità di un condensatore ad armature parallele, al quale può essere in prima approssimazione assimilato il monostrato fosfolipidico, è direttamente proporzionale all'area delle armature, A , ed inversamente proporzionale alla distanza, d , tra di esse

$$C \propto A/d$$

A seguito dell'espansione dell'area della goccia le molecole del fosfolipide, inizialmente disposte verticali rispetto alla superficie elettrodica, tenderanno ad inclinarsi per occupare tutta la superficie a loro disposizione. A seguito dell'inclinazione verrà a diminuire lo spessore del monostrato. Ci aspetteremo quindi un aumento della capacità dovuto a due fattori: (i) aumento dell'area delle armature, (ii) diminuzione della distanza tra esse. Naturalmente il ragionamento fatto è applicabile alla sola regione di minimo della capacità del monostrato caratterizzato da un valore costante di C pari a $1.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ relativa ad un film compatto e ben organizzato. I successivi picchi coinvolgono un processo di riorientamento molecolare cooperativo che risentirà in maniera diversa della variazione dell'impaccamento molecolare.

Nel caso di contrazioni della superficie elettrodica, avremo sicuramente una diminuzione della capacità nella regione di minimo dovuta alla diminuzione dell'area delle armature del condensatore. Inoltre, poiché le molecole fosfolipidiche sono insolubili in acqua, una diminuzione dell'area a disposizione ne aumenterà l'impaccamento con un presumibile effetto su meccanismi di riorientamento molecolare responsabili dei picchi ai potenziali più negativi.

Osservando i grafici ottenuti per espansioni e contrazioni dell'area della goccia su monostrati di DOPC e DOPS si può concludere che:

- 1) contrazioni dell'area della goccia determinano una variazione dei rapporti tra le intensità del primo e secondo picco, i_{p1} ed i_{p2} , tali che, nel caso della DOPC i_{p1}/i_{p2} aumenta a seguito della contrazione, mentre diminuisce nel caso della DOPS;
- 2) espansioni dell'area della goccia determinano una progressiva riduzione del primo picco di riorientamento cooperativo della DOPC mentre lascia gli altri inalterati. Poiché il primo picco è normalmente associato ad una riorganizzazione cooperativa del materiale fosfolipidico che prevede una interazione tra teste polari contigue, la sua assenza indica l'impossibilità delle teste di interagire tra loro in maniera coordinata. Il minor grado di impacchettamento molecolare non influenza però il meccanismo di porazione né quello di desorbimento del materiale lipidico individuati dal secondo e terzo picco rispettivamente.

Nel caso della DOPS la risposta è diversa e più difficilmente quantificabile.

Abbiamo in un secondo tempo valutato l'effetto della presenza di steroli incorporati nel monostrato sul profilo delle voltammetrie AC. Gli steroli sono composti policiclici che entrano a far parte della membrana cellulare occupando gli spazi vuoti tra le code idrocarburiche dei fosfolipidi. Abbiamo utilizzato colesterolo, Chol, ed ergosterolo, Erg. Il primo entra a far parte delle membrane cellulari animali mentre il secondo è proprio delle membrane vegetali. Una peculiarità, questa, che ne fa spesso l'elemento differenziante qualora si vogliano individuare antibiotici con attività selettiva verso funghi e piante o animali.

Per quanto riguarda il colesterolo, sappiamo che esso esercita un effetto disorganizzante per concentrazioni nella membrana fosfolipidica inferiore al 30%, mentre compatta la membrana per concentrazioni superiori^[27]. Abbiamo ragionevolmente esteso questa valutazione anche al caso dell'ergosterolo. In entrambi i casi abbiamo utilizzato concentrazioni di steroli pari ad 1/3 del materiale lipidico. Sia nel caso di monostrati di DOPC e DOPS incorporanti colesterolo che nel caso di monostrati di DOPC incorporanti ergosterolo l'effetto è simile e si può riassumere come: (i) diminuzione della capacità differenziale nella regione di minimo associabile ad una maggiore compattezza e quindi ad una diminuzione della costante dielettrica del film, (ii) inibizione dei processi di riorientamento molecolare cooperativo e di porazione individuati da una soppressione più o meno marcata dei picchi a potenziali negativi.

Sulla base dei risultati relativi alle espansioni e contrazioni della goccia nonché di quelli relativi all'aggiunta di specie che interagendo con le code compattano il monostrato possiamo concludere che:

- A) una specie che si inserisce nella regione delle code favorendone un impacchettamento più fitto ha come effetto una diminuzione di capacità sul minimo accompagnata da una soppressione dei picchi di riorientamento e porazione;
- B) una diminuzione della densità del materiale lipidico del monostrato determina un aumento della capacità nella regione di minimo ed una scomparsa del solo picco di riorientamento su monostrati di DOPC, l'effetto è quasi trascurabile su monostrati di DOPS.

Alla luce di quanto esposto si sono esaminati i dati voltammetrici ottenuti a seguito dell'aggiunta di SRE in presenza di monostrati fosfolipidici supportati al variare della loro composizione nonché del pH della soluzione di lavoro.

L'effetto dell'aggiunta della SRE su monostrati lipidici auto-organizzati supportati da mercurio è stato studiato con la voltammetria AC con risoluzione di fase e con la spettroscopia d'impedenza elettrochimica ai pH 3, 5.4 e 7.

Si è scelto di operare a pH 3, a pH 5.4 ed a pH 7 in modo da valutare l'effetto di una variazione della densità di carica sulle teste polari del monostrato. Infatti sulla base di misure effettuate in questo stesso laboratorio^[28] possiamo affermare che le teste polari della DOPC sono sempre in forma zwitterionica, mentre quelle della DOPS passano da una densità di carica positiva a pH=3 ad una forma zwitterionica neutra a pH=5.4 ad una densità di carica negativa a pH=7. Anche la SRE mostra variazioni di carica al variare del pH^[29]: ha una carica +2 a pH 7, presenta una carica +3 a pH 3. In fig. 4a è mostrate la struttura della SRE. Sull'anello polipeptidico sono riportate le cariche presenti sui residui amminoacidici a pH fisiologico.

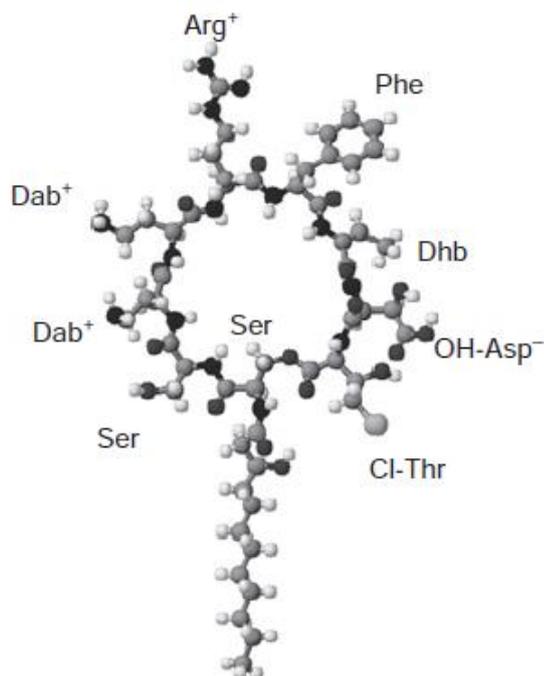


Fig.4a Forma zwitterionica della SRE. Arg⁺, arginina; OH-Asp, acido 3-idrossiaspartico; Dab, acido 2,4-diammino butirrico; Dhb, acido deidro-2-amminobutirrico; Cl-Thr, 4-clorotreonina; Ser, serina; Phe, fenilalanina.^[29]

Nel caso di monostrati di DOPC non si riscontrano differenze significative tra le misure condotte a pH 3 e pH 5.4 (fig. 3.3.1c, fig.3.3.1d). Il profilo dei picchi è solo debolmente alterato e la regione di minimo non è modificata dall'aggiunta di siringomicina se ci si limita ad una serie di scansioni voltammetriche. Una registrazione voltammetrica effettuata però dopo una spettroscopia d'impedenza completa mostra una maggiore alterazione con aumento della capacità sul minimo e soppressione dei picchi. E' evidente quindi che la SRE richiede una incorporazione lenta, durante la quale è fondamentale la permanenza ad ogni singolo potenziale per tempi più lunghi di quanto non permetta una semplice scansione voltammetrica. Anche a pH 7 (fig. 3.3.1e) il profilo dei picchi non è modificato subito dopo l'aggiunta della SRE, ed anche dopo la spettroscopia di impedenza le variazioni del profilo dei picchi è modesto mentre la regione di minimo è solo debolmente alterata. Si può concludere quindi che la SRE interagisca meno profondamente col monostrato a pH 7.

Laddove i monostrati di DOPC siano formati in presenza di SRE, preventivamente aggiunta ad una soluzione non tamponata di KCl 0.1 M a pH 3 ed a pH 5.4, si osservano 2 comportamenti distinti: (i) il monostrato ottenuto è del tutto confrontabile con quelli che si ottengono in assenza di SRE; (ii) il monostrato mostra un minimo di capacità alterato ed i primi 2 picchi di riorientamento soppressi come dopo un'incorporazione efficace di SRE. Questo comportamento può essere spiegato ipotizzando che la SRE possa interagire efficacemente con il materiale lipidico solo se questo è organizzato in strutture supramolecolari ordinate. E' possibile che all'interfase soluzione/azoto queste strutture

preesistano in regioni limitate nello spazio e, nei trasferimenti successivi all'aggiunta, siano diverse le porzioni prelevate dalla goccia, in quanto a composizione lipidica e struttura tridimensionale precedente all'auto-organizzazione sulla superficie elettrodica.

Per quanto riguarda le misure ottenute a pH 3 ed a pH 5.4, se confrontiamo quanto si osserva con quanto verificato effettuando espansioni dell'area della goccia, si evince che l'effetto della SRE è paragonabile a quello di un'espansione per quanto riguarda l'alterazione del primo picco. Possiamo immaginare che l'inserimento almeno parziale della SRE nel monostrato ne alteri le proprietà dielettriche in maniera confrontabile con quanto accade laddove se ne riduca la compattezza. E' possibile anche che alcune molecole del fosfolipide possano interagire con la struttura della SRE, risultando così sottratte alla struttura altamente organizzata rappresentata dal monostrato integro.

Misure di spettroscopia d'impedenza condotte nella regione di minimo su monostrati di DOPC non danno molte informazioni aggiuntive: l'effetto dell'aggiunta della SRE per tutti i valori del pH investigati è decisamente troppo esiguo per permetterne una analisi più puntuale mediante elaborazione dei dati ai diversi potenziali.

Per quanto riguarda le misure condotte sui monostrati di DOPS ai valori di pH 5.4 e 3, l'effetto dell'aggiunta di SRE è immediato ed aumenta dopo una scansione completa di spettroscopia d'impedenza (fig.3.3.2a, fig. 3.3.2b). L'effetto a pH 5.4 su monostrati di DOPS si fa marcato dopo la spettroscopia d'impedenza anche nella regione di minimo. Ciò suggerisce un'incorporazione più veloce della SRE in monostrati di DOPS. Il minimo di capacità è alterato e soprattutto ristretto fino da subito dopo l'aggiunta. Il sistema è molto riproducibile. A pH 5.4 la DOPS è zwitterionica e quindi neutra come la DOPC^[28]. E' pertanto da escludere che la differenza nel comportamento sia da attribuirsi ad una diversa carica superficiale. Molto probabilmente la diversa modalità di interazione dipende da come le cariche sono localizzate sulla testa polare, non soltanto nella forma aggregata, ma anche nella forma libera alla superficie della soluzione elettrolitica.

Monostrati di DOPS formati in presenza di SRE ai pH 3 e 5.4 mostrano un effetto molto scarso nella regione di minimo, ma più forte nella regione dei picchi, che sono completamente soppressi. Si può ipotizzare che il peptide si accumuli nel materiale lipidico all'interfase, interagendo con le teste polari ed inducendone addirittura una auto-organizzazione sulla superficie metallica apparentemente più compatta, salvo poi inibirne il riorientamento, come sembra mostrare il minimo più basso e la mancanza dei picchi di riorientamento.

L'effetto osservato a pH acidi è confrontabile con quello che si ottiene se si sostituisce alla soluzione di KCl 0.1 M una soluzione di CaCl₂ 0.05 M (fig. 3.3.2d). Anche in questo caso si osserva una totale soppressione dei picchi di riorientamento. E' ragionevole a questo punto

ipotizzare che sia il protone che lo ione calcio siano in grado di determinare una variazione nello stato di aggregazione del monostrato di DOPS che permetta una più efficace e rapida interazione con la molecola della SRE. Una prova analoga condotta in presenza di DOPC mostra che in questo caso l'effetto della presenza di ioni calcio è trascurabile, l'incorporazione ricalca quella in KCl 0.1 M ed è apprezzabile solo dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza. In quest'ultimo caso monostrati formati in presenza di SRE non mostrano alterazioni significative dovute alla presenza della SRE stessa.

Per quanto riguarda i monostrati di DOPS a pH 7 l'effetto dell'aggiunta della SRE è significativo fin da subito e diventa ancora più marcato dopo la spettroscopia d'impedenza, determinando un aumento di capacità sul minimo, che diventa più ristretto. Tuttavia, monostrati formati in presenza di SRE non sembrano risentire la sua presenza, in quanto il profilo dei picchi di riorientamento è simile a quello del monostrato di solo DOPS.

Abbiamo valutato anche l'effetto di permeabilizzazione nei confronti dello ione Cd^{2+} indotto dalla presenza di SRE. L'effetto è scarso per entrambi i tipi di monostrato ed aumenta lievemente all'aumentare del pH. Dal momento che l'interazione monostrato/SRE ha invece il massimo effetto a pH 3 è ragionevole concludere che la permeabilizzazione verso questo catione bivalente sia addirittura inibita dalla presenza della SRE carica positivamente alla superficie del monostrato. A pH 7 questo effetto repulsivo è minore. Ad ogni modo si può escludere la presenza di canali ed attribuire il lieve passaggio del cadmio ad una permeabilizzazione aspecifica indotta dalla SRE.

È stato studiato anche l'effetto degli steroli ergosterolo e colesterolo sulle interazioni tra la SRE ed i monostrati fosfolipidici di DOPC e di DOPS. È stato osservato che l'effetto di permeabilizzazione nei confronti dello ione Cd^{2+} in presenza di steroli è maggiore di quanto visto in assenza degli stessi anche laddove non si aggiunga siringomicina. Gli steroli hanno quindi un lieve effetto permeabilizzante sul monostrato la cui entità non risente di una successiva aggiunta del depsipeptide.

Da un confronto con la curva voltammetrica ottenuta nelle stesse condizioni su Hg scoperto si vede comunque che la corrente di riduzione del Cd^{2+} è sempre inferiore alla metà di quella attesa, laddove la goccia sia coperta del monostrato variamente modificato ed il processo è irreversibile (fig. 4b).

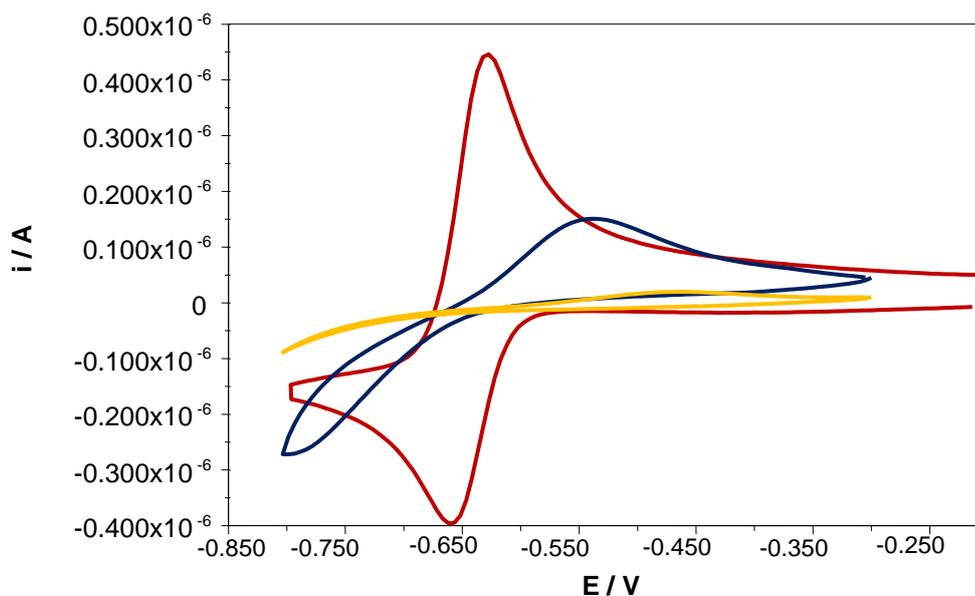


Fig. 4b Voltammogrammi ottenuti con voltammetria ciclica alla velocità di scansione di 50 mV/s. Curva rossa: riduzione di Cd^{2+} su Hg; curva blu: monostrato di DOPC con Chol in presenza di Cd^{2+} ; curva gialla: monostrato di DOPC con Erg in presenza di Cd^{2+} .

E' quindi evidente in ogni caso che la permeabilizzazione osservata non ha nessuna natura specifica né indica alcuna formazione di canali, ma suggerisce esclusivamente una minore compattezza e/o rigidità del bistrato, oppure una maggiore presenza di imperfezioni, che possono rappresentare percorsi preferenziali per l'accesso alla superficie del metallo di ioni presenti in soluzione, indotte da specie estranee al materiale fosfolipidico.

Misure di spettroscopia d'impedenza effettuate in presenza di steroli mostrano un effetto dell'aggiunta di SRE che può essere considerato non trascurabile solo in presenza di ergosterolo e per valori del potenziale applicato più positivi. Questo risultato potrebbe indicare una maggiore affinità della SRE per quelle membrane che contengono ergosterolo giustificando così la parziale selettività antimicotica di questo composto.

Abbiamo provato a titolo di esempio ad elaborare i dati in nostro possesso per il caso della SRE su DOPS a pH 5.4.

Il miglior fitting si ottiene elaborando con 4 maglie RC, delle quali una è come di consueto relativa allo strato di soluzione adiacente al monostrato. Le altre possono essere invece attribuite allo strato compatto delle code, alla regione delle teste polari ed eventualmente allo strato diffuso se le caratteristiche degli altri strati ne permettono la differenziazione.

Non necessariamente a tutti i potenziali la differenziazione è chiara.

In figura 4c sono riportati gli andamenti di C ed $1/R$ della maglia relativa allo strato compatto contro il potenziale applicato E. I punti vuoti sono relativi al solo monostrato di DOPS, quelli pieni allo stesso monostrato dopo l'aggiunta di SRE. Non si osservano effetti significativi relativamente alla capacità del monostrato, mentre la conducibilità è molto alterata soprattutto a potenziali più negativi.

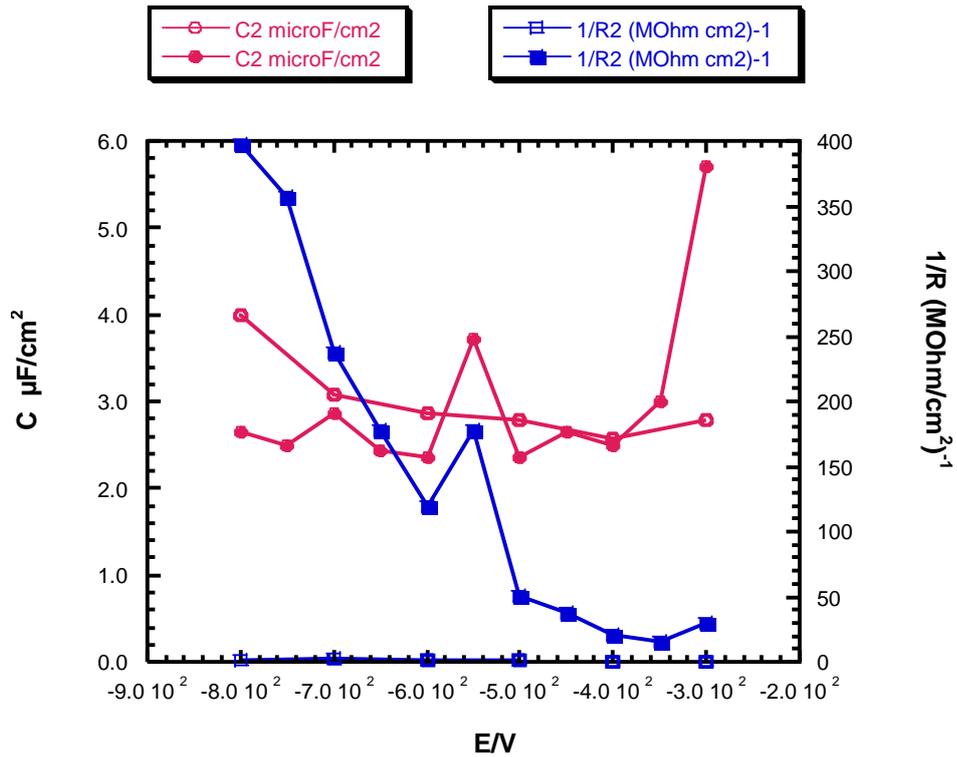


Fig. 4c Andamento di C vs E e 1/R vs E della maglia RC relativa allo strato compatto delle code.

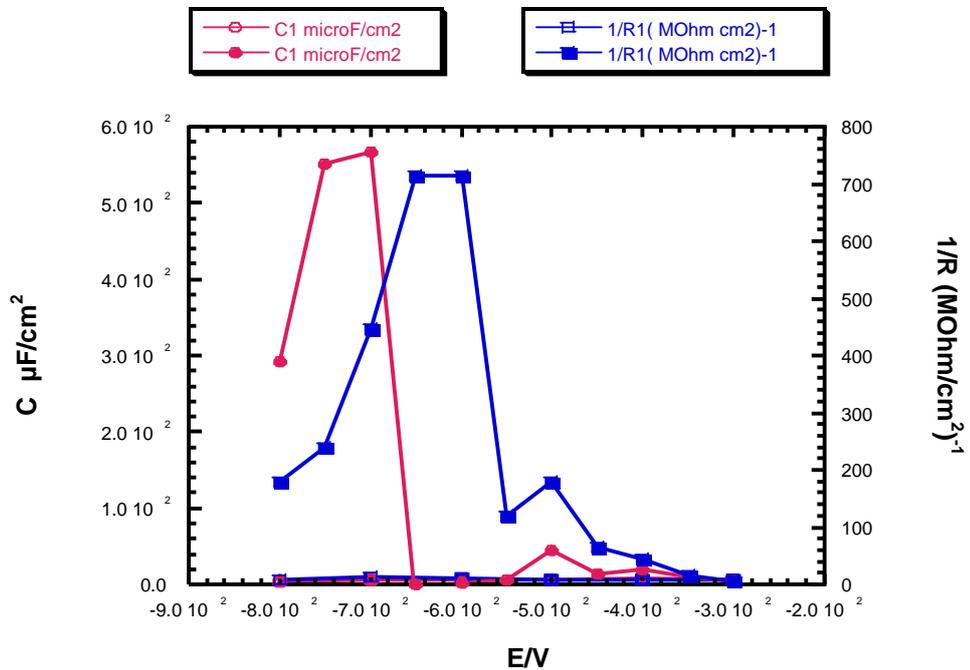


Fig. 4d Andamento di C vs E e 1/R vs E della maglia RC attribuita alla regione delle teste polari.

Riportiamo anche l'andamento di C vs E e $1/R$ vs E della maglia RC attribuita alla regione delle teste polari (fig. 4d). Sia C che $1/R$ aumentano ai potenziali più negativi.

Dall'andamento di questo grafico si può ipotizzare una forte interazione con le teste polari da parte della SRE, che interagendo con più teste adiacenti determina la formazione di zattere lipidiche fortemente aggregate, lasciando invece regioni del monostrato non aggregate e meno compatte.

Tale effetto sembra confermato anche dalla variazione della resistenza dello strato compatto, anche se il valore della capacità dello stesso, nonché la sua impermeabilità nei confronti dello ione cadmio indica che questo strato non è fortemente perturbato nella sua zona più prossima alla superficie del metallo.

Capitolo 5

Conclusioni

Abbiamo studiato le interazioni del ciclodepsipeptide siringomicina con monostrati fosfolipidici supportati da mercurio quali modelli sperimentali di membrana cellulare.

Monostrati di DOPC e DOPS puri o modificati per incorporazione di steroli e studiati al variare del pH della soluzione di lavoro hanno dimostrato di essere un ottimo modello biomimetico al fine di mettere in luce le interazioni che un polipeptide contrae con la regione superficiale di una membrana cellulare.

I risultati ottenuti ci permettono di affermare che la siringomicina si lega alle teste polari grazie ad interazioni elettrostatiche tra le cariche presenti sull'anello peptidico della SRE e quelle presenti sui gruppi protonabili delle teste polari dei fosfolipidi. L'interazione non è rapida e prevede presumibilmente anche l'inserimento della breve coda alchilica della SRE nella regione idrofobica del monostrato. Questo processo multistadio richiede la presenza di strutture supramolecolari altamente ordinate come dimostra il fatto che nel caso di monostrati di DOPC ottenuti e caratterizzati in presenza di SRE si hanno due diversi comportamenti attribuibili ad una probabile presenza di strutture ordinate all'interfase soluzione/ N_2 che incorporano la SRE, mentre regioni meno ordinate danno luogo a monostrati privi di SRE. Purtroppo l'esiguità dell'effetto osservato non permette un esauriente trattamento con la spettroscopia d'impedenza elettrochimica.

Nel caso di monostrati di DOPS le considerazioni fatte sulla densità di carica sulla superficie del monostrato e quelle relative alla carica presente sull'anello peptidico sembrano contrastare con la natura elettrostatica delle interazioni tra SRE e superficie del monostrato. Le interazioni risultano infatti massime quando sia le teste polari che il peptide hanno una carica decisamente positiva. Va però sottolineato come le considerazioni effettuate sul grado di protonazione delle teste polari della DOPS siano strettamente legate alla struttura ordinata del monostrato ed alla particolare collocazione dei piani sui quali si trovano i diversi gruppi protonabili. Il modello da noi utilizzato tiene infatti conto della collocazione su piani diversi della distribuzione superficiale della carica che, generando differenze di potenziale

localizzate, determina un pH locale più acido di quello presente in soluzione giustificando una precoce protonazione delle teste polari. E' ipotizzabile che l'inserimento della SRE alteri la collocazione delle densità di carica determinando una protonazione minore delle teste della DOPS. Quanto detto è confermato dal fatto che in questo caso monostrati formati in presenza di SRE hanno picchi praticamente assenti ad indicare che in questo caso la SRE riesce ad interagire efficacemente anche col materiale lipidico all'interfase che ragionevolmente non è completamente protonato a pH 3.

Per quanto riguarda la permeabilizzazione nei confronti dello ione Cd^{2+} è sempre quasi trascurabile e frutto presumibilmente di interazioni aspecifiche. La permeabilizzazione aumenta all'aumentare del pH della soluzione al contrario di quanto osservato per l'effetto della SRE che è minimo a pH 7.

Ragionevolmente però a pH 3 la carica sulle teste polari e la SRE adsorbita e carica positivamente esercitano un effetto repulsivo nei confronti del catione bivalente che quindi non rappresenta una sonda appropriata per questo studio.

Infine, per quanto riguarda l'effetto della presenza di steroli incorporati nel monostrato non è significativo se non nel caso di Erg in DOPC. Questo effetto, seppure ridotto può essere ragionevolmente associato all'attività antimicotica della SRE poiché l'Erg è uno sterolo caratteristico delle membrane dei funghi.

Parallelamente alle misure su monostrati sono state fatte misure preliminari su bistrati fosfolipidici supportati in modo da verificare quanto gli effetti osservati su monostrati e quindi relativi alle interazioni SRE/superficie della membrana siano estendibili a processi di penetrazione e formazione di canali ionici attraverso i bistrati. Anche in questo caso abbiamo osservato che la presenza di DOPS ed un pH acido facilitano l'incorporazione della SRE a potenziali prossimi ai valori fisiologici. Si formano canali voltaggio dipendenti la cui selettività deve ancora essere verificata. In prospettiva ci proponiamo di verificare maggiormente nei dettagli il meccanismo di formazione di canali transmembranari su bistrati supportati.

Bibliografia

- [1] K. Reder-Christ, Y. Schmidt, M. Dörr, H.G. Sahl, M. Josten, J. M. Raaijmakers, H. Gross, G. Bendas, “Model membrane studies for characterization of different antibiotic activities of lipopeptides from *Pseudomonas*”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818 (2012) 566–573;
- [2] Carol L. Bender, Francisco Alarcón-Chaidez, Dennis C. Gross, “*Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases”, *Microbiol. Mol. Biol.*, 63(2) (1999) 266-292;
- [3] M. Dalla Serra, G. Faggioli, P. Nordera, I. Bernhart, C. Della Volpe, D. Di Giorgio, A. Ballio, G. Menestrina, “The Interaction of Lipodepsipeptide Toxins from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with Biological and Model Membranes: A Comparison of Syringotoxin, Syringomycin, and Two Syringopeptins”, *MPMI*, 12(5) (1999) 391–400;
- [4] G. Menestrina, M. Coraiola, V. Fogliano, A. Fiore, I. Grgurina, A. Carpaneto, F. Gambale, M. Dalla Serra, “Antimicrobial lipodepsipeptides from *Pseudomonas* spp: a comparison of their activity on model membranes. In *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens. Biology and Genetic”, S.N. Iacobellis, editor. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (NL)*, (2003) 185-98;
- [5] K. N. Sorensen, K.-H. Kim, J. Y. Takemoto, “In vitro antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*”, *Antimicrob. Agents Chemother*, 40 (1996) 2710–2713;
- [6] A. Segre, R.C. Bachman, A. Ballio, F. Bossa, I. Grgurina, N.S. Iacobellis, G. Marino, P. Pucci, M. Simmaco, J.Y. Takemoto, “The structure of syringomycins A1, E, and G”, *FEBS*, 255 (1989) 27–31;
- [7] M. Anselmi, T. Eliseo, L. Zanetti-Polzi, M. R. Fullone, V. Fogliano, A. Di Nola, M. Paci, I. Grgurina, “Structure of the lipodepsipeptide syringomycin E in phospholipids and sodium dodecylsulphate micelle studied by circular dichroism, NMR spectroscopy and molecular dynamics”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808 (2011) 2102–2110;
- [8] P. Lavermicocca, N.S. Iacobellis, M. Simmaco, A. Graniti, “Biological properties and spectrum of activity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins”, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 50 (1997) 129–140;
- [9] K.N. Sorensen, K.-H. Kim, J.Y. Takemoto, “In vitro antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*”, *Antimicrob. Agents Chemother*, 40 (1996) 2710–2713;

- [10] E. Buber, A. Stindl, N.L. Acan, T. Kocagoz, R. Zocher, "Antimycobacterial activity of lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv *syringae* B359", *Nat. Prod.Lett.*, 16 (2002) 419–423;
- [11] M.L. Hutchison, M.A. Tester, D.C. Gross, "Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in trans membrane ion flux: A model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction", *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8 (1995) 610–620;
- [12] A.M. Feigin, J.Y. Takemoto, R. Wangspa, J.H. Teeter, J.G. Brand, "Properties of voltage-gated ion channels formed by syringomycin E in planar lipid bilayers", *J. Membr. Biol.*, 149 (1996) 41–47;
- [13] Y.A. Kaulin, L.V. Schagina, S.M. Bezrukov, V.V. Malev, A.M. Feigin, J.Y. Takemoto, J.H. Teeter, J.G. Brand, "Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in bilayer lipid membranes", *Biophys. J.*, 74 (1998) 2918–2925;
- [14] C. Latoud, F. Peypoux, G. Michel, "Interaction of iturin A, a lipopeptide antibiotic, with *Saccharomyces cerevisiae* cells: influence of the sterol membrane composition", *Can. J. Microbiol.*, 36 (1990) 384–389;
- [15] P.A. Backman, J. E. DeVay, "Studies on the mode of action and biogenesis of the phytotoxin syringomycin", *Physiol. Plant Pathol.*, 1 (1971) 215–234;
- [16] A.M. Feigin, L.V. Schagina, J.Y. Takemoto, J.H. Teeter, J.G. Brand, "The effect of sterols on the sensitivity of membranes to the channel forming antifungal antibiotic, syringomycin E", *Biochim. Biophys. Acta*, 1324 (1997) 102–110;
- [17] L.V. Schagina, Y.A. Kaulin, A.M. Feigin, J.Y. Takemoto, J.G. Brand, V.V. Malev, "Properties of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in lipid bilayers: dependence on electrolyte concentration in the bathing solution", (in Russian) *Biol. Membr.*, 15 (1998) 410–425;
- [18] V.V. Malev, L.V. Schagina, P.A. Gurnev, J.Y. Takemoto, E.M. Nestorovich, S.M. Bezrukov, "Syringomycin E Channel: A Lipidic Pore Stabilized by Lipopeptide?", *Biophysical Journal*, 82 (2002) 1985–1994;
- [19] O.S. Ostroumova, P.A. Gurnev, L.V. Schagina, S.M. Bezrukov, "Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning", *FEBS*, 581 (2007) 804–808;
- [20] M. Montal, P. Mueller, "Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69(12) (1972) 3561-3566;
- [21] R. Guidelli, G. Aloisi, L. Becucci, A. Dolfi, M.R. Moncelli, F. Tadini Buoninsegni, "New directions and challenges in electrochemistry.90 Bioelectrochemistry at metal/water interfaces", *J. Electroanal.Chem.*, 504 (2001) 1 –28;

- [22] C. Peggion, F. Formaggio, C. Toniolo, L. Becucci, M.R. Moncelli, R. Guidelli, "A peptide-tethered lipid bilayer on mercury as a biomimetic system", *Langmuir*, 17 (2001) 6585– 6592;
- [23] L. Becucci, R. Guidelli, Q. Liu, R.J. Bushby, S.D. Evans, "A biomimetic membrane consisting of a polyethyleneoxythiol monolayer anchored to mercury with a phospholipid bilayer on top", *J. Phys.Chem.*, B 106 (2002) 10410– 10416;
- [24] L.M. Williams, S.D. Evans, T.M. Flynn, A. Marsh, P.F. Knowles, R.J. Bushby, N. Boden, "Kinetics of the unrolling of small unilamellar phospholipid vesicles onto self-assembled monolayers", *Langmuir*, 13 (1997) 751– 757;
- [25] H. Lang, C. Duschl, H. Vogel, "A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces", *Langmuir*, 10 (1994) 197–210;
- [26] M.R. Moncelli, L. Becucci, S.M. Schiller, "Tethered bilayer lipid membranes self-assembled on mercury electrodes", *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 161-167;
- [27] 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.]
- [28] M. R. Moncelli, L. Becucci, R. Guidelli, "The Intrinsic pK_a Values for Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, and Phosphatidylserine in Monolayers Deposited on Mercury Electrodes", *Biophysical Journal*, 66 (1994) 1969-1980;
- [29] V. Malev, O S. Ostroumova, J.Y. Takemoto, L. V. Schagina. "Voltage-Dependent Ion Channels Induced by Cyclic Lipodepsipeptides in Planar Lipid Bilayers: Structure, Properties, and Resemblance to Native Channels", *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 8 (2008) 60-101;
- [30] M.R. Moncelli, L. Becucci, "A novel model of the hanging mercury drop electrode", *J. Electroanal. Chem.*, 433 (1997) 91-96;

Ringraziamenti

Ringrazio la Dott.ssa Lucia Becucci, il Dott. Massimo Innocenti ed il Prof. Rolando Guidelli per avermi permesso di affrontare questo progetto e per il supporto ricevuto durante la stesura della tesi.

Ringrazio i miei amici, i miei compagni di corso, ma soprattutto i miei genitori , che mi sono stati vicini durante questi anni.