



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di Scienze

Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in

Scienze Chimiche

Uso di tecniche elettrochimiche per lo studio
delle interazioni tra il lipodepsipeptide SP₂₅ e
membrane biomimetiche.

An electrochemical investigation of the
interaction of the lipidepsipeptide SP₂₅ with
tethered BLMs.

Relatore:

Prof.ssa Maria Luisa Foresti

Correlatore:

Dott.ssa Lucia Becucci

Candidato:

Marta Rossi

Anno Accademico:

2013/2014

Indice

Capitolo 1: Introduzione.....	4
1.1 Lipodepsipeptidi.....	4
1.2 Siringopeptina 25 (SP ₂₅).....	7
1.3 Membrane biomimetiche.....	9
1.4 Scopo della Tesi.....	13
Capitolo 2: Parte sperimentale.....	14
2.1 Tecniche elettrochimiche.....	14
2.1.1 Tecniche in corrente continua.....	15
2.1.1.1 Voltammetria ciclica.....	15
2.1.1.2 Cronocoulombometria.....	17
2.1.2 Tecniche in corrente alternata.....	19
2.1.2.1 Voltammetria AC con risoluzione di fase.....	19
2.1.2.2 Spettroscopia d'impedenza elettrochimica.....	20
2.2 Assetto sperimentale.....	25
2.2.1 Cella elettrochimica e camera di lavoro.....	25
2.2.2 Preparazione e caratterizzazione di monostrati lipidici supportati da mercurio.....	27
2.2.3 Preparazione e caratterizzazione di bistrati lipidici supportati da mercurio.....	29
2.2.4 Reagenti.....	30
Capitolo 3: Risultati.....	32
3.1 Studio dell'effetto di SP ₂₅ su monostrati supportati da Hg.....	32
3.1.1 Monostrati di DOPS.....	33
3.1.1.1 Misure a pH=7.....	33
3.1.1.2 Misure a pH=5.4.....	34
3.1.1.3 Misure a pH=3.....	36
3.1.2 Monostrati di DOPC.....	38
3.1.2.1 Misure a pH=7.....	38
3.1.2.2 Misure a pH=5.4.....	39
3.1.2.3 Misure a pH=3.....	40
3.1.3 Monostrati formati a contatto con una soluzione di CaCl ₂	41
3.1.3.1 Monostrati di DOPC.....	41

3.1.3.2 Monostrati di DOPS.....	42
3.2 Studio dell'effetto di SP ₂₅ su bistrati supportati da Hg.....	44
3.2.1 Bistrati DOPS/DPTL.....	45
3.2.1.1 Misure a pH=7.....	45
3.2.1.2 Misure a pH=5.4.....	50
3.2.1.3 Misure a pH=3.....	52
3.2.2 Bistrati DOPS/DPTL.....	56
3.2.2.1 Misure a pH=7.....	56
3.2.2.2 Misure a pH=5.4.....	61
3.2.2.3 Misure a pH=3.....	64
Capitolo 4: Discussione dei risultati.....	68
Capitolo 5: Conclusioni.....	72

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Lipodepsipeptidi

Pseudomonas syringae pv. *syringae* è un batterio fitopatogeno che infetta un'ampia varietà di piante, anche di interesse agricolo, tra cui: riso, grano, piante di fagiolo, agrumi, frutti col nocciolo, etc ^[1] [fig. 1.1 (a)]. Molti ceppi sintetizzano due gruppi diversi di lipodepsipeptidi (LDP): i nonapeptidi, al quale appartengono le siringomicine, le siringostatine, le siringotossine e le pseudomicine; e le siringopeptine, con una catena peptidica di lunghezza variabile di 22 (SP₂₂) e 25 (SP₂₅) residui amminoacidici^[2].

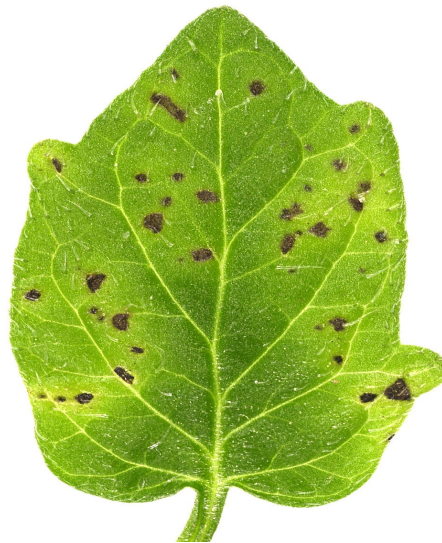


Fig. 1.1 (a) Foglia di pomodoro colpita da *pseudomonas syringae* pv. *syringae*

I nonapeptidi sono costituiti da un acido grasso, di lunghezza variabile, recante un gruppo ossidrilico in posizione 3, e differiscono tra loro per la sequenza amminoacidica. L'acido grasso è legato ad un residuo di serina in posizione N-terminale tramite un legame ammidico e, tale residuo di serina, è legato al C-terminale di una 4-clorotreonina attraverso un legame estereo, formando un anello lattonico. Inoltre le siringomicine, le

siringostatine, le siringotossine e le pseudomicine contengono tre aminoacidi non naturali (l'acido 2,3-deidroamminobutirrico, l'acido 3-idrossi aspartico e la 4-clorotreonina) sul carbonio terminale, come mostrato in figura 1.1 (b).

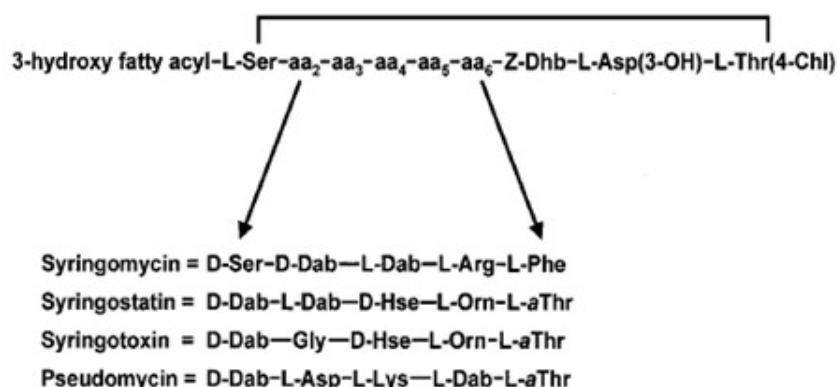
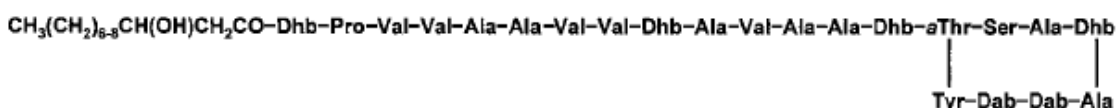


Fig. 1.1 (b) Struttura dei nonapeptidi siringomicina, siringostatina, siringotossina e pseudomicina. Essi differiscono nella sequenza aminoacidica nelle posizioni 2 e 6. Asp(3-OH), acido 3-idrossi aspartico; Dab, acido 2,4-diamminobutirrico; Dhb, acido 2,3-deidroamminobutirrico; Hse omoserina; O, ornitina; Thr(4-Chl), 4-clorotreonina; aThr, allotreonina.

La struttura delle siringopeptine è composta da tre parti: un acido grasso, non ramificato, che può essere 3-idrossidecanoico o 3-idrossidodecanoico, una catena peptidica idrofobica, costituita da 22 (SP₂₂) o 25 (SP₂₅) residui, di cui otto formano un anello lattonico nella parte C-terminale, come esemplificato in figura 1.1(c). Sono molecole basiche, nelle quali la catena peptidica ciclizzata contiene due residui carichi positivamente (acido 2,4-diamminobutanoico)^[3].

SP22



SP25

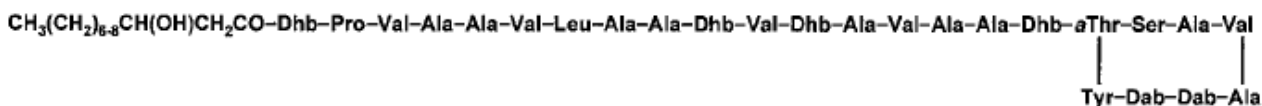


Fig.1.1(c) Struttura delle siringopeptine SP₂₂ e SP₂₅. L'acido grasso può essere sia un acido 3-idrossidecanoico o 3-idrossidodecanoico; Dab, acido 2,4-diamminobutirrico; Dhb, acido 2,3-deidroamminobutirrico; aThr, allotreonina.

Entrambi i gruppi di metaboliti possono essere implicati come fattori virulenti nelle malattie indotte dal batterio. I nonapeptidi hanno marcata attività antimicotica e sono potenzialmente utili per lo sviluppo di agenti per il controllo di patologie che colpiscono la popolazione umana e le piante. Le siringopeptine, invece, hanno una maggiore fitotossicità ed una ridotta attività antimicotica rispetto alle siringomicine e alle

siringostatine. Ambedue i gruppi di lipodepsipeptidi sembrano avere come bersaglio di azione primario la membrana plasmatica, anche se ci sono indicazioni sperimentali che indicano che le SPs sono in grado di interagire con le membrane di alcuni organelli quali vacuoli e mitocondri, portando alla formazione di canali ionici transmembranari^[4]. Tali canali sono oligomerici, formati da quattro fino a sette monomeri, e causano un aumento della permeabilità di membrana, che dipende sia dalla concentrazione del peptide sia dalla composizione lipidica presa in esame. Secondo il modello sviluppato in seguito ad uno studio su vescicole, il processo di permeabilizzazione può essere suddiviso in tre stadi: (I) i monomeri di LDP si legano e si incorporano nella membrana lipidica; (II) i monomeri si aggregano per formare oligomeri di grandezza crescente; (III) oligomeri che raggiungono una grandezza critica portano alla formazione del canale^[5]. Inoltre, esperimenti su monostrati suggeriscono che i lipodepsipeptidi possono interagire con le membrane lipidiche senza la necessità di uno specifico recettore^[2].

1.2 Siringopeptina 25 (SP₂₅)

La siringopeptina 25 (SP₂₅) è un lipodepsipeptide prodotto da *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, un agente patogeno delle piante.

È costituita da due parti: una catena peptidica di 25 residui amminoacidici con un anello ciclico di 8 amminoacidi nella parte C-terminale ed un acido grasso 3-idrossilico a lunga catena, non ramificato, attaccato al carbonio terminale della catena peptidica. La struttura tridimensionale in soluzione acquosa, ottenuta dall'interpretazione dei suoi spettri NMR bidimensionali, è caratterizzata da tre regioni strutturali: un loop, che include residui dalla Pro2 alla Val6, una zona elicoidale (ad α -elica sinistrorsa) alla quale appartengono amminoacidi dall'Ala8 all'Ala15, e un ζ -lattone, contenente residui dalla Thr18 alla Tyr25. SP₂₅ è una molecola basica, infatti la catena peptidica ciclizzata contiene due residui carichi positivamente (acido 2,4-diamminobutanoico)^[6] [fig.1.2(a)].

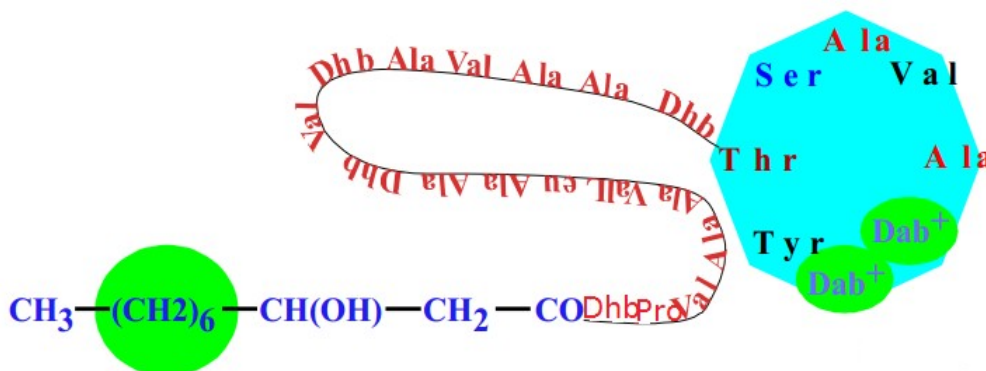


Fig.1.2(a) Struttura della SP₂₅, nella quale è presente un lunga catena idrofobica e due residui carichi positivamente localizzati sull'anello lattone; questi due elementi sono responsabili della stabilizzazione dei pori che si formano nelle membrane cellulari e intracellulari^[4].

Essa ha un'elevata fitotossicità, pertanto dà un contributo significativo all'attività virulenta del batterio *P.syringae*, coinvolto nelle patologie di un'ampia varietà di piante. Il principale bersaglio di azione di SP₂₅ è probabilmente la membrana plasmatica delle cellule delle piante, ma molte evidenze sperimentali indicano che anche le membrane intracellulari possono essere colpite. Tale fatto è suggerito da: 1) la capacità di destabilizzare e attraversare la membrana plasmatica, 2) la chiusura degli stomi delle foglie indotta dalla tossina, 3) gli effetti evidenti indotti da SP₂₅ con dosi submicromolari su mitocondri isolati^[5].

Essa inibisce batteri Gram-positivi e funghi come la *Candida albicans* e la *Saccharomyces cerevisiae*. È stato ipotizzato che la sua interazione con la membrana dell'agente patogeno determini un flusso in ingresso di ioni Ca^{2+} ed in uscita di ioni K^+ . L'uptake di Ca^{2+} è stato valutato usando ceppi di KZ1-1C, nel cui ambiente di coltura viene aggiunto CaCl_2 radiattivo ed in seguito SP_{25} . È stata quindi misurata la radiattività con un liquid scintillation counter. L'efflusso di K^+ , invece, è stato determinato valutando la variazione di concentrazione extracellulare di K^+ , attraverso l'uso della spettroscopia di assorbimento atomico.

SP_{25} ha un grado di inibizione di crescita, relativo alle specie fungine citate, paragonabile a SP_{22A} , anche se minore rispetto ai nonalipodepsipeptidi^[6].

SP_{25} può formare canali ionici in membrane planari lipidiche, e la conduttività dei pori risulta essere 40 pS in NaCl 0,1 M. L'apertura dei canali è fortemente dipende dal voltaggio e richiede l'applicazione di potenziali negativi sul lato della membrana dove la tossina viene aggiunta. È stato stimato che circa 2,6 cariche elementari passano attraverso la membrana durante il processo di apertura e chiusura di ciascun canale e, quando è presente NaCl, i pori, il cui raggio minimo risulta essere 0,4 nm, sono tre volte più permeabili nei confronti degli anioni rispetto ai cationi. M.Dalla Serra ed altri, usando una miscela lipidica di L- α -fosfatidilcolina, L- α -fosfatidiletanolamina e L- α -fosfatidilserina, hanno osservato che la velocità con cui i canali si aprono, durante l'applicazione di un potenziale negativo, aumenta tanto più quanto più è negativo il valore del potenziale applicato. Al contrario, quando vengono impiegate differenze di potenziale positive, i pori si chiudono, anche se più lentamente di come si aprono^[3].

Tali canali, nei protoplasti del tabacco, sono facilmente attraversati da cationi divalenti, come Ca^{2+} , e ciò porta alla morte della cellula^[7].

Un meccanismo di azione simile è stato osservato anche nei globuli rossi, nei quali viene provocata l'emolisi. L'aggiunta di zuccheri alla soluzione ha un effetto protettivo, poiché quest'ultimi sono troppo ingombranti per riuscire ad attraversare il canale e tendono a chiuderlo.

Le siringopetine sono molto attive anche su LUV (Large Unilamellar Vesicles), risultando più attive in presenza di stigmasteroli, un po' meno attive in presenza di ergosteroli, mentre mostrano una completa inattività in presenza di colesterolo e latosterolo^[2].

SP_{25} e SP_{22} hanno, inoltre, proprietà biosurfattanti, che sono state dimostrate dall'abbassamento della tensione interfacciale dell'acqua (HPLC-grade water)^[7] a seguito della loro aggiunta.

1.3 Membrane Biomimetiche

Le membrane biologiche sono strutture complesse che delimitano sia la cellula, sia i suoi componenti interni, quali il nucleo, i mitocondri, i plastidi, ma sono anche implicate nella formazione di strutture cellulari interne (reticolo endoplasmatico rugoso, reticolo endoplasmatico liscio, apparato di Golgi, vacuoli, lisosomi e tilacoidi). Sono costituite da un doppio strato fosfolipidico (con le teste polari, idrofile, verso l'esterno e le code apolari, idrofobe, verso l'interno) e da proteine che possono essere immerse nella struttura lipidica oppure essere legate alla superficie interna, come illustrato in figura 1.3 (a). Le membrane biologiche sono dotate di permeabilità selettiva per mezzo della quale regolano l'omeostasi cellulare, svolgendo, pertanto, un ruolo chiave in tutti i processi di vita della cellula.

A causa della loro complessità, sono state messe a punto diverse tecniche che mirano alla ricostruzione di modelli sperimentali di membrane, per studiarne la loro interazione con composti in grado di impartire proprietà chimiche, fisiche o meccaniche particolari. Tali modelli prendono il nome di membrane biomimetiche.

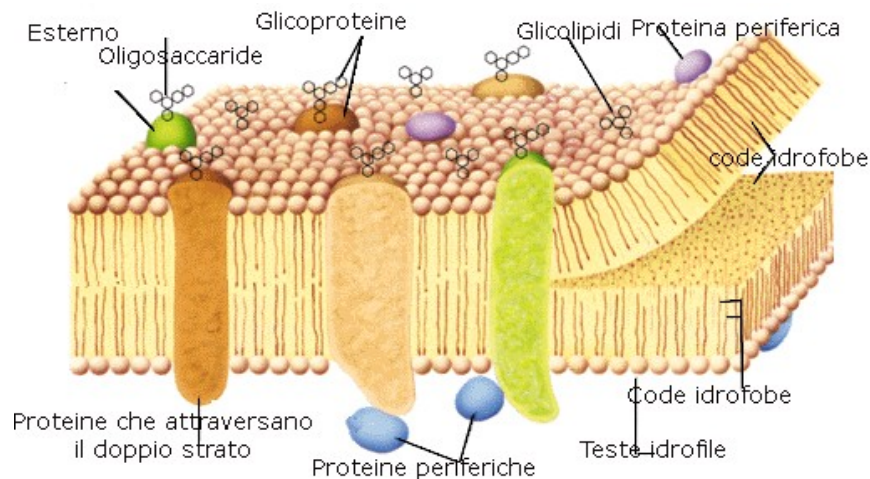


Fig. 1.3(a) Rappresentazione di una membrana plasmatica costituita da un doppio strato fosfolipidico e da proteine transmembrana e periferiche, spesso presenti in forma glicosilata.

Questi sistemi modello possono essere suddivisi in tre gruppi: self-assembled monolayer (SAMs), bilayer lipid membranes (BLMs) e tethered bilayer lipid membranes (tBLMs).

Monostrati lipidici di particolare interesse sono quelli supportati da mercurio, che vengono ottenuti spandendo sulla superficie di una soluzione acquosa il lipide sciolto in pentano e immergendovi l'elettrodo a goccia stazionaria di mercurio. Questa procedura dà luogo ad un monostrato lipidico auto-assemblato, con le code idrocarburiche dirette verso la superficie idrofoba del mercurio e le teste polari poste verso la soluzione. Il supporto, privo di difetti, e la completa assenza di solvente nel film impartiscono maggiore stabilità meccanica, resistenza ai campi elettrici e riproducibilità rispetto a sistemi analoghi. Tale disposizione, che si genera spontaneamente, è dovuta al fatto che il mercurio è il metallo con il minore carattere idrofilico e presenta solo una debole affinità per l'ossigeno delle molecole di acqua. Così le teste polari si dispongono verso la fase acquosa per raggiungere un minimo nella loro energia libera di adsorbimento e possono formare, in tal modo, legami ad idrogeno con le molecole di acqua adiacenti. Inoltre, grazie allo stato liquido del supporto, questi modelli di membrana hanno un'elevata fluidità, che permette al lipide di muoversi sul piano della membrana. I SAMs possono essere usati per studiare l'interazione di peptidi e di proteine periferiche con le teste polari di biomembrane, valutando l'effetto di cambiamenti della composizione ionica e del pH nella soluzione. Tale tecnica non è però adatta allo studio di proteine intrinseche, che necessitano della struttura di un bistrato per essere incorporate in forma funzionalmente attiva. Tali modelli di membrana possono anche essere impiegati per capire le proprietà riguardanti la formazione di canali ionici da parte di piccoli peptidi, quali la gramicidina e l'anfotericina B, verificando se essi permettono l'elettroriduzione di cationi inorganici come Tl^+ [8,9] e Cd^{2+} [10,11]. Nel range di potenziali dove si ha la stabilità del monostrato lipidico, questi ioni possono penetrare solo se sono presenti pori formati dai peptidi, e possono solo in questo caso ridursi con formazione di amalgama.

Un altro modello molto utilizzato sono le Bilayer Lipid Membranes, BLMs. Esse si preparano usando una cella contenente una soluzione elettrolitica, divisa in due compartimenti da un setto in teflon, avente un piccolo foro. Deponendo una goccia di lipide in un solvente opportuno sul foro, lo strato di soluzione lipidica diventa progressivamente più sottile. Si ha così la formazione di un film bimolecolare di spessore 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. In tal modo si ottiene un bistrato lipidico interposto tra due soluzioni acquose.

La maggior parte delle funzioni svolte dalle membrane biologiche dipendono dalla

differenza di potenziale, $\Delta\phi$, che si origina tra le due superfici del bistrato fosfolipidico, non essendo simmetrica la distribuzione di cariche elettriche sulle due superfici. Queste densità di carica generano due diversi strati diffusi nelle soluzioni che si trovano in contatto con il bistrato stesso, ma la densità di carica presente su ogni lato della membrana non viene necessariamente controbilanciata da una carica uguale e opposta presente nel rispettivo strato diffuso. Non si generano, pertanto, due interfasie indipendenti, che darebbero luogo ad una differenza di potenziale transmembranario costantemente nulla. La condizione di elettroneutralità si verifica soltanto considerando l'intero sistema, costituito dalla membrana e dai due strati diffusi adiacenti.

Deboli variazioni del potenziale transmembrana all'interno delle membrane biologiche sono alla base del funzionamento di canali ionici. Infatti, misurando la dipendenza dalla differenza di potenziale transmembrana di molti processi cellulari se ne può chiarire il meccanismo. Si possono quindi considerare le membrane biologiche e i loro modelli come interfasie elettrificate.

Le BLMs possono essere modificate inserendo proteine in grado di formare canali ionici, che possono essere voltaggio dipendenti o non; nel primo caso, applicando al sistema una variazione di potenziale transmembrana, le proteine sono in grado di modificare la loro conformazione rendendo il bistrato permeabile agli ioni e alle molecole di acqua, nel secondo caso, invece, il bistrato è reso permeabile permanentemente.

Uno svantaggio di tali membrane biomimetiche è dovuto al fatto che hanno elevata fragilità meccanica ed elettrica: sono fortemente sensibili alle vibrazioni meccaniche e collassano per $\Delta\phi$ superiori a $\pm 100-150$ mV.

Le tethered bilayer lipid membranes, tBLMs, sono un'evoluzione delle BLMs, in cui il bistrato fosfolipidico è ancorato ad una superficie metallica, garantendone una migliore robustezza. L'ancoraggio viene realizzato legando un monostrato tiolipidico alla superficie di un metallo nobile, come Au, Ag o Hg. Le molecole di tiolipide sono formate da uno spaziatore idrofilico, costituito da una catena polipetidica^[12] o poliossietilenica^[13,14], che termina, da una parte con un gruppo sulfidrilico o disolfuro, per l'ancoraggio al supporto, mentre dall'altra è legato covalentemente a due catene alchiliche, le quali simulano le catene idrocarburiche di un fosfolipide. Il monostrato tiolipidico espone la sua parte idrofoba; sul lato opposto rispetto alla superficie del metallo, su questa superficie modificata, si adsorbono, per mezzo di interazioni idrofobiche, le catene alchiliche di un secondo monostrato lipidico auto-assemblato^[12,13]. Lo spaziatore, rendendo idrofilico lo spazio interposto tra la superficie del supporto metallico (elettrodo) ed il bistrato lipidico, fa

sì che la membrana biomimetica possa incorporare peptidi o proteine^[15]. Infatti, per formare canali ionici funzionalmente attivi, è necessario che la membrana che li incorpora sia a contatto, su entrambi i lati, con un mezzo acquoso o almeno idrofilico [fig.1.2 (b)].

Il tiolipide utilizzato per le nostre misure è denominato DPTL (DiPhytanoilTetraethylenoxyLipoic acid). I lipidi usati sono la dioleoilfosfadilserina (DOPS) e la dioleoilfosfadilcolina (DOPC); sono stati scelti questi lipidi perché sia DOPC che 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 carico negativamente a pH fisiologico e la sua carica superficiale può essere modulata variando il pH della soluzione.

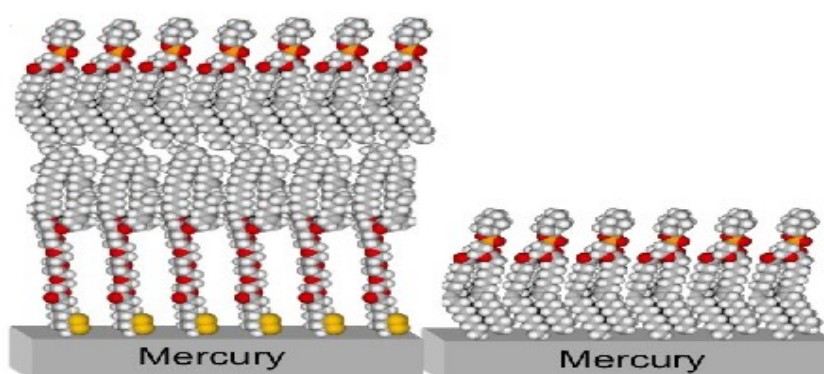


Fig.1.2(b) Rappresentazione di un bistrato fosfolipidico auto-assemblato su Hg (a destra) e di un monostrato fosfolipidico auto-assemblato su Hg (a sinistra).

Per le nostre ricerche è stato impiegato Hg come supporto poiché, a differenza di Au, ha una fluidità tale da conferire ai sistemi autoassemblati una mobilità simile a quella delle membrane a doppio strato lipidico interposte tra le due soluzioni acquose (BLMs), ma al contempo le dota di una maggiore robustezza e resistenza ai campi elettrici. Inoltre l'uniformità della superficie di Hg consente la formazione di un bistrato 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. Tuttavia Au ha il vantaggio di essere utilizzato anche nelle tecniche di analisi superficiale e si presta molto bene nelle applicazioni come biosensore, proprio grazie alla sua natura solida.

1.2 Scopo della tesi

Questo lavoro di tesi ha avuto come obiettivo quello di studiare, mediante l'uso di tecniche elettrochimiche applicate alla caratterizzazione di mono- e bi-strati fosfolipidici supportati, le interazioni della SP₂₅ con modelli biomimetici di membrana cellulare.

Mediante l'uso di monostrati si è quindi cercato di determinare le modalità di interazione del lipodepsipeptide con la superficie della membrana cellulare.

L'uso di bistrati ha invece avuto l'obiettivo di elucidare il meccanismo alla base delle interazioni della SP₂₅ con l'intera struttura della membrana cellulare, che sembra portare alla formazione di canali ionici.

La combinazione dei risultati può permettere di chiarire la natura dei canali che la SP₂₅ è nota formare nelle membrane cellulari con particolare riferimento alla selettività ionica, alle modalità di apertura, voltaggio dipendenti o meno, ed all'influenza che hanno, sul processo di formazione dei canali, la densità di carica superficiale e la composizione lipidica della membrana, nonché il pH e la composizione elettrolitica della soluzione.

Capitolo 2

Parte sperimentale

2.1 Tecniche elettrochimiche

In tutte le tecniche utilizzate durante il nostro lavoro sperimentale, è stato impiegato un sistema potenziostatico a tre elettrodi: un elettrodo di riferimento Ag/AgCl (0,1 M), un controelettrodo di Pt e un elettrodo di lavoro a goccia stazionaria di mercurio (HMDE, Hanging Mercury Drop Electrode).

Le tecniche elettrochimiche utilizzate consistono tutte nell'applicare una differenza di potenziale al sistema in esame e nel misurare la corrente che fluisce nel sistema a seguito della perturbazione che si impone dall'esterno.

Le tecniche utilizzate possono essere classificate, sulla base della natura del segnale di potenziale applicato, in:

- Tecniche in corrente continua, quali voltammetria ciclica (VC) e cronocoulombometria;
- Tecniche in corrente alternata, quali voltammetria AC con risoluzione di fase e spettroscopia d'impedenza elettrochimica.

Le tecniche in corrente continua consistono nell'imporre al sistema una variazione di potenziale lineare (VC) o istantanea (cronocoulombometria) e nel misurare il flusso di corrente che ne deriva. La corrente misurata può essere di natura capacitiva o faradica e misura il flusso di elettroni o ioni a seguito della perturbazione, determinando un accumulo di carica all'interfase o permettendo il trasferimento elettronico in un processo redox. Tale corrente dipende da:

- valore del potenziale applicato;
- rapidità di variazione del potenziale;
- capacità del sistema di "sopportare" il flusso di carica. In particolar modo, nel nostro caso, la presenza di un serbatoio idrofilo a contatto con il metallo, di dimensione finita, fa sì che il flusso di ioni che penetrano nella membrana attraverso un canale

non possa protrarsi nel tempo, ma sia limitato dalla saturazione dello stesso strato idrofilico da parte degli ioni permeanti.

Le tecniche in corrente alternata sovrappongono ad una variazione del potenziale di base, lineare o discreta, un segnale sinusoidale di piccola ampiezza e frequenza fissa o variabile. Si misura quindi la corrente che fluisce nel sistema alla stessa frequenza del segnale sinusoidale di potenziale applicato. Ci si può limitare a misurare tale corrente fissando l'angolo di sfasamento rispetto al potenziale stesso, separando in questo modo contributi di diversa natura. Ad esempio misurando la corrente in fase, ossia sfasata di un angolo zero rispetto al potenziale, si misurerà un contributo di natura resistiva, al contrario misurando la cosiddetta corrente in quadratura, ossia il contributo alla corrente sfasato di 90° rispetto al segnale sinusoidale di potenziale, si avrà una misura del contributo capacitivo.

In alternativa si può misurare la corrente nonché l'angolo di sfasamento rispetto al potenziale.

In entrambe i casi, tecniche di questo tipo permettono di caratterizzare il sistema sulla base delle proprietà dielettriche. In particolar modo permettono di distinguere flussi ed accumuli di carica attraverso ed al confine rispettivamente dei diversi strati dielettrici in cui può essere scomposto il sistema in esame. Questo tipo di caratterizzazione permette di separare i contributi alla corrente a carico dei diversi strati dielettrici, utilizzando circuiti equivalenti in grado di simularne le proprietà. La dipendenza delle proprietà dielettriche dal potenziale di base permette di caratterizzare processi voltaggio-dipendenti.

Stadi di riorientamento di dipoli presenti nella struttura molecolare a contatto con l'elettrodo, nonché processi di adsorbimento e permeabilizzazione sono adeguatamente caratterizzabili. Infine la possibilità, fornita dalla spettroscopia d'impedenza elettrochimica, di usare frequenze variabili di sei ordini di grandezza permette di caratterizzare processi che coinvolgono movimenti di carica, la cui rapidità può variare di altrettanti ordini di grandezza.

2.1.1 Tecniche in corrente continua

2.1.1.1 Voltammetria ciclica

La voltammetria è una tecnica elettrochimica in cui si registra una corrente in funzione del potenziale applicato. Nella voltammetria ciclica si effettua una scansione lineare del

potenziale con forma triangolare [mostrato in figura 2.1.1.1(a)], ovvero si parte da un potenziale iniziale V_i e si arriva ad un potenziale finale V_f con una certa velocità, tornando poi, con la stessa velocità, al potenziale iniziale. Si ottiene un voltammogramma che ha un andamento ciclico.

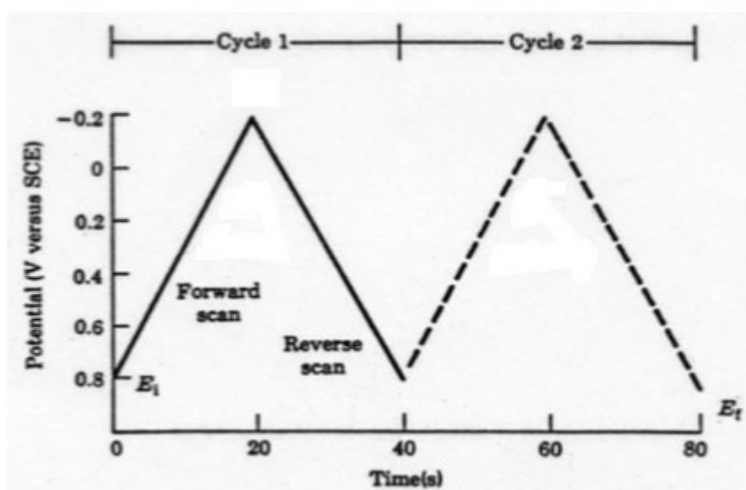


Fig. 2.1.1.1(a) Onda triangolare del potenziale, V , vs il tempo, t .

Questa tecnica è molto utilizzata nello studio di specie che risultano elettroattive all'interno dell'intervallo di potenziali esaminato, infatti fornisce informazioni sulla cinetica del processo redox in esame, il numero di elettroni coinvolti, gli eventuali stadi della reazione e il potenziale formale di coppia, E_0 .

In monostrati o bistrati fosfolipidici auto-assemblati su mercurio, in assenza di processi faradici, la corrente registrata è solo di tipo capacitivo, dovuta al fatto che l'interfase elettrodo/soluzione si comporta come un condensatore elettrico avente una capacità differenziale C . Una variazione del potenziale, V , comporta una variazione della carica Q accumulata sulle armature del condensatore che rappresenta l'interfase elettrodo/soluzione. La capacità differenziale è definita come:

$C = dQ/dV$. Considerando che C sia indipendente dal potenziale, la corrente capacitiva i_c , dovuta alla variazione di potenziale V nel tempo con una velocità costante $v = dV/dt$, sarà data da:

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

Pertanto, in assenza di processi faradici, la curva di andata e quella di ritorno del

voltammogramma ciclico sono parallele e la loro separazione è uguale a $2Cv$. Inoltre, in assenza di processi faradici, il voltammogramma risulta inclinato e la pendenza è pari a $1/R$ (dalla legge di Ohm, $i=V/R$).

In questo lavoro di tesi sono state effettuate misure di voltammetria ciclica, sia prima che dopo l'aggiunta di SP_{25} , anche in presenza di ioni elettroattivi. Tale procedura è stata adottata per verificare se il monostrato o il bistrato, impermeabili agli ioni inorganici in assenza del peptide, mostravano una qualche permeabilità a seguito dell'aggiunta di SP_{25} . Il range di potenziali a cui è stata eseguita la scansione va da -0.2 a -0.8 V, nel caso di monostrati, e da -0.2 a -1.2 , nel caso di bistrati, con velocità di scansione di 0.05 V/s e 0.01 V/s, per verificare se, al variare della velocità, il profilo del voltammogramma rimaneva invariato o presentava picchi aggiuntivi. Infatti, maggiore è il tempo in cui il monostrato/bistrato si trovano ad un dato potenziale (velocità di scansione bassa), maggiore può essere l'entità della carica che riesce a penetrare all'interno dello stesso, laddove siano presenti movimenti di carica lenti. Pertanto, con velocità di scansione di 0.01 V/s, si possono osservare picchi, corrispondenti a processi più lenti di passaggio di carica, che a velocità di 0.05 V/s possono non essere apprezzati.

2.1.1.2 Cronocoulombometria

La cronocoulombometria è una tecnica elettrochimica nella quale si misura la carica che fluisce, attraverso il sistema in esame, in funzione del tempo. Consiste nell'effettuare un salto di potenziale da un valore iniziale V_i , al quale il sistema è stabile, ad un valore finale V_f .

La carica che viene rilevata è dovuta a vari contributi:

- corrente capacitiva, dovuta al fatto che, variando il potenziale applicato, di un valore V , il doppio strato, assimilabile alle armature di un condensatore, si carica di una quantità pari a $Q=C\Delta V$ (C = capacità del condensatore).
- corrente faradica, dovuta a specie elettroattive in soluzione;
- corrente faradica, dovuta a specie elettroattive adsorbite sulla superficie dell'elettrodo.

Oltre alla corrente capacitiva, dovuta al caricamento dell'interfase, si può avere anche una corrente determinata dal flusso di ioni dalla soluzione alla superficie dell'elettrodo, nel caso in cui siano presenti canali ionici nella membrana. Tale flusso è compensato da un flusso

uguale e contrario nel circuito esterno, in modo da mantenere costante la differenza di potenziale all'interfase. Questo tipo di corrente si protrae per tempi più lunghi rispetto a quella prodotta dal caricamento del doppio strato, che invece si esaurisce in tempi inferiori al ms), e quindi risulta essere facilmente distinguibile.

Nel nostro caso tale corrente è comunque limitata alla saturazione dello strato idrofilico a contatto col metallo da parte degli ioni permeanti.

2.1.2 Tecniche in corrente alternata

2.1.2.1 Voltammetria AC con risoluzione di fase

In questa tecnica voltammetrica si ha una scansione lineare del potenziale di base, al quale viene sovrapposto un potenziale sinusoidale di frequenza opportuna e piccola ampiezza (5-10 mV picco-picco). L'ampiezza deve essere necessariamente piccola, poiché, se così non fosse, il potenziale di base verrebbe perturbato e la risposta in corrente non sarebbe lineare con il potenziale. Nel caso di monostrati e bistrati lipidici supportati, le misure sono state effettuate applicando un potenziale sinusoidale di frequenza 75 Hz e ampiezza 10 mV, sovrapposto al potenziale di base che varia nell'intervallo in cui il sistema è stabile. La corrente che viene registrata è anch'essa sinusoidale ed ha la stessa frequenza del potenziale alternato, ma è sfasata rispetto ad esso di un angolo ϕ , detto angolo di fase. Il valore di quest'ultimo è caratteristico del tipo di elemento circuitale a cui può essere assimilato il sistema in esame, e può variare dagli 0° , determinato da un contributo puramente resistivo, ai -90° , nel cui caso l'elemento sia puramente capacitivo. Nelle misure effettuate è stata registrata solo la componente in quadratura della corrente, ovvero quella sfasata di 90° rispetto al potenziale sinusoidale, che è, in prima approssimazione, direttamente proporzionale alla capacità del bistrato/monostrato. Il valore della capacità è stato ricavato a partire dalla corrente misurata, previa taratura con l'uso di un condensatore di precisione.

In figura 2.1.2.1 (a) sono state riportate, a titolo esemplificativo, le curve voltammetriche di un monostrato di DOPS a contatto con una soluzione di KCl 0,1M, in assenza e in presenza di SP₂₅. In tutti e due i profili si nota una regione di minimo, in cui il monostrato è più compatto e la corrente varia di poco al variare del potenziale, e una regione caratterizzata da picchi, specifici per ogni fosfolipide, dove il monostrato perde la propria compattezza a causa di riorientamenti molecolari caratteristici che ne aumentano la permeabilità. Aggiungendo alla DOPS il peptide si osserva un cambiamento dei profili di corrente, con restringimento della regione di minimo e quasi scomparsa della regione dei picchi. L'alterazione del profilo della curva è una misura delle entità delle interazioni tra peptide e sistema auto-organizzato. Le alterazioni della regione di minimo indicano

un'interazione del peptide con la regione delle code idrocarburiche, mentre un'alterazione del profilo dei picchi è indice di un'interazione superficiale con le teste^[16].

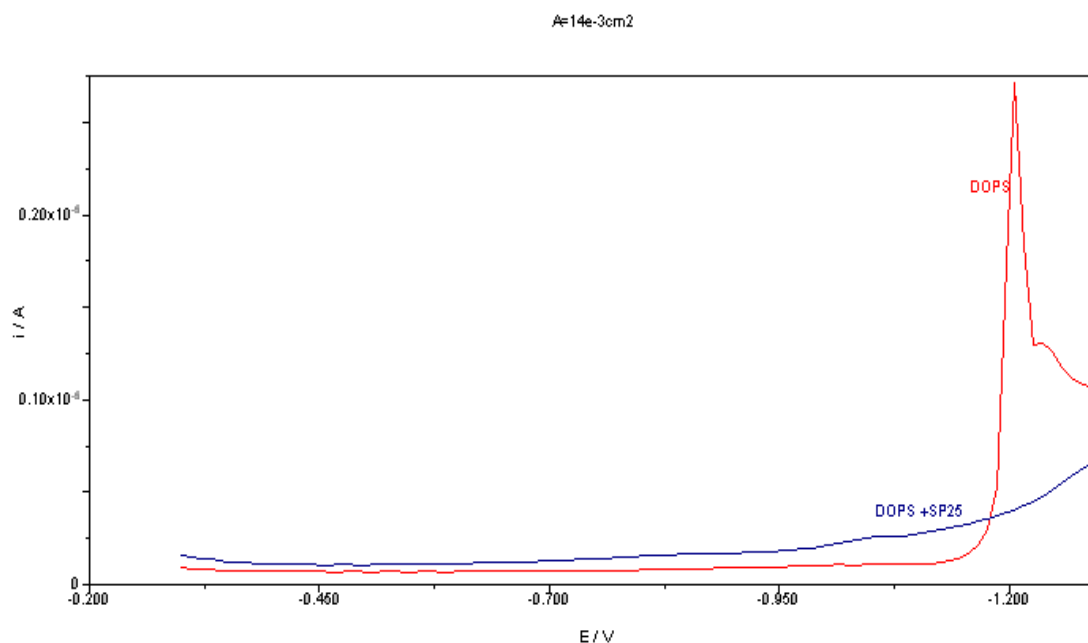


Fig. 2.1.2.1(a) Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPS . Curva rossa: monostrato di DOPS; curva blu: monostrato di DOPS in presenza di SP₂₅.

2.1.2.2 Spettroscopia d'impedenza elettrochimica

Questa tecnica consiste nell'applicare al sistema in esame un potenziale di base al quale si sovrappone un segnale sinusoidale di piccola ampiezza (5-10 mV picco-picco), per avere una risposta lineare. Si misura quindi il valore della corrente che fluisce con la stessa frequenza del segnale di potenziale applicato e, di tale corrente, viene anche registrato lo sfasamento rispetto al segnale di potenziale stesso. La frequenza può essere variata da 10^5 a 10^{-3} Hz e le misure ripetute a potenziali di base diversi. Il sistema di acquisizione traduce la risposta di corrente in valori di impedenza, Z , e ammettenza, Y' , caratteristici del sistema esaminato. I dati possono essere valutati considerando elettrodo/monostrato (o bistrato)/ soluzione una serie di strati consecutivi caratterizzati da proprietà dielettriche diverse. L'interfase può essere rappresentata con un "circuito equivalente" caratterizzato da una serie di maglie RC, costituite da un condensatore di capacità C in parallelo ad una resistenza R , che rappresentano ognuno uno degli strati in cui si può

scomporre l'interfase. Ad esempio un monostrato supportato da mercurio, in contatto con una soluzione elettrolitica, in prima approssimazione, può essere rappresentato nel modo seguente [fig.2.1.2.2 (a)]:

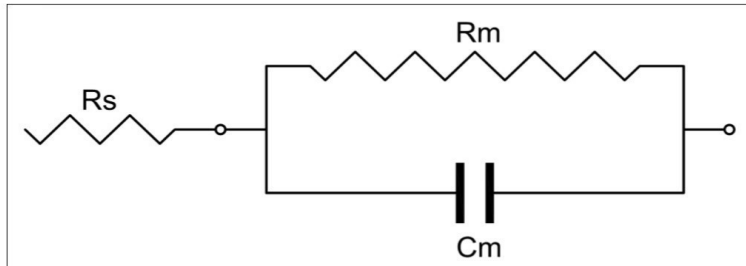


Fig. 2.1.2.2(a) Circuito equivalente utilizzato per rappresentare un monostrato/bistrato fosfolipidico in cui R_s rappresenta la resistenza della soluzione, mentre R_m e C_m sono rispettivamente la resistenza e la capacità della membrana.

L'impedenza totale è data dalla somma delle singole impedenze in serie:

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

Z_s rappresenta l'impedenza della soluzione che, essendo assimilabile ad un elemento puramente resistivo, ovvero in fase con il potenziale applicato ($\varphi=0$), è uguale alla resistenza della soluzione, R_s ;

Z_m è l'impedenza del monostrato (o bistrato) che, per due elementi in parallelo, risulta essere:

$$\frac{1}{Z_m} = \frac{1}{Z(R_m)} + \frac{1}{Z(C_m)} \quad (2)$$

Dato che l'impedenza di un elemento resistivo è uguale alla sua resistenza e l'impedenza di un elemento capacitivo ha solo componente immaginaria ed è sfasata di -90° , si ottiene:

$$\frac{1}{Z_m} = \frac{1}{R_m} + i \omega C_m \quad (3)$$

$$Z_m = \frac{R_m}{1 + i \omega R_m C_m} \quad (4)$$

dove ω è la frequenza angolare del segnale sinusoidale, pari a $2\pi f$. L'impedenza totale risulterà:

$$Z_{tot} = R_s + \frac{R_m}{1 + i\omega R_m C_m} \quad (5)$$

$$Z_m = R_s + \frac{R_m(1 - i\omega R_m C_m)}{(1 + i\omega R_m C_m)(1 - i\omega R_m C_m)} \quad (6)$$

$$Z_{tot} = R_s + \frac{R_m}{1 + \omega^2 R_m^2 C_m^2} - i \frac{\omega R_m^2 C_m}{1 + \omega^2 R_m^2 C_m^2} = Z' - iZ'' \quad (7)$$

Z' rappresenta la componente reale, componente in fase, dell'impedenza totale, mentre $-Z''$ definisce la parte immaginaria, componente in quadratura, di Z_{tot} . I risultati di spettroscopia d'impedenza possono essere riportati in vari modi a seconda del tipo di informazione che si vuole ricavare. Per un'analisi qualitativa si usa generalmente il diagramma di Bode, dove vengono riportate in ordinata il logaritmo del modulo dell'impedenza totale, $\log Z$, e l'angolo di fase φ , e in ascissa il logaritmo della frequenza, $\log f$. Per un monostrato o bistrato supportato da mercurio il grafico dell'angolo di fase ha una tipica forma a campana [fig. 2.1.2.2 (b)].

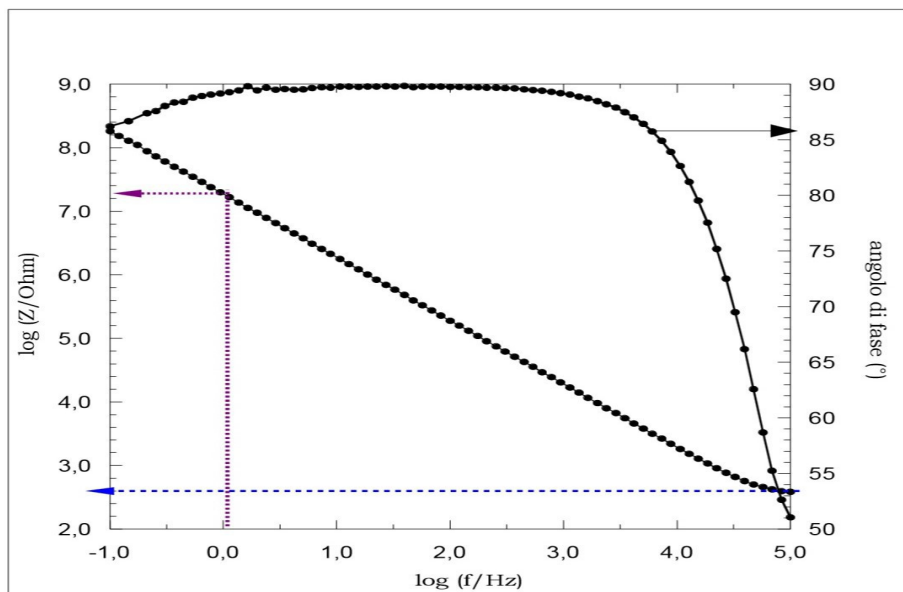


Fig. 2.1.2.2(b) Diagramma di Bode per un bistrato DOPC/DPTL al potenziale di -0.4 V.

Nella zona ad alte frequenze, $\log f=5$, il secondo e il terzo termine dell'eq.(7) possono essere trascurati, infatti ω compare al denominatore al quadrato, quindi Z_{tot} coincide con la resistenza della soluzione. Per un sistema ideale si può dimostrare che, se si ha un controllo puramente resistivo, l'andamento di $\log Z$ vs $\log f$ è una retta parallela all'asse

delle ascisse; tracciando la retta tangente al tratto terminale della curva e parallela all'asse x si può così estrapolare il valore di R_s . Per frequenze inferiori non è possibile trascurare i termini relativi alla maglia. La corrente, dato che la maglia in esame è costituita da una resistenza in parallelo con un condensatore, fluirà attraverso l'elemento a minor impedenza, che caratterizza il profilo del diagramma. Un monostrato/bistrato ben organizzato presenta una resistenza molto elevata, quindi nel range di frequenze compreso tra 10^4 Hz e 1 Hz R_m avrà l'impedenza maggiore e la corrente sarà quindi capacitiva. Come si può osservare dal grafico di Bode, l'angolo di fase è circa 90° in questo intervallo.

$$Z_c = \frac{-i}{\omega C}$$

Si ricava con semplici calcoli che, per $\log f=0$, l'impedenza totale è proporzionale al reciproco della capacità, potendo ricavare il valore della capacità di membrana C_m (freccia viola). A basse frequenze (minori di 1 Hz), il contributo capacitivo all'impedenza della maglia diventa via via maggiore rispetto a quello resistivo.

Conseguentemente la corrente fluisce preferenzialmente attraverso la resistenza R_m , il cui valore può essere ottenuto estrapolando il valore di $\log Z$ alle basse frequenze. In questo studio sono state utilizzate misure di spettroscopia di impedenza su monostrati e bistrati supportati da mercurio prima e dopo l'aggiunta di SP_{25} . Tali misure sono necessarie per valutare inizialmente la corretta formazione del monostrato/bistrato e per capire come il peptide interagisce con questi.

Un particolare tipo di grafico, che permette di evidenziare i diversi strati dielettrici presenti, è il grafico del modulo, in cui è riportato in ascissa, $\omega Z'$ e, in ordinata, $\omega Z''$ [fig. 2.1.2.2(c)] .

Per ogni strato dielettrico si ottiene una semicirconferenza, che ha un raggio pari a $\frac{1}{2C_m}$ e centro nel punto di coordinate ($\omega Z'=0$, $\omega Z''= 1/2C_m$), la cui equazione risulta essere:

$$\left(\omega Z'' - \frac{1}{2C}\right)^2 + (\omega Z')^2 = \left(\frac{1}{2C}\right)^2 \quad (8)$$

Il valore, ω_{max} , della frequenza angolare ω in corrispondenza del punto massimo della semicirconferenza si ottiene considerando che in questo punto Z' e Z'' sono uguali tra loro. Pertanto dall'eq.(8) segue:

$$\omega_{max} = \frac{1}{RC} \quad (9)$$

In una membrana biomimetica priva di canali ionici, le resistenze dei vari strati dielettrici sono relativamente alte, mentre le capacità sono relativamente basse. L'incorporazione di peptidi che formano canali ionici riduce la resistenza dei vari strati, consentendo agli ioni inorganici di attraversarli. La capacità, invece, aumenta, poiché l'accumulo di ioni di un dato segno nelle zone di transizione tra uno strato dielettrico e quelli contigui aumenta in presenza di pori.

Invece, se i peptidi interagiscono preferenzialmente con le teste polari della membrana possono disporsi sopra di essa, portando alla formazione di uno strato dielettrico aggiuntivo, che si diversifica dagli altri per il valore della costante dielettrica, per la diversa idrofobicità e per la costante di tempo $RC=1/\omega_{max}$. I massimi delle semicirconferenze appartenenti a diversi strati possono, pertanto, cadere in zone diverse del grafico del modulo ω , per lo meno, sovrapporsi soltanto in parte ed essere caratterizzabili.

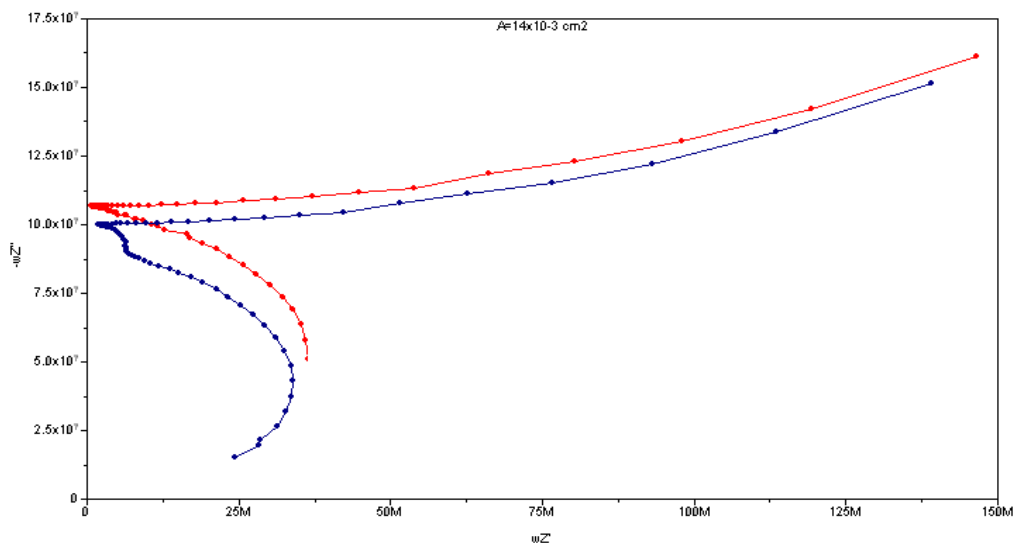


Fig. 2.1.1.2(c) Diagramma del modulo registrato a -0.5 V. La curva rossa identifica un bistrato il cui monostrato distale è DOPS; quella blu identifica il bistrato in presenza di SP₂₅.

2.2 Assetto sperimentale

2.2.1 Cella elettrochimica e camera di lavoro

Le misure sono state condotte in una cella in vetro Pirex avente 5 coni a smeriglio, tre dei quali sono necessari per l'alloggiamento degli elettrodi e due per le aggiunte durante le misure. È stato utilizzato un sistema potenziostatico a tre elettrodi:

- elettrodo di lavoro (3): elettrodo a goccia stazionaria di mercurio (HMDE, Hanging Mercury Drop Electrode) [fig. 2.2.1 (a)], costituito da un capillare di vetro (Metrohm 6.1209.010) attraverso il quale il mercurio fuoriesce a seguito dell'avanzamento di un pistone rettificato, del diametro di un millimetro, all'interno di un pozzetto contenente mercurio. Quest'ultimo è posto sopra il capillare stesso. L'avanzamento del pistone è regolato da una vite micrometrica con display digitale (Mitutoyo Digimatic 350-341), posta in testa all'elettrodo. L'area della goccia di mercurio è stata determinata, previa taratura (0.200 mm di avanzamento del pistone, corrispondono ad un'area di 0.014 cm^2).



Fig. 2.2.1(a) cella elettrochimica: (1) elettrodo di riferimento Ag/AgCl; (2) gorgogliatore attorno al quale è avvolto il controelettrodo di Pt; (3) elettrodo di lavoro HMDE; (4) coni usati per le aggiunte.

- elettrodo di riferimento (1): elettrodo Ag/AgCl (in questo lavoro sono stati usati come elettroliti KCl 0.1M e CaCl₂ 0.05M) costituito da un filo di Ag ricoperto da AgCl, depositato elettrochimicamente. Il suo potenziale è costante, infatti dipende unicamente dalla concentrazione di Cl⁻ presente in soluzione;
- elettrodo ausiliario o contro elettrodo (2): filo di Pt attorcigliato attorno ad un gorgogliatore a due vie, attraverso il quale viene fatto gorgogliare N₂ per mantenere la soluzione disareata durante il corso delle misure. Infatti O₂, se presente disciolto in soluzione, dà interferenza, elettroriducendosi nel campo di potenziali applicato. La disareazione si realizza facendo gorgogliare N₂ in cella per circa mezz'ora, e mantenendo in seguito un battente di tale gas al di sopra della soluzione.

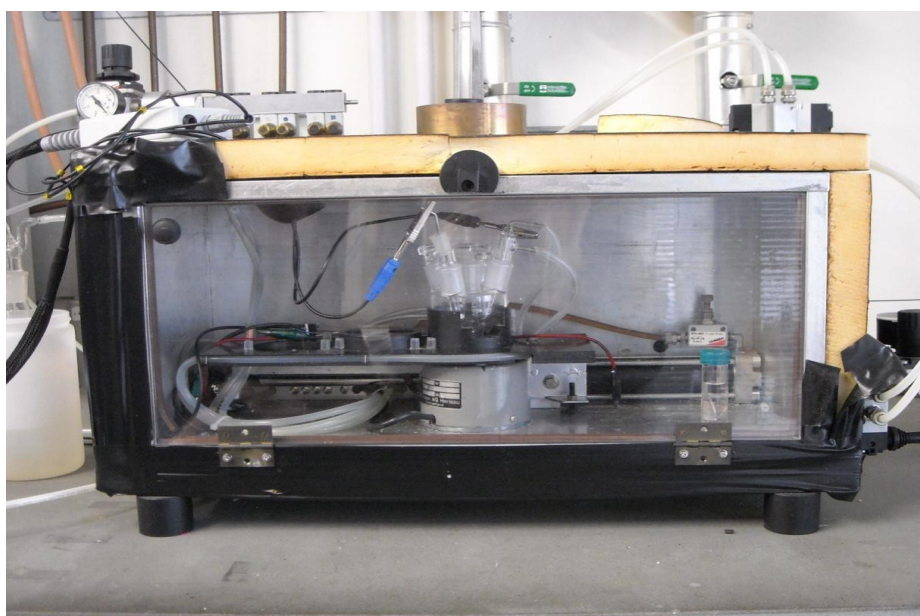


Fig. 2.2.1(b) Camera di lavoro termostata a 25 °C con cella elettrochimica posta all'interno.

L'intero sistema è posto in una camera termostata [(fig. 2.2.1 (b))] alla temperatura di 25 ± 0.1 °C, affinché non si abbiano variazioni del volume della goccia dovute alla dilatazione termica. La camera è dotata di un sistema oleopneumatico per lo spostamento dell'elettrodo di lavoro, necessario per garantire un movimento regolare, in modo da evitare la caduta della goccia durante l'immersione dell'elettrodo nella soluzione. Tutto il sistema è posto sopra un tavolo antivibrante per diminuire il rumore nelle misure, dovuto a vibrazioni meccaniche.

2.2.2 Preparazione e caratterizzazione di monostrati lipidici supportati da mercurio

Le operazioni eseguite per la preparazione del monostrato sono:

1. Termostatazione e disaerazione della soluzione di elettrolita di supporto (KCl 0.1M o CaCl₂ 0.05M), facendo gorgogliare N₂ per almeno 45 minuti. Successivamente, interrotto il flusso del gas, se ne mantiene solo un battente sulla superficie della soluzione, in modo che O₂ non interferisca durante il corso delle misure;
2. spandimento di 50 µL dell'opportuna miscela lipidica in pentano (1 mg/mL), all'interfaccia soluzione acquosa/N₂ dell'elettrolita di supporto. Avvenuta l'evaporazione del solvente (pochi minuti), all'interfase soluzione acquosa/N₂ si forma uno strato lipidico;
3. passaggio dell'elettrodo di lavoro attraverso il film lipidico, sotto il controllo di un sistema oleopneumatico;
4. caratterizzazione per via elettrochimica del monostrato lipidico che si auto-organizza sulla goccia di mercurio, con le code alchiliche rivolte verso la superficie idrofobica del metallo [fig. 2.2.2 (a)].

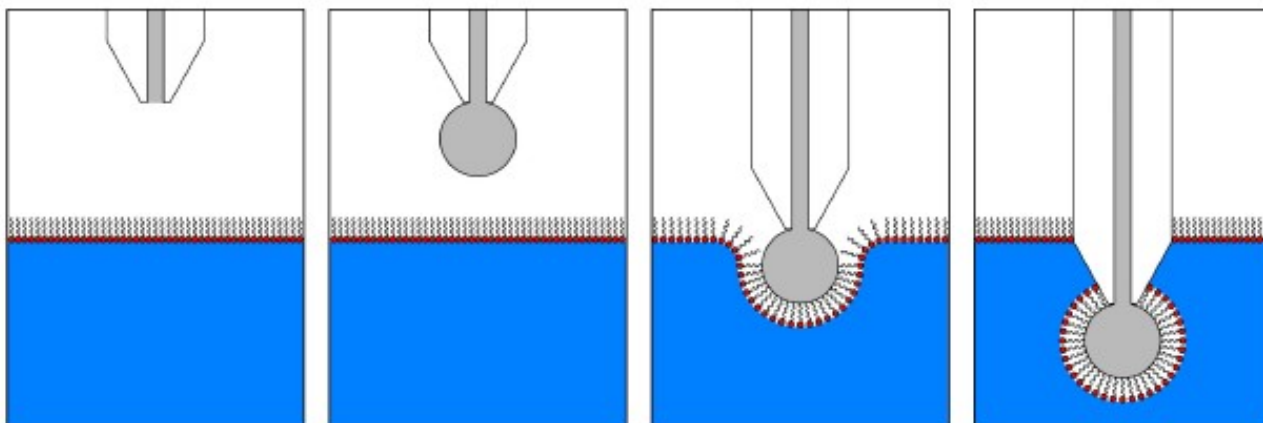


Fig. 2.2.2(a) Rappresentazione degli stadi della formazione di un monostrato auto-assemblato su Hg.

Sono state utilizzati come componenti lipidici DOPC (Dioleoilfosfatidilcolina) e DOPS (Dioleoilfosfatidilserina), le cui strutture sono riportate in fig. 2.2.2(b).

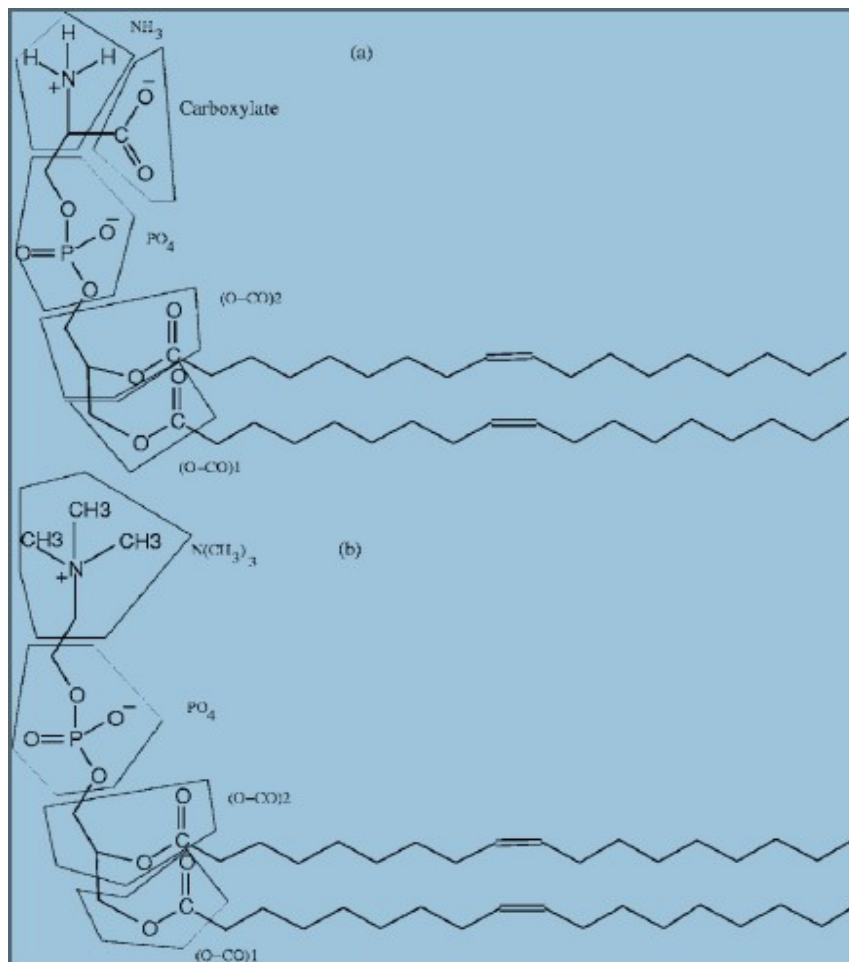


Fig. 2.2.2(b) Strutture di DOPC (in alto) e DOPS (in basso).

La qualità del film lipidico ottenuto sulla goccia di mercurio è verificato tramite voltammetria AC con risoluzione di fase, registrando dieci curve nel campo di potenziali compreso tra -0.2 V e -0.8 V. L'ottenimento di tali curve stabili e riproducibili è indice di un monostrato ben formato, la cui capacità, C , si calcola misurando la corrente nel minimo della curva, i_{\min} (A), passando da esso al valore di C mediante taratura. I valori ottimali sono intorno a 1.70-1.75 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Infine si esegue una caratterizzazione attraverso l'uso della spettroscopia d'impedenza, effettuando le misure in un arco di frequenze comprese tra 10^5 e 10^{-1} Hz e variando il potenziale di base da -0.3 V a -0.8 V. La corretta formazione del monostrato può essere valutata dal grafico di Bode, che deve presentare un angolo di circa 90° nell'arco di frequenze comprese tra 10^3 e 1 Hz.

2.2.3 Preparazione e caratterizzazione di bistrati lipidici supportati da mercurio

La preparazione dei bistrati fosfolipidici è descritta nei seguenti passaggi:

- 1) la soluzione elettrolitica (KCl 0,1M) viene termostata e disareata facendo gorgogliare N₂ per almeno 45 minuti e successivamente, chiuso il flusso del gas, ne viene lasciato un battente sopra la soluzione per tutto il corso delle misure;
- 2) si spandono sulla superficie della soluzione 50 µL di una soluzione lipidica in pentano (1 mg/mL);
- 3) si lava l'elettrodo in etanolo, eliminando qualche goccia;
- 4) si immerge l'elettrodo in una soluzione di DPTL in etanolo (0,5 mg/mL) e si fa una goccia, che viene lasciata per dieci minuti nella soluzione alcolica. Con questa procedura il tiolipide si lega covalentemente alla superficie del mercurio, grazie all'affinità S-Hg, permettendo la formazione di un monostrato-autorganizzato, avente le code alchiliche rivolte verso l'esterno. Si lascia quindi asciugare il monostrato di DPTL sotto flusso di N₂ per due minuti;
- 5) si immerge la goccia ricoperta da DPTL attraverso il film lipidico presente sulla superficie della soluzione di lavoro. In tal modo il monostrato, precedentemente spanto, si auto-organizza su DPTL, rivolgendo le catene alchiliche verso le catene fitaniliche del tiolipide e le teste polari verso la soluzione. Si ha la formazione di un bistrato ancorato a mercurio [(fig. 2.2.3 (a))].

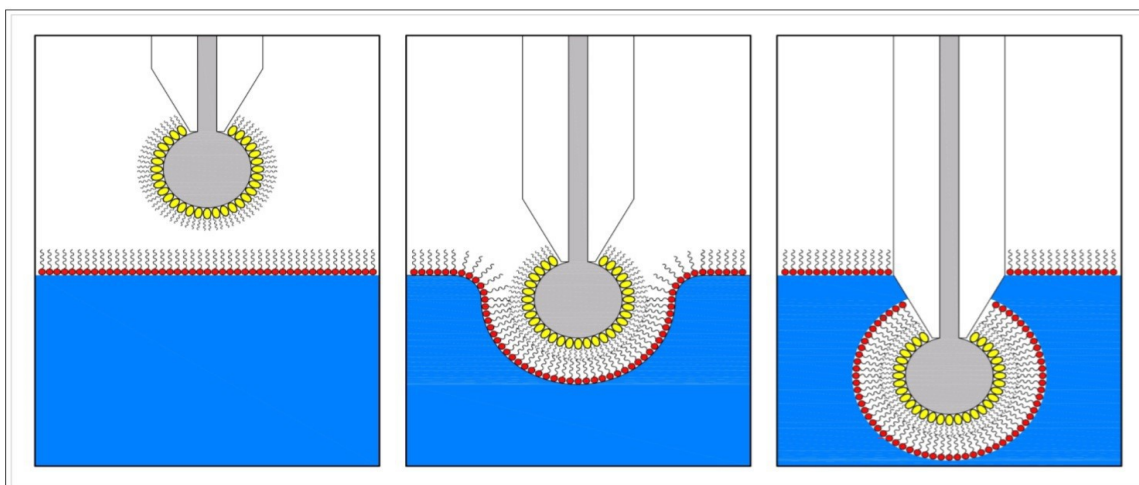


Fig. 2.2.3(a) Rappresentazione della formazione di un bistrato auto-assemblato su Hg.

Per stabilizzare il bistrato è necessario eseguire 15 scansioni di voltammetria AC con risoluzione di fase nell'arco di potenziali compreso tra -0.2 V e -1.2 V, ottenendo un profilo di corrente contro il potenziale costante quando il bistrato è ben formato. Esso è caratterizzato da bassi valori di capacità, tipicamente dell'ordine di $0.55\text{-}0.65 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. In seguito si procede con le misure di spettroscopia d'impedenza che vengono eseguite in un campo di frequenze compreso fra 10^5 e 10^{-1} Hz, variando il potenziale di base da -0.3 V a -1 V. Anche in tal caso si usa il diagramma di Bode per valutare qualitativamente la bontà del bistrato.

2.2.4 Reagenti

- Estere 2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol-1-tetraetilene-glicole-D,L- α dell'acido lipoico (DPTL), fornito dal Prof. Adrian Schwan (University of Guelph, Canada), in etanolo(0,5 mg/mL);
- Dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), in cloroformio (10 mg/mL);
- Dioleoilfosfatidilserina (DOPS), Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), in cloroformio (10 mg/mL);
- $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, Merck;
- TINO_3 , Sigma-Aldrich;
- KCl Suprapur Merck, trattato in muffola a 500°C per eliminare le impurezze organiche;
- HCl, Merck;
- KH_2PO_4 , Merck;
- K_2HPO_4 , Merck;

-CaCl₂, Merck

-Siringopeptina 25 (SP₂₅), fornita dal Dott. A. Scaloni (IABBAM Consiglio Nazionale delle Ricerche, via Argine 1085, I-80147 Napoli), stock in DMSO 1 mg/mL.

-H₂O bidistillata, ovvero acqua deionizzata prima con una distillazione per ridurre ulteriormente il contenuto dei sali e successivamente distillata in permanganato per eliminare eventuali residui organici;

-Miscela cromica, preparata sciogliendo 16 g di K₂Cr₂O₇ in 600 mL di H₂SO₄ concentrato, usata per il lavaggio della cella e della vetreria alla fine di ogni giornata di lavoro.

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

Capitolo 3

Risultati

3.1 Studio dell'effetto di SP₂₅ su monostrati supportati da Hg

I monostrati lipidici usati sono costituiti da: DOPC (dioleoilfosfatidilcolina) e DOPS (dioleoilfosfatidilserina). La prima è un fosfolipide zwitterionico, che si mantiene neutro a tutti i valori di pH investigati (3, 5.4 e 7), mentre la seconda passa da una forma carica negativamente, a pH=7, ad una zwitterionica, pH=5,4, ad una carica positivamente, pH=3^[17,18].

È stato considerato questo intervallo di pH poiché tali valori sono quelli caratteristici dell'ambito fisiologico; in particolare un pH=3 è presente a livello dello stomaco grazie alla secrezione di succhi gastrici, mentre pH neutro è diffuso in varie parti dell'organismo.

Per effettuare le misure a pH=7 è stata utilizzata una soluzione di KCl 0.1M a cui è stato aggiunto KH₂PO₄/K₂HPO₄ 1:1, per quelle a pH=5.4 è stata usata una soluzione di KCl 0.1M, non tamponata, mentre per le misure a pH=3 è stato aggiunto 0.25 mL di HCl 0.1M a 25 mL di KCl 0.1M.

L'uso di due tipi diversi di monostrato ha permesso di valutare l'effetto della densità di carica superficiale sulle modalità d'interazione.

Per quanto riguarda SP₂₅, in base alle pK dei singoli amminoacidi, presenta una carica di +2 a tutti i valori di pH investigati^[6].

Le tecniche elettrochimiche impiegate in questo studio sono: la voltammetria AC con risoluzione di fase, la voltammetria ciclica e la spettroscopia d'impedenza elettrochimica. Attraverso quest'ultima è stato possibile valutare l'effetto dell'aggiunta del peptide sui valori della capacità (C), da considerarsi proporzionale alla compattezza del film lipidico, e sui valori dell'ammettenza in fase (Y'), che, essendo direttamente proporzionale alla conducibilità, rappresenta una misura della permeabilità agli ioni del monostrato.

3.1.1 Monostrati di DOPS

Per analizzare l'interazione di SP₂₅ con il monostrato sono stati aggiunti 5 µL di una soluzione 1 mg/mL del peptide in DMSO, ottenendo una concentrazione in cella di 0.2 µg/mL.

3.1.1.1 Misure a pH=7

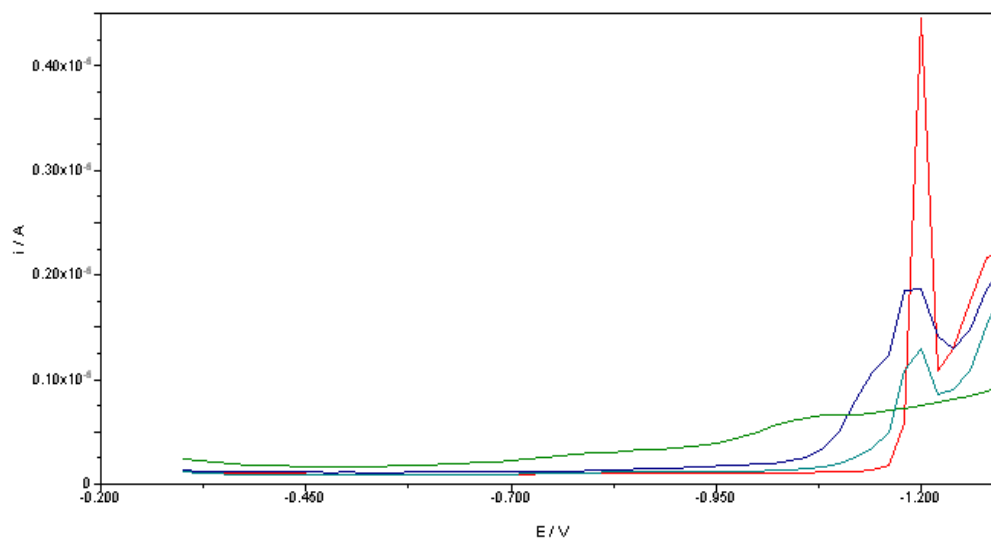


Fig. 3.1.1.1(a) Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPS a pH=7 in KCl 0.1M. Curva rossa: monostrato di DOPS; curva azzurra: monostrato di DOPS con SP₂₅ subito dopo l'aggiunta; curva verde: monostrato di DOPS con SP₂₅ dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza; curva blu: monostrato formato in presenza di SP₂₅.

Immediatamente dopo l'aggiunta del peptide si osserva una riduzione del picco a -1200 mV, caratteristico del profilo voltammetrico di un monostrato di DOPS, che si allarga e si arrotonda. Compare una spalla nella porzione più negativa della regione di minimo che si estende progressivamente fino a quasi -700 mV. Dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza, la capacità sul minimo è più elevata in tutto l'arco dei potenziali investigato ed i picchi sono scomparsi.

Nuovi monostrati formati in presenza di SP₂₅ mostrano un effetto più ridotto sui picchi ed il minimo non risulta alterato. Questo fatto indica che SP₂₅, in queste condizioni, è in grado di interagire più efficacemente col sistema auto-organizzato sull'elettrodo, piuttosto che col materiale lipidico all'interfase [fig.3.1.1.1(a)].

Aggiungendo in soluzione 20 µL di CdSO₄ 0.05M, da misure di voltammetria ciclica si osserva una rapida e significativa permeabilizzazione verso lo ione Cd²⁺. Il processo non è completamente reversibile, ma una separazione dei picchi di circa 120 mV indica

un'elevata permeabilità del monostrato. Dal momento che la struttura del ciclodepsipeptide non sembra permettere la formazione di veri e propri canali in un monostrato, si presume che la specie penetri nello strato compatto del monostrato rendendolo sufficientemente permeabile [fig.3.1.1.1(b)]. Importante sottolineare che in assenza di specie estranee i monostrati sono impermeabili verso gli ioni.

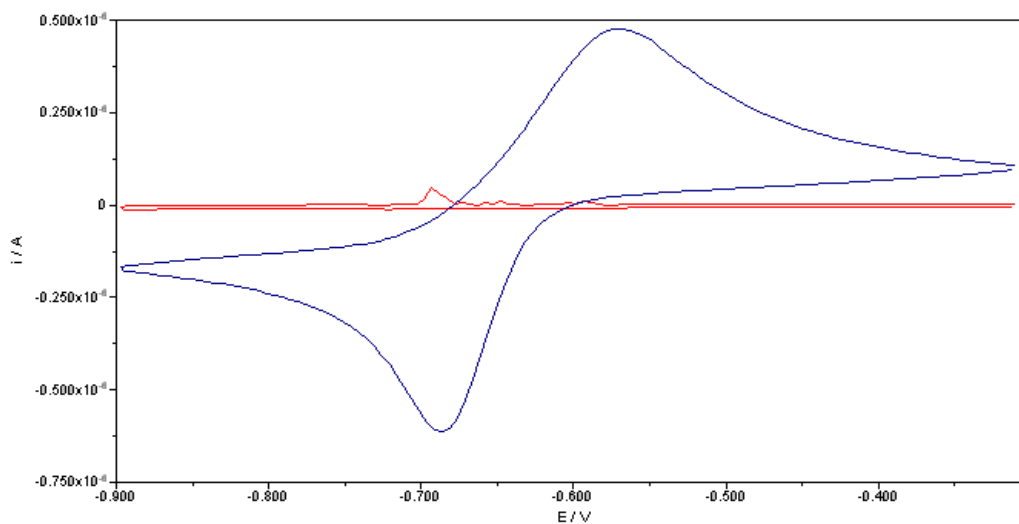


Fig. 3.1.1.1(b) Voltammogrammi ciclici ottenuti con velocità di scansione di 0.05 V/s su monostrato di DOPS in KCl a pH=7 .Curva rossa: monostrato di DOPS con SP₂₅; curva blu: monostrato di DOPS con SP₂₅ e Cd²⁺.

La spettroscopia d'impedenza mostra un lieve effetto sulla capacità e sull'ammettenza in fase dovuto all'aggiunta di SP₂₅ per i valori più negativi del potenziale della regione di minimo.

3.1.1.2 Misure a pH=5.4

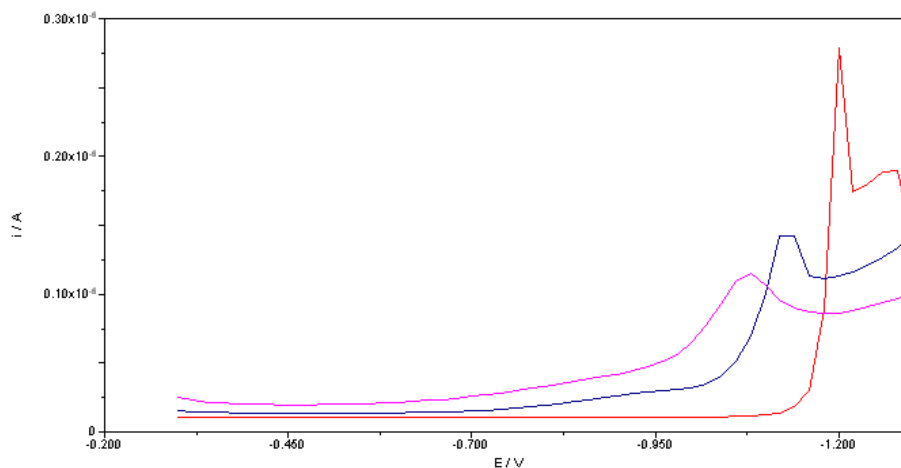


Fig. 3.1.1.2(a) Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPS a pH=5.4 in KCl 0.1M. Curva rossa: monostrato di DOPS; curva blu: monostrato di DOPS con SP₂₅ subito dopo l'aggiunta; curva viola: monostrato di DOPS con SP₂₅ dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza.

Si osserva un effetto significativo da subito dopo l'aggiunta di SP₂₅, che è amplificato in seguito ad una misura di spettroscopia d'impedenza. Come a pH=7 si manifesta la comparsa iniziale di una spalla ai potenziali più negativi della regione di minimo, che determina infine una profonda alterazione del profilo dei picchi, nonché della capacità sul minimo.

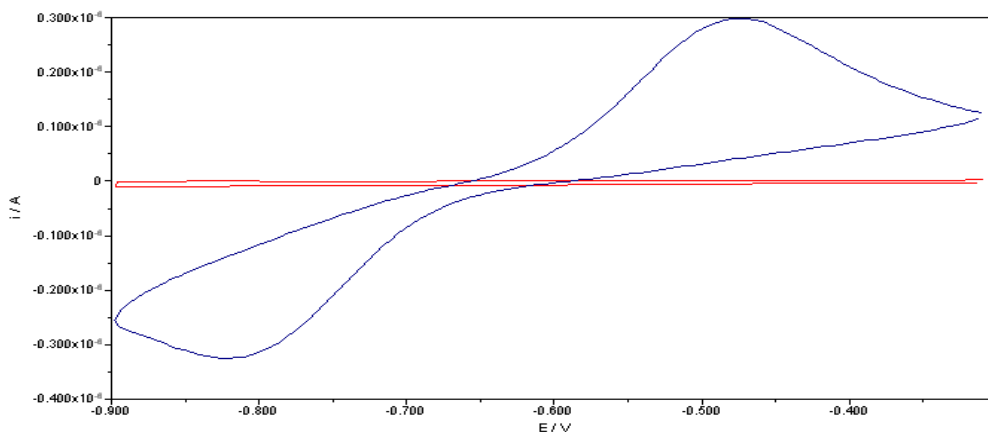


Fig. 3.1.1.2(b) Voltammogrammi ciclici ottenuti con velocità di scansione di 0.05 V/s su monostrato di DOPS in KCl a pH=5.4. Curva rossa: monostrato di DOPS con SP₂₅; curva blu: monostrato di DOPS con SP₂₅ e Cd²⁺.

La permeabilizzazione nei confronti di Cd²⁺ risulta molto inferiore a questo pH rispetto a pH=7. Inoltre il processo è decisamente irreversibile e l'entità della carica che passa è più bassa di quella a cui dà luogo la riduzione di Cd²⁺ su Hg nudo [fig.3.1.1.2(b)].

I risultati ottenuti con la spettroscopia d'impedenza mostrano una leggera alterazione dei profili di C e Y' vs E ai valori più negativi, ad indicare un'interazione di SP₂₅ con lo strato compatto del monostrato, che aumenta mano a mano che il potenziale applicato diventa più negativo. Infatti a questi potenziali si ha probabilmente un richiamo da parte della carica negativa del metallo nei confronti dell'anello lattonico carico positivamente della SP₂₅.

3.1.1.3 Misure a pH=3

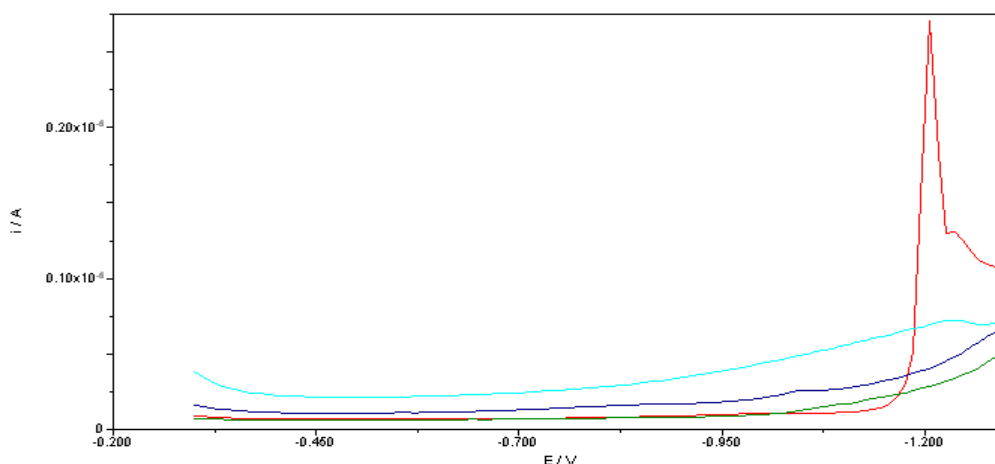


Fig. 3.1.1.3(a) Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPS a pH=3 in KCl 0.1M. Curva rossa: monostrato di DOPS; curva blu: monostrato di DOPS con SP₂₅ subito dopo l'aggiunta; curva viola: monostrato di DOPS con SP₂₅ dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza; curva verde: monostrato di DOPS formato in presenza di SP₂₅.

L'aggiunta di SP₂₅ determina, immediatamente dopo l'aggiunta, un effetto decisamente maggiore rispetto agli altri valori di pH. In particolar modo i picchi sono immediatamente soppressi e la capacità del minimo sale, soprattutto dopo misure di spettroscopia d'impedenza. Monostrati formati in presenza del ciclodepsipeptide mostrano un'assenza dei picchi, ma la regione compatta è praticamente inalterata; si ha infatti solo un debole effetto ai potenziali più negativi della regione di stabilità. Su nuovi monostrati l'effetto è marcato solo sul profilo dei picchi, ed è maggiore di quello osservato a pH=7 [fig.3.1.1.3(a)]. Quest'ultimo risultato può essere interpretato come frutto della capacità di interazione della SP₂₅ con le teste polari della DOPS, anche nella forma disorganizzata presente all'interfase. Va qui sottolineato che in forma non aggregata la DOPS non presenta una carica positiva a pH=3. Infatti, nel caso di monostrati di DOPS su Hg, la particolare disposizione dei gruppi protonabili sulle teste polari del fosfolipide determina una protonazione anticipata del gruppo fosforico che non ha luogo in soluzione. È quindi ipotizzabile che questo favorisca interazioni DOPS/SP₂₅ di natura elettrostatica.

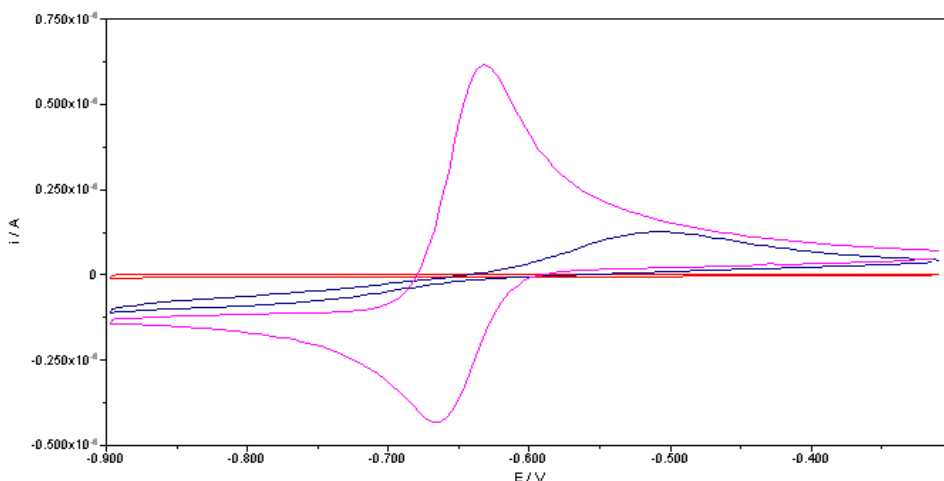


Fig. 3.1.1.3(b) Voltammogrammi ciclici ottenuti con velocità di scansione di 0.05 V/s su monostrato di DOPS in KCl a pH=3. Curva rossa: monostrato di DOPS con SP₂₅; curva blu: monostrato di DOPS con SP₂₅ e Cd²⁺; curva viola: picco di riduzione di Cd²⁺ su Hg.

Il peptide incorporato in un monostrato di DOPS mostra uno scarso effetto permeabilizzante nei confronti dello ione Cd²⁺ a questo pH [fig.3.1.1.3(b)].

Misure di spettroscopia d'impedenza, delle quali si riportano il grafico di C vs E alla frequenza di 10 Hz [fig.3.1.1.3(c)], mostrano in questo caso una maggiore alterazione della capacità nella regione di minimo rispetto a pH 5 e 7. L'alterazione è estesa a tutto l'arco di stabilità, a differenza di quanto si osserva agli altri valori di pH, mentre l'ammettenza è solo debolmente alterata.

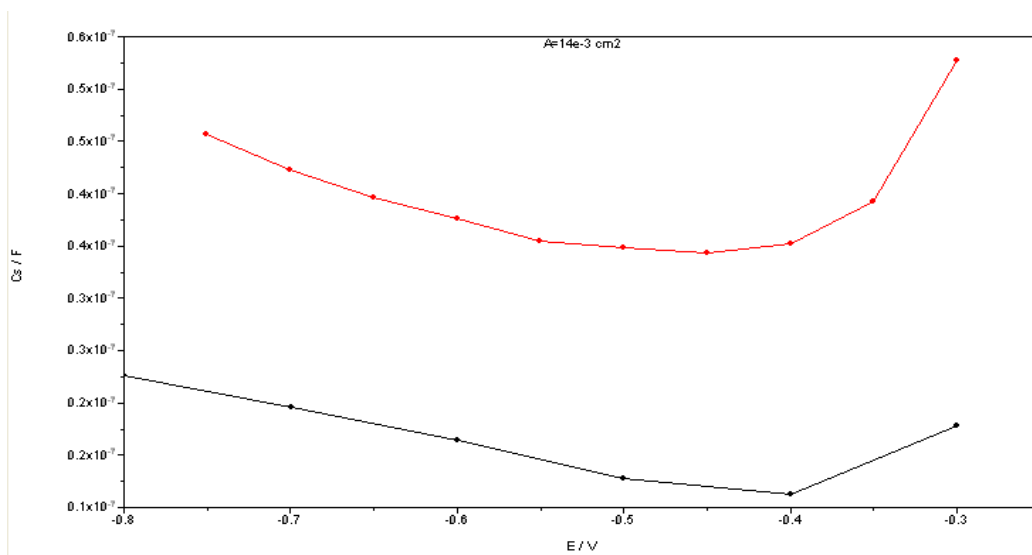


Fig.3.1.1.3(c) Grafico di C vs E ottenuto attraverso misure di spettroscopia d'impedenza elettrochimica. Curva nera: monostrato di DOPS; curva rossa: monostrato di DOPS con SP₂₅.

3.1.2 Monostrati di DOPC

Per analizzare l'interazione di SP₂₅ con il monostrato sono stati aggiunti 5 µL di peptide, ottenendo una concentrazione in cella di 0.2 µg/mL.

3.1.2.1 Misure a pH=7

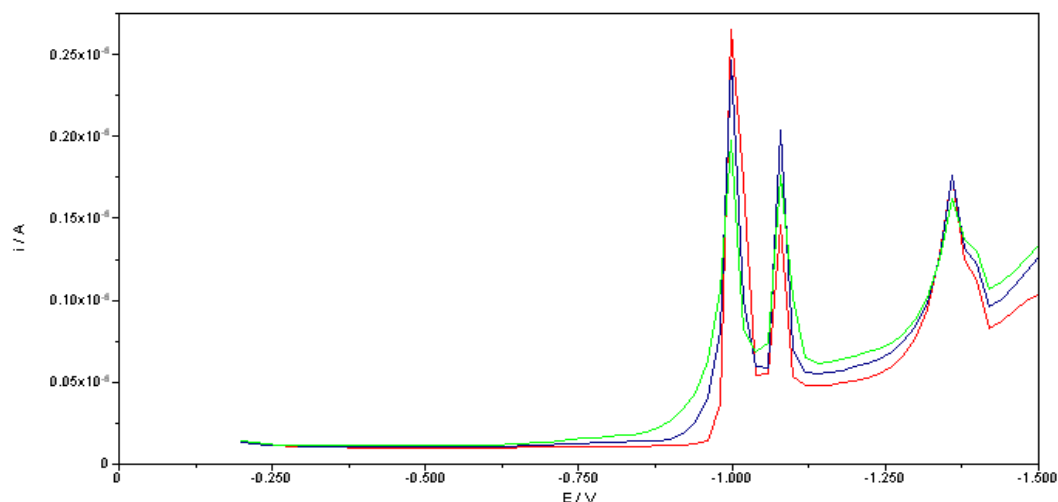


Fig. 3.1.2.1(a) Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPC a pH=7 in KCl 0.1M. Curva rossa: monostrato di DOPC; curva blu: monostrato di DOPC con SP₂₅ subito dopo l'aggiunta; curva verde: monostrato di DOPC con SP₂₅ dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza.

L'aggiunta di SP₂₅ ha un effetto lieve ma immediato di restringimento della regione di minimo per i valori più negativi della stessa. Questo effetto è più significativo dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza nella regione di minimo. L'effetto sui picchi è quasi trascurabile. Non si altera affatto la capacità sul minimo nella regione più positiva, ad indicare che una penetrazione con effetto limitato è possibile solo laddove il monostrato sia meno compatto, ossia per potenziali più negativi si -0.7 V [fig.3.1.2.1(a)].

L'aggiunta di Cd²⁺ mostra una permeabilizzazione verso tale ione; si osserva però un profilo voltammetrico completamente irreversibile. Il picco di riduzione è localizzato ai potenziali più negativi, dove cioè il monostrato è meno compatto e più sensibile all'effetto dell'aggiunta di specie estranee al materiale lipidico, indipendentemente dalla formazione di veri e propri canali [fig.3.1.2.1(b)].

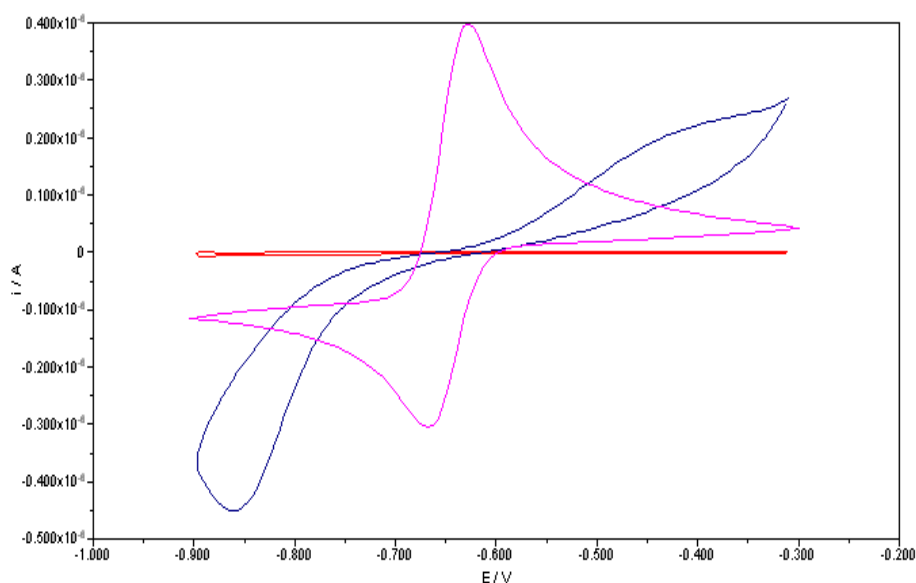


Fig. 3.1.2.1(b) Voltammogrammi ciclici ottenuti con velocità di scansione di 0.05 V/s su monostrato di DOPC in KCl a pH=7. Curva rossa: monostrato di DOPC con SP25; curva blu: monostrato di DOPC con SP25 e Cd^{2+} ; curva viola: picco di riduzione di Cd^{2+} su Hg.

Misure di spettroscopia d'impedenza confermano un effetto sulla capacità nella regione di minimo e sul valore dell'ammettenza a potenziali negativi.

3.1.2.2 Misure a pH=5.4

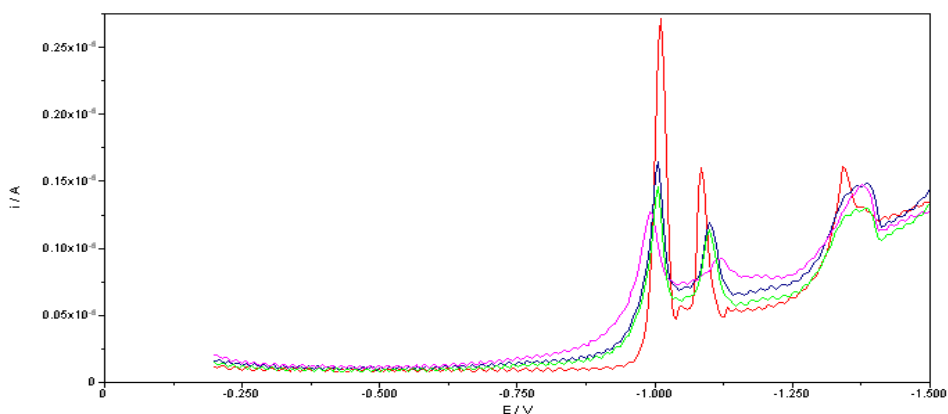


Fig. 3.1.2.2(a) Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPC a pH=5.4 in KCl 0.1M. Curva rossa: monostrato di DOPS; curva blu: monostrato di DOPC con SP_{25} subito dopo l'aggiunta; curva viola: monostrato di DOPC con SP_{25} dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza; curva verde: monostrato di DOPC formato in presenza di SP_{25} .

Misure di voltammetria AC con risoluzione di fase mostrano un'alterazione del profilo dei

primi due picchi di riorientamento che si riducono, mentre la regione di minimo si restringe debolmente; il risultato è riproducibile anche su nuovi monostrati ottenuti in presenza di SP₂₅. Neppure una scansione completa di spettroscopia d'impedenza nella regione di minimo determina un'incorporazione più efficace. Monostrati formati in presenza del peptide danno risultati riproducibili con quelli ottenuti per aggiunta su monostrati preformati. Si può dunque ipotizzare che l'interazione si localizzi preferenzialmente sulle teste polari e non richieda un sistema preventivamente organizzato. Inoltre, la cinetica processo è rapida e non subisce modificazioni nel tempo, come osservato invece nel caso di monostrati di DOPS a tutti i valori di pH [fig.3.1.2.2(a)].

Misure di spettroscopia d'impedenza effettuate su monostrati di DOPC in presenza di SP₂₅ non mostrano nessun effetto significativo; si osserva solo una minima alterazione della capacità e dell'ammittenza in fase, alla frequenza di 10 Hz, limitata ai potenziali più negativi. Ciò indica una scarsa penetrazione del ciclodepsipeptide nel monostrato stesso, presumibilmente la coda lipofila può interagire con le code idrocarburiche, anche se non sembra alterarne significativamente lo stato di aggregazione.

3.1.2.3 Misure a pH=3

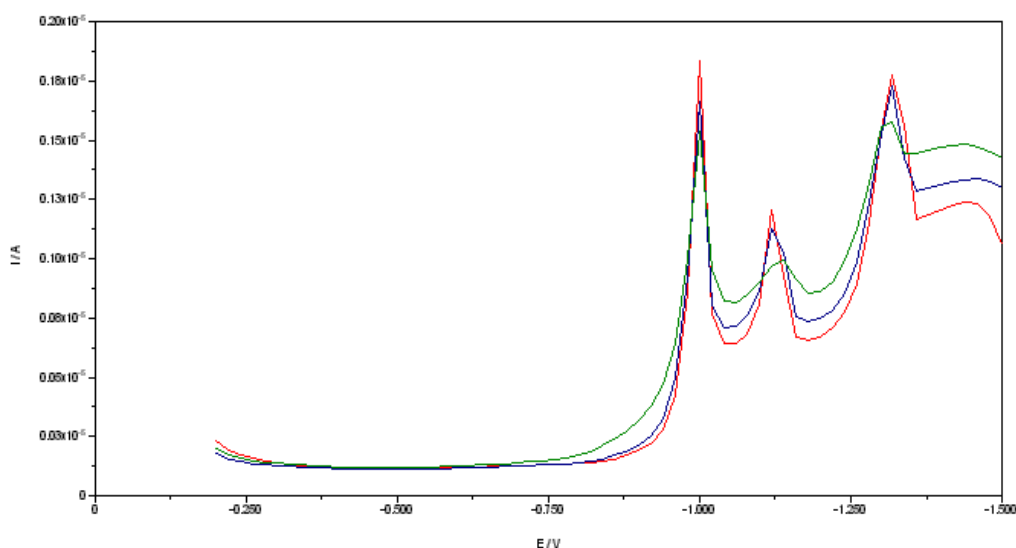


Fig. 3.1.2.3(a) Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPC a pH=3 in KCl 0.1M. Curva rossa: monostrato di DOPC; curva blu: monostrato di DOPC con SP₂₅ subito dopo l'aggiunta; curva verde: monostrato di DOPC con SP₂₅ dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza.

L'aggiunta di SP₂₅ in presenza di un monostrato di DOPC a questo pH determina un effetto

molto lieve sui profili delle curve di voltammetria AC, come si può osservare in fig.3.1.2.3(a). I picchi sono lievemente ridotti e la regione di minimo si restringe sul versante negativo, ma solo dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza tra -0.3V e -0.8V.

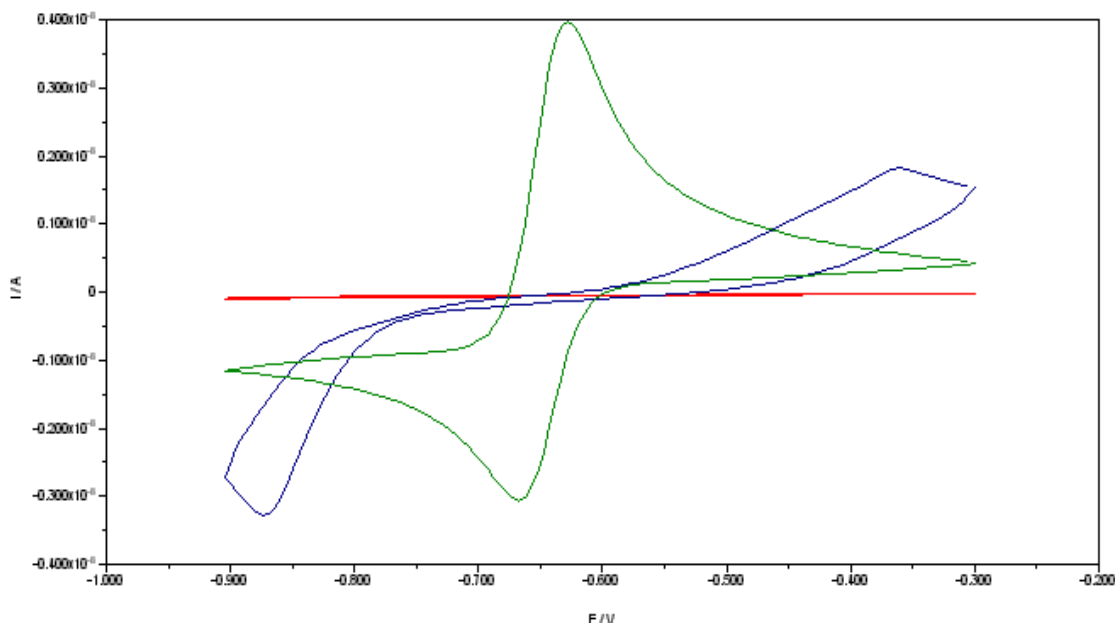


Fig. 3.1.2.3(b) Voltammogrammi ciclici ottenuti con velocità di scansione di 0.05 V/s su monostrato di DOPC in KCl a pH=3. Curva rossa: monostrato di DOPC con SP₂₅; curva blu: monostrato di DOPC con SP₂₅ e Cd²⁺; curva verde: picco di riduzione di Cd²⁺ su Hg.

Voltammetrie cicliche, condotte in presenza dello ione elettroattivo cadmio, mostrano un significativo passaggio di corrente, anche se il processo è completamente irreversibile. La corrente di picco di riduzione è comunque confrontabile con quella su Hg nudo [fig.3.1.2.3(b)]. Questo risultato è completamente confrontabile con quello ottenuto a pH=5.

Misure di spettroscopia di impedenza mostrano un'alterazione del valore della capacità, alla frequenza di 10Hz, nella porzione più negativa della regione di minimo.

3.1.3 Monostrati formati a contatto con una soluzione di CaCl₂

3.1.3.1 Monostrati di DOPC

Monostrati di DOPC formati a contatto con una soluzione di CaCl₂ 0.05M a pH=5.6 con misure di voltammetria AC mostrano i consueti picchi a potenziali diversi rispetto all'utilizzo di KCl come elettrolita: primo e terzo picco sono anticipati, mentre secondo e quarto si

mantengono allo stesso potenziale. L'aggiunta di SP₂₅ ha un effetto molto ridotto e, anche dopo una scansione di spettroscopia d'impedenza tra -0.3V e -0.8V, si osserva solo un restringimento e un aumento della capacità della regione di minimo, soprattutto sul versante dei potenziali negativi. Nuove gocce formate in presenza di SP₂₅ mostrano un minimo piatto con primo e secondo picco più basse. Il profilo del voltammogramma è lo stesso di quello che si ottiene su monostrati preformati alla cui soluzione venga aggiunta SP₂₅; anche su monostrati formati in presenza di SP₂₅ si ha una maggiore irriproducibilità.

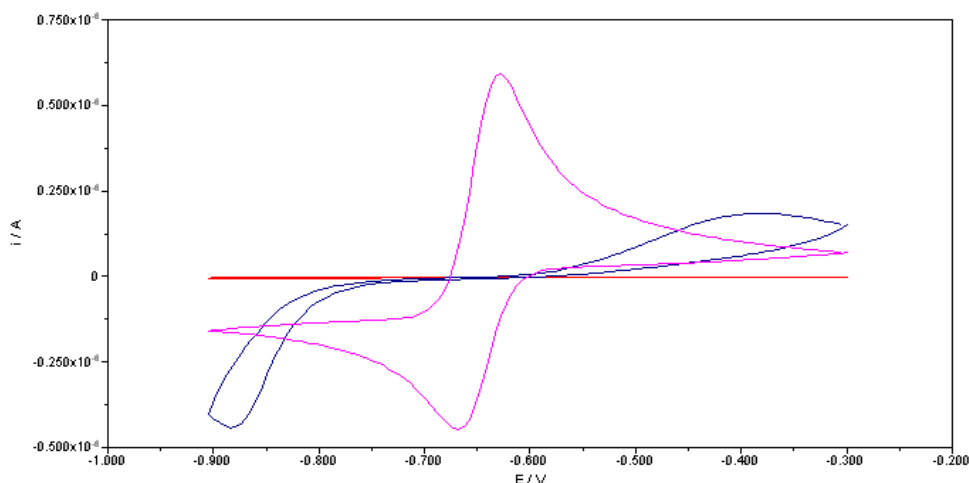


Fig. 3.1.3.1(a) Voltammogrammi ciclici ottenuti con velocità di scansione di 0.05 V/s su monostrato di DOPC in CaCl₂. Curva rossa: monostrato di DOPC con SP₂₅; curva blu: monostrato di DOPC con SP₂₅ e Cd²⁺; curva viola: curva di riduzione di Cd²⁺ su Hg.

Voltammetrie cicliche mostrano una permeabilizzazione nei confronti dello ione Cd²⁺, la cui corrente di riduzione è confrontabile come intensità con quella osservata su Hg nudo, ma il processo è completamente irreversibile e spostato a potenziali molto negativi [fig.3.1.3.1(a)]. Come nel caso di una soluzione di KCl 0.1M allo stesso pH.

Misure di spettroscopia d'impedenza mostrano un effetto solo sulla capacità della regione di minimo, mentre l'ammettenza è praticamente inalterata. Il risultato è confrontabile con quello in KCl 0.1M allo stesso pH.

3.1.3.2 Monostrati di DOPS

Nel caso di un monostrato di DOPS formato a contatto con una soluzione di CaCl₂ 0.05M a pH=5.6, misure di voltammetria AC mettono in evidenza picchi di riorientamento

anticipati rispetto al caso del KCl. L'effetto voltammetrico è significativo immediatamente dopo l'aggiunta di SP₂₅; i picchi infatti sono quasi totalmente soppressi e la regione di minimo della capacità è ristretta sul versante negativo. Scansioni di voltammetria AC effettuate dopo una spettroscopia d'impedenza completa mostrano una forte interazione anche nella regione di minimo, dove la capacità aumenta sensibilmente. Infine mostrati formati in presenza di SP₂₅ mostrano un profilo analogo a quello ottenuto per aggiunta della SP₂₅ su monostrato preformato [fig.3.1.3.2(a)]. Pertanto si può affermare che le interazioni tra il peptide e il materiale lipidico hanno luogo sia dove il monostrato sia compatto e ben organizzato sulla goccia di Hg, che nel caso si trovi all'interfase soluzione/N₂, senza apprezzabili differenze.

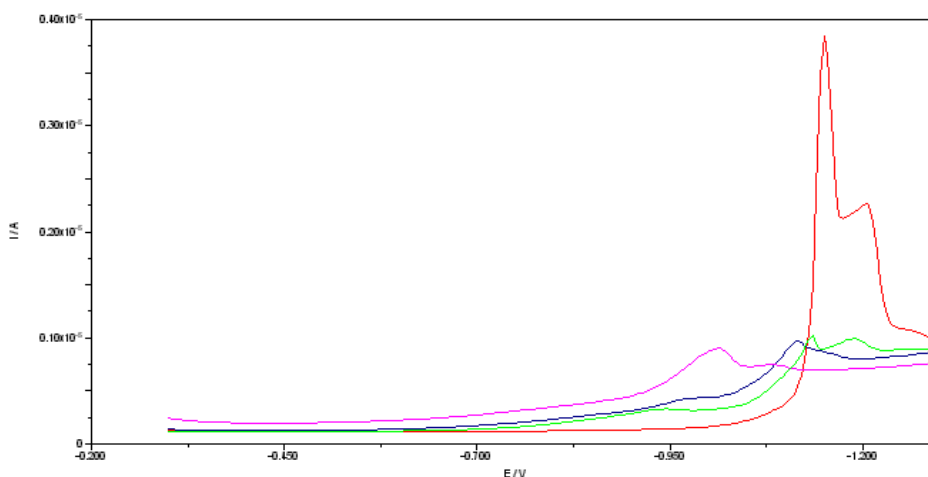


Fig. 3.1.3.2(a) Voltammogrammi ottenuti con voltammetria AC su monostrati di DOPS a pH=5.6 in CaCl₂ 0.05M. Curva rossa: monostrato di DOPS; curva blu: monostrato di DOPS con SP₂₅ subito dopo l'aggiunta; curva viola: monostrato di DOPS con SP₂₅ dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza; curva verde: monostrato di DOPS formato in presenza di SP₂₅.

Nonostante l'alterazione significativa della regione di minimo, non si osserva una corrispondente permeabilizzazione nei confronti di Cd²⁺. Il processo di riduzione è totalmente irreversibile e le correnti coinvolte sono circa ¼ di quelle che si ottengono su Hg nudo nelle stesse condizioni di lavoro.

Misure di spettroscopia d'impedenza mostrano un lieve effetto, ma riproducibile, sul profilo della capacità contro il potenziale alla frequenza di 10 Hz.

3.2 Studio dell'effetto di SP₂₅ su bistrati supportati da Hg

Per lo studio di bistrati supportati e della loro interazione con SP₂₅, in funzione della composizione del monostrato esterno e del pH della soluzione, le tecniche elettrochimiche usate sono state: la voltammetria ac, la voltammetria ciclica, la spettroscopia d'impedenza elettrochimica e la cronocoulombometria.

Come descritto nella parte sperimentale, un bistrato lipidico si compone di due monostrati contrapposti. Il primo monostrato è ancorato alla superficie del metallo dalla quale è separato da una regione idrofilica, detta spaziatore, ed è costituito da catene fitaliniche. Il secondo monostrato si auto-organizza sul primo per immersione della goccia di mercurio coperta dal primo monostrato da una soluzione elettrolitica, alla cui interfase è presente un film lipidico collassato, di composizione nota. Quest'ultimo monostrato è detto monostrato distale. I bistrati usati hanno un monostrato distale costituito da:

- DOPC, le cui teste polari sono zwitterioniche in un arco di pH compreso tra 3 e 7 ^[17,18];
- DOPS, le cui teste polari contengono un gruppo carbossilico, uno amminico ed uno fosforico, le cui costanti di protonazione in forma auto-organizzata nel monostrato sono state determinate^[17,18]. Non si può affermare con certezza che, nei bistrati, al variare del pH, la carica subisca la stessa variazione osservata nei monostrati, anche se è ragionevole ammetterlo.

È stata usata una concentrazione di SP₂₅ di 0,4 e 1 µg/mL, ottenuta aggiungendo in cella rispettivamente 10 e 25 mL di una soluzione stock del peptide in esame (1 mg/mL) in DMSO.

Le misure sono state eseguite, come per i monostrati, a tre diversi pH: 3, 5.4, 7.

Per le misure a pH=7 è stata utilizzata una soluzione di KCl 0.1M a cui è stato aggiunto KH₂PO₄/K₂HPO₄ 1:1.

Per le misure a pH=5.4 è stata utilizzata una soluzione di KCl 0.1M, non tamponata.

Per le misure a pH=3 è stato aggiunto 0.25 mL di HCl 0.1M a 25 mL di KCl 0.1M.

3.2.1 Bistrati di DOPS/DPTL

3.2.1.1 Misure a pH=7

L'incorporazione è stata effettuata con scansione completa di spettroscopia d'impedenza, effettuata tra -0.3 V e -1 V alle frequenze di 10^5 Hz e 0.1 Hz, dopo l'aggiunta del composto peptidico. Sulla base di tali misure, delle quali si riporta l'andamento della capacità e dell'ammettenza in fase contro il potenziale, alla frequenza di 10 Hz, si deduce che l'incorporazione della SP₂₅ è immediata, stabile e localizzata a potenziali decisamente fisiologici^[19]. L'effetto ha un massimo intorno a -600 mV. Effettuando una seconda scansione si osserva un'alterazione dei valori di Y' e C anche a potenziali più positivi di quello di massimo effetto. Il peptide è quindi efficace anche per potenziali transmembranari positivi, una volta che sia stato incorporato in forma attiva [fig.3.2.1.1(a) e (b)].

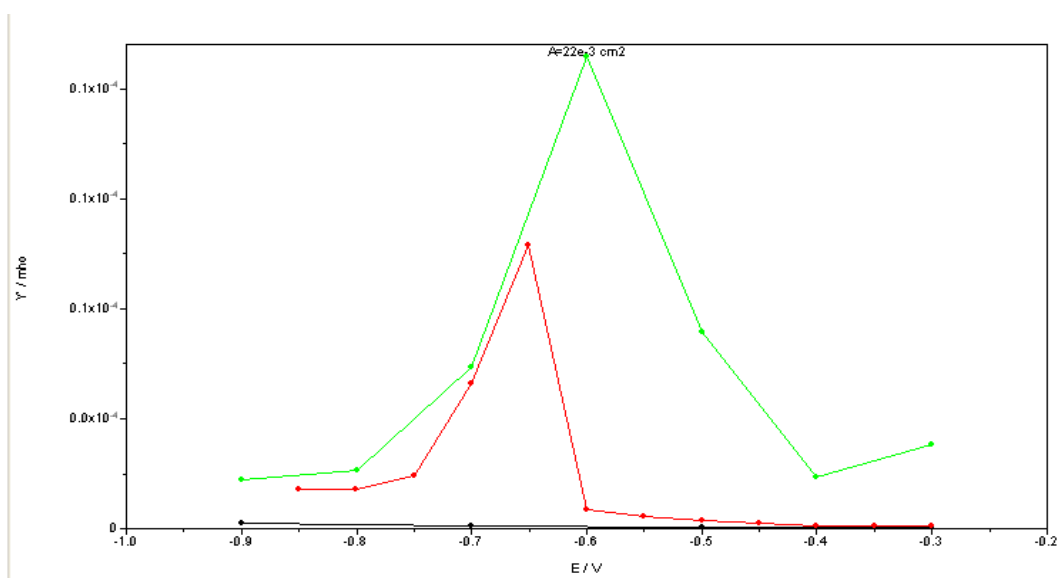


Fig. 3.2.1.1(a) Grafico Y' vs E. Curva nera: DOPS/DPTL; curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅ I scansione; curva verde: DOPS/DPTL con SP₂₅ II scansione.

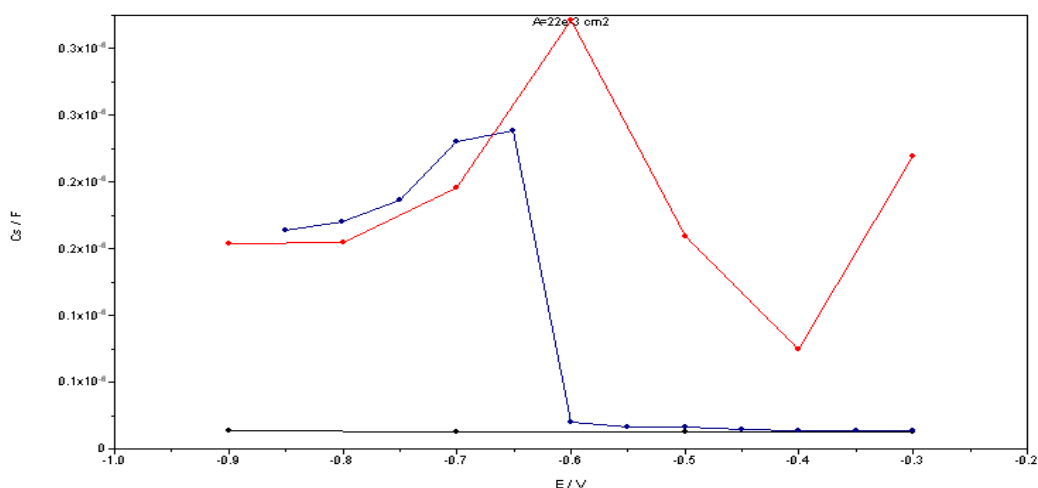


Fig. 3.2.1.1(b) Grafic C vs E. Curva nera: DOPS/DPTL; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ I scansione; curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅ II scansione.

Anche le misure di voltammetria ciclica indicano che l'incorporazione è stabile ed efficace a potenziali fisiologici. La curva voltammetrica mostra infatti un picco negativo di corrente localizzato a circa -650 mV, con una carica sottesa pari a $-35 \mu\text{C}/\text{cm}^2$, il picco positivo è ad un potenziale di -590 mV che sottende una carica di circa $-25 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. La carica è leggermente inferiore alla carica di saturazione stimata per lo ione K^+ pari a $-45/-50 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ [20]. Se si restringe l'arco di potenziali applicato a -0.9 V sul versante negativo, non si osservano riduzioni né spostamenti dei picchi dovuti alla presenza di SP₂₅. La successiva aggiunta di TI^+ determina una riduzione reversibile dello ione, assolutamente confrontabile col processo redox osservabile su Hg nudo [fig.3.2.1.1(c)].

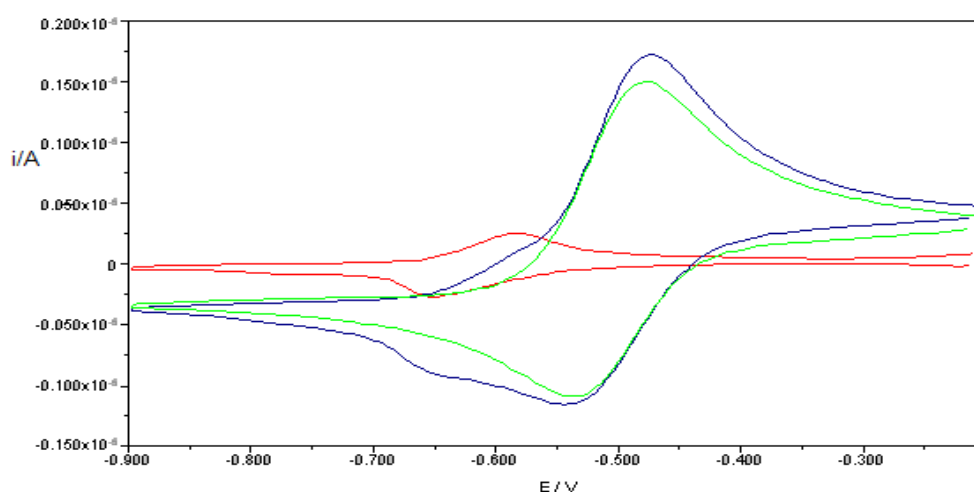


Fig. 3.2.1.1(c) Voltammogrammi ciclici. Curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ e TI^+ ; curva verde: curva di riduzione di TI^+ su Hg.

Infine misure cronocoulombometriche confermano un comportamento ohmico del canale, confrontabile con quello osservato dal canale formato dalla gramicidina^[21], con una carica che raggiunge il valore di saturazione tipico dello ione potassio. Non si osservano sigmoidi neanche effettuando un salto a potenziali finali di -1 V dopo un periodo di permanenza di 300" al potenziale iniziale [fig.3.2.1.1(g)].

Le prove di incorporazione sono state ripetute limitando l'arco di potenziali investigati alla regione corrispondente ai valori fisiologici del potenziale transmembranario.

Tre scansioni consecutive di spettroscopia d'impedenza elettrochimica mostrano un'incorporazione immediata fino dalla prima scansione che risulta debolmente posticipata rispetto alla seconda ed ancor più alla terza scansione. Se si riportano i grafici del modulo, si osserva una loro progressiva variazione, analoga a quella osservata lavorando su di un più ampio arco di potenziali. Ai potenziali positivi rispetto all'incorporazione efficace si osserva la comparsa iniziale di un semicerchio aggiuntivo, che sembra scomparire per scansioni successive laddove la SP₂₅ diventa attiva come canale ionico anche a potenziali meno negativi. Per potenziali più negativi, -0.7 V, l'incorporazione con formazione del canale è stabile fin dopo la prima scansione. Nel caso dei potenziali più positivi rispetto a quelli di incorporazione efficace si può presumere che la SP₂₅ si collochi sulla superficie del bistrato per poi penetrare il bistrato in maniera stabile e irreversibile ai potenziali più negativi [fig.3.2.1.1 (d) e (e)].

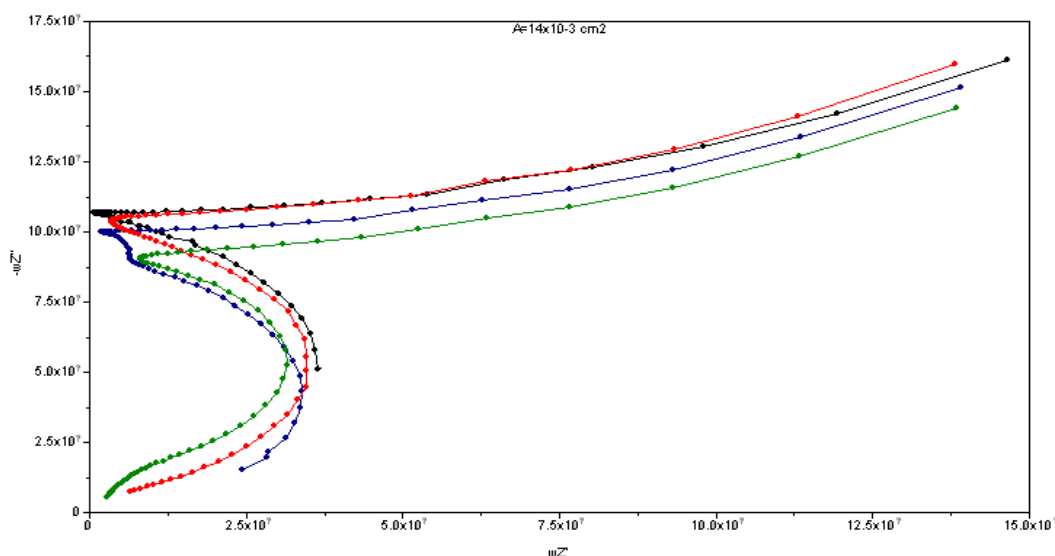


Fig.3.2.1.1(d) Grafico del modulo ottenuto con spettroscopia d'impedenza elettrochimica a -500 mV. Curva nera: DOPS/DPTL; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ I scansione; curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅ II scansione; curva verde: DOPS/DPTL con SP₂₅ III scansione.

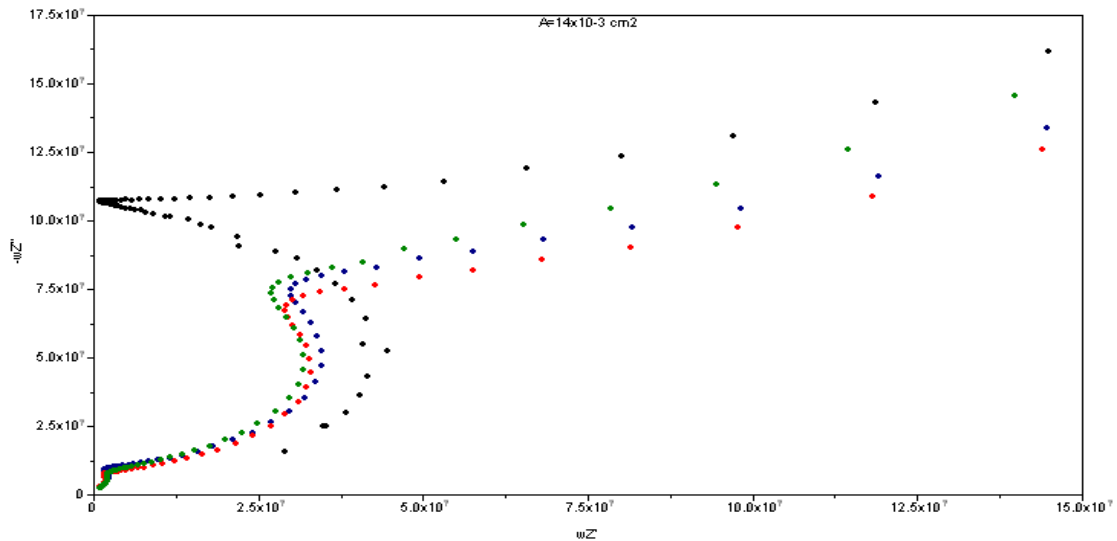


Fig.3.2.1.1(e) Grafico del modulo ottenuto con spettroscopia d'impedenza elettrochimica a -700 mV. Curva nera: DOPS/DPTL; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ I scansione; curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅ II scansione; curva verde: DOPS/DPTL con SP₂₅ III scansione.

Misure di voltammetria ciclica condotte nelle stesse condizioni, dopo l'incorporazione efficace, mostrano un effetto significativo anche se ci si limita a potenziali fisiologici. Il picco voltammetrico negativo è slargato e sembra sdoppiato per velocità di scansione più basse.

L'aggiunta di Tl⁺ mostra un effetto di permeabilizzazione significativo entro l'intervallo dei potenziali fisiologici. Dopo stabilizzazione il contributo di riduzione è sdoppiato: il primo contributo, di entità maggiore, è posizionato in corrispondenza del potenziale di riduzione del Tl⁺ su Hg nudo, il secondo coincide col picco della SP₂₅. Si può ipotizzare che il primo sia relativo al processo che coinvolge gli ioni tallio presenti nello strato idrofilico, il secondo richiede la permeazione attraverso il canale [fig.3.2.1.1(f)].

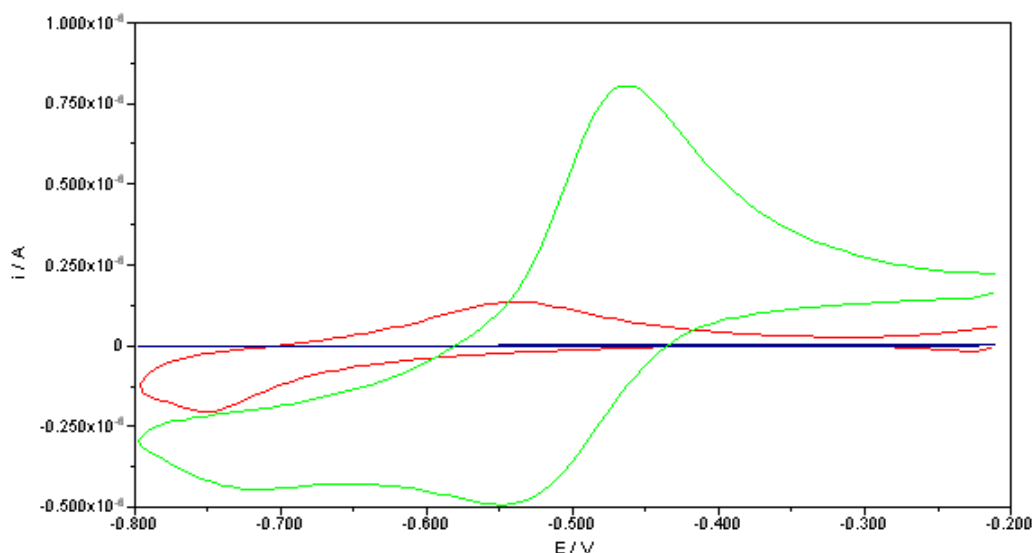


Fig. 3.2.1.1(f) Voltammogrammi ciclici ottenuti con velocità di scansione di 50 mV/s. Curva blu: DOPS/DPTL ; curva rossa: DOPS/DPTL con SP_{25} ; curva verde: DOPS/DPTL con $SP_{25} + TI^+$.

Misure cronocoulombometriche, effettuate sia da potenziali positivi verso potenziali negativi che viceversa, non mostrano un profilo sigmoidale. Un tempo di attesa al potenziale iniziale prima di un salto negativo pari a 300", non modifica né la forma della curva né l'entità della carica. Questo sta a indicare che gli ioni entrati sono facilmente riespansi in tempi brevi e un intervallo di tempo di permanenza a potenziali positivi non disaggrega il canale, la cui formazione non è quindi voltaggio dipendente [fig.3.2.1.1(g)].

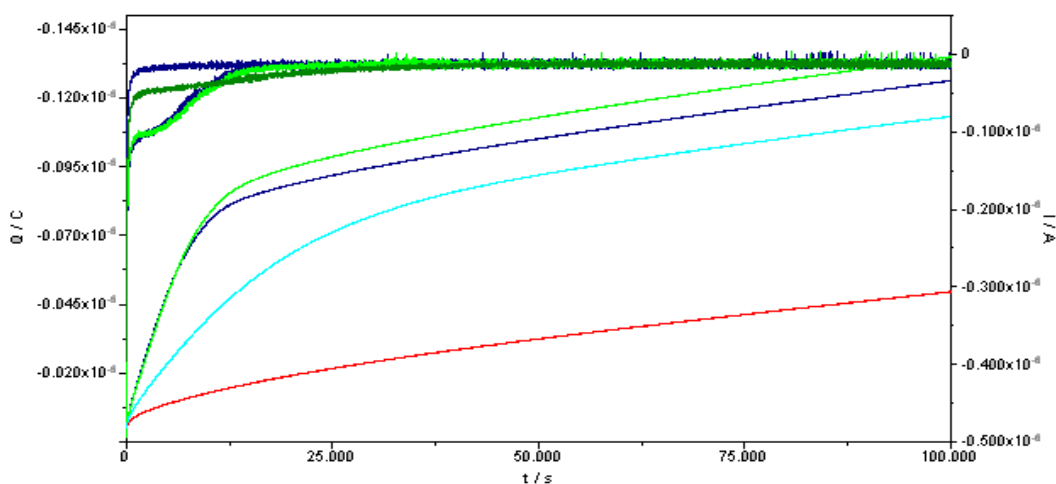


Fig.3.2.1.1(g) Grafico ottenuto attraverso misure cronocoulombometriche effettuate da potenziale positivi verso potenziali negativi. Curva rossa: DOPS/DPTL con SP_{25} a -600 mV; curva celeste: DOPS/DPTL con SP_{25} a -700 mV; curva blu: DOPS/DPTL con SP_{25} a -800 mV con tempo di attesa di 30" al potenziale iniziale; curva verde: DOPS/DPTL con SP_{25} a -800 mV con tempo di attesa di 300" al potenziale iniziale.

3.2.1.2 Misure a pH=5.4

Sulla base delle misure di spettroscopia d'impedenza, delle quali si riporta l'andamento della capacità e dell'ammettenza in fase in funzione del potenziale, alla frequenza di 10 Hz, si deduce che l'incorporazione di questo peptide è immediata, stabile e localizzata a potenziali decisamente fisiologici. Scansioni successive non anticipano significativamente l'effetto osservato né sull'ammettenza né sulla capacità [fig.3.2.1.2(a) e (b)]. Tale effetto raggiunge un valore massimo intorno a -700 mV .

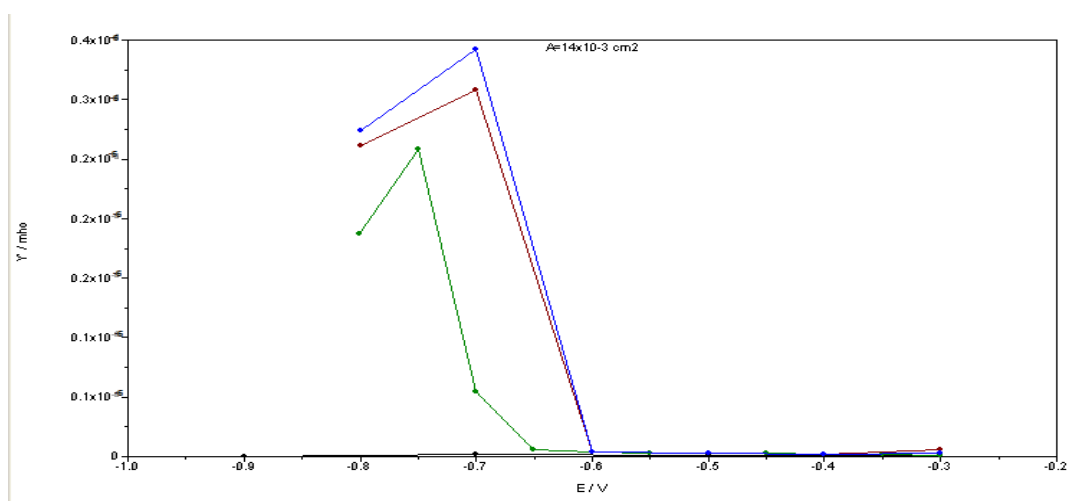


Fig.3.2.1.2(a) Grafico Y' vs E . Curva nera: DOPS/DPTL; curva verde: DOPS/DPTL con SP₂₅ I scansione; curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅ II scansione; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ III scansione.

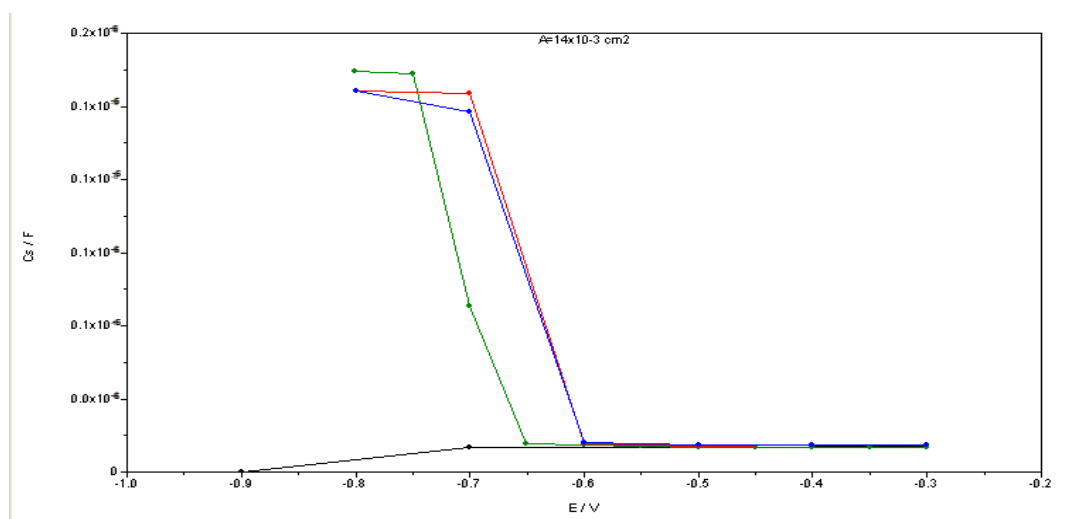


Fig.3.2.1.2(b) Grafico C vs E . Curva nera: DOPS/DPTL; curva verde: DOPS/DPTL con SP₂₅ I scansione; curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅ II scansione; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ III scansione.

Misure di voltammetria ciclica mostrano un picco slargato negativo a cui corrisponde un picco positivo, anche se ci si limita all' intervallo di potenziali applicati corrispondente ad

un potenziale transmembranario fisiologico. Per velocità di scansione più basse, il picco è anticipato e sdoppiato. Ci sono quindi due stadi distinti nella scansione negativa che non si osservano invece in quella positiva [fig.3.2.1.2(c)]

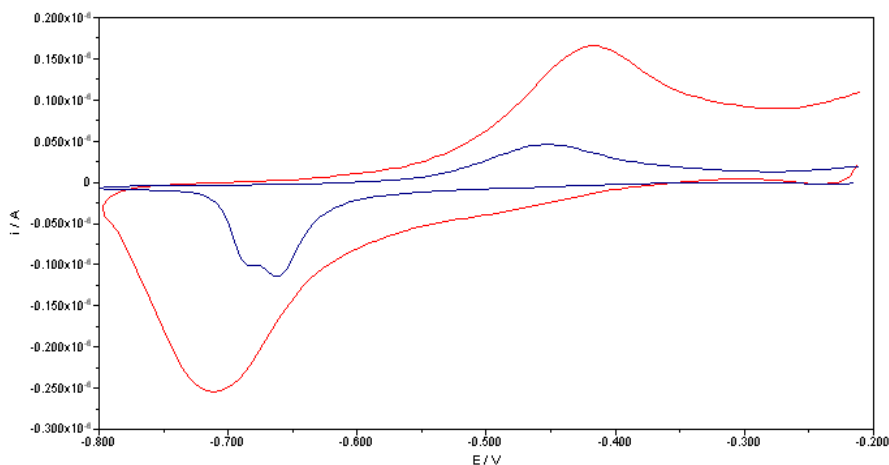


Fig. 3.2.1.2(c) Voltammogrammi ciclici. Curva rossa : DOPS/DPTL con SP_{25} con velocità di scansione di 50 mV/s; curva blu: DOPS/DPTL con SP_{25} con velocità di scansione di 10 mV/s.

Misure cronocoulombometriche mostrano un effetto con profilo approssimativamente sigmoidale fino da un potenziale finale di -650 mV. Come a pH=7, 30" sono sufficienti per la riespulsione degli ioni entrati, infatti due salti consecutivi, di cui il secondo con tempo di attesa di 300" al potenziale iniziale, non mostrano differenze nel valore di carica che fluisce. Inoltre 300" al potenziale iniziale non sono sufficienti per disaggregare il canale, infatti non si ripristina un profilo sigmoidale tipico di un canale che, disaggregato a potenziali positivi, si riforma a valori negativi [fig.3.2.1.2(d)].

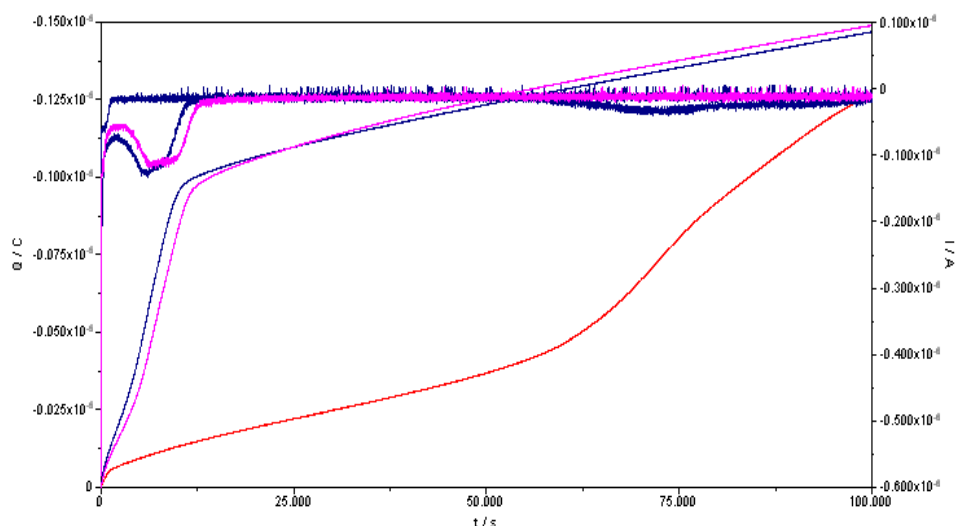


Fig.3.2.1.2(d) Grafico ottenuto attraverso misure cronocoulometriche. Curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅ a -650 mV; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ a -800 mV con tempo di attesa di 30" al potenziale iniziale; curva viola: DOPS/DPTL con SP₂₅ a -800 mV con tempo di attesa di 300" al potenziale iniziale.

3.2.1.3 Misure a pH=3

L'incorporazione di SP₂₅ in bistrati, in cui il monostrato distale è di DOPS, mostra risultati ottenuti con spettroscopia d'impedenza elettrochimica analoghi a quelli osservati a pH=7, per quanto riguarda il profilo dei grafici di C e Y' vs E. Ad una prima scansione si osserva incorporazione ed un effetto permeabilizzante a partire da circa -650 mV, mantenendosi, pertanto, nell'intervallo di potenziali applicati corrispondenti a potenziali transmembranari fisiologici^[19]. La seconda scansione evidenzia, ancora una volta, un'alterazione di C e Y', anche per valori positivi del potenziale transmembranario [fig.3.2.1.3(a) e (b)]. Un'analisi più dettagliata dei grafici del modulo ai singoli potenziali non mostra un semicerchio aggiuntivo ai potenziali che precedono l'incorporazione nella prima scansione. Pertanto non si può ipotizzare in questo caso un adsorbimento piatto sulla superficie del bistrato prima dell'incorporazione al suo interno. Dopo l'incorporazione, il profilo dei grafici del modulo appare simile a quello osservato a pH=7.

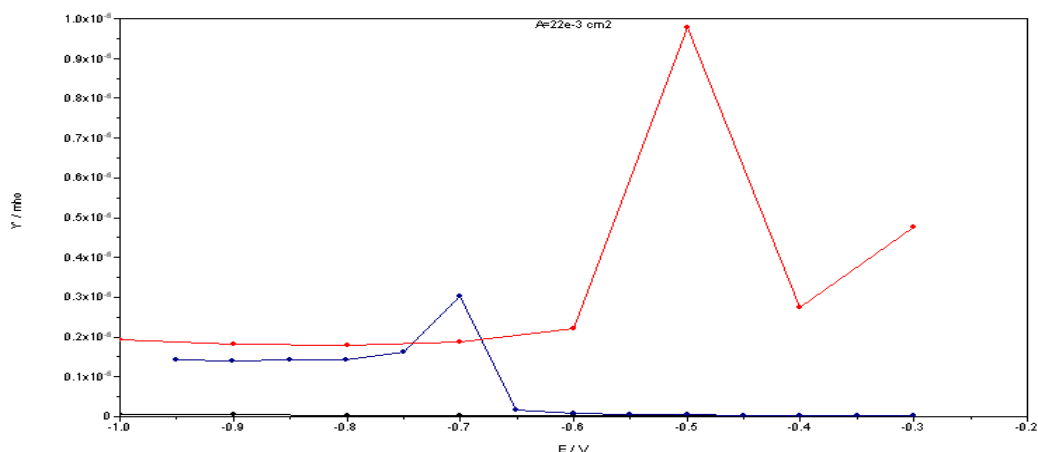


Fig.3.2.1.3(a) Grafico Y' vs E . Curva nera: DOPS/DPTL; curva blu: DOPS/DPTL con SP_{25} I scansione; curva rossa: DOPS/DPTL con SP_{25} II scansione.

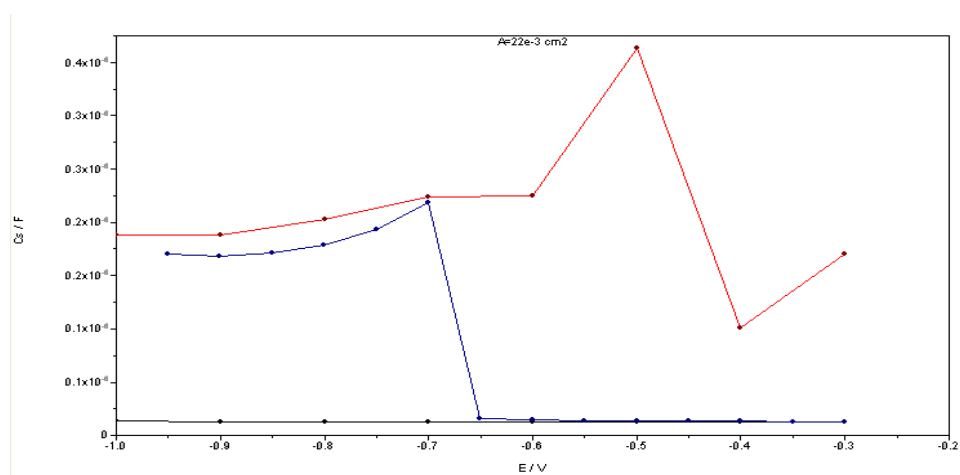


Fig.3.2.1.3(b) Grafico C vs E . Curva nera: DOPS/DPTL; curva blu: DOPS/DPTL con SP_{25} I scansione; curva rossa: DOPS/DPTL con SP_{25} II scansione.

Da un punto di vista voltammetrico il picco, dovuto al flusso di ioni indotto dalla SP_{25} , appare anticipato rispetto a quanto osservato a $\text{pH}=7$ sullo stesso tipo di bistrato e la carica sottesa è $-50 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. Anche in questo caso il picco di corrente negativa è seguito da una spalla a potenziali più negativi. Il corrispondente picco positivo sottende una carica lievemente minore, $-40 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. I due picchi sono separati da circa 60 mV .

L'aggiunta di tallio determina un aumento della corrente ai potenziali più negativi del picco dovuto alla SP_{25} , a questo corrisponde un incremento del picco di corrente positiva nella scansione di ritorno. Il picco non è reversibile, a differenza di quanto osservato a $\text{pH}=7$ [fig.3.2.1.3(c)].

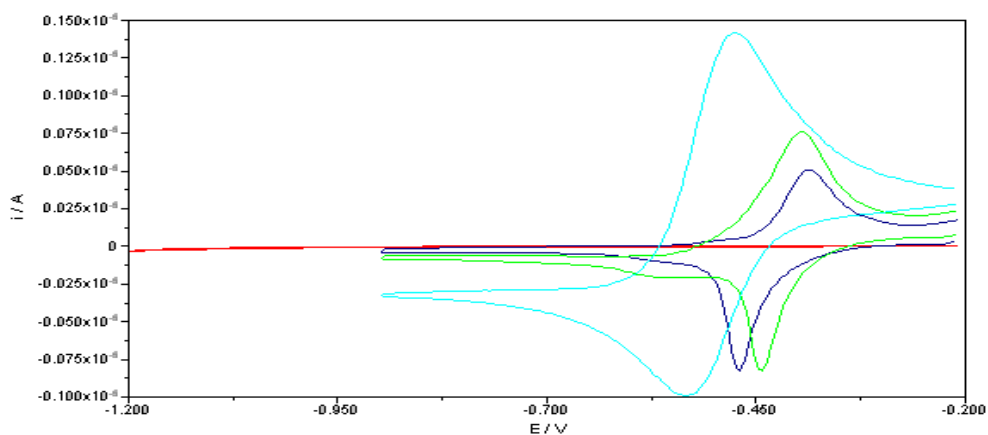


Fig. 3.2.1.3(c) Voltammogrammi ciclici ottenuti con velocità di scansione di 50 mV/s. Curva rossa: DOPS/DPTL ; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅; curva verde: DOPS/DPTL con SP₂₅ +TI⁺; curva celeste: curva di riduzione di TI⁺ su Hg.

Le curve cronocoulombometriche mostrano profilo debolmente sigmoidale ai potenziali in cui la SP₂₅ comincia ad avere un effetto, per poi diventare tipiche di un canale ohmico.

L'incorporazione del peptide è stata poi verificata limitandosi all'intervallo di potenziali fisiologico.

Sono state eseguite tre scansioni di spettroscopia d'impedenza, dalle quali si nota un'incorporazione rapida fino dalla prima scansione. Dalla seconda scansione l'effetto risulta anticipato, fino ad essere addirittura maggiore a potenziale positivi che a potenziali negativi [fig.3.2.1.3(d) e (e)].

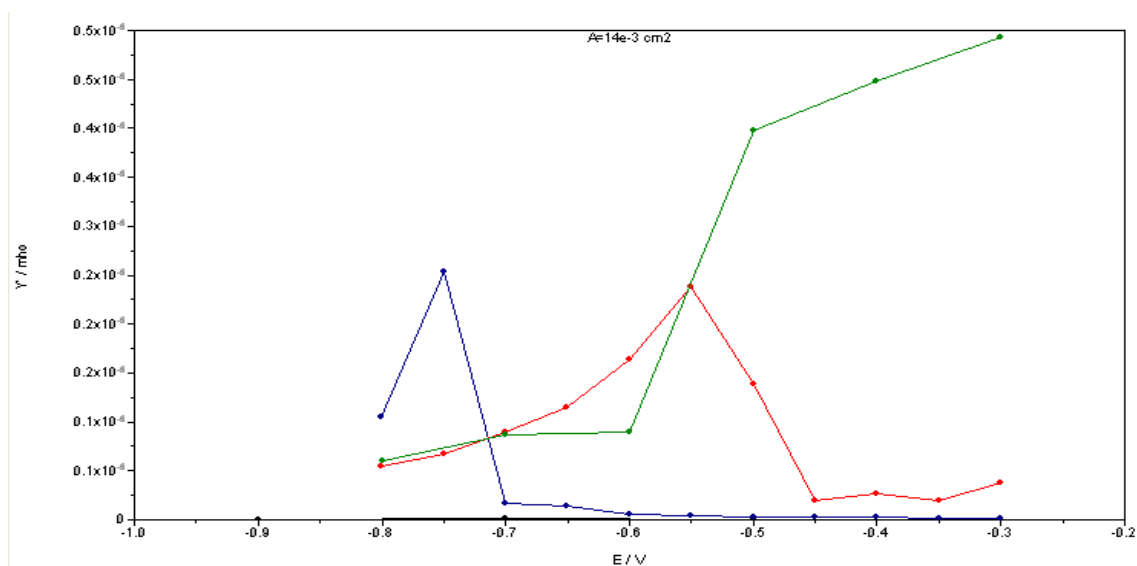


Fig.3.2.1.3(d) Grafico Y' vs E. Curva nera: DOPS/DPTL; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ I scansione; curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅ II scansione; curva verde: DOPS/DPTL con SP₂₅ III scansione.

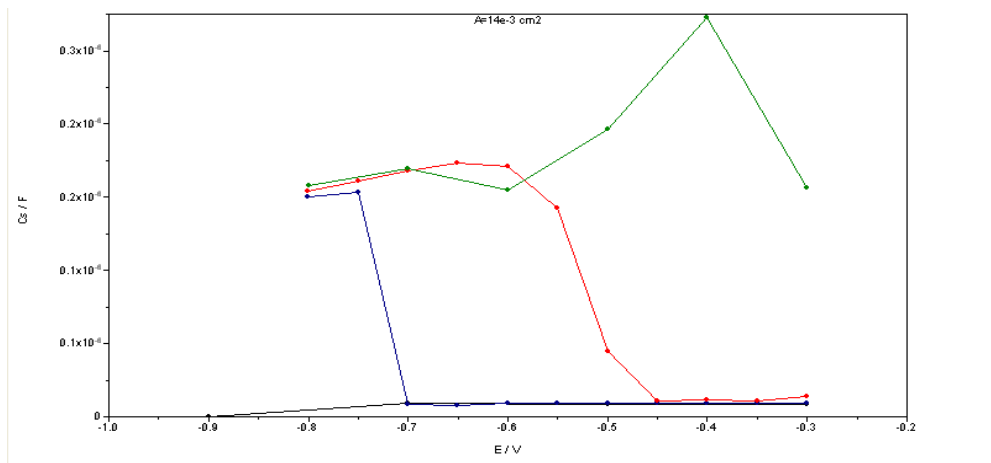


Fig.3.2.1.3(e) Grafico C vs E. Curva nera: DOPS/DPTL; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ I scansione; curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅ II scansione; curva verde: DOPS/DPTL con SP₂₅ III scansione.

Sono state eseguite misure di voltammetria ciclica sia a 50 che a 10 mV/s. In entrambe i casi i picchi, negativo e positivo, sono posizionati intorno a -0.4 V. Si osserva anche una spalla più negativa, successiva al picco negativo, che non si risolve al diminuire della velocità di scansione [fig.3.2.1.3(f)].

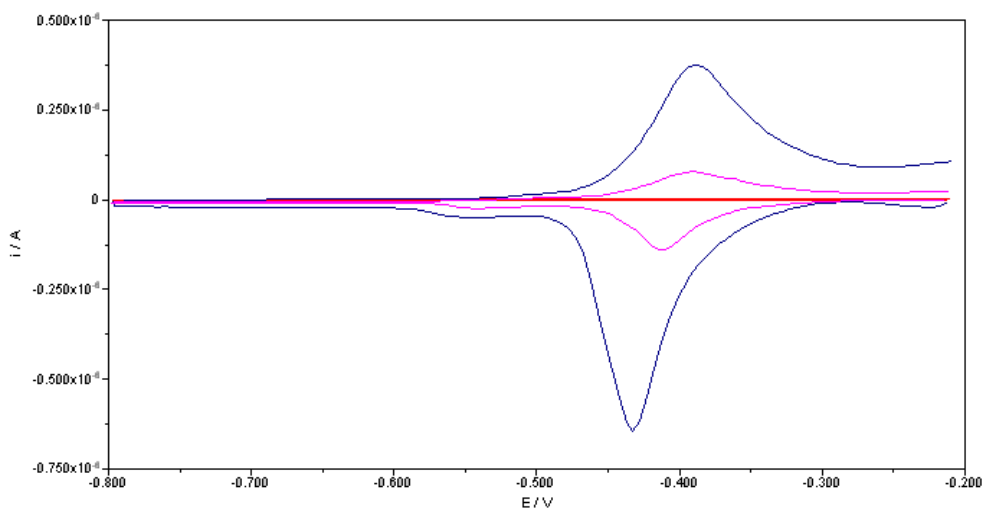


Fig. 3.2.1.3(f) Voltammogrammi ciclici. Curva rossa: DOPS/DPTL ; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ con velocità di scansione di 50 mV/s; curva viola: DOPS/DPTL con SP₂₅ con velocità di scansione di 10 mV/s.

Sono state eseguite come negli altri casi misure cronocoulombometriche partendo da un potenziale iniziale di -0.3 V e variando il potenziale finale da -0.5 a -0.8 V, si osserva sempre un passaggio di carica immediato, senza profili sigmoidali. Il valore della carica è pari a -50 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ e non varia molto né al variare del potenziale finale né all'aumentare del tempo di attesa al potenziale iniziale. Si conferma pertanto un comportamento ohmico del canale. Inoltre sono sufficienti 30" al potenziale iniziale per ripristinare le condizioni iniziali.

Il flusso ionico è pertanto rapido in entrambe i sensi [fig.3.2.1.3(g)].

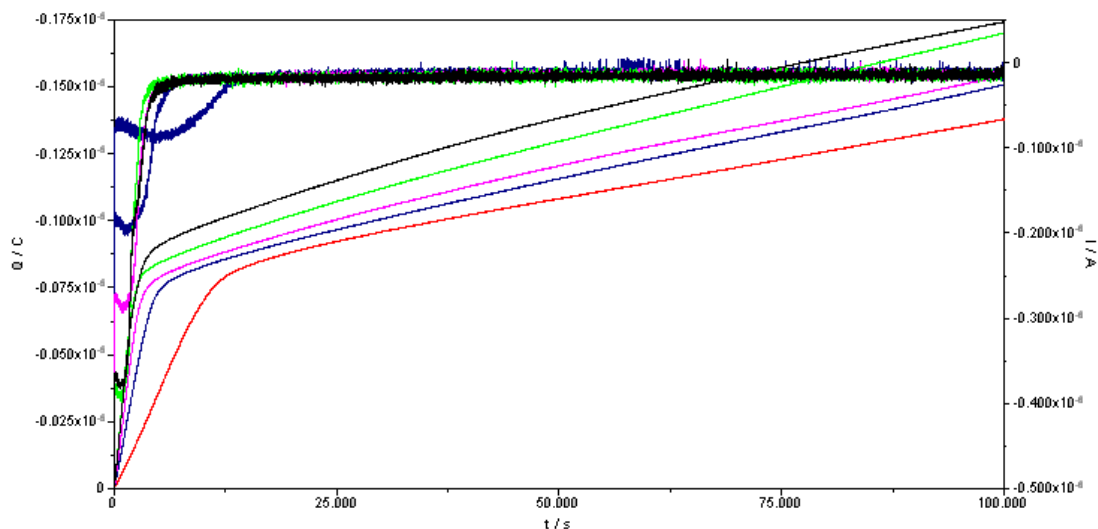


Fig.3.2.1.3(g) Grafico ottenuto attraverso misure cronocoulombometriche. Curva rossa: DOPS/DPTL con SP₂₅ a -500 mV; curva blu: DOPS/DPTL con SP₂₅ a -600 mV; curva viola: DOPS/DPTL con SP₂₅ a -700 mV ; curva verde: DOPS/DPTL con SP₂₅ a -800 mV con tempo di attesa di 30" al potenziale iniziale; curva nera: DOPS/DPTL con SP₂₅ a -800 mV con tempo di attesa di 300" al potenziale iniziale.

3.2.2 Bistrati DOPC/DPTL

3.2.2.1 Misure a pH=7

L'effetto dell'aggiunta di 25 μ L di SP₂₅ è rilevante, soprattutto sulla capacità, alla frequenza di 10 Hz e 1 Hz.

Si è verificato l'effetto dell'aggiunta di una quantità inferiore del peptide (10 μ L), osservando subito un effetto sostanziale per potenziali di poco oltre quelli dell'intervallo fisiologico ad una prima scansione. Nella seconda scansione però l'aumento di Y' e C è significativo anche a potenziali transmembranari positivi, come si osserva in figura 3.2.2.1(a) e 3.2.2.1(b).

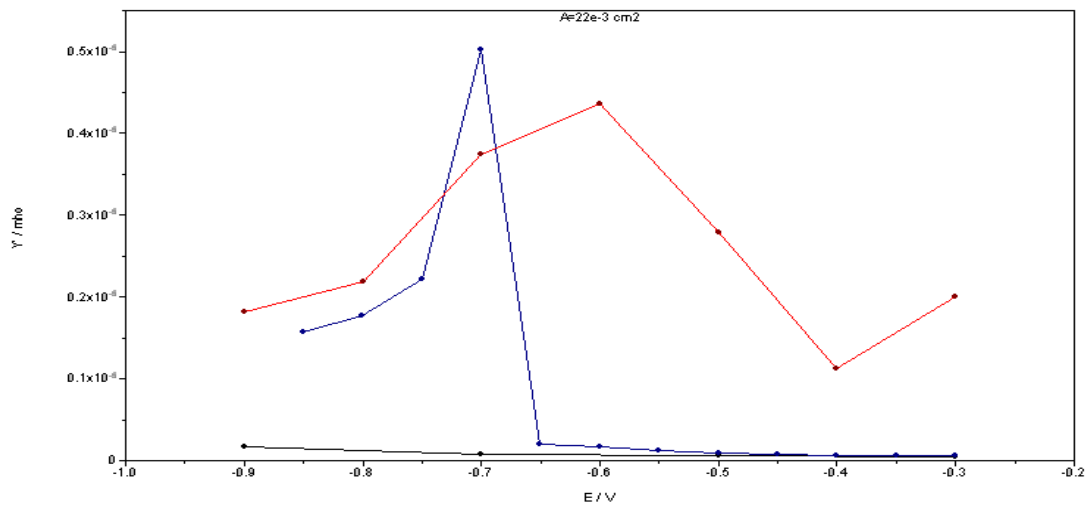


Fig. 3.2.2.1(a) Grafico Y' vs E . Curva nera: DOPC/DPTL; curva blu: DOPC/DPTL con SP_{25} I scansione; curva rossa: DOPC/DPTL con SP_{25} II scansione.

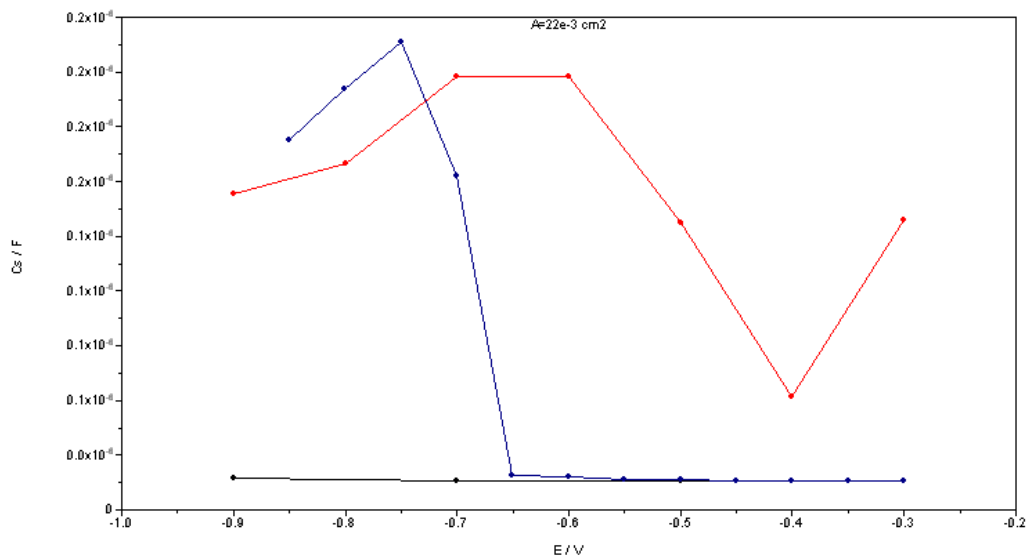


Fig. 3.2.2.1(b) Grafico C vs E . Curva nera: DOPC/DPTL; curva blu: DOPC/DPTL con SP_{25} I scansione; curva rossa: DOPC/DPTL con SP_{25} II scansione.

Dopo l'incorporazione mediante spettroscopia d'impedenza, sono state eseguite misure di voltammetria ciclica nell'arco di stabilità del film, verificando anche la stabilità dell'incorporazione, laddove ci si limiti a potenziali più prossimi a quelli corrispondenti a valori fisiologici del potenziale transmembranario. Si osservano un picco di corrente negativa ed uno di corrente positiva che permangono anche se si restringe l'intervallo di potenziali applicati. Se dopo l'incorporazione ci si limita all'arco di potenziali fisiologici, il picco negativo sembra sdoppiarsi in due contributi e spostarsi verso valori del potenziale

applicato più negativi. La carica sottesa dai due picchi è la consueta carica di saturazione dello spaziatore idrofilico da parte dello ione potassio^[20] ma, restringendo l'arco di potenziali investigato, la carica sottesa si riduce ed è pari a $-35 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ [fig. 3.2.2.1 (c)].

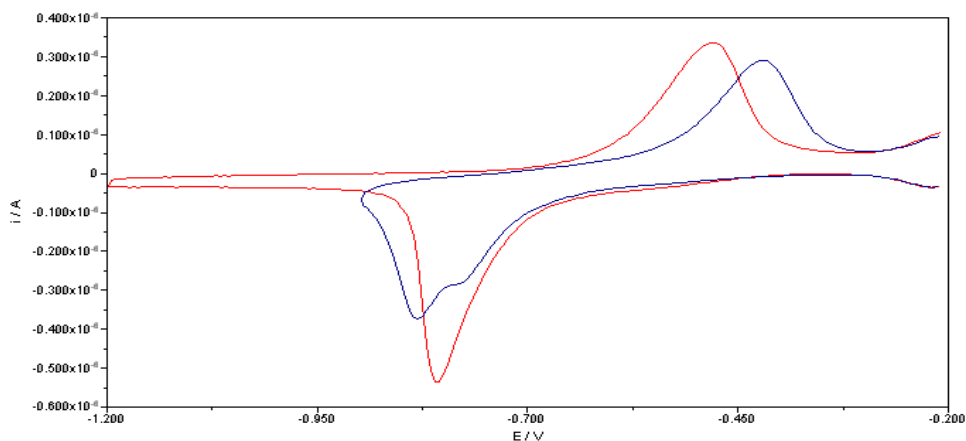


Fig. 3.2.2.1(c) Voltammogrammi ciclici. Curva rossa: DOPC/DPTL con SP_{25} ; curva blu: DOPC/DPTL con SP_{25} nell'arco di potenziali fisiologici.

Misure di voltammetria ciclica, effettuate con una concentrazione minore di SP_{25} , mostrano un picco di corrente negativa slargato, posizionato ad un potenziale leggermente più negativo di -750 mV , dovuto anche in questo caso alla sovrapposizione di due picchi separati tra loro. Esso sottende una carica di $-30 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ ed è associato ad un picco di corrente positiva, posizionato a -570 mV , che sottende una carica ancora minore.

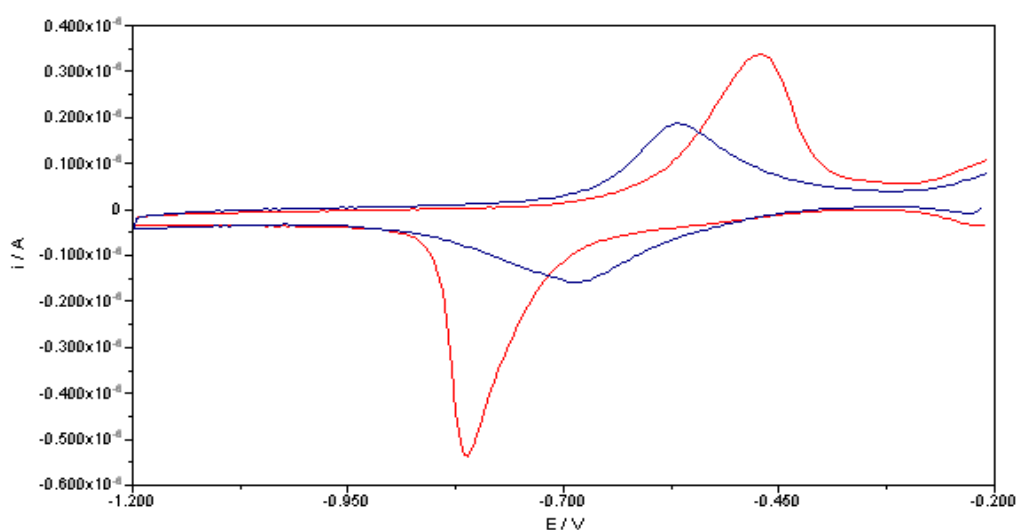


Fig. 3.2.2.1(d) Voltammogrammi ciclici. Curva rossa: DOPC/DPTL con $25 \mu\text{L}$ di SP_{25} ; curva blu: DOPC/DPTL con $10 \mu\text{L}$ di SP_{25} .

Confrontando le due serie di misure alle diverse concentrazioni, si osserva che la carica cresce con l'aumentare della concentrazione di SP_{25} [fig. 3.2.2.1 (d)].

L'aggiunta di Tl^+ , effettuata nell'arco di potenziali fisiologico, non determina alcuna corrente aggiuntiva associabile ad un suo ingresso nella porzione interna del bistrato con successiva riduzione; sembra anzi scomparire anche il picco associato all'effetto permeabilizzante di SP_{25} . Questo comportamento può essere spiegato ipotizzando una selettività del canale nei confronti degli anioni. Infatti è possibile che il flusso di anioni in uscita dal canale a potenziali negativi ostacoli l'ingresso di ioni Tl^+ . Possiamo ipotizzare che si formi il sale poco solubile $TlCl$ (formazione presumibilmente favorita dalle alte concentrazioni di Cl^- all'interno dello stesso canale).

Se ci si spinge a potenziali più negativi il Tl^+ sembra ridursi in due stadi, di cui uno corrispondente al potenziale del processo di riduzione reversibile su Hg. Nonostante il processo di inibizione della riduzione di tallio osservato lavorando esclusivamente nell'arco di potenziali fisiologico, si può ipotizzare che, spingendoci a potenziali più negativi, il tallio, sottoposto ad una forza trainante maggiore, possa ugualmente ridursi a potenziali più negativi di -1 V. I processi redox che si osservano successivamente ai potenziali più positivi possono coinvolgere la coppia Tl^+/Tl^0 , localizzata nello strato idrofilico, che pertanto non ha bisogno di diffondere nel canale per elettroidursi o elettroossidarsi, ma permangono nello strato di spaziatore. Restringendo l'arco di potenziale, i picchi tendono entrambi a ridursi progressivamente. Il tallio ossidato riesce pertanto a diffondere verso l'esterno, ma ne è inibito il reingresso [fig. 3.2.2.1(e)]

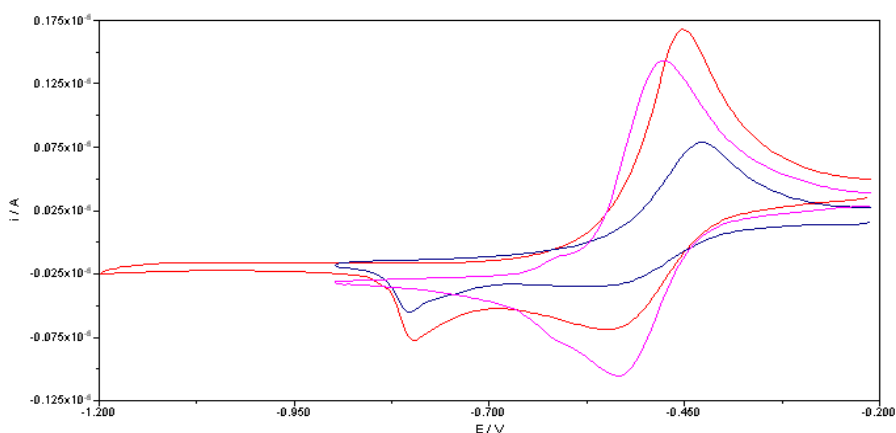


Fig. 3.2.2.1(e) Voltammogrammi ciclici. Curva rossa: DOPC/DPTL con SP_{25} e Tl^+ ; curva blu: DOPC/DPTL con SP_{25} e Tl^+ nell'arco di potenziali fisiologici; curva viola: curva di riduzione di Tl^+ su Hg.

Le misure cronocoulombometriche mostrano un doppio contributo, di cui il primo è più

rapido e pari circa a 1/6 rispetto al secondo. Si ha inoltre una gradualità della crescita della carica coinvolta, che è riproducibile anche se si effettuano nuovi salti meno negativi dopo quello a -1 V. Difficile parlare di veri e propri profili sigmoidali più ragionevolmente le curve della carica, Q , contro il tempo, t , fanno pensare a due stadi caratterizzati da una diversa velocità di flusso ionico. Si può ipotizzare che il flusso ionico abbia luogo anche a potenziali transmembranari fisiologici, ma sia inizialmente lento per poi diventare più rapido solo per valori del potenziale applicato sufficientemente negativi.

Misure cronocoulombometriche ad una concentrazione più bassa di SP_{25} confermano un effetto già da potenziali finali corrispondenti a valori decisamente fisiologici, pari a -600 mV. Anche in questo caso si osservano in modo più evidente due contributi alla carica. Si ha quindi un primo piccolo contributo rapido, e poi un successivo contributo più lento, il cui valore corrisponde approssimativamente alla carica di saturazione dello spaziatore idrofilico. La carica è minore per una concentrazione minore del lipodepsipeptide.

Si riporta un confronto tra i salti ai potenziali più negativi sulle due serie di misure a parità di tempo di attesa al potenziale iniziale [fig. 3.2.2.1(f)].

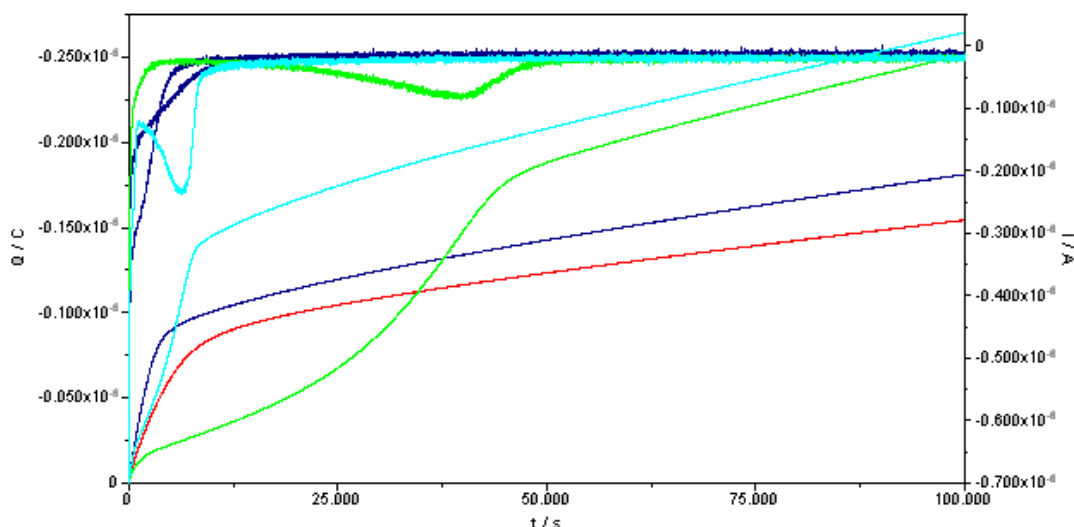


Fig.3.2.2.1(f) Grafico ottenuto attraverso misure cronocoulombometriche. Curva rossa: DOPC/DPTL con 10 μ L di SP_{25} a -800 mV ; curva blu: DOPC/DPTL con 10 μ L di SP_{25} a -1000 mV; curva verde: DOPC/DPTL con 25 μ L di SP_{25} a -800 mV; curva celeste: DOPC/DPTL con 25 μ L di SP_{25} a -1000 mV .

Volendo infine fare una valutazione più accurata dell'effetto del potenziale applicato sull'incorporazione della SP_{25} , ci siamo limitati all'intervallo dei potenziali applicati

corrispondente a valori di potenziale transmembranario fisiologici, sulla base del nostro modello^[19].

Le misure di spettroscopia d'impedenza, effettuate tra -0.3 V e -0.8 V, mostrano un effetto decisamente trascurabile fino a -0.8 V.

Misure di voltammetria ciclica, effettuate nello stesso arco di potenziali, non evidenziano alcun tipo di effetto.

Infine misure di cronocoulombometria mostrano un netto passaggio di carica solo per potenziali più negativi di -0.9V.

3.2.2.2 Misure a pH=5.4

È stata eseguita la stessa sequenza di misure fatte a pH=7. È stata utilizzata la concentrazione più bassa di SP₂₅.

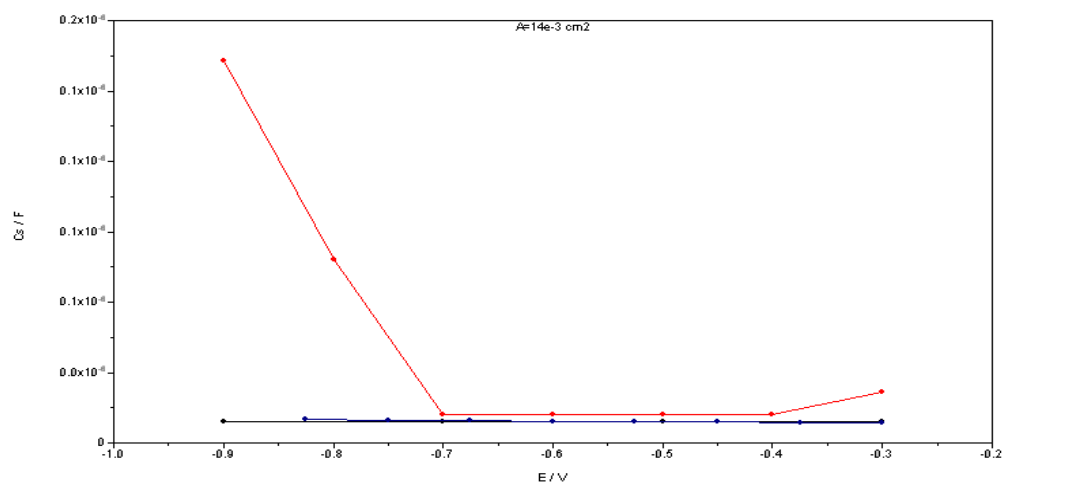


Fig.3.2.2.2(a) Grafico di C vs E. Curva nera: DOPC/DPTL; curva blu: DOPC/DPTL con SP₂₅ I scansione; curva rossa: DOPC/DPTL con SP₂₅ II scansione.

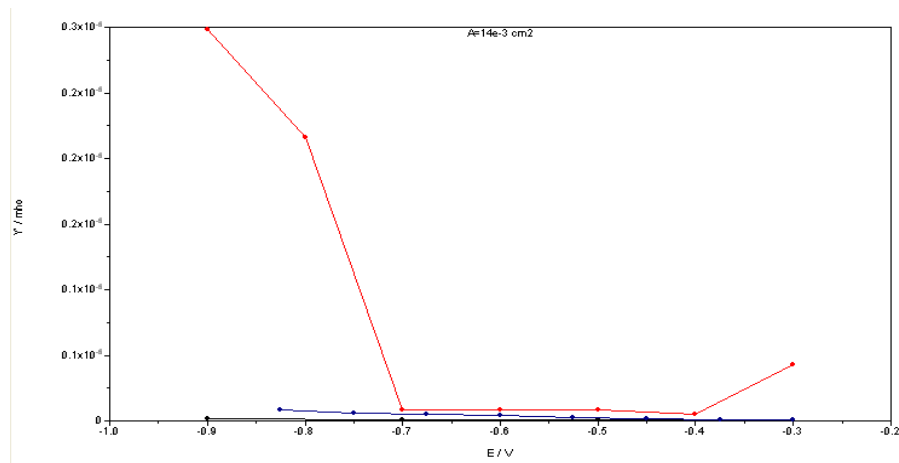


Fig. 3.2.2.2(b) Grafico Y' vs E . Curva nera: Curva nera: DOPC/DPTL; curva blu: DOPC/DPTL con SP_{25} I scansione; curva rossa: DOPC/DPTL con SP_{25} II scansione.

Misure di spettroscopia d'impedenza indicano un effetto maggiore alla seconda scansione sia sul valore della capacità, C , che su quello dell'ammittenza in fase, Y' , contro il potenziale, alla frequenza di 10 Hz [fig.3.2.2.2 (a) e (b)]. A differenza delle misure fatte a $pH=7$, non si osserva nella seconda scansione un'alterazione di Y' e C a tutti i potenziali. L'effetto è però anticipato a potenziali più prossimi a quelli fisiologici. In nessun caso, prima dell'incorporazione efficace si osservano semicerchi aggiuntivi nel grafico del modulo. L'effetto è confrontabile con quello ottenuto sui bistrati nei quali il monostrato distale era costituito da DOPS, allo stesso pH . La somiglianza è ragionevole poiché, per questo valore del pH , entrambi i bistrati dovrebbero essere switterionici e quindi neutri.

Misure di voltammetria ciclica evidenziano, anche in questo caso, la presenza di un picco di corrente negativa, slargato ed apparentemente sdoppiato, a cui si contrappone un picco di corrente positiva. Entrambe i picchi rientrano nell'arco di potenziali fisiologici e sottendono una carica di poco inferiore ai $-60 \mu C/cm^2$. La carica è quindi maggiore di quella di saturazione dello strato idrofilico. Se si restringe l'arco di potenziali investigato all'intervallo fisiologico, i picchi tendono ad allontanarsi e la loro intensità si riduce progressivamente [fig .3.2.2.2(c)]. Una carica osservata, maggiore di quella di saturazione, sembra indicare la somma di due diversi processi che avvengono con diversa velocità e che non si differenziano variando l'arco di potenziale investigato come evidenziato invece a $pH=7$.

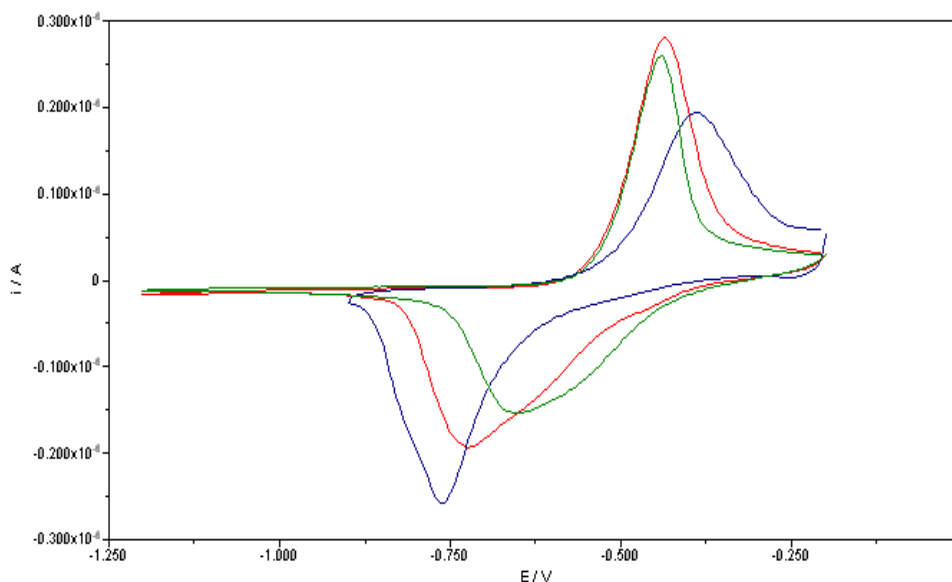


Fig. 3.2.2.2(c) Voltammogrammi ciclici. Curva rossa: DOPC/DPTL con SP_{25} ; curva blu: DOPC/DPTL con SP_{25} nell'arco di potenziali fisiologici; curva verde: DOPC/DPTL con SP_{25} dopo cronocoulombometria.

Le curve cronocoulombometriche, anche in questo caso, non mostrano un chiaro profilo sigmoideale che faccia ipotizzare un meccanismo di nucleazione e crescita del canale [fig.3.2.2.2(d)]. Ciò è in accordo con un funzionamento ohmico di canale della SP_{25} . Solo a -700 mV si ha un profilo in cui la pendenza varia nel tempo. In questo caso, però, l'osservabile può essere associato ad una variazione della velocità con cui fluiscono gli ioni, piuttosto che ad un meccanismo di nucleazione e crescita del canale. Tale comportamento è assolutamente confrontabile con quello osservato a pH=7. Inoltre un tempo di 30" al potenziale iniziale è sufficiente a ripristinare le condizioni iniziali. Ciò è confermato dalla carica assolutamente identica che passa in due salti successivi e che è pari a $-60 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ e dal fatto che due salti a -1 V, con tempi di attesa di 30" e 300", sono assolutamente confrontabili. Questo secondo dato conferma inoltre che il canale non si distrugge né si chiude a potenziali positivi: ulteriore conferma del comportamento ohmico [fig. 3.2.2.2(d)]. Anche in questo caso, come a pH=7, per la concentrazione di SP_{25} più elevata, si possono individuare ai potenziali intermedi due contributi alla carica, di cui uno rapido e molto piccolo, mentre un secondo più consistente e più lento.

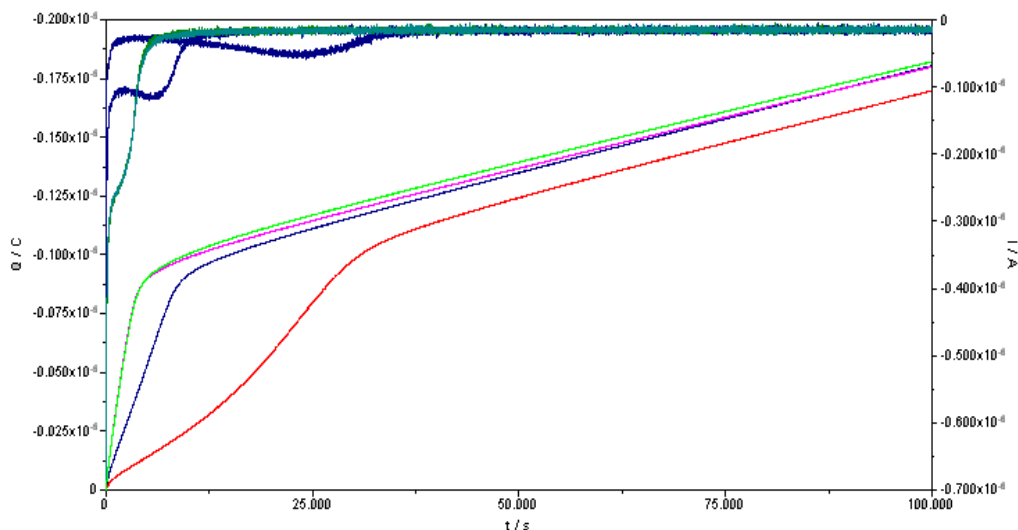


Fig.3.2.2.2(d) Grafico ottenuto attraverso misure cronocoulometriche. Curva rossa: DOPC/DPTL con SP25 a -700 mV; curva blu: DOPC/DPTL con SP25 a -800 mV; curva viola: DOPC/DPTL con SP25 a -1000 mV con tempo di attesa di 30" al potenziale iniziale; curva verde: DOPC/DPTL con SP25 a -1000 mV con tempo di attesa di 300" al potenziale iniziale.

3.2.2.3 Misure a pH=3

Anche in questo caso è stata seguita la stessa procedura per l'incorporazione del peptide, aggiunto con concentrazioni pari a 1 e 0.4 $\mu\text{g/mL}$.

Misure di spettroscopia d'impedenza mostrano un effetto immediato a partire da potenziali di -700/-750 mV e risulta anticipato di circa 100 mV alla seconda scansione per la concentrazione più elevata, mentre sembra che il peptide sia efficace anche a potenziali più positivi dalla seconda scansione sulla concentrazione più bassa [fig.3.2.2.3(a) e (b)]. Impossibile associare la differenza del comportamento alla concentrazione, più probabile che dipenda in maniera critica dall'entità dell'incorporazione, legata anche alla compattezza del bistrato originale.

L'effetto sul grafico del modulo per potenziali che precedono il potenziale di incorporazione efficace è trascurabile, più significativo a potenziali più negativi.

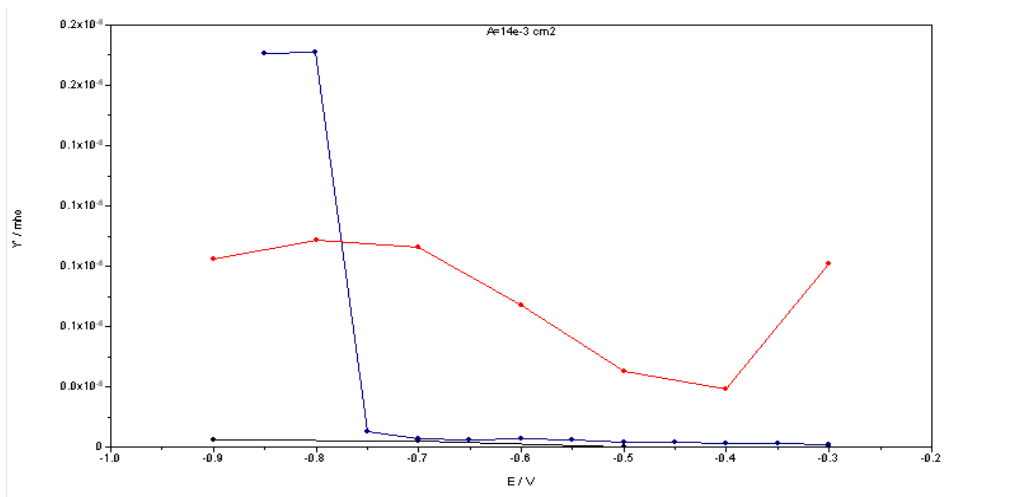


Fig.3.2.2.3(a) Grafico Y' vs E. Curva nera: DOPC/DPTL; curva blu: DOPC/DPTL con SP_{25} I scansione; curva rossa: DOPC/DPTL con SP_{25} II scansione.

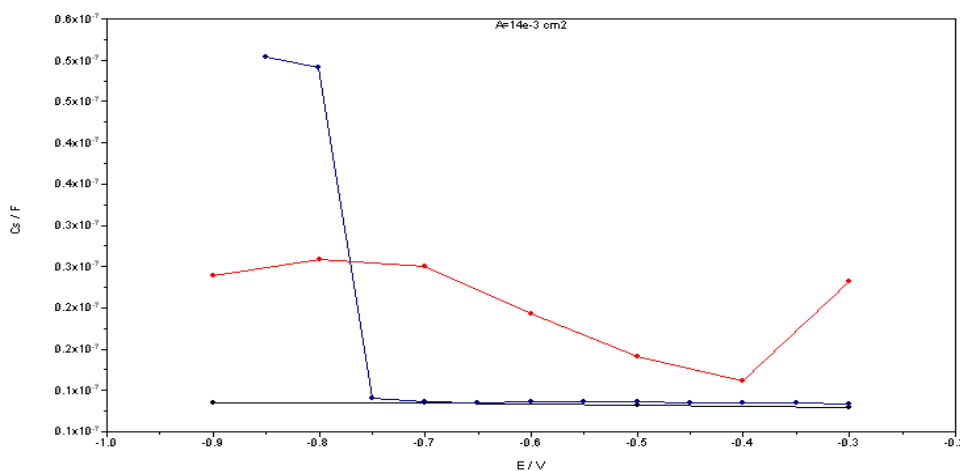


Fig.3.2.2.3(b) Grafico C vs E. Curva nera: DOPC/DPTL; curva blu: DOPC/DPTL con SP_{25} I scansione; curva rossa: DOPC/DPTL con SP_{25} II scansione.

In registrazioni voltammetriche l'aggiunta di SP_{25} alla concentrazione più elevata determina la comparsa di un picco di corrente negativa, evidentemente sdoppiato, con due massimi intorno a -640 mV e -800 mV. La somma delle cariche sottese è pari alla consueta carica di saturazione tipica dello ione potassio, di poco inferiore a $-50 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. A questo picco negativo si contrappone un picco di corrente positiva che si colloca a potenziali più positivi, al limite dell'intervallo di stabilità del film. Se si restringe l'arco di potenziali investigato, i due contributi di corrente negativa si differenziano, quello localizzato a potenziali più negativi sembra addirittura scomparire. Il picco di corrente positiva slitta a valori di potenziale più positivi. L'aggiunta di tallio determina addirittura la scomparsa del picco voltammetrico dovuto alla SP_{25} , come osservato a $\text{pH}=7$, ma, se si allarga il campo di

potenziali investigato, si torna a vedere il picco negativo sdoppiato proprio della SP_{25} che è in realtà solo spostato verso valori più negativi di poco meno di 100 mV.

Anche con la concentrazione minore di SP_{25} , si osserva un picco negativo, che permane se ci si limita all'arco di potenziali fisiologici, ed un picco positivo non completo. La carica sottesa dal picco di corrente negativo è leggermente inferiore a $-40 \mu\text{C}/\text{cm}^2$, ma sempre compatibile con quella di saturazione dello spaziatore idrofilico. L'aggiunta di tallio determina un effetto assolutamente riproducibile a quello osservato precedentemente. La spiegazione può essere la stessa data per l'analogo effetto osservato a $\text{pH}=5.4$, ossia di un fenomeno di occlusione del canale da parte del sale insolubile TlCl che precipita all'interno del canale [fig.3.2.2.3(c)].

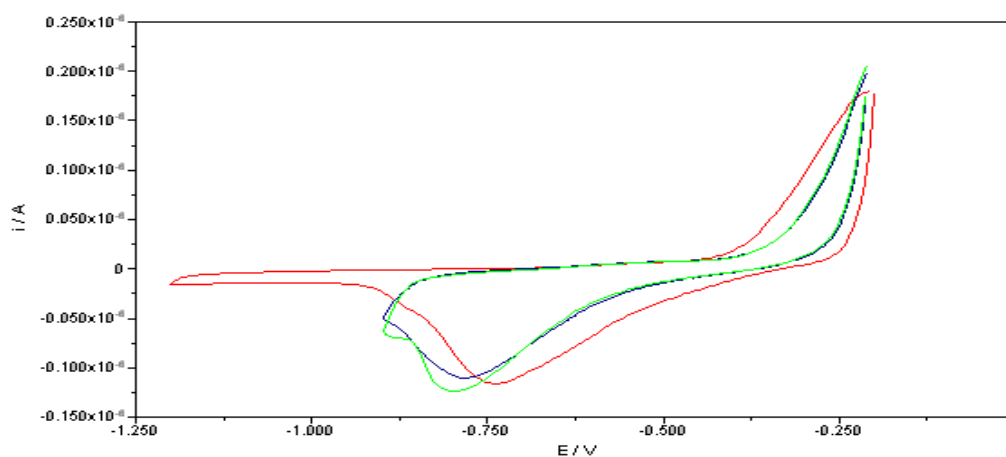


Fig. 3.2.2.3(c) Voltammogrammi ciclici. Curva rossa: DOPC/DPTL con SP_{25} ; curva blu: DOPC/DPTL con SP_{25} nell'arco di potenziali fisiologici; curva viola: DOPC/DPTL con $SP_{25} + \text{TI}^+$ nell'arco di potenziali fisiologici

Misure cronocoulombometriche a pH acido indicano una significativa anticipazione del processo di porazione indotto da SP_{25} , presumibilmente a causa di una variazione del potenziale transmembranario nullo al variare del pH [lavoro in preparazione]. Passando infatti da $\text{pH}=7$ a $\text{pH}=3$ si è osservato un'anticipazione del potenziale transmembranario nullo di circa +250 mV. Non si osservano profili sigmoidali se non con un ridottissimo piede, che non fanno pensare ad un meccanismo di nucleazione e crescita. Anche in questo caso il canale mostra un comportamento ohmico. Un intervallo di 30" al potenziale iniziale è sufficiente affinché si ripristini la condizione precedente al salto. Il canale non viene strutturalmente alterato da tempi fino a 300" al potenziale iniziale, come indica la riproducibilità tra due salti consecutivi separati da 300" al potenziale iniziale positivo [fig.3.2.2.3.(d)]. Ciò conferma che il canale non si chiude a potenziali positivi.

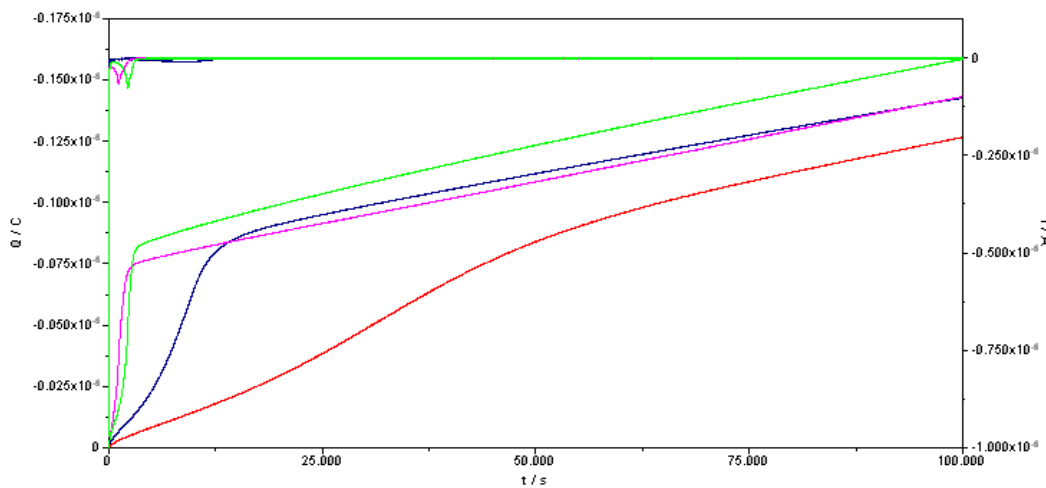


Fig.3.2.2.3(d) Grafico ottenuto attraverso misure cronocoulometriche. Curva rossa: DOPC/DPTL con SP_{25} a -600 mV; curva blu: DOPC/DPTL con SP_{25} a -800 mV; curva viola: DOPC/DPTL con SP_{25} a -1000 mV con tempo di attesa di 30" al potenziale iniziale; curva verde: DOPC/DPTL con SP_{25} a -1000 mV con tempo di attesa di 300" al potenziale iniziale.

Capitolo 4

Discussione dei risultati

Sulla base dei dati riportati in letteratura è noto che ciclodepsipeptidi della classe della peptine sono in grado di formare canali di membrana. In particolar modo SP₂₅ forma canali asimmetrici con una debole selettività nei confronti degli anioni. Da misure di conducibilità su BLMs è stato osservato che, applicando un potenziale negativo sul lato nel quale è stato aggiunto il peptide, si determina l'apertura del canale. È stato ipotizzato che questo sia dovuto ad una parziale estromissione della SP₂₅ incorporata al bistrato in seguito all'applicazione del potenziale^[3]. Infatti, SP₂₅ ha una carica netta positiva sull'anello lattonico pari a +2 a pH=7. L'applicazione successiva di un potenziale di segno opposto determina un lento processo di chiusura del canale, con decadimento esponenziale della corrente.

Abbiamo utilizzato le tecniche elettrochimiche in nostro possesso applicandole allo studio dell'effetto della SP₂₅ su mono- e bi-strati supportati da Hg, allo scopo di comprendere meglio il meccanismo di formazione del canale. È importante sottolineare che, a differenza dei modelli utilizzati, nel nostro caso disponiamo di:

- un monostrato col quale possiamo investigare la natura delle interazioni della SP₂₅ con la superficie della membrana;
- un bistrato asimmetrico col quale investigare le interazioni della SP₂₅ con lo strato compatto e la sua attitudine a formare canali. L'assenza di un vero e proprio monostrato fosfolipidico contrapposto a quello distale, dal momento che nel nostro caso il monostrato interno è privo della regione delle teste polari, ci permette di verificare che ruolo abbia nella formazione del canale stesso la superficie interna della membrana citoplasmatica.

Per quanto riguarda lo studio delle interazioni superficiali esaminato con misure di voltammetria AC con risoluzione di fase, voltammetria ciclica e spettroscopia d'impedenza su monostrati di DOPC e DOPS al variare del pH della soluzione elettrolitica, i risultati possono essere così riassunti:

- su monostrati di DOPC SP₂₅ interagisce debolmente sia con la regione delle teste che con la regione delle code, come si evince dal risultato delle misure voltammetriche. Ridotto è anche l'effetto sul profilo delle curve di Y' e C vs E, ottenute da misure di

spettroscopie d'impedenza. La permeabilizzazione nei confronti dello ione elettroattivo Cd^{2+} è limitata ai valori più negativi del potenziale applicato ad indicare per lo più un effetto aspecifico di destabilizzazione nella regione di potenziale che si trova al limite dell'intervallo di stabilità, dove il film risente più facilmente di specie interagenti in maniera aspecifica.

- Nel caso di monostrati di DOPS le interazioni sono decisamente più significative ed implicano sia un'interazione con le teste polari, evidenziata da una forte alterazione dei picchi di riorientamento, sia un'interazione con la regione delle code, evidenziata invece da un'alterazione della capacità sul minimo. Entrambi gli effetti sono immediati, ad indicare una rapida interazione del peptide col sistema auto-organizzato. Le modalità di interazione dipendono debolmente dal pH. In realtà si hanno due gruppi di risultati apparentemente in disaccordo.

A pH 7 e 5.4 si ha maggiore permeabilità verso Cd^{2+} , massima a pH=7 dove il processo sembra quasi reversibile. Al contempo è meno immediato l'effetto di alterazione del profilo voltammetrico. A pH=3 la permeabilità verso Cd^{2+} è scarsa, ma si ha un effetto maggiore nella regione di minimo.

Il fatto che la SP_{25} carica positivamente instauri un'interazione maggiore con monostrati di DOPS a pH=3, presumibilmente carica dello stesso segno, sembra contraddire semplici considerazioni di natura elettrostatica, che porterebbero ad ipotizzare interazioni massime tra la SP_{25} carica positivamente e le teste della DOPS cariche negativamente a pH=7. Possiamo però ipotizzare che le interazioni primarie che guidano l'incorporazione di SP_{25} nel monostrato siano quelle dovute ai gruppi idrofobici.

Una volta che sia instaurata un'interazione, possono essere formulate due ipotesi per la successiva penetrazione:

1. la presenza di SP_{25} altera la disposizione ordinata delle teste su piani paralleli alla superficie della membrana, che è alla base dell'anticipazione della protonazione del gruppo fosfatidico, presente sulle teste polari^[17,18]. Così facendo può causare una deprotonazione del gruppo fosfato che può interagire con la SP_{25} ;
2. In alternativa si può ipotizzare che, dopo l'interazione della SP_{25} con la porzione idrofoba della membrana, si combinino l'azione repulsiva della regione delle teste di quest'ultima con quella attrattiva di una densità di carica negativa sulla superficie del metallo. I due effetti combinati tenderanno a "spingere" la molecola di SP_{25} verso la

superficie di Hg all'interno del monostrato, che in questo modo risulta completamente destabilizzato.

Questa seconda ipotesi giustifica anche la minore permeabilità verso Cd^{2+} osservato a $\text{pH}=3$. In questo caso infatti Cd^{2+} risente dell'effetto repulsivo della carica superficiale del monostrato.

Sulla base di queste considerazioni è ragionevole supporre un effetto minore a $\text{pH}=5$. Ciò concorda anche con i risultati su DOPC dove SP_{25} si limita presumibilmente a collocarsi sulla superficie senza interagirvi, ancorata però tramite la sua porzione idrofoba.

Nel caso di bistrati fosfolipidici supportati, i risultati sono in accordo con quelli ottenuti su monostrati ed indicano un'incorporazione più rapida e soprattutto più stabile della SP_{25} in bistrati nei quali il monostrato distale sia costituito da DOPS. Questo risultato conferma quanto osservato in vivo relativamente alla maggiore selettività della SP_{25} nei confronti dei batteri gram-positivi, a causa del rivestimento esterno che li circonda, carico negativamente.

In particolar modo:

- voltammetrie cicliche condotte su bistrati, in cui il monostrato distale è costituito sia da DOPC che da DOPS, presentano un profilo della corrente contro il potenziale in cui sono sempre distinguibili due picchi; uno di corrente negativa ed uno di corrente positiva, che non si diversificano significativamente per entità della carica e sono centrati sul potenziale transmembranario nullo;
- cronocoulombometrie mostrano profili lievemente diversi a seconda del pH della soluzione e del lipide che costituisce il monostrato distale. Hanno però la caratteristica comune di profili non sigmoidali, che potrebbero far ipotizzare un processo di nucleazione e crescita del canale. Inoltre l'entità della carica che passa non dipende dal tempo di permanenza al potenziale iniziale. Tutti i risultati acquisiti portano a concludere che la SP_{25} formi canali ohmici^[16], il cui funzionamento non dipende dal valore del potenziale transmembranario. Allo stesso tempo, però, il fatto che su DOPC si osservi un progressivo allontanamento dei picchi laddove ci si limiti ad un arco più limitato di potenziali, sembra indicare che, in questo caso, l'incorporazione efficace della SP_{25} sia reversibile e richieda potenziali transmembranari non fisiologici.

Nel caso della DOPS l'incorporazione è più rapida e stabile anche a potenziali fisiologici. Questo risultato è in accordo con quanto osservato su monostrati di DOPS per tutti i valori

di pH investigati e può essere analizzato nella stessa maniera.

A parte la stabilità dell'incorporazione, si può osservare, a pH=5, la maggiore somiglianza tra l'effetto della SP₂₅ su bistrati in cui il monostrato distale è DOPS rispetto a quelli in cui è DOPC, forse per la carica globalmente neutra che le teste polari che entrambi i fosfolipidi hanno in queste condizioni. Sulla base di quanto osservato su monostrati, le differenze nella fase di adsorbimento permangono, ma gli stadi di penetrazione ed apertura del canale non si diversificano, se non per una maggiore stabilità nel caso di monostrati distali di DOPS. A questo proposito si può anche evidenziare la presenza di un picco voltammetrico negativo sdoppiato su bistrati di DOPC a tutti i pH, che è invece assente su DOPS a pH 3 e 7 ed è presente, ma in maniera meno evidente, a pH=5. Questo doppio contributo, la cui natura non è ancora chiarita, indica però due fasi nella permeabilizzazione. Il contributo di entità minore è anticipato a pH 5 e 7, mentre è posticipato a pH=3. È possibile pertanto che i due processi non risentano allo stesso modo delle variazioni del potenziale transmembranario, il cui valore zero si sposta di circa +250 mV passando da pH=7 a pH=3.

Questa ipotesi è ragionevole sia attribuendo i due stadi alla formazione successiva di due tipi di canale, che a due processi diversi, quali formazione del canale e successiva permeabilizzazione.

Significativo è poi l'effetto dello ione TI⁺. Nel caso dei monostrati si era osservato, se si eccettua il caso di monostrati di DOPS a pH 7, solo una permeabilizzazione aspecifica verso Cd²⁺. Nel caso di bistrati lo ione TI⁺ sembra avere addirittura l'effetto di bloccare il canale della SP₂₅, spostandone l'effetto a valori non fisiologici del potenziale transmembranario. Questo comportamento può essere spiegato tenendo conto che la SP₂₅ mostra una debole selettività nei confronti degli anioni. Possiamo ipotizzare quindi che, durante la scansione negativa, gli ioni Cl⁻, entrati nello strato idrofilico a contatto con il metallo a potenziali transmembranari positivi, escano dal canale. L'elevata concentrazione locale di ioni cloruro può determinare la precipitazione del sale insolubile TICI rendendo TI⁺ indisponibile ad elettroridursi su Hg. Laddove però si applichino potenziali molto negativi, la forza trainante per l'elettroreduzione di TI⁺ prevale e lo ione si elettroreduce dando luogo al profilo voltammetrico osservato. Potenziali applicati corrispondenti a potenziali transmembranari fisiologici non sono sufficienti affinché ciò possa aver luogo. Anche questo tipo di considerazione sembra risentire però della natura del monostrato distale e della sua carica superficiale e rappresenta un aspetto ancora da chiarire.

Capitolo 5

Conclusioni

Sulla base dei dati riportati possiamo concludere:

- SP₂₅ forma canali ohmici su bistrati supportati, indipendentemente dalla composizione fosfolipidica del monostrato distale e del pH della soluzione;
- la formazione del canale segue un adsorbimento superficiale che implica interazioni significative con le teste polari e con le code nel caso della DOPS, mentre è apparentemente limitato ad un'interazione idrofobica con le code nel caso della DOPC;
- i canali hanno una debole selettività nei confronti degli anioni, anche se la loro presenza può determinare una perturbazione della compattezza dello strato lipidico auto-organizzato, causando quindi un passaggio aspecifico di ioni non selettivo per carica;
- si osservano su bistrati neutri due livelli alla carica che fluisce, ad indicare due stadi nella permeabilizzazione, dei quali il contributo maggiore è più sensibile alle variazioni del potenziale transmembranario;
- la formazione del canale non coinvolge le teste polari del monostrato interno della membrana che, nel nostro caso, sono assenti. I processi di formazione, apertura e permeazione, sono a carico della SP₂₅ e dei fosfolipidi del monostrato esterno;
- Con il nostro modello non si osservava il fenomeno di chiusura con decadimento esponenziale della corrente riportato in letteratura a seguito di un'inversione del potenziale da cis + a cis -. È ipotizzabile che questo fenomeno coinvolga le teste polari del monostrato lipidico interno.

Per quanto riguarda il lavoro futuro, dovremo occuparci di:

- ✓ un'ulteriore verifica della selettività verso gli anioni mediante l'uso del sale sodico dell'ATP e successiva aggiunta di Cl⁻;
- ✓ un eventuale utilizzo di miscele lipidiche che formano zattere nel monostrato distale;
- ✓ confrontare i nostri risultati con quelli derivanti dall'analisi di altri lipodepsipeptidi.

Bibliografia

- [1] I. Grgurina, F. Mariotti, V. Fogliano, M. Gallo, A. Scaloni, N.S. Iacobellis, P. Lo Cantore, L. Mannina, V. Van Axel Castelli, M. L. Greco, A. Graniti, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol.1597 (2002) 81-89;
- [2] M. Dalla Serra, G. Fagioli, P. Nordera, I. Bernhart, C. Della Volpe, D. Di Giorgio, A. Ballio, G. Menestrina, *MPMI*, 12(5) (1999) 391-400;
- [3] M. Dalla Serra, I. Bernhart, P. Nordera, D. Di Giorgio, A. Ballio, G. Menestrina, *MPMI*, 12(5) (1999) 401-409;
- [4] C. Julmanop, Y. Takano, J. Takemoto, T. Miyakawa, *J. Gen. Microbiol.*, 139 (1993) 2323-2327;
- [5] A. Carpaneto, M. Dalla Serra, G. Menestrina, V. Fogliano, F. Gambale, *J. Membrane Biol.* 188, (2002) 237-248 ;
- [6] M.F. Bensaci, P.A. Gurnev, S.M. Bezrukov, J.Y. Takemoto, Original research article (2011);
- [7] M.L. Hutchinson, D.C. Gross, *MPMI*, 10(5) (1997) 347-354;
- [8] A. Nelson, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 303 (1991) 852-864;
- [9] L. Becucci, M. R. Moncelli and R. Guidelli, *Biophysical journal*, vol.82 (2002) 852-864;
- [10] L. Becucci, M. Innocenti, S. Bellandi, R. Guidelli, *Electrochimica Acta*, vol.12 (2013) 719-726;
- [11] A. Nelson, *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions*, vol.89 (1993) 2799-2805.
- [12] C. Peggion, F. Formaggio, C. Toniolo, L. Becucci, M.R. Moncelli, R. Guidelli, *Langmuir*, 17 (2001) 6585– 6592;
- [13] L. Becucci, R. Guidelli, Q. Liu, R.J. Bushby, S.D. Evans, *J. Phys. Chem., B* 106 (2002) 10410– 10416;
- [14] L.M. Williams, S.D. Evans, T.M. Flynn, A. Marsh, P.F. Knowles, R.J. Bushby, N. Boden, *Langmuir*, 13 (1997) 751– 757;

- [15] L. Becucci, M. Papini, D. Muller, A. Scaloni, G. Veglia, R. Guidelli, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1808 (2011) 2745-2752;
- [16] L. Becucci, R. Guidelli, *Pharmaceuticals*, 7(2) (2014) 136-168;
- [17] M. R. Moncelli, L. Becucci, R. Guidelli, *Biophys. J.*, 66 (1994) 1969-1980;
- [18] M. R. Moncelli, L. Becucci, *J. Electroanal. Chem.*”, 385 (1995) 183-189;
- [19] L. Becucci, R. Guidelli, *Soft Matter*, 7 (2011) 2195-2201;
- [20] L. Becucci, R. Guidelli, *Soft Matter*, 5 (2009) 2294-2301;
- [21] L. Becucci, A.Santucci, R.Guidelli, *J.* , 111 (2007) 9814-9820