



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche Fisiche
e Naturali

Corso di Laurea in
Chimica
Curriculum Scienze
Chimiche

***Uso di tecniche
elettrochimiche per lo studio
delle interazioni tra
glucopeptidi e membrane
biomimetiche.***

***Electrochemical techniques
applied to the study of the
interaction between
glucopeptides and
biomimetic membranes.***

Relatore

Maria Luisa Foresti

Correlatore

Lucia Becucci

Candidato

Arianna Toppi

Anno Accademico 2013/2014

Indice

Capitolo 1: Introduzione	3
1.1 Sindrome di Rett.....	3
1.2 Sintesi peptidica	6
1.3 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS).....	6
1.3.1 Gruppi Protettori.....	9
1.3.2 Reagenti Attivanti.....	11
1.3.3 Supporto Solido	13
1.4 Sintesi di <i>N</i> -glicopeptidi.....	14
1.4.1 Metodo Convergente	15
1.4.2 Metodo dei building-block	15
1.5 Sonde antigeniche sintetiche specifiche per malattie autoimmuni.....	16
1.6 Membrane biomimetiche	17
1.7 Tecniche elettrochimiche.....	22
1.7.1 Voltammetria ciclica.....	22
1.7.2 Voltammetria AC con risoluzione di fase	25
1.7.3 Spettroscopia d'impedenza elettrochimica	26
1.8 Scopo della tesi.....	32
Capitolo 2: Parte sperimentale	33
2.1 Caratterizzazione elettrochimica delle interazioni peptidi/membrana biomimetica.....	33
2.1.1 Assetto sperimentale	33
2.1.1.1 Cella elettrochimica.....	33
2.1.1.2 Camera di lavoro	35
2.1.2 Preparazione e caratterizzazione di monostrati lipidici supportati da mercurio.....	36
2.1.3 Preparazione e caratterizzazione di bistrati lipidici supportati da mercurio	37
2.1.4 Reagenti.....	39
Capitolo 3: Risultati	40
3.1 CT35, CSF114 e CSF114(Glc) su monostrati fosfolipidici supportati da mercurio.....	40
3.1.1 Monostrati di DOPC.....	41
3.1.1.1 Effetto di una variazione del pH.....	42
3.1.2 Monostrati di DOPC/SM/Chol	43

3.1.2.1 Effetto dell'aggiunta di CT35 e valutazione della risposta antigene-anticorpo con siero SR33.....	43
3.1.2.2 Effetto dell'aggiunta di CSF114 e CSF114(Glc) e valutazione della risposta antigene-anticorpo con siero SR33.....	47
3.2 CT35, CSF114 e CSF114(Glc) su bistrati fosfolipidici supportati da mercurio	54
Capitolo 4: Discussione	59
Capitolo 5: Conclusioni	63
Capitolo 6: Sigle e abbreviazioni	64
Capitolo 7: Bibliografia	65

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Sindrome di Rett

La sindrome di Rett^[1,2] (RTT) è una grave patologia neurologica che colpisce quasi esclusivamente soggetti di sesso femminile, con un'incidenza di circa 1:10 000. Si tratta di una forma relativamente rara di autismo, caratterizzata da una fase iniziale di sviluppo normale del soggetto colpito, corrispondente ai primi 6-18 mesi di vita, seguita poi da una regressione o perdita delle abilità motorie e linguistiche acquisite, dall'incapacità di avere relazioni sociali e dalla comparsa di movimenti stereotipati delle mani.



Figura 1: Bambina con Sindrome di Rett

Vi è una grande variabilità nel modo di progredire e nella gravità dei disturbi causati dalla sindrome, ma si possono distinguere quattro stadi principali:

1. Regressione neurologica: presente nei primi mesi di vita, a volte lieve e quindi non sempre sufficiente per destare attenzione.
2. Fase autistica: dopo il primo anno di vita, in cui si ha il manifestarsi vero e proprio della malattia, con tutti i disturbi che essa comporta.
3. Fase pseudo-stazionaria: si ha tra i due e i dieci anni di età e può durare per lungo tempo.

4. Fase della “sedia a rotelle”: nella maggior parte dei casi si ha la perdita totale della capacità motoria.

È stato osservato che il 95% dei casi di RTT è dovuto ad una mutazione del gene collocato nella regione Xq28 del genoma umano, MECP2. Si ritiene che tale gene controlli la funzione di molti altri geni, oltre a contenere le informazioni per la sintesi di una proteina legante “metil citosina 2”, MeCP2. MeCP2 è necessaria per lo sviluppo cerebrale e agisce come un “interruttore biologico”: può, infatti, indurre essa stessa un aumento o un blocco nell’espressione di geni che codificano proteine con diverse funzioni. Anormalità strutturali o funzionali della MeCP2, dovute al non corretto funzionamento del gene che la codifica negli individui affetti da RTT, possono quindi causare anomalie nell’espressione degli altri geni.

Fino ad oggi il meccanismo patogenetico che conduce dalla mutazione del gene alla malattia non è stato chiarito. La RTT può essere, infatti, considerata un disordine multifattoriale innescato da fattori differenti che agiscono in un substrato geneticamente predisposto. Nei soggetti malati sono state rilevate caratteristiche ricorrenti nei disordini autoimmuni, come un’elevata concentrazione di neopterina nelle urine, presenza di anticorpi antineuronali nel siero e nel liquido cerebrospinale e disfunzione della microglia (piccole cellule gliali che partecipano alla risposta immunitaria del cervello). La RTT è stata per questo proposta come modello della Sclerosi Multipla, una grave patologia neurologica degenerativa che colpisce i fasci di fibre nervose che uniscono l’encefalo con il midollo spinale (sostanza bianca), distruggendo la guaina mielinica che li riveste^[3,4]. Il rivestimento di mielina ha un ruolo funzionale fondamentale, in quanto permette la trasmissione rapida ed efficiente degli impulsi nervosi. E’ costituita per l’80% da lipidi come fosfatidilcolina, fosfatidilserina e sfingomieline; la restante parte è costituita da proteine, tra cui la proteina proteolipidica (PLP, 50%) e la proteina basilica della mielina (MBP, 30%). Altre proteine, come la glicoproteina associata alla mielina (MAG), la glicoproteina Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein (OMgp) e la glicoproteina oligodendrocitica della mielina (MOG, una immunoglobulina localizzata sulla superficie esterna della membrana), sono presenti in percentuali minori. La distruzione di questa guaina mielinica causa il blocco o il rallentamento degli impulsi nervosi che vanno dal sistema nervoso centrale a quello periferico, e viceversa. I sintomi di tale malattia, che ha un’incidenza molto elevata nella popolazione mondiale, riguardano quindi soprattutto disfunzioni di apparati importanti come quello urinario, digerente e visivo, coordinazione spaziale, perdita di tono muscolare e,

a volte, anche delle funzioni cognitive ed emotive. La degenerazione del tessuto nervoso è da attribuire, come nel caso della RTT, alla disfunzione di numerose cellule del sistema immunitario, che esercitano la loro funzione contro le cellule della mielina, non riconoscendole più come proprie e provocandone la distruzione^[5].

Modifiche aberranti, come la glucosilazione, di componenti proteiche di organi o tessuti bersaglio di malattie autoimmuni come, nel nostro caso, la mielina, sono aspetti comuni e basilari nell'evoluzione di entrambe le malattie, e determinano una risposta anticorpale del sistema immunitario^[6]. In un precedente lavoro di tesi è stato studiato un polipeptide la cui struttura è rappresentativa dell'epitopo minimo della proteina, la cui glucosilazione aberrante è tipica della Sclerosi Multipla. Abbiamo qui cercato di concludere il lavoro iniziato estendendolo poi ad una struttura analoga, tipica invece della RTT. Questo lavoro si inserisce in un progetto più ampio, che mira alla individuazione di strutture molecolari tipiche di questo tipo di patologie, con l'obiettivo ultimo di mettere a punto un sistema in grado di seguire l'evolversi della patologia stessa, mediante un monitoraggio selettivo di molecole coinvolte nei vari stadi di evoluzione della malattia. Come primo passo, abbiamo voluto caratterizzare le modalità di interazione delle strutture molecolari in esame con i modelli sperimentali di membrana cellulare in nostro possesso, quali mono- e bi-strati lipidici supportati. Lo studio è stato effettuato mediante l'uso di tecniche elettrochimiche quali voltammetria AC con risoluzione di fase, voltammetria ciclica, nonché spettroscopia d'impedenza elettrochimica.

1.2 Sintesi peptidica

I peptidi sono polimeri costituiti da amminoacidi condensati tra loro attraverso un legame peptidico, il quale si instaura tra il gruppo α -carbossilico di un residuo ed il gruppo α -amminico del successivo. Si forma in questo modo un legame singolo, con parziali caratteristiche di doppio legame. [Figura 2]

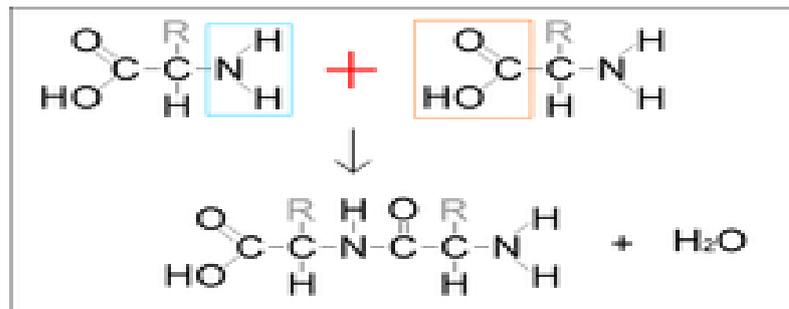


Figura 2: Schema generale di formazione di un legame peptidico

La sintesi peptidica richiede una procedura sintetica complessa in quanto, per renderla efficiente ed evitare la formazione di specie molecolari non desiderate, occorre utilizzare alcuni accorgimenti come la protezione dei gruppi amminici, lasciando liberi solo quelli coinvolti nella formazione del legame peptidico, e l'attivazione di quelli carbossilici. La sintesi peptidica può essere svolta sia in soluzione che in fase solida.

1.3 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)

La sintesi peptidica su fase solida (SPPS *solid phase peptide synthesis*) è una tecnica, messa a punto da Merrifield nel 1963, che richiama in parte la biosintesi delle proteine, la quale, infatti, non ha luogo in soluzione. Tale metodo prevede l'accrescimento di una catena peptidica ancorata, tramite legame covalente, ad un polimero inerte e insolubile, che funge da supporto solido, mimando il complesso ribosoma-RNA messaggero presente nella biosintesi, al quale si legano in sequenza le molecole di RNA-transfer atte al trasporto dei singoli amminoacidi che andranno a costituire la proteina. Finché la sequenza amminoacidica non è completa, la catena peptidica in accrescimento rimane ancorata tramite legame estereo all'RNA-transfer^[7].

Questo nuovo tipo di sintesi peptidica permette di preparare piccole catene proteiche in breve tempo, evitando gli stadi più lunghi della sintesi in fase liquida, che

prevedono estrazione, filtrazione e cristallizzazione del prodotto per ogni aggiunta di un nuovo amminoacido, portando inevitabilmente a rese molto basse.

La SPPS consiste in una serie di passaggi che, una volta fissato il primo amminoacido della sequenza ad un supporto polimerico tramite legame covalente del gruppo carbossilico, si ripetono ciclicamente. Questi consistono nella deprotezione del gruppo α -amminico terminale della sequenza in accrescimento legata al supporto, e nella successiva aggiunta dell'amminoacido entrante, attivato sul gruppo α -carbossilico. Una volta completata la sintesi, il peptide viene staccato dalla resina con la contemporanea rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali. [Figura 3]

L'accrescimento della catena, contrariamente a quanto avviene in natura nei ribosomi, procede in direzione C-terminale \rightarrow N-terminale^[8].

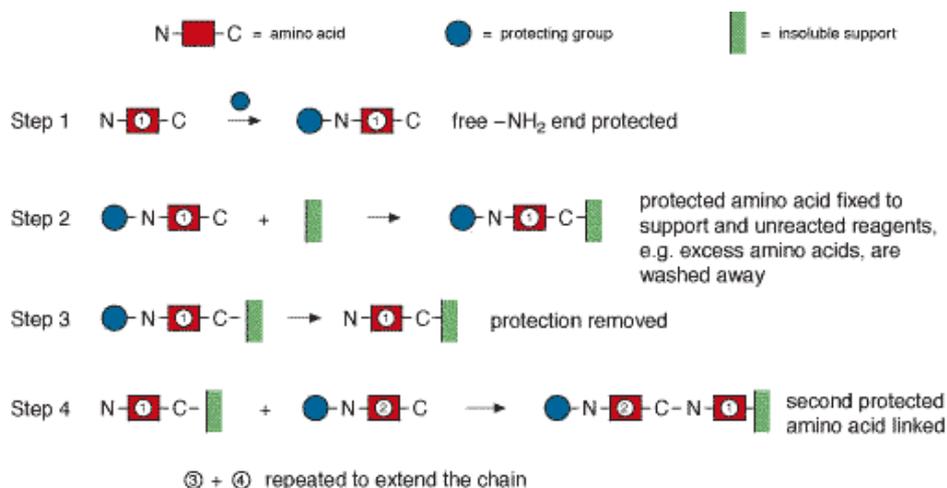


Figura 3: Schema generale di sintesi di un peptide tramite SPPS

Tutte le operazioni di allungamento della catena sono svolte in fase eterogenea, in modo tale che i reagenti in eccesso e i sottoprodotti della sintesi possano essere rimossi per semplice filtrazione e lavaggio della resina alla quale è attaccato il peptide, senza dover isolare e purificare ogni intermedio della sintesi.

La sintesi è stata condotta manualmente, utilizzando un sintetizzatore manuale PLS 4x4 (Advanced Chem Tec), in un reattore di Teflon contenente la resina precedentemente rigonfiata in dimetilformammide (DMF). È necessario far rigonfiare la resina, mantenendola in agitazione in DMF (processo di swelling) prima dell'ancoraggio del primo amminoacido, in modo tale da esporre tutti i siti attivi, cui si attaccano le catene peptidiche, all'ambiente di reazione.

Per quanto riguarda la protezione dei gruppi funzionali, è stato utilizzato il 9H-fluorenil-9metilossicarbonile (Fmoc) sul gruppo amminico in α , il quale, essendo ortogonale a tutti gli altri, può essere rimosso in condizioni basiche, utilizzando, cioè, una soluzione di piperidina al 20% in (DMF), senza compromettere la protezione delle catene laterali. Su queste ultime, a seconda del tipo di residuo, sono stati usati gruppi protettori come il ter-butilossicarbonile (t-Boc), il trifenilmetile (Trt), il ter-butile (t-Bu) ed il 2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofurano-5-sulfonile (Pbf), i quali vengono rimossi nelle condizioni acide del processo di distacco della sequenza dal supporto solido (cleavage).

Il processo di *coupling* viene effettuato aggiungendo all'ambiente di reazione la soluzione in DMF dell'amminoacido entrante, protetto sull' α -NH₂ con il gruppo Fmoc ed eventualmente sulla catena laterale con un protettore ortogonale. Inoltre, per facilitare l'accoppiamento, si attiva *in situ* il gruppo carbossilico ad estere tramite aggiunta di 1-[Bis(dimetilammino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3ossidoesafluorofosfato (HATU) e N-metilmorfolina (NMM) come base.

Una volta completata la sintesi della sequenza, si procede alla rimozione del gruppo Fmoc sull' α -NH₂ terminale della catena, e all'acetilazione dello stesso, tramite trattamento con anidride acetica e NMM in DCM. La presenza di un gruppo acetile blocca l'estremità N-terminale, mimando il legame peptidico, e può facilitare il riconoscimento del peptide da parte degli anticorpi.

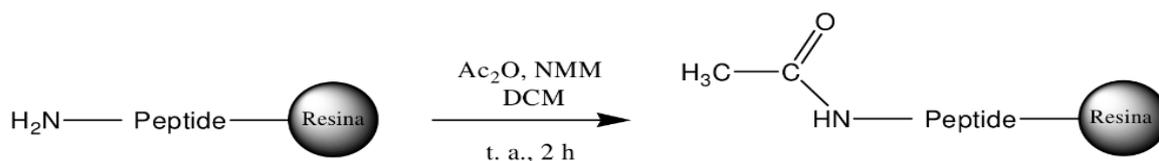


Figura 4: Acetilazione dell'amminoacido N-terminale della sequenza peptidica ancorata alla resina.

Durante il processo di sintesi, per controllare l'esito di ogni singola reazione di coupling, viene effettuato il *test di Kaiser*^[9]. Prima della sua esecuzione la resina viene lavata abbondantemente con DMF, per eliminare dall'ambiente di reazione eventuali sottoprodotti, e poi con DCM per togliere ogni traccia di DMF e quindi evitare il rischio di falsi positivi. Una volta essiccata la resina, se ne preleva qualche granello e lo si pone in un test tube, nel quale si aggiungono tre gocce di ciascuna delle seguenti soluzioni:

- Soluzione 1: 5 g di ninidrina in 100 mL di etanolo.
- Soluzione 2: 80 g di fenolo in 20 mL di etanolo.

- Soluzione 3: 2 mL di soluzione 0,001 M di KCN in 98 mL di piridina.

Il test tube viene a questo punto scaldato a 100° C con un bagno di sabbia, per 5 minuti.

Tale test è basato sulla reazione della ninidrina con le ammine e può fornire i seguenti risultati:

- Soluzione e resina di colore giallo: assenza di gruppi amminici liberi -> elevata resa di coupling
- Soluzione e resina di colore blu: quantità superiore al 5% di gruppi amminici liberi -> bassa resa di coupling. Occorre ripetere la procedura.

Una volta terminati i cicli di sintesi e acetilato il gruppo α -NH₂ terminale della catena, si effettua il "cleavage" (idrolisi acida) del peptide dalla resina di supporto con una soluzione di acido trifluoroacetico, acqua e triisopropilsilano (TIS) (96:2:2), la quale è in grado di rimuovere contemporaneamente i gruppi protettori dalle catene laterali dei residui amminoacidici.

1.3.1 Gruppi Protettori

La scelta dei gruppi protettori, inseriti per evitare reazioni collaterali e quindi l'abbassamento della resa del prodotto, deve essere effettuata in considerazione della possibilità di rimuoverli al termine della sintesi, senza compromettere la stabilità del legame peptidico appena formato.

Occorre annullare il carattere nucleofilo del gruppo α -amminico non coinvolto direttamente nella formazione del legame peptidico attraverso una riduzione della sua densità elettronica; ciò viene realizzato mediante l'uso di sostituenti opportuni, oppure tramite inserimento di grandi gruppi che ne riducono la reattività per ingombro sterico. Anche i gruppi funzionali reattivi delle catene laterali dei residui amminoacidici, come tioli, ammine, gruppi carbossilici o alcoli, devono essere momentaneamente disattivati.

I gruppi protettori devono poter essere introdotti efficacemente e selettivamente; in particolare, è importante che siano "ortogonali" tra di loro: devono avere, cioè, la caratteristica di poter essere rimossi in condizioni di reazione specifiche e indipendentemente l'uno dall'altro.

Le strategie per proteggere i gruppi in maniera ortogonale in SPPS, principalmente sono due. Con la prima, Boc/Bzl, si protegge il gruppo α -amminico con ter-butilossicarbonile (t-Boc), rimovibile con acido trifluoroacetico (TFA) in DCM (1:1), mentre sulle catene laterali

si aggiungono gruppi benzili (Bzl) che vengono poi eliminati durante il cleavage del peptide dalla resina con acido fluoridrico liquido, quindi in condizioni fortemente acide.

La seconda strategia, quella utilizzata nel nostro caso, è la Fmoc/tBu [Figura 5], che prevede la protezione della funzione α -amminica tramite Fmoc.

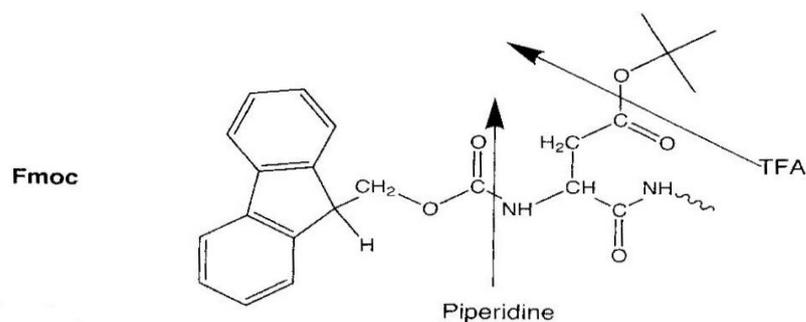


Figura 5: Strategia Fmoc/tBu di SPPS

Tale gruppo, oltre a prevenire la racemizzazione dell'atomo di carbonio in α ^[10], è perfettamente ortogonale al legame peptide-resina: offre una buona resistenza agli acidi, mentre è facilmente rimovibile in ambiente basico e, quindi, in presenza di ammine secondarie, tra cui una soluzione di piperidina al 20% in DMF. Il solvente DMF, grazie al suo carattere polare, stabilizza la formazione dell'intermedio ionico di reazione.

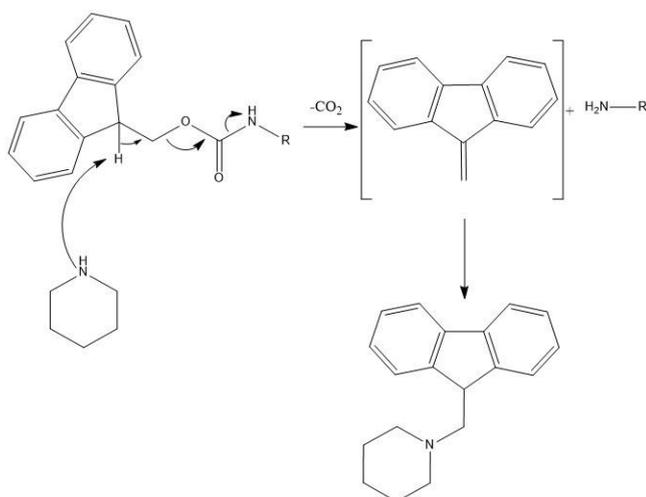


Figura 6: Meccanismo di deprotezione dello Fmoc con Piperidina

I gruppi funzionali delle catene laterali sono, invece, protetti con t-Bu e suoi derivati, agevolmente eliminabili con trattamento acido, effettuato, nel nostro caso, con acido trifluoroacetico (TFA) durante il distacco del polimero dal supporto solido.

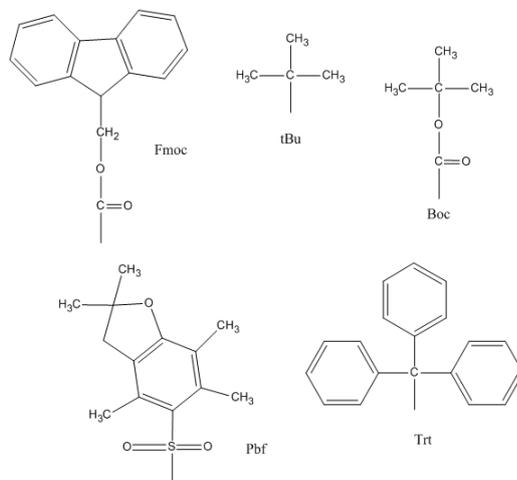


Figura 7: Gruppi protettori usati nella SPPS.

1.3.2 Reagenti Attivanti

Nel processo di condensazione è fondamentale la reattività del gruppo carbossilico dell'amminoacido $N\alpha$ -protetto, che quindi deve essere attivato in modo tale da permettere di lavorare a temperatura ambiente, senza rischiare di degradare il peptide formato.

Inizialmente, venivano utilizzati come attivanti le carbodiimmidi, ed in particolare la *N,N*-dicicloesilcarbodiimide (DCC) e la *N,N*-diisopropilcarbodiimide (DIPCDI) [Figura 8].

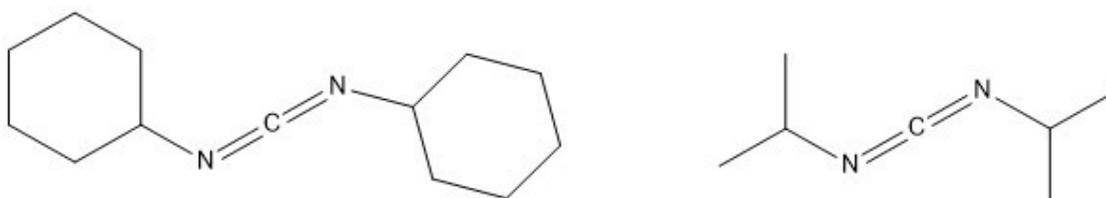


Figura 8: DCC e DIPCDI

Attualmente sono stati sviluppati, invece, altri attivanti come 1-[Bis(dimetilammino)metilene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio 3-ossido esafluorofosfato (HATU) o *N,N,N',N'*-Tetrametil-O-(1*H*-benzotriazo-1-ile)uronio esafluorofostato (HBTU).

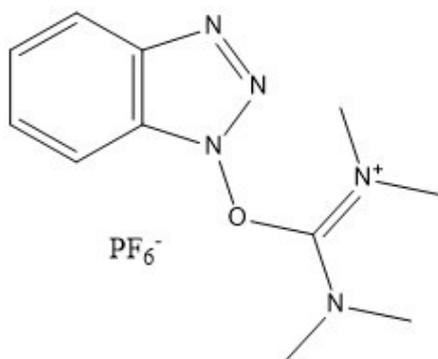


Figura 9: HBTU

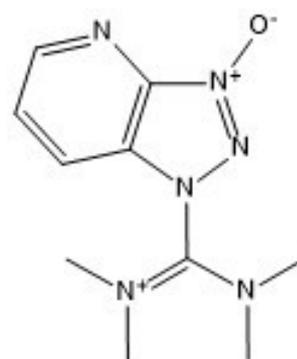


Figura 10: HATU

Il meccanismo di attivazione con HATU è riportato qui di seguito:

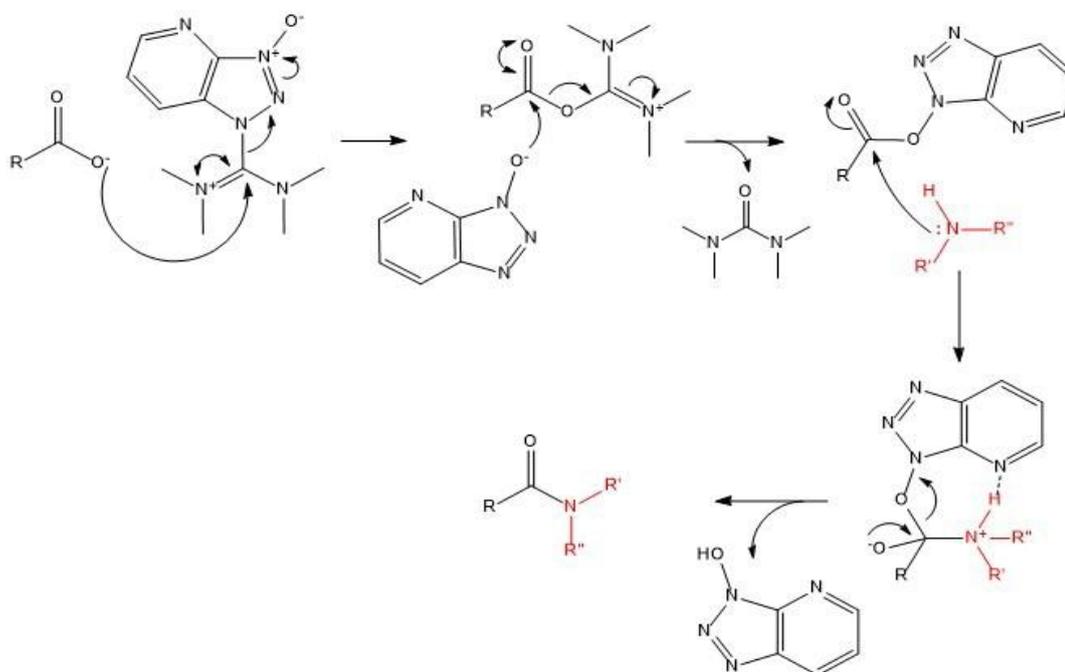


Figura 11: Meccanismo di reazione dell' HATU

L'attivante reagisce con la funzione carbossilica libera dell'amminoacido entrante, generando un estere molto reattivo. L'inserimento di un gruppo elettronattrattore aumenta il carattere elettrofilo del carbonio α -carbossilico, rendendolo maggiormente incline a subire attacco nucleofilo da parte del gruppo α -amminico dell'ultimo amminoacido in catena. Come base per agevolare la formazione dell'anione carbossile, si può utilizzare NMM o N,N-diisopropil-N-etilammina (DIPEA). Nel nostro lavoro è stata utilizzata NMM.

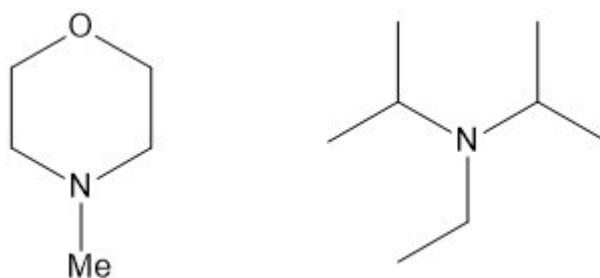


Figura 12: Basi attivanti NMM e DIPEA

1.3.3 Supporto Solido

La resina impiegata come supporto solido deve essere un polimero con caratteristiche particolari; deve, cioè, essere insolubile, inerte e stabile sia chimicamente che meccanicamente, in modo tale da permettere di automatizzare i vari stadi della sintesi e semplificare i processi di purificazione degli intermedi. Inoltre, una volta terminata la sequenza amminoacidica, deve consentire di rimuovere il peptide in modo semplice e in condizioni sufficientemente blande da non incorrere nel rischio di danneggiarlo. Il *linker* stesso deve essere ideato in maniera tale da semplificare quest'ultimo passaggio. Le resine per SPPS devono necessariamente dare la possibilità alle molecole di *linker* di legarsi ed avere siti accessibili a tutti i reagenti; è anche fondamentale che siano caratterizzate da una rapida diffusione.

Con il passare del tempo sono state sviluppate diverse tipologie di resine, tutte derivanti dal supporto polimerico originariamente impiegato da Merrifield e costituito da polistirene (PS) copolimerizzato con divinilbenzene (1-2%) e contenente benzilcloruro come gruppo reattivo.

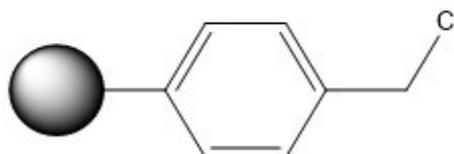


Figura 13: Resina di Merrifield

Alcune resine sono derivatizzate con un linker, che permette l'ottenimento, dopo cleavage, di peptidi con la funzione C-terminale in forma ammidica (Resine Rink-amide), mentre altre (resine Wang) sono funzionalizzate con linkers che permettono di ottenere peptidi con la funzione C-terminale in forma acida^[11].

Nella sintesi del CT35 è stata usata la resina Fmoc4-Lys2-Lys- β -Ala-Wang, che porta già ancorata la prima struttura tetrameric del peptide, costituita da due residui di lisina legati entrambi alla sequenza Lys- β Ala.

Le resine Wang sono costituite da un supporto di clorometilpolistirene, cui sono legate molecole di 4-idrossibenzilalcol, che ha funzione di *spacer*, cioè di spaziatore, in grado di separare i siti attivi della matrice polistirenica, facilitando così il processo di accrescimento della sequenza peptidica. Questa caratteristica li rende completamente solvatati durante le fasi di coupling, e quindi permette l'esecuzione del test di Kaiser, che deve essere effettuato in soluzione; inoltre, questo tipo di resine ha la proprietà di rilasciare il peptide privo di gruppi protettori in catena laterale al 95%, dopo lo sblocco con TFA, e gli *spacer* sono legati in modo tale da consentire il distacco dello stesso al termine del processo. Nel nostro caso l'acido 4-idrossimetilfenossiacetico, legato alla estremità dello *spacer*, permette la formazione del legame estereo tra l'amminoacido e la resina. Il legame tra l'amminoacido e la resina è stabile nelle condizioni basiche di deprotezione di gruppi α -amminici, mentre viene idrolizzato in condizioni acide al termine della sintesi.

La sintesi dei peptidi CSF114 e CSF114(Glc) è analoga a quella sopra descritta; per i dettagli si rimanda alla tesi "*Studio elettrochimico dell'interazione dei polipeptidi CSF114 e CSF114(Glc) con membrane biomimetiche*" di Stefano Benci, con relatrice la Prof.ssa Maria Luisa Foresti e correlatrice la Dott.ssa Lucia Becucci.

1.4 Sintesi di N-glicopeptidi

Lo sviluppo di nuovi test diagnostici per malattie mediate dal sistema immunitario, mediante la ricerca e l'identificazione di specifici autoanticorpi circolanti nei fluidi biologici dei pazienti, è di fondamentale rilevanza. L'identificazione di autoanticorpi viene generalmente effettuata utilizzando, in opportuni test, l'antigene nativo, che nella maggior parte dei casi è una proteina. Gli anticorpi vengono, quindi, rivelati mediante l'uso dell'antigene proteico, estratto dai tessuti o in forma ricombinante. Tuttavia quest'approccio non è sempre vantaggioso, in particolar modo quando le modificazioni post-traduzionali presenti sulle proteine sono coinvolte nel riconoscimento anticorpale. Questo perché non sempre le proteine estratte possono contenere le modificazioni post-traduzionali causa dello stato patologico, e perché le tecniche ricombinanti non consentono di introdurre in modo specifico e selettivo tale tipo di modifiche. In tutti questi casi, un approccio definito "chimico

inverso”, basato sull’utilizzo di peptidi sintetici modificati chimicamente, si è rivelato conveniente per l’identificazione degli autoanticorpi stessi. Tale approccio permette l’ottimizzazione delle sequenze peptidiche che rappresentano gli antigeni sintetici in grado di identificare specificamente gli autoanticorpi presenti nei fluidi biologici. L’approccio viene definito “inverso” perché, al contrario di quanto accade normalmente, in questo caso sono gli autoanticorpi dei pazienti a guidare la selezione dei peptidi sintetici come migliori sonde antigeniche. In particolare, gli anticorpi permettono di definire la struttura “chimica” dei peptidi, che agiscono da mimetici degli epitopi degli antigeni nativi coinvolti nella patogenesi di queste malattie. Questa strategia è particolarmente promettente quando nel riconoscimento anticorpale sono coinvolte modificazioni post-traduzionali delle proteine, quali la glicosilazione^[12]. L’approccio “chimico inverso” è stato applicato con successo presso il Laboratorio di Chimica e Biologia di Peptidi e Proteine (PeptLab) dell’Università di Firenze per l’identificazione di *biomarkers*, mediante l’uso di peptidi glicosilati, in malattie autoimmuni. Per la sintesi di *N*-glicopeptidi esistono due principali metodi di sintesi: il metodo convergente e il metodo del *building-block*.

1.4.1 Metodo Convergente

Tale approccio^[13] prevede la sintesi indipendente della catena peptidica e del carboidrato, che viene inserito mediante formazione del legame ammidico sul peptide, o su parte di esso. Tuttavia, l’approccio convergente può non risultare competitivo e funzionale dal momento che la reazione di glicosilazione sul peptide è più lenta e difficoltosa che non sul singolo amminoacido, ed è fortemente dipendente dall’ingombro sterico prodotto dalle catene laterali della sequenza peptidica. Occorre, inoltre, considerare che l’attivazione della funzione carbossilica in catena laterale di un residuo di Asp può dar luogo a reazioni competitive.

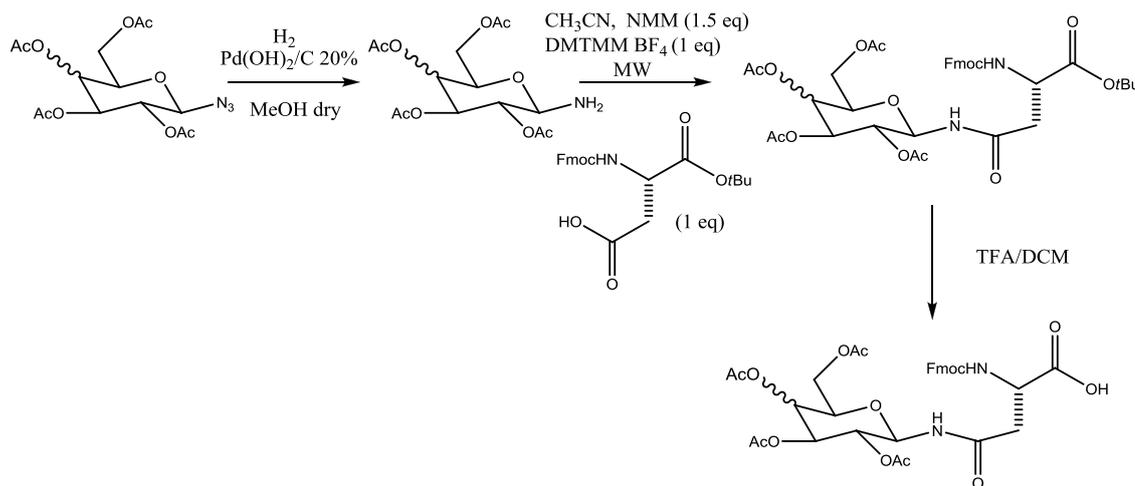
Tali problematiche tendono a limitare l’uso di questo approccio sintetico.

1.4.2 Metodo dei building-block

Questo metodo^[14,15,16] prevede la sintesi dell’amminoacido modificato e, successivamente, il suo inserimento nella catena peptidica mediante sintesi in fase solida (SPPS). Tale approccio richiede, a sua volta, un opportuno schema di protezione ortogonale delle funzioni amminica e carbossilica degli amminoacidi e delle funzioni ossidriliche degli

zuccheri; la reazione di glucosilazione risulta, tuttavia, più rapida, evitando il problema dell'ingombro sterico, nonché il rischio di reazioni competitive.

In questo lavoro di tesi sono stati impiegati residui Fmoc-L-Asn(GlcOAc₄)-OH, ossia residui di asparagina legati tramite legame *N*-glucosidico ad unità di glucosio, come *building blocks* per la SPPS. Questi sono stati sintetizzati utilizzando un processo assistito dalle microonde:



Dove DMTMM BF₄ [4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium tetrafluoroborate] è un reagente a base triazinica che induce il processo di accoppiamento fra la funzionalità amminica e quella carbossilica in catena laterale dell'aspartato di tert-butile. La rimozione dei gruppi protettori delle funzionalità ossidriliche delle unità zuccherine è stata effettuata in soluzione sui peptidi liofilizzati e disciolti in MeOH anidro, per trattamento con una soluzione 0.1 M di MeONa in MeOH anidro.

1.5 Sonde antigeniche sintetiche specifiche per malattie autoimmuni

Ad oggi, il metodo impiegato per l'individuazione degli autoanticorpi, quali *biomarker* di malattia, presenti nel siero di soggetti affetti da patologie autoimmuni, consiste nell'utilizzo di antigeni proteici nativi per effettuare semplici test immunoenzimatici. Tali antigeni sono, infatti, ritenuti fondamentali nei meccanismi di sviluppo della malattia stessa. La difficoltà del metodo consiste, tuttavia, nell'individuare e riprodurre questi ultimi.

A tale scopo, presso il Laboratorio di Chimica e Biologia di Peptidi e Proteine (PeptLab) dell'Università di Firenze, è stato effettuato uno studio con il quale è stata dimostrata l'attività di alcuni glucopeptidi come sonde antigeniche capaci di rivelare autoanticorpi presenti nel siero di persone affette da sindromi quali la Sclerosi Multipla,

come nel caso del [Asn(Glc)hMOG(30-50)^[17], l’analogo glucosilato dell’epitopo immunodominante della MOG. Questo è stato descritto in un precedente lavoro, nel quale è stato preso in esame il CSF114, un glucopeptide avente la stessa composizione amminoacidica della sonda, ma diversa conformazione. Per ulteriori dettagli si rimanda alla tesi “*Studio elettrochimico dell’interazione dei polipeptidi CSF114 e CSF114(Glc) con membrane biomimetiche*” di Stefano Benci.

Analogamente è stato individuato il CT35, una molecola avente quattro catene che si diramano da una piccola struttura comune, (Lys-βAla), ognuna delle quali termina con un residuo di asparagina glucosilato [Figura 14].

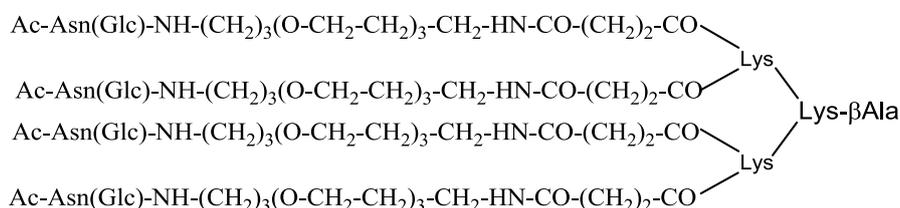


Figura 14: Struttura del CT35

Questo composto tende ad assumere nello spazio una conformazione tale da permettere alle quattro “braccia” di stare il più lontano possibile l’una dall’altra, in modo che non si crei repulsione; tale disposizione rende probabile una maggiore interazione con le membrane. Sono state, dunque, individuate una serie di caratteristiche che fanno del CT35 un’eventuale sonda antigenica sfruttabile per riconoscere gli autoanticorpi in pazienti affetti da RTT.

1.6 Membrane biomimetiche

Con il termine “membrana biomimetica” si intende un modello semplificato di una membrana cellulare. Quest’ultima è un elemento essenziale per la vita della cellula, ma spesso estremamente complesso. Modelli semplificati permettono lo studio selettivo di alcuni aspetti dei processi nei quali la membrana cellulare è coinvolta.

Le membrane biomimetiche possono essere suddivise in due grandi gruppi:

- a. self-assembled monolayers (SAMs);
- b. bilayer lipid membranes (BLMs).

Monostrati lipidici supportati da un elettrodo a goccia stazionaria di mercurio sono stati largamente utilizzati da una ventina di anni per lo studio delle interazioni tra polipeptidi

e membrane cellulari^[18,19,20,21,22,23,24]. Questi vengono realizzati immergendo un elettrodo a goccia stazionaria di mercurio in una soluzione acquosa, sulla cui superficie viene precedentemente spanto il materiale fosfolipidico in un solvente organico volatile. Questo procedimento dà luogo spontaneamente ad un monostrato fosfolipidico auto-assemblato sulla superficie del metallo, le cui code sono rivolte verso la superficie idrofobica del mercurio, mentre le teste polari si trovano a contatto con la soluzione elettrolitica. Caratteristica peculiare di questi monostrati è l'elevata fluidità dovuta allo stato liquido del supporto a goccia di mercurio, che conferisce alle molecole di lipide ampia libertà di movimento. Questa proprietà li rende sicuramente più biomimetici di altri modelli supportati da metalli solidi. Seppur apparentemente meno rappresentativi della struttura della membrana cellulare, dato che ne rappresentano solo una metà, questi monostrati si sono rivelati molto utili per analizzare le interazioni di peptidi e piccole proteine anfifiliche con la parte esterna delle membrane biologiche^[22,23].

Per lo studio di proteine intrinseche che devono essere incorporate all'interno del bistrato affinché siano in forma biologicamente attiva, si rende invece necessario l'uso di modelli a doppio strato lipidico, le cosiddette "bilayer lipid membranes" (BLMs). Queste rappresentano la struttura completa della membrana cellulare.

Numerosi sono i modelli biomimetici utilizzati aventi la struttura di un bistrato. Un particolare tipo di bistrato, messo a punto ed ampiamente utilizzato nel nostro laboratorio, è costituito da un doppio strato lipidico ancorato alla superficie di un elettrodo a goccia stazionaria di Hg. Questo tipo di membrana biomimetica viene preparato auto-assemblando un monostrato fosfolipidico, con la stessa procedura utilizzata per l'ottenimento dei SAMs corrispondenti, su di un elettrodo la cui superficie sia stata preventivamente modificata per ancoraggio di una particolare struttura molecolare, detta "tiolipide". Quest'ultimo si fissa alla superficie del Hg mediante un gruppo sulfidrilico o disolfuro presente ad un'estremità. Tipicamente, il terminale contenente l'atomo di S è legato ad una catena polipeptidica o poliossietilenica, a sua volta legata covalentemente a due catene alchiliche. La struttura molecolare si lega al mercurio esponendo verso l'esterno le catene alchiliche, separate dalla superficie del metallo tramite una regione idrofila costituita da una catena polipeptidica o poliossietilenica. Il trasferimento del monostrato fosfolipidico sul monostrato di tiolipide dà luogo alla formazione di un bistrato separato dalla superficie elettrodica da una regione

idrofila. Il tiolipide utilizzato in questo progetto è il 2,3 di-O-fitanil-sn-glicerol-1tetraetilenglicole estere dell'acido lipoico, noto col nome DPTL.

Uno dei vantaggi offerti dalla membrana biomimetica supportata sopra descritta è la maggiore robustezza rispetto alle BLMs tradizionali, costituite ad un bistrato lipidico interposto tra due soluzioni acquose. A differenza dei bistrati lipidici supportati, infatti, queste ultime collassano per differenze di potenziale transmembranario superiori ai 100/150 mV e sono molto più sensibili alle vibrazioni meccaniche.

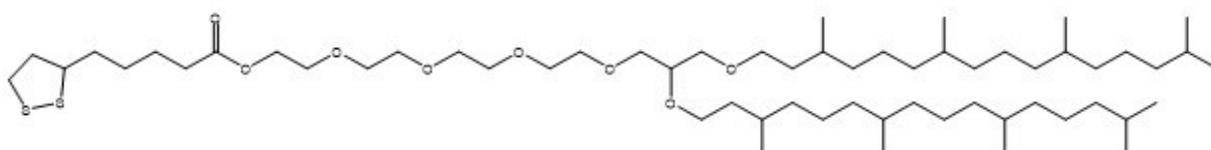


Figura15: Struttura primaria del DPTL

A questo punto va ricordato che la distribuzione di cariche elettriche sulle due superfici di una membrana cellulare è asimmetrica; si genera in questo modo una differenza di potenziale, $\Delta\phi$, (detto potenziale transmembranario) dalla quale dipendono gran parte delle funzioni che essa svolge. In seguito a questo accumulo di cariche sulle due superfici della membrana, si vengono a formare due diversi strati diffusi nelle soluzioni direttamente a contatto, che tuttavia non controbilanciano ognuna la densità di carica distribuita sul lato corrispondente del bistrato. La condizione di elettroneutralità viene, comunque, rispettata considerando il sistema costituito dall'insieme delle cariche sulle due superfici della membrana e dei due strati diffusi. Questo ci fa capire che l'insieme delle cariche distribuite su una delle due superfici della membrana, unitamente al relativo strato diffuso, non è indipendente dall'insieme di cariche distribuito sull'altro lato della membrana, altrimenti la differenza di potenziale transmembranario sarebbe costantemente nulla. Grazie a questa caratteristica è possibile assimilare le membrane biologiche e i loro modelli a delle "interfasi elettrificate"; inoltre la possibilità di misurare ed eventualmente variare $\Delta\phi$ è essenziale per lo studio di molti processi cellulari, in quanto, per esempio, piccoli cambiamenti di potenziale transmembranario sono alla base del funzionamento dei canali ionici. Ci sono, infatti, particolari proteine in grado di cambiare la propria conformazione, e quindi la loro attività a seguito di una variazione del potenziale transmembranario. Laddove tali proteine formino canali ionici, questi si dicono "ohmici" quando la corrente varia linearmente con il potenziale

transmembranario, annullandosi quando quest'ultimo è uguale a zero. Diverso è il caso dei canali ionici "voltaggio-dipendenti", in cui la corrente non è centrosimmetrica nei confronti del potenziale transmembranario zero e può annullarsi in un intero intervallo di potenziale, anziché ad un solo potenziale. E' comunque evidente come, in entrambi i casi, il flusso di specie cariche attraverso il canale dipenda, tanto nel verso quanto nell'intensità, dalla differenza di potenziale applicato tra i due lati della membrana. E' chiaro, pertanto, che il potenziale transmembranario ha un ruolo fondamentale in tutti quei processi che implicano un movimento di specie cariche attraverso la membrana stessa.

Per effettuare misure elettrochimiche si rende necessario l'utilizzo di un supporto che sia un conduttore, generalmente un metallo. L'oro, spesso utilizzato, presenta l'indubbio vantaggio di essere bioaffine e di prestarsi ad essere impiegato anche per misure che utilizzino tecniche di analisi superficiale. Il mercurio non si presta all'impiego di quest'ultimo tipo di tecniche, tuttavia presenta alcune proprietà notevolmente vantaggiose: i) ha una superficie atomicamente liscia ed uniforme che rende possibile l'ottenimento di film lipidici auto-organizzati compatti e privi di imperfezioni, le quali offrirebbero un cammino preferenziale ad eventuali ioni permeanti, ii) la sua natura liquida a temperatura ambiente rende possibile la formazione di strati lipidici sufficientemente fluidi da garantire una mobilità al materiale lipidico su di esso auto-organizzato, confrontabile con quella delle membrane cellulari.

La presenza di una regione idrofila, tra la superficie dell'elettrodo ed il bistrato lipidico, permette alle proteine che si inseriscono nel bistrato stesso di posizionarsi in forma funzionalmente attiva e formare eventualmente canali ionici. E', infatti, necessaria una regione idrofila sufficientemente spaziosa a contatto con l'elettrodo, sia per consentire il corretto posizionamento della porzione extramembrana della proteina che per fornire un serbatoio adeguato agli ioni che attraversano la membrana stessa.

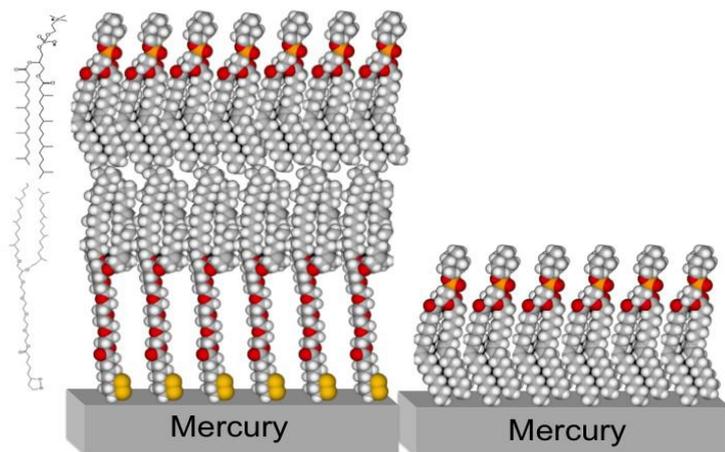


Figura 16: Bistrato fosfolipidico auto-organizzato su Hg (a sinistra) e monostrato fosfolipidico auto-organizzato su Hg (a destra).

1.7 Tecniche elettrochimiche

1.7.1 Voltammetria ciclica

La voltammetria è una tecnica elettrochimica che consiste nell'applicare al sistema in esame un potenziale che varia linearmente nel tempo e nel registrare la corrente che fluisce al variare del potenziale stesso. Nella voltammetria ciclica la differenza di potenziale è variata da un valore iniziale E_i ad un valore finale E_f , per poi tornare al valore iniziale, completando così un intero ciclo. La scansione ciclica del potenziale può essere ripetuta più volte al fine di verificare l'evolversi nel tempo del grafico della corrente, I , contro il potenziale, E . La scansione di potenziale può essere realizzata con velocità diverse. A seconda della velocità di scansione possiamo mettere in evidenza processi in cui si abbia un flusso di carica più o meno veloce, nonché la natura reversibile o meno di un eventuale processo redox che abbia luogo alla superficie dell'elettrodo di lavoro.

Consideriamo il caso in cui sia presente in soluzione una specie in grado di ridursi alla superficie dell'elettrodo. Il potenziale viene fatto variare effettuando una scansione lineare da un valore iniziale, E_i , in corrispondenza del quale la specie è elettroinattiva, fino ad un potenziale E_f a cui la specie si riduce (scansione verso potenziali negativi); il potenziale viene poi riportato al suo valore iniziale E_i , con la medesima velocità di scansione. Il potenziale contro il tempo assume così la forma di un'onda triangolare [Figura 17] ed il risultante voltammogramma (curva della corrente contro la differenza di potenziale applicata) ha un andamento ciclico.

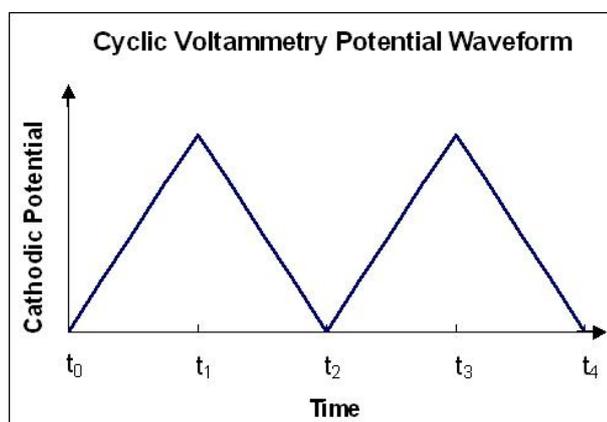


Figura 17: Onda triangolare di E contro il tempo.

Se si prende in esame un sistema in cui è presente la sola specie O , si vede che al potenziale iniziale applicato E_i non si ha passaggio di corrente in quanto, come già detto, questo ha un

valore sufficientemente positivo da non determinarne l'elettroreduzione. Una volta iniziata la scansione da E_i ad E_f , in assenza di processi faradici si osserva una corrente di tipo capacitivo, dovuta al caricamento del doppio strato presente all'interfase, assimilabile alle due armature di un condensatore. In presenza di un processo faradico, allorché il potenziale si avvicina al potenziale formale della coppia, E° , si ha un ulteriore contributo alla corrente, dovuto all'elettroreduzione della specie. Per inciso, si definisce potenziale formale di una coppia redox il potenziale che assume l'elettrodo in condizioni di equilibrio, quando la concentrazione della specie ridotta, R, è uguale a quello della specie ossidata, O.

Man mano che il potenziale diventa più negativo, la corrente cresce in conseguenza dell'aumentare della velocità con cui la specie si elettroreduce. La corrente raggiunge il suo massimo valore quando la concentrazione della specie reagente alla superficie dell'elettrodo si annulla. A questo punto l'impoverimento della specie reagente nello strato di soluzione adiacente alla superficie elettrodica fa sì che lo "strato di diffusione", cioè lo strato di soluzione in cui la concentrazione del reagente risulta minore della sua concentrazione massiva, aumenti il suo spessore. Parallelamente, il gradiente di concentrazione del reagente alla superficie dell'elettrodo, che è una misura dell'intensità della corrente, diminuisce fino ad annullarsi.

Nella scansione inversa del potenziale, da E_f a E_i , inizialmente questo è ancora sufficientemente negativo da determinare un'ulteriore riduzione di O e la corrente continua ad essere negativa. Quando, invece, il potenziale applicato si avvicina al potenziale formale della coppia in esame, si comincia ad avere la riossidazione della forma R che si è prodotta durante la scansione negativa. Si ha nuovamente un massimo di corrente e conseguente diminuzione dovuta all'impoverimento della specie R vicino all'elettrodo.

Lo stadio lento di un processo redox può essere la diffusione della specie dalla soluzione massiva alla superficie dell'elettrodo o lo stadio di trasferimento elettronico. Nel primo caso, se lo stadio di trasferimento elettronico è sufficientemente veloce da poter essere considerato in quasi-equilibrio, si può applicare l'equazione di Nernst alle concentrazioni di O e di R alla superficie dell'elettrodo.

$$E = E^\circ + \frac{0,05916}{n} \log \frac{\prod[\text{ox}]_i^{\nu_{\text{ox}}}}{\prod[\text{red}]_i^{\nu_{\text{red}}}}$$

Equazione di Nernst

Il processo, in questo modo, si dice “reversibile”. In un voltammogramma reversibile la separazione ΔE tra il potenziale E_{pc} del picco catodico e quello, E_{pa} , del picco anodico è pari a $59 \text{ mV}/n$, dove n indica il numero di elettroni scambiati nel processo redox. Inoltre, la corrente di picco catodico e quella di picco anodico sono uguali in valore assoluto. Tale valore è dato dall’equazione di Randles-Sevcik:

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

in cui i_p indica la corrente di picco in Ampere, n il numero di elettroni scambiati, A l'area dell'elettrodo in cm^2 , D è il coefficiente di diffusione della specie elettroattiva in $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, c è la concentrazione della specie nella massa della soluzione in $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ e v è la velocità di scansione in $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se, invece, lo stadio lento è quello di trasferimento elettronico, il processo viene definito “irreversibile”, ed il corrispondente voltammogramma appare deformato; per velocità di trasferimento elettronico sufficientemente basse la curva voltammetrica relativa al processo di riduzione di O e quella relativa al processo di ossidazione di R sono separate da una regione di potenziale dove la corrente è nulla: in molti casi, solo una delle due precedenti curve è effettivamente visibile nel campo di potenziali accessibili sperimentalmente.

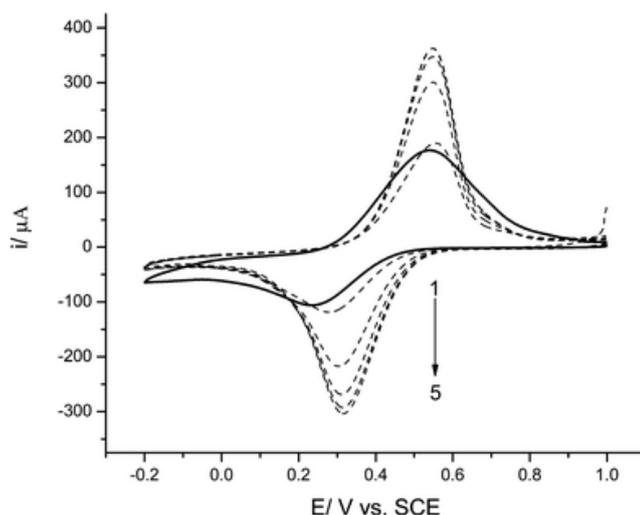


Figura 18: Voltammogramma ciclico reversibile (linee tratteggiate, l'altezza del picco aumenta all'aumentare della velocità di scansione) e irreversibile (linea continua)

In assenza di processi redox, la corrente registrata è esclusivamente di tipo capacitivo, dovuta, cioè, al graduale caricamento, o scaricamento, dell'interfase elettrodo/soluzione, rappresentabile come un condensatore elettrico, con una capacità differenziale C generalmente dipendente dal potenziale applicato E . La capacità differenziale è definita come $C = dQ/dE$. Nel caso in cui C si possa considerare approssimativamente indipendente da E , la corrente capacitiva i_c dovuta alla variazione di potenziale E nel tempo, con una velocità costante $v = dE/dt$, sarà data da:

$$i_c = \frac{dQ}{dt} = \frac{d(CE)}{dt} = C \frac{dE}{dt} = Cv$$

Queste condizioni si verificano in un ampio campo di potenziali quando l'elettrodo sia coperto da un film lipidico in assenza di canali ionici. In questo caso la curva di andata e quella di ritorno del voltammogramma ciclico sono parallele e la loro separazione è pari a $2Cv$.

Nel caso di monostrati e bistrati supportati da mercurio, il voltammogramma risulta inclinato con una pendenza pari a $1/R$ (dalla legge di Ohm, $i = V/R$). Questi sono, infatti, impermeabili anche ad eventuali ioni inorganici elettroattivi in assenza di specie che, interagendo con i film lipidici, ne riducano la compattezza e/o formino canali ionici.

1.7.2 Voltammetria AC con risoluzione di fase

La voltammetria AC è una tecnica voltammetrica in cui alla scansione lineare del potenziale di base viene sovrapposto un potenziale sinusoidale di data frequenza e di ampiezza sufficientemente piccola (5-10 mV picco-picco) da poter considerare la risposta in corrente del sistema elettrochimico lineare con il potenziale sinusoidale. E' quindi una tecnica in corrente alternata. Nel nostro lavoro la frequenza e l'ampiezza del potenziale sinusoidale, impiegate nelle misure di voltammetria AC, sono di 75 Hz e 10 mV rispettivamente.

Si registra una corrente, anch'essa sinusoidale, con stessa frequenza ma sfasata rispetto al potenziale alternato di un dato angolo, detto angolo di fase, φ . L'angolo di fase della corrente risultante è caratteristico del tipo di elemento circuitale cui può essere assimilato il sistema in esame. Un elemento puramente resistivo, ad esempio, produce una corrente sfasata di 0° , che quindi viene detta "in fase" rispetto al potenziale applicato; un

elemento puramente capacitivo dà luogo, invece, ad una corrente con angolo di fase di -90° , detta corrente “in quadratura”.

Nelle misure effettuate è stata registrata la sola componente in quadratura della corrente, la quale è in prima approssimazione proporzionale alla capacità del monostrato o bistrato, in quanto a tale frequenza il contributo resistivo può essere trascurato. Mediante un fattore di conversione, determinato preventivamente tramite taratura del sistema con un condensatore di precisione, si rende possibile la conversione da corrente a capacità.

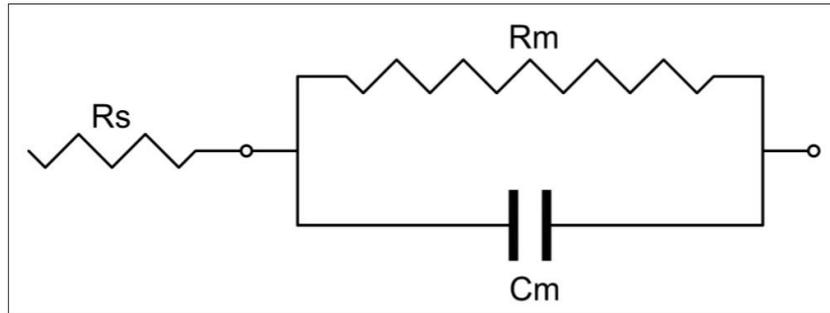
1.7.3 Spettroscopia d'impedenza elettrochimica

La spettroscopia d'impedenza è una tecnica che consiste nell'applicare un potenziale di base al sistema in esame, al quale si sovrappone un potenziale sinusoidale di frequenza variabile e di piccola ampiezza (5-10mV picco-picco). Quest'ultimo accorgimento è necessario per avere una risposta lineare rispetto al potenziale sinusoidale applicato, semplificando così l'analisi dei risultati. Si registra, quindi, la corrente che ha la stessa frequenza del potenziale alternato e se ne misura modulo e sfasamento rispetto al potenziale alternato stesso. La frequenza può variare da 10^5 a 10^{-3} Hz e le varie misure possono poi essere ripetute a potenziali di base diversi.

Il sistema di acquisizione dello strumento traduce i valori di corrente in valori di impedenza Z . L'impedenza è l'equivalente in corrente alternata della resistenza elettrica R della legge di Ohm ($E=iR$) in corrente continua (direct current, DC), ed ha pertanto le stesse dimensioni.

L'interpretazione dei dati viene effettuata assimilando il sistema elettrodo/(monostrato o bistrato)/soluzione ad un “circuito equivalente” in cui i diversi strati dielettrici possono essere schematizzati con una serie di “maglie RC”, costituite ciascuna da una resistenza R in parallelo ad un condensatore di capacità C . In questo modo R dà una misura della permeabilità dello strato agli ioni, mentre C rende conto della capacità dello stesso di accumularli al confine con gli strati contigui.

Un film lipidico supportato da mercurio in contatto con una soluzione elettrolitica può essere descritto utilizzando un circuito equivalente del tipo:



in cui R_s è la resistenza dello strato di soluzione adiacente al monostrato stesso; R_m e C_m sono rispettivamente la resistenza e la capacità della membrana.

L'impedenza totale è espressa dalla combinazione delle impedenze dei singoli costituenti del circuito, applicando le regole degli elementi in serie e in parallelo:

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

Z_s è l'impedenza della soluzione, la quale può essere considerata un puro elemento resistivo; di conseguenza la sua impedenza coincide con la sua resistenza: Z è espresso da un numero reale e risulta in fase con il potenziale applicato ($\varphi=0^\circ$). Z_s è quindi uguale ad R_s . Z_m è, invece, l'impedenza della maglia relativa al monostrato (o bistrato). Per due elementi in parallelo si ha:

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

- $Z(R_m) = R_m$ in quanto l'impedenza di un elemento puramente resistivo coincide con la sua resistenza.
- $Z(C_m) = -\frac{i}{\omega C_m}$ poiché l'impedenza di un elemento capacitivo ha solo componente immaginaria ed è sfasata di -90° . Qui, $\omega = 2\pi f$ è la frequenza angolare del segnale sinusoidale ed i è l'unità immaginaria.

Sostituendo nell'impedenza della maglia abbiamo:

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

da cui si ricava

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

L'impedenza totale sarà dunque:

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

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

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

Da questa equazione appare evidente che l'impedenza totale è costituita da una parte reale, data dalla somma dei primi due addendi, e da una parte immaginaria.

Qualora si vogliono studiare sistemi fisici rappresentabili, come nel nostro caso, da strati dielettrici in serie, un grafico molto utile è il cosiddetto "grafico del modulo", in cui si riporta in ascissa $\omega Z'$ ed in ordinata $-\omega Z''$. Z' e Z'' indicano la parte reale e la parte immaginaria dell'impedenza rispettivamente, e sono quindi le componenti della funzione modulo M .

Dall'eq. (1) si possono quindi scrivere la componente in fase, Z' , e la componente in quadratura, Z'' , relativamente ad una singola maglia RC, come:

$$Z' = \frac{R}{(1 + \omega^2 R^2 C^2)}$$

$$Z'' = -Z' \omega RC$$

Eliminando ωRC dalle due equazioni, si ottiene:

$$Z''^2 + Z'^2 - RZ' = 0$$

Da cui:

$$(Z' - \frac{R}{2})^2 + Z''^2 = (\frac{R}{2})^2$$

Così, moltiplicando entrambi i membri dell'equazione precedente per ω^2 si ottiene:

$$\omega^2 Z''^2 + \omega^2 Z'^2 - \frac{\omega Z''}{C} = 0$$

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

Nel grafico di $\omega Z'$ contro $-\omega Z''$ si ottiene, in questo modo, un semicerchio di diametro C^{-1} ; inoltre la frequenza angolare ω sul massimo del semicerchio è uguale al reciproco della "costante di tempo", RC , della maglia.

Abbiamo riportato, a titolo esemplificativo, il grafico del modulo relativo ad un bistrato (curva nera) ed allo stesso bistrato in presenza di valinomicina (curva rossa), uno ionoforo selettivo nei confronti dello ione potassio [Figura 19].

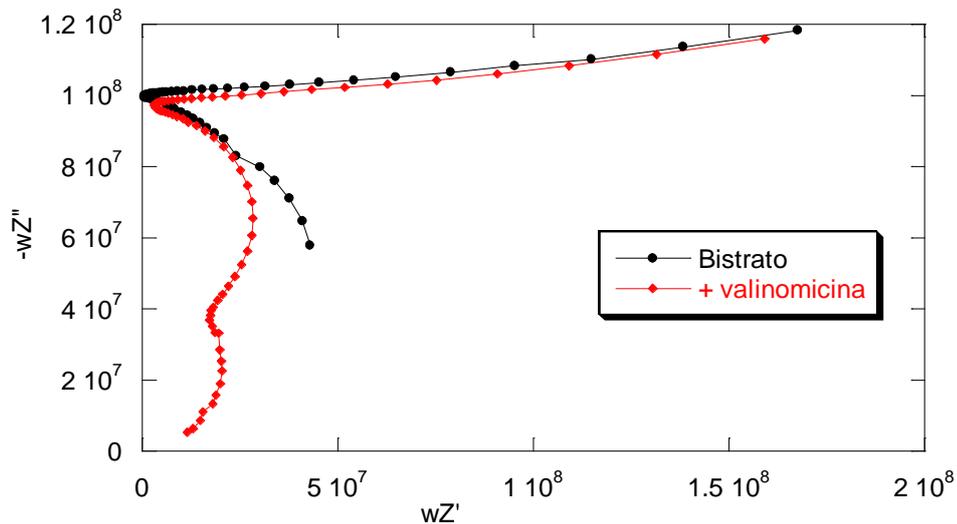


Figura 19: Grafico del modulo per bistrato (curva nera) e bistrato con valinomicina (curva rossa)

Si osserva chiaramente come l'aggiunta della valinomicina faccia sì che il grafico si strutturi diversamente, con la comparsa di due semicerchi al posto dell'unico presente nel caso di un

bistrato supportato, per potenziali di base applicati che si trovino nell'arco dei valori di stabilità del sistema. La presenza dello ionoforo ha l'effetto di abbassare la resistenza dello strato idrofobo, permettendo di caratterizzare anche lo strato idrofilo a contatto con il metallo, che in assenza della valinomicina non è osservabile. Specie che si adsorbono alla superficie del bistrato o che interagiscono con la sua porzione più interna, alterandone le proprietà dielettriche, possono avere effetto analogo. Nel caso dei monostrati, l'effetto dovuto all'adsorbimento nella regione delle teste di specie incapaci di penetrare il film lipidico, ma in grado di formare su di esso uno strato con proprietà dielettriche specifiche, può essere caratterizzato allo stesso modo.

Oltre al grafico del modulo appena descritto, i risultati delle misure di spettroscopia d'impedenza possono essere riportati in modi diversi, a seconda delle informazioni che se ne vogliono ricavare.

Per avere informazioni qualitative sulla corretta formazione del monostrato (o bistrato) autoassemblato, si può utilizzare il diagramma di Bode, in cui si riportano il logaritmo del modulo dell'impedenza totale, $\log Z$, e l'angolo di fase φ contro il logaritmo della frequenza, $\log f$. Nel caso di un monostrato (o bistrato) supportato su mercurio si ottiene un andamento di φ con tipica forma a campana.

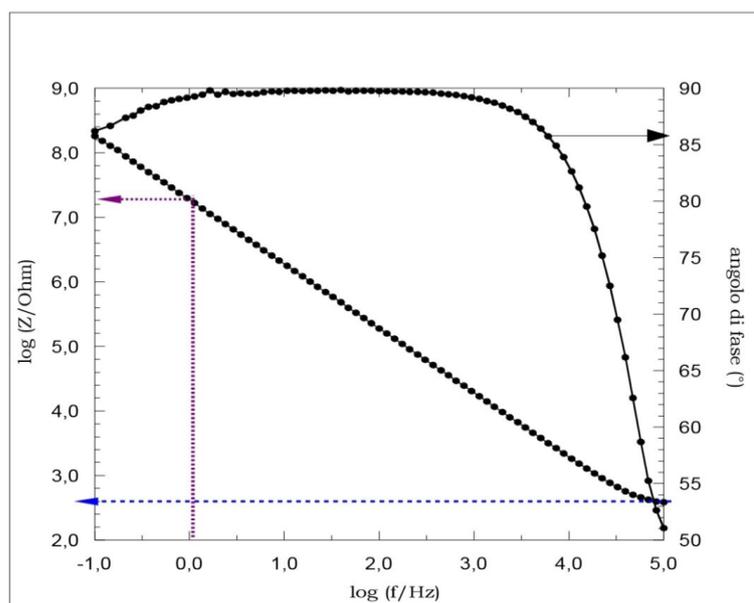


Figura 20: Diagramma di Bode per un bistrato DPTL/DOPC al potenziale base di -0,4V.

Nella zona delle alte frequenze, a destra del grafico ($\log f = 5$), i contributi all'impedenza totale della maglia del bistrato possono essere trascurati a causa dell'alto valore della frequenza angolare al quadrato, ω^2 , (e quindi di f^2) al denominatore di entrambi gli addendi

dell'equazione (1). L'impedenza totale coincide, quindi, con la resistenza della soluzione R_s ; questo viene confermato dal basso valore dell'angolo di fase.

Per un sistema ideale si può dimostrare che, in caso di controllo puramente resistivo, l'andamento di $\log Z$ vs $\log f$ è caratterizzato da una retta parallela all'asse delle ascisse; si può, dunque, estrapolare il valore di R_s tracciando la retta tangente al tratto terminale della curva di $\log Z$ vs $\log f$, parallelo all'asse (freccia blu). Per frequenze inferiori non è, invece, possibile trascurare i termini relativi alla maglia del bistrato. Siccome nella maglia la resistenza è in parallelo con la capacità, la corrente fluirà attraverso l'elemento a minor impedenza, il quale determinerà quindi il profilo del diagramma.

Dato che un monostrato (o bistrato) è caratterizzato da resistenza elevata, nell'arco di frequenze compreso tra 10^4 e 1 Hz la corrente tenderà a passare attraverso l'elemento capacitivo. Dal grafico è possibile osservare che, in tale intervallo di frequenze, l'angolo di fase è di circa 90° . In un sistema ideale, quando siamo sotto controllo capacitivo, l'andamento di $\log Z$ vs $\log f$ è una retta con pendenza -1. Se alla frequenza di 1 Hz ($\log f=0$), l'impedenza totale è controllata esclusivamente dal suo contributo capacitivo, essa risulterà semplicemente data da $1/(2\pi C_m)$. È possibile, di conseguenza, ricavare il valore della capacità della membrana C_m (freccia viola).

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

In questo lavoro le misure di spettroscopia d'impedenza sono state effettuate su monostrati o bistrati supportati da mercurio, prima e dopo l'aggiunta del peptide in esame. Con tale tecnica è, infatti, possibile valutare il corretto assemblaggio della membrana, nonché la formazione di eventuali canali ionici o di ulteriori strati dielettrici.

1.8 Scopo della tesi

Il mio lavoro di tesi è basato sullo studio elettrochimico dell'interazione che il CT35 instaura con due modelli di membrane biologiche (membrane biomimetiche), sia in assenza che in presenza del siero prelevato da due ragazze affette da RTT.

L'idea di procedere con la caratterizzazione del tipo di interazioni che si verificano in tali sistemi, effettuata presso il Laboratorio di Bioelettrochimica dell'Università di Firenze, è nata come conseguenza dei dati ottenuti con un precedente studio sul CSF114. Con questo è stata, infatti, osservata una significativa interazione con la superficie delle membrane biomimetiche, ossia con la regione delle teste polari del materiale fosfolipidico auto-organizzatosi sul supporto elettrodico di mercurio, evidenziata in spettroscopia d'impedenza elettrochimica dalla formazione di uno strato dielettrico aggiuntivo; potendo questo prefigurarsi come la base per lo sviluppo futuro di un biosensore specifico per la Sclerosi Multipla, abbiamo deciso di estendere tale tipo di osservazioni al CT35, al fine di verificare se questo possa a sua volta avere un analogo impiego, per quanto riguarda la sindrome di Rett.

Ne abbiamo studiato il comportamento e l'attività in un ambiente con caratteristiche analoghe a quelle della membrana cellulare bersaglio dell'azione patologica nelle due malattie. Abbiamo, cioè, variato la composizione lipidica della membrana biomimetica ed il pH della soluzione di lavoro, in maniera da avvicinarci alle condizioni fisiologiche specifiche, naturalmente entro limiti imposti dai nostri modelli.

Le misure sul CSF114 sono state effettuate con lo scopo di verificare la riproducibilità dei dati precedentemente ottenuti, nonché con l'obiettivo di ampliarli, estendendoli allo studio delle interazioni antigene-anticorpo, che ancora non era stato affrontato. Nel caso del CT35 sono stati, invece, effettuati sia gli studi preliminari che l'analisi di possibili interazioni antigene-anticorpo, seguendo lo stesso protocollo sperimentale applicato al CSF114 in forma glucosilata.

Capitolo 2: Parte sperimentale

2.1 Caratterizzazione elettrochimica delle interazioni peptidi/membrana biomimetica

2.1.1 Assetto sperimentale

2.1.1.1 Cella elettrochimica

Tutte le nostre misure sono state condotte in una cella di vetro Pirex a cinque coni smerigliati, dei quali tre necessari per l'alloggiamento dei elettrodi e due per effettuare le aggiunte nel corso dell'analisi.

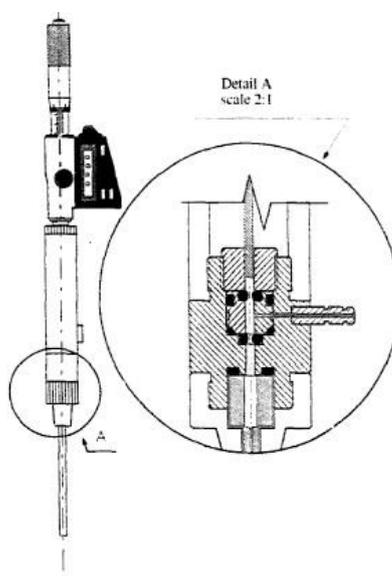


Figura 21: Rappresentazione schematica dell'elettrodo di lavoro a goccia stazionaria di mercurio (HMDE).

Per eseguire le misure abbiamo utilizzato un sistema potenziostatico a tre elettrodi:

1. Elettrodo di lavoro (Working Electrode, WE) a goccia stazionaria di mercurio (Hanging Mercury Drop Electrode, HMDE). E' costituito da un capillare di vetro (Metrohm 6.1209.010) dal quale fuoriesce il mercurio a seguito dell'avanzamento di un pistone rettificato (del diametro di 1 mm) all'interno di un pozzetto contenente il metallo, posizionato sopra il capillare stesso. L'avanzamento del pistone è regolato da una vite micrometrica con display digitale (Mitutoyo Digimatic 350-341) posta in testa all'elettrodo, in modo tale da consentire una misura precisa dell'avanzamento necessario per la formazione di una goccia di mercurio di area predeterminata, previa taratura. Nel nostro caso tutte le misure sono state effettuate su gocce ottenute con avanzamento di 0.200 mm, corrispondente ad un'area di $14 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$.

2. Controelettrodo o elettrodo ausiliario (Auxiliary Electrode, AE), costituito da un filo di platino avvolto attorno ad un gorgogliatore a due vie. Quest'ultimo serve a disareare la cella ed a mantenerla priva di ossigeno durante il corso delle misure, in quanto tale molecola, se presente in soluzione, darebbe interferenza elettroriducendosi nel campo di potenziali in esame. La disareazione si realizza facendo gorgogliare azoto per circa mezz'ora, e mantenendo poi un battente dello stesso al di sopra della soluzione.
3. Elettrodo di riferimento (Reference Electrode, RE) Ag/AgCl/KCl 0,1M, costituito da un filo di argento ricoperto da AgCl tramite deposizione elettrochimica, immerso in una soluzione di KCl a concentrazione nota, in questo caso 0,1 M. Il potenziale di un elettrodo di questo tipo è costante e noto, in quanto dipende solo dalla concentrazione di ioni cloruro in soluzione. Per la generica reazione: $a \text{Ox} + n e^- \rightarrow b \text{Rid}$ viene riportata l'equazione di Nernst, in cui si approssima l'attività di ogni specie con la sua concentrazione.

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

In cui E° rappresenta il potenziale di riduzione standard della coppia, R la costante universale dei gas, T la temperatura assoluta, n il numero di elettroni scambiati nella reazione, F la costante di Faraday.

Nel caso in esame, l'equazione di Nernst per la reazione $\text{AgCl} + e^- \rightarrow \text{Ag} + \text{Cl}^-$ diviene:

$$\text{Ag}^+ + e^- \rightarrow \text{Ag}^\circ \quad E = E^\circ_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} - \frac{RT}{F} \ln \frac{1}{[\text{Ag}^+]}$$

$$\text{AgCl} \leftrightarrow \text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \quad K_{ps} = [\text{Ag}^+][\text{Cl}^-]$$

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

La cella con gli elettrodi e gli altri componenti è riportata in figura 22:

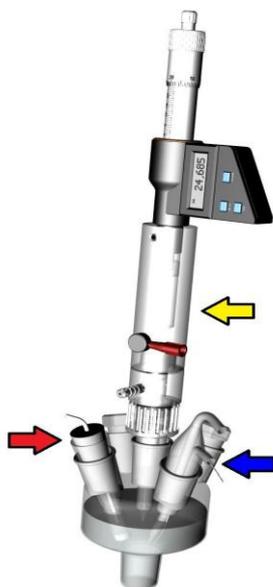


Figura 22: Cella elettrochimica con elettrodo di lavoro HMDE (freccia gialla), elettrodo di riferimento Ag/AgCl (freccia rossa), contro elettrodo di Pt avvolto intorno al gorgogliatore (freccia blu) e, dietro, due coni per le aggiunte.

2.1.1.2 Camera di lavoro

Il sistema è posto in una camera termostata alla temperatura di $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$, in modo tale da evitare variazioni del volume della goccia di mercurio dovute alla dilatazione termica. La camera è munita di un sistema oleopneumatico per lo spostamento dell'elettrodo di lavoro, che ne garantisce un movimento regolare ed evita, quindi, la caduta della goccia durante l'immersione della punta del capillare in soluzione. Il tutto è posto sopra ad un tavolo antivibrante, il quale permette di diminuire il rumore nelle misure, dovuto alle vibrazioni meccaniche. [Figura 23]

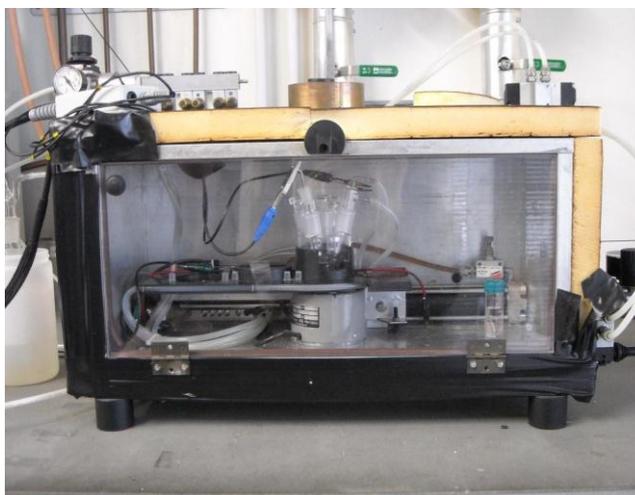


Figura 23: Camera di lavoro termostata e cella elettrochimica.

2.1.2 Preparazione e caratterizzazione di monostrati lipidici supportati da mercurio

Per la preparazione dei monostrati lipidici si è seguita la procedura sotto riportata:

- Si disarea la soluzione elettrolitica facendo gorgogliare azoto attraverso l'apposito gorgogliatore; si termostata la cella per un'ora in camera di lavoro a 25°C. Successivamente si interrompe il flusso di gas in soluzione e se ne mantiene solo un battente sulla superficie della soluzione stessa, durante l'intero il corso delle misure;
- Si spande un'aliquota di 50 μL di una soluzione del lipide in pentano (1 mg/mL) sulla superficie della soluzione elettrolitica in cella. In pochi minuti si ha la completa evaporazione del solvente (data la sua elevata volatilità) e la conseguente formazione di uno strato lipidico organizzato con le teste polari rivolte verso la soluzione e le code alchiliche rivolte verso la fase gassosa. Le soluzioni lipidiche sono preparate per diluizione di soluzioni stock di 10 mg/mL in cloroformio;
- Si procede alla formazione della goccia di mercurio ad area nota e si abbassa l'elettrodo tramite il sistema oleopneumatico, fino a che la punta del capillare non sia immersa in soluzione. In questo modo si determina la formazione spontanea di un monostrato lipidico auto-organizzato sulla goccia di mercurio, con le code alchiliche rivolte verso la superficie del metallo.

Gli stadi per la realizzazione di un "self-assembled monolayer" (SAM) supportato da mercurio sono schematizzati in Figura 24:

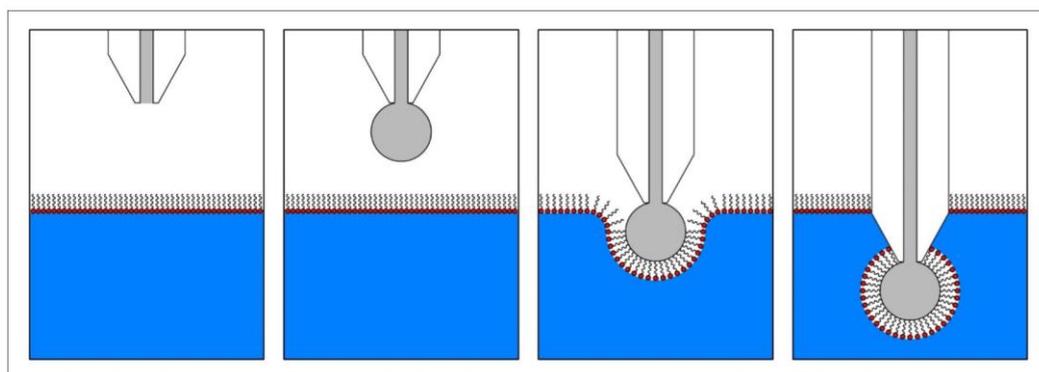


Figura 24: Formazione di un monostrato fosfolipidico auto-organizzato.

Per la caratterizzazione del monostrato lipidico vengono utilizzate voltammetria AC con risoluzione di fase e spettroscopia d'impedenza elettrochimica.

Si effettuano circa dieci scansioni consecutive di voltammetria AC per determinarne la capacità nel campo di potenziale compreso tra -0,2 V e -0,8 V. È sufficiente questo basso numero di scansioni, in quanto la stabilizzazione del SAM è praticamente immediata.

L'ottenimento di curve di corrente contro il potenziale stabili e riproducibili è indice di un monostrato ben formato. La capacità di quest'ultimo si ottiene misurando la corrente nel minimo della curva, i_{\min} (A) e convertendola in capacità previa taratura dello strumento con un condensatore di precisione. I valori ottimali di capacità sono circa 1,70-1,75 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$; se quelli ottenuti sono adeguati, si procede con la spettroscopia d'impedenza.

Con tale tecnica, le misure vengono effettuate applicando un potenziale alternato di ampiezza 10 mV e frequenza che varia tra 10^5 e 10^{-1} Hz, mentre il potenziale di base varia tra -0,3 V e -0,8 V. Il grafico di Bode fornisce un'informazione qualitativa sulla bontà del monostrato; infatti, se questo è ben formato, il grafico a campana presenta un angolo di fase di circa 90° nell'arco di frequenze comprese tra 10^3 e 1 Hz ed un'elevata resistenza. Il valore della resistenza si estrapola alle basse frequenze, tracciando una retta parallela all'asse delle ascisse e tangente alla curva di $\log Z$ contro $\log f$.

Nel nostro progetto sono stati preparati monostrati di DOPC (dioleoilfosfatidilcolina), e DOPC/SM/Chol (dioleoilfosfatidilcolina/sfingomielina/colesterolo).

2.1.3 Preparazione e caratterizzazione di bistrati lipidici supportati da mercurio

Per la preparazione dei bistrati fosfolipidici si è seguita la procedura sotto riportata:

- Si disarea la soluzione elettrolitica facendo gorgogliare azoto e, contemporaneamente, si termostata la cella a 25°C nella camera di lavoro per un'ora. Successivamente viene interrotta la disareazione e viene lasciato un battente di gas sopra la soluzione per tutto il corso delle misure;
- Vengono spanti sulla superficie della soluzione elettrolitica 50 μL di una soluzione lipidica in pentano (1 mg/mL);
- Si immerge la goccia di mercurio in una soluzione di DPTL in etanolo (0,50 mg/mL) per venti minuti. Con tale operazione il tiolipide si lega covalentemente alla superficie del mercurio, dando luogo ad un monostrato auto-organizzato, con le code alchiliche rivolte verso l'esterno. Si lascia quindi evaporare l'etanolo che bagna il monostrato di DPTL per qualche minuto sotto flusso di azoto;
- Si immerge, a questo punto, la goccia ricoperta da DPTL attraverso il film lipidico presente sulla superficie della soluzione in cella. L'immersione dell'elettrodo avviene tramite il sistema oleopneumatico. Il monostrato del lipide precedentemente spanto sulla superficie della soluzione di lavoro si auto-organizza sul DPTL in modo tale da

rivolgere le code alchiliche verso le catene fitaniliche del tiolipide e le teste polari verso la soluzione. Si viene così a creare un bistrato ancorato al mercurio.

Le fasi di realizzazione del bistrato sono schematizzate in Figura 25:

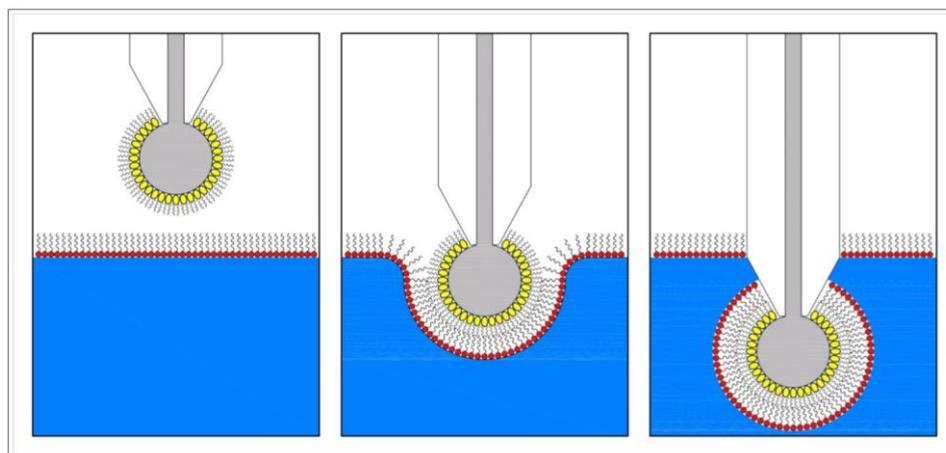


Figura 25: Formazione di un bistrato fosfolipidico auto-organizzato.

Per ottenere una migliore organizzazione e compattezza del bistrato, questo necessita di essere stabilizzato tramite scansioni di potenziale consecutive nel suo campo di stabilità, utilizzando come tecnica la voltammetria AC con risoluzione di fase. Si effettuano almeno 15 scansioni nell'intervallo di potenziale compreso tra $-0,2$ V e $-1,2$ V, registrando la corrente i contro il potenziale applicato V .

Se il bistrato è ben formato con le varie scansioni che si susseguono, si ottiene un profilo della corrente contro il potenziale praticamente costante; tale corrente è proporzionale alla capacità del sistema. I bistrati lipidici su mercurio del tipo DPTL/lipide sono caratterizzati da bassi valori di capacità, tipicamente dell'ordine di $0,55-0,65 \mu\text{F}/\text{cm}^2$; se i valori ottenuti sono adeguati, si procede con le misure di spettroscopia d'impedenza. Queste ultime vengono eseguite in un campo di frequenze compreso tra 10^5 e 10^{-1} Hz, mentre il potenziale di base varia da $-0,3$ V a $-1,0$ V. Anche in questo caso si utilizza il diagramma di Bode per una valutazione qualitativa del bistrato.

2.1.4 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);
- Sfingomieline (SM), Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), in cloroformio (10 mg/mL);
- Colesterolo, Sigma-Aldrich;
- CSF114(Glc), fornito dalla Prof.ssa Anna Maria Papini (Università degli studi di Firenze);
- CT35, fornito dalla Prof.ssa Anna Maria Papini (Università degli studi di Firenze);
- SR33, fornito dalla Prof.ssa Anna Maria Papini (Università degli studi di Firenze);
- KCl Suprapur Merck, trattato in muffola a 500°C per eliminare le impurezze organiche;
- HCl, Merck;
- KH_2PO_4 , Merck;
- K_2HPO_4 , Merck;
- Miscela cromica, preparata sciogliendo a caldo 16 g di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ in 600 mL di H_2SO_4 concentrato, per il lavaggio della cella e della vetreria.

Alla fine di ogni giornata, la cella elettrochimica ed i suoi annessi in vetro vengono lavati in miscela cromica a caldo e poi sciacquati abbondantemente con acqua bidistillata. Dopo la pulizia, vengono avvolti con pellicola di alluminio, per evitare contaminazioni, e asciugati in stufa a 150 °C. Una volta asciugati, devono essere conservati in alluminio e scartati solo al momento dell'utilizzo;

- H_2O bidistillata. L'acqua deionizzata viene, infatti, trattata con una prima distillazione per ridurre ulteriormente il contenuto di sali, e quindi distillata in permanganato per rimuovere eventuali residui organici.

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

Capitolo 3: Risultati

3.1 CT35, CSF114 e CSF114(Glc) su monostrati fosfolipidici supportati da mercurio

Per poter caratterizzare ed analizzare il tipo di interazioni che CT35, CSF114 e CSF114(Glc) contraggono con la superficie esterna della membrana cellulare, abbiamo utilizzato monostrati di dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) e DOPC in miscela con sfingomieline, (SM) e colesterolo (Chol), supportati da un elettrodo a goccia stazionaria di mercurio.

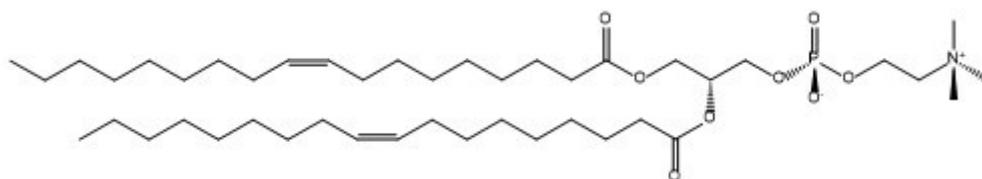


Figura 26: Dioleoilfosfatidilcolina (DOPC)

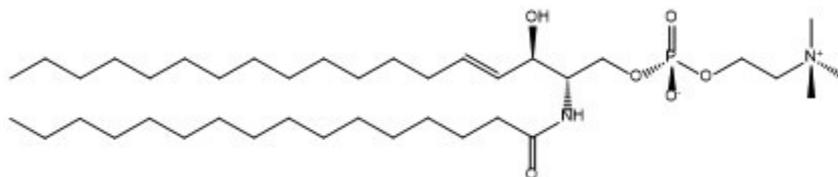


Figura 27: Sfingomieline

È stata, inoltre, utilizzata la miscela DOPC/PSM/Chol con l'obiettivo di valutare l'effetto di un monostrato disomogeneo e meno compatto sulla capacità dei peptidi di interagire con il sistema auto-organizzato^[20]. In particolare, abbiamo usato sfingomieline e colesterolo allo scopo di creare un monostrato con caratteristiche simili a quelle della membrana mielinica, la quale ha un ruolo centrale nello sviluppo di malattie autoimmuni che riguardano il sistema nervoso centrale (SNC), come sindrome di Rett e la sclerosi multipla, da noi prese in esame. Per lo studio sono state impiegate come tecniche elettrochimiche la voltammetria AC e la spettroscopia d'impedenza.

Se si eccettuano le misure di voltammetria AC, con le quali si è investigata la risposta elettrochimica del nostro sistema anche nella regione di potenziale più negativa, dove i processi di riorientamento danno origine a picchi voltammetrici caratteristici, aventi un ruolo diagnostico, le misure sono state effettuate nella regione di potenziale compresa tra -0.2 e -0.8 V, in cui il monostrato è compatto.

Con la spettroscopia d'impedenza, si è valutato l'effetto dell'aggiunta del peptide sul profilo dei grafici del modulo, al fine di mettere in evidenza l'eventuale comparsa di ulteriori semicerchi che potessero indicare un adsorbimento della specie sulla superficie del monostrato. Il nostro obiettivo finale era infatti quello di individuare uno strato dielettrico aggiuntivo, a cui poter attribuire un ruolo diagnostico. Abbiamo, inoltre, esaminato l'andamento della capacità e dell'ammettenza in fase alla frequenza di 10 Hz contro il potenziale. La capacità, C , del monostrato è da considerarsi come un indice della sua compattezza, mentre l'ammettenza in fase, Y' , è una misura della sua permeabilità agli ioni; questi due parametri sono dunque da ritenere significativi per l'analisi della natura delle interazioni che il peptide instaura con il monostrato.

3.1.1 Monostrati di DOPC

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

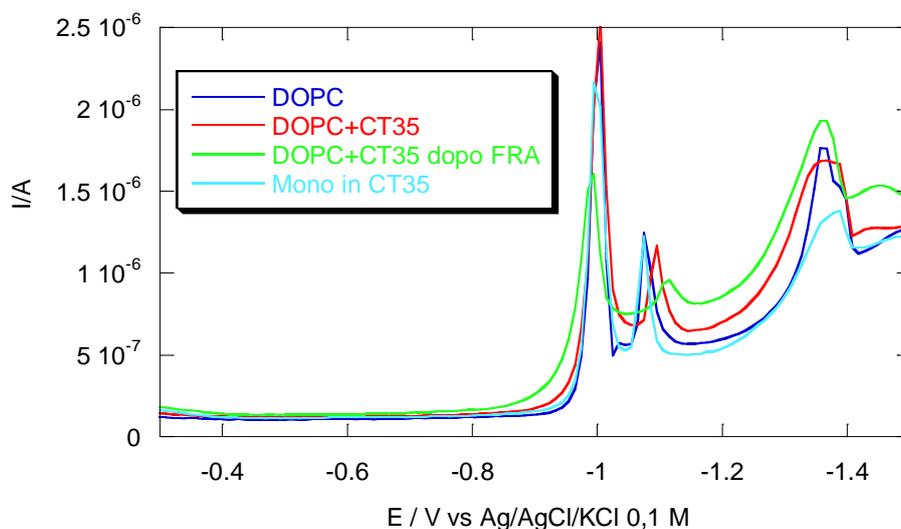


Figura 28: Voltammogrammi AC su monostrato di DOPC. Solo monostrato (curva blu), scansione successiva all'aggiunta del CT35 (curva rossa), scansione effettuata dopo una spettroscopia d'impedenza (curva verde), scansione su di un monostrato formato in presenza di CT35 in soluzione (curva celeste).

Le misure di voltammetria AC su monostrati di DOPC e DOPC/SM/Chol sono state effettuate in un arco di potenziali che va da -0,3 V a -1,5 V.

L'effetto dell'aggiunta di CT35 sul profilo delle curve voltammetriche è molto ridotto, anche dopo un'intera scansione di spettroscopia d'impedenza. Questo risultato indica che neppure un'incorporazione lenta e graduale, quale quella che si realizza utilizzando la spettroscopia d'impedenza elettrochimica, serve ad aumentare l'interazione del peptide con le teste polari. Si può, comunque, notare una diminuzione del secondo picco di riorientamento ed un lieve restringimento della regione del minimo di capacità, in cui il film lipidico è compatto e ben organizzato.

Nessun effetto, invece, si verifica sul profilo dei grafici di C ed Y' alla frequenza di 10 Hz contro il potenziale, E; ciò indica che le interazioni non coinvolgono lo strato compatto del monostrato.

Nessun effetto è stato osservato sul grafico del modulo a seguito dell'aggiunta del CT35; si evita, pertanto, di riportare i grafici relativi a queste ultime misurazioni.

3.1.1.1 Effetto di una variazione del pH

Variazioni del pH della soluzione di lavoro non determinano alcun aumento dell'effetto del CT35 sul profilo voltammetrico, né spostandosi a valori più acidi, né utilizzando pH più alcalini. Per effettuare questo tipo di verifica ci siamo serviti di una soluzione a pH 5,4 (valore tipico di una soluzione di KCl 0,1 M non tamponata), di una soluzione a pH 3 ottenuta aggiungendo l'opportuna quantità di HCl 0,1 M alla soluzione di KCl, e di una soluzione a pH 6,7 ottenuta mediante uso di un tampone $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ (1:1).

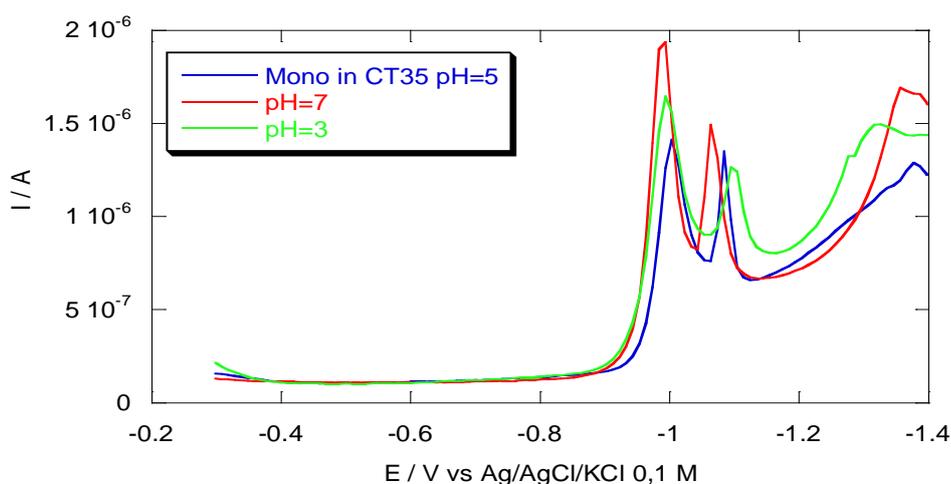


Figura 29: Voltammogrammi AC su monostrato di DOPC a differenti pH. Monostrato formato in presenza di CT35 in soluzione a pH 5,4 (curva blu), scansione a pH 3 (curva verde), scansione a pH 6,7 (curva rossa).

Non si riscontrano variazioni apprezzabili dei voltammogrammi al variare del pH, così come in misure di spettroscopia d'impedenza, dove, infatti, l'aggiunta di CT35 produce effetti trascurabili a ciascuno dei valori di pH investigati.

3.1.2 Monostrati di DOPC/SM/Chol

La composizione della miscela lipidica utilizzata è: 0,8 mg/mL di DOPC, 0,2 mg/mL di SM e 0,6 μ M di colesterolo. Anche in questo caso le misure sono state effettuate con una concentrazione di peptide di 2 μ g/mL nella soluzione di lavoro.

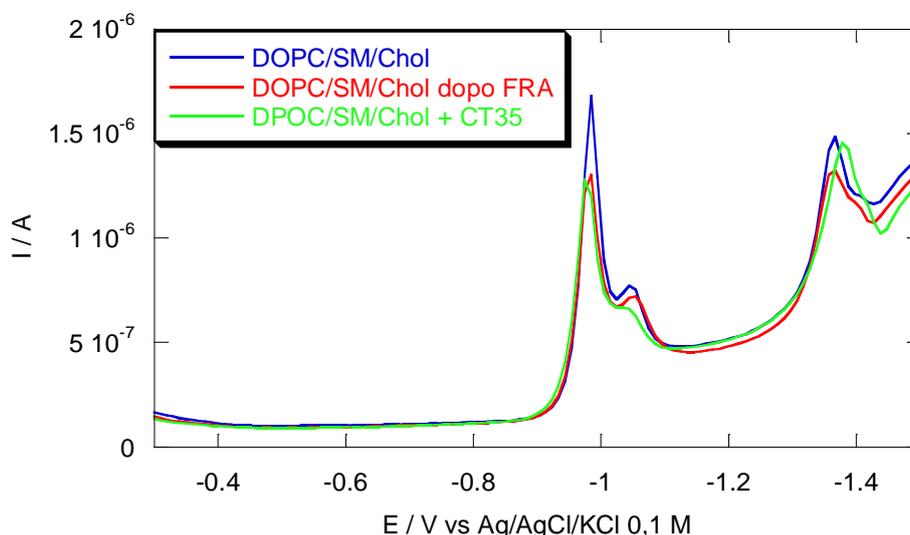


Figura 30: Voltammogrammi AC su monostrato di DOPC/SM/Chol. Scansione sul solo monostrato (curva blu), scansione dopo una spettroscopia d'impedenza (curva rossa), scansione successiva all'aggiunta di CT35 (curva verde).

3.1.2.1 Effetto dell'aggiunta di CT35 e valutazione della risposta antigene-anticorpo con siero SR33

Come si è visto, l'aggiunta di CT35 non ha alcun effetto sul profilo voltammetrico, neppure in presenza di monostrati a composizione mista. Si sono effettuate misure di spettroscopia d'impedenza nella regione di stabilità del monostrato (da -0,3 V a -0,8 V). Si riporta, a titolo esemplificativo, il grafico di $-\omega Z''$ contro $\omega Z'$ al potenziale di -400 mV:

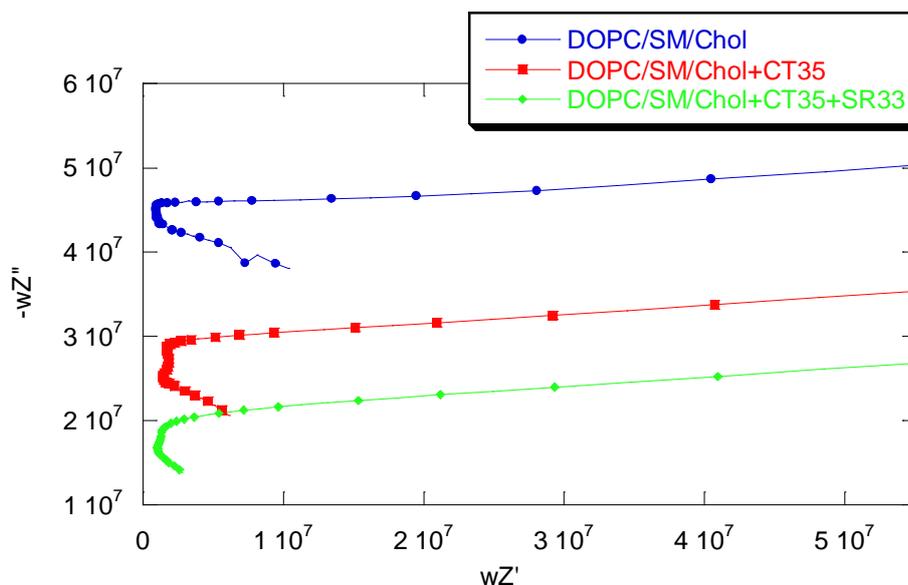


Figura 31: Grafico del modulo su monostrato di DOPC/SM/Chol. Scansione sul solo monostrato (curva blu), scansione dopo l'aggiunta di CT35 (curva rossa), scansione successiva all'aggiunta di SR33 (curva verde).

Come ampiamente descritto nella sezione introduttiva dedicata alle tecniche, questo tipo di grafico, detto grafico del modulo, fornisce informazioni sulla struttura del sistema auto-organizzato. In particolare modo, ogni semicerchio che vi possiamo individuare rappresenta, in prima approssimazione, uno strato dielettrico. La comparsa o la modifica di un semicerchio a seguito dell'aggiunta di una specie esogena indica chiaramente una diversa stratificazione dielettrica, causata proprio dalla sua presenza. Le dimensioni del semicerchio dipendono dalle proprietà dello strato dielettrico stesso.

Prima dell'aggiunta del peptide e del siero, il sistema è composto dal solo monostrato e può essere scomposto in due strati dielettrici: la regione delle code alchiliche e quella delle teste polari; lo strato dielettrico rappresentato dalla soluzione adiacente alla superficie del monostrato costituisce un ulteriore elemento dielettrico, il cui effetto è tuttavia limitato alla regione delle alte frequenze. Questi strati sono visibili nella curva in blu: il semicerchio più grande, di cui si intravede soltanto una piccola parte iniziale, rappresenta la soluzione, mentre quello più piccolo, parzialmente strutturato in due componenti, rappresenta il monostrato.

Si osserva chiaramente che con l'aggiunta di CT35 (curva rossa) compare un semicerchio aggiuntivo che si colloca nella regione di frequenze propria dell'elemento attribuito alle teste polari e che pertanto presenta proprietà dielettriche analoghe. La forma di quest'ultimo semicerchio varia ulteriormente per aggiunta di una piccola aliquota del

siero SR33, che ha dato risposta anticorpale positiva nei test immunoenzimatici. E' evidente, quindi, un'interazione di un qualche componente del siero con lo strato dielettrico contenente CT35.

La risposta spettroscopica sembra in disaccordo con quella voltammetrica, ma non dobbiamo dimenticare che la voltammetria evidenzia solo quelle interazioni che hanno come effetto l'inibizione dei moti di riorientamento cooperativo delle molecole lipidiche auto-organizzate. E' possibile che nel caso di monostrati misti tale cooperatività sia già inficiata dalla complessità del sistema e risenta in maniera minore dell'aggiunta del CT35.

Da un'elaborazione dei dati effettuata utilizzando tre maglie RC, con cui abbiamo rispettivamente simulato lo strato della soluzione elettrolitica adiacente alla superficie del monostrato, la regione delle teste polari e la regione delle code alchiliche, si ottengono i seguenti valori (omettendo quelli della soluzione):

	R_1 $K\Omega \times cm^2$	C_1 $\mu F \times cm^{-2}$	R_2 $M\Omega \times cm^2$	C_2 $\mu F \times cm^{-2}$
Monostrato	0.7	21	3	1.7
+ CT35	0.3	14	0.7	2.9
+ SR33	0.17	17	0.6	4.4

La maglia con indice 2 rappresenta la regione delle code alchiliche. È ragionevole razionalizzare l'aumento di C_2 e la diminuzione di R_2 sulla base di un'interazione del monostrato con i composti che vengono aggiunti, anche se le variazioni osservate non chiariscono il meccanismo con cui tale interazione avviene; infatti, si mette solo in evidenza una destabilizzazione aspecifica della regione compatta del monostrato, la quale si riflette soprattutto in un aumento della sua capacità. La resistenza, d'altro canto, è determinabile tramite elaborazione in maniera molto più approssimata e le sue variazioni risultano, pertanto, meno significative di quanto i risultati riportati possano far sembrare. La diminuzione della resistenza mostra, comunque, una destabilizzazione della regione delle code alchiliche.

La maglia con indice 1 rappresenta, invece, la regione della teste polari, con la quale si può ragionevolmente ipotizzare che il CT35 interagisca, data la sua natura prevalentemente idrofila. A seguito dell'aggiunta del composto si osserva, infatti, una debole diminuzione sia di resistenza che di capacità. I due risultati, contrariamente a quanto

sembra, possono non essere in contrasto tra loro; infatti, se la molecola di CT35 si adsorbe sulle teste non formando un monostrato su di esse, ma raccogliendosi soltanto in determinate aree, anche in dipendenza dalla loro composizione lipidica, può determinare delle zone di discontinuità nello strato che simula la regione delle teste, riducendone così la resistenza con cui si oppone alla penetrazione di ioni. Dall'altro lato, però, se la regione coperta dal CT35 è sufficientemente estesa, questa contribuirà con la sua minore capacità, se confrontata con quella di uno strato misto teste polari/soluzione elettrolitica, ad una frazione significativa all'intera capacità del sistema, determinandone così una diminuzione.

Al momento in cui si aggiunge l'anticorpo specifico, i risultati mostrano un'ulteriore diminuzione della resistenza della regione delle teste polari, mentre la capacità aumenta di nuovo. Come detto in precedenza, la determinazione del valore della resistenza è meno accurata, ma l'aumento di capacità, la quale tende a tornare ai valori iniziali, indica invece che l'interazione con l'anticorpo, presente nel siero SR33, allontana il CT35 dalla regione delle teste, che tornano ad essere libere di muoversi per effetto del campo elettrico, esattamente come prima dell'aggiunta del peptide.

Abbiamo verificato, in questo caso ed anche in passato, come talvolta l'uso di miscele lipidiche abbia il difetto di far sì che non tutti i monostrati abbiano la stessa composizione, ma che alcune volte presentino dei microdomini più ricchi di un componente piuttosto che di un altro; questo effetto, se è limitato ad una stessa serie di misure, può essere rilevante su misure effettuate in giornate diverse.

In linea di massima, monostrati più ricchi in DOPC mostrano una capacità più bassa ed una resistenza più elevata, contrariamente a quelli in cui si ha una percentuale maggiore di SM. Abbiamo, quindi, analizzato nei dettagli anche il caso in cui un monostrato più ricco in fosfolipidi saturi presenti fin dall'inizio una resistenza più bassa. Abbiamo elaborato i dati utilizzando questa volta tre maglie RC, oltre a quella della soluzione (1° caso nella tabella seguente): la necessità stessa di ricorrere ad un circuito più articolato, il quale indica la presenza di ulteriori strati dielettrici differenziati, mostra una sua minore compattezza. Per evitare, inoltre, che la scelta del circuito influisca sui risultati, abbiamo elaborato anche quello utilizzato nella tabella precedente adottando il medesimo circuito equivalente (2° caso nella tabella seguente), malgrado in tale caso esso risulti meno appropriato.

Si sono così ottenute le seguenti serie di valori:

		R_1 $K\Omega \times cm^2$	C_1 $\mu F / cm^2$	R_2 $M\Omega \times cm^2$	C_2 $\mu F / cm^2$	R_3 $K\Omega \times cm^2$	C_3 $\mu F / cm^2$
Monostrato	1° caso	8.4	27	243	24	0.13	30
	2° caso	1	12	3	83	0.08	44
+ CT35	1° caso	0.5	18	54	42	0.008	26
	2° caso	0.5	10	0.9	72	5.6	153
+ SR33	1° caso	0.6	24	49	64	0.008	21
	2° caso	0.07	49	0.4	267	0.014	83

Da un'analisi dei valori, si può notare l'elevata capacità del terzo elemento, C_3 , la quale ci permette, dunque, di attribuirlo ad uno strato di costante dielettrica elevata. Una sua analisi più accurata esula da questo lavoro.

Tenendo conto che in entrambi i casi, R_2 e C_2 rappresentano i parametri dello strato compatto costituito dalla regione delle code alchiliche, si conferma la tendenza ad una diminuzione della resistenza e ad un aumento della capacità.

Associando di nuovo R_1 e C_1 alla regione delle teste polari, seppur con valori diversi per il 1° ed il 2° caso, si riscontra anche in entrambi i casi una diminuzione sia della resistenza che della capacità per aggiunta del CT35; in particolare, la capacità torna ad aumentare per aggiunta ulteriore di SR33. Questo comportamento, nonostante l'irriproducibilità dei dati, conferma le precedenti considerazioni generali.

3.1.2.2 Effetto dell'aggiunta di CSF114 e CSF114(Glc) e valutazione della risposta antigene-anticorpo con siero SR33

Sulla base di misure precedentemente effettuate in questo laboratorio, che hanno avuto come oggetto lo studio delle interazioni di CSF114 e CSF114(Glc) con monostrati di DOPC e DOPS al variare del pH della soluzione, avevamo concluso che questi composti interagiscono debolmente con i modelli di membrana utilizzati, limitandosi ad adsorbirsi nella regione idrofila delle teste polari. Non è stata riscontrata alcuna indicazione di una loro tendenza a formare canali ionici di membrana.

La sclerosi multipla è una patologia che affligge principalmente i tessuti nervosi, e la proteina il cui epitopo minimo è contenuto nella struttura del CSF114 è collocata prevalentemente nella membrana delle cellule che costituiscono la guaina mielinica. Anche

per lo studio di tale peptide abbiamo, quindi, pensato di adattare il nostro modello alla composizione specifica di tale membrana, aggiungendo sfingomieline e colesterolo agli altri componenti lipidici.

Le misure condotte in passato avevano messo in evidenza come l'adsorbimento superficiale del CSF114, glucosilato e non, determinasse la formazione di uno strato dielettrico caratterizzabile mediante misure di spettroscopia d'impedenza elettrochimica. Il nostro obiettivo primario è stato, pertanto, quello di utilizzare queste informazioni preliminari per verificare se si potesse ottenere un sensore in grado di rivelare la presenza dell'anticorpo della malattia stessa, qualora presente nel siero.

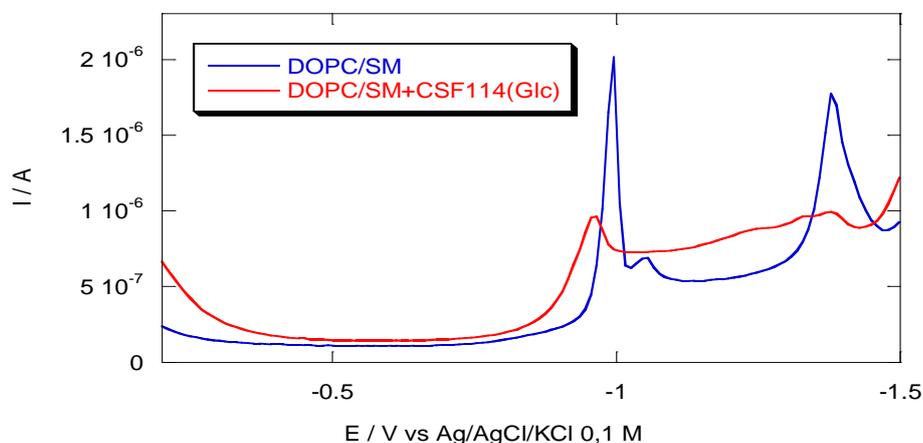


Figura 32: Voltammogrammi AC su monostrato di DOPC/SM (2:1). Scansione sul solo monostrato (curva blu), scansione successiva all'aggiunta di CSF114(Glc) (curva rossa).

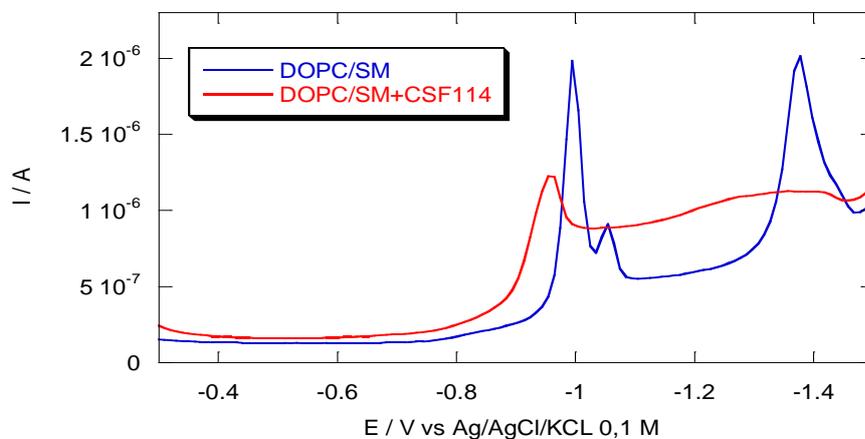


Figura 33: Voltammogramma AC su monostrato di DOPC/SM (2:1). Scansione sul solo monostrato (curva blu), scansione successiva all'aggiunta di CSF114 (curva rossa).

I grafici qui riportati mostrano l'effetto di un'aggiunta di $2\mu\text{g/ml}$ di CSF114 sul profilo voltammetrico di un monostrato misto DOPC/SM (2:1). Sebbene il profilo voltammetrico di monostrati misti di DOPC/SM sia meno riproducibile di quello che si ottiene su monostrati costituiti da un solo lipide, l'effetto di un'aggiunta di CSF114, nella forma glucosilata e non, appare chiaro. Entrambi i composti, infatti, determinano un'alterazione della regione del minimo della capacità, soprattutto per i valori più negativi e più positivi dell'intervallo. L'effetto sul primo picco è modesto, ma la scomparsa del terzo picco, che di norma è attribuito al desorbimento del materiale lipidico dopo il picco di riorientamento cooperativo delle molecole lipidiche, indica un'interazione con le teste non sufficiente ad inibirne completamente il riorientamento, ma in grado di rallentarne il desorbimento. L'alterazione della regione di minimo indica invece una penetrazione, sia pur parziale, del CSF nella regione delle code alchiliche, soprattutto per i valori più positivi del potenziale ed in presenza del CSF114(Glc).

Si sono effettuate misure di spettroscopia d'impedenza al potenziale di -400 mV rispetto ad $\text{Ag/AgCl/KCl } 0.1\text{ M}$, avendo verificato in precedenza che la caratterizzazione di uno strato dielettrico aggiuntivo, a seguito dell'aggiunta di CSF114, è migliore a tale valore di potenziale applicato. Si riporta il grafico di $-\omega Z''$ vs $\omega Z'$ al potenziale di -400 mV :

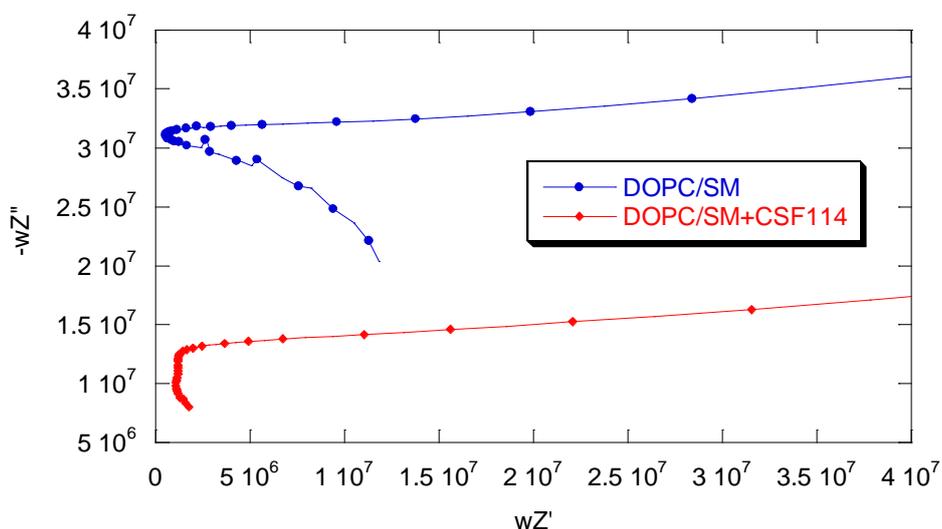


Figura 34: Grafico del modulo su monostrato di DOPC/SM (2:1). Scansione sul solo monostrato (curva blu), prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114 (curva rossa).

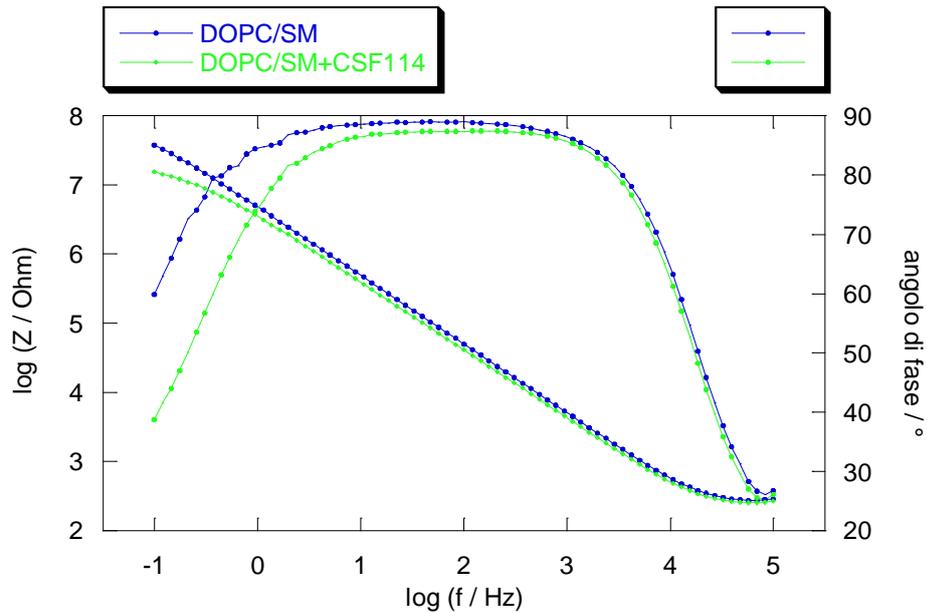


Figura 35: Diagramma di Bode su monostrato DOPC/SM (2:1). Scansione sul solo monostrato (curva blu), scansione dopo aggiunta di CSF114 (curva verde).

Dal grafico di Bode relativo al monostrato, prima e dopo l'aggiunta di CSF114, estrapolando l'intercetta di $\log|Z|$ contro $\log(f)$ alle basse frequenze, si osserva una diminuzione della resistenza del sistema a seguito dell'aggiunta del peptide. La comparsa di un semicerchio aggiuntivo sul grafico del modulo appare, invece, meno evidente, e ciò indica un adsorbimento debole.

Se si considera, in alternativa, il caso di un monostrato costituito da sola DOPC, nel relativo grafico del modulo è possibile osservare la chiara presenza di un ulteriore semicerchio, indicativo della formazione di un nuovo strato dielettrico, rappresentabile con una maglia RC. Per confronto, si riporta di seguito il grafico di $-\omega Z''$ vs $\omega Z'$ al potenziale di -400 mV relativo a questo ultimo caso.

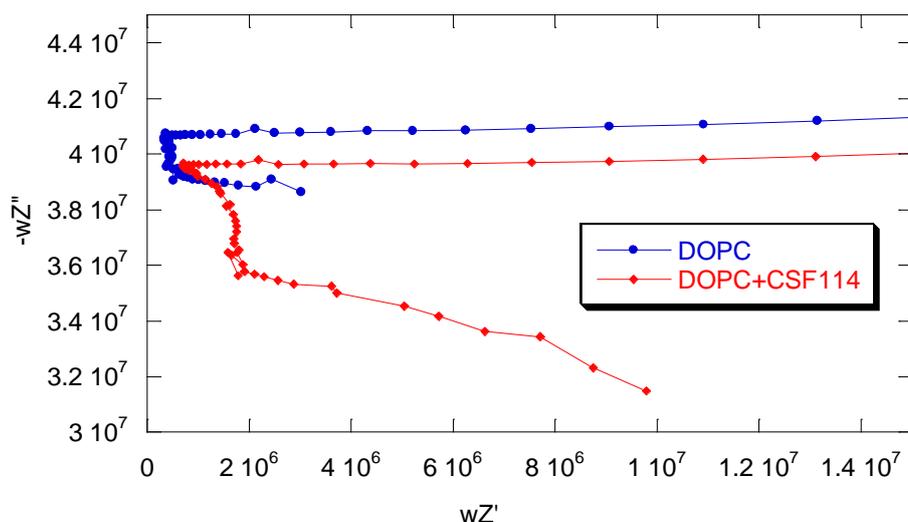


Figura 36: Grafico del modulo su monostrato di DOPC. Scansione sul solo monostrato (curva blu), prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114 (curva rossa).

I dati di spettroscopia d'impedenza descritti sono, quindi, stati elaborati utilizzando un circuito equivalente costituito dalle consuete tre maglie RC in serie tra loro. Anche in questo caso, abbiamo tralasciato la maglia relativa allo strato di soluzione adiacente al monostrato e abbiamo riportato di seguito i risultati ottenuti prima e dopo l'aggiunta di CSF114. Non si sono fatte distinzioni tra CSF114 e CSF114(Glc), in quanto la risposta non ha mostrato differenze significative.

	R_1 $M\Omega \times cm^2$	C_1 $\mu F/cm^2$	R_2 $K\Omega \times cm^2$	C_2 $\mu F/cm^2$
Monostrato DOPC	7.5	1.85	0.13	51
+CSF114	2.3	2	1.2	17

Nel caso di un monostrato di sola DOPC l'elaborazione mostra che, a seguito dell'aggiunta del peptide, si ha una riduzione di oltre il 50% della resistenza, R_1 , dello strato compatto costituito dalla catene alchiliche; questa, tuttavia, non è accompagnata da un aumento corrispondente della capacità, C_1 , dello stesso. Per quanto riguarda, invece, i parametri relativi alla regione delle teste polari, l'aggiunta del CSF114 determina un aumento di resistenza, R_2 , di un ordine di grandezza, mentre la capacità, C_2 , si riduce ad un terzo del suo valore iniziale.

A questo punto, abbiamo arricchito ulteriormente la miscela lipidica, inserendo anche colesterolo. Su monostrati di questo tipo abbiamo aggiunto CSF114(Glc) ed elaborato i dati.

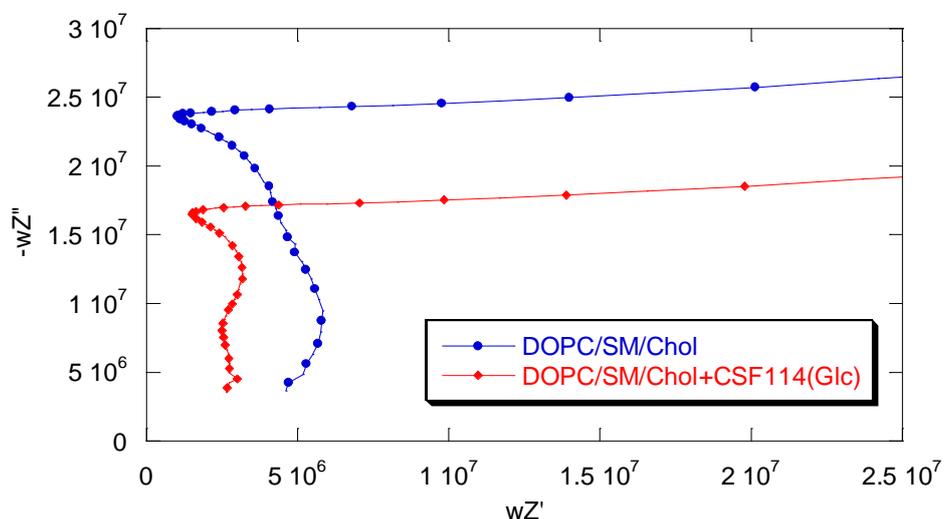


Figura 37: Grafico del modulo su monostrato di DOPC/SM/Chol. Scansione sul solo monostrato (curva blu), scansione dopo l'aggiunta di CSF114(Glc) (curva rossa).

Si sono così ottenute le seguenti serie di valori relative alla elaborazione di più misure di spettroscopia d'impedenza consecutive:

		R_1 $M\Omega \times cm^2$	C_1 $\mu F/cm^2$	R_2 $K\Omega \times cm^2$	C_2 $\mu F/cm^2$
Monostrato	1° caso	0.4	4	20.8	5.8
	2° caso	0.4	3.9	20.6	5.7
+CSF(Glc)	1° caso	0.2	3.8	8.0	4.1
	2° caso	0.2	3.8	7.1	3.9
	3° caso	0.2	5.8	3.9	4.4

Da questi dati si nota che l'aggiunta del CSF114(Glc) ha un effetto poco significativo sulla resistenza della regione delle code alchiliche, R_1 , la quale infatti si riduce solo alla metà; ciò indica una debole penetrazione della molecola in tale regione. Anche la capacità C_1 dello strato, che come di consueto è meno sensibile alle approssimazioni del modello di circuito utilizzato e quindi determinabile con maggiore accuratezza, varia di poco.

La resistenza della regione delle teste polari, R_2 , si riduce invece quasi di un ordine di grandezza ed è accompagnata da una diminuzione, sia pur debole, della capacità

corrispondente; questo indica che CSF114 si adsorbe sulle teste polari e ne compatta solo determinate regioni, formando delle specie di “zattere superficiali”, i cui confini rappresentano zone di discontinuità e permettono, così, una maggiore penetrazione degli ioni dell'elettrolita.

Proseguendo nello studio, su un'altra serie di misure abbiamo aggiunto in sequenza CSF114(Glc) ed un'aliquota del siero SR33, contenente l'anticorpo specifico. Si riporta di seguito il grafico di $-\omega Z''$ vs $\omega Z'$ al potenziale di -400 mV.

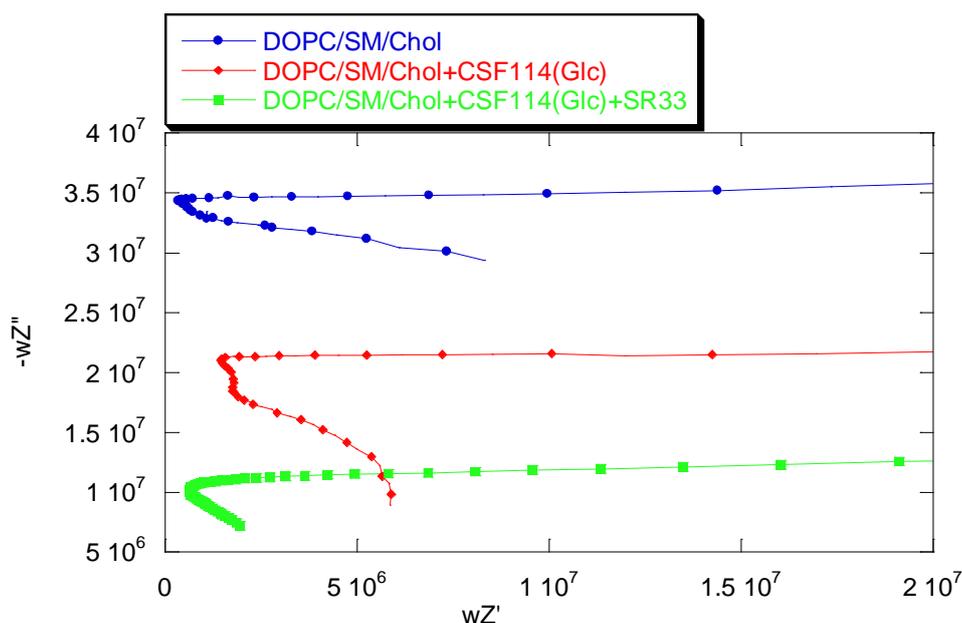


Figura 38: Grafico del modulo su monostrato di DOPC/SM/Chol. Scansione sul solo monostrato (curva blu), prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114(Glc) (curva rossa), scansione successiva all'aggiunta di SR33 (curva verde).

Dall'elaborazione dei dati si sono ottenuti i seguenti valori:

	R_1 $M\Omega \times cm^2$	C_1 $\mu F/cm^2$	R_2 $K\Omega \times cm^2$	C_1 $\mu F/cm^2$
Monostrato	2.4	2.2	0.9	35
+CSF(GLC)	0.4	5	0.003	14
+SR33	0.4	8	3.1	25

Come si è verificato altre volte, l'effetto di CSF114(Glc) sui parametri dielettrici della regione compatta delle catene alchiliche è molto ridotto, anche se non sempre trascurabile. Si osserva, infatti, una scarsa influenza sullo strato compatto, ma si riducono notevolmente

resistenza e capacità della regione delle teste polari. È, inoltre, significativo il fatto che entrambi i parametri tornino ad aumentare per aggiunta di SR33.

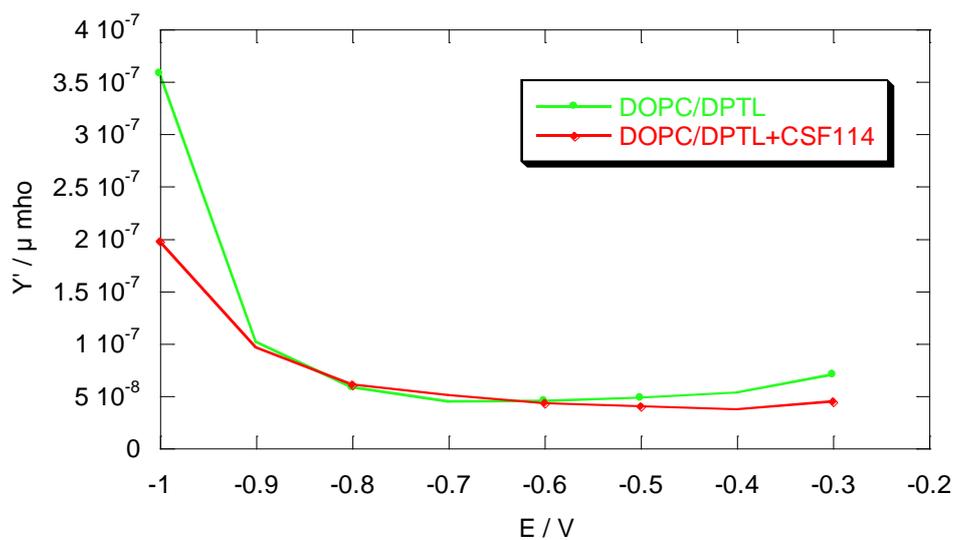
È possibile giustificare un tale risultato ipotizzando che SR33 si associ con il peptide, determinandone un'espulsione dalla regione delle teste polari, con conseguente tendenza a riportare resistenza e capacità ai valori in assenza di CSF114.

3.2 CT35, CSF114 e CSF114(Glc) su bistrati fosfolipidici supportati da mercurio

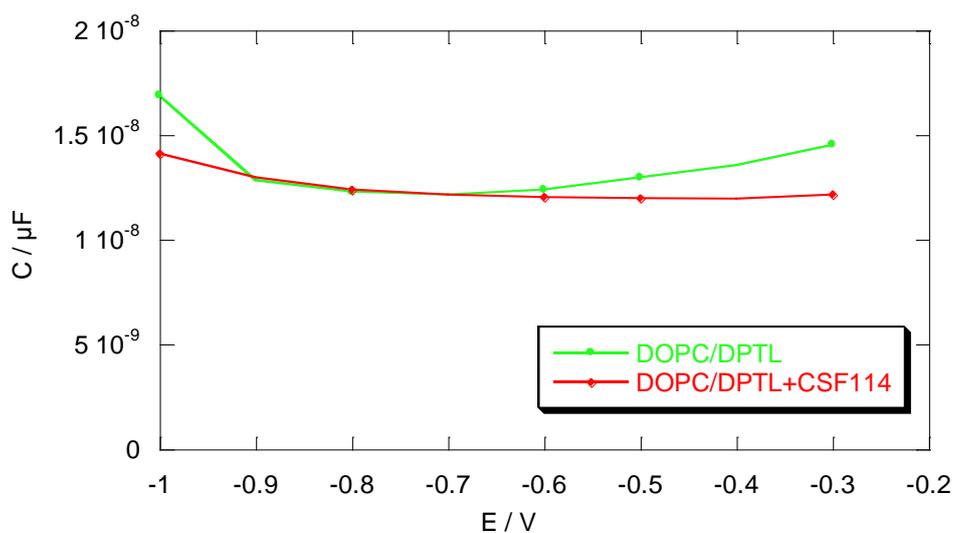
Come descritto nella parte sperimentale, un bistrato lipidico supportato da mercurio si compone di due monostrati contrapposti, di cui il primo, costituito da catene fitaniliche, è ancorato alla superficie del metallo tramite una regione idrofila (lo spaziatore). Il secondo si auto-organizza sopra il primo per immersione della goccia di mercurio in una soluzione elettrolitica, alla cui interfase è presente un film lipidico di composizione nota e variabile a seconda del tipo di analisi che si vuole effettuare. Il primo monostrato è detto *monostrato prossimale*, mentre il secondo monostrato è chiamato *monostrato distale*.

In un lavoro di tesi precedente è già stato studiato l'effetto di CSF114, nelle sue forme glucosilata e non, su bistrati supportati il cui monostrato distale è costituito da DOPC o DOPS. Abbiamo anche verificato l'effetto eventuale di una variazione del pH della soluzione elettrolitica. In nessun caso si è osservata una tendenza di questi peptidi a formare canali ionici di membrana. Si riportano qui di seguito, a titolo esemplificativo, i grafici dell'ammettenza in fase, Y' , e della capacità, C , alla frequenza di 10 Hz contro il potenziale applicato, ottenuti mediante misure di spettroscopia d'impedenza e già riportati in un precedente lavoro di tesi.

Ricordiamo che l'ammettenza in fase è di per sé una misura della conducibilità del bistrato e pertanto una sua variazione, dovuta all'aggiunta di una specie estranea al materiale fosfolipidico, è indice di una permeabilizzazione del bistrato stesso. La capacità, poi, è una misura delle proprietà dielettriche del bistrato; una sua alterazione indica una penetrazione di molecole esogene all'interno dello strato compatto, con conseguente aumento della costante dielettrica, laddove, come nel nostro caso, tali molecole siano più polarizzabili delle catene alchiliche che lo compongono.



(a)



(b)

Figura 39: Grafici dell'ammittenza in fase, Y' , (a) e della capacità, C (b) contro il potenziale su bistrato di DOPC su DPTL (curve verdi), scansioni in presenza di CSF114 (curve rosse).

Non si osserva alcuna alterazione dei due parametri analizzati, e questo implica un effetto trascurabile dovuto all'aggiunta del peptide. Non si osservano differenze significative nel caso del composto glucosilato. Occorre comunque notare che, nel caso di un bistrato, la

diversa struttura dielettrica, rispetto a quella di un monostrato supportato, fa sì che l'adsorbimento superficiale non possa essere investigato con la stessa accuratezza con cui lo si studia su monostrati.

Per lo studio dell'effetto dovuto all'aggiunta di CT35 su bistrati supportati da mercurio, abbiamo utilizzato bistrati nei quali il monostrato distale è costituito unicamente da DOPC, le cui teste polari sono zwitterioniche in un arco di valori di pH compresi tra 3 e 7^[21,22]. Abbiamo limitato l'analisi a questa composizione a causa della scarsità dell'effetto osservato, in analogia con quanto visto con i composti CSF114. Poiché CT35 ha una struttura altamente idrofila, abbiamo ragionevolmente supposto che la sua tendenza ad interagire con la membrana fosse molto ridotta. I risultati ottenuti su bistrati di DOPC/DPTL confermano questa ipotesi, come dimostrano i grafici di C ed Y' contro il potenziale riportati alla frequenza di 10 Hz.

Le misure sono state effettuate con concentrazioni dei peptidi di 4 µg/mL nella soluzione di lavoro. Sono stati esaminati due diversi valori di pH mediante l'uso della spettroscopia d'impedenza elettrochimica. Per confronto, si riportano di seguito i grafici della capacità C e dell'ammittenza Y' in fase dell'intero sistema contro il potenziale, registrati con la spettroscopia d'impedenza alla frequenza di 10 Hz.

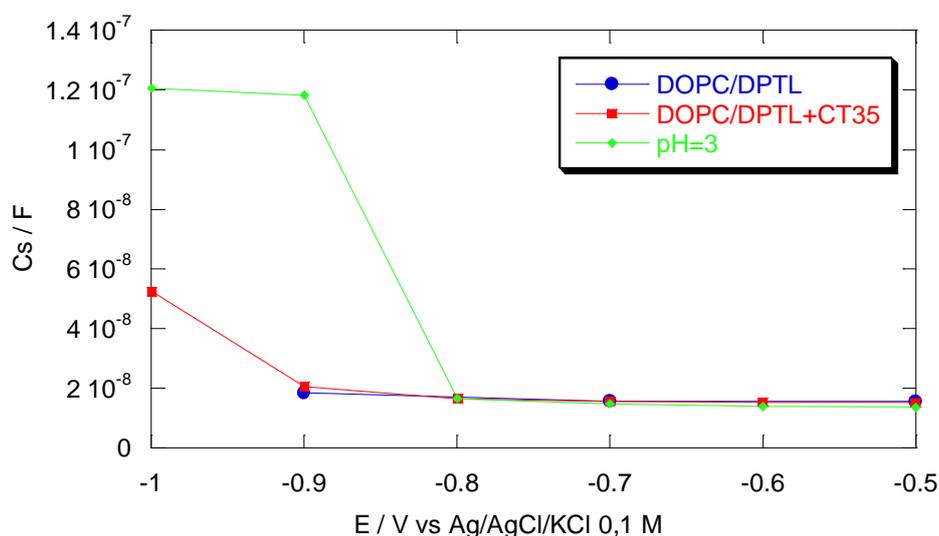


Figura 40: Grafico della capacità contro il potenziale su bistrato di DOPC su DPTL. Prima scansione sul solo bistrato (curva blu), prima scansione successiva all'aggiunta di CT35 (curva rossa), scansione a pH=3 (curva verde).

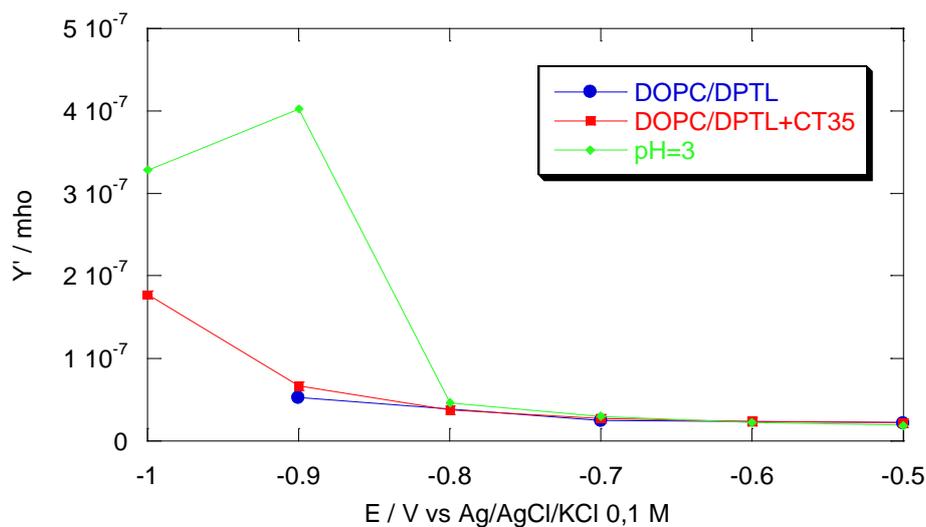


Figura 41: Grafico dell'ammittenza in fase contro il potenziale su bistrato di DOPC su DPTL. Prima scansione sul solo bistrato (curva blu), prima scansione successiva all'aggiunta di CT35 (curva rossa), scansione a pH 3 (curva verde).

Per mettere in evidenza l'effetto del composto interagente è necessario scegliere una frequenza adeguata, la quale è, infatti, strettamente connessa all'elemento di circuito che si vuole analizzare, nonché alla rapidità del fenomeno osservato. Poiché le impedenze relative agli strati auto-organizzati alla superficie dell'elettrodo risultano elevate, le maglie RC ad esse associate avranno costanti di tempo (prodotti RC) elevati. Considerato il fatto che la frequenza alla quale si può osservare un elemento di circuito è proporzionale all'inverso della sua costante di tempo, si intuisce come l'effetto di una sostanza che interagisce con gli strati compatti del bistrato sia rilevabile esclusivamente per frequenze inferiori a 10 Hz. Occorre, inoltre, ricordare che l'ammittenza in fase può essere grossolanamente considerata una misura del reciproco della resistenza della maglia relativa; essa è quindi proporzionale al flusso di carica che attraversa lo strato dielettrico d'interesse, in fase con il potenziale sinusoidale applicato. La capacità è, invece, una misura della tendenza dello strato ad accumulare cariche ai suoi confini con gli strati adiacenti, ed è connessa sia ad un flusso di specie cariche che a tutti i processi di riorientamento che coinvolgono strutture molecolari aventi un momento di dipolo indotto.

Dai dati ottenuti si nota che l'aggiunta di CT35 non ha effetto sui parametri dielettrici che caratterizzano il bistrato. L'adsorbimento superficiale, verificato anche sui monostrati, ha comunque l'effetto di destabilizzare in parte il bistrato stesso, determinandone una maggiore fragilità ai potenziali più negativi e, soprattutto, in condizioni di pH acido.

Questo effetto è associabile ad una variazione della differenza di potenziale attraverso il solo bistrato lipidico facente parte dell'intera membrana biomimetica supportata (potenziale transmembranario), potenziale che dipende a sua volta dal potenziale applicato E. È stato notato, infatti, che il potenziale transmembranario nullo dipende dal pH della soluzione di lavoro; una specie adsorbita sulla superficie di un bistrato risente, quindi, di un potenziale transmembranario diverso al variare della concentrazione idrogenionica. In altre parole, mediante misure ancora non pubblicate, abbiamo verificato che il valore del potenziale transmembranario nullo si sposta verso valori meno negativi se si passa da un pH di 7 ad un pH di 3. E' chiaro, quindi, come il potenziale risentito da una specie incorporata nel bistrato sia diverso a seconda del pH della soluzione di lavoro (lavoro in preparazione).

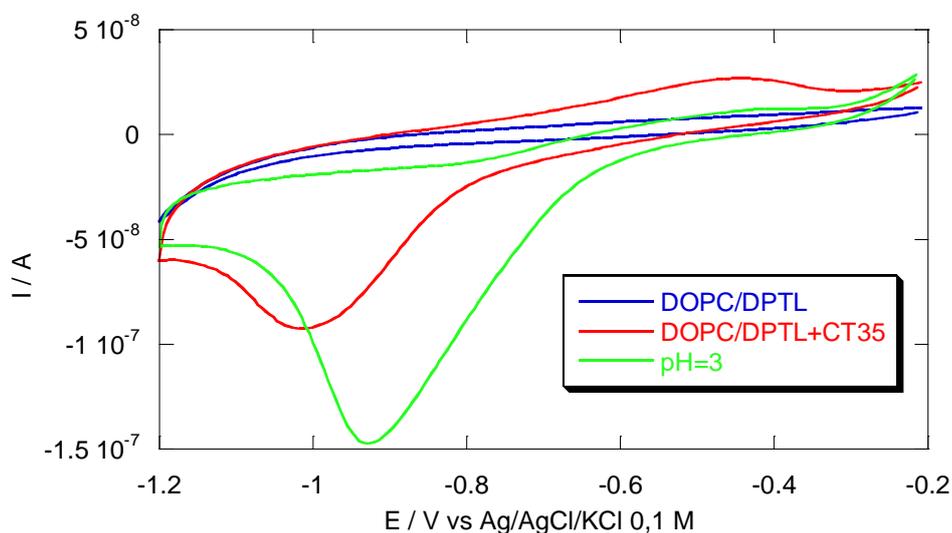


Figura 42: Voltammogrammi ciclici su bistrato di DOPC su DPTL. Scansione sul solo bistrato (curva blu), scansione dopo l'aggiunta di CT35 (curva rossa), scansione a pH=3 (curva verde).

Anche misure di voltammetria ciclica mostrano un effetto molto debole. Il picco negativo che si osserva sottende una carica di circa $-15 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. Una tale carica è troppo bassa per essere associata ad un vero e proprio canale, ma è stata talvolta riscontrata su bistrati non perfettamente auto-assemblati^[22]. Anche questo risultato conferma l'ipotesi di un'interazione aspecifica, analoga a quella osservata per il caso dei CSF114.

Capitolo 4: Discussione

Il lavoro descritto in questa tesi si inserisce nel contesto più ampio di una collaborazione con il laboratorio di sintesi dei peptidi coordinato dalla Prof. Papini. L'obiettivo della collaborazione era quello di saggiare composti peptidici di interesse biomedico sui modelli di membrana in nostro possesso, mediante l'uso di tecniche elettrochimiche. Volevamo mettere in evidenza l'attitudine di questi composti, CSF114, CSF114(Glc), CT35 ad interagire ed eventualmente forare la membrana cellulare. L'interesse per questi polipeptidi deriva dal fatto che essi rappresentano il frammento minimo di proteine aberranti glucosilate che si originano nel corso di malattie autoimmuni, quali la sclerosi multipla o la sindrome di Rett.

La parte del lavoro relativa ai composti CSF114 nelle forme glucosilate è stata oggetto di un primo lavoro di tesi. Durante questa prima parte del lavoro, era stato messo in evidenza come entrambe le forme del peptide si limitassero ad interagire debolmente con mono- e bistrati lipidici supportati, senza alcuna tendenza a formare canali ionici. Utilizzando monostrati fosfolipidici avevamo, tuttavia, messo in evidenza la capacità dei composti peptidici di interagire con la regione delle teste polari, formando su di esse uno strato dielettrico caratterizzabile mediante l'uso della spettroscopia d'impedenza. Con l'intento di confermare questi risultati abbiamo proseguito il lavoro, che si è articolato nei seguenti punti:

- Verifica dei risultati ottenuti su monostrati di DOPC per aggiunta di CSF114 e CSF114 (Glc).
- Modifica della composizione lipidica del monostrato; questa è stata realizzata con l'introduzione di sfingomieline e colesterolo. La scelta di tali lipidi è dovuta al fatto che le guaine mieliniche del sistema nervoso direttamente coinvolte nell'evolversi di patologie, quali la sclerosi multipla e la sindrome di Rett, sono particolarmente ricche in sfingolipidi e colesterolo. In questo modo, abbiamo pensato di avvicinarci alla composizione propria di tali membrane. È noto, inoltre, come la suddetta composizione sia tipica di sistemi biologicamente rilevanti, come le zattere lipidiche, note per facilitare l'inserimento nella membrana di proteine integrali. La formazione di microdomini lipidici a composizione preferenziale è già stata oggetto di studio nel nostro laboratorio, mediante l'uso di tecniche elettrochimiche^[24].

- Valutazione voltammetrica dell'effetto dell'aggiunta di CT35 su monostrati lipidici a composizione mista. Nel caso di CT35 ci siamo, infatti, concentrati fin dall'inizio su una composizione lipidica più affine ai sistemi di nostro interesse, tralasciando un'analisi puntuale del comportamento del peptide in presenza di monostrati di sola DOPC, come fatto in precedenza con CSF114.
- Caratterizzazione comparativa dell'effetto osservato mediante l'uso della spettroscopia d'impedenza elettrochimica, a seguito dell'aggiunta del CSF114(Glc) e del CT35 su monostrati misti DOPC/SM e DOPC/SM/Chol.
- Verifica dell'effetto di un'aggiunta di siero contenente l'anticorpo specifico della sindrome di Rett, SR33, sull'attività dei polipeptidi coinvolti nel riconoscimento anticorpale. Per inciso, lo stesso CSF114(Glc) dà risposta anticorpale positiva con il siero di pazienti affetti da sindrome di Rett.
- Valutazione comparativa dell'effetto dei composti CSF114 e del CT35 su bistrati fosfolipidici.

Per quanto riguarda l'analisi effettuata con la voltammetria AC su monostrati fosfolipidici, misti e non, in presenza di CT35 nonché sui bistrati lipidici, possiamo brevemente riassumere i risultati ottenuti con un'assenza quasi totale di ogni effetto specifico. Per quanto riguarda i monostrati, la voltammetria AC indica una debole interazione con la regione delle teste polari, mentre per i bistrati la spettroscopia d'impedenza non ha rivelato alcun effetto che possa far pensare alla formazione di canali ionici, i quali possono quindi essere esclusi completamente.

Lo studio condotto con misure di spettroscopia d'impedenza su monostrati ha fornito, invece, risultati più interessanti che si riassumono come segue:

1. Tutti i peptidi analizzati mostrano una significativa tendenza ad essere adsorbiti nella regione delle teste polari del monostrato fosfolipidico. La stessa tendenza appare in maniera meno evidente da misure voltammetriche su monostrati misti, forse a causa di una loro ridotta auto-organizzazione nei processi di riorientamento molecolare rispetto a monostrati di sola DOPC. E', infatti, ragionevole ipotizzare che, in un sistema eterogeneo, i picchi voltammetrici pseudo-capacitivi siano meno riproducibili e meno sensibili all'effetto di sostanze esogene di quanto non lo siano nel caso di

monostrati ad un solo componente lipidico. In altre parole, un monostrato misto ha difetti intrinseci e risente in maniera minore dell'aggiunta di sostanze estranee.

L'adsorbimento superficiale è, tuttavia, evidente da misure di spettroscopia d'impedenza elettrochimica, nelle quali si evidenzia la comparsa di un semicerchio aggiuntivo sul grafico del modulo; questo, come riportato in letteratura, indica la presenza di un ulteriore strato dielettrico rispetto a quelli presenti normalmente in il monostrato^[22]. Abbiamo, pertanto, ritenuto che il semicerchio addizionale, del quale qui di seguito riportiamo un esempio per il caso di un monostrato di DOPC con aggiunta di CSF114, potesse essere attribuito ad uno strato sottile ad elevata costante dielettrica contenente teste polari, molecole di CT35 o CSF114 e molecole d'acqua.

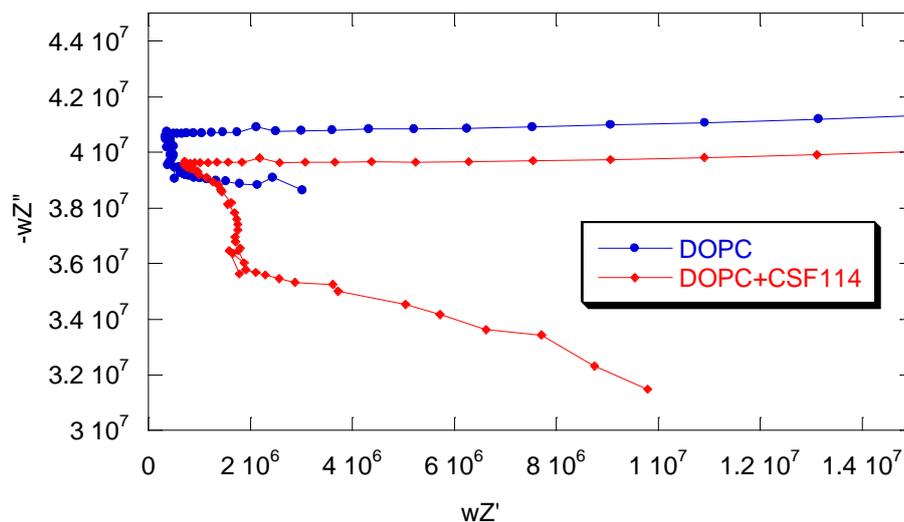


Figura 43: Grafico del modulo su monostrato di DOPC. Scansione sul solo monostrato (curva blu), prima scansione dopo l'aggiunta di CSF114 (curva rossa)

I risultati dell'elaborazione dei dati ottenuti non ha avuto lo scopo di quantificare un fenomeno la cui riproducibilità è solo qualitativa, in quanto dipende da molti fattori quali la composizione lipidica del monostrato, la natura, l'entità e l'orientamento delle molecole adsorbite.

2. L'analisi dell'effetto dell'aggiunta del siero contenente l'anticorpo specifico aveva l'obiettivo di verificare se l'adsorbimento superficiale avesse un orientamento molecolare definito e, in tal caso, se le molecole adsorbite di CT35 e CSF114(Glc) avessero una disposizione tale da esporre i residui glucosidici, responsabili della

risposta anticorpale, verso la soluzione, in modo da rendere possibile l'interazione con l'anticorpo specifico. Dovevamo, infine, verificare se tale interazione potesse essere determinata con la spettroscopia d'impedenza, verificando l'alterazione delle proprietà dielettriche dello strato adsorbito contenente i peptidi. I risultati ottenuti hanno, in effetti, mostrato che SR33 modifica resistenza e capacità dello strato dielettrico contenente il peptide. Si è, quindi, cercato di dare ai dati acquisiti una giustificazione, la quale è, tuttavia, altamente ipotetica in quanto i risultati sono scarsamente riproducibili da un punto di vista quantitativo. Dobbiamo, del resto, sottolineare come tale interpretazione sia frutto del confronto di serie di dati che non hanno un'origine sperimentale diretta, ma derivano da un'elaborazione che risente in maniera determinante della natura del circuito equivalente utilizzato, nonché delle piccole differenze nelle proprietà di partenza dei monostrati esaminati. I risultati risentono dunque della presenza di numerosi fonti di errore che, sommate tra loro, ne impediscono una spiegazione esauriente.

Capitolo 5: Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo concludere che:

- I peptidi CSF114 e CT35 non penetrano la membrana cellulare ma si adsorbono su di essa, preferenzialmente laddove sono presenti microdomini a composizione differenziata contenenti sfingolipidi e colesterolo.
- Questa loro proprietà può essere sfruttata al fine di un utilizzo degli stessi come sensori per il riconoscimento dell'anticorpo specifico, presente nelle fasi di evoluzione delle due sindromi autoimmuni d'interesse.
- Allo stato attuale i risultati risentono di una certa irriproducibilità legata ai molteplici fattori coinvolti nella formazione di film peptidici adsorbiti sulle nostre due membrane biomimetiche; risulta, quindi, necessaria una semplificazione per rendere il sistema più facilmente utilizzabile.

I risultati ottenuti ci hanno portato a pensare di realizzare, per gli studi futuri, procedure più riproducibili e meno complesse in grado di favorire l'incorporazione dei peptidi:

- a. Dotando le molecole peptidiche di un'estremità lipofila, in posizione opposta ai gruppi glucosidici responsabili della risposta anticorpale, in grado di penetrare più stabilmente nel monostrato lipidico; si ritiene che tali molecole riescano così ad essere adsorbite in forma più stabile e possano garantire una risposta maggiormente riproducibile.
- b. In alternativa, si possono dotare le molecole peptidiche di un terminale costituito da un residuo dell'acido lipoico, anch'esso in posizione opposta rispetto al gruppo coinvolto nel riconoscimento. In questo modo tali molecole potranno essere direttamente adsorbite in maniera stabile sulla superficie di un elettrodo di Hg o di Au, grazie al ponte disolfuro terminale dell'acido lipoico, in modo da costituire esse stesse un sensore di riconoscimento per anticorpi specifici. Tale interazione antigene-anticorpo potrà essere a sua volta facilmente rivelata con l'uso di tecniche elettrochimiche, quali spettroscopia d'impedenza e voltammetria ciclica, eventualmente condotte in presenza di sonde redox. Particolarmente interessante è la possibilità di utilizzare elettrodi di Au; ciò potrebbe consentire lo sviluppo di un vero e proprio sensore specifico, con l'ulteriore vantaggio di essere più maneggevole rispetto al Hg.

Capitolo 6: Sigle e abbreviazioni

BLMs	Bilayer lipid membranes
Boc	Ter-Butilossicarbonile
Bzl	Benzile
Chol	Colesterolo
DCM	Diclorometano
DIPEA	N,N-Diisopropiletilammina
DMF	N,N-Dimetilformammide
DOPC	Dioleoilfosfatidilcolina
DPTL	2,3 di-O-fitanil-sn-glicerol-1tetraetilenglicole estere dell'acido lipoico
Fmoc	9-Fluorenilmetilossicarbonile
Glc	Glucosio
HATU	1-[Bis(dimetilammino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo(4,5)piridinio esafluorofosfato
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
MeCP2	Methyl-CpG binding protein 2
MAG	Glicoproteina associata alla mielina
MBP	Proteina basica della mielina
MeOH	Metanolo
MeONa	Metossido di sodio
MOG	Glicoproteina oligodendrocitica della mielina
NMM	N- Metilmorfolina
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildiidrobenzofuran-5-sulfonile
PLP	Proteina Proteolipidica
RNA	Acido ribonucleico
RTT	Sindrome di Rett
SAMs	Self-assembled monolayers
SM	Sfingomieline
SNC	Sistema nervoso centrale
SPPS	Solid phase peptide synthesis
t-BLMs	Tethered bilayer lipid membranes
t-Boc	Ter-butilossicarbonile
t-Bu	Ter-Butile
TFA	Acido trifluoroacetico
Trt	Trifenilmetile

Capitolo 7: Bibliografia

- 1 F. Real-Fernandez, F. Nuti, G. Rossi, S. Pandey, G. Sabatino, C. Tiberi, M. Larregola, S. Lavielle, J. Hayek, C. De Felice, P. Rovero, Anna Maria Papini. *Autoantibodies to N-glycosylated peptide sequons in Rett syndrome: the first insight to disclose an autoimmune mechanism*, poster.
- 2 S.L Williamson and J. Christodoulou. *Rett syndrome: new clinical and molecular insights*, European Journal of Human Genetics, **2006**, 14, 896-903.
- 3 Lassmann H. *Multiple Sclerosis*, **1998**, 4, 93-98.
- 4 Lucchinetti C, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. *Brain Pathol* **1996**, 6, 259-274.
- 5 *Studio di epitopi peptidici coinvolti nel riconoscimento di autoanticorpi anti-CSF114(Glc) nella Sclerosi Multipla*, lavoro di tesi di Francis Ciolli, **2006**.
- 6 M. A. Daniels, K. A. Hogquist, S. C. Jameson, *Nature Immunology*, **2002**, 10, 903.
- 7 P. Write, J. Beythien, *4th International Symposium on Solid Phase Chemistry e Combinatorial Chemistry Libraries*, Edimburg, **1995**, Poster 95.
- 8 R. Merrifield, *Science*, **1986**; 232: 341-347.
- 9 E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook, *Anal. Biochem.*, **1970**; 34: 595-598.
- 10 P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *“Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins”*, CRC Press, **1997**.
- 11 F.C. Gronvald, et al., *“Peptides 1980”*, K. Brunfeldt (Ed), **1981**, 111.

- 12 (a) F. Lolli, B. Mulinacci, A. Carotenuto, B. Bonetti, G. Sabatino, B. Mazzanti, A.M. D'Ursi, E. Novellino, M. Pazzagli, L. Lovato, M.C. Alcaro, E. Peroni, M.C. Pozo-Carrero, F. Nuti, L. Battistini, G. Borsellino, M. Chelli, P. Rovero, and A.M. Papini. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **2005**, 102(29), 10273-10278; (b) A. M. Papini. *Simple test for Multiple Sclerosis, Nature Medicine*, **2005**, 11(1), 13; (c) "Glycopeptides, their preparation and use in the diagnosis or therapeutic treatment of Multiple Sclerosis". Inventors: A.M. Papini, P. Rovero, M. Chelli, F. Lolli. Applicant: University of Florence, Italy. PCT International application (**2003**) WO 03000733 A2. Italian Patent n. 0001327122 (27/04/2005). Granted USA Patent (02/08/2005).
- 13 B.G. Davies, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 579-601.
- 14 M. Meldal, Y.C. Lee, R.T. Lee, *Academic Press, Orlando*, **1994**, 145-198.
- 15 M. Meldal, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1994**, 4, 710-718.
- 16 M. Meldal, K. Bock, *Glycoconjugate J.*, **1994**, 11, 59-63.
- 17 A. Carotenuto, AM. D'Ursi, E.Nardi, A.M.Papini, P.Rovero, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 2378-2381.
- 18 M.R. MONCELLI, R. HERRERO, L. BECUCCI and R. GUIDELLI, *Kinetics of electron and proton transfer to ubiquinone-10 and from ubiquinol-10 in a self-assembled phosphatidylcholine monolayer*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1364 (**1998**) 373-384;
- 19 M.R. MONCELLI, L. BECUCCI , C. DE HAËN and P. TIRONE, *Interaction between magnetic resonance imaging contrast agents and phospholipid monolayers*, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 46 (**1998**) 205-213;
- 20 L. BECUCCI, M. R. MONCELLI and R. GUIDELLI, *Thallos ion movements through gramicidin channels incorporated in lipid monolayers supported by mercury*, *Biophys. J.*, 82 (**2002**) 852-864;

- 21 L. BECUCCI, F. SCALETTI and R. GUIDELLI, *Gel-phase microdomains and lipid rafts in monolayers affect the redox properties of ubiquinone-10*, *Biophys. J.* 101 (2011) 134-143;
- 22 L. BECUCCI and R. GUIDELLI, *Mercury-supported biomimetic membranes for the investigation of antimicrobial peptides*, *Pharmaceuticals*, 7 (2014) 136-168;
- 23 L. Becucci and R. Guidelli *An electrochemical platform for studying biomembrane processes. Mercury supported biomimetic membranes* Lambert Academic Publishing ISBN: 978-3-659-53859-9.
- 24 L. Becucci, S. Martinuzzi, E. Monetti, R. Mercatelli, F. Quercioli, D. Battistel, R. Guidelli. *Electrochemical impedance spectroscopy and 2P-FLIM images of lipid mixtures self-assembled on mercury*, *Soft Matter*, 6 ,2010, 2733-2741
- 25 M. R. Moncelli, L. Becucci, R. Guidelli. *The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine I monolayers deposited on mercury electrodes*. *Biophys. J.*, 66, 1994,1969-1980.
- 26 M. R. Moncelli, L. Becucci. *The intrinsic pKa values for phosphatidic acid in monolayers deposited on mercury electrodes*, *J. Electroanal. Chem.*, 385, 1995, 183-189.

Ringraziamenti:

Per concludere questo lavoro non posso fare altro che RINGRAZIARE tutti coloro che mi hanno aiutato e sostenuto e continuano a farlo, sia per quanto riguarda la mia carriera universitaria, che nella vita di tutti i giorni.

Il primo ringraziamento va ai miei genitori e a tutta la mia famiglia, che con amore, tanta fiducia e ancora più pazienza, mi hanno seguito in ogni passo e mi hanno permesso di diventare la persona che sono oggi.

Il secondo, ma non meno importante e, soprattutto, ENORME ringraziamento va a Lucia, perché è merito suo se sono potuta arrivare fino a qui. Mi ha sostenuto, mi ha aiutato in tutto e ha sopportato le mie continue paranoie; quindi la ringrazio per il supporto professionale e, ancor più, per quello morale, per il senso di calore e familiarità che mi ha trasmesso, per la sua simpatia che ha reso questo tirocinio divertente e pieno di risate.....oltre che utile ed interessante, ma questo era ovvio!

Ringrazio il Professor Guidelli per la cura con cui ha corretto queste pagine, la Professoressa Foresti per la disponibilità, la Professoressa Papini, per averci fornito il materiale su cui si è basato lo studio, Francesca per l'aiuto e Caterina che, con molta gentilezza, mi ha dato utili consigli per migliorare il lavoro.

Ringrazio Nando, Silvano e Antonio che, anche con una semplice risata, hanno contribuito a migliorare e rendere più piacevoli le giornate in laboratorio; Claudio ed Enrico che hanno cercato di tranquillizzarmi (ma senza troppo successo) nei momenti di panico pre-consegna della tesi.

Un grazie speciale va a Stefano, il mio angioletto custode che, con illimitata pazienza e un mare di simpatia, mi ha aiutato sia materialmente che moralmente in questi mesi di delirio.

Marta, che non ho messo per prima come promesso, ma che ringrazio davvero di cuore per l'enorme aiuto che mi ha sempre dato, per le infinite risate, spettegolate e "corse" a fine lezione tu-sai-dove....e ovviamente per i tre giorni di mare, per i quali non trovo aggettivo migliore se non "rigeneranti"! (dormire QUATTORDICI ORE al giorno....non mi capiterà mai più...ne sono convinta!)

Non posso non ringraziare un "secondo", ma solo in questo ordine di elenco, Stefano...il mio compagno di "smatti-pre-esame"..lo ringrazio per questi tre anni passati tra lunghissime nottate di studio, interminabili conversazioni su skype per cercare di colmare assurdi dubbi

onnipresenti e deliri post-esame...ma soprattutto per il profondo affetto e la bellissima amicizia che è nata tra noi due "irrecuperabili casi da CIM"!

Ringrazio Luca perché mi ha fatto divertire e distrarre nei momenti di profonda "crisi-da-studio", perché mi ha aiutato a preparare quell'esame che, diciamo, non "andava giù", ma soprattutto per la bella scatola di cioccolatini che...non è durata poi così a lungo!

Ringrazio Valentina, la mia "Bob l'Aggiusta-Tutto", che, nonostante abbia seguito il mio stesso percorso soltanto per un anno...ha davvero lasciato il segno! Quando mi ha detto che avrebbe cambiato facoltà...per me è stato un trauma!

Daniela, la mia seconda mamma!..non avrei davvero potuto sperare in una coinquilina migliore...quindi ringrazio, ancor prima di te, la nostra "cara vecchia amica"...senza la quale non ti avrei nemmeno conosciuta!...non riesco a trovare le parole per descrivere quello che in così poco tempo sei diventata per me, perché.....chi è quella persona che, nonostante stia studiando per preparare un esame, si interrompe e si mette a leggere a voce alta la MIA tesi, permettendomi di correggere gli errori?!?!

Un grazie particolare va alle AMICHE DI SEMPRE....a Simona che, fin dal primo giorno in cui è entrata in classe, in III elementare, è entrata anche nella mia vita e da lì non ci siamo più lasciate, se non per un breve e brutto periodo...del quale però non rimane che un lontanissimo ricordo...a Chiara, che conosco da "soli" sei anni, ma è come se fossimo amiche da un'intera vita...abbiamo condiviso tutto...momenti belli, brutti, felici e tristi...è sempre stata lì, accanto a me!...Margherita, la mia piccola pulce dalla dolcezza inesauribile e allegria contagiosa...sempre pronta a tirarmi su il morale e a spronarmi ad andare avanti nelle varie situazioni...ad Agnese, la donna super-impegnatissima che, per un motivo o per un altro, non riesce quasi mai a ritagliare un po' di tempo per noi, ma quando c'è...la serata prende sempre una piega migliore!!...Ad Eleonora, con cui ho passato un'infinità di momenti bellissimi, tra risate e, soprattutto...luuuunghissime chiacchierate...

Infine, GRAZIE a te, David...perché ogni giorno mi regali un sorriso...quel sorriso che serve ed aiuta ad affrontare tutto quanto...