



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

## **PEPTIDI ANTIBATTERICI: STUDIO DELLA RESISTENZA ALLA DEGRADAZIONE DA PARTE DI ENZIMI PROTEOLITICI ED EFFETTI DI SOSTITUZIONI AMMINOACIDICHE NELLA SEQUENZA**

RELATORE: PROF. STURLESE MATTIA

CORRELATORE: PROF.SSA PEGGION CRISTINA

LAUREANDA: ROSA ARIANNA

ANNO ACCADEMICO: 2021-2022







# INDICE

<b>SIGLE E ABBREVIAZIONI .....</b>	<b>1</b>
<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>7</b>
1.1 La sfida globale dell'antimicrobico-resistenza .....	7
1.2 I peptidi antimicrobici.....	10
1.3 Proprietà e classificazione degli AMP.....	11
1.4 Meccanismo d'azione dei peptidi antimicrobici .....	13
1.4.1 Barrel stave model .....	15
1.4.2 Toroidal pore model .....	15
1.4.3 Carpet model .....	15
1.5 Vantaggi dei peptidi antimicrobici .....	17
1.6 Svantaggi e sfide future associate agli AMP .....	18
1.6.1 Citotossicità ed attività emolitica .....	19
1.7 Principali meccanismi di resistenza agli AMP nei batteri.....	20
1.7.1 Degradazione proteolitica .....	20
1.8 Le catelicidine .....	22
1.9 PMAP .....	23
1.9.1 Studio degli effetti della dimerizzazione .....	25
1.9.2 Sintesi di derivati più corti .....	25
1.9.3 Coniugazione con catene aciliche.....	27
<b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>28</b>
<b>3. PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>30</b>
3.1 Materiali e strumentazione .....	30
3.1.1 Reagenti e solventi.....	30
3.1.2 Strumentazione .....	31
3.2 Preparazione delle soluzioni da analizzare mediante CD.....	32
3.3 Procedura per le degradazioni enzimatiche.....	33
3.4 Procedura per le degradazioni con siero umano .....	36
3.5 Procedura per la sintesi su fase solida .....	37
3.5.1 Cleavage.....	40

3.5.2 Sblocco parziale.....	42
3.5.3 Kaiser test.....	42
3.6 Sintesi di [U <sup>21</sup> ] -PMAP (12-24).....	43
3.6.1 Sintesi di Ac - [U <sup>21</sup> ] - PMAP (12-24).....	44
3.6.2 Sintesi di Palm - [U <sup>21</sup> ] - PMAP (12-24).....	44
3.6.3 Sintesi di Cys - [U <sup>21</sup> ] - PMAP (12-24).....	45
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>46</b>
4.1 Degradazione di Pep1: Ac - PMAP (12-31).....	47
4.1.1 Test con chimotripsina .....	47
4.1.2 Test con pronasi .....	49
4.2 Degradazione di Pep2: Ac - [A <sup>25</sup> , K <sup>26</sup> ] - PMAP (12-31) .....	51
4.2.1 Test con chimotripsina .....	51
4.2.2 Test con pronasi .....	54
4.3 Degradazione di Pep3: Ac - [A <sup>25</sup> , K <sup>26</sup> ] - PMAP (12-31) - Aun.....	55
4.3.1 Test con chimotripsina .....	55
4.3.2 Test con pronasi .....	58
4.4 Degradazione di Pep4: Lau - [A <sup>25</sup> , K <sup>26</sup> ] - PMAP (12-31).....	59
4.4.1 Test con chimotripsina .....	59
4.4.2 Test con pronasi .....	62
4.5 Degradazione di Pep5: Oct- [A <sup>25</sup> , K <sup>26</sup> ] – PMAP (12-31).....	64
4.5.1 Test con chimotripsina .....	64
4.5.2 Test con pronasi .....	66
4.6. Degradazione di Pep6: Palm - [A <sup>25</sup> , K <sup>26</sup> ] - PMAP (12-31) .....	68
4.6.1 Test con chimotripsina .....	68
4.6.2 Test con pronasi .....	71
4.7 Degradazione di Pep7: Ac-[K <sup>12</sup> (Palm), A <sup>25</sup> , K <sup>26</sup> ] -PMAP (12-31).....	72
4.7.1 Test con chimotripsina .....	72
4.7.2 Test con pronasi .....	74
4.8 Degradazione di Pep8: Ac - [U <sup>14</sup> , A <sup>25</sup> , K <sup>26</sup> ] - PMAP (12-31) .....	76
4.8.1 Test con chimotripsina .....	76
4.8.2 Test con pronasi .....	78
4.9 Degradazione di Pep9: Ac-PMAP (12-24) .....	80

4.9.1 Test con chimotripsina.....	80
4.9.2 Test con pronasi.....	82
4.10 Degradazione di Pep9a: Ac-U <sup>21</sup> -PMAP (12-24).....	84
4.10.1 Test con chimotripsina.....	84
4.10.2 Test con pronasi.....	87
4.11 Degradazione di Pep9b: Palm-U <sup>21</sup> -PMAP (12-24) .....	88
4.11.1 Test con chimotripsina.....	88
4.11.2 Test con pronasi.....	90
4.12 Test con siero umano .....	92
4.12.1 Verifica della capacità degradativa del siero con XP-1.....	92
4.12.2 Degradazione di Pep9 con siero umano .....	93
4.12.3 Degradazione di Pep9a con siero umano .....	96
4.13 Osservazioni sulla resistenza dei peptidi alla degradazione .....	99
4.14 Risultati dei saggi biologici .....	102
4.15 Studio della struttura secondaria mediante dicroismo circolare.....	103
4.15.1 Analisi dei peptidi mediante dicroismo circolare .....	106
4.15.2 Osservazioni sulla struttura secondaria dei peptidi .....	109
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>112</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>114</b>
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>119</b>



## SIGLE E ABBREVIAZIONI

AMR	Antimicrobial Resistance
EU/EEA	European Union/European Economic Area
AMP	Antimicrobial Peptides
LPS	lipopolisaccaridi
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
PMAP	Porcine Myeloid Antimicrobial Peptides
HEPES	Acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinil-etansolfonico
TRIS	Tris-(2-idrossimetil) -amminometano cloridrato
DMSO	Dimetilsolfossido
DMF	N, N-Dimetilformammide
DCM	Diclorometano
HOBt	N-idrossibenzotriazolo
HBTU	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i> ] pyridin-1-ylmethylene] - <i>N</i> -methylmethanaminium hexafluorophosphate <i>N</i> -oxide
DODT	2,2'-(Etilendiossi)dietantiolo
DIPEA	N-etil-diisopropilammina
Fmoc	9-fluorenilmetossicarbonile
Boc	ter-butilossicarbonile
Pbf	2,2,4,6,7- pentametildiidrobenzofurano-5-sulfonile
Trt	trifenilmetile
AA	Aminoacido
Ile (I)	L-Isoleucina
Trp (W)	L-Triptofano
Lys (K)	L-Lisina
Aib (U)	Acido 2-amminoisobutirrico
Val (V)	L-Valina
Gly (G)	L-Glicina
Leu (L)	L-Leucina
Arg (R)	L-Arginina
Cys (C)	L-Cisteina
Tyr (Y)	L-Tirosina
Met (M)	L-Metionina
Phe (F)	L-Fenilalanina
Ser (S)	L-Serina
His (H)	L-Istidina

Asp (D)	Acido L-Aspartico
Aun	Acido 11-amminoundecanoico
Lau	Acido laurico
Oct	Acido ottanoico
Ac	Acetile
Palm	Acido palmitico
TFA	Acido trifluoroacetico
TIS	Triisopropilsilano
HPLC	Cromatografia liquida ad alta prestazione
MS	Spettrometria di massa
UV	Ultravioletto
CD	Dicroismo circolare
ACN	Acetonitrile
TFE	Trifluoroetano
SDS	Sodio dodecil solfato
MIC	Concentrazione Minima Inibente
PM	Peso molecolare

## RIASSUNTO

Negli ultimi decenni il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è aumentato notevolmente, con severe implicazioni dal punto di vista clinico, economico e sociale: di fronte a tale scenario si rende sempre più di fondamentale importanza la ricerca di nuovi farmaci antibatterici.

Questo studio sperimentale si pone l'obiettivo di approfondire le proprietà chimiche di alcuni derivati della catelicidina naturale PMAP-36, un peptide antimicrobico di origine suina.

In particolare, lo studio si focalizza sull'analisi della resistenza di tali derivati a diverse miscele di enzimi, ovvero pronasi, chimotripsina e siero umano, con lo scopo di individuare i peptidi in grado di resistere più a lungo nell'ambiente cellulare.

La serie di peptidi oggetto di questo studio era già stata sintetizzata dal gruppo di ricerca nel quale si è svolto il lavoro di tesi. I peptidi sono sequenze accorciate di PMAP-36, presentano diverse sostituzioni amminoacidiche e alcuni contengono una catena lipofila all'estremità N-terminale. Inoltre, sono stati sintetizzati Ac-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24) e Palm-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24), analoghi con sequenza accorciata, dove la leucina in posizione 21 è stata sostituita con l'amminoacido non proteinogenico Aib e aventi all'N-terminale rispettivamente un acetile o un acido palmitico.

Per valutare quanto l'accorciamento della sequenza peptidica e le sostituzioni amminoacidiche influenzino le proprietà biologiche di PMAP-36, sono stati inseriti in questa tesi i dati relativi ai test antimicrobici *in vitro* eseguiti dal prof. M. Scocchi dell'Università degli Studi di Trieste.

Inoltre, sono state condotte analisi con la tecnica del dicroismo circolare per valutare la struttura secondaria dei peptidi, in soluzione acquosa, in TFE e in SDS (ambiente membrano-mimetico).

Tra i peptidi analizzati nei test di degradazione enzimatica, i più resistenti presentano l'acido palmitico all'estremità N-terminale, ma la loro attività antimicrobica *in vitro* risulta scarsa. Il peptide più promettente tra quelli testati sembra essere il derivato Ac-PMAP (12-24), che ha una buona resistenza all'azione degli enzimi e si rivela efficace nell'inibire la crescita di quasi tutti i microorganismi testati.

La scelta di sostituire la leucina in posizione 21 con Aib, ottenendo i peptidi Ac-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24) e Palm-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24), è stata opportuna per aumentare la resistenza alla degradazione enzimatica: uno degli obiettivi futuri sarà quello di ottenere i dati relativi alla loro efficacia antimicrobica *in vitro*.

Per quanto riguarda gli studi con la tecnica del dicroismo circolare, tutti i peptidi testati assumono una struttura non ordinata in ambiente acquoso e una forma elicoidale in SDS: questi risultati sono positivi, perché in accordo con la dinamica di interazione tra i peptidi antimicrobici e la membrana batterica descritta in diversi studi riportati in letteratura.<sup>1</sup>





## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 La sfida globale dell'antimicrobico-resistenza

La scoperta e l'impiego di farmaci antimicrobici, a partire dalla seconda metà del XX secolo, ha rivoluzionato l'approccio alla cura e alla prevenzione delle malattie infettive, apportando numerosi vantaggi, quali l'aumento della vita media e il progresso della medicina moderna. Tuttavia, negli ultimi anni il fenomeno della resistenza agli antimicrobici (AMR, *antimicrobial resistance*) rischia di compromettere lo sviluppo medico, sociale ed economico ottenuto con la loro scoperta.

L'AMR, definita come mancata sensibilità di un microorganismo a uno o più agenti antimicrobici, può essere acquisita attraverso molteplici meccanismi. Per esempio, nei batteri può avvenire una mutazione spontanea del patrimonio genetico o l'acquisizione di geni esogeni, mediante meccanismi di trasformazione, trasduzione e coniugazione, che apportano caratteristiche geniche di resistenza. Questi fenomeni sono caratteristici dell'evoluzione delle specie batteriche e naturalmente presenti nelle interazioni tra batteri e altri regni.

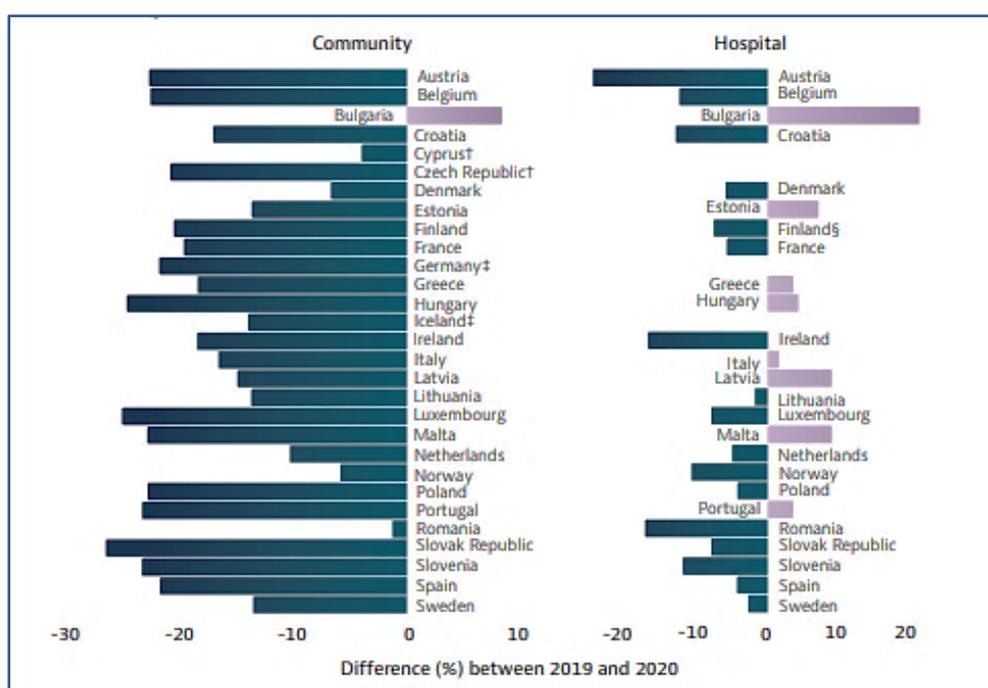
L'evento naturale dell'antimicrobico resistenza viene tuttavia accelerato e inasprito da un utilizzo inappropriato ed eccessivo degli antibiotici. Infatti, una loro applicazione sconsiderata in una popolazione di microbi porta alla morte degli individui sensibili, a favore di quelli naturalmente resistenti che ottengono un vantaggio in termini di spazio e risorse per la propria replicazione; di conseguenza in breve tempo si otterrà una popolazione molto più resistente di quella precedente al trattamento antimicrobico, con il rischio che proliferino microorganismi contro cui tutte le armi antinfettive di cui la medicina dispone non funzionano.

Si stima che nel 2019 si siano verificati circa 4,95 milioni di decessi dovuti all'AMR batterica e le statistiche indicano l'AMR come una delle principali cause di morte in tutto il mondo. <sup>2</sup>

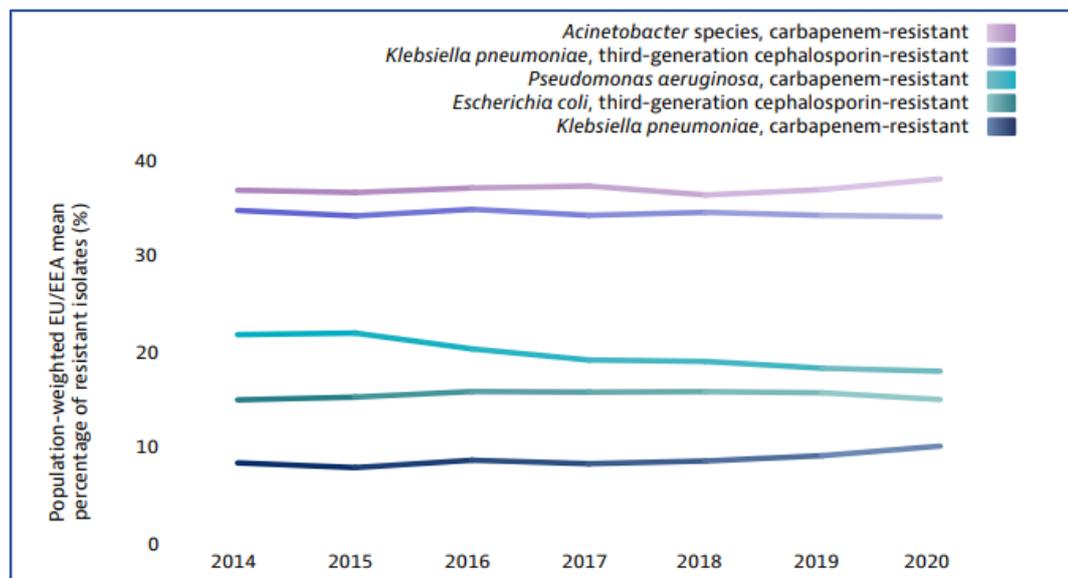
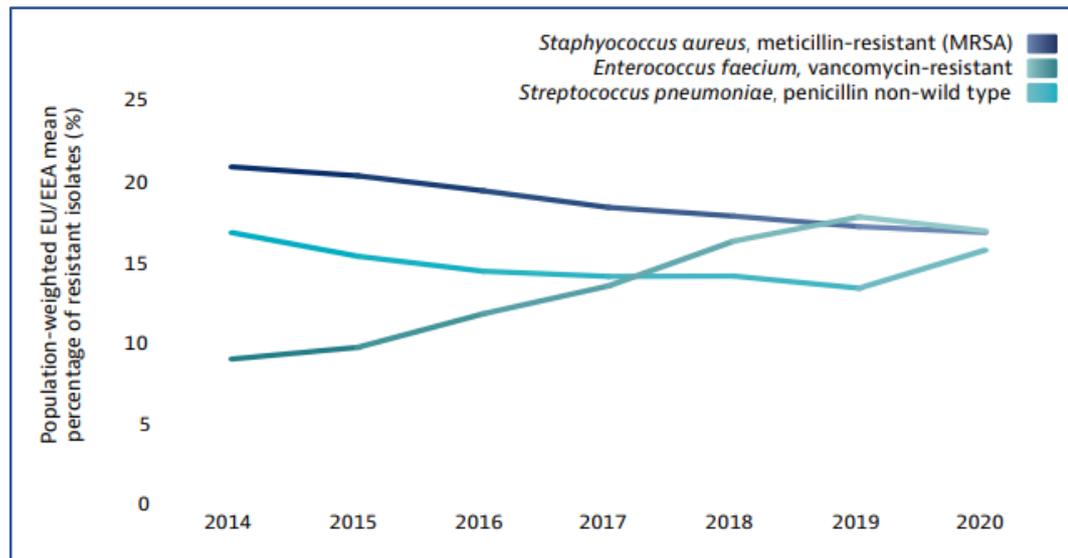
Nella recente nota informativa alla presidenza del Consiglio europeo “Antimicrobial Resistance in the EU/EEA – A One Health Response” si osserva come il consumo complessivo di antibiotici nell'Unione Europea/Area Economica Europea è diminuito del 23% tra il 2011 e il 2020, in particolare durante la pandemia da Sars-Cov2. Ciò è stato attribuito alle misure di distanziamento, sanificazione e protezione individuale che hanno ostacolato la trasmissione non solo di Sars-Cov2, ma anche di batteri associati alle più comuni infezioni delle comunità umane.<sup>3</sup>

Nonostante la riduzione del consumo di antibiotici nell'uomo e negli animali da produzione alimentare, l'AMR in Europa è aumentata dal 2011 per diverse coppie batterio-antimicrobico.

Di fronte a tale scenario, la minaccia globale dell'AMR può essere affrontata utilizzando in modo appropriato le terapie antimicrobiche esistenti e investendo nella ricerca di nuove sostanze antibatteriche.



**Figura 1:** Differenze percentuali nel consumo nazionale di antibiotici tra il 2019 e il 2020, in comunità e in ambiente ospedaliero. Le differenze calcolate sono espresse in DDD per 1000 abitanti al giorno; per Cipro e Repubblica ceca viene espresso il totale dei dati, rilevati sia dal settore ospedaliero che da quello di comunità; per Germania e Islanda sono riportati solo i dati di comunità.<sup>3</sup>



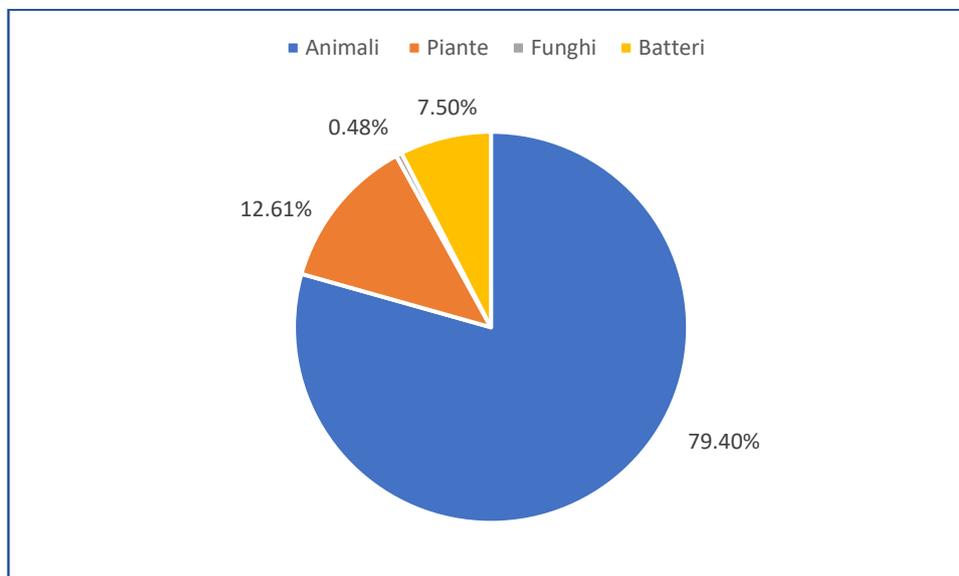
**Figura 2:** La resistenza antimicrobica rimane elevata nel tempo e mostra cambiamenti lenti o nulli in batteri associati alle più comuni infezioni. I dati sono espressi come percentuale della media ponderata di isolati batterici resistenti tra gli isolati batterici invasivi, considerando 29 stati EU/EEA, tra il 2014 e il 2020. Nella prima immagine vengono presi in esame batteri Gram-positivi, nella seconda alcuni Gram-negativi.<sup>3</sup>

## 1.2 I peptidi antimicrobici

Nella ricerca di nuove sostanze antibatteriche, i peptidi antimicrobici (AMP), noti anche come peptidi di difesa dell'ospite, suscitano grande interesse.

Si tratta di piccole proteine bioattive che, negli organismi superiori, costituiscono importanti componenti dell'immunità innata e contribuiscono a costruire la prima linea di difesa dalle infezioni. La produzione di peptidi antimicrobici non è estranea nemmeno ai procarioti, che producono AMP per eliminare altri batteri presenti nella stessa nicchia ecologica. Inoltre, molti AMP mostrano un'attività ad ampio spettro, sia contro batteri Gram-positivi che Gram-negativi, nonché funghi, virus e protozoi unicellulari <sup>4</sup>

L'importanza che i peptidi antimicrobici rivestono per l'immunità innata è supportata da diverse evidenze *in vivo*, per esempio dalla maggiore suscettibilità alle infezioni cutanee di topi geneticamente modificati che non possiedono il gene codificante per un peptide particolare, l'analogo murino dell'AMP umano LL-37. <sup>5</sup>



**Figura 3:** Fonti di peptidi antimicrobici in natura, dati aggiornati a settembre 2017. <sup>6</sup>

### 1.3 Proprietà e classificazione degli AMP

Esistono diverse classi di peptidi antimicrobici e, sebbene mostrino delle differenze nelle proprietà chimico-fisiche, strutturali, nelle origini e meccanismo d'azione, condividono alcune caratteristiche comuni. Sono generalmente molecole corte, composte da meno di 50 amminoacidi, con una carica netta positiva spesso compresa tra +2 e +11 e una notevole percentuale di residui idrofobici, tipicamente circa 50%. Hanno una struttura anfipatica, data dalla presenza di regioni idrofile e idrofobiche, e sono in grado di solubilizzarsi in ambiente acquoso.<sup>7</sup>

Una classe meno comune di AMP è rappresentata dai peptidi antimicrobici anionici, che hanno una carica netta negativa variabile da -1 a -7 e sono stati identificati in diverse specie animali e vegetali.<sup>8</sup>

Questi peptidi sono caratterizzati da molti residui con carica negativa, come l'acido aspartico e glutammico<sup>9</sup> e mostrano un diverso e non completamente chiaro meccanismo d'azione rispetto agli AMP cationici: per facilitare la loro interazione con la cellula batterica, alcuni AMP anionici utilizzano ioni metallici per formare ponti salini cationici con costituenti delle membrane microbiche carichi negativamente, consentendo loro la penetrazione nella cellula.<sup>8</sup>

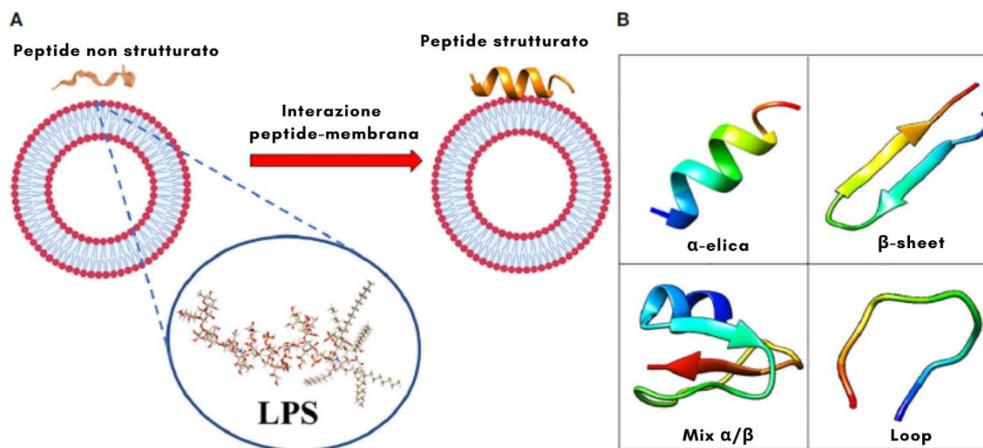
I peptidi antimicrobici possono essere classificati sulla base della loro struttura secondaria, considerando che è possibile la coesistenza di più forme nello stesso peptide:

- I peptidi con struttura  $\alpha$ -elica
- I peptidi con struttura  $\beta$ -sheet
- I peptidi con struttura estesa, generalmente contenenti due o più proline, note per destabilizzare le strutture ordinate<sup>6</sup>

La maggior parte degli AMP mostra un pattern a  $\alpha$ -elica o  $\beta$ -sheet. Interessante è osservare che i peptidi a  $\alpha$ -elica mostrano una conformazione disordinata in ambiente acquoso e formano l'elica quando interagiscono con le membrane

biologiche. Si nota spesso un pattern ordinato nella disposizione degli amminoacidi, in modo che gli idrofobici e gli idrofili siano disposti su lati diversi dell'elica, con la parte carica positivamente che interagisce con le cariche negative della membrana batterica, per esempio quelle dei lipopolisaccaridi (LPS) nei Gram-negativi.

Al contrario dei peptidi a  $\alpha$ -elica, quelli con conformazione  $\beta$ -sheet mantengono una struttura più ordinata in ambiente acquoso e non vanno incontro a cambiamenti conformazionali radicali quando interagiscono con una membrana biologica<sup>10</sup>



**Figura 4:** (A) Interazione tra un AMP e una membrana biologica.  
(B) Strutture secondarie che possono assumere gli AMP.<sup>7</sup>

I peptidi antimicrobici si possono classificare anche in base a come vengono sintetizzati nelle cellule. La loro produzione può avvenire in tre modi: per sintesi ribosomiale, non ribosomiale oppure per degradazione di proteine. Gli AMP possono essere sintetizzati dai ribosomi attraverso la traduzione di un m-RNA messaggero in una sequenza amminoacidica, meccanismo utilizzato per la sintesi proteica. Al contrario, i peptidi sintetizzati per via non ribosomiale sono prodotti da enzimi che incorporano amminoacidi non proteinogenici nella sequenza, metodo che si osserva nei batteri e nei funghi filamentosi.

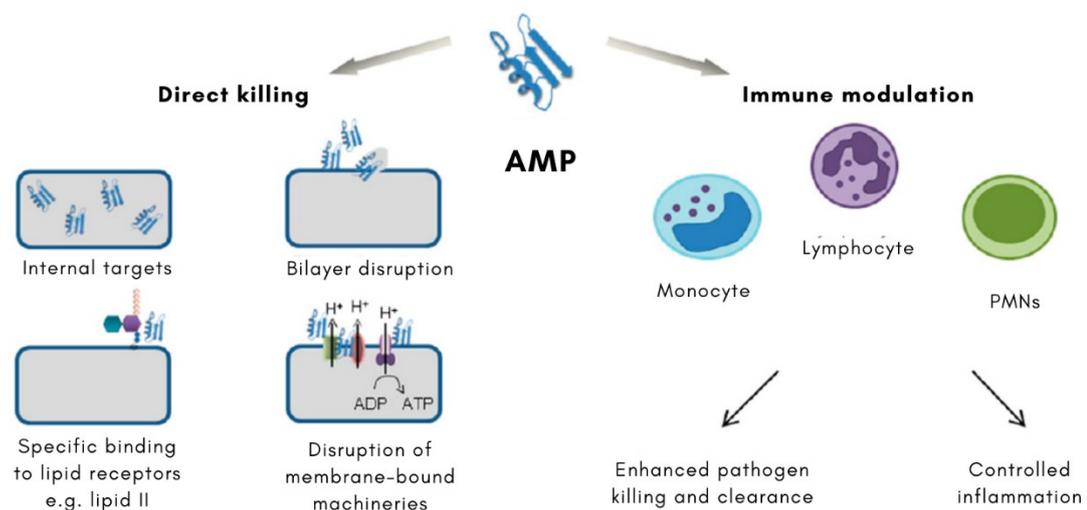
Infine, alcuni AMP noti anche come “*cryptic peptides*”, sono generati dalla scissione di proteine più grandi, aventi di per sé altre funzioni.<sup>7</sup>

Il taglio proteolitico non è semplicemente una possibile strategia di produzione degli AMP ma anche una forma di attivazione. Infatti, alcuni peptidi antimicrobici vengono prodotti come precursori inattivi, che si attivano solo dopo il taglio di specifiche proteasi.

Per quanto concerne il ritmo di sintesi degli AMP, la loro espressione può essere costitutiva o inducibile: alcuni peptidi antimicrobici sono espressi durante tutta la vita cellulare, vengono immagazzinati nel citosol come precursori, attivati e rilasciati solo in seguito a segnali di infiammazione o infezione che raggiungono la cellula.<sup>10</sup>

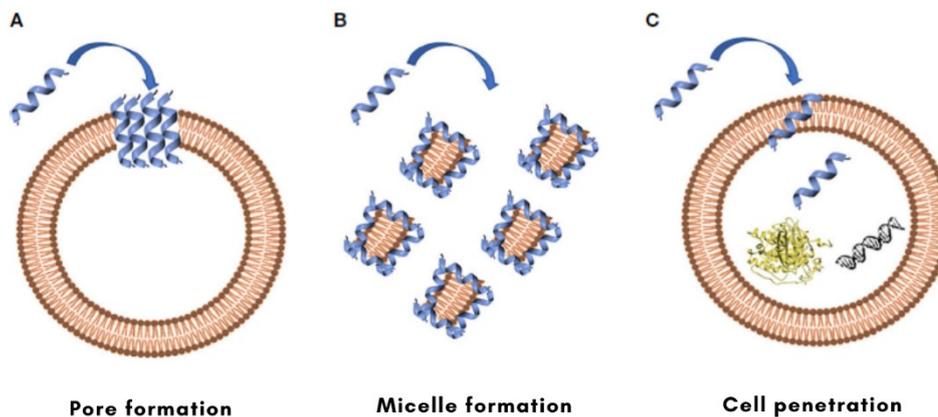
#### 1.4 Meccanismo d’azione dei peptidi antimicrobici

In diversi studi è stato osservato che i peptidi antimicrobici non si limitano a danneggiare direttamente la cellula batterica, ma agiscono anche attraverso la modulazione del sistema immunitario, controllando il processo infiammatorio e dirigendo le cellule immunitarie verso l’agente infettivo, come esplicitato dalla seguente figura.<sup>6</sup>



**Figura 5:** Meccanismo d’azione dei peptidi antimicrobici. Generalmente gli AMP non agiscono solo danneggiando direttamente i batteri, ma anche attraverso la modulazione del sistema immunitario<sup>6</sup>

Nell'ambito della loro capacità di danneggiare direttamente i batteri, alcuni AMP li distruggono danneggiando la membrana citoplasmatica, altri possono interagire con componenti intracellulari, compromettendo funzioni importanti per la vita del batterio.<sup>11</sup>



**Figura 6:** I peptidi antimicrobici possono formare pori sulla membrana batterica (A) o danneggiarla riducendola in micelle (B). Alcuni peptidi attraversano la membrana senza comprometterne l'integrità e raggiungono il loro bersaglio intracellulare (C).<sup>7</sup>

Gli AMP aventi come target d'azione la membrana batterica interagiscono con essa in modo aspecifico, instaurando interazioni elettrostatiche tra le cariche positive del peptide e le cariche negative della superficie, in particolare quelle dell'acido teicoico per i Gram-positivi e del LPS per i Gram-negativi. Alcuni studi suggeriscono che l'entità della carica di superficie non è l'unico fattore importante per l'interazione, ma significativi sembrano essere anche la natura dei fosfolipidi e la curvatura della membrana.<sup>12</sup>

Dopo la formazione delle suddette interazioni tra peptidi e superficie batterica, gli AMP possono danneggiare la membrana secondo diverse strategie. In seguito sono esposte le tre teorie maggiormente consolidate, considerando che esistono anche altri modelli, meno noti o ancora in fase di studio, per descrivere il meccanismo degli AMP.

### 1.4.1 Barrel stave model

In questo modello in una prima fase i peptidi si orientano parallelamente alla membrana e poi si inseriscono perpendicolarmente in essa. I peptidi interagiscono tra di loro e con i fosfolipidi di membrana per formare un poro, che causa la perdita della continuità di membrana e la morte cellulare. Per la formazione di questa struttura, è essenziale che il peptide sia anfipatico, affinché la parte idrofobica possa interagire con i lipidi di membrana e quella idrofila si orienti verso il lume della “botte”. Si è osservato che solo pochi peptidi, come l’alameticina e la pardaxina, hanno questo comportamento a contatto con la membrana batterica; in particolare è richiesta una lunghezza minima di circa 22 amminoacidi per i peptidi ad alfa elica e una minima di circa 8 amminoacidi per gli AMP con conformazione  $\beta$ -sheet.<sup>6</sup>

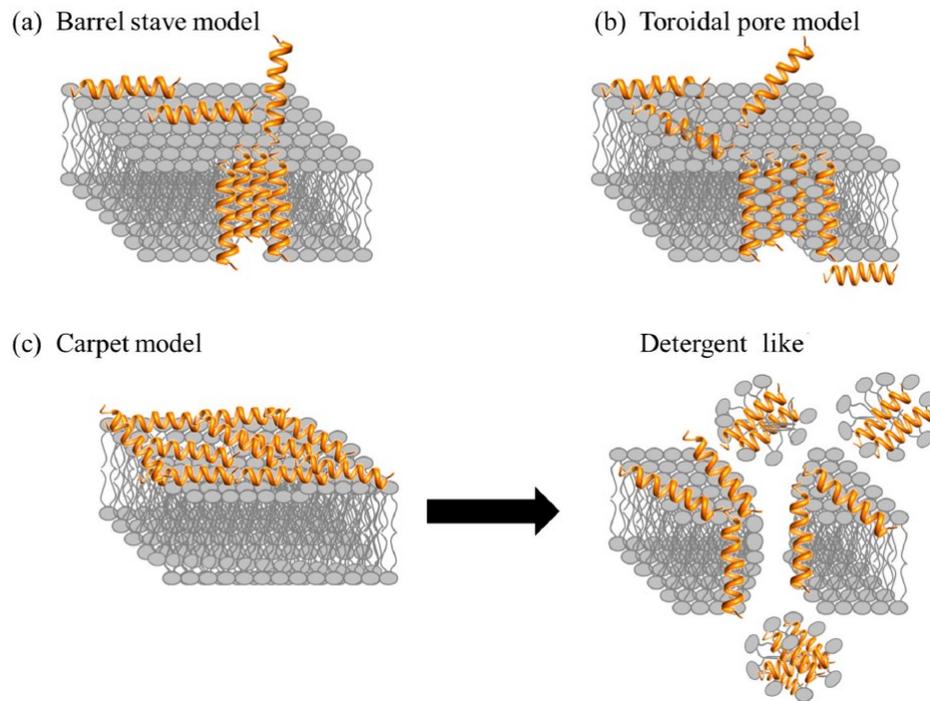
### 1.4.2 Toroidal pore model

Come nel precedente modello, i peptidi dapprima interagiscono parallelamente con la membrana batterica e in seguito si inseriscono in essa formando un poro; non sono presenti interazioni peptide-peptide a livello del canale, che è formato in parte dagli AMP, in parte dalle teste polari dei fosfolipidi di membrana. La differenza fondamentale tra il modello *barrel stave* e quello *toroidal pore* consiste nel fatto che nel primo viene mantenuto il corretto orientamento dei fosfolipidi batterici, nel secondo l’arrangiamento del *bilayer* di membrana viene perturbato. Sono stati individuati diversi AMP che agiscono formando pori toroidali, come magainina 2 e aureina 2.2.<sup>13</sup>

### 1.4.3 Carpet model

In questo modello i peptidi non formano un poro attraverso la membrana: la ricoprono disponendosi parallelamente ad essa e in seguito si verifica un effetto simile a quello apportato dai detergenti, per cui il bilayer fosfolipidico si disintegra e si formano delle micelle. Diversi peptidi agiscono con questo meccanismo, come aureina 1.2 e LL-37, che è stato individuato come uno dei più

importanti peptidi antimicrobici dei tessuti umani. Inoltre, questo è il meccanismo d'azione attribuito a PMAP-36, peptide antimicrobico mieloidi di origine suina, i cui derivati sono oggetto del presente studio sperimentale.<sup>14</sup>



**Figura 7:** Meccanismi d'azione proposti per l'interazione tra AMP e una membrana biologica.<sup>6</sup>

I primi studi sui peptidi antimicrobici ritenevano che essi agissero sui batteri interagendo solo con la loro superficie. Oggi è stato chiarito che i peptidi antimicrobici possono avere target intracellulari: alcuni AMP interagiscono con la membrana solo al fine di attraversarla e compromettere funzioni importanti per la vita della cellula, come la sintesi di proteine, acidi nucleici e altre attività enzimatiche.<sup>15</sup>

Oltre ad apportare un danno diretto ai batteri, diversi peptidi antimicrobici hanno mostrato la capacità di reclutare e attivare cellule del sistema immunitario. Per esempio, AMP umani come LL-37 e le  $\beta$ -defensine quando

rilasciati sono in grado di attirare mastociti, leucociti e cellule dendritiche verso il sito di infezione.<sup>7</sup>

Dunque, la capacità dei peptidi antimicrobici di agire su più fronti nel contrastare l'infezione e modulare l'infiammazione che ne deriva, rende queste molecole estremamente interessanti e promettenti per una futura applicazione clinica, ponendo maggiori difficoltà ai patogeni nello sviluppo di resistenze.

### 1.5 Vantaggi dei peptidi antimicrobici

Negli ultimi anni la comunità scientifica guarda con grande interesse la ricerca sui peptidi antimicrobici, perché sembrano offrire numerosi vantaggi rispetto agli antibiotici convenzionali, per esempio lo scarso sviluppo di resistenze, l'attività ad ampio spettro, l'effetto sinergico con altri antibatterici, la rapidità d'azione e la limitata tossicità per l'ospite, anche se essa non è ancora ben definita. Tali aspetti favorevoli sono riassunti nella seguente tabella.<sup>16</sup>

Confronto tra AMP e antibiotici convenzionali		
Proprietà	Antibiotici convenzionali	Peptidi antimicrobici
<b>Spettro di attività</b>	Spesso selettivi per i microorganismi	Attività ad ampio spettro contro batteri, funghi, alcuni parassiti e virus
<b>Meccanismo d'azione</b>	Specifico, di solito agiscono su un bersaglio principale o su una classe di bersagli. Compromettono le funzioni fisiologiche del batterio	Non specifico, basato sulla struttura e la carica totale dell'AMP
<b>Altre attività</b>	Nessuna	Possono reclutare e attivare cellule del sistema immunitario
<b>Tossicità</b>	Generalmente sicuri per le cellule eucarioti. Per alcuni antibiotici si	Per diversi AMP, la tossicità <i>in vivo</i> deve ancora essere

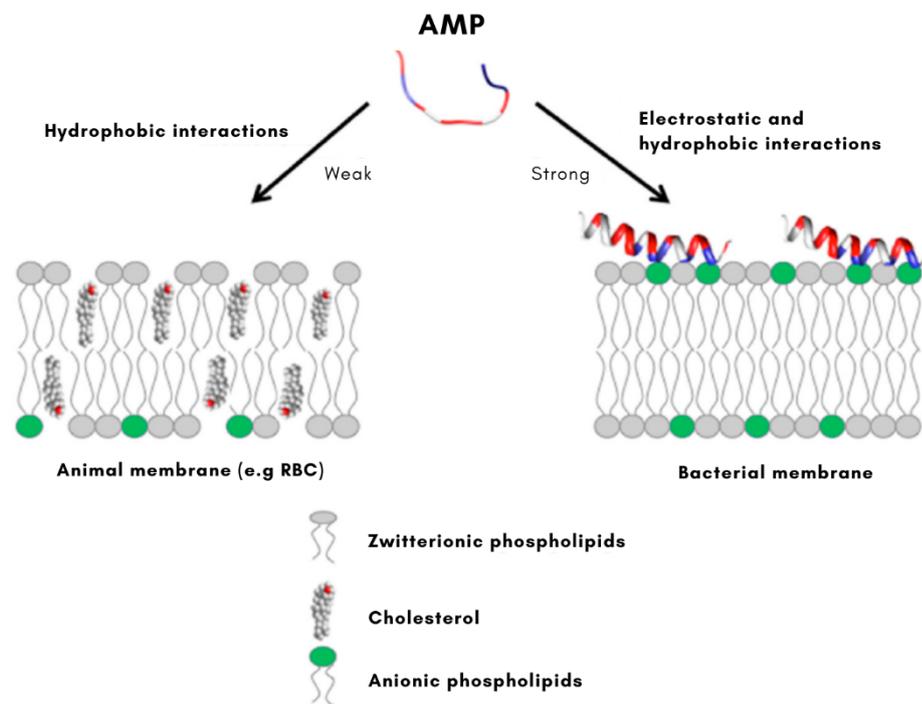
	osserva tossicità a lungo termine o ad alte dosi.	approfondita.
<b>Resistenza</b>	In generale, i batteri tendono sviluppare resistenze agli antibiotici, causate da molteplici meccanismi.	Difficilmente i batteri sviluppano resistenza

*Tabella 1: Confronto tra AMP e antibiotici convenzionali*

## 1.6 Svantaggi e sfide future associate agli AMP

Nonostante molti peptidi antimicrobici siano oggetto di studio e grande interesse scientifico, al giorno d'oggi pochi hanno ottenuto un'applicazione clinica. Sono solo dieci gli AMP presenti in commercio e quarantaquattro i peptidi nelle fasi cliniche o precliniche di sperimentazione (dato aggiornato a settembre 2020).<sup>17</sup> Infatti, per diversi peptidi antibatterici l'applicazione clinica è ostacolata da problemi non irrilevanti, come la tossicità, la potenzialità emolitica, la suscettibilità a una rapida degradazione proteolitica da parte di enzimi dell'ospite e dei batteri.<sup>7</sup>

Molti peptidi antimicrobici mostrano una selettività nei confronti delle cellule procarioti, che si spiega richiamando il meccanismo d'azione degli AMP. Le membrane eucariotiche espongono nell'ambiente extracellulare fosfolipidi zwitterionici, come fosfatidilcolina e sfingomieline, e altri componenti come il colesterolo, che non favoriscono l'interazione con gli AMP grazie alla loro carica complessivamente neutra a pH fisiologico. Al contrario, i peptidi antimicrobici instaurano interazioni elettrostatiche forti con le molecole cariche negativamente esposte sulla superficie batterica.<sup>6</sup>



**Figura 8:** Interazione tra un AMP cationico e una membrana animale (a sinistra) e batterica (a destra). RBC: red blood cell<sup>6</sup>

Nonostante questa importante differenza tra eucarioti e procarioti, che dona ai peptidi antimicrobici una selettività di attacco sulle membrane batteriche anziché umane, in diversi studi *in vitro* e *in vivo* si osservano fenomeni di tossicità sulle cellule eucarioti, che non devono essere sottovalutati al fine di una futura applicazione clinica.

### 1.6.1 Citotossicità ed attività emolitica

Un certo numero di peptidi antimicrobici si è mostrato nefrotossico ad alto dosaggio quando somministrato per via sistemica, aspetto che spiega perché spesso si pensi a un'applicazione topica degli AMP.<sup>17</sup>

In alcuni casi si è osservato un aumento della tossicità quando uno o più residui vengono sostituiti da D-amminoacidi o amminoacidi non naturali, al fine di apportare stabilità alla molecola. Per esempio *Lu et al.* hanno sintetizzato mediante SPPS dei derivati del peptide Pep05; quest'ultimo non presenta

tossicità, mentre il peptide DP06, in cui tutti i residui L-Lys e L-Arg sono stati sostituiti rispettivamente con D-Lys e D-Arg, presenta una marcata tossicità *in vivo*.<sup>18</sup> Un altro potenziale problema dell'applicazione terapeutica dei peptidi antimicrobici è la capacità di alcuni di loro di provocare emolisi. Un'interessante osservazione è stata fatta da *Chen et al.* che hanno sintetizzato dei derivati dell'AMP V13KL variando l'idrofobicità dell' $\alpha$ -elica, osservando che un suo aumento corrispondeva a un incremento del potere emolitico nei saggi biologici.<sup>19</sup>

Comunque, le modifiche sintetiche apportate a AMP naturali possono anche ridurre la tossicità sistemica o l'attività emolitica<sup>17</sup> e al giorno d'oggi sono numerosi i progetti di ricerca che modificano peptidi antimicrobici al fine di ridurre la tossicità e migliorarne il profilo applicativo.

## **1.7 Principali meccanismi di resistenza agli AMP nei batteri**

Diversi studi mostrano come anche i peptidi antibatterici siano soggetti allo sviluppo di resistenze, secondo strategie simili a quelle già osservate con gli antibiotici in commercio. Il meccanismo più comune di resistenza consiste nell'apportare cambiamenti alla superficie cellulare, in modo tale da impedire il legame e la penetrazione del peptide antimicrobico nella cellula batterica. Altre strategie sono l'inibizione della produzione di AMP dell'ospite, la formazione del biofilm, l'utilizzo di pompe di efflusso e di molecole che, quando rilasciate, si legano agli AMP e li inattivano, meccanismo noto come *trapping*.<sup>20</sup> I peptidi antimicrobici possono anche essere degradati da miscele enzimatiche prodotte dai batteri, meccanismo di resistenza che suscita particolare interesse per questo studio sperimentale.

### **1.7.1 Degradazione proteolitica**

I batteri Gram-positivi e Gram-negativi possono produrre peptidasi che degradano gli AMP; in particolare i peptidi lineari sono più sensibili all'azione di questi enzimi perché i siti riconosciuti per la scissione sono maggiormente

esposti. Sono numerosi gli esempi di enzimi batterici che degradano AMP naturali dell'ospite, come l'elastasi di *P. aeruginosa* che scinde LL-37 presso regioni importanti per l'attività del peptide stesso e genera frammenti privi di attività antibatterica.<sup>21</sup>

Inoltre, è stato osservato come diversi batteri, per evitare l'attacco dei peptidi antimicrobici, trattengono le proprie proteasi vicino alla superficie, in modo tale da creare uno scudo attorno alla cellula batterica.<sup>22</sup>

Per la stabilità dei peptidi antimicrobici non sono pericolosi solo gli enzimi batterici, ma anche quelli dell'ospite possono operare tagli proteolitici, con conseguente perdita di attività dei peptidi.

A questo proposito, la ricerca nel campo degli AMP punta non solo a individuare nuovi peptidi antimicrobici, ma anche a trovare strategie per la loro stabilizzazione. La ciclizzazione dei peptidi antibatterici, le modificazioni delle loro catene laterali, la multimerizzazione e i metodi di *drug delivery* sono solo alcuni esempi delle tecniche per incrementare l'applicazione in vivo degli AMP. Un approccio di grande interesse consiste nella sostituzione di alcuni L-amminoacidi del peptide naturale con D-amminoacidi o amminoacidi non naturali. Nello studio sperimentale di *Lu et al.* il peptide UP09, derivato del Pep05 in cui K<sup>1</sup> è stato sostituito con l'amminoacido non proteinogenico Aib e F<sup>14</sup> con Thi, presenta una significativa resistenza alle proteasi del plasma, con oltre il 50% e oltre il 30% di peptide residuo rispettivamente dopo 12 ore e 24 ore dall'inizio della prova di degradazione. Questo risultato potrebbe indicare che un amminoacido Aib all'estremità N terminale aumenta la resistenza di alcuni peptidi antimicrobici all'attacco delle proteasi del plasma<sup>18</sup>, tesi che necessita di ulteriori conferme sperimentali.

In generale, le sostituzioni amminoacidiche di AMP naturali sono studiate per aumentare la resistenza proteolitica, in modo da mascherare il sito di taglio normalmente riconosciuto dagli enzimi batterici o dell'ospite. Tale strategia presenta tuttavia delle criticità da non sottovalutare, per esempio l'aumento del rischio associato a citotossicità, immunogenicità o altri effetti tossici.<sup>18</sup>

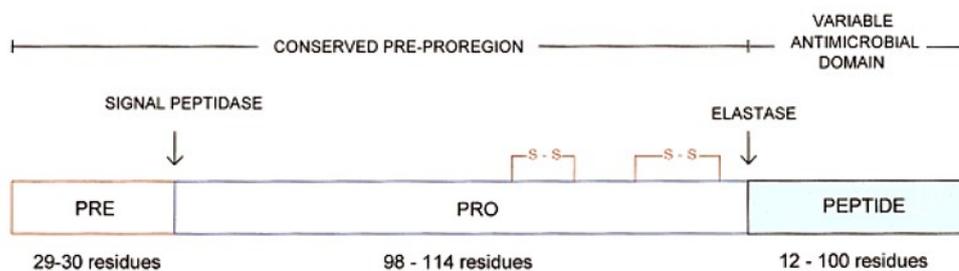
## 1.8 Le catelicidine

Le catelicidine sono una classe di AMP molto diffusa tra i vertebrati, la cui presenza è stata osservata nell'uomo e nei comuni animali da allevamento; sono anche definite *myeloid antimicrobial peptides* (MAP), ovvero peptidi antimicrobici mieloidi.<sup>23</sup>

Le catelicidine si caratterizzano per la natura complessivamente cationica, la struttura anfipatica e sono prodotte come prepropeptidi, successivamente attivati da modificazioni post traduzionali.

In generale, i peptidi precursori delle catelicidine sono sintetizzati nel midollo osseo dai mielociti e metamielociti, stadi cellulari della maturazione dei leucociti. I prepropeptidi si distinguono per la presenza di una regione N-terminale molto conservata, in cui è presente il dominio catelina, e una porzione C-terminale più variabile.<sup>24</sup>

Nei neutrofili maturi le catelicidine sono presenti in forma inattiva, immagazzinate in granuli intracellulari. Quando la cellula immunitaria riceve un opportuno segnale di attivazione, spesso mediato da molecole del patogeno come LPS<sup>25</sup>, i peptidi vengono attivati da peptidasi ed elastasi che operano specifici tagli. Le catelicidine attive possono assumere diverse strutture secondarie e vengono rilasciate per esocitosi, eliminando i microorganismi con uno dei meccanismi membrana-target esposti precedentemente. In numerosi studi è stata osservata l'attività biologica ad ampio spettro delle catelicidine, contro batteri Gram-positivi, Gram-negativi, funghi, parassiti e virus con *envelope*.<sup>25</sup>



**Figura 9:** Rappresentazione schematica di un prepropeptide della famiglia delle catelicidine<sup>24</sup>

## 1.9 PMAP

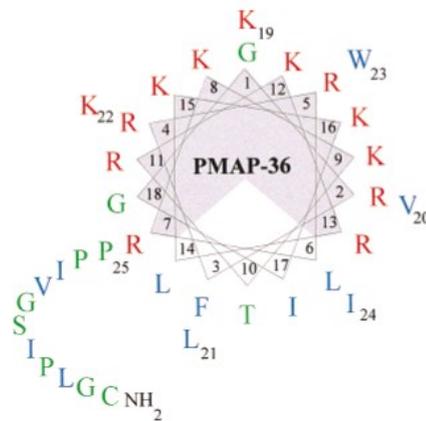
Il termine PMAP, acronimo di *Porcine Myeloid Antimicrobial Peptides*, indica alcune catelicidine estratte dal maiale (*Sus scrofa domesticus*), per esempio PMAP-23, PMAP-37 e PMAP-36, di cui quest'ultimo è il precursore dei peptidi in analisi nel presente studio sperimentale.

PMAP-36 è un peptide di 36 amminoacidi, la cui sequenza in forma attiva è esplicitata in figura 10. Ha una carica netta positiva di +13, dovuta all'abbondanza di amminoacidi basici, prevalentemente collocati tra i primi 20 residui, regione che assume conformazione a  $\alpha$ -elica. Al contrario, la regione C-terminale contiene relativamente più amminoacidi non carichi e sono presenti tre proline, residui che fanno assumere un carattere non strutturato a questa parte. PMAP-36 mostra un carattere anfipatico non solo in direzione longitudinale, ma anche trasversale. Infatti, i residui della porzione a  $\alpha$ -elica si dispongono in modo da formare un ampio settore ricco di amminoacidi polari e uno più stretto in cui si raccolgono gli idrofobici e una treonina, residuo moderatamente polare, come rappresentato in figura 11.<sup>1</sup>

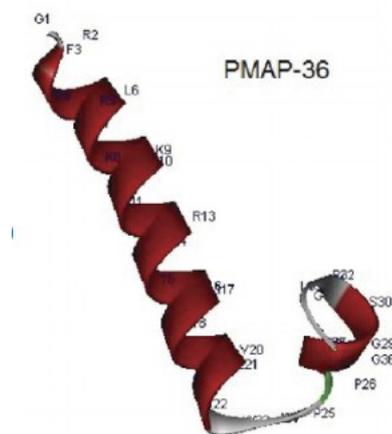
Il 35° residuo è una cisteina che, per formazione di un ponte disolfuro, consente la dimerizzazione di due molecole di PMAP-36; è questa la forma, secondo la ricerca di *Scocchi et al.*, in cui il precursore proPMAP-36 è immagazzinato in alcune cellule del sistema immunitario.<sup>1</sup>

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
G	R	F	R	R	L	R	K	K	T	R	K	R	L	K	K	I	G	K	V	L	K	W	I	P	P	I	V	G	S	I	P	L	G	C	G

**Figura 10:** Sequenza amminoacidica di PMAP-36



**Figura 11:** Struttura elicoidale di PMAP-36. Sono evidenziati in rosso gli aminoacidi con carica positiva, in blu gli aminoacidi idrofobici, in verde i residui idrofili neutri; la faccia idrofila dell'elica è raffigurata in grigio.<sup>24</sup>



**Figura 12:** Struttura tridimensionale di PMAP-36<sup>26</sup>

Negli ultimi anni la ricerca chimica e farmacologica ha prodotto diversi derivati del peptide naturale PMAP-36, di cui sono stati analizzati numerosi aspetti, come l'attività antimicrobica e la tossicità. In seguito, sono esposte le più importanti modifiche apportate a PMAP-36 presenti in letteratura.

### 1.9.1 Studio degli effetti della dimerizzazione

*Scheenstra et al.* hanno indagato gli effetti della dimerizzazione di PMAP-36, osservando che la prevenzione del fenomeno aumenta leggermente l'attività antimicrobica e riduce sia gli effetti citotossici che la capacità immunomodulatoria del peptide.<sup>27</sup>

Anche *Scocchi et al.* hanno analizzato le conseguenze della dimerizzazione: secondo il loro studio essa favorisce la formazione della struttura a  $\alpha$ -elica e non apporta differenze significative di MIC quando l'attività dei dimeri è confrontata con quella dei rispettivi monomeri su batteri *in vitro*, come rappresentato in figura 13.<sup>1</sup>

### 1.9.2 Sintesi di derivati più corti

*Scheenstra et al.* hanno sintetizzato alcuni derivati accorciati di PMAP-36, osservando che i primi 11 amminoacidi (G<sup>1</sup>-T<sup>11</sup>) non sono indispensabili per l'attività antimicrobica, mentre la delezione di ulteriori quattro residui (K<sup>12</sup>-K<sup>15</sup>) porta ad una completa perdita di funzionalità, indicando quindi questa parte del peptide come essenziale per l'attività. Secondo gli autori, un eccessivo calo della carica complessiva della molecola potrebbe essere la causa del crollo della capacità antimicrobica.<sup>27</sup>

Anche *Ly Y et al.* hanno lavorato alla sintesi di derivati corti di PMAP-36. Il peptide PMAP (1-24), composto dai primi 24 residui, mostra un'attività antibatterica *in vitro* comparabile a quella del peptide intero. Al contrario per PMAP (25-36), composto solo dalla porzione C-terminale di PMAP-36, non si è osservato alcun carattere antimicrobico, per la perdita della gran parte dei residui cationici essenziali per l'attività. Inoltre, l'aumento di idrofobicità di PMAP (1-24), ottenuto sostituendo uno o più amminoacidi cationici (K o R) con valina, comporta in questi derivati un leggero calo dell'attività antimicrobica. In questo studio è stata valutata anche l'attività emolitica sugli eritrociti umani, dimostratasi blanda e con andamento dose-dipendente per PMAP-36 e PMAP (1-24). Quest'ultimo raggiunge il 30% di attività emolitica alla concentrazione di 128

$\mu\text{M}$ , che è circa sessanta volte i più comuni valori per cui si ha l'effetto battericida,<sup>28</sup> dati che rendono promettente una futura applicazione clinica di questi composti.

Nello stesso studio è stato anche approfondito il ruolo del triptofano in posizione 23, sintetizzando PMAP (1-24) -W23A, PMAP (1-24) -W23K e PMAP (1-24) -W23L, in cui Trp è stato sostituito rispettivamente con Ala, Lys o Leu. L'attività antimicrobica *in vitro* di PMAP (1-24) -W23A, PMAP (1-24) -W23K si riduce significativamente, mentre viene recuperata da PMAP (1-24) -W23L. Gli autori concludono che probabilmente è l'idrofobicità dell'amminoacido in posizione 23 a rivestire un ruolo importante per l'attività della molecola.<sup>28</sup>

Anche *Scocchi et al.* hanno sviluppato dei derivati di PMAP-36, osservando che il peptide più corto PMAP-36 (1-20), che conserva solo la regione elicoidale verso l'estremità N-terminale, mostra minor potenza e una più lenta permeabilizzazione della membrana batterica, fatto che indica una certa importanza della regione idrofobica non strutturata verso l'estremità C-terminale.<sup>1</sup>

Microorganism and strain	MIC ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>		
	PMAP-36 (1-34)	PMAP-36 (1-35) <sub>2</sub>	PMAP-36 (1-20) <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	2	6
<i>S. aureus</i> 710A	2	2	nr
<i>S. aureus</i> SA-62 (MRSA)	4	4	nr
<i>B. megaterium</i> Bm11	1	1	3
<i>S. epidemidis</i> ATCC 12228	1	1	nr
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	1	12
<i>E. coli</i> ML35	1	0.5	12
<i>E. coli</i> D21	1	0.5	nr
<i>E. coli</i> D22	0.5	0.5	nr
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	1	1	48
<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis H2	1	0.5	nr
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	1	3
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	2	2	nr
<i>P. mirabilis</i> c.i.	> 32	> 32	> 64
<i>Candida albicans</i> c.i.	8	16	> 64
<i>Cryptococcus neoformans</i> c.i.	2	2	nr

**Figura 13:** In questa immagine si può osservare che i valori di MIC del monomero PMAP-36 (1-34) e del dimero PMAP-36 (1-35)<sub>2</sub> sono simili. Inoltre, il derivato accorciato PMAP-36 (1-20) mostra spesso valori di MIC superiori, indicativi di una perdita di attività antimicrobica rispetto ai due derivati a confronto.<sup>1</sup>

Sul peptide PMAP-36 (1-20) *Scocchi et al.* hanno fatto un'altra interessante osservazione: considerando la moderata emolisi indotta da PMAP-36, il derivato più corto non ha mostrato attività emolitica sugli eritrociti umani fino alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , evidenza che suggerisce come la coda idrofobica del peptide è importante per mediare l'interazione sia con le membrane batteriche che con quelle dell'ospite. <sup>1</sup>

### 1.9.3 Coniugazione con catene aciliche

Diversi studi hanno sperimentato l'attacco di catene aciliche ai derivati di PMAP-36, mostrando che la lunghezza influenza l'attività antimicrobica e la tossicità per le cellule eucariotiche.

*Liu et al.* hanno sintetizzato il derivato Myr-36PW, in cui P<sup>25</sup> e P<sup>26</sup> sono state sostituite con due residui di triptofano ed è stata inserita una catena miristica all'estremità N-terminale. Rispetto a PMAP-36 PW, peptide con la suddetta sostituzione amminoacidica ma senza acido miristico, Myr-36PW mostra un'attività antimicrobica superiore *in vitro*, grazie alla capacità della coda lipofila di aumentare le interazioni idrofobiche con la membrana batterica e la permeabilità del peptide attraverso essa. Rispetto a PMAP-36 e PMAP-36 PW, Myr-36PW mostra un'attività emolitica leggermente aumentata negli eritrociti di topo. Tuttavia, essa raggiunge il 30% per una concentrazione di 640  $\mu\text{g/mL}$ , decisamente superiore rispetto ai valori di MIC rilevati nei test *in vitro*; questo dato indica un buon profilo di sicurezza per tutti e tre i suddetti peptidi. <sup>29</sup>

Nella review di *Rounds et al.* viene fatta un'osservazione importante in merito all'attacco di catene aciliche su peptidi antimicrobici: più è lunga la catena, maggiore è il potere emolitico, perché all'aumentare della lunghezza del residuo acilico viene meno il meccanismo di selettività, precedentemente esposto, tra le membrane degli eucarioti e dei procarioti. <sup>30</sup>

## 2. SCOPO DELLA TESI

Uno dei principali problemi che limita l'applicazione terapeutica dei peptidi antimicrobici è la loro scarsa capacità di rimanere intatti e funzionali quando sottoposti all'attacco di enzimi dei patogeni e dell'ospite. Il principale obiettivo del presente elaborato di tesi è testare la resistenza di alcuni derivati di PMAP-36, in soluzione con enzimi o miscele enzimatiche diverse, in condizioni di temperatura che mimano quelle dell'ambiente cellulare. In particolare, i test di degradazione sono stati condotti con chimotripsina, pronasi e, per alcuni peptidi, con il siero umano. In seguito sono esposte le sequenze dei peptidi in esame.

- **Pep1: Ac - PMAP (12-31)**

Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Pro-Pro-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>

- **Pep2: Ac - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**

Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>

- **Pep3: Ac - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31) - Aun**

Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-Aun<sup>32</sup>-NH<sub>2</sub>

- **Pep4: Lau - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**

Lau-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>

- **Pep5: Oct- [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**

Oct-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>

- **Pep6: Palm - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**

Palm-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>

- **Pep7: Ac-[K<sup>12</sup>(Palm), A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**

**Ac-Lys<sup>12</sup>(Palm)-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>**

- **Pep8: Ac - [U<sup>14</sup>, A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**

**Ac-Lys-Arg-Aib<sup>14</sup>-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>**

- **Pep9: Ac-PMAP (12-24)**

**Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-NH<sub>2</sub>**

Inoltre, sono stati sintetizzati due analoghi della sequenza Pep9, in cui la leucina in posizione 21 è stata sostituita con un residuo di acido 2-amminoisobutirrico (Aib, U). Sono stati valutati gli effetti della sostituzione di Leu con Aib, al fine di un miglioramento della resistenza all'azione degli enzimi.

- **Pep9a: Ac-[U<sup>21</sup>] -PMAP (12-24)**

**Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Aib<sup>21</sup>-Lys-Trp-Ile-NH<sub>2</sub>**

- **Pep9b: Palm-[U<sup>21</sup>] -PMAP (12-24)**

**Palm-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Aib<sup>21</sup>-Lys-Trp-Ile-NH<sub>2</sub>**

Nel corso di questa ricerca sperimentale, alcuni dei suddetti peptidi sono stati analizzati mediante dicroismo circolare, per studiare la loro struttura secondaria in solventi diversi, ovvero tampone acquoso fosfato a pH5, soluzione di SDS e TFE. In particolare, **Pep2** è stato confrontato con **Pep3** per osservare se la catena 11-amminoundecanoica apporta modifiche nella conformazione; **Pep9** è stato messo a confronto con **Pep9a** per studiare il ruolo della sostituzione di L<sup>21</sup> con U<sup>21</sup>.

### 3. PARTE SPERIMENTALE

#### 3.1 Materiali e strumentazione

##### 3.1.1 Reagenti e solventi

Per le attività sperimentali sono state utilizzate le seguenti sostanze, di cui è riportata l'azienda produttrice.

Per le degradazioni enzimatiche	
HEPES	Sigma-Aldrich
NaOH	Sigma-Aldrich
TRIS·HCl	Sigma-Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Chimotripsina	Sigma-Aldrich
Pronasi	Sigma-Aldrich
Siero umano	Sigma-Aldrich
DMSO	Fluka
Etanolo 95° denaturato	Carlo Erba
Per la sintesi su fase solida	
N, N-Dimetilformamide (DMF)	Sigma-Aldrich
Diclorometano (DCM)	Sigma-Aldrich
Resina Rink Amide MBHA	Novabiochem
HOBt	Iris Biotech
HBTU	Iris Biotech
HATU	Iris Biotech
DODT	Fluorochem
Piperidina	Honeywell
Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Trp (Boc)-OH; Fmoc-Lys (Boc)-OH; Fmoc-Aib-OH; Fmoc-Val-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Arg (Pbf)-OH;	Iris Biotech GMBH
Boc -Cys (Trt)-OH	Sigma-Aldrich
Acido palmitico	Sigma-Aldrich
N-etil-diisopropilammina (DIPEA)	Fluka
Anidride acetica	Sigma-Aldrich
Metanolo	Sigma-Aldrich
Acido trifluoroacetico (TFA)	Sigma-Aldrich

Triisopropilsilano (TIS)	Sigma-Aldrich
Etere dietilico	Honeywell
<b>Kit Kaiser test</b>	
Ninidrina 6% in etanolo	Sigma-Aldrich
Fenolo 80% in etanolo	Sigma-Aldrich
Potassio cianuro in piridina	Sigma-Aldrich
<b>Per le analisi HPLC-UV e HPLC-MS</b>	
Acetonitrile	Carlo Erba
Acido trifluoroacetico (TFA) per HPLC	Sigma-Aldrich
<b>Per il dicroismo circolare</b>	
Trifluoroetano (TFE)	Sigma-Aldrich
Sodio dodecil solfato (SDS)	Sigma-Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich

**Tabella 2:** Elenco dei reagenti e solventi utilizzati

### 3.1.2 Strumentazione

#### High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Per analizzare la capacità degradativa nel tempo degli enzimi sui peptidi in esame, è stato utilizzato il cromatografo VWR HITACHI Cromaster dotato dei moduli VWR HITACHI UV Detector 5410, settato alle lunghezze d'onda 280 e 214 nm, Auto-sampler 5260 e Pump 5410. È stata utilizzata la colonna a fase inversa Phenomenex C18 100 Å, 5µ, 250 x 4,60 mm, con flusso 1 mL/min.

Gli eluenti utilizzati sono:

- Eluente A: 90% acqua Milli-Q/ 10% ACN + 0,05% TFA
- Eluente B: 10% acqua Milli-Q/ 90% ACN + 0,05% TFA

#### High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (HPLC-MS)

Per l'analisi HPLC-MS di alcuni campioni, è stato utilizzato il modello Agilent Technologies Infinity II, sistema 1260 unito a ESI a singolo quadrupolo. È stata utilizzata la colonna Phenomenex Kinetex 3,5 µm XB-C18, 100 Å, 100 x 4,6mm, con flusso 1mL/min.

Gli eluenti utilizzati sono:

- Eluente A: 100% H<sub>2</sub>O Milli-Q + 0,1% TFA
- Eluente B: 100% ACN + 0,1% TFA

### Centrifughe

Nei test di degradazione enzimatica, è stata utilizzata la centrifuga Biofuge 13 di Heraeus Instruments; per la sintesi dei peptidi su fase solida, è stata impiegato lo strumento ALC 4236 Centrifuge.

### Spettroscopia UV-Vis

Con l'obiettivo di determinare la concentrazione esatta delle soluzioni peptidiche destinate agli studi di dicroismo circolare, sono stati acquisiti gli spettri di assorbimento UV utilizzando lo spettrofotometro Shimadzu UV-250. Per la rivelazione, sono state utilizzate le celle Hellman in quarzo con cammino ottico pari a 0,1 cm operando nella regione spettrale tra 260 e 340 nm.

### Dicroismo circolare

Per gli studi di dicroismo circolare è stato utilizzato il dicrografo Jasco J-1500 con celle circolari Hellman in quarzo aventi cammino ottico di 0,02 cm. La regione spettrale in cui sono state condotte le analisi è stata 190-270 nm, con scanning speed pari a 100 nm/min. Le misurazioni sono state effettuate alla temperatura di 25°C, acquisendo per ogni test un numero di accumuli pari a 8.

Per studiare la struttura secondaria dei peptidi in ambienti diversi, sono stati solubilizzati nei seguenti solventi: tampone fosfato acquoso a pH 5, TFE e soluzione acquosa di SDS.

## **3.2 Preparazione delle soluzioni da analizzare mediante CD**

Per analizzare le soluzioni dei peptidi con la tecnica del dicroismo circolare (CD), è stato necessario determinare la loro concentrazione precisa con la spettroscopia UV-VIS. Per ogni peptide è stata preparata una soluzione  $5 \cdot 10^{-4}$  M in TFE, che è stata analizzata con lo spettrofotometro. È stata ricavata

l'assorbanza al massimo di assorbimento (280 nm) e applicato la legge di Lambert-Beer per ricavare la concentrazione reale della soluzione analizzata.

Successivamente, per ogni soluzione, 3 aliquote da 150  $\mu\text{L}$  ciascuna sono state poste in differenti vials. Delle tre soluzioni ottenute per ogni peptide, in due il solvente TFE è stato fatto evaporare sotto flusso di azoto e sostituito rispettivamente con 150  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato pH5 e 150  $\mu\text{L}$  di soluzione di SDS. In seguito si espongono alcune informazioni supplementari sui solventi utilizzati.

- Il tampone acquoso fosfato a pH 5 è stato preparato sciogliendo 0,1273 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 90 mL d'acqua Milli-Q; il pH acido è stato corretto mediante utilizzo di pH-metro, utilizzando NaOH 0,05M fino a pH 5, portando poi a volume di 100 mL con acqua Milli-Q. Questa soluzione è stata preparata per osservare la struttura secondaria dei peptidi in ambiente acquoso. È stato scelto un pH pari a 5 per favorire la protonazione dei gruppi amminici presenti nella sequenza, al fine di rendere i peptidi più solubili in acqua.
- Il sodio dodecil solfato (SDS) è un tensioattivo anionico che forma micelle e mima la superficie delle membrane biologiche, utile per studiare il comportamento dei peptidi in ambiente membrano-mimetico.
- Il trifluoroetano (TFE) è un solvente polare strutturante, che favorisce la formazione delle strutture elicoidali.

Per ognuno dei quattro peptidi analizzati al CD sono state quindi ottenute tre soluzioni, con TFE, SDS e tampone acquoso fosfato a pH5.

### **3.3 Procedura per le degradazioni enzimatiche**

In questo progetto di tesi è stata studiata la resistenza dei derivati di PMAP-36 a chimotripsina e pronasi.

Chimotripsina è una serin-proteasi che catalizza la rottura del legame ammidico in corrispondenza di residui idrofobici, con preferenza per Tyr, Trp, Met, Phe e Leu. Viene prodotta in forma inattiva nel pancreas e attivata nell'intestino tenue, in cui contribuisce alla digestione delle proteine introdotte con l'alimentazione.

Chimotripsina opera attraverso la triade catalitica Ser<sup>195</sup>, His<sup>57</sup> e Asp<sup>102</sup>, grazie alla quale avviene la degradazione del legame peptidico.<sup>31</sup>

Pronasi è una miscela di diverse endo- ed esoproteasi non specifiche, isolata da *Streptomyces griseus*. Degrada peptidi e proteine in diversi siti, portando alla loro digestione in singoli amminoacidi.<sup>32</sup> L'aspecificità della miscela è la caratteristica per cui pronasi è stata scelta per questi test di degradazione enzimatica: si è potuto osservare la resistenza dei peptidi a un unico ambiente con molti enzimi diversi, come potrebbe verificarsi in caso di un'applicazione *in vitro* e *in vivo*.

Per le degradazioni enzimatiche è stata rispettata una procedura standard, per cui si preparano le seguenti soluzioni:

- Buffer per l'enzima pronasi: soluzione 20 mM di TRIS · HCl pH 7,6. La soluzione tampone adatta per l'utilizzo di pronasi si allestisce sciogliendo 0,3152 g di TRIS · HCl e 0,2218 g di CaCl<sub>2</sub> in 90 mL di acqua Milli-Q. Il pH acido viene corretto mediante pH-metro, utilizzando NaOH 1 M fino a pH 7,6; infine si porta a volume di 100 mL con acqua Milli-Q.
- Buffer per l'enzima chimotripsina: soluzione 50 mM di TRIS · HCl pH 7,8. Questa soluzione tampone si prepara sciogliendo 0,7890 g di TRIS · HCl in 90 mL di acqua Milli-Q. Il pH acido viene corretto utilizzando NaOH 1 M fino a pH 7,8, per poi portare al volume di 100 mL con acqua Milli-Q.
- Soluzione stock di peptide: per ogni peptide si dispone una soluzione a concentrazione 5 mg/mL in DMSO.
- Soluzione stock di enzima: si prepara sciogliendo 1 mg di enzima in 1 mL di acqua Milli-Q, per una concentrazione di 1 mg/mL.
- Soluzione work di enzima: si allestisce prelevando 20 µL di soluzione stock di enzima e aggiungendo 380 µL di opportuno buffer, per una concentrazione finale di 0,05 mg/mL, ovvero venti volte più diluita della soluzione stock di enzima.

- Soluzione di reazione: si prepara ponendo in una provetta eppendorf 50  $\mu\text{L}$  di soluzione stock di peptide, 50  $\mu\text{L}$  di soluzione work di enzima e aggiungendo 900  $\mu\text{L}$  di opportuno buffer.
- Soluzione di riferimento del peptide: si prepara ponendo in un'eppendorf 50  $\mu\text{L}$  di soluzione stock di peptide e aggiungendo 950  $\mu\text{L}$  di opportuno buffer. Questa soluzione viene messa a confronto con quella di reazione per verificare che il buffer non abbia la capacità di degradare il peptide.

Per ogni prova di degradazione, le due eppendorf con la soluzione di riferimento del peptide e la soluzione di reazione vengono poste in bagno termostato a 37°C. Si preleva 50  $\mu\text{L}$  della soluzione di reazione ai seguenti tempi.

t=0'	t=5'	t=15'	t=30'	t=45'	t=60'	t=90'	t=2h	t=3h	t=6h	t=24h
------	------	-------	-------	-------	-------	-------	------	------	------	-------

Per la soluzione di riferimento del peptide, i prelievi, di volume 50  $\mu\text{L}$ , vengono eseguiti ai seguenti tempi.

t=0'	t=30'	t=6h
------	-------	------

Il volume prelevato a ogni campionamento viene posto in un'eppendorf con 200  $\mu\text{L}$  di etanolo assoluto, al fine di bloccare l'eventuale reazione di degradazione. Per favorire tale processo, l'eppendorf viene posta in bagno di ghiaccio per almeno 15 minuti. Successivamente, si centrifuga a 13.000 giri/minuto per 5 minuti; il surnatante viene prelevato e posto in una vial per l'analisi HPLC-UV al gradiente di 5-95% B in 20 minuti. Per i profili più interessanti all'HPLC-UV, è stata eseguita anche l'analisi HPLC-MS al gradiente di 5-95% B in 30 minuti: questa consente di rilevare le specie presenti in soluzione. Lo spettro di massa ci consente di associare ad ogni picco del cromatogramma un peso molecolare, rendendo possibile l'identificazione delle specie presenti.



*Figura 14: Materiale per i test di degradazione enzimatica*

### **3.4 Procedura per le degradazioni con siero umano**

Per la procedura di degradazione con il siero umano sono state preparate le seguenti soluzioni.

- Buffer per il siero: soluzione tampone di HEPES 25 mM a pH 7,24. Si pesano 0,5960 g di HEPES e li si sciolgono in 100 mL di acqua milliQ. Il pH inizialmente acido viene regolato con una soluzione di NaOH 1M portandolo a 7,24.
- Soluzione stock di peptide: per ogni peptide si prepara una soluzione a concentrazione 5 mg/ml in DMSO.
- Soluzione di riferimento del peptide: si prelevano 40  $\mu$ L della soluzione stock di peptide e li si aggiungono in un'ependorf contenente 1,25 mL di soluzione di buffer. Questa soluzione di riferimento viene utilizzata per controllare che il buffer non abbia la capacit  di degradare il peptide.
- Soluzione di riferimento: si pesano 0,5 mg del peptide di riferimento XP-1 e li si sciolgono in 100  $\mu$ L di DMSO. Si prelevano 40  $\mu$ L di questa soluzione e li si aggiungono in un'ependorf contenente 1 mL di soluzione di buffer e 250  $\mu$ L di siero umano. Questa soluzione viene utilizzata per verificare l'appropriata capacit  degradativa del siero contro un peptide di cui  

nota la scarsa resistenza: studi precedenti hanno infatti evidenziato che viene completamente degradato entro tre ore.

- Soluzione di reazione: si prelevano 40  $\mu\text{L}$  della soluzione stock di peptide e li si aggiungono in un'ependorf contenente 1 mL di soluzione di buffer e 250  $\mu\text{L}$  di siero umano.

Le eppendorf con la soluzione di riferimento, la soluzione di riferimento del peptide e la soluzione di reazione vengono immerse nel bagno termostato a 37°C. Per la soluzione di riferimento contenente il peptide XP-1 vengono effettuati prelievi a  $t=0'$ ,  $t=30'$  e  $t=3\text{h}$  dall'inizio della reazione, mentre per la soluzione di riferimento del peptide vengono eseguiti i campionamenti a  $t=0'$ ,  $t=30'$  e  $t=6\text{h}$ . Per la soluzione di reazione i prelievi sono stati eseguiti a  $t=0'$ ,  $t=5'$ ,  $t=15'$ ,  $t=30'$ ,  $t=45'$ ,  $t=60'$ ,  $t=90'$ ,  $t=2\text{h}$ ,  $t=3\text{h}$ ,  $t=6\text{h}$  e  $t=24\text{h}$  dall'inizio del test di degradazione. Per ogni campionamento si prelevano 100  $\mu\text{L}$  di soluzione in bagno termostato e li si inseriscono in un'ependorf contenente 200  $\mu\text{L}$  di etanolo assoluto. La soluzione ottenuta viene posta in bagno di ghiaccio per almeno 15 minuti, per favorire la precipitazione delle proteine del siero, e poi centrifugata a 13000 giri/min per 5 minuti. Si preleva il surnatante, che viene analizzato tramite HPLC-UV al gradiente di 5-95% B in 20 minuti. Per i profili più interessanti all'HPLC-UV, è stata eseguita anche l'analisi HPLC-MS al gradiente di 5-95% B in 30 minuti, al fine di determinare con maggior certezza la presenza dei peptidi ai diversi tempi di campionamento.

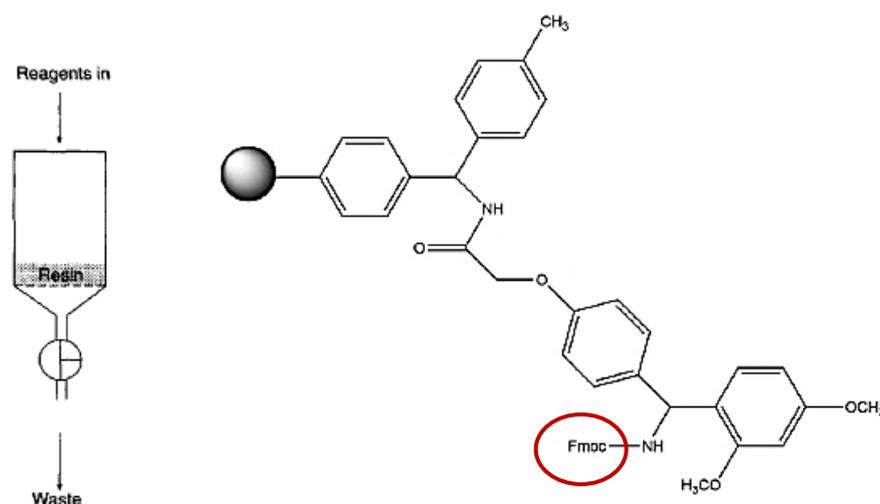
### 3.5 Procedura per la sintesi su fase solida

La sintesi su fase solida (SPPS) è al giorno d'oggi il metodo l'elezione per la preparazione di peptidi in laboratorio, considerando i numerosi vantaggi che comporta rispetto alla sintesi in soluzione. In SPPS tutti gli steps sintetici vengono condotti nello stesso contenitore, senza trasferimento e perdita di materiale, e l'eccesso di reagenti e prodotti collaterali viene allontanato dopo ogni passaggio per semplice filtrazione.<sup>33</sup>

La sintesi è stata eseguita manualmente e prevede l'ancoraggio dell'estremità C-terminale del peptide ad un supporto solido, ovvero la resina Rink Amide MBHA con loading pari a 0,65 mmol/g. Il loading indica le mmol di siti disponibili per l'attacco e la crescita dei peptidi per grammo di resina.

L'allungamento della catena peptidica è un processo *step by step*, poiché ad ogni *coupling* viene aggiunto un singolo amminoacido, al quale seguono numerosi lavaggi per eliminare i sottoprodotti di reazione. La sintesi si svolge all'interno di reattori a forma di siringa forniti di setto poroso, al fine di trattenere la resina su cui cresce il peptide ed eliminare dopo ogni passaggio i reagenti in eccesso, i sottoprodotti e i solventi (*waste*).

In seguito vengono elencate le fasi della sintesi su fase solida.



**Figura 15:** Apparato per la SPPS manuale (a sinistra);  
resina Rink Amide MBHA (a destra)<sup>34</sup>

1. Il primo step viene denominato *swelling*, processo nel quale la resina, precedentemente pesata e posta nella siringa, viene rigonfiata con DMF sotto agitazione meccanica per circa 40 minuti. Lo *swelling* è utile per consentire l'esposizione dei gruppi funzionali amminici della resina.

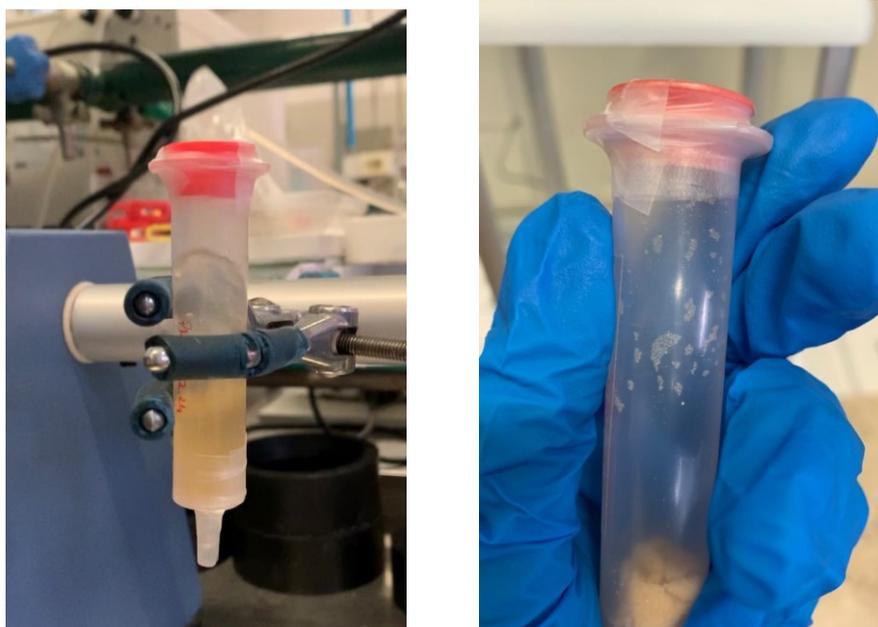
2. Il secondo passaggio consiste nella deprotezione del gruppo amminico della resina, che si trova in commercio protetto con Fmoc, ovvero 9-fluorenilmetossicarbonile. La deprotezione si realizza con una soluzione al 20% di piperidina in DMF, ripetendola due volte, rispettivamente per 5 e 15 minuti.

3. Si procede all'eliminazione dei reagenti in eccesso tramite sei lavaggi con DMF e agitazione meccanica di circa un minuto per ciascuno.

4. Si allestisce la reazione di *coupling*, ovvero l'attacco del primo amminoacido alla resina. La miscela di *coupling* è formata da:

- Fmoc-AA-OH: se ne inseriscono tre equivalenti rispetto al *loading*. Gli amminoacidi si trovano in commercio con una protezione sul gruppo amminico (Fmoc) e quando necessario sulla catena laterale, (Boc, Trt, ter-But...). Grazie alla presenza di opportuni gruppi protettori si evitano reazioni collaterali e si favorisce la reazione tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido e il gruppo amminico sulla resina.
- Attivatore: se ne inseriscono tre equivalenti rispetto al *loading*. Per questa sintesi sono stati utilizzati HOBt/HBTU, inserendo tre equivalenti per ciascuno, oppure HATU. Gli attivatori permettono l'attivazione della funzione carbossilica per formare il legame ammidico.
- DIPEA: se ne inseriscono sei equivalenti rispetto al *loading*. DIPEA è la N, N-diisopropiletilamina, un'ammina terziaria che deprotona l'acido carbossilico e l'ammina che dovranno reagire.
- Solvente: 4 mL di DMF

L'intera soluzione viene trasferita nel reattore, che rimane in agitazione per un'ora.



**Figura 16:** Fase di coupling, con reattore in agitazione (a sinistra); dettaglio dei granelli di resina su cui si forma il peptide (a destra).

5. Successivamente si procede all'eliminazione dei reagenti in eccesso tramite sei lavaggi con DMF e agitazione meccanica di circa un minuto per ciascuno.

6. Si rimuove il gruppo protettore Fmoc utilizzando una soluzione al 20% di piperidina in DMF. Questa reazione si ripete due volte, rispettivamente per 5 e 15 minuti.

7. Per completare lo schema di sintesi, si ripetono i passaggi da (3) a (6).

Per gli amminoacidi ad elevato ingombro sterico, per cui la formazione del legame ammidico è più difficile, si procede ad un doppio *coupling*, ripetendo il punto (4) due volte.

### 3.5.1 Cleavage

Lo sblocco totale o *cleavage* costituisce la fase finale della sintesi su fase solida, in cui, in condizioni fortemente acide, si ha il distacco del peptide dalla resina. Viene realizzato utilizzando una miscela di sblocco composta da TFA/TIS/H<sub>2</sub>O

rispettivamente in percentuale 95%, 2,5%, 2,5%. Questa miscela consente contemporaneamente la rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali e del peptide dalla resina.

Vengono inseriti nel reattore circa 3 mL della miscela di sblocco lasciando reagire per 2 ore e 30 minuti sotto agitazione meccanica. Successivamente la soluzione all'interno del reattore, contenente il peptide libero, viene raccolta in una provetta falcon, in cui il volume viene leggermente ridotto per evaporazione del solvente sotto flusso di azoto. Successivamente nella provetta posta in bagno di ghiaccio, si versa etere dietilico in volume almeno dieci volte superiore alla soluzione già presente, aggiunta che porta alla precipitazione del peptide. Si centrifuga due volte, ciascuna per 10 minuti a 5900 giri/minuto. Con una pipetta Pasteur si elimina il surnatante, si aggiungono alcuni millilitri di Et<sub>2</sub>O e si ripete la centrifugazione. Il surnatante viene eliminato e si pone la provetta in essiccatore per rimuovere le tracce di solvente.

Dopo ogni *cleavage* viene eseguita un'analisi HPLC-MS per verificare che la sintesi sia andata a buon fine, prelevando una piccola quantità di peptide e solubilizzandola in circa 300 µL di metanolo.



**Figura 17:** *Precipitazione del peptide in etere dietilico (a sinistra); fotografia della stessa provetta dopo la centrifugazione (a destra)*

Durante la sintesi sono stati eseguiti dei controlli intermedi, attraverso sblocchi parziali, al fine di verificare il corretto accrescimento della sequenza peptidica.

### 3.5.2 Sblocco parziale

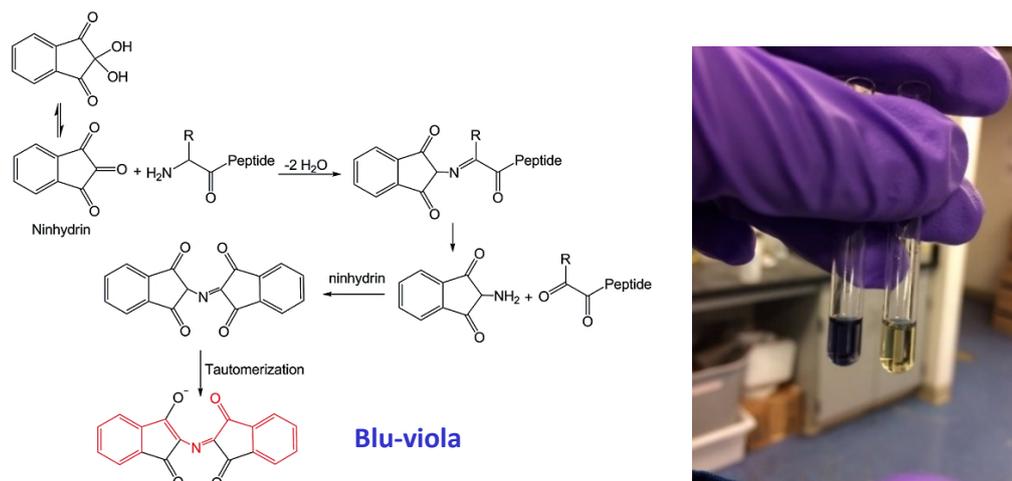
L'analisi è stata eseguita mediante HPLC-MS, seguendo la stessa procedura dello sblocco totale, adoperando volumi di miscela proporzionali ai grammi di resina-peptide pesati. Solitamente sono stati pesati 3-5 mg di resina-peptide e aggiunto 1 mL di miscela di sblocco. La reazione di cleavage viene condotta per 1 ora e 30 minuti.

### 3.5.3 Kaiser test

Il test di Kaiser è un'analisi qualitativa che consente di individuare la presenza di ammine libere. Nella SPPS è utile perché la rilevazione delle ammine indica se lo step di *coupling* è avvenuto in modo corretto e completo.

Si preleva qualche granellino di resina, con il peptide legato, e li si pone in un piccolo reattore, dove vengono seccati con più lavaggi con DCM. Successivamente, i granelli vengono spostati in una piccola provetta.

Si aggiungono i reagenti: 20  $\mu$ L di fenolo, 20  $\mu$ L di ninidrina e 20  $\mu$ L di potassio cianuro. Si scalda la provetta con un flusso d'aria calda: la colorazione blu-viola dei granelli indica la presenza di ammine primarie, altrimenti rimane giallo pallido. Se dopo un *coupling* il risultato del Kaiser test è blu-viola, significa che la reazione non è completa per tutti i siti di accrescimento dei peptidi; sarà dunque necessario ripetere il *coupling*.



**Figura 18:** Reazione del Kaiser test in presenza di un'ammina primaria<sup>35</sup> (a sinistra); Confronto tra Kaiser test positivo e negativo (a destra).

### 3.6 Sintesi di [U<sup>21</sup>] -PMAP (12-24)

Utilizzando la procedura precedentemente espressa, è stato sintetizzato il seguente peptide, per cui sono riportati in tabella 3 i dati importanti per l'esecuzione della sintesi manuale.

Resina	Rink Amide MBHA												
Loading (mmol/g)	0,65												
Peso resina (mg)	300												
	N-term											C-term	
Sequenza AA	K	R	L	K	K	I	G	K	V	U	K	W	I
Amminoacidi (AA)	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Gly-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Val-OH	Fmoc-Aib-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Trp(Boc)-OH	Fmoc-Ile-OH
Eq. AA	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Massa AA (mg)	274.07	379.55	206.74	274.07	274.07	206.74	173.92	274.07	198.55	190.36	274.07	308.06	206.74
Attivatore 1	HBTU	HBTU	HBTU	HBTU	HBTU	HBTU	HBTU	HBTU	HATU	HATU	HBTU	HBTU	HBTU
Eq. attivatore 1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Massa attivatore 1 (mg)	221.9	221.9	221.9	221.9	221.9	221.9	221.9	221.9	222.4	222.4	221.9	221.9	221.9
Attivatore 2	HOBt	HOBt	HOBt	HOBt	HOBt	HOBt	HOBt	HOBt			HOBt	HOBt	HOBt
Eq. attivatore 2	3	3	3	3	3	3	3	3			3	3	3
Massa attivatore 2 (mg)	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6	89.6			89.6	89.6	89.6
Base	DIPEA	DIPEA	DIPEA	DIPEA	DIPEA	DIPEA	DIPEA	DIPEA	DIPEA	DIPEA	DIPEA	DIPEA	DIPEA
Eq. base	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Volume base (µL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

**Tabella 3:** Informazioni e reagenti per la sintesi di [U<sup>21</sup>] -PMAP (12-24)

Terminata la sintesi di [U<sup>21</sup>] - PMAP (12-24), la resina con legati i peptidi è stata divisa in tre parti: la prima è stata acetilata, la seconda acilata con acido palmitico, alla terza è stata legata una cisteina.

### 3.6.1 Sintesi di Ac - [U<sup>21</sup>] - PMAP (12-24)

Conclusa la sintesi di [U<sup>21</sup>] - PMAP (12-24) sulla resina, un terzo (176,5 mg) è stato trasferito in un altro reattore e acetilato. La reazione è stata realizzata preparando una soluzione con 475 µL di Ac<sub>2</sub>O e 225 µL di DIPEA, portati a volume pari a 10 mL con DMF. Di questa miscela sono stati aggiunti 2 mL nel reattore e si è lasciato reagire per un'ora sotto agitazione meccanica. L'acetilazione è stata ripetuta un'altra volta con lo stesso procedimento; infine sono stati eseguiti sei lavaggi con DMF. Successivamente è stato eseguito il *cleavage* dalla resina: la massa del peptide ottenuto è pari a 48 mg, con una resa di sintesi del 45,5%.

### 3.6.2 Sintesi di Palm - [U<sup>21</sup>] - PMAP (12-24)

La seconda frazione (176,5 mg) è stata trasferita in un altro reattore, per procedere al *coupling* con l'acido palmitico.

Residuo	Equivalenti del residuo	Quantità del residuo (mg)	Equivalenti HBTU	Massa HBTU (mg)	Equivalenti HOBt	Massa HOBt (mg)	Equivalenti base	Volume DIPEA (µL)
C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	3	49,9	3	73,9	3	29,9	6	66

**Tabella 4:** Informazioni e reagenti per l'acilazione di [U<sup>21</sup>] - PMAP (12-24)

La miscela, preparata secondo quanto indicato in tabella 4 e diluita con un'opportuna quantità di DMF, è stata inserita nel reattore, rimasto in agitazione per 3 ore e 30 minuti. Il *coupling* è stato ripetuto, facendo defluire la prima miscela e inserendone una nuova con la stessa composizione. Vista la difficoltà di attacco dell'acido palmitico, causata dal suo ingombro sterico, il secondo *coupling* si è protratto per tutta la notte (*overnight coupling*). Successivamente sono stati eseguiti sei lavaggi con DMF.

Infine è stato eseguito il *cleavage* dalla resina: la massa del peptide ottenuto è pari a 55 mg, con una resa di sintesi del 46,5 %.

### 3.6.3 Sintesi di Cys - [U<sup>21</sup>] - PMAP (12-24)

È stato scelto di procedere con questa reazione per consentire in un secondo momento il legame a una superficie di cotone funzionalizzato, in relazione ad un progetto parallelo che riguarda lo studio dei tessuti antimicrobici e di cui si occupa il gruppo di ricerca.

La terza frazione essiccata (171,7 mg) è stata rigonfiata con DMF per 40 minuti sotto agitazione meccanica, per poi procedere al *coupling* con Boc-Cys(Trt)-OH

Residuo	Equivalenti del residuo	Quantità del residuo	Equivalenti HBTU	Massa HBTU (mg)	Equivalenti HOBt	Massa HOBt (mg)	Equivalenti base	Volume DIPEA (μL)
Boc-Cys(Trt)-OH	3	87,8	3	71,9	3	29,0	6	64

**Tabella 5:** Informazioni e reagenti per il *coupling* con Boc-Cys(Trt)-OH

La miscela, preparata secondo quanto indicato in tabella 5 e diluita con un'opportuna quantità di DMF, è stata inserita nel reattore, mantenuto in agitazione meccanica per un'ora. Il *coupling* è stato ripetuto, togliendo la prima miscela e inserendone una nuova con la stessa composizione, lasciando in agitazione per un'ora. Dopo sei lavaggi con DMF, è stato eseguito il *cleavage* dalla resina: la massa del peptide ottenuto è pari a 4,4 mg, con una resa di sintesi del 4,3 %. (la bassa resa è dovuta a un incidente accaduto in fase di *cleavage*, che ha portato alla perdita della maggior parte del prodotto).

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è individuare gli analoghi della catelicidina naturale PMAP-36, in grado di resistere nell'ambiente cellulare. Per condurre tale indagine, i peptidi indicati nell'elenco sottostante sono stati testati in presenza di chimotripsina, pronasi e, alcuni di questi, in siero umano. I risultati ottenuti sono in seguito presentati e discussi.

- **Pep1: Ac - PMAP (12-31)**  
Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Pro-Pro-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>
- **Pep2: Ac - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**  
Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>
- **Pep3: Ac - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31) - Aun**  
Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-Aun<sup>32</sup>-NH<sub>2</sub>
- **Pep4: Lau - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**  
Lau-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>
- **Pep5: Oct- [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**  
Oct-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>
- **Pep6: Palm - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**  
Palm-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>
- **Pep7: Ac-[K<sup>12</sup>(Palm), A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**  
Ac-Lys<sup>12</sup>(Palm)-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>
- **Pep8: Ac - [U<sup>14</sup>, A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)**

Ac-Lys-Arg-Aib<sup>14</sup>-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>

- **Pep9: Ac-PMAP (12-24)**

Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-NH<sub>2</sub>

- **Pep9a: Ac-[U<sup>21</sup>] -PMAP (12-24)**

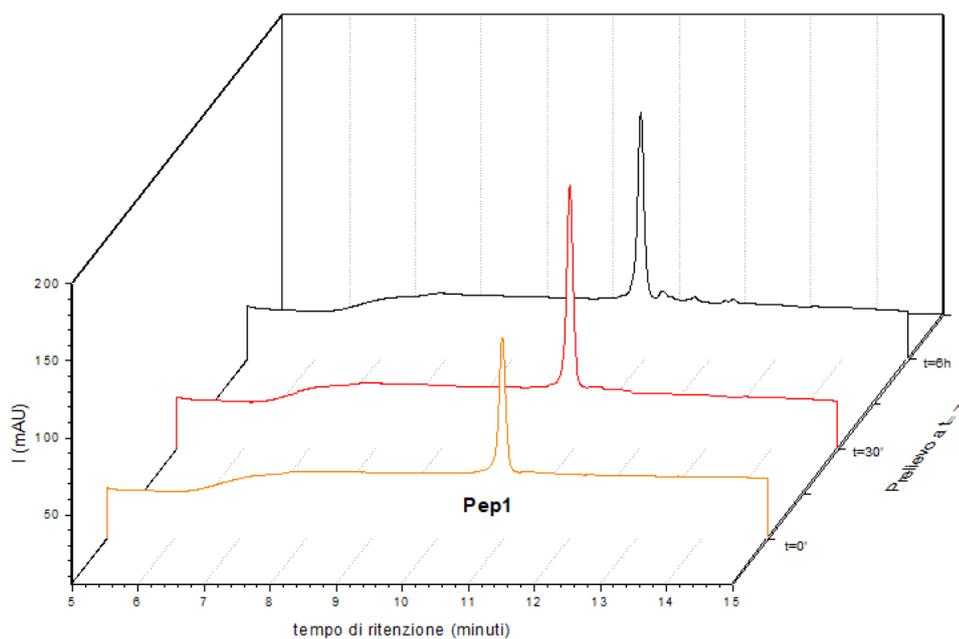
Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Aib<sup>21</sup>-Lys-Trp-Ile-NH<sub>2</sub>

- **Pep9b: Palm-[U<sup>21</sup>] -PMAP (12-24)**

Palm-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Aib<sup>21</sup>-Lys-Trp-Ile-NH<sub>2</sub>

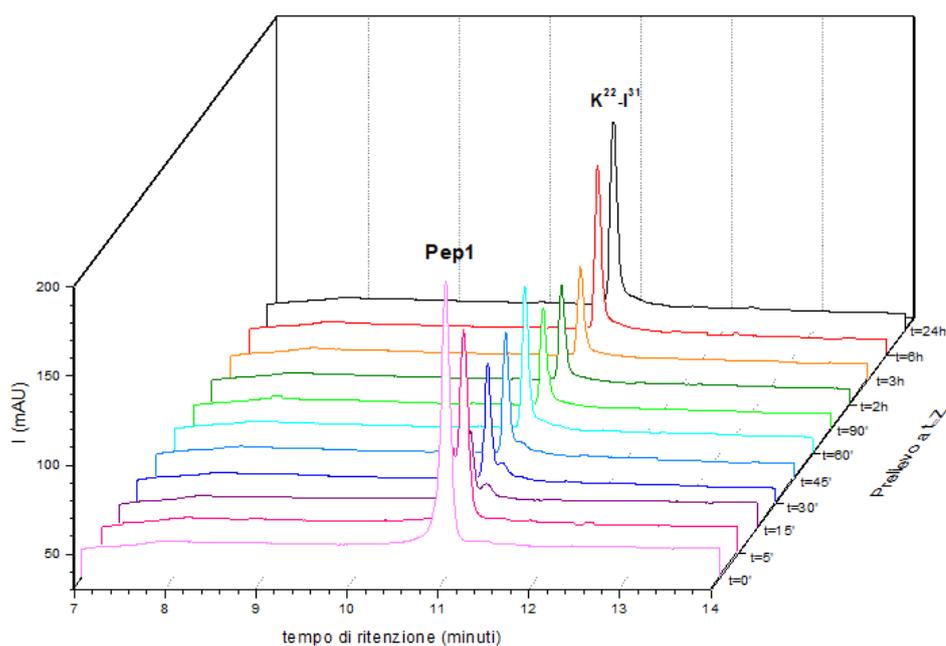
## 4.1 Degradazione di Pep1: Ac - PMAP (12-31)

### 4.1.1 Test con chimotripsina



**Figura 19:** Profili HPLC di Pep1 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

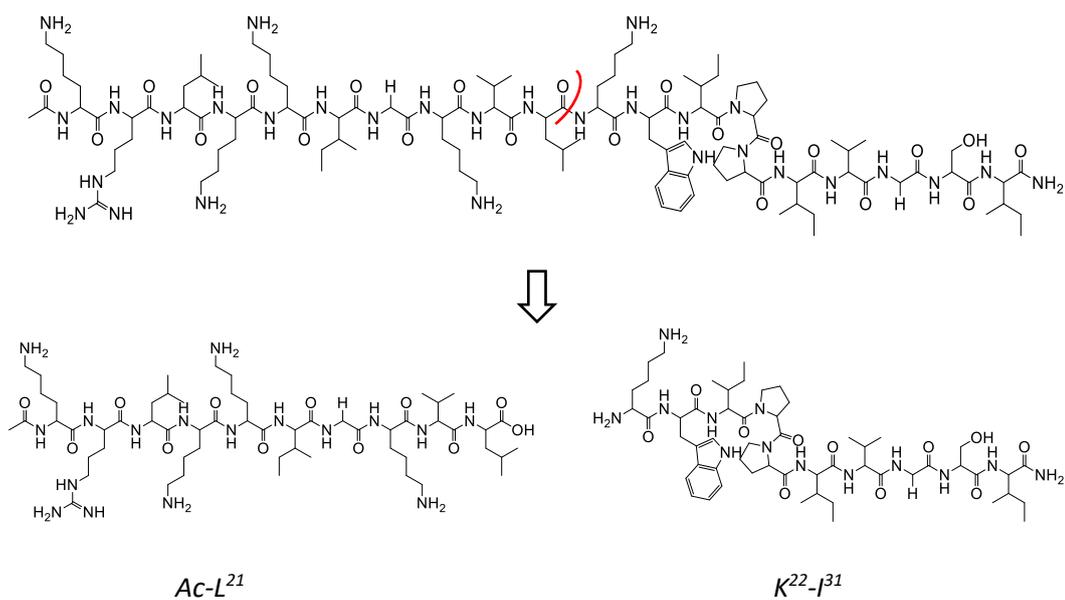
Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=10,99'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada il peptide.



**Figura 20:** Profili HPLC di Pep1 in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

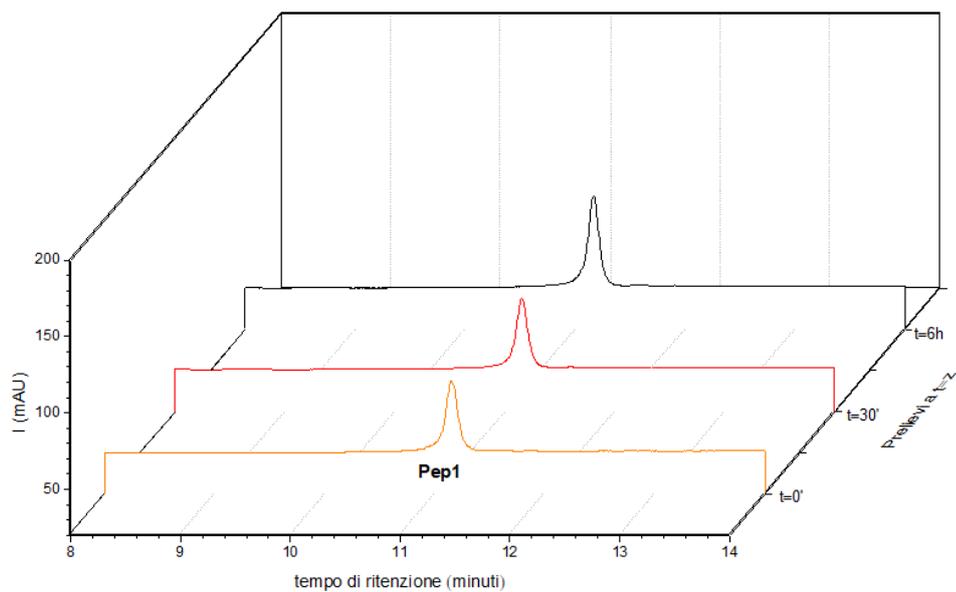
All'inizio dell'esperimento ( $t=0'$ ) si rileva un unico picco a  $t_r=10,99'$  attribuito a **Pep1** grazie all'HPLC-MS (PM del peptide 2314,9 g/mol).

Dopo cinque minuti dall'inizio dell'esperimento ( $t=5'$ ), si rileva ancora il segnale del peptide all'HPLC-UV anche se con un picco meno intenso. Cresce un segnale a  $t_r=10,83'$  attribuito, grazie all'utilizzo dell'HPLC-MS, al frammento  $K^{22}-I^{31}$ . Dopo sei ore dall'inizio della reazione ( $t=6h$ ), si rileva a  $t_r=10,83'$  il frammento già attribuito a  $K^{22}-I^{31}$ , che si afferma come specie più abbondante. Si può pertanto affermare che il legame ammidico tra  $L^{21}$  e  $K^{22}$  è il sito di taglio favorito dell'enzima chimotripsina su **Pep1**. Il sito di taglio viene rappresentato in figura 21.



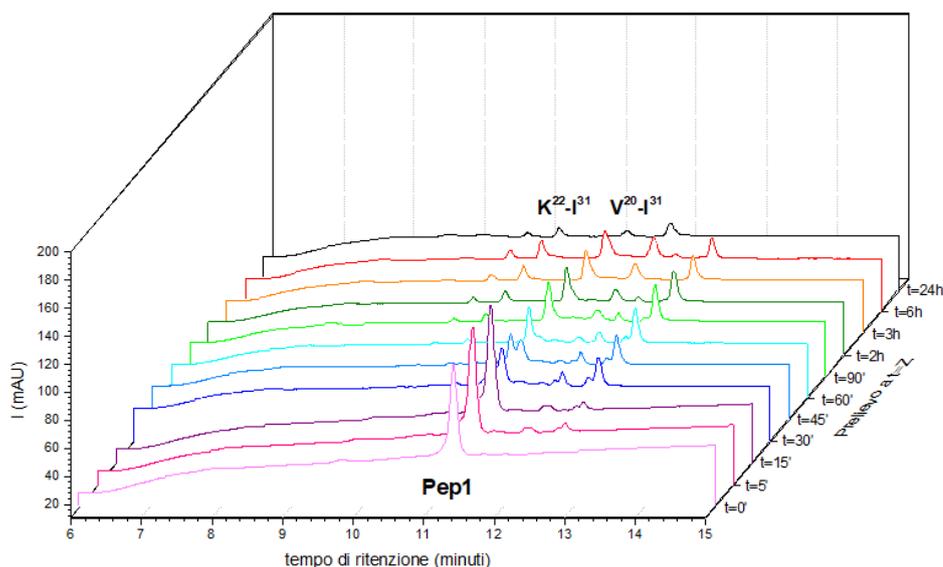
**Figura 21:** Rappresentazione del sito di taglio di chimotripsina sul peptide Pep1

#### 4.1.2 Test con pronasi



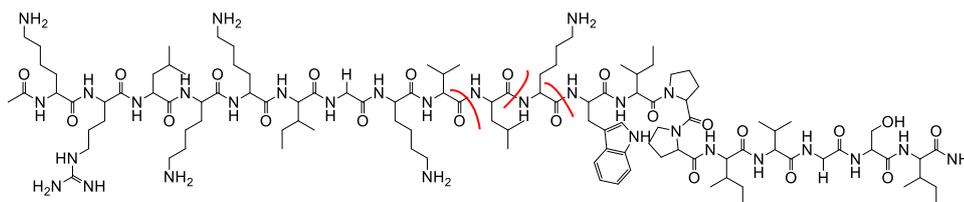
**Figura 22:** Profili HPLC di Pep1 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=11,06'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada **Pep1**.



**Figura 23:** Profili HPLC di **Pep1** in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

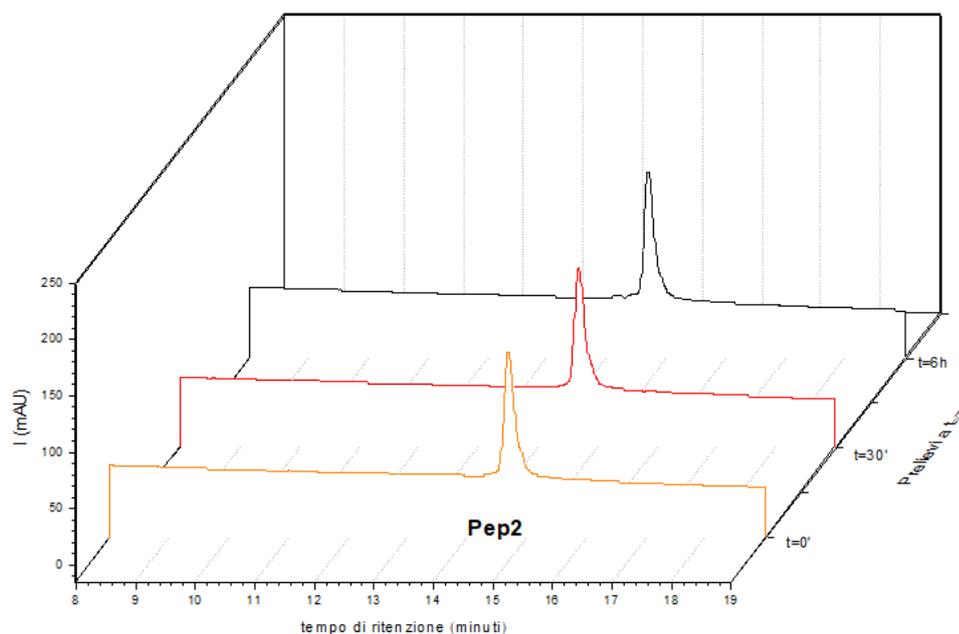
All'inizio dell'esperimento ( $t=0'$ ), si rileva un picco a  $t_r=11,06'$  attribuito, grazie all'utilizzo dell'HPLC-MS, al peptide **Pep1**. Dopo un quarto d'ora ( $t=15'$ ), **Pep1** è ancora rilevabile all'analisi HPLC-UV e il suo segnale è molto vicino al picco intenso a  $t_r=11,30'$  associato, grazie all'HPLC-MS, al frammento  $V^{20}-I^{31}$ . Al prelievo eseguito dopo sei ore dall'inizio della reazione ( $t=6h$ ), si osservano gli stessi picchi già presenti nel campionamento a  $t=15'$ ; inoltre, si osserva un piccolo segnale a  $t_r=10,19'$ , attribuito al frammento  $K^{22}-I^{31}$ . Dopo 24 ore ( $t=24h$ ), si osservano all'HPLC-UV segnali molto piccoli, attribuibili a frammenti di basso peso molecolare difficilmente identificabili. Rimangono visibili i segnali a  $t_r=10,19'$  già attribuito a  $K^{22}-I^{31}$  e a  $t_r=11,30'$ , associato a  $V^{20}-I^{31}$ .



**Figura 24:** Rappresentazione dei possibili siti di taglio di pronasi su Pep1

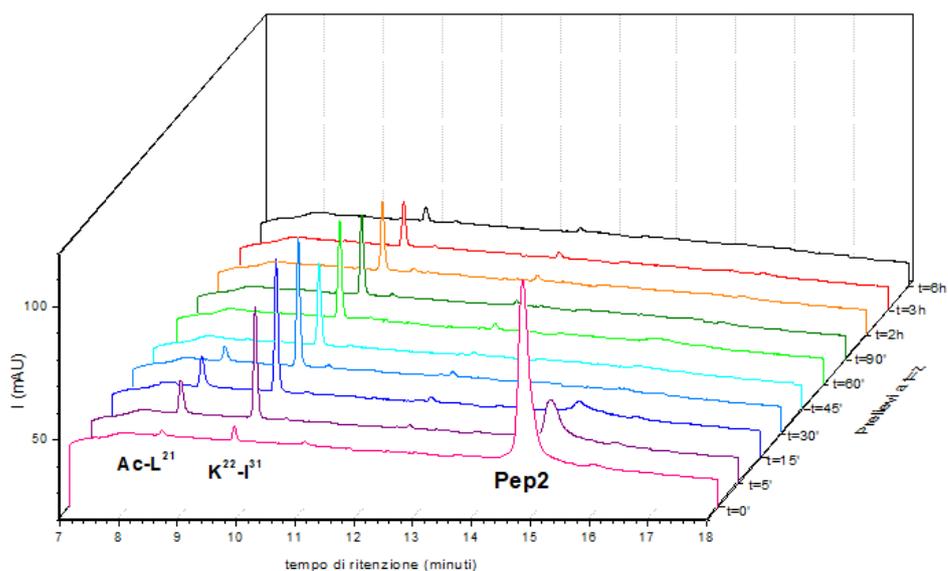
## 4.2 Degradazione di Pep2: Ac - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)

### 4.2.1 Test con chimotripsina



**Figura 25:** Profili HPLC di Pep2 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=14,71'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada **Pep2**.

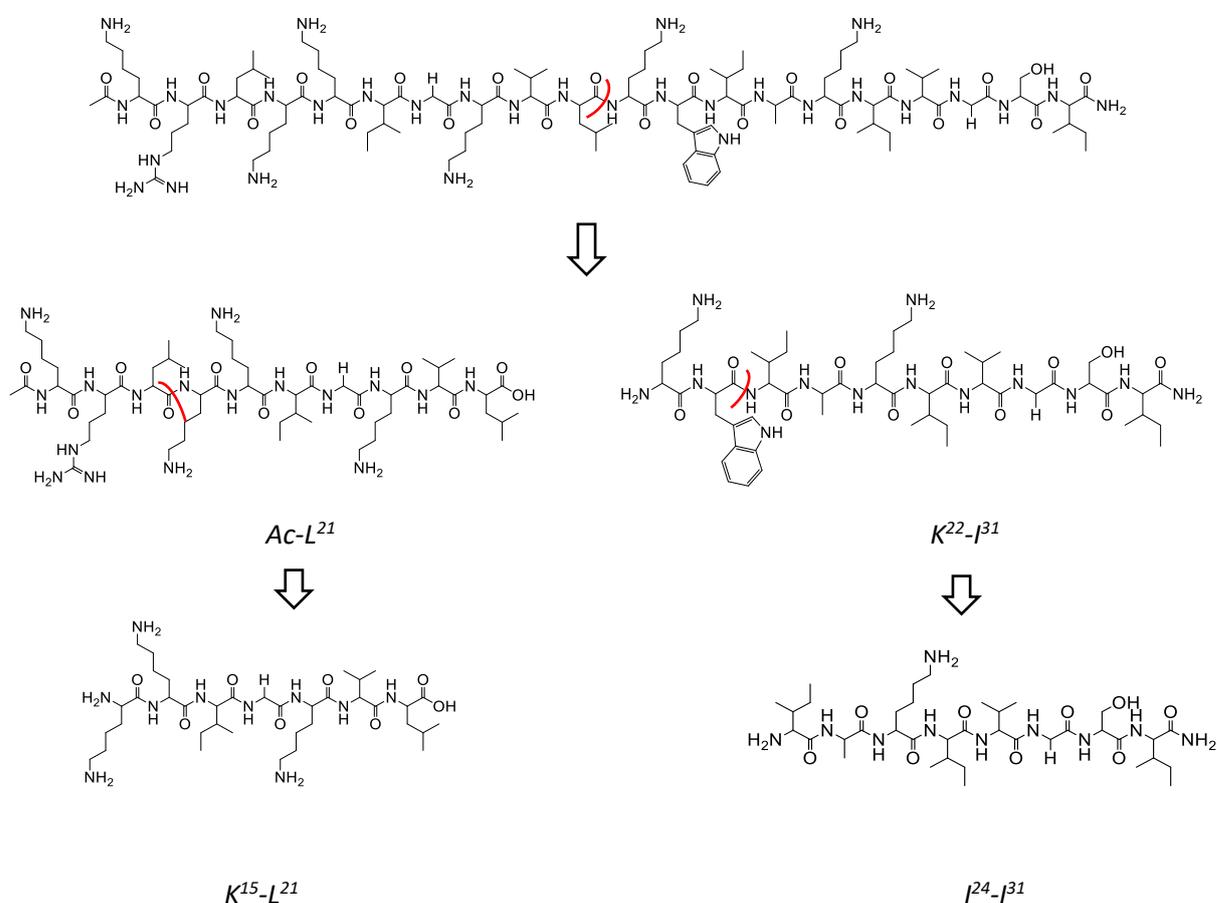


**Figura 26:** Profili HPLC di Pep2 in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

All'inizio dell'esperimento ( $t=0'$ ), si osserva un picco a  $t_r=14,71'$ , attribuito grazie all'analisi HPLC-MS a **Pep2** (PM del peptide 2320,0 g/mol). Già in questo prelievo iniziale si nota un piccolo segnale a  $t_r=9,79'$ . Analizzando il campione con l'HPLC-MS, si è evidenziato che la specie che esce a questo tempo di ritenzione è il frammento  $K^{22}-I^{31}$ , indicando che il taglio eseguito da chimotripsina tra  $L^{21}$  e  $K^{22}$  è immediato.

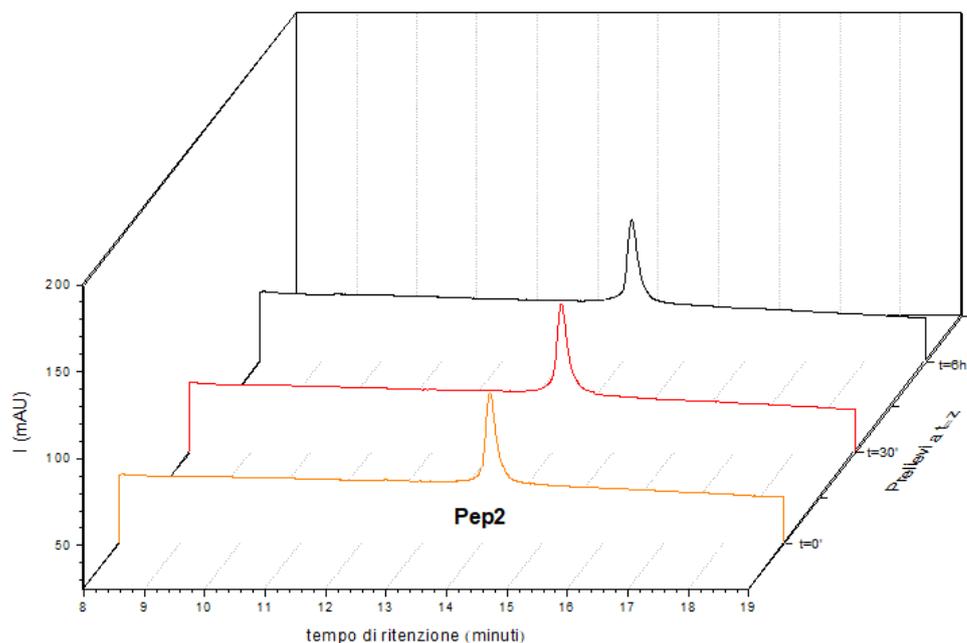
Tra  $t=0'$  e  $t=30'$  il segnale associato a **Pep2** cala drasticamente e aumenta in modo rapido quello attribuito a  $K^{22}-I^{31}$ . Dopo mezz'ora dall'inizio dell'esperimento ( $t=30'$ ), il segnale del peptide è completamente scomparso, mentre è ancora presente nel campionamento a  $t=5'$ . A  $t=30'$  il segnale più importante risulta essere a  $t_r=9,79'$ , attribuito alla specie  $K^{22}-I^{31}$ . Da  $t=0'$  a  $t=30'$  è cresciuto anche un picco a  $t_r=8,54'$ . Analizzando il campione all'HPLC-MS, questo segnale è stato associato alla specie  $Ac-L^{21}$ . Dunque, chimotripsina spezza rapidamente il peptide tra  $L^{21}$  e  $K^{22}$  e si generano i due frammenti relativi a questo taglio. Dall'osservazione dei cromatogrammi in scala, si evidenzia che  $K^{22}-I^{31}$  ha una buona resistenza nel tempo, tanto che si rileva anche ai prelievi successivi. Al contrario  $Ac-L^{21}$  non si trova più dopo un'ora dall'inizio

dell'esperimento e ciò suggerisce che chimotripsina lo degrada ulteriormente in frammenti più piccoli. Dopo sei ore dall'inizio della degradazione ( $t=6h$ ), continua a evidenziarsi il segnale relativo a  $K^{22}-I^{31}$  anche se decisamente inferiore rispetto ai prelievi precedenti. Analizzando il campione all'HPLC-MS è stato possibile evidenziare dei frammenti scarsamente visibili nel cromatogramma fornito dall'HPLC-UV. In particolare, lo spettrometro di massa è stato in grado di rilevare i frammenti  $K^{15}-L^{21}$  e  $I^{24}-I^{31}$ , di cui quest'ultimo è quantitativamente in prevalenza.



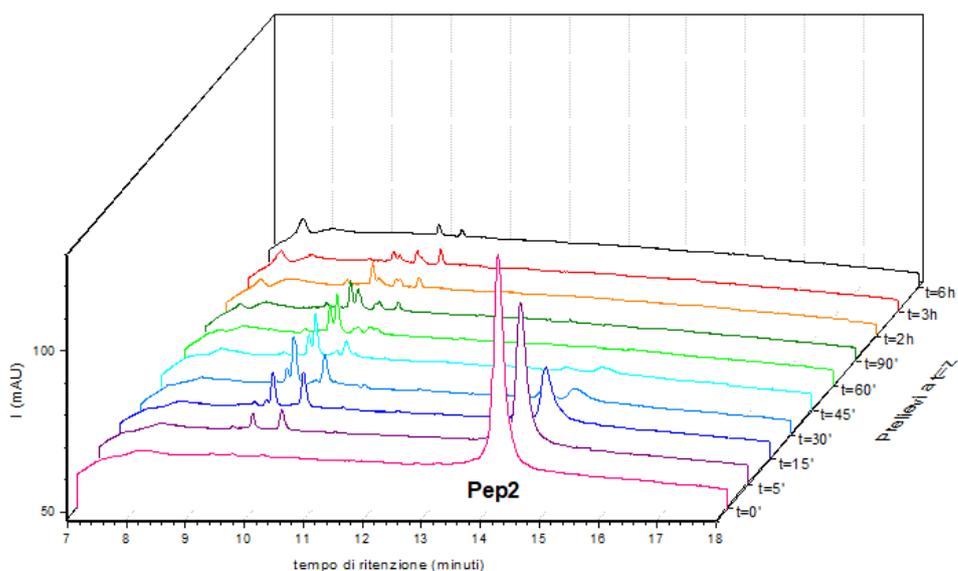
**Figura 27:** Rappresentazione degli step di taglio operati da chimotripsina su Pep2

#### 4.2.2 Test con pronasi



**Figura 28:** Profili HPLC di Pep2 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=14,13'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada il peptide.

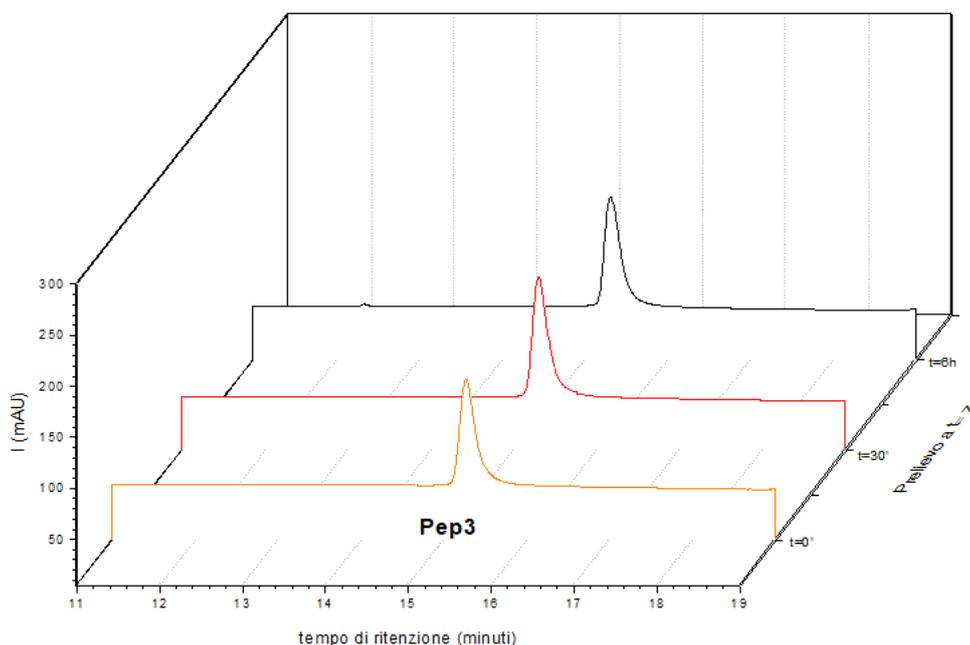


**Figura 29:** Profili HPLC di Pep2 in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

All'inizio dell'esperimento ( $t=0'$ ), l'unico segnale presente nel cromatogramma HPLC-UV si trova a  $t_r=14,13'$  e, grazie all'analisi HPLC-MS, è stato attribuito a **Pep2**. Analizzando il campionamento a  $t=30'$ , all'HPLC-UV non si rileva più il segnale attribuito al peptide, mentre si osservano tre piccoli segnali a  $t_r=9,46'$ ,  $t_r=9,59'$  e  $t_r=10,10'$ . Nell'analisi HPLC-MS si osservano i seguenti pesi molecolari: PM 1212,7 g/mol, che potrebbe essere  $L^{14}-W^{23}$  oppure  $K^{15}-I^{24}$ , e PM 1538,9 g/mol, che è stato attribuito ad  $Ac-W^{23}$ . Dopo tre ore dall'inizio della reazione ( $t=3h$ ), *pronasi* ha degradato il peptide in frammenti scarsamente rilevabili e identificabili sia all'HPLC-UV che all'HPLC-MS.

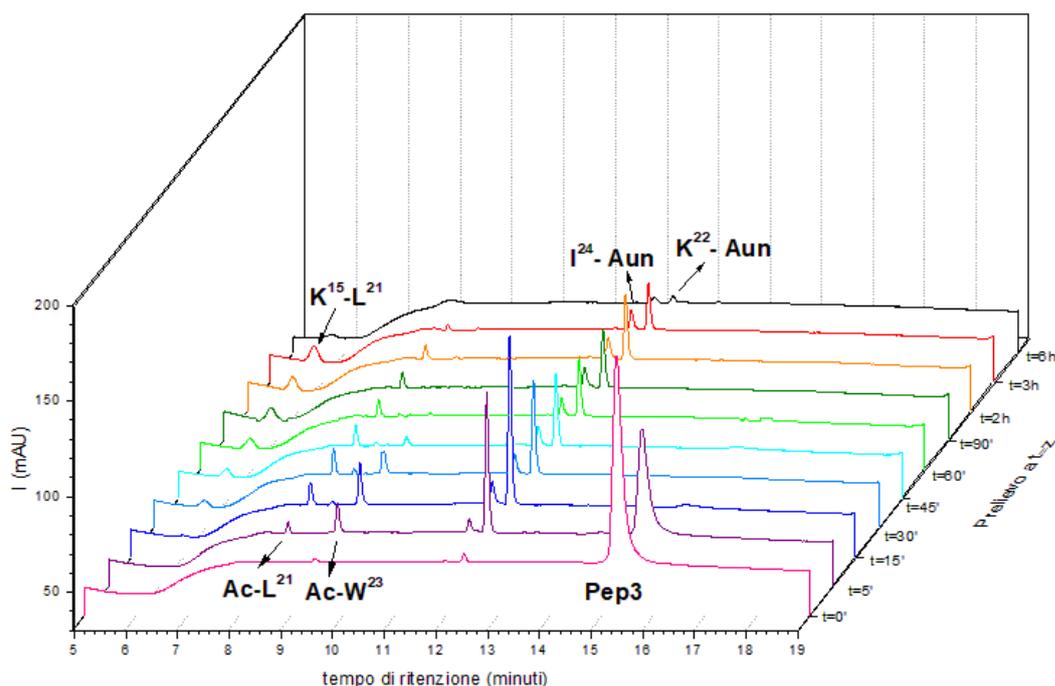
### 4.3 Degradazione di Pep3: Ac - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31) - Aun

#### 4.3.1 Test con chimotripsina



**Figura 30:** Profili HPLC di Pep3 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=15,28'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada **Pep3**.



**Figura 31:** Profili HPLC di Pep3 in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

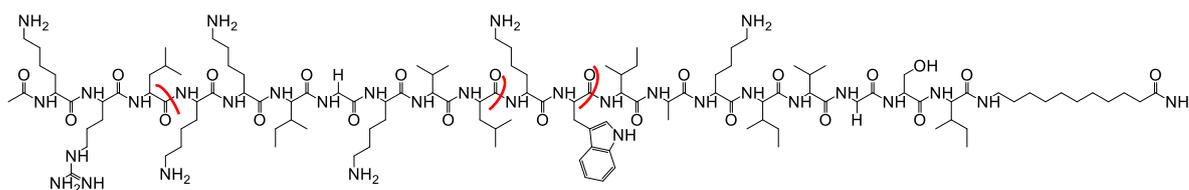
All'inizio dell'esperimento ( $t=0'$ ), si nota un picco a  $t_r=15,28'$  attribuito, grazie all'analisi HPLC-MS, a **Pep3** (PM del peptide 2503,3 g/mol). Inoltre, si osserva un piccolo segnale a  $t_r=12,33'$ , che è stato associato a  $K^{22}$ -Aun. La rilevazione di questo frammento già al prelievo iniziale, indica che il taglio operato da chimotripsina tra  $L^{21}$  e  $K^{22}$  è immediato. All'analisi del campionamento a  $t=15'$ , non si osserva più il picco relativo al peptide integro, mentre si notano quattro segnali, identificati grazie all'utilizzo di HPLC-MS:

- $t_r=8,46'$ : Ac- $L^{21}$  (PM 1224,6 g/mol)
- $t_r=9,43'$ : Ac- $W^{23}$  (PM 1539,0 g/mol)
- $t_r=11,98'$ :  $I^{24}$ -Aun (PM 982,3 g/mol)
- $t_r=12,33'$ :  $K^{22}$ -Aun (PM 1296,7 g/mol)

Questi risultati consentono di identificare il legame ammidico  $W^{23} - I^{24}$  come un altro importante sito di taglio di chimotripsina su **Pep3**. Nel cromatogramma relativo al campionamento a  $t=2h$ , non si evidenzia più il segnale a  $t_r=9,43'$ ,

mentre permane quello a  $t_r=8,46'$ . Continuano a essere presenti, seppur con intensità calante, i segnali a  $t_r=11,98'$  e a  $t_r=12,33'$ . Si rende evidente un nuovo segnale a  $t_r=5,73'$ , associato grazie all'HPLC-MS al frammento  $K^{15}-L^{21}$ .

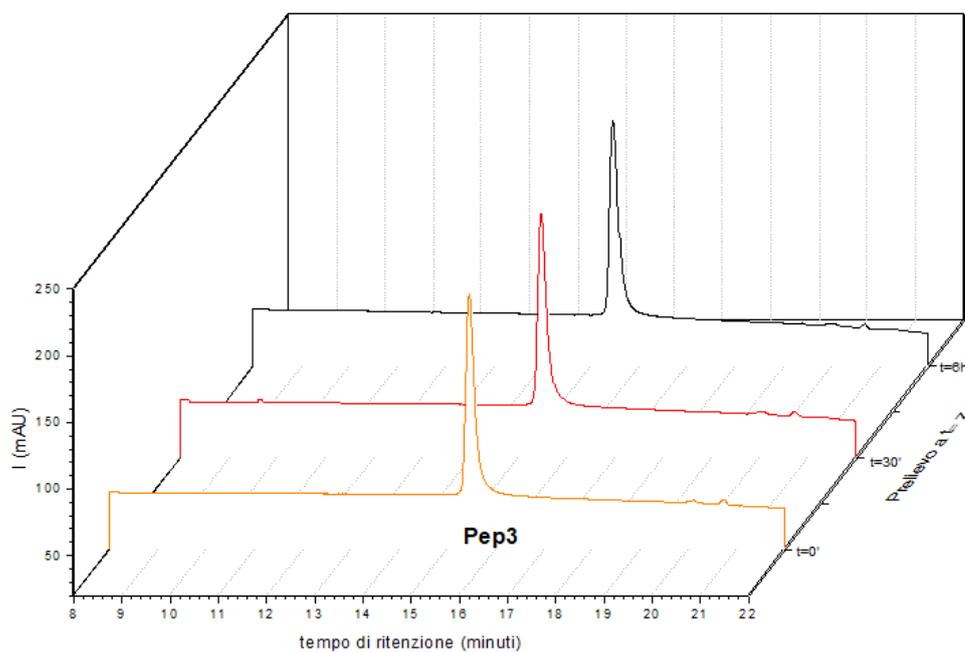
Dopo sei ore dall'inizio della reazione ( $t=6h$ ), si osservano i segnali a  $t_r=5,73'$ ,  $t_r=11,98'$  e  $t_r=12,33'$ , già associati rispettivamente a  $K^{15}-L^{21}$ ,  $I^{24}-Aun$ ,  $K^{22}-Aun$ , anche se con intensità decisamente minore rispetto ai campionamenti precedenti.



**Figura 32:** Rappresentazione dei siti di taglio di chimotripsina sul peptide Pep3

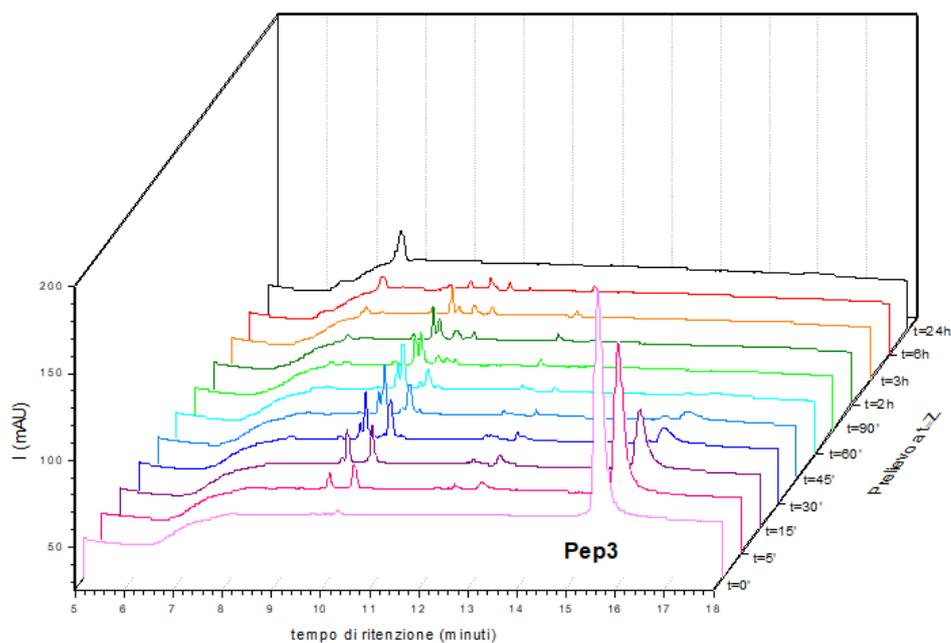
Come rappresentato in figura 32, chimotripsina degrada **Pep3** tagliando il peptide a livello di siti già osservati in altre degradazioni con lo stesso enzima, in particolare tra  $L^{21}$  e  $K^{22}$  in modo immediato, tra  $W^{23}$  e  $I^{24}$  e tra  $L^{14}$  e  $K^{15}$  successivamente.

### 4.3.2 Test con pronasi



**Figura 33:** Profili HPLC di Pep3 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=15,47'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada **Pep3**.



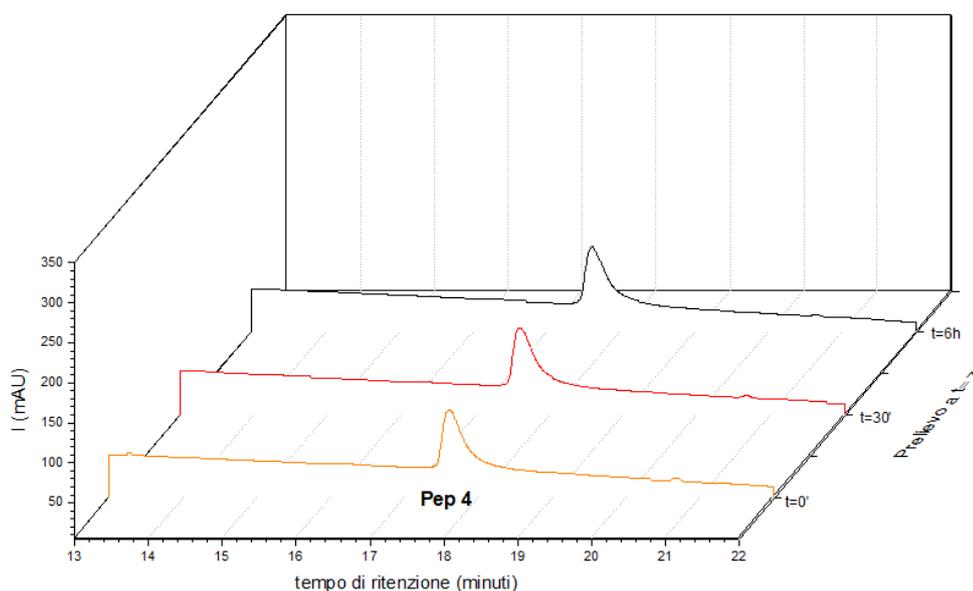
**Figura 34:** Profili HPLC di Pep3 in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

All'inizio dell'esperimento ( $t=0'$ ), si può osservare all'HPLC-UV un segnale a  $t_r=15,47'$  attribuito, grazie all'HPLC-MS, a **Pep3**. Dopo mezz'ora ( $t=30'$ ), il peptide è ancora rilevabile con un debole segnale all'HPLC-UV e si sono formati numerosi piccoli frammenti, che escono ai seguenti tempi di ritenzione:  $t_r=8,07'$ ,  $t_r=9,10'$ ,  $t_r=9,62'$ ,  $t_r=10,12'$ ,  $t_r=12,18'$ ,  $t_r=12,71'$ ,  $t_r=15,17'$ . All'analisi HPLC-MS sono stati rilevati i seguenti pesi molecolari: PM 1212,7 g/mol, che potrebbe corrispondere a  $L^{14}-W^{23}$  oppure  $K^{15}-I^{24}$ , e PM 1538,9 g/mol, attribuito ad  $Ac-W^{23}$ .

Dopo sei ore dall'inizio della reazione ( $t=6h$ ), non c'è traccia del peptide intero all'HPLC-UV. Come si nota dal cromatogramma, i segnali sono ancora più numerosi e meno intensi dei precedenti, a indicare che pronasi dà luogo a una fine degradazione, generando frammenti a basso peso molecolare.

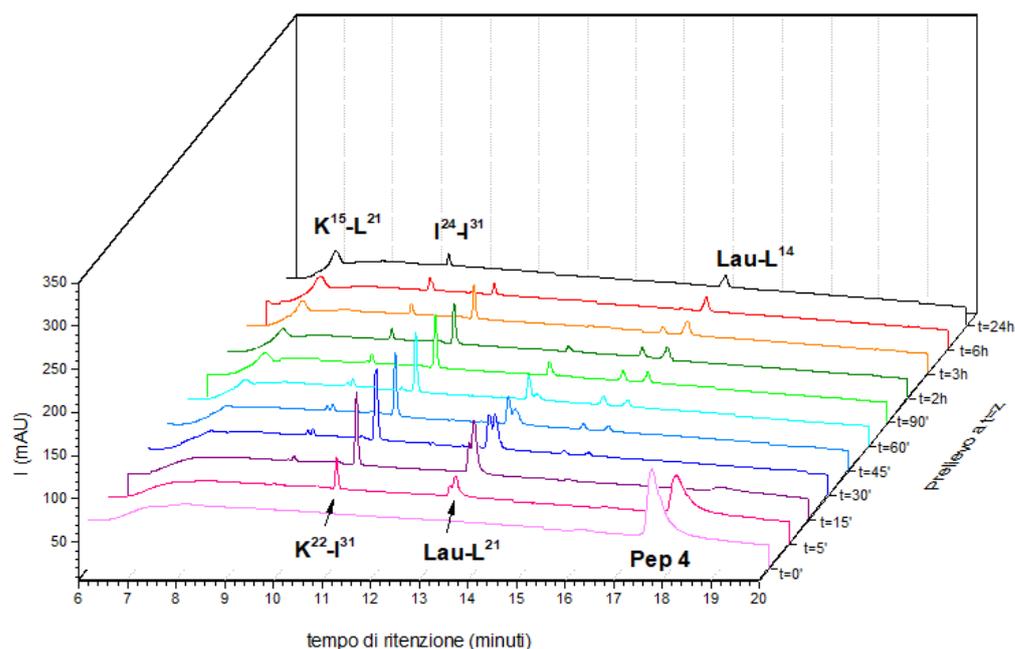
#### 4.4 Degradazione di Pep4: Lau - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)

##### 4.4.1 Test con chimotripsina



**Figura 35:** Profili HPLC di Pep4 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=17,59'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada **Pep4**.



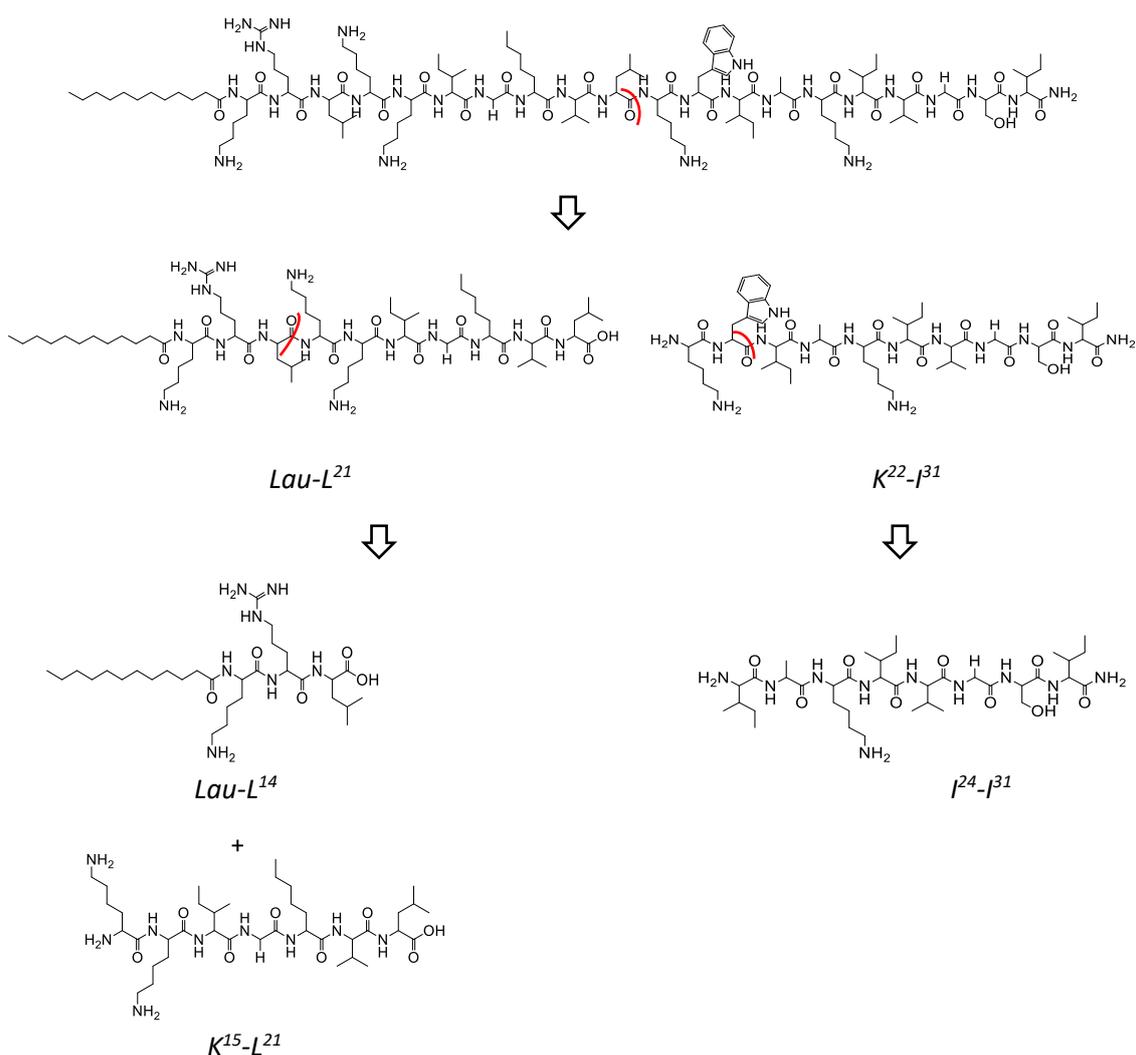
**Figura 36:** Profili HPLC di Pep4 in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

Analizzando all'HPLC-UV il campione prelevato a  $t=0'$ , è possibile osservare un segnale a  $t_r=17,59'$  associato a **Pep4** grazie all'analisi HPLC-MS (PM del peptide 2459,9 g/mol). Dopo cinque minuti ( $t=5'$ ), all'HPLC-UV si nota anche un piccolo segnale a  $t_r=10,70'$  attribuito al frammento  $K^{22}-I^{31}$ . Si evidenzia quindi che la scissione operata da chimotripsina su **Pep4** tra  $L^{21}$  e  $K^{22}$  è molto veloce. Nel primo quarto d'ora il segnale del peptide **Pep4** cala drasticamente, tanto che a  $t=30'$  non è più rilevato. Analizzando questo prelievo all'HPLC-UV si osserva, rafforzato rispetto a  $t=0'$  e come segnale prevalente, il picco a  $t_r=10,70'$  già attribuito al frammento  $K^{22}-I^{31}$ . Inoltre, si osservano anche i seguenti segnali a cui è stato attribuito un significato grazie all'analisi HPLC-MS:

- $t_r=13,14'$ : Lau- $L^{21}$  (PM 1364,5 g/mol)
- $t_r=15,00'$ : Lau- $L^{14}$  (PM 597,5 g/mol)
- $t_r=9,41'$ :  $I^{24}-I^{31}$  (PM 799,0 g/mol)

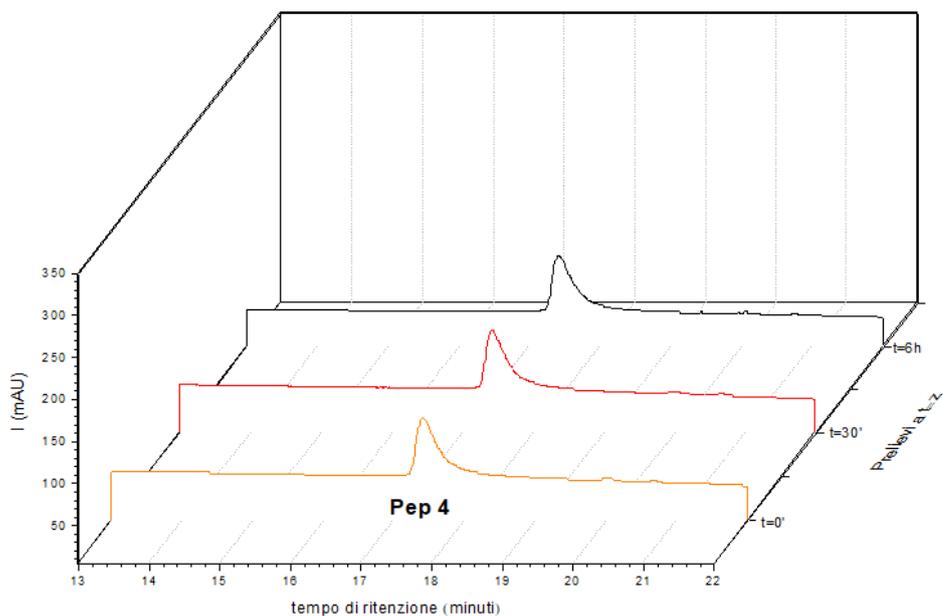
Dopo sei ore dall'inizio della reazione di degradazione ( $t=6h$ ), si osserva un nuovo segnale a  $t_r=7,11'$  attribuito al frammento  $K^{15}-L^{21}$ . Questo deriva dalla degradazione che chimotripsina opera su Lau- $L^{21}$ , che a  $t=30'$  veniva rilevato e

non è presente a  $t=6h$ . A questo campionamento si rilevano ancora i segnali a  $t_r=9,41'$ ,  $t_r=10,70'$  e  $t_r=15,00'$  attribuiti rispettivamente a  $I^{24}-I^{31}$ ,  $K^{22}-I^{31}$  e  $Lau-L^{14}$ . Si nota come il segnale a  $t_r=10,70'$  tende a calare nel tempo, mentre quello a  $t_r=9,41'$  aumenta progressivamente. Ciò può essere spiegato dal fatto che chimotripsina degrada il frammento  $K^{22}-I^{31}$  dando origine a un frammento più corto, ovvero  $I^{24}-I^{31}$ .



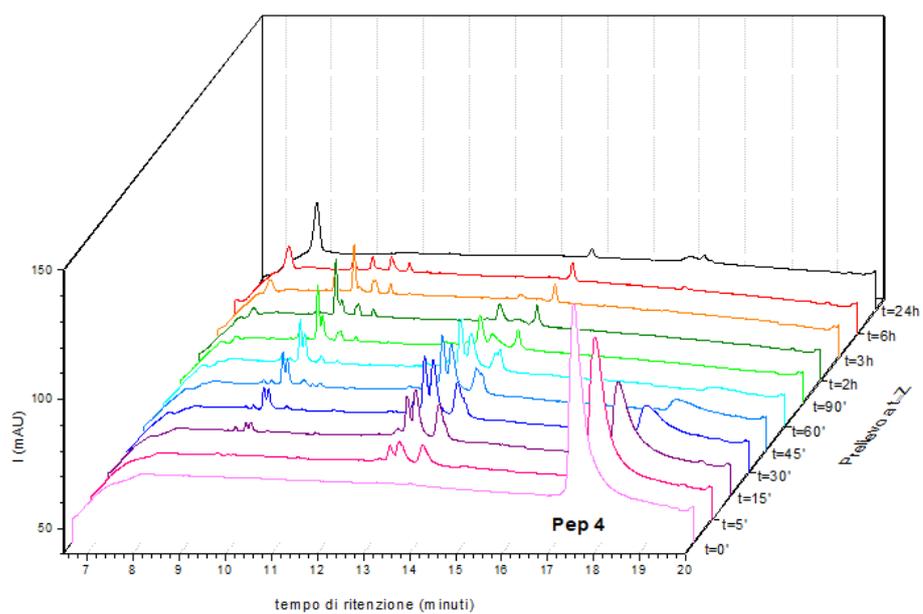
**Figura 37:** Rappresentazione degli step di taglio operati da chimotripsina su *Pep4*

#### 4.4.2 Test con pronasi



**Figura 38:** Profili HPLC di Pep4 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=17,39'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada **Pep4**.



**Figura 39:** Profili HPLC di Pep4 in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

Analizzando all'HPLC-UV la soluzione campionata all'inizio dell'esperimento ( $t=0'$ ), si nota un segnale a  $t_r=17,39'$  attribuito, grazie all'analisi HPLC-MS, al peptide **Pep4**. All'analisi del prelievo a  $t=45'$  non si rileva più il segnale attribuito al peptide integro, mentre si notano alcuni frammenti, a  $t_r=9,25'$ ,  $t_r=9,49'$ ,  $t_r=9,59'$ ,  $t_r=12,97'$ ,  $t_r=13,16'$ ,  $t_r=13,68'$ .

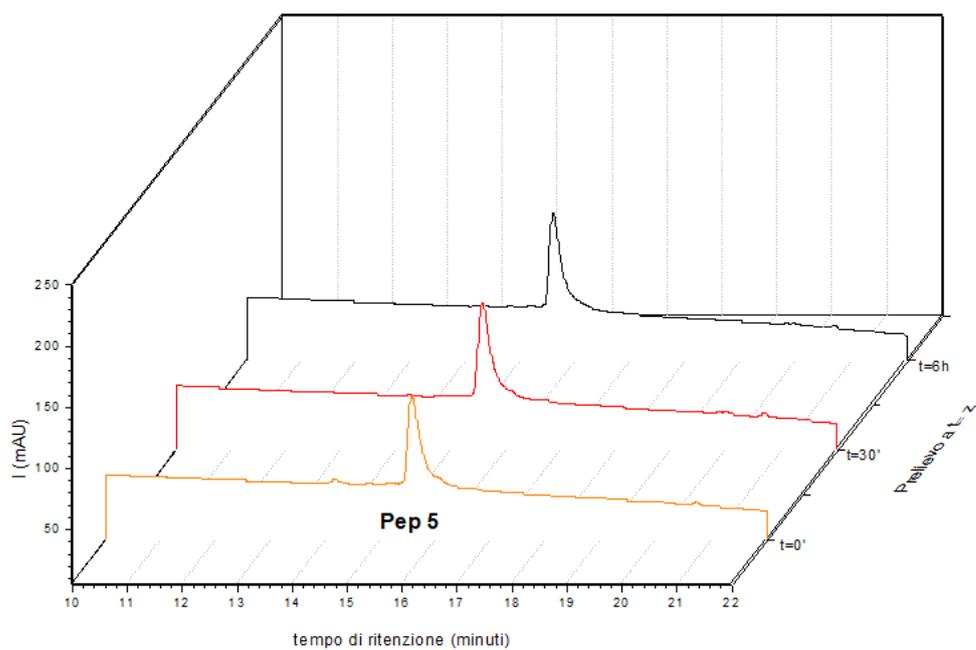
Analizzando all'HPLC-MS il campionamento a  $t=45'$ , sono stati rilevati i seguenti pesi molecolari:

- PM 1212,7 g/mol che potrebbe essere attribuito a  $L^{14}-W^{23}$  oppure a  $K^{15}-I^{24}$
- PM 1524,9 g/mol che potrebbe essere attribuito a  $L^{14}-K^{26}$  oppure a  $K^{15}-I^{27}$
- PM 1680,1 g/mol che potrebbe essere attribuito a  $K^{12}-A^{25}$ ,  $R^{13}-K^{26}$  o  $K^{15}-G^{29}$
- PM 1991,2 g/mol che potrebbe essere attribuito ad  $Ac-K^{26}$

Analizzando il campione prelevato dopo sei ore dall'inizio dell'esperimento ( $t=6h$ ), si osservano numerosi piccoli segnali ai tempi di ritenzione  $t_r=7,71'$ ,  $t_r=9,07'$ ,  $t_r=9,48'$ ,  $t_r=13,82'$ , alcuni dei quali già rilevati nell'analisi del campionamento a  $t=45'$ .

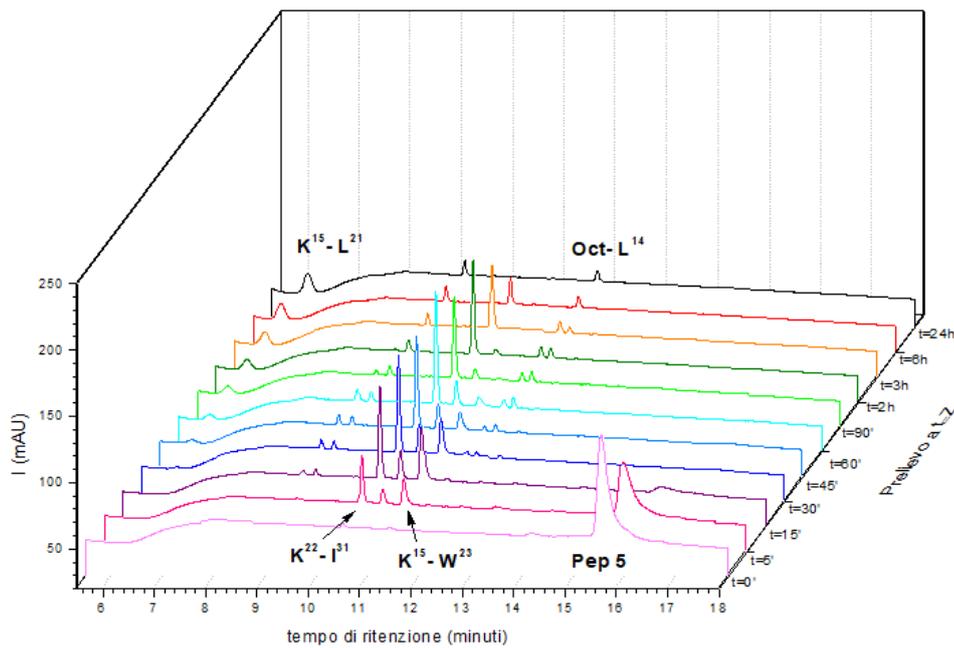
## 4.5 Degradazione di Pep5: Oct- [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] – PMAP (12-31)

### 4.5.1 Test con chimotripsina



**Figura 40:** Profili HPLC di Pep5 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=15,54'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada **Pep5**.



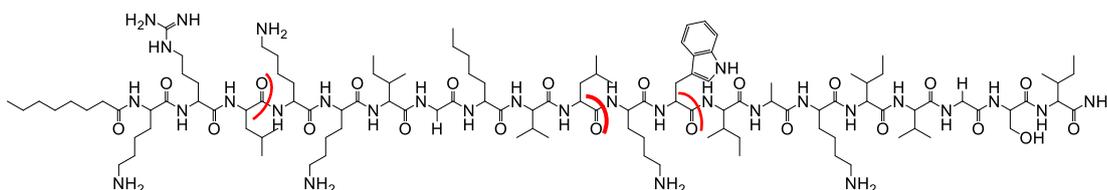
**Figura 41:** Profili HPLC di Pep5 in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

All'inizio dell'esperimento si osserva un segnale a  $t_r=15,54'$  associato, grazie all'analisi all'HPLC-MS, a **Pep5** (PM del peptide 2403,2 g/mol). Inoltre, si osserva anche un piccolo segnale a  $t_r=10,50'$  attribuito al frammento  $K^{22}-I^{31}$ , da cui si evince che l'azione di taglio di chimotripsina su **Pep5** è immediata.

Dopo mezz'ora dall'inizio dell'esperimento ( $t=30'$ ), il peptide integro non viene rilevato, mentre a  $t=5'$  è ancora visibile all'HPLC-UV. Al prelievo a  $t=30'$  il segnale di maggior importanza risulta a  $t_r=10,50'$ , già attribuito a  $K^{22}-I^{31}$ . Come già confermato da altre analisi con chimotripsina sui derivati PMAP,  $L^{21}-K^{22}$  risulta essere il principale sito di taglio. All'HPLC-UV sono stati rilevati anche i seguenti segnali, a cui è stato attribuito un significato grazie all'HPLC-MS: a  $t_r=11,00'$  si osserva  $K^{15}-W^{23}$ , a  $t_r=12,01'$  si rileva  $Oct-L^{14}$ .

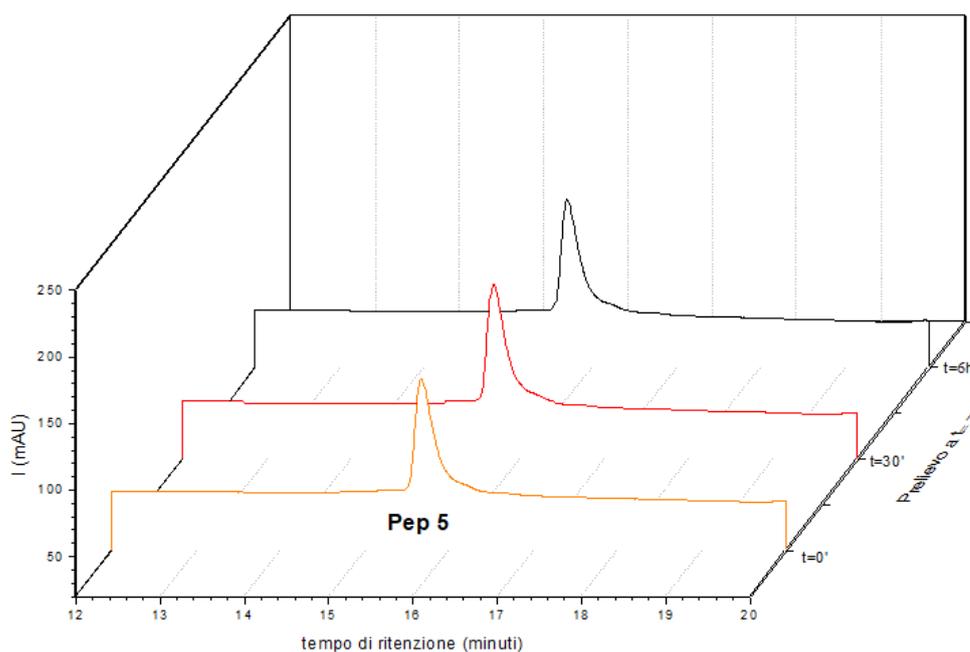
Dopo un'ora e mezza dall'inizio della reazione ( $t=90'$ ), il picco prevalente rimane quello a  $t_r=10,50'$ , già associato a  $K^{22}-I^{31}$ . A  $t_r=6,09'$  si evidenzia un nuovo segnale, attribuito al frammento  $K^{15}-L^{21}$ . Continuano a essere presenti i segnali a  $t_r=11,00'$  e  $t_r=12,01'$ , già rispettivamente associati a  $K^{15}-W^{23}$  e  $Oct-L^{14}$ , quest'ultimo rafforzato rispetto ai precedenti prelievi.

Grazie a questi dati possiamo conoscere i principali siti di taglio di chimotripsina su **Pep5**: tra L<sup>14</sup> e K<sup>15</sup>, tra W<sup>23</sup> e I<sup>24</sup> e tra L<sup>21</sup> e K<sup>22</sup> il quale, osservando anche la degradazione degli altri peptidi con chimotripsina, si dimostra essere il sito di taglio principale.



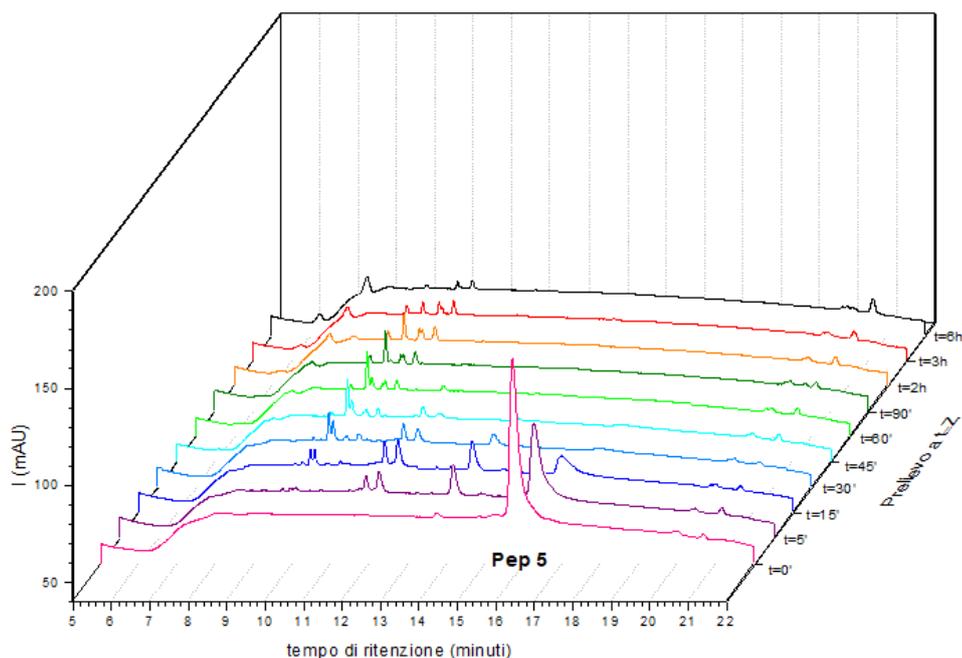
**Figura 42:** Rappresentazione dei siti di taglio di chimotripsina sul peptide Pep5

#### 4.5.2 Test con pronasi



**Figura 43:** Profili HPLC di Pep5 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=15,69'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada **Pep5**.



**Figura 44:** Profili HPLC del peptide *Pep5* in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

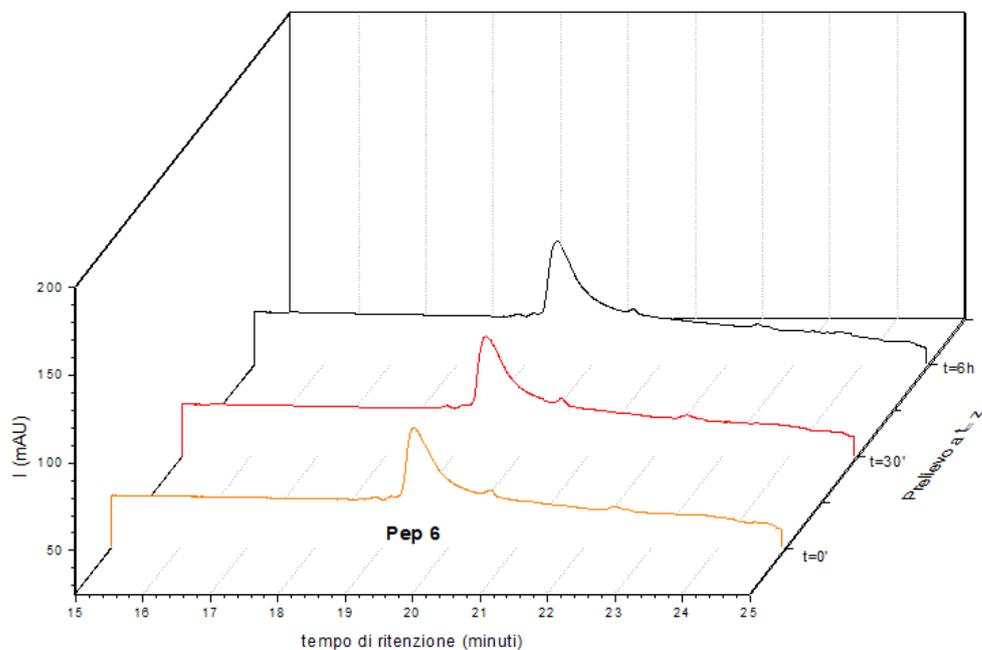
All'inizio dell'esperimento ( $t=0'$ ), l'HPLC-UV mostra un unico segnale a  $t_r=15,69'$  che è stato attribuito a **Pep5**, associazione confermata anche dallo spettrometro di massa che rileva il peso molecolare del peptide intero (PM del peptide 2403,4 g/mol). Dopo un quarto d'ora ( $t=15'$ ), all'HPLC-UV si osserva ancora il segnale del peptide, notevolmente calato rispetto all'inizio dell'esperimento. Si sono formati numerosi piccoli frammenti, a  $t_r=9,46'$ ,  $t_r=11,39'$ ,  $t_r=11,75'$  e  $t_r=13,69'$ . All'analisi HPLC-MS del prelievo a  $t=15'$  sono stati rilevati i seguenti pesi molecolari:

- PM 1524,9 g/mol che potrebbe essere associato a  $L^{14}-K^{26}$  oppure a  $K^{15}-I^{27}$
- PM 1624 g/mol che potrebbe rappresentare  $K^{15}-V^{28}$  o  $I^{17}-I^{31}$
- PM 1935 g/mol che potrebbe essere associato a  $Oct-K^{26}$

Dopo un'ora e mezza dall'inizio dell'esperimento ( $t=90'$ ), il segnale relativo al peptide intero non è presente nel cromatogramma HPLC-UV. È cambiato il pattern di segnali, rilevati a  $t_r=9,03'$ ,  $t_r=9,46'$ ,  $t_r=9,91'$  e  $t_r=10,23'$ .

## 4.6. Degradazione di Pep6: Palm - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)

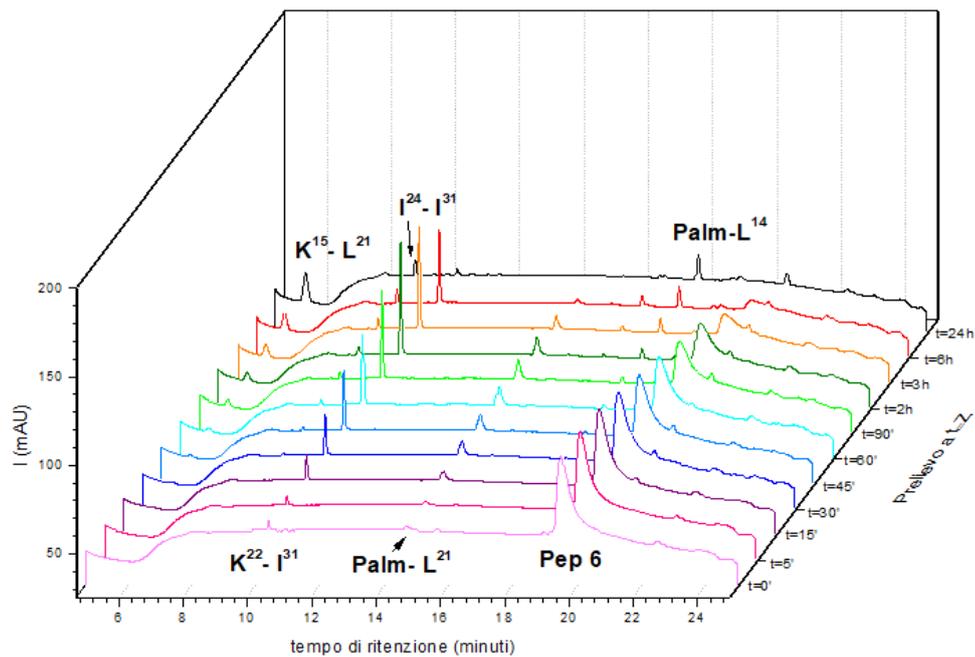
### 4.6.1 Test con chimotripsina



**Figura 45:** Profili HPLC di Pep6 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=19,47'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada **Pep6**.

È possibile anche constatare che in queste condizioni di eluizione (5-95% B in 20 minuti), **Pep6** esce tardivamente dalla colonna rispetto agli altri peptidi testati con chimotripsina. Ciò è attribuibile al fatto che **Pep6** è più lipofilo rispetto agli altri e solo un eluente con un'alta percentuale di soluzione B riesce a spingere il composto fuori dalla colonna.

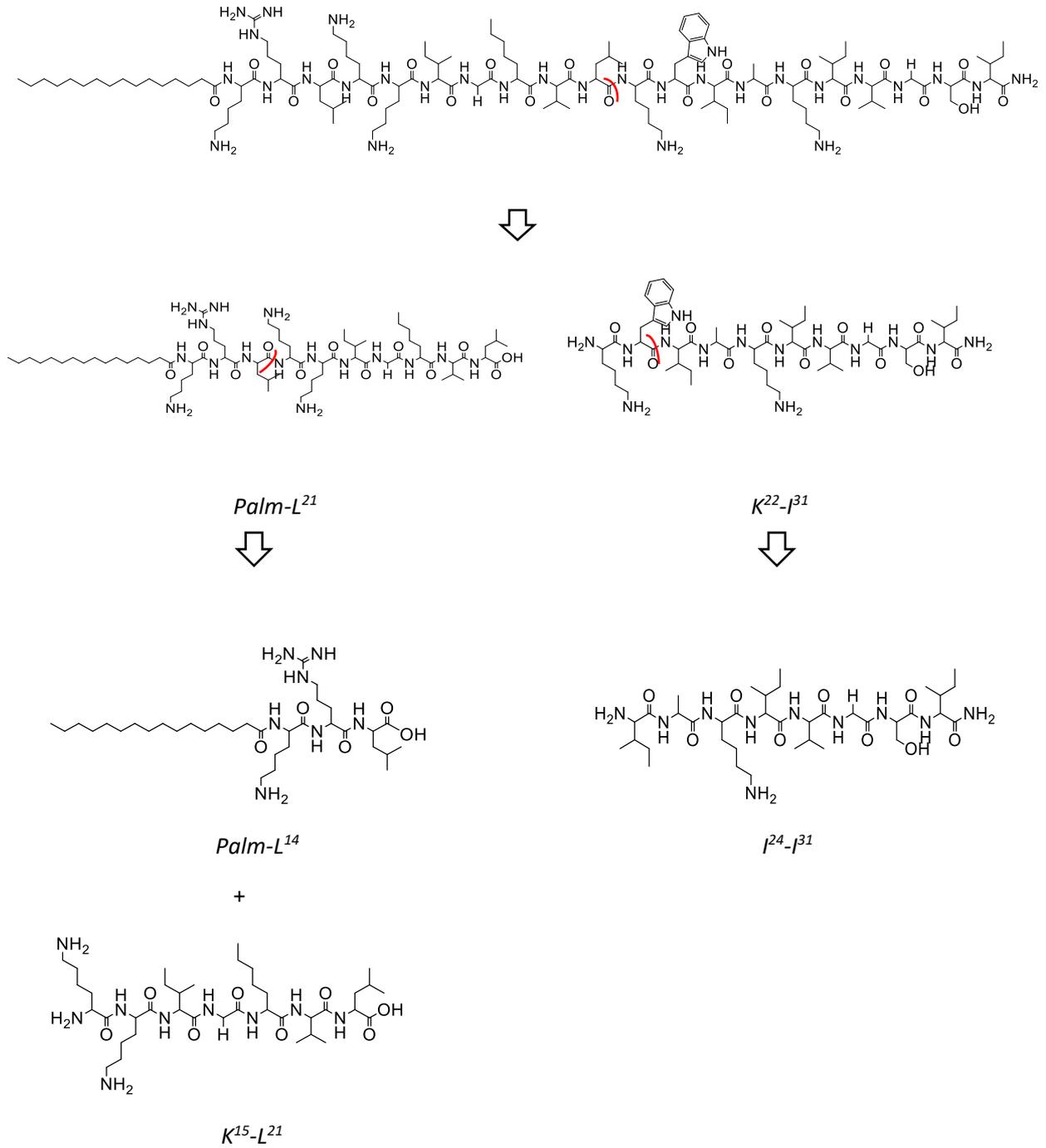


**Figura 46:** Profili HPLC del peptide *Pep6* in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

Nell'analisi HPLC-UV del campionamento iniziale ( $t=0'$ ), si osserva a  $t_r=19,47'$  il segnale associato a **Pep6** (PM del peptide 2515,4 g/mol), che si rileva ancora dopo tre ore dall'inizio dell'esperimento. Nell'analisi di questo campionamento ( $t=3h$ ) il segnale prevalente si osserva a  $t_r=10,37'$  associato, grazie all'utilizzo dell'HPLC-MS, al frammento  $K^{22}-I^{31}$ . Attraverso la strumentazione HPLC-MS è stato anche possibile attribuire un significato ai seguenti segnali registrati all'HPLC-UV:  $t_r=5,58'$ ,  $t_r=9,06'$ ,  $t_r=14,65'$  e  $t_r=17,85'$  sono stati rispettivamente attribuiti a  $K^{15}-L^{21}$ ,  $I^{24}-I^{31}$ ,  $Palm-L^{21}$  e  $Palm-L^{14}$ .

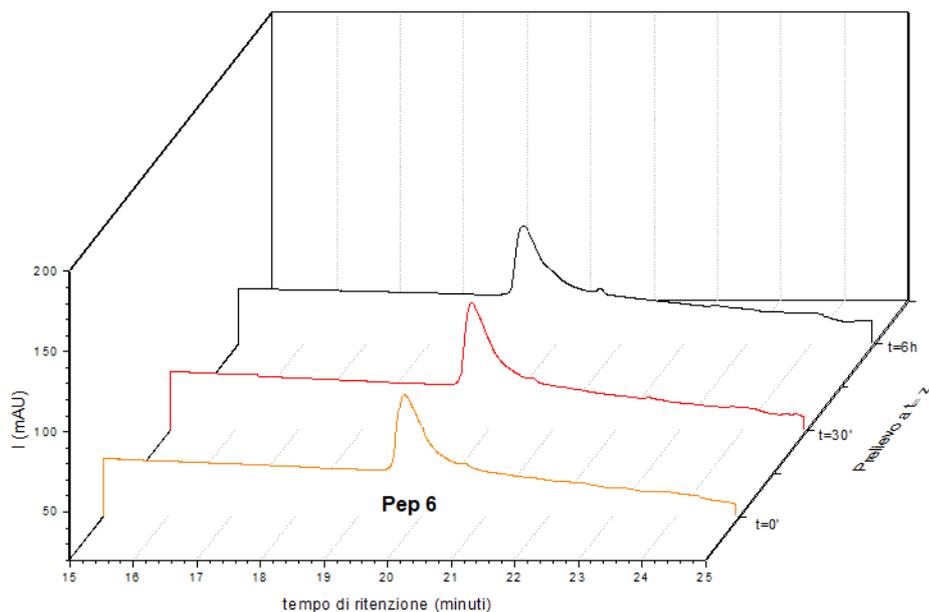
Dopo sei ore ( $t=6h$ ), il peptide intero non si rileva nel cromatogramma HPLC-UV. Il segnale prevalente è quello a  $t_r=10,37'$ , già precedentemente associato a  $K^{22}-I^{31}$ ; inoltre, si osserva lo stesso pattern di segnali rispetto all'analisi del prelievo a  $t=3h$ . Dopo ventiquattro ore dall'inizio dell'esperimento ( $t=24h$ ), il segnale più intenso è quello a  $t_r=5,58'$ , già associato a  $K^{15}-L^{21}$ .

Da questi dati è possibile evidenziare come chimotripsina si appresti a degradare **Pep6** dapprima tra  $L^{21}$  e  $K^{22}$ ; successivamente agisce anche sui legami peptidici,  $L^{14}-K^{15}$  e  $W^{23}-I^{24}$ , altri due siti favoriti per la degradazione.



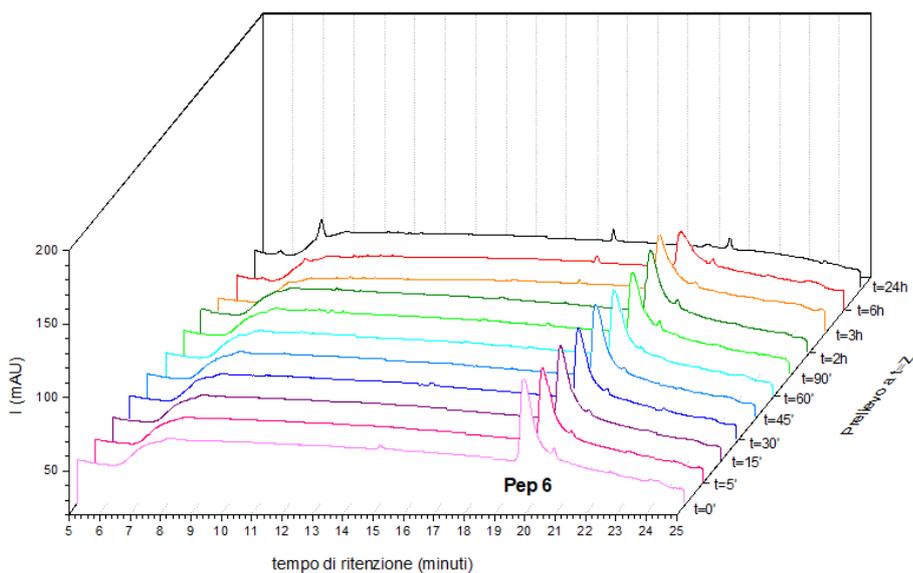
**Figura 47:** Step di taglio operati da chimotripsina sul peptide Pep6

## 4.6.2 Test con pronasi



**Figura 48:** Profili HPLC di Pep6 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=19,70'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada **Pep6**.



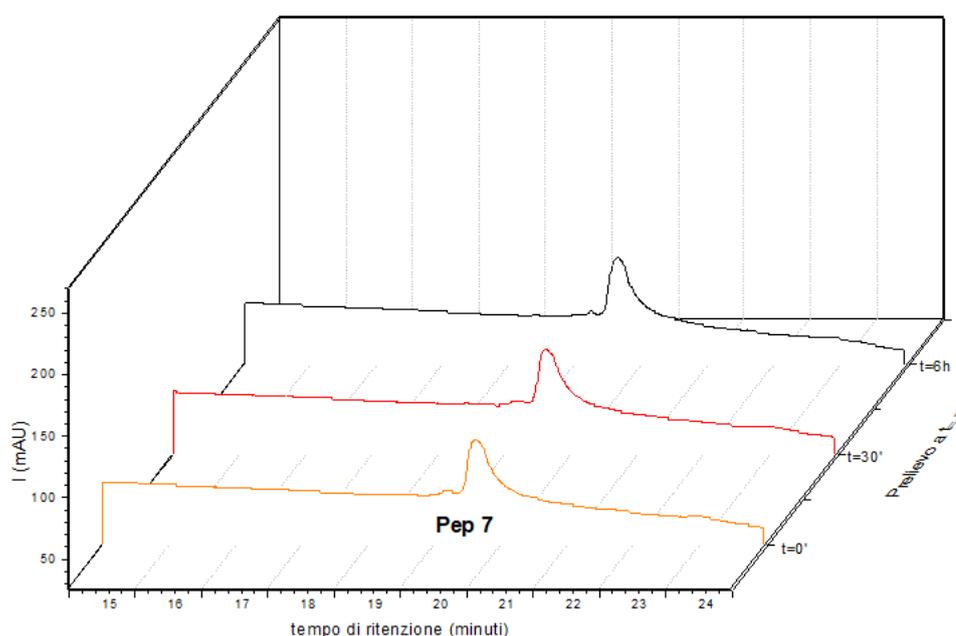
**Figura 49:** Profili HPLC del peptide Pep6 in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

Analizzando il campionamento iniziale ( $t=0'$ ), si osserva a  $t_r=19,70'$  il segnale che è stato associato al peptide **Pep6**. Dall'analisi HPLC-UV si osserva che il peptide ha una buona resistenza nel tempo all'azione di pronasi; il segnale associato a **Pep6** è presente a sei ore di distanza dall'inizio dell'esperimento, mentre è completamente degradato dopo ventiquattro ore.

È possibile osservare come pronasi degradi il peptide in frammenti che danno origine a segnali di bassa intensità alla cromatografia HPLC-UV: essi sono piccoli e di difficile attribuzione, dal momento che pronasi è una miscela di enzimi e i siti di taglio su cui agisce sono estremamente vari.

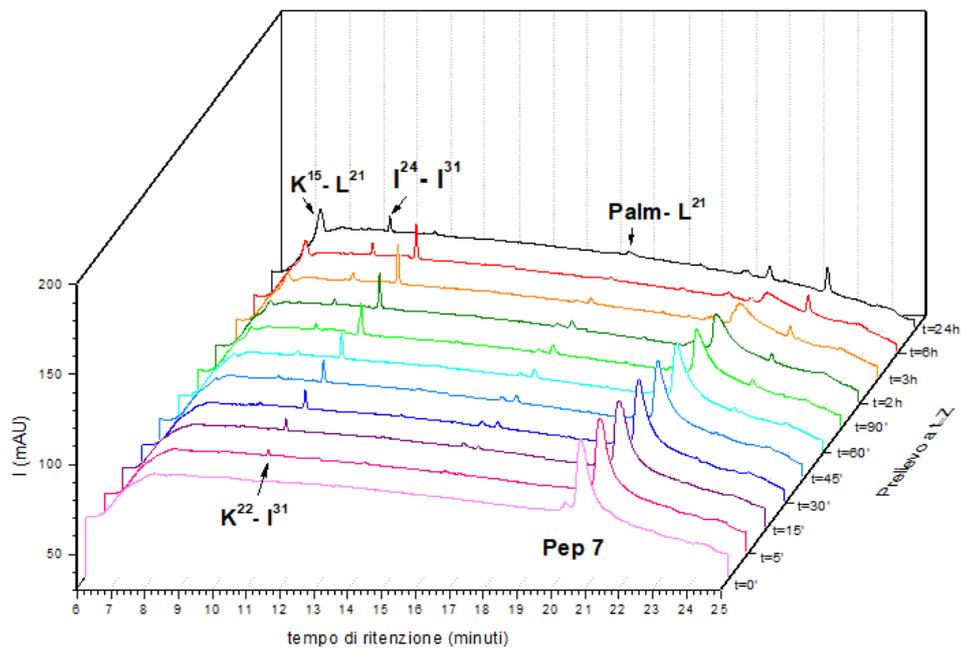
#### 4.7 Degradazione di Pep7: Ac-[K<sup>12</sup>(Palm), A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>]-PMAP (12-31)

##### 4.7.1 Test con chimotripsina



**Figura 50:** Profili HPLC di Pep7 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=20,60'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada **Pep7**.

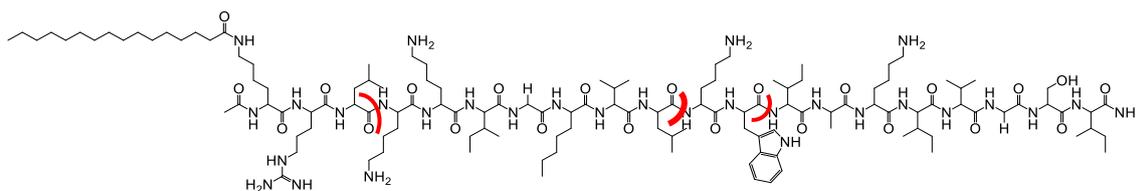


**Figura 51:** Profili HPLC del peptide *Pep7* in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

Nel cromatogramma relativo all'inizio dell'esperimento ( $t=0'$ ), si osserva il segnale prevalente a  $t_r=20,60'$  che è stato associato a **Pep7** (PM del peptide 2558,0 g/mol). Dopo un'ora e mezza ( $t=90'$ ), il peptide si rileva ancora e si osservano anche i seguenti segnali, a cui è stato attribuito un frammento grazie all'utilizzo dell'HPLC-MS:

- $t_r=7,55'$ :  $K^{15}-L^{21}$
- $t_r=9,49'$ :  $I^{24}-I^{31}$
- $t_r=10,81'$ :  $K^{22}-I^{31}$
- $t_r=16,50'$ :  $Palm-L^{21}$

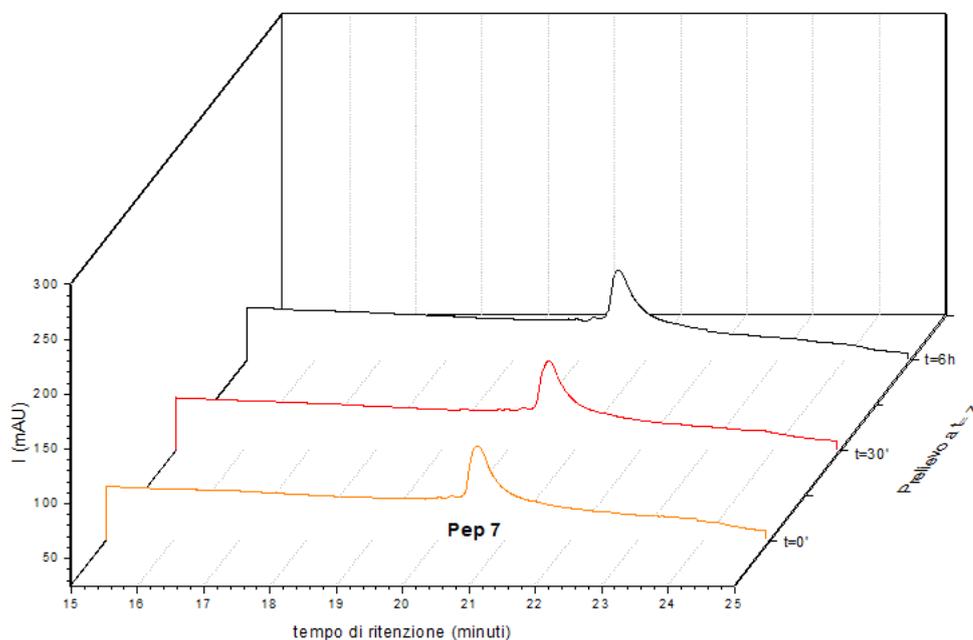
Grazie a questi dati possiamo conoscere i principali siti di taglio di chimotripsina su **Pep7**: tra  $L^{14}$  e  $K^{15}$ , tra  $W^{23}$  e  $I^{24}$  e tra  $L^{21}$  e  $K^{22}$  il quale, osservando anche la degradazione degli altri peptidi con chimotripsina, si dimostra essere il sito di taglio principale.



**Figura 52:** Rappresentazione dei siti di taglio di chimotripsina sul peptide Pep7

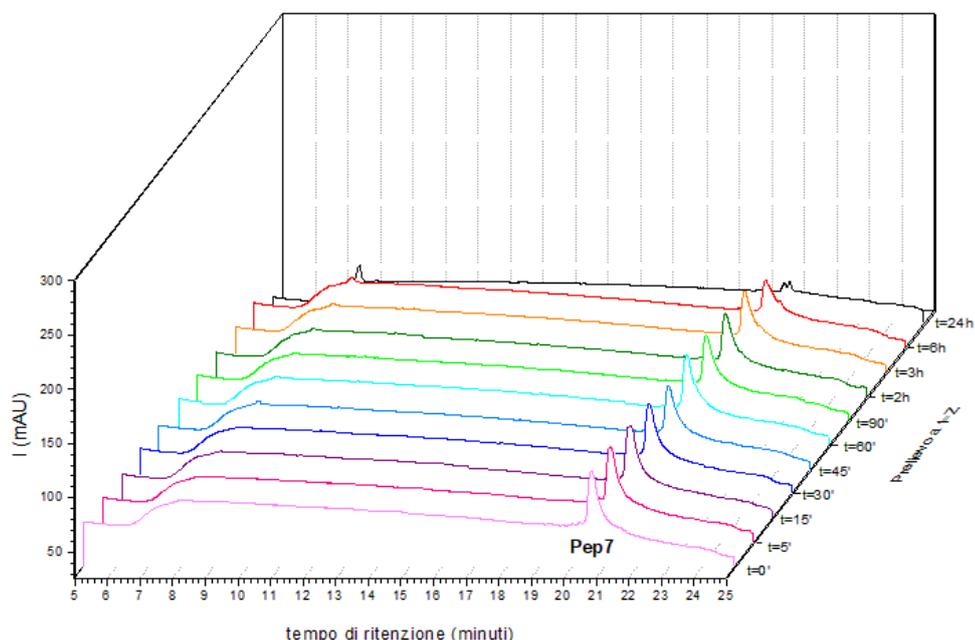
I prelievi a t=2h e t=3h evidenziano gli stessi segnali rispetto al campionamento a t=90', con alcune differenze per quanto riguarda l'intensità. Essa aumenta per i segnali associati a K<sup>15</sup>-L<sup>21</sup> e I<sup>24</sup>-I<sup>31</sup>, mentre cala per Palm-L<sup>21</sup>. Ciò è ragionevole, in quanto il frammento Palm-L<sup>21</sup> si degrada, dando origine a due prodotti più piccoli.

#### 4.7.2 Test con pronasi



**Figura 53:** Profili HPLC di Pep7 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=20,57'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada **Pep7**.



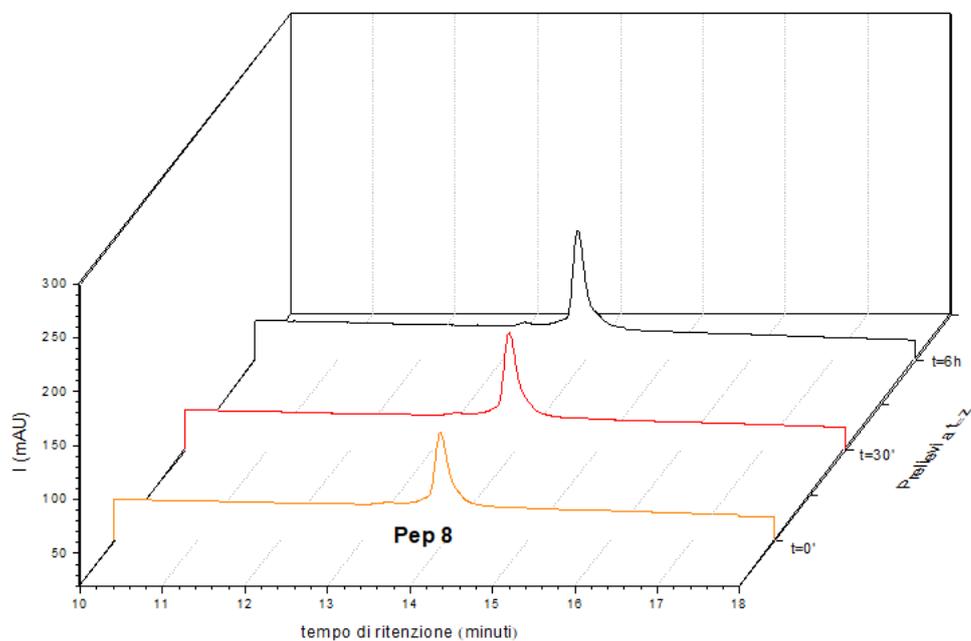
**Figura 54:** Profili HPLC del peptide *Pep7* in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

Nell'analisi HPLC-UV del campionamento iniziale ( $t=0'$ ), si rileva un solo segnale a  $t_r=20,57'$  che è stato associato al peptide **Pep7**.

Analizzando all'HPLC-UV i campionamenti a  $t=3h$  e  $t=6h$ , continua a osservarsi il picco associato al peptide a  $t_r=20,57'$ ; inoltre, nel prelievo a sei ore si nota un segnale a  $t_r=7,99'$ : potrebbe corrispondere a una porzione di PM 1325,7 g/mol,  $V^{20-}I^{31}$  oppure  $L^{14-}I^{24}$ . Dopo ventiquattro ore dall'inizio dell'esperimento ( $t=24h$ ), il picco associato a **Pep7** non si rileva più all'HPLC-UV. Continua a essere presente il segnale a  $t_r=7,99'$  già precedentemente associato al frammento  $V^{20-}I^{31}$  oppure  $L^{14-}I^{24}$ .

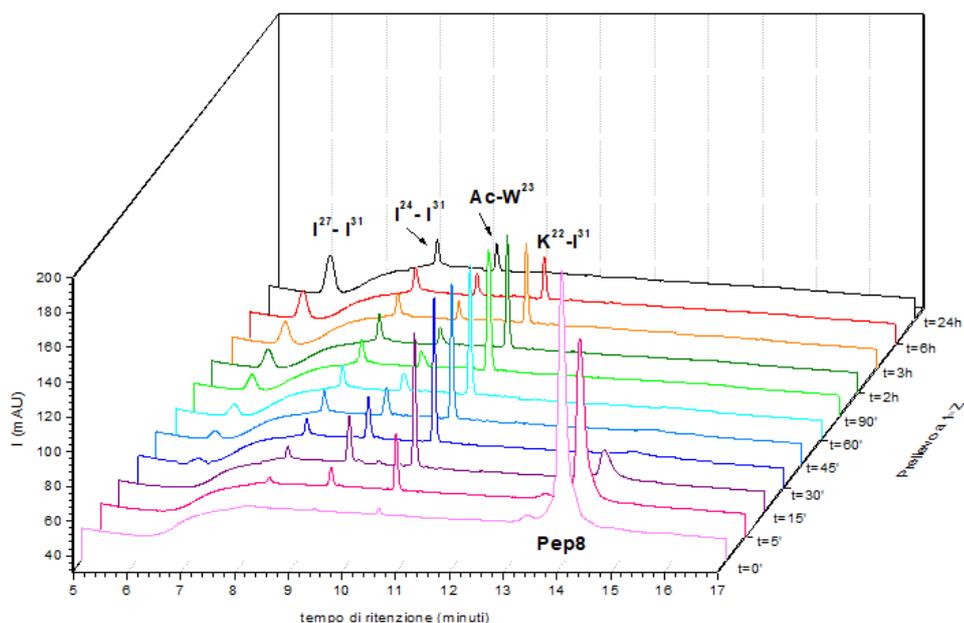
## 4.8 Degradazione di Pep8: Ac - [U<sup>14</sup>, A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31)

### 4.8.1 Test con chimotripsina



**Figura 55:** Profili HPLC di Pep8 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=13,92'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada **Pep8**.



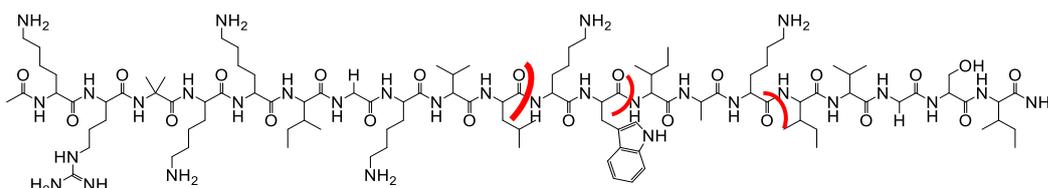
**Figura 56:** Profili HPLC di Pep8 in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

Analizzando all'HPLC-UV il campione iniziale ( $t=0'$ ), si osserva il segnale prevalente a  $t_r=13,92'$ , associato a **Pep8** (PM del peptide 2291,8 g/mol). Inoltre, si nota un segnale a  $t_r=10,50'$  attribuito grazie all'HPLC-MS al frammento  $K^{22}-I^{31}$ , a indicare che l'azione di taglio di chimotripsina su **Pep8** tra  $L^{21}$  e  $K^{22}$  è immediata. Dopo mezz'ora dall'inizio della reazione di degradazione ( $t=30'$ ), il peptide intero non si rileva più, mentre appare ancora visibile nel prelievo a  $t=15'$ . A  $t=30'$  all'HPLC-UV si osservano tre segnali, a  $t_r=8,13'$ ,  $t_r=9,28'$  e  $t_r=10,50'$ , rispettivamente associati a  $I^{24}-I^{31}$ ,  $Ac-W^{23}$  e  $K^{22}-I^{31}$ .

Per l'analisi HPLC-UV del campione prelevato a  $t=90'$ , oltre agli stessi picchi del prelievo precedente, si rileva a  $t_r=6,13'$  un segnale che potrebbe corrispondere, confrontando il segnale HPLC-UV con quello HPLC-MS, a  $I^{27}-I^{31}$ .

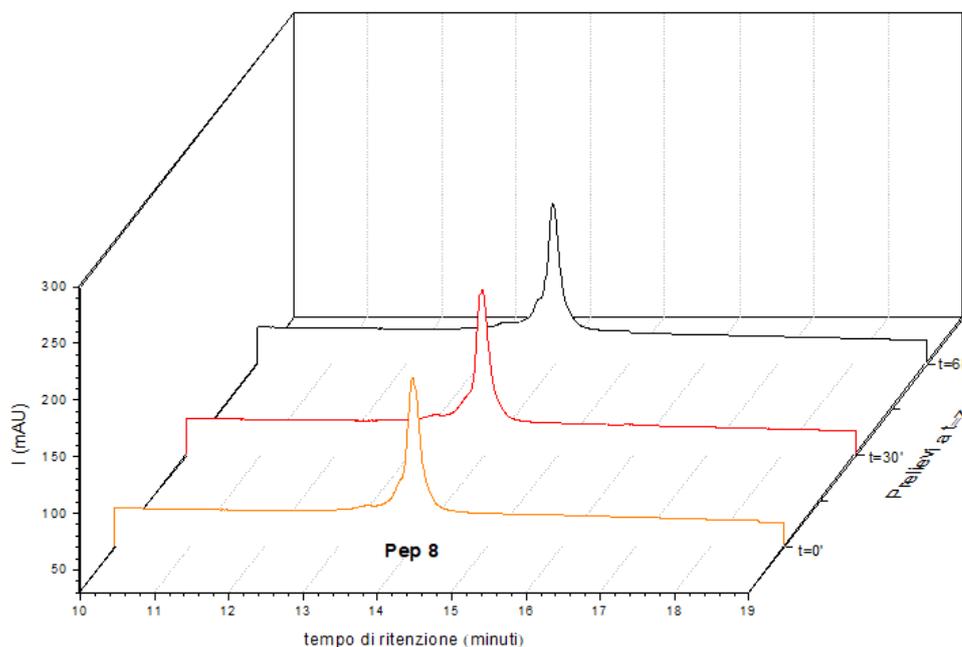
Dopo ventiquattr'ore dall'inizio dell'esperimento ( $t=24h$ ), il picco prevalente si rileva a  $t_r=6,13'$ , attribuibile a  $I^{27}-I^{31}$ . Sono presenti anche i segnali a  $t_r=8,13'$  e  $t_r=9,28'$ , associati rispettivamente a  $I^{24}-I^{31}$  e  $Ac-W^{23}$ . Il segnale a  $t_r=10,50'$  che appariva prevalente nei precedenti campionamenti, dopo ventiquattr'ore non viene più rilevato.

Grazie a questi dati possiamo conoscere i principali siti di taglio di chimotripsina su **Pep8**: tra K<sup>26</sup> e I<sup>27</sup>, tra W<sup>23</sup> e I<sup>24</sup> e tra L<sup>21</sup> e K<sup>22</sup> il quale, osservando anche la degradazione degli altri peptidi con chimotripsina, si dimostra essere il sito di taglio principale.



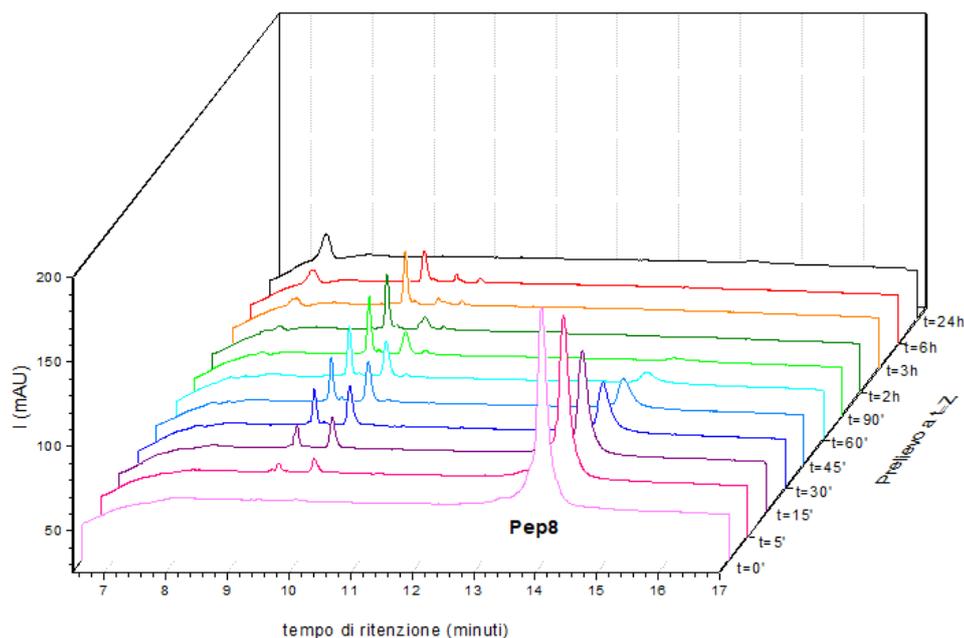
**Figura 57:** Rappresentazione dei siti di taglio di chimotripsina su **Pep8**

#### 4.8.2 Test con pronasi



**Figura 58:** Profili HPLC di **Pep8** in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=13,97'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada **Pep8**.

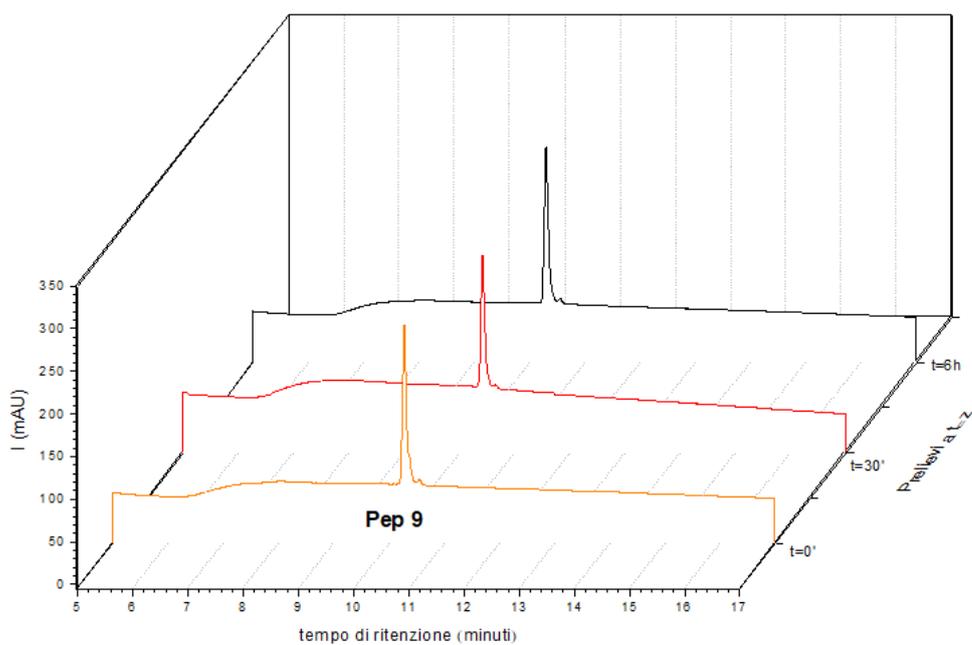


**Figura 59:** Profili HPLC del peptide **Pep8** in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

Nel cromatogramma relativo al prelievo a  $t=0'$  si osserva un segnale  $t_r=13,97'$ , attribuito, grazie all'analisi HPLC-MS, a **Pep8** (PM del peptide 2291,8 g/mol). Dopo un'ora dall'inizio dell'esperimento ( $t=60'$ ), all'HPLC-UV si nota ancora, seppur debole, il segnale relativo al peptide, non più presente al prelievo a  $t=6h$ . Dopo sei ore dall'inizio della prova di degradazione, i segnali di maggior importanza si trovano a  $t_r=7,52'$  e  $t_r=9,37'$ , quest'ultimo osservato anche nei prelievi precedenti. Nell'analisi HPLC-MS sono stati rilevati i seguenti pesi molecolari: PM 1510,8 g/mol, già precedentemente osservato, che potrebbe corrispondere al Ac-W<sup>23</sup> oppure a G<sup>18</sup>-I<sup>31</sup> e PM 985,7 g/mol che potrebbe rappresentare Ac-K<sup>19</sup> o K<sup>19</sup>-K<sup>26</sup> o W<sup>23</sup>-I<sup>31</sup>.

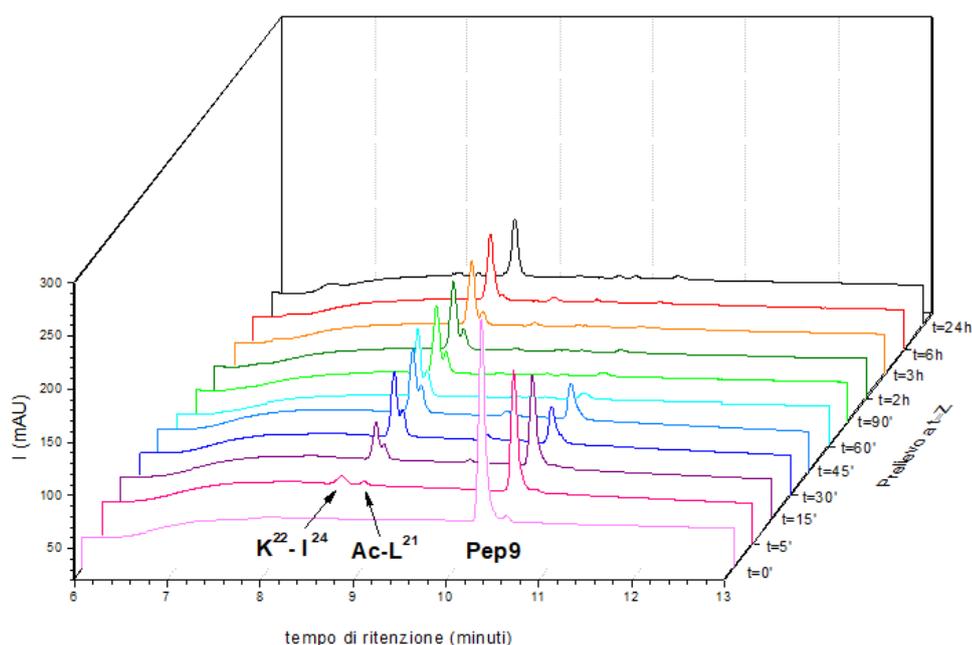
## 4.9 Degradazione di Pep9: Ac-PMAP (12-24)

### 4.9.1 Test con chimotripsina



**Figura 60:** Profili HPLC di Pep9 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=10,29'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada **Pep9**.

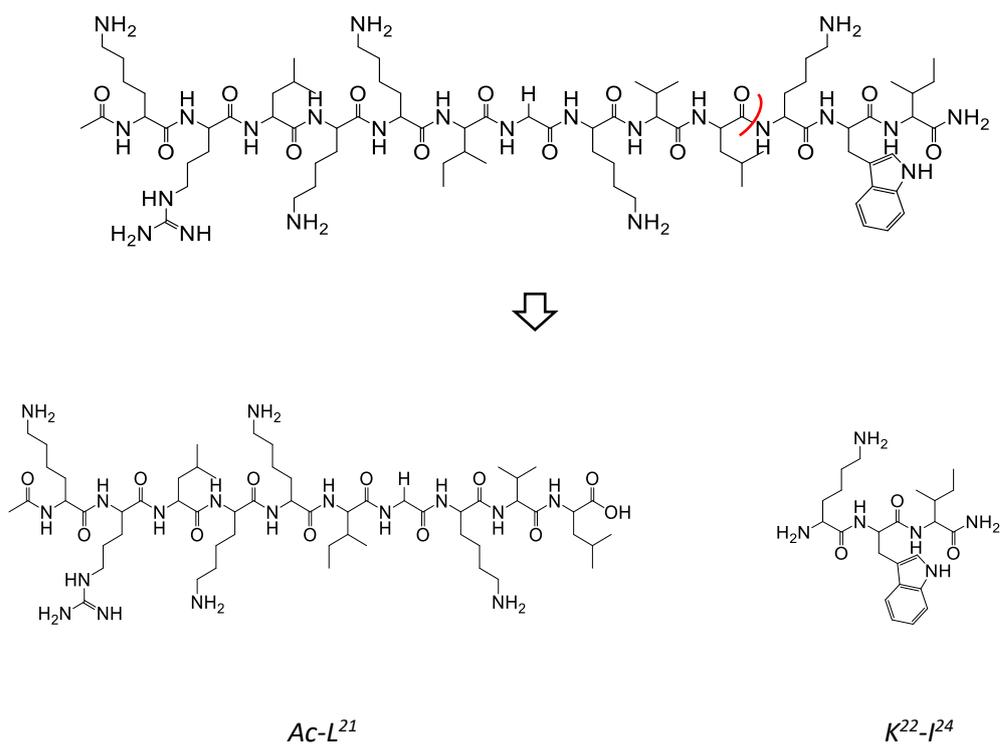


**Figura 61:** Profili HPLC del peptide *Pep9* in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

Nel cromatogramma relativo al prelievo iniziale ( $t=0'$ ), a  $t_r=10,29'$  si può osservare un segnale che è stato associato, analizzando il campione all'HPLC-MS, a **Pep9** (PM del peptide 1651,1 g/mol). Dopo mezz'ora dall'inizio della prova di degradazione ( $t=30'$ ), il peptide si rileva ancora anche se il segnale relativo ad esso si è indebolito. Sono presenti due segnali a  $t_r=8,74'$  e a  $t_r=8,93'$ , rispettivamente attribuiti a  $K^{22}-I^{24}$  e  $Ac-L^{21}$ . Nell'analisi del campionamento a  $t=90'$ , il segnale attribuito al peptide non viene più rilevato, mentre si osservano i due picchi già presenti precedentemente, a  $t_r=8,74'$  e a  $t_r=8,93'$ . Dall'altezza dei segnali si nota come sia prevalente il primo, attribuito a  $K^{22}-I^{24}$ .

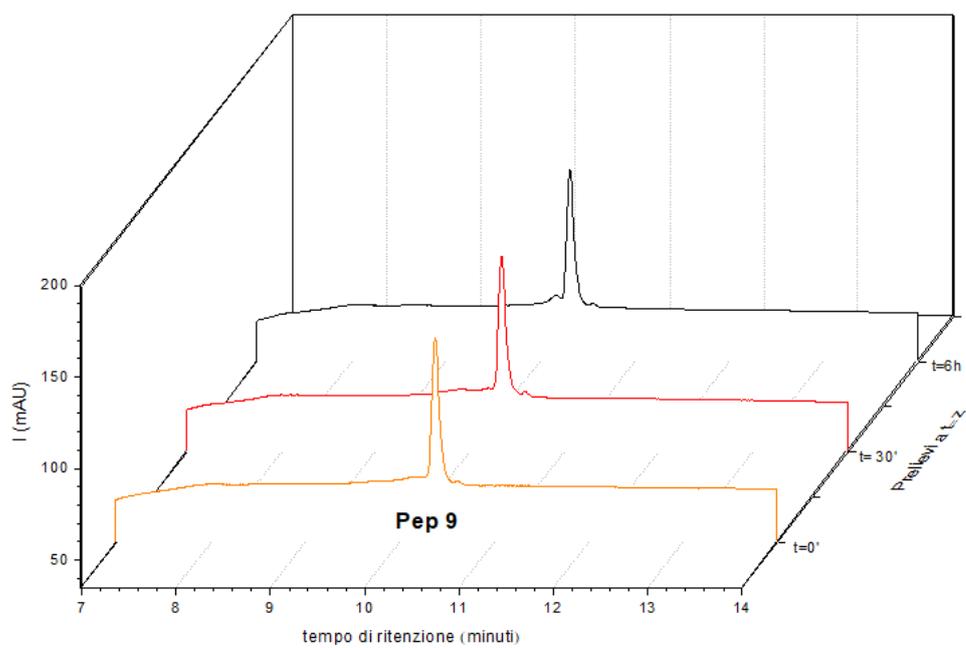
Dopo sei ore dall'inizio dell'esperimento ( $t=6h$ ), il segnale a  $t_r=8,74'$  si conferma prevalente, mentre la specie che esce a  $t_r=8,93'$ , attribuita ad  $Ac-L^{21}$ , è presente ma con un segnale di scarsa intensità.

È possibile concludere che chimotripsina degrada  $Ac-PMAP$  (12-24) scindendolo principalmente a livello del legame  $L^{21} - K^{22}$ , sito importante già osservato trattando altri derivati di  $PMAP-36$  con lo stesso enzima.



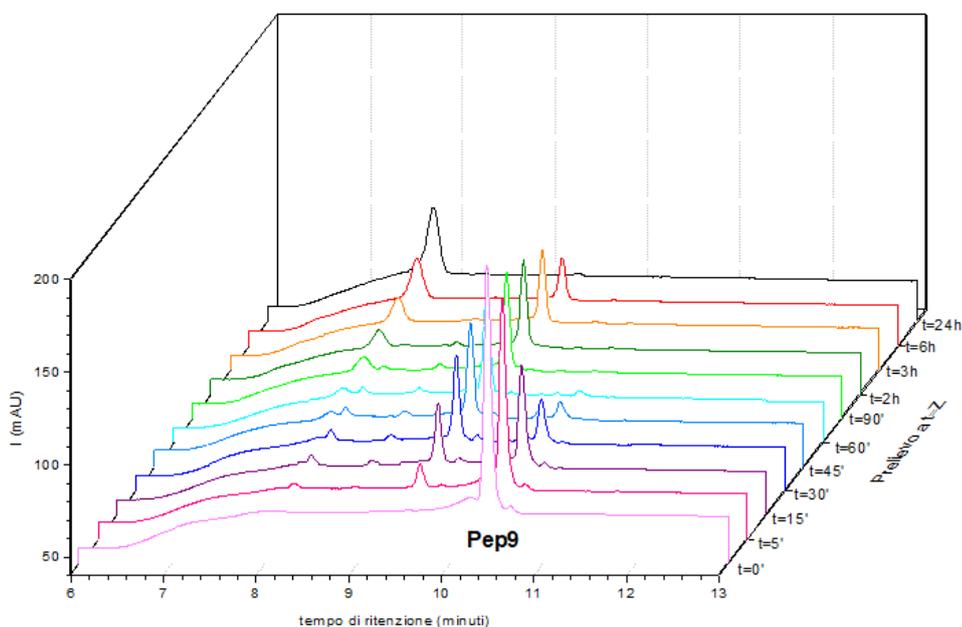
**Figura 62:** Rappresentazione del sito di taglio di chimotripsina sul peptide Pep9

#### 4.9.2 Test con pronasi



**Figura 63:** Profili HPLC di Pep9 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=10,37'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada **Pep9**.



**Figura 64:** Profili HPLC del peptide *Pep9* in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

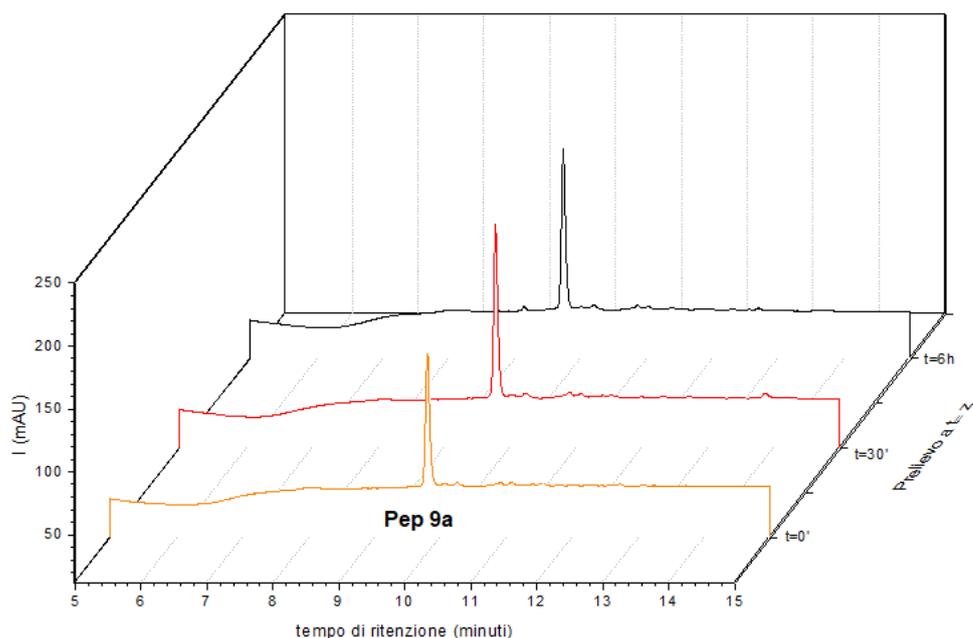
Nel cromatogramma del campionamento iniziale ( $t=0'$ ), si osserva un picco a  $t_r=10,37'$ , che è stato associato a **Pep9** grazie all'analisi HPLC-MS. Dopo un'ora dall'inizio dell'esperimento ( $t=60'$ ), all'HPLC-UV **Pep9** non viene più rilevato, mentre il segnale prevalente si osserva a  $t_r=9,48'$  che potrebbe essere associato a  $L^{14}\text{-K}^{22}$  oppure a  $W^{23}\text{-I}^{24}$ . Dopo sei ore dall'inizio della prova di degradazione ( $t=6h$ ), continua a osservarsi, anche se di altezza minore rispetto ai prelievi precedenti, il picco a  $t_r=9,48'$ . Si osserva un nuovo segnale a  $t_r=7,81'$  che potrebbe essere attribuito al frammento  $K^{15}\text{-V}^{20}$ .

In questa degradazione enzimatica è possibile fare un'osservazione: i segnali all'HPLC-UV che emergono nel tempo sono relativamente pochi e intensi, rispetto alle prove con pronasi e altri peptidi. Infatti, nei cromatogrammi in scala

relativi a queste ultime si osserva una fine degradazione, che porta alla formazione di tanti piccoli frammenti difficilmente identificabili.

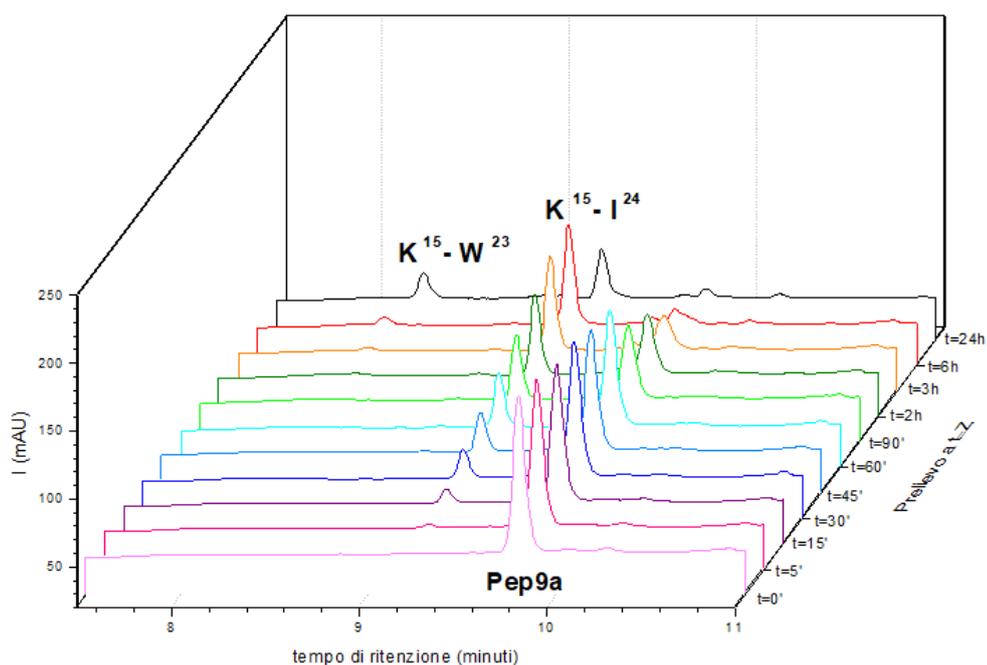
#### 4.10 Degradazione di Pep9a: Ac-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24)

##### 4.10.1 Test con chimotripsina



**Figura 65:** Profili HPLC di Pep9a in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=9,80'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada il peptide.



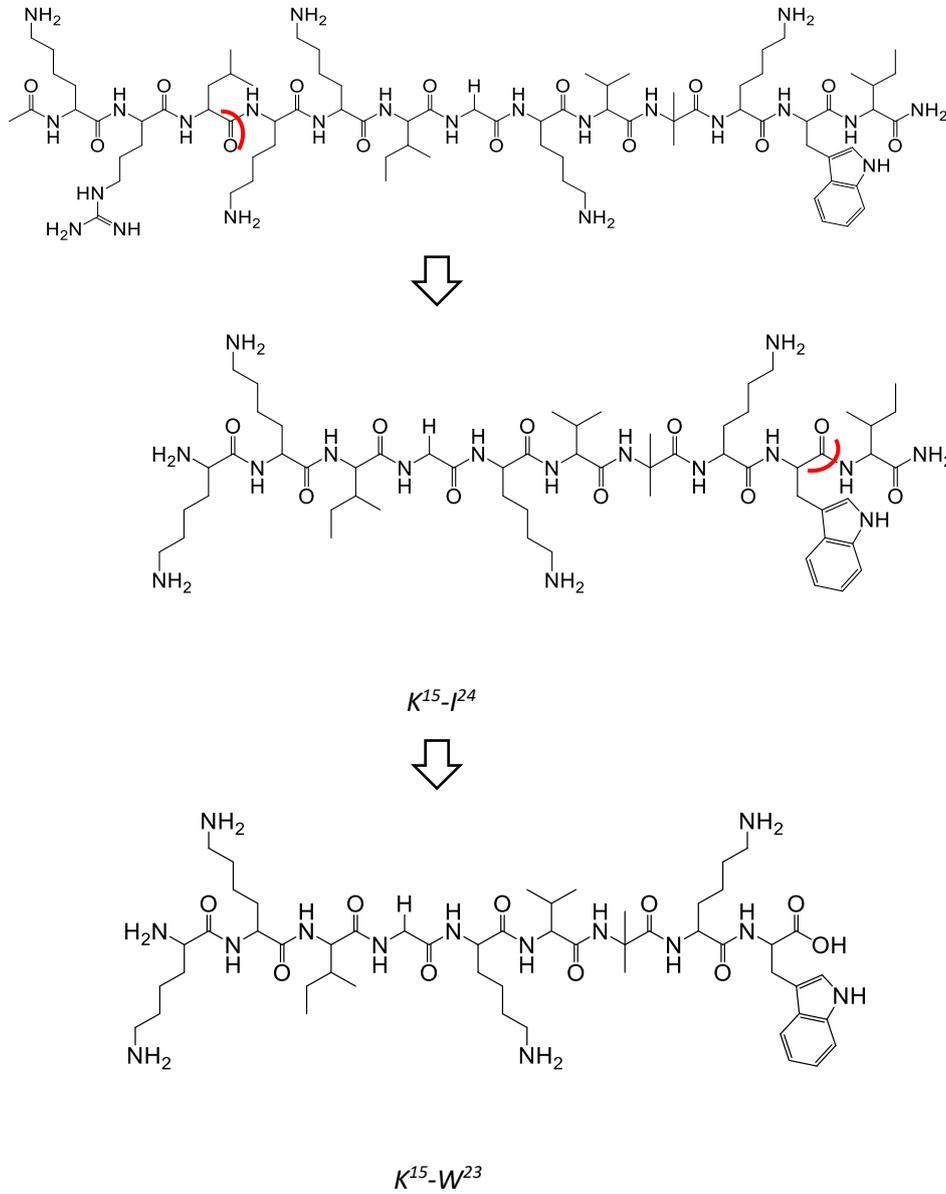
**Figura 66:** Profili HPLC del peptide *Pep9a* in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

Nell'analisi HPLC-UV del campionamento iniziale ( $t=0'$ ), si osserva un unico segnale a  $t_r=9,80'$ , attribuito grazie all'analisi HPLC-MS a **Pep9a** (PM del peptide 1623,0 g/mol). Nel cromatogramma HPLC-UV del prelievo a  $t=60'$ , oltre al segnale già attribuito al peptide integro, si rileva un picco a  $t_r=9,22'$ , associato al frammento  $K^{15}-I^{24}$ . Si nota che dopo un'ora dall'inizio dell'esperimento ( $t=60'$ ) **Pep9a** è ancora la specie più abbondante.

Dopo tre ore dall'inizio della prova ( $t=3h$ ), si rilevano ancora i due picchi a  $t_r=9,22'$  e  $t_r=9,80'$ . Il segnale con la più alta intensità è quello a  $t_r=9,22'$ , già attribuito a  $K^{15}-I^{24}$  che si afferma come la specie più abbondante. Il peptide integro, che esce a  $t_r=9,80'$ , è ancora presente, ma la sua concentrazione cala progressivamente. A  $t_r=8,22'$  si nota un piccolo segnale, che è stato associato al frammento  $K^{15}-W^{23}$ .

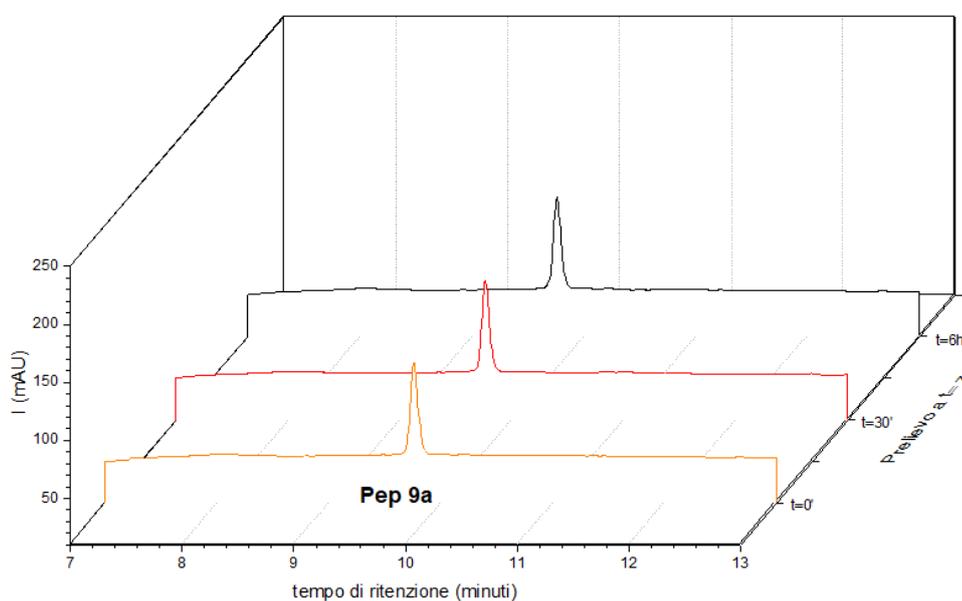
Nel cromatogramma HPLC-UV del prelievo a  $t=6h$ , si nota un segnale che potrebbe rappresentare un residuo di peptide integro, non rilevato tuttavia dall'analisi HPLC-MS. La specie prevalente si conferma essere il frammento  $K^{15}-I^{24}$

ed è presente anche il segnale a  $t_r=8,22'$ , già associato a  $K^{15}-W^{23}$ , crescente nel tempo.



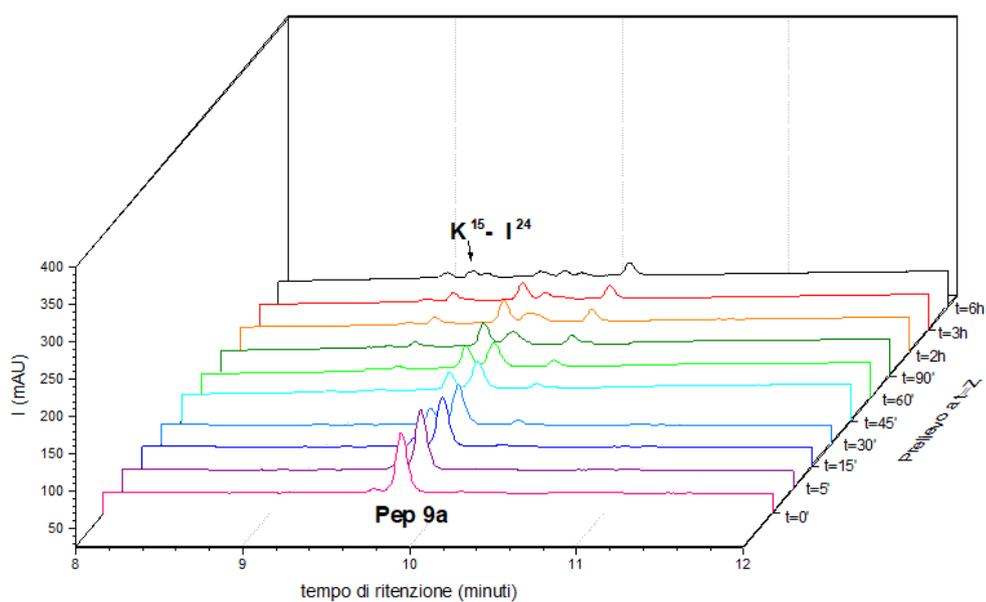
**Figura 67:** Rappresentazione dei principali siti di taglio di chimotripsina su Pep9a

## 4.10.2 Test con pronasi



**Figura 68:** Profili HPLC di Pep9a in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=9,79'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada il peptide.



**Figura 69:** Profili HPLC del peptide Pep9a in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

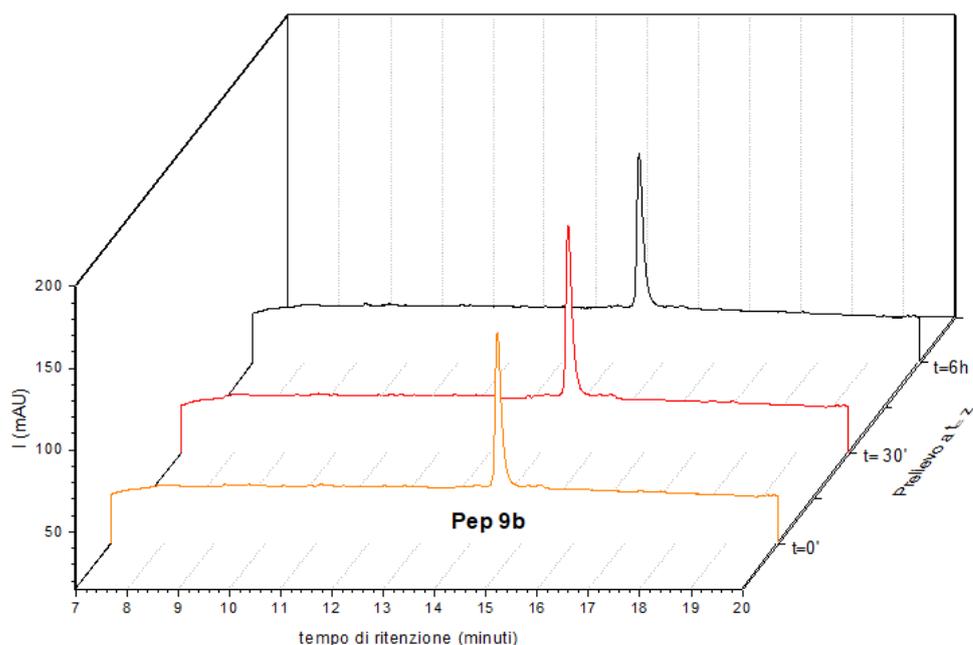
Nel cromatogramma HPLC-UV del prelievo iniziale ( $t=0'$ ), si rileva un unico segnale a  $t_r=9,79'$  attribuito al peptide integro.

Dopo un'ora e mezza dall'inizio dell'esperimento ( $t=90'$ ), si rileva ancora il peptide integro, sia all'HPLC-UV che all'HPLC-MS. Il piccolo segnale all'HPLC-UV a  $t_r=9,20'$  è stato associato al frammento  $K^{15}-I^{24}$ , mentre il picco più elevato a  $t_r=9,61'$  può essere attribuito a  $L^{14}-I^{24}$  oppure a  $I^{17}-I^{24}$ , specie che vengono entrambe rilevate ed escono con due picchi molto vicini nel cromatogramma dell'HPLC-MS.

L'analisi del campionamento dopo due ore ( $t=2h$ ), si mostra sostanzialmente analoga a quella precedente. È interessante notare come il peptide intero sia ancora presente, rilevato sia all'HPLC-UV che all'HPLC-MS. Tuttavia dopo tre ore ( $t=3h$ ) non si osserva più il segnale del peptide nel cromatogramma HPLC-UV e dopo sei ore ( $t=6h$ ) il profilo mostra numerosi piccoli frammenti di degradazione.

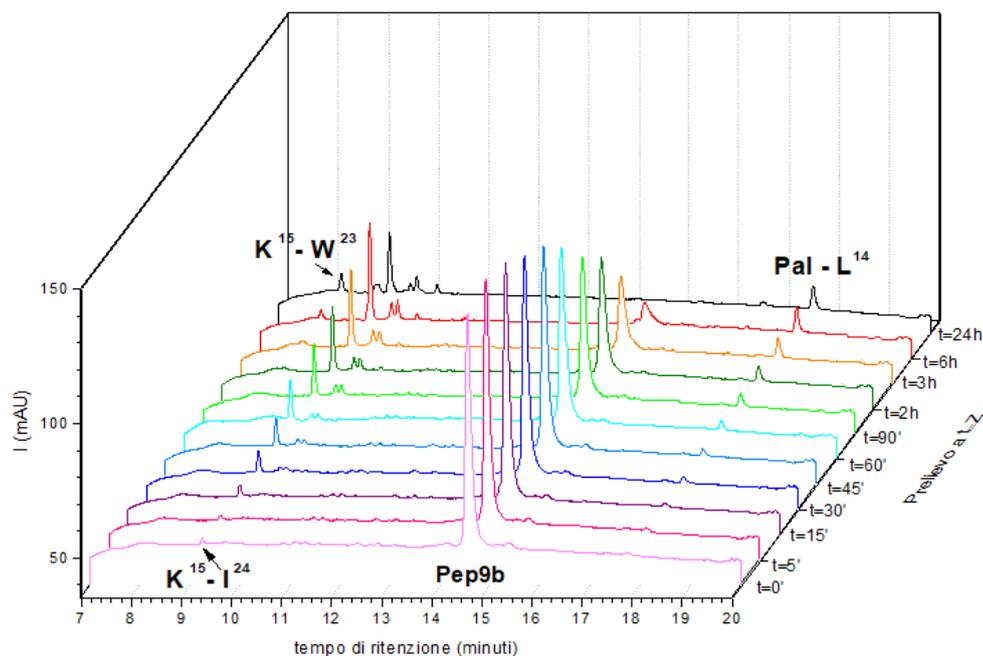
#### 4.11 Degradazione di Pep9b: Palm- $U^{21}$ -PMAP (12-24)

##### 4.11.1 Test con chimotripsina



**Figura 70:** Profili HPLC di Pep9b in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=14,54'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 50 mM a pH 7,8 non degrada il peptide.



**Figura 71:** Profili HPLC di Pep9b in presenza di buffer e soluzione di chimotripsina in bagno termostato a 37 °C

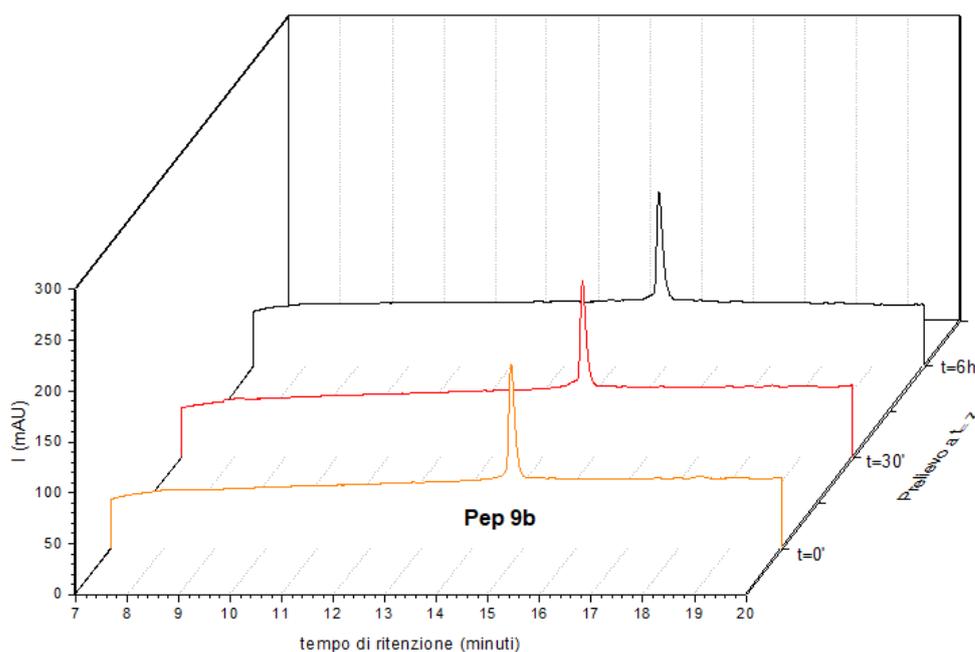
Nel cromatogramma HPLC-UV del campionamento iniziale ( $t=0'$ ), si osserva un unico segnale a  $t_r=14,54'$ , attribuito grazie all'analisi HPLC-MS a **Pep9b** (PM del peptide 1819,0 g/mol).

Dopo un'ora dall'inizio dell'esperimento ( $t=60'$ ), il picco principale risulta essere ancora quello attribuito al peptide. Si nota un segnale a  $t_r=9,23'$  associato, grazie all'HPLC-MS, al frammento  $K^{15}-I^{24}$ . La rimanente porzione generata da questa scissione esce tardivamente dalla colonna a causa della sua natura molto idrofobica: Palm-L<sup>14</sup> è stato associato al segnale a  $t_r=17,72'$ . Grazie allo spettrometro di massa è possibile attribuire un significato anche ai due piccoli segnali a  $t_r=9,54'$  e  $t_r=9,67'$ , che rappresentano rispettivamente i frammenti  $K^{16}-I^{24}$  e  $L^{14}-I^{24}$ .

Il cromatogramma relativo al campionamento dopo tre ore ( $t=3h$ ) risulta simile a quello precedente: a  $t_r=14,54'$  si osserva il peptide intero, con un segnale progressivamente calante. I segnali a  $t_r=9,23'$ ,  $t_r=9,54'$  e  $t_r=9,67'$  si sono intensificati e  $K^{15}\text{-I}^{24}$  è il frammento di degradazione prevalente. A  $t_r=17,72'$  si osserva, rafforzato, il segnale associato al Palm-L<sup>14</sup>.

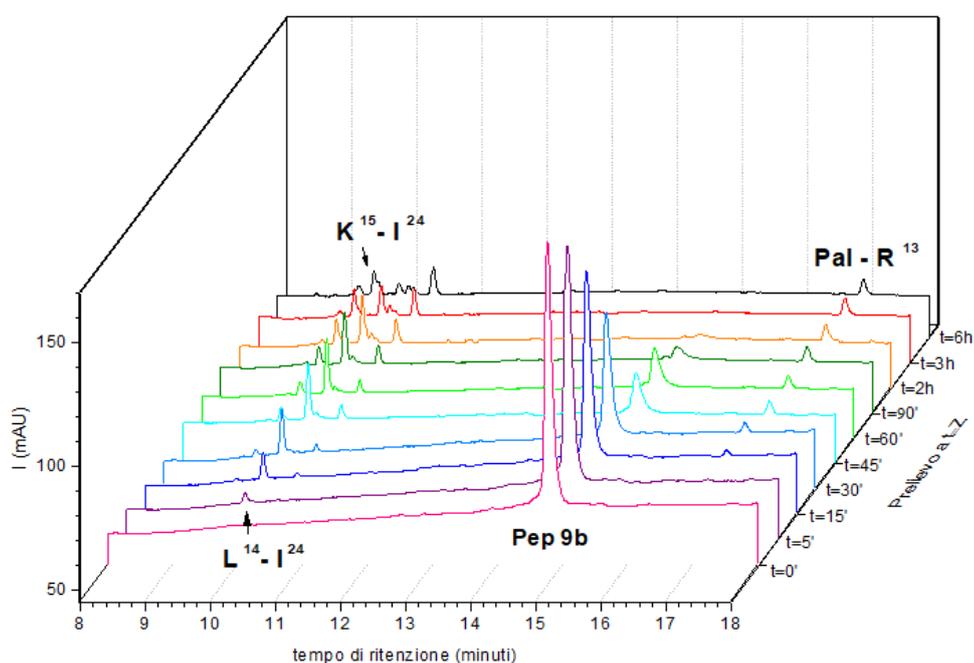
Dopo sei ore dall'inizio della degradazione ( $t=6h$ ), il peptide intero non si rileva più con certezza, mentre continuano a osservarsi gli altri frammenti precedentemente descritti. A  $t_r=7,64'$  si rileva un nuovo segnale associato, grazie all'HPLC-MS, a  $K^{15}\text{-W}^{23}$ , mentre  $K^{15}\text{-I}^{24}$  si conferma essere la specie prevalente, associata al segnale di massima intensità.

#### 4.11.2 Test con pronasi



**Figura 72:** Profili HPLC di Pep9b in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=14,77'$ , evidenza del fatto che il buffer TRIS · HCl 20 mM a pH 7,6 non degrada il peptide.



**Figura 73:** Profili HPLC del peptide **Pep9b** in presenza di buffer e soluzione di pronasi in bagno termostato a 37 °C

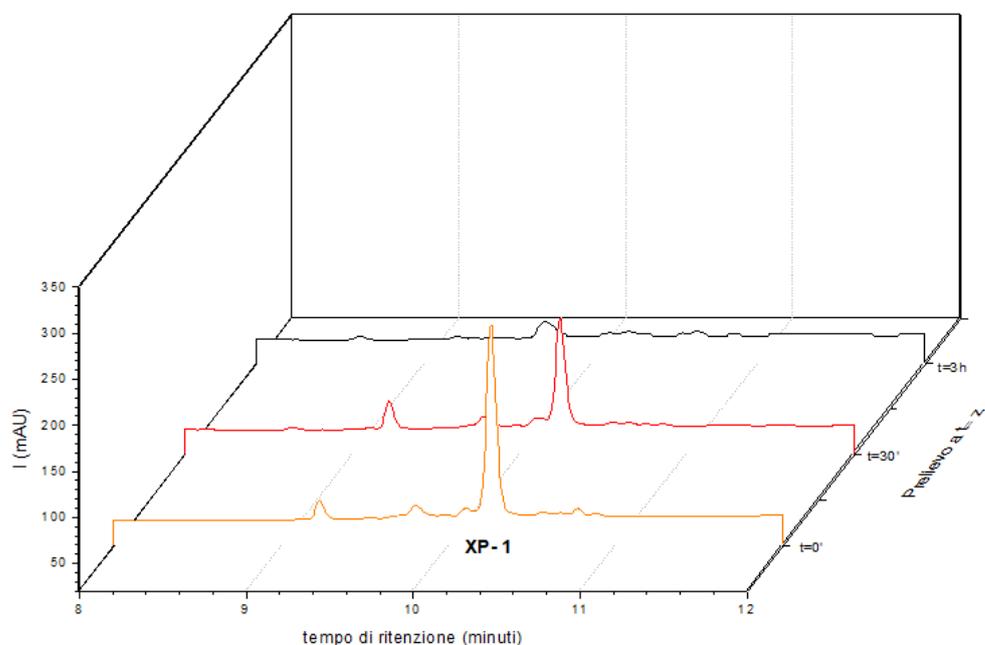
Nel cromatogramma relativo al prelievo iniziale ( $t=0'$ ) si osserva un unico picco a  $t_r=14,77'$ , rappresentativo del peptide **Pep9b** integro.

Dopo un'ora dall'inizio dell'esperimento ( $t=60'$ ), si osserva ancora il segnale relativo al peptide, anche se di intensità molto minore rispetto ai prelievi precedenti. A  $t_r=17,01'$  si nota un segnale associato, grazie all'HPLC-MS, alla porzione Palm-R<sup>13</sup>. Il picco più intenso si rileva a  $t_r=9,81'$  attribuito a L<sup>14</sup>-I<sup>24</sup>, mentre a  $t_r=9,49'$  si osserva la specie K<sup>15</sup>-I<sup>24</sup>.

L'analisi del campionamento a  $t=90'$  fornisce un cromatogramma sostanzialmente analogo al precedente, con la differenza che il segnale del peptide intero a  $t_r=14,77'$  non viene più rilevato.

## 4.12 Test con siero umano

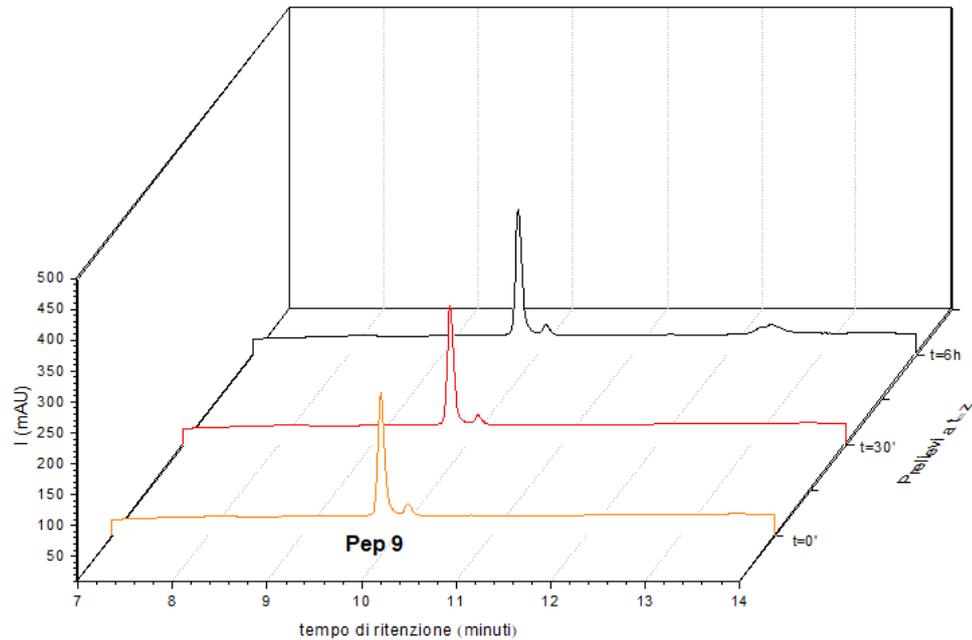
### 4.12.1 Verifica della capacità degradativa del siero con XP-1



**Figura 74:** Profili HPLC del peptide di riferimento XP-1 in presenza di buffer e siero umano in bagno termostato a 37 °C

Per verificare l'appropriatezza della capacità degradativa del siero umano, è stato eseguito un test di degradazione con XP-1, peptide per cui è noto da studi precedenti che si degrada completamente entro tre ore. Dai risultati espressi in figura 74, si osserva che XP-1 non si rileva dopo tre ore dall'inizio dell'esperimento e questo dato conferma la corretta capacità degradativa del siero utilizzato nei test in seguito esposti.

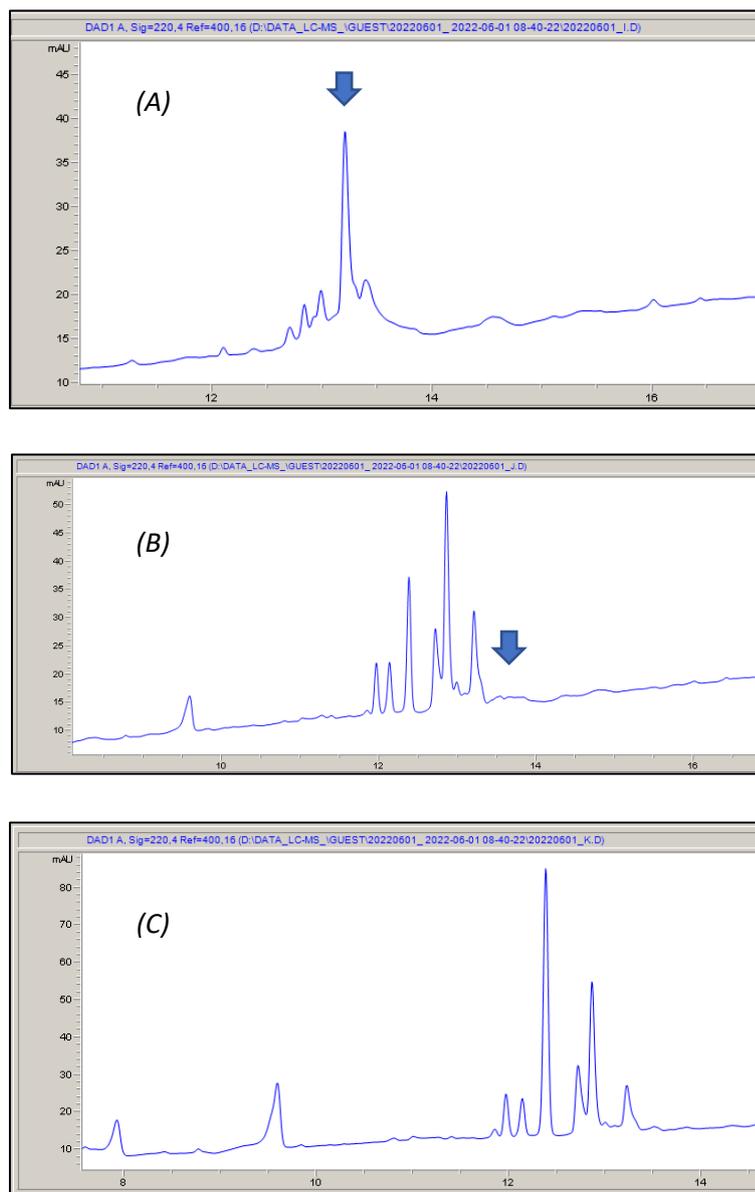
#### 4.12.2 Degradazione di Pep9 con siero umano



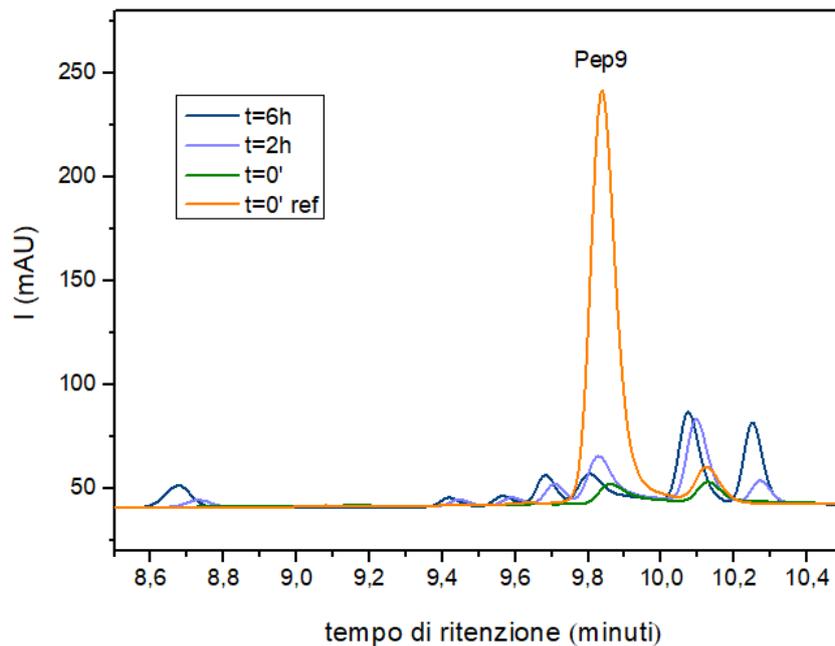
**Figura 75:** Profili HPLC di Pep9 in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

In figura 75 è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=9,83'$ , evidenza del fatto che il buffer HEPES 25 mM a pH 7,23 non degrada il peptide.

Per quanto riguarda l'analisi dei campionamenti della soluzione di reazione, in seguito vengono esposti i cromatogrammi HPLC-MS per  $t=0'$ ,  $t=2h$  e  $t=6h$ , corredati di un breve commento.



**Figura 76:** **(A)** Profilo HPLC-MS per il prelievo a  $t=0'$ . La freccia indica il picco associato a Pep9, grazie alla rilevazione del suo peso molecolare (1651,1 g/mol). **(B)** Profilo HPLC-MS per il prelievo a  $t=2h$ . La freccia indica il debole segnale associato a Pep9. **(C)** Profilo HPLC-MS per il prelievo a  $t=6h$ . È presente lo stesso pattern di segnali rilevato a  $t=2h$ , ma non c'è traccia del peptide intero.



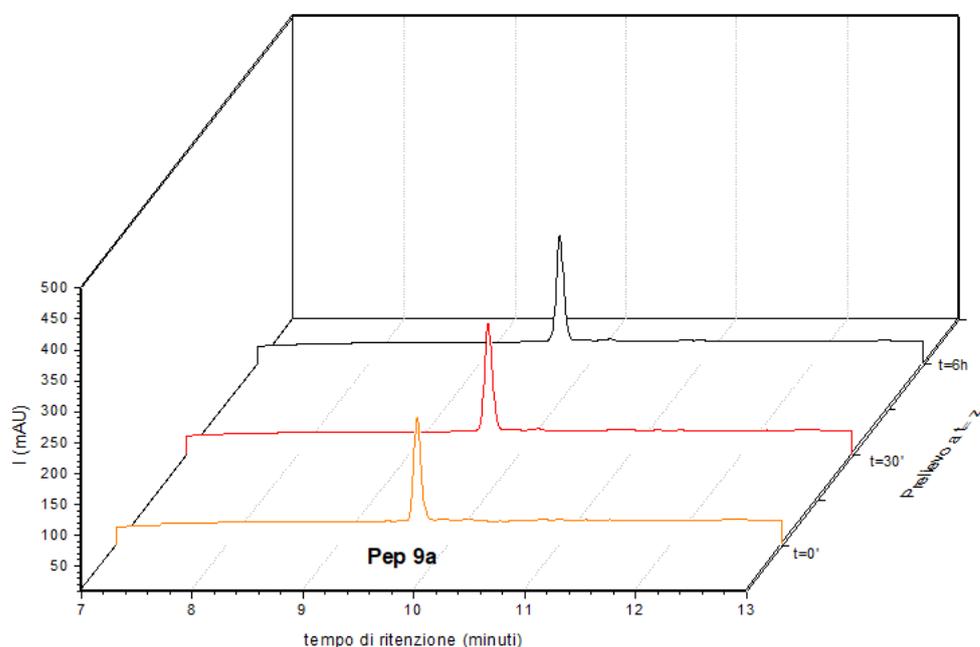
**Figura 77:** Il profilo arancione rappresenta il cromatogramma HPLC-UV del prelievo a  $t=0'$  della soluzione di Pep9 in presenza di solo buffer. I profili verde, azzurro e blu rappresentano i cromatogrammi HPLC-UV dei campionamenti rispettivamente a  $t=0'$ ,  $t=2h$  e  $t=6h$  della soluzione di Pep9 in presenza di buffer e siero umano.

Osservando la figura 77, si nota chiaramente la differenza d'intensità tra i segnali a  $t_r=9,86'$ : nel campionamento a  $t=0'$  senza siero essa è molto maggiore rispetto al prelievo a  $t=0'$  con siero, in quanto parte del peptide precipita insieme alle proteine del siero.

Il segnale a  $t_r=9,82'$  relativo al campionamento a  $t=2h$  è allargato, probabilmente perché a questo tempo di ritenzione la quantità di peptide intero rimasta e un'altra specie escono insieme dalla colonna cromatografica. Infatti, a  $t=6h$  si trova un segnale a  $t_r=9,80'$  e, considerata la completa assenza di peptide integro nell'analisi HPLC-MS, è possibile attribuirlo a un frammento di degradazione.

Da questa analisi emerge che il peptide Ac-PMAP (12-24) ha una buona resistenza all'azione del siero umano, in quanto resiste fino a due ore dall'inizio dell'esperimento di degradazione.

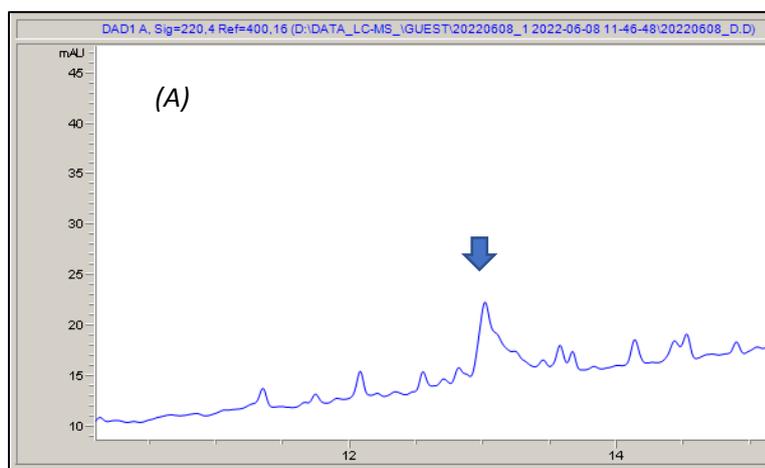
### 4.12.3 Degradazione di Pep9a con siero umano

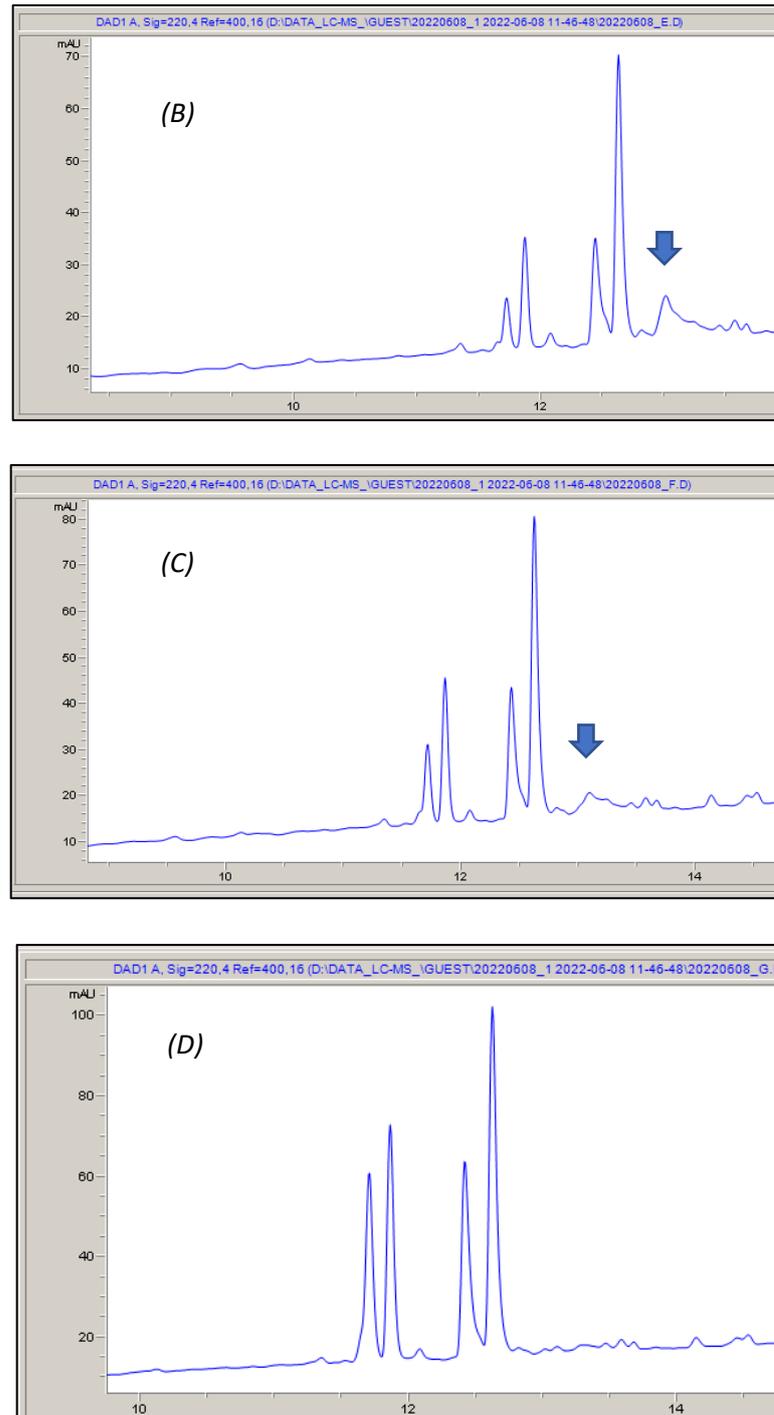


**Figura 78:** Profili HPLC di Pep9a in presenza di buffer in bagno termostato a 37 °C

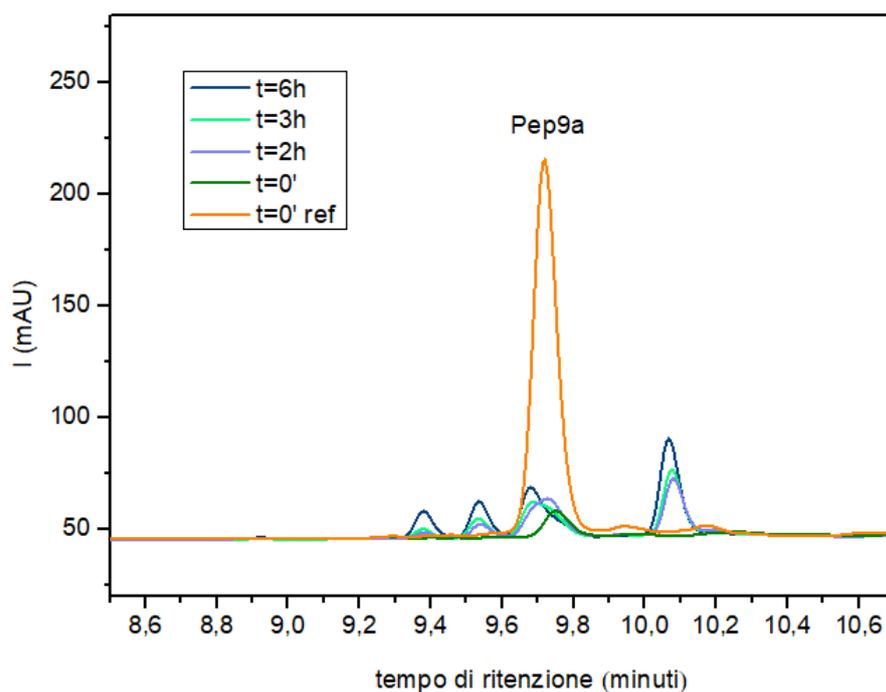
Dall'immagine è possibile osservare nei tre prelievi un picco costante a  $t_r=9,72'$ , evidenza del fatto che il buffer HEPES 25 mM a pH 7,23 non degrada il peptide.

Per quanto riguarda la degradazione di Ac-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24) con il siero, sono in seguito esposti i grafici HPLC-MS dei prelievi a  $t=0'$ ,  $t=2h$ ,  $t=3h$  e  $t=6h$ , correlati di un breve commento.





**Figura 79:** **(A)** Profilo HPLC-MS per il prelievo a  $t=0'$ . La freccia indica il picco associato a Pep9a grazie alla rilevazione del suo peso molecolare. **(B)** Profilo HPLC-MS per il prelievo a  $t=2h$ . La freccia indica il segnale associato a Pep9a. **(C)** Profilo HPLC-MS per il prelievo a  $t=3h$ . La freccia indica il segnale associato a Pep9a, di intensità minore rispetto al campionamento precedente. **(D)** Profilo HPLC-MS per il prelievo a  $t=6h$ . È presente lo stesso pattern di segnali rilevato a  $t=3h$ , ma non si rileva più il peptide intero.



**Figura 80:** Il profilo arancione rappresenta il cromatogramma HPLC-UV del campionamento a  $t=0'$  della soluzione di Pep9a in presenza di solo buffer. I profili verde, azzurro, verde acqua e blu rappresentano i cromatogrammi HPLC-UV dei campionamenti rispettivamente a  $t=0'$ ,  $t=2h$ ,  $t=3h$  e  $t=6h$  della soluzione di Pep9a in presenza di buffer e siero umano.

Osservando la figura 80 è possibile fare la stessa considerazione esposta per la degradazione di **Pep9**: nel campionamento a  $t=0'$  senza siero l'intensità del segnale è molto maggiore rispetto al prelievo a  $t=0'$  con siero, evidenza che conferma come gran parte del peptide integro viene perso con la precipitazione delle proteine del siero.

Dopo due ore dall'inizio dell'esperimento ( $t=2h$ ), il segnale a  $t_r=9,72'$  all'HPLC-UV è abbastanza allargato, fatto che suggerisce che a questo tempo di ritenzione la quantità di peptide integro residua esce dalla colonna insieme a un'altra specie. Comunque, la presenza del peptide integro a  $t=2h$  è confermata dall'analisi HPLC-MS, dove si rileva chiaramente il picco associato a **Pep9a** e il suo peso molecolare. Nel cromatogramma HPLC-UV relativo al prelievo a  $t=3h$  si nota un segnale abbastanza allargato a  $t_r=9,68'$ , per cui vale la stessa considerazione precedente. All'HPLC-MS è ancora ben visibile il picco associato al peptide integro

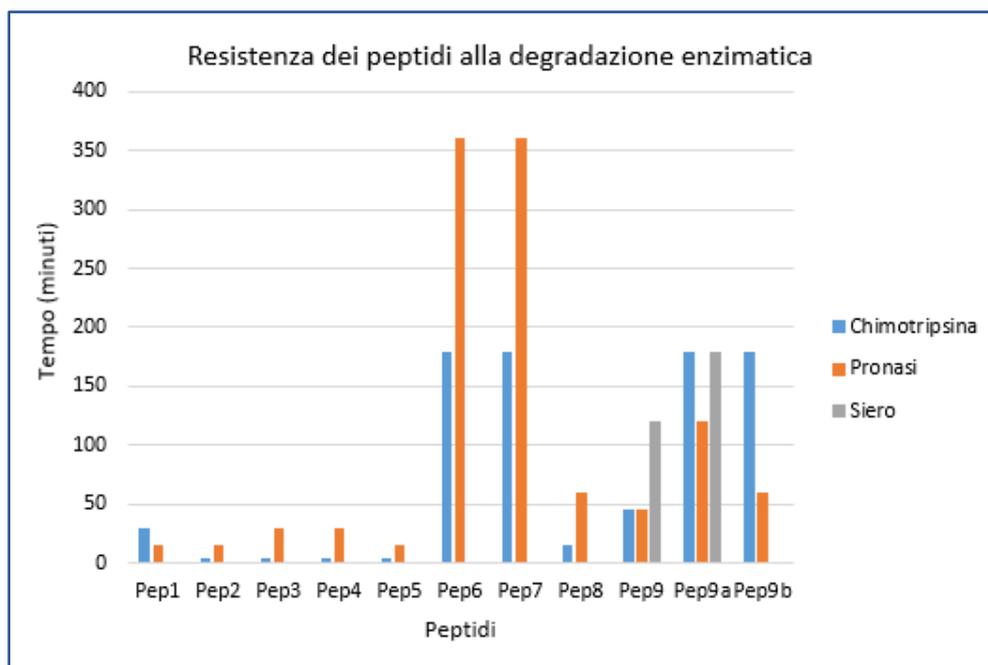
e il suo peso molecolare. Dopo sei ore dall'inizio dell'esperimento ( $t=6h$ ), all'HPLC-MS il segnale di **Pep9a** non si rileva più e all'HPLC-UV si osserva un picco a  $t_r=9,66'$  attribuibile a un frammento di degradazione.

#### 4.13 Osservazioni sulla resistenza dei peptidi alla degradazione

Per ottenere un'utile panoramica della resistenza dei derivati di PMAP-36 alla degradazione enzimatica, è stata elaborata la seguente tabella, che indica il tempo di resistenza dei peptidi (tempo in cui i peptidi sono stati rilevati per l'ultima volta all'HPLC-UV). Tali valori sono stati inseriti nel grafico in figura 81, che offre una visione ancora più immediata della resistenza dei peptidi all'azione degli enzimi.

	Chimotripsina	Pronasi	Siero
<b>Pep1</b>	t=30'	t=15'	
<b>Pep2</b>	t=5'	t=15'	
<b>Pep3</b>	t=5'	t=30'	
<b>Pep4</b>	t=5'	t=30'	
<b>Pep5</b>	t=5'	t=15'	
<b>Pep6</b>	t=180'	t=360'	
<b>Pep7</b>	t=180'	t=360'	
<b>Pep8</b>	t=15'	t=60'	
<b>Pep9</b>	t=45'	t=45'	120'
<b>Pep9a</b>	t=180'	t=120'	180'
<b>Pep9b</b>	t=180'	t=60'	

**Tabella 6:** Sono riassunti i tempi di resistenza dei peptidi, espressi in minuti (tempo in cui i peptidi sono stati rilevati per l'ultima volta all'HPLC-UV).



**Figura 81:** Istogramma riassuntivo dei tempi di resistenza dei peptidi, espressi in minuti.

È possibile osservare che **Pep1**, il peptide più simile alla catelicidina naturale PMAP-36, ha una discreta resistenza alla degradazione con pronasi (fino a 15') e chimotripsina (fino a 30'). La resistenza a quest'ultimo enzima diminuisce sostituendo le proline in posizione 25 e 26 rispettivamente con L-alanina e L-lisina. Tale osservazione sperimentale può essere dovuta al fatto che il completamento della struttura elicoidale del peptide, favorita dalla sostituzione amminoacidica apportata, promuove l'attacco dell'enzima alla molecola.

In **Pep3**, **Pep4**, **Pep5**, **Pep6** e **Pep7** è presente un gruppo acilico di diversa lunghezza. È possibile osservare che **Pep6** e **Pep7**, caratterizzati dalla presenza dell'acido palmitico, sono molto più resistenti alla degradazione enzimatica rispetto agli altri AMP in analisi (fino a 180' nei test con chimotripsina e a 360' nelle prove con pronasi). Ciò può essere spiegato dall'ingombro sterico della catena palmitica che ostacola l'attacco degli enzimi ai siti di taglio sulla sequenza peptidica.

Il peptide **Pep8** è stato sintetizzato sostituendo la leucina in posizione 14 con l'amminoacido Aib. Confrontando **Pep8** con **Pep2**, si osserva che tale sostituzione

è stata favorevole per aumentare la resistenza agli enzimi (da 5' a 15' per chimotripsina, da 15' a 60' per pronasi). Infatti, l'acido 2-amminoisobutirrico (Aib) è un residuo non proteinogenico e non riconosciuto per l'attività litica degli enzimi: ciò rallenta la loro azione di taglio su **Pep8**.

**Pep9**, peptide più corto rispetto agli altri, ha una buona resistenza in tutti i test effettuati (45' con chimotripsina e pronasi, 120' con il siero). Confrontando **Pep9** e **Pep9a**, si osserva che la sostituzione di L<sup>21</sup> con Aib, modifica apportata nel principale sito di taglio di chimotripsina, implementa decisamente la resistenza non solo a questo enzima, ma anche alle altre miscele di degradazione utilizzate, poiché si passa da 45' a 180' nei test con chimotripsina, da 45' a 120' nelle prove con pronasi e da 120' a 180' nei test con il siero. Questi risultati indicano come la modifica in un punto strategico della sequenza amminoacidica può aumentare molto la resistenza del peptide.

Ci si potrebbe aspettare che **Pep9b**, che possiede sia la sostituzione amminoacidica di L<sup>21</sup> con Aib, sia la catena palmitica all'N-terminale, si dimostri più resistente di **Pep9a**. I risultati ottenuti indicano che la presenza dell'acido palmitico non aumenta ulteriormente la resistenza all'azione degli enzimi (nei test con chimotripsina rimane di 180', in quelli con pronasi sembra diminuire, da 120' a 60').

#### 4.14 Risultati dei saggi biologici

Per la maggior parte dei derivati di PMAP-36 presi in esame sono stati svolti i saggi di attività *in vitro*. Questi sono stati condotti dal gruppo di ricerca del prof. Marco Scocchi, del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università degli Studi di Trieste. I risultati riportati in tabella 7 esprimono la concentrazione minima inibente (MIC) la crescita di diverse specie microbiche, espressa come moda di tre ripetizioni. **Pep9a** e **Pep9b** sono stati sintetizzati durante questo studio e non sono ancora disponibili i dati sull'efficacia antimicrobica.

MIC ( $\mu\text{M}$ - Moda di 3 ripetizioni)						
PEPTIDI	E. coli ATCC 25923	S. aureus ATCC 25924	A. baumannii ATCC 19607	K. pneumoniae ATCC 19607	P. aeruginosa ATCC 27854	S. epidermidis ATCC 12229
Pep1	2	64	1	1	4	2
Pep2	4	4	2	8	16	4
Pep3	8	8	4	16	16	8
Pep4	64	32	16	32	64	32
Pep5	16	16	8	16	32	8
Pep6	>64	64	64	>64	>64	64
Pep7	64	64	32	>64	>64	32
Pep8	8	8	4	8	16	4
Pep9	4	>64	2	8	8	4

**Pep1:** Ac-KRLKKIGKVLKWIPPIVGSi-NH<sub>2</sub>

**Pep2:** Ac-KRLKKIGKVLKWI**AK**IVGSi-NH<sub>2</sub>

**Pep8:** Ac-KR**U**KKIGKVLKWI**AK**IVGSi-NH<sub>2</sub>

**Pep5:** **Oct**-KRLKKIGKVLKWI**AK**IVGSi-NH<sub>2</sub>

**Pep4:** **Lau**-KRLKKIGKVLKWI**AK**IVGSi-NH<sub>2</sub>

**Pep6:** **Palm**-KRLKKIGKVLKWI**AK**IVGSi-NH<sub>2</sub>

**Pep3:** Ac-KRLKKIGKVLKWI**AK**IVGSi-**Aun**-NH<sub>2</sub>

**Pep7:** Ac-**K(Palm)**-KRLKKIGKVLKWI**AK**IVGSi-NH<sub>2</sub>

**Pep9:** Ac-KRLKKIGKVLKWI-NH<sub>2</sub>

**Tabella 7:** Risultati dei saggi *in vitro* svolti dall'Università degli Studi di Trieste

Dai risultati delle prove *in vitro* si osserva che **Pep1** è attivo contro tutti i patogeni testati, tranne *S. aureus* che si dimostra resistente. Il completamento della struttura elicoidale del peptide realizzato in **Pep2**, grazie alla sostituzione

delle proline in posizione 25 e 26 con L-alanina e L-lisina, rende la molecola efficace anche contro *S. aureus*, uno dei patogeni che provoca più frequentemente infezioni gravi.

**Pep3** si dimostra discretamente efficace contro i batteri testati, con un aumento dei valori di MIC rispetto a **Pep2**.

I risultati peggiorano per **Pep4**, **Pep5**, **Pep6** e **Pep7**, che si dimostrano scarsamente o per nulla efficaci, in quanto mostrano i valori di MIC più elevati, indicativi di una scarsa sensibilità dei microbi per questi AMP.

Tutti i microorganismi testati si rivelano resistenti ai peptidi con la catena palmitica, ovvero **Pep6** e **Pep7**, che sono quelli con la più elevata resistenza alla degradazione enzimatica.

Bisogna tuttavia considerare che i ricercatori che hanno eseguito i test comunicano che per **Pep6** e **Pep7** hanno incontrato delle difficoltà di solubilizzazione. Pertanto indicano che sarebbe opportuno ripetere queste prove variando le concentrazioni e i solventi, per favorire la solubilizzazione dei peptidi, senza la quale non può esserci attività.

Per il peptide **Pep8**, in cui L<sup>14</sup> è stato sostituito con Aib, si osserva un'efficacia discreta: i valori di MIC sono in leggero aumento rispetto a quelli di **Pep2** e ciò indica un calo di attività nell'inibire la crescita nei microorganismi testati.

**Pep9**, peptide promettente in quanto possiede una buona resistenza all'azione degli enzimi, mostra valori di MIC soddisfacenti, indicativi di una buona efficacia del peptide contro i patogeni testati; ciò non vale per *S. aureus*, che si dimostra resistente all'azione di **Pep9**.

Riassumendo, è possibile individuare **Pep1**, **Pep2**, **Pep3**, **Pep8** e **Pep9** come i peptidi migliori dal punto di vista dell'efficacia antimicrobica secondo i test *in vitro* eseguiti dall'Università degli Studi di Trieste.

#### **4.15 Studio della struttura secondaria mediante dicroismo circolare**

Diverse analisi conformazionali, presenti in letteratura, condotte su peptidi antimicrobici indicano che essi tendono ad assumere una struttura disordinata in

ambiente acquoso, mentre si piegano in una conformazione ordinata quando sottoposti a determinate condizioni, come il contatto con i fosfolipidi della membrana batterica. Nel 2005 *Scocchi et al.* studiarono la struttura secondaria di alcuni derivati di PMAP-36, osservando che in ambiente acquoso assumono una conformazione disordinata, mentre in un solvente polare come il TFE si assiste all'evoluzione di questo andamento verso una tipica forma a  $\alpha$ -elica, fatto che dimostra la tendenza del peptide e dei suoi derivati ad organizzarsi in una struttura elicoidale.<sup>1</sup>

In questa ricerca sperimentale è stato scelto di analizzare mediante dicroismo circolare i seguenti derivati di PMAP-36, interessanti sotto il profilo dell'efficacia antimicrobica o della resistenza all'azione degli enzimi. In particolare, **Pep2** è stato confrontato con **Pep3** per indagare se la catena 11-amminoundecanoica apporta modifiche nella struttura secondaria; **Pep9** è stato messo a confronto con **Pep9a** per studiare il ruolo dell'amminoacido Aib.

- **Ac - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31) → Pep2**  
Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-**Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>**-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-NH<sub>2</sub>
- **Ac - [A<sup>25</sup>, K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31) - Aun → Pep3**  
Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-**Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>**-Ile-Val-Gly-Ser-Ile-**Aun<sup>32</sup>**-NH<sub>2</sub>
- **Ac-PMAP (12-24) → Pep9**  
Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Trp-Ile-NH<sub>2</sub>
- **Ac-[U<sup>21</sup>] -PMAP (12-24) → Pep9a**  
Ac-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Val-**Aib<sup>21</sup>**-Lys-Trp-Ile-NH<sub>2</sub>

Il dicroismo circolare ricopre un ruolo fondamentale nella caratterizzazione di peptidi e proteine. La tecnica si fonda sulla spettroscopia di assorbimento differenziale di luce circolarmente polarizzata levogira e destrogira da parte di molecole chirali, che hanno la capacità di assorbire le due radiazioni

circolarmente polarizzate in modo differente, al contrario di quanto avviene per i composti achirali. Di conseguenza, la radiazione che ha attraversato una soluzione di un composto chirale è ellitticamente polarizzata, mentre per molecole achirali è circolarmente polarizzata.

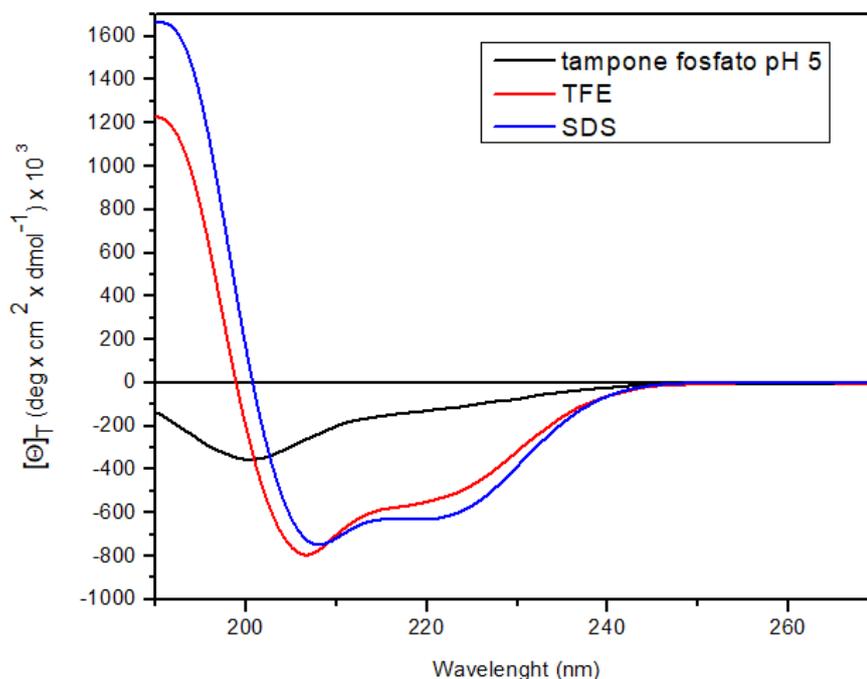
Gli spettri sono stati acquisiti nella regione spettrale 190-270 nm, in cui assorbe il cromoforo peptidico. Sulla base della diversa forma e intensità delle curve di assorbimento, si può determinare la tipologia di struttura secondaria che caratterizza il peptide in un certo solvente. Le molecole proteiche possono organizzarsi in varie strutture secondarie, ovvero  $\alpha$ -elica,  $\beta$ -foglietto, elica  $3_{10}$  oppure possono presentare una struttura disordinata. La struttura a  $\alpha$ -elica è caratterizzata da due massimi negativi a 208 e 222 nm, di intensità paragonabile, e un massimo positivo a 192 nm. La struttura ad elica  $3_{10}$  presenta lo stesso andamento ma si differenzia per l'intensità del segnale, dato che il massimo positivo a 195 nm è meno intenso mentre il massimo negativo a 207 nm è più intenso di quello a 222 nm. Per la corretta assegnazione della struttura secondaria tra le due conformazioni elicoidali, risulta utile calcolare il rapporto tra l'ellitticità molare del massimo negativo a 222 nm e di quello a 208 nm.

$$R = \frac{[\theta]_{222}}{[\theta]_{208}}$$

Nel caso in cui questo rapporto risulti inferiore a 0,4, il peptide presenta una struttura a elica  $3_{10}$ , se R è prossimo a 1 la struttura è a  $\alpha$ -elica. Nell'eventualità in cui R sia compreso tra 0,4 e 1, si osserva un'elica in cui pesa il contributo di entrambe le strutture elicoidali.

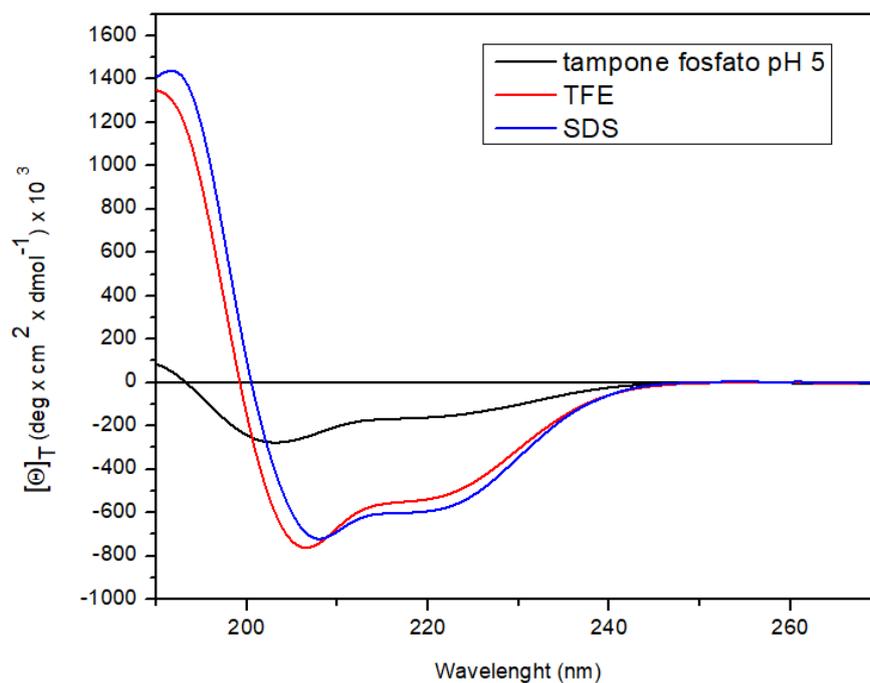
Nell'organizzazione a  $\beta$ -sheet si nota un massimo positivo a 198 nm e uno negativo a 217 nm, mentre in una conformazione non ordinata si registra un unico minimo a 198 nm. In seguito sono esposti i grafici che esprimono l'ellitticità molare totale in funzione della lunghezza d'onda; ciascuno di essi mostra un peptide nei tre diversi solventi.

#### 4.15.1 Analisi dei peptidi mediante dicroismo circolare



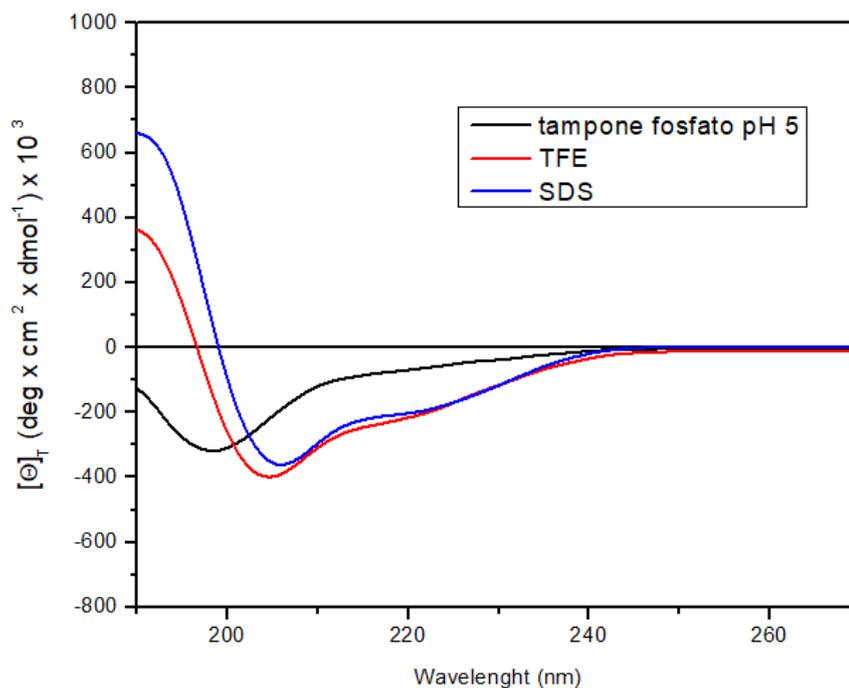
**Figura 82:** Analisi CD di Pep2, ovvero Ac- [A<sup>25</sup>; K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31), nei tre diversi solventi

Il grafico indica che **Pep2** in tampone fosfato a pH5 presenta una conformazione disordinata. Al contrario, negli altri solventi si forma una struttura elicoidale, determinata più precisamente calcolando il rapporto R, che risulta rispettivamente pari a 0,68 per il peptide in TFE e 0,83 in SDS. Poiché R è in entrambi i casi maggiore di 0,4, ma inferiore a 1, è possibile concludere che si forma una struttura elicoidale in cui pesa sia il contributo dell'α-elica, sia dell'elica 3<sub>10</sub>.



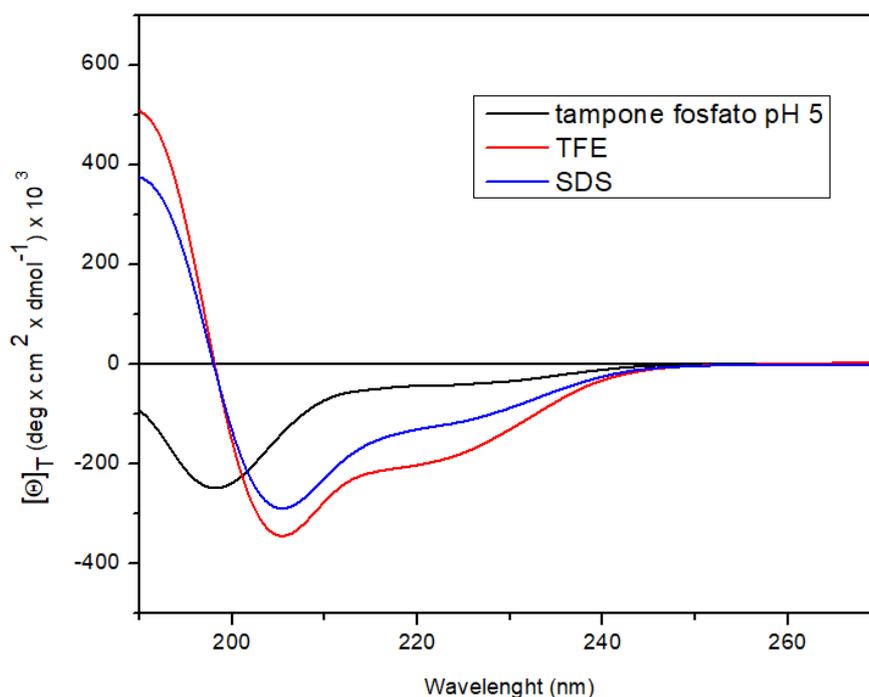
**Figura 83:** Analisi CD di Pep3, ovvero Ac- [A<sup>25</sup>; K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31) - Aun nei tre diversi solventi

Il grafico indica che in tampone fosfato a pH5 **Pep3** presenta una struttura disordinata. In TFE e SDS si forma una struttura elicoidale, determinata più precisamente ricavando il valore R, che risulta essere 0,70 per il peptide in TFE e 0,80 SDS. Poiché R è per entrambi i solventi maggiore di 0,4, ma inferiore a 1, è possibile concludere che si forma una struttura elicoidale in cui pesa sia il contributo dell' $\alpha$ -elica, sia dell'elica  $3_{10}$ .



**Figura 84:** Analisi CD di Pep9, ovvero Ac-PMAP (12-24), nei tre diversi solventi

Il grafico mostra che in tampone fosfato a pH5 **Pep9** presenta una struttura non ordinata. Al contrario, in TFE e SDS si forma una struttura elicoidale, determinata più precisamente attraverso il valore R, pari a 0,57 in TFE e 0,57 in SDS. Poiché questo risulta essere per entrambi i solventi maggiore di 0,4, ma ben inferiore a 1, è possibile concludere che non si forma una struttura pura, ma un'elica in cui pesa sia il contributo dell' $\alpha$ -elica, sia dell'elica  $3_{10}$ .



**Figura 85:** Analisi CD di *Pep9a*, ovvero *Ac-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24)*, nei tre diversi solventi

Questo grafico indica che in tampone fosfato a pH5 **Pep9a** presenta una conformazione disordinata, mentre in TFE e SDS si forma una struttura elicoidale, determinata ricavando il valore R. Questo risulta essere 0,62 per il peptide in TFE e 0,47 in SDS. Poiché questo risulta essere per entrambi i solventi maggiore di 0,4, ma ben inferiore a 1, è possibile concludere che non si forma una struttura pura, ma un'elica in cui pesa sia il contributo dell' $\alpha$ -elica, sia dell'elica  $3_{10}$ .

#### 4.15.2 Osservazioni sulla struttura secondaria dei peptidi

Osservando i grafici ottenuti con la tecnica del dicroismo circolare, è possibile osservare che in ambiente acquoso tutti i peptidi analizzati assumono una forma disordinata. Al contrario, in TFE e SDS tutti e quattro si ripiegano in una struttura elicoidale mista, in quanto pesa sia il contributo della conformazione a  $\alpha$ -elica che dell'elica  $3_{10}$ .

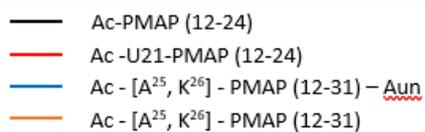
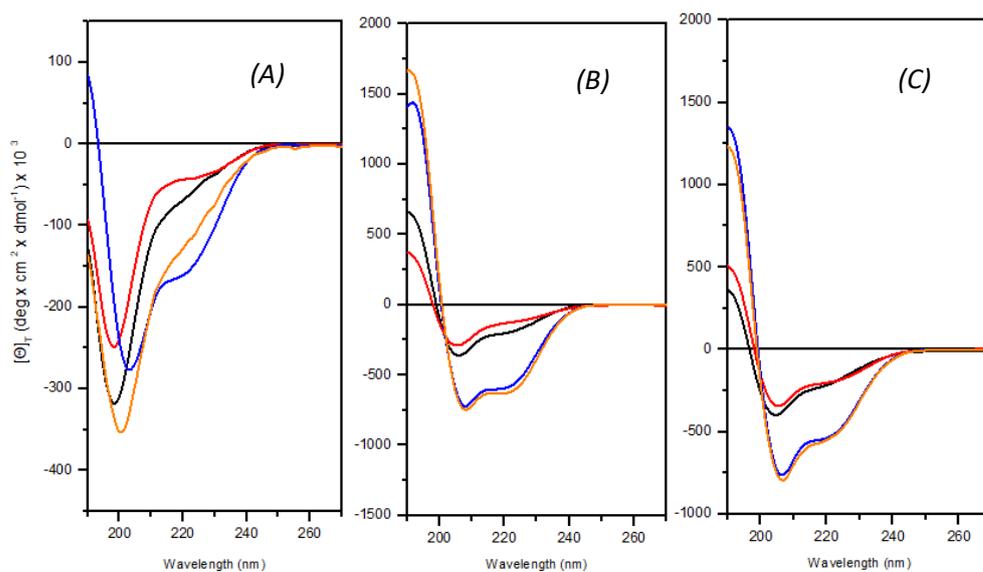
È noto che la presenza delle due proline in posizione 25 e 26 in **Pep1** ostacola la formazione dell'elica ed è questo il motivo per cui era stato deciso di sostituire i

due residui rispettivamente con alanina e lisina. I dati ricavati dal CD mostrano che questa sostituzione è stata favorevole al fine di favorire il completamento della struttura elicoidale.

È possibile notare che i peptidi più lunghi, **Pep2** e **Pep3**, formano un'elica più stabile rispetto ai derivati corti di PMAP-36, **Pep9** e **Pep9a**.

Dal confronto tra **Pep9** e **Pep9a** si osserva che i profili sono simili in TFE e SDS, da cui possiamo concludere che la sostituzione di L<sup>21</sup> con U<sup>21</sup> non ha apportato un miglioramento significativo nella formazione dell'elica per questi peptidi.

Confrontando **Pep2** e **Pep3** si evidenzia che anche i loro profili sono simili in SDS e TFE, da cui si deduce che la presenza dell'acido 11-amminoundecanoico all'estremità C-terminale di **Pep3** non perturba, né favorisce in modo significativo la formazione di una struttura elicoidale.



**Figura 86:** (A) Grafici dei quattro peptidi analizzati in tampone fosfato a pH5. (B) Grafici dei quattro peptidi analizzati in soluzione di SDS. (C) Grafici dei quattro peptidi analizzati in TFE.

Nella sottostante tabella sono riportati i valori del rapporto R, utile per valutare il contributo dell' $\alpha$ -elica e dell'elica  $3_{10}$  nella struttura. Si può osservare che i valori più vicini a 1 si ottengono per Ac- [A<sup>25</sup> K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31) e Ac- [A<sup>25</sup> K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31) -Aun con SDS, evidenza che indica un maggior carattere a  $\alpha$ -elica rispetto agli altri test. Dal momento che SDS è un tensioattivo che mima le membrane biologiche, è possibile ipotizzare che questi peptidi a contatto con la membrana batterica adottino una conformazione simile.

PEPTIDI	TFE	SDS
Ac-PMAP (12-24)	0,57	0,57
Ac-U <sup>21</sup> -PMAP (12-24)	0,62	0,47
Ac- [A <sup>25</sup> K <sup>26</sup> ] - PMAP (12-31)	0,68	<b>0,83</b>
Ac- [A <sup>25</sup> K <sup>26</sup> ]- PMAP (12-31)-Aun	0,70	<b>0,80</b>

**Tabella 8:** Riassunto dei valori R. È possibile osservare come i peptidi più lunghi in soluzione con SDS hanno valori di R più vicini a 1, indicativi di una struttura in cui il contributo dell' $\alpha$ -elica pesa di più.

## 5. CONCLUSIONI

In questa ricerca sperimentale sono state studiate alcune importanti proprietà dei derivati di PMAP-36, in particolare la resistenza alla degradazione enzimatica e la struttura secondaria in solventi diversi, analizzata mediante dicroismo circolare. Inoltre, sono stati sintetizzati nuovi analoghi a sequenza corta di PMAP-36, Ac-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24) e Palm-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24), al fine di ottenere peptidi ancora più resistenti all'azione degli enzimi. In seguito si espongono le principali conclusioni tratte dai risultati ottenuti.

- Tra i peptidi analizzati nei test di degradazione enzimatica, i più resistenti si dimostrano essere **Pep6** e **Pep7**, accomunati dalla presenza dell'acido palmitico all'estremità N-terminale. Nei saggi biologici questi peptidi non si rivelano efficaci nell'inibire la crescita microbica. Considerando la difficoltà di solubilizzazione incontrata durante questi test, ci si propone di ripeterli in futuro, variando le condizioni sperimentali in modo da sciogliere bene i peptidi, consentendo loro di svolgere l'attività antibatterica che ci si aspetta da molecole così stabili.
- Il peptide più promettente tra quelli testati si dimostra essere **Pep9**, ovvero Ac-PMAP (12-24). Esso ha una buona resistenza all'azione di tutti gli enzimi testati (45' con chimotripsina, 45' con pronasi, 120' con il siero) e si rivela efficace anche nell'inibire la crescita *in vitro* di quasi tutti i microorganismi testati.
- La scelta di sostituire L<sup>21</sup> con U<sup>21</sup>, ottenendo il peptide Ac-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24), è stata opportuna per aumentare la resistenza alla degradazione enzimatica. Il peptide resiste più a lungo dell'analogo privo di Aib passando da 45' a 180' nella prova con chimotripsina, da 45' a 120' nel test con pronasi, da 120' a 180' con il siero. Uno degli obiettivi futuri di questo progetto sarà quello di indagare l'efficacia antimicrobica *in vitro* anche di Ac-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24).

- La tecnica del dicroismo circolare ha consentito di studiare la struttura secondaria di alcuni derivati di PMAP-36 in solventi diversi. Tutti i peptidi testati assumono una struttura disordinata in ambiente acquoso e una forma elicoidale in SDS, ambiente membrano-mimetico. Essi si ripiegano in una struttura elicoidale in cui pesa sia il contributo della conformazione a  $\alpha$ -elica che dell'elica  $3_{10}$ . Tra i peptidi testati, i valori di R più vicini all'unità, indicativi di un maggior carattere a  $\alpha$ -elica, sono Ac- [A<sup>25</sup>; K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31) e Ac- [A<sup>25</sup>; K<sup>26</sup>] - PMAP (12-31) -Aun in SDS.

Sono necessari ulteriori studi per conoscere le caratteristiche chimiche, l'efficacia antimicrobica e la tossicità dei derivati di PMAP-36, prima di progettare una loro possibile veicolazione in un medicinale. Per il futuro, l'attività di questo gruppo di ricerca si concentrerà nell'indagare in modo più approfondito gli aspetti chimici dei derivati di PMAP-36, in particolare di Ac-PMAP (12-24) e Ac-U<sup>21</sup>-PMAP (12-24), che allo stato attuale appaiono i peptidi più promettenti per una futura applicazione clinica.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Scocchi, M. *et al.* Structural aspects and biological properties of the cathelicidin PMAP-36. *FEBS Journal* **272**, 4398–4406 (2005).
2. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* **399**, 629–655 (2022).
3. Checchini M., Monnet D.L., Liebana E., Freischem B. & Botgros R. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA: A One Health Response. <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/topic/files/AMR-ECDC-Policy-Brief-2022.pdf> (2022).
4. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L. & Björn, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol* **6**, (2016).
5. Nizet, V. *et al.* Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**, 454–457 (2001).
6. Kumar, P., Kizhakkedathu, J. & Straus, S. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules* **8**, 4 (2018).
7. Moretta, A. *et al.* Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. *Front Cell Infect Microbiol* **11**, (2021).
8. Harris, F., Dennison, S. & Phoenix, D. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Curr Protein Pept Sci* **10**, 585–606 (2009).
9. Lakshmaiah Narayana, J. & Chen, J.-Y. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. *Peptides (N.Y.)* **72**, 88–94 (2015).
10. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L. & Björn, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol* **6**, (2016).
11. Boparai, J. K. & Sharma, P. K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett* **27**, 4–16 (2019).
12. Schmidt, N. W. & Wong, G. C. L. Antimicrobial peptides and induced membrane curvature: Geometry, coordination chemistry, and molecular engineering. *Curr Opin Solid State Mater Sci* **17**, 151–163 (2013).
13. Sparr, E. *et al.* Self-association of Transmembrane  $\alpha$ -Helices in Model Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 39324–39331 (2005).
14. Shi, S. *et al.* Porcine Myeloid Antimicrobial Peptides: A Review of the Activity and Latest Advances. *Front Vet Sci* **8**, (2021).
15. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**, 238–250 (2005).

16. Moravej, H. *et al.* Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microbial Drug Resistance* **24**, 747–767 (2018).
17. Browne, K. *et al.* A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *Int J Mol Sci* **21**, 7047 (2020).
18. Lu, J. *et al.* D- and Unnatural Amino Acid Substituted Antimicrobial Peptides With Improved Proteolytic Resistance and Their Proteolytic Degradation Characteristics. *Front Microbiol* **11**, (2020).
19. Chen, Y. *et al.* Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1398–1406 (2007).
20. Guilhelmelli, F. *et al.* Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* **4**, (2013).
21. Schmidtchen, A., Frick, I.-M., Andersson, E., Tapper, H. & Björck, L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* **46**, 157–168 (2002).
22. Nyberg, P., Rasmussen, M. & Björck, L.  $\alpha$ 2-Macroglobulin-Proteinase Complexes Protect *Streptococcus pyogenes* from Killing by the Antimicrobial Peptide LL-37. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 52820–52823 (2004).
23. Kościuczuk, E. M. *et al.* Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep* **39**, 10957–10970 (2012).
24. Gennaro, R. & Zanetti, M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 31–49 (2000).
25. Young-Speirs, M., Drouin, D., Cavalcante, P. A., Barkema, H. W. & Cobo, E. R. Host defense cathelicidins in cattle: types, production, bioactive functions and potential therapeutic and diagnostic applications. *Int J Antimicrob Agents* **51**, 813–821 (2018).
26. Lyu, Y., Yang, Y., Lyu, X., Dong, N. & Shan, A. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and *Candida*. *Sci Rep* **6**, 27258 (2016).
27. Scheenstra, M. R. *et al.* Cathelicidins PMAP-36, LL-37 and CATH-2 are similar peptides with different modes of action. *Sci Rep* **9**, 4780 (2019).
28. Lv, Y. *et al.* Antimicrobial Properties and Membrane-Active Mechanism of a Potential  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Derived from Cathelicidin PMAP-36. *PLoS One* **9**, e86364 (2014).
29. Liu, Y. *et al.* N-terminal Myristoylation Enhanced the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Peptide PMAP-36PW. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, (2020).

30. Rounds, T. & Straus, S. K. Lipidation of Antimicrobial Peptides as a Design Strategy for Future Alternatives to Antibiotics. *Int J Mol Sci* **21**, 9692 (2020).
31.  $\alpha$ -Chymotrypsin from bovine pancreas.  
<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/sigma/c7762>.
32. Pronase from *Streptomyces griseus*.  
<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/roche/pronro>.
33. Amblard, M., Fehrentz, J.-A., Martinez, J. & Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol Biotechnol* **33**, 239–254 (2006).
34. W.C. Chan P. D. White. *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*. (Oxford University Press, 1999).
35. Palomo, J. M. Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Adv.* **4**, 32658–32672 (2014).





## **RINGRAZIAMENTI**

Giunti al termine di questa ricerca sperimentale, desidero porgere i miei più sentiti ringraziamenti a tutte le figure che sono state importanti nella produzione di questa tesi.

Vorrei ringraziare il mio relatore, il professor Mattia Sturlese, e la mia correlatrice, la professoressa Cristina Peggion, per la disponibilità e la professionalità che hanno dimostrato durante tutti questi mesi. Hanno saputo indirizzarmi opportunamente e affiancarmi nell'allestimento del progetto di ricerca e li ringrazio vivamente per la loro costante disponibilità.

Ringrazio la professoressa Barbara Biondi per i suoi utili consigli nella pratica di laboratorio; un ringraziamento anche a tutti gli assegnisti, borsisti e dottorandi del gruppo di ricerca del professor Formaggio per avermi affiancato giorno dopo giorno nelle attività quotidiane.

Rivolgo un pensiero speciale ai laureandi con cui ho stretto amicizia: Giorgia, Matteo, Claudia, Francesca, Beatrice, Daniele, Niccolò e Francesco. È stato bello condividere con voi i successi e le difficoltà che ho incontrato durante questi mesi.

Al termine di questa ricerca sperimentale posso affermare di essere soddisfatta della mia scelta. È stata una bella esperienza non solo dal punto di vista scientifico, in quanto ho avuto l'occasione di contribuire nel mio piccolo al progresso della ricerca, ma anche sotto l'aspetto umano: ho condiviso con tutti voi un'esperienza che mi porterò nel cuore. Grazie a tutti.

