



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA

**“SINTESI, CARATTERIZZAZIONE E STUDI
CONFORMAZIONALI DI ANALOGHI DELL’ANTIBIOTICO
NATURALE TRICOGINA GA IV,
CONTENENTI L’AMMINOACIDO $p\text{NO}_2\text{Phe}$ ”**

Relatore: Dr.ssa Cristina Peggion

Controrelatore: Prof: Antonio Toffoletti

Laureando: Alberto Meroni

Anno Accademico 2011/2012

Riassunto

Questo lavoro di tesi fa parte di una linea di ricerca che mira a comprendere in maniera più approfondita l'attività degli antibiotici peptaibolici ed in particolare della **tricogina GA IV**. Infatti in questo lavoro sono stati sintetizzati tre analoghi della tricogina aventi un residuo di *para*-nitro-fenilalanina [*p*NO₂Phe] in posizioni diverse della sequenza.

Gli analoghi della tricogina GA IV sintetizzati sono:

- *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-*p*NO₂Phe-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**3**)
- *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-*p*NO₂Phe-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**7**)
- *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-*p*NO₂Phe -L-Lol (**10**)

Inoltre è stato sintetizzato un altro analogo della tricogina pensato per aumentarne la selettività nei confronti di specifiche membrane batteriche. Il peptide modificato presenta la seguente sequenza:

n-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Leu-O-NH-R.

R=DMP

Per gli analoghi della tricogina contenenti la sonda *p*NO₂Phe sono stati condotti studi conformazionali in soluzione (assorbimento IR, NMR e CD) che hanno confermato la presenza di strutture elicoidali stabili. La sonda *p*NO₂Phe è stata testata mediante FT-IR e ATR-FTIR in vari ambienti, allo scopo di verificare se al cambiamento di intorno chimico corrispondesse una variazione della frequenza di stretching del gruppo NO₂.

Sono stati inoltre condotti degli studi preliminari di interazione con delle membrane modello su tutti i peptidi sintetizzati dalle quali si è osservato che gli analoghi **3**, **7** e **10** sono in grado di permeare i doppi strati fosfolipidici. L'analogo **1**, invece, ha dimostrato una minore attività.

I peptidi **3**, **7** e **10** sono stati sottoposti a test di attività in vitro.

INDICE

RIASSUNTO	i
ABBREVIAZIONI	iii
1. INTRODUZIONE	1
1.1. Antibiotici peptaibolici	1
1.2. Conformazione dei peptidi contenenti Aib	4
1.3 Rappresentazione tramite elical wheel	6
1.4. Peptaibolici e lipopeptaibolici: meccanismi d'interazione con le membrane	7
1.5. La tricogina GA IV	9
2. LE MEMBRANE	13
3. II GRUPPO NITRO	16
3.1 Uso del gruppo nitro in biochimica	16
3.2 Introduzione del gruppo nitro	16
3.3 <i>p</i> NO ₂ Phe come sonda IR	17
4. SCOPO DELLA TESI	19
4.1. Sintesi degli analoghi della tricogina GA IV contenenti la sonda NO ₂	19
4.2 Sintesi di un analogo potenzialmente dotato di maggiore selettività	20
5. PARTE SPERIMENTALE	22
5.1 Materiali e metodi	22
5.1.1. Reagenti e solventi	22
5.1.2 Strumentazione e metodi	22
5.2 Procedura generale di sintesi in fase solida	27
5.3 Purificazione dei peptidi	29
5.4 Sintesi e caratterizzazione dei peptidi 3, 7, 10 e 1	31
6. RISULTATI E DISCUSSIONE	34
6.1 Strategia di sintesi in fase solida	34
6.2 Gruppo protettore utilizzato	36
6.3 Metodi di attivazione	37
7. INDAGINI CONFORMAZIONALI	38
7.1 Assorbimento IR	40
7.1.1. Informazione sulla conformazione	40
7.1.2. Effetto della diluizione	42
7.1.3. Studio della sonda NO ₂	44

7.2 Dicroismo circolare	48
7.3 Spettroscopia NMR	52
7.4 Attività biologica	62
7.4.1. Interazione con membrane fosfolipidiche	62
7.4.2. Misure di light scattering	66
7.4.3. Test in vitro	67
8. CONCLUSIONI	70
9. BIBLIOGRAFIA	71
10. RINGRAZIAMENTI	74

Abbreviazioni

Aib (U)	= Acido α -amminoisobutirrico
ATCC	= American Type Culture Collection
ATR-FTIR	= Attenuated Total Reflectance- FT-IR Spectroscopy
CD	= Dicroismo circolare
CDCl ₃	= Deuterocloroformio
Ch	= Colesterolo
CHCl ₃	= Cloroformio
CH ₂ Cl ₂	= Diclorometano
CH ₃ CN	= Acetonitrile
CF	= Carbossifluoresceina
DCM	= Diclorometano
DIPEA	= N,N-diisopropiletilammina
DMSO	= Dimetilsolfossido
EDC	= N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimide
EtOH	= Etanolo
ESI	= Electronspray ionization
Fmoc	= 9-fluorenilmetossicarbonile
FT-IR	= Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier
Gly (G)	= Glicina
HATU	= O- (azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HBTU	= O- (benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
Hepes	= Acido 2-[4- (2-idrossietil)-1-piperazino]etansolfonico
HFIP	= Esafluoroisopropanolo
HOAt	= 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo
HOBt	= 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo
HPLC	= Cromatografia liquida ad alte prestazioni.
IR	= Assorbimento infrarosso
Ile (I)	= Isoleucina
Iva	= Isovalina
Leu (L)	= Leucina
Lipo	= Lipoico

Lol	= Leucinolo
MeOH	= Metanolo
NMR	= Risonanza magnetica nucleare
NOESY	= Spettroscopia di correlazione dipolare
PE	= 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
PG	= dell'1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerolo)
PC	= 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
ROESY	= Spettroscopia di correlazione dipolare nel sistema di riferimento rotante
SDS	= Sodiodecilsolfato
Spps	= Solid phase peptide synthesis
SUV	= Small unilamellar vesicles
TDM	= N,N,N',N'-tetrametil-4,4'-diammino difenil metano
TFA	= Acido trifluoroacetico
THF	= Tetraidrofurano
TOCSY	= Spettroscopia di correlazione scalare omonucleare tipo Hartmann-Hahn
TOF	= Analizzatore a tempo di volo (<i>time of flight</i>)
Triton X-100	= Polietilenglicole terzoctilfeniletere
Trt	= Trifenilmetile (tritle)
UV-Vis	= Spettroscopia di assorbimento ultravioletto-visibile

1. Introduzione

L'uso clinico degli antibiotici nella pratica clinica è iniziato negli anni '40 dello scorso secolo.

Da quella data in poi il personale medico da una parte e i chimici dall'altra si sono trovati a fronteggiare due tipi di problemi legati alla resistenza dei batteri agli antibiotici. Il primo problema era rappresentato dalla resistenza naturale che hanno certi batteri verso alcune classi di farmaci, si veda ad esempio il caso della penicillina ed i batteri Gram negativi; il secondo problema era ed è rappresentato dalla cosiddetta resistenza acquisita, cioè quel fenomeno per cui i batteri mutando nel tempo il loro patrimonio genetico riescono a sviluppare dei meccanismi d'immunità verso composti da cui le generazioni precedenti erano minacciate. L'insorgenza di tale tipo di resistenza è spesso da ricercare nel cattivo uso, abuso ed eccessivo uso degli antibiotici che è stato fatto soprattutto fatto nel passato.

1.1. Antibiotici peptaibolici

In tale ottica la ricerca di composti selettivi e che abbiano bassi effetti collaterali assume estrema importanza. In tempi più moderni è iniziato lo studio di peptidi estratti da microrganismi e da funghi i quali fanno parte dei meccanismi di difesa delle cellule in questione, ed esplicano la loro attività biologica alterando la permeabilità della membrana degli organismi patogeni.

I peptidi in questione sono ionoforici^[1] ed il loro meccanismo di azione consiste nel modificare la permeabilità agli ioni delle membrane biologiche, causando quindi la morte della cellula. Tale alterazione della permeabilità agli ioni può avvenire in due modi a seconda dei composti coinvolti; infatti, si può osservare il trasporto diretto di ioni (ionofori *carrier*) o la formazione di canali nelle membrane (ionofori *channel former*).

Gli ionofori *carrier* sono dei peptidi ciclici che mostrano spesso la capacità di chelare selettivamente ioni metallici formando complessi lipofili che possono diffondere attraverso il doppio strato lipidico.

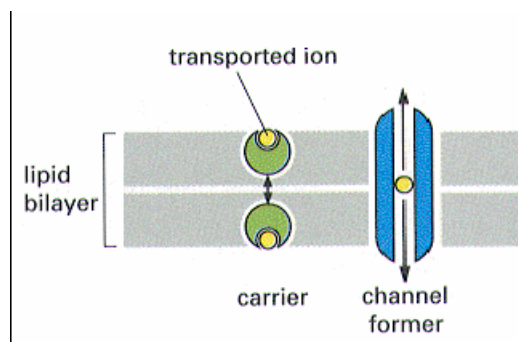


Figura 1.1 Meccanismi di azione degli ionofori carrier (sinistra) e channel former (destra).

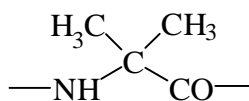
Gli ionofori *channel former* sono invece generalmente peptidi lineari che formano dei pori attraverso i quali gli ioni possono diffondere liberamente.

Tra gli ionofori *channel former* si trovano anche gli antibiotici peptaibolici,^[2,3]. Nella figura 1.2 viene riportata una selezione rappresentativa di tali composti con le relative sequenze amminoacidiche. Per questi antibiotici è stato clonato il nome di peptaibolici in quanto composti lineari di natura peptidica, ricchi in acido α -amminoisobutirrico (Aib; Figura 1.3) e recanti all'estremità C-terminale un residuo di 1,2-amminoalcol. Alcuni peptaibolici contengono, oltre all'Aib, altri due amminoacidi C ^{α} -tetrasostituiti, l'isovalina (Iva) e l' α -etilnorvalina (Etn). E' da notare che l'Iva è di solito presente come enantiomero D, ma alcune sequenze peptaiboliche contengono L-Iva.

ALCUNI ANTIBIOTICI PEPTAIBOLICI RAPPRESENTATIVI	
ALAMETICINA	Ac Aib Pro Aib Ala Aib Ala Gln Aib Val Aib Gly Leu Aib Pro Val Aib Aib Glu Gln Fol
TRICORZIANINAc	Aib Ala Ala Aib Aib Gln Aib Aib Aib Ser Leu Aib Pro Leu Aib Ile Gln Gln Wol
TRICOTOXINA	Ac Aib Gly Aib Leu Aib Gln Aib Aib Ala Ala Aib Aib Pro Leu Aib Iva Glu Vol
ZERVAMICINA	Ac Trp Ile Glu Iva Val Thr Aib Leu Aib Hyp Gln Aib Hyp Aib Pro Fol
SAMAROSPORINA	Ac Phe Aib Aib Aib Val Gly Leu Aib Aib Hyp Gln Iva Hyp Ala Fol
TRICOVIRINA	Ac Aib Asn Leu Aib Pro Ser Val Aib Pro Aib Leu Aib Pro Lol
CERVININA	Ac Leu Aib Pro Aib Leu Aib Pro Ala Aib Pro Val Lol
ARZIANINA	Ac Aib Asn Leu Ile Aib Pro Iva Leu Aib Pro Lol
TRICOGINA	FA Aib Gly Leu Aib Gly Gly Leu Aib Gly Ile Lol
TRICONINGINA KB I	FA Aib Gly Val Aib Gly Gly Val Aib Gly Ile Lol
TRICONINGINA KB II	FA Iva Gly Val Aib Gly Gly Val Aib Gly Ile Lol
LP237-F8	FA Aib Pro Phe Aib Gln Gln Aib Etn Gln Ala Lol
TRICODECENINA	FA Gly Gly Leu Aib Gly Ile Lol
PEPTAIBOLINA	Ac Leu Aib Leu Aib Fol

Figura 1.2 Alcuni antibiotici peptaibolici rappresentativi

(FA, fatty acid, indica un acido grasso con un numero di atomi di carbonio compreso tra 8 e 15).



Aib

Figura 1.3 Amminoacido C^α-tetrasostituito Aib presente nelle sequenze dei peptaibolici.

Questa classe di peptidi ha l'estremità N-terminale sempre bloccata da un gruppo acilico, solitamente tale gruppo N-bloccante è costituito dall'acetile. Alcuni peptidi come la tricogina GA IV,^[4-6] triconingine KB I e KB II,^[7] antibiotici LP237-F7, LP237-F8 e LP237-F5^[8,9] tricodécenine I e II^[10]) recano all'estremità N-terminale una catena acilica lineare lunga. Per questi composti è stato proposto il nome di *lipopeptaibolici*.^[6-11]

Si è scoperto che gli antibiotici lipopeptaibolici hanno una catena corta (fino a undici residui). La peptaibolina rappresenta un caso a parte in cui essa nonostante sia costituita da soli 5 residui (incluso l'amminoalcol C-terminale), reca un gruppo acetilico all'estremità N-terminale analogamente ai peptaibolici lunghi.^[12,13]

In natura queste molecole sono presenti come miscele di molecole spesso con differenze sottili, spesso di un solo amminoacido. Si suppone che questa distribuzione sia dovuta al fatto che non vengono prodotti mediante sintesi ribosomiale.^[14]

L'attività antibiotica dei peptaibolici come già evidenziato in precedenza, si esplica attraverso la modulazione della permeabilità delle membrane biologiche. Tali antibiotici possono dunque manifestare attività emolitica e citolitica,^[15] possono inoltre accrescere la permeabilità dei liposomi^[16] e disaccoppiare la fosforilazione ossidativa.^[17] L'alameticina è un peptide del gruppo dei peptaibolici noto per la sua capacità di creare dei canali voltaggio-dipendenti che si formano quando un numero variabile di molecole (4-12) si auto-assembla per formare il poro^[18-20]. L'alameticina e i peptidi ad essa correlati possono, infatti, fungere da modello^[21] per la comprensione di sistemi molto più complessi, quali sono i canali formati da proteine nelle membrane cellulari.

Negli anni recenti i peptaibolici sono stati studiati, oltre che dal punto di vista biofisico, anche sul piano conformazionale, al fine di comprendere la relazione esistente tra sequenza peptidica e conformazione, e tra questa e l'attività biologica. Dato l'elevato contenuto in Aib, α-amminoacido C^α-tetrasostituito dalle propensioni strutturali, l'attenzione si è focalizzata in particolare sull'influenza esercitata da questi residui sulla struttura tridimensionale dello

scheletro peptidico dei peptaibolici.^[22] Verrà quindi brevemente riassunto qui di seguito quanto noto circa la conformazione assunta dai peptidi contenenti l'amminoacido Aib.

1.2 Conformazione dei peptidi contenenti Aib

L'Aib è il più semplice amminoacido C^α-tetrasostituito. Calcoli di energia conformazionale^[23-26] hanno evidenziato che la presenza di due gruppi metilici sul C^α impone una notevole restrizione dello spazio conformazionale accessibile all'Aib, che risulta quindi confinato alla regione delle conformazioni elicoidali di tipo α (Figura 1.4) e di tipo 3_{10} (Figura 1.5). Poiché il residuo di Aib è achirale, le eliche destrogire e sinistrogire, sono isoenergetiche e quindi equiprobabili. Qualora siano presenti, oltre all'Aib, amminoacidi chirali, il senso di spiralizzazione dell'elica sarà governato dalla chiralità di questi ultimi: gli L-amminoacidi proteici favoriscono eliche destrogire, mentre i D-amminoacidi favoriscono eliche sinistrogire.

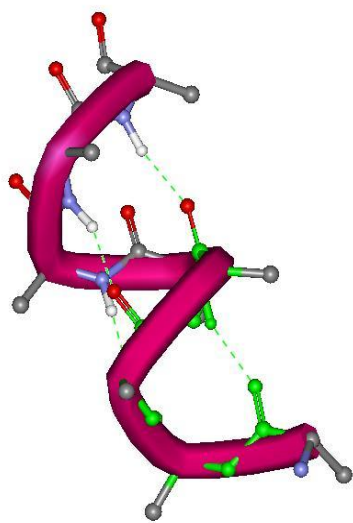


Figura 1.4 α-elica destrogira

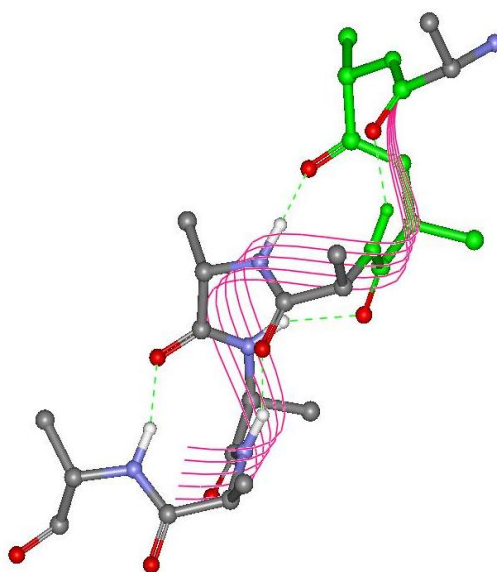


Figura 1.5 elica 3₁₀ destrogira

Qui di seguito vengono riportate le caratteristiche principali delle eliche destrogire α -elica ed elica- 3_{10}

L'elica- 3_{10} presenta invece 3.24 residui per giro ed è caratterizzata da legami ad idrogeno intramolecolari tra il gruppo carbonilico di un residuo i e il gruppo ammidico del residuo $i+3$. Il legame ad idrogeno quindi chiude un ciclo comprendente 10 atomi. L' α -elica è un'elica destrogira caratterizzata da 3.63 residui per giro. Questa conformazione è

stabilizzata dalla presenza di legami ad idrogeno intramolecolari che si formano tra un gruppo carbonilico del residuo i ed il gruppo ammidico del residuo $i+4$. Il legame ad idrogeno chiude un ciclo comprendente 13 atomi. La tabella sottostante riassume quanto esposto.

Tabella 1.1 Parametri per le eliche destregire di tipo 3_{10} e α .

Parametri	Elica 3_{10}	Elica α
ϕ	-57°	-63°
ψ	-30°	-42°
Angolo del legame idrogeno N-H...O=C	128°	156°
Rotazione per residuo	111°	99°
Traslazione assiale per residuo	1.94 Å	1.56 Å
Numero di residui per giro	3.24	3.63
Passo dell'elica	6.29 Å	5.67 Å

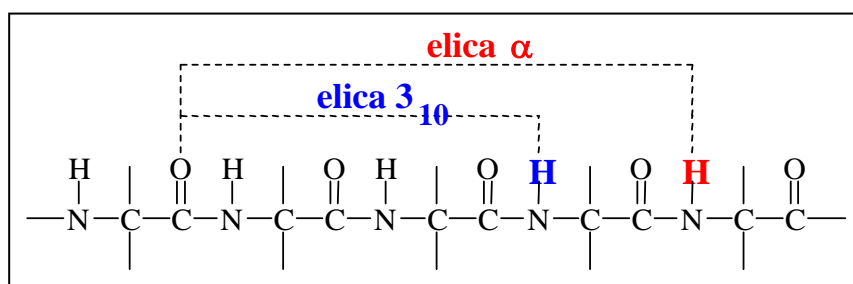


Figura 1.6 Legami a idrogeno intramolecolari nell' α -elica e nell'elica 3_{10} .

Per gli angoli torsionali che definiscono la conformazione di una catena polipeptidica (Figura 1.7) viene utilizzata la convenzione raccomandata dalla Commissione IUPAC-IUB per la Nomenclatura Biochimica.^[27]

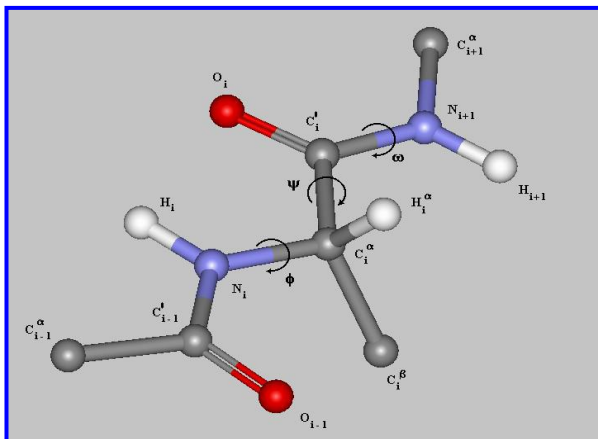
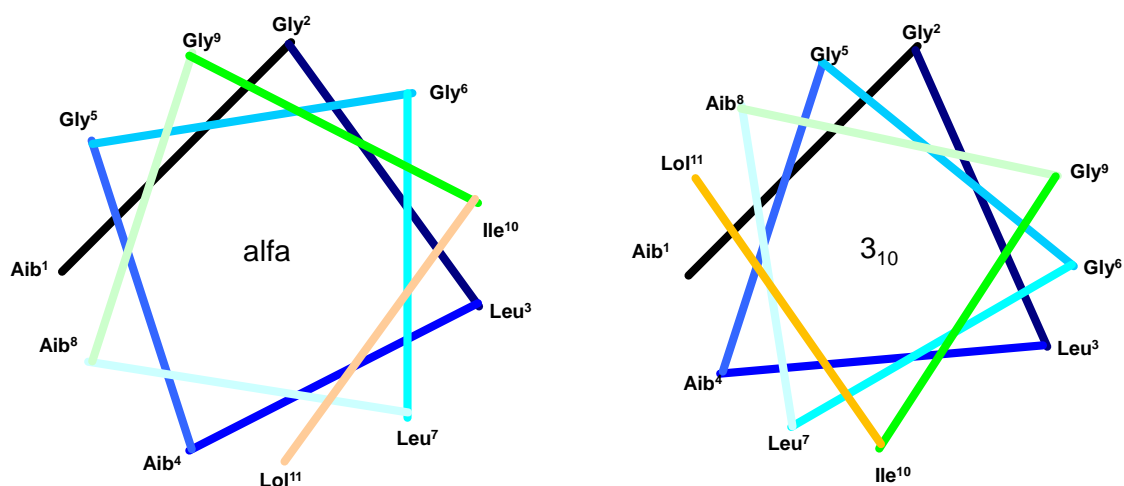


Figura 1.7 *Rappresentazione di una catena polipeptidica (due unità peptidiche). Sono indicate le notazioni raccomandate per gli atomi e gli angoli torsionali. La catena è rappresentata nella conformazione completamente estesa ($\phi = \psi = \omega = 180^\circ$) e il residuo centrale è in configurazione *L*.*

1.3 Rappresentazione tramite modello Helical Wheel

La struttura tridimensionale di un'elica può essere rappresentata da una proiezione bidimensionale chiamata "helical wheel": essa è una rappresentazione in cui le catene laterali degli amminoacidi costituenti il peptide sono disegnate lungo un asse perpendicolare all'asse dell'elica. Il perimetro della ruota corrisponde al backbone della catena peptidica mentre nella parte esterna si trovano le catene laterali.^[28] Si può notare, in entrambi i casi, che il carattere dell'elica è in qualche modo anfifilico dato che i quattro residui di Gly (l'amminoacido meno idrofobico nella sequenza) sono disposti su una faccia dell'elica mentre le catene laterali idrofobiche di Leu, Ile, e Lol sono disposti sull'altra faccia.



Parameter	α -helix	3_{10} -helix
θ	-63°	-57°
ψ	-42°	-30°
Angle of the N \cdots O=C H-bond	156°	128°
Rotation per residue	99°	111°
Axial translation per residue	1.56 Å	1.94 Å
Residues per turn	3.63	3.24
Helix pitch	5.67 Å	6.29 Å

Aib¹-Gly²-Leu³-Aib⁴-Gly⁵-Gly⁶-Leu⁷-Aib⁸-Gly⁹-Ile¹⁰-Lol¹¹

Figura 1.8 modello "helical wheel" per la tricogina GA IV in conformazione α -elica ed elica 3_{10} .

1.4 Peptaibolici e lipopeptaibolici: meccanismi d'interazione con le membrane

La membrana cellulare costituisce la barriera che avvolge il citoplasma di tutte le cellule coinvolte in vari processi essenziali per la vita stessa della cellula. I peptidi che sono in grado di interagire con la membrana sono detti "attivi su membrana": di questa categoria fanno parte i peptaibolici. In generale i peptidi antimicrobici hanno una catena costituita da 10-40 residui amminoacidici e possiedono una struttura anfipatica. In seguito all'invasione di un organismo patogeno tali peptidi agiscono uccidendo l'invasore, distruggendo la membrana cellulare, oppure formando dei canali nella stessa. Molti studi suggeriscono che il peptide assuma la propria struttura secondaria legandosi alla membrana con diversi possibili meccanismi.

Tra le prime sequenze peptaiboliche ad essere delucidate si annoverano quelle dell'alameticina. Come già ricordato l'alameticina ha due caratteristiche importanti, infatti, possiede attività antibatterica ed emolitica. Si ritiene che tale azione sia dovuta alla formazione di pori *trans*-membrana voltaggio-dipendenti.^[29-31] La struttura ai raggi X

dell'alameticina è stata risolta nel 1953^[32]: essa è schematicamente rappresentabile come due segmenti elicoidali i cui assi formano un angolo di circa 20° in corrispondenza di un residuo di Pro. Il carattere dell'elica è inoltre leggermente anfifilico. La conformazione dell'alameticina riscontrata allo stato cristallino sembra essere mantenuta anche in soluzione, come emerge da studi condotti mediante ¹H-, ¹³C- e ¹⁵N-NMR in solventi organici ^[33-35] in sistemi micellari.^[36] I numerosi studi condotti proprio sull'alameticina hanno permesso di individuare alcuni possibili meccanismi di azione applicabili in generale a tutti i peptaibolici. Il meccanismo “a doghe di botte” o quello “carpet” (a tappeto) sono i più accreditati.^[37,38]

Modello “a doghe di botte”. Un certo numero di eliche peptidiche si associa fra loro inserendosi perpendicolarmente alla membrana perforandola da parte a parte e formando così un poro. (Fig. 1.9).

Modello a “tappeto”. Le eliche peptidiche si dispongono parallelamente alla superficie della membrana (Fig.1.9) interagendo in qualche modo con essa e modificando le proprietà fisiche del doppio strato (ad esempio distruggendo l'impaccamento lipidico e/o modificando la curvatura intrinseca di ciascun monostrato).

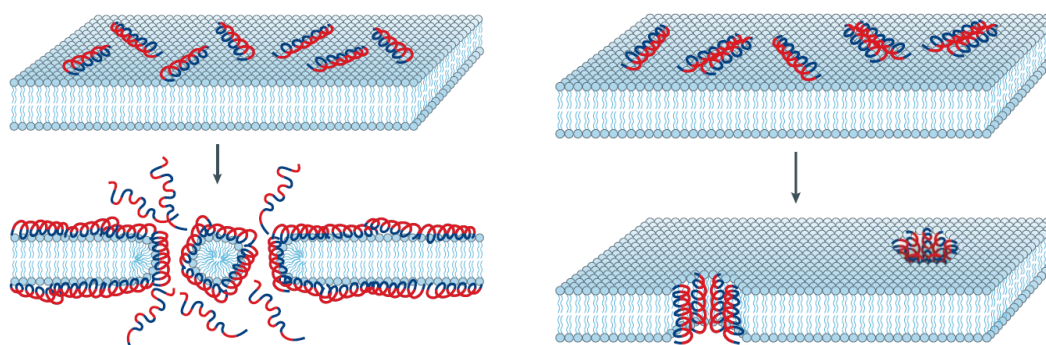


Figura 1.9 Modello “a tappeto” (sinistra) e modello “a doghe di botte” (destra) per l’interazione con le membrane cellulari da parte di molecole elicoidali.

Da numerosi studi effettuati sull'alameticina è stato riscontrato che la parte N-terminale dell'elica si inserisce nella membrana fino allo snodo rappresentato dalla Pro¹⁴ che si fermerebbe sulla superficie della membrana. In seguito all'applicazione di un voltaggio la parte C-terminale del peptide si ri-orienterebbe e s'inserirebbe completamente nella membrana. A questo punto un certo numero di eliche (6-12) si assocerebbe a formare un canale (Fig.1.10). Questo modello, secondo cui il voltaggio sarebbe responsabile di una transizione conformazionale e del conseguente inserimento dell'alameticina nelle membrane,^[39] bene interpreta l'insieme di evidenze sperimentali finora raccolte e si applica

in modo del tutto analogo ai numerosi peptaibolici aventi struttura simile all'alameticina, quali ad esempio la zervamicina.^[33]

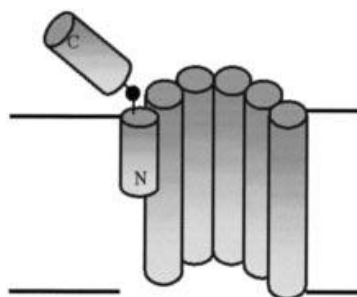


Figura 1.10 Modello "a doghe di botte" per la formazione di canali nelle membrane cellulari da parte dei peptaibolici; lo snodo a livello di una prolina è rappresentato da una sfera nera.

E' opportuno precisare che le lunghezze totali dell'alameticina e di peptaibolici quali la zervamicina, determinate cristallograficamente (28-34 Å), sono sostanzialmente paragonabili allo spessore della porzione idrofobica di una membrana a doppio strato, che è di circa 34 Å.

Gli antibiotici lipopeptaibolici^[6-11] (Fig. 1.2) differiscono dagli altri membri della famiglia per la presenza in posizione N-terminale di un gruppo acilico di 8-10 atomi di carbonio e per la corta sequenza (7-11 residui, includendo nel computo l'1,2-amminoalcol C-terminale). Inoltre la tricogina GA IV, le triconingine KB I e KB IIk, e le tricodecenine, mancano di residui idrofilici e di Pro.

1.5 La tricogina GA IV

Per i lipopeptaibolici non è stato ancora accertato se siano in grado di formare pori voltaggio-dipendenti in membrane lipidiche planari. E' stato invece rilevato che questi peptidi possiedono una significativa attività antibiotica contro i batteri Gram-positivi.^[4-7] La tricogina GA IV è stato il primo lipopeptaibolico ad essere isolato e, pertanto, è anche il peptide di questa famiglia più estesamente studiato. La conformazione di questo peptaibolico è stata studiata in metanolo mediante ¹H, ¹³C-NMR e CD^[5]. Sulla base di questi risultati è stata proposta una conformazione principalmente α -elicoidale con qualche struttura C₁₀. Più recentemente è stata risolta la struttura ai raggi X del racemato della tricogina GA IV, ottenuto mediante co-cristallizzazione degli enantiomeri "tutto D" e "tutto L" in quantità equimolari.^[40] Nel cristallo sono presenti due molecole indipendenti per ciascun enantiomero (molecola A e molecola B) di conformazione molto simile (Fig.1.11).

Nel cristallo sono presenti due molecole indipendenti per ciascun enantiomero (molecola A e molecola B) di conformazione molto simile (Fig.1.11).

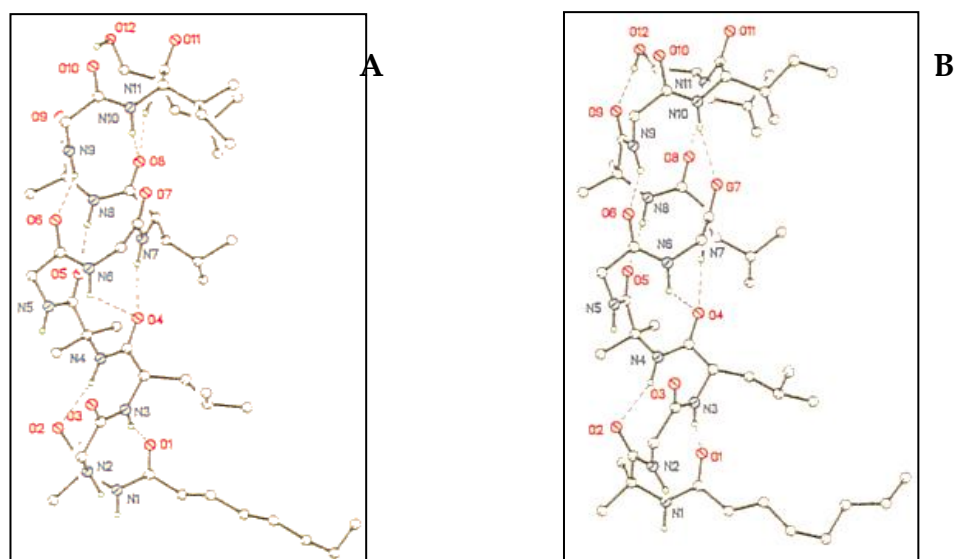


Figura 1.11 Struttura cristallina della tricogina GA IV: enantiomero "tutto L" (A) ed enantiomero "tutto D" (B). I legami a idrogeno sono indicati da linee tratteggiate.

Il peptide assume una conformazione elicoidale mista $\alpha/3_{10}$ (destrogiro per l'enantiomero L, levogiro per quello D). In particolare si riscontra un breve segmento elicoidale 3_{10} nella regione N-terminale seguito da un segmento più lungo di α -elica irregolare. Il gruppo ottanoilico N-terminale è orientato perpendicolarmente all'asse dell'elica e la lunghezza della porzione peptidica è di circa 16 Å, corrispondente approssimativamente a metà dello spessore di una membrana lipidica a doppio strato. Inoltre il carattere dell'elica è in qualche modo anfifilico dato che, sebbene manchino residui propriamente idrofilici, i quattro residui di Gly (l'amminoacido meno idrofobico nella sequenza) sono disposti su una faccia dell'elica mentre le catene laterali idrofobiche di Leu, Ile, Lol e il gruppo ottanoilico sono disposti sull'altra faccia. Dall'impacchettamento cristallino emerge che tali eliche anfifiliche si dispongono a cerchio formando un canale in cui sono ospitate molecole d'acqua co-cristallizzate (Fig.1.12). Questo canale si estende all'infinito poiché paia di molecole di uguale senso d'avvolgimento sono connesse testa-coda attraverso legami a idrogeno intermolecolari.

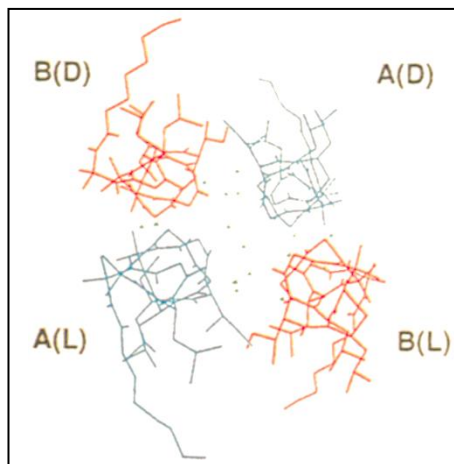


Figura 1.12 Formazione di canali da parte di eliche di tricogina GA IV allo stato cristallino (visione lungo l'asse dell'elica). Le molecole d'acqua sono indicate da punti; sono indicati inoltre il tipo di enantiomero (L o D) e di molecola indipendente (A o B).

A causa delle sue dimensioni si nota facilmente che la tricogina GA IV non è in grado di attraversare da parte a parte la membrana lipidica, come i peptaibolici più lunghi sono invece in grado di fare. Per giustificare la sua attività sulle membrane, occorre quindi invocare un modello di azione diverso da quello già descritto per i peptaibolici più lunghi.

In base alle informazioni ricavate sulla struttura cristallina della tricogina GA IV è stato ipotizzato che questa possa agire sulle membrane secondo un modello a “doghe di botte modificato” (Fig.1.13).

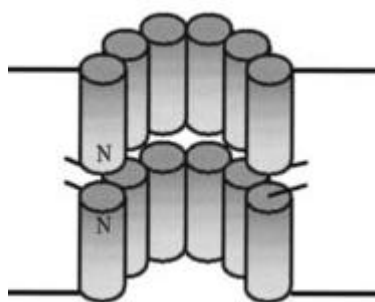


Figura 1.13 Modello a “doghe di botte modificato”: associazione di peptaibolici corti N-terminale a N-terminale per attraversare il doppio strato fosfolipidico.

Si pensa che molecole di tricogina GA IV si leghino testa-a-testa in maniera non covalente dando origine a dimeri di lunghezza sufficiente ad attraversare la membrana. Così facendo si forma un canale idrofilico al cui interno si troverebbero le facce ricche di glicina. La funzione del gruppo *n*-ottanoilico potrebbe essere quella di inserirsi tra le facce idrofobiche

delle molecole orientate testa-a-testa, governando in qualche misura l'allineamento tra le due metà del poro.

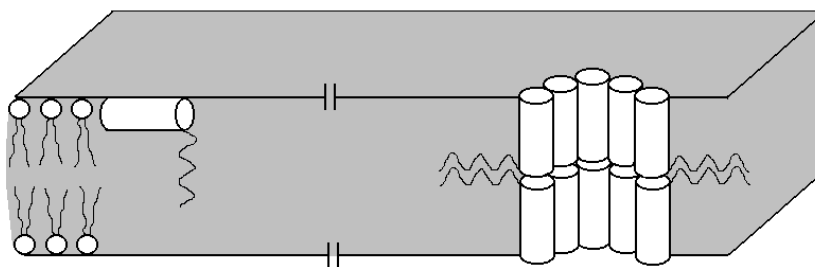


Figura 1.14 Meccanismo di azione della tricogina GA IV sulle membrane secondo i modelli “a tappeto” (sinistra) e “a doghe di botte modificato” (destra).

La differenza fondamentale tra quest’ultimo modello e quello “a tappeto”, dove la funzione del gruppo ottanoilico sarebbe quella di ancorare la molecola alla superficie della membrana perturbandone l’impaccamento fosfolipidico, consiste nella diversa orientazione del peptide rispetto al piano della membrana.

Nel gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la tesi, recentemente, sono stati sintetizzati altri analoghi della tricogina GA IV, contenenti in posizione opportune sonde fluorofore, in modo di poter estendere lo studio dell’attività in membrana a tecniche spettroscopiche quali l’assorbimento UV e la fluorescenza.^[41,42] I risultati ottenuti da tali analisi, condotte su liposomi, hanno portato a concludere che il meccanismo di azione della tricogina GA IV sui doppi strati è dominato dall’equilibrio tra una specie inattiva monomeric, che si orienta parallelamente alla superficie del doppio strato, e una forma aggregata, che si inserisce in membrana consentendo il rilascio di marcatori inclusi nei liposomi (*leakage*). Inoltre, solo il rilascio di sonde di determinate dimensioni ($r \sim 2$ nm) è risultato favorito (*size-selective leakage*). Questo dato, assieme al riscontro di una forte correlazione tra concentrazione di aggregato in membrana e perturbazione della membrana stessa, sembrerebbe supportare l’ipotesi di formazione del poro transmembrana (modello “a doghe di botte”).

2. Le Membrane

I batteri si dividono in Gram positivi e Gram negativi in base al comportamento che manifestano quando vengono sottoposti alla colorazione di Gram. La colorazione agisce sulla parete cellulare: se i batteri trattengono il colorante sono definiti Gram positivi mentre, se non lo trattengono, sono Gram negativi (sono grigiastri, privi di colorazione).

Tale diverso comportamento è da attribuirsi alla diversa struttura della parete cellulare. La parete dei Gram positivi è costituita da uno strato di peptidoglicano che riveste la membrana citoplasmatica.

La parete dei batteri Gram negativi è costituita da due strati, il primo dei quali è formato da un doppio strato di fosfolipidi in cui si inseriscono dei lipopolissaccaridi e delle lipoproteine. Il secondo strato è costituito nuovamente da peptidoglicano però a differenza dei batteri gram positivi lo spessore di esso risulta essere inferiore, quest'ultimo strato riveste la membrana citoplasmatica.

La membrana citoplasmatica delle due classi di batteri ha una composizione lipidica differente. Essa nella maggior parte dei batteri ha come fosfolipide predominante la fosfatidiletanolamina (PE), nella forma zwitterionica. In generale i batteri Gram negativi hanno un contenuto maggiore in PE rispetto ai Gram positivi, i quali, possono avere un contenuto di PE anche molto basso.

La membrana citoplasmatica dei batteri Gram positivi è costituita principalmente da fosfatidilglicerolo (PG) e la cardiolipina (CL).

Tutti i batteri hanno almeno il 15% di lipidi anionici e questi possono essere rappresentati da PG, CL o da entrambi sia per un organismo Gram positivo che per un Gram negativo. E' proprio la composizione lipidica che garantisce la selettività degli agenti antimicrobici verso i batteri, preservando le cellule eucariotiche.

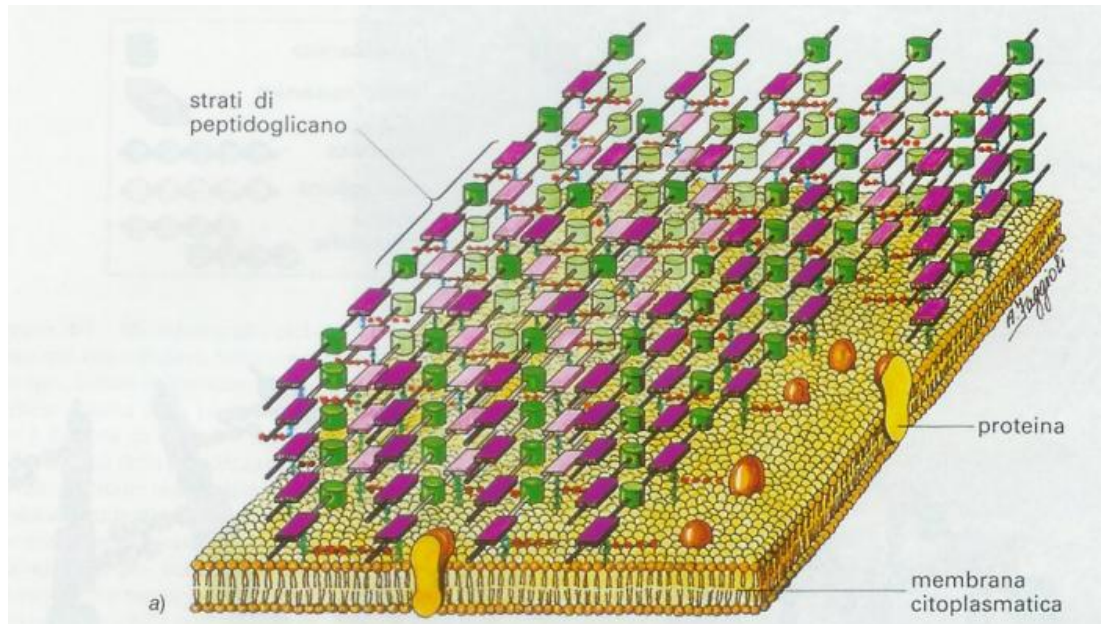


Fig. 2.1 Immagine esemplificativa della struttura cellulare dei batteri Gram positivi;

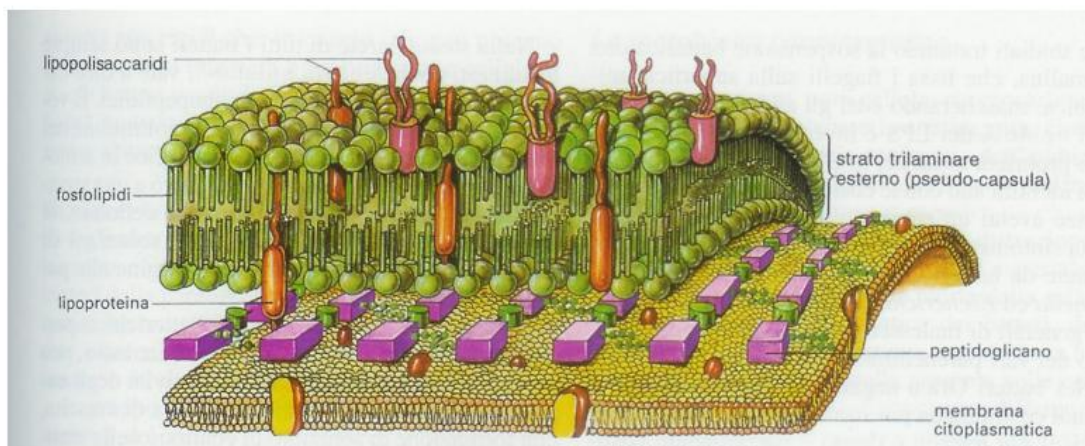


Fig.2.2 Immagine esemplificativa della struttura cellulare dei batteri Gram negativi;

Nel nostro laboratorio sono state preparate membrane artificiali a diversa composizione di lipidi proprio per imitare le diverse cellule batteriche e quelle eritrocitiche. Sono state preparate vescicole fosfolipidiche unilamellari (SUV) usando tre tipi di fosfolipidi che mimano la composizione delle membrane eritrocitiche, dei batteri Gram negativi e dei Gram positivi, rispettivamente.^[43] Successivamente i peptidi più promettenti sono stati testati *in vitro*.

I liposomi sono stati preparati incorporando una sonda fluorescente, quale la carbossifluoresceina (CF). La capacità di modificare la permeabilità delle membrane lipidiche da parte della tricogina GA IV e dei suoi analoghi è stata esaminata misurando la percentuale di rilascio di CF da vescicole unilamellari (SUV) di diversa composizione lipidica, all'aumentare della quantità di peptide aggiunta ad una sospensione di lipidi.

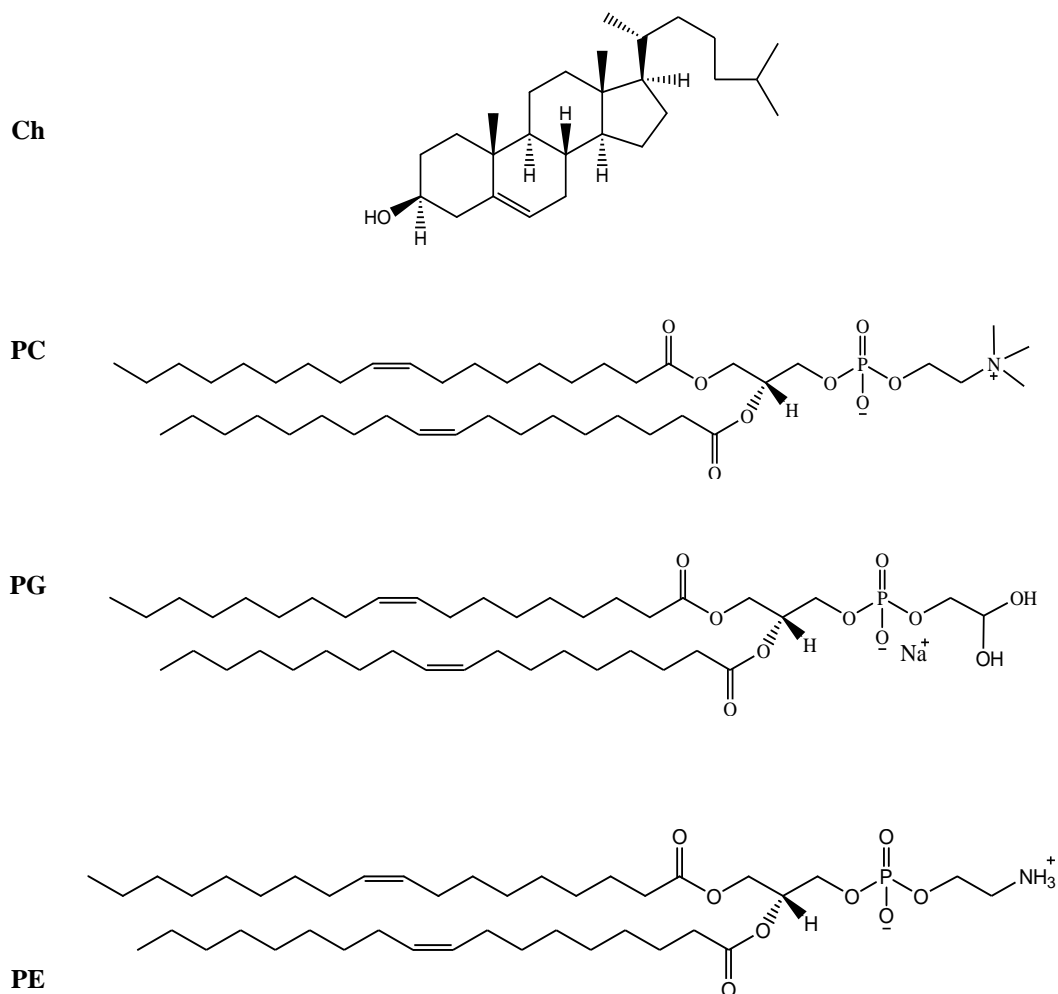


Figura 2.3 Strutture di: Colesterolo (**Ch**), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolcolina (**PC**), sale sodico dell'1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerolo) (**PG**), e 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanalammina (**PE**)

In particolare, le membrane preparate per testare i nostri peptidi hanno la seguente composizione lipidica:

A) Per le membrane eritrocitiche: fosfatidilcolina/colesterolo (PC/Ch) 7:3

B) Per i batteri Gram negativi: fosfatidiletanolamina/fosfatidilglicerolo (PE/PG) 7:3

3. Il gruppo Nitro

3.1 Uso del gruppo $p\text{NO}_2$ in biochimica

L'amminoacido non naturale p-nitrofenilalanina ($p\text{NO}_2\text{Phe}$) è un “probe” biochimico per lo studio della struttura e dell'attività delle proteine. Quando viene introdotto nelle proteine, esso può quenchare la fluorescenza intrinseca dei residui di Triptofano (Trp) che si trovano nelle vicinanze. ^[44]

Recentemente la possibilità di codificare geneticamente questo amminoacido non naturale ha reso possibile la preparazione in vivo di proteine modificate e contenenti la coppia Trp- $p\text{NO}_2$ utile a individuare parametri strutturali della proteina stessa.

3.2 Introduzione del gruppo $p\text{NO}_2$

Per incorporare il gruppo $p\text{NO}_2$ nei peptidi si usa in genere l'amminoacido $p\text{NO}_2$ -fenilalanina ($p\text{NO}_2\text{Phe}$) inserito nelle sequenze mediante l'applicazione dei protocolli standard per la sintesi peptidica su fase solida o in soluzione. L'amminoacido $p\text{NO}_2\text{Phe}$ è disponibile in commercio ed è diventato un composto di uso comune.

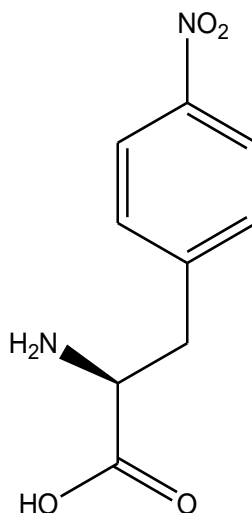


Figura 3.1. Il residuo amminoacido $p\text{NO}_2$ -Phe.

Per l'analisi strutturale è importante che la sonda $p\text{NO}_2$:

- (i) Sia vicina al backbone del peptide;
- (ii) Non alteri sostanzialmente la struttura o la funzione del peptide;

(iii) Venga introdotta solo in alcune posizioni chiave in modo che i segnali non siano multipli e sovrapposti;

Generalmente, la $p\text{NO}_2\text{Phe}$ viene introdotta al posto di un corrispondente amminoacido proteinogenico, preferibilmente l'amminoacido fenilalanina (Phe). Nel nostro caso, in mancanza del residuo Phe nella sequenza nativa della tricogina GA IV, si sceglierà di sostituirlo ad un residuo che si trova nella faccia idrofobica del peptide naturale (Leucina o Isoleucina).

3.3. $p\text{NO}_2\text{Phe}$ come sonda IR

La spettroscopia infrarossa richiede una sonda i cui modi vibrazionali siano sufficientemente separati dalle forti bande di assorbimento tipiche dei peptidi, quali l'ammide I o le bande CH. In questo senso si sono rivelati utili sonde quali il gruppo il triplo legame del gruppo CN o i modi di stretching del gruppo $p\text{NO}_2$. L'amminoacido non naturale Fmoc- $p\text{NO}_2\text{Phe-OH}$ è stato recentemente utilizzato come sonda IR poiché i suoi modi vibrazionali danno due bande di assorbimento in regioni libere da altri segnali. Le bande a 1346 e 1513 cm^{-1} possono essere assegnate rispettivamente ai modi di stiramento simmetrico e antisimmetrico del nitro gruppo. ^[45,46]

In alcuni lavori recenti è stato dimostrato che la frequenza di stretching simmetrico (del nitrofenolo) è estremamente sensibile al solvente nel quale si trova immersa. In particolare, la posizione della banda del gruppo nitro dipende sia dai legami a idrogeno intramolecolari tra il gruppo nitro e il gruppo OH del fenolo che dai legami intermolecolari tra il nitro gruppo e le molecole di solvente.^[47] Il residuo amminoacidico Fmoc- $p\text{NO}_2\text{Phe}$ ha dimostrato che il gruppo nitro è estremamente sensibile al solvente e a qualunque altra piccola variazione intorno alla sonda. In particolare passando da un solvente aprotico quale il tetraidrofurano (THF) all'acqua si è osservato un blue-shift della banda di stretching simmetrico che passa da 1347.3 a 1351.1 cm^{-1} (Figura 3.2). Sembra che, almeno in parte, questo spostamento della banda di assorbimento IR sia dovuto ai legami a idrogeno tra il nitro gruppo e le molecole di acqua. Lo stesso nitro gruppo ha dimostrato di essere molto sensibile anche all'ambiente proteico in cui si trova immerso.^[45]

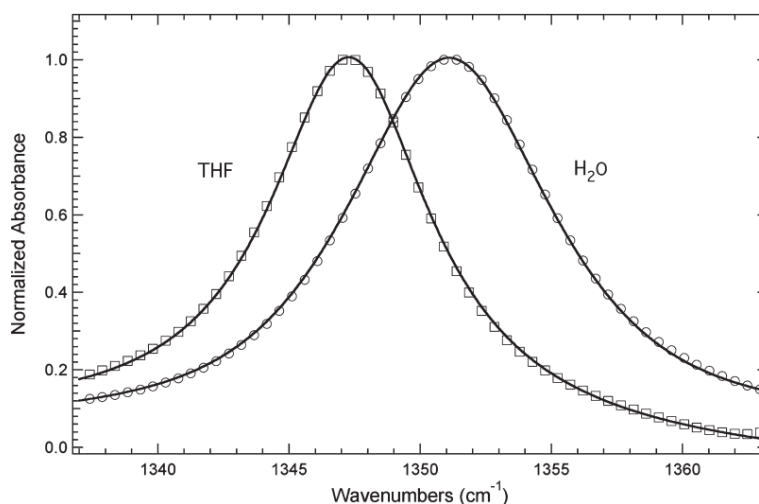


Figura 3.2 Spettri di assorbimento IR di *pNO₂Phe* in soluzione acquosa 100mM di idrossido di sodio (H₂O) e di *Boc-pNO₂Phe* in THF nella regione dello stretching simmetrico del gruppo nitro.

Per questo motivo si è pensato di introdurre il nitro gruppo anche nella sequenza della tricogina GA IV, attiva nelle membrane con un meccanismo non ancora del tutto chiarito.

In questo lavoro di tesi ci si propone dunque di analizzare i peptidi sintetizzati contenenti in nitro gruppo mediante assorbimento FT-IR in diversi solventi. Successivamente ci si propone di analizzare gli stessi in ambiente micellare (membrano-mimetico) e in membrana (liposomi artificiali). In questo secondo caso la spettroscopia FT-IR in soluzione non sarebbe possibile (a causa dell'ambiente acquoso). E' per questo che si faranno misure con la tecnica dell'ATR-IR.

4. Scopo della tesi

4.1. Sintesi degli analoghi della tricogina GA IV contenenti la sonda NO₂

Al fine di effettuare studi di spettroscopia infrarossa per la determinazione di informazioni riguardanti la struttura secondaria dei peptidi, si è pensato di introdurre un gruppo NO₂ che presenta moti normali di vibrazione ben separati da quelli caratteristici del gruppo ammidico. A tale scopo si è scelto di utilizzare la *para*-nitrofenilalanina (*p*NO₂Phe).

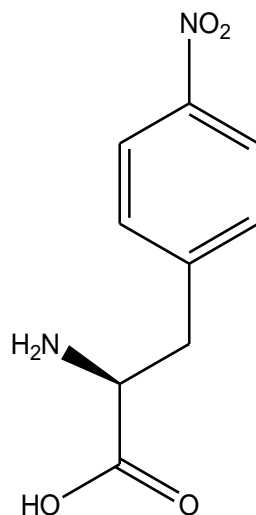


Fig 4.1 pNO₂Phe

Sintetizzando dunque degli analoghi dei peptaibolici contenenti residui amminoacidici nitrati è possibile far luce sulla conformazione assunta dai peptidi.

La *p*NO₂Phe sostituirà rispettivamente la Leu³, la Leu⁷ e l'Ile¹⁰ con la previsione che queste modifiche non alterino la conformazione elicoidale della tricogina ^[48].

Gli analoghi della tricogina GA IV che saranno sintetizzati sono:

- *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-*p*NO₂Phe-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**3**)
- *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-*p*NO₂Phe-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**7**)
- *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-*p*NO₂Phe-L-Lol (**10**)

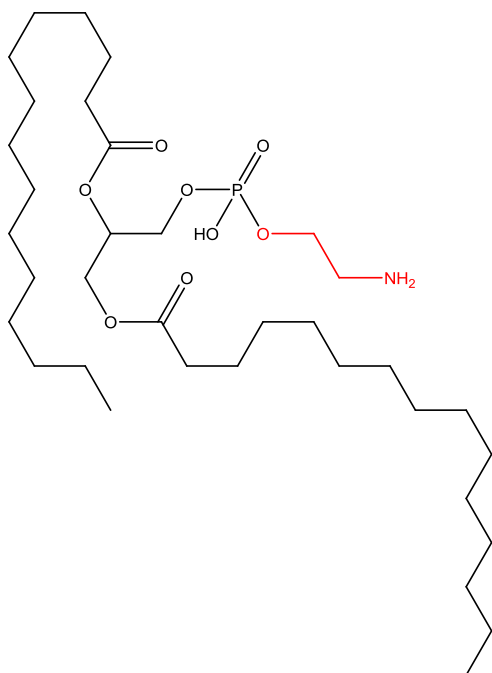
Gli studi conformazionali che seguiranno (mediante tecniche CD, IR e NMR in soluzione) saranno volti a determinare la conformazione degli analoghi sintetizzati, al fine di verificare che la struttura della tricogina sia rimasta sostanzialmente inalterata in seguito alla introduzione della sonda NO₂. Inoltre, i peptidi sintetizzati contenenti il nitro gruppo verranno analizzati mediante assorbimento FT-IR in diversi solventi. Successivamente ci si

propone di analizzare gli stessi in ambiente micellare (membrano-mimetico) e in membrana (liposomi artificiali). In questo secondo caso la spettroscopia FT-IR in soluzione non sarebbe possibile (a causa dell'ambiente acquoso). E' per questo che si faranno misure con la tecnica dell'ATR-IR.

Infine, si procederà allo studio dell'attività biologica su membrane artificiali allo scopo di verificare se i peptaibolici sintetizzati presentano una diversa attività su membrane artificiali di varia composizione.

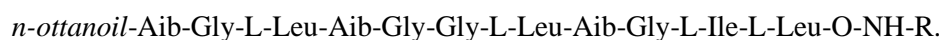
4.2 Sintesi di un analogo potenzialmente dotato di maggiore selettività.

Allo scopo di aumentare la selettività verso le membrane batteriche si è pensato di sintetizzare un analogo delle tricogina GA IV avente una parte affine ai lipidi presenti nelle membrane stesse. In particolare si è pensato di utilizzare un analogo della tricogina in cui il leucinolo terminale è stato sostituito da una leucina e di fare reagire questo amminoacido con il DMPE, la cui struttura è riportata sotto.



Nella molecola qui riportata la parte in rosso fa da linker tra la tricogina modificata ed il resto della molecola.

Il peptide modificato dovrebbe presentare la seguente sequenza:



R=DMP

Pensiamo infatti che introducendo il DMPE potremmo da un lato aumentare la probabilità che il peptide si leghi ad una membrana a doppio strato (per affinità lipide-lipide) e dall'altro che esso si leghi in modo specifico alle membrane dei batteri gram-negativi che contengono l'etanolamina legata al gruppo fosfato.

5. Parte Sperimentale

5.1. Materiali e metodi

5.1.1. Reagenti e solventi

Acros-Janssen (Geel, Belgio): acido α -amminoisobutirrico, acido trifluoroacetico, L-leucina, L-isoleucina, glicina, cloroformio deuterato, metanolo per spettroscopia, 2,2,2-trifluoroetanolo per spettroscopia, N,N-diisopropiletilamina, 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo.

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): Hepes.

Bachem (Bubendorf, Svizzera): Fmoc-L-*p*-nitro-fenilalanina.

Carlo Erba (Milano): acetone, cloroformio, cloruro di metilene, etanolo, idrossido di sodio, ipoclorito di sodio, metanolo.

Fluka (Buchs, Svizzera): acido trifluoroacetico per HPLC (>99,5%), THF anidro, metanolo anidro, N-metilmorfolina, etanolamina.

GL Biochem (Shanghai): 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo, [O-(azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato].

Novabiochem (Svizzera): [O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato].

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): resina Sephadex G-75, colesterolo.

Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA): 1,1',2,2'-tetra-oleoil cardiolipina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, dell'1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerolo), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

5.1.2 Strumentazione e metodi

RP-HPLC (Cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa)

Le analisi HPLC sono state condotte utilizzando il cromatografo Agilent Technologies 1200 Series.

Per la cromatografia analitica sono state utilizzate due colonne analitiche a fase inversa:

- C₁₈ Vydac (250 x 4.6 mm, flusso di 1.0 mL/minuto)
- C₄ Vydac (250 x 4.6 mm, flusso di 1.0 mL/minuto)

che separano generalmente da 5µg a 1 mg di prodotto, a seconda della complessità della miscela da separare. Gli eluenti impiegati sono miscele acquose di acetonitrile. Le sostanze più polari fluiscono prima di quelle meno polari e la forza dell'eluente è aumentata al crescere del tenore del solvente organico.

Per ottenere una sufficiente interazione dell'analita con la superficie idrofobica della fase inversa è necessario ridurre il carattere polare del peptide; ciò è reso possibile effettuando la separazione cromatografica con una fase mobile avente un pH 2-3. Così facendo eventuali gruppi funzionali acidi delle catene laterali possono essere protonati; inoltre, la fase mobile deve contenere un tampone anionico in grado di formare una coppia ionica con gli eventuali gruppi basici presenti nelle catene laterali, mascherando la carica positiva: a tale scopo agli eluenti viene aggiunto l'acido trifluoroacetico.

Eluente A: H₂O/CH₃CN (9:1) + 0.05% di TFA

Eluente B: CH₃CN/H₂O (9:1) + 0.05% di TFA

Le riserve dei due eluenti vengono collegate ad una valvola che li miscela a comando, a seconda del tipo di gradiente, per poi inviarli alla pompa. La rivelazione UV è eseguita con un rivelatore VWD che utilizza una lampada al deuterio la cui lunghezza d'onda viene fissata a 226 nm.

Misure di light scattering:

Le misure sono state effettuate con lo strumento Malvern modello Zetazizer nano series. Lettura in backscatter a 173.5°. Laser He/Ne, 4mW, $\lambda = 633\text{nm}$. Per ogni misura sono state svolte tre letture con 15 accumuli per lettura. Costanti usate dallo strumento: viscosità del fluido 0,8872cP, indice di rifrazione = 1.330. Misure svolte a 25°C mediante sistema di termostatazione.

Determinazione dei punti di fusione

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Leitz modello Laborlux 12 munito di tavolino riscaldante.

Modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali

Le misure di modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali sono state eseguite seguendo il rilascio di CF da vescicole unilamellari (SUV) di fosfatidilcolina/colesterolo 7:3 e di fosfatidiletanolamina/fosfatidilglicerolo 7:3 preparate secondo le metodologie di seguito illustrate.

SUV PC/Ch: 25 mg di PC solidi liofilizzati sono stati aggiunti ad una soluzione di CH_2Cl_2 contenente 35 mg di Ch. La miscela lipidica (PC/Ch 7:3 in moli) è stata seccata prima tramite flusso d'azoto e successivamente è stata posta in essiccatore sotto vuoto per circa 2 ore. In seguito è stata preparata una soluzione di carbossifluoresceina 50 mM aggiungendo 1.0 mL di acqua distillata a 113 mg di carbossifluoresceina, alcune gocce di NaOH 1N fino a rendere la soluzione omogenea e 2 ml di tampone Hepes 30 mM a pH 7.4; infine, si è aggiunta acqua distillata fino a raggiungere un volume di 6.0 mL (pH finale compreso tra 7.4 e 7.5). La miscela lipidica è stata idratata con 6.0 mL della soluzione di CF appena preparata ed è stata lasciata riposare a temperatura ambiente e al buio per 15 ore. Il giorno successivo è stata sonicata a 0° C per 45 minuti e, per separare le vescicole SUV dalla carbossifluoresceina non incapsulata, è stata eseguita una *gel filtration* su colonna di Sephadex G-75 (diametro 2 cm e altezza della fase stazionaria 60 cm) usando come eluente una soluzione di NaCl 100 mM tamponata con Hepes 5 mM, pH 7.4. Infine si è calcolato il fattore di diluizione per la soluzione lipidica.

SUV PE/PG: 9.5 mg di PG solida liofilizzata sono stati aggiunti a una soluzione di CH_2Cl_2 contenente 21.5 mg di PE. I liposomi sono stati preparati con la stessa procedura sopra descritta per le SUV PC/Ch.

La concentrazione totale di lipidi ([PC+Ch] 0.06 mM, ([PG+PE] 0.06 mM) è stata mantenuta costante per tutti gli esperimenti che sono stati eseguiti in cuvette di PVC (1x1 cm) contenenti 2.5 mL di sospensione lipidica.

La CF rilasciata è stata determinata mediante misure di fluorescenza ripetendo l'esperimento a diversi rapporti:

$$R^{-1} = \frac{[\text{peptide}]}{[\text{lipide}]}$$

che sono stati ottenuti aggiungendo aliquote di una soluzione metanolica del peptide. Le misure di fluorescenza sono state eseguite con uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer MPF-66 a 20° C, λ_{exc} 488 nm, λ_{em} 520 nm. La percentuale di CF rilasciata al tempo t (pari a 20 min) è stata determinata come:

$$\%CF = \frac{F_t - F_0}{F_T - F_0} \times 100$$

Dove: F_0 è l'intensità di fluorescenza delle vescicole in assenza del peptide;

F_t è l'intensità di fluorescenza al tempo t in presenza del peptide;

F_T è l'intensità totale di fluorescenza determinata distruggendo le vescicole mediante addizione di 50 μ l di Triton X-100 al 10% in acqua.

Dicroismo circolare

Le misure di dicroismo circolare sono state registrate con il dicrografo Jasco modello J-715, utilizzando celle di quarzo (Hellma) con cammino ottico di 0.1 cm. I valori sono espressi in ellitticità molare ($\text{gradi} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$):

$$[\Theta]_T = (\text{PM} \times \Theta) / (l \times c) = 3300 \times \Delta\varepsilon = 3300 \times (\varepsilon_L - \varepsilon_R)$$

Θ = ellitticità osservata

PM = peso molecolare totale del peptide

l = lunghezza del cammino ottico in cm

c = concentrazione in g/l

$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ = differenza tra i coefficienti di estinzione della luce polarizzata sinistrogira e destrogira, rispettivamente.

Spettrometria di massa

Gli spettri di massa sono stati registrati con uno spettrometro di massa a tempo di volo, *time of flight* (Mariner modello ESI-TOF, Perseptive Biosystems), usando come tecnica di ionizzazione l'ESI. Gli ioni positivi o

negativi formati sono stati accelerati a 10, 15, 20 o 30 keV e analizzati in modo lineare.

Spettroscopia di assorbimento IR

Gli spettri di assorbimento IR allo stato solido, in pastiglia di KBr, sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer modello 580 B equipaggiato con una "IR data station" Perkin-Elmer 3600. Gli spettri di assorbimento IR in deuterochloroformio (99.8% d_2 ; Fluka) sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR modello 1720X operante in trasformata di Fourier, interfacciato ad un personal computer IBM PS/2 modello 50 Z, e celle di cammino ottico di 0.1, 1.0 e 10,0 mm con finestre in CaF_2 . Per ogni spettro sono state eseguite 50 scansioni alla risoluzione nominale di 4 cm^{-1} e con acquisizione digitalizzata del segnale a intervalli di 1 cm^{-1} , utilizzando un "sample shuttle" che consente l'acquisizione alternata del campione e del fondo strumentale. Gli spettri del solvente sono stati ottenuti nelle stesse condizioni ed utilizzando le stesse celle impiegate per i campioni. Allo scopo di minimizzare i contributi del vapore d'acqua atmosferico, il banco ottico ed il vano campioni dello strumento sono stati mantenuti sotto un flusso costante di azoto. Le posizioni dei massimi di assorbimento, di spalle e di bande parzialmente sovrapposte sono state determinate con l'ausilio della derivata seconda. Le elaborazioni spettrali (sottrazione del solvente e derivatizzazione) sono state effettuate con il programma SpectraCalc della Galactic (Salem, USA).

Le misure in ATR-FTIR sono state svolte con uno strumento Nicolet-Nexus 670. Si è utilizzato un cristallo di Ge della Spectratech. Il rivelatore è un MCT raffreddato con azoto liquido. Sono state svolte 100 scansioni tra 4000 e 1000 cm^{-1} alla risoluzione di 4 cm^{-1} .

Spettroscopia NMR

Gli spettri NMR sono stati registrati con lo spettrometro Bruker modello Advance DRX 400 solvente: acetonitrile (99.80% D; Euriso-top).

Gli spostamenti chimici sono espressi in parti per milione (ppm) rispetto al segnale del tetrametilsilano per gli spettri protonici. Le costanti di accoppiamento sono misurate in Hertz. Le molteplicità dei picchi sono

espresse come s (singoletto), d (doppietto), t (tripletto), dd (doppietto di doppietti) e m (multipletto).

5.2 Procedura generale di sintesi in fase solida

Sono stati sintetizzati i seguenti peptidi:

- *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-*p*NO₂Phe-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**3**)
- *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-*p*NO₂Phe-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol (**7**)
- *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-*p*NO₂Phe-L-Lol (**10**)

Per ognuno dei tre peptidi sintetizzati la procedura sperimentale seguita è stata la medesima.

La prima operazione svolta è stata rigonfiare la resina: essa è stata posta in una siringa munita di setto poroso; è stata aggiunta della dimetilformammide (DMF) e la resina è stata mantenuta sotto agitazione per 45-60 minuti. La procedura del rigonfiamento rende disponibili tutti i siti attivi della resina permettendo così la buona riuscita delle reazioni.

La sintesi dei peptidi ha seguito questo schema generale:

Reazione di coupling → Lavaggio → Sblocco gruppo protettore → Reazione di coupling

- Le reazioni di coupling sono durate 60 minuti ciascuna sotto agitazione vigorosa.
- I lavaggi sono stati effettuati con DMF.
- La procedura di sblocco del gruppo protettore prevede quattro passaggi: due atti all'eliminazione dello Fmoc, rispettivamente della durata di 10 e 15 minuti e due passaggi intermedi in cui la resina viene lavata con DMF. Il reagente per eliminare il gruppo protettore è una soluzione di piperidina (PIP) al 20% in DMF.

A seconda dell'amminoacido coinvolto nel coupling sono state scelte opportune condizioni e reagenti per portare la reazione al risultato voluto. Per gli amminoacidi e gli attivatori è stato

mantenuto un eccesso di tre equivalenti mentre per la base (DIPEA) l'eccesso è stato di sei equivalenti.

Amminoacido	Reagente	Reagente	Solvente	Base	Coupling
Glicina	TBTU	HOBT	DMF	DIPEA	singolo
Leucina	TBTU	HOBT	DMF	DIPEA	singolo
Isoleucina	TBTU	HOBT	DMF	DIPEA	singolo
<i>p</i> NO ₂ Phe	TBTU	HOBT	DMF	DIPEA	singolo
Acido ammino isobutirico (Aib)	HATU		DMF	DIPEA	doppio
acido ottanoico	HATU	HOAT	DMF	DIPEA	doppio

Tabella 5.1 Reagenti utilizzati nella sintesi in fase solida

Nel coupling successivo a quello di un Aib è stato utilizzato come reagente l'HATU ed il coupling è stato ripetuto due volte cioè dopo la prima ora di agitazione la resina all'interno della siringa è stata lavata con DMF e filtrata e, invece che sbloccare il gruppo Fmoc, come la sintesi "step by step" richiederebbe, è stato ripetuto il coupling con reagenti freschi per la durata di un'ora.

Per il coupling dell'acido ottanoico sono stati adoperati i reagenti riportati in tabella ed è stato svolto un doppio coupling come spiegato sopra.

Una volta portata a termine la sintesi del peptide, una piccola frazione di resina (pochi granelli) è stata prelevata e sottoposta al cosiddetto "sblocco in piccolo": trattando la suddetta quantità di resina con una soluzione di esafluoroisopropanolo (HFIP) al 30% in DCM è possibile staccare il peptide dalla stessa.

Il peptide "libero" così ottenuto è stato solubilizzato in metanolo e sottoposto a spettroscopia di massa.

Dallo spettro di massa veniva verificato che la massa dello ione molecolare corrispondeva a quella del peptide e se i due dati erano in accordo si procedeva allo sblocco in grande dalla resina.

Lo sblocco "in grande" prevedeva di lavare tutto il contenuto della siringa con abbondante diclorometano (DCM) ed in seguito di trattare prima con HFIP 30% in DCM e poi con una

soluzione di acido trifluoroacetico (TFA) al 1%; a quest'ultima soluzione sono state aggiunte alcune gocce di H₂O deionizzata per evitare che durante la reazione si formasse l'estere trifluoroacetato.

Con la soluzione di HFIP sono stati svolti tre passaggi da un'ora ciascuno intervallati da lavaggio con DCM e filtrazione, mentre con la soluzione di TFA ne sono stati eseguiti due con la medesima durata e modalità. Con l'ultimo peptide sintetizzato, (**3**) la procedura di sblocco in grande è stata leggermente modificata: l'ultimo passaggio con la soluzione di HFIP è stato fatto durare una notte e con la soluzione di TFA ne è stato effettuato uno solo. Questa variazione ha permesso di sbloccare la maggior parte del peptide con HFIP, trattamento che permette di ottenere il prodotto più puro e facilita l'eventuale successiva purificazione.

Sintesi dell'analogo 1:

Sintesi tricogina:

Per questa sintesi è stata utilizzata una resina con un diverso linker: Fmoc-L-Leucina-4-benzilossobenzil-estere. Inoltre è stato necessario sintetizzare una quantità superiore di peptide in quanto la successiva reazione con il DMPE veniva svolta in soluzione.

Reazione con DMPE:

Tabella 5.2 quantità impiegate nella sintesi dell'analogo 1

Reagente	M.W. [g/mol]	massa utilizzata [g]	mmoli
Oct-tric-Leu-COOH	1079	0.2036	0.189
DMPE	635.87	0.1341	0.211
HATU	380.2	0.088	0.231
DIPEA	129.25	0.0487	0.377
LiCl	42.39	0.1924	4.53

La tricogina, l'HATU e la dipea sono stati sciolti in una miscela di DMF/THF (1:1) a 36.5°C. A questa soluzione viene aggiunta una soluzione contenente il DMPE e il LiCl in DMF-THF (1:1). La reazione è stata fatta proseguire per due giorni termostata a 36.5°C, sotto agitazione.

5.3. Purificazione dei peptidi

La purificazione del peptide **10** è stata agevole dato che dallo sblocco con HFIP si è ottenuto un prodotto sostanzialmente pulito per cui si è deciso di purificarlo mediante l'uso di una colonna Sep Pak C₁₈ con i seguenti eluenti:

- A. H₂O deionizzata

- B. Miscela 80% H₂O 20%CH₃CN
- C. Miscela al 50% H₂O, CH₃CN
- D. Miscela al 70% CH₃CN 30%H₂O
- E. CH₃CN puro

Le frazioni uscenti dalla colonna SepPak sono state analizzate via HPLC. Le frazioni contenenti il peptide puro sono state liofilizzate.

Dall'analisi HPLC della soluzione ottenuta dallo sblocco con TFA si è notata la formazione, oltre al prodotto desiderato, dell'estere trifluoroacetico come sottoprodotto formatosi durante la reazione di sblocco. Prima di purificare il peptide, dunque, è stato necessario eseguire una reazione di transesterificazione con la molecola di metanolo, allo scopo di ri-ottenere l'ammino alcol C-terminale. Tale reazione è stata svolta aggiungendo al peptide solubilizzato in metanolo una soluzione di HCl in Et₂O e lasciando sotto agitazione per un'ora. La reazione è stata monitorata tramite HPLC e, una volta andata a completezza, il campione è stato liofilizzato.

Il peptide **7** è stato sbloccato dalla resina utilizzando entrambe le soluzioni. Anche in questo caso il prodotto proveniente dalla reazione con HFIP è risultato più "pulito" e quindi è stato purificato tramite Sep Pak utilizzando solo due eluenti:

- A. Miscela 80%H₂O 20%CH₃CN
- B. CH₃CN puro

Il prodotto sbloccato con TFA invece è stato purificato mediante Sep Pak con 4 eluenti:

- A. Miscela 80%H₂O 20%CH₃CN
- B. Miscela al 50% H₂O, CH₃CN
- C. Miscela al 70% CH₃CN 30%H₂O
- D. CH₃CN puro

Al termine ognuna delle frazioni è stata sottoposta ad HPLC e la provetta C era l'unica a contenere il prodotto.

Al termine della purificazione entrambi i prodotti sono stati liofilizzati.

Il peptide **3** è stato sintetizzato utilizzando 0,035g di resina perché la sintesi è servita a preparare anche della tricogina da utilizzare per altri scopi.

Le condizioni di reazione sono rimaste invariate rispetto alla sintesi degli analoghi precedenti.

Lo sblocco del peptide dalla resina è stato eseguito con entrambe le soluzioni.

La frazione sbloccata con HFIP è risultata abbastanza pulita quindi è stata purificata con colonna SepPak con due soli eluenti:

A. 100% H₂O

B. 100% CH₃CN

Al termine di tale operazione il prodotto è stato liofilizzato. La frazione ottenuta dalla reazione con la soluzione di TFA invece è stata trans-esterificata, come già descritto in precedenza. Dopo tale operazione anche questa frazione è stata liofilizzata.

Purificazione analogo I:

Sintesi tricogina:

Lo sblocco del peptide dalla resina impiegata è stato realizzato mediante una miscela TFA/H₂O (95:5) in due cicli da un'ora. Al termine il filtrato è stato posto in pallone ed il solvente evaporato in evaporatore rotante. Il prodotto è stato ri-cristallizzato da etere dietilico (Et₂O). Il solido è stato isolato mediante centrifugazione. Sono stati svolti tre cicli di centrifugazione a 6500rpm della durata di 8 minuti; al termine di ognuno la frazione liquida è stata rimossa ed è stato aggiunto Et₂O fresco. Al termine, il solido è stato posto in essiccatore per una notte.

5.4 Sintesi e caratterizzazione dei peptidi 3, 7, 10 e 1.

Sintesi di Ott-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-pNO₂Phe-L-Lol

Punto di fusione: 146-150°C

Resa: 62,8%

HPLC (70-100% in B flusso 1.0mL/min) R_t = 16.3min.

Spettrometria di massa (ESI-TOF) [M]⁺ = 1144,7g/mol

NMR(400MHz CD₃CN)

8.114 (m, 2H, pNO₂Phe¹⁰ Aromatici); 7,928(t, 1H, Gly⁶ NH); 7,771 (t, 1H, Gly⁵ NH); 7,694(d, 1H pNO₂Phe¹⁰ NH); 7,685(d, 1H, Leu³ NH); 7,673(t, 1H, Gly⁹ NH); 7,615(m, 2H, pNO₂Phe¹⁰ Aromatici); 7,598(d, 1H, Leu⁷ NH); 7,499(s, 1H, Aib⁴ NH); 7,456(t, 1H, Gly²

NH); 7,193(s, 1H, Aib¹ NH); 6,953(d, 1H, Lol¹¹ NH); 4,396(m, 1H, *p*NO₂Phe¹⁰ α-CH); 4,222(m, 1H, Leu⁷ α-CH); 4,197(m, 1H, Leu³ α-CH) 3,957(m, 1H, Lol¹¹ α-CH); 3,814(m, 2H, Gly⁶ α-CH); 3,788(dd, 1H, Gly² α-CH); 3,747(m, 2H, Gly⁵ α-CH); 3,695(dd, 1H, Gly⁹ α-CH); 3,653(dd, 1H Gly² α-CH); 3,508(dd, 1H, Gly⁹ α-CH);. 3,456 (m, 2H, Lol¹¹ β-CH₂); 3,362(dd, 1H, *p*NO₂Phe¹⁰ β-CH); 3,169(dd, 1H, *p*NO₂Phe¹⁰ β-CH); 2,23 (t, 2H, Oct⁰ β-CH₂); 1,73(m, 2H, Leu⁷ β-CH₂); 1,698(m, 2H, Leu³ β-CH₂); 1,694(m, 1H, Leu⁷ γ-CH); 1,687 (m, 1H, Leu³ γ-CH);1,653(m, 1H Lol¹¹ β-CH); 1,594(m, 2H, Oct⁰ γ-CH₂); 1,483(s, 6H, Aib⁴ β-CH₃); 1,456(m, 1H, Lol¹¹ β-CH); 1,403(s 6H, Aib¹ β-CH₃);1,307(m, 8H, Oct⁰ Chain); 1,292(m, 1H, Lol¹¹ γ-CH); 0,925(m, 6H, Leu³ δ-CH₃); 0,91(m, 6H, Leu⁷ δ-CH₃); 0,904(m, 3H, Oct⁰ ω-CH₃) 0,894(m, 6H, Lol¹¹ δ-CH₃).

Sintesi di Ott-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-*p*NO₂Phe-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol

Punto di fusione: 171-173.5°C

Resa: 62,3%

HPLC (70-100% in B flusso 1.0mL/min) R_t = 20.2min.

Spettrometria di massa (ESI-TOF) [M]⁺ = 1144,7g/mol

NMR (400MHz CD₃CN)

8,114(m, 2H, *p*NO₂Phe⁷ Aromatici); 7,867(t, 1H, Gly⁶ NH); 7,727(t, 1H, Gly⁵ NH); 7,701(d, 1H, *p*NO₂Phe⁷ NH); 7,653(d, 1H, Leu³ NH); 7,636(t, 1H Gly⁹ NH); 7,586(s, 1H, Aib⁸ NH); 7,516(m, 2H, *p*NO₂Phe⁷ Aromatici); 7,479(s, 1H, Aib⁴ NH)7,399 (t, 1H, Gly² NH); 7,269(d, 1H, Ile¹⁰ NH); 7,162(s, 1H, Aib¹ NH); 6,609(d, 1H, Lol¹¹ NH); 4,411(m, 1H, *p*NO₂Phe⁷ α-CH); 4,164(m, 1H, Leu³ α-CH); 4,015(m, 1H, Ile¹⁰ α-CH); 3,896(m, 1H, Lol¹¹ α-CH); 3,784(dd, 1H, Gly² α-CH); 3,757(m, 2H, Gly⁵ α-CH); 3,746(m, 2H, Gly⁶ α-CH); 3,668(m, 2H, Gly⁹ α-CH); 3,623(dd, 1H, Gly² α-CH); 3,390(m, 2H, Lol¹¹ β-CH₂); 3,389(m, 1H, *p*NO₂Phe⁷ β-CH); 3,184(m, 1H, *p*NO₂Phe⁷ β-CH); 2,211(m, 2H, Oct⁰ β-CH₂); 1,917(m, 1H, Ile¹⁰ β-CH); 1,685(m, 2H, Leu³ β-CH₂); 1,660(m, 1H, Leu³ γ-CH) 1,585(m, 2H, Oct⁰ γ-CH₂); 1,563(m, 1H, Lol¹¹ β-CH₂); 1,557(m, 1H, Ile¹⁰ γ-CH); 1,474(s, 6H, Aib⁴ β-CH₃); 1,452(s, 6H, Aib⁸ β-CH₃); 1,392(s, 6H, Aib¹ β-CH₃); 1,304(m, 1H, Lol¹¹ β-CH); 1,299(m, 8H, Oct⁰ CH chain); 1,267(m, 1H, Ile¹⁰ γ-CH); 1,183(m, 1H, Lol¹¹ γ-CH); 1,054(m, 3H, Ile¹⁰ δ-CH₃); 0,912(m, 1H, Ile¹⁰ γ-CH); 0,918(m, 6H, Leu³ δ-CH₃); 0,912 (m, 3H, Ile¹⁰, γ-CH₃) 0,881 (m, 3H, Oct⁰ ω-CH₃); 0,822(m, 6H, Lol¹¹ δ-CH₃).

Sintesi di Ott-Aib-Gly-pNO₂Phe-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol

Punto di fusione: 156-159°C

HPLC (70-100% in B flusso 1.0mL/min) $R_t = 10.3$ min.

Spettrometria di massa (ESI-TOF) $[M]^+ = 1144,7$ g/mol

¹H-NMR: (400MHz CD₃CN) 8,138 (m, 2H, pNO₂Phe³ Aromatici); 7,926(d, 1H, pNO₂Phe³ NH); 7,854(t, 1H, Gly⁶ NH); 7,736(t, 1H, Gly⁵ NH); 7,599(s, 1H, Aib⁴ NH); 7,596(s, 1H, Aib⁸ NH); 7,568(t, 1H, Gly⁹ NH); 7,509(m, 2H, pNO₂Phe³ Aromatici); 7,496(d, 1H, Leu⁷ NH); 7,482(t, 1H, Gly² NH); 7,335(d, 1H, Ile¹⁰ NH); 7,258(s, 1H, Aib¹ NH); 6,839(d, 1H, Lol¹¹ NH); 4,494(m, 1H, pNO₂Phe³ α-CH); 4,096(m, 1H, Leu⁷ α-CH); 4,037(m, 1H, Ile¹⁰ α-CH); 3,962(m, 1H, Lol¹¹ α-CH); 3,8(m, 2H, Gly⁶ α-CH); 3,753(dd, 1H, Gly² α-CH); 3,742(dd, 1H, Gly⁹ α-CH); 3,737(m, 2H, Gly⁵ α-CH); 3,618(dd, 1H, Gly⁹ α-CH) 3,57(dd, 1H, Gly² α-CH); 3,43(m, 2H, Lol¹¹ β-CH₂); 3,388(m, 1H, pNO₂Phe³ β-CH); 3,188(m, 1H, pNO₂Phe³ β-CH); 2,239(m, 2H, Oct⁰ β-CH₂); 1,926(m, 1H, Ile¹⁰ β-CH); 1,647(m, 1H, Lol¹¹ β-CH) 1,636(m, 2H, Leu⁷ β-CH₂); 1,619(m, 1H, Leu⁷ γ-CH); 1,597(m, 1H, Ile¹⁰ γ-CH); 1,461(s, 6H, Aib⁴ β-CH₃); 1,574(m, 2H, Oct⁰ γ-CH₂) 1,451(s, 6H, Aib⁸ β-CH₃) 1,428(m, 1H, Lol¹¹ β-CH); 1,418(s, 6H, Aib¹ β-CH₃); 1,283(m, 8H, Oct⁰ Chain); 1,276(m, 1H, Ile¹⁰ γ-CH); 1,198(m, 1H, Lol¹¹ γ-CH); 0,925(m, 3H, Ile¹⁰ γ-CH₃); 0,867(m, 6H, Leu⁷ δ-CH₃); 0,867(m, 6H, Lol¹¹ δ-CH₃); 0,861(m, 3H, Oct⁰ ω-CH₃); 0,841(d, 3H, Ile¹⁰ δ-CH₃).

Sintesi dell'analogo 1:

HPLC (colonna C₄ 10-100% in B in 35 min. flusso 1.0mL/min) $R_t = 33.5$ min.

Spettrometria di massa (ESI-TOF) $[M]^+ = 1585$ g/mol

6. Risultati e discussione

6.1 Strategia di sintesi in fase solida

Gli analoghi della tricogina GA IV studiati in questa tesi sono stati sintetizzati in fase solida. I vantaggi di usare tale tecnica piuttosto che la classica sintesi in soluzione sono:

- Possibilità di portare a completezza la reazione utilizzando un eccesso dei reagenti solubili facilmente eliminabili per filtrazione;
- Rimozione dei sottoprodotti indesiderati, sempre per filtrazione, con conseguente semplificazione della fase di purificazione;
- Possibilità di automazione;

Questo metodo prevede l'utilizzo di una resina copolimero di stirene contenente 1-2% di divinilbenzene che serve come reticolante che rende la resina insolubile nei solventi organici. Il grado di reticolazione non può essere superiore al 2% perché la matrice polimerica deve essere più simile ad un gel piuttosto che ad un solido dal momento che l'ancoraggio del primo amminoacido ed il successivo accrescimento della catena avvengono all'interno del polimero. Da ciò si capisce l'importanza del rigonfiamento iniziale della resina, che in questo lavoro è sempre stato effettuato con DMF.

Per permettere che l'ancoraggio sia reversibile, che si possa cioè rimuovere il peptide finale dalla resina in condizioni chimiche diverse, tra l'amminoacido e la resina vi è un *linker*.

L'allungamento della catena peptidica si basa su operazioni ripetute, quali lo sblocco del gruppo N^α-protettore Fmoc dell'amminoacido e il successivo *coupling* con un altro Fmoc-derivato. Alla fine, sintetizzata la sequenza peptidica voluta, si sblocca la catena dalla resina.

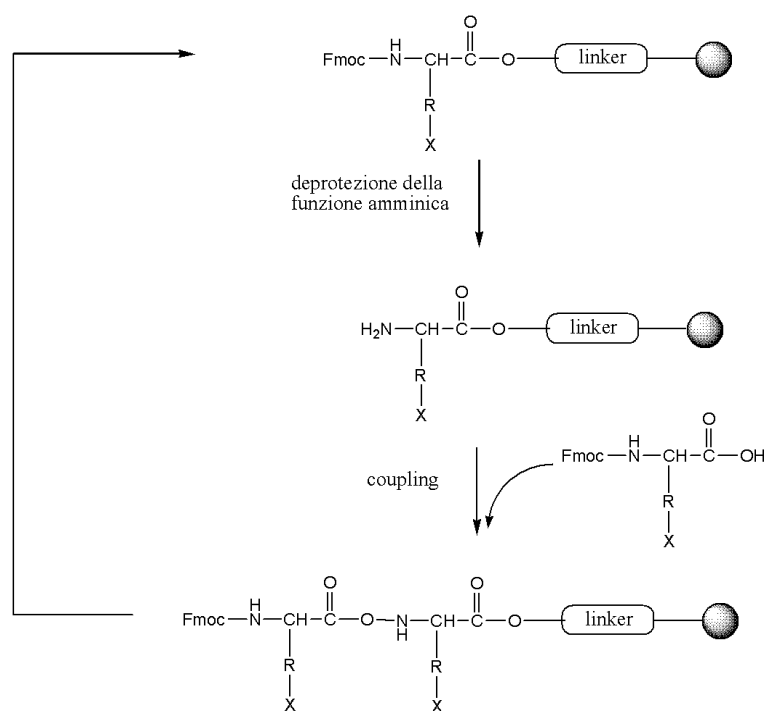


Figura 6.1 Schema generale di sintesi peptidica in fase solida.

Uno dei principali vantaggi della sintesi in fase solida è rappresentato dalla possibilità di lavorare in eccesso dei reagenti, i quali, insieme ai sottoprodotti solubili, vengono eliminati al termine di ogni reazione di coupling per semplice lavaggio con il solvente; così facendo si ottiene un prodotto più puro ed in maggiore quantità rispetto a quanto succede nella sintesi in soluzione, che richiede molti passaggi intermedi (estrazioni e cristallizzazioni). Il prodotto desiderato ha la funzione alcolica terminale libera quindi si è scelto di utilizzare un linker 2 clorotritile ancorato alla resina stirene-divilbenezene con 1% di crosslinking. Il peptide può essere rimosso da tale resina in condizioni leggermente acide: nel protocollo seguito sono stati effettuati tre trattamenti con il 30% di HFIP in DCM: i primi due della durata di un'ora e l'ultimo di una notte. Per la sintesi dell'analogo **1** è stata invece utilizzata una resina con un linker diverso la cui immagine è riportata sotto. In questo caso, è stato dapprima rimosso il gruppo protettore Fmoc con cui viene fornita la resina. Lo sblocco del peptide finale viene realizzato con due cicli di un'ora, utilizzando una miscela TFA/H₂O (95:5).

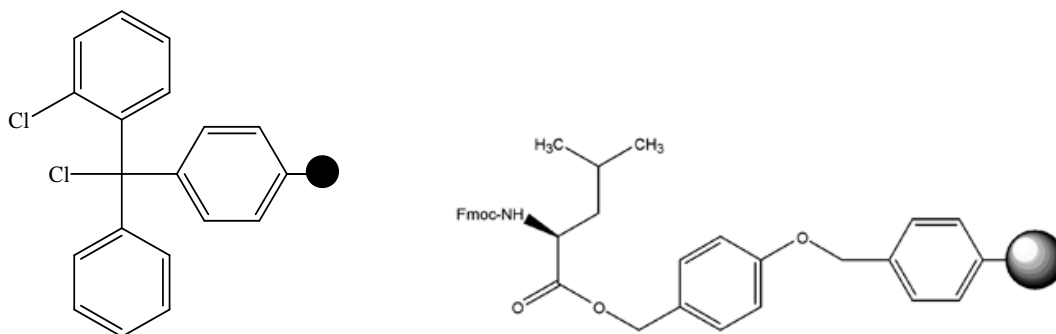


Fig 6.2 a sinistra linker cloro tritile a destra linker Fmoc-L-Leucina-4-benzilossobenzil-estere

6.2 Gruppo protettore utilizzato

Per la sintesi dei peptidi è stato usato come gruppo protettore della funzione N-amminica il 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc)

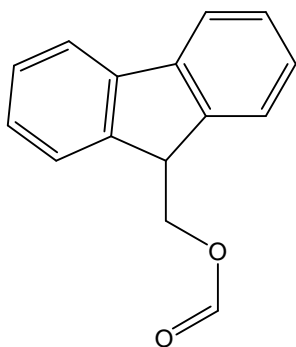


Figura 6.3 Gruppo N-protettore Fmoc.

Tale gruppo protettore viene rimosso trattando la resina con una soluzione di un'ammina secondaria (in questo caso 20% di piperidina in DMF). Da questa reazione si ottiene il gruppo amminico deprotetto, un dibenzofulvene (solubile nel solvente) ed anidride carbonica.

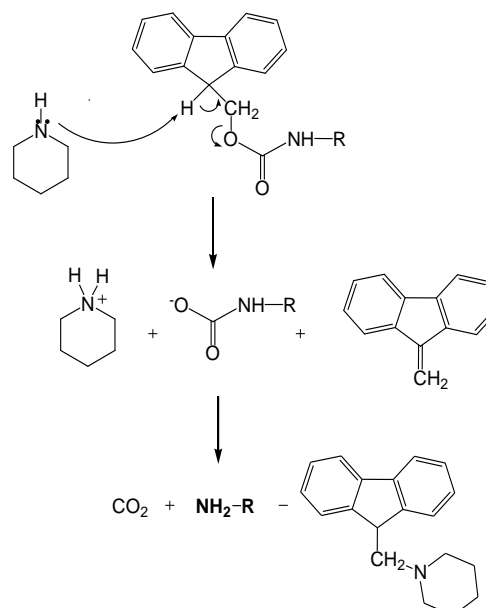


Figura 6.4 Rimozione dello Fmoc con piperidina.

6.3 Metodi di attivazione

La formazione del legame ammidico direttamente dall'acido carbossilico richiede l'attivazione del gruppo carbossilico. Essa può essere ottenuta trasformando l'acido carbossilico in una specie più reattiva (anidride, estere, alogenuro acilico, ecc.). A questo scopo possono essere utilizzati degli attivatori *in situ* quali sali di uronio e fosfonio: HOBt, HATU, HBTU, BOP, HOAt, TCTU, HCTU, TBTU.

In questo lavoro di tesi sono stati adoperati con successo HATU per i coupling coinvolgenti l'Aib, HATU/HOAt per il coupling finale dell'acido ottanoico e TBTU/HOBt per tutti gli altri amminoacidi.

Meccanismo d'azione del TBTU.

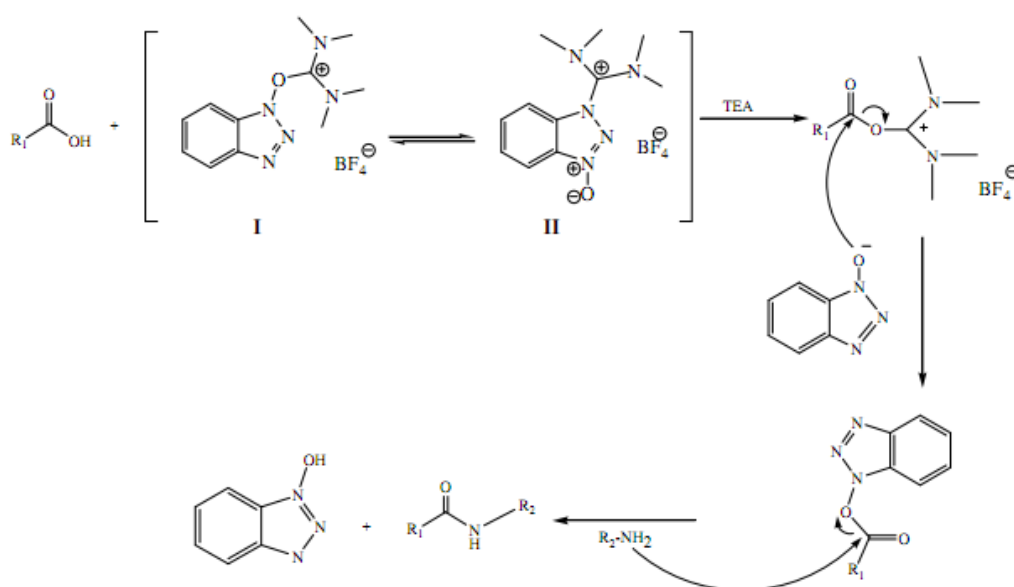


Figura 6.5 Formazione di un estere-OAt con TBTU/HOBt

In questo caso l'aggiunta di HOBt rende più veloce la reazione ^[49].

7. Indagini conformazionali

Le indagini conformazionali sono state effettuate utilizzando le tecniche dell'assorbimento IR, del dicrosimo circolare e dell'NMR bidimensionale.

7.1 Assorbimento IR

I composti sintetizzati sono stati sottoposti a studi di assorbimento IR al fine di ottenere informazioni sulla struttura secondaria dei peptidi. Queste indagini permettono di valutare l'entità dei legami a idrogeno tra gli NH e i C=O ammidici dei peptidi e di ipotizzarne la natura inter o intramolecolare.

Lo studio IR è stato inoltre esteso a più sistemi solvente con lo scopo di osservare il comportamento della sonda *p*NO₂Phe. Il gruppo NO₂ presenta due frequenze di stretching (simmetrico, antisimmetrico) ben distinguibili. Esse sono ben separate dalle bande di stiramento "ammide I" ed "ammide II" e hanno intensità paragonabili alle bande di stretching del gruppo C=O.

Gli spettri sono quindi stati registrati fra 4000 e 1000 cm⁻¹, ponendo attenzione alle zone comprese fra:

- 3600-3200 cm⁻¹ zona di stretching dei legami NH dei gruppi uretanici e peptidici
- 1800-1600 cm⁻¹ zona di stretching del gruppo C=O dei gruppi uretanici e peptidici
- 1550-1300 zona di stretching del gruppo NO₂

L'indagine è stata eseguita sui seguenti peptidi:

- (3) *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-*p*NO₂Phe-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol
- (7) *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-*p*NO₂Phe-Aib-Gly-L-Ile-L-Lol
- (10) *n*-ottanoil-Aib-Gly-L-Leu-Aib-Gly-Gly-L-Leu-Aib-Gly-L-*p*NO₂Phe-L-Lol

Per tutti i peptidi sono stati registrati gli spettri in CDCl₃ alla concentrazione di 1*10⁻³M con cella di 1 mm ed in CD₃CN alla concentrazione di 1*10⁻²M con cella di 0,1 mm . Per gli analoghi **3** e **10** sono stati registrati spettri anche in metanolo (l'analogo **7** non è solubile in metanolo). Ciò al fine di verificare se al cambiamento del solvente corrisponde una variazione della frequenza di stretching del gruppo NO₂ tale da permetterci di utilizzare il gruppo NO₂ come indicatore delle variazioni ambientali e strutturali che avvengono vicino ad esso.

Per l'analogo sostituito in posizione **3** è stato indagato l'effetto della diluizione registrando spettri alle concentrazioni di $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$ $1 \cdot 10^{-4}$ M.

Le frequenze dei massimi di assorbimento IR nelle regioni $3500-3200 \text{ cm}^{-1}$, $1800-1600 \text{ cm}^{-1}$ e $1550-1300 \text{ cm}^{-1}$ dei peptidi **10**, sono riportate nelle Tabelle 7.1 e 7.2.

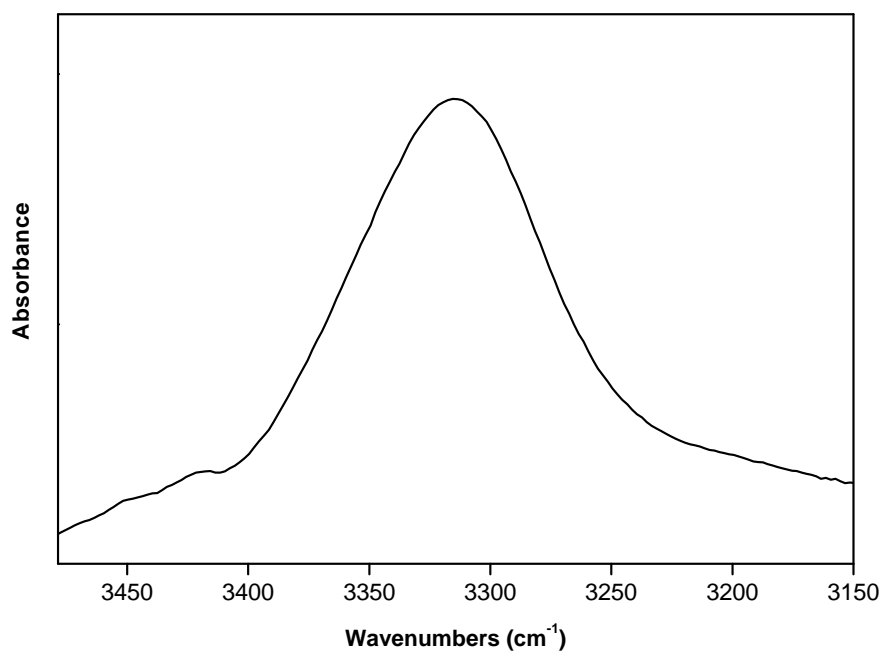
Peptide	$3600-3200 \text{ cm}^{-1}$	$1800-1600 \text{ cm}^{-1}$	$1550-1300 \text{ cm}^{-1}$
3	3319 ^b	<u>1658</u> ;	<u>1542</u> ; 1522 ^a ; <u>1468</u> ; <u>1346</u>
7	3319 ^b	<u>1656</u> ;	<u>1542</u> ; 1522 ^a ; <u>1346</u>
10	3313 ^b	<u>1658</u> ;	<u>1540</u> ; 1522 ^a ; <u>1346</u>

Tabella 7.1 frequenze di assorbimento del peptide **10** a concentrazione $1 \cdot 10^{-3}$ M in CDCl_3
^aspalla, ^bbanda larga. I valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (....) intense (___) o molto intense (----)

Peptide	$3600-3200 \text{ cm}^{-1}$	$1800-1600 \text{ cm}^{-1}$	$1550-1300 \text{ cm}^{-1}$
3	3329	<u>1672</u>	1522; <u>1348</u>
7	3339	<u>1658</u>	1540; <u>1522</u> ; <u>1348</u>
10	3329	<u>1664</u>	1538 ^a ; <u>1522</u> ; <u>1348</u>

Tabella 7.2 frequenze di assorbimento del peptide **10** a concentrazione $1 \cdot 10^{-2}$ M in CD_3CN
^aspalla, ^bbanda larga. I valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (....) intense (___) o molto intense (----)

7.1.1. Informazioni sulla conformazione



7.1 Spettri di assorbimento IR del peptide **10** in $CDCl_3$ nella zona compresa fra 3500-3200 cm^{-1} ; conc. $1 \times 10^{-3} M$ cella 1 mm.

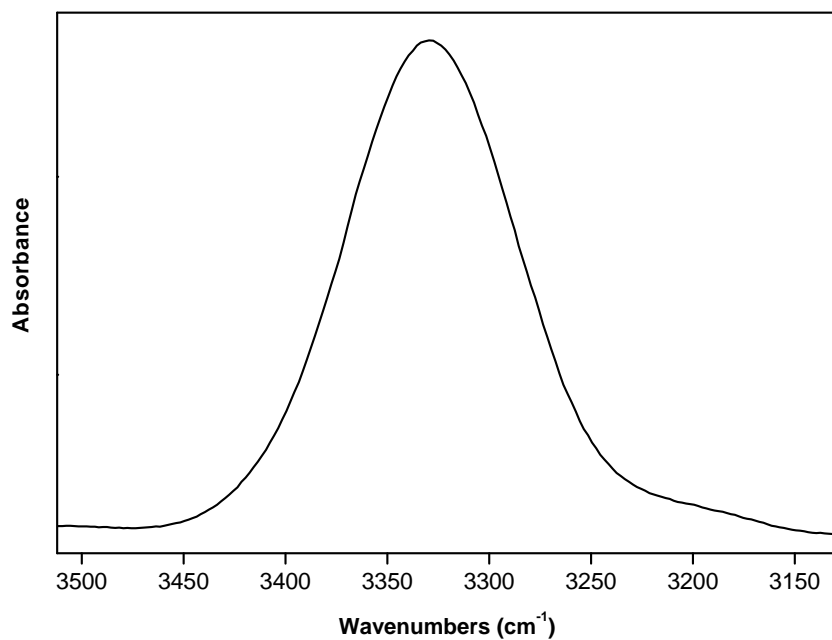


Fig.7.2 Spettri di assorbimento IR del peptide **10** in CD_3CN nella zona compresa fra 3500-3200 cm^{-1} ; conc. $1 \times 10^{-2} M$ cella 0,1 mm.

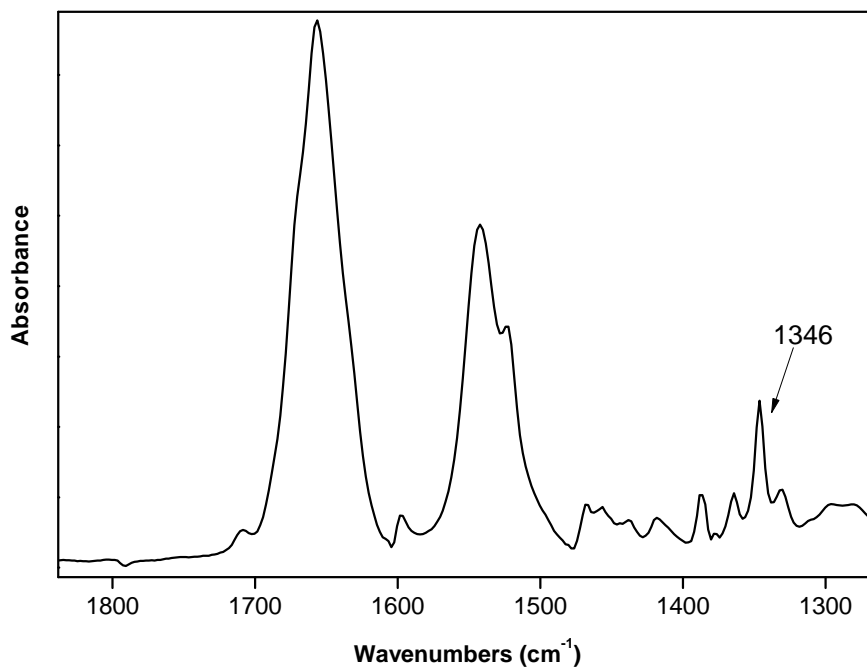


Fig.7.3 Spettri di assorbimento IR del peptide **10** in CDCl_3 nella zona compresa fra 1800-1300 cm^{-1} ; conc. $1 \times 10^{-3} \text{M}$ cella 1 mm.

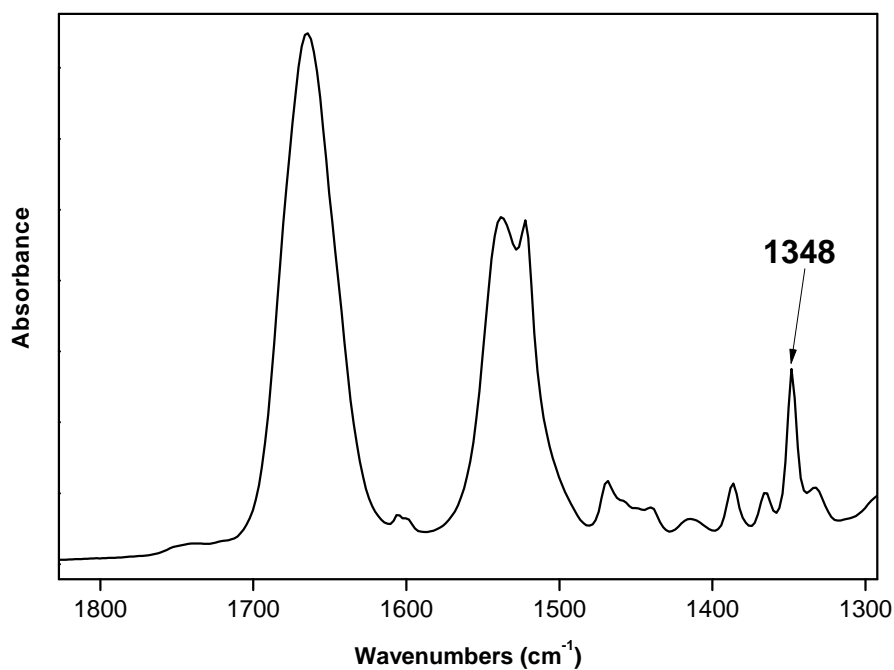


Fig.7.4 Spettri di assorbimento IR del peptide **10** in CD_3CN nella zona compresa fra 1800-1300 cm^{-1} ; conc. $1 \times 10^{-2} \text{M}$ cella 0,1 mm.

Dall'osservazione degli spettri IR in CDCl_3 e in CD_3CN possono essere ricavate le seguenti considerazioni:

- Nella regione spettrale $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ tutti i peptidi esaminati mostrano un'unica banda sita al di sotto di 3400 cm^{-1} , pertanto è assegnabile a vibrazione di stiramento di gruppi N-H impegnati in legami a idrogeno ^[50]
- Il confronto tra le figure 7.1 e 7.2, che mostrano lo spettro del peptide **10** (preso a titolo di esempio) nella zona $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, ci mostra un leggero spostamento della banda degli N-H legati dai 3315 cm^{-1} (in CDCl_3) ai 3330 (in CD_3CN).
- Nella regione spettrale tra $1800\text{-}1600\text{cm}^{-1}$ si osservano i picchi relativi allo stiramento dei gruppi C=O peptidici, banda ammidi I. I massimi di tali segnali ricadono nell'intervallo $1664\text{-}1656\text{ cm}^{-1}$ e indicano che i tre peptidi, a seconda del solvente utilizzato, variano la struttura secondaria: i segnali in CDCl_3 infatti sono molto vicini a 1659 cm^{-1} , valore tipico di una struttura elicoidale α -elica, mentre in CD_3CN sono molto vicini a 1662 cm^{-1} , valore tipico di una struttura elicoidale elica- 3_{10} . ^[51]
- Nella regione spettrale compresa fra 1550 e 1300 cm^{-1} si trovano i picchi della banda ammidi II ($1540\text{-}1542\text{cm}^{-1}$) e le due componenti, simmetrica ed asimmetrica, dello stiramento nel gruppo NO_2 , rispettivamente a 1346 cm^{-1} e $1522\text{-}1524\text{ cm}^{-1}$.

7.1.2 Effetto della diluizione

Di seguito vengono riportati gli spettri per il peptide **3** (analoghe osservazioni si possono fare per i peptidi **7** e **10**) nella regione $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ ottenuti alle concentrazioni 1×10^{-2} , 1×10^{-3} e 1×10^{-4} M. Tali spettri sono normalizzati in quanto per ogni decremento di concentrazione di un fattore 10 è stata utilizzata una cella di cammino ottico 10 volte maggiore: 0.1 mm per 1×10^{-2} , 1.0 mm per 1×10^{-3} e 10.0 mm per 1×10^{-4} M. Dal confronto tra gli spettri registrati a diverse concentrazioni è possibile trarre conclusioni su eventuali fenomeni di aggregazione e stabilire se i legami a idrogeno che coinvolgono gli NH sono di tipo intra- o intermolecolare.

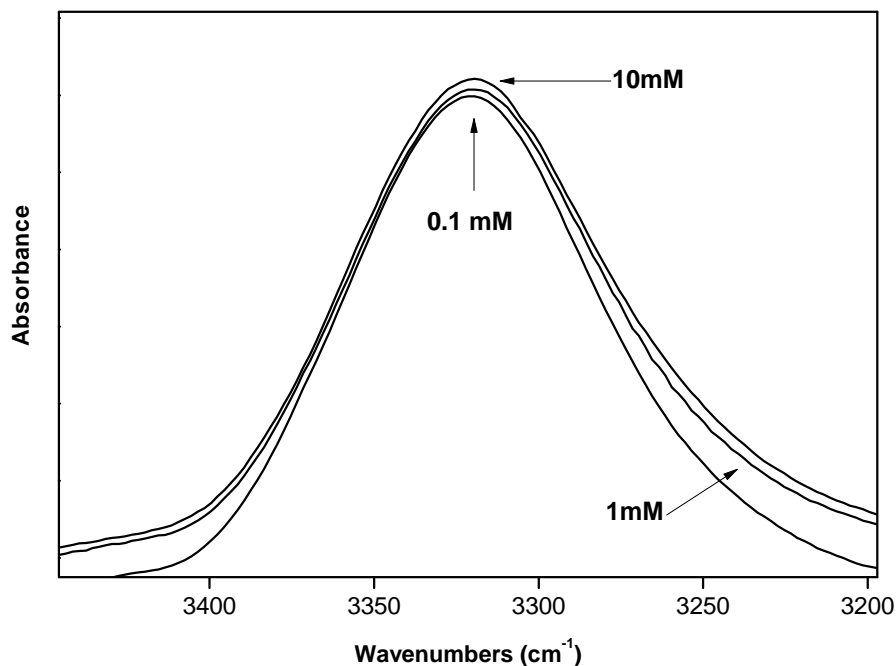


Fig.7.6 Sovrapposizione di spettri IR del peptide 3 in CDCl_3 alle concentrazioni 10mM ,1 mM e 0,1mM .

- Dallo studio degli effetti della diluizione si può ritenere che i legami idrogeno osservati sugli N-H peptidici siano prevalentemente di tipo intramolecolare.^[50,52,53] Infatti, l'intensità delle bande comprese nell'intervallo 3340-3300 cm^{-1} diminuisce poco con la diluizione, ad indicare deboli interazioni intramolecolari (aggregazione) (Fig. 7.6). Tale dato è in accordo con l'adozione di una struttura elicoidale, stabilizzata da legami ad idrogeno intramolecolari, come indicato anche delle analisi NMR e CD (vedi paragrafi successivi). Va anche notato che anche alla concentrazione di 10^{-4} M non si osserva una significativa presenza di N-H non legati (assorbimento sopra 3400 cm^{-1}). Tale comportamento è stato sempre osservato con la tricogina e i suoi analoghi. Esso sta ad indicare che la tricogina tende ad autoassociare mediante gli N-H N-terminali e i C=O C-terminali, non impegnati nei legami ad idrogeno intramolecolari^[50,52,53]

7.1.3. Studio della sonda NO₂

Lo studio IR è proseguito con l'analisi specifica della banda di stretching simmetrico del gruppo NO₂ sita a circa 1346 cm⁻¹. Di seguito sono riportati gli spettri dei tre peptidi in esame in CDCl₃, in CD₃CN e in MeOH. Ad ognuno degli spettri acquisiti è stato sottratto lo spettro corrispondente di un analogo della tricogina contenente l'amminoacido *p*-Fluorofenilalanina (*p*FPhe) al posto del *p*NO₂Phe nella stessa posizione della sequenza. In questo modo è stato possibile isolare la banda di interesse da tutte le altre bande peptidiche ed è stato così possibile studiarne le variazioni in diversi sistemi solvente.

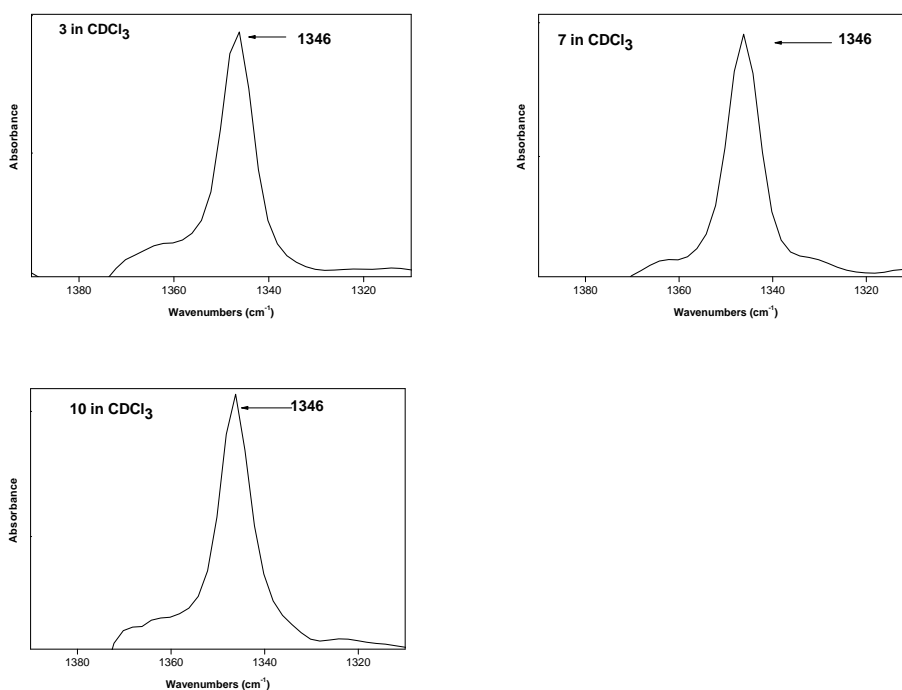


Fig.7.8 Spettri di assorbimento IR dei peptidi **3**, **7**, e **10** in CDCl₃ a cui è stato sottratto l'analogo fluorurato nella zona 1350cm⁻¹; conc. 1x10⁻³M cella 1 mm.

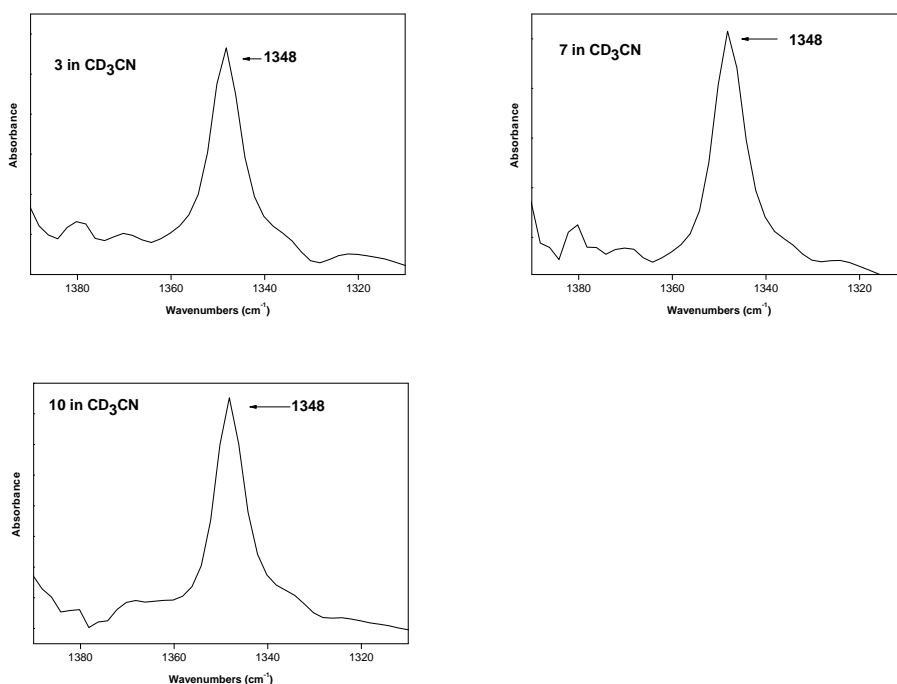


Fig.7.9 Spettri di assorbimento IR dei peptidi **3**, **7**, e **10** in CD₃CN a cui è stato sottratto l'analogo fluorurato nella zona 1350cm⁻¹; conc. 1x10⁻²M cella 0.1 mm.

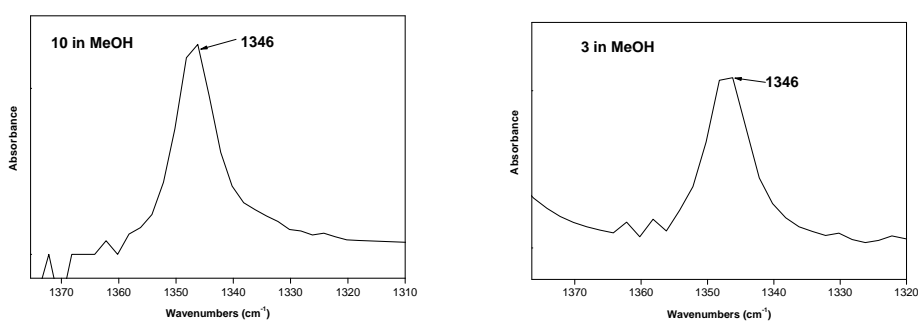


Fig.7.10 Spettri di assorbimento IR dei peptidi **3**, **7**, e **10** in MeOH a cui è stato sottratto l'analogo fluorurato nella zona 1350cm⁻¹; conc. 1x10⁻³M cella 1 mm.

Oltre ai diversi solventi analizzati si è tentato di capire come questa banda IR potesse essere influenzata da un ambiente di membrana o membrano-mimetico.

Per questo studio si è ricorsi alla tecnica dell'ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance- FT-IR Spectroscopy) che ci permette di analizzare i peptidi in ambiente acquoso.

La tecnica dell'ATR non prevede l'attraversamento del campione da parte della radiazione e l'analisi viene fatta in riflettanza. In questa tecnica il campione è posto in stretto contatto con un elemento ottico definito elemento di riflessione interna (o cristallo ATR), costituito da un cristallo a elevato indice di rifrazione. Tramite un sistema di lenti, la radiazione colpisce il campione con angolo superiore a quello critico dei materiali in esame, per cui si è in condizioni di riflessione totale. Il fascio riflesso, sempre tramite un sistema di lenti, viene inviato al rivelatore, dando uno spettro IR in ATR.

L'ATR è una tecnica che permette di analizzare solo la superficie del campione: si definisce "penetration depth" lo spessore del campione che viene effettivamente sottoposto ad analisi.

$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{2\pi(\sin^2 \theta - (n_2/n_1)^2)^{1/2}}$$

Il raggio IR penetra solo per qualche frazione di micron ($0.5 \mu - 5 \mu$) nella sostanza. Dopo alcune riflessioni la diminuzione dell'intensità del raggio (onda evanescente) è sufficiente per essere rilevata dallo spettrofotometro.

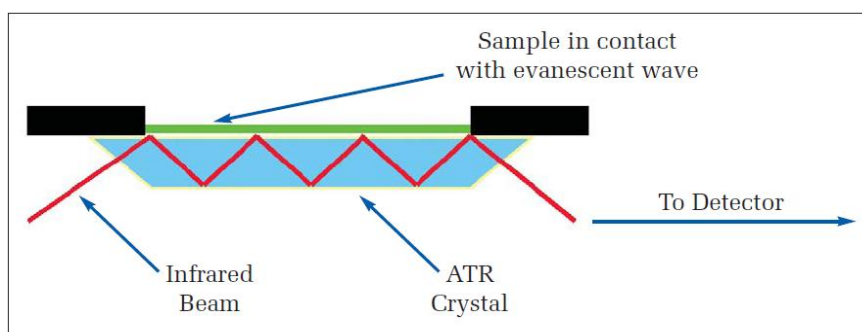


Figura 7.11 Cammino della radiazione infrarossa all'interno di cristallo ATR.

Un vantaggio di questa tecnica è la scarsa penetrazione del raggio nel campione. Ciò evita la forte attenuazione del segnale in solventi che assorbono molto, come le soluzioni acquose, tipiche dei sistemi biologici.

I campioni sono stati preparati inglobando il peptide in una miscela di liposomi costituiti da fosfatidilcolina e colesterolo (rapporto liposoma/peptide 5:1) e solubilizzati in DCM/MeOH 4:1. La miscela è stata depositata sul cristallo ATR ed in seguito il solvente è stato fatto evaporare sotto flusso di azoto.^[54,55] Qui di seguito vengono riportati gli spettri dei tre peptidi in liposomi costituiti da fosfatidilcolina e colesterolo (PC/Ch, 7:3).

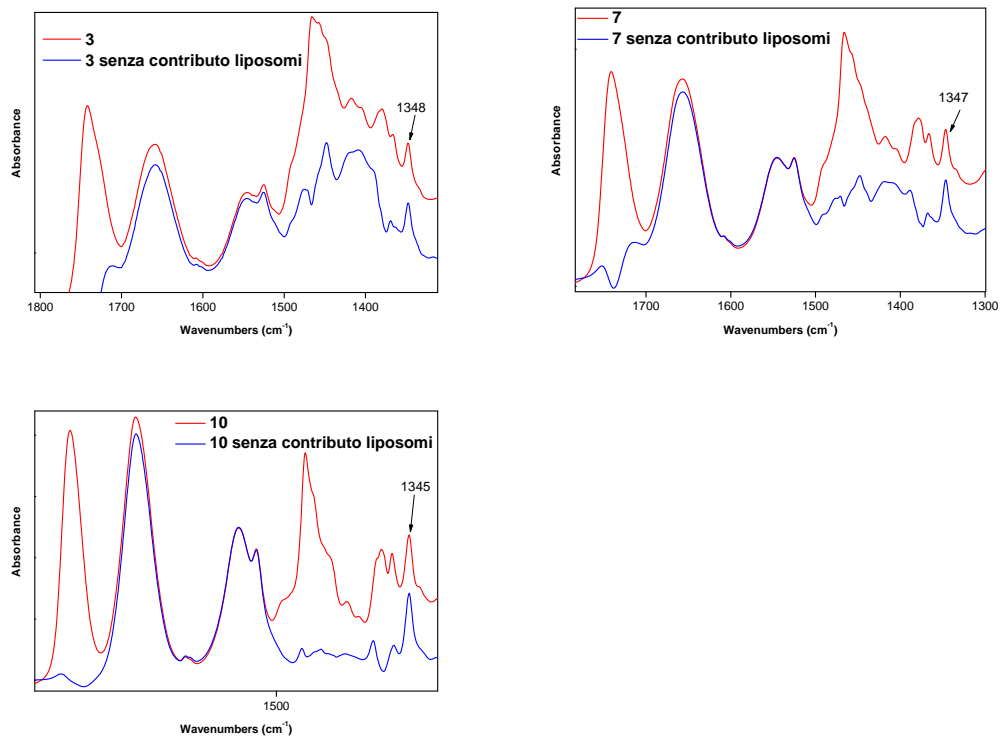


Fig.7.12 Spettri ATR dei peptidi **3**, **7**, e **10** in liposomi di PC/Ch nella zona $1800-1300\text{cm}^{-1}$ (blu). Gli spettri sono stati sovrapposti agli spettri dei liposomi PC/Ch (rosso).

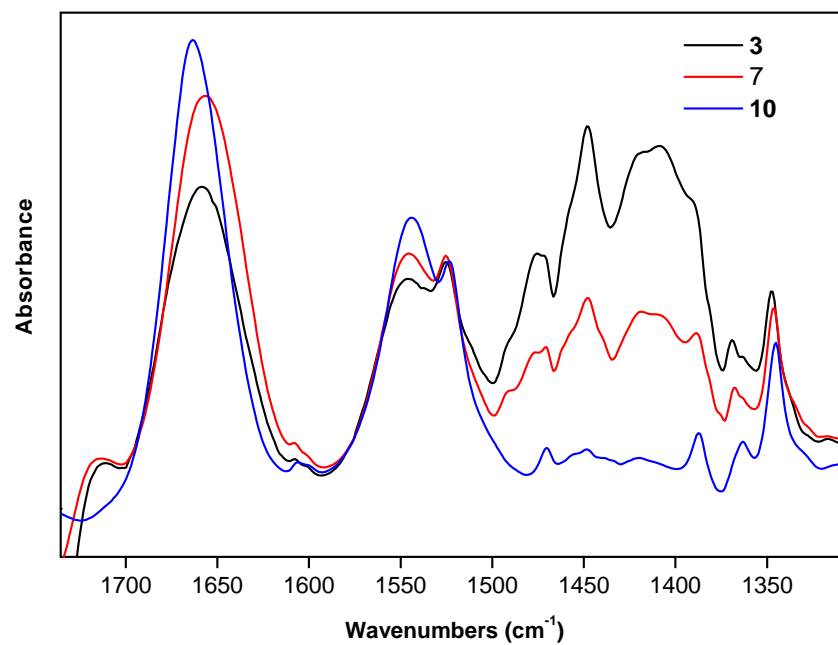


Fig.7.13 Sovrapposizione degli spettri ATR dei peptidi **3**, **7**, e **10** in liposomi di PC/Ch nella zona $1800-1300\text{cm}^{-1}$.

Dall'osservazione della banda a 1346 cm^{-1} nei diversi solventi e nei diversi ambienti di membrana possono essere ricavate le seguenti considerazioni:

- Gli spettri in metanolo non hanno evidenziato uno spostamento della frequenza di assorbimento del gruppo $p\text{NO}_2$, rispetto allo spettro in CDCl_3 .
- Gli spettri in acetonitrile deuterato hanno evidenziato un modestissimo spostamento della frequenza di assorbimento del gruppo $p\text{NO}_2$, rispetto allo spettro in CDCl_3 .
- Gli spettri ATR evidenziano leggeri spostamenti della frequenza di assorbimento per i tre peptidi. Tuttavia tali variazioni non sono sufficientemente significative per fornire informazioni sulle variazioni della struttura secondaria o sull'arrangiamento del sistema peptide-membrana, dal momento che rientrano nell'ordine di grandezza della sensibilità dello strumento.

7.2. Dicroismo circolare

Le preferenze conformazionali degli analoghi della tricogina sintetizzati in questa tesi sono state indagate anche tramite il dicroismo circolare. Nell'analisi sono stati impiegati i seguenti solventi:

- 2,2,2-trifluoroetanolo (TFE),
- Metanolo
- Sodiodecilsolfato (SDS) 100 mM in acqua.
- Acetonitrile (CH_3CN)

Il TFE è un solvente che promuove la formazione di strutture elicoidali^[56-58] l'acetonitrile è lo stesso solvente impiegato negli studi $^1\text{H-NMR}$: questo ci permette di valutare la struttura in soluzione con due tecniche diverse e complementari.; l'SDS crea un ambiente membrano-mimetico. L'analisi CD in CDCl_3 , solvente utilizzato per le misure di assorbimento IR, è preclusa dal forte assorbimento di tale solvente nella zona spettrale dove assorbe il cromoforo ammidico (180-250 nm). Le misure sono state condotte a temperatura ambiente e alla concentrazione 1×10^{-3} M. Si è studiata in particolare la zona tra 190 nm e 260 nm, dove si trovano le bande corrispondenti alle transizioni $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ del cromoforo peptidico. Le transizioni del cromoforo peptidico sono otticamente inattive, ma la presenza di centri chirali nelle vicinanze (i C^α degli amminoacidi) e di strutture elicoidali (intrinsecamente asimmetriche) le rende otticamente attive e quindi indagabili mediante CD.

Sotto vengono riportate le curve dicroiche realizzate nei tre solventi differenti;

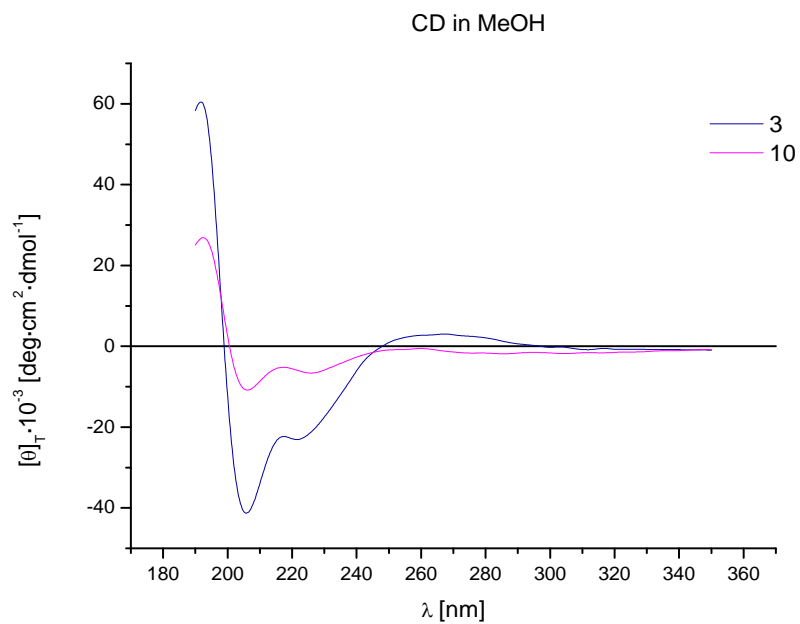


Figura 7.14 Spettri CD (cammino ottico 0.02 cm) dei peptidi **3**, e **10** in MeOH. Concentrazione peptidica: 1×10^{-3} M.

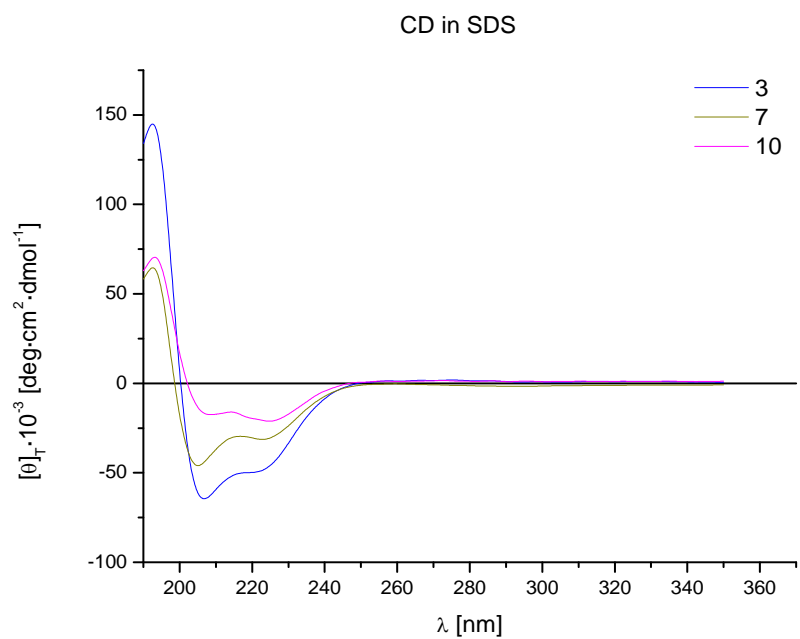


Figura 7.15 Spettri CD (cammino ottico 0.02 cm) dei peptidi **3**, **7**, **10** in SDS. Concentrazione peptidica: 1×10^{-3} M.

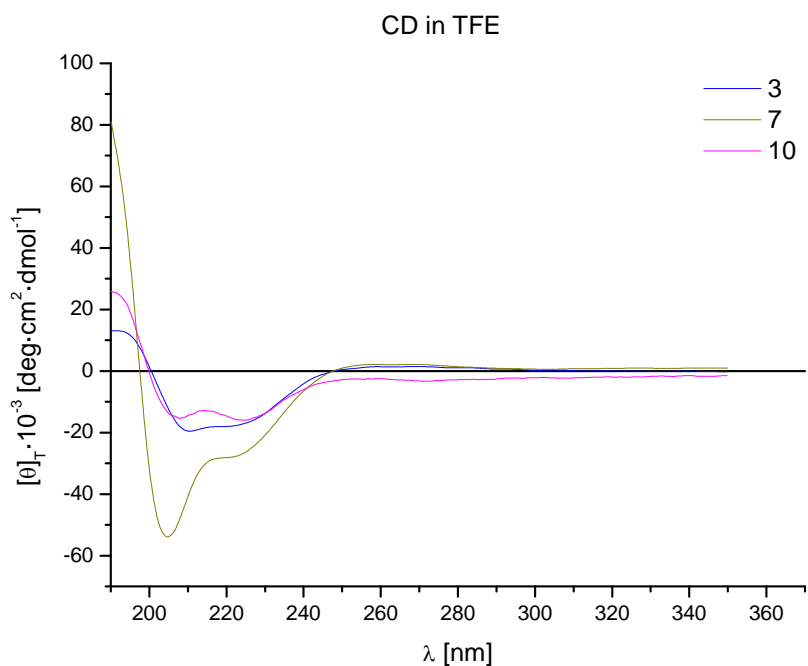


Figura 7.16 Spettri CD (cammino ottico 0.02 cm) dei peptidi 3,7, 10 in TFE. Concentrazione peptidica: 1×10^{-3} M.

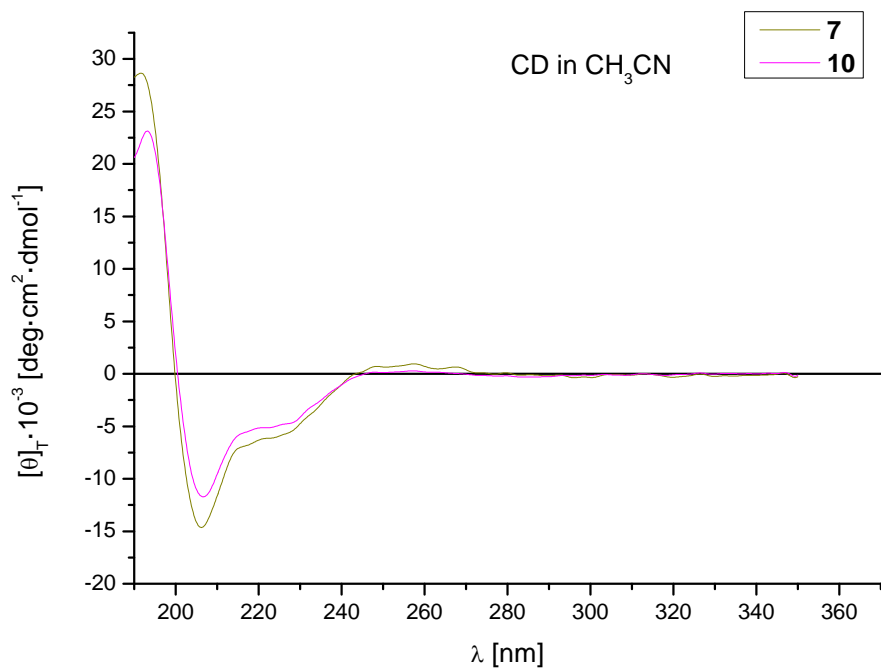


Figura 7.17 Spettri CD (cammino ottico 0.05 cm) dei peptidi 3,7, 10 in MeOH. Concentrazione peptidica: 5×10^{-4} M.

Andamenti di questo tipo si riscontrano in strutture elicoidali destrogire sia di tipo α che 3_{10} .^[59-62] In particolare, le posizioni canoniche per le bande dicroiche di una α -elica sono 222 e 208 nm e il rapporto tra le loro intensità ($R = [\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$) è circa pari a 1. Inoltre, in un'elica destrogira tali bande sono negative. Sulla base di studi computazionali è stato suggerito che un possibile criterio di distinzione tra strutture elicoidali di tipo α e 3_{10} si basi non tanto sulle posizioni delle bande, che sono molto simili per le due strutture, quanto piuttosto sulle intensità relative delle bande stesse. Nell'elica 3_{10} , infatti, la banda a circa 222 nm è meno intensa di quella a circa 208 nm ed R risulta inferiore o uguale a 0.4, quindi tale valore è ritenuto diagnostico anche se non esiste un consenso unanime a riguardo.^[62]

Peptide	Solvente	$\theta_T \times 10^{-3} (205 \pm 1 \text{ nm})$	$\theta_T \times 10^{-3}$	R
3	MeOH	-41.29	-23.08	0.56
	TFE	-19.54	-17.80	0.91
	SDS	-64.51	-49.17	0.76
7	MeOH			
	TFE	-53.92	-27.85	0.52
	SDS	-45.97	-31.34	0.68
	CH ₃ CN	-6.14	-14.64	0.42
10	MeOH	-10.85	-6.64	0.61
	TFE	-15.41	-15.63	1.01
	SDS	-17.49	-21.15	1.21
	CH ₃ CN	-5.15	-11.72	0.44

Tabella 7.1 Ellitticità molare ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$) e rapporto $[\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$ (**R**) per i peptidi alle lunghezze d'onda corrispondenti ai due massimi negativi delle curve dicroiche nei diversi solventi.

Dai dati riportati in tabella 7.1 si può notare che in metanolo tutti i peptidi (ad esclusione dell'analogo **7** che non si scioglie in metanolo) sono vicini al valore di R tipico di un'elica 3_{10} . In TFE gli analoghi **3** e **10** sono vicini all'unità e quindi assimilabili ad un α -elica mentre per l'analogo **7** permane la conformazione ad elica 3_{10} . In SDS la situazione per gli analoghi **3** e **7** è intermedia tra le due strutture mentre per l'analogo **10** si ha α -elica. In acetonitrile i peptidi **7** e **10** assumono una conformazione ad elica 3_{10} . In quest'ultimo solvente il peptide **3** ha un andamento simile agli altri due composti, ma non è stato riportato per un problema di rumorosità del segnale.

Poiché i peptidi trattengono discreti contenuti d'acqua anche dopo estesa liofilizzazione, al fine di verificare se ci fossero differenze di intensità del segnale dicroico tra i tre peptidi in esame, per le misure effettuate in CH₃CN, la concentrazione peptidica corretta è stata calcolata mediante misure UV della soluzione usata per le analisi CD. Come riferimento è stato preso il massimo di assorbimento a circa 275 nm. La stessa correzione non è stata effettuata per gli altri solventi, per cui le diverse intensità delle curve presumibilmente sono da attribuirsi ad errori di concentrazione.

Nell'interpretazione degli spettri dicroici è necessario tenere conto del fatto che il cromoforo *p*NO₂Phe presenta degli assorbimenti nella regione spettrale indagata. Pertanto, è ipotizzabile che esso dia un contributo agli spettri osservati. Tuttavia, le curve dicroiche registrate, con andamenti caratteristici delle strutture elicoidali, inducono a ritenere che il contributo principale al segnale provenga dall'accoppiamento dei cromofori ammidici piuttosto che dalla *p*NO₂Phe.

Dall'osservazione degli spettri CD nei diversi solventi possono essere ricavate le seguenti considerazioni:

- Tutti i peptidi tendono ad assumere una struttura elicoidale di tipo 3₁₀ in acetonitrile, come già osservato dalle misure di assorbimento IR effettuate nello stesso solvente.
- Il peptide **10** è quello che maggiormente sembra preferire la conformazione ad α -elica con un valore di R molto prossimo a 1 o solo poco inferiore anche in metanolo.
- Il peptide **7**, al contrario, ha una spiccata preferenza per la conformazione a elica 3₁₀ in tutti i solventi nei quali è stato possibile effettuare la misura.

Spettroscopia NMR

Mediante spettroscopia NMR è stato possibile non solo caratterizzare i peptidi sintetizzati, ma anche indagarne la conformazione. Gli spettri mono- e bi-dimensionali acquisiti in CD₃CN hanno evidenziato la presenza di una struttura secondaria di tipo elicoidale, confermando quanto già osservato tramite spettroscopia IR e dicroismo circolare.

Tutte le risonanze protoniche sono state assegnate, per tutti i peptidi (tabelle 7.2, 7.4, 7.5), analizzando gli spettri TOCSY, COSY e ROESY.

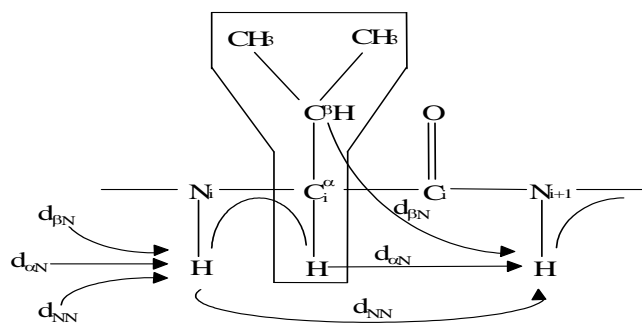


Figura 7.18 Porzione della catena peptidica con indicazione delle correlazioni $C^\alpha H$ -NH COSY (linee) e delle correlazioni ROESY sequenziali (freccie).

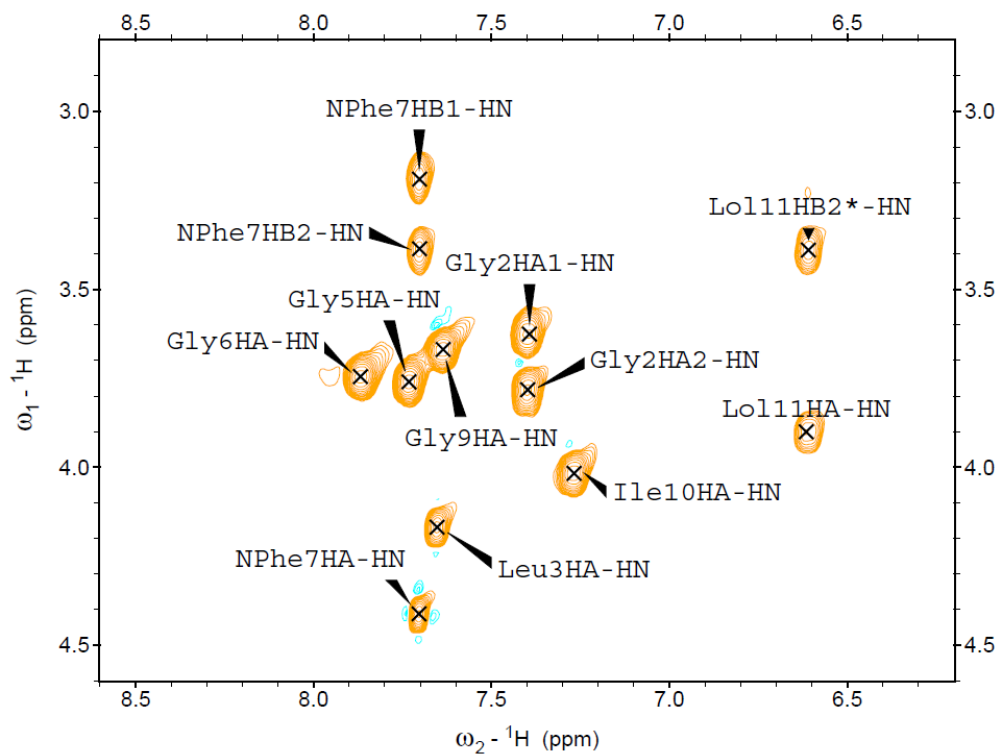


Figura 7.19 Regione $C^\alpha H(i) \rightarrow NH(i+n)$ dello spettro TOCSY della del peptide 7 (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN , 298K)

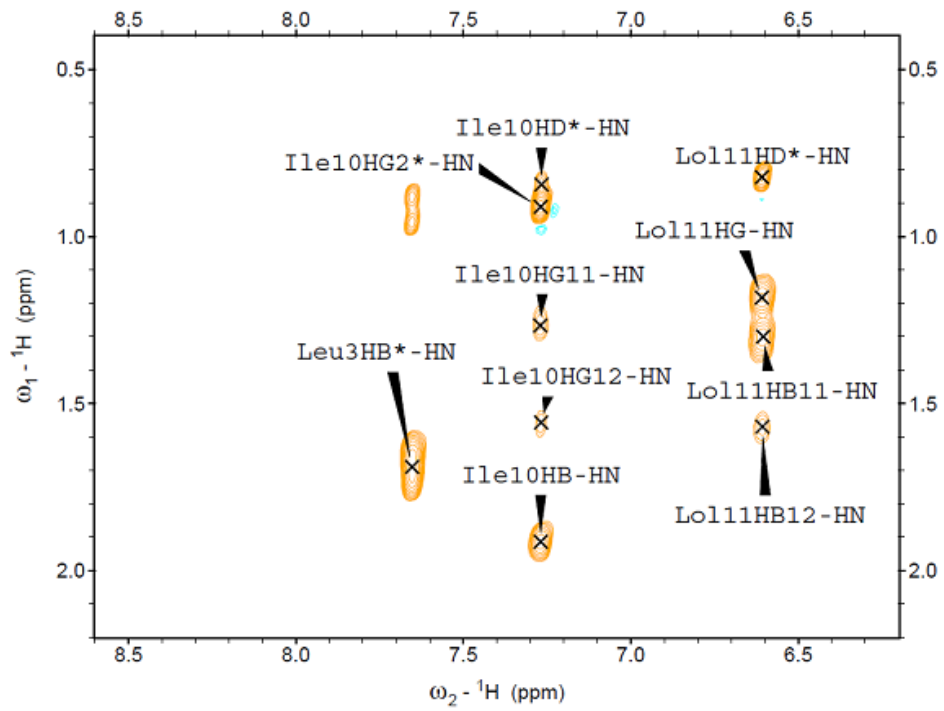


Figura 7.20 Regione $C^\beta H(i) \rightarrow NH(i+n)$ dello spettro TOCSY del peptide 7 (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN , 298K)

Tabella 7.2 Frequenze di risonanza protonica relative al TMS per il peptide 3.

Residuo	NH	α H	β H	γ H	δ H	altri
n-ottanoile			2.239	1.574		1.283 0.861
Aib1	7.258		1.418			
Gly2	7.482	3.753 3.57				
<i>p</i> NO ₂ Phe3	7.926 4.494		3.388 3.188			8.138 7.509
Aib4	7.599		1.47			
Gly5	7.736	3.737				
Gly6	7.854	3.8				
Leu7	7.496	4.096	1.636	1.619	0.867	
Aib8	7.596		1.451			
Gly9	7.568	3.742 3.618				
Ile10	7.335	4.037	1.926	1.276 1.597 0.925	0.841	
Lol11	6.389	3.962	3.43 1.647 1.428	1.198	0.867	

Tabella 7.3 Frequenze di risonanza protonica relative al TMS per il peptide 7.

Residuo	NH	α H	β H	γ H	δ H	altri
n-ottanoile			2.211	1.584		0.881 1.299
Aib1	7.162		1.392			
Gly2	7.399	3.623 3.784				
Leu3	7.653	4.164	1.685	1.660	0.918	
Aib4	7.479		1.474			
Gly5	7.727	3.757				
Gly6	7.867	3.746				
<i>p</i> NO ₂ Phe7	7.701	4.411	3.184 3.389			8.114 7.516
Aib8	7.586		1.452			
Gly9	7.636	3.668				
Ile10	7.269	4.015	1.917	1.267 1.557 0.912	1.054	
Lol11	6.609	3.896	1.304 1.563 3.390	1.183	0.822	

Tabella 7.4 Frequenze di risonanza protonica relative al TMS per il peptide **10**.

Residuo	NH	α H	β H	γ H	δ H	altri
n-ottanoile			2.227	1.595		1.307 1.594 chain ω 0.904
Aib1	7.193		1.403			
Gly2	7.456	3.788 3.653				
Leu3	7.685	4.197	1.698	1.687	0.925	
Aib4	7.499		1.483			
Gly5	7.771	3.747				
Gly6	7.928	3.814				
Leu7	7.598	4.222	1.73	1.694	0.91	
Aib8	7.682					
Gly9	7.673	3.695 3.508				
<i>p</i> NO ₂ Phe10	7.964	4.396	3.362 3.169			8.114 7.615
Lol11	6.953	3.957	3.456 1.653 1.456	1.292	0.894	

L'Effetto Nucleare Overhauser (NOE) dipende dalla distanza spaziale tra due protoni: infatti, due protoni non troppo distanti possono dare accoppiamento dipolare generando nello spettro un *cross-peak*. Di conseguenza, un accoppiamento dipolare tra protoni di residui diversi indica la loro vicinanza spaziale e la probabilità di trovare un picco di correlazione sarà massima per protoni di residui non troppo distanti nella struttura primaria. L'effetto Overhauser è funzione della distanza tra i protoni e del tempo di correlazione secondo la relazione:

$$\eta_{ij} \propto \frac{1}{r^6} \cdot f(\tau_c)$$

I residui vicini possono dunque essere identificati mediante *cross-peak* sequenziali di tipo $(i) \rightarrow (i+1)$.

Nelle figure si riporta la regione dello spettro ROESY (*Rotating-frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) in cui cadono le risonanze dei protoni ammidici dei tre peptidi analizzati. La presenza delle correlazioni sequenziali NH(*i*)→NH(*i*+1) dimostra che la struttura dei peptidi è elicoidale.^[63]

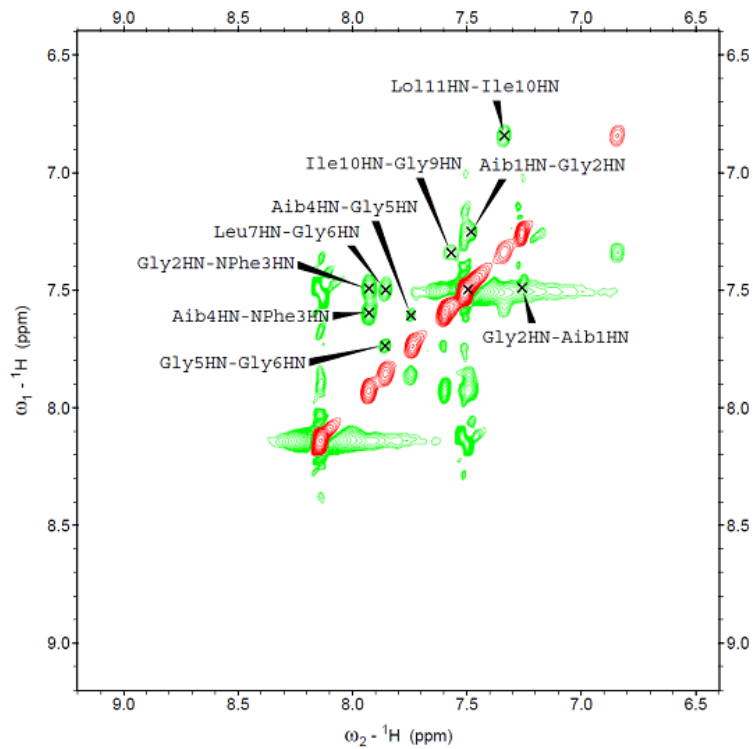


Figura 7.21 Regione dei protoni ammidici dello spettro ROESY di 3 (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN , 298K)

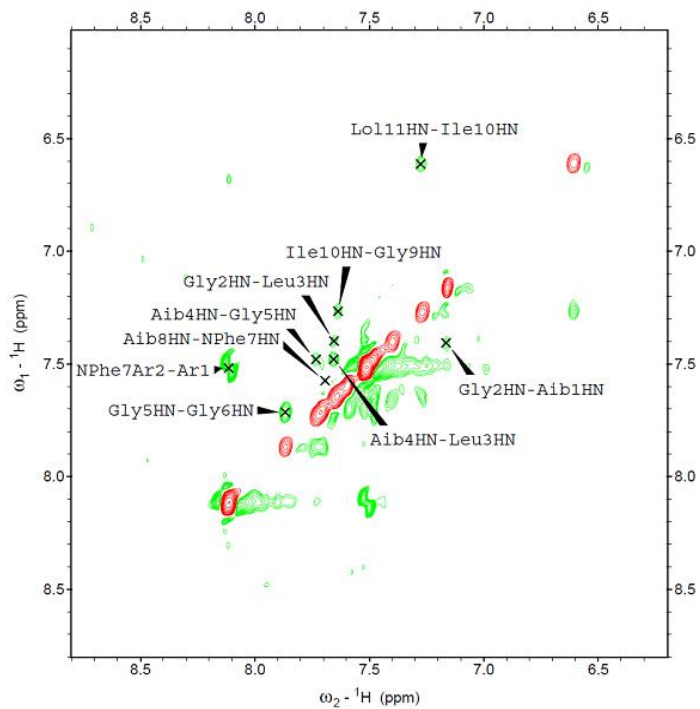


Figura 7.22 Regione dei protoni ammidici dello spettro ROESY del peptide 7 (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN , 298K)

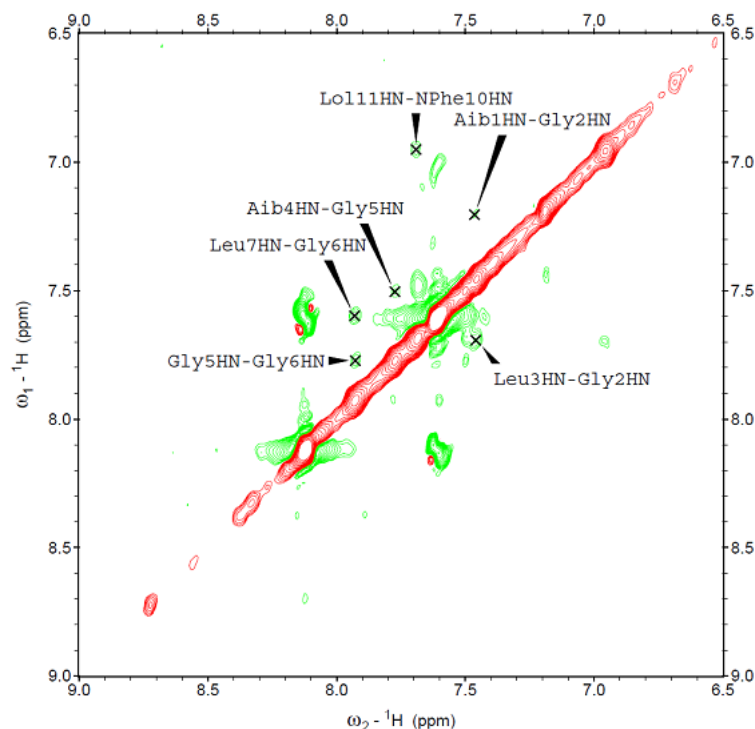


Figura 7.23 Regione dei protoni ammidici dello spettro ROESY del peptide **10** (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN , 298K)

Nelle figure 7.21, 7.22, 7.23, si osservano i segnali dovuti ai cross-peaks $NH(i) \rightarrow NH(i+1)$ per i tre analoghi sintetizzati; tali correlazioni sono tipiche delle strutture elicoidali.

Dagli spettri ROESY si possono carpire ulteriori informazioni, se si analizza la regione “fingerprint” dove si trovano le correlazioni $C^{\alpha}H(i) \rightarrow NH(i+n)$. Tali correlazioni sono indicative della presenza di conformazioni elicoidali e del tipo di elica: infatti correlazioni $C^{\alpha}H(i) \rightarrow NH(i+2)$ sono diagnostiche della struttura elicoidale 3_{10} , mentre correlazioni $C^{\alpha}H(i) \rightarrow NH(i+4)$ sono tipiche di un α -elica; infine, correlazioni $C^{\alpha}H(i) \rightarrow NH(i+3)$ sono compatibili con entrambi i tipi di elica.

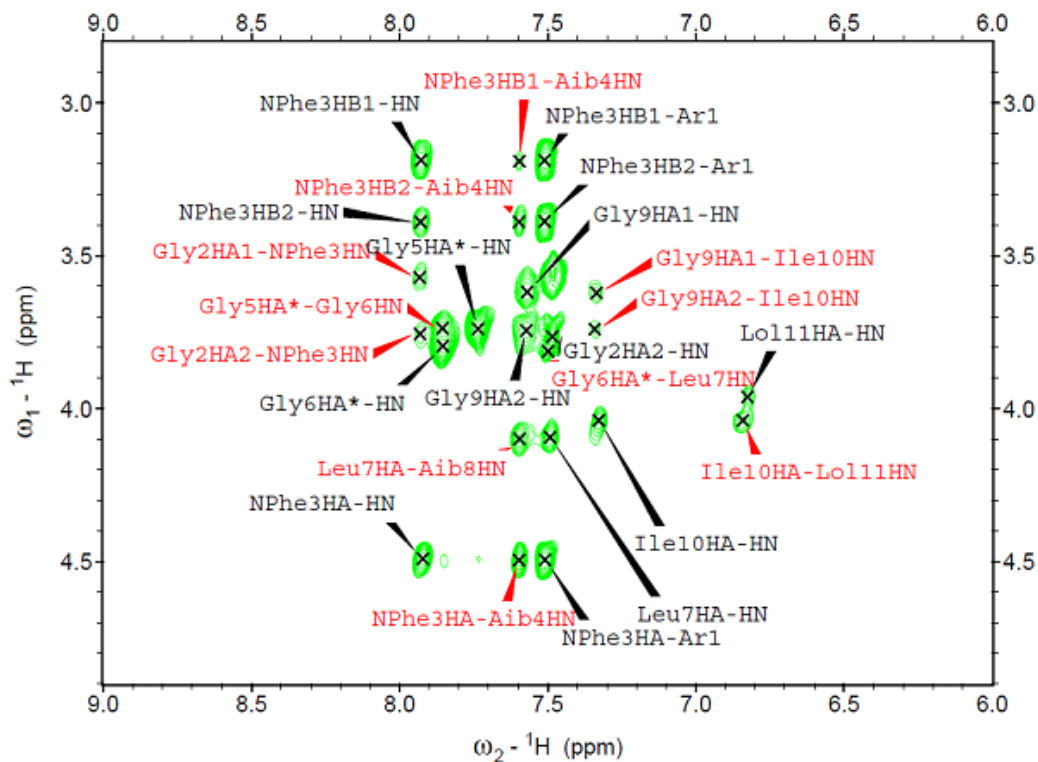


Figura 7.24 Regione $C^{\alpha}H(i) \rightarrow NH(i+n)$ dello spettro ROESY del peptide 3 (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN 298K)

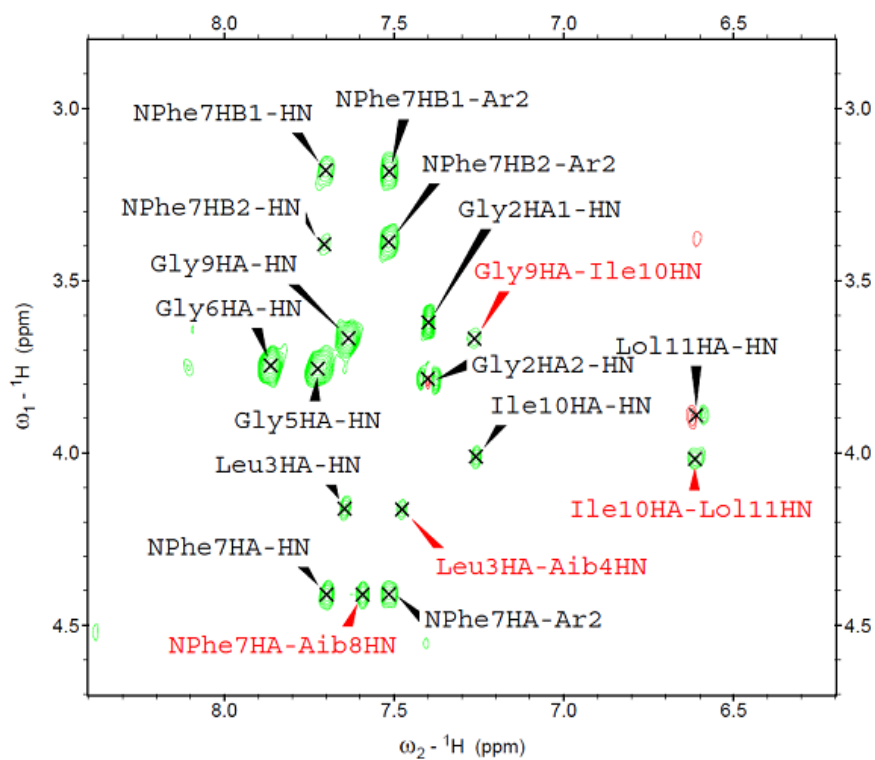


Figura 7.25 $C^{\alpha}H(i) \rightarrow NH(i+n)$ dello spettro ROESY del peptide 7 (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN , 298K)

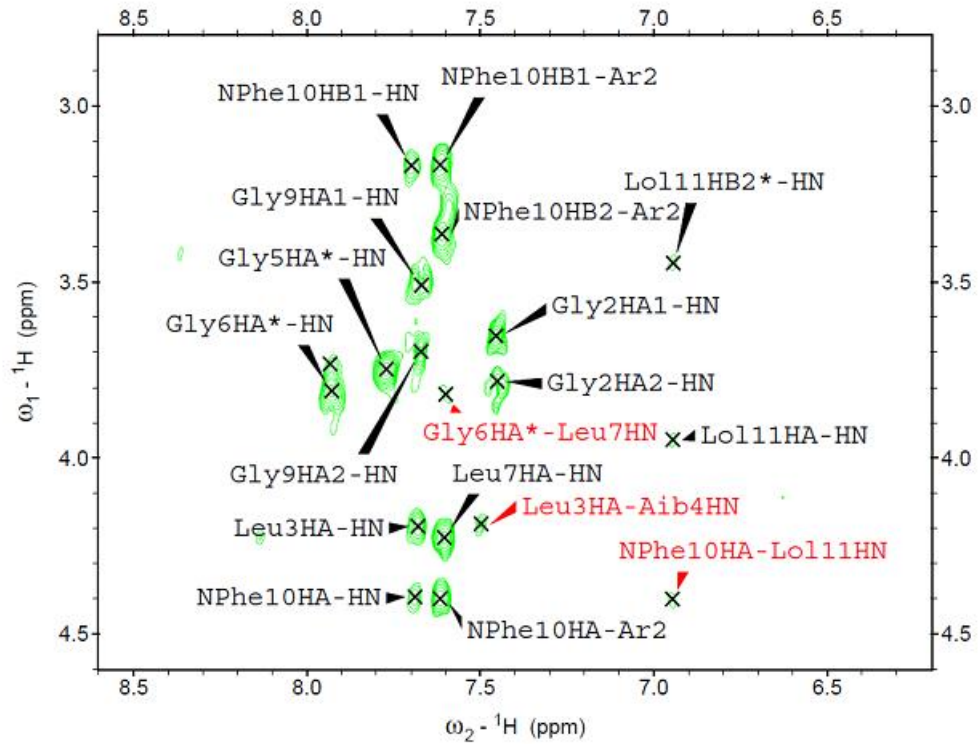


Figura 7.26 Regione $C^{\alpha}H(i) \rightarrow NH(i+n)$ dello spettro ROESY del peptide 10 (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN , 298K)

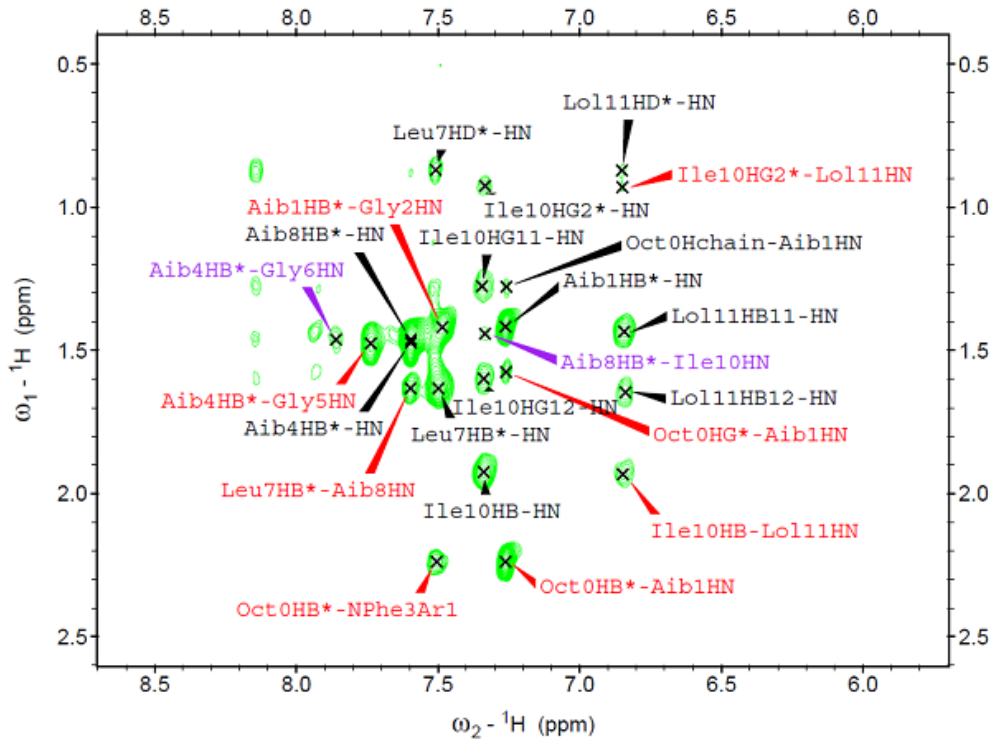


Figura 7.27 Regione $C^{\beta}H(i) \rightarrow NH(i+n)$ dello spettro ROESY del peptide 3 (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN , 298K)

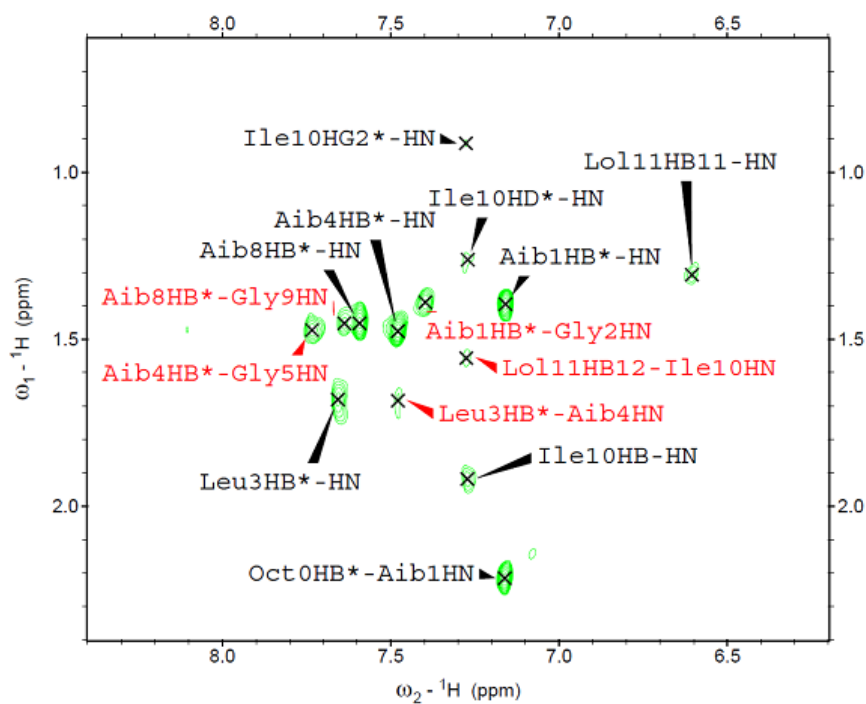


Figura 7.28 Regione $C^{\beta}H(i) \rightarrow NH(i+n)$ dello spettro ROESY del peptide 7 (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN , 298K)

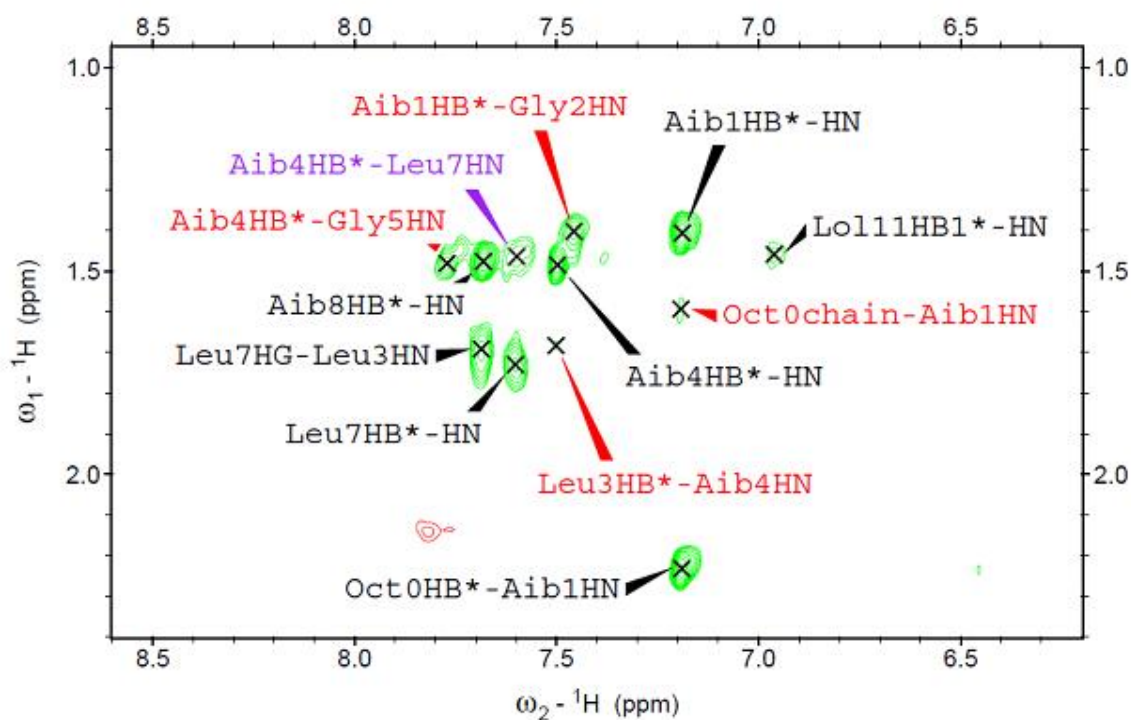


Figura 7.29 Regione $C^{\beta}H(i) \rightarrow NH(i+n)$ dello spettro ROESY del peptide 10 (400MHz, conc 1mM, in CD_3CN T)

Nella zona $C^{\alpha}H(i) \rightarrow NH(i+n)$ non si trovano correlazioni utili ad ottenere informazioni sul tipo di elica assunta dal peptide, mentre tali informazioni per i peptidi **3** e **10** sono contenute nella regione $C^{\beta}H(i) \rightarrow NH(i+n)$. L'analogo **3** presenta due cross peaks $C^{\beta}H(i) \rightarrow NH(i+2)$ che indicano la presenza di un'elica 3_{10} , mentre l'analogo **10** mostra un cross peak $C^{\beta}H(i) \rightarrow NH(i+3)$ che è compatibile sia con l'elica 3_{10} sia con l' α -elica. Per l'analogo **7** non si hanno informazioni sul tipo di elica.

Dall'analisi NMR in CD_3CN possiamo concludere che la struttura degli analoghi della tricogina analizzati è sicuramente di tipo elicoidale e probabilmente di tipo 3_{10} , almeno in questo solvente. Ciò conferma quanto già suggerito dalle altre tecniche utilizzate in questa tesi per lo studio della conformazione. Si può inoltre affermare che le eliche godono di notevole stabilità: il solvente usato, infatti, è un buon accettore di legami ad idrogeno, ma non riesce a competere con i legami ad idrogeno intra-molecolari di tipo $C=O \cdots H-N$, che stabilizzano la struttura peptidica.

7.4 Attività biologica

7.4.1 Interazione con membrane fosfolipidiche

Allo scopo di verificare le capacità dei peptidi sintetizzati di alterare la permeabilità dei doppi strati fosfolipidici è stato eseguito un test preliminare di interazione con membrane in cui i peptidi sintetizzati sono stati confrontati con la tricogina, un peptaibolico ampiamente studiate all'interno di questo gruppo di ricerca^[64]

Mediante misure di fluorescenza è stata determinata la capacità dei quattro peptidi a tre diverse concentrazioni di indurre il rilascio da piccole vescicole uni lamellari (SUV, Small Unilamellar Vesicles) di PC/Ch (7:3) e PE/PG (7:3) della CF precedentemente inglobata. Il rilascio di CF è stato misurato dopo 20 minuti dall'aggiunta del peptide alla soluzione dei liposomi. Una rappresentazione schematica dell'esperimento è riportata nella figura sottostante.

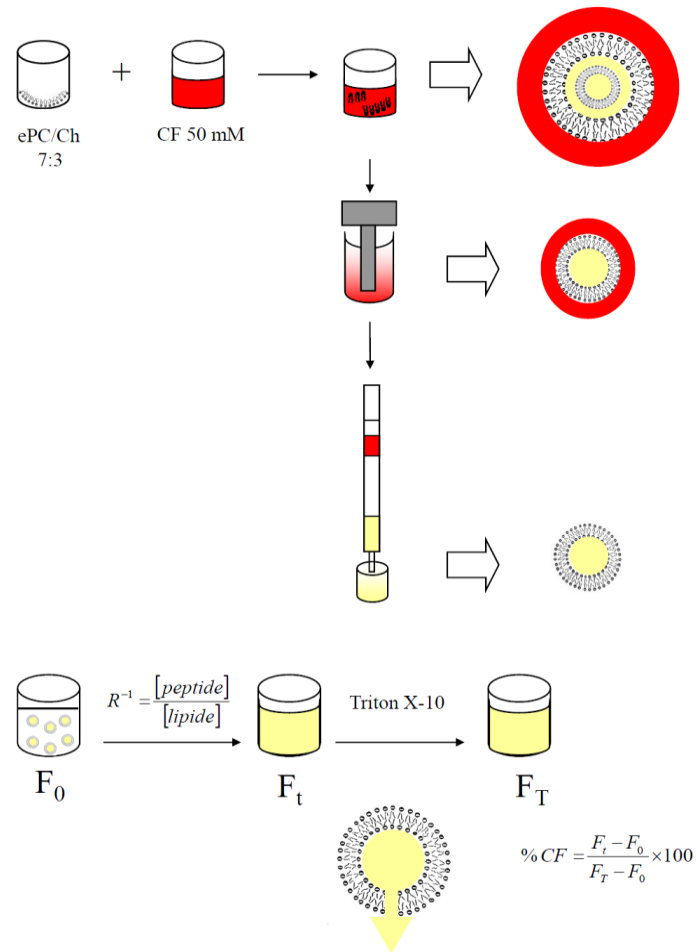


Figura 7.32 Schema dell'esperimento "leakage".

Durante lo svolgimento di tali prove si possono avere due comportamenti diversi a seconda che il peptide riesca a modificare o meno la permeabilità della membrana. Nel caso ci riesca, la fluoresceina fuoriesce dalla vescicola ed il segnale dovuto alla fluorescenza aumenta, nel caso opposto invece si misura una fluorescenza debole grazie al fenomeno dell'autoquenching dovuto all'elevata concentrazione di fluoresceina presente all'interno delle vescicole.

Le misure di fluorescenza sono state effettuate al tempo zero e dopo venti minuti. Dopo la misura a t_{20} è stato aggiunto un tensioattivo "triton" che è servito a disgregare la vescicola rendendo possibile la misura del valore massimo di fluorescenza.

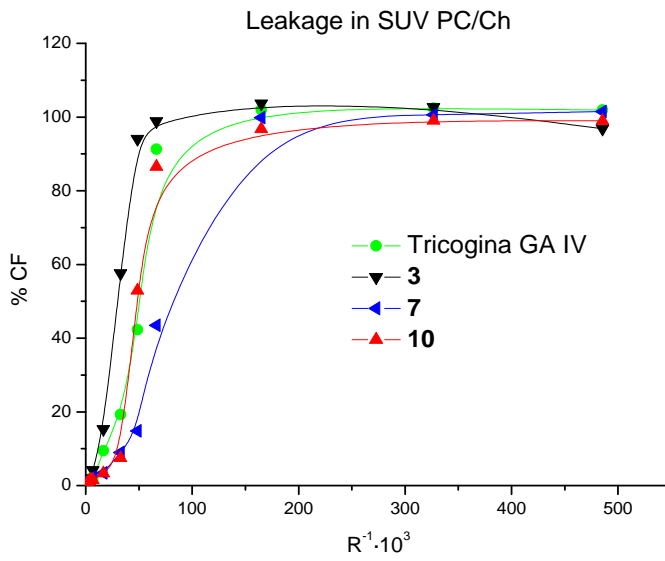


Fig. 7.33 Rilascio di CF da vescicole di PC/Ch (7:3) dopo 20 minuti, a diversi rapporti $R_i^{-1} = [\text{peptide}]/[\text{lipide}]$, indotto dai peptidi **3,7,10** e dalla tricogina GA IV (tricogina).

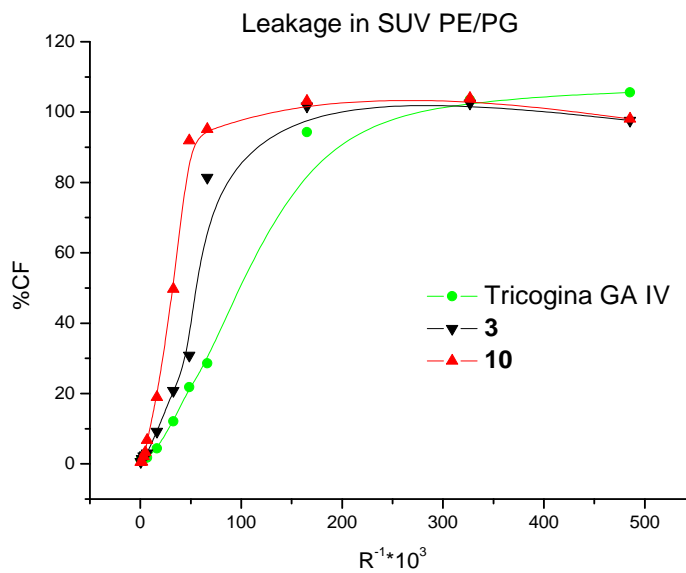


Fig. 7.34 Rilascio di CF da vescicole di PE/PG (7:3) dopo 20 minuti, a diversi rapporti $R_i^{-1} = [\text{peptide}]/[\text{lipide}]$, indotto dai peptidi **3,10** e dalla tricogina GA IV (tricogina).

Le curve ottenute mostrano un chiaro andamento a sigmoide che indica un meccanismo di azione di tipo cooperativo. È quindi necessario che i peptidi raggiungano una concentrazione minima tale da permettere la formazione di aggregati prima di innescare il processo di permeazione dei doppi strati fosfolipidici.

Nel test con le vescicole di PC/Ch l'unico peptide che presenta un'attività maggiore della tricogina è il peptide **3**. L'analogo **7** mostra invece un'attività di membrana di poco inferiore a quella della tricogina. Si ricorda comunque che una maggiore attività verso le vescicole preparate con PC/Ch (tipo eritrocitiche) non costituisce necessariamente un aspetto positivo per questi peptaibolici. Infatti, nel tentativo di trovare peptaibolici con proprietà antimicrobica come possibili nuovi antibiotici, è fondamentale che essi presentino una selettività nei confronti delle cellule batteriche lasciando inalterate le cellule eritrocitiche.

Le membrane delle cellule batteriche mimate in questo studio sono quelle dei Gram negativi (PE/PG). Gli analoghi **3** e **10** mostrano di possedere un'attività superiore alla tricogina verso questo tipo di membrane.

Per tutti i peptidi rimane da verificare l'attività sulle membrane del tipo Gram positivi.

L'analogo **1** è stato anch'esso sottoposto a leakage in SUV di PC/Ch. Sotto viene riportato il risultato confrontato con la tricogina.

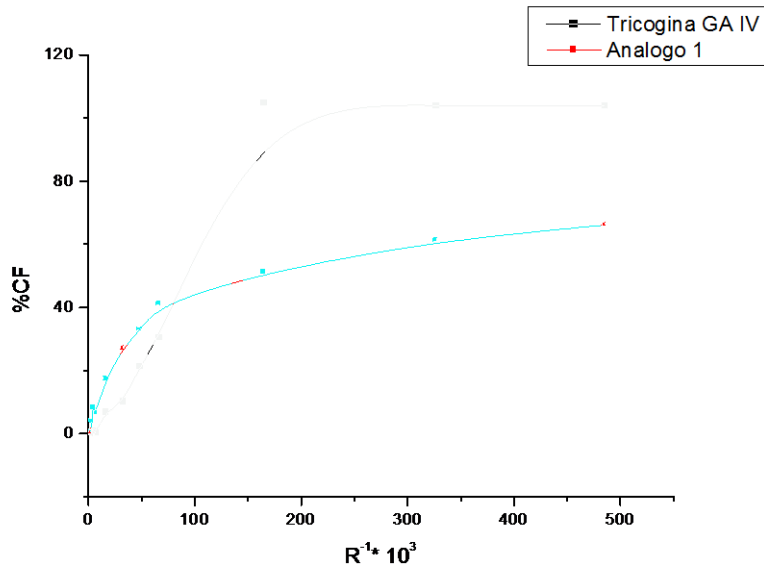


Fig. 7.35 Rilascio di CF da vescicole di PC/Ch (7:3) dopo 20 minuti, a diversi rapporti $R_i^{-1} = [\text{peptide}]/[\text{lipide}]$, indotto dal peptide **1** e dalla tricogina GA IV (tricogina).

Un peptide simile all'analogo **1** non era mai stato sintetizzato all'interno di questo gruppo di ricerca, quindi esso sarà oggetto di ulteriori studi. Avendo esso dimostrato una scarsa attività verso le membrane del tipo eritrocitico, si auspica che, al contrario, esso sia maggiormente selettivo e attivo nei confronti delle membrane batteriche (PE/PG) che, come il peptide stesso, contengono la fosfatidiletanolamina (PE).

7.4.2. Misure di light Scattering

Il Dinamic Light Scattering (DLS) è una tecnica non invasiva, ormai affermata, per la misura della dimensione di molecole, nanoparticelle o colloidali tipicamente sub-micronici.

Nelle misure DLS il campione viene illuminato da un raggio laser, e le variazioni d'intensità della luce diffusa vengono misurate in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dal movimento browniano delle particelle all'origine dello scattering. A parità di temperatura e di viscosità, le particelle 'piccole' si muovono rapidamente creando delle variazioni rapide dell'intensità di scattering mentre le particelle 'grosse' si muovono più lentamente, creando delle variazioni d'intensità lente.

Grazie ad un auto correlatore viene misurata, la velocità delle variazioni d'intensità, e il coefficiente di diffusione delle particelle viene calcolato dalla funzione di correlazione.

L'equazione di Stokes Einstein consente poi di convertire il coefficiente di diffusione in diametro idrodinamico.

$$D = \frac{kT}{6\pi r\eta}$$

Equazione di Stokes-Einstein

In questa tesi si sono fatte delle misure di DLS per stimare le dimensioni delle vescicole preparate per le misure di leakage e per capire se e come queste variassero dopo l'aggiunta del peptide. Le misure sono state fatte per i liposomi PE/PG prima e dopo l'aggiunta dell'analogo **1**. Le prove sono state svolte tre volte ed in seguito è stata fatta la media. Per le SUV di PC/Ch non è stata svolta la prova dell'aggiunta di peptide.

Tabella 7.5 misure di DLS

Campione	Misura [nm]		Media [nm]
PE/PG t=0 1	24.69		25.80
PE/PG t=0 2	23.34		
PE/PG t=0 3	29.38		
PC/Ch t=0 1	25.80		28.36
PC/Ch t=0 2	31.59		
PC/Ch t=0 3	27.70		
DMPE t=0 1	29.98		33.02
DMPE t=0 2	32.62		
DMPE t=0 3	36.45		
DMPE t=20 1	20.75		38.11
DMPE t=20 2	45.17		
DMPE t=20 3	48.42		

Da queste misure possiamo concludere che le dimensioni medie dei liposomi di PE/PG preparati sono dell'ordine dei 25-30 nm. Dopo l'aggiunta del peptide, esse aumentano ma non in modo significativo, indicazione comunque di una interazione, seppur debole, del peptide con la membrana stessa, che conferma quanto osservato dalle misure di leakage.

7.4.3. Studi di attività in vitro

Di seguito viene riportato uno studio di attività in vitro svolto da Dr. Simona Oancea, Università di Sibiu (Romania). In questo tipo di test viene misurato il diametro (in mm) di inibizione batterica indotto dalla deposizione di un peptide su un petri dish su cui è stata precedentemente cresciuta la coltura batterica. L'immagine 7.36 sarà d'esempio:

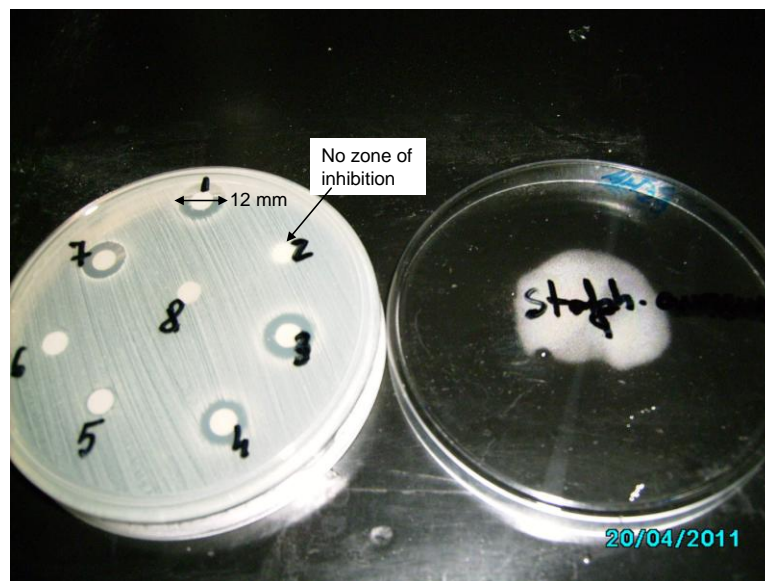


Figura 7.36 capsula di petri in cui sono stati svolti i test in vitro

I valori del diametro di inibizione della crescita batterica (in mm) sono riportati sotto. I composti sono alla concentrazione di 100 μ g/disco; diametro disco = 6mm; Whatman paper; *Staphylococcus aureus* testato su brodo di coltura a base di Mueller-Hinton agar; *Streptococcus pyogenes* testato su brodo di coltura a base di sangue di pecora.

Tabella 7.6 riepilogo dei risultati dei test in vitro

Ceppo/Composto	Trichogin GA IV	3	7	10	Tetracyclin
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15	7	8	12	31
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	10	7	9	9	32
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	28

Dalla tabella dei risultati si nota che gli analoghi della tricogina hanno un'attività inferiore al loro capostipite mentre tutti i peptidi manifestano attività inferiore rispetto all'antibiotico a largo spettro tetraciclina.

Va notato come i peptidi non risultano attivi verso l'*Escherichia coli*, batterio Gram negativo. Tale fatto potrebbe risultare in contrasto con i dati provenienti dal leakage in SUV di PE/PG. Va però ricordato che il liposoma è solo un buon modello della membrana citoplasmatica e che il batterio Gram negativo è formato da una doppia parete che potrebbe possedere dei meccanismi di difesa propri che inibiscono l'azione del peptide.

Il fatto che tutti i peptidi si dimostrino attivi verso i batteri Gram positivi è in accordo con quanto riportato nell'introduzione di questa tesi ^[4-7].

9. Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono stati ottenuti dei peptidi (**3**, **7**, **10**) ottimizzando il processo di sintesi in fase solida e ciò ha consentito di raggiungere rese elevate e prodotti puri. Il secondo risultato in particolare ha permesso di guadagnare una discreta quantità di tempo avendo semplificato il processo di purificazione dei prodotti. Per quanto concerne l'analogo **1** si dovrà cercare di migliorare il metodo di purificazione per aumentare la resa ottenibile.

Le analisi conformazionali dei peptidi **3**, **7**, **10** hanno evidenziato che in metanolo e in acetonitrile essi assumono una conformazione di elica 3_{10} , mentre per quanto riguarda TFE, SDS e CDCl_3 prevale l' α -elica o la coesistenza delle due strutture.

Studi preliminari di interazione con membrane modello, che imitano le membrane eritrocitiche e quelle dei batteri Gram-negativi, hanno mostrato che tutti gli analoghi della tricogina con un residuo di $p\text{NO}_2\text{Phe}$ sono in grado di permeare i doppi strati fosfolipidici con un'attività paragonabile a quella della tricogina GA IV. L'attività del peptide **1**, invece, sembra essere più debole della tricogina e questo dato sarà oggetto di ulteriori approfondimenti.

Infine, gli studi IR sui peptidi contenenti la $p\text{NO}_2\text{Phe}$ hanno confermato che la sonda nitro risulta essere valida in quanto la sua banda di assorbimento è ben distinguibile dalle bande tipiche del peptide. Tuttavia, le indicazioni ricavate dagli studi IR condotti in diversi sistemi solvente hanno dimostrato che tale banda non è sufficientemente sensibile alla variazione dell'intorno chimico. Per questo motivo, la sonda nitro, per quanto facile da introdurre, non è la sonda più indicata per valutare quali variazioni di conformazione avvenga nel peptide nel momento in cui esso esplica la sua attività di membrana.

- [1] Roeske, R. W.; Kennedy, S. J.; In *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Weinstein, B. Eds.; Dekker, New York, **1983**, 205-265.
- [2] Benedetti, E.; Bavoso, A.; Di Blasio, B.; Pavone, V.; Pedone, C.; Toniolo, C.; Bonora, G. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 7951.
- [3] Brückner, H.; Graf, H. *Experientia* **1983**, *39*, 528.
- [4] Auvin-Guette, C.; Rebuffat, S.; Prigent, Y.; Bodo, B.; In *Peptides 1990*, Giralt, E., Andreu, D. Eds.; ESCOM, Leiden, **1991**, 428-429
- [5] Auvin-Guette, C.; Rebuffat, S.; Prigent, Y.; Bodo, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2170.
- [6] Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Pirrone, L.; Bonora, G. M.; Mammi, S.; Peggion, E.; In *Peptides 1992*, Schneider, C. H., Eberle, A. N. Eds.; ESCOM, Leiden, **1993**, 613-614.
- [7] Auvin-Guette, C.; Rebuffat, S.; Vuidepot, I.; Messias, M.; Bodo, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 249.
- [8] Tsantrizos, Y. S.; Pischos, S.; Sauriol, F. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2118.
- [9] Tsantrizos, Y. S.; Pischos, S.; Sauriol, F.; Widden, P. *Can. J. Chem.* **1996**, *74*, 165.
- [10] Fujita, T.; Wada, S.; Iida, A.; Nishimura, T.; Kanai, M.; Toyama, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 489.
- [11] Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Peggion, C.; Epanand, R. F.; Epanand, R. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1179.
- [12] Crisma, M.; Barazza, A.; Formaggio, F.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Kamphuis, J.; Toniolo, C. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2813.
- [13] Hülsman, H.; Heinze, S.; Ritzau, M.; Schlegel, B.; Gräfe, U. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 1055.
- [14] Kleinkauf, H.; von Döhren, H. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *192*, 1.
- [15] Jung, G.; Brückner, H.; Schmitt, H.; In *Structure and Activity of Natural Peptides*, Voelter, W., Weitzel, G. Eds.; de Gruyter, Berlin, **1981**, 75-114.
- [16] Le Doan, T.; El Hajji, M.; Rebuffat, S.; Rajesvari, M. R.; Bodo, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *858*, 1.
- [17] Mathew, M. K.; Balaram, P. *Mol. Cell Biochem.* **1983**, *50*, 47.
- [18] Menestrina, G.; Voges, K.; Jung, G.; Boheim, G. *J. Membr. Biol.* **1986**, *93*, 111
- [19] Mueller, P.; Rudin, D. O. *Nature* **1968**, *217*, 713
- [20] Pandey, R. C.; Cook, J. C. J.; Rinehart, K. L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8469.
- [21] Toniolo, C.; Benedetti, E. *Macromolecules* **1991**, *24*, 4004.
- [22] Marsh, D. *Biochem. J.* **1996**, *315*, 345.
- [23] Improta, R.; Rega, N.; Aleman, C.; Barone, V. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7550

- [24] Marshall, G. R. In *Intra-Science Chemistry Reports*; Kharasch, N., Ed.; Gordon and Breach: New York, 1971; Vol. 5, 305-316.
- [25] Paterson, Y.; Rumsey, S. M.; Benedetti, E.; Némethy, G.; Scheraga, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2947.
- [26] Venkataram Prasad, B. V.; Sasisekharan, V. *Macromolecules* **1979**, *12*, 1107.
- [27] Toniolo, C.; Benedetti, E. *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 350.
- [28] Schiffer, M.; Edmundson, A. B. *Biophys. J.* **1967**, *7*, 121.
- [29] Schmitt, H.; Jung, G. *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 321.
- [30] Sansom, M. S. P. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **1991**, *55*, 139.
- [31] Tieleman, D. P.; Borisenko, V.; Sansom, M. S. P.; Woolley, G. A. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1464.
- [32] Fox, R. O.; Richards, F. M. *Nature* **1982**, *300*, 325.
- [33] Karle, I. L.; Flippen-Anderson, J. L.; Agarwalla, S.; Balaram, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5307.
- [34] Kelsh, L. P.; Ellena, J. F.; Cafiso, D. S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 5136.
- [35] Yee, A. A.; Marat, K.; O'Neil, J. D. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 283.
- [36] Bak, M.; Bywater, R. P.; Hohwy, M.; Thomsen, J. K.; Adelhorst, K.; Jakobsen, H. J.; Sørensen, O. W.; Nielsen, N. C. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1684.
- [37] Brogden, K. A. *Nature* **2005**, *3*, 238.
- [38] Epand, R. M.; Shai, Y.; Segrest, J. P.; Anantharamaiah, G. M. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **1995**, *37*, 319.
- [39] Vogel, H.; Nilsson, L.; Rigler, R.; Meder, S.; Boheim, G.; Beck, W.; Kurt, H.; Jung, G. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 305.
- [40] Toniolo, C.; Peggion, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Shui, X.; Eggleston, D. S. *Nature: Struct. Biol.* **1994**, *1*, 908.
- [41] Mazzuca, C.; Stella, L.; Venanzi, M.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Pispisa, B. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 3411.
- [42] Stella, L.; Mazzuca, C.; Venanzi, M.; Palleschi, A.; Didoné, M.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Pispisa, B. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 936.
- [43] Epand, R. M.; Epand, R. F.; Arnusch, C. J.; Papahadjopoulos-Sternberg, B.; Wang, G.; Shai, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 1272.
- [44] Taso, M. L.; Summerer, D.; Ryu, Y.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*
- [45] Smith, E. E.; Linderman, B. Y.; Luskin, A. C.; Brewer, S. H. *J. Phys. Chem.* **2011**, 2380.
- [46] Haiser, K.; O., K.; M., H.; N., R.; E., S. T.; W., S.; W., Z. *J. Phys. Chem.* **2011**, *115*, 2169.

- [47] Quaroni, L.; Smith, W. E. *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30*, 537.
- [48] Battistella, C. Tesi di Laurea, Università degli Studi di Padova, 2010.
- [49] Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [50] Bonora, G. M.; Mapelli, C.; Toniolo, C.; Wilkening, R. R.; Stevens, E. S. *Intl. J. Biol. Macromol.* **1984**, *6*, 179.
- [51] Kennedy, D. F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Chapman, D. *Biochemistry* **1991**, *30*, 6541.
- [52] Mizushima, S.; Shimanouchi, T.; Tsuboi, M.; Souda, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 270.
- [53] Palumbo, M.; Da Rin, S.; Bonora, G. M.; Toniolo, C. *Makromol. Chem.* **1976**, *177*, 1477.
- [54] Gazit, E.; Miller, I. R.; Biggin, P. C.; Sansom, M. S. P.; Shai, Y. *J. Mol. Biol.* **1996**, *258*, 860.
- [55] Oren, Z.; Lerman, J. C.; Gudmundsson, G. H.; Agerberth, B.; Shai, Y. *Biochem. J.* **1999**, *341*, 501.
- [56] Luo, P.; Baldwin, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 4930.
- [57] Rohl, C. A.; Chakrabartty, A.; Baldwin, R. L. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 2623.
- [58] Shiraki, K.; Nishikawa, K.; Goto, Y. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 180.
- [59] Manning, M. C.; Woody, R. W. *Biopolymers* **1991**, *31*, 569.
- [60] Sreerama, N.; Woody, R. W.; Berova, N.; Nakanishi, K. *Circular dichroism of peptides and proteins*; Wiley: New York, 2000.
- [61] Toniolo, C.; Polese, A.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Kamphuis, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2744.
- [62] Walliman, P.; Kennedy, R. J.; Kemp, D. S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 1290.
- [63] Wuthrich, K. *NMR of Protein and Nucleic Acids*; Wiley, New York, 1986.
- [64] Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Peggion, C.; Monaco, V.; Goulard, C.; Rebuffat, S.; Bodo, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4952.

Ringraziamenti

Arrivato alla conclusione di questo lavoro, è giunto il momento di ringraziare tutte le persone che hanno permesso l'esistenza dello stesso.

Vorrei ringraziare il prof. Claudio Toniolo per avermi concesso la possibilità di far parte di questo gruppo di ricerca composto da persone veramente valide e disponibili.

Ringrazio sentitamente la mia relatrice, dottoressa Cristina Peggion per avermi pazientemente aiutato e mi scuso se in qualche occasione la mia tesi le ha guastato il sonno notturno.

Un sincero ringraziamento va al prof. Fernando Formaggio per i suoi consigli e la sua infinità disponibilità.

Un monumento andrebbe fatto alla mia vicina di cappa, dottoressa Marta De Zotti, con la quale ho condiviso gran parte delle mie giornate in laboratorio che con la sua simpatia ha saputo rallegrare anche le fredde e tetre giornate di leakage. Un altro grazie va alla dottoressa Barbara Biondi per il supporto psicologico che mi ha fornito durante la purificazione dell'analogo 1.

Un grazie alla professoressa Marina Gobbo per avermi fornito la resina per la sintesi dell'analogo 1.

Ringrazio il dr. Marco Crisma per i suoi preziosi consigli ed il suo consistente aiuto nell'interpretazione degli spettri IR.

Ringrazio il dr. Renato Schiesari per la moltitudine di spettri IR che ha registrato.

Un doveroso ringraziamento va ai miei genitori Cinzia e Walter che mi hanno fornito la possibilità ed i mezzi per studiare serenamente ed hanno contribuito a farmi diventare la persona che oggi sono.

Un altro ringraziamento va a tutto il resto della mia famiglia nessuno escluso. Ognuno sa cosa rappresenta per me.

Non trovo parole non banali per ringraziare la mia ragazza, Irene, in passato ho commesso degli errori ma spero di avere rimediato e di avere la possibilità di condividere ancora molte gioie insieme a lei.

Un grazie va a tutti i miei amici che non sono molti ma sono veri.

Un grazie anche a "patugol" e "la megna" i miei primi coinquilini in quel di mortise.

Un grazie anche al mio portatile che sul finire di questa tesi mi ha lasciato a piedi dopo 5 anni di duro lavoro.