



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA
INDUSTRIALE**

**PROGETTAZIONE DI METODI PER LA DIAGNOSI DI PATOLOGIE
DEL TRATTO GASTROINTESTINALE**

Relatrice: *Prof.ssa Monica Dettin*

Laureanda: Laura Baldassar

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di Laurea 13 dicembre 2022

Abstract

Bioengineering deals with the creation of devices and procedures useful in the medical field. As for the pathologies of gastrointestinal tract, Crohn's disease, ulcerative colitis and indeterminate colitis are idiopathic diseases of difficult diagnosis that afflict an increasing number of patients. A simple system that allows you to monitor and evaluate the state of these highly disabling diseases could be of great use not only to help doctors in the targeted treatment of the disease but above all to improve the patient's quality of life. Proteases are important cellular enzymes capable of cutting the peptide bond of protein substrates. The gastrointestinal tract is particularly exposed to proteases where in fact they have a role both digestive and homeostasis. The expression of these enzymes can be greatly altered in pathological conditions, for example in states of chronic inflammation or in tumor states. Cathepsins, elastase and Furin-like enzymes are typically considered markers of these conditions. Further proteases are also likely to be involved, the nature of which remains undetermined. In the present research project, we intend to verify the feasibility of a certain diagnosis of different gastrointestinal pathologies through a non-invasive test. The proposed diagnostic tool is based on the detection of over- or under-expressed protease activity in biological samples of patients suffering from these pathologies through the use of a small library of peptides. For this purpose, some substrates that mimic cutting sites of proteins, important for cell adhesion, have been synthesized and characterized. In parallel, market-available substrates for Cathepsins, Elastase and Furin-like enzymes and other laboratory-available substrates were also used. Measuring the cut of these peptides could offer a great opportunity in the design of a device capable of diagnosing and monitoring the presence and progress of pathologies inherent in the gastrointestinal tract. Finally, this kind of device has a high potential and is well suited for use in the field of precision medicine, the new frontier of science widely supported by international studies.

Indice

Capitolo 1 – Introduzione

- 1.1 Malattie croniche infiammatorie del tratto gastrointestinale
 - 1.1.1 Necessità di un test diagnostico
- 1.2 Proteasi - Il ruolo delle proteasi nelle malattie infiammatorie croniche
 - 1.2.1 Furina
 - 1.2.2 Elastasi
 - 1.2.3 Catepsina
- 1.3 Substrati enzimatici
 - 1.3.1 Desmogleina, Protocaderina, Contactina
- 1.4 Scopo della tesi

Capitolo 2 – Materiali, strumenti e metodi

2.1 Materiali

- 2.1.1 Reagenti
- 2.1.2 Sequenze peptidiche utilizzate
- 2.1.3 Campioni biologici

2.2 Strumentazione

2.3 Metodi

- 2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida
- 2.3.2 Test alla Ninidrina
- 2.3.3 Acetilazione del gruppo N-terminale
- 2.3.4 Sblocco dalla resina
- 2.3.5 Condensazione del gruppo C-terminale con l'amminoacido AMC
- 2.3.6 Deprotezione delle catene laterali
- 2.3.7 Purificazione e caratterizzazione cromatografica
- 2.3.8 Spettrometria di massa
- 2.3.9 Spettroscopia ad assorbimento UV/Vis
- 2.3.10 Preparazione dei campioni biologici
- 2.3.11 Test enzimatici *in vitro*

Capitolo 3 – Parte sperimentale

3.1 Sintesi peptidica di Ac-GDGPYSLVA-AMC e di Ac-KHPHLVRQKR-AMC

- 3.1.1 Sintesi del peptide GDGPYSLV

- 3.1.2 Sintesi del peptide KHPHLVRQK
- 3.1.3 Acetilazione del gruppo N-terminale
- 3.1.4 Condensazione di Ac-GDGPYSLV con l'amminoacido A-AMC
- 3.1.5 Condensazione di Ac-KHPHLVRQK con l'amminoacido R-AMC
- 3.1.6 Caratterizzazione dei peptidi

3.2 Preparazione di buffer

3.3 Produzione di Furina

3.4 Saggi enzimatici *in vitro*

3.4.1 Caratterizzazione e validazione del substrato per Furina

3.4.2 Caratterizzazione e validazione del substrato per Elastasi

3.4.3 Settaggio dei test con campioni biologici

3.4.4 Screening dei campioni biologici con i diversi peptidi

Capitolo 4 – Risultati

4.1 Valutazione dei risultati ottenuti

4.2 Consumo di plastiche

Conclusioni

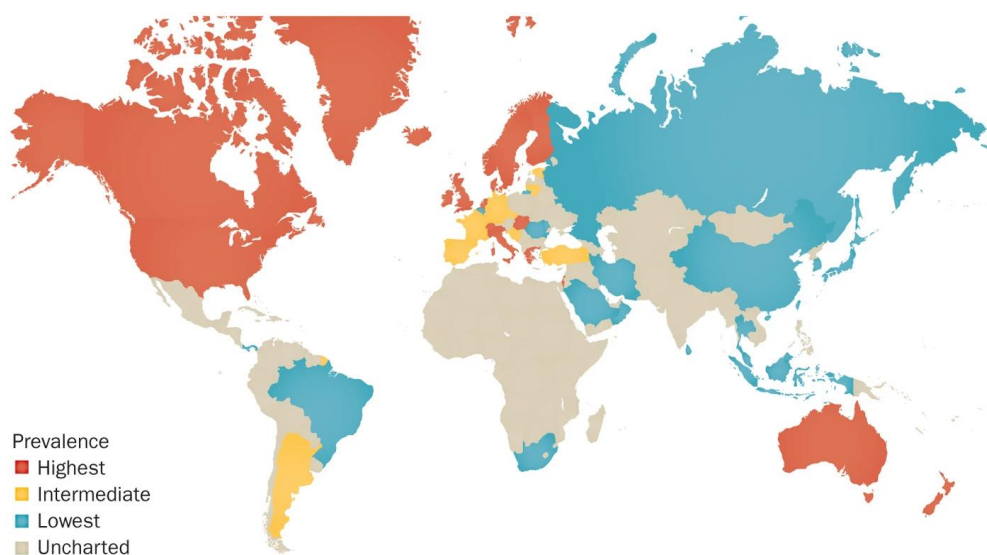
Bibliografia

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE DEL TRATTO GASTROINTESTINALE

Le malattie infiammatorie gastrointestinali (MIG) sono caratterizzate da un'inflammatione cronica e non contagiosa del tratto gastrointestinale (GI) con periodi di remissione e altri di inasprimento¹. Si stima che in Europa circa 2.5-3 milioni di persone soffrano di una MIG con un costo sulla salute di 4.6-5.6 miliardi di euro all'anno². Tra le MIG rientrano patologie come il morbo di Chron (*Chron disease - CD*) e la colite ulcerosa (*Ulcerative Colitis - UC*), i cui sintomi tipici sono dolori addominali e diarrea³. Le MIG diminuiscono la qualità di vita e aumentano la predisposizione dei pazienti al cancro al colon⁴. Con l'industrializzazione dell'occidente dal ventesimo secolo ad oggi, sono aumentati i casi di MIG fino a stabilizzarsi a partire dalla metà del secolo scorso⁵. Come si può notare in Fig. 1.1.1, i paesi maggiormente industrializzati sono quelli che presentano una maggiore incidenza di casi di MIG. È stato dimostrato che le MIG non dipendono dall'etnia o dalla storia genealogica, ma sono dovute più a fattori ambientali e predisposizione genetica⁶.



Nature Reviews | Gastroenterology & Hepatology

Figura 1.1.1 Distribuzione mondiale di MIG nel 2015.⁷

Non sono ancora del tutto note le cause alla base dell'insorgenza di queste patologie, tuttavia è stata riscontrata una correlazione tra MIG e alcuni fattori ambientali:

- Il fumo aumenta il rischio di sviluppare CD⁸. Infatti, il fumo potrebbe contribuire ad un'alterazione del microbioma intestinale, aumentando la predisposizione a questo tipo di patologia⁹;
- Una dieta povera di fibre e ricca di grassi saturi è correlata a un'insorgenza di MIG¹⁰;
- L'utilizzo di antibiotici potrebbe portare a un indebolimento della flora intestinale e aumentare la predisposizione in età adulta a un disturbo gastrointestinale¹¹.

1.1.1 NECESSITÀ DI UN TEST DIAGNOSTICO

Uno dei maggiori problemi nella diagnosi delle MIG e quindi, nell'assegnazione di una terapia efficace, è la difficile discriminazione delle varie patologie tra loro. Infatti, CD e UC presentano spesso gli stessi sintomi, pur interessando distretti anatomici diversi e questo può portare a un'incertezza della diagnosi che si riflette in esami ripetuti o l'assegnazione di una terapia inadatta e inefficace¹². Inoltre, le analisi che vengono effettuate per individuare il tipo di patologia sono spesso invasive ed economicamente onerose, come per esempio endoscopia e radiografie addominali. Si stima che il costo medio all'anno per paziente con MIG sia di circa 26.550 \$ nel primo anno dopo la diagnosi^{1,13}. Tra le altre cause che impediscono la corretta assegnazione della diagnosi rientrano le seguenti:

- Esistenza di malattie che imitano le MIG. Per esempio, la tubercolosi, la sifilide e l'HIV hanno quadri sintomatologici simili a CD;
- Mancanza di caratteristiche istologiche discriminanti affidabili. Infatti, il primo tipo di esame che viene effettuato è l'istologia; questo tipo di esame però, fornisce dati diversi a seconda del distretto anatomico analizzato, a seconda del momento nel decorso della malattia in cui viene fatto e a seconda della terapia farmacologica che il paziente sta assumendo. Inoltre, le biopsie non forniscono informazione sulla gravità delle infiammazioni;
- L'accuratezza della diagnosi microscopica iniziale è del 60-64% per il CD e del 74% per la UC. Questo può essere dovuto dall'inesperienza dell'operatore che valuta il campione, da uno scorretto campionamento di tessuto e dallo stadio di

sviluppo della malattia; infatti, una MIG precoce è molto più difficile da diagnosticare anche perché i sintomi della malattia non sono eclatanti e chiari¹⁴.

Si stima che il 10-15% delle diagnosi iniziali del CD viene convertito in UC entro il primo anno¹⁵.

Entra quindi in gioco la necessità di individuare un test diagnostico in grado di valutare con più accuratezza il quadro clinico di un paziente, attraverso un esame non invasivo e più preciso.

Per fare ciò è innanzitutto necessario capire che cosa avviene all'interno dell'intestino di un paziente affetto da MIG (Fig. 1.1.2). La caratteristica principale è una persistente infiammazione della mucosa, il tessuto che riveste la parete interna dell'intestino. L'infiammazione causa un deterioramento della mucosa stessa, e ciò comporta uno squilibrio delle funzioni delle pareti epiteliali, una maggiore accessibilità per agenti patogeni, e un'attività enzimatica sregolata¹⁶. Inoltre, la rottura delle giunzioni strette e di adesione delle cellule epiteliali, per azione di proteasi, può comportare un deterioramento del tessuto epiteliale intestinale e, conseguentemente, una maggiore permeabilità ad agenti patogeni presenti nel lume.

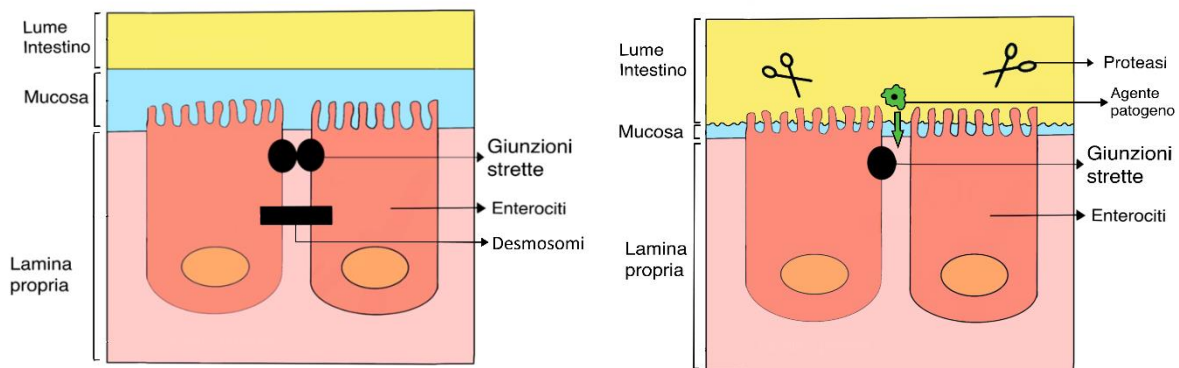


Figura 1.1.2 Schematizzazione di un tessuto epiteliale sano (sinistra) confrontato con uno malato (destra). Nel caso di IBD si ha un aumento dell'attività proteolitica con una conseguente riduzione dello spessore della mucosa, una degradazione delle giunzioni intercellulari e un aumento della permeabilità della barriera intestinale.

1.2 PROTEASI – IL RUOLO DELLE PROTEASI NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE

Un importante ruolo nelle malattie infiammatorie croniche è rivestito da particolari enzimi, le **proteasi**.

Le proteasi sono dei catalizzatori biologici che permettono il taglio del legame peptidico. Finora nel genoma umano sono stati individuati più di 600 geni che codificano per le proteasi. Si suddividono in esopeptidasi, che scindono le proteine alle loro estremità (terminali C e N), ed endopeptidasi, che scindono le proteine in un sito interno alla loro sequenza¹⁷.

Le proteasi sono secrete da numerosi fonti, tra cui le cellule infiammatorie come macrofagi, neutrofilo e mastociti. In particolare si è visto come i mastociti rilascino quantità significative di enzimi quali elastasi, proteinasi e catepsine G¹⁸. Le proteasi vengono anche prodotte dal pancreas e, per quanto riguarda il tratto GI, dalle cellule epiteliali intestinali che sono presenti anche nella mucosa.

Il meccanismo d'azione delle proteasi consiste nel taglio dei substrati proteici, che avviene attraverso il riconoscimento di uno o più amminoacidi di una sequenza. Più la proteasi è specifica per un certo substrato, più è specifica e peculiare la sequenza del sito di taglio.

Questo meccanismo è finemente regolato, al fine di evitare un'iperattività enzimatica. La maggior parte delle proteasi, infatti, sono prodotte in forma inattiva ed è necessario un fattore esterno per poterle attivare, che può essere un altro tipo di proteasi o un cambio di pH. Quando poi la proteasi si modifica nella conformazione attiva, il substrato viene attaccato e tagliato¹⁹.

Inoltre, ogni proteasi ha un inibitore più o meno specifico e questo garantisce l'omeostasi del sistema evitando una sovra-espressione enzimatica.

Per tutti questi motivi, un'irregolare attività proteolitica è spesso correlata a situazioni patologiche.

A seconda di quale amminoacido della sequenza proteica viene attaccato dall'enzima, si ha la classificazione delle proteasi in cinque gruppi (Fig. 1.2.1):

- **Serina proteasi**, costituiscono circa un terzo di tutte le proteasi individuate nel corpo umano. Sono così chiamate perché presentano un residuo di serina nel sito attivo²⁰;
- **Cisteina proteasi**, comprendono alcuni membri della famiglia delle catepsine che sono note per il loro ruolo in malattie infiammatorie come pancreatite²¹, arteriosclerosi²² e cancro^{23,24};

- **Metalloproteinas** (MMPs) enzimi principalmente extracellulari coinvolti nel rimodellamento e nella differenziazione dei tessuti in fase embrionale. Nei tessuti adulti processano diversi tipi di peptidi bioattivi e citochine¹⁷;
- **Aspartato proteasi**, sono il gruppo meno numeroso tra le proteasi e utilizzano una coppia di residui di acido aspartico per scindere il legame peptidico²⁵;
- **Treonina proteasi**, assieme alle aspartato proteasi sono tra le meno numerose ma risultano altamente specifiche²⁶.

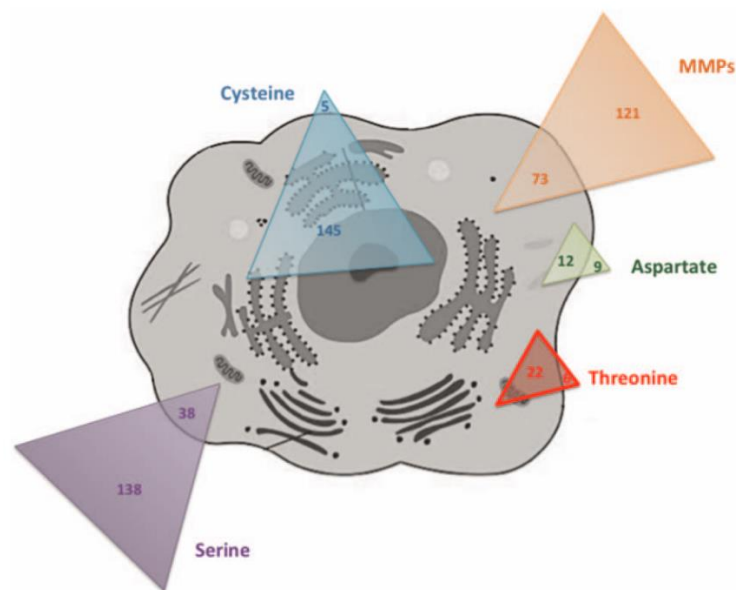


Figura 1.2.1 Schematizzazione del tipo di proteasi prodotte da una cellula, con distinzione tra proteasi intracellulari ed extracellulari. Lo schema è preso da Vergnolle et al.²⁷

In genere, le proteasi vengono secrete nel lume del tratto GI iniziale, dove sono coinvolte nella regolazione dell'attività digestiva e man mano che scendono lungo l'intestino vengono degradate²⁸. Anche il microbiota contribuisce alla presenza di ulteriori serina, cisteina, aspartato e metalloproteinas²⁹.

Le proteasi hanno molteplici substrati, spesso espressi solo in tessuti specifici. La complessità è tale che le informazioni disponibili coprono solo una piccola parte del quadro globale. Questo è uno dei motivi principali per cui non è ancora nota l'origine di gran parte delle proteasi presenti all'interno del tratto GI e dei relativi substrati.

Le proteasi svolgono diverse funzioni:

- Attraverso il taglio dei *protease-activated receptors* (PARs) viene liberato l'N-terminale dei recettori che agisce come possibile ligando inducendo segnali intracellulari³⁰. I PAR sono fondamentali per l'interazione delle proteasi nella

coagulazione di piastrine e cellule endoteliali che regolano l'adesione cellulare e le risposte infiammatorie³¹. I PAR si trovano in tutte le cellule presenti nel tratto GI (epiteliali intestinali, fibroblasti, mastociti, ecc) e possono essere attivati da serina, cisteina e metalloproteinasi³². Nel tratto GI inducono effetti pro-infiammatori e proliferativi²⁷. È stato visto come l'attivazione di PAR₂ sia associata a un aumento della permeabilità epiteliale con conseguente dolore nel caso di sindrome del colon irritabile (*Irritable Syndrome Disease - ISB*)³³;

- Mediano il processo di infiammazione interagendo con citochine, chemochine e integrine favorendo l'infiltrazione di leucociti nel tessuto e quindi promuovendo la risoluzione del processo infiammativo in casi non patologici²⁷;
- Influiscono nei processi di morte cellulare programmata (apoptosi e *anoikis*). Nel caso di apoptosi di cellule infiammatorie questo favorisce la risoluzione dell'infiammazione. Al contrario, quando ad essere colpite sono cellule epiteliali intestinali, questo può provocare un aumento della permeabilità dell'intestino, con un conseguente inasprimento della risposta immunitaria³⁴;
- Degradano le giunzioni strette e le giunzioni di adesione delle cellule, distruggendo così la rete di interconnessione delle cellule epiteliali e permettendo l'infiltrazione di cellule del sistema immunitario nel caso di infiammazione³⁵;
- Sono coinvolte nel processo di rimodellamento dell'ECM attraverso il taglio dei suoi componenti. Tuttavia, in diversi casi di MIG e cancro al colon è stata riscontrata un'eccessiva degradazione dell'ECM con una conseguente elevata attività infiammatoria sfociata poi in fibrosi e metastasi³⁶.

Nel tratto GI in particolare, le proteasi inoltre svolgono un ruolo importante di omeostasi attraverso la regolazione dell'attività digestiva.

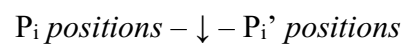
In caso di MIG, IBS e cancro al colon è stata evidenziata una sovra-espressione di proteasi nel tratto GI²⁷. Inoltre, in alcuni campioni di feci di pazienti affetti da MIG è stata riscontrata un'attività enzimatica molto più elevata rispetto ai soggetti sani. Le serina proteasi rappresentavano oltre un terzo delle proteasi presenti; tra queste, le più numerose erano tripsina e catepsina³⁷.

Per questa tesi sono stati utilizzati dei campioni di feci di due pazienti, uno affetto da UC e uno affetto da CD con lo scopo di valutare la loro attività enzimatica su dei substrati specifici. Campioni di feci da volontari sani sono stati presi come riferimento.

I campioni sono stati forniti dal reparto di Gastroenterologia dell'Ospedale Policlinico di Padova (Prof. E. Savarino).

1.2.1 FURINA

Furina è una serina endoproteasi calcio-dipendente di 794 residui amminoacidici che catalizza il rilascio di proteine mature, attivando diverse pro-proteine in siti specifici^{38,39}. È una proteina di membrana localizzata nell'apparato di Golgi; questa posizione strategica le permette di attivare facilmente diversi precursori⁴⁰. Per capire meglio come avviene il taglio da parte di una proteasi è possibile schematizzare ogni substrato nel modo seguente:



Con $P_i \text{ positions}$ (con $i = 1, 2, 3, \dots$) si indicano tutti i residui amminoacidi che si trovano prima del taglio enzimatico, mentre con $P_i' \text{ positions}$ (con $i = 1, 2, 3, \dots$) si indicano tutti i residui amminoacidi che si trovano dopo il taglio. Ogni enzima ha la propria sequenza o preferenza di P_i e P_i' . Come si può notare in Fig. 1.2.2, furina predilige in P_1 e in P_4 Arginina e in P_2 sia Arginina che Lisina. Maggiore è la grandezza della lettera, più quell'amminoacido è preferito da furina. Questo enzima riconosce quindi, sequenze di taglio del tipo $-\text{Arg-X-Lys/Arg-Arg}\downarrow-$, dove X indica un qualsiasi amminoacido. Questo è chiamato sequenza *consensus*. Da evidenze sperimentali, non è necessario avere una sequenza di 4 amminoacidi basici perché avvenga il taglio, l'importante è la presenza di almeno una coppia di amminoacidi basici, che possono essere separati da X_n (con $n = 0, 2, 4$ o 6) amminoacidi qualsiasi.

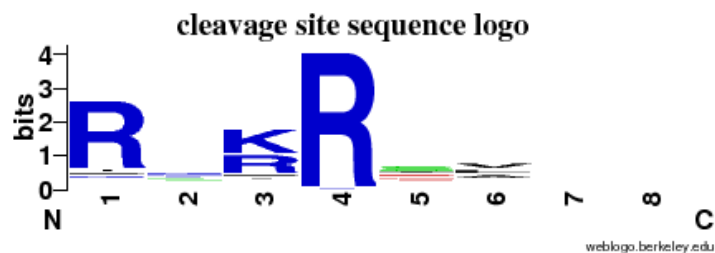


Figura 1.2.2 Sulla base di 216 substrati differenti, è stata ricavata la sequenza logo che mette in evidenza i residui preferiti da furina prima (posizioni P) o dopo (posizioni P') il taglio. Maggiore è la grandezza della lettera, più quell'amminoacido è preferito da parte dell'enzima. L'immagine è stata presa dal sito Merops (<https://www.ebi.ac.uk/merops>).

Questo enzima ha suscitato grande interesse negli ultimi anni perché è stato dimostrato avere un ruolo fondamentale nella maturazione della proteina Spike del virus SARS-CoV-2. La proteina Spike è una proteina transmembrana che si trova sulla superficie

della membrana plasmatica e in condizioni naturali si presenta inattiva. Affinché venga attivata è necessario che l'enzima furina la tagli permettendo al virus di fondersi con la cellula target. A questo punto si attiva il meccanismo di endocitosi per cui il virus entra dentro la cellula umana dove rilascia il materiale genetico. Sono stati quindi avviati numerosi studi con lo scopo di inibire la furina per poter impedire alla proteina Spike di attivarsi e legarsi ai recettori di membrana delle cellule^{41,42}.

Furina svolge un ruolo importante anche in stati tumorali, inclusi quelli gastrointestinali dove la sua espressione risulta alterata^{43,44}.

Recentemente, questa proteasi è stata legata alla degradazione di specifiche citochine espresse dalle cellule epiteliali intestinali, cruciali per preservare la barriera intestinale. Infatti, in pazienti celiaci è stata riscontrata una sovra-espressione dell'enzima⁴⁵.

In casi di UC, invece, è stato visto che furina svolge un ruolo protettivo della mucosa promuovendo particolari pathways cellulari^{46,47}.

1.2.2 ELASTASI

Elastasi è una serina proteasi formata da 267 residui e prodotta principalmente da neutrofilii attivati.

Al contrario di furina, non riconosce una sequenza specifica per effettuare il taglio, tuttavia predilige in posizione P₁ amminoacidi idrofobici come Valina e Alanina.

I primi substrati utilizzati per caratterizzare l'attività di Elastasi erano peptidi solubili di elastina, da cui il nome "elastasi". Tuttavia, successivamente è stato dimostrato che questo enzima, non è implicato solo nel taglio dell'elastina, ma ha rilevanza anche in altri contesti, tra cui quello dell'infiammazione^{48,49}. Infatti, nel caso di malattie infiammatorie, quando i leucociti vengono attivati, le elastasi e due serina proteasi (proteinasasi 3 e catepsina G) vengono attivate e giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta immunitaria. In particolare, partecipano nel processo di degradazione di agenti patogeni intracellulari ed extracellulari.

È stato riscontrato un significativo aumento dell'attività di elastasi in MIG con conseguenti effetti pro-infiammatori⁵⁰. Inoltre, sono stati evidenziati livelli anormali di inibitori endogeni di proteasi *elastase-like* in MIG¹⁹.

1.2.3 CATEPSINE

Le catepsine costituiscono una famiglia che conta numerosi membri. Le catepsine B, C, F, H, L, K, O, S, V, W, e X sono cisteina proteasi e rappresentano la classe di catepsine più numerosa e studiata.

Sono sintetizzate come pro-enzimi inattivi e molte di queste partecipano nei processi infiammatori. Le catepsine sono capaci di tagliare membri della famiglia delle integrine, inibendo la migrazione delle cellule verso i componenti dell'ECM²⁷.

Catepsina G(CTSG) è invece una serina proteasi prodotta principalmente da neutrofili⁴⁹, mentre catepsina D e E sono aspartato proteasi. Storicamente, le catepsine erano ritenute un gruppo di idrolasi intracellulari che partecipavano alla degradazione dei lisosomi. In realtà, negli anni successivi sono state scoperte nuove funzioni per i diversi tipi di catepsina. Per esempio, catepsina L è coinvolta in processi di riproduzione cellulare e differenziazione^{51,52}. Catepsina K è uno dei fattori più importanti nel rimodellamento osseo⁵³ e catepsina C attiva le proteasi dei mastociti che sono coinvolti nella risposta immunitaria. Per quanto riguarda CTSG, essa è coinvolta nella degradazione delle componenti dell'ECM, nel taglio di molecole che modulano la risposta immunitaria e nella coagulazione delle piastrine⁵⁴. In casi di UC è stato visto che CTSG è capace di attivare i recettori PAR₄ collocati nella zona apicale degli enterociti, aumentando la permeabilità della barriera epiteliale, provocandone infine il danneggiamento⁴. Altri studi hanno dimostrato che l'inibizione dell'attività di CTSG migliorava la permeabilità intestinale⁵⁵.

1.3 SUBSTRATI ENZIMATICI

Per **substrato enzimatico** si intende una sequenza peptidica o proteica che può essere riconosciuta e tagliata da enzimi. Il substrato (A) lega il sito attivo dell'enzima (B), formando il complesso enzima-substrato; successivamente, il substrato viene convertito in un prodotto.



Ogni substrato ha la propria costante di Michaelis-Menten K_m , che indica l'affinità tra un enzima e quel substrato; minore è K_m , migliore è l'affinità dell'enzima per quel substrato e quindi, maggiore sarà il prodotto del taglio. Ciò significa che a parità di concentrazioni di enzima, si ottiene più prodotto (cioè substrato tagliato) quando quel substrato è caratterizzato da un valore di K_m basso⁵⁶.

Gli enzimi hanno un ruolo fondamentale nella scissione del legame peptidico, in quanto agiscono da catalizzatori biologici, proponendo un differente meccanismo di reazione che presenta un'energia di attivazione bassa rispetto a quella della reazione non catalizzata.

In questa tesi ci si è concentrati sul taglio di proteine appartenenti al tessuto epiteliale intestinale. Infatti, è stato visto sperimentalmente come mucosa e tessuto enterico in pazienti affetti da MIG vengano deteriorati da un'eccessiva attività enzimatica, causando infiammazione cronica.

In particolare, sono state scelte delle proteine implicate nell'adesione cellulare degli enterociti, le cellule che compongono il tessuto epiteliale dell'intestino. Nello specifico, sono stati sintetizzati dei substrati relativi ai siti di taglio delle proteine Desmogleina-2 (DSG2), Protocaderina-10 (PCDH10) e Contactina-1 (CNTN1).

1.3.1 DESMOGLEINA-2, PROTOCADERINA-10, CONTACTINA-1

La barriera epiteliale intestinale è composta da un unico strato di cellule cilindriche chiamate enterociti, che sono tenute insieme tra loro da diversi tipi di giunzioni intercellulari. Tra queste giunzioni rientrano le giunzioni strette (*tight junction*), le giunzioni aderenti (*adherens junction*) e i desmosomi (*desmosome*). I collegamenti intercellulari permettono di proteggere l'organismo dagli agenti patogeni presenti nel lume dell'intestino. Infatti, un aumento della permeabilità della barriera causa la contaminazione dei tessuti della lamina sottostante e può provocare situazioni di infiammazione cronica⁵⁷.

Una delle caratteristiche distintive degli enterociti differenziati è la matrice densamente compatta di microvilli nota come bordo a spazzola (BB). I BB sono organizzati da un'ampia matrice di collegamenti basati su Protocaderina che collegano le sporgenze adiacenti attraverso collegamenti filiformi calcio-dipendenti. La Protocaderina guida il raggruppamento dei microvilli, portando a un fitto impacchettamento e a una lunghezza uniforme dei microvilli negli enterociti, favorendo quindi, l'assorbimento regolare di nutrienti nell'intestino⁵⁸. È stato osservato che in casi di CD i microvilli erano stati ridotti in lunghezza e avevano evidenti difetti strutturali⁵⁹.

In Fig. 1.2.3 sono schematizzate le principali giunzioni intercellulari presenti nel tessuto epiteliale intestinale, con le proteine principali di cui sono costituite.

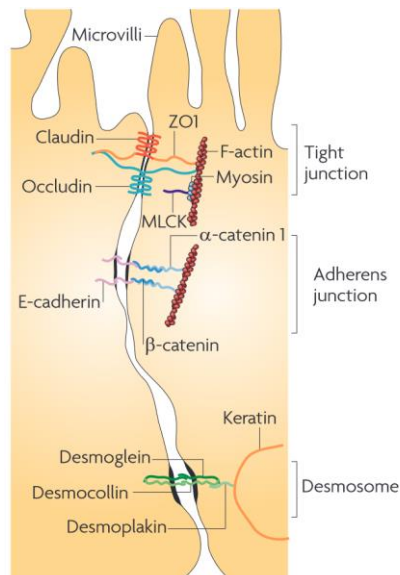


Figura 1.2.3 Schema delle principali giunzioni intercellulari di enterociti. L'immagine è stata presa dal lavoro di Turner et al.⁶⁰

I desmosomi sono costituiti principalmente dalla proteina Desmogleina-2. I desmosomi sono noti per il loro ruolo nelle giunzioni strette e aderenti, mentre non sembrano avere particolare rilevanza nell'adesione cellulare⁶¹.

È stato scelto di sintetizzare due sequenze peptidiche relative a DSG2:

- il peptide MDRSSKGQII₄₁₀↓. Questa sequenza idrofobica è stata scelta in quanto suscettibile al taglio⁶² anche se non esistono dati a supporto di una degradazione di desmogleina-2 in questo sito. ;
- il peptide KHPHLVRQKR₄₉↓, sequenza proposta come sito di taglio per Furina e validata presso il laboratorio della Prof.ssa Monica Dettin .

Un'altra proteina che fa parte delle componenti delle giunzioni aderenti è la Protocaderina. Proviene dalla famiglia delle caderine, proteine implicate nell'adesione cellulare e calcio-dipendenti⁶³. Protocaderina svolge importanti funzioni nella trasduzione dei segnali e nel controllo della crescita cellulare, ma anche nello sviluppo neuronale⁶⁴. Un'inibizione o un'alterazione dell'attività delle Protocaderine è stata spesso osservata in stati carcinogeni, che promuovono l'invasione da parte di cellule tumorali e metastasi⁶⁵.

Oltre all'espressione di Protocaderina durante lo sviluppo cerebrale, molti tessuti mantengono l'espressione di queste molecole anche in età adulta, con lo scopo di regolare la differenziazione cellulare, la rigenerazione dei tessuti e il loro mantenimento⁶⁴.

L'espressione di Protocaderina-7 (PCDH7) e Protocaderina-10 (PCDH10) sono generalmente considerate essere fattori di protezione in stati tumorali⁶⁶⁻⁶⁸. Infatti, la dimetilazione o la sovra-espressione di Protocaderina-10 inibisce significativamente la formazione di colonie e la proliferazione di cellule tumorali di cancro al colon *in vitro*⁶⁹. Potrebbe essere quindi studiato come marker biologico per la valutazione di stati patologici.

È stato deciso di sintetizzare un peptide della Protocaderina-10, in particolare il sito di taglio LSSTATLVVQ₄₁₀↓, riportato essere sensibile all'attività proteasica⁶².

Un'importante proteina di adesione è la famiglia delle Contactine (CNTNs), che fanno parte di un sottogruppo delle molecole appartenenti alle immunoglobuline (Ig).

In particolare, la Contactina-1 (CNTN-1) è stata oggetto di numerosi studi che hanno dimostrato essere coinvolta nello sviluppo del cervello umano e dei tessuti neuronali. È una proteina d'adesione che si trova sulla superficie della membrana cellulare ed è implicata nella crescita e differenziazione delle cellule gliali, nella mielinizzazione e nella formazione delle sinapsi. Contactina-1 media le interazioni tra neuroni e cellule gliali principalmente attraverso i legami che forma con i componenti dell'ECM⁷⁰. Recentemente, è stato osservato che Contactina-1 potrebbe avere un ruolo chiave anche nel peggioramento di stati tumorali. Infatti, è stato riportato che l'invasione e la metastasi delle cellule tumorali mediate dal complesso fattore di crescita dell'endotelio vascolare-c e recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare 3 (VEGF-C/VEGFR-3) aumentano l'espressione di Contactina-1⁷¹, favorendo così la trasduzione dei segnali biochimici e quindi la mobilità delle cellule tumorali *in vivo*⁷². La sovra espressione di Contactina-1 provoca l'inibizione dell'espressione di CDH1 (E-caderina), principale componente delle giunzioni aderenti. Questo a sua volta può portare a metastasi del tessuto.

Contactina-1 può essere, quindi, un potenziale bersaglio terapeutico per il cancro gastrico, tuttavia sono necessari ulteriori studi che vadano a valutare l'effettiva correlazione tra Contactina-1 e migrazione delle cellule tumorali⁷¹.

In questa tesi è stato deciso, quindi, di testare Contactina-1 con i campioni biologici a nostra disposizione, sintetizzando il peptide relativo al sito di taglio GDGPYSLVA₇₉₉↓. Infatti, avendo questo peptide in posizione P₁ un amminoacido idrofobico Ala, avrebbe potuto essere il target di enzimi della famiglia delle catepsine. Inoltre, anche per Contactina-1 è stato riscontrata una propensione al taglio in questa regione⁶².

1.4 SCOPO DELLA TESI

Le proteasi svolgono un ruolo fondamentale nel caso di malattie infiammatorie. In questa tesi, è stato deciso, perciò, di indagare più a fondo la loro attività nel caso di malattie infiammatorie croniche del tratto GI.

L'attività enzimatica può essere misurata utilizzando specifici substrati. Primo scopo di questa tesi è stato la sintesi di substrati peptidici che mimano siti di taglio (potenziali o validati) delle proteine Desmogleina-2, Protocaderina-10 e Contactina-1.

Successivamente, si è voluto testare questi substrati, assieme ad altri già disponibili in laboratorio e alcuni presenti in commercio utilizzando dei campioni biologici di pazienti affetti da CD e UC oppure soggetti sani.

Lo scopo ultimo di questa tesi è stato dimostrare che i substrati fossero effettivamente tagliati da proteasi presenti nei campioni dei malati e in misura significativamente maggiore rispetto al controllo (volontari sani).

L'esperimento eseguito, tuttavia, è solo il primo step nella valutazione di una libreria molto più ampia di substrati appartenenti al tratto GI e non, il cui scopo è individuare quali substrati sono più predisposti al taglio da parte delle proteasi e individuare, se esiste, un pattern di proteasi specifico per ogni malattia infiammatoria. Il goal finale è creare un test diagnostico in grado di valutare la presenza o meno di una specifica patologia senza la necessità di ricorrere a biopsie o esami invasivi e costosi e soprattutto con un'accuratezza maggiore.

CAPITOLO 2

MATERIALI, STRUMENTI E METODI

2.1 MATERIALI

Nei prossimi paragrafi sono riportati i reagenti, le sequenze peptidiche e i campioni biologici utilizzati.

2.1.1 REAGENTI

Per questa tesi sono stati utilizzati i reagenti riportati in Tab. 2.1.

Tabella 2.1

Nome	Formula	Peso molecolare [g/Mol]	CAS	Azienda
1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU)	$C_{10}H_{15}F_6N_6OP$	380.23	148893-10-1	Sigma aldrich
1-Hydroxybenzotriazole hydrate (HoBt)	$C_6H_5N_3O \cdot xH_2O$	135.12	123333-53-9	Sigma aldrich
1-Methyl-2-pyrrolidone	C_5H_9NO	99.13	872-50-4	Sigma aldrich
2,2,2-Trifluoroacetic acid (TFA)	$C_2HF_3O_2$	114.02	76-05-1	Biosolve chimie
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	$C_8H_{18}N_2O_4S$	238.31	7365-45-9	Sigma aldrich
4-(Dimethylamino)pyridine (DMAP/DMF)	$C_7H_{10}N_2$	122.17	1122-58-3	Applied Biosystems
Acetic anhydride	$C_4H_6O_3$	102.09	108-24-7	Janssen
Acetone	CH_3COCH_3	58.08	67-64-1	Sigma aldrich

Acetonitrile	CH ₃ CN	41.05	75-05-8	Sigma aldrich
Calcium chloride	CaCl ₂	147.2	10043-52-4	Prolabo
Cyanomethane, Methyl cyanide, ACN, Ethyl nitrile	CH ₃ CN	41.05	75-05-8	Sigma aldrich
Dichloromethane (DCM)	CH ₂ Cl ₂	84.93	75-09-2	Sigma aldrich
Diethyl ether	(CH ₃ CH ₂) ₂ O	74.12	60-29-7	Sigma aldrich
Dimethyl sulfoxide GR dried (DMSO)	C ₂ H ₆ OS	78.13	67-68-5	Sigma aldrich
Ethyl cyano(hydroxyimino)acetate (Oxyrna Pure)	C ₅ H ₆ N ₂ O ₃	142.11	3849-21-6	Sigma aldrich
Fmoc-Ala-OH	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄	311.33	35661-39-3	Novabiochem
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	C ₂₃ H ₂₅ NO ₅	411.46	71989-14-5	Novabiochem
Fmoc-Gly-OH	C ₁₇ H ₁₅ NO ₄	297.31	29022-11-5	Novabiochem
Fmoc-Leu-OH	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	353.41	35661-60-0	Novabiochem
Fmoc-Pro-OH	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	337.37	71989-31-6	Novabiochem
Fmoc-Ser(tBu)-OH	C ₂₂ H ₂₅ NO ₅	383.45	71989-33-8	Novabiochem
Fmoc-Ser(tBu)-OH	C ₂₂ H ₂₅ NO ₅	383.45	71989-33-8	Novabiochem
Fmoc-Thr(tBu)-OH	C ₂₃ H ₂₇ NO ₅	397.48	71989-35-0	Novabiochem
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	C ₂₈ H ₂₉ NO ₅	459.55	71989-38-3	Novabiochem
Fmoc-Val-OH	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	339.39	68858-20-8	Novabiochem
Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin	-	-	-	Bachem
Fmoc-Val(Boc)-Sasrin	-	-	-	Bachem
H-Ala-AMC	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	246.27	77471-41-1	Bachem
H-L-Arg-AMC*2HCl	C ₁₆ H ₂₁ N ₅ O ₃ *2HCl	331.37*72.90	113712-08-6	Iris Biotech
Methyl alcohol	CH ₃ OH	32.04	67-56-1	Sigma aldrich

N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU)	$C_{11}H_{16}F_6N_5OP$	379.24	94790-37-1	Sigma aldrich
N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA)	$[(CH_3)_2CH]_2NC_2H_5$	129.24	7087-68-5	Sigma aldrich
N,N-Dimethylformamide (DMF)	$(CH_3)_2NCH$	73.09	68-12-2	Sigma aldrich
Piperidine	$(CH_2)_5NH$	85.15	110-89-4	Bisolvon chimie
Sodium acetate	$C_2H_3NaO_2$	136.08	127-09-3	Prolabo
Triethylsilane (TES)	$C_6H_{16}Si$	116.28	617-86-7	EDM Millipore corporation
tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-HCl)	$C_4H_{11}NO_3$	121.14	77-86-1	Poison
Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	292.25	60-00-4	Sigma aldrich
Z-Gly-Leu-Phe-chloromethyl ketone (cmk)	$C_{26}H_{32}N_3O_5Cl$	502.00	41658-44-0	Sigma aldrich

2.1.2 SEQUENZE PEPTIDICHE UTILIZZATE

Per questa tesi sono stati utilizzati i substrati riportati in Tab. 2.2

Tabella 2.2

Sequenza	Peso Molecolare (Da)	Sintetizzato	Azienda	Modalità di lettura
Ac-Ser-Leu-Val-Val-AMC	588.7	x		Fluorescenza
Ac-Pro-Tyr-Ser-Leu-Val-Ala-AMC	848.9	x		Fluorescenza
Ac-Asp-Gly-Pro-Tyr-Ser-Leu-Val-Ala-AMC	1020.1	x		Fluorescenza
Ac-Gly-Asp-Gly-Pro-Tyr-Ser-Leu-Val-Ala-AMC	1078.2	x		Fluorescenza
Ac-Arg-Gln-Lys-Arg-AMC	788.4	x		Fluorescenza

Ac-Leu-Val-Arg-Gln-Lys-Arg-AMC	1000.7	x		Fluorescenza
Ac-Pro-His-Leu-Val-Arg-Gln-Lys-Arg-AMC	1234.9	x		Fluorescenza
Ac-Lys-His-Pro-His-Leu-Val-Arg-Gln-Lys-Arg-AMC	1500.3	x		Fluorescenza
Ac-Leu-Val-Val-Gln-AMC	751.7	x		Fluorescenza
Ac-Ala-Thr-Leu-Val-Val-Gln-AMC	924.9	x		Fluorescenza
Ac-Gly-Gln-Ile-Ile-AMC	628.9	x		Fluorescenza
Ac-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-Ile-AMC	844.2	x		Fluorescenza
Ac-Arg-Ser-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-Ile-AMC	1087.5	x		Fluorescenza
Ac-Met-Asp-Arg-Ser-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-Ile-AMC	1333.8	x		Fluorescenza
PYR-Arg-Thr-Lys-Arg-AMC	827.9		Bachem	Fluorescenza
N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide	590.6		SIGMA	Assorbanza (405 nm)
Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide	624.7		Merck	Assorbanza (405 nm)

Tra questi, sono stati forniti dal lavoro di tesi di Alessandro Senter i seguenti peptidi:

- Ac LVVQ-AMC;
- Ac ATLVVQ-AMC;
- Ac GQII-AMC;
- Ac SKGQII-AMC;
- Ac RSSKGQII-AMC;
- Ac MDRSSKGQII-AMC.

2.1.3 CAMPIONI BIOLOGICI

Dall'ospedale Policlinico di Padova sono stati forniti i campioni di feci di due pazienti affetti da IBD. In particolare, il paziente 1 era affetto da UC, mentre il paziente 2 era

affetto da CD. Come controllo sono stati utilizzati i campioni di feci di due soggetti sani.

È stato ottenuto il consenso informato di tutte le persone coinvolte.

2.2 STRUMENTAZIONE

- Sintetizzatore automatico Syro I, prodotto da MultiSynTech (Witten, Germania)

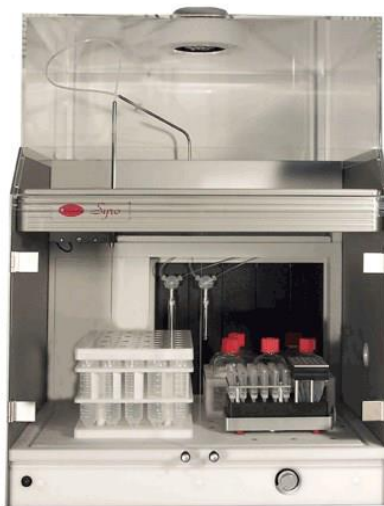


Figura 2.2.1 Sintetizzatore automatico

- Spettrofotometro UV/Vis modello Lambda 2, fornito da Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA)



Figura 2.2.2 Spettrofotometro UV/Vis

- Spettrometro “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight” (MALDI/TOF), fornito da AB Sciex S.R.L. (Brugherio, Monza, Italia)



Figura 2.2.3 Spettrometro di massa

- Il lettore di micropiastre multimodale modello Tecan Spark Control Method Editor, modello Infinite 200Pro (Tecan, Männedorf, Switzerland)



Figura 2.2.4 Lettore di micropiastre

- Essiccatore sottovuoto fornito da Kartell Labware (Noviglio, Italia)



Figura 2.2.5 Essiccatore sottovuoto

- Bilancia analitica modello Mettler AE250, fornita da Mettler Toledo (Columbus, Ohio, USA)



Figura 2.2.6 Bilancia analitica

- pH-metro modello sensionION™+pH3, prodotto da HACH (Padova, Italia)



Figura 2.2.7 pH-metro

- Liofilizzatore modello FreeZone 2.5 Liter Benchtop, fornito da Labconco (Kansas City, Missouri, USA)



Figura 2.2.8 Liofilizzatore

- Bagno ad ultrasuoni modello Branson 1200, fornito da Branson Ultrasonics Corp. (Danbury, Connecticut, USA)
- Pompa volumetrica fornita da New Era Pump System (Farmingdale, NY, USA)
- Distillatore d'acqua da laboratorio modello Stuart D4000, fornito da Norrscope (Chelmsford, Essex, Regno Unito)
- Sistema di purificazione dell'acqua modello Milli-Q Integral for UltraPure Water, fornito da Merck KGaA (Darmstadt, Germania)



Figura 2.2.9 Sistema di purificazione dell'acqua

- Agitatore magnetico modello Microstirrer, fornito da Velp Scientifica (Usmate Velate, Italia)
- Centrifuga da banco modello Rotina 380, fornita da Hettich GmbH & Co. (Tuttlingen, Germania)



Figura 2.2.10 Centrifuga da banco

- Evaporatore rotante modello Laborota-4000-Efficient, fornito da Heidolph Instruments (Schwabach, Germania)
- Sistema RP-HPLC (*Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography*) utilizzato per cromatografia analitica costituito da:
 - pompa binaria HPLC modello Waters 1525, fornito da Waters Corporation (Milford, Massachusetts, USA);
 - Autocampionatore modello Waters 2707, fornito da Waters Corporation (Milford, Massachusetts, USA);
 - rivelatore UV/VIS multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello Waters 2489, fornito da Waters Corporation (Milford, Massachusetts, USA);
 - computer dotato del software di gestione dei dati cromatografici Empower Pro, sviluppato da Waters Corporation (Milford, Massachusetts, USA).

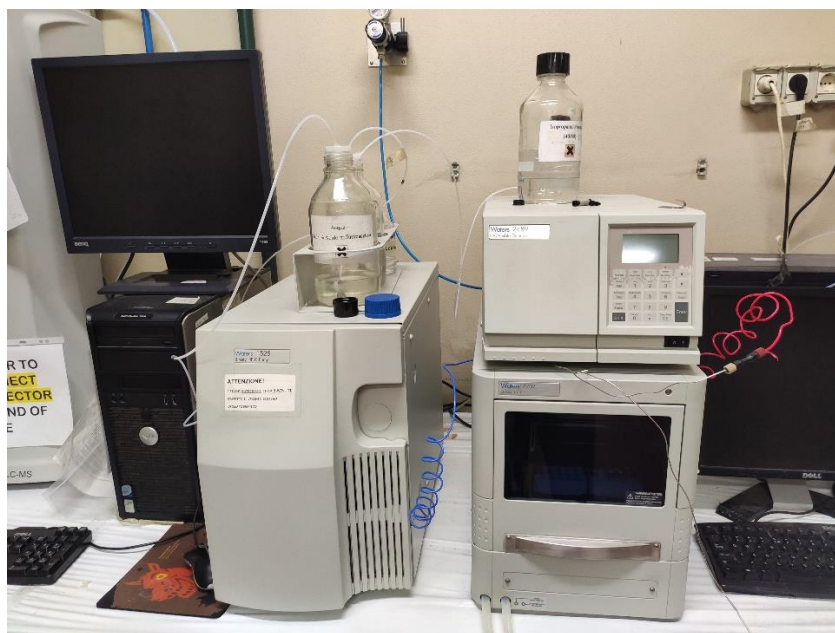


Figura 2.2.11 Sistema RP-HPLC per cromatografia analitica

- Sistema RP-HPLC utilizzato per cromatografia semipreparativa costituito da:
 - sistema di pompaggio multisolvente HPLC modello Waters 600E, fornito da Waters Corporation (Milford, Massachusetts, USA);
 - rivelatore UV/VIS multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello Waters 2487, fornito da Waters Corporation (Milford, Massachusetts, USA);
 - registratore su carta modello BD40/BD41 distribuito dalla Carlo Erba Strumentazione e prodotto dalla Kipp & Zonen (Delft, Olanda).
- Per le analisi cromatografiche vengono impiegate colonne costituite da gel di silice funzionalizzata, che presentano catene idrocarburiche lineari di atomi di carbonio (fase stazionaria apolare), con caratteristiche diverse:
 - Colonna Atlantis dC18 OBD semipreparativa (10 μm , 100 \AA , 10 x 250 mm) fornita da Waters;
 - Colonna Nova-Pak C18 semipreparativa (6 μm , 60 \AA , 7,8 x 300 mm) fornita da Waters;
 - Colonna Atlantis dC18 analitica (5 μm , 4.6 x 250 mm) fornita da Waters;
 - Colonna Nova-Pak C18 analitica (4 μm , 60 \AA , 3.9 x 300 mm) fornita da Waters.
- Agitatore, modello SuperMixer, della Continental Instruments;
- Sonicatore, modello Branson 1200, prodotto dalla Branson Ultrasonics Corporation (Danbury, CT, USA);
- Agitatore magnetico Microstirror, della VELP® Scientifica (Usmate Velate, Italia);

2.3 METODI

In questo capitolo sono riportate tutte le procedure che sono state utilizzate per la sintesi dei peptidi e per i test con i campioni biologici.

2.3.1 SINTESI PEPTIDICA SU FASE SOLIDA

Per ottenere le sequenze peptidiche di interesse è stata utilizzata la tecnica di sintesi peptidica su fase solida, o SPPS (Solid-Phase Peptide Synthesis)⁷³. La SPPS rappresenta una metodologia che consente di ottenere artificialmente peptidi utilizzabili nella ricerca scientifica. I peptidi vengono fatti crescere ancorandoli tramite legame covalente ad un supporto solido insolubile, generalmente di tipo polimerico, una resina. Lo schema riportato in seguito (Figura 2.3.1) riassume le fasi e gli elementi essenziali in una SPPS.

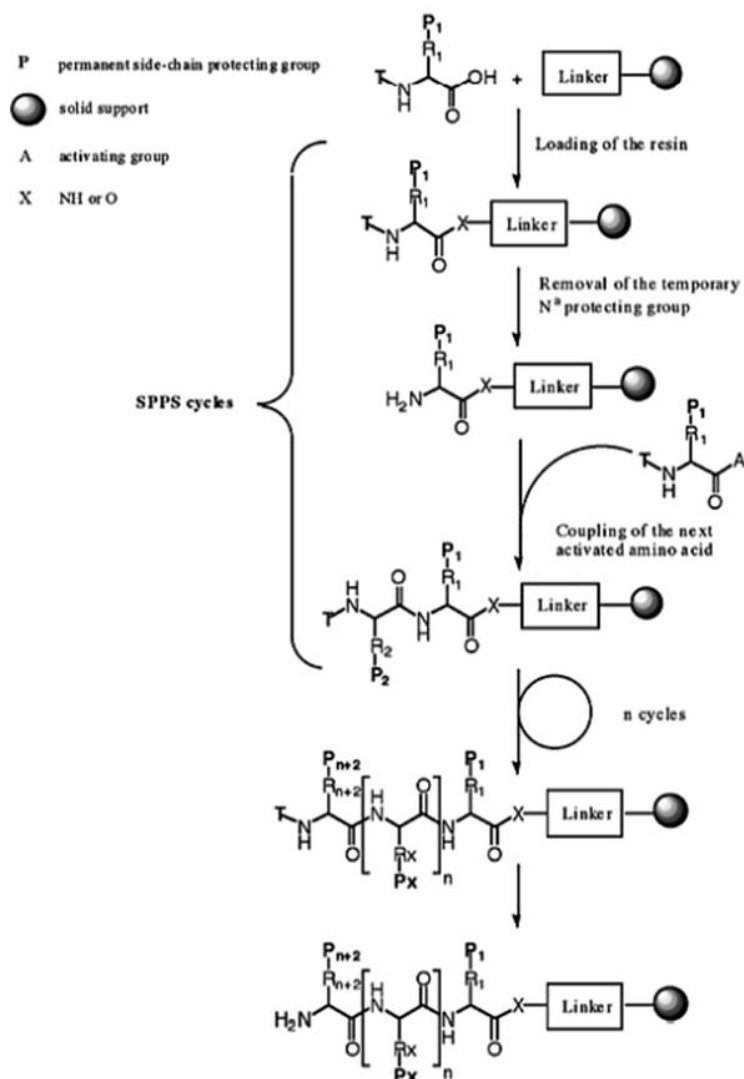


Figura 2.3.1 Schematizzazione delle principali fasi in una sintesi su fase solida (SPPS).

La sintesi comincia dall'estremità C-terminale, dove il gruppo carbossilico, tramite un opportuno *linker*, viene ancorato al supporto solido. Non sempre l'ancoraggio del primo amminoacido alla resina di supporto è necessario in quanto in commercio sono disponibili resine precaricate con diversi tipi di amminoacidi, ed è ciò che è stato scelto per questa tesi. Gli amminoacidi utilizzati nella SPPS vengono protetti con un gruppo protettore base-labile ai terminali C e N, e con una protezione, in genere acido-labile, alle catene laterali. Queste protezioni sono necessarie per evitare reazioni parassite del tipo acido-base, con la conseguente formazione di sali che potrebbero interferire col corretto procedere della sintesi. I gruppi protettori ai terminali sono temporanei in quanto vengono rimossi ad ogni step di addizione dell'amminoacido successivo. In ogni ciclo avvengono due passaggi fondamentali:

- la deprotezione del gruppo α -amminico del *backbone*;
- la formazione del legame peptidico (*coupling*) tra la catena in crescita e il nuovo amminoacido che deve risultare protetto all'estremità N-terminale, ma opportunamente attivato all'estremità C-terminale.

In base alla tipologia di catena da sintetizzare, è possibile ripetere più volte la sola fase di *coupling* tra l'amminoacido di turno e la catena, allo scopo di ottenere una maggiore resa di reazione. Al termine della sintesi vengono rimossi tutti i gruppi protettori dalle catene laterali e avviene anche lo sblocco dalla resina di supporto.

Il vantaggio principale di una SPPS è la possibilità di rimuovere i reagenti in eccesso, in quanto solubili ed eventuali prodotti secondari non ancorati alla catena, tramite lavaggi e filtrazioni. Inoltre, questa procedura richiede tempi decisamente minori rispetto alla sintesi in fase liquida e consente di ottenere rese di reazioni maggiori⁷⁴.

Deprotezione del terminale α -amminico

Per la deprotezione del gruppo α -amminico è stata utilizzata la chimica Fmoc, che sfrutta un protettore di tipo base-labile temporaneo, facilmente rimovibile con una soluzione basica. In questo caso la deprotezione è avvenuta mediante l'utilizzo di un'ammina secondaria, la piperidina. In particolare, per ogni ciclo di deprotezione sono stati applicati i seguenti passaggi:

1. Iniezione nel reattore di una soluzione al 40% di piperidina in DMF per un tempo di reazione di 3 minuti con cicli di vortex di 15 secondi intervallati ad ogni minuto di reazione;

2. Iniezione nel reattore di una soluzione al 20% di piperidina in DMF per 12 minuti con cicli di vortex di 15 secondi intervallati ogni 3 minuti di reazione;
3. 6 cicli di lavaggio ciascuno con DMF.

È bene ricordare che il gruppo Fmoc ha una chimica diversa dai gruppi protettori delle catene laterali, che vengono invece rimosse con una soluzione mediamente acida (TFA). Questo permette di evitare reazioni indesiderate tra l'amminoacido da ancorare con eventuali gruppi amminici diversi dall'N-terminale.

Attivazione del gruppo carbossilico

Quando un gruppo carbossilico e uno gruppo amminico sono fatti reagire non si ha l'immediata reazione di condensazione, bensì una reazione acido-base che porta alla formazione di un sale. Affinché si crei il legame peptidico è necessario rendere più attivo il gruppo carbossilico dell'amminoacido da agganciare per superare la barriera energetica richiesta per la formazione del legame ammidico.

Per procedere all'attivazione del gruppo carbossilico vengono usati i seguenti reagenti:

- 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU) agente attivante vero e proprio;
- Oxima Pure è un alcol reattivo, serve per rendere il gruppo carbossilico del peptide da ancorare più reattivo trasformandolo in qualcosa di chimicamente simile a un estere;
- N-etil-diisopropilammina (DIPEA) è un'ammina terziaria utilizzata per creare un ambiente leggermente basico e impedire la protonazione del gruppo amminico, aumentando così la velocità di reazione.

Coupling

Una volta attivato il gruppo carbossilico avviene la reazione di *coupling*. Il *coupling* si ottiene per attacco nucleofilo da parte del gruppo amminico della catena in crescita al gruppo carbossilico del residuo attivato.

La procedura automatizzata di Syro I per l'attivazione del gruppo carbossilico e successiva condensazione (*coupling* singolo) utilizza i seguenti reagenti:

- 1 mL di soluzione 0,62 M dell'amminoacido Fmoc-protetto in DMF;
- 1,4 mL di soluzione 0,45 M di HBTU/Oxima Pure in DMF;
- 0,625 mL di soluzione 2 M di DIPEA in NMP.

Questa reazione dura 45 minuti (intervallati da 15 secondi di agitazione vortex ogni 3 minuti di reazione).

In seguito, vengono eseguiti 5 cicli di lavaggi, impiegando 3 mL di DMF ciascuno.

Per la sintesi dei peptidi è stato utilizzato un *coupling* doppio, ovvero per ciascun amminoacido è stato eseguito un doppio ciclo di condensazione in modo da migliorare la resa finale di sintesi.

2.3.2 TEST ALLA NINIDRINA

Il test alla Ninidrina o *Kaiser test*, è un test quantitativo e qualitativo che viene utilizzato per determinare la resa di una reazione di *coupling*, valutando la quantità di gruppi amminici liberi⁷⁵. Maggiore è il numero di gruppi amminici liberi minore sarà il calore di resa.

Questo tipo di test sfrutta il cosiddetto complesso di Ruhemann (*Ruhemann's Blue*), ovvero il cromoforo che si forma per reazione tra ninidrina e ammine presenti sugli amminoacidi. La soluzione appare quindi, blu-viola scuro quando la ninidrina lega con le ammine primarie, mentre diventa giallo-marrone se la reazione avviene con le ammine secondarie della prolina. In Fig. 2.3.2 è schematizzata la reazione che porta alla formazione del complesso di Ruhemann.

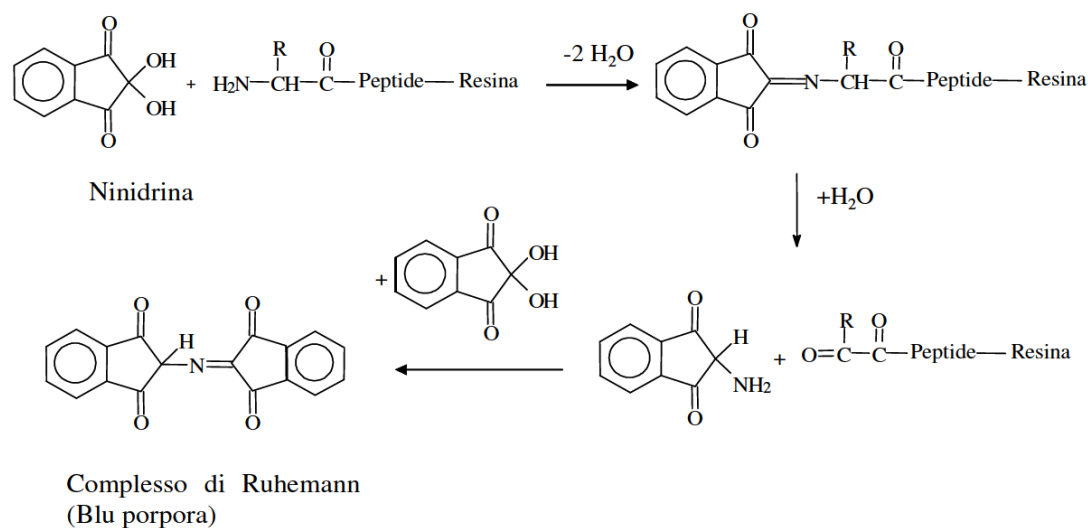


Figura 2.3.2 Schematizzazione della reazione tra ninidrina e ammina primaria che porta alla formazione del complesso di Ruhemann.

Questo test è stato effettuato dopo il primo *coupling* di ogni sintesi per valutare la resa di reazione con il primo amminoacido della sequenza.

Procedimento

1. Si preleva il reattore di sintesi e si eseguono 3-4 lavaggi con DCM per rimuovere i residui amminoacidici che non hanno legato durante la sintesi.
2. Il reattore viene poi coperto con carta filtro e posto sotto campana ad essiccare per almeno un'ora.
3. Una volta che la resina è completamente seccata, si prelevano dai 2 agli 8 mg di composto e li si trasferiscono in una provetta.
4. Successivamente si aggiungono le seguenti soluzioni in questa sequenza:
 - 75 μ L di Monitor 1 (soluzione al 76% di fenolo in etanolo);
 - 100 μ L di Monitor 2 (soluzione di cianuro di potassio + H₂O in piridina);
 - 75 μ L di Monitor 3 (soluzione al 6% di ninidrina in etanolo).
5. Contemporaneamente, si prepara in un'altra provetta la stessa sequenza di sole sostanze Monitor, che costituiranno il "bianco", ovvero il controllo.
6. Le due provette vengono poi poste in una piastra preriscaldata a 100 °C per 5 minuti.
7. Al termine dei 5 minuti vanno aggiunti velocemente 4.8 mL di Monitor 4 (soluzione al 60% di etanolo in acqua milli-Q) in ciascuna provetta per bloccare la reazione.
8. Si trasferiscono le due soluzioni in due cuvette che vanno poi poste nello spettrofotometro UV/Vis per la lettura
9. Lo strumento viene tarato a 570 nm e successivamente si esegue la lettura dell'assorbanza del bianco e poi del campione.

La quantità di funzioni amminiche libere è calcolata mediante la seguente formula:

$$\frac{\mu\text{moli}}{\text{g}} \text{ di ammina} = \frac{[(Abs_{\text{campione}} - Abs_{\text{bianco}}) \times \text{diluizione}] \times 10^6}{\epsilon \times \text{peso}}$$

Dove:

- Abs_{campione} è il valore di assorbanza del campione a 570 nm;
- Abs_{bianco} valore di assorbanza della soluzione di "bianco" a 570 nm;
- diluizione è il volume del campione, in questo caso 5 mL;
- $\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ è il coefficiente di estinzione molare il cui valore dipende dal solvente utilizzato;
- peso [mg] è il peso del campione della resina.

Successivamente si calcola la resa percentuale della reazione di *coupling* con la seguente formula:

$$\text{Resa \%} = \left(1 - \frac{\frac{\mu\text{mol di ammina}}{g}}{\text{nuova sostituzione}} \times 10^{-3} \right) \times 100$$

Dove la *nuova sostituzione* è calcolata come:

$$\text{nuova sostituzione} = \frac{1000}{\text{PM in crescita}}$$

PM in crescita corrisponde al peso molecolare della resina più il peso molecolare dei residui amminoacidici legati.

Il risultato di questo test è considerato accettabile se la resa di reazione risulta essere maggiore del 97%.

2.3.3 ACETILAZIONE DEL GRUPPO N-TERMINALE

L'acetilazione è una reazione che viene eseguita sul gruppo N-terminale di una sequenza peptidica (Fig. 2.3.3). In biologia, l'acetilazione N-alfa-terminale è una modifica post traduzionale frequente nelle cellule, e in genere scoraggia l'attività enzimatica delle esoproteasi⁷⁶. Per lo scopo di questo progetto, si voleva valutare il taglio enzimatico di substrati sintetizzati a livello del fluoroforo AMC, per cui era necessario creare dei peptidi difficilmente attaccabili al gruppo N terminale. Per ogni peptide sintetizzato quindi, è stato deciso di acetilare il gruppo α -amminico.

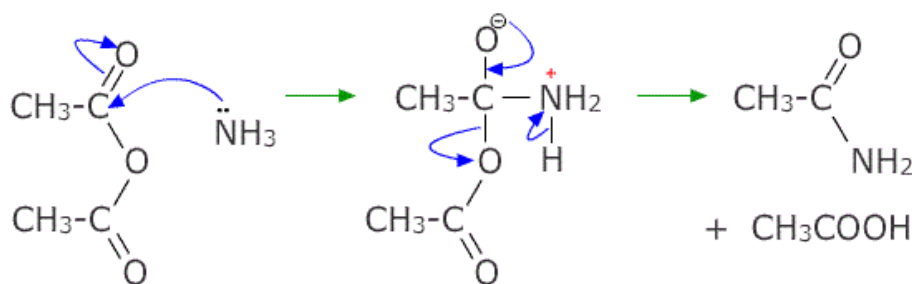


Figura 2.3.3 Esempio di reazione di acetilazione del gruppo α -terminale di una sequenza peptidica con anidride acetica che porta alla formazione di un'ammide.

In una reazione di acetilazione viene impiegato un reagente che reagisce con il gruppo amminico formando un gruppo acetile, in questo caso è stata usata anidride acetica. Inoltre, per catalizzare la reazione è stata utilizzata una base.

Procedimento

Per poter acetilare il gruppo N terminale, per prima cosa è necessario preparare la soluzione di acetilazione di 3 mL totali per ogni reattore contenente il peptide su resina.

Di seguito sono riportate le quantità di reagenti per l'acetilazione di ogni peptide:

- 10% di anidride acetica (0.3 mL);
- 5% di DIPEA (0.15 mL);
- Il tutto in NMP per un volume totale di 3 mL.

Poi si procede come segue:

1. Con la procedura automatizzata per la deprotezione Fmoc descritta nel paragrafo 2.3.1 si libera il gruppo N terminale dal suo protettore.
2. Mentre avviene la reazione di deprotezione, in un cilindro graduato da 10 mL si versano i reagenti per la soluzione di acetilazione e si mescola il contenuto per ottenere un composto omogeneo.
3. Al termine della deprotezione, con una pipetta di vetro si versano 3 mL di soluzione nel reattore contenente il peptide e lascia reagire per 15 minuti.
4. Trascorsi 15 minuti si effettuano tre lavaggi con NMP e successivamente tre lavaggi con DCM.
5. Infine, si copre il reattore con carta filtro e lo si pone in campana del vuoto per almeno un'ora, fino alla completa essiccazione della resina.

In questo modo si ottengono i peptidi acetilati al gruppo α -amminico.

2.3.4 SBLOCCO DALLA RESINA

Per la produzione di questi peptidi era necessario far avvenire lo sblocco delle catene laterali e lo sblocco dalla resina in due momenti separati. Infatti, essendo questi peptidi fluorogenici, prima di sbloccare completamente il peptide, bisognava far avvenire la condensazione tra il gruppo C terminale e l'amminoacido X-AMC. Per cui, per evitare che il fluoroforo legasse con un eventuale gruppo carbossilico presente nelle catene laterali, era necessario mantenere agganciati i gruppi protettori.

Per cui, per questi peptidi è stato scelto di utilizzare una resina super acido-labile, quindi lo stacco dal *linker* poteva avvenire in un ambiente moderatamente acido (1% TFA in DCM) e il rischio di staccare anche i gruppi protettori alle catene laterali diminuiva significativamente. Tuttavia, questo tipo di sblocco è necessario venga eseguito più volte per garantire che tutti i peptidi legati al supporto vengano tolti, essendo una chimica molto debole.

Procedimento

1. Per prima cosa si prepara una soluzione 1% TFA in DCM, considerando che per ogni sblocco vanno inseriti 1 mL di soluzione nel reattore. Per questa tesi sono stati fatti 3-4 sblocchi per ciascun peptide. In particolare, per ogni sblocco sono state usate le seguenti quantità:
 - 10 μ L di TFA;
 - 990 μ L di DCM.
2. Il peptide ancorato alla resina deve essere essiccato, già acetilato e protetto alle catene laterali.
3. Si preleva un 1 mL di soluzione 1% TFA in DCM e si versa nel reattore. La reazione va lasciata agire per 15 minuti, con il reattore completamente chiuso.
4. Trascorsi i 15 minuti vanno eseguiti dei lavaggi con DCM, facendo precipitare il peptide sbloccato in una beuta.
5. Il contenuto viene trasferito in un pallone e portato a secco utilizzando l'evaporatore.
6. Una volta che quasi tutto il DCM è evaporato, si pone il pallone sotto agitazione magnetica e si fa precipitare il peptide con etere etilico.
7. La soluzione di etere etilico e peptide viene poi centrifugata, in modo da poter separare più agevolmente l'etere in eccesso dal prodotto.
8. Il peptide così ottenuto va lasciato asciugare sotto cappa. Se le quantità di peptide sono piccole evitare di porlo nella campana del vuoto perché l'etere etilico essendo molto volatile, potrebbe evaporare velocemente e si rischia di perdere il contenuto.

Per ottenere una buona resa è necessario ripetere i passaggi 3) e 4) almeno tre volte.

2.3.5 CONDENSAZIONE DEL GRUPPO C-TERMINALE CON PEPTIDE AMC

In questo lavoro di tesi, lo scopo era valutare il taglio dei substrati sintetizzati da parte delle proteasi. Per poter osservare, quindi, l'avvenuta del taglio, era necessario creare dei peptidi che al C terminale possedessero un gruppo fluorogenico, che, se tagliato, emettesse una radiazione rilevabile in fluorescenza.

Per agganciare l'amminoacido X-AMC (dove X è l'ultimo amminoacido della sequenza peptidica) è necessario effettuare un'ultima condensazione.

Procedimento

1. Innanzitutto, il peptide deve essere già stato sbloccato dalla resina di supporto per avere così il gruppo carbossilico terminale libero per la condensazione, essere già acetilato e ancora protetto alle catene laterali.
2. Per prima cosa bisogna calcolare le quantità di amminoacido-AMC e le quantità di peptide da funzionalizzare. Per fare ciò si calcolano il numero di moli della sequenza peptidica attraverso la seguente formula:

$$n^{\circ} \text{ moli peptide} = \frac{\text{Peso [g] del peptide}}{\text{Peso molecolare del peptide}}$$

Il peso molecolare del peptide deve essere calcolato tenendo conto dei gruppi protettori alle catene laterali.

3. Poi si calcola la quantità di X-AMC da utilizzare, considerando due equivalenti di peptide. Di conseguenza, si utilizza la seguente formula:

$$\text{Peso [g] di X-AMC} = \frac{n^{\circ} \text{ moli peptide} \times 2}{\text{Peso molecolare di X-AMC}}$$

4. Dopo aver calcolato il numero di moli, è necessario preparare una soluzione di HATU-OXIMA PURE-DMAP-DMF per far avvenire la reazione.
 - HATU è un agente condensante;
 - OXIMA PURE è un alcol reattivo, serve per rendere il gruppo carbossilico del peptide più reattivo trasformandolo in qualcosa di chimicamente simile a un estere;
 - DMAP è una base che serve a deprotonare il gruppo amminico dell'amminoacido legato all'AMC rendendolo più attivo. Quindi fa da catalizzatore per la reazione;
 - DMF per portare a volume.

Per ogni reagente sono necessari i seguenti equivalenti:

- Per HATU serve 1 equivalente del peptide;
- Per OXIMA PURE serve 1 equivalente del peptide;
- Per DMAP servono 0.1 equivalenti del peptide.

Il tutto va portato a volume di 1 mL con DMF. Conoscendo quindi il numero i moli necessario e il peso molecolare di ogni reagente, si calcola la quantità necessaria per ogni reagente.

5. Dopo aver eseguito tutti i calcoli e pesato i vari reagenti, si prepara la soluzione per far avvenire la condensazione.
6. In un matraccio si inseriscono HATU, OXIMA PURE e si porta a volume con DMF.
7. Dentro un pallone si inseriscono le quantità di peptide e di amminoacido AMC pesate.
8. Successivamente si inietta nel pallone 1 mL di soluzione HATU-OXIMA PURE-DMF.
9. Per ultimo si aggiunge DMAP che fa partire la reazione.
10. Il pallone viene chiuso e lasciato sotto agitazione magnetica O/N.
11. Trascorsa una notte, il pallone viene posto sull'evaporatore e il contenuto viene tirato a secco.
12. Infine, si fa precipitare il peptide con etere etilico e, mediante centrifuga si separa dall'eccesso di solvente.
13. Anche in questo caso, il peptide va lasciato asciugare sotto cappa e non in campana, fino alla completa evaporazione dell'etere etilico in eccesso.

In questo modo si ottiene il peptide con il fluoroforo in C terminale e si può procedere all'ultima fase della preparazione del substrato, ovvero la deprotezione delle catene laterali.

2.3.6 DEPROTEZIONE DELLE CATENE LATERALI

Dopo aver eseguito la condensazione del peptide con l'amminoacido AMC, si completa la preparazione del peptide sbloccando le catene laterali dai gruppi protettori. La procedura di sblocco avviene in ambiente acido con l'utilizzo di TFA assieme ad altri reagenti nucleofili come il trietilsilano, che ottimizzano il processo di reazione, in particolare impediscono ai gruppi protettori, che sono carbocationi stabili, di legarsi alle catene laterali reattive della sequenza peptidica. Questi reagenti nucleofili vengono detti *scavengers*.

Per questo sblocco si eseguono i seguenti passaggi:

1. Con la procedura automatizzata per la deprotezione Fmoc descritta nel paragrafo 2.3.1 si libera il gruppo N terminale dal suo protettore.
2. Vengono eseguiti 3 lavaggi del reattore di sintesi con DCM e successivamente si pone sottovuoto a essiccare per il tempo di almeno un'ora.

3. Quando il peptide è completamente essiccato si può procedere con l'inserimento della soluzione per la reazione di deprotezione. In particolare, vanno aggiunti i seguenti reagenti con questo ordine:
 - 125 μ L (2.5%) di acqua milli-Q;
 - 0,125 (2.5%) μ L di trietilsilano (TES) che agisce da *scavengers*;
 - 4,75 (95%) mL di acido trifluoroacetico (TFA) che permette l'effettivo sblocco dei gruppi protettori dalle catene laterali.

La reazione viene lasciata agire per un'ora e mezza all'interno del reattore di sintesi ben chiuso per evitare l'evaporazione di TFA.

4. Al termine della reazione vengono eseguiti tre lavaggi con TFA travasando poi il filtrato in un pallone.
5. A questo punto, tramite evaporatore, si tira a secco il peptide facendo evaporare l'acido.
6. Si posiziona il pallone sotto agitazione magnetica e si fa precipitare il peptide con etere etilico.
7. Infine, mediante centrifuga, si separa l'etere in eccesso dal peptide ottenuto e il peptide si lascia seccare sotto cappa con il contenitore aperto e coperto con carta filtro. Se le quantità di peptide sono piccole evitare di porlo nella campana del vuoto perché l'etere etilico essendo molto volatile, potrebbe evaporare velocemente e si rischia di perdere il contenuto.

In questo modo si ottiene il peptide pronto per la purificazione.

2.3.7 PURIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CROMATOGRAFICA

Nella purificazione e caratterizzazione dei prodotti di sintesi ottenuti dalla SPPS è stata utilizzata la tecnica HPLC a fase inversa (*Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography*), una particolare tipologia di cromatografia liquida su colonna. La cromatografia è un metodo analitico che permette di separare e valutare quantitativamente e qualitativamente i componenti di una soluzione liquida, in questo caso le sequenze peptidiche sintetizzate.

Questa tecnica sfrutta essenzialmente due fasi:

- Una fase stazionaria costituita da una componente solida, in questo caso da catene idrocarburiche idrofobiche;
- Una fase mobile liquida, in cui eluiscono le varie componenti della miscela a seconda del loro tempo di ritenzione caratteristico.

L'analisi cromatografica può essere eseguita in modalità isocratica o a gradiente; nel primo caso, la concentrazione della fase mobile rimane la stessa per tutta la durata dell'analisi, mentre nel secondo caso si ha un aumento graduale della concentrazione di solvente organico. L'utilizzo della modalità a gradiente consente di incrementare l'idrofobicità della fase mobile che va, quindi, a competere maggiormente con la fase stazionaria determinando l'eluizione delle componenti legate a quest'ultima. A seconda del grado di affinità che le varie componenti hanno con la fase stazionaria, si ha l'eluizione delle suddette a intervalli temporali diversi, chiamati tempi di ritenzione. Conoscendo, quindi, il tempo di ritenzione di un composto è possibile distinguerlo dalle altre componenti di scarto che avranno tempi di ritenzione diversi. Maggiore è l'idrofobicità dei peptidi, maggiore sarà il loro tempo di ritenzione.

Un generico sistema HPLC è fondamentalmente articolato come schematizzato in Figura 2.3.4 e presenta le seguenti componenti:

- Due serbatoi che contengono i solventi che costituiscono la fase mobile;
- Una pompa ad alta pressione garantisce e regola la portata del solvente che costituisce la fase mobile;
- Un iniettore che preleva il campione di miscela da analizzare e lo inserisce all'interno della fase mobile che lo trasporta all'interno della colonna cromatografica;
- Una colonna cromatografica che contiene la fase stazionaria ed è il luogo in cui avviene la vera e propria separazione delle componenti;
- Un rivelatore UV/Vis che registra le variazioni nella composizione dell'eluente permettendo l'identificazione dei vari analiti;
- Un computer collegato al detector che elabora il segnale e lo converte in un cromatogramma;
- Un contenitore collegato anch'esso al detector che raccoglie tutti gli scarti.
- Nel sistema si possono trovare anche altri elementi, tra cui, ad esempio, un degasatore per eliminare eventuali bolle all'interno degli eluenti che potrebbero impedire la separazione o falsare il rilevamento.

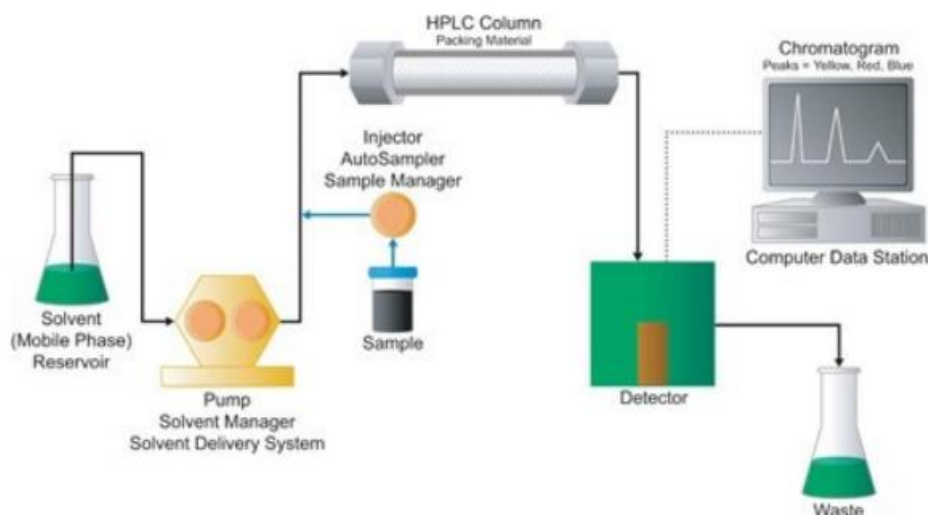


Figura 2.3.4 Schematizzazione di un generico sistema HPLC.

La procedura classica prevede l'iniezione della miscela contenente il peptide grezzo all'interno della fase stazionaria tramite una soluzione acquosa (eluente A) che favorisce l'interazione tra le componenti e la fase stessa.

Successivamente, si varia il gradiente, aumentando progressivamente la concentrazione di solvente organico (eluente B). Si ha così la separazione degli analiti.

Per quanto riguarda i solventi della fase mobile, in questo lavoro sono stati utilizzati i seguenti:

- 0.05% TFA in H₂O Milli-Q (eluente A);
- 0.05% TFA in acetonitrile (eluente B).

La presenza di TFA conferisce all'eluente la capacità di interagire con i gruppi carichi delle componenti della miscela, creando una soluzione più neutra che quindi si separa più facilmente dalla fase stazionaria.

A seconda del tipo di cromatografia, analitica o semipreparativa, varia anche il diametro della colonna cromatografica utilizzata. In genere, le colonne per la purificazione sono di diametro maggiore, in modo tale da poter separare quantitativi maggiori di materiale.

In questo caso sono state utilizzate le seguenti colonne:

- Colonna Atlantis dC18 OBD semipreparativa (10 µm, 100 Å, 10 x 250 mm);
- Colonna Nova-Pak C18 semipreparativa (6 µm, 60 Å, 7,8 x 300 mm);
- Colonna Atlantis dC18 analitica (5 µm, 4.6 x 250 mm);
- Colonna Nova-Pack C18 analitica (4 µm, 60 Å, 3.9 x 300 mm);

I peptidi eluiti sono stati rilevati con un detector a UV/Vis, impostato a due lunghezze d'onda diverse:

- 214 nm, per l'identificazione del legame peptidico;
- 280 nm o 314 nm, per l'identificazione del gruppo AMC. Questa lunghezza d'onda, tuttavia, è stata utilizzata solo nelle cromatografie analitiche.

Il cromatogramma che viene disegnato a seguito della rilevazione da parte del detector può essere di tipo analogico o digitale. Il metodo analogico viene utilizzato in semipreparativa perché agevola il frazionamento della miscela e quindi la purificazione del peptide; il metodo digitale è utilizzato principalmente per scopi analitici, quindi valutare nel complesso il campione e determinarne il grado di purezza.

2.3.8 SPETTROMETRIA DI MASSA

L'identificazione delle biomolecole può avvenire anche attraverso la spettrometria di massa di tipo MALDI-TOF (MALDI-TOF MS, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry*). La spettrometria di massa è un metodo di analisi distruttiva che permette di ottenere il peso molecolare di composti a partire da poche picomoli di campione e ricavare la massa di peptidi e proteine (con masse fino ai 500000 Da) con un buon grado di accuratezza. Questa analisi viene eseguita per confrontare i valori di massa ottenuti sperimentalmente e quelli teorici e quindi, stabilire l'integrità delle molecole sintetizzate e l'eventuale presenza di modifiche strutturali.

L'analisi sfrutta il fenomeno di ionizzazione delle molecole mediante la generazione di un fascio laser. In particolare, quando una molecola viene colpita da una specifica radiazione, espelle elettroni trasformandosi in un radicale, che a sua volta si frammenta, rilasciando ioni carichi. In questo modo lo strumento sfruttando la differenza nel rapporto massa/carica (m/z) delle varie particelle ionizzate è in grado di rilevare, in base all'abbondanza di ciascuno ione, la massa degli analiti corrispondenti.

Lo strumento (Fig. 2.3.5) è costituito dalle seguenti componenti:

- Un sistema di introduzione del campione (*sample inlet*) che preleva un piatto metallico su cui è stato posto il composto da analizzare assorbito in una matrice MALDI. In questo compartimento il campione passa dalla pressione atmosferica al vuoto;
- Una camera di ionizzazione (*ion source*) dove viene emesso un laser pulsato con lunghezza d'onda nell'UV che colpisce il campione frammentandolo;

- Un analizzatore di massa (*mass analyzer*), che separa gli ioni in base al rapporto massa/carica. Nel nostro caso è stato usato il sistema TOF (*time of flight* – a tempo di volo), ovvero gli ioni vengono accelerati con un forte campo elettrico, in modo tale da fornire la stessa energia cinetica a ioni con la stessa carica. A seconda della velocità, che dipende dalla massa dell'analita, arrivano al detector con tempi di volo diversi. Il loro tempo di percorrenza del tubo, risulta inversamente proporzionale al rapporto m/z ;
- Un detector che rileva il segnale emesso dagli ioni e lo amplifica;
- Un computer (*data system*) che trasforma il segnale elaborato dal detector in uno spettro di massa.

Camera di ionizzazione, analizzatore e detector operano tutti in condizioni di vuoto.

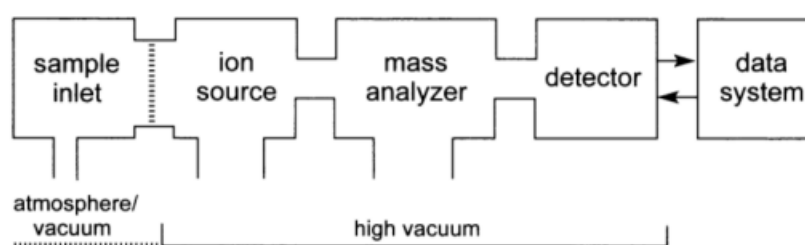


Figura 2.3.5 Schema di un generico spettrometro di massa

Dalla spettrometria di massa di una sostanza risulta uno spettro, in cui l'intensità del segnale indica nei suoi picchi l'abbondanza delle specie ioniche; il picco più intenso, viene normalizzato al 100% dell'intensità relativa. La MALDI-TOF prevede una ionizzazione soft di tipo MALDI, ovvero una matrice composta, in questo caso, da un acido organico debole (acido α -ciano-4-idrossicinnamico (CHCA)), assorbibile alla lunghezza d'onda del laser ionizzante. La matrice contiene anche acetonitrile al 50:50 con lo 0,1% di TFA.

Il laser provoca un'eccitazione molecolare nei cristalli di matrice e crea un accumulo di energia che porta al riscaldamento del composto e quindi all'espulsione di ioni. La matrice, inoltre, minimizza i danni che possono essere prodotti dal laser sugli analiti, assorbendo e trasferendo l'energia adeguata dal laser alle molecole.

2.3.9 SPETTROSCOPIA AD ASSORBIMENTO UV/VIS

La spettroscopia UV/Vis è una tecnica analitica utilizzata per valutare quantitativamente e qualitativamente sostanze che assorbono energia nello spettro

elettromagnetico appartenente all'intervallo di lunghezze d'onda comprese tra la radiazione UV (200 nm e 350 nm) e quella del visibile (350 nm e 700 nm).

L'assorbimento delle radiazioni luminose dalle molecole permette agli elettroni esterni di un orbitale di passare da un livello energetico più basso a un livello energetico più alto. Questo accade se il fotone incidente possiede un'energia sufficientemente elevata per la transizione elettronica, che deve essere maggiore della differenza di energia tra i due orbitali (*band gap*). Il gap energetico è specifico per ogni legame chimico e quindi in base allo spettro di assorbimento è possibile discriminare i diversi composti tra loro.

Lo spettrofotometro è composto da:

- Una sorgente di radiazioni nello spettro UV/Vis, per la regione nel visibile è tipicamente usata una lampada a tungsteno, mentre per la regione nell'ultravioletto una lampada ad idrogeno o deuterio;
- Un monocromatore, che limita il range delle radiazioni emesse rilevabili ad un intervallo molto ristretto centrato nella lunghezza d'onda di interesse;
- Due cuvette, la prima contiene la soluzione composta dal campione da analizzare sciolto in un solvente e la seconda contiene il solo solvente che funge da controllo ("bianco").
- Un rivelatore che converte la radiazione emessa dagli elettroni in segnale elettrico;
- Un registratore computerizzato che acquisisce ed elabora i dati calcolando l'assorbanza, eliminando le bande di assorbimento del solvente e fornendo lo spettro della sostanza campione.

L'assorbanza è definita come:

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0}$$

Dove:

- I_0 rappresenta l'intensità di luce ad una lunghezza d'onda fissata che passa attraverso la cuvetta di controllo;
- I rappresenta l'intensità della luce ad una specifica lunghezza d'onda che passa attraverso la cuvetta contenente il campione da analizzare.

Utilizzando la legge di Lambert-Beer, è possibile descrivere i rapporti tra l'assorbanza misurata, la lunghezza del cammino ottico e concentrazione del campione.

$$A = \epsilon_{\lambda} * b * c$$

Dove:

- A è la differenza tra il valore dell'assorbanza della soluzione con il campione e di quella di controllo;
- c è la concentrazione molare della specie in grado di assorbire [M];
- b è il cammino ottico in [cm];
- ϵ_λ è il coefficiente di estinzione molare della sostanza ad una particolare lunghezza d'onda [$M^{-1} cm^{-1}$].

2.3.10 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI BIOLOGICI

Terminata la fase di produzione dei peptidi, sono stati ottenuti i campioni di feci dall'Ospedale Policlinico di Padova. Si è preferito aspettare la conclusione della parte chimica per la raccolta dei campioni per evitare che lo stoccaggio influisse sull'attività delle eventuali proteasi presenti.

Per la preparazione dei campioni biologici è stato seguito un protocollo sulla falsariga di Jablaoui et al. riportato nel paper *Fecal Serine Protease Profiling in Inflammatory Bowel Diseases*³⁷. Per questi saggi erano a disposizione 4 campioni totali, due soggetti sani e due soggetti malati, uno affetto da CD e uno affetto da UC.

Procedimento

1. Per ogni campione è stato prelevato 1 g di feci congelate che sono state sciolte e omogeneizzate in 5 mL di acqua milli-Q. Al contrario del lavoro di Jabaloui et al. non è stato utilizzato un buffer per questo passaggio per non alterare il pH naturale del campione.
2. La soluzione è stata poi centrifugata per 15 minuti a 5000 giri/min a 4°C.
3. Infine, la soluzione è stata filtrata in una Falcon mediante una siringa da 30 mL e con filtro PTFE 0.45 μ m.
4. L'estratto è stato poi stoccato a -20°C.

In questo modo sono stati ottenuti circa 5 mL di estratto per ogni campione.

2.3.11 TEST ENZIMATICI *IN VITRO*

Lo scopo di questa tesi era valutare il taglio avvenuto ad opera dei campioni biologici a disposizione sui peptidi sintetizzati e su substrati già presenti in laboratorio o disponibili commercialmente. Per fare ciò sono necessari i saggi enzimatici.

I test enzimatici *in vitro*, tra i molteplici utilizzi, sono spesso usati per valutare la modalità di degradazione di un particolare substrato.

Il principio alla base di questo tipo di test consiste nel far reagire un certo enzima (reagente A) con il substrato di interesse (reagente B) per ottenere il substrato tagliato (prodotto C).



Ogni substrato ha la propria costante di Michaelis-Menten K_m , che indica l'affinità tra un enzima e il substrato; minore è K_m , migliore è l'affinità di quel substrato per l'enzima e quindi, maggiore sarà il suo taglio. In genere, un buon K_m è dell'ordine dei nM o pM; ciò significa che a parità di reagenti, minore è la costante di Michaelis-Menten maggiore è il prodotto di taglio. Per la caratterizzazione degli enzimi e per i saggi enzimatici in questo progetto sono state utilizzate concentrazioni di enzima nell'ordine dei μM . Questo valore è stato scelto in modo arbitrario perché non era possibile conoscere il tipo di enzima presente e la sua quantità nel campione biologico.

Sono stati utilizzati due tipi di test enzimatici:

- Test di assorbanza, se il substrato in esame è legato a un gruppo p-nitroanilide. La lettura viene fatta a 405 o 410 nm (Fig. 2.3.6).
- Test fluorogenici, se il substrato in esame è legato a un aminometilcumarina (AMC) (Fig. 2.3.7);

Chromogenic substrates

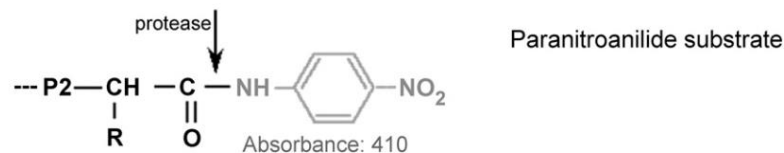


Figura 2.3.6 Schematizzazione di substrato per assorbanza con un gruppo p-nitroanilide in N terminale.

Fluorogenic substrates

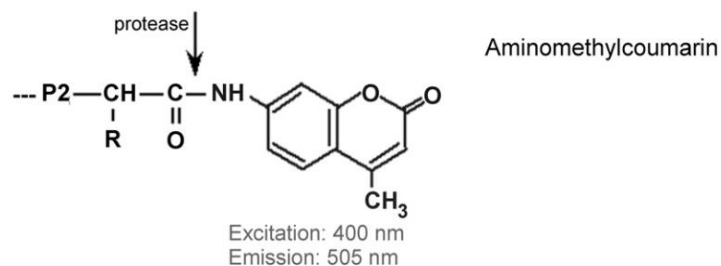


Figura 2.3.7 Schematizzazione di substrato per fluorescenza con un'aminometilcumarina in N terminale.

La differenza tra questi due tipi di test sta nella modalità di lettura (*read-out*), in quanto il metodo di rilevazione delle radiazioni emesse avviene in maniera diversa.

Nel primo caso viene letto un valore di assorbanza. Nel secondo caso, invece, viene calcolato un valore di fluorescenza (RFU – *Relative Fluorescence Unit*) che dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione emessa dal fluoroforo una volta colpito da un laser settato a due lunghezze d'onda differenti. .

Aminometilcumarina, e p-nitroanilide sono molecole che hanno la particolarità di non essere significativamente rilevabili alle lunghezze d'onda suddette quando legate al substrato. Ciò è dovuto all'effetto di risonanza che si crea tra gli ioni del cromoforo e quelli della molecola a cui è legato. Questo fenomeno fa sì che le radiazioni emesse dal sistema substrato-cromoforo abbiano lunghezze d'onda molto diverse rispetto a quelle rilevabili dallo strumento di lettura. Quando avviene il taglio del substrato, invece, gli ioni delle rispettive molecole si allontanano e se il cromoforo viene eccitato, emette una radiazione rilevabile dal detector.

In questo progetto sono stati sintetizzati solo substrati rilevabili con spettroscopia di fluorescenza, ma sono stati testati anche altri substrati rilevabili tramite assorbanza, tra cui i substrati canonici per elastasi e catepsina che sono disponibili commercialmente.

Valutazione del taglio enzimatico

Come anticipato nel Capitolo 1 (§ 1.2.1) è possibile schematizzare ogni substrato nel modo seguente:

$P_i \text{ positions} - \downarrow - P_i' \text{ positions}$

Dove con $P_i \text{ positions}$ (con $i = 1, 2, 3, \dots$) si indicano tutti i residui amminoacidi che si trovano prima del taglio enzimatico, mentre con $P_i' \text{ positions}$ (con $i = 1, 2, 3, \dots$) si indicano tutti i residui amminoacidi che si trovano dopo il taglio. Ogni enzima ha la propria sequenza o preferenza di P_i e P_i' , chiamata sequenza *consensus*.

Con la spettroscopia di fluorescenza e di assorbimento, i $P_i' \text{ positions}$ sono sostituiti dal cromoforo Aminometilcumarina (o p-nitroanilide), in questo modo il taglio enzimatico provoca la separazione del gruppo AMC che risulta quindi rilevabile dal detector.

La spettroscopia di fluorescenza, rispetto quella di assorbanza, ha il vantaggio di essere molto più sensibile e questo è un notevole vantaggio quando si ha a che fare con concentrazioni di substrato e/o enzima molto basse.

Tuttavia, con questa tecnica non è possibile rilevare eventuali tagli avvenuti lungo altri siti della sequenza peptidica. Nel caso si volessero ottenere queste informazioni, la tecnica migliore sarebbe l'HPLC accoppiata a detector di massa. Infatti, solitamente una cromatografia sfrutta lunghezze d'onda pari a 214 nm, che rileva il legame peptidico; inoltre, ogni residuo peptidico avrebbe il proprio tempo di ritenzione, per cui sarebbe possibile discriminare i vari residui peptidici che si creano ad opera della degradazione enzimatica. Lo svantaggio di questa tecnica è che molto dispendiosa di tempo, ha costi significativamente maggiori di un test fluorogenico e necessita quantità di reagenti superiori per poter avere una rilevazione attendibile.

Preparazione di un saggio in vitro

Per questo tipo di test sono state utilizzate delle micro-piastre a 96 pozzetti:

- Costar 96 *Well Half Area, Flat Bottom, Black Polystyrene*, non trattate, per i test di fluorescenza;
- Corning 96 *Well Full Area, Flat Bottom, Transparent Polystyrol*, non trattate, per i test con lettura di assorbanza.

Per ogni test sono state considerate quattro condizioni di pH con lo scopo di valutare quanto l'acidità dell'ambiente di reazione influenzasse il taglio enzimatico:

- pH 5.5;
- pH 6.5;
- pH 7 o 7.5;
- pH 8.3.

Per ogni condizione enzimatica e di pH il campione e il controllo sono stati preparati in triplicato, in modo tale da avere una maggiore attendibilità sul risultato del test.

In particolare, in ogni pozzetto sono stati considerati 100 μ L di volume totale di soluzione i cui reagenti sono stati aggiunti con le seguenti concentrazioni:

- 10% di buffer a un determinato pH;
- 10% di enzima;
- 10% di substrato diluito in acqua milli-Q alle concentrazioni sottoindicate. Nel caso di substrati idrofobici, la diluzione era possibile solo in solvente organico, in questo caso DMSO. Essendo un solvente tossico, per non alterare l'attività enzimatica, è stato necessario utilizzare un volume di substrato minore, riducendo a 5% rispetto al volume totale;
- 70% di acqua milli-Q (o 75% nel caso di substrati sciolti in DMSO).

Per diminuire i tempi nell'organizzazione delle piastre, per ottimizzare il consumo di plastiche, e per avere una migliore riproducibilità nei test sono stati preparati dei *master mix* (MM), ovvero delle soluzioni contenenti il buffer, l'acqua e il substrato specifico, alle concentrazioni richieste e nelle quantità adatte per riempire tutti i pozzetti con quella particolare combinazione di reagenti. In questo modo, inoltre, sono stati diminuiti i tempi di esposizione del substrato all'ambiente acido o alcalino che rischiano di danneggiare il substrato stesso.

Dopo aver pipettato i vari *master mix* nella piastra, come ultimo passaggio è stato inserito l'enzima per far partire la reazione.

Per ogni test sono state eseguite delle letture a intervalli di tempo della durata massima di 30 minuti, per un arco di tempo complessivo di due ore. In alcuni casi, questi intervalli sono stati ridotti a 5, 10 o 20 minuti, a seconda dell'andamento della reazione. Infatti, come verrà spiegato nel Capitolo 4, alcuni substrati testati con i campioni biologici hanno subito un'azione enzimatica talmente massiva che dopo soli pochi minuti la reazione era conclusa.

Successivamente alla lettura, i dati grezzi raccolti sono stati normalizzati rispetto al *background* (piastra contenete solo buffer), quindi dal valore di assorbanza registrato è stato tolto il valore di assorbanza di fondo della piastra che lo strumento registra anche in assenza di campione nel pozzetto. Infine, è stata eseguita la media dei triplicati e calcolato il delta ($\Delta_{T_{\text{finale}}-T_{\text{iniziale}}}$), ovvero la differenza tra il valore di fluorescenza al tempo finale (T_{finale}) e quello iniziale (T_{iniziale}).

CAPITOLO 3

PARTE SPERIMENTALE

3.1 SINTESI PEPTIDICA

Per questa tesi sono stati prodotti i peptidi Ac-GDGPYSLVA-AMC e Ac-KHPHLVRQKR-AMC, relativi rispettivamente ai siti di taglio delle proteine Contactina-1 e Desmogleina-2. Ognuno di questi peptidi è stato prodotto a quattro lunghezze amminoacidiche diverse, con lo scopo di valutare in sede di test enzimatici una possibile predilezione da parte delle proteasi per substrati più specifici o meno. In particolare, per Ac-GDGPYSLVA-AMC sono state ottenute le seguenti sequenze:

- Ac-Gly-Asp-Gly-Pro-Tyr-Ser-Leu-Val-AMC;
- Ac-Asp-Gly-Pro-Tyr-Ser-Leu-Val-AMC;
- Ac-Pro-Tyr-Ser-Leu-Val-AMC;
- Ac-Ser-Leu-Val-AMC.

Per quanto riguarda il peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC sono state invece ottenute le seguenti sequenze:

- Ac-Lys-His-Pro-His-Leu-Val-Arg-Gln-Lys-Arg-AMC;
- Ac-Pro-His-Leu-Val-Arg-Gln-Lys-Arg-AMC;
- Ac-Leu-Val-Arg-Gln-Lys-Arg-AMC;
- Ac-Arg-Gln-Lys-Arg-AMC;

Tuttavia, a causa di problemi tecnici, non è stato possibile portare a termine la produzione delle due sequenze più corte di Ac-GDGPYSLVA-AMC e Ac-KHPHLVRQKR-AMC. Per questo motivo, nei paragrafi successivi verranno descritte le procedure effettuate solo per i peptidi seguenti:

- Ac-Gly-Asp-Gly-Pro-Tyr-Ser-Leu-Val-AMC (PM = 1078.2 Da);
- Ac-Asp-Gly-Pro-Tyr-Ser-Leu-Val-AMC (PM = 1021.1 Da);
- Ac-Lys-His-Pro-His-Leu-Val-Arg-Gln-Lys-Arg-AMC (PM = 1500.3 Da);
- Ac-Pro-His-Leu-Val-Arg-Gln-Lys-Arg-AMC (PM = 1234.9 Da);

Dove Ac indica il gruppo acetile utilizzato come protettore per le esonucleasi e AMC corrisponde ad aminometilcumarina, il fluoroforo utilizzato per la rilevazione del taglio enzimatico nei test di fluorescenza.

Per la produzione dei peptidi sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- Sintesi peptidica su fase solida delle sequenze Ac-GDGPYSLV e Ac-KHPHLVRQKR;
- Acetilazione del gruppo N-terminale per tutte le sequenze;
- Condensazione con il cromoforo AMC per tutte le sequenze.

3.1.1 SINTESI DEL PEPTIDE GDGPYSLV

La sintesi del peptide GDGPYSLV, su fase solida e chimica Fmoc, è stata condotta con il sintetizzatore Syro I in modalità automatica. In particolare, sono stati sintetizzati i seguenti peptidi:

- H-Gly-Asp-Gly-Pro-Tyr-Ser-Leu-Val-NH₂ (PM = 884.3 Da);
- H-Asp-Gly-Pro-Tyr-Ser-Leu-Val-NH₂ (PM = 827.3 Da).

Per questa sintesi è stato utilizzato come supporto solido una resina funzionalizzata con Valina super acido-labile (0.60 mmol/g) con protezione Fmoc del gruppo amminoacidico terminale.

Per sintetizzare i peptidi sono stati utilizzati i seguenti amminoacidi funzionalizzati:

- Fmoc-Gly-OH;
- Fmoc-Asp (OtBu)-OH;
- Fmoc-Pro-OH;
- Fmoc-Tyr-OH;
- Fmoc-Ser (tBu)-OH;
- Fmoc-Leu-OH.

Procedimento

1. È stata calcolata la quantità di resina necessaria tenendo conto della sostituzione e del numero di siti attivi desiderati che in questo caso erano rispettivamente 0.60 mmol/g e 0.125 mmol:

$$\text{grammi di resina} = \frac{\text{peptide}}{\text{loading}} = \frac{0.125 \text{ mmol}}{0.6 \text{ mmol/g}} = 0.208 \text{ g}$$

2. È stato preparato un reattore di sintesi inserendo la quantità di resina pesata e successivamente sono stati aggiunti 7 mL di DMF per far avvenire il rigonfiamento della resina per un tempo di 10 minuti.
3. Successivamente sono stati pesati gli amminoacidi necessari considerando 5 equivalenti cadauno e sono stati sciolti in DMF.

4. Sono state preparate le soluzioni per la sintetizzazione secondo le modalità descritte nel paragrafo 2.2.3.1:
 - 40% Piperidina in DMF;
 - 2 M di DIPEA in NMP;
 - 0.45 M HBTU-OXIMA Pure in DMF.
5. È stata fatta partire la procedura di sintesi automatizzata che ha eseguito per ogni ciclo (i) la deprotezione del gruppo α -amminico e (ii) il *coupling* con il nuovo amminoacido a seguito dell'attivazione del gruppo carbossilico. Per questa sintesi sono stati effettuati tutti *coupling* doppi con HBTU. Complessivamente sono stati eseguiti sette cicli di sintesi, interrotti ogni due con uno STOP, per poter prelevare un'aliquota della resina dal reattore e procedere con i passaggi di acetilazione e condensazione, mentre la restante parte è stata reinserita nel sintetizzatore ed è stata fatta continuare la sintesi.
6. Dopo i primi due *coupling* è stato eseguito il test alla ninidrina (par. 2.2.3.2) per valutare la resa di reazione che è risultata essere del 100%. Quindi, la sintesi è stata fatta proseguire per la produzione delle restanti sequenze.
7. Ad ogni STOP della sintesi, sono stati eseguiti dei lavaggi con DCM del reattore contenente la resina col peptide in crescita e successivamente è stato posto ad essiccare per un'ora nella campana del vuoto prima di poter prelevare l'aliquota.
8. Per ogni aliquota è stata eseguita una deprotezione Fmoc prima di procedere con la fase di acetilazione.

3.1.2 SINTESI DEL PEPTIDE KHPHLVRQK

La sintesi del peptide KHPHLVRQKR, su fase solida e chimica Fmoc, è stata condotta con il sintetizzatore Syro I in modalità automatica. In particolare, sono stati sintetizzati i seguenti peptidi:

- H-Lys-His-Pro-His-Leu-Val-Arg-Gln-Lys-NH₂ (PM = 1729.2 Da);
- H-Pro-His-Leu-Val-Arg-Gln-Lys-NH₂ (PM = 2337.8 Da);

Per questa sintesi è stato utilizzato come supporto solido una resina funzionalizzata con Lisina super acido-labile (0.60 mmol/g) con protezione Fmoc del gruppo amminoacidico terminale. Sono stati eseguiti gli stessi passaggi effettuati per la prima sintesi.

Per sintetizzare i peptidi sono stati utilizzati i seguenti amminoacidi funzionalizzati:

- Fmoc-Lys (Boc)-OH;
- Fmoc-His(Trt)-OH;
- Fmoc-Pro-OH;
- Fmoc-Leu-OH;
- Fmoc-Val-OH;
- Fmoc-Arg(Pbf)-OH;
- Fmoc-Gln(Trt)-OH.

Procedimento

1. È stata calcolata la quantità di resina necessaria tenendo conto della sostituzione e del numero di siti attivi desiderati che in questo caso erano rispettivamente 0.60 mmol/g e 0.125 mmol:

$$\text{grammi di resina} = \frac{\text{peptide}}{\text{loading}} = \frac{0.125 \text{ mmol}}{0.6 \text{ mmol/g}} = 0.208 \text{ g}$$

2. È stato preparato un reattore di sintesi inserendo la quantità di resina pesata e successivamente sono stati aggiunti 7 mL di DMF per far avvenire il rigonfiamento della resina per un tempo di 10 minuti.
3. Successivamente sono stati pesati gli amminoacidi necessari considerando 5 equivalenti cadauno e sono stati sciolti in DMF.
4. Sono state preparate le soluzioni per la sintetizzazione secondo le modalità descritte nel paragrafo 2.2.3.1:
 - 40% Piperidina in DMF;
 - 2 M di DIPEA in NMP;
 - 0.45 M HBTU-OXIMA Pure in DMF.
5. È stata fatta partire la procedura di sintesi automatizzata che ha eseguito per ogni ciclo (i) la deprotezione del gruppo α -amminico e (ii) il *coupling* con il nuovo amminoacido a seguito dell'attivazione del gruppo carbossilico. Per questa sintesi sono stati effettuati tutti *coupling* doppi con HBTU.
 Complessivamente sono stati eseguiti otto cicli di sintesi, interrotti ogni due, per poter prelevare un'aliquota della resina dal reattore e procedere con i passaggi di acetilazione e condensazione, mentre la restante parte è stata reinserita nel sintetizzatore ed è stata fatta continuare la sintesi.

6. Dopo i primi due *coupling* è stato eseguito il test alla ninidrina (par. 2.2.3.2) per valutare la resa di reazione che è risultata essere del 100%. Quindi, la sintesi è stata fatta proseguire per la produzione delle restanti sequenze.
7. Ad ogni STOP della sintesi, sono stati eseguiti dei lavaggi con DCM del reattore contenente la resina col peptide in crescita e successivamente è stato posto ad essiccare per un'ora nella campana del vuoto prima di poter prelevare l'aliquota.
8. Per ogni aliquota è stata eseguita una deprotezione Fmoc del gruppo amminico del *backbone* prima di procedere con la fase di acetilazione.

3.1.3 ACETILAZIONE DEL GRUPPO N-TERMINALE

Al termine della deprotezione Fmoc sono stati acetilati tutti i peptidi sintetizzati con la medesima procedura (paragrafo 2.2.3.3) per ottenere un gruppo acetile al terminale N della sequenza.

Procedimento

1. È stata preparata la soluzione di acetilazione all'interno di un cilindro graduato:
 - 10% di anidride acetica (0.3 mL);
 - 5% di DIPEA (0.15 mL);
 - 85% di NMP per portare a volume di 3 mL.
2. La soluzione è stata inserita nel reattore contenente il peptide da acetilare ed è stata lasciata per 15 minuti.
3. Successivamente sono stati eseguiti prima tre lavaggi con NMP e successivamente tre lavaggi con DCM.
4. Infine, i reattori sono stati coperti con carta filtro e posti ad essiccare nella campana del vuoto per almeno un'ora.

Al termine del processo di acetilazione è stato eseguito lo sblocco dei peptidi dalla resina di supporto con una chimica super acido-labile (paragrafo 2.2.3.4). È stata preparata una soluzione di 20 mL con 1% TFA in DCM e in ogni reattore è stato inserito 1 mL di soluzione per una durata di reazione di 15 minuti. Successivamente sono stati eseguiti tre lavaggi con DCM per completare la separazione dei peptidi dalla resina. La soluzione con peptide e DCM è stata posta in un pallone ed è stata tirata a secco con evaporatore.

Al termine del processo di sblocco sono stati ottenuti i seguenti peptidi acetilati:

- 13 mg di Ac-DGPYSLV;
- 10 mg di Ac-GDGPYSLV;
- 32 mg di Ac-PHLVRQK;
- 36.4 mg di Ac-KHPHLVRQK.

3.1.4 CONDENSAZIONE DI AC GDGPYSLV CON IL PEPTIDE A-AMC

Dopo aver completato lo sblocco dei peptidi dalle rispettive resine, è stata effettuata la condensazione del C terminale dei peptidi Ac-DGPYSLV e Ac-GDGPYSLV con il peptide A-AMC.

Per effettuare la condensazione con il peptide A-AMC era necessario calcolare il numero di moli del peptide a cui andava legato. Dallo sblocco delle resine, sono stati ottenuti le seguenti quantità di peptide:

- 13 mg di Ac-DGPYSLV;
- 10 mg di Ac-GDGPYSLV.

Successivamente è stato calcolato il peso molecolare (PM) di ogni peptide (considerando i gruppi delle catene laterali ancora bloccati):

- $PM_{Ac-DGPYSLV} = PM_{Ac} + PM_{Asp(OtBu)} + PM_{Gly} + PM_{Pro} + PM_{Tyr(tBu)} + PM_{Ser(tBu)} + PM_{Leu} + PM_{Val} + PM_{H_2O} =$
 $= 43.046 + 171.25 + 57.052 + 97.118 + 219.35 + 143.146 + 113.16 + 99.13 + 17 = 870.252 \text{ Da}$
- $PM_{Ac-GDGPYSLV} = PM_{Ac} + PM_{Gly} + PM_{Asp(OtBu)} + PM_{Gly} + PM_{Pro} + PM_{Tyr(tBu)} + PM_{Ser(tBu)} + PM_{Leu} + PM_{Val} + PM_{H_2O} =$
 $= 43.046 + 57.052 + 171.25 + 57.052 + 97.118 + 219.35 + 143.146 + 113.16 + 99.13 + 17 = 927.304 \text{ Da}$

Quindi, è stato calcolato il numero di moli per ciascun peptide:

- $n^\circ \text{ moli di Ac-DGPYSLV} = \frac{\text{Peso Ac-DGPYSLV}}{PM_{Ac-DGPYSLV}} = \frac{0.013 \text{ g}}{870.3 \text{ Da}} = 0.015 \text{ m moli.}$
- $n^\circ \text{ moli di Ac-GDGPYSLV} = \frac{\text{Peso Ac-GDGPYSLV}}{PM_{Ac-GDGPYSLV}} = \frac{0.010 \text{ g}}{927.3 \text{ Da}} = 0.010 \text{ m moli.}$

Per calcolare la quantità di A-AMC da utilizzare, bisognava considerare 2 equivalenti per ciascun peptide.

In questo caso, si avevano a disposizione solo 12 mg di amminoacido A-AMC, per cui sono stati suddivisi in 4 aliquote per i 4 peptidi da funzionalizzare. La quantità di A-

AMC da utilizzare quindi, non è stata calcolata moltiplicando il numero di moli per il peso molecolare della sostanza, ma sono stati usati tassativamente 3 mg per ciascun peptide.

Per la preparazione della soluzione di condensazione è stato tenuto in considerazione il numero di moli più basso tra i peptidi pesati, 0.0039 m mol, questo sempre per risparmiare sulla quantità di A-AMC da utilizzare.

È stata quindi, calcolata la quantità di peptide grezzo da utilizzare per ogni condensazione, moltiplicando il peso molecolare del peptide grezzo per il numero di moli 0.0039 m mol. In particolare, per ogni peptide sono state usate le seguenti quantità:

- $\text{Peso}_{\text{Ac-DGPYSLV}} = \text{PM}_{\text{Ac-DGPYSLV}} \times 0.0039 \text{ m mol} = 3.4 \text{ mg}$
- $\text{Peso}_{\text{Ac-GDGPYSLV}} = \text{PM}_{\text{Ac-GDGPYSLV}} \times 0.0039 \text{ m mol} = 3.6 \text{ mg}$

Di conseguenza, sono stati considerati 2 equivalenti di peptide per ricavare la quantità di A-AMC da utilizzare per ciascuna condensazione:

$$\text{Peso}_{\text{A-AMC}} = \text{PM}_{\text{A-AMC}} \times 0.0078 \text{ m mol} = 1.9 \text{ mg.}$$

Dopo aver calcolato il numero di moli, è stata preparata la soluzione di HATU-OXIMA Pure-DMAP-DMF (par. 2.2.3.5) per far avvenire la reazione.

È stata preparata una soluzione unica di 20 mL considerando come numero di moli 0.0039 m moli.

- Per l'HATU serve 1 equivalente del peptide → 0.0039 m moli
- Per l'OXIMA PURE 1 equivalente del peptide → 0.0039 m moli
- Per il DMAP 0.1 equivalenti del peptide → 0.00039 m moli
- 20 mL di DMF.

È stato quindi calcolato il peso in grammi, necessario per ogni reagente:

- $\text{PM}_{\text{HATU}} = 380.23 \text{ Da} \rightarrow \text{PESO}_{\text{HATU}} = 0.0039 \cdot 380.23 = 1.5 \text{ mg};$
- $\text{PM}_{\text{OXIMA}} = 142.11 \text{ Da} \rightarrow \text{PESO}_{\text{OXIMA}} = 0.0039 \cdot 142.11 = 0.55 \text{ mg};$
- $\text{PM}_{\text{DMAP}} = 122.17 \text{ Da} \rightarrow \text{PESO}_{\text{DMAP}} = 0.0039 \cdot 122.17 = 0.05 \text{ mg.}$

Le quantità di HATU e OXIMA sono state moltiplicate per 20, ottenendo così i seguenti pesi:

- $\text{PESO}_{\text{HATU}} = 1.5 \cdot 20 = 30 \text{ mg};$
- $\text{PESO}_{\text{OXIMA}} = 0.55 \cdot 20 = 11 \text{ mg.}$

Inoltre, essendo il DMAP liquido, per calcolare la quantità necessaria bisognava eseguire la seguente proporzione:

$$0.1 \text{ M} : 1000 \text{ mL} = 0.00039 \text{ m mol} : x$$

$$\rightarrow x = 4 \mu\text{L di DMAP}$$

Procedimento

1. Sono stati pesati 30 mg di HATU e 11 mg di OXIMA PURE e posti dentro un matraccio da 20 mL.
2. Si è aggiunto poi del DMF per portare a volume di 20 mL. È stato versato del DMF in un baker per evitare contaminazione e poi prelevato con una pipetta.
3. Dentro due palloni diversi sono stati inseriti 1.9 mg di A-AMC ciascuno.
4. In ogni pallone è stato versato anche il peptide da condensare.
5. Successivamente è stato iniettato 1 mL di soluzione HATU-OXIMA-DMF in ciascun pallone.
6. Poi sono stati aggiunti dentro il pallone 4 μL di DMAP usando la micropipetta da 100 P. Il DMAP era l'ultimo reagente da inserire per cominciare la reazione.
7. Ogni pallone è stato lasciato sotto agitazione magnetica O/N.
8. Trascorsa una notte, ogni peptide è stato tirato a secco mediante evaporatore.
9. Successivamente i peptidi sono stati precipitati con etere etilico e posti in due falcon da 15 mL.
10. Infine, l'etere è in eccesso è stato separato dal peptide con una pasteur di vetro e il restante è stato lasciato evaporare sotto cappa, coprendo il contenitore con carta filtro.

Risultati

Al completamento di tutti i passaggi, sono state ottenute due falcon contenenti i quattro peptidi condensati con il peptide A-AMC:

- Ac-DGPYSLVA-AMC;
- Ac-GDGPYSLVA-AMC.

I peptidi Ac-DGPYSLVA-AMC e Ac-GDGPYSLVA-AMC sono risultati molto densi e collosi, ciò è stato dovuto probabilmente alla natura idrofobica delle molecole. Un'altra possibile spiegazione è che il DMF presente nella soluzione di condensazione non sia stato tolto completamente durante l'evaporazione e che i residui rimasti abbiano conferito al peptide una consistenza viscosa. Tuttavia, questo non è stato un problema

per procedere con lo sblocco delle catene laterali e i successivi passaggi di purificazione.

Per lo sblocco delle catene laterali è stato usato il protocollo descritto nel paragrafo 2.2.3.6. È stata preparata la soluzione di 5 mL con:

- 95% v/v TFA (4.75 mL);
- 2.5% v/v TES (0.125 mL);
- 2.5% v/v acqua milli-Q (0.125 mL).

I peptidi ricavati dalla condensazione sono stati travasati in un nuovo reattore per lo sblocco finale. La reazione di sblocco è stata lasciata agire per la durata di un'ora e mezza, al termine della quale sono stati eseguiti tre lavaggi con TFA e i peptidi sbloccati sono stati tirati a secco e successivamente fatti precipitare con etere etilico.

Al termine di tutti i passaggi di acetilazione, condensazione e sblocco, sono stati ottenuti pochi milligrammi di peptidi grezzi che presentavano una consistenza molto viscosa.

3.1.5 CONDENSAZIONE DI AC KHPHLVRQK CON IL PEPTIDE R-AMC

Dopo aver completato lo sblocco dei peptidi dalle rispettive resine, è stata effettuata la condensazione del C terminale dei peptidi Ac RQK, Ac LVRQK, Ac PHLVRQK e Ac KHPHLVRQK con il peptide R-AMC.

Per effettuare la condensazione con il peptide R-AMC è stato necessario calcolare il numero di moli del peptide a cui legarlo. Dallo sblocco delle resine, sono state ottenute le seguenti quantità di peptide:

- 32 mg di Ac-PHLVRQK;
- 36.4 mg di Ac-KHPHLVRQK.

Successivamente è stato calcolato il peso molecolare (PM) di ogni peptide considerando i gruppi delle catene laterali ancora bloccati:

$$\begin{aligned} - \text{PM}_{\text{Ac-PHLVRQK}} &= \text{PM}_{\text{Ac}} + \text{PM}_{\text{Pro}} + \text{PM}_{\text{His(trt)}} + \text{PM}_{\text{Leu}} + \text{PM}_{\text{Val}} + \text{PM}_{\text{Arg(Pbf)}} + \\ &\text{PM}_{\text{Gln(trt)}} + \text{PM}_{\text{Lys(Boc)}} + \text{PM}_{\text{H}_2\text{O}} = \end{aligned}$$

$$= 43.046 + 97.118 + 379.45 + 113.161 + 99.134 + 425.55 + 370.45 + 228.25 + 17 = 1773.2 \text{ Da}$$

$$\begin{aligned} - \text{PM}_{\text{Ac-KHPHLVRQK}} &= \text{PM}_{\text{Ac}} + \text{PM}_{\text{Lys(Boc)}} + \text{PM}_{\text{His(trt)}} + \text{PM}_{\text{Pro}} + \text{PM}_{\text{His(trt)}} + \text{PM}_{\text{Leu}} \\ &+ \text{PM}_{\text{Val}} + \text{PM}_{\text{Arg(Pbf)}} + \text{PM}_{\text{Gln(trt)}} + \text{PM}_{\text{Lys(Boc)}} + \text{PM}_{\text{H}_2\text{O}} = \\ &= 43.046 + 228.25 + 379.45 + 97.118 + 379.45 + 113.161 + \\ &99.134 + 425.55 + 370.45 + 228.25 + 17 = 2380.8 \text{ Da} \end{aligned}$$

Quindi, è stato calcolato il numero di moli per ciascun peptide:

$$\begin{aligned} - \text{n}^\circ \text{ moli di Ac-PHLVRQK} &= \frac{\text{Peso Ac-PHLVRQK}}{\text{PM}_{\text{Ac-PHLVRQK}}} = \frac{0.032 \text{ g}}{1773.2 \text{ Da}} = 0.018 \text{ m moli.} \\ - \text{n}^\circ \text{ moli di Ac-KHPHLVRQK} &= \frac{\text{Peso Ac-KHPHLVRQK}}{\text{PM}_{\text{Ac-KHPHLVRQK}}} = \frac{0.0364 \text{ g}}{2380.8 \text{ Da}} = 0.015 \text{ m} \\ &\text{moli.} \end{aligned}$$

Per calcolare la quantità di R-AMC da utilizzare, bisogna considerare due equivalenti per ciascun peptide:

- 0.036 m moli per Ac-PHLVRQK. Siccome il peso molecolare di R-AMC è 404.27 Da, la quantità necessaria da prelevare di R-AMC era 14.5 mg.
- 0.030 m moli per Ac-KHPHLVRQK. Siccome il peso molecolare di R-AMC è 404.27 Da, la quantità necessaria da prelevare di R-AMC era 12 mg.

Dopo aver calcolato il numero di moli, è stata preparata la soluzione di HATU-OXIMA PURE-DMAP-DMF per la reazione di condensazione.

Siccome il numero di moli dei quattro peptidi era pressoché simile, è stata preparata una soluzione unica di 5 mL considerando il numero di moli del peptide Ac-RQK, quindi 0.024 m moli, che era il numero di moli maggiore.

- Per HATU serviva 1 equivalente del peptide → 0.024 m moli
- Per OXIMA PURE 1 equivalente del peptide → 0.024 m moli
- Per DMAP 0.1 equivalenti del peptide → 0.0024 m moli
- Il tutto portato a volume di 5 mL con DMF.

È stato quindi calcolato il peso in grammi, necessario per ogni reagente:

- $\text{PM}_{\text{HATU}} = 380.23 \text{ Da} \rightarrow \text{PESO}_{\text{HATU}} = 0.024 \cdot 380.23 = 9.1 \text{ mg};$
- $\text{PM}_{\text{OXIMA}} = 142.11 \text{ Da} \rightarrow \text{PESO}_{\text{OXIMA}} = 0.024 \cdot 142.11 = 3.4 \text{ mg};$
- $\text{PM}_{\text{DMAP}} = 122.17 \text{ Da} \rightarrow \text{PESO}_{\text{DMAP}} = 0.0024 \cdot 122.17 = 0.3 \text{ mg}.$

Le quantità di HATU e OXIMA sono state moltiplicate per 5, ottenendo così i seguenti pesi:

- $\text{PESO}_{\text{HATU}} = 9.1 \cdot 5 = 45.5 \text{ mg}$;
- $\text{PESO}_{\text{OXIMA}} = 3.4 \cdot 5 = 17.1 \text{ mg}$.

Inoltre, essendo DMAP liquido, per calcolare la quantità necessaria bisogna eseguire la seguente proporzione:

$$0.2 \text{ M} : 1000 \text{ mL} = 0.0024 \text{ m mol} : x$$

$$\rightarrow x = 24 \text{ }\mu\text{L di DMAP}$$

Procedimento

1. Sono stati pesati 45.5 mg di HATU e 17.1 mg di OXIMA PURE e posti dentro un matraccio da 5 mL.
2. Si è aggiunto poi del DMF per portare a volume di 5 mL. È stato versato del DMF in un baker per evitare contaminazione e poi prelevato con una pipetta.
3. Dentro quattro palloni diversi è stata messa la quantità di R-AMC pesata per i due peptidi, in questo caso 14.5 mg per Ac-PHLVRQK e 12 mg per Ac-KHPHLVRQK.
4. In ogni pallone è stato versato anche tutto il peptide da condensare.
5. Successivamente è stato iniettato 1 mL di soluzione HATU-OXIMA-DMF.
6. Poi sono stati aggiunti dentro il pallone 24 μL di DMAP usando la micropipetta da 100 P.
7. Ogni pallone è stato lasciato sotto agitazione magnetica O/N.
8. Trascorsa una notte, ogni peptide è stato tirato a secco mediante evaporatore.
9. Successivamente i peptidi sono stati precipitati con etere etilico e posti in due falcon da 15 mL.
10. Infine, l'etere in eccesso è stato separato dal peptide che è stato poi lasciato evaporare sotto cappa.

Risultati

Al completamento di tutti i passaggi, sono state ottenute due falcon contenenti i due peptidi condensati con il peptide R-AMC:

- Ac-PHLVRQKR-AMC;
- Ac-KHPHLVRQKR-AMC.

I peptidi sono risultati molto viscosi anche al termine della completa evaporazione dell'etere etilico, in quanto non è stato possibile rimuovere completamente il DMF della reazione di condensazione. Si è proceduto quindi, con lo sblocco finale delle catene laterali dai gruppi protettori.

Per lo sblocco delle catene laterali è stato usato il protocollo descritto nel paragrafo 2.2.3.6. È stata preparata la soluzione di 5 mL con:

- 95% v/v TFA (4.75 mL);
- 2.5% v/v TES (0.125 mL);
- 2.5% v/v acqua milli-Q (0.125 mL).

I peptidi ricavati dalla condensazione sono stati travasati in un nuovo reattore per lo sblocco finale. La reazione di sblocco è stata lasciata agire per la durata di un'ora e mezza, al termine della quale sono stati eseguiti tre lavaggi con TFA e i peptidi sbloccati sono stati tirati a secco e successivamente fatti precipitare con etere etilico.

Al termine di tutti i passaggi di acetilazione, condensazione e sblocco, sono stati ottenuti i seguenti peptidi grezzi:

- 32.5 mg di Ac-PHLVRQKR-AMC;
- 35.5 mg di Ac-KHPHLVRQKR-AMC.

La consistenza di questi peptidi, come quelli della sintesi precedente, era piuttosto viscosa.

3.1.6 CARATTERIZZAZIONE DEI PEPTIDI OTTENUTI

Al termine del completamento di tutti i passaggi di produzione di tutti e quattro i peptidi, sono state eseguite delle cromatografie analitiche dei grezzi per valutare se il prodotto isolato contenesse amminoacido AMC libero. Eventuali altre impurezze derivanti da peptidi troncati o sequenze dirette non sono state ritenute essere un problema per i successivi saggi enzimatici. Infatti, poiché gli estratti dei campioni biologici contenevano proteasi di natura diversa e ignota, la presenza di substrati specifici per un determinato enzima non era strettamente richiesta. Ovviamente, si è voluto comunque proporre un certo grado di specificità offrendo un substrato contenente un cuore peptidico e non un singolo amminoacido. Inoltre, se eventualmente

il peptide sintetizzato non avesse reagito con l'amminoacido AMC non avrebbe influito sul saggio enzimatico perché non visibile alla lunghezza d'onda utilizzata per la lettura. Per questo motivo ciascun grezzo è stato analizzato tramite HPLC per evidenziare la presenza dell'amminoacido AMC.

Per prima cosa i singoli A-AMC e R-AMC sono stati analizzati tramite HPLC per valutare il tempo di ritenzione caratteristico nelle condizioni da utilizzare per le analisi del peptide grezzo. Sono state quindi eseguite due cromatografie analitiche con le seguenti condizioni:

- per l'amminoacido R-AMC:
 - Colonna: Atlantis dC18 (5 μ m, 4.6 x 250 mm);
 - Volume di iniezione: 20 μ L;
 - Flusso: 1 mL/min;
 - Eluente A: 0.05% TFA in acqua milli-Q;
 - Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
 - Gradiente: da 0% a 50% di eluente B in 50 minuti;
 - Lunghezza d'onda del detector: 214 nm per rilevare il legame peptidico e 280 nm per rilevare la presenza del fluoroforo AMC.

- per l'amminoacido A-AMC:
 - Colonna: Atlantis dC18 (5 μ m, 4.6 x 250 mm);
 - Volume di iniezione: 20 μ L;
 - Flusso: 1 mL/min;
 - Eluente A: 0.05% TFA in acqua milli-Q;
 - Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
 - Gradiente: da 5% a 25% di eluente B in 40 minuti;
 - Lunghezza d'onda del detector: 214 nm per rilevare il legame peptidico e 280 nm per rilevare la presenza del fluoroforo AMC.

Dalle cromatografie eseguite si è evidenziata la presenza degli amminoacidi a tempi di ritenzione di 26 minuti per l'amminoacido R-AMC e di 32 per l'amminoacido A-AMC, come riportato in Fig. 3.1.1.

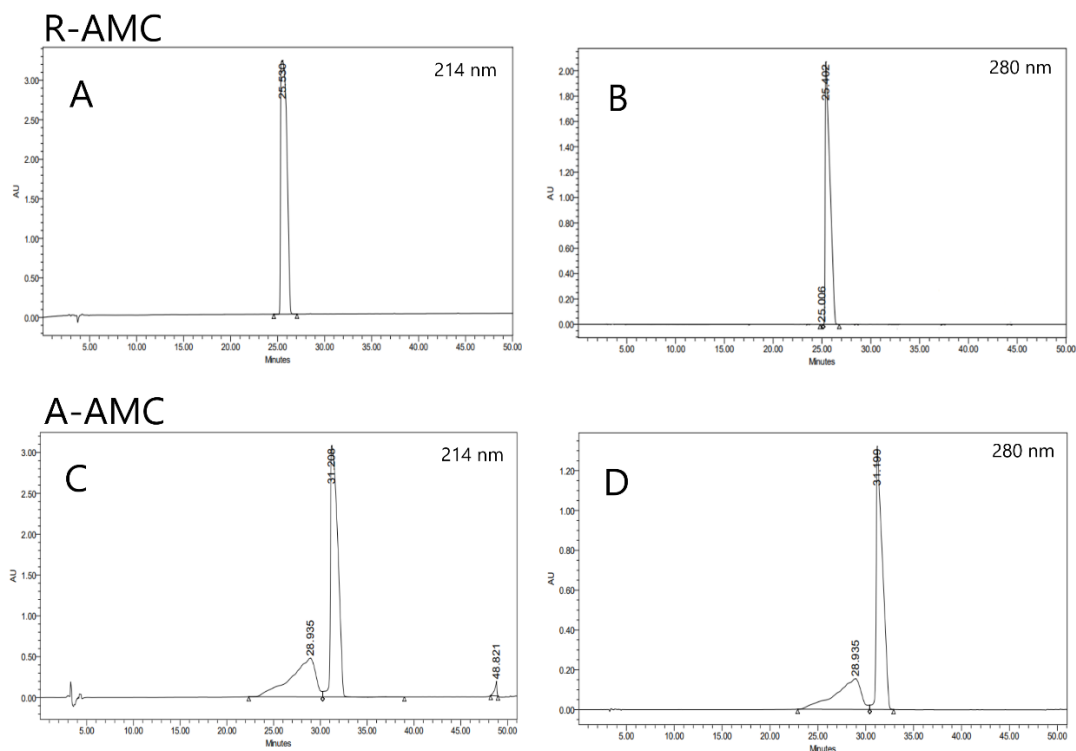


Figura 3.1.1 Cromatogramma dell'amminoacido R-AMC a 214 nm (A) e 280 nm (B) e dell'amminoacido A-AMC a 214 nm (C) e a 280 nm (D) Colonna: Atlantis; volume di iniezione 20 μ L; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0.05% TFA in H₂O milli-Q; eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile; gradiente: da 0% a 50% di eluente B in 50 minuti per l'amminoacido R-AMC e da 5% a 25% di eluente B in 40 minuti per l'amminoacido A-AMC.

Successivamente, sono state eseguite le analisi dei peptidi grezzi sintetizzati, per quantificare la presenza di eventuale A-AMC o R-AMC liberi.

Per le analisi cromatografiche era necessario preparare dei campioni di peptide sciolti in soluzione acquosa. Per ogni 0.1 mg di peptide servivano 100 μ L di acqua milli-Q. Avendo a disposizione piccole quantità di peptide grezzo, per i vari campioni sono stati utilizzati solitamente tra 0.4-0.7 mg per campione. Inoltre, i peptidi Ac-DGPYSLVA-AMC e Ac-GDGPYSLVA-AMC essendo idrofobici, sono stati sciolti in metanolo e in acqua in proporzione 1:1. Le varie soluzioni sono state poi filtrate con filtro PVDF 0.45 μ m, nel caso dei peptidi sciolti in acqua, o con filtro PTFE 0.45 μ m, nel caso dei peptidi sciolti in metanolo.

Per i peptidi Ac-DGPYSLVA-AMC e Ac-GDGPYSLVA-AMC le analisi HPLC sono state eseguite con i seguenti parametri:

- Colonna: Nova-Pak C18 (4 μ m, 60 Å, 3.9 x 300 mm);
- Volume di iniezione: 20 μ L;
- Flusso: 1 mL/min;

- Eluente A: 0.05% TFA in acqua milli-Q;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 5% a 20% di eluente B in 30 minuti;
- Lunghezza d'onda del detector: 214 nm per rilevare il legame peptidico e 280 nm per rilevare la presenza del fluoroforo AMC.

Per i peptidi Ac-PHLVRQKR-AMC e Ac-KHPHLVRQKR-AMC le analisi HPLC sono state eseguite con i seguenti parametri:

- Colonna: Colonna Atlantis dC18 (5 μm, 4.6 x 250 mm);
- Volume di iniezione: 20 μL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in acqua milli-Q;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: da 0% a 30% di eluente B in 30 minuti;
- Lunghezza d'onda del detector: 214 nm per rilevare il legame peptidico e 280 nm per rilevare la presenza del fluoroforo AMC.

Come si nota dalla figura 3.1.2, in tutti i grezzi è presente un picco significativo a tempo di ritenzione compatibile con A-AMC o R-AMC. L'identità dell'amminoacido è stata verificata eseguendo un'analisi di spettrometria di massa sulla frazione relativa al picco, raccolta dopo HPLC (*data non shown*).

Si è reso, quindi, necessario, uno step di purificazione in cui l'amminoacido AMC libero è stato separato dal resto del substrato. A questo scopo, sono state effettuate delle semi-preparative HPLC.

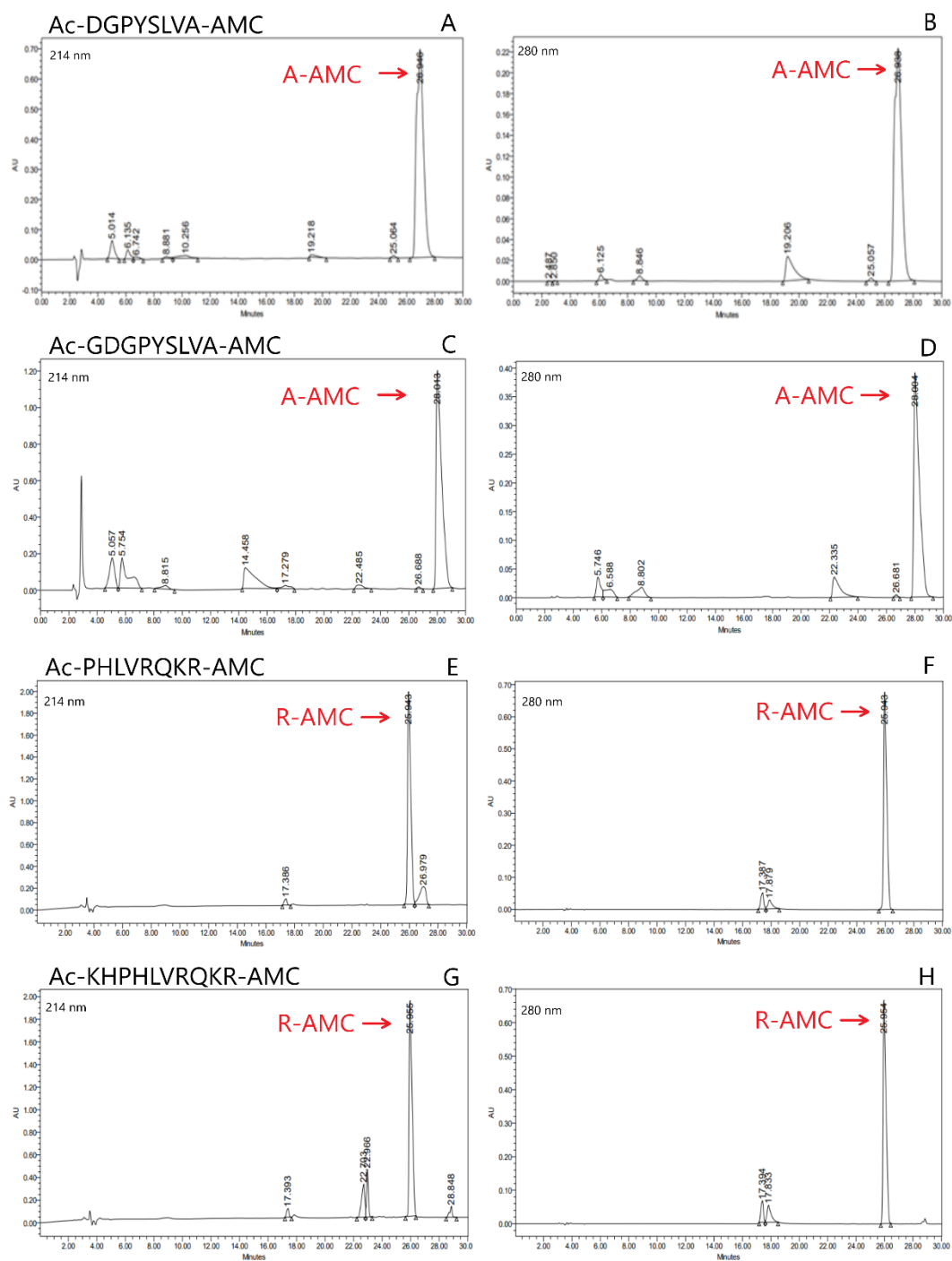


Figura 3.1.2 Cromatografie analitiche dei peptidi Ac-DGPYSLVA-AMC a 214 nm (A) e a 280 nm (B), Ac-GDGPYSLVA-AMC a 214 nm (C) e a 280 nm (D), Ac-PHLVRQKR-AMC a 214 nm (E) e a 280 nm (F) e Ac-KHPHLVRQKR-AMC 214 nm (G) e a 280 nm (H). Per i peptidi Ac-DGPYSLVA-AMC e Ac GDGPYSLVA-AMC sono state utilizzate le seguenti condizioni: Colonna: Nova-Pak; volume di iniezione 20 μ L; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0.05% TFA in H₂O milli-Q; eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile; gradiente: da 5% a 20% di eluente B in 30 minuti. Per i peptidi Ac-PHLVRQKR-AMC e Ac-KHPHLVRQKR-AMC sono state utilizzate le seguenti condizioni: Colonna: Atlantis; volume di iniezione 20 μ L; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0.05% TFA in H₂O milli-Q; eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile; gradiente: da 0% a 30% di eluente B in 30 minuti.

Le analisi HPLC semi-preparative dei peptidi Ac-DGPYSLVA-AMC (Fig. 3.1.3) e Ac-GDGPYSLVA-AMC (Fig. 3.1.4) sono state eseguite con le seguenti condizioni:

- Colonna: Nova-Pak C18 (6 μm , 60 \AA , 7,8 \times 300 mm);
- Flusso: 4 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in acqua milli-Q;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN ;
- Gradiente: da 5% a 20% di eluente B in 30 minuti;
- Lunghezza d'onda del detector: 214 nm;
- Velocità della carta per il cromatogramma: 0.5 cm/min.

Le analisi HPLC semi-preparative dei peptidi Ac-PHLVRQKR-AMC (Fig. 3.1.5) e Ac-KHPHLVRQKR-AMC (Fig. 3.1.6) sono state eseguite con le seguenti condizioni:

- Colonna: Colonna Atlantis dC18 OBD (10 μm , 100 \AA , 10 x 250 mm);
- Flusso: 4 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in acqua milli-Q;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN ;
- Gradiente: da 15% a 30% di eluente B in 45 minuti per il peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC e da 0% a 26% di eluente B in 32 minuti per il peptide Ac-PHLVRQKR-AMC;
- Lunghezza d'onda del detector: 214 nm;
- Velocità della carta per il cromatogramma: 0.5 cm/min.

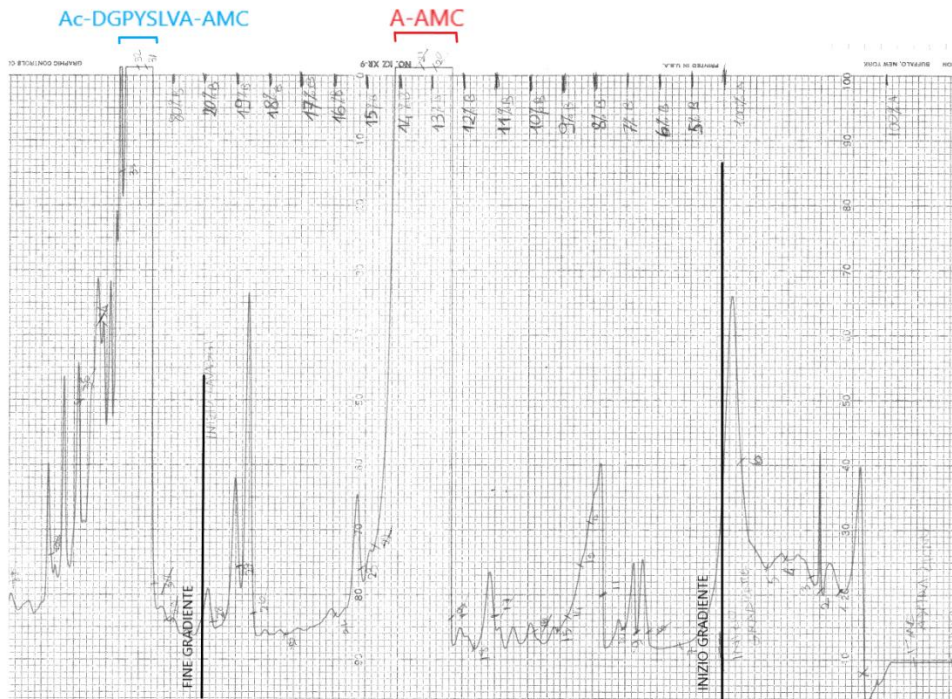


Figura 3.1.3 Cromatogramma della semi-preparativa del peptide Ac-DGPYSLVA-AMC. Colonna: Nova-Pak; flusso: 4 mL/min; eluente A: 0.05% TFA in H₂O milli-Q; eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile; gradiente: da 5% a 20% di eluente B in 30 minuti; $\lambda = 214$ nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

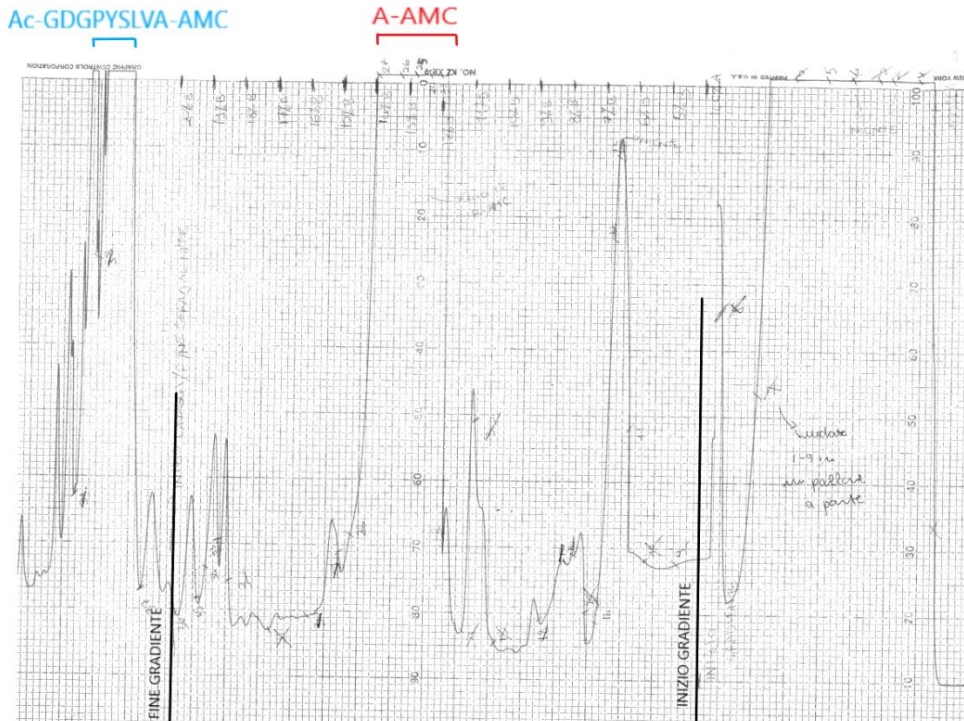


Figura 3.1.4 Cromatogramma della semi-preparativa del peptide Ac-GDGPYSLVA-AMC. Colonna: Nova-Pak; flusso: 4 mL/min; eluente A: 0.05% TFA in H₂O milli-Q; eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile; gradiente: da 5% a 20% di eluente B in 30 minuti; $\lambda = 214$ nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

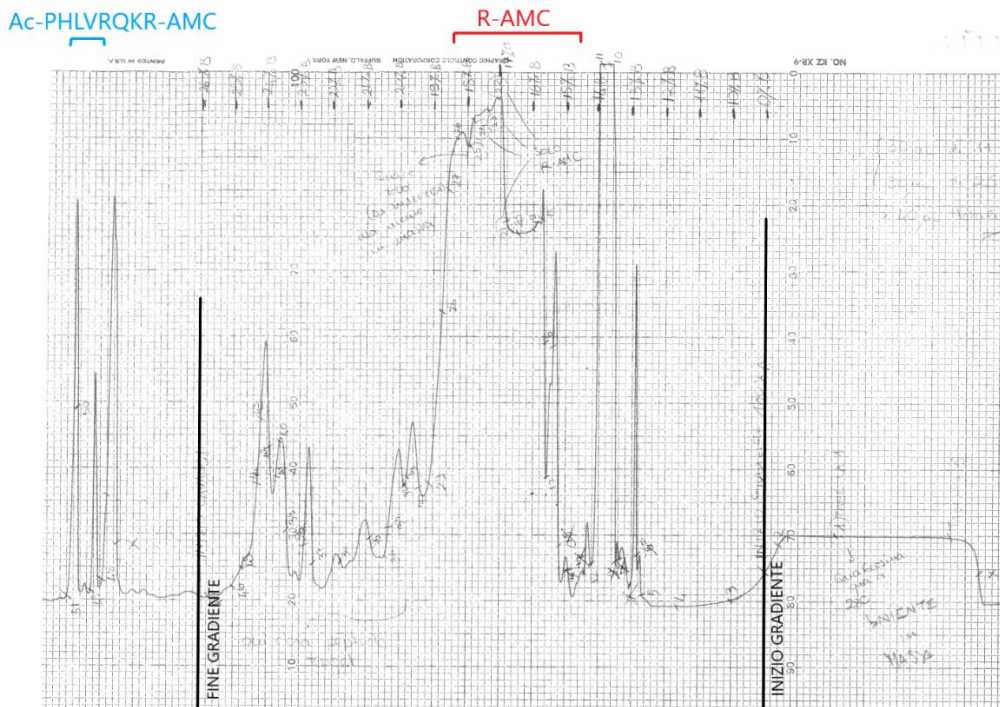


Figura 3.1.5 Cromatogramma della semi-preparativa del peptide Ac-PHLVRQKR-AMC. Colonna: Atlantis; flusso: 4 mL/min; eluente A: 0.05% TFA in H₂O milli-Q; eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile; gradiente: da 0% a 26% di eluente B in 32 minuti; $\lambda = 214$ nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

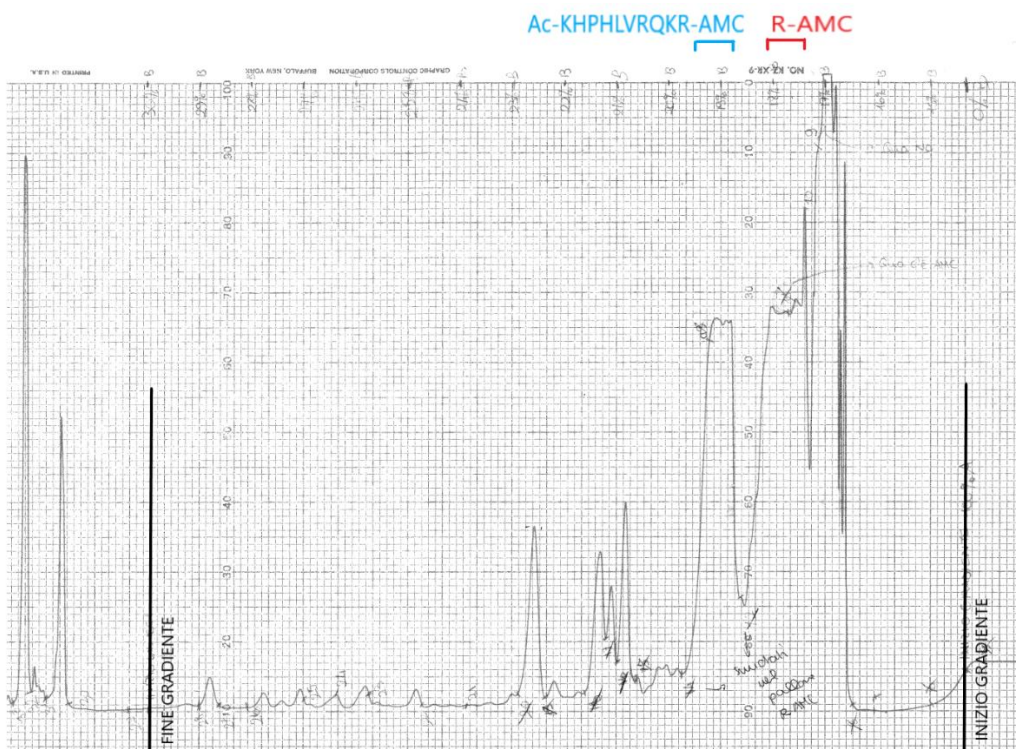


Figura 3.1.6 Cromatogramma della semi-preparativa del peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC. Colonna: Atlantis; flusso: 4 mL/min; eluente A: 0.05% TFA in H₂O milli-Q; eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile; gradiente: da 15% a 30% di eluente B in 45 minuti; $\lambda = 214$ nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

Le frazioni raccolte da semi-preparativa contenenti il probabile peptide target sono state analizzate tramite spettrometria di massa MALDI-TOF (Fig. 3.1.7) e i valori di massa teorica di ciascun peptide sono stati confrontati con quelli rilevati sperimentalmente (Tabella 3.1).

Tabella 3.1

ID	P11	P10	P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	Theoretical mass [Da]	Experimental mass [Da]
Ac-DGPYSLVA-AMC	Ac			D	G	P	Y	S	L	V	A	AMC	1021.1	1018.2
Ac-GDGPYSLVA-AMC	Ac		G	D	G	P	Y	S	L	V	A	AMC	1078.2	1075.3
Ac-PHLVRQKR-AMC	Ac			P	H	L	V	K	Q	K	R	AMC	1234.9	1232.4
Ac-KHPHLVRQKR-AMC	Ac	K	H	P	H	L	V	K	Q	K	R	AMC	1500.3	1497.5

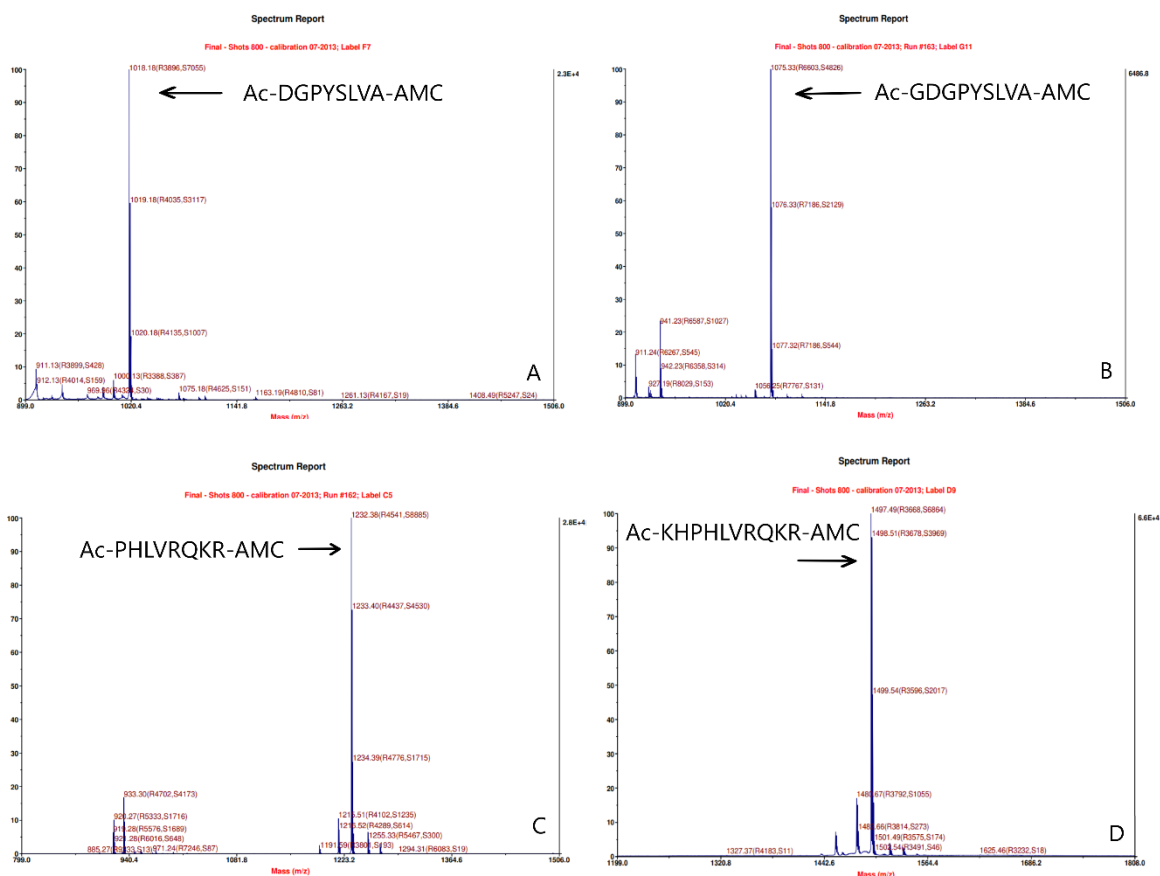


Figura 3.1.7 Spettrometria di massa dei peptidi Ac-DGPYSLVA-AMC (A), Ac-GDGPYSLVA-AMC (B), Ac-PHLVRQKR-AMC (C) e Ac-KHPHLVRQKR-AMC (D).

Dopo aver eseguito l'analisi di massa e aver individuato i peptidi di interesse, le frazioni sono state liofilizzate e sono stati ottenuti i seguenti peptidi:

- 1.58 mg di peptide Ac-DGPYSLVA-AMC;
- 1.74 mg di peptide Ac-GDGPYSLVA-AMC;

- 0.86 mg di peptide Ac-PHLVRQKR-AMC;
- 0.72 mg di peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC.

3.2 PREPARAZIONE DI BUFFER

Per poter valutare la capacità dei campioni biologici di tagliare i substrati scelti, è stato deciso di preparare delle soluzioni tampone a cinque pH diversi, due a pH basico, due pH acido e uno a pH neutro.

- pH 5.5;
- pH 6.5;
- pH 7 o pH 7.5;
- pH 8.3.

Questi pH sono stati scelti secondo le seguenti considerazioni. È noto che gli enzimi, abbiano un loro *pH dependency*, ovvero esista un particolare pH in cui raggiungono la loro massima attività proteolitica. In particolare, per Furina questo pH è tra 6.5-8³⁹, per Cathepsina è tra 4.5-5.5⁷⁷, mentre per Elastasi è tra 8-9⁷⁸. Questi enzimi erano probabilmente presenti in campioni di feci di pazienti affetti da IBD. Per questo motivo, è stato deciso di testare i peptidi sintetizzati utilizzando un ampio spettro di valori di pH al fine di avere la possibilità di massimizzare l'attività proteolitica di enzimi che lavorano a pH differenti.

Procedimento

Il primo buffer è stato prodotto con 250 mM di 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) e 20 mM di Calcio Cloruro (CaCl₂). Per creare questo buffer sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- sono stati pesati 5.97 g di HEPES;
- sono stati aggiunti 75 mL di acqua milli-Q.
- sono stati aggiunti 0.29 g di CaCl₂ alla soluzione che è stata posta sotto agitazione magnetica fino al completo scioglimento dei reagenti;
- sono state aggiunte circa 40 gocce di NaOH 1N con una pasteur di vetro e mediante l'aiuto di un pH-metro è stato raggiunto un pH di 6.5;
- il tutto è stato portato a volume di 100 mL con acqua milli-Q;
- la soluzione è stata filtrata all'interno di una Falcon usando una siringa da 25 mL e un filtro PVDF da 0.45 µm.

È stato ottenuto così un'aliquota di 100 mL con HEPES 250 mM e CaCl₂ 20mM a pH 6.5.

Il secondo buffer è stato prodotto con 250 mM di 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) e 20 mM di Calcio Cloruro (CaCl_2). Per creare questo buffer sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- sono stati pesati 2.98 g di HEPES;
- sono stati aggiunti 25 mL di acqua milli-Q;
- sono stati aggiunti 0.11 g di CaCl_2 alla soluzione che è stata posta sotto agitazione magnetica fino al completo scioglimento dei reagenti;
- sono state aggiunte circa 80 gocce di NaOH 1N con una pasteur di vetro e mediante l'aiuto di un pH-metro è stato raggiunto un pH di 7;
- il tutto è stato portato a volume di 50 mL con acqua milli-Q;
- la soluzione è stata filtrata all'interno di una Falcon usando una siringa da 25 mL e un filtro PVDF da 0.45 μm .

È stato ottenuto così un'aliquota di 50 mL con HEPES 250 mM e CaCl_2 20mM a pH 7.

Il terzo buffer è stato prodotto con 250 mM di tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-HCl) e 20 mM di Calcio Cloruro (CaCl_2). Per creare questo buffer sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- sono stati pesati 1.51 g di Tris-HCl;
- sono stati aggiunti 25 mL di acqua milli-Q;
- sono stati aggiunti 0.11 g di CaCl_2 alla soluzione che è stata posta sotto agitazione magnetica fino al completo scioglimento dei reagenti;
- sono state aggiunte circa 30 gocce di HCl 6N con una pasteur di vetro e mediante l'aiuto di un pH-metro è stato raggiunto un pH di 7.5;
- il tutto è stato portato a volume di 50 mL con acqua milli-Q;
- la soluzione è stata filtrata all'interno di una Falcon usando una siringa da 25 mL e un filtro PVDF da 0.45 μm .

È stato ottenuto così un'aliquota di 50 mL con Tris-HCl 250 mM e CaCl_2 20mM a pH 7.5.

Il quarto buffer è stato prodotto con 250 mM di Sodio Acetato e 20 mM di Calcio Cloruro (CaCl_2). Per creare questo buffer sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- sono stati pesati 1.72 g di Sodio Acetato;
- sono stati aggiunti 25 mL di acqua milli-Q;
- sono stati aggiunti 0.11 g di CaCl_2 alla soluzione che è stata posta sotto agitazione magnetica fino al completo scioglimento dei reagenti;

- sono state aggiunte circa 300 gocce di HCl 0.1M con una pasteur di vetro e mediante l'aiuto di un pH-metro è stato raggiunto un pH di 5.5;
- il tutto è stato portato a volume di 50 mL con acqua milli-Q;
- la soluzione è stata filtrata all'interno di una Falcon usando una siringa da 25 mL e un filtro PVDF da 0.45 μm .

È stato ottenuto così un'aliquota di 50 mL con Sodio Acetato 250 mM e CaCl₂ 20mM a pH 5.5.

Il quinto ed ultimo buffer è stato prodotto con 250 mM di tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-HCl) e 20 mM di Calcio Cloruro (CaCl₂). Per creare questo buffer sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- sono stati pesati 1.51 g di Tris-HCl;
- sono stati aggiunti 25 mL di acqua milli-Q;
- sono stati aggiunti 0.11 g di CaCl₂ alla soluzione che è stata posta sotto agitazione magnetica fino al completo scioglimento dei reagenti;
- la soluzione era molto basica (pH 11.1) per cui sono state aggiunte circa 800 gocce di HCl 0.1M e 80 gocce di HCl 1N con una pasteur di vetro e mediante l'aiuto di un pH-metro per raggiungere un pH di 8.3;
- il tutto è stato portato a volume di 50 mL con acqua milli-Q;
- la soluzione è stata filtrata all'interno di una Falcon usando una siringa da 25 mL e un filtro PVDF da 0.45 μm .

È stato ottenuto così un'aliquota di 50 mL con Tris-HCl 250 mM e CaCl₂ 20mM a pH 8.3.

Risultati

In conclusione, sono stati ottenuti i seguenti 5 buffer:

- Sodio Acetato 250 mM e CaCl₂ 20 mM a pH 5.5;
- HEPES 250 mM e CaCl₂ 20mM a pH 6.5;
- HEPES 250 mM e CaCl₂ 20mM a pH 7.0;
- Tris-HCl 250 mM e CaCl₂ 20 mM a pH 7.5;
- Tris-HCl 250 mM e CaCl₂ 20 mM a pH 8.3.

3.3 PRODUZIONE DI FURINA

Introduzione

La trasfezione è un processo di introduzione di materiale genetico all'interno di cellule eucarioti. Questa procedura viene spesso utilizzata per la produzione di un qualsiasi tipo di proteina da parte di una coltura cellulare attraverso l'utilizzo di plasmidi. I plasmidi sono sequenze di DNA circolare e possiedono un tipo di conformazione chimicamente più stabile e più difficile da degradare da parte delle esonucleasi o delle endonucleasi.

È stata effettuata una trasfezione utilizzando una coltura cellulare (60mL) di cellule HEK-293 e il plasmide che codifica per la proteina Furina.

L'obiettivo di questo esperimento era trasfettare le cellule immortalizzate per ottenere una produzione di furina, da utilizzare successivamente per la validazione con il suo substrato canonico (Pyr RTKR-AMC).

Per fare ciò è stato necessario l'utilizzo di un agente trasfettante, ovvero una molecola che legandosi al DNA, ne permettesse il passaggio attraverso la membrana cellulare. In questo caso, è stata utilizzata la polietilenimina (PEI), un polimero ad alta carica cationica che forma degli agglomerati in grado di inglobare il DNA. La carica e la dimensione di questi agglomerati sono tali da permetterne l'assorbimento da parte della cellula per pinocitosi, ovvero con la formazione di una vescicola sulla membrana cellulare che ingloba la molecola e la rilascia nel citoplasma. Una volta all'interno della cellula, la vescicola viene rotta e il materiale genetico viene rilasciato nel nucleo, trasdotto e infine degradato (Fig. 3.3.1).

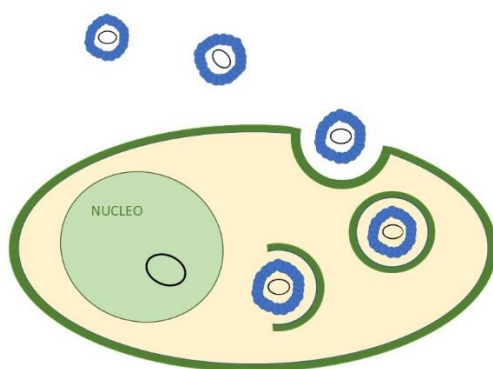


Figura 3.3.1 Schema esemplificativo del meccanismo di trasfezione. Il plasmide (cerchio nero), assemblato alle particelle di PEI (in blu) viene inglobato nella cellula e rilasciato nel nucleo, dove verrà trascritto e trasdotto.

Procedimento

Per la trasfezione è necessaria una concentrazione minima di cellule di 1×10^6 cellule/mL, quindi per prima cosa è stato valutato il numero di cellule presenti in 1 mL di coltura per

verificarne la vitalità. Dalla conta delle cellule è risultata una concentrazione di 1.3×10^6 cellule/mL con una vitalità del 63.6%. La bassa vitalità è dovuta al fatto che le cellule avevano subito una procedura di *split* da appena un giorno, quindi erano ancora in fase di assestamento. Appurato che il numero di cellule fosse sufficiente, è cominciata la procedura per la trasfezione.

1. Il primo passo è stato diluire DNA e PEI in un medium di base, in questo caso è stato utilizzato l'opti-MEM. Per ogni litro di coltura servono 40mL di opti-MEM; noi avevamo 60 mL di coltura, di conseguenza, sono stati prelevati 2.4 mL di medium e divisi in due eppendorf da 1.2 mL di opti-MEM ciascuna.
2. Poi è stato calcolato il volume di DNA e di PEI necessari per 60 μ g di coltura:
 - Per quanto riguarda il DNA, è stato necessario 1 μ g di DNA per ogni mL di coltura. Il DNA utilizzato aveva concentrazione di 7.7 μ g/mL, di conseguenza il volume di DNA da aggiungere alla soluzione di opti-MEM è stato ricavato attraverso il seguente rapporto $\frac{60\mu\text{g}}{7.7\mu\text{g/mL}} = 7.8 \text{ mL}$;
 - Per quanto riguarda il PEI, sono stati necessari 2 μ g di PEI per ogni mL di coltura. Il PEI aveva concentrazione di 1 μ g/mL, di conseguenza il volume di PEI da aggiungere alla soluzione di opti-MEM era:
$$\frac{2\mu\text{g} \cdot 60 \mu\text{g}}{1 \mu\text{g/mL}} = 120 \text{ mL}.$$
3. In un eppendorf è stato aggiunto il DNA e nell'altra il PEI per un tempo di reazione di 15 minuti.
4. In seguito, il PEI è stato unito al DNA e lasciato reagire per ulteriori 15 minuti affinché le due sostanze si unissero tra loro formando gli agglomerati.
5. Infine, con una pipettatrice automatica la soluzione è stata prelevata e aggiunta ai 60mL di coltura cellulare. Il tutto è stato posto in incubatore sotto agitazione a 37 °C e 8% di CO₂ per tre giorni.

Risultati

Dopo tre giorni in incubatore, era avvenuta la produzione di furina. Quindi, il medium contenente l'enzima è stato separato dalle cellule, aliquotato e stoccato a -80 °C.

3.4 SAGGI ENZIMATICI *IN VITRO*

3.4.1 CARATTERIZZAZIONE E VALIDAZIONE DEL SUBSTRATO PER FURINA

In questo esperimento lo scopo era validare Pyr RTKR-AMC come substrato per Furina. Pyr RTKR-AMC è considerato il substrato di riferimento per questo enzima. Infatti, tra i vari enzimi secreti nei tratti GI era possibile la presenza di Furina che si voleva tracciare nei campioni biologici.

Nonostante il pH ottimale per Furina sia attorno a 7, sono state valutate quattro condizioni di pH diverse per coprire tutto il range utilizzato per le analisi dei campioni biologici. In questo modo si voleva validare l'utilizzo di Pyr RTKR-AMC a pH 5.5, 6.5, 7 e 8.3.

Come controllo negativo, è stato utilizzato il surnatante da cellule HEK-293 non trasfettate. Inoltre, per validare ulteriormente il sistema l'attività di Furina su Pyr RTKR-AMC è stata inibita da EDTA al 10%, noto inibitore di Furina. L'EDTA è un agente chelante che intrappola gli ioni Ca^{2+} che Furina necessita per essere attiva. Aggiungendo EDTA quindi, si blocca l'attività enzimatica.

Il seguente esperimento è stato preparato seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 2.2.3.11.

In dettaglio: la concentrazione finale di substrato utilizzata nel pozzetto era 0.1 μM . Partendo da una soluzione madre 100 mM, sono state effettuate diluizioni intermedie per ottenere una soluzione finale di lavoro 1 μM da cui prelevare 10 μL da inserire in ogni pozzetto.

Quindi, sono state effettuate tre diluizioni a partire dalla soluzione madre eseguendo i seguenti passaggi:

- $1 : 100 = x : 200 \mu\text{L} \rightarrow x = 2 \mu\text{L}$ (quantità di soluzione madre a 100 mM da prelevare per avere una soluzione figlia con concentrazione di 1 mM in un volume di 200 μL);
- $1 : 100 = x : 100 \mu\text{L} \rightarrow x = 1 \mu\text{L}$ (quantità di soluzione figlia a 1 mM da prelevare per avere una soluzione figlia con concentrazione di 10 μM in un volume di 100 μL);
- $1 : 10 = x : 500 \mu\text{L} \rightarrow x = 50 \mu\text{L}$ (quantità di soluzione figlia a 10 μM da prelevare per avere una soluzione figlia con concentrazione di 1 μM in un volume di 500 μL).

Di seguito è riportata la tabella riassuntiva delle quantità di substrato e di acqua utilizzate (Tab. 3.2).

Tabella 3.2

	Madre / Figlia (μL)	H ₂ O (μL)	Concentrazione stock	Concentrazione finale (μM)
Soluzione Madre (M)	-	-	100 mM	-
Figlia 1 (F1)	2 (M)	198	1 mM	-
Figlia 2 (F2)	1 (F1)	199	0.01 mM	-
Figlia 3 (F3)	50 (F2)	450	1 μM	0.1

Sono stati preparati, quindi, 16 *master mix* totali per le varie condizioni enzimatiche e di pH, contenenti buffer, acqua o enzima/controllo. In Tabella 3.3 sono riportate le quantità utilizzate per la preparazione di ciascuna condizione. Le quantità necessarie sono state calcolate per 48 pozzetti per ogni *master mix*.

Tabella 3.3

	pH 5.5	pH 6.5	pH 7	pH 8.3
Furina	- 50 μL di Furina; - 50 μL di buffer pH 5.5; - 350 μL di H ₂ O.	- 50 μL di Furina; - 50 μL di buffer pH 6.5; - 350 μL di H ₂ O.	- 50 μL di Furina; - 50 μL di buffer pH 7; - 350 μL di H ₂ O.	- 50 μL di Furina; - 50 μL di buffer pH 8.3; - 350 μL di H ₂ O.
Surnatante	- 50 μL di surnatante; - 50 μL di buffer pH 5.5; - 350 μL di H ₂ O.	- 50 μL di surnatante; - 50 μL di buffer pH 6.5; - 350 μL di H ₂ O.	- 50 μL di surnatante; - 50 μL di buffer pH 7; - 350 μL di H ₂ O.	- 50 μL di surnatante; - 50 μL di buffer pH 8.3; - 350 μL di H ₂ O.
Furina + EDTA	- 50 μL di Furina; - 50 μL di buffer pH 5.5; - 10 μL di EDTA; - 340 μL di H ₂ O.	- 50 μL di Furina; - 50 μL di buffer pH 6.5; - 10 μL di EDTA; - 340 μL di H ₂ O.	- 50 μL di Furina; - 50 μL di buffer pH 7; - 10 μL di EDTA; - 340 μL di H ₂ O.	- 50 μL di Furina; - 50 μL di buffer pH 8.3; - 10 μL di EDTA; - 340 μL di H ₂ O.
Buffer	- 50 μL di buffer pH 5.5; - 400 μL di H ₂ O.	- 50 μL di buffer pH 6.5; - 400 μL di H ₂ O.	- 50 μL di buffer pH 7; - 400 μL di H ₂ O.	- 50 μL di buffer pH 8.3; - 400 μL di H ₂ O.

La piastra è stata organizzata come riportato in Fig. 3.4.1. In riga A sono stati inseriti tutti i campioni con Furina ai 4 pH in triplicato. In riga B sono stati inseriti tutti i campioni con Surnatante ai 4 pH in triplicato. In riga C sono stati inseriti tutti i campioni

con Furina e EDTA ai 4 pH in triplicato. In riga D sono stati inseriti tutti i campioni di controllo con i buffer ai 4 pH in triplicato.

Per questo esperimento è stata utilizzata una piastra Costar 96 *Well Half Area, Flat Bottom, Black Polystyrene*, non trattata.

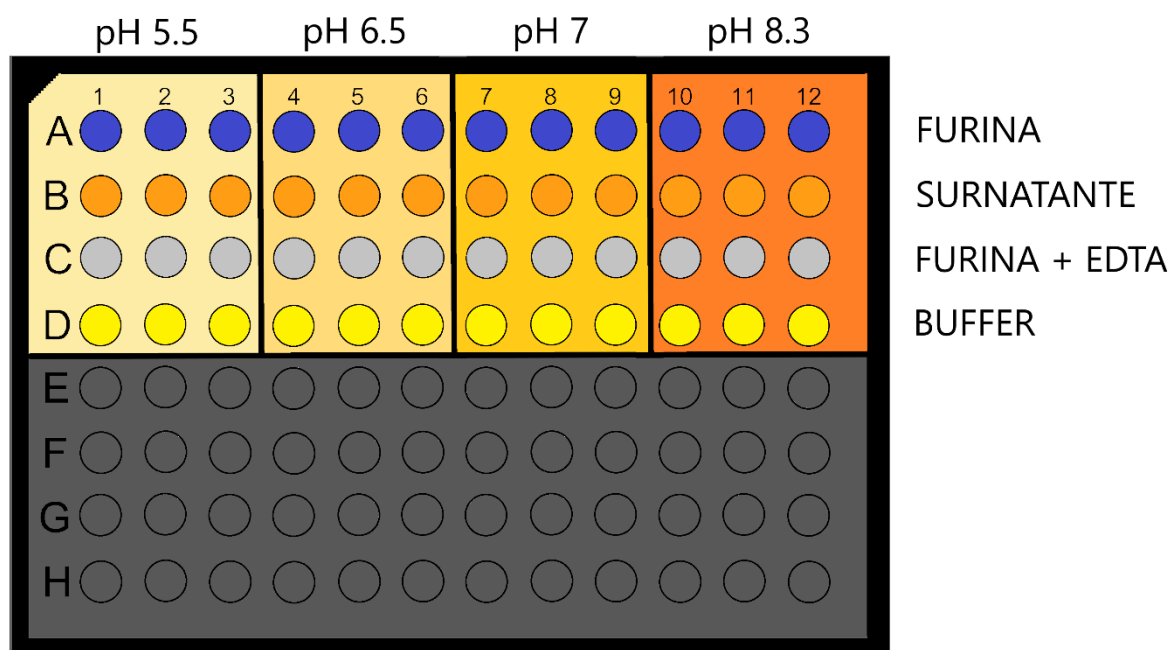


Figura 3.4.1 Organizzazione della piastra per il test di validazione del substrato per Furina.

Procedimento

1. Per prima cosa sono state preparate le soluzioni figlie del substrato Pyr RTKR-AMC in 3 eppendorf da 2 mL.
2. Successivamente sono stati preparati i 16 *master mix* come descritto sopra.
3. Con una pipetta automatica P20 sono stati spottati 10 μ L di substrato in ciascun pozzetto.
4. Successivamente con una pipetta automatica P100 sono stati spottati 90 μ L di *master mix* in ciascun pozzetto, con lo stesso schema riportato in figura sopra.
5. Sono state effettuate delle misure di fluorescenza ogni 5 minuti per la durata di 2 ore, utilizzando il lettore per micropiastre, settato con i seguenti parametri:
 - Modalità di lettura: Fluorescenza
 - Lunghezza d'onda di emissione: 360 nm;
 - Lunghezza d'onda di eccitazione: 465 nm;
 - Gain: 100;
 - Numero di flash per lettura: 5.

- Temperatura dello strumento: 29.5 °C

Risultati

Dai dati raccontati è stata verificato che il substrato Pyr RTKR-AMC venisse tagliato dall'enzima Furina a tutti i pH testati. Infatti, come di può notare in Fig. 3.4.2 c'è un progressivo aumento di fluorescenza nei soli campioni con Furina. Il controllo negativo (Surnatante da cellule HEK-293 non trasfettate) era privo di attività enzimatica nelle stesse condizioni. Inoltre, nel controllo positivo (Furina + EDTA) l'attività enzimatica di Furina era effettivamente inibita. A pH 6.5 si può notare uno sfarfallio dei dati dovuto probabilmente a delle bolle d'aria presenti nei pozzetti che possono aver falsato la lettura del detector, problematica che si riscontra spesso con i saggi di fluorescenza.

In accordo con i dati sperimentali riportati in letteratura, è stato riprodotto il pH ottimale di Furina. Infatti, l'attività enzimatica risulta essere accentuata a pH 7 e 8.3, mentre a pH acidi risulta minore.

Si può notare, inoltre, che nei primi 10 minuti (*lag time*) nei campioni con solo Furina, non c'è stata attività enzimatica. Questo è dovuto al tempo di attivazione che l'enzima richiede.

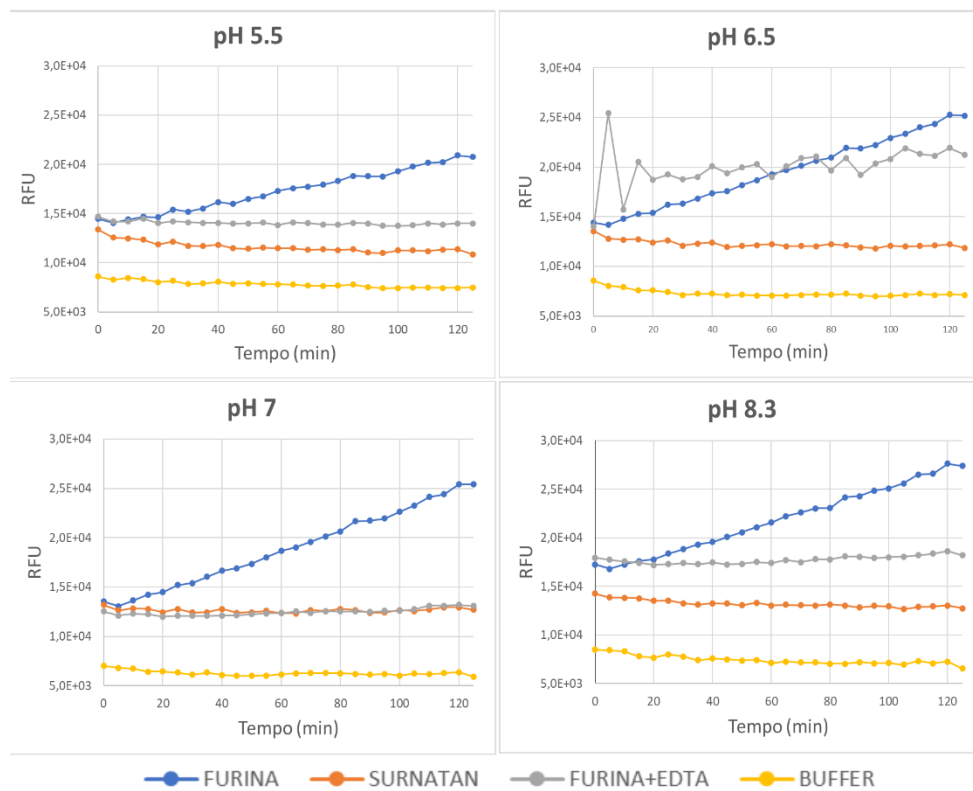


Figura 3.4.2 Risultati dei test di fluorescenza a pH 5.5, pH 6.5, pH 7 e pH 8.3.

3.4.2 CARATTERIZZAZIONE E VALIDAZIONE DEL SUBSTRATO PER ELASTASI

Lo scopo dell'esperimento era verificare che il substrato N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-Nitroanilide venisse tagliato dall'enzima Elastasi nelle condizioni utilizzate per questa tesi. Validare questo test era importante per supportare eventuali dati ottenuti dalla digestione del medesimo substrato con campioni biologici. Sia N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-Nitroanilide che Elastasi, in questo caso, sono stati acquistati.

Per l'esperimento è stato usato uno stock da 10 mg di substrato N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-Nitroanilide. Il peptide è stato diluito in 1128 μL di dimetil-solfossido (DMSO) per ottenere una soluzione madre di peptide con concentrazione 15 mM, seguendo le istruzioni dell'azienda produttrice.

L'enzima Elastasi era presente con una quantità di 50 UG, che è stata sciolta in 1.5 mL di buffer CaCl_2 20 mM, Tris-HCl 250 mM e 0.3 g di NaCl a pH 7.5, seguendo le istruzioni dell'azienda produttrice.

L'ottimizzazione del protocollo adattato alla strumentazione disponibile e alle condizioni volute ha richiesto la valutazione a 4 concentrazioni finali diverse di substrato:

- 50 μM in un volume di 100 μL ;
- 10 μM in un volume di 100 μL ;
- 1 μM in un volume di 100 μL ;
- 0.1 μM in un volume di 100 μL .

Il seguente esperimento è stato preparato seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 2.2.3.11.

Tenendo conto che in ogni pozzetto il volume finale era di 100 μL e che di questi solo 5 μL erano occupati dalla soluzione di substrato, sono state create 4 soluzioni figlie, con le seguenti concentrazioni:

- 1 mM in 150 μL ;
- 200 μM in 150 μL ;
- 20 μM in 150 μL ;
- 2 μM in 150 μL .

Per ottenere queste aliquote sono state effettuate diverse diluizioni a partire dalla soluzione madre. In particolare, per ottenere gli stock da 1 mM, 200 μ M, 20 μ M e 2 μ M, sono state eseguite le seguenti diluizioni:

- $1 : 15 = x : 150 \mu\text{L} \rightarrow x = 10 \mu\text{L}$ (quantità di soluzione madre a 15 mM da prelevare per avere una soluzione figlia con concentrazione di 1 mM in un volume di 150 μ L);
- $1 : 5 = x : 150 \mu\text{L} \rightarrow x = 30 \mu\text{L}$ (quantità di soluzione figlia a 1 mM da prelevare per avere una soluzione figlia con concentrazione di 200 μ M in un volume di 150 μ L);
- $1 : 10 = x : 150 \mu\text{L} \rightarrow x = 15 \mu\text{L}$ (quantità di soluzione figlia a 200 μ M da prelevare per avere una soluzione figlia con concentrazione di 20 μ M in un volume di 150 μ L);
- $1 : 100 = x : 150 \mu\text{L} \rightarrow x = 1.5 \mu\text{L}$ (quantità di soluzione figlia a 200 μ M da prelevare per avere una soluzione figlia con concentrazione di 2 μ M in un volume di 150 μ L).

Di seguito è riportata la tabella riassuntiva delle quantità di substrato e di DMSO utilizzate per ottenere le concentrazioni negli stock e le concentrazioni finali nei pozzetti (Tab. 3.4).

Tabella 3.4

	Madre / Figlia (μ L)	DMSO (μ L)	Concentrazione stock (μ M)	Concentrazione finale (μ M)
Soluzione Madre (M)	-	1128	15000	-
Figlia 1 (F1)	10 (M)	140	1000	50
Figlia 2 (F2)	30 (F1)	120	200	10
Figlia 3 (F3)	15 (F2)	135	20	1
Figlia 4 (F4)	1.5 (F3)	148.5	2	0.1

Infine, sono stati preparati i *master mix* in cui diluire l'enzima Elastasi. Le proporzioni dei vari reagenti in un singolo pozzetto da 100 μ L erano le seguenti:

- 10 μ L di enzima, in questo caso elastasi;
- 10 μ L di buffer (a pH 5.5, 6.5, 7.5 o 8.3);

- 75 μL di acqua milli-Q.

Sono stati preparati 4 *master mix* a 4 pH diversi, valutando che per ogni pH erano necessari almeno 2280 μL di *master mix* (quantitativo per 24 pozzetti) che sono stati arrotondati a 2850 (quantitativo per coprire 30 pozzetti). Di conseguenza, ogni *master mix* è stato preparato con le seguenti quantità:

- *Master mix* a pH 5.5:
 - o 300 μL di enzima elastasi;
 - o 300 μL di buffer a pH 5.5;
 - o 2250 μL di acqua milli-Q.
- *Master mix* a pH 6.5:
 - o 300 μL di enzima elastasi;
 - o 300 μL di buffer a pH 6.5;
 - o 2250 μL di acqua milli-Q.
- *Master mix* a pH 7.5:
 - o 300 μL di enzima elastasi;
 - o 300 μL di buffer a pH 7.5;
 - o 2250 μL di acqua milli-Q.
- *Master mix* a pH 8.3:
 - o 300 μL di enzima elastasi;
 - o 300 μL di buffer a pH 8.3;
 - o 2250 μL di acqua milli-Q.

In conclusione, la piastra ottenuta è stata suddivisa come riportato in Fig. 3.4.3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	substrato + Elastasi Elastasi
B	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
D	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
E	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	substrato Elastasi
F	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
H	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
	pH 5.5			pH 6.5			pH 7.5			pH 8.3			

Fig. 3.4.3 In azzurro sono segnati i pozzetti contenenti solo il controllo con substrato e *master mix* senza enzima. In bianco e in grigio invece sono segnati i pozzetti contenenti il *master mix* con il substrato e l'enzima.

Per questo esperimento è stata utilizzata una piastra Corning 96 *Well Full Area, Flat Bottom, Transparent Polystyrol*, non trattata.

Procedimento

1. Per prima cosa sono state preparate la soluzione madre e le soluzioni figlie del substrato N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-Nitroanilide
2. Successivamente sono stati preparati i 4 *master mix* come descritto sopra.
3. Con una pipettrici automatica P10 sono stati spottati 5 μL di substrato a ciascuna concentrazione, in ogni pozzetto, seguendo lo schema riportato.
4. Successivamente con una pipettrici automatica P100 sono stati spottati 95 μL di *master mix* ai 4 pH in ciascun pozzetto.
5. Sono state eseguite 4 letture ogni 20 minuti per un arco di tempo di un'ora utilizzando il lettore per micropiastre impostato con i seguenti parametri:
 - Modalità di lettura: Assorbanza
 - Lunghezza d'onda: 410 nm;
 - Numero di flash per lettura: 25.
 - Temperatura dello strumento: 25.6 °C
6. Dopo 10 minuti di lettura sono stati inseriti 10 μL di enzima Elastasi e 1 μL di inibitore per Catepsina nei pozzetti delle righe E-H e delle colonne 7-9 comprese.

Risultati

I dati raccolti hanno dimostrato che il substrato N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-Nitroanilide viene attivato dall'enzima Elastasi nelle condizioni testate. La concentrazione dove si osserva maggiore attività enzimatica è quella 50 μM . Nel grafico in figura 3.4.4 sono riportati i valori dei delta per ogni concentrazione. I delta sono stati calcolati sottraendo al valore di RFU misurato al tempo finale (T_{finale}) di ciascuna concentrazione il corrispettivo valore di RFU misurato al tempo iniziale (T_{iniziale}). Questa operazione è stata eseguita per ogni pH.

Quindi, nei saggi con i campioni biologici è stata utilizzata una concentrazione pari a 50 μM di N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-Nitroanilide. In modo analogo, è stato utilizzato lo stesso setting anche per il substrato per Catepsina, Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-Nitroanilide che richiede una lettura UV.

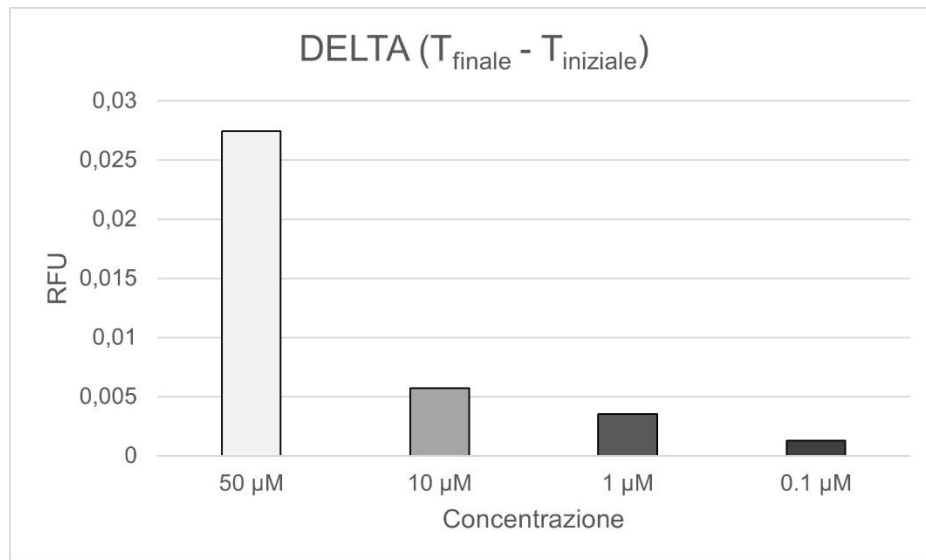


Figura 3.4.4 Nel grafico sono riportati i valori dei delta per le quattro condizioni di concentrazione.

3.4.3 SETTAGGIO DEI TEST CON CAMPIONI BIOLOGICI

Una volta effettuate le validazioni degli enzimi, sono stati eseguiti due test di settaggio:

- Un test per il settaggio del background dei substrati. Lo scopo era settare lo strumento di lettura per avere i valori di fluorescenza minori possibili con il solo substrato non tagliato nel pozzetto. Questo test è stato fatto individuare anche quale fosse la concentrazione ottimale di substrato da utilizzare sia nel settaggio dei campioni biologici, sia nel test finale vero e proprio.
- Un test per il settaggio della concentrazione ottimale di estratto. Lo scopo di questo test era individuare la migliore concentrazione di estratto da utilizzare nel test finale per avere dei valori di fluorescenza che rimanessero all'interno del range rilevabile dalla sensibilità dello strumento.

Settaggio del background con i substrati sintetizzati

Per questo test sono state preparate delle soluzioni figlie per ogni substrato disponibile.

In particolare, i substrati utilizzati sono i seguenti:

- Substrati sintetizzati:
 - Ac-DGPYSLVA-AMC (Cont-1);
 - Ac-GDGPYSLVA-AMC (Cont-2);
 - Ac-PHLVRQKR-AMC (Desm-1);
 - Ac-KHPHLVRQKR-AMC (Desm-2);

- Substrati sintetizzati da Alessandro Senter:
 - Ac-LVVQ-AMC (Prot-1);
 - Ac-GQII-AMC (Desm-A);
 - Ac-SKGQII-AMC (Desm-B);
 - Ac-RSSKGQII-AMC (Desm-C);
 - Ac-MDRSSKGQII-AMC (Desm-D);
- Substrati commercialmente disponibili:
 - Pyr RTKR-AMC (Pyr);
 - N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-Nitroanilide (Elas-Sub);
 - Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-Nitroanilide (Cate-Sub).

Elas-Sub e Cate-Sub sono stati testati separatamente, in quanto erano substrati adatti a una lettura in assorbanza. Tutti gli altri peptidi sono stati letti in fluorescenza. Per cui a seconda della modalità di lettura, sono stati individuati dei parametri differenti per il settaggio dello strumento.

Ogni peptide è stato sciolto in acqua milli-Q, nel caso di Pyr, Desm-1 e Desm-2 e in DMSO, nel caso di tutti gli altri. Sono state ottenute delle soluzioni madri da 10 mM ciascuna, tranne nel caso di Desm-1 e Desm-2 che era a concentrazione 1 mM.

Per ognuno dei substrati sono state preparate due soluzioni figlie rispettivamente a concentrazione 2 μM e 0.2 μM nel caso dei substrati sciolti in acqua, e 1 μM e 0.1 μM nel caso dei substrati sciolti in DMSO. La differenza di concentrazione è dovuta alla necessità di prelevare solo 5 μL di substrato nel caso dei substrati sciolti in DMSO e invece, 10 μL nel caso di substrati sciolti in acqua. In entrambi i casi, la concentrazione finale di substrato nel pozzetto doveva essere rispettivamente di 0.1 μM e 0.01 μM .

Come per tutti gli altri test eseguiti, in ogni pozzetto sono stati considerati 100 μL di soluzione così suddivisi:

- 10 μL (o 5 μL) di substrato a 0.1 μM o 0.01 μM ;
- 90 μL di acqua milli-Q (o 95 μL);

Ogni condizione di concentrazione di substrato è stata preparata in duplicato. Per fare ciò è stata preparata una piastra, organizzata come segue:

- Ogni substrato è stato testato a due concentrazioni, 0.1 μM e 0.01 μM ;
- In ogni pozzetto, su 100 μL totali di volume, 10 μL (o 5 μL) sono stati occupati dal substrato, i restanti 90 μL (o 95 μL) sono stati riempiti con acqua milli-Q.

Oltre ai substrati testati in duplicato e a differenti concentrazioni, come controllo negativo sono stati preparati quattro pozzetti con 100 μ L di acqua milli-Q e quattro pozzetti con 10% di buffer a pH 7.5 in acqua milli-Q, per avere un riferimento sulla sensibilità di base dello strumento.

La piastra è stata organizzata come riportato in Fig. 3.4.5. Per questo esperimento è stata utilizzata una piastra Costar 96 *Well Half Area, Flat Bottom, Black Polystyrene*, non trattata. La piastra è stata poi coperta con un foil di plastica per riprodurre le stesse condizioni che si avrebbero avuto nel test finale.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cont-1 0.1 μ M		Cont-2 0.1 μ M		Desm-1 0.1 μ M		Desm-2 0.1 μ M		Pyr 0.1 μ M		Prot-1 0.1 μ M	
B	Cont-2 0.01 μ M		Cont-2 0.01 μ M		Desm-2 0.01 μ M		Desm-2 0.01 μ M		Pyr 0.01 μ M		Prot-1 0.01 μ M	
C	Desm-A 0.1 μ M		Desm-B 0.1 μ M		Desm-C 0.1 μ M		Desm-D 0.1 μ M		ACQUA		10% B. 7.5 IN ACQUA	
D	Desm-A 0.01 μ M		Desm-B 0.01 μ M		Desm-C 0.01 μ M		Desm-D 0.01 μ M					
E	VUOTO		VUOTO		VUOTO		VUOTO		VUOTO		VUOTO	

Figura 3.4.5 Organizzazione della piastra per il settaggio della concentrazione ottimale di substrato da utilizzare.

Risultati

Per quanto riguarda i parametri dello strumento, il migliore gain era a 60, e il numero di flash 5. È stato quindi, deciso di mantenere questi parametri anche per i successivi test.

Da questo test preliminare sono state tratte le seguenti conclusioni. Tra le concentrazioni testate la migliore è risultata 0.1 μ M, in quanto i valori di fluorescenza erano rilevabili in misura significativamente maggiore rispetto al controllo con solo acqua o al controllo con buffer. In Tab. 3.5 sono riportati i valori medi di fluorescenza registrati per ogni substrato a ciascuna concentrazione. In particolare, per ogni colore il primo valore (sopra) si riferisce alla concentrazione 0.1 μ M e il secondo valore (sotto) si riferisce alla concentrazione 0.01 μ M.

Tabella 3.5

3068	3086	2928	3025	5160	3696
2865	2851	2743	2798	2820	2977
2890	2854	4797	2822	2690	2611
2745	2832	3013	2720		
2209					

Il substrato Pyr aveva valori di fluorescenza circa il doppio di quelli di tutti gli altri substrati. Per questo motivo, nei test con i campioni biologici è stato scelto di mantenere

la concentrazione di 0.1 μM per Pyr e raddoppiare la concentrazione degli altri substrati, portandola a 0.2 μM .

Settaggio della concentrazione ottimale di estratto

Per questo test sono stati preparati i quattro estratti di campioni biologici seguendo il protocollo descritto al paragrafo 2.2.3.9. Successivamente sono state preparate due piastre Costar 96 *Well Half Area, Flat Bottom, Black Polystyrene*, non trattate in cui sono stati distribuiti 20 μL dei vari campioni di feci a quattro concentrazioni differenti:

- 20 μL di estratto;
- 10 μL di estratto diluiti in 10 μL di acqua;
- 1 μL di estratto diluito in 19 μL di acqua;
- 0.1% di estratto diluiti in 19.9 μL di acqua.

Inoltre, i vari campioni sono stati testati per quattro pH: pH 5.5, pH 6.5, pH 7.5 e pH 8.3. Per questo settaggio è stato utilizzato come substrato il Pyr con concentrazione finale nel pozzetto 0.1 μM .

Per ogni condizione enzimatica e di pH i campioni sono stati testati in triplicato.

Le proporzioni dei vari reagenti in un singolo pozzetto da 100 μL erano le seguenti:

- 10 μL di substrato Pyr 0.1 μM ;
- 10 μL di buffer (a pH 5.5, 6.5, 7.5 o 8.3);
- 60 μL di acqua milli-Q.

Sono stati preparati 4 *master mix* ai 4 pH. valutando che per ogni pH erano necessari almeno 7 mL di *master mix* (quantitativo per 1000 pozzetti). Di conseguenza, ogni *master mix* è stato preparato con le seguenti quantità:

- *Master mix* a pH 5.5:
 - 1 mL di substrato Pyr;
 - 1 mL di buffer a pH 5.5;
 - 6 mL di acqua milli-Q.
- *Master mix* a pH 6.5:
 - 1 mL di substrato Pyr;
 - 1 mL di buffer a pH 6.5;
 - 6 mL di acqua milli-Q.
- *Master mix* a pH 7.5:
 - 1 mL di substrato Pyr;

- 1 mL di buffer a pH 7.5;
- 6 mL di acqua milli-Q.
- *Master mix* a pH 8.3:
 - 1 mL di substrato Pyr;
 - 1 mL di buffer a pH 8.3;
 - 6 mL di acqua milli-Q.

Procedimento

1. Ogni piastra è stata organizzata dalla riga A alla riga D con una concentrazione di estratto (20 μ L o 1 μ L di estratto diluito in 19 μ L di acqua) e dalla riga E alla riga H con un'altra concentrazione di estratto (10 μ L di estratto diluiti in 10 μ L di acqua o 0.1% di estratto diluiti in 19.9 μ L di acqua). In particolare, le righe A e E sono state occupate da 20 μ L dell'estratto del controllo 1 (Ctrl-1), le righe B e F da 20 μ L dell'estratto del controllo 2 (Ctrl-2), le righe C e G da 20 μ L dell'estratto del paziente 1 (Paz-1) e le righe D e H da 20 μ L dell'estratto del paziente 2 (Paz-2).
2. È stata preparata una soluzione figlia 1 μ M di substrato Pyr effettuando una diluizione 1:1000 a partire dalla soluzione madre 1 mM.
3. In seguito sono stati preparati i *master mix* ai quattro pH.
4. Successivamente sono stati iniettati in ogni pozzetto 80 μ L di *master mix* ai quattro pH. In particolare, dalla colonna 1 alla colonna 3 è stato inserito il *master mix* a pH 5.5, dalla colonna 4 alla colonna 6 il *master mix* a pH 6.5, dalla colonna 7 alla colonna 9 il *master mix* a pH 7.5 e dalla colonna 10 alla colonna 12 il *master mix* a pH 8.3. In Fig. 3.4.6 è riportato lo schema finale dell'organizzazione di ambo le piastre.
5. Ogni piastra è stata coperta con un foil di plastica per evitare contaminazioni.
6. Successivamente sono state eseguite delle letture di fluorescenza ogni 30 minuti per valutare l'andamento del taglio del substrato e per settare lo strumento al fine di poter individuare i parametri di lavoro più adatti.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	20 ul extract
B	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	
C	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	
D	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	
E	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	10 ul extract + 10uL H2O
F	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	
G	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	
H	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	1 ul extract + 19uL H2O
B	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	
C	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	
D	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	
E	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	0,1 ul extract + 19,9uL H2O
F	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	
G	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	
H	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	

pH 5.5
pH 6.5
pH 7.5
pH 8.3

Figura 3.4.6 Organizzazione delle piastre per il settaggio dei campioni biologici alle quattro concentrazioni di estratto e alle quattro concentrazioni di pH.

Risultati

Dalla prima lettura sono stati riscontrati dei valori di fluorescenza che andavano oltre la sensibilità dello strumento anche per le concentrazioni più basse. Per ottenere dei valori rilevabili nel range di lavoro del detector si è dovuto come Gain 60 e come numero di flash per lettura 5. Questi parametri sono stati mantenuti anche per i test successivi.

Inoltre, si è visto che la concentrazione migliore di estratto fosse quella a 1 μ L diluito in 19 μ L di acqua, in quanto i valori di fluorescenza sono risultati tutti rilevabili per tutta la durata dell'esperienza. Infatti, con 20 μ L e 10 μ L di estratto la fluorescenza per i campioni dei pazienti superava sempre la sensibilità dello strumento, per cui non era possibile valutare quantitativamente il taglio. Al contrario, con 0.1 μ L di estratto i valori di fluorescenza erano troppo bassi e indistinguibili dai valori di *background*. Per questo motivo, nei test successivi, è stata utilizzata come concentrazione di estratto 1 μ L diluito in 19 μ L di acqua.

Infine, è stata evidenziata una lampante differenza in fluorescenza tra i campioni di controllo e i pazienti, segno che nel gruppo di malati ci fosse un'effettiva sovra

espressione di proteasi che provocasse un'attività enzimatica anche decine di volte superiore al controllo con i sani.

3.4.4 SCREENING DEI CAMPIONI BIOLOGICI CON I DIVERSI PEPTIDI

Al termine di tutte le procedure di settaggio, è stato eseguito il test finale utilizzando gli estratti biologici con i seguenti substrati:

- Substrati sintetizzati:
 - Ac-DGPYSLVA-AMC (Cont-1);
 - Ac-GDGPYSLVA-AMC (Cont-2);
 - Ac-PHLVRQKR-AMC (Desm-1);
 - Ac-KHPHLVRQKR-AMC (Desm-2);
- Substrati sintetizzati da Alessandro Senter:
 - Ac-LVVQ-AMC (Prot-1);
 - Ac-ATLVVQ-AMC (Prot-2);
 - Ac-GQII-AMC (Desm-A);
 - Ac-SKGQII-AMC (Desm-B);
 - Ac-RSSKGQII-AMC (Desm-C);
 - Ac-MDRSSKGQII-AMC (Desm-D);
- Substrati commercialmente disponibili:
 - N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-Nitroanilide (Elas-Sub);
 - Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-Nitroanilide (Cate-Sub).

La concentrazione di substrato utilizzata è stata di 1 μ L in 20 μ L di acqua milli-Q, come ricavato dal test di settaggio riportato al paragrafo 3.3.4.3.

Lo scopo di questo test era valutare se i substrati sintetizzati potessero essere un target per gli estratti di feci a nostra disposizione e se esistesse una effettiva differenza di attività proteolitica tra pazienti e controllo.

Per questo esperimento sono state utilizzate 6 piastre Costar 96 *Well Half Area, Flat Bottom, Black Polystyrene*, non trattate per testare i substrati fluorogenici e una piastra Corning 96 *Well Full Area, Flat Bottom, Transparent Polystyrol*, non trattata per la valutazione dei substrati Elas-Sub e Cate-Sub in UV.

Il seguente esperimento è stato preparato seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 2.2.3.11.

I test sono stati eseguiti a quattro condizioni di pH: pH 5.5., pH 6.5, pH 7.5 e pH 8.3. Inoltre, per ciascuna condizione enzimatica e di pH il campione è stato valutato in triplicato.

Per ogni substrato sono state preparate delle soluzioni figlie a concentrazione 4 μM nel caso di substrati sciolti in DMSO (Cont-1, Cont-2, Prot-1, Prot-2, Desm-A, Desm-B, Desm-C, Desm-D, Elas-Sub e Cate-Sub) o a concentrazione 2 μM nel caso di substrati sciolti in acqua (Desm-1 e Desm-2). Nel caso dei substrati Elas-Sub e Cate-Sub, sono state preparate delle soluzioni figlie a 1 mM per avere come concentrazione finale nel pozzetto 50 μM , come stabilito a seguito del test descritto nel paragrafo 3.3.4.2. Infine, per ogni substrato sono stati preparati 4 *master mix* ai quattro pH.

Le proporzioni dei vari reagenti in un singolo pozzetto da 100 μL erano le seguenti:

- 20 μL di estratto (Ctrl-1, Ctrl-2, Paz-1 o Paz-2);
- 10 μL (o 5 μL) di substrato 0.2 μM ;
- 10 μL di buffer (a pH 5.5, 6.5, 7.5 o 8.3);
- 60 μL (o 65 μL) di acqua milli-Q.

Procedimento

1. *Preparazione dei campioni biologici.*

Sono state preparate in quattro falcon le soluzioni con gli estratti di feci dei due pazienti e dei due controlli, in cui gli estratti sono stati diluiti 1:20 in acqua milli-Q. Le quantità prodotte sono state fatte contando 24 pozzetti per ogni campione per otto piastre complessive. In totale servivano delle aliquote da 4 mL per ciascun estratto. In particolare, sono stati prelevati 200 μL di estratto e diluiti in 3800 μL di acqua milli-Q all'interno di quattro falcon.

Sono quindi state ottenute quattro aliquote totali di estratto diluito 1:20 in 4 mL di volume totale.

2. *Preparazione delle aliquote di substrati a concentrazione 2 μM , 4 μM e 1 mM.*

Per i peptidi sciolti in DMSO servivano 5 μL per ogni pozzetto, per un totale di 48 pozzetti. Per cui sono state calcolate le quantità per 80 pozzetti, corrispondenti a 400 μL di volume totale. Per ogni peptide, in eppendorf da 2 mL, sono state preparate delle aliquote da 400 μL a concentrazione 4 μM , prelevando 16 μL di substrato a 100 μM e diluendolo 1:25 in DMSO.

Per quanto riguarda i substrati Elas-Sub e Cate-Sub, sono state preparate in due eppendorf da 2 mL delle aliquote rispettivamente di 450 μL e 380 μL . Per Elas-

Sub, è stata eseguita una diluizione 1:15 a partire dalla soluzione madre 15 mM, per ottenere una soluzione figlia 1 mM, prelevando 30 μL di soluzione madre diluiti poi in 420 μL di DMSO. Per Cate-Sub, invece, è stata eseguita una diluizione 1:20 a partire dalla soluzione madre 20 mM, per ottenere una soluzione figlia 1 mM, prelevando 20 μL di soluzione madre diluiti poi in 380 μL di DMSO.

Per quanto riguarda i peptidi Desm-1 e Desm-2 servivano 10 μL per ogni pozzetto, per un totale di 48 pozzetti. Per cui sono state calcolate le quantità per 60 pozzetti, corrispondenti a 600 μL di volume totale. Per ogni peptide, in eppendorf da 2 mL, sono state preparate delle aliquote da 600 μL a concentrazione 2 μM , prelevando 140 μL di substrato a 10 μM e diluendolo 1:5 in acqua milli-Q.

3. *Preparazione delle soluzioni tampone.*

Sono state preparate in quattro falcon le quantità di acqua e buffer (ad ogni pH) per ogni substrato. Per i peptidi sciolti in DMSO, servivano in ciascun pozzetto 10 μL di buffer (pH 5.5, 6.5, 7.5 e 8.3) e 65 μL di acqua milli-Q. Sono state quindi calcolate, per ogni pH, le quantità di acqua e buffer necessarie per 150 pozzetti. In totale, in quattro falcon, per ogni pH, sono stati iniettati 1500 μL di buffer e 9750 μL di acqua milli-Q.

Per i peptidi sciolti in acqua, servivano in ciascun pozzetto 10 μL di buffer (pH 5.5, 6.5, 7.5 e 8.3) e 60 μL di acqua milli-Q. Sono state quindi calcolate, per ogni pH, le quantità di acqua e buffer necessarie per 80 pozzetti. In totale, in quattro falcon, per ogni pH, sono stati iniettati 800 μL di buffer e 4800 μL di acqua milli-Q.

4. *Preparazione dei master mix*

Come ultimo passaggio sono stati prodotti 4 MM per ogni substrato alle quattro condizioni di pH. Per i peptidi sciolti in DMSO, sono state calcolate le quantità per 16 pozzetti. In ogni pozzetto servivano 75 μL di soluzione tampone e 5 μL di substrato, per un totale di 1280 μL di MM per ogni pH. Quindi, in 4 eppendorf da 2 mL sono stati iniettati 1200 μL di soluzione tampone a un determinato pH e 80 μL di substrato 4 μM . Analogamente, la stessa cosa è stata fatta per i peptidi sciolti in acqua. In particolare, sono state calcolate le quantità per 15 pozzetti. In ogni pozzetto servivano 70 μL di soluzione tampone e 10 μL di substrato,

per un totale di 1280 μL di MM per ogni pH. Quindi, in 4 eppendorf da 2 mL sono stati iniettati 1050 μL di soluzione tampone a un determinato pH e 150 μL di substrato 2 μM .

In questo modo sono stati ottenuti 4 MM ai 4 pH per ogni substrato.

5. *Organizzazione delle piastre*

Sono state preparate complessivamente 7 piastre Costar 96 *Well Half Area, Flat Bottom, Black Polystyrene*, non trattate e 1 piastra Corning 96 *Well Full Area, Flat Bottom, Transparent Polystyrol*, non trattata.

In ogni piastra sono stati testati due substrati con i quattro estratti, alle quattro condizioni di pH. In particolare, le righe A ed E sono state occupate da 20 μL dell'estratto del controllo 1 (Ctrl-1), le righe B e F da 20 μL dell'estratto del controllo 2 (Ctrl-2), le righe C e G da 20 μL dell'estratto del paziente 1 (Paz-1) e le righe D e H da 20 μL dell'estratto del paziente 2 (Paz-2).

Nelle colonne 1-3 sono stati inseriti i MM a pH 5.5, dalla riga A alla riga D del substrato 1 e dalla riga E alla riga H del substrato 2. Nelle colonne 4-6 sono stati inseriti i MM a pH 6.5, dalla riga A alla riga D del substrato 1 e dalla riga E alla riga H del substrato 2. Nelle colonne 7-9 sono stati inseriti i MM a pH 7.5, dalla riga A alla riga D del substrato 1 e dalla riga E alla riga H del substrato 2. Nelle colonne 10-12 sono stati inseriti i MM a pH 8.3, dalla riga A alla riga D del substrato 1 e dalla riga E alla riga H del substrato 2.

In Fig 3.4.7 è riportato lo schema riassuntivo dell'organizzazione delle piastre.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Substrato 1
B	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	
C	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	
D	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	
E	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Ctrl-1	Substrato 2
F	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	Ctrl-2	
G	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	Paz-1	
H	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	Paz-2	
	pH 5.5			pH 6.5			pH 7.5			pH 8.3			

Figura 3.4.7 Esempio di organizzazione di una piastra per il test dei campioni biologici con tutti i substrati disponibili.

6. Al termine della preparazione di tutte le soluzioni, sono stati iniettati in ogni pozzetto 20 μL di estratto per ciascun campione in ogni piastra con una pipetta automatica P20 e utilizzando puntali con filtro.

7. Successivamente sono stati iniettati con una pipetta automatica P100 80 μ L di MM in ogni pozzetto per ogni substrato, utilizzando puntali con filtro.
8. Ogni piastra è stata coperta poi con un foil di plastica per evitare contaminazioni.
9. Infine, sono state effettuate le misure di assorbanza per i substrati Elas-Sub e Cate-Sub e le misure di fluorescenza per i restanti substrati. Per le letture di fluorescenza lo strumento è stato settato con i seguenti parametri:
 - Lunghezza d'onda di emissione: 360 nm;
 - Lunghezza d'onda di eccitazione: 465 nm;
 - Gain: 60 e 65;
 - Numero di flash per lettura: 5.
 - Temperatura dello strumento: 24.7 °C.

Per le letture in assorbanza invece, sono stati utilizzati i seguenti parametri:

- Lunghezza d'onda: 405 nm;
- Numero di flash per lettura: 5;
- Temperatura dello strumento: 27.9 °C.

CAPITOLO 4 - RISULTATI

Nel paragrafo 4.1 sono riportati i risultati ottenuti dai saggi *in vitro* con i campioni biologici testati con i substrati sintetizzati. Nel paragrafo 4.2 è riportato un approfondimento sul consumo di plastica utilizzata per questo progetto di tesi, dalla sintesi dei peptidi ai saggi *in vitro*.

4.1 VALUTAZIONE DEI RISULTATI OTTENUTI

A seguito del test eseguito con campioni biologici e substrati sono stati ottenuti i seguenti risultati.

Dalle prime misurazioni effettuate si è visto che i valori di fluorescenza tendevano a diminuire già dopo 10 minuti di reazione per la maggior parte dei substrati. Questo effetto può essere dovuto a due motivi principali:

- Effetto quenching. Non essendo nota la composizione chimica dei substrati è lecito supporre la presenza di molecole di diversa natura, da enzimi a proteine, che possono aver legato con il substrato e oscurato il gruppo fluoroforo, impedendo così al detector la rilevazione di fluorescenza.
- Degradazione del gruppo AMC. Gli estratti, specialmente quelli dei pazienti malati, presentano grandi quantità di enzimi o molecole che possono interagire con il substrato, degradandolo. Di conseguenza è possibile che il gruppo AMC possa aver subito lo stesso processo di degradazione a causa di un ambiente molto reattivo.

Tuttavia, nonostante non sia stato possibile avere una valutazione attendibile dell'attività enzimatica nel tempo, è stata riscontrata una notevole differenza tra i campioni malati e il controllo, a tutti i pH e in misura diversa a seconda del substrato. Per questo motivo, nei grafici che seguono sono stati riportati solo i valori ottenuti alla prima lettura (tempo zero).

In Fig. 4.1 sono stati riportati con *heat map* i valori di fluorescenza in triplicato, ricavati per Paz-1, Paz-2, Ctrl-1 e Ctrl-2 a pH 5.5 (a), pH 6.5 (b), pH 7.5 (c) e pH 8.3 (d). In ascissa sono riportati i substrati fluorogenici testati: Cont-1 (A), Cont-2 (B), Desm-A (C), Desm-B (D), Desm-C (E), Desm-D (F), Prot-1 (G), Prot-2 (H), Desm-1 (I), Desm-2 (J) e Pyr (K). I valori riportati sono stati ottenuti sottraendo ai dati grezzi i valori di fluorescenza di *background* ricavati con il test di settaggio delle concentrazioni dei peptidi (paragrafo 3.3.4.3).

Si può notare una significativa differenza tra il gruppo di controllo e i malati ad ogni condizione di pH. In particolare, la maggiore attività enzimatica si ha per pH 7.5 e 8.3, e per i substrati Pyr, Cont-1 e Cont-2. Ciò è in linea con quanto riportato in letteratura per le Catepsine e le Elastasi. Infatti, queste famiglie di enzimi raggiungono la massima attività proteolitica rispettivamente per pH neutri e per pH basici^{77,79}.

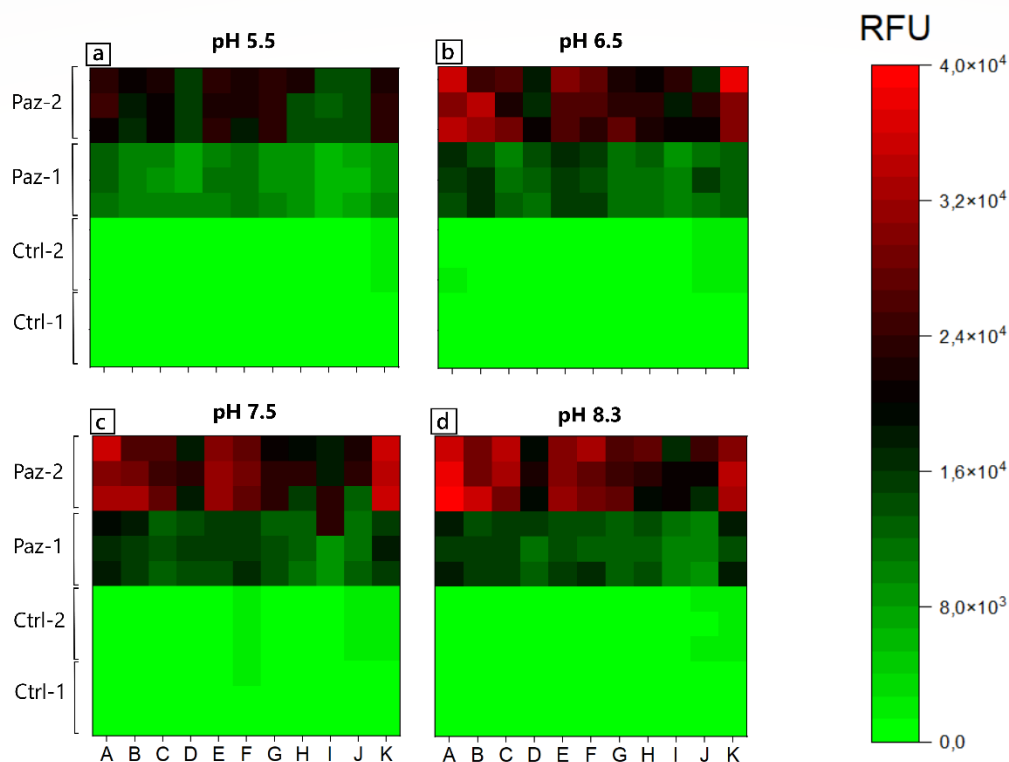


Figura 4.1 Nei grafici sono riportati i valori di fluorescenza in triplicato ricavati per Paz-1, Paz-2, Ctrl-1 e Ctrl-2 a pH 5.5 (a), pH 6.5 (b), pH 7.5 (c) e pH 8.3 (d). In ascissa sono riportati i diversi substrati: Cont-1 (A), Cont-2 (B), Desm-A (C), Desm-B (D), Desm-C (E), Desm-D (F), Prot-1 (G), Prot-2 (H), Desm-1 (I), Desm-2 (J) e Pyr (K).

In generale, si è visto che per Paz-2 la maggiore attività enzimatica è stata riscontrata a pH basici per quasi tutti i substrati, ad eccezione dei substrati più idrofilici, mentre per Paz-1 la maggiore attività enzimatica si è registrata attorno al pH 7.5. In Fig 4.2 sono riportati i valori delle medie dei triplicati normalizzati rispetto al *background* (paragrafo 3.3.4.3) per ogni substrato e per ogni valore di pH. In rosso sono indicati i pH per ogni substrato in cui si è registrata maggiore fluorescenza.

Paziente 1					Paziente 2				
pH 5.5	pH 6.5	pH 7.5	pH 8.3		pH 5.5	pH 6.5	pH 7.5	pH 8.3	
11902	15339	17878	17027	Ac DGPYSLVA-AMC	23060	32949	32726	37698	Ac DGPYSLVA-AMC
10303	15335	16010	15092	Ac GDGPYSLVA-AMC	18497	29794	28820	31040	Ac GDGPYSLVA-AMC
9487	11364	13185	15263	Ac GQII-AMC	21137	25617	25942	31637	Ac GQII-AMC
8513	12206	14292	12993	Ac SKGQII-AMC	15132	18707	19658	20131	Ac SKGQII-AMC
10758	15817	15356	14310	Ac RSSKGQII-AMC	23125	27389	30825	30306	Ac RSSKGQII-AMC
11245	14738	15730	14661	Ac MDRSSKGQII-AMC	20821	25601	27750	29433	Ac MDRSSKGQII-AMC
9278	11633	13216	12738	Ac LVVQ-AMC	23460	24263	22923	25697	Ac LVVQ-AMC
8611	11997	12716	14027	Ac ATLVVQ-AMC	16286	22041	19609	23369	Ac ATLVVQ-AMC
5775	9343	13467	10576	Ac PHLVRQKR-AMC	13495	20414	19476	19405	Ac PHLVRQKR-AMC
7152	12647	11683	9605	Ac KHPHLVRQKR-AMC	14081	20316	19655	20510	Ac KHPHLVRQKR-AMC
9269	12700	15897	16602	Pyr RTRK-AMC	22688	32367	34868	32496	Pyr RTRK-AMC

Figura 4.2 valori delle medie dei triplicati normalizzati rispetto al background per ogni substrato e per ogni valore di pH. In rosso sono indicati i pH a cui è stata registrata maggiore fluorescenza.

Per valutare quantitativamente la differenza tra il gruppo di controllo e i malati, e quindi verificare che ci fosse una differenza statisticamente significativa, è stata ricavata la media dei due gruppi di controllo, e la media dei triplicati per ogni paziente. È stato quindi calcolato il rapporto tra i pazienti malati e il controllo, ottenendo i valori riportati in Fig 4.3. Si può notare come, per entrambi i pazienti, i valori minimi di fluorescenza risultino comunque almeno 9 volte superiori al controllo fino ad arrivare anche a 70 volte superiori come nel caso del paziente 2. Questo trend risulta essere valido ad ogni condizione di pH.

pH 5.5	MEDIA CONTROLLI E RAPPORTO CON PAZIENTI			pH 6.5	MEDIA CONTROLLI E RAPPORTO CON PAZIENTI		
	CTRL	Paz. 1 / CTRL	Paz. 2 / CTRL		CTRL	Paz. 1 / CTRL	Paz. 2 / CTRL
	449	27	51		632	24	52
	457	23	40		416	37	72
	530	18	40		578	20	44
	448	19	34		471	26	40
	604	18	38		717	22	38
	440	26	47		516	29	50
	434	21	54		418	28	58
	426	20	38		355	34	62
	575	10	23		681	14	30
	748	10	19		1394	9	15
	1000	9	23		1093	12	30
pH 7.5	MEDIA CONTROLLI E RAPPORTO CON PAZIENTI			pH 8.3	MEDIA CONTROLLI E RAPPORTO CON PAZIENTI		
	CTRL	Paz. 1 / CTRL	Paz. 2 / CTRL		CTRL	Paz. 1 / CTRL	Paz. 2 / CTRL
	589	30	56		720	24	52
	429	37	67		602	25	52
	559	24	46		635	24	50
	461	31	43		524	25	38
	693	22	44		558	26	54
	1431	11	19		612	24	48
	619	21	37		408	31	63
	483	26	41		516	27	45
	692	19	28		480	22	40
	1300	9	15		922	10	22
	1300	12	27		1432	12	23

Figura 4.3 Nelle tabelle sono riportati i rapporti tra la media dei pazienti con la media dei controlli per le quattro condizioni di pH.

Successivamente è stato analizzato il taglio a seconda del substrato. In Fig. 4.4 è rappresentato ad esempio, il taglio dei vari substrati per il Ctrl-1 (a), per il Ctrl-2 (b),

per il Paz-1 (c) e per il Paz-2 (d) a pH 7.5. I valori di fluorescenza riportati sono stati ottenuti sottraendo ai dati grezzi a tempo zero i valori di background ricavati con il test di settaggio delle concentrazioni dei peptidi (paragrafo 3.3.4.3) ed eseguendo la media dei triplicati.

In generale, sono stati privilegiati substrati con un amminoacido idrofobico in P₁ a dimostrazione della possibile sovra-espressione di Catepsine. In particolare, per i substrati Prot-1 e Prot-2 i bassi valori di fluorescenza sono dovuti principalmente a una cinetica di reazione più lenta, in quanto sono stati gli unici substrati per cui si è registrato un aumento di fluorescenza nel tempo. Ciò dimostra che la diversità nel taglio è influenzata dalla composizione stessa del substrato.

I substrati *furin-like* come Desm-1 e Desm-2, sono stati i meno performanti. Tuttavia, il substrato Pyr considerato anch'esso come substrato di riferimento per Furina, si è dimostrato uno dei migliori target per la degradazione enzimatica. Saranno, quindi, necessari ulteriori test per valutare la significatività nella differenza di taglio tra un substrato e l'altro.

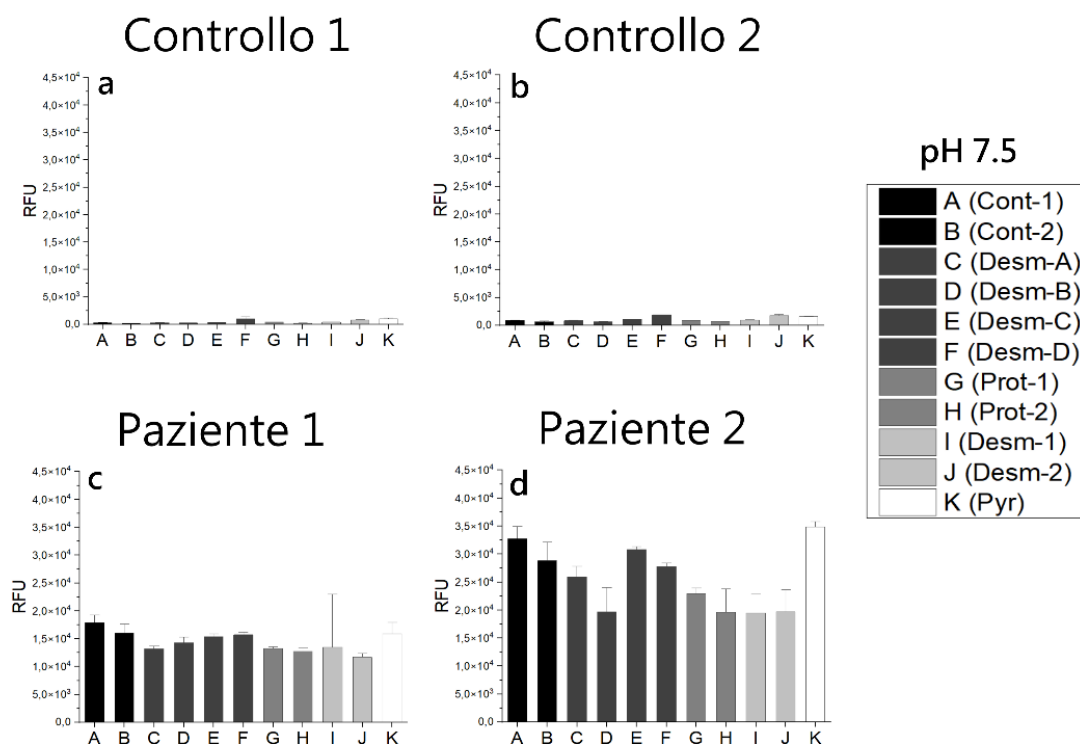


Figura 4.4 Valori di fluorescenza nel taglio dei vari substrati a pH 7.5 per il Controllo-1 (a), per il Controllo-2 (b), per il Paziente 1 (c) e per il Paziente 2 (d).

Per completezza in Fig. 4.5 sono riportati i valori di fluorescenza registrati per ogni substrato ad ogni pH a tempo zero. Si può notare come il profilo di taglio dei substrati sia pressoché simile a tutti i pH nel caso del gruppo dei malati.

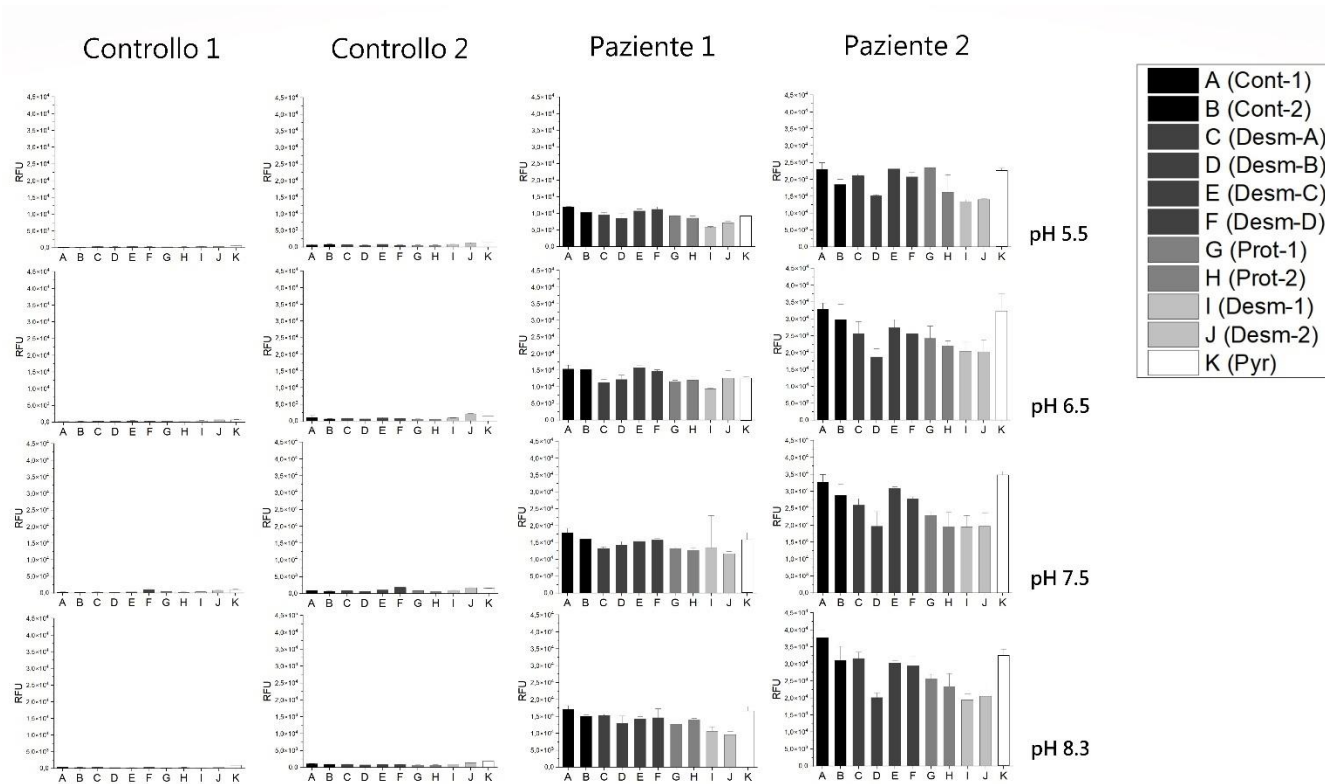


Figura 4.5 Profilo di taglio dei substrati per Paz-1, Paz-2 e controlli ad ogni valore di pH.

Non è risultata una specificità nel taglio, ovvero non è stata riscontrata una differenza nel taglio enzimatica a seconda della lunghezza della sequenza peptidica. Questo probabilmente è dovuto alla grande eterogeneità di enzimi e proteine nell'estratto biologico.

Per quanto riguarda i substrati Elas-Sub e Cate-sub, invece, sono stati ottenuti dei risultati diversi. A tempo zero non è stata registrata alcuna differenza tra i campioni di controllo e i malati. Tuttavia, dopo circa 45 minuti di reazione il gap tra controllo e malati è diventato più evidente e si è continuato a registrare un aumento di assorbanza anche dopo 100 minuti a tutti i pH. Anche in questo caso la maggiore attività enzimatica è stata riscontrata per pH basici, sia per Cate-Sub sia per Elas-Sub.

Questo risultato è in linea con quanto riportato in letteratura³⁷.

È noto che il gruppo p-nitroanilide assorba alla stessa lunghezza d'onda delle emoglobine¹⁹, per cui era possibile che i valori di assorbanza registrati fossero dovuti

non tanto al taglio enzimatico, quanto alla presenza di sangue nell'estratto. Tuttavia, questa ipotesi può essere smentita in questo caso, in quanto i valori di assorbanza tendono a crescere nel tempo, a dimostrazione dell'effettiva presenza di attività enzimatica.

4.2 CONSUMO DI PLASTICHE

Per questo progetto di tesi è stato tenuto in considerazione la quantità di plastica consumata in tutti i processi di produzione dei peptidi e nei test enzimatici.

Molto spesso i materiali utilizzati sono usa e getta, e il consumo di plastica risulta essere anche di 10 kg per un progetto di tesi.

Per questo motivo, si è cercato di ridurre il più possibile il consumo di plastiche attuando i seguenti comportamenti:

- Ottimizzando l'organizzazione delle piastre, utilizzando diversi *master mix* per risparmiare sul consumo di puntali per micropipette;
- Per le analisi di HPLC sono state utilizzate delle vials di vetro, invece che di plastica;
- Al posto delle pasteur di plastica sono state utilizzate il più possibile quelle di vetro;
- Le piastre per i vari test preliminari (senza campioni biologici) sono state lavate e riutilizzate;
- Non sono stati utilizzati, dove possibile, foil di plastica per la copertura delle piastre;

Il consumo di plastiche per questa tesi è stato di 2.8 Kg. In Tabella 4.2 sono riportati tutti i materiali di plastica utilizzati, con il relativo peso per pezzo e totale. Per quanto riguarda il Parafilm, il peso singolo è riferito a una striscia di Parafilm della grandezza di 10 x 3 cm.

Tabella 4.2

Nome	Quantità	Peso per pezzo [g]	Peso totale [g]
Siringhe 1ml	20	2,7	54
Siringhe 3ml	26	3,5	91
Siringhe 25ml	14	10	140
Filtri PDVF 0.45	15	2,8	42
Filtri PVDF 0.45um piccoli	4	0,7	2,8
Filtri PTFE 0.45um	23	2,7	62,1
Falcon 15ml	43	6,3	270,9
Falcon 50mL	47	14	658
Pasteur	73	1,2	87,6

Puntali	910	0,3	273
Eppendorf 1.5 ml	114	0,5	57
Eppendorf 2 ml	124	1	124
Reattori	12	4	48
Parafilm	83	0,7	58,1
Tubetti	33	2,3	75,9
Piastre	15	42,21	633,15
Guanti	17	5	85
Foil	22	0,94	20,68
Totale [Kg]			2,8

CONCLUSIONI

In questo progetto di tesi sono stati sintetizzati peptidi che mimano le proteine di adesione delle cellule epiteliali intestinali.

I peptidi sono stati sintetizzati su fase solida con chimica Fmoc, e successivamente caratterizzate e purificate tramite cromatografie in RP-HPLC analitica e semipreparativa ed analisi di massa di tipo MALDI-TOF.

Successivamente sono stati effettuati dei saggi *in vitro* con dei campioni di feci di pazienti affetti da MIG con lo scopo di valutare il taglio enzimatico dei substrati sintetizzati.

È stato dimostrato che tutti i substrati sintetizzati sono un possibile target per gli enzimi sovra espressi nei campioni di feci di pazienti affetti da malattie gastrointestinali. Lo stesso test è stato effettuato con dei substrati commercialmente disponibili che sono noti essere tagliati da estratti biologici di feci di pazienti affetti da MIG, come controllo sulla bontà del protocollo utilizzato.

I dati raccolti dimostrano la correlazione tra sovra espressione enzimatica e taglio dei substrati, e, in particolare, di substrati relativi a proteine di adesione presenti in cellule epiteliali intestinali.

Questo è un dato molto promettente per la progettazione di un possibile test diagnostico in grado di individuare e monitorare malattie infiammatorie del tratto GI. Infatti, questo esperimento è solo il primo step nella valutazione di una libreria molto più ampia di substrati appartenenti al tratto GI e non. Saranno da effettuare ulteriori test con lo scopo di individuare quali substrati sono più predisposti al taglio da parte delle proteasi e, se esiste, un pattern di proteasi specifico per ogni malattia infiammatoria. In questo modo sarebbe possibile progettare un test diagnostico in grado di valutare la presenza o meno di una specifica patologia senza la necessità di ricorrere a biopsie o esami invasivi e costosi e soprattutto con un'accuratezza maggiore.

BIBLIOGRAFIA

1. Knigge, K. L. Inflammatory bowel disease. *Clin. Cornerstone* **4**, 49–60 (2002).
2. Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., Lakatos, P. L., & ECCO -EpiCom. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J. Crohns Colitis* **7**, 322–337 (2013).
3. GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 17–30 (2020).
4. Dabek, M. *et al.* Luminal cathepsin g and protease-activated receptor 4: a duet involved in alterations of the colonic epithelial barrier in ulcerative colitis. *Am. J. Pathol.* **175**, 207–214 (2009).
5. Molodecky, N. A. *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**, 46-54.e42; quiz e30 (2012).
6. Hou, J. K., El-Serag, H. & Thirumurthi, S. Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. *Am. J. Gastroenterol.* **104**, 2100–2109 (2009).
7. Kaplan, G. G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 720–727 (2015).
8. Calkins, B. M. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **34**, 1841–1854 (1989).
9. Benjamin, J. L. *et al.* Smokers with active Crohn’s disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, 1092–1100 (2012).
10. Ng, S. C. *et al.* Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. *Gut* **64**, 1063–1071 (2015).

11. Ungaro, R. *et al.* Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **109**, 1728–1738 (2014).
12. Tontini, G. E., Vecchi, M., Pastorelli, L., Neurath, M. F. & Neumann, H. Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: state of the art and future perspectives. *World J. Gastroenterol.* **21**, 21–46 (2015).
13. Park, K. T. *et al.* The Cost of Inflammatory Bowel Disease: An Initiative From the Crohn's & Colitis Foundation. *Inflamm. Bowel Dis.* **26**, 1–10 (2020).
14. Feakins, R. M. Ulcerative colitis or Crohn's disease? Pitfalls and problems. *Histopathology* **64**, 317–335 (2014).
15. Stange, E. F. *et al.* European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J. Crohns Colitis* **2**, 1–23 (2008).
16. Anbazhagan, A. N., Priyamvada, S., Alrefai, W. A. & Dudeja, P. K. Pathophysiology of IBD associated diarrhea. *Tissue Barriers* **6**, e1463897 (2018).
17. Bond, J. S. Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. *J. Biol. Chem.* **294**, 1643–1651 (2019).
18. Gb, S., Mw, H. & Ma, L. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J. Leukoc. Biol.* **89**, (2011).
19. Edgington-Mitchell, L. E. Pathophysiological roles of proteases in gastrointestinal disease. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **310**, G234–G239 (2016).
20. Hedstrom, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501–4524 (2002).
21. Halangk, W. *et al.* Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.* **106**, 773–781 (2000).
22. Cheng, X. W. *et al.* Role for cysteine protease cathepsins in heart disease: focus on biology and mechanisms with clinical implication. *Circulation* **125**, 1551–1562 (2012).

23. Edgington-Mitchell, L. E. *et al.* Cysteine cathepsin activity suppresses osteoclastogenesis of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Oncotarget* **6**, 27008–27022 (2015).
24. Gocheva, V. *et al.* IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* **24**, 241–255 (2010).
25. Motwani, H. V., De Rosa, M., Odell, L. R., Hallberg, A. & Larhed, M. Aspartic protease inhibitors containing tertiary alcohol transition-state mimics. *Eur. J. Med. Chem.* **90**, 462–490 (2015).
26. Puente, X. S., Sánchez, L. M., Overall, C. M. & López-Otín, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 544–558 (2003).
27. Vergnolle, N. Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases. *Gut* **65**, 1215–1224 (2016).
28. Ramare, F., Hautefort, I., Verhe, F., Raibaud, P. & Iovanna, J. Inactivation of tryptic activity by a human-derived strain of *Bacteroides distasonis* in the large intestines of gnotobiotic rats and mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1434–1436 (1996).
29. Carroll, I. M. & Maharshak, N. Enteric bacterial proteases in inflammatory bowel disease- pathophysiology and clinical implications. *World J. Gastroenterol.* **19**, 7531–7543 (2013).
30. Hollenberg, M. D. Protease-mediated signalling: new paradigms for cell regulation and drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 3–6 (1996).
31. Heuberger, D. M. & Schuepbach, R. A. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thromb. J.* **17**, 4 (2019).
32. Vergnolle, N. Proteinase-activated receptors (PARs) in infection and inflammation in the gut. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1219–1227 (2008).
33. Cenac, N. *et al.* Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Invest.* **117**, 636–647 (2007).

34. Chin, A. C. *et al.* Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11104–11109 (2003).
35. Chin, A. C., Lee, W. Y., Nusrat, A., Vergnolle, N. & Parkos, C. A. Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 5702–5710 (2008).
36. Bonnans, C., Chou, J. & Werb, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 786–801 (2014).
37. Jablaoui, A. *et al.* Fecal Serine Protease Profiling in Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, (2020).
38. Anderson, E. D. *et al.* The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J. Biol. Chem.* **277**, 12879–12890 (2002).
39. Thomas, G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 753–766 (2002).
40. Molloy, S. S., Thomas, L., VanSlyke, J. K., Stenberg, P. E. & Thomas, G. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* **13**, 18–33 (1994).
41. Harrison, A. G., Lin, T. & Wang, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* **41**, 1100–1115 (2020).
42. Osman, E. E. A., Rehemtulla, A. & Neamati, N. Why All the Fury over Furin? *J. Med. Chem.* **65**, 2747–2784 (2022).
43. Descarpentrie, J. *et al.* Role of Furin in Colon Cancer Stem Cells Malignant Phenotype and Expression of LGR5 and NANOG in KRAS and BRAF-Mutated Colon Tumors. *Cancers* **14**, 1195 (2022).

44. Siegfried, G., Descarpentrie, J., Evrard, S. & Khatib, A.-M. Proprotein convertases: Key players in inflammation-related malignancies and metastasis. *Cancer Lett.* **473**, 50–61 (2020).
45. Biancheri, P. *et al.* Abnormal thymic stromal lymphopoietin expression in the duodenal mucosa of patients with coeliac disease. *Gut* **65**, 1670–1680 (2016).
46. Dong, S. *et al.* Furin inhibits epithelial cell injury and alleviates experimental colitis by activating the Nrf2-Gpx4 signaling pathway. *Dig. Liver Dis.* **53**, 1276–1285 (2021).
47. Zhao, G. *et al.* Influence of a Coronary Artery Disease–Associated Genetic Variant on *FURIN* Expression and Effect of Furin on Macrophage Behavior. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 1837–1844 (2018).
48. Marinaccio, L. *et al.* Peptide Human Neutrophil Elastase Inhibitors from Natural Sources: An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 2924 (2022).
49. Kyriakidi, K. S. *et al.* Neutrophil anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody proteins: bactericidal increasing protein, lactoferrin, cathepsin, and elastase as serological markers of inflammatory bowel and other diseases. *Ann. Gastroenterol.* **29**, 258–267 (2016).
50. Morohoshi, Y. *et al.* Inhibition of neutrophil elastase prevents the development of murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *J. Gastroenterol.* **41**, 318–324 (2006).
51. Roth, W. *et al.* Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14**, 2075–2086 (2000).
52. Robker, R. L. *et al.* Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4689–4694 (2000).
53. Saftig, P. *et al.* Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13453–13458 (1998).
54. Korkmaz, B., Horwitz, M. S., Jenne, D. E. & Gauthier, F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol. Rev.* **62**, 726–759 (2010).

55. Dabek, M. *et al.* Intracolonic infusion of fecal supernatants from ulcerative colitis patients triggers altered permeability and inflammation in mice: role of cathepsin G and protease-activated receptor-4. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 1409–1414 (2011).
56. Seibert, E. & Tracy, T. S. Fundamentals of Enzyme Kinetics: Michaelis-Menten and Non-Michaelis-Type (Atypical) Enzyme Kinetics. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2342**, 3–27 (2021).
57. Farquhar, M. G. & Palade, G. E. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* **17**, 375–412 (1963).
58. Crawley, S. W. *et al.* Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell* **157**, 433–446 (2014).
59. VanDussen, K. L. *et al.* Abnormal Small Intestinal Epithelial Microvilli in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* **155**, 815–828 (2018).
60. Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 799–809 (2009).
61. Schlegel, N. *et al.* Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **298**, G774–G783 (2010).
62. Weeks, A. M., Byrnes, J. R., Lui, I. & Wells, J. A. Mapping proteolytic neo-N termini at the surface of living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, e2018809118 (2021).
63. Hirano, S. & Takeichi, M. Cadherins in brain morphogenesis and wiring. *Physiol. Rev.* **92**, 597–634 (2012).
64. Frank, M. & Kemler, R. Protocadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 557–562 (2002).
65. Berx, G. *et al.* E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J.* **14**, 6107–6115 (1995).
66. Pancho, A., Aerts, T., Mitsogiannis, M. D. & Seuntjens, E. Protocadherins at the Crossroad of Signaling Pathways. *Front. Mol. Neurosci.* **13**, 117 (2020).
67. Jao, T.-M. *et al.* PCDH10 exerts tumor-suppressor functions through modulation of EGFR/AKT axis in colorectal cancer. *Cancer Lett.* **499**, 290–300 (2021).

68. Zhong, X., Zhu, Y., Mao, J., Zhang, J. & Zheng, S. Frequent epigenetic silencing of PCDH10 by methylation in human colorectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **139**, 485–490 (2013).
69. Ying, J. *et al.* Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation. *Oncogene* **25**, 1070–1080 (2006).
70. Chen, D.-H., Yu, J.-W. & Jiang, B.-J. Contactin 1: A potential therapeutic target and biomarker in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **21**, 9707–9716 (2015).
71. Chen, D.-H., Yu, J.-W., Wu, J.-G., Wang, S.-L. & Jiang, B.-J. Significances of contactin-1 expression in human gastric cancer and knockdown of contactin-1 expression inhibits invasion and metastasis of MKN45 gastric cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 2109–2120 (2015).
72. Su, J.-L. *et al.* The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* **9**, 209–223 (2006).
73. Behrendt, R., White, P. & Offer, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **22**, 4–27 (2016).
74. Amblard, M., Fehrentz, J.-A., Martinez, J. & Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* **33**, 239–254 (2006).
75. Sarin, V. K., Kent, S. B., Tam, J. P. & Merrifield, R. B. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.* **117**, 147–157 (1981).
76. Wang, D., Tan, K. S., Arias-Moreno, X., Tan, W. & Cheng, G. Sirt3 increases CNPase enzymatic activity through deacetylation and facilitating substrate accessibility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **571**, 181–187 (2021).
77. Yoon, M. C., Hook, V. & O'Donoghue, A. J. Cathepsin B Dipeptidyl Carboxypeptidase and Endopeptidase Activities Demonstrated across a Broad pH Range. *Biochemistry* **61**, 1904–1914 (2022).

78. Frosco, M., Chase, T. & Macmillan, J. D. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **60**, 728–734 (1992).
79. Sadeghi-Kaji, S., Shareghi, B., Saboury, A. A. & Farhadian, S. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction between spermidine and pancreatic elastase. *Int. J. Biol. Macromol.* **131**, 473–483 (2019).

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare la professoressa Monica Dettin per avermi offerto l'opportunità di prendere parte a questo progetto e per avermi seguito sempre con la sua disponibilità e la sua esperienza.

Ringrazio la dott.ssa Antonella Pasquato per la competenza, la disponibilità e la dedizione che ha messo nel seguirmi per questo progetto pilota che spero possa continuare a portare risultati incoraggianti.

Ringrazio la professoressa Laura Cendron per avermi permesso di lavorare nel suo laboratorio. Ringrazio anche Monica, Angela, Sofia e Filippo per avermi seguito durante la parte sperimentale al dipartimento di Biologia.

Ringrazio Alissa, Vittoria e Francesco per avermi insegnato tutto quello che c'era da sapere per non far esplodere il laboratorio di Bioingegneria Chimica e per eseguire il mio lavoro. Ringrazio anche tutti gli altri compagni di laboratorio per avermi tenuto compagnia in questi mesi.

Ringrazio le mie coinquiline Grace e Fiorella per avermi dato la tranquillità e la serenità di cui avevo bisogno in questi ultimi anni di studio, per avermi sempre offerto qualcosa da mangiare e per aver condiviso con me questa parentesi della loro vita. Ringrazio anche Chapulino per essere stato il migliore antistress del mondo.

Ringrazio Alessia. Per tutto.

Ringrazio i miei compagni di università per essere sempre stati presenti alle lezioni più noiose, ai ripassi più disperati e alle arrampicate più belle. Grazie anche per esserci stati nei momenti peggiori, ma specialmente in quelli più divertenti.

Ringrazio anche le mie amiche storiche per essere rimaste al mio fianco nonostante la distanza.

Infine, ringrazio i miei genitori per avermi dato l'opportunità di frequentare l'università e per avermi sostenuto in tutti questi anni. Ringrazio anche i miei fratelli e in particolare, mio fratello Marco per il supporto grafico.