UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

"Identificazione di nuovi modulatori dell'attività enzimatica di furina"

Relatore: Prof. MONICA DETTIN

Laureando: ALESSANDRO SENTER

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022
Data di laurea 13 Dicembre 2022

Sommario

Abstract 1

CAPITOLO 1 3

1.1 Malattie del tratto gastro intestinale 3

1.2 Proteasi 3

1.2.1 Furina 6

1.3 Proteine 8

1.3.1 Peptidi 9

1.3.2 Desmogleina-2 10

1.4 Cinetica enzimatica 14

1.5 Inibitori 15

1.5.1 Inibizione competitiva 16

1.5.2 Inibizione acompetitiva 17

1.5.3 Inibizione non competitiva o inibizione mista 18

1.6 Metodi di analisi *in vitro* 19

1.7 Scopo della tesi 20

CAPITOLO 2 21

2.1 Materiali 21

2.1.1 Reagenti e solventi 21

2.1.2 Sequenze peptidiche utilizzate 23

2.2 Strumentazione 23

2.2.1 Sintetizzatore per sintesi peptidica su fase solida 23

2.2.2 Spettrofotometro UV/Vis 23

2.2.3 HPLC per analisi cromatografica 24

2.2.3 HPLC per semipreparativa 25

2.2.4 MALDI-TOF per l'analisi spettrometria di massa 26

2.2.5 Freeze-dryer (Labconco, Kansas City, Missouri, USA) 26

2.2.6 Sistema di purificazione dell'acqua modello Milli-Q Integral for UltraPure Water, fornito da Merck KGaA (Darmstadt, Germania) 26

2.2.7 Infinite 200 PRO (TECAN, Männedorf, Switzerland, 1980) 27

2.2.8 Ulteriori strumenti utilizzati 27

2.2 Metodi 27

2.2.1 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS) 27

2.2.2 Test alla Ninidrina 29

2.2.3 Acetilazione 31

2.2.4 Sblocco dalla resina preservando i gruppi protettori delle catene laterali 32

2.2.5 Aggiunta del gruppo –AMC 32

2.2.6 Sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali 34

2.2.7 Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) 35
2.2.8 Fluorescenza 36
2.2.9 Spettrometria di massa 38
2.2.10 La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) 41
2.2.11 Produzione di enzimi: transfezione 42
2.2.12 Libreria di inibitori 44
2.2.13 Analisi statistiche 44
CAPITOLO 3 47
3.1 Sintesi di Gln-AMC 47
3.2 Sintesi di peptidi che mimano un sito di taglio della Desmogleina-2 52
3.2.2 Sintesi del peptide Ac-SKGQII-AMC 59
3.2.3 Sintesi del peptide Ac-RSSKGQII-AMC 63
3.2.4 Sintesi del peptide Ac-MDRSSKGQII-AMC 67
3.3 Sintesi di peptidi che mimano un sito di taglio della protocaderina-10 71
3.3.1 Sintesi del peptide Ac-LVVQ-AMC 72
3.3.1 Sintesi del peptide Ac-ATLVVQ-AMC 76
3.4 Test *in vitro* sulla cinetica enzimatica della Furina 80
3.4.1 Caratterizzazione della Furina 81
3.4.2 Digestione del peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC, Ac-PHLVRQKR-AMC e Pyr-RTKR-AMC da parte di Furina 82
3.4 *Drug screening* 84
CAPITOLO 4 87
4.1 Test *in vitro* 87
4.1.1 Cinetica enzimatica di Furina sul substrato Ac-PHLVRQKR-AMC 87
4.1.3 Cinetica enzimatica di Furina sul substrato Pyr-RTKR-AMC 90
4.1.3 Velocità di digestione dei peptidi 91
4.3 *Screening* di piccoli composti 94
4.3.1 *Drug screening: Kinase library* 94
4.4 Plastica utilizzata 96
CAPITOLO 5 99
Bibliografia 101

Abstract

Le proteasi sono enzimi necessari per mantenere l'omeostasi delle cellule e sono coinvolte in molteplici funzioni biologiche come la proliferazione, la differenziazione cellulare, il rimodellamento della matrice extracellulare e la maturazione di ormoni e peptidi biologicamente attivi. Tutte le attività citate potrebbero essere di notevole importanza nella formulazione di *scaffold* e nella colonizzazione cellulare degli stessi nell'ambito della medicina rigenerativa. Le proteasi svolgono un ruolo fondamentale anche in molti stati patologici dove spesso presentano attività anomala. In particolare, le malattie del tratto gastrointestinale possono essere caratterizzate da tessuti epiteliali compromessi con espressioni enzimatiche alterate. Nel 2020 è stato rilevato che il 40% della popolazione adulta ha sofferto di disordini o patologie gastrointestinali (sindrome dell'intestino irritabile, malattie infiammatorie dell'intestino e cancro del colon-retto) che risultano spesso di difficile diagnosi vista la sovrapposizione del quadro sintomatologico. Particolarmente colpite sono le donne. Infatti il 49% delle donne soddisfaceva i criteri diagnostici di almeno un disturbo gastrointestinale rispetto al 37% degli uomini.

Tra i vari enzimi, la serina proteasi Furina svolge un ruolo importante nello stato tumorale, incluso quello gastrointestinale e nella formazione della matrice extracellulare. Anche molti patogeni – ad esempio SARS-CoV-2, influenza virus, Ebola virus – sono maturati dalla Furina. Poiché quest'ultima è implicata in diverse classi di malattie, molti studi sono stati fatti per valutare la possibilità di modularne l'attività *in vivo* tramite piccole molecole. Ad oggi però non esistono inibitori di Furina approvati dalla Federal and Drug Administration (FDA).

Lo studio del taglio di substrati è importante ai fini di capire come essi vengono processati ed eventualmente identificare modulatori del taglio stesso.

Scopo della tesi è la sintesi e caratterizzazione di substrati differenti per la creazione di una piccola libreria peptidica da utilizzare per lo studio di stati patologici gastrointestinali e altre malattie. In particolare, abbiamo sintetizzato e analizzato con saggi *in vitro* peptidi che mimano il sito di maturazione della desmogleina-2, una proteina importante per la barriera epiteliale intestinale. I dati raccolti sono importanti per lo sviluppo di nuovi biomateriali. In parallelo, questi substrati sono stati utili per testare piccole molecole allo scopo di individuare dei modulatori per l'attività della Furina, l'enzima responsabile della maturazione di desmogleina-2.

Abstract

Proteases are enzymes necessary to maintain cell homeostasis. They are involved in different biological functions such as proliferation, cell differentiation, extracellular matrix remodelling and maturation and activation of hormones and peptides. All these biological activities may be important for the design of scaffolds and in general for cellular colonization in the context of regenerative medicine. Also, proteases play a fundamental role in many pathological states where often they show anomalous activities. In particular, the diseases of the gastrointestinal tract can be characterized by compromised epithelial tissues with an altered enzymatic expressions. In 2020, 40% of the adult population was found to suffer from gastrointestinal disorders or diseases (irritable bowel syndrome, inflammatory bowel diseases and colorectal cancer) which often are difficult to diagnose due to the overlapping of symptoms. Women are particularly affected. Indeed, 49% of women matches at least one diagnostic criteria for gastrointestinal disorders compared to 37% of men.

Among various enzymes, the serine protease Furin plays an important role in cancer – including gastrointestinal tumors – and in the formation of the extracellular matrix. Many pathogens - e.g. SARS-CoV-2, influenza virus, Ebola virus - are also matured by Furin. Given the importance of Furin in different diseases, many studies have been carried out in search of novel drugs capable of modulating its activity *in vivo*.
However, there are no Furin inhibitors approved by the Federal and Drug Administration (FDA), so far.
The study of the cleavage is important in order to understand how substrates are processed to identify modulators, as potential drugs.

The aim of this thesis is the synthesis and characterization of different substrates as part of a small peptide library to be used for the study of gastrointestinal pathological states and other diseases. In particular by *in vitro* assays, we synthesized and analysed peptides that mimic the maturation site of desmoglein-2, an important protein for the intestinal epithelial barrier. The data collected here are important for the development of new biomaterials. In parallel, these substrates were useful for testing small molecules in order to identify modulators of Furin activity, the enzyme responsible for the maturation of desmoglein-2.

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 Malattie del tratto gastro intestinale

Le malattie gastrointestinali come la sindrome dell'intestino irritabile (IBS), le malattie infiammatorie intestinali (IBD) e il cancro del colon-retto (CRC), colpiscono gran parte della popolazione e ad esse sono associate alterazioni dello stato intestinale con un conseguente stato di malessere. Le malattie infiammatorie intestinali sono principalmente due: il morbo di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (UC). Queste due patologie sono causate da un danno dell'epitelio intestinale che porta a una ridotta funzione della barriera intestinale. In questo modo, i batteri che popolano l'intestino riescono ad infiltrarsi e ad invadere la mucosa causando stati infiammatori con effetti anche duraturi [1]. Uno stato infiammatorio duraturo può anche portare all'insorgenza del cancro del colon-retto.

I sintomi più comuni causati dalle IBD variano in funzione della parte di intestino interessata. I pazienti con CD presentano generalmente diarrea cronica e dolore addominale. I pazienti con UC invece, presentano episodi intermittenti di dolore addominale e diarrea emorragica. In entrambe le malattie, i pazienti con lunghe anamnesi possono perdere peso e diventare denutrite. Per diagnosticare queste malattie, i pazienti si devono sottoporre a procedure lunghe e invasive come endoscopie con biopsie tissutali che provocano ai pazienti molto disagio e dolore.

Oggigiorno non esiste ancora una cura per l'IBD. Infatti, la maggior parte dei pazienti cura queste patologie con diete apposite. Tuttavia, ci sono dei trattamenti farmacologici che permettono di ridurre e controllare l'infiammazione intestinale. I pazienti più gravi però, possono richiedere talvolta un intervento chirurgico.

Sebbene le cause di queste malattie rimangano in gran parte sconosciute, ci sono prove crescenti che suggeriscono che un'attività proteasica disregolata possa essere un fattore scatenante. Sebbene i ruoli fisiopatologici di questi enzimi non siano ancora del tutto conosciuti, ci sono sempre più prove che suggeriscono che siano coinvolti nella modulazione della risposta infiammatoria, promuovendo in questo modo il danno tissutale [1].

1.2 Proteasi

Le proteasi sono enzimi che scindono i substrati proteici rompendo il legame peptidico covalente che unisce gli amminoacidi. Ogni proteasi possiede caratteristiche uniche e riconosce preferenzialmente sequenze specifiche di amminoacidi (sequenza di consenso). Attualmente, nell'uomo sono state identificate circa 600 diverse proteasi, che rappresentano circa il 2% del genoma umano. Le proteasi sono suddivise in cinque classi in base al loro meccanismo catalitico: aspartico, cisteina, metallo, serina o treonina proteasi. Questi ultimi sono

ulteriormente raggruppati in famiglie e sottofamiglie secondo il database MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/).

Oggigiorno, sappiamo che c'è un gran numero di proteasi che viene secreto dalle cellule.

- Ci sono 641 geni delle proteasi nell'uomo.
- La proteolisi si verifica praticamente in tutte le fasi della vita di una cellula, in tutti i compartimenti cellulari e in molte fasi dell'esistenza di una proteina: dall'elaborazione delle pre-pro-proteine o dopo la sintesi proteica fino alla distruzione totale della proteina.
- Esiste una grande varietà di strutture proteasiche, da quelle piccole (20 kDa) a grandi (6 MDa), con strutture altamente complesse, alcune contenenti più domini con molte porzioni post-traduzionali.
- Le proteasi regolano il destino, la localizzazione e l'attività di molte proteine.
- Le proteasi sono fattori chiave per la salute e la vitalità delle cellule, coinvolte in molteplici processi, come la proliferazione cellulare, la differenziazione cellulare, il rimodellamento della matrice extracellulare e l'elaborazione di ormoni e peptidi biologicamente attivi.
- Le proteasi sono altamente regolate a livello di trascrizione, post-traduzione, attivazione e inibizione.
- Le proteasi sono coinvolte in molte malattie come il cancro, l'Alz-heimer, l'artrite, i disturbi della coagulazione del sangue, le allergie e le infezioni.
- Gli inibitori della proteasi sono utili in medicina [2].

Le proteasi svolgono funzioni essenziali in tutti gli organismi viventi. Inizialmente sono stati individuati enzimi proteolitici nel succo gastrico coinvolti nella degradazione aspecifica delle proteine alimentari. Tuttavia, i recenti progressi hanno fornito una nuova visione del mondo proteolitico. Oltre a mediare l'idrolisi proteica non specifica, le proteasi agiscono anche come enzimi che eseguono una scissione altamente selettiva, limitata ed efficiente di substrati specifici influenzando molti processi biologici [3].

Sulla base del meccanismo di catalisi, le proteasi sono classificate in cinque classi distinte: proteasi aspartiche, metallo proteasi, cisteina proteasi, serina e treonina proteasi. Le proteasi delle prime due classi utilizzano una molecola d'acqua attivata come nucleofilo per attaccare il legame peptidico del substrato, mentre nelle restanti classi il nucleofilo è un residuo amminoacidico catalitico (Cys, Ser o Thr, rispettivamente) che si trova nel sito attivo da cui derivano i nomi delle classi [3]. In termini di specificità, alcune proteasi mostrano un'elevata specificità nella loro capacità di mirare a una proteina unica, mentre altre sono chiaramente promiscue, con un'attività degradativa che punta a una sequenza specifica di amminoacidi dopo la quale tagliare. Per esempio Furina generalmente taglia in una sequenza composta da Arg-X-(Arg/Lys) -Arg'↓.

La maggior parte delle proteasi vengono sintetizzate come zimogeni inattivi che si attivano attraverso una serie di meccanismi, tra cui la scissione da parte delle proteasi a monte. In primo luogo, molte proteasi contengono pro-domini che svolgono un ruolo auto-inibitore per prevenire la loro attivazione nel posto o nel momento

sbagliato. I pro-domini possono anche fungere da faccia di contatto per i recettori della superficie cellulare e per dirigere le proteasi verso substrati o posizioni specifiche nel tessuto. In secondo luogo, molte proteasi hanno domini ausiliari che facilitano la loro interazione con altre proteine, inibitori e recettori, o hanno qualche tipo di ruolo regolatorio [3]. Una volta che la proteasi è nella conformazione attiva, i substrati possono essere tagliati. Anche le proteasi sono soggette a inattivazione da parte di inibitori. L'equilibrio delle proteasi attive e inattive è strettamente controllato.

Le proteasi del sistema digestivo hanno come funzione il taglio delle proteine per ridurli in peptidi assimilabili dall'epitelio intestinale Fig. 1. Le proteasi sono fondamentali per la digestione e il mantenimento dell'omeostasi proteica. Un esempio di proteasi presente nel sistema digestivo è la pepsina che risulta essere l'enzima più in abbondanza del succo gastrico. La pepsina viene secreta inizialmente in forma inattiva (pepsinogeno) e viene attivata dal pH acido dello stomaco. La pepsina funziona in modo ottimale ad un pH compreso tra 1,5 e 3,5.

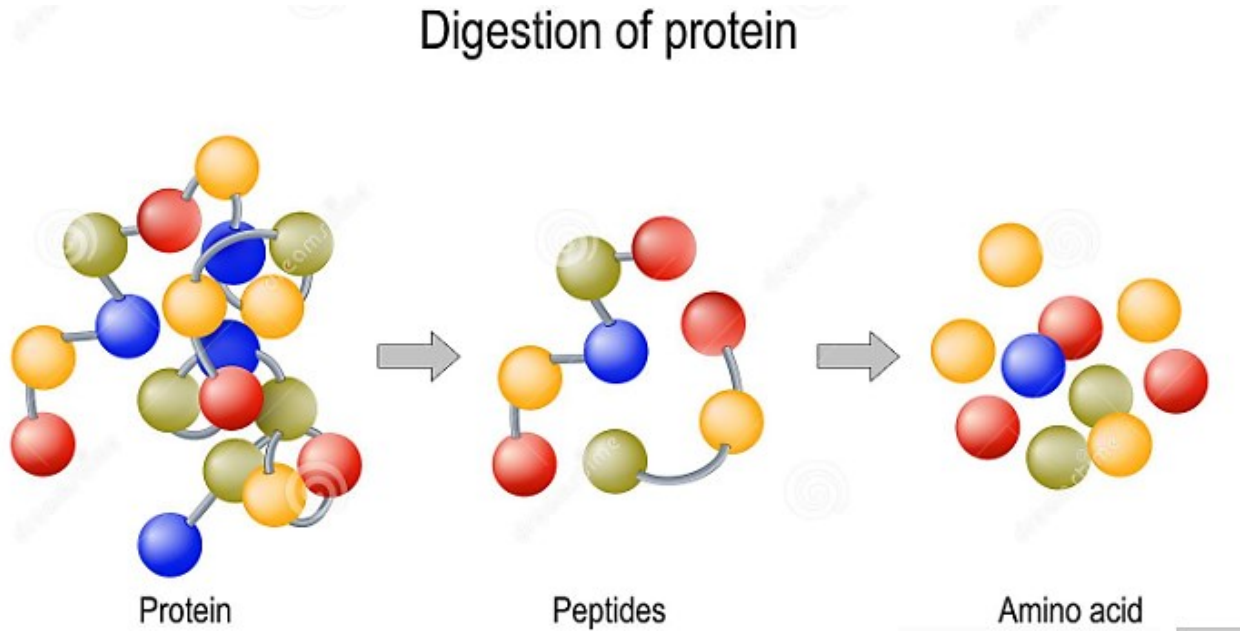

Figura 1: breve schema rappresentativo della digestione delle proteina che avviene nel nostro stomaco (https://it.dreamstime.com/digestione-di-proteina-proteasi-e-peptidasi-degli-enzimi-peptidi-aminoacidi-le-sono-rompe-la-nelle-pi%C3%B9-piccole-catene-del-peptide-image146069137)

È chiaro che qualsiasi alterazione dell'attività proteasica comporta gravi conseguenze, portando a stati patologici. Malattie cardiovascolari, infiammazioni e cancro sono esempi noti. Le proteasi sono normalmente strettamente regolate. Durante la malattia, invece, l'equilibrio tra le proteasi e i loro inibitori è spesso spostato, portando a un controllo spaziale e temporale alterato della scissione del substrato. Di tutti i nostri sistemi di organi, il tratto gastrointestinale contiene i più alti livelli di proteasi. L'errata regolazione delle proteasi è comunemente osservata negli stati infiammatori.

Funzioni proteasiche anormale o carenti potrebbero portare a una serie di condizioni patologiche che possono essere classificate in due gruppi generali: quelle causate da alterazioni nei geni delle proteasi e quelli causati da alterazioni in altri componenti dei sistemi proteolitici. Nel primo caso sono alterazioni frequenti in alcune famiglie di proteasi come le metallo proteasi e sono state collegate allo sviluppo e alla progressione di cancro,

artrite e malattie infiammatorie. Le carenze di proteasi potrebbero anche derivare da alterazioni in altri componenti dei sistemi proteolitici: inibitori, substrati, fattori regolatori e sistemi di trasporto [3].

La classificazione sistematica delle malattie genetiche della proteolisi è utile per una prospettiva globale della diversità delle proteasi, dei meccanismi mutazionali e delle alterazioni patologiche che sono alla base di queste malattie umane.

1.2.1 Furina

Furina è una proteasi, un enzima proteolitico che nell'uomo è codificato dal gene FURIN. Furina appartiene alla famiglia della subtilisina ed è nota anche come PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme). I membri di questa famiglia sono proprotein convertasi (PC) che tagliano le sequenze pro-peptidiche delle proteine rendendole biologicamente attive. Questo enzima si trova principalmente nel compartimento del Golgi [4].

Furina è inizialmente sintetizzata in forma inattiva e subisce un'attivazione autocatalitica mediante il taglio nel sito di scissione del consenso -Arg-Thr-Lys-Arg↓ all'interno della sua pro-regione ammino-terminale (Fig. 2 e 3).

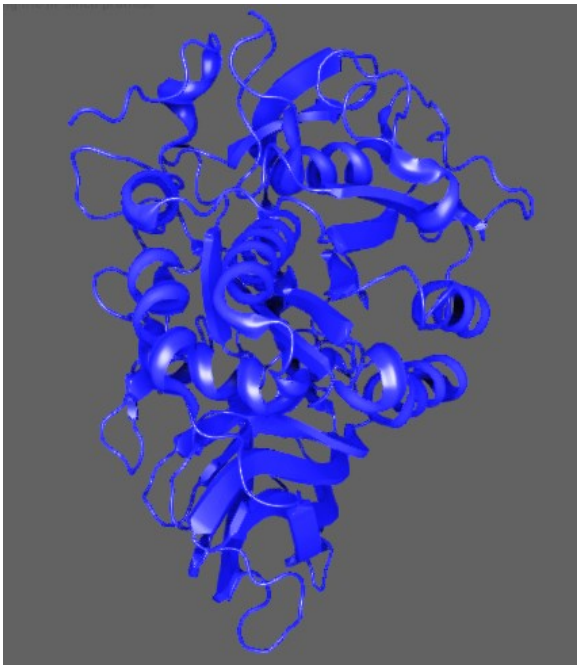

Figura 2: rappresentazione 3D della struttura della Furina (https://www.nextprot.org/entry/NX_P09958/sequence)

Furina è un enzima calcio dipendente quindi, in mancanza di questo ione, il taglio non avviene in modo efficace. Furina scinde le proteine appena a valle di una sequenza bersaglio di amminoacidi basici, solitamente Arg-X-(Arg/Lys)-Arg'↓ dove X è un amminoacido qualsiasi tranne cisteina [4].
Quando un peptide vene tagliato in uno specifico punto, si definisce la parte precedente al taglio Pposition o P mentre la parte successiva al taglio Pprime o P'. Nel caso della Furina per esempio, si hanno quindi le arginine in posizione P1 e P4 e una lisina o arginina in posizione P2.
È stato dimostrato che le arginine in posizione P1 e P4 sono cruciali per l'elaborazione efficiente di un substrato proteico *in vitro*, mentre i residui basici in P2 e P3 hanno meno influenza. Sebbene alcuni potenziali substrati della furina in vivo hanno l'arginina solo in P1 e P4, la maggior parte contiene un residuo basico Lys o Arg in P2. È possibile che l'importanza del residuo in P2 sia dipendente dal tipo di substrato substrato o che il microambiente del compartimento di elaborazione influisca in qualche modo sull'importanza di questo residuo e quindi sull'efficienza del taglio *in vitro*. In generale, Furina catalizza substrati contenenti siti di clivaggio -Arg-X-Lys/Arg-Arg↓ o -Arg-X-X- Arg↓ [4].

Come già detto in precedenza la Furina umana, che contiene un dominio catalitico caratteristico della famiglia delle subtilisina, è un'endoproteasi serina calcio-dipendente che è più attiva tra pH 6,0 e 8,5. Le curve normalizzate indicano che la Furina ha più del 50% dell'attività massima tra pH 6,0 e 8,5 (Fig. 4). Furina richiede, per la sua attivazione, una concentrazione di ioni calcio minima di 0,2mM. I chelanti EDTA ed EGTA sopprimono efficacemente l'attività di Furina, rimuovendo il calcio libero necessario per l'attivazione.

Tra le proteine mature rilasciate dalla furina figurano l'albumina, il componente del complemento C3 ed il fattore di von Willebrand [4]. Oltre a elaborare le proteine precursori cellulari, Furina è utilizzata anche da numerosi agenti patogeni. Ad esempio, le proteine dell'involucro di virus come HIV, il virus dell'influenza, virus ebola e la proteina spike di SARS-CoV-2, devono essere scisse da Furina per diventare completamente funzionali.

Figura 3: sequenza peptidica della Furina (https://www.nextprot.org/entry/NX_P09958/sequence)

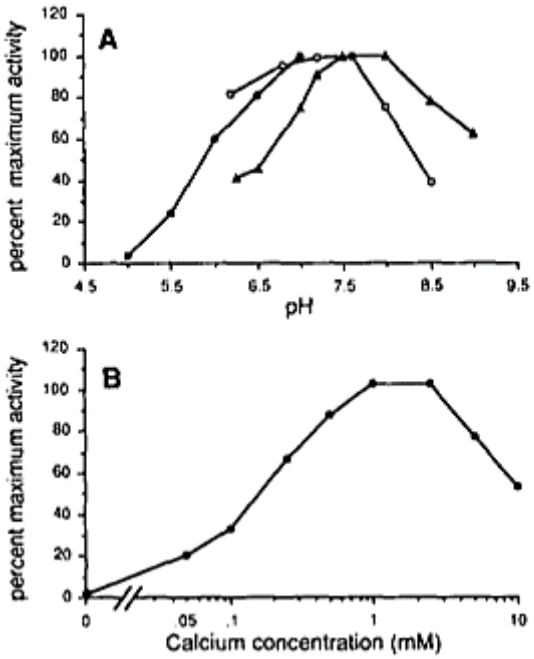

Figura 4: Determinazione del pH ottimale e della dipendenza dal calcio della Furina. A: l'attività della furina in un ampio intervallo di pH. B: si vede la dipendenza della furina dal calcio in base a diverse concentrazioni di ioni calcio [2].

1.3 Proteine

Le proteine sono delle macromolecole costituite da lunghe serie di amminoacidi legati uno all'altro da un legame covalente chiamato legame peptidico. Questo legame peptidico avviene per condensazione tra un gruppo amminico di un amminoacido e il gruppo carbossilico di un altro amminoacido. Le proteine differiscono tra loro per la sequenza di amminoacidi. Questa sequenza è conservata nei geni del DNA. Ogni sequenza di nucleotidi conservati nel DNA, traduce per una sola e specifica proteina. Le diverse sequenze di amminoacidi comportano un ripiegamento tridimensione diverso e specifico che determina una diversa attività biologica della proteina.

Le proteine possono contenere lo stesso tipo e numero di amminoacidi ma differire dall'ordine in cui questi sono situati nella struttura della molecola. Tale aspetto è molto importante perché una piccola variazione nella sequenza degli amminoacidi di una proteina può comportare una variazioni nella struttura tridimensionale della macromolecola che possono rendere la proteina non funzionale o avere funzioni biologiche diverse.

Solitamente i peptidi, una volta sintetizzati, sono preceduti da 2 brevi sequenze amminoacidiche: il peptide segnale e il pro-peptide.
Il peptide segnale o sequenza segnale è una breve sequenza di amminoacidi, solitamente 15-30 amminoacidi di natura idrofobica, presenti all'estremità N-terminale. Questa sequenza è presente della maggior parte delle proteine di nuova sintesi che sono destinate verso la via secretoria. Grazie a questa sequenza di amminoacidi idrofobici, il peptide viene riconosciuto dalla particella di riconoscimento del segnale. La maggior parte delle proteine che possiedono questa sequenza peptidica di riconoscimento, risiedono all'interno di determinati organelli come il reticolo endoplasmatico, il Golgi o gli endosomi, nella cellula o nella maggior parte delle

membrane cellulari. I peptidi segnale hanno il ruolo di condurre la proteine nel luogo di interesse, solitamente la membrana cellulare.
Il precursore proteico, chiamato anche pro-peptide, è un'altra breve sequenza peptidica che, una volta tagliata da PC, come la furina, quindi mediante modificazioni post-traduzionali, rende la proteina biologicamente attiva. Se il taglio della proteina non avviene, la proteina rimane nella sua forma inattiva finché non avviene il taglio.

Le proteine vengono spesso modificate mediante la modificazione post traduzionale. Questo processo avviene grazie a degli enzimi che, tagliando la sequenza pro-peptidica della proteina, rendono quest'ultima biologicamente attiva e pronta ad entrare a far parte dei processi biologici della cellula.

Le proteine costituiscono una parte fondamentale di molti processi biologici a cui prendono parte all'interno della cellula. Esse possono avere funzioni strutturali o meccaniche, come l'actina e la miosina nei muscoli o altre proteine che costituiscono il citoscheletro, che formano strutture come i tuboli e microtuboli che permettono di mantenere la struttura della cellula. Altre invece, permettono la trasmissione di segnali inter ed intracellulari come nella risposta immunitaria, nell'adesione cellulare e nel ciclo cellulare. Le proteine possono anche lavorare e associarsi in complessi multiproteici stabili per raggiungere una particolare funzione. Una volta sintetizzate dalle cellule, le proteine vivono solo per un certo periodo di tempo per poi venire degradate. Questo processo viene chiamato *turnover* proteico. La loro emivita può essere molto varia. Può andare da poche ore fino ad alcuni anni. Tuttavia l'emivita media si aggira intorno a 1 o 2 giorni.

Le proteine svolgono un ruolo fondamentale nella cellula. Hanno compiti specifici codificate nelle informazioni contenute nei geni. Esse possono svolgere una funzione strutturale, di trasporto (di ossigeno, minerali, lipidi, di membrana), enzimatica, contrattile, energetica, ormonale e di difesa.

Ciò che permette loro questa grande varietà di funzioni è la possibilità di legarsi tra loro e con altre molecole in modo specifico. Tutto ciò è permesso da una sequenza di amminoacidi che definiscono il sito di legame che permette questa unione tra due proteine. Un tipico esempio di una sequenza che codifica per un sito di legame è la sequenza RGD che permette alla cellula di legarsi alla matrice extra cellulare (ECM). Questi legami sono molto specifici, reversibili e dipendono fortemente dalla struttura terziaria della proteina e dalla disponibilità dei siti di legame delle proteine. Le proteine possono anche legarsi, o anche essere integrate, nelle membrane cellulari e vengono chiamate proteine trans-membranali.

1.3.1 Peptidi

I peptidi sono brevi sequenze di amminoacidi. A seconda del numero di amminoacidi che li compongono sono classificati in diversi modi: dipeptidi (2 amminoacidi), tripeptidi (3 amminoacidi), oligopeptidi (meno di 20 amminoacidi) e polipeptidi.

L'individuazione di peptidi bioattivi all'interno di una sequenza proteica serve per riprodurre una specifica funzione proteica senza impiegare l'intera proteina. L'uso di brevi sequenze peptidiche è vantaggioso per la

loro stabilità, solubilità, disponibilità in quantità elevate, elevati gradi di purezza ed economicità. D'altra parte, le proteine rispetto ai peptidi, a parità di concentrazione, sono biologicamente più attive, ma sono instabili, insolubili e costose.

1.3.2 Desmogleina-2

La desmogleina-2 è una proteina da 122,2 kDa composta da 1118 aminoacidi. La desmogleina-2 è una glicoproteica trans membranale e, tramite molecole di calcio, lega altre desmogleine creando delle giunzioni cellulari chiamati desmosomi (Fig. 5, Fig. 6). La desmogleina-2 fa parte delle superfamiglia delle cadeine. La superfamiglia delle caderine comprende caderine, protocaderine, desmogleine, desmocolline e altro ancora.

Le caderine sono un tipo di molecola di adesione cellulare importante nella formazione di giunzioni aderenti per consentire alle cellule di aderire l'una all'altra. Le caderine sono proteine transmembranali, e dipendono dagli ioni calcio Ca_2^+ per funzionare, da cui il loro nome. La famiglia delle caderine è essenziale per mantenere il contatto cellula-cellula e regolare i complessi citoscheletrici. L'adesione cellula-cellula è mediata dai domini extracellulari della caderina, mentre la coda citoplasmatica intracellulare interagisce con un complesso di proteine che permette la connessione al citoscheletro di actina.
Sebbene le caderine classiche svolgano un ruolo nella formazione del layer cellulare e nella formazione della struttura, le caderine desmosomiali si concentrano sulla resistenza al danno cellulare. Le caderine desmosomiali hanno il compito di mantenere la funzione dei desmosomi ovvero di sopportare lo stress meccanico dei tessuti. Esistono due tipi di caderine desmosomiali, chiamate desmogleine e desmocolline.

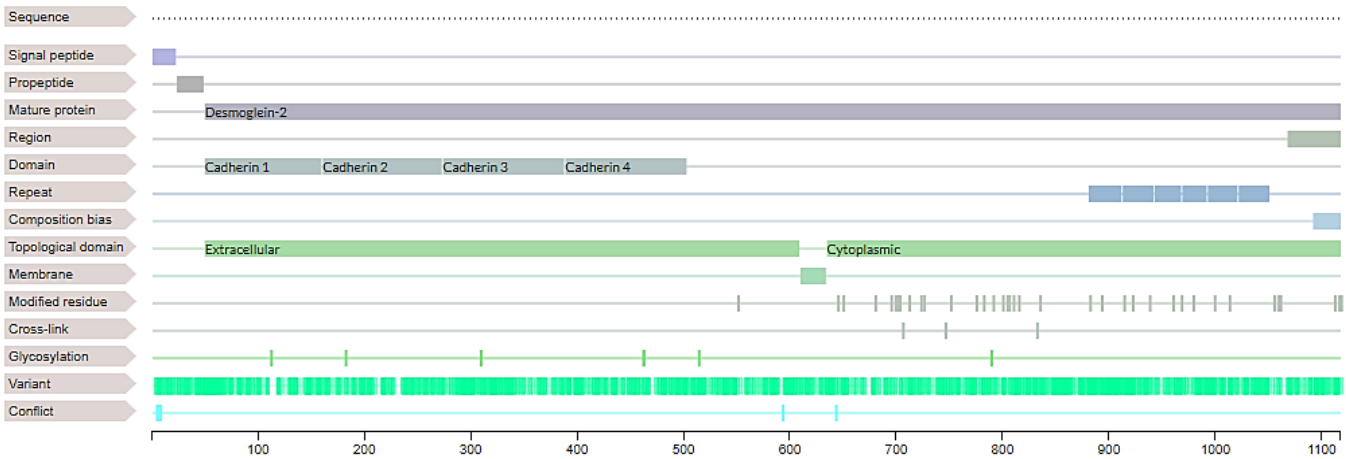

Figura 5: rappresentazione della sequenza amminoacidica della desmogleina-2

Ci sono tre isoforme di Dsg. L'espressione di Dsg1 e Dsg3 è ristretta ad alcuni epiteli squamosi stratificati, mentre il Dsg2 è presente in tutti i tessuti contenenti desmosoma, come le cellule epiteliali gastriche e nei cardiomiociti [5].
La desmogleina-2 è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene DSG2 ed è altamente espressa nei tessuti contenenti i desmosomi, come il muscolo cardiaco, il colon e altre linee cellulari di derivazione epiteliale

semplici e stratificate. La desmogleina-2 è l'unica isoforma di desmogleina espressa nei cardiomiociti. Nel muscolo cardiaco, queste regioni sono regioni specializzate note come dischi intercalari.

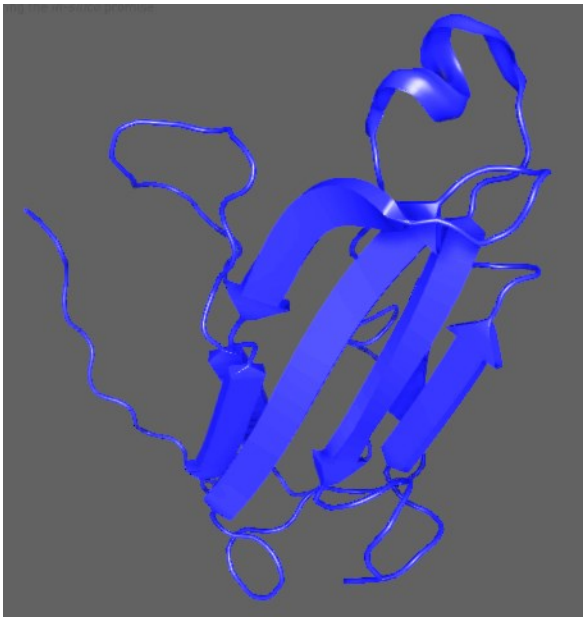

Figura 6: rappresentazione tridimensionale della desmogleina-2

La barriera epiteliale intestinale è costituita da un monostrato di cellule epiteliali colonnari denominate enterociti, tenute insieme e sigillate da giunzioni intercellulari circonferenziali. Le giunzioni intercellulari formano la "barra terminale", che è composta da giunzioni strette, giunzioni aderenti e desmosomi. Il mantenimento di questa barriera svolge un ruolo fondamentale nella protezione dell'organismo contro i patogeni luminali, e quindi una maggiore permeabilità paracellulare provoca contaminazione sistemica, portando potenzialmente a uno stato di grave infiammazione sistemica [6].

È ben noto che giunzioni strette formate da claudine e occludina sigillano la fessura intercellulare, mentre le giunzioni aderenti costituite da caderine forniscono la resistenza meccanica tra le cellule epiteliali. Un ruolo analogo è stato attribuito ai desmosomi nella barriera intestinale epiteliale, dove sono composti dalle proteine di adesione della famiglia delle caderine desmogleina-2 (Dsg2) e desmocollina 2 [6].
L'adesione mediata dalla desmogleina-2 è necessaria per l'integrità della barriera epiteliale intestinale. L'integrità delle giunzioni intercellulari che formano la "barra terminale" nell'epitelio intestinale è fondamentale per sigillare la barriera intestinale. Mentre i ruoli specifici delle giunzioni strette e aderenti sono ben noti, il contributo dell'adesione desmosomiale al mantenimento della barriera epiteliale intestinale, non è stato affrontato in modo specifico, ma, si è dimostrato che, l'adesione mediata da Dsg2 influisce sulle funzioni della barriera epiteliale intestinale in vitro [6].
È sempre più riconosciuto che i desmosomi agiscono non solo come "collanti" intercellulari, ma possono modulare funzioni cellulari cruciali come la proliferazione, l'apoptosi o l'organizzazione del citoscheletro [7].

Si pensa che le caderine, incluso il Dsgs, siano inizialmente sintetizzate come proteine precursori inattive nel reticolo endoplasmatico e transitino attraverso il cis e il trans-Golgi. Le desmogleine sono inizialmente inattive a causa di una sequenza propeptidica N-terminale, che viene poi scissa post-traduzionalmente dalle convertasi proteiche (PC), nel nostro caso Furina, per creare proteine mature e biologicamente attive. Le desmogleine, una volta attivate, verranno assemblate in giunzioni aderenti o desmosomi [8].
Le proteasi tagliano il C-terminale nel motivo di riconoscimento Arg-X-Lys-Arg (RXKR), che è presente in tutte le molecole di caderina [8],[9]. La mutazione del sito di riconoscimento o l'inibizione selettiva delle PC impedisce la maturazione della desmogleina-2 e ne annulla la funzione adesiva [8]. Precedenti studi sull'E-caderina hanno mostrato che, se questa scissione proteolitica è compromessa, la pro-caderina si integra nella membrana ma non è in grado di conferire adesività, poiché la prosequenza può impedire l'interazione riuscita sia per impedimento sterico che mascherando un sito di riconoscimento [9].

Diversi membri della famiglia delle desmogleine sono stati associati ad altre malattie della pelle. Infatti, numerose ricerche dimostrato che l'alterazione della stabilità della giunzione o dello stato di assemblaggio può portare a malattie ereditarie, vesciche e cancro. È stato anche riportato che l'espressione assente o abnorme di Dsg2 è associata alla progressione di vari tumori umani [10].
Alterazioni della molecola di adesione cellulare E-caderina sono state individuate nei carcinomi gastrici. I carcinomi gastrici derivano da una serie di cambiamenti genetici comprendenti alterazioni nei geni oncosoppressori, oncogeni, molecole di adesione cellulare, fattori di crescita e alterazioni della stabilità genetica. Al carcinoma gastrico sono state associate specifiche alterazioni genetiche con il tipo istologico [5]. Difetti nell'adesione cellulare si sono dimostrati cruciali per lo sviluppo di cancro gastrico di tipo diffuso. Diverse mutazioni somatiche nel gene E-caderina, che codifica per uno dei principali componenti della zonula aderente, sono state trovate nel 50% di questi tumori. Inoltre, è stato dimostrato che le mutazioni germinali del gene E-caderina sono la causa del cancro gastrico di tipo diffuso ereditario [5].
In diversi studi, è stata riportata un'espressione di caderina E moderatamente o completamente ridotta fino al 94% dei tumori di tipo diffuso. L'analisi immunoistochimica in altri tipi di tumore ha dimostrato la perdita dell'espressione di Dsg2 nel carcinoma mammario e un'associazione *in vitro* con una ridotta aggregazione cellula-cellula e una maggiore invasione e motilità [5].
Tuttavia, ad oggi, il ruolo del Dsg2 nel cancro è ancora incerto. Studi emergenti hanno indicato che l'espressione di Dsg2 era *down*-regolato nel cancro gastrico, nel cancro alla prostata, nel melanoma, nel cancro del pancreas e nel cancro del colon, che ha mostrato le funzioni del Dsg2 come soppressore del tumore. Al contrario, altre indagini ha riferito che Dsg2 era sovraespresso in skinSCC e carcinoma a cellule basali e carcinoma polmonare non a piccole cellule, mentre implicava la funzione oncogenica della proteina Dsg2 [10].

Bassi livelli di desmogleina nell'epitelio intestinale possono causare difetti di permeabilità e alterazioni della morfologia della giunzione stretta. Un esempio di malattia relativa a una alta permeabilità dell'epitelio è il morbo di Crohn (CD) [7]. È noto che i pazienti affetti da CD presentano profonde alterazioni dell'integrità delle giunzioni occludenti. Allo stesso modo, è stato riportato che la E-caderina è dislocata nel CD e quindi

contribuisce a una maggiore permeabilità intestinale [7]. Tuttavia, sebbene l'adesione desmosomica sia fondamentale per integrità della barriera epiteliale intestinale, non si sa nulla sul ruolo dei desmosomi nella disfunzione della barriera intestinale indotta da CD. Si ipotizza che la perdita delle funzioni di barriera in risposta alla compromissione di Dsg2 possa essere semplicemente una conseguenza di un'adesione intercellulare indebolita. In questo scenario, le giunzioni occludenti possono rompersi perché non possono resistere alla deformazione meccanica quando l'adesione desmosomica è compromessa [7].

In tabella 1 vengono riportate le diverse proprietà della Desmogleina-2.

Desmogleina-2	
Famiglia	Cadeine
Gene	DSG2
Caratteristiche generali	Componente delle giunzioni desmosomiali intercellulari. Coinvolto nell'interazione delle proteine della placca e dei filamenti intermedi che mediano l'adesione cellula-cellula
Funzioni molecolari	È calcio dipendente Consente l'adesione cellulare Consente il legame con le proteine adesive cellulari coinvolte nel fascio della comunicazione dei miociti
Funzioni biologiche	È presente nel fascio dell'adesione dei miociti His cell-Purkinje coinvolto nella comunicazione cellulare È coinvolta nell'adesione cellulare È coinvolta nell'adesione cellula-cellula Coinvolto nell'adesione cellulare omofila tramite molecole di adesione della membrana plasmatica Coinvolto nel miocita di Purkinje Coinvolto nella regolazione della frequenza cardiaca mediante conduzione cardiaca

	Coinvolto nella regolazione del potenziale d'azione delle cellule del muscolo cardiaco

Tabella 1: Proprietà della Desmogleina-2

1.4 Cinetica enzimatica

La cinetica enzimatica o di Michaelis-Menten descrive l'andamento della velocità di una reazione catalizzata da enzimi, al variare della concentrazione del substrato, dell'enzima e da altri fattori che possono influenzarla.

Gli enzimi sono dei catalizzatori dei processi biologici, quindi aumentano la velocità di reazione. Gli enzimi lavorano proponendo un meccanismo caratterizzato da una energia di attivazione inferiore che permette alle molecole di raggiungere più rapidamente uno stato di equilibrio termodinamico. In pratica, agendo da un punto di vista cinetico, gli enzimi permettono di far avvenire rapidamente delle reazioni che normalmente impiegherebbero molto più tempo anche se spontanee.

Una reazione cinetica enzimatica la possiamo così schematizzare:

$$E + S \underset{}{\overset{k1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k2} E + P$$

Dove:

- E: enzima libero che taglia il substrato;
- S: substrato
- ES: complesso substrato-enzima. ES è un intermedio di reazione, dove l'energia di attivazione è tale da permettere che la reazione specifica avvenga.
- P: prodotto della reazione enzimatica;
- k_1, k_2: sono le costanti cinematiche, cioè le costanti specifiche di velocità di reazione.

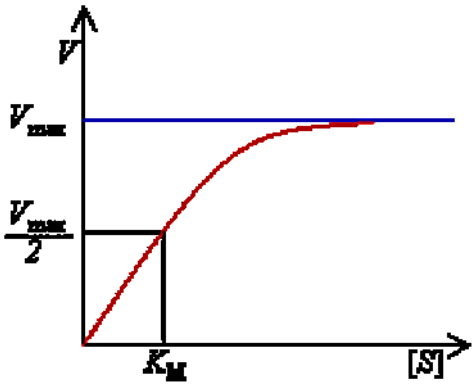

Figura 7: Grafico che mostra l'andamento della velocità di reazione enzimatica in funzione della concentrazione di substrato.

La velocità di reazione di questa equazione dipenda dalla concentrazione di substrato e avremo un andamento come quello in Fig. 7. Se la concentrazione del substrato supera quella dell'enzima, arriveremo al raggiungimento della sua saturazione, in quanto il substrato non viene più attaccato da enzimi. Si raggiunge quindi quella che è definita la velocità massima di reazione (Vmax).

L'equazione della velocità di reazione o formazione del prodotto è:

$$V = \frac{Vmax \times C}{Km + C}$$

Dove:

- V: velocità di reazione;
- C: concentrazione del substrato;
- Km: è la costante di Michaelis-Menten.

Km è una grandezza tipica di ogni enzima e rappresenta l'affinità tra l'enzima e il substrato in forma qualitativa. Km indica la concentrazione di substrato tale da avere una velocità di reazione pari alla metà di Vmax. Quindi, più Km è bassa, più bassa sarà la concentrazione di substrato necessario per raggiungere una velocità di reazione pari alla metà di quella massima. Km ci indica l'affinità che c'è tra enzima e substrato, o meglio, la forza di legame tra substrato ed enzima. In altre parole, più Km è piccola, migliore è il substrato per quell'enzima e viceversa.

La concentrazione di substrato è fondamentale perché influenza sia la Km che la Vmax. A basse concentrazioni avremo delle velocità di reazioni relativamente alte mentre, a concentrazioni alte, si va in saturazione e la velocità di formazione del prodotto rimane costante. Nei nostri test faremo in modo che la concentrazione di substrato sia tale da avere una velocità di reazione massima, quindi una Km doppia.

1.5 Inibitori

Un inibitore enzimatico è una molecola che si lega a un enzima bloccandone l'attività. Come già detto prima, le proteasi sono proteine che accelerano le reazioni chimiche. Un enzima facilita una specifica reazione chimica legando il substrato al suo sito attivo, un'area specializzata dell'enzima. Gli inibitori sono molecole che interagiscono con gli enzimi andando ad occupare il loro sito attivo in modo permanente o temporaneo. In questo modo si va a bloccare o ridurre la catalisi della reazione.

Gli inibitori enzimatici svolgono un ruolo importante in tutte le cellule, poiché sono generalmente specifici di un enzima e servono a controllare l'attività di quell'enzima. Ad esempio, gli enzimi in una via metabolica possono essere inibiti da molecole prodotte successivamente nella stessa via. A volte invece, i residui ottenuti dal taglio stesso, possono risultare degli inibitori delle proteasi stessa. Questo *feedback* negativo permette alla cellula di mantenere un certo equilibrio [11].

Gli inibitori enzimatici sono un insieme molto eterogeneo di sostanze. Possono essere piccole molecole o lunghe catene peptidiche. Un esempio di peptidi che fungono da inibitori sono la superfamiglia delle serpine, inibitori delle serin proteasi.

Alcuni esempi di inibitori specifici per Furina sono l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) e il cloro metil chetone (cmk) Fig. 8. L'EDTA svolge un azione chelante cioè lega ioni calcio Ca^{2+} sottraendoli alla Furina che, essendo calcio dipendente, perde la sua struttura terziaria non riuscendo più a svolge la sua azione

biologica [4]. Il cmk ha un a sequenza Dec-RVKR-cmk; ideale per il taglio della Furina. Questa composto contiene un cloro che è molto instabile ed elettronegativo. Quando la Furina taglia questa sequenza Dec-RVKR↓-cmk, si crea un radicale libero che si lega al sito attivo della Furina occupandolo. In questo modo la furina non è più in grado di tagliare nessun substrato.

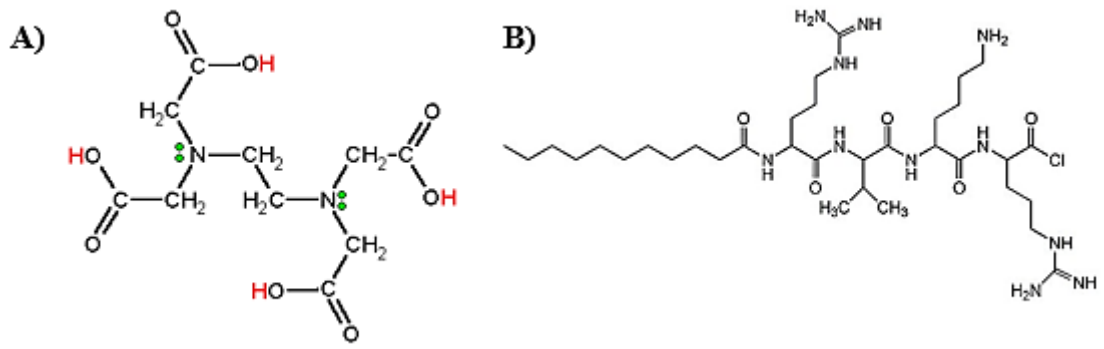

Figura 8: A) formula chimica dell'EDTA; B) formula chimica del cmk.

Molti farmaci inibiscono un enzima up-regolato o un enzima critico per la sopravvivenza di un agente patogeno come un virus, un batterio o un parassita. Un esempio sono gli inibitori della proteasi usati per il trattamento dell'HIV/AIDS. Poiché gli inibitori anti-patogeni generalmente hanno come bersaglio solo un enzima, tali farmaci sono altamente specifici e generalmente producono pochi effetti collaterali nell'uomo. Gli inibitori degli enzimi usati in medicina hanno spesso costanti di dissociazione basse, il che significa che è necessaria solo una piccola quantità di inibitore per inibire l'enzima. Questo permette di ridurre gli effetti collaterali. Tuttavia l'utilizzo di questi inibitori è spesso complicato in quanto l'inibitore di un enzima potrebbe causare l'alterazione di un altro enzima non voluta. Oggigiorno sono noti pochissimi inibitori specifici, e quindi il loro uso è stato limitato [11].

Per utilizzare gli inibitori in modo efficace, è necessario comprendere i meccanismi attraverso i quali gli inibitori agiscono. Gli inibitori si dividono in due classi: irreversibili e reversibili.
Gli inibitori irreversibili si legano in modo covalente al sito catalitico dell'enzima impedendone la normale attività.
Gli inibitori reversibili invece si legano non covalentemente all'enzima (ponte idrogeno, interazione idrofobica o legame ionico) e possono dare tre tipi diversi di inibizione a seconda se si legano all'enzima, al complesso enzima-substrato o ad entrambi. Questi tre tipi di inibizione vengono definiti: inibizione competitiva, inibizione acompetitiva e inibizione non competitiva o mista.

1.5.1 Inibizione competitiva

Si definisce inibizione competitiva quando l'inibitore compete con il substrato e si lega al sito catalitico dell'enzima più velocemente. Questi inibitori sono spesso simili al vero substrato. Il loro effetto dipende dalle concentrazioni dei substrati e dell'inibitore e il grado di inibizione dipende dal numero di siti attivi occupati

dall'inibitore rispetto al substrato. Ciò impedisce la formazione di complessi enzima-substrato e quindi di ridurre l'enzima biologicamente attivo libero ma non la velocità di reazione Fig. 9.

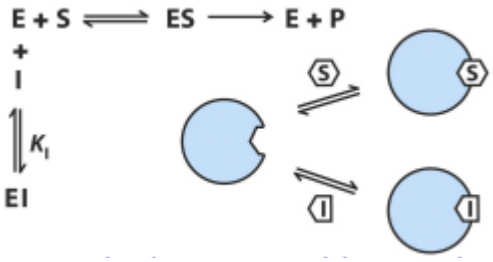

Figura 9: reazione competitiva

L'equazione della velocità allo stato stazionario in presenza di un inibitore competitivo è:

$$V = \frac{Vmax}{Km \times \left(1 + \frac{I}{Ki}\right) + S}$$

- I: inibitore
- Ki: costante di inibizione

L'equazione mostra che un inibitore competitivo modifica Km senza influenzare Vmax e l'inibizione ottenuta dipende dalle concentrazioni di S e di I e quindi dalle loro cosanti Km e Ki. L'inibizione può però essere superata aumentando la concentrazione di substrato [12].

1.5.2 Inibizione acompetitiva

Si definisce inibizione acompetitiva quando l'inibitore si lega al complesso enzima-substrato (ES) per formare un complesso ESI inattivo. In questo caso l'inibitore si lega all'enzima in un punto differente dal sito attivo causando una modificazione conformazionale riducendo così l'affinità enzima-substrato Fig. 10. Poiché non competono con le molecole del substrato, gli inibitori non competitivi non sono influenzati dalla concentrazione del substrato, quindi si abbassa la velocità massima ma non si altera la Km.

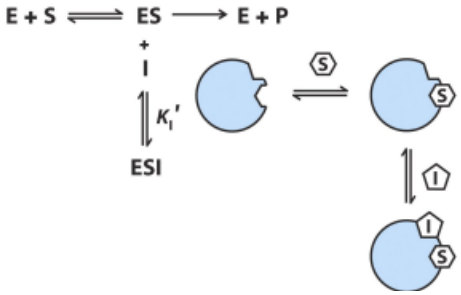

Figura 10: reazione acompetitiva

L'equazione della velocità in stato stazionario per l'inibizione non competitiva è mostrata di seguito.

$$V = \frac{Vmax}{Km + S * \left(1 + \frac{I}{Ki}\right)}$$

In questo caso la costante Ki va a modificare S ma non Km. A differenza degli inibitori competitivi, l'entità dell'inibizione da parte di un inibitore non competitivo aumenta con l'aumento della concentrazione del substrato. Questo perché c'è una maggiore concentrazione del complesso ES a concentrazioni di substrato più elevate [12].

1.5.3 Inibizione non competitiva o inibizione mista

L'inibizione non competitiva o inibizione mista è così definita quando l'inibitore può legarsi sia all'enzima libero che al complesso enzima-substrato. A seconda della diversa affinità tra enzima libero e il complesso enzima-substrato avremo degli effetti diversi. Se il complesso e l'enzima hanno la stessa affinità per l'inibitore l'effetto è quello di modificare sia la velocità di reazione che la quantità di substrato per saturare l'enzima. Se l'affinità dell'inibitore è maggiore per il complesso enzima substrato diminuisce l'efficienza dell'enzima. Se invece l'affinità dell'inibitore è maggiore per l'enzima libero avremo lo stesso comportamento dell'inibizione competitiva Fig. 11.

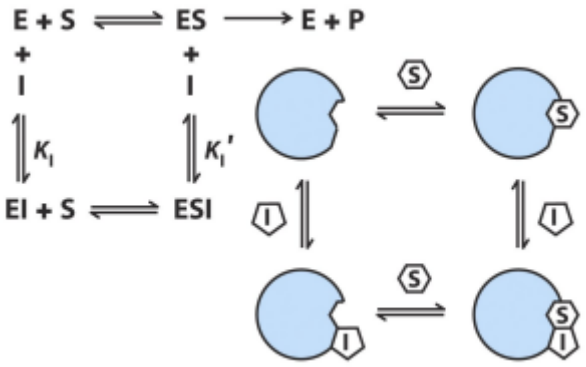

Figura 11: reazione non competitiva o mista

Poiché gli inibitori non competitivi si legano all'enzima in siti diversi rispetto al substrato, il valore di Km non è influenzato dalla loro presenza. L'inibitore non competitivo può legarsi a E o ES, mentre il substrato può legarsi a E o EI. Il complesso enzima-substrato-inibitore (ESI) è cataliticamente inattivo. Gli inibitori non competitivi riducono Vmax per una reazione catalizzata da enzimi.

L'equazione della velocità di equilibrio in presenza di un inibitore non competitivo, è mostrata di seguito.

$$V = \frac{Vmax}{Km * \left(1 + \frac{I}{Ki}\right) + S * \left(1 + \frac{I}{Ki}\right)}$$

In questo caso sia Km che S sono modificati dalla costante di inibizione Ki. Questo fa sì che sia la velocità massima che la Km possono dipendere da Ki [12].

1.6 Metodi di analisi *in vitro*

I saggi *in vitro* sono dei test per verificare dei processi biologici al di fuori dell'organismo vivente. Sono quindi dei test semplificati che ci permettono di isolare e analizzare un singolo fenomeno ma, allo stesso tempo, non ci permettono di avere una visione d'insieme completa dei processi biologici studiati. I metodi utilizzati durante questa tesi sono la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la fluorescenza. Queste tecniche verranno meglio descritte nel capitolo su materiali e metodi.

Per capire le tecniche di analisi è importante sapere in che punto gli enzimi tagliano il peptide e come esso viene denominato. Quando il peptide taglia in un sito specifico andremo a definire la parte del peptide prima del taglio P-position o P mentre la parte successiva al taglio viene chiamata P-prime o P' (Fig. 12) [13].

Un esempio lo possiamo fare con Furina. La furina riconosce sequenze Arg-X-(Arg/Lys)-Arg'↓ e taglia il peptide dopo tale sequenza. Questo vuol dire che la parte di peptide che precede la sequenza Arg-X-(Arg/Lys)-Arg'↓, essa compresa, viene tagliata e denominata P mentre, la parte di peptide successiva, viene denominata P'.

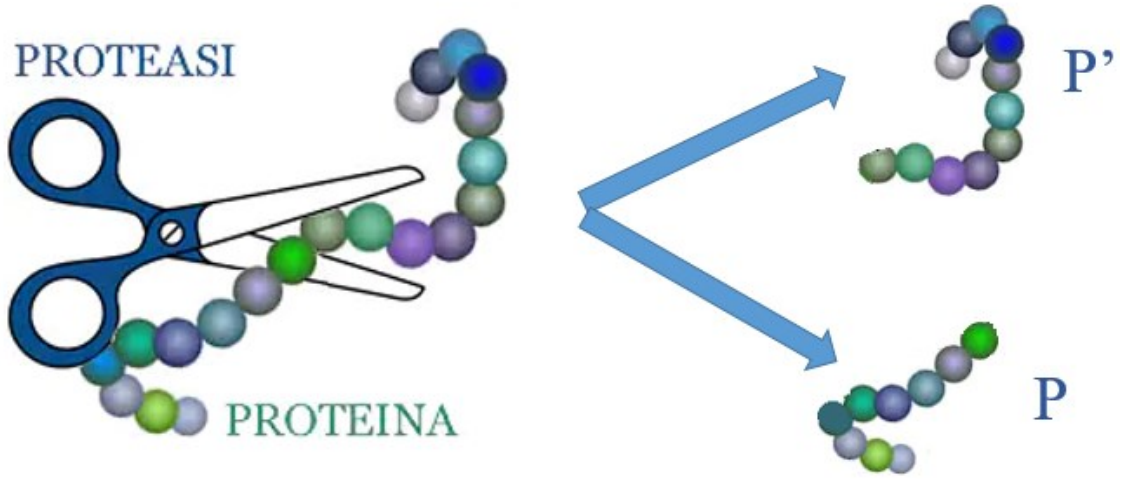

Figura 12: taglio del peptide da parte del enzima, si ottiene coì la prima parte del enzima denominata P o Pposition mentre, la seconda parte viene denominata P' o Pprime.

Sia la tecnica dell'HPLC che la fluorescenza possono essere utilizzate per verificare la scissione del peptide da parte dell'enzima. Ogni tecnica ha però vantaggi e svantaggi:

- Nell'HPLC si ha la possibilità di utilizzare il peptide intero, quindi avremo sia la porzione P che P'. Quindi, il substrato utilizzato nell'HPLC imita molto meglio quello naturale.
  Il substrato utilizzato nella fluorescenza invece, è privo della porzione P' che viene sostituito dal gruppo fluorescente AMC.
- Anche se il taglio da parte dell'enzima non avviene nel punto preciso, si riesce comunque a vedere che la quantità del peptide non tagliato è diminuito.

Nella fluorescenza invece il taglio da parte dell'enzima deve avvenire nel punto prestabilito sennò il gruppo AMC non si "stacca" dal peptide e non emette fluorescenza. Il substrato utilizzato quindi, imita solo in parte il substrato naturale. Questo rende l'HPLC più precisa della fluorescenza.

- L'HPLC ha come svantaggio che è molto lenta rispetto alla fluorescenza che è molto veloce come tipo di analisi.
- La fluorescenza ha un costo più elevato rispetto all'HPLC.
- Se non fosse per il tempo impiegato per fare l'analisi, l'HPLC ci permette di fare analisi più precise e realistiche.

1.7 Scopo della tesi

Questa tesi è parte integrante di un progetto a più ampio respiro che include substrati diversi, tagliati da enzimi differenti.

Scopo della tesi è la sintesi e caratterizzazione di substrati differenti per la creazione di una piccola libreria peptidica da utilizzare per lo studio di stati patologici e non gastrointestinali.

Tra i vari substrati sintetizzati, particolare scopo di questa tesi è caratterizzare il taglio di desmoglein-2 (**KHPHLVRQKR$_{49}$↓)** che comporta l'attivazione della proteina stessa; pochi sono infatti gli studi relativi alla sua maturazione. Inoltre, i peptidi che mimano il sito di taglio di desmoglein-2 verranno utilizzati come piattaforme per testare librerie di piccole molecole in saggi enzimatici con furina. Attualmente gli *screening in vitro* si basano su Pyr-RTKR-AMC, un substrato canonico generico. Quest'ultimo contiene solo informazioni minime (posizioni P4-P1). La presenza di una sequenza estesa è importante perché è noto che gli amminoacidi periferici (>P4) modulano l'attività enzimatica.

I risultati verranno ulteriormente confrontati con *screening* che verranno fatti in parallelo su altri substrati per Furina allo scopo di valutare se alcuni composti sono in grado di bloccare/aumentare preferenzialmente il *processing* di un singolo substrato.

Lo scopo ultimo del progetto è quello di creare un sensore diagnostico composto da una piastra da 96 pozzetti per misurare l'attività enzimatica di campioni di feci di volontari sani e pazienti con malattie infiammatorie intestinali (IBD) utilizzando una serie di substrati fluorogenici. Ci aspettiamo che sequenze peptidiche specifiche vengano tagliate in modo massiccio mentre altre non subiranno alcuna elaborazione. Lo schema dei substrati scissi sarà unico, a seconda della persona e del suo avanzamento nelle condizioni di malattia (medicina personalizzata). I dati consentiranno un migliore profilo dello stato patologico del paziente, offrendo ai medici un possibile nuovo strumento diagnostico. In effetti, i medici hanno opzioni limitate, comprese le indagini colonscopia molto invasive. Al contrario, il nostro sistema può essere eseguito in qualsiasi momento senza ulteriori sofferenze per il paziente. Alla fine, i test hanno applicazioni più ampie e possono essere utilizzati per profilare le attività proteasiche di altri eventi (patologici) rilevanti.

CAPITOLO 2

Materiali, strumenti e metodi

2.1 Materiali

Si elencano di seguito i principali materiali utilizzati nel presente lavoro di tesi

2.1.1 Reagenti e solventi

Reagenti forniti da *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO, USA):

- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)
- N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA)
- N,N,N′,N′-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU)
- N,N-Dimethylformamide (DMF)
- 1-Hydroxybenzotriazole hydrate (HoBt)
- Ethyl cyano(hydroxyimino)acetate (Oxyma Pure)
- Methyl alcohol, Metanolo
- Ethyl nitrile
- Diclorometano (DCM)
- HATU
- Tricloruro di fosforo

Reagenti forniti da *Merck Millipore* (Burlington, Massachusetts, Stati Uniti):

- Triethylsilane (TES)

Reagenti forniti da *Biosolve* (Valkenswaard, Holland):

- Dietiletere
- Piperdina
- Acido trifluoroacetico (TFA)

Reagenti forniti da *Iris Biotech GmbH* (Marktredwitz, Germany):

- N-metil-2-pirrolidone (NMP)

Reagenti forniti da *Applied Biosystems* (Waltham, Massachusetts, USA):

- 4-(Dimethylamino)pyridine (DMAP/DMF)

Reagenti forniti da *Prolabo* (Radnor, Pennsylvania, United States of America):

- Cloruro di calico
- Sodio acetato

Reagenti forniti da *Novabiochem* (Darmstadt, Germany):

- Amminoacidi Fmoc protetti

Reagenti forniti da *Bachem* (Bubendorf, Switzerland):

- Fmoc-Val-Sasrin
- Fmoc-Ile-Sasrin
- H-Ile-AMC
- H-Gln-AMC

Reagenti forniti da *Jansen* (Beerse, Belgium):

- Anidride acetica

Reagenti forniti da *Applied Biosystems* (Waltham, Massachusetts, USA):

- 4-(Dimethylamino)pyridine (DMAP/DMF)

Reagenti forniti da *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, Massachusetts, USA):

- Acetato di etile
- Solfato di sodio

Reagenti forniti da *Laboratory chemical s.p.a.* (Milano, Italia):

- Bicarbonato di sodio

2.1.2 Sequenze peptidiche utilizzate

I peptidi sintetizzati nella seguente tesi sono stati i seguenti Tabella 2 e 3.

Peptide	MW [Da]
Ac-GQII-AMC	628,973
Ac-SKGQII-AMC	844,227
Ac-RSSKGQII-AMC	1087,495
Ac-MDRSSKGQII-AMC	1333,782

Tabella 2: peptide Ac-MDRSSKGQII-AMC

Peptide	MW [Da]
Ac- LVVQ-AMC	738,705
Ac- ATLVVQ-AMC	910,89
Ac- STATLVVQ-AMC	1099,075
Ac- SSTATLVVQ-AMC	1186,154

Tabella 3: peptide Ac- SSTATLVVQ-AMC

2.2 Strumentazione

Di seguito vengono elencati gli strumenti utilizzati per questa tesi.

2.2.1 Sintetizzatore per sintesi peptidica su fase solida

Syro I prodotto dalla MultiSynTech (Witten, Germania) Fig. 13.

Figura 13: Sintetizzatore Syro (MultiSynTech)

2.2.2 Spettrofotometro UV/Vis

Spettrofotometro UV/Vis modello Lamda 2, fornito da Perkin Elmer (Waltham, Massachussets, USA) Fig. 14.

Figura 14: spettrofotometro UV/Vis Lambda 2.

2.2.3 HPLC per analisi cromatografica

I sistemi cromatografici di seguito elencati sono stati utilizzati per l'analisi del peptide. Sono stati utilizzati due strumenti diversi per effettuare questa analisi.

A. Per l'analisi RP-HPLC analitica, il sistema è costituito da Fig. 15:

- Sistema di pompaggio multisolvente HPLC modello Waters 600E Controller (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA);
- Autocampionatore modello Waters 717 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA);
- Rilevatore UV/VIS multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 996 PDA (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA);
- Software Empower Pro, sviluppato da Waters Corporation (Milford, Massachusetts, USA), utilizzato per gestire il sistema e i dati cromatografici.

Figura 15: HPLC per cromatografia analitica

Per eseguire le analisi cromatografiche sono stati utilizzati due diversi eluenti:

- Eluente A: 0.05% TFA in H_2O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile CH_3CN

B. Il secondo strumento utilizzato per effettuare questa analisi è composto da Fig. 16:

- Pompa binaria HPLC modello *Waters 600E*, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA);
- Auto campionatore modello *Waters 2707* fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA);
- Rilevatore un 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 16: sistema HPLC per semipreparativa

Per le analisi cromatografiche sono state utilizzate colonne costituite da gel di silice funzionalizzata, con catene idrocarburiche lineari di atomi di carbonio (fase stazionaria apolare), che presentano caratteristiche diverse:

- Colonna Nova-Pak HR C18 (4 µm, 60 Å, 3.9 x 300 mm, Waters);
- Colonna Atlantis C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, Waters);
- Colonna Atlantis C18 ODB preparative (10 µm, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters);

2.2.3 HPLC per semipreparativa

Il sistema per l'analisi HPLC semipreparativa, è costituito da:

- Sistema di pompaggio multisolvente HPLC modello Waters 600 Controller (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA);
- Rilevatore UV/VIS multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello Waters 2487 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA);
- Registratore su carta modello BD40/BD41 Recorder (distribuito dalla Carlo Erba Strumentazione e prodotto dalla Kipp & Zonen, Delft, Olanda).

2.2.4 MALDI-TOF per l'analisi spettrometria di massa

Le analisi di massa per l'identificazione del peptide sono state effettuate presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli studi di Padova (Prof. C. Zonta), con lo strumento MALDITOF 4800 Plus (AB SCIEX).

2.2.5 Freeze-dryer (Labconco, Kansas City, Missouri, USA)

Dispositivo utilizzato per liofilizzare i peptidi Fig. 17.

Figura 17: Freeze-dryer (Labconco)

2.2.6 Sistema di purificazione dell'acqua modello Milli-Q Integral for UltraPure Water, fornito da Merck KGaA (Darmstadt, Germania)

Dispositivo utilizzato per filtrare l'acqua Fig. 18.

Figura 18: Sistema di purificazione dell'acqua modello Milli-Q Integral for UltraPure Water.

2.2.7 Infinite 200 PRO (TECAN, Männedorf, Switzerland, 1980)

Infinite 200 PRO è un lettore di piastre multimodali che offre soluzioni di rilevamento ad alte prestazioni Fig. 19. In questo lavoro di tesi è stata misurata l'assorbanza grazie a questo strumento.

Figura 19: Infinite 200 PRO (TECAN)

2.2.8 Ulteriori strumenti utilizzati

- Agitatore magnetico modello Microstirrer (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italia);
- Distillatore d'acqua da laboratorio modello Stuart D4000 (Norrscope, Chelmsford, Essex, Regno Unito);
- Bagno ad ultrasuoni modello Branson 1200 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, Connecticut, USA);
- pH-metro modello sensionION^{TM} +pH3, prodotto da HACH (Padova, Italia)

2.2 Metodi

In seguito vengono descritte le procedure sperimentali eseguite durante questo lavoro di tesi.

2.2.1 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)

La sintesi peptidica su fase solida (SPPS) venne introdotta per la prima volta nel 1963 da Bruce Merrifield. Essa consisteva nel far cresce una sequenza peptidica su un supporto solido insolubile.
La sintesi su fase solida prevede due passaggi fondamentali: il primo è la deprotezione del gruppo α-amminico e il secondo è il *coupling* ossia la formazione del legame peptidico tra il gruppo amminico dell'amminoacido legato alla resina e il gruppo carbossilico dell'amminoacido da legare. Queste due reazioni possono avvenire ciclicamente, portando alla crescita della catena polimerica. Quindi il primo amminoacido è legato alla resina attraverso un legame covalente con il suo gruppo carbossilico, e la sintesi di conseguenza viene portata avanti dal C- terminale verso l'N-terminale della sequenza desiderata [14], [15]. Il peptide quindi, cresce rimanendo ancorato alla resina insolubile [16]. Il tutto si presta ad essere automatizzato, infatti essendo un processo ciclico

può essere affidato ad un *robot* sintetizzatore, nel nostro caso Syro I, che preleva con una siringa la soluzione di amminoacidi e la porta in un reattore dove avviene la reazione Fig. 20.

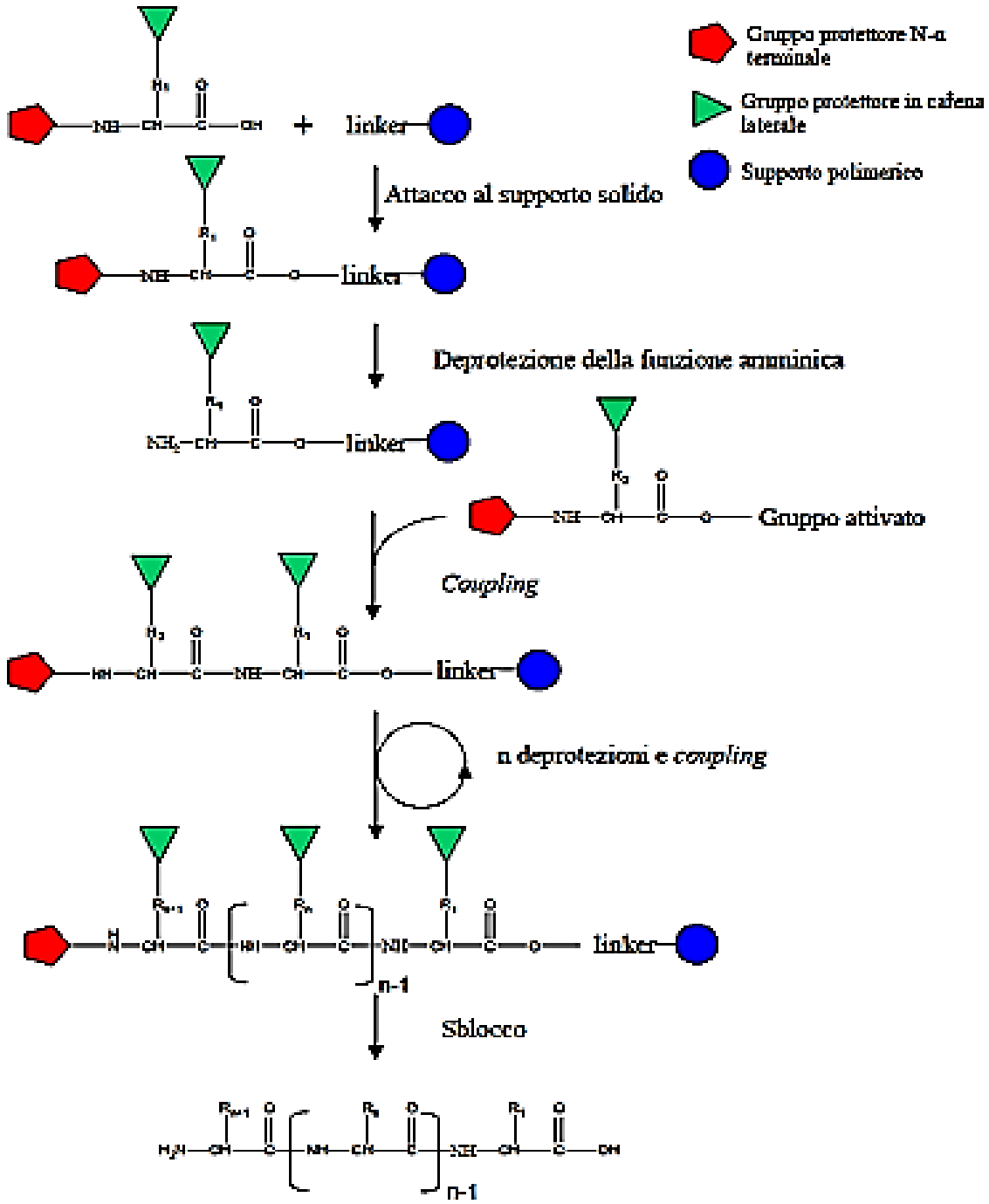

Figura 20: schema della sintesi peptidica su fase solida.

Durante la sintesi peptidica ci si può imbattere in due problemi principali. Il primo inconveniente prevede la reazione indesiderata acido-base tra il gruppo carbossilico e il gruppo amminico. Questa reazione comporta la formazione di un sale che impedisce la corretta crescita del peptide. Per prevenire questo inconveniente è necessario aumentare l'elettrofilicità del gruppo carbossilico attivandolo. Questo processo permette di evitare la formazione del sale che risulta essere un ostacolo per la sintesi. La seconda problematica è la presenza di reazioni indesiderate tra i vari gruppi funzionali degli amminoacidi. Per evitare queste reazioni indesiderate,

si proteggono selettivamente i gruppi che non si vogliono far reagire con molecole che ne silenziano la reattività. Le protezioni dei gruppi laterali è di tipo reversibile e, alla fine della sintesi, verranno rimosse.

Come già detto precedentemente, la sintesi prevede due passaggi cioè la deprotezione del gruppo α-amminico e il *coupling*. Durante la fase di deprotezione si rimuovere il gruppo 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc) che si trova al N-terminale dell'amminoacido Fig. 21. Il gruppo Fmoc è base-labile e questo permette di proteggere ortogonalmente le catene laterali acido-labili. La rimozione prevede l'utilizzo di una soluzione 40% piperidina in dimetilformalmide (DMF). I reagenti in eccesso verranno poi rimossi tramite della procedure di lavaggio e filtraggio.

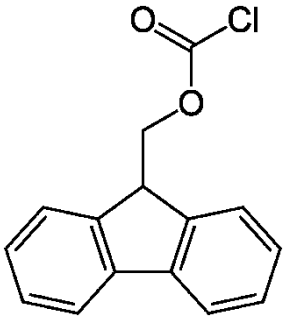

Figura 21: struttura del Fmoc.

Il metodo utilizzato da Syro I per effettuare la sintesi prevede l'attivazione del gruppo carbossilico e in seguito la condensazione degli amminoacidi. Vengono utilizzati i diversi composti: l'HBTU utilizzato come agente attivante in presenza di Oxyma pure, il quale è una componente di cui ci si avvale per incrementare l'efficienza e la velocità di reazione, ed infine, si sfrutta la DIPEA come base organica. Le soluzioni vengono lasciate reagire nel reattore per 45 minuti. Se si esegue un doppio *coupling* la reazione viene ripetuta per due volte per una durata totale di 90 minuti. Infine vengono effettuati dei lavaggi tramite DMF.

2.2.2 Test alla Ninidrina

Il test alla Ninidrina o Kaiser test è un test qualitativo e quantitativo che permette di determinare la presenza di gruppi amminici liberi e viene utilizzato per determinare la resa della reazione di *coupling*. La Ninidrina reagirà con il N- terminale del peptide creando un cromoforo denominato "complesso di Ruhemman" che ha proprietà di assorbire a una lunghezza d'onda di 570nm Fig. 22. Alla fine della reazione, se la soluzione si colora di un blu scuro o viola vuol dire che ci sono molte ammine libere quindi la reazione ha avuto una resa bassa.

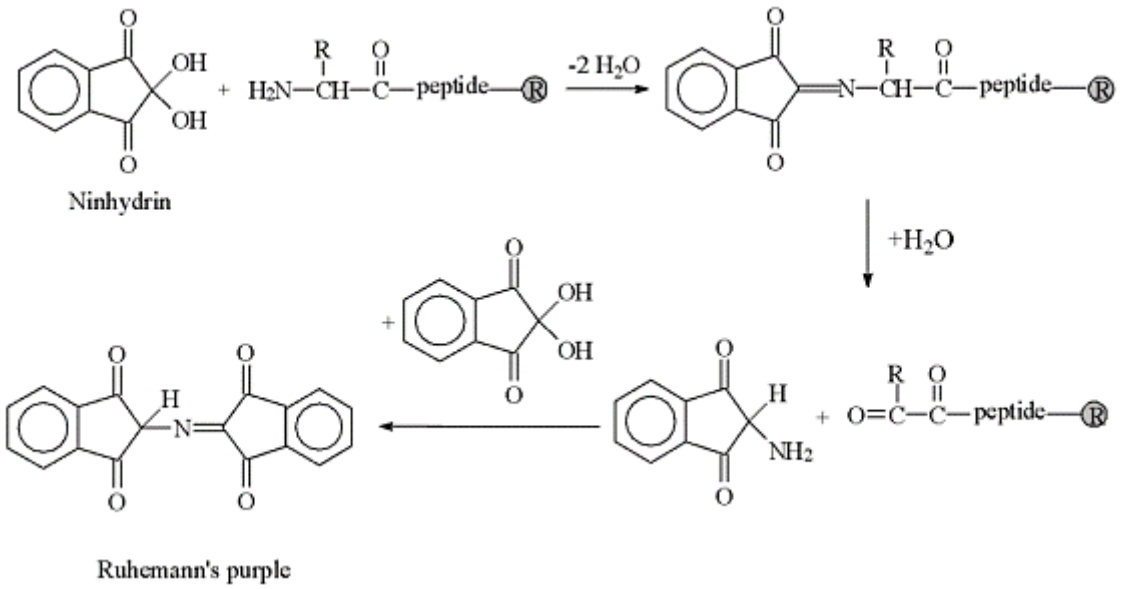

Figura 22: reazione tra Ninidrina e un gruppo amminico N-terminale.

Il protocollo prevede i seguenti punti:

1. Si prelevano dai 2mg ai 8mg di resina e li si depositano in una provetta.
2. Nel frattempo, si accende lo spettrofotometro UV a 570 nm e si accende la piastra riscaldante per le provette, che deve raggiungere i 100°C.
3. Successivamente si addizionano al campione tre soluzioni nella seguente sequenza:
    - 75µl di Monitor 1 (soluzione al 76% (w/w) fenolo/etanolo)
    - 100µl di Monitor 2 (soluzione 0.2 mM di cianuro di potassio/piridina)
    - 75µl di Monitor 3 (soluzione 0.28 M di ninidrina/etanolo)
4. In un'altra provetta si rilasciano le stesse quantità dei tre monitor. Questa provetta costituirà il "bianco"
5. Si posizionano nella piastra riscaldante le provette per 5 minuti.
6. Dopo cinque minuti, si rimuovono le provette dalla piastra riscaldante e si aggiunge a ciascuna 4,8ml di Monitor4 (soluzione di etanolo al 60%).
7. Si agita con il vortex.
8. Si azzera lo spettrofotometro UV a 570 nm: nelle due cuvette in quarzo si mette solo il monitor 4 e le si inserisce nello strumento.
9. Una cuvetta viene sostituita con un'altra contenente il 'bianco' e viene misurata l'assorbanza.
10. Infine si centrifuga la provetta con il campione e si trasferisce il surnatante in una cuvetta, misurando poi con lo spettrofotometro l'assorbanza.

Per calcolare la resa si effettuano poi i seguenti calcoli.

1. Per prima cosa si calcola il peso molecolare nei gruppi amminici liberi:

$$\frac{\mu moli}{g} di\ g = \frac{(ABScamnpione - \ ABSbianco) \times V \times 10^{-6}}{\varepsilon \times P}$$

- ABS-campione: è l'assorbanza del campione alla lunghezza d'onda di 570nm;

- ABS-bianco: è l'assorbanza del "bianco" alla lunghezza d'onda di 570nm;
- V: volume del campione in ml;
- ε: è il coefficiente di estinzione molare ε=15000 [M^{-1} cm^{-1}];
- P: peso della resina in mg

2. Si calcola poi il peso molecolare della resina nota la sostituzione della resina usata durante la sintesi:

$$MW\ resina = \frac{1000}{sostituzione}$$

3. Conoscendo ora il peso molecolare della resina, la quantità di amminoacidi protetti e la quantità di amminoacidi non protetti, ci si può calcolare il peso molecolare totale del peptide su cui si sta eseguendo il test:

$$MW\ peptide = MW\ resina + MW\ residui\ amminoacidici\ protetti$$

4. Si calcola la nuova sostituzione:

$$Nuova\ sostituzione\ = \frac{1000}{MW\ peptide}$$

5. In fine si calcola la percentuale di *coupling*:

$$\%\ coupling = (1 - \frac{\frac{\mu moli}{g}}{10^3 \times nova\ sostituzione}) \times 100$$

Per considerare un test andata a buon fine, si devono ottenere delle rese di reazione superiori al 97%

2.2.3 Acetilazione

I peptidi che vengono sintetizzati devono essere poi acetilati all' N-terminale (Fig. 23, Fig. 24).

Per fare questa operazione si prepara una soluzione composta da: 10% di anidride acetica, 5% di dipea in NMP in un volume totale di 3ml per peptide. Avremo quindi:

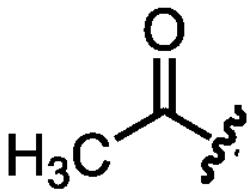

Figura 23: struttura del gruppo acetile

- 0,3ml di anidride acetica.
- 0,15ml di DIPEA.
- Si porta a volume con NMP (volume totale di 3ml).

La soluzione verrà poi versata nel reattore e viene lasciata agire per 15 minuti. Una volta terminati i 15 minuti si effettuano 3 lavaggi con DCM tramite una beuta e la pompa a vuoto e successivamente altri 3 lavaggi con metanolo. In fine la resina andrà seccata sotto vuoto per un'ora.

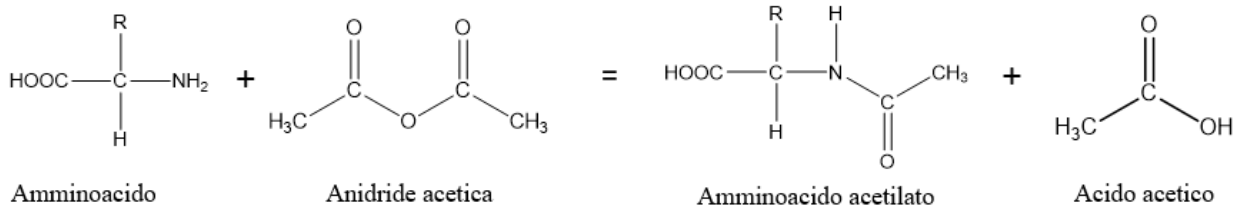

Figura 24: reazione di acetilazione

2.2.4 Sblocco dalla resina preservando i gruppi protettori delle catene laterali

Si prepara una soluzione composta da 1% di TFA in DCM in un volume totale di 1ml. Questa operazione andrà effettuata anche 3 o 4 volte per peptide. Si versa nel reattore contenente il peptide 1ml della soluzione appena preparata e si aspettano 90 minuti. Si può osservare un cambio di colore nella resina che passa da un giallo chiaro a un rosa scuro.

La procedura è la seguente:

a) Nel reattore contenente il peptide si versa 1ml della soluzione preparata e si lascia reagire per 90 minuti.
b) Dopo i 90 minuti di reazione, la soluzione 1% di TFA in DCM, contenete il peptide, viene filtrata via. Si eseguono 3 lavaggi con DCM della resina e si collezionano assieme alle soluzioni di sblocco.
c) Si versa il contenuto della beuta in un pallone. Successivamente, si concentra la soluzione a piccolo volume mediante rotavapor.
d) Nel pallone con il peptide si versa del etere dietilico freddo e lo si lascia in agitazione per qualche minuto. Il peptide precipiterà sotto forma di "fiocchetti" bianchi in sospensione nell'etere.
e) Si prende l'etere dietilico e il peptide presente nel pallone e lo si mette in una falcon che verrà poi centrifugata per far decantare il peptide.
f) Una volta che il peptide si è sedimentato sul fondo, con una Pasteur, si preleva l'etere in eccesso e lo si mette in una seconda falcon. La falcon contenete il peptide la si chiude con della carta filtro e si lascia seccare l'etere o/n.

Se si vede che il peptide ottenuto è ancora poco si possono effettuare nuovamente i passaggi appena descritti. Infatti, questi trattamenti che utilizzano acidi a basse concentrazioni, possono avere una resa bassa e si rende quindi necessario ripetere l'operazione di sblocco.

2.2.5 Aggiunta del gruppo –AMC

I peptidi sono stati tutti funzionalizzati con un amminoacido fluorescente. Il gruppo fluorescente 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) ci permetterà di verificare, durante i test *in vitro*, se i peptidi vengono digeriti dagli enzimi di nostro interesse. Nel nostro caso verrà utilizzato l'amminoacido fluorescente Ile-AMC per tutti i

peptidi della sintesi Ac-MDRSSKGQII-AMC mentre è stato utilizzato l'amminoacido fluorescente Gln-AMC per i peptidi della sintesi Ac-SSTATLVVQ-AMC.

Avendo note la massa del peptide da funzionalizzare il suo peso molecolare si può procedere con i calcoli per la funzionalizzazione.

Per prima cosa si calcolano le moli del peptide da funzionalizzare:

$$Moli\ Peptide = \frac{Peso\ [g]}{MW}$$

Si calcolano poi le moli del gruppo Ile-AMC necessarie. Per essere sicuri che tutto il nostro peptide reagisca con l'amminoacido fluorescente, si utilizza il doppio delle moli rispetto a quelle del peptide:

$$Moli\ \ Ile - AMC = Moli\ peptide \times 2$$

Si calcola quindi il peso del Ile-AMC:

$$Peso\ \ Ile - AMC = Moli\ Ile - AMC \times 288{,}4Da$$

In un pallone andranno messi sia il peptide che la quantità pesata dell'amminoacido fluorescente.

a) Preparazione della soluzione attivante

Per la soluzione attivante avremo bisogno di:

- 1 equivalente di HATU rispetto al peptide;
- 1 equivalente di Oxima pure;
- 0,1 equivalente di DMAP.

Quindi:

- $HATU = Moli\ peptide \times 380{,}23Da$
- $Oxima\ Pure = Moli\ peptide \times 142{,}11Da$
- $DMAP = \frac{1000 \times Moli\ peptide}{0{,}1}$

Per far avvenire la reazione si esegue la seguente procedura:

a) Si pesano l'oxima pure e l'HATU, in seguito si mettono in un matraccio da 2ml;
b) Si aggiunge DMF fino a raggiungere il volume di 1ml;
c) Non si mette ancora la DMPA perché altrimenti la reazione parte subito.

Si esegue quindi la seguente procedura per far avvenire la reazione:

a) Nel pallone dove si erano posti il peptide e l'amminoacido AMC si versa 1ml della soluzione attivante preparata e si può aggiungere la quantità calcolata di DMAP.

b) Si lascia la soluzione in agitazione o/n;
c) Successivamente, tramite *rotavapor*, si concentra la soluzione a piccolo volume.
d) Nel pallone con la soluzione residua si versa del etere dietilico freddo e si lascia in agitazione per qualche minuto.
e) Si centrifuga la soluzione per far decantare il peptide.
f) Una volta che il peptide si è raccolto sul fondo, con una Pasteur, si preleva l'etere e lo si mette in una seconda falcon. La falcon contenete il peptide la si chiude con della carta filtro e si lascia seccare l'etere o/n.

2.2.6 Sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali

Il procedimento di sintesi peptidica su fase solida termina, infine, con lo sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali del peptide. Lo sblocco avviene in ambiente acido utilizzando TFA in combinazione con *scavengers* come il trietilsilano (TES). C'è infatti la possibilità che i gruppi protettori rimossi, essendo dei carbocationici stabili, possano reagire con le catene laterali degli amminoacidi. Utilizzando quindi degli *scavengers*, si neutralizza questa reazione indesiderata.

Per effettuare questa operazione di sblocco saranno necessari 5ml di soluzione composta da 2.5% di acqua MilliQ, 2.5% di TES (*scavengers*) e 95% di TFA.

Si esegue quindi la seguente procedura:

a) In un reattore col peptide vengono aggiunti:
    - 0.125ml di acqua milliQ;
    - 0.125ml di TES;
    - 4.750ml di TFA.
b) Si fa avvenire la reazione per 90 minuti.
c) Successivamente si eseguono 3 lavaggi con TFA e si riduce a minimo volume la soluzione grazie al r*otavapor*.
d) Nel pallone con il peptide si versa del etere dietilico freddo e lo si lascia in agitazione per qualche minuto.
e) Si centrifugata la soluzione per far decantare il peptide.
f) Una volta che il peptide si è raccolto sul fondo, con una Pasteur, si preleva l'etere e lo si mette in una seconda falcon. La falcon contenente il peptide la si chiude con della carta filtro e si lascia seccare l'etere o/n.

2.2.7 Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)

Per l'analisi del peptide è stata utilizzata la tecnica cromatografica High Performance Liquid Chromatography (HPLC). L'HPLC è una tecnica analitica utilizzata per separare, analizzare, identificare e quantificare ogni componente in una miscela. In questo lavoro di tesi è stata utilizzata la cromatografia di partizione detta a fase inversa.

L'HPLC si compone di una fase mobile e una fase stazionaria. La fase mobile è costituita dal campione da analizzare sciolto in un solvente opportuno mentre, la fase stazionaria, è composta da un impaccamento di particelle che permette di separare le diverse molecole che compongono il campione.
Il campione disciolto in un opportuno solvente fluisce all'interno della colonna cromatografica e interagisce con la fase stazionaria. Tra la fase stazionaria e la fase liquida si creerà un certo equilibrio: gli analiti meno affini alla fase stazionaria escono velocemente dalla colonna, mentre gli analiti più affini fluiscono in tempi maggiori. Questo comporta tempi di ritenzione diversi e specifici a seconda del tipo di interazione e quindi a seconda del tipo di molecola presente nel campione. In questo modo, i vari analiti vengono separati in base al loro tempo di eluizione e possono essere separati o analizzati.

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata la cromatografia a fase inversa (RP-HPLC), che prevede che la fase stazionaria sia apolare e quella mobile sia, inizialmente, polare.

La cromatografia può essere o isocratica o a gradiente. Si ha una cromatografia isocratica quando la composizione della fase mobile rimane costante nel tempo, invece si ha una cromatografia a gradiente quando la composizione della fase mobile varia nel tempo.
In questo lavoro di tesi è stata utilizzata una cromatografia a gradiente. In partica, per far staccare l'analita dalla colonna cromatografica si utilizza un solvente organico (Eluente B) in modo da aumentare l'idrofobicità della fase mobile. In questo modo l'idrofobicità della fase mobile competerà con l'idrofobicità di quella stazionaria. Gli analiti quindi, man mano che l'idrofobicità della fase mobile aumenta, tenderanno a passare dalla fase stazionaria a quella mobile. Quando i vari analiti usciranno dalla colonna passeranno nel rilevatore. In conclusione otterremo un grafico dove in ordinata avremo l'assorbanza a una o più lunghezze d'onda (come nel caso di un rilevatore UV/Vis) e in ordinata avremo il tempo. Si osserveranno quindi diversi picchi a tempi di ritenzione diversi.

Il cromatografo è composto dai seguenti elementi Fig. 25:

- Solventi che costituiscono la fase mobile, in questo lavoro sono stati utilizzati due solventi:
    A. Eluente A composta da 0.05% di TFA in acqua MilliQ
    B. Eluente B composto da 0.05% di TFA in acetonitrile.
- Pompa ad alta pressione che permette di generare e gestire la portata desiderata della fase mobile.
- L'iniettore, che inietta il campione nel flusso continuo della fase mobile, in modo da trasportarlo all'interno della colonna cromatografica.

- La colonna cromatografica, che contiene il materiale di impaccamento che costituisce la fase stazionaria. La fase stazionaria solitamente è costituta da particelle solide di dimensione nell'ordine dei µm, solitamente vanno dai 2µm ai 50µm. Nell'RP-HPLC, la fase stazionaria della colonna è solitamente composta da una catena idrocarburica legata a particelle di silice. Le catene idrocarburiche hanno solitamente dimensioni C_8 o C_{12} per la separazione di proteine ad alto peso molecolare. Per analizzare invece peptidi, si utilizzano solitamente catene idrocarburiche più lunghe, C_{18}, con un carattere idrofobico maggiore.
- Un rilevatore per identificare i diversi composti che eluiscono dalla colonna.
- Un computer che elabori il segnale.

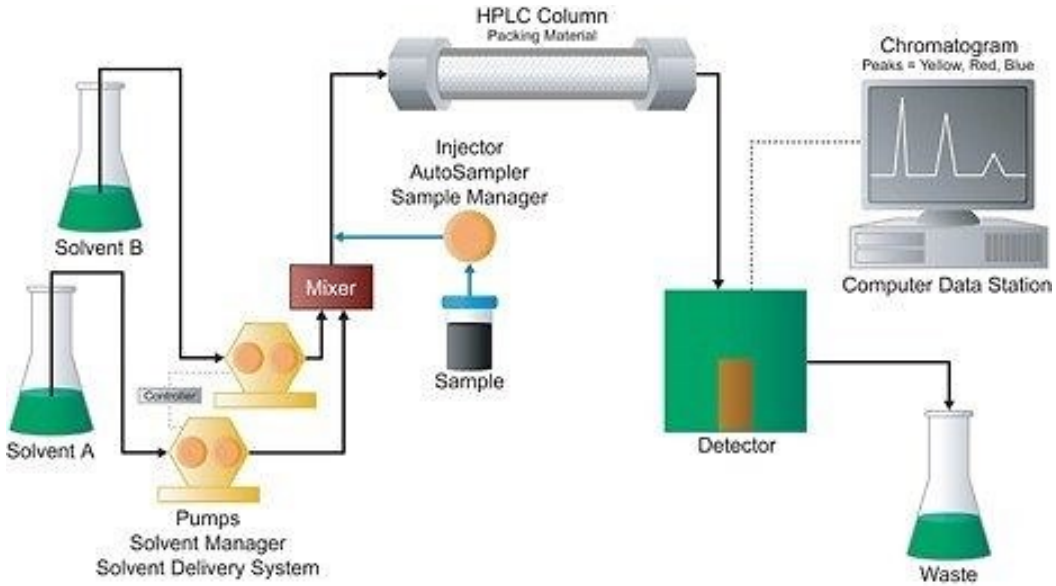

Figura 25: Sistema di funzionamento di un'analisi cromatografica.

Per questo lavoro di tesi sono state utilizzate le seguenti colonne:

- Colonna Nova-Pak HR C18 (4 µm, 60 Å, 3.9 x 300 mm, Waters);
- Colonna Atlantis C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, Waters);
- Colonna Atlantis C18 ODB preparative (10 µm, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters);

Infine come rilevatore è stato utilizzato uno spettrofotometro UV/Vis impostato ad una lunghezza d'onda di 214nm (che corrisponde al picco di assorbimento del legame peptidico).

2.2.8 Fluorescenza

La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze di riemettere (nella maggior parte dei casi a lunghezza d'onda maggiore e quindi a energia minore) le radiazioni elettromagnetiche ricevute. Quindi si parla di fluorescenza

quando un campione è in grado di assorbire la luce ad esso incidente e successivamente ad emettere radiazione a una lunghezza d'onda diversa da quella incidente.

Quando un radiazione incidente eccita gli atomi della sostanza fluorescente, promuovendo un elettrone da un livello energetico più basso a uno più alto quindi più "esterno". Lo stato eccitato perdurerà per pochi nanosecondi. L'elettrone eccitato tornerà poi al livello precedente in due o più fasi, passando quindi per uno o più stati eccitati a energia intermedia. Il decadimento allo stato fondamentale comporta l'emissione di energia sotto forma di onde elettromagnetiche con frequenze minori rispetto a quella incidente. L'ultimo di questi decadimenti emette una luce a una lunghezza d'onda maggiore rispetto alla radiazione incidente e questa luce è detta fluorescenza Fig. 26.

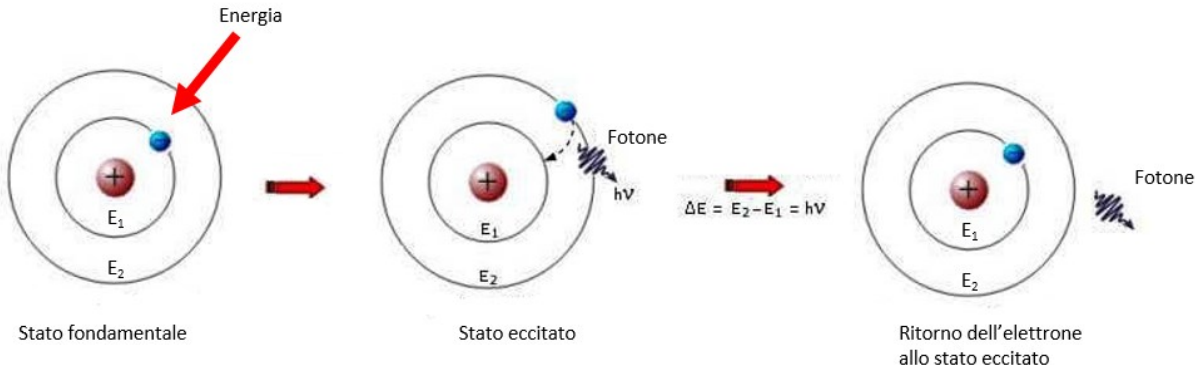

Figura 26: schema rappresentativo sulla fluorescenza.

La fluorescenza ci sarà utile per studiare la scissione dei peptidi da parte degli enzimi in dei sistemi *in vitro*. I peptidi da noi studiati e sintetizzati sono dotati infatti di un gruppo fluorescente: il gruppo AMC Fig. 27. Il test consiste in una miscela di proteasi e brevi sequenze di amminoacidi in tamponi adatti.
I residui collocati prima del sito di scissione contengono il gruppo fluorescente (amminoacidi P) mentre tutti i residui dopo la scissione (residui P') sono assenti. La fluorescenza data dal gruppo AMC è assente quando il fuoroforo è collegato covalentemente al *backbone* del peptide. Una volta rilasciato dall'azione della proteasi, diventa fluorescente. Grazie al gruppo AMC, siamo quindi in grado di rilevare se un peptide è stato processato da un enzima e siamo anche in grado di rilevare l'andamento nel tempo della scissione andando ad effettuare varie misure nel tempo Fig 28.

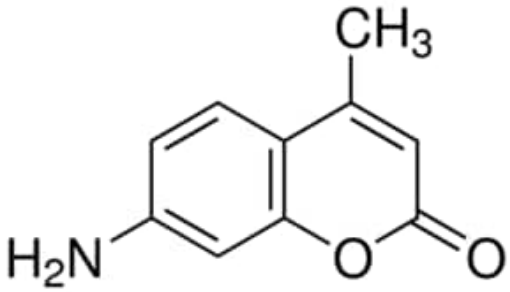

Figura 27: struttura della 7-Amino-4-methylcoumarin.

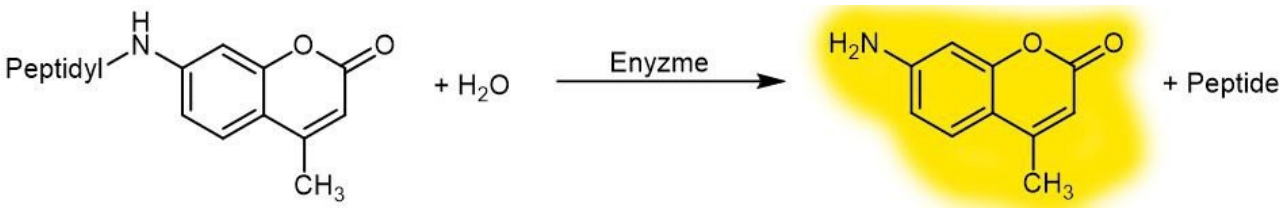

Figura 28: rappresentazione schematica del taglio dei peptidi fluorescenti da parte di un enzima con conseguente rilascio del gruppo fluorescente AMC.

2.2.9 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica distruttiva che permette di individuare la massa molecolare dell'analita. Ciò è possibile grazie alla ionizzazione del campione che crea una flusso di ioni che entrano nell'analizzatore dove, i vari ioni, vengono poi separati e distinti in base al rapporto massa/carica (m/z). Gli ioni entreranno in un campo magnetico perpendicolare alla traiettoria dello ione. In base al rapporto massa/carica, lo ione compirà una traiettoria diversa e, in base al raggio di curvatura, lo spettrometro di massa riuscirà a distinguere e separare i vari ioni.

Lo spettrometro di massa svolge tre operazioni di base:

- Evaporazione e ionizzazione delle molecole di interesse in una camera sotto vuoto
- Separazione degli ioni in base al loro rapporto massa/carica
- Misurazione della quantità di ioni che hanno un rapporto massa/carica specifico.

Gli spettrometri sono composti dai seguenti componenti Fig. 29:

- Una camera di ionizzazione nella quale avviene la ionizzazione dell'analita e il conseguente passaggio a stato gassoso.
- Un analizzatore dove avviene la separazione dei vari ioni in base al loro rapporto massa/carica tramite dei campi magnetici o elettrici. Esistono vari tipi di analizzatori: magnetico, a trappola ionica o, come nel nostro caso, a tempo di volo (TOF). Quest'ultimo si basa sul principio per cui gli ioni, in funzione del rapporto massa/carica, hanno uguale energia ma differente velocità in seguito all'accelerazione subita nella camera di ionizzazione. Questo fenomeno causa una differenza nel tempo che ogni tipo di ione impiega per raggiungere l'analizzatore.
- Un detector che rileva gli ioni e ne amplifica il segnale per una migliore risoluzione.
- Un computer capace di elaborare i segnali provenienti dal detector e processarli creando lo spettro di massa.

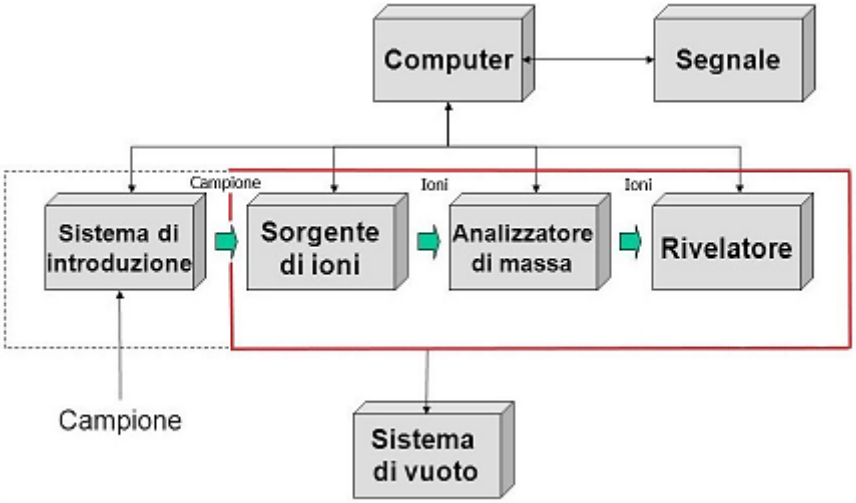

Figura 29: Funzionamento dello spettrofotometro di massa

Gli spettrometri di massa utilizzati sono stati il Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) e l'ElectroSpray Ionization (ESI).

Nel MALDI-TOF si posiziona il campione in una apposita piastra alla quale si aggiunge una matrice apposita per peptidi. La matrice utilizzata è composta da H_2O milliQ e acetonitrile (CH_3CN) in proporzione 50:50 più 0,1% di TFA. Questa matrice deve avere della caratteristiche precise come: evaporare con facilità, non deve danneggiare il campione da analizzare, deve avere un carattere acido (fonte di protoni), deve essere idrosolubile e deve possedere un forte assorbimento ottico nell'ultravioletto.

Si deposita 1µl del campione e sopra al campione si pone 1µl di matrice. Si fa seccare la soluzione che cristallizzerà. La ionizzazione avviene tramite un breve e intenso impulso di luce laser ultravioletta che colpisce i cristalli che evaporeranno a causa delle alte temperature con conseguente ionizzazione. La matrice, cristallizzando con il campione e venendo riscaldata dal laser, permette la formazione di ioni a singola carica che, nel caso dei peptidi saranno a carica positiva. Le molecole vengono quindi vaporizzate e passeranno tra due elettrodi che ne accelereranno il moto verso il rilevatore. Il fascio di ioni verrà quindi analizzato Fig. 30. Lo spettro che si ottiene è un insieme di picchi che indicheranno l'intensità degli ioni che colpiscono il rilevatore nello stesso momento.

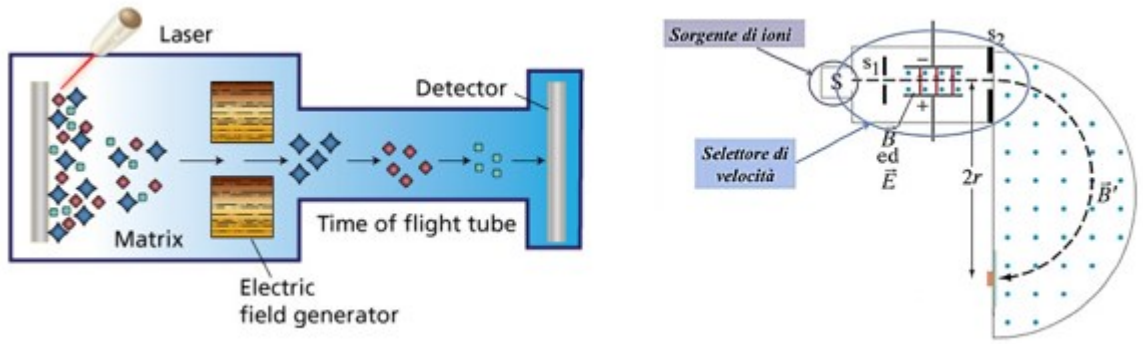

Figura 30: Rappresentazione schematizzata di ionizzazione in una sorgente di tipo MALDI

Lo spettrometro ESI-TOF utilizza una tecnica chiamata appunto *ElectroSpray Ionization* per ionizzare il campione Fig. 31. Questa tecnica permette di lavorare a temperature modeste e a una pressione atmosferica ottenendo la ionizzazione e la nebulizzazione della soluzione contenete il campione. Il campione viene sciolto in una miscela di acqua e di un solvente come l'acetonitrile, con piccole quantità di un acido molto volatile come l'acido acetico. La soluzione passerà per un ago metallico che funge da iniettore. Alla fine di questo ago metallico, viene applicata una forte differenza di potenziale (3-4kV). Dall'ago usciranno quindi della goccioline di soluzione cariche che, grazie alla presenza di un gas inerte, solitamente azoto, vengono nebulizzate. Le goccioline cariche formatesi verranno poi attratte da un contro elettrodo negativo in condizioni di sottovuoto. Un rivelatore infine, acquisisce il flusso di ioni e lo trasforma in un flusso di corrente che verrà poi processato da un computer [17].

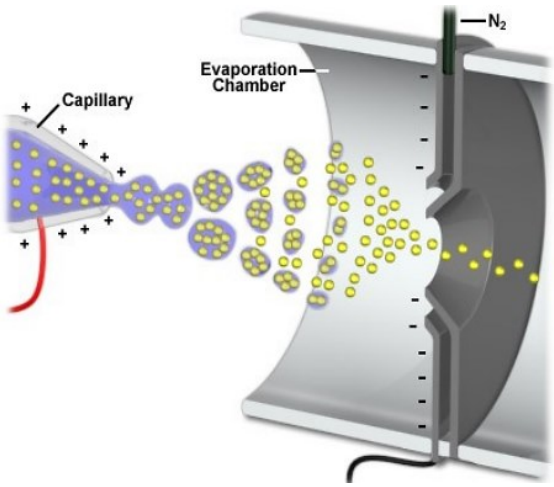

Figura 31: Rappresentazione schematizzata del processo di ionizzazione in una sorgente di tipo ESI.

2.2.10 La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è una tecnica analitica non distruttiva usata per determinare la composizione chimica e la struttura molecolare di un campione. Si basa sull'analisi del comportamento degli spin dei nuclei degli atomi che compongono il campione, in presenza di un forte campo magnetico (da 100 a 1000 MHz). In questa tecnica, grazie all'applicazione di un campo magnetico esterno stazionario, si è in grado di rilevare l'assorbimento di radiofrequenze specifiche da parte di alcuni atomi. L'energia assorbita favorisce la transizione degli spin dei nuclei che viene successivamente riemessa, rilevata e riportata su uno spettro NMR [18].

Lo spin nucleare è tipico di ogni atomo in quanto è generato dai protoni e neutroni che compongono il nucleo. Lo spin quindi dipende dalla composizione del nucleo, in particolare dal numero di protoni e neutroni presenti, i quali si associano in coppie con spin opposto. Se i nuclei hanno lo stesso numero di protoni e neutroni, avranno uno spin nucleare nullo in quanto gli spin prodotti sono tutti appaiati e tendono ad annullarsi. Di conseguenza non generano segnali NMR. Se in vece il numero di neutroni e protoni sono presenti in numero dispari, almeno un nucleone sarà spaiato e avremo uno spin risultante diverso da zero. Questo genererà un segnale NMR. Lo spin viene indicato con I e assume valori uguali a ± ½. I nuclei che vengono più comunemente ricercati con la tecnica NMR sono: ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F e ^{31}P.

L'orientazione che il nucleo può assumere dipende dal numero quantico μ, che può assumere valori ± I. Quando però il nucleo viene sottoposto a un campo magnetico esterno, è sottoposto a una coppia di forze che fa allineare il nucleo con il campo magnetico esterno B0. Visto che lo spin può assumere valori uguali a ± ½, avremo due possibili orientazioni nello spazio e di conseguenza due valori di energia diversi dei nuclei. Lo spin positivo avrà un'energia minore, mentre, gli spin negativi, avranno un'energia maggiore data l'opposizione di verso del momento e del campo magnetico. La quantità di energia viene calcolata dalla seguente equazione:

$$E = h \cdot \nu$$

Dove:

- h: rappresenta la costante di Planck (6.63x10-34 J s).
- ν: rappresenta la frequenza.

ν è anche definita frequenza di Larmor ed è uguale a:

$$\nu = \gamma \cdot B0$$

La frequenza di Larmor o di risonanza è la frequenza alla quale un atomo darà assorbimento. Sostituendo si ottiene che l'energia necessaria per provocare la transizione tra i due livelli sarà:

$$E = h \cdot \gamma \cdot B0$$

Quando si verifica si dice che i nuclei sono in risonanza con la radiazione applicata. Questo comporterà un assorbimento di energia. In pratica la frequenza ν della radiazione dovrà essere uguale alla frequenza di Larmor [19].

In una analisi NMR il campione viene eccitato mediante degli impulsi di radio frequenza di durata nell'ordine dei µs. Mentre il campo magnetico esterno viene mantenuto costante, la frequenza degli impulsi aumenta. Il segnale rivelato dallo spettrometro è l'energia che viene rilasciata dai nuclei durante la fase di rilassamento cioè quando ritornano nel loro stato di equilibrio. Questo viene chiamato *Free Induction Decay* (FID). Il segnale viene quindi registrato da un computer che tramite la trasformata di Fourier si ottiene uno spettro NMR in funzione delle frequenze.

La posizione dei picchi di assorbimento non dipende soltanto dal tipo di atomo ma anche dall'intorno chimico. Ogni particella è influenzata dagli atomi e molecole nel suo intorno che creano una nube elettronica e fanno individuare segnali diversi. Questa nube elettronica viene chiamata schermatura. La schermatura sono dei piccoli campi magnetici che si oppongono a quello esterno. Di conseguenza, gli atomi assorbiranno a frequenze diverse a seconda del tipo di atomi e molecole da cui sono circondati in quanto, questi ultimi, provocano una modifica dal campo magnetico esterno.
Per avere una misura indipendente dal campo magnetico esterno, si sfrutta lo spostamento chimico relativo δ misurato in ppm (Hz/MHz). Per lo zero di questa scala si usa un modello standard di assorbimento che è quello del Tetrametilsilano (TMS). In base allo spostamento chimico è possibile risalire a quale gruppo funzionale appartiene un protone e in base al tipo di segnale si può determinare se è legato ad un atomo singolarmente o se è circondato da altri protoni.
Dall'area del picco, si può risalire al numero di nuclei relativi al segnale visto che è proporzionale all'assorbanza.
Nello spettro NMR, si troveranno più picchi rispetto al numero di nuclei presenti nella molecola analizzata. Questo avviene a causa del fenomeno dell'accoppiamento degli spin tra i nuclei vicini. L'atomo in esame è soggetto a due tipi di campo magnetico: quello esterno schermato e il campo magnetico generato dallo spin degli atomi vicini. Di conseguenza avremo diversi spostamenti chimici dati dal numero di atomi vicini rispetto all'atomo che fornisce il segnale e quindi si ha una molteplicità dei picchi.

2.2.11 Produzione di enzimi: transfezione

La trasfezione è un processo di introduzione di materiale genetico all'interno di cellule eucarioti. Nel nostro caso abbiamo trasfettato del plasmide o cDNA all'interno di una coltura di cellule HEK293 immortalizzate allo scopo di produrre il nostro enzima di interesse: la Furina Fig. 32.
Il plasmide utilizzato codifica per l'enzima della Furina che ci servirà negli esperimenti successivi per verificare se avviene il taglio di alcuni peptidi da noi selezionati.

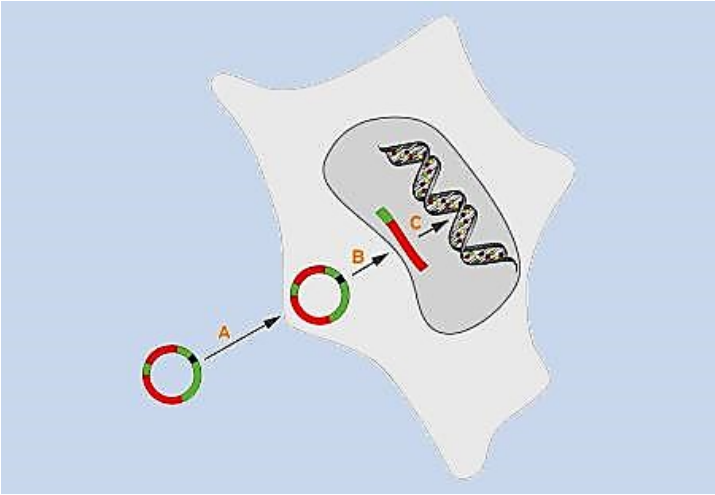

Figura 32: schema rappresentativo della transfezione

Abbiamo utilizzato il plasmide cioè un DNA circolare, perché è più stabile chimicamente in quanto il DNA viene degradato dagli enzimi a partire dai suoi terminali, ed essendo circolare risulta più difficile da degradare visto che non ha dei terminali esposti.

a) Come prima cosa si valuta il numero di cellule presenti in un mL di coltura per verificarne la vitalità. Per la trasfezione è necessaria una concentrazione minima di cellule pari a $1x10^6$ cells/mL, noi ne avevamo $1.3x10^6$ con una vitalità del 63.6%. La bassa vitalità è dovuta al fatto che le cellule erano state *splittate* da appena un giorno e erano presenti un gran numero di *cluster* di cellule che non promuovono la loro vitalità.
b) Successivamente si prende il cDNA e l'agente trasfettante. Come agente trasfettante, abbiamo usato il polietereimmide (PEI), un polimero ad alta carica cationica che permette al cDNA di attraversare la membrana cellulare.
c) Si va poi a diluire cDNA e PEI in un medium di base, in questo caso abbiamo utilizzato l'opti-MEM. Per ogni litro di coltura servono 40mL di opti-MEM. Avendo 60mL di coltura, abbiamo prelevato 2.4mL di medium.
d) Si calcola poi il volume di cDNA e di PEI necessari per 60 µg di coltura:
   - Per quanto riguarda il cDNA, sono necessari 1µg di cDNA per ogni mL di coltura. Il cDNA utilizzato ha concentrazione di 7.7µg/mL, di conseguenza il volume di cDNA da aggiungere alla soluzione di opti-MEM si ricava attraverso il seguente rapporto:

$$\frac{60\mu g}{7.7\mu g/mL} = 7.8\ mL$$

   - Per quanto riguarda il PEI, sono necessari 2µg di PEI per ogni mL di coltura. Il PEI ha concentrazione di 1µg/mL, quindi il volume di PEI da aggiungere alla soluzione di opti-MEM è:

$$\frac{2\mu g \cdot 60\ \mu g}{1\ \mu g/mL} = 120\ mL$$

e) Successivamente si divide l'opti-MEM in due eppendorf, inserendo 1.2mL ciascuna. In un eppendorf si aggiunge il cDNA e nell'altra il PEI e vengono lasciate reagire per 15 minuti.
f) In seguito abbiamo unito il PEI al cDNA e aspettato ulteriori 15 minuti affinché le due sostanze si unissero tra loro.
g) Infine con una micropipetta abbiamo prelevato la soluzione e l'abbiamo aggiunta ai 60mL di coltura cellulare e posta in incubatore sotto agitazione a 37 °C e 8% di CO_2.
h) Per poter prelevare poi la produzione di furina, è necessario attendere almeno 3 giorni.

2.2.12 Libreria di inibitori

Una libreria è una collezione di molecole raggruppate per le loro caratteristiche o in maniera randomica. In ogni libreria è fornita una documentazione che descrive per ogni singola molecola le proprietà chimiche e proprietà fisiche, la struttura e le pericolosità. Un uso tipico delle librerie di molecole è lo *screening* nello sviluppo di farmaci per identificare composti attivi o inibitori.

Le librerie utilizzate in questa tesi sono state le seguenti: la libreria chimica Prestwick® Fitochimica comprende fino a 320 molecole e la SCREEN-WELL® libreria - BML-2832.

La libreria chimica Prestwick® è una raccolta di 320 composti purificati, con attività farmacologica, per lo più provenienti da piante. Ricca di diversi chemiotipi, i composti sono stati selezionati per adattarsi alla chimica di *follow-up*.

La libreria SCREEN-WELL® di inibitori di chinasi contiene 80 inibitori di chinasi con attività ben definita. La libreria è uno strumento ideale per la genomica chimica, lo sviluppo di saggi e altre applicazioni farmacologiche.
In biochimica, una chinasi è un enzima che catalizza il trasferimento di gruppi fosfato da molecole donatori di fosfato (ATP) ad alta energia a substrati specifici. Questo processo è noto come fosforilazione. Le proteine chinasi costituiscono la maggior parte di tutte le chinasi e sono ampiamente studiate. Una proteina chinasi modifica altre molecole, principalmente proteine, mediante fosforilazione per regolare la maggior parte delle vie cellulari, in particolare quelle coinvolte nella trasduzione del segnale. Varie altre chinasi agiscono su piccole molecole come lipidi, carboidrati, amminoacidi e nucleotidi, sia per la segnalazione che per prepararle alle vie metaboliche.

2.2.13 Analisi statistiche

I dati ottenuti in seguito agli esperimenti di fluorescenza sono stati analizzati ed elaborati con Origin Lab. I dati sono stati riportati come media ± deviazione standard. I dati sono confrontati statisticamente utilizzando il test Z-Factor per valutare la significatività statistica e la solidità dei saggi biologici [20]. Il Z-Factor è un indicatore statistico dei dati di un saggio biologico rispetto a un controllo negativo.

$$Z = 1 - \frac{3SDcampione + 3SDcontrollo}{|media\ campione - media\ controllo|}$$

Z assumerà valori che andranno da 0 a 1:

- Se: $Z = 1$ la SD=0 quindi il saggio biologico è ideale.
- Se: $0{,}5 \leq Z < 1$ abbiamo un ottimo saggio biologico.
- Se: $0 < Z < 0{,}5$ si ha un saggio biologico dubbio.
- Se: $Z = 0$ si ha un pessimo saggio biologico dove la media del controllo e la media del campione coincidono.
- Se: $Z < 0$ impossibile.

Lo Z-Factor è stato calcolato nei test *in vitro* di fluorescenza per studiare la cinetica dei peptidi della Desmogleina-2 rispetto al controllo con cmk, un noto inibitore di Furina.

CAPITOLO 3

Parte sperimentale

3.1 Sintesi di Gln-AMC

L'amminoacido H-Gln-AMC è un reagente particolarmente costoso rispetto agli analoghi, come ad esempio H-Ile-AMC comperato e utilizzato in questa tesi. Si è quindi proceduto con la sintesi di H-Gln-AMC per poter avere una quantità sufficiente per coprire la produzione di ulteriori peptidi funzionalizzati da Gln-AMC al C-terminale oltre a quelli pianificati in questo lavoro sperimentale.

La reazione prevede una condensazione tra il gruppo amminico dell'AMC e il gruppo carbossilico della glutammina Fig. 33.

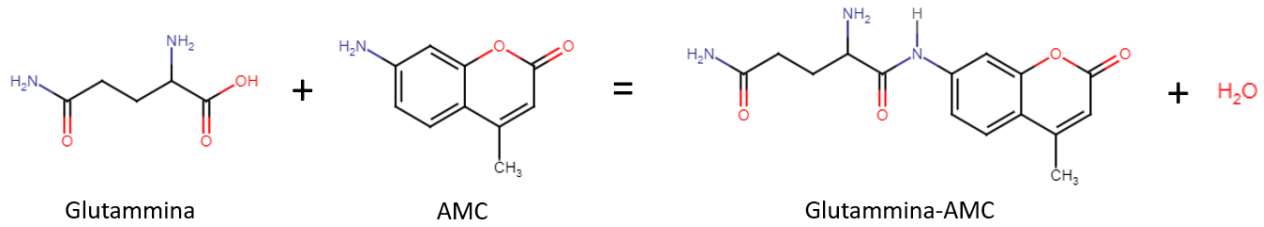

Figura 33: reazione di condensazione tra l'amminoacido glutammina e il gruppo fluorescente AMC.

La sintesi prevede la seguente procedura:

a) 1mg di Boc-Gln-OH viene posto in un pallone. Si aggiunge 1ml di piridina. Si scioglie la glutammina e si aggiunge il gruppo fluorescente AMC. In questa soluzione le moli di AMC sono il doppio rispetto a quelle dell'amminoacido per spingere maggiormente la reazione a destra.
b) Si prepara in un cristallizzatore un bagnetto di ghiaccio e sale per fare in modo di mantenere la reazione a -15°C per due ore.
c) Si mette il pallone in agitazione magnetica nel bagnetto di ghiaccio e sale (Fig. 34A). Con una Pasteur di vetro si aggiunge goccia a goccia 0,35ml di tricloruro di fosforo (PCl_3).
d) Dopo le due ore, il bagnetto di ghiaccio e sale viene rimosso e si lascia il tutto in agitazione o\n.
e) Il giorno successivo si aggiungono 0,7ml di MilliQ e si concentra a piccolo volume con *rotavapor*.

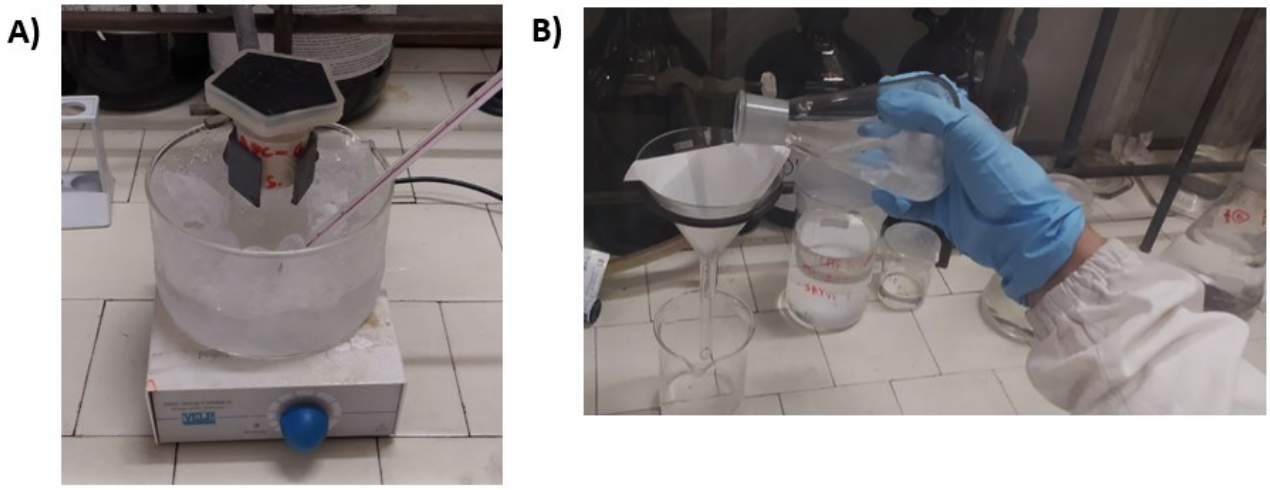

Figura 34: A) si può veder il pallone in agitazione magnetica nel bagnetto di ghiaccio e sale con un termometro per controllare che la temperatura stia a -15°C. B) filtrazione della soluzione contenente acetato di etile e solfato di sodio tramite carta filtro per eliminare quest'ultimo.

A questo punto abbiamo ottenuto un composto con diversi prodotti di scarto che devono essere rimossi. Per effettuare l'operazione di purificazione, si è utilizzato un imbuto separatore Fig. 35. In questa tecnica, vengono utilizzati due tipi di solventi, con differente livello di polarità e miscibilità, al fine di separare l'amminoacido fluorescente dai prodotti di scarto. In questo caso si è utilizzata una soluzione satura di bicarbonato di sodio ($NaHCO_3$) e una di bisolfato di potassio ($KHSO_4$). Quando le soluzioni vengono aggiunte all'imbuto separatore contenente il composto sciolto in un solvente organico, nel nostro caso acetato di etile ($CH_3COOC_2H_5$), i solventi interagiscono con i soluti con i quali hanno una maggiore affinità: la fase polare si miscelerà con la parte più polare mentre, la fase apolare si miscelerà meglio con la parte meno polare. Si creerà un certo equilibrio tra i diversi solventi che costituiranno quindi due fasi ben distinte che verranno poi separate.

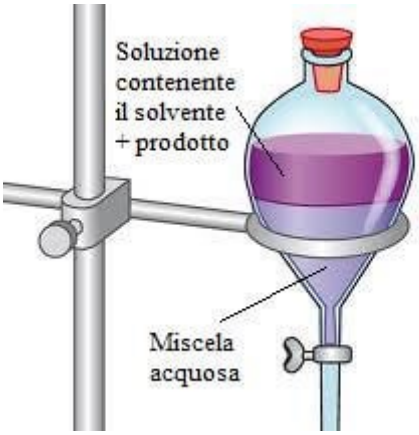

Figura 35: purificazione tramite imbuto separatore.

Si esegue quindi la seguente procedura

a) Si prepara una soluzione da 500ml satura di bicarbonato di sodio.
b) Si prepara una soluzione al 10% di bisolfato di potassio in MilliQ.
c) Si scioglie la Boc-Gln-AMC in 100ml di acetato di etile.

d) Nell'imbuto separatore si versa prima la soluzione di acetato di etile contenente Boc-Gln-AMC e successivamente la soluzione di bisolfato di potassio. Miscelando manualmente si creeranno due fasi: una fase idrofobica sopra e una acquosa sotto. Nella fase idrofobica avremo l'acetato di etile con Boc-Gln-AMC e Boc-Gln-OH. La soluzione acquosa con il bisolfato di potassio, è una soluzione acida che estrae il gruppo fluorescente AMC che non ha reagito. Con l'imbuto separatore quindi faremo uscire tutta la fase acquosa in un becher.
e) Successivamente, nell'imbuto separatore si aggiunge la soluzione di bicarbonato di sodio satura. Si miscela manualmente e si aspetta fin tanto che non si creano le due fasi: quella idrofobica in alto dove avremo il nostro amminoacido fluorescente Boc-Gln-AMC e una soluzione acquosa basica dove verrà estratto Boc-Gln-OH non reagito. Anche in questo caso si separano le due fasi facendo defluire la soluzione acquosa.
f) In un altro becher viene collezionata la soluzione di acetato di etile che, a questo punto, conterrà solamente l'amminoacido fluorescente Boc-Gln-AMC. Si aggiunge del solfato di sodio (Na_2SO_4) che andrà a disidratare la soluzione dall'acqua in eccesso. Si lascia la soluzione o\n.
g) Il giorno dopo con carta filtro e un imbuto si filtra la soluzione rimuovendo il solfato di sodio. La soluzione verrà versata in un pallone (Fig. 34B) e la si concentra a piccolo volume con il *rotavapor*.
h) Infine, lo sblocco del gruppo protettore Boc è stato ottenuto mediante una soluzione di 5ml di TFA e DCM (4:1) per 1 ora. Successivamente, si porta a piccolo volume con il *rotavapor*.
i) Nel pallone con la soluzione residua si versa del etere dietilico freddo e si lascia in agitazione per qualche minuto.
j) Si centrifuga la soluzione per far decantare il peptide.
k) Una volta che il peptide si è raccolto sul fondo, con una Pasteur, si preleva l'etere e lo si mette in una seconda falcon. La falcon contenete il peptide la si chiude con della carta filtro e si lascia seccare l'etere o/n.

Per caratterizzare il composto sono state eseguite alcune corse cromatografiche. Le HPLC sono state fatte utilizzando come riferimento la H-Gln-AMC recuperata dalla RP-HPLC semipreparativa del peptide Ac-ATLVVQ-AMC. In questo modo abbiamo potuto fare il confronto tra OH-Gln-AMC già utilizzata per funzionalizzare i peptidi e quella da noi sintetizzata (Fig. 36- 39).

Per l'analisi cromatografica RP-HPLC con la colonna Atlantis C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, Waters) a due lunghezze d'onda: 214nm e 280nm. Si è disciolto l'amminoacido fluorescente in metanolo con proporzione (1mg/1mL). Questa soluzione è stata conseguentemente filtrata con filtro PVDF da 0.45µm.

L'analisi HPLC analitica è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Volume di iniezione: 20µL.
- Flusso:1 ml/min.
- Eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ.

- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN.
- Gradiente: da 0% a 30% di eluente B in 30 minuti.

➢ H-Gln-AMC: lunghezza d'onda 214nm

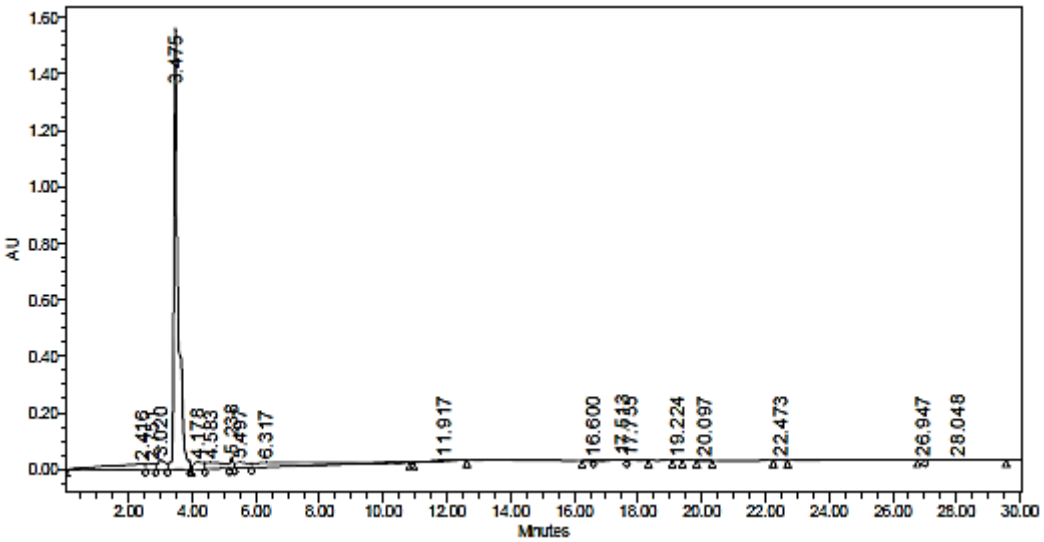

Figura 36: Cromatografia analitica del peptide fluorescente OH-Gln-AMC da noi sintetizzato. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 214nm

➢ H-Gln-AMC: lunghezza d'onda 280nm

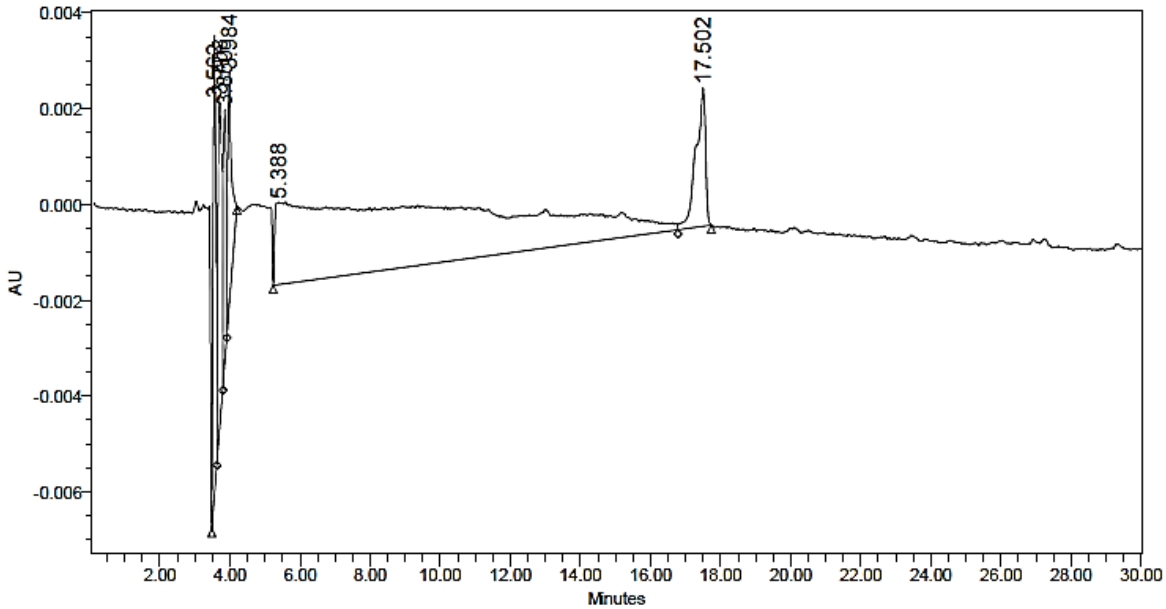

Figura 37: Cromatografia analitica del peptide fluorescente OH-Gln-AMC da noi sintetizzato. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 280nm.

- H-Gln-AMC recuperata per il confronto: lunghezza d'onda 214nm

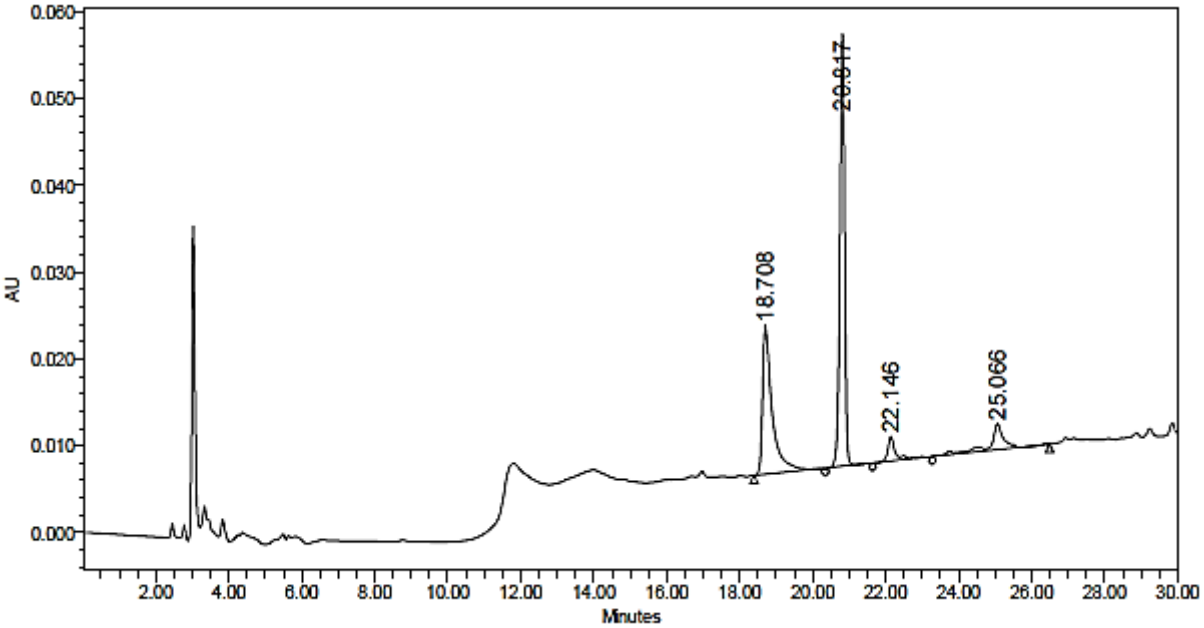

Figura 38: Cromatografia analitica del peptide fluorescente OH-Gln-AMC recuperato per fare il confronto. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH3CN; Gradiente: da 0% al 30% minuti; λ= 214nm.

- H-Gln-AMC recuperata per il confronto: lunghezza d'onda 280nm

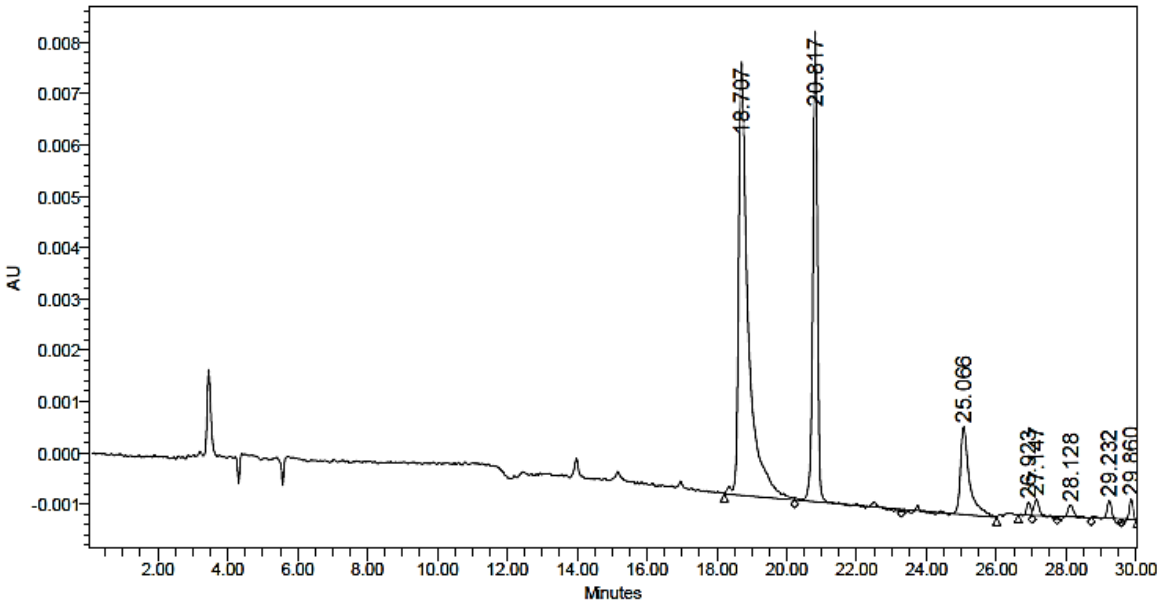

Figura 39: Cromatografia analitica del peptide fluorescente OH-Gln-AMC recuperato per fare il confronto. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 280nm.

I tempi di ritenzione, anche se molto simili, non coincidono perfettamente. Questo ci ha spinti a fare un'analisi NMR al fine di studiare la struttura molecolare Fig. 40. Le analisi sono state eseguite presso il dipartimento di Farmacia dell'Università Federico II di Napoli dalle Prof.sse G. D'Auria e L. Falcigno.

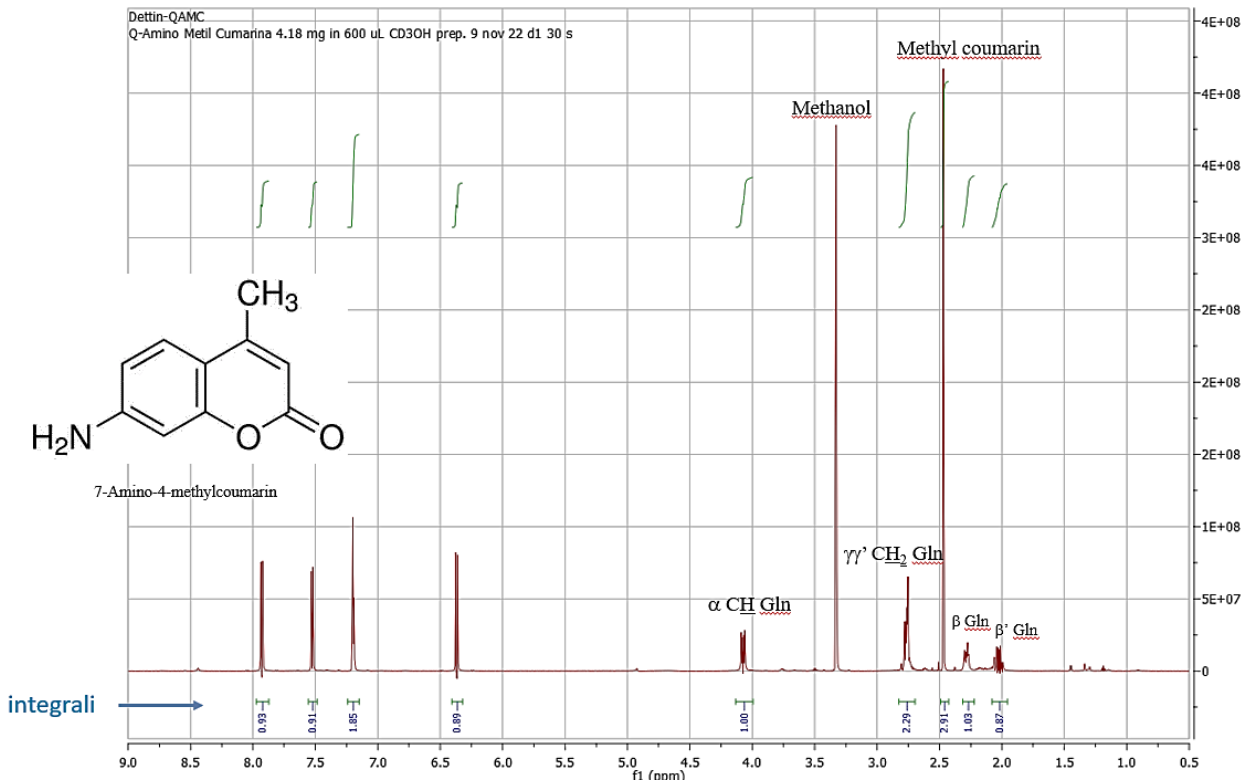

Figura 40: spettro NMR dell'amminoacido fluorescente OH-Gln-AMC.

Il campione è stato preparato nel modo seguente: si sono sciolti i 4,18mg della OH-Gln-AMC in 600µl di metanolo-d3 (CD_3OH). Il metanolo-d3 è un solvente deuterato utile nella ricerca e nelle analisi basate su NMR.

Nello spettrometro NMR, i picchi che nell'intervallo da 6,3ppm a 8ppm corrispondono agli idrogeni dei gruppi aromatici della 7-Amino-4-metilcoumarina. Un altro picco lo troviamo a 2,47ppm corrispondente alla Metilcoumarina.

I picchi invece corrispondenti alla glutammina, li troviamo nell'intervallo che vanno da 2ppm a 4ppm. A 4,07ppm troviamo il carbonio α dell'amminoacido con le relative molteplicità; a 2,28ppm troviamo il carbonio β e a 2,72ppm il carbonio γ.

Il picco a 3,33ppm invece corrisponde al metanolo d3, il sovente utilizzato per sciogliere il campione.

Nello spettro NMR abbiamo dunque trovato i segnali tipici del composto ai tempi richiesti con un accoppiamento e dei tempi di integrazione perfetti. Possiamo quindi concludere dicendo che l'amminoacido fluorescente H-Gln-AMC da noi sintetizzato è puro.

3.2 Sintesi di peptidi che mimano un sito di taglio della Desmogleina-2

La sequenza $_{401}$MDRSSKGQII$_{410}$↓ (Tab. 4) riproduce uno dei possibili siti di taglio della desmogleina-2 [21]. L'obbiettivo era quello di andare a verificare la propensione al taglio da parte di Elastasi o altri enzimi presenti in campioni biologici. È noto che l'estensione del sito di taglio può influenzare la reazione di taglio. Si è deciso quindi di sintetizzare questo sito di 4 lunghezze diverse e marcato al C-terminale con il gruppo AMC per poi andare a verificare quanto i peptidi venivano tagliati e con quale velocità mediante dei test di fluorescenza *in vitro*.

La sintesi quindi si è svolta in 4 step differenti (Fig. 41):

1. Nel primo step, sono stati fatti reagire gli amminoacidi Gln e Gly alla resina funzionalizzata con Ile creando così il primo peptide: H-Gly-Gln-Ile-Ile-resina. A questo punto, si pesa la resina e ¼ della stessa viene messa da parte. I 3/4 di resina invece, vengono posti in un altro reattore per proseguire la sintesi di H-Gly-Gln-Ile-Ile-resina.
2. Nel secondo step si continua la sintesi aggiungendo gli amminoacidi successivi ottenendo così H-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-Ile-resina. Anche in questo caso si pesa la resina e 1/3 viene messo da parte per la sintesi H-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-Ile-resina I restanti 2/3 della resina vengono sistemati in un altro reattore per proseguire la sintesi.
3. Nel terzo step si continua la sintesi aggiungendo gli amminoacidi successivi ottenendo così H-Arg-Ser-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-Ile-resina. Anche in questo caso si pesa la resina e ¼ viene messo da parte. L'¼ della resina restante viene sistemato in un altro reattore per proseguire la sintesi H-Arg-Ser-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-Ile-resina.
4. Nel quarto step si continua la sintesi aggiungendo gli amminoacidi successivi ottenendo così l'ultimo peptide H-Met-Asp-Arg-Ser-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-Ile-resina.

Peptide	PM teorico [Da]	PM misurato [Da]	Peso peptide grezzo [mg]	Resa della sintesi [%]	Purezza [%]	Peso peptide purificato [mg]
Ac-GQII-AMC	628,973	628,21	10,0	23,5	40,2	0,19
Ac-SKGQII-AMC	844,227	844,17	23,5	33,9	38,8	0,34
Ac-RSSKGQII-AMC	1087,495	1087,25	14,9	14,9	3,7	0,43
Ac-MDRSSKGQII-AMC	1333,782	1333,27	39,4	30,2	35,7	2,01

Tabella 4: tabella riassuntiva della sintesi finale peptidi derivati da 401MDRSSKGQII410↓

3.2.1 Sintesi del peptide Ac-GQII-AMC

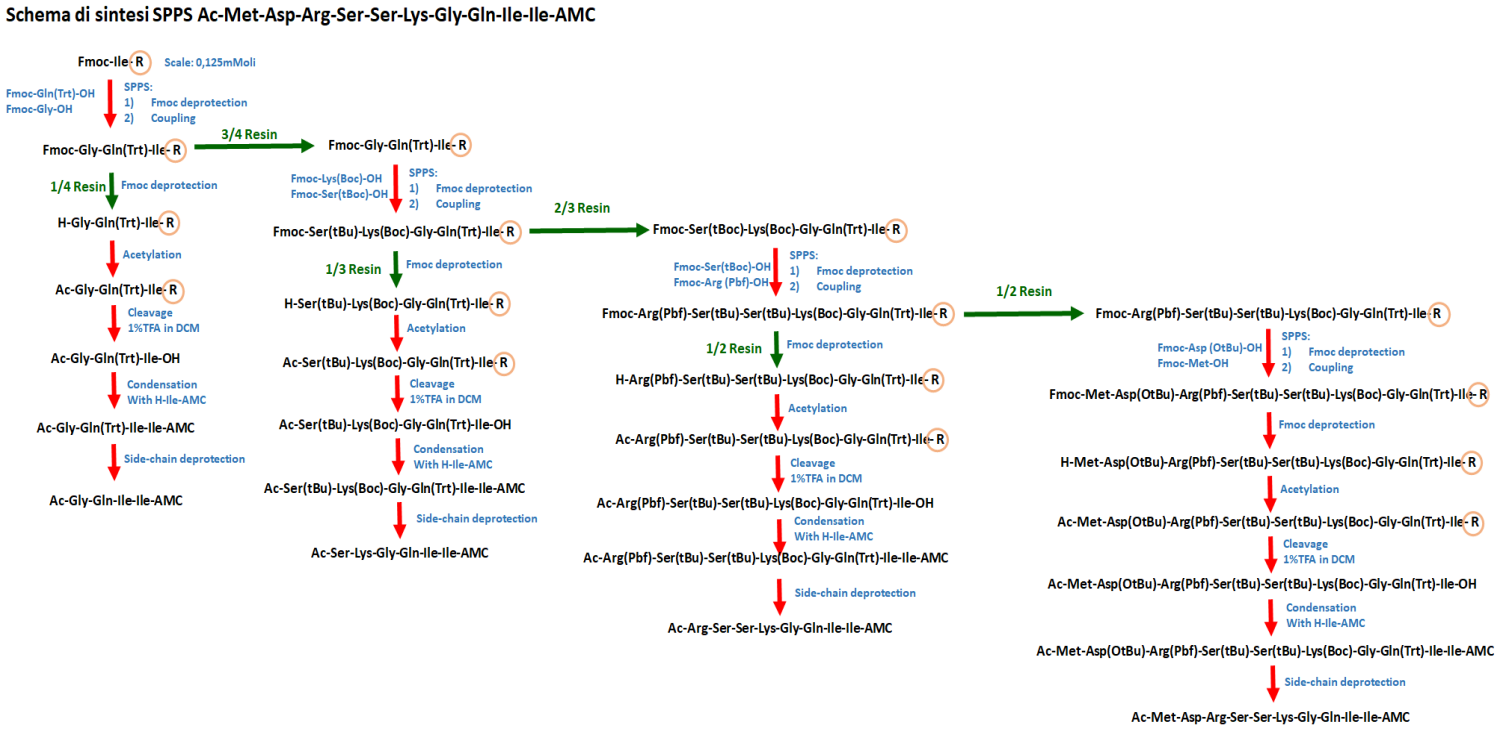

Figura 41: schema della sintesi SPPS dei peptidi derivati da $_{401}$*MDRSSKGQII*$_{410}$ ↓

In questo lavoro di tesi è stato preparato il peptide Ac-Gly-Gln-Ile-OH attraverso l'utilizzo del sintetizzatore automatico Syro I. La sintesi su fase solida (SPPS) è stata realizzata mediante chimica Fmoc utilizzando un doppio coupling per ogni inserimento. La resina super acido-labile utilizzata è stata Fmoc-Ile-Sasrin (0.60mmol/g).

Per sintetizzare il peptide sono stati utilizzati i seguenti amminoacidi funzionalizzati:

- Fmoc-Ile-OH
- Fmoc-Gln (Trt)-OH
- Fmoc-Gly-OH

Le soluzioni necessarie per la sintesi sono:

- ➢ Soluzione a 40% di piperidine in 40ml di DMF necessaria all'inizio di ogni ciclo di *coupling* per la deprotezione del gruppo Fmoc.
- ➢ Soluzione attivante HBTU/Oxyma Pure 0.45M in DMF.
- ➢ Soluzione DIPEA 1,8M in di NMP.

Le soluzioni vengono poi inserite nel sintetizzatore e risultano stabili per tutta la durata della sintesi.

Sintesi

La resina utilizzata in questa sintesi è la Fmoc-Ile-Sasrin (0,6mmol/g). Si volevano utilizzare 0,125mmol di siti attivi e di conseguenza è stata calcolata la quantità di resina necessaria tramite la formula:

$$Massa\ resina = \frac{siti\ attivi}{sostituzione\ resina} = \frac{0{,}125mmol}{0{,}6\,{}^{mmol}/_{g}} = 0{,}208mg$$

La resina è stata successivamente collocata in un reattore dove verrà effettuata la sintesi. Si pesano dunque gli amminoacidi che vengono poi sciolti in DMF e posizionati nel sintetizzatore.

Si può dunque iniziare la sintesi. Per prima cosa si lascia rigonfiare la resina in 6ml di DMF per 10 minuti. Una volta drenata la DMF viene effettuata la deprotezione del gruppo Fmoc del terminale α-amminico tramite la soluzione di piperidina. In seguito avviene l'attivazione del gruppo carbossilico grazie alla soluzione HBTU/Oxyma Pure in DMF. In fine, viene caricato 1ml della soluzione contenente l'amminoacido successivo per effettuare il doppio *coupling*.
In seguito, la resina viene lavata con DCM e posta a seccare in una campana da vuoto per un'ora.

Una volta seccata la resina si effettua il Kiser test per valutare la resa del primo *coupling*. Si è ottenuta una resa del 100% pertanto, si è deciso di far proseguire la sintesi.

Al termine, si pesa il peptide su resina e si preleva il ¼ di resina corrispondente al peptide finito, i restanti ¾ verranno messi in un altro reattore per la continuazione della sintesi. Sulla resina prelevata (¼ del totale) si esegue lo sblocco Fmoc e l'acetilazione tramite una soluzione di anidride acetica (10%) e DIPEA (5%) in NMP (3ml). La soluzione verrà poi versata nel reattore e lasciata a reagire per 15 minuti. Una volta terminati i 15 minuti si effettuano 3 lavaggi con DCM e 3 lavaggi con metanolo. In fine la resina andrà seccata sotto vuoto per un'ora.

Terminata la procedura di acetilazione, si eseguirà lo sblocco del peptide dalla resina preservando i gruppi protettori delle catene laterali mediante una soluzione composta da 1% di TFA in DCM in un volume totale di 1ml per 90 minuti. Questa operazione andrà effettuata 3 o 4 volte. Dopo i 90 minuti di reazione, la soluzione di TFA in DCM, contenente il peptide, viene filtrata via. Si eseguono 3 lavaggi con DCM della resina che si collezionano assieme alla soluzione di sblocco. Il tutto viene poi messo in un pallone e portato a minimo volume con *rotavapor*. Successivamente, nel pallone con la soluzione residua si versa del etere dietilico freddo e si lascia in agitazione per qualche minuto. Si centrifuga poi la soluzione per far decantare il peptide. Una volta che il peptide si è raccolto sul fondo, con una Pasteur, si preleva l'etere e lo si mette in una seconda falcon. La falcon contenete il peptide la si chiude con della carta filtro e si lascia seccare l'etere o/n.

Condensazione dell'amminoacido fluorescente H-Ile-AMC

Lo sblocco del peptide dalla resina, permette di condensare l'amminoacido H-Ile-AMC al C-terminale del peptide sintetizzato. Per la condensazione verranno messi in un pallone i 10mg del peptide grezzo ottenuti

dalla sintesi e 9,9575mg dell'amminoacido H-Ile-AMC, corrispondente al doppio delle moli del peptide. Si aggiunge poi la soluzione attivante nel pallone. La reazione viene lasciata o/n. Successivamente la soluzione viene portata a minimo volume con il *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico con la solita procedura.

Sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali

Si concludere con lo sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali per mezzo di una soluzione costituita da 2,5% di MilliQ, 2,5% di TES in 5ml di TFA. La soluzione è stata lasciata reagire per 90 minuti a temperatura ambiente, agitando manualmente il reattore ogni tanto. Sono stati fatti dei lavaggi con TFA. Poi, tramite la solita procedura, si porta a minimo volume con *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico.

Caratterizzazione e purificazione del peptide Ac-GQII-AMC

È stata svolta un'analisi cromatografica RP-HPLC per avere un riscontro sul grado di purezza e sulla composizione del peptide (Fig. 42 e 43). La colonna utilizzata è Atlantis C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, Waters) la registrazione dell'assorbanza avviene a due lunghezze d'onda: 214nm e 280nm. La prima lunghezza d'onda corrisponde al massimo assorbimento del legame peptidico mentre la seconda rileva l'assorbimento del gruppo fluorescente AMC. Si è disciolto il peptide in metanolo con proporzione (1mg/1mL). Questa soluzione è stata filtrata con filtro PVDF da 0.45µm.

L'analisi HPLC è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Volume di iniezione: 20µL.
- Flusso:1 ml/min.
- Eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ.
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN.
- Gradiente: da 0% a 30% di eluente B in 30 minuti.

- Lunghezza d'onda: 214nm

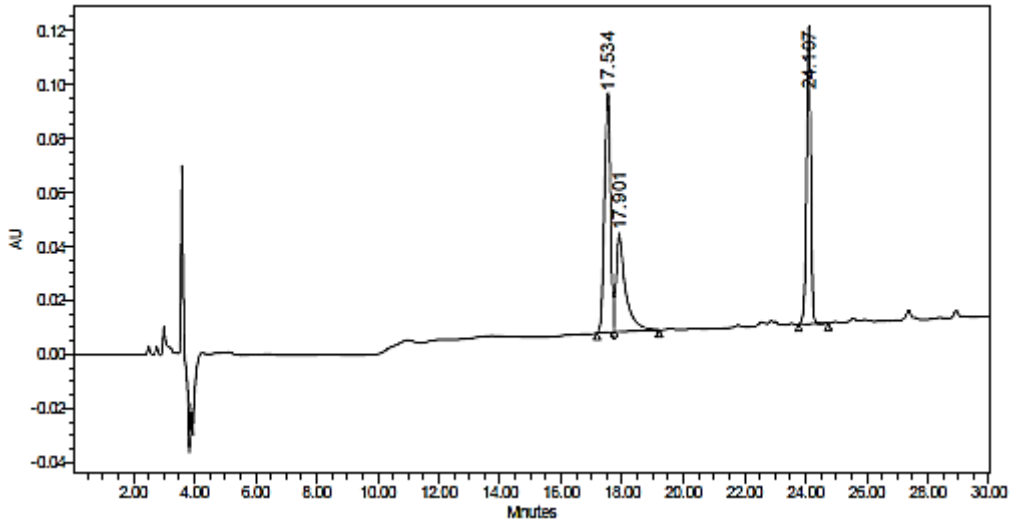

*Figura 42: Cromatografia analitica del peptide Ac-GQII-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20*µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 214nm.

- Lunghezza d'onda: 280nm

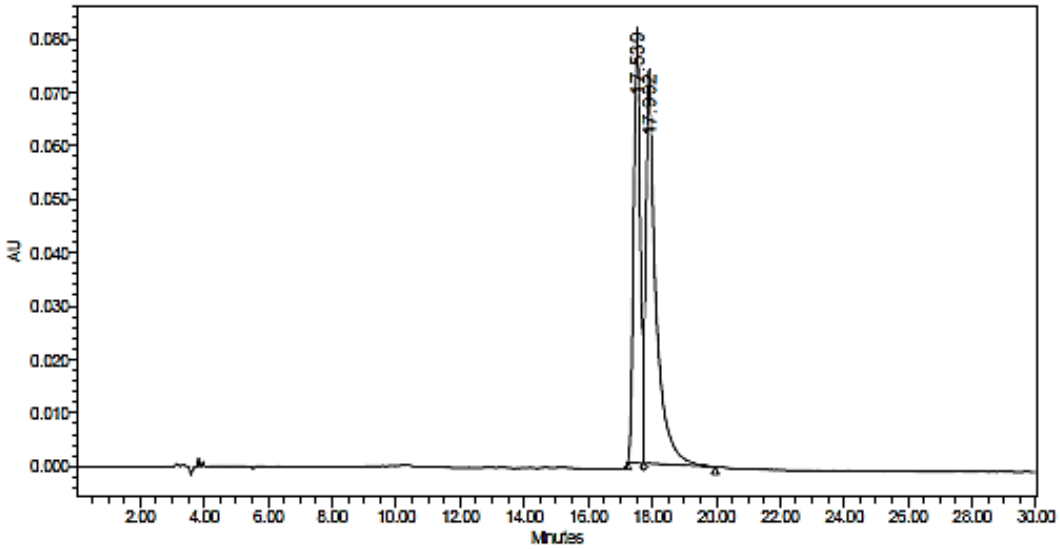

*Figura 43: Cromatografia analitica del peptide Ac-GQII-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20*µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 280nm.

Per completare la caratterizzazione del peptide è stata effettuata un'analisi spettrometrica di massa MALDI-TOF. La massa sperimentale (Fig. 44) è coincidente con la massa teorica (628,21Da).

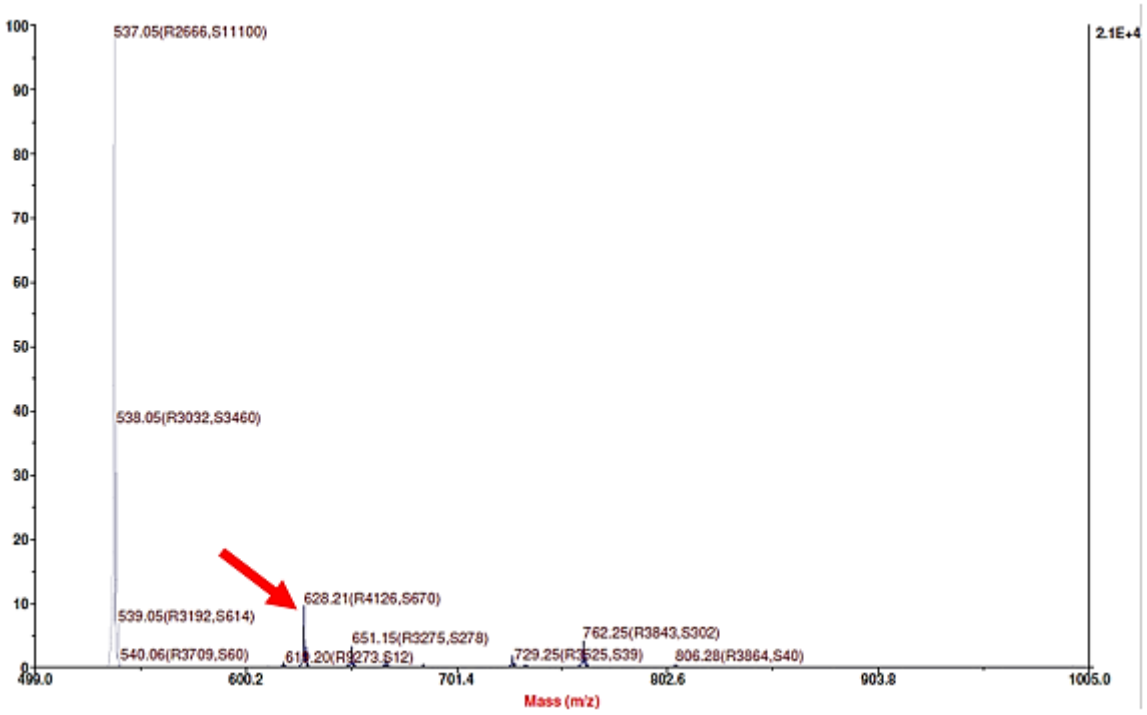

Figura 44: spettrometro di massi (MALDI-TOF) del peptide grezzo.

Il peptide è stato poi purificato tramite una RP-HPLC per eliminare i sottoprodotti creatisi durante la sintesi Fig. 45. Per questa RP-HPLC semipreparativa è stata fatta un'unica corsa visto l'esigua quantità di peptide ed è stata utilizzata la colonna Atlantis C18 ODB *preparative* (10 µm, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters). La preparazione del campione consisteva nel sciogliere il peptide in 1ml di metanolo e 1ml di MilliQ. È stato utilizzato metanolo in quanto il peptide non si scioglieva in solvente acquoso ma solo in solvente organico. Il gradiente utilizzato è stato: da 10% a 45% di eluente B in 35 minuti.

Per tutte le RP-HPLC semipreparative eseguite in questo lavoro di tesi, è stato tutto raccolto in diverse frazioni in delle provette. Alcune di queste provette sono state analizzate tramite HPLC allo stesso gradiente delle cromatografie fatte in precedenza, per andare a individuare l'amminoacido fluorescente H-Ile-AMC che non aveva reagito. Una volta individuate le provette contenenti l'amminoacido fluorescente libero, sono state eliminate, mentre, sono state tenute tutte le provette restanti, le quali sono state poi liofilizzate in dei palloni, ottenendo così il peptide finito.

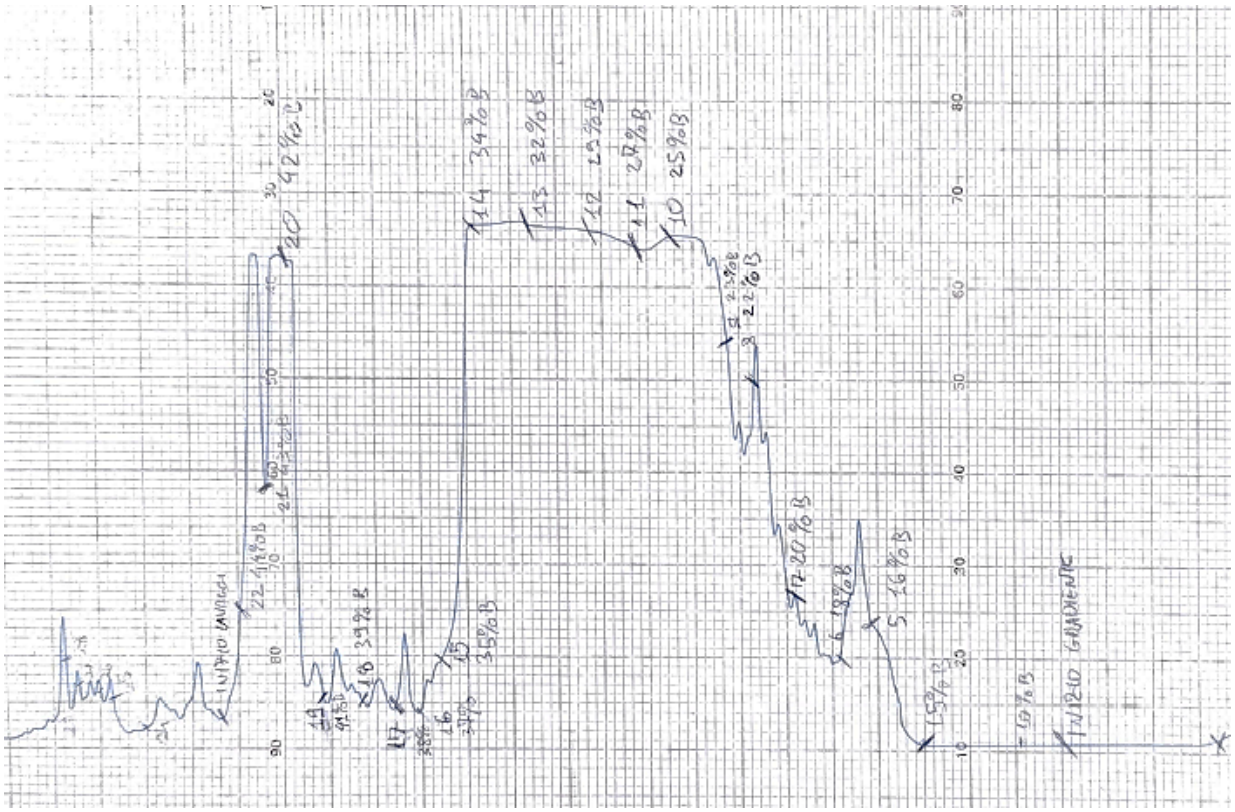

Figura 45: Cromatografia semipreparativa del peptide Ac-GQII-AMC. Colonna: Atlantis C18; flusso:4 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 10% al 45% di eluente B in 35 minuti; λ= 214 nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

3.2.2 Sintesi del peptide Ac-SKGQII-AMC

Per sintetizzare il peptide H-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-OH sono stati aggiunti i seguenti amminoacidi:

- Fmoc-Lys (Boc)-OH
- Fmoc-Ser (tBu)-OH

Sintesi

Per iniziare la sintesi è stato inserito nel sintetizzatore il reattore contenente i ¾ di resina pesati in precedenza. Come per la sintesi del primo peptide si lascia rigonfiare la resina in 6ml DMF, si fa la deprotezione del gruppo Fmoc del terminale α-amminico, si attiva il gruppo carbossilico e si fanno i due *coupling* dell'amminoacido da legare. Questa operazione va ripetuta per entrambi gli amminoacidi. In seguito, viene lavata la resina con DCM e seccata con la campana da vuoto.

Al termine si pesa il peptide su resina e si preleva 1/3 corrispondente al peptide finito mentre, i 2/3 verranno messi in un altro reattore per la continuazione del peptide. Sulla resina prelevata (1/3 del totale) si esegue lo sblocco dello Fmoc e l'acetilazione. Si eseguirà poi lo sblocco del peptide dalla resina preservando i gruppi protettori delle catene laterali mediante una soluzione di TFA in DCM (1ml) per 90 minuti.

Condensazione dell'amminoacido fluorescente H-Ile-AMC

Lo sblocco del peptide dalla resina, permette di condensare l'amminoacido H-Ile-AMC al C-terminale del peptide sintetizzato. Per la condensazione si metteranno in un pallone i 23,53mg del peptide grezzo ottenuti dalla sintesi e i 13,84mg dell'amminoacido H-Ile-AMC, corrispondente al doppio delle moli del peptide. Si aggiunge poi la soluzione attivante nel pallone. La reazione viene lasciata o/n. Successivamente la soluzione viene portata a minimo volume con il *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico con la solita procedura.

Sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali

Si concludere con lo sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali per mezzo di una soluzione costituita da 2,5% di MilliQ, 2,5% di TES in 5ml di TFA. La soluzione è stata lasciata reagire per 90 minuti a temperatura ambiente, agitando manualmente il reattore ogni tanto. Sono stati fatti dei lavaggi con TFA. Poi, tramite la solita procedura, si porta a minimo volume con *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico.

Caratterizzazione e purificazione del peptide Ac-SKGQII-AMC

È stata svolta un'analisi cromatografica RP-HPLC per avere un riscontro sul grado di purezza e sulla composizione del peptide (Fig. 46 e 47). La colonna utilizzata è Atlantis C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, Waters) la registrazione dell'assorbanza avviene a due lunghezze d'onda: 214nm e 280nm. Si è disciolto il peptide in metanolo con proporzione (1mg/1mL). Questa soluzione è stata conseguentemente filtrata con filtro PVDF da 0.45µm.

L'analisi HPLC è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Volume di iniezione: 20µL.
- Flusso:1 ml/min.
- Eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN
- Gradiente: da 10% a 30% di eluente B in 30 minuti

- Lunghezza d'onda: 214nm

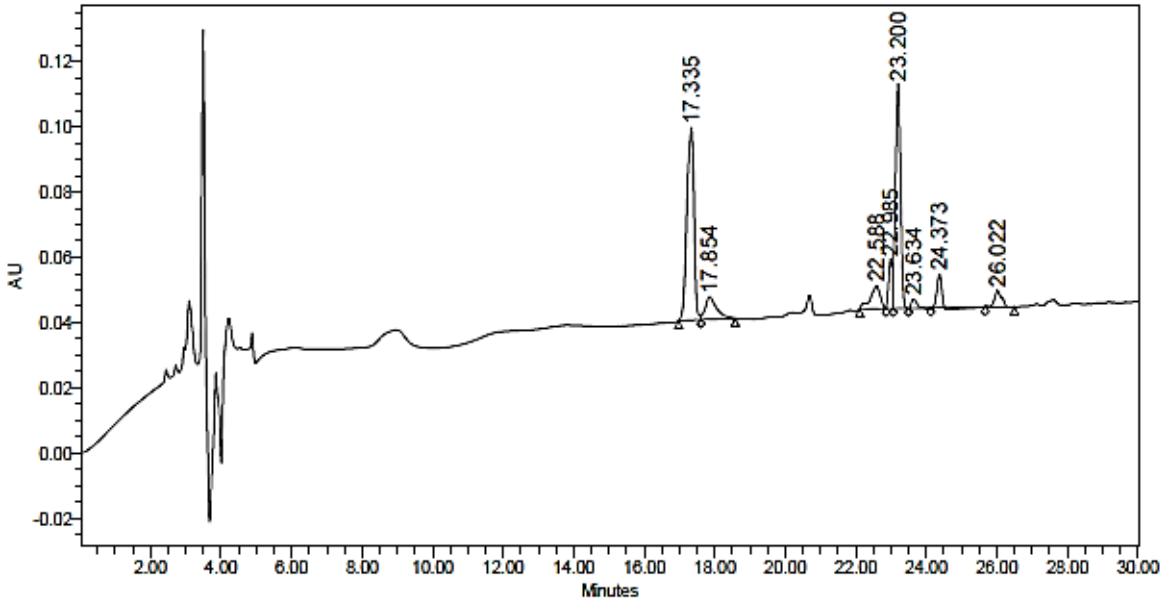

Figura 46: Cromatografia analitica del peptide Ac-SKGQII-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 214nm.

- Lunghezza d'onda: 280nm

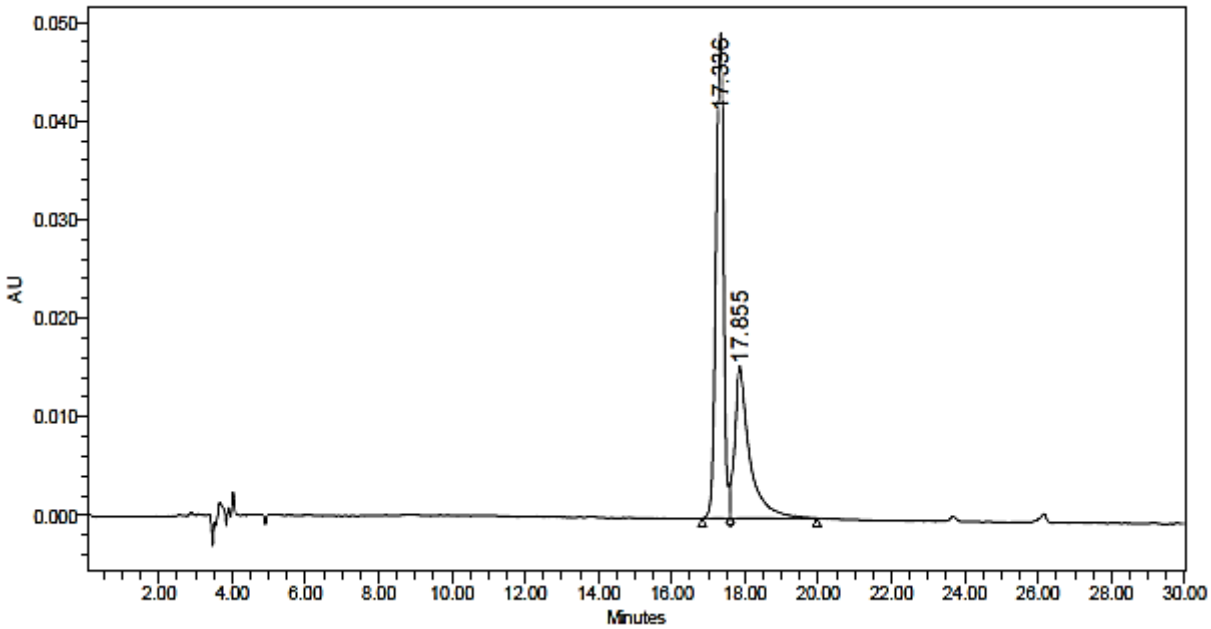

Figura 47: Cromatografia analitica del peptide Ac-SKGQII-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 280nm.

Per completare la caratterizzazione del peptide è stata effettuata un'analisi spettrometrica di massa MALDI-TOF. La massa sperimentale (Fig. 48) coincide con la massa teorica (844,42Da).

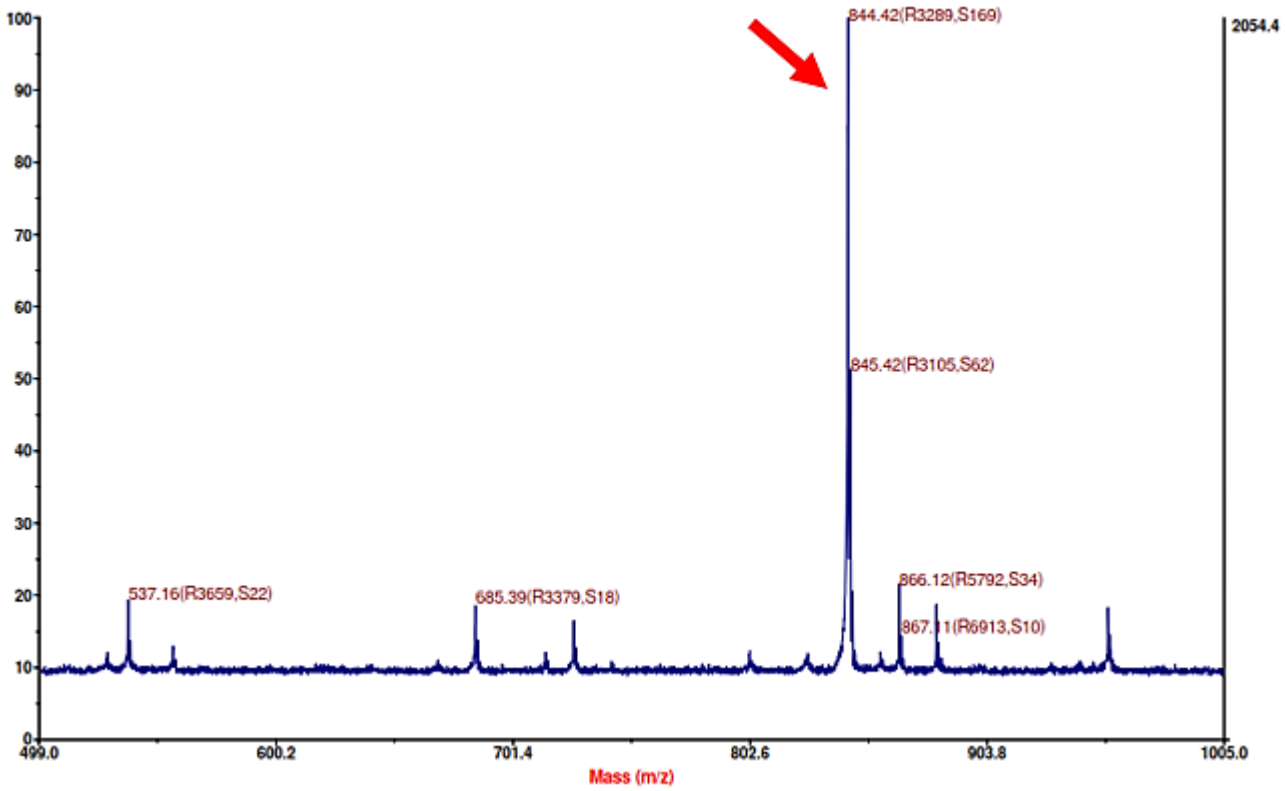

Figura 48: spettrometro di massi (MALDI-TOF) del peptide grezzo Ac-SKGQII-AMC.

Il peptide è stato poi purificato tramite una RP-HPLC per eliminare i sottoprodotti creatisi durante la sintesi Fig. 49. Per questa RP-HPLC semipreparativa è stata fatta un'unica corsa visto l'esigua quantità di peptide ed è stata utilizzata la colonna Atlantis C18 ODB *preparative* (10 µm, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters). La preparazione del campione consisteva nel sciogliere il peptide in 1ml di DMF e 1ml di MilliQ. È stata preferita la DMF invece che il metanolo perché in RP-HPLC semipreparativa aveva un miglior comportamento: il metanolo, essendo un solvente organico, entrava in competizione con la colonna cromatografica non facendo legare tutto il peptide alla colonna. Infatti, la maggior parte del peptide usciva ancor prima che incominciasse il gradiente, non permettendo una corretta purificazione. La DMF invece permetteva al peptide di legarsi alla colonna e tutta la DMF usciva durante il processo di ricondizionamento della colonna, dando come contributo una banda molto larga.

Il gradiente utilizzato è stato: da 10% a 45% di eluente B in 35 minuti.

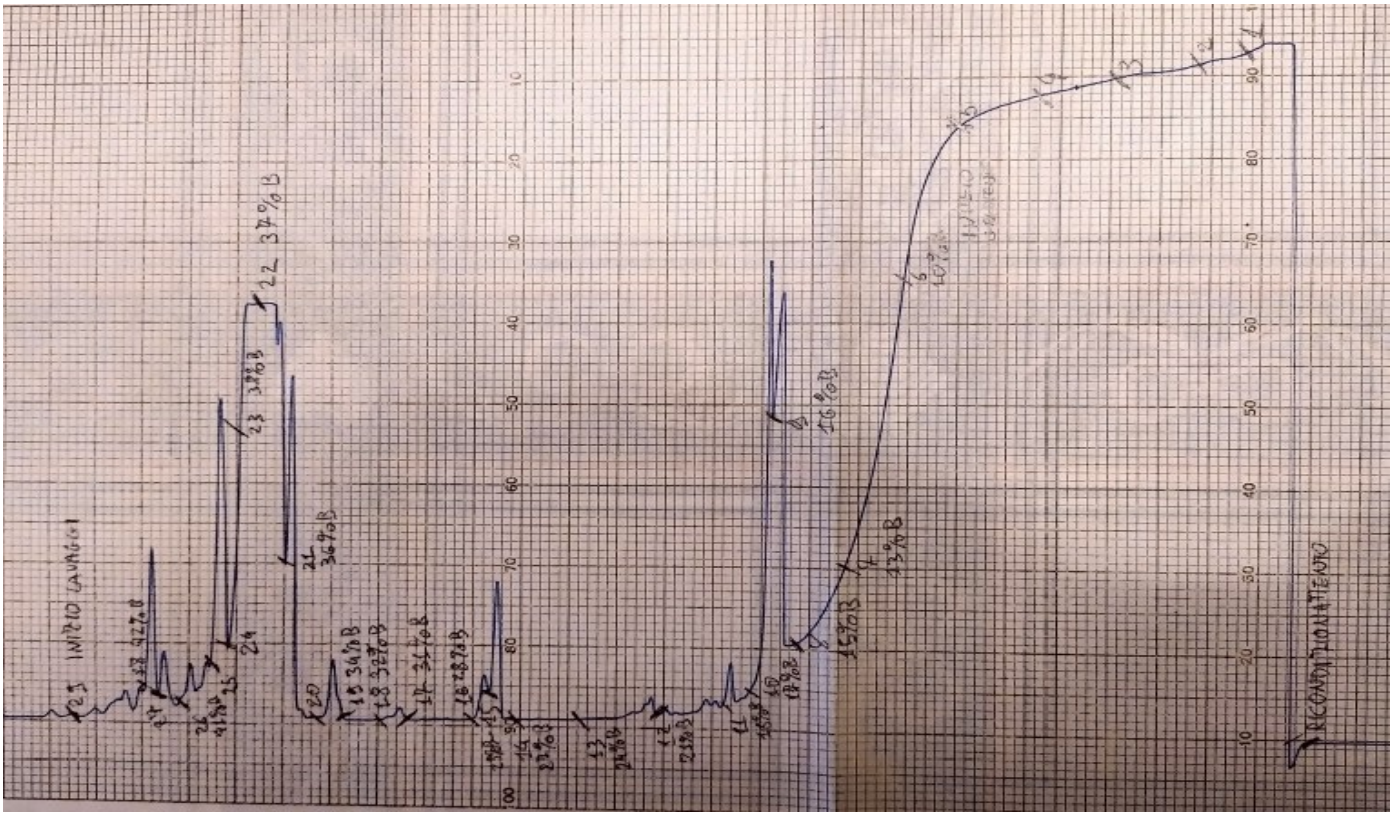

Figura 49: Cromatografia semipreparativa del peptide Ac-SKGQII-AMC. Colonna: Atlantis C18; flusso:4 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 10% al 45% di eluente B in 35 minuti; λ= 214 nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

Per tutte le RP-HPLC semipreparative eseguite in questo lavoro di tesi, è stato tutto raccolto in diverse frazioni in delle provette. Alcune di queste provette sono state analizzate tramite HPLC allo stesso gradiente delle cromatografie fatte in precedenza, per andare a inviduare l'amminoacido fluorescente OH-Ile-AMC che non aveva reagito. Una volta individuate le provette contenenti l'amminoacido fluorescente libero, sono state eliminate, mentre, sono state tenute tutte le provette restanti, le quali sono state poi liofilizzate in dei palloni, ottenendo così il peptide finito.

3.2.3 Sintesi del peptide Ac-RSSKGQII-AMC

Per sintetizzare il peptide H-Arg-Ser-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-OH sono stati aggiunti i seguenti amminoacidi:

- Fmoc-Ser (tBu)-OH
- Fmoc-Arg (Pbf)-OH

Sintesi

Per iniziare la sintesi è stato inserito nel sintetizzatore il reattore contenente i 2/3 di resina pesati in precedenza. Come per la sintesi del primo peptide si lascia rigonfiare la resina in 6ml DMF, si fa la deprotezione del gruppo Fmoc del terminale α-amminico, si attiva il gruppo carbossilico e si fanno i due *coupling* dell'amminoacido

da legare. Questa operazione va ripetuta per entrambi gli amminoacidi. In seguito, viene lavata la resina con DCM e seccata con la campana da vuoto.

Al termine si pesa il peptide su resina e si preleva ½ corrispondente al peptide finito mentre, l'½ verrà messo in un altro reattore per la continuazione del peptide. Sulla resina prelevata (½ del totale) si esegue lo sblocco dello Fmoc e l'acetilazione. Si eseguirà poi lo sblocco del peptide dalla resina preservando i gruppi protettori delle catene laterali mediante una soluzione di TFA in DCM (1ml) per 90 minuti.

Condensazione dell'amminoacido fluorescente H-Ile-AMC

Lo sblocco del peptide dalla resina, permette di condensare l'amminoacido H-Ile-AMC all'C-terminale del peptide sintetizzato. Per la condensazione verranno messi in un pallone 14,9mg di peptide grezzo ottenuti dalla sintesi e 6mg dell'amminoacido H-Ile-AMC, corrispondente al doppio delle moli del peptide. Si aggiunge poi la soluzione attivante nel pallone. La reazione viene lasciata o/n. Successivamente la soluzione viene portata a minimo volume con il *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico con la solita procedura.

Sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali

Si concludere con lo sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali per mezzo di una soluzione costituita da 2,5% di MilliQ, 2,5% di TES in 5ml di TFA. La soluzione è stata lasciata reagire per 90 minuti a temperatura ambiente, agitando manualmente il reattore ogni tanto. Sono stati fatti dei lavaggi con TFA. Poi, tramite la solita procedura, si porta a minimo volume con *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico.

Caratterizzazione e purificazione del peptide Ac-RSSKGQII-AMC

È stata svolta un'analisi cromatografica RP-HPLC per avere un riscontro sul grado di purezza e sulla composizione del peptide (Fig. 50 e 51). La colonna utilizzata è Atlantis C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, Waters) la registrazione dell'assorbanza avviene a due lunghezze d'onda: 214nm e 280nm. Si è disciolto il peptide in metanolo con proporzione (1mg/1mL). Questa soluzione è stata conseguentemente filtrata con filtro PVDF da 0.45µm.

L'analisi HPLC analitica è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Volume di iniezione: 20µL.
- Flusso:1 ml/min.
- Eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN
- Gradiente: da 0% a 30% di eluente B in 30 minuti

- Lunghezza d'onda: 214nm

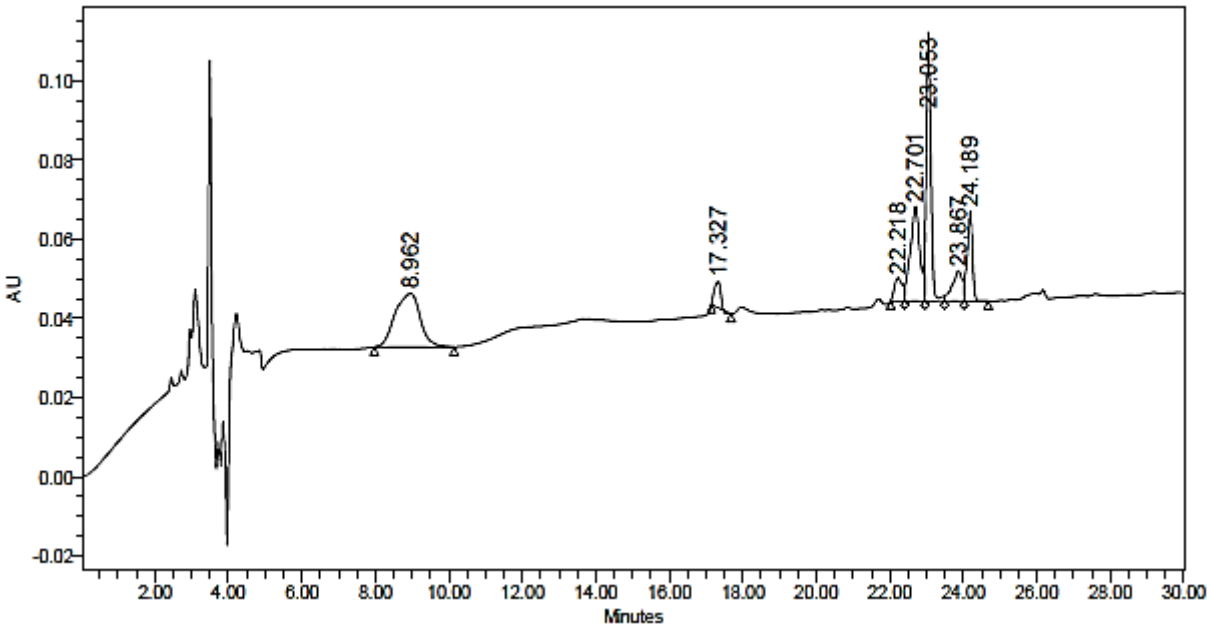

Figura 50: Cromatografia analitica del peptide Ac-RSSKGQII-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 214nm.

- Lunghezza d'onda: 280nm

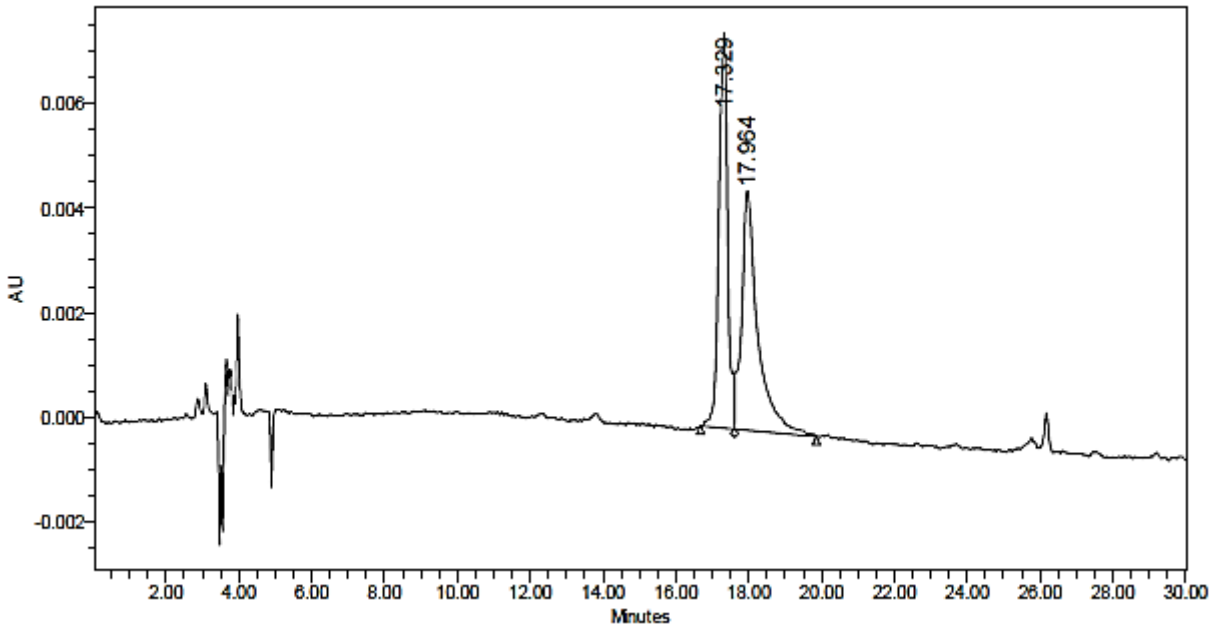

Figura 51: Cromatografia analitica del peptide Ac-RSSKGQII-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 280nm.

Per completare la caratterizzazione del peptide è stata effettuata un'analisi spettrometrica di massa MALDI-TOF. La massa sperimentale (Fig. 52) coincide con la massa teorica (1087,25Da).

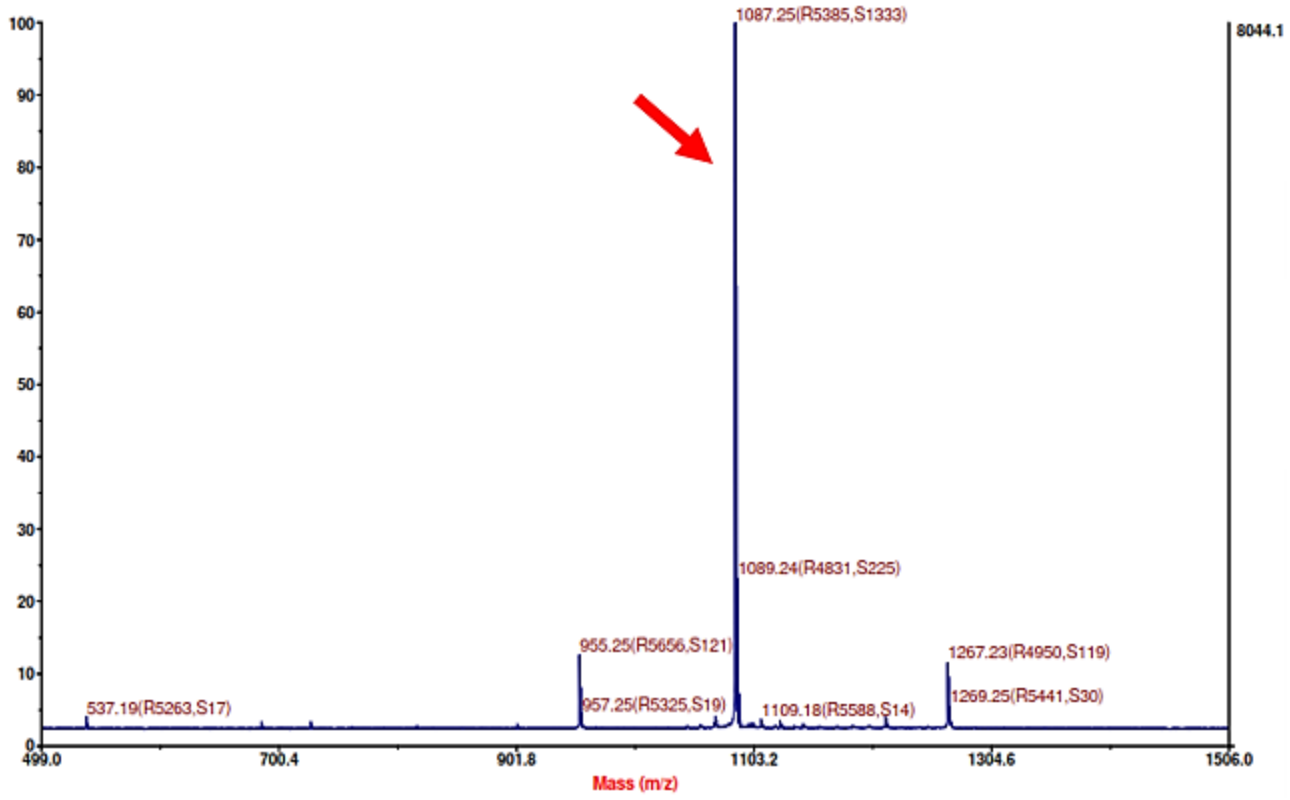

Figura 52: spettrometro di massi (MALDI-TOF) del peptide grezzo Ac-RSSKGQII-AMC.

Il peptide è stato poi purificato tramite una RP-HPLC per eliminare i sottoprodotti creatisi durante la sintesi Fig. 53. Per questa RP-HPLC semipreparativa è stata fatta un'unica corsa ed è stata utilizzata la colonna Atlantis C18 ODB *preparative* (10 µm, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters). La preparazione del campione consisteva nel sciogliere il peptide in 1ml di DMF e 1ml di MilliQ. Il gradiente utilizzato è stato: da 10% a 45% di eluente B in 35 minuti.

Per tutte le RP-HPLC semipreparative eseguite in questo lavoro di tesi, è stato tutto raccolto in diverse frazioni in delle provette. Alcune di queste provette sono state analizzate tramite HPLC allo stesso gradiente delle cromatografie fatte in precedenza, per andare a inviduare l'amminoacido fluorescente OH-Ile-AMC che non aveva reagito. Una volta individuate le provette contenenti l'amminoacido fluorescente libero, sono state eliminate, mentre, sono state tenute tutte le provette restanti, le quali sono state poi liofilizzate in dei palloni, ottenendo così il peptide finito.

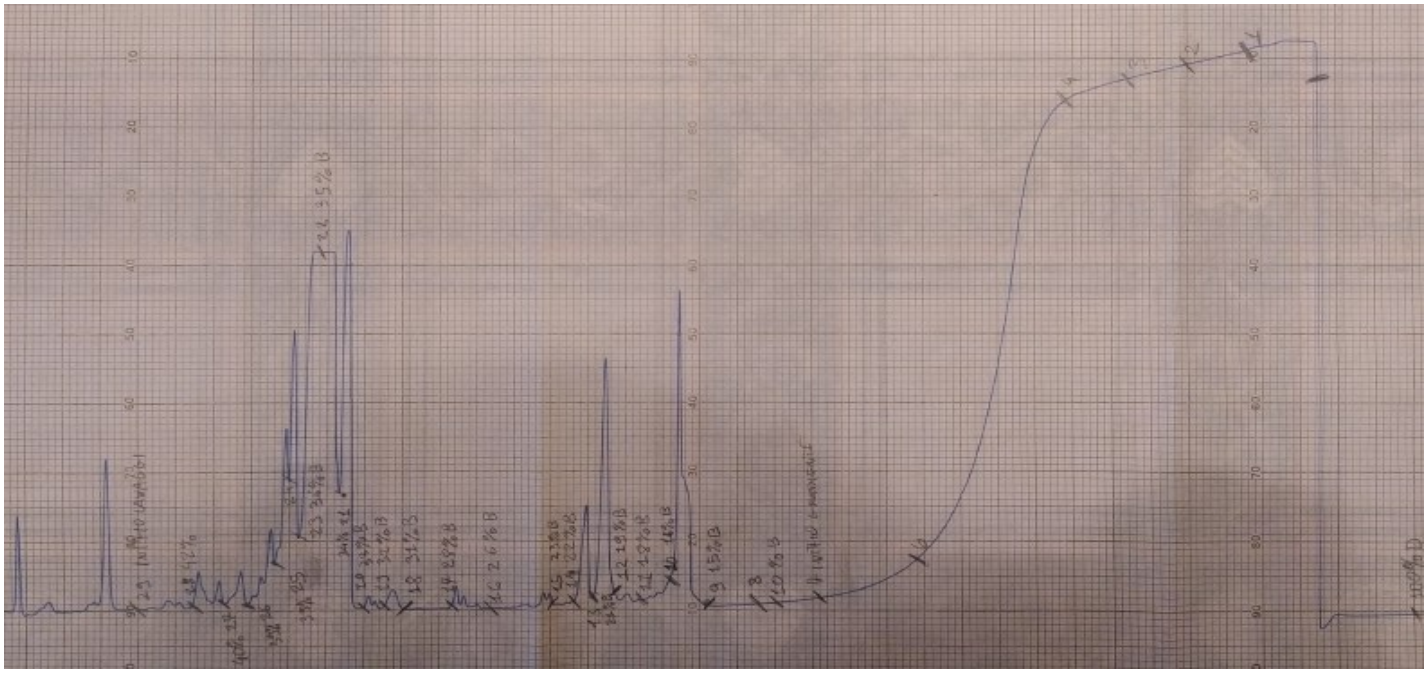

Figura 53: Cromatografia semipreparativa del peptide Ac-RSSKGQII-AMC. Colonna: Atlantis C18; flusso:4 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 10% al 45% di eluente B in 35 minuti; λ= 214 nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

3.2.4 Sintesi del peptide Ac-MDRSSKGQII-AMC

Per sintetizzare il peptide H-Met-Asp-Arg-Ser-Ser-Lys-Gly-Gln-Ile-OH sono stati aggiunti i seguenti amminoacidi:

- Fmoc-Asp (OtBu)-OH
- Fmoc-Met-OH

Sintesi

Per iniziare la sintesi è stato inserito nel sintetizzatore il reattore contenente il ½ di resina pesati in precedenza. Come per la sintesi del primo peptide si lascia rigonfiare la resina in 6ml DMF, si fa la deprotezione del gruppo Fmoc del terminale α-amminico, si attiva il gruppo carbossilico e si fanno i due *coupling* dell'amminoacido da legare. Questa operazione va ripetuta per entrambi gli amminoacidi. In seguito, viene lavata la resina con DCM e seccata con la campana da vuoto.

Sulla resina rimanente, si esegue lo sblocco dello Fmoc e l'acetilazione. Si eseguirà poi lo sblocco del peptide dalla resina preservando i gruppi protettori delle catene laterali mediante una soluzione di TFA in DCM (1ml) per 90 minuti.

Condensazione dell'amminoacido fluorescente H-Ile-AMC

Lo sblocco del peptide dalla resina, permette di condensare l'amminoacido H-Ile-AMC all'C-terminale del peptide sintetizzato. Per la condensazione si mettono in un pallone i 39,4mg del peptide grezzo ottenuti dalla

sintesi e i 13,04mg dell'amminoacido H-Ile-AMC, corrispondente al doppio delle moli del peptide. Si aggiunge poi la soluzione attivante nel pallone. La reazione viene lasciata o/n. Successivamente la soluzione viene portata a minimo volume con il *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico

Sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali

Si concludere con lo sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali per mezzo di una soluzione costituita da 2,5% di MilliQ, 2,5% di TES in 5ml di TFA. La soluzione è stata lasciata reagire per 90 minuti a temperatura ambiente, agitando manualmente il reattore ogni tanto. Sono stati fatti dei lavaggi con TFA. Poi, tramite la solita procedura, si porta a minimo volume con *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico.

Caratterizzazione e purificazione del peptide Ac-MDRSSKGQII-AMC

È stata svolta un'analisi cromatografica RP-HPLC per avere un riscontro sul grado di purezza e sulla composizione del peptide (Fig. 54 e 55). La colonna utilizzata è Atlantis C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, Waters) la registrazione dell'assorbanza avviene a due lunghezze d'onda: 214nm e 280nm. Si è disciolto il peptide in metanolo con proporzione (1mg/1mL). Questa soluzione è stata conseguentemente filtrata con filtro PVDF da 0.45µm.

L'analisi HPLC analitica è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Volume di iniezione: 20µL.
- Flusso:1 ml/min.
- Eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN
- Gradiente: da 0% a 30% di eluente B in 30 minuti

➢ Lunghezza d'onda: 214nm

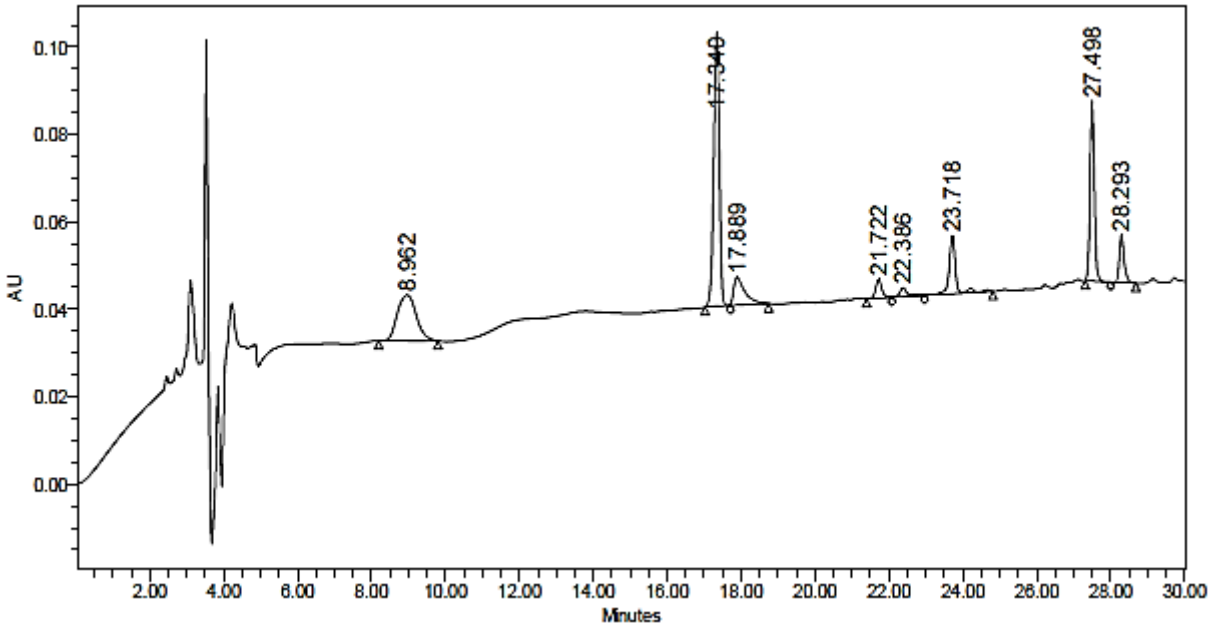

Figura 54: Cromatografia analitica del peptide Ac-MDRSSKGQII-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 214nm.

➢ Lunghezza d'onda: 280nm

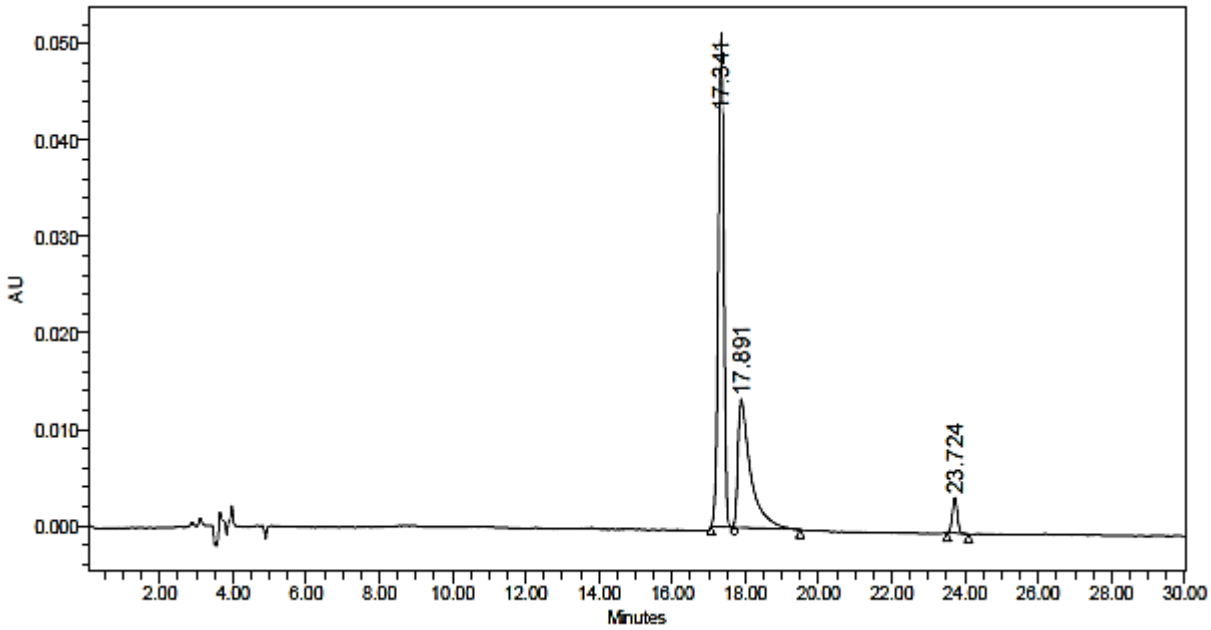

Figura 55: Cromatografia analitica del peptide Ac-MDRSSKGQII-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 l/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 280nm.

Per completare la caratterizzazione del peptide è stata effettuata un'analisi spettrometrica di massa MALDI-TOF. La massa sperimentale (Fig. 56) coincide con la massa teorica (1333.27Da).

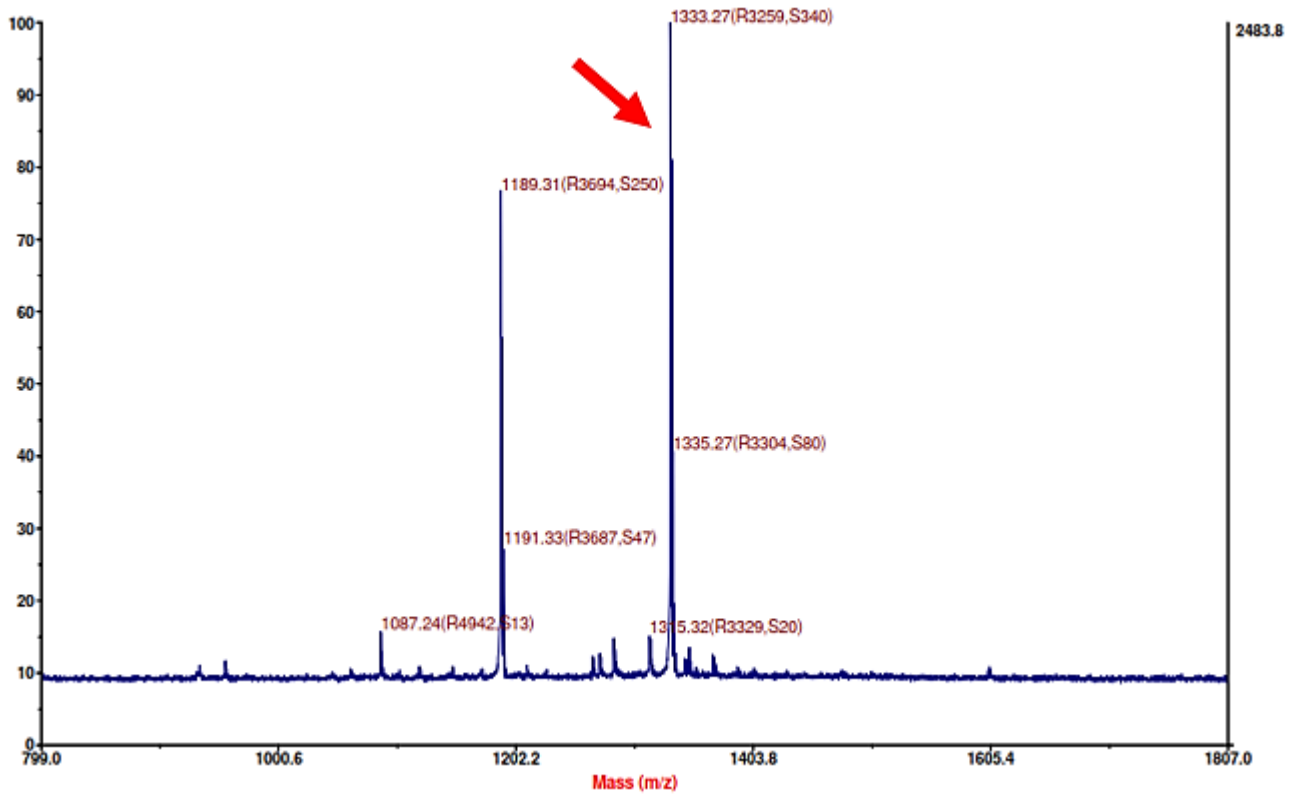

Figura 56: spettrometro di massi (MALDI-TOF) del peptide grezzo Ac-MDRSSGQII-AMC.

Il peptide è stato poi purificato tramite una RP-HPLC per eliminare i sottoprodotti creatisi durante la sintesi Fig. 57. Per questa RP-HPLC semipreparativa è stata fatta un'unica corsa ed è stata utilizzata la colonna Atlantis C18 ODB *preparative* (10 µm, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters). La preparazione del campione consisteva nel sciogliere il peptide in 1ml di MilliQ e 1ml di DMF. Il gradiente utilizzato è stato: da 10% a 45% di eluente B in 35 minuti.

Anche in questo caso sono state fatte delle analitiche al contenuto di alcune provette al fine di eliminare solo l'amminoacido fluorescente.

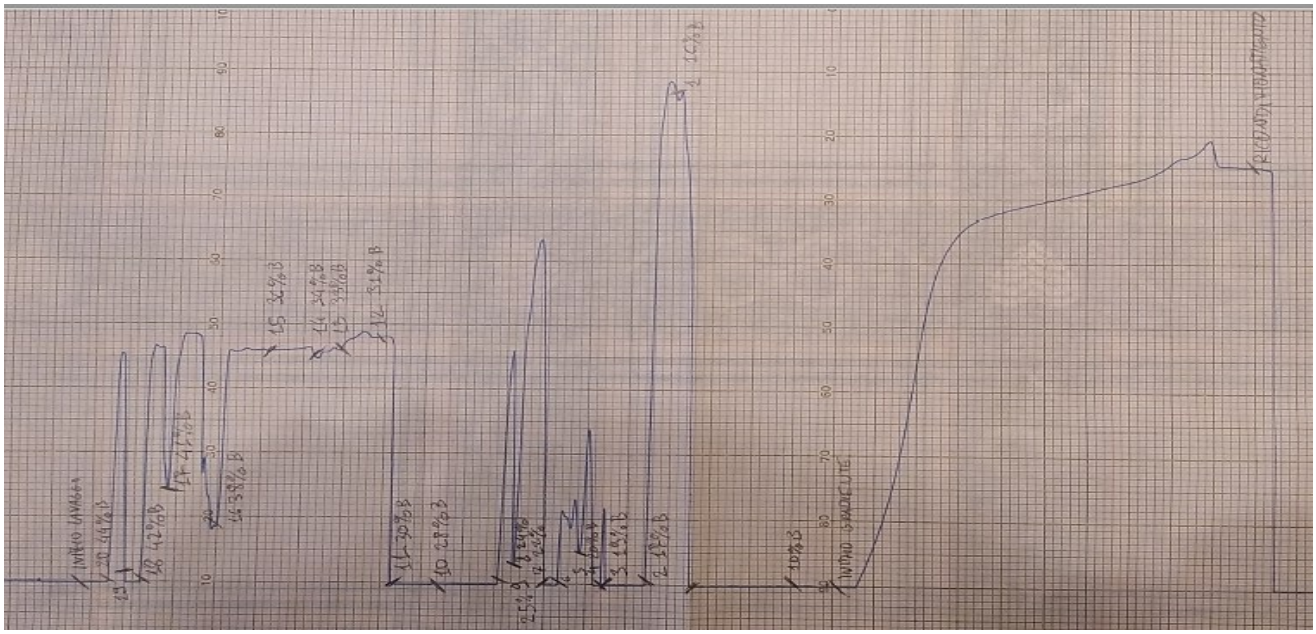

Figura 57: Cromatografia semipreparativa del peptide Ac-MDRSSKGQII-AMC. Colonna: Atlantis C18; flusso:4 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 10% al 45% di eluente B in 35 minuti; λ= 214 nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

3.3 Sintesi di peptidi che mimano un sito di taglio della protocaderina-10

La sequenza $_{668}$SSTATLVVQ$_{677}$↓ (Tab. 5) riproduce un sito di taglio della protocaderina-10. L'obbiettivo era quello di andare a verificare, se questo substrato veniva processato da enzimi *over-espressi* presenti nel tratto gastrointestinale di pazienti affetti da IBD. Si è deciso quindi di sintetizzare peptidi che mimano questo sito in 4 lunghezze diverse. In modo analogo a quanto riportato sopra, i peptidi sono stato marcati con AMC per studiare le cinetiche enzimatiche di taglio mediante dei test di fluorescenza *in vitro*.

Come nel peptide descritto in precedenza, la sintesi si è svolta in 4 *step* differenti dove ogni *step* ha previsto che una porzione della resina venisse prelevata e messa in un reattore per la continuazione della sintesi; La resina restante è stata messa da parte in quanto costituiva il peptide finito Fig. 58.

Peptide	PM teorico [Da]	PM misurato [Da]	Peso peptide grezzo [mg]	Resa della sintesi [%]	Purezza grezzo [%]	Peso peptide purificato [mg]
Ac- LVVQ-AMC	738,705	743,493	4,61	10	16	0,11
Ac- ATLVVQ-AMC	910,89	902,52	5,65	8.4	26,1	0,69

Tabella 5: tabella riassuntiva di peptidi che mimano 668SSTATLVVQ677↓.

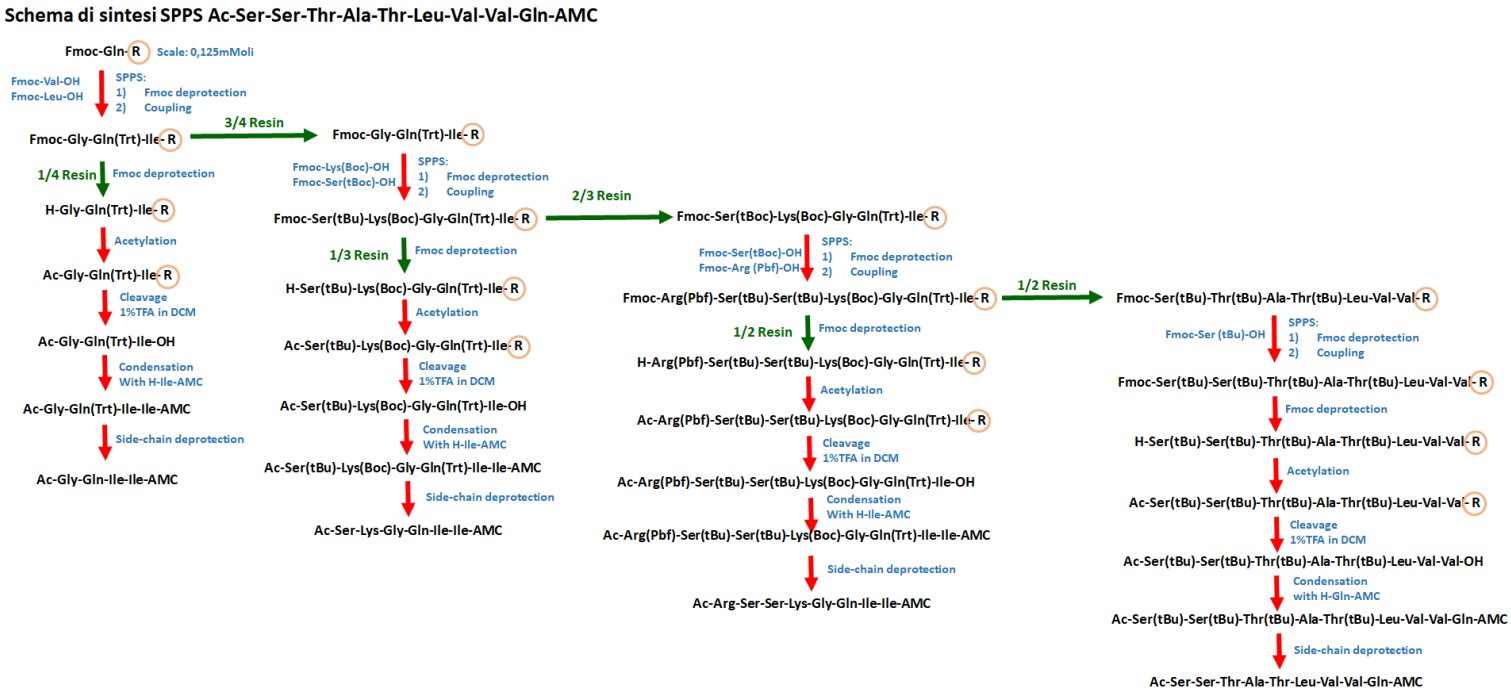

Figura 58: schema della sintesi SPPS di peptidi che mimano $_{668}SSTATLVVQ_{677}\downarrow$.

3.3.1 Sintesi del peptide Ac-LVVQ-AMC

In questo lavoro di tesi è stato preparato il peptide Ac-Leu-Val-Val-OH attraverso l'utilizzo del sintetizzatore automatico Syro I. La sintesi su fase solida (SPPS) è stata realizzata mediante chimica Fmoc utilizzando un doppio *coupling* per ogni inserimento. La resina super acido-labile utilizzata è stata (0.73mmol/g).

Per sintetizzare il peptide sono stati utilizzati i seguenti amminoacidi funzionalizzati:

- Fmoc-Val-OH
- Fmoc-Leu-OH

Le soluzioni necessarie per la sintesi sono:

- ➢ Soluzione a 40% di piperidine in 40ml di DMF necessaria all'inizio di ogni ciclo di *couplig* per la deprotezione del gruppo Fmoc.
- ➢ Soluzione attivante HBTU/Oxyma Pure 0.45M in DMF.
- ➢ Soluzione DIPEA 1,8M in NMP.

Le soluzioni vengono poi inserite nel sintetizzatore e risultano stabili per tutta la durata della sintesi.

Sintesi

La resina utilizzata in questa sintesi è la Fmoc-Gln-Sasrin (0,73mmol/g). Si volevano utilizzare 0,125mmol di siti attivi e di conseguenza si calcola la quantità di resina necessaria tramite la formula:

$$Massa\ resina = \frac{siti\ attivi}{sostituzione\ resina} = \frac{0{,}125 mmol}{0{,}73\ {}^{mmol}/_{g}} = 0{,}171 mg$$

La resina è stata successivamente collocata in un reattore dove verrà effettuata la sintesi. Si pesano dunque gli amminoacidi che vengono poi sciolti in DMF e posizionati nel sintetizzatore.

Si può dunque iniziare la sintesi. Per prima cosa si lascia rigonfiare la resina in 6ml di DMF per 10 minuti. Una volta drenata la DMF viene effettuata la deprotezione del gruppo Fmoc del terminale α-amminico tramite la soluzione di piperidina. In seguito avviene l'attivazione del gruppo carbossilico grazie alla soluzione HBTU/Oxyma Pure in DMF. In fine, viene caricato 1ml della soluzione contenente l'amminoacido successivo per effettuare il doppio *coupling*.
In seguito, la resina viene lavata con DCM e posta a seccare in una campana da vuoto per un'ora.

Al termine, si pesa il peptide su resina e si preleva il ¼ di resina corrispondente al peptide finito, i restanti ¾ verranno messi in un altro reattore per la continuazione della sintesi. Sulla resina prelevata (¼ del totale) si esegue lo sblocco Fmoc e l'acetilazione tramite una soluzione di anidride acetica (10%) e DIPEA (5%) in NMP (3ml). La soluzione verrà poi versata nel reattore e lasciata a reagire per 15 minuti. Una volta terminati i 15 minuti si effettuano 3 lavaggi con DCM e 3 lavaggi con metanolo. In fine la resina andrà seccata sotto vuoto per un'ora.

Terminata la procedura di acetilazione, si eseguirà lo sblocco del peptide dalla resina preservando i gruppi protettori delle catene laterali mediante una soluzione composta da 1% di TFA in DCM in un volume totale di 1ml per 90 minuti. Questa operazione andrà effettuata 3 o 4 volte. Dopo i 90 minuti di reazione, la soluzione di TFA in DCM, contenente il peptide, viene filtrata via. Si eseguono 3 lavaggi con DCM della resina che si collezionano assieme alla soluzione di sblocco. Il tutto viene poi messo in un pallone e portato a minimo volume con *rotavapor*. Successivamente, nel pallone con la soluzione residua si versa del etere dietilico freddo e si lascia in agitazione per qualche minuto. Si centrifuga poi la soluzione per far decantare il peptide. Una volta che il peptide si è raccolto sul fondo, con una Pasteur, si preleva l'etere e lo si mette in una seconda falcon. La falcon contenete il peptide la si chiude con della carta filtro e si lascia seccare l'etere o/n.

Condensazione dell'amminoacido fluorescente H-Gln-AMC

Lo sbloccaggio del peptide dalla resina, permette di condensare l'amminoacido H-Gln-AMC al C-terminale del peptide sintetizzato. Per la condensazione si mettono in un pallone i 1,5mg del peptide grezzo ottenuti dalla sintesi e i 3mg dell'amminoacido H-Gln-AMC, corrispondente al doppio delle moli del peptide. Si aggiunge poi la soluzione attivante nel pallone. La reazione viene lasciata o/n. Successivamente la soluzione viene portata a minimo volume con il *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico con la solita procedura.

Sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali

Per questo peptide non si esegue lo sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali visto che gli amminoacidi utilizzati ne sono sprovvisti.

Caratterizzazione e purificazione del peptide Ac-LVVQ-AMC

È stata svolta un'analisi cromatografica RP-HPLC per avere un riscontro sul grado di purezza e sulla composizione del peptide (Fig. 59 e 60). La colonna utilizzata è Atlantis C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, Waters) la registrazione dell'assorbanza avviene a due lunghezze d'onda: 214nm e 280nm. Si è disciolto il peptide in MilliQ in proporzione (1mg/1mL). Questa soluzione è stata conseguentemente filtrata con filtro PTFE da 0.45µm.

L'analisi HPLC analitica è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Volume di iniezione: 20µL.
- Flusso:1 ml/min.
- Eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ.
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN.
- Gradiente: da 0% a 15% di eluente B in 30 minuti.

➢ Lunghezza d'onda: 214nm

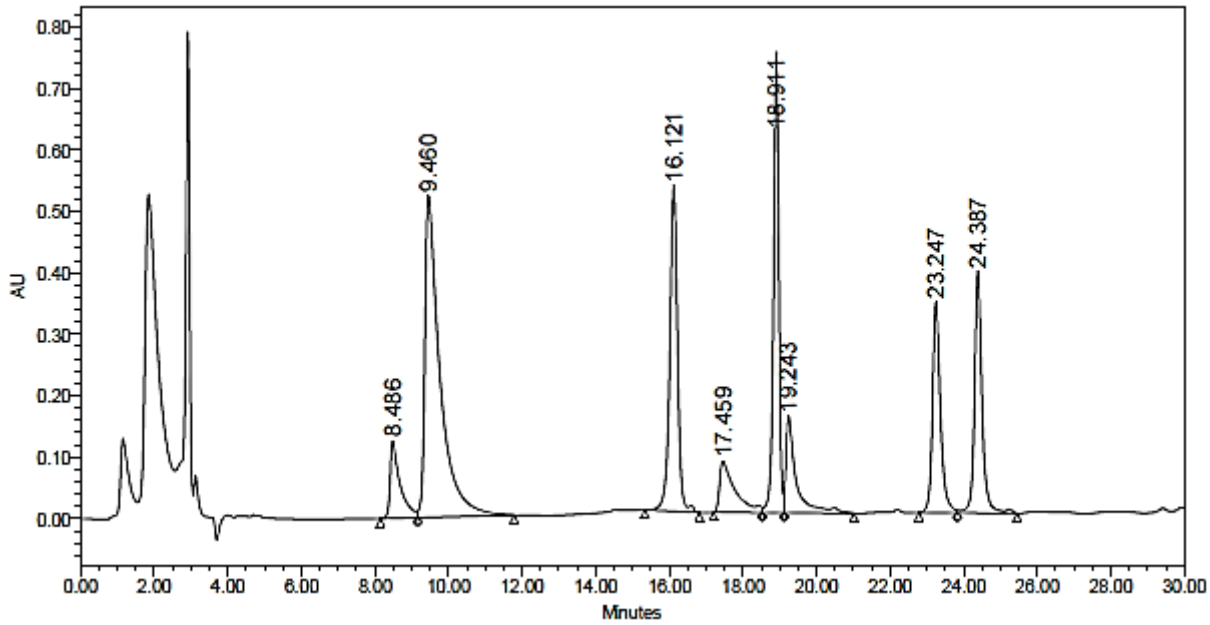

Figura 59: Cromatografia analitica del peptide Ac-LVVQ-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 15% di eluente B in 30 minuti; λ= 214nm.

- Lunghezza d'onda: 280nm

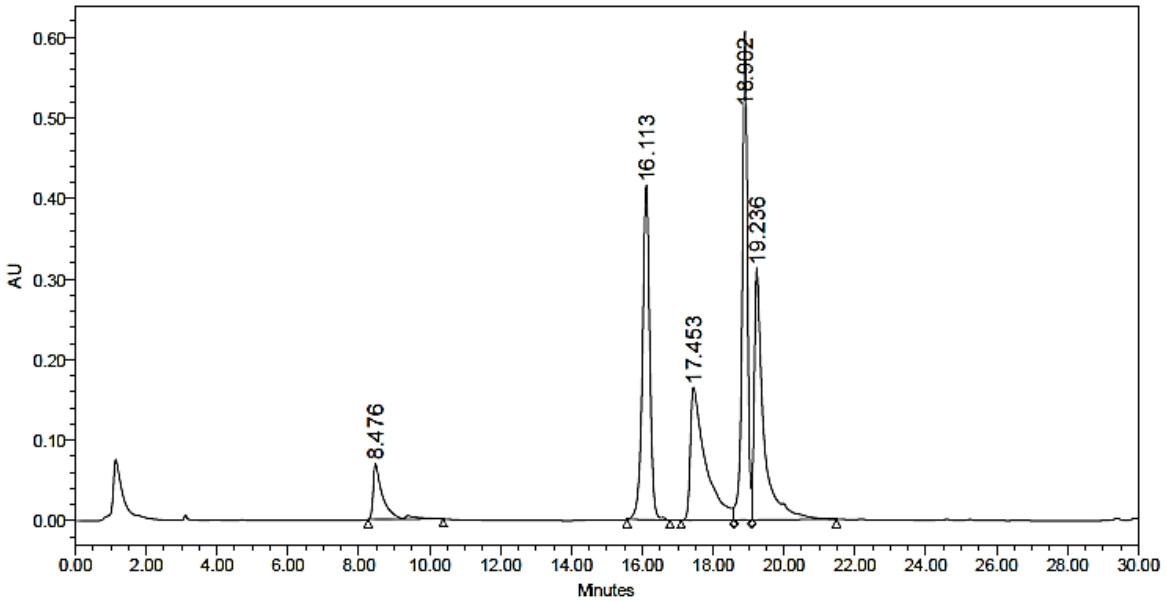

Figura 60: Cromatografia analitica del peptide Ac-LVVQ-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 30% di eluente B in 30 minuti; λ= 280nm.

Per completare la caratterizzazione del peptide è stata effettuata un'analisi di spettrometrica di massa ESI (Elettrospray Ionizaton, Fig. 61). La massa sperimentale (738,705Da) non coincide con quella teorica, quella che si avvicina di più è quella a 743,4933Da.

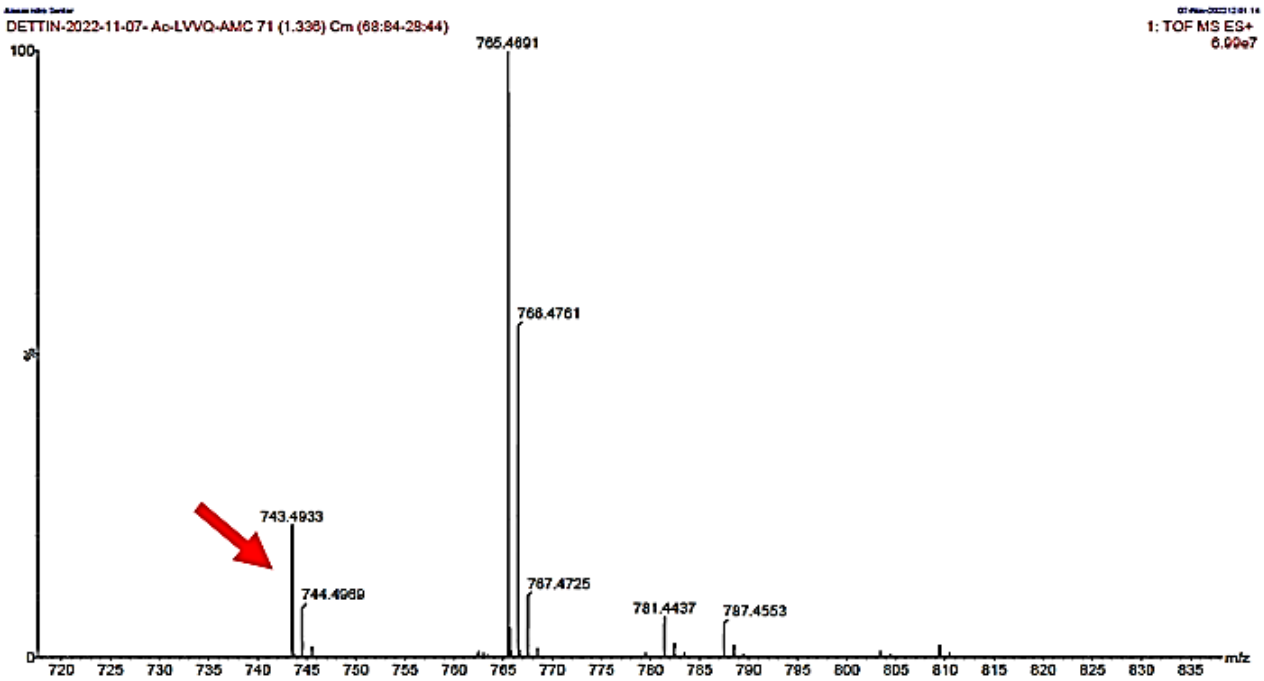

Figura 61: spettrometro di massi (ESI) del peptide grezzo Ac-LVVQ-AMC.

Il peptide è stato poi purificato tramite una RP-HPLC per eliminare i sottoprodotti creatisi durante la sintesi Fig. 62. Per questa RP-HPLC semipreparativa è stata fatta un'unica corsa ed è stata utilizzata la colonna Atlantis C18 ODB *preparative* (10 µm, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters). La preparazione del campione consisteva nel sciogliere il peptide in MilliQ. Il gradiente utilizzato è stato: da 0% a 15% di eluente B in 45 minuti.

Per tutte le RP-HPLC semipreparative fatte in questo lavoro di tesi, è stato tutto raccolto in diverse frazioni in delle provette. Alcune di queste provette sono state analizzate tramite HPLC allo stesso gradiente delle cromatografie fatte in precedenza, per andare a inviduare l'amminoacido fluorescente H-Gln-AMC che non aveva reagito. Una volta individuate le provette contenenti l'amminoacido fluorescente libero, sono state eliminate, mentre, sono state tenute tutte le provette restanti, le quali sono state poi liofilizzate in dei palloni, ottenendo così il peptide finito.

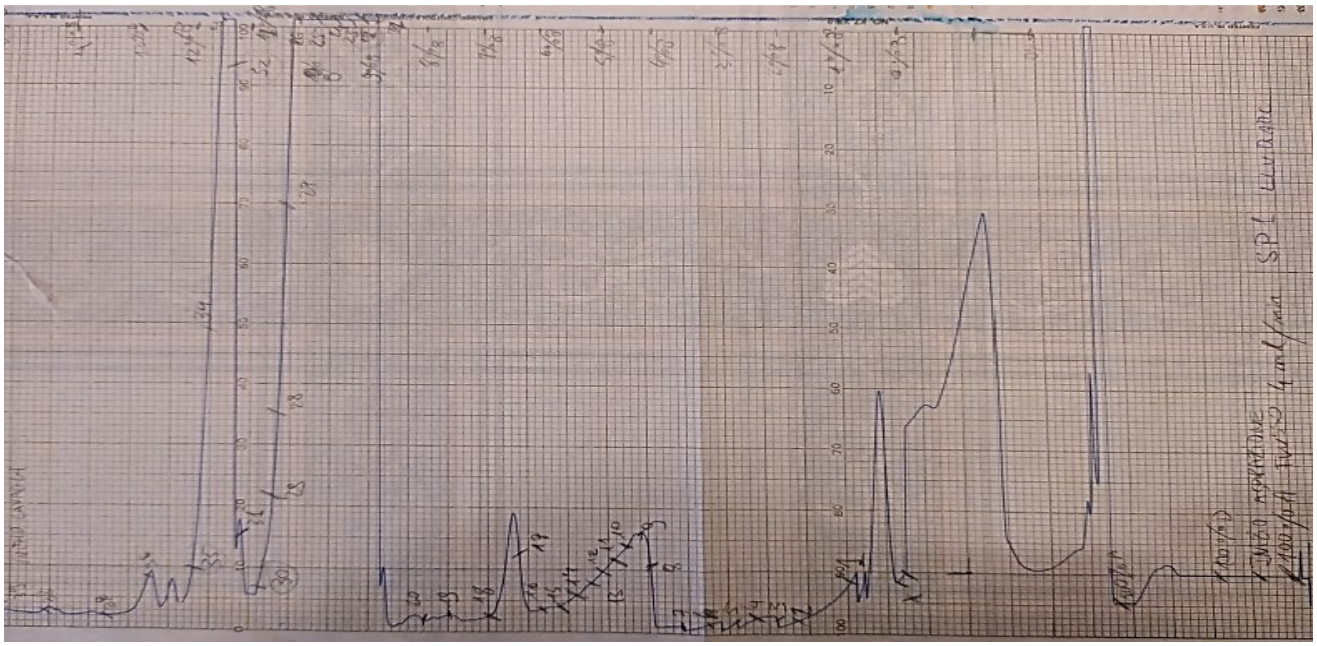

Figura 62: Cromatografia semipreparativa del peptide Ac-LVVQ-AMC. Colonna: Atlantis C18; flusso:4 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 15% di eluente B in 45 minuti; λ= 214 nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

3.3.1 Sintesi del peptide Ac-ATLVVQ-AMC

Per sintetizzare il peptide Ac-Ala-Thr-Leu-Val-Val-OH sono stati aggiunti i seguenti amminoacidi:

- Fmoc-Thr (tBu)-OH
- Fmoc-Ala-OH

Sintesi

Per iniziare la sintesi è stato inserito nel sintetizzatore il reattore contenente i ¾ di resina pesati in precedenza. Come per la sintesi del primo peptide si lascia rigonfiare la resina in 6ml DMF, si fa la deprotezione del gruppo Fmoc del terminale α-amminico, si attiva il gruppo carbossilico e si fanno i due *coupling* dell'amminoacido

da legare. Questa operazione va ripetuta per entrambi gli amminoacidi. In seguito, viene lavata la resina con DCM e seccata con la campana da vuoto.

Al termine si pesa il peptide su resina e si preleva 1/3 corrispondente al peptide finito mentre, i 2/3 verranno messi in un altro reattore per la continuazione del peptide. Sulla resina prelevata (1/3 del totale) si esegue lo sblocco dello Fmoc e l'acetilazione. Si eseguirà poi lo sblocco del peptide dalla resina preservando i gruppi protettori delle catene laterali mediante una soluzione di TFA in DCM (1ml) per 90 minuti.

Condensazione dell'amminoacido fluorescente H-Gln-AMC

Lo sblocco del peptide dalla resina, permette di condensare l'amminoacido H-Gln-AMC al C-terminale del peptide sintetizzato. Per la condensazione verranno messi in un pallone 3,6mg del peptide grezzo ottenuti dalla sintesi e 3mg dell'amminoacido H-Gln-AMC, corrispondente al doppio delle moli del peptide. Si aggiunge poi la soluzione attivante nel pallone. La reazione viene lasciata o/n. Successivamente la soluzione viene portata a minimo volume con il *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico con la solita procedura.

Sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali

Si concludere con lo sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali per mezzo di una soluzione costituita da 2,5% di MilliQ, 2,5% di TES in 5ml di TFA. La soluzione è stata lasciata reagire per 90 minuti a temperatura ambiente, agitando manualmente il reattore ogni tanto. Sono stati fatti dei lavaggi con TFA. Poi, tramite la solita procedura, si porta a minimo volume con *rotavapor* e si precipita il peptide con etere dietilico.

Caratterizzazione e purificazione del peptide Ac-ATLVVQ-AMC

È stata svolta un'analisi cromatografica RP-HPLC per avere un riscontro sul grado di purezza e sulla composizione del peptide (Fig. 63 e 64). La colonna utilizzata è Atlantis C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, Waters) la registrazione dell'assorbanza avviene a due lunghezze d'onda: 214nm e 280nm. Si è disciolto il peptide in MilliQ in proporzione (1mg/1mL). Questa soluzione è stata conseguentemente filtrata con filtro PTFE da 0.45µm.

L'analisi HPLC analitica è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Volume di iniezione: 20µL.
- Flusso:1 ml/min.
- Eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ.
- Eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN.
- Gradiente: da 0% a 50% di eluente B in 25 minuti.

- Lunghezza d'onda: 214nm

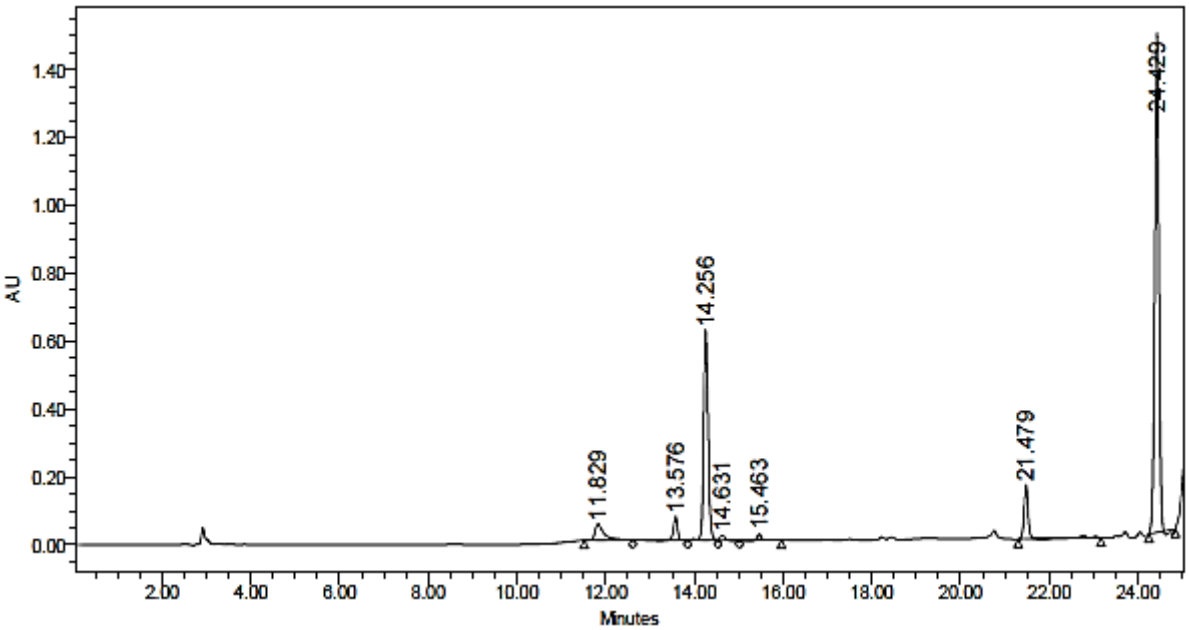

Figura 63: Cromatografia analitica del peptide Ac-ATLVVQ-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 0% al 50% di eluente B in 25 minuti; λ= 214nm.

- Lunghezza d'onda: 280nm

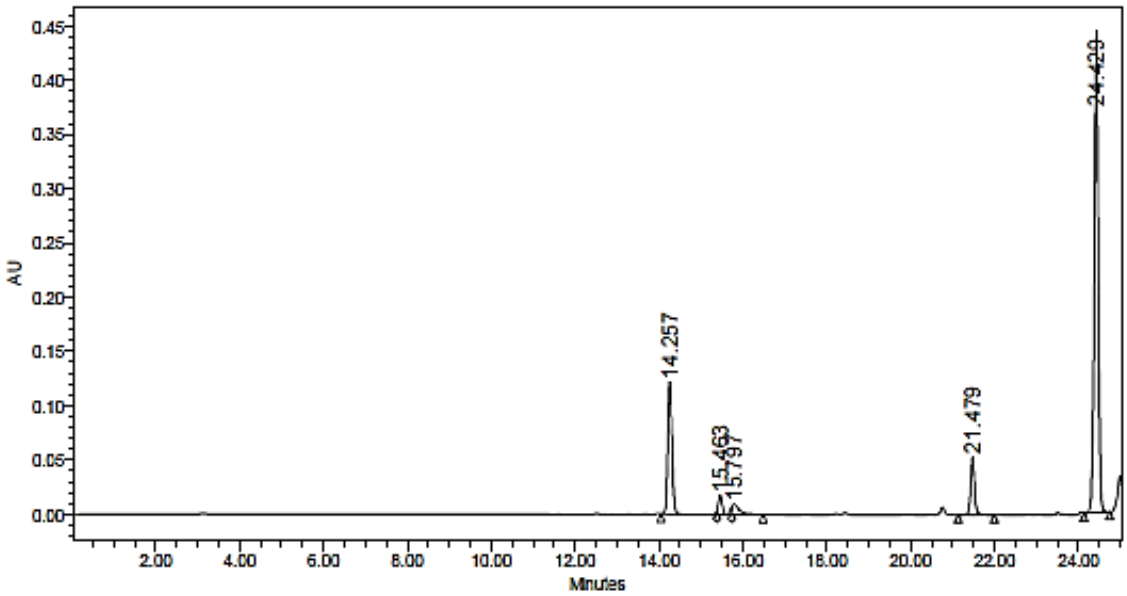

Figura 64: Cromatografia analitica del peptide Ac-ATLVVQ-AMC. Colonna Atlantis C18, volume di iniezione 20µL; flusso:1 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH3CN; Gradiente: da 0% al 50% di eluente B in 25 minuti; λ= 280nm.

Per completare la caratterizzazione del peptide è stata effettuata un'analisi spettrometrica di massa MALDI-TOF Fig. 65. La massa sperimentale (910,89Da) non coincide con quella teorica, quella che si avvicina di più è quella a 902,52Da.

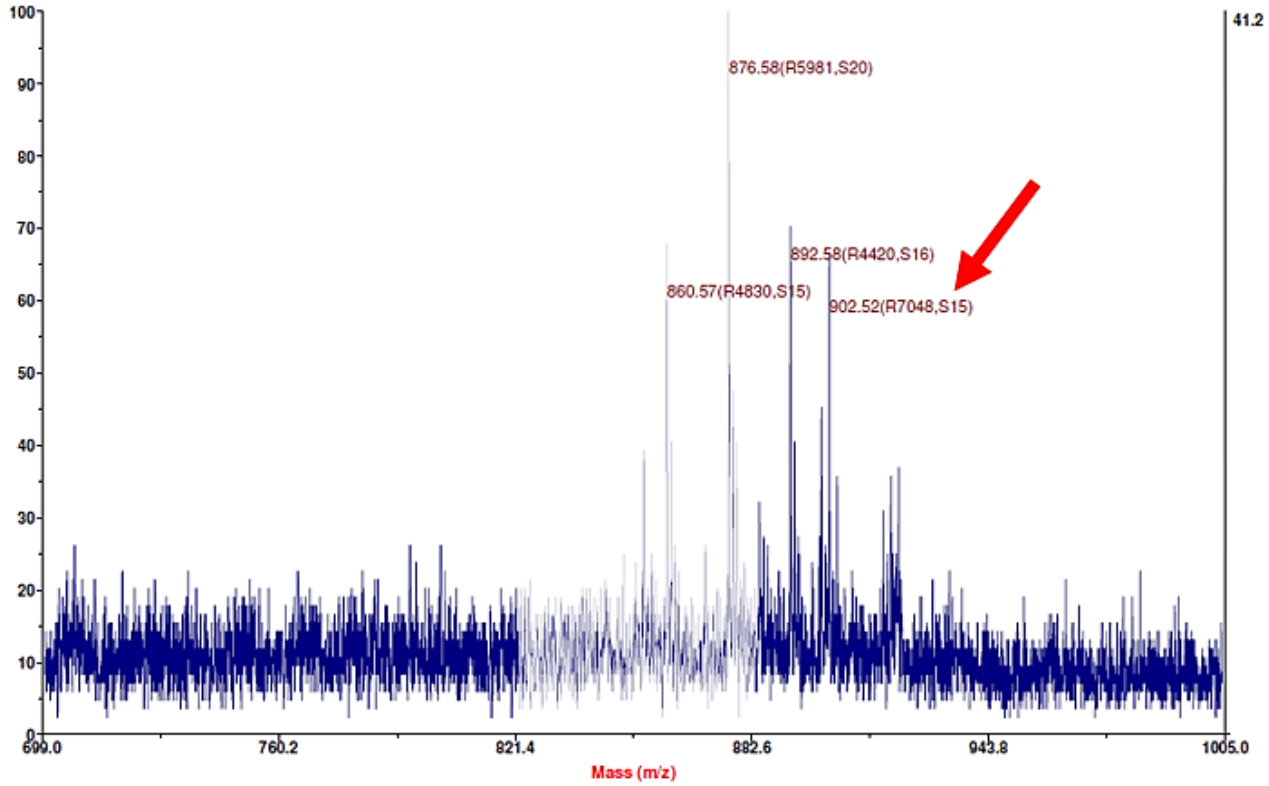

Figura 65: spettrometro di massi (MALDI-TOF) del peptide grezzo Ac-ATLVVQ-AMC.

Il peptide è stato poi purificato tramite una RP-HPLC per eliminare i sottoprodotti creatisi durante la sintesi Fig. 66. Per questa RP-HPLC semipreparativa è stata fatta un'unica corsa ed è stata utilizzata la colonna Atlantis C18 ODB *preparative* (10 µm, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters). La preparazione del campione consisteva nel sciogliere il peptide in MilliQ. Il gradiente utilizzato è stato: da 10% a 45% di eluente B in 35 minuti.

Anche in questo caso sono state fatte delle analitiche al contenuto di alcune provette al fine di eliminare solo l'amminoacido fluorescente.

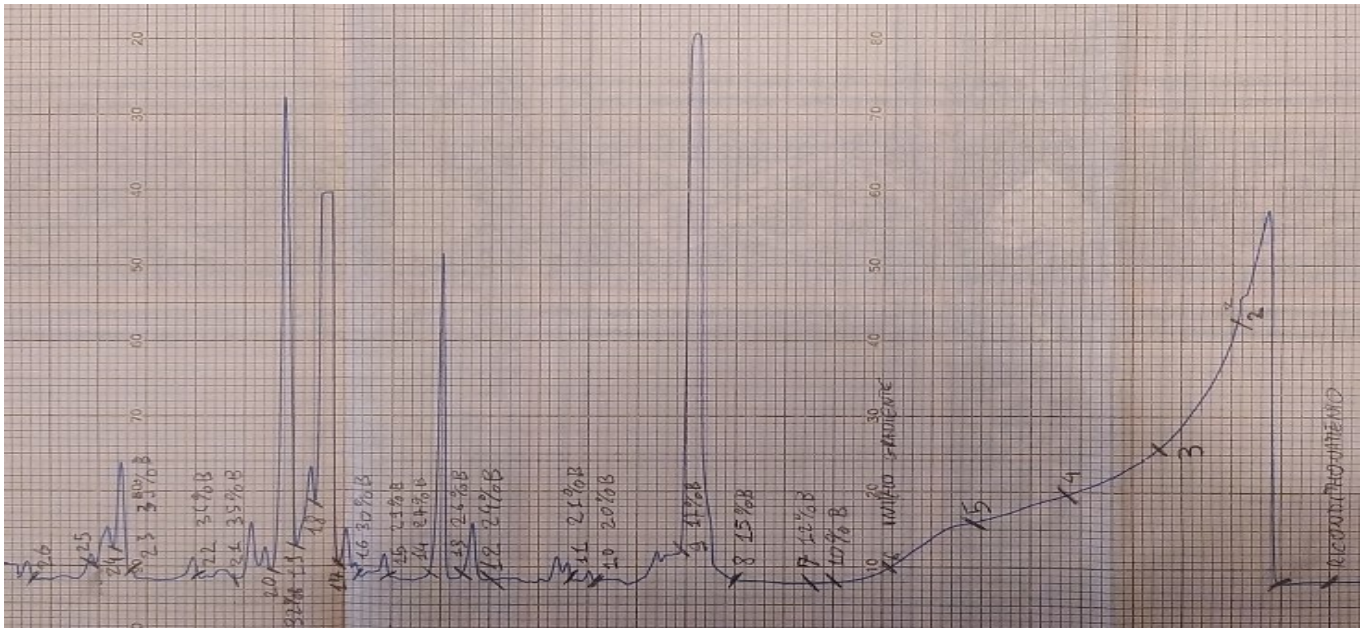

Figura 66: Cromatografia semipreparativa del peptide Ac-ATLVVQ-AMC. Colonna: Atlantis C18; flusso:4 ml/min; eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ; eluente B: 0.05% TFA in CH_3CN; Gradiente: da 10% al 45% di eluente B in 35 minuti; λ= 214 nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

3.4 Test *in vitro* sulla cinetica enzimatica della Furina

Tra le diverse proteasi, la serina proteasi Furina svolge un ruolo importante nello stato tumorale, incluso quello gastrointestinale e nella maturazione di diversi patogeni come SARS-CoV-2. Poiché quest'ultima è implicata in diverse classi di malattie, molti studi sono stati fatti per valutare la possibilità di modularne l'attività *in vivo* tramite piccole molecole. Ad oggi però non esistono inibitori di furina approvati dalla Food and Drug administration (FDA).

Lo studio del taglio di substrati è importanti ai fini di capire come i substrati vengono processati ed eventualmente identificare modulatori del taglio stesso.
Tra i vari substrati sintetizzati, particolare scopo di questa tesi è caratterizzare il taglio della desmogleina-2 ($KHPHLVRQKR_{49}$↓) che comporta l'attivazione della proteina stessa; sono pochi infatti gli studi relativi alla sua maturazione. Inoltre, i peptidi che mimano il sito di taglio di desmogleina-2 verranno utilizzati come piattaforme per testare librerie di piccole molecole in saggi enzimatici con furina. Attualmente gli *screening in vitro* si basano su Pyr-RTKR-AMC, un substrato canonico generico. Quest'ultimo contiene solo informazioni minime (posizioni P4-P1). La presenza di una sequenza più estesa è importante perché è noto che gli amminoacidi periferici (>P4) modulano l'attività enzimatica.

I risultati verranno ulteriormente confrontati con *screening* che verranno fatti in parallelo su altri substrati per Furina allo scopo di valutare se alcuni composti sono in grado di bloccare e/o aumentare preferenzialmente il *processing* di un singolo substrato.

I saggi enzimatici *in vitro* rappresentano un approccio standard per studiare la scissione di substrati specifici da parte delle proteasi. Una piccola aliquota di terreno contenente le proteasi ricombinanti sarà miscelata con quantità µmolari di peptidi disciolti in un solvente opportuno come MilliQ o DMSO. Il pH della soluzione deve essere accuratamente impostato in un *range* che va da 5,5 a 8,5. Questi valori coprono il pH ottimale (attorno alla neutralità) di lavoro della Furina Fig. 4. È sempre importante verificare la scindibilità del pH di un enzima, testando diverse opzioni di impostazione poiché le proteasi viaggiano spesso attraverso vari organelli cellulari in cui il contenuto di H^+ potrebbe non essere lo stesso. Gli esperimenti verranno eseguiti in piastre nere da 96 pozzetti (100µL per pozzetto, Fig. 67) a 37°C con misurazioni nel tempo in un range da 1 a 2 ore. La scissione del bersaglio sarà verificata al termine mediante l'aggiunta di specifici inibitori di Furina.

Figura 67: piastra nera da 96 pozzetti per la fluorescenza.

3.4.1 Caratterizzazione della Furina

Prima di iniziare ad effettuare lo studio *in vitro* del clivaggio del peptide della desmogleina-2, è stata caratterizzata la Furina: si è andati cioè a verificare che il substrato Pyr-RTKR-AMC, considerato il *gold standard* per il taglio della Furina, venisse processato rispetto ad altri substrati con delle sequenza non ideali. Conseguentemente, il Pyr-RTKR-AMC è stato utilizzato come controllo positivo. L'esperimento è stato condotto in una piastra da 96 pozzetti, in triplicato a quattro valori di pH diversi. I buffer utilizzati in questa tesi sono composti da:

- Buffer pH=5,5: 20mM di $CaCl_2$ e 250mM di sodio acetato in un volume totale di 50ml;
- Buffer pH=6,5 e pH=7: 20mM di $CaCl_2$ e HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) in un volume totale di 50ml;
- Buffer pH=8,3: 20mM di $CaCl_2$ e 250 mM Tris–HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethane) in un volume totale di 50ml;

Per aggiustare il pH dei buffer, sono state aggiunte diverse gocce di NaOH se si voleva basificare la soluzione o HCl se si voleva acidificare.

La concentrazione dei substrati utilizzati nei singoli pozzetti era di 1µM con 10µl di Furina.

Nella tabella 6, vengono riportati i valori di fluorescenza, *Relative Fluorescence Unit* (RFU), misurati a distanza di due ore e normalizzati rispetto al t_0 e al *background*.

Si può notare come in tutti i substrati venga riportato un ΔRFU molto piccolo se non addirittura negativo rispetto al substrato canonico Pyr-RTKR-AMC, dove, a pH neutro, si trovano le differenze maggiori. Quindi, abbiamo confermato che il batch di Furina prodotto era sufficientemente puro e non conteneva tracce di altri enzimi.

		ΔRFU							
		pH 5,5	Err.	pH 6,5	Err.	pH 7	Err.	pH 8,3	Err.
Peptidi	Ac-RRLQ-AMC	354	2616	-676	1529	1063	3549	-689	283
	Ac-RRPL-AMC	-483	542	134	835	1082	1126	-256	954
	Ac-RSVL-AMC	-850	1063	-607	1694	-901	1093	-424	2069
	Ac-ERSLK-AMC	-1129	452	-1337	843	-1637	2003	-419	1290
	Ac-FERSLK-AMC	-879	1690	-1257	1921	-144	998	-117	507
	Ac-VERSSLK-AMC	-1412	10630	-1796	5835	-494	1194	-471	382
	Ac-RRLL-AMC	650	1084	96	1403	-230	424	-102	1300
	Ac-SGSGRSVL-AMC	118	1461	201	1046	156	2156	-246	2936
	Ac-SLPKRRPL-AMC	-480	1923	-152	422	-38	1031	-246	2936
	Pyr-RTKR-AMC	1921	1352	8712	2045	10907	3343	7707	4500

Tabella 6: ΔRFU dei vari substrati utilizzati per caratterizzare la Furina. Questi substrati non sono ideali al taglio della Furina rispetto al Pyr-RTKR-AMC. I dati sono stati poi colorati dal blu (il valore più piccolo) al rosso (il valore più grande).

3.4.2 Digestione del peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC, Ac-PHLVRQKR-AMC e Pyr-RTKR-AMC da parte di Furina

Questo test è stato effettuato per andare a studiare la cinetica di digestione dei substrati della desmogleina-2 da parte della Furina. Si potrà poi determinare la costante di Michaelis-Menten, la Km, una grandezza caratteristica di ciascun enzima/substrato. La Km indica l'affinità tra enzima e substrato. Si otterranno quindi dei dati preliminari per poi poter effettuare lo *screening* di piccole molecole.

Il test viene effettuato in triplicato in tre piastre nere per la fluorescenza da 96 pozzetti dove in ogni pozzetto dalla riga A alla riga F vengono depositati 10µl di peptide nelle diverse concentrazioni. Successivamente vengono aggiunti 90µl di un *mastermix* composto da 10µl di buffer, 10µl di Furina e 70µl di MilliQ. Si avranno dunque quattro soluzioni di master mix a pH differenti: pH 5,5, pH 6,5, pH 7 e pH 8,3 Tab. 7.

Mastermix pH=5,5	*Mastermix* pH=6,5	*Mastermix* pH=7	*Mastermix* pH=8.3
10µl di Furina 10µl di buffer a pH=5,5 70µl di MilliQ	10µl di Furina 10µl di buffer a pH=6,5 70µl di MilliQ	10µl di Furina 10µl di buffer pH=7 70µl di MilliQ	10µl di Furina 10µl di buffer a pH=8,3 70µl di MilliQ

Tabella 7: descrizione dei mastermix preparati a diversi pH.

I peptidi della desmogleina-2 e il Pyr-RTKR-AMC sono stati preparati in modo tale da avere una concentrazione madre da 1mM. Nei pozzetti si voleva avere le seguenti concentrazioni: 2µM, 1µM, 0,75µM, 0,5µM, 0,25 µM, 0,1 µM, 0,05µM. Sono state fatte quindi le seguenti diluizioni riportate in Tabella 8. Considerando che nel pozzetto si mettono 10µl di peptide e 90µl di *mastermix,* si ha una diluizione nel pozzetto di 1:10, conseguentemente le concentrazioni riportate nella prima colonna della tabella sono tutte moltiplicate per 10.

Concentrazione nella eppendorf [µM]	Concentrazione Sol. Madre [µM]	Diluizione (C. madre : MilliQ)	Volume di C. madre [µl]	MilliQ [µl]	Volume totale [µl]
20	1000	1:50	8	392	400
10	20	1:1	250	250	500
7,5	10	3:4	75	100	175
5	10	1:1	100	100	200
2,5	10	1:4	50	200	250
1	10	1:10	20	200	220
0,5	1	1:2	50	100	150

Tabella 8: nella tabella vengono riportati le concentrazioni e le diluizioni dei peptidi.

Le piastre vengono quindi così organizzate Fig. 68:

	pH 5,5			pH 6,5			pH 7			pH 8,3		
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
B	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
C	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
D	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
E	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
F	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
G	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
H												

Figura 68: rappresentazione schematica di come è stata organizzata la piastra. In ogni riga abbiamo una concentrazione diversa di peptide in µM. il test è stato poi effettuato in triplicato per ogni concentrazione a pH diverso.

Oltre al Pyr-RTKR-AMC che è stato utilizzato come controllo positivo, in una quarta piastra sono stati organizzati i controlli negativi. Sempre in triplicato, solamente con il *mastermix* a pH 8,3 e il peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC della desmogleina-2 a concentrazione 0,1µM, sono stati aggiunti in 3 pozzetti 2µl di EDTA e in altri 3 pozzetti 2µl di cmk, due noti inibitori della Furina.

L'esperimento si svolgeva nel seguente modalità:

a) Per prima cosa si preparano i diversi *mastermix* nelle eppendorf.
b) Si depositano prima i 10µl di peptide in ogni pozzetto tramite una micropipetta prestando attenzione a non toccare le pareti per evitare il rischio di contaminazioni.
c) Si depositano quindi i 90µl di *mastermix* al giusto pH nei pozzetti.
d) Si prendono quindi diverse misurazioni: a t_0 e poi a distanza di 5 o 10 minuti per 2 ore.

3.4 *Drug screening*

Lo studio della cinetica con cui i substrati della desmogleina-2 vengono digeriti, sono serviti per poter discriminare il substrato, la concentrazione e il pH migliori, per poter effettuare il *drug screening*. È stato deciso di utilizzare il peptide più lungo Ac-KHPHLVRQKR-AMC a concentrazione 0,2µM a pH 8,3.

Il test viene effettuato in duplicato in due piastre nere per la fluorescenza da 96 pozzetti (Fig. 69 e 70). In pratica sono state organizzate due piastre identiche dove in ogni pozzetto si depositavano 10µl di inibitore, 10µl di substrato, e 80µl di *mastermix* contenente 10µl di Furina Tab. 9.

***Mastermix* pH=8.3**
10µl di Furina
10µl di buffer a pH=8,3
68µl di MilliQ

Tabella 9: composizione del mastermix per i drug screening.

L'esperimento è svolto nel seguente modo:

a) Le piastre erano già preparate con 10µl di inibitore.
b) Si aggiunge 80µl di *mastermix* in ogni pozzetto e si aspetta 5 minuti in modo tale da essere sicuri che l'inibitore entrasse nel sito attivo dell'enzima.
c) Successivamente si depositano i 10µl di substrato.
d) Si effettuavano quindi 3 misurazioni di fluorescenza: a t_0, dopo 10 minuti e in fine a 20 minuti.

Kinase

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
D	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
E	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
F	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
G	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
H	cmk	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	DMSO	cmk

Figura 69: organizzazione della piastra della libreria Kinase. Nei pozzetti è indicata la concentrazione del substrato in µM.

Prestwick

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	cmk
B		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	cmk
C		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	DMSO
D		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	DMSO
E		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	DMSO
F		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	DMSO
G		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	DMSO
H		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	DMSO

Figura 70: organizzazione della piastra della libreria Kinase. Nei pozzetti è indicata la concentrazione del substrato in µM.

CAPITOLO 4

Risultati e discussione

4.1 Test *in vitro*

4.1.1 Cinetica enzimatica di Furina sul substrato Ac-PHLVRQKR-AMC

In Figura 71 sono rappresentati i risultati dei test relativi alla cinetica di digestione del peptide da noi sintetizzato Ac-PHLVRQKR-AMC con Furina. I grafici sono distinti per pH. I valori di fluorescenza sono stati raccolti a t_0, a distanza di 5 minuti per i primi 30 minuti, poi ogni 10 minuti fino a 1h e 20minuti e le ultime due misure ogni 20 minuti per un tempo totale di 2 ore. I dati sono stati salvati in un file Excel e poi sono stati normalizzati togliendo il *background* (fluorescenza nel pozzetto vuoto).

Si può notare come il substrato a tutti i valori di pH, alle concentrazioni che vanno da 0,05µM a 0,25µM, non viene tagliato con una cinetica rilevabile nell'arco di tempo preso in considerazione. Infatti, dopo un primo periodo di *lag-time*, il livello di fluorescenza rimane costante nel tempo o almeno non mostra un aumento significativo. Con *lag-time* si intende il tempo di ritardo con cui avviene l'aumento della fluorescenza. Questo è imputabile spesso da una lenta attivazione di Furina. L'enzima, prodotto in modo ricombinante, spesso viene secreto dalle cellule ancora intero. L'attivazione richiede la rimozione della porzione N-terminale. Il processo è catalizzato da Furina stessa, quindi la Furina prodotta in modo ricombinante talvolta ha bisogno di un breve periodo di tempo per raggiunge la sua piena attività. Questo intervallo di tempo, viene definito *lag-time* e si può osservare un leggero decadimento iniziale della fluorescenza che poi aumenta.
All'aumentare della concentrazione di peptide aumenta proporzionalmente anche la quantità di AMC rilasciato. Infatti si più notare come, più le concentrazioni aumentano, più le curve tendono ad avere delle pendenze maggiori, fino a 5,5E+4 Relative Fluorescence Units (RFU), causate da un rilascio rapido di AMC nel tempo Questo si accentua particolarmente a pH neutro (pH 7) dove la Furina trova le condizioni ideali al taglio [4].

I controlli invece con EDTA in generale rimangono costanti nel tempo, dimostrando che il chelante è in grado di abbattere completamente l'incremento di fluorescenza in tutti e quattro i casi di pH, secondo le aspettative. Infatti EDTA sottrae ioni Ca++ che sono importanti per mantenere la struttura enzimaticamente attiva di Furina.

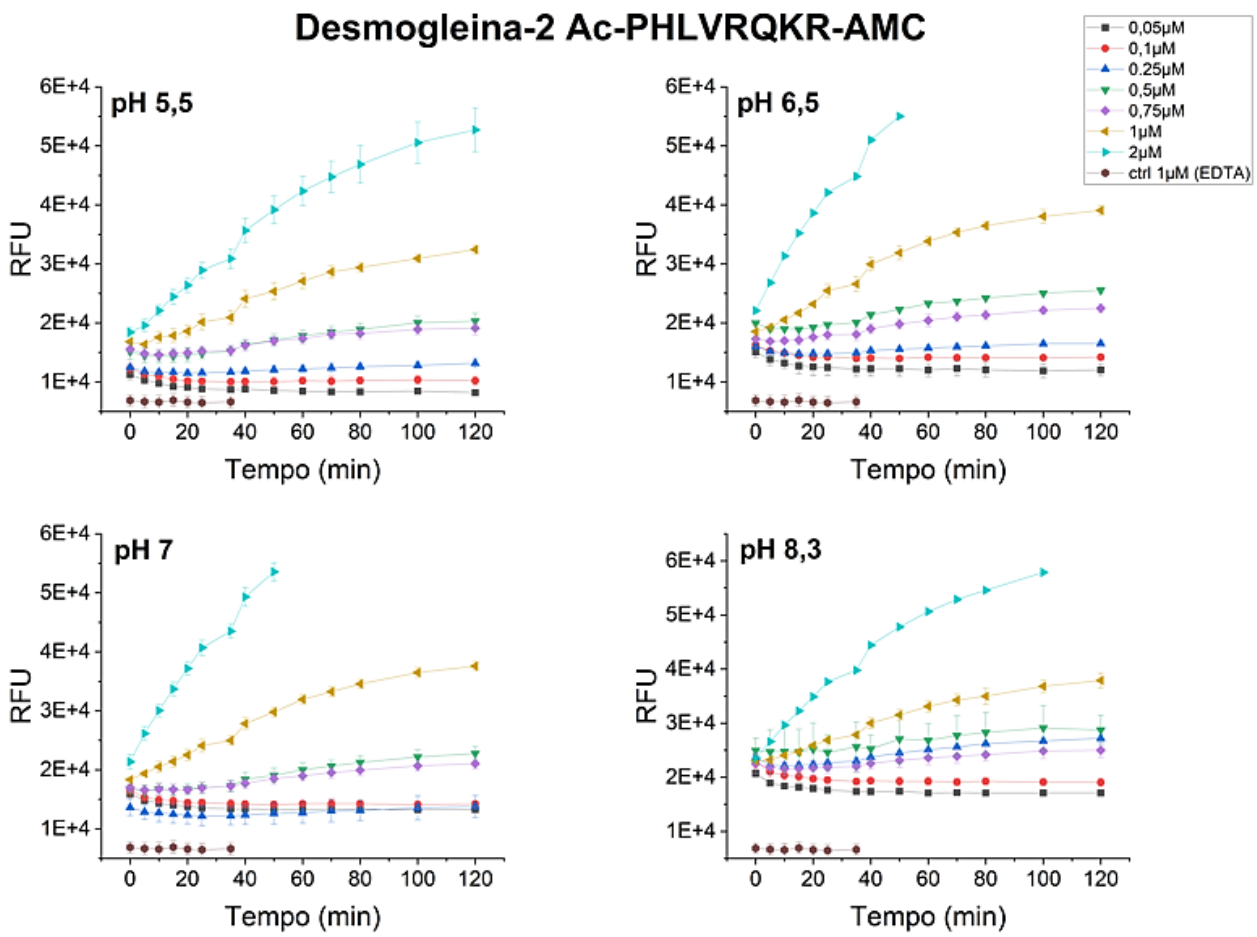

Figura 71: andamento della fluorescenza nel tempo del substrato fluorescente Ac-PHLVRQKR-AMC a pH 5,5, 6,5, 7 e 8,3.

Per valutare la solidità del test è stato calcolato lo Z-Factor, un indicatore statistico dei dati di un saggio biologico rispetto a un controllo negativo. Il controllo negativo da noi scelto è il Decanoyl-RTKR-chloromethyl ketone (cmk)in quanto è un noto inibitore di Furina. Quando Z-factor è maggiore di 0,5 il test è robusto. Il dato è molto importante al fine di valutare se il saggio può essere utilizzato per fare screening biologici. In tabella 10 vengono riportati i valori dello Z-Factor del substrato a t_{35}. Si può notare come dalla concentrazione 0,25µM in poi, i test sono molto affidabili con valori di Z ben oltre lo 0,5.

	Z-Factor			
Concentrazione substrato [µM]	**pH 5,5**	**pH 6,5**	**pH 7**	**pH8,3**
0.05	-0,88	0,33	0,58	0,77
0,1	-0,04	0,63	0,61	0,79
0,25	0,44	0,69	-0,32	0,84
0,5	0,65	0,68	0,71	0,64
0,75	0,65	0,72	0,71	0,80
1	0,77	0,84	0,85	0,88
2	0,85	0,86	0,91	0,88

Tabella 10: Z-Factor del peptide Ac-PHLVRQKR-AMC.

4.1.2 Cinetica enzimatica di Furina sul substrato Ac-KHPHLVRQKR-AMC

In Figura 72 sono rappresentati i risultati dei test di cinetica di digestione del peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC da noi sintetizzato da parte di Furina. I dati sono stati raccolti agli stessi intervalli di tempo indicati sopra e sono stati poi normalizzati togliendo il *background*.

Questo substrato ha dato ottimi risultati surclassando l'analogo più corto per quanto riguarda la propensione al taglio. Infatti, a qualsiasi condizione di pH e a qualsiasi concentrazione, il substrato veniva processato massivamente con conseguenti valori di fluorescenza molto alti. In alcuni casi addirittura, specificatamente alle concentrazioni 0,75µM, 1µM e 2µM, è stato possibile registrare solamente uno o due punti nel tempo visto che il substrato veniva riconosciuto e processato troppo velocemente. Sono stati raggiunti valori di fluorescenza molto più elevati rispetto al substrato più corto di due amminoacidi, superando i 6E+4 RFU. L'unica concentrazione che non ha dato dei risultati in linea con gli altri è stata quella a 0,05µM con dei livelli di fluorescenza che sono rimasti costanti nel tempo. Di contro, le condizioni di attività migliore è stata rilevata a pH 8,3.

I controlli contenenti l'inibitore di Furina EDTA sono rimasti costanti nel tempo in tutti e quattro i casi di pH come in precedenza.

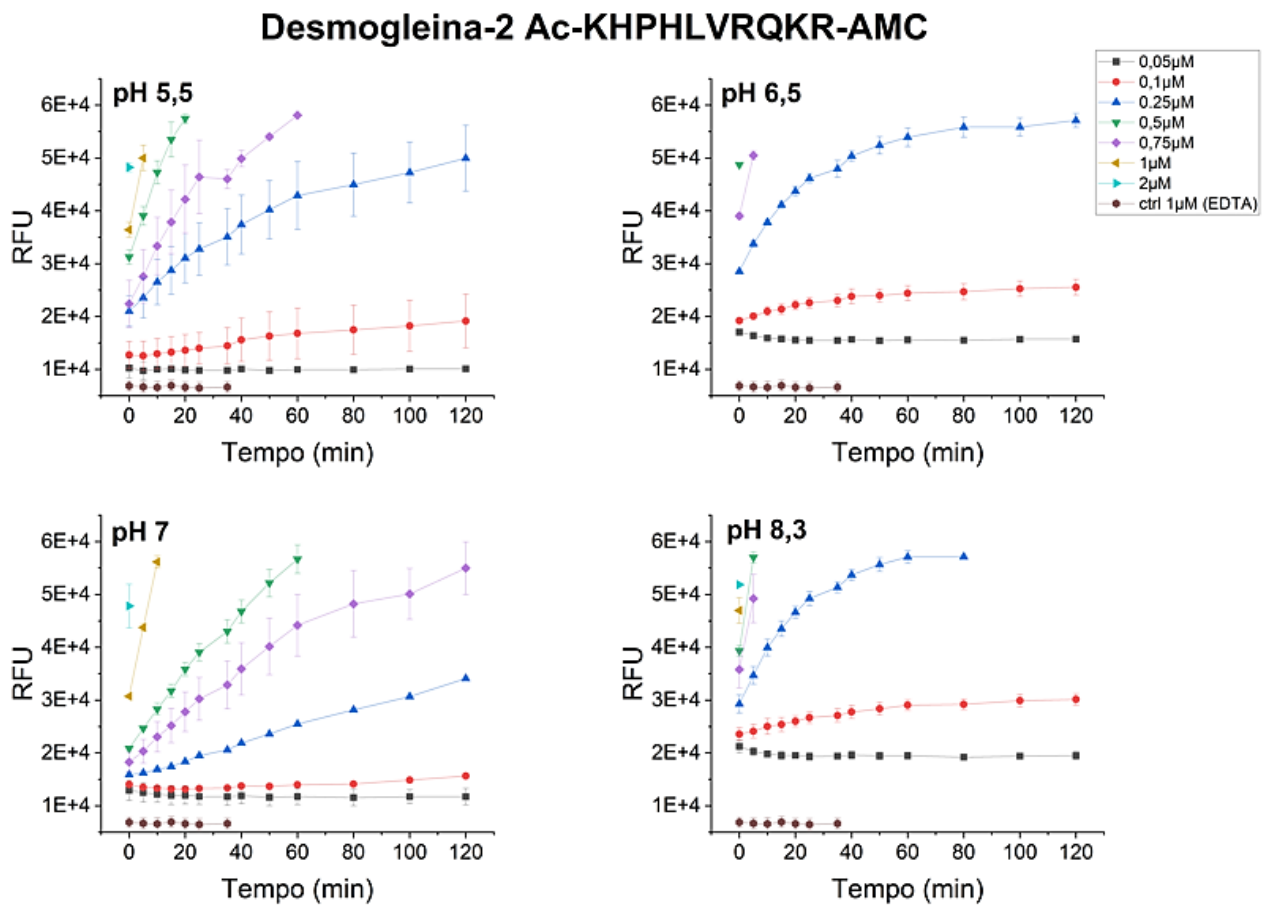

Figura 72: andamento della fluorescenza nel tempo del substrato fluorescente Ac-KHPHLVRQKR-AMC ai 4 pH (5,5, 6,5, 7 e 8,3).

Per valutare la solidità del test è stato calcolato lo Z-Factor rispetto al controllo negativo cmk. In tabella 11 vengono riportati i valori dello Z-Factor del substrato calcolato a t_{35}. Si può notare come dalla concentrazione 0,1µM in poi, i test sono molto affidabili con valori di Z ben oltre lo 0,5.

	Z-Factor			
Concentrazione [µM]	pH 5,5	pH 6,5	pH 7	pH 8,3
0.05	-0,21	0,56	-0,56	0,63
0,1	-0,70	0,59	0,41	0,67
0,25	0,33	0,81	0,76	0,86
0,5	0,89	0,91	0,73	0,88
0,75	0,93	0,96	0,79	0,61
1	0,92	NaN	0,86	0,92
2	0,96	NaN	0,87	NaN

Tabella 11: Z-Factor del peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC.

4.1.3 Cinetica enzimatica di Furina sul substrato Pyr-RTKR-AMC

In Figura 73 si possono osservare gli studi sulla cinetica del Pyr-RTKR-AMC. Questo studio è stato effettuato nello stesso modo degli studi fatti in precedenza allo scopo di utilizzare questi dati come controllo positivo, variando le quantità di substrato e di pH.

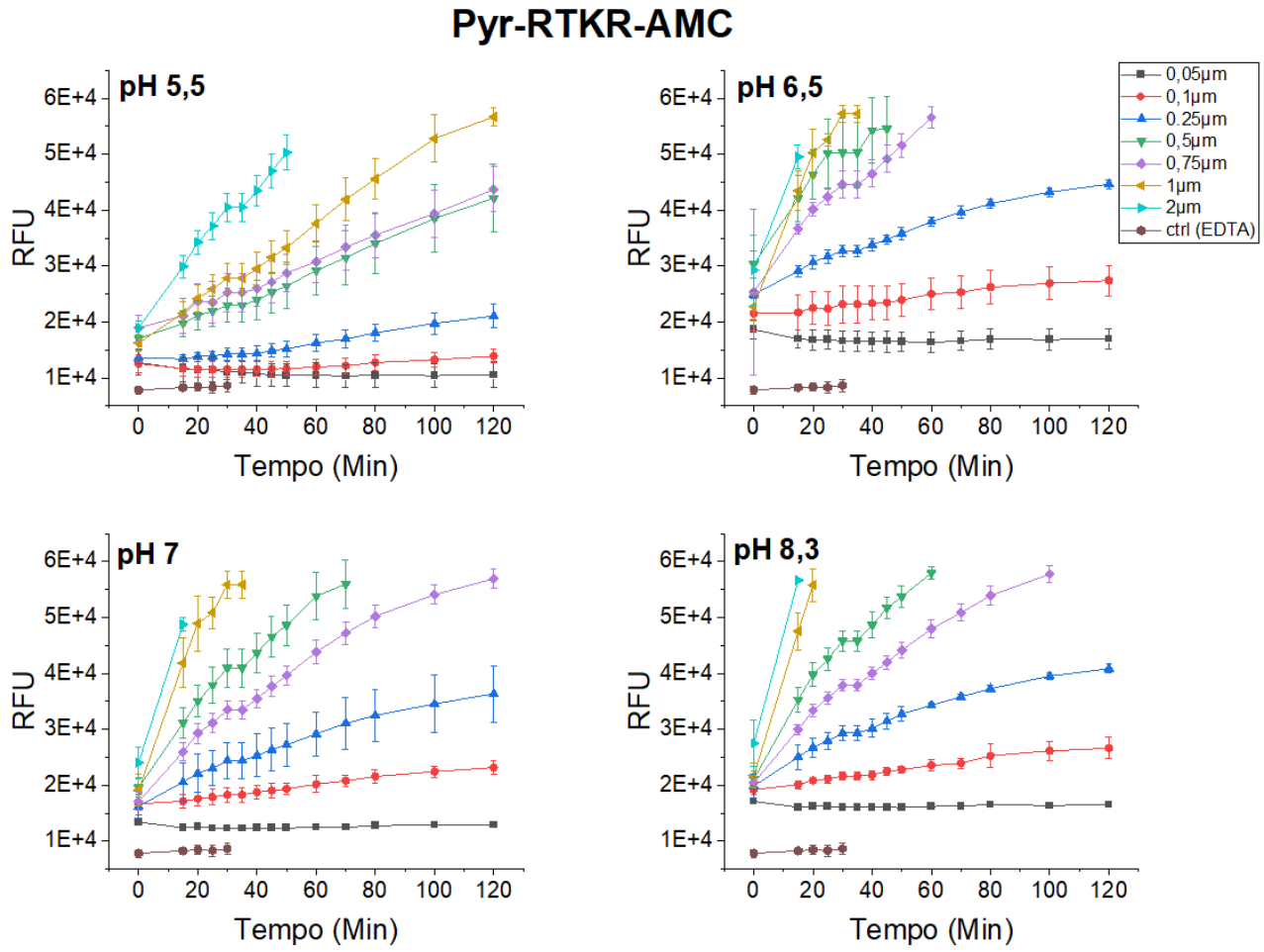

Figura 73: andamento della fluorescenza nel tempo del substrato fluorescente Pyr-RTKR-AMC ai 4 pH (5,5, 6,5, 7 e 8,3).

4.1.3 Velocità di digestione dei peptidi

Dopo aver tracciato i grafici della digestione dei peptidi nel tempo, abbiamo calcolato le pendenze delle curve ottenute alle diverse concentrazioni e ai diversi pH. La pendenza della curva nel tratto lineare esprime la velocità della medesima reazione. Questo ci ha permesso di tracciare un grafico che riporta in ordinata la velocità di reazione [RFU/min] e in ascissa la concentrazione di substrato [µM]. È stata poi calcolata la Km dei substrati ad ogni pH (Tabella 12 e 13).

La Km indica la concentrazione di substrato tale da avere una velocità di reazione pari alla metà di Vmax. Quindi, per ricavare la Km, è stato calcolato il punto medio, la pendenza e l'intercetta della parte lineare della curva. Per il calcolo del punto medio:

$$y = \frac{Vmin + Vmax}{2}$$

Si può quindi calcolare la Km:

$$Km = \frac{y - Intercetta}{pendenza}$$

	Ac-PHLVRQKR-AMC Velocità [RFU/min]							
Concentrazioni [µM]	**pH=5,5**	**Err.**	**pH=6,5**	**Err.**	**pH=7**	**Err.**	**pH=8,3**	**Err.**
0,05	-85,0	0,5	-86,7	1,1	-63,6	0,4	-64,7	0,2
0,1	-78,2	0,5	-75,4	0,3	-59,1	0,6	-80,6	0,5
0,25	15,1	0,6	30,4	0,3	16,3	2,9	19,5	0,1
0,5	71,2	0,6	79,9	1,2	71,8	0,7	72,3	1,5
0,75	58,9	0,6	65,9	0,5	49,1	0,6	43,8	0,6
1	154,6	0,6	180,9	0,4	156,5	0,3	144,1	0,4
2	455,4	0,6	762,1	1,0	734,4	0,4	562,4	0,8
Km	1,36	0,01	1,36	0,01	1,36	0,01	1,35	0,002

Tabella 12: pendenze delle curve del substrato Ac-PHLVRQKR-AMC a diversi pH con relativo calcolo della Km.

	Ac-KHPHLVRQKR-AMC Velocità [RFU/min]							
Concentrazione [µM]	**pH=5,5**	**Err.**	**pH=6,5**	**Err.**	**pH=7**	**Err.**	**pH=8,3**	**Err.**
0,05	11,2	0,7	-51,4	0,2	-35,2	1,7	-51,3	0,4
0,1	69,4	2,6	136,8	0,5	-21,2	0,3	120,4	0,6
0,25	495,6	1,9	662,0	0,2	140,7	0,2	788,6	0,4
0,5	1229,2	0,5	1355,1	0,3	739,5	0,4	3537,9	0,1
0,75	1044,4	2,1	2296,2	0,1	490,5	1,5	2685,3	0,6
1	2715,9	0,3	NaN	NaN	2637,7	1,7	NaN	NaN
2	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
Km	0,61	0,06	0,42	0,004	0,73	0,05	0,32	0,01

Tabella 12: pendenze delle curve del substrato Ac-KHPHLVRQKR-AMC a diversi pH con relativo calcolo della Km.

In figura 74 si possono notare le diverse curve ai 4 pH differenti mentre in figura 75 è stato messo a confronto l'andamento dei tre substrati a pH 8,3 a cui si sono ottenuti i risultati migliori.

Si può osservare come il peptide con la sequenza di desmogleina-2 più lunga venga tagliato con una velocità nettamente maggiore rispetto al Pyr-RTKR-AMC e all'analogo più corto Ac-PHLVRQKR-AMC. I valori di Km quantificano quanto detto. Le Km relative al substrato Ac-KHPHLVRQKR-AMC sono molto più basse rispetto a quelle del substrato Ac-PHLVRQKR-AMC. Più è piccolo il valore di Km, migliore è quel substrato per l'enzima, in questo caso Furina. Quindi, con una quantità inferiore di substrato, si raggiunge prima la velocità massima di digestione del peptide.

La Km media del substrato Ac-KHPHLVRQKR-AMC si attesta a 0,52µM rispetto al 1,36µM del substrato Ac-PHLVRQKR-AMC.

I dati raccolti in questa prima fase di sperimentazione servivano preliminarmente per individuare il substrato, il pH e la concentrazione ideale per effettuare lo *screening* di piccole molecole. Il candidato migliore è risultato essere Ac-KHPHLVRQKR-AMC, a pH basico 8,3 e alla concentrazione 0,2µM; in quanto la sua Km (0,32µM) è quella più piccola rispetto a tutti gli altri.

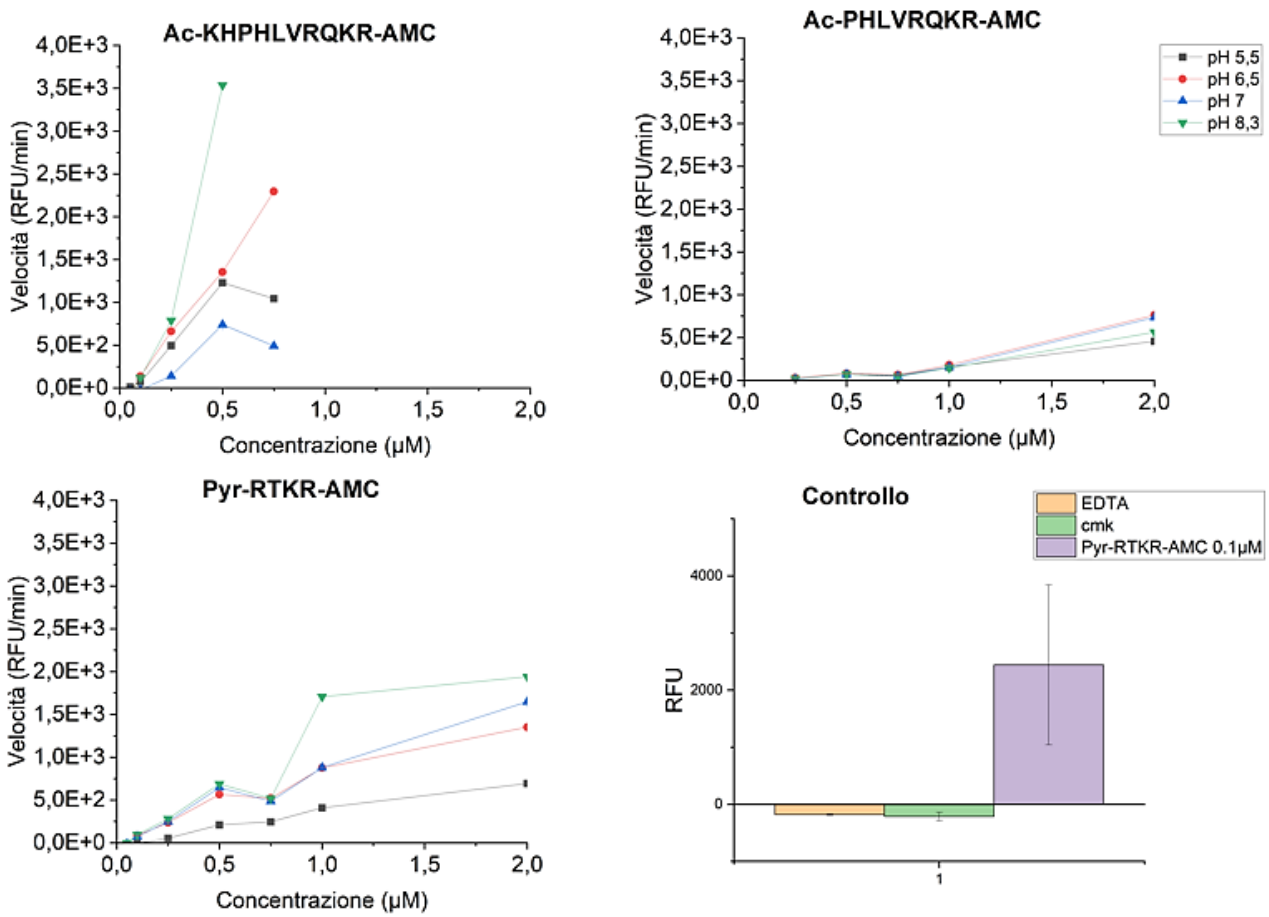

Figura 74: andamento della velocità del taglio dei substrati Ac-KHPHLVRQKR-AMC, Ac-PHLVRQKR-AMC e Pyr-RTKR-AMC ai 4 pH dei substrati.

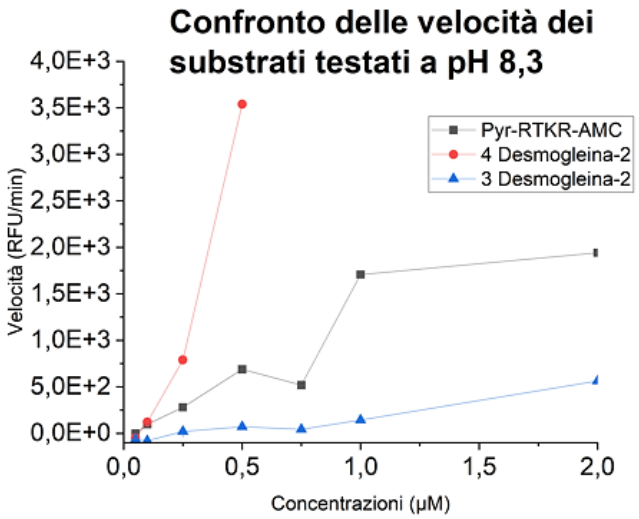

Figura 75: confronto dell'andamento del taglio dei substrati a pH 8,3.

4.3 *Screening* di piccoli composti

Per *lo screening* di piccoli composti è stato utilizzato il peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC a pH basico 8,3 alla concentrazione 0,2µM. È stato scelto il pH basico perché è quello in cui è stata ottenuta una migliore efficienza di taglio da parte della Furina. La concentrazione 0,2µM invece è stata scelta in quanto a pH basico era la concentrazione che ci permetteva di osservare meglio la crescita di fluorescenza. Le concentrazioni maggiori infatti, dopo soli 5 minuti, andavano oltre il limite di misurazione dello strumento.
Le misure sono state prese, per entrambe le librerie, a t_0, a 10 minuti e a 20 minuti. A differenza degli studi precedenti, dove i valori sono stati rilevati in un intervallo di due ore, per i *drug screening*, è stato deciso di rilevare le misure in un intervallo di tempo inferiore. Questo perché i protocolli relativi a *drug screening* sono testati per di testare più molecole possibili nel minor tempo possibile. Questo intervallo di tempo ci permetteva comunque di identificare alcuni possibili inibitori.

Come controlli avevamo 5 pozzetti con 2µl di dimetilsolfossido (DMSO) e 2 pozzetti con 2µl di cmk alla concentrazione di 500µM.
Il DMSO è un solvente organico appartenente alla categoria dei solfossidi. Può essere utilizzato nel campo della biologia per sciogliere composti idrofobici. Nel nostro caso, tutti i composti delle librerie usate, sono stati sciolti in 2µl di DMSO. Il DMSO però, ad alte concentrazioni, può risultare tossico. Come controllo, in alcuni pozzetti sono stati deposti 2µl di DMSO senza inibitore.

I dati sono stati normalizzati sottraendo il valore a t_0. Successivamente è stata effettuata una seconda normalizzazione. Arbitrariamente è stato scelto un pozzetto di DMSO ed è stato considerato il nostro 100% di attività del enzima. Di conseguenza, tutti i dati che sono stati normalizzati la prima volta, sono stati divisi per il valore del pozzetto di DMSO scelto. In questo modo è stata calcolata l'attività residua percentuale [%] di ogni inibitore.
Nelle condizioni testate, nessuno dei composti studiati si è rivelato un inibitore di Furina. È da notare però che abbiamo avuto *readout* di fluorescenza molto variabili all'interno della stessa piastra. Questo è probabilmente imputabile alla concentrazione di substrato utilizzata in relazione all'intervallo di tempo della reazione. È auspicabile quindi che i prossimi esperimenti vengano effettuati tenendo conto della possibilità di variare questi parametri.

4.3.1 *Drug screening: Kinase library*

In figura 76, si può osservare l'attività residua percentuale dei composti della libreria chinasi utilizzata.

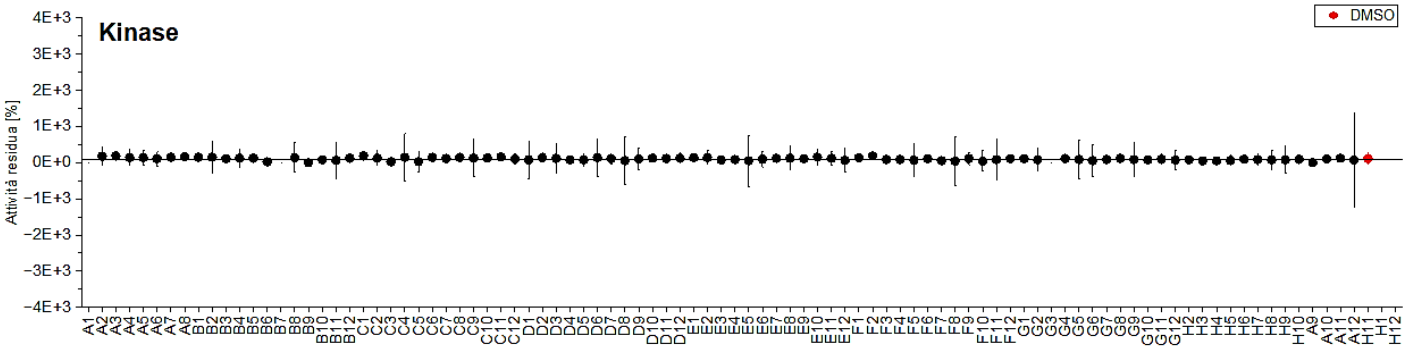

Figura 76: Drug screening della libreria Kinase. In ordinata abbiamo l'attività residua [%] mentre in ascissa le coordinate dei pozzetti.

Nelle condizioni testate, nessuno dei composti studiati si è rivelato un inibitore di Furina. Infatti, nessuna molecola è riuscita a diminuire l'attività di Furina di 50%.

4.3.2 *Drug screening: Prestwick library*

In figura 77 e 78, si può osservare l'attività residua percentuale dei composti della libreria Prestwick utilizzata.

Nelle condizioni testate, nessuno dei composti studiati si è rivelato un inibitore di Furina.

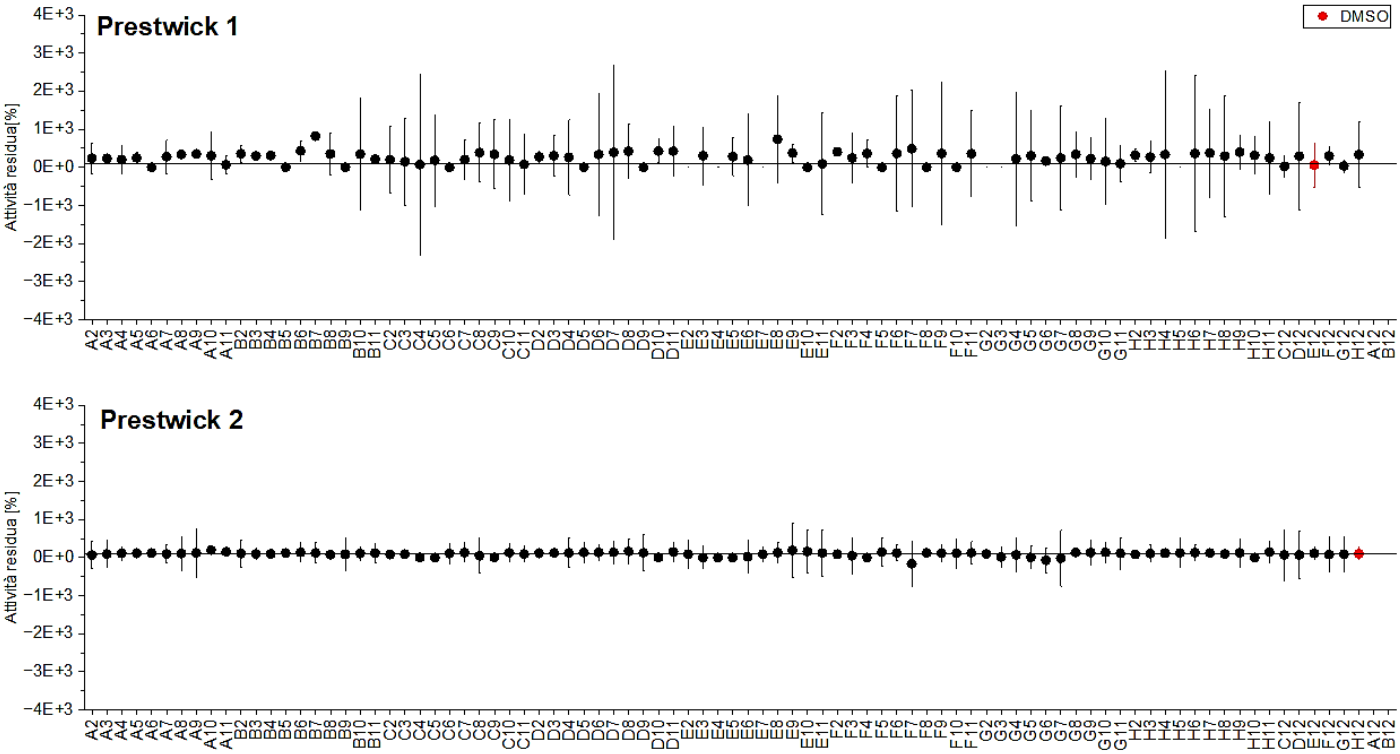

Figura 77: Drug screening delle prime due piastre della libreria Prestwick. In ordinata abbiamo l'attività residua [%] mentre in ascissa le coordinate dei pozzetti.

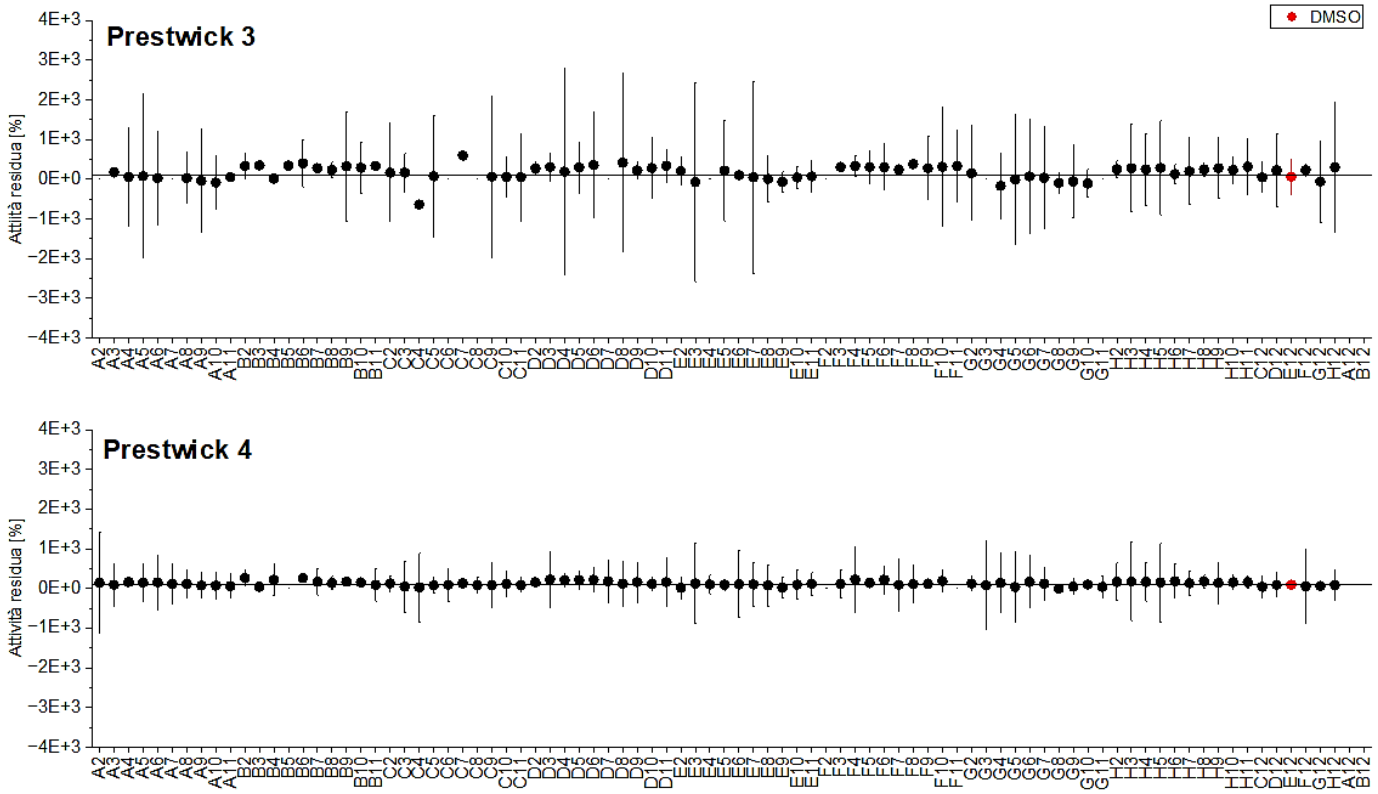

Figura 78: Drug screening delle piastre 3 e 4 della libreria Prestwick. In ordinata l'attività residua [%]. L'attività enzimatica di Furina in DMSO è stata arbitrariamente settata a 100%. In ascissa le coordinate dei pozzetti.

4.4 Plastica utilizzata

La consapevolezza dell'utilizzo delle plastiche è un punto cardine della sostenibilità. Anche l'ambiente di ricerca deve guardare alle plastiche non solo fornendo nuovi mezzi per offrire nuove soluzioni alternative. Per fare ricerca sono necessarie molti consumabili usa e getta in plastica. Qui vogliamo quantificarne l'utilizzo. Quindi, in questo lavoro di tesi è stato fatto un report sulla plastica utilizzata per effettuare i vari esperimenti (tabella 14). Inoltre, spinti da questo impegno, abbiamo cercato di minimizzare l'impiego di oggetti di plastica, lì dove è stato possibile. Ad esempio, sono state lavate tutte le piastre nere da 96 pozzetti utilizzate per i test *in vitro* e riciclate per coprire tutti i saggi enzimatici. Inoltre, abbiamo optato per contenitori in vetro per la raccolta delle frazioni di purificazione dei peptidi sintetizzati. Da questo punto di vista, il vetro rappresenta un ottimo sostituto alla plastica.

Nome	Quantità	Peso [g]	Peso totale [g]
Siringhe 1ml	20	2,7	54
Siringhe 3ml	25	3,5	87,5
Siringhe 25ml	10	10	100
Filtri PVDF 0.45um piccoli	20	0,7	14
Filtri PVDF 0.45um	20	2,7	54
Falcon 15ml	36	6,3	226,8
Falcon 50mL	26	14	364
Pasteur	100	1,2	120
Puntali	200	0,3	60
Eppendorf 1ml	65	0,5	32,5
Eppendorf 1.5ml	90	1	90
Reattori	14	4	56
Totale			**1258,8**

Tabella 14: report sulla plastica.

CAPITOLO 5

Conclusione

Il lavoro sperimentale riportato in questa tesi ha permesso di formulare le seguenti conclusioni.

I test *in vitro* sullo studio della cinetica dei peptidi da noi sintetizzati ha dato esito positivo. Entrambi i peptidi testati vengono processati dalla Furina in qualsiasi condizione di pH. In particolare, le Km del peptide Ac-PHLVRQKR-AMC si attestano mediamente sul 1,36µM mentre le Km del peptide Ac-KHPHLVRQKR-AMC hanno un valore medio di 0,52µM. Questo dimostra come il peptide più lungo venga meglio riconosciuto dall'enzima da noi studiato e quindi digerito più velocemente.
Questo comportamento lo si può attribuire proprio alle diverse lunghezze dei substrati. In linea con quanto riportato in letteratura, un peptide più lungo, viene meglio riconosciuto dalla Furina rispetto a una sequenza più corta, in quanto il match tra il sito catalitico dell'enzima e gli amminoacidi del substrato è ottimale. Infatti, la sequenza di riconoscimento Arg-X-(Arg/Lys)-Arg'↓ è la sequenza minima alla quale avviene il taglio della Furina mentre la regione catalitica dell'enzima può accomodare sequenze più estese. Ne consegue che un substrato più lungo viene processato meglio e più velocemente.
Il substrato che si comporta meglio in assoluto è Ac-KHPHLVRQKR-AMC a pH basico 8,3, con una Km di 0,36µM, 4 volte più piccola rispetto al peptide analogo più corto. Questo substrato a pH basico e alla concentrazione di 0,2µM, è stato infatti scelto per effettuare i *drug screening*.
Un altro dato importante da sottolineare è che siamo stati i primi a dimostrare che peptidi derivanti dalla Desmogleina-2 contenenti la sequenza KHPHLVRQKR sono substrati della Furina. La dipendenza del taglio da questo enzima finora era stato solo ipotizzata. Questa scoperta potrebbe essere la chiave per comprendere meglio le malattie infiammatorie gastrointestinali. Negli stati infiammatori, gli enzimi, tra cui Furina, vengono *over-espressi*. Questo potrebbe innescare un processo di taglio anomalo della Desmogleina-2, causando a sua volta anomalie dell'epitelio dell'intestino tipica delle malattie IBD.

Per quanto riguarda lo *screening* di piccoli composti, non è stata identificata nessuna molecola che possa essere utilizzata per inibire la Furina. Tuttavia, non è un risultato del tutto inaspettato visto che la possibilità di individuare un possibile inibitore è generalmente pari a 0,2%. Sarà quindi necessario procedere con l'analisi di ulteriori librerie contenenti un numero maggiori di composti. È importante però sottolineare che nelle condizioni utilizzate, abbiamo riscontrato valori bassi di fluorescenza che danno adito ad un incidenza maggiore di errore. Per ovviare a questo problema, è auspicabile modificare il protocollo.

Da notare, infine che l'efficienza del test messo qui a punto surclassa di gran lunga quello standard che prevede l'utilizzo del substrato Pyr-RTKR-AMC. Poiché appunto il numero di analisi è generalmente molto grande in uno screening, ne deriva una abbattimento dei costi notevoli.

Un'altra possibile strada che potrebbe essere intrapresa e sviluppata è quella dello studio e sviluppo di idrogel bioriassorbibili. Si potrebbero sviluppare degli idrogel funzionalizzati appunto con tali sequenze di taglio della Desmogleina-2 di diverse lunghezze. Una volta impiantati verrebbero attaccati dalla Furina che taglia le sequenza di riconoscimento e, in questo modo, l'idrogel verrebbe riassorbito dall'organismo. Giocando poi con le diverse lunghezze del peptide della desmogleina-2 si potrebbero avere tempi di riassorbimento più o meno lungi.

Un possibile prospetto futuro potrebbe essere quello di utilizzare degli organoidi che simulino il tratto gastrointestinale. Questi organoidi potrebbero essere colonizzati con cellule prelevate tramite biopsia da pazienti malati, allo scopo di andare a individuare quali enzimi intervengono nelle malattie IBD, quali di questi vengono *over-espressi* e quali proteine vengo processate.
Questo ci potrebbe dare un quadro più completo dello stato patologico delle malattie gastrointestinali potendo poi intervenire in maniera più mirata.

Bibliografia

[1] L. E. Edgington-Mitchell, «Pathophysiological roles of proteases in gastrointestinal disease», *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 310, fasc. 4, pp. G234–G239, feb. 2016, doi: 10.1152/ajpgi.00393.2015.

[2] J. S. Bond, «Proteases: History, discovery, and roles in health and disease», *J. Biol. Chem.*, vol. 294, fasc. 5, pp. 1643–1651, feb. 2019, doi: 10.1074/jbc.TM118.004156.

[3] X. S. Puente, L. M. Sánchez, C. M. Overall, e C. López-Otín, «Human and mouse proteases: a comparative genomic approach», *Nat. Rev. Genet.*, vol. 4, fasc. 7, pp. 544–558, lug. 2003, doi: 10.1038/nrg1111.

[4] S. S. Molloy, P. A. Bresnahan, S. H. Leppla, K. R. Klimpel, e G. Thomas, «Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen», *J. Biol. Chem.*, vol. 267, fasc. 23, pp. 16396–16402, ago. 1992.

[5] K. Biedermann *et al.*, «Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer», *J. Pathol.*, vol. 207, fasc. 2, pp. 199–206, ott. 2005, doi: 10.1002/path.1821.

[6] N. Schlegel, M. Meir, W.-M. Heupel, B. Holthöfer, R. E. Leube, e J. Waschke, «Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity», *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 298, fasc. 5, pp. G774–G783, mag. 2010, doi: 10.1152/ajpgi.00239.2009.

[7] V. Spindler *et al.*, «Loss of Desmoglein 2 Contributes to the Pathogenesis of Crohn's Disease»:, *Inflamm. Bowel Dis.*, p. 1, giu. 2015, doi: 10.1097/MIB.0000000000000486.

[8] M. M. Awad *et al.*, «DSG2 Mutations Contribute to Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy», *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 79, fasc. 1, pp. 136–142, lug. 2006, doi: 10.1086/504393.

[9] M. Yokouchi *et al.*, «Pathogenic Epitopes of Autoantibodies in Pemphigus Reside in the Amino-Terminal Adhesive Region of Desmogleins Which Are Unmasked by Proteolytic Processing of Prosequence», *J. Invest. Dermatol.*, vol. 129, fasc. 9, pp. 2156–2166, set. 2009, doi: 10.1038/jid.2009.61.

[10] C.-P. Han *et al.*, «Desmoglein-2 overexpression predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients», *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 22, fasc. 17, pp. 5481–5489, set. 2018, doi: 10.26355/eurrev_201809_15808.

[11] F. P. Guengerich, «Mechanisms of Enzyme Catalysis and Inhibition», in *Comprehensive Toxicology*, Elsevier, 2010, pp. 31–39. doi: 10.1016/B978-0-08-046884-6.00403-6.

[12] G. L. Kedderis, «Biotransformation of Toxicants», in *Comprehensive Toxicology*, Elsevier, 2010, pp. 137–151. doi: 10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X.

[13] D. Cheng, P. J. Espenshade, C. A. Slaughter, J. C. Jaen, M. S. Brown, e J. L. Goldstein, «Secreted site-1 protease cleaves peptides corresponding to luminal loop of sterol regulatory element-binding proteins», *J. Biol. Chem.*, vol. 274, fasc. 32, pp. 22805–22812, ago. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.32.22805.

[14] D. M. M. Jaradat, «Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation», *Amino Acids*, vol. 50, fasc. 1, pp. 39–68, gen. 2018, doi: 10.1007/s00726-017-2516-0.

[15] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, e G. Subra, «Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis», *Mol. Biotechnol.*, vol. 33, fasc. 3, pp. 239–254, 2006, doi: 10.1385/MB:33:3:239.

[16] P. T. Shelton e K. J. Jensen, «Linkers, Resins, and General Procedures for Solid-Phase Peptide Synthesis», in *Peptide Synthesis and Applications*, vol. 1047, K. J. Jensen, P. Tofteng Shelton, e S. L. Pedersen, A c. di Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 23–41. doi: 10.1007/978-1-62703-544-6_2.

[17] C. S. Ho *et al.*, «Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications», *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 24, fasc. 1, pp. 3–12, 2003.

[18] M. K. Singh e A. Singh, «Nuclear magnetic resonance spectroscopy», in *Characterization of Polymers and Fibres*, Elsevier, 2022, pp. 321–339. doi: 10.1016/B978-0-12-823986-5.00011-7.

[19] «httpswww.pianetachimica.itNMRproblemiSpettroscopia_NMR.pdf».

[20] J.-H. Zhang, T. D. Y. Chung, e K. R. Oldenburg, «A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays», *SLAS Discov.*, vol. 4, fasc. 2, pp. 67–73, apr. 1999, doi: 10.1177/108705719900400206.

[21] A. M. Weeks, J. R. Byrnes, I. Lui, e J. A. Wells, «Mapping proteolytic neo-N termini at the surface of living cells», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 118, fasc. 8, p. e2018809118, feb. 2021, doi: 10.1073/pnas.2018809118.

Ringraziamenti

Il primo ringraziamento lo rivolgo alla prof.ssa Monica Dettin per la sua disponibilità, professionalità, competenza e per avermi dato la possibilità di entrare a lavorare nel suo laboratorio di Bioingegneria chimica.
Ringrazio la ricercatrice Antonella Pasquato per avermi dato la possibilità di partecipare al suo innovativo progetto e la professoressa Laura Cendron per avermi accolto nel suo laboratorio a biologia.
Ringrazio inoltre la dott.ssa Annj Zamuner e la dott.ssa Elena Zeni per avermi seguito e guidato nella parte sperimentale di questo percorso di tesi e per la pazienza.
Ringrazio i miei genitori, mio fratello e tutta la mia famiglia per avermi sempre sostenuto nei momenti difficili e avermi permesso di affrontare questo difficile percorso di studi. Senza di loro non sarei mai potuto arrivare fino a qui.
Ringrazio tutti i miei amici, che mi hanno sostenuto in questi cinque anni di università e tutti i miei compagni di università e di laboratorio.
Infine ringrazio la mia ragazza Elisa che è stata di fondamentale supporto e stimolo per raggiungere questo importante traguardo.