

800 1222·2022
ANNI



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

Sintesi e caratterizzazione di peptidi coiled-coil contenenti l'amminoacido TOAC

Relatore: Prof. Mattarei Andrea

Co-relatore: Prof. Ruzza Paolo

Controrelatore: Prof. Quintieri Luigi

LAUREANDO: Lorenzoni Nicola

ANNO ACCADEMICO: 2021-2022

Sommario

ABBREVIAZIONI.....	I
RIASSUNTO	III
1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Interazioni proteina-proteina (PPI).....	1
1.2 Coiled-coil	2
1.3 Ipotesi Peptide Velcro (PV)	7
1.3.1 Natura dei residui in posizione “a” e “d”	8
1.3.2 Natura dei residui “g” ed “e”	8
1.4 Altri tipi di impaccamenti.....	9
1.4.1 Impaccamento complementare x-da	9
1.4.2 Impaccamento di tipo Ala-coil.....	10
1.5 Stutter e Stammer nelle sequenze heptad.....	12
1.6 Sequenze di innesco	12
1.7 Numero e orientamento delle eliche.....	13
1.8 Coiled-coil E e K: omodimeri ed eterodimeri e dipendenza dal pH.....	14
1.9 Proteine SNARE.....	15
1.10 Amminoacido TOAC.....	18
2. SCOPO DELLA TESI	21
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	23
3.1 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)	23
3.2 Protezione della funzione α -amminica.....	26
3.3 Attivazione della funzione carbossilica.....	28
3.4 Amminoacido TOAC.....	31
3.5 Sintesi del peptide K-T ⁴	32
3.6 Sintesi del peptide K-T ^{4,18}	34
3.7 Sintesi del peptide K-Y ¹⁸	35
3.8 Risonanza paramagnetica elettronica (EPR).....	37
3.9 Dicroismo circolare (CD)	39
4. CONCLUSIONI	55
5. MATERIALI E METODI	57
5.1 Reagenti e solventi.....	57
5.2 Sintesi peptidica su fase solida	57
5.3 Acetilazione del gruppo N-terminale.....	58
5.3 Sblocco dei peptidi dalla resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale ...	58
5.4 Purificazione e caratterizzazione dei prodotti.....	59
5.5 Sintesi del peptide K-T ⁴	59
5.6 Sintesi del peptide K-T ¹⁸	60

5.8 Sintesi del peptide K-Y ¹⁸	61
5.9 Dicroismo Circolare ed EPR.....	61
6. BIBLIOGRAFIA.....	63

ABBREVIAZIONI

- TOAC = 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid;
- Y = Tyr = Tyrosine;
- L = Leu = Leucine;
- I = Ile = Isoleucine;
- K = Lys = Lysine;
- A = Ala = Alanine;
- E = Glu = Glutamic Acid;
- Ac = Acetyl;
- (Ac)₂O = Acetic anhydride;
- CH₂Cl₂ = Dichloromethane;
- CH₃CN = Acetonitrile;
- Fmoc = 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride;
- DMF = N, N-Dimethylformamide;
- DIPEA = N, N-Diisopropylethylamine;
- TIS = Triisopropylsilane;
- TFA = Trifluoroacetic acid;
- TFE = 2, 2, 2-Trifluoroethanol;
- HBTU = N, N, N', N'-Tetramethyl(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate;
- HOBT = N-Hydroxybenzotriazole;
- HATU = 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate;
- HPLC = High performed liquid chromatography;
- ESI-MS = Electrospray ionization mass spectroscopy;
- CD = Circular Dichroism;
- UV = Ultraviolet;
- EPR = Electron paramagnetic resonance.
- SUVs = small unilamellar vesicles
- DMPC=1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
- DMPG=1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol sodium salt

N.B: nel testo gli amminoacidi chirali sono in configurazione L (S) quando non diversamente indicato.

Il lavoro di questa tesi si inserisce all'interno di un progetto di ricerca inerente la sintesi di peptidi modello del complesso proteico SNARE coinvolto nei processi di trasporto vescicolare con la funzione di mediare l'aggancio della vescicola con la membrana bersaglio.

L'interazione tra la componente proteica presente sulla vescicola e quella presente sulla membrana cellulare avviene tramite la formazione di strutture coiled-coil rendendo le sequenze coinvolte ottimi modelli per lo studio di queste interazioni.

L'introduzione nella sequenza peptidica di un residuo amminoacidico contenente un gruppo radicalico in catena laterale, il TOAC, permette di utilizzare la spettroscopia EPR nello studio di queste interazioni. La presenza di una sonda radicalica e la sua conservazione lungo il processo di sintesi e la successiva purificazione ha presentato non pochi problemi riducendo notevolmente le rese di sintesi.

Oltre ai peptidi contenenti uno o due residui di TOAC è stato sintetizzato anche il peptide K-Y¹⁸ che presenta un residuo di Tyr in posizione 18 che verrà utilizzato in successivi studi di fluorescenza. La struttura secondaria dei peptidi sintetizzati è stata studiata mediante misure di dicroismo circolare in ambiente acquoso e membrano mimetico.

1. INTRODUZIONE

Nel corpo umano le proteine hanno diverse funzioni tra cui, ad esempio, possono favorire reazioni metaboliche oppure fungere da trasmettitori ormonali. Questa loro caratteristica viene acquisita in seguito alla complessa struttura che esse possono assumere. La struttura delle proteine può essere quindi suddivisa in diversi livelli [1]:

- Struttura primaria: è la sequenza dei diversi amminoacidi da cui la proteina è composta;
- Struttura secondaria: riguarda particolari organizzazioni di brevi sequenze amminoacidiche. Questi brevi tratti originano strutture che si ripetono (strutture α -elica o foglietto β) in diversi tratti della molecola;
- Struttura terziaria: delinea gli aspetti tridimensionali di una proteina;
- Struttura quaternaria: avviene quando la proteina è costituita da due o più sub-unità polipeptidiche.

1.1 Interazioni proteina-proteina (PPI)

Per svolgere la propria funzione, le proteine hanno la necessità di interagire con altre molecole oppure, molto spesso, con altre proteine.

Per comprendere a pieno le modalità con cui si svolge un qualsiasi processo cellulare è quindi fondamentale conoscere quali proteine siano coinvolte e come esse interagiscano tra di loro.

E' evidente quindi che lo studio di tali interazioni ricopra un ruolo fondamentale sia in un ambito di ricerca che nello sviluppo di farmaci.

Ogni proteina che eserciti un qualsiasi tipo di azione, effetto o influenza su un'altra proteina interagisce con essa; ma il termine interazione proteina-proteina (PPI) indica un'azione più specifica:

- infatti deve comportare un contatto fisico diretto in una posizione e/o in un orientamento specifici (docking molecolare) per la creazione di un complesso proteico permanente o transitorio;

- deve essere non casuale, escludendo perciò tutte le proteine che possono venire in contatto in maniera casuale;
- non deve essere generica cioè l'interazione deve avere uno scopo specifico differente dalle funzioni generiche come la produzione o degradazione delle proteine.

Le interazioni proteina-proteina sono quindi classificate in vari modi:

- in base all'affinità: sono distinte in obbligate, nel caso in cui una o più proteine siano instabili in vivo a meno che non interagiscano e formino un complesso proteico stabile; interazioni non obbligate, nel caso le proteine possano esistere indipendentemente
- a loro volta le interazioni non obbligate sono distinte in base alla stabilità del complesso che formano in permanenti o transitorie (le interazioni transitorie possono essere divise in deboli e forti)

1.2 Coiled-coil

Una interazione molto frequente nelle proteine è il coiled-coil che è così chiamata perché si tratta di proteine che si presentano con una struttura composta da 2 a 5 α -eliche anfipatiche, parallele o antiparallele (figura 1), che si intersecano fra di loro (figura 2). Questo particolare tipo di struttura è identificabile da un repeat di amminoacidi che può essere formato da 7 (heptad repeat) oppure da 11 (undecad repeat) residui [2].

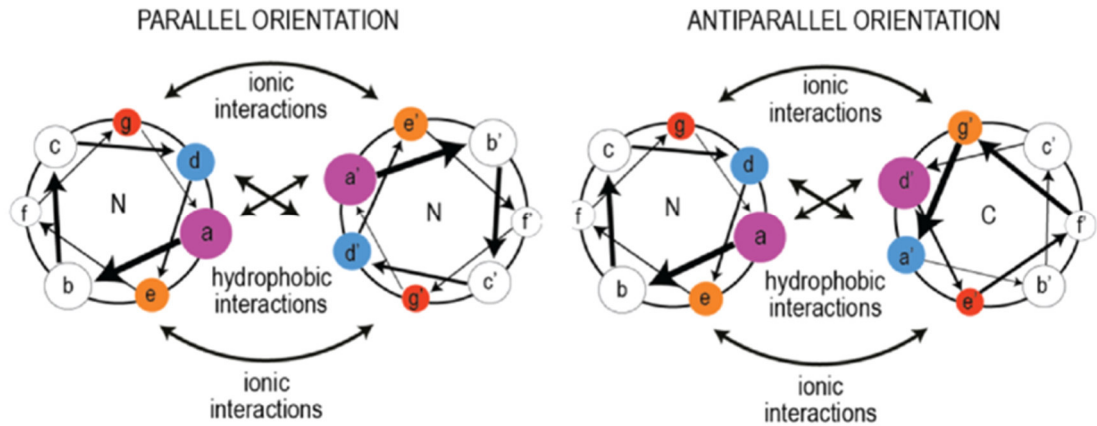


Figura 1 - Schema di coiled-coil paralleli (sinistra) e antiparalleli (destra) [3].

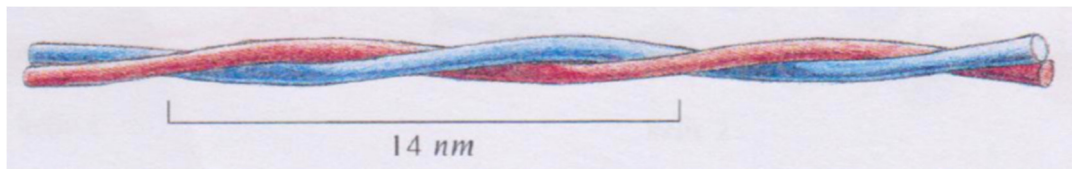


Figura 2 - Struttura coiled-coil costituita da due α -eliche che si intrecciano l'una con l'altra avvolgendosi

Si è giunti alla comprensione di tali sistemi attraverso lo studio degli spettri di diffrazione a raggi X di varie fibre naturali quali la lana o la seta [4]. Astbury individuò che gli spettri di diffrazione ottenuti da tali strutture proteiche si restringevano ad un limitato numero di forme spettrali identificate in questo modo:

- α , esemplificata dalla lana
- β , esemplificata dalla seta
- una terza forma corrispondente al tendine

Durante i suoi esperimenti Astbury osservò che la forma α poteva essere trasformata in altre due forme in base al trattamento al quale veniva sottoposta: nella fattispecie, applicando uno stiramento si otteneva la forma β , mentre attraverso una denaturazione termica si otteneva la forma cross- β (figura 3).

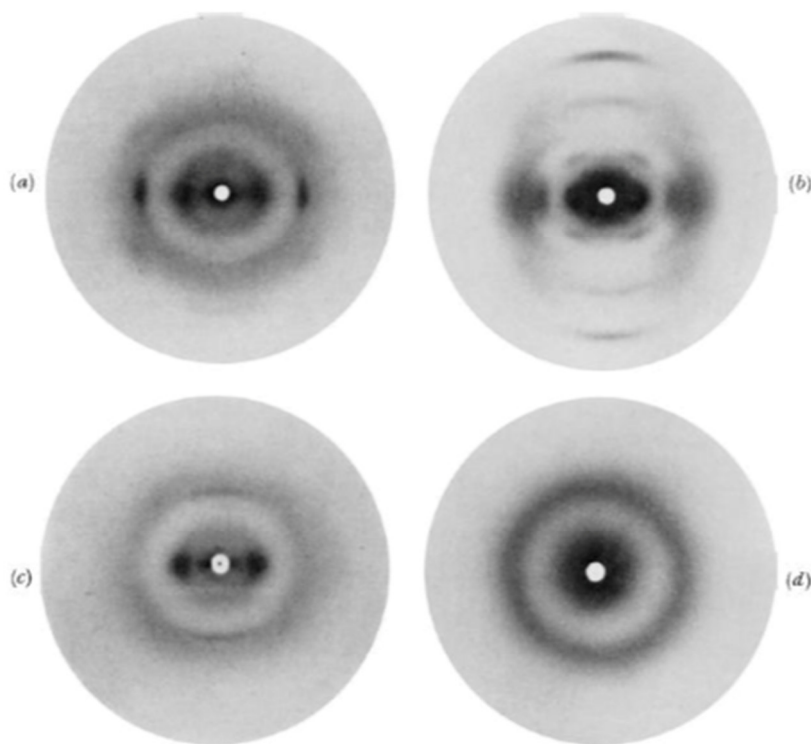


Figura 3 - Immagine ai raggi X delle quattro proteine fibrose: a) tipo β (cheratina stirata); b) collagene (tendine); c) tipo α (cheratina non stirata); d) cross- β .

Tutte queste particolari forme evidenziarono semplici schemi di diffrazione ad indicare che le fibre erano costituite da motivi strutturali ripetuti in maniera continua. L'esempio di diffrazione più comune era quello della forma α originata da un gruppo di proteine che Astbury chiamò "k-m-e-f", che sta per cheratina, miosina, epidermina e fibrinogeno [5]. Ciò che distingueva questo modello era la periodicità con cui si ripeteva la struttura di 5.15 Å. Successivamente Crick, dopo varie osservazioni sperimentali, presentò un modello di α -elica avente una periodicità di 5.4 Å per infine rilevare che tali eliche avevano la tendenza ad assumere un impaccamento denominato "knobs in holes". Quando le catene si avvolgono l'una sull'altra, con angolo di circa 20° (figure 4 e 5), le catene laterali dei residui amminoacidici interagiscono tra di loro e si collocano verso l'interno della struttura, formando un core di interazioni apolari che si ripetono ogni due giri dell' α -elica (oppure ogni 7 residui) modificando il numero dei residui per giro a 3.5 (7/2) rispetto i 3.6 residui per giro della struttura in α -elica[6, 7]. I knobs sono una proiezione delle catene laterali di

un'elica che si "impacchettano" negli holes formati da quattro side-chains dell'elica adiacente. Regioni estese di knobs in holes permettono un migliore impacchamento in modo che le porzioni idrofobiche delle eliche si leghino assieme lontano dal solvente. Fu possibile così spiegare la periodicità di 5.15 Å del modello di Astbury. Questo fenomeno si chiama "superavvolgimento", che si verifica nel senso opposto a quello delle singole eliche, poiché le α -eliche sono destrorse il supercoil risulterà essere sinistroso [7].

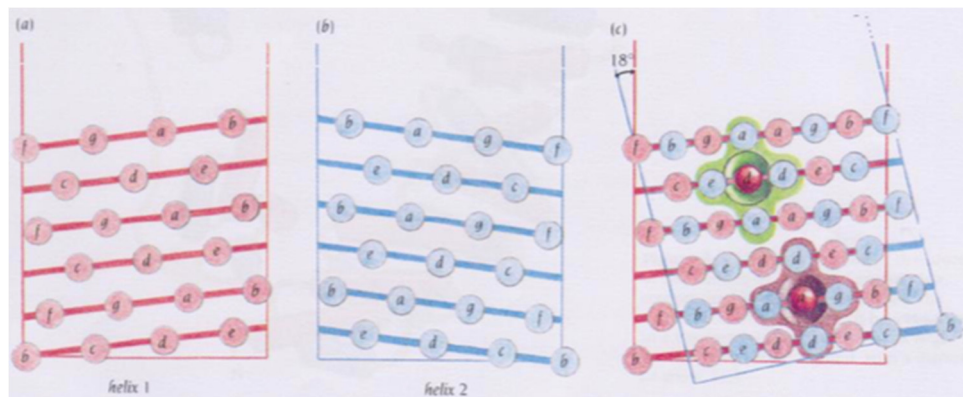


Figura 4 - Schema dell'impaccamento delle side-chains in un core idrofobico della struttura coiled-coil secondo il modello "knobs in holes"[8].

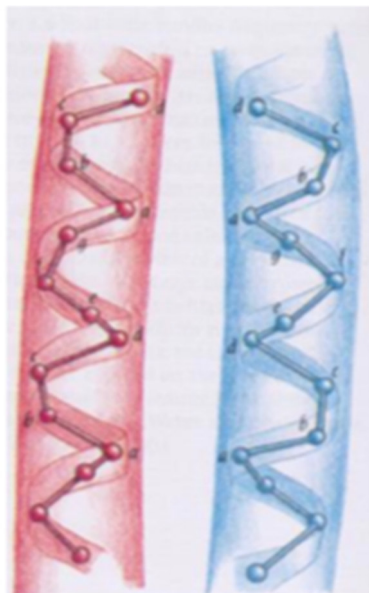


Figura 5 - Illustrazione schematica di un heptad repeat nella struttura coiled-coil e della distorsione a cui sono soggette le α -eliche [8].

Questa elevata regolarità, propria dei coiled-coil, ha permesso lo sviluppo di equazioni parametriche (equazioni 1, 2, 3) allo scopo di rappresentare la struttura del coiled-coil.

$$x = r_0 \cos \omega - r_1 \cos \omega \cos \varphi + r_1 \cos \alpha \sin \omega \sin \varphi \quad (1)$$

$$y = r_0 \sin \omega - r_1 \sin \omega \cos \varphi - r_1 \cos \alpha \sin \omega \sin \varphi \quad (2)$$

$$z = P(\omega 2\pi) + r_1 \sin \alpha \sin \varphi \quad (3)$$

I parametri relativi vengono definiti nel seguente modo (figura 6):

- P rappresenta l'altezza cioè la distanza richiesta per compiere un giro completo della superelica;
- α è l'angolo di inclinazione, cioè l'angolo formato da un'elica e l'asse del coiled-coil (qualche volta chiamato anche angolo di incrocio di superelica);
- Ω È l'angolo compreso tra una coppia di eliche vicine;
- r_0 è il vettore che collega il centro di un'elica all'asse del coiled-coil;
- r_1 è il raggio dell'elica, cioè la distanza che separa il centro di un'elica dal carbonio C_α dei residui che la costituiscono;
- ω è l'angolo che si viene a formare tra due vettori r_0 consecutivi e tale parametro è anche indice dello sfasamento del superavvolgimento (A_ω);
- φ è l'angolo di orientamento (chiamato anche angolo di Crick), cioè l'angolo tra il raggio dell'elica (r_1) e il vettore del raggio dei coiled-coil (r_0) per lo stesso residuo e fornisce la posizione di un dato residuo rispetto all'asse del coiled-coil.

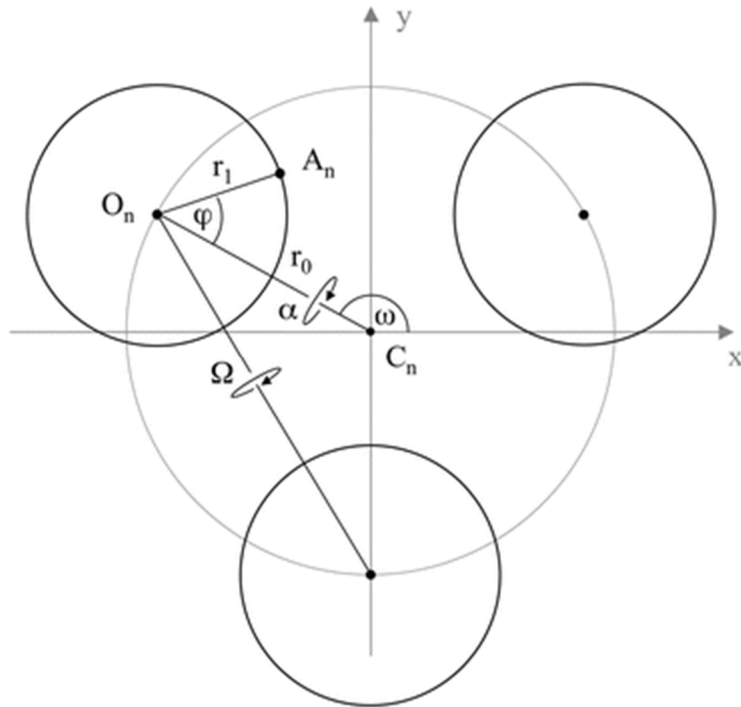


Figura 6 - Rappresentazione geometrica di un coiled-coil (in questo caso come esempio trimero) dove O_n rappresenta il centro di un' α -elica, C_n il residuo costituente dell' α -elica ed indicato come A_n e C_n l'asse del coiled-coil.

1.3 Ipotesi Peptide Velcro (PV)

Per spiegare il motivo della presenza nelle specifiche posizioni dei diversi residui all'interno della sequenza amminoacidica di peptidi che formano strutture coiled-coil è stata esposta un'ipotesi particolare:

- Le posizioni "a" e "d" hanno la necessità di contenere residui idrofobici perché essi stabilizzano la dimerizzazione delle eliche grazie ad interazioni idrofobiche;
- Nelle posizioni "g" ed "e" è richiesta la presenza di residui carichi in modo tale da formare delle interazioni elettrostatiche: infatti interazioni con cariche opposte stabilizzano l'eterodimero mentre, al contrario, destabilizzano l'omodimero;
- Le restanti tre posizioni "b", "c" e "f" devono presentare residui idrofilici perché contribuiscono a formare la superficie esterna esposta all'acqua.

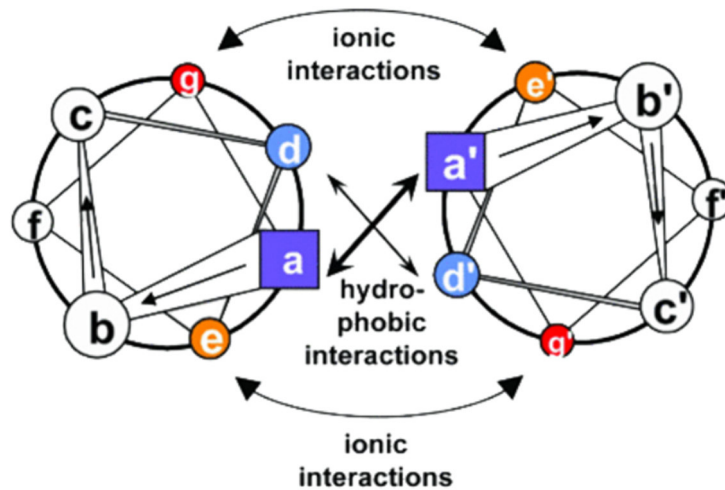


Figura 7 - Schema delle interazioni presenti all'interno di una struttura coiled-coil. In questo esempio si ha un sistema dimerico. Nel core del sistema si hanno interazioni tra i residui idrofobici (residui in posizione "a" e "d") delle due catene; al contrario nella parte più esterna si hanno interazioni ioniche tra i residui polari (posizioni "e" e "g") [2]

1.3.1 Natura dei residui in posizione "a" e "d"

Queste posizioni sono localizzate all'interno del core della struttura coiled-coil, cioè lontano dal solvente e, proprio per questo ricoprono un ruolo fondamentale nel promuovere interazioni tra le diverse eliche che compongono tale struttura. Le principali interazioni che si instaurano tra gli amminoacidi che occupano tali posizioni sono di natura apolare (interazioni di Van der Waals) [2]. Infatti tutto ciò favorisce la dimerizzazione delle eliche ed inoltre costituisce il principale contributo alla stabilità del supercoil. Si è notato che effettivamente la stabilità cresce all'aumentare della natura idrofobica dei residui che occupano le posizioni "a" e "d" [9], laddove invece risulta diminuire a cause dell'ingombro sterico che contraddistingue i residui presenti in quelle posizioni.

1.3.2 Natura dei residui "g" ed "e"

Di solito queste due posizioni sono occupate normalmente dai residui con carica opposta come ad esempio l'acido glutammico e la lisina poiché ciò favorisce la formazione di interazioni elettrostatiche di tipo attrattivo tra le due eliche. Nel caso in cui invece si abbia la presenza di residui con la stessa carica, vengono favorite

interazioni di tipo repulsivo, così da ottenere una destabilizzazione della struttura coiled-coil [10], anche se in fase sperimentale si è notato come in alcune sequenze coiled-coil appaiono delle interazioni repulsive che portano a una deviazione della teoria PV.

1.4 Altri tipi di impaccamenti

La struttura appena descritta è l'impaccamento che si verifica più comunemente, ma esistono delle eccezioni [7], che generalmente sono presenti in strutture antiparallele che si possono riassumere così:

1.4.1 Impaccamento complementare x-da

Questo impaccamento consiste in una rotazione di tutte le eliche di 26° rispetto all'asse centrale[11] . A sua volta, tale rotazione permette uno spostamento dei residui delle eliche che si trovano nel core arrivando così ad avere tre residui invece che due. Se si va ad osservare l'elica dalla parte N-terminale si può vedere come la rotazione oraria vada a modificare la posizione di determinati residui: in particolare si avrà il residuo "e" nella parte esterna mentre il residuo "g" sarà posizionato nella parte interna. Questa configurazione viene chiamata geometria "a-d-g". Nel caso in cui la rotazione fosse antioraria si avrebbe una situazione esattamente opposta alla precedente cioè con il residuo "e" che avrebbe una posizione interna e il residuo "g" invece una posizione esterna. Tale configurazione viene indicata con il nome di geometria "a-d-e" (figura 8). A livello sperimentale è stato rilevato che la geometria predominante risulta essere quella "a-d-e", mentre la geometria "a-d-g" appare più rara.

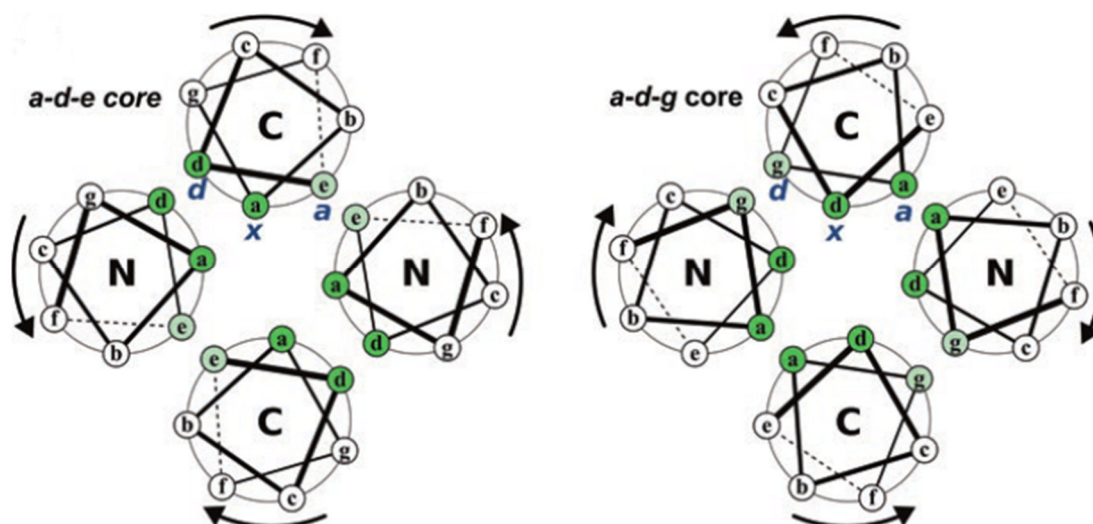


Figura 8 - Schema dell'impaccamento complementare x-da (in questo caso di 4 α -eliche) con conseguente modificazione della geometria del core; a sinistra si ha la geometria a-d-e; mentre a destra si ha la geometria a-d-g. Vengono inoltre evidenziate le posizioni dei residui del core idrofobico di un sistema classico (a-d) e le posizioni risultanti dalla rotazione (e-g) per dare la geometria x-da [11].

In questo tipo di geometrie il residuo che occupa la posizione denominata “x” manifesta la side-chain che punta all’interno della struttura, mentre i residui che occupano le posizioni “d” e “a” dispongono le proprie side-chain verso l’esterno. La struttura che viene così a crearsi delinea una cavità centrale [6].

1.4.2 Impaccamento di tipo Ala-coil

Questa differente variante viene formata dalla forte associazione tra due eliche antiparallele. Tale impaccamento è caratterizzato da una stretta vicinanza tra le catene (8 Å circa) e ciò è dovuto al fatto che si ha una elevata presenza di residui con side-chain di piccole dimensioni, come l’alanina ad esempio, all’interno del core idrofobico. Da ciò si può capire il motivo per cui la struttura viene definita Impaccamento Ala-coil. Ovviamente l’alanina può occupare diverse posizioni all’interno del core idrofobico e in base a dove si colloca si possono distinguere differenti tipi di eliche (figura 9):

- Ala-coil di tipo ferritina se il residuo di alanina occupa la posizione “a”
- Ala-coil di tipo ROP se il residuo di alanina occupa la posizione “d” [7, 12]

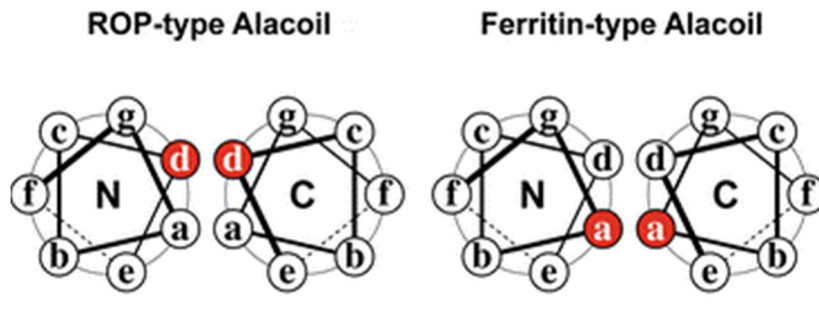


Figura 9 - Interazioni tra due eliche antiparallele nella tipologia Ala-coil: a sinistra Ala-coil di tipo ROP, a destra invece Ala-coil di tipo ferritina [12].

I residui che si trovano generalmente nell'altra posizione centrale, cioè nella posizione "d" per quanto riguarda le eliche tipo ferritina e la posizione "a" nelle eliche tipo ROP, sono residui che solitamente presentano catene laterali voluminose e che quindi interagiscono per interdigitazione (figura10).

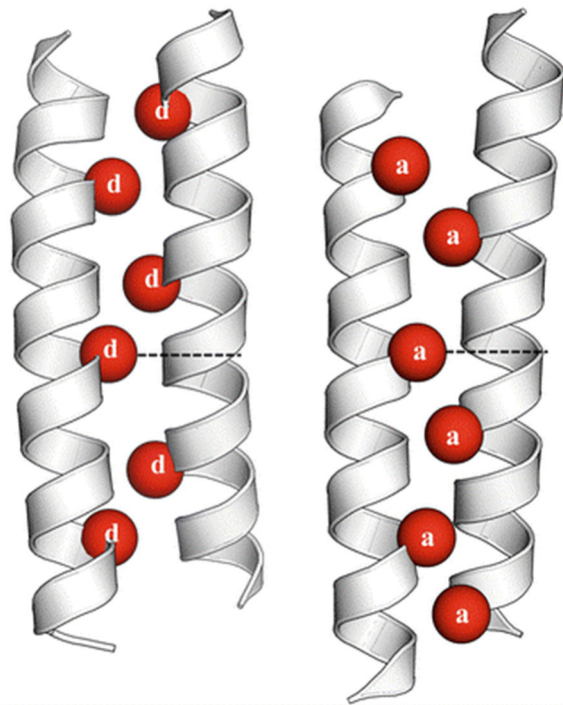


Figura 10 - Schema rappresentativo di una struttura Ala-coil ROP (sinistra) e Ala-coil ferritina (destra): le catene elicoidali nel ROP sembrano posizionarsi direttamente l'una sull'altra, mentre nella struttura della ferritina appaiono sfalsate [12].

1.5 Stutter e Stammer nelle sequenze heptad

Generalmente i coiled-coil manifestano un elevato grado di regolarità nei repeat ma, solo sporadicamente queste ripetizioni appaiono senza nessuna interruzione lungo tutta la catena. Queste alterazioni della regolarità della sequenza heptad vengono identificate con i termini “stutter” e “stammer”. Più precisamente si definisce:

- Stutter (oppure skip): l'eliminazione di tre residui [2, 13] che portano ad un incremento della periodicità a 3.67 residui per giro provocando un consequenziale srotolamento del superavvolgimento sinistoso;
- Stammer: l'eliminazione di quattro residui con una diminuzione della periodicità a 3.33 residui per giro che causa così un consequenziale sovravvolgimento della struttura.

Tali interruzioni, che implicano una modificazione locale (solitamente limitata a due giri dell' α -elica) potrebbero rappresentare la spiegazione non solamente della flessibilità di particolari tipi di proteine (come ad esempio nel caso della miosina [14]), ma anche dello sviluppo del coiled-coil stesso. Infatti, lo stutter e lo stummer agiscono sull'impaccamento del nucleo, portando alla genesi, seppure locale, di una geometria “x-da”, dove lo stummer rappresenterebbe la rotazione oraria, mentre lo stutter risulterebbe essere l'analogo della rotazione antioraria [7].

1.6 Sequenze di innesco

Un diverso ruolo è invece correlabile ad un'altra tipologia di sequenze amminoacidiche, denominate “sequenze di innesco”. I coiled-coil, in base alla loro natura, possono infatti formare una grande varietà di impaccamenti isoenergetici, aventi cioè la stessa quantità di energia. La formazione dei coiled-coil è cineticamente lenta e perciò si rendono necessarie una serie di sequenze amminoacidiche che presentano la funzione di iniziatori o punti di nucleazione per la loro formazione. Infatti non sono parte di una sequenza specifica, ma raffigurano brevi segmenti ad elevata propensione α -elicoidale, in grado di formare interazioni stabilizzanti nell'esatta forma oligomerica grazie ad interazioni elettrostatiche ottimizzate e

impaccamenti idrofobici [6, 7]. Un esempio di tale fenomeno è rappresentato dal coiled-coil della cortexillina-1 che invece non è presente nell'actina [15] (figura 11).

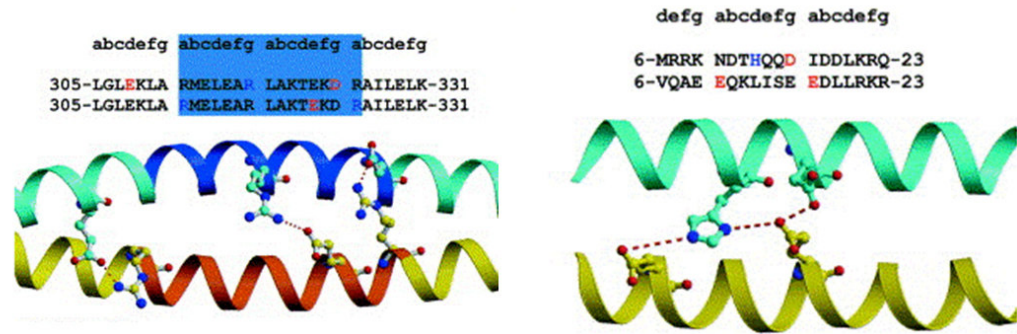


Figura 11 - A sinistra viene riportata la struttura coiled-coil della cortexillina-1 e nel riquadro è evidenziata la sequenza d'innesto indispensabile per la formazione del coiled-coil che invece risulta assente nel sistema dell'actina (a destra).

1.7 Numero e orientamento delle eliche

Come già esposto nei paragrafi 1.3.1 e 1.3.2, i residui nelle posizioni “a”, “d”, “e” “g” possiedono una specifica funzione per la formazione dei coiled-coil. Ci sono però vari fattori che influenzano non solo la struttura oligomerica del coiled-coil ma anche la direzione delle eliche stesse. Questi fattori sono [16, 17] :

- a) Specificità delle posizioni “a” e “d”: nei coiled-coil paralleli, le posizioni “a” e “d” indicano una preferenza per specifiche tipologie di side-chain nel caso in cui il coiled-coil sia composto da 2, 3 o 4 eliche. La causa di tale preferenza è dovuta allo spazio presente nella struttura. Nel caso di un coiled-coil dimerico, il vettore dei residui $C\alpha-C\beta$ risulta essere parallelo a quello del legame peptidico mentre, al contrario, nella posizione “d” il vettore risulta essere perpendicolare. Tale collocazione permette così di avere al centro un più ampio spazio nella posizione “a” (quindi sono preferiti i residui β -ramificati come la isoleucina) e un contesto più limitato in termini di spazio per quanto riguarda la posizione “d” [7].

Nel caso di un coiled-coil trimerico, i vettori $C\alpha-C\beta$ di entrambe le posizioni possiedono un angolo acuto paragonabile all'interfaccia e perciò non si avrà

una preferenza per determinate side-chains. Infine nei coiled-coil tetramerici la situazione è ribaltata in confronto al coiled-coil dimerico. Questo evidenzia come viene influenzata l'oligomerizzazione a seconda della posizione delle side-chains.

- b) Dimensioni delle side-chains nelle posizioni centrali: in particolare i residui alifatici sono compatibili con tutte le forme di coiled-coil, mentre se c'è la presenza di un residuo di triptofano o di fenilalanina nelle posizioni centrali, si ottengono dei pentameri, di cui non si è parlato.
- c) Presenza di residui polari e/o carichi nel nucleo generalmente aiutano la formazione di dimeri.
- d) Natura dei residui nelle posizioni "e" e "g". Se in queste posizioni prevalgono residui di natura idrofobica, è favorita la formazione di tetrameri spesso antiparalleli.

1.8 Coiled-coil E e K: omodimeri ed eterodimeri e dipendenza dal pH

Lo sviluppo di strutture coiled-coil solitamente avviene tra catene peptidiche uguali (omo-oligomerizzazione) oppure tra catene peptidiche diverse (etero-oligomerizzazione). Un particolare esempio di oligo-omerizzazione sono le caratteristiche sequenze peptidiche complementari E3 e K3 (figura12). Questo eterodimero presenta la particolarità di svilupparsi, o meno, a seconda del pH della soluzione in cui esso è disciolto [18]. Il peptide E risulta essere ricco in acido glutammico nelle posizioni "e" e "g", quindi si presenterà con una carica negativa a pH fisiologico [19, 20]. In soluzione si presenta quindi come peptide anionico avente una conformazione randomica della catena [21]. Al contrario, il peptide K mostra un'abbondante presenza di lisine nelle posizioni "e" e "g" e risulta essere perciò carico positivamente a pH fisiologico. In soluzione si presenta come peptide cationico avente caratteristiche strutture elicoidali ed una maggiore propensione all'aggregazione rispetto al peptide E poichè i coil-K sono instabili come monomeri [19, 20]. Si nota

invece che le interazioni elettrostatiche a pH neutro promuovono l'instaurarsi in maniera stabile dell'eterodimero (figura12).

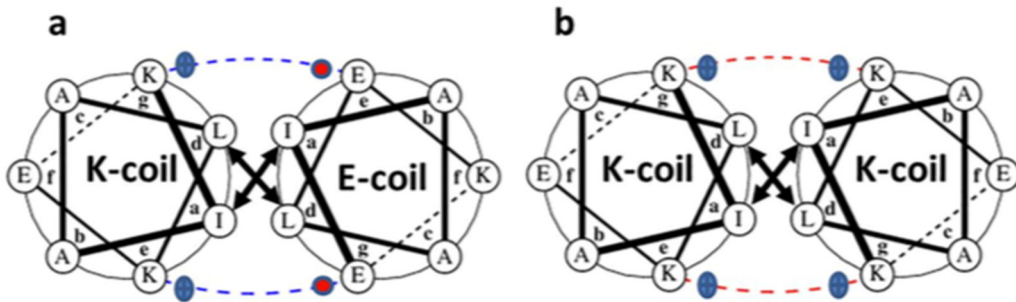


Figura 12 - Schema rappresentativo della struttura quaternaria dei coiled-coil: a) eterodimero K/E paralleli; b) omodimero K/K. Le linee tratteggiate indicano le interazioni di natura coulombiana: si nota come in a) si abbiano interazioni attrattive in quanto si ha la presenza di cariche dal segno opposto (lisina in blu con carica positiva e glutammato in rosso con carica negativa). Al contrario in b) si hanno entrambe le eliche con la medesima carica e ciò provoca interazioni di tipo repulsivo. All'interno del core invece si ha la presenza di interazioni di Van der Waals tra i residui di isoleucina e leucina[5].

1.9 Proteine SNARE

Per svolgere le ordinarie funzioni, come ad esempio la secrezione ormonale o il rilascio di enzimi, tutti gli organismi viventi adoperano come meccanismo principale la fusione delle membrane cellulari [21]. Affinchè il fenomeno della fusione delle membrane cellulari possa avvenire, le cellule devono presentare sulla superficie della loro membrana un complesso proteico. Esso viene comunemente denominato SNARE (soluble NSF attachment protein receptor, dove NSF sta per N-ethylmaleimide – sensitive factor) [22]. Tale fusione tra le membrane è resa possibile appunto dal complesso proteico SNARE che provoca interazioni coiled-coil, di natura eterodimerica, tra tre proteine complementari.

Le proteine che fanno parte di questo complesso proteico mediano processi di fusione della membrana (associati al traffico vescicolare e all'autofagia) fondamentali per tutte le cellule, ma, alcune proteine, presentano funzioni esocitiche/endocitiche specifiche per alcuni tipi di cellule e/o tessuti e sono quindi essenziali ad esempio nello sviluppo embrionale. Mutazioni o varianti dei loro geni codificanti potrebbero quindi dare luogo a disturbi dello sviluppo, come quelli che colpiscono il sistema nervoso e il sistema immunitario producendo casi di autismo, disabilità intellettiva, disturbi del movimento

ed epilessia o patologie legate all'eliminazione e alla corretta inibizione delle cellule del sistema immunitario (Linfoistocitosi emofagocitica) [23].

Osservando bene tale sistema si può evidenziare la sua elevata complessità che è dovuta principalmente all'interazione specifica presente all'interno del core della struttura del coiled-coil (figura 13). Questa interazione così specifica è permessa grazie all'accoppiamento di alcuni residui glutammici che sono mantenuti in posizioni altamente specifiche e alcuni residui di arginina. Questa disposizione asimmetrica, con un core polare, facilita il corretto meccanismo del complesso SNARE [15].



Figura 13 - Schema del sistema esempio SNAP-25-Sintassina-Sinaptobrevina [24]

Data l'elevata complessità di questi sistemi biologici si ricorre quindi all'utilizzo di peptidi modello in grado di instaurare interazioni di tipo coiled-coil. Questi peptidi possono essere ricchi in residui carichi negativamente (sequenze E) o positivamente (sequenze K). Allo scopo di mimare le proteine SNARE, alle due sequenze peptidiche molto spesso è condensato al lato N-terminale un ancoraggio lipidico denominato DOPE (DOPE = 1,2-Dioleoyl-dn-glycero-3-phosphoethanolamine) che interagisce con la membrana fosfolipidica, collegato al coiled-coil zipper tramite un linker di polietilenglicole a basso peso molecolare (figura14) [21, 25].

Coiled-coil E : DOPE- PEG 12 – (EIAALEK)-(EIAALEK)- (EIAALEK) – NH₂

Coiled-coil K : DOPE- PEG12 – (KIAALKE) – (KIAALKE) – (KIAALKE) – NH₂

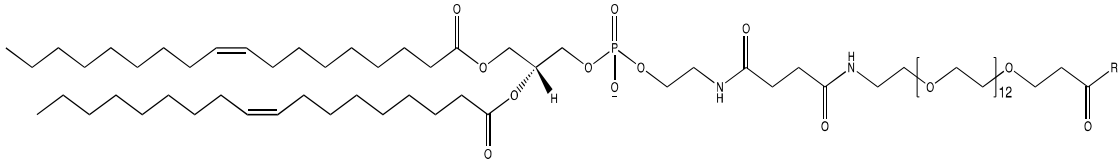


Figura 14 - Struttura dei peptidi idrosolubili complementari LPR (LP = lipopeptide, R indica la parte peptidica cioè il peptide E o K) [25].

L'osservazione sperimentale di questo complesso ha messo in evidenza che la formazione del coiled-coil eterodimerico E/K è solo la parte iniziale del processo di fusione della membrana e corrisponde all'avvicinamento delle membrane interagenti. In questa prima fase il peptide K possiede un ruolo fondamentale: infatti i due peptidi, prima dell'inizio della fusione, hanno atteggiamenti diversi. Il peptide E, essendo anionico, mostra delle interazioni deboli con il sistema lipidico della membrana e rimane in soluzione come spirale dimerica E/E. Il peptide K invece, che presenta numerose cariche positive, interagisce con grande affinità con la membrana fosfolipidica e ciò comporta un aumento della sua elicità. Il modello presentato per descrivere il processo di fusione delle membrane presuppone che la vescicola bersaglio si porti nelle immediate vicinanze della membrana cellulare. Ciò come si è già detto è permesso grazie alla formazione del coiled-coil K/E. In seguito si ha un riarrangiamento dei due doppi strati fosfolipidici con fusione successiva delle due membrane (figura 15) [21, 25].

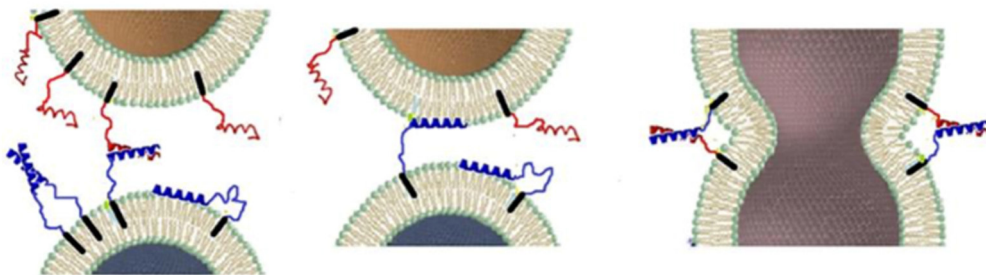


Figura 15 - Modello che illustra le possibili interazioni che avvengono tra le membrane; a sinistra si ha l'interazione coiled-coil con formazione dell'eterodimero che in seguito sviluppa la situazione a destra, cioè la fusione. In mezzo, il caso in cui il peptide K interagisce con la membrana. In blu il peptide K, in rosso il peptide E. Il linker dello stesso colore del peptide e in nero l'ancoraggio lipidico [21].

È stato ipotizzato che il peptide K ricopra un ruolo fondamentale nella fase di riarrangiamento della membrana fosfolipidica causandone la distorsione e curvatura.

Il peptide K risulta quindi coinvolto in due fenomeni in competizione tra di loro: da un lato l'interazione con il peptide E, con cui va a formare strutture coiled-coil, e dall'altro l'interazione con le altre membrane, permessa dalla vicinanza nello spazio tra le membrane interagenti.

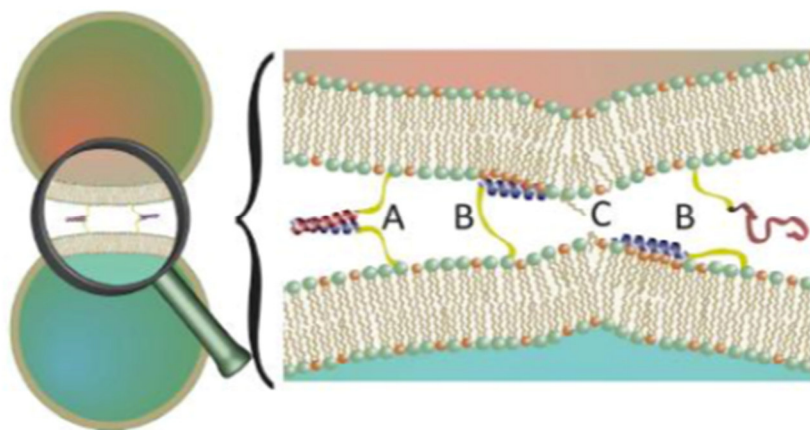


Figura 16 - Illustrazione dei vari ruoli che il peptide K (in blu) può assumere: in A si lega con il peptide E (in rosso) per formare un coiled-coil, in B interagisce con la membrana promuovendo la formazione di una curvatura positiva locale (C) che porta alla protrusione del doppio strato fosfolipidico [26-29].

1.10 Amminoacido TOAC

Per rendere più facile l'analisi delle strutture conformazionali e garantire una più precisa comprensione delle interazioni che avvengono tra i peptidi E e K e tra i peptidi e la membrana negli studi EPR si ricorre all'utilizzo di specifiche sonde [30]. Tra le sonde più comunemente usate troviamo delle molecole che contengono radicali (spin-label) che hanno la possibilità di essere condensate facilmente a specifici gruppi funzionali presenti nelle side-chain dei diversi residui.

Questo comporta che la sonda non sia spazialmente vicina al backbone peptidico. Per ovviare a questo inconveniente si è utilizzato l'amminoacido TOAC (acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidino-1-ossil-4-amino-4-carbossilico, figura 17). Questo amminoacido appartiene alla famiglia degli amminoacidi α -tetrasostituiti ed include al suo interno una sonda paramagnetica nitrossido stabilizzata dalla presenza di due carboni tetrasostituiti in posizione 3 e 5. Nel corso degli anni il TOAC ha acquistato una sempre

maggior rilevanza come spin-label per la stabilità che presenta il radicale NO, permettendo così l'ottenimento di spettri EPR in varie tipologie di solventi [30].

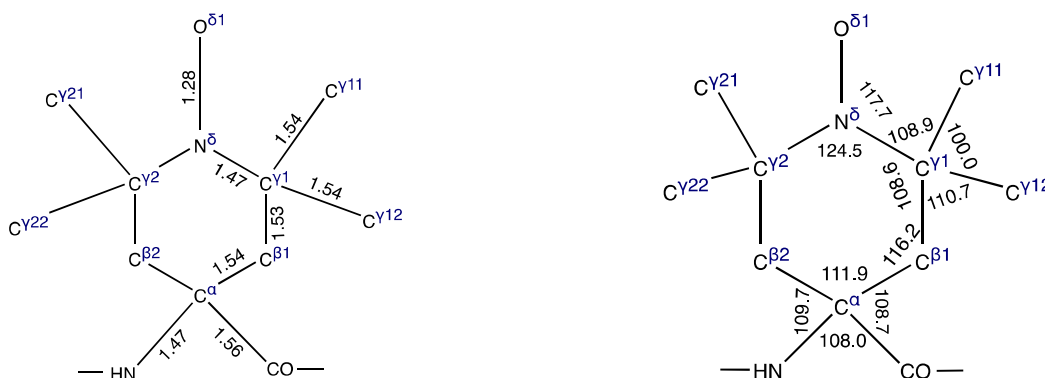


Figura 17 - Rappresentazione della geometria del TOAC con distanze e angoli di legame [31]

In aggiunta il gruppo NO appare anche come un ottimo quencher relativamente ai fluorofori presenti nella sequenza peptidica, allargando il suo utilizzo alla spettroscopia di fluorescenza. Il gruppo nitrossido presenta due bande di assorbimento: la prima nella regione UV, a circa 240 nm ($\epsilon = 10^3\text{-}10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), dovuta ad una transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ ed è sensibile alla polarità del solvente [30]; la seconda a 420-450 nm ($\epsilon = 5\text{-}20 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ed è dovuta ad una transizione $n \rightarrow \pi^*$.

Il residuo di TOAC può andare incontro anche ad una reazione di tipo redox reversibile. Inoltre si contraddistingue per l'assenza di bande vibrazionali negli spettri IR, che potrebbero influenzare le bande ammidiche essenziali per decretare la struttura secondaria dei peptidi in cui è presente. Infine l'inserimento di residui α, α -tetrasostituiti aiuta la formazione di strutture elicoidali (α -eliche oppure eliche 3_{10}) e/o di β -turn [30, 32, 33].

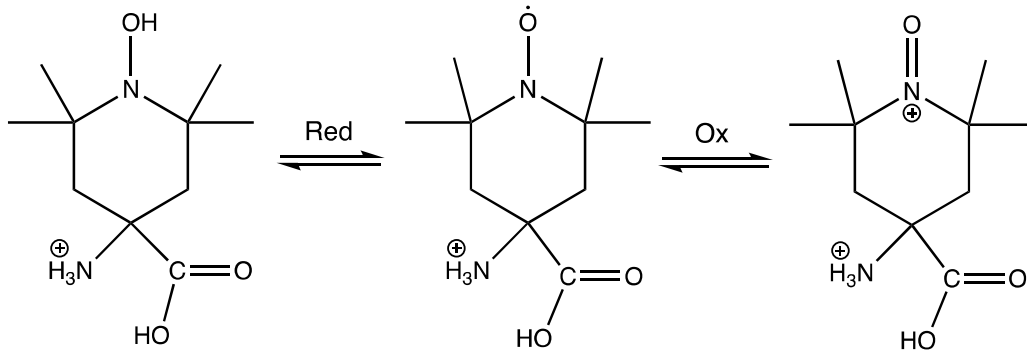


Figura 18 - Illustrazione del fenomeno osso-riduttivo a cui viene sottoposto il TOAC con formazione di un'idrossilammina (sinistra) o di uno ione ossammonio (destra) [30].

2. SCOPO DELLA TESI

Questo progetto di tesi, svolto presso i laboratori dell'ICB – CNR con il gruppo di ricerca del Prof. Paolo Ruzza, prevede la sintesi di peptidi modello di elica coiled-coil, ricchi in residui di Lys (K) contenenti al proprio interno l'amminoacido TOAC come sonda spin-label.

In precedenti studi [21] erano stati utilizzati peptidi analoghi contenenti un residuo di Cys. Nella catena laterale questo amminoacido presenta un gruppo -SH al quale è stato condensato il gruppo MTSL con funzione di spin-label (figura 19). Questo design implica una certa flessibilità strutturale nei pressi della sonda rispetto alla catena peptidica.

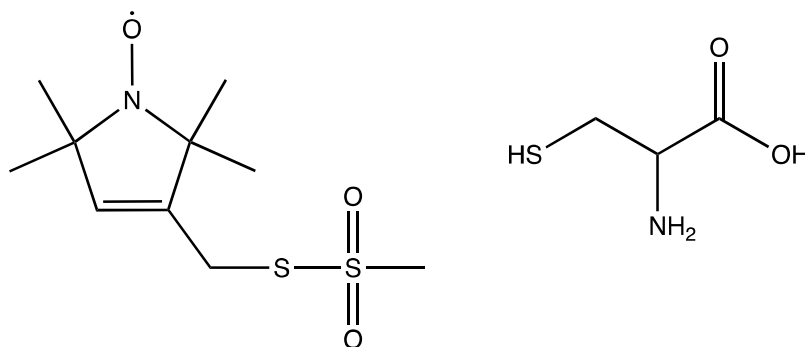


Figura 19 - Struttura chimica della sonda MTSL e del residuo Cys [21].

L'inserimento invece dell'amminoacido TOAC ha permesso di posizionare la sonda spin-label direttamente all'interno della sequenza amminoacidica. Ciò risulta essere un'ottimizzazione per quanto riguarda lo studio di queste particolari strutture in quanto permette di avere informazioni più specifiche.

I peptidi sintetizzati sono:

- | | |
|---------------------------|--|
| K-T⁴ | Ac-(KIA(TOAC)LKE)-(KIAALKE)-(KIAALKE)-CONH ₂ |
| K-T^{4,18} | Ac-(KIA(TOAC)LKE)-(KIAALKE)-(KIA(TOAC)LKE)-CONH ₂ |
| K-Y¹⁸ | Ac-(KIAALKE)-(KIAALKE)-(KIA Y LKE)-CONH ₂ |

Il problema più importante e che ha maggiormente ostacolato l'ottenimento del prodotto finale purificato, utilizzando questa via sintetica, è stato la rigenerazione del radicale nitrossido necessaria a seguito del trattamento con acido durante le operazioni di distacco del peptide dalla resina e alla contemporanea rimozione delle protezioni presenti nei gruppi funzionali in catene laterali.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

La progettazione di questi peptidi prevede l'adempimento principalmente di due diversi criteri: in primo luogo essi devono essere facilmente funzionalizzabili con idonee sonde radicaliche; in secondo luogo essi devono risultare complementari ai peptidi della serie E sintetizzati in un precedente lavoro di tesi così da permettere di riprodurre il sistema d'interazione coiled-coil presente nel complesso proteico SNARE. Ciò è fondamentale per poter studiare le meccaniche esistenti in questo tipo di interazioni proteina-proteina. L'inserimento del residuo di TOAC ha uno scopo in particolare: infatti esso è un radicale nitrossido che viene utilizzato come spin-label nella spettroscopia EPR. Questo residuo è stato posizionato nella posizione 4 (peptide K-T⁴) o in due posizioni (peptide K-T^{4,18}). Questo accorgimento consente lo studio dell'orientamento delle catene peptidiche nel coiled-coil e di verificare la possibile presenza di interazioni intermolecolari (K-T^{4, 18}) legate al misfolding della sequenza peptidica.

3.1 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)

La sintesi su fase solida [34] si fonda sull'impiego di un supporto solido (figura 20) che funge da ancora a cui legare, tramite un opportuno linker, l'amminoacido C-terminale o un gruppo amminico nel caso delle resine che permettono l'ottenimento di peptidi contenenti una funzione ammidica C-terminale. Questo tipo di tecnica di sintesi offre diversi vantaggi come, ad esempio, una maggiore velocità di reazione, una buona facilità di eliminazione, ad ogni step di reazione, dei prodotti secondari (ciò permette un più facile isolamento del prodotto desiderato) ed infine consente di automatizzare i vari step che fanno parte del processo di sintesi. Le procedure di sintesi su fase solida, manuale o automatizzata, sono schematizzate in figura 20.

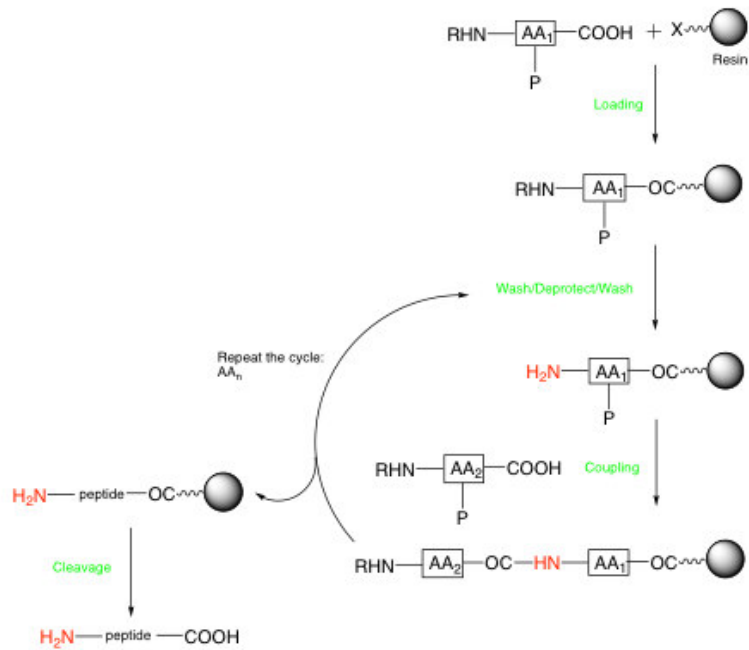


Figura 20 - Rappresentazione schematica della procedura di sintesi peptidica: P = gruppo protettore catena laterale, AA = amminoacido da legare, X = gruppo funzionale presente sulla resina [35]

Osservando tale schema si evidenzia come la procedura sia composta da una sequenza di passaggi ripetitivi. Il primo di questi è la deprotezione del gruppo amminico dell'amminoacido legato alla resina. Successivamente si attuano una serie di lavaggi con DMF per eliminare i sottoprodotti di reazione. Infine si procede con la condensazione del residuo amminoacidico attivato al gruppo carbossilico.

Lo sviluppo della catena peptidica si realizza a partire dal residuo C-terminale verso il residuo N-terminale: così facendo l'attivazione del gruppo carbossilico sarà attuata su di un residuo protetto alla funzione α -amminica con un gruppo uretanico. In questo modo si diminuisce il rischio di epimerizzazione del residuo stesso [36].

Si è ritenuto opportuno utilizzare la resina Rink-Amide MBHA (figura 21) poiché permette di avere, al momento del distacco del peptide dalla resina, nel residuo C-terminale un gruppo ammidico che, assieme al gruppo acetico introdotto al gruppo N-terminale al termine della sintesi, comporta la rimozione delle cariche alle estremità della sequenza peptidica in modo da mimare il fatto che il peptide sintetizzato rappresenta una porzione di una proteina più grande.

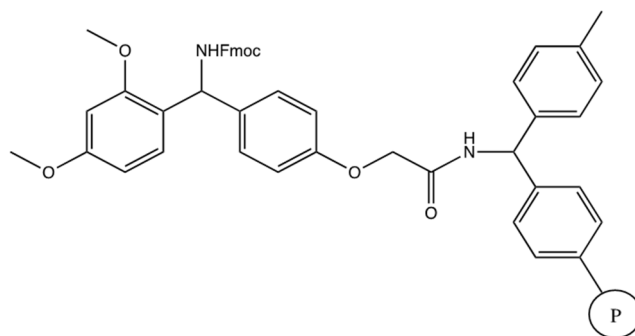


Figura 21 - Struttura della Rink-Amide MBHA [37].

I gruppi funzionali presenti nelle side-chains dei diversi residui amminoacidici non sono coinvolti nelle reazioni che avvengono in questa fase della sintesi in quanto protetti con gruppi protettori che sono rimossi in condizioni di ortogonalità con la reazione di deprotezione del gruppo α -amminico.

I principali gruppi protettori impiegati nella protezione delle catene laterali degli amminoacidi, congiuntamente alle condizioni alle quali vengono rimossi, sono riportati in tabella 1.

Tabella 1 - Descrizione delle catene laterali amminoacidiche con i relativi gruppi protettori e condizioni di rimozione

Amminoacidi	Catene laterali	Gruppi protettori	Condizioni di rimozione
Glu		 Tert-Butile (tBu)	95% TFA, 3% TIS e 2% H ₂ O per 1 ora e 30 minuti
Lys		 Tert-Butilossicarbonile (Boc)	95% TFA, 3% TIS e 2% H ₂ O per 1 ora e 30 minuti
Tyr		 Tert-Butilossicarbonile (Boc)	95% TFA, 3% TIS e 2% H ₂ O per 1 ora e 30 minuti

3.2 Protezione della funzione α -amminica

Il gruppo che viene utilizzato allo scopo di proteggere la funzione α -amminica dei singoli residui amminoacidici è il gruppo 9-fluorenilmetossicarbonile o Fmoc (figura22). Tale gruppo protettivo viene inoltre utilizzato anche per la protezione del gruppo amminico della resina Rink Ammide MBHA.

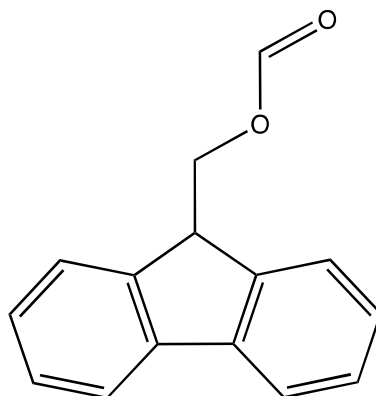


Figura 22 - Struttura chimica del gruppo Fmoc [38].

Questo gruppo è utilizzato in quanto condensato con grande facilità alla funzione α -amminica e rimosso in condizioni ortogonali al distacco del peptide dalla resina. Esso forma un legame di tipo uretanico che evita l'eventuale racemizzazione del carbonio in α [38]. L'eliminazione di questo gruppo si realizza in condizioni basiche, di solito utilizzando una soluzione di piperidina al 20% v/v in DMF [39], condizioni ortogonali rispetto a quelle di rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali presenti nei diversi amminoacidi.

Durante la fase di rimozione del gruppo protettore, la piperidina aggiunta in eccesso, ha due importanti e distinte funzioni: induce la reazione di β -eliminazione tramite la formazione dell'anione ciclopentadienilico con conseguente reazione di β -eliminazione e produzione del dibenzofulvene; forma un addotto stabile con il dibenzofulvene (solubile in DMF), che è allontanato per filtrazione [40].

Nel caso della sintesi del peptide K -T⁴ è stata utilizzata una soluzione 5% di piperazina e 1% DBU in DMF per la rimozione del gruppo Fmoc degli amminoacidi nelle posizioni 1-4, in quanto l'impiego della classica soluzione di piperidina al 20% in DMF non permetteva una corretta rimozione del gruppo protettore molto probabilmente a

causa della conformazione assunta dal peptide. La DBU, una base più forte della piperidina, associata alla piperazina che funge esclusivamente da nucleofilo che reagisce con il dibenzofulvene che si libera, permette la pressoché totale rimozione dell’Fmoc. Il meccanismo E1cb di rimozione dello Fmoc è riportato in figura 23.

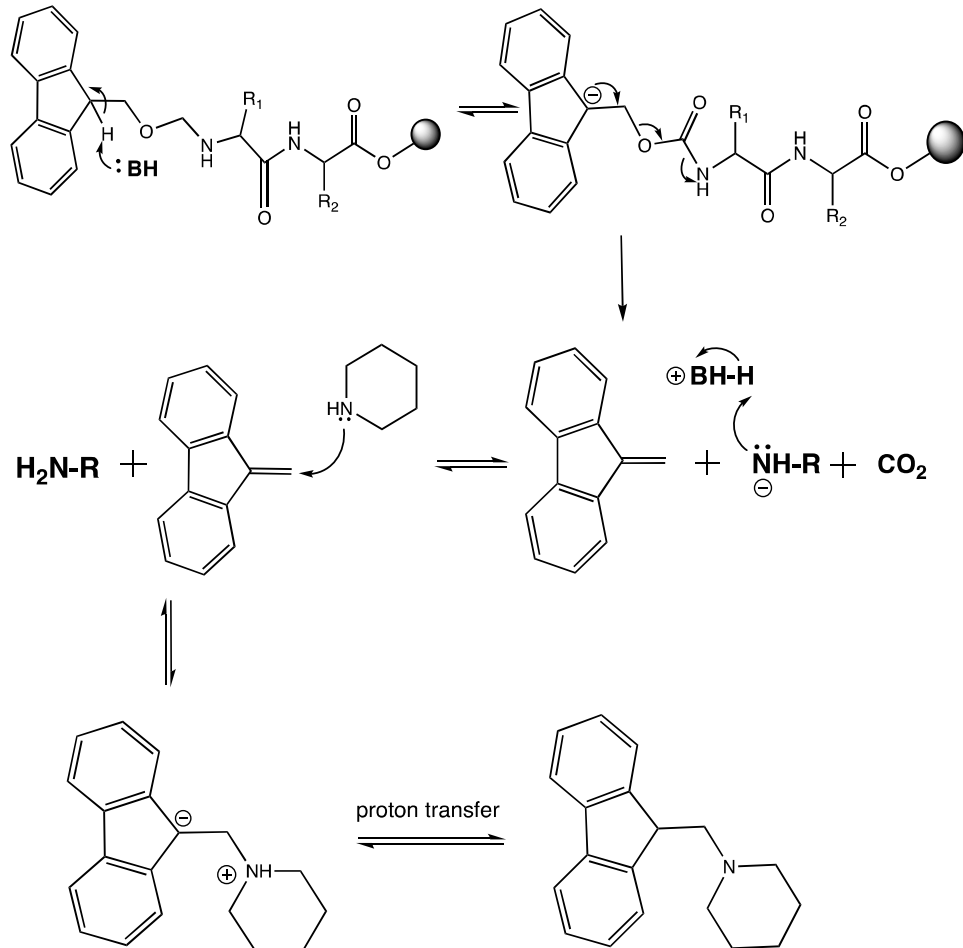


Figura 23 - Meccanismo di rimozione del gruppo Fmoc [38, 41]

3.3 Attivazione della funzione carbossilica

Per poter realizzare la reazione di condensazione dei singoli residui amminoacidi al gruppo α -amminico terminale delle catene polipeptidiche in fase di accrescimento si impiegano due attivatori che appartengono alle famiglie dei sali di uronio: l'HBTU e l'HATU (figura24).

La reazione con l'HBTU avviene alla presenza di un nucleofilo ausiliario, l'HOBt, che promuove la formazione dell'estere attivo corrispondente.

Il meccanismo con cui vengono attivati i diversi amminoacidi è descritto in figura 25

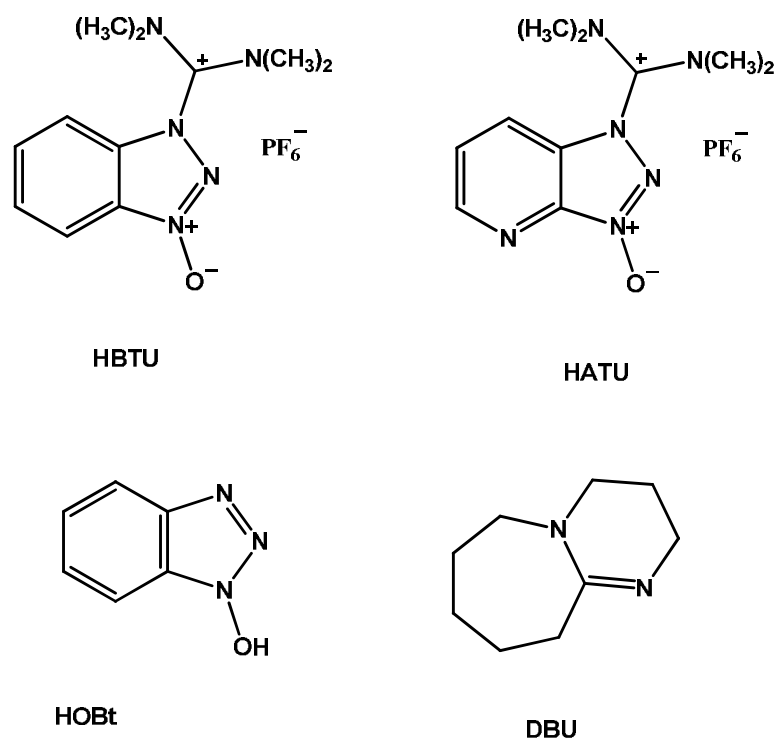


Figura 24 - Strutture molecolari degli attivatori utilizzati.

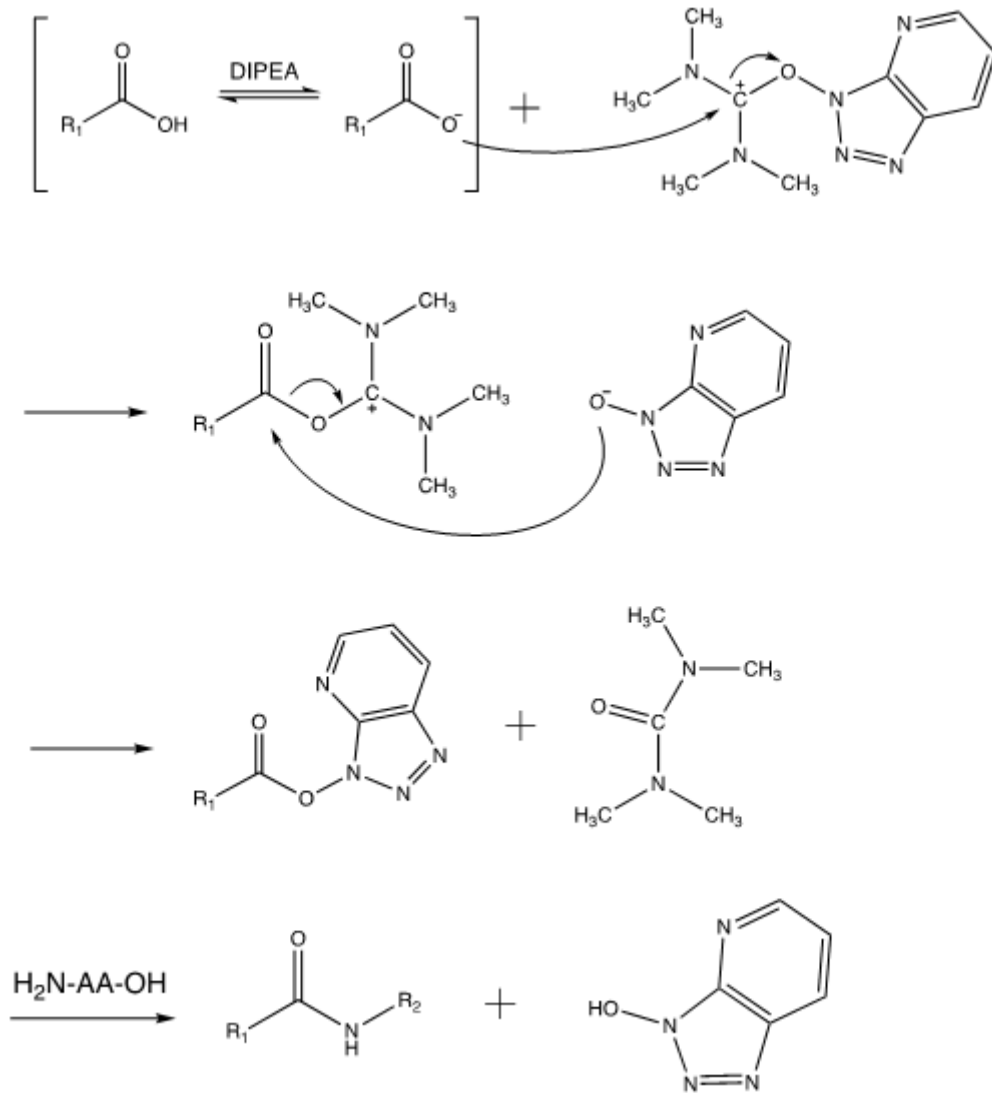


Figura 25 - Meccanismo di attivazione della funzione carbossilica mediante l'impiego dell'HATU.

Come si evince dallo schema sopra riportato, lo stadio iniziale contempla la salificazione della funzione carbossilica dell'amminoacido da condensare grazie all'azione della DIPEA. In seguito l'anione formato reagisce con il sale di uronio con formazione dell'aciluronio che è un intermedio molto reattivo. Questo è rapidamente trasformato nell'estere attivo grazie alla reazione con l'HOBt che si libera dall'HBTU ed aggiunto al mezzo di reazione.

L'estere attivo formato ha la capacità di dare assistenza anchimerica per quanto riguarda la formazione del successivo legame peptidico. Gli studi conformazionali dello stato cristallino [42], mettono in evidenza il fatto che la porzione esterea si dispone ortogonalmente rispetto al piano identificato dal gruppo carbossilico

dell'amminoacido: se si ipotizza che questa disposizione spaziale possa essere presente anche in soluzione, allora l'azoto presente in posizione 2 del benzotriazolo (figura 26) nell'estere attivo può dare origine ad un legame idrogeno con il gruppo amminico della catena peptidica in accrescimento favorendone la reazione con il gruppo carbossilico attivato.

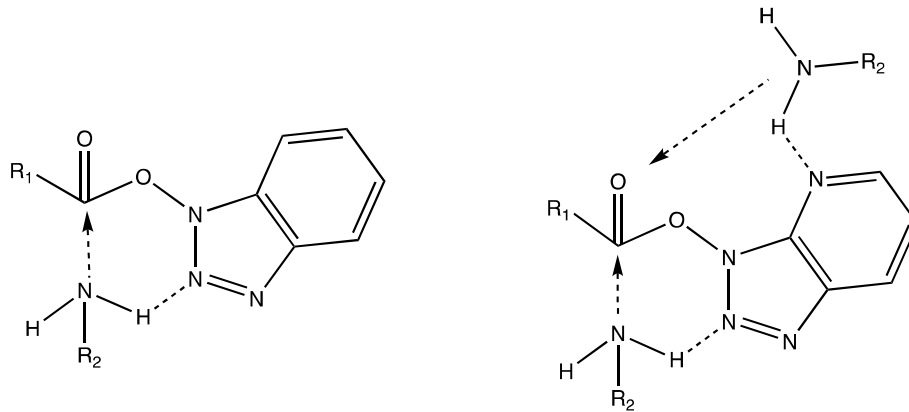


Figura 26 - Differenza nell'assistenza anchimerica tra -OBt (sinistra) e -OAt (destra).

Il meccanismo di attivazione del gruppo carbossilico utilizzando l'HATU è sovrapponibile a quello descritto con l'eccezione che oltre all'atomo di azoto in posizione 2 del benzotriazolo, anche l'atomo di azoto in posizione 7 dell'azabenzotriazolo può offrire assistenza anchimerica nella formazione del legame peptidico e ciò risulta molto importante, se non essenziale, nel caso di condensazione con residui ingombri stericamente quali il TOAC. L'HATU non è stato utilizzato quindi come agente di coupling solo nel momento in cui si va ad inserire il residuo di TOAC, ma anche nella condensazione dei due successivi residui di Ala e Ile in posizione N-terminale al residuo di TOAC stesso. Inoltre al fine di incrementare la resa di questa reazione si provvede ad effettuare un doppio coupling [42-44].

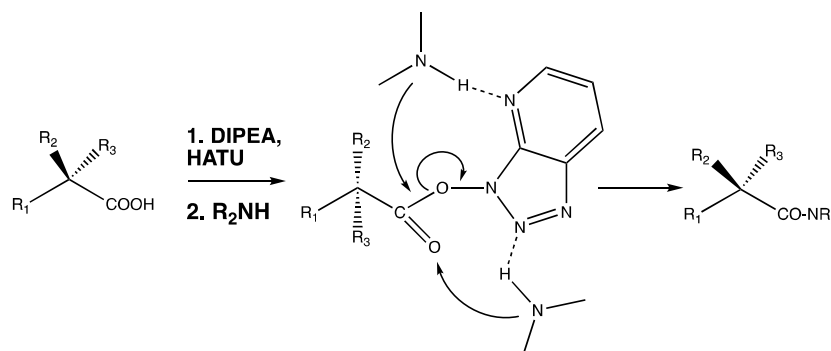


Figura 27 - Schema dell'assistenza anchimerica assoluta dall'OAT grazie agli atomi in posizione 2 e 7 [42].

A sintesi ultimata, i diversi peptidi dopo essere stati deprotetti dal gruppo Fmoc sono acetilati per reazione con una soluzione al 5% di anidride acetica (Ac₂O) in DMF in presenza di DIPEA al fine di mimare la struttura delle sequenze che il peptide dovrebbe rappresentare privo di cariche N- e C-terminali in quanto inserite in una sequenza di dimensioni maggiori.

3.4 Amminoacido TOAC

La perdita del radicale nitrossido secondo la reazione di disproporzionamento descritta in figura 28, è causata dall'ambiente acido che si ha nel corso del distacco del peptide dalla resina e della contemporanea rimozione dei gruppi protettori presenti nelle catene laterali.

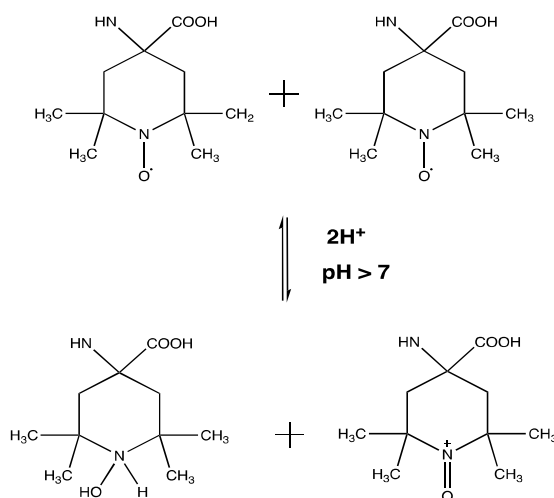


Figura 28 - Meccanismo del fenomeno di disproporzionamento a cui partecipa il TOAC con formazione di un'idrossilammina (sinistra) o di uno ione ossammonio (destra) [45].

La rigenerazione del radicale nitrossido avviene per trattamento con una soluzione di NH_4OH con la quasi totale rigenerazione della sonda radicalica.

L'aggiunta di ammoniaca è utilizzata anche nella successiva fase di purificazione del prodotto tramite HPLC preparativo, impiegando una colonna reverse-phase C18. Le prove condotte hanno dimostrato la necessità di utilizzare il TFA nella fase mobile al fine di permettere una soddisfacente separazione del prodotto desiderato dai sottoprodotti di reazione. Le frazioni raccolte sono quindi trattate con una soluzione di NH_4OH al fine di ripristinare il radicale del TOAC, liofilizzate e quindi desalificate mediante eluizione su colonna semipreparativa utilizzando acqua e acetonitrile come eluenti.

3.5 Sintesi del peptide K-T⁴



Il peptide K-T⁴ è stato ottenuto tramite sintesi peptidica su fase solida che si basa sulla chimica HOBt/HBTU fino all'inserimento del residuo di Leu in posizione 5. A partire dalla condensazione del residuo di TOAC e poi per quelli successivi è stato utilizzato come attivatore l'HATU in sostituzione dell'HBTU e dell'HOBt per i vantaggi che esso presenta, descritti nei paragrafi precedenti. Il gruppo amminico N-terminale è stato acetilato prima del distacco del peptide dalla resina per trattamento con TFA. Il ripristino del radicale nitrossido avviene per trattamento con NH_4OH 2M dopo aver allontanato il TFA per evaporazione.

Il prodotto ottenuto è stato quindi caratterizzato tramite HPLC analitico (figura 29) e spettrometria di massa accoppiata a cromatografia liquida (LC-ESI-MS) (figura 30). Successivamente il campione è purificato mediante HPLC preparativo con gradiente lineare dal 25 al 55% di B in 60 minuti (gradiente binario composto da eluenti A= 0,05% TFA in H_2O , B= 0,05% TFA in 9:1 MeCN/ H_2O) ed infine desalificato mediante eluizione su colonna semipreparativa con un gradiente lineare dal 5 al 90% di acetonitrile in 10 minuti, ottenendo 2 mg di prodotto purificato.

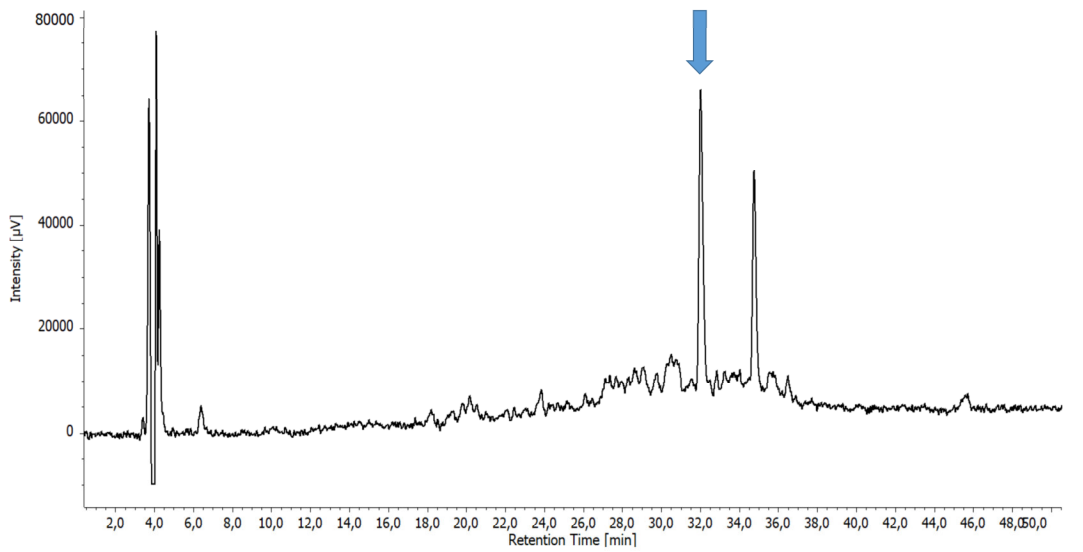


Figura 29 - Cromatogramma HPLC analitico del peptide K-T⁴ utilizzando una colonna Jupiter C18, flusso 1 mL/min con detector a 216 nm. Inizialmente l'eluizione avviene al 25% di B seguendo poi successivamente un gradiente lineare dal 25 al 55% di B in 30 minuti. Con la freccia viene indicato il picco del prodotto.

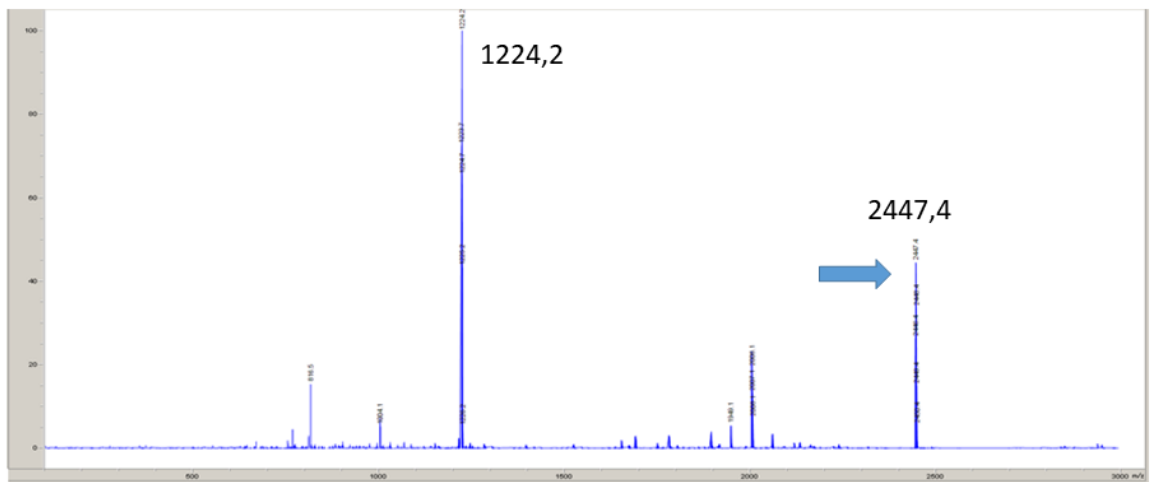


Figura 30 - Spettro di massa ESI-MS del peptide K-T⁴. La freccia indica la massa del peptide $[M+H]^+=2447.4$

3.6 Sintesi del peptide K-T^{4,18}

La sintesi di questo peptide è eseguita come le precedenti ma in maniera frazionata a causa dell'inserimento dei due residui di TOAC in posizione 4 e 18.

La prima parte della sequenza, contenente il primo repeat di 7 amminoacidi, è stata sintetizzata manualmente, mentre poi la sintesi prosegue al sintetizzatore automatico sino al residuo di Leu in posizione 5. L'ultima parte del peptide è quindi realizzata secondo la procedura descritta per il peptide K-T⁴.

Il peptide ottenuto è stato acetilato prima del distacco dalla resina, e il prodotto è stato caratterizzato mediante HPLC analitico e LC-ESI-MS (figure 31 e 32). Successivamente il campione è stato purificato mediante HPLC preparativo con gradiente lineare dal 20 al 60% di B in 80 minuti (A= 0,05% TFA in H₂O, B= 0,05% TFA in 9:1 MeCN/H₂O) ed infine desalificato mediante eluizione su colonna semipreparativa con un gradiente lineare dal 5 al 90% di acetonitrile in 10 minuti per ottenere 2,24 mg di prodotto purificato.

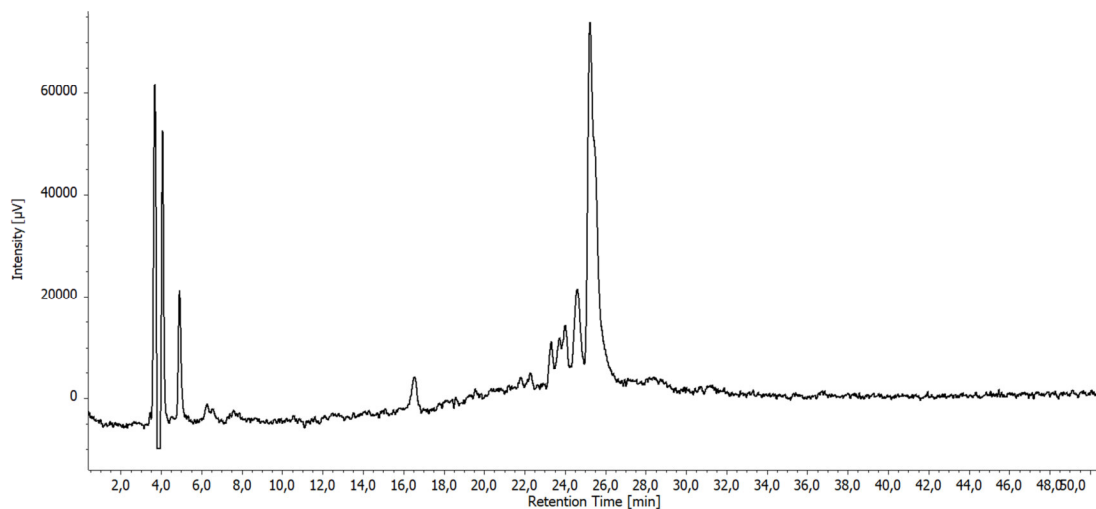


Figura 31 - Cromatogramma HPLC del peptide K-T^{4,18} utilizzando una colonna Jupiter C18, flusso 1 mL/min con detector a 216 nm. Inizialmente l'eluizione avviene al 20% di B e poi segue un gradiente lineare dal 20 al 60% di B in 40 minuti.

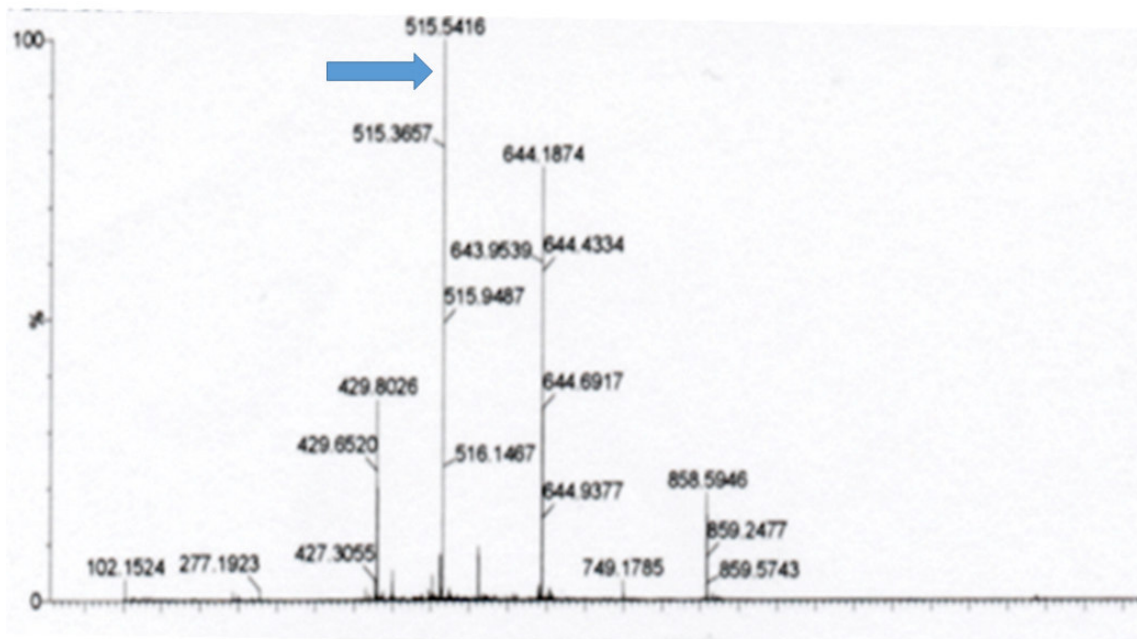


Figura 32 - Spettro di massa TOF MS ES+ del peptide K-T^{4,18}. La freccia indica la massa corretta del prodotto $[M+H]^+ = 2546.4$ m/z, $[M+5H]^{5+} = 515.5$ m/z

3.7 Sintesi del peptide K-Y¹⁸



La sintesi di questo peptide è avvenuta manualmente utilizzando i classici reattivi di coupling (HOBt e HBTU). Il peptide ottenuto è stato acetilato prima del distacco dalla resina, secondo la procedura già descritta in precedenza, ed il prodotto è stato caratterizzato mediante HPLC analitico e LC-ESI-MS (figure 33 e 34). Successivamente il campione è purificato mediante HPLC preparativo con gradiente lineare dal 25 al 70% di B in 90 minuti (A= 0,05% TFA in H₂O, B= 0,05% TFA in 9:1 MeCN/H₂O) per ottenere 32,4 mg di prodotto purificato.

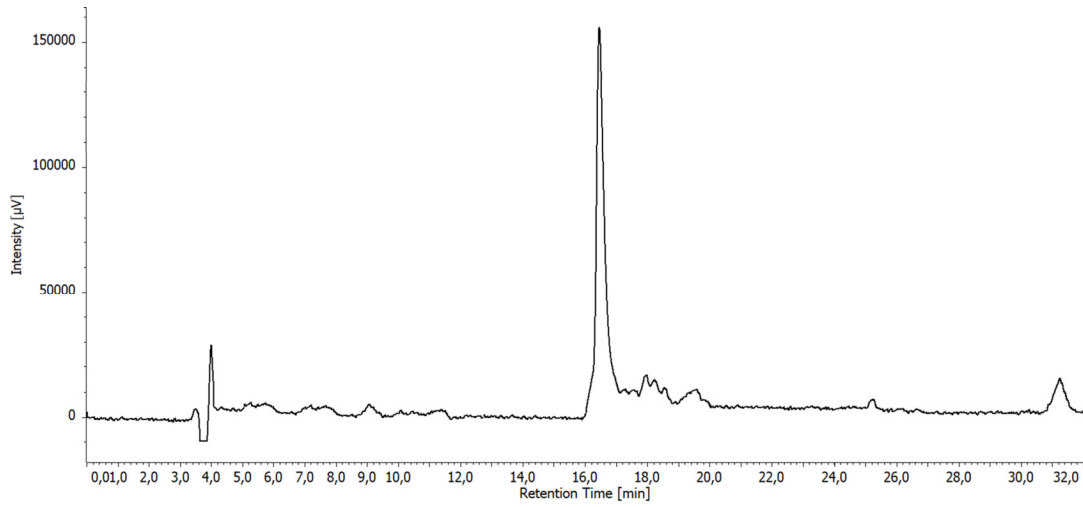


Figura 33 - Cromatogramma HPLC analitico del peptide $K\text{-Y}^{18}$ utilizzando una colonna Jupiter C18, flusso 1 mL/min con detector a 216 nm. Inizialmente l'eluizione avviene al 25% di B per poi proseguire con un gradiente lineare dal 25 al 70% di B in 45 minuti.

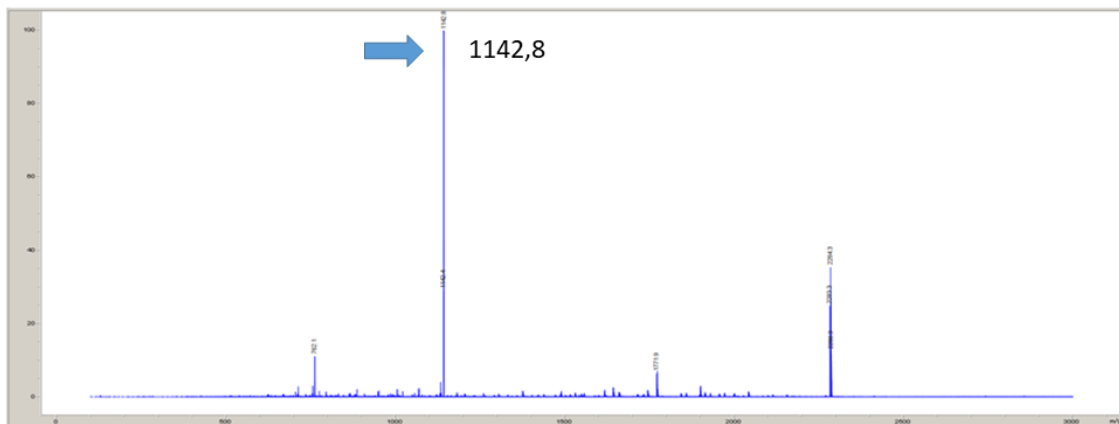


Figura 34 - Spettro di massa ESI-MS del peptide $K\text{-Y}^{18}$. La freccia indica la massa del peptide $[M+H]^+ = 2410.5 \text{ m/z}$, $[M+H]^{2+} = 1142.8 \text{ m/z}$.

3.8 Risonanza paramagnetica elettronica (EPR)

La presenza del radicale nitrossido nel campione purificato è determinata mediante spettroscopia di risonanza di spin elettronico (EPR o ESR), che permette sia lo studio di radicali stabili o persistenti sia lo studio di specie transienti che si formano nel corso di una reazione [30, 31]. Questa spettroscopia si basa sulla diversa energia che presentano i due stadi di spin dell'elettrone quando sottoposti ad un campo magnetico.

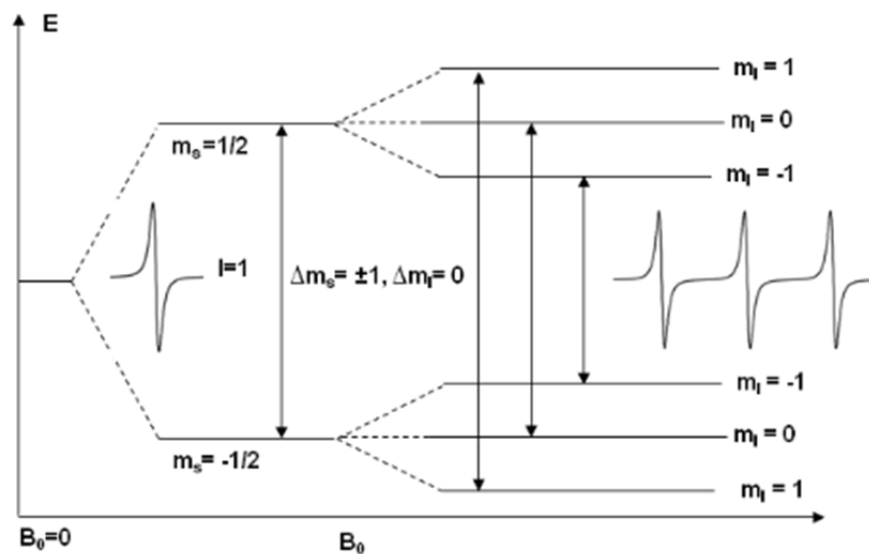


Figura 35 - Diagramma del livello di energia di un radicale nitrossido in presenza di un campo magnetico statico (B_0)

La molecola del TOAC in cui un orbitale è occupato da un solo elettrone è paramagnetica e dà luogo ad uno spettro EPR caratterizzato da 3 righe a causa dell'interazione dell'elettrone spaiato con il nucleo di azoto. La distanza presente tra le righe dello spettro EPR deriva dalla velocità con la quale la molecola ruota nello spazio; questa velocità non è solo prerogativa della sola molecola e delle sue dimensioni ma è influenzata anche dalla viscosità del mezzo. (figura 35).

Lo spettro del peptide contenente due residui di TOAC in posizione 4 e 18 presenta un tripletto più allargato ad indicare che i due radicali sono presenti ma essi risultano troppo lontani per interagire tra di loro (figura 36). Se i due residui fossero ad una distanza tale da poter permettere l'interazione dell'uno con l'altro si osserverebbe la presenza di un quintupletto nello spettro EPR originato dallo scambio di elettroni fra i radicali.

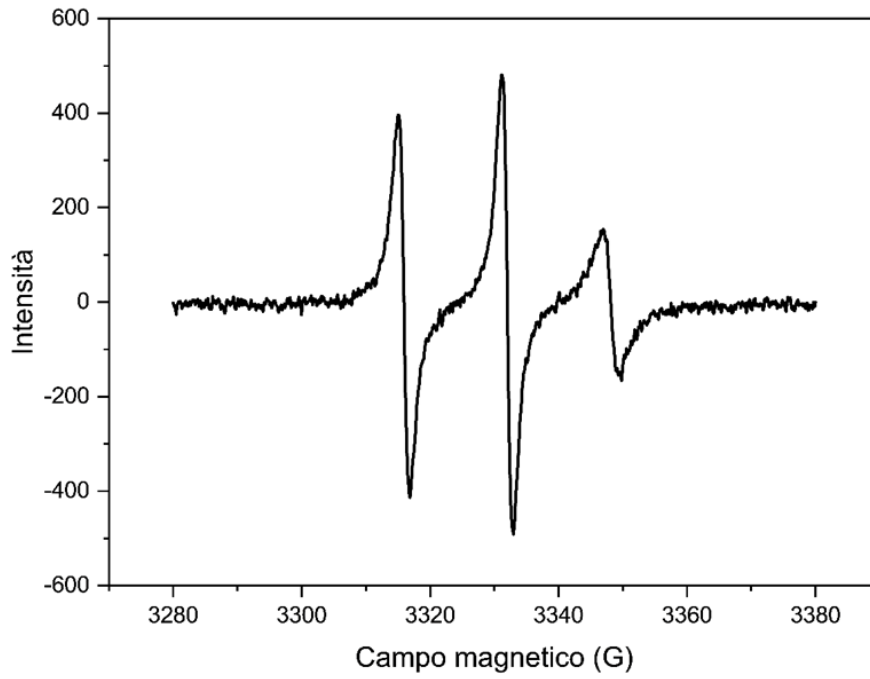


Figura 36 - Spettro EPR del peptide K-T⁴ contenente un solo residuo di TOAC

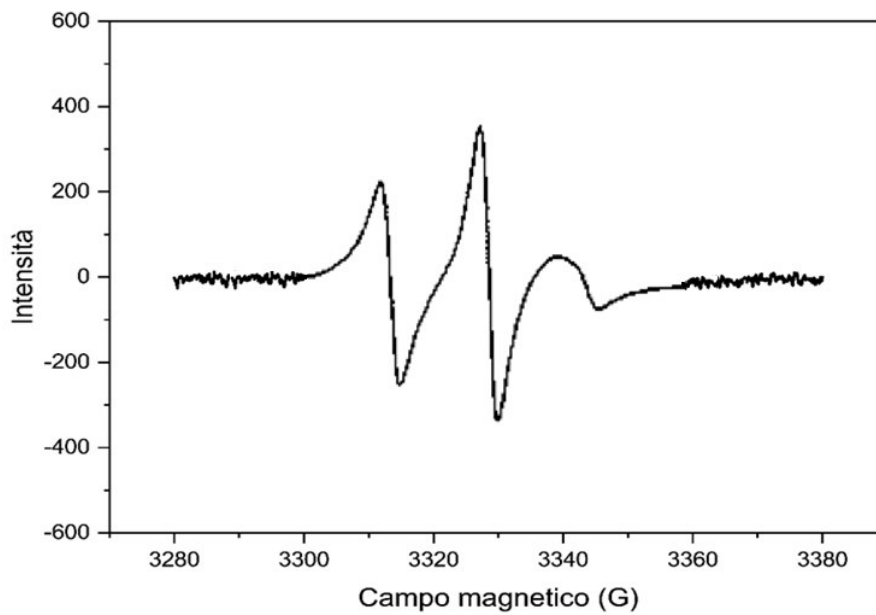


Figura 37 - Spettro EPR del peptide K-T^{4,18} contenente due residui di TOAC.

3.9 Dicroismo circolare (CD)

La struttura secondaria dei peptidi sintetizzati e la loro capacità di interagire con i peptidi analoghi ricchi in residui di acido glutammico è stata studiata mediante spettroscopia di dicroismo circolare (CD).

Questa tecnica spettroscopica si basa sul diverso assorbimento da parte di un cromoforo chirale di una radiazione polarizzata circolarmente destrogiro o levogiro, le due componenti in cui si può scomporre una radiazione polarizzata circolarmente (figura 38).

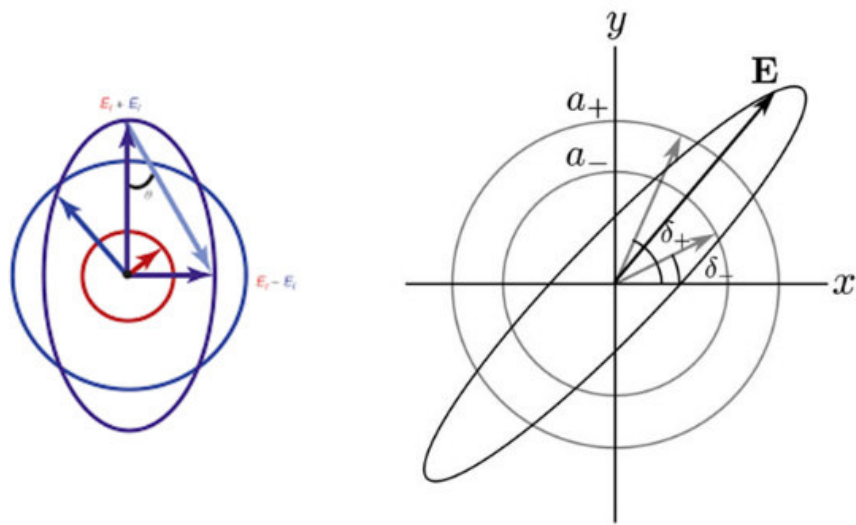


Figura 38 - Rappresentazione geometrica di una luce polarizzata circolarmente

Riportando i valori di $\Delta A = A_L - A_R$ in funzione della lunghezza d'onda si ottiene uno spettro CD.

Normalmente gli strumenti commerciali riportano tali valori in ellitticità (Θ) la cui unità di misura sono i millidegrees (mdeg), che corrisponde all'angolo la cui tangente è il rapporto tra l'asse minore e l'asse maggiore dell'ellisse risultante dal diverso assorbimento della luce polarizzata circolarmente a destra e a sinistra (figura 38).

Al fine di poter confrontare spettri CD di diverse soluzioni, questi vengono riportati in ellitticità molare per residuo:

$$[\Theta] = \frac{\Theta \cdot 0,1 \cdot MRW}{c \cdot l}$$

Dove

$$MRW = \frac{MW}{n - 1}$$

$$c = \text{concentrazione in } \frac{mg}{ml}$$

$$l = \text{cammino ottico della cella in cm}$$

$$n = \text{numero di residui}$$

I peptidi e le proteine possono dare luogo a spettri CD in quanto sono molecole chirali e contengono cromofori (legame peptidico, gruppi aromatici in catena laterale, ponti disolfuro).

L'analisi degli spettri CD permette di determinare la struttura secondaria di un peptide o proteina e l'utilizzo di opportuni algoritmi permette di valutare con una buona precisione il contributo di ciascuna struttura alle conformazioni che presenta il peptide in esame.

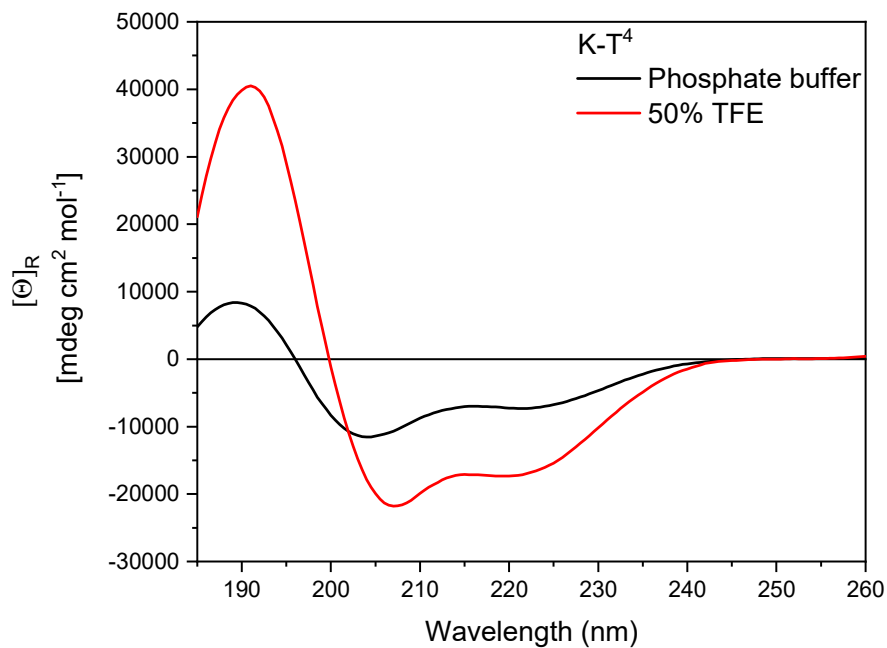


Figura 39 - Spettro CD del peptide K-T⁴ in soluzione acquosa e in presenza di 50% TFE.

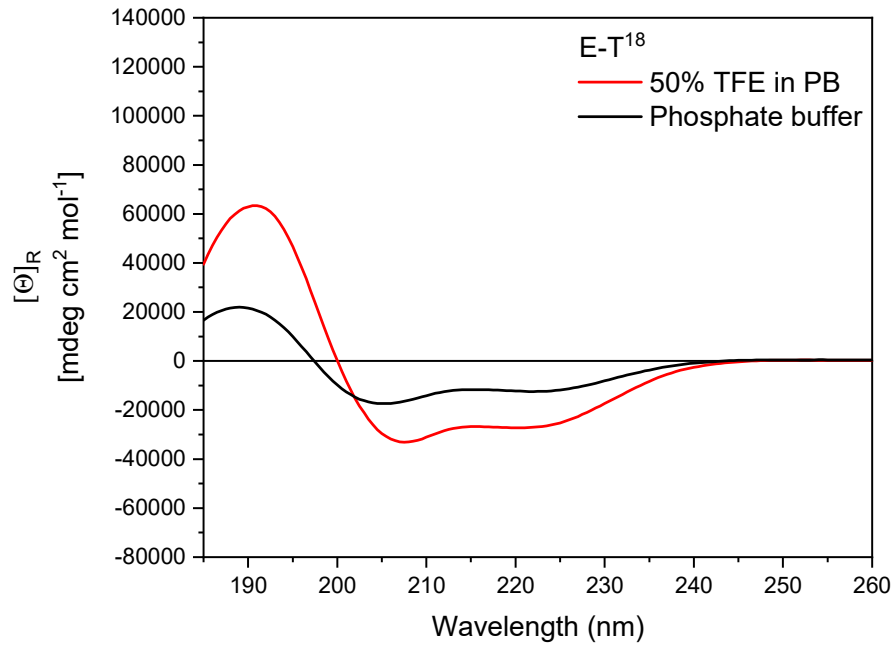


Figura 40 - Spettro CD del peptide E-T¹⁸ in soluzione acquosa e in presenza di 50% TFE.

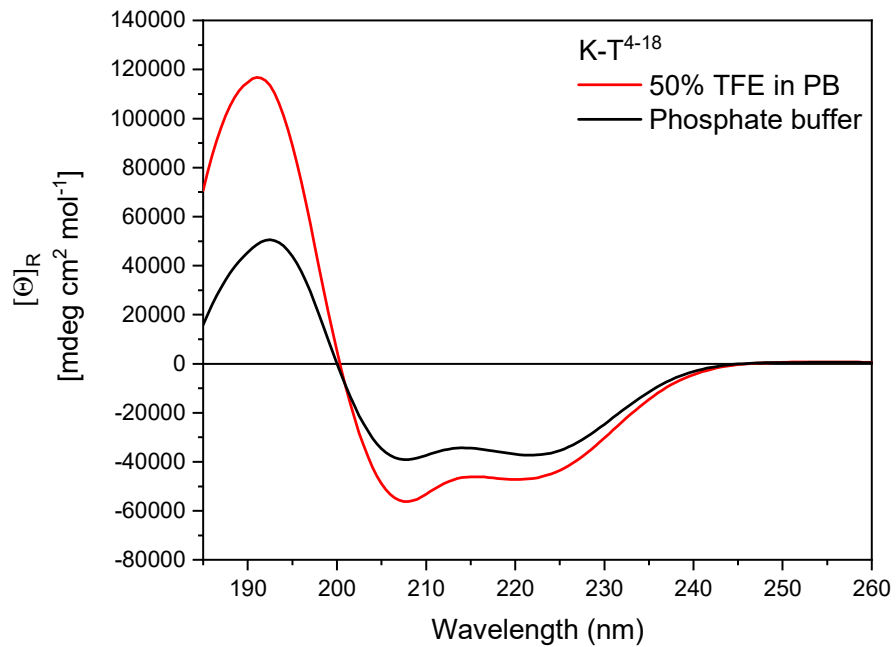


Figura 41 - Spettro CD del peptide K-T^{4,18} in soluzione acquosa e in presenza di 50% TFE.

Come riportato nelle figure 39, 40 e 41 i peptidi sintetizzati (K-T⁴ e K-T^{4,18}) analogamente al peptide E-T¹⁸ in soluzione acquosa (tampone fosfato 10 mM, pH 7) presentano uno spettro dicroico caratterizzato da una banda positiva a circa 190 nm e da due bande negative a circa 207 e 222 nm caratteristiche di una struttura in elica come confermato dal contenuto in struttura secondaria determinato utilizzando il software Jasco Spectra Manager (tabella 2).

Tabella 2 - Costituzione in % della struttura secondaria dei peptidi K-T⁴, E-T¹⁸, K-T^{4,18}, E-W⁴ e K-Y¹⁸ in soluzione acquosa.

Peptide	α -helics	β -sheet	Other
K-T ⁴	29%	1%	70%
K-T ^{4,18}	59%	0%	41%
E-T ¹⁸	36%	3%	61%
E-W ⁴	13%	23%	64%
K-Y ¹⁸	11%	20%	69%

Al contrario i peptidi E-W⁴ e K-Y¹⁸ in soluzione acquosa sono caratterizzati da una banda negativa a circa 195-200 nm indice dell'assenza di una struttura ordinata (figure 42, 43 e tabella 2).

Questi risultati confermano la capacità del residuo di TOAC di indurre e stabilizzare l' α -elica [32].

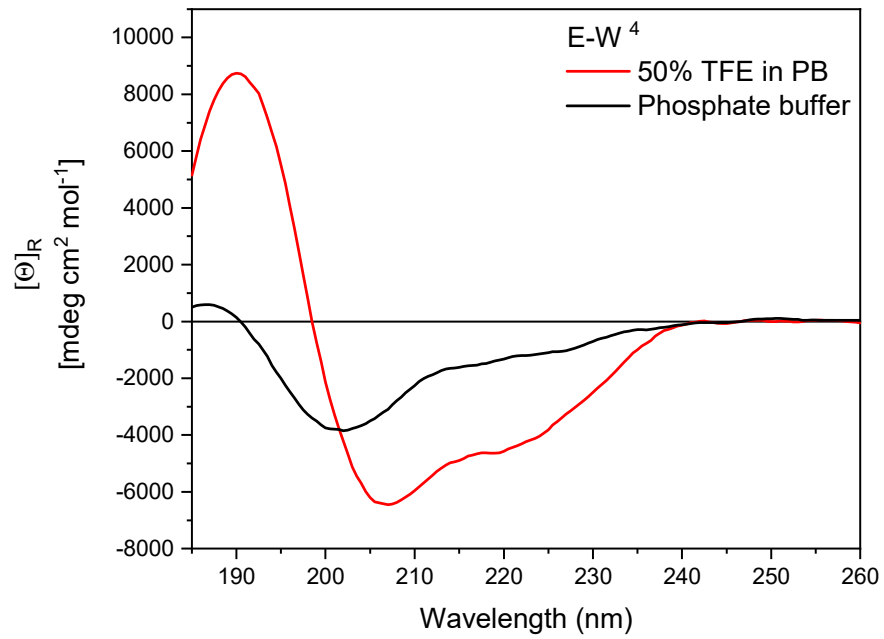


Figura 43 - Spettro CD del peptide E-W⁴ in soluzione acquosa e in presenza di 50% TFE.

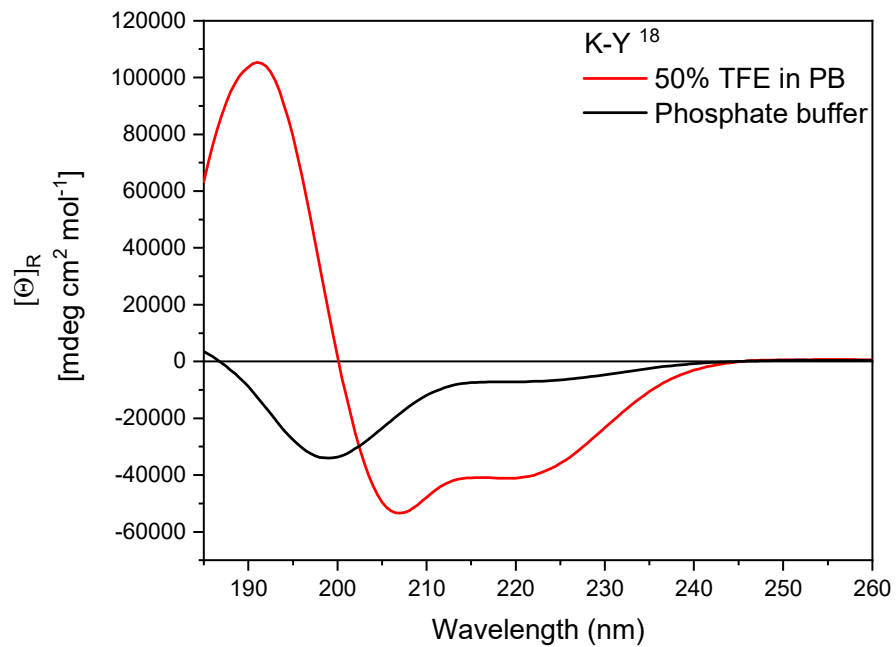


Figura 43 - Spettro CD del peptide K-Y¹⁸ in soluzione acquosa e in presenza di 50% TFE.

Con l'aggiunta di trifluoroetano alla soluzione acquosa, un solvente organico utilizzato per mimare l'ambiente idrofobico indotto delle membrane cellulari con la proprietà di stabilizzare le strutture in α -elica [32], si osserva una notevole variazione negli spettri dicroici descritti in precedenza (figure 42 e 43).

Mentre in presenza del residuo di TOAC si ha un aumento dell'intensità delle bande precedentemente descritte, ad indicare un aumento nel contenuto in α -elica nella struttura secondaria (tabella 3), nel caso degli spettri CD dei peptidi E-W⁴ e K-Y¹⁸ si osserva una conversione conformazionale da una struttura non ordinata alla struttura in elica (figure 42,43 e tabella 3).

Tabella 3 - Costituzione in % della struttura secondaria dei peptidi K-T⁴, E-T¹⁸, K-T^{4,18}, E-W⁴ e K-Y¹⁸ in presenza di TFE 50%.

Peptide	α -helics	β -sheet	Other
K-T ⁴	93%	0%	7%
K-T ^{4,18}	92%	0%	8%
E-T ¹⁸	93%	0%	7%
E-W ⁴	95%	0%	5%
K-Y ¹⁸	93%	0%	7%

Al fine di studiare l'effetto del TFE sulla struttura secondaria dei peptidi analizzati si è provveduto a titolare la soluzione acquosa di ciascun peptide con quantità crescenti di TFE. I risultati ottenuti sono riportati nelle figure 44, 45, 46 e 47.

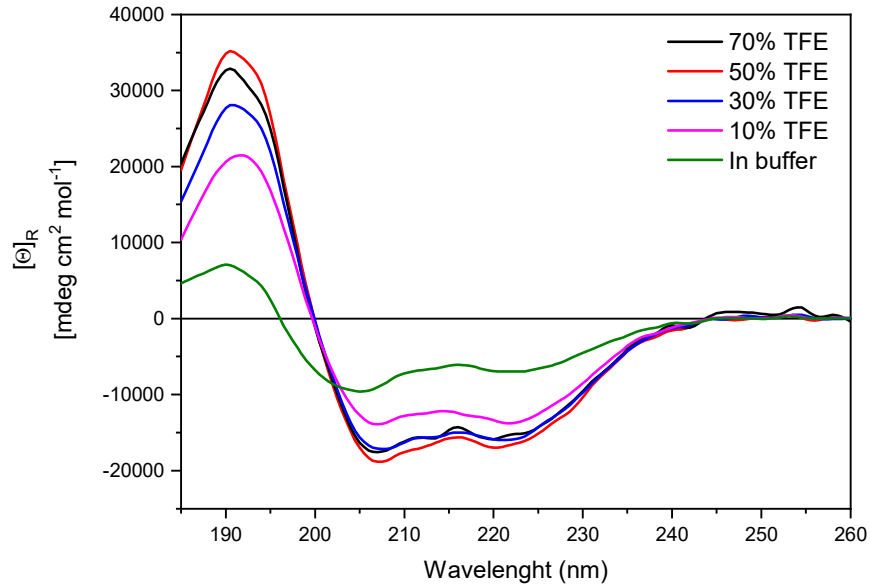


Figura 44 - Spettro CD del peptide $K-T^4$ in presenza di TFE a varie concentrazioni.

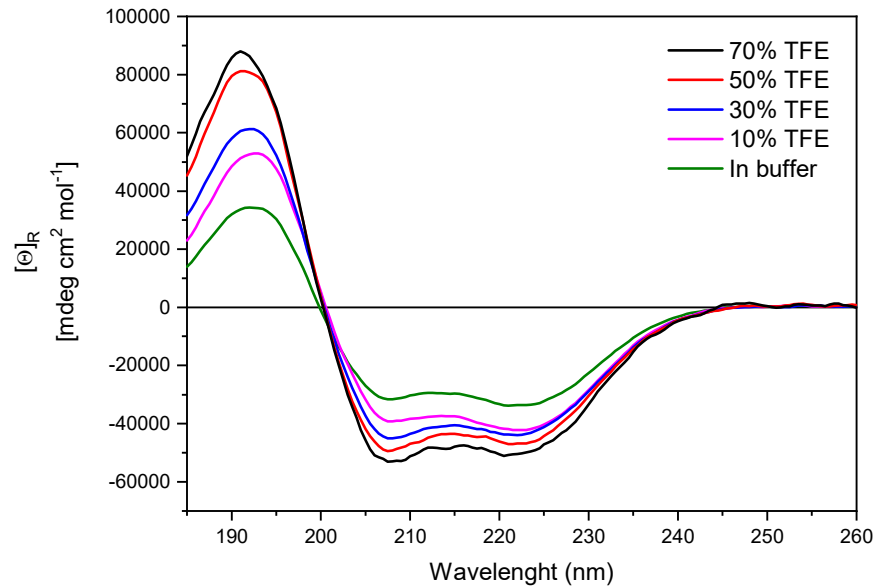


Figura 45 - Spettro CD del peptide $K-T^{4,18}$ in presenza di TFE a varie concentrazioni.

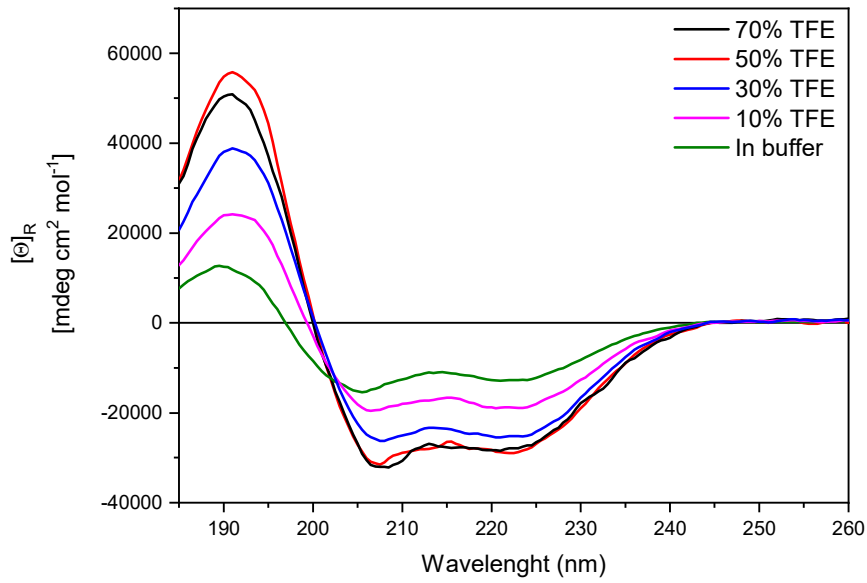


Figura 46 - Spettro CD del peptide E-T¹⁸ in presenza di TFE a varie concentrazioni.

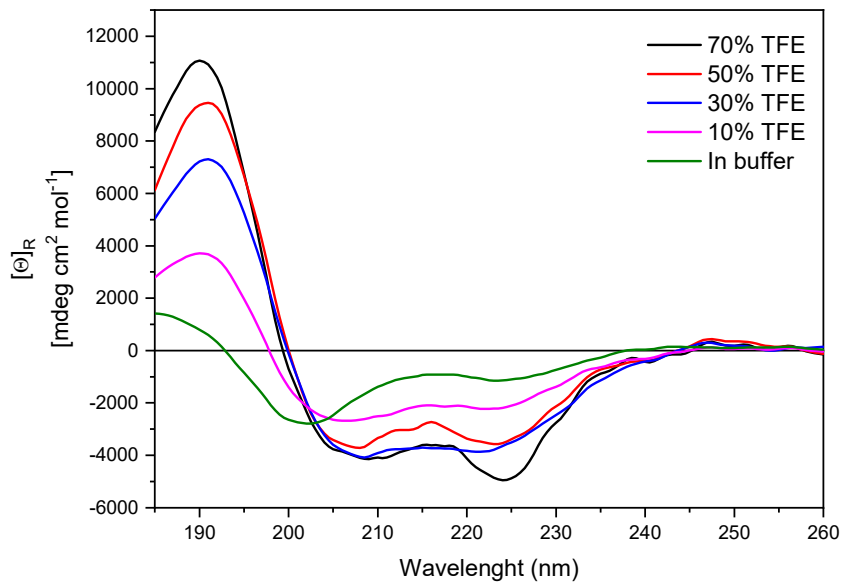


Figura 47 - Spettro CD del peptide E-W⁴ in presenza di TFE a varie concentrazioni.

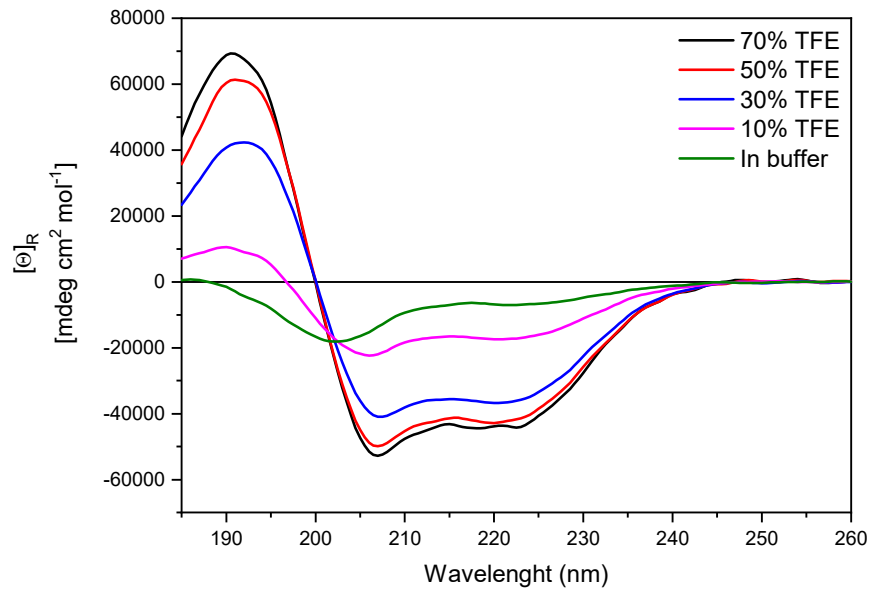


Figura 48 - Spettro CD del peptide K-Y¹⁸ in presenza di TFE a varie concentrazioni.

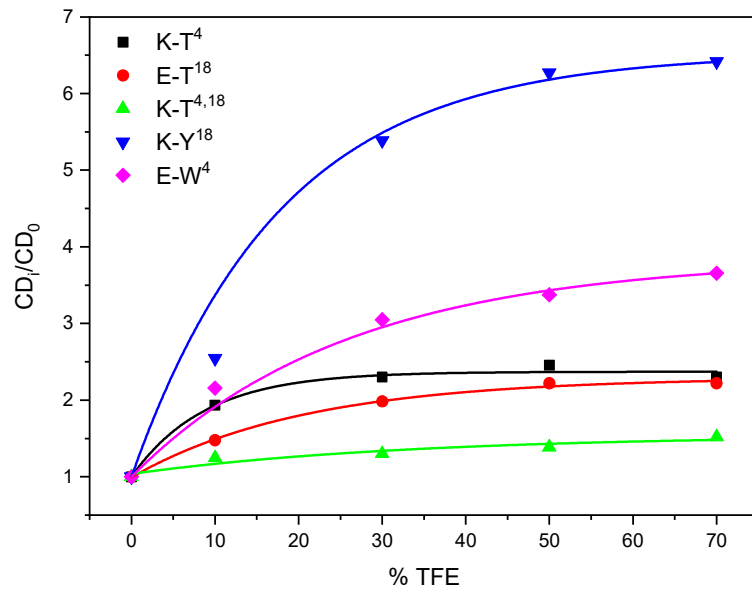


Figura 49 – Variazione relativa di ellitticità in funzione della % di TFE per ciascun peptide indicato in legenda.

Si è quindi provveduto a studiare la struttura molecolare dei diversi peptidi in ambiente membrano mimetico costituito da SUVs di DMPC/DMPG 3:1.

Come mostrato in figura 50, lo spettro dicroico dei diversi peptidi oggetto di questa tesi in presenza di SUVs per DMPC/DMPG è caratterizzato da una maggiore intensità della banda a 222 nm rispetto agli spettri registrati in presenza di TFE. L'analisi del contenuto in struttura secondaria (tabella 4) evidenzia un decremento nel contenuto in α -elica e la presenza di strutture in β -sheet molto probabilmente causata dalle interazioni tra le teste polari dei fosfolipidi che compongono le SUVs (small unilamellar vesicles) e le catene laterali dei residui di lisina e/o acido glutammico dei peptidi che favoriscono l'impacchettamento degli stessi sulla loro superficie formando strutture in β -sheet.

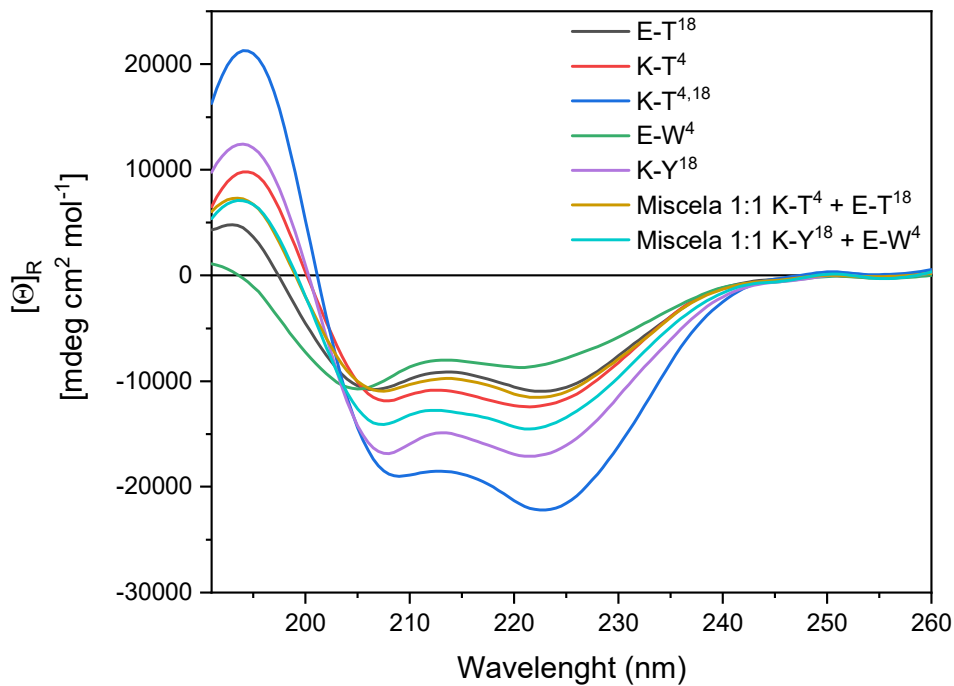


Figura 50 - Spettri CD dei peptidi $K-T^4$, $E-T^{18}$, $K-T^{4,18}$, $E-W^4$ e $K-Y^{18}$ in presenza di DMPC/DMPG.

Tabella 4 - Costituzione % della struttura secondaria dei peptidi K-T⁴, E-T¹⁸, K-T^{4,18}, E-W⁴ e K-Y¹⁸ in presenza di DMPC/DMPG.

Peptide	α -helics	β -sheet	Other
K-T ⁴	18%	20%	62%
K-T ^{4,18}	32%	15%	53%
E-T ¹⁸	8%	16%	76%
E-W ⁴	5%	13%	82%
K-Y ¹⁸	25%	14%	61%

Al fine di valutare la capacità di interagire dei peptidi sintetizzati in questo lavoro di tesi con i peptidi ricchi in residui di acido glutammico, oggetto di un precedente lavoro di tesi, sono stati condotti studi di dicroismo circolare in presenza di una miscela 1:1 dei peptidi K-T⁴ E-T¹⁸ e K-Y¹⁸ E-W⁴ sia in soluzione acquosa che in ambiente membrano mimetico.

Il confronto tra lo spettro dicroico registrato sperimentalmente per le due miscele peptidiche con quello determinato come somma dei singoli contributi di ciascun peptide permette di affermare la presenza di interazioni tra i componenti delle miscele. Interazioni che nel caso della coppia K-Y¹⁸/E-W⁴ (figura 52) non sono in grado di indurre una struttura ordinata in soluzione acquosa ma che rimangono pur presenti.

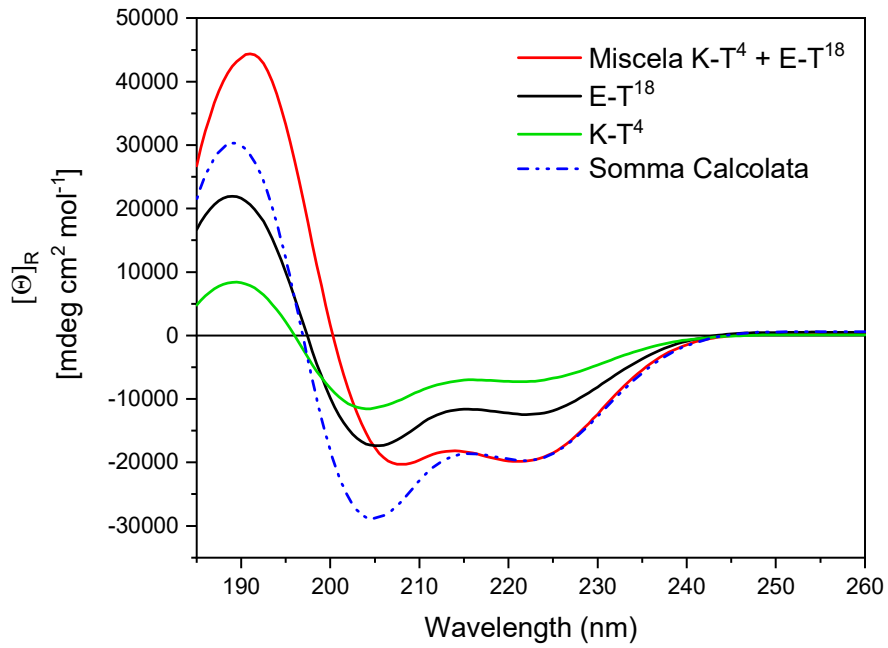


Figura 51 – Spettro CD dei peptidi $K-T^4$, $E-T^{18}$ e loro miscela in soluzione acquosa. Tratteggiato lo spettro calcolato come somma dei singoli contributi.

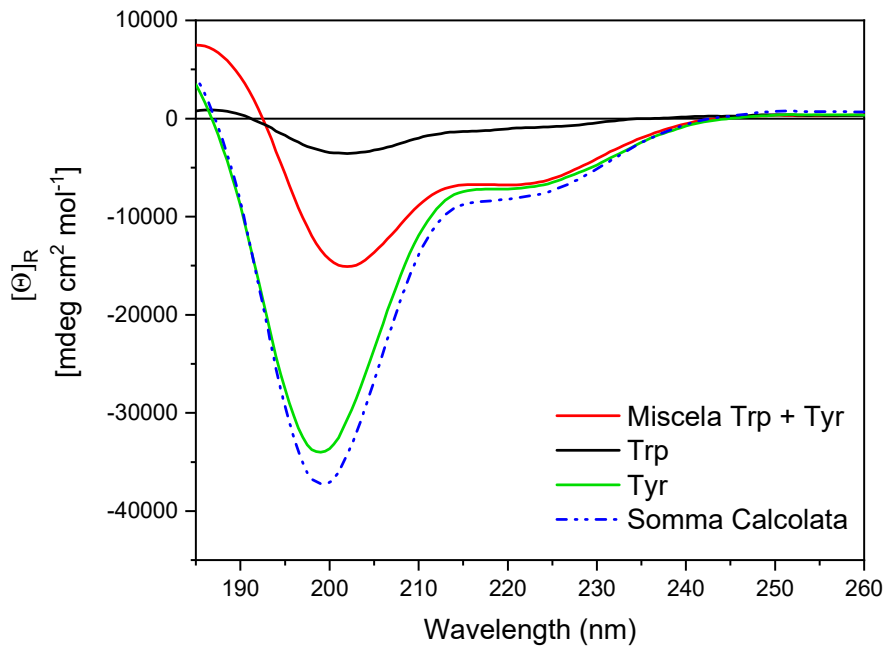


Figura 52 – Spettro CD dei peptidi $K-Y^{18}$, $E-W^4$ e loro miscela in soluzione acquosa. Tratteggiato lo spettro calcolato come somma dei singoli contributi.

Gli spettri dicroici delle coppie K-T⁴/E-T¹⁸ in soluzione acquosa (figura 51) e di entrambe le coppie di peptidi in presenza di SUVs (figure 53 e 54) si osserva un incremento nell'intensità della banda negativa a 222 nm rispetto ai singoli spettri dicroici.

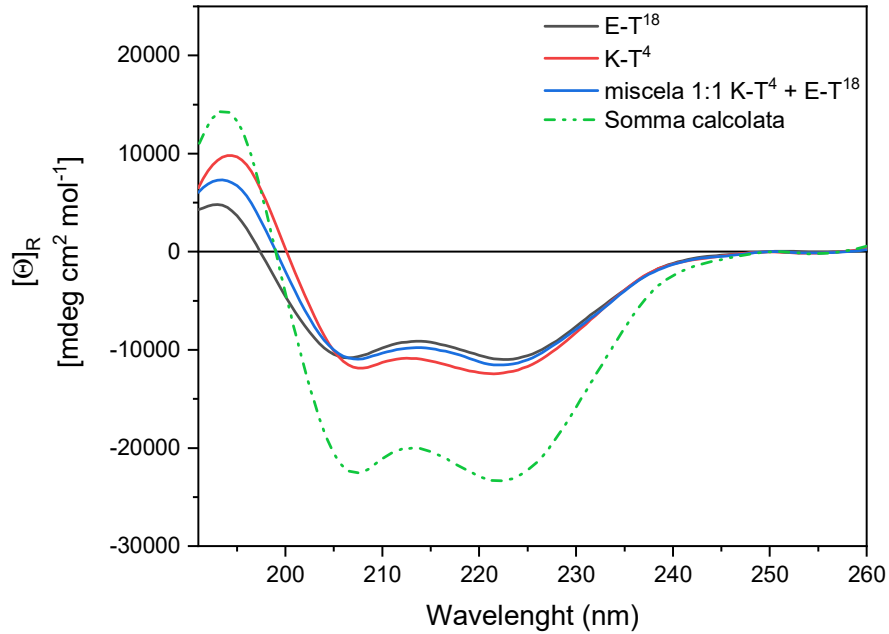


Figura 53 – Spettro CD dei peptidi K-T⁴, E-T¹⁸ e loro miscela in presenza di DMPC/DMPG. Tratteggiato lo spettro calcolato come somma dei singoli contributi.

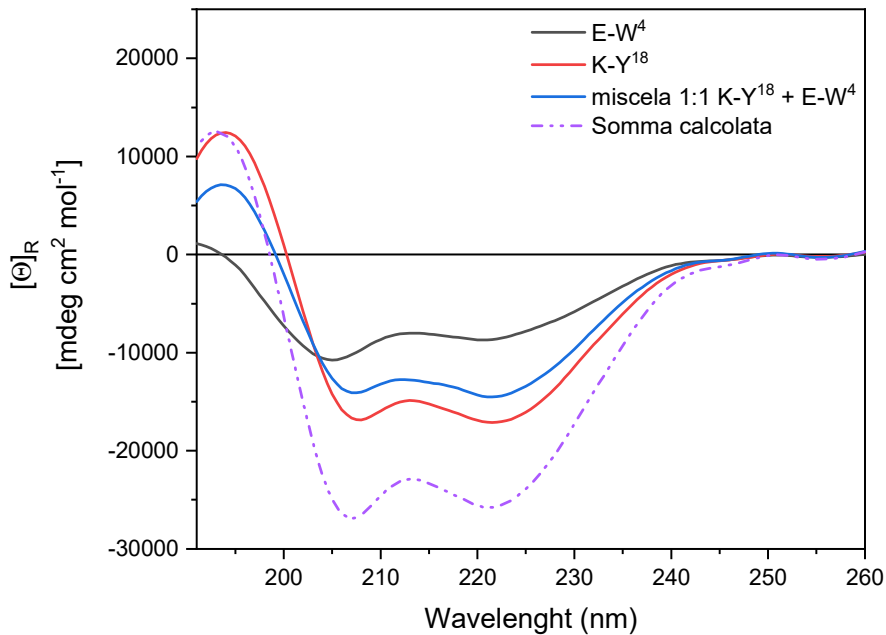


Figura 54 - Spettro CD dei peptidi K-Y¹⁸, E-W⁴ e loro miscela in presenza di DMPC/DMPG. Tratteggiato lo spettro calcolato come somma dei singoli contributi.

Il rapporto tra le intensità delle bande dicroiche a 222 e 208 nm può essere assunto come indice della presenza di strutture coiled-coil. Infatti mentre la banda CD a 222 nm è principalmente indicativa della presenza di struttura in α -elica, la banda a 208 nm è indice della presenza di una struttura in α -elica in forma monomerica o coinvolta in interazioni con altre eliche [46].

È stato proposto che un rapporto $[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$ inferiore a 0,8 è indicativo di una struttura in α -elica monomerica, mentre un rapporto di circa 1,0 è indicativo di una struttura coiled-coil. I valori di questo rapporto determinati per le coppie da noi studiati sono riportati in tabella 5 e confermano la capacità di questi peptidi di formare strutture coiled-coil.

Tabella 5 - Rapporti 222/208 nm per ogni coppia di peptidi

Medium	Peptide	$[\theta]_{222}$	$[\theta]_{208}$	$[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$
Soluzione acquosa	K-T ⁴ /E-T ¹⁸	-19782	-20314	0,97
	K-Y ¹⁸ /E-W ⁴	-6670	-10774	n.c.*
SUV	K-T ⁴ /E-T ¹⁸	-11545	-10898	1,1
	K-Y ¹⁸ /E-W ⁴	-14480	-14014	1,0

*non calcolato in quanto non assume una struttura in elica.

4. CONCLUSIONI

La sintesi su fase solida ha permesso di ottenere una serie di peptidi contenenti al loro interno l'amminoacido TOAC caratterizzato dalla presenza di un radicale nitrossido e da una struttura C^α-tetrasostituita. Il trattamento con ammoniaca, al fine di ottenere un ambiente basico a pH circa 8-9, dopo il distacco dei peptidi dalla resina con la concomitante rimozione dei gruppi protettori in catena laterale ha permesso di ripristinare quasi totalmente il radicale nitrossido, instabile in condizioni acide.

Questo trattamento si è reso necessario anche dopo la purificazione mediante RP-HPLC in quanto le condizioni acide di eluizione hanno compromesso l'integrità del radicale TOAC.

Le rese non eclatanti sono frutto di questi successivi trattamenti che non permettono un ripristino completo della funzione radicalica; inoltre l'ottimizzazione delle condizioni di reazione ha richiesto un ingente consumo di materiale di partenza, con conseguente riduzione delle quantità di prodotto finale ottenibile.

La presenza nel prodotto finale del radicale nitrossido è stata confermata mediante spettroscopia EPR, mentre studi preliminari sulla struttura secondaria dei peptidi sintetizzati e sulla loro capacità di formare strutture coiled-coil sono stati condotti utilizzando la spettroscopia CD. I risultati ottenuti hanno confermato la capacità dei peptidi ricchi di residui di lisina di interagire con i peptidi ricchi di residui di acido glutammico formando strutture coiled-coil.

I peptidi sintetizzati saranno ora inviati ai gruppi di ricerca che collaborano in questo progetto al fine di condurre gli studi EPR sulle interazioni peptidiche e sull'orientamento dei peptidi stessi all'interno della struttura coiled-coil.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Reagenti e solventi

I materiali impiegati nella sintesi e nella successiva purificazione dei peptidi sono stati acquistati dalle seguenti aziende:

Sigma-Aldrich S.r.l. (Milano, IT): dietilere, diclorometano, triisopropilsilano (TIS), acido trifluoroacetico (TFA), piperidina, piperazina, acido acetico, dimetilformamide (DMF).

Iris biotech (Marktredwitz, Germania): amminoacidi protetti e la resina Rink amide MBHA.

Carlo Erba (Milano, IT): metanolo, anidride acetica, soluzione di ammoniaca, acetoneitrile;

L'acqua utilizzata per le diverse preparazioni è stata ottenuta mediante filtrazione con un sistema MilliQ Millipore (Billerica, MA, USA).

Tutte le pesate sono state eseguite utilizzando una bilancia Mettler AE 240 (Columbus, Ohio, USA) e una bilancia Mettler AT21 Comparator.

5.2 Sintesi peptidica su fase solida

La sintesi peptidica su fase solida è stata eseguita utilizzando la chimica Fmoc/HBTU utilizzando un eccesso dei reattivi (3eq.). Ciò è stato fatto sia nella sintesi su fase solida manuale, attraverso l'utilizzo di siringhe di plastica per estrazione su fase solida con all'interno un filtro poroso e dotate di tappi alle estremità per la chiusura, sia nella sintesi automatizzata che è stata eseguita mediante sintetizzatore Biotage® Syro Wave™ della Biotage AB (Svezia) controllato da software "SyroXP peptide" (Figura 55).

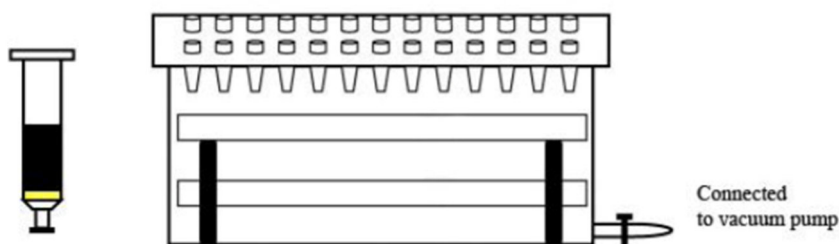


Figura 55 - Strumentazione SPPS: siringa in plastica per estrazione su fase solida (sinistra); collettore di aspirazione (destra)

5.3 Acetilazione del gruppo N-terminale

La reazione di acetilazione è stata eseguita mediante trattamento del peptide su resina con una soluzione di anidride acetica 5% e 2% di DIPEA in DMF. Ciascun peptide ha subito due trattamenti consecutivi da 1 ora. Al termine di ciascun passaggio la resina è stata lavata con DMF per rimuovere i sottoprodotti di reazione.

5.3 Sblocco dei peptidi dalla resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale

Il distacco del peptide dalla resina e la rimozione dei gruppi protettori presenti nelle catene laterali dei singoli amminoacidi sono avvenuti contemporaneamente utilizzando una soluzione al 95% di TFA in presenza di TIS (3%) e acqua (2%) quali scavenger. Tale reazione è stata lasciata decorrere per circa 2 ore a temperatura ambiente. Il TFA è quindi allontanato mediante flusso di N_2 ed il residuo è disciolto in una soluzione 2M di NH_4OH ; dopo 3 h a temperatura ambiente la soluzione è filtrata su filtri di nylon 0.45 μm e liofilizzata.

5.4 Purificazione e caratterizzazione dei prodotti

HPLC analitico è stato condotto utilizzando un sistema analitico Shimadzu (Kyoto, Japan) composto da due pompe LC-10AD VP, controller SCL-10A VP, rivelatore SPD-10A Shimadzu UV-Vis, degassatore Gastorr 154 e auto iniettore SIL-9A Shimadzu. Il software utilizzato per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati è ChromNav (Jasco LC-NetII/ADC, Japan). Le eluizioni sono state eseguite impiegando una colonna Jupiter C18, 300 Å, 10 µm, 250 x 4.60 mm.

L'eluizione è avvenuta attraverso un gradiente lineare binario utilizzando i seguenti eluenti: (A) 0,05% TFA in acqua, (B) 0,05% TFA in 9:1 v/v CH₃CN/H₂O.

La purificazione dei peptidi è stata condotta con HPLC preparativo Shimadzu composto da due pompe LC-8A, controller system SCL-8A, rivelatore spettrofotometrico UV SPD-6A, degassatore ERMA modello ERC-3562 e registratore. Tutte le separazioni sono state condotte utilizzando una colonna VYDAC C18, 300 Å, 10 µm, 250 x 22 mm. L'eluizione è stata eseguita mediante gradiente lineare binario impiegando gli stessi eluenti descritti in precedenza.

Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono aggiunte di ammoniaca, liofilizzate ed eluite su una colonna semipreparativa Jupiter C18, 300 Å, 10 µm, 250 x 10 mm utilizzando un gradiente lineare binario: (A) H₂O; (B) CH₃CN.

Le analisi di massa sono state effettuate tramite l'utilizzo di un sistema Agilent Technologies 1260 Infinity II equipaggiato con analizzatore LC/MS Quadrupolo 6130, con un sistema ESI di ionizzazione.

5.5 Sintesi del peptide K-T⁴



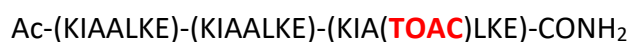
200 mg di resina Fmoc Rink-Amide MBHA (loading 0.65 mmoli/g, mmoli 0.13) sono inseriti all'interno di una siringa per estrazione su fase solida con filtro poroso posto al suo interno e rigonfiati in DMF per 30 minuti. Il gruppo Fmoc è quindi rimosso per trattamento con una soluzione di piperazina al 20% v/v in DMF in presenza di 5% di DBU. Separatamente 3 eq. dell'amminoacido da condensare sono sciolti in DMF ed

aggiunti a 3 eq. di HBTU, 3 eq. di HOBt e 6 eq. DIPEA. Dopo 5 minuti tale soluzione è trasferita all'interno della siringa contenente la resina e la reazione di condensazione è lasciata decorrere per 45 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione.

La miscela di reazione è allontanata per filtrazione e la resina lavata con DMF. Si procede quindi alla rimozione del gruppo Fmoc e dell'amminoacido condensato, secondo quanto precedentemente descritto, per poi procedere all'attivazione e condensazione del residuo successivo. Queste operazioni sono quindi replicate per tutti i residui da condensare fino all'inserimento del residuo di Leu in posizione 5. La successiva condensazione del residuo di TOAC e dei rimanenti residui amminoacidici è condotta utilizzando 3 eq. di HATU in sostituzione dell'HBTU e dell'HOBt sempre in presenza di 6 eq. di DIPEA.

Dopo rimozione del gruppo Fmoc dal residuo N-terminale si procede all'acetilazione della funzione amminica mediante una soluzione di Ac₂O (470 ml) in DMF in presenza di DIPEA (230 ml). 5 ml di questa soluzione sono aggiunti alla resina e la reazione è lasciata decorrere per 1 h, dopo allontanamento della soluzione esausta la reazione è riportata nelle medesime condizioni per altre due volte. Il peptide è rimosso e contemporaneamente alla rimozione delle protezioni in catena laterale per trattamento con una soluzione di TFA (95%) TIS (3%) e H₂O (2%) operando come descritto nella parte generale.

5.6 Sintesi del peptide K-T¹⁸



200 mg di resina Fmoc Rink-Amide MBHA (loading 0.65 mmoli/g, mmoli 0.13) sono rigonfiati in DMF per circa 30 min in una siringa per estrazione su fase solida. La condensazione dei residui di Glu²¹, Lys²⁰ e Leu¹⁹ si realizza come descritto in precedenza, così pure la condensazione dei residui di TOAC¹⁸, Ala¹⁷, Ile¹⁶ e Lys¹⁵ avviene utilizzando il reattivo HATU in sostituzione all'HOBt e HBTU nelle condizioni descritte. I rimanenti residui sono condensati tramite l'impiego di un sintetizzatore automatico utilizzando la chimica HBTU/HOBt. Al termine della sintesi il prodotto è acetilato e lavorato come descritto in precedenza.

5.8 Sintesi del peptide K-Y¹⁸



La sintesi di questo peptide è avvenuta manualmente utilizzando i classici reattivi di coupling (HOBt e HBTU).

200 mg di resina Fmoc Rink-Amide MBHA (loading 0.65 mmol/g, 0.13 mmol) sono rigonfiati con DMF e i diversi residui sono condensati ripetendo ciclicamente le operazioni descritte in precedenza sino ad ottenere il prodotto desiderato.

5.9 Dicroismo Circolare ed EPR

La registrazione degli spettri CD è avvenuta grazie ad un dicrografo Jasco J1500, collegato ad un PC per l'acquisizione dei dati, utilizzando il software J1500 CD Spectra Manager.

Tutti gli spettri CD sono stati registrati nell'intervallo 185-260 nm, data pitch 1 nm, velocità di scansione 50 nm/min, response 2 sec, band width 1 nm. Mediamente sono state effettuate 4 scansioni utilizzando una cella in quarzo con cammino ottico 0.1 cm (Hellma Analytics, Milano) e i dati ottenuti dagli spettri sono stati elaborati utilizzando il programma OriginPro 8.5.

La determinazione della struttura secondaria dei peptidi coil E, K e le loro miscele sono state effettuate preparando prima una soluzione madre del peptide da esaminare. La concentrazione della soluzione madre era di 1 mg/mL in acqua. Da questa, in seguito, sono state preparate le soluzioni impiegate per le analisi CD con concentrazione 0.1 mg/mL. La cuvetta impiegata nell'analisi aveva dimensioni di 1 mm e costituita da quarzo. I solventi impiegati nella preparazione delle soluzioni diluite sono stati una soluzione di tampone fosfato 10 mM pH 7,0 e TFE a varie percentuali (10%, 30%, 50% e 70%) in acqua. Inoltre, i peptidi sono stati analizzati anche in soluzione di fosfolipidi e anche su strato solido di questi ultimi.

L'analisi EPR è stata condotta utilizzando uno spettrometro ad onda continua Bruker Elexys banda x, cavità dielettrica. Per tutti i peptidi si sono registrati gli spettri in una soluzione peptidica in H₂O a temperatura ambiente (295 K).

6. BIBLIOGRAFIA

1. Nelson, D. L.; Cox, M. M., *I principi di biochimica di Lehninger*. 2010; Vol. 3.
2. Mason, J. M.; Arndt, K. M., Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications. *ChemBioChem* **2004**, 5, (2), 170-176.
3. Grigoryan, G.; Keating, A. E., Structural specificity in coiled-coil interactions. *Current opinion in structural biology* **2008**, 18, (4), 477-83.
4. Astbury, W. T., The fourth Spiers memorial lecture. X-ray adventures among the proteins. *Transactions of the Faraday Society* **1938**, 34, (0), 378-388.
5. Crick, F. H. C., The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallographica* **1953**, 6, (8-9), 689-697.
6. Lupas, A. N.; Bessler, J., Coiled Coils – A Model System for the 21st Century. *Trends in Biochemical Sciences* **2017**, 42, (2), 130-140.
7. Lupas, A. N.; Bessler, J.; Dunin-Horkawicz, S., The Structure and Topology of α -Helical Coiled Coils. *Sub-cellular biochemistry* **2017**, 82, 95-129.
8. Vella, F., Introduction to protein structure. By C Branden and J Tooze. pp 302. garland publishing, New York. 1991 ISBN 0–8513–0270–3 (pbk). *Biochemical Education* **1992**, 20, (2), 121-122.
9. Lau, S. Y.; Taneja, A. K.; Hodges, R. S., Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *The Journal of biological chemistry* **1984**, 259, (21), 13253-61.
10. Kohn, W. D.; Kay, C. M.; Hodges, R. S., Protein destabilization by electrostatic repulsions in the two-stranded alpha-helical coiled-coil/leucine zipper. *Protein science : a publication of the Protein Society* **1995**, 4, (2), 237-50.
11. Hulko, M.; Berndt, F.; Gruber, M.; Linder, J. U.; Truffault, V.; Schultz, A.; Martin, J.; Schultz, J. E.; Lupas, A. N.; Coles, M., The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* **2006**, 126, (5), 929-40.
12. Gernert, K. M.; Surles, M. C.; Labean, T. H.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C., The Alacoil: a very tight, antiparallel coiled-coil of helices. *Protein science : a publication of the Protein Society* **1995**, 4, (11), 2252-2260.
13. Lupas, A. N.; Gruber, M., The structure of alpha-helical coiled coils. *Advances in protein chemistry* **2005**, 70, 37-78.

14. Brown, J. H.; Cohen, C.; Parry, D. A., Heptad breaks in alpha-helical coiled coils: stutters and stammers. *Proteins* **1996**, 26, (2), 134-45.
15. Burkhard, P.; Stetefeld, J.; Strelkov, S. V., Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in cell biology* **2001**, 11, (2), 82-8.
16. Harbury, P. B.; Kim, P. S.; Alber, T., Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer. *Nature* **1994**, 371, (6492), 80-3.
17. Harbury, P. B.; Zhang, T.; Kim, P. S.; Alber, T., A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science (New York, N.Y.)* **1993**, 262, (5138), 1401-7.
18. Apostolovic, B.; Klok, H. A., pH-sensitivity of the E3/K3 heterodimeric coiled coil. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (11), 3173-80.
19. Litowski, J. R.; Hodges, R. S., Designing Heterodimeric Two-stranded α -Helical Coiled-coils: EFFECTS OF HYDROPHOBICITY AND α -HELICAL PROPENSITY ON PROTEIN FOLDING, STABILITY, AND SPECIFICITY*. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, (40), 37272-37279.
20. Marsden, H. R.; Korobko, A. V.; van Leeuwen, E. N. M.; Pouget, E. M.; Veen, S. J.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Kros, A., Noncovalent Triblock Copolymers Based on a Coiled-Coil Peptide Motif. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, (29), 9386-9393.
21. Kumar, P.; van Son, M.; Zheng, T.; Valdink, D.; Raap, J.; Kros, A.; Huber, M., Coiled-coil formation of the membrane-fusion K/E peptides viewed by electron paramagnetic resonance. *PLOS ONE* **2018**, 13, (1), e0191197.
22. Margittai, M.; Fasshauer, D.; Pabst, S.; Jahn, R.; Langen, R., Homo- and Heterooligomeric SNARE Complexes Studied by Site-directed Spin Labeling*. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, (16), 13169-13177.
23. Tang, B. L., SNAREs and developmental disorders. *Journal of cellular physiology* **2021**, 236, (4), 2482-2504.
24. Delehedde, M.; Seve, M.; Sergeant, N.; Wartelle, I.; Lyon, M.; Rudland, P. S.; Fernig, D. G., Fibroblast growth factor-2 stimulation of p42/44MAPK phosphorylation and I κ B degradation is regulated by heparan sulfate/heparin in rat mammary fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* **2000**, 275, (43), 33905-10.
25. Rabe, M.; Aisenbrey, C.; Pluhackova, K.; de Wert, V.; Boyle, Aimee L.; Bruggeman, Didjay F.; Kirsch, Sonja A.; Böckmann, Rainer A.; Kros, A.; Raap, J.; Bechinger, B., A Coiled-Coil Peptide Shaping Lipid Bilayers upon Fusion. *Biophysical Journal* **2016**, 111, (10), 2162-2175.

26. Holopainen, J. M.; Lehtonen, J. Y.; Kinnunen, P. K., Evidence for the extended phospholipid conformation in membrane fusion and hemifusion. *Biophysical journal* **1999**, 76, (4), 2111-2120.
27. Kasson, P. M.; Lindahl, E.; Pande, V. S., Atomic-resolution simulations predict a transition state for vesicle fusion defined by contact of a few lipid tails. *PLoS Comput Biol* **2010**, 6, (6), e1000829-e1000829.
28. Larsson, P.; Kasson, P. M., Lipid tail protrusion in simulations predicts fusogenic activity of influenza fusion peptide mutants and conformational models. *PLoS Comput Biol* **2013**, 9, (3), e1002950-e1002950.
29. Smirnova, Y. G.; Marrink, S.-J.; Lipowsky, R.; Knecht, V., Solvent-Exposed Tails as Prestalk Transition States for Membrane Fusion at Low Hydration. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, (19), 6710-6718.
30. Schreier, S.; Bozelli, J. C., Jr.; Marín, N.; Vieira, R. F.; Nakaie, C. R., The spin label amino acid TOAC and its uses in studies of peptides: chemical, physicochemical, spectroscopic, and conformational aspects. *Biophysical reviews* **2012**, 4, (1), 45-66.
31. Flippen-Anderson, J. L.; George, C.; Valle, G.; Valente, E.; Bianco, A.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C., Crystallographic characterization of geometry and conformation of TOAC, a nitroxide spin-labelled C alpha,alpha-disubstituted glycine, in simple derivatives and model peptides. *International journal of peptide and protein research* **1996**, 47, (4), 231-8.
32. Bui, T. T. T.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Monaco, V.; Toniolo, C.; Hussain, R.; Siligardi, G., TOAC: a useful C α -tetrasubstituted α -amino acid for peptide conformational analysis by CD spectroscopy in the visible region. Part I. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2000**, (5), 1043-1046.
33. Toniolo, C.; Valente, E.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Pilloni, G.; Corvaja, C.; Toffoletti, A.; Martinez, G. V.; Hanson, M. P.; Millhauser, G. L.; George, C.; Flippen-Anderson, J. L., Synthesis and conformational studies of peptides containing TOAC, a spin-labelled C α , α -disubstituted glycine. *Journal of Peptide Science* **1995**, 1, (1), 45-57.
34. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, (14), 2149-2154.
35. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/ra/c4ra02458c> .
36. Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M., Reinvestigation of the mixed carbonic anhydride method of peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, 89, (19), 5012-5017.
37. <http://www.anaspec.com/products/product.asp?id=38759>.

38. Ralhan, K.; KrishnaKumar, V. G.; Gupta, S., Piperazine and DBU: a safer alternative for rapid and efficient Fmoc deprotection in solid phase peptide synthesis. *RSC Advances* **2015**, 5, (126), 104417-104425.
39. Carpino, L.; Han, G., The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *The Journal of Organic Chemistry* **1979**, 44, (21), 3739-3739.
40. Sheppeck, J. E.; Kar, H.; Hong, H., A convenient and scaleable procedure for removing the Fmoc group in solution. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, (28), 5329-5333.
41. Chan, W.; White, P., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford, 1999.
42. Getahun, Z.; Huang, C.-Y.; Wang, T.; De León, B.; DeGrado, W. F.; Gai, F., Using Nitrile-Derivatized Amino Acids as Infrared Probes of Local Environment. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (2), 405-411.
43. Crisma, M.; Valle, G.; Moretto, V.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Albericio, F., Reactive intermediates in peptide synthesis: Molecular and crystal structures of HOAt and HOObt, and some ester and amide derivatives of HOBt, HOAt and HOObt. *Letters in Peptide Science* **1998**, 5, (4), 247-258.
44. Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F., Understanding α -amino acid chemistry from X-ray diffraction structures. *Peptide Science* **1996**, 40, (6), 627-651.
45. Martin, L.; Vita, C.; Ivancich, A.; Formaggio, F.; Toniolo, C., Solid-phase synthesis of peptides containing the spin-labeled 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid (TOAC). *The Journal of Peptide Research* **2001**, 58, (5), 424-432.
46. Cànaves, J. M.; Montal, M., Assembly of a Ternary Complex by the Predicted Minimal Coiled-coil-forming Domains of Syntaxin, SNAP-25, and Synaptobrevin: A CIRCULAR DICHROISM STUDY*. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273, (51), 34214-34221.