

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Ingegneria

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Dipartimento di Ingegneria Industriale

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA INDUSTRIALE

Analoghi di peptidi del Quorum Sensing per il Quorum Quenching nelle infezioni dentali

Relatore: *Prof.ssa Monica Dettin*

Correlatore: *Prof.ssa Paola Brun*

Correlatore: *Dott. Francesco Tolomei*

Laureanda: *Chiara Marcolungo*

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Data di Laurea 05/09/2023

ABSTRACT

Il sistema digerente umano ospita varie colonie batteriche complesse e dinamiche che variano per composizione e funzione metabolica. Tuttavia, alcuni ceppi sono anche responsabili di patologie, come il batterio Gram-positivo *Streptococcus mutans*, che è causa di alcune delle più comuni malattie della cavità orale. Inoltre, un uso inadeguato degli antibiotici ha portato all'aumento di ceppi resistenti agli antibiotici, che ha reso necessario lo studio di strategie alternative di controllo attraverso la conoscenza del sistema che questi batteri utilizzano per comunicare fra di loro, detto *Quorum Sensing* (QS). Il QS prevede la produzione, il rilascio e il successivo rilevamento di molecole segnale da parte dei batteri quando queste raggiungono una certa soglia di concentrazione. L'interferenza con il QS prende il nome di *Quorum Quenching* (QQ), un approccio terapeutico diverso, che è in grado di controllare la colonizzazione batterica senza causare i problemi di resistenza che si osservano con gli antibiotici perché non uccide i batteri, ma attenua la loro virulenza. Le molecole segnale sono classificate in base alla tipologia di batterio considerato e per i batteri Gram – positivi sono peptidi chiamati *autoinducer* (AI). In particolare, lo *Streptococcus mutans* secerne un AI di 21 amminoacidi noto come *Competence Stimulating Peptide* o 21 – CSP, che viene in seguito modificato da una proteasi di membrana (SepM) in una forma attivata di 18 amminoacidi (18 – CSP). Lo scopo della tesi è di studiare alcuni analoghi del 21 – CSP, eseguendo delle modifiche sulla sequenza nativa, per investigarne gli effetti nel sistema di QS dello *Streptococcus mutans* e trovare un approccio terapeutico efficace. Gli analoghi peptidici degli *autoinducer* potrebbero essere utilizzati nella formulazione di biomateriali innovativi in grado di contrastare la formazione di biofilm batterici.

SOMMARIO

INTRODUZIONE	1
1.1 <i>Streptococcus mutans</i>	2
1.1.1 Metabolismo dei carboidrati	3
1.2 Biofilm.....	4
1.2.1 Formazione di Biofilm	5
1.2.2 Tolleranza e resistenza agli antibiotici	6
1.3 Quorum Sensing	7
1.3.1 Quorum Sensing: batteri Gram – negativi	8
1.3.2 Quorum Sensing: batteri Gram – positivi.....	9
1.3.3 Quorum Sensing: <i>Streptococcus mutans</i>	9
1.4 Quorum Quenching	11
1.5 Relazione struttura – attività del CSP	12
1.6 Relazione struttura – attività del XIP.....	15
1.7 Scopo della tesi.....	16
 MATERIALI E METODI.....	 19
2.1 Materiali.....	19
2.1.1 Peptidi	20
2.2 Strumenti.....	21
2.3 Metodi.....	24
2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida	24
2.3.2 Test alla Ninidrina	26
2.3.3 Deprotezione delle catene laterali e sblocco dalla resina	28
2.3.4 Cromatografia HPLC.....	29
2.3.5 Spettrometria di massa.....	29
2.4 Saggi Biologici	30
2.4.1 Curve di Crescita	30
2.4.2 Saggi di vitalità cellulare	31
2.4.3 Saggi per valutare il Biofilm.....	32
2.4.4 Analisi Statistica.....	32
 PARTE SPERIMENTALE	 35

3.1 18 – CSP scrambled (18CSPs)	35
3.1.1 Sintesi del peptide.....	35
3.1.2 Sblocco del peptide dalla resina	36
3.1.3 Caratterizzazione del peptide.....	36
3.2 21 – CSP β homoLeu4 (21CSPLeu).....	39
3.2.1 Sintesi del peptide.....	39
3.2.2 Sblocco del peptide dalla resina	40
3.2.3 Caratterizzazione del peptide.....	40
3.2.4 Purificazione del peptide	41
3.3 18 – CSP ciclico (18CSP ciclico)	43
3.3.1 Sintesi del peptide.....	43
3.3.2 Sblocco del peptide dalla resina	44
3.3.3 Reazione di ciclizzazione	44
3.3.4 Deprotezione delle catene laterali.....	46
3.3.5 Caratterizzazione del peptide.....	46
3.3.6 Purificazione del peptide	47
3.4 21 – CSP β homoAsn12 (21CSPAsn)	49
3.4.1 Sintesi del peptide.....	49
3.4.2 Sblocco del peptide dalla resina	50
3.4.3 Caratterizzazione del peptide.....	50
3.4.4 Purificazione del peptide	52
RISULTATI E DISCUSSIONE	55
4.1 Saggi di Biofilm	55
4.2 Saggi di Vitalità Cellulare	56
4.3 Curve di Crescita	56
CONCLUSIONE	59
BIBLIOGRAFIA.....	63

Capitolo 1

INTRODUZIONE

Il sistema digerente umano ospita varie colonie batteriche complesse e dinamiche, denominate collettivamente microbiota umano, che variano per composizione e funzione metabolica spaziando dalla cavità orale al colon. Il microbiota è l'ecosistema microbico più ampio e articolato del corpo umano perché composto da miliardi di cellule, inclusi batteri e funghi. Il loro materiale genetico collettivo influenza significativamente le funzioni dell'organismo che li ospita [1]. Per esempio, alcuni ceppi batterici sono responsabili di patologie e per questo la ricerca si focalizza su come contrastarli. La scoperta dei batteri come agenti infettivi a fine XIX secolo incentivò la ricerca di metodologie di prevenzione efficaci e di appropriati regimi terapeutici. I primi passi avanti, però, vennero fatti solamente cinquant'anni dopo con la scoperta e l'introduzione degli antibiotici, che da allora hanno rivoluzionato la medicina in numerosi aspetti [2]. Tuttavia, l'utilizzo inadeguato e poco attento degli antibiotici ha portato ad un rapido incremento di ceppi batterici resistenti agli antibiotici, rendendo alcune infezioni di fatto incurabili [3].

Il microbiota orale è considerato una parte importante del microbiota umano. Si pensa infatti che la cavità orale possieda il secondo ecosistema microbico più complesso del corpo umano, che segue solo a quello del colon. Il microbiota orale comprende un'ampia varietà di microorganismi che abita la cavità orale ed include batteri, funghi, virus, archeobatteri e protozoi, che insieme sono in grado di influenzare la salute orale e sistemica [4]. Le principali patologie legate alla cavità orale, come carie, placche e periodontite, sono riconducibili alle colonie batteriche che vivono nella cavità orale e, in particolare, a batteri Gram – positivi come lo *Streptococcus mutans* [5]. Per rispondere al crescente bisogno di conoscere a fondo e controllare le infezioni batteriche e, più nello specifico, arrestare il problema dei ceppi resistenti agli antibiotici, la ricerca scientifica si è focalizzata sui sistemi che permettono ai batteri di comunicare tra loro, conosciuti come *Quorum Sensing* (QS). Questo sistema prevede la produzione, il rilascio e il successivo riconoscimento di molecole segnale da parte dei batteri quando queste raggiungono una certa soglia di concentrazione. La sintesi e la caratterizzazione di molecole segnale contenenti piccole mutazioni nei residui amminioacidici potrebbe portare all'identificazione di inibitori o modulatori del QS, ossia di *fake news* in grado di contrastare la formazione di biofilm, agevolando così lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche.

1.1 *Streptococcus mutans*

Lo *Streptococcus mutans* è un batterio Gram – positivo anaerobio facoltativo (Figura 1.1), che vive principalmente nella cavità orale umana e, nello specifico, nella placca dentale che si forma sulla superficie dura del dente. I ceppi dello *Streptococcus mutans* possono essere classificati in quattro differenti gruppi sierologici: c, e, f e k; con una prevalenza del 70 – 80% il sierotipo c è quello più comune presente nella cavità orale, seguito dal sierotipo e (circa il 20%). Al contrario, la frequenza con cui si trovano i restanti sierotipi, f e k, nella cavità orale è molto bassa, con una prevalenza inferiore al 5% [6].

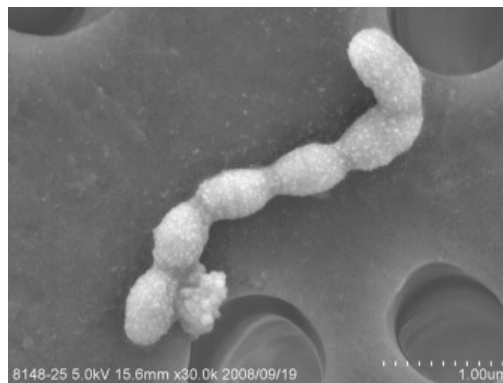


Figura 1.1: Immagine al microscopio elettronico a scansione dello *Streptococcus mutans*

Nel 1924, J. Clarke isolò un organismo dalle lesioni cariose e lo chiamò *S. mutans* perché pensò che le cellule dalla forma ovale osservate fossero forme mutate di streptococchi. Tuttavia, solo negli anni Cinquanta lo *S. mutans* cominciò a ricevere maggiori attenzioni dalla comunità scientifica e, verso la metà degli anni Sessanta, fu riconosciuto come uno dei maggiori agenti eziologici delle carie dentali. Nelle due decadi successive, la ricerca cominciò a scoprire la patofisiologia dello *S. mutans* e, a seguito dei numerosi studi realizzati, oggi è uno dei batteri Gram – positivi meglio caratterizzati.

Grazie all'impegno nella ricerca scientifica, sono stati stabiliti i tre principali tratti virulenti dello *S. mutans*, che gli conferiscono le sue proprietà cariogeniche:

1. la capacità di produrre grandi quantità di acidi organici (acidogenesi) dal metabolismo dei carboidrati;
2. l'abilità di sopravvivere in condizioni di stress ambientale e, in particolare, a bassi pH (aciduricità);
3. la capacità di sintetizzare grandi quantità di omopolimeri di glucano extracellulari a partire dal saccarosio, che giocano un ruolo fondamentale nell'iniziale adesione, colonizzazione e accumulo di biofilm sulla superficie del dente.

Grazie ai progressi nelle tecniche di genetica molecolare raggiunti a fine del secolo scorso, gli scienziati hanno cominciato a comprendere più rapidamente quali vie metaboliche permettono allo *S. mutans* di diventare un patogeno specifico dei denti [7]. Sebbene lo *S. mutans* non sia l'unico responsabile dello sviluppo di carie dentali, differenti studi hanno mostrato che il batterio può alterare l'ambiente locale, arricchendolo di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) e abbassando il pH, creando l'habitat ideale per la crescita di altre specie acidogeniche e aciduriche [8].

1.1.1 Metabolismo dei carboidrati

Il genoma dello *S. mutans* UA159, un ceppo del sierotipo *c*, è stato completamente sequenziato e la sua analisi ha fornito informazioni su come il batterio si è adattato a sopravvivere all'ambiente della cavità orale. Lo *S. mutans* metabolizza i carboidrati attraverso vie non ossidative, e tutti questi *pathway* sono stati identificati, insieme a tutti i sistemi di trasporto associati. Il genoma del ceppo UA159 codifica 14 sistemi di fosfotransferasi (PTS), enzimi coinvolti nel trasporto degli zuccheri all'interno della cellula, specifici per vari mono- e disaccaridi. Inoltre, questo specifico tipo di *S. mutans* codifica anche per due trasportatori ABC (*ATP – binding cassette transporters*), che sono principalmente coinvolti nel trasporto di oligosaccaridi attraverso le membrane cellulari.

Lo *S. mutans* si affida esclusivamente alla glicolisi per la produzione di energia e una caratteristica particolare di questo batterio è la capacità di metabolizzare una grande varietà di carboidrati, maggiore di qualsiasi altro batterio Gram – positivo [8, 9]. In particolare, è stato dimostrato che il saccarosio e il fruttosio sono i carboidrati più cariogenici e influenzano lo sviluppo di carie dentali in vari modi. Il saccarosio funge da substrato per molteplici glucosiltransferasi (Gtfs), enzimi che convertono il disaccaride in omopolimeri extracellulari di glucosio chiamati glucani. Per esempio, le GTF tipiche dello *S. mutans* sono tra i principali agenti eziologici delle carie dentali perché rilasciano glucani, che si comportano come supporti adesivi per promuovere la formazione di biofilm orali, in particolare sulla superficie liscia del dente. Inoltre, come altri streptococchi, è in grado di produrre fruttosiltransferasi (Ftf), enzimi che convertono il saccarosio in omopolimeri di fruttosio (fruttani) e glucosio libero [10].

Alcuni ceppi di *S. mutans* producono fino a tre tipologie di glucosiltransferasi - GtfB, GtfC e GtfD -, che utilizzano i monosaccaridi di glucosio derivati dal saccarosio come substrato per sintetizzare glucani. Più nello specifico, la glucosiltransferasi B (GtfB) sintetizza glucani insolubili in acqua e ricchi di legami $\alpha(1 - 3)$, la glucosiltransferasi C (GtfC) produce un

insieme di glucani solubili ricchi di legami $\alpha(1 - 6)$; infine, la glucosiltransferasi D (GtfD) sintetizza principalmente glucani solubili, spesso chiamati destrani [8].

1.2 Biofilm

I biofilm sono definiti come aggregati di microorganismi incorporati in una matrice di EPS, che aderiscono a loro stessi e/o ad una superficie. La struttura e la composizione della matrice possono variare in base ai microorganismi costituenti, sono influenzate dalle condizioni ambientali locali e possono anche cambiare nel tempo [11]. I biofilm si trovano sulle superfici mucose, come quelle della cavità orale e nasale. È noto che le interazioni tra i componenti di queste complesse colonie possono influenzare la popolazione batterica, passando da una condizione fisiologica ad una patologica. Questo è particolarmente vero per la cavità orale dove, tra i vari lattobacilli, lo *S. mutans* tende a dominare il microbiota orale e la progressiva formazione di carie. Infatti, le carie dentali sembrano risultare da un cambio nella composizione del microbiota a seguito di variazioni ambientali, come alte concentrazioni di zucchero e abbassamento del pH [7].

I biofilm presenti nella cavità orale si presentano come strutture tridimensionali, costituite da ceppi batterici ancorati alle superfici solide, come lo smalto dentale, le radici dei denti o gli impianti dentali. I biofilm sono inclusi in una matrice polisaccaridica (Figura 1.2), la cui composizione è determinata dalle condizioni presenti nella cavità orale ed è variabile nel tempo. Inoltre, le sostanze polimeriche extracellulari (EPS) possono influire sulle proprietà fisiche e biochimiche del biofilm. La principale fonte di EPS sono le GTF e le FTF, che derivano dal saccarosio.

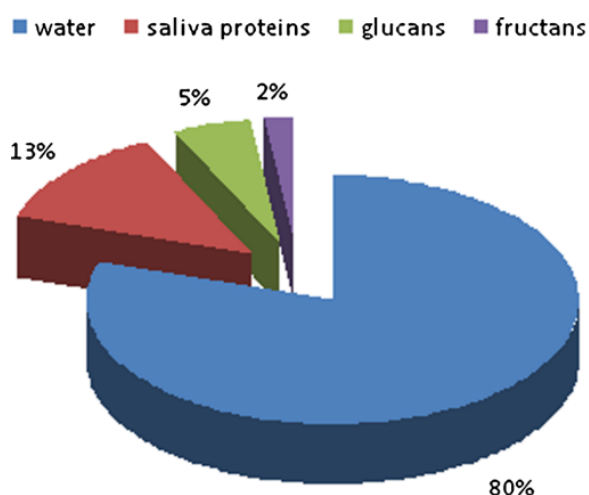


Figura 1.2: Composizione in percentuale della matrice polisaccaridica

Il processo di formazione dei biofilm comincia con il rivestimento della superficie del dente da parte della pellicola salivare acquisita, formata da componenti della saliva (proteine ricche di prolina, amilasi, lisozima, istatine, perossidasi, mucina e componenti batteriche come FTF e GTF), che vengono assorbite in modo specifico dalla pellicola dentale. Quest'ultima funge da base per la colonizzazione della cavità orale da parte di biofilm formati da microorganismi. Singole cellule di *S. mutans* o loro aggregati aderiscono alle pellicole attraverso due meccanismi indipendenti: un meccanismo saccarosio – indipendente e un meccanismo saccarosio – dipendente [12]. L'adesione delle cellule batteriche è iniziata dal primo meccanismo, saccarosio – indipendente, ma il secondo meccanismo saccarosio – dipendente è il principale responsabile per stabilire la colonizzazione della superficie del dente, e di conseguenza portare alla formazione delle carie dentali [13].

1.2.1 Formazione di Biofilm

Le malattie infettive della cavità orale sono l'esempio principale delle conseguenze di un'interazione dinamica tra i microorganismi, l'ospite e la sua dieta, portando alla colonizzazione da parte del microbiota delle superfici della cavità orale e alla formazione di biofilm patogenici, ossia la placca dentale [14].

I primi colonizzatori aderiscono allo smalto del dente tramite proteine presenti nella saliva e cominciano a formare un biofilm tridimensionale in condizioni non cariogeniche. In condizioni di pH vicine alla neutralità, la produzione di H_2O_2 da parte dei batteri perossigenici e di altri prodotti antimicrobici sintetizzati dal microbiota orale, prevengono la crescita eccessiva di specifici patogeni, come lo *S. mutans*, nei biofilm dentali. Le glucosiltransferasi secrete dallo *S. mutans* sono assorbite dalla pellicola dentale o dalla superficie batterica. In presenza di saccarosio, le GTF catabolizzano il disaccaride per produrre grandi quantità di glucani sia solubili che insolubili, che contribuiscono all'accumulo di una robusta matrice extracellulare polisaccaridica (EPS). La matrice, formata principalmente da componenti insolubili, funge da supporto per la struttura del biofilm e media l'adesione tra lo smalto dentale e i batteri, perché i glucani forniscono siti di ancoraggio per le proteine BGP (*glucan – binding proteins*) dello *S. mutans* e per altri organismi. Il DNA extracellulare (eDNA) è un altro costituente fondamentale della matrice dei biofilm orali perché, formando nanofibre che connettono cellule ad altre cellule e cellule al substrato, contribuisce all'integrità e alla stabilità della matrice. Un continuo apporto di saccarosio da parte dell'organismo ospite porta ad una serie di cambiamenti che favoriscono la crescita di specie batteriche aciduriche e altamente acidogeniche, come lo *S. mutans*. Questi cambiamenti alterano il metabolismo del biofilm orale, portando alla

produzione di elevate quantità di acidi organici che contribuiscono all'abbassamento del pH dell'ambiente. Una volta che lo *S. mutans* diventa la specie prevalente, comincia la secrezione di grandi quantità di mutacina, una batteriocina che uccide quasi tutte le altre specie concorrenti, come gli streptococchi perossigenici. Il mantenimento costante di un ambiente a basso pH nella cavità orale impatta sulle strutture di idrossiapatite presenti nello smalto dentale, comportando la demineralizzazione dell'osso e dando inizio ai processi di formazione delle carie dentali [8].

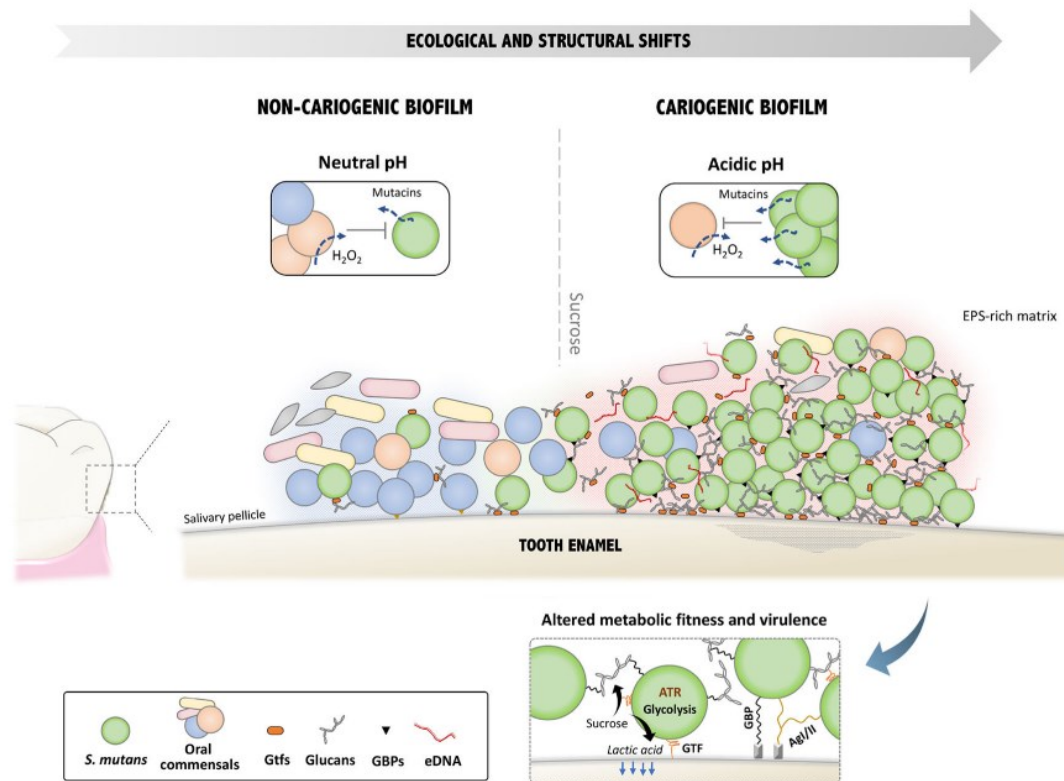


Figura 1.3: Formazione di biofilm e interazioni ospite – patogeni nello *Streptococcus mutans*

1.2.2 Tolleranza e resistenza agli antibiotici

La formazione di biofilm può avere effetti negativi non indifferenti sulla salute umana. È ben noto che le infezioni derivate da biofilm sono molto difficili da debellare con antimicrobici a causa dell'elevata tolleranza che i biofilm mostrano nei loro confronti; la presenza di biofilm aumenta la tolleranza agli antibiotici fino a mille volte se comparata alle singole cellule. Generalmente, si parla di resistenza agli antibiotici quando si verifica un incremento nel valore di concentrazione inibitoria minima (MIC) di un antibiotico; questo fenomeno avviene a causa di cambiamenti permanenti nei batteri, ad esempio mutazioni o resistenza acquisita mediante trasferimento genico orizzontale. Al contrario, la tolleranza è la capacità delle cellule di sopravvivere all'effetto degli antibiotici grazie ad uno stato fenotipico reversibile [15].

L'eliminazione di un biofilm risulta notevolmente difficile. I batteri che hanno sviluppato questa tolleranza crescono più lentamente o presentano lunghi periodi di stallo nel loro sviluppo

quando escono dalla fase stazionaria rispetto alla controparte non – tollerante. I target più comune di molti antibiotici, come le RNA polimerasi ed enzimi, mostrano bassa attività nelle cellule non in crescita; pertanto, cellule a crescita lenta o interrotta riescono ad evitare di essere uccise dagli antibiotici. Inoltre, la tolleranza si differenzia in modo sostanziale dalla resistenza, in quanto quest'ultima è solitamente specifica per un singolo antibiotico o per una loro classe. Anche l'aumento della tolleranza agli antibiotici mostrato dai biofilm è provocato da alterazioni nella fisiologia delle cellule che li compongono. È infatti stato dimostrato che le dimensioni della matrice sono maggiori rispetto a quelle degli antibiotici e che questi non interagiscono in modo significativo con le componenti della matrice [16].

1.3 Quorum Sensing

Il Quorum Sensing (QS) è un processo di comunicazione batterica cellula – cellula che comporta la produzione, il riconoscimento e la risposta a molecole segnale extracellulari chiamate autoinducer (AIs). Siccome i fenotipi interessati necessitano che i batteri siano presenti in numero sufficiente per essere efficaci, queste vie di comunicazione sono dipendenti dalla densità cellulare batterica. Gli AI si accumulano nell'ambiente con l'aumento della popolazione batterica, che monitora quest'informazione per tenere traccia dei cambiamenti; ad una certa soglia (*quorum*) di concentrazione degli AI extracellulari i batteri riescono a percepire l'esistenza delle molecole segnale, andando ad alterare l'espressione genica e a provocare cambiamenti nel loro comportamento [24]. Questi *pathway* giocano un ruolo importante nei processi controllati dal QS che coordinano le attività che risultano vantaggiose se eseguite da un gruppo di batteri che agiscono in sincrono. Tra i processi interessati si hanno quelli che contribuiscono all'infettività (produzione di fattori virulenti, formazione di biofilm), alla resistenza agli antibiotici (competenza batterica, formazione di biofilm, mobilità dello sciame) e alle interazioni simbiotiche (luminescenza).

Tutti i sistemi di QS noti dipendono da tre principi di base:

1. I membri della colonia batterica producono AI, che sono molecole segnale. A bassa densità cellulare (*low cell density* o LCD), gli AI diffondono lontano e, quindi, sono presenti in concentrazioni più basse di quella di soglia necessaria per il rilevamento. Ad elevate densità (*high cell density* o HCD), la produzione cumulativa di AI comporta una concentrazione locale elevata, permettendone il rilevamento e una risposta;

2. Gli AI sono rilevati dai recettori che si trovano nel citoplasma o sulla membrana;
3. Oltre ad attivare l'espressione dei geni necessari per le attività di cooperazione, il rilevamento degli AI comporta l'attivazione della produzione di ulteriori AI.

Inoltre, ci sono tre principali categorie di circuiti di QS, divise per la tipologia di molecola segnale utilizzata: i batteri Gram – negativi generalmente si affidano a piccole molecole note come N-acil omoserina lattoni, mentre i batteri Gram – positivi usano molecole a base peptidica, che sono spesso chiamati *autoinducing peptides* (AIPs). La terza categoria di molecole segnale è coinvolta principalmente nelle comunicazioni interspecie e utilizza l'*autoinducer 2*, che risulta “universale” [17, 18].

1.3.1 Quorum Sensing: batteri Gram – negativi

I batteri Gram – negativi comunicano utilizzando piccole molecole come AI, che solitamente sono N-acil omoserina lattoni (AHLs) o altre molecole la cui produzione dipende dalla S-adenosil metionina (SAM), che agisce da substrato. Questi batteri solitamente utilizzano sistemi di QS del tipo LuxI/LuxR, omologo a quello scoperto per la prima volta dal batterio simbiotico marino bioluminescente *Vibrio fischeri*. In questi sistemi di QS l'omologo LuxI è una sintasi di AI che catalizza una reazione tra SAM e una proteina di trasporto dell'acile (ACP) per la produzione degli *autoinducer* AHL. Ad alte concentrazioni, gli AI si legano a fattori citoplasmatici di trascrizione affini LuxR (Figura 1.4).

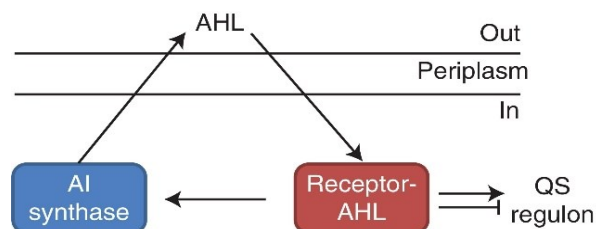


Figura 1.4: Sistema di Quorum Sensing di tipo LuxI/LuxR tipico dei batteri Gram – negativi

Quando non sono legati ad un *autoinducer*, le proteine LuxR vengono degradate rapidamente, probabilmente per prevenire che i batteri possano “corto circuitare” il loro sistema di QS. I legami con gli AI stabilizzano le proteine LuxR permettendone il *folding*, di legare DNA e di attivare la trascrizione dei geni target. Tipicamente, il legame tra AHL e proteine LuxR attiva anche l'espressione di *luxI*, dando luogo ad un circuito ciclo autoindotto di *fast – forward* che contribuisce ad aumentare la concentrazioni degli AI nelle vicinanze [17].

1.3.2 Quorum Sensing: batteri Gram – positivi

Dozzine di batteri Gram – positivi di interesse clinico utilizzano il QS per controllare la produzione collettiva di fattori virulenti. In generale, questi batteri utilizzano peptidi come *autoinducer*, che vengono secreti attraverso un trasportatore ABC (*ATP – binding cassette*). Il sistema di QS dei peptidi Gram – positivi prevede delle proteine a risposta adattiva a due componenti per il rilevamento degli *autoinducer*. In Figura 1.5 è illustrato uno schema di come avviene il QS mediato da peptidi: un precursore del peptide segnale viene tradotto in una proteina, che va incontro a tagli nella struttura per produrre l'*autoinducer* peptidico. Quando la concentrazione extracellulare del peptide segnale raggiunge un livello di stimolazione minimo viene rilevato da un'istidina chinasi di un sistema di *signaling* a due componenti. La chinasi autofosforila in un residuo di istidina e, di conseguenza, il gruppo fosforile è trasferito ad una proteina regolatrice di risposta affine. Il regolatore di risposta è fosforilato in un residuo di aspartato e va ad attivare la trascrizione del gene o dei geni target [19].

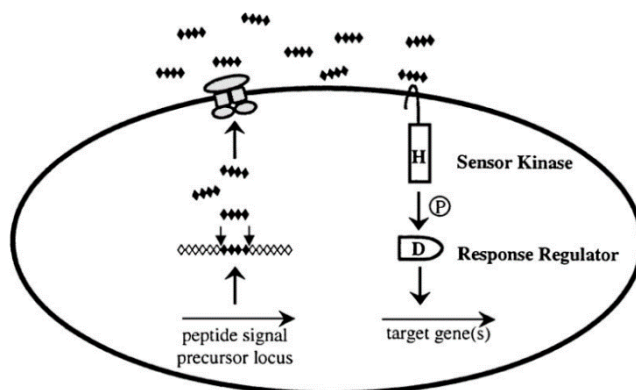


Figura 1.5: Modello generale di Quorum Sensing mediato da peptidi in batteri Gram – positivi

1.3.3 Quorum Sensing: *Streptococcus mutans*

La scoperta del sistema di QS dello *S. mutans* è avvenuta principalmente utilizzando informazioni sulle specie strettamente correlate, come lo *Streptococcus pneumoniae*; il suo circuito di comunicazione cellula – cellula è il meglio caratterizzato tra tutti gli streptococchi. Di conseguenza, utilizzando la sequenza comCDE dello *S. pneumoniae* anche il sistema di QS dello *S. mutans* è stato scoperto [20]. Per poter sopravvivere nella cavità orale, lo *S. mutans* forma biofilm sulla superficie dei denti e per controllare la loro formazione utilizza un sistema di QS chiamato regolatore di competenza (*competence regulon*). La competenza batterica è la capacità delle cellule di raccogliere DNA extracellulare (eDNA) e di incorporarlo nel loro genoma. In questo modo, le cellule in grado di trasformarsi naturalmente possono usare il eDNA per riparare danni al DNA o, in alternativa, per acquisire nuovi tratti come la resistenza agli antibiotici [21, 22]. Inoltre, il sistema di QS dello *S. mutans* si è evoluto per produrre

batteriocine, note in questo caso specifico come mutacine, antibiotici peptidici usati come difesa contro altri microorganismi della cavità orale. Il QS del *S. mutans* si basa principalmente su una molecola segnale peptidica, detto *competence stimulating peptide* (CSP) o *mutacin – inducing peptide* (MIC), che viene riconosciuta dal TCSTS (*two – way component signal transduction system*), un sistema che gioca un ruolo importante nell’adattamento, sopravvivenza e virulenza dei batteri. Il TCSTS riconosce cambiamenti nell’ambiente e modifica l’espressione di specifici geni per coordinare la risposta agli stimoli ambientali [8].

Il segnale del CSP è codificato dal gene *comC* come precursore peptidico *comC*, che viene processato e secreto da complesso di trasportatori ABC (*ComAB*) per produrre un residuo peptidico di 21 amminoacidi (21 – CSP). In seguito, il 21 – CSP è clivato ulteriormente al C – terminale da una proteina di membrana, *SepM*, per creare una molecola segnale attiva, il 18 – CSP, che interagisce con il recettore istidina chinasi transmembrana affine, *ComD*. Il legame 18 – CSP:*ComD* innesca la fosforilazione di *ComE*, un regolatore di risposta del citoplasma, e stimola l’espressione dei geni coinvolti nella formazione di biofilm, la produzione di batteriocine e lo sviluppo della competenza, oltre all’up – regolazione del gene regolatore di competenza, *comABCDE*. Un altro sistema di QS nello *S. mutans*, codificato dai geni *comR – comS*, è collegato allo sviluppo della competenza batterica. *ComS*, un polipeptide di 17 amminoacidi, è secreto e processato nella sua forma matura, *sigma X – inducing peptide* (XIP); questo viene poi riportato all’interno della cellula per attivare il regolatore *ComR*, che va ad upregolare l’espressione genica di *ComS* e *ComX* (Figura 1.6).

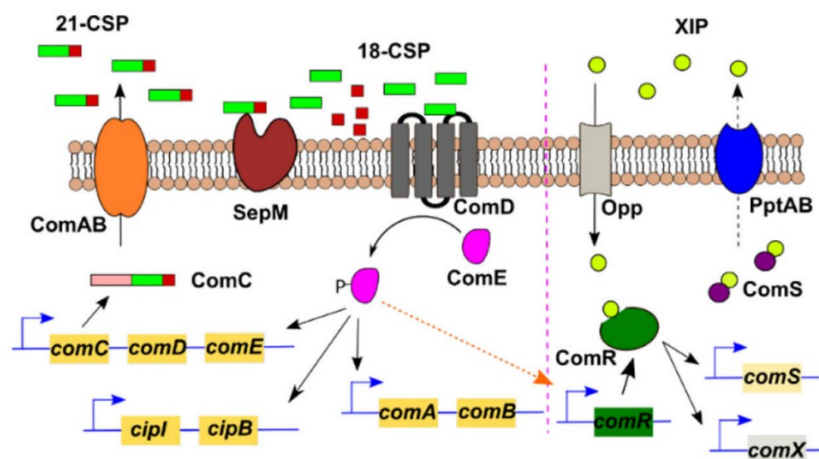


Figura 1.6: Modello dei pathway CSP e XIP per il Quorum Sensing nello *S. mutans*

Lo sviluppo della competenza per mezzo del sistema mediato da CSP o da XIP dipende dal terreno di coltura: in terreni ricchi di nutrienti prevale il primo sistema, che utilizza il CSP; al contrario, in un terreno chimicamente definito (CDM), privo di alcun peptide esogeno, domina il secondo sistema, mediato da XIP [21, 23].

Di recente, è stato scoperto un nuovo *pathway* del QS per lo *S. mutans* chiamato sistema PdrA/WGK. Nel 2021, si è visto che l'operone WGK dello *S. mutans* è regolato da un corto AIP idrofobico (SHP) e da un regolatore di risposta chiamato PdrA. Lo SHP è portato fuori dalla cellula da un trasportatore transmembrana PptAB e poi riportato al suo interno da un trasportatore Opp. L'attivazione dell'operone innesca la produzione di un peptide chiamato triglisina B, un peptide di sette amminoacidi che contiene la sequenza Try – Gly – Lys, che inibisce vari streptococchi orali (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. gordonii*). La triglisina B è anche un autoinibitore; tuttavia, lo *S. mutans* si riprende dall'inibizione entro 24 ore [24].

1.4 Quorum Quenching

I biofilm stanno diventando un problema sempre più stringente perché molte infezioni croniche tipiche dell'uomo sono provocate da biofilm batterici e vengono pertanto trattate con antimicrobici. In particolare, una delle questioni più problematiche è il loro utilizzo eccessivo e indiscriminato, che potrebbe risultare nello sviluppo di resistenza agli antimicrobici. A questo problema contribuiscono vari fattori, tra cui l'eccessiva prescrizione, l'auto – medicazione e, in alcuni paesi, anche la mancanza di regolamentazione riguardo la prescrizione di antibiotici. Pertanto, la ricerca ha cominciato ad esplorare nuovi modi per trattare le patologie mediate da biofilm batterici. Uno di questi approcci è la ricerca di inibitori del QS e il Quorum Quenching (QQ), che permetterebbe di offrire modalità di trattamento ricavabili da varie fonti (piante, batteri e prodotti sintetici) e libere da problemi di resistenza agli antimicrobici. Infatti, il QQ ha come obiettivo l'interruzione delle vie di comunicazione batteriche responsabili per la virulenza [24]. Il QQ consiste nell'inibizione dei sistemi di QS e sta prendendo piede come alternativa alla terapia farmacologica perché permette l'attenuazione o l'inibizione dei fattori virulenti responsabili delle infezioni, ma non provoca la morte dei batteri e di conseguenza nemmeno resistenza agli antibiotici [25].

Trattamenti per biofilm ricavati da diversi prodotti a base vegetale hanno mostrato proprietà inibitorie nei confronti della formazione di biofilm, collegate alla down-regolazione di ComDE. Tra questi prodotti troviamo la baicaleina (5,6,7 – triidrossiflavone) che è in grado di abbassare l'idrofobicità del biofilm, importante nelle interazioni batteri – carboidrati. Per quanto riguarda l'utilizzo di prodotti microbici per il QQ, si è visto che lo *S. mutans* coesiste in modo competitivo con varie altre specie, che con i loro prodotti potrebbero alterare il sistema di QS del *mutans*. Infatti, lo *S. gordonii* e lo *S. sanguinis* sono inibiti dalla triglisina B prodotta dallo *S. mutans* ma, di rimando, possono interrompere i segnali di ComRS e ComE e causare la

degradazione dei biofilm formati dallo *S. mutans*. Infine, una terza possibilità è costituita da molecole sintetiche per il QQ dello *S. mutans*: un primo esempio è l'utilizzo di analoghi peptidici del CSP o di XIP, che può causare l'inibizione del QS attraverso *binding* competitivo, mentre un'altra applicazione è la sintesi di molecole come la mucina MUC5B, che si trova naturalmente nella saliva umana ed è in grado di inibire la formazione dei biofilm formati dallo *S. mutans* [24]. Questa tesi si focalizza sulla sintesi di analoghi peptidici del CSP per l'inibizione del sistema di QS del batterio *S. mutans*.

1.5 Relazione struttura – attività del CSP

Una volta identificato il sistema di QS, è importante capire gli effetti che le proprietà strutturali degli AIP hanno sull'interazione con il recettore. Per comprendere questo aspetto, la relazione struttura – attività (SAR) può essere determinata attraverso differenti metodi che includono modifiche sistematiche del peptide mediante sostituzione, funzionalizzazione (come la metilazione) o il troncamento. Dalle informazioni ricavate, si possono progettare ulteriori alterazioni alla struttura. Informazioni aggiuntive sulla SAR possono essere ottenute dall'analisi conformazionale usando dicroismo circolare (CD) o per mezzo di scansioni ai raggi X oppure risonanza magnetica nucleare (NMR) [18].

I vari studi, fatti per identificare il frammento minimo attivo e determinare il ruolo che hanno alcuni amminoacidi della sequenza del CSP, hanno mostrato che:

- i. per il *binding* con il recettore, la regione del terminale C è più importante del terminale N;
- ii. l'eliminazione degli ultimi tre residui dal terminale N non comporta perdita di biotività da parte del peptide;
- iii. il 18 – CSP maturo derivato da modifiche extracellulari del suo precursore 21 – CSP vede la perdita di tre residui amminoacidici al terminale C;
- iv. modifiche nei residui Phe7, Phe11 e Phe15 comportano perdita di bioattività;
- v. eseguendo l'*alanine scanning* sul 21 – CSP e sostituendo i residui Gly2, Ser3 e Gln17 con Ala, il riconoscimento da parte di SepM aumenta e di conseguenza migliora il processing del peptide 18 – CSP. Al contrario, gli amminoacidi Leu4, Asn12 e Arg13 sono importanti per l'interazione con SepM e non possono essere cambiati;

- vi. cambiamenti nella parte N – terminale sono più tollerati dei cambiamenti nella regione C – terminale grazie all'analisi con gli amminoacidi D;
- vii. la struttura alfa elicoidale è importante per la bioattività, come dimostrano studi di dicroismo circolare (CD).

Per ottenere più informazioni sulla bioattività del 21 – CSP, è stata creata una libreria di peptidi sintetizzati con troncamenti sia al C – terminale che al terminale N. In particolare, peptidi in cui tre o quattro residui amminoacidici sono eliminati dal terminale C non esprimono i geni per la competenza. Questi peptidi non presentano attività di QS, confermando che i residui del C – terminale sono necessari per attivare il *Quorum Sensing*. Al contrario, troncamenti del terminale N non hanno mostrato gli stessi risultati: eliminando fino a tre residui dal terminale, il sistema QS viene attivato e la competenza batterica espressa. Questo suggerisce che i tre amminoacidi presenti al terminale N non sono necessari né per l'attivazione della trasduzione del segnale né per il legame con il recettore [26].

Per prima cosa si osservano i risultati ottenuti tramite *alanine scanning*, ossia sostituendo determinati residui nella sequenza con Ala. Visto che il 18 – CSP è la molecola segnale attiva che lega il recettore ComD, qualsiasi cambiamento osservato nella sua bioattività può essere attribuito ad un'alterazione del legame CSP:ComD. Al contrario, variazioni nella bioattività degli analoghi del 21 – CSP possono essere il risultato della modulazione del lavoro della SepM oppure del legame con ComD. Pertanto, la correlazione tra i *trend* del comportamento di entrambi i CSP potrebbe consentire lo studio dei cambiamenti nelle interazioni CSP:SepM. È stato osservato tramite scansione all'alanina che modifiche nei residui idrofobici del 18 – CSP provocano una drastica riduzione della sua bioattività, mentre alterazioni nei residui idrofilici sono molto meglio tollerati. Questo dimostra l'importanza della sua regione idrofobica centrale nel legame con il recettore ComD. Allo stesso modo è stato valutato il *trend* della bioattività degli analoghi del 21 – CSP per poterlo paragonare a quello del 18 – CSP e identificare quali posizioni nella sequenza sono importanti per il riconoscimento e il *processing* del SepM. Dai risultati ottenuti si può evincere che una sostituzione nelle posizioni Gly2, Ser3 e Gln17 portano ad un incremento dell'attività legata al SepM e di conseguenza ad una maggiore concentrazione efficace del corrispondente analogo 18 – CSP. Al contrario, cambiamenti nelle posizioni Leu4 o Asn12 hanno portato alla riduzione significativa nella bioattività del 21 – CSP; le stesse mutazioni per il 18 – CSP non hanno però mostrato la stessa efficacia. Un simile comportamento si è osservato anche per il residuo Arg13. Si può dedurre che, vista la riduzione nella bioattività del 21 – CSP, i residui Leu4, Asn12 e Arg13 sono importanti per il

riconoscimento e il funzionamento di SepM e, quindi, modifiche in queste posizioni risultano nell'inabilità di SepM di processare gli analoghi del 21 – CSP nel loro corrispettivo attivo 18 – CSP [23].

Successivamente, cominciando dal 18 – CSP, modifiche con D – amminoacidi nella regione del terminale N si sono dimostrate molto più tollerabili rispetto a quelle al terminale C. Questo implica che la maggior parte dei legami tra 18 – CSP e ComD sono localizzati nella regione centrale e al terminale C del CSP. Inoltre, i requisiti stringenti della stereochimica suggeriscono che il 18 – CSP si leghi ad un sito di legame sul ComD relativamente piccolo. Questo spiegherebbe ulteriormente l'importanza di eliminare gli ultimi tre residui del 21 – CSP perché sono responsabili dell'ingombro sterico che impedisce al peptide di legarsi al ComD, impedendo l'attivazione del recettore. Di conseguenza, osservando i risultati ottenuti da questa analisi e dalla scansione all'alanina, si evince che il terminale N del CSP ha un ruolo secondario nel legame con il ComD. Se si considera il 21 – CS, con l'eccezione di Thr6, Leu10 e Arg13, si possono applicare le stesse osservazioni fatte per il 18 – CSP. Questo avviene perché gli analoghi contenenti amminoacidi D mostrano bioattività ridotta o per l'incapacità del SepM di processare in modo efficace i medesimi analoghi. Nel caso dei residui Thr6, Leu10 e Arg13 le modifiche con gli amminoacidi D si sono mostrate più tollerabili nel 21 – CSP rispetto al 18 – CSP. I risultati ottenuti mostrano che la chiralità invertita in queste posizioni permette un migliore riconoscimento da parte di SepM. Infine, guardando gli ultimi tre residui del C – terminale, modifiche alla chiralità di Leu19 sono meno tollerati di modifiche alla catena laterale. Visto che SepM taglia la catena tra i residui Ala18 e Leu19, non sorprende che ci siano dei requisiti rigidi sull'orientazione di entrambi questi residui per il riconoscimento del sito di clivaggio. Al contrario, la posizione Lys21 sembra essere altamente modificabile sia dalla sostituzione con alanina che con D – amminoacidi perché hanno mostrato bioattività simili [23]. Utilizzando analisi NMR, si è visto che il CSP del *S. mutans* UA159 ha una struttura ad alfa – elica anfipatica, con una faccia idrofobica ben definita caratterizzata da una fila di quattro residui di fenilalanina (Phe). Modifiche nelle posizioni Phe7, Phe11 e Phe15 con residui idrofilici hanno mostrato la completa mancanza di bioattività da parte dei peptidi, incapaci di attivare il sistema di QS [26].

Analisi sulla struttura secondaria dei CSP tramite spettroscopia CD ha mostrato che gli analoghi del 21 – CSP e del 18 – CSP assumono una struttura a α -elica o a α -elica distorta, mentre gli analoghi inattivi adottano una struttura β -sheet, β -sheet distorta o β -turn. Questo conferma l'importanza della conformazione a α -elica nella formazione del legame con ComD [23].

Le informazioni ottenute dall'analisi della SAR del 18 – CSP hanno mostrato come la parte centrale formata da residui idrofobici del peptide sia importante per il legame con il ComD. Inoltre, si nota che la regione C – terminale del 18 – CSP è fondamentale per la sua bioattività (rimuovere uno degli amminoacidi da questa regione comporta la perdita totale di attività di QS), mentre nella parte N – terminale si possono rimuovere i primi due residui senza perdita di bioattività. Questi risultati hanno permesso di identificare la sequenza peptidica minima necessaria per il legame con il ComD e l'attivazione (Figura 1.7). La sequenza del 21 – CSP dello *S. mutans* è la seguente: S – G – S – L – S – T – F – F – R – L – F – N – R – S – F – T – Q – A – L – G – K. Da ciò si trova che il frammento attivo minimo è: S – G – S – L – S – T – F – F – R – L – F – N – R – S – F – T – Q – A [23].

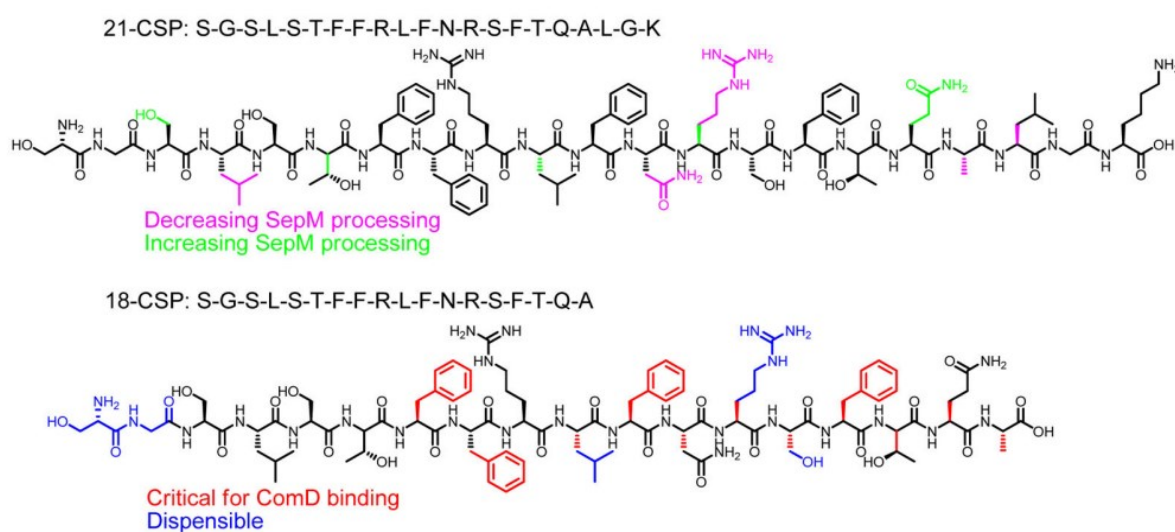


Figura 1.7: Struttura minima necessaria al 21 – CSP affinché venga processato da SepM e del 18 – CSP perché possa legarsi al recettore ComD

1.6 Relazione struttura – attività del XIP

Come nel caso precedente, per valutare la SAR sono state utilizzate la scansione all'alanina e la sostituzione con D – amminoacidi su XIP.

La scansione all'alanina mostra alcuni trend molto interessanti: la modifica in Ala dei residui Gly1, Asp3 o Ser6 è tollerata e risulta in analoghi con bioattività simile a quella nativa di XIP. Al contrario, la sostituzione in Ala di Leu2 o Trp5 ha mostrato che gli analoghi ottenuti sono relativamente inattivi, evidenziando che questi residui della catena sono coinvolti nel legame con il recettore ComR. Invece, la sostituzione con amminoacidi D porta ad analoghi completamente inattivi. I risultati che si ottengono dallo scanning all'alanina mostrano quindi che i residui Leu2 e Trp5 sono fondamentali per il legame con il recettore, mentre Trp4 e Leu7 sono importanti per l'attivazione del recettore [27].

Successivamente, vengono fatte delle mutazioni in queste quattro posizioni usando residui amminoacidici proteinogenici e non – proteinogenici per indagare più a fondo le interazioni tra queste catene laterali e il sito di ancoraggio su ComR. I residui alifatici idrofobici (Leu2 e Leu7) vengono sostituiti con altri residui alifatici idrofobici (Ile, Val, norLeu e norVal); invece, gli amminoacidi aromatici (Trp4 e Trp5) sono modificati con altri aromatici (Phe e Tyr) e il residuo con ciclo non aromatico in catena laterale (beta – cicloesil Ala).

Cominciando da Leu2, la perdita di ramificazione della catena, mantenendone la lunghezza (Leu → norVal) o abbinata ad un allungamento della catena (Leu → norLeu), è relativamente tollerata e comporta analoghi con bioattività simile a XIP. Al contrario, cambiare la posizione della ramificazione della catena (Leu → Ile) è molto meno tollerato e gli analoghi ottenuti presentano bioattività ridotta, probabilmente a causa dell'ingombro sterico con il sito di ancoraggio del recettore ComR. Inoltre, l'accorciamento della catena (Leu → Val) porta ad analoghi con bioattività ridotta, mostrando che cambiare la posizione della ramificazione della catena è dannoso per il legame con ComR. Passando a Leu7, l'accorciamento della catena come la perdita o lo spostamento della ramificazione della catena sono tollerate, comportando analoghi con bioattività simile a XIP; al contrario, l'allungamento della catena (Leu → norLeu) è meno tollerato, probabilmente a causa di problemi di ingombro con il sito di ancoraggio di ComR. Questi risultati suggeriscono che per questo residuo, il ComR è in grado accogliere modifiche differenti abbastanza bene. Inoltre, per questa posizione, le catene laterali contenenti carbonio γ sono necessarie per un'interazione efficace con il recettore ComR che comporti la sua attivazione perché le modifiche in Ala hanno portato XIP a diventare un inibitore competitivo debole [27].

Per poter trovare la sequenza minima di XIP che sia in grado di legare e attivare ComR, sono stati eseguiti anche dei tagli ad entrambi i terminali. Complessivamente, la valutazione biologica degli analoghi XIP troncati ha rivelato che il C – terminale di XIP è più importante per la bioattività del terminale N, perché i residui troncati al terminale C mostrano una riduzione di bioattività significativa [27].

1.7 Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è di studiare alcuni analoghi del 21 – CSP e del 18 – CSP, eseguendo delle modifiche sulla loro sequenza nativa, per investigarne gli effetti nel sistema di QS dello *Streptococcus mutans*. A partire dalle informazioni ottenute sul Quorum Sensing e sulla sua modulazione e inibizione, sono stati sintetizzati una serie di analoghi peptidici utilizzando la

tecnica della sintesi su fase solida. Una volta purificati, i peptidi sono stati analizzati mediante saggi microbiologici e biologici per studiarne i possibili effetti interferenti con il QS.

Gli analoghi degli *autoinducer* sintetizzati comprendono:

- un peptide di controllo, il 18 – CSP scrambled, ricavato riposizionando casualmente gli amminoacidi della sequenza nativa;
- un analogo del 18 – CSP ciclico, ottenuto ciclizzando testa – coda la struttura lineare;
- un analogo del 21 – CSP in cui Leu4 è stato sostituito con β – homo – Leu, in quanto questo punto della sequenza è stato evidenziato come chiave per la ricerca di antagonisti e inibitori di SepM;
- un analogo del 21 – CSP in cui Asn12 è stato sostituito con β – homo – Asn, in quanto questo punto della sequenza è stato evidenziato come chiave per la ricerca di antagonisti e inibitori di SepM.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

Colonne cromatografiche:

- Colonna Vydac C18 218TP semipreparativa (5 μ m, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters);
- Colonna Vydac C18 218TP analitica (5 μ m, 100 Å, 4.6 x 250 mm, Waters).

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

- Acetonitrile;
- Acetone;
- Diclorometano (DCM);
- Etanolo (EtOH);
- Etil cianoidrossiimmuno acetato (Oxyma Pure);
- Metanolo (MeOH);
- N, N – diisopropilammia (DIPEA);
- N, N – (DMF);
- [Etil ciano(idrossimmino)acetato - O²]tri – 1 – pirrolidinilfosfonio esafluorofosfato (PyOxim);
- Piperidina;
- Amminoacidi Fmoc – protetti: Alanina (Fmoc – Ala – OH), Fenilalanina (Fmoc – Phe – OH), Glicina (Fmoc – Gly – OH), Leucina (Fmoc – Leu – OH), Asparagina (Fmoc – Asn(Trt) – OH), Glutammia (Fmoc – Gln(Trt) – OH), Arginina (Fmoc – Arg(Pbf) – OH), Serina (Fmoc – Ser(tBu) – OH), Treonina (Fmoc – Thr(tBu) – OH);
- Acido trifluoroacetico (TFA);
- 2 – (1H – benzotriazol – 1 – il) – 1,1,3,3 - tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU);
- 1-[Bis(dimetilammio)metilene]-1H-1,2,3,-triazolo[4.5-b]piridinio3-ossido esafluorofosfato (HATU);
- Tietilsilano (TES).

Solventi forniti da *Biosolve* ((Valkenswaard, Paesi Bassi):

- N, N – dimetilformammide (DMF).

Solventi forniti da *Carlo Erba* (Milano, Italia):

- Dietil etere;
- N – metil – 2 – pirrolidone (NMP).

I reagenti per il Kaiser test sono stati forniti da *Applied Biosystem* (Perkin – Elmer, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti):

- Monitor 1 (76%w/w Fenolo/Etanolo);
- Monitor 2 (0.2 mM cianuro di potassio/piridina);
- Monitor 3 (0.28 M Ninidrina/Etanolo).

Reagenti forniti da *Carlo Erba* (Milano, Italia):

- Dietil etere;
- N – metil – 2 – pirrolidone (NMP).

Reagenti forniti da *Novabiochem* (Merck KGaA, Darmstadt, Germania):

- Fmoc – Glu(OtBu) – Wang Resin;
- Fmoc – Lys(Boc) – Wang Resin.

Reagenti forniti da *Rapp Polymere GmbH* (Tübingen, Germania):

- Tentagel S Ac – Lys(Boc) – Fmoc.

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

- Fmoc – Gly – Sasrin.

Reagenti forniti da *GenScript Biotech* (Piscataway, New Jersey, Stati Uniti):

- Fmoc – β – homo – Leu – OH.

2.1.1 Peptidi

Per la realizzazione di questo lavoro di tesi è stata necessaria la sintesi e la successiva purificazione dei seguenti peptidi:

- 18 – CSP scrambled

Sequenza: H – Leu – Arg – Ser – Asn – Thr – Phe – Arg – Phe – Gly – Leu – Ser – Ala – Phe – Ser – Thr – Phe – Ser – Gln – OH

PM: 2066.308 Da

- Sequenza: H – Ser – Gly – Ser – (β – homoLeu) – Ser – Thr – Phe – Phe – Arg – Leu – Phe – Asn – Arg – Ser – Phe – Thr – Gln – Ala – Leu – Gly – Lys – OH

Sequenza lineare: H – Ser – Leu – Ser – Thr – Phe – Phe – Arg – Leu – Phe – Asn – Arg
– Ser – Phe – Thr – Gln – Ala – Ser – Gly – OH

PM: 2048.308 Da

- Sequenza: H – Ser – Gly – Ser – Leu – Ser – Thr – Phe – Phe – Arg – Leu – Phe – (β – homoAsn) – Arg – Ser – Phe – Thr – Gln – Ala – Leu – Gly – Lys – OH

2.2 Strumenti

Sintetizzatore

Sintetizzatore automatico programmabile Syro I (*MultiSynTech GmbH*, Witten, Germania) (Figura 2.1). La programmazione è stata operata tramite il software Syro XP.



Figura 2.1: Sintetizzatore Syro I

Spettrofotometro UV/Vis modello Lambda 2 (*Perkin – Elmer*, Waltham, Massachusetts, USA) (Figura 2.2) per test alla Ninidrina.



Figura 2.2: Spettrofotometro UV/Vis Lambda 2

Cromatografo

HPLC per cromatografia analitica: sistema HPLC Waters™ 1525 composto da pompa binaria, autocampionatore Waters™ 2707, lampada UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile Waters™ 2489 (*Waters*, Milford, Massachusetts, USA) (Figura 2.3).



Figura 2.3: HPLC per cromatografia analitica

HPLC per cromatografia semipreparativa, pompa Waters™ 600 equipaggiato con Controller, lampada UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile Waters™ 2487 e registratore BD 40/BD 41 (*Carlo Erba Instruments/Kipp & Zonen Delf BV*, Delft, Paesi Bassi) (Figura 2.4).



Figura 2.4: HPLC per cromatografia semipreparativa

Liofilizzatore, modello FreeZone® 2.5 Dry System 76705 (Labconco, Kansas City, Missouri, USA) per liofilizzazione.

Spettrofotometro di massa MALDI – TOF

Le analisi di massa sono state effettuate presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova. Lo strumento utilizzato è lo spettrofotometro di massa 4800 MALDI – TOF/TOFTM Analyzer (*AB SCIEX*) e il software 4000 Series Explorer™ (*Applied Biosystems*, Foster City, California, USA).

Sistema Milli - Q® Plus (*Millipore*, Billerica, Massachusetts, USA) (Figura 2.5).



Figura 2.5: Sistema MilliQ (Millipore)

Bilancia, modello Mettler AE240 (*Mettler Toledo*, Columbus, Ohio, USA).

Piastra Riscaldante (*Boekel Scientific*, Philadelphia, USA).

Evaporatore rotante, modello Rotavapor Laborota 4000 – Efficient (*Heidolph Instruments GmbH & Co.KG*, Schwabach, Germania) (Figure 2.6).



Figura 2.6: Evaporatore rotante

Lettore di micropiastre Varioskan LUX™ (*ThermoFischer Scientific*, Massachusetts, USA).

Agitatore meccanico, modello SuperMixer (*Continental Instruments*).

Sonicator, modello Branson 1200 (*Branson Ultrasonics Corporation*, Danbury, CT, USA).

Agitatore magnetico, Microstirrer (*VELP® Scientifica*, Usmate Velate, Italia).

Campana a vuoto, Kartell LABWARE (Noviglio, Milano, Italia).

2.3 Metodi

2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida

Per sintetizzare i peptidi utilizzati per questo lavoro di tesi, è stata utilizzata la sintesi peptidica su fase solida (SPPS), una tecnica di produzione peptidica introdotta per la prima volta dal biochimico Bruce Merrifield nel 1963 [28]. La SPPS è basata sull'utilizzo di un supporto polimerico solido, una resina insolubile, su cui vengono assemblati i peptidi; la sequenza peptidica si forma a partire dall'amminoacido C – terminale (ultimo della struttura primaria) verso quello N – terminale (primo nella struttura primaria). Si tratta di una procedura automatica eseguita con un sintetizzatore, in questo caso utilizzando Syro I e resine diverse per i differenti peptidi sintetizzati. Quindi, si hanno una fase solida, data dalla resina, e una fase liquida in cui sono disciolti i reagenti e gli amminoacidi. Le resine utilizzate in questa tesi sono: Fmoc – Glu(OtBu) – Wang Resin (Figura 2.7) per sintetizzare il 18 – CSP scrambled, Tentagel S Ac – Lys(Boc) – Fmoc per sintetizzare il 21 – CSP Leu4 e Fmoc – Gly – Sasrin per sintetizzare la sequenza lineare del 18 – CSP da ciclizzare.

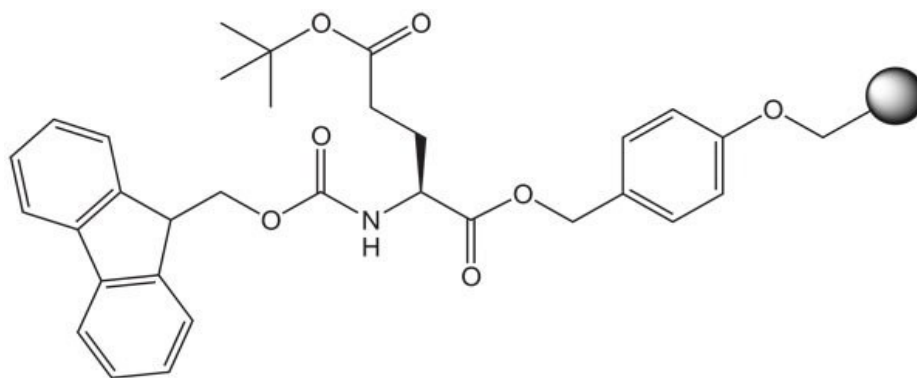


Figura 2.7: Struttura della Fmoc – Glu(OtBu) – Wang Resin

La struttura base degli amminoacidi è la medesima e consiste in un gruppo amminico, un gruppo carbossilico e una catena laterale, che varia in base all'amminoacido considerato (Figura 2.8).

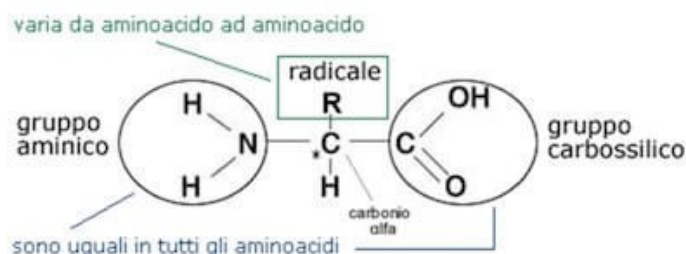


Figura 2.8: Struttura base di un amminoacido

Gli amminoacidi vengono disciolti in DMF ad eccezione della Fenilalanina che, invece, viene sciolta in N – metil – 2 – pirrolidone (NMP). Per evitare che reazioni indesiderate abbiano luogo

durante la sintesi, il gruppo α – amminico dell'amminoacido e gli eventuali gruppi reattivi in catena laterale sono protetti utilizzando dei gruppi protettori; al terminale N è pertanto presente il gruppo protettore Fmoc (N^{α} – 9 - fluorenilmetilcarbonile) (Figura 2.9), che è base – labile. La protezione del gruppo α – amminico è temporanea e la sua deprotezione è necessaria per l'aggancio dell'amminoacido successivo nella sequenza; la sua rimozione avviene in ambiente basico, utilizzando una soluzione composta dal 40% di Piperidina in DMF. Al contrario, i gruppi protettori che si trovano in catena laterale sono acido – labili e vengono rimossi solo alla fine del processo di sintesi tramite una soluzione di acqua MilliQ, trietilsilano (TES) e acido trifluoroacetico (TFA) (procedimento spiegato al Paragrafo 2.3.3) [29].

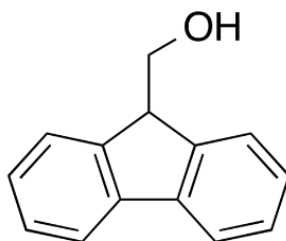


Figura 2.9: Struttura del gruppo Fmoc

Inizialmente, la resina viene pesata all'interno di un reattore, rigonfiata con dimetilformammide (DMF) e il primo amminoacido della sequenza peptidica desiderata, quello C – terminale, che è attaccato alla resina tramite legame covalente. In questo lavoro di tesi il passaggio appena descritto non è stato necessario, in quanto sono state utilizzate delle resine precaricate con il primo amminoacido della sequenza desiderata. La sequenza del peptide è stata ottenuta per mezzo di una serie di cicli automatizzati di deprotezione e *fmoc*. Il processo di deprotezione è necessario per rimuovere il gruppo Fmoc dal terminale N dell'amminoacido sulla resina, per permettergli di reagire con il gruppo carbossilico libero dell'amminoacido successivo, in modo da formare un legame peptidico. Per attivare il gruppo carbossilico durante la reazione di *coupling* sono state utilizzate due soluzioni: HBTU/Oxyma Pure in DMF e DIPEA in DMF. Una volta completata la sintesi, si esegue la deprotezione del gruppo α – amminico dell'ultimo amminoacido inserito in catena.

Per assicurarsi che la resa di reazione sia elevata, in particolare se la sequenza peptidica desiderata è molto lunga, si inseriscono nella sintesi *coupling* doppi. Questo perché la resa è più elevata nei primi step della sintesi e poi tende a diminuire con l'aumento del numero di cicli di *coupling*, in quanto gli amminoacidi precedenti potrebbero non essersi legati correttamente. Per verificare che la resa si mantenga alta, si possono inserire anche dei Test alla Ninidrina o Kaiser Test (procedimento spiegato al Paragrafo 2.3.2) durante la sintesi.

Uno schema generale dei vari passaggi del processo di sintesi peptidica su fase solida (SPPS) è illustrato di seguito (Figura 2.10):

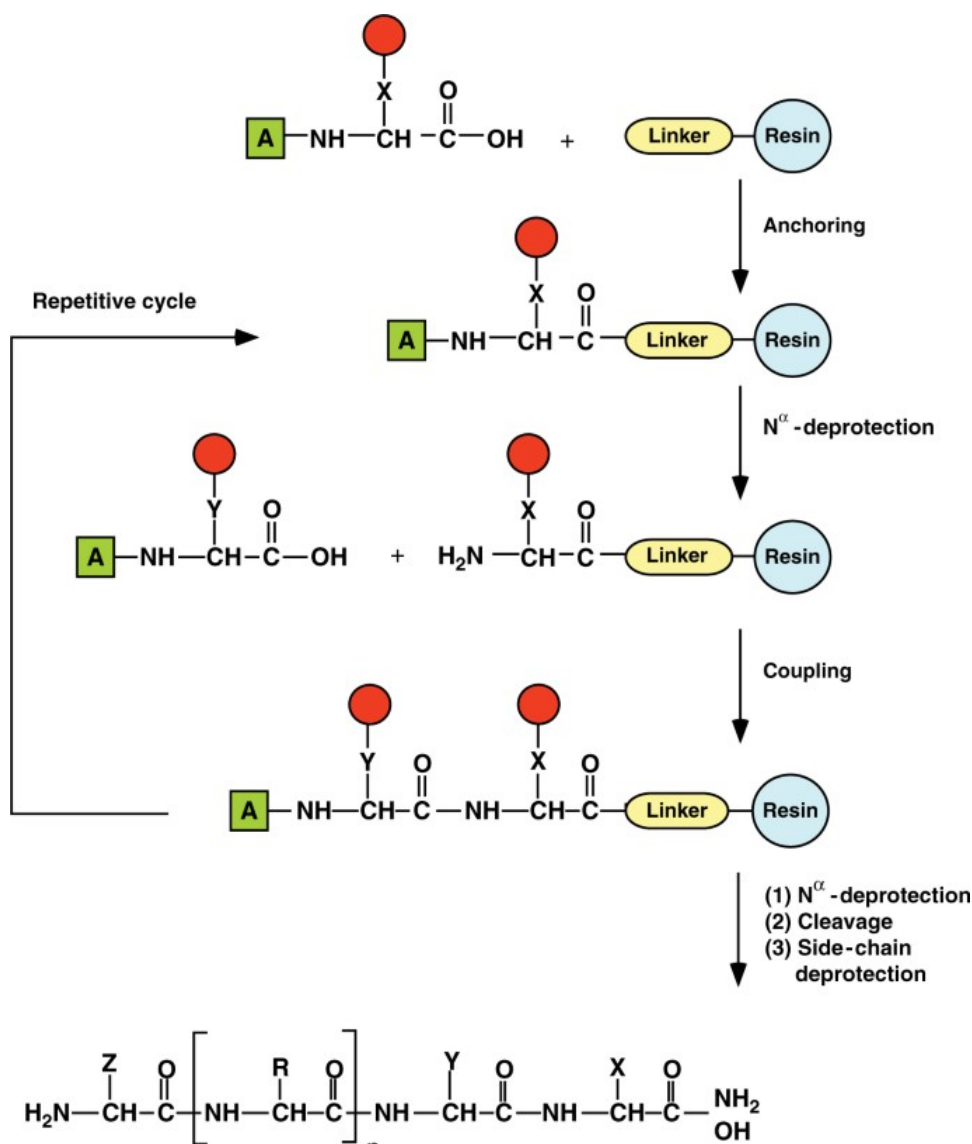


Figura 2.10: Schema della SPPS

Il peptide ottenuto dalla sintesi viene definito grezzo; al contrario, il peptide si definisce puro una volta sottoposto a rigorosa purificazione. Questo procedimento viene eseguito tramite tecniche cromatografiche, al termine delle quali ci si aspetta che il peptide puro produca un singolo picco simmetrico in analisi HPLC [30]. Per verificare l'identità del peptide desiderato si utilizza la spettrometria di massa.

2.3.2 Test alla Ninidrina

Il test alla Ninidrina (o Kaiser test) è un test qualitativo e quantitativo utilizzato per rilevare la presenza di gruppi amminici liberi e valutare la resa della reazione di *coupling*. Il test è basato sulla reazione dell'ammina libera con la Ninidrina, come mostrato in figura (Figura 2.11). Un

elevato numero di ammine libere corrisponde ad una resa di *coupling* bassa e lo si può vedere anche dal colore della soluzione, che tende verso il blu/viola scuro.

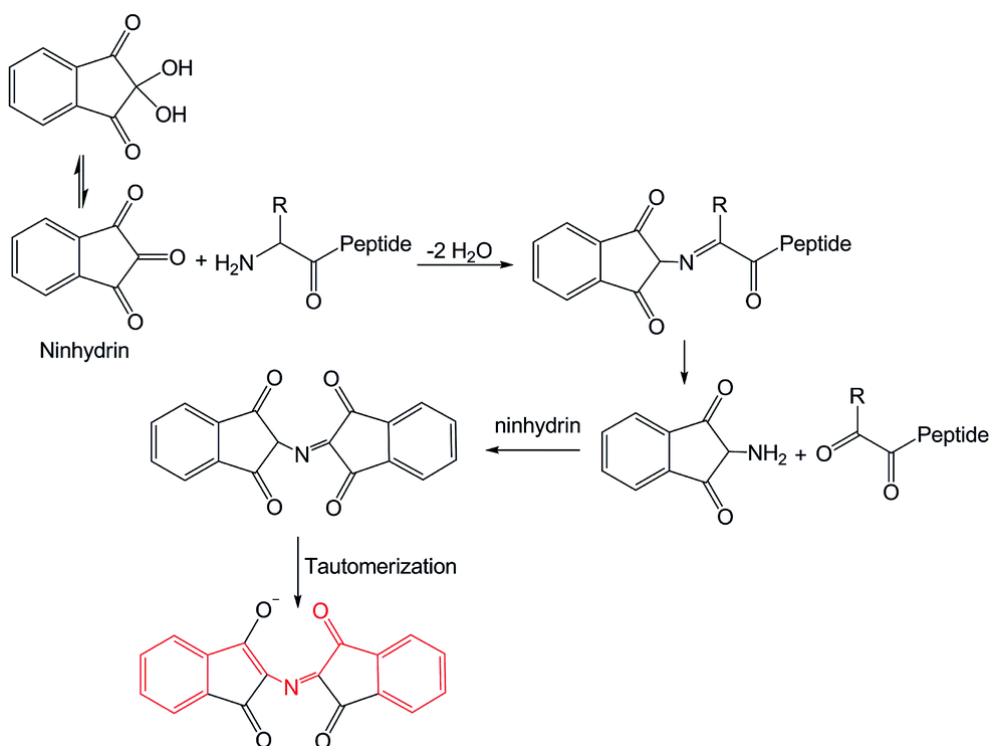


Figura 2.11: Reazione del gruppo amminico libero con la Ninidrina

Il primo step per eseguire un Kaiser test è seccare la resina (procedimento spiegato al Paragrafo 2.3.3) e, successivamente, pesarne una quantità compresa tra 2 e 8 mg in una provetta. Durante la procedura di asciugatura della resina è stato acceso lo spettrofotometro, impostato a 570 nm, e la piastra riscaldante a 100°C. Nella provetta contenente la resina sono stati aggiunti i seguenti reagenti, in quest'ordine: 75 µL di Monitor 1, 100 µL di Monitor 2 e 75 µL di Monitor 3. In un'altra provetta è stata creata una soluzione di controllo aggiungendo la medesima sequenza di reagenti senza la resina. Create le due soluzioni, sono state messe nella piastra riscaldante a 100° per 5 minuti e, una volta finito il tempo, la reazione è stata bloccata aggiungendo 4,8 mL di Monitor 4 (60% di etanolo in acqua MilliQ) in entrambe le provette; a questo punto si possono osservare cambiamenti di colore e valutazioni qualitative possono essere fatte se la soluzione con la resina diventa più scura.

In seguito, sono state utilizzate due cuvette per leggere il valore di assorbanza con lo spettrofotometro. La prima misurazione, detta "*back correction*" è stata eseguita inserendo Monitor 4 in entrambe le cuvette ad una lunghezza d'onda di 570 nm. Successivamente, una delle due cuvette è stata lavata per inserire la soluzione di controllo (bianco) ed è stata messa nello spettrofotometro per registrare il valore di assorbanza. Infine, la stessa cuvetta è stata lavata nuovamente per inserire la soluzione del campione.

Seguendo le formule riportate in seguito si possono calcolare la quantità di gruppi amminici liberi e la resa di *coupling* percentuale:

$$\mu\text{mol/g} = \frac{\Delta\text{Abs} \cdot \text{Vol} \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot P}$$

dove ΔAbs è la differenza tra i valori assorbanza delle due soluzioni, Vol è il volume della soluzione utilizzata in [mL], ε è il coefficiente di estinzione molare pari a $1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e P è il peso del campione in [mg].

La resa di *coupling* percentuale è:

$$\%coupling = \left(1 - \frac{\mu\text{mol/g}}{\text{nuova sostituzione} \cdot 10^3} \right) \cdot 100$$

dove *nuova sostituzione* è la nuova sostituzione della resina e, noto il peso molecolare del peptide in crescita, può essere calcolata come:

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

In generale, se la resa ottenuta è superiore a 97% lo si può considerare come un buon risultato.

2.3.3 Deprotezione delle catene laterali e sblocco dalla resina

Una volta terminata la sintesi, la resina va seccata: la DMF non è un solvente volatile; quindi, il peptide su resina va lavato tre volte con diclorometano (DCM), usando una beuta in cui viene creato il vuoto per permettere ai liquidi di passare attraverso il filtro. Il peptide su resina presente nel reattore va poi coperto con carta filtro e messo in campana da vuoto per un'ora.

Il passo successivo è procedere con la deprotezione dei gruppi in catena laterale e lo sblocco del peptide grezzo dalla resina. Queste due procedure si possono eseguire contemporaneamente perché utilizzano lo stesso procedimento: nel reattore vanno aggiunti in ordine acqua MilliQ, trietilsilano (TES) e acido trifluoroacetico (TFA). La percentuale dei reagenti è rispettivamente 2.5%, 2.5% e 95,5% del volume totale. In ogni reattore è stato inserito un volume totale di 5 mL e più nello specifico 0.125 mL di acqua MilliQ, 0.125 mL di TES e 4.75 mL di TFA; la soluzione è stata lasciata reagire per 90 minuti agitando manualmente il reattore. Al termine della reazione, la soluzione è stata separata dalla resina; la resina è stata lavata per tre volte con TFA. La soluzione contenente il peptide sbloccato e deprotetto e i lavaggi sono stati trasferiti in un pallone e portati a piccolo volume utilizzando l'evaporatore rotante. Successivamente, il peptide è stato precipitato usando etere etilico freddo sotto agitazione magnetica e filtrato

tramite un gooch G4. Il peptide precipitato contenuto nel gooch è stato seccato in campana da vuoto per un'ora.

2.3.4 Cromatografia HPLC

La *High – performance Liquid Chromatography* (HPLC) è stata impiegata per analizzare sia il peptide grezzo che quello puro. Questa tecnica utilizza differenti tipologie di colonne cromatografiche, un eluente inorganico composto da 0.05% di TFA in acqua MilliQ (eluente A), un eluente organico composto da 0.05% di TFA in Acetonitrile (eluente B), un sistema di pompe e una lampada che può essere impostata a 214 o a 280 nm, sulla base della sequenza peptidica da analizzare. Per rimuovere l'aria dagli eluenti si usa un flusso continuo di elio [30]. Il campione va inserito in una *vial* con un volume variabile tra 20 e 200 μ L e, definite le condizioni di gradiente, il flusso è impostato a 1 mL/min. Ogni peptide interagisce con la colonna in modo diverso e, pertanto, eluisce a differenti concentrazioni di eluente B. Quindi, il gradiente viene impostato per partire da basse percentuali di B e poi aumentare; il flusso di 1 mL/min è mantenuto costante, mentre le percentuali degli eluenti A e B variano nel tempo secondo uno specifico gradiente, scelto sulla base della sequenza da analizzare. Generalmente, il peptide grezzo restituisce un cromatogramma con vari picchi, mentre i peptidi puri presentano un unico picco simmetrico [30].

L'HPLC semipreparativa viene impiegata per la purificazione del peptide grezzo e funziona in modo simile a quello appena descritto: si utilizzano gli stessi eluenti, ma le colonne hanno diametro maggiore e pertanto il flusso può essere di 4 mL/min. Per la purificazione, il peptide va sciolto in acqua MilliQ o eluente A, in rapporto 1:1, e il volume usato è maggiore, di solito intorno a 30 – 40 mL. Seguendo l'assorbanza delle soluzioni eluite dalla colonna riportata sul cromatogramma, è possibile dividere la soluzione eluita in frazioni distinte nel corso del tempo. Successivamente, le frazioni vengono analizzate nuovamente con cromatografia analitica per verificare il livello di omogeneità e individuare quelle corrispondenti al peptide puro [30].

2.3.5 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica analitica usata per stimare il peso molecolare di un campione. Le tecniche più utilizzate sono la MALDI – TOF (*Matrix – assisted laser desorption ionization Time – of – flight*) e la ESI (*electron spray ionization*). Per questa tesi è stata utilizzata la spettrometria di massa MALDI perché produce ioni a carica singola, il confronto tra i dati è più semplice e non richiede precedenti analisi cromatografiche sul campione.

Per eseguire l'analisi dei peptidi, il campione è stato coperto con un composto organico che assorbe l'energia del laser, che viene chiamato matrice. Per analizzare le sequenze peptidiche la matrice utilizzata in questa tesi è una soluzione composta al 50% da acqua MilliQ e al 50% da Metanolo, in cui vengono aggiunti lo 0.1% di TFA e 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ di acido α – ciano – 4 – idrossicinnamico (CHCA).

Lo strumento utilizzato per la MS – MALDI prevede di disporre 1 μL di campione da analizzare su un'apposita piastra, sul quale viene poi messo 1 μL di matrice; il campione va lasciato ad asciugare prima dell'inizio dell'analisi. Una volta inserito nello strumento, il campione è ionizzato con un raggio laser in maniera *soft*, in modo da non provocare perdite elevate di campione. La ionizzazione crea ioni positivi a carica singola che vengono accelerati da un potenziale elettrico all'interno del tubo di accelerazione; gli ioni rilasciati vengono accelerati e separati dal loro diverso rapporto massa su carica (m/z) sulla base del tempo necessario per percorrere l'intera lunghezza del tubo. Questo valore viene definito tempo di volo (*time of flight* o *TOF*) e a ciascuno corrisponde un diverso rapporto m/z . Sulla base delle informazioni ottenute rilevando e misurando ciascun valore di TOF, viene creato uno spettro, chiamato “impronta digitale di massa del peptide”, in cui si vedono diversi picchi in corrispondenza dei pesi molecolari delle componenti presenti all'interno del campione. Tanto più alto è il picco, tanto maggiore è la presenza di quella determinata componente nel campione (Figura 2.12) [31].

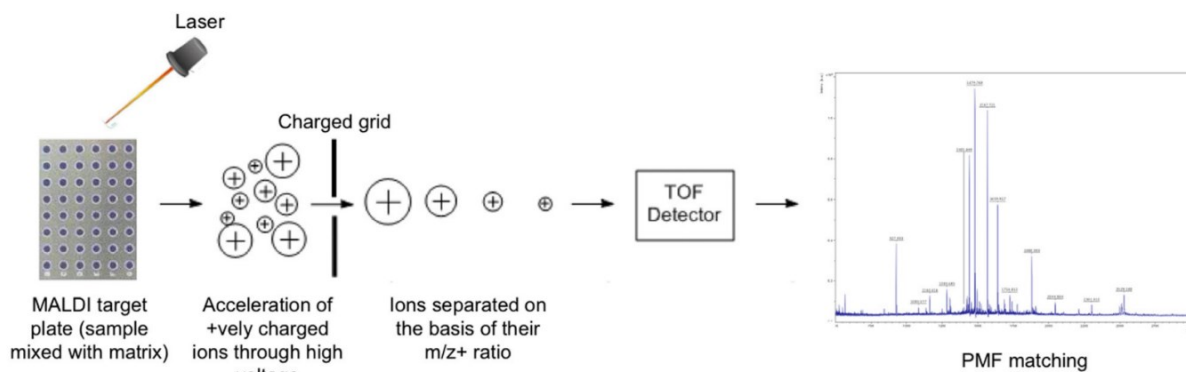


Figura 2.12: Analisi di spettrometria di massa

2.4 Saggi Biologici

2.4.1 Curve di Crescita

Le curve di crescita sono state eseguite in piastre da 96 pozzetti con un volume totale di 100 μL per ciascun pozzetto. In ciascuno di essi sono stati posti 80 μL di terreno di coltura BHI (*Brain Heart Infusion broth*) usando una micropipetta multicanale. Successivamente, 10 μL di coltura batterica sono stati inoculati con una concentrazione di 10^5 UFC/mL nella prima fila della

piastra; poi, 10 μL di ciascun peptide sono stati inseriti in duplicato nella prima riga. Per ottenere concentrazioni differenti di peptide, sono state eseguite delle diluizioni prelevando 10 μL dai pozzetti della prima riga e diluendoli nella seconda riga, proseguendo fino all'ultima riga. La piastra è stata poi incubata all'interno del Varioskan LUXTM a 37° con il coperchio per evitare che ci siano contaminazioni. Dopo aver impostato il programma per leggere l'assorbanza a 600 nm, la crescita batterica nei diversi pozzetti è stata registrata ogni ora per 20 ore. Trascorse le 20 ore, i dati sono stati esportati ed elaborati per ottenere i grafici delle curve di crescita.

2.4.2 Saggi di vitalità cellulare

Il saggio alla Resazurina è stato eseguito per escludere la possibilità che l'assorbanza ottenuta nei saggi precedenti (Paragrafo 2.3.6) sia dovuta a detriti cellulari.

Il saggio alla Resazurina (o Saggio Alamar Blue) è un saggio fluorimetrico usato per misurare la capacità metabolica delle cellule, andando ad indicare la vitalità cellulare o la citotossicità. Questo saggio è basato sulla riduzione della resazurina (indicatore blu non fluorescente) in resorufina (indicatore viola/rosso) da parte della catena respiratoria mitocondriale nelle cellule vive (Figura 2.13); la quantità di resorufina è direttamente proporzionale al numero di cellule vive. La lettura dell'assorbanza è stata possibile utilizzando la “*fluorescent mode*” del Varioskan LUXTM con Ex/Em di 560/590 nm.

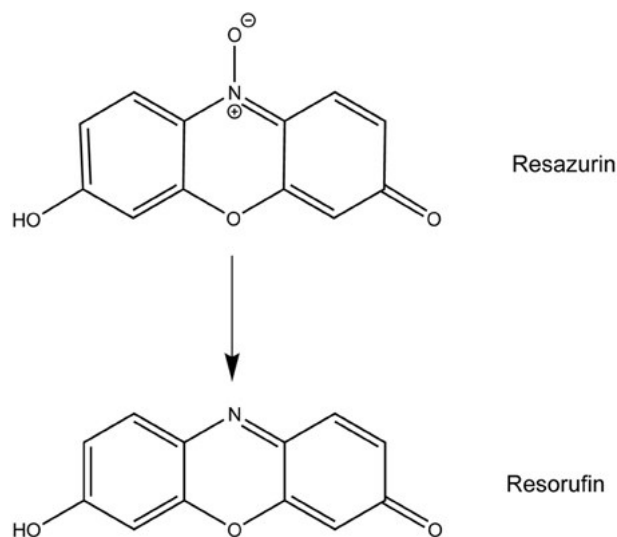


Figura 2.13 : Reazione di riduzione della Resazurina in Resorufina

Per il test 100 μL di resazurina sono stati versati in una piastra da 96 pozzetti, che sono stati lasciati in incubazione per 3 ore a 37°C in condizioni statiche. Una volta terminate le 3 ore, le informazioni sulla vitalità delle cellule sono state ottenute con il Varioskan LUXTM.

2.4.3 Saggi per valutare il Biofilm

Per valutare la capacità dei peptidi di ridurre o inibire la formazione di biofilm da parte dello *S. mutans*, è stato eseguito un saggio sul Biofilm utilizzando un kit MBEC Assay®. Il kit MBEC Assay® è formato da un coperchio di plastica con 96 *peg* di polistirene e 96 pozzetti corrispondenti. Il biofilm si forma sui *peg* e permette un saggio comparativo sulla crescita del biofilm con differenti stimoli alle medesime condizioni di coltura. Questo saggio è stato eseguito per comprendere dopo quanto tempo la formazione di biofilm è al suo massimo e come gli stimoli influenzano la sua crescita.

Per il saggio, 270 µL di coltura batterica sono stati posti all'interno della piastra MBEC. Ad eccezione del primo e del settimo pozzetto, 30 µL di stimoli a concentrazione 1 ng/mol sono stati aggiunti alla prima riga a tempi differenti: i peptidi sono stati iniettati nella prima metà della prima riga immediatamente, mentre i pozzetti rimanenti sono stati riempiti dopo 12 ore. Questo è stato fatto per mostrare gli effetti dei peptidi a due tempi diversi. Il biofilm è stato quindi evidenziato mediante colorazione cristal violetto.

2.4.4 Analisi Statistica

I dati ottenuti dai saggi biologici sono stati elaborati usando il software GraphPad Prism versione 8.4.3. I risultati delle curve di crescita, il saggio alla Resazurina e dei saggi sui biofilm sono stati confrontati utilizzando il test di analisi della varianza unidirezionale (One way ANOVA). È stato eseguito il test di confronto multiplo di Turkey per confrontare tra loro tutte le condizioni, con livello di significatività del 5%.

Capitolo 3

PARTE SPERIMENTALE

3.1 18 – CSP scrambled (18CSPs)

3.1.1 Sintesi del peptide

Il peptide 18 – CSP *scrambled* è stato sintetizzato utilizzando la sintesi su fase solida (SPPS) e la chimica Fmoc, impiegando il sintetizzatore automatico Syro I. La sequenza del peptide è stata ottenuta utilizzando un software online (mimotopes.com) per randomizzare la sequenza nativa del 18 – CSP. Come supporto solido è stata scelta la resina Fmoc – Glu(OtBu) – Wang Resin (sostituzione 0.77 mmol/g) e la scala di sintesi è 0.125 mmol. Pertanto, sono stati usati 162 mg di resina.

La sequenza peptidica è:



con peso molecolare teorico del peptide pari a 2066.308 Da.

Lista degli amminoacidi utilizzati:

- Fmoc – Ala – OH;
- Fmoc – Phe – OH;
- Fmoc – Gly – OH;
- Fmoc – Leu – OH;
- Fmoc – Asn(Trt) – OH;
- Fmoc – Arg(Pbf) – OH;
- Fmoc – Ser(tBu) – OH;
- Fmoc – Thr(tBu) – OH;

dove Trt, Pbf e tBu sono i gruppi protettori dei gruppi funzionali in catena laterale degli amminoacidi.

Tutti gli amminoacidi sono stati solubilizzati in Dimetilformammide (DMF) ad eccezione della Fenilalanina che, invece, è stata disciolta in N – metil – pirrolidone (NMP). La scala di sintesi usata è: 5 equivalenti di amminoacidi, 5 equivalenti di soluzione attivante HBTU e 10 equivalenti di DIPEA. Pertanto, sono state preparate le seguenti soluzioni: 0.45 M di HBTU/Oxyma Pure in DMF, 40% di Piperidina in DMF e 1.8 N DIPEA in NMP.

La sintesi consiste in 17 cicli di *coupling*, ognuno dei quali è doppio. Alla fine della sintesi è stato aggiunto un ciclo di *Fmoc Deprotection* per togliere il gruppo protettore dal gruppo α – amminico dell'ultimo amminoacido della catena. Successivamente, il reattore è stato lavato per tre volte con DCM su una beuta da vuoto e lasciato in campana a vuoto per un'ora per seccarne il contenuto.

Peso teorico del peptide con catene laterali protette = 258 mg

Peso ottenuto del peptide con catene laterali protette = 239 mg

3.1.2 Sblocco del peptide dalla resina

Lo sblocco del peptide dalla resina e la deprotezione dei gruppi funzionali in catena laterale sono stati eseguiti contemporaneamente seguendo il metodo illustrato nel capitolo precedente (Paragrafo 2.3.3).

Il procedimento prevede di inserire nel reattore i seguenti reagenti:

- 0.125 mL di acqua MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.75 mL di TFA.

La reazione di sblocco è durata 90 minuti. Successivamente, il reattore è stato lavato tre volte con TFA su beuta da vuoto; in questo modo, il peptide grezzo, staccato dalla resina e con le catene laterali sbloccate, viene trasferito sul fondo della beuta, mentre la resina è rimasta nel reattore. Il liquido contenente il peptide grezzo è stato trasferito in un pallone di vetro ed è stato utilizzato l'evaporatore rotante per far evaporare l'acido e ridurre la soluzione a piccolo volume. Completato questo passaggio, il contenuto del pallone è stato precipitato con etere etilico freddo sotto agitazione magnetica, filtrato con un gooch G4 e lasciato a seccare per un'ora in campana a vuoto. Al termine del processo sono stati ottenuti 203 mg di 18 – CSP *scrambled* grezzo.

3.1.3 Caratterizzazione del peptide

Per caratterizzare il peptide grezzo è stata eseguita una *Reverse – phase high performance liquid chromatography* (RP – HPLC). Per l'analisi è stata utilizzata la colonna Vydac C18 218TP (5 μ m, 100 Å, 4.6 x 250 mm, Waters) alle seguenti condizioni: gradiente da 25% a 45% di eluente B in 40 minuti a flusso 1 mL/min. Sono stati iniettati 100 μ L di peptide grezzo sciolto in acqua MilliQ ad una concentrazione 1 mg/mL e il detector è stato impostato a 214 nm. Gli eluenti utilizzati sono Eluente A composto da 0.05% di TFA in acqua MilliQ e Eluente B preparato con 0.05% di TFA in acetonitrile (Figura 3.1).

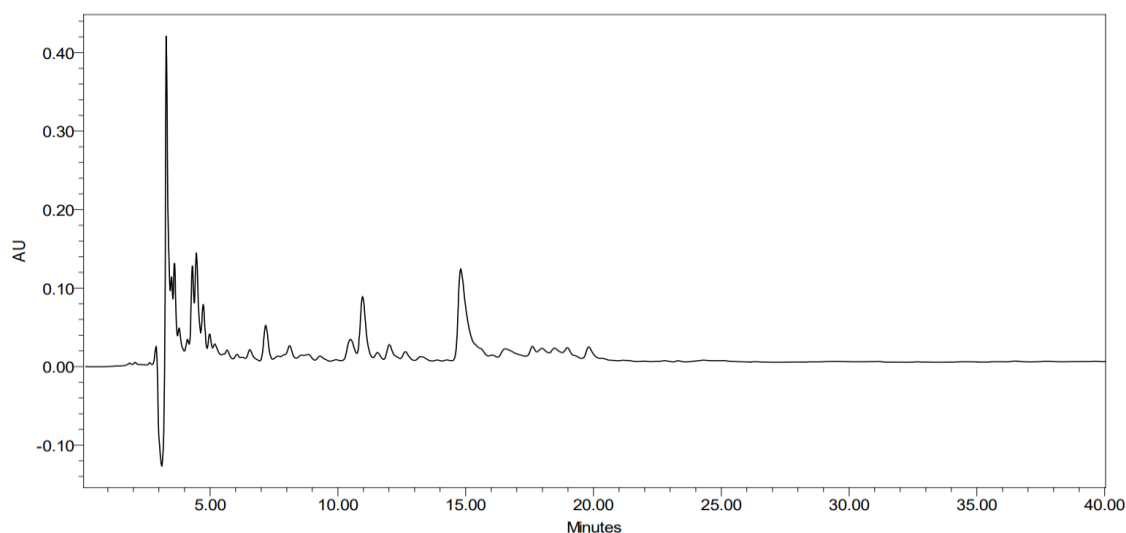


Figura 3.1: HPLC analitica del peptide 18 – CSP scrambled grezzo, colonna Vydac C18, volume iniettato 100 μ L, flusso 1 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 25% a 45% di B in 40 minuti, $\lambda = 214$ nm. Sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di assorbanza.

Per assicurarsi che il peptide voluto sia effettivamente tra i prodotti di sintesi, è stata eseguita anche un'analisi spettrometrica di massa MALDI di controllo. Il peso molecolare teorico del 18 – CSP scrambled senza gruppi protettori è 2066.308 Da. È riportato in Figura 3.2 il risultato ottenuto dall'analisi, che conferma la presenza effettiva del peptide voluto. I picchi di intensità inferiore che si osservano nel grafico sono riferiti alle componenti secondarie da cui andrà purificato il peptide.

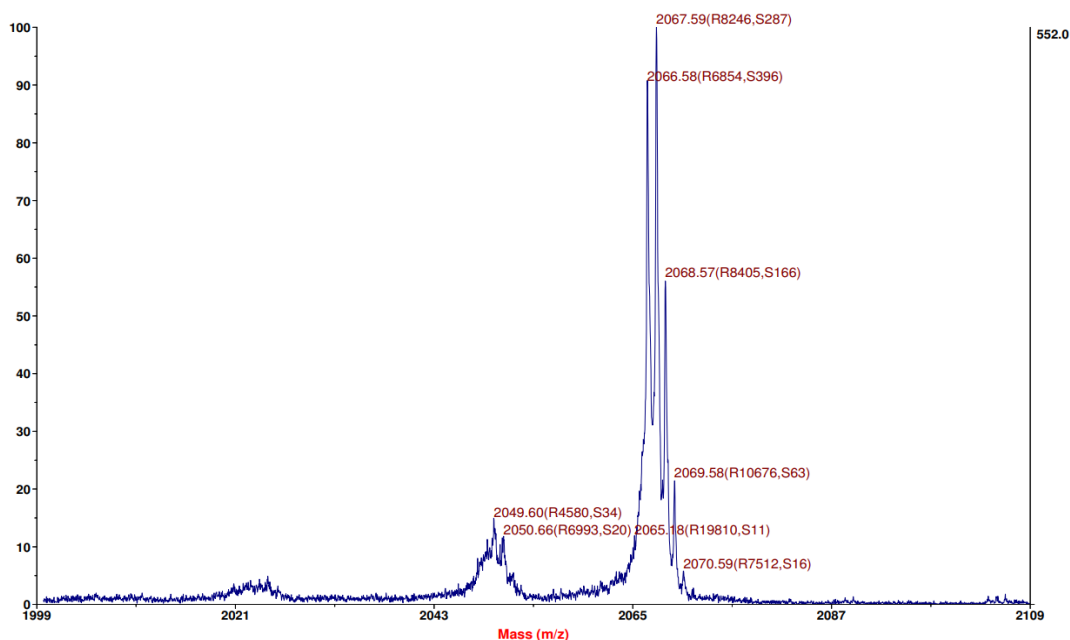


Figura 3.2: Spettro di massa MALDI del peptide grezzo 18 – CSP scrambled

3.1.4 Purificazione del peptide

Per purificare il peptide è stata impiegata una HPLC semipreparativa usando la colonna cromatografica Vydac C18 218TP Preparative Column (5 μ m, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters)

con gradiente da 20% a 35% di eluente B in 60 minuti a flusso 4 ml/min. Per ogni corsa cromatografica sono stati analizzati 30 mg di peptide grezzo sciolto in rapporto peso/volume 1:1 in una soluzione composta da DMF e acqua MilliQ in rapporto 1:14. Il detector è stato impostato a 214 nm. Per l'analisi sono stati utilizzati eluente A (0.05% di TFA in acqua MilliQ) e eluente B (0.05% di TFA in acetonitrile). Di seguito (Figura 3.3) viene riportato un cromatogramma semipreparativo delle sei corse eseguite complessivamente.

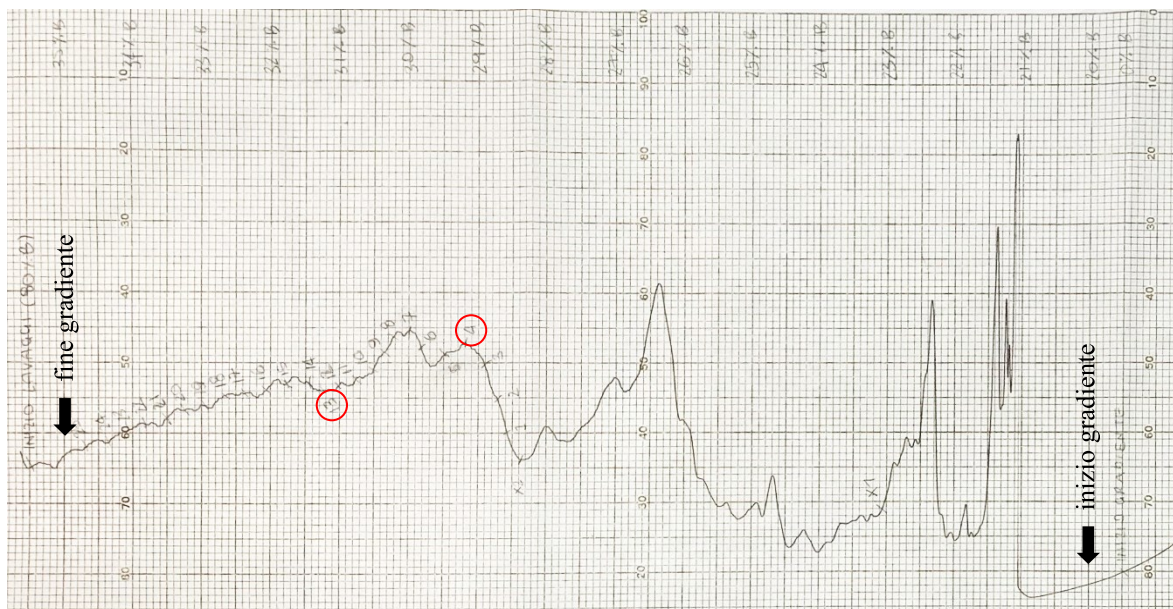


Figura 3.3: cromatografia semipreparativa del peptide 18 – CSP scrambled, colonna Vydac C18 218TP Preparative Column, volume iniettato 30 mL, flusso 4 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 20% a 35% di B in 60 minuti, $\lambda = 214$ nm. Velocità di scorrimento della carta: 0.5 cm/min. In rosso sono segnate la prima e l'ultima frazione scelta per il pool che compone il cuore del peptide.

Per verificare il grado di purificazione ottenuto, sono state eseguite ulteriori analisi HPLC ed è stato osservato un grado di omogeneità pari a 72.36% (Figura 3.4). Sono state raccolte le frazioni da 4 a 13 in un pool per essere liofilizzate.

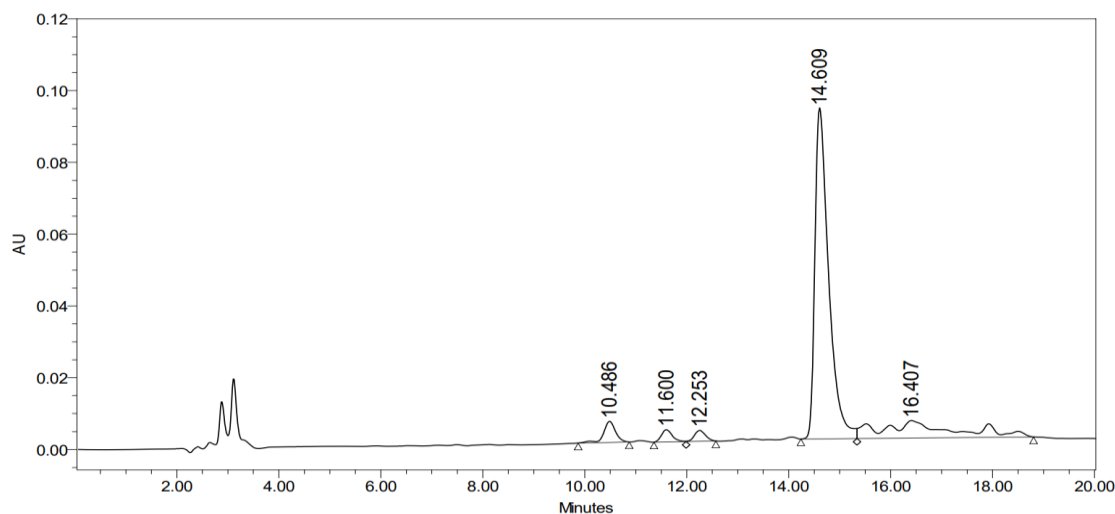


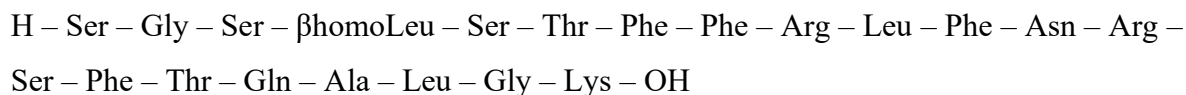
Figura 3.4: HPLC analitica del peptide 18 – CSP scrambled purificato, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C18, volume iniettato 100 μ L, flusso 1 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 25% a 35% di B in 20 minuti, $\lambda = 214$ nm.

3.2 21 – CSP β homoLeu4 (21CSPLeu)

3.2.1 Sintesi del peptide

Il peptide 21 – CSP Leu4 è stato sintetizzato utilizzando la sintesi su fase solida (SPPS) e la chimica Fmoc, impiegando il sintetizzatore automatico Syro I. Come supporto solido è stata scelta la resina Tentagel S Ac – Lys(Boc) – Fmoc (sostituzione 0.22 mmol/g) e la scala di sintesi è 0.125 mmol. Pertanto, sono stati usati 568 mg di resina.

La sequenza peptidica è:



con peso molecolare teorico del peptide pari a 2378.721 Da.

Lista degli amminoacidi utilizzati:

- Fmoc – Ala – OH;
- Fmoc – Phe – OH;
- Fmoc – Gly – OH;
- Fmoc – Leu – OH;
- Fmoc – Asn(Trt) – OH;
- Fmoc – Gln(Trt) – OH;
- Fmoc – Arg(Pbf) – OH;
- Fmoc – Ser(tBu) – OH;
- Fmoc – Thr(tBu) – OH;
- Fmoc – β homoLeu – OH;

dove Trt, Pbf e tBu sono i gruppi protettori dei gruppi funzionali in catena laterale degli amminoacidi.

Tutti gli amminoacidi sono stati disciolti in Dimetilformammide (DMF) ad eccezione della Fenilalanina che, invece, è stata disciolta in N – metil - pirrolidone (NMP). La scala di sintesi usata è: 5 equivalenti di amminoacidi, 5 equivalenti di soluzione attivante HBTU e 10 equivalenti di DIPEA. Pertanto, sono state preparate le seguenti soluzioni: 0.45 M di HBTU/Oxyma Pure in DMF, 40% di Piperidina in DMF e 1.8 N DIPEA in NMP.

La sintesi consiste in 20 cicli di *coupling*, di cui i primi cinque e il diciassettesimo sono stati impostati come singoli, mentre tutti gli altri sono doppi. Sono stati inseriti degli STOP al termine dei cicli quinto, undicesimo, quattordicesimo e diciassettesimo per eseguire dei Kaiser

test (procedura illustrata al Paragrafo 2.3.2) per valutare la resa di reazione; al termine di ciascun test è stata ottenuta una resa maggiore del 97%. Rispettivamente, sono state ottenute rese di *coupling* pari a 97.5%, 98.77%, 98.2% e 99.3%. Alla fine della sintesi è stato aggiunto un ciclo di *Fmoc Deprotection* per togliere il gruppo protettore dal gruppo α – amminico dell'ultimo amminoacido della catena. Successivamente, il reattore è stato lavato per tre volte con DCM su una beuta da vuoto e lasciato in campana a vuoto per un'ora per seccarne il contenuto.

Peso ottenuto di resina + peptide con catene laterali protette = 662 mg

3.2.2 Sblocco del peptide dalla resina

Lo sblocco del peptide dalla resina e la deprotezione dei gruppi funzionali in catena laterale sono stati eseguiti contemporaneamente seguendo il metodo illustrato nel capitolo precedente (Paragrafo 2.3.3).

Il procedimento prevede di inserire nel reattore i seguenti reagenti:

- 0.125 mL di acqua MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.75 mL di TFA.

La reazione di sblocco è durata 90 minuti. Successivamente, il reattore è stato lavato tre volte con TFA su beuta da vuoto; in questo modo, il peptide grezzo, sbloccato dalla resina e con le catene laterali libere, viene trasferito sul fondo della beuta, mentre la resina è rimasta nel reattore. Il liquido contenente il peptide grezzo è stato trasferito in un pallone di vetro ed è stato utilizzato l'evaporatore rotante per far evaporare l'acido e ridurre la soluzione a piccolo volume. Completato questo passaggio, il contenuto del pallone è stato precipitato con etere etilico freddo sotto agitazione magnetica, filtrato con un gooch G4 e lasciato a seccare per un'ora in campana a vuoto. Al termine del processo sono stati ottenuti 144 mg di 21 – CSP Leu4 grezzo.

3.2.3 Caratterizzazione del peptide

Per caratterizzare il peptide grezzo è stata eseguita una *Reverse – phase high performance liquid chromatography* (RP – HPLC). Per l'analisi è stata utilizzata la colonna Vydac C18 218TP (5 μ m, 100 Å, 4.6 x 250 mm, Waters) alle seguenti condizioni: gradiente da 30% a 40% di eluente B in 20 minuti a flusso 1 mL/min. Sono stati iniettati 100 μ L di peptide grezzo sciolto in acqua MilliQ alla concentrazione 1 mg/mL e il detector è stato impostato a 214 nm. Gli eluenti utilizzati sono Eluente A composto da 0.05% di TFA in acqua MilliQ e Eluente B preparato con 0.05% di TFA in acetonitrile (Figura 3.5).

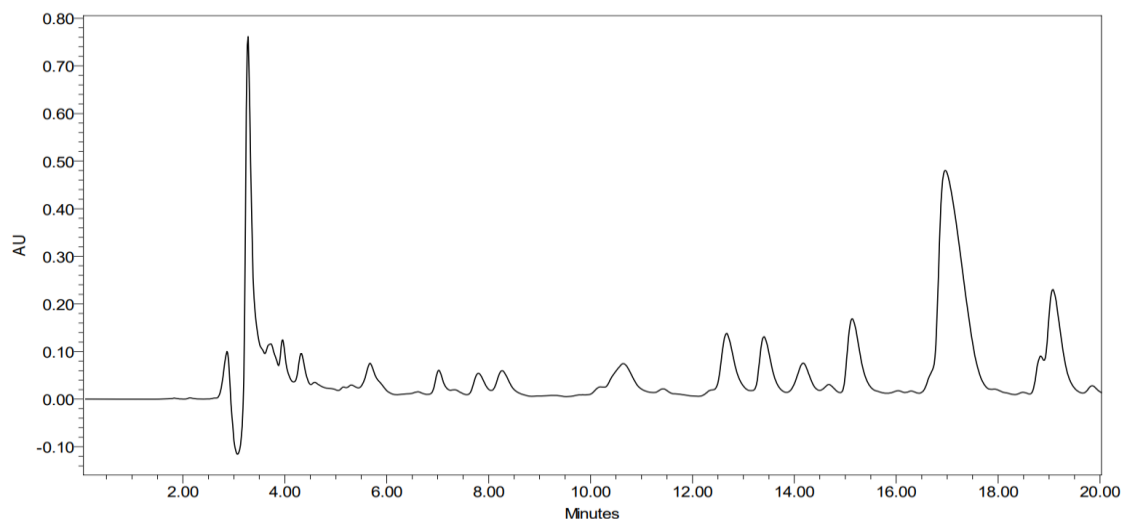


Figura 3.5: HPLC analitica del peptide 21 – CSP Leu4 grezzo, colonna Vydac C18, volume iniettato 100 μ L, flusso 1 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 30% a 40% di B in 20 minuti, $\lambda = 214$ nm. Sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di assorbanza

Per assicurarsi che il peptide voluto sia effettivamente tra i prodotti di sintesi, è stata eseguita anche un'analisi spettrometrica di massa MALDI di controllo. Il peso molecolare teorico del 21 – CSP Leu4 senza gruppi protettivi è 2378.721 Da. È riportato in Figura 3.6 il risultato ottenuto dall'analisi, che conferma la presenza effettiva del peptide voluto. I picchi di intensità inferiore che si osservano nel grafico sono riferiti alle componenti secondarie da cui andrà purificato il peptide.

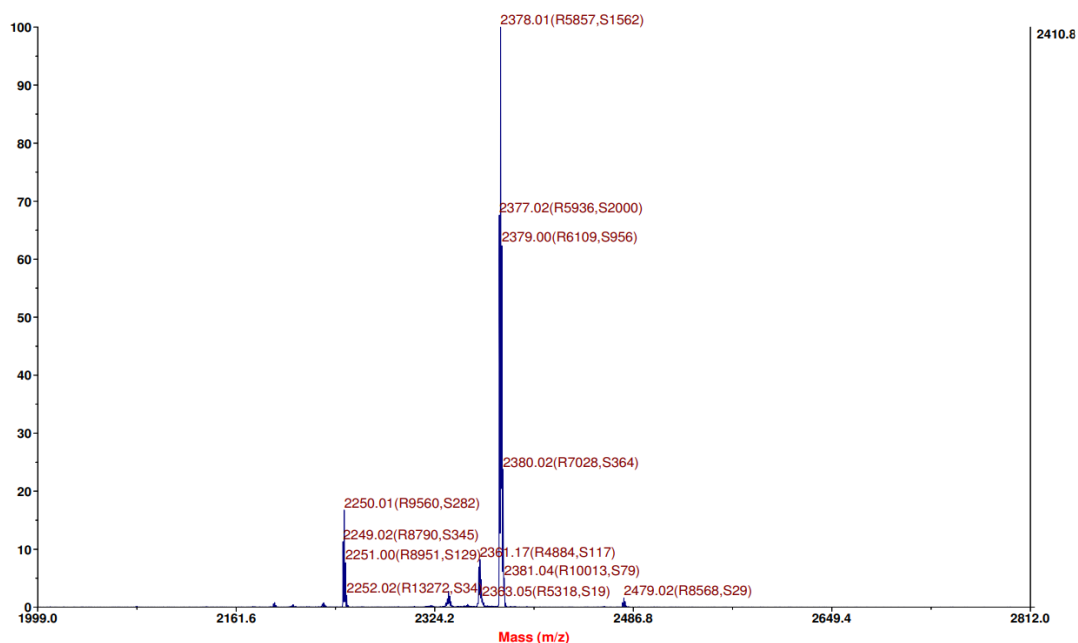


Figura 3.6: Spettro di massa MALDI del peptide grezzo 21 – CSP Leu4

3.2.4 Purificazione del peptide

Per purificare il peptide è stata impiegata una HPLC semipreparativa usando la colonna cromatografica Vydac C18 218TP Preparative Column (5 μ m, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters)

con gradiente da 26% a 40% di eluente B in 42 minuti a flusso 4 mL/min. Per ogni corsa cromatografica sono stati analizzati 40 mg di peptide grezzo sciolto in 40 mL eluente A. Il detector è stato impostato a 214 nm. Per l'analisi sono stati utilizzati eluente A (0.05% di TFA in acqua MilliQ) e eluente B (0.05% di TFA in acetonitrile). In Figura 3.7 è riportato un esempio di cromatogramma semipreparativo. In tutto sono state eseguite quattro cromatografie semipreparative.

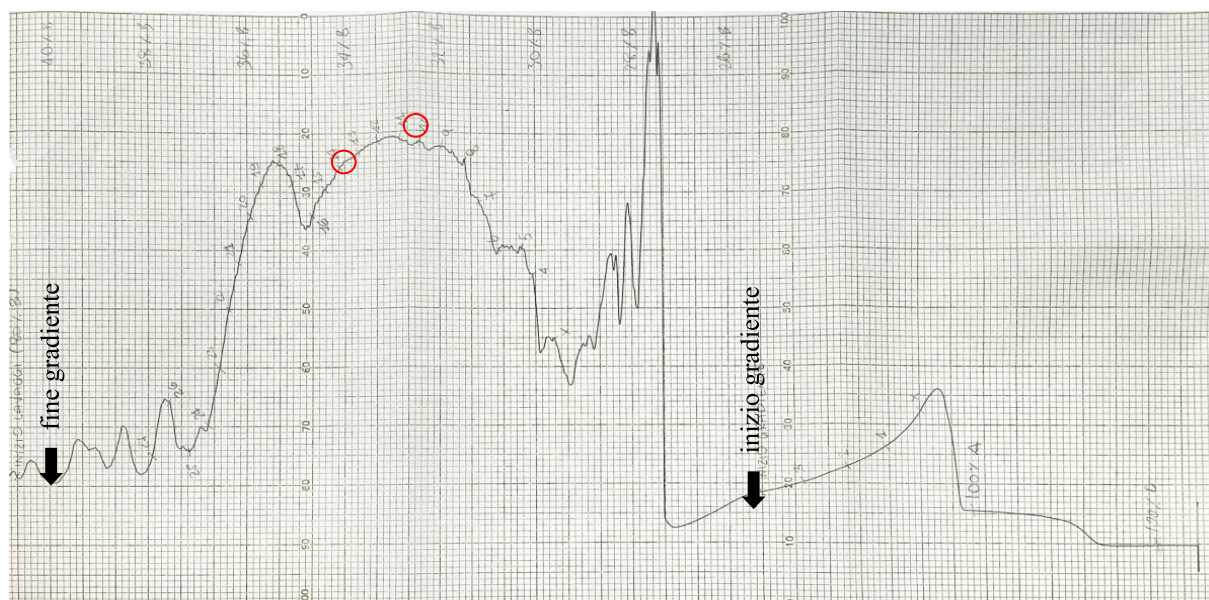


Figura 3.7: cromatografia semipreparativa del peptide 21 – CSP Leu4, colonna Vydac C18 218TP Preparative Column, volume iniettato 40 mL, flusso 4 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 26% a 40% di B in 42 minuti, $\lambda = 214$ nm. Velocità di scorrimento della carta: 0.5 cm/min. In rosso sono segnate la prima e l'ultima frazione scelta per il pool che compone il cuore del peptide 21 – CSP Leu4

Per verificare il grado di purificazione ottenuto, sono state eseguite ulteriori analisi HPLC ed è stato osservato un grado di omogeneità pari a 99.32% (Figura 3.8). Sono state raccolte le frazioni da 11 a 14 in un pool per essere liofilizzate.

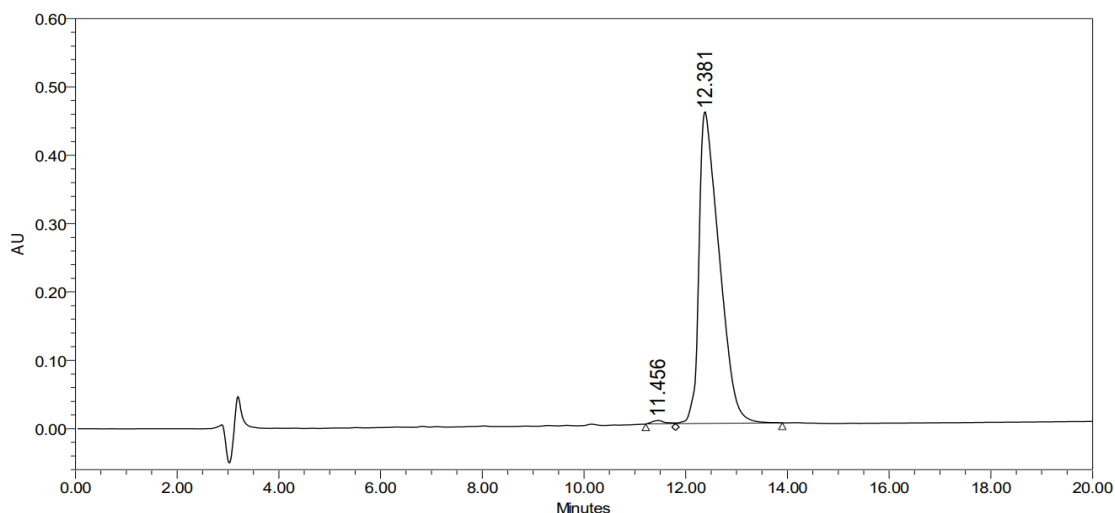


Figura 3.8: HPLC analitica del peptide 21 – CSP Leu4 purificato, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C18, volume iniettato 30 μ L, flusso 1 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 30% a 40% di B in 20 minuti, $\lambda = 214$ nm.

La sintesi consiste in 17 cicli di *coupling*, ognuno dei quali è doppio. Alla fine della sintesi è stato aggiunto un ciclo di *Fmoc Deprotection* per togliere il gruppo protettore dal gruppo α – amminico dell'ultimo amminoacido della catena. Successivamente, il reattore è stato lavato per tre volte con DCM su una beuta da vuoto e lasciato in campana da vuoto per un'ora per seccarne il contenuto.

Peso ottenuto di resina + peptide con catene laterali protette = 492 mg

3.3.2 Sblocco del peptide dalla resina

Il peptide grezzo è stato sbloccato dalla resina senza la reazione di deprotezione dei gruppi in catena laterale. Questa scelta è stata fatta per favorire la reazione di ciclizzazione, perché il terminale amminico della Ser e il terminale carbossilico della Gly sono gli unici gruppi liberi che possono reagire.

Per la reazione di sblocco sono stati preparati:

- acqua MilliQ fredda;
- una soluzione 1% TFA in DCM.

Inizialmente, un terzo della resina è stato trasferito in un becher e sono stati aggiunti 10 mL di soluzione TFA in DCM, che sono stati lasciati reagire per 15 minuti. Nel frattempo, è stato preparato un pallone contenente 1 mL di DMF, che è stato immerso in un bagno di acqua e ghiaccio. Terminata la reazione il contenuto del becher è stato filtrato utilizzando un gooch G3 e il contenuto della beuta da vuoto è stato versato nel pallone contenente DMF. È stato poi impiegato l'evaporatore rotante per ridurre il volume della soluzione fino ad ottenere 0.5 – 2 mL. Successivamente, il peptide protetto in catena laterale, contenuto nel pallone, è stato precipitato con acqua MilliQ fredda sotto agitazione magnetica e filtrato con gooch G4. Il processo appena descritto è stato ripetuto 3 volte per ottenere una soluzione di acqua MilliQ fredda limpida e, al termine, entrambi i gooch G3 e G4 sono stati lasciati a seccare in campana per un'ora. Terminato il processo di sblocco anche per gli altri 2/3 della resina, sono stati ottenuti 291 mg di 18 – CSP grezzo.

3.3.3 Reazione di ciclizzazione

Il volume totale di peptide grezzo ottenuto dalla reazione di sblocco è stato diviso in tre parti e un terzo è stato utilizzato per la reazione di ciclizzazione (97.06 mg). Inizialmente, è stata eseguita una reazione di deprotonazione del gruppo amminico N – terminale tramite condizionamento in ambiente basico. A questo scopo è stata preparata una soluzione al 2% di

Piperidina in DMF e il trattamento è stato eseguito su metà della frazione di peptide pesata (39 mg). Il peptide è stato sciolto in 3 ml di soluzione Piperidina in DMF e trasferito in un pallone per essere ridotto a piccolo volume utilizzando l'evaporatore rotante. Successivamente, il contenuto del pallone è stato precipitato con etere etilico freddo sotto agitazione magnetica e lasciato a seccare per un'ora in campana da vuoto. Al termine del trattamento di deprotonazione sono stati ottenuti 28.5 mg di 18 – CSP da ciclizzare.

In seguito, è stata eseguita la reazione di ciclizzazione testa – coda, che prevede di aggiungere al peptide i seguenti reagenti:

- 3 equivalenti di HATU;
- 3.2 equivalenti di HOAt;
- 5 equivalenti di DIPEA.

Il tutto è stato sciolto in un volume di DMF tale da raggiungere una concentrazione pari a 10^{-3} M. La soluzione è stata lasciata reagire per due settimane. Per verificare l'evoluzione della reazione di ciclizzazione sono stati impiegati due metodi differenti: test alla Ninidrina e analisi HPLC. Il test alla Ninidrina è stato svolto ogni due giorni per verificare la presenza di gruppi amminici liberi, che non dovrebbero essere presenti una volta avvenuta la reazione. Per ogni test sono stati prelevati 100 μ L della soluzione di reazione che sono stati tirati a secco tramite evaporatore rotante per far evaporare la DMF. Terminato questo passaggio, è stato svolto il test alla Ninidrina utilizzando la procedura standard (procedimento illustrato al Paragrafo 2.3.2). A partire dai valori di assorbanza del bianco e del campione registrati, è stato possibile calcolare la concentrazione con la seguente formula:

$$C = \frac{\Delta Abs}{\varepsilon \cdot b} = \frac{\Delta Abs}{15000}$$

dove ΔAbs è la differenza tra i valori di assorbanza e ε è il coefficiente di estinzione molare. Conoscendo il volume (5 mL), sono state calcolate le moli di ammine presenti:

$$n_{moli} = C \cdot V$$

Il risultato dei test eseguiti a diversi momenti della reazione ha mostrato una diminuzione delle moli di ammine libere, possibile indicazione della riuscita della ciclizzazione del 18 – CSP. Per l'analisi HPLC è stata utilizzata la colonna Vydac C18 218TP (5 μ m, 100 Å, 4.6 x 250 mm, Waters) con precolonna compatibile alle seguenti condizioni: gradiente da 20% a 80% di eluente B in 30 minuti a flusso in colonna pari a 1 mL/min. Sono stati iniettati 30 μ L di peptide grezzo sciolto in acqua MilliQ in concentrazione 1 mg/mL e il detector è stato impostato a 214

nm. Gli eluenti utilizzati sono Eluente A composto da 0.05% di TFA in acqua MilliQ e Eluente B preparato con 0.05% di TFA in acetonitrile.

3.3.4 Deprotezione delle catene laterali

Terminata la reazione di ciclizzazione, la soluzione è stata trasferita in un pallone e utilizzando l'evaporatore rotante è stata portata a piccolo volume. Il contenuto è stato poi precipitato con etere etilico freddo sotto agitazione magnetica e seccato in campana da vuoto per un'ora. In seguito, lo stesso metodo utilizzato per gli altri peptidi è stato applicato per la deprotezione dei gruppi in catena laterale.

Il procedimento prevede di inserire nel reattore i seguenti reagenti:

- 0.125 mL di acqua MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.75 mL di TFA.

La reazione di sblocco è durata 90 minuti. Successivamente, la soluzione è stata concentrata a piccolo volume in evaporatore rotante. Il peptide ciclico è stato precipitato con etere etilico freddo sotto agitazione magnetica, filtrato con gooch G4 e lasciato a seccare per un'ora in campana da vuoto. Al termine del processo sono stati ottenuti 9 mg di 18 – CSP ciclico grezzo.

3.3.5 Caratterizzazione del peptide

Per caratterizzare il peptide grezzo è stata eseguita una *Reverse – phase high performance liquid chromatography* (RP – HPLC). Per l'analisi è stata utilizzata la colonna Vydac C18 218TP (5 µm, 100 Å, 4.6 x 250 mm, Waters) alle seguenti condizioni: gradiente da 20% a 50% di eluente B in 30 minuti a flusso in colonna pari a 1 mL/min. Sono stati iniettati 100 µL di peptide grezzo sciolto in acqua MilliQ alla concentrazione di 1 mg/mL e il detector è stato impostato a 214 nm. Gli eluenti utilizzati sono Eluente A composto da 0.05% di TFA in acqua MilliQ e Eluente B preparato con 0.05% di TFA in acetonitrile (Figura 3.9).

Per determinare l'identità del peptide grezzo è stata eseguita anche un'analisi spettrometrica di massa MALDI di controllo. Il peso molecolare teorico del 18 – CSP ciclico senza gruppi protettori è 2048.308 Da. È riportato in Figura 3.10 il risultato ottenuto dall'analisi, che conferma la presenza effettiva del peptide voluto. I picchi di intensità inferiore che si osservano nel grafico sono riferiti alle componenti secondarie da cui andrà purificato il peptide.

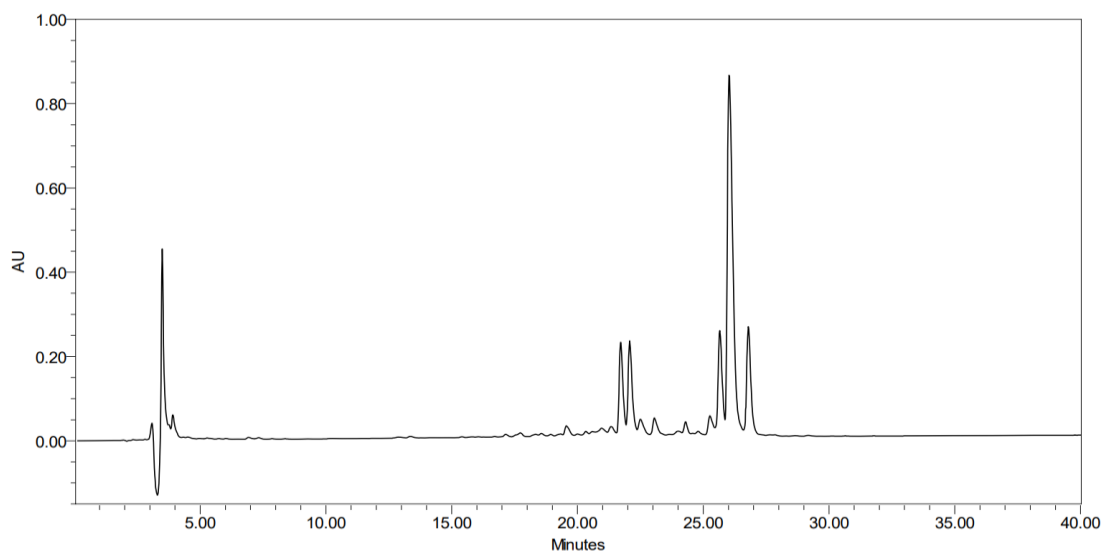


Figura 3.9: HPLC analitica del peptide 18 – CSP ciclico grezzo, colonna Vydac C18, volume iniettato 100 μ L, flusso 1 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 30% a 40% di B in 20 minuti, $\lambda = 214$ nm. Sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di assorbanza

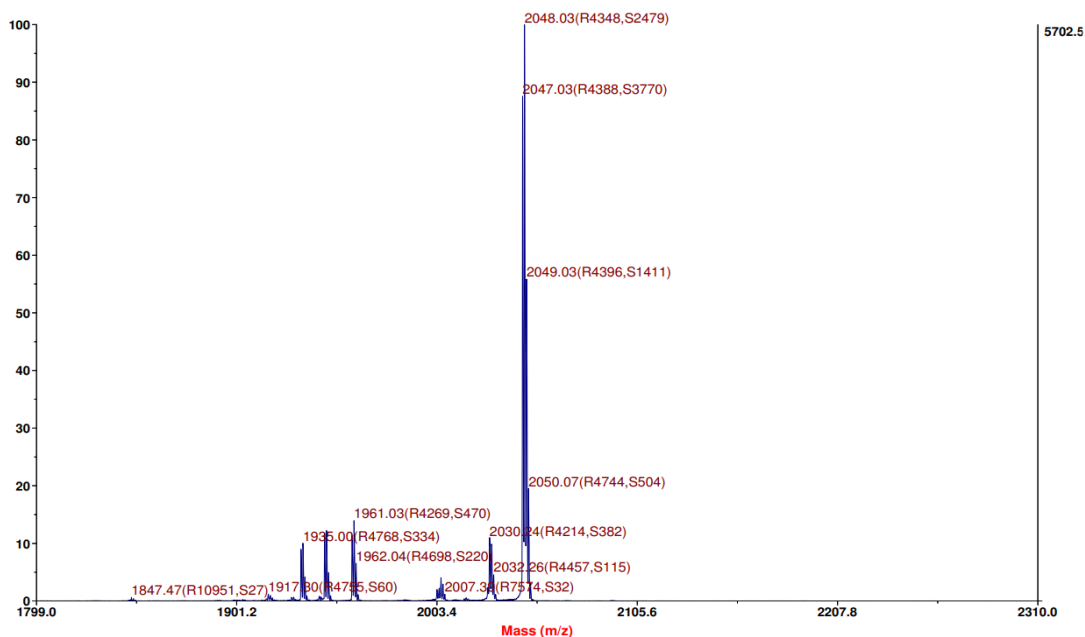


Figura 3.10: : Spettro di massa MALDI del peptide grezzo 18 – CSP ciclico

3.3.6 Purificazione del peptide

Per purificare il peptide è stata impiegata una colonna cromatografica Vydac C18 218TP Preparative Column (5 μ m, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters) con gradiente da 20% a 50% di eluente B in 90 minuti a flusso in colonna 4 ml/min. Il detector è stato impostato a 214 nm. Per l'analisi sono stati utilizzati eluente A (0.05% di TFA in acqua MilliQ) e eluente B (0.05% di TFA in acetonitrile). In Figura 3.11 è riportato il cromatogramma della semipreparativa fatta.

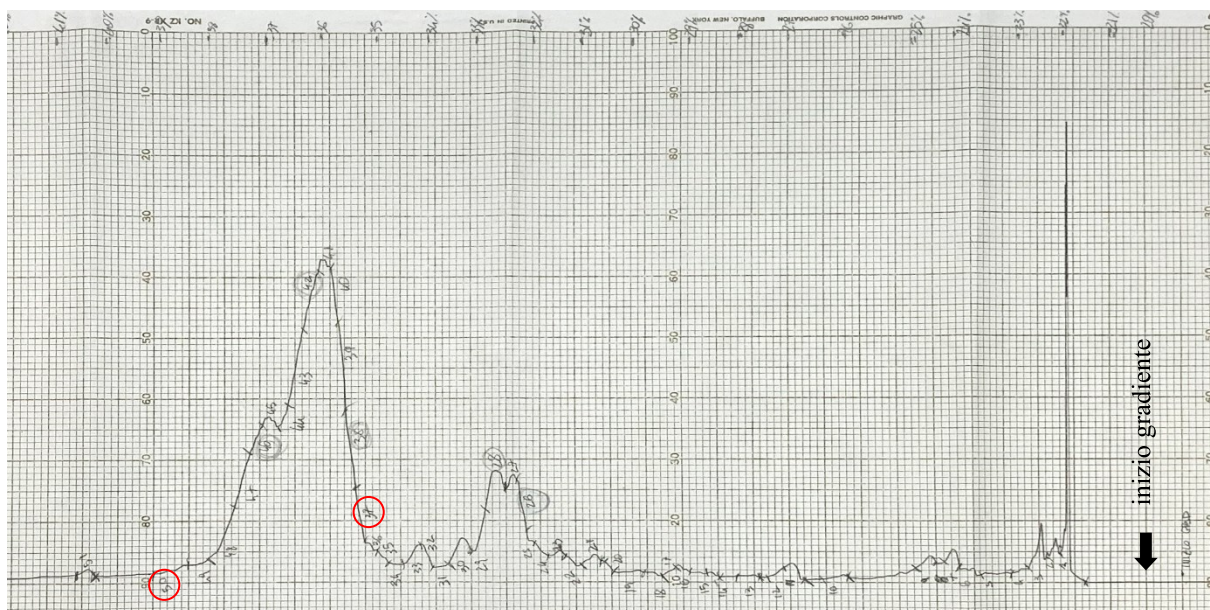


Figura 3.11: cromatografia semipreparativa del peptide 18 – CSP ciclico, colonna Vydac C18 218TP Preparative Column, volume iniettato 40 mL, flusso 4 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 20% a 50% di B in 90 minuti, $\lambda = 214$ nm. Velocità di scorrimento della carta: 0.5 cm/min. In rosso sono segnate la prima e l'ultima frazione scelta per il pool che compone il cuore del peptide 18 – CSP ciclico

Per localizzare le frazioni contenenti solamente il peptide ciclico è stata eseguita un'analisi spettrometrica di massa MALDI su alcune delle frazioni raccolte dall'HPLC semipreparativa. Il risultato ha mostrato la presenza del 18 – ciclico nella frazione 42 (Figura 3.12); pertanto, è stato deciso di raccogliere le frazioni da 37 a 50 in un pool per essere liofilizzate.

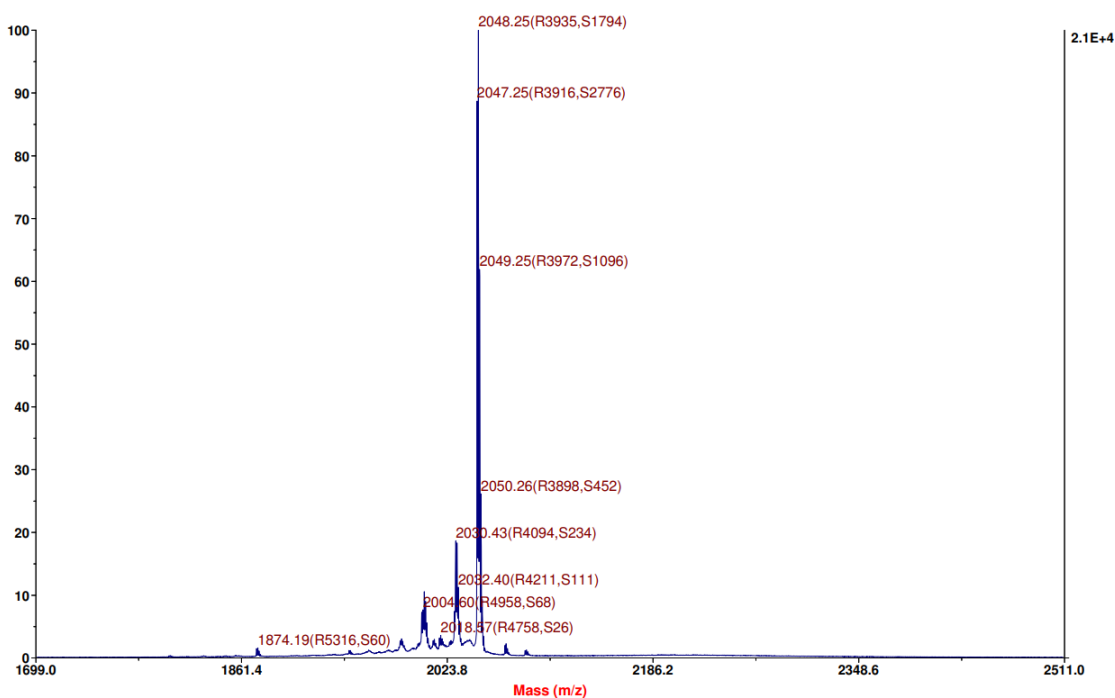


Figura 3.12: : Spettro di massa MALDI della frazione 42

3.4 21 – CSP β homoAsn12 (21CSPAsn)

3.4.1 Sintesi del peptide

Il peptide 21 – CSP Asn12 è stato sintetizzato utilizzando la sintesi su fase solida (SPPS) e la chimica Fmoc, impiegando il sintetizzatore automatico Syro I. Come supporto solido è stata scelta la resina Fmoc – Lys(Boc) – Wang Resin (sostituzione 0.77 mmol/g) e la scala di sintesi è 0.125 mmol. Pertanto, sono stati usati 162 mg di resina.

La sequenza peptidica è:

H – Ser – Gly – Ser – Leu – Ser – Thr – Phe – Phe – Arg – Leu – Phe – β homoAsn – Arg – Ser – Phe – Thr – Gln – Ala – Leu – Gly – Lys – OH

con peso molecolare teorico del peptide pari a 2378.719 Da.

Lista degli amminoacidi utilizzati:

- Fmoc – Ala – OH;
- Fmoc – Phe – OH;
- Fmoc – Gly – OH;
- Fmoc – Leu – OH;
- Fmoc – Gln(Trt) – OH;
- Fmoc – Arg(Pbf) – OH;
- Fmoc – Ser(tBu) – OH;
- Fmoc – Thr(tBu) – OH;
- Fmoc – β homoAsn(Trt) – OH;

dove Trt, Pbf e tBu sono i gruppi protettori dei gruppi funzionali in catena laterale degli amminoacidi.

Tutti gli amminoacidi sono stati disciolti in Dimetilformammide (DMF) ad eccezione della Fenilalanina che, invece, è stata disciolta in N – metil – pirrolidone (NMP). La scala di sintesi usata è: 5 equivalenti di amminoacidi, 5 equivalenti di soluzione attivante HBTU e 10 equivalenti di DIPEA. Pertanto, sono state preparate le seguenti soluzioni: 0.45 M di HBTU/Oxyma Pure in DMF, 40% di Piperidina in DMF e 1.8 N DIPEA in NMP.

La sintesi consiste in 20 cicli di *coupling*, di cui i primi cinque e il nono sono stati impostati come singoli, mentre tutti gli altri sono doppi. Sono stati inseriti degli STOP al termine dei cicli quinto, nono, undicesimo e quattordicesimo per eseguire dei Kaiser test (procedura illustrata al Paragrafo 2.3.2) per valutare la resa di reazione; al termine di ciascun test è stata ottenuta una resa maggiore del 97%. Rispettivamente, sono state ottenute rese di *coupling* pari a 78.6%,

98.88%, 99.05% e 97.25%. Alla fine della sintesi è stato aggiunto un ciclo di *Fmoc Deprotection* per togliere il gruppo protettore dal gruppo α – amminico dell'ultimo amminoacido della catena. Successivamente, il reattore è stato lavato per tre volte con DCM su una beuta da vuoto e lasciato in campana a vuoto per un'ora per seccarne il contenuto.

Peso ottenuto di resina + peptide con catene laterali protette = 250 mg

3.4.2 Sblocco del peptide dalla resina

Lo sblocco del peptide dalla resina e la deprotezione dei gruppi funzionali in catena laterale sono stati eseguiti contemporaneamente seguendo il metodo illustrato nel capitolo precedente (Paragrafo 2.3.3). Il volume totale di peptide grezzo su resina ottenuto dalla sintesi è stato diviso in due parti e la reazione di sblocco è stata eseguita solamente su metà della resina (125 mg).

Il procedimento prevede di inserire nel reattore i seguenti reagenti:

- 0.125 mL di acqua MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.75 mL di TFA.

La reazione di sblocco è durata 90 minuti. Successivamente, il reattore è stato lavato tre volte con TFA su beuta da vuoto; in questo modo, il peptide grezzo, sbloccato dalla resina e con le catene laterali libere, viene trasferito sul fondo della beuta, mentre la resina è rimasta nel reattore. Il liquido contenente il peptide grezzo è stato trasferito in un pallone di vetro ed è stato utilizzato l'evaporatore rotante per far evaporare l'acido e ridurre la soluzione a piccolo volume. Completato questo passaggio, il contenuto del pallone è stato precipitato con etere etilico freddo sotto agitazione magnetica, filtrato con un gooch G4 e lasciato a seccare per un'ora in campana a vuoto. Al termine del processo sono stati ottenuti 43 mg di 21 – CSP Asn12 grezzo.

3.4.3 Caratterizzazione del peptide

Per caratterizzare il peptide grezzo è stata eseguita una *Reverse – phase high performance liquid chromatography* (RP – HPLC). Per l'analisi è stata utilizzata la colonna Vydac C18 218TP (5 μ m, 100 Å, 4.6 x 250 mm, Waters) alle seguenti condizioni: gradiente da 20% a 50% di eluente B in 30 minuti a flusso 1 mL/min. Sono stati iniettati 100 μ L di peptide grezzo sciolto in acqua MilliQ alla concentrazione 1 mg/mL e il detector è stato impostato a 214 nm. Gli eluenti utilizzati sono Eluente A composto da 0.05% di TFA in acqua MilliQ e Eluente B preparato con 0.05% di TFA in acetonitrile (Figura 3.13).

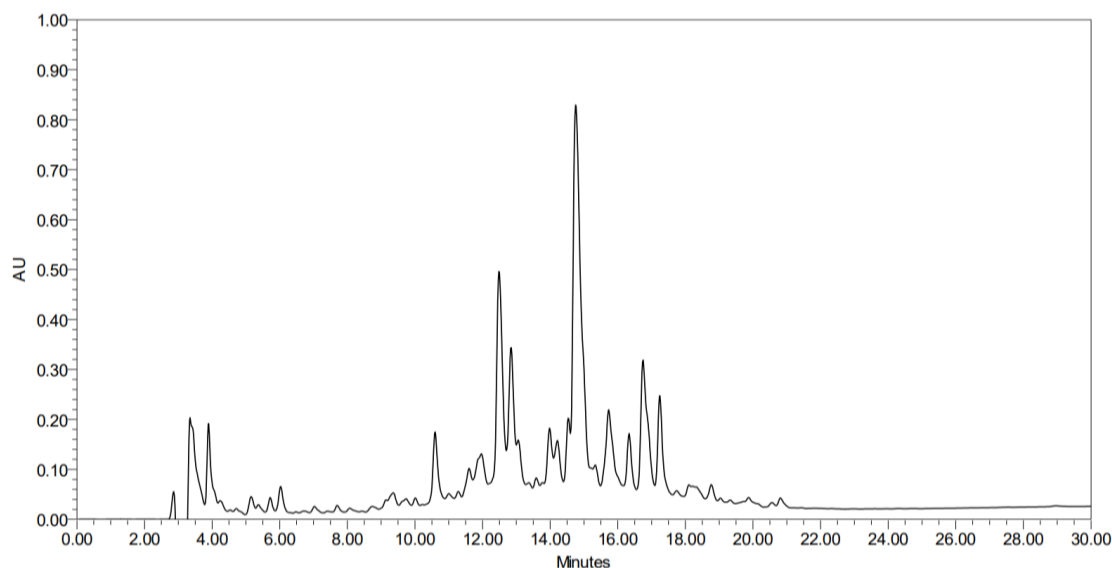


Figura 3.13: HPLC analitica del peptide 21 – CSP Asn12 grezzo, colonna Vydac C18, volume iniettato 100 μ L, flusso 1 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 20% a 50% di B in 30 minuti, λ = 214 nm. Sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di assorbanza

Per assicurarsi che il peptide voluto sia effettivamente tra i prodotti di sintesi, è stata eseguita anche un'analisi spettrometrica di massa MALDI di controllo. Il peso molecolare teorico del 21 – CSP Asn12 senza gruppi protettivi è 2378.719 Da. Come riportato in Figura 3.14, l'analisi non è stata in grado di confermare la presenza del peptide voluto.

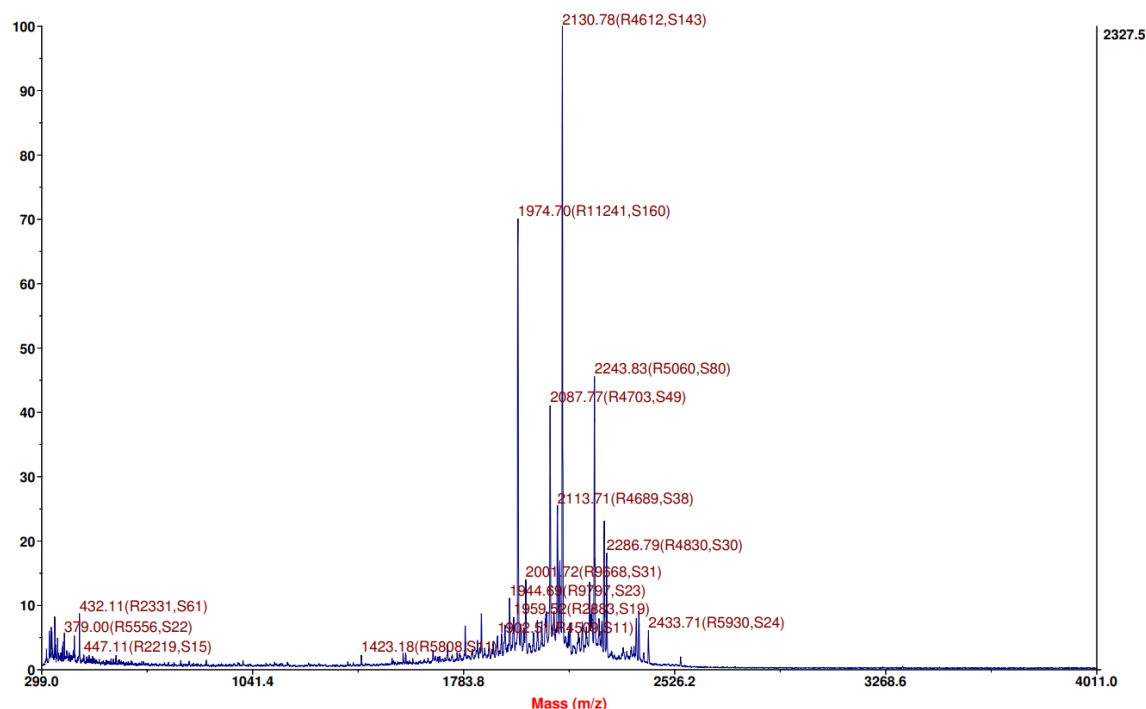


Figura 3.14: Spettro di massa MALDI del peptide grezzo 21 – CSP Asn12

Per comprendere i risultati ottenuti dall'analisi di massa MALDI e capire a cosa sono dovute le discrepanze tra il peso molecolare teorico del 21 – CSP Asn12 e i valori di massa sperimentali che si osservano nello spettro, il peptide è stato sequenziato in collaborazione con la

Professoressa Patrizia Polverino De Laureto del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Padova. I risultati hanno confermato la presenza di due peptidi che corrispondono ai due picchi principali. Inoltre, l'analisi ha dimostrato che il peptide principalmente presente ha peso molecolare 1973 Da e differisce dalla sequenza target del 21 – CSP Ans12 per la mancanza di tre residui: Thr in posizione 6, Phe in posizione 7 e Arg in posizione 9.

3.4.4 Purificazione del peptide

Per purificare il peptide è stata impiegata una HPLC semipreparativa usando la colonna cromatografica Vydac C18 218TP Preparative Column (5 μ m, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters) con gradiente da 26% a 40% di eluente B in 42 minuti a flusso 4 ml/min. Per ogni corsa cromatografica sono stati analizzati 30 mg di peptide grezzo sciolto in 40 mL eluente A. Il detector è stato impostato a 214 nm. Per l'analisi sono stati utilizzati eluente A (0.05% di TFA in acqua MilliQ) e eluente B (0.05% di TFA in acetonitrile). In Figura 3.15 è riportato il cromatogramma semipreparativo ottenuto.

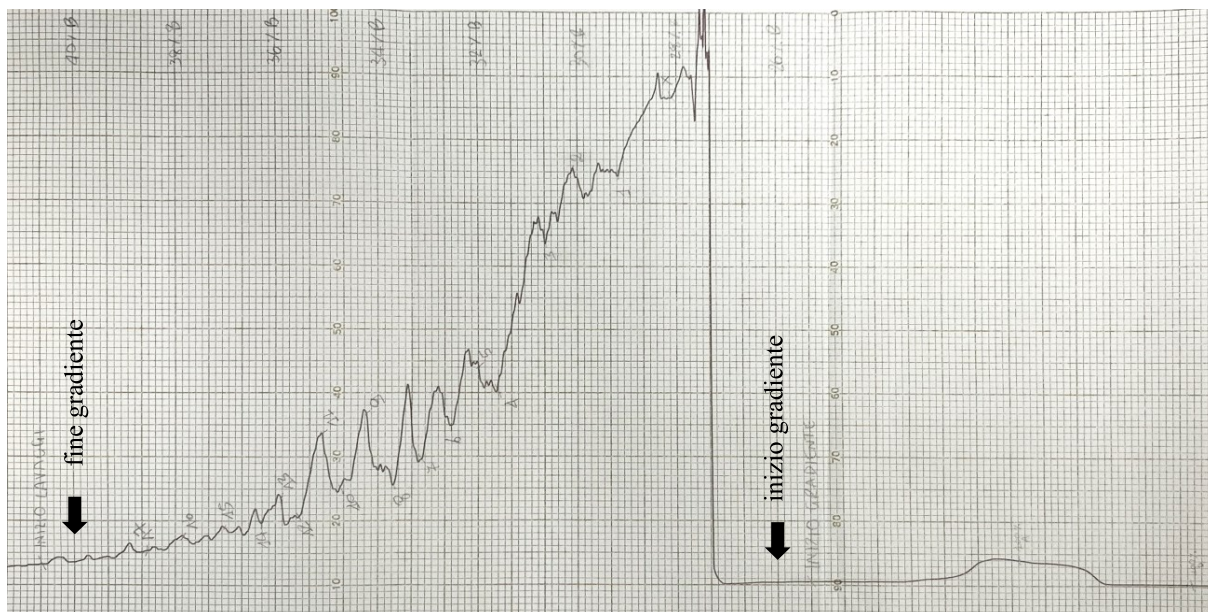


Figura 3.15: cromatografia semipreparativa del peptide 21 – CSP Asn12, colonna Vydac C18 218TP Preparative Column, volume iniettato 30 mL, flusso 4 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 26% a 40% di B in 42 minuti, $\lambda = 214$ nm. Velocità di scorrimento della carta: 0.5 cm/min.

Per verificare il grado di purificazione ottenuto, sono state eseguite ulteriori analisi HPLC; è stato deciso di raccogliere la frazione 1, su cui è stata eseguita un'ulteriore HPLC semipreparativa per purificare ulteriormente il peptide. È stata impiegata la colonna cromatografica Vydac C18 218TP Preparative Column (5 μ m, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters) con gradiente da 22% a 32% di eluente B in 40 minuti a flusso 4 ml/min. Il detector è stato

impostato a 214 nm. Per l'analisi sono stati utilizzati eluente A (0.05% di TFA in acqua MilliQ) e eluente B (0.05% di TFA in acetonitrile). In Figura 3.16 è riportato il cromatogramma semipreparativo ottenuto.

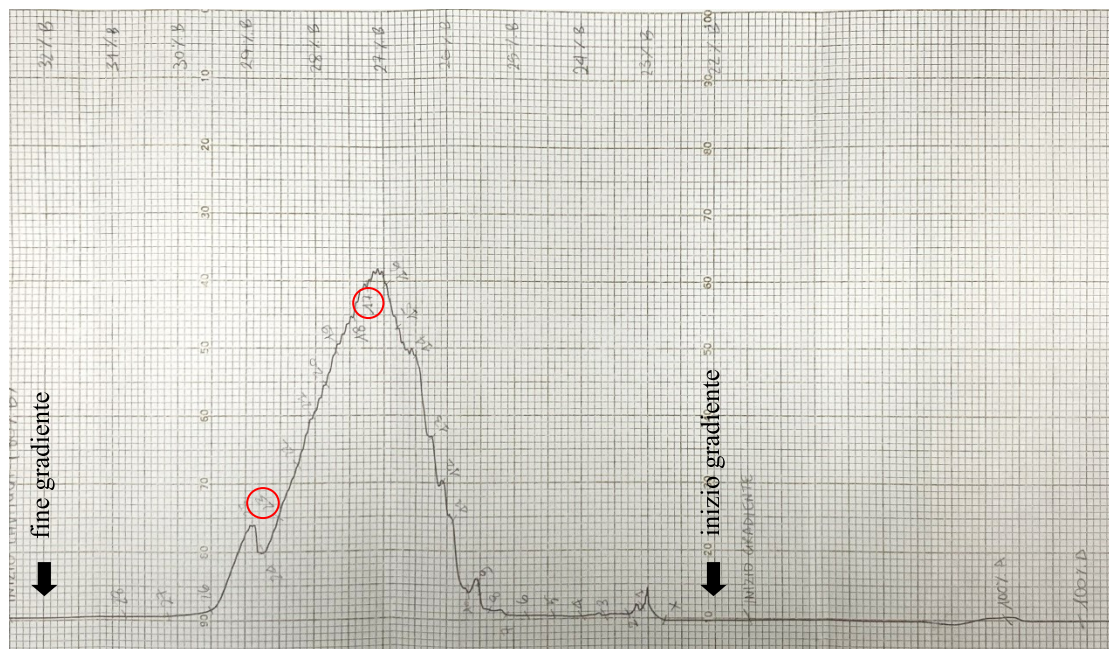


Figura 3.16: cromatografia semipreparativa della frazione 1 del peptide 21 – CSP Asn12, colonna Vydac C18 218TP Preparative Column, flusso 4 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 22% a 32% di B in 40 minuti, $\lambda = 214$ nm. Velocità di scorrimento della carta: 0.5 cm/min. In rosso sono segnate la prima e l'ultima frazione scelta per il pool che compone il cuore del peptide 21 – CSP Asn12

Per verificare il grado di omogeneità ottenuto, sono state eseguite ulteriori analisi HPLC ed è stato osservato un grado di purezza pari a 93.25% (Figura 3.17). Sono state raccolte le frazioni da 17 a 23 in un pool per essere liofilizzate.

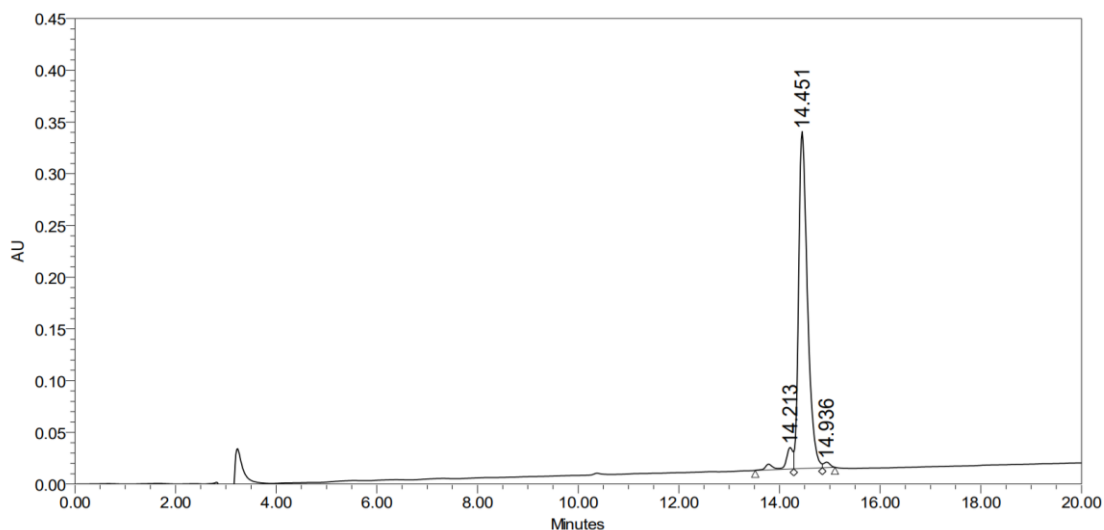


Figura 3.17: HPLC analitica del peptide 21 – CSP Asn12 purificato, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna Vydac C18, volume iniettato 30 μ L, flusso 1 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in acqua MilliQ, eluente B: 0.05% TFA in Acetonitrile, gradiente da 20% a 40% di B in 20 minuti, $\lambda = 214$ nm.

Capitolo 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

Come già descritto al paragrafo 2.4 sono stati eseguiti i seguenti saggi biologici: formazione di biofilm, saggi sulla vitalità cellulare e curve di crescita. I peptidi sintetizzati per questo lavoro di tesi (18 – CSP *scrambled*, 18 – CSP ciclico, 21 – CSP Leu4 e 21 – CSP Asn12) sono stati messi a confronto con il batterio *Streptococcus mutans* non trattato e il peptide 21 – CSP *wild type*, responsabile della virulenza del batterio e della formazione di biofilm.

4.1 Saggi di Biofilm

La formazione del biofilm è stata valutata a 12 ore e a 24 ore (Figura 4.1).

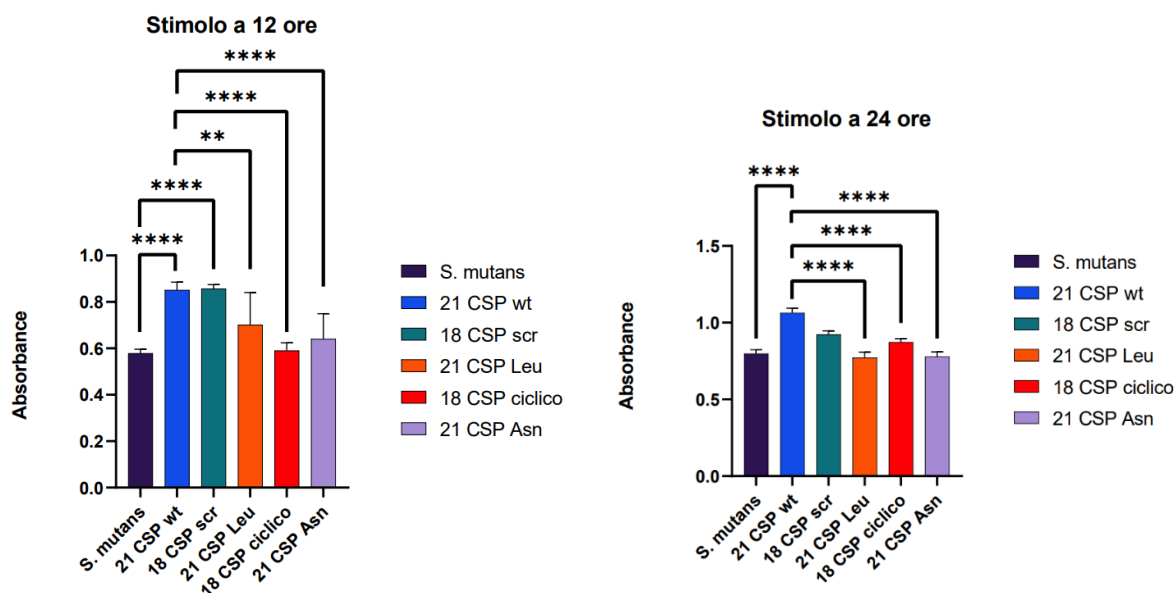


Figura 4.1: Saggi sulla formazione di Biofilm valutata a 12 ore e a 24 ore. Livelli di significatività: **<0.01, ****<0.0001

Nei due diversi time – point si può vedere come il peptide 21 – CSP *wild type* aumenta significativamente la capacità del batterio *Streptococcus mutans* di formare biofilm. Il peptide 18 – CSP *scrambled* opera in modo analogo al 21 – CSP *wild type* sia a 12 ore che a 24 ore. Gli altri peptidi sintetizzati invece riducono significativamente la capacità del batterio di formare biofilm, con differenze significative rispetto al 21 – CSP *wild type* sia a 12 ore sia a 24 ore. In saggi precedenti [32], la capacità di indurre il biofilm della sequenza 21 – CSP *scrambled* era risultata significativamente ridotta rispetto al 21 – CSP *wild type* come atteso. In questi saggi invece la sequenza *scrambled* di 18 – CSP risulta avere lo stesso effetto del peptide naturale 21 – CSP.

4.2 Saggi di Vitalità Cellulare

Il saggio alla Resazurina condotto dopo 20 ore di incubazione mostra differenze significative tra il batterio coltivato con i peptidi e il solo batterio *Streptococcus mutans*, soprattutto per i peptidi 18 – CSP *scrambled* e 18 – CSP ciclico che inducono un incremento della popolazione batterica. Degno di nota l'effetto del peptide 18 – CSP ciclico che pur incrementando la popolazione batterica a 3 ore, determina una diminuzione del biofilm rispetto alla stimolazione con 21 – CSP *wild type*. I peptidi non mostrano quindi effetti citotossici (Figura 4.2).

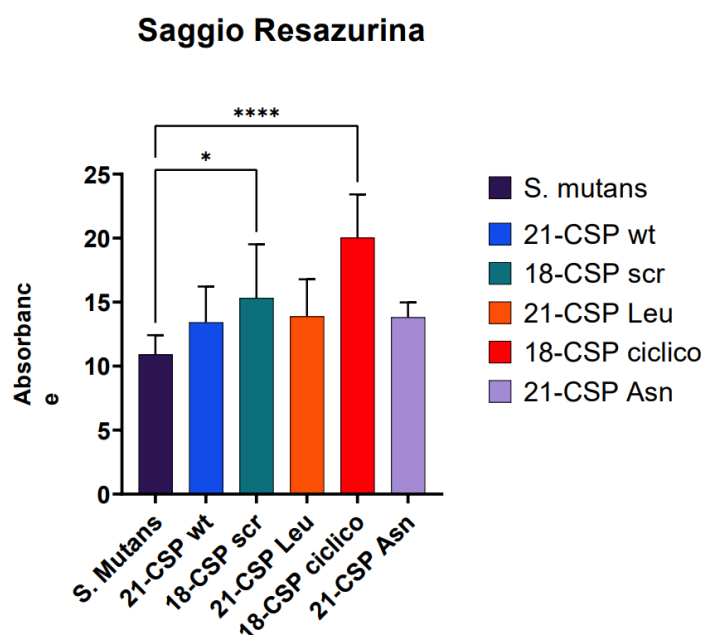


Figura 4.2: Saggio alla Resazurina. Livelli di significatività: * <0.05 , **** <0.0001

4.3 Curve di Crescita

Per escludere ulteriori effetti tossici, il batterio *Streptococcus mutans* è stato incubato con i diversi peptidi sintetizzati per testare il suo comportamento. Sono state analizzate differenti concentrazioni del batterio. I grafici delle curve di crescita sono stati ottenuti dopo aver elaborato i dati esportati in Excel dal software SkanIt™.

I grafici mostrano come il comportamento del solo batterio sia diverso rispetto a quello del batterio coltivato con i differenti peptidi (Figura 4.3). Sebbene questo comportamento sia diverso, la presenza dei peptidi non altera la crescita del batterio.

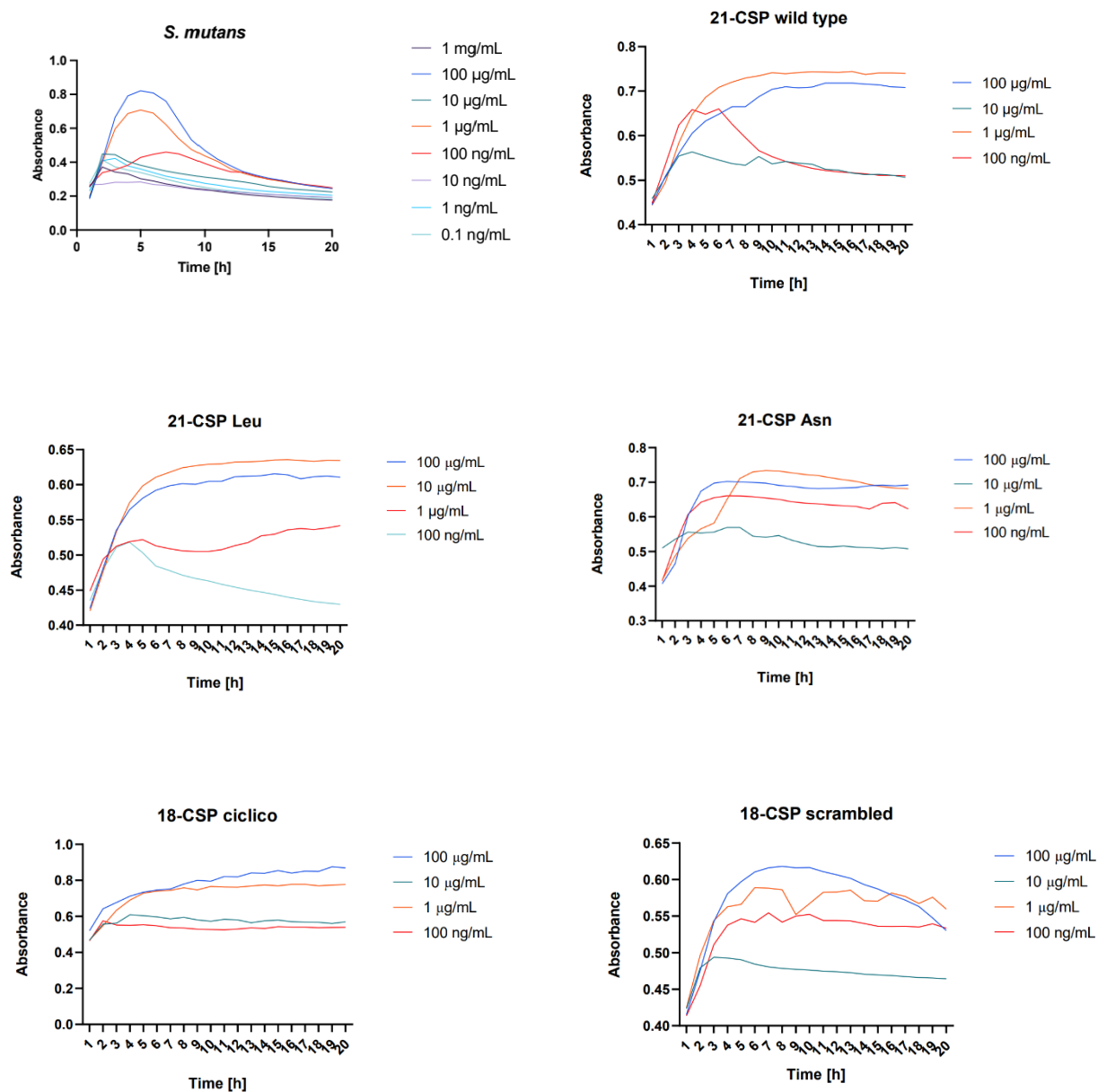


Figura 4.3: Curve di crescita a diverse concentrazioni di *S. mutans*

Capitolo 5

CONCLUSIONE

Il microbiota della cavità orale comprende per la maggior parte batteri non patogeni che hanno un ruolo importante sulle funzioni dell'organismo. Tuttavia, alcune specie patogene presenti possono causare problemi alla salute umana, come le carie, o più gravi, come la polmonite. In seguito alla scoperta della penicillina, la ricerca scientifica si è focalizzata sulla ricerca di nuovi antibiotici da introdurre sul mercato per contrastare le malattie di origine batterica. Nonostante il grande contributo che hanno avuto nella medicina, l'utilizzo inadeguato degli antibiotici ha portato anche all'insorgenza di un nuovo problema: lo sviluppo di ceppi batterici resistenti agli antibiotici. Oggi, a causa della resistenza agli antimicrobici, le infezioni batteriche provocano ogni anno milioni di morti perché sono diventate difficili da trattare o di fatto incurabili.

Di conseguenza, gli ultimi decenni sono stati dedicati alla ricerca di nuovi modi per risolvere il problema dei ceppi batterici resistenti agli antibiotici. In particolare, si sono rivelati promettenti lo studio e l'esplorazione dei sistemi che permettono ai batteri di comunicare fra loro, ossia il *Quorum Sensing*. Questo sistema consiste nella produzione e nella diffusione di piccole molecole organiche o di peptidi che, una volta riconosciute come molecole segnale dalle altre cellule, permettono di controllare la formazione di biofilm e la virulenza. L'identificazione delle molecole segnale consente la ricerca di inibitori del *Quorum Sensing* e l'identificazione di nuove modalità di trattamento delle infezioni batteriche tramite l'interruzione delle comunicazioni batteriche (*Quorum Quenching*).

Le principali patologie della cavità orale sono legate al batterio Gram – positivo *Streptococcus mutans*, che comunica con differenti sistemi di *Quorum Sensing*. Il sistema su cui si focalizza questo lavoro di tesi è quello mediato dal *Competence Stimulating Peptide* (CSP). In particolare, sono stati sintetizzati degli analoghi del 21 – CSP e del 18 – CSP per investigare la loro capacità di interferire con il sistema di comunicazione batterica e, di conseguenza, ridurre o inibire la formazione di biofilm.

Ciascun analogo è stato sintetizzato, caratterizzato e purificato. In seguito, sono stati eseguiti dei saggi biologici per valutare gli effetti che questi analoghi peptidici hanno in relazione alla crescita dello *S. mutans* e la sua capacità di produrre biofilm.

Dai risultati ottenuti dai saggi di vitalità cellulare (saggio alla Resazurina) e dai grafici delle curve di crescita non sono stati osservati effetti citotossici. Le curve di crescita hanno

dimostrato che tutti i peptidi sintetizzati non influenzano la crescita del batterio, escludendo quindi potenziali effetti tossici dato questo significativo in quanto le strategia antivirulenza quali quelle del QQ tendono a disarmare la virulenza del batterio senza provocarne la morte e quindi la resistenza all'agente applicato. Di fatti, i saggi sulla formazione di biofilm hanno confermato che tutti gli analoghi sintetizzati hanno l'abilità di ridurre la formazione di biofilm, fattore di virulenza fondamentale in *S. mutans* perché sono state osservate differenze significative con il 21 – CSP *wild type* sia a 12 ore che a 24.

La possibilità di tenere sotto controllo le popolazioni batteriche patogene e di impedire la formazione di biofilm senza causare la comparsa di ceppi resistenti agli antibiotici aprirà nuovi scenari anche nell'ambito dei biomateriali innovativi, volti da un lato ad assicurare le proprietà meccaniche e biochimiche allo scaffold da ripopolare con le cellule del ricevente per formare nuovo tessuto funzionale e dall'altro ad evitare di veicolare infezioni da parte di agenti patogeni.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Brun, H. I. Akbarali, and I. Castagliuolo, “Editorial: The gut microbiota orchestrates the Neuronal-Immune system,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, Mar. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.672685.
- [2] J. Davies and D. R. Davies, “Origins and evolution of antibiotic resistance,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, no. 3, pp. 417–433, Sep. 2010, doi: 10.1128/mmmbr.00016-10.
- [3] M. I. Hutchings, A. W. Truman, and B. Wilkinson, “Antibiotics: past, present and future,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 51, pp. 72–80, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- [4] Y. Zhang, X. Wang, H. Li, C. Ni, Z. Du, and F. Yan, “Human oral microbiota and its modulation for oral health,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 99, pp. 883–893, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.146.
- [5] K. R. R. Krishnan, T. Chen, and B. J. Paster, “A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease,” *Oral Diseases*, vol. 23, no. 3, pp. 276–286, Jul. 2016, doi: 10.1111/odi.12509.
- [6] M. Matsumoto-Nakano, “Dental caries,” in *Elsevier eBooks*, 2014. doi: 10.1016/b978-0-12-801238-3.00001-5.
- [7] J. P. S. Lemos, R. G. Quivey, H. C. Koo, and J. Abranches, “Streptococcus mutans: a new Gram-positive paradigm?,” *Microbiology*, vol. 159, no. Pt_3, pp. 436–445, Mar. 2013, doi: 10.1099/mic.0.066134-0.
- [8] J. A. Lemos *et al.*, “The Biology of *Streptococcus mutans*,” *Microbiology Spectrum*, vol. 7, no. 1, Feb. 2019, doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018.
- [9] D. Ajdic *et al.*, “Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 22, pp. 14434–14439, Oct. 2002, doi: 10.1073/pnas.172501299.

- [10] L. Zeng and R. A. Burne, "Comprehensive Mutational Analysis of Sucrose-Metabolizing Pathways in *Streptococcus mutans* Reveals Novel Roles for the Sucrose Phosphotransferase System Permease," *Journal of Bacteriology*, vol. 195, no. 4, pp. 833–843, Dec. 2012, doi: 10.1128/jb.02042-12.
- [11] W. D. Bowen and H.-J. Koo, "Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms," *Caries Research*, vol. 45, no. 1, pp. 69–86, Jan. 2011, doi: 10.1159/000324598.
- [12] W. Krzyściak, A. Jurczak, D. Kościelniak, B. Bystrowska, and A. Skalniak, "The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 33, no. 4, pp. 499–515, Oct. 2013, doi: 10.1007/s10096-013-1993-7.
- [13] J. A. Banas, "Virulence properties of *Streptococcus Mutans*," *Frontiers in Bioscience*, vol. 9, no. 1–3, p. 1267, Jan. 2004, doi: 10.2741/1305.
- [14] W. G. Bowen, R. A. Burne, H. Wu, and H. C. Koo, "Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments," *Trends in Microbiology*, vol. 26, no. 3, pp. 229–242, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.tim.2017.09.008.
- [15] I. C. Olsen, "Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 34, no. 5, pp. 877–886, Jan. 2015, doi: 10.1007/s10096-015-2323-z.
- [16] J. Yan and B. L. Bassler, "Surviving as a community: Antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms," *Cell Host & Microbe*, vol. 26, no. 1, pp. 15–21, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.chom.2019.06.002.
- [17] S. T. Rutherford and B. L. Bassler, "Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control," *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 2, no. 11, p. a012427, Nov. 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a012427.
- [18] D. N. McBrayer, C. D. Cameron, and Y. Tal-Gan, "Development and utilization of peptide-based quorum sensing modulators in Gram-positive bacteria," *Organic and Biomolecular Chemistry*, vol. 18, no. 37, pp. 7273–7290, Jan. 2020, doi: 10.1039/d0ob01421d.

- [19] M. A. Miller and B. L. Bassler, “Quorum sensing in bacteria,” *Annual Review of Microbiology*, vol. 55, no. 1, pp. 165–199, Oct. 2001, doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165.
- [20] D. B. Senadheera and D. G. Cvitkovitch, “Quorum Sensing and Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, pp. 178–188. doi: 10.1007/978-0-387-78885-2_12.
- [21] C. R. Bikash, S. R. Hamry, and Y. Tal-Gan, “Structure–Activity Relationships of the Competence Stimulating Peptide in *Streptococcus mutans* Reveal Motifs Critical for Membrane Protease SepM Recognition and ComD Receptor Activation,” *ACS Infectious Diseases*, vol. 4, no. 9, pp. 1385–1394, Jul. 2018, doi: 10.1021/acsinfecdis.8b00115.
- [22] E. Shanker and M. P. Federle, “Quorum Sensing Regulation of Competence and Bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and *mutans*,” *Genes*, vol. 8, no. 1, p. 15, Jan. 2017, doi: 10.3390/genes8010015.
- [23] C. R. Bikash, S. R. Hamry, and Y. Tal-Gan, “Structure–Activity Relationships of the Competence Stimulating Peptide in *Streptococcus mutans* Reveal Motifs Critical for Membrane Protease SepM Recognition and ComD Receptor Activation,” *ACS Infectious Diseases*, vol. 4, no. 9, pp. 1385–1394, Jul. 2018, doi: 10.1021/acsinfecdis.8b00115.
- [24] P. P. Wright and S. S. Ramachandra, “Quorum Sensing and Quorum Quenching with a Focus on Cariogenic and Periodontopathic Oral Biofilms,” *Microorganisms*, vol. 10, no. 9, p. 1783, Sep. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10091783.
- [25] A. T. Odularu, A. J. Afolayan, A. P. Sadimenko, P. A. Ajibade, and J. Z. Mbese, “Multidrug-Resistant biofilm, quorum sensing, quorum quenching, and antibacterial activities of indole derivatives as potential eradication approaches,” *BioMed Research International*, vol. 2022, pp. 1–9, Aug. 2022, doi: 10.1155/2022/9048245.
- [26] R. T. Syvitski et al., “Structure-Activity Analysis of Quorum-Sensing Signaling Peptides from *Streptococcus mutans*,” *Journal of Bacteriology*, vol. 189, no. 4, pp. 1441–1450, Feb. 2007, doi: 10.1128/jb.00832-06.
- [27] C. R. Bikash and Y. Tal-Gan, “Structure Activity Relationship Study of the XIP Quorum Sensing Pheromone in *Streptococcus mutans* Reveal Inhibitors of the

- Competence Regulon,” ACS Chemical Biology, vol. 15, no. 10, pp. 2833–2841, Sep. 2020, doi: 10.1021/acscchembio.0c00650.
- [28] M. Cudic and G. B. Fields, “Solid-Phase peptide synthesis,” in Humana Press eBooks, 2008, pp. 515–546. doi: 10.1007/978-1-60327-375-6_32.
- [29] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, and G. Subra, “Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis,” Molecular Biotechnology, vol. 33, no. 3, pp. 239–254, Jan. 2006, doi: 10.1385/mb:33:3:239.
- [30] G. Grant, “Synthetic Peptides: A User’s Guide, ser. UWBC biotechnical resource series. W.H. Freeman, 1992. [Online]. Available: <https://books.google.it/books?id=ATDRwQEACAAJ>
- [31] N. Singhal, M. Kumar, P. K. Kanaujia, and J. S. Virdi, “MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis,” Frontiers in Microbiology, vol. 6, Aug. 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00791.
- [32] Tesi Magistrale in Bioingegneria Industriale di Alessandro Salvetti, “Fake talk in bacteria: quorum quenching in dental infection”, 2022/2023