



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA**

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

**Sintesi di frammenti dell'Orexina A e B coinvolti nello stress  
ossidativo. Studi conformazionali e di attività biologica.**

Relatore: Dr. Paolo Ruzza

Controrelatore: Prof.ssa Alberta Ferrarini

Laureando: Nicolò Abis

ANNO ACCADEMICO 2023/2024







# Indice

Riassunto .....	III
<b>1. Introduzione.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Il sistema orexinergico .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. La struttura delle orexine .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2. I recettori orexinergici .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Stress ossidativo.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS) .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2 Specie reattive dell'azoto (RNS).....</b>	<b>12</b>
<b>1.4. La deamidazione dell'asparagina (Asn).....</b>	<b>16</b>
<b>2. Obiettivo.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Risultati e discussione .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS) .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.1 Protezione della funzione amminica .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.2 Protezione delle catene laterali.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.3 Attivazione della funzione carbossilica.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.4 Sintesi del frammento 17-24 dell'orexina B (P1).....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.5 Sintesi del frammento 17-isoAsp20-24 dell'orexina B (P2) .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.6 Sintesi del frammento 10-28 dell'orexina B (P3).....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.7 Sintesi del frammento 10-isoAsp20-28 dell'orexina B (P4) .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1.8 Sintesi del frammento 4-16 dell'orexina A (P5) .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 Studio degli effetti dello stress ossidativo.....</b>	<b>38</b>
<b>3.6 NMR .....</b>	<b>50</b>
<b>4. Conclusioni.....</b>	<b>57</b>
<b>5. Materiali e metodi .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1 Reagenti e solventi.....</b>	<b>59</b>
<b>5.2 Sintesi peptidica su fase solida .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3. Acetilazione dei peptidi .....</b>	<b>60</b>
<b>5.4. Sblocco dei peptidi dalla resina e rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali ....</b>	<b>60</b>
<b>5.5 Purificazione e caratterizzazione dei prodotti .....</b>	<b>60</b>
<b>5.6. Spettrometria di massa .....</b>	<b>60</b>
<b>5.7. Risonanza Magnetica Nucleare.....</b>	<b>61</b>
<b>5.8. Dicroismo Circolare .....</b>	<b>61</b>
<b>5.9 Spettroscopia di assorbimento UV.....</b>	<b>61</b>

<b>5.10 Sintesi del frammento di orexina-B: Ac-Ala17-Gly24-NH2 (P1)</b> .....	62
<b>5.11. Sintesi del frammento di orexina-B: Ac-Ala17-isoAsp20-Gly24-NH2 (P2)</b> .....	62
<b>5.12. Sintesi del frammento di orexina-B: Ac-10-28-NH2 (P3)</b> .....	63
<b>5.13 Sintesi del frammento di orexina-B: Ac-10--isoAsp20-28-NH2 (P4)</b> .....	63
<b>5.14. Sintesi del frammento di orexina-A: Ac-4-16-NH2 (P5)</b> .....	64
<b>6. Abbreviazioni</b> .....	65
<b>7. Bibliografia</b> .....	67
<b>Appendice</b> .....	71
<b>Dicroismo circolare</b> .....	71
<b>Determinazione della struttura secondaria di un peptide</b> .....	73

# Riassunto

Le orexine A e B sono due neuropeptidi, isolati per la prima volta nel 1998 dall'ipotalamo laterale del ratto, un'area coinvolta nella regolazione dell'appetito. Successivamente è stato osservato che neuroni orexinergici si proiettano verso altre aree cerebrali, suggerendo il loro coinvolgimento in numerose funzioni dell'organismo, tra cui la regolazione del ciclo sonno-veglia, il bilancio energetico e di funzioni neuroendocrine. Questi neuropeptidi risultano quindi fondamentali per il funzionamento dell'organismo e una loro perdita di attività, che si sospetta possa essere riconducibile anche a condizioni di stress ossidativo, porta all'insorgenza di diverse patologie quali ad esempio narcolessia, obesità, depressione e deficit nell'apprendimento e nella memoria. In questo lavoro di tesi sperimentale sono stati sintetizzati, su fase solida (SPPS) con strategia Fmoc/HBTU, alcuni frammenti corrispondenti alla porzione attiva dell'orexina B e un frammento dell'orexina A contenente i ponti disolfuro, e sono stati caratterizzati con tecniche spettroscopiche al fine di determinare l'effetto dello stress ossidativo, in particolar modo dovuto a specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto. Particolare attenzione è stata data ai ponti disolfuro e alla loro stabilità in condizioni di stress ossidativo (orexina A), e al residuo di asparagina (orexina B), il quale presenta la tendenza a deammidarsi passando per un intermedio succinimidico, quindi ad idrolizzare per dare un residuo di aspartato o di isoaspartato (racemi) dove è largamente favorita la reazione di  $\alpha$ - $\beta$  shift. Prospettive future includono lo studio dell'attività biologica su cellule e/o ratti, dei frammenti che portano le modifiche causate dallo stress ossidativo.





# 1. Introduzione

Le orexine A e B sono due neuropeptidi, la cui identificazione è stata pubblicata per la prima volta nel 1998, in seguito alla scoperta di un nuovo percorso di trasduzione del segnale, da parte di due gruppi di ricerca indipendenti. [1]

I neuropeptidi sono storicamente definiti come delle piccole sostanze proteiche, prodotte e rilasciate dai neuroni, che agiscono sui substrati neurali. Noti da oltre 50 anni, sono la classe più grande e varia di molecole di segnalazione nel cervello e sono impegnate in molteplici funzioni fisiologiche. Si possono comportare sia come neurotrasmettitori che come modulatori delle neurotrasmissioni stesse, ma, anche come regolatori autocrini o paracrini all'interno degli ambienti cellulari o come ormoni a lungo raggio. [2]

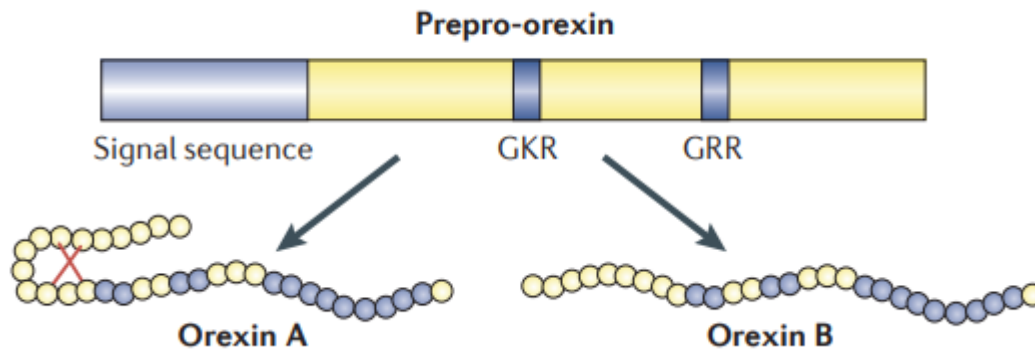
## 1.1 Il sistema orexinergico

Il nome “*Orexina A*” e “*Orexina B*” è stato dato dal gruppo di Yanagisawa (Università del Texas Southwestern): deriva dalla parola greca orexis (Ορέξιη) che significa appetito, per l'idea iniziale che questi peptidi fossero promotori dello stesso. [3] Il secondo gruppo che ha identificato questi peptidi, coordinato da Sutcliffe (Scripps Research Institute in La Jolla), le ha nominate “*ipocretina-1*” e “*ipocretina-2*” sia per via del loro luogo di produzione, l'*ipotalamo*, che per le omologie di sequenza con l'ormone intestinale *secretina*, un ormone peptidico lineare composto da 27 residui amminoacidici. [1, 4]

Nei mammiferi, questi neuropeptidi sono sintetizzati da dei cluster di neuroni, che nel cervello umano sono costituiti da circa 70000 cellule, presenti esclusivamente nell'*ipotalamo*. [5] Anche la loro trascrizione genetica avviene in modo altamente specifico, in neuroni nell'area dell'*ipotalamo laterale*. [6] I neuroni orexinergici si proiettano verso diverse regioni del cervello e i loro segnali sono inviati verso tutto il sistema nervoso centrale (CNS). [1, 7] Infatti, regolano varie funzioni vitali e una loro mancanza porta all'insorgenza di patologie quali la narcolessia, l'obesità, la depressione e disfunzioni nell'apprendimento e della memoria. [7]

L'*ipotalamo* si comporta come principale regolatore dell'omeostasi endocrina, ed è composto da un insieme di nuclei, i quali regolano una vasta gamma di attività fisiologiche e comportamentali. Per alcune di queste attività sono stati identificati dei peptidi particolari come principali prodotti di specifici nuclei cerebrali, i quali espletano le loro funzioni tramite il trasporto nell'*ipofisi*, entrando nella circolazione generale, o tramite secrezioni nel sistema nervoso centrale. [4]

Le orexine derivano dalla scissione proteolitica post-traslazionale dallo stesso polipeptide precursore di 131 residui amminoacidici, chiamato “prepro-orexina” (**figura 1**), [8] il cui mRNA [6] è espresso in abbondanza e specificatamente nell’ipotalamo laterale e nelle aree adiacenti, una regione classicamente implicata nella regolazione dell’appetito e dell’omeostasi dell’energia: l’ipotalamo ventromediale come centro della sazietà e l’ipotalamo laterale come centro dell’appetito. [3] E’ stato osservato che nei ratti la somministrazione di orexine stimola il consumo di cibo e la loro produzione è influenzata dallo stato nutritivo dell’animale. [3]



*Figura 1: prepro-orexina suddivisa nelle sue componenti principali: una sequenza di segnalazione e due siti di riconoscimento per l’enzima convertasi, scissa per liberare l’orexina A (a sinistra) e l’orexina B (a destra). [5]*

L’mRNA relativo alla prepro-orexina umana è composto da 616 nucleotidi ed è codificato da un genoma di 1432 coppie di basi azotate. Dei suoi 131 residui amminoacidici, i primi 33 sono caratteristici di una sequenza di segnalazione secretoria; dalla Gln<sup>34</sup> inizia la sequenza dell’orexina A, che ciclizza enzimaticamente nel residuo piroglutammico N-terminale per transamidazione, e termina con la Leu<sup>66</sup>. Questa è seguita da Lys<sup>68</sup>-Arg<sup>69</sup> che costituisce un sito di riconoscimento per un enzima convertasi che è in grado di scindere la catena e la Arg<sup>69</sup> costituisce l’inizio della sequenza dell’orexina-B che termina con la Met<sup>96</sup>, seguito a sua volta dal sito di riconoscimento Gly<sup>97</sup>-Arg<sup>98</sup>-Arg<sup>99</sup> per l’enzima convertasi. [6]

L’mRNA, nei ratti, si accumula nell’ipotalamo dopo la terza settimana dalla nascita, senza differenze tra adulti maschio e femmina, indicando che la sua funzione non è legata a processi sessuali dimorfici. [4] Il gene della prepro-orexina umana si localizza nel cromosoma 17q21, sospetto di essere responsabile di un gruppo di disordini neurodegenerativi, collettivamente chiamati “demenza legata al cromosoma 17”. [6]

Negli umani, l’mRNA della prepro-orexina si trova abbondantemente nel nucleo subtalamico ed è assente in altre regioni del corpo, supportando l’ipotesi di coinvolgimento delle orexine come peptidi regolatori che funzionano all’interno sistema nervoso centrale. [6]

Il sistema orexinergico è molto simile tra mammiferi e gli è riconosciuto un ruolo fondamentale per la stabilizzazione dello stato di veglia e per la regolazione dello stato di vigilanza in diversi processi fisiologici, poiché riesce a integrare le informazioni sia del sistema interno che di quello esterno, come lo stato emotivo, il ciclo luce-buio e il bilancio di energia, per adattare i livelli di eccitazione e permettere una risposta appropriata del comportamento. [1]

I livelli di orexina A, nel fluido celebrale extracellulare e cerebrospinale, seguono il ritmo circadiano: aumentano durante il periodo di veglia e precipitano velocemente durante il sonno. Gli aumenti dei livelli di orexina sono necessari per competere con l'accumulo della stanchezza che cresce durante lunghi periodi di veglia e, quindi, per evitare di addormentarsi. Tuttavia, l'andamento dell'attività dei neuroni orexinergici non segue solo il ritmo circadiano ma dipende anche dallo stato emotivo, con un grande aumento della concentrazione in correlazione a emozioni positive e interazioni sociali. [1]

I neuroni contenenti orexine si diramano in tutto il cervello, comprese le proiezioni monosinaptiche nella corteccia celebrale, nel sistema limbico e nel tronco encefalico. Per questo motivo, i neuroni orexinergici potrebbero essere coinvolti nella regolazione degli aspetti cognitivo, motivazionale, emozionale e autonomo che sono implicati nel processo di ingestione di cibo e regolazione del peso corporeo. [6] L'espressione genetica dell'orexina è influenzata dai livelli di glucosio nel plasma e da quelli di leptina, un ormone polipeptidico coinvolto nell'obesità e in disturbi cardiovascolari. [6, 9]

### **1.1.1. La struttura delle orexine**

L'orexina-A è composta da 33 residui amminoacidici, con una massa molare di 3562 Da, è caratterizzata da un gruppo piroglutammico sul residuo amminoacidico N-terminale ed è ammidata sul residuo C-terminale. Questa presenta, inoltre, due ponti disolfuro intramolecolari tra le quattro cisteine presenti nella sequenza, specificatamente tra i residui Cys<sup>6</sup>-Cys<sup>12</sup> e tra Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>14</sup>, la cui topologia è stata determinata per confronto dell'analisi HPLC in fase inversa tra il peptide naturale purificato e tutte le combinazioni possibili che sono state ottenute per via sintetica. [3]

L'orexina-B, con una massa molare di 2937 Da, è composta da una catena lineare di 28 residui amminoacidici la cui sequenza è per il 46% identica a quella dell'orexina A (13 residui su 28). Anch'essa presenta il residuo C-terminale ammidato (**figura 2**). [3]



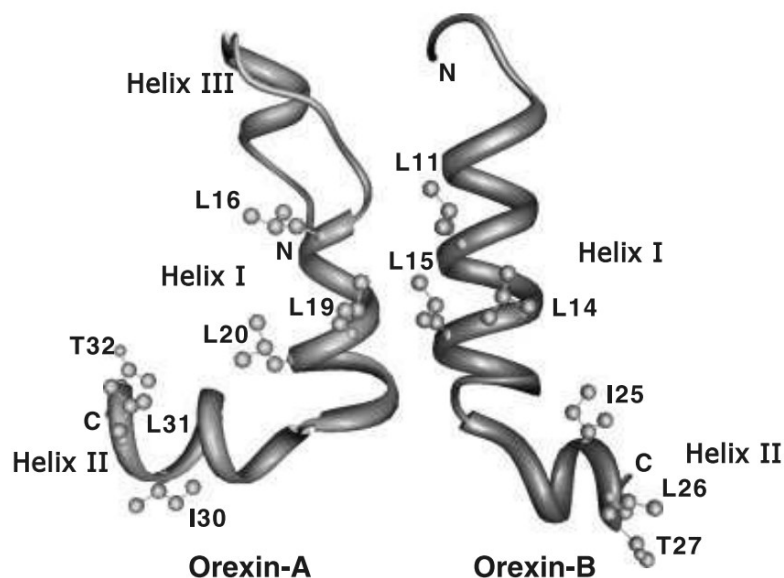
*Figura 2: sequenza dell'orexina A e dell'orexina B, entrambe ammidate sul residuo C-terminale e dove con "U" è indicato il residuo dell'acido piroglutammico. Le linee indicano i ponti disolfuro dell'orexina A e nei riquadri si trovano evidenziate le omologie tra le due sequenze. [10]*

Mentre l'orexina A è identica tra le specie umana, bovina e del ratto, l'orexina B umana presenta delle piccole differenze, in particolare nell'estremità C-terminale. [3] Questa grande conservazione della sequenza, tra specie, ne suggerisce un ruolo fisiologico rilevante. [6]

La struttura secondaria dell'orexina A, in ambiente membrano mimetico, adotta una conformazione composta da tre sezioni elicoidali: Cys<sup>6</sup>-Gln<sup>9</sup>, Leu<sup>16</sup>-Gly<sup>22</sup> e Asn<sup>25</sup>-Thr<sup>32</sup>. [11]

La struttura secondaria dell'orexina B, disciolta in acqua a pH 3.5, presenta due  $\alpha$ -eliche, tra Leu<sup>7</sup> e Ser<sup>18</sup> e tra Ala<sup>23</sup> e Met<sup>28</sup> con una orientazione di circa 60-80° tra di loro e collegate attraverso un linker flessibile (**figura 3**). Il dipeptide Pro<sup>4</sup>-Pro<sup>5</sup> induce, inoltre, la formazione di un  $\beta$ -turn. [11]

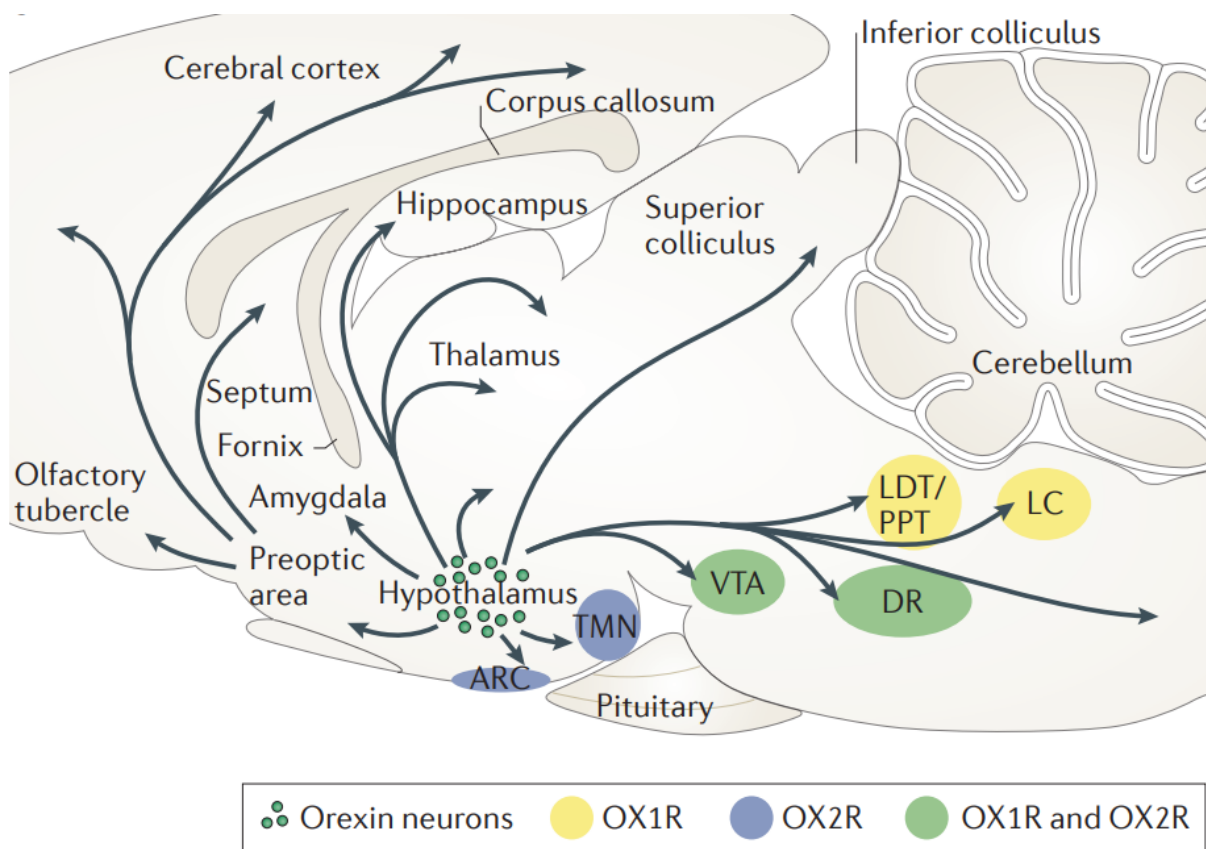
Si suppone che la regione N-terminale dell'orexina A svolga un ruolo fondamentale nel differenziarsi dall'orexina B.



*Figura 3: struttura 3D dell'orexina A (a sinistra) e dell'orexina B (a destra) in ambiente membrano mimetico (SDS), ottenuta tramite esperimenti 1H e 13C NMR 2D. [11]*

### 1.1.2. I recettori orexinergici

L'attività delle orexine è modulata da due recettori specifici, accoppiati a proteine G (GPCRs), strettamente correlati e chiamati OX1R e OX2R. Questi recettori condividono il 64% della sequenza ma sono distribuiti diversamente nel cervello: Il recettore OX1R è distribuito in diversi distretti del sistema nervoso centrale, tra cui la corteccia prefrontale e infralimbica, l'ippocampo, l'amigdala, l'ipotalamo anteriore ed altri nuclei cerebrali; mentre il recettore OX2R è distribuito nell'amigdala, nel nucleo ipotalamico dorsomediale, nel nucleo paraventricolare e nell'ippocampo (**figura 4**). [7, 12]



**Figura 4:** rappresentazione schematica delle proiezioni orexinergiche nel sistema nervoso centrale. [5]

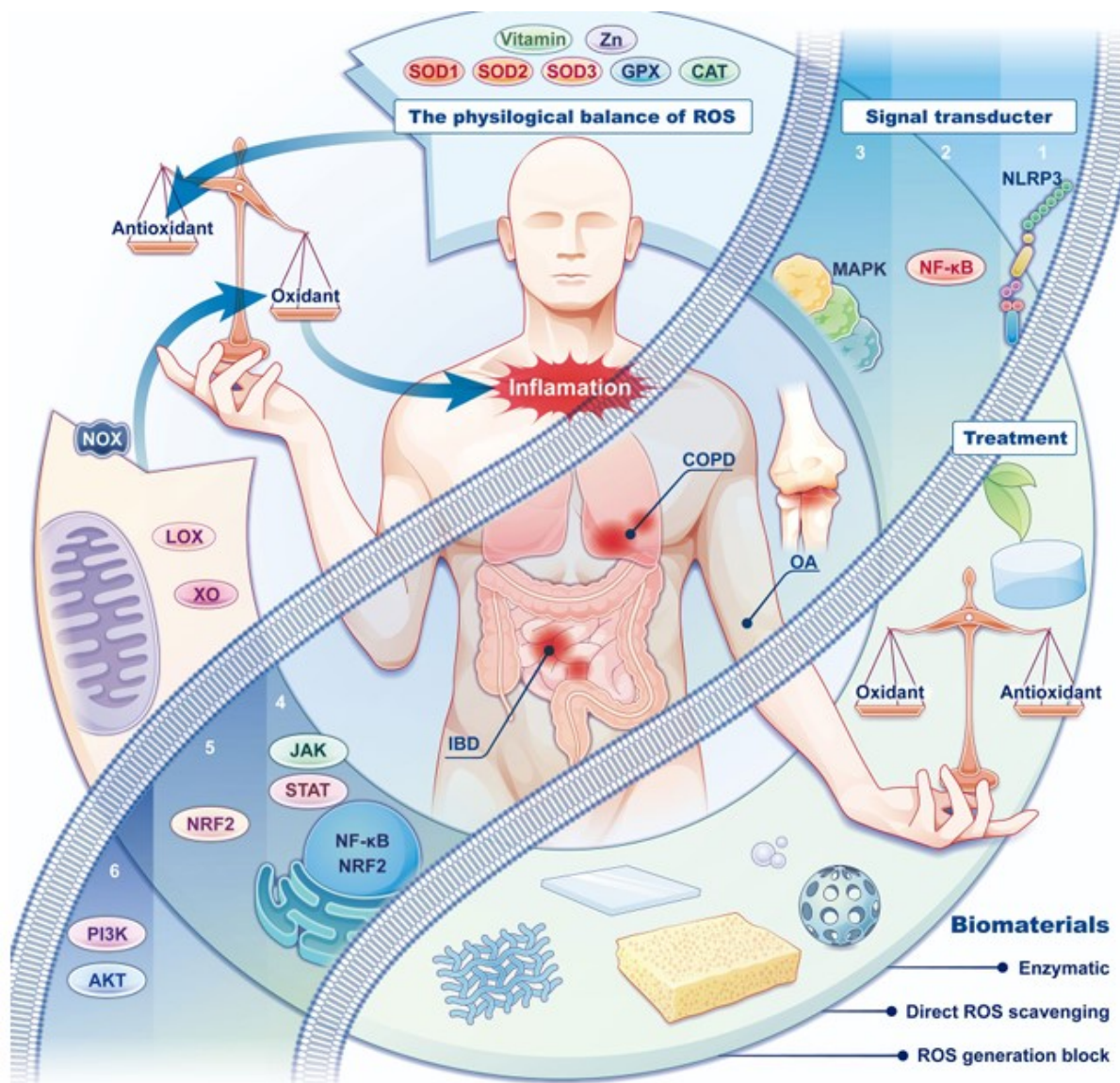
OX1R presenta un'affinità un ordine di grandezza maggiore per l'orexina A rispetto alla B, mentre OX2R ha affinità simili per entrambe: svolgono quindi diversi ruoli fisiologici e sono implicati in vie di signaling differenti, ma che risultano complementari. [5]

I frammenti Arg<sup>15</sup>-Leu<sup>33</sup> per l'orexina A e Arg<sup>10</sup>-Met<sup>28</sup> per la B sono le sequenze peptidiche più corte ad essere attive rispettivamente per i recettori OX1R e OX2R, mentre il frammento dell'orexina A 17-33 è il peptide più corto che presenta una selettività preferenziale verso

OX1R. [13] La parte C-terminale dei due neuropeptidi risulta quindi essenziale per l'attivazione dei recettori, sottolineando l'importanza della struttura secondaria ad  $\alpha$ -elica di questi ultimi. [12] Le orexine presentano un'attività micromolare e il loro binding con i loro recettori causa un'aumento delle concentrazioni di ioni  $Ca^{2+}$  intracellulare nei neuroni. [12]

## 1.2. Stress ossidativo

La perdita di attività biologica delle orexine sembra essere associata a condizioni di "stress ossidativo". [10] Lo stress ossidativo è definito come la mancanza di equilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (rispettivamente ROS e RNS) e la capacità dell'organismo di contrastare le loro azioni attraverso il sistema di protezione antiossidante (**figura 5**). [14]

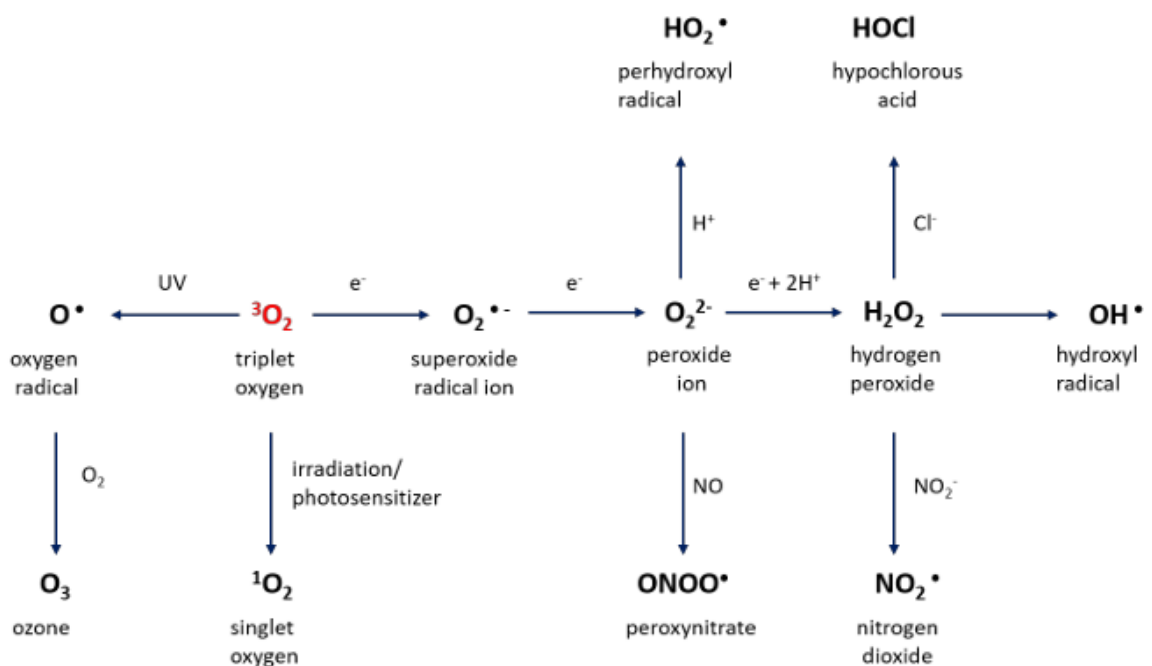


*Figura 5: schema delle dinamiche di produzione ed eliminazione dei ROS. [15]*

I suoi effetti sono associati all'invecchiamento e a diverse patologie quali malattie cardiovascolari, neurodegenerative e infiammatorie e troviamo nello stress ossidativo una possibile concausa di malattie come il cancro, gli enfisemi, la cataratta e il diabete. [16, 17]

ROS e RNS, tuttavia, non sono solo specie dannose verso le biomolecole, ma sono prodotte nelle cellule sia come strumento di difesa per la rimozione di sostanze tossiche che per la segnalazione cellulare e per il controllo di reazioni biosintetiche. [18] Rappresentano, inoltre, un sistema di difesa immunitario innato, nonostante siano in grado di danneggiare anche le cellule ospitanti, e sono in grado di regolare funzioni fisiologiche quali il tono vascolare, la sintesi dell'insulina e la proliferazione, la differenziazione e la migrazione delle cellule. [16]

Tra queste specie troviamo i radicali liberi, prodotti nei processi aerobici in seguito alla respirazione cellulare, all'esposizione di infezioni microbiche che attivano i fagociti, durante l'attività fisica di alta intensità o prodotti dall'azione di inquinanti e tossine quali il fumo di sigaretta, gli alcolici, i pesticidi, l'ozono e i raggi UV e ionizzanti (**figura 6**). [16]

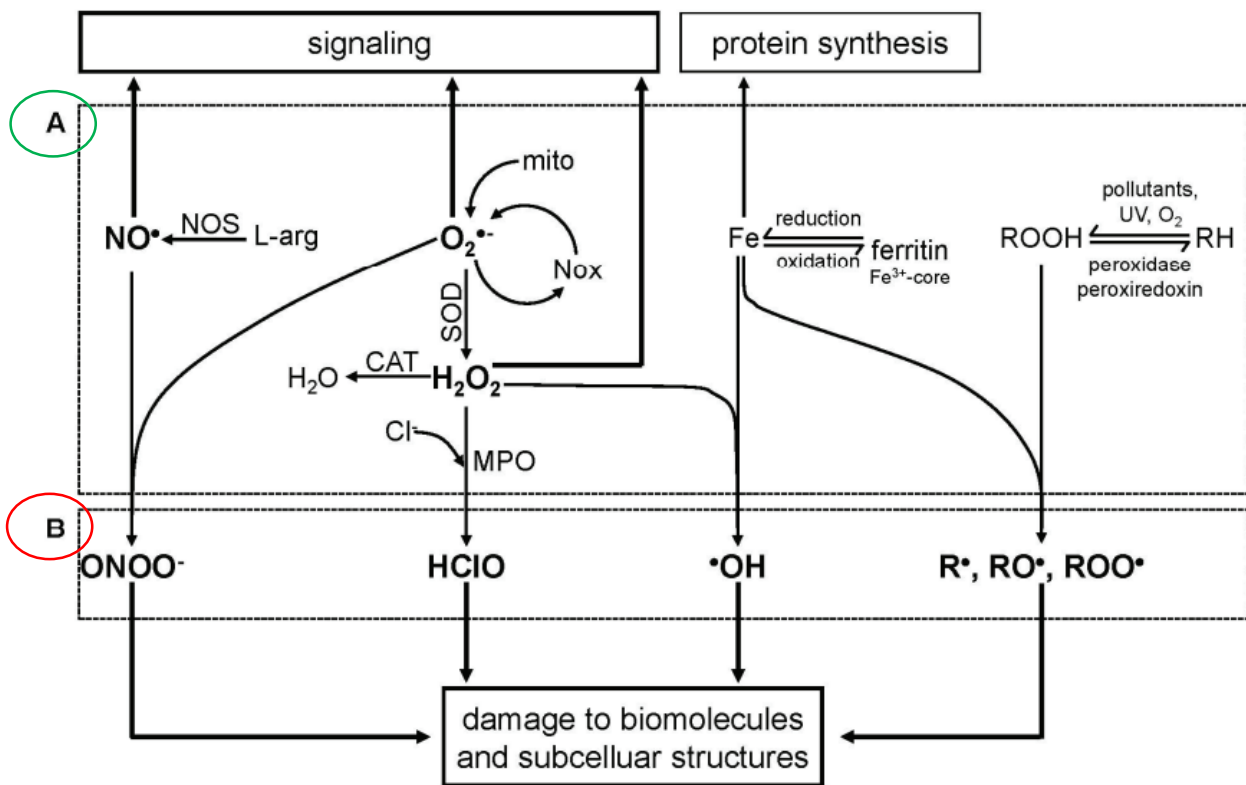


*Figura 6: produzione intracellulare di specie radicaliche a partire dall'ossigeno di tripetto. [19]*

ROS e RNS, collettivamente chiamati RONS, presentano un effetto determinato in primo luogo dalla loro qualità (cioè se sono primari o secondari) e solo successivamente dalla loro quantità. Sono considerate primarie quelle specie che si formano direttamente a causa dei processi fisiologici, mentre sono dette secondarie quelle specie che si formano per reazione delle specie primarie (**figura 7**). Gli effetti deleteri, nominati stress ossidativo, non si presentano se nel sistema biologico sono presenti solo specie primarie, anche se ad alte concentrazioni.

Per avere effetti deleteri, le specie primarie devono reagire tra loro o con ioni di metalli di transizione, formando specie secondarie altamente reattive come, per esempio, lo ione nitroperossido ( $\text{ONOO}^-$ ) e il radicale ossidrilico ( $\text{OH}^\bullet$ ).

I RONS secondari sono cataliticamente molto attivi e non controllabili, di conseguenza non possono comportarsi da trasduttori di segnalazione, mentre i RONS primari sono ben controllati, le reazioni con i loro target sono reversibili e privi di effetti deleteri. Questo li rende ideali per i processi di segnalazione intracellulare. [20]



**Figura 7:** (A) specie primarie (contribuiscono ai processi fisiologici, in verde); (B) specie secondarie (deleterie, in rosso). [20]



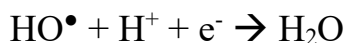
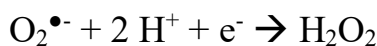
### 1.2.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Meno del 5% dell'O<sub>2</sub> che respiriamo va a formare le specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) come sottoprodotto del metabolismo aerobico; tuttavia, considerando la massa corporea media di un uomo, questo ne produce circa 2 kg all'anno, risultando essere tra i metaboliti principali.

[21]

I ROS, a basse concentrazioni, si comportano come molecole di segnalazione nella regolazione della proliferazione cellulare, dell'apoptosi e dell'espressione genetica. Inoltre, sono essenziali quando generati dai fagociti come meccanismi di difesa contro batteri e funghi. [22]

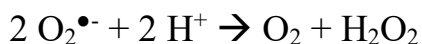
Nei processi aerobici che sfruttano l'ossigeno per ossidare biomolecole contenenti atomi di carbonio e di idrogeno, al fine di produrre energia chimica e calore, l'ossigeno viene gradualmente ridotto a diversi intermedi: radicale idroperossido (HO<sub>2</sub>•), radicale anionico superossido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ione idrossido (OH<sup>-</sup>) e radicale idrossile (OH•) (**schema 1**). [23] Gli elettroni responsabili di questi processi sono quelli che fuoriescono dall'interno della membrana durante il loro trasporto da NADH e FADH<sub>2</sub> all'O<sub>2</sub>, per formare acqua come sottoprodotto della formazione di ATP. [16, 24]



*Schema 1: riduzione progressiva dell'ossigeno. Radicale idroperossido (HO<sub>2</sub>•), radicale anionico superossido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), radicale idrossile (OH•). [23]*

Il radicale anionico superossido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) si forma per aggiunta di un elettrone negli orbitali di antilegame (π\*) dell'ossigeno. [23] È una riduzione a 1 elettrone che si forma per mezzo di diverse ossidasi ma anche nella catena di trasporto elettronico mitocondriale, durante il processo di sintesi dell'ATP. [24] In acqua è un ossidante debole per l'acido ascorbico e i tioli, mentre è un forte riducente per alcuni complessi di ferro. [22] La sua forma protonata, il radicale idroperossido (HO<sub>2</sub>•), è più forte sia come ossidante che come riducente, ma molto meno stabile a pH fisiologico e si deprotona con una pKa di 4.80. [23]

L'anione radicalico superossido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) può dismutare, portando alla formazione di ossigeno molecolare e acqua ossigenata (**schema 2**). [25]



*Schema 2: dismutazione del radicale anionico superossido in ambiente acido per formare ossigeno (O<sub>2</sub>) e acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). [16]*

L'acqua ossigenata è prodotta a livello fisiologico dagli enzimi ossidasi, per trasferimento di 2 elettroni all'ossigeno molecolare. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è in grado di produrre radicali altamente reattivi in presenza di ioni metallici. [23]

Il radicale idrossile (OH<sup>•</sup>) è una specie altamente aggressiva, responsabile del danno ossidativo della maggior parte delle biomolecole. Si forma dalle reazioni tipo Fenton ma anche dalla fotolisi dell'acqua. [25] La sua formazione fu proposta da Haber and Weiss, in un articolo del 1934, dall'interazione del radicale anionico superossido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e acqua ossigenata H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avvalendosi della reazione di Fenton (**schema 3**). [21, 26]



Reazione netta:

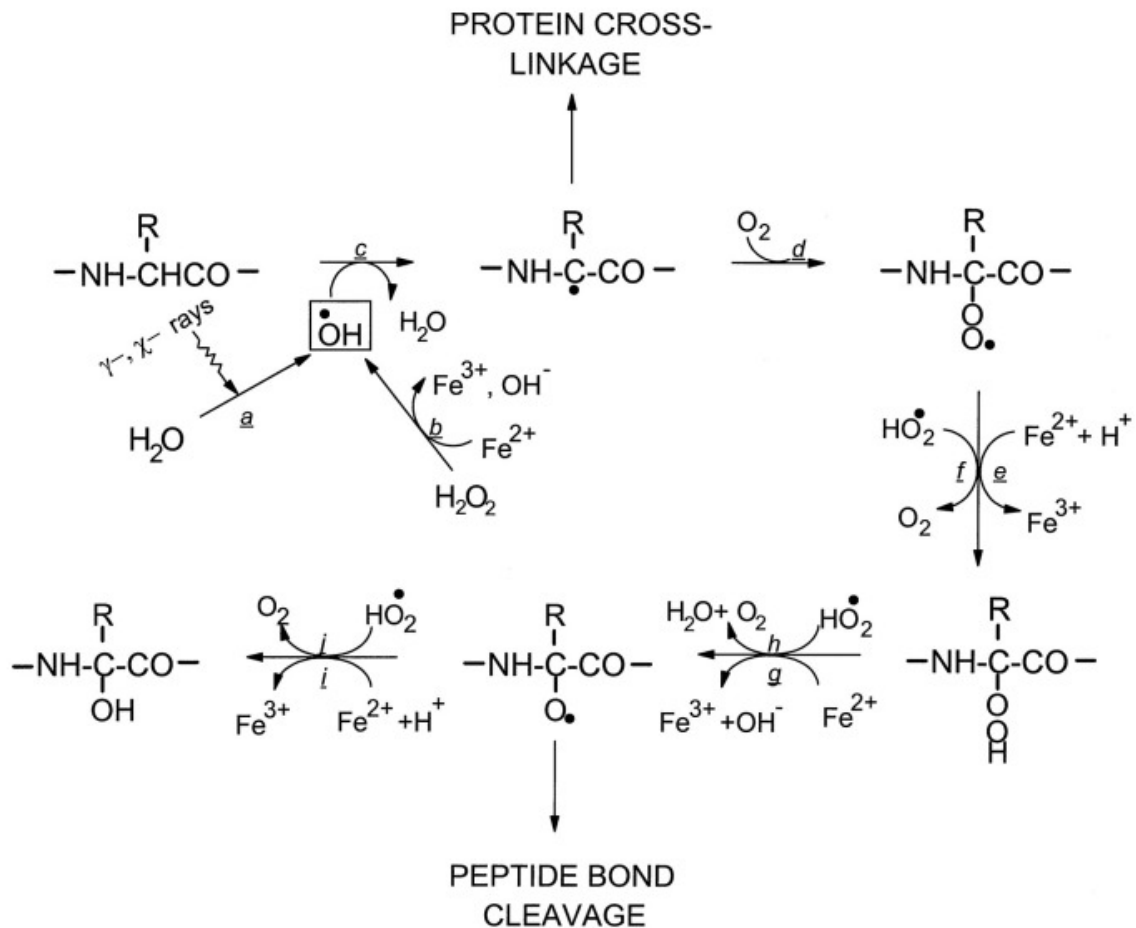


*Schema 3: reazione di Weiss-Haber. [26]*

Riconosciuto il fatto che questa reazione è termodinamicamente sfavorita nei sistemi biologici, necessita di un qualche catalizzatore per poter procedere. La reazione netta (3) può essere divisa in due reazioni (1 e 2). Nonostante anche altri metalli di transizione sono in grado di catalizzare questa reazione, avvalendosi della reazione di Fenton, quello proposto è considerato il meccanismo principale di formazione della specie altamente reattiva HO<sup>•</sup> nei sistemi biologici. [21] Il loro contributo esatto nell'insorgere di varie condizioni patologiche non è del tutto chiaro, poiché sono sia iniziatori ma anche prodotti del danneggiamento dei tessuti.

Nel corpo umano in salute, la produzione di HO<sup>•</sup> è controllata da un sistema complesso di proteine di stoccaggio, cioè proteine deputate alla conservazione del ferro libero, in modo da assicurare che ce ne sia quanto meno possibile che possa catalizzare la reazione di Fenton. [21] L'acido ipocloroso (HClO) è un ossidante altrettanto forte, generato dalla mieloperossidasi a partire da acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in presenza di anione cloruro (Cl<sup>-</sup>), e induce clorurazione ossidativa in amminoacidi, proteoglicani, lipidi e altri composti intracellulari e di membrana.

[27] L'ossidazione delle proteine da parte dei ROS può generare sia prodotti stabili che prodotti reattivi. Nei sistemi biologici si possono trovare: 2-ossostidina, 3-clorotirosina, 3-nitrotirosina, acido amminomalonico, dimeri di aminoacidi aromatici idrossilati, idroperossileucina e idroperossivalina, orto- e meta-tirosina, para-idrossifenilacetaldeide e carbonili (**schema 4**). [26]



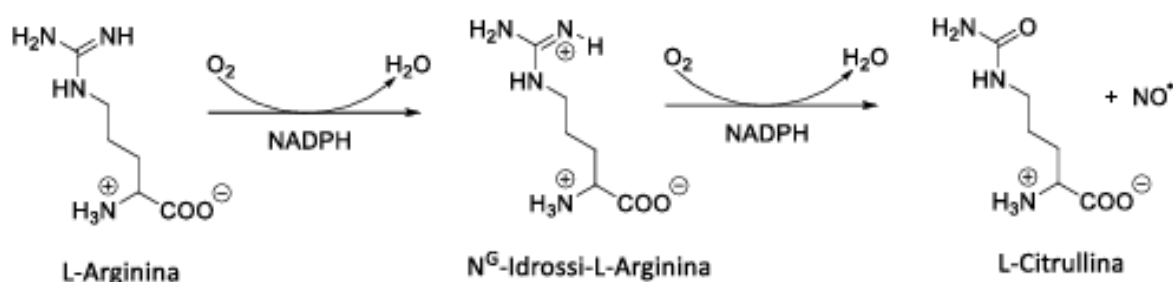
*Schema 4: meccanismo dell'ossidazione delle proteine a carico delle specie radicaliche dell'ossigeno. [28]*

Le proteine non possiedono un sistema di riparazione poiché per la cellula risulta più efficiente ed economico distruggere quelle modificate e risintetizzarle. Questo è evidenziato dal fatto che le proteine ossidate tendono a denaturarsi e, a sua volta, si rendono più facilmente riconoscibili alla proteolisi che le rimuove dal sistema. Nonostante la maggior parte delle proteine funzionalmente inattive vengano rimosse velocemente, altre si accumulano nel tempo contribuendo ai danni associati all'invecchiamento e disturbi quali diabete, aterosclerosi e a patologie neurodegenerative. [26]

### 1.2.2 Specie reattive dell'azoto (RNS)

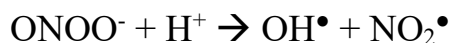
Similmente allo stress ossidativo, lo stress nitrosativo riguarda la chimica delle specie reattive all'azoto come l'ossido di azoto ( $\text{NO}^\bullet$ ), il diossido di azoto ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) e specie non radicaliche come lo ione perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e le nitrosammine  $\text{R}_2\text{NNO}$ . [29]

Il radicale monossido di azoto ( $\text{NO}^\bullet$ ) ha un ruolo sia fisiologico che patologico. Questa specie è prodotta per via endogena da parte di enzimi, detti sintetasi di monossido di azoto, per riduzione dei dell'L-arginina in presenza di ossigeno e NADPH (**schema 5**).



*Schema 5: reazione di formazione del radicale monossido di azoto a partire dall'L-arginina. [30]*

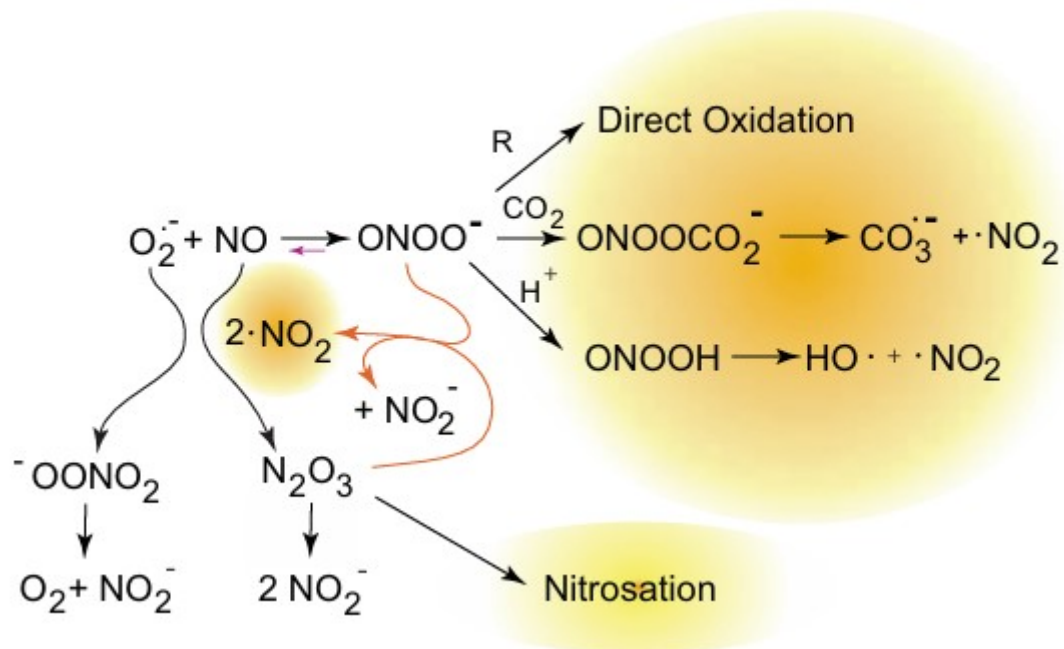
Inoltre, può essere prodotto dai fagociti durante i processi coinvolti nella risposta immunitaria. [16] È una delle rare molecole gassose di segnalazione, è implicata nella vasodilatazione e nella neurotrasmissione, ed è essenziale nelle reazioni biochimiche di S-nitrosazione dei tioli e nitrosilazione degli ioni dei metalli di transizione. Tuttavia, può attaccare il gruppo eme dell'emoglobina alterandone la struttura, [31] e può reagire con il radicale anionico superossido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) per dare il perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un potente ossidante verso diverse biomolecole. Quest'ultimo può anche decomporsi, spontaneamente o in presenza di metalli di transizione, in radicale idrossile e diossido di azoto (**schema 6**). [23, 32, 33]



*Schema 6: reazione di decomposizione del perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) per produrre radicali idrossili ( $\text{OH}^\bullet$ ) e radicale diossido di azoto ( $\text{NO}_2^\bullet$ ). [16]*

L'acido perossinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), cioè la forma protonata del perossinitrito, è un potente ossidante che si comporta in modo simile al radicale idrossile e può decomporsi originando ioni nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), coinvolti nella nitratura della tirosina, triptofano, cisteina e metionina. [16]

La reazione tra radicale anionico superossido e monossido di azoto, in presenza di anidride carbonica, può formare diossido di azoto radicalico ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) e nitroperossicarbonato ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ) (schema 7).

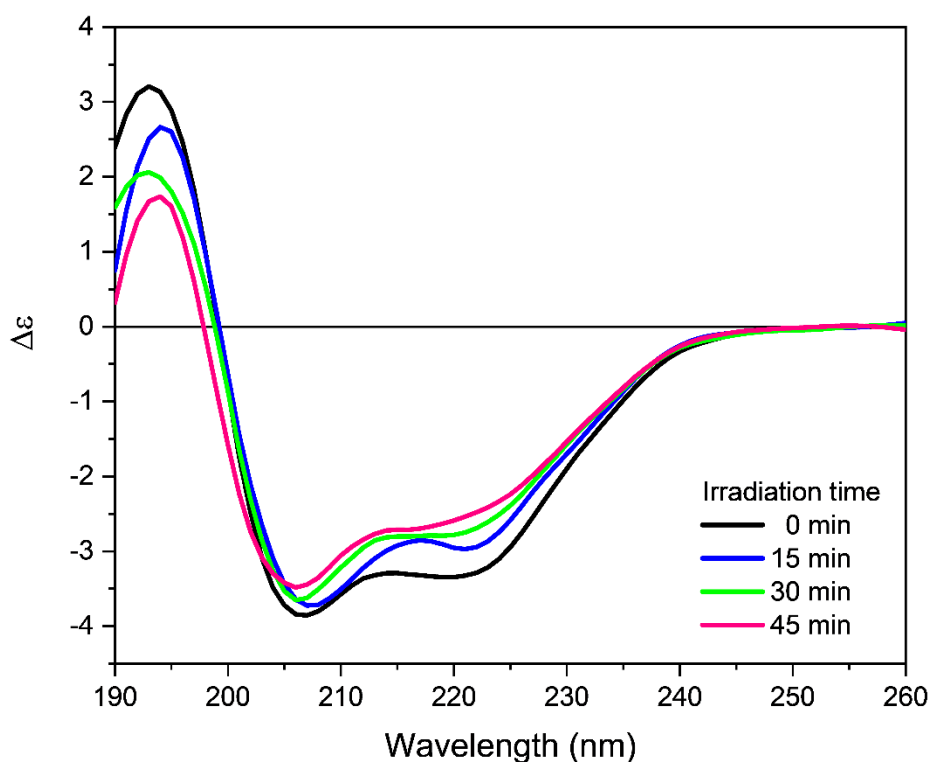


*Schema 7: interazione tra ossido nitrico (NO), ione radicalico superossido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). [34]*

### 1.3 Studi conformazionali precedenti

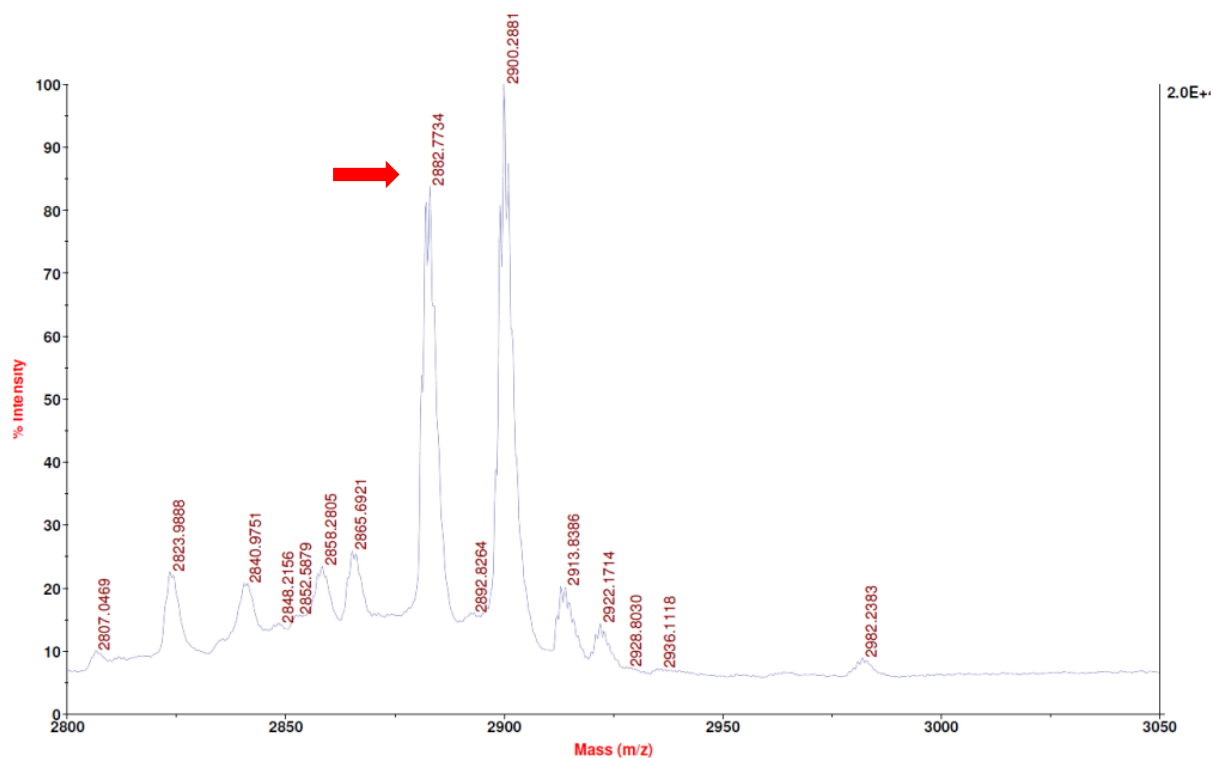
All'interno del gruppo di ricerca in cui è stato svolto questo internato di tesi, si è interessati, tra i vari hot topics, allo studio degli effetti dello stress ossidativo sulla conformazione delle orexine.

L'analisi conformazionale dei due neuropeptidi è stata condotta sia in acqua che in ambiente membrano mimetico (utilizzando TFE o micelle SDS di fosfolipidi) e tramite tecniche spettroscopiche, quali il dicroismo circolare, e la spettrometria di massa MALDI, sono stati valutati gli effetti dello stress ossidativo e dei prodotti di degradazione ossidativa dei lipidi. Le specie radicaliche all'ossigeno (ROS) sono state generate per irraggiamento UV, mentre le specie radicaliche all'azoto (RNS) sono state introdotte per trattamento con specie donatori di  $\text{NO}^\bullet$ . L'analisi della struttura secondaria dell'orexina B in ambiente membrano mimetico mostra un'alta percentuale di ripiegamento elicoidale. L'irradiazione della soluzione in tampone fosfato non risulta indurre effetti sulla struttura secondaria, mentre in soluzione di fosfolipidi, dallo spettro dicroico (**figura 8**), si nota una diminuzione della struttura elicoidale in favore della conformazione  $\beta$ . L'analisi della spettrometria di massa suggerisce che in entrambi i casi avviene l'ossidazione della metionina.



*Figura 8: spettri CD dell'orexina B (34  $\mu\text{M}$ ) in DMPG/DMPC 1:3, irradiato a tempi crescenti con una lampada UV-C a temperatura ambiente. Spettri registrati a 25°C con uno spettropolarimetro Jasco J-1500.*

Il trattamento con RNS, all'analisi CD, non induce effetti significativi sulla struttura secondaria. Tuttavia, l'analisi alla spettrometria di massa suggerisce una deamidazione (**figura 9**), processo che passa per la formazione di un intermedio succinimidico e che risulta in un  $\alpha$ - $\beta$  shift favorito dalla presenza dell'istidina.



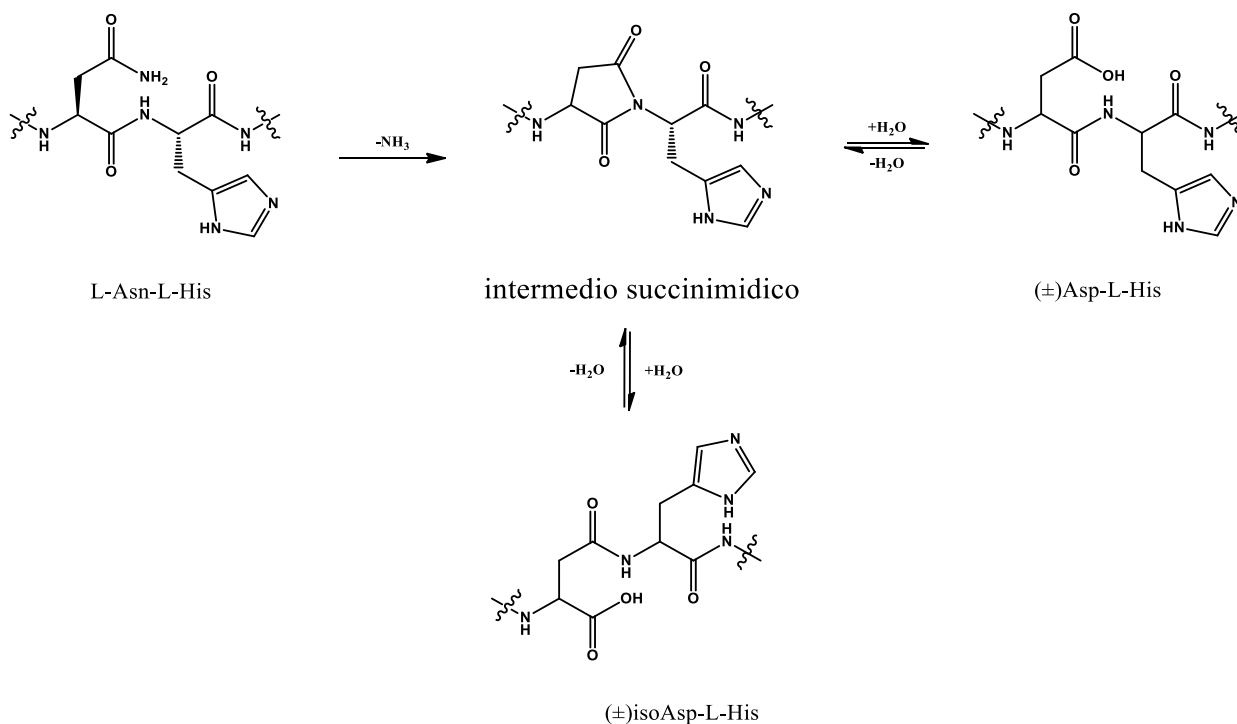
**Figura 9:** spettro di massa MALDI-TOF dell'orexina B (massa calcolata  $[M+H^+] = 2899$  m/z) trattata con DEA NONO-Ate in tampone fosfato mostra un picco a -17 u.m.a. (freccia rossa) indicativo della deamidazione. [10]

Ulteriori studi di dicroismo circolare e spettrometria di massa MALDI-TOF sull'orexina A indicano una maggiore suscettibilità all'effetto dello stress ossidativo rispetto all'orexina B, probabilmente a causa della presenza dei ponti disolfuro intramolecolari.

## 1.4. La deamidazione dell'asparagina (Asn).

Tra i processi che portano alla perdita di attività delle proteine troviamo anche le reazioni che coinvolgono i residui amminoacidici che le compongono, tra cui la deamidazione dell'asparagina.

In letteratura sono numerosi gli studi, sia in ambito chimico che biologico e farmaceutico, che riportano la tendenza dell'asparagina a deammidarsi per formare un'anello succinimidico, secondo una reazione che risulta irreversibile. [35-41] Questo anello idrolizza formando due nuovi peptidi in cui il residuo di asparagina è sostituito da un residuo di acido aspartico. A seguito dell'apertura dell'anello succinimidico otteniamo due forme: un peptide in cui tutti i legami ammidici coinvolgono il gruppo carbossilico in  $\alpha$ , e un altro peptide in cui il legame peptidico avviene con il gruppo carbossilico in catena laterale del residuo di acido aspartico. La formazione di questo secondo peptide risulta favorita nel rapporto 1:3. (**schema 8**). [42]  $\pm$



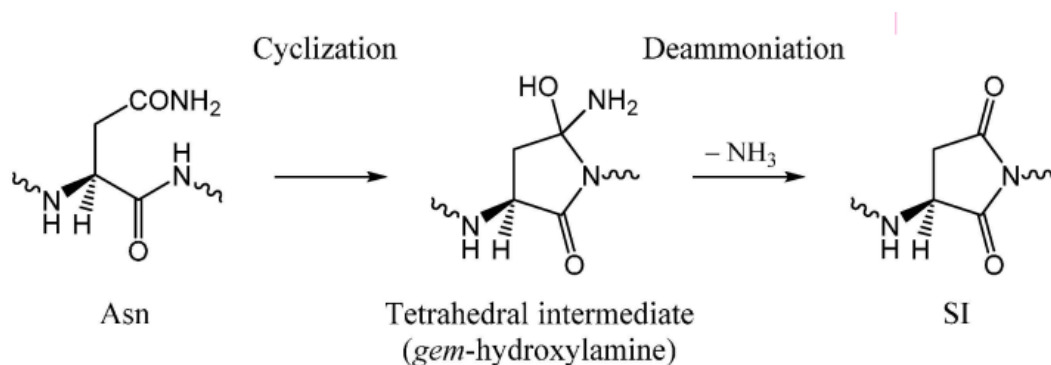
**Schema 8:** deamidazione dell'Asn e idrolisi dell'anello succinimidico con  $\alpha$ - $\beta$ shift favorito in rapporto 1:3.

La velocità di questa reazione cambia largamente in funzione della struttura del peptide, tanto che è stato proposto che questa reazione funga da orologio molecolare, regolando il tempismo di eventi biologici quali il turnover delle proteine. [42]



La formazione dell'anello succinimidico consiste in una reazione di sostituzione nucleofila intramolecolare che avviene in due step fondamentali: ciclizzazione e deammonizzazione.

Nel primo step, l'azoto del residuo amminoacidico legato alla funzione carbossilica dell'asparagina attacca il carbonio ammidico della catena laterale dell'Asn stessa per formare un intermedio ciclico a 5 termini, che presenta il carbonio ammidico in forma tetraedrica, una gem-idrossilammina. Nel secondo step la specie tetraedrica libera ammoniaca per dare la specie succinimidica (**schema 9**). Il meccanismo di trasferimento protonico non è stato ancora chiarito, ma calcoli computazionali suggeriscono che il trasferimento protonico mediato dall'acido carbossilico potrebbe avvenire in condizioni acide. [42]



*Schema 9: meccanismo di formazione dell'intermedio succinimidico (SI). [42]*

Questo processo dipende principalmente dal residuo condensato sulla funzione carbossilica: la reazione risulta favorita nel caso di amminoacidi poco ingombrati stericamente e diventa sempre più sfavorita al crescere dell'ingombro sterico della catena laterale del residuo in questione. Nel caso dell'istidina invece, nonostante l'ingombro della sua catena laterale, questa reazione risulta favorita a causa dell'anello imidazolico, il quale funge da catalizzatore in grado di favorire la sostituzione nucleofila intramolecolare. Calcoli computazionali suggeriscono che l'anello imidazolico, nella forma neutra, funge da mediatore del trasferimento protonico dall'azoto ammidico e lo trasferisca all'ossigeno del gruppo ammidico presente sulla catena laterale del residuo di asparagina. [42]



## 2. Obiettivo

Gli obiettivi di questo lavoro di tesi magistrale sono stati la sintesi e la caratterizzazione conformazionale di alcuni frammenti di orexina A e orexina B, al fine di valutare gli effetti dello stress ossidativo. Nel dettaglio, si possono individuare i seguenti punti fondamentali:

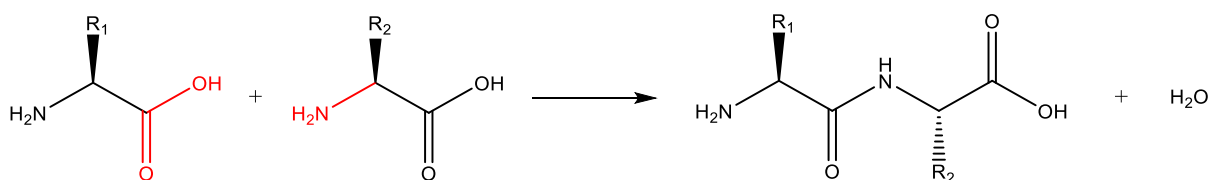
- La sintesi dei frammenti dell'orexina B 10-28 e 17-24 corrispondenti rispettivamente alla minima sequenza attiva dell'orexina stessa e al solo octapeptide contenente la sequenza Asn-His che può subire reazioni di  $\alpha,\beta$ -shift. Inoltre, si vogliono sintetizzare gli analoghi contenenti il residuo di acido isoaspartico in posizione 20, in sostituzione al residuo di asparagina;
- La sintesi del frammento 4-16 dell'orexina A contenente i due ponti disolfuro Cys<sup>6</sup>-Cys<sup>12</sup> e Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>14</sup>;
- Gli studi conformazionali in ambiente acquoso e membrano mimetico sui diversi peptidi sintetizzati, in condizioni normali e dopo l'azione di ROS;
- Le sequenze 10-28 dell'orexina B contenenti il residuo di Asn<sup>20</sup> e il residuo di isoAsp<sup>20</sup> saranno oggetto di studio sulle loro proprietà biologiche presso la sede di Pozzuoli dell'ICB-CNR.

Obiettivo

### 3. Risultati e discussione

I peptidi sono delle molecole polimeriche, le cui unità fondamentali sono gli amminoacidi: questi sono caratterizzati da una funzione amminica e una carbossilica che, nelle proteine in casistica, sono legate allo stesso atomo di carbonio, costituendo la famiglia degli  $\alpha$ -amminoacidi.

Gli amminoacidi sono legati tra loro attraverso un legame ammidico, o “legame peptidico”, tra il gruppo amminico di uno e il gruppo carbossilico dell’altro residuo amminoacidico, con rilascio di una molecola di acqua (**Schema 8**).



*Schema 8: reazione di condensazione per formare il legame peptidico tra due L- $\alpha$ -amminoacidi.*

L’amminoacido più semplice è la glicina, poiché presenta solo due protoni sul carbonio legato alle funzioni caratteristiche, per cui è achirale. Tutti gli altri  $\alpha$ -amminoacidi sono chirali ed esistono in due configurazioni stereochimiche: L e D. In particolare, gli amminoacidi naturali sono in configurazione L. Sulla base delle regole di nomenclatura CIP, gli amminoacidi L hanno tutti la configurazione S, tranne che per la cisteina e i suoi derivati. [43]

Nella sintesi peptidica è fondamentale il ruolo dei gruppi protettori, dal momento che per far reagire un solo gruppo funzionale di una molecola, tutti gli altri devono vedere la loro reattività soppressa. Solitamente questo avviene per derivatizzazione del gruppo funzionale con un gruppo protettore. Questa modificazione dev’essere reversibile e la deprotezione dev’essere selettiva: i gruppi protettori devono essere ortogonali. Due gruppi sono ortogonali quando necessitano di diversi meccanismi per la loro rimozione, in modo da mantenere la protezione di gruppi che non devono reagire nello step successivo o fino alla fine della sintesi. [43]

Un aspetto importante della sintesi peptidica è la conservazione dell’informazione chirale dei residui amminoacidici. Questo obiettivo è raggiunto usando degli amminoacidi che sulla funzione amminica sono protetti con gruppi N-alcossicarbonilici. Questo comporta che la sintesi avvenga dal residuo carbossi-terminale della catena peptidica.

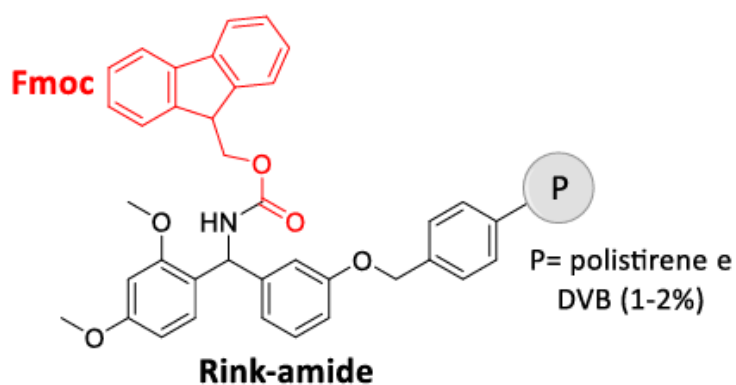
### 3.1 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)

La sintesi peptidica su fase solida, SPPS dall'inglese *solid-phase peptide synthesis*, è la metodologia di scelta che permette la sintesi di qualsiasi sequenza peptidica, compresi i peptidi ciclici. La sua invenzione si deve a Bruce Merrifield del 1963 [44], il cui approccio di sintesi su un supporto solido migliora le tempistiche di produzione, permette la rimozione dei sottoprodotti e dei composti non reagiti per semplice filtrazione, consente l'automazione del processo ed è scalabile a livello industriale. Al fine di ottenere una buona resa finale, ogni step di condensazione dovrebbe avere una resa prossima al 100%.

Tuttavia, le strategie sintetiche basate sulla SPPS soffrono di un'impronta ambientale negativa, specialmente a causa dell'uso estensivo di solventi, per di più classificati problematici dalle agenzie ambientali di tutto il mondo. [45]

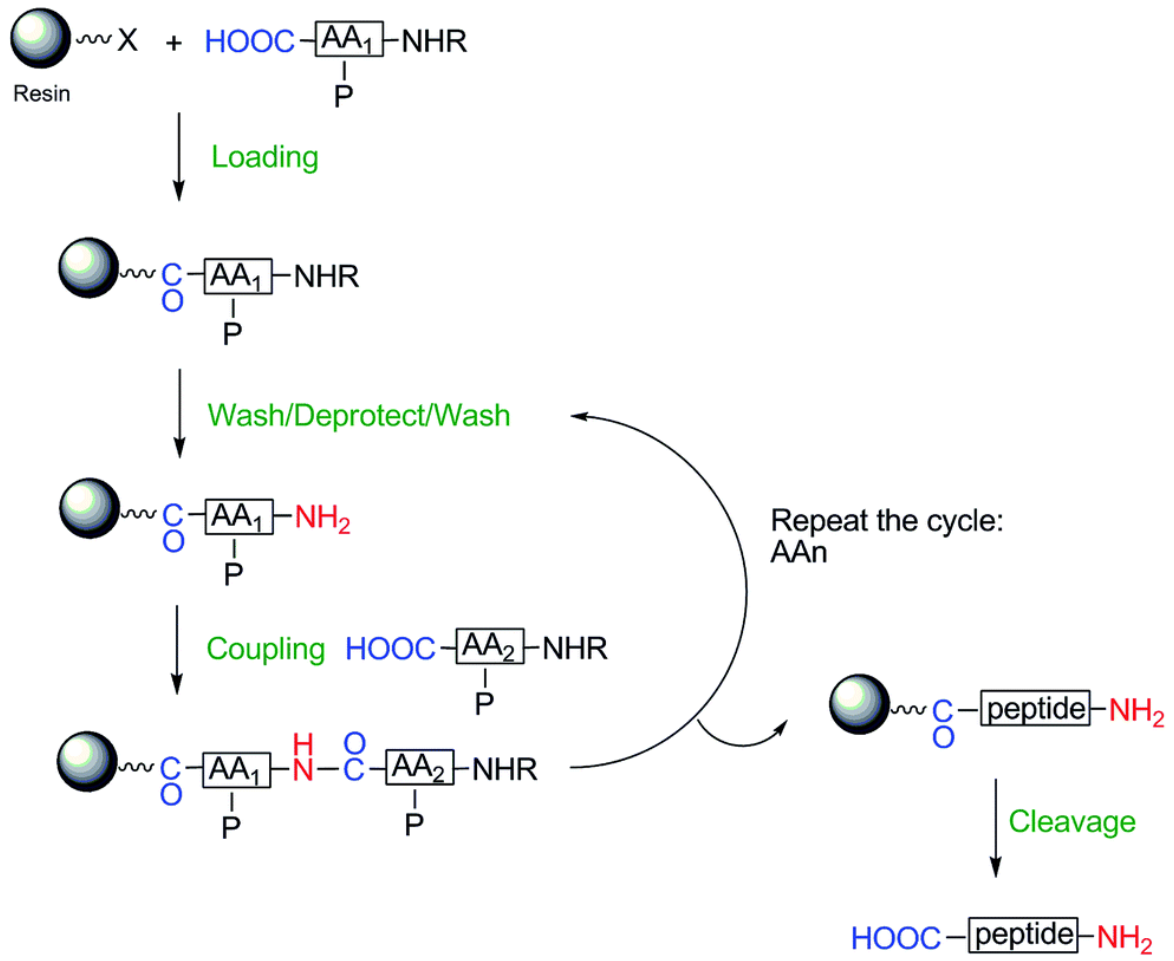
Il supporto solido sul quale viene condensata la catena peptidica è solitamente un polimero cross-linked costituito da polistirene e una piccola percentuale, circa 1-2%, di divinilbenzene, al fine di ottenere una migliore stabilità meccanica e un buon rigonfiamento nei solventi organici (**figura 10**).

Il solvente, solitamente DMF, permette il rigonfiamento della resina che, espandendosi, massimizza l'esposizione dei siti di attacco, costituito da un linker con cui è funzionalizzata la resina.



*Figura 10: struttura della resina Rink-Amide.*

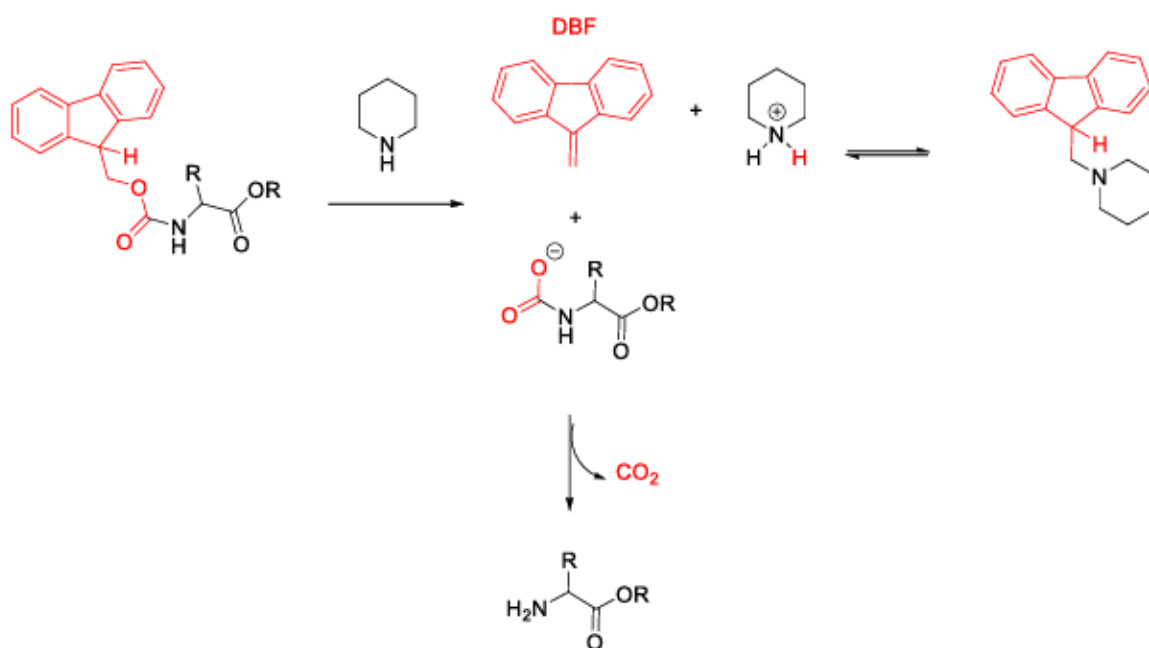
La procedura SPPS è, nella pratica, un processo composto da diversi passaggi ripetuti ciclicamente (**schema 9**). Inizialmente, si ha la rimozione del gruppo protettore sulla funzione amminica del residuo amminoacidico legato alla resina (o del gruppo protettore sulla resina nel caso della prima condensazione) e, successivamente, si procede con la condensazione dell'amminoacido successivo, precedentemente attivato alla funzione carbossilica. La reazione avviene in presenza di una base, solitamente un'ammina terziaria.



*Schema 9: procedura schematica della sintesi peptidica su fase solida (SPPS). [46]*

### 3.1.1 Protezione della funzione amminica

La funzione  $\alpha$ -amminica è protetta con il gruppo uretanico Fmoc, il quale ne diminuisce il carattere nucleofilo. Questo gruppo protettore è rimovibile rapidamente in presenza di ammine primarie (come cicloesilammina o etanolammina) e secondarie (come piperidina o piperazina), oltre che in presenza di ioni fluoruro e DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene), mentre è rimosso lentamente in presenza di ammine terziarie. [47] Nel caso della piperidina (**schema 10**) si utilizza una soluzione al 20% v/v in DMF mentre con la piperazina si utilizza una soluzione al 5% p/v in DMF, in presenza del 2% di DBU. La DBU, grazie alla sua struttura ammidinica, agisce come una base più forte rispetto alle ammine secondarie comunemente utilizzate. Tuttavia, poiché non può reagire con il dibenzofulvene che si libera durante la rimozione del gruppo Fmoc, si opera in presenza di piperazina. Quest'ultima svolge anche il ruolo di molecola caotropica, riducendo l'effetto di aggregazione che può verificarsi nelle catene peptidiche in crescita. [48]



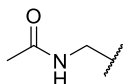
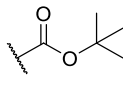

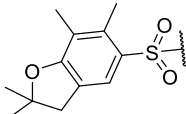
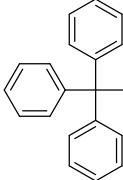
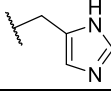
*Schema 10: meccanismo di rimozione del gruppo protettore Fmoc.*

Il meccanismo della reazione di rimozione del gruppo Fmoc prevede una reazione di eliminazione  $E_{1cb}$  che porta alla formazione di un anione, stabilizzato per risonanza. Successivamente, avviene la liberazione del dibenzofulvene che reagisce con l'eccesso di ammina secondaria. I sottoprodotti formati durante la sintesi sono facilmente rimossi dall'ambiente di reazione tramite filtrazione. Dopo la rimozione del gruppo Fmoc, si ottiene la componente amminica non protonata, libera per la condensazione successiva.



### 3.1.2 Protezione delle catene laterali

I gruppi utilizzati a protezione delle catene laterali sono riportati in **figura 11**. Questi devono essere stabili per tutta la durata della sintesi e sono rimovibili in ambiente acido contemporaneamente al distacco del peptide dalla resina.

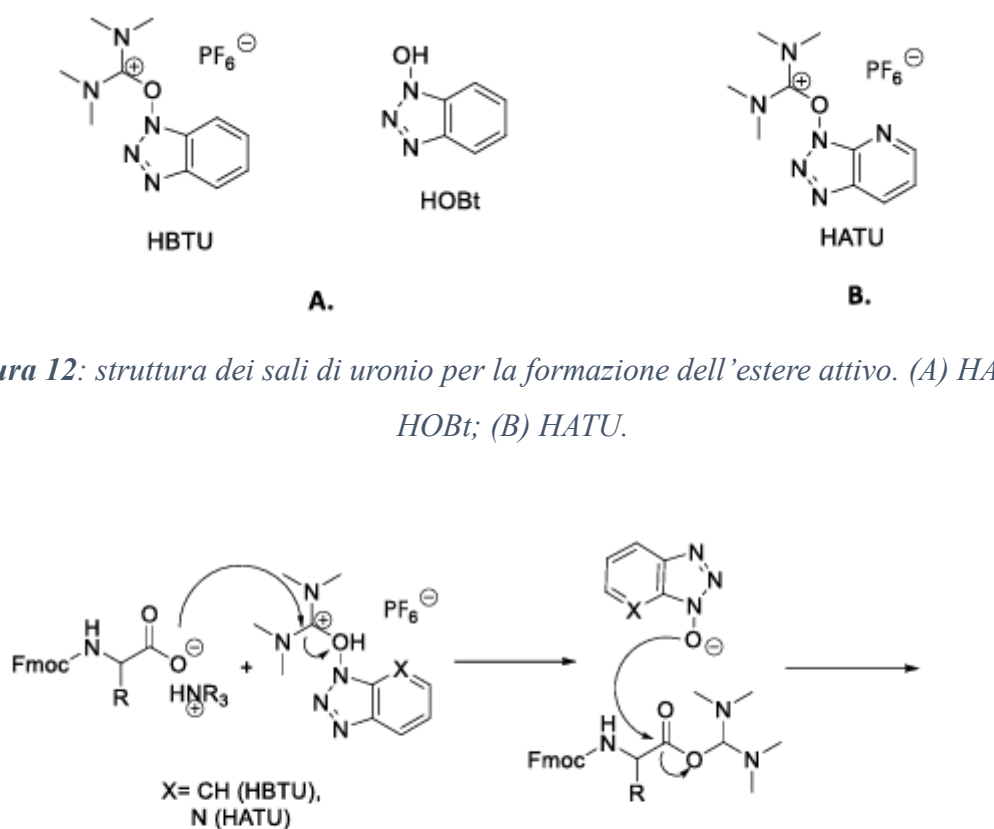
Gruppo protettore	Amminoacido	Catena laterale
 Acm	Cys	HS-CH <sub>2</sub> -
 Boc	Lys	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
 OtBu	Asp	HO-C(=O)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
	Glu	HO-C(=O)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
	Ser	HO-CH <sub>2</sub> -
	Thr	CH <sub>3</sub> -CH(OH)-
 Pbf	Arg	H <sub>2</sub> N-C(=NH <sup>+</sup> )-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
 Trt	Asn	H <sub>2</sub> N-C(=O)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
	Cys	HS-CH <sub>2</sub> -
	Gln	H <sub>2</sub> N-C(=O)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
	His	

*Figura 11: gruppi protettori delle catene laterali per i diversi residui amminoacidici.*

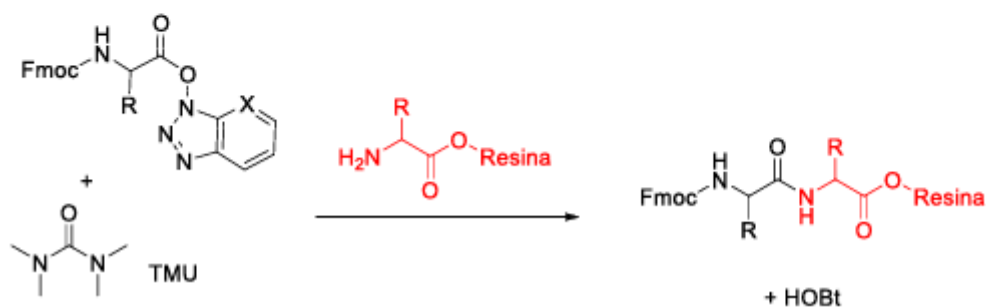
### 3.1.3 Attivazione della funzione carbossilica

Per la reazione di condensazione tra gli aminoacidi risulta essenziale l'attivazione della funzione carbossilica. Questo processo può essere realizzato utilizzando sali d'uronio, quali HBTU e HATU (**figura 12**), che portano alla formazione di un estere attivo. [49]

La reazione con HBTU avviene in presenza del nucleofilo HOBT, il quale svolge un ruolo cruciale nella formazione del composto attivato. Inoltre, è necessaria la presenza di una base, come la DIPEA, per indurre la formazione dello ione carbossilato dell'amminoacido da condensare.



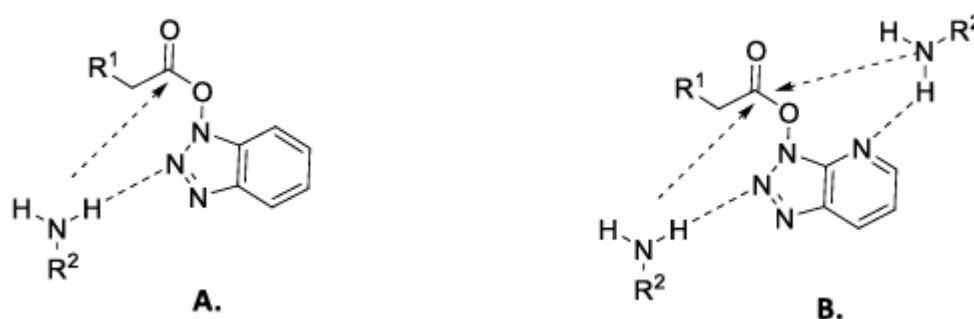
*Figura 12: struttura dei sali di uronio per la formazione dell'estere attivo. (A) HBTU e HOBT; (B) HATU.*



*Schema 11: meccanismo di formazione dell'estere attivo.*

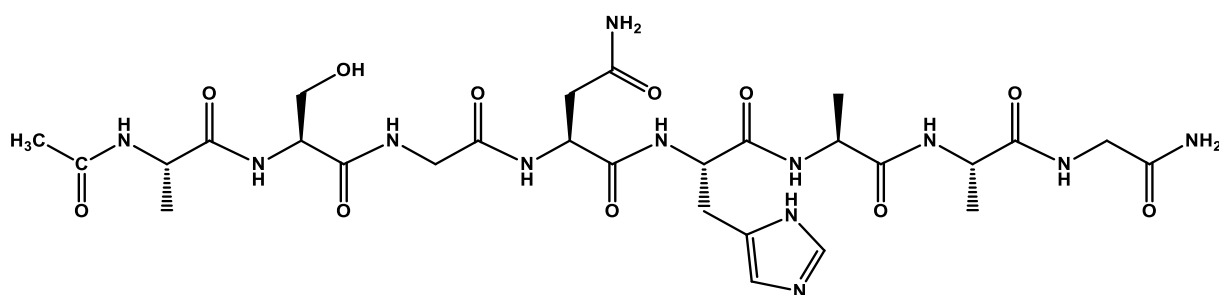
Come illustrato nello **schema 11**, il carbossilato reagisce con il sale di uronio formando un intermedio reattivo che reagisce con l'HOBt in eccesso per formare un estere attivo.

Studi cristallografici sull'estere attivo dell'HOBt hanno evidenziato come la funzione esterea si posizioni ortogonalmente rispetto al piano della funzione  $\alpha$ -carbossilica dell'amminoacido. In questo modo, l'azoto dell'anello benzotriazolico può fornire assistenza anchimerica con il gruppo amminico coinvolto nella reazione di accoppiamento nella catena peptidica in crescita. Nel caso dell'HATU, la presenza di un ulteriore atomo di azoto in posizione 7 dell'anello benzotriazolico può dar luogo ad una seconda assistenza anchimerica e favorire ulteriormente la reazione anche in presenza di residui stericamente ingombri (**figura 13**).



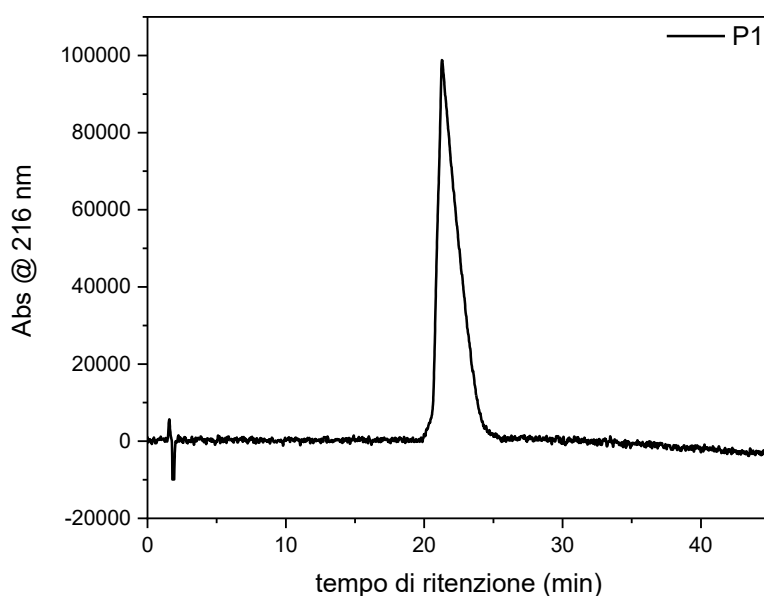
**Figura 13:** (A) assistenza anchimerica singola con l'attivatore HBTU; (B) assistenza anchimerica doppia con l'attivatore HATU.

### 3.1.4 Sintesi del frammento 17-24 dell'orexina B (P1)

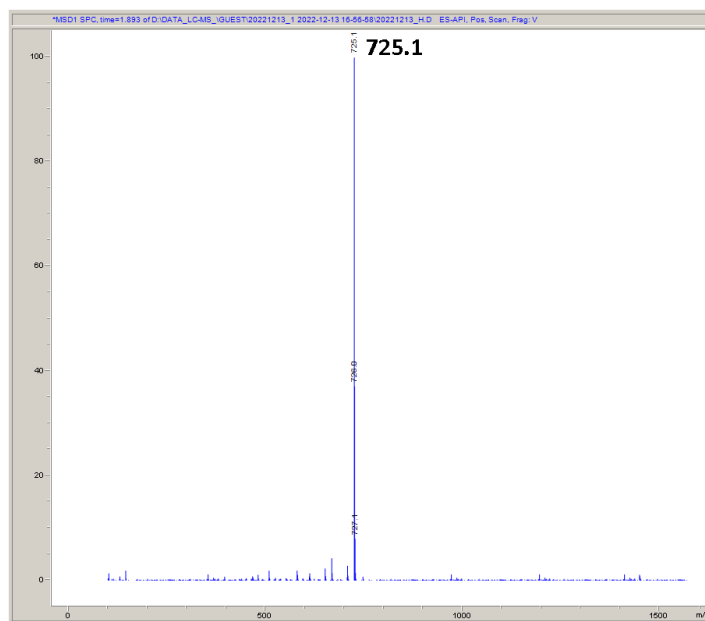


*Ac-Ala-Ser-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-NH<sub>2</sub>*

Il frammento 14-24 dell'orexina B è stato sintetizzato con la strategia Fmoc/HBTU utilizzando una resina Rink-Amide. Il distacco del peptide della resina è avvenuto simultaneamente alla rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali, per mezzo di una soluzione acida al 95% v/v di TFA. La caratterizzazione è avvenuta tramite HPLC analitica (**figura 14**) e LC-ESI-MS (**figura 15**) ed il prodotto grezzo è purificato tramite HPLC per fase inversa (RP-HPLC), utilizzando una miscela binaria di eluenti costituiti da 0.05% v/v TFA in H<sub>2</sub>O (eluente A) e 0.05% v/v TFA in 1:8 v/v MeCN:H<sub>2</sub>O (eluente B).

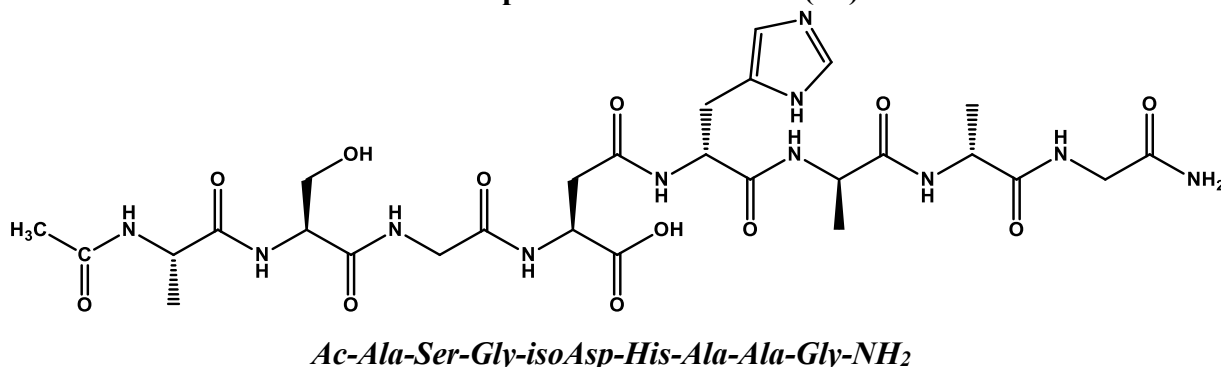


**Figura 14:** cromatogramma HPLC analitico del peptide **P1**. L'eluizione avviene utilizzando una colonna Phenomenex Kinetex 5 $\mu$  XB-C18 100Å 150 x 4.6 mm, flusso 1 mL/min con rilevazione a 216 nm. Eluizione isocratica al 4% B per 25 minuti e quindi gradiente lineare dal 4-15% B in 20 minuti. Eluente A: 0.05 % TFA in H<sub>2</sub>O, Eluente B: 0.05 % TFA in H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1 v/v.

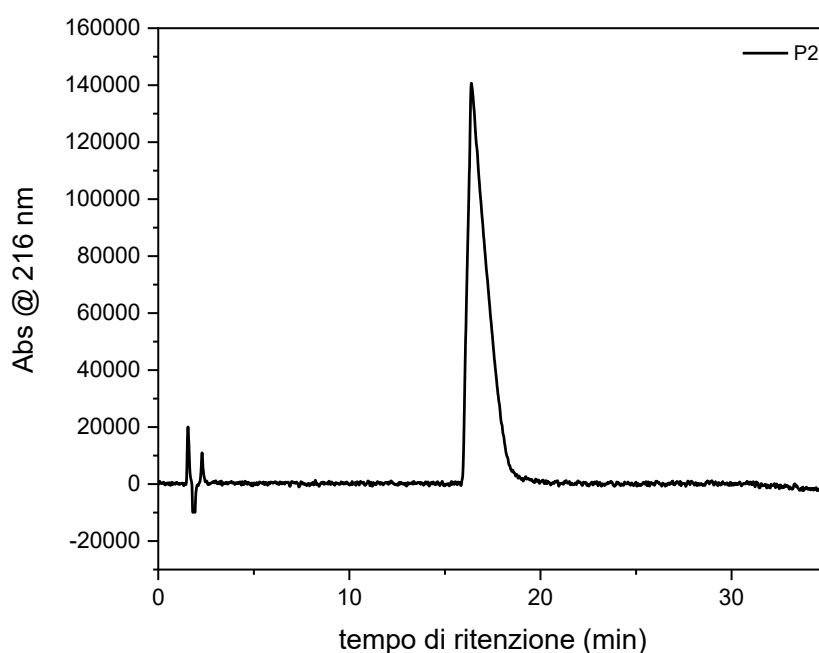


**Figura 15:** spettro di massa ESI(+)-MS per il peptide **P1**. Massa calcolata per  $C_{28}H_{44}N_{12}O_{11} = 724.4$  Da. Massa determinata  $[M+H]^+ = 725.1$ .

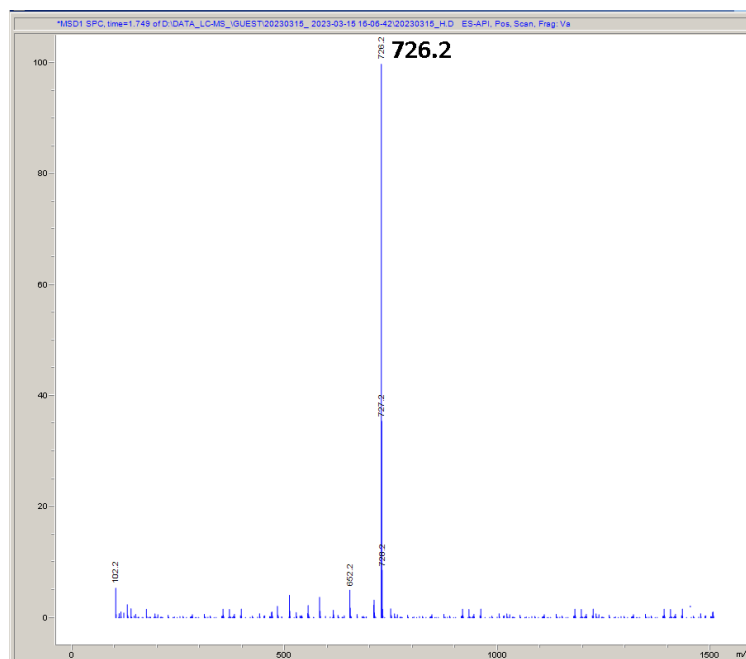
### 3.1.5 Sintesi del frammento 17-isoAsp20-24 dell'orexina B (P2)



Il frammento 17-24 dell'orexina B, contenente un residuo di isoAsp in posizione 20, è stato sintetizzato nelle stesse condizioni riportate per l'analogo peptidico contenente il residuo di Asn. La caratterizzazione è avvenuta tramite HPLC analitica (**figura 16**) e LC-ESI-MS (**figura 17**) ed il prodotto grezzo è purificato tramite RP-HPLC, utilizzando una miscela binaria di eluenti costituiti da 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O (eluente A) e 0.05% TFA in 1:4 v/v MeCN:H<sub>2</sub>O (eluente B).

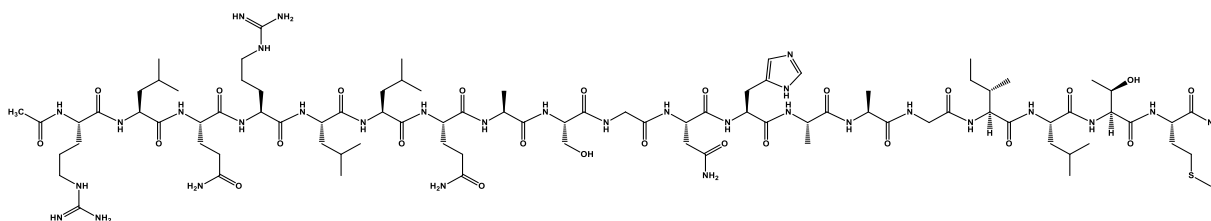


**Figura 16:** cromatogramma HPLC analitico del peptide **P2**. L'eluizione avviene utilizzando una colonna Phenomenex Kinetex 5 $\mu$  XB-C18 100 $\text{\AA}$  150 x 4.6 mm, flusso 1 mL/min con rilevazione a 216 nm. Eluizione isocratica al 4% B per 25 minuti e quindi gradiente lineare dal 4-15% B in 10 minuti. Eluente A: 0.05 % TFA in H<sub>2</sub>O, Eluente B: 0.05 % TFA in H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1 v/v.



*Figura 17: spettro di massa ESI(+)-MS per il peptide **P2**. Massa calcolata per  $C_{28}H_{43}N_{11}O_{12} = 725.3$  Da. Massa determinata  $[M+H]^+ = 726.2$ .*

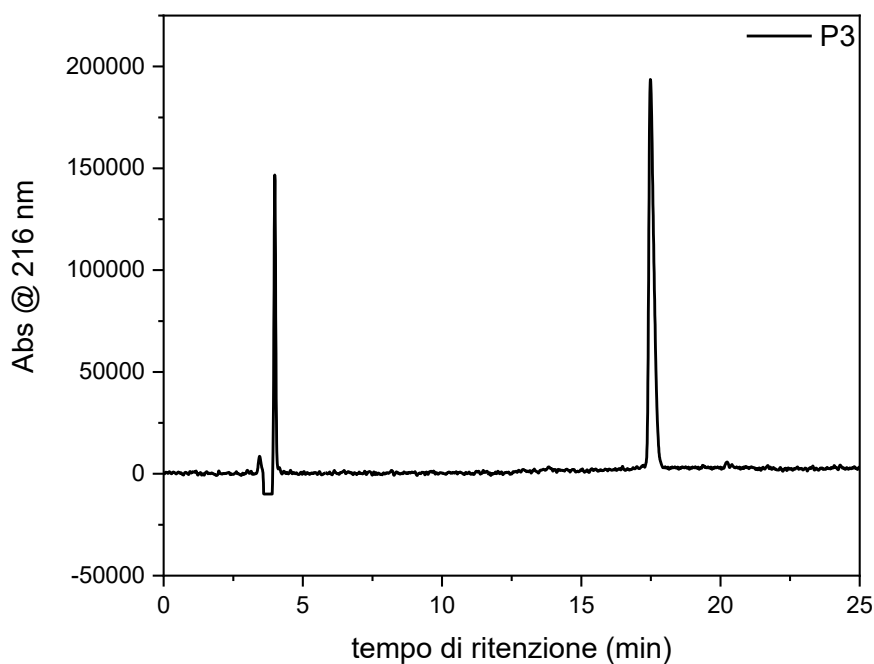
### 3.1.6 Sintesi del frammento 10-28 dell'orexina B (P3)



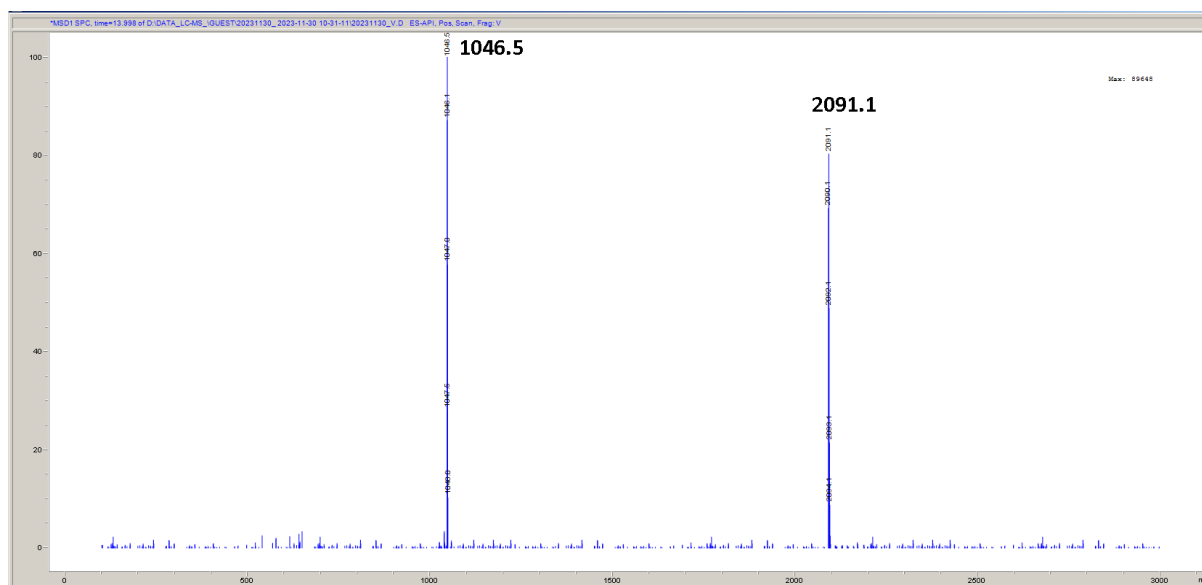
***Ac-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Ala-Ser-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-Thr-Met-NH<sub>2</sub>***

Il frammento 10-28 dell'orexina B, corrispondente alla porzione attiva del neuropeptide, è stato sintetizzato secondo le procedure descritte in precedenza. Nella prima sintesi sono stati utilizzati come attivatori HBTU e HOBt, eseguendo solo coupling singoli, e la deprotezione del gruppo protettore Fmoc è stata condotta con piperidina in DMF. Questa sintesi ha portato alla formazione del peptide desiderato ma con una resa non soddisfacente. La sintesi è stata quindi ripetuta controllando spettroscopicamente che il residuo di His<sup>21</sup> vada a legarsi completamente al residuo di Ala<sup>22</sup> e avviene dopo quattro coupling. Inoltre, sono stati introdotti dei doppi coupling a livello dei residui di arginina e leucina evidenziati in verde (Ac-RLQRLQASGNHAAGILTM-NH<sub>2</sub>). A partire dal residuo dei Asn, è stato utilizzato HATU come attivatore e rimuovendo il gruppo Fmoc con una soluzione 5% p/v di piperazina in presenza del 2% v/v DBU in DMF. Pur utilizzando questa procedura anche in questo caso la resa non è risultata soddisfacente e si è, quindi, provveduto ad una terza sintesi utilizzando esclusivamente HATU come attivatore, e il gruppo Fmoc è rimosso con piperidina. I coupling multipli sono stati mantenuti come nel caso precedente. Lo sblocco in piccolo del peptide, avvenuto dopo la condensazione della Ser<sup>17</sup>, ha portato alla luce un'incompleta condensazione dell'Asn<sup>20</sup>. La sintesi è stata quindi sospesa sintetizzando ex-novo il peptide, con la stessa metodologia della sintesi precedente se non per il doppio coupling sul residuo di Asn<sup>20</sup>, ottenendo il peptide desiderato con una resa soddisfacente. La caratterizzazione è avvenuta tramite HPLC analitica (**figura 18**) e LC-ESI-MS (**figura 19**) ed il prodotto grezzo è purificato tramite RP-HPLC, utilizzando una miscela binaria di eluenti costituiti da 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O (eluente A) e 0.05% TFA in 9:1 MeCN:H<sub>2</sub>O v/v (eluente B).



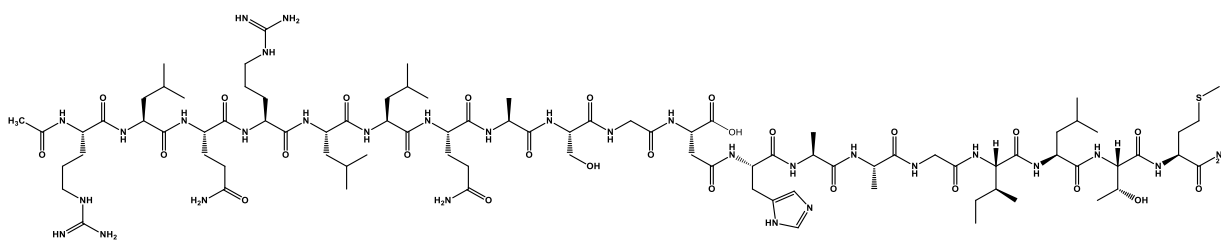


**Figura 18:** Cromatogramma HPLC analitico del peptide **P3**. L'eluizione avviene utilizzando una colonna Phenomenex Jupiter 5 $\mu$  C18 300 $\text{\AA}$  250 x 4.6 mm, flusso 1 mL/min con detector impostato a 216 nm. Eluizione isocratica al 27% B per 5 minuti e quindi gradiente lineare dal 27-40% B in 15 minuti. Eluente A: 0.05 % TFA in H<sub>2</sub>O, Eluente B: 0.05 % TFA in H<sub>2</sub>O/MeCN 1/9 v/v.



**Figura 19:** spettro di massa ESI(+)-MS del peptide **P3**. Massa calcolata per C<sub>89</sub>H<sub>155</sub>N<sub>31</sub>O<sub>25</sub>S = 2090,1 Da. Massa determinata [M+H]<sup>+</sup> = 2091.1 m/z, [M+2H]<sup>2+</sup> = 1046.5

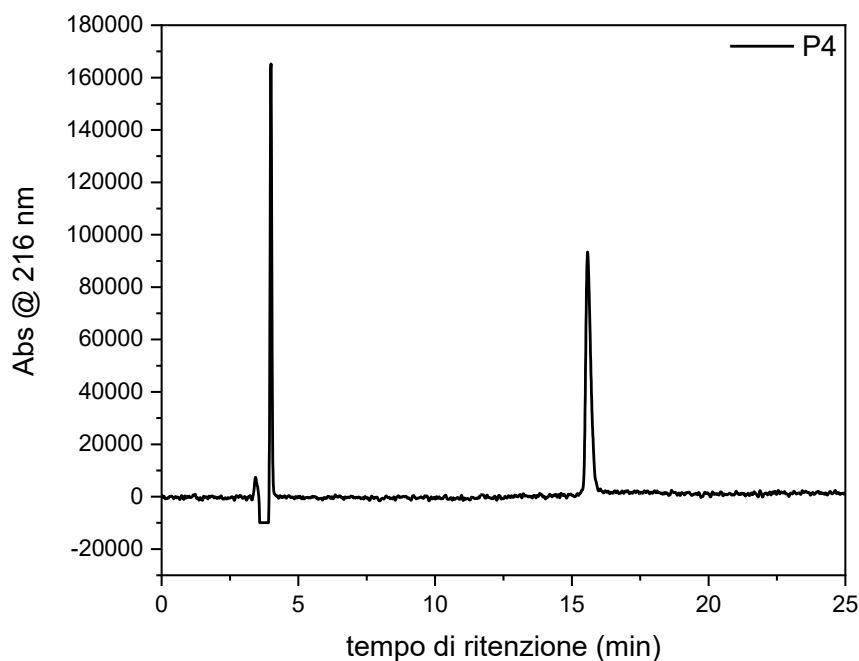
### 3.1.7 Sintesi del frammento 10-isoAsp20-28 dell'orexina B (P4)



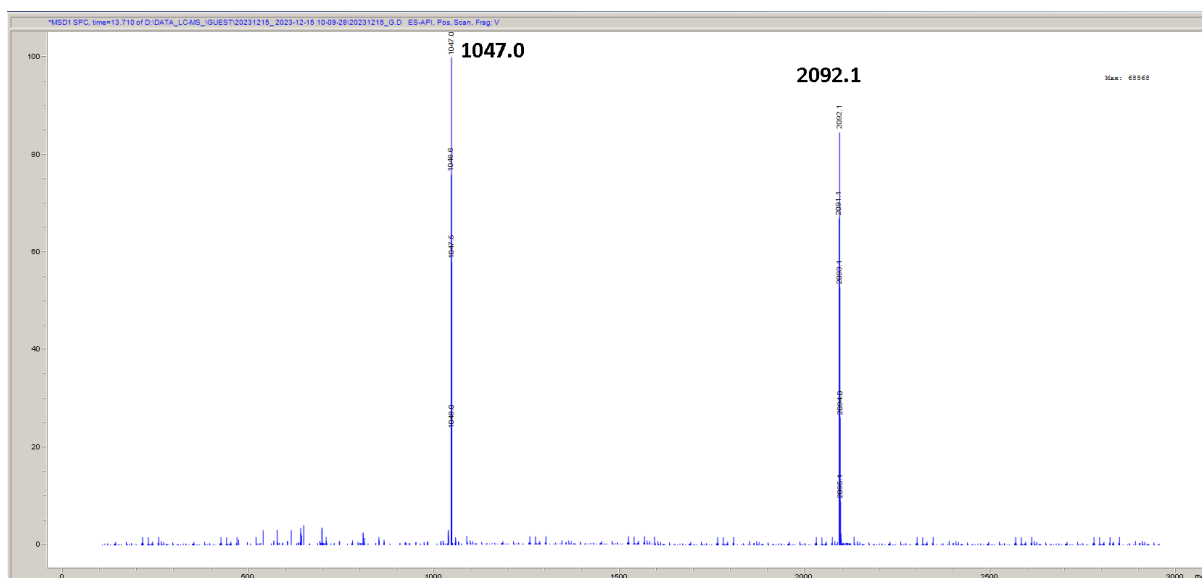
**Ac-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Ala-Ser-Gly-isoAsp-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-Thr-Met-NH<sub>2</sub>**

Il frammento 10-28 dell'orexina B, contenente il residuo di isoAsp in posizione 20, è sintetizzato utilizzando come attivatori HBTU e HOBt ed eseguendo solo coupling singoli. In queste condizioni si ha una resa non soddisfacente. La sintesi è stata quindi condotta utilizzando le condizioni riportate per l'analogo contenente il residuo di Asn<sup>20</sup> (4° sintesi), omettendo il doppio coupling del residuo di isoAsp (Ac-RLQRLQASGisoDHAAGILTM-NH<sub>2</sub>) in verde sono indicati i residui su cui si effettuano i doppi coupling ed in azzurro il residuo di His su cui è stato condotto un coupling quadruplo).

La caratterizzazione è avvenuta tramite HPLC analitica (**figura 20**) e LC-ESI-MS (**figura 21**) ed il prodotto grezzo è purificato tramite RP-HPLC, utilizzando una miscela binaria di eluenti descritti per il peptide P3.

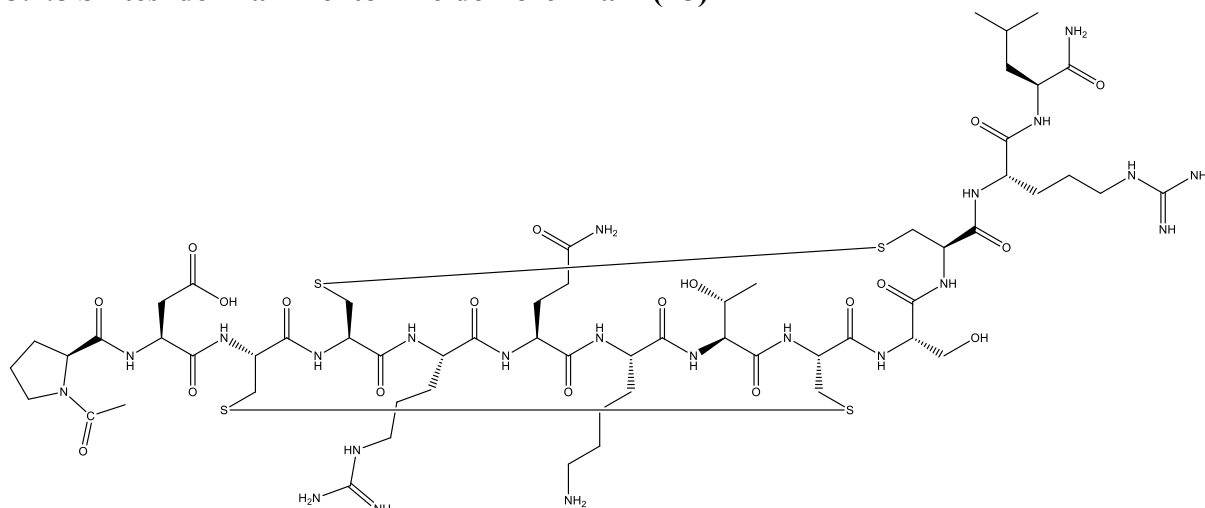


**Figura 20:** cromatogramma HPLC analitico del peptide **P4**. L'eluizione avviene utilizzando una colonna Phenomenex Jupiter 5 $\mu$  C18 300 $\text{\AA}$  250 x 4.6 mm, flusso 1 mL/min con rilevazione a 216 nm. Eluizione isocratica al 25% B per 5 minuti e quindi gradiente lineare dal 25-40% B in 15 minuti. Eluente A: 0.05 % TFA in H<sub>2</sub>O, Eluente B: 0.05 % TFA in H<sub>2</sub>O/MeCN 1/9 v/v.



**Figura 21:** spettro di massa ESI(+)-MS del peptide **P4**. Massa calcolata per C<sub>89</sub>H<sub>154</sub>N<sub>30</sub>O<sub>26</sub>S = 2091,1 Da. Massa determinata  $[M+H]^+ = 2092.1$  m/z,  $[M+2H]^{2+} = 1047.0$ .

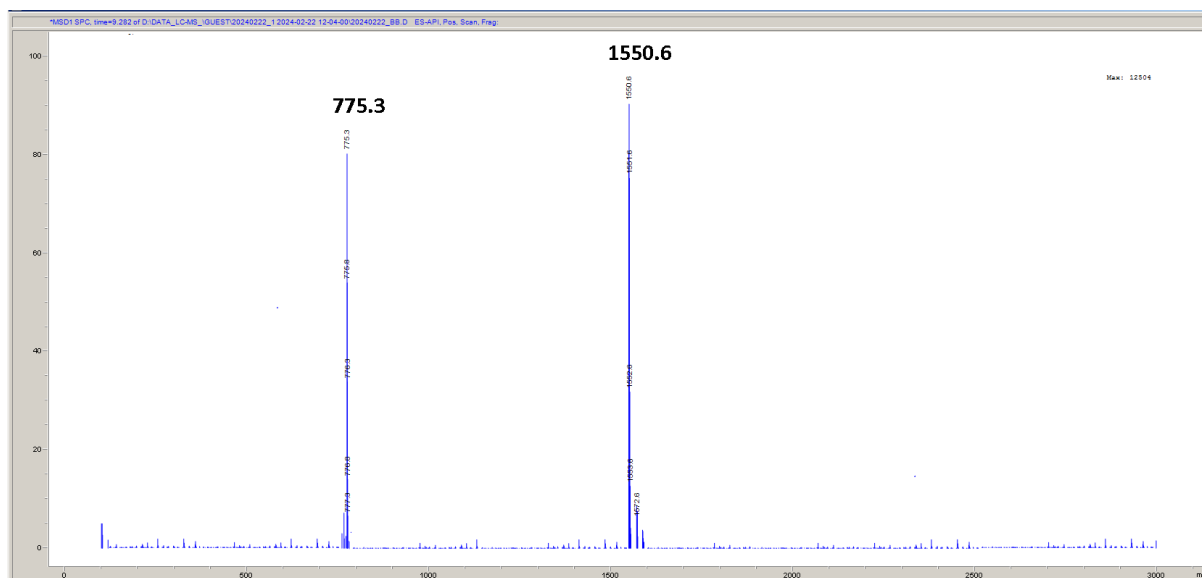
### 3.1.8 Sintesi del frammento 4-16 dell'orexina A (P5)



*Ac-Pro-Asp-Cys-Cys-Arg-Gln-Lys-Thr-Cys-Ser-Cys-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>*

Il frammento 4-16 dell'orexina A è stato sintetizzato utilizzando HATU come reattivo di coupling e piperidina per la rimozione del gruppo Fmoc. L'introduzione di residui amminoacidici riportati in verde nella sequenza (Ac-PDCCRQKTCSCRL-NH<sub>2</sub>) è avvenuta tramite doppi coupling. Il peptide orexina A è caratterizzato dalla presenza di due ponti disolfuro, rispettivamente tra i residui Cys<sup>6</sup>-Cys<sup>12</sup> e Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>14</sup>. L'utilizzo di gruppi protettori diversi al gruppo tiolico dei residui di Cys, permette la formazione selettiva di ponti disolfuro desiderati. In questo lavoro i residui Cys<sup>6</sup> e Cys<sup>12</sup> sono protetti con il gruppo Ac, mentre il gruppo Trt è utilizzato per i residui Cys<sup>7</sup> e Cys<sup>14</sup>, labile nelle condizioni di cleavage del peptide dalla resina. La formazione dei ponti disolfuro avviene sul peptide ancorato alla resina tramite trattamento con una soluzione di I<sub>2</sub> (15 equivalenti) in MeOH/CHCl<sub>2</sub> 1:1 v/v. La reazione è condotta a temperatura ambiente, sotto agitazione per 4 ore, secondo la procedura descritta da Söll et al.[50]. I due gruppi protettori utilizzati sono caratterizzati dal possedere un tempo di emivita, quando legati allo zolfo, molto diverso tra loro in presenza di I<sub>2</sub> [51], permettendo la formazione selettiva dei ponti S-S desiderati. Al termine della reazione la resina è lavata con MeOH/CHCl<sub>2</sub> e DMF, ed il peptide è rimosso dalla resina contemporaneamente al distacco dei gruppi protettori per trattamento con TFA 95%.

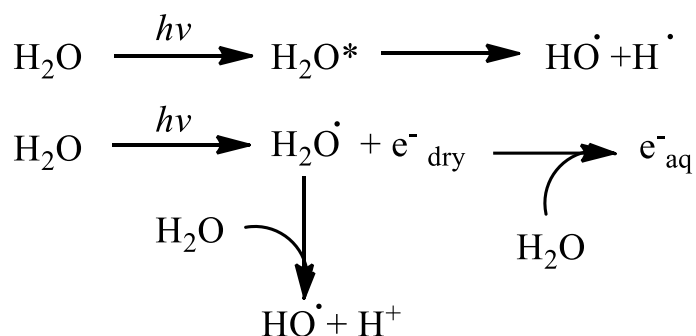
La caratterizzazione del peptide grezzo è avvenuta tramite LC-ESI-MS (**figura 22**).



**Figura 22:** spettro di massa ESI(+)-MS per il peptide **P5**. Massa calcolata per  $C_{59}H_{100}N_{22}O_{19}S_4 = 1548,6$  Da. Massa determinata  $[M+H]^+ = 1550.6$ ;  $[M+2H]^{2+} = 775.3$ .

### 3.4 Studio degli effetti dello stress ossidativo.

In precedenza, è stato dimostrato che l'irradiazione di soluzioni acquose con una lampada UV che emette a 254 nm, analogamente all'utilizzo della radiazione di sincrotrone, porta alla generazione di specie radicaliche che causano la denaturazione delle proteine e/o peptidi presenti in soluzione (**schema 12**). [10]



*Schema 12: formazione di specie radicaliche dell'ossigeno per irraggiamento UV.*

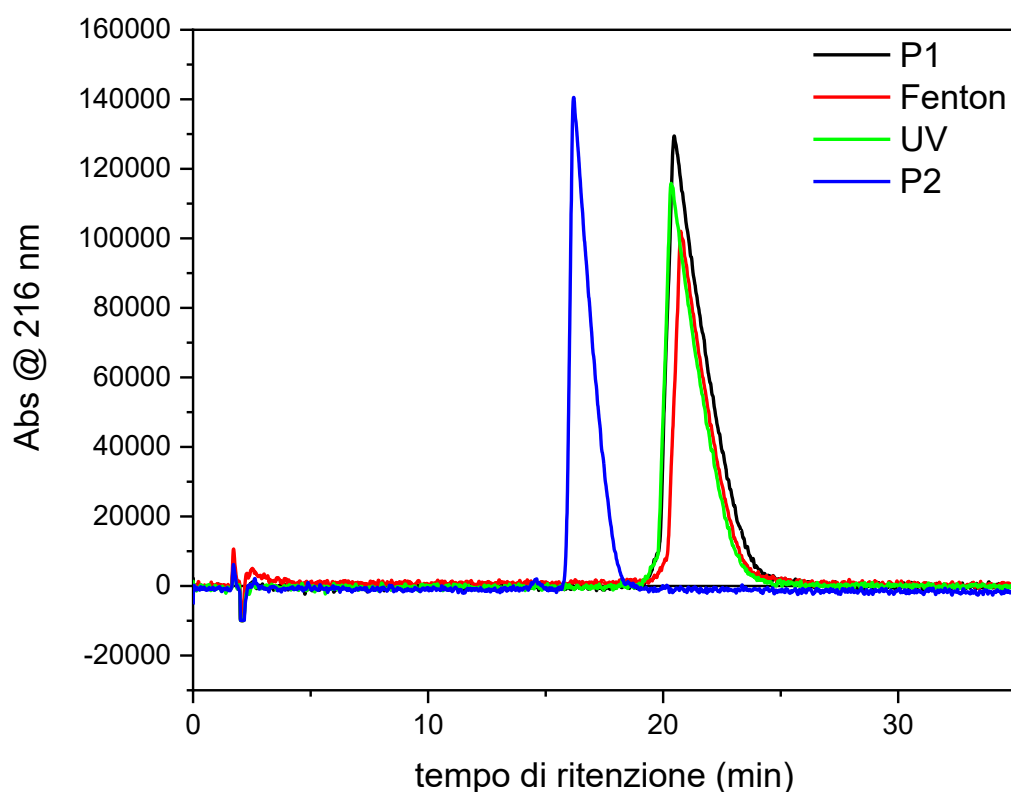
Analogamente, la reazione di Fenton causa la formazione di specie radicaliche secondo la reazione descritta:



Mentre lo studio tramite irradiazione con luce UV-C può essere condotta in tampone fosfato a pH = 7.4, la reazione di Fenton, a causa della presenza degli ioni  $\text{Fe}^{2+}$ , è condotta in soluzione acquosa.

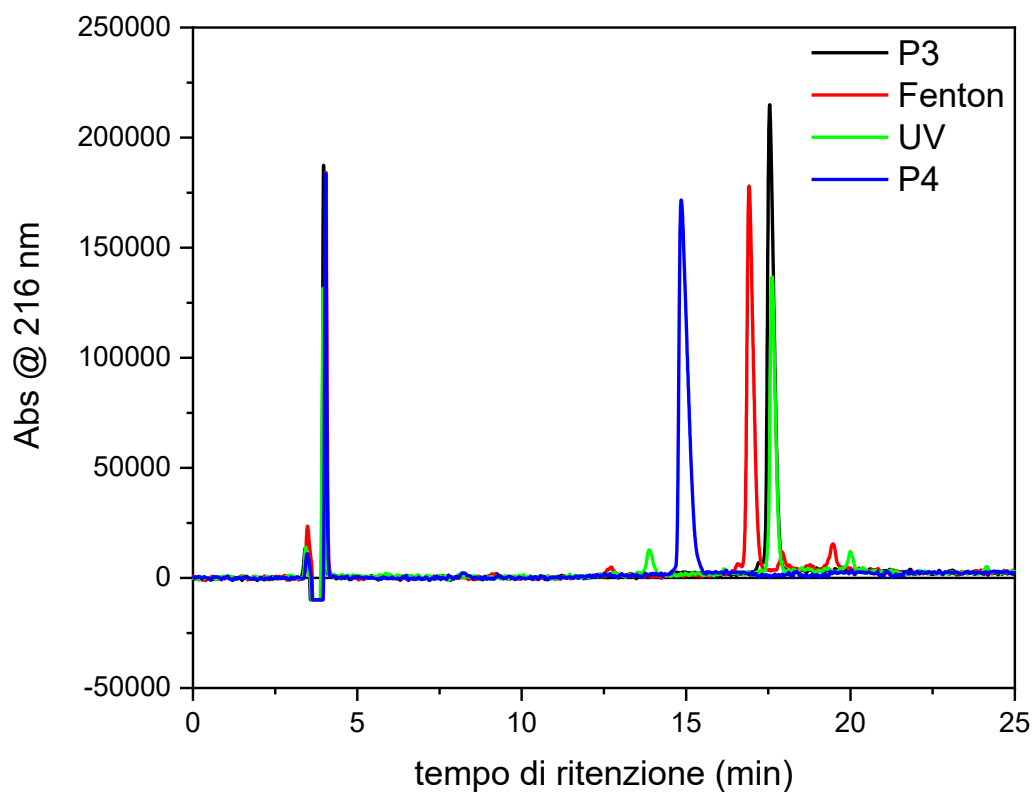
L'analisi dell'effetto delle specie radicaliche dell'ossigeno sui peptidi **P1** e **P3**, contenenti il residuo di Asn in posizione 20, è stata inizialmente condotta mediante HPLC analitico. Entrambi i peptidi sono stati sottoposti all'azione delle specie radicaliche dell'ossigeno ottenuti per fotolisi dell'acqua in seguito all'irraggiamento con radiazioni UV-C o tramite la reazione di Fenton.

I risultati ottenuti sono riportati in **figura 23** e **24** rispettivamente per il peptide **P1** e **P3**, in cui oltre al cromatogramma del peptide prima del trattamento è riportato il cromatogramma del peptide sottoposto ad irradiazione con luce UV o alla reazione di Fenton e il cromatogramma dell'analogo peptidico contenente il residuo di acido isoaspartico (peptidi **P2** e **P4**).



**Figura 23:** HPLC analitico del peptide **P1** (nero), in seguito ad esposizione a radicali ottenuti tramite reazione di Fenton (rosso), esposizione alla luce UV-C per 30 minuti (verde) e del peptide **P2** (blu). L'eluizione avviene utilizzando una colonna Phenomenex Kinetex 5 $\mu$  XB-C18 100 $\text{\AA}$  150 x 4.6 mm, flusso 1 mL/min con rilevazione a 216 nm. Eluizione isocratica al 5% B per 5 minuti e quindi gradiente lineare dal 5% al 15% di B in 30 minuti. Eluente A: 0.05 % TFA in H<sub>2</sub>O, Eluente B: 0.05 % TFA + H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1 v/v.

Dai cromatogrammi si evince che, in seguito ai trattamenti a cui sono sottoposti i due peptidi, non si verifica la deamidazione dell'asparagina con formazione dell'analogo con acido isoaspartico. Per il peptide **P1** si osserva una leggera variazione nel tempo di ritenzione in seguito alla reazione di Fenton, mentre non varia il tempo di ritenzione del peptide **P1** in seguito ad irraggiamento con luce UV-C.



**Figura 24:** HPLC analitico del peptide **P3** (nero), in seguito ad esposizione a radicali ottenuti tramite reazione di Fenton (rosso), esposizione alla luce UV-C per 30 minuti (verde) e del peptide **P4** (blu). L'eluizione avviene utilizzando una colonna Phenomenex Jupiter 5 $\mu$  C18 300Å 250 x 4.6 mm, flusso 1 mL/min con rilevazione a 216 nm. Eluizione isocratica al 27% B per 5 minuti e quindi gradiente lineare dal 27 al 40% di B in 15 minuti. Eluente A: 0.05 % TFA in H<sub>2</sub>O, Eluente B: 0.05 % TFA + H<sub>2</sub>O/MeCN 1/9 v/v.

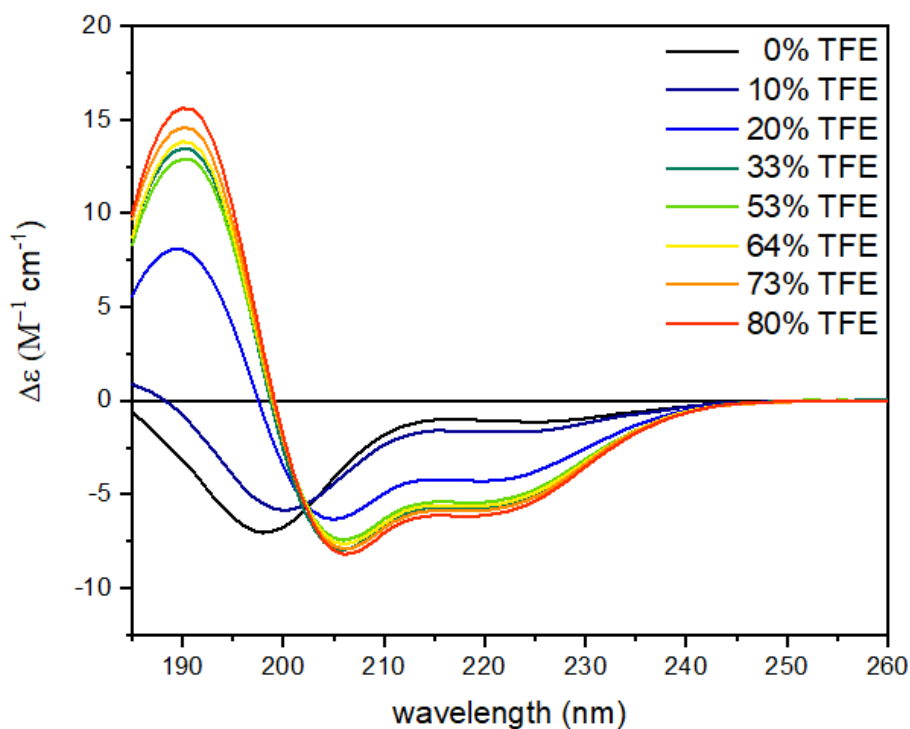
Nel caso del peptide **P3** si osserva una variazione nel tempo di eluizione del peptide sottoposto alla reazione di Fenton, mentre nel campione esposto alla luce UV-C non si osserva alcuna variazione del tempo di ritenzione.



Successivamente sono stati condotti studi di dicroismo circolare al fine di valutare gli effetti dello stress ossidativo sulle strutture secondarie dei peptidi **P3** e **P4**.

Le orexine espletano la loro azione attraverso l'interazione con recettori di membrana, per questo motivo gli studi sono stati condotti in un ambiente membranoso mimetico utilizzando quale solventi una miscela TFE/H<sub>2</sub>O. Il TFE è un solvente riconosciuto come membranoso mimetico. Inoltre, possiede la capacità di indurre conformazioni ordinate, principalmente in  $\alpha$ -elica a causa della sua minor polarità e competizione per le formazioni di legami idrogeno rispetto all'acqua. [52]

In soluzione acquosa in assenza di TFE, il peptide **P3** assume essenzialmente una struttura unordered caratterizzata da una banda negativa a circa 200 nm e da un plateau negativo nella regione da 215 a 230 nm. All'aumentare della % di TFE la banda negativa si sposta a lunghezze d'onda maggiori ed in presenza del 20% di TFE lo spettro dicroico è caratterizzato dalla presenza predominante della struttura ad  $\alpha$ -elica, la percentuale determinata è circa del 50% con due metodi di calcolo di struttura secondaria SSE (SELCON3 e CONTIN/LL, descritti in appendice). Aumentando ancora la percentuale di TFE si ha un ulteriore incremento del contenuto in  $\alpha$ -elica sino a circa il 70% (**figura 25, tabella 1**).

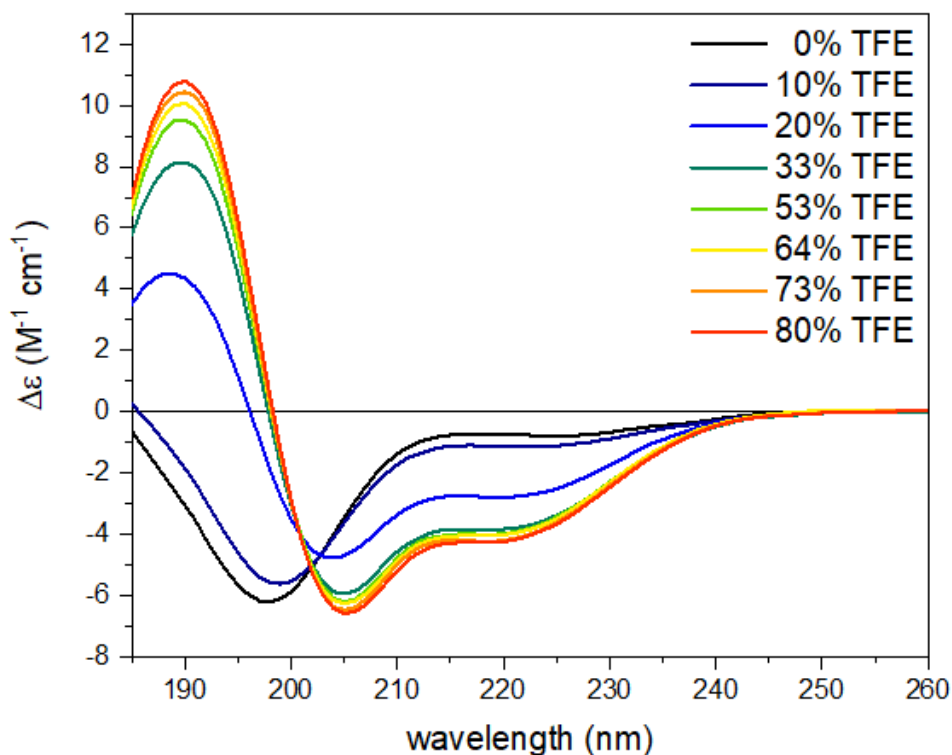


**Figura 25:** spettri CD del peptide **P3** 0.1 mg/mL a diverse percentuali di TFE in H<sub>2</sub>O (indicate in legenda). Spettri registrati in cella di quarzo da 0.1 cm di cammino ottico, velocità di scansione 50 nm/min, tempo di integrazione 1 sec, banda passante 2 nm.

% TFE	% $\alpha$ -elica		% $\beta$ -sheets		% Turns		% Unordered	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
<b>0</b>	15	10	15	20	25	30	45	40
<b>10</b>	20	20	15	15	25	25	40	40
<b>20</b>	50	45	5	10	20	20	30	25
<b>33</b>	60	60	5	5	15	10	25	25
<b>53</b>	60	65	10	0	15	15	25	20
<b>64</b>	60	60	5	5	15	10	25	25
<b>73</b>	65	60	5	5	10	10	25	25
<b>80</b>	65	65	5	5	10	10	20	25

**Tabella 1:** percentuali di struttura secondaria determinata con i metodi SELCON 3 (A) e CONTIN/LL (B).

Analogamente al peptide **P3**, anche il peptide **P4** in soluzione acquosa presenta una struttura disordinata con uno spettro dicroico sovrapponibile a quello del peptide **P3**. All'aumentare delle percentuali di TFE, il peptide **P4** assume una struttura in  $\alpha$ -elica (**figura 26, tabella 2**). L'analisi del contenuto di struttura secondaria evidenzia come in presenza del residuo di acido isoaspartico in posizione 20, il peptide **P4** raggiunga una percentuale di  $\alpha$ -elica del 50% ad elevate percentuali di TFE (80%), nettamente inferiori a quello determinato per il peptide **P3** contenenti il residuo di Asn in posizione 20, questo a causa dell'effetto di "rottura" della struttura in  $\alpha$ -elica causato dal proseguo della sequenza peptidica nel carbonile in catena laterale del residuo di acido aspartico.



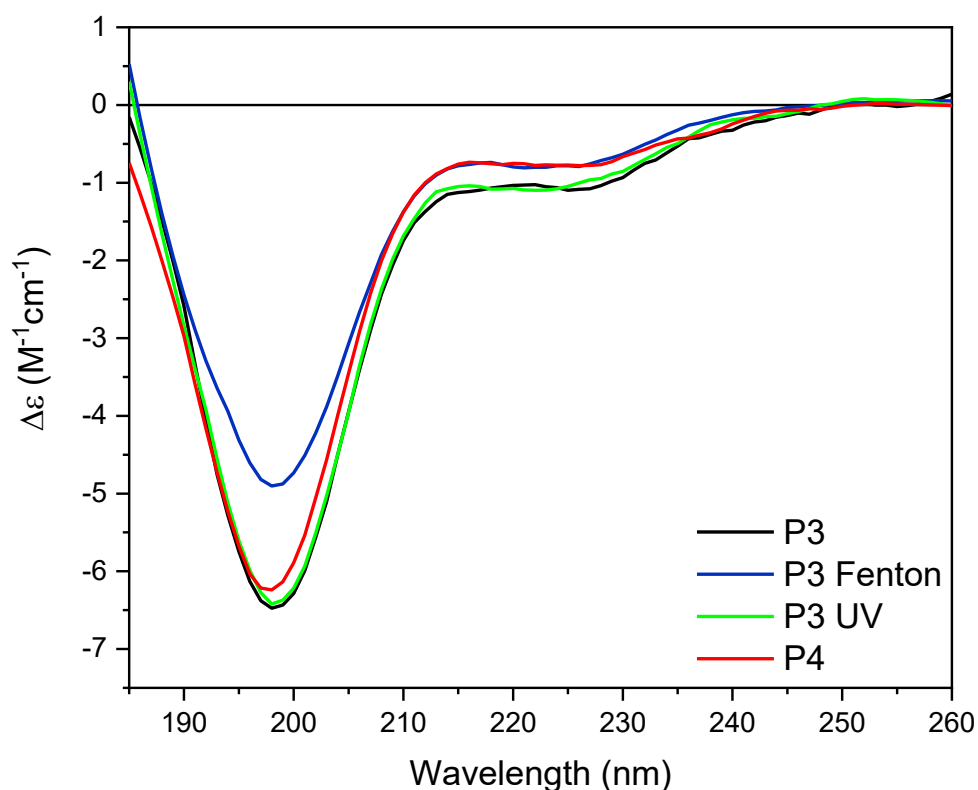
**Figura 26:** spettri CD del peptide **P4** 0.1 mg/mL a diverse percentuali di TFE in H<sub>2</sub>O (indicate in legenda). Spettri registrati in cella di quarzo da 0.1 cm di cammino ottico, velocità di scansione 50 nm/min, tempo di integrazione 1 sec, banda passante 2 nm.

% TFE	% $\alpha$ -elica		% $\beta$ -sheets		% Turns		% Unordered	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
<b>0</b>	10	10	20	20	25	25	45	45
<b>10</b>	15	10	20	25	25	25	45	40
<b>20</b>	35	35	10	10	20	20	35	35
<b>33</b>	45	50	5	20	20	25	30	5%
<b>53</b>	45	50	5	15	20	10	30	30
<b>64</b>	45	50	10	10	20	15	30	30
<b>73</b>	50	50	5	10	15	15	30	25
<b>80</b>	50	50	10	10	15	15	25	25

**Tabella 2:** percentuali di struttura secondaria determinata con i metodi SELCON 3 (A) e CONTIN/LL (B).

Il peptide **P3** è stato quindi sottoposto all'azione dei radicali dell'ossigeno sia tramite esposizione alla luce UV-C (254 nm) sia tramite reazione di Fenton in soluzione acquosa.

Il peptide **P3** assume una struttura disordinata come indicato precedentemente, e l'esposizione all'azione dei radicali causa unicamente una diminuzione del segnale dicroico a circa 200 nm in seguito a trattamento con il reattivo di Fenton, mentre lo spettro registrato dopo l'esposizione alla radiazione UV-C risulta sovrapponibile a quello iniziale del peptide non trattato. L'analisi della struttura secondaria in questo caso non fornisce un valido aiuto nel determinare variazioni sulla struttura stessa (**figura 27 e tabella 3**).

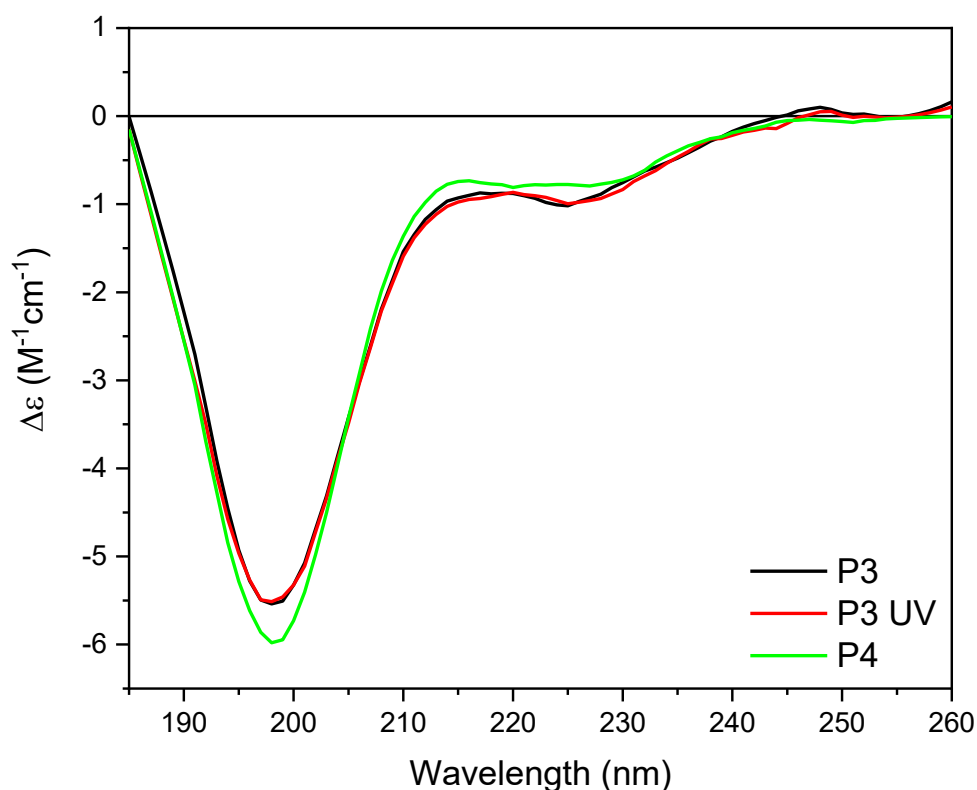


**Figura 27:** spettri CD del peptide **P3** (Asn) 0.1 mg/ml in H<sub>2</sub>O (nero), sottoposto a reazione di Fenton (blu), esposto alla luce UV-C (verde) e de peptide **P4** (rosso). Spettri registrati in cella di quarzo da 0.1 cm di cammino ottico, velocità di scansione 50 nm/min, tempo di integrazione 1 sec, banda passante 2 nm.

<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>% <math>\alpha</math>-elica</b>		<b>% <math>\beta</math>-sheets</b>		<b>% Turns</b>		<b>% Unordered</b>	
	<b>(A)</b>	<b>(B)</b>	<b>(A)</b>	<b>(B)</b>	<b>(A)</b>	<b>(B)</b>	<b>(A)</b>	<b>(B)</b>
<b>Asn</b>	15	10%	20	15	25	25	45	50
<b>Fenton</b>	15	10	20	25	20	25	40	45
<b>UV</b>	15	10	20	20	25	25	45	45
<b>isoAsp</b>	10	10	20	20	25	25	45	45

**Tabella 3:** percentuali di struttura secondaria determinata con i metodi SELCON 3 (A) e CONTIN/LL (B).

Risultati analoghi si ottengono quando gli esperimenti sono condotti in tampone fosfato. In queste condizioni non è possibile utilizzare la reazione di Fenton e la produzione di ROS è quindi ad opera della sola esposizione alla luce UV-C (**figura 28, tabella 4**).

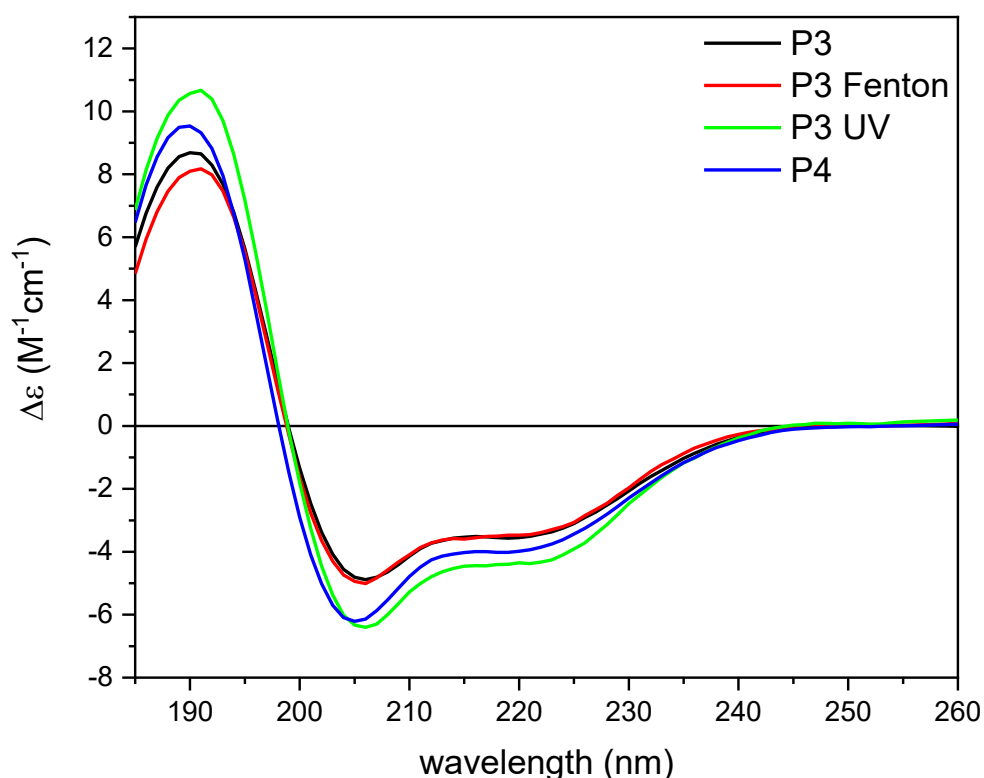


**Figura 28:** spettri CD del peptide **P3** 0.1 mg/mL in TFE 50% in H<sub>2</sub>O (nero esposto alla luce UV-C (ROSSO) e in confronto con il peptide **P4** (isoAsp, VERDE). Spettri registrati in cella di quarzo da 0.1 cm di cammino ottico, velocità di scansione 50 nm/min, tempo di integrazione 1 sec, banda passante 2 nm.

H <sub>2</sub> O	% $\alpha$ -elica		% $\beta$ -sheets		% Turns		% Unordered	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
Asn	10	10	15	20	25	25	45	45
UV	10	10	20	20	25	25	45	45
isoAsp	10	10	15	20	25	25	45	45

**Tabella 4:** Percentuali di struttura secondaria determinata con i metodi SELCON 3 (A) e CONTIN/LL (B).

Successivamente gli studi sono stati condotti in presenza di TFE (54% v/v) sia in soluzione acquosa che in presenza di tampone fosfato. In presenza di H<sub>2</sub>O/TFE (**figura 29, tabella 5**) si osserva una diminuzione sostanziale del contenuto di  $\alpha$ -elica del peptide **P3** in seguito alla reazione di Fenton. La percentuale di  $\alpha$ -elica diminuisce dal 60 al 40%, mentre per il peptide esposto alla radiazione UV-C il contenuto in  $\alpha$ -elica diminuisce solamente del 5%.

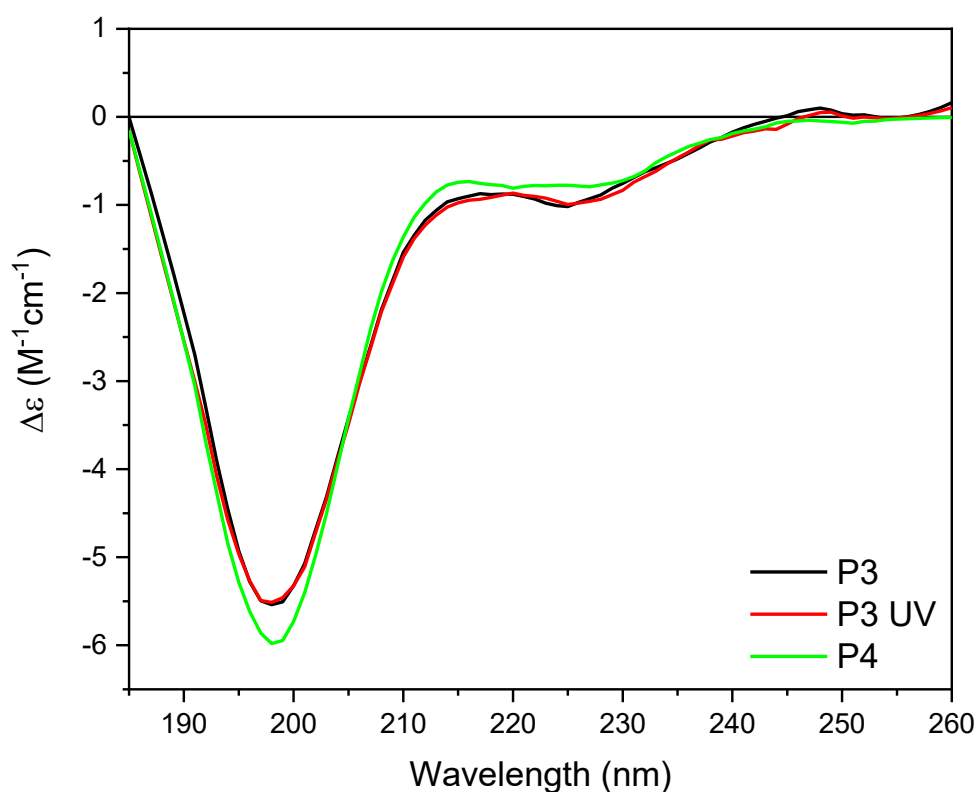


**Figura 29:** spettri CD del peptide **P3** 0.1 mg/mL in TFE 50% in H<sub>2</sub>O (nero), sottoposto a reazione di Fenton (blu), esposto alla luce UV-C (verde) e in confronto con il peptide **P4** (isoAsp, rosso). Spettri registrati in cella di quarzo da 0.1 cm di cammino ottico, velocità di scansione 50 nm/min, tempo di integrazione 1 sec, banda passante 2 nm.

53% TFE in H <sub>2</sub> O	% $\alpha$ -elica		% $\beta$ -sheets		% Turns		% Unordered	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
<b>Asn</b>	60	65	10	0	15	15	25	20
<b>Fenton</b>	40	45	15	10	15	15	25	30
<b>UV</b>	55	55	5	5	15	15	25	25
<b>isoAsp</b>	45	50	5	15	20	10	30	30

**Tabella 5:** percentuali di struttura secondaria determinata con i metodi SELCON 3 (A) e CONTIN/LL (B).

Mentre l'esposizione alla radiazione UV-C in tampone fosfato non evidenzia differenze significative (**figura 30, tabella 6**).

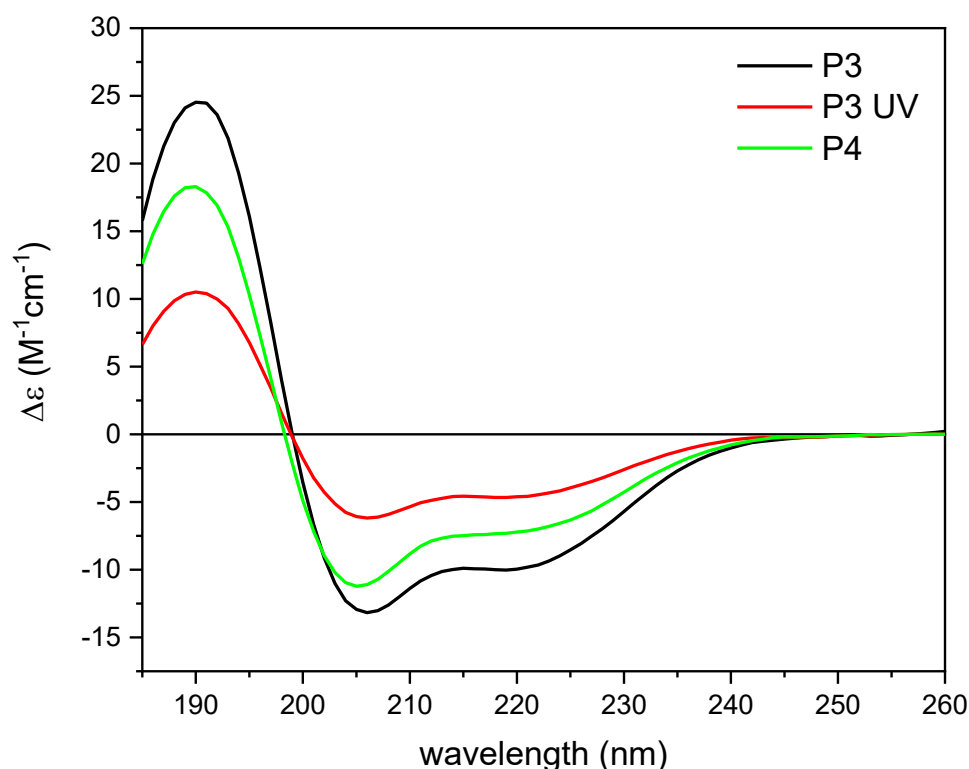


**Figura 30:** spettri CD del peptide **P3** 0.1 mg/mL in TFE 53% in H<sub>2</sub>O (nero), esposto alla luce UV-C (ROSSO) e del peptide **P4** (isoAsp, VERDE). Spettri registrati in cella di quarzo da 0.1 cm di cammino ottico, velocità di scansione 50 nm/min, tempo di integrazione 1 sec, banda passante 2 nm.

H <sub>2</sub> O	% $\alpha$ -elica		% $\beta$ -sheets		% Turns		% Unordered	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
Asn	10	10	15	20	25	25	45	45
UV	10	10	20	20	25	25	45	45
isoAsp	10	10	15	20	25	25	45	45

**Tabella 6:** percentuali di struttura secondaria determinata con i metodi SELCON 3 (A) e CONTIN/LL (B).

Come ultima prova si è determinato come la struttura secondaria del peptide **P3** in presenza di TFE (53% v/v) e tampone fosfato è influenzata dall'esposizione alla radiazione UV-C (**figura 31, tabella 7**). I risultati mostrano anzitutto che in presenza di tampone fosfato e TFE si abbia un aumento della percentuale di struttura secondaria in  $\alpha$ -elica e l'esposizione alla luce UV-C causa una drastica diminuzione del contenuto in  $\alpha$ -elica.



**Figura 31:** spettri CD del peptide P3 0.1 mg/mL in TFE 53% in tampone fosfato (nero), esposto alla luce UV-C (ROSSO) e del peptide P4 (VERDE). Spettri registrati in cella di quarzo da 0.1 cm di cammino ottico, velocità di scansione 50 nm/min, tempo di integrazione 1 sec, banda passante 2 nm.



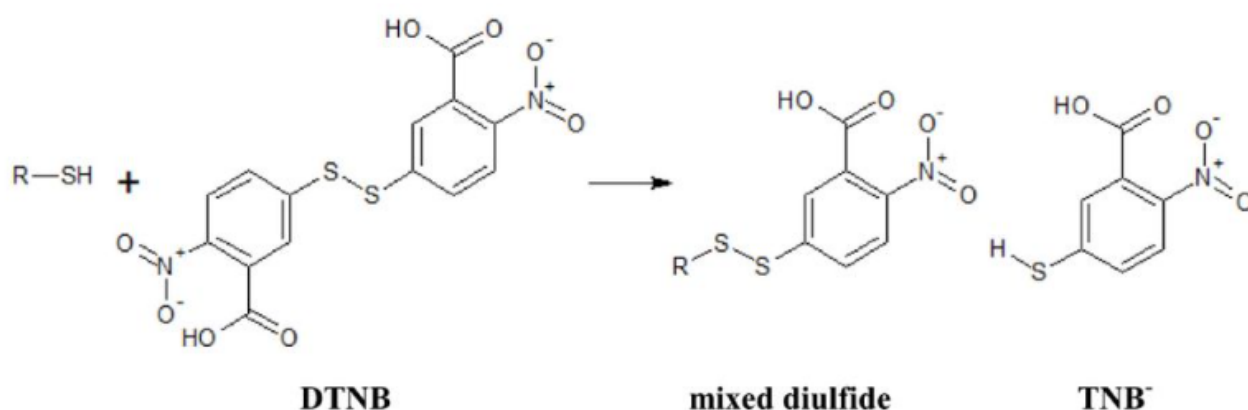
53% TFE in H <sub>2</sub> O	% $\alpha$ -elica		% $\beta$ -sheets		% Turns		% Unordered	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
Asn	95	85	0	5	5	0	20	45
UV	50	50	10	10	15	15	25	45
isoAsp	65	70	0	5	5	5	30	45

**Tabella 7:** percentuali di struttura secondaria determinata con i metodi SELCON 3 (A) e CONTIN/LL (B).

Questi dati ottenuti negli ultimi giorni suggeriscono che la presenza del tampone fosfato possa influire sulla produzione di ROS per irraggiamento e nelle loro azioni sulla struttura secondaria aprendo così un nuovo filone di indagini.

Per ultimo si è valutato l'azione dei ROS prodotti tramite reazione di Fenton sulla stabilità dei ponti disolfuro del frammento 4-16 (peptide **P5**) dell'orexina A. In questo caso gli esperimenti preliminari sono stati condotti utilizzando il peptide non purificato. Successivamente alla reazione di Fenton il peptide è stato trattato con una soluzione di acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) a pH 8.

Il DTNB (o reattivo di Ellman) (**schema 13**) reagisce con gli eventuali gruppi -SH generati per azione dei ROS liberando il TNB<sup>-</sup> che presenta un caratteristico assorbimento a 412 nm.



**Schema 13** Struttura del reagente di Ellman (DTNB) e prodotti di reazione con il gruppo tiolo.

L'analisi spettrofotometrica rivela un assorbimento della soluzione trattata con DTNB maggiore di 0.03 unità, indicativo della produzione di gruppi -SH liberi per azione dei ROS .

### 3.6 NMR

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è una tecnica analitica, basata sull'interazione tra le proprietà magnetiche degli atomi e un campo magnetico esterno, e i relativi esperimenti in due dimensioni risultano utili per lo studio delle biomolecole. Tra questi troviamo la spettroscopia di correlazione (COSY), la spettroscopia di correlazione totale (TOCSY) e la spettroscopia rotazionale dell'effetto Overhauser (ROESY).

I primi due misurano la connettività scalare spin-spin attraverso il legame, mentre il terzo misura la connettività dipolare spin-spin attraverso lo spazio.

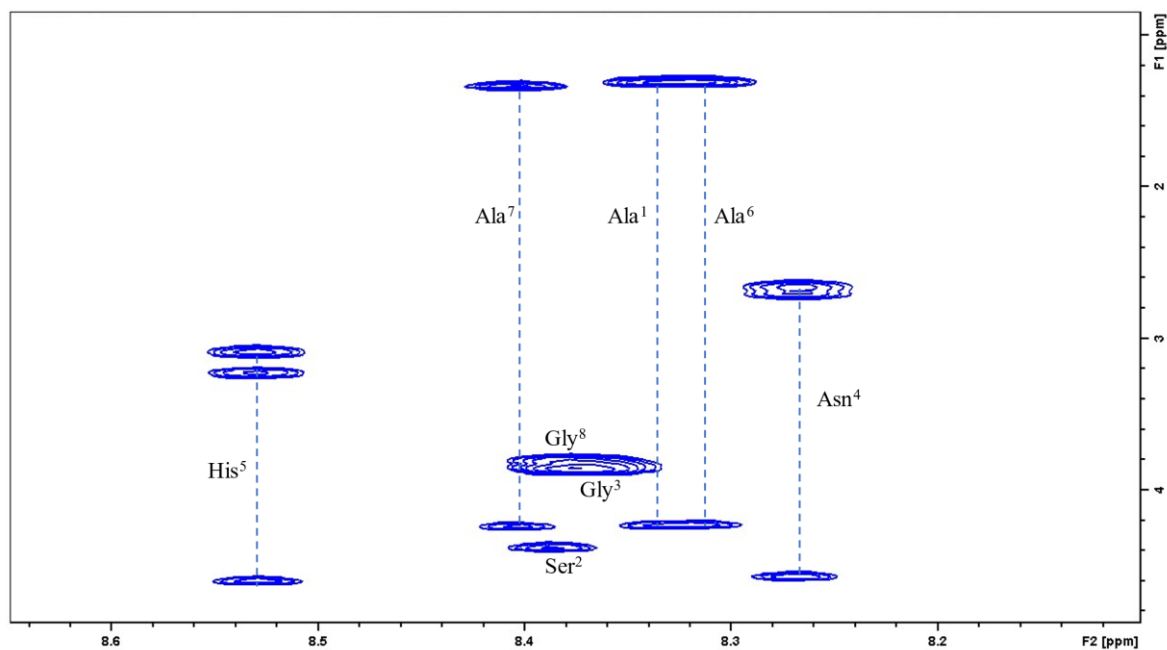
Le connettività di accoppiamento scalare tra singoli spin si manifestano con cross-peaks situati all'intersezione di linee rette parallele agli assi. Un singolo spettro COSY presenta una mappa della rete di accoppiamento scalare completa in una macromolecola e può essere interpretato tenendo conto del fatto che i cross-peaks si osservano solo tra protoni separati da tre o meno legami covalenti. La regione NH-CH $\alpha$  della catena peptidica (tra 5-3 ppm per CH $\alpha$  e tra 7-9 ppm per NH) è di particolare interesse, in quanto rappresenta l'impronta digitale della sequenza peptidica. Questa impronta digitale è particolarmente riconoscibile quando si tratta di spettri TOCSY, in cui un singolo amminoacido costituisce un sistema di spin distinto e ciascuno è separato dall'altro dal gruppo carbonilico. Negli spettri TOCSY non si vedono solo i cross-peaks tra NH e CH $\alpha$ , ma anche i protoni delle catene laterali degli amminoacidi.

Gli esperimenti ROESY si basano sull'effetto Overhauser (NOE), cioè il trasferimento della polarizzazione dello spin nucleare da un nucleo attivo ad un altro se spazialmente vicini.

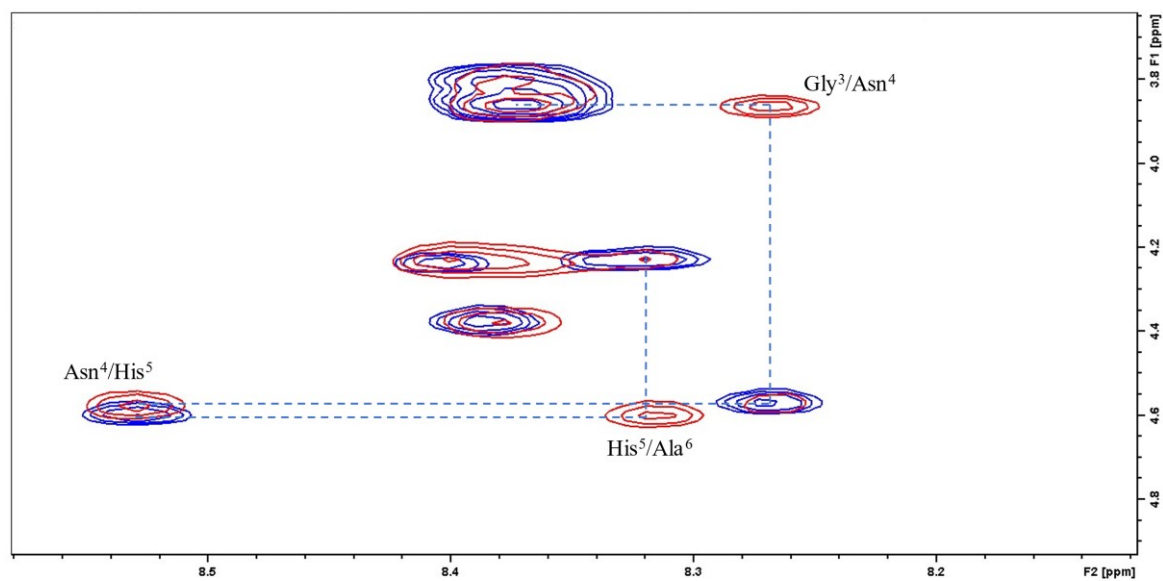
Le risonanze dei singoli residui amminoacidici dei peptidi **P1** e **P2** sono riportati rispettivamente nelle **tabelle 8 e 9**.

TOCSY	NH (ppm)	$\alpha$ H (ppm)	$\beta$ H (ppm)	Others (ppm)
<b>Ac</b>				2.03 CH <sub>3</sub>
<b>Ala<sup>1</sup></b>	8.32	4.29	1.36	
<b>Ser<sup>2</sup></b>	8.38	4.46	3.90	
<b>Gly<sup>3</sup></b>	8.37	3.93		
<b>Asn<sup>4</sup></b>	8.27	4.65	2.72; 2.77	7.57 $\delta$ NH <sub>2</sub> ; 6.92 $\delta$ NH <sub>2</sub>
<b>His<sup>5</sup></b>	8.54	4.67	3.28; 3.15	8.60; 7.29
<b>Ala<sup>6</sup></b>	8.31	4.30	1.36	
<b>Ala<sup>7</sup></b>	8.40	4.31	1.39	
<b>Gly<sup>8</sup></b>	8.37	3.87		
<b>NH<sub>2</sub></b>	7.44; 7.08			

*Tabella 8: assegnazione delle risonanze protoniche dei diversi residui amminoacidici del peptide **P1**.*



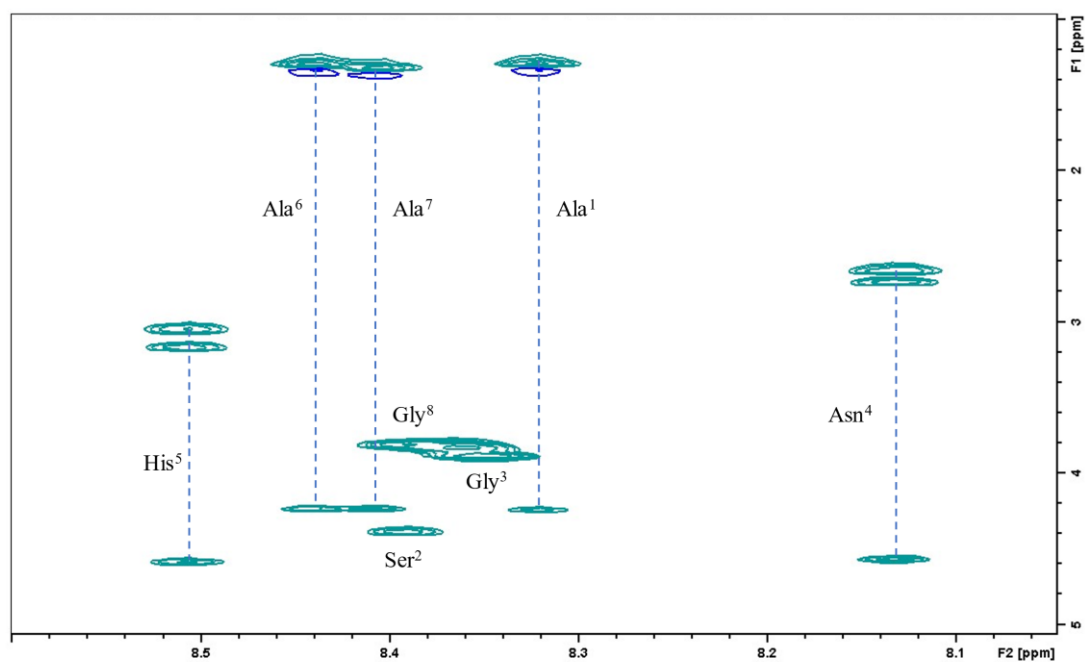
*Figura 32: spettro TOCSY del composto P1: sono evidenziati i sistemi di spin dei singoli residui amminoacidici.*



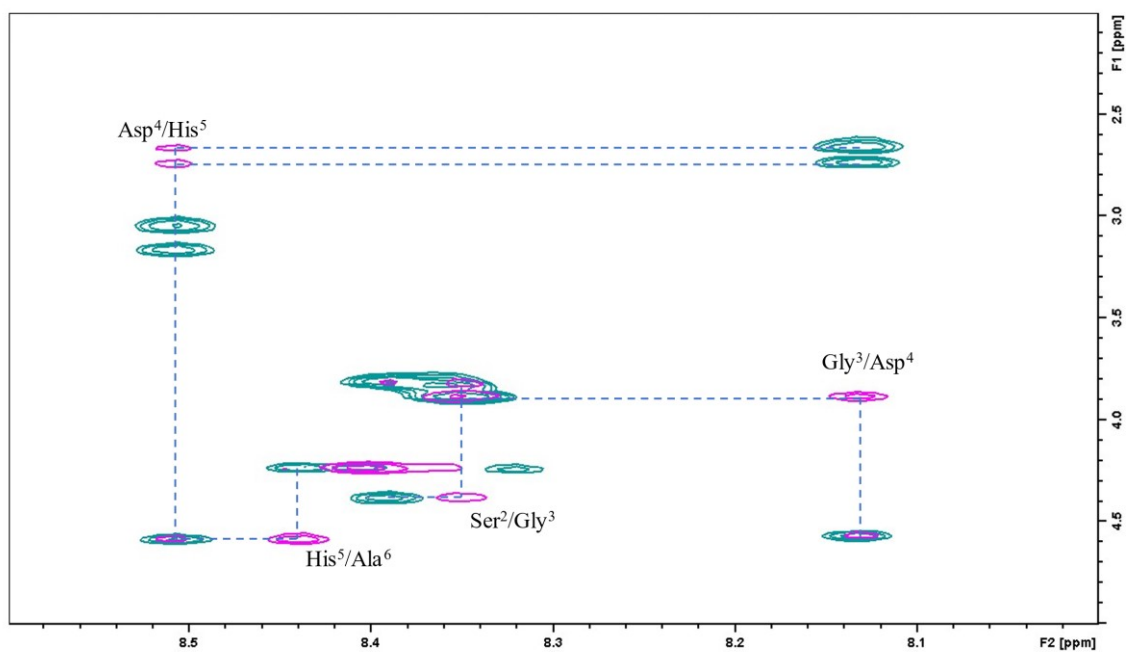
*Figura 33: sovrapposizione degli spettri TOCSY (blu) e ROESY (rosso) del composto P1. Si evidenziano le correlazioni Gly<sup>3</sup>/Asn<sup>4</sup>, Asn<sup>4</sup>/His<sup>5</sup> e His<sup>5</sup>/Ala<sup>6</sup>.*

TOCSY	NH (ppm)	$\alpha$ H (ppm)	$\beta$ H (ppm)	Others (ppm)
Ac				2.03 CH <sub>3</sub>
Ala <sup>1</sup>	8.32	4.30	1.36	
Ser <sup>2</sup>	8.38	4.46	3.87	
Gly <sup>3</sup>	8.34	3.95	-	
isoAsp <sup>4</sup>	8.12	4.63	2.80; 2.72	
His <sup>5</sup>	8.50	4.65	3.23; 3.11	
Ala <sup>6</sup>	8.45	4.30	1.36	
Ala <sup>7</sup>	8.40	4.30	1.38	
Gly <sup>8</sup>	8.35	3.90	-	
NH <sub>2</sub>	7.43	7.08		

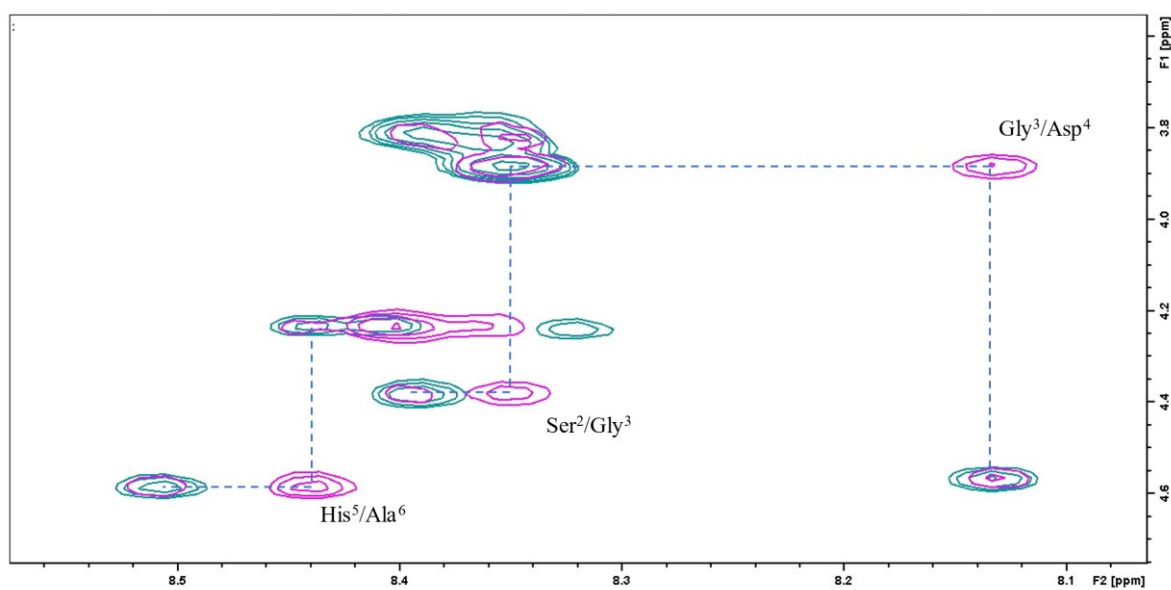
*Tabella 9: assegnazione delle risonanze protoniche dei diversi residui amminoacidici del peptide P2.*



*Figura 34: spettro TOCSY del composto P2: sono evidenziati i sistemi di spin dei singoli residui amminoacidici.*

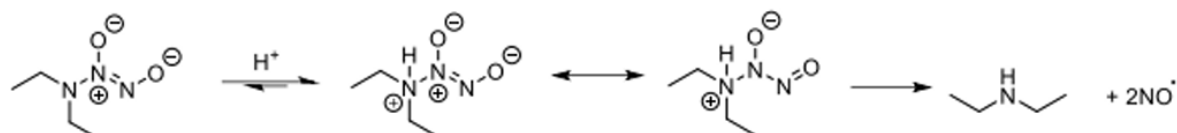


**Figura 35:** sovrapposizione degli spettri TOCSY (blu) e ROESY (viola) del composto **P2**. Si evidenziano le correlazioni Ser<sup>2</sup>/Gly<sup>3</sup>, Gly<sup>3</sup>/Asp<sup>4</sup>, Asp<sup>4</sup>/His<sup>5</sup> e His<sup>5</sup>/Ala<sup>6</sup>.



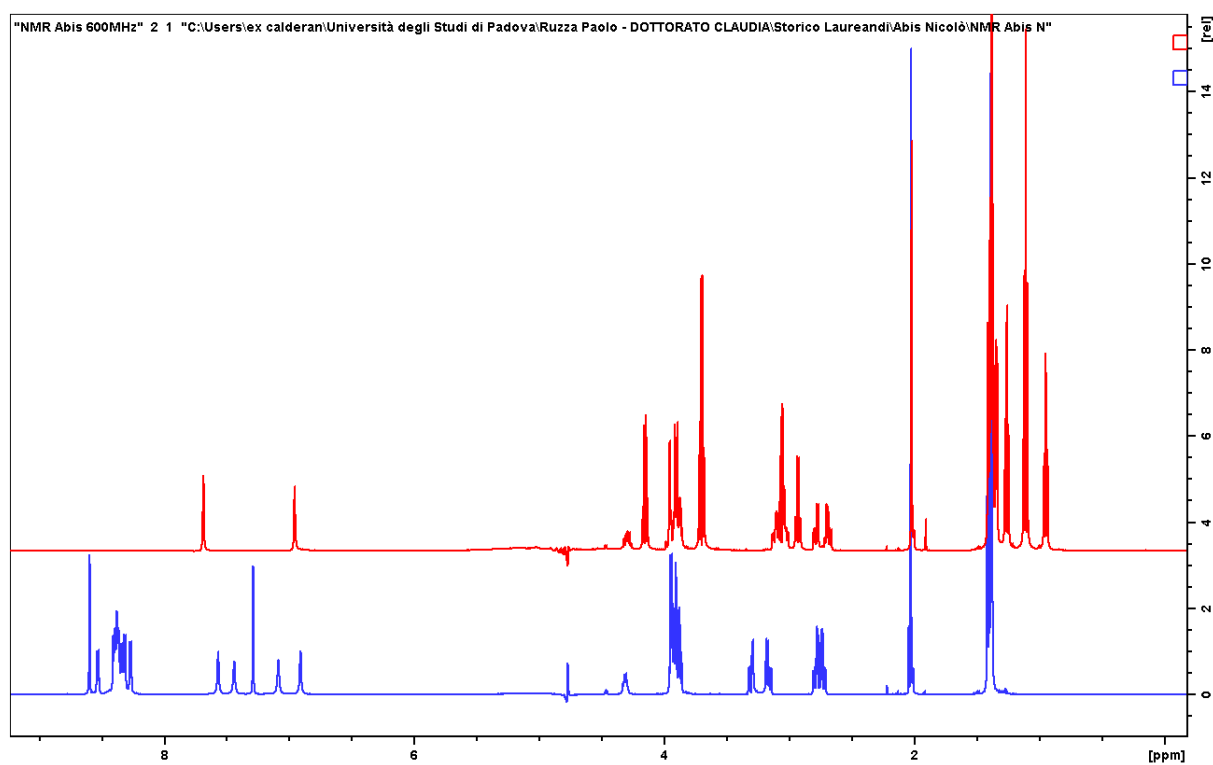
**Figura 36:** sovrapposizione degli spettri TOCSY (blu) e ROESY (viola) del composto **P2**. Si evidenziano le correlazioni Ser<sup>2</sup>/Gly<sup>3</sup>, Gly<sup>3</sup>/Asp<sup>4</sup> e His<sup>5</sup>/Ala<sup>6</sup>.

Al fine di valutare l'effetto dei radicali dell'azoto sulle possibili reazioni di  $\alpha,\beta$ -shift a livello del dipeptide Asn-His, al peptide **P1** sono stati aggiunti di 6 equivalenti di DEA NONO-Ate in grado di produrre radicali  $\text{NO}^\bullet$  secondo la reazione nello **schema 14**.



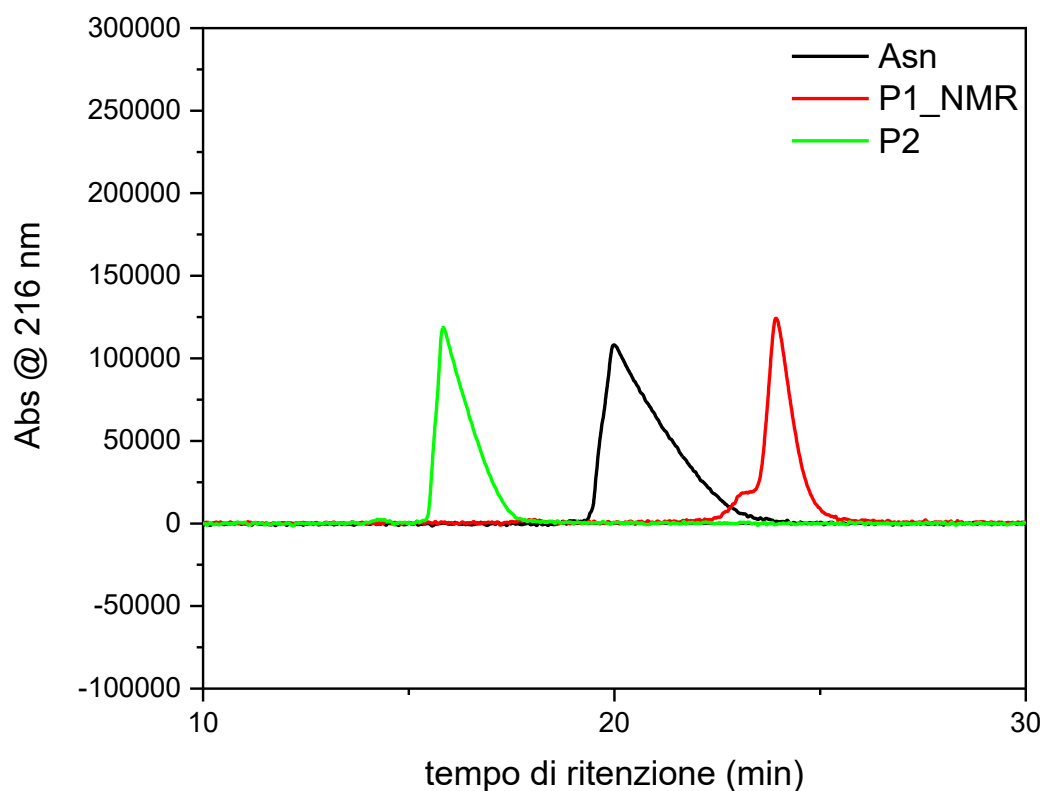
*Schema 14: meccanismo di formazione del radicale  $\text{NO}^\bullet$  a partire da DEA NONO-Ate. [10]*

Dunque, si è provveduto a registrare lo spettro monodimensionale (**figura 37**).



*Figura 37: sovrapposizione degli spettri protonici 1D del peptide **P1** (blu) e del peptide **P1** trattato con 6 equivalenti di DEA-nonoate (rosso).*

I risultati mostrano come l'aggiunta di DEA NONO-Ate causi la scomparsa di tutti i segnali nella regione delle ammidi e modifichi sostanzialmente lo spettro NMR. Anche i valori di chemical-shift intorno ai 5 ppm, questo molto probabilmente a causa di interazioni del radicale  $\text{NO}^\bullet$  con il peptide. Al fine di confermare un'azione dei radicali dell'azoto sul peptide, si è provveduto ad analizzare cromatograficamente il contenuto del tubo NMR e confrontarlo con i cromatogrammi dei peptidi **P1** e **P2**. Come mostrato in **figura 38**, il peptide **P1** contenuto nel tubo NMR ha esibito l'azione dei radicali dell'azoto, ma non ha subito reazioni di  $\alpha,\beta$ -shift. L'analisi ESI-MS del campione NMR rivela la presenza di prodotti di degradazione del peptide **P1**.



**Figura 38:** HPLC analitico del peptide **P1** (nero), in seguito ad esposizione a radicali dell'azoto ottenuti tramite DEA-nonoate (rosso) e del peptide **P2** (verde). L'eluizione avviene utilizzando una colonna Phenomenex Kinetex  $5\mu$  XB-C18 100Å 150 x 4.6 mm, flusso 1 mL/min con rilevazione a 216 nm. Eluizione isocratica al 4% B per 30 minuti. Eluente A: 0.05 % TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , Eluente B: 0.05 % TFA +  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  4/1 v/v.





## 4. Conclusioni

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi anzitutto confermano quanto già evidenziato dai colleghi che mi hanno preceduto nello studio dell'orexina A e B. La sintesi anche di frammenti più corti contenenti la sequenza Asn-His presenta notevoli difficoltà e le rese di sintesi e soprattutto di purificazione risultano essere molto esigue.

Le analisi condotte al fine di valutare l'effetto dei diversi radicali dell'ossigeno o dell'azoto sulla struttura secondaria dei frammenti sintetizzati hanno solo in parte confermato quanto osservato utilizzando le medesime procedure per l'orexina A e B. In particolare, al diminuire delle dimensioni del peptide (peptide **P1** rispetto al peptide **P3**) si osserva una minore suscettibilità all'azione dei ROS, e questa sembra essere molto legata alla composizione del mezzo in cui è disciolto il peptide. Infatti, si osserva una maggiore suscettibilità all'azione dei ROS per il peptide P3 in tampone fosfato rispetto allo stesso campione disciolto in acqua.

Gli studi non hanno confermato la presenza di una reazione di  $\alpha$ - $\beta$ -shift a carico del residuo di Asn<sup>20</sup>. Il confronto cromatografico e spettroscopico con l'omologo peptidico contenente un residuo di isoAsp in posizione 20 ha sempre dato esito negativo.

I due peptidi **P3** e **P4**, possedendo la sequenza sufficiente per essere riconosciuti dai recettori per l'orexina, sono inviati ai colleghi della sede di Pozzuoli dell'ICB per determinarne l'attività biologica e l'influenza di un residuo di isoAsp su di essa.

Per ultimo è stato sintetizzato anche il peptide contenente i due ponti disolfuro, presente nella regione N-terminale dell'orexina A. I tempi di presentazione della tesi non hanno permesso la sua purificazione, ma saggi preliminari sul peptide grezzo evidenziano come i ponti disolfuro possano degradarsi per azione dei ROS. Quest'ultimo aspetto sarà oggetto di prossime analisi e forse potrà permettere la giusta interpretazione della perdita di attività del peptide orexina A a seguito di stress ossidativo.



## 5. Materiali e metodi

### 5.1 Reagenti e solventi

I reagenti e i solventi utilizzati nella sintesi e nella purificazione dei peptidi sono stati acquistati dalle seguenti aziende:

- Sigma Aldrich s.r.l. (Milano, IT): dietiletere (Et<sub>2</sub>O), acido trifluoroacetico (TFA), piperidina, piperazina, dimetilformamide (DMF), acido acetico, trifluoroetano (TFE), diclorometano (DCM), triisopropilsilano (TIPS)
- Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germania): amminoacidi e resina Rink-amide MBHA
- CARLO ERBA Reagents S.r.l. (Cornaredo Milano, Italia): acetonitrile; solfato ferroso

L'acqua utilizzata è stata ottenuta con un sistema "Elga Veolia PURELAB" (Londra, UK).

Le pesate sono state effettuate con una bilancia Mettler AE 240 o una bilancia Mettler  $\Delta$ T21 Comparator.

### 5.2 Sintesi peptidica su fase solida

La sintesi peptidica è stata svolta manualmente, avvalendosi di un agitatore, all'interno di siringhe ISOLUTE<sup>R</sup> Reservoir da 15 mL dotate di un filtro poroso,

1. Rigonfiamento della resina con DMF (30 minuti);
2. Deprotezione del gruppo protettore Fmoc dalla resina o dall'ultimo residuo amminoacidico condensato, con una soluzione di piperidina al 20% v/v in DMF;
3. Lavaggio della resina con DMF;
4. Attivazione del gruppo  $\alpha$ -carbossilico, del residuo da condensare, con HATU o HBTU/HOBt in presenza di DIPEA in DMF (5 minuti);
5. Reazione di condensazione (45 minuti);
6. Lavaggio della resina con DMF.

Gli step 2-6 sono stati ripetuti per ciascun residuo fino al completamento della sequenza amminoacidica. La reazione di condensazione è stata svolta, rispetto a 1 equivalente di resina, con 3 equivalenti di amminoacido, 3 equivalenti di attivatore e 6 equivalenti di DIPEA.

### 5.3. Acetilazione dei peptidi

La reazione di acetilazione è stata effettuata utilizzando  $\text{Ac}_2\text{O}$  (0,235 mL, 2,5 mmol) e DIPEA (0,115 mL, 0,66 mmol) in una soluzione di DMF. La reazione è condotta per 60 minuti a temperatura ambiente e ripetuta due volte.

### 5.4. Sblocco dei peptidi dalla resina e rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali

I peptidi sono stati rimossi dalla resina contemporaneamente al distacco dei gruppi protettori presenti sulle catene laterali dei residui amminoacidici utilizzando una soluzione di TFA al 95% v/v in presenza di 3% di TiPS e 2% di acqua come scavengers. La reazione decorre per circa 3 ore a temperatura ambiente. Il TFA è parzialmente evaporato con l'ausilio di un flusso di  $\text{N}_2$  e il prodotto grezzo è precipitato per aggiunta di dietiletere. Il campione è centrifugato, solubilizzato in acqua, filtrato su filtri di cellulosa 0.45  $\mu$  e liofilizzato.

### 5.5 Purificazione e caratterizzazione dei prodotti

La purezza dei peptidi sintetizzati è stata determinata con HPLC analitico Shimadzu (Kyoto, Giappone) composto da due pompe LC-10- $\Delta$ D UP, controller SCL-10A VP, rilevatore SPD-10A Shimadzu UV-Vis, degassatore Gastorr 154 e auto iniettore SIL-9A Shimadzu. L'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stata effettuata con il software ChromNAV (Jasco, Tokyo, Giappone). Le eluizioni sono state svolte con una colonna Phenomenex Kinetex 5 $\mu$  C18 100Å 150 x 21.2 mm o alternativamente una colonna Dionex Vydac 10 $\mu$  C18 300Å. L'eluizione è avvenuta tramite un gradiente lineare binario con le soluzioni: (A) 0.05% TFA in acqua e (B) 0.05% TFA in 90% v/v MeCN e 10% v/v acqua o alternativamente 0.05% TFA in 25% v/v MeCN e 75% acqua.

La purificazione dei prodotti grezzi è stata effettuata tramite un HPLC preparativo Shimadzu, composto da due pompe LC-8A, rilevatore spettrofotometrico UV-SPD-6A, degassatore ERMA modello ERC-3562 e registratore.

La purificazione dai Sali è stata condotta con una colonna Sephadex G25 eluita con  $\text{HCl}$   $10^{-2}$  M.

### 5.6. Spettrometria di massa

Le misure di spettrometria di massa sono state condotte con uno strumento composto da un sistema di cromatografia liquida accoppiato ad uno spettrometro di massa (LC-MS) Agilent

Technologies 1260 Infinity. Il sistema di ionizzazione è l'elettrospray (ESI) e un analizzatore a quadrupolo (Quadrupolo 6130).

## 5.7. Risonanza Magnetica Nucleare

Gli spettri NMR sono stati registrati con uno strumento Bruker Avance DMX 600 MHz. I peptidi analizzati sono stati sciolti in 10% v/v D<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O (circa 4 mg/mL), quindi per la registrazione degli spettri sia 1D che 2D sono state utilizzate sequenze d'impulso disponibili nella libreria Bruker per la soppressione del segnale dell'acqua. Nel dettaglio, per gli spettri monodimensionali <sup>1</sup>H si è utilizzato il pulprogr zg per la determinazione della frequenza di risonanza del solvente, e quindi per la registrazione dello spettro <sup>1</sup>H la sequenza di 1D Excitation Sculpting (zgesgp) che prevede l'uso di un impulso a 180° selettivo per l'acqua (O1P 2802.00 Hz). Per gli spettri omonucleari bidimensionali, che prevedono sempre la soppressione del segnale dell'acqua, sono state utilizzate le sequenze cosygpph5 per il COSY, mlevesgpph per il TOCSY e roesyegpph per il ROESY. L'elaborazione dei dati è stata svolta con il software TopSpin 4.2.0. L'esperimento in presenza di una fonte di specie radicaliche all'azoto (RNS) è stato condotto con 6 eq di DEA NONO-Ate.

## 5.8. Dicroismo Circolare

Le misure sono state condotte con uno strumento Jasco J-1500 a 25°C in una cuvetta con 0.1 cm di cammino ottico (Hellma Analytics, Milano), data pitch 1 nm, velocità di scansione 50 nm/min, digital integration time 1 sec e bandwidth 1 nm. Gli spettri sono stati registrati con il software Spectra Manager (Jasco), come media di 4 scansioni. Il range di lunghezza d'onda è stato impostato tra 260 e 185 nm. I dati sono stati processati con il software Spectra Manager. La stima della struttura secondaria dei peptidi è stata condotta con il software CDApps, utilizzando entrambi gli algoritmi CONTINLL e SELCON3, un di 37 proteine, analizzando gli spettri nel range di lunghezza d'onda tra 185 e 240 nm.

I campioni sono stati preparati per diluizione a partire da una soluzione madre 0,5 mg/mL in acqua e diluiti con un opportuno solvente sino ad ottenere una concentrazione di 0.1 mg/mL.

## 5.9 Spettroscopia di assorbimento UV

Gli spettri UV sono stati registrati con uno Shimadzu UV-2501, controllato dal software UV-Probe. Gli spettri sono stati registrati nel range 350-600 nm in una cella in quarzo SUPRASIL 10x4 mm (Hellma Analytics, Milano) con cammino ottico 10 mm.

### **5.10 Sintesi del frammento di orexina-B: Ac-Ala17-Gly24-NH<sub>2</sub> (P1)**

Sequenza: Ac-ASGNHAAG-NH<sub>2</sub>

La sintesi è avvenuta a partire da 200 mg di resina Rink Amide (loading = 0,71 mmol/g), utilizzando HBTU e HOBt come attivatori, secondo la procedura di sintesi peptidica su fase solida riportata in precedenza.

Sono stati ottenuti 81 mg di grezzo (resa = 79%).

Il peptide è caratterizzato mediante HPLC analitica utilizzando una colonna Phenomenex Kinetex 5 $\mu$  XB-C18 100Å 150 x 4.6 mm; eluita con gradiente isocratico al 4% B per 25 minuti e 4-15% B in 20 minuti, utilizzando come eluenti (A) 0.05% TFA in acqua; (B) 0.05% TFA in 25% MeCN in acqua).

Il peptide è stato purificato mediante HPLC preparativa, utilizzando una colonna Phenomenex Kinetex 5 $\mu$  C18 100Å 150 x 21.2 mm; eluita con gradiente isocratico al 4% B per 25 minuti e 4-11% B in 17 minuti, utilizzando come eluenti (A) 0.05% TFA in acqua; (B) 0.05% TFA in 12.5% MeCN in acqua).

Si sono ottenuti 48 mg di prodotto pulito (resa = 47%)

### **5.11. Sintesi del frammento di orexina-B: Ac-Ala17-isoAsp20-Gly24-NH<sub>2</sub> (P2)**

Sequenza: Ac-ASGisoDHAAG-NH<sub>2</sub>

La sintesi è avvenuta a partire da 200 mg di resina Rink Amide (loading = 0,71 mmol/g), utilizzando HBTU e HOBt come attivatori, secondo la procedura di sintesi peptidica su fase solida riportata in precedenza.

Sono stati ottenuti 69 mg di grezzo (resa = 67%).

Il peptide è caratterizzato mediante HPLC analitica utilizzando una colonna Phenomenex Kinetex 5 $\mu$  XB-C18 100Å 150 x 4.6 mm; eluita con gradiente isocratico al 4% B per 25 minuti e 4-15% B in 10 minuti, utilizzando come eluenti (A) 0.05% TFA in acqua; (B) 0.05% TFA in 25% MeCN in acqua).

Il peptide è stato purificato mediante HPLC preparativa, utilizzando una colonna Phenomenex Kinetex 5 $\mu$  C18 100Å 150 x 21.2 mm; eluita con gradiente isocratico al 2% B per 35 minuti e 2-30% B in 10 minuti, utilizzando come eluenti (A) 0.05% TFA in acqua; (B) 0.05% TFA in 25% MeCN in acqua).

Si sono ottenuti 36 mg di prodotto pulito (resa = 35%)

### 5.12. Sintesi del frammento di orexina-B: Ac-10-28-NH<sub>2</sub> (P3)

Sequenza: Ac-RLQ<sup>RL</sup>LLQASGN<sup>HA</sup>AAGILTM-NH<sub>2</sub>

La sintesi è avvenuta a partire da 150 mg di resina Rink Amide (PS-1% DVB, loading = 0,71 mmol/g) e utilizzando HATU come attivatore, secondo la procedura di sintesi peptidica su fase solida riportata in precedenza. I residui amminoacidici evidenziati in verde sono stati condensati tramite doppio coupling, mentre il residuo in blu con coupling quadruplo.

Sono stati ottenuti 103 mg di grezzo (resa = 46%).

Il peptide è caratterizzato mediante HPLC analitica utilizzando una colonna Phenomenex Jupiter 5 $\mu$  C18 300Å 250 x 4.6 mm; eluita con gradiente isocratico al 27% B per 5 minuti e 27-40% B in 15 minuti, utilizzando come eluenti (A) 0.05% TFA in acqua; (B) 0.05% TFA in 90% MeCN in acqua).

Il peptide è stato purificato mediante HPLC preparativa, utilizzando una colonna Dionex Vydac 10 $\mu$  C18 300Å; eluita con gradiente isocratico al 27% B per 5 minuti e 27-29% B in 60 minuti, utilizzando come eluenti (A) 0.05% TFA in acqua; (B) 0.05% TFA in 90% MeCN in acqua).

Si sono ottenuti 7 mg di prodotto pulito (resa = 3%)

### 5.13 Sintesi del frammento di orexina-B: Ac-10--isoAsp20-28-NH<sub>2</sub> (P4)

Sequenza: Ac-RLQ<sup>RL</sup>LLQASG<sup>isoD</sup>HAAGILTM-NH<sub>2</sub>

La sintesi è avvenuta a partire da 150 mg di resina Rink Amide (PS-1% DVB, loading = 0,71 mmol/g) e utilizzando HATU come attivatore, secondo la procedura di sintesi peptidica su fase solida riportata in precedenza. I residui amminoacidici evidenziati in verde sono stati condensati tramite doppio coupling, mentre il residuo in blu con coupling quadruplo.

Sono stati ottenuti 136 mg di grezzo (resa = 61%).

Il peptide è caratterizzato mediante HPLC analitica utilizzando una colonna Phenomenex Jupiter 5 $\mu$  C18 300Å 250 x 4.6 mm; eluita con un gradiente isocratico al 25%B per 5 minuti e 25-40% B in 15 minuti, utilizzando come eluenti (A) 0.05% TFA in acqua; (B) 0.05% TFA in 90% MeCN in acqua).

Il peptide è stato purificato mediante HPLC preparativa, utilizzando una colonna Dionex Vydac 10 $\mu$  C18 300Å; eluita con gradiente isocratico al 26% B per 5 minuti e 26-32% B in 60 minuti, utilizzando come eluenti (A) 0.05% TFA in acqua; (B) 0.05% TFA in 90% MeCN in acqua).

Si sono ottenuti 6 mg di prodotto pulito (resa = 3%)

#### 5.14. Sintesi del frammento di orexina-A: Ac-4-16-NH<sub>2</sub> (P5)

Sequenza: Ac-PDCCRQKTCSCRL -NH<sub>2</sub>

La sintesi è avvenuta a partire da 250 mg di resina Rink Amide (PS-1% DVB, loading = 0,71 mmol/g) e utilizzando HATU come attivatore, secondo la procedura di sintesi peptidica su fase solida riportata in precedenza. I residui amminoacidici evidenziati in verde sono stati condensati tramite doppio coupling. I ponti disolfuro sono stati ottenuti selettivamente con l'ausilio di gruppi protettori differenti il gruppo Ac<sub>m</sub> per i residui Cys<sup>6</sup> e Cys<sup>12</sup> e il gruppo Trt per i residui Cys<sup>7</sup> e Cys<sup>14</sup>. L'ossidazione è stata condotta, per le cisteine deprotette dal gruppo Trt, in presenza di I<sub>2</sub> e MeOH per 1 ora a temperatura ambiente; per aggiunta di acqua sono stati rimossi i gruppi Ac<sub>m</sub>, permettendo l'ossidazione delle cisteine rimanenti. L'eccesso di I<sub>2</sub> è stato quenched per aggiunta di acido ascorbico.

Sono stati ottenuti 231 mg di grezzo (resa = 84%).

L'eccesso di Sali è stato rimosso per gel-filtrazione su una colonna Sephadex G25, eluita con HCl 10<sup>-2</sup> M.



## 6. Abbreviazioni

CD = dicroismo circolare

COSY = COrrelation SpectroscopY

CNS = sistema nervoso centrale

DEA NONO-Ate = dietilammina NONOate

DIPEA = N,N-diisopropilettilammina

DBF = dibenzofulvene

DBU = 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene

DMF = N,N-dimetilformammide

DMPC = 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DMPG = 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilglicerolo sale sodico

DTNB = 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)

DVB = divinilbenzele

ESI-MS = electrospray ionization mass spectroscopy

Fmoc = 9-fluorenilmetilossiarbonil cloruro

GPCRs = recettori accoppiati a proteine G

HATU = 1-[bis(dimetilammino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridino esafluorofosfato

HBTU = N,N,N',N',-tetrametil(1H-benzotriazol-1-il)uronio esafluorofosfato

HOBt = N-idrossibenzotriazolo

HPLC = high performance liquid chromatography

LC-ESI-MS = liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy

OX1R/OX2R = recettori orexinerfici 1 e 2

PB = tampone fosfato

ROESY = Rotating-frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

ROS = specie reattive dell'ossigeno

RNS = specie reattive dell'azoto

RONS = specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto

SPPS = sintesi peptidica su fase solida

TFA = acido trifluoroacetico

TFE = 2,2,2-trifluoroetanolo

TIPS = triisopropilsilano

TOCSY = Total Correlation SpectroscopY

### **Abbreviazioni residui amminoacidici**

A/Ala = alanina

C/Cys = cisteina

D/Asp = acido aspartico

IsoD/isoAsp = acido isoaspartico

G/Gly = glicina

H/His = istidina

I/Ile = isoleucina

L/Leu = leucina

M/Met = metionina

N/Asn = asparagina

P/Pro = prolina

Q/Gln = glutammina

R/Arg = arginina

S/Ser = serina

T/Thr = treonina

## 7. Bibliografia

1. Muehlan, C.; Roch, C.; Vaillant, C.; Dingemans, J., The orexin story and orexin receptor antagonists for the treatment of insomnia. *Journal of Sleep Research* **2023**, 32, (6), e13902.
2. Burbach, J. P., What are neuropeptides? *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**, 789, 1-36.
3. Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R. M.; Tanaka, H.; Williams, S. C.; Richardson, J. A.; Kozlowski, G. P.; Wilson, S.; Arch, J. R.; Buckingham, R. E.; Haynes, A. C.; Carr, S. A.; Annan, R. S.; McNulty, D. E.; Liu, W. S.; Terrett, J. A.; Elshourbagy, N. A.; Bergsma, D. J.; Yanagisawa, M., Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **1998**, 92, (4), 573-85.
4. de Lecea, L.; Kilduff, T. S.; Peyron, C.; Gao, X.; Foye, P. E.; Danielson, P. E.; Fukuhara, C.; Battenberg, E. L.; Gautvik, V. T.; Bartlett, F. S., 2nd; Frankel, W. N.; van den Pol, A. N.; Bloom, F. E.; Gautvik, K. M.; Sutcliffe, J. G., The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, (1), 322-7.
5. Sakurai, T., The role of orexin in motivated behaviours. *Nature reviews. Neuroscience* **2014**, 15, (11), 719-31.
6. Sakurai, T.; Moriguchi, T.; Furuya, K.; Kajiwara, N.; Nakamura, T.; Yanagisawa, M.; Goto, K., Structure and function of human prepro-orexin gene. *The Journal of biological chemistry* **1999**, 274, (25), 17771-6.
7. Chieffi, S.; Carotenuto, M.; Monda, V.; Valenzano, A.; Villano, I.; Precenzano, F.; Tafuri, D.; Salerno, M.; Filippi, N.; Nuccio, F.; Ruberto, M.; De Luca, V.; Cipolloni, L.; Cibelli, G.; Mollica, M. P.; Iacono, D.; Nigro, E.; Monda, M.; Messina, G.; Messina, A., Orexin System: The Key for a Healthy Life. *Frontiers in physiology* **2017**, 8, 357.
8. Ramanjaneya, M.; Conner, A. C.; Chen, J.; Kumar, P.; Brown, J. E.; Jöhren, O.; Lehnert, H.; Stanfield, P. R.; Randeva, H. S., Orexin-stimulated MAP kinase cascades are activated through multiple G-protein signalling pathways in human H295R adrenocortical cells: diverse roles for orexins A and B. *The Journal of endocrinology* **2009**, 202, (2), 249-61.
9. Lin, C.-M.; Hou, S.-W.; Wang, B.-W.; Ong, J.-R.; Chang, H.; Shyu, K.-G., Molecular Mechanism of (-)-Epigallocatechin-3-gallate on Balloon Injury-Induced Neointimal Formation and Leptin Expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62, (6), 1213-1220.
10. Rotondo, M.; Honisch, C.; Tartaglia, S.; Ruzza, P., Circular Dichroism Study of Orexin B under Oxidative Stress Conditions. **2023**, 28, (2), 484.
11. Takai, T.; Takaya, T.; Nakano, M.; Akutsu, H.; Nakagawa, A.; Aimoto, S.; Nagai, K.; Ikegami, T., Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2006**, 12, (7), 443-54.
12. Lang, M.; Söll, R. M.; Dürrenberger, F.; Dautzenberg, F. M.; Beck-Sickinger, A. G., Structure-Activity Studies of Orexin A and Orexin B at the Human Orexin 1 and Orexin 2 Receptors Led to Orexin 2 Receptor Selective and Orexin 1 Receptor Preferring Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 47, (5), 1153-1160.

## Bibliografia

13. German, N. A.; Decker, A. M.; Gilmour, B. P.; Thomas, B. F.; Zhang, Y., Truncated Orexin Peptides: Structure–Activity Relationship Studies. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 4, (12), 1224-1227.
14. Persson, T.; Popescu, B. O.; Cedazo-Minguez, A., Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**, 2014, 427318.
15. Liu, J.; Han, X.; Zhang, T.; Tian, K.; Li, Z.; Luo, F., Reactive oxygen species (ROS) scavenging biomaterials for anti-inflammatory diseases: from mechanism to therapy. *Journal of Hematology & Oncology* **2023**, 16, (1), 116.
16. Pisoschi, A. M.; Pop, A., The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 97, 55-74.
17. López-Alarcón, C.; Denicola, A., Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta* **2013**, 763, 1-10.
18. López-Alarcón, C.; Denicola, A., Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta* **2013**, 763, 1-10.
19. Mitra, S.; Nguyen, L. N.; Akter, M.; Park, G.; Choi, E. H.; Kaushik, N. K., Impact of ROS Generated by Chemical, Physical, and Plasma Techniques on Cancer Attenuation. *Cancers* **2019**, 11, (7).
20. Weidinger, A.; Kozlov, A. V., Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* **2015**, 5, (2), 472-84.
21. Halliwell, B., Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews* **1997**, 55, (1 Pt 2), S44-9; discussion S49-52.
22. Poljsak, B.; Šuput, D.; Milisav, I., Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 2013, 956792.
23. Gutteridge, J. M. C., Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions* **1994**, 91, (2), 133-140.
24. Dröse, S.; Brandt, U., Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Advances in experimental medicine and biology* **2012**, 748, 145-69.
25. Kohen, R.; Nyska, A., Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **2002**, 30, (6), 620-650.
26. Kehrer, J. P., The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **2000**, 149, (1), 43-50.
27. Locatelli, F.; Canaud, B.; Eckardt, K. U.; Stenvinkel, P.; Wanner, C.; Zoccali, C., Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2003**, 18, (7), 1272-80.
28. Berlett, B. S.; Stadtman, E. R., Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress\*. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, (33), 20313-20316.
29. Pitocco, D.; Zaccardi, F.; Di Stasio, E.; Romitelli, F.; Santini, S. A.; Zuppi, C.; Ghirlanda, G., Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *The review of diabetic studies : RDS* **2010**, 7, (1), 15-25.
30. Mayer, B.; Hemmens, B., Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in biochemical sciences* **1997**, 22, (12), 477-81.

31. van Faassen, E. E. H.; Vanin, A. F., NITRIC OXIDE. In *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, Worsfold, P.; Townshend, A.; Poole, C., Eds. Elsevier: Oxford, 2005; pp 183-191.
32. Hou, Y. C.; Janczuk, A.; Wang, P. G., Current trends in the development of nitric oxide donors. *Current pharmaceutical design* **1999**, 5, (6), 417-41.
33. Green, S. J.; Mellouk, S.; Hoffman, S. L.; Meltzer, M. S.; Nacy, C. A., Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunology letters* **1990**, 25, (1-3), 15-9.
34. Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L., Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews* **2007**, 87, (1), 315-424.
35. Geiger, T.; Clarke, S., Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *The Journal of biological chemistry* **1987**, 262, (2), 785-94.
36. Capasso, S.; Mazzarella, L.; Sica, F.; Zagari, A., Deamidation via cyclic imide in asparaginyl peptides. *Peptide research* **1989**, 2, (2), 195-200.
37. Patel, K.; Borchardt, R. T., Chemical pathways of peptide degradation. III. Effect of primary sequence on the pathways of deamidation of asparaginyl residues in hexapeptides. *Pharmaceutical research* **1990**, 7, (8), 787-93.
38. Tyler-Cross, R.; Schirch, V., Effects of amino acid sequence, buffers, and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptides. *The Journal of biological chemistry* **1991**, 266, (33), 22549-56.
39. Lindner, H.; Helliger, W., Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins. *Experimental gerontology* **2001**, 36, (9), 1551-63.
40. Fujii, N.; Matsumoto, S.; Hiroki, K.; Takemoto, L., Inversion and isomerization of Asp-58 residue in human alphaA-crystallin from normal aged lenses and cataractous lenses. *Biochimica et biophysica acta* **2001**, 1549, (2), 179-87.
41. Sadakane, Y.; Konoha, K.; Kawahara, M.; Nakagomi, K., Quantification of structural alterations of L-Asp and L-Asn residues in peptides related to neuronal diseases by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chemistry & biodiversity* **2010**, 7, (6), 1371-9.
42. Takahashi, O.; Manabe, N.; Kirikoshi, R., A Computational Study of the Mechanism of Succinimide Formation in the Asn-His Sequence: Intramolecular Catalysis by the His Side Chain. **2016**, 21, (3), 327.
43. Fields, G. B., Introduction to peptide synthesis. *Current protocols in protein science* **2002**, Chapter 18, 18.1.1-18.1.9.
44. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, (14), 2149-2154.
45. Pawlas, J.; Rasmussen, J. H., ReGreen SPPS: enabling circular chemistry in environmentally sensible solid-phase peptide synthesis. *Green Chemistry* **2019**, 21, (21), 5990-5998.
46. Palomo, J. M., Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Advances* **2014**, 4, (62), 32658-32672.
47. Chang, C. D.; Waki, M.; Ahmad, M.; Meienhofer, J.; Lundell, E. O.; Haug, J. D., Preparation and properties of Nalpha-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert.-butyl side chain protection. *International journal of peptide and protein research* **1980**, 15, (1), 59-66.
48. Luna, O. F.; Gomez, J.; Cárdenas, C.; Albericio, F.; Marshall, S. H.; Guzmán, F., Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? **2016**, 21, (11), 1542.

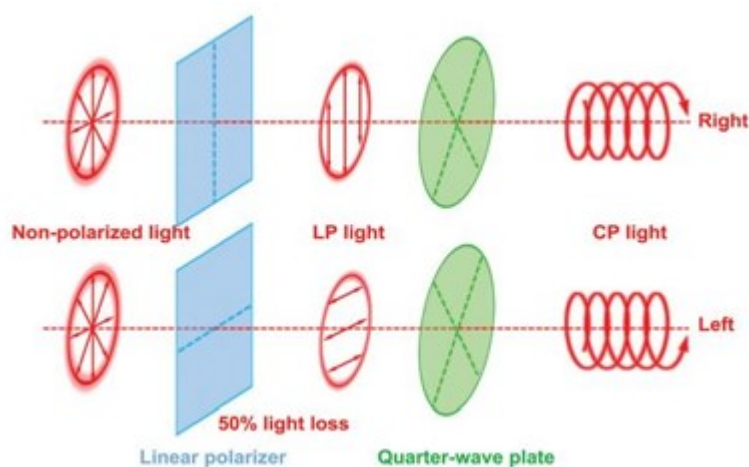
## Bibliografia

49. El-Faham, A.; Albericio, F., Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chemical Reviews* **2011**, 111, (11), 6557-6602.
50. Söll, R.; Beck-Sickinger, A. G., On the synthesis of orexin A: a novel one-step procedure to obtain peptides with two intramolecular disulphide bonds. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2000**, 6, (8), 387-97.
51. Kamber, B.; Hartmann, A.; Eisler, K.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber, P.; Rittel, W., The Synthesis of Cystine Peptides by Iodine Oxidation of S-Trityl-cysteine and S-Acetamidomethyl-cysteine Peptides. **1980**, 63, (4), 899-915.
52. Schwyzer, R., Molecular Mechanism of Opioid Receptor Selection. *Biochemistry* **1986**, 25, 6335-6342.
53. Fasman, G. D. In *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Springer US, 1996; 1996.
54. Zhang, D.-W.; Li, M.; Chen, C.-F., Recent advances in circularly polarized electroluminescence based on organic light-emitting diodes. *Chemical Society Reviews* **2020**, 49, (5), 1331-1343.
55. Rogers, D. M.; Jasim, S. B.; Dyer, N. T.; Auvray, F.; Réfrégiers, M.; Hirst, J. D., Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins. *Chem* **2019**, 5, (11), 2751-2774.
56. Greenfield, N. J., Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols* **2006**, 1, (6), 2876-90.
57. Sreerama, N.; Woody, R. W., Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry* **2000**, 287, (2), 252-260.

## Appendice

### Dicroismo circolare

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica che sfrutta l'interazione tra una sostanza otticamente attiva e la luce polarizzata circolarmente.[53] Quando la radiazione polarizzata linearmente, risultante dalla combinazione di due onde polarizzate circolarmente in fase tra loro e con uguale intensità, attraversa un campione chirale, si possono avere due fenomeni: la rotazione ottica e il dicroismo circolare. La rotazione ottica è dovuta ai diversi indici di rifrazione delle due componenti circolarmente polarizzate,  $n_L = c/v_L$  e  $n_R = c/v_R$ , che determinano velocità diverse di attraversare il mezzo. Le componenti usciranno sfasate dal mezzo e la somma vettoriale risultante sarà rappresentata da un vettore che giace su un piano diverso da quello di partenza. Due enantiomeri ruotano il piano della luce polarizzata dello stesso angolo ma in direzioni opposte. La dispersione ottica rotatoria ORD è la variazione della rotazione ottica  $\Phi$  al variare della lunghezza d'onda  $\lambda$ .



*Figura 39: schema del processo fisico per l'ottenimento di luce circolarmente polarizzata.*

[54]

Un campione otticamente attivo, attraversato da una luce circolarmente polarizzata, assorbe i due fasci di luce enantiomorfi diversamente. La differenza di assorbimento è data dalla legge di Lambert-Beer:

$$\Delta A(\lambda) = \Delta \epsilon(\lambda) * l * c = A_L(\lambda) - A_R(\lambda)$$

Dove  $\Delta A$  è il segnale dell'assorbimento misurato,  $A_L - A_R$  sono gli assorbimenti della luce circolarmente polarizzata rispettivamente a sinistra e a destra,  $\Delta \epsilon$  è la differenza dei coefficienti di estinzione molare (l'unità di misura di  $\epsilon = L / \text{cm} \cdot \text{mol}$ , o  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $c$  è la concentrazione,  $l$  è il cammino ottico.

Il dicroismo circolare è dovuto al fatto che le due componenti circolarmente polarizzate destrorsa e sinistrorsa hanno diversi coefficienti di assorbimento,  $\epsilon_L$  e  $\epsilon_R$  e quindi il vettore somma non avrà più modulo costante ma oscillerà tra un massimo e un minimo descrivendo una traiettoria elicoidale.

L'ellitticità  $\theta$  risultante è data dall'angolo la cui tangente è il rapporto tra l'asse minore  $a$  e l'asse maggiore  $b$  dell'ellisse.

$$\theta = \arctg(a/b)$$

L'ellitticità e l'assorbanza sono legate dalla relazione:

$$\theta = 2.303 (180/4\pi)(A_L - A_R) = 33 \Delta A$$

La misura può essere normalizzata rendendola indipendente dalla concentrazione, quindi esprimendo  $\theta$  come ellitticità molare media per residuo,  $[\theta]_{\text{MRW}}$  (MRW = peso molecolare medio per residuo)

$$[\theta]_{\text{MRW}} = (\theta \cdot \text{MRW}) / (10 c l)$$

Dove  $\theta$  è espressa in gradi e  $[\theta]_{\text{MRW}}$  è espresso in gradi  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ .

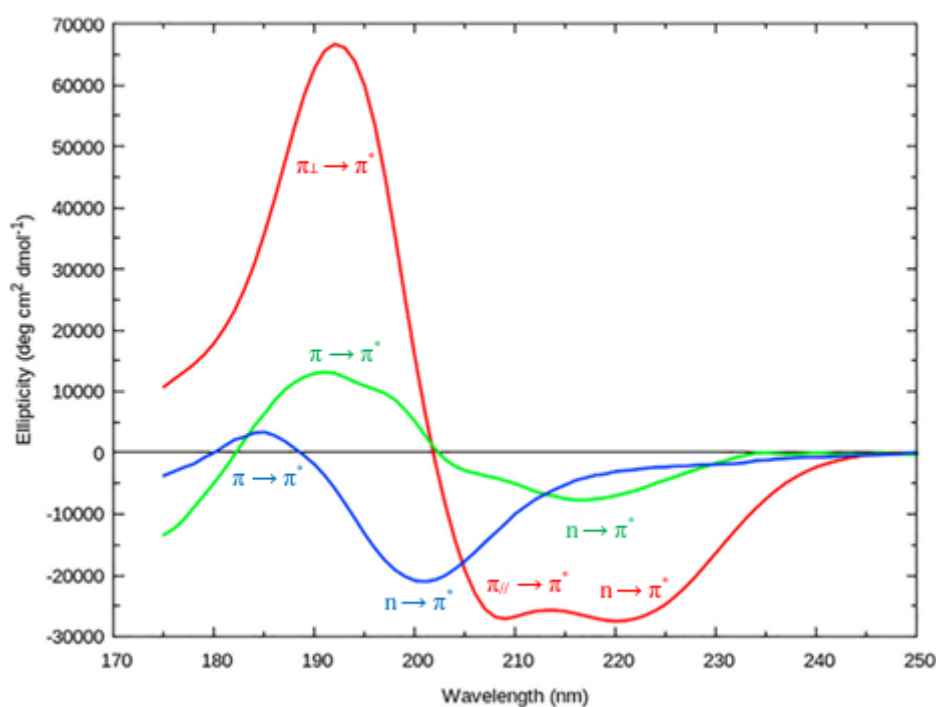
Una transizione elettronica è attiva al CD se  $\mu_e \cdot \mu_m \neq 0$

Dove:  $\mu_e$  è il momento di dipolo della transizione elettronica (spostamento lineare di elettroni per transizione verso uno stato eccitato);  $\mu_m$  è il momento di transizione magnetica (spostamento radiale di elettroni per transizione verso uno stato eccitato).

Nel caso delle proteine e dei peptidi, il CD fornisce informazioni sulla struttura secondaria e sulle variazioni conformazionali nella regione del lontano UV (250-190 nm), in risposta a cambiamenti di temperatura, agenti chimici o interazioni con altre molecole. Le analisi degli spettri CD in questa regione permettono di identificare le diverse strutture secondarie, come l' $\alpha$ -elica, il  $\beta$ -strand e la conformazione disordinata, in base alle caratteristiche delle bande di assorbimento.

Tra queste, l' $\alpha$ -elica presenta una banda positiva con un massimo intorno ai 192 nm e due bande negative intorno a 207 e 220 nm; il  $\beta$ -foglietto presenta un massimo positivo intorno a 197 nm e un negativo a circa 217 nm; la conformazione disordinata è caratterizzata da una banda negativa centrata a circa 195 nm.





*Figura 40: spettro CD di:  $\alpha$ -elica (rosso),  $\beta$ -foglietto (verde), conformazione disordinata (blu). [55]*

### Determinazione della struttura secondaria di un peptide

Il dicroismo circolare nel lontano UV riflette la struttura secondaria delle proteine. Sono stati sviluppati diversi metodi empirici per l'analisi di uno spettro dicroico in questo ambito, sulla base del principio secondo cui lo spettro può essere espresso come combinazione lineare degli spettri dei singoli componenti della struttura secondaria. Uno spettro acquisito su un campione sperimentale viene quindi confrontato per deconvoluzione con gli spettri CD di un set di proteine la cui struttura secondaria è stata determinata attraverso altre tecniche, specialmente attraverso cristallografia a raggi X. Il metodo di analisi della struttura secondaria utilizzato in questo lavoro di tesi è implementato nel software CDApps sviluppato presso la Beamline B23 del sincrotrone della Diamond Light Source (UK) ove è operante un SRCD e utilizza due diversi algoritmi: SELCON3 e CONTIN/LL. [56, 57]

L'algoritmo SELCON3 è una versione del metodo auto-coerente, il quale include lo spettro della proteina analizzata nella matrice dei dati spettrali del set di base e la struttura secondaria è determinata per similitudine con lo spettro più simile tra quelli di riferimento. Il processo viene ripetuto fino ad ottenere la convergenza. La matrice che mette in relazione gli spettri CD

con la struttura secondaria viene risolta con l'algoritmo della decomposizione del valore singolare. Le soluzioni accettate devono soddisfare quattro regole di selezione. La soluzione finale è la media di tutte le soluzioni che soddisfano queste quattro regole di selezione. [p-f]

L'altro algoritmo, il CONTIN/LL, utilizza la procedura di regressione ridge e cerca di approssimare lo spettro sperimentale come combinazione lineare degli spettri di N proteine del set di riferimento. Il metodo trova una serie di soluzioni in base ad un valore di regolarizzazione. Questo metodo seleziona una soluzione in base a criteri specifici; tuttavia, non sempre è la migliore e soluzioni più vicine alla struttura a raggi X della proteina vengono spesso rifiutate dal programma. La soluzione con il minor errore standard tra le soluzioni fornite da CONTIN, è quella che fornisce i risultati migliori. In questo metodo le proteine di riferimento sono ordinate in base alla distanza della radice della media dei quadrati degli spettri della soluzione di riferimento.

Le proteine dell'insieme di riferimento sono disposte in ordine crescente di distanza sulla base della radice della media quadratica degli spettri di riferimento rispetto a quello della proteina analizzata e le più lontane sono eliminate per costruire un set di base più ristretto e si ottiene un insieme di soluzioni. La soluzione finale è la media delle soluzioni che soddisfano le quattro regole di selezione.