



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Chimiche

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO SCIENZE CHIMICHE
CICLO XXIV

LA CICLOFILINA D COME BERSAGLIO FARMACOLOGICO: SUOI POTENZIALI INIBITORI PEPTIDICI

Direttore della Scuola: Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Prof. Stefano Mammi

Cosupervisore: Dott. Andrea Calderan

Dottorando: Nicola Antolini

Indice

INDICE

RIASSUNTO	1
SUMMARY	5
ABBREVIAZIONI	9
1 INTRODUZIONE	11
1.1 I MITOCONDRI	11
1.2 LE CICLOFILINE	18
1.3 IL PORO DI TRANSIZIONE MITOCONDRIALE	21
1.4 ANTAMANIDE	26
2 SCOPO	29
3 MATERIALI E METODI	31
3.1 SINTESI DEI PEPTIDI	31
3.2 ESPRESSIONE DI PROTEINE	37
3.3 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE	40
3.3.1 Vettori di espressione e ceppi batterici	40
3.3.2 Cellule competenti e loro trasformazione	42
3.3.3 Colture batteriche e induzione	43

4.1.3 Gly 9 c(VPPAFFPPGF)	81
4.1.4 Tyr 6 c(VPPAFYPPFF)	84
4.1.5 Tyr 9 c(VPPAFFPPYF)	86
4.1.6 Otta-Gly 9 c(VPPAPPGF)	88
4.1.7 Otta-Tyr 9 c(VPPAPPYF)	90
4.2 SAGGI BIOLOGICI	92
4.2.1 Calcium Retention Capacity (CRC)	92
4.2.2 Studi di depolarizzazione e morte cellulare	95
4.3 ESPRESSIONE DI CypD	98
4.4 REFOLDING DI CypD	103
4.4.1 Dialisi	103
4.4.2 Diluizione	104
4.4.3 Column refolding	105
4.5 ANALISI STRUTTURALI	105
4.5.1 Dialisi	106
4.5.2 Column refolding	107
4.6 CARATTERIZZAZIONE Anta	110
5 CONCLUSIONI	113
6 BIBLIOGRAFIA	117
APPENDICE	129

Riassunto dell'attività svolta

Il poro di transizione mitocondriale (MPTP) gioca un ruolo chiave nel processo di morte cellulare mediata dal mitocondrio (apoptosi). Molecole in grado di inibire il MPTP possono dunque essere dei potenziali agenti terapeutici, utili nel trattamento di patologie come il trauma, il danno da ischemia/riperfusion, le malattie di Parkinson e Alzheimer e in generale di tutte quelle condizioni in cui è coinvolto lo stress ossidativo e che portano all'apoptosi.

La ciclofilina D (CypD), una peptidil-prolil isomerasi della famiglia delle ciclofiline, è una proteina della matrice mitocondriale che è strettamente implicata nella regolazione della transizione aperto-chiuso dell'MPTP. Il meccanismo con cui esplica la sua azione non è ancora conosciuto. Vi sono però delle evidenze che mettono in luce il suo ruolo fondamentale nella modulazione della permeabilità mitocondriale. CypD, così come altri membri della famiglia delle ciclofiline, è il bersaglio principale della ciclosporina A (CsA), un undecapeptide ciclico estratto dal fungo *Tolypocladium inatum*, che ha rivoluzionato la pratica dei trapianti prevenendo le reazioni di rigetto. CsA infatti è ben nota per la sua potente azione immunosoppressiva che si esplica mediante la formazione di un complesso ternario con una ciclofilina e la calcineurina (Cn), una Ser/Thr fosfatasi Ca^{2+} /calmodulina dipendente. Cn, attraverso la defosforilazione del fattore nucleare di attivazione delle cellule T, è fortemente coinvolta nelle vie del segnale che attivano la risposta immunitaria. CsA complessa con una ciclofilina e il complesso CsA-Cyp si associa con Cn, inibendone l'attività enzimatica.

Studi di ablazione genica della CypD mostrano un'inibizione della permeabilità mitocondriale. Inoltre il trattamento con la CsA migliora, attraverso l'interazione con CypD e quindi l'inibizione dell'MPTP, le condizioni di diverse patologie legate alla disregolazione mitocondriale in modelli animali. Tutte queste evidenze convalidano l'ipotesi che inibire CypD sia una buona strategia terapeutica.

Il maggior problema inerente all'uso di CsA come inibitore di CypD è la sua azione immunosoppressiva, che ne limita l'impiego in quanto è possibile

somministrarla solo per brevi periodi di tempo. Infatti studi clinici preliminari effettuati su pazienti affetti da distrofia di Ullrich e miopatia di Bethlem hanno dato risultati incoraggianti, ma in poche settimane i pazienti sono diventati immunodepressi e quindi esposti al rischio potenziale di contrarre pericolose infezioni. Un altro problema è che la CsA, nonostante la sua lipofilia, non raggiunge adeguate concentrazioni nel sistema nervoso centrale, in particolare nel cervello, dopo somministrazione sistemica, in quanto non riesce a permeare adeguatamente la barriera emato-encefalica.

Alla luce di queste considerazioni appare chiaro che la CypD sia un bersaglio farmacologico di grande interesse e che l'ottenimento di ligandi privi di attività nei confronti della Cn e in grado di raggiungere concentrazioni elevate nel sistema nervoso centrale, sia una condizione promettente per lo sviluppo di agenti terapeutici in grado di controllare una gran varietà di disturbi o patologie.

Un altro peptide ciclico con struttura riconducibile alla CsA è l'antamanide (Anta). L'Anta è un ciclodecapeptide non tossico isolato dal fungo *Amanita phalloides*. Molte delle ricerche condotte su questa molecola sono state rivolte allo studio della sua attività in relazione alla sua capacità di formare complessi con metalli alcalini e alcalino-terrosi, principalmente Na^+ e Ca^{2+} , che sono poi stati studiati da un punto di vista strutturale e funzionale. Come la CsA e il ciclolinopeptide A, un ciclonoapeptide estratto dai semi di lino, l'Anta possiede una certa attività immunosoppressiva, che risulta però inferiore a quella della CsA.

Lo scopo di questo lavoro è l'ideazione, la sintesi chimica e la caratterizzazione, mediante NMR, delle interazioni atomiche con la proteina, di inibitori peptidici della CypD e più specificatamente dell'Anta e suoi derivati. L'obiettivo è quello di identificare nuovi ligandi che non risultino immunosoppressivi. L'Anta è stata scelta come base di partenza per le caratteristiche comuni alla CsA, per il fatto di avere un'attività biologica intrinseca e per la capacità di chelare ioni Ca^{2+} che giocano, anch'essi, un ruolo importante nella regolazione dell'MPTP.

Per questo motivo abbiamo sintetizzato l'Anta e alcuni suoi derivati in cui i residui di Phe in posizione 6 e 9 sono sostituiti alternativamente da residui di Gly di Tyr. Inoltre abbiamo sintetizzato due ottapeptidi in cui mancano le Phe in posizione 5 e 6 e in posizione 9 la Phe è stata sostituita da Gly e Tyr.

Infine abbiamo ottenuto per espressione in *E. coli* la CypD marcata al ^{15}N , così da poter effettuare esperimenti NMR bidimensionali eteronucleari. Tuttavia, le notevoli difficoltà riscontrate nel refolding della proteina non ci hanno permesso di ottenere le preziose informazioni che questa tecnica poteva offrire. Sui peptidi sono stati effettuati comunque dei saggi biologici in vitro, che hanno dimostrato come l'Anta sia un inibitore del poro di transizione mitocondriale e che questa azione si esplica attraverso l'inibizione della CypD. Inoltre abbiamo dimostrato che protegge dalla depolarizzazione mitocondriale e dalla morte cellulare. Infine possiamo affermare che le Phe 6 e 9 sono fondamentali per l'azione biologica su CypD, poiché tutti i suoi derivati si sono mostrati privi di attività.

Summary

The mitochondrial permeability transition pore (MPTP) plays a key role in the process of mitochondria-mediated cell death (apoptosis). Molecules able to inhibit the MPTP can therefore be potential therapeutic agents useful in treating conditions such as trauma, ischemia/reperfusion injury, Parkinson's and Alzheimer's disease and in general all those conditions in which oxidative stress is involved and leading to apoptosis.

The cyclophilin D (CypD), a peptidyl-prolyl isomerase, is a mitochondrial matrix protein that is closely involved in the open-closed transition regulation of MPTP. The mechanism by which exerts its action is not yet known. There are, however, evidence highlighting its key role in the modulation of mitochondrial permeability. Like other cyclophilin family members, is targeted by cyclosporin A (CsA), a cyclic undecapeptide extracted from the fungus *Tolypocladium inatum*, which has revolutionized the practice of preventing transplant rejection. In fact, CsA is well known for his powerful immunosuppressant that is expressed through the formation of a ternary complex with a cyclophilin and calcineurin (Cn), a Ser/Thr phosphatase, Ca²⁺/calmodulin-dependent. Cn, through the dephosphorylation of nuclear factor of activated T cells, is heavily involved in signal pathways that activate the immune response. CsA interacts with a cyclophilin and the CsA-Cyp complex associates with Cn, inhibiting its enzymatic activity. Gene ablation studies show that CypD desensitizes MPTP. In addition, treatment with CsA improves, through interaction with CypD and then MPTP inhibition, the conditions of various diseases related to mitochondrial dysregulation in animal models. All these findings validate the hypothesis that inhibition of CypD is a good therapeutic strategy.

The major problem in the use of CsA as an inhibitor of CypD is its immunosuppressive action, which limits its use as may be given only for short periods of time. Indeed, preliminary clinical studies performed on patients with Ullrich dystrophy and Bethlem myopathy have yielded encouraging results, but in a few weeks, the patients became immunosuppressed, and then exposed to

the potential risk of contracting dangerous infections. Another problem is that CsA, in spite of its lipophilicity, does not reach adequate concentrations in the central nervous system, particularly in the brain after systemic administration, because it fails to adequately penetrate the blood-brain barrier.

In light of these considerations it is clear that CypD is a drug target of interest and obtaining ligands with no activity against the Cn and can reach high concentrations in the central nervous system, is a condition for the development of promising of therapeutic agents that can control a variety of disorders or diseases.

Antamanide (Anta) is a non-toxic cyclodecapeptide isolated from the fungus *Amanita phalloides*. Much of the research conducted on this molecule have been devoted to the study of his activities in relation to its ability to form complexes with alkali metals and alkaline earth metals, mainly Na^+ and Ca^{2+} , which were then structurally and functionally studied. As CsA and ciclolinopeptide A, a ciclonoapeptide extracted from flax seed, the Anta has some immunosuppressive activity, which is however lower than that of CsA. The purpose of this work is to design, chemical synthesis and characterization, with NMR, atomic interactions with the protein, of peptide inhibitors of CypD and more specifically of the Anta and its derivatives. The objective is to identify new ligands that are not immunosuppressive. The Anta has been chosen as the starting point for the features common to CsA, for the fact of having biological activity and the ability to chelate Ca^{2+} ions that play an important role in the regulation of MPTP. For this reason we synthesized the Anta and some derivatives in which the Phe residue at position 6 and 9 are replaced by either Gly and Tyr residues. We also synthesized two octapeptidies lacking the Phe in position 5 and 6, and the Phe in position 9 has been replaced by Gly and Tyr. Finally we got for expression in *E. coli* the CypD marked with ^{15}N , to perform two-dimensional heteronuclear NMR experiments. However, the great difficulties encountered in the refolding of the protein did not allow us to obtain valuable information that this technique could offer. Peptides were performed on the in vitro biological assays, which have shown as the Anta is an inhibitor of the mitochondrial transition pore and that this action is via

inhibition of CypD. We have also shown that Anta protects from mitochondrial depolarization and cell death. Finally we can say that the Phe 6 and 9 are essential for the biological action on CypD, as all its derivatives have shown no activity.

Elenco delle abbreviazioni

AcOEt	Etile acetato
Anta	Antamanide
Boc	<i>tert</i> -butilossicarbonile
CD	<i>Circular Dicroism</i>
Cn	Calcineurina
CRC	<i>Calcium Retention Capacity</i>
CsA	Ciclosporina A
Cyp	Ciclofilina
DCCI	Dicicloesilcarbodiimmide
DCM	Diclorometano
DMF	N,N-dimetilformammide
ESI-MS	<i>ElectroSpray Ionization Mass Spectroscopy</i>
Et₂O	Etere etilico
HOSu	Idrossisuccinimmide
IBCF	Isobutilcloroformiato
Me	Metile
MeCN	Acetonitrile
MeOH	Metanolo
MPTP	<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
NMM	N-metilmorfolina
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>

RP-HPLC	<i>Reverse phase high performance liquid chromatography</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
tBu	<i>tert-butile</i>
TEA	Trietilamina
TFA	Acido trifluoroacetico
THF	Tetraidrofurano
TLC	<i>Thin Liquid Chromatography</i>
Z	Benzilossicarbonile

Introduzione

1.1 I MITOCONDRI

I mitocondri sono organuli presenti nel citosol di tutte le cellule animali a metabolismo aerobico. Sono costituiti da due membrane: la membrana interna e la membrana esterna; lo spazio fra queste due membrane è detto spazio intermembrana. Lo spazio delimitato dalla membrana interna è detto matrice mitocondriale; la membrana interna si estende nella matrice formando delle pieghe dette creste mitocondriali, dove si concentrano gli enzimi respiratori (Fig. 1).

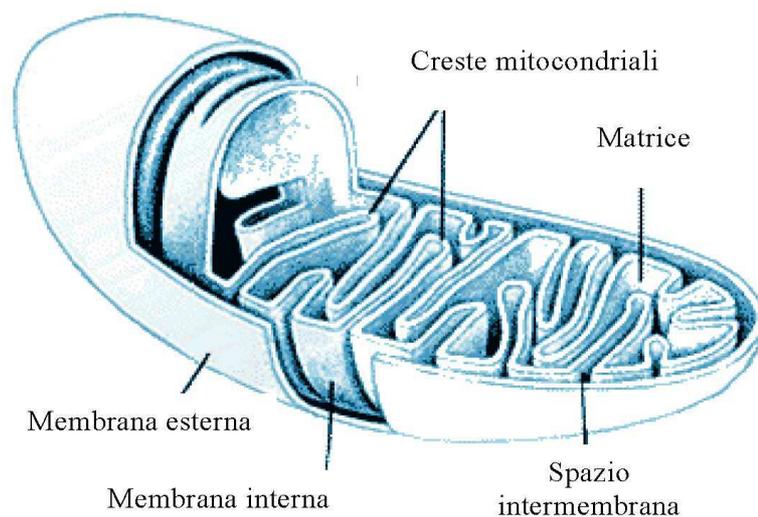


Fig. 1. Struttura di un mitocondrio.

Nella maggior parte delle cellule si presentano come bastoncini del diametro di 0.2-1 μm e possono raggiungere una lunghezza massima di 10 μm . Le due membrane mitocondriali presentano differenti proprietà a causa della loro diversa composizione. La membrana esterna è composta per il 50% da lipidi e per il resto da svariati enzimi dalle molteplici attività tra cui: l'ossidazione dell'adrenalina, l'allungamento degli acidi grassi e la degradazione del triptofano. Essa, inoltre, contiene porine, canali proteici transmembrana che la rendono permeabile e permettono il passaggio di molecole di massa inferiore a

5 kDa. Nella membrana interna risiedono i complessi proteici, muniti di gruppi prostetici comprendenti ioni metallici, che costituiscono la “catena respiratoria”, il cui compito è di trasportare all’ossigeno gli “equivalenti riducenti” generati dall’ossidazione dei substrati. Al progressivo trasferimento degli elettroni da un centro redox della catena all’altro fino alla formazione di O^{2-} (H_2O) è associato un trasferimento netto (“pompaggio”) di protoni dalla “matrice” interna allo spazio intermembrana [1]. Una caratteristica particolare, propria delle membrane batteriche, è la presenza di molecole di cardiolipina (difosfatidil-glicerolo) e l'assenza di colesterolo. La membrana interna, al contrario di quella esterna, è selettivamente permeabile, priva di porine, ma con trasportatori transmembrana altamente selettivi per ogni molecola o ione. A seguito di ciò le due facce della membrana interna vengono chiamate, rispettivamente, versante della matrice e versante citosolico (in quanto viene facilmente raggiunto dalle piccole molecole del citosol cellulare) oppure versante N e versante P in ragione del diverso potenziale di membrana (negativo nel versante citosolico e positivo nello spazio intermembranoso interno). La matrice mitocondriale ha consistenza gelatinosa a causa della concentrazione elevata di proteine idrosolubili (circa 500 mg/ml) tra cui numerosi enzimi, ribosomi e molecole di DNA circolare a doppio filamento. I mitocondri, infatti, possiedono un proprio materiale genetico che viene trascritto e tradotto all'interno del mitocondrio stesso, nella matrice. Le proteine mitocondriali vengono codificate in parte da geni nucleari e in parte da geni del DNA mitocondriale. La presenza di questo materiale genetico all'interno dei mitocondri è una delle evidenze a sostegno della teoria endosimbiotica. Si pensa infatti che i mitocondri, come i cloroplasti nelle piante, derivino da batteri ossidativi fagocitati nella cellula e poi sopravvissuti come simbionti. Funzionalmente, i mitocondri rappresentano la centrale energetica della cellula eucariotica, in quanto al suo interno, mediante ciclo di Krebs e catena di trasporto degli elettroni, viene prodotto l'ATP, la principale molecola trasportatrice di energia della cellula (Fig. 2).

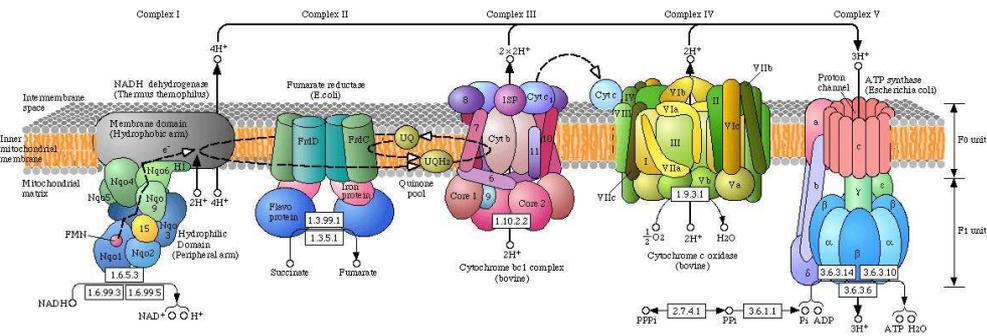


Fig. 2. Catena respiratoria mitocondriale.

Questo processo viene definito fosforilazione ossidativa. Durante la fosforilazione ossidativa può accadere che un solo elettrone vada a ridurre una molecola di O_2 determinando la produzione di un anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), un radicale estremamente reattivo. $O_2^{\cdot-}$ può essere protonato formando così il radicale idroperossido ($HO_2\cdot$) che può reagire, a sua volta, con un altro anione superossido per produrre perossido di idrogeno (H_2O_2) [2].

La sintesi di radicali liberi è anche un processo che, se opportunamente controllato, può essere una valida arma contro determinati microorganismi. Durante l'infiammazione, infatti, i leucociti polimorfonucleati sono soggetti ad una produzione massiva di questi radicali per attivazione dell'enzima NADPH ossidasi. Per difendersi dai potenziali danni dovuti ai radicali liberi la cellula possiede degli specifici sistemi scavenger:

- la catalasi: un enzima che catalizza la reazione di eliminazione del perossido di idrogeno ($2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$),
- il glutathione (GSH) che determina l'eliminazione dei radicali liberi sfruttando il gruppo sulfidrilico nella sua forma ridotta ($H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow GSSG$ (omodimero di glutathione) + $2 H_2O$, $OH\cdot + 2 GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$),
- vari antiossidanti quali l'acido ascorbico e le vitamine A ed E,
- il gruppo delle superossidodismutasi (Fig. 3)..

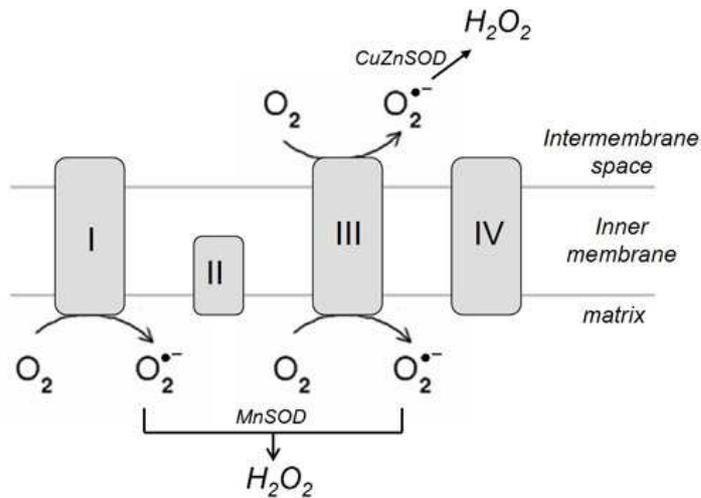


Fig. 3. Gruppo delle superossidodismutasi.

Dunque esiste un equilibrio tra formazione ed eliminazione di specie ossidanti. Quando questo equilibrio si rompe si è nella condizione che viene definita stress ossidativo [3]. Fattori come il fumo di sigaretta, il colesterolo elevato, il diabete e l'ipertensione sono tra le principali cause di questa condizione, ritenuta essere alla base di più di 100 patologie tra le quali le malattie di Parkinson e di Alzheimer. La produzione di radicali è massima se la catena respiratoria viene interrotta completamente, o quasi, usando degli inibitori che impediscono il flusso di elettroni verso la citocromo ossidasi terminale e da questa all'ossigeno. Una situazione di grande rilevanza patofisiologica, e di interesse per questa tesi, si verifica nel caso di anossia o marcata ipossia. In questo caso, mancando il recettore terminale degli elettroni, la catena respiratoria viene ad essere completamente inibita. Se viene reintrodotta l'ossigeno, soprattutto se a bassa concentrazione, come nelle prime fasi della risoluzione di un'ischemia, una parte di questa carica redox della catena verrà smaltita via reazioni secondarie di trasferimento monoelettronico, con una fase di intensa produzione di $O_2^{\bullet-}$ [4].

Anche un aumento dei livelli di Ca^{2+} mitocondriali stimola fortemente, con un meccanismo tuttora ignoto, la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) [5]. Lo scompenso dei livelli di Ca^{2+} citosolico e mitocondriale è una caratteristica di varie patologie, in particolare neurodegenerative e di origine ischemica, e porta all'iperproduzione di ROS mitocondriali. Una super-

produzione cronica di superossido si avrà anche nel caso di un malfunzionamento della catena respiratoria per difetti genetici o danni accumulatisi nel tempo. I mitocondri sono il più importante sito cellulare di produzione di ROS: è stato stimato che fino all'1% del consumo di ossigeno, in condizioni normali, possa portare alla formazione di superossido [6]. A queste ROS mitocondriali viene attribuito un ruolo importante nei processi di invecchiamento, nella necrosi e in patologie degenerative quali ad esempio la malattia di Parkinson.

Le "mitocondriopatie" strettamente intese sono causate da mutazioni in geni che codificano proteine mitocondriali [7,8] o che comunque possono influire sulla funzionalità degli organuli [9]. I mitocondri possono però essere implicati nell'eziologia di una varietà di diverse e gravi patologie anche perché hanno un ruolo fondamentale in processi che portano alla morte della cellula: apoptosi e necrosi [10-12]. Gli effetti di disfunzioni mitocondriali sono una ridotta disponibilità di ATP (importante in cellule che dipendono dalla fosforilazione ossidativa) e una accentuata produzione di ROS [13].

"Apoptosi" usava indicare il processo di morte fisiologica, programmata, durante lo sviluppo (l'esempio classico è l'eliminazione della coda nei girini). Dopo la scoperta delle caratteristiche salienti del suo meccanismo biochimico, negli anni '90, il termine venne applicato spesso anche a processi di morte indotti da farmaci, radiazioni genotossiche ed altri stimoli che mettono in funzione gli stessi meccanismi. Si tratta di un processo ordinato, che richiede una precisa sequenza di eventi ed energia (ATP) per essere portato a termine, in cui la cellula mantiene la sua integrità fino ad uno stadio avanzato, e che nell'organismo culmina nella fagocitosi dei residui cellulari. L'apoptosi e i suoi meccanismi sono uno dei campi più attivi della ricerca biologica di questi anni [14-16]. Un passaggio importante è il rilascio dallo spazio intermembrana dei mitocondri di proteine pro-apoptotiche, fra cui il citocromo c, la proteina solubile che trasporta equivalenti riducenti dal complesso III al complesso IV della catena respiratoria. Giunti nel citoplasma questi fattori determinano, fra l'altro, l'attivazione delle caspasi, proteasi con il compito di distruggere una serie di proteine vitali per la sopravvivenza cellulare.

Per “necrosi” s’intende invece la morte “accidentale”, che deriva da uno scompenso dell’omeostasi metabolica e ionica della cellula e/o dalla perdita dell’integrità fisica della membrana plasmatica e culmina nella frammentazione della cellula con dispersione dei suoi componenti. Da un punto di vista biochimico, i due fenomeni di maggior spicco associati a necrosi sono lo scompenso dell’omeostasi del Ca^{2+} cellulare (che peraltro avviene anche in molti processi apoptotici) e lo stress ossidativo. Nella necrosi entrambi questi fattori convergono ai mitocondri per determinare la “Transizione di Permeabilità Mitocondriale”. Questa causa depolarizzazione dei mitocondri, perdita di fattori mitocondriali, un aumento della produzione di ROS (con conseguente feedback positivo), deplezione di ATP e, se prolungata, morte della cellula. L’aumento di permeabilità è stato proposto come evento chiave nell’apoptosi indotta da una varietà di agenti, ma risultati recenti sembrano piuttosto indicare che porti prevalentemente a necrosi [17-20] e lasciano pochi dubbi che sia un evento fondamentale nel danno tissutale determinato da ischemia/riperfusion [21]. Il coinvolgimento di ROS nella produzione del danno da ischemia/riperfusion è stato chiaramente dimostrato [22,23]. Gli eventi cellulari che hanno luogo nell’ischemia/riperfusion sono precisamente quelli che portano alla permeabilità mitocondriale [24-26].

Durante l’ischemia cardiaca, il flusso di sangue e quindi il rifornimento di ossigeno e glucosio alla zona colpita sono interrotti. La generazione del potenziale transmembrana e la fosforilazione ossidativa sono inibite, e le cellule passano ad un metabolismo glicolitico. La conseguente produzione di acido lattico determina un abbassamento del pH, che interferisce con la glicolisi stessa. Avviene un’idrolisi netta di ATP, con corrispondente aumento dei livelli di Pi. Uno scambiatore Na^+/H^+ della membrana cellulare esporta protoni ed importa Na^+ , che non può venire ri-esportato dalla Na^+/K^+ ATPasi a causa della deplezione di ATP. A causa dell’aumento del Na^+ citosolico, lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ della membrana cellulare, che in condizioni normali esporta Ca^{2+} , ora lo importa, e la concentrazione di Ca^{2+} citosolico aumenta. Il poro di transizione mitocondriale rimane nondimeno chiuso, a causa dell’acidificazione e perchè la depolarizzazione della membrana mitocondriale

interna limita l'accumulo di Ca^{2+} in matrice. Data la mancanza di ossigeno, i centri redox della catena respiratoria diventano completamente ridotti. Alla reintroduzione di O_2 , la riossidazione della catena respiratoria porta alla generazione di ROS, le pompe protoniche della catena riprendono a funzionare determinando la ripolarizzazione della membrana interna, e i mitocondri di conseguenza importano Ca^{2+} . Mano a mano che i valori di pH tornano alla normalità, le condizioni si avvicinano a quelle ideali per l'apertura del poro, la cui induzione è la causa prossimale di morte nella zona periferica dell'area infartuata (mentre le cellule più severamente colpite muoiono, pare, per apoptosi). Eventi simili hanno luogo anche in altri tessuti, fra cui il più importante clinicamente è il cervello.

L'interesse per le malattie di origine mitocondriale e la dimostrazione che i mitocondri hanno un ruolo centrale in molte patologie non genetiche hanno determinato la nascita di un nuovo settore di ricerca, che si propone di individuare strumenti farmacologici che agiscano a livello mitocondriale per bloccare (ad esempio nelle malattie neurodegenerative) o attivare (ad esempio nel cancro) i processi di morte cellulare. Gli approcci e i contesti di questa attività sono molteplici, come le patologie su cui si può sperare di intervenire. Si va da tentativi di terapia genica delle malattie mitocondriali [27], alla chemioterapia antitumorale basata su induttori della permeabilità (spesso composti con attività redox, usati come pro-ossidanti) [28-30] all'uso, viceversa, di inibitori [31-33], di composti anti-ossidanti, di modulatori delle proteine regolatrici dell'apoptosi [34,35] o di composti che ne mimano gli effetti nella terapia anti-neurodegenerativa [36]. Per una "medicina mitocondriale" è importante sviluppare farmaci indirizzati specificamente ai mitocondri (mitocondriotropici) [37,38]. Questo punto è illustrato bene dalla scarsa efficacia della somministrazione di antiossidanti come ad esempio la vitamina E nei confronti di malattie pur sicuramente ad eziogenesi almeno parzialmente ossidativa, come la malattia di Parkinson. La mancanza di un effetto significativo è attribuita a difficoltà di assorbimento dei composti e alla loro diluizione a livelli uniformi in tutto il corpo e nelle cellule [39].

1.2 LE CICLOFILINE

Le ciclofiline (Cyp) sono proteine presenti sia nei procarioti che negli eucarioti; quelle umane sono rappresentate da una famiglia di 26 omologhi. Il loro ruolo biologico non è ancora stato completamente compreso, ma sappiamo di certo che sono coinvolte nell'assemblaggio proteico e nella trasmissione del messaggio cellulare. Le ciclofiline umane hanno recentemente assunto un ruolo promettente come bersagli farmacologici. Per esempio, CypA risulta essere implicata nel ciclo replicativo del virus HIV e CypB in quello dell'epatite C [40,41]. L'interesse, in questo progetto, è rivolto a CypD, una proteina mitocondriale che è parte integrante del sistema che regola il poro di transizione mitocondriale (MPTP), il quale gioca un ruolo fondamentale nel processo di morte cellulare [42].

La permeabilizzazione delle membrane mitocondriali, attraverso la formazione di pori di natura multi-proteica, è frequentemente la conseguenza di stress o danni cellulari che portano alla dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale, al disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, al rigonfiamento dell'organulo e, infine, al rilascio di proteine apoptotiche dallo spazio intermembrana, dando il via a una cascata di eventi che culmina con la morte della cellula [43]. Appare chiaro, quindi, come i componenti del MPTP possano essere degli interessanti bersagli farmacologici per tutte quelle condizioni in cui è implicata la morte cellulare, apoptotica o necrotica, come ad esempio il danno da ischemia/riperfusion, il trauma e le patologie neurodegenerative [44].

CypD, come tutte le altre ciclofiline, è una Peptidil-Protil Isomerasi (PPIase) e funziona quindi da chaperone nel mitocondrio, catalizzando l'isomerizzazione *cis-trans* del legame ammidico che precede un residuo di prolina (Fig. 4) [45].

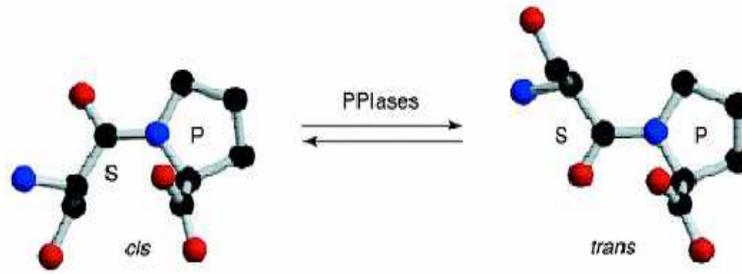


Fig. 4. Isomerizzazione *cis-trans* di un legame peptidil-prolinico

I ribosomi, infatti, sintetizzano catene peptidiche con il legame ammidico in conformazione *trans*, la forma stericamente più favorita. Tuttavia è a volte necessario che questo legame sia in configurazione *cis*, per far sì che le proteine si ripieghino nella giusta maniera.

Tutte le ciclofiline sono geneticamente e strutturalmente conservate sia nei batteri che negli animali (Fig. 5).

Cyp B:	MK VLLAAALIAG SVFFLLLPGP	SAADKKKGP	32			
Cyp C:	MGPG FRLLLPVLC	VULGALVPS	GAGPFREROP	34		
Cyp D:	ML ALRCGRNLQ LLSVPRSVPL	ELFAARACSK	GGDPSSSSS	43		
Cyp E:	MATTKR VLYVGLAHE	VDEKVLHAF	IFPGDITDIQ	36		
	IFLDYSTEKH RGFAPVEPEL	ARDAAAIDN	NHESELFQRT	IRVLAQPMR	86	
	IEEGSSRPVW	SDDDLKRFY	QKLEENKKE	EGSEPFKAT	QSEPIAKKA	136
Cyp40:		MS	HPSPQAKPSH	12		
CypNK:			MGA	3		
	1	11	21	31	41	
Cyp A:	MVNPVYFDI	AVDGEPLGRV	SPRLPADKVP	KTAENFRALS	TGEKQFG	47
Cyp B:	KVTQVYFDL	RIGDEDVGRV	IFGLFGKTVP	KTYDNFVALA	TGEKQFG	79
Cyp C:	SVTAKVYFDV	RIGDEDVGRV	VIGLFGKTVP	KTYENFVALA	TGEKQFG	81
Cyp D:	SGNPLVYLDV	DANGKPLGRV	VLELEADVVP	KTAENFRALC	TGEKQFG	89
Cyp E:	RSNPGVYMDI	RIGNKPFAGRI	QMLLRSDVVP	MTAENFRCLC	TREKQFG	183
Cyp40:	PSNPVYFDV	DIGGERVGRV	VLELFDIIVP	KTAENFRALC	TGEKQIGHTT	62
CypNK:	QDRPQCFDI	SEINREPVGRI	MFQLPFDICP	KTCYNFLCLC	SGEKGLKTT	53
	51	61	71	81	90	
Cyp A:	-----YKG	SCFHRILPGF	MCQGGDFTRH	NGTGGKSIYG	ERFEDENFIL	90
Cyp B:	-----YKN	SKPFRVIKDF	MIQGGDFTRG	DOTGGKSIYG	ERFPDENFKL	122
Cyp C:	-----YKG	SKPFRVIKDF	MIQGGDITTG	DOTGGVSIYG	ETFPDENFKL	124
Cyp D:	-----YKG	SIPFRVIPSF	MCQAGDFTRH	NGTGGKSIYG	SRFPDENFTL	132
Cyp E:	-----FKG	SEFHRILPGF	MCQGGDFTRH	NGTGGKSIYG	ERFPDENFIL	226
Cyp40:	GKPLHFKG	CFPFRILKDF	MIQGGDFSMQ	NGTGGKSIYG	ERFPDENFHY	110
CypNK:	GKPLCYKG	SIPFRVIVHF	MIQGGDFSRG	NGKGGKSIYG	GYPKDENFIL	101
	81	101	111	121	131	140
Cyp A:	KHTPGILSM	ANAGPNTNGS	QFFICTAKTE	WLDGKHVVFG	KVKEGMNIVE	140
Cyp B:	KHYPGWVEM	ANAGKDTNGS	QFFITTKTA	WLDGKHVVFG	KVLEGEVVR	172
Cyp C:	KHYGIGVEM	ANAGPDTNGS	QFFITLTKPT	WLDGKHVVFG	KVIDGMVVE	174
Cyp D:	KHYGPGVLSM	ANAGPNTNGS	QFFICTIKTD	WLDGKHVVFG	KVKEGMNIVE	182
Cyp E:	KHTPGILSM	ANSGPNTNGS	QFFLTCDKTD	WLDGKHVVFG	EVTEGLDVLK	276
Cyp40:	KHDRKGLLSM	ANAGPNTNGS	QFFITVTFP	HLDGKHVVFG	QVIEGIGVAR	160
CypNK:	KHDRAPLLSM	ANRGRNTNGS	QFFITTKPAP	HLDGKHVVFG	LVISGFEVIE	151
	141	151	161	171	181	
Cyp A:	AMERFGSRNG	KTSKKITLAD	CGQLL			165
Cyp B:	KVEBTKTDSR	DEPLKDVIIA	DCGRIVEKRP	FAIARR		208
Cyp C:	SIELQATDGH	DRPLTNCSSII	NSGKIDVETP	FVVELADW		212
Cyp D:	KIESFGSKSG	KYSKKIVITD	CGQLL			287
Cyp E:	QIEAQGSKDG	KPKQKVIAD	CGEVV			301
Cyp40:	ILENVVKGR	KPAKLCVIAE	CGHLEGGDGG	GIFPKDGGSD	SNPDPFEDAD	210
CypNK:	QIENLKTDAE	SRPYADVRFI	DCQVLATKS-			180

Fig. 5. Allineamento di sequenza delle maggiori ciclofiline umane.

Presentano un dominio comune costituito da 109 residui amminoacidi definito Cyclophilin-Like Domain (CLD), che si sviluppa in 8 β -strands antiparalleli formanti un β -barrel. Questo è poi circondato da domini (eliche e loops), unici per ogni tipo di ciclofilina, che sono associati alla compartimentazione cellulare e alla specializzazione funzionale [46].

Le ciclofiline sono il principale bersaglio del farmaco immunosoppressore Ciclosporina A (CsA), un undecapeptide ciclico estratto dal fungo *Tolypocladium inatum*, che ha rivoluzionato la pratica dei trapianti prevenendo le reazioni di rigetto (Fig. 6).

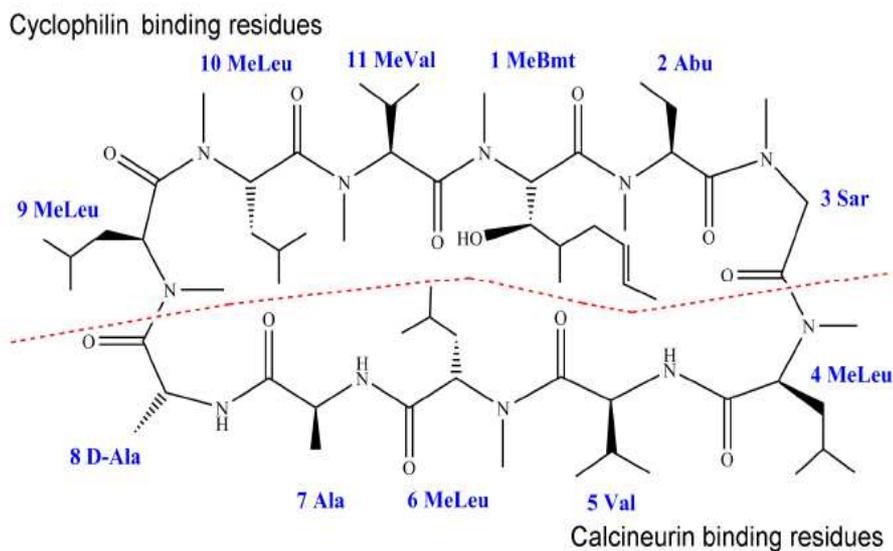


Fig. 6. Struttura della ciclosporina A

CsA presenta due siti di binding, uno per le Cyp e uno per la Calcineurina (Cn), una Ser/Thr fosfatasi Ca^{2+} /calmodulina dipendente. Cn, attraverso la defosforilazione del fattore nucleare di attivazione delle cellule T, gioca un ruolo importante nelle vie del segnale che attivano la risposta immunitaria. CsA complessa con una ciclofilina e il complesso CsA-Cyp si associa con Cn, inibendone l'attività enzimatica [47].

CypD è una proteina solubile codificata dal nucleo. Viene biosintetizzata con una sequenza che la indirizza al mitocondrio e che viene poi scissa nella matrice mitocondriale, in uno di due punti, portando ad ottenere proteine mature di rispettivamente 17.6 kDa come prodotto minoritario e 18.6 kDa

come prodotto prevalente. L'omologia con altre ciclofiline è elevata: 75% con CypA, 61% con CypB e 58% con CypC.

I residui altamente conservati sono distribuiti attraverso la superficie proteica e tutti quelli interagenti con CsA sono conservati in tutte le specie. Il folding di CypD è essenzialmente identico a quello delle altre ciclofiline, come confermato dalle strutture cristallografiche della proteina in assenza o in presenza di CsA (Fig. 7) [48,49].

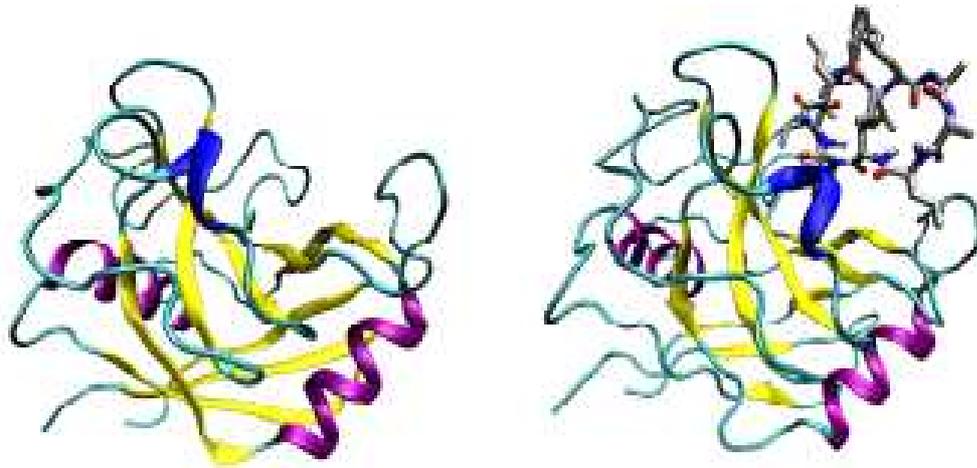


Fig. 7. Struttura della CypD in assenza e in presenza di ciclosporina A (File pdb 2BIT e 2Z6W).

1.3 IL PORO DI TRANSIZIONE MITOCONDRIALE (MPTP)

L'MPTP può essere visto come un canale composto, o regolato, da molecole di diversi compartimenti mitocondriali. Il diametro del poro è di circa 3 nm. La sua transizione aperto-chiuso è altamente e finemente regolata da svariati effettori e in differenti siti. Può rimanere chiuso a lungo, probabilmente per regolare l'omeostasi del Ca^{2+} , oppure rimanere aperto per lungo tempo, situazione che compromette la vita della cellula. Una volta aperto, le componenti non proteiche della matrice e dello spazio intermembrana, come H^+ , ATP e nucleotidi pirimidinici, si riequilibrano attraverso la membrana interna causando depolarizzazione mitocondriale e deplezione di importanti substrati. Inoltre l'apertura del poro causa il rigonfiamento della matrice, con spiegamento delle creste ed infine rottura della membrana esterna. Una volta

rotta la membrana esterna, quella interna rilascia proteine apoptotiche, incluso il citocromo C, dando il via al processo di morte cellulare [50]. L'apertura del poro è modulata dal pH della matrice e dal potenziale mitocondriale. Essa è favorita dalla presenza nella matrice di Ca^{2+} , fosfato inorganico (Pi), acidi grassi, come ad esempio l'acido arachidonico [51], basi pirimidiniche ossidate, perossidi, ROS, NOS, e tossine [52,53]. L'apertura è, invece, inibita da Mg^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ubichinone 0 (Ub0), nucleotidi adeninici e pH elevato [54]. Infine, l'apertura è favorita dalla depolarizzazione mitocondriale: aumentando il potenziale di soglia gli induttori possono favorire l'apertura, mentre portandolo a valori più negativi gli inibitori possono diminuire la probabilità di attivazione del MPTP [55].

La composizione molecolare del MPTP non è ancora ben conosciuta. Una delle ipotesi più apprezzate è che esso sia costituito da tre componenti:

- **VDAC**: Voltage-Dependent Anion Channel, situato nella membrana esterna;
- **ANT**: Adenine Nucleotide Translocator, situato nella membrana interna;
- **CypD**: Cyclophilin D, situata nella matrice.

In questo modello, CypD è in grado di legare ANT o il complesso ANT-VDAC e l'unione di queste tre componenti porta all'apertura del MPTP (Fig. 8) [56].

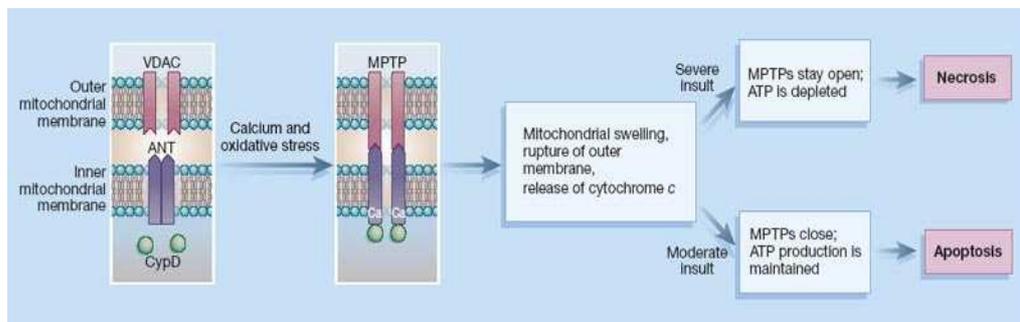


Fig. 8. Rappresentazione schematica del MPTP.

Più recentemente, grazie a studi condotti su cellule sottoposte ad ablazione genica, si è potuto constatare che nessuna di queste proteine è indispensabile

per l'assemblaggio del MPTP, poiché si poteva osservare permeabilità nonostante la loro mancanza. Inoltre, mitocondri isolati da cellule di *Artemia franciscana*, un gamberetto, non mostrano permeabilità, pur presentando VDAC, ANT e CypD [57].

Un secondo modello prevede che CypD, e altre proteine chaperon-like, sopprimano la conduttanza nel canale formatosi in seguito a misfolding e aggregazione di proteine di membrana, attraverso un legame con esse che permette la chiusura del condotto. Un aumento della concentrazione di Ca^{2+} nella matrice perturba il complesso tra chaperoni e proteine canale aprendo così il poro (Fig. 9) [58].

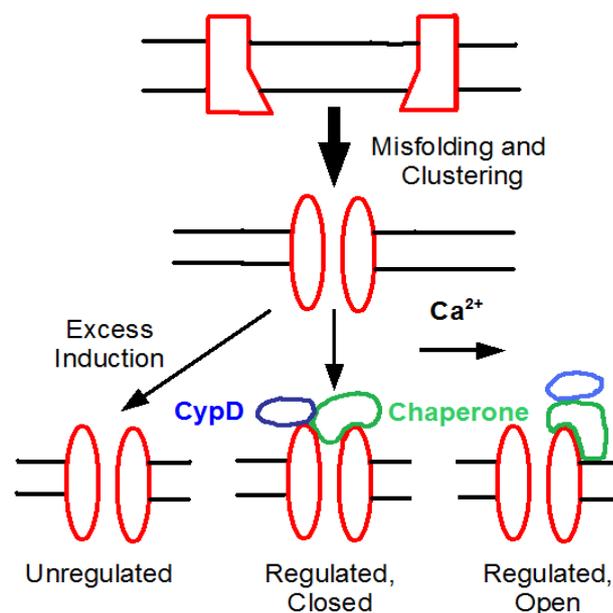


Fig. 9. Secondo modello del MPTP.

Queste proteine che interagiscono con il poro giocano un ruolo molto importante nella sua regolazione, tuttavia non possono essere considerate dei veri e propri costituenti di esso. Tra le più importanti troviamo le proteine anti e pro-apoptotiche della famiglia Bcl-2 [59], situate sulla membrana esterna, la creatin-chinasi (CK) mitocondriale, le esochinasi (HK) associate al mitocondrio sulla membrana esterna [60] e ancora il recettore periferico delle benzodiazepine (PBR) sempre sulla membrana esterna. A livello della matrice, invece, troviamo la ciclofilina D. CypD, dunque, è essenziale per la

regolazione del MPTP, ma non ne è un componente. Infatti, in topi CypD-knock-out il poro risulta desensibilizzato al Ca^{2+} , ma può ancora essere aperto. I topi CypD-deficienti sopravvivono, non presentano un fenotipo particolare e si sviluppano normalmente, con un cervello e un sistema cerebrovascolare apparentemente normale. Mostrano, però, obesità e modificazioni del comportamento in età adulta, con alti livelli di ansia ed emotività [61]. CypD non è essenziale per la morte cellulare mediata dal mitocondrio; in particolare, non è richiesta per i processi apoptotici essenziali nell'embriogenesi e nella sopravvivenza del topo adulto. Tuttavia può giocare un ruolo cruciale nella risposta a stress cellulari. Inaspettatamente, studi di sovraespressione hanno dimostrato che CypD protegge dall'apoptosi invece che innescarla [62,63]. La complessità del ruolo di CypD è inoltre sottolineata dalle recenti scoperte inerenti agli effetti età-dipendenti legati all'inibizione del MPTP [64]. Nonostante il fatto che le proteine bersaglio di CypD non siano ancora state ben definite, la scoperta che il MPTP è inibito dalla CsA o dall'ablazione genica di CypD, ha suggerito che CypD possa essere un potenziale bersaglio farmacologico per il trattamento di disturbi dovuti alla disregolazione del MPTP. Il trattamento con CsA, o con derivati non immunosoppressori, migliora, attraverso l'inibizione del MPTP, la distrofia muscolare congenita di Ullrich (collagene VI), normalizza la funzione mitocondriale e l'apoptosi e, sorprendentemente, favorisce la rigenerazione muscolare nei pazienti affetti da miopatie correlate al collagene VI (distrofia di Ullrich e miopatia di Bethlem) [65-67]; questo fenomeno è strettamente legato all'età. Inoltre l'ablazione genica di CypD protegge il topo dal danno cardiaco indotto dall'ischemia/riperfusion, una tipica causa di deplezione di ATP, aumento di Ca^{2+} e produzione di ROS [68]. Protegge il topo dall'ischemia cerebrale [69], aiuta il recupero in modelli animali di distrofia muscolare [70,71], di encefalomielite autoimmune [72] e della malattia di Alzheimer [73]. Tutte queste evidenze convalidano l'ipotesi che inibire CypD sia una buona strategia terapeutica. Il maggior problema inerente all'uso di CsA come inibitore di CypD è la sua azione immunosoppressiva, che ne limita l'impiego in quanto è possibile somministrarla solo per brevi periodi di tempo. Studi clinici

preliminari effettuati su pazienti affetti da distrofia di Ullrich e miopatia di Bethlem hanno dato risultati incoraggianti, ma in poche settimane i pazienti sono diventati immunodepressi e quindi esposti al rischio potenziale di contrarre pericolose infezioni. Di conseguenza, è diventato molto importante sviluppare analoghi di CsA privi della capacità di interagire con la Calcineurina e, quindi, di inibire la risposta immunitaria [74]. Un altro problema è che la CsA, nonostante la sua lipofilia, non raggiunge adeguate concentrazioni nel sistema nervoso centrale, in particolare nel cervello, dopo somministrazione sistemica, in quanto non riesce a permeare adeguatamente la barriera emato-encefalica. Un approccio diretto per investigare le funzioni biologiche di CypD e il suo modo di regolare il MPTP è stato quello di analizzare i suoi partner cellulari. Al momento è stato dimostrato che CypD interagisce con le seguenti molecole:

1. ANT: tradizionalmente si pensava che CypD interagisse con ANT con un meccanismo CsA-dipendente che rilascia CsA dal complesso. L'identità di questo partner è stata ampiamente discussa. Comunque CypD forma con ANT un immunocomplesso che precipita [75].
2. Trasportatore del fosfato: è stato identificato un immunoprecipitato tra CypD e il carrier del fosfato mitocondriale. Visto che anche ANT interagisce con questa proteina, è stato proposto che il MPTP sia attivato dal reclutamento Ca^{2+} -dipendente di CypD ad opera del trasportatore del fosfato, il quale è anche sensibile ai ligandi di ANT. A supporto di questo modello vi è il fatto che inibitori del MPTP, come Ub0, Ro 68-3400 e NEM, sono anche inibitori del carrier del fosfato, ma non sono disponibili studi genetici approfonditi.
3. Complesso F_1F_0 -ATPasi: CypD si associa al complesso e ne inibisce l'attività, mentre, in presenza di CsA, CypD si stacca dalla membrana interna e l'idrolisi di ATP aumenta, come avviene nei mitocondri di cellule CypD knock-out.
4. Bcl-2: è stato identificato anche un immunoprecipitato di CypD con proteine della famiglia Bcl-2, proteine localizzate di norma sulla

membrana mitocondriale esterna. Questo risultato inaspettato può essere spiegato assumendo che una parte di queste proteine risieda sulla membrana interna, oppure che l'interazione tra Bcl-2 e CypD avvenga in siti di contatto tra la membrana interna e quella esterna, dove CypD potrebbe esercitare un'azione anti-apoptotica in collaborazione con Bcl-2, inibendo il rilascio di citocromo C [76].

5. TRAP 1 (TNF Receptor-Associated Protein 1): TRAP 1 è uno chaperone mitocondriale della famiglia di Hsp90. TRAP 1 è stato identificato come una proteina associata al recettore del TNF (Tumor Necrosis Factor) [77]. Mostra un comportamento anti-apoptotico in molte condizioni; infatti una sua inibizione favorisce il processo di morte cellulare. Viene fosforilata da PINK1, una Ser/Thr-chinasi mitocondriale le cui mutazioni sono responsabili di una forma recessiva autosomiale di malattia di Parkinson. La fosforilazione di TRAP1 protegge contro gli stress ossidativi [78]. TRAP1 sembra essere coinvolto in interazioni con Hsp90 e CypD che antagonizzano l'effetto di CypD sul MPTP [79].

1.4 ANTAMANIDE

L'antamanide (ANTA) è un ciclodecapeptide non tossico c(Val-Pro-Pro-Ala-Phe-Phe-Pro-Pro-Phe-Phe), isolato nel 1968 dal fungo *Amanita phalloides* (Fig. 10) [80].

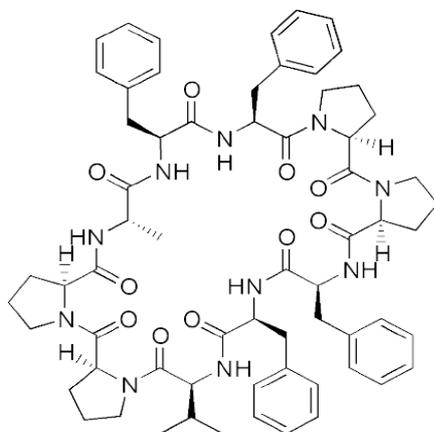


Fig. 10. Struttura dell'Antamanide.

Una ben nota funzione dell'Antamanide è quella di essere un antidoto per le intossicazioni dello stesso fungo da cui si estrae, prevenendo l'accumulo delle fallotossine nelle cellule. Molte delle ricerche condotte su questa molecola sono rivolte allo studio della sua attività in relazione alla sua capacità di formare complessi con metalli alcalini e alcalino-terrosi, principalmente Na^+ e Ca^{2+} [81], che sono poi stati studiati da un punto di vista strutturale [82-84] e funzionale [85,86]. L'Antamanide infatti, come dimostrato da analisi effettuate con spettrometria di massa, dicroismo circolare, IR e altre tecniche, in solventi non polari mostra la capacità di formare complessi altamente stabili con cationi metallici. Al contrario, in ambiente acquoso non vi è evidenza di queste interazioni. Come la CsA e il ciclolinopeptide A, un ciclonapeptide estratto dai semi di lino con struttura simile a quella di ANTA e CsA, l'Antamanide possiede una forte attività immunosoppressiva [87]. Il trattamento con Antamanide si è rivelato efficace nell'infiammazione polmonare, nell'edema renale e cardiaco e riduce la concentrazione plasmatica del trombossano B2. Infine presenta anche un'azione antiproliferativa su linee cellulari F 10 metastasiche, inibendone la crescita [88].

Scopo

La CypD è un bersaglio farmacologico di grande interesse. L'ottenimento di ligandi privi di attività nei confronti della Cn e in grado di raggiungere concentrazioni elevate nel sistema nervoso centrale, diventa dunque una condizione promettente per lo sviluppo di agenti terapeutici in grado di controllare una gran varietà di disturbi o patologie. La CsA si è rivelata essere un valido inibitore della CypD, ma la sua potente azione immunosoppressiva ne limita l'impiego, in quanto è possibile somministrarla solo per brevi periodi di tempo. Recentemente è stato sviluppato un analogo della CsA, l'Alizporivir, conosciuto anche come Debio 025, la cui struttura è strettamente connessa a quella della CsA, le cui lievi modifiche fanno sì che non interagisca con la Cn. Il Debio 025 infatti non manifesta attività immunosoppressiva (Fig. 11).

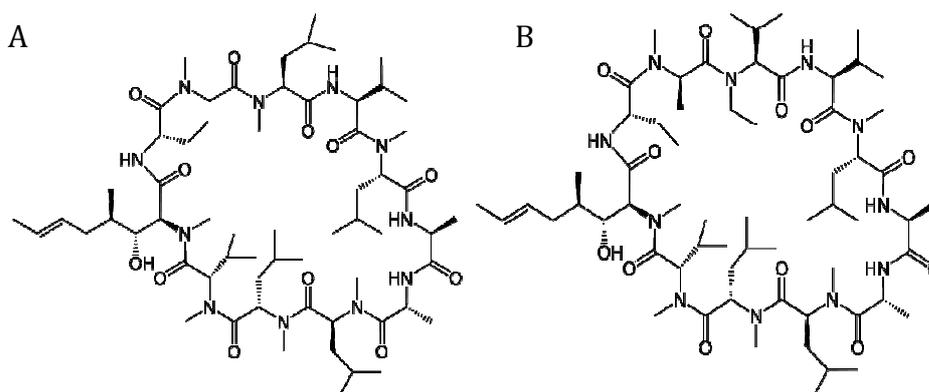


Fig. 11. CsA (A) e Debio 025 (B)

Anche l'Anta è riconducibile strutturalmente alla CsA e come essa manifesta attività immunosoppressiva, seppur molto più blanda. Presenta una certa attività biologica intrinseca e ha la capacità di formare complessi con gli ioni Ca^{2+} , i quali a livello mitocondriale giocano un ruolo importante nella regolazione dell'MPTP. In virtù di queste sue caratteristiche è stata scelta, in questo lavoro, come punto di partenza per lo sviluppo di nuove molecole che,

attraverso l'interazione con la CypD, siano in grado di inibire l'MPTP senza manifestare attività immunosoppressiva.

L'obiettivo generale di questo lavoro, dunque, è stato di utilizzare l'NMR per identificare nuovi inibitori della CypD a ridotta attività immunosoppressiva. Le due molecole di partenza, come detto, sono il Debio 25 e l'Antamanide, il primo ottenuto dal produttore ed il secondo per sintesi chimica.

Per effettuare un design razionale di nuove molecole è stato necessario ottenere, tramite espressione proteica in *E. coli*, la CypD marcata ¹⁵N in modo da poter effettuare esperimenti NMR e ricavare importanti informazioni circa le interazioni a livello atomico tra la proteina e le due molecole "lead": attraverso esperimenti HSQC le informazioni riguardanti il sito di legame sulla proteina e mediante misure di altro genere identificare i residui coinvolti nel peptide. Tutto ciò con lo scopo di sviluppare e sintetizzare derivati dell'Anta e del Debio 25 che risultino più affini alla proteina e che, possibilmente, non manifestino affinità per la Cn.

Materiali e Metodi

3.1 SINTESI DEI PEPTIDI

Fin dall'isolamento dell'Antamanide sono stati sintetizzati suoi analoghi in gran numero per indagare i dettagli strutturali necessari perché questo peptide ciclico manifesti la sua azione biologica. Il primo approccio fu quello di sostituire singoli amminoacidi con altri. Ci si rese conto del fatto che la natura lipofila della catena laterale del residuo 1, Val nell'Anta, era molto importante e che il residuo in posizione 4 poteva non essere presente, mantenendo comunque l'attività. Inoltre un gran numero di derivati attivi sono stati ottenuti sostituendo residui di Phe con Tyr [89].

Noi abbiamo sintetizzato l'Antamanide e i corrispondenti derivati in cui i residui di Phe in posizione 6 e 9 sono sostituiti alternativamente da residui di Gly di Tyr. Inoltre abbiamo sintetizzato due ottapeptidi in cui mancano le Phe in posizione 5 e 6 e in posizione 9 la Phe è stata sostituita da Gly e Tyr (Fig 12).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anta	V	P	P	A	F	F	P	P	F	F
Gly 6	V	P	P	A	F	G	P	P	F	F
Gly 9	V	P	P	A	F	F	P	P	G	F
Tyr 6	V	P	P	A	F	Y	P	P	F	F
Tyr 9	V	P	P	A	F	F	P	P	Y	F
Otta-Gly 9	V	P	P	A	-	-	P	P	G	F
Otta-Tyr 9	V	P	P	A	-	-	P	P	Y	F

Fig. 12. Sequenze dei derivati sintetizzati.

La sintesi di un peptide ciclico presenta due punti critici: la scelta del metodo di ciclizzazione finale e la scelta del residuo attivato in posizione C-terminale. La sintesi dell'Antamanide può essere effettuata mediante ciclizzazione di 10 differenti isomeri lineari decapeptidici. Abbiamo optato per il metodo via azide

e abbiamo deciso di condensare i residui 4 e 5, ossia l'Ala C-terminale e la Phe N-terminale (Pro nel caso dell'ottapeptide). L'Ala è stata scelta per la sua scarsa tendenza a dare racemizzazione [90], nonostante siano presenti quattro residui di Pro. Infatti, anche se l'integrità ottica della Pro rimane inalterata nella maggior parte delle condizioni usuali della sintesi peptidica, la possibilità di reazioni secondarie durante l'attivazione del residuo di Pro per ottenere legami Pro-Pro o Pro-Phe non è da sottovalutare [91-93].

Per ottenere i derivati decapeptidici idrazidici lineari sono state seguite due vie sintetiche, entrambe basate sulla preparazione di tre frammenti e sul loro seguente assemblaggio sempre via azide: sequenza 1-4, contenente *ab initio* il gruppo *tert*-butilossicarbonile (Boc) sull'N libero del residuo idrazidico Ala 4, sequenza 5-6 e sequenza 7-10. La porzione idrazidica può essere introdotta *ab initio* ed essere selettivamente protetta durante la sintesi usando solo due gruppi protettori, in quanto le catene laterali dei residui che compongono la molecola sono prive di gruppi funzionali. Grazie all'espedito della condensazione dei frammenti, usando lo stesso gruppo protettore (Boc) per l'N-terminale e l'idrazide C-terminale e un gruppo selettivamente rimovibile per la protezione temporanea della funzione α -amminica, è stato possibile ottenere il decapeptide lineare con le funzioni N-terminale e idrazide C-terminale libere simultaneamente.

Il frammento 1-4 è stato preparato mediante la procedura delle anidridi miste modificata da Anderson [94], partendo da H-Ala-NHNH-Boc in posizione 4. Vista la presenza di questo gruppo protettore acido-labile per la funzione α -amminica è stato usato il benzilossicarbonile (Z). Questo metodo è stato utilizzato anche per la formazione dei legami X-Pro. Si sono ottenute buone rese in questi passaggi fissando il pH a 8.5.

La Val in posizione 1 è stata condensata al tripeptide H-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc sia come anidride mista che come Z-Val-OSu; con questo ultimo metodo si è ottenuta una resa maggiore (81% contro 54%). Il frammento 7-10 è stato ottenuto partendo dal dipeptide Boc-Phe-Phe-OMe (9-10), corrispondente anche al frammento 5-6. Dopo deprotezione con acido dell'N- α -amminico, il dipeptide è stato condensato due volte con Z-Pro-OH via anidride mista fino ad

ottenere Z-Pro-Pro-Phe-Phe-OMe (7-10). Una frazione di tetrapeptide è stata N-deprotetta mediante idrogenolisi e condensata via azide con Boc-Phe-Phe-NHNH₂ ottenendo mediante trattamento con idrazina idrata del corrispondente metil estere (5-6). È stato ottenuto dunque l'esapeptide metil estere Boc-Phe-Phe-Pro-Pro-Phe-Phe-OMe (5-10) che per reazione con idrazina idrata è stato convertito in idrazide e successivamente in azide mediante il metodo di Rudinger [95], pronto per reagire con il residuo α -amminico del segmento 1-4. La rimanente porzione del frammento 7-10 è stata convertita in idrazide mediante idrazinolisi e dopo conversione ad azide è stata condensata al frammento 1-4 per ottenere l'ottapeptide.

La reazione di ciclizzazione richiede la presenza di due gruppi reattivi all'interno della stessa molecola che possono tra loro reagire intramolecolarmente per dare il composto ciclico voluto. Questi gruppi però possono reagire anche intermolecolarmente, dando dimeri o polimeri. Queste reazioni secondarie possono sostanzialmente essere prevenute applicando il principio della diluizione. In una soluzione diluita la quota di reazioni bimolecolari è ridotta, mentre quella della ciclizzazione, unimolecolare, rimane inalterata [96]. Generalmente la ciclizzazione viene condotta a una concentrazione che non supera l'1 mM. Comunque anche la separazione dello step di attivazione da quello di condensazione consente un miglior controllo e aumenta le rese. La procedura di formazione dell'azide di Rudinger avviene in condizioni acide e di conseguenza il coupling non può avvenire fino a che non viene aggiunta una base per deprotonare i gruppi amminici α . Dunque è possibile separare i due step di attivazione e di ciclizzazione. La procedura generica utilizzata è la seguente: l'idrazide è trasformata in azide con *tert*-butilnitrito in DMF in presenza di HCl alla concentrazione di circa 50 mM. L'azide con l' N - α -amminico ancora protonato viene diluita a circa 1 mM prima di essere neutralizzata con 5 equivalenti di K₂HPO₄.

Per evitare le reazioni secondarie sopracitate inerenti alla Pro durante la procedura delle anidridi miste, è stata seguita una via alternativa nella sintesi dei derivati con Gly o Tyr in posizione 6 o 9. Il dipeptide Z-Pro-Pro-OH è stato sintetizzato mediante il metodo di Wünsch con DCCI [97]. Il dipeptide è stato

poi condensato a H-Ala-NHNH-Boc (4) e H-Phe-Phe-OMe (10) sempre con lo stesso metodo.

A titolo di esempio è qui riportato lo schema di sintesi dell'Antamanide (Fig. 13).

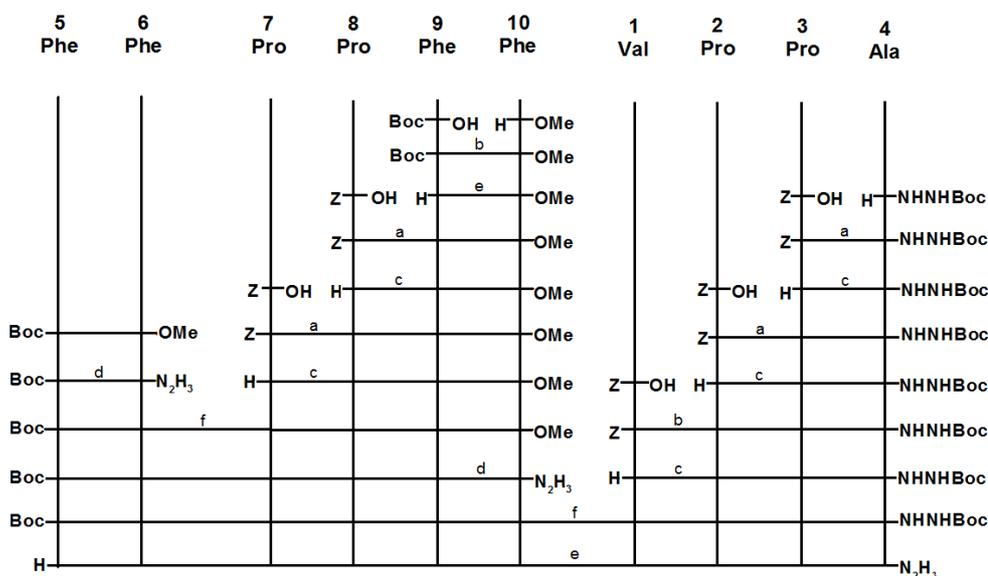


Fig. 13. Schema di sintesi dell'Antamanide.

- isobutilcloroformiato/NMM in THF a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$; 10 min a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$; 30 min a T ambiente.
- HOSu in THF a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. 24 h a T ambiente.
- H_2/PdC in MeOH.
- idrazina idrata in MeOH per 6 giorni.
- 90% TFA/10% anisolo per 90 min.
- tert*-butilnitrito/HCl in diossano in DMF a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poi raffreddamento a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. TEA/HOSu. 6 giorni a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1 giorno a T ambiente.

Le principali procedure sintetiche utilizzate sono le seguenti:

- Anidridi miste: alla soluzione del componente carbossilico (1 equivalente) in THF anidro raffreddato a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ si aggiungono isobutilcloroformiato (1 equivalente) e NMM (1 equivalente). Dopo 2 min viene aggiunta la soluzione pre-raffreddata del componente

amminico neutralizzato con TEA se protonato. La reazione è condotta per 10 min a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min a T ambiente e poi viene evaporata a olio che viene ripartito tra AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata consecutivamente con KHSO_4 al 2%, Na_2CO_3 0.5 M, acqua e infine viene anidrificata con Na_2SO_4 . La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con etere di petrolio.

2. Wünsch: a una soluzione di componente amminico e carbossilico insieme (1:1) sciolti in MeCN anidro a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ viene aggiunta DCCI (1 equivalente). La reazione decorre per 2 h a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1 giorno a T ambiente. Dopodiché viene concentrata e lavorata come nel caso del metodo delle anidridi miste.
3. Rudinger: l'idrazide (1 equivalente) sciolta in DMF anidra raffreddata a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ viene trattata con 4 equivalenti di HCl in diossano e 1.1 equivalenti di *tert*-butilnitrito. Dopo la formazione dell'azide, controllata tramite saggio apposito, la soluzione è raffreddata a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, neutralizzata con 4 equivalenti di TEA e combinata con la soluzione preraffreddata del componente amminico contenente 1 equivalente di TEA se protonato. Il pH viene aggiustato a 7.5-8 con TEA e viene aggiunto 1 equivalente di HOSu come catalizzatore. La reazione decorre 6 giorni a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1 giorno a T ambiente e poi viene lavorata come detto sopra.
4. Ciclizzazione: il peptide sciolto in DMF è trasformato in azide con *tert*-butilnitrito come sopra. La soluzione acida è raffreddata a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e diluita alla concentrazione di 1 mM con DMF preraffreddata anidra tenuta in atmosfera di azoto. Si aggiungono 5 equivalenti di K_2HPO_4 e 1 equivalente di HOSu come catalizzatore. La reazione procede 6 giorni a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in atmosfera di azoto. Poi il solvente viene evaporato e il peptide è precipitato con una soluzione al 10% di AcOH.
5. Idrazinolisi: il peptide N-protetto metil estere viene sciolto in MeOH e trattato con 20 equivalenti di idrazina idrata a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con acqua. Si

filtra e il filtrato viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato con MeOH/Et₂O.

6. Idrogenolisi: l'idrogenazione è effettuata in MeOH a T ambiente e P atmosferica in presenza di carbone palladiato (10%). Si porta il pH a 5 con HCl in MeOH per favorire la reazione. Il catalizzatore è eliminato per filtrazione e il filtrato viene concentrato e precipitato con Et₂O.
7. TFA: il Boc viene rimosso per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 60-90 min. Il peptide è precipitato con Et₂O.

La purificazione dei prodotti è stata effettuata mediante RP-HPLC preparativa, utilizzando uno strumento Shimadzu (Kyoto, Japan) costituito da due pompe LC-8A, da un controller SCL-8A e da un rivelatore spettrofotometrico SPD-6A con una colonna Phenomenex Jupiter C18, 10 µm, 300 Å, 250 x 22 mm. Gli eluenti (H₂O, CH₃CN) sono stati deareati con degasatore ERMA modello ERC-3562. La caratterizzazione tramite HPLC analitica è stata effettuata utilizzando un apparecchio Shimadzu costituito da pompe LC-10AD, controller SCL-10A, rivelatore SPD-10A e degasatore Gastorr 154, con una colonna Phenomenex Jupiter C18, 10 µm, 300 Å, 250 x 4.6 mm. I dati sono stati acquisiti tramite il software Starlet ChromStar Bruker (Bremen, Germany). L'eluizione è stata condotta utilizzando una miscela CH₃CN/H₂O in percentuali variabili in presenza di 0.05% TFA. Le condizioni di eluizione sono riportate nella descrizione della sintesi. L'analisi tramite spettrometria di massa ESI-MS è stata condotta con uno spettrometro PerSeptive Biosystem (Framingham, MA, USA). La taratura è stata effettuata usando uno standard esterno costituito da una soluzione 1 pmol/µl dei seguenti tre peptidi: angiotensina I, bradichinina e neurotensina, in 1:1 v/v H₂O/acetonitrile in presenza di 1% di HCOOH. I campioni sono stati preparati sciogliendo quantità ponderate dei composti da analizzare in appropriate soluzioni.

3.2 ESPRESSIONE DI PROTEINE

Lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante e gli avanzamenti nelle tecniche riguardanti l'ingegneria genetica hanno reso possibile la produzione, in tempi brevi, di grandi quantità di proteine attraverso sistemi di espressione in colture cellulari utilizzando come cellule ospiti, sia cellule procariotiche (di solito *E. coli*), che eucariotiche (cellule isolate da mammiferi, funghi, lievito). Il modo più diretto per ottenere una proteina è permettere al cDNA (*complementary DNA*), sintetizzato tramite trascrittasi inversa da uno stampo di mRNA maturo, di dirigerne la sintesi nella cellula ospite. Tale metodologia è particolarmente utile qualora si utilizzino come cellule ospiti dei batteri in quanto questi non sono in grado di processare l'RNA immaturo [98]. Un altro vantaggio dell'utilizzo di cDNA è la ridotta dimensione della sequenza genica inserita in quanto vengono eliminate le lunghe sequenze introniche che rappresentano la maggior parte della sequenza trascritta [99].

Come vettori di espressione sono utilizzati plasmidi o virus [100] in cui vengono inserite le sequenze geniche codificanti per la proteina d'interesse. In commercio è disponibile una grande varietà di vettori di espressione ciascuno ingegnerizzato in funzione del tipo di cellule ospiti.

Un vettore plasmidico è una molecola di DNA circolare, a doppia elica, costruita artificialmente. È un elemento genico extracromosomico, capace di replicarsi autonomamente in un organismo ospite, come un batterio, in cui un gene o frammento di DNA può essere inserito in una posizione nota senza alterarne le funzioni.

Un vettore plasmidico deve possedere le seguenti caratteristiche fondamentali [99]:

- un'origine di replicazione (*ori*), che permette la replicazione del plasmide nell'ospite. Cicli di replicazione possono essere iniziati con la stessa frequenza della divisione cellulare (regolazione "stringente") o non essere strettamente correlati alla divisione cellulare, cosicché la replicazione del plasmide è molto più frequente di quella cromosomica (replicazione "rilassata");

- un sito promotore, spesso di origine fagica (per esempio il T7 promoter), riconosciuto dalla specifica RNA polimerasi DNA-dipendente e necessario per la produzione di un elevato numero di copie di mRNA della sequenza clonata. Tale promotore in genere è sottoposto ad uno specifico sistema di controllo per regolare l'espressione della proteina ricombinante;
- un *ribosome binding site* (RBS), una sequenza specificatamente riconosciuta e legata dal ribosoma, situata a monte della tripletta (ATG) d'inizio della regione codificante;
- un *multiple cloning site* (MCS), una sequenza sede di molteplici siti unici di taglio riconosciuti in modo specifico da enzimi di restrizione. Questa regione è progettata per l'inserzione del frammento di DNA da clonare;
- un gene che codifica per una proteina che agisce da repressore legandosi al sito operatore che è situato a valle del promotore. Il repressore può essere rimosso per via chimica, ad esempio con l'induttore IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galattoside) nel caso di *lacI* [100];
- uno o più geni, denominati marcatori di selezione (MS), che conferiscono al batterio la resistenza ad uno o più antibiotici consentendo la selezione delle sole colonie batteriche che hanno inglobato il plasmide.

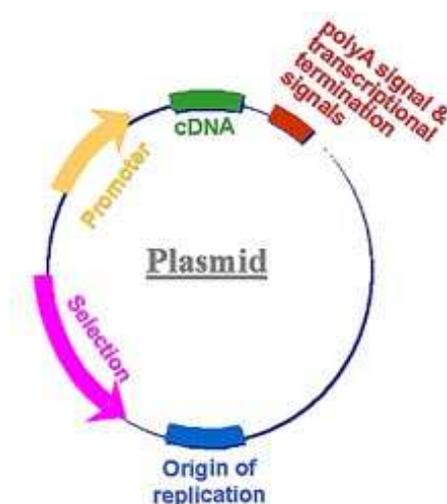


Fig. 14. Schema dell'anatomia di un plasmide.

La sequenza delle operazioni per ottenere un vettore plasmidico può essere così brevemente riassunta: da uno stampo di mRNA maturo (isolato mediante cromatografia) viene effettuata la copiatura del primo filamento di cDNA

grazie all'enzima trascrittasi inversa. Il prodotto della trascrizione è un ibrido RNA-DNA. L'enzima Ribonucleasi H, che riconosce le molecole ibride, digerisce il filamento di RNA in corti frammenti che servono da *primer* per la DNA polimerasi che sintetizza il filamento di DNA complementare al cDNA.

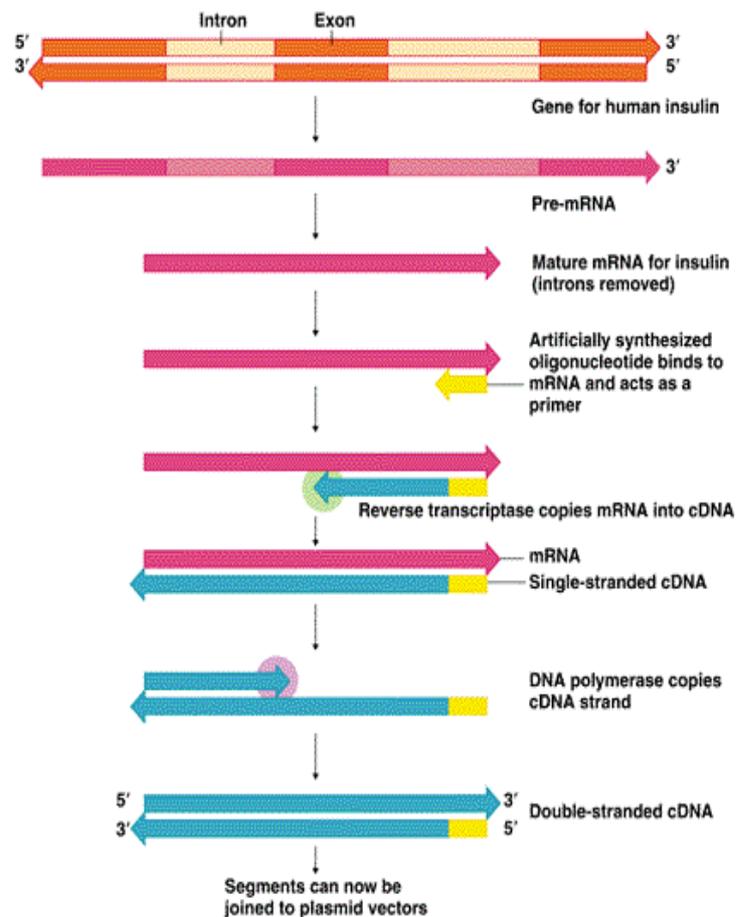


Fig. 15. Sintesi del cDNA codificante per l'insulina umana.

Le molecole di DNA a doppio filamento sono trattate con la DNA ligasi che unisce tra loro i diversi frammenti [99].

Alle estremità del cDNA *double strand* sono inserite, qualora assenti, sequenze di oligonucleotidi aventi siti di restrizione per specifici enzimi complementari a quelle presenti nel vettore plasmidico. L'azione degli enzimi di restrizione porta alla formazione di estremità coesive o piatte che permettono, tramite

DNA ligasi, l'inserimento della sequenza nel vettore in maniera unidirezionale [99].

Quando nella proteina sono presenti delle sequenze o domini che permettono una facile estrazione e purificazione questa è espressa tal quale; alternativamente la proteina è espressa come prodotto di fusione con una proteina generica, come la β -galattosidasi o la glutatione-S-transferasi (GST), o con una sequenza poli-istidinica (*His tag*) [98] per facilitarne il recupero e la purificazione.

Dopo rottura della membrana cellulare il pool proteico intracellulare è estratto tramite successive centrifugazioni e quindi le proteine di fusione sono purificate mediante cromatografia di affinità, mentre la purezza del prodotto ottenuto è determinata tramite elettroforesi su gel.

3.3 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

3.3.1 Vettori d'espressione e ceppi batterici

Per l'espressione in *E. coli* della CypD, sono stati utilizzati vettori di tipo pET (acronimo per plasmid for expression by T7 RNA polymerase). In essi è presente un promotore di trascrizione noto come *T7lac*, in grado di legare la T7 RNA polimerasi batterica. La produzione di quest'ultimo enzima, che viene espresso a partire dal genoma appartenente alla cellula di *E. coli*, può essere indotta artificialmente mediante l'introduzione nel sistema di IPTG: stimolando la produzione di T7 RNA polimerasi, essa interagirà con il corrispondente promotore situato sul plasmide provocando la trascrizione del gene e, di conseguenza, la produzione della proteina ricombinante. I plasmidi che si utilizzano generalmente contengono geni in grado di conferire resistenza nei confronti di antibiotici quali la tetraciclina, l'ampicillina o la kanamicina (questi ultimi sono detti geni marcatori in quanto successivamente sono utili per la distinzione tra cellule che hanno acquisito o meno il vettore). Ad essi viene addizionato il gene relativo alla proteina che si vuole ottenere.

Per l'espressione di CypD si è utilizzato il plasmide pET-28a(+), ingegnerizzato con il costrutto codificante per *His tag*, utile per la purificazione via IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) (Fig. 16).

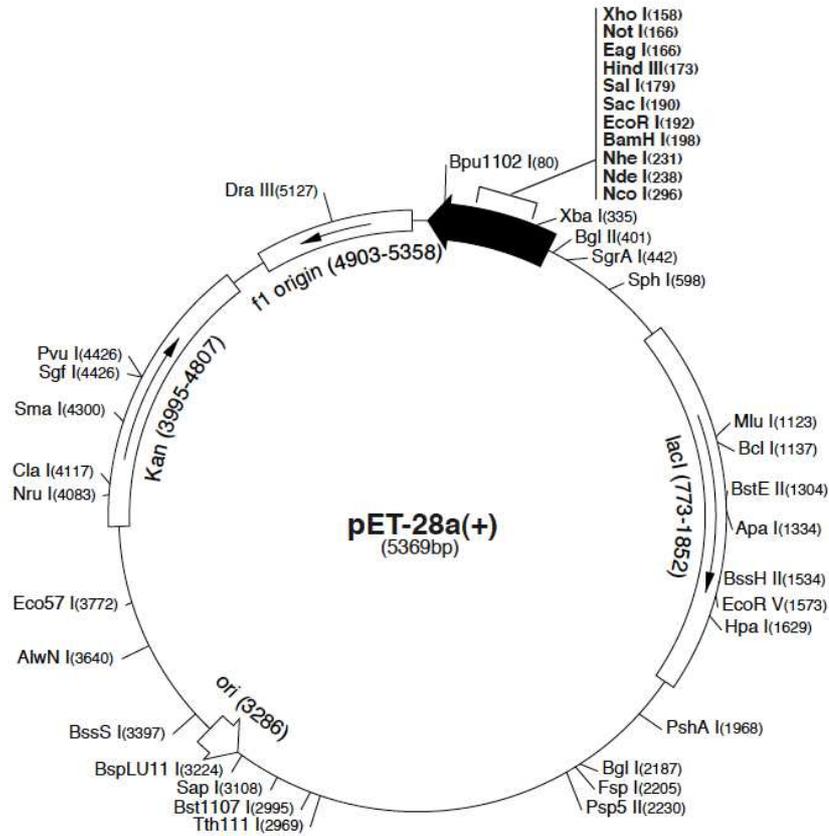


Fig. 16. Plasmide pET-28a(+).

Il costrutto contiene un gene marcatore che conferisce resistenza all'antibiotico kanamicina; pertanto il terreno di coltura in cui vengono fatte crescere le colonie è addizionato di tale antibiotico al fine di selezionare solo i ceppi trasformati correttamente col vettore plasmidico.

L'induzione dell'espressione della proteina di fusione avviene per aggiunta di IPTG, che si lega irreversibilmente al gene repressore *lacI*, con conseguente sblocco del sito promotore e induzione dell'espressione proteica.

Per quanto concerne le colture batteriche, sono stati utilizzati *E. coli* di ceppo BL21(DE3), cresciuti in bordo di coltura di lisogenia (LB) per l'ottimizzazione delle procedure di purificazione, mentre saranno effettuate colture in mezzo

minimo M9 per l'espressione della proteina marcata isotopicamente con ^{15}N per studi NMR.

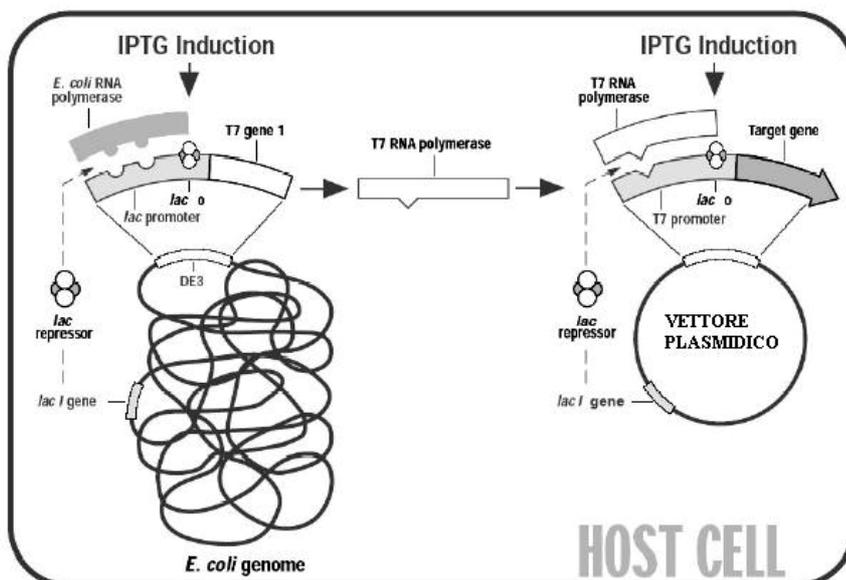


Fig. 17. Meccanismo di induzione dell'espressione proteica tramite aggiunta di IPTG.

3.3.2 Cellule competenti e loro trasformazione

Per poter introdurre DNA plasmidico all'interno dei batteri è necessario predisporre le cellule di *E. coli* mediante trattamento con CaCl_2 . I batteri ottenuti in seguito a questa procedura sono detti competenti, e sono caratterizzati da una parete cellulare localmente destabilizzata dai cationi bivalenti Ca^{2+} . Ciò permette potenzialmente l'entrata del plasmide che codifica la proteina che si vuole esprimere. La procedura consiste nella crescita di una colonia batterica a $37\text{ }^\circ\text{C}$ in LB, monitorandone la crescita fino ad un OD_{600} (Assorbanza allo spettrofotometro con $\lambda = 600\text{ nm}$) pari a 0.3. Una volta bloccata la crescita ponendo il brodo di coltura in ghiaccio per 20 minuti, questo viene centrifugato a bassa velocità (5000 rpm per 5 minuti a $4\text{ }^\circ\text{C}$). Il "pellet" viene risospeso in una soluzione di CaCl_2 0.1 M in acqua sterile pari alla metà del volume del brodo di coltura iniziale. Dopo 30 minuti a riposo in ghiaccio si ripete la centrifugazione e la risospensione in un volume minore,

questa volta 1:50 rispetto al volume iniziale. Il sistema viene lasciato a riposo *overnight* a 4 °C, in maniera tale che con la bassa temperatura aumenti la competenza delle cellule. Successivamente, la sospensione di batteri viene suddivisa in aliquote di 100 µL e crioconservata a -80 °C. La trasformazione, ossia l'introduzione del DNA plasmidico all'interno delle cellule ospiti, avviene per shock termico: secondo tale procedura è necessario riportare uno stock di cellule competenti da -80 °C a circa 0 °C, quindi si introduce il DNA plasmidico e si lascia a riposo in ghiaccio il sistema in maniera tale da permettere la diffusione dello stesso all'interno del campione.

Lo shock termico viene effettuato ponendo lo stock di cellule a 42 °C per 90 secondi, al termine dei quali si ripone nuovamente il campione in ghiaccio. Successivamente l'intero quantitativo viene ridissolto in circa 1 mL di mezzo di coltura SOC (composto da glucosio 20 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ (???) 10 mM, KCl 2.5 mM, NaCl 10 mM, tryptone 20 g/L ed estratto di lievito 5 g/L) e posto in agitazione per 40 minuti a 37 °C; infine la soluzione viene dispersa su una piastra di terreno LB agar in cui è presente l'antibiotico per il quale è stata sviluppata la resistenza nel batterio attraverso il plasmide, e posta a 37 °C *overnight*, per permettere la formazione soltanto delle colonie batteriche trasformate.

3.3.3 Colture batteriche e induzione

Una volta ottenute delle colonie batteriche, è possibile effettuare una coltura allo scopo di esprimere la proteina ricombinante che si vuole studiare. Dal momento che le condizioni sperimentali quali temperatura, tipo di terreno di coltura, presenza e concentrazione di IPTG possono variare la resa di espressione, è necessario effettuare degli screening preliminari. In genere il *modus operandi* prevede la preparazione e la crescita *overnight* a 37 °C di un preinoculo nello stesso mezzo di coltura utilizzato successivamente, sempre in presenza dell'antibiotico necessario alla discriminazione delle cellule trasformate da quelle prive del plasmide (kanamicina ad una concentrazione pari a 25 mg/mL). In seguito, tale preinoculo viene suddiviso in vari

quantitativi di brodo di coltura per verificare l'effetto della temperatura sulla crescita (28 °C o 37 °C). La crescita dei batteri non ancora indotti viene condotta e monitorata durante la fase di crescita pre-logaritmica (o *lag phase*), cioè fino al raggiungimento di un valore di OD₆₀₀ pari a 0.6.

Al raggiungimento di tale valore, è possibile indurre l'espressione della proteina ricombinante per mezzo dell'IPTG. Terminata la crescita, è possibile isolare il pellet cellulare per centrifugazione e conservare quanto ottenuto ad una temperatura di -80 °C.

3.3.4 Lisi dei batteri ed identificazione della frazione contenente la proteina

Una volta isolato il pellet batterico, è necessario determinare se la proteina ricombinante sia solubile nel citosol cellulare o se precipiti sotto forma di corpi d'inclusione, cioè come aggregati densi di materiale proteico insolubili. Si assume che i corpi d'inclusione abbiano la loro origine a partire da interazioni tra residui idrofobici appartenenti a molecole differenti, attraverso un processo autocatalizzato che porta rapidamente alla precipitazione di aggregati amorfi. La formazione di corpi d'inclusione è più facile nel caso la proteina risulti citotossica oppure assuma un *misfolding* durante il processo di espressione.

In questo caso si ha il vantaggio che la proteina risulta essere abbastanza pura, ma lo svantaggio che, a causa della sua strutturazione non corretta, non può essere impiegata direttamente per ulteriori studi se non attraverso una serie di passaggi di purificazione dagli eventuali contaminanti (sia proteici che acidi nucleici), di risolubilizzazione ed infine di rinaturazione. Nonostante la presenza di corpi d'inclusione sia un evento frequente nell'espressione proteica in *E. coli*, non esiste tuttora un metodo universale per la purificazione ed il *refolding*.

Per quanto concerne la determinazione della solubilità e l'isolamento, è necessario effettuare la lisi delle cellule e, una volta separata per centrifugazione la fase solida (composta da detriti solidi cellulari ed eventuali corpi d'inclusione) da quella liquida (proteine e acidi nucleici solubili), è

sufficiente un'elettroforesi in condizioni denaturanti per determinare la quantità di proteina in entrambe le frazioni. La rottura dei batteri viene in genere realizzata attraverso metodi termici (*freeze-thaw*), enzimatici (utilizzando il lisozima), chimici (ad esempio, con l'impiego di detergenti), o meccanici (*French press* o sonicazione). Per quantità piccole di materiale cellulare si predilige l'utilizzo della sonicazione: il pellet viene portato da -80 °C a 0 °C e viene risospeso in un tampone, quale 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl e pH 7.4. Alla sospensione vengono aggiunti degli inibitori di proteasi batteriche (che possono venire in contatto con la proteina ricombinante a seguito della lisi). Tali inibitori sono il PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro) che inattiva le Ser-proteasi quali chimo tripsina e trombina EDTA (acido etilendiamminotetracetico, inibitore per metalloproteine), Bestatin (inibitore per Leu-amminopeptidasi e Ala-amminopeptidasi), Pepstatin A (che inattiva proteasi acide quali pepsina, catepsina D o chimosina) ed E-6A (altro inibitore di papaina ed in generale di Cys-proteasi).

La sonicazione viene effettuata in ghiaccio e applicando ultrasuoni a medio-bassa intensità e di breve durata attraverso una punta metallica immersa nella sospensione e collegata ad un generatore, con pause tra cicli d'impulsi per evitare il surriscaldamento della sospensione e per permettere l'omogeneizzazione del campione (la sonicazione è più efficiente nelle immediate vicinanze della punta). A seguito della completa distruzione delle cellule, verificabile empiricamente come variazione della viscosità della soluzione e con il viraggio del colore da giallo tenue verso il bianco, si è in grado di separare la frazione solubile del campione dai resti cellulari semplicemente per centrifugazione.

3.3.5 Purificazione da Frazione Solubile

Se la proteina sovraespressa è solubile, è necessario purificarla dai contaminanti presenti, quali altre proteine e acidi nucleici. È possibile separare questi ultimi attraverso precipitazione con streptomina solfato o mediante l'utilizzo di un policatione quale il PEI (polietilenimina), seguita da

centrifugazione per eliminare il precipitato. Nel caso di proteine in grado di legare acidi nucleici invece, questa prima operazione è di per sé un metodo per eliminare gran parte del materiale proteico di scarto, dal momento che la specie studiata precipita con i polinucleotidi stessi.

Inoltre, spesso è possibile eliminare parte del materiale proteico di scarto, sempre sfruttando le diverse solubilità delle specie presenti in soluzione, con l'aggiunta di un elettrolita quale l'ammonio solfato, che sia in grado di modulare la costante dielettrica della soluzione e nel contempo di sottrarre molecole d'acqua dalla sfera di solvatazione delle biomolecole (fenomeno questo, detto di *salting out*). Naturalmente, questa operazione necessita di uno screening preliminare dal momento che la solubilità è una proprietà intrinseca della proteina e non è dato sapere a priori a quale concentrazione di precipitante essa o i contaminanti presenti raggiungano i loro limiti di solubilità. Come ultimo passaggio per la purificazione è possibile avvalersi di tecniche cromatografiche, quali la cromatografia per affinità (*affinity chromatography*), per esclusione (*size exclusion chromatography*), a scambio ionico.

3.3.6 Purificazione da Corpi d'Inclusione

Nell'espressione di proteine ricombinanti in *E. coli*, il mancato corretto ripiegamento e la formazione di aggregati insolubili noti come corpi d'inclusione è un fenomeno piuttosto frequente. A causa della notevole diversità delle proteine che presentano questo comportamento, non esiste tuttora una procedura universale valida per l'isolamento ed il *refolding* di tali proteine verso la struttura nativa. Le metodologie utilizzate a tale scopo comunque prevedono un passaggio di isolamento, rimozione di contaminanti, seguita da solubilizzazione della proteina per mezzo di soluzioni concentrate di agenti chimici denaturanti, tipicamente urea o cloruro di guanidinio (noti anche come agenti caotropici). Per quanto la purezza della proteina presente all'interno di corpi d'inclusione sia normalmente più elevata rispetto alle proteine sovraespresse che rimangono in soluzione, la presenza o meno di

impurezze ha un effetto cruciale sul successivo passaggio di rinaturazione, dal momento che esse possono aumentare la resa di aggregazione durante tale processo e quindi ridurre drasticamente la resa di *refolding*. Questo vale per ogni genere di contaminante, sia esso DNA plasmidico, lipopolisaccaridi o proteine.

Per quanto concerne la procedura sperimentale, sono possibili due alternative: la prima prevede una serie di passaggi di risospensione del lisato batterico insolubile in soluzioni contenenti un tensioattivo, il deossicolato di sodio, e di centrifugazione, dopo un trattamento con DNasi ed RNasi, enzimi necessari per un'ulteriore frammentazione (oltre a quella eventualmente prodotta dalla sonicazione) dei polinucleotidi presenti. Il deossicolato infatti è in grado di rimuovere completamente i nucleotidi presenti senza distruggere i corpi d'inclusione. Successivamente, il pellet, composto in linea di principio soltanto dalla proteina aggregata, viene completamente solubilizzato e denaturato in un tampone contenente un'alta concentrazione di urea o di cloruro di guanidinio; nel caso fosse presente più di una cisteina è necessaria l'aggiunta di un agente riducente, per evitare la formazione di ponti disolfuro preventivamente al processo di *refolding* che verrà effettuato successivamente. Eventuali cambiamenti a tale strategia consistono nell'utilizzo di detergenti alternativi al deossicolato, quali il Triton X-100, il CTAC (cetilmetilammonio cloruro), o di una solfobetaina non detergente anche come agente per la solubilizzazione e denaturazione [101-103].

In alternativa a questo protocollo è possibile avvalersi di una seconda procedura: essa consiste in uno screening preliminare allo scopo di identificare la concentrazione massima di urea necessaria per ottenere la solubilizzazione delle specie contaminanti presenti nel lisato batterico insolubile preservando l'integrità dei corpi d'inclusione (la concentrazione dipenderà dalla natura dei contaminanti come dalla densità dei corpi d'inclusione). Dopo aver risospeso il materiale nel tampone con urea ottimizzato in questo modo e, successivamente, aver separato i corpi insolubili dalle impurezze per mezzo di una centrifugazione, è dunque possibile solubilizzare la proteina ricombinante in un secondo tampone in cui il denaturante è presente in elevate concentrazioni

(tipicamente cloruro di guanidinio 6 M o urea 8 M). Questa seconda metodologia è senza dubbio efficace per quanto concerne la separazione della proteina d'interesse da materiale proteico di scarto, mentre può risultare insoddisfacente per quanto riguarda l'eliminazione degli acidi nucleici.

3.3.7 Purificazione via *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC)

Qualora le metodiche tradizionali non portino a livelli di purezza sufficienti per l'utilizzabilità della proteina in ulteriori esperimenti (siano essi di indagine strutturale, saggi cinetici o di interazione con altre specie chimiche), le tecniche di DNA ricombinante permettono la costruzione di proteine-fusione in cui vengono aggiunti alla sequenza amminoacidica della proteina d'interesse delle specifiche sequenze, dette "tag", che consentano la purificazione della proteina mediante cromatografia di affinità. Tali tag devono essere piccoli, avere effetti minimi sulla struttura, attività e proprietà della proteina ricombinante, o quantomeno deve esserci la possibilità di rimuoverli, in un secondo momento, attraverso l'utilizzo di enzimi specifici in grado di riconoscere parte della sequenza del tag e di tagliarlo dal resto del backbone amminoacidico (compatibilmente con quest'ultimo, dal momento che la sequenza di riconoscimento può essere presente nella proteina stessa). Tra i vari enzimi preposti a tale scopo vi sono ad esempio la trombina, o la TEV proteasi (Tobacco Etching Virus protease). Per quanto concerne i tag, i più utilizzati sono l'His-tag (composto da sei istidine e da altri amminoacidi per il riconoscimento da parte delle proteasi e per il *linkage* alla proteina), il glutathione S-transferase-tag e maltose-binding-protein-tag.

Per la purificazione di una proteina recante l'His-tag ci si avvale di una tecnica cromatografica in cui la fase stazionaria è costituita da un polisaccaride come supporto inerte, l'agarosio, in grado di legare ioni Ni^{2+} grazie a opportune sostituzioni in catena laterale. Le catene laterali delle istidine sono in grado di complessare i cationi metallici presenti in colonna coordinandosi per mezzo dell'atomo di azoto presente nell'anello imidazolico. Una volta che il *flow through* contenente le rimanenti proteine è stato fatto eluire dalla colonna, è

possibile ottenere la proteina ancora legata nella fase stazionaria facendola eluire per mezzo di un gradiente di imidazolo.

Questa tecnica, utilizzabile sia con proteine solubili che insolubili (avendo l'accortezza, in quest'ultimo caso, di utilizzare l'agente denaturante durante tutta l'eluizione), presenta come vantaggio principale la possibilità di ottenere la proteina ricombinante sostanzialmente pura con un singolo passaggio.

3.3.8 Refolding di proteine a partire da condizioni denaturanti

Sviluppare metodologie in grado di permettere il recupero della struttura nativa della proteina ottenuta a partire da corpi d'inclusione è senza dubbio una sfida importante: sfortunatamente però, neanche in questo caso, esiste un protocollo universale valido per tutte le biomolecole. Numerose sono le variabili, a partire dal metodo stesso e dal mezzo in cui viene svolta questa operazione (ossia il *refolding buffer*), che è necessario prendere in considerazione per poter raggiungere un'elevata resa di rinaturazione e, molto più importante, l'ottenimento di una struttura identica a quella che la proteina nativa avrebbe in condizioni fisiologiche.

Per quanto concerne le metodologie, comunemente vengono utilizzate il *refolding* per diluizione, per dialisi o il *column refolding*, cioè attraverso l'utilizzo della cromatografia di affinità a metalli immobilizzati precedentemente descritta, che si rivela essere così uno strumento che permette la rinaturazione e la purificazione in un solo step.

Attraverso il metodo per diluizione, si assume che il *refolding* avvenga immediatamente attraverso la diluizione della soluzione contenente la proteina in condizioni denaturanti in un elevato volume di un tampone privo dell'agente denaturante. Il volume necessario dev'essere tale da cancellare l'effetto del caotropico presente inizialmente e da minimizzare la probabilità di interazione tra proteine. Pur essendo la metodologia più semplice da applicare, essa presenta l'innegabile svantaggio di ottenere un grande quantitativo di una soluzione diluita di proteina, che successivamente dovrà essere concentrata per diafiltrazione o per centrifugazione: questo passaggio, oltre ad essere

dispendioso in termini di tempo, può provocare perdita di campione qualora la proteina interagisca con la membrana di cellulosa dei concentratori.

Il metodo per dialisi, a differenza della diluizione, non comporta la prevenzione dell'interazione tra proteine [104]. Nonostante ciò vada a discapito della resa di rinaturazione, rimane comunque una tecnica valida dal momento che non comporta necessariamente una concentrazione successiva del campione. Sperimentalmente, si inserisce il campione di proteina in un tubo da dialisi avente *cut off* dei pesi molecolari minore rispetto alla proteina da rinaturare, e si pone il tutto in una soluzione agitata avente un volume molto maggiore rispetto al dializzato (il rapporto dev'essere almeno 1:50) ed una concentrazione di denaturante minore in confronto alla soluzione di proteina. Variando la concentrazione di denaturante (attraverso cambi di tampone) nel tempo è possibile eseguire una rinaturazione controllata. La resa sarà tanto maggiore quanto più lenta è la procedura, o quanto minore è la differenza di concentrazione di denaturante tra un cambio di tampone e quello successivo.

Infine, è stato notato che separando fisicamente le molecole tra loro durante il processo di rinaturazione, si ha un considerevole aumento della resa di *refolding*. Ciò può essere ottenuto appunto immobilizzando la proteina (con l'apposito tag) su una colonna ad affinità, ed effettuando un gradiente inverso dell'agente denaturante prolungato nel tempo.

Qualunque sia la scelta della metodologia che si vuole applicare al sistema in esame, è necessario scegliere un *refolding buffer* tale da mantenere la proteina solubile durante tutto il processo di rinaturazione. Sfortunatamente, la composizione di tale tampone è fortemente proteina-dipendente e mantenere semplicemente una differenza ragionevole tra pH della soluzione e punto isoelettrico della proteina è una condizione necessaria, ma non sufficiente, per soddisfare a tale requisito.

Prima di eseguire un esperimento di *refolding*, è buona norma ricavare le condizioni più adatte per mezzo di un *factorial design*. Esso non è altro che un metodo per testare più tamponi contemporaneamente, basato sull'idea che la probabilità per una proteina di incontrare una composizione che favorisca il *fold*ing corretto aumenti all'aumentare dei *buffer* testati. Si tratta comunque

sostanzialmente di uno screening di solubilità per la proteina e, per quanto una proteina completamente solubilizzata sia più portata ad assumere una conformazione corretta rispetto ad un sistema metastabile, ovvero solubilità e *folding* si sovrappongono soddisfacentemente, la sovrapposizione non è però sempre del 100%. Soltanto un confronto tra le strutture della proteina rinaturata e della proteina nativa (quando possibile), per esempio mediante il confronto tra i relativi spettri di Dicroismo Circolare o delle rispettive attività enzimatiche, può determinare se il processo ha avuto successo.

In un *full factorial design*, si prendono in considerazione alcune possibili variabili che si ritiene possano influenzare la solubilità della molecola e, per ogni variabile, si decidono due valori di concentrazione (limiti inferiore e superiore). Le variabili più importanti sono il pH, la forza ionica (intesa come concentrazione di elettroliti forti quali NaCl o KCl), la presenza di arginina, PEG (polietilenglicole), glucosio o tensioattivi ed infine, per proteine recanti più di due cisteine, differenti rapporti di concentrazione di glutathione ridotto (GSH) e ossidato (GSSG) [105].

Una volta deciso quali variabili sondare, è necessario preparare una quantità di soluzioni pari a tutte le possibili combinazioni dei valori di ogni variabile: dato un numero N di variabili, si otterranno 2^N combinazioni, a cui corrisponderà un uguale numero di soluzioni. Per questo motivo, qualora il numero di variabili considerate sia troppo elevato, conviene operare con un *fractional factorial design*: con questo tipo di screening si indaga un sottogruppo rappresentativo di combinazioni di reagenti appartenente al *full factorial design*. Dovrà essere progettato per massimizzare il numero di variabili di *refolding* esplorate minimizzando contemporaneamente la quantità di dati acquisiti.

In seguito, si utilizza ogni soluzione come *refolding buffer* per diluizione: si mescola rapidamente la soluzione di proteina denaturata con ognuno dei tamponi in rapporto 1:20. Il sistema viene mantenuto alla temperatura alla quale avverrà in seguito lo *scaling up*, indipendentemente dalla metodologia con cui si vuole operare. Dopo aver atteso per alcuni minuti, è possibile effettuare delle misure sul campione, in genere di spettroscopia di assorbimento UV-visibile (ricavando, ad esempio, la concentrazione della

proteina rimasta in soluzione dal valore di assorbanza a 280 nm, previa centrifugazione ad alta velocità per separare gli eventuali aggregati presenti), o di *light scattering*, per rilevare direttamente la presenza di aggregati in soluzione.

3.4 SDS-PAGE

L'elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (sodio dodecilsolfato), comporta la separazione di proteine in base alle loro dimensioni. Attraverso il riscaldamento di un campione in condizioni denaturanti e riducenti, le proteine oltre a perdere la loro struttura originaria, vengono ricoperte da molecole del detergente, acquisendo un'elevata carica netta negativa proporzionale alla lunghezza della catena polipeptidica. Le proteine caricate in una matrice di gel, in presenza di un campo elettrico applicato sulla stessa, migreranno verso l'elettrodo carico positivamente e verranno separate in funzione della percentuale di acrilammide nel gel (preparato a partire da una soluzione *stock* di acrilammide al 30% e bis-acrilammide allo 0.8% in acqua). Sperimentalmente, il gel viene composto da due parti distinte: la prima, dove vengono caricati i campioni, viene detta *stacking gel* e consiste in una matrice polimerica con una quantità di acrilammide pari al 5%. Essa, avendo un'elevata porosità, ha la funzione di focalizzare le proteine, mentre la parte inferiore, in cui l'acrilammide è presente in quantità superiori, è necessaria per la risoluzione vera e propria della miscela di materiale proteico. La scelta del quantitativo di acrilammide necessario nel *running gel* è dipendente dal peso molecolare della proteina che si vuole rivelare.

L'APS (persolfato d'ammonio) ed il TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiammina) in particolare hanno la funzione di indurre la polimerizzazione del gel attraverso un processo radicalico: l'iniziatore è l'APS che, in soluzione acquosa, è presente in equilibrio con la forma dissociata radicalica. Il TEMED invece, in grado di esistere anche in forma radicalica, funge da catalizzatore. La corsa elettroforetica avviene in presenza di un

tampone costituito da 25 mM Tris, 250 mM Glicina a pH 8.3. La differenza di potenziale necessaria a tale scopo va dai 100 V durante l'attraversamento dello *stacking gel* a 150 V durante la corsa nel *running gel*.

Le condizioni denaturanti per il campione sono raggiunte, oltre alla sopra citata denaturazione termica, attraverso la dissoluzione in un apposito tampone, costituito da 50 mM Tris/HCl a pH 6.8, 100 mM ditiotreitolo (DTT), 0.2% SDS, 0.1% blu di bromofenolo e 10% glicerolo. Per la determinazione della massa molecolare delle proteine viene caricato sul gel anche una miscela di standard a massa molecolare nota, quali fosforilasi β (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), carbonico anidrasi (30 kDa), inibitore della tripsina (20.1 kDa) e α -lattoalbumina (14.4 kDa).

Per la rilevazione delle bande proteiche al termine della corsa elettroforetica, il gel viene immerso in una soluzione composta da 50% etanolo, 10% acido acetico e 0.25% *Coomassie Brilliant Blue* R-250, un colorante in grado di legarsi ai gruppi amminici, normalmente appartenenti alle catene laterali di arginina e lisina. In seguito si effettua la rimozione del colorante in eccesso per mezzo di un secondo tampone (10% acido acetico, 45% etanolo), dopodichè il gel può essere conservato in una soluzione acquosa al 10% di acido acetico.

Mediante questa tecnica è possibile evidenziare la proteina d'interesse attraverso l'interazione con anticorpi specifici in grado di riconoscere un epitopo della proteina.

Le proteine risolte per mezzo di un SDS-PAGE vengono trasferite su una membrana in PVDF (polivinilidene fluoruro), preventivamente trattata con lavaggi in metanolo ed acqua. Ciò è reso possibile ponendo tale membrana in contatto con il gel di poliacrilammide per azione di un campo elettrico (35 V, a 4 °C, *overnight*, in un apposito supporto contenente un tampone 48 mM Tris, 39 mM Glicina, 20% v/v metanolo, e 0.037% v/v SDS). Si sfrutta la carica negativa acquisita dall'interazione delle proteine con SDS presente nel gel. Una volta effettuato il trasferimento, si esegue un ulteriore lavaggio in TBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) ed in seguito si tratta la membrana con una soluzione di latte in polvere al 5% in TBS-T come agente bloccante. Quindi, eseguita una serie di lavaggi in TBS-T, è possibile trattare il

sistema con l'anticorpo specifico per la proteina e, successivamente, con l'anticorpo secondario (anti IgG di coniglio coniugato con la perossidasi di rafano). La presenza di questo anticorpo secondario può essere a questo punto rivelata attraverso un reagente chemiluminescente, il luminolo (che viene ossidato dalla perossidasi di rafano presente nell'anticorpo secondario). Sfruttando l'emissione intensa nel visibile del luminolo ossidato, è possibile ottenere il responso dell'analisi sotto forma di lastra fotografica, in cui le bande relative alla proteina d'interesse saranno visibili come macchie scure, a differenza delle proteine non recanti l'epitopo.

3.5 DICROISMO CIRCOLARE

La spettroscopia CD è una tecnica chiroottica utile per evidenziare particolari strutture secondarie di macromolecole biologiche quali acidi nucleici, peptidi e proteine in soluzione. Si tratta di una variante della tecnica di assorbimento molecolare che sfrutta l'attività ottica esibita dai cromofori del campione. Il fenomeno fisico implicato è il diverso assorbimento della luce circolarmente polarizzata destra e sinistra da parte di un mezzo chirale.

Una radiazione planarmente polarizzata è scomponibile in due componenti polarizzate circolarmente sinistra (L) e destra (R), aventi la stessa lunghezza d'onda λ , opposto senso di rotazione, stessa fase e stessa ampiezza (Fig. 18).

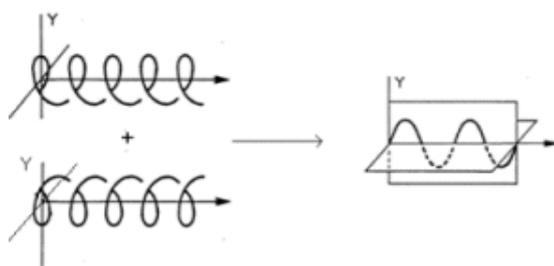


Fig. 18. Componenti destrorsa e sinistrorsa della radiazione planarmente polarizzata che attraversano un mezzo otticamente attivo.

Se queste due componenti attraversano un mezzo otticamente attivo, esse mostrano velocità diverse, dovute ai diversi indici di rifrazione, per cui escono sfasate, con rotazione del piano di polarizzazione, dando origine al fenomeno

della dispersione ottica rotatoria (ORD). Inoltre se c'è assorbimento da parte delle molecole in esame, si osserva un diverso assorbimento delle due componenti, A_L e A_R , dovuti ai diversi coefficienti di estinzione molare (ϵ_L e ϵ_R). Le due componenti circolarmente polarizzate sinistra e destra, una volta ricombinate, danno luogo a una radiazione polarizzata ellitticamente: è il fenomeno del dicroismo circolare (Fig 19)..

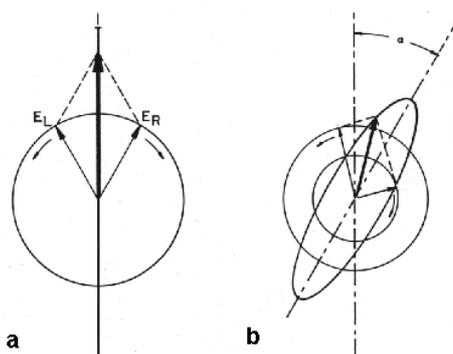


Fig. 19. Ricombinazione delle componenti della radiazione circolarmente (a) ed ellitticamente (b) polarizzata.

Il parametro che misura l'entità della differenza di assorbanza è l'ellitticità, definita da:

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

dove a e b sono rispettivamente l'asse maggiore e minore dell'ellisse. La relazione che lega l'ellitticità alla differenza di assorbanze A_L e A_R è:

$$\theta = 33 (A_L - A_R) \quad (\text{gradi})$$

Uno spettro CD riporta la variazione di θ (o direttamente di $A_L - A_R$) al variare della lunghezza d'onda di un campione esposto alternativamente a luce circolarmente polarizzata sinistra e destra. Con la strumentazione attuale $A_L - A_R$ può essere misurata accuratamente e convertita in ellitticità θ tramite la

precedente formula. Per meglio confrontare campioni diversi per concentrazione e cammino ottico, si introduce la grandezza molare:

$$[\theta] = \theta / (c \cdot l) \quad (\text{gradi} \cdot \text{litro} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

dove c = concentrazione molare, l = cammino ottico.

Per peptidi e proteine si preferisce riferirsi ad un singolo residuo, introducendo l'ellitticità molare per residuo $[\theta]_R$:

$$[\theta]_R = [\theta] / (n^\circ \text{ residui} - 1) \quad (\text{gradi} \cdot \text{litro} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

Da notare che lo spettro dicroico presenta sia bande positive che negative e che fuori dalla regione di assorbimento l'ellitticità è nulla. Sia il segno sia l'intensità delle bande CD sono sensibili alla struttura molecolare.

Affinchè il composto sia otticamente attivo devono essere soddisfatti alcuni requisiti: la molecola deve presentare cromofori capaci di assorbire radiazioni a determinate lunghezze d'onda e i cromofori devono essere otticamente attivi. Devono avere una chiralità intrinseca (asimmetria configurazionale) oppure una chiralità in funzione della struttura secondaria (asimmetria conformazionale), o una chiralità indotta da centri asimmetrici vicini o per l'asimmetria dell'intorno (asimmetria d'ambiente).

Polipeptidi e proteine sono otticamente attivi in quanto sono costituiti da unità monomeriche chirali ed in quanto capaci di formare strutture secondarie chirali.

I gruppi cromofori sono:

- Il gruppo peptidico, che presenta assorbimenti nel lontano UV (170-250 nm) e che non è chirale.
- Gli anelli aromatici degli amminoacidi (Phe, Tyr, Trp, His) che assorbono sia nel vicino UV (250-300 nm) che nella zona del gruppo peptidico e che sono anch'essi dei cromofori intrinsecamente non chirali in quanto aventi almeno un elemento di simmetria.

- Il ponte disolfuro, che presenta un assorbimento intorno ai 250 nm ed è intrinsecamente asimmetrico.

Il range in cui solitamente si effettuano le misure, è quello relativo all'assorbimento del gruppo peptidico (180-250 nm), in cui la chiralità è indotta principalmente dall'asimmetria conformazionale. In questo intervallo si osservano le bande corrispondenti alle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ (190 nm) e $n \rightarrow \pi^*$ (210 – 220 nm) del cromoforo peptidico.

In generale, tutti i metodi per la stima del contenuto in struttura secondaria assumono che lo spettro di una proteina possa essere rappresentato da una combinazione lineare di elementi di struttura secondaria, più un termine correttivo che include il contributo dei cromofori aromatici. In questo modo ogni spettro CD può essere ricostruito per combinazione lineare di spettri di riferimento (o standard) corrispondenti alle principali conformazioni. I vari approcci al calcolo delle percentuali di queste strutture si differenziano per l'utilizzo di standard diversi. Pertanto misure CD nel lontano UV sono utilizzate per studiare la struttura secondaria di peptidi e proteine. I pattern generali dell' α -elica, del β -sheet, e dei β -turn sono ben caratterizzati. In aggiunta a queste conformazioni, si è identificato un quarto stato conformazionale denominato *random coil*, che può essere interpretato con lo stato naturale di un polimero favorito dalla sua entropia e dalle sue interazioni con il solvente [106]. Generalmente è assunto come standard di questo stato la conformazione assunta in soluzione acquosa a pH 7.6 dalla poliprolina.

Studi teorici ed evidenze sperimentali suggeriscono una ridefinizione dello stato *random coil* [106]. In particolare i risultati degli studi CD condotti in solventi criogenici, hanno portato Drake e collaboratori [107], a definire la struttura *random* come un equilibrio tra due stati conformazionali, coinvolgente una struttura estesa ad elica sinistrogira, tipo poliprolina II e una struttura disordinata. Inoltre, studi teorici indicano come diverse eliche sinistrogire tipo poliprolina II mostrino spettri CD vibrazionali simili a quelli evidenziati da strutture *random coil* (Fig. 20).

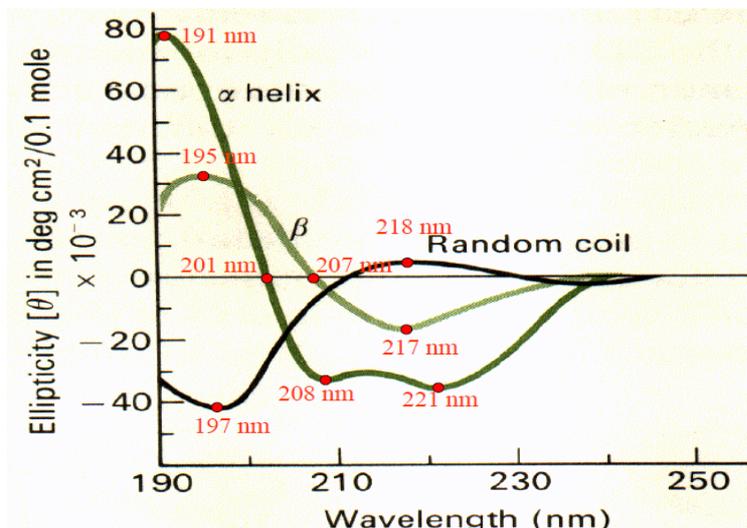


Fig. 20. Modelli generali di struttura secondaria

3.6 RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

La risonanza magnetica nucleare (NMR) è una tecnica spettroscopica molto utilizzata per la determinazione di elementi di struttura secondaria e di strutture tridimensionali di peptidi e di proteine in soluzione [108]. Il principio su cui si basa è l'interazione tra il momento magnetico di un nucleo, immerso in un campo magnetico, e le radiazioni elettromagnetiche proprie della regione delle radiofrequenze. Come analisi diventa indispensabile quando non è possibile ottenere cristalli singoli adatti ad essere analizzati con diffrazione dei raggi X. Il fatto di operare in soluzione è un altro grande vantaggio di questa tecnica. Si possono variare, infatti, parametri come temperatura, pH, forza ionica e solvente al fine di controllare gli effetti sulla struttura. La tecnica inoltre consente di studiare i processi dinamici che avvengono in soluzione, come la interconversione di conformeri, la cui scala temporale sia compatibile con la scala dei tempi NMR. Operare in soluzione rappresenta anche lo svantaggio principale dello studio NMR. La necessità di avere concentrazioni dell'ordine di 2-3 mM senza che il polimero si aggregi e il fatto che l'aumento del peso molecolare del composto porta ad un allargamento delle righe spettrali sono due dei principali difetti dell'NMR. L'allargamento delle linee spettrali deriva dalla riduzione dei tempi di rilassamento e porta ad un'inevitabile

sovrapposizione dei segnali. La possibilità di utilizzare tecniche multidimensionali, di arricchire il campione con ^{13}C e ^{15}N e di sfruttare, quindi, la maggior dispersione di *chemical shift* di altri nuclei ha permesso di rimuovere le sovrapposizioni dei segnali delle macromolecole e ha contribuito ad innalzare il limite delle dimensioni accessibili all'NMR. Inoltre, tramite lo sviluppo di spettrometri ad alta frequenza (600-900 MHz per ^1H) si è ottenuto un notevole aumento della risoluzione e della sensibilità.

Quando un impulso a radiofrequenza investe un campione in un campo magnetico statico, perturba l'equilibrio tra le popolazioni dei suoi stati di spin. Cessato l'impulso, il sistema ritorna alle condizioni iniziali attraverso processi di rilassamento longitudinale o trasversale che determinano la graduale scomparsa del segnale.

3.6.1 NMR monodimensionale

I nuclei aventi momento angolare di spin diverso da zero possiedono anche un momento magnetico di spin, μ , non nullo ad esso legato tramite:

$$\mu = \gamma \mathbf{I}$$

dove γ è il rapporto giromagnetico del nucleo in esame. Se il numero quantico di spin è pari a I allora il momento angolare di spin \mathbf{I} avrà modulo e componente lungo l'asse z dati da:

$$|\mathbf{I}| = [I (I + 1)]^{1/2} \hbar \quad \text{dove } \hbar = h / 2\pi \text{ e } h \text{ è la costante di Planck}$$

$$I_z = m_I \hbar \quad \text{dove } m_I = I, I + 1 \dots - I = \text{numero quantico spin}$$

Sono possibili quindi $(2I+1)$ stati di spin, energeticamente degeneri, che si differenziano solo per il valore di m_I . Dal momento che viene applicato un campo magnetico statico B_0 la degenerazione viene rimossa. Convenzionalmente il campo statico si assume lungo l'asse z . Il protone, per esempio, ha spin $I = 1/2$ e quindi sarà caratterizzato da due possibili stati di spin. Il primo, più stabile e popoloso in condizioni di equilibrio, è lo stato α ($m_I = 1/2$), mentre il secondo è lo stato β caratterizzato da ($m_I = -1/2$) ed è ad

energia maggiore rispetto allo stato α . Lo stato β sarà meno popolato in condizioni di equilibrio proprio perchè è ad energia maggiore. Il salto di energia tra i due è calcolabile con la seguente espressione:

$$\Delta E = E_{\beta} - E_{\alpha} = \gamma \frac{\hbar}{2\pi} B_0$$

Per promuovere la transizione tra i due stati di spin è necessaria una radiazione di frequenza $\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$ alla quale è associata una energia pari a $\Delta E = E_{\beta} - E_{\alpha} = h\nu_0$.

La frequenza di Larmor (ν_0) è propria del nucleo, è funzione del campo magnetico applicato e del rapporto giromagnetico e definisce la condizione di risonanza del nucleo.

In un campione macroscopico bisogna considerare che si lavora con un insieme di atomi. La distribuzione di Boltzmann descrive la differenza di popolazione nei due stati:

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$

La somma vettoriale dei singoli momenti magnetici di tutti i nuclei produce il vettore di magnetizzazione macroscopica M_0 che, nelle condizioni di equilibrio, avrà la componente lungo la direzione del campo magnetico diversa da zero. Le componenti lungo x e y, invece, sono nulle perchè si trova in una situazione di *random phase* dove le componenti dei singoli μ_i sono statisticamente presenti con uguale probabilità. In queste condizioni, in una popolazione di nuclei, i singoli vettori μ_i precedono attorno alla direzione di B_0 con frequenza di Larmor caratteristica ma non in fase tra loro.

L'applicazione di un impulso di radiofrequenze B_1 perpendicolare a B_0 porta ad una transizione di elettroni dallo stato di spin α allo stato di spin β se la frequenza, propria dell'impulso, è uguale alla frequenza di Larmor caratteristica ($\nu_1 = \nu_0$). L'effetto è la deflessione della magnetizzazione di un angolo θ dalla direzione del campo statico attorno all'asse di applicazione dell'impulso. Tale angolo è proporzionale alla durata dell'impulso (τ_p) secondo la seguente relazione:

$$\theta = \gamma B_1 \tau_p$$

Si origina una componente trasversale (M_{x,y}) del vettore magnetizzazione. Una volta rimosso B₁, se la durata dell'impulso è tale da avere θ = 90°, allora il vettore giacerà sul piano xy e precederà attorno alla direzione di B₀ con la frequenza di Larmor caratteristica del nucleo. Questa precessione produce nel circuito di rilevazione il FID. FID sta per *Free Induction Decay*, segnale sinusoidale il cui decadimento esponenziale è dovuto ai processi di rilassamento.

La frequenza di risonanza dei vari nuclei è fortemente condizionata dall'intorno chimico. Proprio questa caratteristica fa dell'NMR uno strumento utilissimo per distinguere i vari tipi di nuclei e definire la struttura di una molecola. Ogni nucleo subisce, infatti, una schermatura da parte della nuvola elettronica che lo circonda e che dipende dall'intorno. Il nucleo quindi non sentirà tutto il campo magnetico ma un campo efficace pari a B_{eff} = B₀(1 - σ) dove σ è la costante di schermo. Il nucleo non risuonerà alla frequenza di Larmor come è definita prima ma ad una frequenza effettiva che include il termine di schermatura. Questa frequenza effettiva viene definita come segue:

$$\nu_{eff} = \gamma B_0 (1 - \sigma) / 2\pi$$

L'effetto di schermatura viene quantificato definendo il *chemical shift* (δ), che viene misurato in ppm secondo la formula:

$$\delta = \frac{\nu_0 - \nu_{rif}}{\nu_{rif}} 10^6 (ppm)$$

Come si vede dalla formula, viene utilizzata una frequenza di riferimento per rendere la misura totalmente indipendente dallo strumento utilizzato.

Un esperimento monodimensionale si articola in due periodi (Fig. 21):

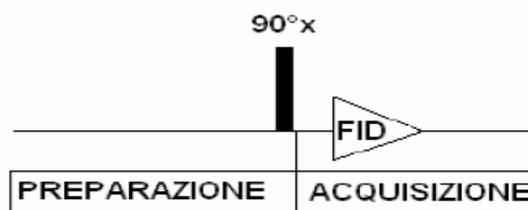


Fig. 21. Schema di un esperimento NMR monodimensionale.

In primo luogo c'è un periodo di preparazione dove viene raggiunto l'equilibrio termico che viene perturbato da un impulso a 90° il quale porta il vettore magnetizzazione sul piano xy. Nel periodo successivo si acquisisce il FID mentre viene applicata la Trasformata di Fourier (FT) che converte il segnale da funzione nel dominio dei tempi a funzione in quello delle frequenze. Nel dominio delle frequenze si ottiene una serie di picchi centrati alle varie frequenze di risonanza.

Usando una tecnica ad impulso tutti i nuclei di interesse vengono eccitati contemporaneamente e tutti i segnali vengono raccolti in un momento solo. Si può così ripetere più volte l'esperimento e sommare i FID ottenuti. Questo processo ha lo scopo di migliorare il rapporto segnale/rumore (S/N), che dipende da n, numero di esperimenti ripetuti secondo la formula seguente:

$$\frac{S}{N} = \sqrt{n}$$

Nonostante la grande importanza rivestita dagli esperimenti monodimensionali, per proteine e peptidi bisogna ricorrere agli esperimenti multidimensionali. Questi ultimi permettono una maggiore risoluzione diminuendo la sovrapposizione di picchi rispetto agli esperimenti 1D. Gli esperimenti 2D sono vantaggiosi per lo studio di proteine e peptidi perchè i 20 amminoacidi naturali che costituiscono le catene polipeptidiche danno segnali caratteristici. Oltre a questo bisogna considerare che lo spettro di risonanza dei protoni amminoacidici è piuttosto ampio (10-12 ppm) ed esiste una forte dipendenza dei valori di *chemical shift* dei protoni di un determinato residuo dalla conformazione della catena.

3.6.2 NMR bidimensionale

A differenza degli spettri monodimensionali, gli esperimenti 2D consistono in una superficie quadrata dove il segnale NMR viene rappresentato come funzione di due variabili, le frequenze ω_1 e ω_2 . L'esperimento è anche caratterizzato una serie di impulsi tale per cui l'intensità del segnale raccolto risulta funzione di due distinti intervalli di tempo: t_1 e t_2 .

Schematicamente si può descrivere un esperimento 2D come in figura 22:

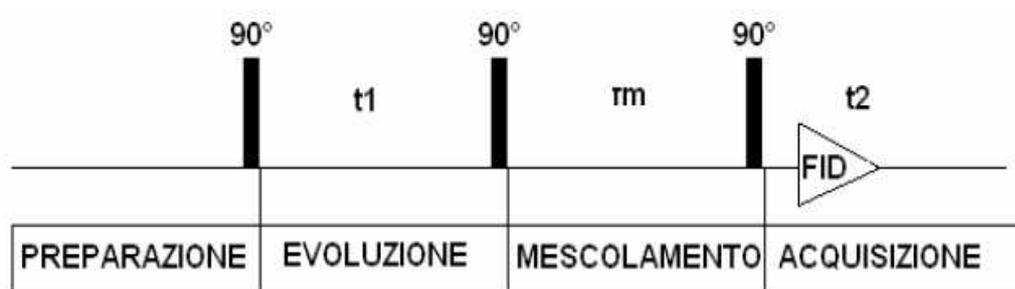


Fig. 22. Schema di un esperimento NMR bidimensionale.

Gli stadi principali in cui si suddivide un'analisi NMR bidimensionale sono quattro:

- **PREPARAZIONE:** il campione raggiunge l'equilibrio termico e viene perturbato da un impulso a 90° che deflette la magnetizzazione sul piano xy .
- **EVOLUZIONE:** la magnetizzazione evolve sotto l'effetto di accoppiamenti scalari (spin-spin) e precessione di Larmor; t_1 è il periodo di durata di questo stadio.
- **MESCOLOAMENTO:** una serie di impulsi ed intervalli di tempo permettono il trasferimento della magnetizzazione sfruttando meccanismi diversi a seconda della sequenza di impulsi utilizzata. La durata totale è τ_m .
- **ACQUISIZIONE:** come nel monodimensionale ho la vera e propria acquisizione del segnale (FID) durante l'intervallo t_2 .

Lo spettro definitivo si ottiene ripetendo n volte la sequenza appena descritta incrementando sistematicamente t_1 di un preciso intervallo Δt_1 . Si acquisiscono n FID che vengono sottoposti alla Trasformata di Fourier. L'applicazione della Trasformata ai segnali FID acquisiti durante t_2 fornisce la matrice $S(t_2, \omega_2)$ che può essere vista come un insieme di n spettri 1D con i segnali nel dominio delle frequenze ω_2 modulati in ampiezza e/o fase a causa delle evoluzioni avvenute durante t_1 . La successiva Trasformata lungo l'asse dei tempi t_1 permette di ottenere lo spettro bidimensionale $S(\omega_1, \omega_2)$ dalla matrice appena descritta.

Il trasferimento di magnetizzazione tra due nuclei A e B può avvenire, durante la fase di mescolamento (tempo τ_m) sfruttando due meccanismi possibili:

- *accoppiamento scalare*: è un fenomeno che si trasmette lungo i legami. I due nuclei devono essere separati da un numero piccolo di legami e l'interazione avviene a causa della polarizzazione della loro nube elettronica. Tipici esperimenti che sfruttano questo accoppiamento sono COSY e TOCSY.
- *accoppiamento dipolare*: è un fenomeno che si trasmette attraverso lo spazio e può essere evidenziato utilizzando l'effetto NOE (Nuclear Overhauser Effect). Si osservano picchi di correlazione di questo tipo per distanze massime di 5 Å tra i due nuclei in esame. Esperimenti NOESY e ROESY si basano su questo effetto e sono un valido strumento per la determinazione della struttura secondaria delle proteine.

Per molti esperimenti il solvente è l'acqua, con un 10% di D₂O per il segnale di *lock*. Per gli spettri protonici diventa necessario sopprimere, o quanto meno ridurre, il segnale dell'acqua che sarebbe quello di intensità gran lunga maggiore. A tale scopo si ricorre a due espedienti: *presaturazione* e *WATERGATE*. La presaturazione consiste nell'irradiazione selettiva della risonanza da sopprimere con un debole campo di radiofrequenze. L'irradiazione è mantenuta per un tempo tale da saturare la risonanza considerata. La presaturazione è inserita solitamente durante il periodo di preparazione, subito prima della applicazione degli impulsi. Un problema connesso con l'applicazione della presaturazione allo studio dei peptidi è il fatto che satura in parte anche i protoni aminoacidici che scambiano con l'acqua riducendo l'intensità di questi segnali. Per ovviare a questo problema si ricorre spesso al WATERGATE (WATER suppression by Gradient-Tailored Excitation). Consiste in una sequenza che permette di defasare selettivamente la magnetizzazione trasversale del solvente utilizzando impulsi a gradiente. Si può schematizzare come segue (Fig. 23):

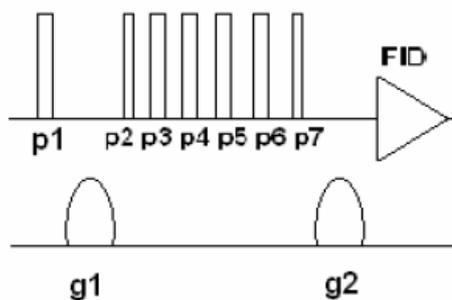


Fig. 23. Schema del WATERGATE.

In questa immagine si vedono i vari momenti che si alternano nella sequenza WATERGATE. Un primo impulso (p1) non selettivo deflette la magnetizzazione sul piano xy; segue un impulso a gradiente di campo (g1) che defasa tutti gli spin. La sequenza di impulsi p2-p7 porta alla inversione di 180° di tutte le risonanze tranne quella del solvente. Infine un altro impulso a gradiente (g2) uguale al primo, rifocalizza le magnetizzazioni e defasa ulteriormente quella del solvente che, quindi, viene distrutta. C'è da segnalare che neanche il WATERGATE è esente da controindicazioni. I segnali vicini a quello del solvente, infatti, possono essere persi durante la sequenza.

Gli esperimenti, oltre per il differente meccanismo di trasferimento della magnetizzazione, si possono distinguere in *omo-* ed *eterocorrelati*. Nel primo caso si indagano le risonanze dello stesso nucleo mentre nel secondo gli accoppiamenti tra nuclei diversi.

3.6.2.1 COSY

La sigla COSY sta per COrrelation SpectroscopY e rappresenta storicamente il primo esperimento 2D. La magnetizzazione viene trasferita scalarmente tra gli spin. L'accoppiamento scalare tra due nuclei si manifesta nei *cross-picchi*. Sperimentalmente si osservano questi segnali se i nuclei in esame sono separati da non più di tre legami e questo permette di ottenere informazioni importanti sulla struttura del composto in esame. La fig. 24 riporta la sequenza degli impulsi di un esperimento COSY.

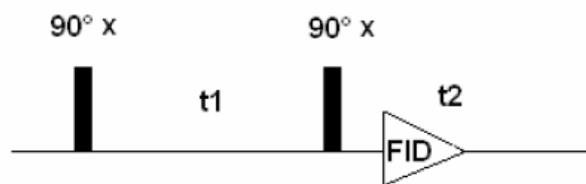


Fig. 24. Sequenza di impulsi di un COSY.

Il primo impulso a 90° lungo l'asse x porta la magnetizzazione sul piano trasversale; essa evolve nel tempo t_1 per effetto del chemical shift e dell'accoppiamento scalare. In questo modo per un sistema di due nuclei, AX, scalarmente accoppiati ottengo termini in fase contenenti lo spin di uno solo dei due protoni e a termini in antifase contenenti il prodotto degli spin e derivanti dall'accoppiamento scalare. A questo punto il secondo impulso, uguale al primo, modifica i termini in antifase lungo y dei due nuclei. Si ottiene un reciproco trasferimento di magnetizzazione: il termine in antifase relativo ad A è trasformato in quello relativo a X e viceversa.

Ciò significa che l'antifase del nucleo A evolve con ω_A durante il tempo t_1 e con ω_X durante t_2 e viceversa per X. Il segnale derivante dalla magnetizzazione in antifase è funzione del chemical shift di un protone nella dimensione F_1 e di quello dell'altro nella dimensione F_2 . Lo spettro COSY che ne segue presenta i cross-picchi (ω_A, ω_X) e (ω_X, ω_A) simmetrici rispetto alla diagonale. La diagonale invece contiene i picchi (ω_A, ω_A) e (ω_X, ω_X) che derivano dai termini di magnetizzazione in fase che sono invariati rispetto all'impulso di mescolamento. Derivano infatti dal *chemical shift* di uno stesso nucleo in entrambe le direzioni.

3.6.2.2 TOCSY

Come per gli esperimenti appena descritti, anche nel TOCSY si sfrutta un trasferimento scalare della magnetizzazione. TOCSY significa Total Correlation Spectroscopy e con una specifica sequenza di impulsi, chiamata *spin lock*, attua il trasferimento della magnetizzazione di ciascun protone a tutti i protoni appartenenti allo stesso sistema di spin, che siano o meno accoppiati

con il precedente. Nello studio di peptidi e proteine, il sistema di spin è l'insieme di tutti i protoni del residuo amminoacidico. Il legame peptidico interrompe il trasferimento della magnetizzazione.

La sequenza degli impulsi è riportata in Fig. 25:

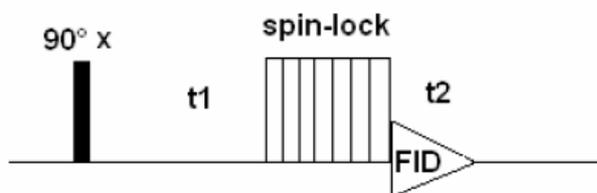


Fig. 25. Sequenza di impulsi di un TOCSY.

Durante la sequenza di *spin lock* la magnetizzazione viene bloccata sul piano trasversale e, se il suo tempo (*mixing time* t_m) di durata è sufficientemente grande, si ottiene il trasferimento della magnetizzazione lungo tutta la catena amminoacidica. I *mixing time* di solito sono dell'ordine di 70-80 ms per avere un trasferimento completo da uno spin al vicino e poi a quello successivo e così via. Lo *spin lock* può essere realizzato mediante l'applicazione di un campo di radiofrequenze in onda continua, lungo la direzione desiderata e per un tempo opportuno, oppure mediante un treno di impulsi composito. Solitamente è proprio quest'ultimo caso che viene utilizzato perchè porta ad un minor riscaldamento del probe.

3.6.2.3 NOESY e ROESY

Entrambi gli esperimenti si basano sull'effetto NOE e osservano il trasferimento (dipolare) di magnetizzazione attraverso lo spazio. Si considera un sistema costituito da due nuclei accoppiati, I (*'interesting'*) ed S (*'source'*). Il sistema viene irraggiato da una radiazione con frequenza di Larmor del primo nucleo fino a saturare le transizioni α - β . Il sistema tende a ripristinare le iniziali condizioni di equilibri grazie a meccanismi di rilassamento a zero, singolo o doppio quanto (W_0 , W_1 , W_2). Questo fenomeno comporta una variazione nell'intensità del segnale del secondo nucleo perchè i momenti magnetici dei due spin interagiscono l'uno con l'altro nello spazio non

rilassando contemporaneamente. Nell'ipotesi che, per uno spin S nel sistema non perturbato, l'intensità della risonanza sia S_0 e che tale intensità diventi S dopo la saturazione di I, si definisce NOE la quantità:

$$\eta_I(S) = \frac{S - S_0}{S_0}$$

L'entità dell'effetto NOE dipende dal bilanciamento dei vari fenomeni di rilassamento, in particolare a doppio e zero-quanto, parametri che influenzano le popolazioni degli stati di spin nel nucleo S. La transizione a zero-quanto produce una diminuzione della differenza di popolazione in α e β relativa ad S. Ne conseguono una diminuzione del vettore magnetizzazione di S lungo z e una diminuzione dell'intensità del segnale per S (NOE negativo). W_2 per contro aumenta la differenza di popolazione tra i due stati e quindi un aumento del segnale (NOE positivo). Si osserverà, quindi, un effetto NOE positivo o negativo a seconda della transizione che prevale mentre sarà nullo se le due si uguagliano. L'efficacia delle transizioni W_0 , W_1 e W_2 dipende dalla velocità di riorientazione delle molecole in soluzione e quindi dal loro tempo di correlazione rotazionale (τ_c). Si può convertire il volume dei cross-picchi in distanze interatomiche. L'effetto NOE è infatti inversamente proporzionale alla sesta potenza della distanza internucleare secondo la relazione seguente:

$$\eta_I(S) = \frac{W_2 - W_0}{2W_1 + W_0 + W_2} \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \propto \frac{1}{r^6} f(\tau_c)$$

Sperimentalmente sono osservabili solo i picchi derivati dall'accoppiamento scalare di nuclei distanti un massimo di 5Å.

La fig. 26 riporta la sequenza di impulsi dell'esperimento NOESY.

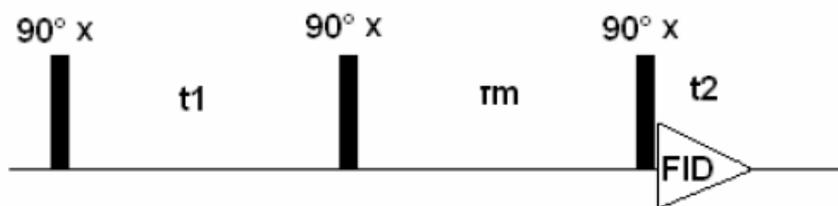


Fig. 26. Sequenza di impulsi di un NOESY.

Il primo impulso a 90° deflette la magnetizzazione sul piano trasversale dove, durante t_1 , evolve sotto l'effetto del *chemical shift* e degli accoppiamenti scalari. Il secondo impulso riporta parzialmente la magnetizzazione lungo z dove viene lasciata rilassare per un periodo pari a τ_m , per effetto dell'accoppiamento dipolare. Con il terzo impulso la magnetizzazione risultante ritorna sul piano xy e viene rivelata durante t_2 . Ovviamente è opportuno eliminare tutti gli accoppiamenti scalari con vari cicli di fase.

Un ruolo fondamentale, dunque, è rivestito dalla scelta del tempo di mescolamento (τ_m). Questo parametro deve essere sufficientemente grande da consentire il trasferimento della magnetizzazione tra spin dipolarmente accoppiati ma non deve essere troppo lungo per evitare i fenomeni di *spin-diffusion*. Si può spiegare la *spin-diffusion* segue: se il nucleo A è dipolarmente accoppiato con il nucleo B ma non con il nucleo C e B, a sua volta, è accoppiato con C allora la magnetizzazione si trasferisce da A a C creando ingannevoli cross-picchi.

ROESY è l'acronimo di Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy. È un esperimento che misura l'effetto NOE sotto l'azione dello *spin lock* ed è indicato per molecole che hanno un τ_c tale per cui $\omega\tau_c \approx 1$, dove ω è la frequenza angolare pari a $\omega = \gamma B$. In alcuni casi il NOE è vicino a zero mentre il *rotating-frame NOE* (ROE) è sempre positivo e cresce in modo monotono al crescere di τ_c . L'effetto NOE è tipicamente vicino a zero per molecole piccole (1000-2000 dalton) quindi diventa necessario osservare l'effetto ROE per determinare accoppiamenti dipolari. Nei ROESY il *mixing time* è rappresentato dallo *spin lock*. Durante questo periodo avviene lo scambio di spin tra i componenti della magnetizzazione tra nuclei differenti. La sequenza di impulsi per il ROESY è molto simile a quella del TOCSY ed è qui riportata:

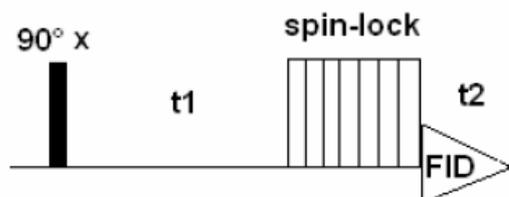


Fig. 27. Sequenza di impulsi di un ROESY.

3.6.2.4 NMR eteronucleare: HSQC

La sequenza INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer) è alla base di molti esperimenti eteronucleari che correlano i protoni agli eteronuclei con cui accoppiano. I vari nuclei attivi in NMR mostrano differente sensibilità in accordo al loro rapporto giromagnetico. Lo scopo dell' INEPT è quello di trasferire magnetizzazione da un nucleo con alto rapporto giromagnetico, in genere il protone, ad uno con un rapporto giromagnetico inferiore, come azoto e carbonio, attraverso l'accoppiamento scalare.

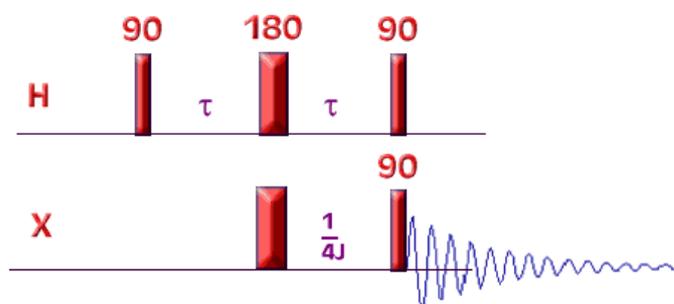


Fig. 28. Sequenza INEPT.

L'esperimento HSQC applica due sequenze INEPT: la prima permette di trasferire la magnetizzazione dal protone all'eteronucleo, la seconda, che risulta essere l'opposto della prima, trasferisce di nuovo la magnetizzazione sul nucleo di partenza.

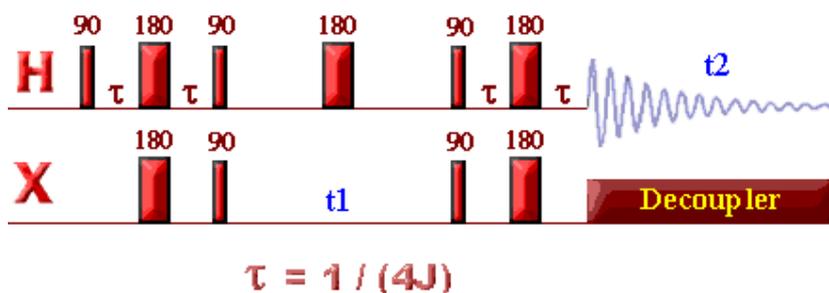


Fig. 29. Sequenza di impulsi di un HSQC.

Iniziando e finendo l'esperimento sui nuclei con alto valore di γ la sensibilità può essere aumentata notevolmente. Gli esperimenti che rilevano il protone sono i più usati in ambito biomolecolare in quanto non solo la sensibilità è alta,

ma il *recycle delay* può essere mantenuto breve poiché lo spin del protone recupera il suo equilibrio di magnetizzazione velocemente. Ciò aumenta significativamente il rapporto segnale/rumore.

Risultati e Discussione

4.1 SINTESI DEI PEPTIDI

4.1.1 Anta c(VPPAFFPPFF)

Sintesi del frammento 1-4 (VPPA):

2.493 g di Z-Pro-OH (10 mmol) sono sciolti in THF anidro. La soluzione viene raffreddata a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e si aggiungono 1.31 mL di IBCF (10 mmol) e 1.10 mL di NMM (10 mmol). Dopo 2 min si aggiungono 2.032 g di H-Ala-NHNH-Boc (10 mmol) preventivamente sciolti in THF anidro raffreddato a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si aggiusta il pH a 8.5. La reazione è condotta per 10 min a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min a T ambiente. La soluzione viene poi evaporata a olio che viene ripartito tra AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata consecutivamente 3 volte con KHSO_4 al 2%, 3 volte con Na_2CO_3 0.5 M, acqua e infine viene anidrificata con Na_2SO_4 . La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con etere di petrolio.

Per la rimozione del gruppo Z il precipitato è sciolto in MeOH e si effettua un'idrogenazione a T ambiente e P atmosferica in presenza di carbone palladiato (10%). Si porta il pH a 5 con HCl in MeOH per favorire la reazione. L'andamento viene seguito mediante TLC. Il catalizzatore viene eliminato per filtrazione e il filtrato viene concentrato e precipitato con Et_2O . Il dipeptide H-Pro-Ala-NHNH-Boc viene quindi purificato mediante RP-HPLC preparativa e poi liofilizzato. Si sono ottenuti 1.822 g (6.2 mmol) pari a una resa del 62%.

1.546 g di Z-Pro-OH (6.2 mmol) sono sciolti in THF anidro. La soluzione viene raffreddata a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e si aggiungono 813 μL di IBCF (6.2 mmol) e 682 μL di NMM (6.2 mmol). Dopo 2 min si aggiungono 1.822 g di H-Pro-Ala-NHNH-Boc (6.2 mmol) preventivamente sciolti in THF anidro raffreddato a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si aggiusta il pH a 8.5 e si procede come sopra. Si sono ottenuti 1.510 g di H-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc (3.8 mmol) pari a una resa del 61%.

1.324 g di Z-Val-OSu (3.8 mmol) sono sciolti in THF a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si aggiungono 1.510 g di H-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc (3.8 mmol) e si lascia sotto agitazione per 24 h a T ambiente. L'estere attivo viene preparato per reazione tra Z-Val-

OH con 1 equivalente di DCCI e 1 equivalente di HOSu in DCM a 0 °C per 8 h. A reazione terminata la soluzione viene evaporata a olio e ripartita tra AcOEt e acqua e lavorata come sopra. Dopo rimozione del gruppo Z e purificazione si sono ottenuti 1.540 g di H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc (3.1 mmol) pari a una resa dell'81%.

Il tetrapeptide è stato sintetizzato in quantità elevata in quanto risulta essere comune a tutti i peptidi di seguito preparati.

Sintesi del frammento 5-6 (FF):

215.68 mg di H-Phe-OMe·HCl (1 mmol) sono sciolti in THF a 0 °C. Si aggiungono 13 µL di TEA (1 mmol) per deprotonare l'ammina e in seguito 362.38 mg di Boc-Phe-OSu (1 mmol) precedentemente preparato per reazione con DCCI/HOSu in DCM a 0 °C. Si lascia reagire a T ambiente per 24 h. La soluzione è evaporata a olio e ripartita tra AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata consecutivamente 3 volte con KHSO₄ al 2%, 3 volte con Na₂CO₃ 0.5 M, acqua e infine viene anidrificata con Na₂SO₄. La soluzione viene concentrata su rotavapor e il dipeptide è precipitato con etere di petrolio. Dopo filtrazione il precipitato viene essiccato in stufa a vuoto. In seguito a purificazione tramite RP-HPLC e successiva liofilizzazione si sono ottenuti 358.27 mg di Boc-Phe-Phe-OMe (0.84 mmol) pari a una resa dell'84%.

In seguito il dipeptide così ottenuto viene diviso in due porzioni uguali. Una è sottoposta a idrazinolisi: il peptide viene sciolto in MeOH e trattato con 20 equivalenti di idrazina idrata a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il dipeptide è precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato da MeOH/Et₂O. Dopo purificazione si sono ottenuti 170.6 mg di Boc-Phe-Phe-N₂H₃ (0.40 mmol) pari a una resa del 95%.

Sintesi del frammento 7-10 (PPFF):

Una porzione del dipeptide Boc-Phe-Phe-OMe sintetizzato nel passaggio precedente viene usata per questa preparazione. La rimozione del gruppo protettore Boc avviene per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di

anisolo per 90 min sotto agitazione. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con Et₂O. Il peptide viene quindi filtrato e lavato più volte con etere etilico fresco. Infine viene messo in stufa sotto vuoto e poi utilizzato senza ulteriore purificazione.

133.87 mg di H-Phe-Phe-OMe (0.41 mmol) sono sciolti in THF anidro a -15 °C. La soluzione viene aggiunta a una soluzione di THF a -15 °C in cui sono sciolti 102.2 mg di Z-Pro-OH (0.41 mmol), 54 µL di IBCF (0.41 mmol) e 45 µL di NMM (0.41 mmol). Si aggiusta il pH a 8.5. La reazione è condotta per 10 min a -10 °C, 30 min a T ambiente. La soluzione viene poi evaporata a olio che viene ripartito tra AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata consecutivamente 3 volte con KHSO₄ al 2%, 3 volte con Na₂CO₃ 0.5 M, acqua e infine viene anidrificata con Na₂SO₄. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con etere di petrolio. Il precipitato è sciolto in MeOH e si effettua un'idrogenazione a T ambiente e P atmosferica in presenza di carbone palladiato (10%). Si porta il pH a 5 con HCl in MeOH per favorire la reazione. L'andamento viene seguito mediante TLC. Il catalizzatore viene eliminato per filtrazione e il filtrato viene concentrato e precipitato con Et₂O. Il peptide viene quindi purificato mediante RP-HPLC preparativa e poi liofilizzato. Si sono ottenuti 122.86 mg di H-Pro-Phe-Phe-OMe (0.29 mmol) pari a una resa del 70%.

72.29 mg di Z-Pro-OH (0.29 mmol) sono sciolti in THF anidro a -15 °C. Si aggiungono 38 µL di IBCF (0.29 mmol) e 32 µL di NMM (0.29 mmol). Si aggiunge quindi la soluzione di THF anidro preraffreddata contenente i 122.86 mg di H-Pro-Phe-Phe-OMe e si procede come sopra. Dopo rimozione del gruppo Z e purificazione si sono ottenuti 98.95 mg di H-Pro-Pro-Phe-Phe-OMe (0.19 mmol) pari a una resa del 67%.

Condensazione frammenti 5-6 e 7-10:

81 mg di Boc-Phe-Phe-N₂H₃ (0.19 mmol) vengono sciolti in DMF anidra raffreddata a -15 °C. La soluzione viene trattata con 4 equivalenti di HCl in diossano e 25 µL di *tert*-butilnitrito (1.1 eq). Dopo la formazione dell'azide, verificata tramite saggio apposito, la soluzione è raffreddata a -60 °C e

neutralizzata con 4 equivalenti di TEA. Si aggiunge quindi la soluzione preraffreddata del componente amminico contenente 98.95 mg di H-Pro-Pro-Phe-Phe-OMe (0.19 mmol). Il pH viene aggiustato a 7.5-8 con TEA e vengono aggiunti 21.87 mg di HOSu (1 eq) come catalizzatore. La reazione decorre 6 giorni a 4 °C e 1 giorno a T ambiente. La soluzione viene poi evaporata a olio che viene ripartito tra AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata consecutivamente 3 volte con KHSO₄ al 2%, 3 volte con Na₂CO₃ 0.5 M, acqua e infine viene anidrificata con Na₂SO₄. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con etere di petrolio. Il precipitato viene poi sciolto in MeOH e trattato con 20 equivalenti di idrazina idrata a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato da MeOH/Et₂O. In seguito a purificazione in RP-HPLC si sono ottenuti 164.75 mg di Boc-Phe-Phe-Pro-Pro-Phe-Phe-N₂H₃ (0.18 mmol) pari a una resa del 96%.

Condensazione frammenti 5-10 e 1-4:

164.75 mg di Boc-Phe-Phe-Pro-Pro-Phe-Phe-N₂H₃ (0.18 mmol) sono fatti reagire in DMF anidra a -15 °C con 89.42 mg di H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc (0.18 mmol) nelle stesse condizioni della condensazione tra 5-6 e 7-10. Alla fine il Boc viene rimosso per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 90 min. Il peptide è poi precipitato con Et₂O. Dopo purificazione si sono ottenuti 200.78 mg di H-Phe-Phe-Pro-Pro-Phe-Phe-Val-Pro-Pro-Ala-N₂H₃ (0.17 mmol) pari a una resa del 94%.

Ciclizzazione:

Il peptide deprotetto viene sciolto in DMF ed è trasformato in azide con *tert*-butilnitrito come riportato precedentemente. La soluzione acida è raffreddata a -60 °C e diluita alla concentrazione di 1 mM con DMF preraffreddata anidra sotto atmosfera di azoto. Si aggiungono 5 equivalenti di K₂HPO₄ e 1 equivalente di HOSu come catalizzatore. La reazione procede 6 giorni a 4 °C in atmosfera di azoto. Poi il solvente viene evaporato e il peptide è precipitato con

una soluzione al 10% di AcOH. Infine viene purificato mediante RP-HPLC preparativa. La resa della reazione è quantitativa.

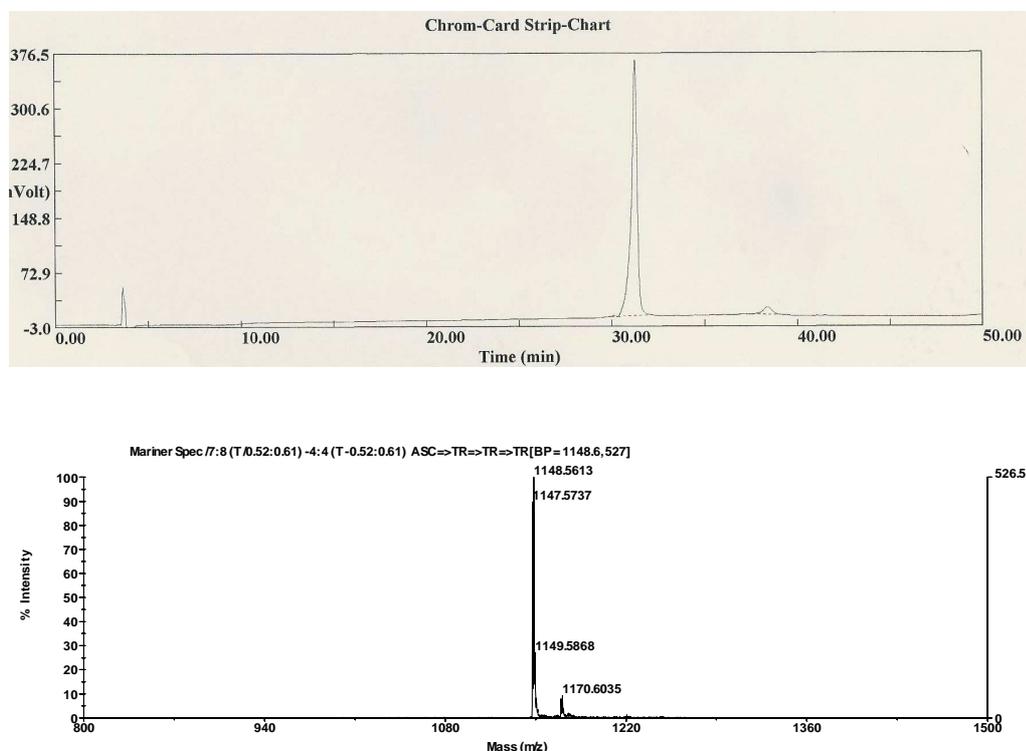


Fig. 30. Cromatogramma analitico e spettro ESI-MS di Anta.

4.1.2 Gly 6 c(VPPAFGPPFF)

Sintesi del frammento 1-4 (VPPA):

Il tetrapeptide H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc viene sintetizzato come riportato nella sintesi di Anta ed è una porzione di quel prodotto.

Sintesi del frammento 5-6 (PG):

36.24 mg di Boc-Phe-OSu (0.1 mmol), precedentemente preparato, sono sciolti in THF anidro a 0 °C. Si aggiungono 13.55 mg di H-Gly-OMe•HCl (0.1 mmol) e 1.3 µL di TEA (0.1 mmol) per deprotonare l'ammina. La reazione decorre 24 h a T ambiente. La soluzione è evaporata a olio e ripartita tra AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata consecutivamente 3 volte con KHSO₄ al 2%, 3 volte con Na₂CO₃ 0.5 M, acqua e infine viene anidrificata con Na₂SO₄. La

soluzione viene concentrata e il dipeptide è precipitato con etere di petrolio. Successivamente viene sciolto in MeOH e trattato con 20 equivalenti di idrazina idrata a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il dipeptide è precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato da MeOH/Et₂O. Dopo purificazione tramite RP-HPLC e successiva liofilizzazione si sono ottenuti 26.04 mg di Boc-Phe-Gly-N₂H₃ (0.091 mmol) pari a una resa del 91%.

Sintesi del frammento 7-10 (PPFF):

215.68 mg di H-Phe-OMe•HCl (1 mmol) sono sciolti in THF a 0 °C. Si aggiungono 13 µL di TEA (1 mmol) per deprotonare l'ammina e in seguito 362.38 mg di Boc-Phe-OSu (1 mmol) precedentemente preparato per reazione con DCCI/HOSu in DCM a 0 °C. Si lascia reagire a T ambiente per 24 h. La soluzione è evaporata a olio e ripartita tra AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata consecutivamente 3 volte con KHSO₄ al 2%, 3 volte con Na₂CO₃ 0.5 M, acqua e infine viene anidrificata con Na₂SO₄. La soluzione viene concentrata e il dipeptide è precipitato con etere di petrolio. Dopo filtrazione il precipitato viene essiccato in stufa a vuoto. In seguito a purificazione tramite RP-HPLC e successiva liofilizzazione si sono ottenuti 375.33 mg di Boc-Phe-Phe-OMe (0.88 mmol) pari a una resa dell'88%. Il dipeptide viene quindi diviso in 4 parti uguali in quanto corrisponde anche ai frammenti 5-6 di Gly 9 e Tyr 9 e al frammento 9-10 di Tyr 6.

249.26 mg di Z-Pro-OH (1 mmol) sono sciolti con 171.23 mg di H-Pro-OtBu (1 mmol) in MeCN anidro a -10 °C. Si aggiungono 206.33 mg di DCCI (1 mmol). La reazione decorre per 2 h a 0 °C e 1 giorno a T ambiente. La soluzione è evaporata a olio e lavorata come sopra. La rimozione di tBu avviene come per il Boc per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 90 min. Il peptide è precipitato con Et₂O. Si sono ottenuti 226.68 mg di Z-Pro-Pro-OH (0.92 mmol) pari a una resa del 92%. Il dipeptide viene diviso in 6 parti uguali in quanto corrisponde al frammento 7-8 di tutti gli altri derivati dell'Anta di seguito sintetizzati. 36.96 mg di Z-Pro-Pro-OH (0.15 mmol) sono sciolti con 48.98 mg di H-Phe-Phe-OMe (0.15 mmol, ottenuto per

rimozione del Boc dal dipeptide corrispondente) in MeCN anidro a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si aggiungono 30.95 mg di DCCI (0.15 mmol) e si procede come sopra. La rimozione del gruppo Z avviene mediante idrogenazione in MeOH, a T ambiente e P atmosferica, in presenza di carbone palladiato (10%). Si porta il pH a 5 con HCl in MeOH per favorire la reazione. L'andamento viene seguito mediante TLC. Il catalizzatore viene eliminato per filtrazione e il filtrato viene concentrato e precipitato con Et₂O. In seguito a purificazione in RP-HPLC si sono ottenuti 72.91 mg di H-Pro-Pro-Phe-Phe-OMe (0.14 mmol) pari a una resa del 93%.

Condensazione dei frammenti 5-6 e 7-10:

26.04 mg di Boc-Phe-Gly-N₂H₃ (0.091 mmol) vengono sciolti in DMF anidra raffreddata a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. La soluzione viene trattata con 4 equivalenti di HCl in diossano e 11 μL di *tert*-butilnitrito. Dopo la formazione dell'azide, verificata tramite saggio apposito, la soluzione è raffreddata a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e neutralizzata con 4 equivalenti di TEA. Si aggiunge quindi la soluzione di DMF anidra preraffreddata contenente 47.39 mg di H-Pro-Pro-Phe-Phe-OMe (0.091 mmol). Il pH viene aggiustato a 7.5-8 con TEA e vengono aggiunti 10.47 mg di HOSu (1 eq) come catalizzatore. La reazione decorre 6 giorni a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1 giorno a T ambiente. La soluzione viene poi evaporata a olio che viene ripartito tra AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata consecutivamente 3 volte con KHSO₄ al 2%, 3 volte con Na₂CO₃ 0.5 M, acqua e infine viene anidrificata con Na₂SO₄. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con etere di petrolio. Il precipitato viene poi sciolto in MeOH e trattato con 20 equivalenti di idrazina idrata a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato da MeOH/Et₂O. In seguito a purificazione in RP-HPLC si sono ottenuti 73.42 mg di Boc-Phe-Gly-Pro-Pro-Phe-Phe-N₂H₃ (0.089 mmol) pari a una resa del 98%.

Condensazione dei frammenti 5-10 e 1-4:

73.42 mg di Boc-Phe-Gly-Pro-Pro-Phe-Phe-N₂H₃ (0.089 mmol) sono sciolti in DMF anidra a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e trattati come sopra per formare l'azide. Si aggiungono

44.20 mg di H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc (0.089 mmol) in soluzione di DMF pre-raffreddata e si procede nelle stesse condizioni della condensazione tra 5-6 e 7-10. Alla fine il Boc viene rimosso per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 90 min. Il peptide è poi precipitato con Et₂O. Dopo purificazione si sono ottenuti 101.12 mg di H-Phe-Gly-Pro-Pro-Phe-Phe-Val-Pro-Pro-Ala-N₂H₃ (0.085 mmol) pari a una resa del 96%.

Ciclizzazione:

Il peptide deprotetto viene sciolto in DMF ed è trasformato in azide con *tert*-butilnitrito come sopra. La soluzione acida è raffreddata a -60 °C e diluita alla concentrazione di 1 mM con DMF preraffreddata anidra tenuta in atmosfera di azoto. Si aggiungono 5 equivalenti di K₂HPO₄ e 1 equivalente di HOSu come catalizzatore. La reazione procede 6 giorni a 4 °C in atmosfera di azoto. Poi il solvente viene evaporato e il peptide è precipitato con una soluzione al 10% di AcOH. Infine viene purificato mediante RP-HPLC preparativa. La resa della reazione è quantitativa.

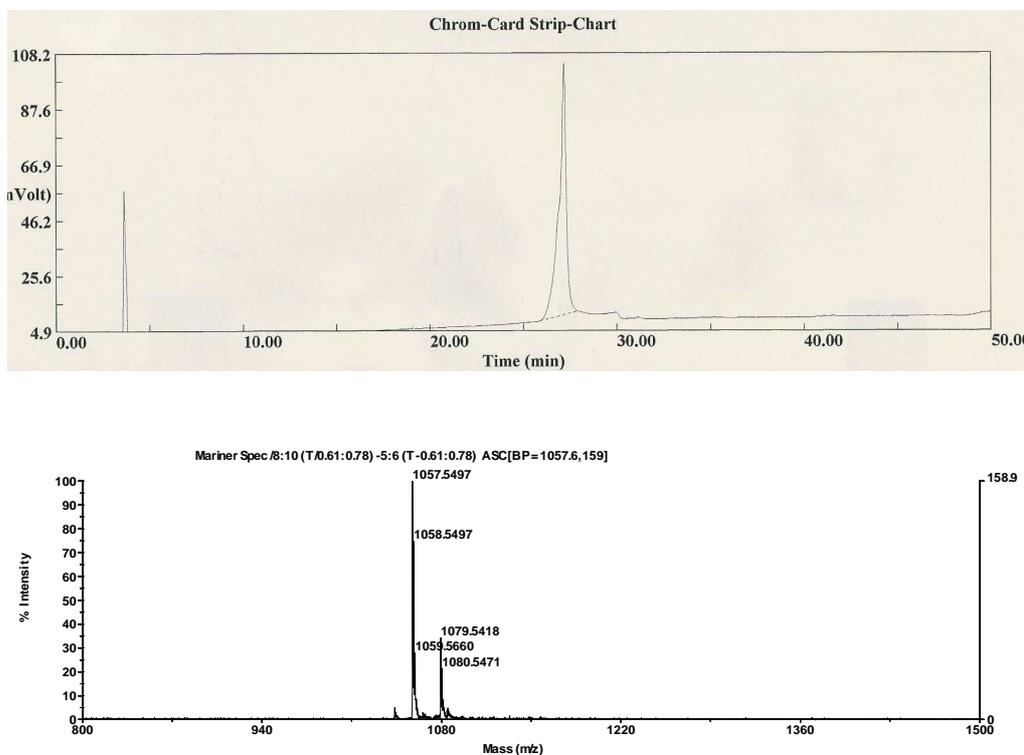


Fig. 31. Cromatogramma analitico e spettro ESI-MS di Gly 6.

4.1.3 Gly 9 c(VPPAFFPPGF)

Sintesi del frammento 1-4 (VPPA):

Il tetrapeptide H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc viene sintetizzato come riportato nella sintesi di Anta ed è una porzione di quel prodotto.

Sintesi del frammento 5-6 (FF):

Il dipeptide Boc-Phe-Phe-OMe viene sintetizzato come il dipeptide 9-10 usato nella preparazione del frammento 7-10 di Gly 6 ed è una porzione di quel prodotto. 93.83 mg (0.22 mmol) sono sciolti in MeOH e trattati con 20 equivalenti di idrazina idrata a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il dipeptide è precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato da MeOH/Et₂O. Dopo purificazione tramite RP-HPLC e successiva liofilizzazione si sono ottenuti 93.12 mg di Boc-Phe-Phe-N₂H₃ (0.218 mmol) pari a una resa del 99%.

Sintesi del frammento 7-10 (PPGF):

43.14 mg di H-Phe-OMe•HCl (0.2 mmol) sono sciolti in THF a 0 °C. Si aggiungono 2.6 µL di TEA (0.2 mmol) per deprotonare l'ammina e in seguito 54.46 mg di Boc-Gly-OSu (0.2 mmol) precedentemente preparato. Si lascia reagire a T ambiente per 24 h. La soluzione è evaporata a olio, ripartita tra AcOEt e acqua e lavorata come in precedenza. Il Boc è rimosso per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 90 min. Il peptide viene poi precipitato con Et₂O. Dopo purificazione si sono ottenuti 39.71 mg di H-Gly-Phe-OMe (0.168 mmol) pari a una resa dell'84%.

Il dipeptide Z-Pro-Pro-OH viene sintetizzato come il dipeptide 7-8 usato nella preparazione del frammento 7-10 di Gly 6 ed è una porzione di quel prodotto.

20.70 mg di Z-Pro-Pro-OH (0.084 mmol) sono sciolti con 19.85 mg di H-Gly-Phe-OMe (0.084 mmol) in MeCN anidro a -10 °C. Si aggiungono 17.33 mg di DCCI (0.084 mmol). La reazione decorre per 2 h a 0 °C e 1 giorno a T ambiente. La soluzione è evaporata a olio e lavorata come sopra. Il peptide è

diviso in due porzioni uguali in quanto viene utilizzato anche per la sintesi di Otta-Gly 9. Su una la rimozione del gruppo Z avviene mediante idrogenazione in MeOH, a T ambiente e P atmosferica, in presenza di carbone palladiato (10%). Si porta il pH a 5 con HCl in MeOH per favorire la reazione. L'andamento viene seguito mediante TLC. Il catalizzatore viene eliminato per filtrazione e il filtrato viene concentrato e precipitato con Et₂O. Dopo purificazione si ottengono 29.71 mg di H-Pro-Pro-Gly-Phe-OMe (0.069 mmol) pari a una resa dell'82%.

Condensazione dei frammenti 5-6 e 7-10:

29.43 mg di Boc-Phe-Phe-N₂H₃ (0.069 mmol) vengono sciolti in DMF anidra raffreddata a -15 °C. La soluzione viene trattata con 4 equivalenti di HCl in diossano e 8.3 µL di *tert*-butilnitrito. Dopo la formazione dell'azide, verificata tramite saggio apposito, la soluzione è raffreddata a -60 °C e neutralizzata con 4 equivalenti di TEA. Si aggiunge quindi la soluzione di DMF anidra preraffreddata contenente 29.71 mg di H-Pro-Pro-Gly-Phe-OMe (0.069 mmol). Il pH viene aggiustato a 7.5-8 con TEA e vengono aggiunti 7.94 mg di HOSu (1 eq) come catalizzatore. La reazione decorre 6 giorni a 4 °C e 1 giorno a T ambiente. La soluzione viene poi evaporata a olio che viene ripartito tra AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata consecutivamente 3 volte con KHSO₄ al 2%, 3 volte con Na₂CO₃ 0.5 M, acqua e infine viene anidrificata con Na₂SO₄. La soluzione viene concentrata su rotavapor e il peptide è precipitato con etere di petrolio. Il precipitato viene poi sciolto in MeOH e trattato con 20 equivalenti di idrazina idrata a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato da MeOH/Et₂O. In seguito a purificazione in RP-HPLC si sono ottenuti 51.61 mg di Boc-Phe-Phe-Pro-Pro-Gly-Phe-N₂H₃ (0.065 mmol) pari a una resa del 94%.

Condensazione dei frammenti 5-10 e 1-4:

51.61 mg di Boc-Phe-Phe-Pro-Pro-Gly-Phe-N₂H₃ (0.065 mmol) sono sciolti in DMF anidra a -5 °C e trattati come sopra per formare l'azide. Si aggiungono

32.28 mg di H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc (0.065 mmol) in soluzione di DMF pre-raffreddata e si procede nelle stesse condizioni della condensazione tra 5-6 e 7-10. Alla fine il Boc viene rimosso per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 90 min. Il peptide è poi precipitato con Et₂O. Dopo purificazione si sono ottenuti 64.58 mg di H-Phe-Phe-Pro-Pro-Gly-Phe-Val-Pro-Pro-Ala-N₂H₃ (0.061 mmol) pari a una resa del 94%.

Ciclizzazione:

Il peptide deprotezionato viene sciolto in DMF ed è trasformato in azide con *tert*-butilnitrito come sopra. La soluzione acida è raffreddata a -60 °C e diluita alla concentrazione di 1 mM con DMF preraffreddata anidra tenuta in atmosfera di azoto. Si aggiungono 5 equivalenti di K₂HPO₄ e 1 equivalente di HOSu come catalizzatore. La reazione procede 6 giorni a 4 °C in atmosfera di azoto. Poi il solvente viene evaporato e il peptide è precipitato con una soluzione al 10% di AcOH. Infine viene purificato mediante RP-HPLC preparativa. La resa della reazione è quantitativa.

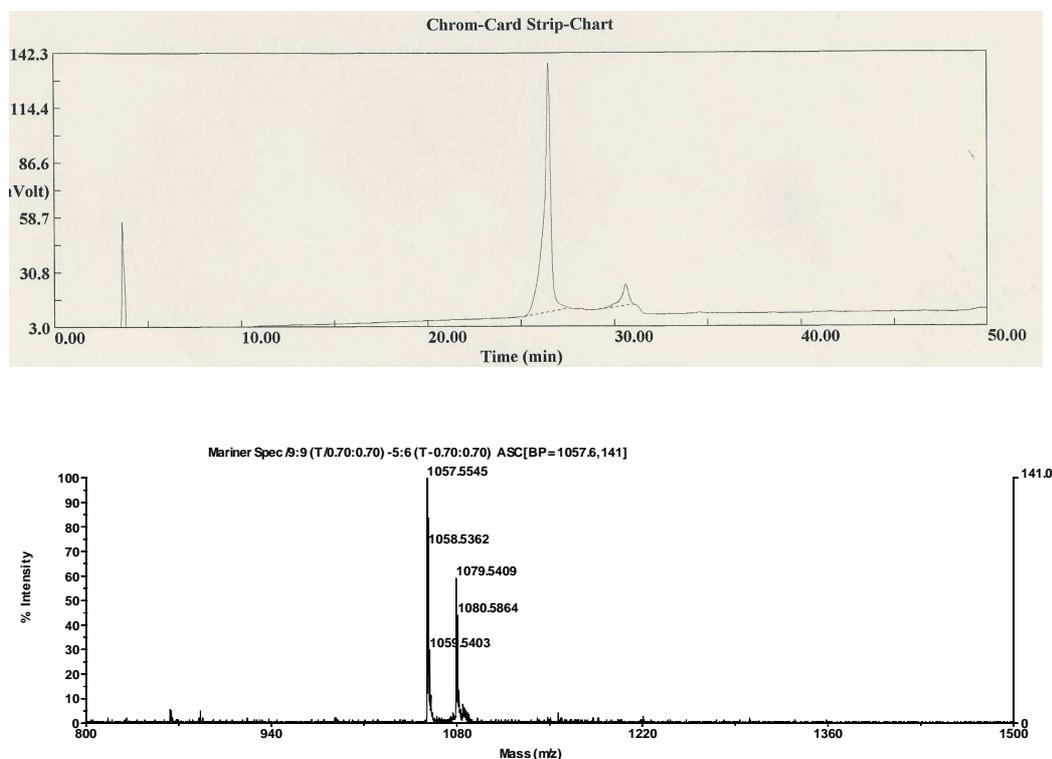


Fig. 32. Cromatogramma analitico e spettro ESI-MS di Gly 9.

4.1.4 Tyr 6 c(VPPAFYPPFF)

Sintesi del frammento 1-4 (VPPA):

Il tetrapeptide H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc viene sintetizzato come riportato nella sintesi di Anta ed è una porzione di quel prodotto.

Sintesi del frammento 5-6 (FY):

36.24 mg di Boc-Phe-OSu (0.1 mmol), precedentemente preparato, sono sciolti in THF anidro a 0 °C. Si aggiungono 23.17 mg di H-Tyr-OMe•HCl (0.1 mmol) e 1.3 µL di TEA (0.1 mmol) per deprotonare l'ammina. La reazione decorre 24 h a T ambiente. La soluzione è evaporata a olio e ripartita tra AcOEt e acqua. La fase organica viene lavata consecutivamente 3 volte con KHSO₄ al 2%, 3 volte con Na₂CO₃ 0.5 M, acqua e infine viene anidrificata con Na₂SO₄. La soluzione viene concentrata su rotavapor e il dipeptide è precipitato con etere di petrolio. Successivamente viene sciolto in MeOH e trattato con 20 equivalenti di idrazina idrata a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il dipeptide è precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato da MeOH/Et₂O. Dopo purificazione tramite RP-HPLC e successiva liofilizzazione si sono ottenuti 38.93 mg di Boc-Phe-Tyr-N₂H₃ (0.088 mmol) pari a una resa del 88%.

Sintesi del frammento 7-10 (PPFF):

Il tetrapeptide H-Pro-Pro-Phe-Phe-OMe viene sintetizzato come riportato nella sintesi di Gly 6 ed è una porzione di quel prodotto.

Condensazione dei frammenti 5-6 e 7-10:

38.93 mg di Boc-Phe-Tyr-N₂H₃ (0.088 mmol) sono fatti reagire con 45.83 mg di H-Pro-Pro-Phe-Phe-OMe (0.088 mmol) in DMF anidra a -15 °C secondo le modalità già riportate sopra per il coupling via azide. Il peptide così ottenuto viene trasformato in idrazide trattandolo con 20 equivalenti di idrazina idrata in MeOH a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il peptide è

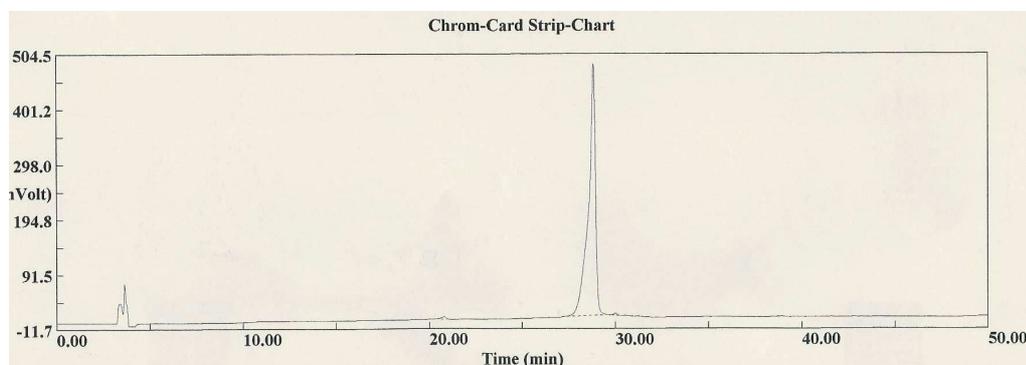
precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H_2SO_4 al 98% e in seguito ricristallizzato da $\text{MeOH}/\text{Et}_2\text{O}$. In seguito a purificazione in RP-HPLC si sono ottenuti 76.36 mg di Boc-Phe-Tyr-Pro-Pro-Phe-Phe- N_2H_3 (0.082 mmol) pari a una resa del 93%.

Condensazione dei frammenti 5-10 e 1-4:

76.36 mg di Boc-Phe-Tyr-Pro-Pro-Phe-Phe- N_2H_3 (0.082 mmol) sono fatti reagire in DMF anidra a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ con 40.73 mg di H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc (0.082 mmol) nelle stesse condizioni già riportate. Alla fine il Boc viene rimosso per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 90 min. Il peptide è poi precipitato con Et_2O . Dopo purificazione si sono ottenuti 94.47 mg di H-Phe-Tyr-Pro-Pro-Phe-Phe-Val-Pro-Pro-Ala- N_2H_3 (0.079 mmol) pari a una resa del 96%.

Ciclizzazione:

Il peptide deprotetto viene sciolto in DMF ed è trasformato in azide con *tert*-butilnitrito come sopra. La soluzione acida è raffreddata a $-60\text{ }^\circ\text{C}$ e diluita alla concentrazione di 1 mM con DMF preraffreddata anidra tenuta in atmosfera di azoto. Si aggiungono 5 equivalenti di K_2HPO_4 e 1 equivalente di HOSu come catalizzatore. La reazione procede 6 giorni a $4\text{ }^\circ\text{C}$ in atmosfera di azoto. Poi il solvente viene evaporato e il peptide è precipitato con una soluzione al 10% di AcOH. Infine viene purificato mediante RP-HPLC preparativa. La resa della reazione è quantitativa.



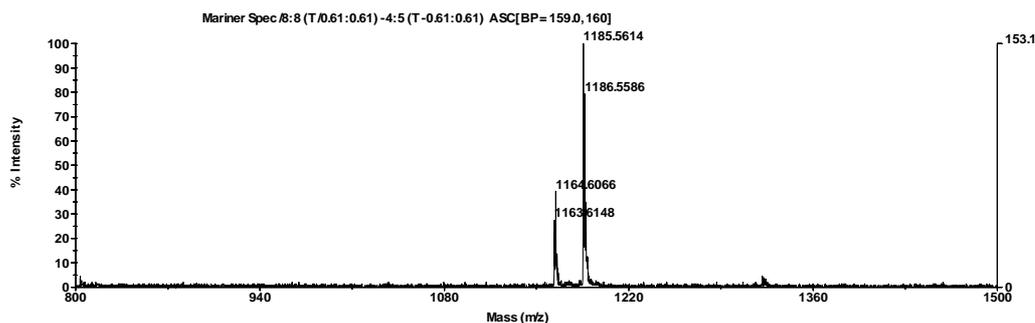


Fig. 33. Cromatogramma analitico e spettro ESI-MS di Tyr 6.

4.1.5 Tyr 9 c(VPPAFFPPYF)

Sintesi del frammento 1-4 (VPPA):

Il tetrapeptide H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc viene sintetizzato come riportato nella sintesi di Anta ed è una porzione di quel prodotto.

Sintesi del frammento 5-6 (FF):

Il dipeptide Boc-Phe-Phe-N₂H₃ viene preparato come riportato nella sintesi del frammento 5-6 del peptide Gly 9 ed è una porzione di quel prodotto.

Sintesi del frammento 7-10 (PPYF):

43-14 mg di H-Phe-OMe•HCl (0.2 mmol) sono sciolti in THF a 0 °C. Si aggiungono 2.6 µL di TEA (0.2 mmol) per deprotonare l'ammina e in seguito 75.68 mg di Boc-Tyr-OSu (0.2 mmol) precedentemente preparato. Si lascia reagire a T ambiente per 24 h. La soluzione è evaporata a olio, ripartita tra AcOEt e acqua e lavorata come in precedenza. Il Boc è rimosso per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 90 min. Il peptide viene poi precipitato con Et₂O. Dopo purificazione si sono ottenuti 29.79 mg di H-Tyr-Phe-OMe (0.087 mmol) pari a una resa dell'87%.

Il dipeptide Z-Pro-Pro-OH viene sintetizzato come il dipeptide 7-8 usato nella preparazione del frammento 7-10 di Gly 6 ed è una porzione di quel prodotto.

21.44 mg di Z-Pro-Pro-OH (0.087 mmol) sono sciolti con 29.79 mg di H-Tyr-Phe-OMe (0.087 mmol) in MeCN anidro a -10 °C. Si aggiungono 17.95 mg di DCCI (0.087 mmol). La reazione decorre per 2 h a 0 °C e 1 giorno a T

ambiente. La soluzione è evaporata a olio e lavorata come sopra. Il peptide è diviso in due porzioni uguali in quanto viene utilizzato anche per la sintesi di Otta-Tyr 9. Su una parte la rimozione del gruppo Z avviene mediante idrogenazione in MeOH, a T ambiente e P atmosferica, in presenza di carbone palladiato (10%). Si porta il pH a 5 con HCl in MeOH per favorire la reazione. L'andamento viene seguito mediante TLC. Il catalizzatore viene eliminato per filtrazione e il filtrato viene concentrato e precipitato con Et₂O. Dopo purificazione si ottengono 39.18 mg di H-Pro-Pro-Tyr-Phe-OMe (0.073 mmol) pari a una resa dell'84%.

Condensazione dei frammenti 5-6 e -7-10:

31.14 mg di Boc-Phe-Phe-N₂H₃ (0.073 mmol) sono fatti reagire con 39.18 mg di H-Pro-Pro-Tyr-Phe-OMe (0.073 mmol) in DMF anidra a -15 °C secondo le modalità già riportate sopra per il coupling via azide. Il peptide così ottenuto viene trasformato in idrazide trattandolo con 20 equivalenti di idrazina idrata in MeOH a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato da MeOH/Et₂O. In seguito a purificazione in RP-HPLC si sono ottenuti 57.35 mg di Boc-Phe-Phe-Pro-Pro-Tyr-Phe-N₂H₃ (0.069 mmol) pari a una resa del 95%.

Condensazione dei frammenti 5-10 e 1-4:

57.35 mg di Boc-Phe-Phe-Pro-Pro-Tyr-Phe-N₂H₃ (0.069 mmol) sono fatti reagire in DMF anidra a -15 °C con 34.27 mg di H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc (0.069 mmol) nelle stesse condizioni già riportate. Alla fine il Boc viene rimosso per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 90 min. Il peptide è poi precipitato con Et₂O. Dopo purificazione si sono ottenuti 76.60 mg di H-Phe-Phe-Pro-Pro-Tyr-Phe-Val-Pro-Pro-Ala-N₂H₃ (0.064 mmol) pari a una resa del 93%.

Ciclizzazione:

Il peptide deproteetto viene sciolto in DMF ed è trasformato in azide con *tert*-butilnitrito come sopra. La soluzione acida è raffreddata a -60 °C e diluita alla

concentrazione di 1 mM con DMF preraffreddata anidra tenuta in atmosfera di azoto. Si aggiungono 5 equivalenti di K_2HPO_4 e 1 equivalente di HOSu come catalizzatore. La reazione procede 6 giorni a 4 °C in atmosfera di azoto. Poi il solvente viene evaporato e il peptide è precipitato con una soluzione al 10% di AcOH. Infine viene purificato mediante RP-HPLC preparativa. La resa della reazione è quantitativa.

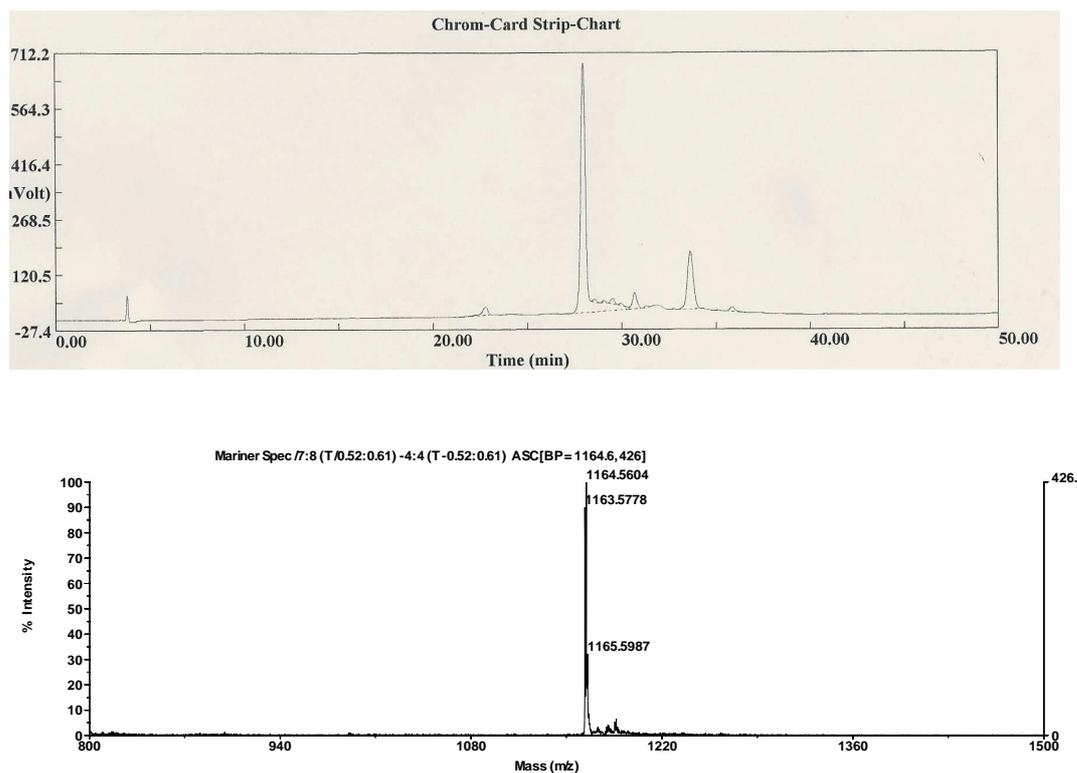


Fig. 34. Cromatogramma analitico e spettro ESI-MS di Tyr 9.

4.1.6 Otta-Gly 9 c(VPPAPPGF)

Sintesi del frammento 1-4 (VPPA):

Il tetrapeptide H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc viene sintetizzato come riportato nella sintesi di Anta ed è una porzione di quel prodotto.

Il frammento 5-6 non è presente nella molecola

Sintesi del frammento 7-10 (PPGF):

Il tetrapeptide Z-Pro-Pro-Gly-Phe-OMe viene sintetizzato come riportato nella sintesi del peptide Gly 9 ed è una porzione di quel prodotto. 33.45 mg (0.072

mmol) di peptide così ottenuto sono trasformati in idrazide trattandoli con 20 equivalenti di idrazina idrata in MeOH a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato da MeOH/Et₂O. In seguito a purificazione in RP-HPLC si sono ottenuti 32.99 mg di Z-Pro-Pro-Gly-Phe-N₂H₃ (0.071 mmol) pari a una resa del 99%.

Condensazione dei frammenti 7-10 e 1-4:

32.99 mg di Z-Pro-Pro-Gly-Phe-N₂H₃ (0.071 mmol) sono fatti reagire in DMF anidra a -15 °C con 35.26 mg di H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc (0.071 mmol) secondo le modalità già riportate per il coupling via azide. La rimozione del gruppo Z avviene mediante idrogenazione in MeOH, a T ambiente e P atmosferica, in presenza di carbone palladiato (10%). Si porta il pH a 5 con HCl in MeOH per favorire la reazione. L'andamento viene seguito mediante TLC. Il catalizzatore viene eliminato per filtrazione e il filtrato viene concentrato e precipitato con Et₂O. La rimozione del gruppo Boc avviene per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 90 min. Il peptide è poi precipitato con Et₂O. Dopo purificazione si ottengono 50.89 mg di H-Pro-Pro-Gly-Phe-Val-Pro-Pro-Ala-N₂H₃ (0.064 mmol) pari a una resa del 90%.

Ciclizzazione:

Il peptide deproteetto viene sciolto in DMF ed è trasformato in azide con *tert*-butilnitrito come sopra. La soluzione acida è raffreddata a -60 °C e diluita alla concentrazione di 1 mM con DMF preraffreddata anidra tenuta in atmosfera di azoto. Si aggiungono 5 equivalenti di K₂HPO₄ e 1 equivalente di HOSu come catalizzatore. La reazione procede 6 giorni a 4 °C in atmosfera di azoto. Poi il solvente viene evaporato e il peptide è precipitato con una soluzione al 10% di AcOH. Infine viene purificato mediante RP-HPLC preparativa. La resa della reazione è quantitativa.

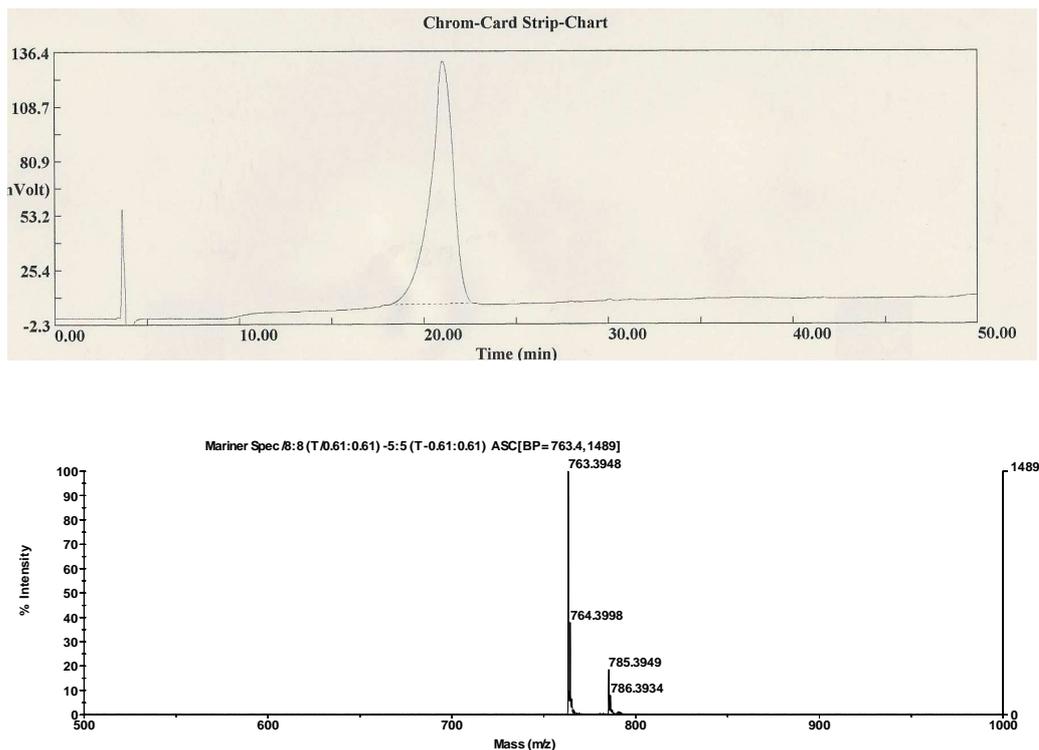


Fig. 35. Cromatogramma analitico e spettro ESI-MS di Otta-Gly 9.

4.1.7 Otta-Tyr 9 c(VPPAPPYF)

Sintesi del frammento 1-4 (VPPA):

Il tetrapeptide H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc viene sintetizzato come riportato nella sintesi di Anta ed è una porzione di quel prodotto.

Il frammento 5-6 non è presente nella molecola

Sintesi del frammento 7-10 (PPYF):

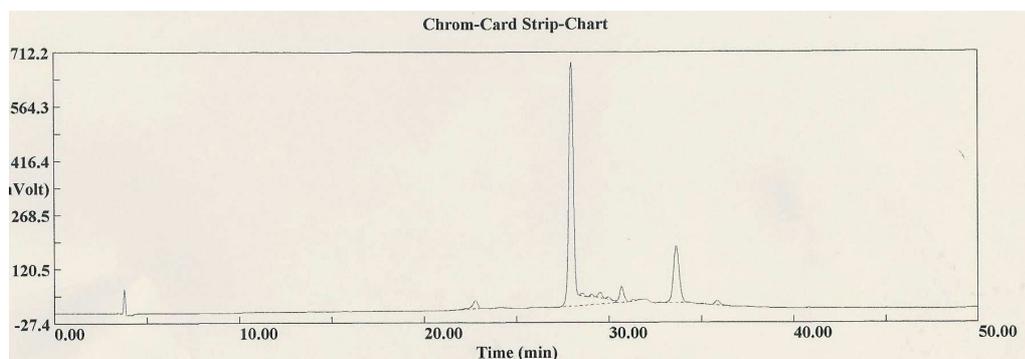
Il tetrapeptide Z-Pro-Pro-Tyr-Phe-OMe viene sintetizzato come riportato nella sintesi del peptide Tyr 9 ed è una porzione di quel prodotto. 44.45 mg (0.078 mmol) di peptide così ottenuto sono trasformati in idrazide trattandoli con 20 equivalenti di idrazina idrata in MeOH a T ambiente per 6 giorni. La soluzione viene concentrata e il peptide è precipitato con acqua. Dopo filtrazione viene anidrificato con H₂SO₄ al 98% e in seguito ricristallizzato da MeOH/Et₂O. In seguito a purificazione in RP-HPLC si sono ottenuti 43.88 mg di Z-Pro-Pro-Tyr-Phe-N₂H₃ (0.077 mmol) pari a una resa del 99%.

Condensazione dei frammenti 7-10 e 1-4:

43.88 mg di Z-Pro-Pro-Tyr-Phe-N₂H₃ (0.077 mmol) sono fatti reagire in DMF anidra a -15 °C con 38.24 mg di H-Val-Pro-Pro-Ala-NHNH-Boc (0.077 mmol) secondo le modalità già riportate per il coupling via azide. La rimozione del gruppo Z avviene mediante idrogenazione in MeOH, a T ambiente e P atmosferica, in presenza di carbone palladiato (10%). Si porta il pH a 5 con HCl in MeOH per favorire la reazione. L'andamento viene seguito mediante TLC. Il catalizzatore viene eliminato per filtrazione e il filtrato viene concentrato e precipitato con Et₂O. La rimozione del gruppo Boc avviene per trattamento con una soluzione di TFA con 10% di anisolo per 90 min. Il peptide è poi precipitato con Et₂O. Dopo purificazione si ottengono 63.99 mg di H-Pro-Pro-Tyr-Phe-Val-Pro-Pro-Ala-N₂H₃ (0.071 mmol) pari a una resa del 92%.

Ciclizzazione:

Il peptide deproteetto viene sciolto in DMF ed è trasformato in azide con *tert*-butilnitrito come sopra. La soluzione acida è raffreddata a -60 °C e diluita alla concentrazione di 1 mM con DMF preraffreddata anidra tenuta in atmosfera di azoto. Si aggiungono 5 equivalenti di K₂HPO₄ e 1 equivalente di HOSu come catalizzatore. La reazione procede 6 giorni a 4 °C in atmosfera di azoto. Poi il solvente viene evaporato e il peptide è precipitato con una soluzione al 10% di AcOH. Infine viene purificato mediante RP-HPLC preparativa. La resa della reazione è quantitativa.



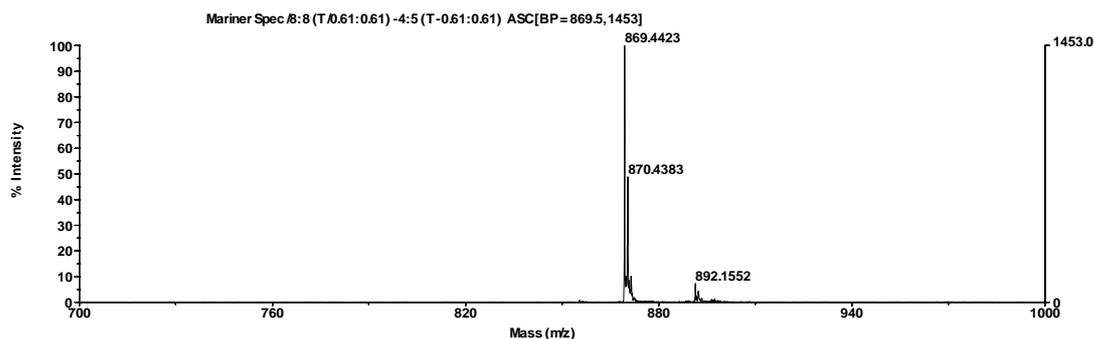


Fig. 36. Cromatogramma analitico e spettro ESI-MS di Otta-Tyr 9.

4.2 SAGGI BIOLOGICI

Al fine di valutare l'attività biologica dell'Antamanide e dei suoi derivati sono stati condotti degli esperimenti su cellule e su mitocondri isolati. Gli esperimenti sono stati eseguiti da Dott. Luca Azzolin presso il Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali dell'Università di Padova.

4.2.1 Calcium Retention Capacity (CRC)

Questo saggio è stato condotto per valutare l'apertura del MPTP in mitocondri isolati, o in cellule permeabilizzate, misurando la fluorescenza della sonda Calcium Green-5N (λ_{exc} : 505 nm; λ_{em} : 535 nm) in seguito ad aggiunte costanti di Ca^{2+} , a 25 °C, in una soluzione 130 mM di KCl, 10 mM Tris/MOPS, 10 mM Tris/EGTA. L'analisi inizia aggiungendo aliquote di Ca^{2+} . Tutte determinano un incremento della fluorescenza di Calcium Green-5N, che aumenta in seguito alla formazione di un complesso con il catione; la fluorescenza tuttavia diminuisce subito in quanto il mitocondrio inizia ad importare il Ca^{2+} . Quando tutto il Ca^{2+} è stato importato si procede a un'altra aggiunta e questa procedura è ripetuta fino a che non vi è un improvviso aumento della fluorescenza corrispondente all'apertura del MPTP con rilascio quindi di Ca^{2+} nell'ambiente extramitocondriale. Stimoli che favoriscono l'apertura del poro quindi riducono la CRC, mentre gli inibitori, come la CsA, la aumentano.

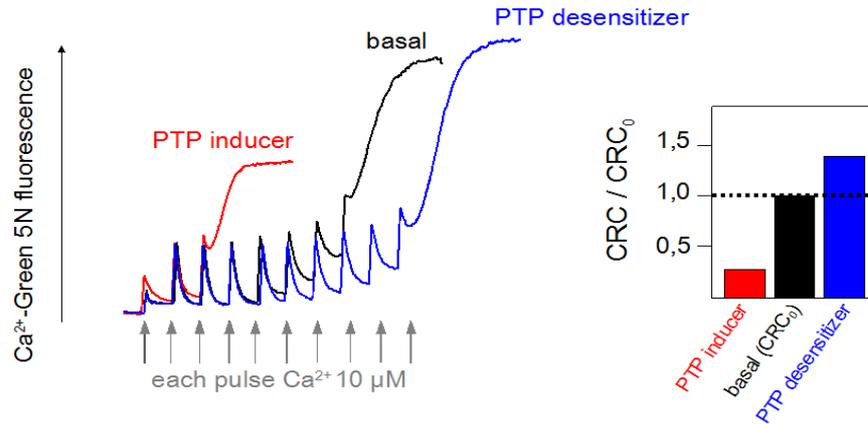


Fig. 37. Esempio dell'azione di un inibitore o di un induttore sulla CRC.

Come controlli si usano il Rosso di Rutenio per inibire selettivamente l'importo mitondriale di Ca^{2+} e l'Alameticina per permeabilizzare tutte le membrane in modo da avere il rilascio di Ca^{2+} da tutti i compartimenti cellulari. La fluorescenza di Calcium Green-5N è stata misurata mediante spettrofluorimetro PerkinElmer Life Sciences LS50B.

I test sono stati effettuati con cellule murine wild type permeabilizzate e con fibroblasti CypD knock-out energizzati al complesso II con succinato in presenza di rotenone e con una concentrazione 1 mM di fosfato inorganico. Il Ca^{2+} viene aggiunto a intervalli di 2 min a una concentrazione 5 μM . Il saggio viene effettuato anche con CsA come controllo positivo.

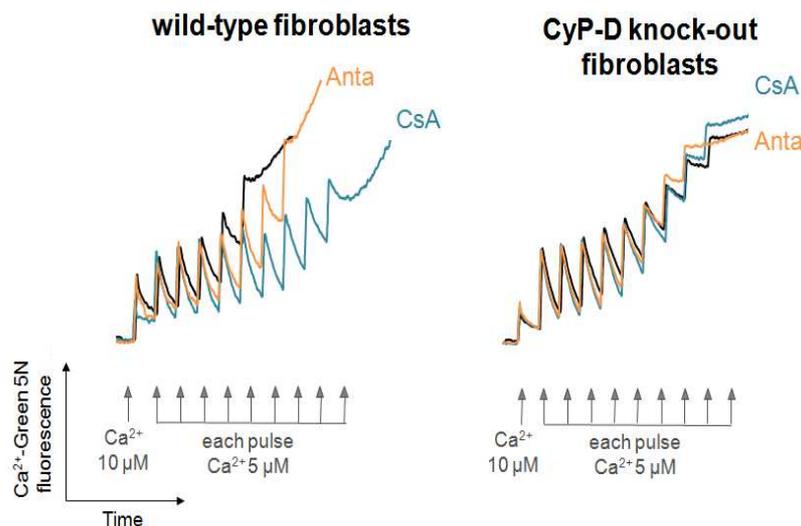


Fig. 38. Effetto di Anta e CsA su CRC.

Come nel caso della CsA, quando l'esperimento viene effettuato in presenza di Antamanide 8 μM si ha un apprezzabile incremento della CRC misurata nelle cellule wild type, ma non in quelle CypD knock-out. Non si manifesta un'azione additiva significativa se i peptidi vengono testati insieme su cellule wild-type. Nei fibroblasti CypD knock-out non vi è desensibilizzazione del poro causata da CsA o Anta; ciò suggerisce che esse abbiano lo stesso meccanismo d'azione sul poro, che richiede un'interazione con CypD. Quest'ipotesi è stata ulteriormente confermata ripetendo i test su mitocondri isolati dello stesso topo e su mitocondri di cellule HeLa, come rappresentative del modello umano. I mitocondri isolati vengono utilizzati esclusivamente per la qualità dell'analisi. I saggi effettuati sui derivati dell'Antamanide hanno dato tutti esito negativo.

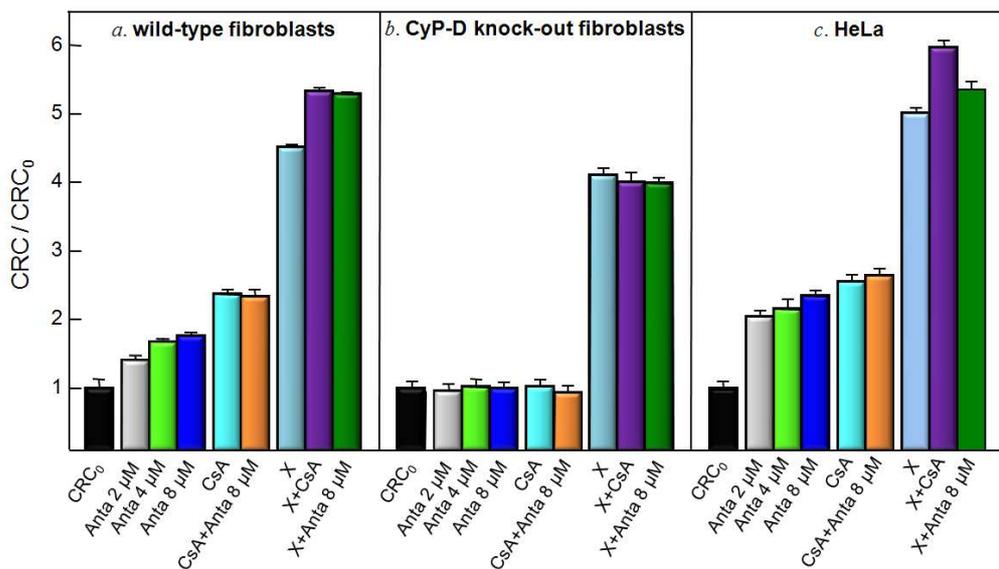


Fig. 39. Effetto sulla CRC di Anta, CsA e X (inibitore del poro CypD-indipendente).

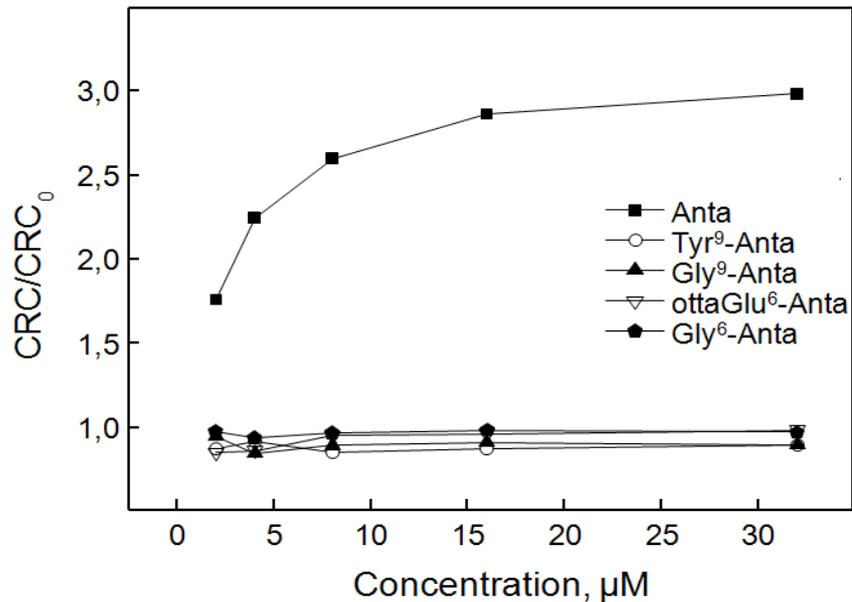


Fig. 40. Effetto sulla CRC di Anta e dei suoi derivati.

4.2.2 Studi di depolarizzazione e morte cellulare

Le cellule, normalmente 50000, vengono poste su un vetrino e lasciate crescere nel loro ambiente per 2 giorni. I vetrini sono sterilizzati mediante esposizione ai raggi UV per 1 h prima di osservare le cellule. La misura di depolarizzazione mitocondriale si basa sull'accumulo di tetrametil rodamina metil estere (TMRM), sonda che si accumula nei mitocondri polarizzati, in presenza di CsH 4 μM che inibisce la glicoproteina P, proteina di membrana implicata nella multi-drug resistance, ma non il MPTP. Le sostanze da studiare che vengono aggiunte sono anch'esse introdotte nell'ambiente di coltura. La misura della fluorescenza di TMRM (λ_{exc} : 268 nm; λ_{em} : 585 nm) viene effettuata a temperatura ambiente con un microscopio Olympus IX71/IX51 equipaggiato con una fotocamera digitale. La sequenza di immagini digitali è acquisita ogni 2 min, con un tempo di esposizione di 25 ms. L'aggiunta di inibitori, o altre sostanze, viene effettuata tra un'acquisizione e l'altra direttamente nell'ambiente cellulare senza mai eccedere l'1% del volume di incubazione. Alla fine di tutti gli esperimenti i mitocondri sono completamente depolarizzati mediante aggiunta di FCCP 4 μM.

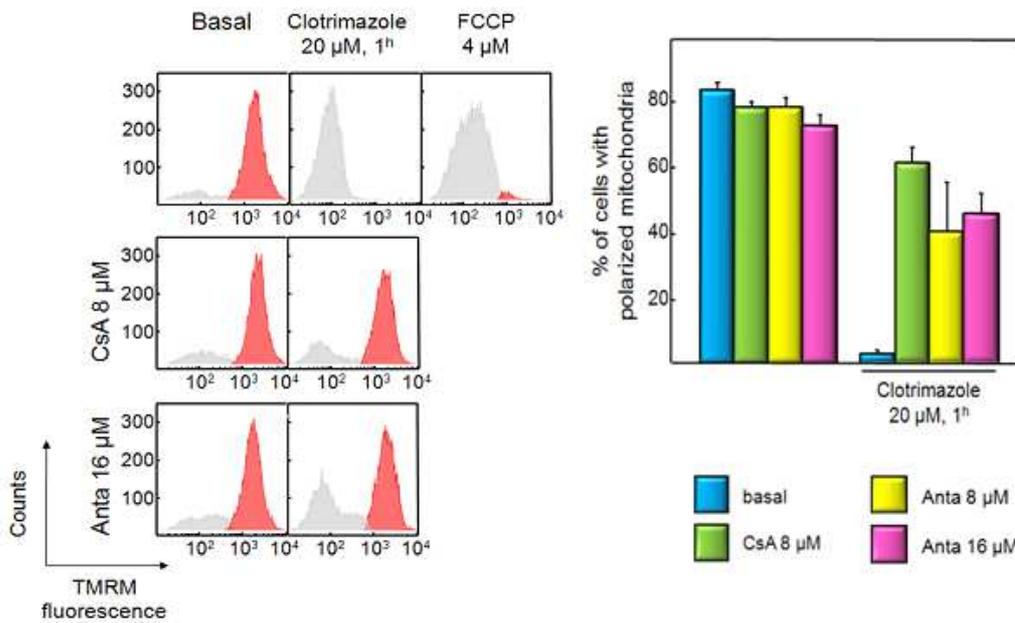


Fig. 41. Effetto di Anta e CsA sulla depolarizzazione mitocondriale indotta da Clotrimazolo. Le cellule con i mitocondri polarizzati e depolarizzati sono indicate rispettivamente in rosso e in grigio.

L'apertura del poro viene osservata indirettamente, dunque, attraverso la depolarizzazione mitocondriale e la risultante diminuzione di fluorescenza di TMRM. Dato che l'apertura del poro è l'evento chiave nella via apoptotica, sono stati condotti anche test di morte cellulare con Propidio ioduro, che in seguito a permeabilizzazione della membrana, dopo la morte, è in grado di penetrare la cellula.

L'Antamanide e i suoi derivati sono stati studiati usando Clotrimazolo e TAT-HK (non mostrato) come induttori del MPTP e di morte cellulare. Il Clotrimazolo è in grado di staccare HK II dal mitocondrio in molti modelli di cellule animali, come HeLa e Jurkat, inducendo morte con un meccanismo MPTP-dipendente. Il meccanismo di azione sul poro risulta ancora non chiaro, anche se è noto che inibisce la respirazione e aumenta l'uptake di Ca^{2+} , fattori che favoriscono l'apertura del MPTP. Le stesse considerazioni inerenti alla morte cellulare valgono anche per TAT-HK. Gli studi sono effettuati anche su CsA. Come controllo positivo si usa FCCP per la depolarizzazione e Digitonina per la morte.

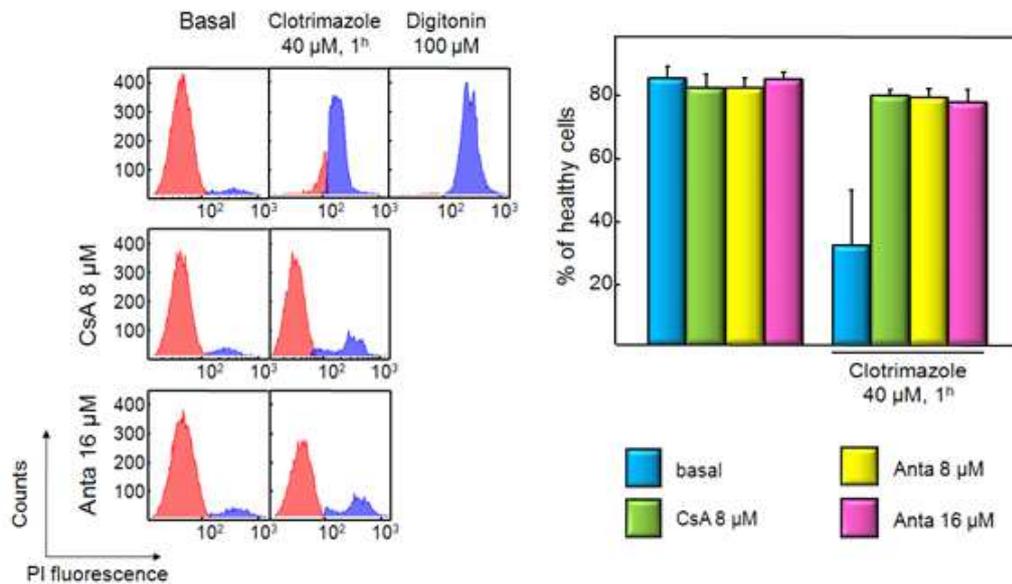


Fig. 42. Effetto di Anta e CsA sulla morte cellulare indotta da Clotrimazolo.

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule HeLa vive. Il Clotrimazolo induce depolarizzazione mitocondriale e morte cellulare ed entrambi gli eventi sono antagonizzati sia dalla CsA che dall'Anta.

Alla luce di questi risultati possiamo affermare che l'Antamanide inibisce l'apertura del poro di transizione mitocondriale e che questa azione si esplica attraverso l'interazione con la ciclofilina D. Infatti non vi è alcun effetto su cellule CypD knock-out, non c'è un effetto additivo con la Ciclosporina A ma questo effetto si manifesta con inibitori del poro con meccanismo CypD-indipendente. Inoltre l'Antamanide protegge dalla depolarizzazione mitocondriale e dalla morte cellulare. Si può infine dedurre che i residui di Phe in posizione 6 e 9 siano fondamentali per l'attività biologica.

Il prossimo passo è stato quello di ottenere per espressione la ciclofilina D marcata al ^{15}N con lo scopo di effettuare, mediante NMR, studi di affinità e ottenere informazioni strutturali importanti per poter progettare e quindi sintetizzare derivati più attivi e che non risultino immunosoppressori.

4.3 ESPRESSIONE DI Cyp-D

La sequenza amminoacidica della Cyp-D clonata per l'espressione è la seguente:

```

      10      20      30      40      50      60
HHHHHHSSGL VPRGSHMLAL RCGSRWLGLL SVPRSVPLRL PAARACSKGS GDPSSSSSSG

      70      80      90      100     110     120
NPLVYLDVDA NGKPLGRVVL ELKADVVPKT AENFRALCTG EKGFGYKGST FHRVIPSFMC

     130     140     150     160     170     180
QAGDFTNHNG TGGKSIYGSR FPDENFTLKH VGPVLSMAN AGPNTNGSQF FICTIKTDWL

     190     200     210     220
DGKHVVFHGHV KEGMDVVKKI ESFGSKSGRT SKKIVITDCG QLS

```

Fig. 43. Sequenza amminoacidica della CypD. Theoretical pI/Mw: 9.58 / 23841.17

I residui 1-16 rappresentano l'His-tag, composto da 6 His e un linker che costituisce il sito di riconoscimento per l'enzima usato per la rimozione del tag stesso. La proteina presenta inoltre la sequenza mitocondriotropica con cui viene biosintetizzata nel citosol e che viene rimossa una volta giunta nella matrice mitocondriale.

Una volta ottenuto il plasmide, gentilmente fornito dalla Dr.ssa Isabella Tessari del laboratorio del Prof. Luigi Bubacco, del Dipartimento di Biologia, la prima operazione è stata quella di mettere a punto un protocollo di espressione efficiente.

La crescita delle cellule è stata condotta ponendo alcune colonie di batteri trasformati con pET28a(+) in LB a 37 °C, in presenza dell'antibiotico kanamicina 50 µg/mL. La coltura è stata poi divisa in tre parti per testare varie concentrazioni di induttore. L'espressione proteica è stata indotta introducendo IPTG ad una concentrazione pari a 0.25 mM nel primo campione, 0.5 mM nel secondo e 1 mM nel terzo, in seguito al raggiungimento di un OD₆₀₀ = 0.6. Il sistema è stato mantenuto in queste condizioni per ulteriori tre ore, dopodiché il materiale cellulare è stato isolato per centrifugazione (5000 rpm per 25 min a 4 °C). Il pellet è stato risospeso in tampone fosfato 50 mM pH 6.5, 100 mM

NaCl, 4 mM DTT e sottoposto a sonicazione. Dopo centrifugazione del lisato batterico, pellet e surnatante sono stati isolati e sono stati raccolti i campioni per determinare le condizioni di espressione ottimali in seguito ad analisi elettroforetica SDS-PAGE. La composizione del gel è la seguente:

	Stacking		Separating
Gel percentage (%)	5	Gel percentage (%)	12
40 % Polyacrylamide (mL)	0.5	40 % Polyacrylamide (mL)	1.8
1M Tris(pH8.8)(mL)	0.5	1.5M Tris(pH8.8)(mL)	1.5
10 % Ammonium persulfate (mL)	0.04	10 % Ammonium persulfate (mL)	0.06
10 % SDS (mL)	0.04	10 % SDS (mL)	0.06
TEMED (mL)	0.004	TEMED (mL)	0.0024
H ₂ O (mL)	2.92	H ₂ O (mL)	2.58
Total volume (mL)	4	Total volume (mL)	6

Fig. 44. Composizione del gel per la SDS-PAGE.

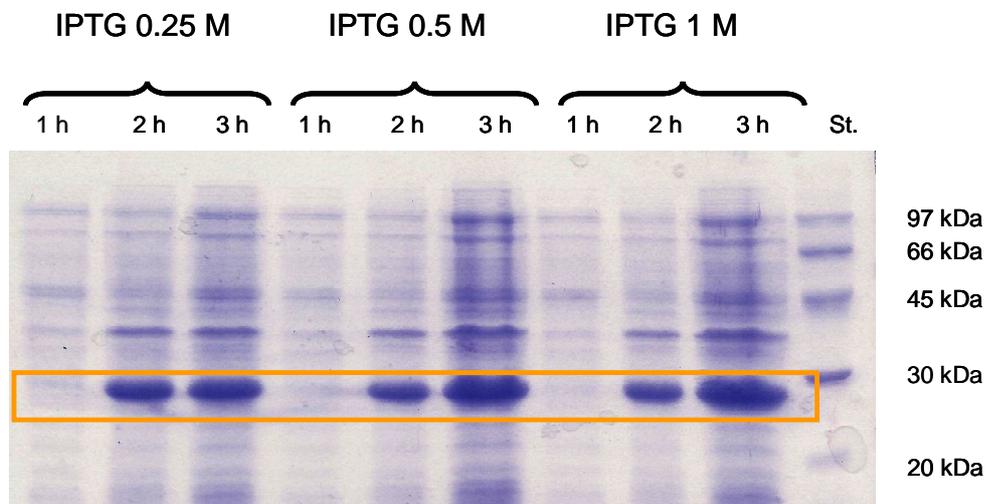


Fig. 45. SDS-PAGE relativo alle prove di induzione di CypD.

I campioni vengono raccolti ogni ora, per tre ore, a partire dall'induzione. Vengono raccolti tre campioni per ognuna delle tre diverse concentrazioni di IPTG. L'assegnazione dei pozzetti è la seguente: 1-2-3 IPTG 0.25 M; 4-5-6 IPTG 0.5 M; 7-8-9 IPTG 1 M; 10 Standard.

I risultati mostrano che l'espressione non è particolarmente influenzata dalla concentrazione di induttore e che la proteina resta nei pellet, in corpi di inclusione, come confermato successivamente dall'analisi elettroforetica effettuata su entrambe le frazioni, solubile e insolubile, nelle medesime condizioni sopra riportate.

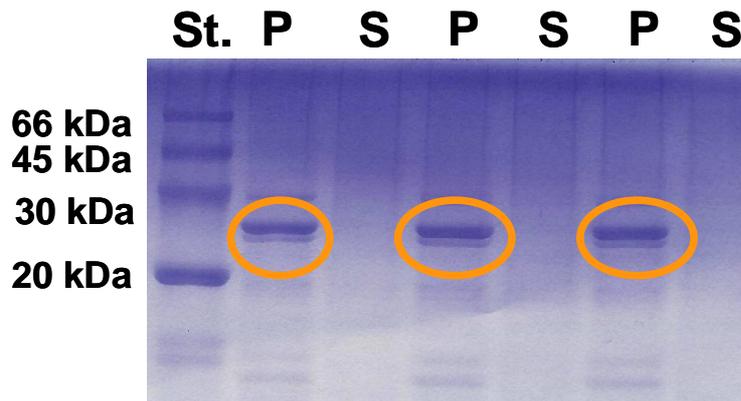


Fig. 46. SDS-PAGE (P: pellet; S: surnatante; St.: standard).

Alla luce di questi risultati abbiamo ripetuto l'espressione con una concentrazione di IPTG pari a 0.25 mM. Abbiamo poi provato a purificare la proteina mediante denaturazione e refolding. Dopo sonicazione e centrifugazione il pellet è stato risospeso in 10 mL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 5 mM, mercaptoetanolo 100 mM, urea 1 M e lasciato sotto agitazione per 3 h. Questa operazione avrebbe dovuto portare in soluzione buona parte dei contaminanti e lasciare pressochè inalterati i corpi di inclusione.

Dopo centrifugazione, pellet e surnatante sono stati separati. Sono stati raccolti dei campioni per la SDS-PAGE e il pellet è stato risospeso in 10 mL dello stesso tampone con una concentrazione di urea 8 M e lasciato sotto agitazione per 3 h. Infine la soluzione è stata dializzata contro tampone privo di urea per 24 h. Dopo centrifugazione e filtrazione è stata effettuata un'analisi elettroforetica.

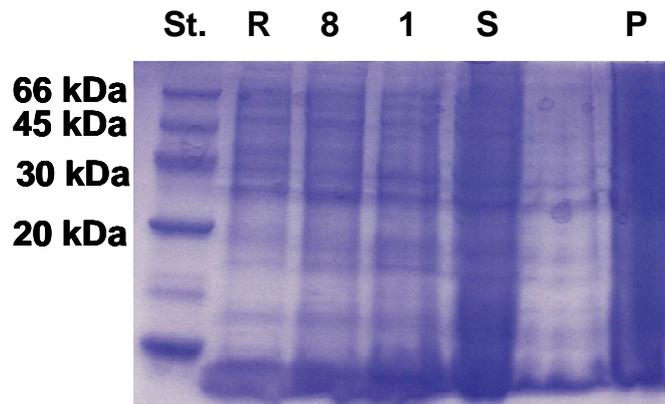


Fig. 47. SDS-PAGE di CypD dopo dialisi. P: Pellet; S: Surnatante; 1: Urea 1 M; 8: Urea 8 M; R: Refolded; St.: Standard.

I risultati mostrano come la procedura non sia efficiente in quanto la proteina risulta contaminata da altre specie. Alla luce di ciò è stato eseguito uno screening di urea per valutare quale fosse la concentrazione massima utilizzabile per eliminare i contaminanti lasciando al contempo i corpi di inclusione pressoché inalterati. Lo scopo di questa operazione è quello di ottenere corpi di inclusione con un elevato grado di purezza, in maniera tale da semplificare le operazioni sia di purificazione che, in particolare, di refolding, in quanto come spiegato in precedenza, la presenza di contaminanti risulta essere particolarmente sfavorevole durante il ripiegamento della proteina per assumere la configurazione nativa.

A questo scopo, dunque, dopo sonicazione e centrifugazione il pellet è stato risospeso in 5 mL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 5 mM, mercaptoetanolo 100 mM, urea 1 M e lasciato sotto agitazione per 30 min a 4 °C. Sono stati raccolti 40 µL per l' SDS-PAGE che in seguito a centrifugazione sono stati separati in surnatante e pellet. Alla soluzione di urea 1 M sono stati aggiunti quindi 833 µL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 5 mM, mercaptoetanolo 100 mM, urea 8 M, ottenendo una concentrazione di urea pari a 2 M. La soluzione è stata lasciata sotto agitazione per 30 min e sono stati raccolti 40 µL di campione per il gel elettroforetico. Le operazioni sono state ripetute fino ad arrivare ad una concentrazione di urea 6 M.

[urea]	V urea 8 M (mL)	V tot (mL)
1	0	5
2	0.83	5.83
3	1.17	7
4	1.75	8.75
5	2.9	11.65
6	5.8	17.47

L'analisi elettroforetica è stata effettuata nelle medesime condizioni sopra riportate.

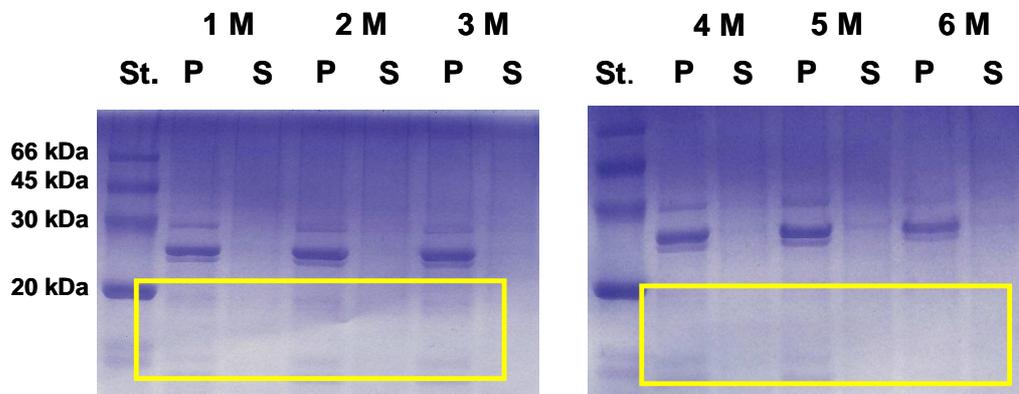


Fig. 48. SDS-PAGE di CypD a diverse concentrazioni di Urea.

I risultati mostrano come, all'aumentare della concentrazione di urea, vi sia una netta scomparsa delle bande corrispondenti ai contaminanti a basso peso molecolare e una diminuzione dell'intensità di quelle ad alto peso molecolare. Alla luce di questi risultati quindi è stata adottata la seguente strategia per le successive espressioni:



Questa metodica permette di ottenere corpi di inclusioni con un elevatissimo grado di purezza come dimostra il seguente gel:

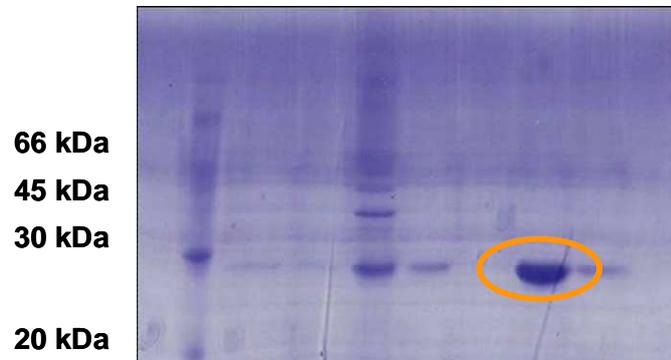


Fig. 49. SDS-PAGE di CypD. Cerchiata la banda relativa alla proteina.

4.4 REFOLDING di CypD

Una volta ottimizzata la strategia di espressione e di purificazione sono state testate varie metodiche per tentare di far ripiegare correttamente la proteina. In particolare :

1. dialisi
2. diluizione
3. IMAC

4.4.1 Dialisi

La dialisi è stata effettuata sostanzialmente in 2 modi: lineare, ovvero mettendo direttamente il tubo da dialisi in tampone privo di urea, e a step, abbassando gradualmente la concentrazione di urea nell'ambiente esterno al dializzato. Dopo sonicazione e centrifugazione il pellet è stato risospeso in 5 mL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8.5, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 100 mM, urea 6 M e lasciato sotto agitazione per 30 min a 4 °C. Successivamente la soluzione è stata sottoposta nuovamente a centrifugazione. Il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 5 mL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8.5, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 100 mM, urea 8 M e lasciato sotto agitazione a 4 °C fino a completa dissoluzione. La soluzione così ottenuta è stata trasferita in un tubo da dialisi con cut off di 8000 kDa precedentemente sterilizzato

previa bollitura in acqua deionizzata. Dopo accurata chiusura il tubo è stato quindi introdotto in un beaker contenente nel caso della dialisi lineare 250 mL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8.5, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 1 mM, nel caso della dialisi a step 250 mL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8.5, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 1 mM, urea 7 M. Il tutto è stato posto sotto lenta e costante agitazione alla temperatura di 4° C. Nel caso della dialisi a step ogni 24 h si è provveduto ad abbassare la concentrazione di urea diluendo con tampone Tris/HCl 50 mM pH 8.5, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 1 mM, passando a 6 M, poi a 5 M e così via fino a ridurla prossima allo 0 M. A questo punto è stato sostituito il tampone con dell'altro fresco e si è proceduti per altre 24 h. Nel caso della dialisi lineare è stato sufficiente cambiare frequentemente il tampone con dell'altro fresco.

Entrambe le metodiche hanno portato alla formazione di aggregati proteici con conseguente precipitazione di CypD all'interno del tubo. Comunque è stato possibile ottenere un modesta quantità di campione, che in seguito è stato caratterizzato mediante CD e NMR (nel caso della proteina marcata).

4.4.2 Diluizione

Anche la diluizione è stata effettuata secondo due modalità: rapida e lenta (così definite esclusivamente in relazione alla velocità con cui tutto il campione è diluito). Per la diluizione rapida in seguito a sonicazione e centrifugazione il pellet è stato risospeso in 5 mL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8.5, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 100 mM, urea 6 M e lasciato sotto agitazione per 30 min a 4 °C. Successivamente la soluzione è stata sottoposta nuovamente a centrifugazione. Il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 1 mL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 100 mM, urea 8 M e lasciato sotto agitazione a 4 °C fino a completa dissoluzione. La soluzione così ottenuta è stata poi versata in 100 mL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 1 mM, sotto agitazione e raffreddato alla temperatura di 4 °C.

Per la diluizione lenta invece dopo sospensione in 5 mL di tampone con urea 8 M, la soluzione è stata fatta gocciolare, tramite l'utilizzo di una pompa

peristaltica, in 100 mL di tampone Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, mercaptoetanol 1 mM, sotto agitazione e raffreddato alla temperatura di 4 °C. Alla fine, per entrambe le procedure, la soluzione è stata caricata in una colonna IMAC, sempre con l'ausilio di una pompa peristaltica, in modo tale da concentrare la proteina che infine è stata spiazzata dalla colonna di affinità con una soluzione di tampone Tris/HCl 50 mM, pH 8, mercaptoetanol 1 mM, imidazolo 500 mM.

Entrambe le procedure si sono rivelate però molto sconvenienti, sia per i tempi lunghi che per la resa. La difficoltà di CypD a legarsi alla IMAC combinata con la bassa concentrazione che deriva dalla metodica stessa, rende molto difficile il recupero della proteina.

4.4.3 Column refolding

La metodica che più si è rivelata soddisfacente è stata invece il column refolding. In generale essa prevede:

1. la denaturazione della proteina
2. l'ancoraggio di questa ad una colonna di affinità IMAC tramite FPLC
3. il refolding in colonna mediante eluizione con gradiente inverso di denaturante
4. lo spiazzamento della proteina con imidazolo

Sono state effettuate diverse prove in diverse condizioni sperimentali variando parametri come la temperatura, il pH, il tipo di denaturante e in particolare la forza ionica dei tamponi.

I dettagli sono riportati nel paragrafo successivo insieme agli spettri CD.

4.5 ANALISI STRUTTURALI

Tutti gli spettri CD e NMR di CypD sono effettuati in tampone fosfato 20 mM, pH 6.8, NaCl 100 mM a 25 °C. Per il CD è stata utilizzata una cuvetta da 0.1 mm.

4.5.1 Dialisi

Lo spettro CD ottenuto dal campione sottoposto a refolding mediante dialisi a step è il seguente:

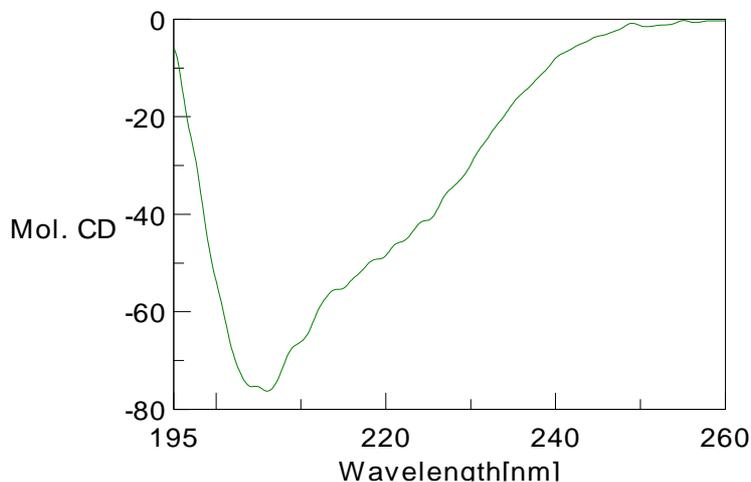


Fig. 50. Spettro CD di CypD sottoposta a dialisi.

Analizzando lo spettro e confrontandolo con i pattern proteici standard è possibile intuire che la proteina presenta delle modeste componenti di α -elica miste a porzioni di random-coil. Dato che il campione deriva dalla dialisi di CypD marcata al ^{15}N su di esso è stato eseguito anche un esperimento HSQC. Come si può notare non vi è una grande dispersione delle risonanze. Tutti i protoni ammidici del backbone risuonano in un intervallo ristretto compreso tra 8.4 e 7.7 ppm. Questo comportamento è caratteristico di proteine che non sono strutturate. La presenza infatti di una struttura secondaria influenza notevolmente l'intorno chimico dei nuclei sensibili con l'effetto di avere una distribuzione delle risonanze in un intervallo di ppm maggiore.

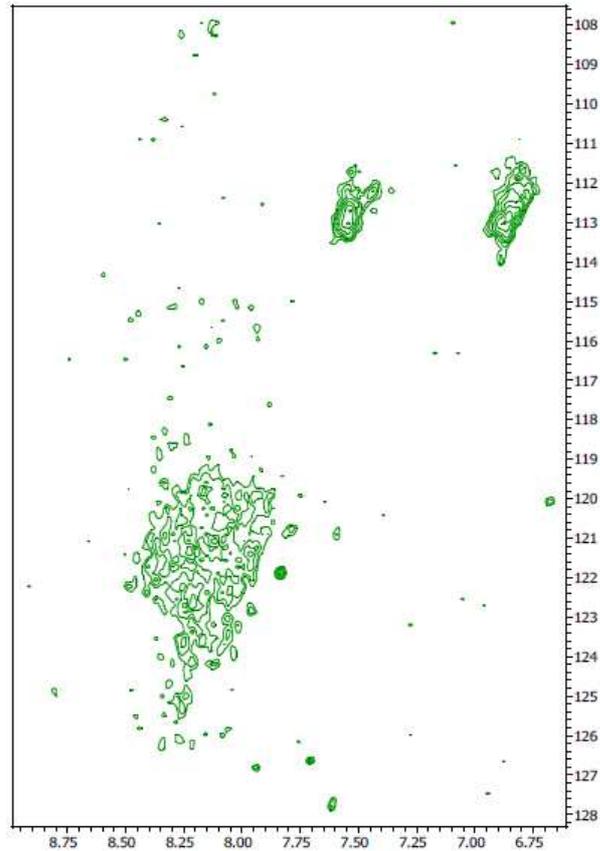


Fig. 51. Spettro HSQC di CypD sottoposta a dialisi.

4.5.2 Column refolding

Come già accennato questa metodica è stata effettuata utilizzando diversi tamponi. Di seguito sono riportate le condizioni e gli spettri ottenuti nei diversi casi.

Un primo tentativo è stato effettuato in queste condizioni:

- Caricamento in colonna con tampone Tris/HCl 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, mercaptoetanolo 1 mM, guanidinio cloruro 6 M.
- Eluizione con tampone Tris/HCl 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, mercaptoetanolo 1 mM, urea 6 M.
- Gradiente di urea 8 M da 100% a 0% in 2 h, flusso 0.5 mL/min.

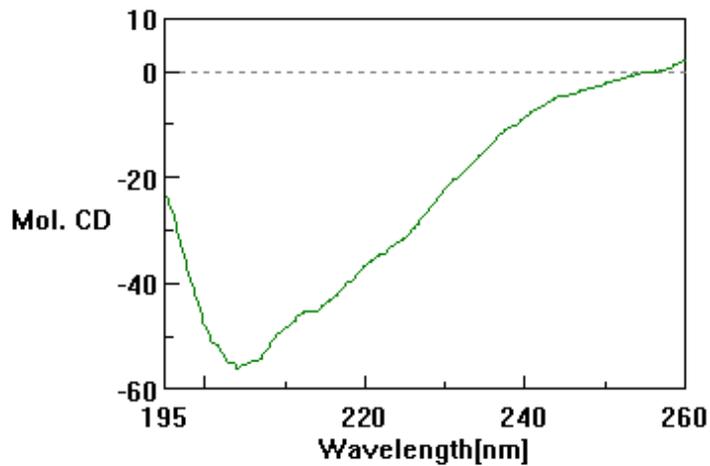


Fig. 52. Spettro CD di CypD dopo column refolding.

Lo spettro CD ottenuto, mostrato qui sopra, non risulta essere molto diverso da quello ottenuto con la dialisi. L'operazione è dunque stata ripetuta utilizzando solo urea come agente denaturante:

- Caricamento in colonna con tampone Tris/HCl 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, mercaptoetanolo 1 mM, urea 8 M.
- Eluizione con tampone Tris/HCl 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, mercaptoetanolo 1 mM, urea 8 M.
- Gradiente di urea da 100% a 0% in 2 h, flusso 0.5 mL/min.

Lo spettro ottenuto è il seguente:

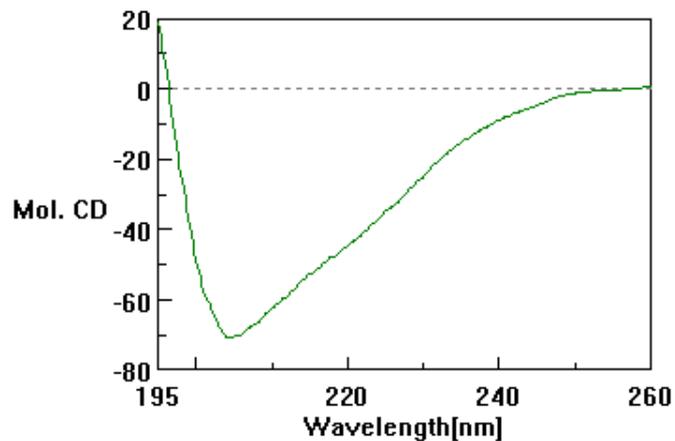


Fig. 53. Spettro CD di CypD dopo column refolding in presenza di sola urea.

Il cambio di denaturante non è sembrato dunque essere influente. Migliori risultati invece sono stati ottenuti variando la forza ionica, aumentando la concentrazione di NaCl da 100 mM a 500 mM:

- Caricamento in colonna con tampone Tris/HCl 20 mM, pH 8, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 1 mM, urea 8 M.
- Eluizione con tampone Tris/HCl 20 mM, pH 8, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 1 mM, urea 8 M.
- Gradiente di urea da 100% a 0% in 2 h, flusso 0.5 mL/min.

Lo spettro ottenuto è il seguente:

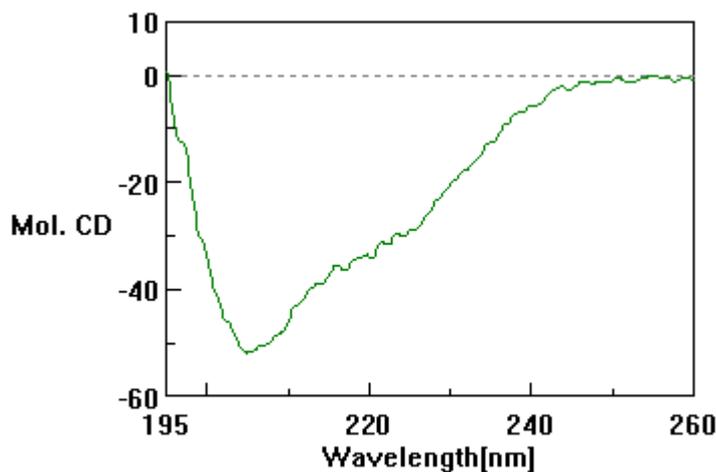


Fig. 54. Spettro CD di CypD dopo column refolding con NaCl 0.5 M.

zione intorno ai 220 nm, caratteristica di una strutturazione ad α -elica. Ancora più interessante è stato il risultato ottenuto aggiungendo 2 amminoacidi, L-Gly e L-Arg, noti in letteratura per inibire l'aggregazione proteica nelle operazioni di refolding:

- Caricamento in colonna con tampone Tris/HCl 20 mM, pH 8, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 1 mM, urea 8 M, L-Gly 500 mM, L-Arg 500 mM.
- Eluizione con tampone Tris/HCl 20 mM, pH 8, NaCl 500 mM, mercaptoetanolo 1 mM, urea 8 M, L-Gly 500 mM, L-Arg 500 mM.
- Gradiente di urea da 100% a 0% in 2 h, flusso 0.5 mL/min.

Lo spettro ottenuto è il seguente:

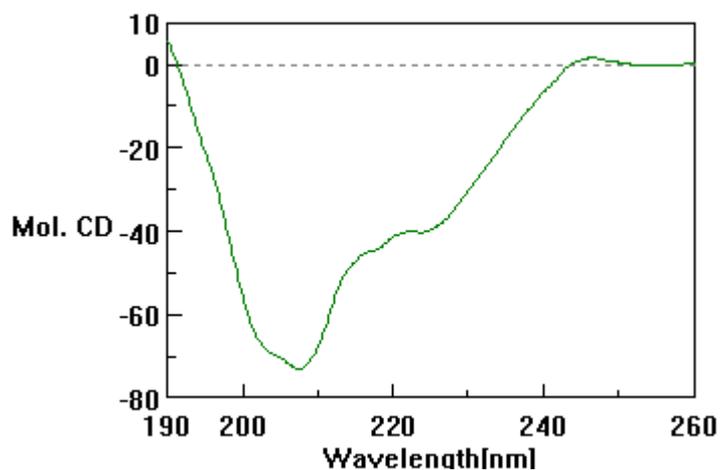


Fig. 55. Spettro CD di CypD dopo column refolding in presenza di Arg e Gly 0.5 M.

Purtroppo il campione non era marcato al ^{15}N e non è dunque stato possibile effettuare un HSQC.

4.6 CARATTERIZZAZIONE Anta

Alla luce dei risultati ottenuti dai saggi biologici anche Anta è stata caratterizzata mediante NMR con lo scopo di ottenere preziose informazioni circa l'interazione con CypD. Vista l'idrofobicità di Anta, gli esperimenti sono stati effettuati in CD_3CN , ad una concentrazione di Anta 4 mM. Essendo inoltre CD_3CN miscibile con l'acqua, è stato scelto in vista di effettuare titolazioni con la CypD. Lo spettro monodimensionale è il seguente:

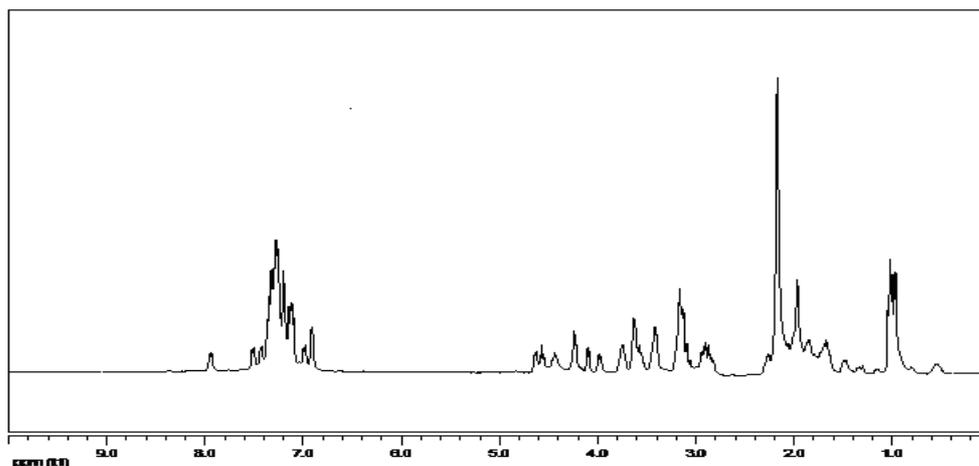


Fig. 56. Spettro NMR monodimensionale di Anta.

Data la elevata sovrapposizione dei segnali risulta di difficile assegnazione. A questo scopo sono dunque stati effettuati gli esperimenti bidimensionali COSY, TOCSY e ROESY.

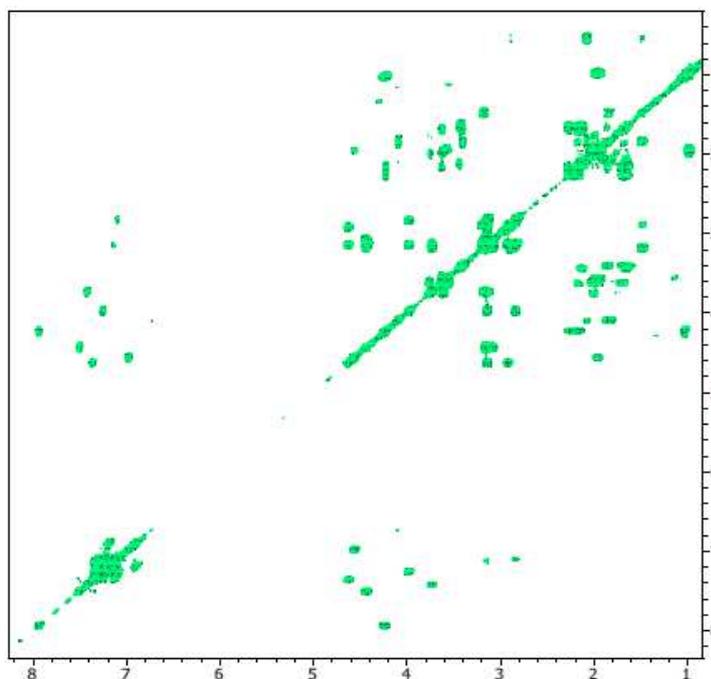


Fig. 57. Spettro COSY di Anta.

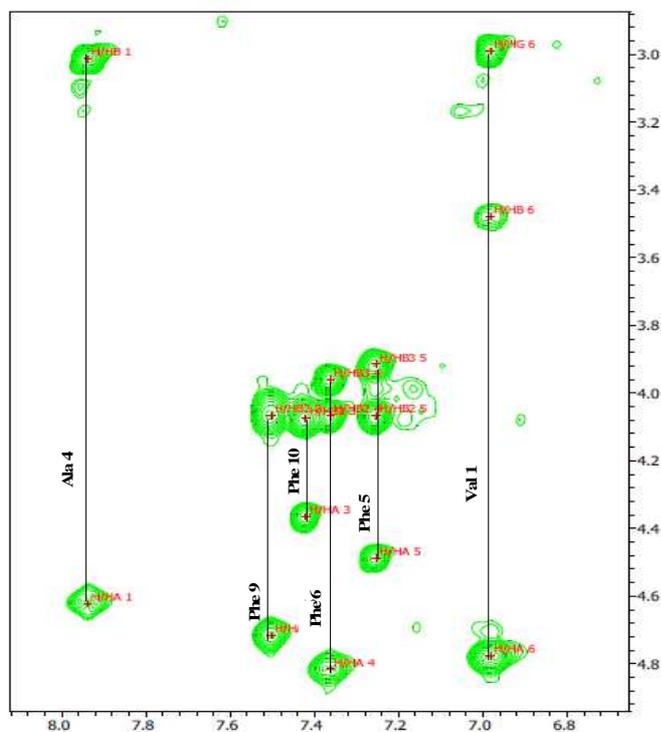


Fig. 58. Spettro TOCSY di Anta.

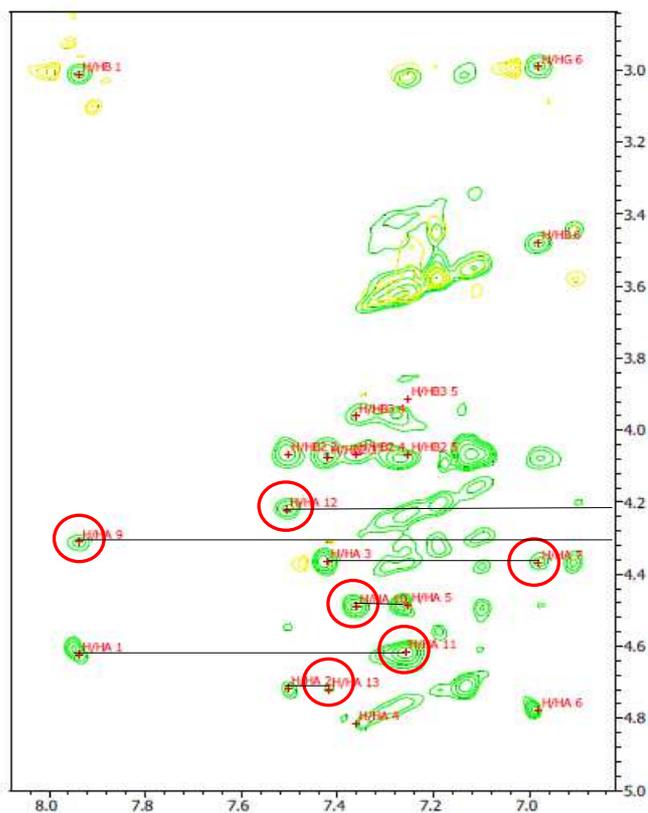


Fig. 59. Spettro ROESY di Anta. Cerchiati in rosso gli accoppiamenti dipolari.

L'assegnazione di questi ha permesso di ricavare con relativa facilità i chemical shift protonici di Anta che sono qui riportati:

	NH	H α γ	H β	H β	H γ	H δ	H δ
Val 1	6.999	4.555	1.956	-	0.982	-	-
Pro 2	-	3.416	1.645	1.840	0.893	2.243	2.172
Pro 3	-	4.229	1.848	1.653	1.031	2.239	2.168
Ala 4	7.909	4.236	1.031	-	-	-	-
Phe 5	7.273	3.958	3.136	2.848	-	-	-
Phe 6	7.372	4.633	3.136	2.921	-	-	-
Pro 7	-	3.756	2.135	1.975	1.690	3.608	-
Pro 8	-	4.090	1.842	2.062	1.484	2.893	3.178
Phe 9	7.492	4.434	3.149	-	-	-	-
Phe 10	7.440	3.726	3.160	-	-	-	-

Fig. 60. Chemical shift protonici di Anta.

Conclusioni

In questo lavoro sono stati ottenuti per sintesi chimica in soluzione sette peptidi ciclici: l'Anta e sei suoi derivati. In quattro di questi le Phe 6 e 9 dell'Anta sono state sostituite alternativamente con residui di Gly e Tyr per ottenere quindi i ciclopeptidi Gly6, Gly9, Tyr6 e Tyr9. Gli altri due derivati, Otta-Gly9 e Otta-Tyr9, oltre alla sostituzione della Phe 9 con Gly e Tyr, sono caratterizzati dall'assenza delle Phe 5 e 6. Queste molecole sono state testate in vitro con cellule e mitocondri isolati per valutare la loro capacità di inibire l'MPTP e in particolare di interagire con la CypD. I saggi biologici dimostrano che l'Anta inibisce l'apertura del poro di transizione mitocondriale e che questa azione si esplica attraverso l'interazione con la ciclofilina D. Infatti non vi è alcun effetto su cellule CypD knock-out e non c'è un effetto additivo con la CsA, effetto che invece si manifesta con inibitori del poro con meccanismo CypD-indipendente. Inoltre l'Anta protegge dalla depolarizzazione mitocondriale e dalla morte cellulare. Tutti i derivati sintetizzati non manifestano alcuna azione biologica. Si può quindi dedurre che i residui di Phe in posizione 6 e 9 siano fondamentali per l'attività biologica. Infine si può anche dedurre che il sito di legame dell'Anta e della CsA sulla CypD sia il medesimo. Questo però deve essere dimostrato mediante NMR, come previsto dal progetto alla base di questo lavoro. Primo passo verso questo obiettivo è l'ottenimento della CypD marcata ^{15}N .

L'espressione di CypD in *E. coli* non ha presentato alcuna difficoltà, . mentre il fatto che essa vada in corpi di inclusione ha reso laboriosa e rallentato la purificazione della proteina. Tuttavia la metodica è stata ottimizzata e attraverso una serie di passaggi mirati all'ottenimento di corpi di inclusione privi di contaminanti, è stato possibile ottenere quantitativi soddisfacenti di proteina con un elevato grado di purezza.

La problematica più difficile da affrontare si è rivelata essere il refolding. Ad oggi centinaia di costrutti vengono abbandonati poiché non si è in grado di far assumere alla proteina una struttura terziaria. L'ottenimento di questa è fondamentale per poterne studiare il comportamento e/o la funzione biologica.

Le tecniche classiche, come la dialisi e la diluizione, testate nel presente lavoro non si sono rivelate efficaci. Risultati apprezzabili si sono ottenuti invece con il column refolding. Diverse sono state le condizioni in cui è stato effettuato e dai risultati si evince che un fattore molto importante risulta essere la forza ionica del tampone. In particolare la presenza di agenti antiaggreganti. Per macromolecole di queste dimensioni l'aggregazione è un fenomeno molto frequente cui al momento non siamo riusciti a far fronte completamente. Infatti, la proteina ottenuta è stata sottoposta ad un'analisi strutturale mediante CD e HSQC che ha confermato come in tutte le condizioni testate questa risulti non essere adeguatamente strutturata.

Per il futuro è auspicabile ottenere per clonazione la CypD priva della sequenza mitocondriotropica, in modo da ridurre notevolmente il numero di residui amminoacidi, così da aumentare le possibilità di un corretto folding e, al contempo, diminuire invece la probabilità di aggregazione. In aggiunta anche l'utilizzo di tecniche alternative come, ad esempio, il refolding mediato dal polietilenglicole (PEG) potrebbe rivelarsi utile.

Bibliografia

- [1] Szeto, H.H.; “Mitochondria-Targeted Peptide Antioxidants: Novel Neuroprotective Agents” *The AAPS journal* 8(3) (2006).
- [2] Turrens, J.F.; “Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain” *Biosci. Rep.* 17, 3-8 (1997).
- [3] Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J.; “Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review” *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 509-517 (2006).
- [4] Guzy, R.D.; Schumaker, P.T.; “Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia” *Exp. Physiol.* 91, 807-819 (2006).
- [5] Kowaltowski, A.J.; Vercesi, A.E.; “Reactive Oxygen Generation by Mitochondria” In “Mitochondria in pathogenesis” (Lemasters, J.J. e Nieminen, A.L., eds.). Kluwer/Plenum Publishers, New York. pp. 281-300 (2001).
- [6] Ischiropoulos, H.; Beckman, J.S.; “Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?” *J. Clin. Invest.* 111, 163-169 (2003).
- [7] Di Mauro, S.; “Mitochondrial diseases” *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 80-88 (2004).
- [8] Wallace, D.C.; “A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine” *Annu. Rev. Genet.* 39, 359-407 (2005).
- [9] Brandon, M.; Baldi, P.; Wallace, D.C.; “Mitochondrial mutations in cancer” *Oncogene* 25, 4647-4662 (2006).
- [10] Mattson, M.P.; “Pathways towards and away from Alzheimer's disease” *Nature* 430, 631-639 (2004).
- [11] Martin, L.J.; “Mitochondriopathy in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis” *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 1103-1110 (2006).

- [12] Abou-Sleiman, P.M.; Muqit, M.M.; Wood, N.W.; “Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease” *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 207-219 (2006).
- [13] Enns, G.M.; “The contribution of mitochondria to common disorders” *Mol. Genet. Metab.* 80, 11-26 (2003).
- [14] Hengartner, M.O.; “The biochemistry of apoptosis” *Nature* 407, 770-776 (2000).
- [15] Green, D.R.; Kroemer, G.; “The pathophysiology of mitochondrial cell death” *Science* 305, 626-629 (2004).
- [16] Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Brenner, C.; “Mitochondrial membrane permeabilization in cell death” *Physiol. Rev.* 87, 99-163 (2007).
- [17] Baines, C.P.; Kaiser, R.A.; Purcell, N.H.; Blair, N.S.; Osinska, H.; Hambleton, M.A.; Brunskill, E.W.; Sayen, M.R.; Gottlieb, R.A.; Dorn, G.W.; Robbins, J.; Molkenin, J.D.; “Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death” *Nature* 434, 658-662 (2005).
- [18] Nakagawa, T.; Shimizu, S.; Watanabe, T.; Yamaguchi, O.; Otsu, K.; Yamagata, H.; Inohara, H.; Kubo, T.; Tsujimoto, Y.; “Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death” *Nature* 434, 652-658 (2005).
- [19] Bernardi, P.; Krauskopf, A.; Basso, E.; Petronilli, V.; Blachly-Dyson, E.; Di Lisa, F.; Forte, M.A.; “The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target” *FEBS J.* 273, 2077-2099 (2006).
- [20] Golstein, P.; Kroemer, G.; “Cell death by necrosis: towards a molecular definition” *Trends Biochem. Sci.* 32, 37-43 (2007).
- [21] Di Lisa, F.; Bernardi, P.; “Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole” *Cardiovasc. Res.* 70, 191-199 (2006).
- [22] Wiseman, A.; “Oxygen-induced reperfusion-injury is caused by ROS: Amelioration is possible by recombinant-DNA antioxidant enzymes and mimics in selected tissues” *Med. Hypotheses* 66, 329-331 (2006).

- [23] Blomgren, K.; Hagberg, H.; “Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain” *Free Radic. Biol. Med.* 40, 388-397 (2006).
- [24] Halestrap, A.P.; Kerr, P.M.; Javadov, S.; Woodfield, K.Y.; “Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart” *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 79-94 (1998).
- [25] Halestrap, A.P.; Clarke, S.J.; Javadov, S.A.; “Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion: a target for cardioprotection” *Cardiovasc. Res.* 61, 372-385 (2004).
- [26] Halestrap, A.P.; “Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die” *Biochem. Soc. Trans.* 34, 232-237 (2006).
- [27] Wallace, D.C.; “The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: On the road to therapeutics and performance enhancement” *Gene* 354, 169-180 (2005).
- [28] Mattson, M.P.; Kroemer, G.; “Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection” *Trends Mol. Med.* 9, 196-205 (2003).
- [29] Galluzzi, L.; Larochette, N.; Zamzami, N.; Kroemer, G.; “Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy” *Oncogene* 25, 4812-4830 (2006).
- [30] Kroemer, G.; “The mitochondrial permeability transition pore complex as a pharmacological target. An introduction” *Curr. Med. Chem.* 10, 1469-1472 (2003).
- [31] Shanmuganathan, S.; Hausenloy, D.J.; Duchen, M.R.; Yellon, D.M.; “Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H237-H242 (2005).
- [32] Halestrap, A.P.; Brenner, C.; “The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death” *Curr. Med. Chem.* 10, 1507-1525 (2003).

- [33] Angelin, A.; Tiepolo, T.; Sabatelli, P.; Grumati, P.; Bergamin, N.; Golfieri, C.; Mattioli, E.; Gualandi, F.; Ferlini, A.; Merlini, L.; Maraldi, N.M.; Bonaldo, P.; Bernardi, P.; “Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 991-996 (2007).
- [34] O'Neill, J.; Manion, M.; Schwartz, P.; Hockenbery, D.M.; “Promises and challenges of targeting Bcl-2 anti-apoptotic proteins for cancer therapy” *Biochim. Biophys. Acta* 1705, 43-51 (2004).
- [35] Manion, M.K.; Fry, J.; Schwartz, P.S.; Hockenbery, D.M.; “Small-molecule inhibitors of Bcl-2” *Curr. Opin. Investig. Drugs* 7, 1077-1084 (2006).
- [36] Chauhan, D.; Neri, P.; Velankar, M.; Podar, K.; Hideshima, T.; Fulciniti, M.; Tassone, P.; Raje, N.; Mitsiades, C.; Mitsiades, N.; Richardson, P.; Zawel, L.; Tran, M.; Munshi, N.; Anderson, K.C.; “Targeting mitochondrial factor Smac/DIABLO as therapy for multiple myeloma (MM)” *Blood* 109, 1220-1227 (2007).
- [37] Weissig, V.; “Targeted drug delivery to mammalian mitochondria in living cells” *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 89-102 (2005).
- [38] Torchilin, V.P.; “Recent Approaches to Intracellular Delivery of Drugs and DNA and Organelle Targeting” *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8, 343-375 (2006).
- [39] Murphy, M.P.; Smith, R.A.; “Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 629-656 (2007).
- [40] Zander, K.; Sherman, M.P.; Tessmer, U.; Bruns, K.; Wray, V.; Prechtel, A.T.; Schubert, E.; Henklein, P.; Luban, J.; Neidleman, J.; Greene, W.C.; Schubert, U.; “Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression” *J. Biol. Chem.* 278, 43202-43213 (2003).

- [41] Eliseev, R.A.; Malecki, J.; Lester, T.; Zhang, Y.; Humphrey, J.; Gunter, T.E.; "Cyclophilin B is a functional regulator of Hepatitis C Virus RNA polymerase" *Mol. Cell* 19, 111-122 (2005).
- [42] Waldmeier, P.; Zimmermann, K.; Qjan, T.; Tintelot-Blomey, M.; Lemasters, J.; "Cyclophilin D as a Drug Target" *Curr. Med. Chem.* 10, 1485-1506 (2003).
- [43] Kromer, G.; Reed, J.C.; *Nature Med.* 6, 513 (2000).
- [44] Yang, Y.; Moir, E.; Kontopidis, G.; Taylor, P.; Wear, M.A.; Malone, K.; Dunsmore, C.J.; Page, A.P.; Turner, N.J.; Walkinshaw, M.D.; "Structure-based discovery of a family of synthetic cyclophilin showing a cyclosporin-A phenotype in *Caenorabditis elegans*" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 1013-1019 (2007).
- [45] Harrison, R.K.; Stein, R.L.; "Mechanistic studies of enzymic and nonenzymic prolyl cis-trans isomerization" *J. Am. Chem. Soc.* 114, 3464-3471 (1992).
- [46] Howard, B.R.; Vajdos, F.F.; Li, S.; Sundquist, W.I.; Hill, C.P.; "Structural insight into the catalytic mechanism of cyclophilin A" *Nat. Struct. Mol. Biol.* 10, 475-481 (2003).
- [47] Jin, L.; Harrison, S.C.; "Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13522-13526 (2002).
- [48] Schlatter, D.; Thoma, R.; Kung, E.; Stihle, M.; Muller, F.; Borroni, E.; Cesura, A.; Hennig, M.; "Crystal engineering yields crystals of cyclophilin D diffracting to 1.7Å resolution" *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 61, 513-519 (2005).
- [49] Kajitani, K.; Fujihashi, M.; Kobayashi, Y.; Shimizu, S.; Tsujimoto, Y.; Miki, K.; "Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor cyclosporin A at 0.96Å resolution" *Proteins* 70, 1635-1639 (2008).
- [50] Petronilli, V.; Penzo, D.; Scorrano, L.; Bernardi, P.; Di Lisa, F.; "The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death" *J. Biol. Chem.* 276, 12030-12034 (2001).

- [51] Scorrano, L.; Penzo, D.; Petronilli, V.; Pagano, F.; Bernardi, P.; “Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition” *J. Biol. Chem.* 276, 12035-12040 (2001).
- [52] Bianchi, C.; Fato, R.; Angelin, A.; Trombetti, F.; Ventrella, V.; Borgatti, A.R.; Fattorusso, E.; Ciminiello, P.; Bernardi, G.; Lenaz, P.; Parenti Castelli, G., “Yessotoxin, a shellsh biotoxin, is a potent inducer of the permeability transition in isolated mitochondria and intact cells” *Biochim. Biophys. Acta* 1656, 139-147 (2004).
- [53] Rigoni, M.; Paoli, M.; Milanese, E.; Caccin, P.; Rasola, A.; Bernardi, P.; Montecucco, C.; “Snake phospholipase A2 neurotoxins enter neurons, bind specially to mitochondria, and open their transition pores” *J. Biol. Chem.* 283, 34013-34020 (2008).
- [54] Fontaine, E.; Ichas, F.; Bernardi, P.; “A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore” *J. Biol. Chem.* 273, 25734-25740 (1998).
- [55] Bernardi, P.; Krauskopf, A.; Basso, E.; Petronilli, V.; Blalchy-Dyson, E.; Di Lisa, F.; Forte, M.A.; “The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target” *FEBS J.* 273, 2077–2099 (2006).
- [56] Halestrap, A.; “A pore way to die” *Nature* 434, 578-579 (2005).
- [57] Menze, M.A.; Hutchinson, K.; Laborde, S.M.; Hand, S.C.; “Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage” *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R68-R76 (2005).
- [58] He, L.; Lemasters, J.J.; “Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function?” *FEBS Lett.* 512, 1-7 (2002).
- [59] Rasola, A.; Bernardi, P.; “The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis” *Apoptosis* 12, 815-833 (2009).
- [60] Chiara, F.; Castellaro, D.; Marin, O.; Petronilli, V.; Brusilow, W.S.; Juhaszova, M., Sollott, S.J.; Forte, M.A.; Bernardi, P.; Rasola, A.;

“Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels” *Plos One* 3, e1852 (2008).

- [61] Luvisetto, S.; Basso, E.; Petronilli, V.; Bernardi, P.; Forte, M.A.; “Enhancement of anxiety, facilitation of avoidance behavior, and occurrence of adult-onset obesity in mice lacking mitochondrial cyclophilin D” *Neuroscience* 155, 585-596 (2008).
- [62] Lin, D.T.; Lechleiter, J.D.; “Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization” *J. Biol. Chem.* 277, 31134-31141 (2002).
- [63] Schubert, A.; Grimm, S.; “Cyclophilin D, a component of the permeability transition-pore, is an apoptosis repressor” *Cancer Res.* 64, 85-93 (2004).
- [64] Wang, X.; Carlsson, Y.; Basso, E.; Zhu, C.; Rousset, C.I.; Rasola, A.; Johansson, B.R.; Blomgren, K.; Mallard, C.; Bernardi, P.; Forte, M.A.; Hagberg, H.; “Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury” *J. Neurosci.* 29, 2588-2596 (2009).
- [65] Angelina, A.; Tiepolo, T.; Sabatelli, P.; Grumati, P.; Bergamin, N.; Goleri, C.; Mattioli, E.; Gualandi, F.; Ferlini, A.; Merlini, L.; Maraldi, N.M.; Bonaldo, P.; Bernardi, P.; “Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 991-996 (2007).
- [66] Angelina, A.; Bonaldo, P.; Bernardi, P.; “Altered threshold of the mitochondrial permeability transition pore in Ullrich congenital muscular dystrophy” *Biochim. Biophys. Acta*, 1777, 896-896 (2008).
- [67] Merlini, L.; Angelina, A.; Tiepolo, T.; Braghetta, P.; Sabatelli, P.; Zamparelli, A.; Ferlini, A.; Maraldi, N.M.; Bonaldo, P.; Bernardi P.; “Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI myopathies” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 13, 5225-5229 (2008).

- [68] Nakagawa, T.; Shimizu, S.; Watanabe, T.; Yamaguchi, O.; Otsu, K.; Yamagata, H.; Inohara, H.; Kubo, T.; Tsujimoto, Y.; “Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death” *Nature* 434, 652-658 (2005).
- [69] Wang, X.; Carlsson, Y.; Basso, E.; Zhu, C.; Rousset, C.I.; Rasola, A.; Johansson, B.R.; Blomgren, K.; Mallard, C.; Bernardi, P.; Forte, M.A.; Hagberg, H.; “Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury” *J. Neurosci.* 29, 2588-2596 (2009).
- [70] Palma, E.; Tiepolo, T.; Angelina, A.; Sabatelli, P.; Maraldi, N.M.; Basso E.; Forte M.A.; Bernardi, P.; Bonaldo, P.; “Genetic ablation of cyclophilin D rescues mitochondrial defects and prevents muscle apoptosis in collagen VI myopathic mice” *Hum. Mol. Genet.* 18, 2024-2031 (2009).
- [71] Millay, D.P.; Sargent, M.A.; Osinska, H.; Baines, C.P.; Barton, E.R.; Vuagniaux, G.; Sweeney, H.L.; Robbins, J.; Molkenin, J.D.; “Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial dependent necrosis attenuates muscular dystrophy” *Nat. Med.* 14, 442-447 (2008).
- [72] Forte M.A.; Gold, B.G.; Marracci, G.; Chaudhary, P.; Basso, E.; Johnsen, D.; Yu, X.; Fowlkes, J.; Rahder, M.; Stem, K.; Bernardi, P.; Bourdette, D.; “Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7558-7563 (2007).
- [73] Du, H.; Guo, L.; Fang, F.; Chen, D.; Sosunov, A.A.; McKhann, G.M.; Yan, Y.; Wang, C.; Zhang, H.; Molkenin, J.D.; Gunn-Moore, F.J.; Vonsattel, J.P.; Arancio, O.; Chen, J.X.; Yan, S.D.; “Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer’s disease” *Nat. Med.* 14, 1097-1105 (2008).
- [74] Tiepolo, T., Angelin, A.; Palma, E.; Sabatelli, P.; Merlini, L.; Nicolosi, L.; Finetti, F.; Braghetta, P.; Vuagniaux, G.; Dumont, J-M.; Baldari, C.T.; Bonaldo, P.; Bernardi, P.; “The cyclophilin inhibitor Debio 025 normalizes mitochondrial function, muscle apoptosis and ultrastructural

- defects in Col6a1^{-/-} myopathic mice” *British Journal of Pharmacology* 157, 1045-1052 (2009).
- [75] Chiara, F.; Castellaro, D.; Marin, O.; Petronilli, V.; Brusilow, W.S.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J.; Forte, M.A.; Bernardi, P.; Rasola, A.; “Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels” *Plos One* 3, e1852 (2008).
- [76] Eliseev, R.A.; Malecki, J.; Lester, T.; Zhang, Y.; Humphrey, J.; Gunter, T.E.; “Cyclophilin D interacts with Bcl-2 and exerts an anti-apoptotic effect” *J. Biol. Chem.* 284, 9692-9699 (2009).
- [77] Song, H.Y.; Dunbar, J.D.; Zhang, Y.X.; Guo, D.Q.; Donner, D.B.; “Identification of a protein with homology to Hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor” *J. Biol. Chem.* 270, 3571-3581 (1995).
- [78] Pridgeon, J.W.; Olzmann, J.A.; Chin, L.S.; Li, L.; “The mitochondrial permeability transition pore in motor neurons: Involvement in the pathobiology of ALS mice” *Plos Biology* 5, e172 (2007).
- [79] Kang, B.H.; Plescia, J.; Dohi, T.; Rosa, J.; Doxsey, S.J.; Altieri, D.J.; “Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network” *Cell* 131, 257-270 (2007).
- [80] Wieland, T.; “The discovery, isolation, elucidation of structure, and synthesis of antamanide” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 7, 204-208 (1968).
- [81] Wieland, T.; Faulstich, H.; Burgermeister, W.; Otting, W.; Mohle, W.; Shemyakin, M.M.; Ovchinnikov, Y.A.; Ivanov, V.T.; Malenkov, G.G.; “Affinity of antamanide for sodium ions” *FEBS Lett.* 9, 82-92 (1970).
- [82] Ivanov, V.T.; Miroshnikov, A.I.; Abdullaev, N.D.; Senyavina, L.B.; Arkhipova, S.F.; Uvarova, N.N.; Khalilulina, K.K.; Bystrov, V.F.; Ovchinnikov, Y.A.; “Conformation of the Na⁺ complex of antamanide in solution” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9, 654-663 (1971).
- [83] Tonelli, A.E.; Patel, D.J.; Goodman, M.; Naider, F.; Faulstich, H.; Wieland, T.; “Experimental and calculated conformational

- characteristics of the cyclic decapeptide antamanide” *Biochemistry* 10, 3211-3217 (1971).
- [84] Patel, D.J.; “Conformation of antamanide-sodium in solution” *Biochemistry* 12, 677-688 (1973).
- [85] Wieland, T.; Faulstich, H.; Burgermeister, W.; “Antamanide and analogs. Studies on selectivity and stability of complexes” *Biochem Biophys Res Commun.* 47, 984-992 (1972).
- [86] Burgermeister, W.; Wieland, T.; Winkler, R.; “Antamanide. Dynamics of metal-complex formation” *Eur. J. Biochem.* 44, 305-310 (1974).
- [87] Siemion, I.Z.; Pedyczak, A.; Trojnar, J.; Zimecki, M.; Wieczorek, Z.; “Immunosuppressive activity of antamanide and some of its analogues” *Peptides* 13, 1233-1237 (1992).
- [88] Ruzza, P.; Calderan, A.; Carrara, M.; Tancredi, T.; Borin, G.; “Antamanide and its Gly or Tyr-analogues: synthesis and pharmacological properties” *Current Topics in Peptide & Protein Research* 2, 21-32 (1997).
- [89] Wieland, T.; “Chemistry and Biology of Peptides” J. Meienhofer Ed.; Ann Arbor Science Publ. Inc.; Michigan (1973).
- [90] Bodanszky, M.; “Peptide chemistry. A practical textbook” Springer-Verlag; Berlin (1988).
- [91] Merrifield, R.B.; *Biochemistry* 3, 1385 (1964).
- [92] Merrifield, R.B.; Wolley, D.W.; *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4686 (1956).
- [93] Savrda, J.; *J. Org. Chem.* 42, 3199 (1977).
- [94] Anderson, G.W.; Zimmermann, J.E.; Callahan, F.M.; *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5012 (1967).
- [95] Honzl, J.; Rudinger, J.; *Coll. Czech. Chem. Commun.* 26, 2333 (1961).
- [96] Ziegler, K.; Eberle, H.; Ohlinger, H.; *Liebigs Ann. Chem.* 504, 95 (1933).
- [97] Wünc, E.; Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie; E. Wünc Ed.; vol. 15; Georg-Thieme Verlag, Stuttgart (1974).

- [98] Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D.; DNA cloning and Genetic Engineering. In “Molecular biology of the cell”. Garland Publishing, Inc. New York & London. 265-266 (1989).
- [99] Wilson, K.; Walker, J.; Clonaggio molecolare e analisi genetica. In “Metodologia Biochimica”. Raffaello Cortina Editore V ed. Milano, 135-199 (2005).
- [100] Sambrook, J.; Russell, D.W.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (2001).
- [101] Buchberger, A; Schroder, H; Hesterkamp, T; Schonfeld, H.J.; Bukau, B.; *J. Mol. Biol.* 261, 328-333, (1996).
- [102] Vallejo, L.F.; Rians, U.; *Microb. Cell. Fact.* 3, 11, (2004).
- [103] Goloubinoff, P.; Mogk, A.; Zvi, A.P.; Tomoyasu, T.; Bukau, B.; *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13732-13737, (1999).
- [104] Middelberg, A.P.J.; *TRENDS biotech.* 20 (10), 437-444; (2002).
- [105] Vincentelli, R.; Canaan, S.; Campanacci, V.; Valencia, C.; Maurin, D.; Frassinetti, F.; Scappucini-Calvo, L.; Cambillau, C.; Bignon, C.; “High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies” *Protein Sci* 13, 2782-2792, (2004).
- [106] Rabanal F.; Ludevid M.D.; Pons M.; Giralt E.; “CD of proline-rich polypeptides. Application to the study of the repetitive domaine of maize glutelin-2” *Biopolymers* 33, 1019-1028 (1993).
- [107] Drake A.F., Siligardi G., Gibbons W.A.; “Reassessment of the electronic circular dichroism criteria for random coil conformations of poly (L-lisyne) and the implications for protein folding and denaturation studies” *Biophys Chem* 31, 143-146 (1988).
- [108] Claridge, T.D.W.; “High resolution NMR Techniques in Organic Chemistry” PERGAMON (1999).

Appendice

Codici di abbreviazione a tre e ad una lettera per gli aminoacidi proteinogenici

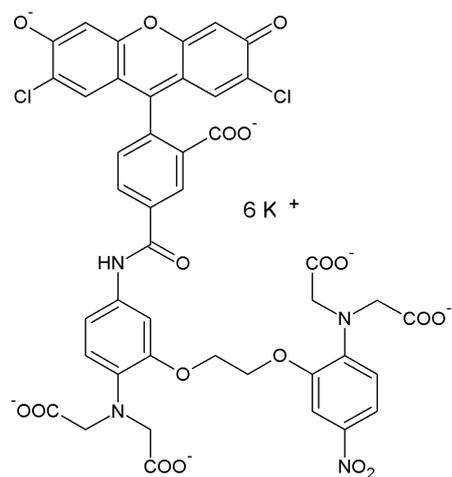
<i>Nome</i>	<i>Codice a tre lettere</i>	<i>Codice ad una lettera</i>
Acido aspartico	Asp	D
Acido glutammico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteina	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutammica	Gln	Q
Isoleucina	Ile	I
Istidina	His	H
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

IUPAC-IUB Commission, *Eur. J. Biochem.*, **1994**, *138*, 9-37.

Formule di struttura

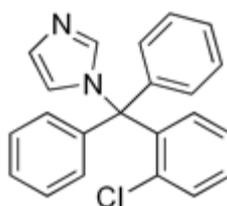
Ca²⁺-Green 5N

C₄₃H₂₆Cl₂K₆N₄O₁₈; MM 1192.19 g/mol



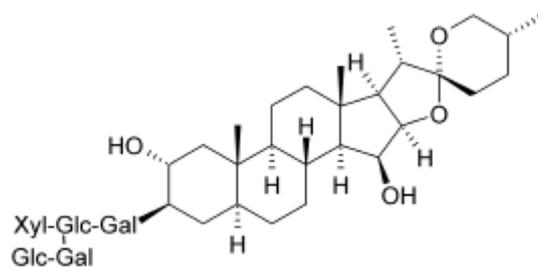
Clotrimazolo

C₂₈H₄₀N₂O₉; MM 548.63 g/mol

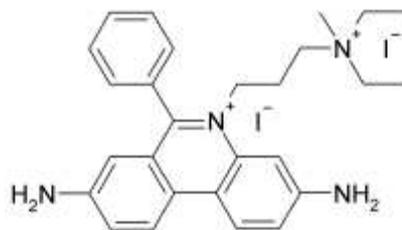


Digitonina

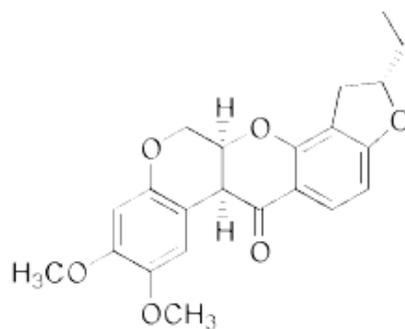
C₅₆H₉₂O₂₉; MM 1229.31 g/mol



Propidio ioduro $C_{27}H_{34}I_2N_4$; MM 668.39 g/mol



Rotenone $C_{23}H_{22}O_6$; MM 394.41 g/mol



TMRM $C_{25}H_{25}ClN_2O_7$; MM 500.93 g/mol

