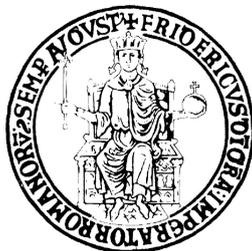


**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XXI CICLO

**PROGETTAZIONE E SINTESI DI PEPTIDI ANTIMICROBICI
CORRELATI ALLE TEMPORINE**

Dott. ^{ssa} Stefania Malfi

**TUTOR:
Prof. Paolo Grieco**

**COORDINATORE:
Prof. ^{ssa} Maria Valeria D'Auria**

“γνωθι σαυτον”

(Eracrito)

*A mio fratello Antonio,
con l'augurio che si appassioni alla ricerca...*

del “vero”

*A mia madre e a mio padre,
senza di loro tutto ciò non sarebbe stato possibile*

INDICE

CAPITOLO I

INTRODUZIONE	pag.1
1.IMPORTANZA DEGLI AMPs	pag.2
1.1 I PEPTIDI ANTIMICROBICI	pag.6
1.2 CARATTERISTICHE STRUTTURALI DEGLI AMPs	pag.7
1.3 CLASSIFICAZIONE DEGLI AMPs	pag.8
1.3.1 Peptidi contenenti Cys	pag.10
1.3.2 Peptidi contenenti un'elevata percentuale di residui specifici	pag.13
1.3.3 Peptidi con sequenza lineare ad elevata percentuale di α -elica.	pag.14
1.4 MECCANISMO D'AZIONE DEGLI AMPs	pag.17

CAPITOLO II

IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA	pag.21
2.1 IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA	pag.22
2.2 LE TEMPORINE	pag.23
2.3 CARATTERISTICHE DELLE TEMPORINE	pag.26
2.4 LA TEMPORINA A (TA)	pag.27
2.5 LA TEMPORINA L (TL)	pag.28
2.6 TEMPORINA A E TEMPORINA L: IL CONFRONTO	pag.30
2.7 MECCANISMO D'AZIONE	pag.31

CAPITOLO III

1 ^a FASE DEL PROGETTO: STUDI STRUTTURALI	pag.34
3.1 I BERSAGLI DELLE TEMPORINE: LE MEMBRANE BATTERICHE	pag.35
3.2 STUDI SPETTROSCOPICI E COMPUTAZIONALI	pag.36
3.3 STUDI STRUTTURALI	pag.37

3.3.1	Analisi Conformazionale mediante dicroismo circolare	pag.37
3.3.2	Spettroscopia CD di TA e TL	pag.40
3.3.3	Analisi conformazionale mediante tecniche H ¹ NMR	pag.42
3.3.4	TL in soluzione SDS	pag.47
3.3.5	TL in soluzione DPC	pag.52
3.3.6	TA in soluzione di SDS	pag.53
3.3.7	TA in soluzione di DPC	pag.54
3.4 DISPOSIZIONE RELATIVA ALLE MICELLE		pag.55
3.5 RISULTATI		pag.58
3.5.1	<i>“Dynamic Peptide-Lipid Supramolecular Pore”</i>	pag.62
3.6 MATERIALE PER GLI STUDI SPETTROSCOPICI		pag.64
3.6.1	Metodica per gli studi di dicroismo circolare	pag.64
3.6.2	Materiali e metodi spettroscopia NMR	pag.65
<u>CAPITOLO IV</u>		
2^a FASE DELLA RICERCA:		
PROGETTAZIONE E SINTESI DEI NUOVI ANALOGHI		pag.67
4.1 I NUOVI ANALOGHI DELLE TEMPORINE		pag.68
4.2 SERIE DI ANALOGHI DELLA TEMPORINA L		pag.69
4.2.1	Studio della conformazione di TL	pag.70
4.2.2.	Studio della carica positiva nella regione C-terminale della sequenza di TL	pag.71
4.2.3	Studio della carica positiva sull'intera sequenza peptidica di TL	pag.72
4.2.4	Studio dei residui idrofobici di TL	pag.73
4.2.5	Confronto e studio della regione N-terminale di TL e TA	pag.75
4.2.6	Interruzione della struttura ad α -elica in posizione N-terminale e C-terminale di TL	pag.77
4.2.7	Studio sull'interruzione dell' α -elica in posizione N-terminale in correlazione con la carica positiva.	pag.78

4.3 STUDIO DELLA TEMPORINA A: I NUOVI ANALOGHI	pag.80
4.3.1 Interruzione della struttura ad α-elica nella regione C-terminale	pag.80
4.3.2 Confronto temporina A e temporina L	pag.82
4.3.3 Introduzione di una carica positiva nella regione C-terminale di TA	pag.84
 <u>CAPITOLO V</u>	
AMBITO SPERIMENTALE	
SEZIONE CHIMICA E SEZIONE FARMACOLOGICA	pag.85
5.1 SEZIONE CHIMICA	pag.86
5.1.2 Sintesi peptidica	pag.86
5.1.3 Purificazione e caratterizzazione	pag.92
5.2 SEZIONE FARMACOLOGICA	pag.94
5.2.1 Saggi antimicrobici	pag.94
5.2.2 Microorganismi	pag.95
5.3 SAGGI EMOLITICI	pag.95
 <u>CAPITOLO VI</u>	
RISULTATI E DISCUSSIONI	pag.97
6.1 RISULTATI FARMACOLOGICI.	pag.98
6.1.1 Attività antimicrobica ed emolitica di TL template, D-Isomero, Retroinverso	pag.98
6.1.2 Attività antimicrobica dei derivati TL con modifiche all'interno della sequenza.	pag.100
6.2 ATTIVITA' EMOLITICA	pag.104
6.2.1 Attività emolitica di TL template, D-Isomero e Retroinverso.	pag.104
6.2.2 Attività emolitica dei derivati TL con sostituzioni all'interno della sequenza.	pag.106
6.3 ATTIVITA' ANTIMICROBICA DI TA E DERIVATI	pag.108
6.4 ATTIVITA' EMOLITICA DELLA TA E DEI SUOI ANALOGHI	pag.110

**6.5 ATTIVITA' ANTIMICROBICA ED EMOLITICA:
IL CONFRONTO DEI DERIVATI TA E TL** pag.111

CAPITOLO VII

CONCLUSIONI pag.112

7.1 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE pag.113

CAPITOLO VIII

BIBLIOGRAFIA pag.116

ABBREVIAZIONI

Le abbreviazioni usate per gli aminoacidi e per la designazione dei peptidi seguono le regole della IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature in *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 977-983. I simboli degli aminoacidi denotano la configurazione L se non altrimenti specificato. Sono state utilizzate le seguenti abbreviazioni: L, Leu, : leucina. P: Prolina. Q, Gln: glutammina. S, Ser: serina. K, Lys: lisina. O, Orn: ornitina. I, Ile: isoleucina. R, Arg: arginina. W, Trp: triptofano. F, Phe: fenilalanina. V, Val: valina. G, Gly: glicina. SDS, dodecilsolfato di sodio; DPC, dodecilfosfocolina; SAR, relazione struttura-attività; NMR, risonanza magnetica nucleare; DQF-COSY, double quantum filtered correlated spectroscopy; TOCSY, total correlated spectroscopy; NOESY, nucleare Overhauser enhancement spectroscopy; NOE, nucleare Overhauser effetto, MD, dinamica molecolare; EM, minimizzazione energetica; 1D, 2D e 3D, mono-, bi- e tridimensionale; TPS, acido 3-(trimetilsilanoil)propionico, PC, fosfatidilcolina; SOPC, 1-stearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina; POPG, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerolo; DCM, diclorometano; NMP, N-metilpirrolidone, DIPEA, N,N-diisopropilettilamina; DMF, N,N-dimetilformamide; Et₃SiH, trietilsilano; Fmoc, 9-fluorenil-metossicarbonil. Boc: terzbutilossicarbonile, tBu: terzbutile Trt: tritile o trifenilmetile. HOBt, N-idrossi-benzotriazolo; HBTU, 2-(1H-benzotriazolo-1-yl)-1,1,3,3,-tetrametiluronioesafluoro-fosfato; Pbf, 2,2,4,6,7-

pentametildiidrobenzo-furan-5-sulfonil; RP-HPLC, cromatografia ad alta prestazione a fase inversa; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization.

CAPITOLO I:
INTRODUZIONE

1. IMPORTANZA DEI PEPTIDI ANTIMICROBICI AMPs

La presenza di agenti patogeni costituisce un problema atavico nell'insorgenza di infezioni di varia tipologia; pertanto nel corso del tempo si è accresciuto l'interesse verso forme batteriche, funginee, virali, al fine di circoscrivere o debellare le infezioni da essi causate. L'impiego evidente di farmaci antibiotici nei confronti dei patogeni risale al secolo scorso, e numerose altre classi di farmaci sono state scoperte nel corso degli anni; oggi sono disponibili centinaia di farmaci antimicrobici. Si stima che allo stato attuale circa il 30% dei pazienti ospedalizzati sono sottoposti a cicli di terapia antibatterica. Il decesso, quindi, provocato da infezioni batteriche incurabili fa parte del passato.

Tuttavia, gli antibatterici, rappresentano la classe di farmaci più utilizzata, il cui impiego è stato però caratterizzato da un uso smodato, spesso errato da parte dei medici. Sebbene, infatti, sia universalmente noto che i farmaci antibatterici non esercitano alcuna attività antivirale, più del 50% dei pazienti a cui è diagnosticata un'infezione di tipo virale del tratto respiratorio, è sottoposto ad un ciclo di terapia antibatterica. Conseguenza inevitabile, pertanto, dell'intenso uso di antibatterici è stata l'insorgenza di patogeni resistenti agli antibiotici; insorgenza che costituisce, al giorno d'oggi, un'emergenza sempre più sentita nella terapia antibatterica, tale da condurre la ricerca verso lo sviluppo di nuovi farmaci. Analizzando le cause che

inducono i patogeni a sviluppare resistenza, è possibile identificare il realizzarsi di tre processi[1]:

1. Il farmaco non raggiunge il suo bersaglio.
2. Il farmaco viene disattivato
3. Il bersaglio è alterato

Particolarmente importante risulta il terzo punto ai fini della resistenza.

Le alterazioni del bersaglio, infatti, possono essere dovute a:

- mutazioni del bersaglio naturale stesso, (es. resistenza ai fluorochinolonicici)
- modificazioni del bersaglio (es. resistenza ai macrolidi alle tetracicline per protezione ribosomiale)
- sostituzione, da parte del patogeno, del bersaglio naturale e sensibile con un'alternativa resistente, (es. resistenza alla meticillina negli stafilococchi), quest'ultima situazione determina un'interazione mancata tra il farmaco e il suo target.

Attualmente, la percentuale di patogeni che ha sviluppato resistenza ai classici antibiotici è destinata a crescere, esempi lampanti sono rappresentati da ceppi come: *Pseudomonas aeruginosa*, costitutivamente resistente a svariati tipi di antibiotici in quanto privo delle classiche purine ad elevata permeabilità, ancora *Escherichia Coli*, *Neisseria gonorrhoeae* aventi sistemi di pompe di estrusione del farmaco che ne impediscono l'azione in quanto lo espellono[2].

Da qui nel corso dell'ultimo decennio si è accresciuto l'interesse nei confronti di composti che potessero agire anche su batteri che sviluppano resistenza. A tale scopo la ricerca ha rivolto la sua attenzione su peptidi antimicrobici già presenti in diverse specie, sia vegetali che animali.

Tali composti si sono rivelati essere attivi anche contro ceppi resistenti ai classici antibiotici, un esempio particolarmente interessante è rappresentato dalla famiglia delle temporine che esplicano un'azione antimicrobica, anche su ceppi vancomicina-resistenti [3].

Un numero sempre maggiore di AMPs è stato isolato e caratterizzato nel corso degli anni, tuttavia un notevole interesse si è avuto soprattutto a ridosso degli anni '97-'99 per avere un vero e proprio exploit negli ultimi tempi.

In figura 1 è stato riportato un istogramma relativo agli AMPs isolati a partire dal 1985 ad oggi; risulta chiaro come siano state prese in esame oltre 300 molecole.

In particolare, notevole interesse si è evidenziato nell'ultimo quinquennio. Attualmente risultano caratterizzati ben oltre 800 peptidi antimicrobici [4].

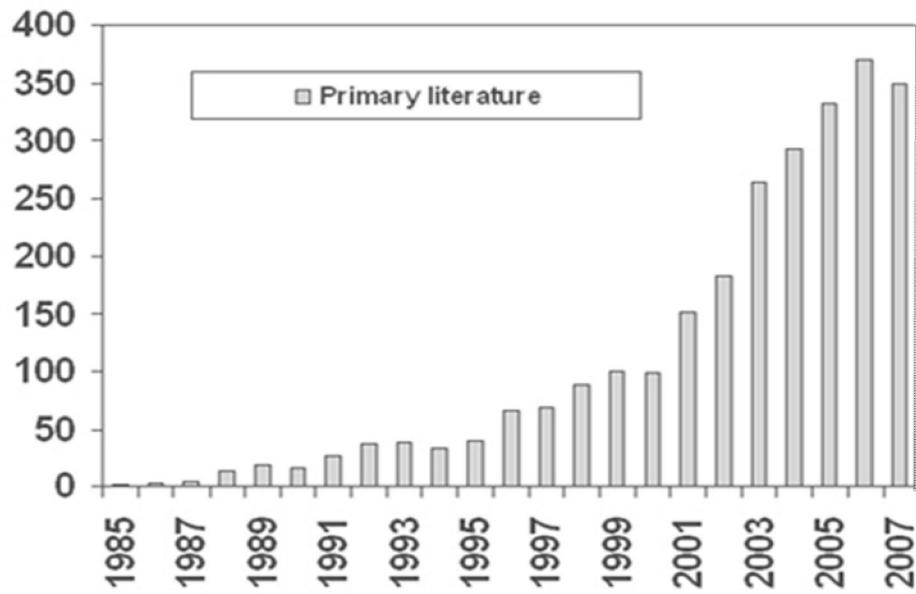


Figura 1: Isolameto di AMPs nel corso degli anni

1.1 I PEPTIDI ANTIMICROBICI AMPs

I peptidi antimicrobici sono codificati da specifici geni implicati nella risposta immune innata, tipica di tutti gli esseri viventi [5].

Nel corso del tempo, un numero sempre maggiore di AMPs è stato isolato da diverse fonti biologiche, includendo oltre a specie procariote anche quelle eucariote, comprendendo perfino l'uomo.

Di qui l'importanza nello studiare le attività svolte da tali molecole. Bulet e collaboratori hanno evidenziato, in un excursus che va dagli AMPs isolati negli invertebrati a quelli isolati nei vertebrati, quanto questi fossero fondanti nel proteggere l'organismo da invasioni di batteri, protozoi, funghi, addirittura alcuni virus [6]

Studi accurati effettuati da Hans Boman [7] hanno evidenziato come scarsa selettività e rapidità nell'uccisione dei patogeni siano caratteristiche connotative degli AMPs, tali da rendere questi peptidi la prima risposta immune innata nelle invasioni da microbi.

Quest'ultima, esplicitata dai peptidi antimicrobici, non solo gioca un ruolo fondamentale negli invertebrati ma addirittura, nei vertebrati superiori, essa è attivata come sistema immediato prima della risposta immune specifica.

La diffusione di microorganismi patogeni che hanno sviluppato e sviluppano resistenza a farmaci convenzionali, sta diventando un'emergenza sempre più

sentita nel mondo scientifico, che ha rivolto e rivolge la sua attenzione alla ricerca di nuove molecole che possano, quantomeno, bypassare il fenomeno della resistenza batterica. Fra i possibili candidati gli AMPs rivestono un ruolo d'elezione in quanto molecole potenzialmente utilizzabili nelle terapie come agenti anti-infettivi [8] o, eventualmente, in qualità di conservanti alimentari [9].

1.2 CARATTERISTICHE STRUTTURALI DEGLI AMPs

Considerato l'elevato interesse nel corso dell'ultimo decennio sui peptidi antimicrobici, e la loro eventuale valenza nel mondo della ricerca, è d'uopo soffermarsi sulle proprietà strutturali connotative di questi peptidi.

Nello specifico, gli AMPs essendo presenti in diversi organismi, quali piante, insetti, mammiferi ma soprattutto anfibi, hanno caratteristiche grosso modo comparabili in funzione dell'attività esplicata.

Pur variando notevolmente nel numero di residui della sequenza che li compongono da 10 a 40 AA, presentano caratteristiche comuni, sono, infatti, tutti peptidi basici, aventi un'elevata percentuale di idrofobicità, e una natura anfipatica. Nascono come pro-peptidi di circa 60-170 residui che subiscono poi processi di maturazione ad opera di specifiche proteasi. I pro-peptidi sono tutti generalmente formati da una sequenza segnale per il reticolo

sarcoplasmatico, da una pro-sequenza anionica di lunghezza variabile, il cui ruolo è quello di neutralizzare le cariche positive del peptide rendendolo inattivo, e, ovviamente la sequenza del peptide maturo.

Nello specifico numerosi AMPs, sono stati isolati da anfibi; è stato infatti la loro pelle risulta essere un'importante fonte di tali peptidi, normalmente immagazzinati nelle ghiandole della pelle degli anuri (rane e rospi) e vengono secreti in modo olocrino in seguito a uno stress o danno cellulare, agendo come prima difesa contro le invasioni di patogeni.[10]

1.3 CLASSIFICAZIONE DEGLI AMPs

Studi precedenti attinenti alle caratteristiche degli AMPs, hanno permesso di effettuare una sorta di classificazione che prescindesse dalle specie da cui tali molecole sono state isolate. Pertanto, è stato possibile raggrupparli in tre grandi fasce principali, sulla base della composizione e della struttura secondaria:

🚦 PEPTIDI CONTENENTI CISTEINE

🚦 PEPTIDI CONTENENTI UN'ELEVATA PERCENTUALE DI
RESIDUI SPECIFICI

✚ PEPTIDI CONTENENTI SEQUENZA LINEARE, ELEVATA PERCENTUALE AD α -ELICA.

La prima classe comprende a sua volta altre due sottoclassi, rispettivamente

- Peptidi aventi più ponti disolfuro che adottano una struttura a foglietto β -antiparallelo (esempi defensine, tachiplesine) [11]
- Peptidi aventi una struttura a *loop* con un solo ponte disolfuro (bactenecine, brevinine, esculetine) [12]

Nello specifico, alla prima sottoclasse del primo gruppo appartengono le defensine, peptidi con struttura a β -foglietto immagazzinati nei granuli citoplasmatici dei neutrofili di mammifero (topo, ratto, coniglio, uomo).

Presentano un elevato numero di residui di Arg e sei residui di Cys, le cui posizioni sono conservate all'interno della famiglia.

Alla seconda classe appartengono peptidi con elevata percentuale di residui specifici, come nel caso dei peptidi bovini ricchi di Pro e Arg rispettivamente i Bac5 e i Bac7. Sono inclusi nella classe di peptidi lineari contenuti un'elevata percentuale di α -elica numerosissimi peptidi antimicrobici quali cecropine, megainine, temporine, bombinine.[13]

1.3.1 Peptidi contenenti Cys

Fanno parte di questa classe di composti peptidi contenenti ponti disolfuro per la presenza di Cys. In base alla struttura e alla composizione di tali AMPs si è ritenuto opportuno suddividere questo gruppo in 2 sottogruppi, in base al contenuto dei ponti disolfuro:

☞ Peptidi aventi più ponti disolfuro che adottano una struttura a β -foglietto;

Defensine: peptidi immagazzinati nei granuli citoplasmatici dei neutrofilo di mammifero (topo, ratto, coniglio, uomo), appartengono al primo sottogruppo dei composti contenenti cisteina.

Le α -defensine sono costituite da 29-30 residui le cui sequenze presentano un elevato numero di arginine e cisteine. Tali molecole sono accumulate nei granuli dei neutrofilo in forma attiva e, successivamente vengono rilasciate nei vacuoli fagociti. Essendo caratteristica tipica dei neutrofilo quella di fagocitare e distruggere l'agente invasore, tali composti rappresentano un punto fondante nel prendere parte al meccanismo ausiliario all'uccisione "ossigeno-dipendente" mediata dai leucociti.

E' stato possibile isolare dai neutrofili bovini un gruppo di 13 defensine, anche definite β -defensine, avente una sequenza di 38-42 residui al cui interno sono presenti sempre 6 cisteine in posizioni altamente conservate.

In linea generica si tratta comunque di peptidi compatti, globulari, formati da 3 foglietti β -antiparalleli, privi di α -elica. I tre ponti disolfuro presenti nella struttura conferiscono rigidità alla stessa. Nonostante presentino delle differenze strutturali con i classici peptidi, le defensine esplicano la loro azione formando sulla parete della cellula batterica dei veri e propri pori multimerici al fine da indurre la lisi delle vescicole lipidiche.

L'anfipaticità, dunque, risulta una caratteristica altamente conservata, anche nel caso di strutture tridimensionali ad α -elica antipatica. Diviene chiaro, quindi, come tali molecole siano il frutto di un'evoluzione convergente, ipotesi suffragata dall'evidenza che pur presentando composizione e struttura diverse agiscono in modo molto simile. [11]

Tachiplesine sintetizzati dal crostaceo giapponese *Tachypleus tridentatus*, e immagazzinati nei granuli di tali cellule, sono peptidi decisamente più brevi delle defensine, siamo infatti dinanzi a sequenze di 17-18 residui.

Strutturalmente, anche sulla base di precedenti studi NMR è stato possibile apprezzare una struttura a foglietto- β antiparallelo stabilizzata da due ponti disolfuro tra i residui di cisteina 4-17 e 8-13. All'interno di tale struttura l'anfipaticità risulta conservata. Attive su cellule funginee e batteriche, gli è

stata attribuita la capacità di legare i lipopolisaccaridi della membrana esterna dei Gram-negativi grazie all'interazione dei 4 residui di arginina con i 2 gruppi fosforici del glicolipide del LPS il che spiegherebbe la loro efficacia. [11]

☞ Peptidi aventi un ponte disolfuro che adottano una struttura a loop

Bactenecina Peptidi isolati dai neutrofili bovini aventi una sequenza di 12 residui, sono caratterizzati da una struttura ad ansa dovuta alla presenza di un unico ponte disolfuro. Tali molecole hanno uno spettro d'azione che comprende sia Gram-positivi che negativi; tuttavia evidenziano attività citotossica su cellule neuronali e gliali. [12]

Brevinine-1, 2: isolati dalla pelle della rana coreana *Rana brevipola porsa* e in seguito dalla pelle della *Rana esculenta*, si tratta di peptidi basici aventi, nella regione C-terminale una Cys implicata nella formazione con un ponte disolfuro con un'altra Cys distante 6 residui a monte. La regione N-terminale assume una conformazione ad α -elica anfipatica e il ponte disolfuro dà luogo ad un anello nella regione C-terminale.

Nello specifico le brevinine-1 derivano da un precursore di 71 residui, avente una sola sequenza di un peptide da 24 residui.

Le brevinine-2 sono, invece, costituite da 28-30amminoacidi e derivano da precursori di 68-74 residui. Tali molecole presentano attività nei confronti di ceppi Gram-positivi e Gram-negativi; nella fattispecie le brevinine-1 esplicano la loro attività anche nei confronti di alcuni lieviti, quali la *Candida albicans*, presentano, inoltre carattere emolitico. [12]

Esculetine: isolate dalle ghiandole della secrezione cutanea di anfibi del genere *Rana esculenta*, sono state individuate due isoforme di tali molecole, rispettivamente le esculetine-1 contenenti 46 residui e le esculetine-2 caratterizzate invece da 37 residui. La presenza di un ponte disolfuro nella struttura, determina la formazione di un anello a sette termini a ridosso dell'estremità C-terminale. Questi peptidi presentano un'attività nei confronti di ceppi Gram-positivi e negativi, tuttavia non è stata riscontrata attività emolitica. [12]

1.3.2 Peptidi contenenti un'elevata percentuale di residui specifici

Fanno parte di tale classe peptidi aventi un'elevata percentuale di specifici residui, ad esempio Arg, Trp, Pro; che conferiscono particolari caratteristiche strutturali alla molecola.

Apidecine: Isolati dall'emolinfa di *Api millifera*, sono costituiti da 18 residui caratterizzati da un elevato contenuto di Pro (29%) e di Arg (17%). Attive contro Gram-negativi, recenti studi hanno dimostrato che i peptidi formati da D-aa hanno evidenziato l'inattività di tali molecole.

PR-39: isolato dal maiale e successivamente dall'uomo (FALL-39) è un peptide formato da 39 residui di cui 10 Arg e 19 Pro. Esplica la sua azione bloccando la sintesi del DNA e delle proteine. E' soprattutto attivo nei confronti di ceppi Gram-negativi, inoltre si comporta da fattore di crescita nei confronti delle cellule di mammifero, intervenendo nei processi di cicatrizzazione delle ferite.

Bac-5 e bac-7: peptidi di diversa lunghezza, isolati dai granuli citoplasmatici dei neutrofili bovini, presentano una conformazione ad α -elica anfipatica in ambienti idrofobici. Oltre all'attività antimicrobica, inibiscono la replicazione del virus *Herpes simplex*.

1.3.3 Peptidi con sequenza lineare ad elevata percentuale di α -elica.

Appartengono a questa classe la stragrande maggioranza di peptidi antimicrobici.

Cecropine: isolate dalla larva della farfalla *Hyalophora cecropia* sono state identificate tre diverse classi, rispettivamente: cecropine A, B, D. Successivamente sono state identificate anche nelle specie animali come il maiale (cecropina P1).

Si tratta di peptidi lineari basici costituiti da 35-37 residui con un certo grado di omologia nella struttura primaria, pari a circa il 62-65%.

Per le cecropine isolate dagli insetti è stato dimostrato che esplicano la loro attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram-negativi mediante la formazione di canali atti a dissipare il gradiente elettrochimico. Nel caso della cecropina P1, è stato ipotizzato un meccanismo d'azione di tipo detergente in cui i monomeri ad α -elica anfipatica si dispongono a ridosso del doppio strato lipidico in modo tale da disintegrare la stessa.

Melittine: isolate dal veleno dell'ape da miele *Apis mellifera*, sono molecole costituite da 26 residui, aventi 5-6 cariche positive con una struttura ad elevata percentuale di α -elica anfipatica. Il meccanismo d'azione identificato per le melittine è di tipo "Barrel Stave", determinano, infatti, la formazione di pori multimerici il cui diametro è di 25-30Å. Tali composti sono noti per il loro elevato potere emolitico. Inoltre evidenze sperimentali hanno dimostrato che tali composti possono danneggiare anche cellule eucariote, come i

fibroblasti di topo, agendo come co-mitogeni senza determinandone la distruzione.

Megainine: secreti dalla pelle della rana africana *Xenopus laevis* sono peptidi costituiti da 23 residui. Mostrano attività nei confronti di numerosi ceppi batterici, funghi, protozoi, e alcune linee tumorali, non presentano carattere emolitico. A basse concentrazioni le magainine si dispongono parallelamente alle superficie delle teste polari dei fosfolipidi; a concentrazioni elevate, invece, il peptide si dispone perpendicolarmente al doppio strato formando dei canali ionici di tipo “toroidale”.

Dermaseptine: secrete dalla pelle delle rane sudafricane della sottofamiglia *Phyllomedusinae*. Costituite da circa 27 residui presentano un’elevata percentuale di strutturazione ad α -elica anfipatica.[14]

Bombinine: secrete dalla pelle della *Rana variegata*, sono peptidi aventi attività antimicrobica ed emolitica. Queste caratteristiche sono state attribuite originariamente alla bombinina peptide di 24 residui. Successivamente sono stati isolati dalle ghiandole secretorie della pelle di *Bombina orientalis* 3 peptidi bombinino-simili. Dalla sequenza dei precursori è stata confermata l’esistenza di altri peptidi definiti bombinine H. Le bombinine hanno attività nei confronti di Gram-negativi e Gram-positivi la bombininina H ha attività

citotossica nei confronti degli eritrociti. Le bombinine H nello specifico sono una classe di peptidi ammidici di 17-20 residui caratterizzati da una netta carica positiva +3. Le bombinine H differiscono tra loro per la presenza di Ile o Leu in prima posizione, Ile o D-allolisoleucina in seconda posizione, Leu o Met in ottava. Inoltre è da notare che la presenza di un D-amminoacido sia la peculiare caratteristica di queste molecole, in quanto, ad oggi non sono mai stati isolati in natura altri composti contenenti D-amminoacidi aventi attività antimicrobica[15][16].

Temporine: famiglia di peptidi ammidici lineari basici secreti dalla pelle della *Rana temporaria*. Presentano una carica positiva netta a pH neutro e mostrano una certa omologia nella sequenza con quella delle melittine.

1.4 MECCANISMO D'AZIONE DEGLI AMPs

Per meglio chiarire il meccanismo attraverso il quale i peptidi antimicrobici esplicano la loro attività nei confronti delle cellule batteriche è d'uopo porre l'accento sulle caratteristiche strutturali dei loro bersagli.

Indipendentemente dalla modalità di azione degli AMPs, lo step prioritario di tali peptidi è rappresentato dall'interazione con la membrana dei batteri.

Studi pregressi hanno ampiamente dimostrato e caratterizzato la composizione della membrana cellulare batterica. Quest'ultima risulta, infatti, prioritariamente formata da notevoli quantità di fosfolipidi carichi negativamente, quali fosfatidilglicerolo, cardiolipina (bisfosfatidilglicerolo) [17]

Al contrario, le membrane costituenti le cellule eucariotiche sono composte principalmente da: fosfatidilcolina, sfingomieline e colesterolo, tutte molecole aventi carica neutra a pH fisiologico[18]. Appare quindi evidente come peptidi con una bassa carica netta negativa (δ -emolisina) oppure con una bassa carica netta positiva distribuita lungo il *backbone* elicoidale (es. melittina) siano maggiormente litici nei confronti di cellule eucariote piuttosto che procariote; d'altra parte gli AMPs possiedono un'elevata carica netta positiva dovuta alla presenza di un gran numero di residui basici distribuiti lungo la faccia idrofila dell' α -elica anfipatica [19-20].

In figura è riportata l'interazione di un peptide strutturato ad α -elica con le cariche positive interfacciate con le cariche negative del doppio strato fosfolipidico.

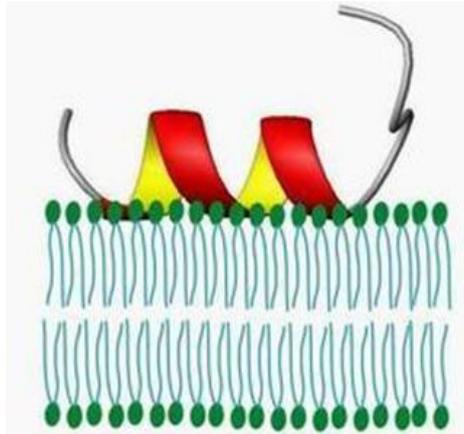


Figura 1.4 : Esempio di interazione di un AMPs lineare ad α -elica con i fosfolipidi di membrana di un patogeno

Va inoltre aggiunto che un ulteriore fattore destabilizzante della membrana del patogeno agli attacchi degli AMPs è costituito dal potenziale transmembranario delle cellule batteriche, altamente negativo che può facilitare la formazione di canali ionici [21-23].

Tuttavia, nonostante questi fattori è stata riscontrata l'esistenza di un discreto numero di specie batteriche che hanno sviluppato resistenza all'azione tossica degli AMPs. Tra i meccanismi più accreditati bisogna annoverare le modificazioni a carico dei componenti cellulari di membrana come ad esempio l'incorporazione di molecole di Lys all'interno del fosfatidilglicerolo, o ancora l'impiego di proteasi esterne, oppure l'attivazione di pompe di efflusso [24-27].

Tuttavia numerosi peptidi antimicrobici mostrano una straordinaria attività e una specifica selettività nei confronti di alcune specie batteriche, divenendo così dei promettenti candidati come antibiotici.[28-29].

L'AMP lega specifici recettori di membrana determinando l'innescamento di un *pathway* che culminerà con la morte cellulare.

- L'AMP lega importanti target intracellulari inibendo funzioni vitali.
- L'AMP lega il DNA all'interno della cellula, bloccando il processo di sintesi proteica e determinando la morte cellulare.
- L'AMP determina il disintegro della membrana mediante “*pore-forming*”.

CAPITOLO II:
IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

2.1 IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

Il presente lavoro di ricerca è stato incentrato sullo studio, la progettazione, la sintesi, la caratterizzazione, l'attività farmacologica e sugli aspetti conformazionali delle temporine.

Nello specifico, oggetto della ricerca sono state: la temporina A (TA) e la temporina L (TL).

In prima istanza, si è quindi proceduto ad effettuare un'analisi accurata delle caratteristiche dei due template naturali rispettivamente di TA e TL; essendo queste connotate da aspetti diversi. Quindi, su tali basi è stata poi, effettuata la progettazione di analoghi di TA e TL, che si è concretizzata con la sintesi e la loro caratterizzazione mediante l'utilizzo di tecniche spettroscopiche e di dinamica molecolare.

L'epilogo di questa fase strutturale del progetto ha condotto all'ottenimento di risultati particolarmente interessanti, che hanno permesso di proporre un diverso meccanismo molecolare con il quale i due peptidi esplicano attività antimicrobica e attività emolitica.

Inoltre, i risultati estremamente rilevanti, ottenuti dagli studi farmacologici, hanno mostrato l'importanza di alcuni dei peptidi analoghi alle temporine, progettati e sintetizzati, evidenziandone un profilo di attività migliorato in termini di MIC e di percentuale di emolisi.

La simbiosi delle varie fasi in cui è stato articolato il progetto di ricerca, ha fatto sì che si potessero concretizzare, in un vero e proprio quadro sinottico, non solo l'effettivo comportamento di TA e TL nella modalità di interazione con le membrane batteriche e non, ma anche e soprattutto l'apertura ex-novo di un filone di ricerca per la progettazione di nuovi analoghi sulla base di quelli, ottimali, già ottenuti con il presente studio.

2.2 LE TEMPORINE

Si tratta di peptidi antimicrobici identificati per la prima volta nel 1996 nella pelle della rana rossa Europea *Rana temporaria* da cui prendono il nome, (Tabella 2.2) in seguito sono state isolate in altre specie infatti sono state trovate anche nelle rane del Nord America e dell'Euroasia, alcune anche all'interno del veleno delle vespe [30-32] .

Le rane costituiscono un vero e proprio modello per lo studio in vivo del ruolo svolto dagli AMPs nei vertebrati e studi precedenti hanno evidenziato l'importante funzione di tali molecole nel controllo della flora naturale degli animali. [5]

Tuttavia la sintesi risulta regolata a livello trascrizionale dal fattore NF- κ B/I κ B α , risultando, ovviamente comunque stimolata dall'invasione di microorganismi.[5][33]

Le temporine sono prodotte dalle ghiandole dermali della pelle della Rana temporaria prevalentemente localizzate nella regione dorsale dell'animale.

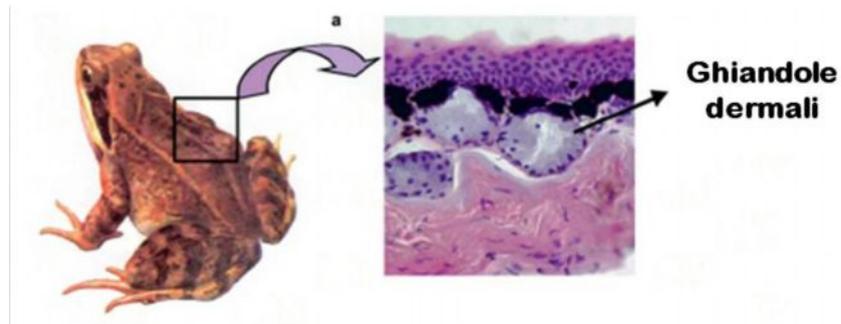


Figura 2.2a: Ghiandole dermali della *Rana temporaria*.

Esami pregressi hanno permesso l'ottenimento delle temporine sottoponendo l'animale ad un lieve stimolo elettrico della durata di 5 sec. necessario per la secrezione degli AMPs. Figura 2.2b

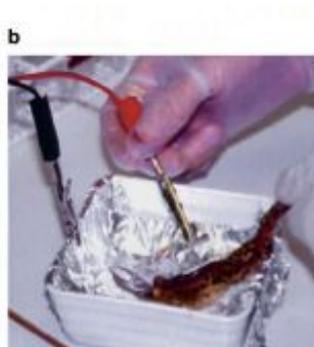


Figura 2.2b: Stimolo elettrico dorsale

Il secreto è stato poi isolato e caratterizzato mediante RP-HPLC in modo tale da ottenere i diversi AMPs che sono stati quindi catalogati e riportati in tabella 1.

Tabella 2.2: Classificazione delle temporine isolate.

Peptide	Source	Sequence		Net charge	Reference
		1	10		
Consensus sequence		FLPLIASLLS	KLL		
Temporin A	° <i>R. temporaria</i>	FLPLIG R VLS	GIL-NH ₂	+2	34
Temporin B	<i>R. temporaria</i>	LLPIVG NLLK	SLL-NH ₂	+2	34
Temporin C	<i>R. temporaria</i>	LLPILGNLLN	GLL-NH ₂	+1	34
Temporin D	<i>R. temporaria</i>	LLPIVG NLLN	SLL-NH ₂	+1	34
Temporin E	<i>R. temporaria</i>	VLP I IGNLLN	SLL-NH ₂	+1	34
Temporin F	<i>R. temporaria</i>	FLPLIG K VLS	GIL-NH ₂	+2	34
Temporin G	<i>R. temporaria</i>	FFPVIG R ILN	GIL-NH ₂	+2	34
Temporin H	<i>R. temporaria</i>	LSP--- NLLK	SLL-NH ₂	+2	34
Temporin K	° <i>R. temporaria</i>	LLP--- NLLK	SLL-NH ₂	+2	34
Temporin L	<i>R. temporaria</i>	FVQWFS K FLG	R IL-NH ₂	+3	34
Temporin-1ARa	* <i>R. areolata</i>	FLPIVG R LIS	GLL-NH ₂	+2	91
Temporin-1AUa	* <i>R. aurora aurora</i>	FLPIIG Q LIS	GLL-NH ₂	+1	54
Temporin-1BYa	* <i>R. boylii</i>	FLPIIA K VLS	GLL-NH ₂	+2	92
Temporin-1Ca	* <i>R. clamitans</i>	FLPFLA K ILT	GVL-NH ₂	+2	93
Temporin-1Cb	<i>R. clamitans</i>	FLPLFASLIG	K LL-NH ₂	+2	93
Temporin-1Cc	<i>R. clamitans</i>	FLPFLASLLT	K VL-NH ₂	+2	93
Temporin-1Cd	<i>R. clamitans</i>	FLPFLASLLS	K VL-NH ₂	+2	93
Temporin-1Ce	<i>R. clamitans</i>	FLPFLATLLS	K VL-NH ₂	+2	93
Temporin-1Ec	° <i>R. esculenta</i>	FLPVIAGLLS	K LF-NH ₂	+2	94
Temporin-1Ga	* <i>R. grylio</i>	SILPTIVSFL	S KVF-NH ₂	+2	71
Temporin-1Gb	<i>R. grylio</i>	SILPTIVSFL	S KFL-NH ₂	+2	71
Temporin-1Gc	<i>R. grylio</i>	SILPTIVSFL	T KFL-NH ₂	+2	71
Temporin-1Gd	<i>R. grylio</i>	FILPLIASFL	S KFL-NH ₂	+2	71
Temporin-1Ja	° <i>R. japonica</i>	ILPLVGNLLN	D LL-NH ₂	0	53
Temporin-1La	* <i>R. luteiventris</i>	VLPLISMALG	K LL-NH ₂	+2	95
Temporin-1Lb	<i>R. luteiventris</i>	NFLGTLINLA	K KIM-NH ₂	+3	95
Temporin-1Lc	<i>R. luteiventris</i>	FLPILINL H	K GLL-NH ₂	+3	95
Temporin-1Oa	° <i>R. ornativentris</i>	FLPLLASLFS	R LL-NH ₂	+2	56
Temporin-1Ob	<i>R. ornativentris</i>	FLPLIG K ILG	TIL-NH ₂	+2	56
Temporin-1Oc	<i>R. ornativentris</i>	FLPLLASLFS	R LF-NH ₂	+2	56
Temporin-1Od	<i>R. ornativentris</i>	FLPLLASLFS	GLF-NH ₂	+1	56
Temporin-1P	* <i>R. pipiens</i>	FLPIVG K LLS	GLL-NH ₂	+2	95
Temporin-1PLa	* <i>R. palustris</i>	FLPLVG K ILS	GLI-NH ₂	+2	96
Temporin-1PRa	° <i>R. pirica</i>	ILPILGNLLN	GLL-NH ₂	+1	55
Temporin-1PRb	<i>R. pirica</i>	ILPILGNLLN	SLL-NH ₂	+1	55
Temporin-1TGa	° <i>R. tagoi</i>	FLPILG K LLS	GIL-NH ₂	+2	97
Temporin-1Va	* <i>R. virgatipes</i>	FLSSIG K ILG	NLL-NH ₂	+2	98
Temporin-1Vb	<i>R. virgatipes</i>	FLSIIA K VLG	SLF-NH ₂	+2	98
Temporin-1Vc	<i>R. virgatipes</i>	FLPLVTMLLG	K LF-NH ₂	+2	98
Ranatuerin-6	* <i>R. catesbeiana</i>	FISAIASMLG	K FL-NH ₂	+2	99

2.3 CARATTERISTICHE DELLE TEMPORINE

Sintetizzate come grandi precursori, contengono una singola copia del peptide maturo nella regione C-terminale, presentano, inoltre una sequenza altamente conservata che include un peptide segnale di 22 residui [30]. Strutturalmente, le temporine si presentano come peptidi ammidici costituiti da 10-14 residui, con una carica netta positiva a pH neutro, e una struttura ad α -elica anfipatica a contatto con membrane o in ambienti idrofobici. È stato possibile individuare per questa classe di AMPs, una sequenza *consensus*: **FLPLIASLLSKLL-NH₂** [34].

Le temporine sono risultate particolarmente attive contro i batteri Gram-positivi, specie di *Candida*, funghi inoltre presentano la capacità di legare e permeare sia membrane artificiali che biologiche.[35-37]

Di questa famiglia di AMPs è stata posta l'attenzione in particolar modo sulla temporina A e la temporina L oggetto del presente lavoro di ricerca. È d'uopo a tal proposito enucleare le caratteristiche connotative.

2.4 LA TEMPORINA A (TA)

Appartenente alla più ampia famiglia delle temporine, la temporina A, TA, presenta una sequenza amminoacidica costituita da 13 residui con una carica positive netta a pH neutro pari a +2 (figura 2.4) [38]



Figura 2.4: Sequenza peptidica della temporina A

Lo spettro d'azione che essa presenta risulta ristretto ai soli batteri Gram-positivi [38]. Tuttavia, le è stata riscontrata attività antibatterica contro numerosi ceppi di Gram-positivi clinicamente importanti, con azione moderata contro i ceppi meticillino-sensibili e meticillino-resistenti di *Stafilococcus Aureus*. Inoltre, studi precedenti hanno dimostrato una sua efficacia nell'uccisione di parassiti protozoari come la *Leishmania* [39].

Tuttavia, caratteristica connotativa di TA è un'attività litica quasi del tutto insignificante nei confronti degli eritrociti umani [36], il che ne determina l'importanza come candidata per lo studio e il confronto con TL, a più ampio spettro d'azione ma fortemente emolitica.

2.5 LA TEMPORINA L (TL)

Caratterizzata anch'essa da una sequenza amminoacidica di 13 residui con la regione C-terminale ammidata, presenta una carica positiva netta a pH neutro pari ad un valore di +3 (figura 2.5)



Figura 2.5: Sequenza peptidica della temporina L

Se confrontata con TA, e con tutte le altre temporine, TL presenta uno spettro d'azione più ampio e connotativo, quest'ultima, infatti risulta essere attiva anche nei confronti di ceppi Gram-negativi quali la *Pseudomonas aeruginosa* A.T.C.C. 15692 e l'*Escherichia Coli* D21.

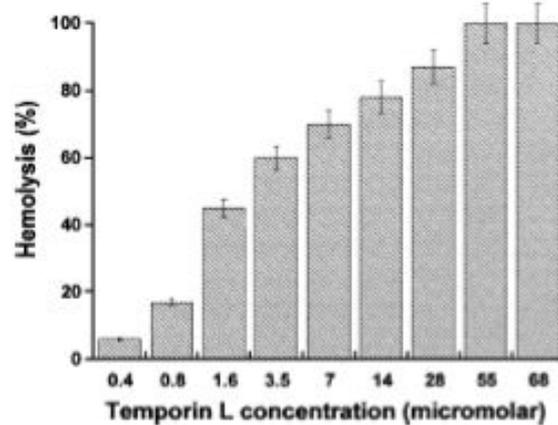
Un accurato studio incentrato sull'azione antimicrobica ed emolitica di TL, effettuato da Rinaldi e collaboratori, ha evidenziato come tale peptide espliciti un'attività citotossica anche nei confronti di alcune linee cellulari di tumore umano come: Hut-78, K-562, U-937 [35]. L'attività antimicrobica di TL è stata testata su numerosi ceppi batterici ed isolati clinici, così come le diverse specie di *Candida*, ed è stata determinata dal test di inibizione della zona. La TL ha mostrato sui microrganismi testati

un'attività di gran lunga superiore rispetto alle altre temporine e in particolare di almeno dieci volte superiore all'attività antimicrobica della temporina B. [35]

Inoltre le è stata riscontrata anche una debole attività contro il patogeno oculare *Ps. Aeruginosa 2*.

Tuttavia, il limite rappresentato dalla temporina L è dovuto alla sua caratteristica di essere emolitica nei confronti degli eritrociti umani.

Gli effetti di concentrazioni crescenti di TL sull'emolisi di eritrociti umani sono riportati nell'istogramma in base alla % di emolisi in funzione della concentrazione di TL [35].



Istogramma 2.5: Valori percentuali di emolisi in funzione delle diverse concentrazioni di TL μM

Partendo da tali basi si è proceduto, quindi alla strutturazione del presente progetto di ricerca al fine di ridurre l'attività emolitica di TL lasciandone inalterata l'attività antimicrobica.

2.6 TEMPORINA A E TEMPORINA L:

IL CONFRONTO

Numerosi AMPs, come la TL e la TA, sono anche in grado di legare e permeare le membrane delle cellule di mammiferi.

Una chiara comprensione degli elementi strutturali responsabili delle interazioni con le membrane cellulari, sia batteriche che di mammiferi, rappresenta lo status fondamentale nella progettazione di peptidi ad eventuale uso terapeutico o profilattico. Tutto questo conferisce un valido apporto per l'ideazione di nuove sequenze peptidiche aventi attività antimicrobica simile o migliore, ma con un carattere emolitico ridotto.

Date le caratteristiche connotative, significativamente diverse tra TA e TL, in questo progetto di ricerca si è proceduto ad un confronto tra i due peptidi articolato in molteplici aspetti.

Il primo step è stato incentrato sullo studio strutturale atto all'identificazione della conformazione di entrambi, nonché al chiarimento della loro modalità d'azione; in seguito, si è posta l'attenzione sulla progettazione di molecole al fine di ottimizzarne gli aspetti positivi.

2.7 MECCANISMO D'AZIONE

Attualmente esistono tre diversi meccanismi d'azione per peptidi ad α -elica che inducono la formazioni di fori nel bilayer dei batteri.

Tutti hanno inizio con uno step principale che si traduce nell'adsorbimento delle catene peptidiche sull'interfaccia della membrana e la formazione di una struttura secondaria del peptide adeso. L'adsorbimento della regione iniziale del peptide prelude ad un'espansione ai lati della membrana e ad uno stiramento del core lipidico idrofobico [40-44].

Si possono verificare tre diverse tipologie d'azione:

- ✓ **“Barrel stave”** Meccanismo secondo cui un set di peptidi cationici a contatto con le membrane batteriche, si organizza nella formazione di un tunnel transmembrario. Tale strutturazione prevede che il lato idrofobico della porzione transmembrana dell' α -elica sia orientato verso i lipidi mentre la porzione idrofila sia posizionata all'interno del tunnel.[45-47]. (Figura 2.7 A)

- ✓ **“Carpet like”** Tale approccio prevede che il lato carico della catena peptidica interagisca con le teste anioniche dei fosfolipidi della membrana batterica, strutturandosi nella formazione di un tappeto che si estende sulla superficie della membrana bersaglio. In tal modo l’area superficiale del foglietto esterno si assottiglia e si espande in relazione al foglietto più interno portando alla distruzione del doppio strato fosfolipidico tramite la formazione di veri e propri disgregati. (Figura 2.7 B) [47-49]

- ✓ **Toroidal, “wormhole”** infine in accordo con il modello toroidale, in seguito all’interazione del peptide sulla membrana, i fosfolipidi si curvano continuamente da un lato all’altro del doppio strato come all’interno di una ciambella. Le catene peptidiche inizialmente posizionate sulla membrana vengono immerse nell’interfaccia idrofilica/idrofobica e trascinate insieme alle molecole lipidiche del bilayer determinando la formazione di un poro. (Figura 2.7 C) [50-51].

Sebbene non siano stati ancora del tutto chiariti i meccanismi d’azione delle temporine, l’ipotesi più accreditata presume che questi peptidi esercitino la loro attività mediante *pore forming*.

In riferimento a tale aspetto, scopo del presente progetto di ricerca è quello di chiarire sulla base degli studi strutturali l'effettivo meccanismo di tali molecole.

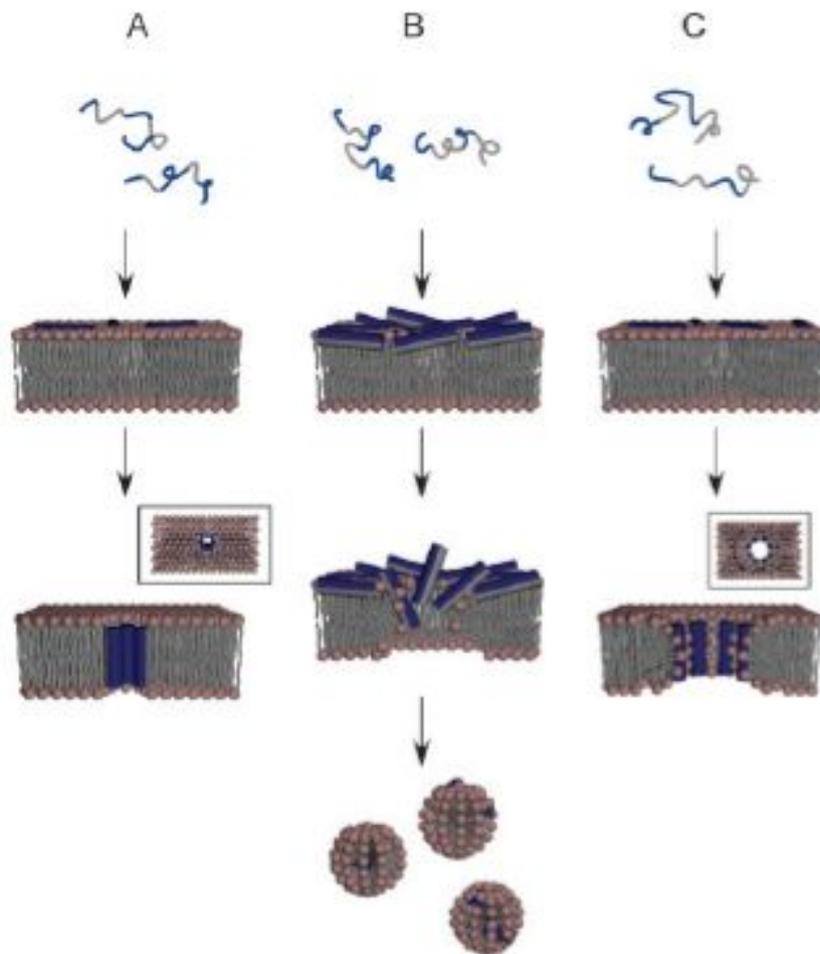


Figura 2.7: A) meccanismo d'azione "barrel-stave" B) meccanismo d'azione "carpet-like" C) meccanismo d'azione toroidal "wormhole". I peptidi sono rappresentati in blue.

CAPITOLO III

1^a FASE DEL PROGETTO: STUDI STRUTTURALI

3.1 I BERSAGLI DELLE TEMPORINE:

LE MEMBRANE BATTERICHE

Il target di TA e TL è rappresentato dalle membrane batteriche, pertanto risulta opportuno porre l'accento sui questi bersagli al fine di comprendere le interazioni di tali peptidi. La composizione lipidica della membrana dei batteri è molto diversa da quella delle cellule eucariotiche. Le prime, infatti, contengono quantità notevoli di fosfolipidi carichi negativamente come fosfatidilglicerolo e cardiolipina (bisfosfatidilglicerolo).[52] Le seconde, invece, sono composte principalmente da: fosfatidilcolina, sfingomieline e colesterolo, tutte molecole aventi carica neutra a pH fisiologico [53] Sulla base di tali presupposti molecolari risulta, quindi, ovvia la selettività da parte di TL e TA nei confronti di cellule procariotiche rispetto a quelle eucariotiche.

Tuttavia l'impiego di metodi spettroscopici e computazionali ha permesso di chiarire la modalità di interazione di questi peptidi con il loro target.

3.2 STUDI SPETTROSCOPICI E COMPUTAZIONALI.

Tali tecniche sono state incentrate sulle interazioni con micelle di sodio dodecilsolfato (SDS) e dodecilmfosfolina (DPC), che mimano rispettivamente le membrane batteriche e di mammifero[54]

Generalmente gli studi condotti mediante tecniche spettroscopiche (NMR) sono basate sull'impiego di micelle al posto del mono o del doppio strato fosfolipidico; in quanto esse sono costituite da un nucleo idrofobico ben definito e da un'interfaccia idrofilica, come il bilayer.[55-56]

Sebbene non esista una diretta correlazione tra i gruppi polari dell'SDS e quelli dei fosfolipidi costituenti la membrana batterica, la micella di SDS è generalmente considerata un modello idoneo nel mimare le membrane batteriche, in quanto caratterizzata dalla presenza di un anione sulla superficie esterna e un nucleo idrofobico più interno [57-58]

Le micelle di DPC, invece, sono considerate modelli idonei per le membrane delle cellule eucariotiche, generalmente ricche di fosfolipidi zwitterionici.

3.3 STUDI STRUTTURALI

La sequenza amminoacidica di un peptide risulta di fondamentale importanza nella determinazione sia della sua specifica attività biologica, sia del suo spazio conformazionale.

La tendenza del peptide ad assumere precise conformazioni dipende prioritariamente dalla sua costituzione chimica. Uno degli scopi degli studi conformazionali di peptidi in soluzione è proprio la determinazione della possibile conformazione bioattiva. Lo studio della struttura di proteine e peptidi viene generalmente effettuato allo stato solido, tramite metodi diffrattometrici o in soluzione, utilizzando tecniche di dicroismo circolare (CD) e risonanza magnetica nucleare (NMR).

3.3.1 Analisi Conformazionale mediante dicroismo circolare

La spettroscopia CD rappresenta una tecnica notevolmente utilizzata per analizzare la struttura secondaria di peptidi in soluzione. Essa fa parte delle spettroscopie chiroottiche, ossia di quelle tecniche spettroscopiche che, utilizzando luce polarizzata, mettono in risalto l'attività ottica delle molecole in esame. Infatti il dicroismo circolare si ha quando cromofori, presenti in un ambiente asimmetrico, interagiscono con la luce polarizzata.

Nelle proteine i principali gruppi otticamente attivi sono rappresentati dai legami ammidici del *backbone* peptidico e dalle catene laterali aromatiche. Polipeptidi e proteine, di solito, presentano regioni in cui i cromofori sono altamente ordinati, originando in tal modo strutture ad α -elica e/o β -sheet. In base all'orientamento dei legami peptidici, le transizioni ottiche dei legami ammidici possono essere splittate in transizioni multiple, inoltre la lunghezza d'onda e l'intensità delle transizioni possono essere aumentate o diminuite. Su tali presupposti molte strutture secondarie comuni quali: α -elica, β -turn e β -sheet ripiegati presentano profili di CD caratteristici[59]. Gli spettri di polipeptidi rappresentativi con le loro conformazioni sono mostrati in Figura 3.3.1.

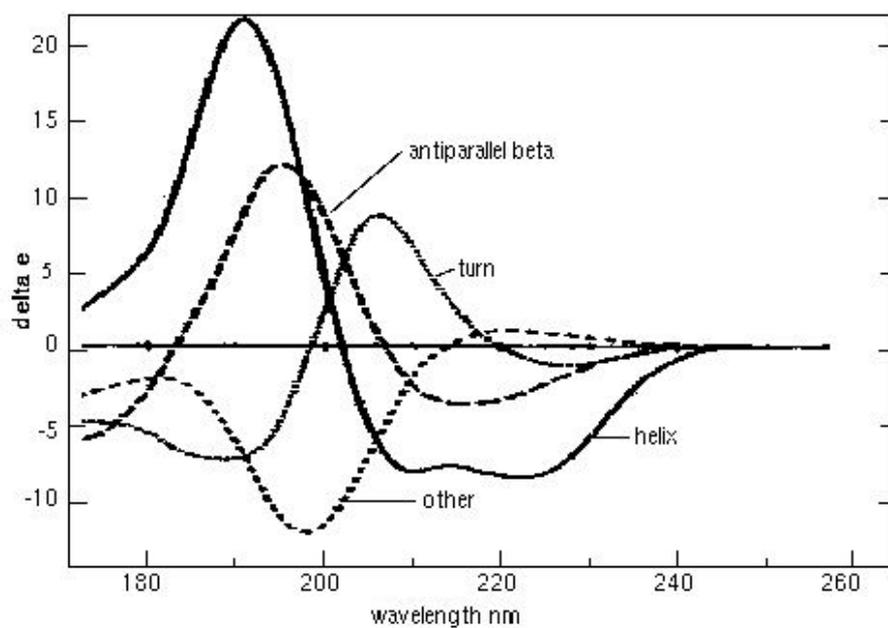


Figura 3.3.1 Spettri CD di peptidi rappresentativi

In particolare, peptidi che si strutturano ad α -elica presentano due minimi negativi a 222 e 208 nm con valori positivi tra 200 e 190 nm, mentre molecole che assumono una conformazione β -sheet presentano un minimo negativo intorno a 216 nm. Peptidi non strutturati, invece, presentano un tipico spettro CD con minimo intorno a 195 nm.

I risultati ottenuti mediante questa tecnica conferiscono informazioni sulle percentuali di strutture secondarie presenti nei polipeptidi. Anche se non è possibile stabilire la posizione nella sequenza, per cui sono scarsamente utili ai fini del calcolo strutturale, possono essere utilizzati per uno screening iniziale per la scelta del sistema solvente nell'analisi NMR e come controllo dei risultati ottenuti dal calcolo strutturale.

3.3.2 Spettroscopia CD di TA e TL

Per analizzare il comportamento conformazionale della TA e TL in questa prima fase di ricerca è stato inizialmente eseguito uno studio CD di questi due template in acqua, in soluzioni di SDS/acqua e in DPC/acqua (figura 3.3.2)

Per quanto riguarda gli spettri CD in acqua (pH 7.4), i dati suggeriscono la presenza di conformeri disordinati con un minimo intorno ai 200 nm. Questi risultati sono in linea con i dati di studi precedenti, che indicano l'assenza di una struttura secondaria definita per TA [36-38] [60-61] e TL [60-62] in acqua.

Al contrario, in soluzioni acquose di SDS e di DPC (20 mM) gli spettri CD di TA e TL suggeriscono la presenza di una α -elica con due minimi intorno a 209 nm e 222 nm. Le interazioni di TA con DPC e SDS sono simili. I relativi spettri mostrano due minimi: intorno a 209 nm e 222 nm indicativi di una struttura ad elica. Strutture β sono evidenziate anche da un minimo a 209 nm più intenso (minimo assoluto) in confronto a quello a 222 nm. Confrontando le soluzioni di SDS e DPC, si è osservato un aumento del contenuto di elica dei peptidi nel secondo caso in cui il minimo relativo a 222 nm diventa più intenso. I cambiamenti conformazionali di TL indotti dalle interazioni con le micelle zwitterioniche di DPC sono sensibilmente più pronunciati di quelli riscontrati dalle interazioni con micelle cariche

negativamente di SDS, il che indica che il contenuto di α -elica della TL in soluzioni di DPC è più grande di quello in soluzioni di SDS. [80]

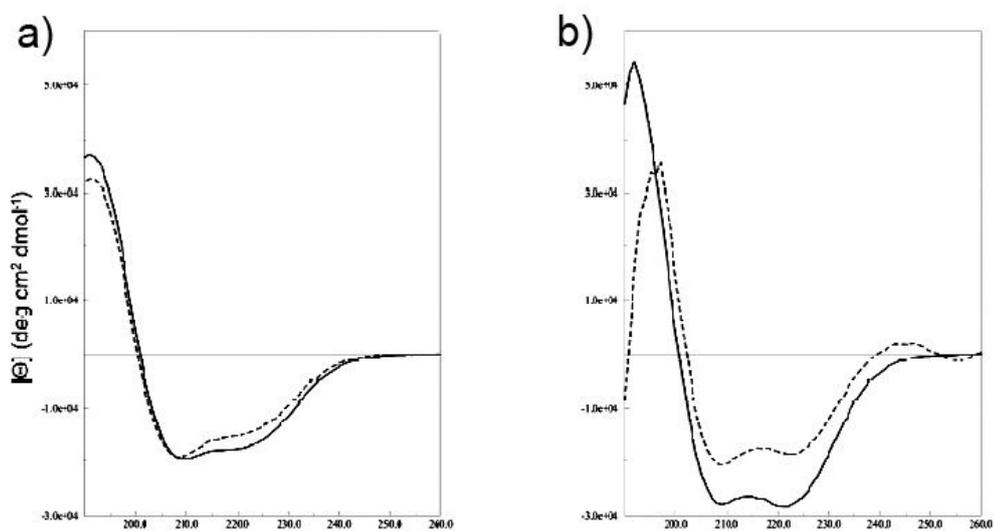


Figura 3.3.2. Spettri CD di Temporina A (a) e Temporina L (b) in soluzioni di DPC (linea continua) e SDS (linea tratteggiata).

3.3.3 Analisi conformazionale mediante tecniche ^1H NMR

L'analisi NMR è fondante per lo studio strutturale di molecole. Sia TA che TL sono state sottoposte ad analisi NMR. Un intero set di spettri 1D e 2D NMR sono stati registrati per TA e TL. Gli spettri sono stati eseguiti in soluzioni acquose sia di DPC che SDS (pH 4.5, $T=298.1$ K). L'assegnazione completa dei chemical shifts ^1H NMR è stata effettuata per tutti i peptidi analizzati secondo la procedura Wüthrich [63] tramite l'applicazione sistematica di esperimenti DQF-COSY[64 a) e b)] TOCSY [65] e NOESY[66] con il supporto del pacchetto software XEASY [67] (Tabella 3.3a, 3.3.3b, 3.3.3c, 3.3.3d). Non è stato possibile misurare le costanti di accoppiamento $J_{\text{HN-H}\alpha}$, probabilmente a causa della combinazione di costanti di accoppiamento piccole (strutture ad α -elica) e picchi slargati.

Tabella 3.3.3a: Assegnazione dei chemical shifts ^1H NMR di TL in SDS.

residui	NH ($-\Delta\delta/\Delta T$, etc)	C^αH	C^βH	Altri
Phe 1		4.40	3.25	7.32(δ);7.26(ϵ)
Val 2	7.81 (6.9, f)	3.91	1.94	0.78(γ)
Gln 3	8.61 (3.8, f)	4.20	2.14	2.38(γ);7.48,6.86 (ϵ)
Trp 4	7.65 (3.5, f)	4.27	3.25,3.14	7.33(δ);9.90,7.07
Phe 5	7.56 (3.6, ms)	4.16	2.95,2.71	7.15(δ);7.07 (ϵ)
Ser 6	8.17 (3.6, ms)	3.96	4.00	
Lys 7	7.70 (1.9, s)	4.03	1.82	1.35,1.29(γ);1.58(δ);2.88(ϵ);7.35(ζ)
Phe 8	7.92 (3.8, ms)	4.26	3.00,2.94	7.08(δ);7.13(ϵ)
Leu 9	8.20 (4.3, ms)	3.75	1.58,1.54	1.40(γ);0.76(δ)
Gly10	8.02 (1.0, s)	3.74, 3.80		
Arg 11	7.57 (1.6, s)	4.15	1.92	1.66,1.58(γ);3.22,3.14(δ);7.22(ϵ)
Ile 12	7.57 (2.7, s)	3.94	1.73	1.28,0.99,0.75 (γ); 0.62(δ)
Leu 13	8.00 (3.8, ms)	4.25	1.67	1.53(γ);0.84(δ);6.95(HN ϵ)

Tabella 3.3.3b Assegnazione dei chemical shifts ^1H NMR di TL in DPC.

residui	NH ($-\Delta\delta/\Delta T$, etc)	C $^\alpha$ H	C $^\beta$ H	Altri
Phe 1		4.09	3.47,3.20	7.16(δ);7.01(ϵ)
Val 2	9.23 (-1.3, f)	3.55	2.16	1.12,1.00(γ)
Gln 3	8.84 (2.2, f)	4.01	2.12	2.46,2.36(γ);7.68,7.04 (ϵ);
Trp 4	7.97 (7.0, ms)	4.23	3.39,3.19	7.35(δ);10.76,7.15
Phe 5	8.13 (7.7, ms)	3.80	2.53,2.33	7.00(δ);7.15 (ϵ);
Ser 6	8.35(3.4, ms)	3.86	3.90	
Lys 7	7.51 (0.5, s)	3.99	1.82,1.75	1.46,1.34(γ);1.61(δ);2.89(ϵ);7.56(ζ)
Phe 8	7.89 (3.0, ms)	4.08	2.72,2.57	6.98(δ);7.14(ϵ)
Leu 9	8.17 (3.6, ms)	3.62	1.50,1.37	1.21(γ);0.64(δ)
Gly10	7.97 (0.9, s)	3.80,		
Arg 11	7.50 (1.8, s)	4.08	1.85	1.66,1.54(γ);3.18,3.11(δ);7.50(ϵ)
Ile 12	7.50 (2.8, s)	3.85	1.68	1.21,0.96,0.70 (γ); 0.56(δ)
Leu 13	7.85 (3.7, ms)	4.15	1.68	1.49(γ);0.81(δ);6.89(HN ϵ)

Tabella 3.3.3c Assegnazione dei chemical shifts ^1H NMR di TA in SDS

residui	NH ($-\Delta\delta/\Delta T$, etc)	C $^\alpha$ H	C $^\beta$ H	Altri
Phe 1		4.43	3.18,3.14	7.33(δ);7.25(ϵ)
Leu 2	8.10 (9.8, f)	4.48	1.60	1.55(γ);0.91(δ)
Pro 3		4.30	2.30,2.14	2.01(γ); 3.91,3.74(δ)
Leu 4	8.22 (5.4, ms)	4.08	1.86	1.58(γ); 0.94,0.88(δ)
Ile 5	7.50 (-1.4, ms)	3.63	2.01	1.60,1.22,0.88(γ);0.85(δ)
Gly 6	8.27 (3.5, ms)	3.99, 3.71		
Arg 7	7.87 (2.0, s)	4.10	1.98,1.74	1.60(γ);3.20,3.16(δ);7.15(ϵ)
Val 8	8.06 (5.1, ms)	3.77	2.19	1.07,0.94(γ)
Leu 9	8.37 (5.6, ms)	4.08	1.80	1.52(γ);0.82(δ)
Ser10	8.10 (3.8, ms)	4.15	3.96	
Gly 11	7.89 (1.4, s)	3.99, 3.89		
Ile 12	7.76 (3.5, f)	4.05	1.86	1.68,1.22,0.93 (γ); 0.84(δ)
Leu 13	7.99 (4.5, f)	4.24	1.72	1.57(γ);0.88(δ);7.10,6.95(HN ϵ)

Tabella 3.3.3.d Assegnazione dei chemical shifts ^1H NMR di TA in DPC.

residui	NH ($-\Delta\delta/\Delta T$, etc)	C^αH	C^βH	Altri
Phe 1		4.26	3.30,3.19	7.28(δ);7.20(ϵ)
Leu 2	8.90 (12.0, f)	4.33	1.68,1.63	1.54(γ);0.89(δ)
Pro 3		4.32	2.35,2.08	1.98,1.92(γ); 3.78,3.70(δ)
Leu 4	8.27 (5.1, ms)	4.09	1.81	1.62(γ);0.94,0.90(δ)
Ile 5	7.88 (1.2, ms)	3.68	1.97	1.52,1.18,0.93(γ)
Gly 6	8.38 (3.5, ms)	3.95, 3.68		
Arg 7	7.95 (2.1, s)	4.11	1.97,1.76	1.63(γ);3.19(δ);7.48(ϵ)
Val 8	8.09 (5.0, ms)	3.75	2.20	1.07,0.94(γ)
Leu 9	8.36 (5.4, ms)	4.08	1.84	1.52(γ);0.94,0.84(δ)
Ser10	8.21 (4.0, ms)	4.10	3.96	
Gly 11	7.94 (1.5, s)	3.97, 3.84		
Ile 12	7.73 (3.5, f)	4.01	1.89	1.74,1.22,0.93 (γ); 0.84(δ)
Leu 13	7.91 (4.5, f)	4.20	1.76	1.57(γ);0.87(δ);7.13(HN ϵ)

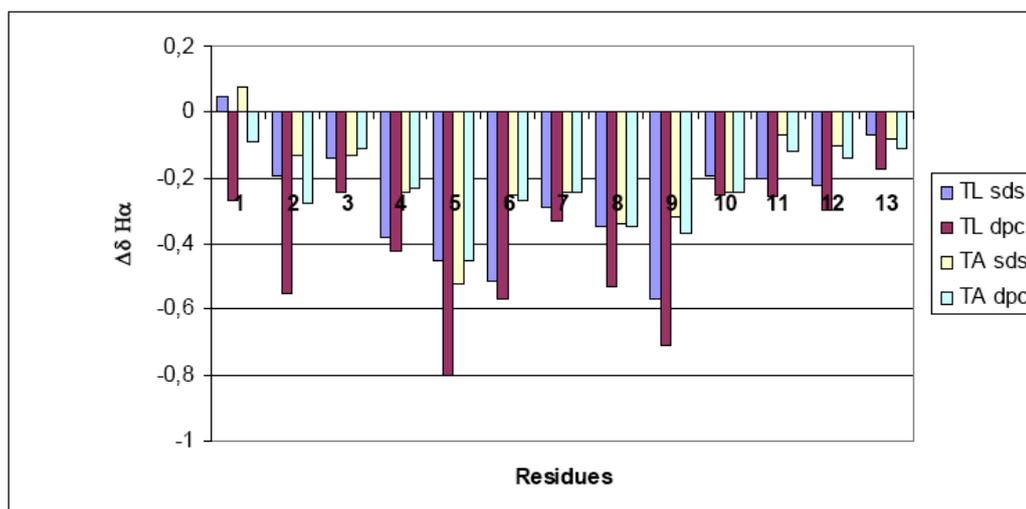


Figura 3.3.3.: Confronto delle deviazioni dei chemical shift dei protoni H_{α} dai valori random coil

3.3.4 TL in soluzione SDS

I Parametri diagnostici NMR osservati per TL in soluzione di SDS sono: chemical shifts degli H_{α} (Figura 3.3.3.), contatti NOE (Figura 3.3.4A), velocità di scambio degli NH e coefficienti di temperatura. Tutti indicano una propensione conformazionale verso la struttura ad elica. In particolare, le prove della formazione di un' α -elica sono fornite dall'analisi delle risonanze degli H_{α} che dipendono fortemente dalla struttura secondaria locale[64a) e b)] Gli *shifts* a campi alti per H_{α} rispetto ai valori di *random*

coil sono generalmente trovati per residui implicati in un' α -elica o in un turn e in *shifts* a campi bassi per residui implicati nella formazione di un β -*sheets*. Come mostrato in figura 3.3.4A, si osservano spostamenti a campi alti dei segnali NMR H_{α} , dal residuo 2 al residuo 13, se paragonati ai segnali osservati per gli stessi aminoacidi a valori di *random coil*. Inoltre, il continuo *stretch* dei contatti NOE del tipo $d_{\alpha N}(i, i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ e $d_{NN}(i, i+2)$ possono essere osservati lungo i residui 3-12 (Figura 3.3.4A a). Coerentemente con i risultati CD, tutti questi dati indicano la presenza di un α -elica lungo l'intera sequenza del peptide. L'analisi delle velocità di scambio e dei coefficienti di temperatura per le risonanze degli NH indicano che tale conformazione ad elica è in equilibrio con conformazioni più disordinate, perché solo le risonanze degli NH dei residui 7, 10 e 11 mostrano coefficienti di temperatura ($-\Delta\delta/\Delta T < 3.0$ ppb/K) e velocità di scambio compatibili con una struttura ad elica stabile.

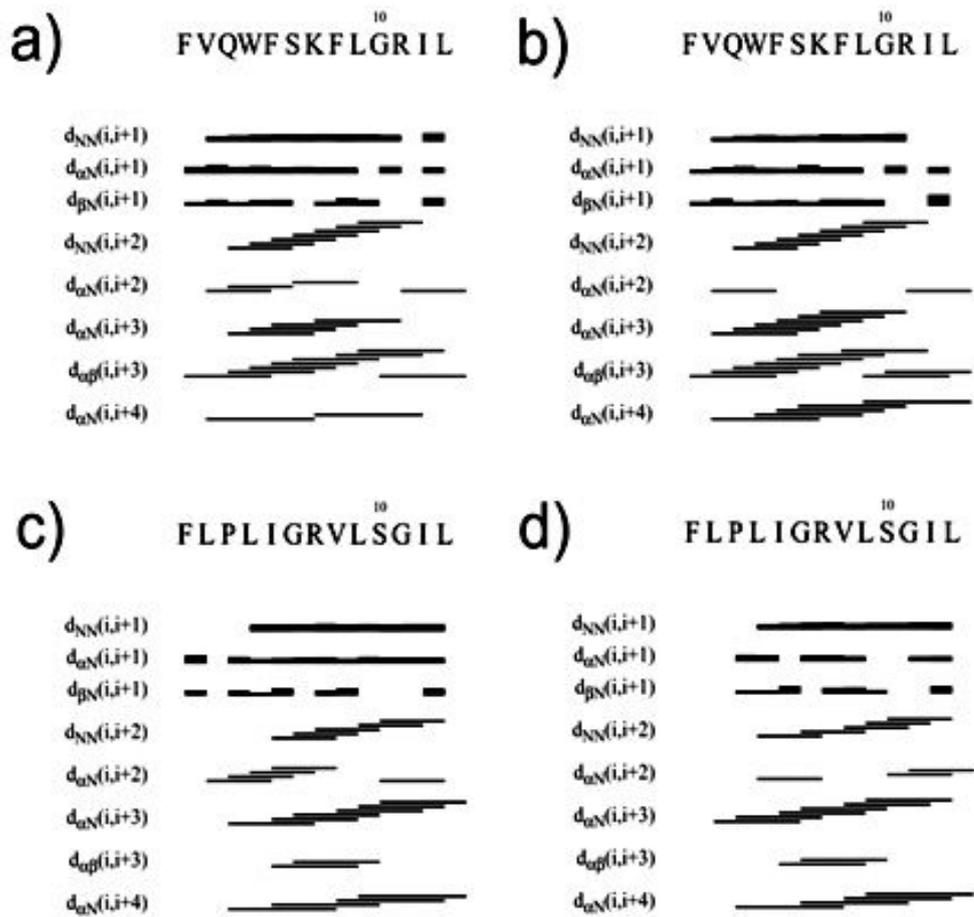


Figura 3.3.4.A: Diagramma a barre di TL in SDS (a), TL in DPC (b), TA in SDS (c) e TA in DPC (d).

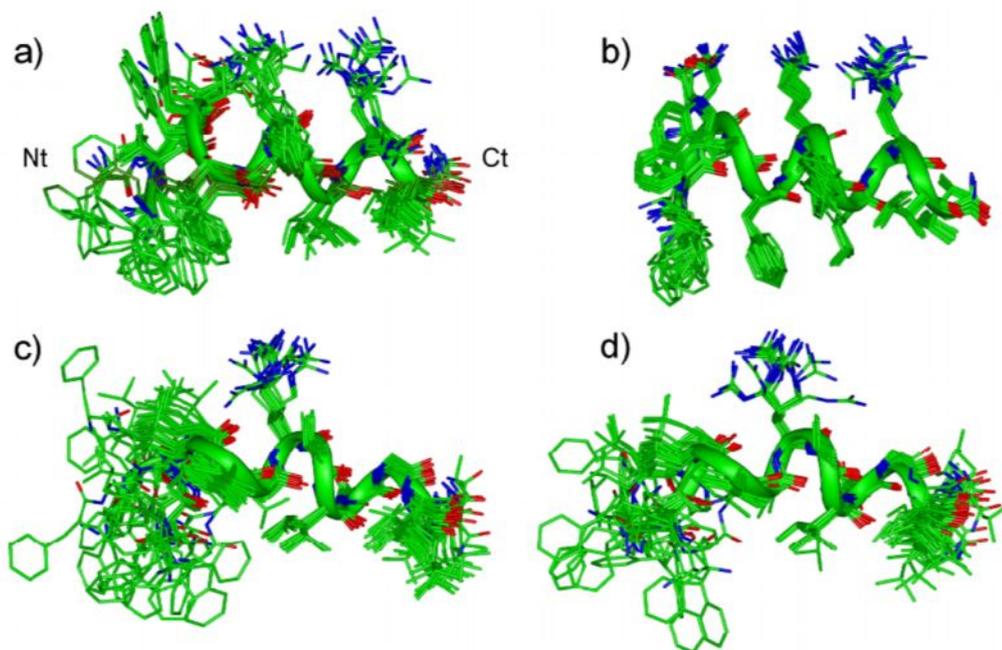


Figura 3.3.4.B Sovrapposizione dei 20 conformeri a più bassa energia di TL in SDS (a), TL in DPC (b), TA in SDS (c) e TA in DPC (d). La sovrapposizione è stata effettuata sugli atomi del backbone dei residui 3-11. Gli atomi sono mostrati con diversi colori (Carbonio verde, Azoto blu, Ossigeno rosso) per chiarezza non sono mostrati gli atomi di Idrogeno. Gli atomi del backbone del conformero a minore energia sono evidenziati come ribbon. Nt: N-terminale, Ct: C-terminale.

Le *constraints* derivanti dall’NMR, ottenute per la TL in SDS sono state usate come dati di input per un calcolo di strutture mediante simulated annealing come realizzato dal protocollo standard del programma DYANA [68]

Le *constraints* derivate dai NOE sono state trasformate in distanze interprotoniche e usate come distanze massime in successive procedure di *annealing* per produrre 200 conformeri da cui sono state scelte 100 strutture le cui distanze interprotoniche concordavano meglio con le distanze ottenute dai dati NOE. Le strutture scelte sono state meglio rifinite attraverso successivi passaggi di calcoli EM (minimizzazione energetica) *restrained e unrestrained* usando il programma Discover (Biosym, San Diego). Un insieme di 50 strutture che soddisfacessero le *constraints* derivanti dall’NMR (violazioni più piccole di 0.50 Å) sono state, poi, scelte per ulteriori analisi. Come riportato in Figura 3.3.4.B-a, TL mostra una struttura ad α -elica che comprende i residui 3-11 (RMSD=0.5 Å sugli atomi del backbone di questi residui). L’orientazione delle catene laterali è ben definita (RMSD=1.0 Å sugli atomi del *backbone* di questi residui 4-11). Le regioni N- e C-terminali sono meno definite per la coesistenza di strutture ripiegate ed estese.

3.3.5 TL in soluzione DPC

La Temporina L in soluzione di DPC mostra spettri caratteristici simili a quelli trovati in soluzione di SDS. Le differenze tra i dati NMR nei due ambienti indicano una più alta stabilità conformazionale della TL in micelle di DPC. In particolare, è stato riscontrato: un numero più alto di connessioni NOE medium *range* (Figura 3.3.4A-b), dei tempi di scambio degli NH più lunghi, dei coefficienti di temperatura più alti per quasi tutti i residui; tali aspetti indicano che questi NH sono impiegati in legami a idrogeno più forti, stabilizzando la struttura ad elica. Inoltre, i valori di *chemical shift* H_{α} sono significativamente spostati a campi alti in soluzione di DPC se confrontati con quelli in soluzione di SDS. Gli *shifts* principali sono stati osservati per i residui 1, 2 e 5 che indicano che la struttura ad elica è estesa fino ai residui N-terminali nelle soluzioni di DPC. Altre caratteristiche spettrali che indicano una struttura stabile nella porzione N-terminale in soluzioni di DPC sono:

δ un intenso *shift* a campi bassi osservato per l'NH della Val² (da 7.81 ppm in SDS a 9.23 ppm in DPC) e

δ gli H_{β} della Phe¹ in SDS risultano degeneri (3.25 ppm) mentre in DPC risuonano a due valori di *chemical shift* differenti (3.20 e 3.47 ppm).

Le *constraints* derivanti dall’NMR, ottenute per la TL in DPC sono state usate come dati di input per un calcolo di strutture mediante *simulated annealing* come descritto in precedenza. Per ogni peptide, sono state scelte 50 strutture tra quelle calcolate che meglio soddisfacessero le *constraints* derivanti dall’NMR (violazioni più piccole di 0.35 Å). Come mostrato in figura 3.3.4B-b, la TL mostra una struttura ad α -elica che comprende tutti i residui (RMSD=0.3 Å sugli atomi del *backbone*), con qualche variazione solo a ridosso della zona C-terminale. Anche l’orientazione delle catene laterali risulta ben definita (RMSD=0.7 Å per tutti gli atomi).

3.3.6 TA in soluzione di SDS

I parametri diagnostici NMR osservati per la TA in soluzione di SDS indicano una propensione conformazionale verso una struttura ad elica. Come mostrato in figura 3.3.3, si osservano spostamenti a campi alti dei segnali NMR H_{α} , dal residuo 2 al residuo 13, se paragonati ai segnali osservati per gli stessi aminoacidi a valori di *random coil*.

Tuttavia, l’analisi delle velocità di scambio e dei coefficienti di temperatura delle risonanze degli NH indicano che le strutture ripiegate sono in equilibrio con conformazioni più disordinate perché solo le risonanze degli NH dei residui 7 e 11 mostrano coefficienti di temperatura ($-\Delta\delta/\Delta T < 3.0$

ppb/K) e velocità di scambio compatibili con una struttura ad elica stabile. Inoltre, la presenza simultanea di accoppiamenti dipolari di tipo $d_{\alpha N}(i, i+2)$, insieme a qualche debole $d_{\alpha N}(i, i+3)$ e $d_{\alpha N}(i, i+4)$ (Figura 3.3.4A-c) indicano la presenza di β -turn in equilibrio con una struttura ad α -elica, soprattutto lungo la regione N-terminale del peptide. Il calcolo di strutture fornisce un insieme di 50 strutture che soddisfano le constraints derivanti dall’NMR (violazioni più piccole di 0.60 Å). Tutte le strutture della TA mostrano un’ α -elica che comprende i residui centrali 6-9 (Figura 3.3.4B(c)). Pochi conformeri (7/50) evidenziano un’ α -elica lungo quasi tutta la sequenza (residui 3-12), mentre alcuni (11/50) presentano una struttura 3_{10} -elica lungo i residui 10-12. Molte strutture (38/50) mostrano i residui N-terminali in conformazione turn. Possono essere osservati β -turn sui residui Pro³-Leu⁴ e γ -turn sulla Pro³.

3.3.7 TA in soluzione di DPC

La Temporina A in una soluzione di DPC mostra caratteristiche spettrali simili a quelle trovate in soluzione di SDS, con contatti NOE (Figura 3.3.4.A-d), velocità di scambio degli NH, coefficienti di temperatura degli NH e risonanze protoniche simili. Le più grandi differenze, tra i dati NMR nei due ambienti, sono state osservate nella regione N-terminale del

peptide. In particolare, i valori di chemical shift degli H_α (Figura 3.3.3.) per i residui Phe¹ e Leu² sono significativamente spostate a campi alti in soluzione di DPC confrontati con quelli in soluzione di SDS. Inoltre, *shifts* significativi sono stati osservati per le risonanze degli NH della Leu² e Ile⁵ (da 8.10 ppm in SDS a 8.84 ppm in DPC, per la Leu²; da 7.50 ppm in SDS a 7.87 ppm in DPC, per l'Ile⁵). Il calcolo di strutture ha fornito un insieme di 50 strutture che soddisfacessero le constraints derivanti dall'NMR (violazioni più piccole di 0.50 Å). Circa la metà delle strutture (24/50) si trovano in conformazione ad α -elica lungo i residui 3-12, l'altra metà di esse, mostra una struttura β e γ -turn intorno ai residui N-terminali osservati in SDS (Figura 3.3.4B-d).

3.4 DISPOSIZIONE RELATIVA ALLE MICELLE

Il posizionamento dei peptidi TA e TL, relativo alla superficie e all'interno delle micelle di SDS e DPC, è stato studiato usando sonde paramagnetiche: l'acido 16-doxilstearioico e Mn^{2+} .

A tal proposito c'è da considerare che gli elettroni spaiati provocano una drammatica accelerazione del rilassamento longitudinale e trasversale dei protoni nelle loro vicinanze. Quindi, queste sonde paramagnetiche causano l'allargamento dei segnali NMR e la riduzione di intensità delle risonanze

dei residui all'esterno della micella (Mn^{2+}), o profondamente immersi nelle micelle (16-doxile) [69 a) e b)] Gli spettri TOCSY di TA e TL (nelle soluzioni di SDS e DPC) sono stati registrati in presenza ed in assenza di *spin labels*, lasciando costanti tutte con tutte le altre condizioni.

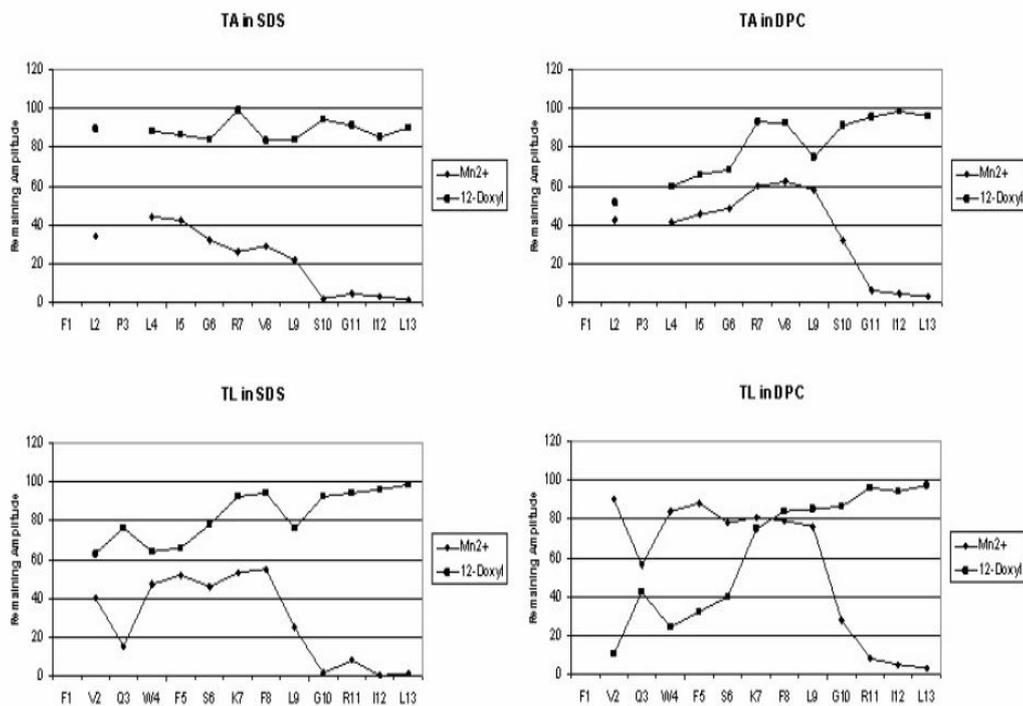


Figura 3.4: Intensità residua dei picchi TOCSY HN-H α di TA in SDS, TA in DPC, TL in SDS e TL in DPC.

Considerando TA in una soluzione di SDS, si nota come l'intensità di tutti i segnali sia rimasta costante in seguito all'aggiunta di acido 16-doxilsteario. Tale risultato dimostra che nessun residuo di TA si addentra nel core idrofobico delle micelle di SDS. In presenza di Mn^{2+} , i volumi di tutti gli NH/H α risultano allargati e diminuiti in intensità, i residui C-terminali sono i più influenzati con una scomparsa completa dei segnali

NH/H_α. I risultati degli spin label forniscono una prova rilevante sul fatto che la TA sia localizzata all'interfaccia micella SDS-acqua.

Per quanto riguarda TA in soluzione di DPC, l'intensità dei segnali dei residui 2, 4 e 6 mostra una riduzione significativa (circa 30-40%) dopo l'aggiunta di acido 16-doxilsteario. Infatti, successivamente all'introduzione di Mn²⁺ è stata osservata una diminuzione generalizzata dell'intensità dei segnali (maggiore del 40%), principalmente sui residui C-terminali 11-13 (addirittura superiore al 90%). Questi dati possono essere spiegati ammettendo che il peptide sia in equilibrio tra una forma legata sulla superficie, e in un altro stato in cui l'N-terminale sia inserito nel core idrofobico della micella.

Considerando TL in soluzioni di SDS, l'intensità dei segnali dei residui 2, 4 e 5 mostra una riduzione (circa il 30-40%) dopo l'aggiunta di acido 16-doxilsteario.

In seguito all'aggiunta di Mn²⁺, è stata osservata una diminuzione dell'intensità dei segnali per tutti i residui, principalmente, per il residuo 3, e per i residui 10-13 nella regione C-terminale.

Pertanto, alla luce di tali dati risulta che TL è localizzata preferenzialmente all'interfaccia liquido-acqua delle micelle di SDS. Inoltre, la riduzione dei segnali dei residui N-terminali dopo addizione di acido 16-doxilsteario indica che la zona N-terminale del peptide può occasionalmente muoversi all'interno del core delle micelle.

TL in soluzione di DPC mostra una diminuzione dell'intensità superiore al 50% per i residui N-terminali in seguito ad aggiunta di acido 16-doxilsteirico, e una simile riduzione per i residui C-terminali dopo addizione di Mn^{2+} (Figura 3.4). I dati indicano chiaramente che l'elica della TL è disposta perpendicolarmente alla superficie delle micelle con la regione N-terminale inserita nel core idrofobico e la regione C-terminale al lato esterno, immersa nel compartimento acquoso.

3.5 RISULTATI

Le analisi CD ed NMR rivelano che TA e TL assumono una conformazione random coil in soluzioni acquose e preferiscono una conformazione ad elica in ambienti mimetici delle membrane. In entrambe le soluzioni di SDS e DPC, i due peptidi analizzati mostrano strutture che possono essere descritte come α -eliche anfipatiche almeno quando consideriamo i residui centrali 6-9 (Figura 3.3.4B). Questo risultato è in accordo con i precedenti studi NMR effettuati su TA, usando una soluzione di TFE (trifluoroetanolo) che mima gli ambienti idrofobici [38]. La propensione di TA [38] [36] [60-61] e TL[60-62] a disporsi ad elica era stata anche valutata dall'analisi spettroscopica CD in soluzione di TFE. L'analisi CD di TA in soluzioni di SDS [61], e di TL in presenza di piccole vescicole unilamellari composte da

SOPC (1-stearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) e POPG (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerolo) [62] inoltre ha dato risultati simili.

Inoltre, la percentuale di elica di TL aumenta significativamente passando da micelle di SDS a DPC. La stabilizzazione dell'elica è evidente sull'intera sequenza peptidica ma lo è particolarmente nella zona N-terminale del peptide.

In effetti, i residui Phe¹ e Val² passano da uno stato disordinato ad una conformazione ad elica. In accordo con i presenti risultati, Rinaldi e co. hanno riscontrato che l'abilità di permeare la membrana da parte di TL è maggiore in liposomi composti da fosfolipidi zwitterionici e che un incremento del contenuto di POPG influenza negativamente questa attività[35].

Il comportamento conformazionale di TA osservato in soluzioni di SDS e DPC è stato simile. Leggere differenze sono localizzate nella regione N-terminale del peptide. Le strutture β e γ -turn sono state osservate in micelle di SDS mentre un contenuto aumentato di struttura ad elica può essere descritto in DPC.

Anche se risulta ostico effettuare una diretta comparazione della stabilità conformazionale tra TA e TL, complessivamente i dati spettroscopici indicano che la propensione a formare una struttura ad α -elica è la seguente: TL in soluzione di DPC > TL in soluzione di SDS \geq TA in soluzione di DPC > TA in soluzione di SDS. In linea con i suddetti risultati, D'Abramo

e co. hanno dimostrato la più alta stabilità della conformazione ad α -elica nella TL confrontata con la TA [60]

Attraverso un'analisi di dinamica molecolare di 290 ns, essi hanno concluso che TA e TL (in acqua a 300 K) non mostrano alcuna conformazione ad α -elica, anche se TL presenta una propensione maggiore a formare un α -elica stabile in acqua rispetto a TA. Gli autori, inoltre, hanno definito un gruppo centrale di residui che innescano il ripiegamento sia di TA che di TL: i residui da 7 a 10. Questa regione coincide approssimativamente con la regione ad α -elica più stabile ottenuta dalla analisi NMR (residui 6-9) effettuata in questo lavoro di ricerca.

La posizione delle temporine rispetto alle micelle dipende dalla sequenza peptidica e dalla natura delle teste polari delle micelle stesse. L'analisi effettuata anche tramite sonde paramagnetiche (Figura 3.4) evidenzia che la TA, nell'interagire con le micelle di SDS caricate negativamente, si localizza all'interfaccia lipide-acqua, parallela alla membrana. Al contrario, TL, quando si lega a micelle zwitterioniche di DPC, assume una disposizione perpendicolare alla membrana, con la regione N-terminale situata in prossimità del centro della micella. La situazione è meno definita quando si considera la localizzazione di TA in micelle di DPC e TL in micelle di SDS. In questi casi, i peptidi sono localizzati preferenzialmente all'interfaccia lipide-acqua delle micelle, ma essi possono occasionalmente muoversi all'interno del core delle micelle; può esistere un equilibrio delle

varie orientazioni (all'interno o sulla superficie). La capacità delle temporine analizzate di penetrare le micelle può essere ordinata come segue: TL in soluzione di DPC > TA in soluzione di DPC > TL in soluzione di SDS > TA in soluzione di SDS.

I presenti risultati, circa la localizzazione della TL nelle micelle zwitterioniche, concordano con quelli riscontrati da Zhao e co [70] [62.]

Alla luce di tali dati, è stato possibile far chiarezza sulla modalità d'interazione delle temporine con le membrane. E' quindi possibile riassumere tutti i risultati proponendo un diverso meccanismo d'azione per spiegare l'attività antimicrobica ed emolitica di TA e TL. Nello specifico, TA interagisce con le micelle di SDS, che mimano le membrane dei batteri, ripiegandosi in una conformazione ad α -elica intorno ai suoi residui centrali (6-9), adottando conformazioni turn nella regione N-terminale e una conformazione più flessibile nella regione C-terminale. Inoltre, il peptide è posizionato parallelamente all'interfaccia membrana-acqua. Un comportamento simile è stato trovato per la TL in micelle di SDS, con due sole differenze: a) l'N-terminale della TL ha una maggiore propensione a formare strutture ad elica; b) la TL presenta una certa tendenza ad entrare nel core della micella. I risultati sulle interazioni temporine/micelle di SDS indicherebbero un meccanismo "*carpet*" per spiegare la disgregazione della membrana dei batteri. Secondo il "*modello carpet*", i peptidi si legano alle superficie della membrana fosfolipidica fino a raggiungere una

concentrazione soglia oltre la quale solubilizzano la membrana in maniera analoga ad un detergente (micellizzazione).

3.5.1 “*Dynamic Peptide-Lipid Supramolecular Pore*”

Siccome non è stato osservato un simile effetto detergente, nel caso delle temporine [37] per descrivere la loro attività antimicrobica è stato proposto il modello “*dynamic peptide-lipid supramolecular pore*”. Secondo questo modello [71], gli AMPs si legano sullo strato esterno della membrana e penetrano all’interno, trasportando con loro le teste polari dei lipidi. Quando un’alta concentrazione locale di peptide è raggiunta, si formano pori acquosi transienti di varie misure. In base al presente studio, si suppone che i due modelli (*carpet* e *dynamic peptide-lipid supramolecular pore*) non siano in conflitto tra di loro poiché i peptidi possono formare prima pori transienti quando il rapporto peptide:lipide è al di sotto di una certa soglia. Al di sopra di tale soglia si ha micellizzazione della membrana (*carpet*).

Al contrario, TL (con elevata attività emolitica) interagisce con le micelle di DPC, che mimano le membrane dei mammiferi, ripiegandosi in una conformazione ad α -elica lungo l’intera sequenza peptidica. La TL si dispone perpendicolarmente alla superficie delle micelle di DPC, con l’N-terminale posizionato nel core idrofobico. L’attività emolitica di TL può

essere spiegata grazie al modello “*barrel stave*” [72]. In questo modello, i peptidi formano dei pori trans membrana disponendosi come “doghe di un barile”: il numero di peptidi formanti il canale determinerà la dimensione dello stesso; la stabilità del barile determinerà la vita del poro. Dal momento che i canali peptidici richiedono una lunghezza minima di ~23 residui per attraversare la membrana, sarebbe interessante poter determinare l’architettura del poro delle temporine in teoria, tali molecole sono troppo corte. Questi peptidi, tuttavia, potrebbero formare dei pori in una maniera più elaborata, si ipotizza attraverso strutture dimeriche [30] [38]. La bassa attività litica di TA nei confronti degli eritrociti umani [30] può essere spiegata considerando la sua parziale capacità di inserirsi all’interno delle micelle di DPC.

È ben noto che le interazioni idrofobiche giocano un ruolo fondante nell’attività degli AMPs con i bilayer formati da fosfolipidi zwitterionici . Siccome la TA ha una maggiore idrofobicità (H) e maggiore momento idrofobico (μ) rispetto alla TL (H=0.2246 vs 0.06461, μ =0.360 vs 0.312) [37] [70], essa dovrebbe permeare meglio le membrane zwitterioniche, contrariamente ai risultati sperimentali. Tuttavia gli studi condotti con il presente lavoro di ricerca fanno presupporre che questa apparente contraddizione possa essere spiegata considerando la leggera differenza conformazionale dei due peptidi. La differenza principale tra la struttura secondaria della TA e TL è la presenza di conformazioni turn nella regione

N-terminale della TA invece che di una α -elica presente nella TL. La perdita di una conformazione ad elica regolare può spiegare la ridotta capacità della TA a penetrare le micelle di DPC. [80]

3.6 MATERIALE PER GLI STUDI SPETTROSCOPICI

L'H₂O al 99% è stato ottenuta da Aldrich (Milwaukee, USA), l'SDS-d₂₅ ed il DPC-d₃₈ al 98% sono stati ottenuti da Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA), l'acido [(2,2,3,3-tetradeterio-3-(trimetilsilano)] propionico (TPS) da MSD Isotopes (Montreal, Canada). L'acido 16-doxilstearico è stato ottenuto da Sigma, ed il MnCl₂ da Merck (Darmstadt, Germania).

3.6.1 Metodica per gli studi di dicroismo circolare

Tutti gli spettri CD sono stati registrati usando uno spettropolarimetro JASCO J710 a 25°C, con una cella di 1mm in lunghezza. Le misurazioni CD sono state eseguite nel range da 260 a 190 nm, con una lunghezza di banda di 1 nm, 4 accumulazioni e 100 nm/min di velocità di scansione. Gli

spettri CD della TA e TL, a concentrazione di 0.1 mM, sono stati eseguiti in acqua (pH 7.4), in soluzioni micellari di SDS (20 mM) e DPC (20 mM).

3.6.2 Materiali e metodi spettroscopia NMR

Spettroscopia NMR. I campioni per la spettroscopia NMR sono stati preparati dissolvendo un'appropriata quantità del peptide in 0.55 ml di $1\text{H}_2\text{O}$ (pH 4.5), 0.05 mL di $2\text{H}_2\text{O}$ per ottenere una concentrazione 1-2 mM di peptide e 200 mM di SDS- d_{25} o DPC- d_{38} . Gli studi sulla velocità di scambio degli NH sono stati condotti dissolvendo il peptide in 0.60 ml di $2\text{H}_2\text{O}$ e 200 mM di SDS- d_{25} o DPC- d_{38} . Gli spettri NMR sono stati registrati con uno spettrometro Varian Inova 700 MHz. Tutti gli spettri sono stati registrati a temperatura di 298.1K. e sono calibrati rispetto a TPS (0.00 ppm) come standard interno. Quelli monodimensionali sono stati acquisiti con una trasformata di Fourier con la quadrature detection. Gli spettri bidimensionali DQF-COSY [77], TOCSY [78], e NOESY [79] sono stati registrati in fase sensitive mode usando il metodo di States . Sono stati acquisiti 2048 punti in t_2 e 512 in t_1 . Gli esperimenti TOCSY sono stati condotti impiegando un mixing time di 70 ms. Gli esperimenti NOESY sono stati condotti impiegando un mixing time compreso in un range di 150-300 ms. Il segnale dell'acqua è stato soppresso con un gradiente echo.

Gli spettri bidimensionali NMR sono stati processati usando il pacchetto software NMRPipe . Prima della trasformata di Fourier, il fid è stato moltiplicato per una funzione sen^2 in entrambe le dimensioni, ed è stato usato lo zero filling sia in F1 che F2. Le analisi qualitative e quantitative degli spettri DQF-COSY, TOCSY e NOESY sono state ottenute usando il pacchetto software XEASY [79]. I coefficienti di temperatura dei chemical shift dei protoni ammidici sono stati calcolati mediante esperimenti 1D ^1H NMR e 2D TOCSY eseguiti a temperature differenti in un range che va da 298 a 320K mediante regressione lineare.

CAPITOLO IV:
2^a FASE DELLA RICERCA:
PROGETTAZIONE E SINTESI DEI NUOVI ANALOGHI

4.1 I NUOVI ANALOGHI DELLE TEMPORINE

Sulla base della prima fase di attuazione del progetto e sui risultati ottenuti dagli studi strutturali e conformazionali, mediante le tecniche di NMR e di CD, nonché delle strutture tridimensionali fatte, è stata articolata la seconda fase del lavoro di ricerca incentrata sulla progettazione, sintesi e caratterizzazione di nuovi analoghi delle temporine A ed L partendo dai rispettivi template. L'obiettivo prefissato, in questa seconda fase è quello di migliorare il profilo farmacologico di tali peptidi sia in termini di attività, sia in termini di percentuale di emolisi.

4.2 SERIE DI ANALOGHI DELLA TEMPORINA L

Partendo dal template della temporina L sono stati sintetizzati svariati analoghi. Tali composti sono stati progettati sulla base di sostituzioni puntiformi dei residui amminoacidici costituenti la sequenza di TL. Nello specifico i derivati sono stati progettati a livelli diversificati di studio. Più dettagliatamente la fase progettuale dei peptidi è stata articolata su:

- studio della conformazione di TL,
- studio della carica positiva
- studio dei residui idrofobici
- studio e confronto dei due template TL e TA.
- studio della strutturazione ad α -elica.

Per ognuno di essi sono stati sintetizzati dei peptidi.

Inoltre, per meglio chiarire gli aspetti legati all'attività della temporina L, anche alla luce dei risultati farmacologici, è stato effettuato un vero e proprio connubio tra questi stessi livelli di studio nella progettazione successiva degli analoghi qui di seguito descritti.

4.2.1 Studio della conformazione di TL

Al fine di studiare l'importanza della conformazione della temporina L nell'esplicare la sua attività antimicrobica ed emolitica, si è ritenuto opportuno progettare e sintetizzare un D-isomero e un retroinverso di TL. Nello specifico, il primo la cui sequenza è riportata in tabella 4.2.1 presenta l'intera del template, inalterata nel numero e nella sequenza dei residui, la sola differenza è costituita dal fatto che si tratti di amminoacidi tutti della serie D.

Nel retroinverso, invece, la sequenza del template non è alterata nel numero ma risulta invertita. Infatti, sono stati invertiti rispettivamente le regioni N-terminale e C-terminale, non solo, ma gli amminoacidi costituenti il peptide retroinverso di TL sono tutti della serie D.

Tabella 4.2.1: sequenze di TL riferimento, D-isomero, Retrpinverso.

PEPTIDE	SEQUENZA
TL riferimento	H-FVQWFSKFLGRIL-NH ₂
D-isomero	H-Dphe-Dval-Dgln-Dtrp-Dphe-Dser-Dlys-Dphe-Dleu-gly-Darg-Dile-Dleu-NH ₂
Retroinverso	H-Dleu-Dile-Darg-gly-Dleu-Dphe-Dlys-Dser-Dphe-Dtrp-Dgln-Dval-Dphe-NH ₂

4.2.2. Studio della carica positiva nella regione C-terminale della sequenza di TL

Per i composti di questa serie è stata effettuata una modifica puntiforme in cui il residuo dell'Arg in posizione 11 del template è stato sostituito da un residuo recante una funzione amminica in catena laterale, ottenendo così due nuovi analoghi.

E' stato infatti ottenuto il peptide definito TL-1 recante in 11 un residuo comunque basico, ma amminico e non guanidinico, la Lys e il peptide TL-2 avente, invece sempre nella medesima posizione, al posto dell'Arg di TL un residuo amminoacidico di Orn, omologo inferiore della Lys. In tabella 4.2.2. sono state riportate le sequenze degli analoghi con quella di riferimento del template TL.

Tabella 4.2.2: in viola è evidenziato il residuo di Arg in 11 di TL sostituito nei due analoghi. In rosso sono evidenziati i residui sostituiti.

PEPTIDE	SEQUENZA
TL riferimento	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-1	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ K ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-2	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ O ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂

4.2.3 Studio della carica positiva sull'intera sequenza peptidica di TL

Si è voluta studiare in modo più approfondito l'introduzione del gruppo guanidinico della catena laterale dell'Arg sull'intera sequenza della temporina L.

Nello specifico sono stati sintetizzati due analoghi aventi sostituzioni singole e un terzo composto in funzione della combinazione dei due precedenti.

L'analogo, definito TL-3, presenta la sostituzione della Lys in posizione 7 con un residuo di Arg (sostituzione di un gruppo amminico con un gruppo guanidinico). Discorso analogo è stato fatto per il derivato TL-4 in cui in posizione 7 viene mantenuta la Lys, come nel template, ma viene sostituita la Gln in 3, sempre con un residuo di Arg (sostituzione di un gruppo ammidico in catena laterale con un gruppo guanidinico). Infine, dalla combinazione dei peptidi di sintesi TL-3 e TL-4 è stato ottenuto il derivato TL-5 che presenta entrambe le sostituzioni in 3 e in 7 con un residuo di Arg. Particolarmente interessante quest'ultimo in quanto ha: Arg³ Arg⁷ e l'Arg conservata del template in 11. Pertanto vi è la presenza di un gruppo guanidinico ad una determinata distanza dall'altro all'interno dell'intera sequenza peptidica. Le sequenze di tali derivati sono mostrate in tabella

4.2.3

Tabella 4.2.3: sequenze degli analoghi. In viola sono evidenziati i residui del template che sono stati sostituiti. In rosso sono evidenziati i residui amminoacidici sostituiti nei derivati sintetici.

PEPTIDE	SEQUENZA
TL riferimento	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-3	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ R ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-4	H-F ¹ V ² R ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-5	H-F ¹ V ² R ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ R ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂

4.2.4 Studio dei residui idrofobici di TL

Gli analoghi appartenenti a questa serie sono stati sintetizzati sulla base delle sostituzioni di tutti i residui idrofobici presenti nel template TL con un residuo di Leu dando luogo ad un motivo ripetuto di leu, suffragato anche dalla sequenza consensus delle temporine.

E' stato sintetizzato il peptide TL-6, in cui i residui: Phe¹, la Val², Phe⁵, Phe⁸ Ile¹² del template, sono stati sostituiti dalla Leu.

Sulla stessa base progettuale è stato sintetizzato il composto TL-7 nella cui sequenza permangono le sostituzioni dei residui idrofobici con le leu, in aggiunta in posizione 12 è stato introdotto un Trp, residuo comunque idrofobico, recante in catena laterale un anello indolico. Si introduce così

un residuo ingombrato che potrebbe indurre una conformazione strutturale diversa dando eventualmente luogo a delle interazioni pi-stacking.

Tabella 4.2.4: in viola sono evidenziati i residui del template sostituiti; in rosso le sostituzioni degli analoghi

PEPTIDE	SEQUENZA
TL riferimento	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-6	H-L ¹ L ² Q ³ W ⁴ L ⁵ S ⁶ K ⁷ L ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ L ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-7	H-L ¹ L ² Q ³ W ⁴ L ⁵ S ⁶ K ⁷ L ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ W ¹² L ¹³ -NH ₂

4.2.5 Confronto e studio della regione N-terminale di TL e TA.

I composti di questa serie sono stati progettati sul confronto delle sequenze di entrambi i template: TA e TL e, nello specifico, è stata oggetto di studio la regione N-terminale dei peptidi.

Il derivato sintetico TL-8, infatti, in posizione 3 al posto del residuo di Gln, presente nel template TL, ha una Pro, presente nella medesima posizione nel template di TA.

La Pro è un residuo particolarmente importante, in quanto essendo un imminoacido, inoltre ciclico, rompe il motivo ad α -elica della temporina, inducendo un turn assente in TL e presente in TA. Si è quindi voluto porre particolare attenzione su questa sostituzione, infatti sullo stesso template del derivato TL-8 è stato progettato e sintetizzato l'analogo TL-9 in cui è stata mantenuta la sostituzione in posizione 3 ed è stata aggiunta, sempre sulla base del confronto con TA, la sostituzione della Val in 2 con la Leu. In tal modo, si è ottenuto un peptide avente nella regione N-terminale la medesima sequenza della stessa regione di TA (F¹-L²-P³), e la restante parte costituita dai residui del template di TL. In tabella 4.2.5 sono riportate le sequenze degli analoghi e quelle relative ai due template confrontati.

Tabella 4.2.5: sequenze dei template TA e TL e degli analoghi sintetizzati. In viola sono evidenziati gli amminoacidi sostituiti nei due template; in rosso le sostituzioni nei derivati di sintesi.

PEPTIDE	SEQUENZA
TL riferimento	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-8	H-F ¹ V ² P ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-9	H-F ¹ L ² P ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TA riferimento	H-F ¹ L ² P ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ G ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂

4.2.6 Interruzione della struttura ad α -elica in posizione N-terminale e C-terminale di TL

Sulla base del precedente studio relativo al confronto inerente la regione N-terminale dei due template di riferimento, TA e TL, è stato sintetizzato il peptide TL-8. Essendo quest'ultimo particolarmente interessante per la presenza di un turn introdotto dal residuo di Pro, in posizione 3, quindi a ridosso della regione N-terminale, si è voluto interrompere l' α -elica anche nella regione C-terminale. Tale sostituzione è stata fatta a ridosso della Gly in posizione 10.

E' stato allora introdotto un secondo turn nella sequenza, grazie alla sostituzione di un amminoacido, molto flessibile, la Gly, per l'appunto, con un secondo residuo di Pro, strutturalmente costretto, quindi molto più rigido, che lasciasse comunque inalterata la carica netta complessiva dell'intera sequenza. E' stato ottenuto il peptide TL-10. Per chiarezza in tabella 4.2.6 sono state riportate le sequenze sia di TL che resta il riferimento fondante e la sequenza di TL-8.

Tabella 4.2.6: sequenza di TL e sequenze degli analoghi sintetici. In viola sono evidenziati gli amminoacidi che sono stati sostituiti nel template, in rosso i residui sostituiti nei derivati.

PEPTIDE	SEQUENZA
TL riferimento	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-8	H-F ¹ V ² P ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-10	H-F ¹ V ² P ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ P ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂

4.2.7 Studio sull'interruzione dell' α -elica in posizione N-terminale in correlazione con la carica positiva.

Alla luce delle osservazioni effettuate su TL incentrate soprattutto sull'importanza della struttura ad α -elica, e la sintesi di analoghi che la interrompessero, si è ritenuto opportuno correlare tali peptidi con quelli della serie relativa allo studio della carica positiva.

Pertanto, è stato progettato e sintetizzato il composto TL-11 in cui è presente sia l'interruzione dell' α -elica nella regione N-terminale, dovuta alla presenza della Pro in posizione 3 (composto TL-8) e l'Orn in posizione 11 a ridosso della regione C-terminale. (composto TL-2).

In tabella 4.2.7 è stata riportata la sequenza di TL-8 e di TL-2, le cui sostituzioni sono sempre evidenziate rispetto al template TL in rosso ed è riportata la sequenza del peptide TL-11

Tabella 4.2.7: sequenze di TL riferimento, TL-2, TL-8, TL-11

PEPTIDE	SEQUENZA
TL riferimento	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-2	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ O ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-8	H-F ¹ V ² P ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-11	H-F ¹ V ² P ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ O ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂

4.3 STUDIO DELLA TEMPORINA A: I NUOVI ANALOGHI

Oggetto di studio molto più approfondito rispetto alla temporina L, la temporina A appare con un profilo di gran lunga più definito.

Studi precedenti, infatti, hanno già evidenziato le caratteristiche strutturali e conformazionali di tale peptide.[38] [73]

Lo studio di tale template, è stato, quindi, approntato partendo dalla progettazione di composti che potessero approfondire gli studi pregressi.

Inoltre, come per la temporina L si è ritenuto opportuno effettuare un confronto tra la sequenza di TA e di TL, in modo da poter ottenere un riscontro incrociato dei risultati ottenuti da tale serie di peptidi sintetizzati.

4.3.1 Interruzione della struttura ad α -elica nella regione C-terminale

La temporina A si struttura prioritariamente ad α -elica, come del resto la stragrande maggioranza degli AMPs appartenenti a questa famiglia.

E' stato progettato e sintetizzato il peptide TA-1 al fine di interrompere la strutturazione ad α -elica e valutare, non solo quanto questa sia fondante ai fini dell'attività antimicrobica, ma soprattutto, in che percentuale incida.

Essendo la sequenza nativa di TA, già caratterizzata da un'interruzione nella strutturazione dell' α -elica nella regione N-terminale, a causa della

presenza della Pro in posizione 3, è stata introdotta una seconda Pro in posizione 11 al posto della Gly.

E' stato creato in tal modo il composto sintetico TA-1 avente anche nella regione C-terminale un residuo ciclico, quindi conformazionalmente costretto induttore di turn.

In tabella 4.3.1 è riportata la sequenza del template e la sequenza relativa al peptide TA-1, in entrambi il residuo in posizione 11 è stato evidenziato con diverso colore.

Tabella 4.3.1: sequenza di TA riferimento e di TA-1

PEPTIDE	SEQUENZA
TA riferimento	H-F ¹ L ² P ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ G ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TA-1	H-F ¹ L ² P ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ P ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂

4.3.2 Confronto temporina A e temporina L

Il composto TA-2 nasce da un confronto incrociato tra TA e TL.

Rispettivamente è stato possibile creare una chimera in cui in posizione 3 di entrambi i peptidi nativi è stata effettuata una sostituzione puntiforme di uno specifico residuo. E' stato quindi ottenuto per TL il composto TL-8 (par.4.2.5) e per TA il peptide TA-2. Quest'ultimo presenta infatti, al posto della Pro³ in TA, una Gln in posizione 3, un residuo presente nel template di TL e assente in TA.

Tuttavia oltre al peptide TA-2 che ha la sua controparte nel corrispettivo derivato di TL, TL-8, sempre sulla base del confronto tra i due template TA e TL è stato progettato e sintetizzato il composto TA-3.

Quest'ultimo oltre ad avere in posizione 3 la Gln, presenta la sostituzione dell'Arg in 7 con la Lys, residuo presente nella medesima posizione all'interno della sequenza di TL.

Pertanto, in TA-3 si osserva da un punto di vista strutturale: ad ripristino di un eventuale α -elica interrotta dalla presenza della Pro³ nel template TA, in quanto è presente la Gln³. Da un punto di vista chimico è d'uopo considerare che è stato sostituito un gruppo guanidinico (catena laterale dell'Arg⁷) con un gruppo amminico (catena laterale della Lys⁷) lasciando tuttavia, inalterata la carica netta dell'intera sequenza. In tabella 4.3.2 sono

state riportate le sequenze dei tre peptidi nello specifico TA, TA-2 e TL al fine di evidenziarne il confronto.

Tabella 4.3.2: sequenza di TA, di TL e dell'analogo sintetico TA-2 e TA-3. In viola sono evidenziati gli amminoacidi nei due template, in rosso i residui sostituiti nei derivati.

PEPTIDE	SEQUENZA
TA riferimento	H-F ¹ L ² P ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ G ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TA-2	H-F ¹ L ² Q ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ G ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TA-3	H-F ¹ L ² Q ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ K ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ G ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL riferimento	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂

4.3.4 Introduzione di una carica positiva nella regione C-terminale di TA

Sulla base del confronto della sequenza di TL con TA, è stato riscontrato che nella regione C-terminale di TL è presente una carica positiva, assente in TA.

E' stato quindi sintetizzato il peptide TA-4 che presenta, a ridosso della regione C-terminale, l'introduzione di una carica positiva. Infatti, in posizione 11 è stata sostituita il residuo di Gly con un residuo di Lys, recante un gruppo amminico in catena laterale. In tabella 4.3.4 sono riportate le sequenze del template TA e di TA-4

Tabella 4.3.4: sequenza di TA e di TA-4. In viola è evidenziato il residuo di Gly sostituito dal residuo di Lys, in rosso, nel peptide TA-4.

PEPTIDE	SEQUENZA
TA riferimento	H-F ¹ L ² P ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ G ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TA-4	H-F ¹ L ² P ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ K ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂

CAPITOLO V

AMBITO SPERIMENTALE:

SEZIONE CHIMICA E SEZIONE FARMACOLOGICA.

5.1 SEZIONE CHIMICA

La sezione chimica è stata articolata sulla sintesi di tutti gli analoghi progettati, inclusi i due template.

In seconda istanza, si è proceduto alla purificazione e alla caratterizzazione di tutti i composti ottenuti.

5.1.2 Sintesi peptidica

I peptidi sono stati ottenuti mediante la classica metodica sintetica in fase solida via Fmoc. Tale approccio, eterogeneo, prevede l'impiego di un supporto solido, la resina, in combinazione con una fase liquida, i reagenti, infatti, questi ultimi, sono introdotti in soluzione a concentrazione definita 0,5 M in N,N-dimetilformamide, DMF.

E' stato scelto questo tipo di tecnica sintetica, in quanto considerata la più idonea e facilmente automatizzabile, per l'ottenimento di peptidi di media lunghezza. La sintesi viene eseguita all'interno di reattori/pozzetti i cui setti consentono di operare in corrente inerte d'azoto o argon evitando perdite di materiale, e di ottenere elevate rese di prodotti grezzi. Il supporto solido utilizzato è stato accuratamente scelto in base alle caratteristiche chimiche

delle sequenze peptidiche da sintetizzare, trattandosi di peptidi ammidati, di una lunghezza di 13 residui, ciascuno, è stata impiegata una resina Rink-amide avente un *loading* di 0,74 mmol/g. Per ogni composto sono stati impiegati 300mg di tale resina precedentemente sottoposta a *swelling* in 4ml di DMF per una durata di 2ore. Successivamente si è proceduto alla deprotezione del gruppo Fmoc dal linker della resina, impiegando una soluzione al 25% di piperidina in DMF, per circa 30 minuti. Si è poi effettuato l'accoppiamento del primo residuo amminoacidico, così come dei successivi, tramite attivazione in situ in presenza di agenti di coupling: HBTU, HOBt, entrambi in un eccesso di 3 equivalenti, in presenza di una base terziaria, DIPEA, in un eccesso di 6 equivalenti, e Fmoc-AA-OH, ortogonalmente protetto in catena laterale, anch'esso in un eccesso di 3 equivalenti. Gli amminoacidi usati per la sintesi sono tutti ortogonalmente protetti in catena laterale (Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH). Il gruppo N^α-Fmoc di ogni residuo accoppiato, è stato rimosso mediante l'uso di una soluzione di Piperidina al 25% in DMF per una durata di 30 minuti. Cicli di coupling e di deprotezione si sono alternati fino all'ottenimento dell'intero peptide ancorato alla resina. Ogni fase dei suddetti cicli è stata monitorata mediante

Kaiser test.[74] Tali step sono stati, inoltre, intervallati da lavaggi atti a rimuovere i reagenti in eccesso o eventuali sottoprodotti formati.

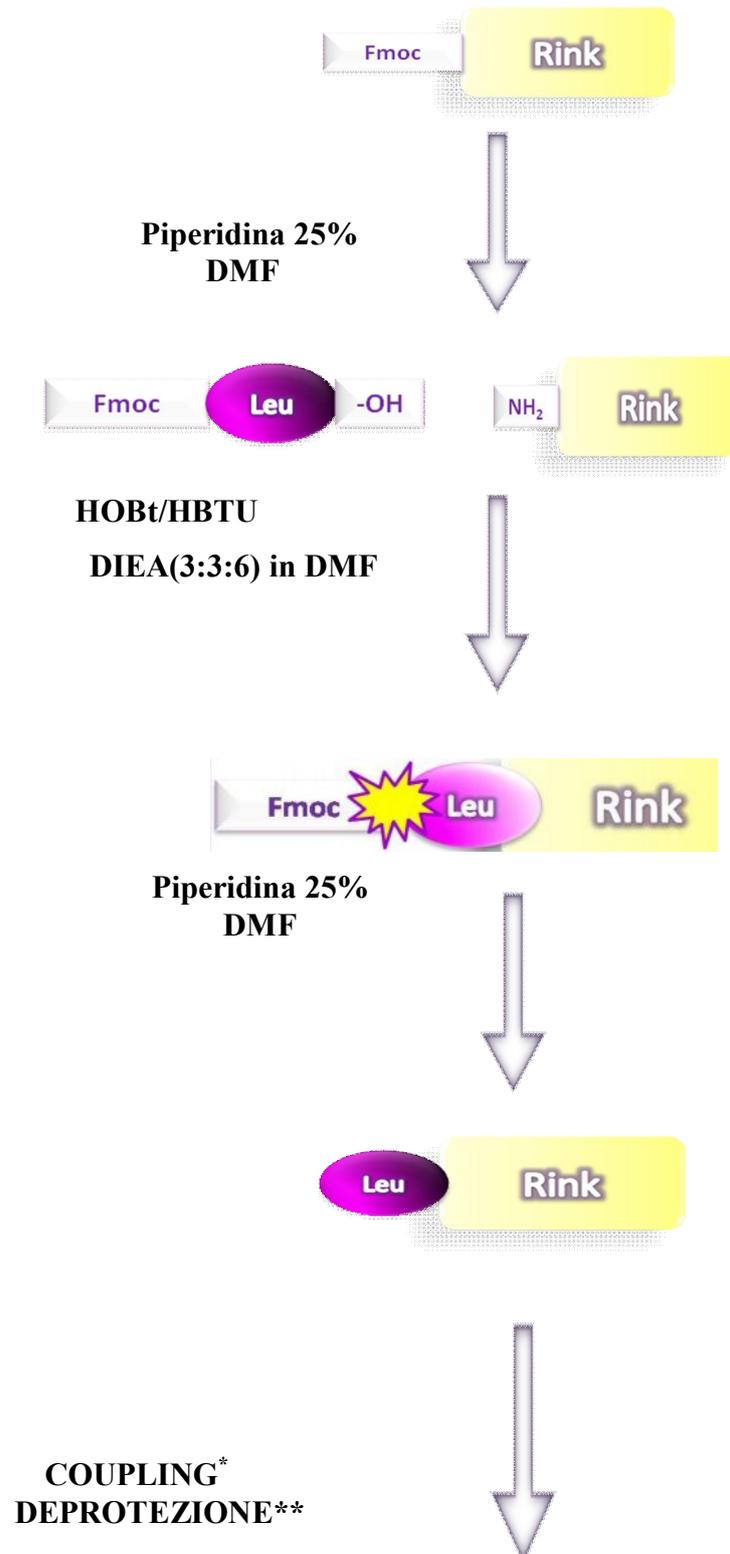
Per sequenze particolarmente ostiche nel reagire si è rilevata vantaggiosa la sostituzione del solvente, è stato infatti usato NMP, N-metilpirrolidone, al posto di DMF.

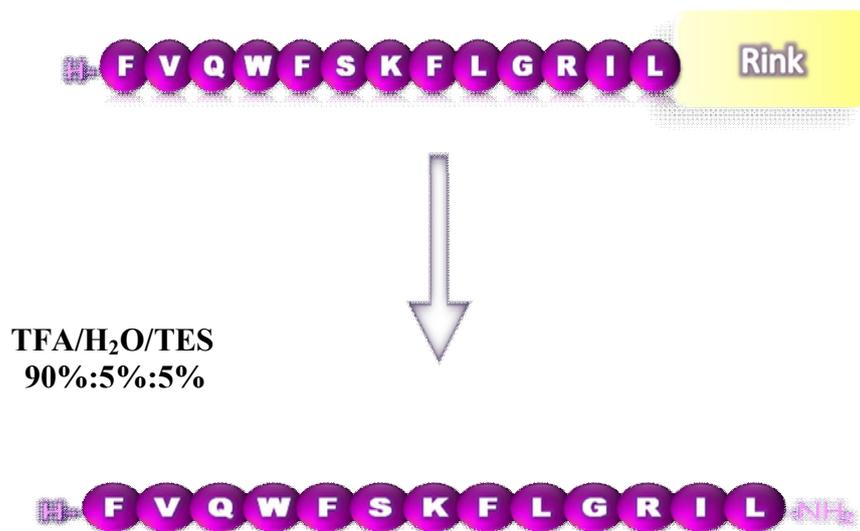
Peptidi come il derivato Retroinverso TL e il D-isomero TL, nonché coupling come Ile-Leu, Trp-Phe, sono stati sintetizzati impiegando NMP. Questo solvente, infatti ha permesso una distensione delle catene laterali del peptide in crescita sul supporto solido, facilitando gli urti efficaci tra le molecole per la reazione peptidica.

Ultimata la sintesi, il peptide è ancorato al supporto solido, si procede quindi al cleavage che prevede la rimozione del composto dalla resina mediante trattamento con soluzione al 90% di TFA, acido trifluoroacetico, 5% di TES, Trietilsilano, e 5% H₂O posto in agitatore per 3 ore.

L'impiego di tale metodica, tuttavia, può determinare una possibile alchilazione dei residui di Trp, da parte degli intermedi cationici prodotti durante il *cleavage*, a tale scopo l'impiego dei trialchilsilani, il Et₃SiH,(TES), come *scavenger*, si è rivelato efficace [75]. La resina è stata poi rimossa tramite filtrazione sottovuoto e il peptide grezzo è stato precipitato in 40ml di etere etilico freddo, ottenendo per tutti i peptidi, composti aventi una consistenza polverosa.

Schema di sintesi





Coupling* : HOBt/HBTU/DIEA/Fmoc-AA-OH (3:3:6:3) in DMF

Deprotezione**: Piperidina al 25% in DMF

Nello schema sintetico, per semplicità è stata riportata la sola sintesi della sequenza del template TL, allo stesso modo sono stati ottenuti tutti gli altri analoghi riportati in tabella 5.1.2a) e b)

Tabella 5.1.2 a) sequenze di TL template e dei corrispettivi analoghi
 b) sequenza di TA template e dei corrispettivi analoghi.

a)

PEPTIDE	SEQUENZA
TL riferimento	H-FVQWFSKFLGRIL-NH ₂
D-isomero	H-Dphe-Dval-Dgln-Dtrp-Dphe-Dser-Dlys-Dphe-Dleu-gly-Darg-Dile-Dleu-NH ₂
Retroinverso	H-Dleu-Dile-Darg-gly-Dleu-Dphe-Dlys-Dser-Dphe-Dtrp-Dgln-Dval-Dphe-NH ₂
TL-1	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ K ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-2	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ O ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-3	H-F ¹ V ² Q ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ R ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-4	H-F ¹ V ² R ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-5	H-F ¹ V ² R ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ R ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-6	H- L ¹ L ² Q ³ W ⁴ L ⁵ S ⁶ K ⁷ L ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ L ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-7	H- L ¹ L ² Q ³ W ⁴ L ⁵ S ⁶ K ⁷ L ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ W ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-8	H-F ¹ V ² P ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-9	H-F ¹ L ² P ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-10	H-F ¹ V ² P ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ P ¹⁰ R ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TL-11	H-F ¹ V ² P ³ W ⁴ F ⁵ S ⁶ K ⁷ F ⁸ L ⁹ G ¹⁰ O ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂

b)

PEPTIDE	SEQUENZA
TA riferimento	H-F ¹ L ² P ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ G ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TA-1	H-F ¹ L ² P ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ P ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TA-2	H-F ¹ L ² Q ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ G ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TA-3	H-F ¹ L ² Q ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ K ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ G ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂
TA-4	H-F ¹ L ² P ³ L ⁴ I ⁵ G ⁶ R ⁷ V ⁸ L ⁹ S ¹⁰ K ¹¹ I ¹² L ¹³ -NH ₂

5.1.3 Purificazione e caratterizzazione

I peptidi sintetizzati, sono stati ottenuti come composti grezzi, pertanto la fase successiva è stata incentrata sulla loro purificazione.

Quest'ultima è stata effettuata mediante l'impiego di RP-HPLC preparativo utilizzando una colonna preparativa Vydac C-18 (218 TP 1520 15 μ m).

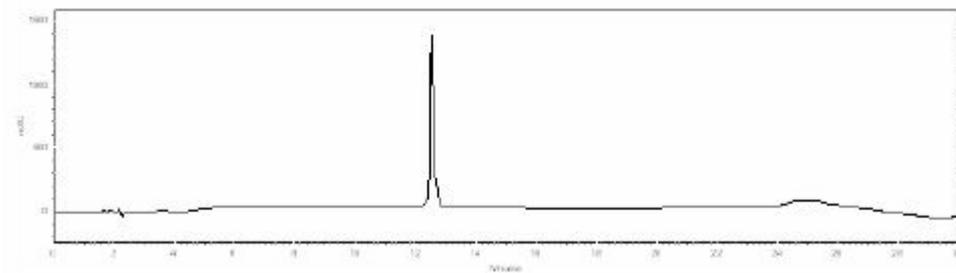
I composti sono stati eluiti con un flusso di 15ml/min utilizzando una tabella con gradiente crescente di H₂O allo 0,1% di TFA/CH₃CN (acetonitrile) allo 0,1% di TFA per una durata complessiva della corsa di 35 minuti.

Il grado di purezza dei composti è stato valutato mediante RP-HPLC analitico.

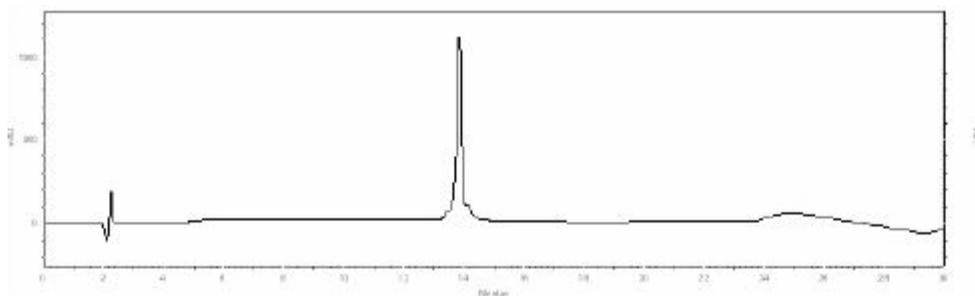
In figura 5.2a e b sono riportati rispettivamente i cromatogrammi della temporina L, e della temporina A, ottenuti mediante RP-HPLC analitico. E' stata utilizzata una colonna analitica C-18 (Vydac 218TP1010, 1.0 x 25.00 cm) con un gradiente crescente di CH₃CN allo 0.1% di TFA e H₂O allo 0.1% di TFA ed un flusso di eluizione di 1.0 mL/min. Infine la caratterizzazione dei composti è stata effettuata tramite spettrometria di massa sorgente ESI o MALDI (Kratos Analytical mod. Kompact).

Figura 5.1.3 a) e b): cromatogrammi analitici di TL e TA

a)TL



b)TA



Inoltre le frazioni pure sono state raggruppate e liofilizzate in seguito all'allontamento della componente dell'eluente CH_3CN .

5.2 SEZIONE FARMACOLOGICA

La sezione farmacologica è incentrata su saggi effettuati per valutare l'attività antimicrobica, e su saggi per valutare l'attività emolitica.

5.2.1 Saggi antimicrobici

I test sono stati realizzati con il metodo delle diluizioni secondo le procedure descritte dalla *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2001) usando piastre sterili costituite da 96 pozzetti.

Aliquote (50 μ l) di batteri, in fase semi-logaritmica ad una concentrazione di 2×10^6 colony-forming units (CFU)/ml nel terreno di coltura, sono stati addizionati a 50 μ l di brodo MH contenente il peptide diluito in due volte con etanolo al 20%. L'intervallo delle diluizioni del peptide è stato da 0.75 a 24 μ M. La stessa procedura è stata eseguita con le cellule di lievito, ma usando il terreno Winge [76]. L'inibizione della crescita microbica è stata determinata misurando l'assorbanza a 600 nm, dopo un'incubazione di 18-20 h a 37 °C (30 °C per i lieviti), con un 450-Bio Rad Microplate Reader. L'attività antimicrobica è stata espressa come la minima concentrazione inibente (MIC), la concentrazione del peptide che riesce ad inibire la crescita microbica del 100% è stata osservata dopo 18-20 h di incubazione.

5.2.2 Microorganismi

Le linee cellulari batteriche e funginee usate per testare l'attività antimicrobica sono state:

- Gram-negativi *Enterobacter faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* D21, *Yersina pseudotuberculosis* YPIII, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692, *Pseudomonas syringae pv tobaci* 1918 NCPPB;
- Gram-positivi *Bacillus megaterium* Bm11, *Staphylococcus aureus* Cowan I, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus capitis* n.1, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus pyogenes* ATCC 21547; i
- lieviti *Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pombe*.

5.3 SAGGI EMOLITICI

Per valutare l'attività emolitica dei composti sintetizzati, sono stati effettuati saggi su eritrociti umani. Aliquote di questi ultimi sono state sospese in 0.9% (p/p) di NaCl, e sono state incubate con una doppia

diluzione di peptide (disciolto in 20% di etanolo precedentemente usato) per 30 min a 37 °C con agitazione blanda.

I campioni sono stati poi centrifugati e l'assorbanza dei surnatanti è stata misurata a 415 nm. La lisi completa è stata misurata sospendendo gli eritrociti in acqua distillata [36].

CAPITOLO VI
RISULTATI E DISCUSSIONI

6.1 RISULTATI FARMACOLOGICI.

Su tutti i composti sintetizzati, inclusi i template TA e TL, sono stati effettuati i saggi per la valutazione dell'attività antimicrobica ed emolitica.

6.1.1 Attività antimicrobica ed emolitica di TL template, D-Isomero, Retroinverso

L'attività antimicrobica degli analoghi di TL rispettivamente relativa al D-isomero e Retroinverso è stata saggiata su tutte le linee cellulari precedentemente elencate (par. 5.2.1). In tabella 6.1.1 è riportata l'attività in termini di MIC a concentrazione μM .

Come si può evincere dai dati riportati, sia per il D-isomero che per il peptide Retroinverso della temporina L, non ci sono variazioni significative per quanto concerne l'attività. I valori di MIC, infatti, risultano paragonabili a quelli riscontrati per il template TL.

Tabella 6.1.1: Attività antimicrobica espressa in valori di MIC a concentrazione μM del template TL, del D-isomero e del Retroinverso.

Strains	TL-Riferimento	D-isomero	Retroinverso
Bacillus megaterium BM1	1.6 μM	1,6 μM	1,6 μM
Candida Albicans ATCC10231	12.5 μM	6 μM	12,5 μM
Candida tropicalis	3 μM	---	---
Candida guiller mondii	1,6 μM	---	---
Enterobacter faecalis	6 μM	3 μM	12.5 μM
Escherichia coli D21	12.5 μM	12,5 μM	12,5 μM
Micrococcus luteus2	>50 μM	6 μM	>100 μM
Pseudomonas aeruginosaATCC15692	25 μM	50 μM	>100 μM
Staphylococcus aureus ATCC25923	3 μM	3 μM	12.5 μM
Staphylococcus aureus Cowan I	3 μM	3 μM	3 μM
Staphylococcus epidermidis ATCC12228	3 μM	3 μM	6 μM
Yersina pseudotuberculosis YPIII	3 μM	3 μM	25 μM
Staphylococcus capiti I	1,6 μM	3 μM	6 μM
P. Syringae pv tobaci 1918NCPPB	6 μM	6 μM	6 μM
Saccharomyces cerviciae	6 μM	6 μM	>100 μM
Saccharomyces pombe	6 μM	6 μM	---
Streptococcus pyogenes ATCC21547	6 μM	6 μM	6 μM
Pseudomonas Aeruginosa ATCC27853	>50 μM	>50 μM	---
Escherichia Coli ATCC25992	12.5 μM	12,5 μM	12,5 μM
Acinetobacter Baunami ATCC19606	6 μM	6 μM	---
Acinetobacter Juni RT4	6 μM	6 μM	6 μM
S.Epidermidis 11	1,6 μM	---	---
S.Epidermidis 21	---	---	---
Candida Glabrata 11098	---	---	---
Candida Albicans 9521	---	---	---
Proteus Mirabilis 9315	12.5 μM	---	---
Enterococcus Faecalis 9596	12.5 μM	---	6 μM
Escherichia Coli 11265	12.5 μM	---	---
Proteus Mirabilis 95940	>100 μM	---	>50 μM

6.1.2 Attività antimicrobica dei derivati TL con modifiche all'interno della sequenza

Confrontando l'attività antimicrobica di tutti i derivati che presentano delle modifiche a livello di un singolo, o di due residui nella sequenza peptidica, sono stati riscontrati dei risultati particolarmente interessanti. In tabella 6.1.2 sono riportati i valori di MIC espressi in termini di concentrazione μM su tutte le linee batteriche e funginee testate.

Come si evince dai dati, per quanto concerne i composti derivanti da una progettazione incentrata sullo studio dei residui idrofobici non vi sono risultati particolarmente significativi. Il derivato TL-6, infatti, presenta un incremento dell'attività antimicrobica rispetto al template TL, a dimostrazione che la percentuale di α -elica, che nel composto TL-6 è maggiore rispetto al TL nativo, risulta fondamentale per l'esplicazione dell'attività antimicrobica. Ciò è ampiamente dimostrato dalla diminuzione dell'attività del derivato TL-10, che presenta l'interruzione dell' α -elica sia in posizione N-terminale, che C-terminale per la presenza di Pro³ e Pro¹⁰.

Tuttavia il composto TL-7, risulta avere un'attività antimicrobica paragonabile al template TL, addirittura su alcune linee cellulari batteriche appare perfino ridotta rispetto al riferimento. Pertanto l'introduzione del Trp in posizione 12 ha condotto non solo ad un composto meno attivo del

derivato TL-6 sul cui template è stata progettata la sostituzione, ma persino ad un peptide meno attivo della temporina L.

Per quanto riguarda i derivati incentrati sullo studio della carica positiva in posizione C-terminale, in cui il gruppo guanidinico, in catena laterale dell'Arg, è stato sostituito da un gruppo amminico, in catena laterale della Lys e del suo omologo inferiore l'Orn, è stato osservato che entrambi i derivati TL-1 e TL-2 presentano una diminuzione dell'attività antimicrobica rispetto al template. Tuttavia, confrontandoli tra loro si nota che il derivato TL-2 risulta, per alcune linee cellulari con un'attività incrementata. Medesimo discorso può essere effettuato per i composti TL-3, TL-4, TL-5, sempre progettati sulla base dello studio dell'importanza della carica positiva lungo la sequenza TL template. In particolare, TL-4 se paragonato a TL-3 risulta più attivo di quest'ultimo, ma comunque meno rispetto al riferimento. Inoltre la correlazione tra l'interruzione dell' α -elica in N-terminale, con lo studio della carica positiva in C-terminale non ha condotto a risultati significativi in termini di attività, infatti il derivato TL-11 resta comunque meno attivo del template TL.

Diverse le osservazioni che si possono effettuare sui derivati TL-8 e TL-9 ottenuti dalla base progettuale del confronto tra i due template TA e TL nella regione N-terminale.

Più dettagliatamente, si osserva che anche nel caso del derivato TL-9, vi è una diminuzione dell'attività.

Particolarmente interessante, risulta invece il composto TL-8. Nel caso di tale composto, infatti si ha, per alcuni ceppi, un'attività paragonabile al template, per altri, addirittura si osservano dei valori di MIC dimezzati, come nel caso di linee di lievito quali *Candida albicans*, *Saccharomices pombe*, e nel caso di batteri Gram-positivi: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. (Tabella 6.1.2).

Tabella 6.1.2: Attività antimicrobica espressa in valori di MIC dei derivati della temporina L.

ATTIVITA' ANTIMICROBICA (VALORI DI MIC CONCENTRAZIONE μM)												
STRAINS	TL	TL-1	TL-2	TL-3	TL-4	TL-5	TL-6	TL-7	TL-8	TL-9	TL-10	TL-11
Bacillus megaterium BM1	1,6	3	1.6	6	3	3	1.6	3	1.6	3	3	---
Candida Albicans ATCC10231	12.5	12.5	6	12.5	12.5	25	6	12.5	6	12.5	12.5	12.5
Candida tropicalis	3	---	---	---	---	12.5	---	6	3	---	6	---
Candida guilliermondii	1,6	---	---	---	---	6	---	6	6	---	6	---
Enterobacter faecalis	6	12.5	6	12.5	12.5	25	3	12.5	6	12.5	50	25
Escherichia coli D21	12.5	25	12.5	50	12.5	25	12.5	>50	12.5	>12.5	25	---
Micrococcus luteus2	>50	---	6	---	---	---	6	---	6	6	---	---
Pseudomonas aeruginosa ATCC15692	25	25	25	25	12.5	25	12.5	>100	25	>12.5	>100	100
Staphylococcus aureus ATCC25923	3	6	3	6	6	6	3	6	3	3	25	12.5
Staphylococcus aureus Cowan I	3	12.5	1.6	6	6	6	1.6	6	1.6	3	25	---
Staphylococcus epidermidis ATCC12228	3	6	3	6	3	12.5	1.6	---	1.6	3	12.5	12.5
Yersinia pseudotuberculosis YPIII	3	6	3	6	3	6	3	6	3	6	25	12.5
Staphylococcus capiti I	1.6	6	3	6	3	6	1.6	6	1.6	3	12.5	12.5
P. Syringae pv tobaci 1918NCPFB	6	12.5	12.5	12.5	6	---	6	---	6	12.5	25	---
Saccharomyces cervisiae	6	6	12.5	12.5	50	25	3	12.5	6	12.5	12.5	12.5
Saccharomyces pombe	6	6	12.5	6	25	25	3	12.5	3	6	12.5	25
Streptococcus pyogens ATCC21547	6	6	25	6	3	---	6	---	6	6	12.5	---
Pseudomonas Aeruginosa ATCC27853	>50	50	25	50	---	25	---	>100	---	>25	---	---
Escherichia Coli ATCC25992	12.5	12.5	12.5	12.5	25	50	12.5	>100	25	12.5	50	25
Acinetobacter Baunami ATCC19606	6	6	12.5	6	6	6	---	6	6	12.5	50	25
Acinetobacter Juni RT4	6	6	12.5	6	3	---	---	---	6	12.5	12.5	---
S.Epidermidis 11	1.6	---	---	6	---	---	3	---	3	---	---	---
S.Epidermidis 21	---	---	---	---	---	---	3	---	6	---	---	---
Candida Glabrata 11098	---	---	---	---	---	---	---	---	>50	---	>50	---
Candida Albicans 9521	---	---	---	---	---	---	---	---	12.5	---	12.5	6
Proteus Mirabilis 9315	12.5	---	---	---	---	---	6	---	25	---	---	25
Enterococcus Faecalis 9596	12.5	---	---	---	---	---	6	---	25	---	---	12.5
Escherichia Coli 11265	12.5	---	---	---	---	---	12.5	---	25	---	---	12.5
Proteus Mirabilis 95940	>100	---	---	---	---	---	>50	---	>100	---	---	>100

6.2 ATTIVITA' EMOLITICA

I saggi di attività emolitica sono stati effettuati sugli eritrociti umani.

I risultati ottenuti sono stati espressi in termini di percentuale di emolisi.

6.2.1. Attività emolitica di TL template, D-Isomero e Retroinverso

In tabella 6.2.1 sono riportati i dati relativi ai saggi emolitici effettuati seguendo un range di concentrazioni che va da 100 a 1.56 μM . I valori di emolisi riportati sono stati espressi in termini di percentuale. Com'è evidente la temporina L template presenta un'intensa attività emolitica pari al 100% già alla concentrazione di 50 μM . Il fine del presente progetto è stato incentrato, infatti, sull'ottenimento di derivati che potessero esplicitare il minimo effetto emolitico conservando il più possibile l'attività antimicrobica.

Pertanto, in virtù di questo, saggiando su eritrociti umani sia il D-isomero che il Retroinverso, non sono state riscontrate variazioni di rilievo nella diminuzione dell'attività emolitica. Infatti, come mostrato in tabella 6.2.1 i valori percentuali sono paragonabili al template.

Tabella 6.2.1: Valori percentuali di emolisi di TL, D-Isomero e Retroinverso.

PERCENTUALE DI ATTIVITA' EMOLITICA			
Concentrazione di Peptide(μM)	TL-Riferimento	D-Isomero	Retroinverso
100	---	---	---
50	100%	---	99%
25	94%	90%	81%
12.5	92%	88%	49%
6.25	48%	46%	15%
3.12	13%	13%	6%
1.56	3%	5%	1%

6.2.2 Attività emolitica dei derivati TL con sostituzioni all'interno della sequenza.

L'attività emolitica è stata riportata per tutti i derivati della temporina L progettati sulla base delle sostituzioni puntiformi in tabella 6.2.2.

E' interessante notare come per il derivato TL-1 si riscontri addirittura un aumento dell'attività emolitica, perfino superiore a quella del template, mentre per il derivato TL-2 si ha una diminuzione della percentuale di emolisi, a dimostrazione dell'importanza relativa al posizionamento della carica positiva (Orn¹¹ omologo inferiore della Lys¹¹).

Lo studio relativo all'introduzione di un gruppo guanidinico portato in catena laterale dell'Arg per i derivati TL-3, TL-4 e TL-5 ha condotto a peptidi con caratteristiche emolitiche diverse. Nello specifico, considerando tale triade, TL-4 risulta essere più emolitico del template, ma anche di TL-5, che, a sua volta presenta percentuali di emolisi paragonabili a TL, ma comunque maggiori di TL-3. Quest'ultimo, come si evince dai dati, a parità di concentrazioni è il meno emolitico di questa serie e del template TL.

Per quanto concerne i peptidi TL-6 e TL-7 si osserva, per quest'ultimo un incremento dell'emolisi rispetto al template; mentre per il derivato TL-6 si riscontra un valore di lisi eritrocitaria ridotta rispetto alla temporina L di circa il 20%.

Particolarmente significativi sono i dati relativi ai derivati TL-8 e TL-9 per i quali si osserva una diminuzione drastica dell'attività emolitica.

Confrontando, infatti, i valori percentuali di TL e quelli di TL-8 e TL-9 ad una concentrazione di 12.5 μM , risulta evidente una riduzione rispettivamente del 50% e del 30% di emolisi.

Ancora più drastica la riduzione dell'attività emolitica per i peptidi TL-10 e TL-11, considerando il medesimo valore di concentrazione di peptide sugli eritrociti (12.5 μM), sempre rispetto al template, si ha una diminuzione dell'emolisi rispettivamente dell'85% e del 77%.

Tabella 6.2.2: Attività emolitica di TL e derivati, espressa in percentuali di emolisi a concentrazioni decrescenti di peptide.

PERCENTUALE DI ATTIVITA' EMOLITICA												
[Peptide] (μM)	TL	TL-1	TL-2	TL-3	TL-4	TL-5	TL-6	TL-7	TL-8	TL-9	TL-10	TL-11
100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
50	100%	100%	---	---	100%	100%	---	100%	---	---	---	96%
25	94%	100%	89%	98%	100%	100%	100%	100%	92%	93%	5%	72%
12.5	92%	100%	62%	90%	100%	92%	73%	100%	42%	64%	5%	12.5%
6.25	48%	>50%	22%	29%	52%	43%	25%	78%	10%	19%	4.5%	2%
3.12	13%	>10%	7%	9%	20%	14.5%	9%	13%	6%	9%	2%	1%
1.56	3%	>5%	3%	4%	7%	6%	4%	8%	4.5%	4%	2%	0.7%

6.3 ATTIVITA' ANTIMICROBICA DI TA E DERIVATI

La temporina A presenta un range d'azione piuttosto ristretto se confrontato con quello della L, infatti risulta essere attiva solo su linee cellulari batteriche di Gram-positivi. In tabella 6.3 sono riportati i valori di MIC espressi in termini di concentrazione μM . Particolarmente interessante risulta l'incremento dell'attività antimicrobica da parte del derivato TA-2 in cui si osserva un dimezzamento dei valori di MIC. Discorso di tutt'altro tipo è da farsi a proposito dell'analogo TL-1 in cui si riscontra addirittura una diminuzione dell'attività con esagerati valori di MIC.

Per quanto concerne gli altri due derivati di TA, rispettivamente TA-3 e TA-4 non si riscontrano variazioni di rilievo per l'attività antimicrobica.

Tabella 6.3: Attività antimicrobica della temporina A e analoghi espressa in valori di MIC a concentrazione μM .

ATTIVITA' ANTIMICROBICA DI TA E DERIVATI (VALORI DI MIC A CONCENTRAZIONE μM)					
STRAINS	TA	TA-1	TA-2	TA-3	TA-4
<i>Acinetobacter baumannii</i> Atcc 19606	>30	>100	>30	---	>60
<i>Acinetobacter Junii</i> Rt-4	15	---	---	---	---
<i>Bacillus megaterium</i> Bm11	1.9	---	0.9	1.25	0.9
<i>Candida albicans</i>	15	>100	7.5	>10	7.5
<i>Enterobacter faecalis</i>	15	>100	7.5	10	7.5
<i>E. Coli</i> ATCC 25922	---	>100	---	---	---
<i>E. Coli</i> D21	>30	---	>30	>10	30
<i>Micrococcus luteus</i> 2	>30	---	7.5	10	7.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692	>30	>100	>30	>10	>60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	---	---	---	---	---
<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tobaci</i> 1918NCPBB	>30	>100	>30	>10	>60
<i>Saccaromices cerevisiae</i>	7.5	100	7.5	>5	3.8
<i>Saccaromices pombe</i>	3.8	100	3.8	5	3.8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0	100	1.9	2.5	1.9
<i>Staphylococcus capiti</i> 1	1.9	100	1.9	2.5	1.9
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I	1.9	---	1.9	2.5	0.9
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	3.8	100	1.9	2.5	1.9
<i>Streptococcus pyogens</i> ATCC 21547	15	---	7.5	>5	7.5
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YPIII	15	>100	7.5	10	3.8

6.4 ATTIVITA' EMOLITICA DI TA E DEI SUOI ANALOGHI

La temporina A non presenta attività emolitica di rilevanza, tuttavia, si è ritenuto opportuno saggiare il grado di emolisi per confrontare i risultati anche alla luce dei nuovi analoghi sintetizzati.

Come si evince dai risultati ottenuti in tabella 6.4, per il derivato TA-1 vi è una perdita totale dell'attività emolitica. Si riscontra un'emolisi poco significativa per il peptide TA-3 e per il peptide TA-4. Diverso il discorso per il peptide TA-2, che invece mostra un significativo incremento dell'attività emolitica.

Tabella 6.4: Attività emolitica di TA e derivati espressa in percentuale di emolisi in funzione di concentrazioni μM decrescenti di peptide.

PERCENTUALE DI ATTIVITA' EMOLITICA					
Concentrazione di Peptide(μM)	TA-Riferimento	TA-1	TA-2	TA-3	TA-4
25	12.2%	1.1%	91.7%	4.03%	86%
12.5	5.25%	0%	69.4%	4.33%	31%
6.25	2.8%	0.7%	18.3%	2.12%	12%
3.125	1.65%	0%	9.2%	3.09%	5.5%
1.56	1.6%	0%	7.4%	2.87%	4%

6.5 ATTIVITA' ANTIMICROBICA ED EMOLITICA : IL CONFRONTO DEI DERIVATI TA E TL

Correlando i risultati relativi all'attività antimicrobica ed emolitica dei derivati di TL, è possibile evincere che particolarmente interessante risulta essere il peptide TL-8. Quest'ultimo, infatti presenta un'attività antimicrobica per certi ceppi paragonabile al template, tuttavia vanta, per altri, dei valori di MIC addirittura dimezzati. Altro aspetto che lo rende peculiare è la drastica riduzione dei valori di emolisi, come evidenziato nella tabella 6.2.2.

Pertanto la sostituzione della Gln³, presente nel template TL, con la Pro³, presente nel template TA si è rivelata particolarmente proficua ai fini del raggiungimento dell'obiettivo preposto dal presente progetto di ricerca. Inoltre per uno studio incrociato anche il peptide TA-2 si è rivelato particolarmente interessante, non solo per un incremento dell'attività antimicrobica della temporina A, ma anche per un incremento dell'attività emolitica.

CAPITOLO VII

CONCLUSIONI

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il presente progetto di ricerca, è stato articolato in diverse fasi, dalle quali è stato possibile ottenere risultati particolarmente significativi.

Nell'ambito della prima fase sperimentale, incentrata sugli studi strutturali delle temporine, è stato possibile determinare la conformazione della temporina L ed A sia in micelle zwitterioniche di DPC, eccellenti modelli sperimentali per le membrane eucariotiche, sia in micelle di SDS, particolarmente adatte a mimare la carica negativa delle membrane batteriche. Inoltre, è stato possibile, con il presente lavoro di ricerca, ottenere risultati che hanno permesso di indicare un diverso meccanismo molecolare secondo cui viene esplicitata l'azione antimicrobica ed emolitica di TA e TL. Nello specifico è stato possibile concludere per tale fase progettuale che i modelli "*dynamic peptide-lipid supramolecular pore*" e "*barrel stave*" sono esplicitativi per spiegare rispettivamente l'attività antimicrobica e l'attività emolitica delle temporine [80].

Questo differente meccanismo molecolare è in perfetto connubio con l'ambito farmacologico, i cui risultati conferiscono ulteriore conferma della fase progettuale dei derivati dei due template TA e TL. Infatti, in eccellente accordo con i dati farmacologici, nonché con gli studi conformazionali, i peptidi sintetizzati hanno sottolineato la correlazione tra una struttura ad α -elica, e l'attività emolitica; correlazione che va letta in una visione più ampia

includendo anche lo studio delle cariche positive in entrambi i template TA e TL.

Resta rilevante l'importanza di due peptidi “*chimera*” rispettivamente TA-2 e TL-8 che emergono da questo lavoro di ricerca per le loro peculiari caratteristiche farmacologiche.[80]

In particolare, nel caso di TA-2 la sostituzione della Pro³, residuo induttore di *turn*, con la Gln³, recante un gruppo ammidico, si è rivelata positiva nell'incrementare l'attività antimicrobica di TA, ma sicuramente negativa nell'aver determinato un aumento notevole di una percentuale di emolisi che per il template TA era insignificante. Un aspetto questo, particolarmente interessante, che attribuisce al residuo Gln³ nonché alla sua posizione una connotativo coinvolgimento nell'attività antimicrobica ed emolitica.

D'altra parte, per il derivato TL-8 la sostituzione della Gln³ con Pro³ ha interrotto la strutturazione ad α -elica in posizione N-terminale, e in perfetto accordo con gli studi strutturali della I fase del progetto ha dimostrato non solo un incremento dell'attività antimicrobica, ma addirittura un dimezzamento del grado di emolisi.[80]

Ad oggi il peptide TL-8 risulta il derivato sintetico del template TL con il migliore profilo farmacologico.

Alla luce di quanto dimostrato gli obiettivi prefissati dal presente lavoro di ricerca sono stati raggiunti con successo, costituendo così i presupposti

fondanti per la progettazione di nuovi analoghi partendo stavolta da due template diversi TA-2 e TL-8.

CAPITOLO VIII

BIBLIOGRAFIA

- [1]. Davies, J. "Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes." *Science* 1994, 264: 375-382
- [2] Nikaido, H. "Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps." *Clin. Infect. Dis.*, 1998 27(suppl.1): S32-S41
- [3] Ghiselli R., Giacometti A., Cirioni O., Mocchegiani F., Kamysz W., Del Prete M.S., Lukasiak J., Scalise G., and Saba V. "Temporin A as a prophylactic agent against methicillin sodium-susceptible and methicillin sodium-resistant *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection" *J.Vasc. Surg.* 2002;36: 1027-1030.
- [4] Orsolya Toke "Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections" *Biopolymers Pept. Science*, 2005 Vol.80, 717-735
- [5] Boman, H.G. "Innate immunity and normal microflora". *Immunol Rev.*2000, 173 5-16.
- [6] Bulet, P., Menin, L. "Anti-microbial peptides: from invertebrate to vertebrates." *Immunol. Rev.*2004 198 169-184.
- [7] Boman, H.G. "Peptides antibiotics and their role in innate immunity" *Ann. Rev. Immunol.* 1995, 13 61-92
- [8] Zasloff, M. *Nature* 2002, 415 389-395
- [9] Papagianni, M. *Biotechnol Adv* 2003 21, 465-499.
- [10] Rinaldi, A.C. "Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario". *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002, 6, 799-804
- [11] Karen Taylor,¹ Perdita E. Barran,² Julia R. Dorin, *Structure-Activity Relationships in b-Defensin Peptides*, Interscience Wiley periodicals Inc. *Biopolymers (Pept Sci)*90: 1-7, 2008
- [12] J. Michael Conlona, Jolanta Kolodziejekb, Norbert Nowotnyb, Jérôme Leprincec, Hubert Vaudryc, Laurent Coquetc, Thierry Jouennec, e and Jay D. Kingf: "Characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the Malaysian frogs, *Odorrana hosii* and *Hylarana picturata* Anura:Ranidae" giugno 2008
- [13] <http://w3.uniroma1.it/biocmed2/peptidi.html>.
- [14] Ammar B., Perianin A. , Mor A., Sarfati G., Tissot M., Nicolas P., et al.(1998) "Dermaseptin, a peptide antibiotic, stimulates microbicidal activities of polymorphonuclear leukocytes". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 870-875.
- [15] Gibson, B. W., Tang, D. Z., Mandrell, R., Kelly, M. and Spindel, E. R. (1991) "Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the Asian toad, *Bombina orientalis*". *J. Biol. Chem.* 266, 23103-23111

- [16] Simmaco, M., Barra, D., Chiarini, F., Noviello, L., Melchiorri, P., Kreil, G. and Richter, K. (1991) "A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*." *Eur. J. Biochem.* 199, 217-222.
- [17] Gidalevitz, D.; Ishitsuka, Y.; Muresan, A. S.; Konovalov, O.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Lee, K. Y. "Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2003, 100, 6302–6307.]
- [18] Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance". *Pharmacol. Rev.* 2003, 55, 27–55.
- [19] Y. Shai, Z. Oren, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7305-730
- [20] Z. Oren, J. Hong, Y. Shai, , *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 14643-14649.
- [21] Zilberstein, D.; Schuldiner, S.; Padan, E. *Biochemistry* 1979, 18, 669–673.
- [22] de Kroon, A. I.; Vogt, B.; van't Hof, R.; de Kruijff, G.; de Gier, J. *Biophys J* 1991, 60, 525–537.
- [23] Vaz Gomes, A.; de Waal, A.; Berden, J. A.; Westerhoff, H. V. *Biochemistry* 1993, 32, 5365–5372.]
- [24] Ernst, R. K.; Guina, T.; Miller, S. I. *J Infect Dis* 1999, 179, S326–S330.
- [25] Peschel, A. *Trends Microbiol* 2002, 10, 179–186.
- [26] Guina, T.; Yi, E. C.; Wang, H.; Hackett, M.; Miller, S. I. *J. Bacteriol* 2000, 182, 4077–4086.
- [27] Shafer, W. M.; Qu, X.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95, 1829–1833.
- [28] Chinchar, V. G.; Wang, J.; Murti, G.; Carey, C.; Rollins-Smith, L. *Virology* 2001, 288, 351–357.
- [29] Robinson, W. E., Jr.; McDougall, B.; Tran, D.; Selsted, M. E. *J Leukoc Biol* 1998, 63, 94–100.]
- [30] Simmaco M., Mignogna G., Canofeni S., Miele R., Mangoni M. L. and Barra D. (1996) "Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*." *Eur. J. Biochem.* 242: 788–792.
- [31] Krishnakumari V. and Nagaraj R. (1997) "Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs". *J. Pept. Res.* 50: 88–93.
- [32] Argiolas A. and Pisano J. J. (1984) "Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*." *J. Biol. Chem.* 259: 10106–10111.

- [33] Mangoni M.L. Miele R., Renda T.G., Barra D. and Simmaco M., (1998) “Molecular cloning of a bombin gene from *bombin orientalis*: detection of NF-kappaB and NF-IL6” binding sites in its promoter. *FEBS Lett.* 431: 23-28.
- [34] Wade, D. “Unambiguous consensus sequences for temporin-like antibiotic peptides.” *Internet J. Chem.* 2002, 5, 5. [Online.] <http://preprint.chemweb.com/biochem/0204002>.]
- [35] Rinaldi, A. C.; Mangoni, M. L.; Rufo, A.; Luzi, C.; Barra, D.; Zhao, H.; Kinnunen, P. K. J.; Bozzi, A.; Di Giulio, A.; Simmaco, M. “Temporin L: antimicrobial, hemolytic and cytotoxic activities, and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles.” *Biochem. J.* 2002, 368, 91–100.
- [36] Mangoni, M. L.; Rinaldi, A. C.; Di Giulio, A.; Mignogna, G.; Bozzi, A.; Barra, D.; Simmaco, M. “Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin.” *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 1447–1454
- [37] Rinaldi, A. C.; Di Giulio, A.; Liberi, M.; Gualtieri, G.; Oratore, A.; Schinina, M. E.; Simmaco, M.; Bozzi, A. “Effects of temporins on molecular dynamics and membrane permeabilization in lipid vesicles.” *J. Pept. Res.* 2001, 58, 213–220.
- [38] Wade, D.; Silberring, J.; Soliymani, R.; Heikkinen, S.; Kilpeläinen, I.; Lankinen, H.; Kuusela, P. “Antibacterial activities of temporin A analogs.” *FEBS Lett.* 2000, 479, 6–9
- [39] Mangoni, M. L.; Saugar, J. M.; Dellisanti, M.; Barra, D.; Simmaco, M.; Rivas, L. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity.“ *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 984–990.
- [40] Chen, F.-Y.; Lee, M.-T.; Huang, H. W. *Biophys J* 2003, 84, 3751–3758.
- [41] Ludtke, S. J.; He, K.; Huang, H. W. *Biochemistry* 1995, 34, 16764–16769.
- [42] Chen, F.-Y.; Lee, M.-T.; Huang, H. W. *Biophys J* 2002, 82, 908–914.
- [43] Heller, W. T.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Yang, L.; Huang, H. W. *Biochemistry* 2000, 39, 139–145.
- [44] Lee, M.-T.; Chen, F.-Y.; Huang, H. W. *Biochemistry* 2004, 43, 3590–3599.
- [45] Ehrenstein, G.; Lecar, H. *Quart Rev Biophys* 1977,10, 1–34.
- [46]. Ojcius, D. M.; Young, J. D. *Trends Biochem Sci* 1991, 16, 225–229.
- [47] Shai, Y. *Trends Biochem Sci* 1995, 20, 460–464.]
- [48] Pouny, Y.; Rapaport, D.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y. *Biochemistry* 1992, 31, 12416–12423.
- [49] Shai, Y. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1462, 55–70.

- [50] Ludtke, S. J.; He, K.; Heller, W. T.; Harroun, T. A.; Yang, L.; Huang, H. W. *Biochemistry* 1996, 35, 13723–13728.
- [51] Huang, H. W. *Biochemistry* 2000, 39, 8347–8352.
- [52] Gidalevitz, D.; Ishitsuka, Y.; Muresan, A. S.; Konovalov, O.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Lee, K. Y. Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2003, 100, 6302–6307.
- [53] Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 2003, 55, 27–55.
- [54] Langham, A. A.; Khandelia, H.; Kaznessis, Y. N. “How can a β -sheet peptide be both a potent antimicrobial and harmfully toxic? Molecular dynamics simulations of protegrin-1 in micelles.” *Biopolymers* 2006, 84, 219–231.
- [55] Henry, G. D.; Sykes, B. D. “Methods to study membrane protein structure in solution.” *Methods Enzymol.* 1994, 239, 515–535.]
- [56] Kallick, D. A.; Tessmer, M. R.; Watts, C. R.; Li, C. Y. J. “The use of dodecylphosphocholine micelles in solution NMR.” *J. Magn. Reson. B* 1995, 109, 60–65.
- [57] Lee SA, Kim YK, Lim SS, Zhu WL, Ko H, Shin SY, Hahm KS, Kim Y. Solution structure and cell selectivity of piscidin 1 and its analogues. *Biochemistry*, 2007, 46, 3653-63.
- [58] Van den Hooven, H. W. S.; Chris, A. E. M.; van de Kamp, M.; Konings, R. N. H.; Hilbers, C. W.; van de Ven, F. J. M. Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *Eur. J. Biochem.* 1996, 235, 394–403.
- [59] Greenfield N.J., *Analytical Biochemistry*, 1996, 235, 1-10.
- [60] D'Abramo, M.; Rinaldi, A. C.; Bozzi, A.; Amadei, A.; Mignogna, G.; Di Nola, A.; Aschi, M. Conformational behavior of temporin A and temporin L in aqueous solution: a computational/experimental study. *Biopolymers*, 2006, 81, 215–224
- [61] Kamysz, W.; Mickiewicz, B.; Rodziewicz-Motowidlo, S.; Greber, K.; Okroj, M. Temporin A and its retro-analogues: synthesis, conformational analysis and antimicrobial activities. *J. Pept. Sci.* 2006, 12, 533–537.
- [62] Zhao H, Kinnunen PK. Binding of the antimicrobial peptide temporin L to liposomes assessed by Trp fluorescence. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25170-25177.
- [63] Wüthrich, K. in “NMR of Proteins and nucleic acids” John Wiley & Sons, Inc., Eds., New York. 1986.
- [64] a) Piantini, U.; Sorensen, O.W.; Ernst, R.R. Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling network. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 6800-6801. b) Marion. D.; Wüthrich, K. Application of phase sensitive Two-Dimensional Correlated Spectroscopy

(COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, 113, 967-974.

[65] Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 1983, 53, 521-528.

[66] Jenner, J.; Meyer, B.H.; Bachman, P.; Ernst, R.R. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 1979, 71, 4546-4553

[67] Bartels, C.; Xia, T.; Billeter, M.; Guentert, P.; Wüthrich, K. The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* 1995, 6, 1-10

[68] Güntert, P.; Mumenthaler, C.; Wüthrich, K.; Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* 1997, 273, 283-298.

[69] a) Brown, L. R.; Bösch, C.; Wüthrich, K. Location and orientation relative to the micelle surface for glucagon in mixed micelles with dodecylphosphocholine: EPR and NMR studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1981, 642, 296-312.

b) Lindberg, M.; Jarvet, J.; Langel, U.; Graslund, A. Secondary structure and position of the cell-penetrating peptide transportan in SDS micelles as determined by NMR. *Biochemistry* 2001, 40, 3141-3149.

[70] Zhao, H.; Rinaldi, A. C.; Di Giulio, A.; Simmaco, M.; Kinnunen, P. K. J. Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model biomembranes. Comparison of temporins B and L. *Biochemistry* 2002, 41, 4425-4436.

[71] Matsuzaki, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1462, 1-10.

[72] Shai, Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides.. *Trends Biochem. Sci.* 1995, 20, 460-464.

[73] Wojciech K., Beata M., Sylwia R.M., Katarzyna G., and Marcin O., Temporin A and its retro-analogues: synthesis, conformational analysis and antimicrobial activities *J. Pept. Sci.*

[74] Kaiser E., Colecott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 1970, 34, 595-598.

[75] Pearson D.A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 2739-2742.

[76] Valenti, P.; Visca, P.; Antonini, G.; Orsi, N. Antifungal activity of ovotransferrin towards genus *Candida*. *Mycopathologia.* 1985, 89, 169-175.

[77] Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. "Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy." *J. Magn. Reson.* 1983, 53, 521-528.

[78] Jenner, J.; Meyer, B.H.; Bachman, P.; Ernst, R.R. "Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy." *J. Chem. Phys.* 1979, 71, 4546-4553.

[79] Bartels, C.; Xia, T.; Billeter, M.; Guentert, P.; Wüthrich, K. "The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules." *J. Biomol. NMR* 1995, 6, 1-10.

[80] Cartenuto A., Malfi S., Saviello M.R., Campiglia P., Gomez-Monterrey I., Mangoni M.L. Herculani Gaddi L.M., Novellino E. Grieco P. "A Different Molecular Mechanism Underlying Antimicrobial and Hemolytic Actions of Temporins A and L." *JMC* 2008 51 (8) 2354-2362.

RINGRAZIAMENTI:

E' d'uopo un ringraziamento al prof. Paolo Grieco, per la grande disponibilità mostratami in ambito laboratoriale e non, per essersi rivelato un tutor "*sui generis*" per correttezza, fiducia e stima.

Un grazie alla Dott.ssa Maria Luisa Mangoni per i saggi farmacologici, la solerzia e il tempismo nella comunicazione dei risultati.

Al prof Alfonso Carotenuto per la precisione degli studi strutturali e conformazionali sulle temporine.

Ai colleghi: Clelia, Maria Pia, Claudio, Luigia, Francesco, Salvatore, Marina, Sandro, Carmen, Francesca, con cui ho condiviso il triennio di dottorato.

Un ringraziamento infinito va all'amica, più che collega, Cristina, per il supporto scientifico, morale ma soprattutto affettivo.

Grazie a MaryRose, amica universitaria, oltre che collega di ricerca, per la sua immensa disponibilità.

Un grazie a Gianni, mentore chimico, per i suoi preziosi consigli, per essersi rivelato un amico fidato soprattutto in periodi burrascosi.

Grazie a Catia, per tutti i suoi infiniti "perché".

Un grazie a tutti i tesisti: Anna Maria, Imma, Eliana, Marilena I., Nunzia F., Loredana, Nunzia G., Giovanna, Cristiana, Paolo, Carolina, Caterina, Rosa, Annalisa, Rossella, Peppe, Luca, Serena A., Serena B., Maria Giovanna, Antonella, Gabriella, Luisa, Angela, Marilena S., Gianluigi, Alessandro, Francesco, Maria, Irene, per avermi coadiuvato nel corso delle varie sintesi peptidiche.

Grazie all'amica Stefania, per il continuo supporto extra-laboratoriale.

A mio padre e a mia madre, per la fiducia che mi hanno infuso da sempre, un ringraziamento particolare va a mia madre, immancabile maestra di vita; grazie, per aver subito le mie isterie, le mie depressioni, per aver condiviso le mie gioie, un grazie per esserci stata sempre, anche in un campo diametralmente opposto al suo.

Ai miei nonni, per avermi trasmesso determinazione nel gestire le conoscenze e immensa umiltà nell'apprenderle.

A mio fratello, Antonio, che non smetterò mai di ringraziare...

A voi tutti Grazie per essere stati parte del mio percorso di vita