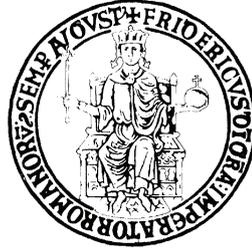


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XXII CICLO

PROGETTAZIONE ED ANALISI

CONFORMAZIONALE DI PEPTIDI AD ATTIVITA'

ANTIMICROBICA

Dott. ^{ssa} Maria Rosaria Saviello

TUTOR:

Prof. A. Carotenuto

COORDINATORE:

Prof. ^{ssa} M. V. D'Auria

INDICE

SOMMARIO	<i>pag. 1</i>
INTRODUZIONE	<i>pag. 2</i>
CAPITOLO I Peptidi Antimicrobici AMPs	
1.1 Caratteristiche dei peptidi antimicrobici AMPs	<i>pag. 5</i>
1.2 Classificazione degli AMPs	<i>pag. 6</i>
1.2.1 Peptidi contenenti Cys	<i>pag. 7</i>
1.2.2 Peptidi contenenti un'elevata percentuale di residui specifici	<i>pag. 9</i>
1.2.3 Peptidi con sequenza lineare ad elevata percentuale di α -elica.	<i>pag. 10</i>
1.3 Meccanismo d'azione degli AMPs	<i>pag. 12</i>
CAPITOLO II Metodiche Generali	
2.1 Studi strutturali	<i>pag. 16</i>
2.1.1 Analisi conformazionale di molecole di interesse biologico mediante CD	<i>pag. 16</i>
2.1.2 Analisi conformazionale di molecole di interesse biologico mediante NMR	<i>pag. 18</i>
2.1.3 Parametri spettrali nelle risonanze magnetiche nucleari	<i>pag. 21</i>
2.2 Calcoli conformazionali	<i>pag. 24</i>
2.3 Dinamica Molecolare	<i>pag. 25</i>
CAPITOLO III L'ormone α-MSH	
3.1 Introduzione	<i>pag. 31</i>
3.2 Analisi NMR	<i>pag. 34</i>
3.2.1 Analisi conformazionale di α -MSH(6-13)	<i>pag. 35</i>
3.3.2 Analisi conformazionale di [D-Nal-7,Phe-12]- α -MSH (6-13)	<i>pag. 38</i>
3.3.3 Analisi conformazionale di [D-Nal-7,Asp-12]- α -MSH(6-13)	<i>pag. 40</i>
3.3 Relazioni Attività-Conformazione	<i>pag. 42</i>
3.4 Conclusioni	<i>pag. 43</i>
3.5 Sezione Sperimentale	<i>pag. 44</i>
3.5.1 Preparazione del campione	<i>pag. 44</i>

3.5.2 Spettroscopia NMR	<i>pag. 44</i>
3.5.3 Determinazioni strutturali e calcoli di modellistica	<i>pag. 45</i>
CAPITOLO IV Le Temporine	
4.1 Introduzione	<i>pag. 48</i>
4.1.1 Caratteristiche delle Temporine	<i>pag. 48</i>
4.1.2 Peptidi analizzati	<i>pag. 50</i>
4.2 Temporina A e Temporina L	<i>pag. 51</i>
4.2.1 Spettroscopia CD	<i>pag. 51</i>
4.2.2 Analisi NMR	<i>pag. 53</i>
4.2.2.1 TL in soluzione di SDS	<i>pag. 53</i>
4.2.2.2 TL in soluzione di DPC	<i>pag. 56</i>
4.2.2.3 TA in soluzione di SDS	<i>pag. 57</i>
4.2.2.4 TA in soluzione di DPC	<i>pag. 58</i>
4.2.3 Disposizione relativa alle micelle	<i>pag. 59</i>
4.3 Nuovi Analoghi: progettazione, sintesi, caratterizzazione biologica ed analisi conformazionale	<i>pag. 61</i>
4.3.1 Analisi NMR	<i>pag. 63</i>
4.3.1.1 Gln ³ -TA in soluzione di SDS	<i>pag. 63</i>
4.3.1.2 Gln ³ -TA in soluzione di DPC	<i>pag. 67</i>
4.3.1.3 Pro ³ -TL in soluzione di SDS	<i>pag. 68</i>
4.3.1.4 Pro ³ -TL in soluzione di DPC	<i>pag. 68</i>
4.3.2 Disposizione relativa alle micelle	<i>pag. 69</i>
4.4 TL e Pro ³ -TL: Studio dell'attività emolitica	<i>pag. 70</i>
4.4.1 Titolazione di TL e Pro ³ -TL in soluzione di DPC	<i>pag. 70</i>
4.4.2 Simulazioni di Dinamica Molecolare di TL e Pro ³ -TL in micelle di DPC	<i>pag. 72</i>
4.4.2.1 Comportamento conformazionale	<i>pag. 72</i>
4.4.2.2 Posizione relativa peptide-micella	<i>pag. 74</i>
4.4.2.3 Interazione peptide-micella	<i>pag. 76</i>
4.4.2.4 Influenza del peptide sulla forma della micella	<i>pag. 79</i>
4.5 Relazioni Conformazione-Attività	<i>pag. 80</i>
4.6 Conclusioni	<i>pag. 90</i>
4.7 Serie D: progettazione e caratterizzazione biologica	<i>pag. 91</i>

4.8 Sezione Sperimentale	<i>pag. 93</i>
4.8.1 Preparazione del campione	<i>pag. 93</i>
4.8.2 Microorganismi	<i>pag. 94</i>
4.8.3 Saggi antimicrobici	<i>pag. 95</i>
4.8.4 Saggi emolitici	<i>pag. 95</i>
4.8.5 Materiale per gli studi spettroscopici	<i>pag. 96</i>
4.8.6 Dicroismo Circolare	<i>pag. 96</i>
4.8.7 Spettroscopia NMR	<i>pag. 97</i>
4.8.8 Esperimenti di Spin-Label	<i>pag. 105</i>
4.8.9 Determinazioni strutturali e calcoli di modellistica	<i>pag. 106</i>
4.8.10 Simulazioni di Dinamica Molecolare	<i>pag. 107</i>
ABBREVIAZIONI	<i>pag. 109</i>
BIBLIOGRAFIA	<i>pag. 110</i>
PUBBLICAZIONI	<i>pag. 130</i>

SOMMARIO

La presenza di agenti patogeni costituisce un problema di vecchia data nell'insorgenza di infezioni di varia tipologia; pertanto nel corso del tempo è accresciuto l'interesse verso forme batteriche, funginee, virali, al fine di circoscrivere o debellare le infezioni da essi causate.

I farmaci antibatterici rappresentano la classe di farmaci più utilizzata, il cui impiego è stato però caratterizzato da un uso eccessivo ed errato, tale da provocare l'insorgenza di patogeni resistenti agli antibiotici e da richiedere lo sviluppo di nuovi farmaci.

In tale ottica il presente lavoro di ricerca ha riguardato lo studio del comportamento conformazionale, mediante tecniche spettroscopiche (CD e NMR) e simulazioni di dinamica molecolare, dei seguenti peptidi antimicrobici: Temporina L, Temporina A ed i derivati dell'ormone α -MSH.

Sulla base dei risultati conformazionali ottenuti per questi peptidi la seconda parte del progetto si è focalizzata essenzialmente sul design razionale e sull'analisi conformazionale di nuovi analoghi. Sia l'attività biologica che il comportamento conformazionale di tali analoghi sono risultati in accordo con la progettazione effettuata, rappresentando il punto di partenza per lo sviluppo di altre interessanti molecole potenzialmente utilizzabili nelle terapie come agenti anti-infettivi o, eventualmente, in qualità di conservanti alimentari.

Tale progettazione ha inoltre portato ad alcuni derivati della Temporina L con elevata attività antimicrobica (antibatterica e/o antifungina) e con ridotta tossicità (valutata come effetto emolitico).

INTRODUZIONE

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.

Al giorno d'oggi gli antibatterici rappresentano la classe di farmaci più utilizzata, il cui impiego è stato però caratterizzato da un uso smodato. Conseguenza inevitabile dell'intenso uso di antibatterici è stata l'insorgenza di patogeni resistenti agli antibiotici; insorgenza che costituisce 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:

- Il farmaco non raggiunge il suo bersaglio;
- Il farmaco viene disattivato;
- 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 fluorochinolonic).
- modificazioni del bersaglio (es. resistenza ai macrolidi alle tetracicline per protezione ribosomiale).
- sostituzione, da parte del patogeno, del bersaglio naturale 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 quali *Pseudomonas aeruginosa*, che risulta resistente a svariati tipi di antibiotici in quanto privo delle classiche porine ad elevata permeabilità ed ancora *Escherichia Coli*, e *Neisseria gonorrhoeae* che presentano sistemi di pompe di estrusione del farmaco impedendone l'azione [1].

Per questo nel corso dell'ultimo decennio, 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 e ciò conferisce loro un ruolo d'elezione in quanto molecole potenzialmente utilizzabili nelle terapie come agenti anti-infettivi [2] o, eventualmente, in qualità di conservanti alimentari [3].

In tale ambito il presente lavoro di ricerca è stato incentrato sull'analisi conformazionale e la progettazione di nuovi analoghi di peptidi antimicrobici noti:

- ormone α -MSH.
- Temporine.

CAPITOLO I

I Peptidi Antimicrobici

AMPs

1.1 Caratteristiche dei Peptidi Antimicrobici AMPs

I peptidi antimicrobici sono codificati da specifici geni implicati nella risposta immune innata, tipica di tutti gli esseri viventi [4]. Un numero sempre crescente di queste molecole è stato isolato da un vasto insieme di sorgenti biologiche, sia da organismi procarioti che eucarioti, incluso l'uomo. Questi peptidi proteggono gli organismi dall'invasione di batteri, protozoi, funghi e virus [3,5]. Essi mostrano un'estrema diversità nelle loro strutture primarie e secondarie, e solitamente hanno uno spettro d'azione piuttosto ampio per quanto riguarda l'attività antimicrobica. Studi accurati effettuati da Hans Boman hanno evidenziato che la scarsa selettività e la velocità nell'uccidere i microbi sono caratteristiche peculiari del meccanismo di difesa di tali peptidi, e li rendono una sorta di sistema immunitario "istantaneo" contro l'invasione dei patogeni. Questa risposta immediata alle infezioni svolge un ruolo importante non solo negli invertebrati, la cui difesa dipende esclusivamente da essa, ma anche nei vertebrati superiori, dove entra in azione prima che si attivi l'immunità specifica [6,7]. Gli AMPs sono presenti in diversi organismi, quali piante, insetti, mammiferi ma soprattutto anfibi, e presentano 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 aminoacidici, 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.

1.2 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 classi principali, sulla base della composizione e della struttura secondaria:

- ∅ peptidi contenenti cisteina [8,9];
- ∅ peptidi contenenti un'elevata percentuale di residui specifici;
- ∅ peptidi contenenti sequenza lineare, elevata percentuale ad α -elica [10-12].

Alla prima classe appartengono peptidi con struttura a foglietto β che presentano un elevato numero di residui di Cys, le cui posizioni sono conservate all'interno delle varie famiglie, come ad esempio le Defensine.

Alla seconda classe appartengono peptidi con elevata percentuale di residui specifici, come nel caso dei peptidi bovini Bac5 e i Bac7, ricchi di Pro e Arg. Infine sono inclusi nella classe di peptidi lineari contenuti un'elevata percentuale di α -elica numerosissimi peptidi antimicrobici quali Cecropine, Magainine, Temporine, Bombinine.

1.2.1 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 foglietto β .

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 dei fagociti.

E' stato possibile isolare dai neutrofilo 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.

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 AMPs, le Defensine esplicano la loro azione formando sulla membrana della cellula batterica dei veri e propri pori multimerici che provocano la lisi delle vescicole lipidiche.

Tachiplesine: peptidi sintetizzati dal crostaceo giapponese *Tachypleus tridentatus*, e immagazzinati nei granuli di tali cellule, aventi sequenze di 17-18 residui aminoacidici.

Strutturalmente presentano una struttura a foglietto- β antiparallelo stabilizzata da due ponti disolfuro tra i residui di cisteina 4-17 e 8-13. 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, caratteristici di tali peptidi, con i gruppi fosforici del glicolipide del LPS.

∞ Peptidi aventi un ponte disolfuro che adottano una struttura a loop.

Bactenecina: peptidi isolati dai neutrofilii 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 Gram-negativi; ma esercitano un'attività citotossica su cellule neuronali e gliali.

Brevinine-1, 2: peptidi 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 amfipatica e il ponte disolfuro dà luogo ad un anello nella regione C-terminale.

Le Brevinine-1 derivano da un precursore di 71 residui, e sono costituite da una sequenza aminoacidica di 24 residui.

Le Brevinine-2 sono, invece, costituite da 28-30 residui amminoacidici e derivano da precursori di 68-74 residui. Tali molecole presentano attività nei confronti di ceppi Gram-positivi e Gram-negativi; ed inoltre le Brevinine-1 esplicano la loro attività anche nei confronti di alcuni lieviti, quali *Candida albicans*. Presentano, però carattere emolitico.

Esculetine: peptidi isolati dalla secrezione ghiandolare 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'elevata attività nei confronti sia di ceppi Gram-positivi che Gram-negativi.

1.2.2 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 loro particolari caratteristiche strutturali.

Apidecine: peptidi isolati dall'emolinfa di *Api mellifera*, sono costituiti da 18 residui caratterizzati da un elevato contenuto di Pro (29%) e di Arg (17%). Sono particolarmente attive contro batteri Gram-negativi.

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 amfipatica in ambienti idrofobici. Oltre all'attività antimicrobica, inibiscono la replicazione del virus *Herpes simplex*.

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

Appartengono a questa classe la maggioranza di peptidi antimicrobici.

Cecropine: peptidi isolati 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%.

E' stato dimostrato che le Cecropine isolate dagli insetti esplicano la loro attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram-negativi mediante la formazione di canali atti a dissipare il gradiente elettrochimico. Per quanto riguarda la Cecropina P1 è stato, invece, ipotizzato un meccanismo d'azione di tipo detergente in cui i monomeri ad α -elica amfipatica si dispongono a ridosso del doppio strato lipidico in modo tale da disintegrarlo.

Melittine: peptidi isolati 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 amfipatica. Il meccanismo d'azione identificato per le Melittine è di tipo "Barrel Stave" (paragrafo 1.3), 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 possono danneggiare anche cellule eucariotiche, come i fibroblasti di topo, agendo come co-mitogeni.

Magainine: peptidi 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. Il meccanismo d'azione di tali peptidi varia a seconda della concentrazione dello stesso. 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: peptidi secreti dalla pelle delle rane sudafricane della sottofamiglia *Phyllomedusinae*. Costituite da circa 27 residui presentano un'elevata percentuale di strutturazione ad α -elica amfipatica.

Bombinine: peptidi secreti dalla pelle della *Rana variegata*, sono peptidi aventi attività antimicrobica contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi ed attività citotossica contro gli eritrociti. 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. Esse 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-alloisoleucina in seconda posizione, Leu o Met in ottava. Inoltre la presenza di un D-amminoacido rappresenta la caratteristica peculiare di queste molecole, in quanto, ad oggi non sono mai stati isolati in natura altri composti contenenti D-amminoacidi aventi attività antimicrobica.

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 di sequenza con le Melittine. Questa famiglia di peptidi sarà trattata dettagliatamente nel Capitolo IV.

1.3 Meccanismo d'azione degli AMPs

Il meccanismo d'azione dei peptidi antimicrobici naturali non è stato completamente chiarito. Si crede che la maggior parte di questi peptidi eserciti la propria azione antimicrobica interagendo con la membrana batterica. Quest'ultima risulta, infatti, prioritariamente formata da notevoli quantità di fosfolipidi carichi negativamente, quali fosfatidilglicerolo, cardiolipina (bisfosfatidilglicerolo) [13]. Ciò la rende facilmente attaccabile dagli AMPs che possiedono un'elevata carica netta positiva dovuta alla presenza di un gran numero di residui basici [14,15].

Un ulteriore fattore destabilizzante la membrana del patogeno è costituito dal potenziale transmembranario delle cellule batteriche, altamente negativo che può facilitare la formazione di canali ionici [16-18].

Vi sono diversi meccanismi d'azione ipotizzati per tali peptidi:

☞ **“Barrel stave”**. Meccanismo secondo cui tali peptidi cationici a contatto con le membrane batteriche, si organizzano nella formazione di un poro transmembranario. 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 poro.[19-21]. (Figura 1.1 A).

☞ **“Carpet like”**. Tale meccanismo prevede che il lato carico della catena peptidica interagisca con le teste anioniche dei fosfolipidi della membrana batterica, formando un tappeto che si estende sulla superficie della membrana bersaglio. In tal modo l'area superficiale dello strato lipidico si assottiglia e si espande, in corrispondenza lo strato interno, portando alla distruzione del doppio strato fosfolipidico tramite la formazione di veri e propri disgregati. (Figura 1.1 B) [21,22,23].

☞ **“Toroidal, wormhole”**. Il modello toroidale, prevede la curvatura continua da un lato all'altro del doppio strato dei fosfolipidi, in seguito all'interazione del peptide sulla membrana, 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 1.1 C) [24,25].

Lo step principale di tutti questi meccanismi prevede l'adsorbimento delle catene peptidiche sull'interfaccia della membrana e la formazione di una struttura secondaria del peptide adsorbito [26,30].

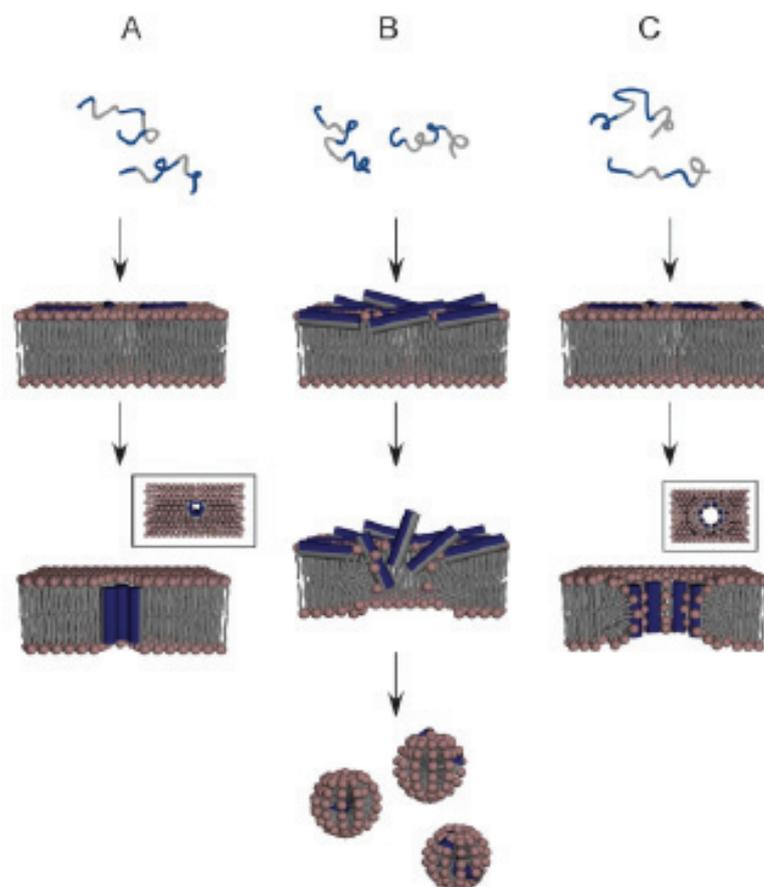


Figura 1.1. A) meccanismo d'azione "barrel-stave" B) meccanismo d'azione "carpet-like" C) meccanismo d'azione toroidal "wormhole". I peptidi sono rappresentati in blu.

CAPITOLO II

Metodiche Generali

2.1 Studi Strutturali

La sequenza aminoacidica di un peptide ne determina sia la specifica attività biologica sia il suo spazio conformazionale; la tendenza del peptide ad assumere certe conformazioni dipende dalla sua costituzione chimica. Uno degli scopi degli studi conformazionali di peptidi in soluzione è proprio la possibile determinazione della conformazione bioattiva. Lo studio della struttura di proteine e peptidi viene generalmente effettuato allo stato solido, per mezzo di metodi diffrattometrici o in soluzione, utilizzando tecniche di dicroismo circolare (CD) e risonanza magnetica nucleare (NMR).

2.1.1 Analisi Conformazionale di molecole di interesse biologico 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, cioè 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 i legami ammidici del backbone peptidico e le catene laterali aromatiche. Polipeptidi e proteine hanno regioni dove i cromofori peptidici sono altamente ordinati, come le strutture ad α -elica e/o β -sheet. In conseguenza dell'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. Come conseguenza molte strutture secondarie comuni come le α -elica, β -turn e β -sheet hanno molti spettri CD caratteristici [31]. Gli spettri di polipeptidi rappresentativi con le loro conformazioni sono mostrati in Figura 2.1.

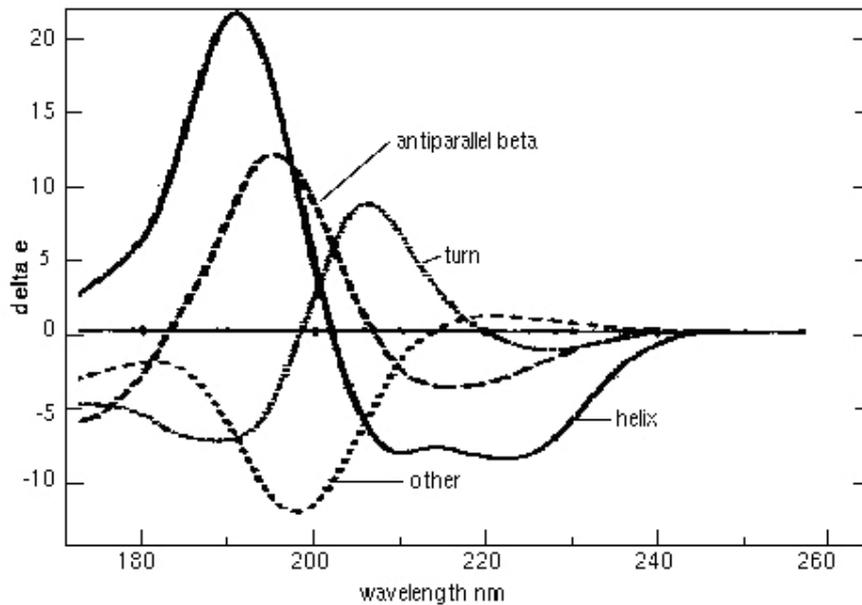


Figura 2.1. Spettri CD di strutture rappresentative.

In particolare l' α -elica presenta due minimi negativi a 222 e 208 nm ed assume valori positivi tra 200 e 190 nm, mentre strutture β -sheet presentano un minimo negativo intorno a 216 nm. Invece peptidi non strutturati presentano un tipico spettro CD con minimo intorno a 195 nm.

I risultati ottenuti mediante questa tecnica danno informazioni sulle percentuali di strutture secondarie presenti nei polipeptidi anche se non è possibile stabilirne la posizione nella sequenza, per cui sono scarsamente utili ai fini del calcolo strutturale, ma 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.

2.1.2 Analisi conformazionale di molecole di interesse biologico mediante NMR.

Il primo passo nello studio strutturale di qualsiasi molecola mediante NMR è quello di assegnare tutte le risonanze relative ai protoni ed, eventualmente, altri nuclei dotati di momento magnetico. Il principale metodo di assegnazione delle risonanze protoniche di peptidi e proteine è quello denominato "sequenziale". Questo metodo introdotto per la prima volta da Wüthrich e coll. nello studio della BPTI [32], è basato sull'utilizzo di due tipi di esperimenti:

- 1) esperimenti che danno informazioni sulle relazioni lungo i legami.
- 2) esperimenti che danno informazioni sulle relazioni attraverso lo spazio.

Per l'assegnazione del tipo di residuo si utilizzano soprattutto esperimenti di correlazione: COSY [33], DQF-COSY [33], TOCSY [34] etc. Questi esperimenti permettono di raggruppare le risonanze che appartengono ai singoli aminoacidi, poiché vengono mostrate solo le relazioni intraresiduo, così come permettono di identificare le classi di spin degli aminoacidi cui appartengono. Gli aminoacidi Gly, Ala, Thr, Leu, Ile e Val si considerano a sistema di spin unico, di conseguenza la loro identificazione è abbastanza immediata; Asp, Asn e Cys, insieme ai protoni alifatici di His, Phe, Tyr, e Trp appartengono tutti alla classe del sistema di spin AMX (cioè un protone H_α e due protoni H_β); poi si considera il gruppo di Glu, Gln, Met e quello dei sistemi di spin a catena lunga che

comprendono Arg, Lys e Pro. Il più semplice esperimento di correlazione è l'esperimento COSY (spettroscopia di correlazione omonucleare bidimensionale), descritto per la prima volta nel 1976, che mostra solo le correlazioni dirette attraverso i legami. Così, per un residuo avente come protoni NH, H_α, H_β e H_γ, sono presenti correlazioni solo fra l'NH e l'H_α, l'H_α ed il H_β, e tra il H_β ed il H_γ. Questo esperimento di base è ora stato superato da esperimenti molto più sofisticati, come ad esempio il DQF-COSY (spettroscopia di correlazione omonucleare bidimensionale con filtro a doppio quanto), che ha il vantaggio di mostrare le diagonali in puro assorbimento di fase. Presi da soli, questi esperimenti che mostrano solo le correlazioni dirette attraverso i legami, sono di utilità limitata, a causa dei problemi di sovrapposizione spettrale; tale sovrapposizione aumenta procedendo dalla regione degli NH e degli H_α alle catene laterali. Per questo motivo risultano molto utili quegli esperimenti che mostrano anche le correlazioni indirette o relayed, cioè trasmesse in più stadi attraverso i legami, come gli esperimenti COSY-RELAYED o TOCSY. Quest'ultimo esperimento è particolarmente utile in quanto, aggiustando il parametro del tempo di miscelamento, è possibile ottenere, a scelta, correlazioni dirette o a relay singolo, doppio o multiplo; inoltre nel TOCSY le componenti dei multipletti dei *cross-peaks* sono tutte in fase, hanno cioè lo stesso segno, mentre in esperimenti di tipo COSY sono in antifase. Questo comporta che l'esperimento di tipo TOCSY sia notevolmente più sensibile ed offra anche una risoluzione migliore rispetto agli esperimenti di tipo COSY. Una volta identificati i sistemi di spin, si può procedere sistematicamente nella ricerca dei contatti sequenziali tra

sistemi di spin vicini. Tali informazioni si ottengono dall'analisi delle regioni degli spettri NOESY [35] contenenti i *cross-peaks*: NH-NH, NH-H_α, NH-H_β. In pratica si ha bisogno sia del NOESY che del COSY, è necessario, infatti, collegare continuamente le informazioni sulle relazioni attraverso i legami e quelle attraverso lo spazio.

Combinando gli spettri NOESY e COSY, data la simmetria dei due spettri rispetto alla diagonale è possibile riportarli in un unico diagramma come due matrici triangolari. Partendo da una risonanza NH dello spettro COSY è possibile individuare il picco H_α corrispondente, appartenente allo stesso residuo; alla frequenza di questo H_α nello spettro NOESY si troverà quasi certamente un picco NH che corrisponde al residuo successivo. Questi due nuclei, infatti, si trovano generalmente abbastanza vicini nello spazio; in particolare la loro separazione spaziale dipende in modo dettagliato dalla struttura secondaria, ed è minima in tratti di struttura di tipo β, ma possiamo avere effetti di una certa intensità anche per altre situazioni conformazionali. Continuando a passare dal NOESY al COSY si possono individuare tutti i residui successivi, per lo meno fino ad incontrare una prolina. Anche in questo caso in realtà si può supplire alla mancanza della risonanza NH sfruttando la vicinanza tra protoni δ dell'anello prolinico e l'H_α del residuo precedente.

Gli effetti Overhauser (NOE) dovuti a distanze H_α-NH, sono utili soprattutto per l'assegnazione sequenziale di tratti di *β-sheets*; nel caso di tratti elicoidali sono più intensi e più utili diagnosticamente gli effetti derivanti da distanze corte NH-NH.

2.1.3 Parametri spettrali nella risonanza magnetica nucleare

Una volta effettuato l'assegnazione sequenziale si procede alla raccolta di parametri utilizzabili per l'analisi conformazionale quali: costanti di accoppiamento, velocità di scambio dei protoni ammidici, coefficienti di temperatura degli stessi protoni ed effetti NOE.

Le costanti di accoppiamento J ed in particolare le costanti ${}^3J_{H\alpha-NH}$ danno informazioni circa gli angoli diedri della molecola. Relazioni del tipo di quelle originariamente proposte da Karplus [36], opportunamente parametrizzate, consentono di ottenere informazioni sull'angolo phi (ϕ) dell' i^{mo} aminoacido. Pardi e Coll [37] hanno utilizzato la struttura ai raggi X di una proteina (BPTI) per calibrare i parametri della costante di accoppiamento vicinale ${}^3J_{H\alpha-NH}$. Questa costante è la più semplice da determinare sperimentalmente, misurando la separazione delle componenti in antifase dei cross-peak $NH_i-H_{\alpha i}$ in esperimenti di tipo COSY. L'equazione di Pardi è la seguente: ${}^3J_{H\alpha-NH} = 6.4\cos^2\phi - 1.4\cos\phi + 1.9$. I valori di ${}^3J_{H\alpha-NH}$ minori di 6Hz e maggiori di 9Hz corrispondono ad intervalli degli angoli torsionali rispettivamente, da -10 a -90 e da -80 a -180°. Tuttavia queste relazioni danno risultati univoci solamente per valori grandi delle costanti di accoppiamento (8-10Hz). Per valori intermedi delle costanti di accoppiamento si hanno invece risultati incerti perché parecchi angoli diedri possono corrispondere ad una certa costante; inoltre, per piccoli peptidi in soluzione, i valori delle costanti di accoppiamento possono essere una media di valori derivanti da più conformazioni in soluzione (ripiegate ed estese) in veloce equilibrio tra loro. Nell'analisi conformazionale dei peptidi, i parametri spettrali

legati ai protoni ammidici possono essere di un certo valore diagnostico, *chemical shifts* di protoni maggiori di 8.5 ppm sono indizio di un possibile coinvolgimento in un legame a idrogeno. I legami idrogeno rappresentano il principale fattore di stabilizzazione delle strutture di peptidi e proteine e, inoltre, i principali tipi di struttura secondaria (*α -eliche*, *β -sheets* e *turn*) sono generalmente associati a caratteristici pattern di ponti idrogeno. La presenza di particolari legami idrogeno può essere valutata misurando la velocità di scambio col deuterio dei protoni ammidici. E', infatti, noto che, nella maggior parte dei casi, i protoni ammidici che sono "protetti" dal solvente sono impegnati in legami idrogeno e, di conseguenza, i parametri che danno informazioni sulla loro accessibilità al solvente rappresentano dei buoni indicatori della formazione di tali legami. Tale velocità di scambio può essere misurata dissolvendo un peptide in D₂O e monitorando la scomparsa dei segnali ammidici in uno spettro monodimensionale o dei relativi picchi di correlazione in spettri bidimensionali. Risultano di particolare importanza per determinare la presenza dei legami ad idrogeno anche i valori dei coefficienti di temperatura dei protoni amidici del backbone. Valori di coefficienti inferiori a 3.0 ppb/K (in valore assoluto) indicano protoni non esposti al solvente e quindi che probabilmente partecipano al legame ad idrogeno. Per ultimi ma più importanti, sono da considerarsi senza dubbio gli effetti NOE intramolecolari, che danno informazioni circa le distanze interprotoniche di atomi vicini nello spazio. In un sistema a due spin costituito dai nuclei A e B, vicini nello spazio, in modo che siano dipolarmente accoppiati, quando si perturbano le popolazioni relative al nucleo A, con l'applicazione di una

grossa sorgente di radio frequenze che ne satura i livelli, si induce un riassetamento delle popolazioni relative anche al nucleo B, per i processi di scambio che intercorrono tra i due nuclei. Si ha così un trasferimento di magnetizzazione tra i due spin, che conduce ad una variazione delle intensità delle linee spettrali del nucleo B. A causa del debole momento magnetico protonico e della dipendenza dalla distanza internucleare di un fattore r^{-6} , gli effetti NOE possono essere misurati solo fra protoni che sono ad una distanza relativamente corta ($\sim 5\text{\AA}$). Con l'uso di opportune procedure, tali NOE possono dunque essere tradotti in vincoli sulle distanze interprotoniche. Il dato certo è che ad un certo valore dell'effetto NOE corrisponde una certa distanza interprotonica compresa in un dato intervallo di valori (upper e lower limits). L'intervallo di distanza costituisce l'incertezza della misura e violazioni dei limiti inferiori e superiori di tali intervalli sono presi come criterio per valutare la qualità dei modelli della molecola, ottenuti dagli algoritmi dei computer.

Gli elementi regolari di una struttura secondaria possono già essere facilmente identificati in base ad un'interpretazione qualitativa degli effetti NOE sequenziali. Infatti, ogni tipo di struttura secondaria è caratterizzato da uno schema particolare di NOE del tipo short e *medium-range*, cioè fra residui lontani fra loro non più di cinque legami nella sequenza. Le α -eliche sono caratterizzate da una serie di effetti NOE di intensità forte o media del tipo $\text{NH}_i\text{-NH}_{i+1}$, $\text{NH}_i\text{-NH}_{i+2}$, $\text{H}_{\beta i}\text{-NH}_{i+1}$, $\text{H}_{\alpha i}\text{-NH}_{i+3}$, $\text{H}_{\alpha i}\text{-NH}_{i+4}$, $\text{H}_{\alpha i}\text{-H}_{\beta i+3}$, e da effetti deboli $\text{H}_{\alpha i}\text{-NH}_{i+1}$. Le strutture β invece, sono caratterizzate da forti $\text{H}_{\alpha i}\text{-NH}_{i+1}$ e dall'assenza di altri effetti short-range. Tali strutture β possono essere identificate grazie ad effetti NOE

intercatena di tipo long-range, come ad esempio effetti $H_{\alpha i}-H_{\alpha Nj}$. Una simbologia alternativa per indicare lo stesso NOE è la seguente: $d_{\alpha\alpha}(i, j)$.

Per quanto riguarda i piccoli peptidi, gli elementi di struttura secondaria più ricorrenti sono i *turn* di tipo β e di tipo γ . Tali strutture sono caratterizzate da tipici pattern di effetti NOE e di costanti di accoppiamento ${}^3J_{H_{\alpha}-HN}$ che permettono di risalire ai possibili angoli ϕ e ψ relativi a residui centrali del *turn*. In particolare, per i β -turn il segnale diagnostico è il $H_{\alpha}-HN$ tra i residui $i+1$ ed $i+3$ del turn (Figura 2.2)

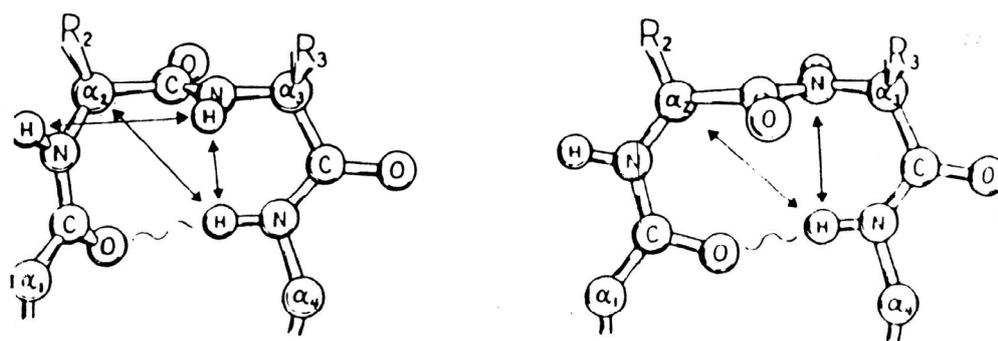


Figura 2.2. NOE caratteristici di un β -turn.

2.2 Calcoli Conformazionali

Una volta ottenuti i dati NMR prima descritti si possono utilizzare al fine di determinare la struttura tridimensionale della molecola. I metodi più utilizzati per il calcolo di strutture sono basati sull'esplorazione di limitate regioni intorno ad un punto iniziale oppure su campionamenti statistici di zone più ampie di spazio conformazionale. La prima classe di metodi, cui appartengono le minimizzazioni energetiche e le simulazioni di dinamica molecolare a temperatura ambiente,

presuppongono strutture di partenza già abbastanza realistiche e rappresentative della regione principale di spazio conformazionale accessibile al sistema. Ad esempio, queste condizioni sono soddisfatte quando, nota la struttura cristallografica di una molecola, si voglia determinare la sua struttura in soluzione, ed esistano evidenze sperimentali che suggeriscano un limitato allontanamento di quest'ultima da quella nota per lo stato solido.

Laddove, invece, non esistano informazioni a priori su una determinata struttura, risulta necessario ricorrere a metodi statistici di campionamento, quali mappature più o meno sistematiche dello spazio conformazionale, metodi di tipo Montecarlo, o simulazioni di dinamica molecolare ad alta temperatura (il cosiddetto “*simulated annealing*”). La procedura definita “*simulated annealing*” consiste nell’effettuare una dinamica molecolare ad elevata temperatura in modo da permettere al peptide di fuoriuscire da eventuali minimi relativi di energia potenziale. Il sistema è alla fine raffreddato lentamente alla temperatura di 0 K.

2.3 Dinamica Molecolare

Si identifica in generale con il termine Dinamica Molecolare (MD) quell’insieme di tecniche computazionali di simulazione che, mediante l’integrazione delle equazioni del moto, permette di studiare la dinamica di evoluzione di un sistema fisico a livello atomico. La dinamica molecolare classica permette di studiare il moto e le proprietà termodinamiche di un sistema di atomi attribuendo ad ognuno di essi un vettore posizione e un vettore velocità.

Essa risolve la semplice equazione di moto di Newton:

$$F_i(t) = m_i a_i(t)$$

dove F_i è la forza che agisce sul atomo i-esimo

m_i è la massa dell'atomo i-esimo

$a_i(t)$ è l'accelerazione dell'atomo i-esimo

La forza può anche essere espressa come gradiente di energia potenziale:

$$F_i = -\Delta_i E$$

Combinando le due equazioni si può calcolare la forza sul atomo i-esimo dalla derivata dell'energia potenziale E rispetto alle sue coordinate r_i :

$$-\left(\frac{dE}{dr_i}\right) = m_i \left(\frac{d^2 r_i}{dt^2}\right)$$

dove E è l'energia potenziale del sistema e r il vettore posizione. L'equazione del moto di Newton può essere quindi relazionata alla derivata dell'energia potenziale al cambiare della posizione in funzione del tempo.

Poniamo il caso che l'accelerazione sia costante:

$$a_i = \frac{dv}{dt}$$

Dopo l'integrazione otteniamo un'espressione per la velocità:

$$v = at + v_0$$

E quindi:

$$v = \frac{dr}{dt}$$

E integrando ulteriormente:

$$r = vt + r_0$$

Combinando questa equazione con l'espressione per la velocità, otteniamo la seguente relazione, che ci dà il valore di r al tempo t come funzione dell'accelerazione a , della posizione iniziale r_0 , e della velocità iniziale v_0 :

$$r = at^2 + v_0t + x_0$$

L'accelerazione è data dalla derivata dell'energia potenziale rispetto alla posizione r :

$$a = -\frac{1}{m} \frac{dE}{dr}$$

Perciò, per calcolare una traiettoria, si ha solo bisogno della posizione iniziale degli atomi, della distribuzione iniziale delle velocità e dell'accelerazione, che è determinata dal gradiente della funzione energia potenziale. Le equazioni del moto sono deterministiche, per cui, ad esempio, le posizioni e le velocità al tempo zero determinano le posizioni e le velocità a tutti gli altri tempi t .

Le posizioni iniziali possono essere ottenute da strutture sperimentali, come le strutture cristallografiche a raggi X o quelle determinate dalla spettroscopia NMR.

Le velocità iniziali vengono assegnate in modo casuale ma con valori conformi alla temperatura del sistema e corretti in modo da avere un momento totale nullo:

$$P = \sum_{i=1}^N m_i v_i = 0$$

Le velocità v_i sono spesso scelte casualmente da una distribuzione di Maxwell Boltzmann a una data temperatura, ne consegue la probabilità che un atomo i abbia una velocità v_x , in direzione x alla temperatura T :

$$P(v_{ix}) = 4\pi n \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{3/2} v^2 e^{-\frac{m_i v_{ix}^2}{2k_B T}}$$

La temperatura può essere calcolata dalle velocità usando la relazione:

$$T = \frac{1}{(3N)} \sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{2m_i}$$

dove N è il numero di atomi del sistema.

L'energia potenziale è una funzione delle posizioni atomiche ($3N$) di tutti gli atomi del sistema. A causa della natura complicata di questa funzione, non ci sono soluzioni analitiche alle equazioni del moto, ma devono essere risolte numericamente.

Generalmente prima di iniziare una simulazione di dinamica molecolare il sistema viene sottoposto a un processo di minimizzazione, dove esso raggiunge una condizione di minimo energetico, che può corrispondere o meno al minimo assoluto del sistema.

Un protocollo di dinamica si articola poi in due fasi, dette di equilibrizzazione termica e di produzione.

Durante fase di equilibrizzazione una struttura, precedentemente minimizzata, viene portata per tappe successive alla temperatura richiesta assegnando una certa velocità iniziale agli atomi componenti il sistema, in modo che la somma delle loro singole energie cinetiche corrisponda all'energia totale del sistema a quella temperatura. A questo punto, attribuita ad ogni atomo una velocità iniziale, è possibile applicare al sistema l'equazione del moto di Newton per poi integrarla agli intervalli di tempo prestabiliti.

Nella fase di produzione le energie cinetiche, e quindi le velocità possedute dai singoli atomi, determinano la variazione delle loro posizioni relative, modificando le lunghezze di legame, le ampiezze degli angoli, dei diedri e le interazioni di non legame, convertendo parzialmente l'energia cinetica in energia potenziale.

CAPITOLO III

L'ormone α -MSH

3.1 Introduzione

L'ormone α -Melanocita stimolante è un peptide lineare endogeno derivato da proopiomelanocortina (POMC). Questo peptide ha una potente attività antinfiammatoria, antipiretica e pigmentale [38-40]. Il riconoscimento e il clonaggio dei cinque recettori melanocortinici (MC1R a MC5R) [41-46], che legano α -MSH ed altre melanocortine correlate, hanno migliorato enormemente la conoscenza delle interazioni peptide-cellula target ed hanno aperto nuove possibilità di terapie [47]. Le proprietà antimicrobiche di α -MSH sono state inizialmente considerate per analizzare l'idea che questo agente antinfiammatorio endogeno potrebbe essere anche antifettivo [48]. Infatti, α -MSH è un peptide molto antico che apparve durante l'era Paleozoica, molto prima che apparisse l'immunità adattativa, e mostra similitudini coi peptidi antimicrobici naturali conosciuti: è prodotto dalla barriera epiteliale [49-51] ed ha carica positiva. Si è scoperto che α -MSH e il suo tripeptide C-terminale Lys-Pro-Val hanno un'attività antimicrobica contro due patogeni rappresentativi *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* [48]. Gli studi suggeriscono che l'attività antimicrobica di α -MSH è esercitata attraverso un meccanismo unico, differente da quello degli altri peptidi antimicrobici naturali. Infatti, precedenti ricerche suggeriscono che l'effetto candidicida di α -MSH è legato all'attività del peptide capace di indurre la produzione di cAMP: α -MSH incrementava la produzione di cAMP in *C. albicans*, mentre l'inibitore ddAdo dell'adenilato ciclasi annullava parzialmente l'effetto candidicida del peptide [48]. E' interessante che questo meccanismo d'azione nel lievito mima l'azione di α -MSH nella cellula di mammifero in cui il

peptide lega i recettori melanocortinici accoppiati a proteina G, attiva l'adenilato ciclasi e aumenta l'cAMP [38]. Poiché sia l'induttore di cAMP Forskolina sia il ddAdo inibitore dell'adenilato ciclasi riducono le colonie di *Candida*, sembra che l'cAMP sia cruciale per la vitalità di *C. albicans* e che sia marcati incrementi che riduzioni di questo mediatore possano ridurre la vitalità del lievito [48]. In uno studio recente mirato all'identificazione di nuovi peptidi melanocortinici candidicidi [52], sono state analizzate le posizioni 7 e 12 del peptide α -MSH (6-13) (peptide **1**, Tabella 3.1). Questo peptide è stato il punto di partenza della mio lavoro, dato che il frammento 6-13 contiene la sequenza centrale His-Phe-Arg-Trp (6-9), che è cruciale per il legame ai recettori melanocortinici [53], e la sequenza Lys-Pro-Val (11-13) è rilevante sia per l'attivazione recettoriale [38], sia per l'attività antimicrobica [54]. La sostituzione Phe-7/D-Nal-7 in α -MSH (6-13) causava un incremento notevole e molto consistente dell'attività [95.3 ± 7.7 % contro il 59.4 ± 15.5 % di α -MSH (6-13)]. L'attività era maggiormente incrementata quando D-Nal-7 è stata associata alla Phe-12 (peptide **2**). Questo peptide uccideva il 100% di *C. albicans* in esperimenti ripetuti (99.7 ± 0.4 %) ed infatti è risultato il composto più promettente della serie. Un'osservazione molto interessante è stata che il peptide contenente Asp-12 (peptide **3**) o Glu-12, due aminoacidi con carica negativa in catena laterale, non aveva attività candidica. L'attività non era ripristinata nemmeno se queste sostituzioni erano associate alla D-Nal-7. Queste osservazioni suggeriscono che, così come per gli altri peptidi antimicrobici [55], una carica negativa nella regione C-terminale impedisce l'interazione peptide-microbo e riduce l'attività antimicrobica. Sulla base di questi precedenti risultati,

il presente lavoro di ricerca ha riguardato l'analisi conformazionale, mediante metodi spettroscopici e computazionali, di α -MSH (6-13) (**1**), del potente derivato candidica [D-Nal-7,Phe-12]- α -MSH(6-13) (**2**) e dell'analogo inattivo [D-Nal-7,Asp-12]- α -MSH (6-13) (**3**).

Tabella.3.1 Peptidi analizzati e loro attività candidica (100 μ M)

peptide	structure	% inhibition	SD
α -MSH (6-13)	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂	59.4	15.5
	H-His- D-Phe -Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂	80.5	27.0
	H-His- D-Nal -Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂	95.3	7.7
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly- Ala -Pro-Val-NH ₂	26.2	29.1
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- Ala -Val-NH ₂	12.8	18.1
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro- Ala -NH ₂	68.4	31.5
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro- D-Val -NH ₂	82.5	26.8
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro- Leu -NH ₂	87.4	22.7
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- D-Ala -Val-NH ₂	46.1	30.0
	H-His- D-Nal -Arg-Trp-Gly-Lys- Ala -Val-NH ₂	28.0	24.5
	H-His- D-Nal -Arg-Trp-Gly-Lys- D-Ala -Val-NH ₂	69.2	27.1
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- Gly -Val-NH ₂	41.8	27.9
	H-His- D-Nal -Arg-Trp-Gly-Lys- Gly -Val-NH ₂	36.2	24.2
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- Ser -Val-NH ₂	32.3	25.5
	H-His- D-Nal -Arg-Trp-Gly-Lys- Ser -Val-NH ₂	73.9	25.0
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- Phe -Val-NH ₂	90.8	9.3
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- D-Phe -Val-NH ₂	97.5	4.2
	H-His- D-Phe -Arg-Trp-Gly-Lys- Phe -Val-NH ₂	89.6	14.5
	H-His- D-Phe -Arg-Trp-Gly-Lys- D-Phe -Val-NH ₂	77.7	31.5
	H-His- D-Nal -Arg-Trp-Gly-Lys- Phe -Val-NH ₂	99.7	0.4
	H-His- D-Nal -Arg-Trp-Gly-Lys- D-Phe -Val-NH ₂	67.7	29.1
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- Asp -Val-NH ₂	5.9	9.1
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- D-Asp -Val-NH ₂	15.7	15.6
	H-His- D-Phe -Arg-Trp-Gly-Lys- Asp -Val-NH ₂	3.7	4.9
	H-His- D-Nal -Arg-Trp-Gly-Lys- Asp -Val-NH ₂	16.8	22.3
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- Glu -Val-NH ₂	11.2	12.7
	H-His- D-Nal -Arg-Trp-Gly-Lys- Glu -Val-NH ₂	32.3	25.6
	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- Lys -Val-NH ₂	41.0	26.9
	H-His- D-Nal -Arg-Trp-Gly-Lys- Lys -Val-NH ₂	83.8	26.9

Le sequenze dei tre peptidi analizzati sono (la numerazione è quella dell' α -MSH):



3.2 Analisi NMR

Il comportamento conformazionale dei peptidi 1-3 è stato analizzato tramite spettroscopia magnetica nucleare (NMR). Gli spettri NMR sono stati registrati in un ambiente che mima le membrane (micelle SDS). Questo ambiente mima le membrane dei batteri cariche negativamente. Inoltre, ipotizzando un meccanismo d'azione mediato da recettore per questi peptidi, è stato proposto un meccanismo di interazione membrana-assistito tra i peptidi e i loro recettori. Secondo questo modello la superficie della membrana gioca un ruolo chiave nel promuovere la transizione del peptide da una conformazione random coil adottata nell'ambiente extracellulare, ad una conformazione che è riconosciuta dal recettore. Un intero set monodimensionale (1D) e bidimensionale (2D) di spettri NMR è stato registrato per questi peptidi. Per controllare l'assenza di stati d'aggregazione dei peptidi, gli spettri sono stati acquisiti in un intervallo di concentrazione di 0.2-2 mM. Non sono stati osservati dei cambiamenti significativi nella distribuzione e nella forma delle risonanze protoniche, indicando che non era avvenuto nessun fenomeno di aggregazione in questo intervallo di concentrazione. Le assegnazioni complete dei chemical shift protonici sono state ottenute secondo la procedura Wüthrich tramite la consueta applicazione sistematica di esperimenti DQF-COSY [33], TOCSY [34] e NOESY [35] con il supporto del pacchetto software XEASY.

3.2.1 Analisi conformazionale di α -MSH (6-13) (1)

Le preferenze conformazionali del peptide precursore **1** sono state esaminate prendendo anche in considerazione i precedenti studi NMR svolti sull'intera sequenza di α -MSH [56-60]. Una serie di contatti NOE *medium* range osservati nello spettro NOESY lungo tutta la sequenza del peptide (accoppiamenti H_{α} - NH_{i+2} tra Phe⁷-Trp⁹, Arg⁸-Gly¹⁰, Trp⁹-Lys¹¹ e Lys¹¹-Val¹³) hanno suggerito la presenza di diverse strutture β -turn consecutive. I forti accoppiamenti tra NH - NH_{i+1} lungo i residui 7-11 e i forti accoppiamenti NH - H_{δ} tra Lys¹¹ e Pro¹² e H_{δ} - NH tra Pro¹² e Val¹³ hanno confermato l'esistenza di queste strutture β -turn.

I vincoli derivati dai dati NMR per il peptide **1** sono stati utilizzati come dati di input per il calcolo di strutture mediante simulated annealing come realizzato dal protocollo standard del programma DYANA [61]. I vincoli ottenuti dai dati NOE sono stati trasformati nelle distanze interprotoniche e queste usate come distanze massime nei procedimenti di annealing per produrre 200 conformazioni. Da queste sono state scelte 50 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) usando il programma DISCOVER (Accelrys, San Diego, CA, USA). Per ogni peptide, è stata scelta per ulteriori analisi una famiglia di 20 strutture, soddisfacente i vincoli ottenuti dai dati NMR (violazioni inferiori a 0.37 Å). Il programma PROMOTIF è stato usato per estrapolare dettagli sulla localizzazione e sui tipi di strutture secondarie presenti [62]. Come previsto dai dati NMR, nel peptide α -MSH (6-13) sono presenti 4 strutture β -turn consecutive (Figura 3.1).

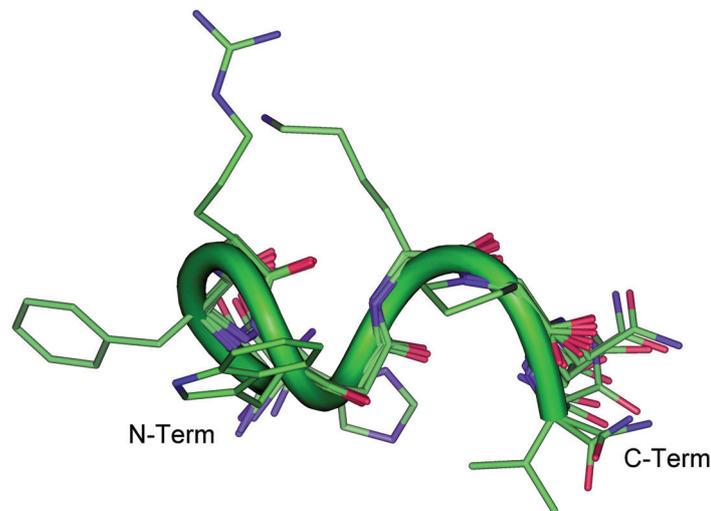


Figura.3.1. Sovrapposizione delle 10 strutture a più bassa energia del peptide1. La sovrapposizione è stata effettuata sugli atomi del backbone dei residui 7-12 (evidenziati come nastri). Per chiarezza sono mostrate solo le catene laterali di uno dei conformeri. Gli atomi sono mostrati con differenti colori: il carbonio è rappresentato in verde, l'ossigeno in rosso e l'azoto in blu.

In particolare, sono osservabili strutture β -turn consecutive intorno ai residui 7-10 (tipo III), 8-11 (tipo I), 9-12 (tipo III distorto) e 10-13 (tipo I) ($\varphi_8 = -67 \pm 5$, $\psi_8 = -41 \pm 3$; $\varphi_9 = -76 \pm 3$; $\psi_9 = -26 \pm 2$; $\varphi_{10} = -84 \pm 5$, $\psi_{10} = -1 \pm 15$; $\varphi_{11} = -67 \pm 13$; $\psi_{11} = -46 \pm 6$; $\psi_{12} = -3 \pm 45$). I valori relativamente alti dei coefficienti di temperatura osservati per tutti i protoni amidici del peptide (Tabella 3.2) suggeriscono che questa struttura è piuttosto flessibile ed è in equilibrio con le conformazioni random coil. Infine, le orientazioni della catena laterale dei residui 7-11 sono state ben definite. Come illustrato in figura 3.1, le catene laterali di Arg⁸ e di Lys¹¹ cariche positivamente si orientano dallo stesso lato della molecola, mentre le catene laterali idrofobiche della Phe⁷ e del Trp⁹ si orientano dall'altro lato, delimitando una superficie anfipatica.

Tabella 3.2 Assegnazione delle risonanze NMR^a dei Peptidi **1-3** in soluzione di SDS-d₂₅ 200mM.

Residui	NH (³ J _{αN} , -Δδ/ΔT) ^b	C ^α H	C ^β H	Altri
Peptide 1				
His 6		4.32	3.26	7.37 (C ^δ H); 8.62 (C ^ε H)
Phe 7	8.51(5.4, 6.7)	4.59	3.01, 3.09	7.30(C ^δ H); 7.28(C ^ε H)
Arg 8	7.70(5.7, 4.0)	4.14	1.49	1.01(C ^γ H); 2.91(C ^δ H); 6.83 (C ^ε H)
Trp 9	7.20(6.0, 3.0)	4.64	3.12, 3.31	7.24(C ^δ H); 7.46, 9.83(N ^ε H); 6.97, 7.33(C ^ζ H); 7.00(C ^η H)
Gly 10	7.79(5.4, 6.2)	3.84,		
Lys 11	7.71(5.3, 7.5)	4.43	1.65, 1.77	1.40 (C ^γ H)
Pro 12		4.47	2.26, 1.91	1.97(C ^γ H); 3.78, 3.58(C ^δ H)
Val 12	7.87(7.1, 8.0)	4.07	2.09	0.94(C ^γ H)
Peptide 2				
His 6		4.32	2.92, 2.98	6.83 (C ^δ H); 8.22(C ^ε H)
DNal 7	8.62(7.1, 4.5)	4.83	3.03, 3.32	7.52(C ^{δ1} H); 7.74(C ^ε H); 7.80(C ^{δ2} H)
Arg 8	7.78(4.1, 4.3)	3.97	1.07	0.56, 0.72(C ^γ H); 2.64, 2.56(C ^δ H); 6.67 (C ^ε H)
Trp 9	7.74(6.3, 7.5)	4.68	3.40	7.31(C ^δ H); 7.83, 9.92(N ^ε H); 6.99, 7.40 (C ^ζ H); 7.01(C ^η H)
Gly 10	8.16(7.2, 2.5)	3.94		
Lys 11	8.01(4.5, 8.0)	4.09	1.50, 1.62	1.04 (C ^γ H); 1.50 (C ^δ H); 2.82 (C ^ε H); 7.39(C ^ζ H)
Phe 12	8.06(4.7, 5.5)	4.68	3.02, 3.22	7.33(C ^δ H); 7.26 (C ^ε H); 7.17(C ^ζ H)
Val 13	7.67(7.4, 7.5)	4.07	2.08	0.89(C ^γ H);
Peptide 3				
His 6		4.39	3.10, 3.00	6.98 (C ^δ H); 8.33(C ^ε H)
DNal 7	8.74(7.2, 4.5)	4.85	3.29, 3.10	7.82 (C ^{δ1} H); 7.41(C ^ε H);
Arg 8	7.64(4.2, 4.4)	4.03	1.11, 0.93	0.61 (C ^γ H); 2.59, 2.52(C ^δ H); 6.63(C ^ε H)
Trp 9	7.84(6.2, 7.4)	4.68	3.41, 3.33	7.31 (C ^δ H); 7.73, 9.93(N ^ε H); 7.01, 7.40 (C ^ζ H); 7.02(C ^η H)
Gly 10	8.18(7.3, 2.7)	3.92		
Lys 11	7.99(7.2, 6.5)	4.26	1.81	1.40 (C ^γ H); 1.66(C ^δ H);
Asp 12	8.38(7.5, 7.8)	4.74	2.95, 2.74	
Val 13	7.83(7.3, 7.7)	4.07	2.09	0.94 (C ^γ H)

^aOttenuti a 25 °C, pH = 5.5, con TSP (δ 0.00 ppm) come standard. I Chemical shifts sono accurati a ±0.02 ppm. ^b Costanti di accoppiamento ³J_{αN} misurate in Hz.).

3.2.2 Analisi Conformazionale di [D-Nal-7,Phe-12]- α -MSH (6-13)

(2)

Gli spettri NMR del peptide **2** hanno mostrato una buona dispersione delle risonanze protoniche suggerendo un'elevata definizione strutturale. Sono stati osservati alcuni contatti NOE *medium* range nello spettro NOESY del peptide. In particolare, un debole accoppiamento H_{α} -NH_{i+2} tra Arg⁸ e Gly¹⁰ suggerisce la presenza di un β -turn che comprende i residui 7-10. Il forte accoppiamento NH-NH_{i+1} tra i residui 9-10 e l'osservazione del basso coefficiente di temperatura del protone amidico in posizione 10 ($-\Delta\delta/\Delta T = 2.5$ p.p.b./K, Tabella 3.2) supporta l'esistenza di un β -turn intorno ai residui 7-10. L'osservazione di un contatto NOE relativamente forte NH-NH_{i+1} tra il residuo della Phe¹² e Val¹³, e piccole costanti di accoppiamento $^3J_{NH-H\alpha}$ (<5 Hz) per il residuo di Lys¹¹, e Phe¹² indicano la presenza di un secondo β -turn intorno ai residui 10-13 anche se i coefficienti di temperatura dei protoni amidici dei residui 11-13 sono tutti relativamente elevati ($-\Delta\delta/\Delta T > 4.0$ p.p.b./K, Tabella 3.2) indicando che questa struttura turn non è stabilizzata da alcun legame ad idrogeno.

Infine, significativi spostamenti a campi alti sono stati osservati per le risonanze dei H _{β} e H _{γ} di Arg⁸ e di Lys¹¹. Questo fenomeno di schermatura potrebbe essere dovuto all'influenza delle correnti dell'anello aromatico di Trp⁹ e di Phe¹² su Arg⁸ e su Lys¹¹, rispettivamente. In effetti, i diversi accoppiamenti intercatena osservati nello spettro NOESY indicano che la catena laterale di Arg⁸ è spazialmente vicina alla porzione aromatica di Trp⁹ e che la catena laterale di Lys¹¹ è spazialmente vicina all'anello aromatico di Phe¹². I vincoli ottenuti dai dati NMR per il peptide

2 sono stati utilizzati come input per il calcolo di strutture mediante simulated annealing come descritto per il peptide **1**. Come previsto dai vincoli NMR, 18 su 20 strutture mostravano un β -turn intorno i residui 7-10 (distanze tra $H_{\alpha-7}$ e $H_{\alpha-10}$ $< 7 \text{ \AA}$, Figura 3.2).

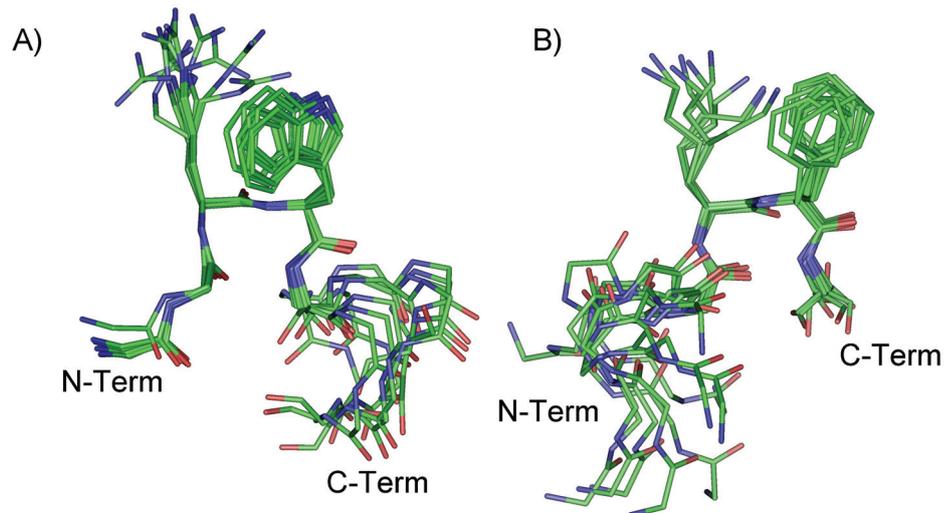


Figura.3.2. Sovrapposizione delle 10 strutture a più bassa energia del peptide **2**. La sovrapposizione è stata effettuata sugli atomi del backbone dei residui 7-10 (A) e 10-13 (B). Per chiarezza sono mostrate solo le catene laterali dei residui 8 e 9 (A), 11 e 12 (B). Gli atomi sono mostrati con differenti colori: il carbonio è rappresentato in verde, l'ossigeno in rosso e l'azoto in blu.

Dall'analisi degli angoli diedri dei residui centrali 8-9 questo turn può essere definito come di tipo I ($\varphi_8 = -58 \pm 4$, $\psi_8 = -35 \pm 3$, $\varphi_9 = -88 \pm 4$, $\psi_9 = -9 \pm 4$). Inoltre 15 strutture calcolate su 20 mostrano un β -turn intorno ai residui 10-13 (Figura 3.2). L'esame degli angoli diedri di residui centrali 11-12 definisce questo turn come un β -turn distorto di tipo III. ($\varphi_{11} = -45 \pm 5$, $\psi_{11} = -74 \pm 7$, $\varphi_{12} = -53 \pm 8$, $\psi_{12} = -35 \pm 8$). Il residuo centrale Gly¹⁰ è meno definito ed estremamente flessibile ($\varphi_{10} = -31 \pm 49$, $\psi_{10} = -7 \pm 38$). Anche le catene laterali dei residui 8-9 e

11-12 sono state ben definite. In particolare, le catene laterali aromatiche di Trp⁹ e di Phe¹² mostrano una forte preferenza per i rotameri *gauche* ($\chi_1 \approx -60^\circ$), mentre le catene laterali di Arg⁸ e Lys¹¹ preferiscono una conformazione *trans* ($\chi_1 \approx -180^\circ$). Come conseguenza la catena laterale di Trp⁹ è spazialmente vicina alla catena laterale di Arg⁸ (Figura 3.2A); similmente, la catena laterale di Phe¹² è spazialmente vicina alla catena laterale di Lys¹¹ (Figura 3.2B). Questo risultato concorda con i NOE osservati e anche con lo spostamento a campi alti osservato per le risonanze H_β e H_γ di Arg⁹ e Lys¹¹ che sono probabilmente dovute all'influenza della corrente dell'anello aromatico su queste risonanze protoniche.

3.2.3 Analisi Conformazionale di [D-Nal-7,Asp-12]-α-MSH(6-13)

(3)

Il peptide **3** differisce dal peptide **2** solo per la sostituzione della Phe¹² con un residuo di aspartato. Inoltre, gli spettri NMR dei due peptidi sono molto simili. In particolare, le risonanze dei protoni dei residui N-terminali sono quasi identiche, indicando una conformazione 3D simile in questa regione. Infatti, gli accoppiamenti NOE diagnostici (H_α-NH_{i+2} tra Arg⁸ e Gly¹⁰, NH-NH_{i+1} tra Trp⁹ e Gly¹⁰) osservati nello spettro NOESY di **2**, sono stati osservati anche nello spettro NOESY di **3** suggerendo la presenza di β-turn intorno ai residui 7-10. Il basso coefficiente di temperatura del protone amidico in posizione 10 ($-\Delta\delta/\Delta T = 2.7$ p.p.b./K, Tabella 3.2) suggerisce l'esistenza di β-turn intorno a questi residui. Inoltre, significativi spostamenti a campi alti sono stati osservati per le risonanze degli H_β e H_γ di Arg⁸ e diversi accoppiamenti intercatena sono stati osservati tra la

catena laterale di Arg⁸ e il sistema aromatico di Trp⁹. In contrasto, non è stato osservato nessun contatto NOE diagnostico per i protoni appartenenti alla regione C-terminale di **3** indicando un alto grado di flessibilità in questa porzione del peptide. I vincoli derivati dai dati NMR per il peptide **3** sono stati usati come input per un calcolo strutturale mediante simulated annealing come descritto sopra. Come supposto dai dati NMR, 17 strutture su 20 (Figura 3.3) mostrano un β -turn intorno ai residui 7-10. Questo turn può essere definito di tipo I ($\varphi_8 = -54 \pm 3$, $\psi_8 = -33 \pm 2$, $\varphi_9 = -114 \pm 2$, $\psi_9 = -8 \pm 3$). Le catene laterali dei residui 8-9 mostrano preferenze dei rotameri simili a quelle osservate nel composto **2**, e ancora, la catena laterale di Trp⁹ è spazialmente vicina alla catena laterale di Arg⁸ (Figura 3.3). Infine, la regione C-terminale che comprende i residui 10-13 non presenta affatto una struttura secondaria definita.

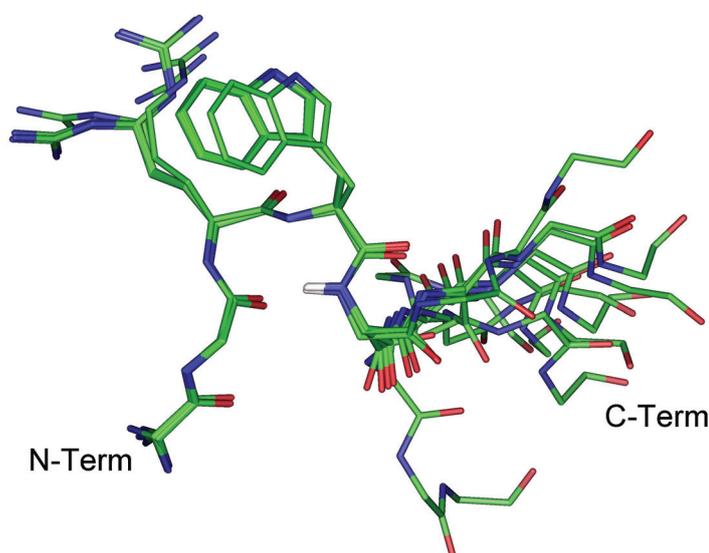


Figura 3.3. Sovrapposizione delle 10 strutture a più bassa energia del peptide **3**. La sovrapposizione è stata effettuata sugli atomi del backbone dei residui 7-10. Per chiarezza sono mostrate solo le catene laterali dei residui 8 e 9. Gli atomi sono mostrati con differenti colori: il carbonio è rappresentato in verde, l'ossigeno in rosso e l'azoto in blu.

3.3 Relazioni Attività-Conformazione

Gli effetti antimicrobici di α -MSH passano attraverso l'incremento dell'cAMP, con rimarcabile similitudine a ciò che avviene nelle cellule di mammifero in cui α -MSH lega i recettori melanocortinici ed esercita la sua influenza principalmente attivando una via cAMP-dipendente [48]. Quindi, α -MSH e le molecole ad esso connesse potrebbero esercitare i loro effetti candidici attraverso un'interferenza nel ciclo cellulare del lievito legandosi ad un recettore melanocortino-simile finora sconosciuto.

L'analisi conformazionale del potente derivato candidica [D-Nal-7,Phe-12]- α -MSH (6-13) (**2**) (% di inibizione del 99.7 ± 0.4 alla concentrazione del peptide di 100 μ M; 35) indica la presenza di due β -turn intorno ai residui 7-10 e 10-13 (tipo I, e il tipo III distorto, rispettivamente). Questi due turn, che possono rappresentare le regioni farmacoforiche, sono legati al residuo glicinico (Gly¹⁰) altamente flessibile che li può orientare nel modo corretto all'interno del recettore putativo. Solo uno di questi due turn (ad esempio quello N-terminale) è indispensabile per l'attività candidica come indicato dall'attività residua del peptide H-His-D-Nal-Arg-Trp-NH₂ (% di inibizione del 43.0 ± 13.4 alla concentrazione del peptide di 100 μ M) e dall'inattività del peptide H-Gly-Lys-Phe-Val-NH₂ (% di inibizione del 5.0 ± 2.6 ; 53). Il turn C-terminale aumenta l'attività di tutto il peptide. Perciò, si può ipotizzare che il turn N-terminale (7-10) è responsabile dell'attivazione del recettore, mentre il turn C-terminale (10-13) opera solamente rafforzando il legame al recettore attraverso interazioni positive con un sito di legame ausiliario. Il peptide **3** è quasi inattivo (% di inibizione del

16.8 ± 22.3 alla concentrazione del peptide di 100 μM, 35). La sostituzione di Phe¹² con un residuo di Asp distrugge il turn C-terminale osservato nell'analogo **2**. Quindi la porzione non strutturata C-terminale può prevenire il legame del peptide col recettore. La carica negativa del residuo di Asp gioca un ruolo cruciale in questo fenomeno. Considerando il peptide precursore α-MSH (6-13) (**1**), sono presenti quattro β-turn consecutivi lungo la sua sequenza. In particolare, i β-turn intorno ai residui 7-10 e 10-13 sono ancora osservabili, come nel peptide **2** più potente. La riduzione dell'attività candidica del peptide **1** (% di inibizione del 59.4 ± 15.5 alla concentrazione del peptide di 100 μM, 35) paragonata al peptide **2**, può essere attribuita sia ai differenti tipi di β-turn osservati in questo peptide (confrontati con il peptide **2**), sia alla ridotta flessibilità del residuo centrale di glicina (Gly¹⁰) che potrebbe porre resistenza al raggiungimento della conformazione bioattiva del peptide. Sicuramente, le interazioni positive di D-Nal⁷ e di Phe¹² col recettore possono anche spiegare l'incremento dell'attività del peptide **2**.

3.4 Conclusioni

In questo studio, viene descritta la relazione conformazione-attività di tre peptidi melanocortino-derivati con differenti attività candidica. I diversi elementi strutturali dei peptidi esaminati sono stati relazionati alla loro attività biologica. Un'ipotesi affascinante riguardo il meccanismo di azione di questi peptidi è stata formulata e si basa sull'interazione di questi peptidi con un recettore, ancora sconosciuto. In accordo con questa ipotesi, residui appartenenti ai β-turn

farmacoforici (β -turn N-terminale è di tipo I, il β -turn C-terminale è di tipo III) interagirebbero rispettivamente con due siti recettoriali diversi: un sito funzionale di legame, responsabile dell'attivazione del recettore, e un sito di legame ausiliario che rafforza il legame. Questi due turn devono essere collegati da un linker flessibile. Questa ipotesi deve essere confermata da nuovi composti, alcuni di essi sono già sotto indagine. In particolare, sono in fase di realizzazione e di studio nuovi analoghi in cui il linker glicinico è stato sostituito con residui più o meno flessibili.

3.5 Sezione Sperimentale

3.5.1 Preparazione del campione

I peptidi in esame sono stati sintetizzati e purificati presso il Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, laboratorio di ricerca del Prof. Grieco [35]. SDS-d₂₅ al 98% è stato ottenuto da Cambridge Isotope Laboratories, Inc (Andover, MA, USA), e acido [(2,2,3,3-tetradeuterio-3-(trimetilsilanil)]-propionico (TSP) è stato ottenuto da MSD Isotopes (Montreal, Canada).

3.5.2 Spettroscopia NMR

I campioni per la spettroscopia NMR sono stati preparati dissolvendo l'appropriata quantità del peptide in 0,45 ml di ¹H₂O (pH 5.5), 0,05 mL di ²H₂O per ottenere una soluzione 1-2 mM di peptidi e 200 mM di SDS-d₂₅. Gli spettri NMR sono stati registrati con uno spettrometro Varian Inova 700 MHz. Tutti gli spettri sono stati registrati alla temperatura di 25°C. Gli spettri NMR

monodimensionali sono stati acquisiti con trasformata di Fourier in quadrature detection e il segnale dell'acqua è stato soppresso mediante un'irradiazione selettiva a bassa frequenza in homogated mode. Gli esperimenti bidimensionali DQF-COSY [32], TOCSY [33] e NOESY [34] sono stati condotti in fase sensitive mode usando la quadrature detection in ω_1 usando il metodo di States [63]. Sono stati acquisiti 4096 punti in t_2 e 512 in t_1 . Per entrambe le dimensioni si è utilizzata una funzione finestra di tipo sen^2 . Gli esperimenti TOCSY sono stati condotti impiegando un mixing time di 70 ms. Gli esperimenti NOESY sono stati registrati a 25 °C con un mixing time compreso in un range di 150-300 msecondi. Gli spettri sono stati calibrati rispetto a TSP (0.00 p.p.m.) come standard interno. Le analisi qualitative e quantitative degli spettri DQF-COSY, TOCSY e NOESY sono state effettuate utilizzando il pacchetto software XEASY [64], i valori $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ sono stati ottenuti dagli spettri 1D $^1\text{H-NMR}$ e 2D DQF-COSY. I coefficienti di temperatura dei chemical shift dei protoni ammidici sono stati calcolati mediante esperimenti 1D $^1\text{H-NMR}$ e 2D DQF-COSY eseguiti a temperature differenti in un range che va da 25° a 35°C mediante regressione lineare.

3.5.3 Determinazioni strutturali e calcoli di modellistica

I vincoli basati sulle distanze NOE sono stati ottenuti dagli spettri NOESY acquisiti con un mixing time di 200 ms. I cross-peaks NOE sono stati integrati con il programma XEASY e sono stati convertiti in upper distance bounds (distanze massime di legame) usando il programma CALIBA compreso nel pacchetto software DYANA [61]. I cross-peaks che si sovrappongono più del 50%, sono

stati usati come deboli vincoli nel calcolo con DYANA. Per ciascun peptide esaminato, sono state prodotte un insieme di 200 strutture con il protocollo standard di simulated annealing del programma DYANA. Sono state scelte 50 strutture, le cui distanze interprotoniche meglio si adattavano alle distanze ottenute dai dati NOE, e poi rifinite attraverso successivi step di calcoli EM, restrained e unrestrained con algoritmo steepest descent, utilizzando il programma Discover (Accelrys, San Diego, CA) e il campo di forza CVFF (consistent valence force field) [65]. Sono stati usati una costante di forza di 32 Kcal/Å, con un valore massimo di 100 Kcal/mol. La minimizzazione è proseguita fino ad ottenere variazioni di energia inferiori a 0,05 Kcal/Å. Questo è stato seguito da 3000 step di minimizzazione totalmente non vincolata. E' stata fissata una costante dielettrica distanza-dipendente pari a $4*r$ per valutare le interazioni elettrostatiche. La minimizzazione ha ridotto l'energia totale delle strutture; nessun residuo è stato trovato nelle regioni non ammesse del Ramachandran plot. Le strutture finali sono state analizzate usando il programma InsightII (Accelrys, San Diego, CA). La rappresentazione grafica è stata eseguita con il programma InsightII (Accelrys, San Diego, CA). L'analisi delle deviazioni rms tra le strutture ad energia minimizzata è stata eseguita con il programma MOLMOL [66]. Il programma PROMOTIF è stato usato per estrarre dettagli sulla posizione e sul tipo di struttura secondaria [62].

CAPITOLO IV

Le Temporine

4.1 Introduzione

4.1.1 Caratteristiche delle Temporine

Le Temporine sono peptidi antimicrobici identificati per la prima volta nel 1996 nella pelle della rana rossa Europea *Rana temporaria* (Tabella 4.1), 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 [67-69].

Tabella 4.1: Classificazione delle Temporine isolate.

Peptide	Source	Sequence		Net charge
		1	10	
Consensus sequence		FLPLIASLLS	KLL	
Temporin A	^o <i>R. temporaria</i>	FLPLIG R VLS	GIL-NH ₂	+2
Temporin B	<i>R. temporaria</i>	LLPIVGN L LK	SLL-NH ₂	+2
Temporin C	<i>R. temporaria</i>	LLPILGNLLN	GLL-NH ₂	+1
Temporin D	<i>R. temporaria</i>	LLPIVGNLLN	SLL-NH ₂	+1
Temporin E	<i>R. temporaria</i>	VLPIIGNLLN	SLL-NH ₂	+1
Temporin F	<i>R. temporaria</i>	FLPLIG K VLS	GIL-NH ₂	+2
Temporin G	<i>R. temporaria</i>	FFPVI G RILN	GIL-NH ₂	+2
Temporin H	<i>R. temporaria</i>	LSP---N L LK	SLL-NH ₂	+2
Temporin K	^o <i>R. temporaria</i>	LLP---N L LK	SLL-NH ₂	+2
Temporin L	<i>R. temporaria</i>	FVQWFS K FLG	RIL-NH ₂	+3
Temporin-1ARa	* <i>R. areolata</i>	FLPIV G RLLS	GLL-NH ₂	+2
Temporin-1AUa	* <i>R. aurora aurora</i>	FLPIIGQLLS	GLL-NH ₂	+1
Temporin-1BYa	* <i>R. boylei</i>	FLPIIA K VLS	GLL-NH ₂	+2
Temporin-1Ca	* <i>R. clamitans</i>	FLPFLA K IILT	GVL-NH ₂	+2
Temporin-1Cb	<i>R. clamitans</i>	FLPFLASLLG	K LL-NH ₂	+2
Temporin-1Cc	<i>R. clamitans</i>	FLPFLASLLT	K VL-NH ₂	+2
Temporin-1Cd	<i>R. clamitans</i>	FLPFLASLLS	K VL-NH ₂	+2
Temporin-1Ce	<i>R. clamitans</i>	FLPFLATLLS	K VL-NH ₂	+2
Temporin-1Ec	^o <i>R. esculenta</i>	FLPVIAGLLS	K LF-NH ₂	+2
Temporin-1Ga	* <i>R. gryllo</i>	SILPTIVSFL	S KVF-NH ₂	+2
Temporin-1Gb	<i>R. gryllo</i>	SILPTIVSFL	S KFL-NH ₂	+2
Temporin-1Ge	<i>R. gryllo</i>	SILPTIVSFL	T KFL-NH ₂	+2
Temporin-1Gd	<i>R. gryllo</i>	FILPLIASFL	S KFL-NH ₂	+2
Temporin-1Ja	^o <i>R. japonica</i>	ILPLVGNLLN	D LL-NH ₂	0
Temporin-1La	* <i>R. luteiventris</i>	VLPLISMALG	K LL-NH ₂	+2
Temporin-1Lb	<i>R. luteiventris</i>	NFLGTLINLA	K KIM-NH ₂	+3
Temporin-1Lc	<i>R. luteiventris</i>	FLPILINLI H	K GLL-NH ₂	+3
Temporin-1Oa	^o <i>R. ornativentris</i>	FLPLLASLFS	R LL-NH ₂	+2
Temporin-1Ob	<i>R. ornativentris</i>	FLPLIG K ILG	TIL-NH ₂	+2
Temporin-1Oc	<i>R. ornativentris</i>	FLPLLASLFS	R LF-NH ₂	+2
Temporin-1Od	<i>R. ornativentris</i>	FLPLLASLFS	GLF-NH ₂	+1
Temporin-1P	* <i>R. pipiens</i>	FLPIV G KLLS	GLL-NH ₂	+2
Temporin-1PLa	* <i>R. palustris</i>	FLPLV G KILS	GLI-NH ₂	+2
Temporin-1PRa	^o <i>R. pirica</i>	ILPILGNLLN	GLL-NH ₂	+1
Temporin-1PRb	<i>R. pirica</i>	ILPILGNLLN	SLL-NH ₂	+1
Temporin-1TGa	^o <i>R. tagoi</i>	FLPIL G KLLS	GIL-NH ₂	+2
Temporin-1Va	* <i>R. virgatipes</i>	FLSSIG K ILG	NLL-NH ₂	+2
Temporin-1Vb	<i>R. virgatipes</i>	FLSIIA K VLG	SFL-NH ₂	+2
Temporin-1Vc	<i>R. virgatipes</i>	FLPLV T MLLG	K LF-NH ₂	+2
Ranatucriin-6	* <i>R. catesbeiana</i>	FISAIASMLG	K FL-NH ₂	+2

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].

La sintesi di tali peptidi risulta regolata a livello trascrizionale dal fattore NF- κ B/I κ B α , ed è stimolata dall'invasione di microorganismi [5,70]. Sono prodotte dalle ghiandole dermali della pelle della *Rana temporaria* prevalentemente localizzate nella regione dorsale dell'animale (Figura 4.1).

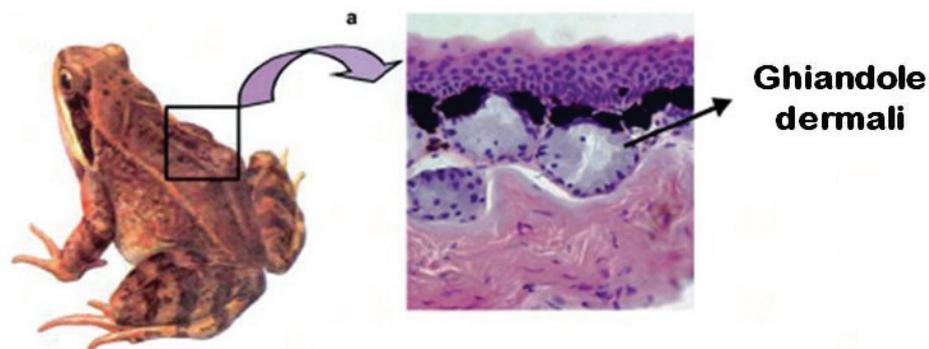


Figura 4.1. Ghiandole dermali della *Rana temporaria*.

Le differenti Temporine finora isolate sono riportate in tabella 4.1. Biosintetizzate come grandi precursori, contengono una singola copia del peptide maturo nella regione C-terminale, ed inoltre presentano una sequenza altamente conservata che include un peptide segnale di 22 residui [67]. Strutturalmente, le Temporine si presentano come peptidi ammidati al carbossile C-terminale e relativamente corti rispetto agli altri AMPs, essendo costituiti da 10-14 residui. Mostrano una carica netta positiva a pH neutro, e una struttura ad α -elica anfipatica in membrane o in

ambienti idrofobici. E' stato possibile individuare per questa classe di AMPs, una sequenza consensus: **FLPLIASLLSKLL-NH₂** [71].

Le Temporine sono risultate particolarmente attive contro i batteri Gram-positivi e specie di *Candida*, ed inoltre presentano la capacità di legare e permeare sia membrane artificiali che biologiche [72-74].

4.1.2 Peptidi Analizzati

A causa del loro differente spettro di attività antimicrobica e tossicità, è stata posta l'attenzione in particolar modo sulla Temporina A (TA) e la Temporina L (TL) (Tabella 4.2). Il comportamento conformazionale dei due peptidi è stato studiato in micelle di sodio dodecilsolfato (SDS) e dodecilsolfocolina (DPC), che mimano rispettivamente le membrane batteriche e di mammifero [75]. Le micelle posseggono un nucleo idrofobico ben definito e un'interfaccia idrofilica come il doppio strato lipidico. Esse sono usate generalmente al posto del mono o doppio strato fosfolipidico in metodi spettroscopici come l'NMR in soluzione [76,77]. Sebbene non c'è una diretta correlazione tra i gruppi polari dell'SDS e quelli dei fosfolipidi che compongono la membrana dei batteri, la micella di SDS è generalmente considerata un buon modello per mimare le membrane dei batteri possedendo un anione sulla superficie esterna e un nucleo più interno idrofobico [78,79] Al contrario, le micelle di DPC sono considerate buoni modelli per le membrane delle cellule eucariotiche, che sono generalmente ricche di fosfolipidi zwitterionici. Sulla base dei risultati conformazionali ottenuti per TA e TL sono stati progettati due nuovi analoghi Gln³-TA e Pro³-TL, le cui differenze nella loro

efficacia contro le specie microbiche e gli eritrociti umani sono risultate essere molto interessanti.

Tabella 4.2 Sequenze dei peptidi analizzati

Peptide	Sequenza
TA	H-Phe ¹ -Leu ² -Pro ³ -Leu ⁴ -Ile ⁵ -Gly ⁶ -Arg ⁷ -Val ⁸ -Leu ⁹ -Ser ¹⁰ -Gly ¹¹ -Ile ¹² -Leu ¹³ -NH ₂
TL	H-Phe ¹ -Val ² -Gln ³ -Trp ⁴ -Phe ⁵ -Ser ⁶ -Lys ⁷ -Phe ⁸ -Leu ⁹ -Gly ¹⁰ -Arg ¹¹ -Ile ¹² -Leu ¹³ -NH ₂
Gln ³ -TA	H-Phe ¹ -Leu ² -Gln ³ -Leu ⁴ -Ile ⁵ -Gly ⁶ -Arg ⁷ -Val ⁸ -Leu ⁹ -Ser ¹⁰ -Gly ¹¹ -Ile ¹² -Leu ¹³ -NH ₂
Pro ³ -TL	H-Phe ¹ -Val ² -Pro ³ -Trp ⁴ -Phe ⁵ -Ser ⁶ -Lys ⁷ -Phe ⁸ -Leu ⁹ -Gly ¹⁰ -Arg ¹¹ -Ile ¹² -Leu ¹³ -NH ₂

Per confrontare i nuovi analoghi con i peptidi genitori, è stato effettuato uno studio conformazionale anche su di essi. Inoltre, poiché l'attività emolitica era drasticamente ridotta passando da TL a Pro³-TL, per meglio comprendere il meccanismo responsabile di tale attività, sono stati effettuati studi di dinamica molecolare per entrambi i peptidi in micelle di DPC.

4.2 Temporina A e Temporina L

4.2.1 Spettroscopia CD

Per analizzare il comportamento conformazionale della TA e TL è stato inizialmente eseguito uno studio CD di questi peptidi in acqua, soluzioni di SDS/acqua e DPC/acqua (Figura 4.2). Gli spettri CD in acqua (pH 7.4) suggeriscono la presenza di conformeri disordinati con un minimo intorno ai 200 nm. Questi risultati sono in linea con i risultati di studi precedenti, che indicano l'assenza di una struttura secondaria definita per TA [80-83] e TL [82,84] 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 anche evidenziate da un minimo a 209 nm più intenso (minimo assoluto) in confronto a quello a 222 nm. Confrontando le soluzioni di SDS e DPC, osserviamo 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 osservati 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.

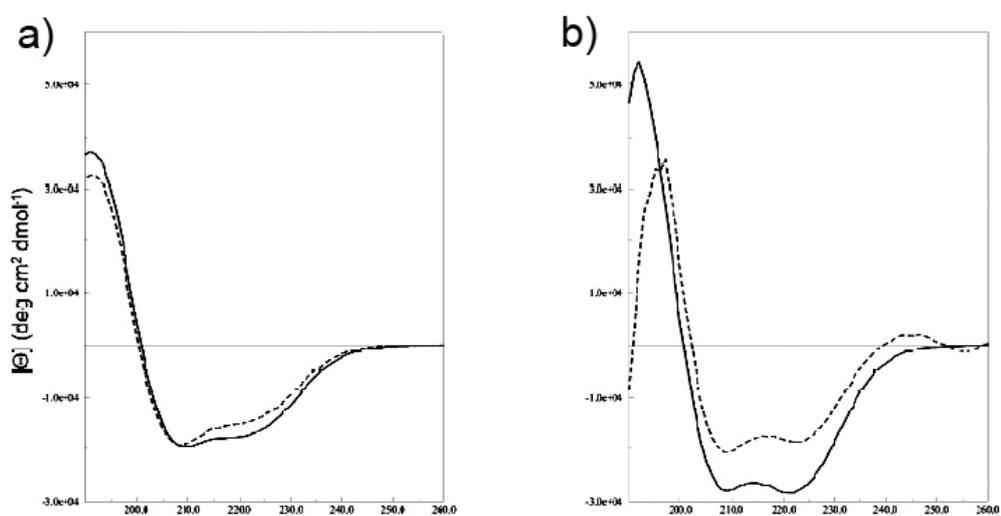


Figura 4.2. Spettri CD di Temporina A (a) e Temporina L (b) in soluzioni di DPC (linea continua) e SDS (linea tratteggiata).

4.2.2 Analisi NMR

4.2.2.1 TL in soluzione di SDS

I parametri NMR diagnostici osservati per TL in soluzione di SDS sono: variazione dei chemical shifts degli H_α (Figura 4.3), contatti NOE diagnostici (Figura 4.4), velocità di scambio degli NH e coefficienti di temperatura (Tabelle 4.13-4.16) 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 [85]. Shifts a campi alti delle risonanze degli H_α rispetto ai valori di random coil sono generalmente trovati per residui implicati in un' α -elica o in turn; e shifts a campi bassi sono osservati per residui implicati nella formazione di β -sheets. Come mostrato in figura 4.3, si osservano spostamenti a campi alti dei segnali NMR H_α , dal residuo 2 al residuo 13.

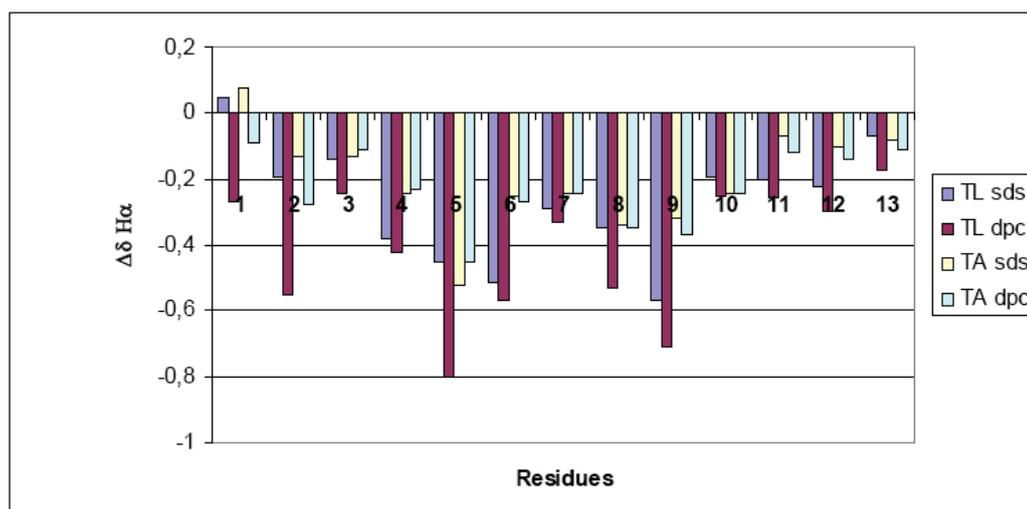


Figura 4.3. Deviazioni dei chemical shift dei protoni H_α dai valori random coil.

Inoltre, una serie di NOE di 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 4.4a). Coerentemente con i risultati CD, tutti questi dati indicano la presenza di un α -elica lungo l'intera sequenza del peptide.

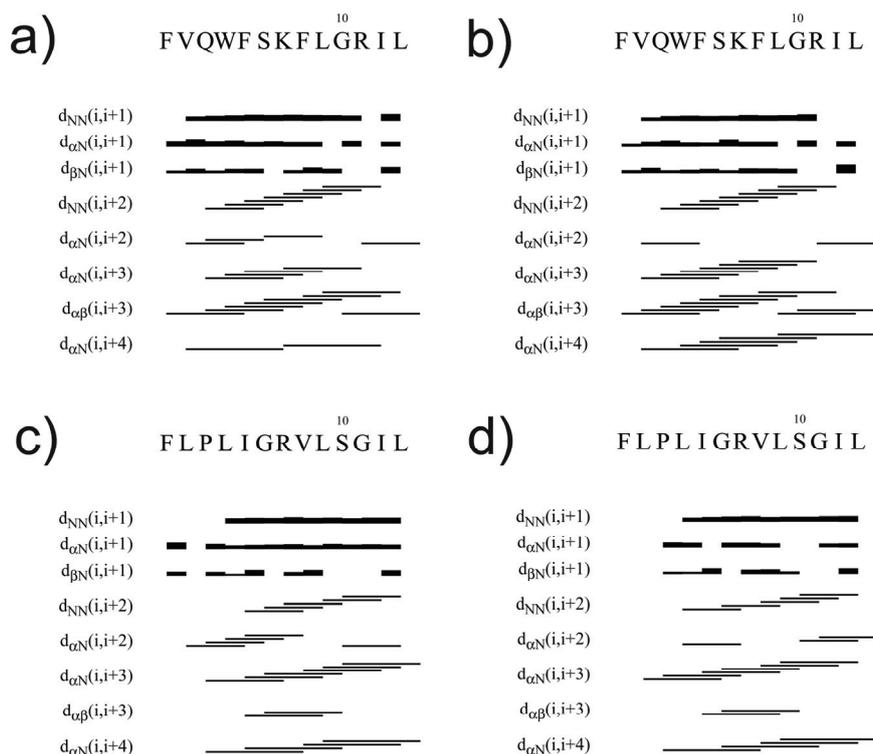


Figura 4.4. Diagramma a barre di TL in SDS (a), TL in DPC (b), TA in SDS (c) e TA in DPC (d).

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.

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. Un insieme di 50 strutture che soddisfano le *constraints* derivanti dall’NMR (violazioni più piccole di 0.50 Å) sono state scelte per ulteriori analisi.

Come mostrato in Figura 4.5a, 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 definito (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.

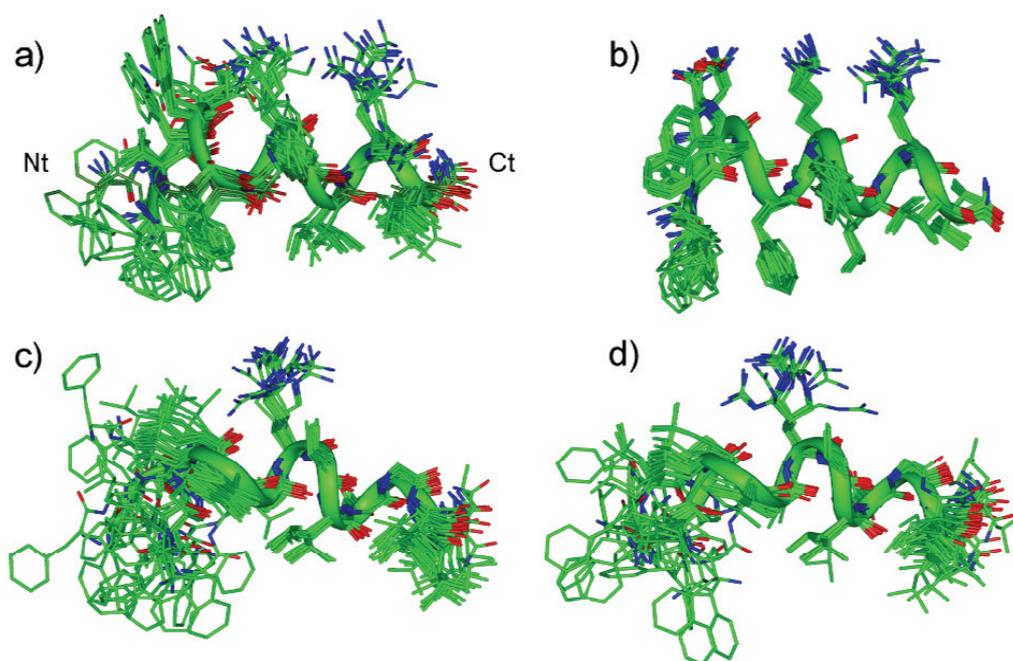


Figura 4.5. Sovrapposizione dei 20 conformeri a più bassa energia di TL in SDS (a), TL in DPC (b), TA in SDS (c) e TA in DPC (d). La sovrapposizione è stata effettuata sugli atomi del backbone dei residui 3-11. Gli atomi sono mostrati con differenti colori (Carbonio verde, Azoto blu, Ossigeno rosso) 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.

4.2.2.2 TL in soluzione di DPC

La Temporina L in soluzione di DPC mostra caratteristiche spettrali 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, si è osservato un numero più alto di connessioni NOE *medium range* (Figura 4.4b), tempi di scambio degli NH più lunghi e coefficienti di temperatura più alti per quasi tutti i residui, che 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 (Figura 4.3). 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: *i*) 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 *ii*) 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 sopra. Per ogni peptide, sono state scelte 50 strutture tra quelle calcolate che soddisfano le constraints derivanti dall'NMR (violazioni più piccole di 0.35 Å). Come mostrato in figura 4.5b, la TL mostra una struttura ad α -elica che comprende tutti i residui (RMSD=0.3 Å sugli atomi del backbone), con certo

grado di solo nella zona C-terminale. Anche l'orientazione delle catene laterali è ben definita (RMSD=0.7 Å per tutti gli atomi).

4.2.2.3. 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 4.3, 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 4.4c) indica 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 4.5c). Pochi conformeri (7/50) mostrano un' α -elica lungo quasi tutta la sequenza (residui 3-12), mentre alcuni (11/50) mostrano 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 centrati sui residui Pro³-Leu⁴ e γ -turn sulla Pro³.

4.2.2.4 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 4.4d), 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 4.3) 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 soddisfano 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 mostrano una struttura β e γ -turn intorno ai residui N-terminali osservati in SDS (Figura 4.5d).

4.2.3 Posizionamento Relativo Peptide-Micella

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 (*spin-labels*): acido 16-doxilstearico e Mn^{2+} .

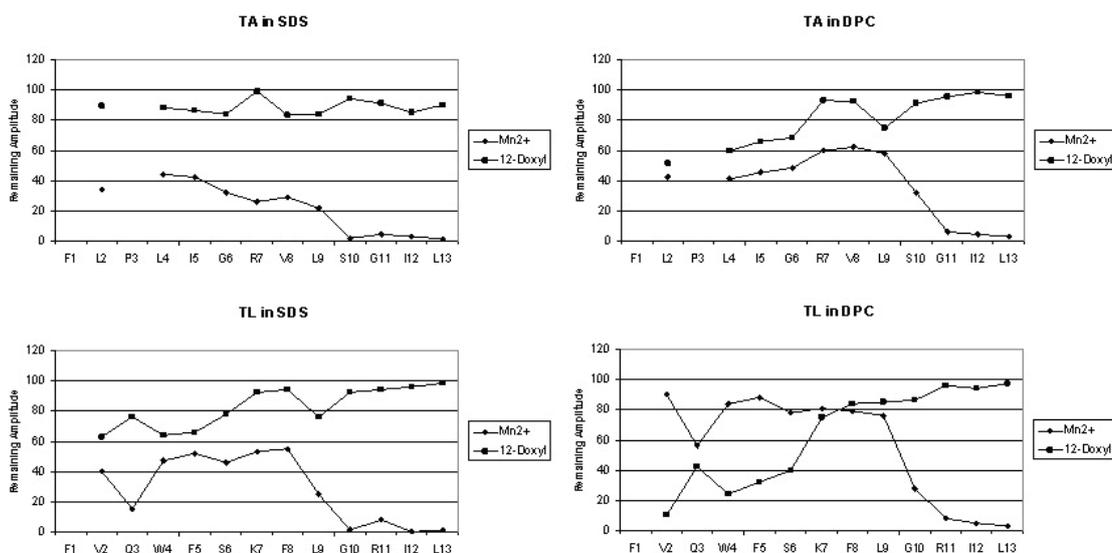


Figura 4.6. Intensità residua dei picchi TOCSY HN-H α di TA in sds, TA in dpc, TL in sds e TL in dpc.

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-doxil) [86]. Gli spettri TOCSY di TA e TL (nelle soluzioni di SDS e DPC) sono stati registrati in presenza ed in assenza di *spin labels*, con tutte le altre condizioni mantenute costanti.

Considerando TA in una soluzione di SDS, l'intensità di tutti i segnali è rimasta costante dopo l'aggiunta di acido 16-doxilsteario, risultato provante 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 che la TA è 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. Dopo aggiunta di Mn^{2+} , è stata osservata una riduzione generalizzata dell'intensità dei segnali (una riduzione maggiore del 40%) e principalmente sui residui C-terminali 11-13 (una riduzione maggiore del 90%). Questi dati possono essere spiegati ammettendo che il peptide è in equilibrio tra una forma legata sulla superficie, e un altro stato in cui l'N-terminale è 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. Dopo l'aggiunta di Mn^{2+} , è osservata una riduzione dell'intensità dei segnali per tutti i residui, principalmente, il residuo 3, e i residui C-terminali 10-13. Perciò, TL è localizzata preferenzialmente all'interfaccia liquido-acqua delle micelle di SDS. La riduzione dei segnali dei residui N-terminali dopo aggiunta 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 riduzione dell'intensità superiore al 50% per i residui N-terminali dopo addizione di acido 16-doxilstearico, e una simile riduzione per i residui C-terminali dopo addizione di Mn^{2+} (Figura 4.6). I dati indicano chiaramente che l'elica della TL è disposta perpendicolarmente alla superficie delle micelle con la regione N-terminale disposta all'interno del core idrofobico e la regione C-terminale al lato esterno, immerso nel compartimento acquoso.

4.3 Nuovi Analoghi: Progettazione, Sintesi, Caratterizzazione Biologica ed Analisi Conformazionale

Sulla base dei risultati NMR e delle strutture 3D, sono stati progettati e sintetizzati nuovi analoghi di TL e TA (Tabella 4.1) con l'obiettivo di migliorare il loro profilo farmacologico. L'attività antimicrobica di questi peptidi è stata valutata come capacità di inibire la crescita di vari Gram-positivi, Gram-negativi e lieviti. I risultati sono mostrati nella tabella 4.3

Siccome la differenza principale osservata tra le strutture secondarie di TA e TL, è la presenza di conformazioni turn nella regione N-terminale della TA, probabilmente indotta dal residuo Pro³, è stato studiato il ruolo di questo aminoacido in entrambi i peptidi. In primo luogo, per ottenere un analogo della TL con una struttura turn N-terminale, è stata sostituita la Gln³ con un residuo di Pro³ (Tabella 4.2). L'attività antimicrobica di questo analogo è risultata uguale o più del doppio di quella del peptide nativo, contro linee cellulari di lievito di *Candida albicans* e *Saccharomyces pombe*, batteri Gram-positivi *Staphylococcus*

aureus e *Staphylococcus epidermidis*, come indicato dai corrispondenti valori di minima concentrazione inibente (MIC), che sono stati ridotti della metà (Tabella 4.3).

Tabella 4.3 Attività antimicrobica ed emolitica di TA, TL e loro analoghi.

	MIC (μM)			
	TL	Pro ³ -TL	TA	Gln ³ -TA
Gram-negativi				
<i>Escherichia coli</i> D21	12	12	>24	>24
<i>Enterobacter faecalis</i> ATCC 29212	6	6	12	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692	24	24	>24	>24
<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tobaci</i>	6	6	>24	>24
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YPIII	3	3	12	6
Gram-positivi				
<i>Bacillus megaterium</i> Bml 1	1.5	1.5	1.5	0.75
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I	3	1.5	1.5	1.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	3	3	1.5
<i>Staphylococcus capitis</i> , 1	1.5	1.5	1.5	1.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	3	1.5	3	1.5
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 21547	6	6	12	6
Lieviti				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12	6	12	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	6	6	6
<i>Saccharomyces pombe</i>	6	3	3	3
Concentrazione Peptide (μM)		% emolisi		
3	13	6	3	9
6	48	10	4.5	18
12	92	42	6	70
24	94	92	28	92

L'attività emolitica sugli eritrociti umani è più bassa di 2-5 volte rispetto a TL, in un range di concentrazioni di 3-12 μM (Tabella 4.3).

Analogamente, è stato progettato e sintetizzato un derivato chimerico della TA in cui la Pro³ è stata sostituita con un residuo di Gln, il quale è presente nella sequenza della TL, nella stessa posizione (Tabella 4.2). Questa sostituzione

dovrebbe condurre ad un analogo della TA con maggiore propensione ad una struttura ad elica nella regione N-terminale.

Rispetto al peptide precursore TA, l'attività emolitica della Gln³-TA è divenuta significativamente più elevata; in aggiunta, una maggiore attività è stata riscontrata contro Gram-positivi *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes*, i Gram-negativi *Y. Pseudotuberculosis* e *Enterobacter faecalis* e contro il lievito *Candida albicans* (Tabella 4.3).

4.3.1 Analisi NMR

4.3.1.1 Gln³-TA in soluzione di SDS

I Parametri diagnostici NMR osservati per Gln³-TA in soluzione di SDS sono: chemical shifts degli H_α (Figura 4.7), contatti NOE (Figura 4.8a), velocità di scambio degli NH e coefficienti di temperatura (Tabelle 4.17-4.20). 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 [85]. Come mostrato in figura 4.7, si osservano spostamenti a campi alti dei segnali NMR H_α, dal residuo 2 al residuo 13.

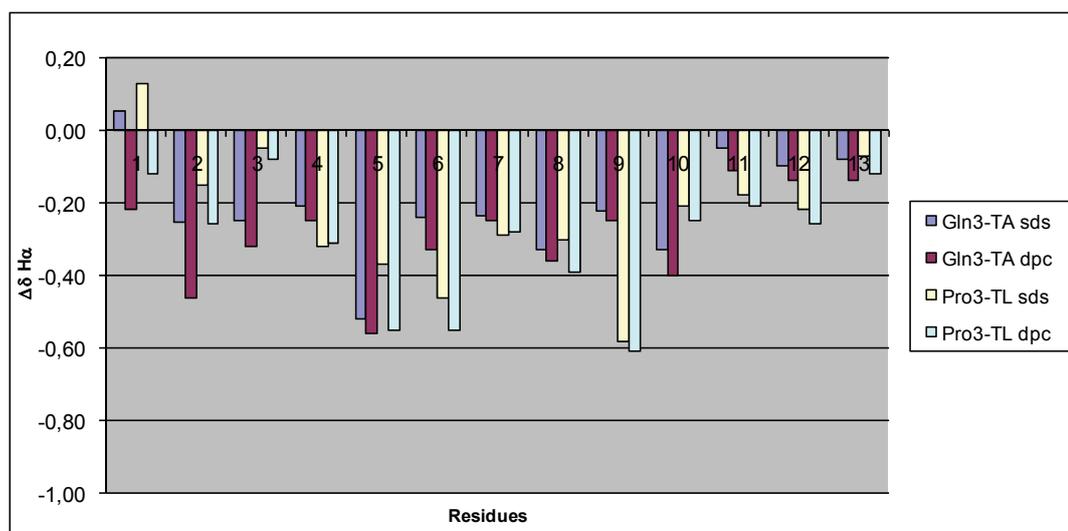


Figura 4.7. Confronto delle deviazioni dei chemical shift dei protoni H_{α} dai valori random coil.

Inoltre, una serie continua di 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 4.8a). Tutti questi dati indicano la presenza di un α -elica lungo l'intera sequenza del peptide. L'analisi 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 6, 8, 10, 12 e 13 mostrano coefficienti di temperatura ($-\Delta\delta/\Delta T < 3.0$ ppb/K) compatibili con una struttura ad elica stabile. Le *constraints* derivanti dall'NMR, ottenute per la Gln³-TA in SDS sono state usate come dati di input per un calcolo di strutture mediante simulated annealing come descritto precedentemente [61].

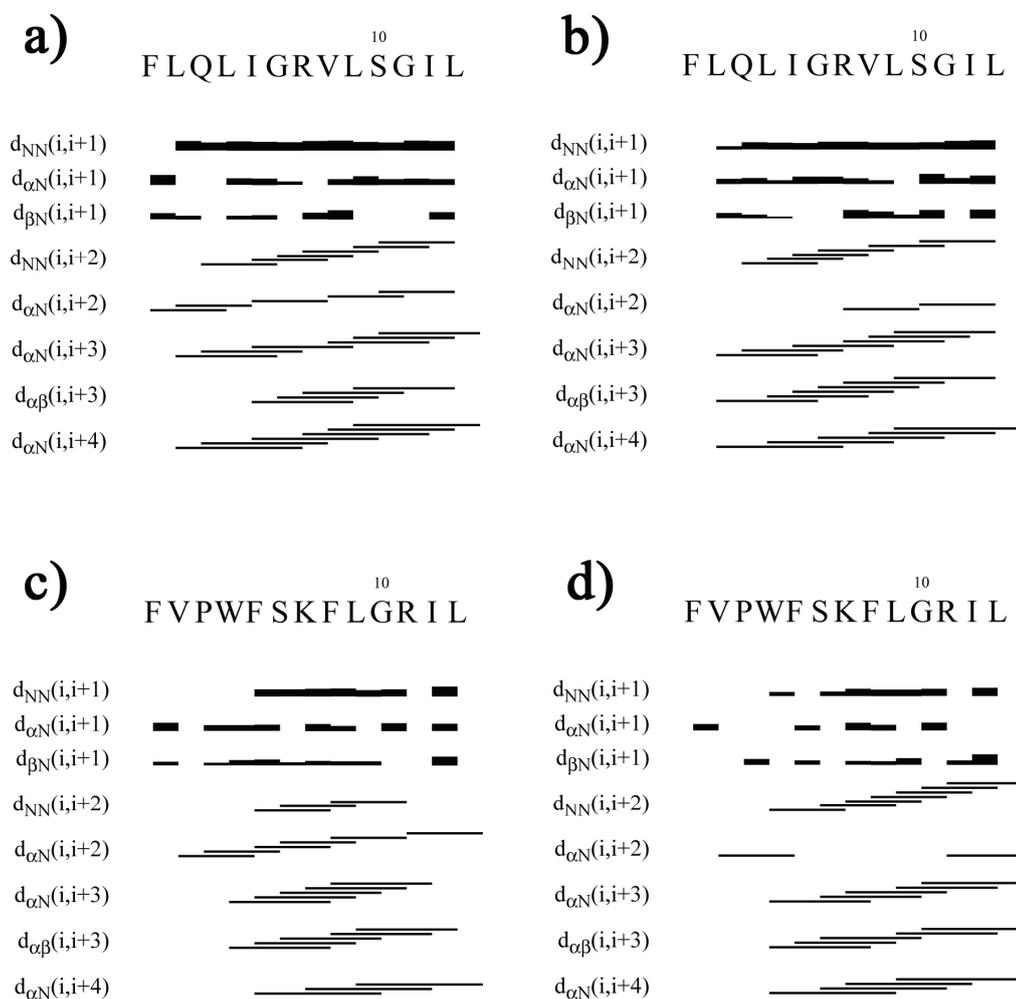


Figura 4.8. Diagramma a barre di Gln³-TA in SDS (a), Gln³-TA in DPC (b), Pro³-T L in SDS (c) e Pro³-TL in DPC (d).

Un insieme di 50 strutture che soddisfano le constraints derivanti dall’NMR (violazioni più piccole di 0.50 Å) sono state scelte per ulteriori analisi. Come mostrato in Figura 4.7a, Gln³-TA mostra una struttura ad α -elica che comprende i residui 4-10 (RMSD=0.5 Å sugli atomi del backbone di questi residui). L’orientazione delle catene laterali è ben definito (RMSD=1.2 Å sugli atomi del

backbone di questi residui 4-10). Le regioni N e C-terminali sono meno definite per la coesistenza di strutture ripiegate ed estese.

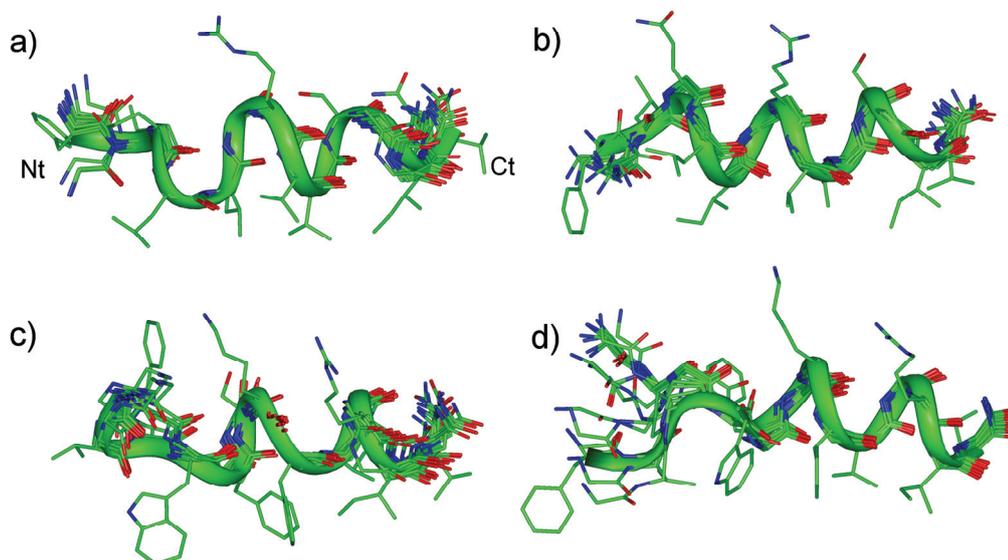


Figura 4.9. Sovrapposizione dei 20 conformeri a più bassa energia di Gln³-TA in SDS (a), Gln³-TA in DPC (b), Pro³-TL in SDS (c) e Pro³-TL in DPC (d). La sovrapposizione è stata effettuata sugli atomi del backbone dei residui 3-11. Gli atomi sono mostrati con differenti colori (Carbonio verde, Azoto blu, 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.

4.3.1.2 *Gln³-TA in soluzione di DPC*

La Gln³-TA in soluzione di DPC mostra spettri caratteristici simili a quelli trovati in soluzione di SDS. La differenza tra i dati NMR nei due ambienti indicano una più alta stabilità conformazionale della Gln³-TA in micelle di DPC. In particolare, si osservano un numero più alto di connessioni NOE *medium range* (Figura 4.8b), tempi di scambio degli NH più lunghi e coefficienti di temperatura più alti per quasi tutti i residui, che 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 e 2 che indicano che la struttura ad elica è estesa fino ai residui N-terminali nella soluzione di DPC. Un'altra caratteristica spettrale che indica una struttura stabile nella porzione N-terminale in soluzione di DPC è un intenso shift a campi bassi osservato per l'NH della Leu² (da 8.37 ppm in SDS a 9.36 ppm in DPC).

Le constraints derivanti dall'NMR, ottenute per la Gln³-TA in DPC sono state usate come dati di input per un calcolo di strutture mediante simulated annealing come descritto sopra. Per ogni peptide, sono state scelte 50 strutture tra quelle calcolate che soddisfano le constraints derivanti dall'NMR (violazioni più piccole di 0.35 Å). Come mostrato in figura 4.9b, la Gln³-TA mostra una struttura ad α -elica che comprende i residui 2-13 (RMSD=0.25 Å sugli atomi del backbone), con qualche variazione solo nelle zone N e C-terminale. Anche l'orientazione delle catene laterali è ben definita (RMSD=0.9 Å per tutti gli atomi).

4.3.1.3. *Pro³-TL in soluzione di SDS*

I parametri diagnostici NMR osservati per Pro³-TL in soluzione di SDS indicano una propensione conformazionale verso una struttura ad elica. Come mostrato in figura 4.7, si osservano spostamenti a campi alti dei segnali NMR H_α, dal residuo 2 al residuo 13. L'analisi delle velocità di scambio e dei coefficienti di temperatura delle risonanze degli NH indicano che questa conformazione elicoidale è stabile lungo i residui 5-13, mostrando le risonanze di questi NH bassi 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 di accoppiamenti dipolari di tipo $d_{\alpha N}(i, i+2)$ tra Val² e Trp⁴ (Figura 4.8c) indicano la presenza di β-turn 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). La maggior parte delle strutture (41/50) della Pro³-TL mostrano un'α-elica che comprende i residui 6-11. Pochi conformeri (9/50) mostrano un'α-elica che comprende i residui 4-12. Molte strutture (36/50) mostrano i residui N-terminali in conformazione turn. Possono essere osservati β-turn centrati sui residui Pro³-Leu⁴ e γ-turn sulla Pro³ (Figura 4.9c).

4.3.1.4 *Pro³-TL in soluzione di DPC*

La Pro³-TL in una soluzione di DPC mostra caratteristiche spettrali simili a quelle trovate in soluzione di SDS, con contatti NOE (Figura 4.8d), 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 4.7) per i residui Phe¹ e Leu² sono significativamente spostate a campi alti in soluzione di DPC confrontati con quelli in soluzione di SDS. Il calcolo di strutture ha fornito un insieme di 50 strutture che soddisfano le constraints derivanti dall’NMR (violazioni più piccole di 0.50 Å). Quasi tutte le strutture (42/50) si trovano in conformazione ad α -elica lungo i residui 6-13, mentre solo alcune (8/50) mostrano un’elica che coinvolge tutti i residui (RMSD=0.9 Å sugli atomi del backbone). Molte strutture (42/50) mostrano strutture β e γ -turn intorno ai residui N-terminali osservati in SDS (Figura 4.9d). Tuttavia, la struttura di Pro³-TL in DPC può essere descritta come un β -turn all’N-terminale (residui 2-5) seguito da un’ α -elica (residui 6-13). Questa regione elicoidale mostra una più elevata stabilità paragonata alla corrispondente regione per gli altri sistemi descritti (RMSD= 0.08 Å sugli atomi del backbone contro 0.10 della Gln³-TA in DPC).

4.3.2 Posizionamento Relativo Peptide-Micella

Il posizionamento del peptide Pro³-TL relativo alla superficie e all’interno delle micelle di DPC è stato studiato usando sonde paramagnetiche (*spin-labels*). Gli spettri TOCSY di Pro³-TL (in soluzione di DPC) sono stati registrati in presenza ed in assenza di *spin labels*, con tutte le altre condizioni mantenute costanti (Tabella 4.4).

Tabella 4.4 Intensità residua dei picchi TOCSY HN-H α di Pro³-TL in soluzione di DPC 200 mM dopo aggiunta di sonde paramagnetiche (ov.: Segnali sovrapposti).

Sonda	Residui										
	Val ²	Trp ⁴	Phe ⁵	Ser ⁶	Lys ⁷	Phe ⁸	Leu ⁹	Gly ¹⁰	Arg ¹¹	Ile ¹²	Leu ¹³
16-dx	ov. 0.6	ov. 0.7	1.0	0.9	0.6	0.7	0.9	0.8	0.7		
Mn ²⁺	ov. 0.2	ov. 0.2	0.3	0.4	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.04	

Le intensità dei segnali dei residui 4 e 6 mostrano una riduzione significativa (circa 30-40%) dopo l'aggiunta di acido 16-doxilsteario. Dopo aggiunta di Mn²⁺, è stata osservata una riduzione generalizzata dell'intensità dei segnali (una riduzione maggiore del 60%) e principalmente sui residui C-terminali 10-13 (una riduzione maggiore del 80%). I risultati degli *spin label* indicano che Pro³-TL è localizzata preferenzialmente all'interfaccia micella/acqua. 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 della micella.

4.4 TL e Pro³-TL: Studio dell'Attività Emolitica

4.4.1 Titolazione di TL e Pro³-TL in soluzione di DPC

Lo stato delle funzioni protonabili (N-terminale, catena laterale della Lys⁷ e gruppo guanidinico dell'Arg¹¹) è stato studiato effettuando una titolazione dei due peptidi. Gli spettri TOCSY di TL e Pro³-TL in soluzione di DPC sono stati registrati a differenti valori di pH. In particolare, è stato osservato uno shift a

campi alti per il CH_α del residuo Phe^1 in seguito alla variazione del pH da un valore di 5 ad un valore di 8 (Figura 4.10).

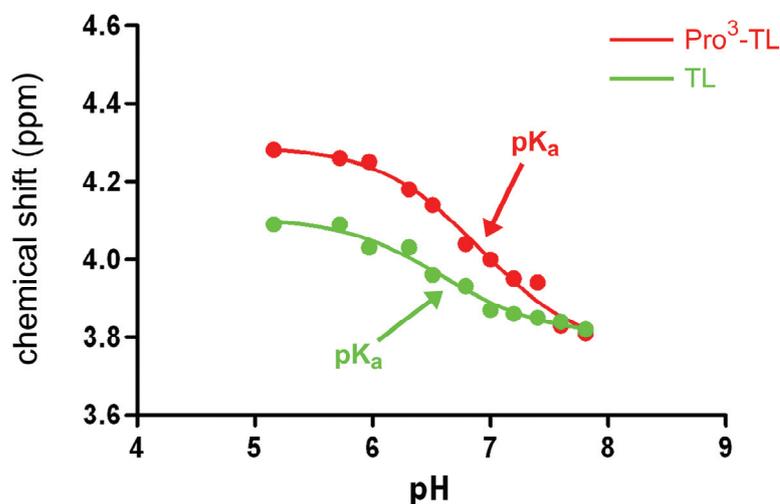


Figura 4.10. Titolazione di TL and Pro³-TL in soluzione di DPC a differenti valori di pH.

I cambiamenti del chemical shift del CH_α della Phe^1 sono il risultato di un equilibrio dinamico tra uno stato in cui il gruppo amminico terminale della Phe^1 è carico e uno in cui non è carico. Seguendo questa variazione di chimica shift, si è potuto determinare il valore di pK_a apparente per il gruppo amminico N-terminale. Questo pK_a è 6.6 per la TL e 7.0 per la Pro³-TL. Per entrambi i peptidi quindi il gruppo amminico della Phe^1 è, a pH fisiologico (7.4), in equilibrio tra uno stato carico ed uno stato non carico, con una prevalenza (2.8 per Pro³-TL, e 6.5 per TL) dello stato non carico. Gli altri gruppi protonabili (Lys⁷ e Arg¹¹) non cambiano il loro stato carico positivamente, nell'intervallo di pH considerato, poiché non si osserva nessuna variazione delle risonanze protoniche delle catene laterali in seguito al cambiamento di pH.

4.4.2 Simulazioni di Dinamica Molecolare di TL e Pro³-TL in micelle di DPC

Una simulazione di Dinamica Molecolare (MD) di 40 ns è stata effettuata per TL e Pro³-TL in acqua esplicita e micelle di DPC. Sulla base dei dati ottenuti dalla titolazione, la simulazione è stata effettuata sia con funzione aminica N-terminale neutra (TL_N e Pro³-TL_N) sia carica positivamente (TL_C e Pro³-TL_C).

4.4.2.1 Comportamento Conformazionale

In accordo con i dati NMR, sia TL_N che TL_C mantengono una predominante conformazione elicoidale nel corso dell'intera simulazione, mentre Pro³-TL in entrambi gli stati perde la conformazione elicoidale principalmente nella regione N-terminale (Tabelle 4.5, 4.6, 4.7, 4.8)

Tabella 4.5. Angoli diedri di TL_N in soluzione di DPC valori medi sull'intera simulazione. I valori in parentesi sono gli RMSD.

Residui	Φ	Ψ
Phe1		1.3 (86.3)
Val2	-85.8 (37.7)	-40.00 (19.5)
Gln3	-57.1 (14.3)	-34.6 (17.2)
Trp4	-101.6 (29.5)	-33.4 (19.8)
Phe5	-59.8 (8.4)	-33.1 (10.7)
Ser6	-56.9 (9.9)	-39.1 (17.2)
Lys7	-68.7 (11.3)	-30.9 (17.7)
Phe8	-85.3 (35.4)	-36.3 (12.8)
Leu9	-56.5 (10.8)	-40.5 (12.9)
Gly10	-56.8 (12.5)	-32.7 (19.5)
Arg11	-66.8 (15.6)	-27.1 (12.0)
Ile12	-114.2 (19.8)	-18.6 (12.3)
Leu13	-106.6 (33.8)	-6.0 (28.8)

Tabella 4.6. Angoli diedri di TL_C in soluzione di DPC valori medi sull'intera simulazione. I valori in parentesi sono gli RMSD.

Residui	Φ	Ψ
Phe1		-64.7 (95.2)
Val2	-87.5 (38.4)	-35.8 (16.8)
Gln3	-58.2 (9.0)	-30.5 (14.2)
Trp4	-66.2 (20.9)	-31.7 (16.6)
Phe5	-62.2 (21.4)	-30.5 (12.2)
Ser6	-58.7 (11.2)	-37.2 (14.0)
Lys7	-67.4 (16.4)	-24.0 (18.4)
Phe8	-100.7 (28.3)	-20.6 (17.2)
Leu9	-56.4 (10.8)	-42.8 (9.2)
Gly10	-56.8 (8.0)	-39.6 (16.0)
Arg11	-62.6 (17.2)	-29.6 (18.6)
Ile12	-94.4 (28.2)	-30.8 (14.3)
Leu13	-97.9 (32.7)	-9.6 (22.2)

Tabella 4.7. Angoli diedri di Pro³-TL_N in soluzione di DPC valori medi sull'intera simulazione. I valori in parentesi sono gli RMSD.

Residui	Φ	Ψ
Phe1		138.6 (52.5)
Val2	-61.1 (23.9)	-32.3 (94.9)
Pro3		-17.6 (10.1)
Trp4	-66.1 (13.9)	-16.3 (15.0)
Phe5	-80.7 (42.1)	-19.6 (17.8)
Ser6	-54.3 (7.7)	-33.3 (13.1)
Lys7	-75.1 (13.1)	-25.2 (18.3)
Phe8	-75.8 (26.8)	-42.7 (8.0)
Leu9	-56.8 (9.4)	-37.7 (12.1)
Gly10	-65.3 (13.6)	-22.2 (23.1)
Arg11	-90.1 (32.9)	-18.2 (17.4)
Ile12	-123.1 (25.2)	-15.0 (25.4)
Leu13	-133.3 (27.3)	-17.3 (32.4)

Tabella 4.8. Angoli diedri di Pro³-TL_C in soluzione di DPC valori medi sull'intera simulazione. I valori in parentesi sono gli RMSD.

Residui	Φ	Ψ
Phe1		-13.5 (11.0)
Val2	-133.0 (26.2)	147.6 (19.0)
Pro3		-23.4 (17.4)
Trp4	-68.6 (26.5)	-17.7 (17.0)
Phe5	-140.0 (20.4)	-13.8 (15.0)
Ser6	-60.1 (9.4)	-27.4 (13.6)
Lys7	-83.1 (22.9)	-28.6 (21.0)
Phe8	-81.3 (35.4)	-30.2 (25.2)
Leu9	63.4 (19.9)	-30.0 (16.6)
Gly10	-57.4 (11.0)	-30.9 (18.6)
Arg11	-73.8 (25.2)	-24.0 (18.3)
Ile12	-111.5 (26.4)	-23.6 (13.8)
Leu13	-131.1 (25.3)	-9.0 (25.9)

4.4.2.2 Posizione Relativa Peptide-Micella

In tutti i sistemi analizzati i peptidi diffondono dal core delle micelle all'interfaccia micella/acqua (Figure 4.11, 4.12). Tuttavia mentre l'N-terminale di TL_C e Pro³-TL_C si muove rapidamente sulla superficie, l'N-terminale di Pro³-TL_N rimane all'interno della micella per un periodo di tempo più lungo (circa 13ns), e l'N-terminale di TL_N oscilla durante quasi tutta la simulazione. Quindi l'N-terminale di Pro³-TL_N e TL_N si trova in una posizione più interna paragonato a quello dei peptidi carichi.

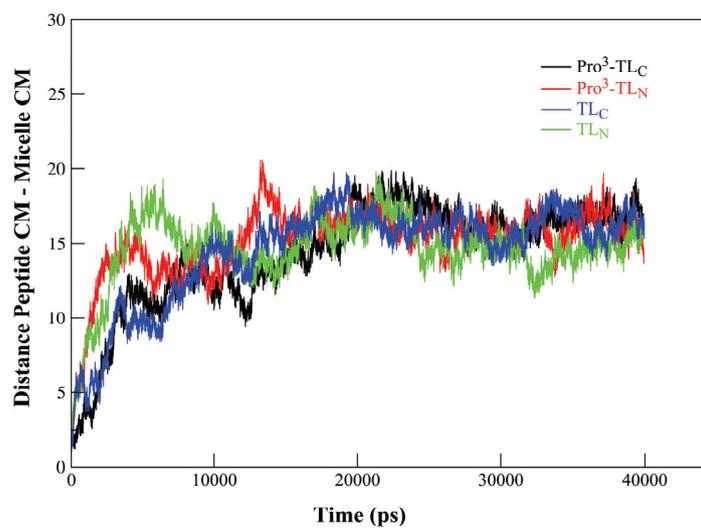


Figura 4.10. Distanza tra il centro di massa (CM) dei peptidi e quello della micella.

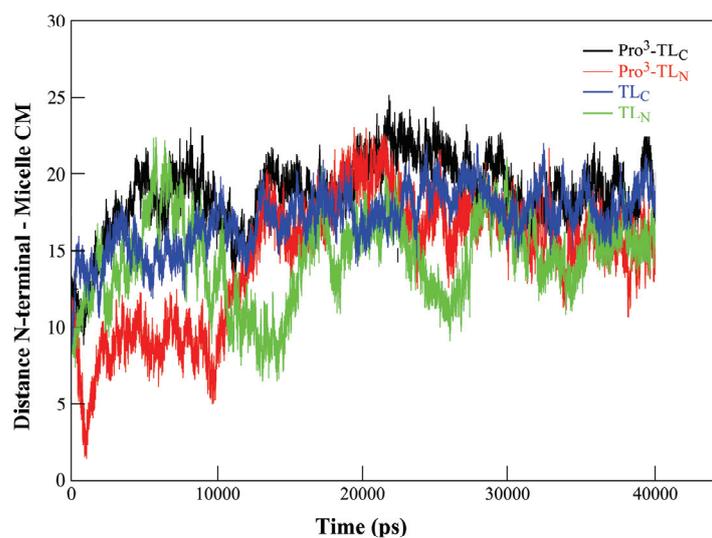


Figura 4.11. Distanza tra l'N-terminale dei peptidi ed il centro di massa (CM) della micella.

4.4.2.3 Interazione Peptide-Micella

Come detto, entrambi i peptidi TL e Pro³-TL diffondono dal core delle micelle all'interfaccia micella/acqua durante i 40 ns di simulazione. Essi preferiscono una disposizione con i residui idrofobici immersi nella fase lipidica e quelli idrofilici localizzati nel compartimento acquoso (Figura 4.13).

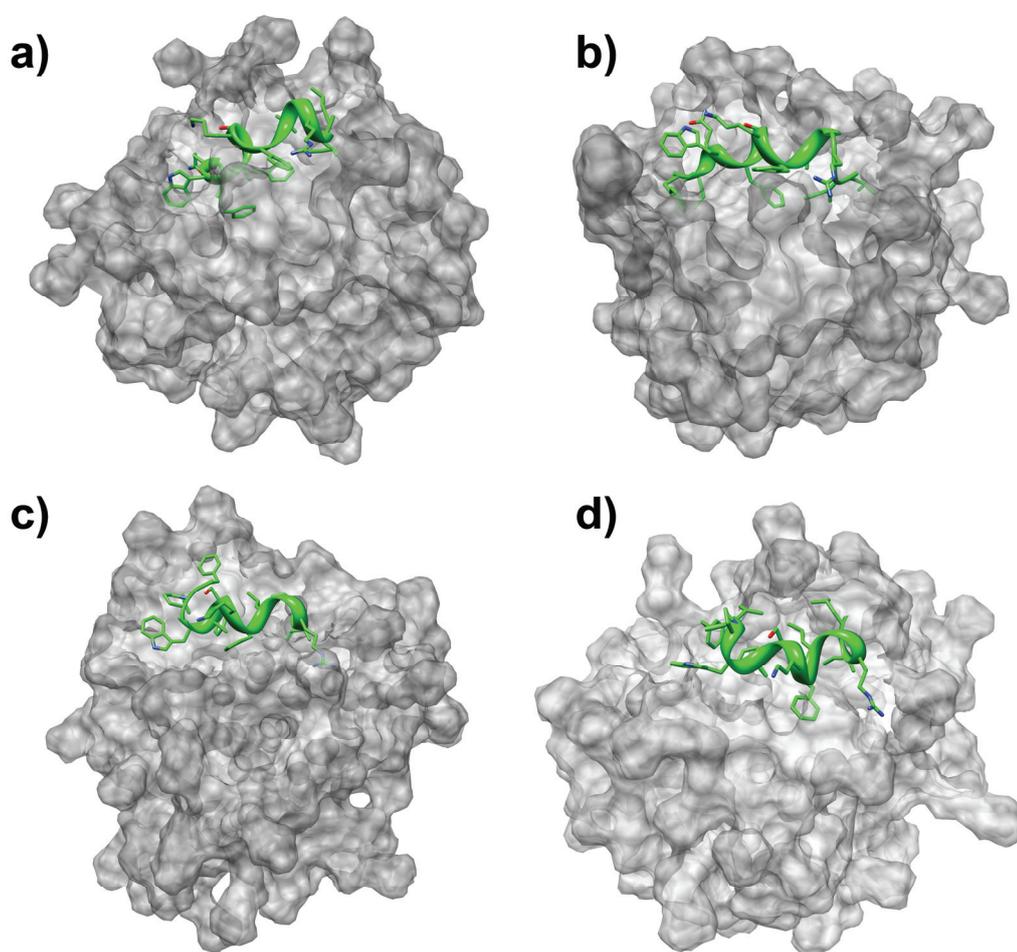


Figura 4.13. *Snapshots* illustrativi della localizzazione finale di TL_N (a), TL_C (b), Pro³-TL_N (c) e Pro³-TL_C (d) in micelle di DPC.

Per quantificare le interazioni tra i peptidi e le micelle sono stati calcolati gli numeri di idratazione e le funzioni di distribuzione radiali(RDFs). I numeri di

idratazione sono un'indicazione del numero di molecole collocate vicino ad ogni residuo dando un'informazione di quali residui sono collocati nel compartimento acquoso (alto numero di idratazione) e quali all'interno della micella (basso numero di idratazione). Per ogni sistema sono stati calcolati due set di numeri di idratazione, uno per gli atomi delle catene laterali ed un altro per il carbonio carbonilico di ogni residuo (Tabella 4.9)

Tabella 4.9 numeri di idratazione^a

	Carbonio Carbonilico				Catene Laterali			
	TL _C	TL _N	Pro ³ -TL _C	Pro ³ -TL _N	TL _C	TL _N	Pro ³ -TL _C	Pro ³ -TL _N
Phe ¹	0.097	0.02	0.12	0.72	0.36	0.06	0.63	0.43
Val ²	0.002	0.46	0.05	0.036	0.025	0.19	0.14	0.14
Gln ³ /Pro ³	0.56	0.93	0.58	0.84	3.25	3.26	0.27	0.32
Trp ⁴	0.23	0.2	0.44	0.72	1.61	1.53	1.78	1.28
Phe ⁵	0.006	0.002	0.03	0.044	0.04	0.05	0.01	0.023
Ser ⁶	0.84	0.67	0.35	0.74	1.47	1.60	1.21	1.42
Lys ⁷	1.00	0.86	0.60	0.74	3.10	3.00	2.74	2.98
Phe ⁸	0.06	0.12	0.03	0.29	0.92	0.38	0.28	0.70
Leu ⁹	0.024	0.01	0.005	0.078	0.11	0.09	0.01	0.13
Gly ¹⁰	0.75	0.74	0.65	0.82	-	-	-	-
Arg ¹¹	0.67	0.73	0.65	0.84	2.61	2.52	2.59	2.50
Ile ¹²	0.51	0.67	0.49	0.65	0.06	0.03	0.04	0.09
Leu ¹³	0.96	0.99	0.73	1.08	0.18	0.23	0.14	0.23

^a Gli numeri di idratazione sono calcolati su una media di 40 ns per ogni sistema simulato e sono calcolati per un raggio di idratazione di 3.0 Å.

Il set calcolato per i carboni carbonilici mostra la stessa tendenza di una maggiore idratazione per i residui C-terminali rispetto a quelli N-terminali. Quindi, in tutti i sistemi, la regione C-terminale è posizionata maggiormente nel compartimento acquoso rispetto a quella N-terminale. Le catene laterali meno idratate sono quelle dei residui Val², Phe⁵, Leu⁹ e Ile¹² per tutti i sistemi. Inoltre anche la catena laterale della Phe¹ di TL_N mostra un basso grado di idratazione. Tutti questi dati indicano che l'N-terminale di TL_N assume una posizione maggiormente interna alla micella di DPC. Le catene laterali di Trp⁴, Ser⁶, Lys⁷ e Arg¹¹ mostrano invece

un alto grado di idratazione. Infine la catena laterale della Gln³ sia per la TL_N che per la TL_C risulta essere il residuo maggiormente idratato.

Le funzioni di distribuzione radiali (RDF) illustrano le relative affinità tra differenti set di atomi in ogni sistema. Sono stati calcolati gli RDF tra le catene laterali dei residui e i gruppi fosfato carichi negativamente presenti sulle micelle (Figura 4.14). I quattro sistemi mostrano simili valori di RDF per ogni residuo con i gruppi fosfato delle micelle. I residui di arginina mostrano le più forti interazioni con i gruppi fosfato paragonati agli altri residui idrofilici.

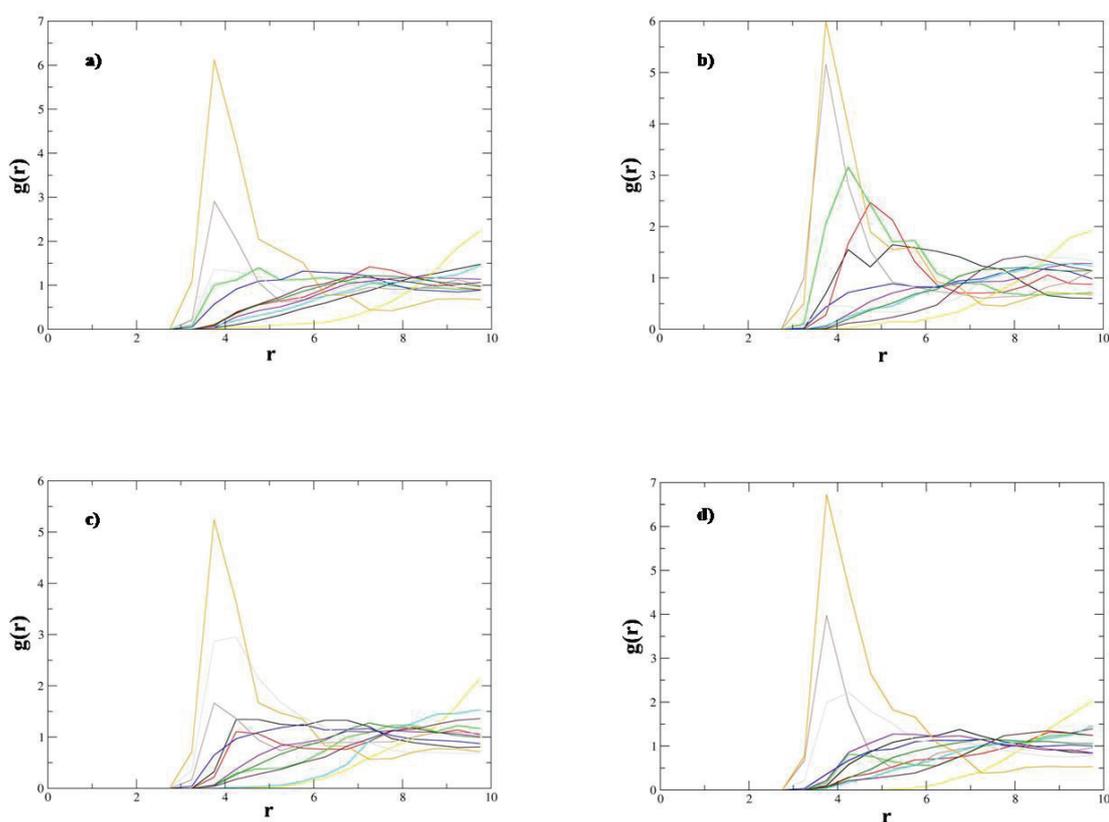


Figura 4.14. Funzioni di distribuzione radiali tra i gruppi fosfato delle micelle di DPC e le catene laterali dei residui aminoacidici di TL_N (a), TL_C (b), Pro³-TL_N (c) e Pro³-TL_C (d). Legenda: Phe¹, nero; Val², rosso; Gln³ (in TL) Pro³ (in Pro³-TL), verde, Trp⁴, blu; Phe⁵, giallo; Ser⁶ marrone chiaro; Lys⁷, grigio chiaro; Phe⁸, viola; Leu⁹, azzurro; Arg¹¹, arancione; Ile¹², marrone scuro; Leu¹³, verde scuro.

4.4.2.4 Influenza del Peptide sulla Forma della Micella

L'effetto di ogni peptide sulla forma della micella di DPC può essere quantificato paragonando alcune proprietà (vedi sotto) della micella in presenza del peptide con quelle della micella sola. La stabilità delle micelle viene controllata considerando il rapporto tra i tre momenti di inerzia e l'eccentricità della micella stessa.

I tre momenti di inerzia (I_1, I_2 ed I_3) sono calcolati lungo vettori ortogonali scelti arbitrariamente. R_1 rappresenta il rapporto tra I_2 e I_1 , R_2 quello tra I_3 e I_1 ed R_3 rappresenta il rapporto di I_1 con se stesso (ovviamente $R_3=1$), I_1 è il momento di inerzia lungo gli assi x , y oppure z con la più piccola ampiezza. Per una sfera perfetta tutti questi rapporti sono uguali ad 1, tuttavia le micelle non sono sfere perfette. I valori riportati in letteratura per i rapporti tra momenti di inerzia per le micelle pure costituite da 54 e 65 residui fosfolipidici sono 1.13:1.08:1 e 1.19:1.10:1, rispettivamente. Il risultato dalla simulazione (Tabella 4.10) indica che la micella di DPC (60 residui fosfolipidici) è parzialmente distorta in seguito all'interazione con TL_N mentre TL_C , Pro^3-TL_N e Pro^3-TL_C non sembrano avere influenza sulla forma della micella.

Un altro parametro per definire la forma della micella è l'eccentricità. Essa è definita come $e = 1 - I_1/I_{avg}$ dove I_1 è il momento di inerzia lungo gli assi x , y oppure z con la più piccola ampiezza e I_{avg} è la media dei tre momenti di inerzia. Per una sfera perfetta tale parametro è uguale a zero. I valori di eccentricità per micelle pure di 54 e 65 residui fosfolipidici sono 0.066 e 0.087 rispettivamente. I

valori di eccentricità calcolati per i sistemi in studio indicano, di nuovo, che TL_N cambia significativamente la forma della micella.

Tabella 4.10 Momenti di inerzia medi (in a.m.u. * nm²), rapporti tra i momenti di inerzia ed eccentricità delle micelle di DPC.

	TL_N	TL_C	Pro^3-TL_N	Pro^3-TL_C
I_1	108114	99520.9	172735	111593
I_2	133692	116684	203242	128975
I_3	124896	111194	194489	125378
R_1	1.24	1.17	1,17	1,16
R_2	1.15	1.12	1,12	1,12
e	0.116	0.088	0.092	0.085

4.5 Relazioni Conformazione-Attività

Lo scopo di questo studio è quello di fornire un quadro a risoluzione molecolare delle interazioni di TA, TL e dei due analoghi progettati Pro^3-TL e Gln^3-TA (Tabella 4.1) con micelle cariche negativamente di SDS e zwitterioniche di DPC (che sono buoni modelli sperimentali rispettivamente delle membrane dei batteri e delle cellule eucariotiche) e per spiegare la differente attività antimicrobica ed emolitica di questi peptidi, in base alla loro differente interazione con i due tipi di micelle.

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 amfipatiche almeno quando consideriamo i residui centrali 6-9 (Figura 4.5). Questo risultato è in accordo con precedenti studi NMR effettuati su TA, usando

una soluzione di TFE (trifluoroetanolo) che mima gli ambienti idrofobici [80]. La propensione di TA [80-83] e TL [82] 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 [83], e di TL in presenza di piccole vescicole unilamellari composte da SOPC (1-stearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina) e POPG (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerolo) [84] inoltre ha dato risultati simili. Nel presente studio, sottili differenze possono essere osservate nelle preferenze conformazionali dei due peptidi nei differenti ambienti che mimano le membrane. 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 essa è particolarmente evidente 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 nostri risultati, Rinaldi e co. hanno trovato 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 [72].

Il comportamento conformazionale di TA osservato in soluzioni di SDS e DPC è simile. Leggere differenze sono localizzate nella regione N-terminale del peptide. 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 non è facile 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 questi risultati, D'Abramo e co. hanno dimostrato la più alta stabilità della conformazione ad α -elica nella TL confrontata con la TA. 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 mostra 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 dall'analisi NMR condotta nel presente studio (residui 6-9).

La posizione delle Temporine rispetto alle micelle dipende dalla sequenza peptidica e dalla natura delle teste polari delle micelle. La nostra analisi con sonde paramagnetiche (Figura 4.6) mostra che la TA è localizzata all'interfaccia lipide-acqua, parallela alla membrana, quando interagisce con le micelle di SDS caricate negativamente. Al contrario, TL assume una disposizione perpendicolare alla membrana quando si lega a micelle zwitterioniche di DPC, con la regione N-terminale situata vicino al centro della micella. La situazione è meno definita quando consideriamo 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 risultati ottenuti, circa la localizzazione della TL nelle micelle zwitterioniche, concordano con quelli trovati da Zhao e co [84,87] Usando la spettroscopia di fluorescenza, questi autori hanno mostrato che TL si inserisce profondamente all'interno della membrana con un disposizione perpendicolare e aumenta l'ordine delle catene aciliche dei lipidi. In un altro studio, basato su esperimenti EPR (electron paramagnetic resonance) con spin-label incorporati nei liposomi [74] di fosfatidilcolina, mostra che la TA si dispone in maniera parallela alla superficie della membrana.

A seguito dei risultati ottenuti, è stato ipotizzato un differente meccanismo d'azione per spiegare l'attività antimicrobica ed emolitica di TA e TL. TA mostra attività antimicrobica (preferenzialmente contro i batteri Gram-positivi) ed una ridotta attività emolitica. Essa interagisce con le micelle di SDS, che mimano le membrane dei batteri, ripiegandosi in una conformazione ad α -elica intorno ai sui 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: *i)* l'N-terminale della TL ha una maggiore propensione a formare strutture ad elica; *ii)* la TL mostra 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 [21]. 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).

Siccome non è stato osservato un simile effetto detergente, nel caso delle Temporine [74], per descrivere la loro attività antimicrobica è stato proposto il modello “dynamic peptide-lipid supramolecular pore”. Secondo questo modello [88-90], gli AMPs si legano sullo strato esterno della membrana e penetrano all’interno, trasportando con loro le teste polari dei lipidi. Quando è raggiunta una sufficiente concentrazione locale di peptide, si formano pori acquosi transienti di varie misure. I due modelli (carpet e dynamic peptide-lipid supramolecular pore) non sembrerebbero però 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” [21]. In questo modello, i peptidi formano dei pori trans membrana disponendosi come le “doghe di un barile”: il numero di peptidi che formano il canale determinerà la dimensione dello stesso; la stabilità del barile determinerà la vita del poro.

La bassa attività litica di TA nei confronti degli eritrociti umani [67] può essere spiegata considerando la sua ridotta capacità di inserirsi all'interno delle micelle di DPC.

È ben noto che le interazioni idrofobiche giocano un ruolo importante dell'attività degli AMPs con i bilayer formati da fosfolipidi zwitterionici [92]. 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) [74,84], essa dovrebbe permeare meglio le membrane zwitterioniche, contrariamente ai risultati sperimentali. In realtà questa apparente contraddizione potrebbe essere spiegata considerando la 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. Per provare questa ipotesi, sono stati progettati, sintetizzati, misurate l'attività antimicrobica ed emolitica ed effettuata una dettagliata analisi conformazionale di alcuni analoghi. Siccome le strutture turn sono principalmente indotte dal residuo di Pro³, è stato analizzato il ruolo di questa posizione sia nella TA che nella TL. Con l'obiettivo di indurre una struttura turn nei derivati di TL, è stata sostituita la Gln³ della TL con un residuo di Pro (Tabella 4.1). I dati biologici della Pro³-TL mostrano un incremento dell'attività antimicrobica contro i Gram-positivi e cellule di lievito, con un decremento dell'attività emolitica rispetto al peptide nativo (Tabella 4.3). Inoltre, è stato progettato e sintetizzato un derivato chimera di TA nel quale è stato

sostituito un residuo di Pro con un residuo di Gln, che occupa la stessa posizione nella TL, ottenendo l'analogo Gln³-TA. Esso ha un'attività antimicrobica migliorata specialmente contro i batteri Gram-positivi e Candida, ma anche una maggiore capacità di lisare i globuli rossi umani rispetto alla TA nativa (Tabella 4.3).

Il comportamento conformazionale di Gln³-TA e Pro³-TL è risultato essere in accordo con la progettazione razionale che è portato a questi derivati. Entrambi i peptidi, in entrambe le soluzioni di SDS e DPC mostrano, come i peptidi genitori, strutture che possono essere descritte come un' α -elica anfipatica almeno considerando i residui centrali 6-10 (Figure 4.7-4.9). Il carattere elicoidale di Gln³-TA incrementa significativamente passando da micelle di SDS a micelle di DPC. L'intera sequenza peptidica è coinvolta in questo aumento della struttura elicoidale ma è particolarmente evidente per i residui N-terminali (i residui Phe¹ e Leu² passano da una forma disordinata ad una struttura elicoidale (Figure 4.7-4.9). Nella Pro³-TL i residui N-terminali preferiscono conformazioni turn maggiormente centrate sul residuo di Pro³. Queste conformazioni turn sono osservate sia in soluzione di SDS che in soluzione di DPC. La relazione conformazione-attività dei peptidi naturali TA e TL e dei nuovi analoghi Gln³-TA e Pro³-TL dimostrano che mentre la struttura ad elica nella regione N-terminale non è un requisito essenziale per il peptide per interagire con le cellule batteriche e per l'attività antibatterica, esso appare un elemento fondamentale per legare e penetrare le membrane zwitterioniche e per l'attività emolitica.

Poiché la drastica riduzione dell'attività emolitica di Pro³-TL paragonato al peptide genitore TL è stato uno dei nostri maggiori risultati, nel tentativo di comprendere i determinanti strutturali responsabili di tale attività è stata eseguita per entrambi i peptidi in acqua esplicita e micelle di DPC una lunga (40 ns) simulazione di dinamica molecolare. Le simulazioni sono state eseguite sui peptidi con la funzione N-terminale neutra (TL_N e Pro³-TL_N) e carica (TL_C e Pro³-TL_C). I due stati, infatti risultano entrambi popolati a pH fisiologico (7.4) come indicato dalla titolazione (Figura 4.10). I risultati della simulazione confermano le tendenze conformazionali per TL e Pro³-TL ottenute sperimentalmente. Sia TL che Pro³-TL diffondono dal core delle micelle all'interfaccia micella/acqua (Figure 4.11, 4.12). essi preferiscono una localizzazione con i residui idrofobici inseriti nell'interfaccia lipidica della micella ed i residui idrofilici in contatto con il compartimento acquoso (Figura 4.13). I residui idrofilici sembrano essere dotati di differenti ruoli nell'interazione peptide-micella. Dagli RDF (Figura 4.14), la catena laterale dell'Arg¹¹ interagisce maggiormente con i gruppi fosfato della micella. Le catene laterali di Ser⁶, Lys⁷ e Gln³(in TL) interagiscono principalmente con le molecole d'acqua, dato il loro più alto numero di idratazione (Tabella 4.5).

Alcune differenze possono essere osservate tra i sistemi simulati: *i*) gli N-terminali di TL_N e Pro³-TL_N sono, in media, maggiormente inseriti nelle micelle di DPC paragonati a quelli di TL_C e Pro³-TL_C; *ii*) TL_N mostra un basso numero di idratazione per la catena laterale di Phe¹ (Tabella 4.5); *iii*) solo TL_N causa una significativa distorsione della forma della micella (Tabella 4.6). Considerando che

la titolazione stabilisce una prevalenza dello stato non carico all’N-terminale di TL rispetto a quello di Pro³-TL (6.5 vs 2.8, rispettivamente), queste differenze indicano che TL, principalmente nel suo stato non carico TL_N, perturba la superficie della micella di DPC, in accordo con la sua attività emolitica. Tuttavia i risultati di dinamica molecolare sembrano in contrasto con il modello barrel stave [21], proposto precedentemente per l’attività emolitica della TL, poiché tutti i peptidi tendono a localizzarsi all’interfaccia micella/acqua. In maggior dettaglio, la TL, altamente emolitica, si comporterebbe come una “barra elicoidale rigida”, quasi perpendicolare alla superficie della micella ma con la Phe¹ N-terminale più inserita nel core idrofobico e i residui C-terminali più esposti all’acqua. TL, quindi, non è perfettamente parallela alla superficie della micella ma è leggermente inclinata e può essere vista come una “zappa che ara i campi”. La Phe¹ e la Phe⁵ sono le lame e l’Arg¹¹ è il manico ancorato ai gruppi fosfato di DPC. Il risultante solco sulla superficie della micella è riempito dalle molecole d’acqua drenate dalle catene laterali di Gln³, Ser⁶ e Lys⁷. La mancanza di penetrazione profonda di TL nei lipidi zwitterionici è in contrasto sia con i nostri risultati sperimentali (paragrafo 4.2.3) sia con quelli di altri [84,87]. Questa incongruenza potrebbe essere dovuta a limiti tecnici delle simulazioni di dinamica molecolare. Oppure, siccome TL subisce una aggregazione molto rapida dopo la sua interazione con la superficie delle vescicole [87], si potrebbe pensare che la riorientazione e la penetrazione nella membrana potrebbe avvenire solo dopo lo step di oligomerizzazione. Quindi, si può ipotizzare la seguente sequenza di eventi (Figura 4.15):

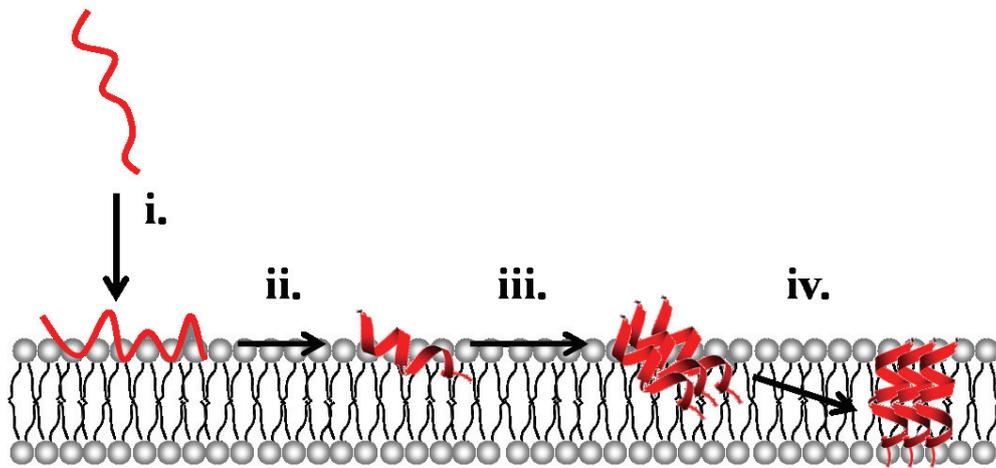


Figura 4.15. Illustrazione schematica delle fasi di associazione-strutturazione-aggregazione alla membrana.

i) iniziale associazione del peptide allo stato random coil rafforzata da interazioni elettrostatiche; *ii)* cambiamento conformazionale dallo stato random coil ad alfa elica amfipatica, con il peptide quasi parallelo al piano della membrana; *iii)* aggregazione dei peptidi elicoidali in oligomeri; *iv)* riorientazione e inserzione del peptide nella membrana.

Infine, gli oligomeri potrebbero organizzarsi in strutture a canale (meccanismo barrel-stave). In questo modello, la faccia idrofobica dell'elica amfipatica è a contatto con le catene idrofobiche del bilayer mentre la superficie idrofila punta all'interno, producendo un poro acquoso. Come precedentemente detto la lunghezza di un canale peptidico richiesta per attraversare completamente la membrana è di circa 23 residui. Poiché la TL è un peptide di soli 13 residui aminoacidici, una dimerizzazione coda-coda potrebbe spiegare il modello barrel stave [67,80]. Tale dimerizzazione è stata sperimentalmente osservata per la gramicidina, un peptide antibatterico lungo 15 residui aminoacidici [92]. È

interessante notare inoltre che il gruppo amminico terminale è prevalentemente in forma neutra nella TL, e questo potrebbe favorire la dimerizzazione CN-NC, evitando la repulsione tra cariche positive. Infine i meccanismi sopra descritti potrebbero evolvere nella formazione di un amiloide non tossico [93].

4.6 Conclusioni

La spettroscopia CD e NMR sono state usate per determinare la conformazione e localizzazione della TL e TA e dei suoi analoghi Gln³-TA e Pro³-TL sia in micelle zwitterioniche di DPC, che sono buoni modelli sperimentali delle membrane delle cellule eucariotiche, sia in micelle di SDS, che sono adatte a mimare la carica negativa delle membrane batteriche. I risultati ottenuti indicano un differente meccanismo molecolare alla base dell'azione antimicrobica ed emolitica di TA e TL. In particolare, i modelli “dynamic peptide-lipid supramolecular pore” e “barrel stave” sono stati rispettivamente impiegati per interpretare l'attività antimicrobica ed emolitica delle Temporine. L'attività biologica e l'analisi conformazionale di nuovi analoghi progettati confermano le nostre ipotesi. In particolare, rispetto al peptide nativo TL, l'analogo Pro³-TL ha mostrato un'incrementata potenza antimicrobica e una diminuzione dell'attività emolitica. L'analisi conformazionale dei nuovi analoghi ha confermato che la struttura ad elica nella regione N-terminale non è un requisito essenziale per il peptide per interagire con le cellule batteriche, ma è un elemento fondamentale per legare e penetrare le membrane zwitterioniche. Tale risultato ha rappresentato il punto di partenza per un'analisi computazionale dei peptidi TL e Pro³-TL, che differiscono

principalmente per il diverso effetto emolitico. L'analisi MD indica che TL produce delle distorsioni della micella di DPC maggiori rispetto al suo analogo Pro³-TL, in accordo col suo maggiore effetto emolitico. Combinando analisi spettroscopiche (NMR) e computazionali (MD) è stato quindi ottenuto un quadro a risoluzione molecolare dell'interazione tra la TL ed i suoi analoghi e micelle mimetiche delle membrane. La conoscenza del comportamento conformazionale di questi peptidi e del modo di interazione di ogni singolo residuo aminoacidico con modelli di membrane rappresenta uno strumento essenziale per la progettazione di nuove molecole con migliorate caratteristiche antimicrobiche e ridotto effetto emolitico.

4.7 Serie D: Progettazione e Caratterizzazione Biologica

L'analogo della TL denominato Pro³-TL, ha interessanti proprietà biologiche essendo un potente antimicrobico con ridotto effetto emolitico (Tabella 4.2). La riduzione dell'effetto emolitico osservata in Pro³-TL (e TA) è stata spiegata dalla perdita della conformazione ad α -elica nella regione N-terminale di questo peptide che a sua volta comporta una ridotta capacità di penetrare le micelle di DPC. Partendo da questo presupposto, sono stati progettati e sintetizzati nuovi analoghi della TL in cui l'alfa elica è stata interrotta anche nella regione centrale/C-terminale dei peptidi mediante l'introduzione di D-aminoacidi (Tabella 4.11).

Tabella 4.11: peptidi progettati a partire da TL

Peptide	Sequenza
TL	H-Phe-Val-Gln-Trp-Phe-Ser-Lys-Phe-Leu-Gly-Arg-Ile-Leu-NH ₂
Pro ³ -TL	H-Phe-Val-Pro-Trp-Phe-Ser-Lys-Phe-Leu-Gly-Arg-Ile-Leu-NH ₂
Pro ³ -DLys ⁷ -TL	H-Phe-Val-Pro-Trp-Phe-Ser-DLys-Phe-Leu-Gly-Arg-Ile-Leu-NH ₂
Pro ³ -DPhe ⁸ -TL	H-Phe-Val-Pro-Trp-Phe-Ser-Lys-DPhe-Leu-Gly-Arg-Ile-Leu-NH ₂
Pro ³ -DLeu ⁹ -TL	H-Phe-Val-Pro-Trp-Phe-Ser-Lys-Phe-DLeu-Gly-Arg-Ile-Leu-NH ₂
Pro ³ -DArg ¹¹ -TL	H-Phe-Val-Pro-Trp-Phe-Ser-Lys-Phe-Leu-Gly-DArg-Ile-Leu-NH ₂
Pro ³ -DIle ¹² -TL	H-Phe-Val-Pro-Trp-Phe-Ser-Lys-Phe-Leu-Gly-Arg-DIle-Leu-NH ₂
Pro ³ -DLeu ¹³ -TL	H-Phe-Val-Pro-Trp-Phe-Ser-Lys-Phe-Leu-Gly-Arg-Ile-DLeu-NH ₂

L'attività antimicrobica di questi peptidi è stata valutata come capacità di inibire la crescita di vari Gram-positivi, Gram-negativi e lieviti. I risultati sono mostrati nella Tabella 4.12.

Tabella 4.12: Attività antimicrobica ed emolitica TL e suoi analoghi.

	MIC (µM)							
	TL	Pro ³ -TL	DLys ⁷	DPhe ⁸	DLeu ⁹	DArg ¹¹	DIle ¹²	DLeu ¹³
Gram-negativi								
<i>Escherichia coli</i> D21	12	12	50	25	12.5	25	12.5	12.5
<i>Enterobacter faecalis</i> ATCC 29212	6	6	>100	50	25	50	25	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692	24	24	>100	100	>100	>100	50	50
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YPIII	3	3	12.5	6	6	12.5	12.5	6
Gram-positivi								
<i>Bacillus megaterium</i> Bm11	1.5	1.5	3	3	1.6	3	3	3
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I	3	1.5	12.5	6	6	6	12.5	6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	3	25	6	6	12.5	12.5	12.5
<i>Staphylococcus capitis</i> , 1	1.5	1.5	12.5	6	6	12.5	25	12.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	3	1.5	6	12.5	6	6	12.5	12.5
Lieviti								
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12	6	12.5	12.5	6	12.5	12.5	12.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	6	12.5	12.5	6	6	6	12.5
<i>Saccharomyces pombe</i>	6	3	12.5	12.5	3	6	6	25
Concentrazione di Peptide (µM)					% emolisi			
3	13	6	4	5	2	4	4	6
6	48	10	7	17	3	6	5	8
12	92	42	5	19	7	8	10	17
24	94	92	8	19	11	16	14.5	17

Tutti i peptidi della serie D presentano attività emolitica ridotta rispetto al peptide precursore TL ed anche di Pro³-TL. Il composto più interessante della serie è risultato il peptide in cui il residuo di Leu⁹ è stato sostituito con una D-Leu⁹. L'attività antimicrobica di questo analogo è incrementata contro linee cellulari di lievito di *Candida albicans* e *Saccharomyces pombe*, come indicato dai corrispondenti valori di minima concentrazione inibente (MIC), che risultano ridotti della metà (Tabella 4.12). Anche l'attività emolitica sugli eritrociti umani è notevolmente ridotta rispetto a TL naturale, in un range di concentrazioni di 3-24 μ M (Tabella 4.12).

L'elevata riduzione dell'attività emolitica e l'incremento dell'attività antifungina la rendono una molecola interessante per ulteriori studi struttura-attività.

4.8 Sezione Sperimentale

4.8.1 Sintesi

La sintesi è stata effettuata secondo la classica metodica in fase solida via Fmoc. Per l'ottenimento dei peptidi amidati sono stati utilizzati 0,5 g di resina Rink-amide con grado di sostituzione di 0,7 mmol/g. La resina è stata opportunamente rigonfiata utilizzando 5 ml di *N,N*-dimetilformamide (DMF) in corrente inerte di Ar per circa 2h. Dopo aver effettuato lo sblocco dell' NH_2 della resina, si è proceduto con l'accoppiamento del primo AA utilizzando un eccesso di 3 eq. in condizioni di agenti accoppianti: HOBt, HBTU, DIPEA rispettivamente nel rapporto di 3:3:6 in DMF per un tempo di 2h. La successiva deprotezione del gruppo N ^{α} dell'AA dal gruppo Fmoc, è stata effettuata mediante l'uso di una

soluzione di piperidina al 25% in DMF (in due tempi: il primo di 5 min e il secondo di 20 min). Cicli di accoppiamento e deprotezione sono stati monitorati dal Kaiser Test e sono stati effettuati in corrente inerte di Ar. Ultimata la sintesi, i peptidi ottenuti sono stati clivati dalla resina mediante una soluzione costituita da: 90% TFA, 5% TES e 5% H₂O in agitatore per 3h. La resina è stata rimossa per filtrazione e i composti grezzi in soluzione, sono stati, in seguito, precipitati in etere etilico freddo. Successivamente sono stati filtrati e purificati mediante RP-HPLC utilizzando una colonna semi-preparativa C-18 (Vydac 218TP1010, 1.0 x 25.00 cm) con un gradiente crescente di CH₃CN al 0.1% di TFA e H₂O al 0.1% di TFA ad un flusso di 1.0 mL/min. Le frazioni purificate sono state caratterizzate tramite MALDI (Kratos Analytical mod. Kompact) ed il grado di purezza è stato valutato mediante RP-HPLC analitico. Le frazioni pure sono state liofilizzate in seguito all'allontanamento della componente di CH₃CN con il rotavapor.

4.8.2 Microorganismi

Le seguenti linee cellulari batteriche usate sono state: i Gram-negativi *Enterobacter faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* D21, *Yersina pseudotuberculosis* YPIII, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692, *Pseudomonas syringae* pv tobaci 1918 NCPPB; i 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*.

4.8.3 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 delle piastre sterili con 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 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 [94]. 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.

4.8.4 Saggi Emolitici

L'attività emolitica è stata misurata sui globuli rossi umani [95]. Aliquote di eritrociti umani, sospesi in 0.9% (p/p) di NaCl, sono stati incubati peptide (disciolto in 20% di etanolo precedentemente usato) per 30 min a 37 °C sotto leggera agitazione. I campioni sono stati poi centrifugati e l'assorbanza dei supernatanti è stata misurata a 415 nm. La lisi completa è stata misurata sospendendo gli eritrociti in acqua distillata [96].

4.8.5 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-tetradeuterio-3-(trimetilsilano)]propionico (TPS) da MSD Isotopes (Montreal, Canada). L'acido 16-doxilsteario è stato ottenuto da Sigma, ed il MnCl₂ da Merck (Darmstadt, Germania).

4.8.6 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).

4.8.7 Spettroscopia NMR

Un intero set di spettri 1D e 2D NMR sono stati registrati per tutti i peptidi. 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 [97] tramite l'applicazione sistematica di esperimenti DQF-COSY [32], TOCSY [98] e NOESY [34] con il supporto del pacchetto software XEASY [64] (Tabella 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20). 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 -alica) e picchi slargati.

Tabella 4.13 Assegnazione dei chemical shifts ^1H NMR di TL in sds.

Residui	NH ($-\Delta\delta/\Delta T$, etc)	C $^{\alpha}$ H	C $^{\beta}$ H	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 (ϵ); 7.30, 6.79(ζ); 6.88(η)
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 4.14 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(ϵ); 7.26, 6.75(ζ); 6.71(η)
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, 3.62		
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 4.15 Assegnazione dei chemical shifts ^1H NMR di TA in sds.

Residui	NH ($-\Delta\delta/\Delta T$, etc)	C^αH	C^βH	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	1.60,1.220.88(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 4.16 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)

Tabella 4.17 Assegnazione dei chemical shifts ^1H NMR di Gln³-TA in sds.

Residui	NH ($-\Delta\delta/\Delta T$, exc)	C $^\alpha$ H	C $^\beta$ H	Altri
Phe 1		4.40	3.28, 3.21	7.32(δ); 7.31(ϵ)
Leu 2	8.37 (4.6, f)	4.07	1.82	1.54(γ); 0.85(δ)
Gln 3	8.55 (2.9, f)	4.09	2.11	2.44, 2.40(γ); 7.51, 6.88(ϵ)
Leu 4	8.08 (-0.1, ms)	4.11	1.87	1.58(γ); 0.94, 0.88(δ)
Ile 5	7.56 (2.0, ms)	3.63	2.00	1.64, 1.56, 0.88 (γ); 0.85(δ)
Gly 6	8.26 (3.8, ms)	3.95, 3.72		
Arg 7	7.82 (1.7, s)	4.11	1.99, 1.78	1.63(γ); 3.19, 3.14(δ); 7.14(ϵ)
Val 8	8.06 (4.6, ms)	3.77	2.19	1.06, 0.94(γ)
Leu 9	8.40 (2.4, ms)	4.10	1.82	1.53(γ); 0.84(δ)
Ser 10	8.13 (4.3, ms)	4.14	3.97	
Gly 11	7.88 (0.3, s)	3.98, 3.91		
Ile 12	7.74 (3.8, ms)	4.05	1.86	1.68, 1.24, 0.93(γ); 0.84(δ)
Leu 13	8.01 (5.3, f)	4.24	1.72	1.57(γ); 0.88(δ)

Tabella 4.18 Assegnazione dei chemical shifts ^1H NMR di Gln³-TA in dpc.

Residui	NH ($-\Delta\delta/\Delta T$, exc)	C $^{\alpha}$ H	C $^{\beta}$ H	Altri
Phe 1		4.13	3.45, 3.21	7.23(δ); 7.13(ϵ)
Leu 2	9.36 (1.4, f)	3.86	1.83, 1.78	1.52(γ); 0.95, 0.88(δ)
Gln 3	8.83 (0.3, f)	4.02	2.09	2.48, 2.32(γ); 7.76, 7.07(ϵ)
Leu 4	7.83 (0.4, ms)	4.07	1.75	1.62(γ); 0.92, 0.88(δ)
Ile 5	7.48 (1.1, ms)	3.59	1.85	1.38, 1.04, 0.87 (γ); 0.80(δ)
Gly 6	8.39 (1.9, ms)	3.90, 3.63		
Arg 7	7.90 (1.5, s)	4.09	1.98, 1.76	1.63(γ); 3.18(δ); 7.44(ϵ)
Val 8	8.08 (2.9, ms)	3.74	2.18	1.05, 0.93(γ)
Leu 9	8.41 (2.9, ms)	4.07	1.84	1.48(γ); 0.93, 0.82(δ)
Ser 10	8.22 (1.7, ms)	4.07	3.92	
Gly 11	7.90 (-0.2, s)	3.96, 3.85		
Ile 12	7.70 (3.1, ms)	4.01	1.88	1.74, 1.21, 0.92 (γ); 0.83(δ)
Leu 13	7.92 (3.7, ms)	4.18	1.76	1.56(γ); 0.87(δ)

Tabella 4.19 Assegnazione dei chemical shifts ^1H NMR di Pro³-TA in sds.

Residui	NH ($-\Delta\delta/\Delta T$, exc)	C $^{\alpha}$ H	C $^{\beta}$ H	Altri
Phe 1		4.48	3.19	7.35(δ); 7.26(ϵ)
Val 2	7.67 (6.1, f)	4.24	1.79	0.63(γ)
Pro 3		4.38	2.26	2.06(γ); 3.73(δ)
Trp 4	7.57 (3.2, ms)	4.33	3.32, 3.19	7.38(δ); 10.00, 7.17(ϵ); 7.32, 6.82(ζ); 6.92(η)
Phe 5	7.36 (1.6, ms)	4.24	2.94, 2.67	7.09(δ); 7.17(ϵ)
Ser 6	8.18 (2.9, ms)	4.01	3.95	
Lys 7	7.81 (1.8, s)	4.03	1.86	1.41, 1.33(γ); 1.62(δ); 2.91(ϵ); 7.39(ζ)
Phe 8	7.94 (3.2, ms)	4.31	3.10	7.11(δ); 7.16(ϵ)
Leu 9	8.23 (3.3, ms)	3.74	1.57, 1.51	1.39(γ); 0.76(δ)
Gly10	8.01 (1.1, ms)	3.80, 3.75		
Arg 11	7.58 (2.2, s)	4.16	1.94	1.67, 1.60(γ); 3.24, 3.15(δ); 7.23(ϵ)
Ile 12	7.56 (3.0, ms)	3.93	1.72	1.28, 1.00, 0.76 (γ); 0.62(δ)
Leu 13	7.98 (3.9, ms)	4.25	1.69	1.53(γ); 0.85(δ)

Tabella 4.20 Assegnazione dei chemical shifts ^1H NMR di Pro³-TA in dpc.

Residui	NH ($-\Delta\delta/\Delta T$, exc)	C $^\alpha$ H	C $^\beta$ H	Altri
Phe 1		4.23	3.14	7.21(δ); 7.26(ϵ)
Val 2	7.55 (1.2, f)	4.13	1.94	0.74(γ)
Pro 3		4.35	2.32, 1.93	2.07, 2.00(γ); 3.78, 3.74(δ)
Trp 4	7.92 (1.3, ms)	4.34	3.46, 3.27	7.45(δ); 10.90, 7.20(ϵ); 7.34, 6.80(ζ); 6.85(η)
Phe 5	7.27 (1.5, ms)	4.06	2.68, 2.49	6.96(δ); 7.15(ϵ)
Ser 6	8.27 (3.1, ms)	3.92	3.88	
Lys 7	7.82 (0.8, s)	4.04	1.87	1.45, 1.35(γ); 1.66(δ); 2.93(ϵ); 7.10(ζ)
Phe 8	7.89 (2.8, ms)	4.22	2.99	7.10(δ); 7.20(ϵ)
Leu 9	8.15 (2.9, ms)	3.71	1.58, 1.51	1.34(γ); 0.74(δ)
Gly10	8.04 (1.0, ms)	3.85, 3.71		
Arg 11	7.55 (2.0, s)	4.13	1.90	1.70, 1.60(γ); 3.22, 3.13(δ); 7.11(ϵ)
Ile 12	7.51 (2.9, ms)	3.89	1.73	1.29, 1.02, 0.74 (γ); 0.62(δ)
Leu 13	7.81 (3.9, ms)	4.20	1.71	1.50(γ); 0.85(δ)

I campioni per la spettroscopia NMR sono stati preparati dissolvendo un'adeguata 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. Gli spettri sono stati calibrati rispetto a TPS (0.00 ppm) come standard interno. Gli spettri monodimensionali sono stati

acquisiti con una trasformata di Fourier con la *quadrature detection*. Gli spettri bidimensionali DQF-COSY, TOCSY, e NOESY sono stati registrati in fase *sensitive mode* usando il metodo di States [63]. 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* [98]. Gli spettri bidimensionali NMR sono stati processati usando il pacchetto software NMRPipe [99]. 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. 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.

4.8.8 Esperimenti di Spin-Label

I campioni NMR sono stati preparati sciogliendo 2mM di peptide in 200 mM di soluzione di SDS deuterata in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90:10. Assumendo un numero di 56 micelle di SDS aggregate, questo corrisponde ad una concentrazione micellare di 3.6 mM. L'acido doxilsteario (solubilizzato in $\text{DMSO-}d_6$) e Mn^{2+} (disciolto in H_2O) sono stati addizionati ai campioni ad una concentrazione di uno spin label per micella.

4.8.9 Determinazioni Strutturali E Calcoli di Modellistica

I vincoli basati sulle distanze NOE sono stati ottenuti dagli spettri NOESY acquisiti con un *mixing time* di 200 ms. I *cross-peaks* NOE sono stati integrati con il programma XEASY e sono stati convertiti in *upper distance bounds* (distanze massime di legame) usando il programma CALIBA compreso nel pacchetto software DYANA. Solo le constraints derivanti dai dati NOE sono considerate nei processi di annealing. Per ciascun peptide esaminato, sono state prodotte un insieme di 200 strutture con il protocollo standard di *simulated annealing* del programma DYANA. Sono state scelte 100/200 strutture, le cui distanze interprotoniche meglio si adattavano alle distanze ottenute dai dati NOE, e poi rifinite attraverso successivi step di calcoli EM, *restrained* e *unrestrained* con l'algoritmo Discover (Accelrys, San Diego, CA) e il campo di forza CVFF (*consistent valence force field*) [100]. La minimizzazione ha ridotto l'energia totale delle strutture; nessun residuo è stato trovato nelle regioni non ammesse del Ramachandran plot. Le strutture finali sono state analizzate usando il programma InsightII (Accelrys, San Diego, CA). La rappresentazione grafica è stata eseguita con il programma InsightII (Accelrys, San Diego, CA). L'analisi delle deviazioni *rms* tra le strutture ad energia minimizzata è stata eseguita con il programma MOLMOL [66]. Il programma PROMOTIF è stato usato per estrarre dettagli sulla posizione e sul tipo di struttura secondaria [62].

4.8.10 Simulazioni di Dinamica Molecolare

La micella iniziale, costituita da 65 molecole di DPC, è stata ottenuta da Tieleman laboratory website; <http://moose.bio.ucalgary.ca> [101]. I peptidi sono stati posti all'interno delle micelle con una conformazione iniziale ad α -elica come determinato dagli studi NMR per TL in soluzione di DPC. Inoltre l'elica è stata posta perpendicolarmente alla superficie della micella come mostrato dall'analisi con le sonde paramagnetiche per TL in soluzione di DPC. Il centro di massa della micella è stato sovrapposto al centro di massa del peptide. L'inserimento del peptide ha richiesto la rimozione di cinque molecole di DPC. Per tutte le minimizzazioni e le simulazioni è stato usato il programma Amber9 [102]. I parametri dei peptidi sono stati definiti dal *force field* parm99 [103], mentre le molecole di DPC sono state parametrizzate usando il programma Antechamber [105] con il *General Amber Force Field* (GAFF) [104]. Infine il TIP3P è stato usato per le molecole d'acqua [105]. Il complesso peptide/micella/acqua è stato posto in una box rettangolare con una distanza dalle pareti di 8 Å. Sono stati aggiunti controioni mediante il modulo Leap per neutralizzare le cariche del sistema. Come primo step le molecole d'acqua sono state minimizzate. In seguito, per rimuovere possibili contatti tra i peptidi e la micella, l'intero sistema è stato minimizzato mediante 20.000 step di *steepest descent* seguiti da 10.000 step di *conjugate gradient*. I sistemi sono stati quindi riscaldati a 300 K mediante un algoritmo *weak coupling* e sono stati equilibrati per 185ps. 40ns di simulazione di dinamica molecolare sono stati effettuati per ogni sistema in *periodic boundary condition*. Il *cutoff* è stato settato a 10 Å. Le

interazioni elettrostatiche long-range sono state calcolate mediante l'algoritmo *particle-mesh Ewald* [106]. Il *time step* è stato settato a 1.5fs, e l'algoritmo SHAKE è stato usato per mantenere gli idrogeni nelle loro posizioni di equilibrio. Nessun atomo è stato mantenuto fisso durante la simulazione. La pressione del sistema è stata mantenuta ad 1 atm (NPT ensemble) e le coordinate per l'analisi sono state salvate ogni 0.15ps.

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. Le abbreviazioni usate sono le seguenti: SDS, dodecilsolfato di sodio; DPC, dodecilsolfocolina; 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*-glicerolo-3-fosfocolina; POPG, 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerolo-3-fosfoglicerolo; DCM, diclorometano; DIPEA, *N,N*-diisopropiletilamina; DMF, *N,N*-dimetilformamide; Et₃SiH, trietilsilano; Fmoc, 9-fluorenil-metossicarbonil; 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.

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, S32-S41.

[3] Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002, 415, 389-395.

[4] Papagianni, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications *Biotechnol Adv.* 2003, 21, 465-499.

[5] Boman, H.G. Innate immunity and normal microflora. *Immunol Rev.* 2000, 173, 5-16.

[6] Mangoni, M. L.; Miele, R.; Renda, T. G.; Barra, D.; Simmaco, M. The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms. *Faseb. J.* 2001, 15, 1431-1432.

[7] Bulet, P.; Stocklin, R.; Menin, L. Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 2004, 198, 169–184.

[8] Conlona, J.M.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Leprince, J.; Vaudry, H.; Coquet, L.; Jouennec, T.; King, J.D. Characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the Malaysian frogs, *Odorrana hosii* and *Hylarana picturata* Anura: Ranidae. *Toxicon* 2008, 52, 465-473.

[9] <http://w3.uniroma1.it/biocmed2/peptidi.html>.

[10] Ammar, B.; Perianin, A.; Mor, A.; Sarfati, G.; Tissot, M.; Nicolas, P. Dermaseptin, a peptide antibiotic, stimulates microbicidal activities of polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 247: 870-875.

[11] Gibson, B. W.; Tang, D. Z.; Mandrell, R.; Kelly, M.; Spindel, E. R. Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the Asian toad, *Bombina orientalis*. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 23103-23111.

[12] Simmaco, M.; Barra, D.; Chiarini, F.; Noviello, L.; Melchiorri, P.; Kreil, G.; Richter, K. A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*. *Eur. J. Biochem.* 1991, 199, 217-222.

[13] 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.

[14] Shai, Y.; Oren, Z. Diastereoisomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 7305-730

[15] Oren, Z.; Hong, J.; Shai, Y. A repertoire of novel antibacterial diastereomeric peptides with selective cytolytic activity. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 14643-14649.

[16] Zilberstein, D.; Schuldiner, S.; Padan, E. Proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells and its relation to active transport of lactose. *Biochemistry* 1979, 18, 669–673.

[17] de Kroon, A. I.; Vogt, B.; van't Hof, R.; de Kruijff, G.; de Gier, J. Ion gradient-induced membrane translocation of model peptides. *Biophys J.* 1991, 60, 525–537.

[18] Vaz Gomes, A.; de Waal, A.; Berden, J. A.; Westerhoff, H. V. Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes. *Biochemistry* 1993, 32, 5365–5372.

[19] Ehrenstein, G.; Lecar, H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quart Rev Biophys* 1977, 10, 1–34.

[20]. Ojcius, D. M.; Young, J. D. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends Biochem Sci* 1991, 16, 225–229.

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

[22] Pouny, Y.; Rapaport, D.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 1992, 31, 12416–12423.

[23] Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1462, 55–70.

[24] Ludtke, S. J.; He, K.; Heller, W. T.; Harroun, T. A.; Yang, L.; Huang, H. W. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 1996, 35, 13723–13728.

[25] Huang, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 2000, 39, 8347–8352.

[26] Chen, F.-Y.; Lee, M.-T.; Huang, H. W. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys J* 2003, 84, 3751–3758.

- [27] Ludtke, S. J.; He, K.; Huang, H. W. Antimicrobial peptide pores in membranes detected by neutron in-plane scattering. *Biochemistry* 1995, 34, 16764–16769.
- [28] Chen, F.-Y.; Lee, M.-T.; Huang, H. W. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin. *Biophys J* 2002, 82, 908–914.
- [29] Heller, W. T.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Yang, L.; Huang, H. W. Membrane thinning effect of the beta-sheet antimicrobial protegrin. *Biochemistry* 2000, 39, 139–145.
- [30] Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. Lee, M.-T.; Chen, F.-Y.; Huang, H. W. *Biochemistry* 2004, 43, 3590–3599.
- [31] Greenfield N.J., Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical Biochemistry*, 1996, 235, 1-10.
- [32] (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.

[33] Bax A., Davis D.G. Mlev-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn Reson.* 1985, 65, 355–360.

[34] 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.

[35] Karplus M., *J. Chem. Phys.*, 1959, 30, 11.

[36] Pardi A., Billater M., Wüthrich K., *J. Mol. Biol.*, 1984, 180, 741.

[37] Eberle A. *The Melanotropins*. Basel, Switzerland: Karger 1988.

[38] Catania, A.; Lipton, J.M. α -Melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions. *Endocr. Rev.* 1997, 14, 564-576.

[39] Lipton, J.M.; Catania, A. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator α -MSH. *Immunol. Today* 1997, 18, 140-145.

[40] Chhajlani, V.; Wikberg, J.E. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.* 1992, 309, 417-420.

[41] Mountjoy, K.G.; Robbins, L.S.; Mortrud, M.T.; Cone, R.D. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992, 257, 1248-1251.

[42] Cone, R.D.; Lu, D.; Koppula, S.; Vage, D.I.; Klungland, H.; Boston, B.; Chen, W.; Orth, D.N.; Pouton, C.; Kesterson, R.A. The melanocortin receptors: agonists, antagonist, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog. Horm. Res.* 1996, 51, 287-317.

[43] Gantz, I.; Miwa, H.; Konda, Y.; Shimoto, Y.; Tashiro, T.; Watson, S.L.; DelValle, J.; Yamada, T. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 15174-15179.

[44] Gantz, I.; Shimoto, Y.; Konda, Y.; Miwa, H.; Dickinson, C.J.; Yamada, T. Molecular cloning, expression, and characterization of a fifth melanocortin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 200, 1214-1220.

[45] Gantz, I.; Tashiro, T.; Shimoto, Y.; Miwa, H.; Munzert, G. Watson, S.L.; DelValle, J.; Yamada, T. Molecular cloning, of a novel melanocortin receptor. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 8246-8250.

[46] Wikberg, J.E. Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 1999, 375, 295-310.

[47] Cutuli, M.; Cristiani, S.; Lipton, J.M.; Catania, A. Antimicrobial effects of α -MSH peptides. *J. Leucocyte Biol.* 2000, 67, 233-239.

[48] Fox, J.A.; Kraicer, J. Immunoreactive α -melanocyte stimulating hormone, its distribution in the gastrointestinal tract of intact and hypophysectomised rats. *Life Sci.* 1981, 28, 2127-2132.

[49] Thody, A.J.; Ridley, K.; Penny, R.J.; Chalmers, R.; Fisher, C.; Shuster, S. MSH peptides are present in mammalian skin. *Peptides*, 1983, 4, 813-816.

[50] Colombo, G.; Buffa, R.; Bardella, M.T.; Garofalo, L.; Carlin, A.; Lipton, J.M.; Catania, A. Anti-inflammatory effects of α -melanocyte stimulating hormone in celiac intestinal mucosa. *Neuroimmunomodulation* 2006, 13, 51–55.

[51] Grieco, P.; Rossi, C.; Colombo, G.; Gatti, S.; Novellino, E.; Lipton, J.M.; Catania, A. Novel α -melanocyte stimulating hormone peptide analogues with high candidacidal activity. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 850–855.

[52] Hruby, V.J.; Wilkes, B.C.; Hadley, M.E.; Al-Obeidi, F.; Sawyer, T.K.; Staples, D.J.; de Vaux, A.E.; Dym, O.; Castrucci, A.M.; Hintz, M.F. α -Melanotropin: the minimal active sequence in the frog skin bioassay. *J. Med. Chem.* 1987, 30, 2126–2130.

[53] Hancock, R.E.; Lehrer, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 1998, 16, 82-88.

[54] Hong, S.Y.; Park, T.G.; Lee, K.H. The effects of charge increase on the specificity and activity of a short antimicrobial peptide. *Peptides* 2001, 22, 1669-1674.

[55] Ying, J.; Gu, X.; Cai, M.; Dedek, M.; Vagner, J.; Trivedi, D.B.; Hruby, V.J. Design, synthesis, and biological evaluation of new cyclic melanotropin peptide analogues selective for the human melanocortin-4 receptor. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 6888–6896.

[56] Cho, M.K.; Lee, C.J.; Lee, C.H.; Li, S.Z.; Lim, S.K.; Baik, J.H.; Lee, W. Structure and function of the potent cyclic and linear melanocortin analogues. *J. Struct. Biol.* 2005, 150, 300–308.

- [57] Ying, J.; Kover, K.E.; Gu, X.; Han, G.; Trivedi, D.B.; Kavarana, M.J.; Hruby, V.J. Solution structures of cyclic melanocortin agonists and antagonists by NMR. *Biopolymers* 2003, 71, 696–716.
- [58] Cho, M.K.; Kim, S.S.; Lee, M.R.; Shin, J.; Lee, J.; Lim, S.K.; Baik, J.H.; Yoon, C.J.; Shin, I.; Lee, W. NMR studies on turn mimetic analogs derived from melanocyte-stimulating hormones. *J Biochem. Mol. Biol.* 2003, 36, 552–557.
- [59] Li, S.Z.; Lee, J.H.; Lee, W.; Yoon, C.J.; Baik, J.H.; Lim, S.K. Type I beta-turn conformation is important for biological activity of the melanocyte-stimulating hormone analogues. *Eur. J. Biochem.* 1999, 265, 430–440.
- [60] Al-Obeidi, F.; O'Connor, S.D.; Job, C.; Hruby, V.J.; Pettitt, B.M. NMR and quenched molecular dynamics studies of superpotent linear and cyclic alpha-melanotropins. *J. Pept. Res.* 1998, 51, 420–431.
- [61] Guntert, P.; Mumenthaler, C.; Wüthrich, K. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* 1997, 273, 283–298.
- [62] Hutchinson, E.G.; Thornton, J.M. PROMOTIF – a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci.* 1996, 5, 212–220.

- [63] States, D.J.; Haberkorn, R.A.; Ruben, D.J. A two-dimensional nuclear overhauser experiment with pure absorption phase four quadrants. *J. Magn. Reson.* 1992, 48, 286–292.
- [64] Bartels, C.; Xia, T.; Billeter, M.; Güntert, P.; Wüthrich, K. The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* 1995, 6: 1–10.
- [65] Maple, J.; Dinur, U.; Hagler, A.T. Derivation of force fields for molecular mechanics and dynamics from ab initio energy surface. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 1998, 85, 5350–5354.
- [66] Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* 1996, 14, 51–55.
- [67] Simmaco, M.; Mignogna, G.; Canofeni, S.; Miele, R.; Mangoni, M.L.; Barra, D. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur. J. Biochem.* 1996, 242, 788–792.
- [68] Krishnakumari, V.; Nagaraj, R. 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.* 1997, 50, 88–93.

[69] Argiolas, A.; Pisano, J. J. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*. *J. Biol. Chem.* 1994, 259, 10106–10111.

[70] Mangoni, M.L.; Miele, R.; Renda, T.G.; Barra, D.; Simmaco, M. Molecular cloning of a bombin gene from *bombin orientalis*: detection of NF- κ B and NF-IL6 binding sites in its promoter. *FEBS Lett.* 1998, 431, 23-28.

[71] Wade, D. Unambiguous consensus sequences for Temporin-like antibiotic peptides. *Internet J. Chem.* 2002, 5, 5.

[72] 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.

[73] 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.

[74] 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.

[75] 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.

[76] Henry, G.D.; Sykes, B.D. Methods to study membrane protein structure in solution. *Methods Enzymol.* 1994, 239, 515–535.

[77] 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.

[78] 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.

[79] 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.

[80] 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.

[81] 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.

[82] 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.

[83] 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.

[84] Zhao, H; Kinnunen, PK. Binding of the antimicrobial peptide Temporin L to liposomes assessed by Trp fluorescence. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 25170-25177.

[85] a) Wishart, D.S.; Sykes, B.D.; Richards, F.M. The Chemical Shift Index: a fast method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1992, 31, 1647-1651. b) Andersen, N.H.; Liu, Z.; Prickett, K.S. Efforts toward deriving the CD spectrum of a $3_{(10)}$ helix in aqueous medium. *FEBS Lett.* 1996, 399, 47-52.

[86] 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.

[87] 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.

[88] 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.

[89] Matsuzaki, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1376, 391–400.

[90] Wu, M.; Maier, E.; Benz, R.; Hancock, R. E. W. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1999, 38, 7235–7242.

[91] Wieprecht, T.; Dathe, M.; Epanand, R.M.; Beyermann, M.; Krause, E.; Maloy, W. L.; MacDonald, D.L.; Bienert, M. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry* 1997, 36, 6124–6132.

[92] Kovacs, F.; Quine, J.; Cross, T.A. Validation of the single-stranded channel conformation of gramicidin A by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96, 7910-7915.

[93] Mahalka, A.K.; Kinnunen, P.K. Binding of amphipathic α -helical antimicrobial peptides to lipid membranes: lessons from Temporins B and L. *Biochim. et Biophys. Acta* 2009, 1788, 1600–1609.

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

- [95] 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.
- [96] Henry, G.D.; Sykes, B.D. Methods to study membrane protein structure in solution. *Methods Enzymol.* 1994, 239, 515–535.
- [97] Wüthrich, K. In *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons, Inc.: New York. 1986.
- [98] Hwang, T.L.; Shaka, A.J. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *J. Magn. Res.* 1995, 112, 275-279.
- [99] Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR.* 1995, 6, 277-93.
- [100] Maple, J.; Dinur, U.; Hagler, A.T. Derivation of force fields for molecular mechanics and dynamics from ab initio energy surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988, 85, 5350-5354.

- [101] Tieleman Laboratory website; <http://moose.bio.ucalgary.ca>.
- [102] Case, D.A.; Darden, T.A.; Cheatham, T.E., Simmerling, C.L.; Wang, J.; Duke, R.E.; Luo, R.; Merz, K. M.; Pearlman, D.A.; Crowley, M.; Walker, R.C.; Zhang, W.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Wong, K.F.; Paesani, F.; Wu, X.; Brozell, S.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Yang, L.; Tan, C. AMBER9; University of California: California, 2006.
- [103] Wang, J.M.; Cieplak, P.; Kollman, P.A.. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* 2000, 21, 1049-1074.
- [104] Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanism calculations. *J. Mol. Graphics Modell.* 2006, 25, 247-260.
- [105] Jorgensen, W.L; Chandrasekhar, J; Madura, J.D.; Impey, R.W.; Klein, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 1983, 79, 926-935.

[106] Zhou, R.; Harder e.; Xu, H.; Berne, B.J. Efficient multiple time step method for use with Ewald and particle mesh Ewald for large biomolecular systems. *J. Chem. Phys.* 2001, 115, 2348-2358.

PUBBLICAZIONI

I risultati del presente lavoro di ricerca sono stati oggetto delle seguenti pubblicazioni:

Carotenuto, A.; **Saviello, M.R.**; Auriemma, L.; Campiglia, P.; Catania, A.; Novellino, E.; Grieco, P. Structure-function relationships and conformational properties of alpha-MSH(6-13) analogues with candidacidal activity. *Chem. Biol. Drug des.* 2007, 69, 68-74.

Carotenuto, A.; Malfi, S.; **Saviello, M.R.**; Campiglia, P.; Gomez-Monterrey, I.; Mangoni, M.L.; Herculani Gaddi Marcellini, L.; Novellino, E.; Grieco, P. A Different Molecular Mechanism Underlying Antimicrobial and Hemolytic Actions of Temporins A and L. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 2354-2362.

Saviello, M.R.; Malfi, S.; Campiglia, P.; Cavalli, A.; Grieco, P.; Novellino, E.; Carotenuto, A. New Insight into the Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptides Temporins. Inviato a *Biochemistry* in referaggio.

