

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**MODULAZIONE DEL QUORUM SENSING BATTERICO NELLA
PROGETTAZIONE DI BIOMATERIALI INNOVATIVI**

Relatore: Prof.ssa Monica Dettin

Correlatore: Prof.ssa Paola Brun

Laureanda: Jessica Mustali

ANNO ACCADEMICO 2020 – 2021

21 Luglio 2021

ABSTRACT

I dispositivi biomedici sono parte fondante della salute e del benessere personale. Lo sviluppo e l'utilizzo di dispositivi sempre più complessi per la prevenzione, la diagnosi e la terapia è senza dubbio uno dei fattori di prolungamento e miglioramento della qualità della vita nei paesi occidentali. Per questo motivo la domanda di dispositivi medici sicuri ed efficaci è crescente e, di conseguenza, il loro mercato è in espansione. I notevoli progressi nel campo dei dispositivi medici, concretizzati negli ultimi decenni, sono in parte da attribuire al crescente sviluppo di nuovi biomateriali. Tuttavia, al loro impiego possono essere ancora associate gravi infezioni batteriche. La superficie abiotica dei biomateriali può essere colonizzata da microorganismi che si aggregano in biofilm, ovvero comunità batteriche immerse in una matrice polisaccaridica da esse prodotta. La spesa energetica necessaria alla produzione della matrice avviene nel senso di una maggiore protezione dall'ambiente esterno dei microbi stessi, una maggiore disponibilità di nutrienti e di cooperazione metabolica. I biofilm batterici sono caratterizzati da una drastica diminuzione della sensibilità dei microbi a vari agenti antibiotici e ai disinfettanti. Queste premesse spiegano la necessità di ricercare nuove strategie innovative per trattare le complicanze causate da batteri organizzati in colonie.

Un nuovo fronte da investigare per prevenire le infezioni correlate a biofilm consiste nell'inibizione del *quorum sensing*, sistema di comunicazione intercellulare che i batteri utilizzano per coordinarsi e responsabile della formazione del biofilm.

Il *quorum sensing* si basa sul rilascio di piccole molecole segnale (*autoinducers*) da parte dei batteri che, una volta raggiunto un valore soglia di densità cellulare delle microcolonie (*quorum*), attivano la coordinata espressione nella popolazione microbica di fattori di virulenza coinvolti nello sviluppo di biofilm, produzione di molecole ad attività antimicrobica e tossine, essenziali alla specie batterica per competere con successo con gli altri batteri e sbaragliare le difese dell'ospite. Pertanto, la ricerca di composti che abbiano la capacità di interferire nella comunicazione cellulare, inibendo il *quorum sensing* e bloccando la coordinata espressione genica responsabile della crescita di colonie batteriche potrebbe rappresentare la strategia vincente contro la formazione di biofilm. In futuro si potrebbe dunque approdare all'utilizzo di biomateriali trattati (*coating*) con molecole inibitorie del *quorum sensing* come agenti anti-biofilm.

Lo *Streptococcus mutans* è un batterio Gram positivo che utilizza un *competence stimulating peptide* (di seguito denominato CSP *mutans*) di 21 amminoacidi per attivare l'espressione genica e indurre la crescita di biofilm. In questo lavoro di tesi ci siamo posti l'obiettivo di studiare l'effetto, auspicabilmente inibitorio, sul *quorum sensing* in *S. mutans* da parte di molecole ottenute tramite modifiche chimiche in punti strategici del CSP.

Nel presente lavoro di tesi sono stati sintetizzati il CSP *mutans* e una permutazione della sua sequenza peptidica, CSP *scrambled*, come controllo negativo per i saggi biologici. Sono inoltre stati ottenuti altri tre peptidi analoghi del CSP *mutans* tramite reazioni di acetilazione, doppia acetilazione (peracetilazione) e acilazione con il gruppo benzoile. Sono stati eseguiti i primi saggi funzionali *in vitro* atti alla valutazione dell'effetto dei peptidi sulla crescita di *S. mutans* in forma planctonica e sulla formazione di biofilm di *S. mutans*. Lo studio proseguirà con altri esperimenti che permetteranno di definire la possibile azione inibitoria degli analoghi del CSP *mutans* al meccanismo di *quorum sensing*, alla conseguente formazione di biofilm e all'attivazione degli altri fattori di virulenza.

INDICE

CAPITOLO 1	1
Introduzione	1
1.1 Biomateriali e infezioni.....	1
1.2 Biofilm e biomateriali	4
1.3 <i>Streptococcus mutans</i>	5
1.4 <i>Quorum sensing</i>	6
1.5 <i>Quorum sensing</i> in <i>Streptococcus mutans</i>	9
1.6 Scopo della tesi	10
CAPITOLO 2	11
Materiali, strumenti e metodi	11
2.1 Materiali	11
2.1.1 Reagenti.....	11
2.1.2 Peptidi sintetizzati	12
2.1.3 Analoghi del peptide	13
2.1.4 Ceppi batterici e terreni di coltura.....	14
2.2 Strumenti	14
2.2.1 Sintetizzatore per sintesi peptidica su fase solida	14
2.2.2 Test alla ninidrina.....	15
2.2.3 Cromatografia	15
2.2.4 Analisi di massa	16
2.2.5 Densità ottica.....	17
2.2.6 Ulteriore strumentazione di laboratorio	17
2.3 Metodi	17
2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida.....	18
2.3.1.1 Attivazione del gruppo carbossilico.....	21
2.3.1.2 Test alla Ninidrina.....	21
2.3.1.3 Sbocco del peptide dalla resina	24
2.3.2 Purificazione e caratterizzazione cromatografica	24

2.3.3 Spettroscopia UV/Vis.....	27
2.3.4 Spettrometria di massa	29
2.3.5 Reazione di acetilazione.....	31
2.3.6 Reazione di addizione del gruppo benzoile	31
 CAPITOLO 3	 33
Parte sperimentale	33
3.1 Sintesi peptidica	33
3.1.1 Sintesi del peptide CSP <i>mutans</i>	33
3.1.2 Caratterizzazione e purificazione del peptide CSP <i>mutans</i>	36
3.1.3 Sintesi del peptide CSP <i>scrambled</i>	41
3.1.4 Caratterizzazione e purificazione del peptide CSP <i>scrambled</i>	44
3.1.5 Analoghi del CSP	51
3.1.5.1 Preparazione del peptide CSP <i>acetilato</i>	51
3.1.5.2 Caratterizzazione e purificazione del peptide CSP <i>acetilato</i>	52
3.1.5.3 Preparazione del peptide CSP <i>peracetilato</i>	57
3.1.5.4 Caratterizzazione e purificazione del peptide CSP <i>peracetilato</i>	58
3.1.5.5 Preparazione del peptide CSP <i>benzoile</i>	67
3.1.5.6 Caratterizzazione e purificazione del peptide CSP <i>benzoile</i>	68
3.2 Saggi cellulari.....	73
3.2.1 Curva di crescita di <i>S. mutans</i>	73
3.2.2 Valutazione della formazione di biofilm di <i>S. mutans</i>	74
Discussione e conclusioni	77
Riferimenti bibliografici.....	79
Ringraziamenti	83

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 Biomateriali e infezioni

Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo (II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Gran Bretagna, 1991). La definizione di biomateriale è cambiata nel tempo a fronte della grande evoluzione che questo campo della ricerca ha conosciuto. Possiamo raccogliere i biomateriali in base al tipo di interazione con il sistema biologico in:

- Biomateriali di prima generazione: il requisito fondamentale per il materiale è di essere bioinerte, ovvero di possedere una combinazione adeguata di proprietà fisiche uguali a quelle del tessuto sostituito, con una tossicità minima;
- Biomateriali di seconda generazione: si richiede al materiale di essere bioattivo, ovvero di provocare azioni e reazioni controllate nell'ambiente fisiologico, o riassorbibile, dunque di degradarsi chimicamente e riassorbirsi in maniera controllata, in modo da essere sostituito dal tessuto che lo ospita, senza causare problemi di rigetto o tossicità.
- Biomateriali di terza generazione: rappresenta il presente e il futuro dei biomateriali; il materiale deve essere sia bioattivo che riassorbibile [1].

I biomateriali si possono classificare in base alla loro natura chimica in metallici, polimerici, ceramici, compositi, biologici. Ogni tipo di biomateriale ha delle proprie caratteristiche, presentando dei vantaggi e degli svantaggi relativi al suo utilizzo che ne permettono delle differenti applicazioni nel settore biomedico. In tabella 1 sono riportati degli esempi di impiego dei diversi tipi di biomateriali.

Materiali	Applicazioni
Metallici (<i>acciai, titanio e leghe, leghe di cobalto</i>)	protesi in ortopedia e odontoiatria
Polimerici (<i>siliconi, poliuretani, polietilene, poliesteri</i>)	suture, cateteri, protesi cardiovascolari
Ceramici (<i>ossidi di alluminio, alluminati di calcio, ossidi di titanio</i>)	protesi d'anca, protesi dentali
Compositi (<i>metalli rivestiti con ceramici, matrici rinforzate con fibre</i>)	protesi valvolari cardiache, protesi di ginocchio
Biologici (<i>vene, pericardio</i>)	protesi vascolari e rivestimenti

Tabella 1: Biomateriali e loro applicazioni nel settore dei Dispositivi medici.

I biomateriali sono dunque una classe di prodotti di impiego sempre più diffuso per applicazioni che, pur essendo tutte classificabili nell'ambito della salute, sono molto differenti tra loro [2].

Per sopperire agli svantaggi che i diversi tipi di materiali hanno, si cerca di ingegnerizzarli affinché siano meglio riconosciuti all'interno del corpo umano e acquisiscano proprietà innovative e benefiche. Vari materiali sono stati impiegati nell'implantologia in campo medico durante gran parte del XX secolo. Nonostante si sia assistito ad un ovvio miglioramento nel tempo in quanto a sofisticazione e qualità dei materiali, solo durante gli ultimi vent'anni si è verificata una rivoluzione nell'approccio ai concetti di materiali per protesi mediche. Secondo il vecchio approccio le protesi venivano costruite con materiali sintetici, come ad esempio il polietilene o materiali ceramici ricoperti di titanio in associazione col polietilene, a basso coefficiente di frizione, massima inerzia e capacità minima di indurre irritazioni. Tuttavia, vari studi hanno dimostrato che l'impiego di materiali inerti, che non innescano cioè alcuna reazione nell'organismo ospite, né di rifiuto né di riconoscimento, non ha portato a buoni risultati. Nessun dispositivo che sia tollerato passivamente dall'organismo e non stimoli una incorporazione ed un riconoscimento può assicurare la stabilità delle sue prestazioni nel lungo periodo [3]. Gli studi più recenti sono pertanto rivolti all'impiego di materiali bioattivi, ovvero capaci di promuovere funzioni benefiche nelle cellule e nei tessuti che circondano l'impianto.

Requisito fondamentale di cui i biomateriali devono essere in possesso è la biocompatibilità, ovvero l'attitudine del materiale ad essere ben tollerato dall'organismo ospite, determinando una risposta opportuna in relazione all'applicazione da parte di quest'ultimo. Gli aspetti fondamentali della biocompatibilità sono: la tossicità del materiale, di eventuali sostanze rilasciate, dei prodotti di degradazione, la carcinogenicità,

ossia la valutazione e predizione a lungo termine dei possibili effetti carcinogenici di un biomateriale, l’emocompatibilità, ossia l’effetto prodotto dal contatto (a breve e lungo termine) con il sangue (es. potenziale emolitico), la trombogenicità, ossia la valutazione dell’induzione alla formazione di trombi per contatto diretto con il biomateriale.

La biocompatibilità di un materiale deve conservarsi per l’intera durata dell’applicazione a cui è destinato e non è una proprietà intrinseca del biomateriale, in quanto ogni paziente può reagire al contatto con il biomateriale in maniera diversa.

La biocompatibilità di un materiale può essere compromessa dalla contaminazione da parte di batteri. Infatti, nonostante i notevoli progressi nel campo dei dispositivi medici impiantabili, concretizzati negli ultimi decenni grazie al crescente sviluppo di nuovi, più idonei, materiali sintetici, possono ancora risultare ancora associate al loro impiego gravi complicanze infettive.

Le infezioni rappresentano un serio problema da tenere in considerazione quando si studiano le proprietà della superficie di un biomateriale e le procedure di impianto. Si possono riconoscere tre tipi di infezione associati agli impianti:

1. Infezione immediata superficiale: ha luogo sulla o vicino alla pelle e può essere causata dai batteri che normalmente popolano la pelle o l’ambiente esterno.
2. Infezione immediata in profondità: tende ad avvenire poco dopo le procedure chirurgiche invasive e sembra essere dovuta ai batteri inavvertitamente trasferiti dalla pelle o dall’ambiente esterno
3. Infezione ritardata in profondità: ha luogo a mesi (o anni) di distanza dall’intervento chirurgico che non ha dato precedenti problemi. Può essere imputata ad una comparsa ritardata della contaminazione che è stata effettivamente prodotta nel corso dell’intervento, ma che si sviluppa lentamente. Può anche essere il risultato di batteri che erano presenti in un altro sito anatomico e che, una volta entrati nel flusso sanguigno, hanno colonizzato il nuovo sito. Le infezioni ritardate sono un grosso problema in molte procedure di impianto, non perché abbiano luogo frequentemente, ma perché sono assai difficili da trattare. La rimozione di suture infette è facile; la rimozione di una valvola cardiaca o di una protesi d’anca con nuovi materiali è molto più complicata [4].

Quando un biomateriale viene impiantato nel corpo umano, si sviluppa una “corsa alla superficie” tra cellule dell’ospite e batteri eventualmente presenti [5,6,7]. I batteri hanno il vantaggio, rispetto alle cellule del sistema immunitario, di processi riproduttivi più

veloci e di una estrema capacità di adattamento all’ambiente, con immediata formazione di biofilm già dopo poche ore dall’adesione sull’impianto. Gli studi indicano che la presenza di biomateriali impiantati riduce anche di 10.000 volte il numero di batteri necessari per causare un’infezione [7]. Una volta che un biofilm si è formato, è difficile da trattare poiché i batteri risultano maggiormente protetti sia dalla fagocitosi che dagli antibiotici. [8,9]

I batteri sono in grado di resistere a una gamma sempre più ampia di antibiotici: se i batteri sono resistenti all’antibiotico rilasciato, questa soluzione è del tutto inefficace; se la concentrazione di antibiotico è meno che efficace, si incorre nel rischio di creare un nuovo ceppo di batteri antibiotico-resistenti.

Per tutti questi motivi, avendo constatato i limiti degli antibiotici sistematici nel trattamento e nella prevenzione delle infezioni correlate a biofilm, la ricerca è volta alla progettazione di rivestimenti innovativi dei biomateriali impiantabili, allo scopo di prevenire l’adesione e la colonizzazione batterica e la formazione del biofilm [10,11,12].

1.2 Biofilm e biomateriali

La formazione di biofilm batterici sulla superficie dei biomateriali rappresenta una delle criticità da affrontare e tenere in considerazione nella loro fase di progettazione, affinché non venga meno la fondamentale proprietà di sterilità di cui i biomateriali devono essere in possesso per non perdere la biocompatibilità.

I biofilm sono comunità strutturate di cellule microbiche e altri microrganismi racchiusi in una matrice esopolisaccaridica autoprodotta. La superficie colonizzata funge da base di sostegno e può essere un tessuto vivente (biotico) o un qualunque altro materiale (abiotico). La capacità dei microrganismi batterici di formare biofilm su differenti tipi di superfici rappresenta uno dei maggiori contributi al meccanismo etio-patogenico di infezione batterica. È stato riportato che una percentuale compresa tra il 65% e l’80% delle infezioni batteriche trattate dai medici nei paesi sviluppati è causata da batteri che crescono in biofilm, e che tutte le infezioni batteriche associate all’uso di dispositivi medici appartengono a questa categoria [9,13].

La matrice è solitamente la parte preponderante del biofilm, la quale può arrivare a rappresentare il 90% del peso a secco del biofilm. Tale matrice autoprodotta appare come una pellicola che ricopre la comunità microbica, da cui deriva il termine biofilm. La

matrice extracellulare funge principalmente da barriera fisica contro stress ambientali, attacchi di altri organismi, asportazione meccanica e infine contro agenti antimicrobici. La crescita in biofilm conferisce ai batteri una resistenza ai trattamenti antibiotici fino a 1000 volte superiore rispetto agli stessi batteri cresciuti in colture planctoniche (batteri isolati ed in sospensione). I motivi di questa resistenza sono da imputare, tra l'altro, ad un rallentata diffusione delle sostanze attraverso la matrice e alla presenza di microrganismi con attività metabolica molto diversa [14,15].

La formazione del biofilm è un processo dinamico e complesso che si articola in diverse fasi: adesione dei batteri alla superficie, formazione di microcolonie e maturazione del biofilm (fig. 1).

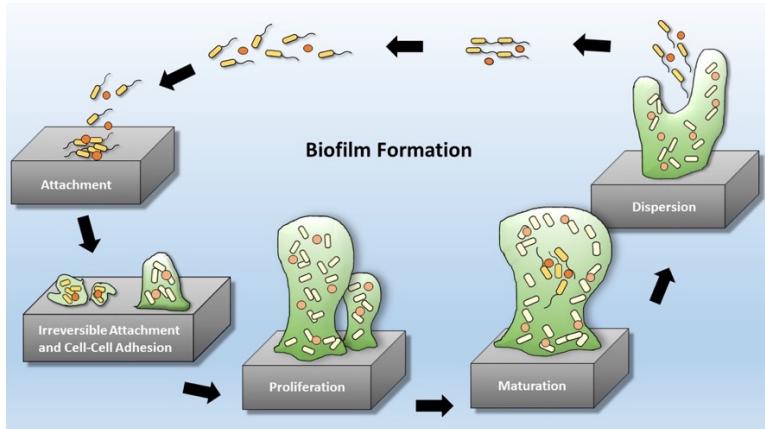


Figura 1: Formazione di biofilm

L'adesione al substrato e la formazione di microcolonie sono eventi influenzati da segnali ambientali, quali pH, osmolarità, disponibilità di ferro, ossigeno, temperatura e disponibilità di nutrienti [16]. La maturazione del biofilm avviene secondo un meccanismo legato alla concentrazione batterica ed è regolata dal *quorum sensing*, sistema di comunicazione interbatterico [15].

1.3 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans è un batterio Gram-positivo che forma attivamente biofilm con meccanismo mediato da *quorum sensing*. *S. Mutans* è un buon organismo-modello per lo studio del ruolo del *quorum sensing* nella formazione di biofilm, poiché il funzionamento

del suo *quorum sensing* è stato studiato e alcune delle sue caratteristiche si conservano in altri organismi.

S. Mutans è stato isolato dalle carie nel 1924 ed è stato di conseguenza considerato uno dei principali agenti eziologici delle carie. *S. mutans* manifesta ottima capacità di adesione, caratteristica comune a tutti gli Streptococchi [17], grazie all'esposizione sulla superficie cellulare di svariate adesine. GBP (glucan binding protein) è la proteina maggiormente presente sulla superficie di *S. mutans* la quale lega i glucani della matrice extracellulare del biofilm [18]. Oltre alla formazione delle carie, *S. mutans* è implicato anche nella progressione delle parodontiti e nell'instaurazione di un processo infiammatorio a carico delle gengive. Dalle lesioni presenti nella cavità orale, *S. mutans* può raggiungere il circolo sistemico ed essere responsabile di endocarditi essendo in grado di colonizzare le valvole cardiache con formazione di biofilm su di esse. Diversi studi riportano un'incidenza di 3-6 casi di endocarditi di origine infettiva ogni 100000 persone ogni anno [19], dei quali il 15% a carico di *S. mutans* [20].

1.4 *Quorum sensing*

Molti batteri coordinando la loro attività usando un sistema di comunicazione intercellulare noto come *quorum sensing* (QS). Il *quorum sensing* consiste nella modifica dell'espressione genica in risposta a una variazione della densità di popolazione batterica. Questo sistema di comunicazione è mediato dal rilascio e ricezione di molecole segnale chiamate *autoinducers* (autoinduttori). Durante il loro ciclo riproduttivo, i singoli batteri sintetizzano *autoinducers*. Nei batteri gram-negativi, le molecole segnale prodotte, Acil-omoserina lattoni (AHLs) o altre molecole sintetizzate a partire da S-adenosilmethionina (SAM), diffondono passivamente attraverso la sottile membrana cellulare. Al contrario, i batteri gram-positivi utilizzano piccoli peptidi come *autoinducers*, che devono essere trasportati attivamente attraverso la membrana di peptidoglicani grazie alle proteine ABC (dall'inglese ATP-binding cassette). In ambo i casi, gli autoinduttori escono dalle singole cellule non appena sono prodotti. La concentrazione di *autoinducer* in un dato ambiente è proporzionale al numero di batteri presenti. Pertanto, rilevare la concentrazione di *autoinducer* consente ai batteri un meccanismo di conta reciproca. Al raggiungimento di un valore di concentrazione sufficientemente elevato (*quorum*) il trasporto (per diffusione o attivo) di *autoinducer* fuori dalle cellule è energeticamente sfavorito, con conseguente

incremento della concentrazione intracellulare di *autoinducer* [15]. L'*autoinducer* lega una proteina intracellulare di segnale modificandone la conformazione e promuovendo la formazione del complesso autoinduttore-regolatore della risposta capace poi di legare sequenze specifiche di DNA e di regolare l'espressione di determinati geni [21,22] coinvolti in processi biologici quali l'emissione di bioluminiscenza, la produzione di molecole antibatteriche, la colonizzazione di superfici in microcolonie o la produzione di fattori di virulenza ed enzimi idrolitici durante le infezioni in ospiti eucarioti.

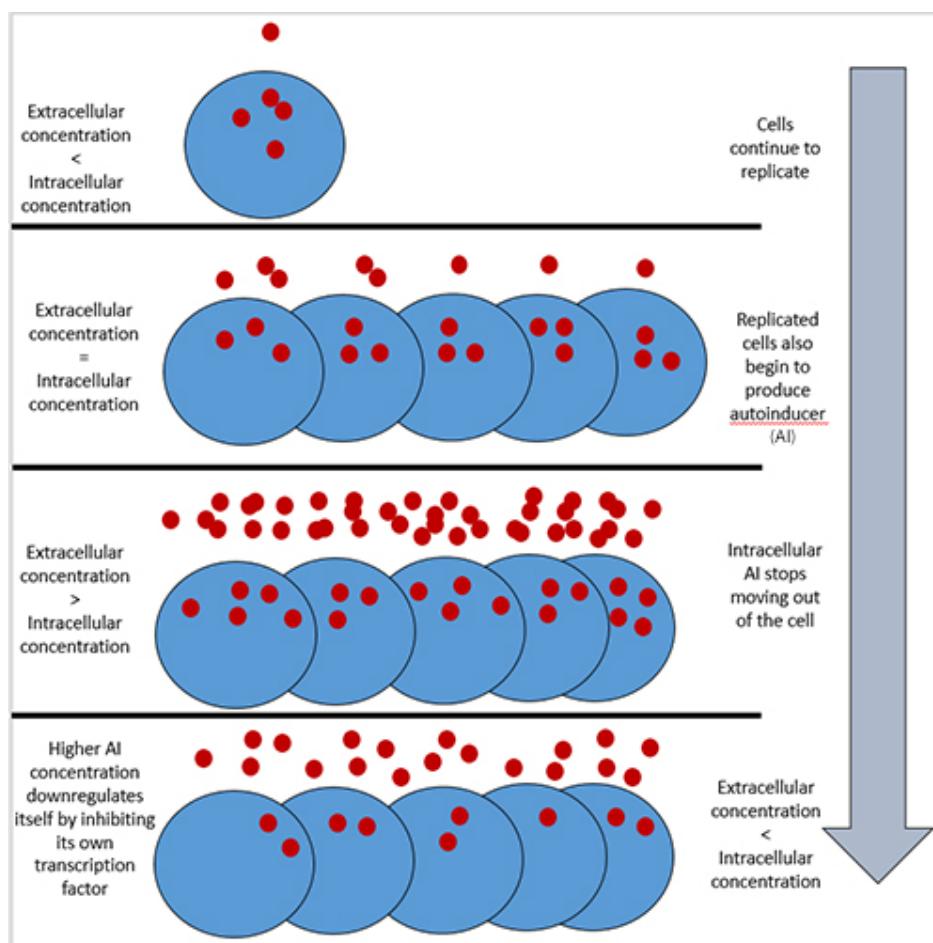


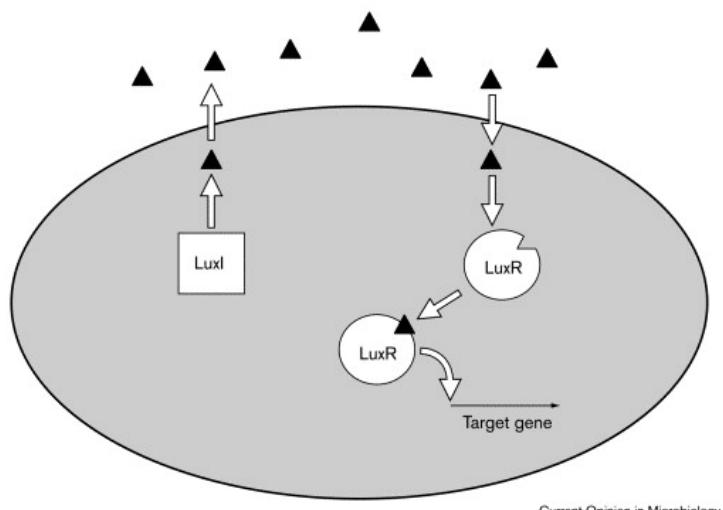
Figura 2: Overview di come funziona il quorum sensing nei batteri

Il quorum sensing può quindi esser definito come il meccanismo che permette di regolare l'espressione di certi geni che incrementano la patogenicità batterica in dipendenza alla densità di popolazione, tramite la produzione e il rilascio dell'autoinduttore [15,23]. I patogeni opportunisti come *Pseudomonas aeruginosa* preferiscono rimanere “dormienti” e rinviare la loro virulenza finché la loro popolazione sia cresciuta a sufficienza da poter sopraffare i meccanismi di difesa dell'ospite [14,24]. Alcuni batteri come *Vibrio cholerae*

usano il *quorum sensing* per dissolvere il biofilm, portando a una dispersione di batteri responsabile di una condizione altamente infettiva [25].

Diversi studi hanno riportato che la comunicazione intercellulare mediante *autoinducers* avviene anche tra batteri di specie differenti. Nonostante cambino la natura dei segnali chimici, il meccanismo di rilascio del segnale, e i geni controllati dal quorum sensing batterico, la capacità dei batteri di comunicare tra loro permette ai batteri stessi di coordinare l'espressione genica, e pertanto il comportamento dell'intera comunità [26].

Nei batteri gram-negativi le proteine LuxI e LuxR, inizialmente caratterizzate nel simbionte dei calamari giganti bioluminescenti *Vibrio fischeri* [27], rispettivamente catalizzano la formazione di uno specifico autoinduttore Acil-osmoserina-lattone (AHL) e ne rilevano la presenza quando la concentrazione dell'autoinduttore raggiunge un livello di soglia nel mezzo circostante. I complessi LuxR-AHL attivano la trascrizione dei geni target riconoscendo specifici siti di legame dei promotori dei geni regolati dal *quorum sensing*. Attualmente sono conosciuti più di 70 sistemi quorum sensing di tipo LuxIR nei batteri Gram-negativi [28].



Current Opinion in Microbiology

Figura 3: Tipico circuito dei gram-negativi LuxIR

Nei batteri Gram-positivi le molecole autoinduttrici sono rappresentate da piccoli oligopeptidi, chiamati autoinduttori polipeptidici (AIPs). Gli AIPs sono prodotti nel citoplasma come precursori peptidici, successivamente subiscono modificazioni post-traduzionali e infine sono secreti. Raggiunta una concentrazione soglia, gli AIPs interagiscono con i domini di specifici recettori di membrana (istidina-chinasi) appartenenti ad un sistema a due componenti (two-component regulatory system, TCTS).

L’interazione dell’AIPs con lo specifico recettore ne stimola l’attività chinasica che fosforila una proteina regolatrice che lega il DNA e induce la trascrizione di alcuni geni [29,30,31].

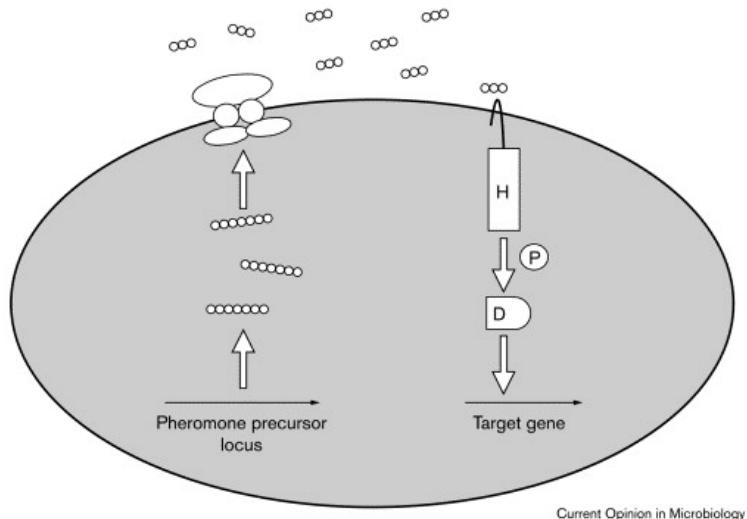


Figura 4: Tipico circuito a due componenti AIP dei Gram positivi

Appreso il ruolo fondamentale giocato dal *quorum sensing* nella regolazione dei fattori di virulenza, trovare un modo per interferire in tale sistema di comunicazione, riducendone l’efficienza o bloccandolo completamente, potrebbe essere la chiave per limitare la produzione di batteriocine, la capacità di competere con successo con altri microbi, e la formazione di biofilm.

1.5 *Quorum sensing in Streptococcus mutans*

Il *quorum sensing* nei batteri Gram-positivi è basato sulla sintesi e il rilascio di piccoli peptidi come autoinduttori, che attraversano la membrana mediante specifiche proteine di trasporto ABC (ATP-binding cassette). I segnali peptidici interagiscono con i domini di specifici recettori di membrana (istidina-chinasi) appartenenti ad un sistema a due componenti (two-component regulatory system, TCTS), dando il via a un meccanismo di trasduzione del segnale consistente in una cascata di fosforilazioni.

S. mutans sintetizza due molecole-segnale di *quorum sensing*: *competence stimulating peptide* (CSP) e *sigX inducing peptide* (XIP) [32]. Lo studio svolto in questa tesi si è concentrato sul *quorum sensing* mediato da CSP, essendo questa la via che regola più fattori di virulenza del batterio.

Il meccanismo di *quorum sensing* CSP mediato coinvolge almeno sei prodotti genici codificati da comCDE, comAB e comX [33,34,35,36]. Il gene comC codifica un precursore del peptide segnale, che viene tagliato e trasportato per rilasciare un *competence stimulating peptide* (CSP) di 21 aminoacidi attraverso un trasportatore ABC specifico codificato da comAB [36]. Il gene comC si trova nello stesso operone del gene comD, che codifica per l'istidina chinasi, e del gene comE, che codifica per il regolatore della risposta. I geni comDE codificano dunque il sistema di trasduzione del segnale a due componenti specifico per il CSP. L'altro gene coinvolto è comX che codifica un fattore sigma che dirige la trascrizione di numerosi geni coinvolti nella competenza [5].

Quando viene raggiunta una concentrazione critica di CSP (*quorum*), il CSP interagisce con il recettore istidina-chinasi ComD di cellule vicine portando alla fosforilazione di ComE. Quando viene fosforilato, ComE attiva i suoi geni target, comCDE, comAB e comX, stimolando un loop a feedback positivo per il segnale di *quorum sensing* [18,23,25] e la cascata di segnali per la formazione di biofilm [5,18,23], la produzione di batteriocine e la competenza [37,38], i quali sono tutti fattori di virulenza fondamentali per la patogenesi di *S. mutans* [23,39].

I *competence stimulating peptides* sono altamente specifici, pertanto il CSP di una specie sarà in grado di legare solamente la sua istidina-chinasi [29,40].

1.6 Scopo della tesi

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati il CSP, l'*autoinducer* di *quorum sensing* in *Streptococcus mutans*, e suoi analoghi strutturali al fine di studiare il loro effetto sul *quorum sensing* e sulla crescita di biofilm di *S. mutans*. Sono stati eseguiti i primi saggi biologici per verificare la presunta capacità dei peptidi analoghi del CSP ottenuti di interferire sul *quorum sensing* e dunque sulla crescita di colonie batteriche di *S. mutans*. Il lavoro svolto si inserisce nel contesto della ricerca di una molecola che abbia la capacità di interferire nella comunicazione cellulare mediata da *quorum sensing*, inibendo la formazione di biofilm sulle superfici. Le prospettive future prevedono la possibilità di approdare all'utilizzo di biomateriali opportunamente trattati con molecole anti-biofilm, che prevengano dunque il rischio di infezioni batteriche.

CAPITOLO 2

Materiali, strumenti e metodi

2.1 Materiali

2.1.1 Reagenti

Reagenti forniti da *Biosolve* (Dieuze, Francia):

- Diclorometano (DCM)
- Acido trifluoracetico (TFA)
- Piperidina
- N-etil-diisopropilammina (DIPEA)

Reagenti forniti da *Sigma-Aldrich* (Merck KGaA, St. Louis, Missouri, USA):

- Metanolo
- N-metil-2-pirrolidone (NMP)
- Acetonitrile
- Acido acetico
- N, N-dimetilformammide (DMF)
- Trietossisilano (TES)

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

- Etanolo

Reagenti forniti da *Applied Biosystems* (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA):

- Monitor 1: soluzione al 76% (w/w) fenolo/etanolo
- Monitor 2: soluzione 0,2 mM di KCN/piridina
- Monitor 3: soluzione 0,28 M ninidrina/etanolo
- Anidride acetica
- Anidride benzoica

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

- Amminoacidi Fmoc-protetti
- Resina Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin
- Resina Fmoc-Ser-Sasrin
- 2-(1H-benzotriazolo-1-1*i*l)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU)
- Etil ciano (idrossiammino) acetato (Oxima Pure)
- 1-[Bis(dimetilammino)metilene]-1H-1,2,3,-triazolo[4.5-b]piridinio3-ossido esafluorofosfato (HATU)

Reagenti forniti da *Prolabo* (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)

- Etere dietilico

Reagenti forniti da *VWR chemicals* (Radnor, Pennsylvania, USA):

- Acetone
- Lutidina

2.1.2 Peptidi sintetizzati

Per la realizzazione di questo lavoro di tesi è stata necessaria la sintesi e la successiva purificazione del peptide induttore di *quorum sensing* in *S. mutans*, di seguito denominato CSP *mutans* e una permutazione della sua sequenza peptidica, di seguito denominata CSP *scrambled*.

➤ CSP *mutans*

PM: 2364.696 Da

Sequenza: 21 amminoacidi

H-Ser-Gly-Ser-Leu-Ser-Thr-Phe-Phe-Arg-Leu-Phe-Asn-Arg-Ser-Phe-Thr-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys-OH

➤ CSP *scrambled*

PM: 2364.696 Da

Sequenza: 21 amminoacidi

H-Thr-Gln-Thr-Leu-Lys-Phe-Gly-Leu-Ala-Phe-Ser-Phe-Ser-Arg-Gly-Asn-Arg-Phe-Ser-Lys-Ser-OH

2.1.3 Analoghi del peptide

Parte del peptide CSP mutans sintetizzato è stato sottoposto a reazioni chimiche per ottenere i seguenti peptidi analoghi del CSP *wild-type*:

➤ CSP *acetilato*

PM: 2406.696 Da

Sequenza: 21 amminoacidi

Ac-Ser-Gly-Ser-Leu-Ser-Thr-Phe-Phe-Arg-Leu-Phe-Asn-Arg-Ser-Phe-Thr-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys-OH

Ac = Acetil (COCH₃)

➤ CSP *peracetilato*

PM: 2448.696 Da

Sequenza: 21 amminoacidi

Ac-Ser-Gly-Ser-Leu-Ser-Thr-Phe-Phe-Arg-Leu-Phe-Asn-Arg-Ser-Phe-Thr-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys(Ac)-OH

Ac = Acetil (COCH₃)

➤ CSP1 *benzoile*

PM: 2468,696 Da

Sequenza: 21 amminoacidi

C₆H₅-CO-Ser-Gly-Ser-Leu-Ser-Thr-Phe-Phe-Arg-Leu-Phe-Asn-Arg-Ser-Phe-Thr-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys-OH

2.1.4 Ceppi batterici e terreni di coltura

In questo lavoro di tesi gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il ceppo standard *S. mutans* ATCC25175 (commercializzato in Italia da *LGC Standards S.r.l.*; Sesto San Giovanni, MI). Il batterio è stato incubato a 37°C in agitazione (140 rivoluzioni per minuto, rpm) in terreno Brain Heart Infusion (BHI) addizionato di saccarosio 0,1% p/vol, cresciuto per 16 ore prima di ogni esperimento.

Il terreno di coltura BHI (Merck) è stato preparato solubilizzando 3,7g di polvere in 100 ml di acqua deionizzata e successivamente sterilizzato in autoclave. Il saccarosio (Fluka), quando necessario, è stato prima sterilizzato mediante filtrazione con filtri a maglie da 0,22 µm e quindi addizionato a BHI sterile una volta raggiunta la temperatura ambiente (concentrazione finale di saccarosio 0,1%).

2.2 Strumenti

Si elencano di seguito gli strumenti utilizzati durante l'attività di laboratorio:

2.2.1 Sintetizzatore per sintesi peptidica su fase solida

Per realizzare le sintesi peptidiche è stato utilizzato il sintetizzatore automatico prodotto dalla *MultiSynTech* (Witten, Germania) modello Syro I (fig. 5).

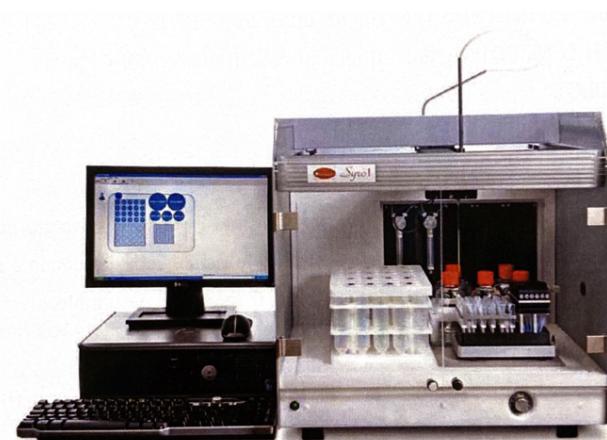


Figura 5: Sintetizzatore Syro I

Le sintesi eseguite in questo lavoro di tesi sono state eseguite su fase solida. Nella procedura di sblocco dei peptidi dalle resine è stato utilizzato un evaporatore rotante (Laborota 4000-Efficient, *Heidolph Instruments s.r.l.*, Milano, Italia) ed il liofilizzatore modello Lioph 4.5 (*Labconco*, Kansas city, MO, USA) per la conservazione a lungo termine dei composti biologici ottenuti a seguito della purificazione mediante cromatografia.

2.2.2 Test alla ninidrina

Per eseguire i test alla ninidrina è stato necessario l'utilizzo di uno spettrofotometro UV/Vis Lambda 2 (fig. 6), modello fornito da *Perkin Elmer* (Waltham, Massachusetts, USA).



Figura 6: Spettrofotometro UV/Vis Lambda 2

2.2.3 Cromatografia

Le fasi di purificazione peptidica post sintesi sono state effettuate mediante l'utilizzo di tre diversi sistemi cromatografici:

- Sistema RP-HPLC “semipreparativa” costituito da:
 - Sistema di pompaggio multisolvente HPLC modello Waters 600E, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
 - Rilevatore UV/VIS multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello Waters 2487, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
 - Registratore su carta modello BD40/BD41 distribuito dalla *Carlo Erba Strumentazione* e prodotto dalla *Kipp & Zonen* (Delft, Olanda)

- Sistema RP-HPLC “analitica” costituito da:
- Pompa binaria HPLC modello Waters 1525, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
 - Autocampionatore modello Waters 2707, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
 - Rilevatore UV/VIS multicanale a lunghezza d’onda programmabile modello Waters 2489, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
 - Computer dotato del software di gestione dei dati cromatografici Empower Pro, sviluppato da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA).

Per eseguire le analisi cromatografiche sono stati utilizzati due diversi eluenti:

- Eluente A: 0.05% di TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile (CH₃CN).

Per le analisi cromatografiche sono state utilizzate colonne costituite da gel di silice funzionalizzata, con catene idrocarburiche lineari di atomi di carbonio (fase stazionaria apolare), che presentano caratteristiche diverse:

- Vydac C₁₈ analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 x 250 mm) fornita da *Grace* (Columbia, Maryland, USA)
- Nova Pak C₁₈ analitica (6 µm, 60 Å, 7.8 x 300 mm) fornita da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
- Nova-Pak C-18 semipreparativa (6 µm, 60 Å, 7,8 x 300 mm) fornita da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)

dove C₁₈ indica che le particelle impaccate presentano in superficie gruppi idrocarburici a 18 atomi di carbonio.

2.2.4 Analisi di massa

L’identità del prodotto della sintesi viene verificata mediante un’analisi di massa. Per l’analisi di massa dei peptidi sintetizzati durante questo lavoro di tesi è stato utilizzato lo spettrometro MALDI-TOF.

2.2.5 Densità ottica

La concentrazione di *S. mutans* è stata stabilita misurando la densità ottica (OD) a 620 nm allo spettrofotometro (*Eppendorf Biophotometer*). Per ottenere una carica batterica corrispondente 10^7 CFU/ml la coltura di *S. mutans* è stata opportunamente diluita sino ad ottenere una O.D. pari a 0,05 a 620 nm.

2.2.6 Ulteriore strumentazione di laboratorio

- Liofilizzatore Modello FreeZone 2.5 Liter Benchtop, fornito da *Labconco* (Kansas city, MO, USA)
- Evaporatore rotante modell Laborota 4000-Efficient, fornito da *Heidolph Instrument* (Schwabach, Germania)
- Distillatore da laboratorio, modello Stuart D4000, fornito da *Norrscope* (Chelmsford, Essex, UK)
- Sistema di purificazione dell'acqua modello Milli-Q Integral for Ultrapure water, fornito da *Merk KGaA* (Darmstadt, Germania)
- Bagno ad ultrasuoni modello Branson 1200, fornito da Branson *Ultrasonic Corp.* (Dambury, Connecticut, USA)
- Agitatore magnetico modello Microstirrer, forniti da *Velp Scientifica* (Usmate Velate, Italia)
- Centrifuga da banco modello Rotina 380, fornita da *Hettich GmbH & Co.* (Tuttlingen, Germania)
- Essiccatore sottovuoto fornito da *Kartell Labware* (Noviglio, Italia)
- Bilancia analitica modello Mettler AE250, fornita da *Mettler Toledo* (Columbus, Ohio, USA)

2.3 Metodi

Nel paragrafo seguente vengono descritti i principali metodi utilizzati in laboratorio.

2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida

I peptidi sono biomolecole ottenute dalla condensazione di amminoacidi tramite un legame di tipo ammidico che si instaura tra il gruppo α -carbossilico di un residuo e il gruppo α -amminico del successivo (fig. 7).

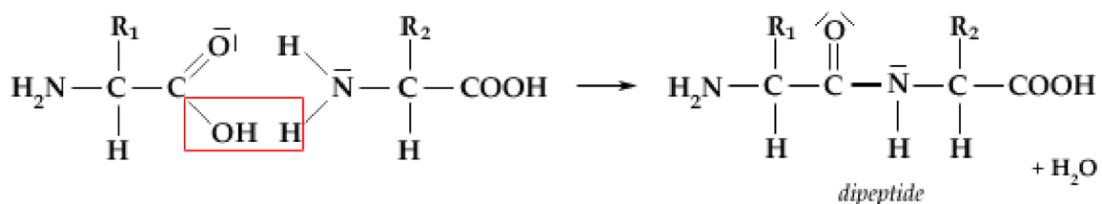


Figura 7: formazione di un dipeptide

I peptidi oggetto di studio sono stati sintetizzati mediante sintesi peptidica su fase solida (*Solid Phase Peptide Synthesis SPPS*). Tale metodologia, che richiama in parte la biosintesi delle proteine, è stata messa a punto nel 1963 da Bruce Merrifield, ed è tutt'ora la via più vantaggiosa per ottenere peptidi su piccola/media scala. L'estrema efficienza della biosintesi delle proteine, che avviene nel citoplasma delle cellule al ritmo di 20 amminoacidi al secondo, è stata uno stimolo forte per esplorare nuove strade nel campo della sintesi di peptidi e giungere alla SPPS. Durante la biosintesi le proteine non si trovano in soluzione, ma sono ancora ancorate con legame estereo ad una molecola di RNA transfer il quale, a sua volta, è legato al complesso ribosoma-RNA messaggero. Questo costituisce una sorta di supporto solido dal quale le proteine si staccano solo quando sono state completate.

La crescita del peptide sintetico procede a partire dall'estremità C-terminale, a differenza di quanto avviene naturalmente nelle cellule, ed il gruppo carbossilico dell'ultimo amminoacido della sequenza sintetizzata è quello ancorato alla resina.

Il principale vantaggio di questa tecnica è rappresentato dall'ancoraggio del peptide solubile ad una matrice insolubile durante la sintesi; il peptide in crescita, legato alla resina insolubile, è facilmente isolato da eventuali sottoprodotto o reagenti in eccesso presenti in soluzione mediante cicli di lavaggio e filtrazione. Altri vantaggi legati alla possibilità di condurre la sintesi in un unico contenitore (reattore) sono la riduzione dei tempi necessari al processo e la ridotta perdita di materiali grazie all'assenza di trasferimenti.

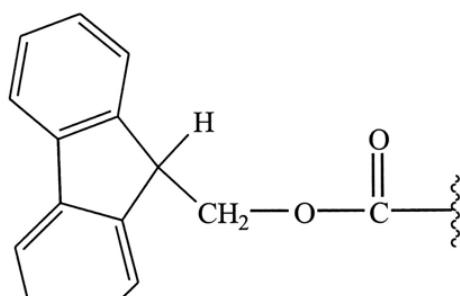
Le resine di supporto alla sintesi sono costituite solitamente da polimeri quali, ad esempio, il polistirene copolimerizzato all'1% con divinilbenzene o la poliacrilammide. Queste resine possiedono la capacità di rigonfiarsi notevolmente in solventi polari non protici come N,N-dimetilformammide (DMF), N-metil-2-pirrolidone (NMP) e diclorometano (DCM), con la possibilità di raggiungere un volume anche 10 volte superiore rispetto a quello iniziale.

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate due resine già funzionalizzate con il primo amminoacido, protetto al gruppo α -amminico e in catena laterale. Queste risultano essere molto acido labili e permettono, in particolari condizioni, lo sblocco del peptide dal supporto senza staccare i gruppi protettori delle catene laterali degli amminoacidi. I gruppi protettori delle catene laterali sono necessari affinché eventuali gruppi laterali reattivi degli amminoacidi non interferiscano con la formazione del legame peptidico di interesse, e devono rimanere stabili nelle condizioni di rimozione del gruppo protettore α -amminico della catena principale, affinché la loro funzione non venga meno. Tale strategia è denominata protezione ortogonale.

Per la sintesi del peptide CSP *mutans* sono stati usati 209 mg di resina Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin con sostituzione 0,6 mmol/g (scala di sintesi 0,125 mmol).

Per la sintesi del peptide CSP *scrambled* sono stati usati 278 mg di resina Fmoc-Ser(tBu)-Sasrin con sostituzione 0,45 mmol/g.

Tutti gli amminoacidi utilizzati hanno come protezione del gruppo α -amminico il gruppo base-labile 9-fluorenilmelossicarbonile (Fmoc) (fig. 8), rimosso con piperidina e i gruppi protettori delle catene laterali sono acido-labili, rimossi generalmente con acido trifluoracetico (TFA).



Fmoc

Figura 8: Struttura del gruppo N- α -protettore Fmoc

La costruzione della catena peptidica consiste in una serie di cicli di reazioni di deprotezione e condensazione (*coupling*). Il primo step della procedura prevede la rimozione del gruppo protettore α -amminico Fmoc del residuo amminoacidico legato alla resina mediante trattamento con una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti, seguiti da trattamento con una soluzione al 20% di piperidina in DMF per 12 minuti.

Successivamente viene attivata la reazione di condensazione tra il gruppo α -amminico appena deprotectto ed il gruppo carbossilico, preventivamente attivato, di un nuovo residuo che possiede a sua volta la funzione α -amminica protetta dal gruppo Fmoc, con la conseguente formazione di un legame peptidico. Questa serie di operazioni è ripetuta per tutte le unità monomeriche da condensare al peptide in crescita sulla resina funzionalizzata per ottenere la sintesi desiderata (fig. 9).

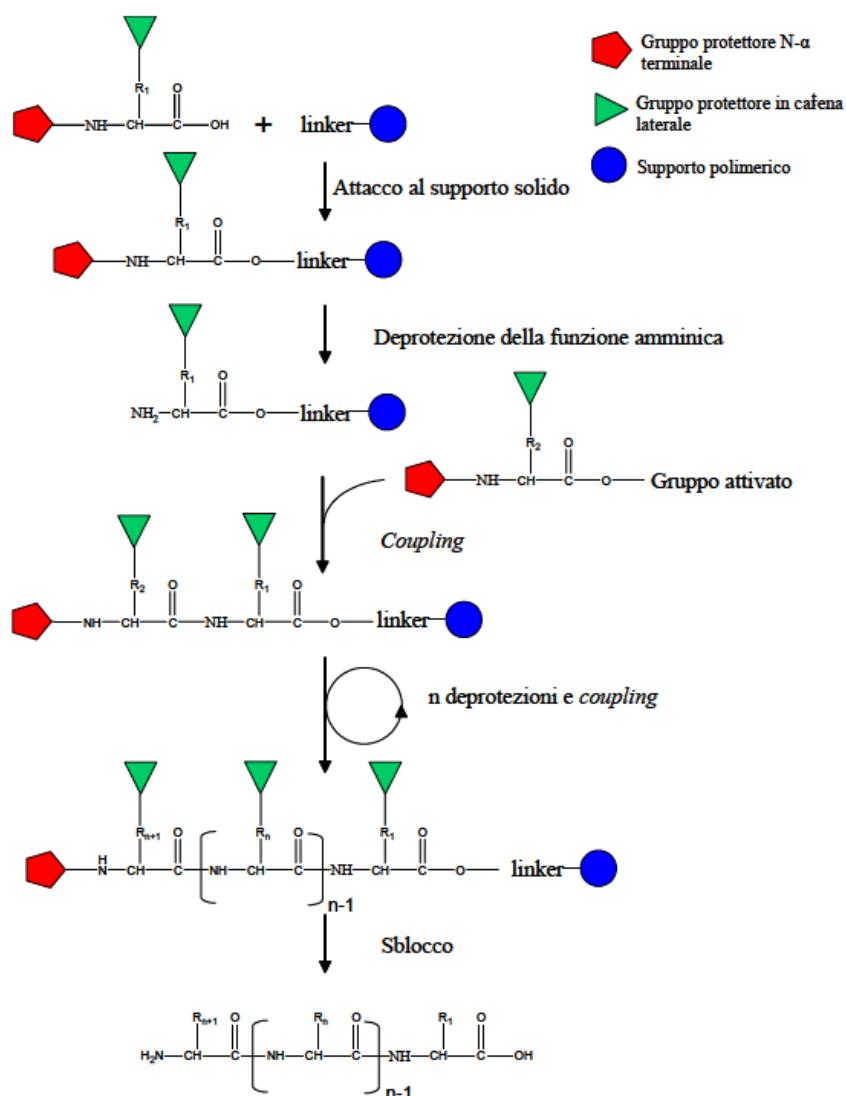


Figura 9: Schema generale della sintesi peptidica su fase solida (SPPS)

2.3.1.1 Attivazione del gruppo carbossilico

Per permettere la realizzazione del legame peptidico con rese di reazione elevate è di fondamentale importanza non solo l'accessibilità e la reattività della funzione α -amminica deprotetta della sequenza amminoacidica in crescita, ma anche la reattività del gruppo carbossilico da legare alla catena peptidica che si sta sintetizzando. Tra i possibili metodi di attivazione del gruppo carbossilico quello utilizzato maggiormente nelle operazioni di sintesi peptidica su fase solida è l'attivazione *in situ*. Questa tecnica prevede l'uso di un agente attivante, HBTU, in presenza di Oxima Pure e di una base quale l'ammina terziaria DIPEA (fig. 10).

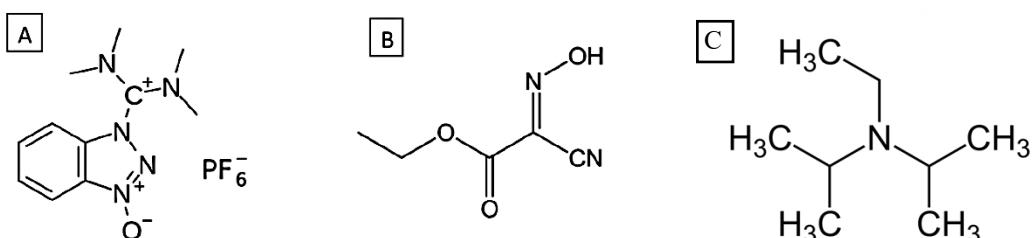


Figura 10: Struttura chimica di A) HBTU, B) Oxima Pure, C) DIPEA

La procedura automatizzata di Syro I prevede per l'attivazione del gruppo carbossilico e successiva condensazione (coupling singolo) l'utilizzo di:

- 1 mL di soluzione 0,62 M dello Fmoc-amminoacido in DMF (5 equivalenti)
- 1,4 mL di soluzione 0,45 M di HBTU/Oxima Pure in DMF (5 equivalenti);
- 0,625 mL di soluzione 2 M di DIPEA in NMP (10 equivalenti).

Il tempo di reazione è di 45 minuti (intervallando 15 secondi di agitazione vortex ogni 3 minuti di reazione).

In seguito, sono stati eseguiti 5 cicli di lavaggi, impiegando 3 mL di DMF ciascuno. La sintesi è stata condotta con coupling doppio, cioè è stato eseguito un doppio ciclo di condensazione per ciascun amminoacido in modo da migliorare la resa finale di sintesi.

2.3.1.2 Test alla Ninidrina

Un fattore che limita l'efficienza della sintesi su fase solida è rappresentato dalla crescita di sequenze che differiscono dalla sequenza desiderata per la mancanza di uno o più

residui. Questi prodotti, simili al peptide corretto, possono comportare problemi nella successiva fase di purificazione.

Il test alla Ninidrina o Kaiser test, è un test quantitativo che permette di valutare la resa della reazione di *coupling*. Nella procedura di *coupling* di un nuovo amminoacido è prevista la deprotezione del Fmoc del terminale amminico della catena in crescita; al termine di un *coupling* andato a buon fine tale terminale non sarà più libero. Mediante l'uso di un cromoforo (ninidrina) che assorbe nel visibile viene determinata la presenza di eventuali gruppi amminici liberi, indice del fatto che il *coupling* non è avvenuto (bassa resa di *coupling*).

Si procede effettuando alcuni lavaggi del peptide in crescita su resina utilizzando diclorometano. Si pone il reattore con filtro su una beuta da vuoto, il cui beccuccio è connesso tramite un tubo alla pompa ad aria. In questo modo la frazione liquida (diclorometano di lavaggio) verrà aspirata dal reattore, finendo nella beuta, e sul filtro rimarrà solamente il peptide su resina.

Il reattore viene coperto con della carta filtrante e riposto a seccare per 1 ora nella campana per il vuoto.

Una volta essiccata la resina, si preleva un quantitativo compreso tra 4-8 mg e lo si trasferisce in una provetta. Si addizionano in sequenza:

1. 75 μ L di Monitor 1 (76% di fenolo in etanolo);
2. 100 μ L di Monitor 2 (cianuro di potassio + H₂O in piridina);
3. 75 μ L di Monitor 3 (6% di ninidrina in etanolo).

nella provetta contenente il campione e in una seconda provetta vuota. La provetta con i soli Monitor costituirà il “bianco”. Le due provette vengono poste in una piastra riscaldante a 100°C per 5 minuti esatti. Intercorso il tempo di reazione, si rimuovono le provette dalla piastra, si aggiungono 4,8 mL di Monitor 4 (soluzione 60% etanolo in H₂O), si gita con vortex e si lascia riposare per far sì che la resina si depositi sul fondo. Si azzerà lo spettrofotometro Uv-Vis inserendovi due cuvette contenenti solo Monitor 4. Il valore di assorbanza è impostato a 570 nm. Si effettuano le misure di assorbimento del “bianco” e del campione.

La quantità di funzioni amminiche libere è calcolata mediante la seguente formula:

$$\mu\text{mol/g di ammina} = \frac{[(\text{Abscampione} - \text{Absbianco}) \times \text{diluizione}] \times 10^6}{\epsilon \times \text{peso}}$$

Dove:

- $Abs_{campione}$ valore di assorbanza del campione a 570 nm;
- Abs_{bianco} valore di assorbanza della soluzione di “bianco” a 570 nm;
- $diluizione = 5 \text{ mL}$;
- $\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ è il coefficiente di estinzione molare il cui valore dipende dal solvente utilizzato;
- $peso [\text{mg}]$ è il peso espresso in milligrammi del campione di peptide su resina su cui si è fatta l’analisi.

La resa percentuale della reazione di coupling è data da:

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

Dove il valore della nuova sostituzione da inserire nella formula si calcola come:

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

La reazione attraverso la quale si ottiene il cromoforo, detto complesso di Ruhemann, che assorbe nel visibile a 570 nm è riportato in figura 11.

Maggiore è la quantità dei gruppi amminici liberi, maggiore sarà l’intensità del colore blu-viola e il valore dell’assorbanza.

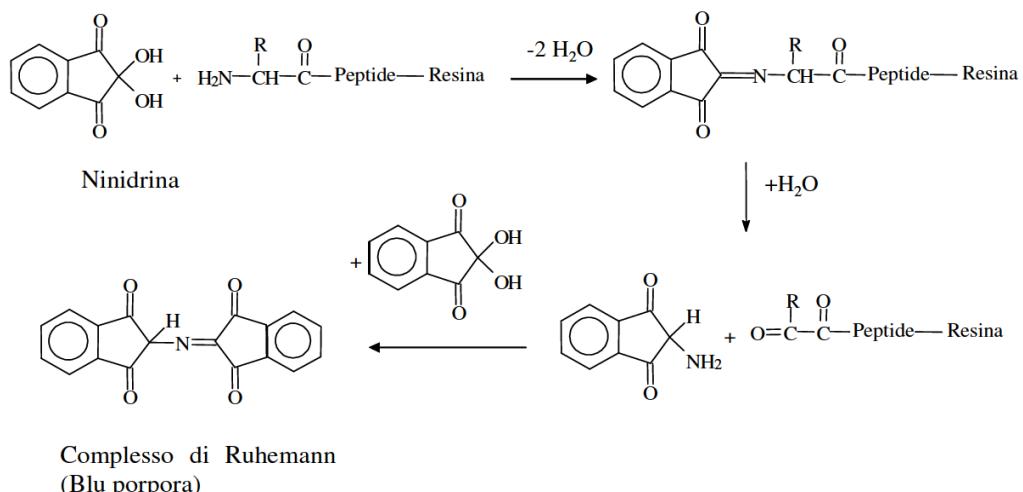


Figura 11: Reazione della ninidrina con il residuo N-terminale del peptide in crescita

2.3.1.3 Sbocco del peptide dalla resina

Quando nel processo di sintesi peptidica vengono utilizzate resine acido labili, si può ottenere simultaneamente lo sblocco del peptide dalla resina e la liberazione delle catene laterali dai gruppi protettori. Tuttavia, il processo di deprotezione in ambiente acido può generare specie altamente reattive (carbocationi) in grado di modificare in maniera covalente alcuni residui amminoacidici. Per questo motivo, durante lo sblocco col TFA, si aggiungono degli agenti nucleofili (*scavengers*) in modo da ridurre tali reazioni collaterali indesiderate. La procedura adottata per lo sblocco prevede i seguenti passaggi:

- a conclusione della sintesi, si libera la funzione N-terminale dal gruppo protettore Fmoc, trattando il peptide protetto su resina mediante la procedura riportata precedentemente;
- il peptide ancora protetto in catena laterale e su resina viene lavato con DCM e posto a seccare per 1 ora in una campana sottovuoto;
- al reattore contenente il peptide su resina essiccato viene aggiunto in ordine:
 - 0,125 mL di acqua MilliQ ultrapura;
 - 0,125 mL di TES (*scavenger*);
 - 4,75 mL di TFA.
- si mantiene la miscela in agitazione magnetica per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente;
- per filtrazione, si separa la resina dalla soluzione contenente il peptide, e si riduce il volume di tale soluzione in evaporatore rotante;
- si aggiunge rapidamente etere dietilico freddo (~4°C) per far precipitare il peptide grezzo, lo si filtra tramite filtro gooch G3, ed infine lo si lascia seccare sottovuoto per circa 1 ora;
- si scioglie il peptide in acqua MilliQ e lo si liofilizza.
- Il peptide grezzo così ottenuto viene infine pesato.

2.3.2 Purificazione e caratterizzazione cromatografica

I peptidi sintetizzati sono stati purificati attraverso la tecnica cromatografica *Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). Questa tecnica è nata come tecnica preparativa ma si è affermata poi anche come tecnica analitica, ed è adatta

alla separazione di specie non volatili termicamente labili come i peptidi. Essa permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'affinità che vengono a crearsi tra una "fase stazionaria", posta all'interno della colonna cromatografica, e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo detto di "ritenzione"), rispetto a una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta affinità per la fase mobile.

L'HPLC a fase inversa è una cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari, mentre per la fase mobile si possono utilizzare diverse miscele composte da soluzioni acquose e solventi organici. L'interazione dei peptidi nella fase stazionaria è di tipo idrofobico. Il campione da analizzare viene sciolto all'interno della fase mobile e viene fatto fluire in modo continuo attraverso la fase stazionaria immiscibile. I componenti maggiormente affini alla fase stazionaria vengono trattenuti e per questo motivo si muovono più lentamente con il flusso della fase mobile. Gli elementi con minor affinità, invece, sono debolmente trattenuti e quindi si muovono più velocemente. L'analisi cromatografica può essere eseguita in modalità isocratica o a gradiente; nel secondo caso si imposta un aumento graduale della concentrazione di solvente organico rispetto all'acqua, generando un aumento dell'idrofobicità della fase mobile. In questo modo si crea competizione tra la fase mobile e quella stazionaria provocando il rilascio dell'analita per una ben precisa concentrazione di solvente organico. In questo modo si può sfruttare la diversa mobilità dei componenti per dividerli in picchi discreti e possono così essere analizzati qualitativamente e quantitativamente. I diversi metodi cromatografici vengono classificati in base al tipo di fase mobile e stazionaria; nella cromatografia liquida, che è stata utilizzata in questo lavoro di tesi, la fase mobile è costituita da un liquido mentre la fase stazionaria consiste in un altro liquido immiscibile adsorbito su particelle solide impaccate in una colonna. La fase stazionaria in altri casi può anche essere composta da un solido o da uno scambiatore anionico o cationico (cromatografia a scambio ionico). Le colonne cromatografiche, al fine di aumentarne l'efficienza, vengono riempite con gel di silice funzionalizzata (granuli con diametro pari a 3- 10 µm), e vengono fatte di lunghezza compresa tra i 10 e i 30 cm e aventi diametri interni che variano tra i 3.9 e gli 8.0 mm. In questo modo riesco a ottimizzare l'impaccamento della fase stazionaria. Il forte impaccamento comporta un

rallentamento del flusso della fase mobile all'interno della colonna, rendendo necessario l'intervento di una pompa per evitare tempi di analisi troppo lunghi.

I peptidi tendono a separarsi meglio in ambiente acido e per questo motivo la maggior parte delle fasi mobili contengono piccole percentuali di TFA (in questa tesi è stata usata come fase mobile H_2O MilliQ addizionata con 0.05% di acido TFA e acetronitrile CH_3CN addizionato con 0.05% di acido TFA) il quale agisce da coppia ionica. L'effetto dell'acido è quello di aumentare la ritenzione e favorire la solubilità dei peptidi e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanolici presenti nella fase stazionaria.

Le componenti basilari di un sistema HPLC sono qui di seguito elencate, e riportate in figura 12:

- serbatoi contenenti i solventi (la fase mobile);
- una pompa ad alta pressione per generare e gestire la portata desiderata della fase mobile (in genere millilitri per minuto);
- un iniettore che introduce il campione all'intero del flusso della fase mobile in modo da poter trasportare il campione all'interno della colonna;
- una colonna contenente del materiale impaccato (fase stazionaria) che effettua la separazione;
- un detector che rileva i diversi composti quando eluiscono dalla colonna;
- un computer che traduce il segnale elettrico generato dal detector in un cromatogramma.

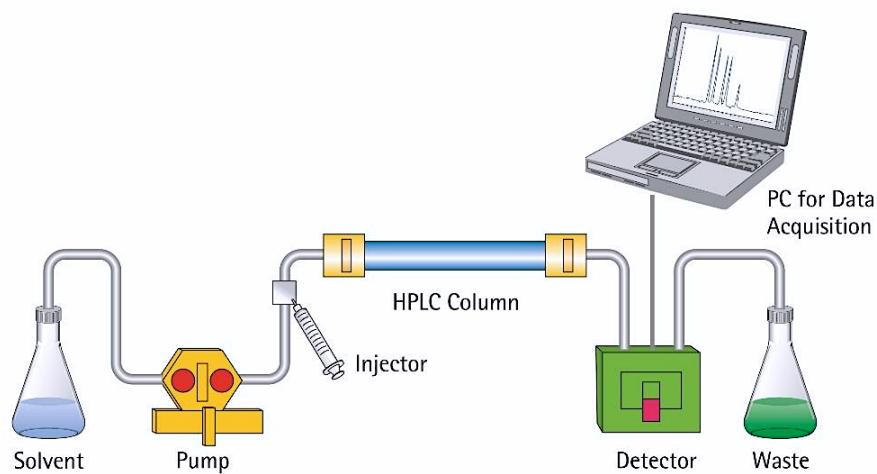


Figura 12: Schema generale di funzionamento di un HPLC

Nel seguente lavoro di tesi sono state eseguite analisi cromatografiche semipreparative ed analitiche. Con le prime si effettuano i primi stadi delle purificazioni peptidiche. Mediante queste cromatografie sono stati isolati i componenti che presentavano tempi di ritenzione diversi, allontanando così i prodotti di reazione indesiderati. Le cromatografie analitiche permettono invece di caratterizzare i peptidi più nel dettaglio, fornendo anche il loro grado di purezza. Nelle cromatografie analitiche, viene mostrato a video sul computer un chromatogramma, il quale consiste in una serie di picchi che si distinguono da una *baseline*; la *baseline* rappresenta il flusso di fase mobile che passa attraverso la cella del detector, i picchi rappresentano i diversi composti. I picchi sono più o meno alti e spaciati a seconda della concentrazione dei composti corrispondenti e della velocità di eluizione; l'area sottesa dal picco è direttamente proporzionale alla quantità di analita. Il chromatogramma ha in ascissa il tempo e in ordinata l'assorbanza registrata dal detector UV. Il valore di assorbimento del legame peptidico da impostare è 214 nm.

2.3.3 Spettroscopia UV/Vis

La spettroscopia Uv-Vis risulta una delle tecniche maggiormente utilizzate in quanto gran parte delle molecole assorbono nell'intervallo di lunghezze d'onda comprese tra la radiazione UV e quella del visibile.

La radiazione UV si estende nell'intervallo compreso tra 100 nm e 400 nm, mentre la radiazione visibile nell'intervallo compreso tra 400 nm e 700 nm. In genere, gli spettrometri Uv-Vis sono dotati di due lampade: una al Deuterio che permette di produrre luce nell'intervallo 175-375 e da una a filamento di Tungsteno che produce luce nell'intervallo 250-2500 nm.

Il principio di funzionamento su cui si basa la spettroscopia Uv-Vis è quello di colpire con una radiazione la molecola che passerà dallo stato fondamentale allo stato eccitato: questo permette di promuovere gli elettroni dall'orbitale ad energia più elevata occupato, ad un orbitale ad energia più bassa non occupato. Il delta energetico tra i due orbitali viene detto band gap e dipende dalla struttura chimica della molecola in analisi.

Nello specifico, una radiazione policromatica proveniente dalla sorgente che emette nel visibile e/o nell'UV, viene separata nelle lunghezze d'onda che lo compongono mediante un prisma o un reticolo di diffrazione. Ogni lunghezza d'onda in ingresso è deviata in una direzione diversa dalle altre, di conseguenza, grazie alla rotazione del prisma, è possibile

selezionare la radiazione monocromatica di interesse. Una volta selezionata la radiazione che possiede la lunghezza d'onda prescelta, questa viene inviata contemporaneamente alle due celle del campione e di riferimento; queste sono generalmente dei contenitori in quarzo progettati per avere un cammino ottico di 1 cm: la cella del campione conterrà la sostanza che si vuole analizzare disciolta in un solvente che non deve assorbire in maniera significativa nel *range* di lunghezze d'onda di interesse, mentre la cella di riferimento conterrà il solo solvente puro. In figura 13 è riportato lo schema di funzionamento.

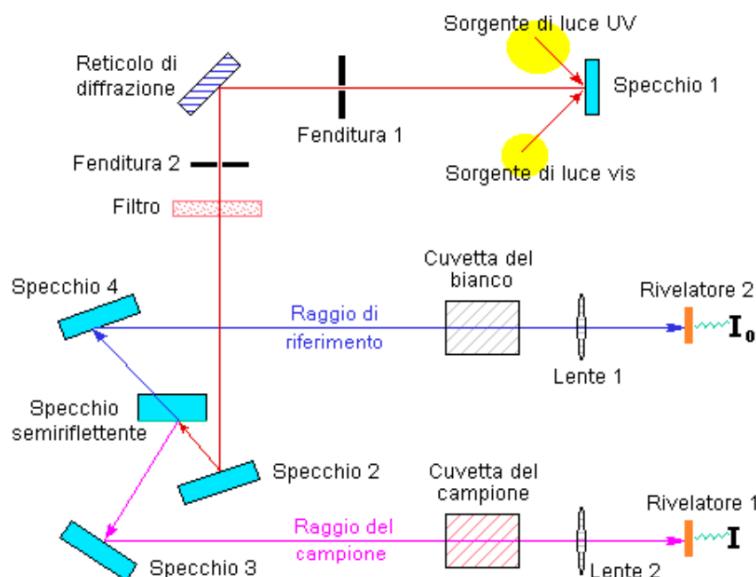


Figura 13: Schema di funzionamento di uno spettrofotometro UV-Vis

Dopo che le radiazioni hanno attraversato il campione e la sostanza di riferimento, i dati vengono acquisiti tramite un rivelatore e analizzati attraverso un registratore computerizzato, e in questo modo, per sottrazione, si possono eliminare le bande di assorbimento del solvente e si registra lo spettro della sostanza in esame.

A questo punto, un detector converte la luce in corrente: maggiore è l'intensità di luce, maggiore sarà l'intensità di corrente. L'assorbanza viene calcolata dal computer attraverso la relazione seguente:

$$A = -\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

Dove:

- I è l'intensità della luce ad una specifica lunghezza d'onda che passa attraverso la cella contenente il campione,

- I_0 è l'intensità della luce ad una specifica lunghezza d'onda che passa attraverso la cella di rifornimento.

La legge che descrive i rapporti tra assorbanza misurata, concentrazione del campione e lunghezza del cammino ottico, è la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon_\lambda \times b \times c$$

Dove:

- $\varepsilon_\lambda [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$ è il coefficiente di estinzione molare della sostanza
- $b [\text{cm}]$ è il cammino ottico
- $c [\text{M}]$ è la concentrazione molare della sostanza a quella particolare lunghezza d'onda

2.3.4 Spettrometria di massa

La spettrometria è una metodologia di analisi distruttiva, che consente di misurare le masse molecolari e di ottenere dei profili di frammentazione i quali sono specifici per ciascun composto. In questo modo risulta possibile individuare la formula di struttura di composti sconosciuti, anche quando sono disponibili in quantità estremamente esigua. Il principio su cui si basa è il seguente: una molecola in fase gassosa impatta con un elettrone frammentandosi negli ioni che a compongono, i quali vengono poi discriminati sulla base del loro rapporto massa su carica e rivelati da un detector.

Lo spettrometro è costituito di tre componenti fondamentali:

1. la sorgente di ioni, dove le molecole vengono ionizzate;
2. l'analizzatore dove grazie all'applicazione di un campo elettrico, le molecole caricate provenienti dalla sorgente sono separate in funzione del loro rapporto massa/carica;
3. il detector dove gli ioni, una volta separati dall'analizzatore, vengono rilevati ed i dati vengono raccolti in un foglio elettronico per successivamente esportati in forma grafica (spettro di massa).

In figura 14 è schematizzata la struttura di uno spettrometro di massa e si vedono, evidenziate in rosso, le tre componenti principali.

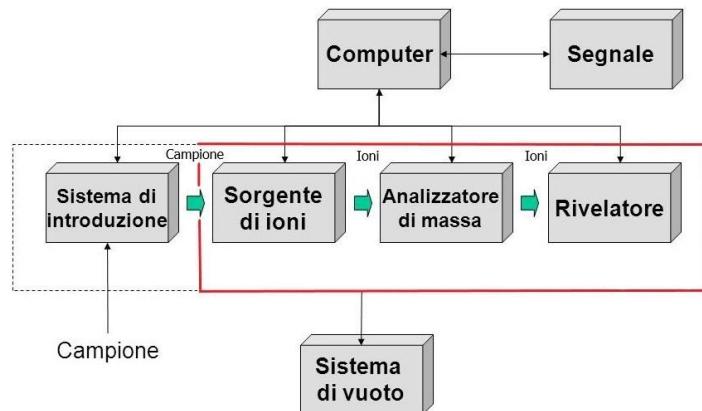


Figura 14: Struttura di uno spettrofotometro

Per l’analisi dei peptidi sintetizzati durante questo lavoro di tesi è stato utilizzato lo spettrometro MALDI-TOF, strumento che utilizza una tecnica di ionizzazione detta *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) in cui l’eccitazione delle molecole del campione viene effettuata tramite un raggio laser, e con un analizzatore di tipo TOF (*time of flight* cioè tempo di volo) il quale seleziona gli ioni in base al loro rapporto massa/carica e al tempo che essi impiegano per percorrere l’analizzatore.

Il laser agisce andando a colpire le molecole di matrice che, assorbendo la luce ultravioletta, passano ad uno stato eccitato e provocano un rapido riscaldamento della regione di interesse; si ottiene così l’espulsione di aggregati di analita solvatato dalle molecole di matrice ed una desolvatazione con conseguente trasferimento di un protone.

In figura 15 è presentato il processo di ionizzazione MALDI.

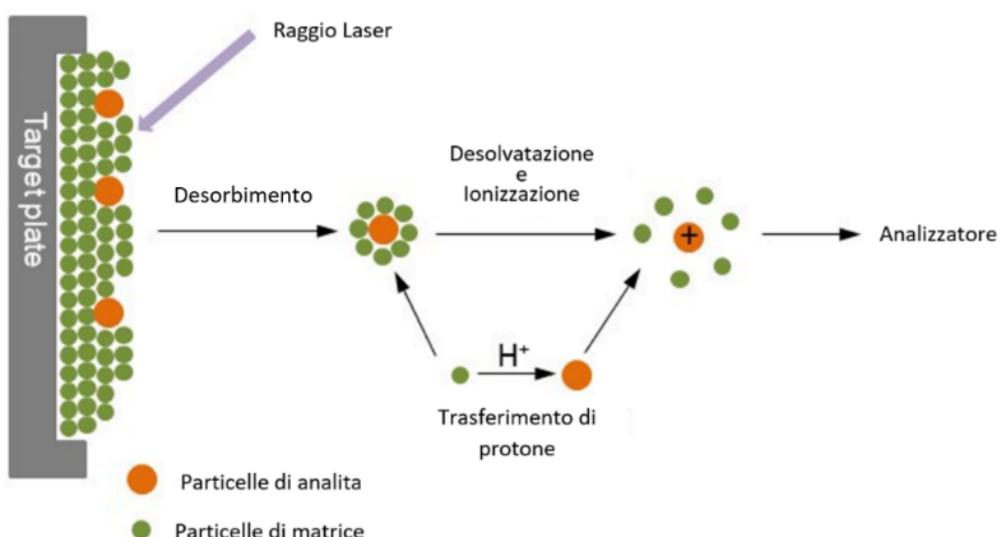


Figura 15: Processo di ionizzazione di tipo MALDI

In uscita dal rivelatore viene registrato uno spettro di massa cioè un grafico che presenta una serie di picchi di intensità variabile e la cui posizione viene determinata dal rapporto massa/carica mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati. Le intensità dei picchi vengono espresse in percentuali utilizzando come riferimento il picco più intenso, detto “picco base”, a cui si assegna il valore arbitrario 100.

2.3.5 Reazione di acetilazione

L'acetilazione è una reazione chimica in cui viene legato un gruppo acetile (fig. 16) ad una molecola. L'acetile ($-\text{COCH}_3$) è un gruppo funzionale composto dalla parte acilica dell'acido acetico (fig. 17).

La molecola da acetilare viene fatta reagire con una soluzione costituita dal 10% di anidride acetica (agente acetilante) e 5% di lutidina in DMF.

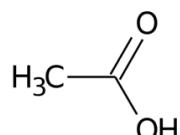
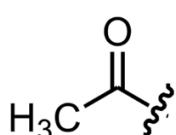


Figura 16: Struttura del gruppo acetile

Figura 17: struttura dell'acido acetico

2.3.6 Reazione di addizione del gruppo benzoile

Il benzoile (fig. 18) è un gruppo funzionale derivante formalmente dall'acido benzoico (fig. 19) per eliminazione di un ossidrile.

Il benzoile è pertanto un residuo costituito da un anello benzenico legato a un gruppo carbonilico. La formula chimica è $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$.

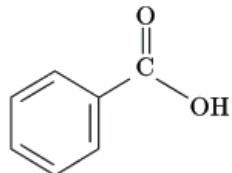
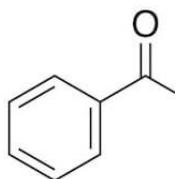


Figura 18: Struttura del gruppo benzoile

Figura 19: struttura dell'acido benzoico

L'addizione del gruppo benzoile avviene facendo reagire la molecola con una soluzione costituita dal 10% di anidride benzoica e 5% di lutidina in DMF.

CAPITOLO 3

Parte sperimentale

Nel seguente capitolo verrà trattato il lavoro svolto per la sintesi, purificazione e caratterizzazione dei peptidi oggetto di tesi e verranno presentati i primi esperimenti volti a indagare l'attività del CSP e analoghi sul ceppo batterico *Streptococcus mutans*.

I saggi biologici sono stati svolti con la collaborazione della Prof.ssa Paola Brun presso il laboratorio del Dipartimento di Medicina Molecolare del nostro Ateneo.

3.1 Sintesi peptidica

3.1.1 Sintesi del peptide CSP *mutans*

Il peptide CSP *mutans* è stato sintetizzato su fase solida con chimica Fmoc utilizzando il sintetizzatore Syro I. Il supporto solido utilizzato per la sintesi è la resina Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin (sostituzione 0,6 mmol/g), precaricata con lisina, l'amminoacido C-terminale della sequenza peptidica. Il calcolo della quantità di resina da utilizzare per la sintesi va effettuato tenendo conto del fatto che si vogliono ottenere 0,125 mmol di siti attivi (scala di sintesi). Il peso della resina inserita nel reattore è dunque:

$$m_{\text{resina}} = \frac{0,125 \text{ mmol}}{0,6 \text{ mmol/g}} = 0,209 \text{ g}$$

Sequenza CSP *mutans*:

H-Ser-Gly-Ser-Leu-Ser-Thr-Phe-Phe-Arg-Leu-Phe-Asn-Arg-Ser-Phe-Thr-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys-OH

Peso molecolare: 2364,696 Da

Schema di sintesi:

La sintesi è composta da 20 cicli di *coupling* (21 amminoacidi totali, di cui uno precaricato). Tutti i cicli sono stati impostati con *coupling* doppio. Sono inoltre stati programmati tre Stop per Kaiser test (test alla Ninidrina) dopo le reazioni di condensazione potenzialmente più critiche e con una resa inferiore al valore desiderabile (>98%):

1. Test dopo il primo ciclo (*coupling* di glicina su lisina)
2. Test dopo l'undicesimo ciclo (*coupling* di leucina su feninalanina)
3. Test dopo il quattordicesimo ciclo (*coupling* di feninalanina su feninalanina)

Il sintetizzatore Syro I ha fornito la seguente tabella riassuntiva dei reagenti necessari alla sintesi impostata:



MultiSynTech GmbH

Calculation protocol
Cycle 1 to Cycle 20
csp:jessica

Resin load : 0.6mmol/g	Synthesis time: 2 Days 13 Minutes
Resin amount : 209mg	
Equivalents : 5	

Name	Code	Mol weight [g/mol]	Mat. [g]	Mat. Vol. [ml]	Dissolve vol. [ml]	Conc. [mol/l]	Retil [cycle]	Overall vol. [ml]	max. single Vol. [μl]	Coupling Conc. [mol/l]
Fmoc-Alanine	Ala	311.30	0.507		2.25	0.63		2.60	1000.00	
Fmoc-Phenylalanin	Phe	387.40	2.182		7.24	0.63		8.90	1000.00	
Fmoc-Glycine	Gly	297.30	0.876		4.11	0.63		4.70	1000.00	
Fmoc-Leucine	Leu	353.40	1.507		5.61	0.63		6.80	1000.00	
Fmoc-Asparagine (Trt)	Asn	597.80	0.975		1.93	0.63		2.60	1000.00	
Fmoc-Glutamine (Trt)	Gln	611.80	0.997		1.90	0.63		2.60	1000.00	
Fmoc-Arginine (Pbf)	Arg	648.78	1.912		3.29	0.63		4.70	1000.00	
Fmoc-Serine (But)	Ser	383.40	2.139		7.34	0.63		8.90	1000.00	
Fmoc-Threonine (But)	Thr	397.50	1.171		3.76	0.63		4.70	1000.00	
all AminoAcids				= 37.43						
HBTU/HoBt/DMF		0.00	0.000		63.00			63.00	1400.00	
40%Piperidine/DMF		0.00	0.000		45.00			45.00	1000.00	
DIPEA/NMP		129.20	7.413	9.75	22.05	1.80		31.80	695.00	
DMF		0.00	0.000		1130.50			1130.50	3000.00	

Figura 20: Tabella riassuntiva fornita da Syro I, riassuntiva dei reagenti utilizzati durante la sintesi del peptide CSP

Preparazione dei reagenti della sintesi:

Sono state preparate le soluzioni 0,63 M in N, N-dimetilformammide (DMF) di tutti gli amminoacidi, ad eccezione della feninalanina che per essere solubilizzata richiede l'utilizzo di N-metil-2-pirrolidone (NMP).

Sono state poi preparate le soluzioni necessarie alla reazione:

- Soluzione al 40% di piperidina in DMF, utilizzata all'inizio di ogni ciclo di *coupling* per la deprotezione del gruppo Fmoc.
- Soluzione attivante HBTU/Oxima Pure 0,45 M in DMF
- Soluzione DIPEA 1,8 M in NMP

Sono stati effettuati un paio di lavaggi della resina con DMF, dopodiché è stata avviata la sintesi. Ogni ciclo di sintesi prevede i seguenti passaggi:

1. Rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- α -amminica di ciascun residuo incorporato nel peptide in crescita, trattando il peptide con 1 ml di soluzione al 40% di Piperidina in DMF per 3 minuti e, a seguire, con una soluzione al 20% di Piperidina in DMF per 12 minuti.
2. Attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc, da condensare alla catena in crescita, utilizzando 5 equivalenti della soluzione con l'amminoacido (1 ml), 5 equivalenti di HBTU (1,4 ml della soluzione 0,45 M HBTU/Oxima Pure in DMF) e 10 equivalenti di DIPEA (0,695 ml di una soluzione 1,8 M di DIPEA in NMP).

Stop e test alla Ninidrina

Giunta la sintesi al primo stop è stato eseguito il primo test alla ninidrina, seguendo i passaggi previsti dalla procedura, per valutare la resa del *coupling* della glicina sulla resina funzionalizzata con lisina. Il test ha determinato una resa del 97,946%. In genere un *coupling* si considera andato a buon fine se la resa è >98%. La resa ottenuta è stata comunque ritenuta buona e la sintesi è stata fatta ripartire dal punto di Stop, senza programmare un ulteriore ciclo di *coupling* di glicina.

In modo analogo, è stato eseguito il secondo test alla ninidrina dopo l'undicesimo *coupling* per valutare la resa della reazione di condensazione della leucina su feninalanina. Il test ha determinato un valore di resa buono, pari al 98,81%. La sintesi è stata fatta ripartire.

Dopo il terzo Stop è stato eseguito il test alla ninidrina per la valutazione della resa della reazione del quattordicesimo *coupling*, feninalanina su feninalanina. Il test ha determinato una resa del 98,79%; pertanto la sintesi è stata fatta riprendere dal quindicesimo ciclo ed è proseguita fino a giungere al termine.

A sintesi terminata, la resina è stata sottoposta ad alcuni lavaggi con DCM e lasciata seccare per 1 h nella campana da vuoto. Dopodiché il prodotto è stato pesato: sono stati ottenuti 0,57883 g di peptide su resina con terminale amminico ancora protetto da Fmoc. Si è deciso di effettuare la deprotezione dal gruppo Fmoc terminale e lo sblocco del

peptide dalla resina su $\frac{1}{3}$ del totale. La parte rimanente è stata conservata e successivamente utilizzata per ottenere gli analoghi del CSP *mutans*.

Rimozione del gruppo Fmoc terminale

Sono stati pesati in un reattore 0,1929 g di peptide su resina. Il reattore è stato inserito nel sintetizzatore e dopo aver effettuato un paio di lavaggi con DMF, è stata programmata dal software la reazione di deprotezione dal gruppo Fmoc. Terminata la reazione, il peptide su resina è stato sottoposto a diversi cicli di lavaggio con DCM e seccato in campana da vuoto per 1 ora.

Deprotezione dei gruppi laterali e sblocco dalla resina:

Il peptide su resina è stato dunque sottoposto alla reazione di sblocco dalla resina, con la concomitante deprotezione dei gruppi laterali. Al reattore sono stati aggiunti in ordine 0,125 ml di acqua MilliQ, 0,125 ml di TES e 4,75 ml di TFA. La soluzione è stata lasciata a reagire per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente, agitando manualmente il reattore di tanto in tanto. Al termine della reazione, si è filtrata la resina dalla soluzione e la soluzione contenente il peptide grezzo è stata portata a piccolo volume in evaporatore rotante. Successivamente il peptide è stato fatto precipitare mediante aggiunta di etere dietilico freddo (4° C). Il prodotto grezzo è stato filtrato su *Gooch* G3 e seccato nella campana da vuoto per 1 ora.

Il peptide nel *Gooch* è stato pesato; sono stati ottenuti 0,06757 g di CSP *mutans* grezzo.

3.1.2 Caratterizzazione e purificazione del peptide CSP *mutans*

Caratterizzazione del peptide grezzo

È stato pesato 1 mg del peptide grezzo in una *eppendorf*, cui è stato aggiunto 1 ml di acqua MilliQ. La soluzione 1 mg/ml è stata filtrata e caratterizzata mediante corsa con RP-HPLC analitica.

L'analisi RP-HPLC si è svolta nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm , 300 Å, 4,6 \times 250 nm);
- Flusso: 1 ml/min;
- Volume di iniezione: 200 μl ;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;

- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 30% al 50% di eluente B in 40 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Si è presentato un picco di assorbanza al tempo di ritenzione di 15 minuti (37,5% B) (figura 21).

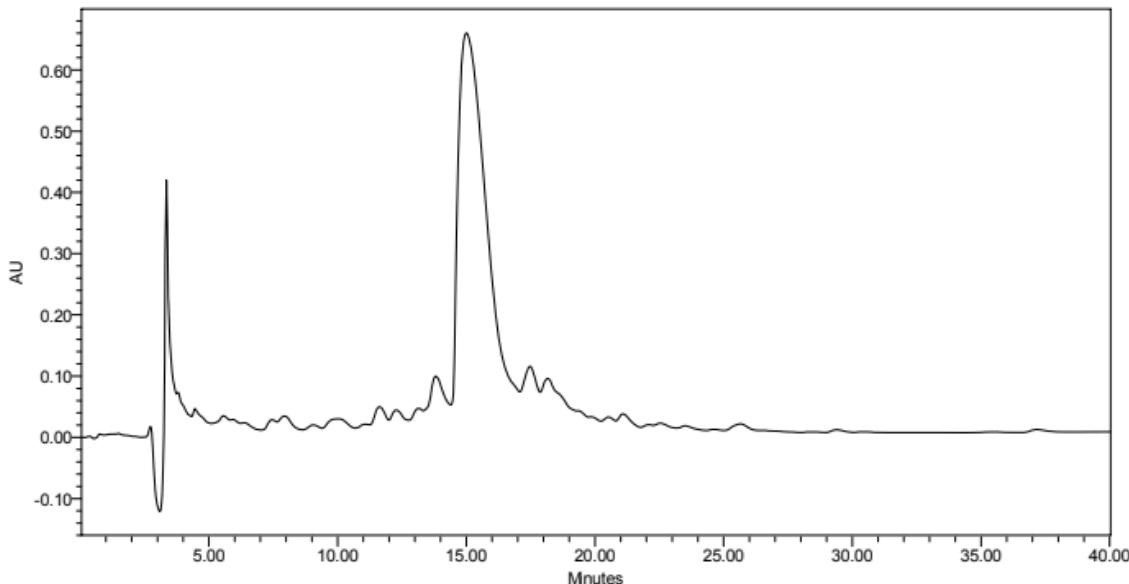


Figura 21: Cromatografia analitica del peptide CSP mutans grezzo. Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 200 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 30% al 50% in 40 minuti; λ: 214 nm.

Per verificare la natura della molecola e l'effettiva identità con il peptide *target* è stata effettuata un'analisi di massa MALDI-TOF (fig. 22). L'analisi ha confermato che il picco a 15 minuti è riconducibile al peptide desiderato, poiché il grafico della spettrometria di massa presenta uno *spike* in corrispondenza del peso molecolare 2364,07 Da (PM_{teorico}: 2364,7 Da).

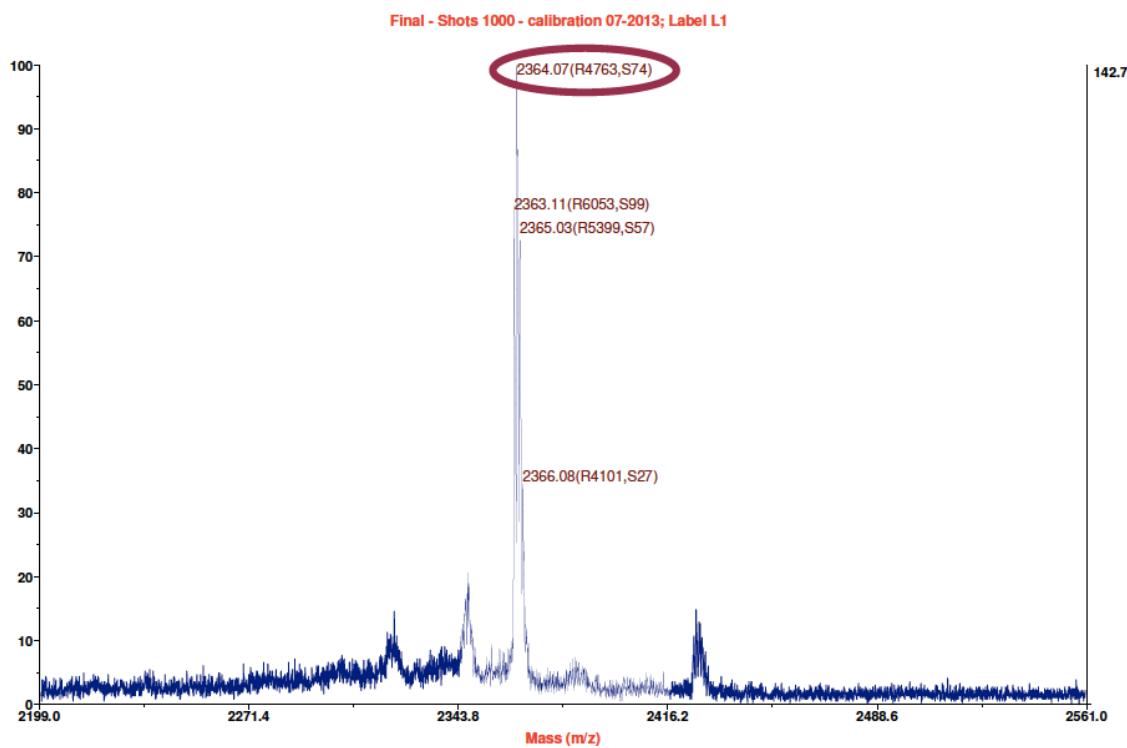


Figura 22: Spettro di massa MALDI-TOF del peptide CSP mutans grezzo

Purificazione del peptide grezzo

Il peptide grezzo (67,57 mg) è stato purificato in due corse tramite cromatografia semipreparativa in RP-HPLC. Per ogni corsa semipreparativa, circa 33 mg di peptide sono stati sciolti in 20 ml di eluente A (0,05% TFA in acqua MilliQ). La soluzione è stata filtrata prima di essere caricata in colonna.

L’analisi RP-HPLC semipreparativa è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: NovaPak C₁₈ (6 μm, 60 Å, 7,8 × 300 nm);
- Flusso: 4 ml/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 20% al 45% di eluente B in 50 minuti;
- Lettura dell’assorbanza a 214 nm;
- Velocità della carta: 0,5 cm/min.

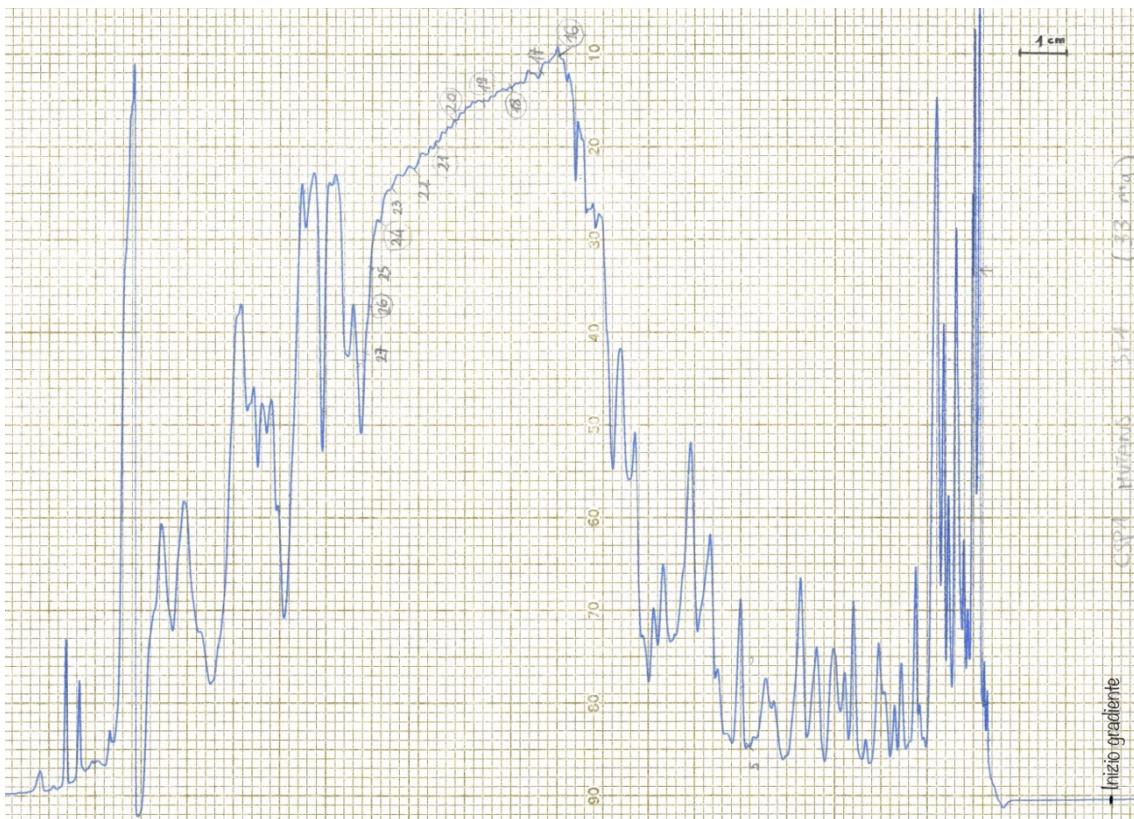


Figura 23: Cromatografia semipreparativa I del peptide CSP. Colonna: NovaPak C₁₈ (6 μm, 60 Å, 7,8 × 300 nm); Flusso: 4 ml/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dal 20% al 45% di eluente B in 50 minuti; Lettura dell’assorbanza a 214 nm; Velocità della carta: 0,5 cm/min.

L’eluito in uscita è stato frazionato in differenti provette. Dopo un’analisi del tracciato cromatografico, sono state selezionate le frazioni in corrispondenza del picco più significativo da sottoporre a cromatografia analitica, per confermare la presenza del peptide desiderato ed escludere prodotti secondari di sintesi. Le analisi analitiche RP-HPLC sono state condotte nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4,6 × 250 nm);
- Flusso: 1 ml/min;
- Volume di iniezione: 30 μl;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 30% al 40% di eluente B in 20 minuti;
- Lettura dell’assorbanza a 214 nm.

Le frazioni purificate hanno presentato picchi di assorbanza al tempo di ritenzione atteso per il peptide CSP ($t_r=15$ minuti, flusso 37,5% B), confermando di essere riconducibili al peptide desiderato. In figura 24 è riportato il cromatogramma della frazione 21 raccolta durante la semipreparativa 1 (sp1) del CSP *mutans* grezzo.

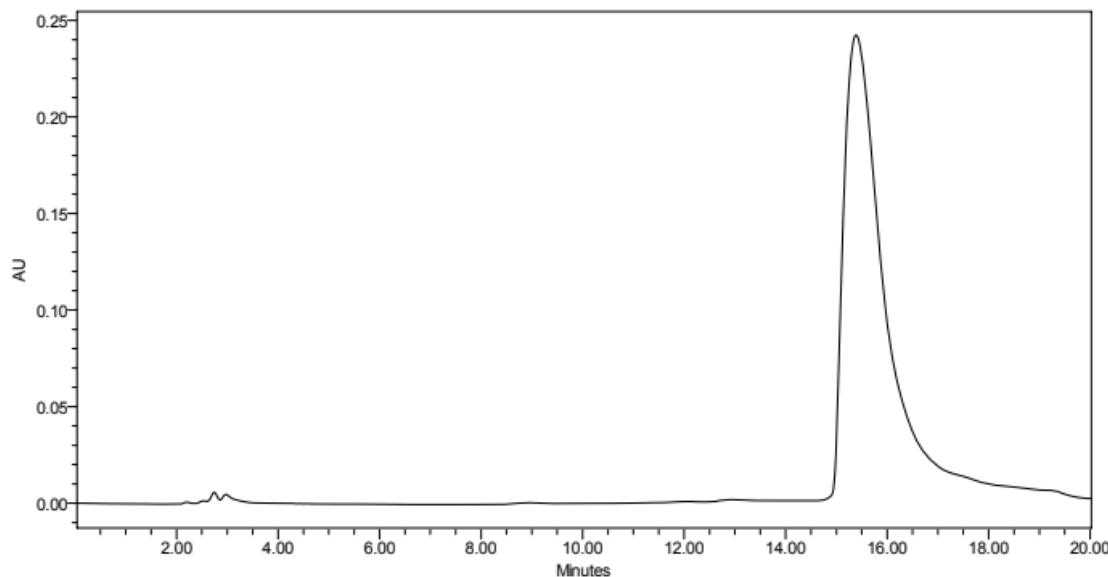


Figura 24: Cromatografia analitica della frazione 20 sp1 CSP mutans grezzo. Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 30 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 30% al 40% in 20 minuti; λ: 214 nm.

Dopo aver esaminato i chromatogrammi delle analisi RP-HPLC, è stata decisa in base alla purezza la suddivisione delle frazioni in tre *pool*: *pool “sporco in testa”*, *pool cuore*, *pool “sporco in coda”*. Le frazioni con percentuale di purezza più alta sono state raccolte nel *pool cuore*. I *pool* sono poi stati liofilizzati e pesati. Sono stati ottenuti 22,3 mg di peptide al 98,71% (chromatogramma del *pool cuore* in fig. 25), 7,39 mg di peptide al 93%, 0,66 mg di peptide al 75%.

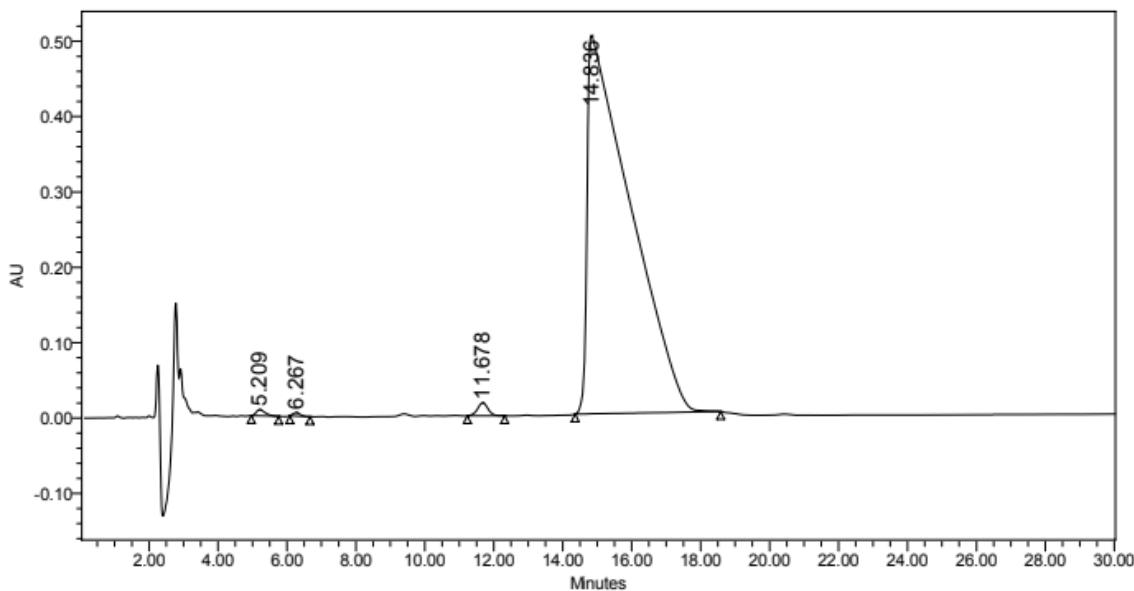


Figura 25: Cromatografia analitica del pool cuore del CSP. Colonna NovaPak C₁₈; volume di iniezione 120 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 35% al 50% in 30 minuti; λ: 214 nm.

3.1.3 Sintesi del peptide CSP *scrambled*

Negli esperimenti che coinvolgono saggi biologici si usa sintetizzare, oltre al peptide la cui attività biologica è nota, anche una permutazione della sua sequenza peptica. Il peptide *scrambled* è usato come controllo negativo per dimostrare la specificità della sequenza peptidica corretta.

Di seguito denominiamo la permutazione della sequenza del CSP come CSP *scrambled*.

Quali sono le caratteristiche della esatta sequenza di amminoacidi che permettono al CSP di svolgere la sua attività?

In uno studio [37] è emerso che sostituendo Phe-7, Phe-11 o Phe-15 con residui idrofilici, il peptide, prima in conformazione ad α-elica anfipatica, perde la sua funzionalità non essendo più in grado di legarsi al recettore. Una modifica alla sequenza C-terminale ha dimostrato invece di non determinare un cambiamento nella struttura ad α-elica; la capacità di legarsi al recettore non viene persa, ma il peptide con sequenza C-terminale troncata o modificata non attiva più il *quorum sensing* (potrebbe dunque avere azione inibitrice del *quorum sensing* quando si lega al recettore). Dallo stesso studio è emerso che modificando/troncando la sequenza N-terminale il *quorum sensing* viene

normalmente attivato ma solo per i primi 10 minuti. Alla luce di questi risultati, una permutazione in cui sia il corpo centrale che le parti terminali siano diverse dalla sequenza originale non dovrebbe conservare l'attività biologica della corretta sequenza peptidica. Utilizzando un software online (mimotopes.com) sono state generate diverse permutazioni della sequenza peptidica del CSP *mutans*. La scelta della sequenza *scrambled* da sintetizzare è ricaduta su un peptide che non presentasse accoppiamenti Phe-Phe o Phe-Leu, noti per essere *coupling* con una resa potenzialmente bassa.

Sequenza CSP scrambled:

H-Thr-Gln-Thr-Leu-Lys-Phe-Gly-Leu-Ala-Phe-Ser-Phe-Ser-Arg-Gly-Asn-Arg-Phe-Ser-Lys-Ser-OH

Peso molecolare: 2364,696 Da

Il peptide CSP *scrambled* è stato sintetizzato su fase solida con chimica Fmoc utilizzando il sintetizzatore Syro I. Il supporto solido utilizzato per la sintesi è la resina Fmoc-Ser(tBu)-Sasrin (sostituzione 0,45 mmol/g), precaricata con Serina, l'amminoacido C-terminale della sequenza peptidica. Il peso della resina inserita nel reattore è:

$$m_{\text{resina}} = \frac{\text{scala di sintesi}}{\text{sostituzione della resina}} = \frac{0,125 \text{ mmol}}{0,45 \text{ mmol/g}} = 0,278 \text{ g}$$

Schema di sintesi:

La sintesi è composta da 20 cicli di *coupling* (21 amminoacidi totali, di cui uno precaricato). Tutti i cicli sono stati impostati con *coupling* doppio. Non è stato impostato nessuno stop per test alla ninidrina.

La tabella riassuntiva di sintesi fornita da *Syro I* è uguale a quella del CSP *mutans* in figura 20, essendo i due peptidi costituiti dai medesimi amminoacidi ma disposti in una sequenza diversa.

Preparazione dei reagenti della sintesi:

Sono state preparate le soluzioni 0,63 M in DMF di tutti gli amminoacidi, ad eccezione della fenilalanina che per essere solubilizzata richiede l'utilizzo di NMP.

Sono state poi preparate le soluzioni necessarie alla reazione:

- Soluzione al 40% di piperidina in DMF, utilizzata all'inizio di ogni ciclo di coupling per la deprotezione del gruppo Fmoc.
- Soluzione attivante HBTU/Oxima Pure 0,45 M in DMF
- Soluzione DIPEA 1,8 M in NMP

Sono stati effettuati un paio di lavaggi della resina con DMF, dopodiché è stata avviata la sintesi. Ogni ciclo di sintesi prevede i seguenti passaggi:

3. Rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- α -amminica di ciascun residuo incorporato nel peptide in crescita, trattando il peptide con 1 ml di soluzione al 40% di Piperidina in DMF per 3 minuti e, a seguire, con una soluzione al 20% di Piperidina in DMF per 12 minuti.
4. Attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc protetto da condensare in catena utilizzando 5 equivalenti della soluzione con l'amminoacido (1 ml), 5 equivalenti di HBTU (1,4 ml della soluzione 0,45 M HBTU/Oxima Pure in DMF) e 10 equivalenti di DIPEA (0,695 ml di una soluzione 1,8 M di DIPEA in NMP).

Una volta giunta al termine la sintesi, il prodotto è stato sottoposto ad alcuni lavaggi con DCM e lasciato seccare per 1 h nella campana da vuoto. Dopodiché il peptide su resina è stato pesato: sono stati ottenuti 0,72132 g di peptide su resina, con terminale amminico ancora protetto da Fmoc.

Si è deciso di effettuare la deprotezione dal Fmoc terminale e lo sblocco del peptide dalla resina su $1/2$ del totale.

Rimozione del gruppo Fmoc terminale

Sono stati pesati in un reattore 0,3606 g di peptide su resina. Il reattore è stato inserito nel sintetizzatore e dopo aver effettuato un paio di lavaggi con DMF, Syro I è stato programmato per effettuare la reazione di deprotezione dal gruppo Fmoc. Conclusa la reazione, il peptide su resina è stato sottoposto a diversi cicli di lavaggio con DCM e seccato in campana da vuoto per 1 ora.

Deprotezione dei gruppi laterali e sblocco dalla resina:

Il peptide su resina è stato dunque sottoposto alla reazione di sblocco dalla resina, con la concomitante deprotezione dei gruppi laterali. Al reattore sono stati aggiunti in ordine 0,125 ml di acqua MilliQ, 0,125 ml di TES e 4,75 ml di TFA. La soluzione è stata lasciata a reagire per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente, agitando manualmente il reattore di tanto in tanto. Al termine della reazione, si è filtrata la resina dalla soluzione. La soluzione contenente il peptide grezzo è stata portata a piccolo volume in evaporatore rotante. Successivamente il peptide è stato fatto precipitare mediante aggiunta di etere dietilico freddo (4° C). Il prodotto grezzo è stato filtrato su *Gooch* G3 e seccato nella campana da vuoto per 1 ora.

Il peptide nel *Gooch* è stato pesato; sono stati ottenuti 0,13439 g di peptide CSP *scrambled* grezzo.

3.1.4 Caratterizzazione e purificazione del peptide CSP *scrambled*

Caratterizzazione del peptide grezzo

È stata preparata una soluzione 1 mg/1 ml con una piccola aliquota di CSP *scrambled* in acqua MilliQ, da caratterizzare mediante corsa cromatografica analitica e spettrometria di massa. Il peptide però ha mostrato insolubilità. Gli amminoacidi carichi che costituiscono il peptide sono R+ K+ H+ E- D-. Il peptide ha carattere basico prevalente, pertanto va sciolto preferibilmente in ambiente acido. Alla soluzione con il peptide sono dunque stati aggiunti 100 µl di acetonitrile e 400 µl di eluente A (0,05% acido trifluoracetico in H₂O). Per fare sciogliere il peptide nella soluzione sono stati alternati vortex, sonicatore e bagno caldo, senza però giungere ad un risultato del tutto soddisfacente. La soluzione è stata comunque filtrata e caratterizzata mediante analisi cromatografica analitica. L'analisi analitica RP-HPLC si è svolta nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 nm);
- Flusso: 1 ml/min;
- Volume di iniezione: 100 µl;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 10% al 50% di eluente B in 40 minuti;

- Lettura dell'assorbanza a 214 nm.
- Velocità della carta: 0,5 cm/min.

Si è presentato un picco prevalente di assorbanza al tempo di ritenzione di 34 minuti (flusso 44% B).

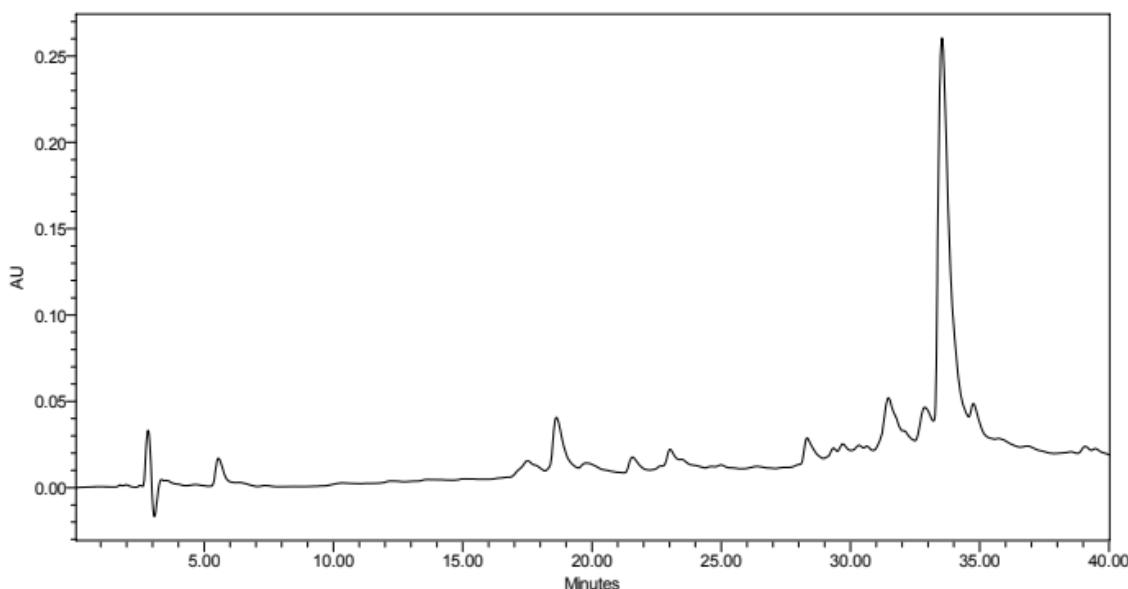


Figura 26: Cromatografia analitica del peptide CSP scrambled grezzo. Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 100 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 10% al 50% in 40 minuti; λ: 214 nm.

Purificazione del peptide grezzo

Sono stati effettuati diversi tentativi per sciogliere il peptide grezzo da purificare. Il peptide (28 mg del grezzo) è sembrato sciogliersi dopo aver aggiunto 2,5 ml di DMF. Abbiamo evitato di aggiungere ulteriore DMF per non rischiare di arrecare danni alla colonna del RP-HPLC. Sono stati dunque aggiunti 28 ml di eluente A alla soluzione di peptide e DMF. La soluzione è stata filtrata prima di essere caricata in colonna.

L'analisi RP-HPLC semipreparativa è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: NovaPak C₁₈ (6 µm, 60 Å, 7,8 × 300 nm);
- Flusso: 4 ml/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 15% al 45% di eluente B in 60 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm;

- Velocità della carta: 0,5 cm/min.

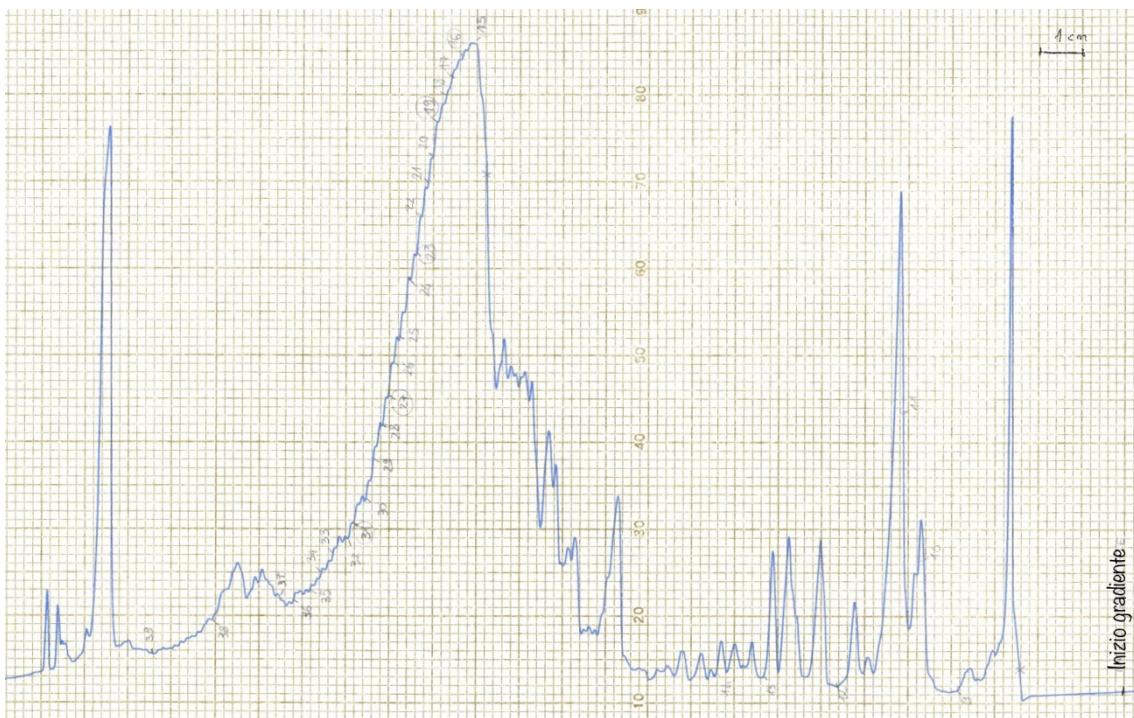


Figura 27: Cromatografia semipreparativa 1 del peptide CSP scrambled. Colonna: NovaPak C₁₈ (6 μm, 60 Å, 7,8 × 300 nm); Flusso: 4 ml/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dal 15% al 45% di eluente B in 60 minuti; Lettura dell'assorbanza a 214 nm; Velocità della carta: 0,5 cm/min.

Il cromatogramma mostra un picco quando il flusso è al 30% di B, pulito in coda ma non molto ampio; questo risultato indica che la quantità di analita non sarà elevata, essendo questa proporzionale all'area sottesa dal picco. L'eluito in uscita dal cromatogramma è stato frazionato in provette, separando così i sottoprodotto in base al loro tempo di ritenzione. Dopo un'analisi del tracciato cromatografico, sono state selezionate le frazioni in corrispondenza del picco più significativo da sottoporre a cromatografia analitica per identificare la presenza del peptide desiderato rispetto a prodotti secondari di sintesi. Le analisi analitiche sono state condotte nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4,6 × 250 nm);
- Flusso: 1 ml/min;
- Volume di iniezione: 30 μl;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;

- Gradiente: dal 30% al 40% di eluente B in 20 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm.

In figura 28 è riportata la cromatografia analitica della frazione 16 della semipreparativa 1 del CSP *scrambled*.

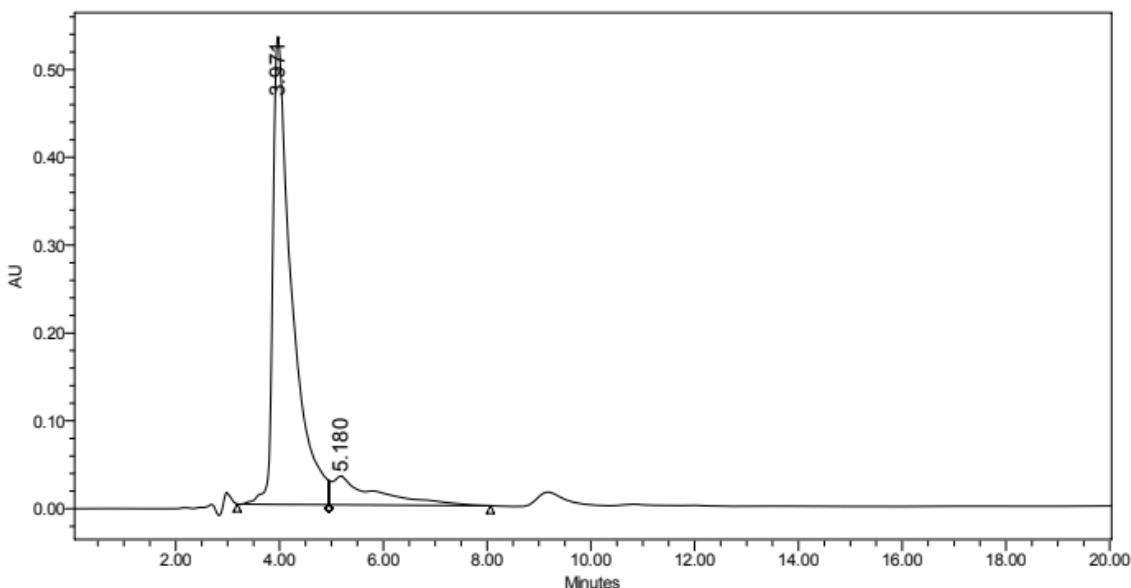


Figura 28: Cromatografia analitica della frazione 16 sp1 del CSP *scrambled* (raccolta nel pool cuore).

Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 30 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 30% al 40% in 20 minuti; λ: 214 nm.

Per verificare l'identità con il peptide *target* è stata effettuata un'analisi di massa MALDI-TOF della frazione 16 sp1 del CSP1 *scrambled* (fig. 29). L'analisi ha confermato che il picco a 4 minuti è riconducibile al peptide desiderato, poiché il grafico della spettrometria di massa presenta un picco in corrispondenza del peso molecolare 2364,37 Da (PM_{teorico}: 2364,7 Da).

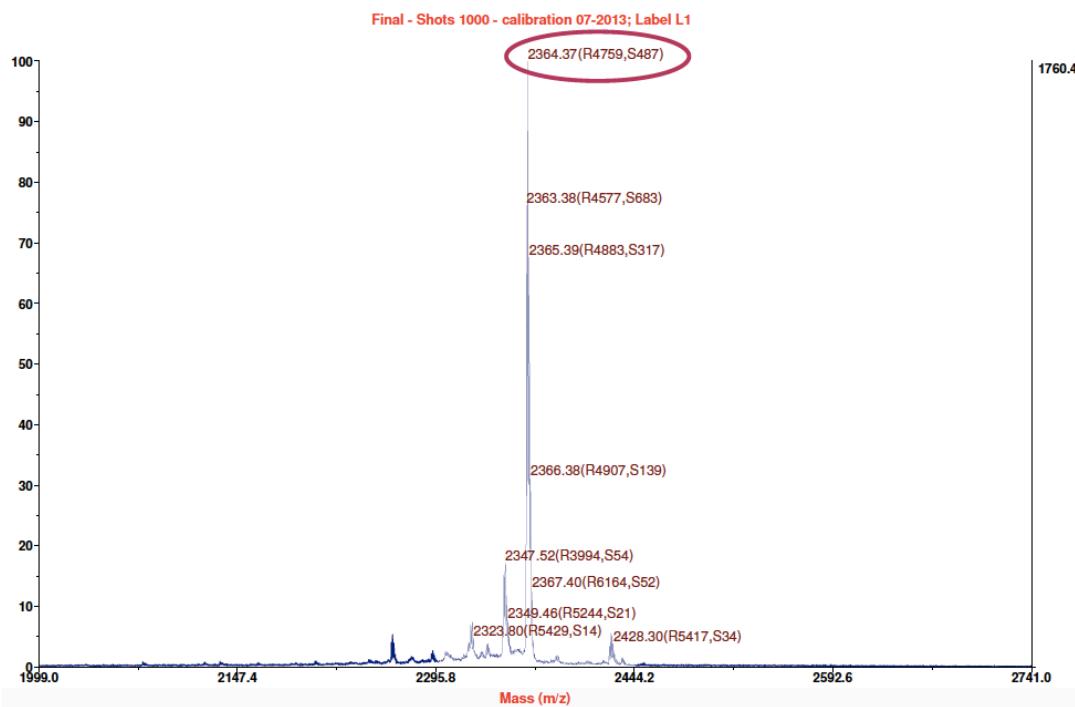


Figura 29: Spettro di massa MALDI-TOF della frazione 16 sp1 del CSP scrambled

Dopo aver esaminato i cromatogrammi delle analisi RP-HPLC, è stata decisa in base alla purezza la suddivisione delle frazioni in tre *pool*. Le frazioni con percentuale di purezza più alta sono state raccolte nel *pool cuore*. I *pool* sono stati liofilizzati e successivamente pesati. Sono stati ottenuti 2,12 mg di peptide al 92,12% (cromatogramma del *pool cuore* in fig. 30), 1,23 mg di peptide al 88%, 1,72 mg di peptide al 76%.

Il quantitativo di peptide purificato ottenuto, circa 5 mg, è basso rispetto al peptide grezzo di partenza (28 mg). Questo risultato può essere legato alla difficoltà riscontrata per sciogliere il peptide; buona parte del peptide potrebbe infatti essere rimasta sul filtro con cui è stata filtrata la soluzione prima di essere caricata in colonna ed essere stata persa.

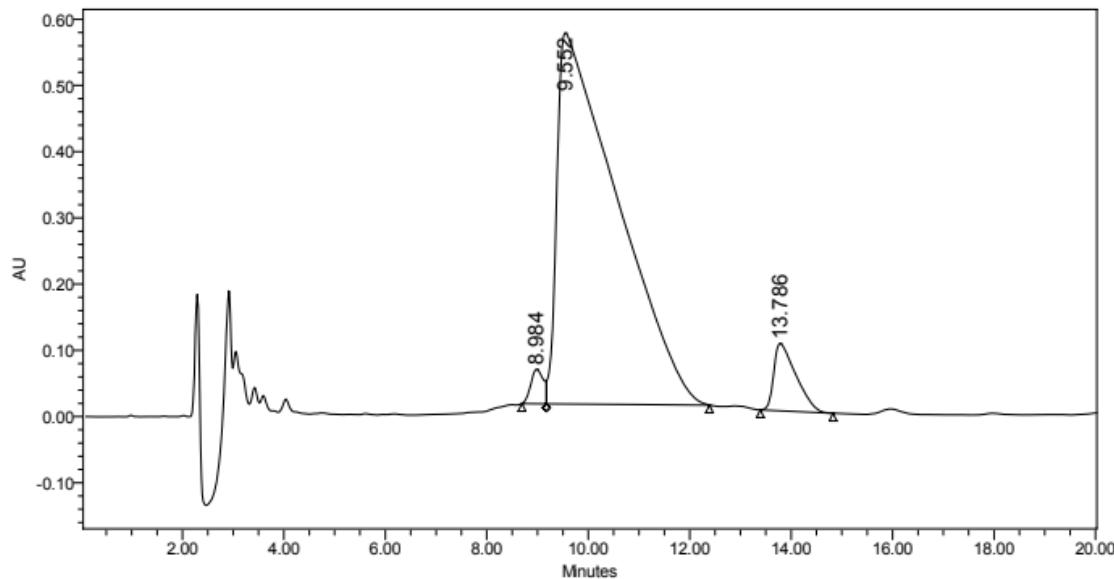


Figura 30: Cromatografia analitica del pool cuore del CSP scrambled sp1. Colonna NovaPak C₁₈; volume di iniezione 200 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 30% al 40% in 20 minuti; λ: 214 nm.

Per ottenere più peptide purificato è stata eseguita una seconda semipreparativa RP-HPLC. Sono stati pesati 31 mg di peptide grezzo e sciolti in 15 ml di eluente A e 15 ml di DMF, cercando di agevolarne la solubilizzazione con il bagno caldo e il sonicatore. La soluzione ha opposto molta resistenza passando attraverso il filtro, segno che anche in questo caso il peptide potrebbe non essersi sciolto correttamente.

L'analisi RP-HPLC semipreparativa è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: NovaPak C₁₈ (6 µm, 60 Å, 7,8 × 300 nm);
- Flusso: 4 ml/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 20% al 35% di eluente B in 30 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm;
- Velocità della carta: 0,5 cm/min.

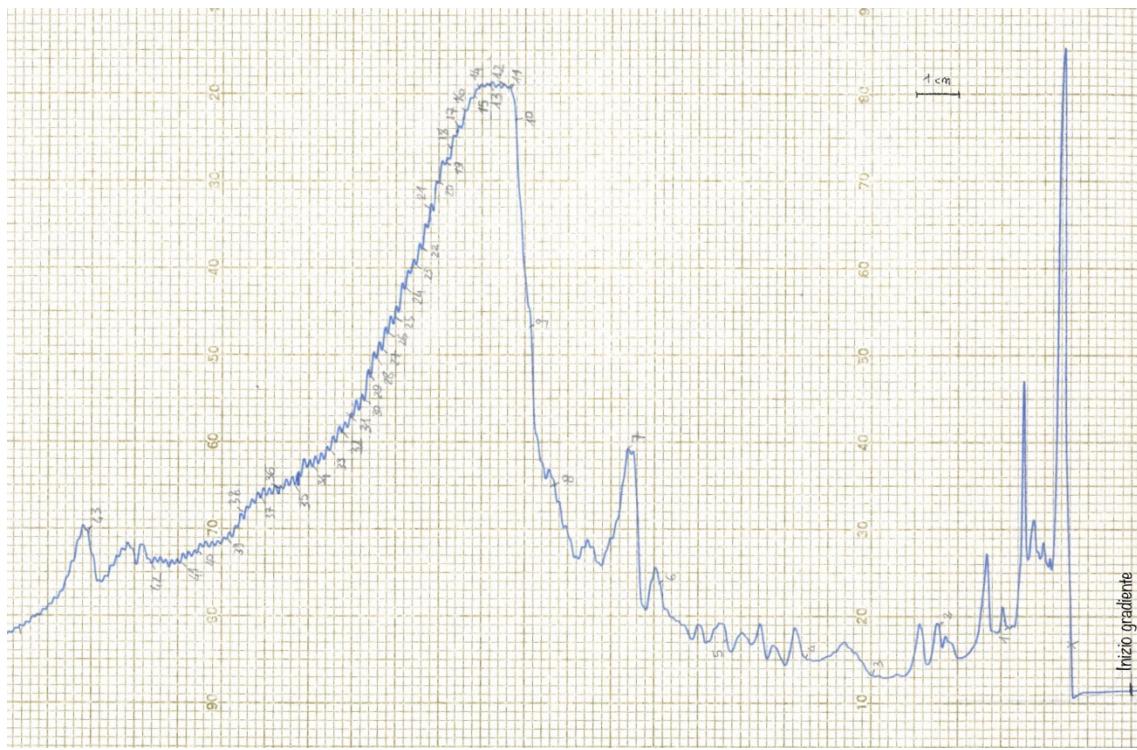


Figura 31: Cromatografia semipreparativa 2 del peptide CSP scrambled. Colonna: NovaPak C₁₈ (6 μm, 60 Å, 7,8 × 300 nm); Flusso: 4 ml/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dal 20% al 35% di eluente B in 30 minuti; Lettura dell'assorbanza a 214 nm; Velocità della carta: 0,5 cm/min.

Anche questa volta la banda corrispondente al nostro peptide non è larga, segnalando che la quantità di peptide purificato non sarà elevata.

Sono state eseguite diverse analisi analitiche delle frazioni in corrispondenza della banda. Dopo aver esaminato i chromatogrammi delle analisi RP-HPLC, è stata decisa in base alla purezza la suddivisione delle frazioni in due *pool*. Le frazioni con percentuale di purezza più alta sono state raccolte nel *pool cuore*. I *pool* sono stati liofilizzati e successivamente pesati. Sono stati ottenuti 3,77 mg di peptide al 100% (chromatogramma del *pool cuore* in fig. 32), e 1,9 mg di peptide al 87%.

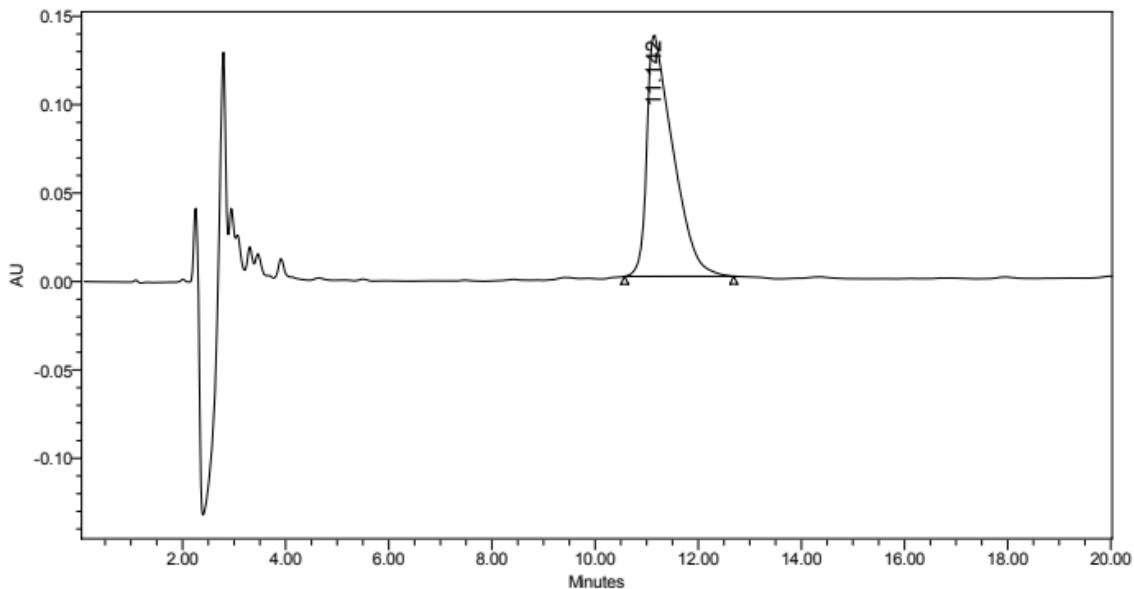


Figura 32: Cromatografia analitica del pool cuore del CSP scrambled sp2. Colonna NovaPak C₁₈; volume di iniezione 120 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 30% al 40% in 20 minuti; λ: 214 nm.

3.1.5 Analoghi del CSP

Parte del CSP *mutans* sintetizzato è stato sottoposto a reazioni chimiche strategiche al fine di ottenere analoghi del peptide che, pur mantenendo il riconoscimento da parte del recettore istidina chinasi, ne bloccino l'attivazione.

3.1.5.1 Preparazione del peptide CSP *acetilato*

L'addizione del gruppo acetile avviene tramite legame ammidico. Pertanto, eseguendo la reazione di acetilazione con peptide ancorato alla resina, il gruppo acetile verrà addizionato al terminale amminico. Qualora invece la reazione avvenisse con peptide sbloccato dalla resina, si avrebbe addizione del gruppo acetile anche in corrispondenza del gruppo laterale amminico della lisina C-terminale.

Sequenza CSP *acetilato*:

Ac-Ser-Gly-Ser-Leu-Ser-Thr-Phe-Phe-Arg-Leu-Phe-Asn-Arg-Ser-Phe-Thr-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys-OH

Ac = Acetil (COCH₃)

PM: 2406,696 Da

Per ottenere l'analogo del peptide CSP *mutans* con residuo N-terminale acetilato il procedimento svolto è stato il seguente:

1. Sono stati pesati in un reattore 0,187 g di CSP *mutans* su resina (1/3 del peptide totale sintetizzato) ed è stata eseguita la rimozione del gruppo Fmoc dal terminale amminico del peptide; la reazione di sblocco è stata eseguita con l'ausilio del sintetizzatore automatico Syro I.
2. Al reattore con il peptide su resina sono stati aggiunti 2 ml di soluzione costituita dal 10% di anidride acetica e 5% di lutidina in DMF. La soluzione è stata lasciata agire per 20 minuti (reazione di acetilazione).
3. Terminata la reazione, sono stati impostati 5 cicli di lavaggio automatizzato dal software Syro I. Successivamente il peptide acetilato su resina è stato sottoposto a diversi cicli di lavaggio con DCM e seccato in campana da vuoto per 1 ora.
4. Il peptide acetilato su resina è stato dunque sottoposto alla reazione di sblocco dalla resina, con la concomitante deprotezione dei gruppi laterali. Al reattore sono stati aggiunti in ordine 0,125 ml di acqua MilliQ, 0,125 ml di TES e 4,75 ml di TFA e la reazione è stata lasciata agire per 1 ora e 30 minuti. Al termine della reazione, si è filtrata la resina dalla soluzione. La soluzione contenente il peptide grezzo è stata portata a piccolo volume in evaporatore rotante. Successivamente il peptide è stato fatto precipitare mediante aggiunta di etere dietilico freddo (4° C). Il prodotto grezzo è stato filtrato su *Gooch* G3 e seccato nella campana da vuoto per 1 ora.

Il peptide nel *Gooch* è stato pesato; si sono ottenuti 66,26 mg di peptide CSP *acetilato*. Metà del peptide grezzo è stato trasferito in un *becher* ed è stato sottoposto a ulteriore reazione di acetilazione della lisina (peracetilazione). L'altra metà è stata invece purificata.

3.1.5.2 Caratterizzazione e purificazione del peptide CSP *acetilato*

Caratterizzazione del peptide grezzo

È stato preparato un campione di CSP *acetilato* pesando 0,2 mg di grezzo, che sono stati sciolti in acqua MilliQ alla concentrazione 1 mg/1 ml. La soluzione è stata filtrata e caratterizzata mediante corsa RP-HPLC, svolta nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 nm);
- Flusso: 1 ml/min;

- Volume di iniezione: 30 μ l;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 35% al 45% di eluente B in 20 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Si è presentato un picco di assorbanza al tempo di ritenzione di 10 minuti (40% B)

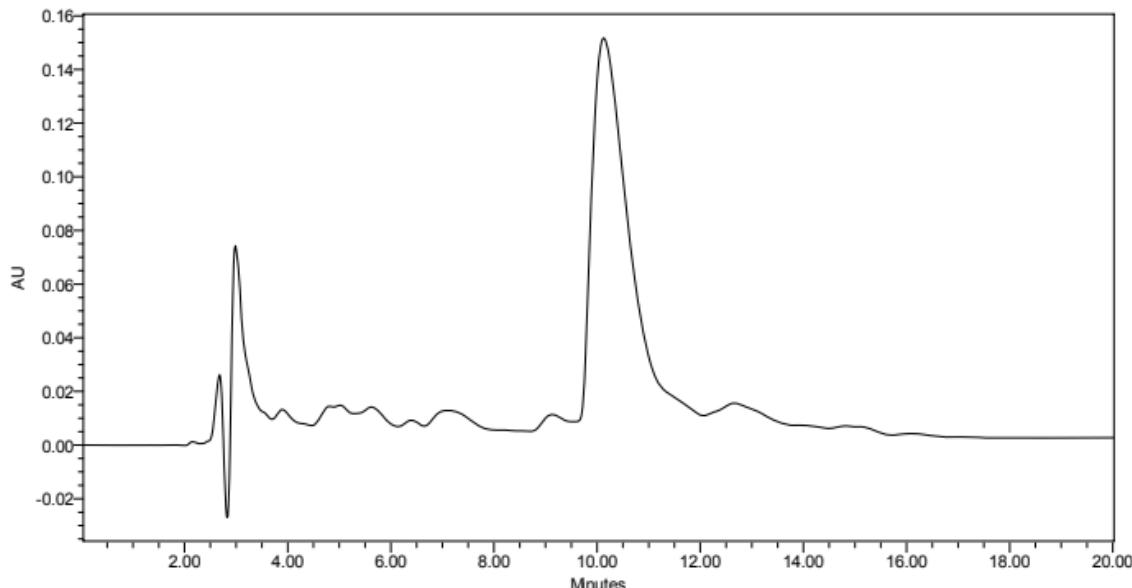


Figura 33: Cromatografia analitica del peptide CSP acetilato grezzo. Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 30 μ l; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 35% al 45% in 20 minuti; λ : 214 nm.

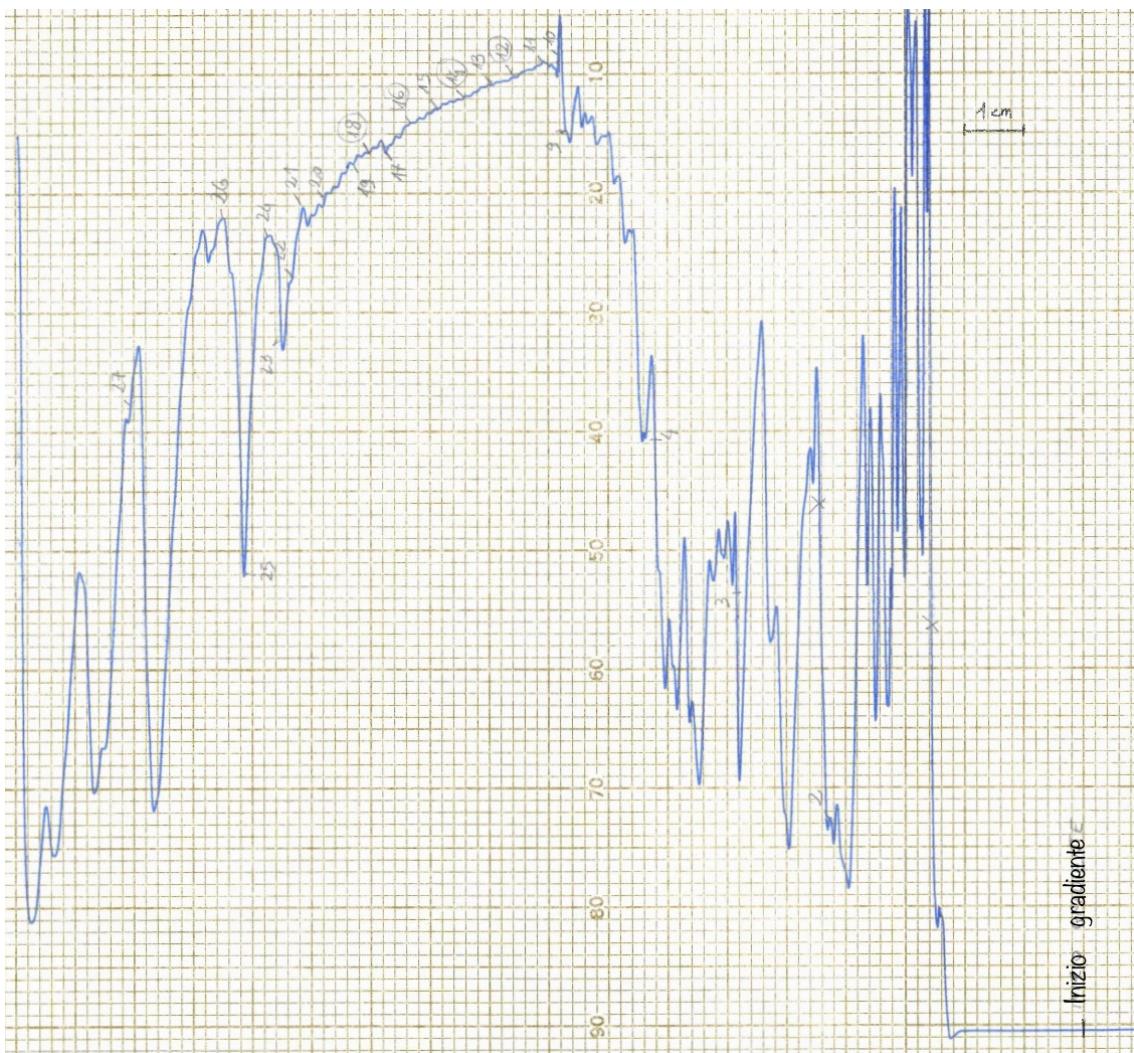
Purificazione del peptide grezzo

Il peptide grezzo (31,34 mg) è stato sciolto in 32 ml di eluente A (0,05% TFA in acqua MilliQ). La soluzione è stata filtrata prima di essere caricata in colonna e purificata tramite cromatografia semipreparativa in RP-HPLC.

L'analisi RP-HPLC semipreparativa è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: NovaPak C₁₈ (6 μ m, 60 Å, 7,8 \times 300 nm);
- Flusso: 4 ml/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 25% al 50% di eluente B in 50 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm;

- Velocità della carta: 0,5 cm/min.



- Volume di iniezione: 30 μ l;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 35% al 45% di eluente B in 20 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm.

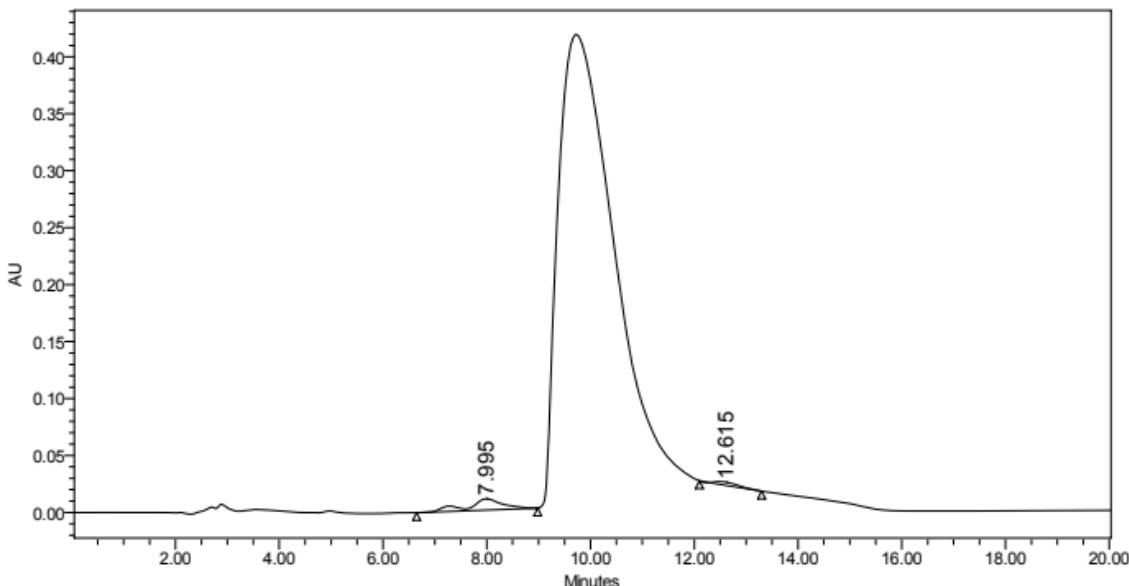


Figura 35: Cromatografia analitica della frazione 12 sp1 del CSP acetilato. Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 30 μ l; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 35% al 45% in 20 minuti; λ : 214 nm.

Le frazioni purificate hanno presentato picchi di assorbanza al tempo di ritenzione atteso per il peptide CSP *acetilato* ($t_r=10$ minuti, flusso 40% B), confermando di essere riconducibili al peptide desiderato. In figura 35 è riportato il cromatogramma della frazione 12 raccolta durante la semipreparativa del CSP *acetilato* grezzo.

Dopo aver esaminato i chromatogrammi delle analisi RP-HPLC, è stata decisa in base alla purezza la suddivisione delle frazioni in quattro *pool*. Le frazioni con percentuale di purezza più alta sono state raccolte nel *pool cuore*. I *pool* sono stati liofilizzati e successivamente pesati. Sono stati ottenuti 15,8 mg di peptide al 98,82% (chromatogramma del *pool cuore* in fig. 36), 1,1 mg di peptide al 87,4%, 2,58 mg di peptide al 72,4%, 1,3 mg di peptide al 86,5%.

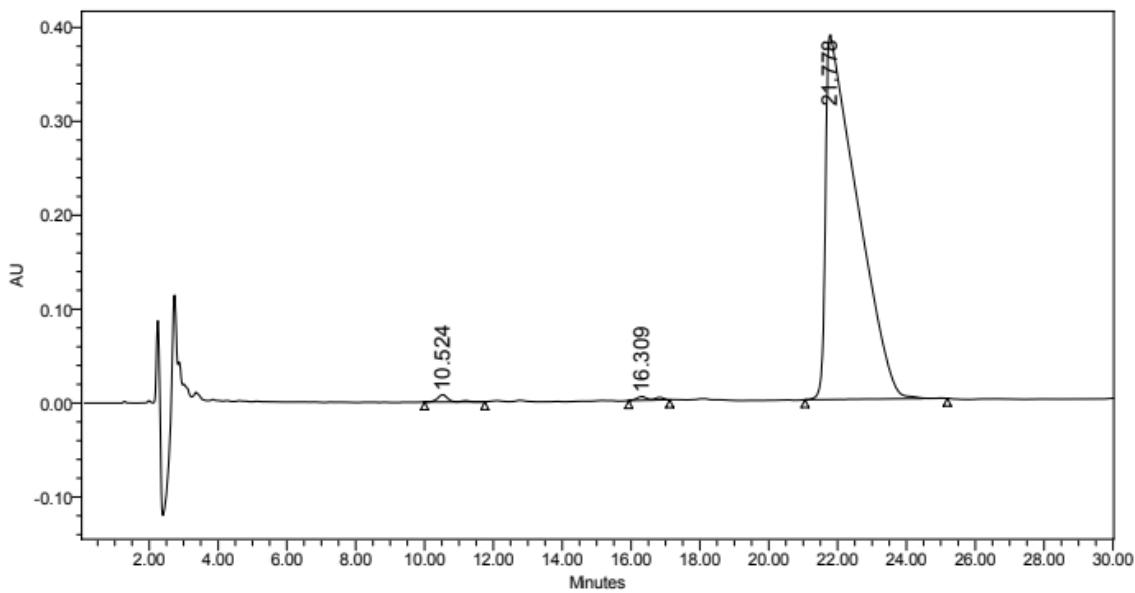


Figura 36: Cromatografia analitica del pool cuore del CSP acetilato. Colonna NovaPak C₁₈; volume di iniezione 90 μ l; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 35% al 50% in 30 minuti; λ : 214 nm.

Per verificare l'identità con il peptide *target* è stata effettuata un'analisi di massa MALDI-TOF preparando un campione del *pool cuore* del CSP acetilato. L'analisi ha confermato che il picco a 10 minuti è riconducibile al peptide desiderato, poiché il grafico della spettrometria di massa presenta uno *spike* in corrispondenza del peso molecolare 2405,54 Da (PM_{teorico}: 2406,696 Da).

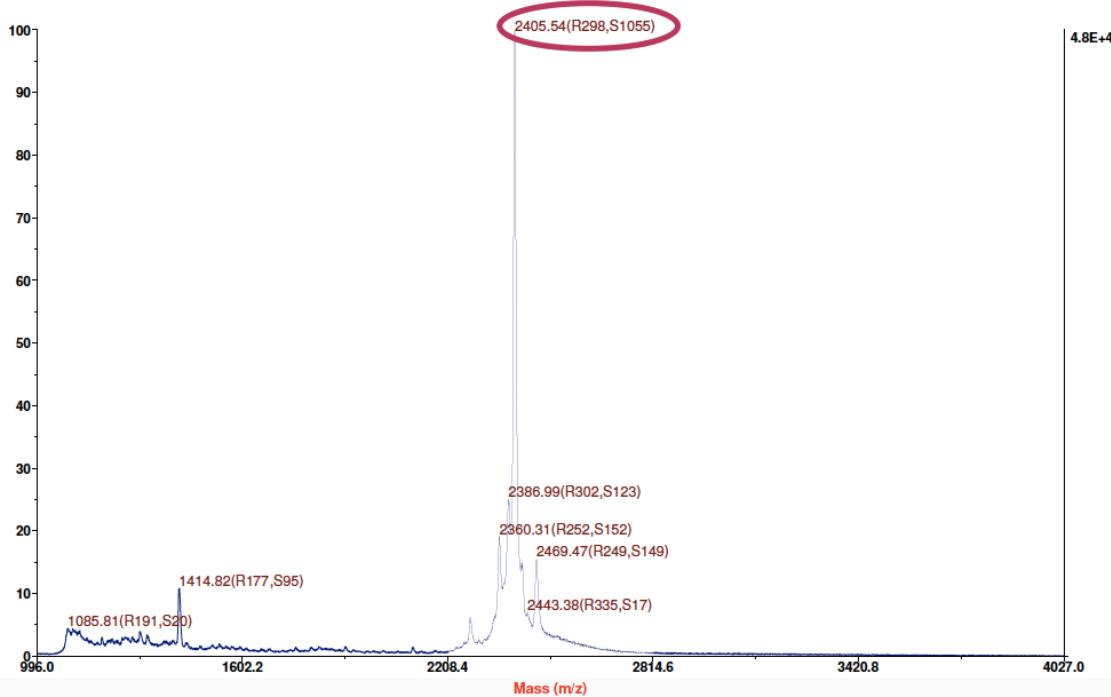


Figura 37: Spettro di massa MALDI-TOF del peptide CSP acetilato pool cuore.

3.1.5.3 Preparazione del peptide CSP *peracetilato*

L'analogo peracetilato del CSP *mutans*, ovvero con gruppo acetile addizionato al terminale amminico di catena e al gruppo laterale amminico della lisina (C-terminale) è stato ottenuto effettuando un'ulteriore reazione di acetilazione del peptide precedentemente acetilato e sbloccato dalla resina.

Sequenza CSP *peracetilato*:

Ac-Ser-Gly-Ser-Leu-Ser-Thr-Phe-Phe-Arg-Leu-Phe-Asn-Arg-Ser-Phe-Thr-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys(Ac)-OH
Ac = Acetil (COCH₃)
PM: 2448,696 Da

Metà del peptide acetilato (33,22 mg) è stato trasferito in un *becher* e lasciato reagire per 20 minuti con 2 ml di soluzione costituita dal 10% di anidride acetica e 5% di lutidina in DMF. Al termine della reazione, il prodotto è stato trasferito in un pallone e portato a piccolo volume in evaporatore rotante. Successivamente il peptide è stato fatto precipitare mediante aggiunta di etere dietilico freddo (4° C). Il prodotto grezzo è stato filtrato su *Gooch* G3, seccato nella campana per 1 ora e infine pesato.

Sono stati ottenuti 3,2 mg di peptide CSP *peracetilato*, valore molto basso rispetto ai 32 mg di peptide da cui siamo partiti per la reazione di acetilazione aggiuntiva. Come possibile causa di ciò si è pensato che il peptide, non precipitato in modo ottimale, possa non essere stato trattenuto dal filtro del *Gooch*, rimanendo in soluzione nell'etere scartato. Il peptide peracetilato grezzo è stato caratterizzato e purificato; verrà denominato CSP *peracetilato sp1*.

Si è deciso di ottenere ulteriore peptide grezzo peracetilato eseguendo questa volta un'unica reazione di acetilazione su peptide CSP grezzo sbloccato dalla resina. In questo modo, l'addizione del gruppo acetile ai due terminali può avvenire contemporaneamente in un'unica fase. La procedura è stata la seguente:

1. Sono stati pesati in un reattore 88 mg di CSP *mutans* su resina (1/6 del peptide totale sintetizzato) ed è stata eseguita la rimozione del gruppo Fmoc dal terminale amminico; la reazione di sblocco è stata eseguita con l'ausilio del sintetizzatore

automatico Syro I. Successivamente il peptide acetilato su resina è stato sottoposto a diversi cicli di lavaggio con DCM e seccato in campana da vuoto per 1 ora.

2. Il peptide è stato dunque sottoposto alla reazione di sblocco dalla resina, con la concomitante deprotezione dei gruppi laterali. Al reattore sono stati aggiunti in ordine 0,125 ml di acqua MilliQ, 0,125 ml di TES e 4,75 ml di TFA. La soluzione è stata lasciata a reagire per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente, agitando manualmente il reattore di tanto in tanto. Al termine della reazione, si è filtrata la resina dalla soluzione. La soluzione contenente il peptide grezzo è stata portata a piccolo volume in evaporatore rotante. Successivamente il peptide è stato fatto precipitare mediante aggiunta di etere dietilico freddo (4° C). Il prodotto grezzo è stato filtrato su *Gooch* G3, seccato nella campana per 1 ora e pesato. Sono stati ottenuti 42,92 mg di peptide CSP *mutans* grezzo.
3. Il peptide grezzo è stato fatto reagire per 2 ore all'interno di un *becher* con 2,5 ml di soluzione acetilante costituita dal 10% di anidride acetica e 5% di lutidina in DMF.
4. Il prodotto è stato trasferito in un pallone e portato a piccolo volume con evaporatore rotante. Successivamente il peptide è stato fatto precipitare mediante aggiunta di etere dietilico freddo (4° C). Per isolare il precipitato dall'etere è stato usato un procedimento diverso rispetto alla filtrazione su *Gooch*. Sono stati centrifugati 6 ml di soluzione alla volta all'interno di una *falcon*, trasferendo ogni volta il surnatante (etere con eventuale peptide residuo) in un contenitore che è stato conservato in via cautelativa. La *falcon* utilizzata per centrifugare è stata coperta con della carta filtrante e messa a seccare nella campana da vuoto per 1 ora. Successivamente il peptide è stato pesato.

Sono stati ottenuti 33,98 mg di peptide peracetilato. Anche questo peptide peracetilato grezzo è stato caratterizzato e purificato; verrà denominato CSP *peracetilato sp2*.

3.1.5.4 Caratterizzazione e purificazione del peptide CSP *peracetilato*

Caratterizzazione del peptide grezzo: CSP *peracetilato sp1*

Il peptide peracetilato si è mostrato molto difficile da sciogliere. Dopo aver provato, in modo non efficace, a solubilizzarlo usando eluente A, DMF, e TFA, i 3,2 mg di peptide sono stati sciolti in una soluzione con 2 ml di DMF e 2 ml di eluente A, con l'aiuto del sonicatore e del bagno caldo.

La soluzione è stata filtrata e un campione è stato caratterizzato mediante corsa RP-HPLC, svolta nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 nm);
- Flusso: 1 ml/min;
- Volume di iniezione: 10 µl;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 35% al 45% di eluente B in 20 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Il “bandone” di assorbimento a inizio gradiente è rappresentativo della DMF utilizzata per sciogliere il peptide. Il picco di assorbanza maggiore si è presentato al tempo di ritenzione di 13 minuti (41,5% B).

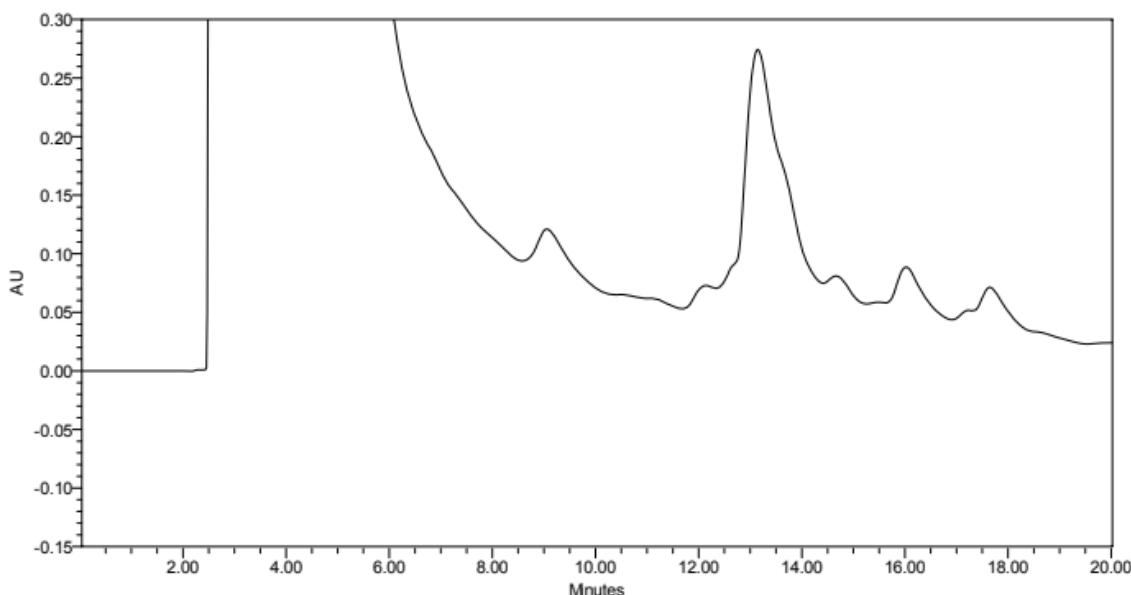


Figura 38: Cromatografia analitica del peptide CSP peracetilato sp1 grezzo. Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 10 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 35% al 45% in 20 minuti; λ: 214 nm.

Purificazione del peptide grezzo: CSP peracetilato sp1

Il peptide grezzo (3,2 mg) in soluzione con 2 ml di DMF e 2 ml di eluente A è stato purificato tramite cromatografia semipreparativa in RP-HPLC eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: NovaPak C₁₈ (6 µm, 60 Å, 7,8 × 300 nm);
- Flusso: 4 ml/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 25% al 50% di eluente B in 50 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm;
- Velocità della carta: 0,5 cm/min.

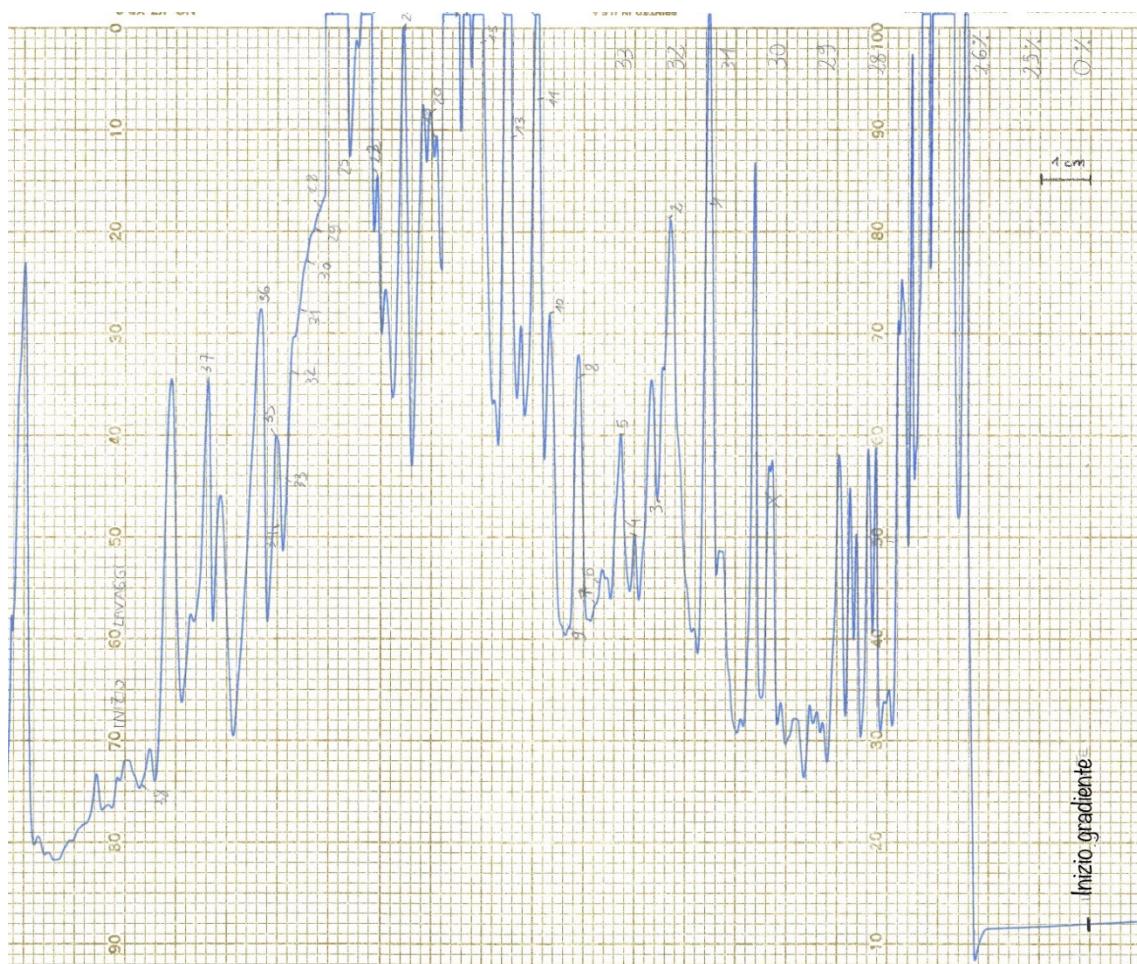


Figura 39: Cromatografia semipreparativa del peptide CSP peracetilato sp1. Colonna: NovaPak C₁₈ (6 µm, 60 Å, 7,8 × 300 nm); Flusso: 4 ml/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dal 25% al 50% di eluente B in 50 minuti; Lettura dell'assorbanza a 214 nm; Velocità della carta: 0,5 cm/min. Durante la semipreparativa sono stati fatti diversi cambi scala.

L'eluito in uscita dal cromatogramma è stato frazionato in differenti provette. Dopo un'analisi del tracciato cromatografico, sono state selezionate le frazioni in corrispondenza del picco più significativo da sottoporre a cromatografia analitica, per

confermare la presenza del peptide desiderato ed escludere prodotti secondari di sintesi. Le analisi analitiche sono state condotte nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4,6 × 250 nm);
- Flusso: 1 ml/min;
- Volume di iniezione: 10 μl;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 35% al 45% di eluente B in 20 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm.

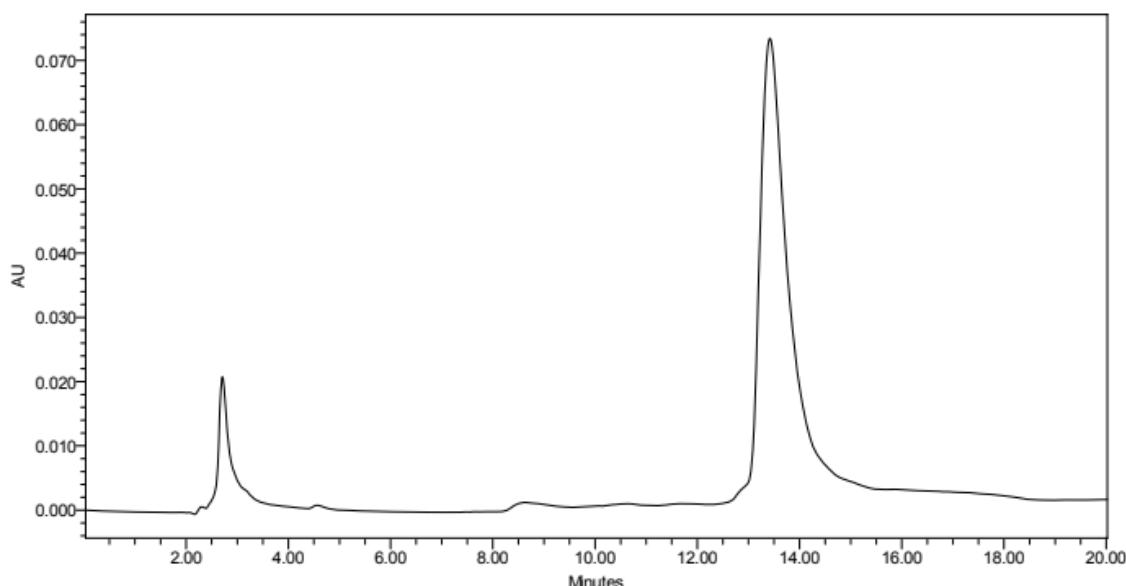


Figura 40: Cromatografia analitica della frazione 28 del CSP peracetilato *spl1*. Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 10 μl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 35% al 45% in 20 minuti; λ: 214 nm.

Le frazioni purificate hanno presentato in analitica picchi di assorbanza al tempo di ritenzione atteso per il peptide CSP1 peracetilato ($t_r=13$ minuti, flusso 41,5% B), confermando di essere riconducibili al peptide desiderato. In figura 40 è riportato il cromatogramma della frazione 28 raccolta durante la semipreparativa del CSP peracetilato *spl1*.

Dopo aver esaminato i chromatogrammi delle analisi RP-HPLC, sono state selezionate le frazioni con percentuale di purezza più alta, raccolte nel *pool cuore*. Sono stati ottenuti 1,2 mg di peptide al 97,11% (chromatogramma del *pool cuore* in figura 41).

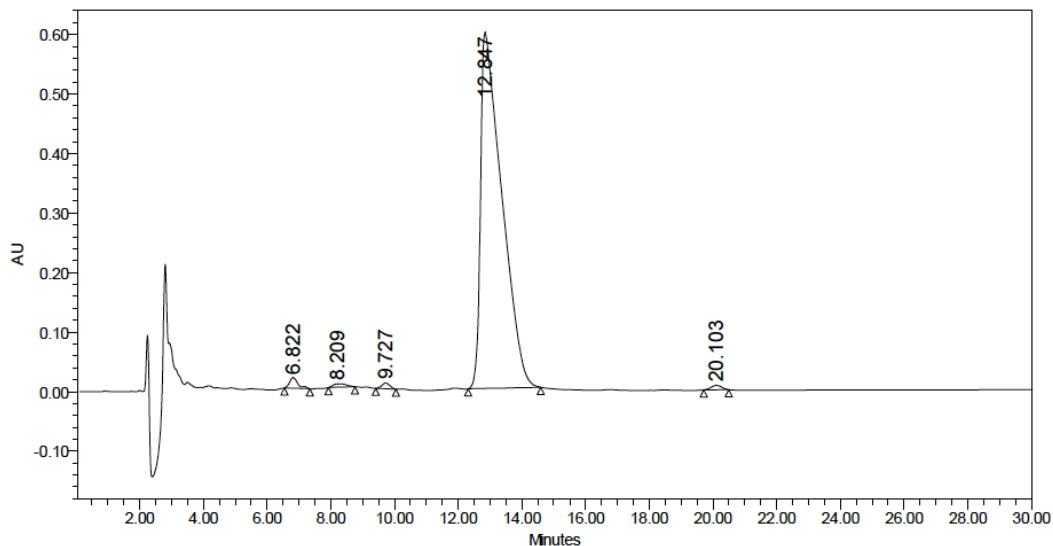


Figura 41: Cromatografia analitica del pool cuore del CSP peracetilato sp1. Colonna NovaPak C₁₈; volume di iniezione 150 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 40% al 55% in 30 minuti; λ: 214 nm.

Per verificare l'identità con il peptide *target* è stata effettuata un'analisi di massa MALDI-TOF della frazione 28 della semipreparativa del peptide CSP *peracetilato sp1* (cromatografia analitica della frazione 28 in fig. 40). L'analisi ha confermato che il picco a 13 minuti è riconducibile al peptide desiderato, poiché il grafico della spettrometria di massa presenta uno *spike* in corrispondenza del peso molecolare 2448,08 Da (PM_{teorico}: 2448,7 Da).

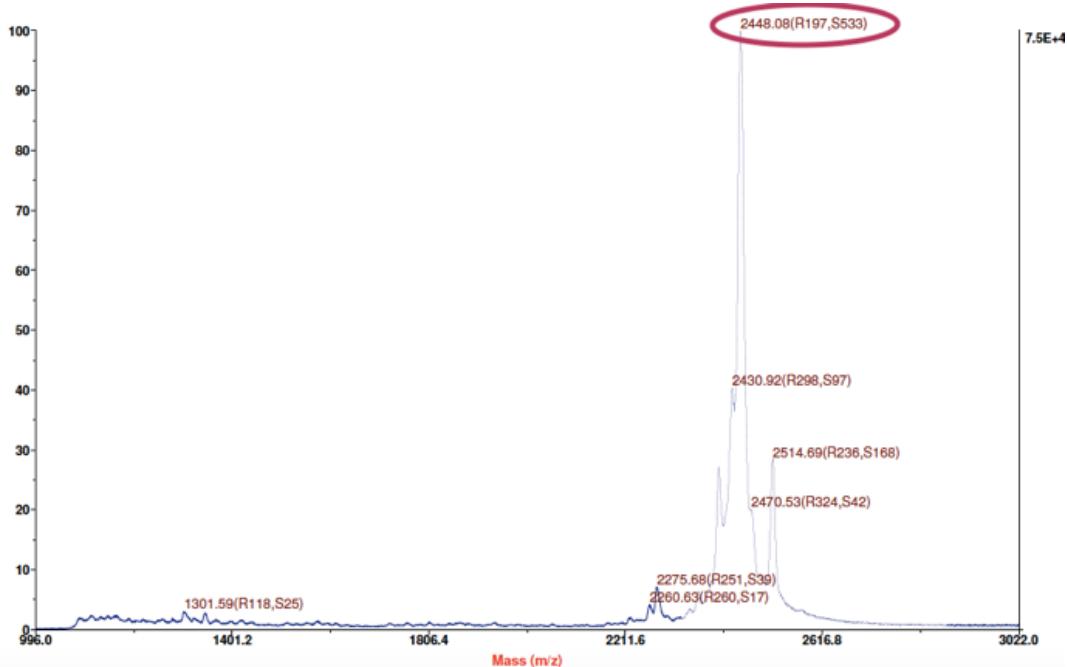


Figura 42: Spettro di massa MALDI-TOF della fr. 28 del peptide CSP peracetilato sp1.

Purificazione del peptide grezzo: CSP peracetilato sp2

Il peptide CSP *peracetilato sp2* (34 mg) è stato sciolto in 30 ml di eluente A e 25 ml di DMF. La soluzione è stata filtrata prima di essere caricata in colonna.

L'analisi RP-HPLC semipreparativa è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: NovaPak C₁₈ (6 μm, 60 Å, 7,8 × 300 nm);
- Flusso: 4 ml/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 25% al 50% di eluente B in 50 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm;
- Velocità della carta: 0,5 cm/min.

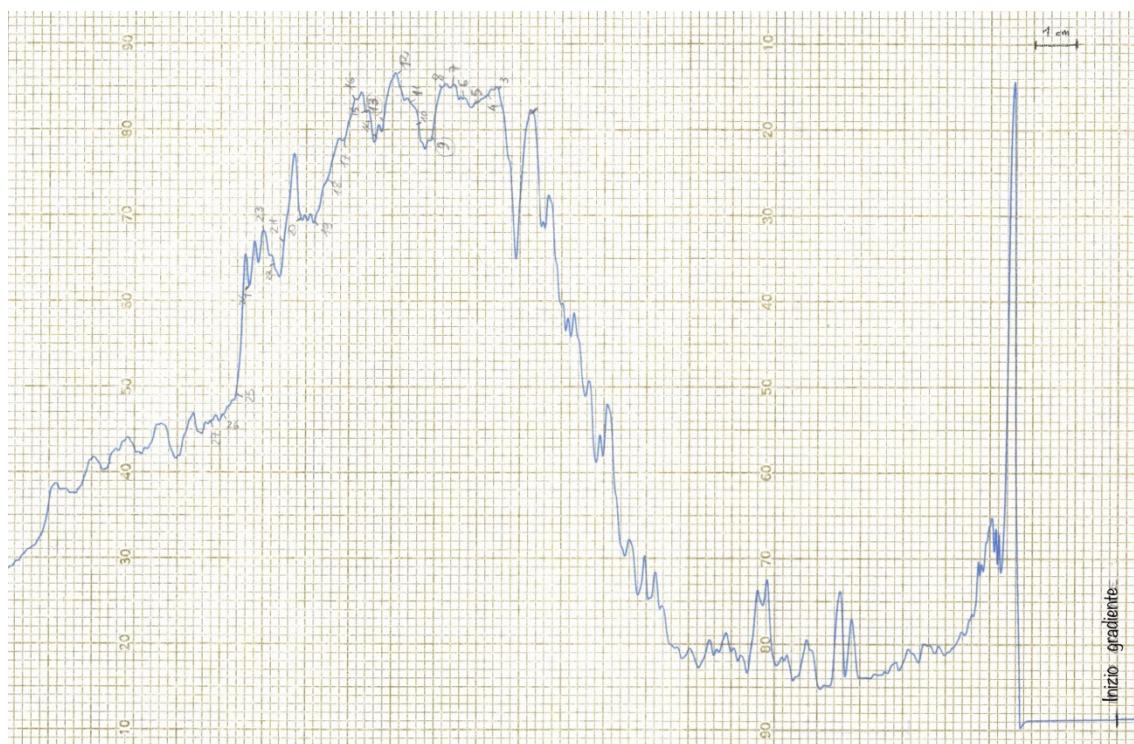


Figura 43: Cromatografia semipreparativa I del CSP *peracetilato sp2*. Colonna: NovaPak C₁₈ (6 μm, 60 Å, 7,8 × 300 nm); Flusso: 4 ml/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dal 25% al 50% di eluente B in 50 minuti; Lettura dell'assorbanza a 214 nm; Velocità della carta: 0,5 cm/min.

Il grafico della cromatografia semipreparativa (fig. 43) non mostra il tipico andamento con picco e plateau riconoscibili; in prossimità del flusso di uscita target (40% B) escono molti altri sottoprodoti. L'eluito in uscita dal chromatogramma è stato frazionato in

differenti provette. Dopo un'analisi del tracciato cromatografico, sono state selezionate le frazioni in corrispondenza del picco target da sottoporre a cromatografia analitica. Le frazioni analizzate sono risultate essere tutte “sporate” da prodotti secondari di sintesi con tempi di ritenzione simili che non sono stati isolati con la prima semipreparativa.

Per verificare la presenza del peptide *target* è stata effettuata un'analisi di massa MALDI-TOF della frazione 5 della semipreparativa del peptide CSP *peracetilato sp2*. L'analisi ha confermato la presenza tra i vari prodotti ottenuti del peptide desiderato, poiché il grafico della spettrometria di massa presenta uno *spike* in corrispondenza del peso molecolare 2448,42 Da (PM_{teorico}: 2448,7 Da).

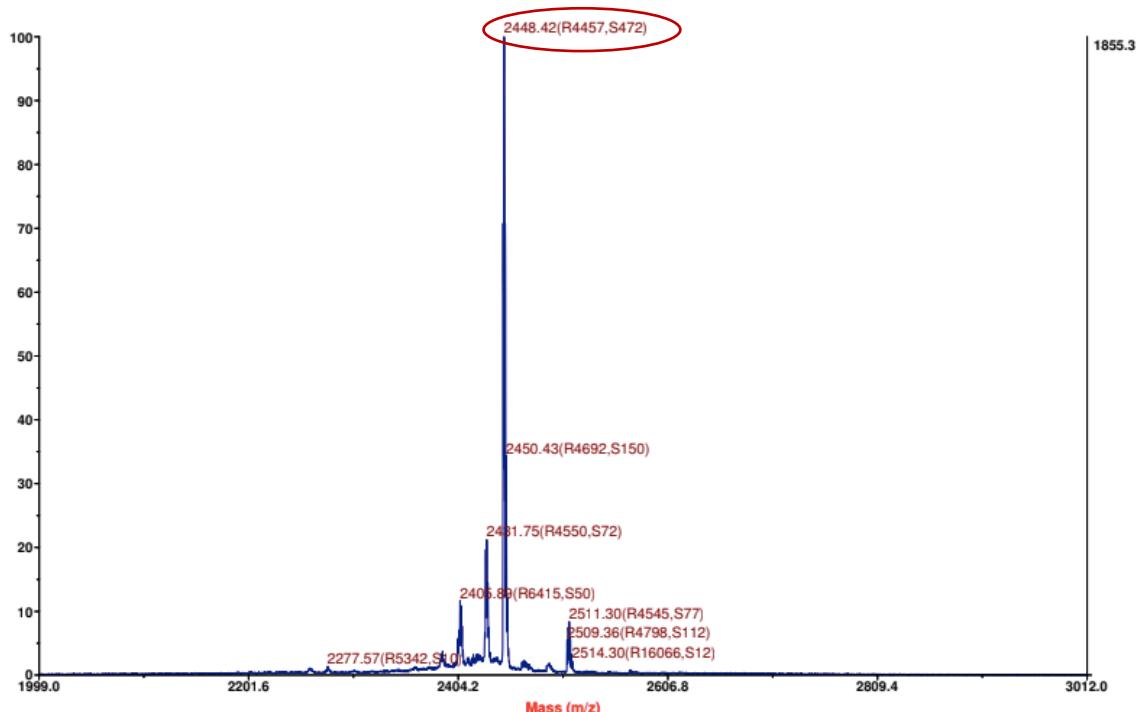


Figura 44: Spettro di massa MALDI-TOF della frazione 5 della semipreparativa 1 del peptide CSP *peracetilato sp2*.

Per frazionare i vari sottoprodoti e isolare il peptide *target* è necessario effettuare una seconda semipreparativa con un gradiente di 1% di eluente B ogni 4 minuti, anziché ogni 2 minuti, per distanziare i tempi di ritenzione dei prodotti.

Sono state raccolte in un pallone e liofilizzate le frazioni corrispondenti al picco target da ripassare in semipreparativa RP-HPLC. Le frazioni liofilizzate (11,7 mg) sono state sciolte in 10 ml di eluente A e 10 ml di DMF.

L'analisi RP-HPLC semipreparativa è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: NovaPak C₁₈ (6 µm, 60 Å, 7,8 × 300 nm);
- Flusso: 4 ml/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 30% al 45% di eluente B in 60 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm;
- Velocità della carta: 0,5 cm/min.

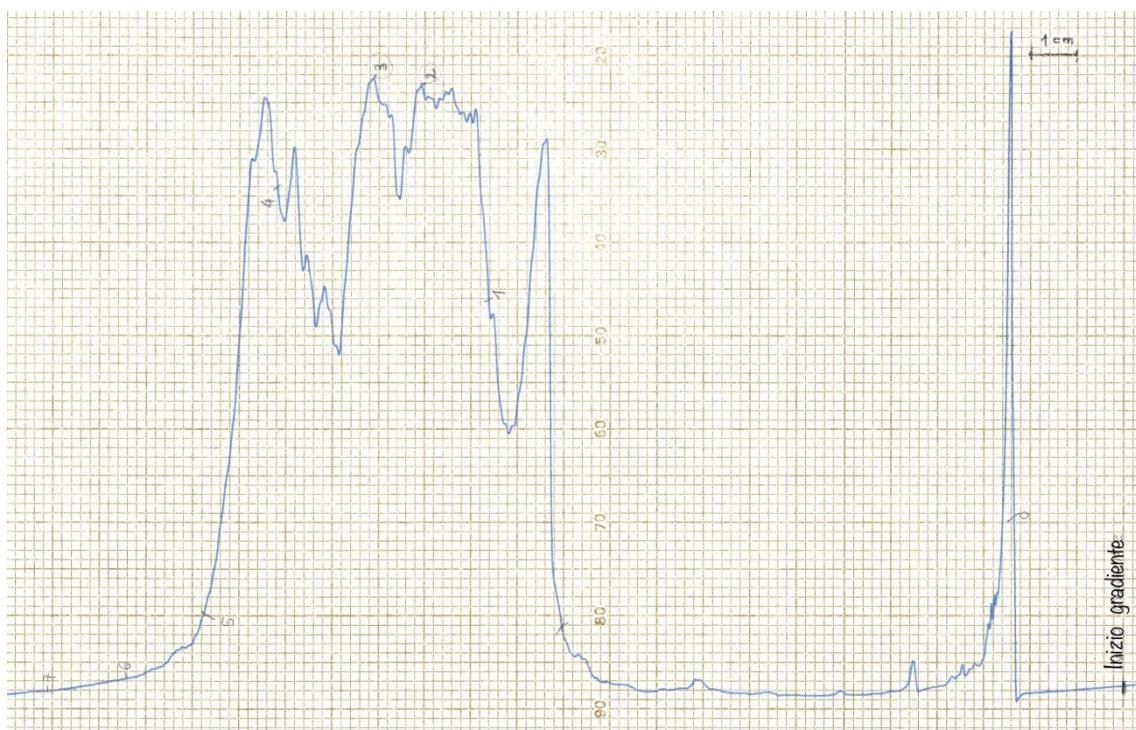


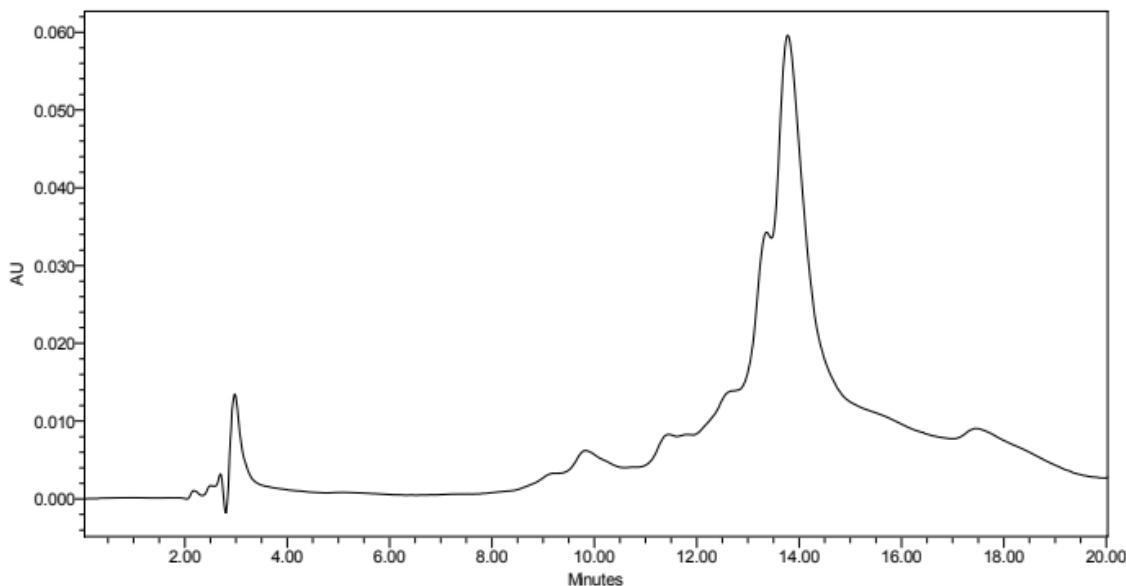
Figura 45: Cromatografia semipreparativa 2 del peptide CSP peracetilato sp2. Colonna: NovaPak C₁₈ (6 µm, 60 Å, 7,8 × 300 nm); Flusso: 4 ml/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dal 30% al 45% di eluente B in 60 minuti; Lettura dell'assorbanza a 214 nm; Velocità della carta 0,5 cm/min.

Dal cromatogramma di figura 45 possiamo vedere come nemmeno con questa semipreparativa aggiuntiva siamo riusciti a separare adeguatamente i sottoprodoti. Le frazioni 2 e 3 sono state sottoposte a cromatografia analitica.

L'analitica RP-HPLC è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 nm);
- Flusso: 1 ml/min;

- Volume di iniezione: 30 μ l;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 35% al 45% di eluente B in 20 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm.



*Figura 46: Cromatografia analitica della frazione 2 semipreparativa 2 del CSP peracetilato sp2.
Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 30 μ l; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 35% al 45% in 20 minuti; λ : 214 nm.*

Le frazioni purificate hanno presentato in analitica picchi di assorbanza vicini al tempo di ritenzione atteso per il peptide CSP peracetilato ($t_r=13/14$ minuti), confermando la presenza del peptide desiderato. In figura 46 è riportato il cromatogramma della frazione 2 raccolta durante la semipreparativa 2 del peptide CSP peracetilato *sp2*. La frazione 3 è risultata essere molto “sporca”. Pertanto, si è scelto di liofilizzare solamente la frazione 2, quella con percentuale di purezza più alta.

Sono stati ottenuti 2,45 mg di peptide al 48,76% (cromatogramma in figura 47).

Il quantitativo di peptide purificato ottenuto è molto basso rispetto al peso del peptide grezzo (34 mg). Anche in questo caso, complice della bassa resa potrebbe essere stata la difficoltà nel solubilizzare il peptide.

Il valore di purezza del prodotto ottenuto con la doppia reazione di acetilazione, prima solo del terminale N-amminico con peptide su resina e poi del peptide sbloccato dalla

resina, è nettamente maggiore. Eseguendo la reazione di acetilazione direttamente sul peptide sbloccato dalla resina si è formata una quantità rilevante di sottoprodoti di reazione che hanno interferito con la buona riuscita del prodotto desiderato.

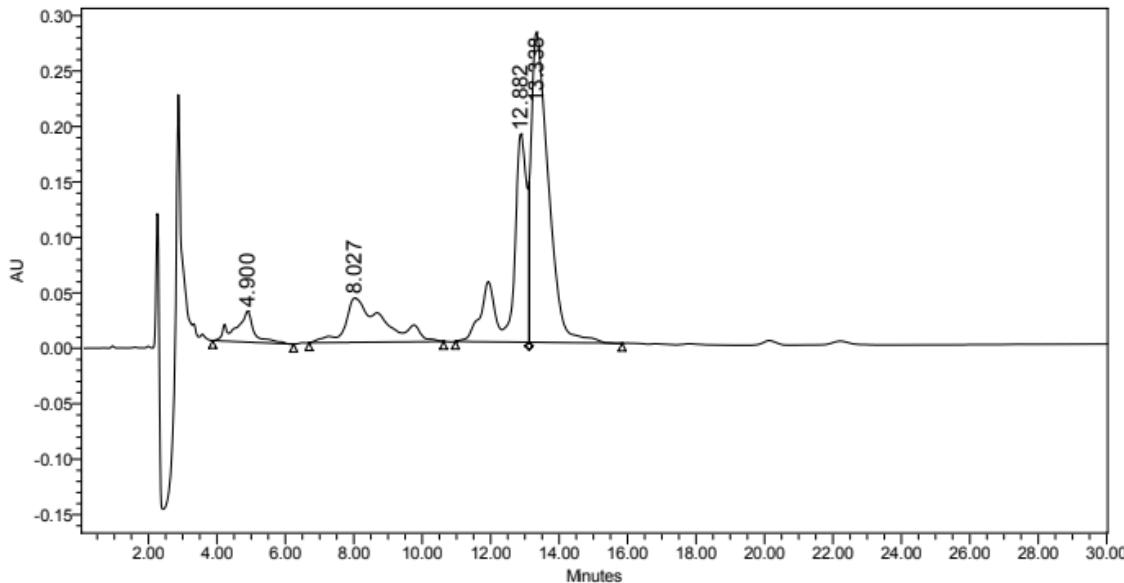


Figura 47: Cromatografia analitica del pool cuore CSP peracetilato sp2. Colonna NovaPak C₁₈; volume di iniezione 200 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 40% al 55% in 30 minuti; λ: 214 nm.

3.1.5.5 Preparazione del peptide CSP *benzoile*

L’addizione del gruppo benzoile avviene tramite legame ammidico con il gruppo amminico terminale del peptide. La reazione di addizione del gruppo benzoile è stata eseguita con peptide legato alla resina.

Sequenza CSP *benzoile*:

C₆H₅-CO-Ser-Gly-Ser-Leu-Ser-Thr-Phe-Phe-Arg-Leu-Phe-Asn-Arg-Ser-Phe-Thr-Gln-Ala-Leu-Gly-Lys-OH

PM: 2468,696 Da

Per ottenere l’analogo del peptide CSP *mutans* con residuo N-terminale addizionato con il gruppo benzoile il procedimento svolto è stato il seguente:

1. È stata effettuata la rimozione del gruppo Fmoc dal terminale amminico del rimanente CSP *mutans* su resina (1/6 del peptide totale sintetizzato); la reazione di sblocco è stata eseguita con l'ausilio del sintetizzatore automatico Syro I.
2. Al reattore con il peptide su resina sono stati aggiunti 2 ml di soluzione costituita dal 10% di anidride benzoica e 5% di lutidina in DMF. La soluzione è stata lasciata agire per 1 ora.
3. Terminata la reazione, sono stati impostati 5 cicli di lavaggi automatizzati dal software Syro I. Successivamente il peptide acetilato su resina è stato sottoposto a diversi cicli di lavaggio con DCM e seccato nella campana da vuoto per 1 ora.
4. Per verificare la buona riuscita della reazione è stato effettuato il test alla ninidrina, seguendo la procedura prevista. L'assorbanza del campione con il peptide è risultata essere la stessa del *bianco* (soluzione con soli monitor). Il test ha pertanto fornito come risultato una resa del 100%.
5. Il peptide è stato dunque sottoposto alla reazione di sblocco dalla resina, con la concomitante deprotezione dei gruppi laterali. Al reattore sono stati aggiunti in ordine 0,125 ml di acqua MilliQ, 0,125 ml di TES e 4,75 ml di TFA; la reazione è stata lasciata agire per 1 ora e 30 minuti. Al termine della reazione, si è filtrata la resina dalla soluzione. La soluzione contenente il peptide grezzo è stata portata a piccolo volume in evaporatore rotante. Successivamente il peptide è stato fatto precipitare mediante aggiunta di etere dietilico freddo (4° C). Il prodotto grezzo è stato centrifugato in una falcon, con rimozione del surnatante a ogni ciclo, e seccato nella campana da vuoto per 1 ora.

Il peptide secco contenuto nella falcon è stato pesato. Sono stati ottenuti 34 mg di peptide CSP *benzoile* grezzo.

3.1.5.6 Caratterizzazione e purificazione del peptide CSP *benzoile*

Caratterizzazione del peptide grezzo

È stato preparato un campione di CSP *benzoile* pesando 0,1 mg di grezzo, che sono stati sciolti in 200 µl di acqua MilliQ e 100 µl di eluente A. La soluzione è stata filtrata e caratterizzata mediante corsa RP-HPLC, svolta nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 nm);
- Flusso: 1 ml/min;

- Volume di iniezione: 200 μ l;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 35% al 45% di eluente B in 20 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Si è presentato un picco di assorbanza al tempo di ritenzione di 17 minuti (42,5% B)

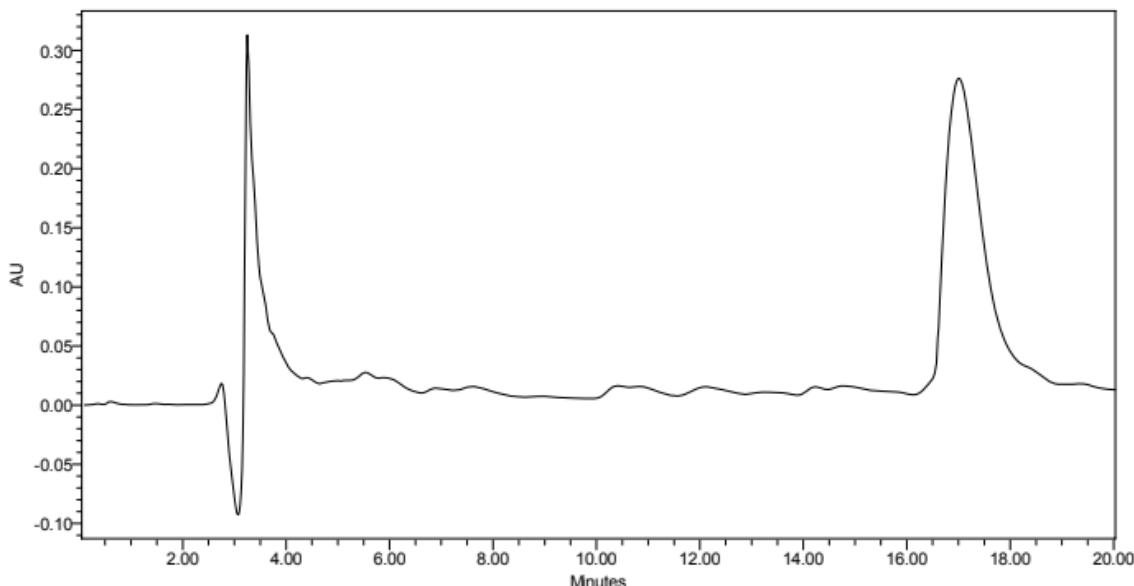


Figura 48: Cromatografia analitica del peptide CSP benzoile grezzo. Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 200 μ l; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 35% al 45% in 20 minuti; λ : 214 nm.

Purificazione del peptide grezzo

Il peptide grezzo (34 mg) è stato sciolto in 30 ml di eluente A (0,05% TFA in acqua MilliQ), filtrato e successivamente purificato tramite cromatografia semipreparativa. L'analisi RP-HPLC semipreparativa è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: NovaPak C18 (6 μ m, 60 \AA , 7,8 \times 300 nm);
- Flusso: 4 ml/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 25% al 50% di eluente B in 50 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm;
- Velocità della carta: 0,5 cm/min.

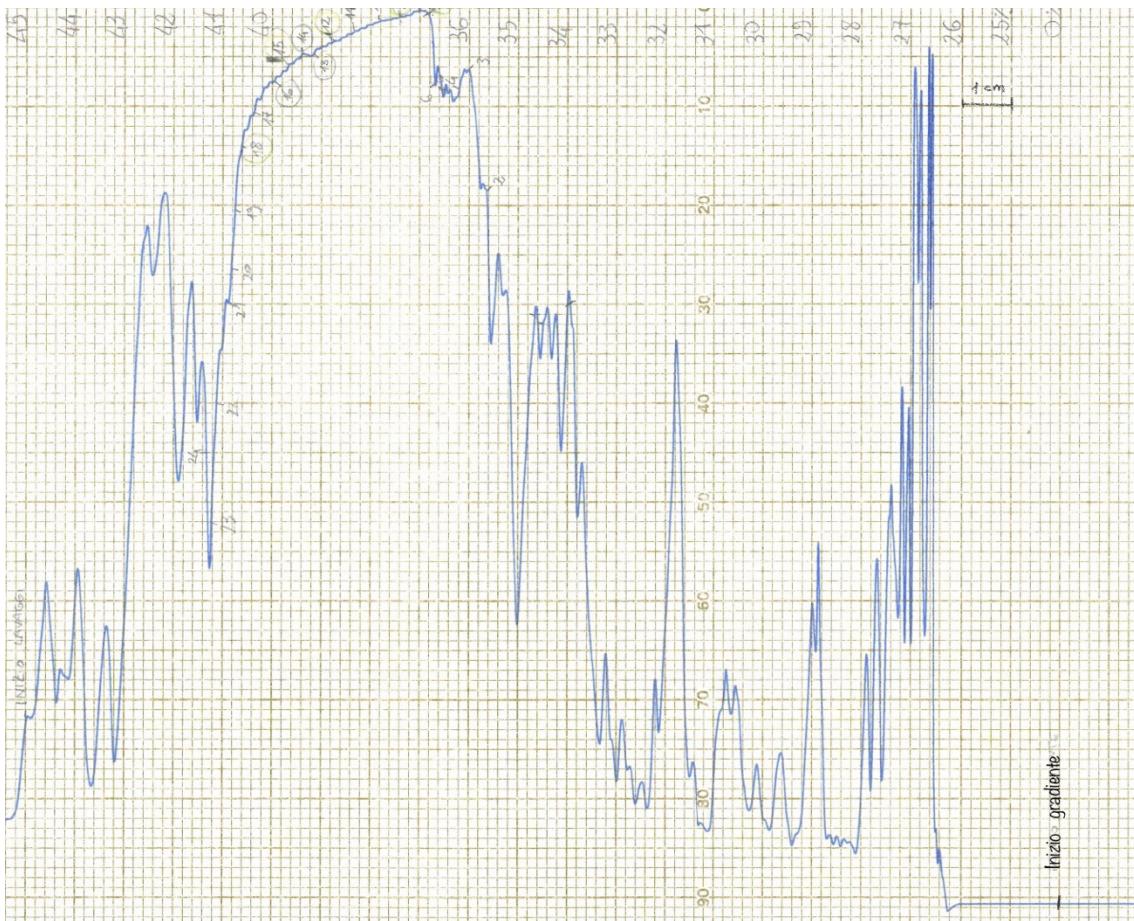


Figura 49: Cromatografia semipreparativa del peptide CSP benzoile. Colonna: NovaPak C₁₈ (6 μm, 60 Å, 7,8 × 300 nm); Flusso: 4 ml/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dal 25% al 50% di eluente B in 50 minuti; Lettura dell'assorbanza a 214 nm; Velocità della carta: 0,5 cm/min.

L'eluito in uscita dal cromatogramma è stato frazionato in differenti provette. Dopo un'analisi del tracciato cromatografico, sono state selezionate le frazioni in corrispondenza del picco più significativo da sottoporre a cromatografia analitica per confermare la presenza del peptide desiderato ed escludere prodotti secondari di sintesi. Le analisi analitiche sono state condotte nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4,6 × 250 nm);
- Flusso: 1 ml/min;
- Volume di iniezione: 30 μl;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dal 38% al 48% di eluente B in 20 minuti;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm.

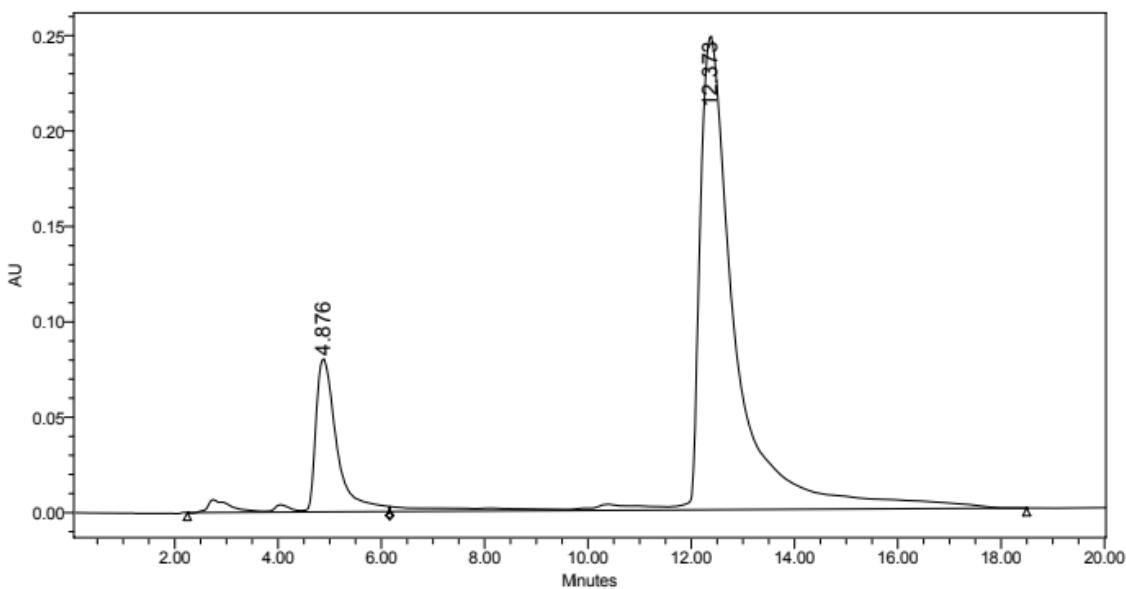


Figura 50: Cromatografia analitica della frazione 15 sp1 del CSP benzoile. Colonna Vydac C₁₈; volume di iniezione 30 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 38% al 48% in 20 minuti; λ: 214 nm.

Le frazioni purificate hanno presentato picchi di assorbanza al tempo di ritenzione atteso per il peptide CSP *benzoile* ($t_r=12$ minuti, flusso 44% B), confermando di essere riconducibili al peptide desiderato. In figura 50 è riportato il chromatogramma della frazione 15 raccolta durante la semipreparativa del CSP *benzoile* grezzo.

Dopo aver esaminato i chromatogrammi delle analisi RP-HPLC, è stata decisa in base alla purezza la suddivisione delle frazioni in tre *pool*. Le frazioni con percentuale di purezza più alta sono state raccolte nel *pool cuore*. I *pool* sono stati liofilizzati e successivamente pesati. Sono stati ottenuti 8,25 mg di peptide al 98,02% (analitica del *pool cuore* in figura 51), 3,5 mg di peptide al 97,17%, 0,72 mg di peptide al 88%.

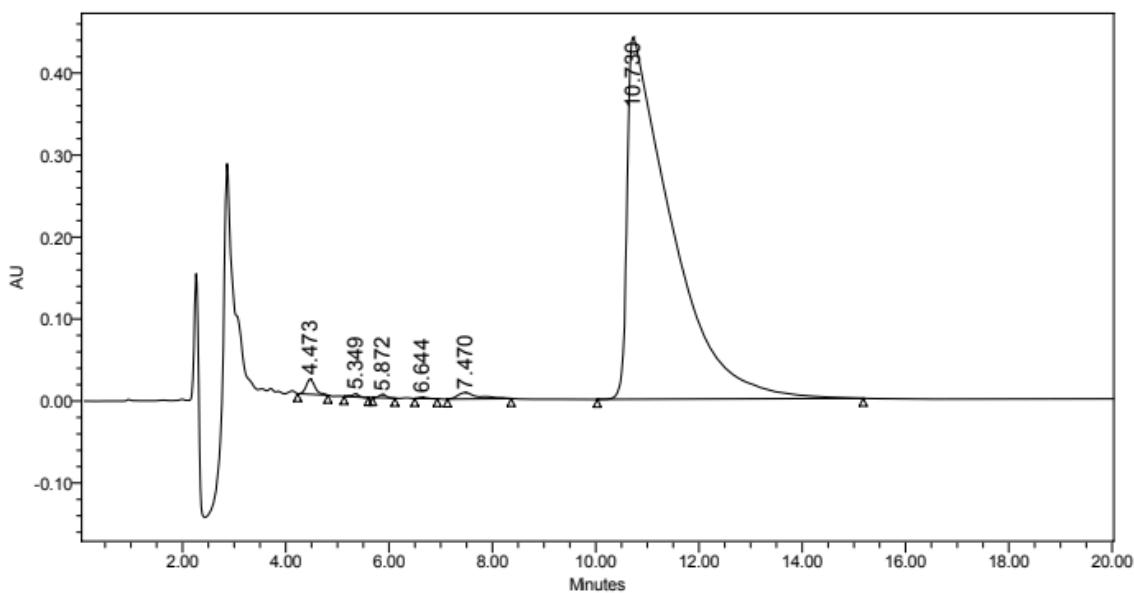


Figura 51: Cromatografia analitica del pool cuore del CSP benzoile. Colonna NovaPak C₁₈; volume di iniezione 200 µl; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 45% al 55% in 20 minuti; λ: 214 nm.

Per verificare l'identità con il peptide *target* è stata effettuata un'analisi di massa MALDI-TOF preparando un campione del *pool cuore* del CSP benzoile. L'analisi ha confermato che il picco in analitica è riconducibile al peptide desiderato, poiché il grafico della spettrometria di massa presenta uno *spike* in corrispondenza del peso molecolare 2468,57 Da (PM_{teorico}: 2468,7Da).

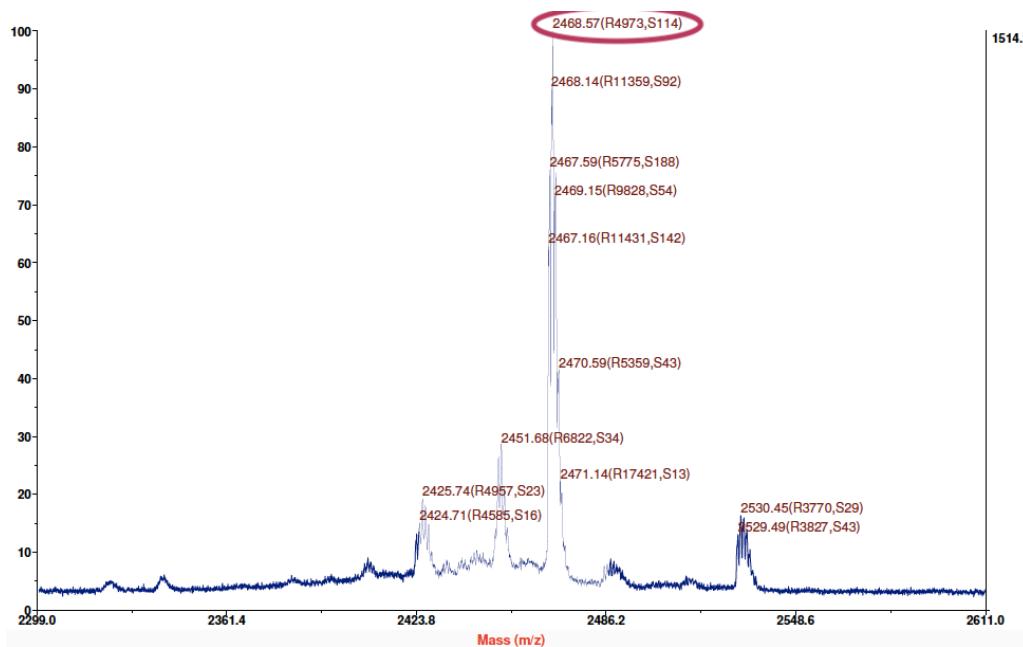


Figura 52: Spettro di massa MALDI-TOF della frazione 15 della semipreparativa del peptide CSP benzoile

3.2 Saggi cellulari

I peptidi sintetizzati sono stati risospesi con acqua deionizzata e sterile al fine di ottenere una concentrazione pari a 2mM e quindi incubati con *S. mutans* al fine di valutare il loro effetto sulla crescita batterica e sulla produzione di biofilm. Gli esperimenti sono stati svolti presso il laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Medicina Molecolare, università di Padova, con la collaborazione della Prof.ssa Paola Brun.

3.2.1 Curva di crescita di *S. mutans*

Al fine di saggiare la capacità dei peptidi sintetizzati di interferire o meno nella crescita in forma plantonica di *Streptococcus mutans*, colture batteriche sono state inoculate in terreno di coltura liquido composto da BHI con aggiunta di saccarosio al 0,1% p/vol, in presenza o in assenza dei diversi peptidi. Sono stati allestiti 5 inoculi corrispondenti a:

- 1) *S. mutans*
- 2) *S. mutans* + CSP
- 3) *S. mutans* + CSP *scrambled*
- 4) *S. mutans* + CSP *acetilato*
- 5) *S. mutans* + CSP *benzoile*

Per questo esperimento si è preferito non utilizzare il peptide CSP *peracetilato*, avendone a disposizione un quantitativo limitato.

Le colture batteriche di *S. mutans* sono state opportunamente diluite in maniera tale da ottenere una carica batterica pari a 10^7 CFU/ml, corrispondente ad una O.D. pari a 0,05 a 620 nm. I peptidi sono stati saggiai ad una concentrazione di $20 \mu M$.

La crescita batterica è stata monitorata per 8 ore, misurando la densità ottica delle diverse colture ai diversi tempi di incubazione. Le curve di crescita costruite con i dati raccolti (figura 53) seguono un andamento pressoché sovrapponibile a quello registrato per colture di *S. mutans* non trattato, dimostrando che CSP e peptidi analoghi non influiscono sulla crescita del batterio, permettendo quindi di escludere un effetto battericida dei peptidi.

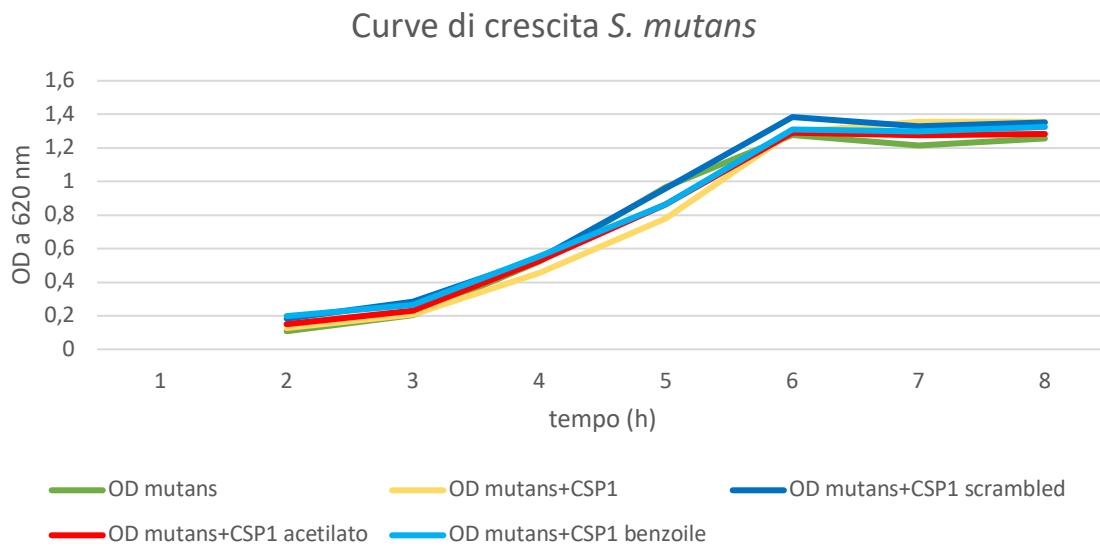


Figura 53: Curve di crescita di colture batteriche di *S. mutans*, in presenza ed in assenza del CSP e peptidi analoghi. Le colture batteriche sono state poste in incubatore a 37 gradi, 140 rpm. Sono state effettuate 7 misurazioni della densità ottica (OD) allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 620 nm per 8 ore. Dal grafico si può notare come tutte le curve hanno andamento pressoché sovrapponibile.

3.2.2 Valutazione della formazione di biofilm di *S. mutans*

Per valutare l'impatto dei peptidi oggetto di studio sulla formazione di biofilm di *S. mutans* è stato eseguito l'esperimento di seguito illustrato.

Sono stati ottenuti biofilm di *S. mutans* su piastre da 96 pozzi a fondo piatto, inoculando 150 μ l di coltura fresca alla concentrazione di 10^7 CFU/mL in ogni pozzetto, allestendo 6 pozzi per ognuna delle 6 condizioni corrispondenti a:

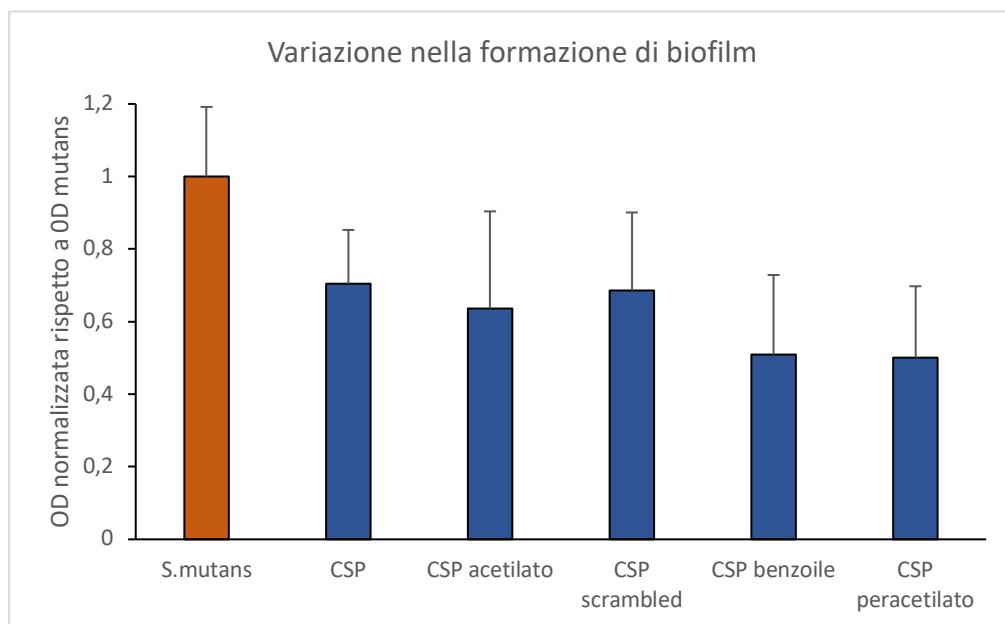
- 1) *S. mutans*
- 2) *S. mutans* + CSP
- 3) *S. mutans* + CSP acetilato
- 4) *S. mutans* + CSP scrambled
- 5) *S. mutans* + CSP benzoile
- 6) *S. mutans* + CSP peracetilato

I peptidi sono stati saggiati ad una concentrazione 20 μ M.

Nei pozzi più esterni della piastra sono stati aggiunti 200 μ l di acqua MilliQ per prevenire l'evaporazione del terreno di coltura. La piastra è stata lasciata incubare in camera calda per un tempo di 48 h, al termine del quale è stato possibile vedere a occhio

nudo la formazione di aggregati sul fondo dei pozzetti. La formazione di biofilm è stata valutata mediante il metodo di colorazione con cristalvioletto e successiva determinazione dell'assorbanza ottica (O.D) allo spettrofotometro.

Dopo aver scartato il terreno residuo dai pozzetti, questi sono stati lavati con 100 µl di acqua (facendo attenzione a non toccare il fondo dei pozzetti con il puntale della pipetta al fine di non rimuovere il biofilm). Rimossa l'acqua sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 90 µl di etanolo 95° e si è lasciata la piastra incubare per 15 minuti. Dopo aver aspirato l'etanolo e fatto un ulteriore lavaggio con acqua sono stati aggiunti 100 µl di cristalvioletto 0,1% (MP Biomedicals). Dopo 15 minuti di incubazione è stato eseguito un lavaggio con acqua e sono stati aggiunti in ogni pozzetto 100 µl di acido acetico 30%. È stata dunque misurata la densità ottica (OD) a 620 nm tramite lo spettrofotometro.



*Figura 54: Effetto di CSP e analoghi sulla formazione di biofilm ad opera di *S. mutans* dopo 48 ore di coltura. Il biofilm formato da *S. mutans* senza peptide è stato considerato come riferimento rispetto al quale sono stati normalizzati i valori.*

Nel grafico in figura 54 è possibile vedere come la formazione di biofilm di *S. mutans* trattato con i peptidi sia stata inferiore rispetto al biofilm formato da *S. mutans* senza peptide. Questo risultato sembra in contrasto con gli studi che provano l'effetto di stimolo indotto da CSP sulla formazione del biofilm. Tuttavia, il risultato ottenuto non è significativo poiché il numero di dati raccolti non è sufficientemente elevato: la

formazione di biofilm andrebbe saggiata più volte a diversi intervalli di tempo. Conosciamo inoltre il ruolo fondamentale svolto dalla concentrazione di *competence stimulating peptide* nel meccanismo di *quorum sensing*. Pertanto, il CSP andrebbe saggiato a diverse concentrazioni con un dose-risposta. Infatti, mentre *S. mutans* cresce in *biofilm*, la concentrazione di CSP cambia: bisognerebbe trovare un sistema abbastanza affinato da riprodurre quello che succede naturalmente in *S. mutans*.

Per le stesse ragioni, la minore formazione di biofilm di *S. mutans* quando trattato con gli analoghi CSP *acetilato* o CSP *benzoile* non può essere considerato un risultato rilevante, anche se tendenzialmente inferiore rispetto a colture di *S. mutans* incubate con solo CSP nativo. I dati raccolti sono del tutto preliminari e necessitano di ulteriori ripetizioni per provare l'azione inibitoria sul sistema del *quorum sensing* da parte delle molecole analoghe di CSP. Tale studio potrebbe portare a risultati di fondamentale importanza nel campo della ricerca di metodi innovativi per prevenire l'adesione, la colonizzazione batterica e la formazione di biofilm da parte dei batteri, fenomeni che interessano la superficie dei biomateriali e che sono responsabili di un numero sempre crescente di fallimenti in implantologia.

Discussione e conclusioni

Le infezioni in cui è coinvolta la presenza di biofilm microbici rappresentano una delle principali sfide per la medicina moderna. La capacità dei microrganismi di colonizzare, con formazione di biofilm, la superficie dei biomateriali è attualmente considerata il più importante fattore patogenetico delle infezioni associate a dispositivi medici, quali gli impianti. I biofilm batterici sono caratterizzati da una drastica diminuzione della sensibilità dei microbi a vari agenti antibiotici e ai disinfettanti, caratteristiche che rendono l'infezione molto difficile da eradicare. Le comunità batteriche che sviluppano biofilm risultano infatti 1000 volte più resistenti all'azione di antibiotici rispetto agli stessi batteri cresciuti in colture planctoniche [16].

In base a tali premesse, per contrastare l'azione dei microbi organizzati in biofilm, è necessario un approccio differente dalle tradizionali molecole ad attività antibatterica.

Il sistema di comunicazione intercellulare utilizzato dai batteri, il *quorum sensing*, è stato negli ultimi anni oggetto di un notevole interesse per lo sviluppo di nuovi agenti in grado di controllare la crescita di popolazioni microbiche patogene. A rendere il *quorum sensing* un importante oggetto di studio è il ruolo giocato nella coordinazione tra la popolazione batterica dei processi di virulenza coinvolti nello sviluppo di biofilm, produzione di molecole ad attività antimicrobica e tossine. Pertanto, interferire in questa coordinata attività della colonia batterica, fornisce una nuova strategia di intervento per bloccare la virulenza del patogeno.

Il batterio Gram-positivo *S. mutans* possiede più sistemi di *quorum sensing*. In questo studio ci siamo posti come obiettivo quello di interferire sulla via del *quorum sensing* mediata dal peptide *Competence-Stimulating Peptide* (CSP), poiché maggiormente implicata nella modulazione di importanti fattori di virulenza quali la formazione di biofilm, produzione di batteriocine e competenza. A questo scopo sono stati sviluppati degli analoghi strutturali del CSP di *S. mutans* (CSP *acetilato*, CSP *peracetilato*, CSP *benzoile*), tramite modifiche chimiche in punti strategici, con l'obiettivo di antagonizzare l'attività del peptide nativo e quindi interferire con il *signaling* del *quorum sensing*. È stato inoltre sintetizzato, come controllo negativo per i saggi biologici, il peptide CSP *scrambled*, una permutazione della sequenza nativa del CSP.

Sono stati quindi condotti, presso il laboratorio di Microbiologia, alcuni saggi biologici preliminari per valutare l'effetto degli analoghi del CSP nativo sulla crescita in forma planctonica di *S. mutans* e sulla produzione di biofilm.

I saggi sulla crescita batterica hanno dimostrato che il CSP nativo e i peptidi analoghi non influiscono sulla crescita di *S. mutans*, permettendo quindi di escludere un effetto battericida, che è da evitare, dei peptidi.

I saggi sulla formazione di biofilm hanno mostrato che, con peptidi saggiati ad una concentrazione 20 μ M e per 48 h, la formazione di biofilm di *S. mutans* trattato con i peptidi è stata inferiore rispetto al biofilm formato da *S. mutans* senza peptide. Tuttavia, i risultati ottenuti non sono da considerare significativi poiché il numero di dati raccolti non è sufficientemente alto e la formazione di biofilm andrebbe saggiate più volte, a diversi intervalli di tempo e a diverse concentrazioni. Sappiamo infatti che l'esatta concentrazione (*quorum*) gioca un ruolo fondamentale nel meccanismo di *quorum sensing*; da qui la necessità di costruire una curva dose-risposta nei prossimi saggi.

Un dato interessante, seppur da non ritenere significativo per le ragioni precedentemente illustrate, è la formazione di biofilm tendenzialmente inferiore delle colture di *S. mutans* incubate con gli analoghi del CSP *acetilato* o CSP *benzoile*. I dati raccolti sono del tutto preliminari e necessitano di ulteriori ripetizioni per provare l'azione inibitoria delle molecole analoghe del CSP al meccanismo di *quorum sensing*. Tale risultato avrebbe una notevole importanza nel campo della ricerca di metodi innovativi per prevenire le infezioni batteriche associate ai biomateriali.

Riferimenti bibliografici

1. Di Bello C., Bagno A. *Interazioni tra biomateriali e tessuti*. Patron Editore, Bologna (2009).
2. Di Bello C., Bagno A. *Biomateriali. Dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*. Patron Editore, Bologna (2016).
3. Salernitano, Elena. *Properties and processing technologies of polymers for medical devices*. 2000.
4. Antinori S., Vullo V., Moroni M. *Manuale di malattie infettive*. Edra Masson (2015).
5. Arciola, CR. (2009). *New concepts and new weapons in implant infections*.
6. Barth E., Myrvik QM., Wagner W., Gristina AG. (1989). *In vitro and in vivo comparative colonization of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis on orthopaedic implant materials*. Biomaterials, 10(5), 325-328.
7. Petty W., Spanier S., Shuster JJ., Silverthorne C. (1985). *The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model*. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 67(8), 1236-1244.
8. Martins N., Rodrigues CF. *Biomaterial-Related Infections*. Journal of Clinical Medicine. 2020; 9(3):722.
9. Drago L., *Infezioni impianto-correlate e biofilm batterico*. LO SCALPELLO-OTODI Educational 23.3 (2009): 153-159.
10. Drago L., De Vecchi E., Mattina R., Romanò CL. (2013). *Activity of N-acetyl-L-cysteine against biofilm of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa on orthopedic prosthetic materials*. Int J Artif Organs 36:39–46
11. Romanò CL., Toscano M., Romanò D., Drago L. (2013). *Antibiofilm agents and implant-related infections in orthopaedics: where are we?*. J Chemother 25:67–80
12. Tsuchiya H., Shirai T., Nishida H. et al. (2012). *Innovative antimicrobial coating of titanium implants with iodine*. J Orthop Sci 17:595–604
13. Donelli G., Guaglianone E. *Microbial Biofilm 2005. I National Workshop*. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 20-21 June 2005. Abstract book. (2005).

14. Dehò G., Galli E., Bernardini MR. *Biologia dei microrganismi*. Casa Editrice Ambrosiana, 2012.
15. Davies DG., Parsek MR., Pearson JP., Iglewski BH., Costerton JW., Greenberg EP. (1998). *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm*. Science, 280(5361), 295-298.
16. Kumar A., Alam A., Rani M., Ehtesham NZ., Hasnain SE. (2017). *Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens*. International Journal of Medical Microbiology, 307(8), 481-489.
17. Jakubovics NS., Brittan JL., Dutton LC., Jenkinson HF. *Multiple adhesin proteins on the cell surface of Streptococcus gordonii are involved in adhesion to human fibronectin*. Microbiology 155, 3572–3580 (2009).
18. Nobbs AH., Lamont RJ., Jenkinson HF. *Streptococcus Adherence and Colonization*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73, 407–450
19. Moreillon P., Que YA. *Infective endocarditis*. Lancet 363, 139– 149 (2004).
20. Brusch JL. (2007). *Microbiology of infective endocarditis and clinical correlates: gram-positive organisms*. Infective Endocarditis (pp. 29-66). CRC Press.
21. Rutherford ST., Bassler BL. *Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control*. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, (2012).
22. Li Yung-Hua, Xiaolin Tian. *Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms*. Sensors 12.3 (2012): 2519-2538.
23. Cvitkovitch DG., Li YH., Ellen RP. (2003). *Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections*. J. Clin. Investig. 112:1626-1632.
24. Syvitski RT., Tian XL., Sampara K., Salman A., Lee SF., Jakeman DL., Li YH. (2007). *Structure-activity analysis of quorum-sensing signaling peptides from Streptococcus mutans*.
25. Yada S., Kamlesh B., Sonwane S., Guptha I., Swetha RK. (2015). *Quorum sensing inhibition, relevance to periodontics*. Journal of international oral health: JIOH, 7(1), 67.
26. Miller MB., Bassler BL. *Quorum sensing in bacteria*. Annual Reviews in Microbiology 55.1 (2001): 165-199.
27. Schaefer AL., Hanzelka BL., Eberhard A., Greenberg EP. (1996). *Quorum sensing in Vibrio fischeri: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs*. Journal of bacteriology, 178(10), 2897-2901.

28. Whitehead NA., Barnard AM., Slater H., Simpson NJ., Salmond GP. (2001). *Quorum-sensing in Gram-negative bacteria*. FEMS microbiology reviews, 25(4), 365-404.
29. Reading NC., Sperandio S. *Quorum sensing: the many languages of bacteria*. FEMS microbiology letters 254.1 (2006): 1-11. APA.
30. Schauder S., and Bonnie BL. *The languages of bacteria*. Genes & development 15.12 (2001): 1468-1480
31. Bassler BL. *How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing*. Current opinion in microbiology 2.6 (1999): 582-587
32. Szafrański SP., Deng ZL., Tomasch J. et al. *Quorum sensing of Streptococcus mutans is activated by Aggregatibacter actinomycetemcomitans and by the periodontal microbiome*. BMC Genomics 18, 238 (2017).
33. Ajdic D., McShan WM., McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, Primeaux C., Tian R. et al. Ferretti.2002. *Genome sequence of Streptococcus mutans UA159, a cariogenic dental pathogen*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA99:14434-14439.
34. Aspiras MB., Ellen RP, Cvitkovitch DG. (2004). *ComX activity of Streptococcus mutans growing in biofilms*. FEMS Microbiol. Lett.238:167-174.
35. Li YH., Lau PC., Lee JH., Ellen RP., Cvitkovitch DG. (2001). *Natural genetic transformation of Streptococcus mutans growing in biofilms*. Journal of bacteriology, 183(3), 897-908.
36. Petersen FC., Scheie AA. (2000). *Genetic transformation in Streptococcus mutans requires a peptide secretion-like apparatus*. Oral Microbiology and Immunology: Short communication, 15(5), 329-334.
37. Ahn SJ., Wen ZT., Burne RA. (2006). *Multilevel control of competence development and stress tolerance in Streptococcus mutans UA159*. Infection and immunity, 74(3), 1631-1642.
38. van der Ploeg JR. (2005). *Regulation of bacteriocin production in Streptococcus mutans by the quorum-sensing system required for development of genetic competence*. Journal of bacteriology, 187(12), 3980-3989.
39. Kuramitsu HK. (1993). *Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics*. Crit. Rev. Oral Biol. Med.4:159-176.
40. Senadheera D., Cvitkovitch DG. (2008). *Quorum sensing and biofilm formation by Streptococcus mutans*. Bacterial signal transduction: networks and drug targets, 178-188

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la Prof.ssa Monica Dettin per avermi dato la possibilità di lavorare a questo progetto di tesi, guidandomi nell'attività di laboratorio con estrema pazienza e gentilezza. La ringrazio, inoltre, per aver condiviso la sua grande conoscenza e la sua esperienza; ne farò tesoro. Ringrazio la Prof.ssa Paola Brun per avermi permesso di collaborare con il suo gruppo nello svolgimento dei saggi biologici e per la grande disponibilità dimostrata. Tengo a ringraziare, inoltre, tutti coloro che hanno fatto parte di questa esperienza di laboratorio; in particolare il Dott. Leonardo Cassari, per avermi seguita e supportata nello svolgimento dell'attività sperimentale e per i momenti di leggerezza passati assieme durante le pause (e tra un'analitica e l'altra).

Ringrazio la mia famiglia, la cosa più preziosa che ho, per aver sempre creduto in me. Un ringraziamento speciale va a mia mamma e alle mie sorella, Tamara e Melissa, per essere parte integrante di me.

Infine, ringrazio di cuore tutti i miei più cari amici.

