

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biotecnologie Avanzate

Dipartimento di Chimica

Complessi metallo-porfirinoidi come modulatori di specie reattive all'ossigeno (ROS)

Relatore:
Prof. Simone Dell'Acqua

Correlatore:
Dott.ssa Chiara Bacchella

Tesi Sperimentale di
Angelo Ferraresi

Anno Accademico 2023/2024

Riassunto

Lo stress ossidativo è causato da uno squilibrio tra i livelli delle specie reattive all'ossigeno (ROS) e l'attività dei sistemi detossificanti, tra cui gli enzimi superossido dismutasi (SOD) o catalasi (CAT). L'aumento dello stress ossidativo porta a danni alla struttura cellulare e ai tessuti. La chimica delle specie reattive all'ossigeno è legata a quella dei metalli, sia liberi che inseriti in cofattori, che producono ROS attraverso il ciclo di Fenton/Haber-Weiss:

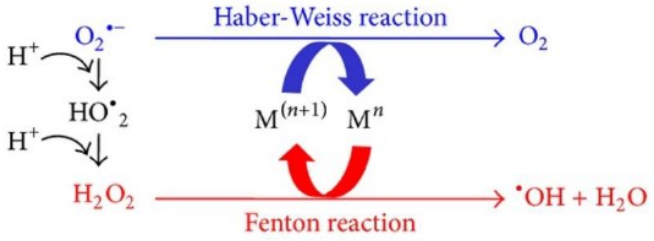


Fig.1 *Ciclo di Fenton/Haber-Weiss.*

Lo stress ossidativo contribuisce all'insorgere della neurodegenerazione. Con neurodegenerazione si intende l'insieme di diverse patologie croniche che sono caratterizzate da una progressiva morte neuronale. Una delle malattie neurodegenerative più diffuse è la patologia di Alzheimer, caratterizzata da un incremento di stress ossidativo e dall'aggregazione di peptidi neuronali, come i peptidi amiloidi, a formare placche insolubili, che sono trovate in tutte le zone del cervello dei pazienti coinvolti.

I metalli durante la neurodegenerazione tendono ad accumularsi e ad interagire con questi peptidi neuronali, portando ad un aumento dell'aggregazione degli stessi, e ad un aumento della reattività dei metalli sopra descritta (Fig.1). I metalli coinvolti in questa reattività ossidativa sono essenzialmente il ferro e il rame. In ambito biologico il ferro è abbondantemente legato al cofattore porfirinico per formare il gruppo eme. È stato dimostrato che l'accumulo di eme libero favorisce l'aggregazione dei peptidi amiloidi, grazie ad un'interazione che si sviluppa tra il ferro del gruppo eme e i residui di istidina presenti nella zona N-terminale dei peptidi amiloidi, che porta alla formazione di un complesso eme:peptide che può avere stechiometria 1:1 o 1:2.

Il gruppo eme è composto da macrociclo porfirinico che lega al suo interno il ferro. Quando il ferro all'interno del macrociclo si trova nello stato di ossidazione III, il complesso prende il nome di emina.

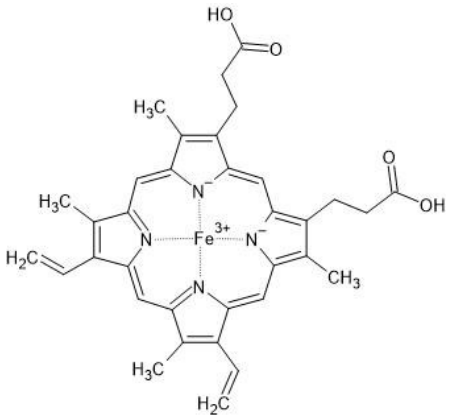


Fig.2 *Struttura del complesso emina.*

Esistono tre forme dell'eme, a seconda del tipo di legame che instaura con le proteine: eme *a* ed eme *b*, dove il complesso non è legato covalentemente alla proteina e l'eme *c* dove invece si instaura un doppio ancoraggio covalente con due cisteine.

Il gruppo eme è quindi molto studiato sia per una sua completa caratterizzazione della sua funzione biologica sia in ambito fisiologico (attività enzimatica in reazioni ossidative) che patologico (contributo allo stress ossidativo), sia per poter sviluppare molecole con strutture analoghe che possano modulare le reazioni collegate con l'ossigeno molecolare e le sue specie intermedie di riduzione (ROS). In relazione a quest'ultimo aspetto si può ipotizzare che le molecole in grado di potenziare la reattività ossidativa dell'eme possano essere impiegate come catalizzatori bioinspirati in reazioni ossidative, viceversa i composti in grado di spegnere la reattività dei ROS sono da considerare ottimi esempi di molecole antiossidanti.

La prima categoria presa in esame di sistemi porfirinoidi come analoghi del gruppo eme è costituita dai corroli. Queste molecole appartengono ad un particolare gruppo di macrocicli tetrapirrolici aromatici, caratterizzati da una cavità centrale di dimensioni ridotte rispetto alla porfirina, per via del legame diretto di due pirroli, e dal fatto che sono triprotici, a differenza delle porfirine che sono diprotiche. Questi macrocicli possono formare complessi con metalli di transizione, ma anche con altri tipi di metalli come i lantanidi. I campi di applicazione sono molteplici, per via del fatto che presentano caratteristiche favorevoli, come il poter stabilizzare ioni metallici altovalenti. Studi hanno dimostrato che i corroli sono potenzialmente efficaci come agenti citoprotettivi contro lo stress ossidativo e nitrativo.

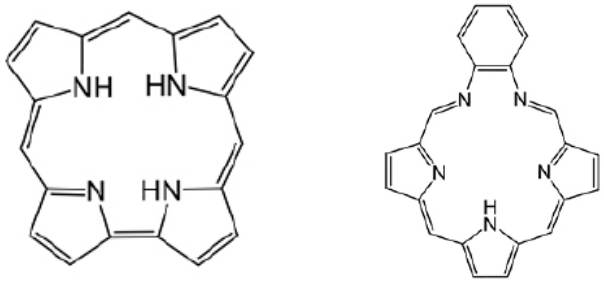


Fig.3 *Struttura del macrociclo corrolico e del macrociclo texafirinico.*

Un altro gruppo di macrocicli porfirinoidi è rappresentato dalle texafirine, porfirine espanse con cinque atomi di azoto, che presentano una chimica di coordinazione ricca e molto studiata.

Lo scopo di questo lavoro è quello di caratterizzare dal punto di vista della reattività cinque sistemi porfirinoidi, uno contenente il ferro, il 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di ferro (FeTCPC), e quattro contenenti manganese: 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di manganese (MnTCPC), 5,10,15-tris(4-piridil)corrolato di manganese (MnTPC), 5,10,15-tris(4-metilpiridil)corrolato di manganese (MnTPCMe) e manganese-texafirina carbossilato (MnTEXCOOH). Per tre di questi sistemi (FeTCPC, MnTCPC e MnTPC) è stato ottimizzato un processo di sintesi che permettesse di ottenere quantità sufficienti di composti da utilizzare nei successivi studi.

In seguito, è stata studiata l'interazione tra il FeTCPC e un frammento del peptide β-amiloide, con il fine di valutare l'affinità di legame e confrontarla con quella che presenta l'emina con il peptide. Da questi studi è emerso che il FeTCPC presenta buona affinità di legame per il complesso 1:1, ma la formazione della specie esacoordinata con stechiometria 1:2 risulta meno favorita, probabilmente per via del fatto che la sesta posizione di coordinazione viene più difficilmente occupata.

Il sistema FeTCPC è stato anche valutato in termini di attività perossidasica, per valutare l'azione come catalizzatore dell'attivazione del perossido e dell'ossidazione di substrati. Per questo studi sono stati utilizzati tre substrati modello, l'acido 3-(4-idrossifenil)propionico (HPA), il 4-metilcatecolo (4-MC) e la dopamina, molecola importante in ambito biologico. Da questi studi è emerso che il FeTCPC presenta attività perossidasica generalmente minore rispetto a quella dell'emina.

Oltre all'attività perossidasica è stata valutata anche l'attività catalasica di tutti i sistemi porfirinoidi presenti in questo lavoro. La catalasi è un enzima molto presente in natura che catalizza la reazione di disproporzionamento del perossido di idrogeno ad acqua e ossigeno, trasformando quindi una molecola potenzialmente tossica come H_2O_2 in molecole non dannose. Utilizzando il sale di diammonio-2,2'-azinobis[acido 3-etilbenzotiazolin-6-solfonico] (ABTS) e il perossido di idrogeno,

si può valutare l'attività catalasica dei composti. Da questo studio risulta che i manganese-corroli sono i migliori sistemi in termine di attività catalasica.

Per ultimo, è stata valutata l'attività dei sistemi come *scavengers* di specie reattive all'ossigeno. Utilizzando il sistema Cu/O_2/ascorbato per produrre ROS, si possono quantificare le modifiche ossidative a danno del peptide Aβ16 in presenza dei sistemi porfirinoidi. I migliori sistemi presentano percentuali di modifiche ossidative minori. Il MnTPCMe risulta il sistema migliore in termine di protezione dai ROS.

In conclusione, i sistemi porfirinoidi usati in questo lavoro presentano caratteristiche che possono essere riconducibili ad una potenziale detossificazione dalle specie reattive all'ossigeno. In particolare, i corroli al manganese presentano un'ottima attività catalasica. Studi futuri si concentreranno sullo studio della reattività dei complessi in presenza di peptidi neuronali, come il peptide Aβ-16, per verificare se la presenza del legame possa influenzare la reattività ossidativa osservata con i composti liberi. Inoltre, si potrà completare l'analisi con lo studio di altri tipi di reattività, come la reazione superossido dismutasi.

Indice

1. Introduzione ---- 1

1.1 Stress ossidativo e malattie neurodegenerative ---- 1

1.2 Sistemi metallo porfirinoidi ---- 3

2. Scopo della tesi ---- 6

3. Risultati e Discussione ---- 8

3.1 Sintesi e caratterizzazione di sistemi porfirinoidi ---- 8

3.2. Studi di legame con leganti metilimidazolo e peptide Aβ1-16 ---- 11

3.2.1 Studi di legame dell'emina e del FeTCPC con metilimidazolo ---- 12

3.2.2 Studi di legame dell'emina e del FeTCPC con peptide Aβ16 ---- 14

3.3 Studi di attività perossidasica dei composti emina e FeTCPC ---- 17

3.3.1 Studi attività perossidasica con substrato HPA ---- 19

3.3.1.1 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato HPA dalla concentrazione del perossido di idrogeno ---- 19

3.3.1.2 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato HPA dalla concentrazione del substrato ---- 21

3.3.2 Studi attività perossidasica con substrato 4-metilcatecolo ---- 22

3.3.2.1 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo dalla concentrazione del perossido di idrogeno ---- 23

3.3.2.2 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo dalla concentrazione del substrato ---- 25

3.3.3 Studi attività perossidasica con substrato dopamina ---- 26

3.3.3.1 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato dopamina dalla concentrazione del perossido di idrogeno ---- 26

3.3.3.2 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo dalla concentrazione del substrato ---- 28

3.4 Studi di attività catalasica ---- 29

3.5 Ossidazione dell'ascorbato di sodio ---- 31

3.5.1 Identificazione dei frammenti del peptide Aβ16 mediante HPLC/MS ---- 34

4. Conclusioni ---- 39

5. Materiali e metodi ---- 39

5.1 Strumentazione ---- 42

5.2 Sintesi 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di ferro(III) cloruro (FeTCPC) ---- 42

5.3 Sintesi 5,10,15-tris(4-carbossifenil)corrolato di manganese(II) (MnTCPC) ---- 44

5.4 Sintesi 5,10,15-tris(4-piridil)corrolato di manganese(II) (MnTPC) ---- 45

5.5 Studi di legame di FeTCPC ed emina con 4-metilimidazolo e peptide Aβ16 ---- 45

5.5.1 Preparazione della soluzione di FeTCPC---------- 45
5.5.2 Preparazione della soluzione di emina---------- 46
5.5.3 Saggio emocromogeno---------- 46
5.5.4 Titolazioni spettrofotometriche del FeTCPC e dell'emina---------- 47
5.5.5 Titolazione spettrofotometrica del FeTCPC e dell'emina con Aβ16 ---------- 50
5.6 Studi di reattività dei Corroli e confronto con emina---------- 52
5.6.1 Studi di attività perossidasica del FeTCPC e dell'emina---------- 52
5.6.2 Reazione di ossidazione d'acido 3-(4-idrossifenil)propionico (HPA) in presenza di FeTCPC ed emina ---------- 53
5.6.2.1 Dipendenza dalla concentrazione di perossido ---------- 54
5.6.2.2 Dipendenza dalla concentrazione di substrato---------- 55
5.6.3 Reazione di ossidazione del 4-metilcatecolo (4-MC) in presenza di FeTCPC ed emina- 57
5.6.3.1 Dipendenza dalla concentrazione di perossido ---------- 57
5.6.3.2 Dipendenza dalla concentrazione del substrato ---------- 59
5.6.3 Reazione di ossidazione della dopamina in presenza di FeTCPC ed emina ---------- 61
5.6.3.1 Dipendenza dalla concentrazione di perossido ---------- 62
5.6.3.2 Dipendenza dalla concentrazione del substrato ---------- 63
5.6.5 Attività catalasica dei corroli---------- 65
5.6.7 Ossidazione dell'ascorbato ---------- 66
5.6.8 Identificazione delle modifiche ossidative del peptide Aβ16 mediante HPLC/MS ------- 67
6. Bibliografia---------- 68

1. Introduzione

1.1 Stress ossidativo e malattie neurodegenerative

Lo stress ossidativo è causato da uno squilibrio tra i livelli delle specie reattive all'ossigeno (ROS) (Tab. 1) e l'attività dei sistemi detossificanti, tra cui gli enzimi superossido dismutasi (SOD) o catalasi (CAT). L'aumento dello stress ossidativo porta a danni alla struttura cellulare e ai tessuti. Nonostante questo, le specie reattive all'ossigeno sono necessarie per il funzionamento cellulare; infatti, gli organismi superiori utilizzano ROS e specie reattive all'azoto (RNS) come molecole segnale, come meccanismi di difesa e nella regolazione di funzioni cellulari, ad esempio nella produzione di energia da parte del mitocondrio. [1]

Specie reattive all'ossigeno	
Radicale idrossile	$OH^{\cdot}$
Ione idrossido	OH^{-}
Ossigeno singoletto	$^{1}O_2$
Perossido di idrogeno	H_2O_2
Anione superossido	$O_2^{\cdot -}$
Ione perossido	O_2^{2-}
perossinitrito	$ONOO^{-}$

Tab. 1 *Principali specie reattive all'ossigeno (ROS).*

La chimica dei ROS è strettamente legata a quella dei metalli, sia metalli liberi che metalli presenti in cofattori, ad esempio nell'eme (complesso tra il ferro e il macrociclo porfirinico che sarà descritto nel paragrafo successivo), per via del fatto che i metalli possono sia attivare l'ossigeno molecolare e produrne specie parzialmente ridotte sia svolgere la funzione di *scavenger* di ROS

L'accumulo di eme libero in condizioni patologiche porta alla produzione di specie reattive all'ossigeno, per via del fatto che i metalli di transizione possono catalizzare la produzione del radicale idrossido, forte ossidante, a spese dell'ossigeno superossidico e del perossido di idrogeno nel ciclo di Fenton/Haber-Weiss [2]:

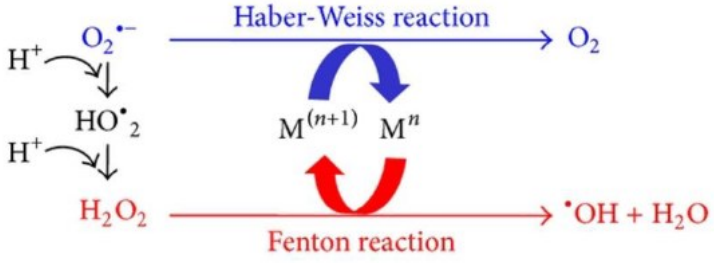


Fig.1 *Ciclo di Fenton/Haber-Weiss.*

La neurodegenerazione è un processo complesso che porta a diverse patologie croniche e caratterizzato da una progressiva morte neuronale seguita da disfunzioni cognitive e motorie, a seconda dell'area del cervello interessata.

Tra le cause principali che portano alla neurodegenerazione vi sono l'aggregazione di proteine e il danno causato da stress ossidativo; altri fattori da cui può derivare la neurodegenerazione sono quelli genetici, i fattori ambientali (neurotossine o infezioni) e l'invecchiamento.

Il cervello è soggetto ad un alto rischio di danno ossidativo per via di diverse caratteristiche intrinseche dello stesso, come l'alto consumo di ossigeno e gli alti livelli di ferro presente [3].

Lo stress ossidativo contribuisce alla degenerazione tipica della patologia di Alzheimer, per via del fatto che è uno dei primi eventi che prende luogo nel citoplasma dei neuroni vulnerabili, che sono danneggiati nella patologia. La caratteristica principale della patologia è l'accumulo e l'aggregazione di proteine β-amiloidi a dare placche amiloidi, composte da un *core* denso di peptidi β-amiloidi circondato da una corona meno densa; queste placche insolubili sono trovate in tutte le zone del cervello dei pazienti affetti dalla patologia. [3] I peptidi amiloidi derivano dal taglio proteolitico di alcune secretasi ai danni della proteina precursore dell'amiloide (APP); questi peptidi hanno lunghezze variabili ma i più comuni sono i peptidi denominati 1-40 e 1-42[3]. Entrambi i peptidi presentano nella zona N-terminale istidine che sono siti di legame per metalli redox attivi come ferro e rame; di seguito riportata la sequenza del peptide β-amiloide 1-16, peptide utilizzato in questa tesi, con evidenziate le istidine coinvolte nel legame con i metalli:

AspAlaGluPheArgHisAspSerGlyTyrGluValHisHisGlnLys-NH_2 (Aβ16)

Poiché l'omeostasi dei metalli è deregolata durante le patologie neurodegenerative, questi tendono ad accumularsi e ad interagire col peptide stesso, interazione che può portare ad un aumento dell'attività dei metalli sopra descritta.

Inoltre, è stato anche verificato che l'accumulo di eme libero può modulare l'aggregazione dei peptidi β-amiloidi, per via del fatto che il gruppo eme può legare due catene di Aβ grazie al legame di coordinazione con gli azoti istidinici [4].

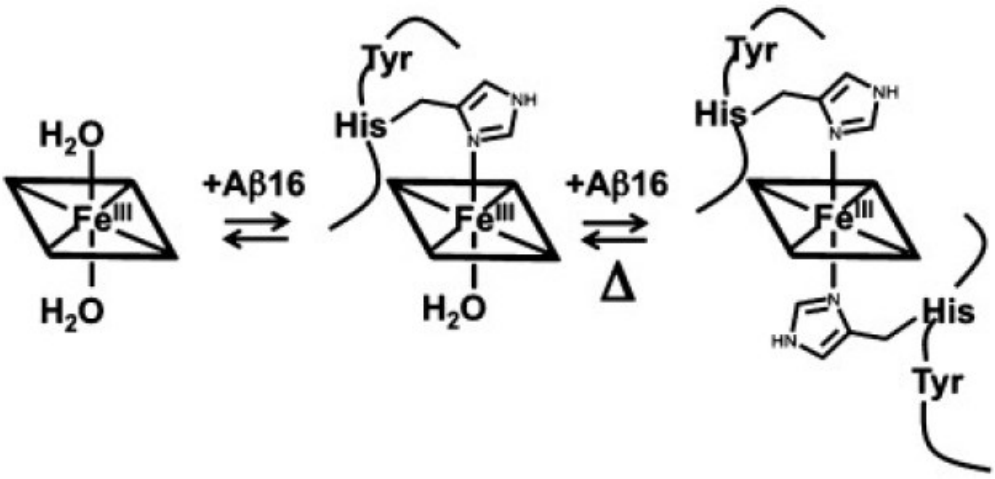


Fig.2 *Interazione emina con un frammento del peptide β-amiloide.*

1.2 Sistemi metallo porfirinoidi

Come detto in precedenza il gruppo eme è costituito da un complesso tra il ferro ed il macrociclo porfirinico. Le porfirine sono una classe di composti che presentano un eterociclo composto da pirroli, che spesso si distinguono tra di loro per il tipo di metallo che legano all'interno della struttura. Si trovano in molti organismi, e sono conosciute per le loro proprietà antiossidanti.

Il complesso porfirinico più importante e comune è l'eme, dove il ferro risulta legato alla protoporfirina, sistema che rispetto alla porfirina presenta due sostituenti vinilici, due sostituenti propionici e quattro sostituenti metilici. Quando lo ione si trova nello stato ferroso il sistema prende il nome di eme, mentre quando è presente nello stato ferrico il sistema prende il nome di emina (Fig.3).

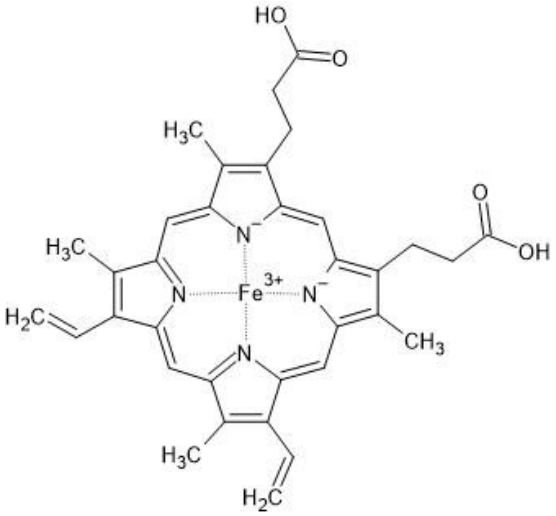


Fig.3 *Struttura del complesso emina.*

Nei sistemi biologici l'eme è presente in tre diverse forme, eme *a*, eme *b* ed eme *c* e la differenza tra le tre forme risiede nel legame con la proteina: i primi due tipi di eme non sono legati covalentemente con la proteina, mentre l'eme *c* presenta un doppio ancoraggio dovuto a legami covalenti con due residui di cisteina.

Le funzioni principali dell'eme sono quelle di trasporto e stoccaggio dell'ossigeno, funzioni esplicate nei sistemi emoglobina e mioglobina. Oltre a queste due funzioni l'eme ha un ruolo anche nei processi di trasferimento elettronico quando associato a varie forme di citocromi e nelle reazioni catalitiche dell'ossigeno e del perossido di idrogeno quando associato ad enzimi come i citocromi P450 e le perossidasi.

L'eme libero, quando accumulato sopra valori soglia, risulta tossico per via dell'alto potere ossidativo che possono raggiungere i suoi derivati e per via della sua capacità di indurre stress ossidativo mediante produzione di specie reattive all'ossigeno utilizzando il ciclo di Fenton/Haber-Weiss. L'aumento di eme libero viene riscontrato in diverse malattie neurologiche quali Alzheimer e Parkinson. Studi sul morbo di Alzheimer hanno dimostrato che l'eme ferrico lega i peptidi β-amiloidi e le proteine tau, e ha un ruolo rilevante nell'aggregazione in condizioni di stress ossidativo. Nel primo caso, questa interazione induce un incremento nella tendenza all'aggregazione della proteina, portando alla formazione delle placche amiloidi [4] mentre per la proteina tau, è responsabile dello stress ossidativo che porta al danneggiamento della stessa e alla formazione di grovigli neurofibrillari intracellulari, caratteristici della malattia di Alzheimer (AD).

Un altro esempio di porfirinoidi è costituito dai corroli; essi sono un particolare gruppo di macrocicli tetrapirrolici aromatici che si differenziano dalla porfirina per il legame diretto di due pirroli del macrociclo. Per questo i corroli presentano una cavità centrale più piccola rispetto a quella delle porfirine. La struttura del macrociclo ricorda quella della corrina, presente nella cobalamina come legante del cobalto, ma la differenza risiede nell'aromaticità dei due macrocicli.

La caratteristica principale dei corroli, oltre alla cavità centrale di dimensioni ridotte, sta nel fatto che questi macrocicli sono triprotici, a differenza delle porfirine che invece sono diprotiche.

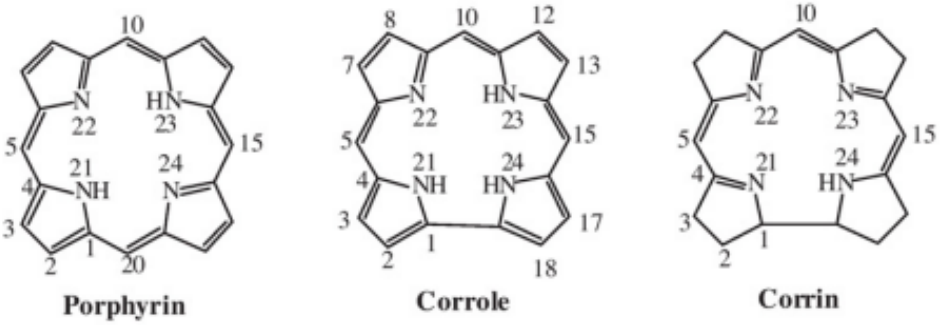


Fig.4 *Struttura del macrociclo di porfirina, corrolo e corrina.*

Gli studi rivolti a questi composti hanno subito un rapido aumento a partire dagli anni ‘90, con lo sviluppo di procedure di sintesi semplici che permettono di ottenere alte rese della base libera. La presenza in grandi quantità del legante di partenza ha permesso di preparare una serie di complessi con diversi ioni metallici e di ampliare la chimica di coordinazione di questi composti[5].

I corroli presentano una chimica di coordinazione ricca e molto studiata; i complessi più studiati sono quelli con i metalli di transizione, ferro e manganese su tutti, ma sono riportati in letteratura anche lavori con lantanidi, come il gadolinio, e attinidi, come il torio e l’uranio. [6]

I corroli presentano tanti potenziali campi di applicazione, ad esempio l’utilizzo come catalizzatori, sensori dell’ossigeno o agenti di imaging, sebbene uno dei campi di ricerca più attivo consista nell’impiego dei tali composti come potenziali agenti antitumorali.[7] [8]

I corroli risultano essere solubili in acqua, non necessitano di attivazione mediante fotoeccitazione per esplicare la loro citotossicità, legano le proteine cellulari in modo spontaneo e non covalente ma necessitano di un carrier per entrare nella cellula (specificità del *delivery*); inoltre hanno il vantaggio di poter stabilizzare ioni metallici alto valenti.

Un altro campo di applicazione è quello dei metallo-corroli come agenti citoprotettivi contro lo stress ossidativo e nitrativo. Infatti, il problema principale nel trattamento delle patologie legate allo stress ossidativo, incluse le patologie neurodegenerative, sta nel fatto che i sistemi detossificanti più comuni ed efficienti (come la superossido dismutasi al manganese - Mn-SOD, o la catalasi che contiene un gruppo eme), risultano troppo grandi per essere somministrati come agenti terapeutici poiché non riuscirebbero a superare la barriera ematoencefalica (BBB). È quindi necessario lo sviluppo di composti biomimetici che possano sopperire a questo problema.

È stato dimostrato che corroli al ferro e al manganese presentano attività catalitica in diverse reazioni quali la disproporzione del perossido di idrogeno (attività catalasica), la dismutazione del radicale superossido (attività superossido dismutasica) e la decomposizione del perossinitrito. In particolare, la detossificazione del perossinitrito è un target di ampio interesse terapeutico a causa della bassa efficienza dei classi antiossidanti naturali come *scavengers*. Studi hanno dimostrato che i complessi Fe-corroli sono potenziali agenti antiossidanti nei confronti del perossinitrito in modelli murini.[10]

Un altro tipo di macrocicli porfirinici di interesse in questo ambito sono le texafirine, ovvero porfirine espanse contenenti cinque atomi di azoto (Fig.5). In contrasto con le proprietà dei corroli, le texafirine sono caratterizzate da una cavità centrale più larga rispetto a quella delle porfirine, e dal fatto che sono macromolecole monoprotiche. Anche questi composti presentano una chimica di coordinazione ricca e molto studiata, infatti formano complessi stabili con molti cationi metallici soprattutto con i lantanidi, come il gadolinio. [11]

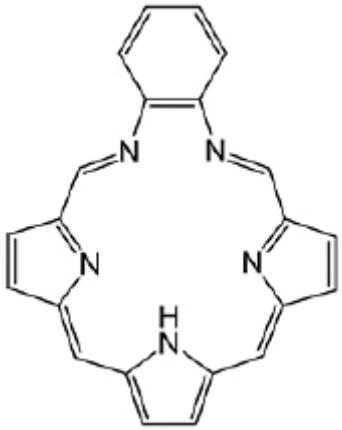


Fig.5 *Struttura del macrociclo delle texafirina.*

Anche per queste macromolecole sono presenti molti campi di applicazione, soprattutto quello dei farmaci antitumorale; ad esempio, il Motexafin gadolinio e il Motexafin luteinio, sono stati proposti come possibili agenti chemioterapici.[11]

2. Scopo della tesi

Alla luce delle conoscenze descritte nei paragrafi precedenti, lo scopo di questo lavoro di tesi è incentrato sull'estendere la conoscenza dei sistemi porfirinici quali eme, corroli e texafirine in ambito dei processi di attivazione dell'ossigeno molecolare e delle sue specie intermedie. Nella Fig.6 sono riportati i complessi con cui si è lavorato in questo progetto.

Per i sistemi corrolici è stato scelto di approfondire le conoscenze in termini di reattività redox dei seguenti composti: 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di ferro, 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di manganese e 5,10,15-tris(4-piridil)corrolato di manganese. La prima parte del lavoro ha quindi richiersto una fase di ottimizzazione del processo di sintesi che potesse permettere l'ottenimento dei composti in quantità sufficienti per i successivi studi.

Il 5,10,15-tris(4-metilpiridil)corrolato di manganese (MnTPCMe) è stato fornito dal laboratorio della Prof.ssa Sara Nardis e del Prof. Roberto Paolesse presso l'Università di Roma Tor Vergata.

La texafirina usata è stata fornita dal laboratorio del Prof. Alan Jasanoff e del Dott. Gregory Thiabaud presso il Massachusetts Institute of Technology (MIT) a Boston.

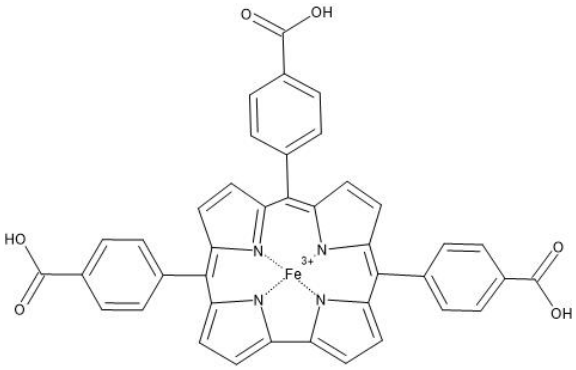
Una volta ottenuti i macrocicli richiesti, si intende valutare la loro capacità di formare un legame con i peptidi coinvolti nelle malattie neurodegenerative come il peptide β-amiloide, prendendo come riferimento l'eme, il cui legame con il peptide in questione è già ampiamente trattato in letteratura.

Un ulteriore obbiettivo di questo studio è la valutazione della reattività ossidativa dei sistemi porfirinoidi. Anche in questo caso l'eme costituisce l'elemento di confronto ed in particolare si prenderà in considerazione la reattività di tipo perossidasico tipica di questo composto. In particolare, saranno impiegati dei substrati modello, come l'acido 3-(4-idrossifenil)propionico e il 4-metilcatecolo, e substrati di importanza biologica quale la dopamina. L'utilizzo di questi substrati è inoltre importante in quanto permette di confrontare i parametri cinetici ottenuti in presenza dei corroli con dati ottenuti su altri sistemi presso il nostro laboratorio oppure presenti in letteratura.

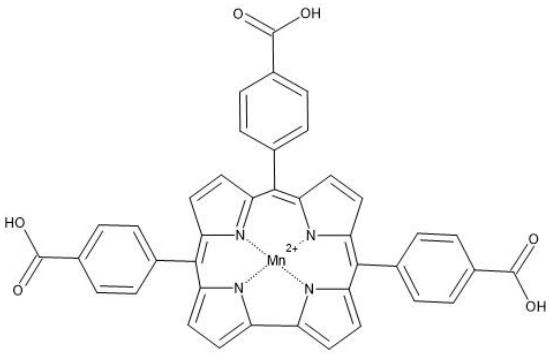
È stata valutata anche l'attività catalasica dei sistemi porfirinoidi, in riferimento all'attività dell'enzima catalasi da fegato di bovino.

Per ultimo è stata valutata la potenziale attività di *scavenger* di specie reattive all'ossigeno dei sistemi in esame, mediante studio delle modifiche ossidative a danno del peptide β-amiloide.

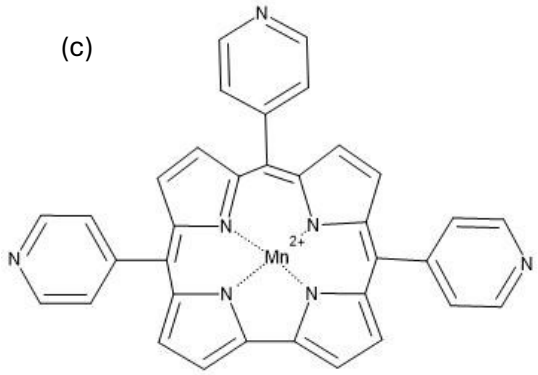
(a)



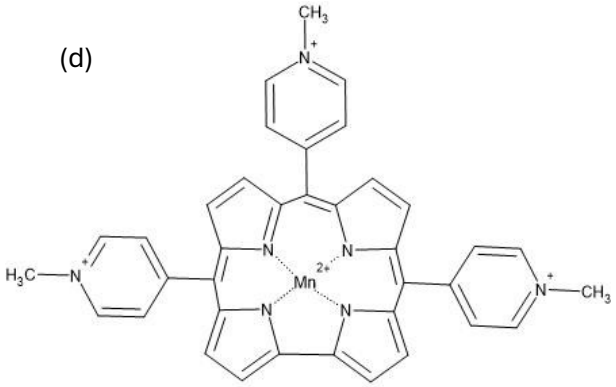
(b)



(c)



(d)



(e)

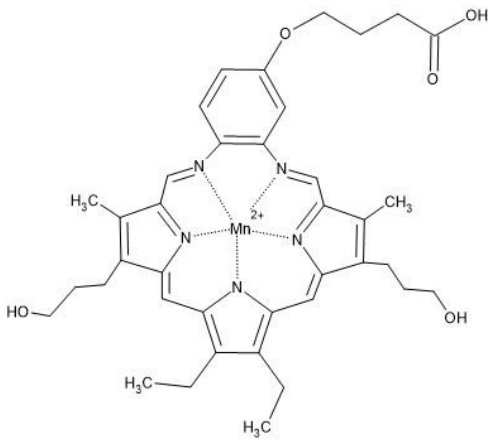
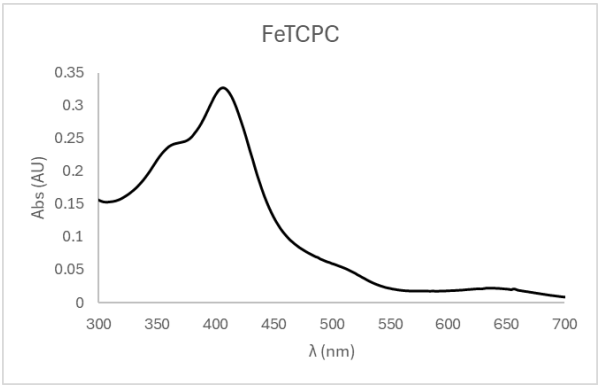


Fig.6 *Strutture dei macrocicli porfirinoidi usati. (a) 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di ferro (FeTCPC); (b) 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di manganese (MnTCPC); (c) 5,10,15-tris(4-piridil)corrolato di manganese (MnTPC); (d) 5,10,15-tris(4-metilpiridil)corrolato di manganese (MnTPCMe); (e) manganese-texafirina carbossilato (MnTEXCOOH).*

3. Risultati e Discussione

3.1 Sintesi e caratterizzazione di sistemi porfirinoidi

Per il 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di ferro (FeTCPC) è stato ottimizzato un processo di sintesi in tre fasi, descritto in dettaglio nel paragrafo 5.2. Il primo passaggio consiste nella preparazione del macrociclo corrolico demetallato e con i gruppi carbossilici protetti. Il secondo step consiste nella metallazione del macrocicli seguita dalla deprotezione dei gruppi carbossilici mediante idrolisi basica. per quest'ultima reazione sono state testate diverse basi forti, con l'idrossido di litio che si è rivelato l'unico reagente in grado di fornire un risultato apprezzabile.



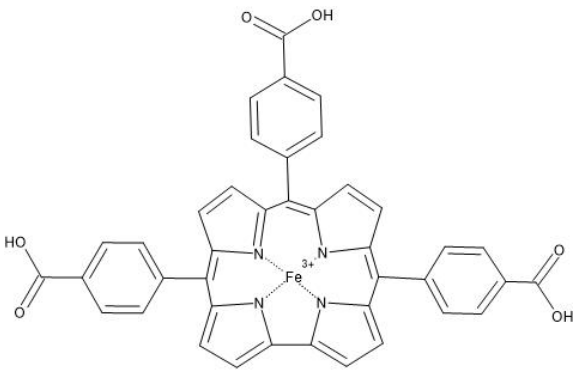


Fig.7 *Spettro di assorbimento del FeTCPC (λ_{max} = 390 nm, $\mathcal{E}$ = 35000 $M^{-1}cm^{-1}$ [12]) in metanolo e relativa struttura del macrociclo (MW = 711 g/mol).*

Il 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di manganese (MnTCPC) è stato sintetizzato in un processo simile a quello adoperato per il FeTCPC. La differenza nelle due sintesi si trova nella base usata per la reazione finale di idrolisi, che in questo caso risulta essere l'idrossido di sodio.

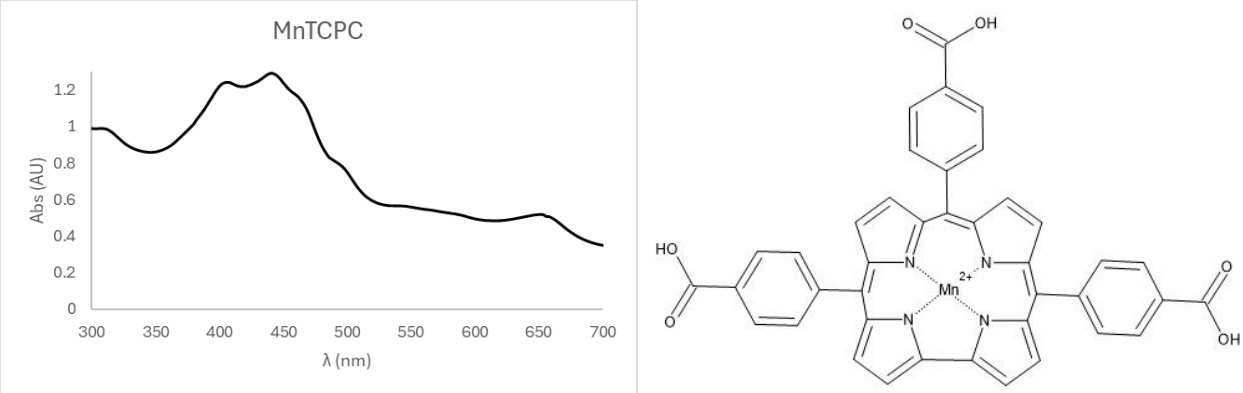


Fig.8 *Spettro di assorbimento del MnTCPC (λ_{max} = 432 nm, $\mathcal{E}$ = 45000 $M^{-1}cm^{-1}$[13]) in metanolo e relativa struttura del macrociclo (MW = 710 g/mol).*

Il 5,10,15-tris(4-piridil)corrolato di manganese (MnTPC) è stato sintetizzato in un processo a due fasi. Per primo è stato sintetizzato il legante macrociclico, che sarà successivamente metallato.

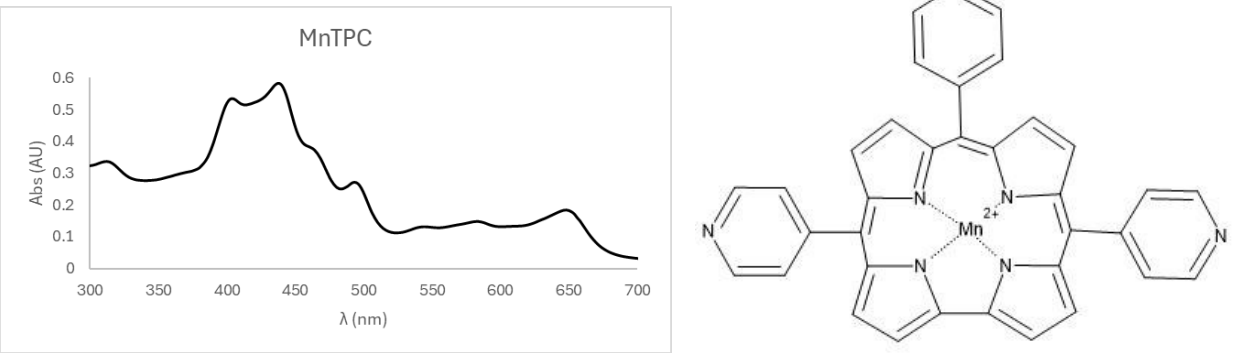


Fig.9 *Spettro di assorbimento del MnTPC (λ_{max} = 438 nm, $\mathcal{E}$ = 36000 $M^{-1}cm^{-1}$[12]) in metanolo e relativa struttura del macrociclo (MW = 581 g/mol).*

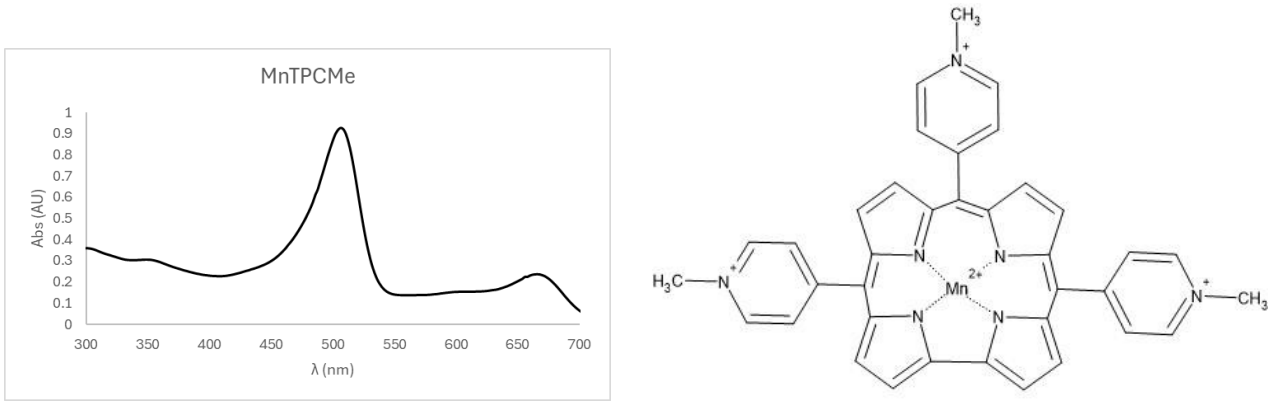


Fig.10 *Spettro di assorbimento del MnTPCMe (λ_{max} = 506 nm, $\mathcal{E}$ = 36000 $M^{-1}cm^{-1}$[12]) in metanolo e relativa struttura del macrociclo (MW = 627 g/mol).*

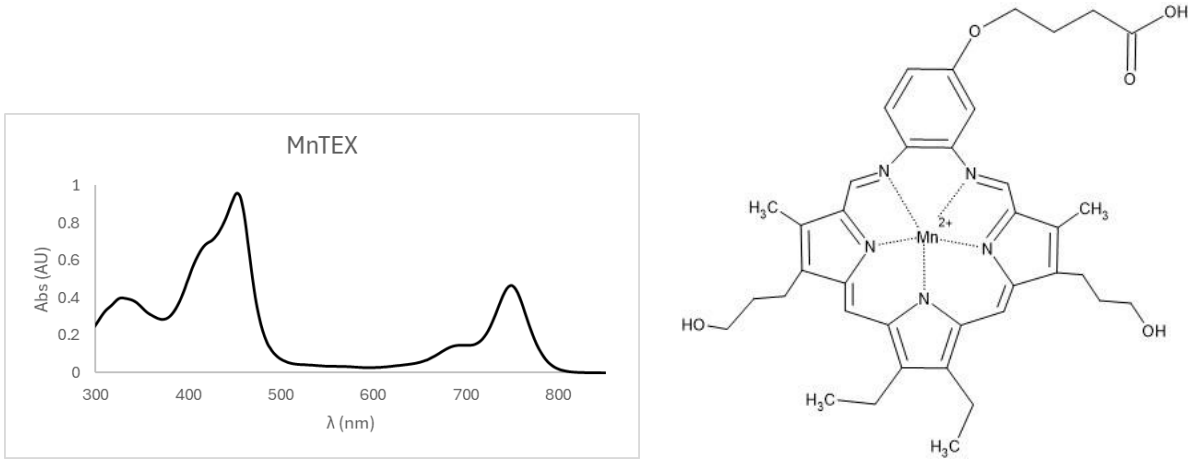


Fig.11 *Spettro di assorbimento della MnTEXCOOH (λ_{max} = 452 nm) in metanolo e relativa struttura del macrociclo (MW = 706 g/mol).*

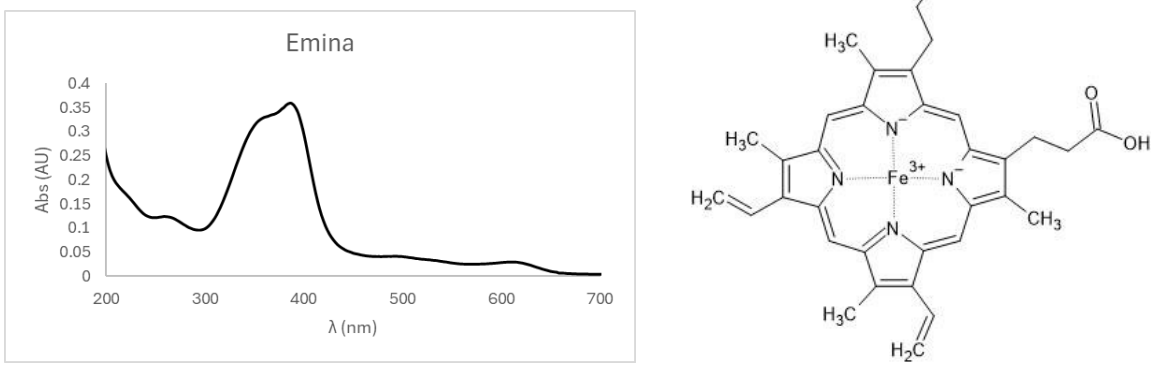


Fig.12 *Spettro di assorbimento dell'emina (λ_{max} = 390 nm, $\mathcal{E}$ = 65000 $M^{-1}cm^{-1}$) in metanolo e relativa struttura del macrociclo.*

3.2. Studi di legame con leganti metilimidazolo e peptide Aβ1-16

Il secondo obiettivo di questo lavoro è studiare l'entità del legame del FeTCPC con potenziali leganti, quali il metilimidazolo ed un frammento del peptide β-amiloide, ovvero il peptide Aβ1-16. Studi con il metilimidazolo sono molto presenti in letteratura, perché permette di simulare una coordinazione di tipo istidinico senza il bisogno di dover usare un peptide o proteine più grandi.

Il binding con l'emina è usato come termine di confronto in quanto già ampiamente caratterizzato. In questo caso, il ferro contenuto nella protoporfirina IX è nello stato di ossidazione 3+ ed è legato assialmente a due molecole d'acqua (leganti a campo debole), che mantengono il ferro nel suo stato ad alto spin. L'emina in soluzione acquosa si presenta sottoforma di miscela monomero/dimero (Fig.14); tale equilibrio può essere influenzato dalla presenza di leganti più forti, come per es. anelli imidazolici.

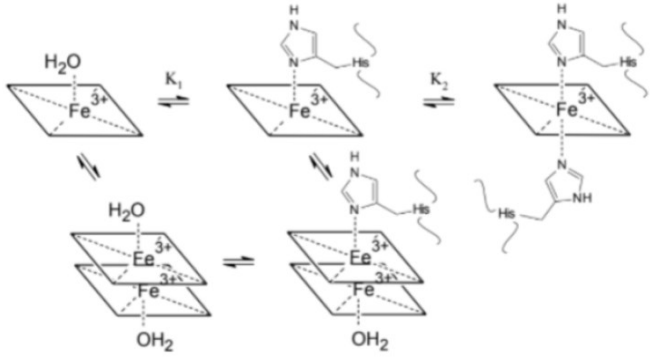


Fig.14. *Schema di legame tra una molecola di emina e un generico residui istidinico a formare il mono (1:1) e il bis (1:2) addotto.*

È noto in letteratura che il legame tra una molecola di emina ed un legante a campo forte, cioè la formazione del mono addotto 1:1, viene indicato da una diminuzione di intensità della banda Soret a 390 nm dell'emina (effetto ipocromico), senza però variazioni della lunghezza d'onda. Inoltre, l'equilibrio di formazione del complesso emina:peptide 1:1 è governato da una costante di equilibrio, generalmente indicata come K_1. D'altar parte, la formazione della specie esacoordinata a basso spin, ovvero del complesso emina:peptide con stechiometria 1:2 (anche detto bis-addotto), è accompagnata da uno spostamento della banda Soret verso lunghezze d'onda maggiori (red-shift). Questo equilibrio è governato dalla costante K_2.

Di seguito viene riportata l'equazione a due stadi, e a bassa affinità, che relaziona le due costanti di equilibrio K_1 e K_2:

$$\Delta\mathrm{Abs} = \frac{\mathrm{A}K_1[\mathrm{substrato}] + \mathrm{B}K_1K_2[\mathrm{substrato}]^2}{1 + K_1[\mathrm{substrato}] + K_1K_2[\mathrm{substrato}]^2}$$

3.2.1 Studi di legame dell'emina e del FeTCPC con metilimidazolo

Una volta ottenuto il corrolo FeTCPC, è stato eseguito uno studio di legame con il metilimidazolo; come confronto è stato eseguito lo stesso studio anche con l'emina.

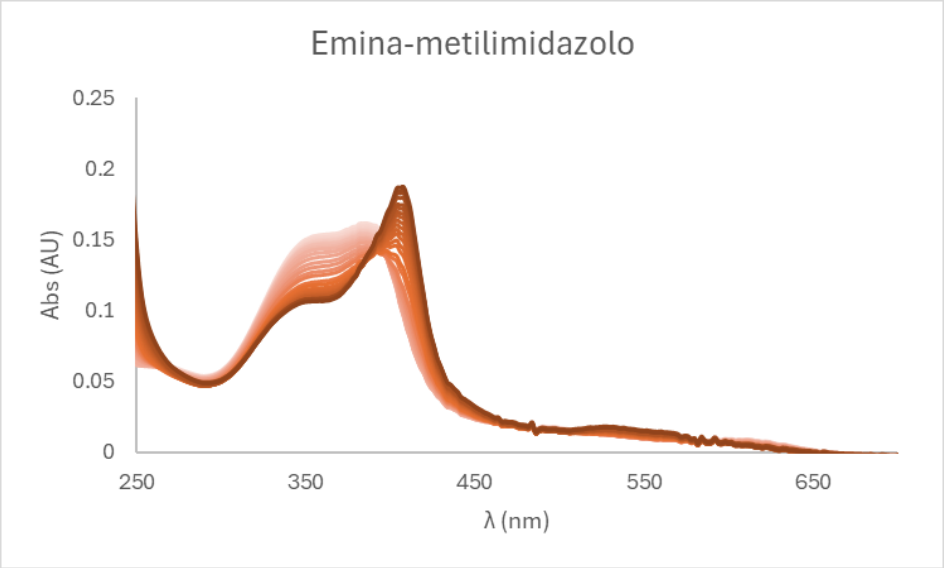


Fig.15 *Titolazione spettrofotometrica UV-vis in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4 dell'emina (4 μM) con metilimidazolo (da 0 mM a 10 mM, da marrone chiaro a marrone scuro).*

Come si può notare dalla Fig.15, all'aumentare della concentrazione di metilimidazolo il contributo a 390 nm diminuisce, sintomo della formazione del complesso 1:1 tra emina e metilimidazolo. in presenza di larghi eccessi di legante, si nota inoltre un red-shift della banda Soret dell'emina, ad indicare la formazione del complesso 1:2 tra emina e metilimidazolo.

Per poter determinare le costanti di legame, K_1 e K_2, è necessario prendere in considerazione le λ dove sono maggiori le variazioni di assorbanza (relative ad una unica specie, penta- o esa-coordinata) all'aumento della concentrazione di metilimidazolo; a questo scopo si considera la differenza tra i valori di assorbanza a 390 nm con quelli ottenuti a 424 nm. La curva di legame (Fig.16) che si genera viene poi fittata, mediante software FPWIN con l'equazione a due stadi a bassa affinità che ci permette di ottenere le due costanti di legame, riportate in Tabella 2.

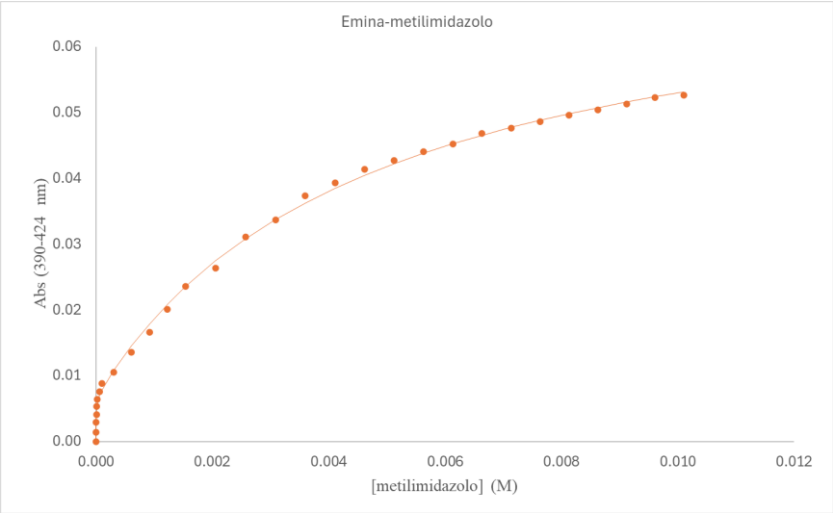


Fig.16 *Curva di legame della titolazione spettrofotometrica [metilimidazolo] vs ΔAbs (390-424 nm). I punti sono interpolato con l'equazione a due stadi ad alta affinità.*

L'esperimento viene ripetuto anche con il corrolo FeTCPC e, anche in questo caso, si può osservare un calo della banda Soret a 390 nm all'aumentare delle concentrazioni di metilimidazolo, indice della formazione dell'addotto 1:1 FeTCPC:metilimidazolo. A concentrazioni elevate del substrato si verifica un modesto red-shift *vs* 400 nm.

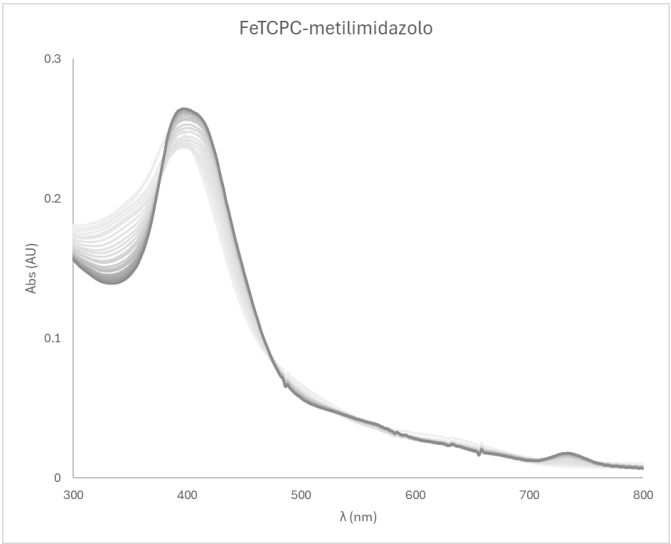


Fig.17 *Titolazione spettrofotometrica Uv-vis in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4 del FeTCPC (20 μM) con metilimidazolo (da 0 mM a 10 mM, da grigio chiaro a grigio scuro).*

Viene costruita la corrispondente curva di legame (Fig.18) delle variazioni spettrali a 390 e 400 nm *vs* [legante]; essa viene poi fittata per ottenere le costanti di legame K_1 e K_2. In questo caso il valore della K_2 non è determinabile con precisione (< 100 M^{-1}).

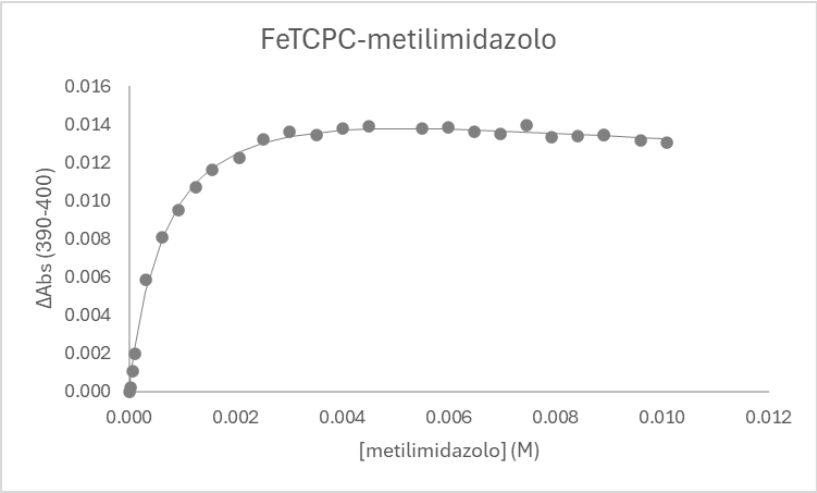


Fig.18 *Curva di legame della titolazione spettrofotometrica ΔAbs (390-424 nm) vs [metilimidazolo]. I punti sono interpolati con l'equazione a due stadi a bassa affinità.*

	K_1 (M^{-1})	$LogK_1$	K_2 (M^{-1})	$LogK_2$
emina	$(1.32 \pm 0.41) \times 10^5$	5.12	$(1.34 \pm 0.11) \times 10^3$	3.13
FeTCPC	$(2.13 \pm 0.13) \times 10^2$	2.33	< 100	< 2

Tab.2 *Costanti di binding K_1 e K_2 del binding di emina (in arancione) e FeTCPC (in grigio) con metilimidazolo.*

Confrontando i valori di K_1 e K_2 riportati in Tab.2, l'emina presenta un binding più forte nei confronti del metilimidazolo rispetto al binding del corrolo. La K_2 dell'emina risulta più bassa rispetto alla K_1 ad indicare una maggiore propensione a formare il complesso con stechiometria 1:1 rispetto a quello 1:2.

3.2.2 Studi di legame dell'emina e del FeTCPC con peptide Aβ16

Come spiegato nel capitolo introduttivo, l'emina presenta un'alta affinità di legame con i peptidi amiloidi, per via della presenza di tre istidine al N-termine del peptide β-amiloide che costituiscono un potenziale sito di legame per il centro metallico. In questi studi, utilizzando appunto l'emina come riferimento, ci si pone lo scopo di verificare se anche il FeTCPC, essendo un sistema porfirinico al ferro come l'emina, presenti una buona affinità di legame per i peptidi amiloidi. Per verificare questo, è stato utilizzato un frammento del peptide Aβ42, limitando la sequenza ai primi 16 amminoacidi (Aβ16); questo frammento presenta solamente la regione N-terminale, fondamentale per l'interazione con il metallo, escludendo la coda C-terminale idrofobica

(normalmente associata al processo di aggregazione tipico di tali peptidi) al fine di semplificare gli studi. Per prima cosa è stata eseguita la titolazione spettrofotometrica dell'emina con il peptide.

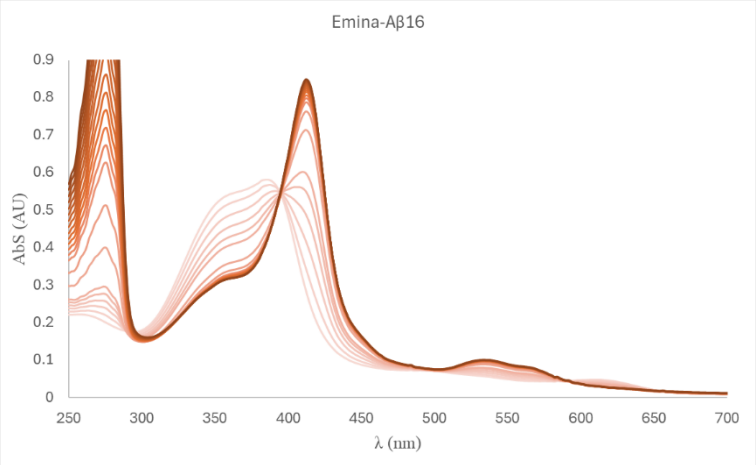


Fig.19 *Titolazione spettrofotometrica Uv-vis in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4 dell'emina (10 µM) con Aβ16 (da 0 mM a 0.4 mM, da marrone chiaro a marrone scuro).*

Come si nota dalla Fig.19, all'aumentare della concentrazione di peptide l'intensità del contributo a 390 nm decresce e si assiste ad un red-shift della banda Soret *vs* 424 nm. Queste due modifiche della banda sono sintomo della formazione degli addotti 1:1 e 1:2 tra emina e peptide, perfettamente in linea con quanto riportato in letteratura.

Come per lo studio con il metilimidazolo viene generata la corrispondente curva di legame (Fig.20), che sarà successivamente fittata con l'equazione a due stadi a bassa affinità per ottenere le due costanti di legame.

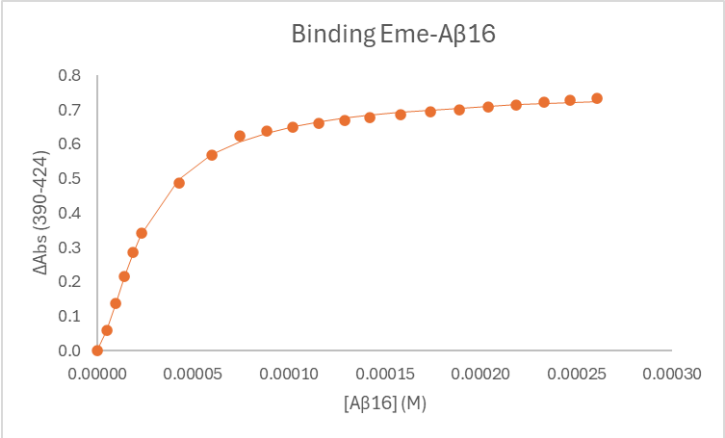


Fig.20 *Curva di legame della titolazione spettrofotometrica ΔAbs (390-424 nm) vs [Aβ16]. I punti sono interpolati con l'equazione a due stadi a bassa affinità.*

Successivamente è stato riprodotto lo stesso studio ma in presenza del complesso FeTCPC.

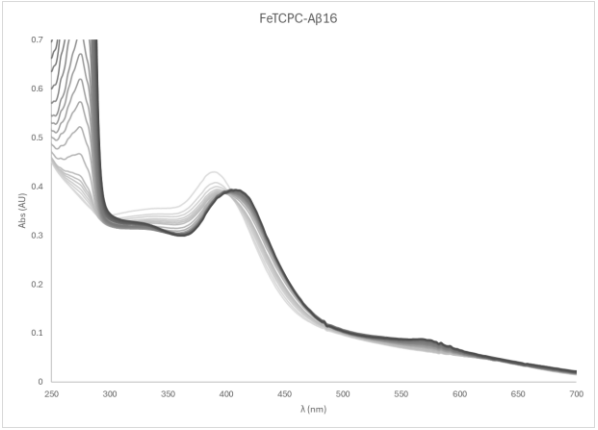


Fig.21 *Titolazione spettrofotometrica UV-vis in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4 del FeTCPC (80 µM) con Aβ16 (da 0 mM a 1 mM, da grigio chiaro a grigio scuro).*

Come si nota dal grafico, anche in questo caso è presente un calo della banda Soret a 390 nm seguito da un modesto red-shift a 412 nm, ad indicare la formazione degli addotti 1:1 e 1:2 tra FeTCPC e peptide. Come per l'emina, viene generata la curva di legame mostrata in Fig.22, che sarà interpolata con equazione a due stadi a bassa affinità per il calcolo delle costanti di legame K_1 e K_2.

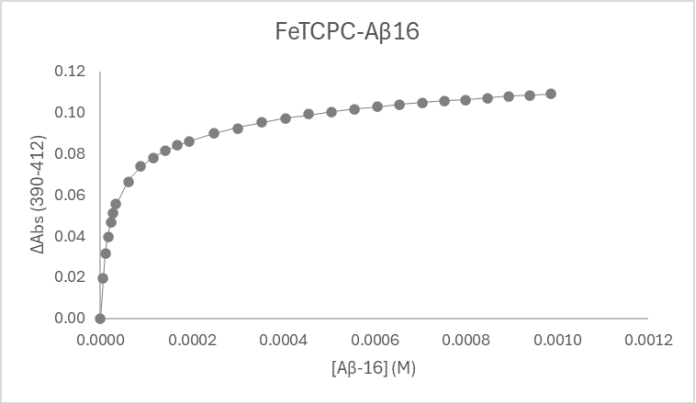


Fig.22 *Curva di legame della titolazione spettrofotometrica ΔAbs (390-412 nm) vs [Aβ16]. I punti sono interpolati con l'equazione a due stadi a bassa affinità.*

Le costanti di legame dei due esperimenti sono riportate nella tabella 3:

	K_1 (M^{-1})	LogK_1	K_2 (M^{-1})	LogK_2
emina	$(4.36 \pm 1.10) \times 10^4$	4.64	$(5.47 \pm 0.49) \times 10^4$	4.74
FeTCPC	$(5.52 \pm 0.14) \times 10^4$	4.74	$(1.71 \pm 0.19) \times 10^3$	3.23

Tab.3 *Costanti di binding K_1 e K_2 del binding di emina (in arancione) e FeTCPC (in grigio) con metilimidazolo.*

Le costanti K_1 di formazione dell'addotto 1:1 risultano confrontabili per entrambi i sistemi, ad indicare che per entrambi la formazione del complesso 1:1 risulta favorita. D'altra parte, i valori di K_2 che regolano la formazione delle specie esacoordinate differiscono notevolmente tra loro, evidenziando che, a differenza dell'emina, la sesta posizione di coordinazione del centro metallico nel corrolo viene più difficilmente occupata da una seconda molecola di peptide.

3.3 Studi di attività perossidasica dei composti emina e FeTCPC

Oltre alla caratterizzazione delle proprietà di legame del FeTCPC con leganti istidinici, come il peptide β-amiloide, è importante caratterizzare la potenziale promozione da parte dei corroli di reazioni ossidative potenzialmente dannose per le cellule. Per questo motivo viene valutata la potenziale attività di tipo perossidasico, in quanto è noto che diversi complessi ferroporfirinici presentano questa reattività tipica delle eme-proteine. In queste reazioni diversi substrati vengono ossidati attraverso reazioni di trasferimento elettronico a spese del perossido di idrogeno, precedentemente attivato dal complesso ferro-porfirinico; in questo processo, due molecole di substrato vengono ossidate monoelettricamente e successivamente si legano a formare un dimero.
In generale, il ciclo catalitico della perossidasi si divide in tre stadi e prevede la formazione di due intermedi, chiamati Composto I e Composto II:

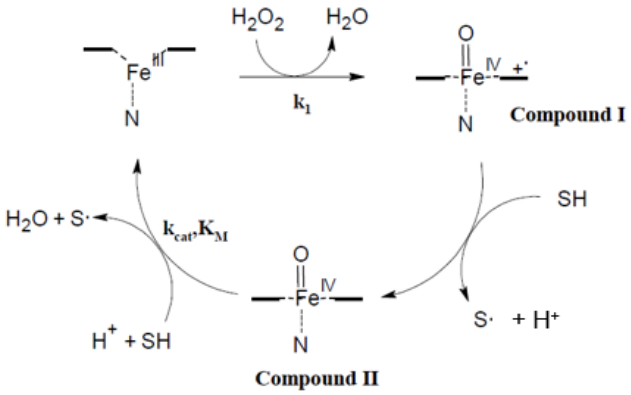


Fig.23 *Rappresentazione schematica del ciclo catalitico enzimatico della perossidasi.*

Il perossido si lega alla ferro-proteina contenente ferro ad alto spin portando alla formazione di un complesso idroperosso a basso spin. Il complesso subisce la rottura del legame O-O, che porta all'uscita di una molecola d'acqua e alla formazione della specie Fe^{V}=O che sarà stabilizzata dai residui amminoacidici della tasca catalitica a Fe^{IV}=O, lasciando una lacuna elettronica sulla catena peptidica o sull'anello porfirinico (Composto I).

Il Composto I reagisce con una molecola di substrato estraendo un elettrone, che colmerà la lacuna elettronica, formando il Composto II. Anche questa specie è fortemente ossidante e ossida una seconda molecola di substrato con riduzione del Fe^{IV} a Fe^{III}, riportando l'enzima alla forma nativa.
Il Composto I risulta più reattivo e reagisce più velocemente con il substrato rispetto al Composto II: infatti la reazione comporta una maggior variazione delle distanze di legame dovuta allo spostamento del ferro pentacoordinato fuori dal piano della porfirina.
L'equazione cinetica da cui si estrapola la velocità del primo step (regolata dalla costante cinetica k_1), che governa la formazione del Composto I, è la seguente:

$$v = k_1[catalizzatore][H_2O_2]$$

Sperimentalmente la dipendenza dalla concentrazione di perossido presenta un andamento a saturazione che porta ad un massimo di velocità oltre al quale si osserva una diminuzione della velocità ad alte concentrazioni di perossido, dovuta alla formazione di una specie meno reattiva che rallenta il processo.

Operando a concentrazioni ottimali di perossido di idrogeno e variando le concentrazioni di substrato, lo stadio cineticamente determinante è la riduzione attuata dal substrato del Composto II allo stato ferrico. La reazione segue un meccanismo di tipo Michaelis-Menten:

$$v = \frac{k_{cat}[catalizzatore][S]}{K_M + [S]}$$

dove la costante K_M esprime l'affinità del substrato per il Composto II, mentre la costante k_{cat} è legata al suo potenziale e all'interazione con il substrato. All'aumentare della concentrazione di substrato la velocità aumenta fino al raggiungimento di un massimo corrispondente alla k_{cat} (condizione di saturazione del substrato). Dalla curvatura dell'andamento sperimentale si ricava la K_M.

L'attività pseudo-perossidasica dei sistemi modello ferroporfirinici si svolge con un meccanismo simile a quello che si trova nelle perossidasi:

$$HM + H_2O_2 \rightleftharpoons [HM / H_2O_2] \longrightarrow HM_{ox1} + H_2O \quad (1)$$

$$HM_{ox1} + SH \longrightarrow HM_{ox2} + S^{\cdot} + H^{+} \quad (2)$$

$$HM_{ox2} + SH + H^{+} \longrightarrow HM + S^{\cdot} + H_2O \quad (3)$$

L'emina (HM) reagisce col perossido a dare un addotto che evolve liberando una molecola d'acqua e la specie analoga al Composto I (HM_{OX1}). Questa specie reagisce con la prima molecola di substrato, formando il radicale, l'equivalente del Composto II (HM_{OX2}) e un protone. Nell'ultimo

step la specie ferro altovalente HM_{OX2} reagisce con una seconda molecola di substrato rigenerando l'emina nativa.

I substrati usati per questi studi sono l'acido 3-(4-idrossifenil)propionico (HPA), il 4-metilcatecolo (4-MC), substrati modello molto usati in letteratura per questo tipo di studio e la dopamina (DA), molecola dall'alta importanza in ambito biologico.

3.3.1 Studi attività perossidasica con substrato HPA

Il primo substrato usato per gli studi cinetici è l'acido 3-(4-idrossifenil)propionico (HPA), substrato di tipo fenolico che dà come prodotto di ossidazione un radicale che a sua volta genera una miscela di dimeri, la cui formazione porta ad un aumento della banda di assorbimento a 300 nm. Per questi studi sono stati utilizzati l'emina, come riferimento, ed il FeTCPC.

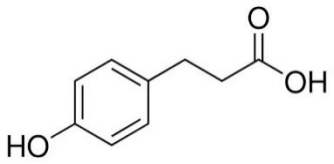


Fig.24 *Acido 3-(4-idrossifenil)propionico (HPA).*

3.3.1.1 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato HPA dalla concentrazione del perossido di idrogeno

La variazione della concentrazione di perossido di idrogeno ci permette di rendere lento il primo stadio del processo catalitico. Infatti, come spiegato in precedenza, a concentrazioni basse di perossido e concentrazioni alte di substrato (non ottimizzate) lo stadio 1 risulta lento e ciò permette di poter calcolare la k_1; inoltre, aumentando le concentrazioni di perossido, si può determinare la concentrazione saturante dello stesso che sarà utile negli studi successivi.

Si lavora quindi con concentrazioni variabili di perossido (da 0 a 50 mM), mantenendo costanti le concentrazioni di HPA (3 mM), emina (2 μM) e FeTCPC (2 μM). La concentrazione saturante di perossido si ricava dal grafico v/[cat] (s^{-1}) *vs* [H_2O_2] (M), dove le velocità sono calcolate dividendo la velocità iniziale in Abs/s ottenuta nel primo tratto lineare per la concentrazione del catalizzatore ed il coefficiente di estinzione molare del prodotto della reazione di ossidazione.

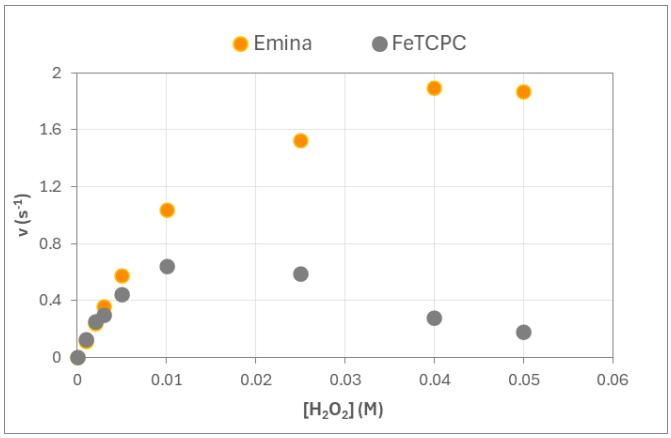
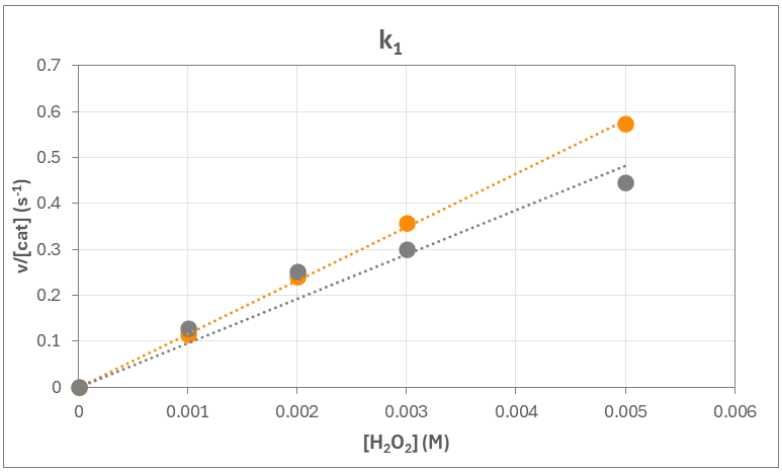


Fig.25 *Velocità di ossidazione del substrato HPA a concentrazioni variabili di H2O2 (da 0 a 50 mM) e concentrazioni costanti di HPA (3 mM), emina (2 µM) e FeTCPC (2 µM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*



	k_1 (M^{-1} s^{-1})
Emina	107 ± 2
FeTCPC	96 ± 6

Fig.26 *Grafico per la determinazione della costante cinetica k_1 per emina (in arancione) e FeTCPC (in grigio).*

Tab.3 *Valori di k_1 ottenuti in presenza di sola emina (in arancione) o FeTCPC (in grigio).*

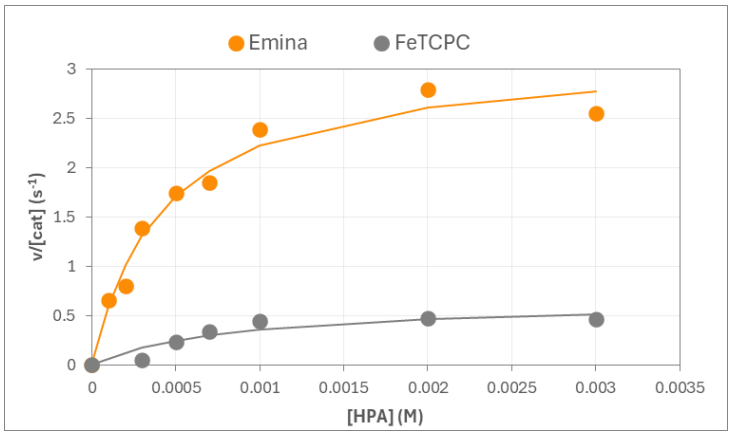
Inoltre, dalla Fig.26 si ottengono i seguenti valori saturanti di H_2O_2:

$[H_2O_2]_{saturante\text{-}emina}$ = 40 mM e **$[H_2O_2]_{saturante\text{-}FeTCPC}$** = 10 mM

Come si evince dalla Fig.25 e dalla Tab. 3, i due complessi di ferro mostrano un'efficienza paragonabile in termini di attivazione del perossido, ma la differenza principale sembra risiedere nella diversa stabilità del catalizzatore. Infatti, all'aumentare del perossido l'efficienza catalitica dell'emina aumenta fino a raggiungere un valore saturante oltre al quale l'eccesso di perossido accelera i processi di degradazione del catalizzatore; un simile andamento è riscontrabile anche in presenza del corrolo, ma in questo caso il complesso mostra una maggiore suscettibilità all'attacco del perossido, portando ad una degradazione più rapida del macrociclo.

3.3.1.2 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato HPA dalla concentrazione del substrato

Le concentrazioni saturanti di perossido sono fondamentali per studiare il terzo passaggio del ciclo catalitico dove la velocità deve essere indipendente dalla concentrazione di perossido, e la riduzione del Composto II diventa lo stadio determinante del processo.
Lo studio viene eseguito variando le concentrazioni di HPA (da 0.3 mM a 3 mM) e mantenendo costanti le concentrazioni di emina / FeTCPC (2 μM) e perossido di idrogeno (concentrazione saturante determinata nell'esperimento precedente, ovvero 40 mM per l'emina e 10 mM per il FeTCPC).
Dal grafico v/[cat] (s^{-1}) *vs* [HPA] (M) si determina la concentrazione saturante di substrato, che sarà pari a 2 mM per entrambi i catalizzatori.



	K_M x 10^{-4} (M)	k_{cat} (s^{-1})
Emina	4.3 ± 0.7	3.2 ± 0.2
FeTCPC	8.6 ± 4	0.7 ± 0.1

Fig.27 *Velocità di ossidazione del substrato HPA a concentrazioni variabili di HPA (da 0 a 3 mM) e concentrazioni costanti di H_2O_2 (40 mM per l'emina e 10 mM per il FeTCPC), emina / FeTCPC (2 µM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

Tab. 4 *Costanti cinetiche K_M e Vmax per l'emina e per il FeTCPC.*

L'andamento ottenuto è stato interpolato con l'equazione cinetica di tipo Michaelis-Menten che permette di ricavare le costanti cinetiche K_M e k_{cat}. Come evidenziato in Fig.27 e in Tab.4, l'efficienza catalitica dell'emina è nettamente maggiore a quella evidenziata con il corrolo, come si evince sia dal maggior valore della costante K_M, che indica una più bassa affinità per il substrato fenolico da parte del FeTCPC rispetto all'emina, e sia dal valore di k_{cat} maggiore per l'emina rispetto al corrolo. Tuttavia, si deve tenere presente che la deviazione standard associata a questo valore risulta essere piuttosto elevata. Tale divergenza nel comportamento pseudoperossidasico potrebbero essere dipendente dalla natura chimica del substrato, sia in termini di carica (tenendo presente la diversa carica del corrolo vs emina) e sia in termini di reattività (e protezione del catalizzatore vs H_2O_2). Di conseguenza, il medesimo studio è stato ripetuto con substrati chimicamente differenti, quali il 4-metilcatecolo e la dopamina.

3.3.2 Studi attività perossidasica con substrato 4-metilcatecolo

Il secondo substrato usato per gli studi cinetici è il 4-metilcatecolo (4-MC), un substrato catecolico facilmente ossidabile, il cui prodotto di ossidazione è il 4-metilchinone (Fig.28), il quale presenta una banda di assorbimento a 400 nm; durante le cinetiche è stata seguita la principale banda osservabile a 490 nm, corrispondente ad un prodotto dimerico solubile del 4-metilchinone.

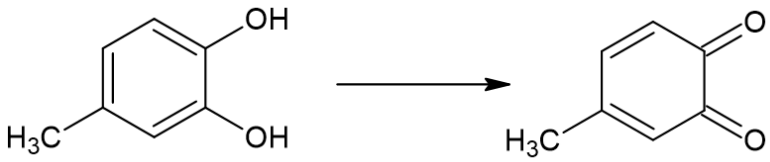


Fig.28 *Reazione di ossidazione del 4-metilcatecolo a 4-metilchinone.*

3.3.2.1 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo dalla concentrazione del perossido di idrogeno

Come per lo studio con il substrato HPA, anche in questo caso la variazione delle concentrazioni di perossido ci permette di rendere lento il primo step (a basse concentrazioni di perossido) per calcolare la k_1. Anche in questo caso sarà ricavata la concentrazione saturante di perossido.

Le cinetiche sono state eseguite variando la concentrazione di perossido (da 0 a 500 mM), mantenendo costanti le concentrazioni del substrato (1 mM, concentrazione saturante non ottimizzata), dell'emina (0.2 µM) e del FeTCPC (0.2 µM); la concentrazione del catalizzatore (1/10 rispetto a quella impiegata nello studio in presenza di HPA) tiene conto della maggiore reattività dei substrati catecolici rispetto a quelli fenolici. La concentrazione saturante di perossido di idrogeno e la costante k_1 sono ricavate come nello studio precedente.

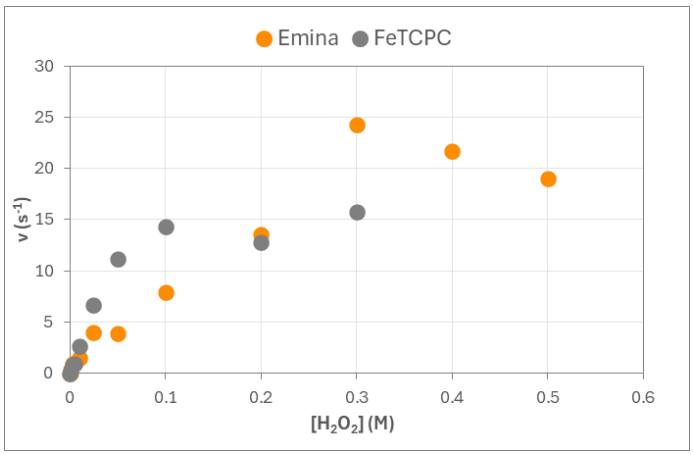
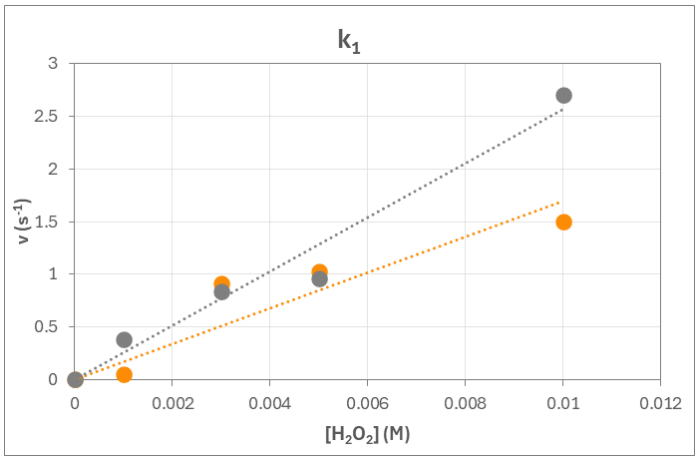


Fig.29 *Velocità di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo a concentrazioni variabili di H_2O_2 (da 1 mM a 500 mM) e concentrazioni costanti di 4-metilcatecolo (1 mM), emina / FeTCPC (0.2 µM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*



	k_1 (M^{-1} s^{-1})
Emina	170 ± 21
FeTCPC	267 ± 6

Fig.30 *Grafico utilizzato per la determinazione della costante cinetica k_1 per emina (in arancione) e FeTCPC (in grigio).*

Tab. 5 *Valori di k_1 ottenuti in presenza di sola emina (in arancione) o FeTCPC (in grigio).*

Dalle costanti (Tab. 5) ricavate dal grafico mostrato in Fig.30 si evince che il valore della k_1 del FeTCPC risulta più alto, ad indicare una maggiore efficienza nella reazione di attivazione del perossido di idrogeno rispetto all'emina. Tale andamento potrebbe dipendere dal fatto che la presenza del 4-metilcatecolo (che è un substrato maggiormente reattivo rispetto all'HPA) possa proteggere maggiormente il catalizzatore (a basse concentrazioni di perossido), rendendolo più efficiente nella reazione di ossidazione. D'altra parte, la presenza di un largo eccesso di perossido porta ad un crollo nell'attività catalitica, indice della parziale degradazione del catalizzatore (in particolare, del corrolo, a causa della sua maggiore instabilità).

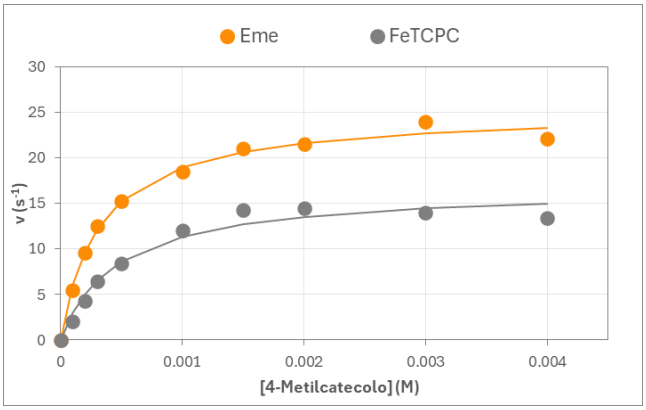
La Fig.30 permette inoltre di ricavare i valori di concentrazione saturante di perossido di idrogeno da usare utilizzare successivamente:

$$[H_2O_2]_{saturante\text{-}emina} = 400 \text{ mM e } [H_2O_2]_{saturante\text{-}FeTCPC} = 100 \text{ mM}$$

3.3.2.2 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo dalla concentrazione del substrato

Le concentrazioni di perossido saturanti sono usate nello studio successivo in cui varia la concentrazione del substrato 4-metilcatecolo (da 0 a 4 mM) e mantenendo costanti le concentrazioni di emina / FeTCPC (0.2 µM) e di perossido di idrogeno.

Dal grafico v/[cat] (s^{-1}) *vs* [4-metilcatecolo] (M) si determina la concentrazione saturante del substrato, che in tutti e due i casi sarà 3 mM.



	K_M x 10^{-4} (M)	k_{cat} (s^{-1})
Emina	3.2 ± 0.3	25 ± 0.5
FeTCPC	4.7 ± 0.9	17 ± 0.9

Fig.31 *Velocità di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo a concentrazioni variabili di 4-metilcatecolo (da 0.1 mM a 4 mM) e concentrazioni costanti di H_2O_2 (400 mM per l'emina e 100 mM per il FeTCPC), emina / FeTCPC (0.2 µM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

Tab. 6 *Costanti cinetiche K_M e k_{cat} per l'emina (in arancione) e per il FeTCPC (in grigio).*

Le costanti cinetiche K_M e k_{cat} sono ottenute fittando il grafico mostrato in Fig.31 e utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten. Sebbene l'impiego del 4MC sembri favorire parzialmente l'interazione del centro metallico con il perossido, i valori delle costanti cinetiche ottenute (come mostrato in Tab. 6) non si discostano molto dai dati ottenuti in precedenza sul substrato fenolico. Infatti, il corrolo appare meno efficiente sia in termini di interazione col substrato stesso (K_M maggiore rispetto all'emina) sia in termini di reattività massima (l'emina possiede una k_{cat} più alta).

3.3.3 Studi attività perossidasica con substrato dopamina

L'ultimo substrato usato per gli studi cinetici è la dopamina, una catecolammina che svolge in vivo la funzione di neurotrasmettitore; per via della sua rilevanza biologica, è un substrato di studio molto importante. In vivo, livelli anomali di dopamina sono correlati a patologie neurodegenerative come il morbo di Parkinson. L'ossidazione della dopamina genera inizialmente il dopachinone (Fig.32) che risulta facilmente ossidabile, formando il dopamminocromo. Quest'ultimo risulta più stabile ed è quindi possibile seguire la formazione della sua banda di assorbimento a 475 nm durante gli studi cinetici.

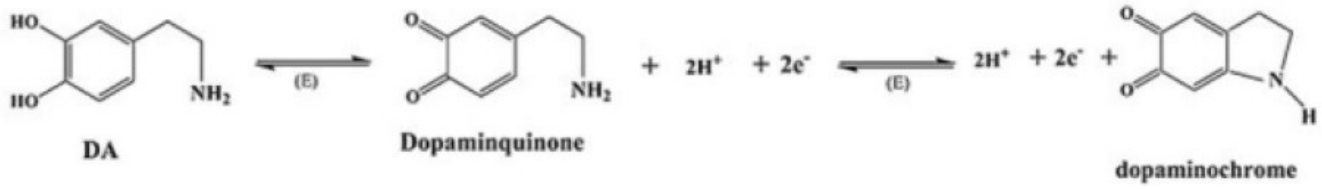


Fig.32 *Reazione di ossidazione della dopamina.*

3.3.3.1 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato dopamina dalla concentrazione del perossido di idrogeno

Anche in questo caso, come negli studi precedenti per l'HPA e per il 4-metilcatecolo, la prima fase consiste nello studiare la dipendenza della velocità di reazione dalla concentrazione di perossido di idrogeno e ricavare la costante cinetica k_1 e la concentrazione saturante di perossido di idrogeno per emina e FeTCPC.

Le cinetiche sono state eseguite variando la concentrazione di perossido (da 0 a 500 mM) e mantenendo costanti le concentrazioni del substrato (1 mM, concentrazione saturante non ottimizzata), dell'emina (0.2 μM) e del FeTCPC (0.2 μM).

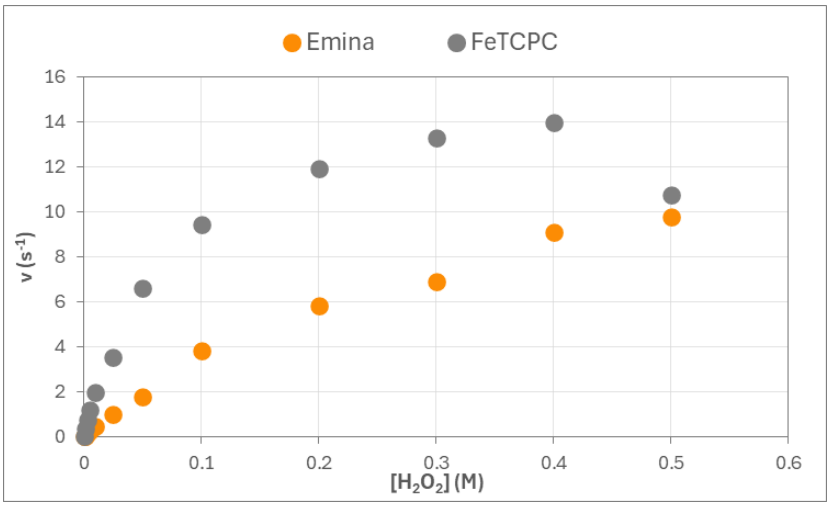
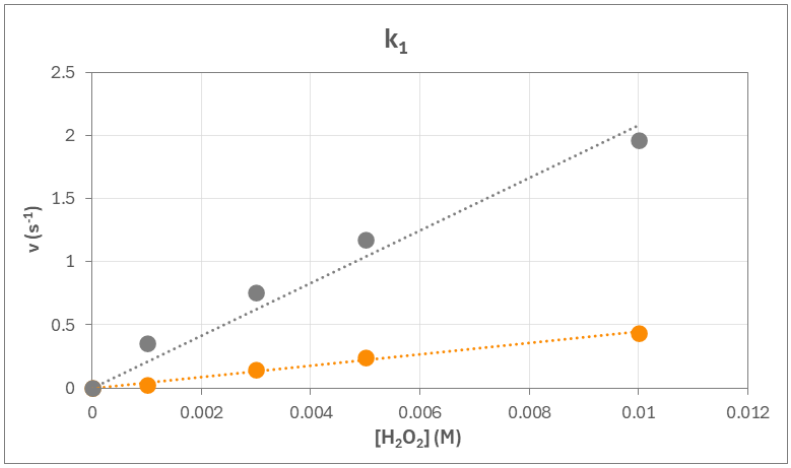


Fig.33 *Velocità di ossidazione del substrato dopamina a concentrazioni variabili di H_2O_2 (da 0 a 600 mM) e concentrazioni costanti di dopamina (1 mM), emina / FeTCPC (0.2 µM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*



	k_1 (M^{-1} s^{-1})
Emina	40 ± 1
FeTCPC	208 ± 11

Fig.34 *Grafico utilizzato per la determinazione della costante cinetica k_1 per emina (in arancione) e FeTCPC (in grigio).*

Tab. 7 *Valori di k_1 ottenuti in presenza di emina (in arancione) o FeTCPC (in grigio).*

Come si può notare dalla Fig.34 e dalla Tab. 7, la costante k_1 risulta più alta per il FeTCPC rispetto all'emina, analogamente ai dati ottenuti nello studio precedente con il 4-metilcatecolo. Ne consegue che la maggiore attivazione del perossido da parte del corrolo è strettamente correlata alla reattività

intrinseca del substrato ed alla capacità dello stesso di diminuirne la suscettibilità all'ossidazione (con preferenza verso i catecoli rispetto ai fenoli).

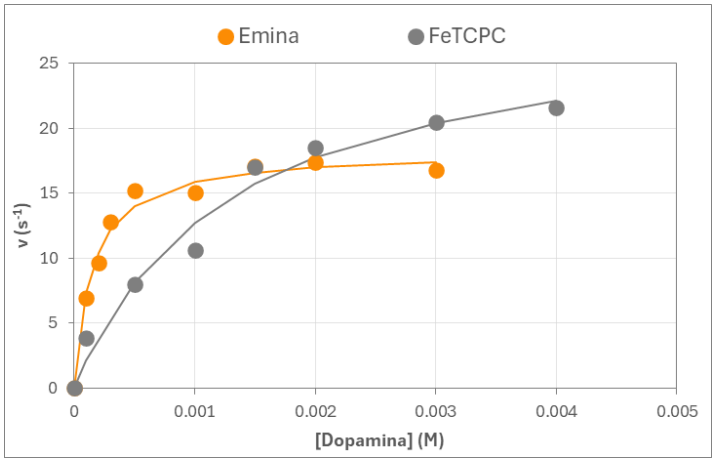
La Fig.33 permette anche di ricavare i valori di perossido di idrogeno saturanti:

$$[H_2O_2]_{saturante\text{-}emina} = 500 \text{ mM e } [H_2O_2]_{saturante\text{-}FeTCPC} = 400 \text{ mM}$$

3.3.3.2 Dipendenza della velocità di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo dalla concentrazione del substrato

Le concentrazioni saturanti di perossido di idrogeno ottenute nello studio precedente permettono di svolgere un'ulteriore analisi in cui si varia la concentrazione di substrato per ottenere le costanti cinetiche K_M e k_{cat}. In questo studio viene fatta variare la concentrazione di dopamina (da 0.1 mM a 4 mM) mantenendo costanti le concentrazioni di emina / FeTCPC (0.2 µM) e di perossido (concentrazioni saturanti, 500 mM per l'emina e 400 mM per il FeTCPC).

Dal grafico v/[cat] (s^{-1}) *vs* [dopamina] (M) si evince che la concentrazione saturante del substrato è 2 mM per l'emina e 4 mM per il FeTCPC.



	K_M x 10^{-4} (M)	k_{cat} (s^{-1})
Emina	1.5 ± 0.2	18 ± 0.5
FeTCPC	12 ± 4	29 ± 3

Fig.35 *Velocità di ossidazione del substrato dopamina a concentrazioni variabili di substrato (da 0.1 mM a 4 mM) e concentrazioni costanti di H_2O_2 (500 mM per l'emina e 400 mM per il FeTCPC), emina / FeTCPC (0.2 µM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

Tab. 8 *Costanti cinetiche K_M e k_{cat} per l'emina (in arancione) e per il FeTCPC (in grigio).*

In questo caso il FeTCPC presenta sia la costante K_M che la k_{cat} maggiori rispetto a quelle dell'emina. Ne consegue che, nonostante l'interazione del Fe-corrolo col substrato sia sempre sfavorita rispetto all'emina (probabilmente per la minore accessibilità alle posizioni assiali dello ione ferro se inserito nell'anello corrolico rispetto ad una classica porfirina), l'attività di FeTCPC viene in questo caso promossa grazie alla maggiore efficienza del substrato catecolamminico nel proteggere il catalizzatore.

3.4 Studi di attività catalasica

La catalasi è un enzima molto presente in natura che catalizza la reazione di disproporzionamento del perossido di idrogeno ad acqua e ossigeno, trasformando quindi una molecola potenzialmente tossica come H_2O_2 in molecole non dannose; per questo motivo la catalasi è un enzima fondamentale nella protezione cellulare contro lo stress ossidativo. Esistono 3 classi di catalasi:

- catalasi monofunzionali contenenti eme
- catalasi-perossidasi contenenti eme, come la catalasi umana e alcune catalasi batteriche; le due si distinguono per il quinto legante del ferro, che nel caso dell'enzima umano è una tirosina, mentre per quello batterico il legante è una istidina [15][16]
- catalasi contenenti manganese, presenti nei batteri. [17]

La catalasi umana è composta da un tetramero composto da quattro subunità suddivise in 4 domini. Ogni subunità contiene quattro gruppi eme. La reazione avviene in due step (P indica l'anello porfirinico):

$$(1)\quad H_2O_2 + P\text{-}Fe^{3+} \rightarrow H_2O + P^{(\cdot+)}\text{-}Fe^{4+}{=}O$$

$$(2)\quad H_2O_2 + P^{(\cdot+)}\text{-}Fe^{4+}{=}O \rightarrow P\text{-}Fe^{3+} + O_2$$

La catalasi si trova principalmente negli epatociti a livello dei perossisomi, organelli che ossidano molecole organiche, principalmente acidi grassi e amminoacidi, producendo perossido di idrogeno che verrà poi degradato appunto dalla catalasi. La catalasi risulta localizzata anche a livello del citosol dei globuli rossi.

In questo studio viene utilizzato come substrato il sale di diammonio-2,2'-azinobis[acido 3-etilbenzotiazolin-6-solfonico] (ABTS), utilizzato perché il prodotto della sua ossidazione, il radicale $ABTS^{\cdot+}$, presenta una banda di assorbimento facilmente rilevabile a 660 nm. Inoltre, oltre al FeTCPC sono stati utilizzati anche altri sistemi porfirinici come il 5,10,15-tris(4-

carboxyphenyl)corrolato di manganese(III) (MnTCPC), il 5,10,15-tris(4-pyridyl)corrolato di manganese(III) (MnTPC), il 5,10,15-tris(4-metilpyridyl)corrolato di manganese(III) e una texafirina al manganese che presenta un sostituente carbossilico.

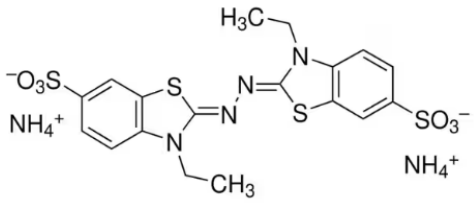


Fig.36 *Sale di diammonio-2,2'-azinobis[acido 3-etilbenzotiazolin-6-solfonico].*

L'esperimento è condotto facendo incubare per dieci minuti in cuvetta il perossido di idrogeno con i composti di cui si intende verificare l'attività catalasica; i composti che presentano attività catalasica andranno a disproporzionare il perossido impedendo l'ossidazione dell'ABTS. Come sistema di riferimento viene utilizzata la catalasi da fegato bovino. Qualitativamente si può osservare la comparsa di bolle nei composti con attività catalasica più elevata, sintomo della formazione di ossigeno.

Una volta terminato il tempo di incubazione viene aggiunto in cuvetta il substrato, l'ABTS, ed un enzima perossidasico che catalizzi la reazione di ossidazione dell'ABTS. In questo studio è stata usata la perossidasi da rafano (HRP), enzima perossidasico molto studiato e disponibile commercialmente. Per sistemi che presentano una elevata attività catalasica si noterà una minore ossidazione del substrato, che risulterà minima nel caso della catalasi da fegato bovina e massima nel caso in cui nessun sistema con attività catalasica venga incubato nella miscela di reazione.

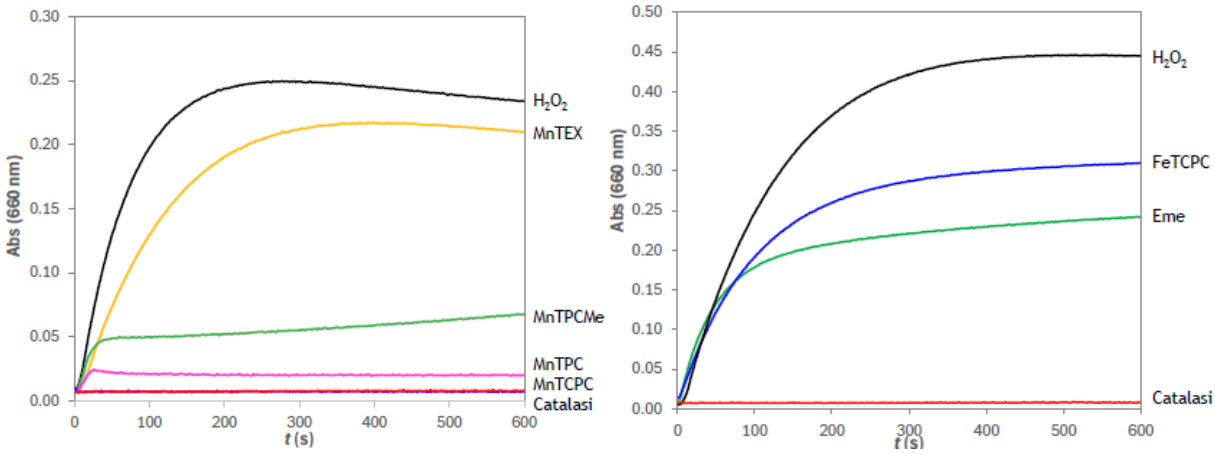


Fig.37 *Profili di ossidazione dell'ABTS (0.1 mM), in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4; a sinistra sono riportati i sistemi contenenti manganese, a destra quelli contenenti ferro (concentrazioni catalizzatori 0.1 µM).*

Come si può notare dai grafici in Fig.37, tutti i sistemi presentano parziale attività catalasica; i migliori sistemi risultano essere i manganese-corroli, mentre nei sistemi contenenti ferro il FeTCPC risulta essere leggermente meno efficiente dell'emina, a parità di concentrazione. La manganese-texafirina è il sistema che presenta minore attività catalasica.

3.5 Ossidazione dell'ascorbato di sodio

L'ascorbato di sodio è il substrato scelto per questo studio perché presenta una reattività diversa (in termini di potenziale redox e meccanismo di reazione) rispetto a quella dei substrati usati in precedenza, ovvero fenoli e catecoli, ed è una fonte di specie ROS; esso inoltre è ampiamento utilizzato in studi riportati in letteratura, in particolare in presenza di ioni rame. [18] Il rame, infatti, catalizza la formazione di ROS, passando dalla sua forma Cu(I) a Cu(II); l'ascorbato di sodio ossidandosi andrà a rigenerare la forma del Cu(I), che riprenderà la produzione di ROS, seguendo il ciclo di Fenton/Haber-Weiss (Fig.1, capitolo introduttivo)

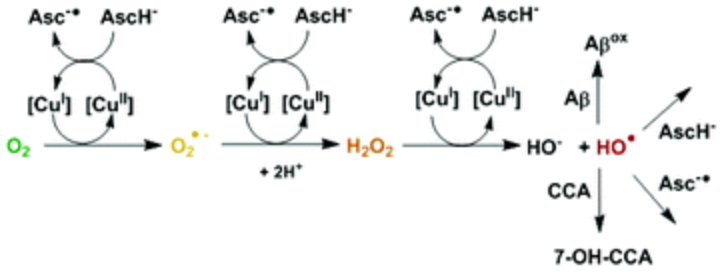


Fig.38 *Meccanismo di produzione di ROS da parte del sistema Cu/O_2/ascorbato di sodio.*

L'ascorbato presenta una banda di assorbimento caratteristica e molto intensa a 265 nm; la diminuzione di questa banda dovuta alla sua ossidazione può essere facilmente monitorata durante uno studio cinetico.

Lo scopo dello studio è quello di identificare quanto i complessi porfirinoidi usati, corroli al ferro e al manganese, siano efficaci come *scavengers* di specie reattive all'ossigeno generate dal sistema Cu/O_2/ascorbato. Per i sistemi migliori sarà evidente una minore ossidazione dell'ascorbato rispetto al solo rame.

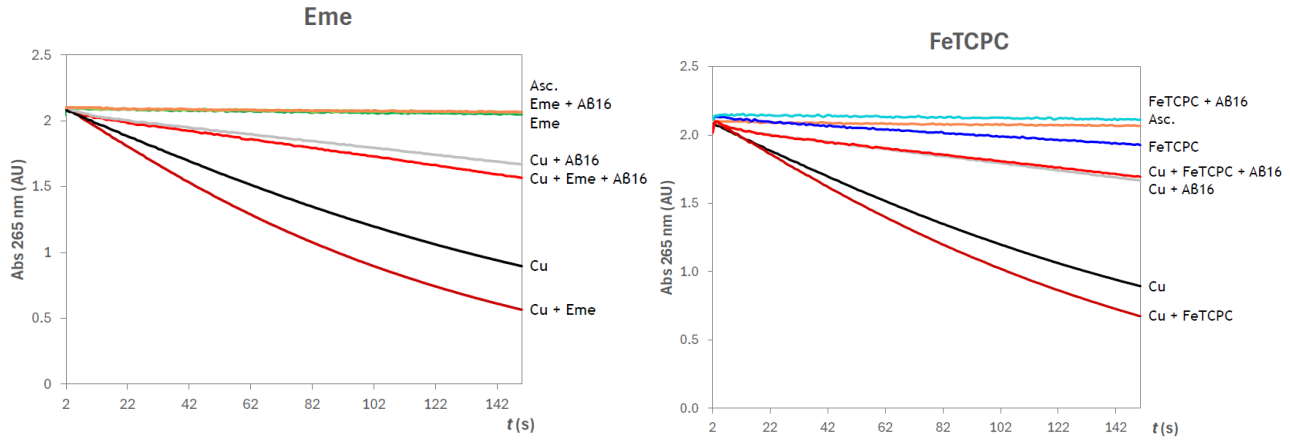


Fig.39 *Grafici relativi all'ossidazione dell'ascorbato in presenza di Cu^{2+} (20 µM), emina (4 µM, a sinistra), FeTCPC (4 µM, a destra) e peptide Aβ16 (20 µM), in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

Come si può notare dai grafici, la presenza dei complessi di ferro sembra potenziare leggermente l'ossidazione dell'ascorbato promossa principalmente dal rame. Come osservato in studi precedenti, [15] l'aggiunta del peptide Aβ16 con la conseguente coordinazione al rame determina una diminuzione della velocità di ossidazione dell'ascorbato, dovuta principalmente alla capacità del peptide di coordinare il catalizzatore e stabilizzarne lo stato ossidato (ostacolandone la riduzione a Cu(I)).

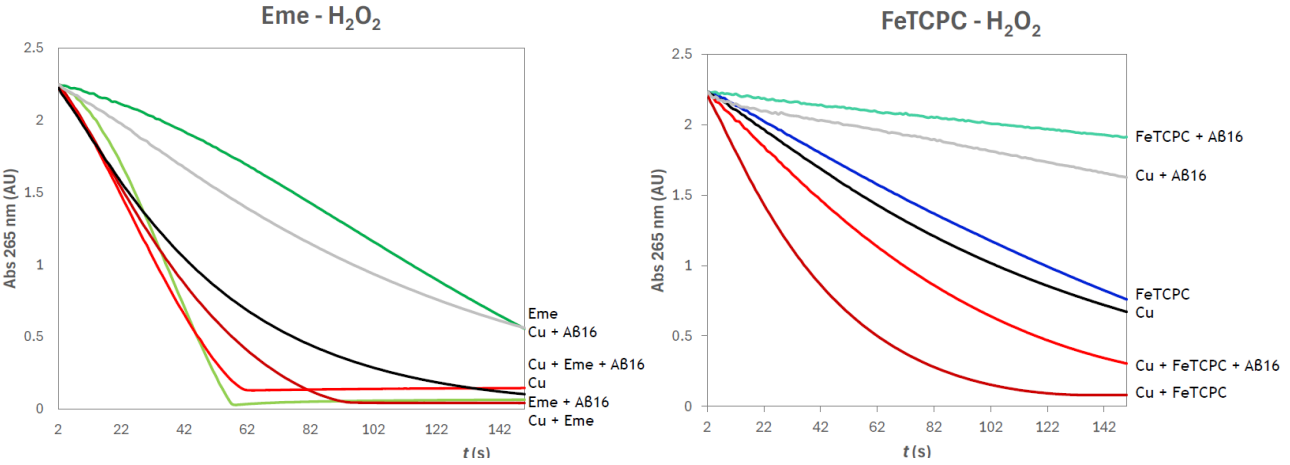


Fig.40 *Grafici relativi all'ossidazione dell'ascorbato in presenza di Cu^{2+} (20 µM), emina (4 µM, a sinistra), FeTCPC (4 µM, a destra), peptide Aβ16 (20 µM) e perossido di idrogeno (1 mM), in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

Lo studio è stato ripetuto aggiungendo perossido di idrogeno per potenziare la produzione di ROS. In queste condizioni, la promozione della produzione di ROS a partire dal substrato riducente viene maggiormente promossa dalla presenza dei complessi di ferro. Di conseguenza, tutti i sistemi di

ferro impiegati non sembrano avere alcuna attività *scavenging*, anzi sembrano promuovere il danno ossidativo.

Inoltre, comparando il comportamento dell'emina e del FeTCPC, le maggiori differenze nei dati cinetici si osservano quando all'ambiente di reazione è aggiunto il peptide Aβ16, in quanto il complesso emina/Aβ16 si evidenzia maggiormente efficiente nella reazione con l'ascorbato rispetto all'addotto FeTCPC/Aβ16. Di conseguenza, tale studio suggerisce la necessità di saggiare la reattività di tali sistemi anche in presenza di una molecola coordinante, come il peptide Aβ16, poiché la coordinazione assiale nel caso del corrolo potrebbe (differentemente dall'emina) ulteriormente sfavorire l'accessibilità al substrato/transfer elettronico.

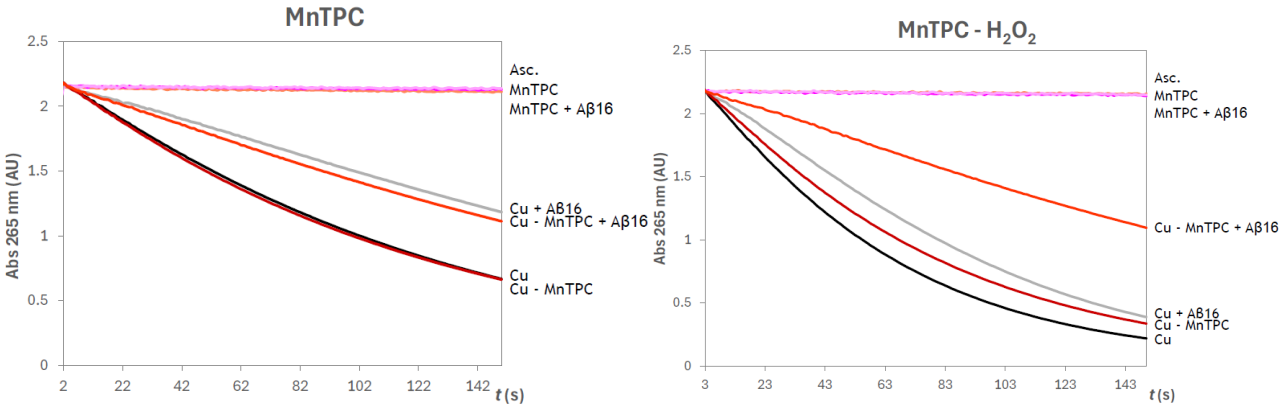


Fig.41 *Grafici relativi all'ossidazione dell'ascorbato in presenza di Cu^{2+} (20 μM), MnTPC (4 μM), peptide Aβ16 (20 μM) e perossido di idrogeno (1 mM, a destra), in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

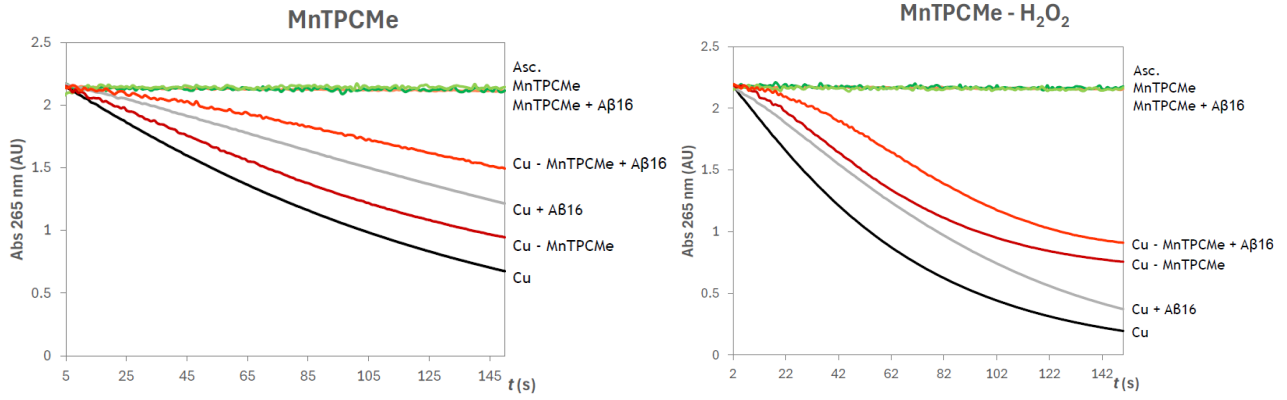


Fig.42 *Grafici relativi all'ossidazione dell'ascorbato in presenza di Cu^{2+} (20 μM), MnTPCMe (4 μM), peptide Aβ16 (20 μM) e perossido di idrogeno (1 mM, a destra), in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

La Fig.41 mostra invece lo stesso esperimento in presenza del manganese-corrolo MnTPC. Come si può notare dal grafico di sinistra la presenza di MnTPC non ha particolari effetti sull'azione promossa dal rame. Inoltre, in presenza di H_2O_2, l'addotto MnTPC/Aβ16 non è in grado di attivare

il perossido di idrogeno per indurre l'ossidazione dell'ascorbato, a differenza di quanto osservato per FeTCPC.

La presenza del complesso MnTPCMe (Fig.42) induce invece una diminuzione della produzione di ROS catalizzata da ioni rame e questo effetto risulta potenziato in presenza del peptide Aβ16. Questo effetto si mantiene anche in presenza di perossido idrogeno. Si conclude quindi che l'addotto MnTPCMe/Aβ16 risulta essere il migliore in termine di protezione dal danno ossidativo.

Infine, sia MnTCPC da solo che l'addotto MnTCPC/peptide (Fig.43) non sembrano avere significativa attività di *scavenging*.

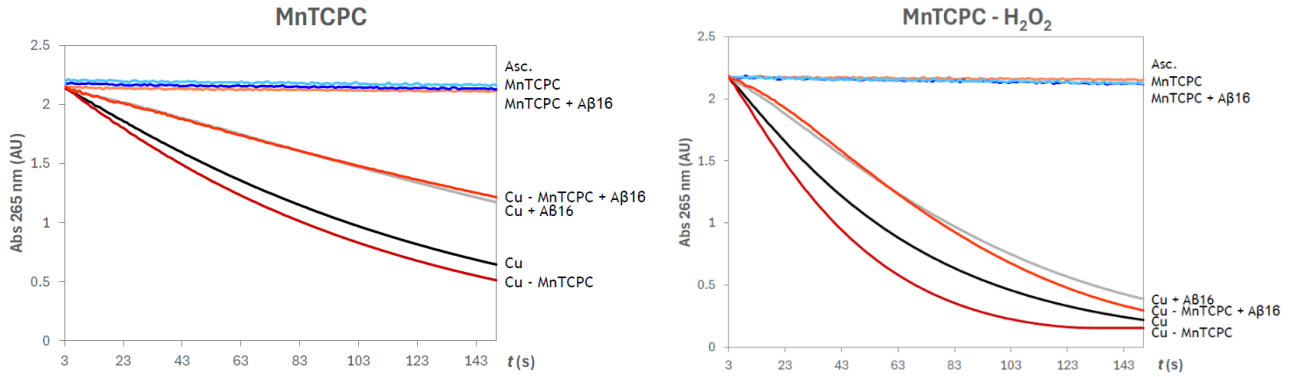


Fig.43 *Grafici relativi all'ossidazione dell'ascorbato in presenza di Cu^{2+} (20 μM), MnTCPC (4 μM), peptide Aβ16 (20 μM) e perossido di idrogeno (1 mM, a destra), in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

3.5.1 Identificazione dei frammenti del peptide Aβ16 mediante HPLC/MS

Un altro sistema per valutare l'attività di *scavengers* dei complessi porfirinoidi è la valutazione delle modifiche ossidative a danno di un target sacrificale, come per esempio il peptide Aβ16. In presenza di ROS, il peptide potrebbe essere attaccato da specie ossidanti in corrispondenza di siti particolarmente suscettibili, portando ad un accumulo nel tempo di diverse modifiche ossidative. Valutando la percentuale di peptide che subisce queste modifiche si può capire quanto un complesso porfirinoide possa agire da *scavenger*. La modifica ossidativa più probabile ai danni del peptide è l'ossidazione ai danni delle istidine e della tirosina, modifiche che portano ad un incremento della massa di +16 a.m.u.

Di seguito è riportata la sequenza del peptide Aβ16, con evidenziate i residui suscettibili all'ossidazione:

DAEFRHDSGYEVHHQK

Questo studio è effettuato mediante l'uso di una HPLC accoppiata ad uno spettrofotometro di massa. Come prima cosa è stata valutata l'ossidazione del peptide in assenza di sistemi potenzialmente *scavengers* di ROS (Fig.44). Nelle Fig.45, Fig.46, Fig.47 e Fig.48 sono riportati i cromatogrammi relativi all'ossidazione del peptide in presenza dei sistemi corrolici. Nella Tab.9 sono riportate le percentuali delle modifiche ossidative ai danni del peptide Aβ16, in assenza ed in presenza dei sistemi corrolici.

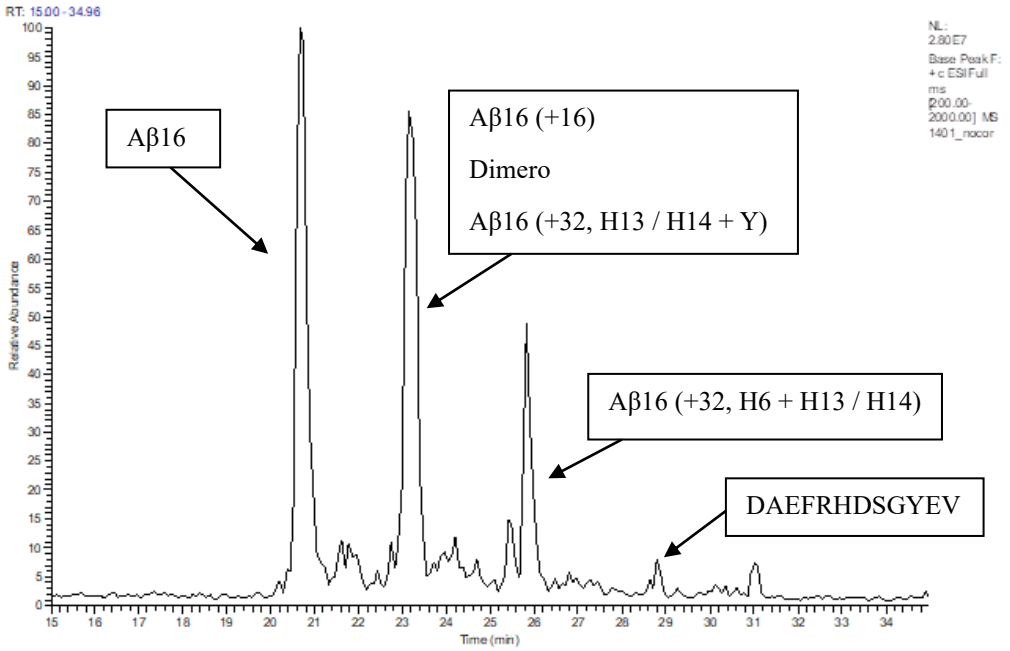


Fig.44 *Profilo di eluizione HPLC-MS di Aβ16 (20 µM), incubato per due ore in presenza di* Cu^{2+} *(20 µM) e ascorbato di sodio (15 mM).*

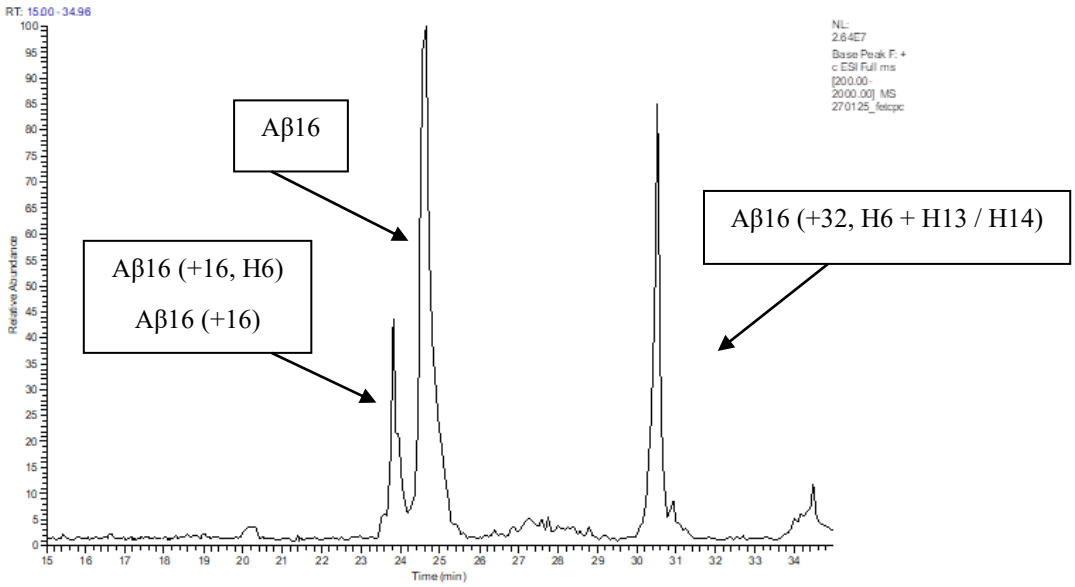


Fig.45 *Profilo di eluizione HPLC-MS di Aβ16 (20 µM), incubato per due ore in presenza di Cu2+ (20 µM), ascorbato (15 mM) e FeTCPC (4 µM).*

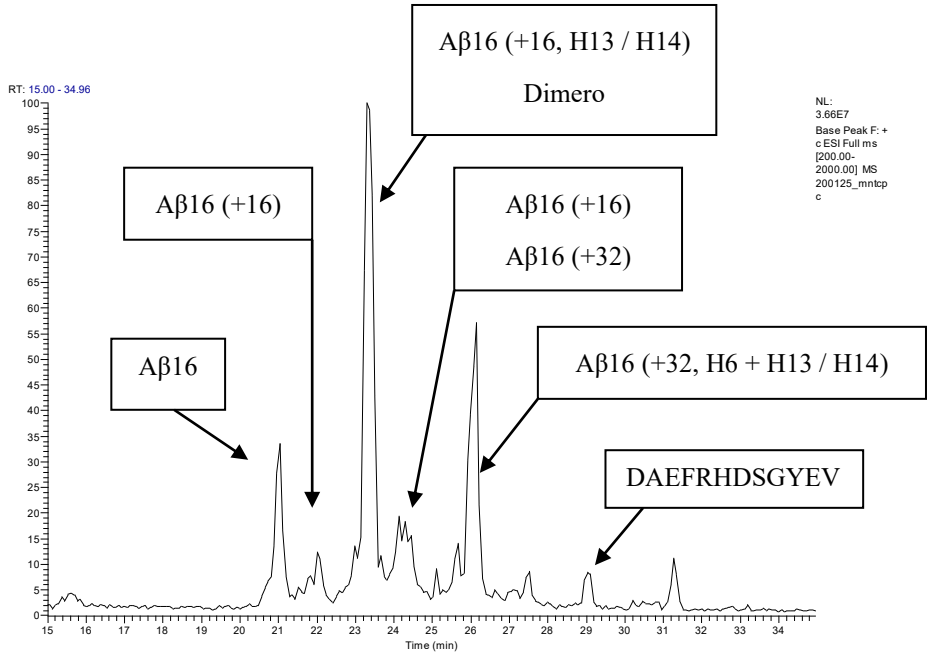


Fig.46 *Profilo di eluizione HPLC-MS di Aβ16 (20 µM), incubato per due ore in presenza di Cu2+ (20 µM), ascorbato (15 mM) e MnTCPC (4 µM).*

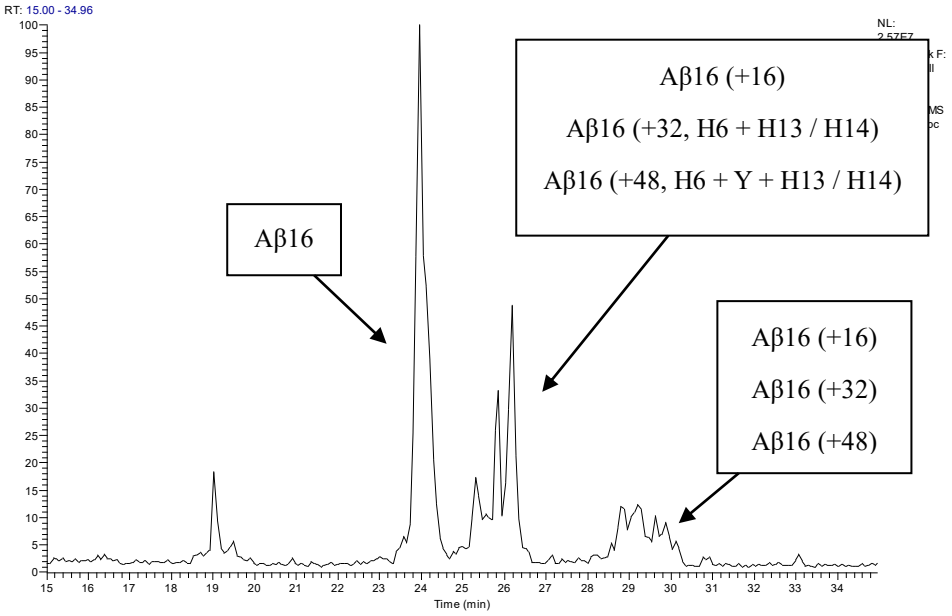


Fig.47 *Profilo di eluizione HPLC-MS di Aβ16 (20 µM), incubato per due ore in presenza di Cu2+ (20 µM), ascorbato (15 mM) e MnTPC (4 µM).*

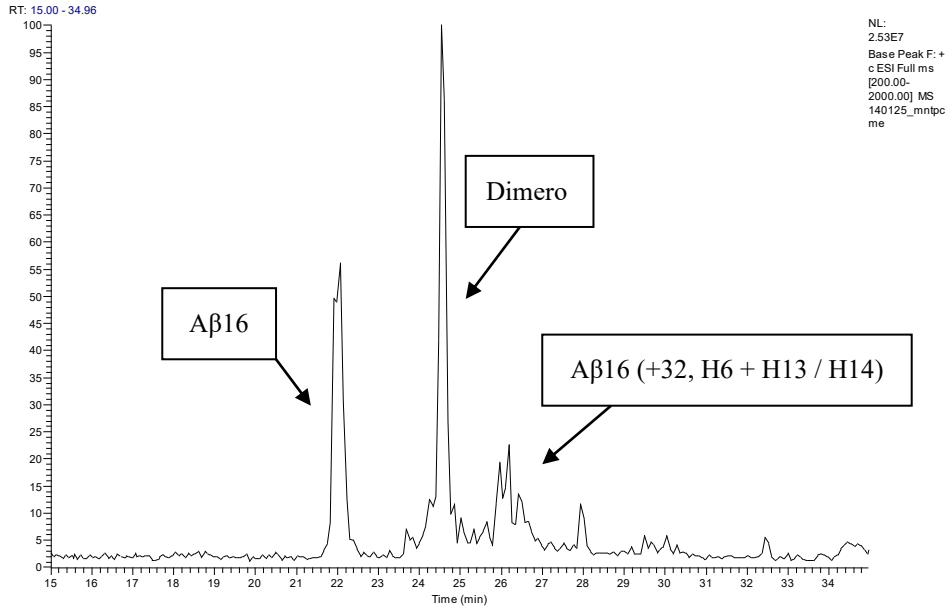


Fig.48 *Profilo di eluizione HPLC-MS di Aβ16 (20 µM), incubato per due ore in presenza di Cu2+ (20 µM), ascorbato (15 mM) e MnTPCMe (4 µM).*

	No Corrolo	FeTCPC	MnTCPC	MnTPC	MnTPCMe
Non modificato	**37%**	**26%**	**19%**	**36%**	**72%**
+16	**32%**	**46%** (di cui 11.6% su H6)	**48%** (di cui 39.6% su H13 / H14)	**25%**	
+32	**3%** (H13 /H14 + Y) **13%** (H6 + H13 /H14)	**30%** (H6 + H13/H14)	**29%** (di cui 27.1% su H6 + H13/H14)	**33%** (di cui 28.5% su H6 + H13 / H14)	**11%** (H6 + H13 / H14)
+48				**7%** (di cui 3.4% su H6 + Y + H13/H14)	
Dimero	**4%**		**4%**		**18%**
Frammento 1-12	**11%**		**2%**		

Tab.9 *Percentuali di ossidazione del peptide Aβ16 in assenza e in presenza dei sistemi porfirinoidi. Tra parentesi sono riportati i frammenti indentificati, dove (His13 / His14) indica ossidazione presente su una delle due istidine presenti nella zona N-terminale.*

Il calcolo delle aree dei vari picchi ha permesso ricavare le percentuali relative alle varie specie modificate riportate in Tab.9 nelle varie condizioni. In assenza del sistema porfirinico, il peptide viene significativamente attaccato dai ROS prodotti dal sistema Cu/Asc, portando sia all'ossidazione che alla frammentazione del peptide stesso in seguito a tempi relativamente brevi di incubazione (90 min). A differenza dei dati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio di ricerca,[19] il sito di ossidazione preferenziale in presenza del sistema Cu/Asc non si limita al tandem istidinico ma coinvolge significativamente anche l'istidina 6 (generalmente riconosciuta come sito accessorio per lo ione rame). L'aggiunta di FeTCPC, MnTCPC o MnTPC sembra influenzare solo parzialmente il pattern di modificazione del peptide, principalmente influenzando la suscettibilità del peptide alla frammentazione. D'altra parte, si può osservare che il sistema migliore in termini di protezione dalle specie reattive all'ossigeno risulta essere il MnTPCMe (Fig.47), in accordo con quanto riscontrato nelle cinetiche di ossidazione dell'ascorbato (Fig.42). Tale corrolo sembra portare ad una importante riduzione delle specie ossidate presenti nella miscela di ossidazione (a parità di tempo di incubazione), impendendo, in particolare, la conversione del residuo di tirosina in 3-idrossitirosina; sfortunatamente, tale meccanismo aumenta la suscettibilità del peptide a dare specie dimeriche generate dal cross-linking tra residui di tirosine di due catene peptidiche.

4. Conclusioni

Le patologie neurodegenerative sono caratterizzate dalla comparsa di placche causate dall'aggregazione di proteine β-amiloidi o proteina tau. La presenza di queste placche è strettamente legata all'aumentare dello stress ossidativo. È noto in letteratura che l'aumento di eme libero porti all'innalzamento dello stress ossidativo stesso e dell'aggregazione di questi peptidi neuronali. Inoltre, il complesso tra l'eme ed i peptidi β-amiloidi è dotato di attività perossidasica che porta all'ossidazione di diversi substrati di interesse biologico, come la dopamina.

In questa tesi ci si è concentrati sullo studio di molecole porfirinoidi che potessero portare dei vantaggi rispetto all'eme in una duplice direzione: da un lato si tenta di ottenere sistemi con attività ossidativa potenziata con la finalità di proporre nuovi catalizzatori, dall'altro si studiano complessi che invece possano essere impiegati come sistemi antiossidanti potenzialmente terapeutici per patologie associate allo stress ossidativo. Per prima cosa è stata studiata l'entità del legame tra un frammento del peptide β-amiloide composto dei primi sedici amminoacidi, Aβ16, ed un sistema porfirinoide, il 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di ferro (FeTCPC). Da questo studio è risultato che il corrolo FeTCPC lega il peptide amiloide formando il complesso con stechiometria 1:1 con costante K_1 simile a quella ottenuta con l'emina (~5 x 10^6 M^{-1}), mentre la formazione del complesso 1:2 risulta fortemente sfavorita, presentando una costante K_2 di circa 50 volte minore, al contrario di quello che avviene con emina. La scarsa affinità per la formazione del complesso 1:2 si rivela un dato positivo in quanto la formazione del complesso 1:2 è strettamente legata con l'aggregazione dei peptidi e la formazione delle placche.

Oltre agli studi di binding sono stati effettuati anche studi di reattività. Usando sempre come riferimento l'emina, è stata valutata l'attività perossidasica del FeTCPC verso substrati modello, come l'acido 3-(4-idrossifenil)propionico (HPA) ed il 4-metilcatecolo (4-MC) e substrati di interesse biologico come la dopamina (DA). Da questi studi risulta che il FeTCPC è un catalizzatore meno efficiente rispetto all'emina sia in termini di interazione con i substrati fenolici e/o catecolici sia in termini di attività massima. Le differenze di reattività riscontrate in presenza dei diversi substrati sembrano essere correlate alla capacità della molecola (maggiore per i catecoli rispetto ai fenoli) a competere nella reazione di ossidazione diretta sul catalizzatore stesso. In generale, il FeTCPC si è dimostrato maggiormente suscettibile alla degradazione ROS-mediata rispetto all'emina.

Una volta terminati gli studi di attività perossidasica ci si è concentrati su un altro tipo di reattività, l'attività di tipo catalasica. *In vivo* la catalasi è un enzima contenente ferro o manganese in grado di detossificare dalle specie reattive all'ossigeno mediante la disproporzione del perossido di idrogeno.

Usando come riferimento la catalasi da fegato di bovino, è stata valutata l'attività di quattro sistemi corrolico, il FeTCPC, di cui era già stata valutata l'attività perossidasica e quattro sistemi contenenti manganese: 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di manganese (MnTCPC) (Fig.6 (b)); 5,10,15-tris(4-piridil)corrolato di manganese (MnTPC) (Fig.6 (c)); 5,10,15-tris(4-metilpiridil)corrolato di manganese (MnTPCMe) (Fig.6 (d)); manganese-texafirina carbossilato (MnTEXCOOH) (Fig.6 (e). L'attività catalasica è stata valutata seguendo la banda di formazione del prodotto di ossidazione del sale di diammonio-2,2'-azinobis[acido 3-etilbenzotiazolin-6-solfonico] (ABTS).

Da questo studio si è potuto osservare come i tre sistemi corrolici al manganese presentano un'ottima attività catalasica. Per la texafirina al manganese non si osserva un'attività catalasica apprezzabile mentre confrontando emina e FeTCPC, il corrolo risulta il sistema con minore attività.

L'ultimo studio effettuato permette di valutare la capacità dei sistemi corrolici di agire come *scavengers* di specie reattive all'ossigeno. Utilizzando il sistema Cu/O_2/ascorbato, è possibile generare specie reattive all'ossigeno, che andranno ad ossidare il peptide Aβ16. Inserendo nel sistema i macrocicli corrolici, è possibile valutare quanto questi agiscano da *scavenger* di ROS, quantificando le modifiche ossidative ai danni del peptide. Il risultato finale ci permette di indicare il MnTPCMe come il miglior *scavenger*, per via del fatto che il peptide subisce meno modifiche ossidative in sua presenza.

In conclusione, l'analisi dei macrocicli porfirinoidi condotta in questo studio ha evidenziato diverse caratteristiche promettenti; partendo dai sistemi al ferro, il FeTCPC è in grado di legare i peptidi amiloidi e presenta scarsa affinità per la formazione del complesso macrociclo:peptide 1:2, complesso che invece è promosso in presenza di emina e che favorisce l'aggregazione del peptide e la formazione di placche. Sfortunatamente il FeTCPC presenta attività perossidasica generale minore rispetto a quella dell'emina. I corroli al manganese, invece, presentano tutti un'ottima attività catalasica, con il MnTPCMe che si distingue anche come ottimo *scavenger* di ROS in presenza del sistema Cu/O_2/ascorbato.

I risultati confermano che la presenza di metalli diversi nel sistema porfirinoide possa modulare la reattività. In particolare, i complessi al ferro mostrano una modesta attività pro-ossidante, viceversa i manganese-complessi si candidano come ottimi sistemi antiossidanti.

In prospettiva futura, questo lavoro può essere arricchito considerando la reattività del complesso FeTCPC:peptide confrontata con quella del solo FeTCPC. Infatti, considerando il sistema noto emina:peptide β-amiloide, si osserva che la coordinazione assiale dell'istidina del peptide Aβ aumenta la capacità del sistema porfirinico di attivare il perossido di idrogeno per reazioni

ossidative. Inoltre, si può pensare di espandere gli studi ad altri tipi di reattività dei sistemi porfirinoidi, come ad esempio la valutazione dell'attività di tipo superossido dismutasi.

Ulteriori esami si concentreranno su studi di binding con frammenti peptidici più estesi, fino ad arrivare alle dimensioni dei peptidi più abbondanti a livello biologico come l'Aβ40/42, e sull'interazione dei sistemi corrolici con altre proteine neuronali, come la proteina tau o i prioni.

Una volta caratterizzati completamente i sistemi porfirinoidi presenti in questo lavoro, si potrà passare allo studio di altri sistemi che presentano ad esempio sostituenti differenti o metalli di transizione differenti.

Inoltre, i complessi che presentano le proprietà antiossidanti più promettenti saranno testati con saggi cellulari per saggiarne la proprietà come potenziali agenti terapeutici.

5. Materiali e metodi

5.1 Strumentazione

- Spettrometro di massa

Gli spettri di massa sono registrati con strumento LCQ ADV MAX (Thermo Finnigan) con sorgente ESI e vengono successivamente analizzati con software Xcalibur 1.3.

- Spettrofotometro Uv-Vis

Gli studi cinetici e le titolazioni per studi di binding sono stati effettuati con uno spettrofotometro Agilent 8453 con un rilevatore array di fotodiodi (1024), utilizzando un range di analisi 190-1100 nm. È stata usata una cuvetta di quarzo con cammino ottico pari a 1 cm.

- HPLC-MS

Le analisi HPLC-MS vengono effettuate con HPLC Autosampler Surveryor IC pump (Thermo Finnigan) accoppiato a spettrometro di massa LCQ ADV MAX con una sorgente ESI e sono analizzati con software Xcalibur e Bioworks. La colonna usata è una colonna Phenomenex, Jupiter 4 um, 2,0 ×150 mm, Proteo 90Å, flusso 0,2 ml/min.

- NMR

Tutti gli spettri 1H-NMR sono stati registrati con uno spettrometro Bruker Avance 400 MHz.

5.2 Sintesi 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di Ferro(III) cloruro (FeTCPC)

Le sintesi del 5,10,15-tris(p-carbossifenil)corrolato di ferro(III) cloruro (FeTCPC) e del 5,10,15-tris(4-carbossifenil)corrolato di manganese(II) (MnTCPC) sono state eseguite prendendo come riferimento articoli di letteratura apponendo delle modifiche in alcuni passaggi chiave [20]

Per prima cosa è stato sintetizzato il legante 5,10,15-tris(p-carbossimetilfenil)corrolato (H3TCMPC): metil p-formilbenzoato (5 mmol, 821 mg) e pirrolo (10 mmol, 697 µL) sono sciolti in 200 ml di CH_3OH, con conseguente aggiunta di 200 ml di H_2O. Alla soluzione viene aggiunto HCl concentrato (4.25 ml), e la reazione viene fatta procedere a temperatura ambiente per 3 h.

Al termine delle 3 h viene eseguita una estrazione con solvente CH_3Cl, la fase organica viene lavata con H_2O distillata, seccata con Na_2SO_4, filtrata e diluita con CH_3Cl.

A questo punto viene aggiunto tetracloro-p-benzochinone (cloranile, 5 mmol, 1.23 g) e la soluzione viene lasciata in agitazione a riflusso per 2 h. Al termine delle 2 h la soluzione viene concentrata con evaporatore rotante ed il prodotto viene purificato all'HPLC, utilizzando una colonna semipreparativa impaccata con silice, in gradiente lineare CH_2Cl_2/CH_3CN. Il prodotto ottenuto dalla purificazione viene analizzato tramite spettrofotometro UV-Vis (430, 590, 638 nm) e spettrometro di massa (m/z 701 (+)).

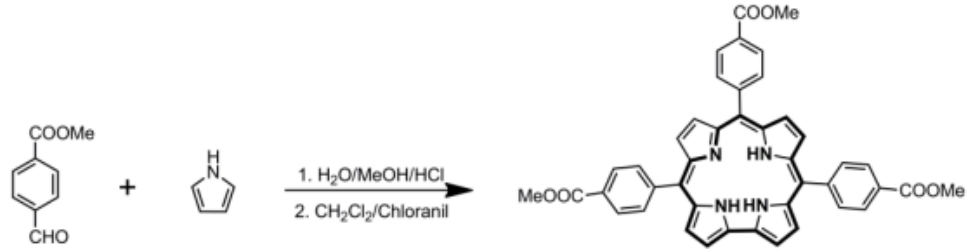


Fig.49 *Reazione di sintesi del H_3TCMPC a partire da metil p-formilbenzoato e pirrolo.*

Il prodotto ottenuto, H_3TCMPC (68 mg, 9.7×10^{-5} mol), viene sciolto in dimetilformammide (DMF) satura di argon, e viene aggiunto $FeCl_2\cdot 4H_2O$ (20 equivalenti, 247 mg); la soluzione viene lasciata in ambiente saturato di argon per 2 h a riflusso.

Terminate le due ore, la soluzione viene riportata a temperatura ambiente e vengono aggiunti 15 ml di HCl 3 M, per indurre la precipitazione. Il precipitato ottenuto viene sciolto in CH_2Cl_2 ed estratto con HCl 7% (v/v). La fase organica viene successivamente seccata su Na_2SO_4, filtrata e concentrata con evaporatore rotante; il prodotto ottenuto viene analizzato allo spettrofotometro UV-Vis (364, 408, 640 nm) e allo spettrometro di massa (m/z 753 (+)).



Fig.50 *Reazione di sintesi del FeTCMPC a partire da H3TCMPC.*

Il FeTCMPC (10 mg) ottenuto viene sciolto in CH_2Cl_2 (5 ml), e alla soluzione ottenuta vengono aggiunti goccia a goccia 5 ml di una soluzione contenente LiOH (volume finale = 10 ml, 50 equivalenti LiOH). La reazione viene mantenuta a 40°C, sotto agitazione, overnight. La soluzione viene quindi raffreddata a temperatura ambiente, acidificata con HCl fino a pH < 3; il tutto viene diluito in DCM ed estratto con H_2O distillata; la fase organica viene seccata con Na_2SO_4, filtrata e concentrata tramite evaporatore rotante. Il prodotto, FeTCPC, viene infine sgranato con dietiletere e

lasciato seccare overnight. Il prodotto ottenuto dalla purificazione viene analizzato allo spettrometro UV-Vis (364, 400, 640 nm), allo spettrometro di massa (m/z 711(+)) e all'NMR (Fig.13).

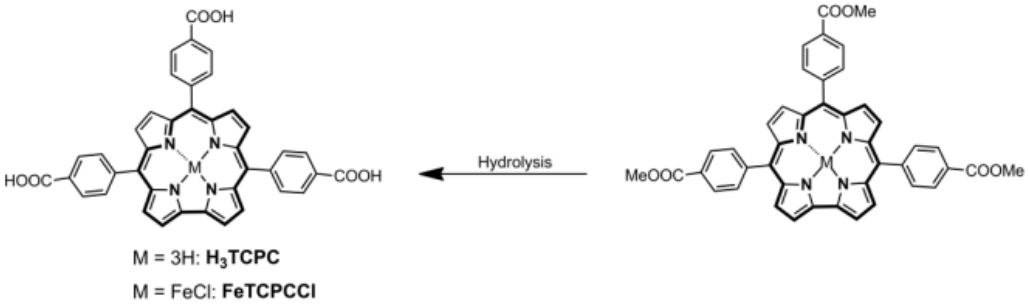


Fig.51 *Reazione di sintesi del FeTCPC a partire da FeTCMPC.*

5.3 Sintesi 5,10,15-tris(4-carbossifenil)corrolato di manganese(II) (MnTCPC)

Per la sintesi del 5,10,15-tris(4-carbossimetilfenil)corrolato di manganese(II), il ligando H_3TCMPC viene sciolto in DMF satura di argon, e viene aggiunto manganese acetato tetraidrato, sciolto in DMF (volume totale di reazione = 5 mL), e la reazione è lasciata a riflusso sotto agitazione per 2 h; al termine delle due ore la miscela di reazione viene raffreddata a temperatura ambiente, e viene successivamente indotta la precipitazione con aggiunta di H_2O goccia a goccia; viene raccolto il precipitato che viene sciolto in abbondante CH_2Cl_2 (100 mL) e viene eseguita una successiva estrazione con H_2O. La fase organica ottenuta viene seccata con Na_2SO_4, filtrata e concentrata con evaporatore rotante.

Il 5,10,15-tris(4-carbossifenil)corrolato di manganese(II) ottenuto viene sciolto in 5 mL di THF e viene aggiunta goccia a goccia sotto energica agitazione una miscela 5 mL CH_3OH + 1,5 mL KOH (10 equivalenti); la reazione viene lasciata a 40°C overnight.

La miscela di reazione viene quindi raffreddata a temperatura ambiente e acidificata con HCl (fino a pH < 3); a questo punto viene aggiunto CH_2Cl_2 e si procede con lavaggi usando H_2O distillata; la fase organica viene seccata con Na_2SO_4, filtrata e concentrata mediante evaporatore rotante; il prodotto ottenuto viene sgranato con dietiletere e seccato overnight. Il 5,10,15-tris(4-carbossifenil)corrolato di manganese(III) ottenuto viene analizzato tramite spettrofotometro UV-Vis (402, 432, 656 nm) e spettrometro di massa (m/z 710 (+)).

5.4 Sintesi 5,10,15-tris(4-piridil)corrolato di manganese(II) (MnTPC)

La sintesi del 5,10,15-tris(4-piridil)corrolato di manganese(II) (MnTPC) è stata eseguita prendendo come riferimento procedure riportate in letteratura. [14][21]

Per prima cosa è stato sintetizzato il legante 5,10,15-tris(4-piridil)corrolato; pirrolo (697 µL, 10 mmol) e 4-piridincarbossialdeide (471 µL, 5 mmol) sono sciolti in 250 mL di acido acetico, e la soluzione è mantenuta a riflusso sotto agitazione per 3 h. Al termine delle 3 h la soluzione è fatta raffreddare a temperatura ambiente e vengono addizionati 250 mL di H_2O distillata. La soluzione ottenuta viene purificata mediante due separazioni cromatografiche. La prima colonna viene impaccata con gel di silice e viene usato come eluente una miscela CH_2Cl_2/CH_3OH (8.5 : 2); dalla prima colonna si raccoglie la prima frazione di colore verde; questa frazione sarà poi separata nella seconda colonna cromatografica, usando gel di silice come fase stazionaria e una miscela CH_3COOEt/CH_3OH (96 : 4); da questa separazione si raccoglie la seconda frazione di colore verde. La frazione raccolta viene concentrata mediante evaporatore rotante, e analizzata tramite spettrofotometro UV-Vis e spettrometro di massa.

Il legante ottenuto viene sciolto in piridina (20 mL) e alla soluzione viene aggiunto manganese acetato tetraidrato (10 equivalenti); la soluzione è lasciata a 60° per 30 minuti sotto agitazione. Al termine della reazione, viene fatto evaporare il solvente mediante evaporatore rotante. Il prodotto ottenuto viene analizzato tramite spettrofotometro UV-Vis (403, 438, 494, 583, 648) e spettrometro di massa (m/z 581 (+)).

5.5 Studi di legame di FeTCPC ed emina con 4-metilimidazolo e peptide Aβ16

5.5.1 Preparazione della soluzione di FeTCPC

Vengono pesati circa 2-3 mg di FeTCPC (MW = 711 g/mol) che vengono sciolti in 1 mL di MeOH. La concentrazione della soluzione viene determinata con la legge di Lambert-Beer tramite spettroscopia Uv-Vis, monitorando la banda di assorbimento (banda Soret) a 400 nm. Il bianco è effettuato in MeOH e tutti gli spettri sono eseguiti in condizioni termostatate alla temperatura di 25°C.

La celletta utilizzata (quarzo, cammino ottico 1 cm) viene preventivamente lavata prima con NaOH 1 M, successivamente con abbondante H_2O distillata, poi con H_2SO_4 1 M e infine con H_2O distillata e lasciata asciugare all'aria.

5.5.2 Preparazione della soluzione di emina

L'emina utilizzata è una ferro(III)protoporfirina-IX commerciale Alfa Aesar (MW = 651.95 g/mol). Ne vengono pesati 2-3 mg e sciolti in 1 ml di NaOH 0.1 M precedentemente preparata con H_2O milli-Q; la soluzione viene sonicata per 60 min. La soluzione viene quindi centrifugata per 5-6 minuti, dopo di che si controlla sul fondo dell'eppendorf: se è presente del precipitato si trasferisce il surnatante in una eppendorf pulita e si ripete sonicazione e centrifugazione. Le soluzioni di lavoro vengono preparate per diluizione in H_2O milli-Q. La soluzione stock è conservata in freezer per una settimana, al termine della quale la soluzione va preparata nuova, mentre le soluzioni diluite sono ripreparate per ogni studio.

La concentrazione dell'emina viene determinata con la legge di Lambert Beer tramite spettroscopia Uv-Vis, monitorando la banda di assorbimento (banda Soret) a 390 nm.

Il bianco è effettuato in tampone fosfato e tutti gli spettri sono eseguiti in condizioni termostatate alla temperatura di 25°C.

La celletta utilizzata (quarzo, cammino ottico 1 cm) viene preventivamente lavata prima con NaOH 1 M, successivamente con abbondante H_2O distillata, poi con H_2SO_4 1 M e infine con H_2O distillata e lasciata asciugare all'aria.

Il coefficiente di estinzione molare (ε) dipende dall'aggregazione dell'emina, che determina intensità e larghezza della banda; esso viene determinato tramite saggio emocromogeno**.**

5.5.3 Saggio emocromogeno

Si prepara una soluzione di emina in acqua distillata con assorbanza della banda Soret circa 1, in celletta con cammino ottico di 1 cm, $V_{iniziale}$ = 1600 µL. A questo punto si registra lo spettro Uv-Vis e si riporta il valore preciso di assorbanza in corrispondenza del massimo di assorbimento della banda Soret ($A_{maxSoret}$).

Si aggiungono 320 µL di piridina (concentrazione in celletta 0.1 M) e 75 µL di NaOH 2 M (concentrazione in celletta 0.075 M). Si aggiunge quindi una punta di spatola di sodio ditionito ($Na_2S_2O_4$). In queste condizioni si forma l'addotto eme bis-piridina di cui è noto il coefficiente di estinzione molare a 556 nm (ε_{556} = 34400 M-1cm-1).

Si registra lo spettro Uv-Vis e si riporta il valore di assorbanza a 556 nm. Utilizzando la legge di Lambert-Beer si ricava la concentrazione molare di addotto eme bis-piridina che è equivalente alla concentrazione di eme nei 1995 µL finali:

$$[Eme]_f = [addotto] = \frac{A_{556}}{\varepsilon_{556}}$$

Si calcola la concentrazione di eme nei 1600 µL iniziali:

$$[Eme]_i = [Eme]_f * \frac{1995\ \mu L}{1600\ \mu L}$$

Il coefficiente di estinzione molare dell'eme si ricava dividendo $A_{maxSoret}$ misurata inizialmente per la concentrazione dell'eme:

$$\varepsilon_{maxSoret} = \frac{A_{maxSoret}}{[Eme]_i}$$

$$\varepsilon emina = 65000\ M^{-1}cm^{-1}$$

5.5.4 Titolazioni spettrofotometriche del FeTCPC e dell'emina

La procedura prevede l'iniziale preparazione delle soluzioni dei vari corroli sciogliendo circa 2-3 mg in MeOH, e la determinazione delle concentrazioni molari in cuvette (quarzo, cammino ottico 1 cm, epsilon ricavate da letteratura) mediante spettrometria UV-Vis. In seguito, si procede con la preparazione della soluzione di lavoro (Fe^{III})protoporfirina IX in tampone fosfato 20 mM pH 7.4 e alla determinazione della concentrazione in cuvette (quarzo, cammino ottico 1 cm), mediante spettrofotometria UV-Vis. Una volta determinata la molarità effettiva delle soluzioni vengono ricavati i µL di metilimidazolo necessari per le aggiunte e si procede titolando con aggiunte ogni 30 secondi, agitando magneticamente di volta in volta la soluzione e registrando quindi lo spettro. Tutti gli spettri vengono condotti in condizioni termostatate alla temperatura di 25°C. Le famiglie di spettri così ottenute sono corrette per diluizione e si ricavano le curve di legame, da cui, mediante fitting con equazione appropriata, vengono determinate le constanti di affinità FeTCPC-metilimidazolo ed emina-metilimidazolo. Il programma utilizzato per il fitting è FPWIN e per ciascuno studio sono eseguite più ripetizioni delle quali si riporta solo lo studio migliore.

Le condizioni e i dati riguardanti lo studio di legame emina-metilimidazolo in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4, sono riportati in seguito:

V finale (µL)	1600
[emina] (µM)	30
Eq. MeIm	0-1000

Aggiunta MeIm	µL aggiunti	V_{totale} (µL)	[MeIm] (M)	ΔAbs (390-424)
0	0	1524.4	0	0
1	2.1	1526.5	4.1271×10^{-6}	0.00141
2	2.1	1528.6	8.2428×10^{-6}	0.00297
3	2.1	1530.7	1.2347×10^{-5}	0.00416
4	2.1	1532.8	1.6441×10^{-5}	0.00540
5	2.1	1534.9	2.0523×10^{-5}	0.00642
6	2.1	1537	6.1483×10^{-5}	0.00759
7	2.1	1539.1	1.0233×10^{-4}	0.00877
8	2.1	1541.2	3.0658×10^{-4}	0.01043
9	3.2	1544.4	6.1674×10^{-4}	0.01344
10	3.2	1547.6	9.2563×10^{-4}	0.01642
11	3.2	1550.8	1.2332×10^{-3}	0.01978
12	3.2	1554	1.5396×10^{-3}	0.02317
13	2.7	1556.7	2.0572×10^{-3}	0.02587
14	2.7	1559.4	2.5731×10^{-3}	0.03044
15	2.7	1562.1	3.0872×10^{-3}	0.03290
16	2.7	1564.8	3.5995×10^{-3}	0.03643
17	2.7	1567.5	4.1100×10^{-3}	0.03828
18	2.7	1570.2	4.6188×10^{-3}	0.04024
19	2.7	1572.9	5.1259×10^{-3}	0.04143
20	2.7	1575.6	5.6312×10^{-3}	0.04263
21	2.7	1578.3	6.1348×10^{-3}	0.04374
22	2.7	1581	6.6366×10^{-3}	0.04523
23	2.7	1583.7	7.1368×10^{-3}	0.04585
24	2.7	1586.4	7.6352×10^{-3}	0.04679
25	2.7	1589.1	8.1320×10^{-3}	0.04766
26	2.7	1591.8	8.6270×10^{-3}	0.04832
27	2.7	1594.5	9.1204×10^{-3}	0.04907
28	2.7	1597.2	9.6121×10^{-3}	0.04990

29	2.7	1600	1.0102×10^{-2}	0.05022

Tab. 10 *Dati relativi alla titolazione spettrofotometrica di emina con metilimidazolo in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

Le condizioni e i dati riguardanti lo studio di legame FeTCPC-metilimidazolo in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4, sono riportati in seguito:

V iniziale (µL)	1600
[FeTCPC] (µM)	30
Eq. MeIm	0-500

Aggiunta MeIm	µL aggiunti	V_{totale} (µL)	[MeIm] (M)	ΔAbs (390-424)
0	0	1527	0	0
1	2.1	1529.1	2.0600×10^{-5}	0.00020
2	2.1	1531.2	6.1716×10^{-5}	0.00104
3	2.1	1533.3	1.0272×10^{-4}	0.00196
4	2.1	1535.4	3.0774×10^{-4}	0.00584
5	3.2	1538.6	6.1907×10^{-4}	0.00804
6	3.2	1541.8	9.2911×10^{-4}	0.00939
7	3.2	1545	1.2379×10^{-3}	0.01058
8	3.2	1548.2	1.5453×10^{-3}	0.01148
9	2.7	1550.9	2.0649×10^{-3}	0.01204
10	2.7	1600	2.5078×10^{-3}	0.01261
11	2.7	1602.7	3.0090×10^{-3}	0.01297
12	2.7	1605.4	3.5085×10^{-3}	0.01278
13	2.7	1608.1	4.0063×10^{-3}	0.01310
14	2.7	1610.8	4.5024×10^{-3}	0.01320
15	2.7	1613.5	5.4897×10^{-3}	0.01304
16	2.7	1616.2	5.9809×10^{-3}	0.01303
17	2.7	1618.9	6.4705×10^{-3}	0.01303
18	2.7	1621.6	6.9584×10^{-3}	0.01282
19	2.7	1624.3	7.4447×10^{-3}	0.01267
20	2.7	1627	7.9294×10^{-3}	0.01312
21	2.7	1629.7	8.4125×10^{-3}	0.01246
22	2.7	1632.4	8.8940×10^{-3}	0.01252

23	2.7	1635.1	8.8940×10^{-3}	0.01254
24	2.7	1600	9.5953×10^{-3}	0.01257
25	2.7	1602.7	1.0085×10^{-2}	0.01245

Tab. 11 *Dati relativi alla titolazione spettrofotometrica di FeTCPC con metilimidazolo in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

5.5.5 Titolazione spettrofotometrica del FeTCPC e dell'emina con Aβ16

Le condizioni e i dati riguardanti lo studio di legame emina-Aβ16 in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4, sono riportati in seguito:

V iniziale (µL)	1600
[emina] (µM)	10
Eq. Aβ16	0-260

Aggiunta Aβ16	µL aggiunti	V_{totale} (µL)	[Aβ16] (M)	ΔAbs (390-400)
0	0	1600.0	0	0
1	2.8	1627.6	4.9177×10^{-6}	0.05829
2	2.8	1655.2	9.6713×10^{-6}	0.13300
3	2.8	1682.8	1.4269×10^{-5}	0.20535
4	2.8	1710.4	1.8718×10^{-5}	0.26693
5	2.8	1738.0	2.3026×10^{-5}	0.31510
6	13.8	1876.0	4.2665×10^{-5}	0.41663
7	13.8	2014.0	5.9613×10^{-5}	0.45281
8	13.8	2152.0	7.4387×10^{-5}	0.46542
9	2.0	2172.3	8.8456×10^{-5}	0.47107
10	2.0	2192.6	1.0227×10^{-4}	0.47467
11	2.0	2212.9	1.1582×10^{-4}	0.47792
12	2.0	2233.2	1.2913×10^{-4}	0.47956
13	2.0	2253.5	1.4220×10^{-4}	0.48103
14	2.5	2278.8	1.5816×10^{-4}	0.48174
15	2.5	2304.1	1.7378×10^{-4}	0.48200
16	2.5	2329.4	1.8905×10^{-4}	0.48172
17	2.5	2354.7	2.0399×10^{-4}	0.48139

18	2.5	2380.0	2.1862×10^{-4}	0.48083
19	2.5	2405.3	2.3294×10^{-4}	0.48007
20	2.5	2430.6	2.4696×10^{-4}	0.47931
21	2.5	2455.9	2.6070×10^{-4}	0.47774

Tab. 12 *Dati relativi alla titolazione spettrofotometrica di emina con Aβ16 in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

Le condizioni e i dati riguardanti lo studio di legame FeTCPC-Aβ16 in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4, sono riportati in seguito:

V iniziale (µL)	1600
[FeTCPC] (µM)	80
Eq. Aβ16	0-12

Aggiunta Aβ16	**µL aggiunti**	**V_{totale} (µL)**	**[Aβ16] (M)**	**ΔAbs (390-400)**
0	0.0	1434.0	0	0
1	2.7	1436.7	5.6379×10^{-6}	0.01942
2	2.7	1439.4	1.1255×10^{-5}	0.03162
3	2.7	1442.1	1.6850×10^{-5}	0.03949
4	2.7	1444.8	2.2425×10^{-5}	0.04619
5	2.7	1447.5	2.7979×10^{-5}	0.05083
6	2.7	1450.2	3.3513×10^{-5}	0.05523
7	3.9	1454.1	6.0780×10^{-5}	0.06555
8	3.9	1458.0	8.7901×10^{-5}	0.07282
9	3.9	1461.9	1.1488×10^{-4}	0.07666
10	3.9	1465.8	1.4171×10^{-4}	0.07978
11	3.9	1469.7	1.6840×10^{-4}	0.08212
12	3.9	1473.6	1.9495×10^{-4}	0.08383
13	7.9	1481.5	2.4830×10^{-4}	0.08695
14	7.9	1489.4	3.0109×10^{-4}	0.08903
15	7.9	1497.3	3.5332×10^{-4}	0.09131
16	7.9	1505.2	4.0500×10^{-4}	0.09263
17	7.9	1513.1	4.5614×10^{-4}	0.09416
18	7.9	1521.0	5.0675×10^{-4}	0.09474

19	7.9	1528.9	5.5683×10^{-4}	0.09547
20	7.9	1536.8	6.0640×10^{-4}	0.09617
21	7.9	1544.7	6.5547×10^{-4}	0.09647
22	7.9	1552.6	7.0403×10^{-4}	0.09680
23	7.9	1560.5	7.5211×10^{-4}	0.09721
24	7.9	1568.4	7.9969×10^{-4}	0.09713
25	7.9	1576.3	8.4681×10^{-4}	0.09727
26	7.9	1584.2	8.9345×10^{-4}	0.09779
27	7.9	1592.1	9.3963×10^{-4}	0.09742
28	7.9	1600.0	9.8535×10^{-4}	0.09779

Tab. 13 *Dati relativi alla titolazione spettrofotometrica di FeTCPC con Aβ16 in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

5.6 Studi di reattività dei Corroli e confronto con emina

5.6.1 Studi di attività perossidasica del FeTCPC e dell'emina

L'attività perossidasica del FeTCPC e dell'emina viene caratterizzata seguendo l'ossidazione perossido-catalizzata dell'acido 3-(4-idrossifenil)propionico, del 4-metilcatecolo e della dopamina, in tampone fosfato (20 mM, pH 7.4), in celletta con cammino ottico 1 cm, in condizioni termostatate a 25°C e sotto agitazione magnetica.

Per prima cosa vengono preparate le soluzioni di FeTCPC ed emina come precedentemente descritto e di queste sono determinate le concentrazioni mediante spettroscopia UV-Vis, tramite la legge di Lambert-Beer. Si prepara quindi la soluzione di perossido di idrogeno, diluendo la soluzione madre commerciale con H_2O milli-Q. La soluzione di HPA viene preparata sciogliendo inizialmente il substrato in 100 µL di MeOH, e successivamente viene portata la soluzione al volume di 1 mL aggiungendo 900 µL di H_2O milli-Q. Le soluzioni di 4-metilcatecolo e dopamina sono preparate sciogliendo i substrati in 1 mL di H_2O milli-Q.

Il bianco viene registrato per ciascuna cinetica in tampone. La cinetica viene fatta partire con l'aggiunta del perossido di idrogeno, e seguita mediante lo sviluppo della banda di assorbimento dei prodotti di ossidazione per un intervallo di tempo pari a 150 secondi. La cuvetta usata viene lavata

tra una cinetica e l'altra prima con NaOH 1 M, successivamente con abbondante H_2O distillata, poi con H_2SO_4 1 M e infine con H_2O distillata e lasciata asciugare all'aria.
La velocità Abs/s è ricavata dalla pendenza delle tracce cinetiche nel tratto iniziale (nei primi 30 secondi circa, per basse concentrazioni di perossido) e viene convertita in velocità di *turnover* (s^{-1}) dividendo per [catalizzatore] e ε dei prodotti di ossidazione.
La k_1 e la concentrazione di perossido saturante vengono ricavate dal grafico di v/[cat] (s^{-1}) *vs* [H_2O_2] (M) relativo a esperimenti in cui viene fatta variare la concentrazione di ossidante in condizioni saturanti di substrato. Il valore riportato di k_1 corrisponde alla pendenza della retta ricavata interpolando i dati per basse concentrazioni di perossido, mentre andando a concentrazioni più elevate si ottiene una curva di tipo iperbolico, dalla quale si determina la concentrazione saturante di ossidante in corrispondenza del massimo valore registrato nella curva. Tale concentrazione è quella che si utilizza negli studi successivi in cui viene valutata la velocità di reazione in funzione del substrato. In questi esperimenti viene fatta variare la concentrazione di substrato e plottando v/[cat] (s^{-1}) *vs* [substrato] (M) si ricava un andamento di tipo Michaelis-Menten che viene fittato con software FPWIN per determinare i valori di K_M e k_{cat}.
Per tutte le analisi cinetiche vengono eseguite più ripetizioni delle quali si riportano solo i dati e le costanti relativi allo studio migliore.

5.6.2 Reazione di ossidazione d'acido 3-(4-idrossifenil)propionico (HPA) in presenza di FeTCPC ed emina

Il primo substrato utilizzato è l'acido 3-(4-idrossifenil)propionico (HPA), facilmente ossidabile in presenza di metalli redox attivi. L'ossidazione dell'HPA porta alla formazione di un radicale che a sua volta genera una miscela di dimeri; la formazione della miscela di dimeri coincide con un aumento di una banda di assorbimento a 300 nm che sarà seguita per la durata della cinetica (150 s).
Le soluzioni di HPA, emina e perossido sono preparate in H_2O Milli-Q, mentre la soluzione di FeTCPC viene preparata in MeOH. Il bianco viene eseguito all'inizio dello studio in tampone.

5.6.2.1 Dipendenza dalla concentrazione di perossido

In questi studi cinetici viene mantenuta costante la concentrazione di substrato HPA (3 mM), di emina e di corrolo (2 µM), mentre viene fatta variare la concentrazione di perossido da 1 a 50 mM, il tutto in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4:

V_{totale} (µL)	1600
[emina] (µM)	2
[HPA] (mM)	3

Abs/s	**[H_2O_2] (mM)**	**V (s^{-1})**
0.0004453	1	0.11419
0.0009371	2	0.240287
0.0013932	3	0.357231
0.0022397	5	0.574282
0.0040551	10	1.039769

Tab.14 D*ati relativi all'attività perossidasica dell'emina in dipendenza dalla concentrazione di H_2O_2, con emina (2 µM) e HPA (3 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

La k_1 viene ricavata dal grafico di v/[cat](s^{-1}) contro [H_2O_2] (M) e corrisponde alla pendenza della retta che si ricava interpolando i primi punti del grafico, a basse concentrazioni di perossido; ad alte concentrazioni di perossido si viene a formare una curva, il cui massimo valore sarà la concentrazione saturante di ossidante.

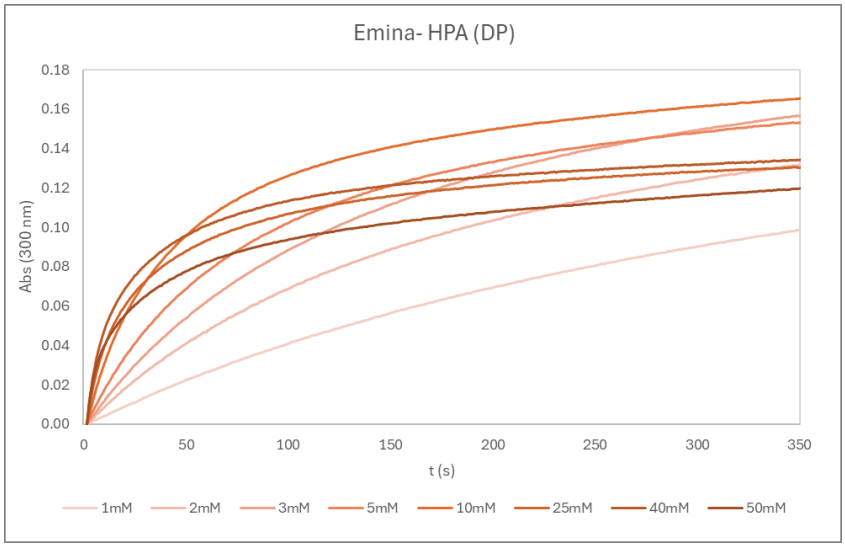


Fig.52 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato HPA (3 mM) in presenza di emina (2 µM) e concentrazioni crescenti di perossido (da 1 mM a 50 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

V_{totale} (µL)	1600
[FeTCPC] (µM)	2
[HPA] (mM)	3

Abs/s	$[H_2O_2]$ (mM)	v (s^{-1})
0.0004972	1	0.1275
0.0009822	2	0.2519
0.001172	3	0.3005
0.001738	5	0.4456

Tab.15 *Dati relativi all'attività perossidasica del FeTCPC in dipendenza dalla concentrazione di H_2O_2, con FeTCPC (2 µM) e HPA (3 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

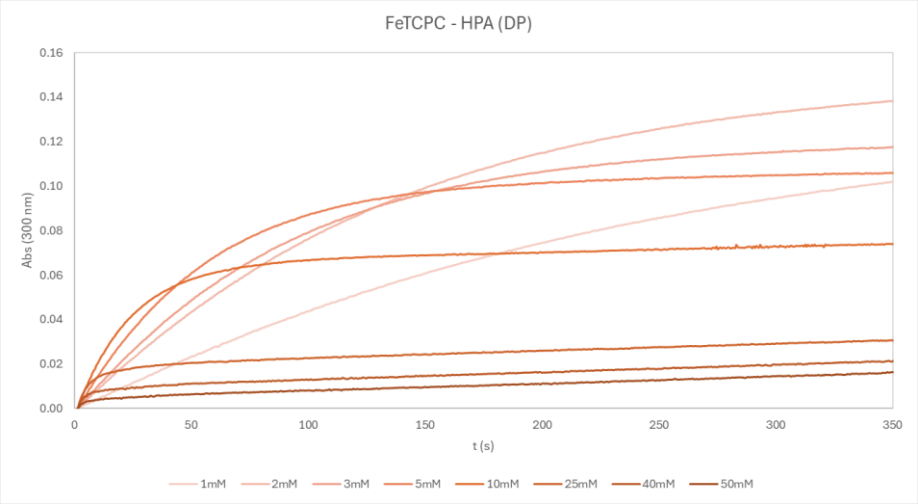


Fig.53 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato HPA (3 mM) in presenza di FeTCPC (2 µM) e concentrazioni crescenti di perossido (da 1 mM a 50 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

5.6.2.2 Dipendenza dalla concentrazione di substrato

In questi studi cinetici viene fatta variare la concentrazione di substrato di HPA da 0.3 a 3 mM, mentre vengono mantenute costanti le concentrazioni di emina/corrolo (2 µM) e di perossido (concentrazione saturante determinata nell'esperimento precedente), il tutto in tampone fosfato 20mM, pH 7.4:

V totale (µL)	1600
[emina] (µM)	2
[H_2O_2] saturante (mM)	40

Abs/s	[HPA] (mM)	v (s^{-1})
0.002546	0.1	0.6527
0.003110	0.2	0.7975
0.005433	0.3	1.393
0.006812	0.5	1.747
0.007208	0.7	1.848
0.009333	1	2.393
0.01090	2	2.795
0.009970	3	2.556

Tab.16 *Dati relativi all'attività perossidasica dell'emina in dipendenza dalla concentrazione di substrato HPA, con emina (2 µM) e H_2O_2 (Concentrazione saturante, 40 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

Si ricavano i grafici v/[cat](s^{-1}) contro [HPA] (M), che presentano un andamento Michaelis-Menten, che viene fittato con il software FPWIN per determinare i valori di K_M e k_{cat}.

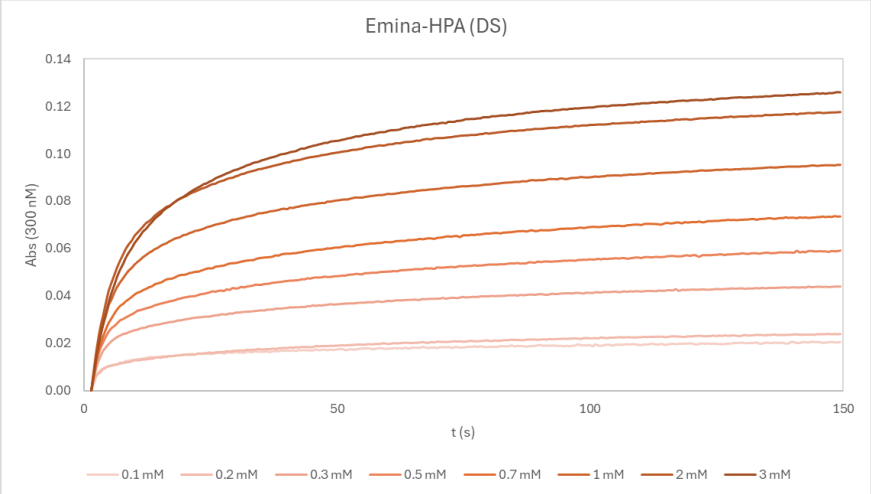


Fig.54 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato HPA (da 0.3 mM a 3 mM) in presenza di emina (2 µM) e di perossido (40 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

V_{totale} (µL)	1600
[FeTCPC] (µM)	2
[H_2O_2] saturante (mM)	10

Abs/s	[HPA] (mM)	v (s^{-1})
0.0001912	0.3	0.04903
0.0009164	0.5	0.2350
0.001338	0.7	0.3429
0.001723	1	0.4419
0.001860	2	0.4770
0.001826	3	0.4683

Tab.17 *Dati relativi all'attività perossidasica del FeTCPC in dipendenza dalla concentrazione di substrato HPA, con FeTCPC (2 µM) e H_2O_2 (Concentrazione saturante, 10 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

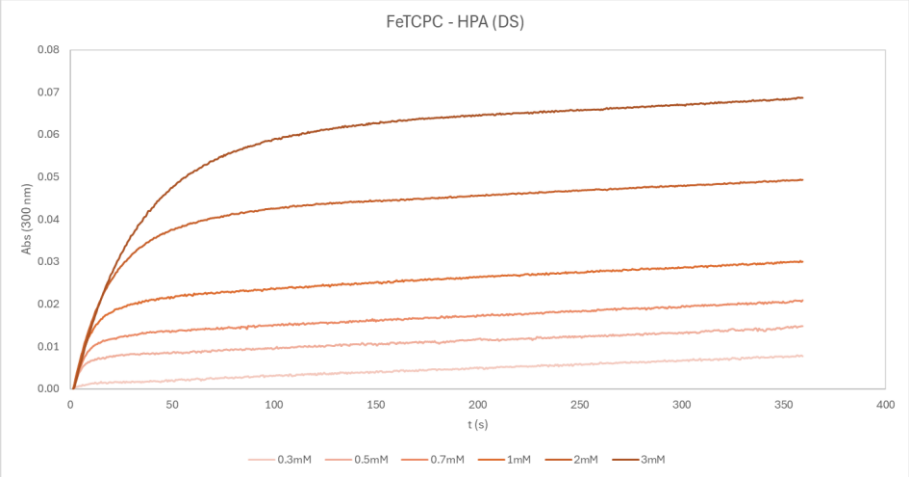


Fig.55 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato HPA (da 0.3 mM a 3 mM) in presenza di FeTCPC (2 µM) e di perossido (10 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

5.6.3 Reazione di ossidazione del 4-metilcatecolo (4-MC) in presenza di FeTCPC ed emina

Il secondo substrato usato per gli studi dell'attività perossidasica è il 4-metilcatecolo, la cui reazione di ossidazione da come prodotto il 4-metilchinone, che presenta una banda di assorbimento a 500 nm; lo studio cinetico viene eseguito come il precedente.

5.6.3.1 Dipendenza dalla concentrazione di perossido

In questi studi cinetici viene mantenuta costante la concentrazione di substrato 4-MC (1 mM), di emina e di FeTCPC (0.2 µM), mentre viene fatta variare la concentrazione di perossido da 1 a 300 mM, il tutto in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4:

V_{totale} (µL)	1600
[emina] (µM)	0.2
[4-MC] (mM)	1

Abs/s	**[H_2O_2] (mM)**	**v (s^{-1})**
0.00001500	1	0.04839
0.0002824	3	0.9109
0.0003187	5	1.028
0.0004642	10	1.497
0.001250	25	4.032

Tab.18 *Dati relativi all'attività perossidasica dell'emina in dipendenza dalla concentrazione di H_2O_2, con emina (0.2 µM) e 4-metilcatecolo (1 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

La costante k_1 e la concentrazione saturante di perossido sono determinate come nello studio precedente.

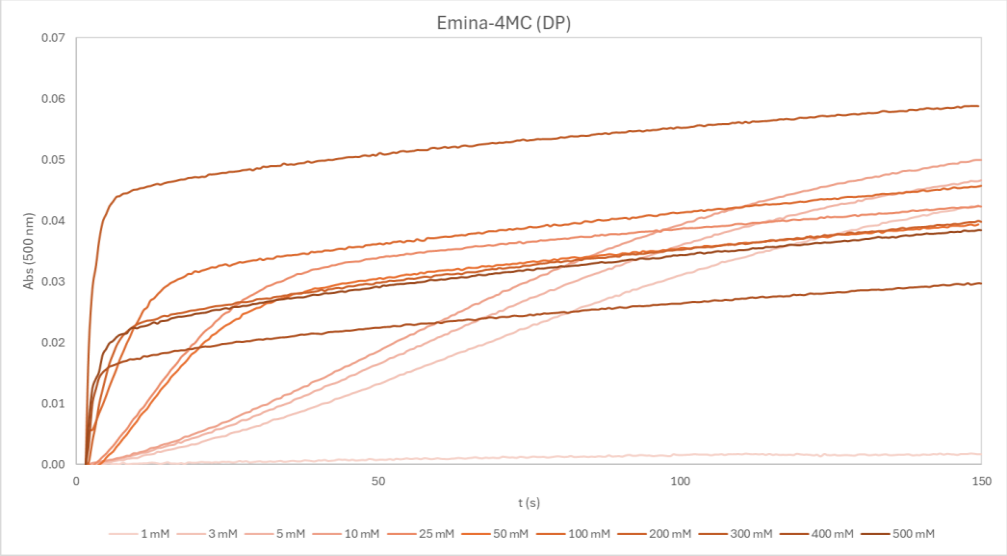


Fig.56 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo (1 mM) in presenza di emina (0.2 µM) e concentrazioni crescenti di perossido (da 1 mM a 500 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

V_{totale} (µL)	1600
[FeTCPC] (µM)	0.2
[4-MC] (mM)	1

Abs/s	$[H_2O_2]$ (mM)	v (s^{-1})
0.0001187	1	0.3830
0.0002587	3	0.8344
0.0002983	5	0.9623
0.0008368	10	2.699
0.002084	25	6.722

Tab.19 *Dati relativi all'attività perossidasica del FeTCPC in dipendenza dalla concentrazione di H_2O_2, con FeTCPC (0.2 µM) e 4-Metilcatecolo (1 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

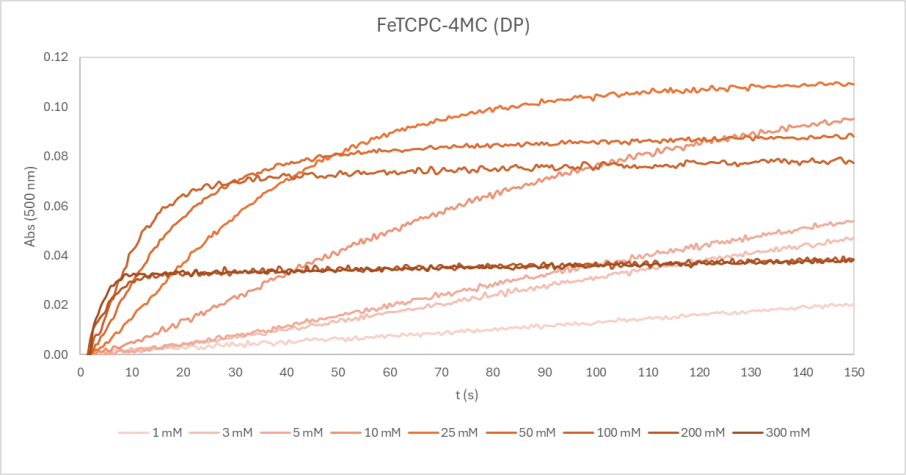


Fig.57 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo (1 mM) in presenza di FeTCPC (0.2 µM) e concentrazioni crescenti di perossido (da 1 mM a 500 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

5.6.3.2 Dipendenza dalla concentrazione del substrato

In questi studi cinetici viene fatta variare la concentrazione di substrato 4-MC da 0.1 a 4 mM, mentre vengono mantenute costanti le concentrazioni di emina, di FeTCPC (0.2 µM) e di perossido (concentrazione saturante determinata nell'esperimento precedente), il tutto in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4:

V_{totale} (µL)	1600
[emina] (µM)	0.2
[H_2O_2] saturante (mM)	400

Abs/s	[4-MC] (mM)	v (s^{-1})
0.001708	0.1	5.510
0.002891	0.2	9.325
0.003895	0.3	12.57
0.004735	0.5	15.27
0.005736	1	18.50
0.006533	1.5	21.07
0.006693	2	21.59
0.007434	3	23.98
0.006872	4	22.17

Tab.20 *Dati relativi all'attività perossidasica dell'emina in dipendenza dalla concentrazione di substrato 4-metilcatecolo, con emina (0.2 µM) e H_2O_2 (Concentrazione saturante, 400 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

I valori di K_M e k_{cat} sono determinati come nello studio precedente.

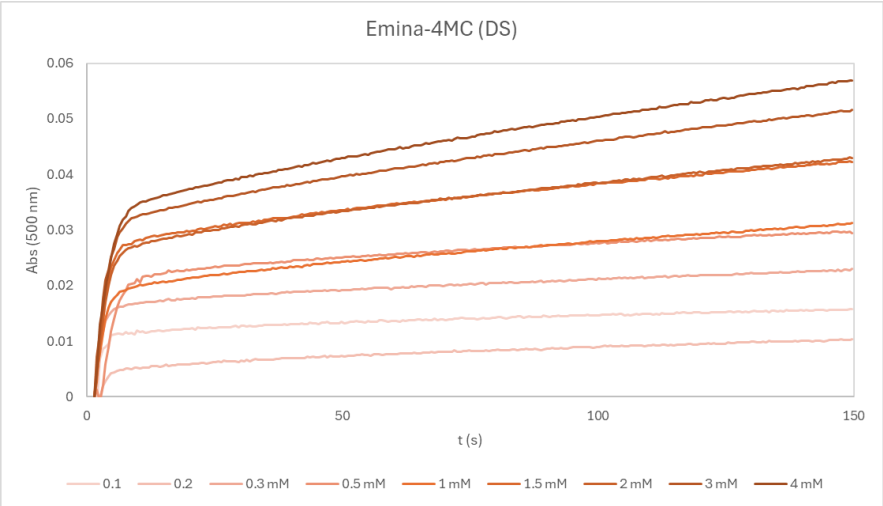


Fig.58 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo (da 0.1 mM a 4 mM) in presenza di emina (0.2 µM) e di perossido (400 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

V_{totale} (µL)	1600
[FeTCPC] (µM)	0.2
[H_2O_2] saturante (mM)	100

Abs/s	[4-MC] (mM)	v (s^{-1})
0.0006250	0.1	2.016
0.001343	0.2	4.331
0.002005	0.3	6.468
0.002600	0.5	8.388
0.003733	1	12.04
0.004420	1.5	14.26
0.004494	2	14.50
0.004336	3	13.99
0.004169	4	13.45

Tab.21 *Dati relativi all'attività perossidasica del FeTCPC in dipendenza dalla concentrazione di substrato 4-metilcatecolo, con FeTCPC (0.2 µM) e H_2O_2 (Concentrazione saturante, 100 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

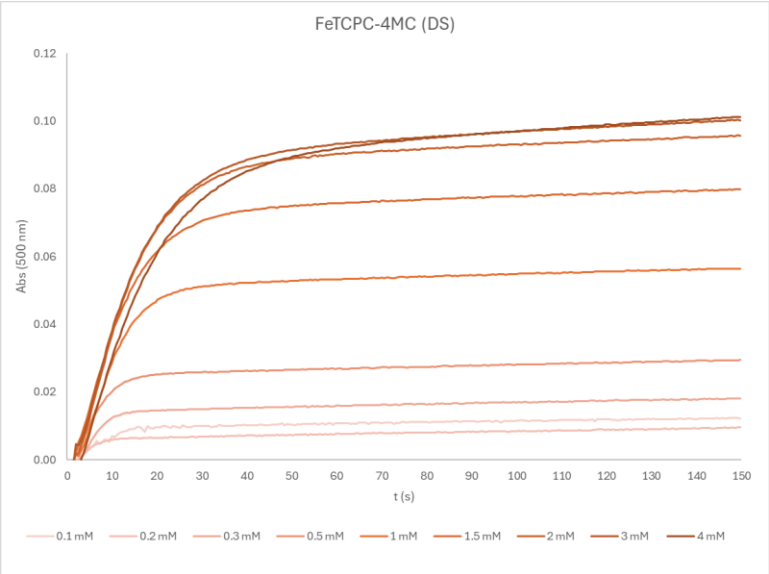


Fig.59 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato 4-metilcatecolo (da 0.1 mM a 4 mM) in presenza di FeTCPC (0.2 µM) e di perossido (100 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

5.6.3 Reazione di ossidazione della dopamina in presenza di FeTCPC ed emina

L'ultimo substrato usato per gli studi dell'attività perossidasica è la dopamina, la cui reazione di ossidazione da come prodotto il dopaminocromo, che presenta banda di assorbimento a 475 nm, che sarà seguita per la durata della cinetica (150 s). Lo studio è svolto come per i substrati precedenti.

5.6.3.1 Dipendenza dalla concentrazione di perossido

In questi studi cinetici viene mantenuta costante la concentrazione di substrato dopamina (1 mM), di eme e di FeTCPC (0.2 µM), mentre viene fatta variare la concentrazione di perossido da 1 a 500 mM, il tutto in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.

V_{totale} (µL)	1600
[emina] (µM)	0.2
[DA] (mM)	1

Abs/s	**[H_2O_2] (mM)**	**v (s^{-1})**
0.00001847	1	0.02799
0.00009372	3	0.1420
0.0001617	5	0.2449
0.0002895	10	0.4386
0.0006370	25	0.9652

Tab.22 *Dati relativi all'attività perossidasica dell'emina in dipendenza dalla concentrazione di H_2O_2, con emina (0.2 µM) e dopamina (1 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

la costante cinetica k_1 è determinata come negli studi precedenti.

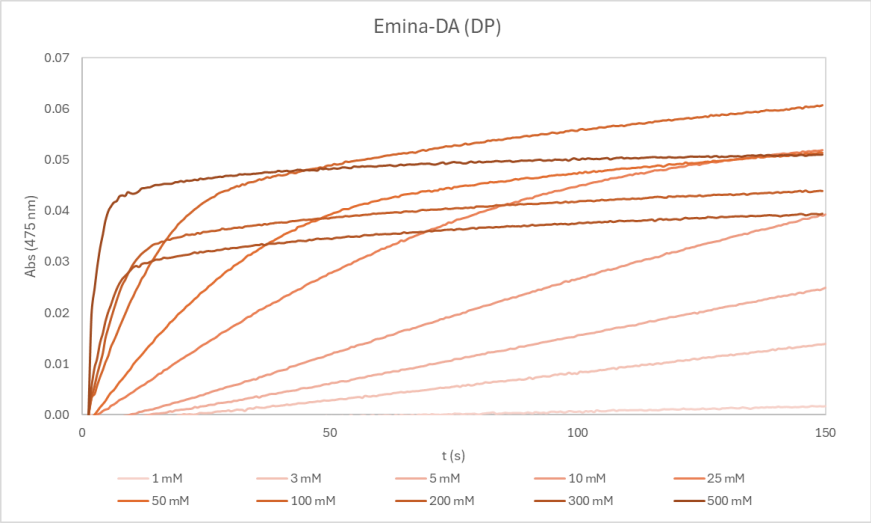


Fig.60 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato dopamina (1 mM) in presenza di emina (0.2 µM) e di perossido (da 1 a 500 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

V totale (µL)	1600
[FeTCPC] (µM)	0.2
[DA] (mM)	1

Abs/s	$[H_2O_2]$ (mM)	v (s^{-1})
0.0002318	1	0.3512
0.0004986	3	0.7554
0.0007751	5	1.174
0.001295	10	1.963

Tab.23 *Dati relativi all'attività perossidasica del FeTCPC in dipendenza dalla concentrazione di H_2O_2, con FeTCPC (0.2 µM) e dopamina (1 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

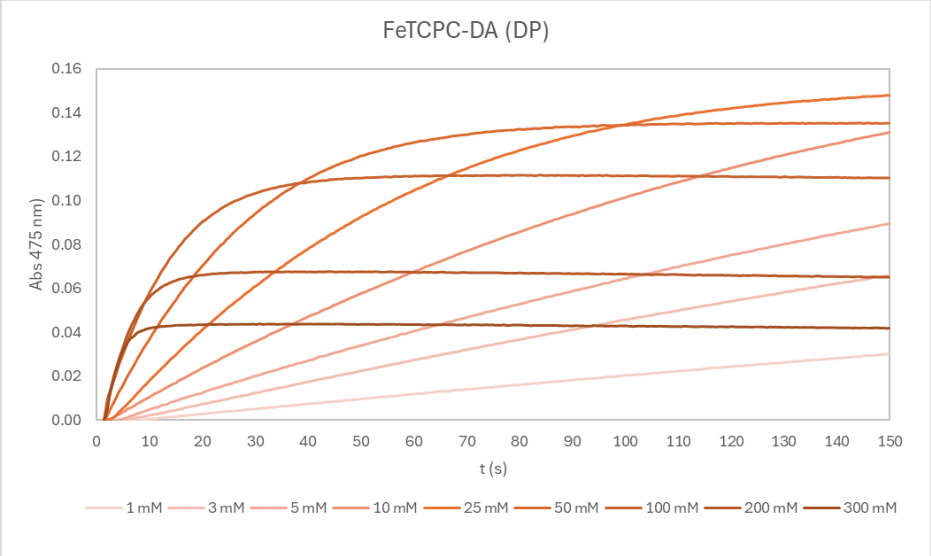


Fig.61 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato dopamina (1 mM) in presenza di FeTCPC (0.2 µM) e di perossido (da 1 a 500 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

5.6.3.2 Dipendenza dalla concentrazione del substrato

In questi studi cinetici viene fatta variare la concentrazione di substrato dopamina da 0.1 a 4 mM, mentre vengono mantenute costanti le concentrazioni di emina, di FeTCPC (0.2 µM) e di perossido (concentrazione saturante determinata nell'esperimento precedente), il tutto in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4:

V totale (µL)	1600
[emina] (µM)	0.2
[H_2O_2] saturante (mM)	500

Abs/s	[DA] (mM)	v (s^{-1})
0.004553	0.1	6.898
0.006372	0.2	9.655
0.008422	0.3	12.76
0.01004	0.5	15.22
0.00993	1	15.05
0.01125	1.5	17.04
0.01145	2	17.35
0.01090	3	16.52
0.008192	4	12.41

Tab.24 *Dati relativi all'attività perossidasica dell'emina in dipendenza dalla concentrazione di substrato dopamina, con emina (0.2 µM) e H_2O_2 (Concentrazione saturante, 500 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

Le costanti K_M e k_{cat} sono determinate come negli studi precedenti.

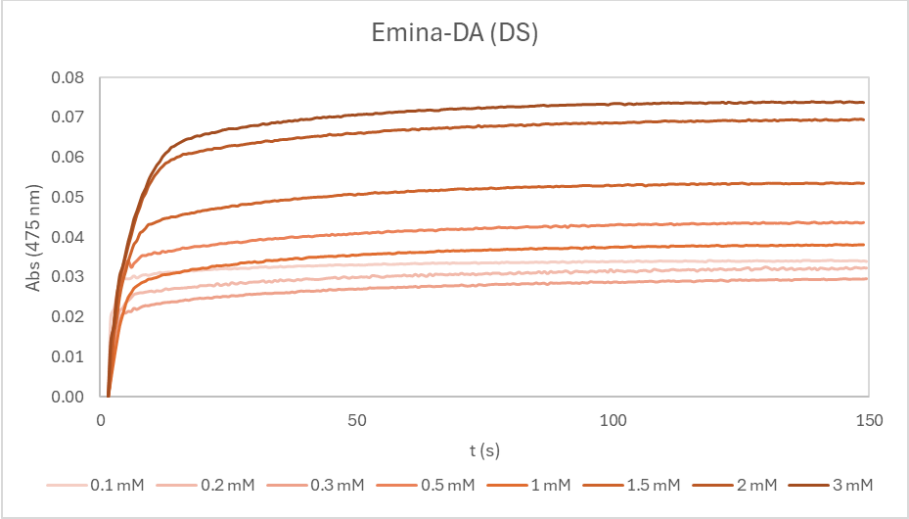


Fig.62 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato dopamina (da 0.1 mM a 4 mM) in presenza di emina (0.2 µM) e di perossido (500 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

V totale (µL)	1600
[FeTCPC] (µM)	0.2
[H_2O_2] saturante (mM)	400

Abs/s	[DA] (mM)	v (s^{-1})
0.002554	0.1	3.869
0.005259	0.5	7.968
0.007016	1	10.63
0.01122	1.5	17.00
0.01223	2	18.53
0.01351	3	20.47
0.01422	4	21.55

Tab.25 *Dati relativi all'attività perossidasica del FeTCPC in dipendenza dalla concentrazione di substrato dopamina, con FeTCPC (0.2 µM) e H_2O_2 (Concentrazione saturante, 400 mM) in tampone fosfato 20 mM pH 7.4.*

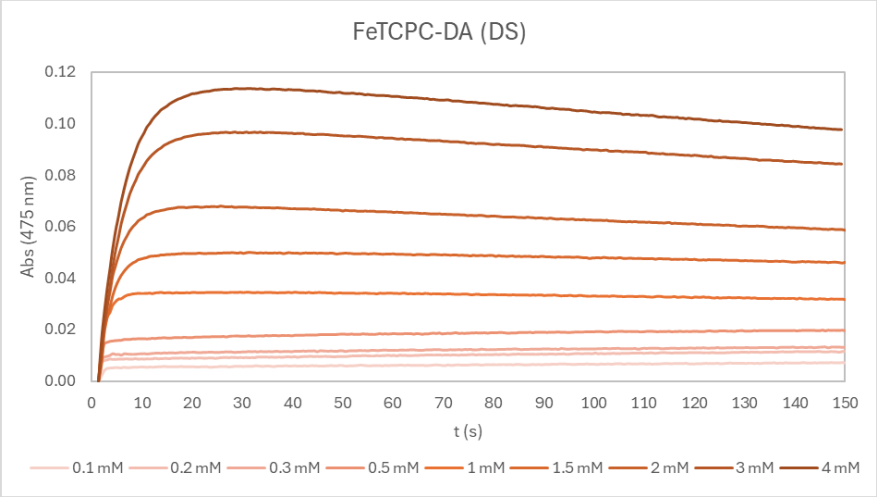


Fig.63 *Profili cinetici della reazione di ossidazione del substrato dopamina (da 0.1 mM a 4 mM) in presenza di FeTCPC (0.2 µM) e di perossido (400 mM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4.*

5.6.5 Attività catalasica dei corroli

L'attività catalasica dei corroli in esame è determinata seguendo la reazione di ossidazione del substrato acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS) eseguita dalla perossidasi da rafano (HRP), reazione che porta alla formazione del radicale $ABTS^{\cdot+}$, che presenta una banda di assorbimento facilmente rilevabile a 660 nm. La reazione viene seguita per una durata di 600 s.

Le soluzioni di H_2O_2, della catalasi, dell'ABTS e dell'HRP vengono preparate in H_2O Milli-Q, mentre le soluzioni dei corroli sono preparate in MeOH; inoltre vengono usate come riferimento l'emina e l'enzima catalasi.

Per prima cosa viene fatta incubare per 10 minuti in cuvetta una soluzione contenente il catalizzatore (HRP, corroli, emina o TEXA) e H_2O_2 in tampone fosfato 20mM, pH 7.4. Alla soluzione incubata viene aggiunto l'ABTS e per ultimo l'HRP, facendo così partire la reazione e la cinetica.
Di seguito sono riportare le condizioni sperimentali:

[ABTS] (mM)	0.1
[Catalizzatore] (µM)	1
[Catalasi] (µM)	0.1
[H_2O_2] (mM)	5
[HRP] (ηM)	40
V totale (µL)	1600

5.6.7 Ossidazione dell'ascorbato

L'ossidazione dell'ascorbato è valutata seguendo il decrescere della banda di assorbimento a 265 nm, in presenza di Cu^{II}, peptide Aβ16, corroli (FeTCPC, MnTCPC, MnTPC e MnTPCMe) e H_2O_2, il tutto in tampone fosfato 20mM, pH 7.4 per una durata di 150 s; viene usata come riferimento l'emina. Sono eseguiti due set di cinetiche, il primo in assenza di H_2O_2, il secondo con H_2O_2.
Viene prima valutato il consumo del solo ascorbato, poi dell'ascorbato in presenza di Cu^{II}, in presenza di Cu^{II} e corroli ed infine in presenza di Cu^{II}, corroli e peptide Aβ16. Il Cu^{II} viene aggiunto per ultimo facendo partire la cinetica. Di seguito sono riportate le condizioni sperimentali:

V totale (µL)	1600
[ascorbato] (mM)	0.15
[Cu^{II}] (µM)	20
[corroli] (µM)	4
[Aβ16] (µM)	20
[H_2O_2] (mM)	1

5.6.8 Identificazione delle modifiche ossidative del peptide Aβ16 mediante HPLC/MS

Le modifiche ossidative sulla sequenza peptidica sono analizzate attraverso HPLC-ESI\MS. vengono preparati 4 campioni contenenti ascorbato (15 mM), Cu^{II} (20 μM), peptide Aβ16 (20 μM) e un corrolo ciascuno (4 μM) in tampone fosfato 20 mM, pH 7.4. Le soluzioni sono lasciate ad incubare per 2 h a 5°C. Lo strumento HPLC-ESI\MS utilizza una colonna Phenomenex, Jupiter 4 um, 2,0 × 150 mm, Proteo 90 Å, flusso 0,2 ml/min, i solventi usati sono H_2O milli-Q (solvente A) e acetonitrile (solvente B) addizionati dello 0.1% di acido formico; il gradiente utilizzato parte da 98% del solvente A per 5 minuti, seguito da un gradiente lineare da 98% a 55% del solvente A per 65 minuti. I dati sono stati elaborati con i programmi Bioworks 3.1 e XcaliburTM 2.0.7 SP1.

6. Bibliografia

1. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. *Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health*. Oxid Med Cell Longev. 2017.

2. Gaeta, A.; Hider, R.C. *The crucial role of metal ions in neurodegeneration: The basis for a promising therapeutic strategy*. Br. J. Pharmacol. 2005.

3. Selkoe DJ, Hardy J. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*. EMBO Mol Med. 2016.

4. Thiabaud G, Pizzocaro S, Garcia-Serres R, Latour JM, Monzani E, Casella L. *Heme binding induces dimerization and nitration of truncated β-amyloid peptide Aβ16 under oxidative stress.* Angew Chem Int Ed Engl. 2013.

5. Z. Gross, N. Galili, I. Saltsman Angew. Chem. Int. Ed., 38 (1999), p. 1427.

6. Ashleigh L. Ward, Heather L. Buckley, Wayne W. Lukens, and John Arnold, *Synthesis and Characterization of Thorium(IV) and Uranium(IV) Corrole Complexes*, Journal of the American Chemical Society 2013.

7. Di Natale, Corrado, Claude P Gros, and Roberto Paolesse. "*Corroles at Work: A Small Macrocycle for Great Applications*." Chemical Society reviews. 51.4, 2022.

8. Zhang, Zhao et al. "*Photocytotoxicity and G-quadruplex DNA Interaction of Water-soluble Gallium(III) Tris(N -methyl-4-pyridyl)Corrole Complex*." Applied organometallic chemistry. 30.3, 2016.

9. Haber A, Mahammed A, Fuhrman B, Volkova N, Coleman R, Hayek T, Aviram M, Gross Z. *Amphiphilic/Bipolar metallocorroles that catalyze the decomposition of reactive oxygen and nitrogen species, rescue lipoproteins from oxidative damage, and attenuate atherosclerosis in mice.* Angew Chem Int Ed Engl. 2008.

10. Sessler, Jonathan L et al. "*Gadolinium(III) Texaphyrin: A Novel MRI Contrast Agent.*" Journal of the American Chemical Society. 115.22, 1993.

11. Darren Magda, Richard A. Miller, *Motexafin gadolinium: A novel redox active drug for cancer therapy*, Seminars in Cancer Biology, Volume 16, Issue 6, 2006, Pages 466-476.

12. Zhang Yang, Chen Huan, Wen Jin-Yan, Wang Xiang-Li, Wang Hui, Ji Liang-Nian, Liu Hai-Yang. *Oxidative DNA Cleavage Mediated by Water-soluble Carboxyl Iron(III) Corrole*[J]. Chem. J. Chinese Universities, 2013, 34(11): 2462.

13. Zhang, Y., Wang, Q., Wen, J., Wang, X., Mahmood, M.H., Ji, L. and Liu, H. (2013), *DNA Binding and Oxidative Cleavage by a Water-soluble Carboxyl Manganese(III) Corrole*. Chin. J. Chem., 31: 1321-1328.

14. Fu B, Zhang D, Weng X, Zhang M, Ma H, Ma Y, Zhou X. *Cationic metal-corrole complexes: design, synthesis, and properties of guanine-quadruplex stabilizers*. Chemistry. 2008.

15. Christopher D Putnam, Andrew S Arvai, Yves Bourne, John A Tainer, *Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism.* Journal of Molecular Biology, Volume 296, Issue 1, 2000, Pages 295-309.

16. Olive J. Njuma, Elizabeth N. Ndontsa, Douglas C. Goodwin, *Catalase in peroxidase clothing: Interdependent cooperation of two cofactors in the catalytic versatility of KatG*, Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 544, 2014, Pages 27-39

17. Whittaker JW. *Non-heme manganese catalase--the 'other' catalase*. Arch Biochem Biophys. 2012 Sep 15.

18. Cheignon C, Collin F, Faller P, Hureau C. *Is ascorbate Dr Jekyll or Mr Hyde in the Cu(Aβ) mediated oxidative stress linked to Alzheimer's disease?* Dalton Trans. 2016 Aug 9.

19. Chiara Bacchella, Stefania Nicolis, Simone Dell'Acqua, Enrico Rizzarelli, Enrico Monzani, and Luigi Casella, *Membrane Binding Strongly Affecting the Dopamine Reactivity Induced by Copper Prion and Copper/Amyloid-β (Aβ) Peptides. A Ternary Copper/Aβ/Prion Peptide Complex Stabilized and Solubilized in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles.* Inorganic Chemistry 2020 *59* (1), 900-912

20. Yanming Zhao, Shibo Qi, Zheng Niu, Yunlei Peng, Chuan Shan, Gaurav Verma, Lukasz Wojtas, Zhenjie Zhang, Bao Zhang, Yaqing Feng, Yu-Sheng Chen, and Shengqian Ma, *Robust Corrole-Based Metal–Organic Frameworks with Rare 9-Connected Zr/Hf-Oxo Clusters*, Journal of the American Chemical Society 2019, supporting informations.

21. Roberto Paolesse, Sara Nardis, Francesco Sagone, Richard G. Khoury, *Synthesis and Functionalization of meso-Aryl-Substituted Corroles*, The Journal of Organic Chemistry 2001.