



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Sede Consorzata: FBK & CNR, Istituto di Biofisica di Trento

Dipartimento di BIOLOGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN: FISIOLOGIA MOLECOLARE E BIOLOGIA STRUTTURALE
CICLO XX

**Analisi funzionale e strutturale di peptidi antimicrobici
prodotti da *Pseudomonas* spp. e loro potenzialità in
applicazioni biotecnologiche**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Benedetto Salvato

Supervisor: Ch.mo Prof. Luigi Bubacco

Dr. Mauro Dalla Serra

Dottoranda: Roberta Paletti

DATA CONSEGNA TESI
31 gennaio 2008

INDICE

INDICE	I
RIASSUNTO	5
SUMMARY	5
CAPITOLO I	
INTRODUZIONE.....	7
<i>Pseudomonas spp. e le sue tossine</i>	
1.1 Il batterio.....	9
1.1.1 <i>Pseudomonas syringae</i>	9
1.1.2 <i>Pseudomonas tolaasii</i>	11
1.1.3 <i>Pseudomonas reactans</i>	12
1.1.4 Altri <i>Pseudomonas spp.</i>	13
1.2 Le tossine.....	14
1.2.1 Struttura.....	14
Micine.....	14
WLIP.....	15
Peptine.....	16
1.2.2 Biosintesi.....	19
Micine.....	20
Peptine.....	21
Regolazione della produzione.....	22
Secrezione.....	23
1.2.3 Ruolo nella patogenicità.....	23
1.2.4 Il meccanismo d'azione.....	24
1.3 Possibili applicazioni.....	26
1.3.1 Applicazioni biomediche.....	26
1.3.2 Applicazioni in bioagricoltura.....	27
1.3.3 Altre applicazioni.....	28
CAPITOLO II	
MATERIALI E METODI.....	29
2.1 Materiali.....	31
2.1.1 Tossine.....	31
2.1.2 Soluzioni.....	32
2.1.3 Lipidi.....	32

2.1.4 Altri composti	32
2.2 Metodi	33
2.2.1 Preparazione di liposomi contenenti calceina e misure di permeabilizzazione	33
2.2.2 Test di attività emolitica su globuli rossi di coniglio (RRBC)	34
2.2.3 Effetto inibitorio degli analoghi non attivi sulle forme attive dei LDP.....	35
2.2.4 Inserimento dei LDP in un monostrato lipidico: misura della variazione della pressione superficiale con il metodo di Wilhelmy	36
2.2.5 Studio della struttura del poro	39
2.2.6 Preparazione di nuovi sistemi modello partendo da organismi patogeni	42
LUV da lipidi estratti da patogeni fungali	42
LUV da membrane di lievito	43
 CAPITOLO III	
RISULTATI E DISCUSSIONE	45
3.1 Attività su membrane modello e naturali	47
3.1.1 Importanza delle caratteristiche strutturali dei LDP sull'attività permeabilizzante	47
3.1.2 Effetto inibitorio delle forme non attive sulla capacità permeabilizzante dei LDP attivi.....	52
3.1.3 Legame ed inserimento dei LDP in un monostrato lipidico.....	57
3.1.4 Inibizione della capacità di interazione con la membrana di tol I e WLIP da parte di WLIP idrol	62
3.2. Struttura del poro	67
3.3 Attività su nuovi sistemi modello preparati da organismi patogeni fungali	70
3.3.1 Azione biologica su liposomi preparati da lipidi estratti da organismi fungali	70
3.3.2 Azione su liposomi preparati dalla membrana isolata da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
 CAPITOLO IV	
CONCLUSIONI	75
BIBLIOGRAFIA.....	79
RINGRAZIAMENTI.....	89

Riassunto

I lipodepsipeptidi (LDP) sono un gruppo di metaboliti ciclici secondari prodotti da diverse specie di *Pseudomonas*. Sulla base della lunghezza della loro catena peptidica, sono solitamente suddivisi in due gruppi: le micine e le peptine. Il primo gruppo è costituito da peptidi N-acilati di 9 aminoacidi chiusi in una struttura ciclica tra il primo e l'ultimo residuo. Le peptine sono più grandi e più complesse. Possiedono una catena peptidica dai 18 ai 25 aminoacidi, ciclizzata nella porzione C-terminale a formare un anello lattonico (di 5 o 8 residui aminoacidici), ed N-acilata dalla catena di un acido grasso. Entrambi i LDP sono espressi *in vivo* e contribuiscono alla patogenesi del batterio. Il loro sito di azione primario è la membrana plasmatica delle cellule vegetali, ma possono attaccare anche altri organismi. Peptine e micine inducono entrambe emolisi degli eritrociti e la permeabilizzazione di liposomi, tramite la formazione di pori. L'attività emolitica delle micine è maggiore rispetto a quella delle peptine e risulta proporzionale all'indice anfipatico della molecola. La capacità permeabilizzante è dipendente anche dalla composizione lipidica. In particolare le micine mostrano una preferenza per le membrane che contengono steroli, mentre le peptine sono più attive in presenza di fosfolipidi, specialmente la sfingomielinina. Le peptine sono in grado di inibire la crescita di batteri Gram positivi ed hanno una maggiore attività fitotossica rispetto alle micine. Queste ultime presentano invece un'elevata attività antifungale. Recentemente è stato dimostrato che tale differenza è da attribuirsi alla presenza della parete cellulare, che funge da setaccio molecolare, e non permette il passaggio dei peptidi più grandi, che quindi non possono raggiungere il loro bersaglio d'azione. È stato infatti osservato uno spiccato sinergismo tra LDP ed enzimi degradanti la parete cellulare dei funghi. L'attività antifungale delle peptine è maggiormente favorita dall'azione degli enzimi, indicando un importante ruolo di queste tossine contro gli organismi fungali. Chiaramente, un'azione sinergica tra gli enzimi degradativi della parete cellulare ed i LDP può essere parte del meccanismo adoperato *in vivo* dal batterio nelle interazioni con altri microrganismi, poiché è nota la produzione di questi enzimi da parte di alcuni ceppi di *Pseudomonas*.

Le proprietà antifungali sono potenzialmente utili per lo sviluppo di agenti per il biocontrollo di malattie vegetali, e risultano interessanti anche nella prospettiva di applicazioni biomediche.

Considerevoli perdite economiche in agricoltura sono causate da infezioni fungali che si sviluppano sui frutti durante il periodo di post raccolta. Tradizionalmente queste malattie sono controllate con l'applicazione di fungicidi. La perplessità dell'opinione pubblica sull'utilizzo dei pesticidi chimici e sulla loro potenziale pericolosità, associata allo sviluppo di resistenza da parte di molte popolazioni fungali, ha stimolato la ricerca di strategie alternative. Il controllo biologico dei patogeni è un'alternativa emergente all'utilizzo di sostanze chimiche. Due prodotti, contenenti specie di *Pseudomonas syringae*, sono commercialmente disponibili, in molti Paesi ma non ancora in Italia, per il controllo di muffe su frutta in post raccolta.

Infezioni fungali opportunistiche sono anche causa di un aumento di morbilità e mortalità di pazienti ricoverati in ospedale. Al momento è disponibile un numero limitato di farmaci per curare queste micosi. L'aumentata incidenza delle infezioni fungali ha stimolato la ricerca di nuovi farmaci con un ampio spettro antifungale ma privi di attività tossica. Ad esempio una micina, la pseudomicina B, è stata scelta dalla compagnia farmaceutica Eli Lilly come candidato per la creazione di un nuovo farmaco.

Il chiarimento dei meccanismi d'azione dei LDP appare un requisito fondamentale per la comprensione della loro attività antibiotica e per proporre il loro utilizzo in sicurezza e a ridotto impatto ambientale.

Noi abbiamo investigato l'importanza delle caratteristiche strutturali dei LDP sulla loro funzionalità, intesa qui come abilità di creare una lesione nella membrana di liposomi e globuli rossi. Sono stati analizzati alcuni analoghi di tol I, una peptina prodotta da *Pseudomonas tolaasii*, e di WLIP, un nonapeptide di *P. reactans*. I risultati hanno confermato l'importanza dell'anello lattonico e della catena acilica N-terminale. Inoltre è stata osservata anche la rilevanza di alcuni residui aminoacidici della porzione peptidica. In particolare la sostituzione di alcuni aminoacidi può influire sulla conformazione finale della molecola, e quindi influenzare la sua capacità di interagire con la membrana.

Questo studio ha individuato alcuni derivati di WLIP, prodotti con modifiche chimiche in laboratorio, particolarmente promettenti. Due analoghi, metilato ed acetilato, hanno mostrato di mantenere la stessa attività permeabilizzante sui liposomi (considerato a questo livello un buon sistema modello di patogeno), mentre hanno perso completamente la capacità emolitica (misura della potenziale tossicità di un composto). Questo risulta quindi un ottimo punto di partenza nello sforzo di isolare o produrre LDP molto efficaci ma poco tossici. La comprensione della loro azione è presupposto al loro diretto utilizzo come protettori da patogeni fungali di vario genere. L'individuazione di modifiche strutturali interessanti dei LDP incentiva anche interventi sulla biosintesi dei peptidi, volti a generare un sistema in grado di produrre solo le tossine di nostro interesse. La sua

applicazione avrebbe il vantaggio di produrre facilmente una grande quantità di LDP.

L'analogo di WLIP in cui è stato idrolizzato l'anello lattonico (WLIP idrol) ha perso completamente la capacità di permeabilizzare la membrana. Lo studio dell'interazione della tossina con un monostrato lipidico ha mostrato che l'apertura dell'anello induce anche una diminuzione della sua capacità di inserimento nella membrana, anche se non viene completamente annullata. È interessante notare che WLIP idrol è in grado di inibire l'attività permeabilizzante di alcuni LDP attivi sui liposomi, WLIP e tol I. Lo studio più approfondito sulla natura di questa interazione, mediante l'utilizzo di monostrati lipidici, ha mostrato che WLIP idrol non condiziona la capacità di legame di WLIP, mentre diminuisce sensibilmente l'abilità di inserimento di tol I nella membrana. Si è infine ipotizzato che l'interazione tra WLIP e WLIP idrol possa avvenire a livello della membrana, dove è impedita l'oligomerizzazione dei monomeri di WLIP, necessaria per la formazione di un poro attivo. Tol I e WLIP idrol invece potrebbero interagire anche in soluzione, formando un aggregato che sottrae il LDP attivo all'interazione con la membrana. L'individuazione di un analogo privo di attività, compresa quella emolitica (potenzialmente tossica), ma in grado di diminuire l'azione di LDP naturali fa prospettare una nuova applicazione dei LDP. WLIP idrol potrebbe essere un buon candidato come inibitore dell'attività patogena di *Pseudomonas tolaasii* (che produce tol I) e di *P. reactans* (che sintetizza WLIP) verso i funghi coltivati *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus*, il loro bersaglio d'azione naturale. È inoltre importante ricordare che tra i LDP si sono sempre osservate delle grandi similitudini funzionali, specialmente all'interno delle classi di micine e peptine. L'ipotesi che possano esistere altre interazioni simili tra LDP, prodotti anche da altri ceppi di *Pseudomonas*, non è quindi da escludere.

È stata investigata la natura dell'interazione di differenti LDP con i lipidi del doppio strato. I risultati hanno mostrato che le peptine promuovono la ridistribuzione di un lipide fluorescente tra i due foglietti lipidici. Questa è una chiara indicazione della formazione di un poro "toroidale", costituito in parte dai peptidi ed in parte dalle teste polari dei lipidi del doppio strato. Questa lesione permette il contatto tra il foglietto interno ed esterno della membrana.

Abbiamo infine preparato vescicole con lipidi estratti da differenti patogeni fungali per saggiare l'attività di peptine e micine con sistemi più simili al loro bersaglio d'azione naturale. I nuovi sistemi modello hanno presentato una maggior sensibilità verso le peptine, supportando il loro importante ruolo antifungale, quando manca l'impedimento della parete cellulare.

Summary

Lipodepsipeptides (LDP) are a group of cyclic secondary metabolites produced by many *Pseudomonas* species. On the basis of their amino acid chain length, they are usually divided into two groups: the mycins and the peptins. The first group consists of acylated peptides of 9 amino acids closed in a cyclic structure between the first and the last residue. The peptins are bigger and more complex than the former, being composed of 18 to 25 amino acids, again cyclized (usually in an 8 or in a 5 residues ring) and acylated. Both kind of peptides, mycins and peptins, are expressed *in vivo*, they significantly contribute to bacterial pathogenesis and have the plasma membrane of plants as their primary site of action, but may have also different target organisms. Both classes of LDPs induce hemolysis and leakage from liposomes by the formation of pores. The hemolytic activity of the smaller mycins is higher than that of the bigger peptins and proportional to the amphipathic index of the molecule. The extent of permeabilization is dependent also on the composition of the lipid membrane. In particular, mycins show a preference for sterols, whereas peptins are more active on phospholipids, especially sphingomyelin. The peptins inhibit the growth of Gram positive bacteria and have stronger phytotoxic activity than the mycins. The mycins displays a prominent antifungal activity. This is caused by the cell wall that blocks the big peptides. Recently was in fact observed a synergism between LDP and cell wall degrading enzymes against different fungal species. The antifungal activity of peptins was much more increased by the enzymes action than that of the mycins, suggesting a stronger antifungal role for the peptins.

The antifungal property is potentially useful for the development of biocontrol agents and also appears interesting in the perspective of biomedical applications. Considerable economic loss in agriculture is caused by fungal infections developed on fruit during the post-harvest period. Traditionally, the post-harvest diseases have been controlled by the application of fungicides during processing. However, because of negative public perception about the use of pesticides and their potential harmfulness, development of resistance to fungicides among fungal population, different approaches are desirable. Biological control of post-harvest pathogens is an emerging alternative to the use of synthetic chemicals. Two products, containing *Pseudomonas syringae* strains, are commercially available, in many countries but not yet in Italy, to control post-harvest diseases.

Opportunistic fungal infections are also increasingly important causes of morbidity and mortality in hospitalized patients. A limited number of agents are available to treat systemic mycoses. The increase in the incidence of fungal infections have prompted a search for new antifungal agents with broad antifungal activities and minimal toxicity. A mycin, pseudomycin B, was chosen by the Eli Lilly pharmaceutical company as a candidate for a new antifungal drug.

For these strategies is very important to clarify the mechanism of action of LDPs. We investigated the importance of LDPs structural characteristics on their ability to create a lesion on liposomes and RBC. Some structural analogues of tol I, produced by *Pseudomonas tolaasii*, and WLIP, by *P. reactans*, were tested. The results have suggested the importance of the lactone ring and the N-terminus acyl moiety. Furthermore, the importance of some residues in the peptide chain was observed. In particular structural changes in these amino acids may modify the LDP conformation and consequently their permeabilization ability. The analysis individuated some WLIP derivatives completely non active. Hydrolyzed WLIP resulted particularly interesting. The study of the interaction of the LDP with lipid monolayer showed that the opening of the ring decreases the ability to bind the membrane. Moreover, hydrolyzed WLIP is able to inhibit the permeabilizing ability of its natural form, WLIP, and also of tol I on vesicles. Experiments on monolayer suggested that hydrolyzed WLIP does not affect the insertion in the membrane of WLIP while it decreases the tol I interaction with the monolayer. We hypothesized that the interaction between WLIP and hydrolyzed WLIP can happen at the membrane level, blocking the oligomerization process which is necessary for the pore formation. Tol I and hydrolyzed WLIP instead can interact in solution, forming an aggregate that subtract the active LDP to the interaction with the membrane. Finally, hydrolyzed WLIP could be proposed like inhibitor of pathogen action of *Pseudomonas tolaasii* and *P. reactans*.

Furthermore, the nature of the interaction of the different LDPs with lipids by determining the transmembrane movement of a fluorescent lipid asymmetrically included in the bilayer was also investigated. The results suggested that peptins promoted the lipid transfer between the inner and the outer membrane layer. This was a clear indication that a mixed lipid/peptide pore with “toroidal” structure is formed. This lesion permits the contact of the inner and outer leaflets of the membrane bilayer.

Finally we prepared vesicles from different fungal pathogen lipids to test peptins and mycins activity on systems more similar to natural targets. On these new model systems peptins displayed more activity than the mycins, supporting the strong antifungal role of the peptins when the cell wall is removed.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

***Pseudomonas* spp. e le sue tossine**

1.1 Il batterio

Pseudomonas è un genere dei proteobatteri, appartenente alla famiglia delle pseudomonadi. L'estesa presenza delle pseudomonadi in natura le ha rese note sin dalla prima storia della microbiologia. Il nome *Pseudomonas* fu definito nel 1894 per descrivere batteri Gram-negativi, di forma bastoncellare e dotati di uno o più flagelli polari che ne permettono il movimento. Generalmente sono batteri aerobi che non formano spore. Le pseudomonadi furono isolate da molte nicchie naturali. Numerose specie presentano patogenicità animale o vegetale.

Le specie che abbiamo preso in considerazione durante questo lavoro sono principalmente fitopatogene. Differiscono nello spettro d'azione ma hanno in comune la produzione di tossine simili.

1.1.1 *Pseudomonas syringae*

Gli studi su *Pseudomonas syringae* risalgono all'inizio del ventesimo secolo. Questo organismo fu originariamente isolato dal lillà (*Syringa vulgaris*, da cui prende il nome) nel 1902 da van Hall, che descrisse i sintomi della malattia e riprodusse l'infezione naturale inoculando il batterio nella pianta di lillà. Egli intuì anche il coinvolgimento di tossine nella virulenza. Nel corso del decennio successivo fu stabilito che *P. syringae* è un batterio Gram-negativo, fitopatogeno, con un ampio spettro d'azione che causa danni in più di 30 generi di piante. Il batterio è eterogeneo e si divide in 57 pathovar, che si differenziano sulla base delle piante infettate, dei sintomi provocati e dei profili biochimici. Molte di queste infettano mono- e di-cotiledoni di notevole importanza economica. *P. syringae* è l'agente causale del cancro batterico degli alberi da frutto con nocciolo (fig. 1.1), del danneggiamento dell'albero di limoni, dell'inibizione dell'inflorescenza nell'albero di pere, della formazione di spots sulle foglie di fagiolo e di mais (fig. 1.2). *P. syringae* pv. *syringae* è l'unico pathovar conosciuto a provocare necrosi dei tessuti. Molti causano spots su foglie e fusti, frutti e piccioli, in generale su tutte le parti verdi delle piante ospiti suscettibili. Il cancro degli alberi da frutto è caratterizzato dalla formazione di un essudato colloso che è

uno dei sintomi più caratteristici causati dal batterio.



Fig. 1.1 Cancro agli alberi da frutto (*P. syringae* pv. *syringae* e pv. *mursprunorum*).



Fig. 1.2 Spots su foglia di fagiolo (*P. syringae* pv. *syringae*).

Le sottospecie hanno diverse preferenze verso gli ospiti da infettare. Alcune possono crescere su più di una pianta, altre sono più specifiche. Il batterio può vivere anche in forma epifitica, cioè mantenendo una popolazione sulla superficie delle foglie senza provocare la malattia. Anche a questo livello c'è una certa variabilità. Il patogeno è disseminato dal vento e dalla pioggia, lo sviluppo stesso della malattia dipende dal clima e dai cambiamenti di stagione. In estate il batterio persiste in forma latente sulle foglie ed ha un'attività contaminante solo d'inverno, al freddo e in condizioni umide (Grgurina I., 2002).

Alla fine degli anni '60 un gruppo di fitopatologi americani guidati da De Vay, studiarono più approfonditamente il batterio con lo scopo di isolare i suoi metaboliti secondari tossici e scoprire il loro coinvolgimento nella virulenza. Essi mostrarono che l'estratto prodotto dal batterio in coltura, iniettato in piante sane, produceva sintomi paragonabili a quelli osservati nelle piante naturalmente infettate dal batterio. Osservarono inoltre come questo materiale fitopatogeno possedesse un'attività antibiotica contro alcuni microrganismi procarioti ed eucarioti.

All'inizio il materiale bioattivo fu considerato un singolo composto che prese il nome di siringomicina. Successivamente la messa a punto di un più efficiente metodo di separazione mediante HPLC in fase inversa permise di svelare la complessità dell'estratto bioattivo del brodo di coltura di *P. syringae* pv. *syringae* e di isolare i singoli componenti. Da analisi strutturali, chimiche e spettroscopiche si è visto che tali composti sono i lipodepsipeptidi (LDP) (Ballio et al., 1988).

1.1.2 *Pseudomonas tolaasii*

Pseudomonas tolaasii è classificato come membro del gruppo tassonomico *Pseudomonas fluorescens*. Alcuni studi discordano con questa classificazione e suggeriscono che il batterio dovrebbe essere incluso in una specie separata, o in un altro gruppo (Rainey et al., 1992; Wells et al., 1996). *P. tolaasii* non è un patogeno ospite specifico, infatti può infettare quasi tutte le specie di funghi ed anche alcune piante. I funghi commestibili ed economicamente importanti, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Agaricus bisporus*, *A. bitorquis* ed altri *Agaricales* sono ospiti usuali del batterio (Lo Cantore, 2001). Principalmente il batterio è però conosciuto come l'agente causale della "Maculatura bruna" di *Agaricus bisporus* (fig. 1.3).



Fig. 1.3 Maculatura bruna di *Agaricus bisporus*.

P. tolaasii è stato descritto anche come patogeno di alcune piante, come cavolfiori, *Nicotiana tabacum*, altre *Solanum* spp. e fragola. Può essere presente anche in forma saprofito. È stato isolato dalla superficie di pere e da fagioli (Lo Cantore, 2001).

L'agente causale principale della patogenicità sembra essere una tossina (un LDP) prodotta dal batterio, la tolaasina I (fig. 1.7). Infatti quando è applicata direttamente sui funghi riproduce i sintomi della "Maculatura bruna" (Brodey et al., 1991; Rainey et al., 1991; Hutchison and Johnstone, 1993). È sicuramente il fattore di virulenza principale del patogeno a cui si addebitano i maggiori danni sugli pseudotessuti fungini (Peng, 1986; Rainey et al., 1992; Soler-Rivas et al., 1999b).

1.1.3 *Pseudomonas reactans*

P. reactans è un'entità batterica non ancora classificata che viene utilizzata per la specifica identificazione di *P. tolaasii* nel saggio della "linea bianca" (Wong and Preece, 1979). Quando le colonie dei due batteri sono accresciute ad alcuni millimetri di distanza sul substrato Pseudomonas Agar F e successivamente incubate a 25°C per 48 ore, viene osservato un precipitato bianco, sotto forma di una linea bianca tra le due colonie. Questo è il risultato della specifica interazione tra un LDP prodotto da *P. reactans*, chiamato White Line Inducing Principle (WLIP) (fig. 1.6) e la tolaasina I, da *P. tolaasii*. La formazione della linea bianca può avvenire anche quando altri ceppi batterici, come *P. gingeri* ed alcuni biotipi di *P. fluorescens*, sono accresciuti vicino a colonie di *P. tolaasii*. Questo indica che tali batteri sono in grado di produrre sostanze correlate strutturalmente a WLIP, in grado di interagire con la tolaasina I (Lo Cantore, 2001).

Il batterio, ritenuto un saprofito, è in grado di causare l'imbrunimento di blocchetti di pseudotessuti ricavati da pilei di *Agaricus bisporus* oltre che di carpofori interi dello stesso fungo (Iacobellis and Lo Cantore, 1997; Wells et al., 1996). Tale batterio è risultato responsabile, insieme a *P. tolaasii* ed altre pseudomonadi fluorescenti, dell'ingiallimento di *Pleurotus ostreatus* (fig. 1.4) (Iacobellis and Lo Cantore, 1998).

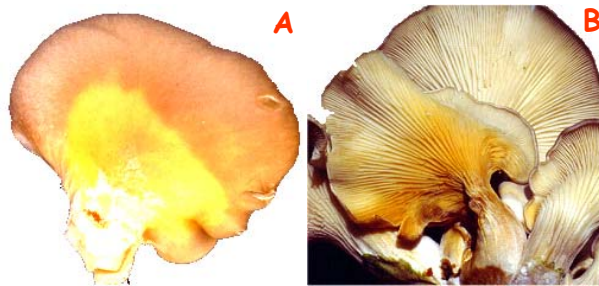


Fig. 1.4 Ingiallimento del pileo (A) e delle lamelle (B) di *Pleurotus ostreatus*.

La patogenicità, anche in questo caso, sembra essere dovuta alla produzione di metaboliti tossici responsabili delle alterazioni sui funghi. Non è escluso che tale sostanza sia lo stesso peptide denominato WLIP (Mortishire-Smith et al., 1991), responsabile della formazione del precipitato in presenza della tolaasina I. Ci sono infatti indicazioni che la capacità di alterare gli pseudotessuti di *Agaricus bisporus* sia correlata alla capacità di produrre WLIP (Lo Cantore, 2001).

1.1.4 Altri *Pseudomonas* spp.

Altre specie di *Pseudomonas* producono fitotossine, strutturalmente molto simili a quelle di *P. syringae*, che rientrano nella famiglia dei lipodepsipeptidi. Le similitudini strutturali inducono probabilmente anche uno stesso meccanismo d'azione a livello molecolare e quindi fanno ipotizzare un'attività biologica molto simile.

P. corrugata è un batterio che è stato isolato in tutto il mondo dal terreno e dalla rizosfera, come da molte specie di piante. È l'agente causale di alcune malattie necrotiche di piante coltivate, come la necrosi del midollo del pomodoro e del peperone. La sua infezione provoca avvizzimento e morte della pianta. Il tipo di danno causato, in particolare la perdita di turgore del tessuto parenchimatico, il collassamento cellulare e la necrosi, suggerisce il coinvolgimento delle tossine prodotte dal patogeno nello sviluppo dei sintomi delle malattie. *P. corrugata* è anche un forte antagonista di molti batteri (Scaloni et al., 2004). Il batterio produce LDP, la cormicina (CM), e le due forme A e B della corceptina (CP) (Emanuele et al., 1998) (fig. 1.5 e 1.7).

P. fuscovaginae è il fitopatogeno identificato come agente batterico causale del marciume della guaina del riso e di altre graminacee come *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Avena sativa* e *Zea mays* (Ballio et al., 1996). Questo patogeno causa lesioni necrotiche delle foglie e riduzione della normale crescita del peduncolo, che risulta nell'inibizione dell'inflorescenza e nella sterilità della pannocchia. Questo batterio produce due metaboliti di 19 residui chiamati fuscopeptina A e B (Baré et al., 1999) (fig. 1.7).

1.2 Le tossine

1.2.1 Struttura

La particolarità del nome di queste tossine è dovuta alla loro struttura. I lipodepsipeptidi infatti sono composti da una parte lipidica e da una peptidica, “depsi” indica il legame estere che si crea tra due aminoacidi per formare un anello lattonico. Il residuo N-terminale è N-acilato da una lunga catena priva di ramificazioni di un acido grasso idrossilato nella posizione 3. La regione C-terminale contiene diversi aminoacidi non canonici, comprendenti: aminoacidi in configurazione D, acido deidroamino butirrico (Dhb), acido 2,4-diaminobutirrico (Dab), acido 3-idrossi aspartico (3-OH-Asp) e 4-clorotreonina (4-Cl-Thr). Sulla base della lunghezza della catena aminoacidica i LDP finora caratterizzati sono generalmente suddivisi in due gruppi: le micine (Takemoto et al., 2003) e le peptine (Dalla Serra et al., 2003a).

Micine

Sono nonapeptidi con una stessa sequenza C-terminale, Dhb-Asp(3-OH)-Thr(4-Cl), ed una serina N-terminale N-acetilata da un acido grasso ed O-acetilata dal carbossile della 4-cloro treonina per formare un anello lattonico. I cinque aminoacidi localizzati tra la serina N-terminale e il tripeptide C-terminale hanno solitamente una struttura fuori dal comune e caratterizzano la regione variabile della parte peptidica (Segre et al., 1989) (fig 1.5). La variabilità nella catena acilica permette di distinguere forme analoghe dei metaboliti.

Studi sulla conformazione di siringotossina e pseudomicina hanno mostrato che la struttura tridimensionale in soluzione è condizionata da due caratteristiche peculiari: i residui contenenti un doppio legame (ad es. Dhb), che conferiscono una rigidità conformazionale alla catena peptidica, e l’alternanza di chiralità che provoca una preferenza per il ripiegamento turn. L’anello delle micine prende la forma delle cuciture di una palla da tennis (Takemoto et al., 2003) (fig. 1.8).

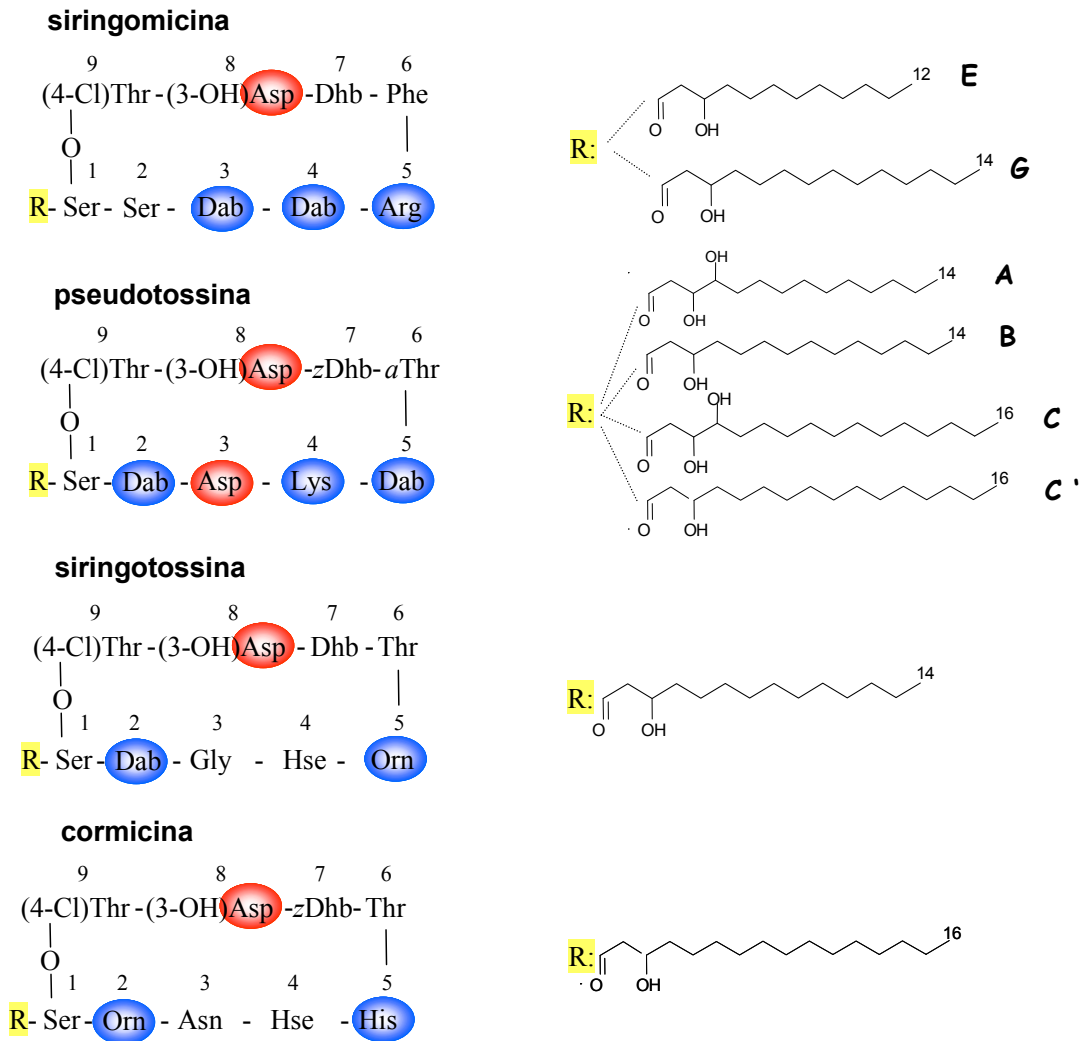


Fig. 1.5 Struttura primaria dei LDP appartenenti alla classe delle micine. In rosso sono segnati i residui con una carica negativa ed in blu quelli con una carica positiva. Dab, acido diamminobutirrico; Dhb, acido deidroaminobutirrico; α Thr, allotreonina; Hse, omoserina; Orn, ornitina.

WLIP

WLIP è stato purificato per la prima volta da Mortishire et al. (Mortishire-Smith et al., 1991). È costituito da nove aminoacidi, sei dei quali D-isomeri, ed un residuo dell'acido β -idrossidecanoico N-terminale. La differenza dalle micine è la presenza di un anello lattonico, di soli setti aminoacidi, tra la D-treonina in

posizione 3 e la L-isoleucina N-terminale (fig. 1.6). Esso è strutturalmente identico ad un altro lipodepsipeptide chiamato viscosina (Laycock et al., 1991), prodotto da *P. fluorescens*, tranne per la chiralità dell'aminoacido leucina in posizione 5, che è D- in WLIP ed L- nella viscosina. La molecola presenta un ripiegamento a foglietto β di tipo II tra Ser6 e Ile9. Il ripiegamento globale assomiglia, come per gli altri nonapeptidi analizzati, alle cuciture di una palla da tennis (Mortishire-Smith et al., 1991). (fig. 1.8)

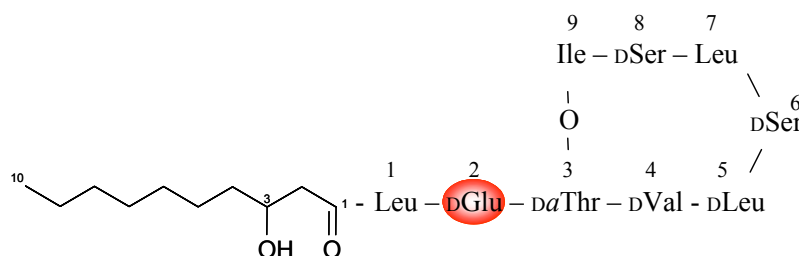


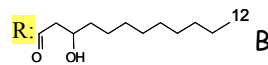
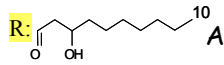
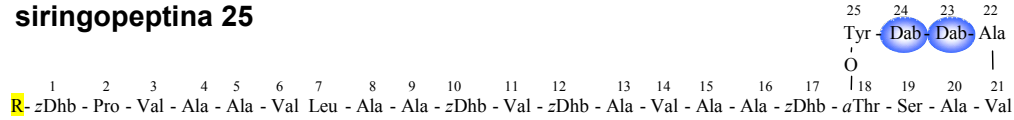
Fig. 1.6 Struttura primaria di WLIP, prodotto da *Pseudomonas reactans*. In rosso è segnato il residuo aminoacidico carico negativamente. α Thr, allotreonina

Peptine

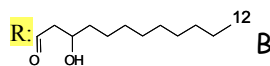
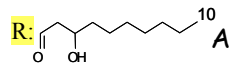
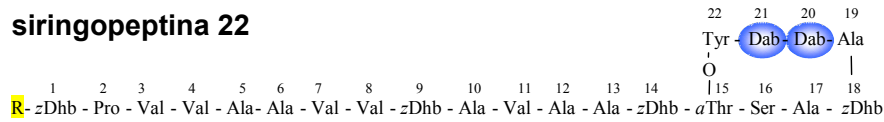
Sono componenti meno polari delle micine. Sono più grandi e più complesse nella forma. Sono composte da un numero variabile di aminoacidi (tra 18 e 25), ciclizzati nella parte C-terminale in anelli da 5 o 8 residui, e acilati all'estremità N-terminale. Sono molecole basiche poiché nell'anello contengono residui carichi positivamente. La catena peptidica ha un alto contenuto di residui idrofobici (Menestrina et al., 2003). Le differenze più pronunciate tra le peptine riguardano la regione C-terminale della molecola e la porzione dell'acido grasso (Grgurina I., 2002) (fig. 1.7).

Analisi strutturali sulla SP25A (da *P. syringae*) in soluzione mostrano che la parte peptidica è caratterizzata da tre regioni interrotte dai quattro residui rigidi Dhb: un loop che include i residui dalla Pro2 alla Val6; una zona elicoidale (simile a un alfa-elica sinistrorsa) che include i residui da Ala8 a Ala15; e un anello lattonico comprendente i residui tra Thr18 e Tyr25 (fig. 1.8). La catena acilica non è coinvolta in nessuna regione strutturata; è abbastanza flessibile, nonostante la presenza di un persistente legame idrogeno tra l'OH della catena ed l'NH del Dhb1 (Ballio et al., 1995). La struttura dell'anello assomiglia alle cuciture di una palla da tennis, la stessa trovata nelle micine (Grgurina I., 2002; Dalla Serra et al., 2003a; Carpaneto et al., 2002).

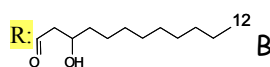
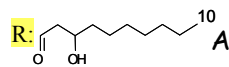
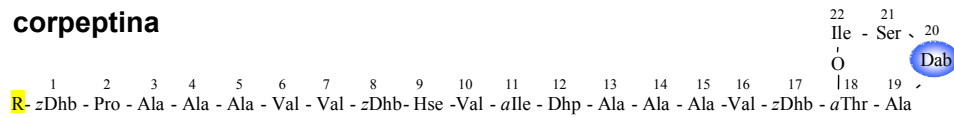
siringopeptina 25



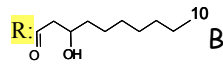
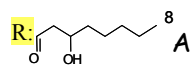
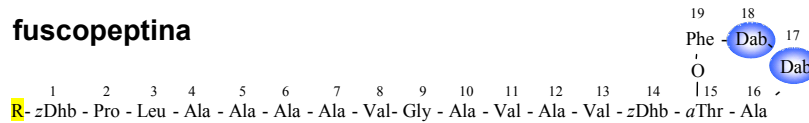
siringopeptina 22



corpeptina



fuscopeptina



tolaasina I

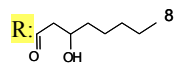
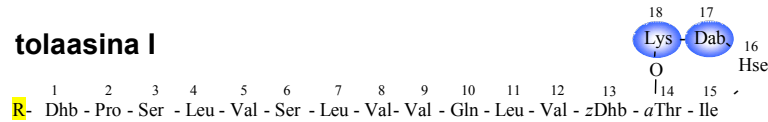


Fig. 1.7 Struttura primaria delle peptine. In blu sono evidenziati i residui carichi positivamente. Dab, acido diaminobutirrico; Dhb, acido deidroaminobutirrico; αThr, allotreonina; Hse, omoserina.

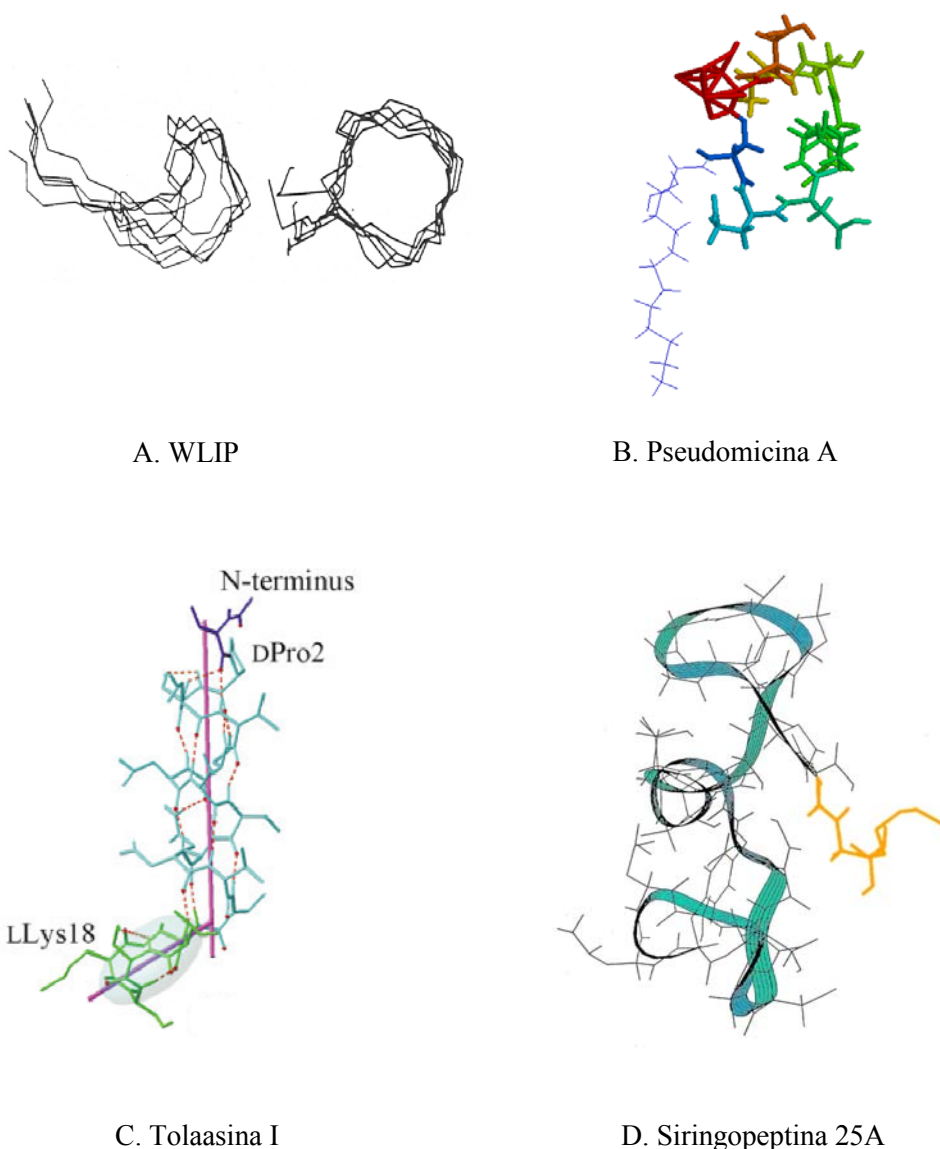


Fig. 1.8 Struttura tridimensionale di due nonapeptidi, WLIP e pseudomicina A (PSA), e di due peptine, tolaasina I (tol I) e siringopeptina 25A (sp25A). I dati ottenuti dalle analisi strutturali hanno confermato anche a questo livello una grande similitudine tra i LDP all'interno delle due classi. A. WLIP, visione ortogonale di 5 delle 10 strutture calcolate in DMSO con spettroscopia bidimensionale NMR: il ripiegamento del macrociclo assomiglia alle cuciture di una palla da tennis (Ballio et al., 1995). B. PSA, la struttura in soluzione comprende l'anello lattonico e la catena acilica (sottile linea blu). C. Tol I, è qui mostrata la sua struttura 3D, in SDS, in cui si distinguono chiaramente l'anello lattonico (regione ombreggiata) e i ripiegamenti della catena lineare (Jourdan et al., 2003). D. SP25A, la struttura è ottenuta in D₂O a pH 3.6; la catena acilica è segnalata in giallo (Dalla Serra et al., 2003a). Le coordinate di PSA ci sono state gentilmente inviate dalla prof.ssa A. Segre.

Anche la struttura di tol I (da *P. tolaasii*) è stata determinata (Jourdan et al., 2003) da studi ad alta risoluzione in sodio dodecil solfato, che mima la condizione della membrana, tramite NMR 2D e simulazioni di dinamica molecolare. Tol I forma un'alfa elica sinistrorsa nella regione compresa tra la posizione 2 e 14 della catena, comprendente sette aminoacidi in conformazione D e la regione adiacente L-D-L-D-D. Inoltre il macrociclo lattonico adotta una conformazione detta 'boatlike' ed è spostata dall'asse dell'elica per formare una struttura a 'mazza da golf' (fig. 1.8) Lo spettro NMR della fuscopeptina B in soluzione acquosa è caratteristico di un peptide con una conformazione completamente non strutturata. L'aggiunta di trifluoroetanolo (80%), che mima l'ambiente della membrana, induce una variazione conformazionale con un aumento del ripiegamento elicoidale. La struttura della fuscopeptina B (Baré et al., 1999) è composta da due regioni ben definite: un loop da Dhb1 a Ala5 e una regione, da Val13 a Phe19, che include l'anello lattonico. Queste sono connesse da una regione elicoidale, con una certa flessibilità conformazionale, da Ala6 ad Ala12. L'acido grasso della molecola è altamente flessibile. La conformazione dell'anello assomiglia nuovamente alla cucitura di una palla da tennis. Tutti i dati ottenuti per la fuscopeptina B si presume valgano anche per la fuscopeptina A, poiché questa differisce dalla prima solo per la lunghezza della catena dell'acido grasso.

Analisi all'FTIR hanno mostrato per le tre peptine, sp25A e fpB (Paletti, 2004) e toll (Coraiola et al., 2006), che aumenta la struttura ordinata ad α -elica passando da un ambiente idrofilico, quale il tampone, ad ambienti meno polari, inclusa la membrana lipidica. La struttura inoltre risulta inserita nel doppio strato con un angolo di circa $24^\circ \pm 3^\circ$ rispetto alle catene aciliche dei lipidi.

1.2.2 Biosintesi

La biosintesi dei LDP avviene per via non ribosomiale e richiede l'intervento di complessi multifunzionali di enzimi, le sintetasi peptidiche. Questa via è usata da molti organismi procarioti ed eucarioti che producono peptidi con importanti attività terapeutiche. In particolare molti antibiotici sono prodotti con questo sistema, inclusa la gramicidina S, la surfactina e la tioricidina da *Bacillus* spp. (Scholz-Schroeder et al., 2003). La sintesi è sfruttata anche da microorganismi abitanti del suolo, come gli *Actinomycetes* Gram-positivi, alcuni batteri e funghi filamentosi. Le diversità strutturali dei metaboliti prodotti per questa via superano quelle dei peptidi sintetizzati per via ribosomiale. Questi metaboliti infatti sono costituiti spesso da aminoacidi non canonici e possono avere delle modificazioni all'interno della struttura aminoacidica, come metilazioni, acilazioni, glicosilazioni e formazione di anelli eterociclici, che possono essere condotte da

enzimi. In contrapposizione alla grossa variabilità strutturale la via biosintetica è molto conservata.

Le sintetasi peptidiche non ribosomiali sono complessi enzimatici multifunzionali che conducono diverse reazioni in maniera coordinata. Sono organizzate in moduli responsabili dell'attivazione di un aminoacido substrato e della sua incorporazione nella catena peptidica nascente. Ogni modulo è composto da tre domini che catalizzano un singolo step della reazione: in ordine si trovano il dominio di elongazione, di adenilazione e di tiolazione. La caratteristica principale di queste sintetasi è la formazione di un legame covalente tra i substrati e l'enzima fino al momento in cui il prodotto finale è liberato. Sul terminale della sintetasi è fuso un grosso dominio tioesterasico (TE) responsabile del rilascio del peptide maturo dal complesso. La sintesi procede in direzione da N-terminale a C-terminale. In alcuni casi possono intervenire anche enzimi esterni al complesso, durante l'elongazione della catena o dopo il rilascio del peptide per giungere alla forma matura.

La manipolazione delle sintetasi peptidiche mediante ingegneria genetica potrebbe essere interessante in vista di un potenziale controllo per la biosintesi di varianti di metaboliti conosciuti, utili per applicazioni biotecnologiche (si veda più avanti), o anche di prodotti completamente nuovi.

Micine

Tra le micine è nota la via di sintesi della siringomicina E prodotta da *Pseudomonas syringae*.

La via di sintesi non ribosomiale può essere suddivisa in tre classi: lineare, iterativa e non lineare. La sintesi della siringomicina E fa parte dell'ultima classe, che è anche la più complessa (Mootz et al., 2002).

Il cluster genico della siringomicina (fig. 1.9) racchiude una regione di 37 kb sul cromosoma di *P. syringae* pv. *syringae* B301D (Bender et al., 1999; Guenzi et al., 1998). Sei Open Reading Frame (ORF \equiv singole unità di lettura aperte) nel cluster codificano per proteine coinvolte nella sintesi (SyrB1, SyrB2, SyrC e SyrE) (Zhang et al., 1995), nella secrezione (SyrD) e nella regolazione della produzione (SyrP) (Zhang et al., 1997) della siringomicina.

In particolare syrE codifica per la sintetasi contenente otto moduli che attivano ognuno un aminoacido. La sintesi comincia dal modulo SyrE1 con l'attivazione dell'aminoacido N-terminale, la L-Ser. Il dominio di adenilazione è responsabile per il riconoscimento e l'attivazione dell'aminoacido. Il dominio di tiolazione lega covalentemente l'aminoacido attivato con un legame tioestere al cofattore fosfopanteteina, che media il trasferimento degli aminoacidi attivati tra i moduli allineati. Il dominio di elongazione catalizza il trasferimento del 3-idrossi acido

grasso da SyrC alla L-Ser e successivamente il suo spostamento al secondo modulo allineato, SyrE2. La sintesi continua con una serie di cicli di elongazione fino alla formazione di un octapeptide legato al dominio di tiolazione del modulo SyrE8. La peculiarità della via non lineare sta nel fatto che il dominio TE è separato da SyrE8 da un dominio di elongazione e da un dominio di tiolazione, gli elementi cioè di un nono modulo mancante però del dominio di adenilazione. Il nono dominio di adenilazione è codificato da *syrB* a monte della sintetasi SyrE. Questo interrompe la completa colinearità, caratteristica della via lineare, tra i moduli della sintetasi e la sequenza aminoacidica del peptide.

Una volta ciclizzata la siringomicina è trasportata attraverso la membrana citoplasmatica da una proteina trasportatrice legante ATP, codificata da *syrD* (vedi più avanti).

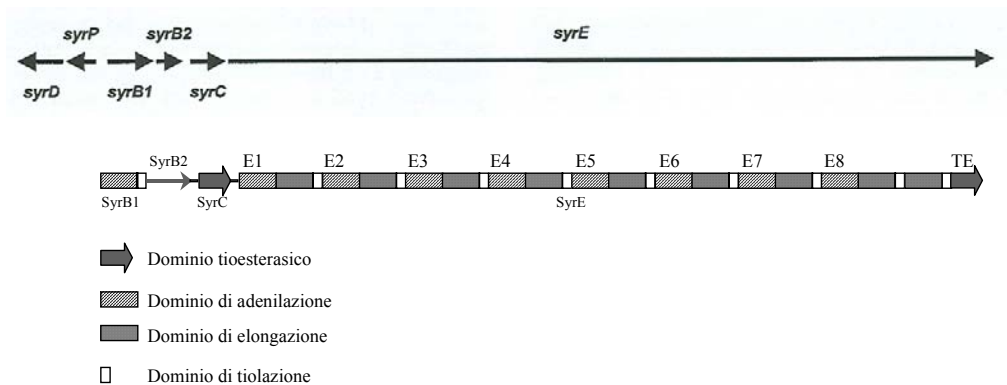


Fig. 1.9 Mappa fisica del cluster genico della siringomicina E di *P. syringae* pv. *syringae*. I geni *syrD* e *syrP* sono trascritti in senso opposto a tutti gli altri (Bender et al., 1999).

Peptine

Recentemente anche la via di biosintesi della siringopeptina di *Pseudomonas syringae* è stata chiarita (Scholz-Schroeder et al., 2003).

La siringopeptina è sintetizzata da un sistema enzimatico distinto da quello coinvolto nella sintesi della siringomicina (Bender et al., 1999). Il cluster genico *syp* è adiacente al cluster genico *syr*, a valle di *syrD*. È ora evidente che ci sono tre geni *sypA*, *sypB* e *sypC*, che occupano 73.8 kb, che codificano per tre grandi sintetasi peptidiche responsabili della biosintesi non ribosomiale della siringopeptina (fig. 1.10). L'analisi delle proteine SypA, B e C indicano che tutte contengono moduli di attivazione multipla degli aminoacidi. In particolare SypA e SypB ne contengono cinque ciascuno, mentre SypC ne contiene 12, arrivando quindi ad attivare un totale di 22 aminoacidi (come si trova nella siringopeptina 22). I moduli di attivazione sono a loro volta composti da diversi domini: il

dominio di condensazione (o elongazione), adenilazione e tiolazione, che svolgono le stesse funzioni già viste nella biosintesi della siringomicina. Sono stati trovati inoltre due moduli TE (tioesterasici) all'estremità C-terminale di SypC. Questi si pensa siano coinvolti nel rilascio della molecola di siringopeptina e nella sua ciclizzazione per formare l'anello lattonico. Nonostante la presenza di numerosi D-isomeri degli aminoacidi non è stato invece trovato nessun dominio di epimerizzazione in Syp A, B e C. L'assenza di questo dominio suggerisce che gli aminoacidi possono essere modificati precedentemente nella loro isoforma D, che viene poi direttamente legata al dominio di adenilazione e successivamente incorporata nella struttura della siringopeptina, come suggerito per la sintesi della ciclosporina o HC-tossina (Scott-Craig et al., 1992; Weber et al., 1994). Al contrario potrebbe essere ipotizzata una modifica posteriore al legame con il dominio di attivazione, come suggerito da Guenzi et al. (Guenzi et al., 1998) per la sintesi della siringomicina.

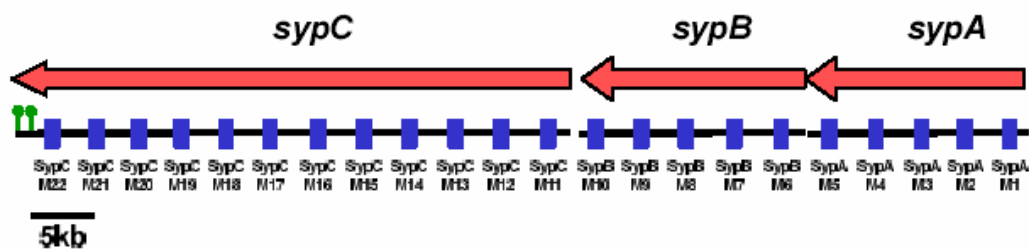


Fig. 1.10 Mappa della regione di 74 kb sul cromosoma di *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D contenente il gene syp per la biosintesi della siringopeptina. La posizione e l'orientamento dei geni sul cromosoma sono mostrati dalle frecce rosse (Scholz-Schroeder et al., 2003).

Regolazione della produzione

La siringopeptina è prodotta nelle stesse condizioni di coltura della siringomicina. Questo suggerisce che la sintesi di entrambe le tossine sia attivata da un comune sistema regolatore (Bender et al., 1999). Diversi fattori ambientali controllano l'espressione del gene per la produzione della siringomicina e della siringopeptina. Fattori nutrizionali e molecole segnale delle piante ospiti ne modulano la produzione. I segnali primari sono specifici glicosidi fenolici abbondanti nelle foglie, nella corteccia e nei fiori di molte specie di piante parassitate da *P. syringae* pv. *syringae*. L'attività dei segnali fenolici è aumentata dalla presenza di zuccheri che si trovano in grande quantità nel tessuto delle foglie. È stato infatti dimostrato recentemente che un glucoside fenolico, l'arbutina, e uno zucchero, il D-fruttosio, aumentano il livello trascrizionale dei geni che contribuiscono alla sintesi, alla secrezione ed alla regolazione di siringopeptina e siringomicina

(Wang et al., 2006). Il gene *syrP* (fig. 1.9) esercita un effetto regolatore sulla produzione delle tossine. E' localizzato tra *syrB* e *syrD* e codifica per una proteina che funziona come intermedio tra una proteina sensore e un regolatore di risposta. Sono stati anche identificati dei regolatori fisicamente non legati al cluster genico. La produzione delle tossine è anche controllata dai geni *syrF*, *syrG* e *salA* (Scholz-Schroeder et al., 2003). È stato mostrato che in *P. syringae* il sistema di trasduzione del segnale a due componenti GacS/A regola positivamente l'espressione del gene *SalA* (Kitten et al., 1998) e sembra trovarsi in cima alla gerarchia regolatoria (Bender et al., 1999). GacS è una proteina transmembrana che presumibilmente funziona come una istidina chinasi, che viene fosforilata in risposta a stimoli ambientali. GacA è una proteina di regolazione della risposta, che viene probabilmente fosforilata da GacS. Una caratteristica inusuale di questo sistema a due componenti è che i due geni non sono fisicamente legati.

Secrezione

Anche il meccanismo di secrezione sembra essere condiviso da siringomicina e siringopeptina. Il gene *syrD* codifica per un membro della famiglia dei trasportatori ABC, che funziona nell'esportazione di proteine citotossiche o proteolitiche che aumentano la virulenza nei procarioti. La proteina SyrD presenta un'alta similitudine a PvdE, un trasportatore ABC implicato nella secrezione di pioverdina in *P. aeuriginosa*. La tasca legante ATP è localizzata nella porzione idrofilica C-terminale ed è citoplasmatica. La porzione idrofobica N-terminale è invece inserita nella membrana. SyrD quindi funziona come una pompa ATPasica per la secrezione delle tossine attraverso la membrana citoplasmatica (Bender et al., 1999).

1.2.3 Ruolo nella patogenicità

Studi di genetica hanno portato ad interessanti risultati sulla determinazione del ruolo dei LDP nella patogenicità del batterio. Paragonando la patogenicità e la virulenza della specie wild type di *P. syringae* pv. *syringae* con quelle in cui è bloccata la produzione di micina, di peptina o di entrambe le tossine ha permesso di valutare il loro coinvolgimento.

I mutanti mancanti della produzione di siringomicina sono meno virulenti del 26%. Quelli in cui è soppressa la sintesi di siringopeptine hanno una diminuzione del 59% della virulenza. I mutanti che non producono nessuna delle due tossine diventano meno virulenti del 70-76%.

Questi dati indicano che le siringopeptine danno un contributo maggiore alla

fitotossicità rispetto alle siringomicine (Grgurina I., 2002). E' importante comunque sottolineare che la loro produzione non è indispensabile per la patogenicità del batterio e che esistono specie di *P. syringae* pv. *syringae* che producono LDP che non causano sintomi dannosi alle piante. Alcune indagini hanno dimostrato che ceppi di *P. syringae* producono anche metaboliti secondari diversi dai LDP che inibiscono la crescita di batteri Gram-negativi come *Escherichia coli*, verosimilmente interferendo nel metabolismo degli aminoacidi (Bender et al., 1999).

1.2.4 Il meccanismo d'azione

La caratteristica distintiva del meccanismo d'azione dei lipodepsipeptidi è la loro capacità di interagire con le membrane biologiche. Il carattere anfipatico di queste molecole consente il loro inserimento nel doppio strato lipidico, con la conseguente formazione di canali ionici che causano la fuoriuscita di elettroliti, l'alterazione del potenziale di membrana e la perdita del materiale intracellulare. Il loro sito di azione primario è la membrana plasmatica delle cellule vegetali, ma possono avere anche organismi bersaglio diversi (Menestrina et al., 2003).

Tutti questi composti mostrano attività emolitica, ma differiscono nello spettro antibiotico. Le peptine inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi; le micine sono dotate di una spiccata attività antifungale. Le proprietà antifungali possono aiutare la sopravvivenza del batterio in natura: questi batteri, epifiti sulla superficie delle foglie, devono infatti competere con altri microbi per l'insufficienza dei nutrienti. A questo proposito è interessante notare che sono anche capaci di produrre enzimi, come la chitinasi e la glucanasi, che degradano la parete cellulare dei funghi facilitando l'invasione del batterio. Da alcuni studi si è osservata un'azione sinergica tra alcuni LDP prodotti da *P. syringae* ed enzimi degradanti la parete cellulare che favorisce l'azione fungicida durante l'interazione con altri microbi (Fogliano et al., 2002b). Molte evidenze indicano che anche membrane intracellulari possono essere colpite. Concentrazioni micromolari di alcuni LDP inducono un significativo aumento della permeabilità del tonoplasto. E' possibile che la distruzione dell'integrità del tonoplasto sia vantaggiosa per il batterio poichè questo darebbe accesso ai metaboliti immagazzinati nel vacuolo (Carpaneto et al., 2002).

Tutti i LDP sono anche in grado di permeabilizzare membrane modello artificiali, come per esempio vescicole lipidiche (Menestrina et al., 2003). Si è osservata però una differente attività tra micine e peptine dipendente dalla composizione lipidica della membrana.

Le peptine sono più attive su vescicole con una tipica composizione delle membrane vegetali. Infatti la loro attività aumenta quando sono presenti fosfolipidi, in particolare quelli carichi negativamente e la sfingomieline. Anche tra gli steroli esse preferiscono lo stigmasterolo, che ancora è un tipico lipide vegetale. Le micine invece hanno una forte preferenza per gli steroli, in particolare colesterolo ed ergosterolo (tipico delle cellule fungali). Questo comportamento riflette la maggior attività antifungale delle micine e fitotossica delle peptine. La capacità permeabilizzante risulta inoltre proporzionale alla lunghezza della catena acilica dei LDP e alla carica netta positiva della porzione peptidica.

Esperimenti di protezione osmotica hanno permesso di determinare il diametro della lesione formata dai LDP (Dalla Serra et al., 1999). Il poro delle peptine ha un raggio di 0.98 ± 0.03 nm indipendente dalla concentrazione di tossina utilizzata. Le micine invece sono in grado di formare pori anche più grandi delle peptine, e la dimensione aumenta con la dose di tossina (da 0.7 a 1.7 nm). Questo è possibile perché le lesioni sono create dall'oligomerizzazione dei monomeri dei LDP. Il numero di unità che formano il poro delle peptine è stato stimato a 5 ± 1 . Per le micine questo numero è variabile, ma il numero minimo di monomeri presenti è pari a 6 ± 1 (Dalla Serra et al., 1999).

1.3 Possibili applicazioni

La spiccata attività antimicrobica, ed in particolare antifungale, dei LDP appare molto interessante per le possibili applicazioni sia in medicina che in agricoltura.

1.3.1 Applicazioni biomediche

Infezioni fungali opportunistiche sono causa di un aumento di morbidità e mortalità di pazienti ricoverati in ospedale. Gli individui a rischio di sviluppo di infezioni fungali invasive sono quelli con il sistema immunitario compromesso dall'AIDS, da chemioterapie, da farmaci usati per prevenire il rigetto di organi trapiantati e i pazienti con cateteri intravascolari. Gli sforzi per combattere queste infezioni sono ostacolati dalla scarsità di farmaci e dalla aumentata resistenza da parte di una crescente lista di patogeni (Sorensen et al., 1996). La ricerca medico-farmaceutica mira quindi all'ottenimento di analoghi strutturali con una buona attività antifungale, ma privi di attività secondarie, quali quella irritante ed emolitica, che possano essere usati come farmaci antimicotici.

In molti casi *Candida albicans* è un abitante ordinario dei tratti gastro-intestinale e genito-urinario, ma può diffondere nel sistema sanguigno ed essere trasportato ad altri tessuti quando le difese innate di una persona sono diminuite. Molte specie di funghi che una volta non erano una minaccia per l'uomo si stanno ora scoprendo essere causa di malattie in persone immuno-compromesse. Le micine mostrano attività antifungale contro molte specie di *Candida*, così come contro *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium monoliforme* e *Fusarium oxysporum*, i principali patogeni che minacciano l'uomo. La pseudomicina B fu scelta dalla compagnia farmaceutica Eli Lilly come candidata per studi su di un nuovo farmaco antifungale (Chen et al., 2000; Chen SH and Rodriguez M, 2004). SRE riduce la vitalità fungale del 90-98% ad una concentrazione con la quale causa meno del 20% di rilascio di emoglobina dagli eritrociti (De Lucca et al., 1999). La letalità per gli eritrociti, test normalmente impiegato per valutare la potenziale patogenicità per l'uomo, non significa necessariamente che un composto non possa essere usato come antibiotico: l'attività emolitica si può presentare infatti a concentrazioni molto maggiori di quelle necessarie per avere un'attività contro i patogeni fungali.

1.3.2 Applicazioni in bioagricoltura

La ricerca di metodi alternativi alla lotta chimica contro i patogeni delle piante ha avuto negli ultimi anni un impulso notevole. L'emergenza di popolazioni fungine resistenti ad alcuni fungicidi, la maggiore attenzione da parte di produttori e consumatori alla salubrità dei prodotti alimentari, la revoca dell'autorizzazione all'impiego di alcuni composti chimici (in particolare derivati del rame), e non ultimo le perplessità sull'uso di organismi geneticamente modificati, ha stimolato la ricerca verso strategie alternative da utilizzare per l'agricoltura sostenibile.

Pseudomonas syringae è tra i batteri attualmente studiati come agente di controllo biologico in numerose piante coltivate ed in post raccolta. In tempi recenti, sono stati individuati diversi ceppi di *P. syringae* considerati potenziali agenti di lotta biologica nei confronti di funghi e batteri fitopatogeni. Ceppi di *P. syringae* si sono mostrati efficaci nei confronti di *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* su pere, *Monilina fructicola* e *Rhizopus stolonifer* su pesche, *Penicillium digitatum* su agrumi e di *Botrytis cinerea* su uva, *P. expansum* su mele, *E.coli* O157:H7 in mele e in succhi di mela. E' stata infine segnalata la capacità di indurre resistenza nei confronti di *Plasmopara viticola* e *Uncinula necator* su uva.

L'applicazione di *P. syringae* come antagonista in agricoltura ha raggiunto il livello commerciale in diversi Paesi, tra cui gli USA, ma non ancora in Italia. Considerevoli perdite economiche in agricoltura sono causate da infezioni fungali sviluppate sui frutti nel periodo post-raccolta. Mele e pere sono danneggiate dalle muffe blu *Penicillium expansum* e *italicum* e anche da *Botrytis cinerea*. Gli agrumi sono frequentemente distrutti dalla muffa verde *Penicillium digitatum* e dalla muffa blu *P. italicum*. Nel 1995 due prodotti efficaci nel contrastare queste infezioni sono diventati commercialmente disponibili (approvati per l'uso dalla United States Environmental Protection Agency): BioSaveTM110 e BioSaveTM10 contengono rispettivamente ceppi di *P. syringae* ESC-11 ed ESC-10. Queste specie inizialmente isolate dalle mele non causano malattie in nessun ospite conosciuto e non danneggiano il frutto. Per questo non è stato assegnato loro nessun pathovar. Queste specie assomigliano a *P. syringae* pv. *syringae*: contengono i geni omologhi a *syrB* e *syrD* responsabili per la sintesi e il trasporto della siringomicina (Grgurina I., 2002).

Il relativo livello di controllo raggiunto da queste specie è influenzato dalla combinazione patogeno-ospite in cui essi sono usati. ESC-10 è superiore a ESC-11 per la protezione degli agrumi dalle muffe verdi e blu ed è più efficace sui limoni rispetto alle arance. Viceversa ESC-11 è più efficiente nel controllo di malattie post-raccolta su mele e pere. E' stato dimostrato che ESC-10 ed ESC-11 producono siringomicina E (Bull et al., 1998).

Studi recenti hanno proposto WLIP, il lipodepsipeptide prodotto da ceppi di *P. reactans*, come inibitore potenziale della “Maculatura bruna” di *Agaricus bisporus*, sfruttando la sua capacità di interagire con la tolaasina I nella formazione della “linea bianca”. L’ipotesi che tale precipitato insolubile potesse essere inattivo, ha indotto alcuni ricercatori (Soler-Rivas et al., 1999a) ad utilizzare WLIP come possibile inibitore dei sintomi della malattia. Applicando sospensioni acquose di WLIP su carpofori di *Agaricus bisporus*, prima dell’inoculazione di una sospensione batterica di *P. tolaasii*, si è infatti notata una riduzione dell’intensità dell’imbrunimento provocato dalla malattia. L’applicazione effettiva del LDP è però complicata dal fatto che WLIP presenta attività dannosa per la pianta a determinate concentrazioni.

L’interazione tol I-WLIP è stata analizzata anche con l’utilizzo di sistemi modello, costituiti da liposomi di PC/SM (1/1 mol), a diversi tempi di incubazione e differenti dosi di tossina (Paletti et al., 2007). I risultati mostrano una diminuzione dell’attività permeabilizzante, ma non il completo annullamento, quando i due LDP sono presenti in proporzione equimolare.

1.3.3 Altre applicazioni

Un’applicazione diffusa in molti Paesi, tra cui la Germania e la Francia, è l’utilizzo di un lisato batterico, principalmente del ceppo *Pseudomonas syringae* PS31R, per un prodotto utilizzato negli impianti di innevamento, chiamato Snowmax (snow inducer). Questo prodotto infatti è in grado di congelare l’acqua uniformemente tra 26° e 26.8°. Inoltre l’acqua si ghiaccia in piccole gocce rendendo la neve più granulare. È dimostrato che nel lisato sono presenti due LDP, SRE ed sp22A. Recentemente è stato caratterizzato un nuovo lipopeptide lineare di 11 aminoacidi, che presenta una buona attività contro *Rhodotorula pilimanae*. Tuttavia la presenza di peptidi con nota attività antimicrobica ed emolitica potrebbe avere serie implicazioni ambientali, considerati i volumi di prodotto impiegato e la stabilità dei metaboliti.

CAPITOLO II

MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

2.1.1 Tossine

I LDP prodotti da *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas corrugata* sono stati purificati nel laboratorio dei Prof. V. Fogliano del dipartimento di Scienze degli Alimenti (Università di Napoli “Federico II”) e Prof. I. Grgurina del Dipartimento di Scienze Biochimiche e Centro di Biologia Molecolare del CNR (“Rossi Fanelli”, Università “La Sapienza” di Roma). I LDP prodotti da *Pseudomonas tolaasii* e *Pseudomonas reactans*, ed alcuni loro analoghi, sono stati forniti invece dai laboratori del Prof. A. Evidente del Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell’Ambiente e delle Produzioni Animali (Università di Napoli “Federico II”) e del Prof. N. S. Iacobellis del Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro Forestali (Università della Basilicata, Potenza). Le tossine, fornite in polvere, sono le seguenti:

- siringomicina E, SRE (da *P. syringae*)
- siringopeptina 25A, sp25A (da *P. syringae*)
- siringopeptina 22A, sp22A (da *P. syringae*)
- cormicina, CM (da *P. corrugata*)
- tolaasina I, tol I (da *P. tolaasii*)
- tolaasina II, tol II (da *P. tolaasii*)
- tolaasina A, tol A (da *P. tolaasii*)
- tolaasina B, tol B (da *P. tolaasii*)
- tolaasina C, tol C (da *P. tolaasii*)
- tolaasina D, tol D (da *P. tolaasii*)
- tolaasina E, tol E (da *P. tolaasii*)
- tolaasina acetilata, tol acet (acetilazione di tol I)
- White Line Inducing Principle, WLIP (da *P. reactans*)
- WLIP idrolizzato, WLIP idr (idrolisi dell’anello lattonico)
- WLIP metil-esterificato, WLIP est (metilazione di un residuo)
- WLIP metil-acetilato, WLIP acet (metilazione seguita da acetilazione di diversi siti)

Prima dell’utilizzo le tossine sono risolubilizzate in acqua mQ, ad eccezione di WLIP e dei suoi analoghi, che sono disciolti in DMSO, e di tol acet, che viene solubilizzata in metanolo.

Alcune tossine di controllo sono state utilizzate negli esperimenti di determinazione della struttura del poro (par. 2.2.5): α -tossina di *Staphylococcus aureus*, comperata dalla Sigma e sticolisina I dell'anemone dei Caraibi *Stichodactyla heliantus*, gentilmente fornitaci dalla Prof. M. Tejuca dell'Università dell'Havana (Cuba).

2.1.2 Soluzioni

- soluzione A: 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.0
- soluzione B: 20 mM MES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6.0
- soluzione C: 250 mM saccarosio, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 3 mM EDTA, 1% BSA (V frazione) w/v, 2 mM PMSF e 5 mM DTT (aggiunti appena prima dell'utilizzo)
- soluzione D: 30 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH7.0

2.1.3 Lipidi

I lipidi utilizzati negli esperimenti sono la egg fosfatidilcolina (PC), la brain sfingomieline (SM) e l'asolectina acquistati dall'Avanti Polar Lipids (APL), il colesterolo (COL) dalla Fluka ed il pyrene-PC gentilmente fornitoci dal laboratorio del Prof. Muller dell'Istituto di Biologia e Biofisica (Università di Berlino).

2.1.4 Altri composti

Globuli rossi di coniglio (RRBC, sospensione al 5% di emazie) acquistati dalla Zootecnica "Il Gabbiano", Prionex (frazione polipeptidica derivata da collagene purificato di maiale, Pentafarm LTD), Sephadex G-50 medio (Pharmacia), Calceina (Sigma), 5(6)-Carbossifluoresceina (Sigma), Triton X-100 (Merck), Latex beads di 114 nm di diametro (Sigma), BSA (Bovine Serum Albumine, Calbiochem), Fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF, Sigma), Ditiotreitolo (DTT, Sigma), YPD broth (Sigma).

2.2 Metodi

Il meccanismo d'azione dei LDP da noi investigati consiste nella destabilizzazione delle membrane biologiche in seguito alla formazione di pori. Allo scopo di analizzare più in dettaglio l'azione di queste tossine sono stati fatti saggi sia su membrane modello che naturali.

2.2.1 Preparazione di liposomi contenenti calceina e misure di permeabilizzazione

L'attività permeabilizzante dei LDP, e di alcuni loro analoghi, è stata misurata su vescicole lipidiche unilamellari (LUV) di PC/SM (1/1 mol), di diametro pari a 100 nm e contenenti il tracciante fluorescente calceina ($\lambda_{exc} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm). Il protocollo di preparazione e i saggi di attività sono stati fatti come descritto in (Kayalar and Düzgünes, 1986; Tejuca et al., 1996). I lipidi diluiti in cloroformio sono disposti in una boccettina a fondo tondo, asciugati a pressione ridotta attraverso un evaporatore rotante per 10-15 minuti e quindi in pompa a membrana per circa 1 ora. I film così ottenuti sono risospesi mediante agitatore e con l'aiuto di palline di vetro (diametro 1-2 mm) in calceina 80 mM pH 7.0 (con NaOH). Questa sospensione è sottoposta a 6 cicli di congelamento-scongelo in N₂ liquido, seguiti da estrusione attraverso filtri di policarbonato con pori di diametro opportuno (100 nm in questo caso) per ottenere vescicole unilamellari. Il diametro delle LUV è stato misurato con lo Zetasizer 1000HSA della Malvern, strumento che permette di determinare le dimensioni di particelle colloidali in sospensione nel range 5-5000 nm usando la tecnica del light scattering dinamico. La calceina non incapsulata nei liposomi viene rimossa mediante il passaggio in colonnine riempite con sephadex G50 medio nella soluzione utilizzata negli esperimenti (soluzione A).

La permeabilizzazione delle vescicole viene misurata come aumento di fluorescenza nel tempo (fig. 2.1) con un lettore di micropiastre a 96 pozzetti (Fluostar BMG) collegato ad un PC dotato del programma FLUOsoft, per l'impostazione dei parametri e la registrazione delle misure. Le piastre utilizzate sono bianche a fondo piatto (Biomat) e vengono pretrattate con 0.1 mg/ml di Prionex (per saturare i siti aspecifici della plastica e ridurre l'adsorbimento dei peptidi sulle pareti dei pozzetti).

La tossina viene diluita serialmente di un fattore 2 tra un pozzetto e quello successivo di una stessa riga nella soluzione A. La cinetica ha una durata di 45

minuti al cui termine viene aggiunto 1 mM di Triton X-100, in grado di micellizzare tutti i liposomi, per produrre il massimo rilascio possibile.

Per ciascun pozzetto vengono determinati la fluorescenza iniziale (F_{in}), la fluorescenza finale (F_{fin}), dopo l'azione della tossina, e la fluorescenza massima (F_{max}), raggiunta con l'aggiunta del TX-100. In questo modo si determina la percentuale di rilascio di calceina (%R) indotta dalle tossine:

$$\%R = 100 \times (F_{fin} - F_{in}) / (F_{max} - F_{in})$$

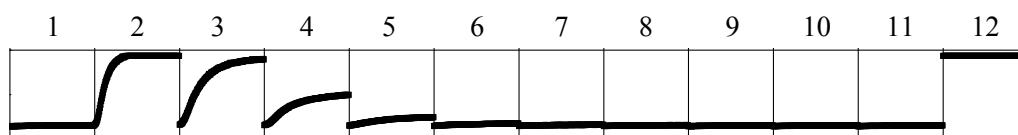


Fig. 2.1 Cinetiche di permeabilizzazione di una tossina formante pori. L'attività si osserva come aumento di fluorescenza rispetto al tempo dovuto al rilascio di calceina contenuta nei liposomi. La prima colonna rappresenta il controllo di sole vescicole, per osservare il loro eventuale rilascio spontaneo. Nell'ultima colonna è aggiunto un detergente, il tx100, che micellizza tutte le vescicole producendo il segnale di fluorescenza massimo. La concentrazione iniziale di tossina (colonna 2) è diluita serialmente di due volte nei pozzetti successivi. La durata complessiva degli esperimenti è di 45 minuti.

2.2.2 Test di attività emolitica su globuli rossi di coniglio (RRBC)

Il test è effettuato come descritto in (Dalla Serra et al., 1999). Brevemente gli RRBC (sospensione al 5% di emazie) sono sottoposti ad una serie di lavaggi con la soluzione D.

Per il saggio di emolisi gli RRBC così preparati vengono diluiti nella soluzione A, in modo che il valore di densità ottica apparente (D.O.) a 650 nm della sospensione sia pari a 0.2. La misurazione viene fatta in una micropiastra da 96 pozzetti trasparente e a fondo piatto con 200 μ l per pozzetto (di cui 100 μ l della sospensione di RRBC), mediante un lettore di micropiastre in assorbanza (UVmax, Molecular Devices) interfacciato con computer dotato di programma SOFTmax.

La lisi degli RRBC viene osservata come una diminuzione della torbidità nel pozzetto (fig. 2.2). Come per le misure di permeabilizzazione, la micropiastra viene pretrattata con Prionex 0.1 mg/ml. Il metodo consente di saggiare una serie di 11 diluizioni della tossina (a fattore 2) per ogni riga a disposizione (8 in totale).

La lettura, della durata di 45 minuti o 4 ore (nel caso delle tolaasine), è effettuata ogni 9 secondi ed è intervallata dal mescolamento automatico della piastra stessa. L'attività emolitica percentuale in ogni buca è calcolata mediante l'equazione:

$$\%HA = 100 \times (D.O._{in} - D.O._{fin}) / (D.O._{in} - D.O._{min})$$

dove $D.O._{in}$ e $D.O._{fin}$ sono rispettivamente la densità ottica della sospensione standard e quella alla fine dell'esperimento, mentre $D.O._{min}$ è il valore di densità ottica corrispondente al 100% di emolisi (ottenuto dalla lisi ipotonica dei globuli rossi in acqua pura).

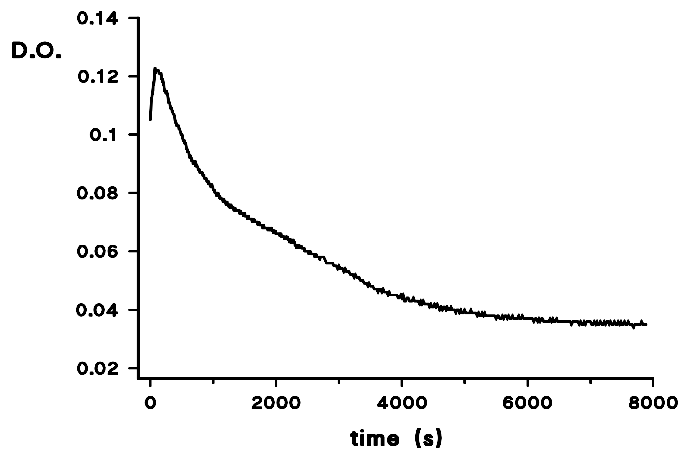


Fig. 2.2 Variazione della D.O. rispetto al tempo provocata dalla lisi di una sospensione di eritrociti.

2.2.3 Effetto inibitorio degli analoghi non attivi sulle forme attive dei LDP

Dopo aver individuato gli analoghi dei LDP non attivi con i saggi sopra descritti (par. 2.2.1 e 2.2.2) è stato investigato un loro possibile effetto inibitorio sulla capacità permeabilizzante ed emolitica di alcuni LDP attivi. Tre diverse concentrazioni di LDP, provocanti circa il 60-90% di rilascio di calceina o di emolisi, sono state mescolate in diverse proporzioni alla forma non attiva. È stato calcolato il fattore di inibizione IF nel seguente modo:

$$IF = (A_{tox} - A_{mix}) / A_{tox}$$

dove A_{tox} è l'attività del LDP attivo e A_{mix} è l'attività dello stesso in presenza della forma non attiva.

2.2.4 Inserimento dei LDP in un monostrato lipidico: misura della variazione della pressione superficiale con il metodo di Wilhelmy

La tecnica dei monostrati lipidici è stata utilizzata per analizzare più in dettaglio l'interazione che avviene tra i LDP e la membrana. L'interesse crescente per questa tecnica è dato dall'omogeneità e dalla stabilità del sistema modello che si viene a creare, e dalla sua geometria planare, dove le molecole lipidiche assumono uno specifico orientamento. Il monostrato lipidico risulta quindi un ottimo sistema per studiare, in condizioni vicine a quelle biologiche, che cosa accade quando un peptide idrosolubile, presente nel mezzo extracellulare, si trovi in prossimità della superficie di membrana della cellula bersaglio (Maget-Dana, 1999). La tecnica si basa su misure di variazione della pressione superficiale di un monostrato lipidico, formato alla superficie di una soluzione acquosa, in seguito all'inserimento della tossina, aggiunta nella fase sottostante (fig. 2.4). La formazione di una pellicola superficiale all'interfaccia aria-acqua, determina un abbassamento della tensione superficiale (λ) della soluzione acquosa, cioè della forza per unità di lunghezza, che agisce parallelamente alla superficie. L'abbassamento della tensione superficiale è definito pressione superficiale (π) ed è equivalente a:

$$\pi = \Delta\gamma = \gamma_0 - \gamma_m$$

dove γ_0 e γ_m rappresentano rispettivamente la tensione superficiale della soluzione acquosa in assenza ed in presenza del monostrato. Il metodo di Wilhelmy è quello più comunemente utilizzato per misurare la pressione superficiale di interfacce fluide piane. Il metodo si basa sull'utilizzo di una sottile lamina parzialmente immersa nella fase liquida e connessa ad una microelettrobilancia. La forza totale (F) che agisce sulla lamina è la somma del suo peso (P), della tensione superficiale che la tira verso il basso e della spinta di Archimede (A) che spinge verso l'alto (Maget-Dana, 1999).

$$F = P + 2\gamma (w + t) \cos\theta - A$$

Dove t e w sono rispettivamente lo spessore e la lunghezza della lamina ($t \ll w$), e θ è l'angolo di contatto tra la lamina e il menisco (fig. 2.3). Se la piastra è completamente bagnata l'angolo di contatto θ è circa uguale a 0 e così $\cos\theta \approx 1$. Si ottiene quindi:

$$F = P + 2\gamma w - A$$

Quando la composizione all'interfaccia varia, P ed A rimangono costanti (se la lamina è mantenuta in una posizione fissa) e quindi:

$$\Delta F = 2w (\gamma_m - \gamma_0) = -2w\pi$$

da qui si ottiene la definizione di pressione superficiale che è misurata in mN/m:

$$\pi = -\Delta F/2w$$

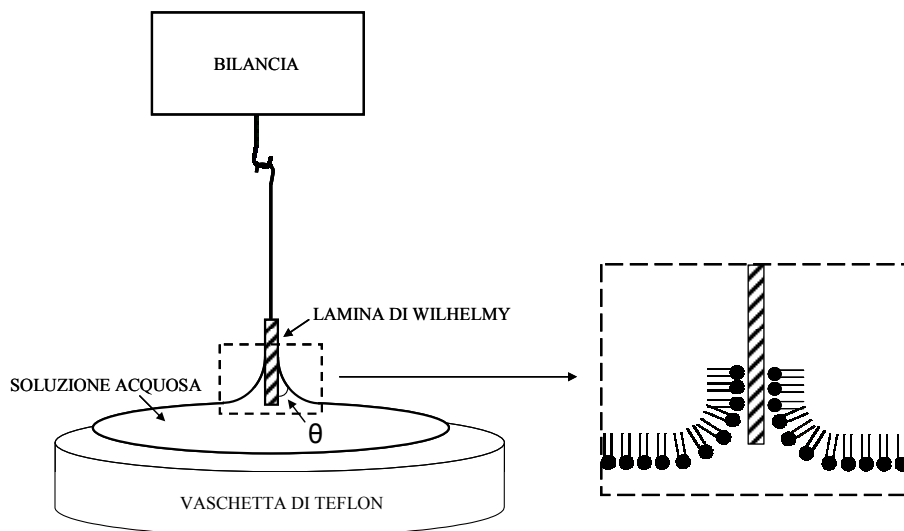


Fig. 2.3 Rappresentazione schematica della bilancia di Wilhelmy. La lamina è parzialmente immersa nella soluzione acquosa, alla superficie della quale è formato il monostrato lipidico (ingrandimento della parte tratteggiata), ed è connessa alla bilancia per la registrazione delle variazioni di pressione superficiale.

Lo strumento utilizzato è il Delta Pi (Kibron), collegato ad un computer dotato del programma Delta Graph, che permette di seguire in tempo reale la cinetica di variazione di pressione superficiale durante l'esperimento. Questo strumento è adatto inoltre per effettuare misure con piccoli volumi, condizione necessaria per utilizzare dosi ridotte di tossina, e per questo è dotato di una sonda con un piccolo diametro (0.51 mm), al posto della tradizionale lamina di platino. La sensibilità dello strumento non viene sacrificata ed è al contrario molto alta (10 μ N/m).

Lo strato lipidico monomolecolare, di PC/SM (1/1 mol), è creato alla superficie di una soluzione acquosa (soluzione A) contenuta in una vaschetta di teflon di 600 μ l (diametro 14 mm), in seguito al deposito di pochi microlitri di lipide, solubilizzato in cloroformio alla concentrazione iniziale di 0.1 o 0.025 mg/ml. La quantità di

lipide dispensata in superficie, mediante l'impiego di micropipette, varia a seconda della pressione superficiale iniziale che si vuole raggiungere (da 20 a 30 mN/m). È importante che il lipide venga dispensato alla superficie in piccole gocce per evitare che diffonda nella soluzione sottostante e per favorire l'evaporazione del solvente. Quando il monostrato si è stabilizzato ($\approx 20'$) viene aggiunto il LDP iniettandolo nella fase sottostante il monostrato attraverso una piccola scanalatura nella vaschetta, che permette a puntali lunghi e flessibili di inserirsi nella sottofase senza perturbare il monostrato. La diffusione della tossina è favorita dalla presenza di un agitatore magnetico che mantiene costantemente in lenta agitazione la soluzione, pur non perturbando la stabilità del lipide. La vaschetta e il sensore devono essere perfettamente puliti in quanto la pressione superficiale varia enormemente in presenza di sostanze organiche. A questo scopo la vaschetta è accuratamente sottoposta a ripetuti lavaggi con acqua e solventi organici e risciacquata abbondantemente con acqua mQ, mentre la sonda viene bruciata con l'utilizzo di un bunsen rendendola incandescente per qualche secondo.

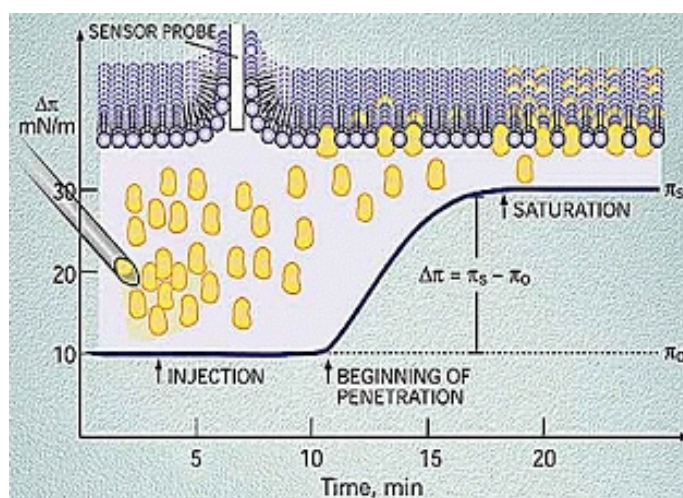


Fig. 2.4 Rappresentazione esemplificativa dell'inserimento di una tossina nel monostrato lipidico. Il peptide iniettato nella fase sottostante il monostrato lipidico, inserendosi nella membrana, provoca un aumento di pressione superficiale, fino a raggiungere un valore di saturazione alla stabilità.

La soluzione acquosa deve essere altrettanto pulita e per questo viene filtrata prima dell'utilizzo con filtri Millipore da $0.22 \mu\text{m}$. Gli esperimenti sono condotti a temperatura ambiente e lo strumento è protetto da un contenitore di plexyglass per il mantenimento di condizioni costanti durante la misura. Il legame e l'inserimento della tossina nel monostrato lipidico vengono registrati come un

aumento della pressione superficiale fino al raggiungimento di un valore di saturazione (fig. 2.4).

Con questa tecnica si è valutata la capacità di interazione ed inserimento nella membrana di alcuni LDP risultati particolarmente interessanti nei saggi di permeabilizzazione ed emolisi. La tecnica ha permesso di investigare il meccanismo di inibizione tra alcune coppie di LDP. Questi esperimenti sono stati fatti aggiungendo in serie le due tossine di interesse oppure preincubandole insieme per 30' prima dell'addizione nella soluzione sottostante il monostrato.

2.2.5 Studio della struttura del poro

Le dimensioni ridotte dei LDP e precedenti indicazioni sperimentali ci hanno fatto ipotizzare il possibile coinvolgimento dei lipidi del doppio strato nella formazione della lesione. In condizioni normali la diffusione dei lipidi attraverso il doppio strato delle vescicole è molto lento. Al contrario del poro 'barrel stave' la formazione di un poro detto 'toroidale' (fig. 2.5) mette in connessione il foglietto esterno ed interno permettendo una veloce redistribuzione dei lipidi tra i due strati mediante diffusione laterale.

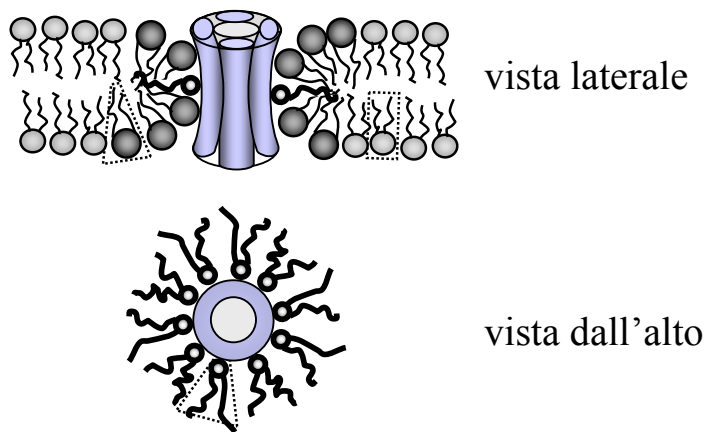


Fig. 2.5 Modello di poro toroidale (Alvarez et al., 2001).

L'abilità di una tossina di promuovere il movimento transmembrana dei lipidi può essere quindi utilizzata per discriminare tra i due tipi di lesione, come descritto da Muller et al. (Muller et al., 2000). L'utilizzo di un lipide fluorescente aggiunto inizialmente solo sul foglietto esterno delle vescicole ci ha permesso di monitorare in una cinetica la redistribuzione lipidica transmembrana. Il lipide in

questione è il pyrene-PC, un analogo fluorescente della fosfatidilcolina. Il py-PC contiene una lunga catena acilica, lauroyl, alla posizione sn1, ed una più corta, butyroyl, nella posizione sn2, a cui è legata la parte fluorescente (il pirene). La presenza di una catena acilica corta promuove la traslocazione dell'analogo dalla fase acquosa alla membrana. Così il lipide può essere semplicemente aggiunto esternamente alla sospensione di vescicole lipiche per includerlo nel foglietto esterno. Il metodo è basato sulla diluizione del lipide, inizialmente legato allo strato esterno, come conseguenza del suo spostamento verso il foglietto interno, attraverso il movimento laterale nel lume del poro. Questo causa un cambiamento nello spettro di fluorescenza del py-PC, che presenta due picchi di emissione caratteristici del monomero eccitato e del dimeri eccitato (eccimero), a 395 nm e a 470 nm rispettivamente (fig. 2.6B).

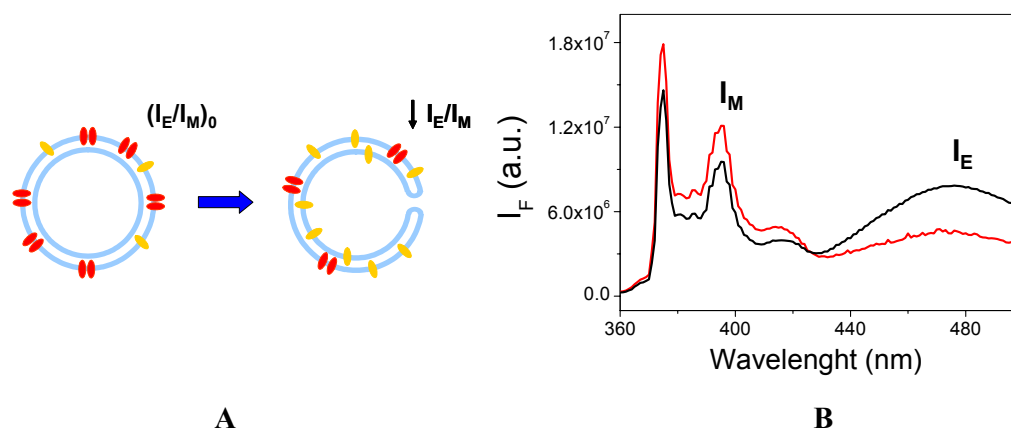


Fig. 2.6 A) Rappresentazione schematica del metodo basato sulla diffusione laterale transmembrana del lipide fluorescente py-PC. Il rapporto relativo tra l'emissione della forma eccimerica (in rosso) e quella monomerica (in giallo) diminuisce in seguito alla redistribuzione di py-PC anche nel foglietto interno. B) Spettro di fluorescenza di py-PC. Il picco a 395 nm è dovuto all'emissione della forma monomerica mentre quella dell'eccimero da origine ad una banda a 470 nm. Lo spettro delle vescicole asimmetriche, in cui py-PC è presente solo sul foglietto esterno, è mostrata in nero. Dopo la redistribuzione del lipide verso l'interno aumenta l'emissione prodotta dalla forma monomerica rispetto a quella dovuta all'eccimero (linea rossa). La lunghezza d'onda di eccitazione usata è 344 nm.

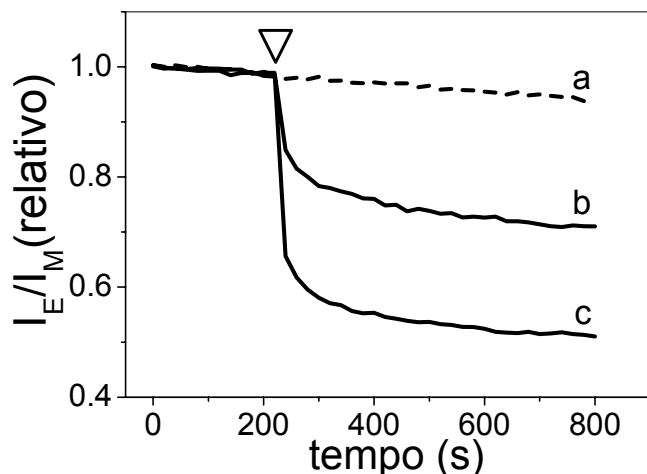


Fig. 2.7 Diminuzione del rapporto relativo dell'intensità tra eccimero e monomero (I_E/I_M) dovuta all'aggiunta di $0.1 \mu\text{M}$ (b) e $0.3 \mu\text{M}$ (c) di sticolisina I, una tossina formante pori di tipo toroidale. La linea tratteggiata (a) rappresenta la variazione del rapporto quando sono addizionati $0.6 \mu\text{M}$ di alfa-tossina, che crea un poro "barrel stave".

La concentrazione del dimerio in membrana dipende dalla frequenza di collisione tra gli omologhi presenti, che è determinata dalla loro concentrazione e dalla loro diffusione laterale. Come si osserva in fig. 2.6, una volta incorporato nello strato esterno, la ridistribuzione del py-PC nello strato interno produce un cambiamento nella concentrazione degli analoghi in entrambi i foglietti, che altera il rapporto dell'intensità tra eccimero e monomero (I_E/I_M). Così la diffusione transmembrana del py-PC può essere misurata monitorando la diminuzione del rapporto rispetto al tempo (fig. 2.7).

La variazione di fluorescenza è stata misurata con uno spettrofluorimetro FluoroMax (Jobin, Yvon/SPEX Division) supportato dal programma DATAmx. Il sistema è dotato di una cella termostata, nella quale è posta la cuvetta da 1 ml in quarzo, e di un agitatore magnetico, che consente il mescolamento continuo della soluzione (soluzione A, negli esperimenti con tol I e WLIP, o soluzione B, con sp25A e CM). Gli esperimenti sono stati fatti a 37°C . Le LUV di PC/SM (1/1 mol) o di PC/COL (1/1 mol) sono aggiunte alla soluzione ad una concentrazione finale di $20 \mu\text{M}$. Il py-PC dissolto in cloroformio/metanolo 1/1 (v/v) è stato asciugato e risolubilizzato in poche gocce di etanolo e $250 \mu\text{l}$ di acqua mQ per ottenere aliquote da 0.2 mg/ml , e poi aggiunto alla soluzione di vescicole ($15 \mu\text{l}$) per la preparazione di liposomi marcati sullo strato esterno. L'inclusione del pyPC nelle LUV è controllata con spettri di fluorescenza al tempo iniziale e dopo 20 minuti (tempo di stabilizzazione delle LUV asimmetriche). Le vescicole marcate simmetricamente, utilizzate per le misure di controllo, sono preparate

aggiungendo il py-PC, dissolto in cloroformio/metanolo 1/1 (v/v), ai lipidi prima della formazione del film lipidico (vedi paragrafo 2.2.1), ad un rapporto lipidi totali/py-PC (sul peso) pari a 2.5.

2.2.6 Preparazione di nuovi sistemi modello partendo da organismi patogeni

Allo scopo di ottenere sistemi modello di significatività e complessità più elevata si è iniziato ad implementare dei protocolli di preparazione partendo da organismi biologici patogeni, quali i funghi, contro cui è particolarmente interessante l'azione dei LDP.

LUV da lipidi estratti da patogeni fungali

L'estrazione dei lipidi da diversi patogeni è stata eseguita come descritto in (Griffiths et al., 2003). La sospensione cellulare è raccolta tramite centrifugazione (8000g x 20 minuti a 4°C) delle colture liquide. Le cellule, immerse in isopropanolo a 70°C, sono state omogeneizzate e lasciate nel solvente per 15 minuti, in modo da inattivare gli enzimi degradativi dei lipidi, impedendo così l'origine di prodotti secondari artificiali. La sospensione è stata quindi centrifugata a 1000g per 10 minuti. Il surnatante viene raccolto, mentre il precipitato è lavato due volte, la prima con isopropanolo caldo e la seconda con una miscela di isopropanolo/cloroformio 1/1 (v/v). I tre surnatanti sono stati uniti, asciugati mediante pompa a vuoto e risospesi in cloroformio per essere conservati a -20°C, fino alla preparazione delle vescicole unilamellari di diametro di 100 nm riempite di calceina, similmente a quanto descritto nel paragrafo 2.2.1. La composizione dei lipidi estratti dai patogeni è stata analizzata mediante cromatografia su strato sottile (Thin Layer Chromatography, TLC) utilizzando piastre di gel di silice G60. La TLC è una tecnica di ripartizione in due fasi in cui è presente una fase solida stazionaria (nel nostro caso il gel di silice) ed una fase liquida mobile, rappresentata da una miscela di solventi, diversa a seconda delle proprietà chimiche dei composti che si vogliono andare a separare. I campioni vengono posizionati in piccole gocce (con l'ausilio di un capillare) ad un'estremità della piastra, che viene poi immersa nella fase liquida. La miscela di solventi per capillarità risale la fase stazionaria. Più fortemente un composto è assorbito nella fase solida meno tempo passerà in quella liquida e migrerà più lentamente. Le bande corrispondenti ai diversi composti sono rese visibili tramite colorazione con solfato di cerio disciolto in acido solforico al 30% (fig. 2.8), e confrontate con quelle degli standard lipidici fatti correre sulla stessa piastra.

Per separare i lipidi polari è stata utilizzata la composizione di solventi cloroformio – metanolo - acido acetico - acqua (170:30:20:7 sul volume) e per quelli neutri una miscela di etere di petrolio - etere dietilico - acido acetico (80:20:1).

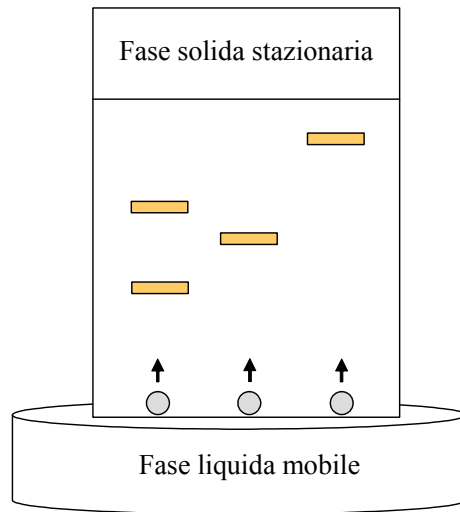


Fig. 2.8 Schema di una cromatografia su strato sottile (TLC). I campioni sono posizionati alla base del gel di silice (spot grigi) che rappresenta la fase solida. Quando la lastra è immersa nella fase liquida i componenti dei campioni si spostano, insieme al liquido, lungo la lastra di silice per capillarità, e si fermano a differenti altezze a seconda delle loro caratteristiche polari e molecolari. Le bande corrispondenti ai lipidi che costituiscono la composizione divengono visibili dopo colorazione con cerio solfato.

LUV da membrane di lievito

L'isolamento delle membrane di lievito è stato fatto come descritto da Eren e Arguello (Eren and Arguello, 2004) con qualche piccola modifica. Le colture liquide di lievito sono cresciute nel terreno YPD 50 mg/l a 37°C per due giorni. Le cellule sono raccolte centrifugando a 500g x 20' e lavate 3 volte con acqua mQ. A circa 2.2 g di cellule sono aggiunti 30 ml di soluzione C insieme a 8 g di piccole palline di vetro (0.2 µm di diametro). La sospensione è stata omogeneizzata 4 volte per 30'' e poi sottoposta ad una prima centrifugazione (10,000g x 20') per eliminare la parete cellulare e le cellule ancora integre. Il surnatante raccolto è stato centrifugato a 110,000g x 1h per precipitare la frazione di membrana. Il rotore utilizzato è l'SW 41 TI della Beckman. Tutti i passaggi

sono stati effettuati mantenendo la temperatura a 4°C. La quantificazione proteica è effettuata con il test della BCA (PIERCE) utilizzando la BSA come standard. Le vescicole contenenti la membrana di lievito e riempite di un marker fluorescente sono state preparate basandoci su quanto appreso da una serie di articoli (Ongjoco et al., 1987; Van den Broek et al., 1997; Van Leeuwen et al., 1991). La sola membrana isolata dal lievito non costituisce vescicole ben sigillate, ma forma piuttosto dei foglietti di membrana permeabili a ioni e protoni. Membrane ben sigillate si possono ottenere invece dalla fusione della frazione di membrana del lievito con vescicole di solo lipide (Van den Broek et al., 1997). Noi abbiamo scelto come composizione lipidica l'asolectina, un insieme di lipidi vegetali naturali. Il lipide (10 mg) viene asciugato in una boccettina a fondo tondo per formare il film lipidico. La membrana di lievito è risospesa in una soluzione di 50 mM di 5(6)-carbossifluoresceina a pH 7.4 (con NaOH) ad una concentrazione finale di proteina di membrana pari a 0.5 mg/ml. La sospensione ottenuta è utilizzata per risospesare il film lipidico con l'ausilio di palline di vetro (1-2 mm di diametro). Si procede quindi ad un ciclo di congelamento e scongelamento in azoto liquido, per stimolare la fusione delle membrane, per poi estrarre 31 volte in filtri di policarbonato con pori di 200 e 100 nm di diametro. La dimensione e l'omogeneità delle vescicole è controllata con l'aiuto dello Zetsizer 1000HSA della Malvern, come già descritto nel paragrafo 2.2.1. L'attività dei LDP è misurata come rilascio del marker fluorescente dall'interno delle vescicole, che provoca un aumento di fluorescenza rispetto al tempo. La 5(6)-carbossifluoresceina ha le stesse proprietà della calceina, ma la sua struttura è più piccola ed ha caratteristiche meno polari (fig. 2.9).

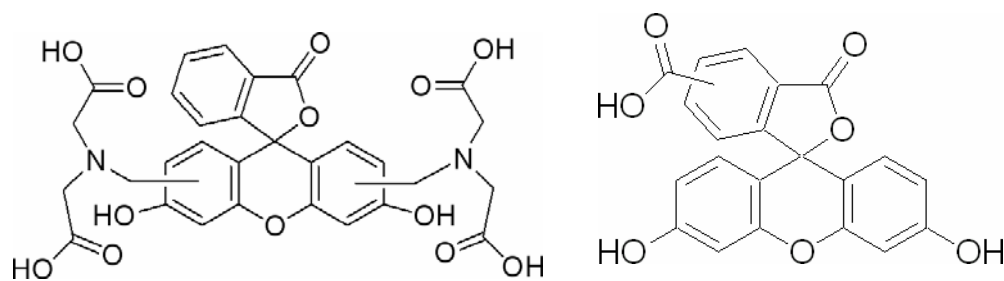


Fig. 2.9 Confronto tra la struttura della calceina, PM = 623 Da (a sinistra) e della 5(6)-carbossifluoresceina, PM = 376 Da (a destra). Max exc = 490 nm, min emis = 520 nm.

CAPITOLO III

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Attività su membrane modello e naturali

Il carattere anfipatico dei LDP favorisce la loro interazione con la membrana cellulare, che viene destabilizzata attraverso la formazione di una lesione. Abbiamo investigato in dettaglio l'importanza delle caratteristiche strutturali delle tossine sull'attività, analizzando in particolare il comportamento di alcuni analoghi strutturali dei LDP, naturali o prodotti chimicamente, su membrane modello e biologiche. Avendo individuato alcuni derivati inattivi abbiamo inoltre determinato il loro effetto inibitorio sull'attività degli altri LDP.

3.1.1 Importanza delle caratteristiche strutturali dei LDP sull'attività permeabilizzante

E' noto che alcune caratteristiche strutturali dei LDP abbiano una funzione chiave per la loro attività, ad esempio l'apertura dell'anello lattonico porta ad una totale inattivazione di SRE, prodotto da *Pseudomonas syringae* (Dalla Serra et al., 2003b). *Pseudomonas tolaasii* è in grado di produrre in coltura tol I, tol II ed altri cinque metaboliti minori, tol A, B, C, D ed E, la cui struttura è stata recentemente determinata da Bassarello et al. (Bassarello et al., 2004). Un analogo acetilato è stato invece prodotto chimicamente in laboratorio. Le differenze nella catena peptidica o acilica di queste peptine si possono osservare nella tabella riassuntiva in fig. 3.1. Un batterio in alcuni casi coinvolto nella stessa patogenesi di *P. tolaasii* è *P. reactans*, che produce un nonapeptide chiamato White Line Inducing Principle, WLIP (fig. 3.2). Tre suoi analoghi strutturali sono stati preparati nel laboratorio del Prof. Evidente dell'Università "Federico II" di Napoli in seguito all'idrolizzazione dell'anello lattonico, alla metilazione o alla metilazione seguita dall'acetilazione di residui della catena peptidica ed acilica (fig. 3.2).

È stata saggiata la capacità permeabilizzante delle tossine su liposomi di PC/SM (1/1 mol), valutando l'aumento del segnale di fluorescenza dovuto al rilascio di calceina incapsulata in essi (fig. 3.3 e 3.4), e l'attività emolitica, come diminuzione della torbidità di una sospensione di globuli rossi di coniglio (RRBC). La capacità di permeabilizzare la membrana è espressa come $1/C_{50}$, dove C_{50} è la concentrazione di tossina necessaria per raggiungere il 50% dell'attività, come riportato in tab. 3.1.

Tolaasina I

aa1 aa2 aa3 aa4 aa5 aa6 aa7 aa8 aa9 aa10 aa11 aa12 aa13 aa14 aa15 aa16 aa17 aa18
 L1-ΔBut-dPro-dSer-dLeu-dVal-dSer-dLeu-dVal-LVal-dGln-LLeu-dVal-ΔBut-daThr-LIle-LHse-dDab-LLys

LDP	CATENA ACILICA	aa14	aa15	aa16	aa17	aa18
Tolaasina I	L1	aThr	Ile	Hse	Dab	Lys
Tolaasina II	L1			Gly		
Tolaasina A	L2					
Tolaasina B	L1		Val			
Tolaasina D	L1		Leu			
Tolaasina E	L1		Leu	Gly		
Tolaasina acet	L1 ac			Hse ac	Dab ac	Lys ac
Tolaasina C	L1	forma lineare				

L1: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}$

L2: $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_3\text{CO}$

ac: acetilato

Fig. 3.1 Struttura degli analoghi di tolaasina I, prodotti da *Pseudomonas tolaasii* (Bassarollo et al., 2004), e tolaasina acetilata, originata da modificazioni chimiche in laboratorio. ΔBut, acido deidroaminobutirrico; Dab, acido diaminobutirrico; Hse, omoserina; aThr, allo-treonina.

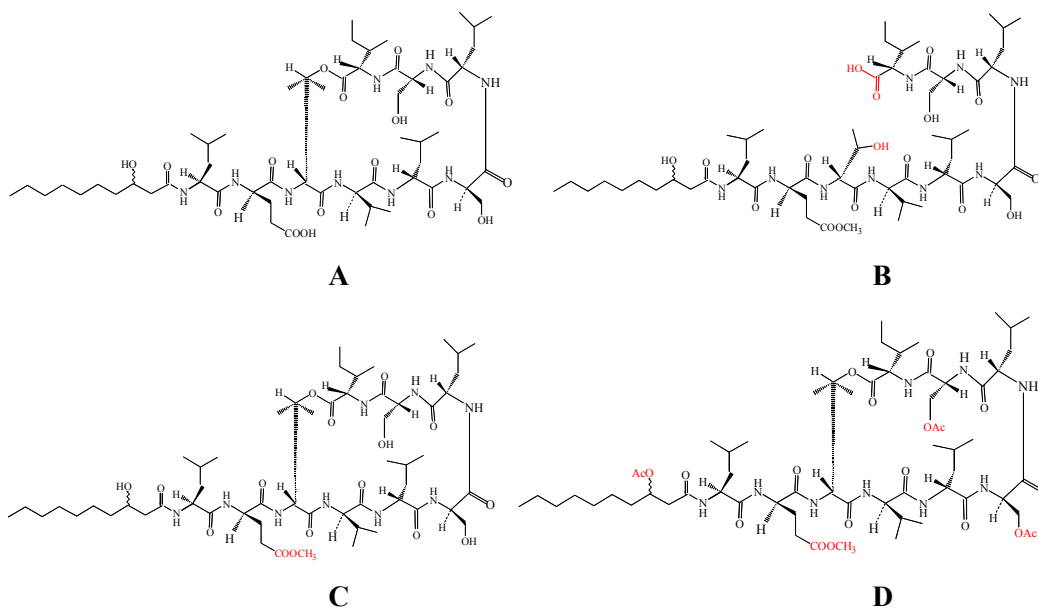


Fig. 3.2 Modifiche chimiche alla struttura base di WLIP, prodotto da *Pseudomonas reactans*. A) WLIP naturale (WLIP); B) WLIP idrolizzato (WLIP idrol); C) WLIP metil-esterificato (WLIP est); D) WLIP metil-acetilato (WLIP acet).

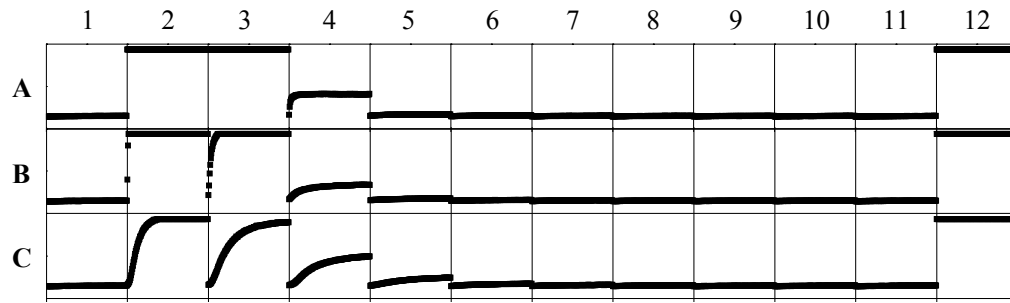


Fig. 3.3 Cinetiche di permeabilizzazione di WLIP (A), WLIP est (B) e WLIP acet (C) su LUV di PC/SM (1/1 mol). La prima colonna rappresenta il controllo di sole LUV, per stimare F_0 e valutare il rilascio spontaneo. Il massimo del rilascio si ottiene con l'aggiunta, nell'ultima colonna, di un detergente che micellizza le vescicole, il Tx100. La concentrazione iniziale (colonna 2) delle tossine ($4.4 \mu\text{M}$) è diluita serialmente di due volte nei pozzetti successivi. La durata complessiva delle cinetiche è di 45 minuti.

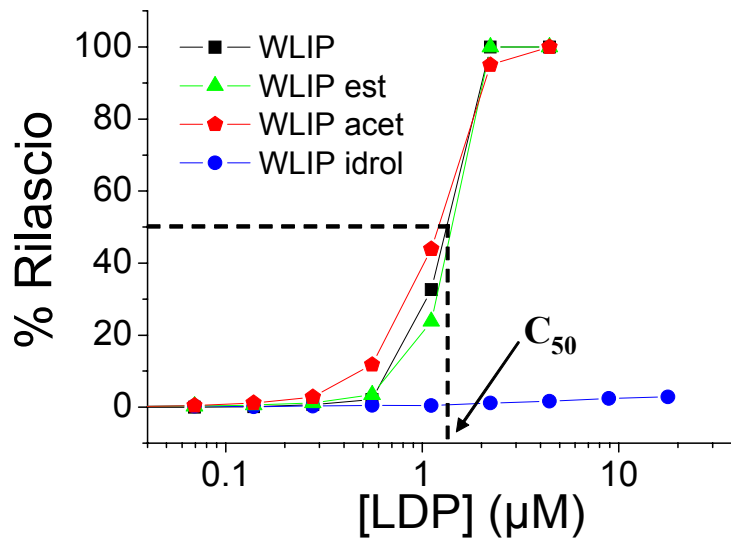


Fig. 3.4 Titolazione dell'attività degli analoghi di WLIP, rappresentata come percentuale di rilascio di calceina rispetto alla concentrazione di tossina. La composizione lipidica delle vescicole è di PC/SM (1/1 mol). L'attività viene solitamente espressa come C_{50} (concentrazione di tossina necessaria per raggiungere il 50% di rilascio), che si calcola dalle linee tratteggiate.

Si osserva che tol II, sostituita solo nell'aminoacido 16 (con una Gly al posto di una Hse), mantiene un'attività simile a quella di tol I. Tol D, che varia solo nella posizione 15 della catena peptidica (una Leu sostituisce una Ile) dimezza la capacità permeabilizzante. E' interessante notare invece che tol E, che presenta queste due variazioni combinate, ha un'attività decisamente minore. Tol C,

l'analogo lineare di tol I, che origina dall'idrolisi dell'anello lattonico, non perde completamente l'attività, come accade invece per i nonapeptidi con modificazioni simili, SRE (Dalla Serra et al., 2003b) e WLIP (vedi di seguito). Tol B, come la D, è sostituita nell'aminoacido 15 (con una Val al posto della Ile). Questo diminuisce fortemente la capacità permeabilizzante. L'accorciamento della catena acilica, nella tol A, rende l'analogo tra i meno attivi. Infine l'acetilazione del LDP ha scarso effetto sulla sua attività.

	Attività permeabilizzante $1/C_{50}$ (μM^{-1}) \pm SE	Attività emolitica $1/C_{50}$ (μM^{-1}) \pm SE	Efficacia
Tol I	4.36 \pm 1.67	0.034 \pm 0.004	128
Tol II	5.25 \pm 1.70	0.031 \pm 0.005	169
Tol A	0.35 \pm 0.03	n.a. ⁽¹¹³⁾	> 40
Tol B	0.37 \pm 0.06	n.a. ⁽¹¹³⁾	> 42
Tol C	0.37 \pm 0.06	0.012	31
Tol D	1.89 \pm 0.22	0.011	172
Tol E	0.26 \pm 0.05	n.a. ⁽¹¹³⁾	> 29
Tol acet	2.24 \pm 0.81	0.011	204

n.a. non attiva (max concentrazione saggiata $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Tab. 3.1 Attività permeabilizzante ed emolitica di analoghi strutturali di tol I, espressa come $1/C_{50}$. C_{50} è la concentrazione di tossina necessaria per ottenere il 50% di rilascio di calceina da vescicole di PC/SM (1/1 mol) oppure il 50% di emolisi di RRBC. PC: fosfatidilcolina; SM: sfingomielina. La media si riferisce ad un insieme di almeno tre esperimenti. L'efficacia deriva dal rapporto tra l'attività delle tossine sui liposomi (che rappresenta l'efficienza contro patogeni) e l'attività emolitica su RRBC (che rappresenta la tossicità delle tossine).

I risultati dell'attività permeabilizzante delle tolaasine suggeriscono l'importanza dell'anello lattonico come si è osservato per tol C, per cui si è osservata una discreta diminuzione dell'attività. La lunghezza della catena acilica N-terminale, e quindi il grado di idrofobicità della molecola, risulta proporzionale alla capacità permeabilizzante, come mostrato dall'attività minore di tol A. Questa osservazione era già stata fatta per fuscopeptina (Paletti, 2004), una peptina prodotta da *P. fuscovagine*, sintetizzata nella forma A e B, differenti solo per la lunghezza della catena acilica (fig. 1.7), ed altri LDP (Menestrina et al., 2003). Le forme contenenti la catena acilica più lunga presentavano una maggior attività. Anche l'importanza per l'attività del residuo aminoacidico in posizione 15 è stata

dimostrata. Infatti la sostituzione dell'isoleucina con una valina, nella tol B, o di una leucina, nella tol D determina una grande ed una lieve diminuzione dell'attività rispettivamente, se paragonata a quella di tol I. La presenza di una leucina in posizione 15 nella tol E, diminuisce notevolmente l'attività se paragonata a quella di tol II. Sulla stessa sostituzione aminoacidica del residuo 15 (per tol D e tol E) pesa in modo maggiore la presenza di una glicina in posizione 16, al posto di una omoserina.

Come recentemente determinato (Jourdan et al., 2003) da studi ad alta risoluzione strutturale in sodio dodecil solfato, che mima la condizione della membrana, tramite NMR 2D e simulazione di dinamica molecolare, tol I forma un'alfa elica sinistrorsa nella regione compresa tra la posizione 2 e 14 della catena, comprendente sette aminoacidi in conformazione D e la regione adiacente L-D-L-D-D. Inoltre il macrociclo lattonico adotta una conformazione detta 'boatlike' ed è spostata dall'asse dell'elica per formare una struttura a 'mazza da golf' (fig. 1.8). Queste caratteristiche strutturali appaiono importanti per l'azione tossica sulla cellula (Bassarello et al., 2004). Quindi cambiamenti strutturali nella posizione 15, come nel caso di tol B e D, in posizione 16, come per tol II, e in entrambe le posizioni, come accade per tol E, possono modificare la conformazione dell'anello e di conseguenza la capacità di interagire a livello di membrana.

È interessante notare che non sempre la variazione della capacità permeabilizzante sulle vescicole rispecchia perfettamente quella emolitica. Poiché il test di emolisi è solitamente utilizzato per avere una misura della tossicità di un composto (From et al., 2007; Wu et al., 2007) in tabella 3.1 abbiamo riportato 'l'efficacia', rappresentante il rapporto tra l'attività delle tossine su LUV e la loro attività emolitica su RRBC. Quando il valore è più alto, rispetto alla forma naturale di riferimento, consideriamo l'analogo migliore in vista delle possibili applicazioni biotecnologiche, in cui appunto si tenta di isolare forme di LDP più efficaci sui patogeni e meno tossiche per l'uomo. Gli analoghi di tol I che aumentano chiaramente l'efficacia sono quindi tol II, tol D, ma soprattutto tol acet, che raddoppia il rapporto rispetto a tol I. Per quanto riguarda gli altri analoghi, alcuni di loro sono potenzialmente molto efficaci, essendo completamente privi di attività emolitica, ma si dovrebbe aumentare ulteriormente la concentrazione negli esperimenti per averne la certezza.

Questo comportamento si osserva ancora più marcatamente per gli analoghi di WLIP (tab. 3.2). Infatti, se risulta chiaro il ruolo fondamentale dell'anello lattonico, l'attività viene completamente annullata dall'idrolizzazione della forma naturale, un comportamento più complesso è mostrato dalle forme metilata ed acetilata. Queste infatti non presentano variazioni nell'attività permeabilizzante, anche se la cinetica diventa più lenta (fig. 3.3), mentre perdono totalmente la

capacità emolitica. La loro efficacia aumenta quindi in modo consistente, risultando più di venti volte maggiore rispetto a quella della forma naturale.

	Attività permeabilizzante $1/C_{50}$ (μM^{-1}) \pm SE	Attività emolitica $1/C_{50}$ (μM^{-1}) \pm SE	Efficacia
WLIP	0.71 \pm 0.03	0.22 \pm 0.04	3
WLIP idrol	n.a. (17.8)	n.a. (89)	-
WLIP est	0.74 \pm 0.09	n.a. (89)	> 66
WLIP acet	0.72 \pm 0.05	n.a. (89)	> 64

n.a. non attiva (max concentrazione saggiata $\mu\text{g/ml}$)

Tab. 3.2 Attività, espressa come $1/C_{50}$, ed efficacia (attività su LUV/attività su RRBC) degli analoghi strutturali di WLIP. C_{50} è la concentrazione di tossina necessaria per ottenere il 50% di rilascio di calceina da vescicole di PC/SM (1/1 mol) e il 50% di emolisi di RRBC. La media si riferisce ad un insieme di almeno tre esperimenti.

Si è osservato dunque che la sostituzione di un singolo aminoacido o un piccolo cambiamento della struttura dei LDP può influire, a volte in modo significativo, sulla loro capacità di permeabilizzare la membrana. L'effetto può essere determinato da una diminuzione del carattere anfipatico o dal mancato ripiegamento nella conformazione corretta della molecola, che la rende stabile nell'interazione con la membrana.

3.1.2 Effetto inibitorio delle forme non attive sulla capacità permeabilizzante dei LDP attivi

I batteri produttori di LDP sono spesso in grado di sintetizzare simultaneamente peptine e micine. Questo ha suggerito in passato di investigare un possibile effetto sinergico tra le due classi di LDP, in particolare tra sp25A ed SRE prodotti da *Pseudomonas syringae*, come possibile meccanismo amplificativo della capacità patogena del batterio. Un sinergismo positivo della capacità permeabilizzante è stato effettivamente osservato su sistemi modello (dati non mostrati), anche se non è ancora chiaro il possibile meccanismo molecolare. Un'interazione di tipo negativo è nota invece per altri due LDP. Come già accennato in precedenza infatti tol I, prodotta da *Pseudomonas tolaasii*, e WLIP, da *P. reactans*, sono in grado di produrre un precipitato bianco in soluzione. Questa interazione produce

effetti inibitori sia della capacità permeabilizzante su vescicole lipidiche (Paletti et al., 2007) che della patogenicità verso *Agaricus bisporus* (Soler-Rivas et al., 1999a), uno dei bersagli d'azione naturali di *Pseudomonas tolaasii*. È interessante evidenziare, inoltre, che alcune modifiche strutturali che abbiamo analizzato, e che hanno presentato una diversa attività, possono originarsi anche in natura, in particolari condizioni ambientali. L'idrolisi dell'anello lattonico, per esempio, può essere indotta da un ambiente leggermente basico. Con queste premesse ci siamo domandati quindi se le forme che perdono attività possano influire in qualche modo sull'efficienza degli altri LDP, in particolare presentando un'azione inibente. Una volta individuato un analogo non attivo di WLIP, abbiamo investigato il suo possibile effetto inibitorio sulla capacità permeabilizzante delle forme attive. Abbiamo analizzato l'azione di WLIP idrol sull'attività di WLIP, WLIP est e WLIP acet su liposomi di PC/SM (1/1 mol). Tre diverse concentrazioni di tossina, in grado di provocare un rilascio di calceina compreso tra 60 e 90%, sono state mescolate in diverse proporzioni alla forma idrolizzata. L'attività è risultata dipendente dal rapporto di concentrazione della coppia di tossine considerate, come si osserva anche dalle cinetiche esemplificative in figura 3.6.

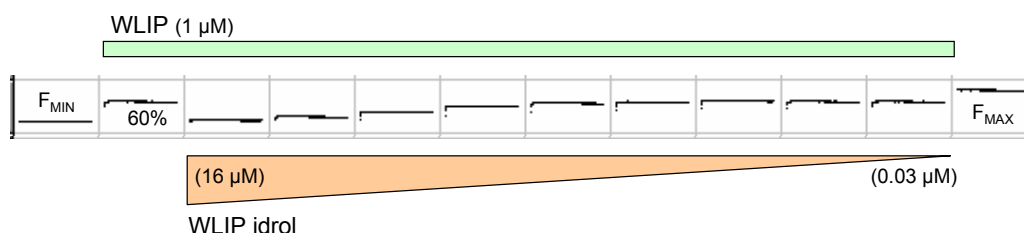


Fig. 3.6 Cinetiche di rilascio di calceina da liposomi di PC/SM (1/1 mol) dopo l'aggiunta di WLIP in presenza di concentrazioni decrescenti di WLIP idrol. Nella prima colonna c'è il controllo di sole LUV. Nella seconda colonna alle vescicole è aggiunta la tossina attiva (nella stessa concentrazione in cui è presente in tutti i pozzetti fino all'undicesimo). L'ultima colonna rappresenta il rilascio di calceina massimo ottenuto dall'aggiunta di TX100, che micellizza tutte le vescicole. Dalla terza alla penultima colonna è presente anche WLIP idrol, diluito di due volte da un pozzetto a quello successivo. Rapporto massimo $[WLIP\ idrol]/[WLIP] = 16$. La durata della cinetica è di 45 minuti.

L'influenza di WLIP idrol sull'attività viene rappresentata come fattore di inibizione (IF):

$$IF = (A_{tox} - A_{mix})/A_{tox}$$

dove A_{tox} e A_{mix} sono rispettivamente l'attività, espressa come percentuale di calceina rilasciata, di WLIP da solo o in presenza di WLIP idrol. La figura 3.7

(quadrati neri) mostra il fattore di inibizione rispetto al rapporto $[\text{WLIP idrol}]/[\text{WLIP}]$ quando i due LDP sono aggiunti contemporaneamente alla soluzione di liposomi. All'aumentare della concentrazione di WLIP idrol cresce anche l'inibizione dell'attività degli altri LDP. WLIP est risulta solo leggermente influenzato dalla presenza di WLIP idrol. Questo comportamento è riassunto in tabella 3.3, dove è riportato il fattore di inibizione al più alto rapporto saggiato ($[\text{WLIP idrol}]/[\text{WLIP}] = 16$).

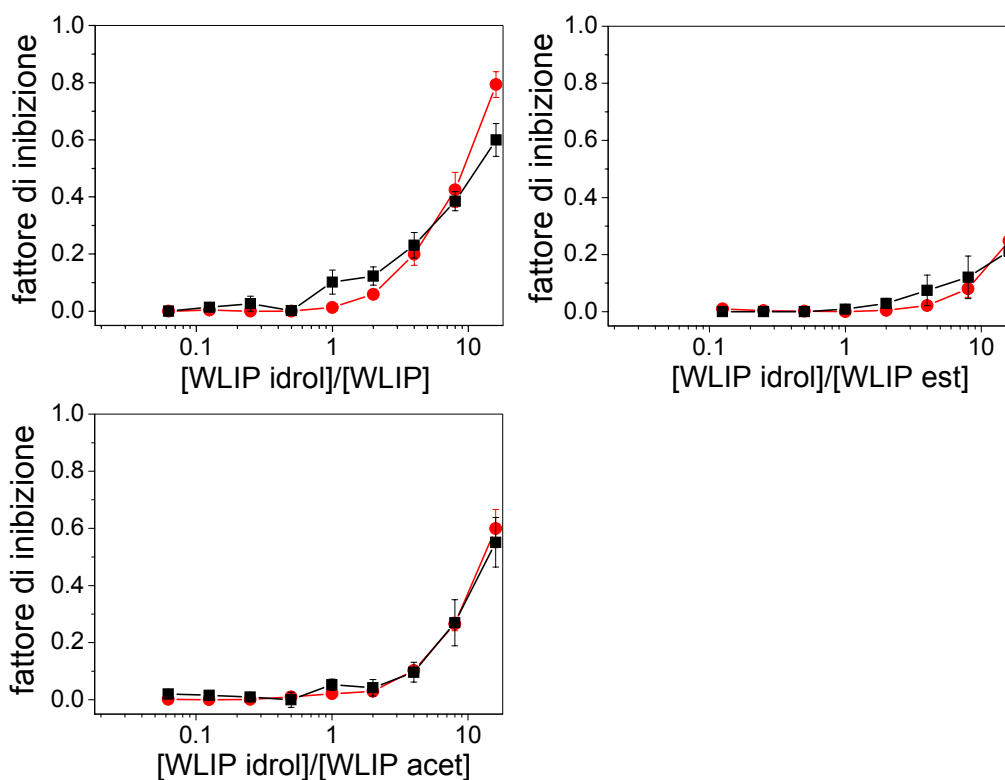


Fig. 3.7 Effetto inibitorio di WLIP idrol sull'attività permeabilizzante di WLIP, WLIP est e WLIP acet, su liposomi di PC/SM (1/1 mol) mostrato come fattore di inibizione rispetto al rapporto $[\text{WLIP idrol}]/[\text{WLIP}]$. I quadri neri rappresentano l'aggiunta contemporanea delle due tossine. I tondi rossi mostrano la situazione in cui WLIP idrol è stato preincubato per mezz'ora con i liposomi prima dell'aggiunta del LDP attivo. L'errore (SE) è considerato su un insieme di almeno tre esperimenti.

	μM	% rilascio	IF
WLIP	1.1	70 ± 30	0.7 ± 0.1
WLIP acet	1.1	60 ± 20	0.6 ± 0.1
WLIP est	1.1	60 ± 40	0.2 ± 0.1

Tab. 3.3 Azione inibente di WLIP idrol in rapporto molare 16:1 sulle forme attive di WLIP. IF: fattore di inibizione.

L'attività delle tossine in presenza di WLIP idrol è stata misurata anche dopo incubazione con i liposomi, in modo da favorire, se necessario, la ripartizione di WLIP idrol in membrana. In questo modo si voleva ottenere una prima indicazione sulla possibilità che l'interazione tra i due LDP avvenisse a livello della membrana piuttosto che in soluzione. Un aumento dell'inibizione, rispetto agli esperimenti precedenti, suggerirebbe che l'attività di WLIP sia modulata dalla presenza di WLIP idrol in membrana. I risultati di questo saggio, però, non hanno presentato significative differenze (fig. 3.7, tondi rossi). Questo approccio non ci ha permesso di avere indicazioni supplementari sul meccanismo d'azione.

Allo stesso modo si è indagato l'andamento dell'attività emolitica di WLIP, l'unica forma attiva sugli eritrociti, dopo l'aggiunzione delle forme modificate (fig. 3.8). In questo caso WLIP idrol non ha alcun effetto sull'attività della forma naturale, mentre le forme esterificata ed acetilata diminuiscono la capacità litica, quando la loro concentrazione è uguale o superiore a quella di WLIP. Anche in questo caso la preincubazione dei derivati inattivi con i globuli rossi non ha mostrato un rilevante aumento del fattore di inibizione (fig. 3.8B), impedendoci di ottenere indicazioni aggiuntive sul tipo di interazione tra le coppie di LDP.

La perdita di efficacia di WLIP idrol risulta invece inaspettata. Questo comportamento suggerisce un meccanismo d'azione differente con i globuli rossi, che potrebbe vedere coinvolti recettori di membrana, proteici o lipidici. Informazioni molecolari saranno ottenute dagli esperimenti con altri approcci sperimentali: utilizzo di monostrati lipidici.

Poiché tol I e WLIP sono in grado di interagire tra loro nella formazione di un precipitato bianco in soluzione, abbiamo iniziato ad esaminare anche l'attività della coppia tol I - WLIP idrol su liposomi di PC/SM (1/1 mol). Il fattore di inibizione cresce all'aumentare del rapporto $[\text{WLIP idrol}]/[\text{tol I}]$ (fig. 3.9, quadri neri). La preincubazione di WLIP idrol con le vescicole produce un considerevole aumento dell'effetto inibitorio (fig. 3.9, tondi rossi), suggerendo la possibilità che

l'interazione tra le due tossine avvenga a livello di membrana, meccanismo che verrà approfondito.

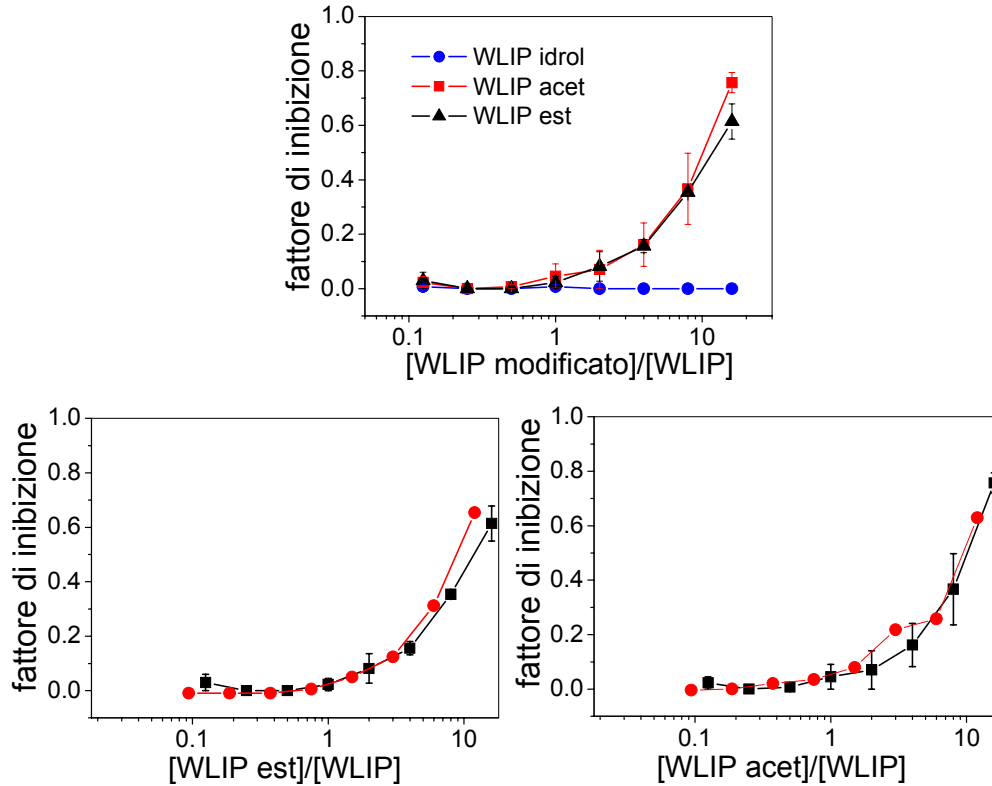


Fig. 3.8 Sopra) Inibizione della capacità emolitica di WLIP indotta da WLIP idrol, WLIP est e WLIP acet. Sotto) Confronto tra gli esperimenti in cui la coppia di tossine è aggiunta contemporaneamente (quadri neri) e quelli in cui gli analoghi sono fatti preincubare con gli eritrociti per 30 minuti a temperatura ambiente prima dell'aggiunta di WLIP (tondi rossi).

Si è osservato quindi che WLIP idrol è in grado di inibire l'attività permeabilizzante sia della sua forma naturale che di una peptina, la tol I. Il meccanismo di interazione merita di essere ulteriormente investigato. L'effetto inibitorio può essere ricondotto alla formazione di un aggregato in soluzione, che sottrae la tossina attiva annullando la sua capacità di legarsi alla membrana. Nel caso in cui l'incontro delle tossine non avvenga in soluzione l'inibizione che abbiamo osservato può essere dovuta alla competizione dei LDP per uno stesso sito di legame. La presenza di entrambi i LDP nel doppio strato potrebbe infine impedire l'oligomerizzazione dei monomeri, necessaria alla formazione della lesione, o dare origine ad un poro misto inattivo.

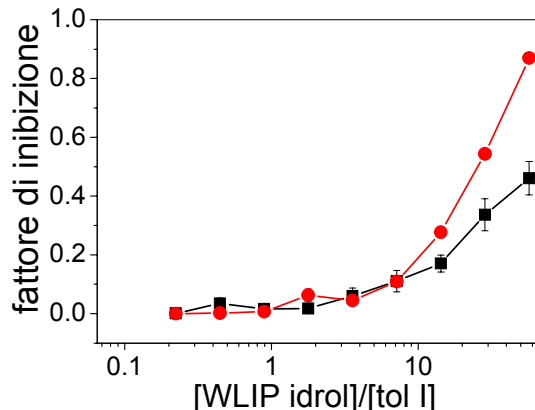


Fig. 3.9 Azione inibitoria dell'attività permeabilizzante di tol I su vescicole di PC/SM (1/1 mol) in presenza di quantità crescenti di WLIP idrol aggiunto contemporaneamente a tol I (quadrati neri) o preincubato per 30 minuti con le vescicole prima dell'aggiunta del LDP attivo (tondi rossi).

3.1.3 Legame ed inserimento dei LDP in un monostrato lipidico

Fino a questo momento abbiamo analizzato la capacità di formare una lesione sulla membrana da parte dei LDP. Il modello di formazione del poro, proposto da Parente et al. (Parente et al., 1990), successivamente rivisto da Rapaport et al. (Rapaport et al., 1996), e riportato anche da Dalla Serra et al. (Dalla Serra et al., 1999) divide il processo in tre stadi: 1) le tossine si legano e vengono incorporate nello strato lipidico; 2) i monomeri legati si aggregano per formare oligomeri e crescere in grandezza; 3) gli oligomeri che hanno raggiunto una misura critica formano il canale che permeabilizza la membrana.

Avendo individuato un analogo molto interessante in WLIP idrol, che perde completamente l'attività permeabilizzante ed è in grado di inibire quella di WLIP e tol I, abbiamo deciso di indagare la sua capacità di legame ed inserimento nella membrana mettendolo a confronto con i LDP attivi.

Monostrati lipidici, formati alla superficie di una soluzione acquosa, si prestano molto bene allo studio di interazione di una molecola anfipatica con la componente lipidica della membrana. Uno dei vantaggi di questa tecnica consiste nell'ottenere un sistema modello stabile ed omogeneo in cui le molecole lipidiche assumono uno specifico orientamento all'interfaccia aria-acqua (MagetDana, 1999). I peptidi antimicrobici in generale sono noti per la loro azione a livello della membrana delle cellule sensibili e la loro attività biologica è direttamente relazionata alla loro sequenza e alle caratteristiche strutturali. La loro anfipaticità

ne permette la solubilità in mezzi di polarità diversa e la diffusione verso interfacce polari-apolari come la membrana cellulare. Un'altra conseguenza della loro anfipaticità è la loro naturale tendenza ad aggregare. Queste molecole sono definite biosurfattanti, ossia sostanze che sono in grado di assorbire all'interfaccia. L'attività superficiale dei peptidi è influenzata di solito da fattori conformazionali, come la struttura anfipatica, la misura e la flessibilità molecolare e la carica netta (MagetDana, 1999). I LDP infatti quando sono iniettati nella fase acquosa sono in grado di migrare all'interfaccia aria/acqua, andando a formare un monostrato di tossina alla superficie. Questo viene registrato come incremento di pressione superficiale e dipende dalla concentrazione di LDP presente in soluzione. Tol I, WLIP e WLIP idrol hanno presentato attività superficiale all'interfaccia aria-acqua (dati non mostrati). Per valutarne la capacità di inserimento in membrana è stato preparato un monostrato lipidico della stessa composizione utilizzata per gli esperimenti di permeabilizzazione, ossia PC/SM (1/1 mol). L'aggiunta di tol I nella fase sottostante il monostrato provoca un incremento di pressione superficiale (fig. 3.10A), che dipende dalla concentrazione di tossina presente nella sottofase (fig. 3.10B). Questo indica la capacità di tol I di inserirsi tra le molecole lipidiche. La cinetica di inserimento alla pressione superficiale iniziale di 22-23 mN/m mostra un andamento semplice. Aumentando però la pressione superficiale iniziale (fig. 3.10B) si osserva che l'aggiunta della tossina provoca un rapido e significativo aumento di pressione superficiale, seguito da una diminuzione allo stato di equilibrio. Questo comportamento è stato precedentemente osservato per un'altra peptina, la sp25A (Dalla Serra et al., 1999), ed altri lipopeptidi ciclici di origine batterica (MagetDana, 1999). L'andamento potrebbe indicare un veloce adsorbimento della tossina all'interfaccia nella configurazione solubile in acqua, seguito da una riorganizzazione delle molecole in una conformazione più stabile e più compatta. È noto infatti per alcune peptine, tol I (Coraiola et al., 2006), siringopeptina 25A e fuscopeptina B (Paletti, 2004), che la struttura secondaria subisce delle modifiche passando da ambienti idrofilici, quale il tampone, ad ambienti più idrofobici, come solventi che mimano la condizione della membrana, ed anche nella membrana stessa. In particolare per tol I si è osservato un aumento della struttura ordinata ad α -elica (da 46 a 63%) inserita nel doppio strato lipidico con un angolo di $20^\circ \pm 2^\circ$ rispetto alle catene aciliche degli acidi grassi. È dimostrato che anche WLIP è in grado di inserirsi nel monostrato lipidico (fig. 3.11A), mentre il suo analogo lineare produce variazioni di pressione paragonabili solo se presente ad una concentrazione 13 volte maggiore (fig. 3.11B). Questo indica che l'apertura dell'anello lattonico riduce significativamente la capacità di interazione con la membrana. Si osserva inoltre che i due analoghi presentano un andamento diverso. L'inserimento di WLIP segue un comportamento di tipo

cooperativo, infatti l'incremento della pressione superficiale è ritardato rispetto all'aggiunta della tossina. WLIP idrol presenta invece un adsorbimento più simile a quello di tol I.

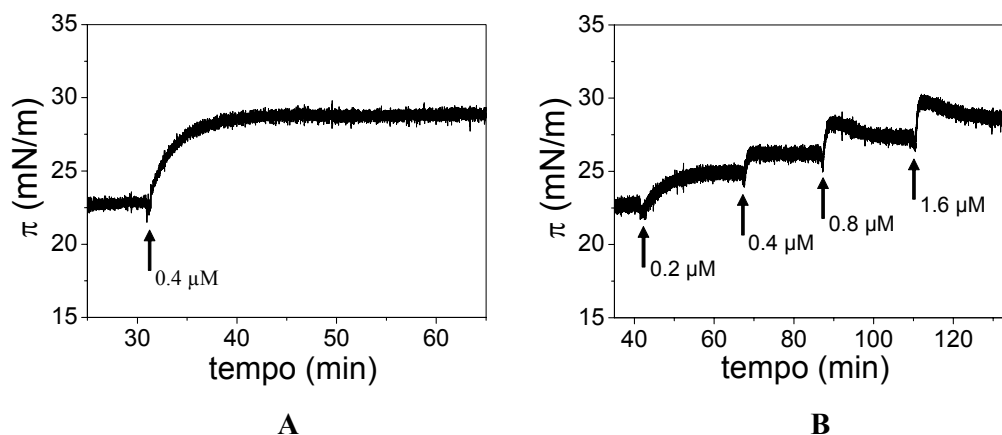


Fig. 3.10 A) Cinetica dell'incremento di tol I in un monostrato lipidico di PC/SM (1/1 mol). Tol I è aggiunta nella soluzione sottostante ad una concentrazione finale di $0.4 \mu\text{M}$. B) Aumento di pressione superficiale indotto dall'aggiunta successiva di quantità crescenti di tol I. Le concentrazioni indicate sono quelle finali di tossina in soluzione.

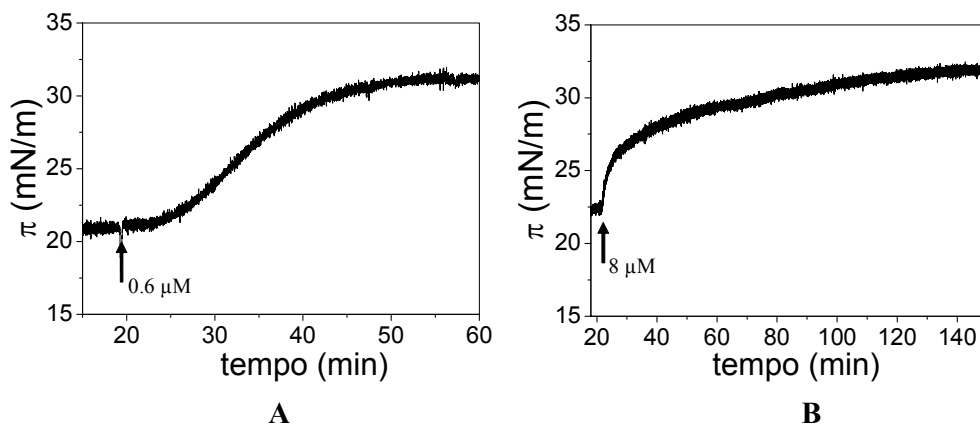


Fig. 3.11 Incremento di pressione superficiale indotto dall'aggiunta nella soluzione sottostante il monostrato di PC/SM (1/1 mol) di WLIP (A) e di WLIP idrol (B).

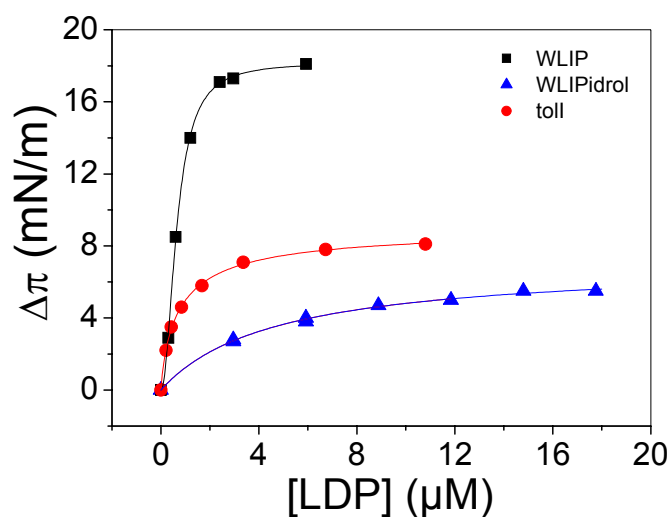


Fig. 3.12 Adsorbimento in un monostrato lipidico di PC/SM 1/1 mol di tol I, WLIP e WLIP idrol.

LDP	$\Delta\pi_{\max}$ (mN/m)	n	K (μM^{-1})
WLIP	18.2 ± 0.1	2.05 ± 0.07	1.53 ± 0.03
WLIP idrol	7.1 ± 0.7	1.0 ± 0.1	0.21 ± 0.04
tol I	9.1 ± 0.2	0.83 ± 0.05	1.3 ± 0.1

Tab. 3.4 Valori ottenuti dal fitting delle curve di adsorbimento dei LDP con il modello generalizzato di Langmuir- Freundlich.

Riportando la variazione di pressione ($\Delta\pi$) in funzione della concentrazione di tossina si ottiene un grafico dell'adsorbimento dal quale è possibile ricavare la costante di legame apparente del LDP (Nordera et al., 1997) (fig. 3.12). L'adsorbimento è solitamente descritto dall'isoterma di Langmuir:

$$\Delta\pi / \Delta\pi_{\max} = \theta = KT/(1 + KT)$$

Dove la grandezza θ rappresenta il grado di ricoprimento, K la costante di equilibrio del legame tossina-lipide e T la concentrazione della tossina.

Assumendo che la tossina si leghi in forma monomerica al lipide, la reazione di legame può essere così schematizzata:



in cui N_l e N_o rappresentano il numero di siti lipidici liberi ed occupati rispettivamente.

All'equilibrio si ha:

$$K = N_o/T (N_t - N_o)$$

In cui N_t rappresenta il numero totale di siti a cui la tossina si può legare.

È facile comprendere come la probabilità di adesione della tossina dipenda dalla porzione superficiale non ancora ricoperta. Introduciamo quindi a questo punto una grandezza che solitamente gioca un ruolo importante nei processi di adsorbimento, e cioè il grado di ricoprimento (θ). Questo rappresenta il rapporto tra il numero di siti occupati e il numero totale dei siti.

$$\theta = N_o/N_t$$

con semplici passaggi matematici è possibile passare all'equazione che descrive l'isoterma di adsorbimento di Langmuir (che spiega l'adsorbimento di un gas ad una superficie solida), in cui si sostituisca la concentrazione della specie adsorbita, alla pressione parziale.

Possiamo infine supporre che la relazione che intercorre tra il grado di ricoprimento θ e l'aumento di pressione superficiale misurato, sia la seguente:

$$\theta = \Delta\pi / \Delta\pi_{\max}$$

L'adsorbimento descritto dall'isoterma di Langmuir ha un andamento semplice. Nel nostro caso è stato necessario utilizzare un'isoterma generalizzata, detta di Langmuir-Freundlich (Praus and Turicová, 2007):

$$\Delta\pi / \Delta\pi_{\max} = \frac{(KT)^n}{1 + (KT)^n}$$

in cui compare una nuova variabile, n , il fattore di cooperazione. Per un'interazione semplice, corrispondente al modello di Langmuir il valore di n è pari ad 1. Quando $n > 1$ si assume che l'adsorbimento sia di tipo cooperativo positivo, mentre con $0 < n < 1$ ci aspettiamo un comportamento cooperativo negativo. In tabella 3.4 sono riportati i valori di $\Delta\pi_{\max}$, l'aumento di pressione superficiale massimo indotto dall'inserimento della tossina, e le costanti n e K . Si osserva che tol I e WLIP idrol hanno un valore di n vicino ad 1; il loro

adsorbimento è quindi descritto bene dal modello classico di Langmuir. WLIP presenta $n > 1$, mostrando invece un comportamento cooperativo. La K , che rappresenta l'affinità della tossina per il monostrato, è simile per WLIP e tol I, 1.53 e 1.3 rispettivamente, mentre è 6-7 volte minore quella di WLIP idrol.

3.1.4 Inibizione della capacità di interazione con la membrana di tol I e WLIP da parte di WLIP idrol

La tecnica dell'inserimento in un monostrato lipidico è stata utilizzata anche per investigare più in dettaglio l'effetto inibitorio osservato sull'attività permeabilizzante di WLIP e tol I da parte di WLIP idrol.

Da aggiunte successive di una tossina ad un monostrato e dall'aggiunta delle stesse quantità a monostrati lipidici aventi pressioni superficiali (π) iniziali maggiori si assume che l'incremento di π dipenda solo dalla π iniziale di un monostrato, sia essa dovuta al solo lipide o all'insieme di lipide e proteina (dati non mostrati). Partendo dalla precedente osservazione e basandoci su quanto descritto da Van Mau et al. (Van Mau et al., 2005) riguardo alla possibile interazione di due petidi coinvolti nell'apoptosi, Bax e tBid, abbiamo analizzato l'effetto di WLIP idrol sull'inserimento nel doppio strato di WLIP e tol I, come esemplificato in figura 3.13. Inizialmente abbiamo valutato l'inserimento di WLIP e tol I in presenza di WLIP idrol in membrana. Per questo (fig. 3.13A, linea nera) abbiamo introdotto una concentrazione tale di WLIP idrol da indurre un incremento prefissato di π , tanto da indicare il suo adsorbimento nel monostrato. Quando il segnale ha raggiunto la stabilità è stato addizionato WLIP o tol I. L'incremento di π provocato da questa seconda aggiunta è stato confrontato con quello ottenuto dopo l'introduzione della stessa quantità di tossina ad un monostrato lipidico con π iniziale uguale a quella raggiunta dopo l'inserimento di WLIP idrol (fig. 3.13A, linea rossa). Per verificare se l'interazione tra i due LDP avviene già in soluzione, si è confrontato l'aumento di π indotto dall'aggiunta contemporanea della coppia di tossine, dopo averle co-incubate per 30' a temperatura ambiente (fig. 3.13B, linea blu), con l'incremento di π provocato dall'introduzione delle tossine in successione (fig. 3.13B, linea nera). Sono state provate due concentrazioni di WLIP idrol (3 e 6 μM) con due di WLIP (0.3 e 0.6 μM) e due di tol I (0.2 e 0.4 μM), ottenendo così quattro combinazioni diverse per ogni coppia.

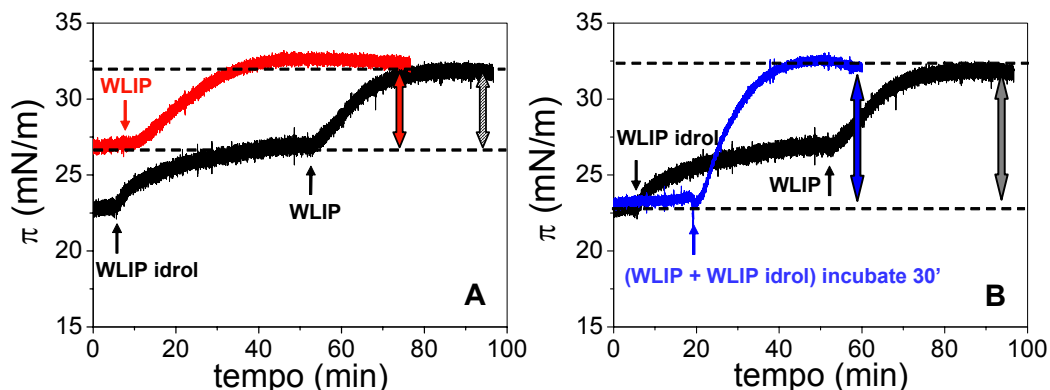


Fig. 3.13 Rappresentazione esemplificativa degli esperimenti condotti per valutare più in dettaglio l'effetto inibitorio di WLIP idrol in soluzione e in membrana. A) sono confrontati l'incremento di π indotto dall'aggiunta di WLIP in presenza di WLIP idrol nel monostrato (linea nera e freccia tratteggiata) e l'aumento di π dopo l'aggiunta della stessa quantità di WLIP ad un monostrato completamente lipidico avente π iniziale pari a quella raggiunta dall'inserimento di WLIP idrol (linea rossa e freccia rossa). B) Paragone tra l'aumento di π provocato dall'inserimento di WLIP idrol seguito da quello di WLIP (linea nera e freccia grigia) e l'introduzione delle stesse concentrazioni dei due LDP incubati precedentemente per 30' (linea blu e freccia blu). La composizione lipidica del monostrato è di PC/SM (1/1 mol). [WLIP] = 0.3 μ M. [WLIP idrol] = 6 μ M.

Dai risultati riportati negli istogrammi di fig. 3.14 si osserva chiaramente che l'interazione di WLIP con il monostrato lipidico non è influenzata dalla presenza di WLIP idrol in membrana (a sinistra in fig.), poiché l'incremento di π indotto da WLIP al solo lipide (colonne rosse) è identico a quello prodotto in presenza di WLIP idrol nel monostrato (colonne tratteggiate). Il comportamento di WLIP è indifferente anche alla presenza di WLIP idrol in soluzione (a destra in fig.), poiché l'aumento di π in seguito all'aggiunta delle due tossine preincubate per 30' (colonne blu) è uguale a quello indotto dalle addizioni successive di LDP (colonne grigie). Gli stessi esperimenti hanno mostrato un comportamento molto diverso da parte di tol I. Tol I (fig. 3.15), infatti, mostra una ridotta capacità di inserimento quando anche WLIP idrol è adsorbito nel monostrato (a sinistra in fig.) mentre, incubata con WLIP idrol, induce un incremento di π ancora minore rispetto a quello provocato dall'aggiunta separata dei due LDP (a destra in fig.). Questi risultati ci hanno permesso di approfondire lo studio sul meccanismo d'azione con cui WLIP idrol è in grado di inibire l'azione di WLIP e di tol I.

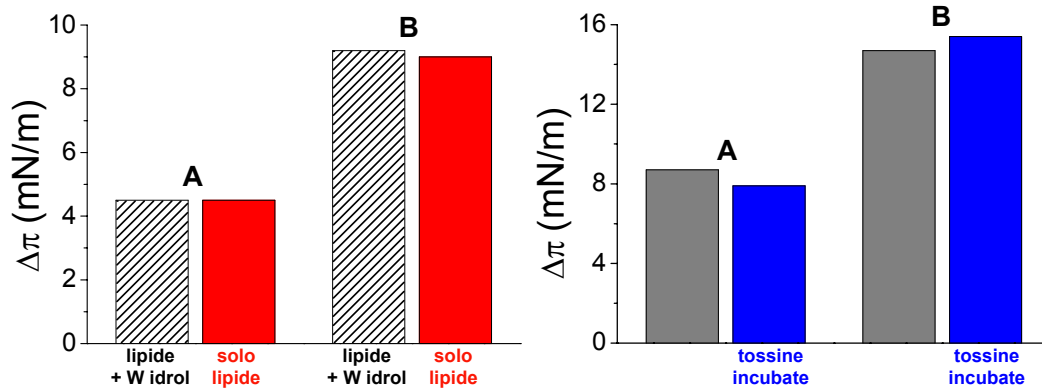


Fig. 3.14 Effetto di WLIP idrol ($6 \mu\text{M}$) sulla capacità di interazione con il monostrato di WLIP, presente in due concentrazioni, $0.3 \mu\text{M}$ (A) e $0.6 \mu\text{M}$ (B). A sinistra sono paragonati l'incremento di pressione superficiale provocata dall'inserimento di WLIP ad un monostrato lipidico in cui è inserito anche WLIP idrol (colonne nere a righe) e dall'adsorbimento della tossina al solo monostrato lipidico avente π iniziale uguale a quella raggiunta dall'inserimento di WLIP idrol (colonne rosse). A destra è presentato l'aumento di π indotto dall'aggiunta dei due LDP in successione (colonne grigie) o contemporaneamente dopo una preincubazione di $30'$ a temperatura ambiente (colonne blu). La composizione lipidica del monostrato è di PC/SM (1/1 mol).

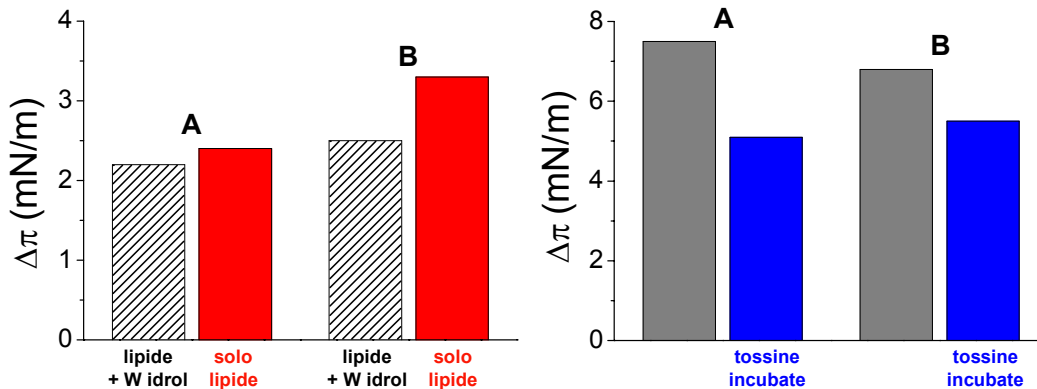


Fig. 3.15 Influenza di WLIP idrol ($6 \mu\text{M}$) sulla capacità di inserimento di tol I ($0.2 \mu\text{M}$, A, e $0.4 \mu\text{M}$, B) in un monostrato lipidico di PC/SM (1/1 mol). Stessa procedura di fig. 3.14.

Gli esperimenti di permeabilizzazione dei liposomi (par. 3.1.2) avevano dimostrato chiaramente che l'attività di WLIP e tol I era diminuita dalla presenza di WLIP idrol ad un rapporto $[\text{WLIP idrol}]/[\text{LDP attivo}]$, ≥ 1 per WLIP e ≥ 4 per tol I. Inoltre la preincubazione di WLIP idrol con le vescicole aveva provocato

un'inibizione maggiore dell'attività di tol I, suggerendo che l'interazione dei due LDP potesse avvenire anche a livello di membrana.

Questi nuovi dati dimostrano che la capacità di inserimento di WLIP non è ridotta dalla presenza della forma idrolizzata, né in soluzione né in membrana. La diminuzione dell'attività permeabilizzante è quindi riconducibile ad uno stadio successivo a quello del legame di WLIP con la membrana. L'azione di WLIP idrol potrebbe essere quella di ostacolare l'oligomerizzazione funzionale dei monomeri di WLIP, ad esempio intercalandosi tra di essi per la formazione di un poro misto inattivo.

La capacità di inserimento di tol I nella membrana è invece fortemente influenzata dalla presenza di WLIP idrol, sia quando esso è presente in membrana, sia quando si trova in soluzione. L'effetto inibitorio è più marcato nel secondo caso, indicazione che WLIP idrol è in grado di interagire con tol I in soluzione.

La forma idrolizzata di WLIP ha mostrato una ridotta capacità di inserimento nella membrana ma è in grado di interagire specificamente con tol I per la formazione di un aggregato inattivo. È in programma il ricorso a tecniche complementari, come per esempio la Surface Plasmon Resonance (SPR), per confermare questi risultati.

È importante ricordare che è già stata osservata un'interazione tra tol I e la forma naturale di WLIP, nella formazione di un precipitato bianco. Il preciso meccanismo che è alla base della formazione del precipitato è ancora ignoto. È ipotizzabile che ciò avvenga mediante incastro conformazionale tra i due LDP e forse l'unione è anche facilitata dalla presenza di cariche di segno opposto sulle due molecole (Lo Cantore, 2001). Infatti tol I, grazie alla presenza degli aminoacidi Lys e Dab (in posizione 17 e 18) presenta due cariche positive (Nutkins et al., 1991), mentre WLIP, per la presenza di un gruppo -COOH presenta una carica negativa (Mortishire-Smith et al., 1991).

Incubation time (@ 4°C)	mixture (tol I : WLIP)	[tol I + WLIP] (μM)	tol I E _o (%) ^b	WLIP E _o (%) ^b	mixture E _c (%) ^a	E _o (%) ^b	RC ^c
24 h	1 : 1	0.2 + 0.2	89	20	91	81	12
	1 : 1	0.2 + 0.2	89	20	91	73	19
72 h	1 : 2	0.2 + 0.4	89	47	94	79	16
	1 : 5	0.2 + 1.0	89	84	98	86	13

^a L'effetto atteso dovuto alla somma dell'attività dei singoli composti.

^b L'effetto osservato calcolato dal rilascio di calceina negli esperimenti.

^c Il coefficiente di riduzione usato per esprimere il grado di interazione tra le tossine nella miscela = 100 (E_c - E_o)/E_c

Tab. 3.5 Attività permeabilizzante della miscela di tol I e WLIP su liposomi di PC/SM (1/1 mol), dopo 24 o 72 ore di incubazione (Paletti et al., 2007).

È stato riportato (Paletti et al., 2007) inoltre che l'attività permeabilizzante su LUV di PC/SM (1/1 mol) è diminuita quando le due tossine sono incubate a diversi rapporti. Questi risultati sono mostrati in tabella 3.5.

Alcuni ricercatori hanno inoltre valutato la potenzialità di WLIP come inibitore della maculatura bruna di *Agaricus bisporus*, provocata principalmente dall'azione di tol I di *Pseudomonas tolaasii* (Soler-Rivas et al., 1999a). Essi hanno osservato effettivamente una diminuzione dei sintomi della malattia, quando WLIP era applicato sul fungo, prima dell'inoculazione della sospensione batterica di *P. tolaasii*. L'attuazione effettiva di queste scoperte è però complicata dall'attività patogena residua posseduta dallo stesso WLIP, responsabile insieme a tol I dello sviluppo dei sintomi della maculatura di *Agaricus bisporus* e di altre malattie su funghi coltivati. I nostri risultati acquisiscono quindi un'importanza aggiuntiva, poiché abbiamo individuato un analogo non attivo di WLIP che è però ancora in grado di inibire l'azione di tol I. Sarebbe quindi promettente approfondire lo studio di questa interazione, per poter utilizzare WLIP idrol come inibitore dei sintomi delle malattie prodotte da tol I e più in generale da *P. tolaasii*, il batterio che la produce.

Quando si parla di LDP è importante ricordare che le due classi di tossine rappresentate da peptine e micine mostrano al loro interno grandi similitudini, non solo strutturali, ma anche funzionali. Si presuppone dunque che quello che si osserva per queste coppie di LDP possa valere anche per altre. Queste osservazioni aprono la strada a nuovi tipi di applicazioni biotecnologiche; come per esempio il controllo dell'infezione degli stessi batteri produttori di LDP. *Pseudomonas syringae* ed altre specie di *Pseudomonas* sono patogeni di molte colture, anche di grande interesse agronomico. Sarebbe quindi interessante, partendo dagli analoghi risultati inattivi, preparare un formulato in grado di inibire l'attività patogena dei batteri, per esempio dispensando il preparato direttamente sulla superficie degli organismi vegetali da proteggere.

3.2. Struttura del poro

La dimensione ridotta dei LDP, non sufficiente ad attraversare completamente la membrana, suggerisce il possibile coinvolgimento dei lipidi del doppio strato nel processo di formazione del poro. Per questo abbiamo investigato più in dettaglio la struttura della lesione creata dai LDP. Le tossine che formano canali possono destabilizzare la membrana formando principalmente due tipi caratteristici di poro. Il poro “barrel stave” è un canale acquoso avente le pareti esclusivamente costituite da porzioni proteiche; il secondo, detto toroidale, ha le pareti composte in parte dal peptide e in parte dalle teste polari dei lipidi: i due foglietti lipidici (interno ed esterno) vengono messi in connessione tra di loro. Lo studio si è basato sulla determinazione della ridistribuzione tra i due strati del foglietto lipidico di un analogo fluorescente della fosfatidilcolina, il pyrenePC, aggiunto inizialmente solo sul foglietto esterno dei liposomi (Muller et al., 2000). In relazione alla sua concentrazione, il lipide può essere presente in membrana nella forma monomerica o dimerica, caratterizzate da due picchi di emissione differenti, a 395 nm e a 470 nm rispettivamente, ad una stessa frequenza di eccitazione di 344 nm. La formazione di un poro toroidale permette la ridistribuzione di pyPC, tramite diffusione laterale nel lume del poro, dal foglietto esterno verso quello interno, provocando la diluizione del lipide fluorescente. Si ha quindi l'aumento della forma monomerica rispetto a quella dimerica, misurabile come diminuzione del rapporto tra le intensità delle due forme, I_E/I_M , dove I_E e I_M sono le intensità dovute all'emissione del dimero eccitato (eccimero) e del monomero eccitato, rispettivamente.

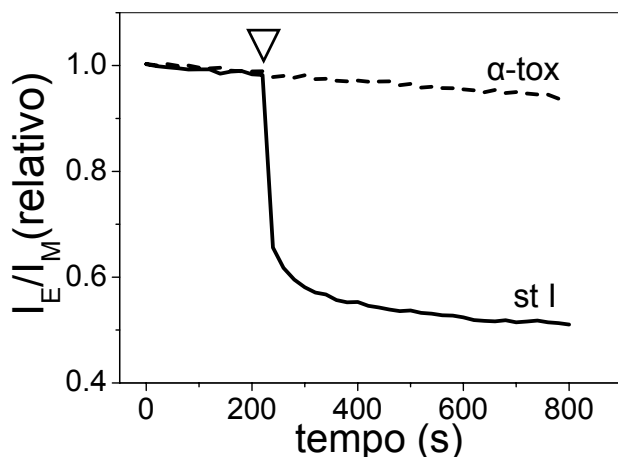


Fig. 3.16 Variazione del rapporto di intensità tra eccimero e monomero indotta dall'aggiunta di $0.6 \mu\text{M}$ di α -tossina (linea tratteggiata), che crea un poro di tipo 'barrel stave', e di $0.3 \mu\text{M}$ di sticcolisina I (linea nera), che forma un poro toroidale.

Il rapporto I_E/I_M rimane costante durante una cinetica di 20 minuti in assenza di tossina, indicando che la ridistribuzione spontanea del lipide fluorescente nei liposomi è trascurabile (dati non mostrati).

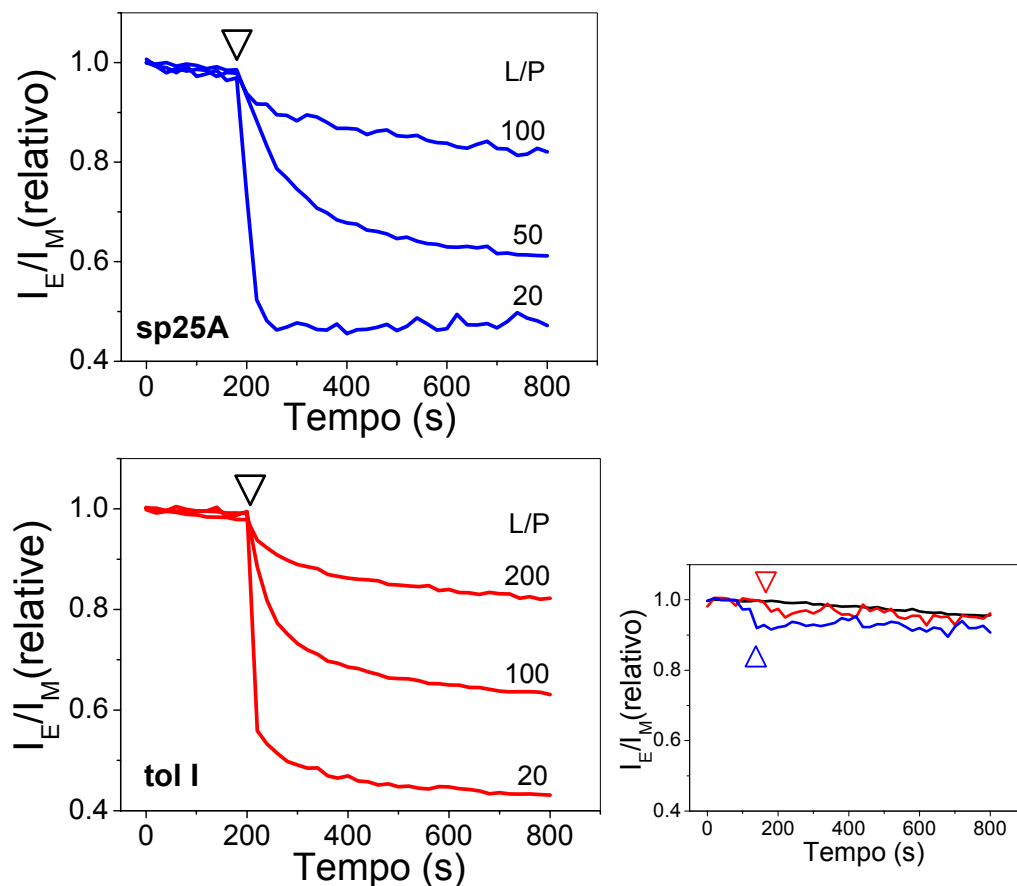


Fig. 3.17 Diminuzione del rapporto I_E/I_M dovuto all'aggiunzione di diverse concentrazioni di sp25A e di tol I ad una soluzione 20 μM di liposomi PC/SM (1/1 mol), in cui il lipide fluorescente pyPC è contenuto solo nel foglietto esterno. Nelle misure di controllo (a destra) sono aggiunti 0.5 μM di tol I (linea rossa) e di sp25A (linea blu) a 20 μM di LUV marcate simmetricamente. La linea nera rappresenta le vescicole senza l'aggiunzione di tossina. Le misure di fluorescenza sono state fatte ad una frequenza di eccitazione di 344 nm. $L/P = [\text{lipide}]/[\text{peptide}]$

In fig. 3.16 si osservano i due comportamenti estremi possibili presentati da tossine di controllo delle quali si conosce il tipo di interazione con la membrana. L' α -tossina di *S. aureus* non provoca una diminuzione significativa del rapporto I_E/I_M poiché essa forma un poro di natura puramente proteica, che non modifica la struttura lamellare della membrana e la separazione tra i foglietti componenti il doppio strato lipidico (linea tratteggiata) (Song et al., 1996). L'aggiunta di

sticolisina I induce invece un immediato decremento del rapporto poiché permette la redistribuzione del pyPC tra i due strati della membrana (linea nera), con la formazione di un poro toroidale (Alvarez et al., 2001).

I risultati hanno confermato i precedenti studi (Paletti, 2004) da noi condotti con il metodo descritto da Alvarez (Alvarez et al., 2001). Le peptine formano chiaramente un poro di tipo toroidale, provocando la diminuzione dell'intensità dell'eccimero rispetto a quella del monomero (fig. 3.17), quando sono aggiunte a diverse concentrazioni. La variazione osservata non può essere attribuita all'estrazione dai liposomi del pyPC da parte delle peptine, poiché la loro addizione a vescicole marcate simmetricamente non induce variazioni significative dello spettro di fluorescenza di pyPC, ossia il rapporto I_E/I_M rimane pressoché costante (fig. 3.17 a destra). I nonapeptidi, WLIP (fig. 3.18) ed SRE (dati non mostrati), indicativamente possono formare un poro toroidale alle basse concentrazioni, ma a quelle alte le tossine inducono anche aggregazione o micellizzazione delle vescicole, che non permettono questo tipo di indagine.

Inoltre risultati preliminari indicano la capacità della carica elettrica del lipide nella modulazione della selettività del canale di fpA (Coraiola et al., 2007). Questi stessi risultati ottenuti per SRE avevano suggerito la formazione di un poro toroidale da parte di questa tossina (Malev et al., 2002).

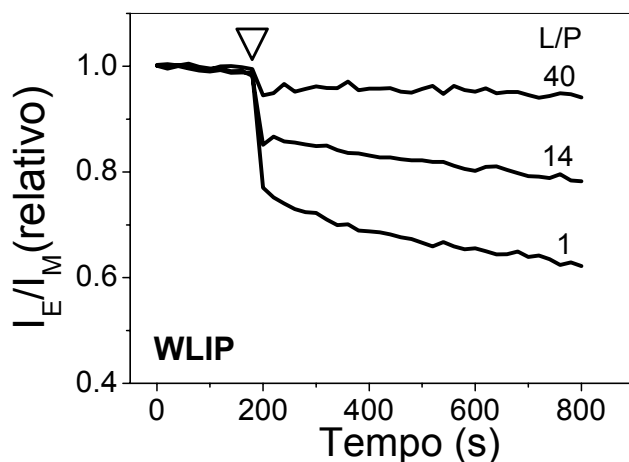


Fig. 3.18 Variazione del rapporto I_E/I_M dopo l'aggiunta di concentrazioni crescenti di WLIP ad una composizione PC/SM (1/1 mol) di liposomi (20 μ M). La concentrazione massima usata di WLIP provoca il 20-30% di rilascio di calceina su liposomi della stessa composizione. Quando la quantità di tossina è aumentata alle concentrazioni più attive si osserva un effetto micellizzante delle vescicole. $L/P = [\text{lipide}]/[\text{peptide}]$

3.3 Attività su nuovi sistemi modello preparati da organismi patogeni fungali

Allo scopo di validare i dati ottenuti con i liposomi e di realizzare sistemi modello sempre più vicini al bersaglio d'azione naturale, si è iniziato a mettere a punto protocolli di preparazione di vescicole partendo da organismi biologici. I LDP sono noti infatti per la loro funzione antimicrobica. Di particolare interesse è l'azione antifungale per le possibili applicazioni biotecnologiche.

3.3.1 Azione biologica su liposomi preparati da lipidi estratti da organismi fungali

Abbiamo preparato dei liposomi, utilizzando lipidi estratti da cinque diversi funghi patogeni. *Alternaria alternata* è patogeno del pomodoro (Brandwagt et al., 2000) e causa malattie necrotiche in diverse piante, tra cui la fragola, gli agrumi e la pera (Hatta et al., 2002). *Fusarium oxysporum* è comunemente trovato nel terreno, dove sopravvive e cresce della materia organica. Induce necrosi o afflosciamento vascolare in varie colture di importanza agronomica (Olivain et al., 2006). *Rhizoctonia solani* è patogeno della barbabietola da zucchero e specialmente delle patate. Agisce attaccando la parte basale delle piante (Balali et al., 2007; El Tarabily, 2004). *Trichoderma harzianum* è presente nel terreno ed ha un'azione antifungale, anche contro importanti fitopatogeni (Ait-Lahsen et al., 2001; Carsolio et al., 1994). *Botrytis cinerea* è responsabile della muffa grigia di centinaia di piante dicotiledoni, tra cui la vite (Choquer et al., 2007). L'attività permeabilizzante di diversi LDP è stata determinata valutando l'aumento del segnale di fluorescenza dovuto al rilascio di calceina incapsulata nei liposomi, ed è riportata come $1/C_{50}$ in tabella 3.6. Si osserva che siringomicina E, SRE (da *P. syringae*), mantiene circa la stessa attività sui diversi tipi di patogeno, e presenta solo un leggero aumento della capacità permeabilizzante sui liposomi di *A. alternata* e *F. oxysporum*. La cormicina, CM (da *P. corrugata*), l'altra micina saggiata, è tra tutte la meno attiva, a parte sulle vescicole preparate da lipidi di *F. oxysporum*, con cui presenta la maggior attività, paragonata a tutti i LDP analizzati. In generale però sono le peptine (siringopeptina 22A e 25A, SP22A e SP25A, da *P. syringae*) a mostrare la maggior attività se confrontate con i nonapeptidi, ed in particolare hanno la massima capacità permeabilizzante con i patogeni in cui le micine presentano la minor attività (*R. solani* e *T. harzianum*).

	$1/C_{50}$ (μM^{-1})			
	SRE	CM	SP22A	SP25A
<i>Alternaria alternata</i>	0.5	0.29	1	0.83
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.53	1.25	0.83	0.4
<i>Rhizoctonia solani</i>	0.38	0.16	1.43	1.25
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.37	0.2	1.67	1.25
* <i>Botrytis cinerea</i>	-	+		++

* + e - indicano l'attività maggiore e minore rispettivamente

Tab. 3.6 Attività dei LDP, espressa come $1/C_{50}$, su liposomi carichi di calceina ottenuti partendo da lipidi estratti da diversi patogeni fungali. C_{50} è la concentrazione di tossina necessaria per ottenere il 50% di rilascio di calceina.

È interessante notare che SRE ed sp22A hanno uno spettro d'azione diversificato. I dati sono ottenuti nel laboratorio di Fogliano dell'Università Federico II di Napoli. L'attività è stata saggiata depositando 10 μl delle tossine a differenti concentrazioni su piastre in cui erano stati disposti i conidi dei patogeni. L'attività antifungale è indicata dalla presenza di un alone di inibizione della crescita in corrispondenza all'applicazione dei LDP. I risultati sono riassunti in tabella 3.7, riportando il diametro dell'alone di inibizione della crescita in presenza di SRE ed sp22A. È facile notare che SRE mostra una maggior attività antifungale rispetto alla peptina, come già noto in letteratura (Dalla Serra et al., 2003a).

Diametro (mm)	<i>A. alternata</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>B. cinerea</i>
SRE	3.95	5.4	5.5	9.4	6.8
sp22A	2.3	3.9	1.2	4	2.8

Tab. 3.7 Attività antifungale dei LDP espressa come diametro dell'alone di inibizione della crescita in presenza di 0.5 mg/ml di SRE e sp22A.

In generale i nostri dati confermano i risultati pubblicati da Fogliano (Fogliano et al., 2002a), i più significativi dei quali sono stati riportati in tabella 3.8. È mostrata l'azione sinergica dei LDP con enzimi degradanti la parete cellulare sull'inibizione della germinazione di spore di tre tipi di funghi. Come già visto infatti le micine esprimono generalmente una maggior attività antifungale rispetto

alle peptine e ciò a causa dell'azione di setaccio molecolare espletata dalla parete cellulare, che non permette ai LDP più grandi di raggiungere il loro bersaglio d'azione. Nel caso in cui la parete cellulare viene, totalmente o in parte, eliminata le peptine riescono ad agire a livello della membrana cellulare e risultano maggiormente efficaci rispetto alle micine.

	$1/ED_{50} (\mu\text{g/ml})^{-1}$			
	SRE	SP25A	SRE + enzimi	SP25A + enzimi
<i>Fusarium oxysporum</i>	1.78	1.25	5.26	20
<i>Botrytis cinerea</i>	1.09	< 0.7	3.45	8.33
<i>Thricoderma atroviride</i> (<i>harzianum</i>)	2.63	< 0.7	8.33	20

Tab. 3.8 Azione dei LDP da soli e in presenza di enzimi degradanti la parete cellulare sull'inibizione delle spore di diversi organismi fungali (Fogliano et al., 2002a). ED_{50} : dose efficace di tossina per ottenere il 50% dell'attività.

L'attività dei LDP può quindi essere associata alla diversa composizione lipidica delle membrane dei patogeni. La determinazione della componente di membrana è stata effettuata tramite cromatografia su strato sottile (TLC), in collaborazione con il laboratorio del Prof. Fogliano dell'Università Federico II di Napoli. I dati ottenuti sono riassunti in tabella 3.9. Tra i fosfolipidi presenti nella membrana dei patogeni c'è una parte consistente di lipidi carichi negativamente: la fosfatidiserina (PS), il fosfatidilinositolo (PI) e l'acido fosfatidico (PA). È noto che la presenza di cariche negative tra i componenti di membrana favorisce l'interazione delle peptine (Menestrina et al., 2003). L'alta capacità permeabilizzante di queste ultime è probabilmente conseguenza della presenza consistente di lipidi carichi negativamente in tutte le estrazioni lipidiche utilizzate (> 46% sul totale di fosfolipidi considerati). Nei patogeni fungali sono presenti anche steroli (TLC non mostrata), su cui però non si è effettuata una caratterizzazione quantitativa. La loro presenza aumenta la capacità permeabilizzante delle micine, specialmente colesterolo (tipico delle membrane animali) ed ergosterolo (presente solitamente nelle membrane fungali) (Paletti, 2004; Scaloni et al., 2004; Menestrina et al., 2003). Ci si aspetta dunque che anche la percentuale di steroli all'interno della composizione lipidica dei patogeni abbia un ruolo importante sulle diverse attività osservate nelle micine.

	PC	PE	PS	PI	PA
<i>Alternaria alternata</i>	27%	27%	11.5%	19%	15.5%
<i>Fusarium oxysporum</i>	23%	27%	11.5%	34.5%	4%
<i>Rhizoctonia solani</i>	22.5%	26%	10%	19%	22.5%
<i>Trichoderma harzianum</i>	17.5%	29.5%	12%	23.5%	17.5%
<i>Botrytis cinerea</i>	23%	23%	11.5%	27%	15.5%

Tab. 3.9 Percentuale relativa ai fosfolipidi considerati, caratterizzanti le membrane dei funghi patogeni.

3.3.2 Azione su liposomi preparati dalla membrana isolata da *Saccharomyces cerevisiae*

In seguito abbiamo cercato di produrre un sistema modello ancora più simile alla situazione naturale. Abbiamo usato *Saccharomyces cerevisiae*, buon sistema modello fungale e di facile utilizzo, per mettere a punto un metodo di preparazione di liposomi partendo dalla membrana cellulare isolata dall'organismo. Una volta ottenuta la frazione di membrana abbiamo preparato i liposomi mescolandola con asolectina in un rapporto lipide/proteina di membrana pari a 20/1.

L'attività dei LDP sui nuovi liposomi, in cui è stato incapsulato un marker fluorescente simile alla calceina, ma meno polare, (la carbossifluoresceina), è riportata in tabella 3.10. L'attività di LDP su liposomi di solo lipide asolectina, contenenti il marker fluorescente carbossifluoresceina, è confrontabile però con quella ottenuta con i nuovi sistemi modello (fig. 3.19). Questo indica che, con questa composizione lipidica, la presenza di proteine di membrana del lievito non influenza la capacità permeabilizzante dei LDP, suggerendo che il loro bersaglio d'azione sono proprio i lipidi di membrana. Questo sarà un argomento interessante di approfondimento nella prospettiva di chiarire meglio il meccanismo d'azione di queste tossine.

LDP	$1/C_{50}$ (μM^{-1})
SRE	0.064
CM	0.45
Sp22A	5.26
Sp25A	2.38

Tab. 3.10 Attività permeabilizzante di due micine, SRE e CM, e di due peptine, sp22A e sp25A, su liposomi contenenti asolectina e la membrana cellulare isolata dal lievito in un rapporto lipide/proteina di membrana 20/1. C_{50} è la concentrazione di tossina necessaria per ottenere il 50% di attività.

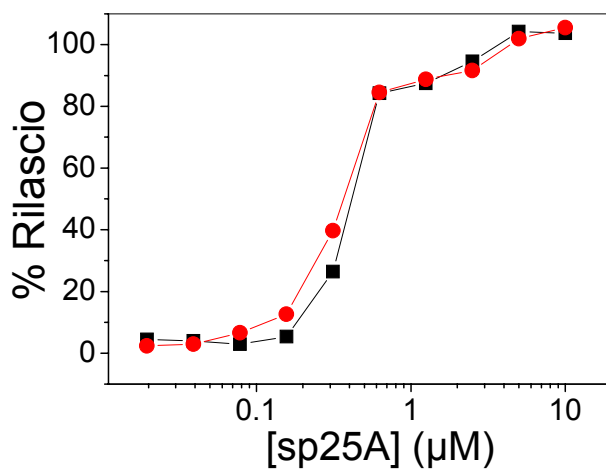


Fig. 3.19 Percentuale di rilascio di carbossifluoresceina indotto da concentrazioni crescenti di sp25A su LUV di sola asolectina (tondi rossi) e su LUV contenenti membrana di lievito ad un rapporto lipide/proteina di membrana pari a 20/1 (quadrati neri).

CAPITOLO IV

CONCLUSIONI

I LDP prodotti da ceppi di *Pseudomonas* agiscono a livello della membrana cellulare, dove creano lesioni che aumentano in modo non specifico la permeabilità a ioni e piccole molecole, alterando l'equilibrio interno della cellula fino a provocarne la morte. Le loro proprietà antimicrobiche, ed in particolare antifungali, li hanno resi affascinanti oggetti di studio per la prospettiva di utilizzo in applicazioni biotecnologiche. Alcune specie dei batteri produttori di LDP sono già utilizzate in agricoltura biologica per il controllo di muffe su frutta in post raccolta. L'azione aspecifica dei LDP su vari tipi di membrane, tra cui anche quella dei globuli rossi, mostra però una potenziale tossicità delle molecole non ancora completamente chiarita. Un utilizzo sicuro e a ridotto impatto ambientale dei LDP, come componenti di formulati per la lotta biologica e integrata o anche come alternativa e complemento agli attuali farmaci antimicotici, non può prescindere dal chiarimento molecolare del loro meccanismo d'azione.

Questo lavoro ha cercato di far luce su alcuni aspetti dell'attività di queste molecole mediante l'uso di membrane modello e biologiche, e di individuare buoni candidati tra i LDP per uno studio mirato volto agli utilizzi sopra indicati.

È stato determinato il ruolo delle caratteristiche strutturali dei LDP sull'attività. Si è analizzata la capacità permeabilizzante di liposomi e globuli rossi di alcuni analoghi di tol I, una peptina prodotta da *Pseudomonas tolaasii*, e di WLIP, un nonapeptide di *P. reactans*. Questi esperimenti hanno evidenziato l'importanza dell'anello lattonico e della lunghezza della catena acilica N-terminale. Inoltre anche singole sostituzioni di aminoacidi hanno mostrato una riduzione dell'attività. Si suppone che i cambiamenti di alcuni residui aminoacidici influiscano sulla capacità della molecola di ripiegarsi nella giusta conformazione, condizionando la sua tendenza ad interagire con la membrana. È noto infatti che alcune peptine subiscono cambiamenti conformazionali quando passano da un ambiente idrofilico ad uno più idrofobico, compreso l'inserimento nella membrana, aumentando la loro struttura ordinata ad alfa elica. Questo suggerisce che la riorganizzazione delle molecole in una forma più stabile è un elemento determinante per il loro legame al doppio strato.

I derivati di WLIP sono risultati particolarmente interessanti. La metilazione e l'acetilazione della molecola mantenevano la stessa attività della forma naturale sui liposomi, ma annullavano completamente quella emolitica. Questo risultato è molto promettente nella prospettiva di isolare LDP, o loro analoghi, efficaci contro i patogeni ma privi di attività tossica. Queste caratteristiche meritano di essere approfondite ulteriormente, poiché i derivati risultano buoni candidati per il biocontrollo di patogeni fungali. Lo sviluppo di un sistema batterico, che agendo direttamente sulla biosintesi dei LDP, riesca ad apportare le modifiche in grado di diminuire la tossicità dei LDP, ma non la loro potenzialità contro i patogeni, sarebbe inoltre una strada molto stimolante da seguire.

Anche la forma lineare di WLIP (WLIP idrol) ha presentato una rilevanza particolare, poiché ha perso completamente la capacità di permeabilizzare la membrana, ma è risultata in grado di inibire l'attività della sua forma naturale e di tol I. L'analisi dell'inserimento dei LDP in un monostrato lipidico ha mostrato che WLIP idrol è ancora in grado di ripartire nella membrana, seppur con efficienza ridotta. Questi esperimenti hanno dimostrato inoltre che WLIP idrol non influenza la capacità di legame di WLIP, mentre riduce l'inserimento di tol I nella membrana. La natura dell'interazione delle due coppie di tossine sembra quindi differente. L'azione inibente di WLIP idrol subentra dopo il legame di WLIP con la membrana, probabilmente ostacolando l'oligomerizzazione dei monomeri di WLIP, necessaria per la formazione di un poro attivo. Tol I e WLIP idrol possono interagire anche in soluzione, con la formazione di un aggregato che sottrae la tossina attiva, impedendone l'interazione con la membrana. Il comportamento di WLIP idrol risulta comunque degno di essere approfondito, soprattutto perché apre la strada ad un nuovo potenziale utilizzo dei LDP. Diverse specie di *Pseudomonas* sono patogene di molti generi di piante, anche di grande interesse agronomico. Sarebbe quindi interessante, partendo dagli analoghi risultati inattivi, creare un composto in grado di controllare l'attività patogena degli stessi batteri produttori di LDP.

La dimensione ridotta delle tossine, non sufficiente ad attraversare la membrana, ha suggerito il possibile coinvolgimento dei lipidi del doppio strato nel processo di formazione del poro. La natura dell'interazione dei LDP con la membrana è stata investigata determinando il movimento transmembrana di un lipide fluorescente incluso nello strato esterno dei liposomi. È stato dimostrato che le peptine formano un poro "toroidale", struttura in parte composta dai lipidi del doppio strato e in grado di mettere in connessione i due foglietti lipidici promuovendo il movimento transmembrana dei lipidi.

L'attività dei LDP è stata infine osservata su nuovi sistemi modello, preparati con l'intento di avvicinarsi sempre di più al bersaglio d'azione naturale, pur mantenendo la condizione privilegiata di un sistema omogeneo, di facile utilizzo e conservazione. Sono stati usati lipidi estratti da diversi patogeni fungali per preparare vescicole lipidiche. Le peptine hanno mostrato una maggior attività, confermando il ruolo antifungale rilevante di questa classe di molecole, quando viene a mancare l'ostacolo costituito dalla parete cellulare. Allo scopo di capire l'importanza delle proteine di membrana nell'attività dei LDP, è stato fatto inoltre un confronto tra liposomi di solo lipide e liposomi in cui è contenuta una piccola quantità di membrana isolata da *Saccharomyces cerevisiae* (rapporto lipide/proteina di membrana = 20/1). Questi risultati preliminari non hanno presentato significative differenze sulla sensibilità dei due sistemi modello, supportando l'importanza dei lipidi di membrana nell'interazione dei LDP.

Bibliografia

1. Ait-Lahsen,H., A.Soler, M.Rey, C.J.de La, E.Monte, and A.Llobell. 2001. An antifungal exo-alpha-1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5833-5839.
2. Alvarez,C., M.Dalla Serra, C.Potrich, I.Bernhart, M.Tejuca, D.Martinez, I.F.Pazos, M.E.Lanio, and G.Menestrina. 2001. Effects of lipid composition on membrane permeabilization by Sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys. J.* 80:2761-2774.
3. Balali,G.R., S.M.Neate, A.M.Kasalkheh, B.J.Stodart, D.L.Melanson, and E.S.Scott. 2007. Intraspecific variation of *Rhizoctonia solani* AG 3 isolates recovered from potato fields in Central Iran and South Australia. *Mycopathologia* 163:105-115.
4. Ballio,A., D.Barra, F.Bossa, J.E.DeVay, Grgurina I., N.S.Iacobellis, G.Marino, B.Pucci, M.Simmaco, and G.Surico. 1988. Multiple forms of siringomycin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33:493-496.
5. Ballio,A., F.Bossa, L.Camoni, D.Di Giorgio, M.C.Flamand, H.Marcite, G.Nitti, P.Pucci, and A.Scaloni. 1996. Structure of fuscopeptins, phytotoxic metabolites from *Pseudomonas fuscovaginae*. *FEBS Lett.* 381:213-216.
6. Ballio,A., F.Bossa, D.Di Giorgio, A.Di Nola, C.Manetti, M.Paci, A.Scaloni, and A.L.Segre. 1995. Solution conformation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* phytotoxic lipodepsipeptide syringopeptin 25A: two-dimensional NMR, distance geometry and molecular dynamics. *Eur. J. Biochem.* 234:747-758.
7. Baré,S., V.M.Coiro, A.Scaloni, A.DiNola, M.Paci, A.L.Segre, and A.Ballio. 1999. Conformations in solution of the fuscopeptins - Phytotoxic metabolites of *Pseudomonas fuscovaginae*. *Eur. J. Biochem.* 266:484-492.
8. Bassarello,C., S.Lazzaroni, G.Bifulco, P.Lo Cantore, N.S.Iacobellis, R.Riccio, L.Gomez-Paloma, and A.Evidente. 2004. Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *J. Nat. Prod.* 67:811-816.

9. Bender, C.L., F. Alarcon Chaidez, and D.C. Gross. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:266-292.
10. Brandwagt, B.F., L.A. Mesbah, F.L. Takken, P.L. Laurent, T.J. Kneppers, J. Hille, and H.J. Nijkamp. 2000. A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:4961-4966.
11. Brodey, C.L., P.B. Rainey, M. Tester, and K. Johnstone. 1991. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4:407-411.
12. Bull, C.T., M.L. Wadsworth, K.N. Sorensen, J.Y. Takemoto, R.K. Austin, and J.L. Smilanick. 1998. Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. *Biol. Control* 12:89-95.
13. Carpaneto, A., M. Dalla Serra, G. Menestrina, V. Fogliano, and F. Gambale. 2002. The phytotoxic lipodepsipeptide syringopeptin 25A from *Pseudomonas syringae* pv *syringae* forms ion channels in sugar beet vacuoles. *J. Membr. Biol.* 188:237-248.
14. Carsolio, C., A. Gutierrez, B. Jimenez, M. Van Montagu, and A. Herrera-Estrella. 1994. Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:10903-10907.
15. Chen SH and Rodriguez M. 2004. Antifungal lipopeptides: a tale of pseudomycin prodrugs and analogues. *Drugs of the future* 28:441-463.
16. Chen, S.H., X. Sun, R. Boyer, J. Paschal, D. Zeckner, W. Current, M. Zweifel, and M. Rodriguez. 2000. Syntheses and biological evaluation of novel pseudomycin side-chain analogues. Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10:2107-2110.
17. Choquer, M., E. Fournier, C. Kunz, C. Levis, J.M. Pradier, A. Simon, and M. Viaud. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 277:1-10.
18. Coraiola, M., P. Lo Cantore, S. Lazzaroni, A. Evidente, N.S. Iacobellis, and M. Dalla Serra. 2006. Tolaasin I and WLIP, Lipodepsipeptides from *Pseudomonas tolaasii* and *P. "reactans"*, permeabilize model membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1758:1713-1722.

19. Coraiola, M., Paletti, R., Fiore, A., Fogliano, V., and Dalla Serra, M. Structure of the fuscopeptin pore on lipid membranes. *Eur. Biophys. J.* 36[Suppl. 1], O367. 2007. Ref Type: Abstract
20. Dalla Serra, M., G.Faggiuoli, P.Nordera, I.Bernhart, C.Della Volpe, D.Di Giorgio, A.Ballio, and G.Menestrina. 1999. The interaction of lipodepsipeptide toxins from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with biological and model membranes: a comparison of syringotoxin, syringomycin and syringopeptins. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:391-400.
21. Dalla Serra, M., G.Menestrina, A.Carpaneto, F.Gambale, V.Fogliano, and A.Ballio. 2003a. Molecular mechanism of action of syringopeptins, antifungal peptides from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. In Pore-forming peptides and protein toxins. G.Menestrina, editor. Taylor & Francis Group, London, UK. 272-95.
22. Dalla Serra, M., G.Menestrina, M.Coraiola, and I.Grgurina. 2003b. Interaction of syringomycin E structural analogues with biological and model membranes. In *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Biology and Genetic. S.N.Iacobellis, editor. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (NL). 207-15.
23. De Lucca, A.J., T.J.Jacks, J.Y.Takemoto, B.Vinjad, J.Peter, E.Navarro, and T.J.Walsh. 1999. Fungal lethality, binding, and cytotoxicity of syringomycin-E. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:371-373.
24. El Tarabily, K.A. 2004. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 96:69-75.
25. Emanuele, M.C., A.Scaloni, P.Lavermicocca, N.S.Iacobellis, L.Camoni, D.DiGiorgio, P.Pucci, M.Paci, A.Segre, and A.Ballio. 1998. Corpeptins, new bioactive lipodepsipeptides from cultures of *Pseudomonas corrugata*. *FEBS Lett.* 433:317-320.
26. Eren, E. and J.M.Arguello. 2004. *Arabidopsis* HMA2, a divalent heavy metal-transporting P(1B)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiol.* 136:3712-3723.
27. Fogliano, V., A.Ballio, M.Gallo, S.Woo, F.Scala, and M.Lorito. 2002a. *Pseudomonas* lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15:323-333.

28. From, C., V. Hormazabal, S.P. Hardy, and P.E. Granum. 2007. Cytotoxicity in *Bacillus mojavensis* is abolished following loss of surfactin synthesis: implications for assessment of toxicity and food poisoning potential. *Int. J. Food Microbiol.* 117:43-49.
29. Grgurina I. 2002. Toxicity of Syringomycins and its Pathological Significance. In *Advances in Microbial Toxin Research and its Biotechnological Exploitation*. Rajeev K. Upadhyay, editor. Kluwer Academic, New York. 105-40.
30. Griffiths, R.G., J. Dancer, E. O'Neil, and J.L. Harwood. 2003. Lipid composition of *Botrytis cinerea* and inhibition of its radiolabelling by the fungicide iprodione. *New Phytol.* 160:199-207.
31. Guenzi, E., G. Galli, I. Grgurina, D.C. Gross, and G. Grandi. 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J. Biol. Chem.* 273:32857-32863.
32. Hatta, R., K. Ito, Y. Hosaki, T. Tanaka, A. Tanaka, M. Yamamoto, K. Akimitsu, and T. Tsuge. 2002. A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics* 161:59-70.
33. Hutchison, M.L. and K. Johnstone. 1993. Evidence for the involvement of the surface active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of the brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42:373-384.
34. Iacobellis, N. S. and Lo Cantore, P. Bacterial diseases of cultivated mushrooms in southern Italy. Proceedings of X Congress of Mediterranean Phytopathological Union, 33-37. 1997. Ref Type: Conference Proceeding
35. Iacobellis, N.S. and P. Lo Cantore. 1998. Recenti acquisizioni sul determinismo della batteriosi del carboncello (*Pleurotus eryngii*). *Agricoltura Ricerca* 176:51-54.
36. Jourdan, F., S. Lazzaroni, B.L. Mendez, P. Lo Cantore, M. de Julio, P. Amodeo, N.S. Iacobellis, A. Evidente, and A. Motta. 2003. A left-handed alpha-helix containing both L- and D-amino acids: the solution structure of the antimicrobial lipodepsipeptide tolaasin. *Proteins* 52:534-543.

37. Kayalar,C. and N.Düzgünes. 1986. Membrane action of colicin E1: detection of the release of carboxyfluorescein and calcein from liposomes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 860:51-56.
38. Kitten,T., T.G.Kinscherf, J.L.McEvoy, and D.K.Willis. 1998. A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 28:917-929.
39. Laycock,M.V., P.D.Hildebrand, P.Thibault, J.A.Walter, and J.L.C.Wright. 1991. Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Agric. Food Chem.* 39:483-489.
40. Lo Cantore, P. Aspetti patogenetici, fisiologici e molecolari di *Pseudomonas tolaasii* e *P. reactans*. 2001. Università degli Studi della Basilicata, Potenza. Ref Type: Thesis/Dissertation
41. MagetDana,R. 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1462:109-140.
42. Malev,V.V., L.V.Schagina, P.A.Gurnev, J.Y.Takemoto, E.M.Nestorovich, and S.M.Bezrukov. 2002. Syringomycin E Channel: A Lipidic Pore Stabilized by Lipopeptide? *Biophys. J.* 82:1985-1994.
43. Menestrina,G., M.Coraiola, V.Fogliano, A.Fiore, I.Grgurina, A.Carpaneto, F.Gambale, and M.Dalla Serra. 2003. Antimicrobial lipodepsipeptides from *Pseudomonas* spp: a comparison of their activity on model membranes. *In Pseudomonas syringae and Related Pathogens. Biology and Genetic.* S.N.Iacobellis, editor. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (NL). 185-98.
44. Mootz,H.D., D.Schwarzer, and M.A.Marahiel. 2002. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* 3:490-504.
45. Mortishire-Smith,R.J., J.C.Nutkins, L.C.Packman, C.L.Brodey, P.B.Rainey, K.Johnstone, and D.H.Williams. 1991. Determination of the structure of an extracellular peptide produced by the mushroom saprophytic *Pseudomonas reactans*. *Tetrahedron* 47:3645-3654.

46. Muller,P., S.Schiller, T.Wieprecht, M.Dathe, and A.Herrmann. 2000. Continuous measurement of rapid transbilayer movement of a pyrene-labeled phospholipid analogue. *Chem. Phys. Lipids* 106:89-99.
47. Nordera,P., M.Dalla Serra, and G.Menestrina. 1997. The adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A to phospholipid monolayers is controlled by pH and surface potential. *Biophys. J.* 73:1468-1478.
48. Nutkins,J.C., R.J.Mortishire-Smith, L.C.Packman, C.L.Brodey, P.B.Rainey, K.Johnstone, and D.H.Williams. 1991. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J. Am. Chem. Soc.* 113:2621-2627.
49. Olivain,C., C.Humbert, J.Nahalkova, J.Fatehi, F.L'Haridon, and C.Alabouvette. 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1523-1531.
50. Ongjoco,R., K.Szkutnicka, and V.P.Cirillo. 1987. Glucose transport in vesicles reconstituted from *Saccharomyces cerevisiae* membranes and liposomes. *J Bacteriol.* 169:2926-2931.
51. Paletti, R. Struttura e funzione di lipodepsipeptidi di *Pseudomonas syringae*, biomolecole batteriche con attività fitotossica ed antifungale. Uno studio su membrane modello e biologiche. 2004. Università di Padova, Fac. Scienze MM.FF.NN. Ref Type: Thesis/Dissertation
52. Paletti,R., M.Coraiola, A.Cimmino, P.Lo Cantore, A.Evidente, N.S.Iacobellis, and M.Dalla Serra. 2007. WLIP and Analogues of Tolaasin I, Lipodepsipeptides from *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas tolaasii*. A Comparison of Their Activity on Natural and Model Membranes. In *Pseudomonas Syringae* Pathovars and Related Pathogens-Identification, Epidemiology and Genomics. M.Fatmi, editor. 183-9.
53. Parente,R.A., S.Nir, and F.C.Szoka, Jr. 1990. Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry* 29:8720-8728.
54. Peng, J. T. Resistance to disease in *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. 1986. University of Leeds, Department of Plant Science. Ref Type: Thesis/Dissertation

55. Praus,P. and M.Turicová. 2007. A Physico-Chemical Study of the Cationic Surfactants Adsorption on Montmorillonite. *J. Braz. Chem. Soc.* 18:378-383.
56. Rainey,P.B., C.L.Brodey, and K.Johnstone. 1991. Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39:57-70.
57. Rainey,P.B., C.L.Brodey, and K.Johnstone. 1992. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom. *Adv. Plant Pathol.* 8:95-117.
58. Rapaport,D., R.Peled, S.Nir, and Y.Shai. 1996. Reversible surface aggregation in pore formation by pardaxin. *Biophys. J.* 70:2502-2512.
59. Scalon,A., M.Dalla Serra, P.Amodeo, L.Mannina, R.M.Vitale, A.L.Segre, O.Cruciani, F.Lodovichetti, M.L.Greco, A.Fiore, M.Gallo, C.D'Ambrosio, M.Coraiola, G.Menestrina, A.Graniti, and V.Fogliano. 2004. Structure, conformation and biological activity of a novel lipodepsipeptide from *Pseudomonas corrugata*: Cormycin A. *Biochem. J.* 384:25-36.
60. Scholz-Schroeder,B.K., J.D.Soule, and D.C.Gross. 2003. The sypA, sypS, and sypC synthetase genes encode twenty-two modules involved in the nonribosomal peptide synthesis of syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D. *Mol Plant Microbe Interact.* 16:271-280.
61. Scott-Craig,J.S., D.G.Panaccione, J.A.Pocard, and J.D.Walton. 1992. The cyclic peptide synthetase catalyzing HC-toxin production in the filamentous fungus *Cochliobolus carbonum* is encoded by a 15.7-kilobase open reading frame. *J Biol Chem* 267:26044-26049.
62. Segre,A., R.C.Bachmann, A.Ballio, F.Bossa, I.Grgurina, N.S.Iacobellis, G.Marino, P.Pucci, M.Simmaco, and J.Y.Takemoto. 1989. The structure of syringomycins A1, E and G. *FEBS Lett.* 255:27-31.
63. Soler-Rivas,C., N.Arpin, J.M.Olivier, and H.J.Wichers. 1999a. WLIP, a lipodepsipeptide of *Pseudomonas 'reactans'*, as inhibitor of the symptoms of the brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Microbiol.* 86:635-641.
64. Soler-Rivas,C., S.Jolivet, N.Arpin, J.M.Olivier, and H.J.Wichers. 1999b. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:591-614.

65. Song,L., M.R.Hobaugh, C.Shustak, S.Cheley, H.Bayley, and J.E.Gouaux. 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274:1859-1866.
66. Sorensen,K.N., K.H.Kim, and J.Y.Takemoto. 1996. In vitro antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipodepsinonapeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2710-2713.
67. Takemoto,J.Y., J.G.Brand, Y.A.Kaulin, V.V.Malev, L.V.Schagina, and K.Blasko. 2003. Lipodepsipeptide pore formers from plant bacterium *Pseudomonas syringae*. In Pore-forming peptides and protein toxins. G.Menestrina, editor. Taylor & Francis Group, London, UK. 260-71.
68. Tejuca,M., M.Dalla Serra, M.Ferreras, M.E.Lanio, and G.Menestrina. 1996. The mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 35:14947-14957.
69. Van den Broek,P.J., A.E.van Gompel, M.A.Luttik, J.T.Pronk, and C.C.Van Leeuwen. 1997. Mechanism of glucose and maltose transport in plasma-membrane vesicles from the yeast *Candida utilis*. *Biochem. J.* 321 (Pt 2):487-495.
70. Van Leeuwen,C.C., E.Postma, P.J.Van den Broek, and J.Van Steveninck. 1991. Proton-motive force-driven D-galactose transport in plasma membrane vesicles from the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *J Biol Chem* 266:12146-12151.
71. Van Mau,N., A.V.Kajava, C.Bonfils, J.C.Martinou, and M.C.Harricane. 2005. Interactions of Bax and tBid with lipid monolayers. *J. Membr. Biol.* 207:1-9.
72. Wang,N., S.E.Lu, J.L.Wang, Z.J.Chen, and D.C.Gross. 2006. The expression of genes encoding lipodepsipeptide phytotoxins by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is coordinated in response to plant signal molecules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:257-269.
73. Weber,G., K.Schorgendorfer, E.Schneider-Scherzer, and E.Leitner. 1994. The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr. Genet.* 26:120-125.
74. Wells,J.M., G.M.Sapers, W.F.Fett, J.E.Butterfield, J.B.Jones, H.Bouzar, and F.C.Miller. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushrooms *Agaricus*

bisporus caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. "reactans"*, and *P. "gingeri"*. *Phytopathology* 86:1098-1104.

75. Wong, W.C. and T.F. Preece. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *J. Appl. Bacteriol.* 47:401-407.

76. Wu, R.P., D.S. Youngblood, J.N. Hassinger, C.E. Lovejoy, M.H. Nelson, P.L. Iversen, and H.M. Moulton. 2007. Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity. *Nucleic Acids Res.* 35:5182-5191.

77. Zhang, J.H., N.B. Quigley, and D.C. Gross. 1995. Analysis of the *syrB* and *syrC* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thiotemplate mechanism. *J. Bacteriol.* 177:4009-4020.

78. Zhang, J.H., N.B. Quigley, and D.C. Gross. 1997. Analysis of the *syrP* gene, which regulates syringomycin synthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2771-2778.

RINGRAZIAMENTI



GRAZIE al Prof. Evidente, al Prof. Iacobellis, e ai loro fidati collaboratori Alessio Cimmino e Pietro Lo Cantore.

GRAZIE al Prof. Fogliano, ad Alberto Fiore e a Maria.

GRAZIE al Prof. Bubacco e al Prof. Beltramini. Grazie per i vostri suggerimenti e per avermi stimolata a fare sempre di più.

GRAZIE a Mauro. Grazie per la tua passione per la scienza e per la tua onestà.

GRAZIE ai colleghi di tutti i giorni che hanno reso questi anni veramente piacevoli. Grazie Manuela per avermi insegnato tante cose, ma soprattutto per avermi donato una bella amicizia. Grazie Rossella e Arianna, siete state delle fantastiche compagne di ufficio. Grazie Gabriella per i tuoi consigli veramente professionali. Grazie Cristina, Mattia e Michele per le rigeneranti pause caffè (che ultimamente si sono tramutate in pause the).

GRAZIE alla mia famiglia. Grazie per avermi sempre sostenuta e incoraggiata.

GRAZIE a Diego. Grazie per avermi sopportata e viziata come solo tu sai fare.

GRAZIE a Dio. Per avermi sempre dato molto più del necessario.