

Magnani Chiara

Relatore: Berti Debora (debora.berti@unfi.it)

Correlatore: Montis Costanza (montis@csgi.unifi.it)

Comprensione delle proprietà antibatteriche di agenti terapeutici nanostrutturati tramite interazione con modelli di membrane Gram-negative

Nell'ambito del progetto DNA TRAP è stato messo a punto un antibiotico di nuova generazione finalizzato ad arrestare le infezioni dovute a batteri Gram-negativi che prevede l'azione sinergica di un componente aspecifico, il CM2, e di un componente specifico, un Transcription Factor Decoy (TFD). Il CM2 è un bolanfifilo cationico a 12 atomi di carbonio che in acqua forma aggregati di 177 nm di diametro idrodinamico. Il target di CM2 è la membrana batterica (doppio strato fosfolipidico, con carica netta negativa), in aggiunta CM2 ha funzione di carrier per il TFD, un aptamero (filamento di DNA), che blocca la sintesi di RNA polimerasi del batterio. CM2 e TFD si organizzano in complessi CM2-TFD (LNPs), che costituiscono la forma finale dell'antibiotico.

In questo progetto di tesi è stato studiato il meccanismo d'azione dell'antibiotico CM2-TFD in modo da progettare eventuali modifiche della formulazione che ne migliorino l'efficienza. A tale scopo sono stati scelti modelli semplificati di membrane batteriche, quali liposomi e GUV (Giant Unilamellar Vesicles), ed è stata monitorata l'interazione con l'antibiotico per individuare gli elementi chiave che ne favoriscono l'azione, al variare della composizione del bistrato modello: in particolare, oltre al fosfolipide zwitterionico POPC sono stati usati fosfolipidi anionici, cardiolipina e fosfatidilglicerolo, e i lipopolisaccaridi, elementi distintivi delle membrane di batteri Gram-negativi.

Negli esperimenti con i liposomi, con l'ausilio di sonde fluorescenti, è stata analizzata l'interazione antibiotico-bistrato lipidico per valutarne l'effetto sui complessi CM2-TFD e sulle membrane fosfolipidiche, mettendo in luce la diversa influenza di lipidi zwitterionici e anionici.

Utilizzando GUV come sistemi modello, studiati tramite microscopia confocale a scansione laser, è stata osservata l'influenza dei lipopolisaccaridi (LPS) nell'interazione con le LNPs. Inoltre le tecniche microfluidiche hanno permesso il monitoraggio dell'interazione LNPs-membrane modello a tempi brevi su singolo oggetto. Infine analisi FCS all'interno di GUV contenenti o meno LPS hanno permesso di verificare la penetrazione del TFD libero o parzialmente complessato all'interno del pool acquoso delle vescicole.

Per valutare l'affidabilità di GUV e liposomi come modelli di membrana batterica, dei campioni di batteri Gram-negativi modello, *E. coli*, sono stati incubati con LNPs e analizzati con le stesse tecniche applicate sulle GUV, ottenendo risultati consistenti.

In conclusione i lipidi anionici e in particolare i lipopolisaccaridi sono gli elementi essenziali che promuovono l'azione dell'antibiotico, inoltre liposomi e GUV risultano essere validi modelli per prevedere il comportamento delle membrane batteriche.