



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea:
Scienze Biologiche

L'INTRIGANTE RUOLO DEI RAMNOLIPIDI SUL RIMODELLAMENTO DELLA MEMBRANA PLASMATICA: DALLE ZATTERE LIPIDICHE AL GERMOGLIAMENTO DELLA MEMBRANA

THE INTRIGUING ROLE OF RHAMNOLIPIDS ON PLASMA MEMBRANE REMODELLING: FROM LIPID RAFTS TO MEMBRANE BUDDING

Tesi di laurea di:
Rossella Pia Marano

Docente referente:
Paolo Mariani

Sessione: Straordinaria, Febbraio 2022

Anno Accademico: 2020-2021



INDICE

I. RIASSUNTO ESTESO

II. INTRODUZIONE

- Cosa sono le GUV
- Ramnolipidi (RL) e biorisanamento

III. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

IV. EFFETTI DELL' INSERZIONE DI RL IN DUE TIPI DI GUV: POPC E DOPC

- Visione al microscopio a fluorescenza
- Analisi dei dati

V. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI



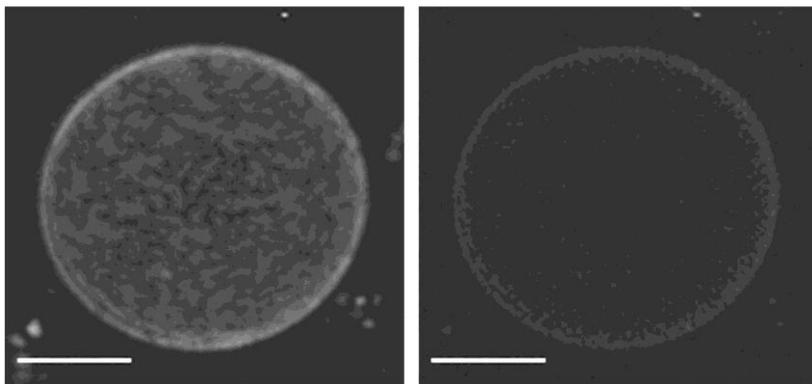
RIASSUNTO ESTESO

I ramnolipidi (RL) comprendono una classe di glicolipidi prodotti da *Pseudomonas aeruginosa* in condizioni appropriate in terreno di coltura. Agiscono come biosurfattanti, essendo composti da una testa idrofila di una (mono-RL) o due (di-RL) frazioni ramnosio accoppiate a catene idrossialifatiche. È ben accettato che i RL presentano una bassa attività biolitica rispetto ad altri tensioattivi sintetici. Tuttavia, i loro meccanismi di azione nei sistemi biologici non sono ancora ben definiti. L'interazione dei RL con i doppi strati lipidici è qui studiata per affrontare il loro impatto sulla membrana plasmatica a livello molecolare. Il nostro approccio sperimentale si è basato su un'analisi approfondita dei dati di microscopia ottica da vescicole unilamellari giganti (GUV) disperse in soluzioni acquose contenenti fino a 0,5mM di RL disponibili in commercio (una miscela di mono-RL, 33-37% in moli e di-RL, 63-67% in moli, cmc di 0:068 +/- 0:005mM). Le GUV erano costituite: una da un singolo POPC lipidico e l'altra da un sistema ternario contenente DOPC, sfingomieline e colesterolo, che mimano le piattaforme della zattera lipidica. I nostri risultati dimostrano che i RL hanno una bassa partizione nel doppio strato lipidico rispetto alle molecole totali in soluzione. Supponiamo che i RL si inseriscano nel foglietto esterno con bassa propensione a flip-flop. Nel caso di GUV POPC, l'inserimento di molecole RL nel foglietto esterno altera i cambiamenti nella curvatura spontanea della membrana col tempo di incubazione. Quindi, si formano piccoli germogli che rimangono collegati alla membrana originale. Non sono stati rilevati cambiamenti nella permeabilità della membrana. Un notevole risultato si riferisce all'inserimento di RL in membrane contenenti liquido ordinato (Lo) - liquido disordinato (Ld) in coesistenza di fasi. È stato osservato che la velocità di interazione è maggiore per la fase Ld rispetto alla fase Lo ($0:12 * 10^{-6} s^{-1}$ e $0:023 * 10^{-6} s^{-1}$ per Ld e Lo, rispettivamente, ad una concentrazione RL di 0,5mM). Di conseguenza, l'inserimento preferenziale di RL in fase Ld può anche alterare la curvatura spontanea della membrana che, accoppiata alla variazione della tensione di linea associata al confine dei domini, ha condotto alla protrusione del dominio Lo. Anche se è stato osservato su un sistema modello, tale rimodellamento della membrana potrebbe correlare a processi endocitici attivati nelle membrane cellulari, indipendentemente dalla partecipazione di proteine specifiche. Inoltre, i cambiamenti imposti dai RL nelle zattere lipidiche possono influenzare l'associazione delle proteine chiave arruolato nella segnalazione cellulare, che può perturbare l'omeostasi cellulare.



GIANT UNILAMELLAR VESICLES

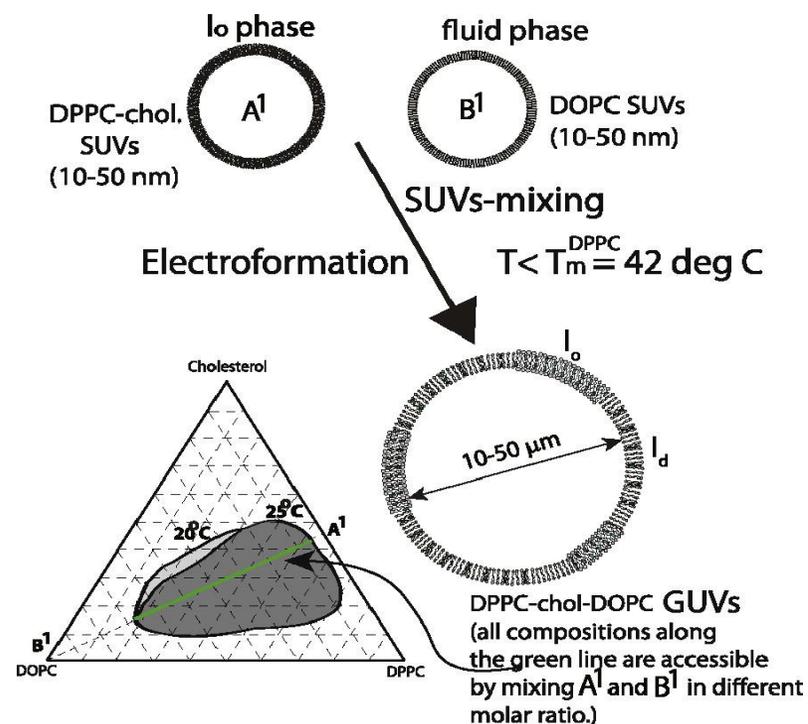
- Sono sistemi per lo studio delle membrane biologiche
- Si producono in laboratorio per elettroformazione:
 1. Depositare i liposomi su una superficie conduttiva
 2. Applicazione di una tensione elettrica



Coesistenza Gel- L_d per campione binario 18:0-SM/DOPC a 22°C. Composizione 0,50/0,50, illuminazione a due fotoni a 780nm, LR-DPPE (a sinistra) e naftopirene (a destra). Ogni etichetta a 0,05% in moli, barre di scala 10 μ m.

«GUV preparation and imaging: Minimizing artifacts»

Autori: Nelson F.Morales-Pennington, JingWu Elaine R.Farkas, Shih LinGoh, Tatyana M.Konyakhina, Judy Y.Zheng, Watt W.Webb, Gerald W.Feigenson



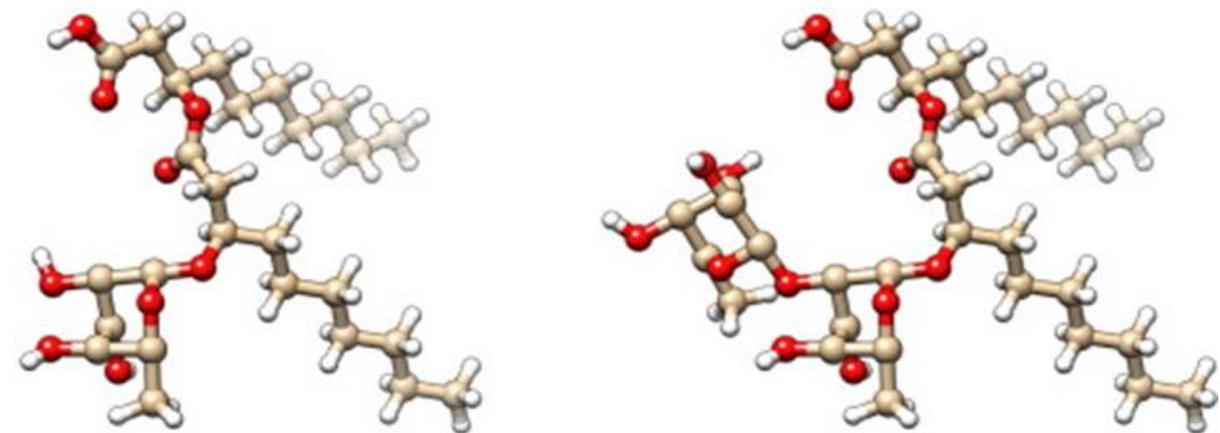
«Preparing giant unilamellar vesicles (GUVs) of complex lipid mixtures on demand: Mixing small unilamellar vesicles of compositionally heterogeneous mixtures»

Autori: Tripta Bhatia, Peter Husen, Jonathan Brewer, Luis A. Bagatolli, Per L. Hansen, John H. Ipsen, Ole G. Mouritsen



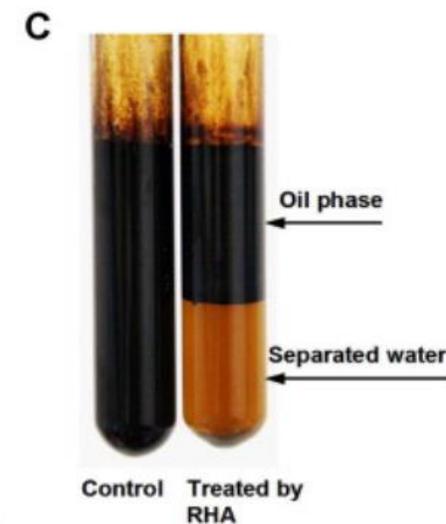
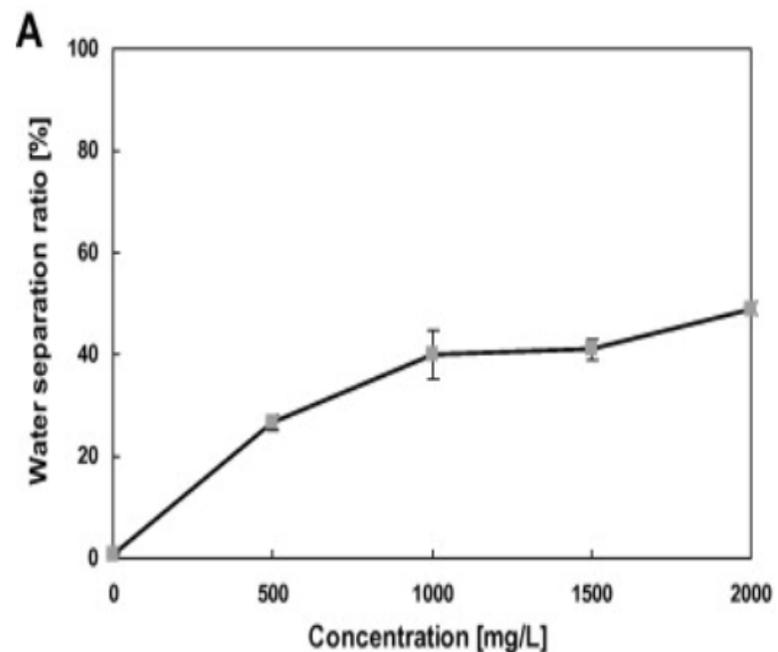
RAMNOLIPIDI ED EFFETTI SULL' AMBIENTE

1. Sono prodotti naturalmente da un batterio: *Pseudomonas aeruginosa*
2. Agiscono come biosurfattanti
3. Costituiti da una testa idrofila di una (mono-RL) o due (di-RL) porzioni ramnosio e una o due code di acidi β -idrossidecanoici



Rappresentazioni palla-and-stick di un mono-RL (RL-C10-C10, a sinistra) e un di-RL (RL-RL-C10-C10, a destra)

4. Offrono un contributo importante nel biorisanamento



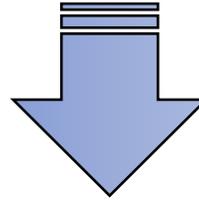
Effetto della concentrazione di ramnolipidi (A), sull'efficienza di disidratazione dell'emulsione di petrolio greggio di scarto e la foto del petrolio greggio di scarto di controllo (a sinistra) e trattato (a destra) (C)

Xuwei Long, Guoliang Zhang, Chong Shen, Guansong Sun, Ruixu Wang, Lujiang Yin, Qin Meng
«Application of rhamnolipid as a novel biodemulsifier for destabilizing waste crude oil»



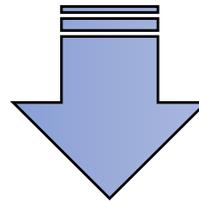
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- RL da *Pseudomonas Aeruginosa* (polvere, purezza 90%) è composto da mono-ramnolipidi (33-37% mol) e di-ramnolipidi (63-67% mol). RL sarà disperso in soluzione di glucosio.



- PREPARAZIONE GUV:

- 1) 20 μ L di 1.0g/L di lipidi totali in soluzione cloroformica sono stati spalmati sulle superfici di due vetrini conduttivi rivestiti con ossido di indio-stagno.
- 2) I vetrini sono stati posizionati con i lati conduttivi uno di fronte all'altro e separati da un telaio in teflon di 2mm di spessore.
- 3) La camera è stata riempita con una soluzione di saccarosio 0,2M fino a un volume di 1,0mL.
- 4) Alle lastre di vetro è stata applicata una tensione alternata di 2V con una frequenza di 10Hz per 2h.
- 5) L'elettroformazione delle GUV composte da DOPC:SM:CHOL è stata condotta a 55 °C. Sono state lasciate a 4°C durante la notte e osservate il giorno successivo.

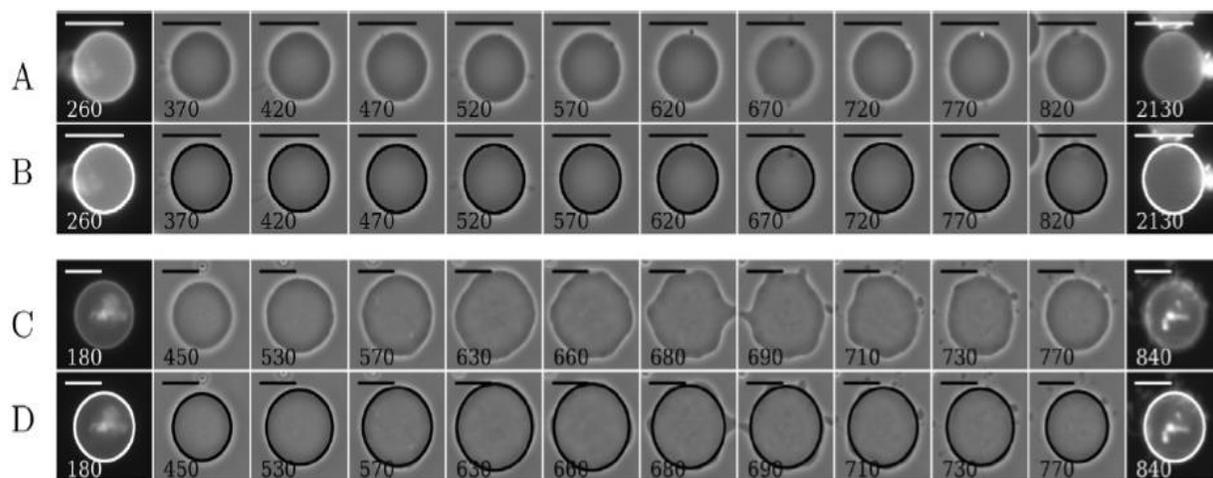
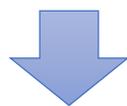


- 100 μ L di GUV elettroformate sono state miscelate con 600 μ L di una soluzione di glucosio 0,2M contenente RL.

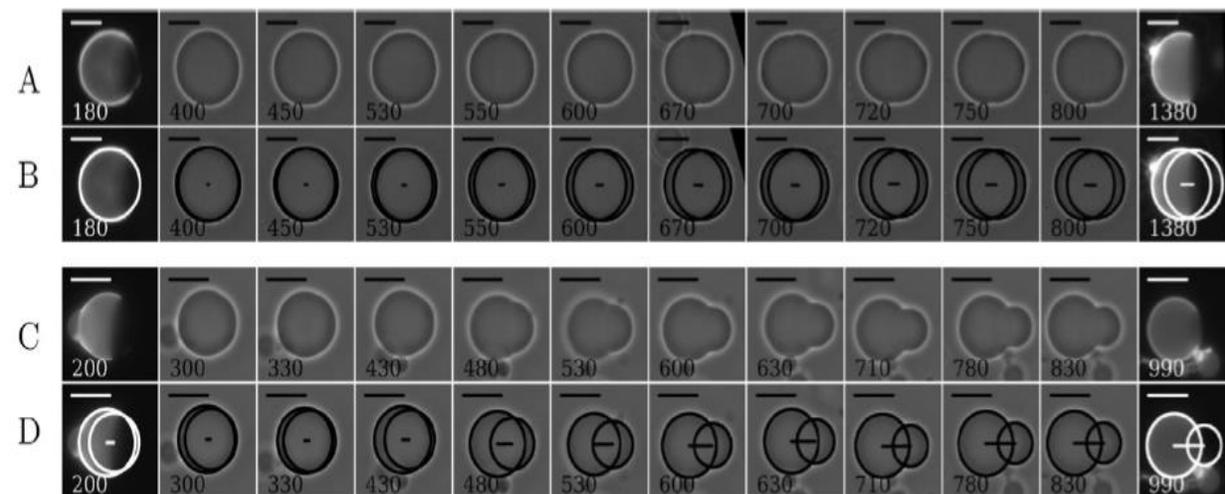


VISIONE AL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA DELLE GUV CON INSERZIONE DI RAMNOLIPIDI

a. GUV POPC: costituita da un solo tipo di lipide: **FOSFATIDILCOLINA**



b. GUV DOPC: costituita da un sistema ternario di lipidi in proporzione 1:1:1 di: **DOPC:SM:CHOL**



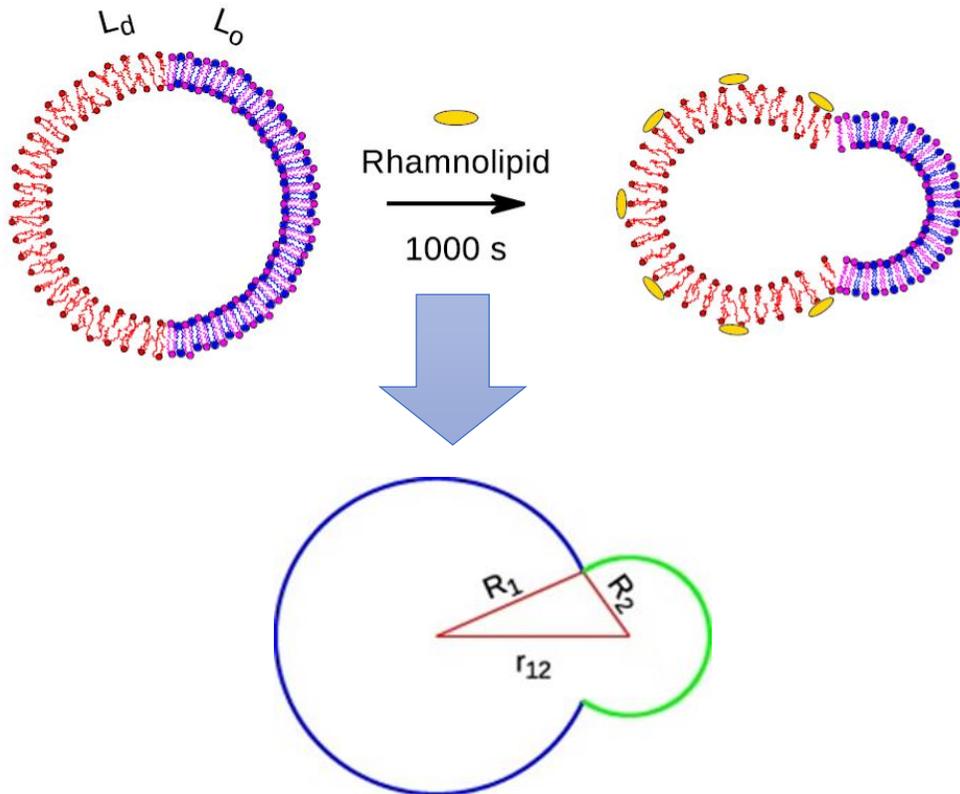
- pannello A: POPC (0,00376mM) con 0,1mol% di Rho-PE disperso in 0,20mM RL
- pannello C: soluzione di glucosio contenente 0,50mM RL
- angolo in basso a sinistra: tempo, in s, trascorso dopo aver miscelato RL con la soluzione GUV
- pannelli B e D: immagini dei pannelli A e C con sovrapposto il cerchio migliore che circonda le GUV determinate con ImageJ

- pannello A: 0,00431mM di concentrazione lipidica totale, 0,1mol% di Rho-PE disperso in una soluzione di glucosio contenente 0,20mM RL
- pannello C: soluzione di glucosio contenente 0,50mM RL
- angolo in basso a sinistra: tempo, in s, trascorso dopo aver miscelato RL con la soluzione GUV
- pannelli B e D: immagini dei pannelli A e C con sovrapposto il cerchio migliore che circonda le GUV determinate con ImageJ



GERMOGLIAMENTO DELLA GUV DOPC

Germogliamento del dominio L_o nella GUV DOPC dopo 1000s dall'aggiunta di RL



Proiezione nel piano di una vescicola formata sigillando una vescicola di raggio R_1 con una vescicola di raggio R_2 , essendo r_{12} la distanza tra i centri delle due vescicole. Gli archi blu e verdi si riferiscono rispettivamente alle aree A_1 e A_2 .

Le superfici delle due calotte sferiche con raggio R_1 e R_2 , sono dati dalle seguenti espressioni:

$$1. A_1 = \frac{\pi R_1}{r_{12}} (R_1^2 - R_2^2 + r_{12}(r_{12} + 2R_1))$$

$$2. A_2 = \frac{\pi R_2}{r_{12}} (R_2^2 - R_1^2 + r_{12}(r_{12} + 2R_2))$$

La superficie totale è: $A_{tot} = A_1 + A_2$, mentre il volume racchiuso dell'intera vescicola è calcolato secondo:

$$3. V = \frac{\pi}{12r_{12}} (R_1 + R_2 + r_{12})^2 (3R_1^2 + 2R_1r_{12} - r_{12}^2 - 6R_1R_2 + 2r_{12}R_2 + 3R_2^2)$$

Sia l'evoluzione temporale dei raggi dei cerchi R_i ($i=1,2$) così come la distanza r_{12} tra i centri dei cerchi sono stati approssimati con le seguenti eq.:

$$4. R_i(t) = R_i^0 + (R_i^\infty - R_i^0) \frac{1 - \exp\left(\frac{t}{\Delta t_{R_i}}\right)}{2 - \exp\left(\frac{t}{\Delta t_{R_i}}\right) - \exp\left(\frac{t_0 R_i}{\Delta t_{R_i}}\right)}$$

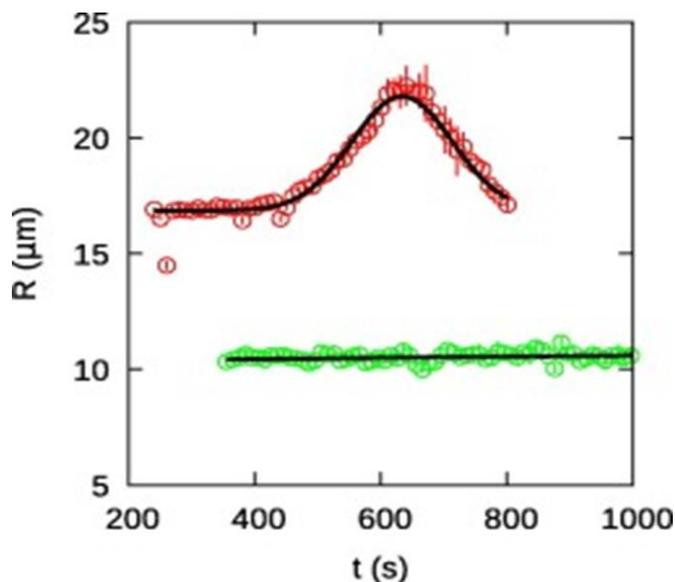
$$5. r_{12}(t) = r_{12}^\infty \frac{1 - \exp\left(\frac{t}{\Delta t_{r_{12}}}\right)}{2 - \exp\left(\frac{t}{\Delta t_{r_{12}}}\right) - \exp\left(\frac{t_0 r_{12}}{\Delta t_{r_{12}}}\right)}$$



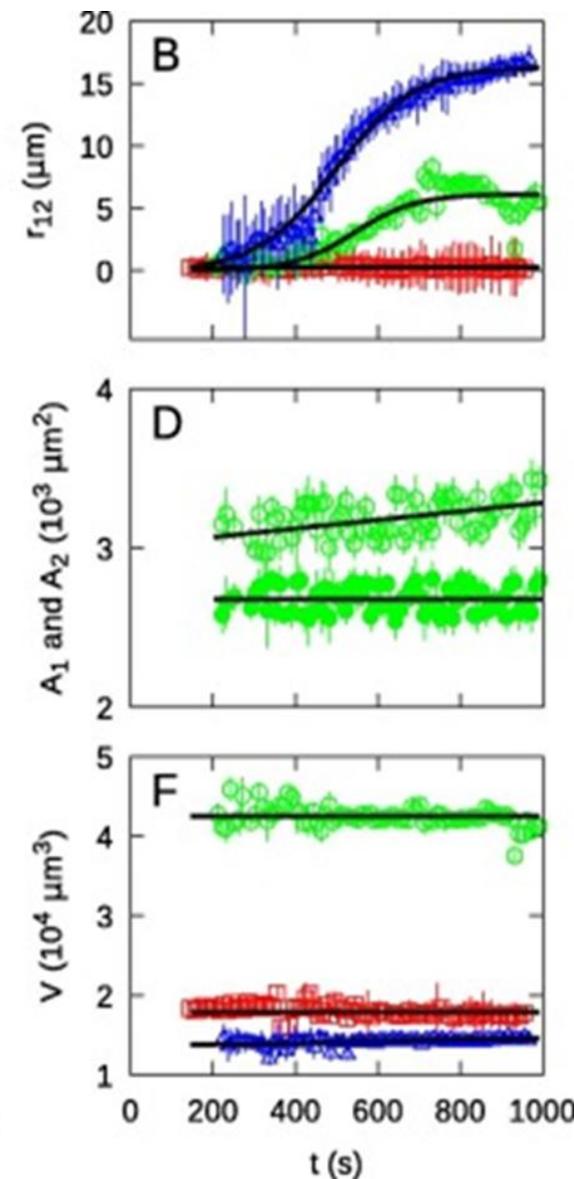
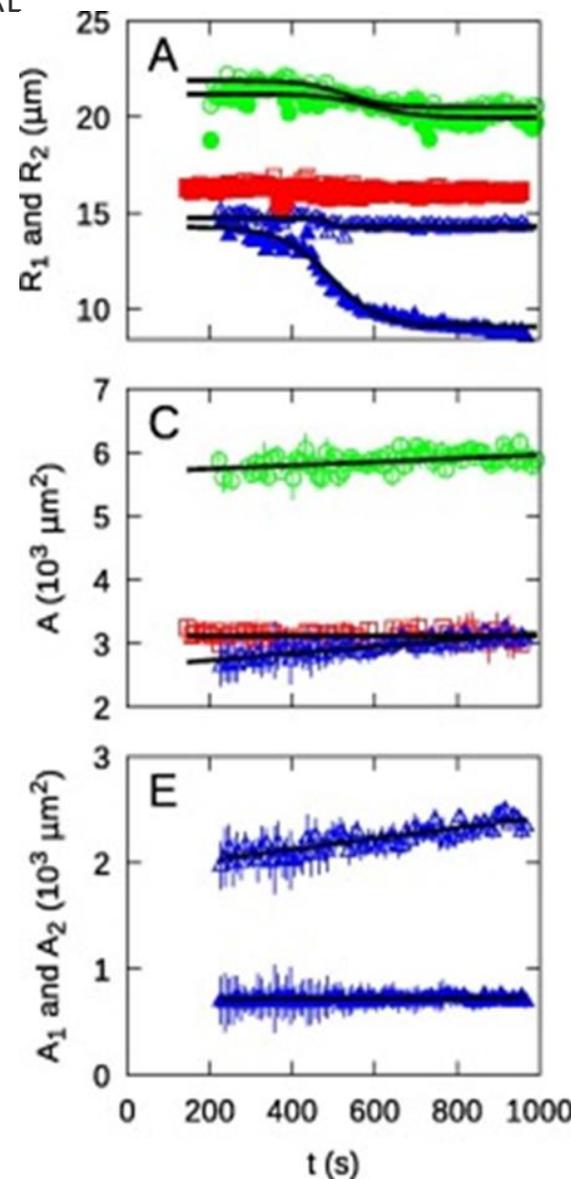
ANALISI DEI DATI

a. Dipendenza dal tempo del raggio di **POPC**

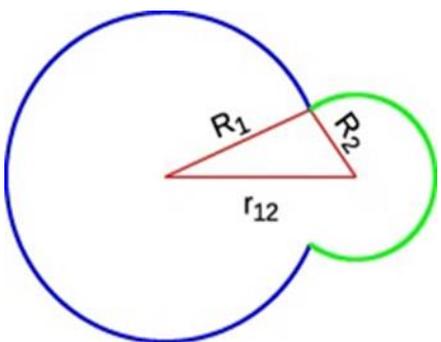
- cerchi verdi: **GUV** in presenza di 0,20 mM **RL**
- cerchi rossi: **GUV** in presenza di 0,50 mM **RL**



b. Dipendenza dal tempo dei parametri geometrici delle **GUV** formate da **DOPC, SM, CHOL (1:1:1)**



Proiezione nel piano di una vescicola formata sigillando una vescicola di raggio R_1 con una vescicola di raggio R_2 . r_{12} : distanza tra i centri delle due vescicole. Gli archi blu e verdi si riferiscono rispettivamente alle aree A_1 e A_2 .

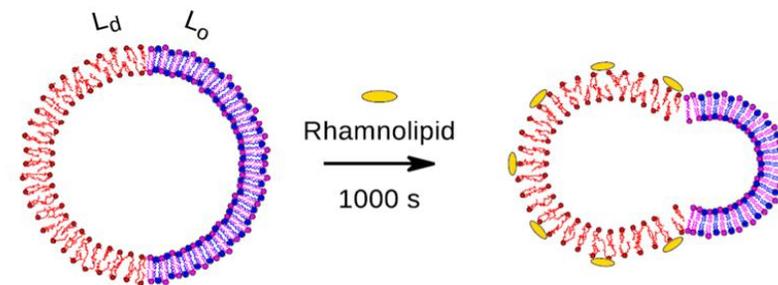


- Quadrati rossi: assenza di **RL**
- Cerchi verdi e triangoli blu: presenza di 0,20 e 0,50mM **RL**
- Pannello **A**: grande (R_1 , simboli aperti) e piccoli (R_2 , simboli pieni) raggio del cerchio, migliore adattamento ottenuto Eq.4 .
- Pannello **B**: distanza da centro a centro, miglior adattamento ottenuto Eq.5.
- Pannello **C**: superficie totale delle **GUV**.
- Pannello **D**: superfici A_1 (cerchi verdi aperti) e A_2 (cerchi verdi chiusi) delle calotte sferiche con raggio R_1 e R_2 con 0.20mM **RL**.
- Pannello **E**: superfici A_1 (triangoli blu aperti) e A_2 (triangoli blu chiusi) delle calotte sferiche con raggio R_1 e R_2 in presenza di 0,50mM.
- Pannello **F**: volume **GUV**.



CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

- ❑ **Obiettivo:** chiarire il meccanismo di danno dei RL.
- ❑ Due tipi di **GUV**:
 - **GUV POPC:** aumento dell'area fino al raggiungimento di un valore max. Ripristino dell' area originale con la formazione di gemme.
 - **GUV DOPC:** separazione del dominio L_o dal dominio L_d .

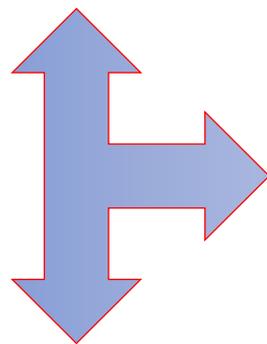


- ❑ Alterazioni promosse dai RL nei rafts:

- di(associazione) delle proteine chiave
- influenzando l'omeostasi cellulare



morte cellulare



- ❑ **SCOPO: OTTENERE SOSTANZE AD AZIONE BIOCIDA A BASE DI RL, APPLICABILI IN VARI CAMPI AD «IMPATTO 0» SULL' AMBIENTE.**