

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Farmacia

PROGETTO STRAIN
“Strategie Terapeutiche Innovative”
POR Campania FSE 2007/2013
CUP B25B0900000000

**Titolo: Identificazione di target terapeutici per il trattamento
di micosi sistemiche**

Tutor: Prof.
Anna Maria D’Ursi

Assegnista:
Mario Scrima

Il lavoro di ricerca svolto ha riguardato lo studio di peptidi ad attività antimicrobica (AMP) e le loro interazioni con modelli di membrane biologiche.

In natura esistono molti peptidi con proprietà antimicrobiche. Molti di questi peptidi esercitano la propria attività antimicrobica interagendo con l'envelope batterico e alterando la permeabilità della membrana batterica [1]. La maggior parte dei peptidi antimicrobici è strutturalmente caratterizzata da una ricca componente di Arg e Trp. La presenza di amminoacidi carichi positivamente, quali le Arg, fa sì che i peptidi siano attratti dalla superficie della membrana microbica carica negativamente. Invece i residui idrofobici presenti nella sequenza peptidica permettono al peptide di interpersi nella porzione idrofobica della membrana dove causano la formazione di pori o la destabilizzazione del doppio strato fosfolipidico, provocano la morte della cellula[2].

Recentemente attraverso l'uso di librerie combinatoriali sintetiche, è stato individuato e sintetizzato il peptide AMT1 con sequenza Ac-RRWRF-NH₂. Tale peptide e il suo analogo ciclico hanno mostrato attività antimicrobica contro ceppi batterici e funghi. L'attività antimicrobica è dovuta all'interazione del peptide con la membrana del microorganismo con conseguente permeazione e distruzione della membrana[3, 4].

Ispirati dalla sequenza dell'AMT1 e cyclo-AMT1, il gruppo di ricerca col quale ho svolto il mio progetto di ricerca ha progettato i peptidi AMT2, cyclo-AMT2, AMT3 e cyclo-AMT3 (figura 1). I nuovi peptidi sono stati progettati secondo un approccio polifarmacologico, ossia un'unica molecola in cui diverse porzioni strutturali sono capaci di interagire con diversi target biologici. Le nuove sequenze differiscono dall'AMT1 per la presenza di uno o due residui di His il cui anello imidazolico ha la funzione di mimare l'anello imidazolico dei composti azolici antifungini, una classe di farmaci il cui meccanismo d'azione consiste nell'inibire la lanosterolo demetilasi un enzima coinvolto nella sintesi dell'ergosterolo di membrana.

I peptidi da noi sintetizzati sono stati testati su varie specie di funghi mostrando attività nei confronti di diversi ceppi fungini e in particolare contro il *C. Neoformans* (tabella 1)[5]. Dai dati di attività si osserva come AMT2, cyclo-AMT2, AMT3 e cyclo-AMT3 siano più attivi del precursore AMT. Inoltre è evidente come i peptidi ciclici siano più attivi dei rispettivi analoghi lineari. Ciò suggerisce una correlazione tra conformazione e attività.

Successivi studi di microscopia di fluorescenza con peptidi labellati con DAP hanno mostrato come i peptidi oggetto di studio si accumulino sulla superficie fungina senza penetrare all'interno della cellula. Ciò lascia ipotizzare che l'attività dei peptidi sia da correlare ad interazione diretta di essi con la superficie fungina piuttosto che per interazione con componenti citosolici (figura 2).

Il lavoro di ricerca è stato rivolto allo studio delle interazioni dei peptidi AMT2, cyclo-AMT2, AMT3 e cyclo-AMT3 con modelli di membrane biologiche al fine di verificare l'ipotesi che l'attività dei peptidi sia correlata ad un'azione diretta sulla membrana microbica così come già dimostrato per il peptide precursore AMT1[3, 4].

Il lavoro svolto ha previsto

- l'analisi strutturale tramite NMR dei peptidi in ambiente mimetico di membrana. L'NMR è una tecnica spettroscopica che permette di ottenere informazioni strutturali ad alta risoluzione, ma per limiti tecnici non consente di utilizzare modelli di membrana molto più complicati di micelle. In questo studio sono state utilizzate micelle di SDS.

- una valutazione dell'interazione peptide-modello di membrana attraverso l'osservazione dello spettro di fluorescenza del Trp. Dall'osservazione dello spettro di emissione del Trp è possibile ricavare informazioni sull'ambiente che circonda l'anello indolico. Gli spettri di fluorescenza dei

peptidi sono stati acquisiti prima in soluzione acquosa e poi in presenza di crescenti quantità di tensioattivo (SDS). Per l'AMT3 e il cyclo-AMT3 sono stati anche registrati spettri in soluzioni liposomiali di DOPC/DOPG.

- la valutazione dell'interazione peptide-modello di membrana attraverso misure di ITC (isothermal titration calorimetry).

Studi NMR dei peptidi in micelle di SDS

Ogni peptide è stato disciolto in una soluzione micellare di SDS ($=0.08 \text{ mol kg}^{-1}$) in modo da ottenere una soluzione con concentrazione peptidica di 1.5mM.

Sono stati acquisiti spettri ^1H monodimensionali (1D), in cui il segnale dell'acqua è stato soppresso con irradiazione selettiva a bassa potenza usando il WATERGATE[6], mentre le sequenze di impulso bidimensionali impiegate per l'analisi di tale tipo di molecole sono state: DQF-COSY, TOCSY e NOESY[7-9]. Dopo aver acquisito e trasformato gli spettri, si è proceduto all'assegnazione dei segnali relativi ai protoni; tutti gli spettri sono stati assegnati utilizzando la procedura sviluppata da Wüthrich[10].

L'individuazione e la successiva assegnazione dei sistemi di spin dei vari aminoacidi sono state effettuate mediante l'analisi degli spettri TOCSY(correlazioni tra protoni riferiti allo stesso sistema di spin)[9] mentre l'individuazione e la successiva assegnazione delle correlazioni sequenziali ed inter-residuo dei peptidi in esame sono state ottenute grazie all'ausilio di spettri NOESY (accoppiamento dipolare)[7].

TOCSY e NOESY[7, 9]sono stati analizzati simultaneamente utilizzando il software SPARKY[11]. L'assegnazione dei segnali NOESY è stata seguita da integrazione dei cross-peaks. I valori dei *chemical shifts* e dei volumi ottenuti, sono stati utilizzati dallo *script* CALIBA (software CYANA) per convertire i volumi in distanze inter-protoniche, valori che costituiscono l'*input* per il calcolo delle strutture tridimensionali. Delle strutture calcolate, sono state selezionate le 20 migliori, con più bassi valori di funzione *target* (0.83-1.19) e bassa violazione sul residuo (max. violazione 38Å) e sottoposte a successivi calcoli di minimizzazione energetica utilizzando il modulo SANDER del software AMBER 5.0[12, 13] usando i *restraints* derivati da DYANA. Dopo la minimizzazione le migliori 10 strutture avevano un valore di AMBER energy compreso tra -441.4 e -391.1 Kcal/mol. Le strutture finali sono analizzate col programma Insight 98.0 (Molecular Simulations, San Diego, CA, USA).

Le possibili strutture secondarie che un peptide può assumere possono essere dedotte dal tipo di effetti NOE riscontrati. Ogni tipo di struttura secondaria, infatti, è caratterizzata da un particolare insieme di effetti NOE, *short* e *medium range*, tra aminoacidi che distano non più di 5 residui.

In figura 3 sono riportati gli effetti NOE di AMT2, AMT3, cyclo-AMT2 e cyclo-AMT3 presenti nello spettro NOESY. Effetti sequenziali NH-NH(i,i+1) e sporadici effetti medium range $\text{CH}\alpha\text{-NH}(i, i+2)$ si osservano nello spettro dell'AMT2. Invece gli spettri di AMT3, cyclo-AMT2 e cyclo-AMT3 presentano effetti sequenziali NH-NH(i, i+1) e diversi effetti medium range quali $\text{CH}\alpha\text{-NH}(i, i+2)$ and NH-NH(i, i+2).

La figura 4 invece riporta i bundle di strutture ottenute dal calcolo col software DYANA.

I bundles di strutture ottenuti per l'AMT2 e il cyclo-AMT2 sono composti da conformeri ben sovrapponibili tra loro (RMSD < 0.80 Å), anche se l'analisi degli angoli diedri del backbone tramite PROMOTIF [12] rileva una scarsa presenza di strutture secondarie canoniche.

Al contrario il bundle dell'AMT3 è meno ordinato dei precedenti ma dall'analisi degli angoli diedri è possibile identificare delle strutture secondarie regolari quali γ -turn tra i residui His3-Arg5 stabilizzato da un legame idrogeno tra C=O His3 e HN Arg5. L'analisi degli angoli diedri del bundle di strutture del cyclo-AMT3 evidenzia un γ -turn tra i residui di Trp6-Phe9.

In tutte le strutture calcolate le catene laterali sono orientate in maniera ordinata. Ciò conferma come in presenza di micelle di SDS prevalgano strutture ordinate.

Studi di fluorescenza

Le interazioni peptide-membrana sono state valutate attraverso studi di fluorescenza osservando i cambiamenti nello spettro di fluorescenza del Trp del peptide in soluzione acquosa ed in seguito all'aggiunta di crescenti quantità di tensioattivo(SDS).

Per gli studi di fluorescenza è stata preparata una soluzione di ciascun peptide ($3 \times 10^{-6} \text{M}$) in buffer fosfato (10mM, pH 7). Di ogni campione è stato registrato lo spettro di fluorescenza in soluzione acquosa eccitando il campione con luce monocromatica con lunghezza d'onda di 280nm e acquisendo lo spettro di fluorescenza in una finestra spettrale compresa tra 300-400nm. La titolazione con SDS è stata condotta aggiungendo alla soluzione peptidica precisi volumi di una soluzione tampone (10 mM buffer fosfato; pH 7) contenente peptide ($3 \times 10^{-6} \text{M}$) e SDS in concentrazione molto superiore alla cmc (concentrazione micellare critica). La soluzione i SDS così preparata permette durante la titolazione di aumentare la concentrazione di surfattante ad ogni aggiunta senza diluire il peptide presente in cuvetta. Allo stesso modo AMT3 e cyclo-AMT3 sono stati titolati in presenza di liposomi di DOPC/DOPG (80/20; M/M).

La figura 5 mostra gli spettri di fluorescenza dei 6 peptidi in tampone fosfato e in presenza di micelle di SDS. Per tutti i peptidi lo spettro di fluorescenza in buffer fosfato mostra un segnale di fluorescenza tipico dell'anello indolico immerso in soluzione acquosa ($\lambda_{\text{max}} \approx 358 \text{ nm}$). Per i peptidi lineari la presenza di micelle di SDS causa una riduzione dell'intensità del segnale di fluorescenza che può essere dovuta ad interazioni peptide-micelle [14] e un lieve shift del massimo di emissione a lunghezze d'onda più basse ($\lambda_{\text{max}} \approx 350 \text{ nm}$). Il lieve shift del segnale di fluorescenza indica che il Trp è ancora in contatto con il solvente e l'interazione con le micelle avviene in superficie piuttosto che nel nucleo idrofobico della micella. Gli spettri di fluorescenza del cyclo-AMT1 e cyclo-AMT2 in presenza di micelle di SDS mostrano un aumento dell'intensità del segnale, ciò fa ipotizzare una diversa interazione peptide-micella[15] [16].

Per questi peptidi lo shift del segnale a lunghezze d'onda minori è più evidente ($\lambda_{\text{max}} \approx 345 \text{ nm}$) rispetto agli analoghi lineari. L'aumento dello shift indica che l'anello indolico di questi peptidi pur restando ancora in contatto con la fase acquosa è maggiormente immerso nel cuore idrofobico della micella rispetto agli analoghi lineari.

Lo spettro di fluorescenza del cyclo-AMT3, diversamente dagli altri peptidi ciclici, è simile allo spettro dell'AMT3.

Gli spettri di fluorescenza dei peptidi acquisiti in presenza di concentrazioni di SDS inferiori alla cmc permette di valutare l'interazione peptide-tensioattivo. Per tutti i peptidi sono sufficienti piccole quantità di SDS per provocare sensibili cambiamenti nello spettro di fluorescenza per poi non osservare nessun ulteriore cambiamento alla cmc. L'ipotesi è che i peptidi interagiscono con i monomeri di tensioattivo indicando l'aggregazione[17].

Dai dati di fluorescenza è possibile quantificare l'interazione peptide-tensioattivo determinando la K_a (costante di associazione peptide-tensioattivo) e n (molecole di tensioattivo).

I dati sono riassunti nella tabella 2.

Dalla tabella si può notare come i valori di K_a siano molto elevati, ciò indica che i peptidi formano complessi con molecole di SDS. In media ogni peptide interagisce con 4-6 molecole di SDS. cyclo-AMT1 e cyclo-AMT2 hanno un K_a più bassa dei rispettivi analoghi lineari. Diversamente dal cyclo-AMT3 la cui K_a è più alta della K_a dell'AMT3.

Per meglio indagare le interazioni peptide-membrana gli studi di fluorescenza sono stati ripetuti con LUVs (large unilamellar vesicles) di DOPC/DOPG (80/20 M/M). I liposomi hanno una struttura più complessa delle micelle che meglio rappresenta il doppio strato fosfolipidico delle membrane biologiche. I fosfolipidi DOPC/DOPG sono in rapporto tale da riprodurre la parziale carica negativa (2-3%) tipica delle membrane cellulari.

Entrambi i peptidi in buffer fosfato mostrano uno spettro di emissione del Trp tipico dell'ambiente acquoso. In seguito ad aggiunta di liposomi l'intensità del segnale cambia e si osserva uno shift del segnale a lunghezze d'onda minori. Anche in questo caso l'intensità dello shift è tale da far ipotizzare che il peptide legghi i liposomi nella porzione superficiale senza penetrare nel cuore idrofobico del doppio strato. Dai dati di fluorescenza sono stati calcolati i valori di K_a e n di AMT3 e cyclo-AMT3 in liposoma (Tabella 2). I risultati mostrano come il cyclo-AMT3 legghi meglio le vescicole rispetto all'analogo lineare.

Studi di Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Ogni reazione chimica comporta produzione o assorbimento di calore. Queste variazioni di calore possono essere misurate attraverso esperimenti di isothermal titration calorimetry (ITC) e usate per il calcolo di parametri termodinamici quali ΔH , ΔG , ΔS [18] e costante di binding (K).

Negli esperimenti di calorimetria la soluzione peptidica (80 μ M) contenuta nella cella è stata titolata con soluzione liposomiale di SUVs.

Dagli esperimenti di ITC si ottiene ΔH come somma dei calori di reazione ottenuti ad ogni aggiunta di SUVs durante la titolazione.

ΔG e ΔS sono calcolati dalle equazioni $\Delta G = -RT \ln 55.5K$ e $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

La costante di binding K si calcola considerando le interazioni elettrostatiche peptide-membrane nella teoria di Gouy-Chapman.

Titolazione con SUVs POPC/POPG (75/25 M/M)

Con i primi esperimenti le soluzioni peptidiche di AMT1, cyclo-AMT1, AMT2, cyclo-AMT2, AMT3 e cyclo-AMT3 (80 μ M) tamponate a pH 7.4 (10 mM TRIS, 154mM NaCl) sono titolate con una soluzione liposomiale di SUVs POPC/POPG (75/25 M/M) nello stesso tampone. In questi primi esperimenti sono state ricreate le stesse condizioni di pH e temperatura (25°C) già usate per esperimenti di ITC con l'AMT1 e SUVs di POPC [4]. La composizione fosfolipidica dei SUVs POPC/POPG (75/25 M/M) è stata scelta in modo da riprodurre la carica superficiale delle membrane fungine[19].

La tabella 3 riporta i parametri termodinamici ricavati dagli esperimenti di calorimetria per l'AMT1, cyclo-AMT1, AMT2, cyclo-AMT2, AMT3 e cyclo-AMT3. AMT1 e AMT3 hanno costanti di binding più alte dei rispettivi analoghi ciclici, al contrario la costante di binding dell'AMT2 è più bassa del cyclo-AMT2. Dai dati emerge che il cyclo-AMT3 pur essendo il più attivo della serie non risulta il più affine ai liposomi.

Nei successivi esperimenti sono state cambiate gradualmente le condizioni sperimentali avvicinandosi ai parametri di pH e temperatura usati nei saggi biologici (temp 35°C, pH7)[5]. La tabella 4 riassume il risultato degli esperimenti per l'AMT3 lineare e ciclico. Per l'AMT3 al diminuire del pH si osserva un graduale aumento di K. Il cyclo-AMT3 invece è meno sensibile alle variazioni di pH rispetto all'analogo lineare. I dati lasciano ipotizzare che al diminuire del pH ci sia una maggiore protonazione dei residui basici del peptide lineare e ciò migliora l'attrazione tra peptide (carico positivamente) e il liposoma (carico negativamente). Nel caso del cyclo-AMT3 le forze elettrostatiche non sembrano giocare un ruolo importante nell'interazione peptide-membrana.

Titolazione di AMT3 e cyclo-AMT3 con SUVs POPC

Per valutare il contributo delle sole forze idrofobiche, AMT3 e cyclo-AMT3 sono stati titolati con SUVs di solo POPC (tabella 5).

L'AMT3 titolato con SUVs di POPC ha una K minore che se titolato con SUVs di POPC/POPG. Il cyclo-AMT3 invece ha una K maggiore se titolato con SUVs di solo POPC. Questo fa ipotizzare che per il peptide ciclico il contributo idrofobico abbia un peso maggiore ai fini dell'interazione con la membrana rispetto al contributo elettrostatico.

Titolazione di AMT2 con SUVs POPC/POPG (75/25 M/M)

Per valutare l'influenza delle istidine anche l'AMT2 (HRRWRF) è stato titolato a diversi valori di pH. Muovendosi da pH 7.4 a pH 7 si osserva una diminuzione del valore della costante di binding da 550 a 350 M⁻¹. Le successive titolazioni da pH 7 a pH 6 mostrano, come visto per l'AMT3, un aumento di K. In questo caso l'incremento è meno drastico di quello osservato per l'AMT3 (HGHRWRF) (Tabella 6).

Titolazione con SUVs POPC/POPG (75/25 M/M) e colesterolo

Per gli esperimenti successivi la composizione dei SUVs è stata modificata aggiungendo colesterolo come mimetico dell'ergosterolo, tipico componente delle membrane fungine[19]. Per l'AMT3 l'aggiunta di colesterolo comporta una diminuzione della costante di binding da 1700 a 700 M⁻¹. Per il cyclo-AMT3 la diminuzione del valore di K va da 400 a 250 M⁻¹. Per entrambi i peptidi l'aggiunta di colesterolo comporta una diminuzione di K. Il decremento è più drastico per il peptide lineare che per quello ciclico (Tabella 7).

L'aggiunta di colesterolo comporta una diminuzione della fluidità delle membrane ed è quindi un ostacolo alla penetrazione del peptide nel doppio strato fosfolipidico. I dati mostrano che la presenza di colesterolo diminuisce l'interazione di entrambi i peptidi ai liposomi ma il peptide lineare è molto più sensibile alla presenza di colesterolo rispetto al ciclico.

Titolazione con SUVs POPC/POPG/POPE (50/25/25 M/M/M) e colesterolo

Per mimare ulteriormente alla composizione delle membrane fungine AMT3 e cyclo-AMT3 sono stati titolati con SUVs di POPC/POPG/POPE (50/25/25 M/M/M) e colesterolo[19]. I dati sono

riportati in tabella 8. Dal paragone con i dati in tabella 7 si osserva come in l'aggiunta di POPE comporta un'ulteriore diminuzione del valore della costante di binding K per entrambi i peptidi. La presenza del POPE diminuisce ulteriormente la fluidità delle membrane e cio' si traduce in una minore affinità dei peptidi per i liposomi.

Conclusioni

AMT2, cyclo-AMT2, AMT3 and cyclo-AMT3 sono peptidi sintetici di cui è stata provata l'attività antimicrobica. Durante questo anno di ricerca è stata studiata l'interazione AMT-membrana al fine di chiarire il meccanismo d'attività antimicrobica. Studi di fluorescenza sul Trp dei peptidi in soluzioni micellari di SDS e in soluzioni liposomiali di DOPC/DOPG hanno mostrato come il legame dei peptidi alle micelle/liposomi avvenga all'interfaccia senza coinvolgere la porzione idrofobica di micelle/liposomi. Inoltre i peptidi sembrano avere affinità maggiore con le molecole di surfattante che con i complessi micellari.

Studi di calorimetria hanno dimostrato come l'affinità dei peptidi lineari per le membrane sia maggiormente dipendente da fenomeni elettrostatici mentre per i peptidi ciclici sono le forze di idrofobiche le principali responsabili dell'interazione (tabella 4-6). L'affinità dei peptidi risente della composizione delle membrane e in particolare si osserva una diminuzione della costante di binding al diminuire della fluidità del doppio strato (tabella 7 -8). Tuttavia gli studi di calorimetria non mostrano un'interazione con i modelli di membrana tale da spiegare l'attività antimicrobica.

Le strutture dei peptidi in micelle di SDS ottenute tramite NMR presentano un elevato grado di ordine. In particolare nei peptidi ciclici è possibile riconoscere strutture secondarie quali turn nella regione Trp-Trp-Arg-Phe (Trp4-Phe7 per il cyclo-AMT2 e Trp6-Phe9 per il cyclo-AMT3). Nei peptidi ciclici le catene laterali della regione Trp-Arg-Phe sono disposte sullo stesso lato del ciclo, probabilmente a causa di interazioni tra il gruppo guandinico dell'Arg e gli anelli aromatici di Trp e Phe. Questa interazione che stabilizza la conformazione peptidica è favorita nel peptide ciclico rispetto al lineare. In particolare nel cyclo-AMT2 sono le catene di Trp5, Arg6 and Phe7 ad essere disposte su un lato della molecola, invece per il cyclo-AMT3 si tratta dei residui di Arg5, Trp7, Arg8 e Phe9.

I dati raccolti fanno ipotizzare che l'attività antimicrobica degli AMT non sia dovuta ad un danno a livello della membrana fungina, bensì all'interazione con uno specifico target esposto sulla membrana. L'adesione del peptide alla membrana mediata da Trp e Arg stabilizza i peptidi sulla superficie della membrana dove possono meglio interagire con il target.

Reference

- [1] R.E. Hancock, Peptide antibiotics, *Lancet*, 349 (1997) 418-422.
- [2] B. Bechinger, The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy, *Biochim Biophys Acta*, 1462 (1999) 157-183.
- [3] C. Appelt, A. Wessolowski, J.A. Soderhall, M. Dathe, P. Schmieder, Structure of the antimicrobial, cationic hexapeptide cyclo(RRWRF) and its analogues in solution and bound to detergent micelles, *Chembiochem*, 6 (2005) 1654-1662.
- [4] M. Dathe, H. Nikolenko, J. Klose, M. Bienert, Cyclization increases the antimicrobial activity and selectivity of arginine- and tryptophan-containing hexapeptides, *Biochemistry*, 43 (2004) 9140-9150.
- [5] M. Grimaldi, M. De Rosa, S. Di Marino, M. Scrima, B. Posteraro, M. Sanguinetti, G. Fadda, A. Soriente, A.M. D'Ursi, Synthesis of new antifungal peptides selective against *Cryptococcus neoformans*, *Bioorg Med Chem*, 18 7985-7990.
- [6] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions, *J Biomol NMR*, 2 (1992) 661-665.
- [7] J. Jeener, B. Meier, P. Bachmann, R. Ernst, Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *The Journal of Chemical Physics*, 71 (1979) 4546.
- [8] U. Piantini, O. Sorensen, R.R. Ernst, Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks, *Journal of the American Chemical Society*, 104 (1982) 6800-6801.
- [9] A. Bax, D.G. Davis, MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy, *J. magn. Reson*, 65 (1985) 355-360.
- [10] K. Wuthrich, NMR of proteins and nucleic acids, The George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University (USA), (1986).
- [11] T. Goddard, D. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco, CSI (c)(version 1.1) A Program Prepared by: Protein Engineering Network of Centres of Excellence, University of Alberta Edmonton, Alberta, Canada.
- [12] E.G. Hutchinson, J.M. Thornton, PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins, *Protein Sci*, 5 (1996) 212-220.
- [13] D.A. Case, D.A. Pearlman, J.W. Caldwell, T.E. Cheatham III, J. Wang, W.S. Ross, C. Simmerling, T. Darden, K.M. Merz, R.V. Stanton, AMBER 7, University of California, San Francisco, (2002).
- [14] J. Dufourcq, J. Faucon, R. Maget-Dana, M. Pileni, C. HÃ©ne, Peptide-membrane interactions A fluorescence study of the binding of oligopeptides containing aromatic and basic residues to phospholipid vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 649 (1981) 67-75.
- [15] R. Spadaccini, G. D'Errico, V. D'Alessio, E. Notomista, A. Bianchi, M. Merola, D. Picone, Structural characterization of the transmembrane proximal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798 344-353.
- [16] S. Galdiero, A. Falanga, G. Vitiello, M. Vitiello, C. Pedone, G. D'Errico, M. Galdiero, Role of membranotropic sequences from herpes simplex virus type I glycoproteins B and H in the fusion process, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798 579-591.
- [17] C. Esposito, G. D'Errico, M.R. Armenante, S. Giannecchini, M. Bendinelli, P. Rovero, A.M. D'Ursi, Physicochemical characterization of a peptide deriving from the glycoprotein gp36 of the feline immunodeficiency virus and its lipoylated analogue in micellar systems, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758 (2006) 1653-1661.
- [18] M.L. Doyle, Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry, *Current opinion in biotechnology*, 8 (1997) 31-35.
- [19] P. Wang, Y.H. Nan, S.Y. Shin, Candidacidal mechanism of a Leu/Lys-rich alpha-helical amphipathic model antimicrobial peptide and its diastereomer composed of D,L-amino acids, *J Pept Sci*, 16 601-606.

Tabella 1 : minima concentrazione inibente (MIC) dei peptidi.

sm [n]	AMT1 (µg/mL)		cyclo-AMT1 (µg/mL)		AMT2 (µg/mL)		cyclo-AMT2 (µg/mL)		AMT3 (µg/mL)		cyclo-AMT3 (µg/mL)		AMB (µg/mL)		FLU (µg/mL)	
	MIC range	MIC ₅₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC range	MIC ₅₀
ams (20)	128->512	512	64-512	256	128->512	512	128-512	256	256->512	>512	32-128	128	0.03-0.25	0.125	0.125-0.5	0.25
rete (20)	128->512	512	64-256	256	128->512	512	128-512	256	256->512	>512	64-256	256	0.03-0.25	0.125	4->64	64
er (20)	128-512	256	32-128	64	128->512	512	32-128	64	256->512	512	32-64	64	0.03-0.125	0.06	16->64	64
krals (20)	128-512	512	64-512	256	128->512	512	128-512	256	256->512	>512	32-128	128	0.03-0.125	0.06	0.5-4	2
psilosis (20)	128-512	256	64-256	128	64-128	128	32-128	128	>512	512	32-128	128	0.06-0.125	0.06	1-4	2
brmans (35)	8-16	16	4-8	8	16-64	64	4-16	8	8-32	16	2-8	4	0.125-0.25	0.25	2-64	4

Tabella 2 : K_a (costante di associazione tra il peptide e surfattante/liposoma) e n (numero di molecole di surfattante/vescicole che interagiscono con ogni peptide), calcolati per AMT1, AMT2, AMT3, cyclo-AMT1, cyclo-AMT2 e cyclo-AMT3 in micelle di SDS e liposomi di DOPC/DOPG.

	solvent medium	$K_a \times 10^{-2} / M^{-1}$	n
AMT1	SDS micelles	3.8±0.4	4±1
AMT2	SDS micelles	3.3±0.4	5±1
AMT3	SDS micelles	3.4±0.3	4±1
Cyclo-AMT1	SDS micelles	2.2±0.2	6±2
Cyclo-AMT2	SDS micelles	2.0±0.4	6±1
Cyclo-AMT3	SDS micelles	5.5±0.4	6±1
AMT3	DOPC/DOPG liposomes	3000±600	6±1
Cyclo-AMT3	DOPC/DOPG liposomes	16000±3000	6±2

Tabella 3 : parametri termodinamici di binding dei peptidi con POPC/POPG SUVs, pH7.4, T:25°C

POPC/POPG				
peptide	$K(M^{-1})$	$\Delta H(kcal/mol)$	$\Delta G(kcal/mol)$	$\Delta S(cal/(mol K))$
AMT1	700	-9,47	-6,26	-10,78
Cyclo-AMT1	400	-10,58	-5,93	-15,62
AMT2	550	-9,15	-6,11	-10,18
Cyclo-AMT2	800	-7,8	-6,34	-4,92
AMT3	600	-7,44	-6,17	-4,27
Cyclo-AMT3	400	-7,87	-5,93	-6,52

Tabella 4 : parametri termodinamici di binding per AMT3 e cyclo-AMT3 con POPC/POPG SUVs

POPC						
peptide	$K(M^{-1})$	$\Delta H(kcal/mol)$	$\Delta G(kcal/mol)$	$\Delta S(cal/(mol K))$	pH	T(°C)
AMT3	2500	-5,39	-7,25	6,03	6.0	35
CicloAMT3	800	-5,25	-6,55	4,22	6.0	35

Tabella 5 : parametri termodinamici di binding per AMT3 e cyclo-AMT3 con POPC SUVs

POPC/POPG						
peptide	K(M ⁻¹)	$\Delta H(\text{kcal/mol})$	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta S(\text{cal}/(\text{mol K}))$	pH	T(°C)
AMT2	550	-9,15	-6,11	-10,19	7.4	25
AMT2	350	-10,92	-6,04	-15,83	7.0	35
AMT2	450	-10,78	-6,20	-14,88	6.5	35
AMT2	1000	-8,82	-6,69	-6,93	6.0	35

Tabella 6 : parametri termodinamici di binding per AMT2 e con SUVs di POPC/POPG a diversi valori di pH.

OPC/POPG e colesterolo						
peptide	K(M ⁻¹)	$\Delta H(\text{kcal/mol})$	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta S(\text{cal}/(\text{mol K}))$	pH	T(°C)
AMT3	700	-7,37	-6,47	-2,93	6.5	35
CicloAMT3	250	-7,85	-5,84	-6,54	6.5	35

Tabella 7 : parametri termodinamici di binding dell'AMT3 e cyclo-AMT3 con SUVs di POPC/POPG e colesterolo.

POPC/POPG/POPE e colesterolo						
peptide	K(M ⁻¹)	$\Delta H(\text{kcal/mol})$	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta S(\text{cal}/(\text{mol K}))$	pH	T(°C)
AMT3	600	-5,36	-6,37	3,29	6.5	35
CicloAMT3	150	-6,33	-5,52	-2,62	6.5	35

Tabella 8 : parametri termodinamici di binding dell'AMT3 e cyclo-AMT3 con SUVs di POPC/POPG/POPE e colesterolo.

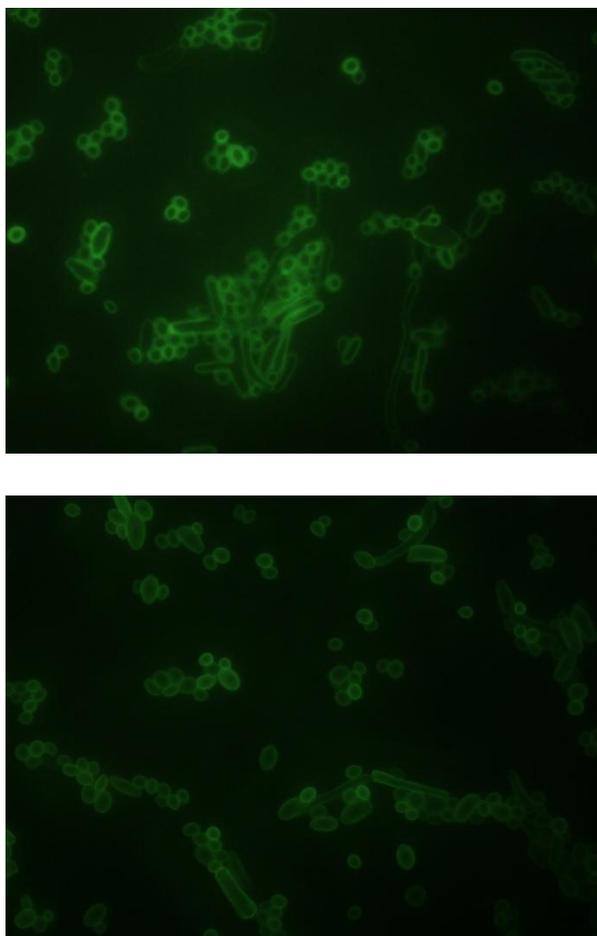
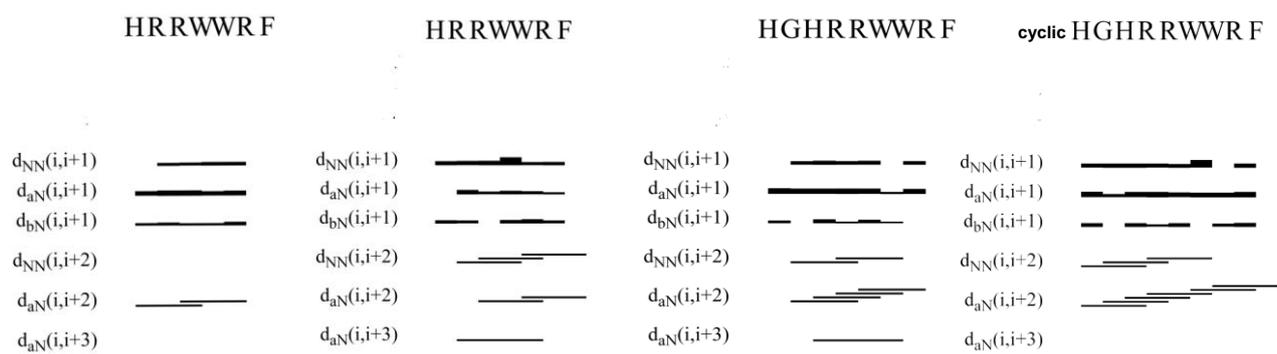


Figura 2 : microscopia di *C. albicans* in presenza di cyclo-AMT3 labellato con DAP.



Correlazioni interprotoniche dedotti da spettri NOESY dei peptidi bundles di AMT2, cyclo-AMT2, AMT3, cyclo-AMT3.

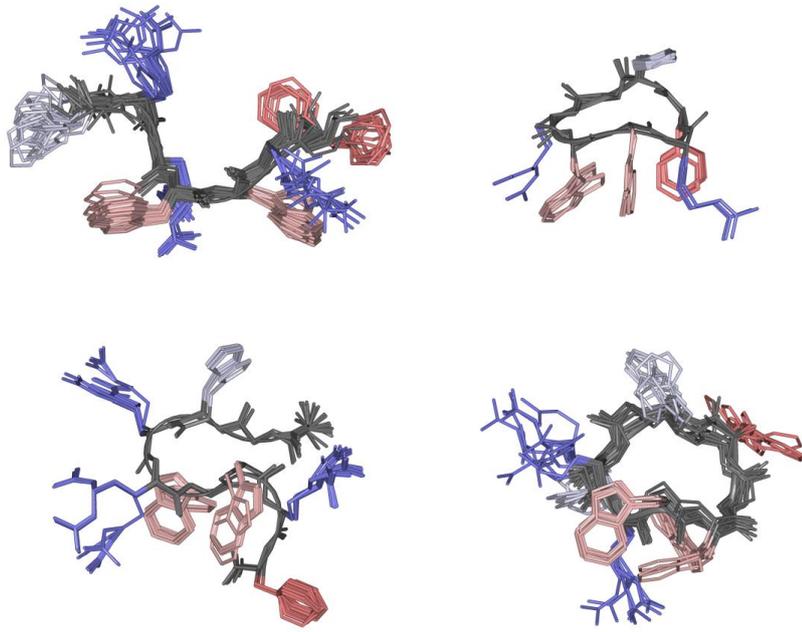


Figura 4 : bundles di AMT2, cyclo-AMT2, AMT3, cyclo-AMT3.

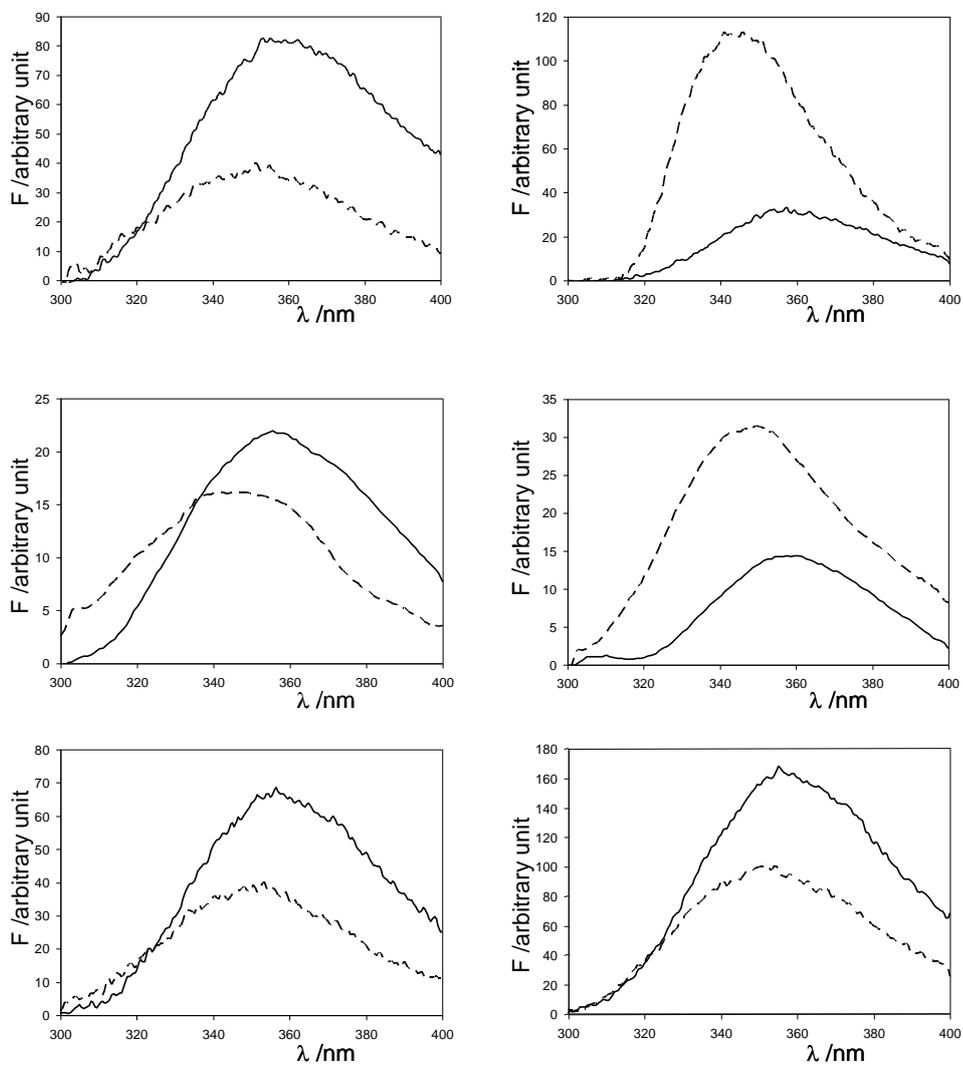


Figura 5 : Spettri di fluorescenza di AMT1, cyclo-AMT1 (A), AMT2, cyclo-AMT2 (B), AMT3 and cyclo-AMT3 (C) in tampone fosfato (linea continua) e in micelle di SDS (linea tratteggiata)