

Università degli Studi di Milano



Scuola di Dottorato
Terra Ambiente e Biodiversità

Dottorato di Ricerca in Biologia Animale
XXIV ciclo

Dipartimento di Biologia
Settore Disciplinare BIO 09

**Proprietà funzionali della barriera intestinale di insetto e
modulazione della permeabilità paracellulare**

Tesi di Dottorato di:
Barbara DIAMANTE

Tutor: Dott.ssa Morena **Casartelli**

Coordinatore del Dottorato: Prof. Giulio **Melone**

A.A.
2010-2011

Indice

Capitolo primo: INTRODUZIONE	1
Premessa	2
1 La membrana peritrofica	3
1.1 Caratteri generali, composizione molecolare e struttura.....	3
1.2 Ruolo della MP nella fisiologia intestinale	6
1.3 Permeabilità della MP e controllo degli insetti dannosi.....	7
2 La larva di <i>Bombyx mori</i> : un modello per lo studio della fisiologia del trasporto di molecole nell'epitelio intestinale delle larve dei Lepidotteri	10
2.1 Architettura dell'epitelio e della giunzione settata	10
2.2 Proprietà funzionali e vie di permeazione nell'intestino medio. Via cellulare.....	17
2.2.1 Secrezione di potassio e assorbimento di amminoacidi.....	17
2.2.2 Alcalinizzazione del lume intestinale	19
2.2.3 Assorbimento delle proteine	19
2.3 Via paracellulare e controllo degli insetti dannosi.....	20
2.3.1 Gli studi sulla permeabilità della SJ	21
2.3.2 Modulazione fisiologica della permeabilità della via paracellulare	25
2.3.3 Permeabilizzazione della TJ di mammifero indotta da molecole specifiche	27
2.3.4 Permeabilizzazione della SJ.....	30
2.4 Proctolin e TMOF, due peptidi a potenziale attività insetticida che permeano attraverso la via paracellulare	31
3 Il denso virus di <i>Junonia coenia</i> (<i>JcDNV</i>).....	34
 Capitolo secondo: MATERIALI E METODI	38
1 Animali da esperimento.....	39
2 Isolamento della membrana peritrofica e caratteristiche dell'apparato sperimentale.....	41
3 Misura del flusso di blu di metilene e TMOF attraverso la membrana peritrofica di <i>H. virescens</i>	42

4	Isolamento e perfusione dell'intestino medio larvale di lepidottero	44
5	Determinazione della resistenza elettrica paracellulare o resistenza di shunt (R_{sh})	46
6	Effetto del C10 sul passaggio di fluoresceina attraverso l'intestino medio delle larve di <i>B. mori</i>	49
7	Effetto del C10 sul passaggio di proctolin rodaminato attraverso l'intestino medio delle larve di <i>B. mori</i>	50
8	Localizzazione di JcDNV nell'intestino medio larvale di <i>S. frugiperda</i>	51
9	Localizzazione del JcDNV in presenza di inibitori dell'endocitosi	52
10	Quantificazione del flusso di JcDNV attraverso l'intestino medio larvale di <i>S.</i> <i>frugiperda</i>	53
11	Disaggregazione enzimatica dell'intestino medio larvale per l'ottenimento di cellule isolate	54
12	Determinazione del calcio citosolico	55
	Capitolo terzo: RISULTATI	57
1	Modulazione della permeabilità della membrana peritrofica	58
1.1	Effetto <i>in vitro</i> della ChiA sulla permeabilità della MP al blu di metilene e al TMOF in <i>H. virescens</i>	58
1.2	Effetto della ChiA <i>in vivo</i> sulla permeabilità della MP in larve alimentate su piante di tabacco transgeniche esprimenti l'enzima	61
2	Modulazione della via paracellulare nell'intestino larvale di lepidottero	62
2.1	Effetto dell'acido grasso a media catena caprato di sodio (C10) sulla resistenza paracellulare dell'intestino larvale di <i>B. mori</i> e <i>S. littoralis</i>	62
2.2	Effetto del C10 sulla permeazione di piccole molecole organiche	65
2.3	Analisi della morfologia della giunzione in intestini incubati con C10	69
2.4	Variazione della concentrazione intracellulare di calcio in cellule intestinali incubate con C10	70
2.5	Effetto degli inibitori della fosfolipasi C (PLC), del legame calcio- calmodulina e della chinasi attiva sulla catena leggera della miosina (MLCK)	72
3	Il densovirus di <i>Junonia coenia</i> e la sua permeazione attraverso l'intestino medio delle larva suscettibile <i>S. frugiperda</i>	78

3.1 Localizzazione di <i>JcDNV</i> nell'epitelio dell'intestino larvale e suo effetto sulla resistenza elettrica paracellulare	78
3.2 Effetto del <i>JcDNV</i> sulla concentrazione di calcio citosolico.....	81
3.3 Passaggio del <i>JcDNV</i> attraverso l'epitelio intestinale di <i>S. frugiperda</i>	82
3.4 Localizzazione del <i>JcDNV</i> in presenza o assenza di inibitori specifici dell'endocitosi	84
Capitolo quarto: DISCUSSIONE	86
Capitolo quinto: BIBLIOGRAFIA	95

Capitolo primo

Introduzione

Premessa

Ad oggi, l'utilizzo di pesticidi chimici è ancora l'approccio più comune per il controllo degli insetti dannosi, sebbene presenti diversi aspetti negativi quali l'alterazione della qualità degli alimenti, effetti tossici anche su specie non target e l'insorgere di fenomeni di resistenza in quelle target. Un obiettivo importante per la nostra società è quindi quello di sviluppare nuove strategie per il controllo degli insetti, che permettano di ridurre l'impiego dei prodotti chimici. Tra gli insetti dannosi ci sono le larve di lepidottero: la quasi totalità di questi bruchi è fitofaga, cioè ricava il proprio nutrimento dalle piante e molti di essi sono dannosi per specie vegetali di interesse agricolo o forestale.

In questi anni i processi che regolano l'assorbimento intestinale di proteine e peptidi in insetto sono particolarmente studiati poiché potrebbero mediare il passaggio all'emocele di prodotti genici ad attività insetticida. Recentemente, infatti, sono stati identificati numerosi peptidi e proteine, derivati da microrganismi, piante, predatori e parassitoidi degli Artropodi (Whetstone e Hammock, 2007) che potrebbero essere utilizzati come biopesticidi perché in grado di alterare i processi fisiologici degli insetti bersaglio fino a provocarne la morte.

Molti sono i gruppi di ricerca impegnati nell'identificazione di prodotti genici ad attività bioinsetticida e, parallelamente, alcuni gruppi, fra cui il nostro, tentano di identificare le modalità più efficaci per la somministrazione dei prodotti tossici identificati, considerando che la via privilegiata finora è quella orale. Una molecola esogena ingerita dall'insetto che, insieme all'alimento, raggiunge il lume del tratto intestinale deputato all'assorbimento, deve oltrepassare due barriere prima di raggiungere l'ambiente emocelico: la membrana peritrofica e il sottostante epitelio intestinale. Le molecole organiche che permeano selettivamente attraverso l'epitelio possono seguire due percorsi: la via cellulare attraversando le singole cellule epiteliali, o la via paracellulare, percorrendo lo spazio tra le cellule modulato dalle giunzioni serrate intercellulari.

In questa ricerca ho studiato le caratteristiche della membrana peritrofica e della via paracellulare dell'intestino larvale di lepidottero, e ho esaminato la possibilità di utilizzare molecole in grado di aumentare la permeabilità di queste due barriere, in modo da facilitare il passaggio all'emocele di peptidi tossici.

Inoltre ho collaborato a uno studio volto a chiarire come il densovirus di *Junonia coenia* (*JcDNV*), che infetta in modo specifico i lepidotteri, è in grado di invadere il suo ospite permissivo *Spodoptera frugiperda*, attraversando l'intestino medio

1 La membrana peritrofica

1.1 Caratteri generali, composizione molecolare e struttura

La membrana peritrofica (MP) è una sottile lamina acellulare di circa 1 μ m di spessore secreta dall'epitelio intestinale di numerosi invertebrati e della maggioranza degli insetti, e costituisce un'importante barriera al passaggio di patogeni e/o macromolecole potenzialmente nocive dal lume intestinale all'emocele.

La MP avvolge il contenuto intestinale ed è posizionata fra lo stesso e l'orletto a spazzola dell'intestino (Lehane, 1997; Binnington *et al.*, 1998; Terra, 2001) separando così il comparto luminale, detto spazio endoperitrofico, da quello compreso tra la MP e l'epitelio intestinale, denominato spazio ectoperitrofico (Lehane, 1997). (Figura 1.1). Questa compartimentazione gioca un ruolo fondamentale nelle funzioni digestive dell'insetto (Terra e Ferreira, 2005).

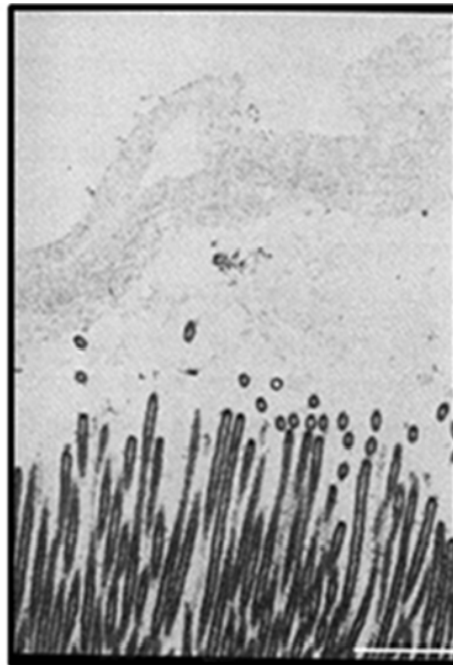


Figura 1.1: Immagine al microscopio elettronico della membrana peritrofica.

Barra 1 μ m da Reyerse *et al.*, 1992

La MP è costituita da una maglia di microfibrille di chitina associate a glicoproteine, proteine e proteoglicani (Figura 1.2, A, B). Le microfibrille hanno diametri uniformi compresi fra 2 e 6 nm (Peters *et al.*, 1979), probabilmente superano i 500 nm di lunghezza (Peters *et al.*, 1979) e sono spesso organizzate in bande, costituite da gruppi paralleli di 10 o più unità e non formano mai delle strutture lamellari, come quelle tipiche della cuticola. La chitina è un omopolimero lineare costituito da molecole di 2-acetamido-2-deossi-D-glucopiranoside (N-acetil-glucosamina, GlcNAc) connesse da legami β -1-4, e costituisce dal 3 al 13% della membrana peritrofica (Zimmerman *et al.*, 1975).

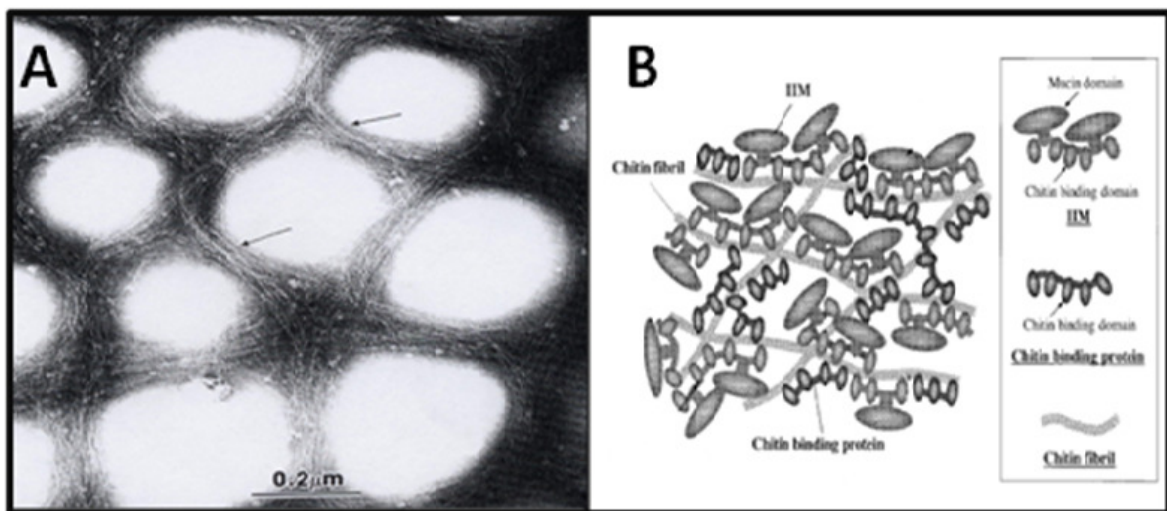


Figura 1.2 A e B: **A:** Microfibrille di chitina della membrana peritrofica della larva di blatta (*Dasygnathus dejeani*) (da Binnington *et al.*, 1998); **B:** Composizione molecolare della membrana peritrofica

Nella maggior parte degli insetti, le proteine formano dal 20 al 55% della massa totale della MP (Adang *et al.*, 1983; De Mets *et al.*, 1962; Zimmermann *et al.*, 1975) e vengono suddivise in quattro differenti classi, in base alle difficoltà di estrazione. Il primo gruppo include proteine legate covalentemente alla MP (componente minore); il secondo gruppo, le peritrofine, sono legate strettamente ma non covalentemente (frazione maggiore); il terzo gruppo comprende proteine periferiche rimuovibili mediante blandi trattamenti con detergenti ed il quarto gruppo è rappresentato da proteine facilmente asportabili con lavaggi ionici più o meno aggressivi (Lehane, 1997). Recentemente sono state identificate e clonate due proteine (chitin-binding proteins) la *BmMP-P43* (43 kDa) e la *BmPM-P41* (41 kDa) dalle MP delle larve di *B. mori* (Yang *et al.*, 2010).

I proteoglicani si distinguono dalle glicoproteine perché le catene di carboidrati, attaccate alla componente proteica, sono più lunghe e non ramificate (generalmente glicosaminoglicani, formati da ripetizioni di unità disaccaridiche). Essi conferiscono alla MP un notevole carattere idrofilico, grazie alla presenza di gruppi solfato e carbossilici, che attraggono efficacemente i cationi che, a loro volta, richiamano acqua. La matrice della MP è perciò simile a un gel in cui si genera una pressione di turgore contrastata dalle microfibrille di chitina in essa contenute (Hardingham *et al.*, 1990). I proteoglicani idratati conferiscono alle MP una grande resistenza contro le forze compressive (Jackson *et al.*, 1991) e, insieme alla forza elastica esercitata dalle microfibrille di chitina, sono importanti nel garantire una buona resistenza meccanica. Essi sembrano inoltre avere una influenza determinante sulle caratteristiche di permeabilità della membrana.

Tradizionalmente le MP degli insetti vengono suddivise nelle due categorie, tipo I e tipo II, che differiscono per le modalità di formazione (Wigglesworth, 1930). La prima è secreta lungo tutto l'intestino medio e, in alcuni casi, può venire formata solamente in risposta al nutrimento e/o al tipo di cibo ingerito, mentre la seconda viene prodotta da una ristretta regione specializzata dell'intestino anteriore degli insetti (Waterhouse, 1953; Peters, 1992). Durante il loro ciclo vitale, alcune specie possono alternare la formazione di MP di tipo I o II, oppure produrre un solo tipo di MP, che si differenzia però chimicamente nei diversi stadi (Stamm *et al.*, 1978; Tellam, 1996a). Queste osservazioni suggeriscono che le pressioni evolutive operano per assicurare una corrispondenza fra il tipo di cibo ingerito e le caratteristiche della membrana.

Lo spessore totale delle MP di tipo II è generalmente compreso fra 0.1 e 2 μm , mentre le MP di tipo I raggiungono tipicamente uno spessore di 5-20 μm . Strutturalmente, la MP di tipo I può presentarsi simile a una rete aperta, sostenuta da un'impalcatura di microfibrille di chitina altamente ordinate in una tessitura esagonale od ortogonale. Il tipo di tessitura sembra essere in relazione a diversi fattori, quali la presenza di cibo nell'intestino e l'arrangiamento dei microvilli, che possono costituire lo stampo della membrana sovrastante (Peters, 1992). I precursori della MP di tipo I sono infatti secreti e si organizzano all'interno di una matrice fibrosa che si dispone intorno e sopra i microvilli delle cellule epiteliali intestinali, un processo questo che determina la porosità stessa della membrana (Ryerse *et al.*, 1992). La MP di tipo I è generalmente multistratificata (Figura 1.1) e può presentare delle zone differenziate al proprio interno, il cui significato fisiologico è ancora sconosciuto (Peters, 1992).

La MP di tipo II viene prodotta in modo continuativo e, dopo un periodo di distensione, costituisce un'unica struttura plurilaminare (Ryerse *et al.*, 1992) che decorre dalla zona di formazione (*cardia* o *proventricolo*), localizzata a livello della porzione distale dell'intestino anteriore, fino all'intestino posteriore. Nella zona di formazione, una ordinata serie di cellule secernenti produce i componenti della MP e determina le condizioni di un ambiente extracellulare specializzato nel quale questi si assemblano (Peters, 1992). A differenza del tipo I, la MP di tipo II è posizionata ad una certa distanza dalle cellule epiteliali intestinali, determinando la formazione di un più ampio spazio ectoperitrofico (Ryerse *et al.*, 1992). Una caratteristica interessante delle MP di diverse specie di ditteri è la presenza di uno strato elettrondenso adiacente al lume intestinale che può contenere substrutture simili a bastoncini, organizzate in uno o più strati e con funzione di controllo della permeabilità. I “bastoncini” possono assumere disposizioni ordinate, osservabili in sezioni tangenziali (Peters, 1992). La maggior parte degli insetti fino ad ora esaminati presentano una MP di tipo I, ad eccezione dei Diptera, Dermaptera, Embioidea e di alcune famiglie di Lepidoptera (Peters, 1992). Tra queste ultime, il lepidottero *Heliothis virescens* produce una tipica MP di tipo II, organizzata in due lamine separate da uno strato di matrice (Ryerse *et al.*, 1992) mentre il lepidottero *Bombyx mori* ha la peculiarità di secernere la membrana peritrofica sia da una zona specializzatae l'intestino anteriore che dall'intero epitelio dell'intestino medio (Wigglesworth, 1972; Ryerse *et al.*, 1992).

1.2 Ruolo della MP nella fisiologia intestinale

La MP esplica delle funzioni fondamentali nella fisiologia dell'intestino; infatti protegge meccanicamente l'epitelio dalle abrasioni dovute al contatto con nutrienti particolari e, grazie alla natura simile a un gel dovuta ai suoi componenti, esercita un'azione lubrificante che facilita il passaggio del cibo lungo il canale alimentare.

Alcune ipotesi sostengono che la presenza, l'assenza e forse anche il tipo stesso di MP siano da mettere in relazione con la carica batterica dei cibi ingeriti. A supporto di ciò vi è l'assenza della MP in insetti che si nutrono di liquidi con scarsa presenza di patogeni, come il sangue dei vertebrati o il nettare delle piante, e la sua presenza in insetti che si alimentano di liquidi contaminati con microrganismi, come pozze fangose.

La MP esercita anche una protezione di tipo chimico prendendo parte alla detossificazione ed escrezione di materiale nocivo, soprattutto negli erbivori. Per esempio, in *Schistocerca gregaria* oltre il 30% dei tannini potenzialmente tossici assunti con la dieta si legano alla MP e vengono poi escreti con essa. Inoltre, Abedi e Brown (1961) constatarono che *Aedes aegypti* sembrava resistere più di altre specie all'insetticida DDT grazie alla produzione di un quantitativo di MP fino a nove volte superiore a quello presente nelle zanzare non esposte all'insetticida. La MP ha anche importanti funzioni antiossidanti che permettono all'insetto di proteggersi da agenti ossidanti potenzialmente tossici presenti nella dieta.

Un'altra funzione di rilievo della membrana peritrofica è il controllo della distribuzione degli enzimi digestivi prodotti dalle cellule epiteliali intestinali. Questi attraversano la MP per digerire le macromolecole contenute nello spazio endoperitrofico, mentre i nutrienti che ne derivano si muovono nell'opposta direzione. La MP mantiene gli enzimi a una diversa concentrazione nei due ambienti endo- ed ectoperitrofico, garantendone la conservazione ed il ricircolo (Terra e Ferreira, 2005).

1.3 Permeabilità della MP e controllo degli insetti dannosi

Numerose funzioni della MP sono strettamente connesse alla sua permeabilità: la protezione contro le infezioni dovute a ingestione di agenti patogeni (Brandt *et al.*, 1978; Adang e Spence, 1983; Derksen e Granados, 1988); la compartimentazione del lume intestinale (Terra e Ferreira 2005); la difesa contro le sostanze tossiche delle piante (Bernays e Chamberlain, 1980; Bernays *et al.*, 1980, 1981; Barbehenn e Martin, 1992, 1994).

La membrana peritrofica è stata fin dall'inizio considerata un ultrafiltro (Wigglesworth, 1929) e sono stati condotti diversi studi per determinarne le caratteristiche di permeabilità. I "pori" che attraversano la MP sono in realtà canali acquosi complessi, immersi nel gel formato dai proteoglicani. I diametri dei "pori" della membrana sembrano essere differenti in specie diverse, ma non è chiaro se la estrema variabilità delle dimensioni dei "pori" determinata sperimentalmente rifletta delle differenze reali tra le specie o se debba piuttosto essere dovuta alle peculiarità e alle limitazioni delle diverse tecniche impiegate. Alcune metodiche si sono basate sulla quantificazione *in vitro* del

flusso di molecole marcate attraverso la membrana, oltre sulla misurazione diretta della grandezza dei pori della maglia chitinica in MP esaminate al microscopio elettronico.

La membrana peritrofica costituisce la prima barriera al passaggio di molecole dal lume intestinale all'emocele degli insetti e la possibilità di incrementarne la permeabilità potrebbe essere decisiva per il controllo degli insetti, favorendo il passaggio di tossine, pesticidi e patogeni. Negli ultimi anni notevole attenzione è stata rivolta al tentativo di aumentare la permeabilità della MP agendo o sulla matrice proteica o sulla maglia di chitina.

Le chitinasi sono proteine in grado di idrolizzare la chitina, attraverso un'interazione specifica con essa. L'idrolisi enzimatica avviene casualmente all'interno del polimero (endochitinasi) e i prodotti finali della catalisi sono macromolecole di GlcNAc solubili a basso peso molecolare (Reynolds e Samuels, 1996). Queste molecole diventano, a loro volta, i substrati di un altro tipo di enzima chitinolitico, la β -N-acetilglucosaminidasi (esochitinasi), che taglia le unità di GlcNAc in sequenza a partire dall'estremità non riducente della molecola (Fukamizo e Kramer, 1985).

Entrambe le attività enzimatiche sono state rinvenute sia in organismi contenenti chitina come insetti, crostacei, lieviti e funghi, sia in quelli che ne sono privi, quali batteri, piante e vertebrati. Nei batteri le chitinasi sono coinvolte nel processamento e nella digestione di macromolecole organiche contenenti GlcNAc, che vengono utilizzate come fonte di nutrienti. Nelle piante esse svolgono una funzione di difesa da organismi patogeni (Boller, 1987). Inoltre, alcuni tessuti verdi, che non esprimono normalmente l'enzima, possono mostrare attività chitinasica quando sono esposti a patogeni, insetti o altri tipi di stress (Lin *et al.*, 1995). Negli artropodi, le chitinasi sono coinvolte nel turnover della cuticola e nella digestione dei nutrienti. La loro produzione è infatti importante nel processo di eliminazione periodica del vecchio esoscheletro e della membrana peritrofica (Lehane, 1997). Le chitinasi sono state ritrovate nei fluidi di insetti in metamorfosi, nelle ghiandole del veleno e nell'intestino medio degli insetti (Terra *et al.*, 1996). Questi enzimi sono stati purificati anche dalla ghiandola del veleno della vespa *Chelonus* e dai fluidi e dal tegumento dei lepidotteri *Manduca sexta* e *Bombyx mori* in metamorfosi (Krishnan *et al.*, 1994).

Le caratteristiche chimiche e fisiche delle chitinasi sono state ben caratterizzate. Esse hanno peso di 40-85 kDa negli insetti, 25-40 kDa nelle piante e 20-60 kDa nei batteri. Gli enzimi chitinolitici sono attivi a valori di pH compresi fra 4 e 8 ed il loro punto isoelettrico può variare nell'intervallo 5-7 unità di pH. Le chitinasi sono caratterizzate dall'aver molti

siti di glicosilazione e dall'organizzazione in multidomini che comprende un dominio catalitico, un dominio di legame alla chitina ricco di glicina e un dominio di glicosilazione ricco di serine e treonine (Tellam, 1996b). Il dominio catalitico è fortemente conservato nei diversi organismi, compresi i funghi, i batteri e gli insetti.

Negli anni '70 del secolo scorso è stato osservato per la prima volta che le chitinasi erano in grado di perforare *in vitro* la membrana peritrofica dell'intestino medio degli insetti (Brandt *et al.*, 1978). Negli anni successivi, questi risultati sono stati confermati anche *in vivo*. Regev *et al.* (1996) hanno ottenuto risultati importanti utilizzando l'endochitinasi ricombinante ChiAII, codificata dal batterio *Serratia marcescens* e prodotta in *Escherichia coli*. Le membrane peritrofiche, isolate dal lepidottero *Spodoptera littoralis*, sono state incubate con concentrazioni crescenti di chitinasi (da 0.1 µg/ml a 10 µg/ml) per 30 minuti. L'osservazione dei campioni al microscopio elettronico a scansione ha evidenziato un'alterazione dose-dipendente delle MP, testimoniata dalla formazione di fori in numero e dimensioni progressivamente crescenti. La perforazione della membrana è stata confermata anche *in vivo*, analizzando MP isolate da larve alimentate con una dieta contenente ChiAII.

Le alterazioni strutturali indotte dalla chitinasi sulla membrana peritrofica hanno fatto ipotizzare che questo enzima possa favorire la penetrazione di sostanze tossiche o parassiti all'interno dell'organismo target. Ciò ha favorito ricerche che prevedono un suo utilizzo come possibile bioinsetticida.

Studi svolti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che la chitinasi ricombinante codificata dal virus della nucleopoliedrosi di *Autographa californica* (AcMNPVChiA) produce perforazioni della MP larvale di *B. mori* con un effetto dose-dipendente. Infatti il numero e le dimensioni delle lesioni sulla membrana aumentano all'aumentare della concentrazione dell'enzima. Si è inoltre osservato che l'alterazione strutturale della MP è associata ad un incremento significativo della sua permeabilità sia al colorante blu di metilene (320 Da), che al piccolo neuropeptide proctolin (649 Da) (Rao *et al.*, 2004). L'azione di questa chitinasi è stata anche osservata *in vivo*: larve alimentate con dieta contenente ChiA per tutta la durata della quinta età larvale mostravano una maggiore percentuale di mortalità rispetto alle larve di controllo, e in quelle trattate con una dose sub-letale dell'enzima si osserva un peso inferiore e un prolungamento della fase larvale. Anche l'alterazione dei parametri nutrizionali in seguito a somministrazione di ChiA è compatibile con una alterata compartimentazione degli enzimi digestivi (Rao *et al.*, 2004).

2. La larva di *Bombyx mori*: un modello per lo studio della fisiologia del trasporto di molecole nell'epitelio intestinale insetto delle larve di Lepidottero

Un ottimo modello sperimentale per lo studio della permeabilità dell'intestino larvale di lepidottero è il *Bombyx mori* perchè l'intestino costituisce fino al 50% del peso corporeo delle larve e raggiunge in V età larvale dimensioni tali da poter essere facilmente isolato e usato a fini sperimentali.



Figura 2.1: Larva di *Bombyx mori*

Inoltre le caratteristiche biochimiche, fisiologiche e genetiche di questo insetto sono ampiamente caratterizzate.

2.1 Architettura dell'epitelio e della giunzione settata.

Nelle larve di *B. mori*, come in altri lepidotteri, l'intestino è suddiviso in tre porzioni: il tratto anteriore, breve e di origine ectodermica; il tratto medio, ampio, rettilineo dove avvengono digestione ed assorbimento delle sostanze nutritive, di origine endodermica; il tratto posteriore, breve e di origine ectodermica.

L'intestino medio può a sua volta essere diviso in tre parti: anteriore, intermedia e posteriore. Ogni regione è identificabile per la morfologia, per il grado di ripiegamento dell'epitelio e per le proprietà funzionali. Infatti le tre regioni sono caratterizzate da una differente distribuzione degli enzimi digestivi (Terra e Ferreira, 1994) e di alcune proteine di trasporto deputate all'assorbimento degli amminoacidi (Giordana *et al.*, 1998).

L'epitelio dell'intestino medio è monostratificato ed è costituito prevalentemente da tre tipi cellulari, che si distinguono per morfologia e funzione: le cellule staminali, le cellule colonnari e le cellule a coppa (Cioffi, 1979; Baldwin and Hakim, 1991). Numerose cellule endocrine sono interposte tra le cellule colonnari e quelle a coppa. Le cellule staminali hanno forma tondeggianti e si trovano raggruppate in piccoli nidi alla base dell'epitelio; sono cellule indifferenziate che possono dare origine sia alle cellule colonnari sia alle cellule a coppa. Prima di ogni muta, le cellule staminali aumentano notevolmente di numero in seguito ad un picco di ecdisteroidi (Baldwin e Hakim, 1991). Le cellule colonnari sono le più numerose, in rapporto 5:1 con le cellule a coppa (Baldwin e Hakim, 1991). Le cellule colonnari e le cellule a coppa nella regione antero-intermedia e in quella posteriore dell'intestino presentano sia differenze strutturali (Cioffi, 1979; Santos *et al.*, 1984) (Figura 2.2) che funzionali (Giordana *et al.*, 1998).

Le cellule colonnari sono cellule cilindriche la cui membrana apicale si ripiega in estroflessioni, i microvilli, che formano un orletto a spazzola rivolto verso il lume, quella basale presenta ampie invaginazioni a cui sono associati numerosi mitocondri. Va però osservato che la parte apicale dei microvilli delle cellule colonnari del tratto antero-intermedio dà origine a vescicole che vengono riversate nel lume, fenomeno che non è presente nella regione posteriore, dove i microvilli appaiono più numerosi.

Le cellule a coppa del tratto antero-intermedio presentano una cavità ampia che si spinge fino al polo basale della cellula, dovuta all'introflessione della membrana apicale e caratterizzata da microvilli irregolari. All'interno di ogni microvillo si trova un mitocondrio. Questi microvilli, verso l'apice della cavità, diventano più brevi, privi di mitocondri e si dispongono in modo da creare una valvola apicale che chiude la cavità delle cellule a coppa. Nella regione posteriore, le cellule a coppa possiedono una cavità più ridotta che occupa solo la metà superiore della cellula e non sono presenti mitocondri nei microvilli.

Nella porzione apicale delle cellule colonnari è presente un abbondante reticolo endoplasmatico ruvido, il complesso di Golgi, numerosi granuli di glicogeno e pochi mitocondri. La maggior parte dei mitocondri si trova infatti in posizione basale. Le cisterne

del reticolo endoplasmico sono spesso dilatate, specialmente nella regione posteriore dell'intestino medio. Il nucleo è situato nella parte centrale della cellula e le invaginazioni della membrana basale penetrano nella cellula fino a livello del nucleo. Nella regione antero-intermedia numerosi mitocondri sono associati a queste invaginazioni e nessun altro organello è presente in questa regione della cellula. Il citoplasma della regione basale delle cellule colonnari della regione posteriore contiene invece, oltre ai mitocondri, anche il complesso di Golgi, granuli di glicogeno e il reticolo endoplasmico ruvido

Nella regione intermedia dell'intestino medio le cellule colonnari contengono numerose vescicole del diametro di 0.5-1 μm , che non sono presenti nella porzione anteriore e sono meno numerose in quella posteriore. Al microscopio elettronico il contenuto di queste vescicole appare omogeneo e debolmente elettrondenso. Le cellule colonnari della regione anteriore contengono numerose vescicole prodotte dal complesso di Golgi contenenti materiale elettrondenso, particolarmente numerose nella regione apicale delle cellule. Nella regione posteriore, l'apparato di Golgi dà origine a vescicole di dimensioni maggiori rispetto a quelle presenti nella regione anteriore e contengono materiale elettrondenso. Nella regione intermedia, le cellule colonnari contengono nella loro regione apicale sia vescicole di dimensioni minori contenenti materiale elettrondenso sia vescicole più grandi con contenuto non elettrondenso (Cioffi 1979).

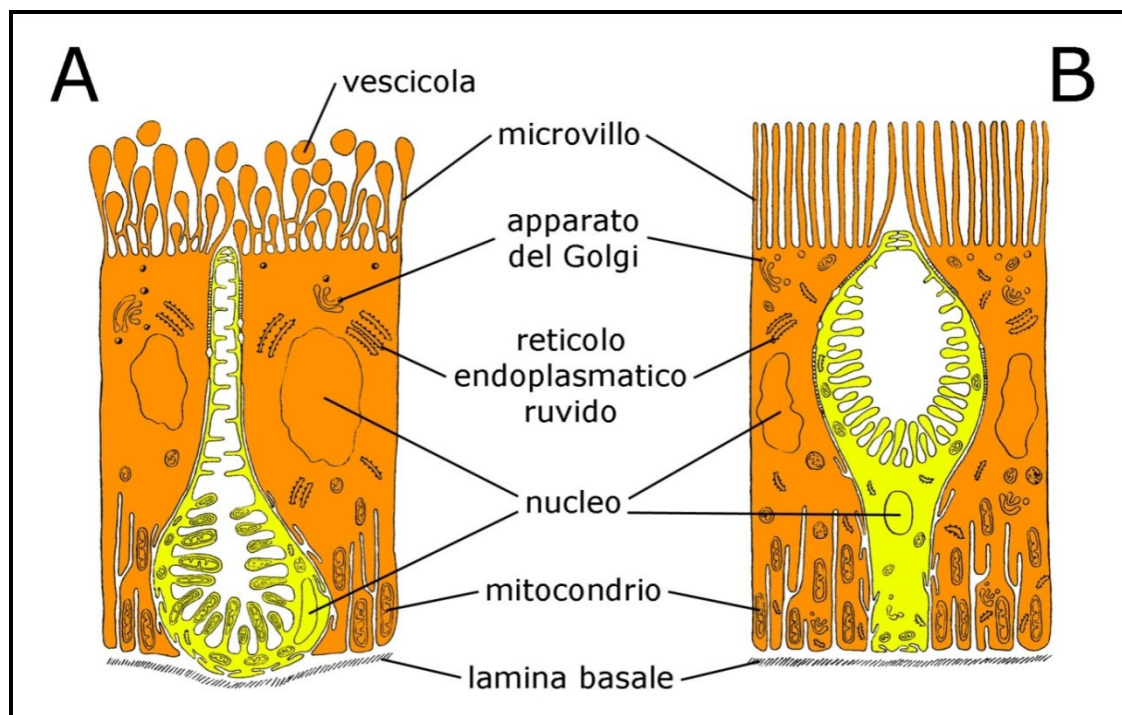


Figura 2.2: Differenze morfologiche tra le cellule della regione antero-intermedia (A) e posteriore (B) dell'intestino medio di lepidottero. Le figure rappresentano una cellula a coppa (in giallo) tra due colonnari (in arancione). (modificato da Cioffi, 1979)

Nell'epitelio intestinale degli insetti, come in quello dei vertebrati, le cellule sono connesse tra loro da strutture giunzionali. Le giunzioni possono essere classificate dal punto di vista funzionale in:

- giunzioni occludenti: saldano le cellule di un epitelio in modo da regolare il passaggio di molecole da un lato all'altro del foglietto epiteliale attraverso la via paracellulare e prendono il nome di giunzioni strette o *tight junction* (TJ) nei vertebrati e di giunzioni settate o *septate junction* (SJ) negli invertebrati;
- giunzioni di ancoraggio: mantengono meccanicamente unite le cellule alle loro vicine o alla matrice extracellulare (giunzioni aderenti, desmosomi, adesioni focali e emidesmosomi);
- giunzioni comunicanti: mediano il passaggio di segnali chimici o elettrici da una cellula a quella vicina.

Le giunzioni occludenti sono di particolare interesse ai fini dello studio presentato in questa tesi, perché sono coinvolte nella funzione barriera dell'epitelio e possono regolare selettivamente il passaggio di ioni e molecole dal lume intestinale all'ambiente interno

dell'organismo. Negli insetti sono state individuate due tipi di giunzioni settate: le giunzioni di tipo *pleated* (SJp) e quelle di tipo *smooth* (SJs) (Flower e Filshie, 1975; Noirot e Noirot-Timothèe, 1998) (Figura 2.3). In entrambi i tipi di giunzione lo spazio intercellulare è diviso da setti più o meno regolari ed è largo circa 15 nm. A parte qualche eccezione, le SJp sono principalmente associate ad epitelii di origine ectodermica, quali l'epidermide e le trachee, mentre le SJs sono associate ad epitelii di origine endodermica, come gli epitelii intestinali e i tubuli malpighiani. Inoltre, mentre le SJp si presentano sempre anastomizzate e ramificate, con setti ben visibili, le SJs, dette anche continue, non si mostrano mai anastomizzate e i setti non sono evidenti se non dopo impregnazione con lantanio (Noirot e Noirot-Timothèe, 1998).

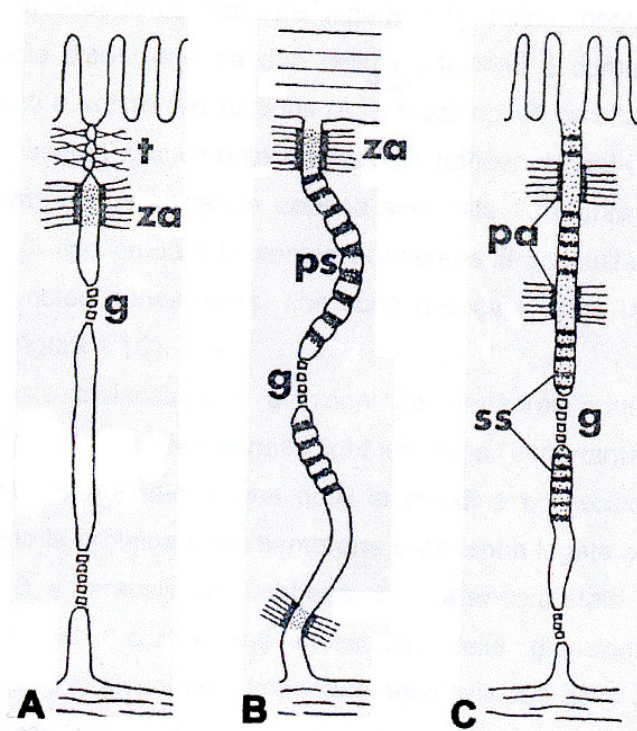


Figura 2.3: Giunzioni presenti in un epitelio monostratificato di vertebrato (A) e di insetto (B e C). t, tight junction; ps, giunzioni settate di tipo pleated; ss, giunzioni settate di tipo smooth; za, zonula adherens; pa, punctae adherentes; g, giunzioni comunicanti. Modificato da Noirot e Noirot-Timothèe, 1998.

Intercalate alle SJ si trovano le giunzioni comunicanti o *gap junctions* (Lane e Dilworth, 1989) che, come nei vertebrati, permettono la comunicazione tra due cellule contigue, consentendo il passaggio di ioni e piccole molecole organiche direttamente dal citoplasma di una cellula al citoplasma dell'altra. La funzione di adesione è invece garantita dalle giunzioni aderenti o *adhaerens junctions*. Negli epiteli con giunzioni settate di tipo *pleated* esse sono rappresentate da una *zonula adhaerens*, analoga a quella che nei vertebrati è posizionata immediatamente al di sotto della TJ, la quale è localizzata nella porzione apicale della membrana laterale di due cellule adiacenti. Negli epiteli con giunzioni settate di tipo *smooth* la *zonula adhaerens* è sostituita da zone d'adesione puntiformi, le *punctae adhaerentes*. Le giunzioni settate sono molto più estese delle TJ e si estendono fino ai 2/3 della lunghezza della membrana laterale.

Studi di tipo genetico-molecolare, finalizzati ad evidenziare alcuni geni importanti per lo sviluppo delle SJp in *Drosophila melanogaster*, hanno permesso di individuare diverse componenti proteiche omologhe a quelle presenti nella giunzione occludente dei vertebrati, alcune delle quali giocano un ruolo chiave nel determinare le proprietà strutturali e funzionali delle giunzioni (Tepass *et al.*, 2001). Due importanti componenti delle SJ di *Drosophila* omologhe a proteine presenti nella TJ sono le proteine coracle (Cor) e neurexin-IV (Nrx-IV). Esse sono in stretta associazione e sembrano determinare sia la struttura che la funzione della giunzione stessa. Nrx-IV, in particolare, è ritenuta una componente strutturale fondamentale delle SJ: embrioni che presentano mutazioni in questa proteina mostrano una disgregazione della giunzione (Tepass *et al.*, 2001). Localizzate alla periferia della giunzione settata sono invece le Dlg; queste proteine sono importanti nel determinare l'ultrastruttura e la polarità cellulare (Woods *et al.*, 1996) e costituiscono un'impalcatura sulla quale si inseriscono Cor e Nrx-IV durante la formazione della giunzione stessa. In *Drosophila*, sono state identificate altre proteine omologhe a quelle presenti nelle TJ dei vertebrati, alcune delle quali coinvolte nell'assemblaggio della giunzione, come la proteina Pyd/ZO-1, che è del tutto simile alla proteina ZO-1 dei mammiferi, e le proteine del complesso BAZ/PAR-3 (Tepass *et al.*, 2001).

Le due importanti proteine che nelle TJ svolgono la principale funzione occludente, sono la claudina e l'occludina. Nelle SJ non è stata identificata nessuna proteina omologa all'occludina (Tepass *et al.*, 2001), mentre sono state individuate due proteine claudino-simili, la megatrachea (Mega) (Behr *et al.*, 2003) e la sinuous (Sinu) (Wu *et al.*, 2004). Entrambe le proteine sono deputate a svolgere il ruolo di barriera e a determinare le caratteristiche di selettività della SJ. La Mega, in particolare, assolve questa funzione

interagendo con il complesso Cor-Nrx-IV. Poiché Cor è omologa alle proteine di membrana che nei vertebrati sono connesse al citoscheletro, si può supporre che Cor e Nrx-IV abbiano un ruolo nella connessione tra le componenti delle SJ e quelle citoscheletriche (Behr *et al.*, 2003).

Nei vertebrati, il citoscheletro connesso alle giunzioni aderenti e occludenti presenti negli epitelii assorbenti costituisce una struttura a rete definita “terminal web”, costituita da un anello di filamenti che decorre parallelamente alla superficie luminale immediatamente al di sotto dell’orletto a spazzola. Poiché il “terminal web” è costituito prevalentemente da filamenti di actina e da miosina tra loro interconnessi, esso viene anche denominato *anello perigiunzionale acto-miosinico*.

Nel 1988 è stato dimostrato che anche le SJ degli insetti sono in contatto con elementi citoscheletrici, rappresentati da filamenti actino-simili (Lane e Flores, 1988). In seguito, è stato evidenziato che i filamenti actinici, abbondantemente presenti nei microvilli e nella porzione del citoplasma immediatamente sottostante, da qui discendono profondamente nella cellula decorrendo parallelamente tra loro. I filamenti tendono a piegarsi verso la membrana laterale, prendendo contatto con essa a livello della struttura giunzionale (Dallai *et al.*, 1998). In corrispondenza del punto di intersezione dei filamenti di actina sulla membrana, sono stati individuati degli allineamenti di particelle intramembranali (Intra Membraneous Particles, IMP). Le IMP, da una parte sono ancorate ai filamenti di actina (Dallai *et al.*, 1998), e dall’altra fanno da ancoraggio ai setti (Kukulies e Komnick, 1983). A prima vista, sembra che l’actina entri in contatto diretto con le IMP della giunzione (Dallai *et al.*, 1998), ma non si può escludere l’intermediazione di proteine, quali l’ α -actinina e la vinculina (Colombo *et al.*, 1993), o la spectrina (Bonfanti *et al.*, 1992). È stato dimostrato che agenti in grado di alterare l’organizzazione dell’actina, come la citocalasina D, danneggiano notevolmente l’organizzazione delle IMP e dell’intera giunzione settata (Lane e Flores, 1988, 1990). Questi risultati dimostrano che negli insetti, come nei vertebrati, l’actina svolge un ruolo molto importante nel mantenere l’organizzazione dell’apparato giunzionale, e suggeriscono che la permeabilità della SJ potrebbe essere modulata agendo proprio a livello del citoscheletro associato alla giunzione. L’effettiva presenza della miosina associata all’actina nel citoscheletro in contatto con le SJ non è ancora del tutto chiarita: una proteina miosino-simile è stata identificata in *Manduca sexta* (Bonfanti *et al.*, 1992), ma niente è ancora noto su come questa proteina interagisca con l’actina.

2.2 Proprietà funzionali e vie di permeazione nell'intestino medio. Via cellulare

L'epitelio intestinale svolge la funzione di barriera fisica e di superficie deputata allo scambio selettivo di molecole tra l'ambiente esterno e quello interno dell'organismo. La membrana apicale e quella basolaterale delle cellule epiteliali così come il complesso giunzionale che mantiene unite tra loro due cellule adiacenti sono coinvolti in queste importanti funzioni.

Gli ioni e le molecole organiche di piccole dimensioni possono attraversare la barriera intestinale attraverso la via paracellulare o la via transcellulare. Il passaggio di molecole attraverso la via paracellulare, il canale acquoso delimitato dalle membrane laterali di due cellule adiacenti, è regolato dalla permeabilità delle giunzioni settate. Il movimento attraverso la via transcellulare è invece dipendente dall'asimmetrica distribuzione di proteine di trasporto e di canali sulla membrana apicale e basolaterale delle cellule epiteliali assorbenti. Come discusso nei prossimi tre sottoparagrafi, un passaggio cruciale di ioni, amminoacidi e proteine ha luogo seguendo la via cellulare.

2.2.1 Secrezione di potassio e assorbimento di amminoacidi

Le cellule colonnari hanno il compito di sintetizzare gli enzimi digestivi e secerne nel lume intestinale (Terra e Ferreira, 1994) e di assorbire le sostanze nutritive (Giordana *et al.*, 1998; Leonardi *et al.*, 1998; Casartelli *et al.*, 2001).

L'attività delle cellule a coppa, cellule specializzate peculiari dello stadio larvale dei lepidotteri, determina alcune particolari proprietà funzionali dell'intero epitelio intestinale: a livello della membrana apicale di queste cellule sono presenti una pompa protonica (Wieczorek *et al.*, 1989) con caratteristiche simili a quella presente nel tonoplasto delle cellule vegetali e in organuli cellulari come i lisosomi, definita perciò ATPasi vacuolare o V-ATPasi, e un antiporto $K^+/2H^+$ (Azuma *et al.*, 1995). La pompa protonica trasloca H^+ nella cavità delle cellule a coppa determinando un accumulo localizzato di protoni. Il gradiente di protoni diretto dalla cavità all'interno della cellula viene utilizzato dall'antiporto $K^+/2H^+$ per trasportare lo ione potassio contro gradiente dal citoplasma della cellula a coppa verso la sua cavità. L'effetto dei due processi combinati è l'estrusione di

potassio dall'emolinfa al lume intestinale, come per la prima volta osservato da Harvey e Nedergaard (1964), mentre il protone è utilizzato solo per una ricircolazione cellula-cavità della cellula a coppa (Figura 2.4).

Le attività della pompa protonica vacuolare e dell'antiporto $K^+/2H^+$ sono responsabili sia dell'elevata differenza di potenziale elettrico transmembrana presente a livello della membrana apicale delle cellule colonnari di circa 150 mV (Moffett e Koch, 1992), sia dell'elevata concentrazione di potassio nel lume intestinale, che insieme generano un gradiente elettrochimico favorevole all'ingresso di potassio cellula nella cellula colonnare attraverso l'orletto a spazzola. Il gradiente di potassio promuove il trasporto controgradiente dal lume alla cellula di diverse categorie di aminoacidi, mediato da specifici cotrasportatori K^+ /amminoacidi (Giordana e Parenti 1994; Giordana *et al.*, 1998; Casartelli *et al.*, 2001) (Figura 2.4).

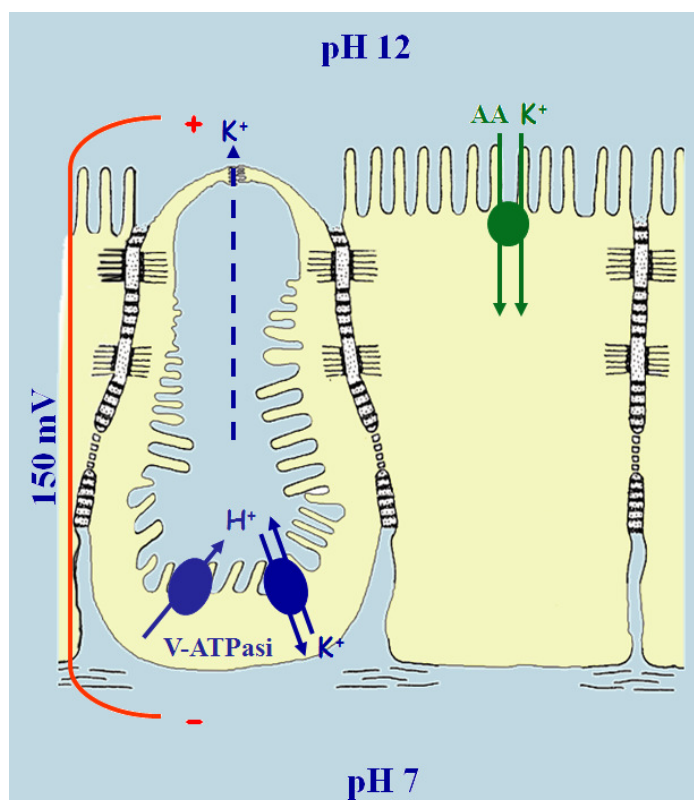


Figura 2.4: Rappresentazione schematica delle cellule a coppa e colonnari che costituiscono l'epitelio intestinale delle larve di lepidottero, in cui sono indicate alcune proteine di trasporto (la V H^+ -ATPasi, l'antiporto $K^+/2H^+$, il cotrasportatore K^+ -amminoacido).

2.2.2 Alcalinizzazione del lume intestinale

La pompa protonica e l'antiporto $K^+/2H^+$ sembrano implicati anche nell'alcalinizzazione del lume intestinale (Azuma *et al.*, 1995). Il pH del contenuto luminale raggiunge valori estremamente elevati lungo l'intera estensione dell'intestino medio (Dow, 1984; Moffett e Cummings, 1994) ed in particolare nel tratto antero-intermedio, dove sono stati misurati valori di pH pari a 12 unità (Dow, 1984; Moriyama *et al.*, 1984).

L'intestino rappresenta il punto di contatto tra la larva e il cibo introdotto dall'ambiente in cui vive e, come messo in evidenza da Appel (1994), esso è responsabile della complessa strategia volta a ridurre la tossicità delle sostanze allelochimiche contenute nelle foglie, a limitare le infezioni causate da batteri ed ad ottimizzare l'estrazione di nutrienti dal cibo ingerito. Il pH fortemente alcalino del lume intestinale sembra essere una delle caratteristiche chimico-fisiche che, insieme alla capacità ossidoriduttiva del lume intestinale (Appel e Martin, 1990), contribuisce a questo importante scopo. In particolare il pH alcalino del lume aumenta la solubilità delle proteine fogliari (Appel e Maynes, 1995; Felton e Duffey, 1991), incrementa l'efficienza dell'estrazione dei nutrienti dalle foglie e l'utilizzo degli amminoacidi contenuti nella dieta (Felton *et al.*, 1989).

2.2.3 Assorbimento di proteine

Le diverse proteine di trasporto e i canali espressi sulle membrane plasmatiche delle cellule assorbenti sono deputati al passaggio di molecole polari relativamente piccole e di ioni, mentre per assorbire macromolecole, ad esempio le proteine, la cellula utilizza il meccanismo della transitosi. Questo sistema di trasporto sfrutta il traffico di membrana al polo apicale e basale delle cellule per internalizzare ed esocitare le molecole (Mostov *et al.*, 2000) e consiste, essenzialmente, di tre fasi:

- 1) la macromolecola viene endocitata ad un polo della cellula mediante la formazione, a livello di particolari regioni della membrana plasmatica, di invaginazioni che daranno origine a vescicole di endocitosi;

2) la vescicola endocitotica migra nel citoplasma seguendo un preciso percorso intracellulare e si fonde con il dominio di membrana opposto rispetto a quello in cui si è formata;

3) il contenuto della vescicola viene esocitato inalterato all'altro polo della cellula.

Dai primi studi di Palade nel 1953, il fenomeno della transcitosi è stato ampiamente studiato in mammifero, dimostrando che si tratta di un meccanismo di trasporto diffuso negli epitelii, ma non esclusivo delle cellule polarizzate (Tuma e Hubbard, 2003).

Negli ultimi anni l'assorbimento intestinale delle proteine è stato osservato anche in insetto; infatti diversi studi hanno dimostrato che proteine somministrate oralmente possono raggiungere l'emocele conservando inalterata la propria attività biologica (Jeffers e Roe, 2008). Nel nostro laboratorio è stato dimostrato, utilizzando l'intestino larvale di *B. mori* montato in un opportuno apparato di perfusione, che anche in insetto il meccanismo coinvolto nell'assorbimento delle proteine è la transcitosi (Casartelli *et al.*, 2005, 2007). Inoltre, per l'albumina, una delle proteine utilizzate in questi studi, è stato anche identificato il recettore coinvolto nel processo di endocitosi a livello della membrana apicale delle cellule colonnari (Casartelli *et al.*, 2008). In questo studio sono state utilizzate cellule colonnari in coltura, ottenute dal differenziamento *in vitro* delle cellule staminali isolate dal tessuto intestinale larvale (Cermenati *et al.*, 2007).

2.3 Via paracellulare e controllo degli insetti dannosi

Come detto, oltre alla via transcellulare, le molecole e gli ioni possono attraversare l'intestino attraverso la via paracellulare, la cui permeabilità è determinata dalle giunzioni. Questo percorso è seguito sia dagli ioni che dalle piccole molecole organiche come i peptidi. L'efficacia di piccole molecole organiche ad attività insetticida somministrate oralmente e con target emocelico è strettamente correlata alla loro capacità di superare l'epitelio intestinale. Il canale acquoso delimitato dalle membrane laterali di due cellule adiacenti, il cui raggio è selettivamente modulato dalla giunzione occludente, può rappresentare un'interessante via per il passaggio di queste molecole biologicamente attive. Come dimostrato dagli studi in mammifero finalizzati alla somministrazione di farmaci (Salama *et al.*, 2006; Deli, 2009), la via paracellulare è priva di enzimi proteolitici e

diverse molecole possono agire da agenti permeabilizzanti (Cano-Cebrian *et al.*, 2005; Deli, 2009). Per questa ragione sono particolarmente necessari studi funzionali sulla permeabilità della giunzione settata dell'intestino medio degli insetti, al fine di identificare adeguate strategie per aumentare il passaggio di specifiche molecole tossiche attraverso questa via.

2.3.1 Gli studi sulla permeabilità della SJ

Mentre la permeabilità della TJ dei vertebrati è stata ampiamente caratterizzata, pochi sono gli studi in letteratura che riportano dati sulle proprietà funzionali della giunzione settata di insetto e sul suo ruolo nella permeazione di ioni e piccole molecole organiche. Nell'epitelio rettale delle larve di *Aeshna cyanea* gli ioni lantanio (La^{3+} , 138,905 uma) non sono in grado di penetrare per l'intera lunghezza le SJp, indicando che queste giunzioni sono in grado di occludere il passaggio attraverso la via paracellulare (Kukulies e Komnick, 1983). Anche le SJp presenti tra le cellule UMBGE-4, una linea cellulare derivata dall'epidermide di *Blatella germanica*, non permettono la diffusione del lantanio attraverso la via paracellulare (Reise Suosa *et al.*, 1993). Al contrario, nell'intestino anteriore di *Schistocerca gregaria*, la SJs permette il passaggio di grosse molecole organiche quali l'inulina (Zhu *et al.*, 2001).

Nel 1987, Skaer *et al.* hanno studiato la permeabilità della giunzione settata dei tubuli malpighiani di *Rhodnius prolixus* a molecole che differivano per grandezza, conformazione e carica (La^{3+} , saccarosio, glicole polietilenico o PEG), concludendo che la SJs di questo epitelio è permeabile a una grande varietà di composti, anche di peso molecolare elevato, analogamente a quanto si osserva per la TJ degli epiteli a bassa resistenza elettrica come l'intestino di mammifero. Gli autori di questo studio propongono due possibili spiegazioni dell'elevata permeabilità delle SJs dei tubuli malpighiani. La prima è che i setti non siano strutture continue, ma piuttosto strutture dotate di fenestrature che permettono il passaggio anche di molecole ad alto peso molecolare. La seconda spiegazione si basa su un modello funzionale che gli stessi autori propongono: la giunzione è strutturata come la rampa di un parcheggio multilivello, e gli ioni e le molecole attraversano la via paracellulare percorrendo questa rampa (Figura 2.5).

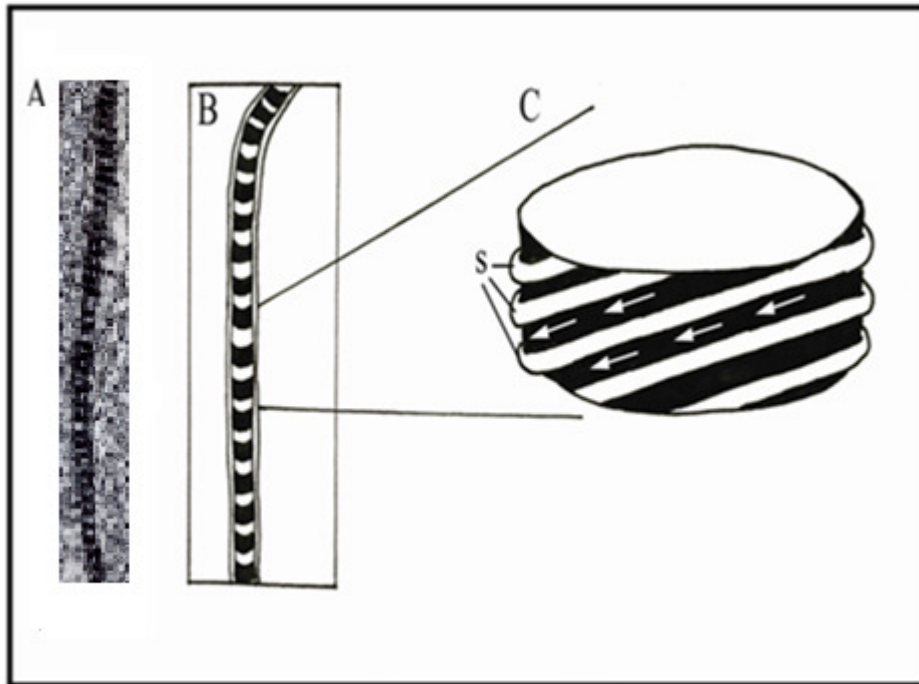


Figura 2.5: Modello ipotetico del passaggio di ioni e molecole attraverso la SJs nei tubuli malpighiani secondo Skaer *et al.* (1987). **A:** foto in microscopia elettronica; **B:** rappresentazione schematica della giunzione settata; **C:** disposizione dei setti (s) e via di permeazione dei soluti.

Alcune evidenze suggeriscono quindi che la via paracellulare di insetto possa essere più permeabile a molecole di notevole peso molecolare di quanto non lo sia la TJ. Alcuni autori (Lane e Flores, 1988) hanno anche ipotizzato che le giunzioni settate abbiano in realtà un ruolo importante nel mantenere adese due cellule vicine piuttosto che avere la stessa funzione occludente delle TJ di vertebrato. Dieci anni più tardi, però, Noiroi e Noiroi-Timotheé (1998) hanno riaperto il dibattito sulla funzione delle SJs e sono arrivati alla conclusione che la loro principale funzione è quella occludente, mentre quella di adesione è solo secondaria. Questi autori suggeriscono che sia il numero e la disposizione dei setti a determinare l'elevata o la ridotta permeabilità della SJ, la quale, però, è comunque meno efficiente nell'occludere la via paracellulare rispetto alla TJ di mammifero e quindi necessita di una maggiore estensione per produrre un'adeguata chiusura di questa via di passaggio.

Nel nostro laboratorio si sono intrapresi studi funzionali volti a caratterizzare la permeabilità paracellulare dell'intestino larvale di *B. mori* isolato e montato nella camera di Ussing (Fiandra *et al.*, 2006). Misurando i potenziali di diffusione generati a cavallo

dell'intestino larvale da gradienti di diversi sali (KCl, NaCl, (TMA)Cl, KGluconato e NaGluconato), si è osservato che la giunzione presenta cariche negative deboli, dato che permette la rapida diffusione dei cationi ma esclude solo parzialmente il passaggio di piccoli anioni come il cloro. La permeabilità della giunzione ai cationi è comunque inversamente correlata alla loro dimensione (valutata come raggio dello ione idratato): il potassio permea maggiormente rispetto allo ione sodio e quest'ultimo è molto più permeabile del tetrametilammonio. La capacità della giunzione settata di discriminare gli ioni sulla base della loro dimensione è confermata anche dalla ridottissima permeabilità della via paracellulare al grosso anione gluconato. Al contrario, nei tubuli Malpighiani di *Aedes aegypti*, dove ha luogo la secrezione passiva di ioni Cl^- attraverso la via paracellulare (Yu e Beyenbach, 2001, 2002), le giunzioni settate sono scarsamente permeabili ai cationi e presentano, perciò, parziali cariche positive (Williams e Beyenbach, 1984). E' chiaro, quindi, che la struttura molecolare della SJ varia a seconda della funzione specifica dell'epitelio considerato.

È possibile ottenere una stima della permeabilità agli ioni della via paracellulare delle barriere epiteliali eseguendo misurazioni elettrofisiologiche della resistenza elettrica transepiteliale (R_t). Nell'epitelio intestinale delle larve di *B. mori* è stato calcolato il valore di R_t , che, in presenza di una concentrazione extracellulare di Ca^{2+} pari a 1 mM, è di $28.2 \pm 2.1 \Omega\text{cm}^2$ (media \pm E.S. di 12 misurazioni) (Fiandra *et al.*, 2006). Questo valore definisce che questo epitelio intestinale rientra nella categoria degli epiteli a bassa resistenza: la differenza di potenziale elettrico transepiteliale estremamente elevata (150 mV, lume positivo) è interamente dovuta all'attività elettrogenica della V- H^+ ATPasi presente sulla membrana apicale delle cellule a coppa, come descritto nel paragrafo 2.2.1.

La R_t è la risultante della somma della resistenza cellulare (R_c), dovuta alla restrizione imposta dalle membrane plasmatiche apicale e basolaterale al passaggio degli ioni, e della resistenza paracellulare o di shunt (R_{sh}), indice della permeabilità della via paracellulare agli ioni, disposte in parallelo tra loro. In accordo con il modello teorico elaborato da Pannabecker *et al.* (1992) e con i dati sperimentali da loro ottenuti per i tubuli Malpighiani di *Aedes aegypti*, negli epiteli caratterizzati dalla presenza di una pompa fortemente elettrogenica, l'inibizione della stessa provoca un forte incremento della R_c , e la R_t può essere considerata equivalente alla R_{sh} . Sulla base di questo modello, grazie alla inibizione della pompa elettrogenica V- H^+ ATPasi tramite l'eliminazione dello ione potassio nei fluidi di perfusione, è stato possibile misurare la R_{sh} dell'intestino larvale di *B. mori*. La resistenza elettrica della via paracellulare è pari a $61.9 \pm 4.4 \Omega\text{cm}^2$ (media \pm E.S.

di 14 misurazioni) (Fiandra *et al.*, 2006). La possibilità di misurare questo parametro è di grande utilità per gli studi sulla permeabilità della via paracellulare e per valutare l'eventuale modulazione indotta da agenti permeabilizzanti.

La Figura 2.6 riporta il circuito elettrico equivalente dell'epitelio intestinale delle larve di *B. mori*.

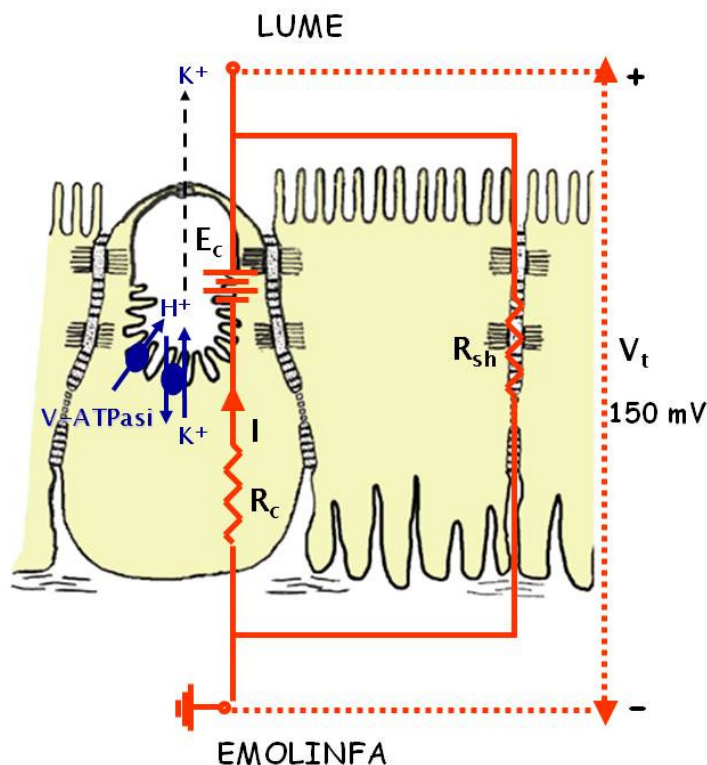


Figura 2.6: Modello elettrico equivalente dell'epitelio intestinale, le cui componenti sono: la forza elettromotrice (E_c), determinata dall'attività della V-ATPasi, l'intensità di corrente (I) portata dalle cariche in movimento, la resistenza elettrica cellulare (R_c), che è quella imposta dalla membrane cellulari al passaggio degli ioni, e la resistenza paracellulare o di shunt (R_{sh}), indice della permeabilità della via paracellulare agli ioni. La R_c e la R_{sh} , tra loro in parallelo, costituiscono la resistenza transepiteliale. Il potenziale elettrico transepiteliale è indicato con V_t .

La selettività della SJs è stata ulteriormente analizzata nell'epitelio isolato in camere di Ussing, misurando il flusso delle seguenti molecole: PEG 4000 (4000 Da), molecola molto utilizzata negli studi di permeabilità della via paracellulare, il saccarosio (342 Da) e la fluoresceina (332 Da) (Fiandra *et al.*, 2009). Quest'ultima molecola, al valore di pH della soluzione luminale utilizzata in questi esperimenti (pH 10) è un di-anione, mentre

PEG e saccarosio sono molecole neutre. Tutte queste molecole organiche non sono in grado di superare l'epitelio attraverso la via transcellulare e sono quindi utili per valutare la permeabilità della via paracellulare. Dal valore di flusso è stato calcolato il coefficiente di permeabilità apparente (P_{app}) delle tre molecole ed è emerso che il saccarosio presenta un P_{app} molto maggiore rispetto a quello del PEG 4000, in accordo con il loro differente peso molecolare; la fluoresceina ha invece un valore di P_{app} ridotto e minore di quello del saccarosio, sebbene queste due molecole abbiano un peso molecolare non così diverso. D'altra parte la fluoresceina possiede due cariche negative e questo risultato conferma che la SJs dell'epitelio intestinale di *B. mori* presenta cariche negative, come osservato in precedenza (Fiandra *et al.*, 2006). È quindi possibile affermare che la via paracellulare delle larve di lepidottero è fortemente selettiva rispetto alla dimensione e alla carica della molecola permeante.

2.3.2 Modulazione fisiologica della permeabilità della via paracellulare

Molti studi condotti in mammifero hanno indagato il funzionamento della TJ, utilizzando il valore di R_{sh} come parametro utile per valutarne la possibile modulazione (Madara *et al.*, 1986; Perez *et al.*, 1997; Karczewski e Groot, 2000). In insetto, studi elettrofisiologici eseguiti nel 1992 sui tubuli Malpighiani di *Aedes aegypti* hanno messo per la prima volta in evidenza che anche la giunzione settata può essere modulata (Pannabecker *et al.*, 1992). Gli autori hanno dimostrato che il neuropeptide leucochinina VIII determina una riduzione significativa della R_{sh} , con un conseguente aumento della secrezione di Cl^- attraverso la via paracellulare.

Studi successivi (Yu e Beyenbach, 2002) hanno dimostrato che la leucochinina determina l'aumento della permeabilità della via paracellulare attivando un percorso intracellulare che porta ad un aumento della concentrazione citosolica di calcio. Questo ione, così come l'adenosinmonofosfato ciclico (cAMP), sono due modulatori intracellulari della permeabilità anche della TJ di mammifero (Perez *et al.*, 1997; Karczewski e Groot, 2000).

La leucochinina si lega allo specifico recettore posto nella membrana basolaterale, segue l'attivazione della fosfolipasi C di membrana che induce, attraverso la via di trasduzione del segnale IP₃-dipendente, la mobilitazione degli ioni calcio dalle riserve intracellulari. L'incremento della concentrazione dello ione nel citoplasma determina l'apertura della via paracellulare. In presenza di tapsigargina (TG), un inibitore potente e specifico delle Ca²⁺-ATPasi deputate al trasporto del catione nei compartimenti intracellulari (Lytton *et al.*, 1991), gli effetti della leucochinina sulla resistenza elettrica e sul potenziale transepiteliale vengono raddoppiati (Yu e Beyenbach, 2002). Anche il calcio extracellulare sembra avere un ruolo importante nel regolare la permeabilità della SJ, perchè gli effetti della leucochinina sulla R_t dipendono anche dalle variazioni di concentrazione del calcio nel medium esterno: aumentando la concentrazione esterna dello ione, la R_t si stabilizza su valori significativamente inferiori rispetto a quelli registrati in presenza dell'ormone ma in assenza di Ca²⁺. Aggiungendo alla soluzione emolinfatica la nifedipina (NP), un inibitore dei canali per il calcio situati sulla membrana basolaterale, si ha un decremento degli effetti diuretici dell'ormone e un innalzamento dei valori di R_t (Yu e Beyenbach, 2002).

Recentemente è stato dimostrato nel nostro laboratorio che il calcio e l'cAMP sono in grado di modulare il valore della R_{sh}, e quindi la permeabilità della via paracellulare agli ioni, anche nell'intestino medio di *B. mori* (Fiandra *et al.*, 2006). La variazione della concentrazione intracellulare di Ca²⁺ dipende sia dall'efficienza dell'attività delle Ca²⁺-ATPasi dei compartimenti intracellulari che dai canali per lo ione presenti nelle membrane plasmatiche, perchè TG e NP modificano la R_{sh} esattamente come nei tubuli malpighiani (Fiandra *et al.*, 2006). L'aumento intracellulare di Ca²⁺ e cAMP incrementa anche il passaggio transepiteliale di saccarosio (Fiandra *et al.*, 2006), una molecola organica che può superare l'epitelio intestinale esclusivamente attraverso la via paracellulare e può quindi essere considerato un buon marker di questa via di permeazione nei lepidotteri (Giordana e Sacchi, 1977).

Non è ancora chiaro il meccanismo con cui la mobilitazione del calcio intracellulare induce l'apertura della giunzione settata, ma è possibile che ciò avvenga, in modo analogo a quanto osservato per le TJ di mammifero, attraverso il rimodellamento del citoscheletro connesso alla SJ. Gli attori molecolari coinvolti nella cascata di segnali innescata dalle variazioni del titolo citosolico di Ca²⁺ non sono ancora definiti, sebbene un modello ipotetico recentemente proposto da Beyenbach *et al.* (2009) preveda l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) che attiva due messaggeri intracellulari: il diacilglicerolo (DAG)

e l'inositolo trifosfato (IP₃). Il legame di IP₃ al recettore del reticolo endoplasmatico apre i canali del Ca²⁺, permettendo l'entrata dello ione nel citoplasma. Il Ca²⁺ legandosi alla proteina chinasi C (PKC) inattiva, permette l'interazione della PKC con il DAG nella membrana plasmatica. Una volta legatasi al DAG, la PKC è attivata. Questo enzima, modificando l'attività di alcune proteine regolatorie, destabilizza il citoscheletro causando un aumento della permeabilità della via paracellulare (Beyenbach *et al.*, 2009).

2.3.3 Permeabilizzazione della TJ di mammifero indotta da molecole specifiche

Tra i modulatori della via paracellulare di mammifero una categoria molto studiata è rappresentata dai chitosani, molecole che derivano dalla parziale deacetilazione della chitina. I chitosani aumentano la permeabilità della via paracellulare determinando una riorganizzazione strutturale delle proteine associate alle TJ (Schipper *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2004).

Altre molecole molto studiate in grado di modulare la TJ di mammifero sono alcuni sali di acidi grassi a catena media, tra cui il caprilato di sodio (C8), il caprato di sodio (C10) e il laurato di sodio (C12). Gli acidi grassi differiscono per il numero di atomi di carbonio presenti e per il tipo, numero e posizione dei legami chimici che li uniscono. Sono definiti a catena media gli acidi grassi saturi formati da 6 a 12 atomi di carbonio. I trigliceridi con acidi grassi a catena media sono di derivazione animale e sono soprattutto contenuti nel latte, sono perciò facilmente reperibili ed economicamente convenienti.

Per lo studio *in vitro* dell'azione di permeabilizzanti, o "enhancers", della via paracellulare viene preferenzialmente utilizzato come modello della mucosa intestinale, l'epitelio monostratificato formato da cellule Caco-2, derivate da adenocarcinoma del colon di mammifero; in questo epitelio è molto studiato anche l'assorbimento dei farmaci. In questa linea cellulare è stato valutato l'effetto dei tre sali di acidi grassi a catena media C8, C10 e C12 e si è osservato che tutte le molecole inducono un aumento dose-dipendente del passaggio paracellulare della molecola marker mannitolo, anche se il C12 è risultato il più efficace (Lindmark *et al.*, 1995). Studi *in vivo* hanno mostrato invece il seguente ordine di efficacia nel modificare la permeabilità della via paracellulare: C10 > C12 > C8

(Ishizawa *et al.*, 1987; Sasaki *et al.*, 2003). Questo risultato, insieme al fatto che il C10 rappresenta al momento l'unico sale di acido grasso incluso in un preparato farmaceutico in vendita sul mercato (Takahashi *et al.*, 1994), hanno fatto sì che il C10 fosse l'agente permeabilizzante di questa categoria più studiato.

Il caprato di sodio favorisce un aumento del passaggio di ioni anche attraverso l'epitelio intestinale, come indicato dalla riduzione della resistenza elettrica transepiteliale (Sakai *et al.*, 1997). Studi *in vitro* sull'epitelio di cellule Caco-2 hanno dimostrato che la loro esposizione al C10 aumenta significativamente, con effetto dose- e tempo-dipendente, il passaggio transepiteliale di alcuni markers della via paracellulare a basso peso molecolare, quali il mannitolo, il rosso fenolo, la fluoresceina e il polietilenglicole (Lindmark *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 1997;), ma anche il passaggio di molecole organiche a elevato peso molecolare. In accordo con questi risultati, studi condotti *in vitro* su tessuto intestinale isolato di ratto, hanno evidenziato che il C10 induce un incremento della permeabilità del colon all'insulina (Uchiyama *et al.*, 1999) e dell'ileo al polisaccarosio (Soderholm *et al.*, 1998). Il C10 induce anche un incremento dose-dipendente del flusso del farmaco neuroattivo acamprosato in cellule Caco-2 (Cano-Cebrián *et al.*, 2005).

L'azione del C10 sulla permeabilità delle TJ è stata confermata da diversi studi *in vivo*. Alcune sperimentazioni sono state eseguite su ratto (Ishizawa *et al.*, 1987; Zornoza *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2003); altri studi sono stati eseguiti su cane (Burcham *et al.*, 1995), sul maiale (Raouf *et al.*, 2002), su coniglio (Do Santos *et al.*, 2003) e anche sull'uomo (Lindmark *et al.*, 1997; Lennernäs *et al.*, 2002). Tutti i risultati ottenuti hanno confermato la capacità del C10 di aumentare la biodisponibilità di numerosi composti, anche farmaceutici.

La tossicità del caprato di sodio è stata ampiamente studiata prima del suo impiego in campo farmaceutico. *In vitro* si è osservato che essa dipende non solo dalla sua concentrazione, ma anche dalla durata dell'esposizione del tessuto alla molecola stessa. Ci sono dati contrastanti riguardo al valore di concentrazione che può risultare tossico per le cellule intestinali. Söderholm *et al.* (1998) hanno osservato che, alla concentrazione di 10 mM, il C10 non compromette la vitalità delle cellule dell'ileo di ratto. Secondo Sakai *et al.* (1998), una certa tossicità si riscontra per le cellule Caco-2 solo intorno ai 50 mM, sebbene altri ricercatori abbiano dimostrato che queste cellule subiscono danni irreversibili già a 10 mM. Il fatto che le concentrazioni di C10 tossiche in cellule Caco-2 non lo siano sul tessuto intestinale può essere spiegato se si considera che l'epitelio in coltura è normalmente più sensibile agli effetti tossici degli "enhancers" rispetto all'epitelio

intestinale (Aungst, 2000). Ciò è confermato dal fatto che somministrazioni *in vivo* di caprato di sodio 100 mM non sembrano causare alcun danno alla mucosa dell'intestino di ratto. Sembra quindi che il C10 sia ben tollerato dalla membrana mucosale intestinale e non provochi danni alle cellule (Ishizawa *et al.*, 1987; Raoof *et al.*, 2002). È bene ricordare che sia la complessa architettura dell'orletto a spazzola, altamente organizzata, che gli efficienti meccanismi di riparazione della mucosa intestinale mancano nell'epitelio in coltura.

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione del C10, c'è un generale accordo nel ritenere che quest'ultimo eserciti il suo effetto inducendo una dilatazione dello spazio intercellulare a livello delle TJ. Sebbene sia stato anche proposto che questo cambiamento dello spazio intercellulare avvenga tramite un'azione diretta sulle proteine giunzionali (Watson *et al.*, 2001), la maggior parte dei ricercatori che hanno studiato il meccanismo d'azione della molecola, è concorde nel ritenere che l'azione dell'acido grasso sia mediata da un incremento della concentrazione di calcio intracellulare in seguito all'attivazione della fosfolipasi C (PLC) nella membrana plasmatica delle cellule epiteliali (Tomita *et al.*, 1995; Lindmark *et al.*, 1995; 1998; Cano-Cebrián *et al.*, 2005). La via di trasduzione del segnale è schematizzata nelle Figura 2.7 (da Cano Cebrián *et al.*, 2005). L'azione dell'enzima sul fosfolipide di membrana fosfatidilinositolo (4,5)-bifosfato genera la produzione di diacilglicerolo (DAG) e inositolo trifosfato (IP₃). Quest'ultimo secondo messaggero determina il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico e l'aumento della sua concentrazione citosolica. Il calcio si lega alla calmodulina e il complesso attiva una chinasi calmodulina-dipendente (CaMK), che quest'ultima attiva la chinasi che fosforila selettivamente la catena leggera della miosina (Myosin Light Chain Kinase, MLCK). La fosforilazione della MLCK determina la contrazione dell'anello perigiunzionale acto-miosinico associato alla TJ e quindi l'aumento dello spazio giunzionale.

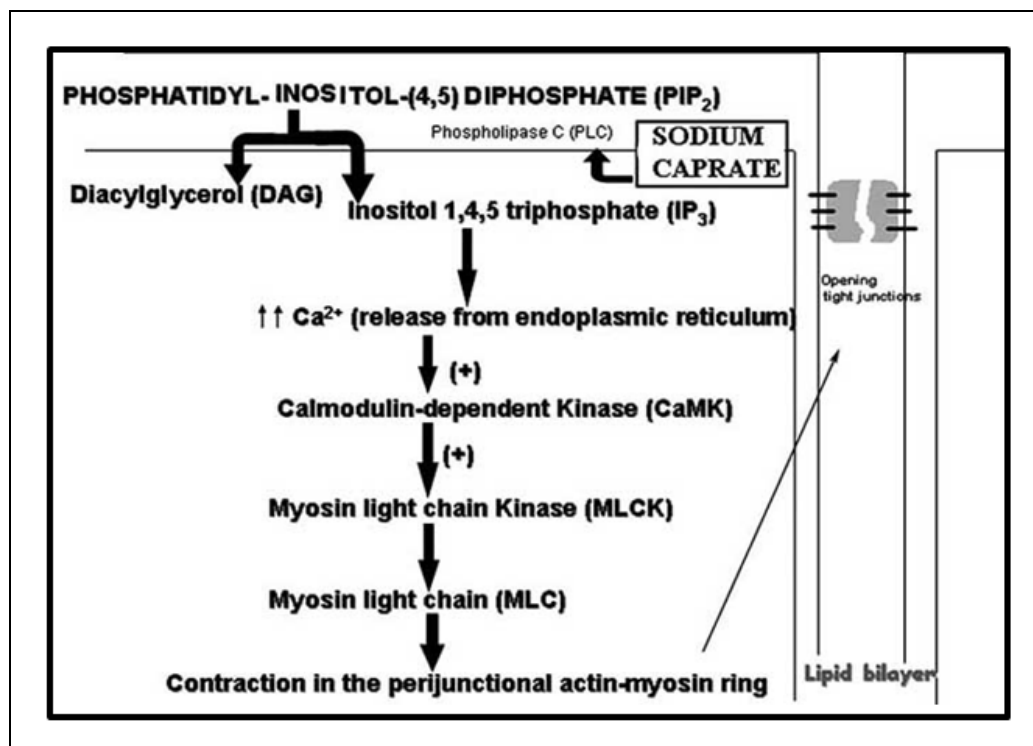


Figura 2.7: Meccanismo d'azione del C10 attraverso l'attivazione della fosfolipasi C di membrana. Tratto da Cano-Cebrián *et al.*, 2005.

2.3.4 Permeabilizzazione della SJ di insetto

In letteratura sono riportati diversi approcci per ottenere un aumento del passaggio attraverso l'intestino di insetto di potenziali polipeptidi tossici: la loro trasformazione chimica in analoghi resistenti alle proteasi (Nachman *et al.*, 2002), producendo proteine di fusione con una mannosio lectina, l'agglutinina di *Galanthus nivalis* (GNA) (Fitches *et al.*, 2002, 2004), attraverso l'attacco con legame covalente di polietilenglicol (PEGylation) e infine, più recentemente, sfruttando la capacità di piccoli peptidi ricchi in residui di arginina e lisina, chiamati Cell Penetrating Peptides (CPPs), di attraversare rapidamente la membrana plasmatica delle cellule, agendo come vettori di macromolecole ad essi legati (Cermenati *et al.*, 2011). Peraltro, sia nel caso in cui il legame venga formato con la GNA che con un CPP, la via di permeazione che viene incrementata è quella transcellulare.

Nulla è invece presente in letteratura sull'eventuale effetto anche sulla SJs di insetto degli "enhancers" attivi sulla TJ di mammifero, nonostante sia ormai accertato che nella SJs è espresso l'omologo della claudina (Furuse *et al.*, 1998), la principale proteina

responsabile della selettività della TJ (Van Itallie e Anderson, 2006). La ricerca riportata in questa tesi intende rispondere a questa totale mancanza di informazione, esaminando l'effetto sulla permeabilità paracellulare dell'intestino medio larvale di *B. mori* di un "enhancer" ben caratterizzato in mammifero e analizzandone il meccanismo di azione.

2.4 Proctolin e TMOF: due peptidi a potenziale attività insetticida che permeano attraverso la via paracellulare

Nell'ambito degli studi volti ad identificare possibili bioinsetticidi da impiegare nel controllo degli insetti ha trovato consenso la proposta di utilizzare peptidi noti come fattori di regolazione endogena degli insetti, perchè la somministrazione orale di questi modulatori in quantità e in tempi diversi da quelli fisiologici induce alterazioni del ciclo biologico e/o diminuisce la sopravvivenza dell'insetto. Due molecole interessanti da questo punto di vista sono il proctolin e il Trypsin Modulating Oostatic Factor (TMOF), due piccoli peptidi per i quali il passaggio attraverso il sistema giunzionale può rappresentare la via preferenziale per attraversare l'epitelio intestinale.

Il proctolin è un pentapeptide (Arg-Tyr-Leu-Pro-Thr) di 649 Da, isolato nel 1975 da *Periplaneta americana* (Starratt e Brown, 1975) ed individuato poi in sei ordini di insetti ed in alcuni vertebrati (Konopinska e Rosinski, 1999). Il proctolin presenta una conformazione ripiegata su se stessa (Figura 2.8) dovuta al fatto che la conformazione del peptide è stabilizzata da un ponte salino tra il gruppo carbossilico della treonina e il gruppo guanidinico dell'arginina. La principale attività del proctolin è quella di neurotrasmettitore e modulatore neuromuscolare, con proprietà miotropiche sulla muscolatura scheletrica e intestinale di insetto (Konopinska. e Rosinski 1999).

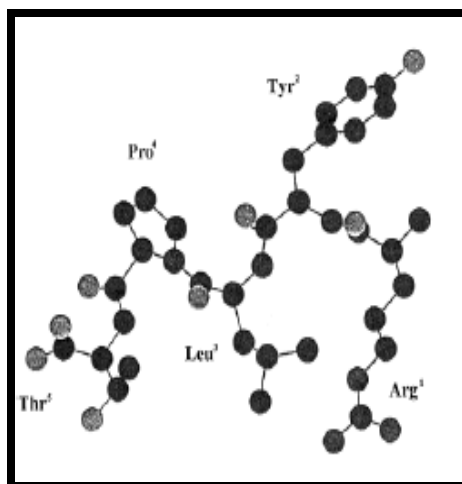


Figura 2.8: Conformazione spaziale del proctolin (da Konopinska e Rosinski, 1999)

Il proctolin stimola la contrazione della muscolatura della tibia di *Locusta migratoria* e, sempre nelle locuste, determina un aumento nei movimenti dei muscoli viscerali (Konopinska e Rosinski 1999).

Alcuni studi indirizzati a evidenziare una possibile attività insetticida del proctolin, hanno dimostrato che somministrazioni *in vivo* di tale peptide, per iniezione nell'emocele o per ingestione, inducono catatonìa nelle larve del lepidottero *Helicoverpa armigera* (Bavoso *et al.*, 1995). La reazione catatonica è caratterizzata dall'assenza reversibile di ogni attività locomotoria e il recupero, quando si manifesta, è associato a movimenti non coordinati particolarmente evidenti nella parte posteriore del corpo.

Studi recenti condotti nel nostro laboratorio (Fiandra *et al.*, 2010) hanno dimostrato che il peptide provoca un aumento delle contrazioni peristaltiche dell'intestino posteriore della larva di *B. mori* misurate *in vitro*, dimostrando che nel tratto intestinale considerato sono effettivamente presenti recettori per il proctolin, anche se la risposta si ottiene a concentrazioni molto superiori a quelle endogene. Per valutare il suo potenziale come bioinsetticida, sono stati misurati *in vivo* i parametri nutrizionali standard in seguito alla sua somministrazione orale. Alla concentrazione di 0,18 mg/g larva, il proctolin induce una riduzione significativa dell'efficienza di conversione in massa corporea del cibo ingerito (ECI) e digerito (ECD), con una conseguente diminuzione del tasso di crescita (GR). La concentrazione di peptide attiva nel ridurre la crescita larvale di *B. mori* è però estremamente critica: infatti aumentando di circa dieci volte la dose di proctolin

somministrata alle larve, vengono attivati meccanismi compensativi correlati a una stimolazione del comportamento alimentare della larva, che aumenta la quantità di cibo ingerito, annullando completamente l'effetto finale sulla GR.

Un altro peptide molto studiato come possibile bioinsetticida è il TMOF di *Aedes aegypti* (*Aea*-TMOF), ormone decapeptide (YDPAPPPPPP) di 866 Da prodotto dagli ovari della femmina e rilasciato nell'emolinfa in seguito ad un pasto di sangue. Il TMOF mostra una conformazione lineare avvolta ad elica sinistrorsa (Figura 2.9) (Borovsky, 2003).

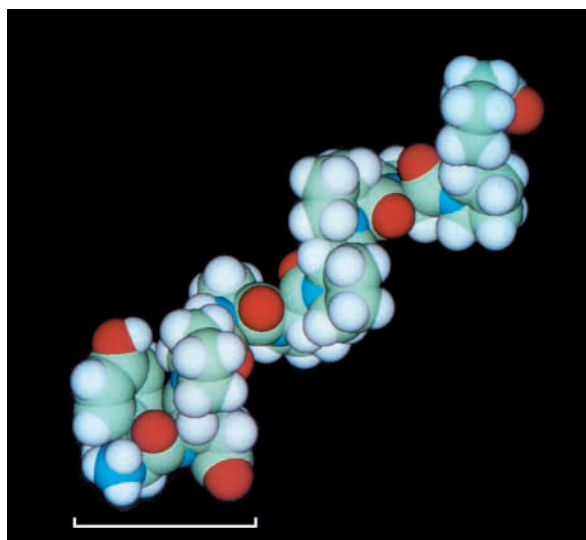


Figura 2.9: Conformazione spaziale dell'*Aea*-TMOF (da Borovski 2003)

Il peptide si lega a un recettore presente nella membrana basolaterale delle cellule intestinali e provoca il blocco della sintesi della tripsina con un meccanismo ancora non chiarito (Borovsky, 2003). Effetti dell'*Aea*-TMOF sono stati osservati anche *in vivo* in differenti specie di zanzare, in cui la somministrazione del peptide ha determinato la riduzione del livello delle proteasi digestive e di conseguenza la diminuzione dell'apporto nutrizionale, con effetti negativi sullo sviluppo e la crescita larvale e causando mortalità (Borovski e Meola 2004).

Anche l'espressione in piante di tabacco dell'*Aea*-TMOF è in grado di inibire la sintesi della tripsina in *Heliothis virescens*: infatti è stato osservato un aumento della mortalità del 20-33% nelle larve alimentate con piante transgeniche esprimenti la proteina (Tortiglione *et al.*, 2003).

Il trasporto transepiteliale dei due peptidi è stato studiato nell'epitelio intestinale delle larve di *B. mori* isolato in camere di Ussing (Fiandra *et al.*, 2009). L'osservazione in microscopia confocale di intestini “whole-mount”, dopo incubazione dal lato mucosale con le due molecole marcate con un fluorocromo, ha evidenziato che il proctolin supera la barriera intestinale esclusivamente attraverso la via paracellulare, mentre il TMOF utilizza sia questa via di permeazione che la via transcellulare. È quindi chiaro che il passaggio paracellulare è una via percorsa anche in insetto da peptidi e molecole organiche a basso peso molecolare. Poiché la sua permeabilità può essere modulata (Fiandra *et al.*, 2006), è certamente interessante, ai fini del controllo degli insetti dannosi, individuare “enhancers” che siano attivi sulla SJs, in modo da favorire il passaggio all'emocele di molecole di piccole dimensioni ad attività bioinsetticida con target emocelico.

3 Il densovirus di *Junonia coenia* (*JcDNV*)

Durante il periodo di ricerca da me svolto presso il “Laboratoire de Biologie Intégrative et Virologie” INRA-UMII (Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier, France), sotto la supervisione della Dr. Mylene Ogliastro, ho studiato le interazioni tra il Densovirus di *Junonia coenia* (*JcDNV*) e il suo ospite permissivo, il lepidottero *Spodoptera frugiperda*.

Il *JcDNV* appartiene alla famiglia *Parvoviridae*. Tale famiglia riunisce tutti i virus nudi, cioè senza involucro lipidico, dotati di un capsido icosaedrico che racchiude un piccolo genoma (tra le 4 e le 6 kb) costituito da DNA lineare a singolo filamento. È suddivisa in due sottofamiglie: *Parvovirinae*, che infettano i Vertebrati, e *Densovirinae*, che infettano gli Artropodi e principalmente insetti nelle fasi larvali. Caratteristica di questa sottofamiglia è quella di provocare, nelle cellule in cui il genoma virale si replica, un'ipertrofia dei nuclei, che appaiono elettrondensi al microscopio elettronico, da cui il nome “DensoNucleosis Virus”, DNV, abbreviato poi in “densovirus”.

L'ampiezza della gamma di ospiti che i differenti densovirus sono in grado di infettare varia notevolmente: alcuni virus sono monospecifici, mentre altri possono infettare anche diversi generi di insetti. Inoltre, replicandosi in tessuti differenti, anche i sintomi provocati nell'animale infettato possono essere molto diversi. All'interno della sottofamiglia *Densovirinae*, costituita da una trentina di virus, sono stati individuati quattro generi: *Densovirus*, *Pefudensovirus*, *Iteravirus*, *Brevidensovirus* (Bergoin e Tijssen, 2008). Al genere *Densovirus* appartiene il densovirus di *Junonia coenia*, che deve il suo nome al lepidottero in cui è stato descritto per la prima volta da Rivers e Longworth (1972). Per essere trascritto, il genoma del *JcDENV*, deve essere trasformato nella "forma replicativa" a doppio filamento. Il genoma del virus possiede delle sequenze nucleotidiche terminali palindrome che servono come innesco della replicazione: tali sequenze hanno infatti la caratteristica di costituire, appaiandosi, un tratto di DNA a doppio filamento che fa da innesco per la DNA-polimerasi della cellula ospite.

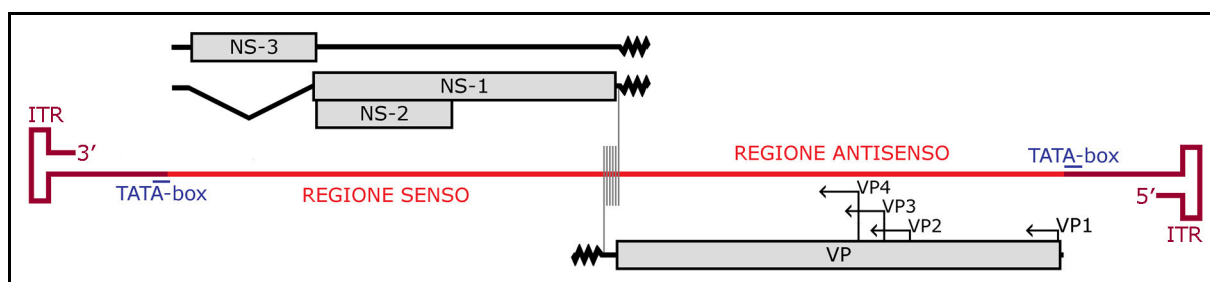


Figura 3.1: Rappresentazione schematica della struttura del genoma di *JcDENV*. In rosso, il singolo filamento di DNA che presenta, ad entrambe le estremità, delle sequenze palindrome (Inverted Terminal Repeat, ITR); in nero, gli RNA messenger trascritti dopo che si è costituita la "forma replicativa" a doppia catena: nella regione senso, l'mRNA viene prodotto per trascrizione del filamento di DNA virale, mentre nella regione antisenso l'mRNA viene prodotto per trascrizione della catena complementare di nuova sintesi. (Da Bergoin e Tijssen, 2008, modificato).

Il genoma di *JcDENV* (Figura 3.1) è detto "ambisenso": sulla prima porzione della macromolecola la trascrizione procede da 5' a 3' (cioè in direzione "senso"), mentre la seconda metà della catena viene chiamata "regione antisenso" perché ad essere trascritto è

il filamento complementare, che viene sintetizzato solo al momento della replicazione virale.

Sulla parte che viene trascritta in direzione “senso” sono situate due Open Reading Frames (ORFs) che danno origine a tre proteine non strutturali, NS1, NS2, NS3, implicate nella replicazione virale; nella “regione antisenso”, invece, è presente un’unica ORF che porta alla produzione di quattro diverse proteine strutturali, VP1, VP2, VP3, VP4, isoforme che differiscono per la porzione N-terminale della catena peptidica costituenti il piccolo (20-25 nm) capsido icosaedrico del virus (figura 3.2).

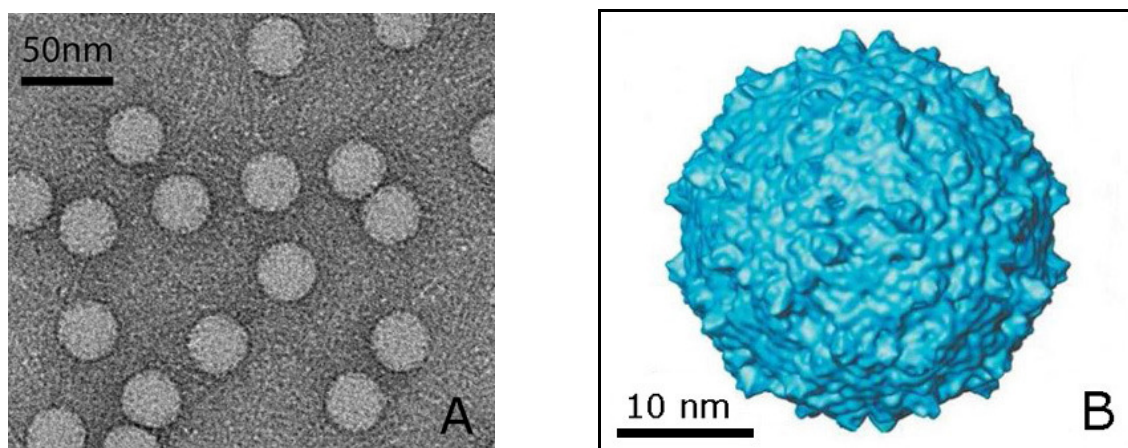


Figura 3.2: **A:** Particelle virali di *JcDNV* come appaiono al microscopio elettronico. **B:** Ricostruzione, con una risoluzione di 0.87 nm, della superficie esterna del capsido di *JcDNV*. (Da Bruemmer *et al.*, 2005, modificato).

In natura, il *JcDNV* si trasmette da un animale all’altro tramite ingestione di particelle virali, che devono quindi oltrepassare la barriera intestinale (intesa come membrana peritrofica ed epitelio intestinale) per raggiungere i tessuti bersaglio all’interno del corpo dell’ospite, tra cui le trachee e i muscoli viscerali (Mutuel *et al.*, 2010). Diversamente da altri membri della sottofamiglia *Densovirinae*, infatti, il *JcDNV* non si replica nelle cellule dell’epitelio intestinale (Bergoin e Tijssen, 2008). La membrana

peritrofica viene attraversata per diffusione passiva, grazie alle piccole dimensioni del capsido virale. Il virus raggiunge quindi la superficie apicale dell'epitelio intestinale e deve mettere in atto delle opportune strategie per superare tale barriera e raggiungere i tessuti bersaglio in cui si replica.

Il meccanismo di infezione dei virus appartenenti alla famiglia *Parvoviridae* è ancora poco noto. Per quanto riguarda la sottofamiglia *Parvovirinae*, il meccanismo di infezione e l'identificazione del recettore di membrana responsabile dell'internalizzazione dei virus in questione sono stati descritti per il parvovirus B19, che infetta i precursori degli eritrociti dell'uomo, causando la quinta malattia o eritema infettivo (Brown *et al.*, 1993), oppure per il parvovirus canino (CPV) e per il virus della panleucopenia felina (FPV) (Palermo *et al.*, 2003). Per quanto riguarda i virus appartenenti alla sottofamiglia *Densovirinae*, nessun recettore è stato ad oggi identificato. Tenendo presente che l'interazione tra un virus e il suo recettore rappresenta il primo livello di specificità e che scarse sono le informazioni circa il meccanismo di infezione dei densovirus, questo campo di indagine risulta essere particolarmente interessante.

L'interesse nei confronti dei virus appartenenti alla sottofamiglia *Densovirinae* risiede nel loro possibile impiego come bioinsetticidi. Come precedentemente detto, questi virus infettano gli Artropodi e principalmente insetti nelle fasi larvali, tra cui molti Lepidotteri fitofagi dannosi all'agricoltura e Ditteri ematofagi vettori di malattie. Per esempio, il densovirus di *Sibile fusca* (*SfDNV*) e il densovirus di *Casphalia extranea* (*CeDNV*) sono già stati utilizzati con successo, rispettivamente in Colombia e Costa d'Avorio, per il controllo della popolazione dei loro ospiti (*S. fusca* e *C. extranea*), due lepidotteri che causano ingenti danni alle piantagioni di palma da olio (Bergoin e Tijssen, 2008). Inoltre, in Cina viene prodotto un formulato contenente il densovirus di *Periplaneta fuliginosa* (*PfDNV*) molto utile per il controllo dello scarafaggio *P. fuliginosa* (Yang *et al.*, 2008). Come ultimo esempio, in Ucraina è stato studiato un prodotto (Viroden) a base del densovirus di *Aedes aegypti* (*AaeDNV*) che ha dimostrato ottimi risultati nel combattere la zanzara *A. aegypti* sia allo stadio larvale che adulto (Carlson *et al.*, 2006).

Capitolo secondo

Materiali e metodi

1 Animali da esperimento

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando larve di *Heliothis virescens* in quinta età larvale (Figura 1 A), larve di *Bombyx mori* al 3°-5° giorno della quinta età larvale (Figura 1B) e larve di *Spodoptera littoralis* (Figura 1C) e *Spodoptera frugiperda* in sesta età larvale (Figura 1D).

Le larve di *H. virescens* sono state allevate singolarmente su dieta artificiale o dieta artificiale fino alla terza età larvale e poi su foglie di tabacco transgeniche esprimenti l'enzima chitinasi A (ChiA) del virus della nucleopoliedrosi di *Autographa californica*.

Le uova di *B. mori* sono state fornite dal Consiglio per la Ricerca e l'Agricoltura, unità di Ricerca per l'Apicoltura e bachicoltura, Padova (CRA-API). Le larve sono state alimentate su dieta artificiale formulata da Capellozza *et al.*, (2005).

Le larve di *S. littoralis* sono state fornite da ISAGRO Ricerca S.r.l, e allevate su foglia di tabacco fresca e dieta artificiale (Pabulum), la cui composizione è: (w/v): agar 3%, germe di grano 4%, lievito di birra 6%, farina di mais 17%, acido ascorbico 0,6%, acido benzoico 0,15%, nipagina 0,12%.

Le larve di *S. frugiperda*, fornite dall'Università di Montpellier, sono state allevate su dieta artificiale (Pabulum).

Tutte le larve sono state allevate in condizioni controllate a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 65-70% di umidità e fotoperiodo di 12L:12D.



Figura 1: Larva di *Heliothis virescens* in V età (A); larva di *Bombyx mori* in V età (B); larva di *Spodoptera littoralis* in VI età (C); larva di *Spodoptera frugiperda* in VI età (D).

2 Isolamento della membrana peritrofica e caratteristiche dell'apparato sperimentale

Le larve di *H. virescens* al terzo giorno della V età vengono anestetizzate con CO₂. Si procede quindi all'asportazione delle estremità cefalica e caudale, incidendo l'animale rispettivamente sotto le prime due paia di zampe e tra il terzo ed il quarto paio di pseudozampe. Durante questa operazione la larva deve essere mantenuta in posizione verticale, con la porzione anteriore rivolta verso il basso. La membrana peritrofica avvolgente il contenuto intestinale, sporge dall'intestino e può essere delicatamente recuperata con un paio di pinzette e posta su una garza di cotone morbido, a sua volta adagiata sopra una Petri di vetro. La garza, necessaria per sostenere la membrana peritrofica e per mantenerla distesa, ha una maglia molto ampia e non offre restrizioni alla permeazione delle molecole. La membrana peritrofica viene poi tagliata longitudinalmente, aperta a foglietto e, una volta rimosso il contenuto intestinale, lavata con una soluzione salina (Saccarosio 210mM, KCl 45mM, Hepes-Tris 10mM, a pH 7.0). Tutte le operazioni sono svolte alla temperatura di 4 °C affinché la struttura della membrana peritrofica si mantenga integra. A questo punto, la membrana peritrofica ed il suo supporto vengono ritagliati in pezzetti quadrati aventi una superficie di circa 1 cm². Da ogni membrana peritrofica si ottengono generalmente due frammenti, uno dei quali viene utilizzato per il trattamento con la chitinasi A e l'altro come campione di controllo. Ciò permette di eliminare una eventuale variabilità individuale nella resistenza o funzionalità della membrana. Il frammento di membrana peritrofica con il supporto viene montato su di una camera di Ussing (Figura 2).

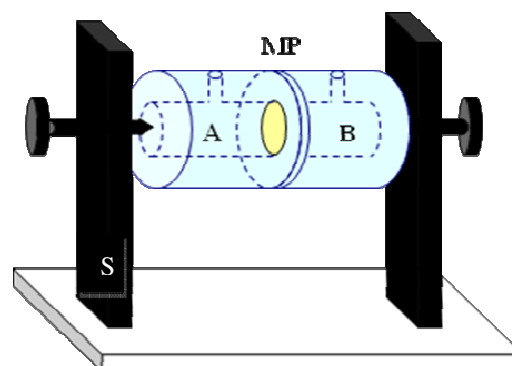


Figura 2 : Camera di Ussing. MP, membrana peritrofica; A, comparto endoperitrofico; B, comparto ectoperitrofico; S, supporto.

Questa è costituita da due emicamere cilindriche di plexiglas che presentano, al centro, un'apertura circolare di 19.6 mm². La membrana viene posizionata a livello del foro e funge quindi da divisorio fra i due compartimenti. Una delle due emicamere presenta, attorno all'apertura, cinque punte che permettono di fissare la garza nella giusta posizione. Le due semicamere vengono quindi assemblate, dopo averne rivestito i margini con della pasta di silicone per evitare lesioni della membrana peritrofica e perdite della soluzione, e posizionate su di un'apposita struttura di sostegno (Figura 2). La superficie della membrana peritrofica a contatto con la garza è il lato ectoperitrofico, adiacente alle cellule dell'epitelio intestinale, mentre l'altra superficie è il lato endoperitrofico, ossia quello a contatto con il contenuto intestinale. Le due emicamere, separate dalla membrana peritrofica, ricreano quindi i due ambienti ecto- ed endoperitrofico. Entrambi i compartimenti vengono riempiti con lo stesso volume (520 µl) del tampone di eluizione utilizzato per la purificazione della chitinasi. Tale tampone ha un valore di pH pari a 7.5 ed è composto da NaCl 300 mM, Na₂HPO₄ 50 mM, imidazolo 200 mM e glicerolo al 10%. Durante il riempimento delle emicamere è necessario fare attenzione a non provocare la formazione di bolle d'aria e a non creare variazioni della pressione idrostatica nei due comparti.

3 Misura del flusso di blu di metilene e TMOF attraverso la membrana peritrofica di *H. virescens*

In questa sperimentazione è stata utilizzata chitinasi A ricombinante codificata dal virus della nucleopoliedrosi di *Autographa californica* (AcMNPVChiA) e prodotta nel laboratorio della Prof.ssa Rosa Rao del Dipartimento di Scienze del Suolo e della Pianta dell'Università Federico II di Napoli. L'enzima è stato conservato alla temperatura di 4°C. L'effetto della chitinasi è stato indagato *in vitro* sulla permeabilità della membrana peritrofica al colorante blu di metilene (319.9 Da) e al TMOF (866 Da). Le membrane peritrofiche vengono isolate e montate sulla camere di Ussing come precedentemente descritto.

Il blu di metilene viene sciolto nello stesso tampone con cui sono riempite le emicamere (vedi paragrafo 2). Nella soluzione endoperitrofica dei campioni controllo si

aggiunge blu di metilene alla concentrazione finale di 1 mg/ml, mentre in quella dei campioni trattati è presente, oltre al colorante, anche ChiA alla concentrazione di 40 µg/ml. La quantità totale di colorante diffuso nel comparto ectoperitrofico nelle due condizioni sperimentali dopo 90 minuti di incubazione è stata determinata mediante l'uso di uno spettrofotometro (Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech, Cambridge, UK), e l'assorbanza dei campioni è stata misurata ad una lunghezza d'onda di 661 nm. In questi esperimenti è stata costruita una retta di taratura utilizzando dei campioni standard a concentrazioni note di blu di metilene (in µg/ml): 1, 2.5, 5, 10, 20. I valori di assorbanza così ottenuti sono stati posti in grafico in funzione delle corrispondenti concentrazioni di blu di metilene presenti nei campioni standard e, mediante l'utilizzo di un programma di regressione lineare, si è ottenuta la retta che meglio interpola i punti sperimentali. Per determinare la quantità di blu di metilene presente nei campioni prelevati dal comparto ectoperitrofico, sono stati utilizzati i valori di intercetta e di pendenza della retta di taratura.

Il flusso di TMOF (sintetizzato dalla GenScript Corporation, USA) viene misurato aggiungendo il peptide (1 mg/ml) nel comparto endoperitrofico in assenza (controllo) o presenza di ChiA 40 µg/ml, e recuperando la soluzione ectoperitrofica dopo 90 minuti di incubazione. La quantità di TMOF permeato è stata determinata tramite Elettroforesi capillare (Beckman Coulter P/ACE MDQ Capillary System) nel laboratorio della Prof.ssa Rosa Rao (Dipartimento di Scienze del Suolo e della Pianta dell'Università Federico II di Napoli), utilizzando una opportuna retta di taratura.

Abbiamo inoltre valutato l'azione permeabilizzante della ChiA sulla membrana peritrofica di larve di *H. virescens* allevate a partire dal primo giorno della quarta età su foglie di tabacco esprimenti l'enzima. Dopo 132 ore dall'inizio del trattamento, le membrane isolate dalle larve alimentate su pianta transgenica e dalle larve controllo (allevate su piante wild type) sono state montate in camere di Ussing per misurarne la permeabilità al blu di metilene alla concentrazione finale di 1 mg/ml per 90 minuti di incubazione.

I flussi stimati di TMOF e blu di metilene vengono espressi in nmol/cm²/h. I valori medi ottenuti sono stati confrontati tramite il test statistico del *t* di Student.

4 Isolamento e perfusione dell'intestino medio larvale di lepidottero

Larve di *B. mori* al 3° giorno della V età e larve di *S. frugiperda* e *S. littoralis* in VI età vengono anestetizzate con CO₂. Si procede quindi all'asportazione delle estremità cefalica e caudale, incidendo l'animale rispettivamente sotto le prime due paia di zampe toraciche e tra il terzo ed il quarto paio di pseudozampe addominali. Durante questa operazione la larva deve essere mantenuta in posizione verticale, con la porzione anteriore rivolta verso il basso in modo tale che la membrana peritrofica, avvolgente il contenuto intestinale, sporga dall'intestino e possa essere delicatamente estratta ed eliminata. La larva viene poi adagiata sopra una Petri a contatto con il ghiaccio, in modo che tutte le operazioni successive vengano effettuate a 4°C ed il tessuto non vada incontro a deterioramento. Facendo attenzione a non lesionare il tessuto intestinale, si esegue un taglio longitudinale della cuticola ventrale della larva, i lembi della cuticola vengono divaricati e si preleva delicatamente l'intestino medio. Esso viene adagiato sopra un disco di tulle, tagliato in senso longitudinale ed aperto a foglietto. Si usa il tulle per dare sostegno al tessuto e, allo stesso tempo, per impedire che si richiuda su se stesso. A questo punto l'intestino viene montato a foglietto nella camera di Ussing come descritto nel paragrafo 2 di questo capitolo. La superficie dell'intestino a contatto con il disco di tulle è quella che *in vivo* è rivolta verso l'emocele, mentre l'altra superficie è quella rivolta verso il lume intestinale. Le due emicamere, separate dall'intestino medio aperto a foglietto, ricreano quindi l'ambiente emocelico e quello luminale. La camera di Ussing viene poi posizionata su un'apposita struttura di sostegno e collegata a "reservoirs" di vetro in cui vengono introdotte le soluzioni luminale ed emolinfatica (2,5 ml), mantenute alla temperatura costante di 25°C per tutta la durata dell'esperimento (Figura 3). Le composizioni delle soluzioni variano a seconda delle esigenze sperimentali e verranno riportate nei paragrafi seguenti. Durante il riempimento delle emicamere è necessario fare attenzione a non provocare la formazione di bolle d'aria e a non creare variazioni della pressione idrostatica nei due compartimenti. L'intestino necessita di essere sempre perfuso con le soluzioni fisiologiche appropriate e abbondantemente ossigenato affinché possa mantenere la sua vitalità.

La vitalità del tessuto è monitorata registrando la differenza di potenziale transepiteliale (V_t). A questo scopo la camera di Ussing viene collegata ad un potenziometro tramite elettrodi Ag/AgCl (elettrodi di voltaggio) (Figura 3) inseriti in

piccoli tubi contenenti agar al 5.5% solubilizzato in KCl 3M a 80°C. La misurazione della differenza di potenziale è eseguita assumendo il lume come polo positivo.

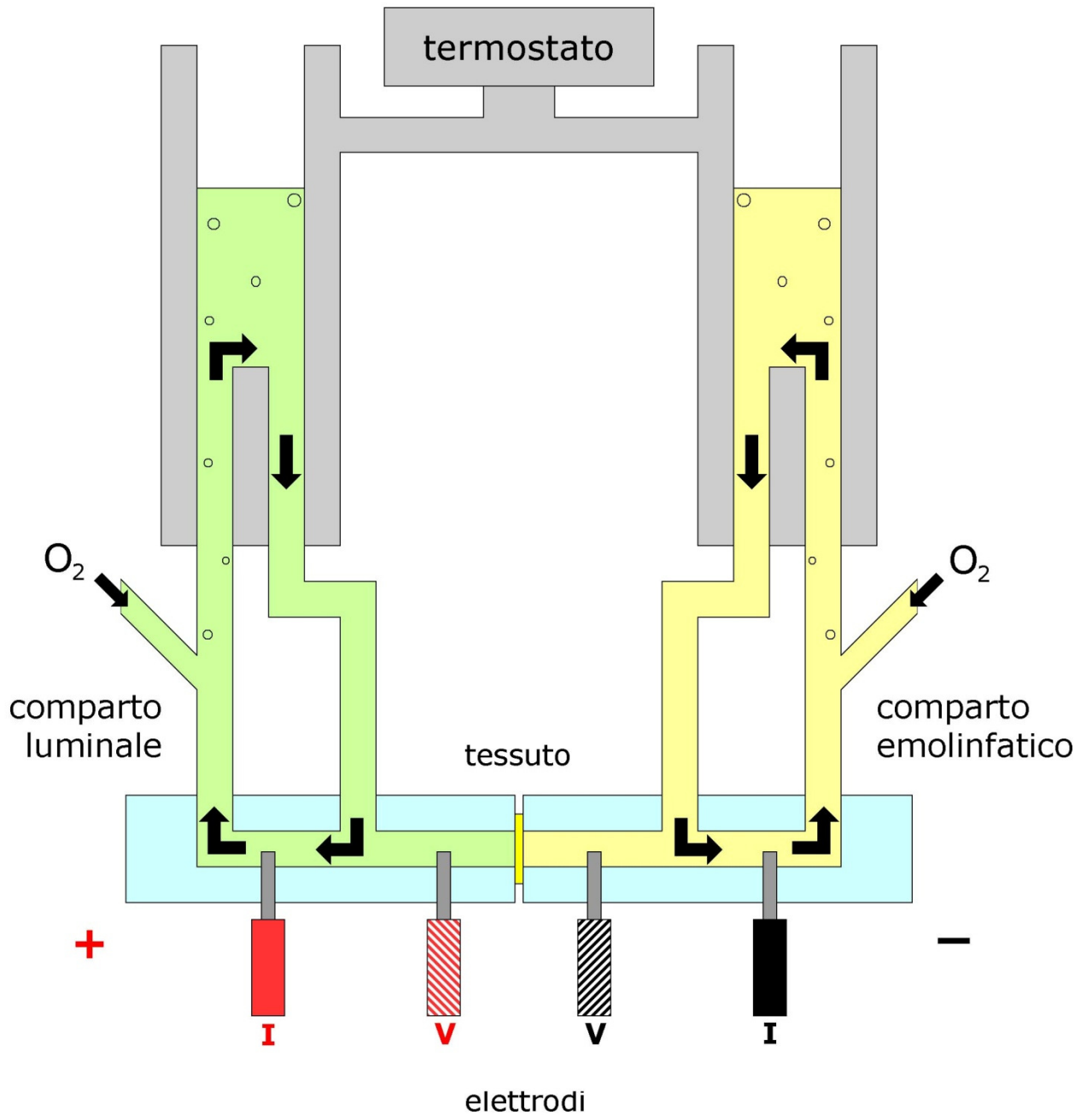


Figura 3: schema dell'apparato sperimentale: camera di Ussing collegata ai reservoirs e agli elettrodi.

V: elettrodi di voltaggio; I: elettrodi di corrente.

5 Determinazione della resistenza elettrica paracellulare o resistenza di shunt (R_{sh})

Per misurare la resistenza elettrica transepiteliale (R_t), viene fatto passare un impulso di corrente attraverso il tessuto montato a foglietto sulla camera di Ussing. L'impulso di corrente induce una variazione del potenziale elettrico transepiteliale (ΔV_t) proporzionale all'intensità (I) della corrente stessa e la R_t può quindi essere calcolata applicando la legge di Ohm ($R = \Delta V / I$). La corrente, prodotta da un generatore di impulsi, viene fatta passare da un'emicamera all'altra attraverso il tessuto grazie a due elettrodi inseriti nelle emicamere esternamente a quelli di voltaggio (Figura 3). L'intensità dell'impulso elettrico, della durata di un secondo, è pari a 90 μA , che corrisponde a 714,3 $\mu A/cm^2$.

La resistenza transepiteliale è la risultante della resistenza cellulare (R_c) e della resistenza paracellulare o di shunt (R_{sh}), tra loro in parallelo. In accordo con il modello teorico e con i dati sperimentali discussi da Pannabecker *et al.* (1992) per i tubuli Malpighiani di *Aedes aegypti*, negli epitelii caratterizzati dalla presenza di una pompa fortemente elettrogenica, l'inibizione della stessa provoca un forte incremento della R_c e in queste condizioni la R_t può essere considerata equivalente alla R_{sh} . Sulla base di questo modello, abbiamo misurato la R_{sh} dell'intestino larvale di *B. mori*, *S. littoralis* e *S. frugiperda* in differenti condizioni sperimentali come riportato di seguito. In questo epitelio, sulla membrana apicale delle cellule a coppa, è presente una pompa fortemente elettrogenica: la V-ATPasi. L'attività di questa pompa è strettamente correlata a quella dell'antiporto $K^+/2H^+$, trasportatore anch'esso espresso sulla membrana apicale delle cellule a coppa. In questo tessuto è quindi possibile misurare la R_{sh} bloccando l'attività della V-ATPasi; tale attività è stata bloccata eliminando il K^+ dalle soluzioni di incubazione. È stato infatti dimostrato, che l'assenza di potassio inibisce l'attività dell'antiporto associato alla V-ATPasi e, di conseguenza, quella della pompa, riducendo fortemente il trasferimento di cariche dall'interno della cellula verso il lume (Fiandra *et al.*, 2006).

Questo approccio sperimentale è stato utilizzato per valutare l'effetto del caprato di sodio (C10) sulla resistenza paracellulare dell'epitelio intestinale delle larve di *B. mori* e *S. littoralis*. La composizione della soluzione presente nel comparto emolinfatico è (in mM): saccarosio 280, $MgSO_4$ 4,8, $CaCl_2$ 1, TRIS-HCl 5, pH 7,2. La composizione della soluzione presente nel comparto luminale è in mM: saccarosio 283, CAPS-TMAOH 5, pH

9,8. Quest'ultima soluzione è priva di calcio e magnesio per evitare la formazione di precipitati in seguito all'aggiunta di C10. Dopo aver montato l'intestino larvale sull'apparato di perfusione, viene registrata la variazione di potenziale elettrico transepiteliale indotta dall'impulso di corrente ad intensità nota. Come detto in precedenza, applicando la legge di Ohm, è possibile calcolare il valore di resistenza e, quando tale valore risulta costante, solitamente dopo 60 minuti, si proseguono le registrazioni in assenza (controllo) o in presenza di caprato di sodio (20 mM) aggiunto nel comparto luminale, per ulteriori 120 minuti.

Tre intestini larvali di *B. mori* incubati in assenza (controllo) e tre in presenza di C10 al termine dell'esperimento sopra descritto sono stati smontati dalla cameretta di Ussing e, ancora appoggiati sul tulle, sono stati messi overnight a 4 °C in tampone cacodilato contenente Glutaraldeide al 4 %. I tessuti sono stati poi trattati per la visione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) ed osservati nel laboratorio del Dr. Gianluca Tettamanti (Dipartimento di biotecnologie e scienze della vita, Università dell'Insubria, Varese).

Per valutare se il C10 nell'epitelio intestinale di *B. mori* attiva la cascata di segnale dei fosfoinositidi, come avviene nelle cellule Caco 2 (Cano-Cebrián *et al.* 2005), si sono eseguiti esperimenti di registrazione della R_{sh} in presenza di C10 e in presenza o assenza di specifici inibitori di proteine chiave coinvolte in questa via di segnalazione. Per questi esperimenti sono stati scelti: l'inibitore della fosfolipasi C (PLC) (1-(6-((17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione) (U73122), l'inibitore del legame calcio-calmodulina N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulphonamide (W7) e i due inibitori che agiscono sulla chinasi responsabile della fosforilazione della catena leggera della miosina (MLCK), 1-(5-Iodonaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine hydrochloride (ML7) PEPTIDE-18 (H-RKKYKYRRK-NH₂). Le concentrazioni sono state scelte in base ai rispettivi valori di K_i riportati in letteratura (Lukas *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2000; Muto *et al.*, 1997; Stam *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 1997; Yule *et al.*, 1992; Zolotarevsky *et al.*, 2002; Sepehri *et al.*, 2010).

L'intestino viene montato a foglietto nella camera di Ussing, perfuso con le soluzioni luminale ed emolinfatica, la cui composizione è quella precedentemente riportata, in assenza o in presenza dell'inibitore in esame aggiunto in entrambi i comparti. Poiché tutti

gli inibitori sono sciolti in DMSO, nelle incubazioni in assenza di queste molecole sia nel comparto luminale sia in quello emolinfatico viene aggiunto un adeguato volume del solo solvente organico. Dopo 60 minuti, è stato aggiunto C10 (20 mM) nel comparto luminale. L'incubazione dell'intestino larvale nelle due condizioni sperimentali (in presenza di C10 o in presenza di C10 e inibitore) prosegue per ulteriori 120 minuti. Durante tutta la durata dell'esperimento (complessivamente 180 minuti) viene registrata la variazione del potenziale elettrico transepiteliale indotta dall'impulso di corrente ad intensità nota che permette, utilizzando la legge di Ohm, di calcolare il valore di R_{sh} . Sono stati effettuati anche esperimenti in cui l'intestino larvale montato a foglietto nella camera di Ussing è stato perfuso per 180 minuti con le soluzioni emolinfatica e luminale (composizione in mM: saccarosio 280, $MgSO_4$ 4,8, $CaCl_2$ 1, TRIS-HCl 5, pH 7,2 ; e saccarosio 283, CAPS-TMAOH 5, pH 9,8 rispettivamente) in assenza di C10 e degli inibitori, ma con l'aggiunta di DMSO in entrambi i comparti dell'apparato di perfusione. Come precedentemente indicato, questo solvente organico è utilizzato per solubilizzare gli inibitori che abbiamo utilizzato per questa sperimentazione. La percentuale di DMSO aggiunta nei due comparti è pari a 1,2% (v/v) che corrisponde alla percentuale massima di solvente aggiunta negli esperimenti in presenza dei diversi tipi di inibitori. Anche per questi esperimenti sono stati calcolati i valori di R_{sh} per verificare possibili variazioni di questo parametro indotte dal DMSO rispetto al controllo (intestini incubati in assenza di DMSO).

La misurazione della resistenza elettrica paracellulare è stata eseguita anche per valutare se il densovirus di *Junonia coenia* (*JcDNV*) è in grado di determinare una variazione di questo parametro elettrofisiologico nell'intestino isolato dalle larve di *S. frugiperda* all'ultimo stadio larvale montato in camere di Ussing. Le soluzioni presenti nei reservoirs collegati alla camera di Ussing hanno la seguente composizione: $CaCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 4.8 mM, saccarosio 280 mM e Tris 5 mM a pH 7 nel comparto emolinfatico o CAPS 5 mM a pH 10 nel comparto luminale. Quando l'intestino larvale di *S. frugiperda* viene montato sull'apparato, viene registrata la variazione del potenziale elettrico transepiteliale indotta dall'impulso di corrente ad intensità nota. E' così possibile calcolare il valore di resistenza, e quando tale valore risulta costante (dopo 30 minuti), si proseguono le registrazioni in assenza (controllo) o in presenza di *JcDNV* (100 ng/ μ l), nel comparto luminale, per ulteriori 40 minuti.

6 Effetto del C10 sul passaggio di fluoresceina attraverso l'intestino medio delle larve di *B. mori*

Per misurare il flusso di fluoresceina in presenza o assenza di caprato di sodio, gli intestini isolati dalle larve di *B. mori* in V età sono stati montati nella camera di Ussing. Il tessuto è stato perfuso con soluzione luminale avente la seguente composizione (in mM): Kgluconato 20, Saccarosio 212 o 252, rispettivamente in presenza o assenza di C10 (20 mM) e CAPS-TMAOH 5, pH 9,8. La composizione della soluzione emolinfatica è (in mM): Kgluconato 20, CaCl₂ 5, MgSO₄ 24, saccarosio 190 e TRIS-HCl 2, pH 7,2. Il flusso di fluoresceina dall'ambiente luminale a quello emolinfatico è stato misurato aggiungendo la molecola fluorescente alla soluzione luminale in modo da avere una concentrazione finale di 3 mM. Sono state eseguite incubazioni di 120 o 180 minuti. Al termine di ogni incubazione sono stati prelevati 2 ml di soluzione emolinfatica e contemporaneamente lo stesso volume è stato prelevato dal comparto luminale, per evitare il formarsi di variazioni di pressione idrostatica a cavallo del tessuto. La quantità di fluoresceina presente nel comparto emolinfatico è stata determinata allo spettrofluorimetro (Cary Eclipse, Varian) utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 509 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 521 nm. Per quantificare la fluoresceina presente nei campioni è stata realizzata una retta di taratura. Sono stati preparati dei campioni standard a concentrazioni note di fluoresceina sciolta in soluzione emolinfatica. Le concentrazioni di fluoresceina dei campioni standard sono le seguenti (in µg/ml): 0,039; 0,078; 0,0156; 0,3125; 0,625; 1,25. I valori di intensità di fluorescenza così ottenuti sono stati posti in grafico in funzione delle corrispondenti concentrazioni di fluoresceina negli standard. È stato quindi utilizzato un programma di regressione lineare ed è stata ottenuta la retta che meglio interpola i punti sperimentali. I valori di intercetta e pendenza di tale retta sono stati utilizzati per calcolare la concentrazione di fluoresceina nei campioni prelevati nel comparto emolinfatico. La quantità di fluoresceina passata dal lato luminale a quello emolinfatico è stata espressa in nmol/cm². Sono stati condotti, oltre agli esperimenti con l'aggiunta di fluoresceina in presenza o assenza di C10 nel comparto luminale, esperimenti in assenza di tali composti, per ottenere dei campioni di controllo (bianco). In questo modo è possibile valutare correttamente l'entità del passaggio della fluoresceina dal comparto luminale a quello emolinfatico, tenendo conto di tutte le eventuali sostanze di natura proteica che il tessuto potrebbe rilasciare durante l'incubazione e che potrebbero non permettere la corretta

quantificazione della fluoresceina presente al termine dell'incubazione nel comparto emolinfatico. Il tessuto potrebbe infatti rilasciare molecole in grado di assorbire o emettere luce alle stesse lunghezze d'onda da noi utilizzate per quantificare la fluoresceina. I valori di fluorescenza misurati prelevando 2 ml di soluzione emolinfatica nelle incubazioni di 120 o 180 minuti in assenza di C10 e fluoresceina sono stati quindi sottratti ai valori letti allo spettrofluorimetro per i campioni prelevati dal comparto emolinfatico nelle incubazioni eseguite in presenza di fluoresceina.

7 Effetto del C10 sul passaggio di proctolin rodaminato attraverso l'intestino medio delle larve di *B. mori*

Per misurare il flusso di proctolin rodaminato (rh-proctolin) in presenza o assenza di caprato di sodio il tessuto intestinale isolato dalle larve *B. mori* è stato montato nella camera di Ussing. L'intestino è stato perfuso con le soluzioni luminale ed emolinfatica le cui composizioni sono quelle riportate nel paragrafo precedente. Il passaggio di rh-proctolin dall'ambiente luminale a quello emolinfatico è stato misurato aggiungendo il peptide marcato con il fluorocromo alla soluzione luminale, in modo da avere una concentrazione di 130 μM , e in presenza o assenza di C10 20 mM. Il tessuto è stato incubato per 120 minuti. Per tutta la durata dell'incubazione sia nel comparto luminale sia in quello emolinfatico è stato aggiunto un cocktail di inibitori delle peptidasi per evitare la possibile degradazione del proctolin ad opera delle peptidasi espresse sulla membrana apicale delle cellule intestinali. La composizione del cocktail è la seguente (in mM): fenantrolina 1, bestatina 0,01, amastatina 0,01. Al termine dell'incubazione sono stati prelevati 2 ml di soluzione dal comparto emolinfatico. La quantità di rh-proctolin presente in questo comparto è stata determinata allo spettrofluorimetro (Cary Eclipse, Varian) utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 567 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 582 nm. Anche in questi esperimenti è stata costruita una retta di taratura utilizzando dei campioni standard a concentrazioni note di rh-proctolin (in μM): 0,44; 0,88; 1,76; 3,5; 7. I valori di fluorescenza così ottenuti sono stati posti in grafico in funzione delle corrispondenti concentrazioni di rh-proctolin presenti nei campioni standard e, mediante l'utilizzo di un programma di regressione lineare, si è ottenuta la retta che meglio interpola i punti sperimentali. Per determinare la quantità di rh-proctolin (espressa

in nmol/cm²) presente nei campioni prelevati dal comparto emolinfatico, sono stati utilizzati i valori di intercetta e di pendenza della retta di taratura.

Anche per questa sperimentazione sono stati condotti esperimenti in assenza di C10 e rh-proctolin (bianco) che consentono di ottenere una corretta quantificazione del passaggio della molecola fluorescente dal comparto luminale a quello emolinfatico. Il tessuto, infatti, potrebbe rilasciare sostanze di natura proteica in grado di assorbire o emettere la luce alle stesse lunghezze d'onda utilizzate per questi esperimenti che impedirebbero un'esatta stima della concentrazione di rh-proctolin presente nel comparto emolinfatico al termine del periodo di incubazione.

Alcuni dei tessuti, incubati per due ore in presenza di rh-proctolin e in assenza o presenza di C10, vengono smontati dalla camerette di Ussing e, ancora distesi sul tulle, lavati abbondantemente con soluzione fisiologica (la cui composizione in mM è: saccarosio 283, CAPS-TMAOH 5, pH 9,8) ed incubati in Paraformaldeide 4% (w/v) in PBS 1X per 30 minuti al buio. Al termine dell'incubazione gli intestini vengono lavati con PBS 1X per 5 volte, tolti dal tulle e posti su un vetrino portaoggetto. Dopo aver asciugato il PBS in eccesso il tessuto viene coperto con Prolong Gold (Invitrogen) e con il vetrino coprioggetto. I preparati vengono osservati immediatamente al microscopio confocale (LEICA TCS SP2, munito di laser Argon/kripton e laser UV Elio/Neon). Il fluorocromo viene eccitato ad una lunghezza d'onda di 543 nm e la fluorescenza emessa viene letta tra 555 e 620 nm.

8 Localizzazione di *JcDNV* nell'intestino medio larvale di *S. frugiperda*

Per valutare la localizzazione del densovirus di *Junonia coenia* (*JcDNV*) nell'intestino medio larvale di *S. frugiperda* dopo differenti tempi di incubazione, il tessuto isolato da larve all'ultimo stadio viene montato a foglietto in camera di Ussing come descritto nel paragrafo 4. Le soluzioni presenti nei reservoirs collegati alla camera di Ussing hanno la seguente composizione: K-gluconato 20 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 4.8 mM, saccarosio 240 mM e Tris-HCl 5 mM a pH 7 nel comparto emolinfatico o CAPS-TMAOH 5 mM a pH 10 nel comparto luminale. Nel comparto luminale è stato aggiunto *JcDNV* (100 ng/μl)

marcato con il fluorocromo Cy3 e, dopo 10, 30 o 60 minuti di incubazione, i tessuti sono stati rimossi dalla camera di Ussing e, ancora distesi sul tulle, lavati 5 volte con la soluzione del comparto emolinfatico e fissati per 30 minuti in paraformaldeide al 4% (w/v). I campioni sono stati quindi lavati 5 volte in PBS 1X, rimossi dal tulle e posti su di un vetrino portaoggetto. Dopo aver eliminato il PBS in eccesso, il tessuto viene coperto con Prolong Gold (Invitrogen) e con un vetrino coprioggetto. I preparati sono stati immediatamente osservati al microscopio confocale (CLSM, TCS SP2 AOBS, Leica, munito di laser Ar/Kr e di laser UV He/Ne). Il fluorocromo viene eccitato ad una lunghezza d'onda di 561 nm e la fluorescenza emessa viene letta tra 555 e 620 nm.

9 Localizzazione del *JcDNV* in presenza di inibitori dell'endocitosi

Per indagare il meccanismo coinvolto nell'internalizzazione di *JcDNV* nelle cellule dell'intestino medio larvale di *S. frugiperda*, i tessuti isolati da larve all'ultimo stadio sono stati montati in camera di Ussing e perfusi con le soluzioni riportate nel paragrafo 8.

I tessuti sono stati preincubati per 30 minuti in assenza (controllo) o presenza di 3 inibitori che interferiscono con i processi di endocitosi: Dynasore (DYN, 400 μ M) che inibisce l'endocitosi mediata da clatrina, Metil- β -ciclodestrina (M β CD, 60 μ M) che inibisce l'endocitosi mediata da lipid-raft e Wortmannina (WTN, 10 μ M) una tossina che inibisce l'endocitosi mediata da recettore. Al termine della preincubazione è stato aggiunto il virus (100 ng/ μ l) nel comparto luminale e dopo 10 minuti i tessuti sono stati rimossi dalla camera di Ussing e fissati per 20 minuti in paraformaldeide al 4 %. Dopo 3 lavaggi in PBS, i tessuti sono stati incubati per 15 minuti in PBS contenente BSA all'1 % e permeabilizzati in PBS contenente Triton X 100 allo 0,1 %. Dopo ulteriori 3 lavaggi in PBS, i tessuti sono stati incubati per 1 ora in PBS contenente l'anticorpo policlonale contro la proteina del capsid VP4 diluito 1:1000. I tessuti sono stati quindi lavati in PBS contenente BSA all'1 % e incubati per 1 ora nella stessa soluzione a cui vengono aggiunti l'adeguato anticorpo secondario diluito 1/50 (Jackson 711-175-152) marcato con Cy3 e la falloidina marcata con FITC (2 μ g/ml) in modo da poter visualizzare, rispettivamente, le particelle virali e i filamenti di actina. I nuclei sono stati marcati con Hoechst (5 μ g/ml). I tessuti sono stati quindi preparati per la visione al microscopio confocale come descritto nel paragrafo 8. Il

Cy3 viene eccitato ad una lunghezza d'onda di 635 nm e la fluorescenza emessa viene letta tra 650 e 670 nm, il FITC viene eccitato ad una lunghezza d'onda di 488 nm e la fluorescenza emessa viene letta tra 500 e 560 nm, l'Hoechst viene eccitato ad una lunghezza d'onda di 405 nm e la fluorescenza emessa viene letta tra 410 e 430 nm.

10 Quantificazione del flusso di JcDNV attraverso l'intestino medio larvale di *S. frugiperda*

Per misurare il flusso transepiteliale di JcDNV diretto dal comparto luminale a quello emolinfatico, il tessuto intestinale isolato dalle larve *S. frugiperda* all'ultimo stadio è stato montato nella camera di Ussing e perfuso con le soluzioni riportate nel paragrafo 8. Il virus (100 ng/ μ l) è stato aggiunto alla soluzione luminale e dopo 10 e 30 minuti di incubazione state recuperate le soluzioni luminale ed emolinfatica per determinare, mediante PCR quantitativa, la quantità di virus che ha superato il tessuto, espressa come rapporto tra il DNA virale presente nel comparto emolinfatico e quello presente nel comparto luminale. Il DNA virale è stato purificato utilizzando il kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). La qPCR è stata eseguita utilizzando i seguenti primers:

senso: 5' GGAGGAGGCAACACTTCAGG 3'

antisenso: 5' TCTGCCATGGAATTCAGCC 3'

I primer virali sono stati disegnati utilizzando il Primer Express software (Applied Biosystem). Essi permettono l'amplificazione di un frammento del DNA virale di 200 pb localizzato nell'Open Reading Frame 1, la quale codifica per la proteina maggiormente espressa nel capsido, la Proteina Virale 4 (VP4). Per le reazioni di qPCR è stato utilizzato il kit Platinum SYBR Green Super Mix (Invitrogen). Le condizioni della reazione è la seguente: 2 minuti a 50 °C, 2 minuti a 95 °C, 40 cicli costituiti da 15 minuti a 95 °C e 30 secondi a 60 °C. L'apparato utilizzato è ABI Pris 7000 (Applied Biosystem). È stata anche preparata una retta di taratura utilizzando come template un plasmide contenente il DNA virale a concentrazione nota.

11 Disaggregazione enzimatica dell'intestino medio larvale per l'ottenimento di cellule isolate

Circa venti larve di *B. mori* al terzo giorno della V età per ogni condizione sperimentale sono state anestetizzate in CO₂ e la loro superficie esterna è stata sterilizzata immergendole consecutivamente, per circa un minuto, in ognuna delle seguenti soluzioni acquose: detergente antisettico (Pharma Soap, Medical) al 10% (v/v), acido p-idrossibenzoico metilestere (Sigma) allo 0,3% ottenuto diluendo 1:50 in acqua una soluzione al 15% (w/v) dello stesso acido in etanolo al 95%; ipoclorito di sodio allo 0,1% (v/v).

L'intestino larvale è stato quindi isolato, come riportato nel paragrafo 4, con la sola differenza che, dopo la rimozione della parte cefalica e caudale della larva, la parte centrale viene posta in una capsula petri contenente la seguente soluzione (IPS, Insect Physiological Solution): KCl 47 mM, MgCl₂ 20,5 mM, MgSO₄ 20 mM, K₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, CaCl₂ 1 mM, saccarosio 88 mM, pH 7 modificata con l'aggiunta di gentamicina (50 mg/ml, Sigma) allo 0,2% (v/v), di Soluzione Antibiotica–Antimicotica (Stock 1X, Sigma) allo 0,01% (v/v) e di ipoclorito di sodio allo 0,003‰ (v/v). Si isola quindi l'intestino medio larvale, lo si apre a foglietto, eseguendo un taglio longitudinale, e si effettuano 4 lavaggi, ognuno di circa 10 minuti: i primi due in IPS modificato, gli ultimi due in IPS. Gli intestini vengono poi trasferiti in una capsula petri contenente IPS senza Ca²⁺ e Mg²⁺ (KCl 47 mM, K₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, saccarosio 192 mM, pH 7) con l'aggiunta di tripsina al 2,5% (w/v) e lasciati in agitazione per 30 minuti. Durante questa incubazione, l'enzima disaggrega parzialmente il tessuto permettendo di ottenere cellule intestinali isolate in sospensione. La soluzione è stata poi filtrata attraverso un colino con maglia da 100 µm: i frammenti di tessuto sono stati scartati, mentre le cellule presenti nella soluzione (per la maggior parte cellule di intestino medio mature, ossia cellule colonnari e a coppa) sono state centrifugate a 400 g per 5 minuti. Il surnatante è stato eliminato e il pellet lavato due volte mediante centrifugazione sempre in IPS senza Ca²⁺ e senza Mg²⁺ per allontanare completamente l'enzima. Le cellule di intestino medio ottenute tramite questo procedimento vengono immediatamente utilizzate per gli esperimenti.

12 Determinazione del calcio citosolico

Per determinare possibili variazioni della concentrazione citosolica di calcio nelle cellule dell'intestino medio larvale di *B. mori* e *S. frugiperda* in differenti condizioni sperimentali, è stata utilizzata la sonda fluorescente Fluo-3 acetossimetilestere (Fluo-3AM). Il Fluo-3AM è in grado di superare le membrane plasmatiche grazie al fatto che ai suoi gruppi carbossilici sono inizialmente legati (tramite un legame estere) dei gruppi acetossimetile che rendono la molecola lipofila; una volta all'interno della cellula, i gruppi acetossimetile vengono rimossi dalle esterasi intracellulari: la sonda è così in grado di legare gli ioni calcio presenti nel citosol e di assorbire la luce ad una lunghezza d'onda di 488 nm ed emetterla a 525 nm. L'intensità della fluorescenza è strettamente correlata alla concentrazione degli ioni calcio liberi nel citosol ed è quindi possibile stimare eventuali variazioni citosoliche di questo ione in differenti condizioni sperimentali.

Le cellule, ottenute per disaggregazione enzimatica dell'epitelio intestinale, dopo l'ultimo lavaggio, sono state risospese in 300 µl di IPS senza Ca^{2+} e Mg^{2+} per ogni condizione sperimentale, e poste in un vetrino goccia-pendente. Le cellule sono state quindi incubate per 30 minuti, a 25 °C e al buio, con Fluo-3AM (5 µM); durante questo intervallo di tempo la sonda fluorescente si accumula all'interno delle cellule, che vengono poi lavate tre volte in IPS senza Ca^{2+} e Mg^{2+} , in modo da rimuovere il fluorocromo presente all'esterno delle cellule stesse. Durante questi lavaggi, della durata complessiva di circa 15 minuti, le esterasi intracellulari rimuovono i gruppi acetossimetile, rendendo il Fluo-3AM capace di legare lo ione calcio.

Per determinare se il C10 possa causare una variazione della concentrazione del Ca^{2+} citosolico, le cellule isolate dell'intestino larvale di *B. mori*, al termine dei lavaggi di 15 minuti sopra descritti, vengono poste in una petri con fondo di vetro e vengono incubate in IPS senza Ca^{2+} e Mg^{2+} , in assenza (controllo) o presenza di C10 (2 mM). Le cellule vengono immediatamente osservate al microscopio a fluorescenza (AXIOVERT 200M, dotato di AXIOcam HRm, Zeiss). Vengono acquisite immagini dell'area prescelta in campo chiaro e in fluorescenza ogni minuto fino al quindicesimo minuto di incubazione. La sonda fluorescente viene eccitata ad una lunghezza d'onda di 488 nm e la fluorescenza emessa viene letta tra 500 e 560 nm. L'esperimento è stato eseguito in triplo.

Per stabilire se il JcDENV è in grado di causare variazioni nella concentrazione di calcio citosolico, le cellule isolate dell'intestino larvale di *S. frugiperda*, al termine dei

lavaggi di 15 minuti sopra descritti, vengono poste in un vetrino goccia pendente, incubate in IPS senza Ca^{2+} e senza Mg^{2+} in assenza (controllo) o in presenza di *JcDNV* (0.1 ng/ μl) per 10 minuti e poi lavate per tre volte e immediatamente osservate al microscopio a fluorescenza (AXIOVERT 200M, dotato di AXIOcam HRm, Zeiss). Vengono quindi acquisite immagini in campo chiaro e in fluorescenza. Per ogni esperimento, eseguito in triplo, sono state osservate almeno 200 cellule. E' stata anche eseguita la quantificazione dell'intensità della fluorescenza nelle due condizioni sperimentali utilizzando il software AxioVision 4.6.3 (Zeiss).

Capitolo terzo

Risultati

1 Modulazione della permeabilità della membrana peritrofica

La chitinasi A (ChiA) virale codificata dal virus della nucleopoliedrosi di *Autographa californica* (AcMNPV) è un enzima che agisce sulla chitina delle larve ospiti infettate, fino a portarle a completa liquefazione. Il suo effetto è molto marcato anche sulla membrana peritrofica (MP) e il suo uso come potenziale nuovo strumento per il controllo degli insetti è stato inizialmente studiato in *B. mori*. In particolare, si è osservato che la permeabilità al colorante blu di metilene della MP, isolata *in vitro* in camera di Ussing, è incrementata in presenza di ChiA (Rao *et al.*, 2004).

1.1 Effetto *in vitro* della ChiA sulla permeabilità della MP al blu di metilene e al TMOF in *H. virescens*

La sperimentazione è stata ripetuta utilizzando una larva infestante, valutando gli effetti della ChiA sul flusso di due molecole di dimensioni differenti, il colorante blu di metilene (320 Da) e il peptide TMOF (866 Da), attraverso MP di *H. virescens* montate in camera di Ussing (vedi Materiali e Metodi paragrafo 2).

Il flusso di blu di metilene è stato determinato aggiungendo il colorante nel comparto endoperitrofico e determinando spettrofotometricamente la quantità totale di colorante diffuso nel comparto ectoperitrofico. Il grafico riportato in Figura 1.1 mostra come il flusso del blu di metilene sia significativamente aumentato rispetto ai controlli nelle MP incubate in presenza di ChiA 40 µg/ml.

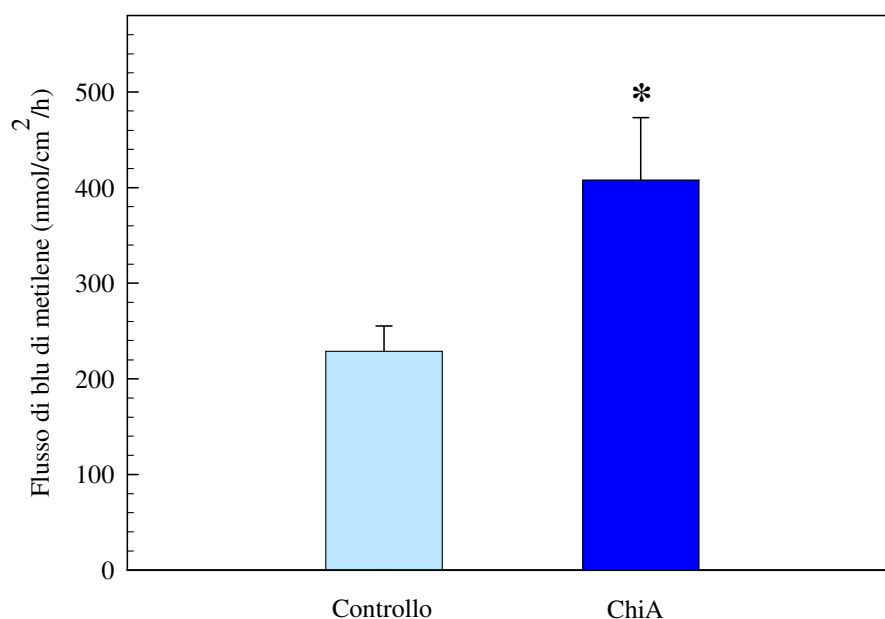


Figura 1.1: Flusso del colorante blu di metilene attraverso la MP isolata da larve di *Heliothis virescens*, incubate in assenza (controllo) o presenza di ChiA 40 µg/ml. Media ± E. S. di 3 repliche. * P < 0.05, test del *t* di Student.

Per verificare se la ChiA aumenta la permeabilità della MP anche a molecole di maggiori dimensioni, è stato misurato il flusso del TMOF, un decapeptide con conformazione lineare avvolta a elica sinistrorsa (vedi Introduzione Figura 2.9) che conferisce alla molecola un certo ingombro sterico. A differenza del blu di metilene, che è stato utilizzato semplicemente come molecola marker, il TMOF è una molecola di un certo interesse applicativo, in quanto il peptide è un ormone che, legandosi ad un recettore intestinale, determina il blocco della sintesi della tripsina nell'intestino medio. L'aumento del passaggio di questo potenziale insetticida attraverso la MP potrebbe avere quindi interessanti ripercussioni nell'ambito del controllo degli insetti dannosi.

Il grafico riportato in Figura 1.2 mostra come il flusso di TMOF sia significativamente aumentato nelle MP incubate in presenza di ChiA rispetto ai controlli.

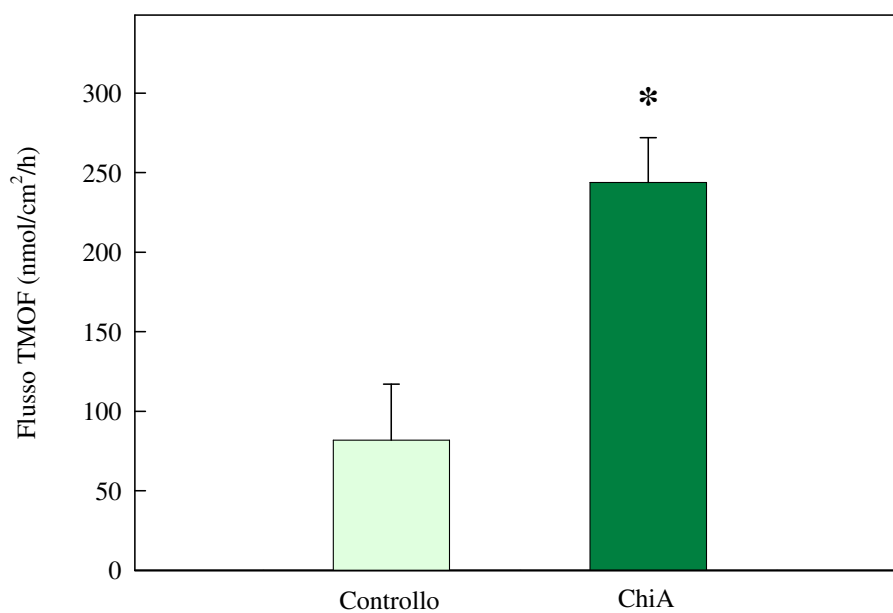


Figura 1.2: Flusso di TMOF attraverso la MP isolata da larve di *Heliothis virescens*, incubata in assenza (controllo) o presenza di ChiA 40 µg/ml. Media ± E. S. di 3 repliche. * P < 0.05, test del *t* di Student.

1.2 Effetto della ChiA *in vivo* sulla permeabilità della MP in larve alimentate su piante di tabacco transgeniche esprimenti l'enzima

Larve di *H. virescens* sono state alimentate con piante di tabacco esprimenti ChiA (prodotta nel laboratorio della Prof.ssa R. Rao presso il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali dell'Università di Napoli Federico II) a partire dal primo giorno della quarta età larvale e l'effetto sulla permeabilità della MP è stato verificato misurando il flusso di blu di metilene attraverso le MP isolate dalle larve allevate su piante transgeniche per 132 ore, poiché solo dopo questo tempo le dimensioni delle MP sono abbastanza ampie da poter essere montate nella camera di Ussing.

La figura 1.3 mostra che il flusso del blu di metilene attraverso la MP isolata dalle larve allevate su piante di tabacco esprimenti la ChiA è significativamente maggiore rispetto a quello misurato nelle MP controllo isolate da larve alimentate su piante wild type.

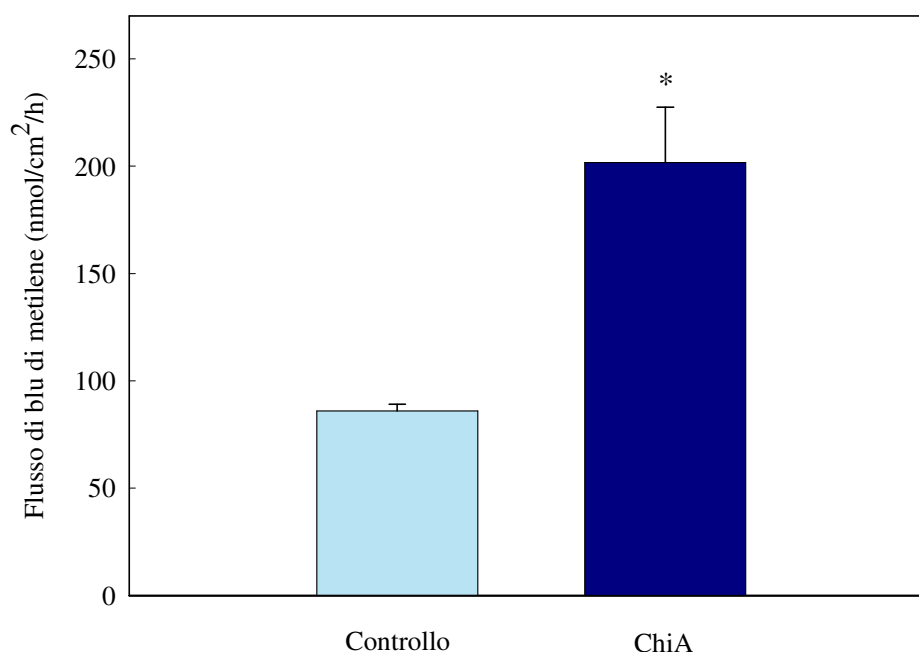


Figura 1.3: Flusso di blu di metilene attraverso MP isolate da larve di *Heliothis virescens*, alimentate su piante transgeniche esprimenti la ChiA o su piante wild type (controllo). Media \pm E. S. di 3 repliche. * $P < 0.05$, test del *t* di Student.

2 Modulazione della via paracellulare nell'intestino larvale di lepidottero

Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che la permeabilità della via paracellulare dell'intestino larvale di lepidottero è modulabile dai due mediatori intracellulari AMP ciclico e Ca^{2+} (Fiandra *et al.*, 2006). E' evidente l'importanza di chiarire quali fattori e percorsi intracellulari mediano la maggiore o minore permeabilità della giunzione e di identificare molecole, somministrabili oralmente, in grado di permeabilizzare la via paracellulare.

2.1 Effetto dell'acido grasso a media catena caprato di sodio (C10) sulla resistenza paracellulare dell'intestino larvale di *B. mori* e *S. littoralis*

Come riportato nell'introduzione, il caprato di sodio (C10) aumenta la permeabilità della via paracellulare in mammifero, attivando una cascata di eventi intracellulari che, tramite l'aumento della concentrazione di calcio, modula la permeabilità della giunzione occludente (TJ) (Cano-Cebrián *et al.*, 2005). Abbiamo quindi verificato se questa molecola fosse capace di alterare la permeabilità della via paracellulare anche in lepidottero.

Abbiamo misurato il valore della resistenza paracellulare (R_{sh}) in intestini isolati da larve di *B. mori* in V età montati a foglietto nella camera di Ussing (come descritto in Materiali e Metodi paragrafo 4), in condizioni sperimentali in cui tale valore è un indice della permeabilità agli ioni attraverso la sola via paracellulare (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 5). L'intestino è stato incubato per 180 minuti con le soluzioni luminale ed emolinfatica (riportate in Materiali e Metodi, paragrafo 5), in assenza (controllo) o in presenza di C10 aggiunto al solo comparto luminale dopo la prima ora di incubazione.

Il grafico riportato in figura 2.1 mostra l'andamento della R_{sh} espressa come variazione percentuale del valore di resistenza misurato 90 minuti dopo l'inizio dell'incubazione. Tali valori erano $60.2 \pm 2.6 \Omega\text{cm}^2$ per il controllo e $60.0 \pm 2,2 \Omega\text{cm}^2$ per le incubazioni con C10 (i valori sono la media \pm E.S. di 5 diversi esperimenti). Il tempo 0

riportato nel grafico, corrisponde al trentesimo minuto dopo l'aggiunta di C10 nel comparto luminale dell'apparato di perfusione e, nel caso del controllo, al novantesimo minuto dopo l'inizio dell'incubazione. Si è scelto di non riportare in grafico i valori di R_{sh} calcolati nella prima ora e mezza di incubazione poiché in questa fase non si riscontrano variazioni significative della R_{sh} tra le due condizioni sperimentali.

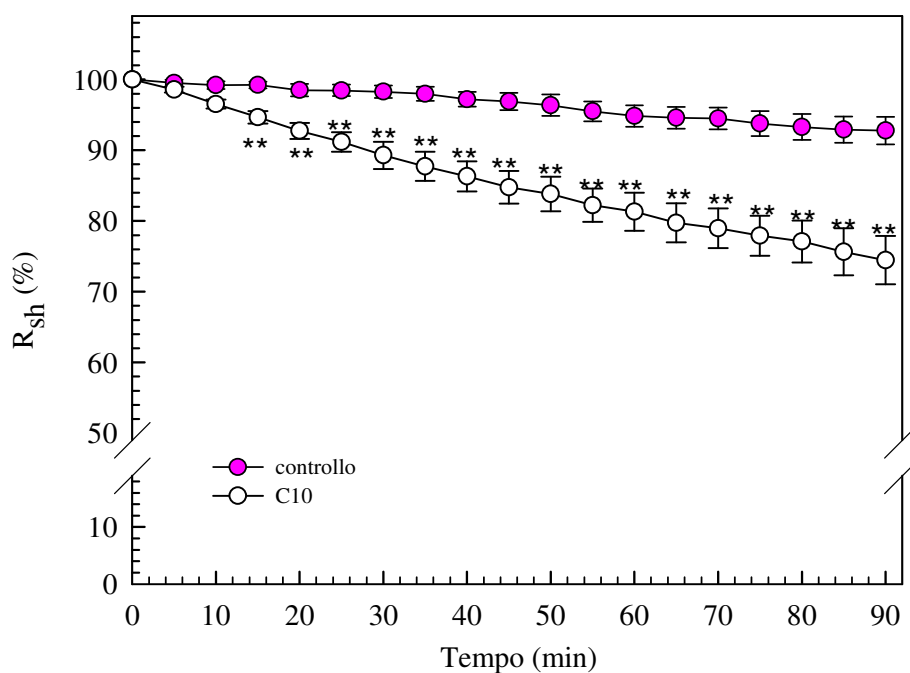


Figura 2.1 Andamento nel tempo della resistenza elettrica paracellulare (R_{sh}) in assenza o in presenza di caprato di sodio 20 mM nell'intestino larvale di *B. mori*. Valori medi \pm E.S. di 5 esperimenti. $**P < 0.01$ rispetto al controllo (test del t di Student).

Nella figura 2.1 si osserva la progressiva diminuzione della R_{sh} , in presenza di C10 rispetto ai valori della condizione di controllo. La riduzione diviene significativa dopo 45 minuti di esposizione del tessuto alla sostanza (nel grafico questo tempo corrisponde al quindicesimo minuto).

Da questo primo esperimento possiamo concludere che il C10 è in grado di causare un aumento della permeabilità della via paracellulare agli ioni nell'epitelio intestinale delle larve di *B. mori*.

Abbiamo esaminato l'effetto del C10, alla stessa concentrazione e nelle stesse condizioni sperimentali dell'esperimento precedente, anche sull'intestino larvale di *S. littoralis*, un tipico lepidottero dannoso. Anche per questa sperimentazione si è scelto di riportare in grafico (Fig. 2.2) la variazione percentuale della R_{sh} rispetto al valore di resistenza misurato 90 minuti dopo l'inizio dell'incubazione. Tali valori erano $62.3 \pm 2.1 \Omega\text{cm}^2$ per il controllo e $61.9 \pm 1,8 \Omega\text{cm}^2$ per le incubazioni con C10 (i valori sono la media \pm E.S. di 5 diversi esperimenti). Anche in questo esperimento il tempo 0 riportato nel grafico corrisponde al trentesimo minuto dopo l'aggiunta di C10 nel comparto luminale e, nel caso del controllo, al novantesimo minuto dopo l'inizio dell'incubazione. Nella prima ora e mezza di incubazione non si riscontravano variazioni significative della R_{sh} tra le due condizioni sperimentali.

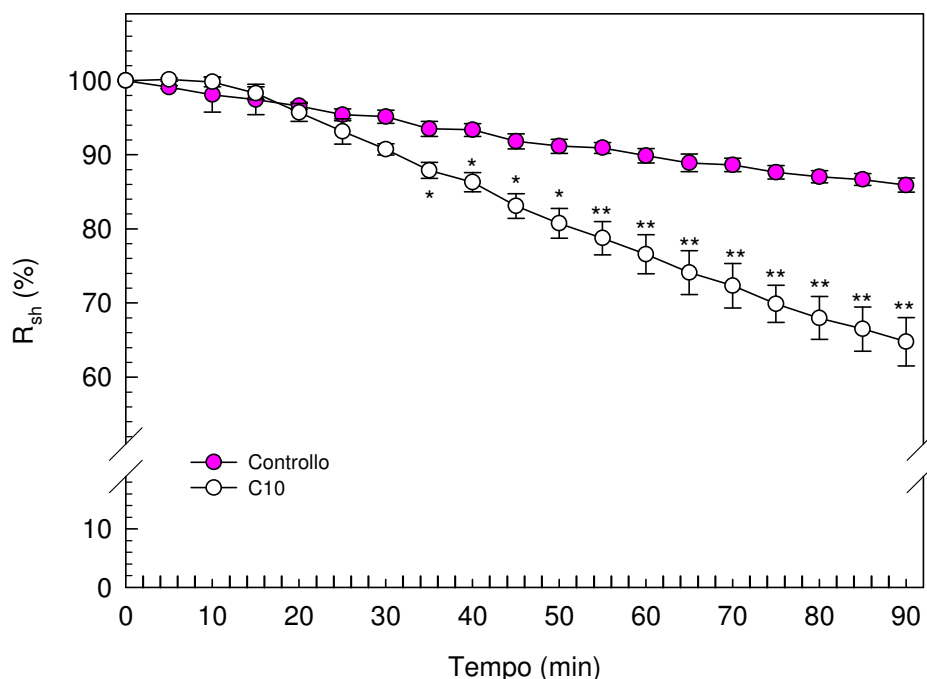


Figura 2.2: Andamento nel tempo della resistenza elettrica paracellulare (R_{sh}) in assenza o in presenza di caprato di sodio 20 mM nell'intestino larvale di *S. littoralis*. Valori medi \pm E.S. di almeno 4 esperimenti. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ rispetto al controllo (test del t di Student).

Il tempo d'azione della sostanza varia rispetto a quello osservato in *B. mori* (Figura 2.1), dove la riduzione della R_{sh} indotta dal C10 diviene significativa dopo 45 minuti di esposizione del tessuto, mentre in *S. littoralis* (Figura 2.2) una differenza significativa si osserva solo dopo 65 minuti. Il fatto che la modulazione delle SJ si manifesti più tardivamente in *S. littoralis* che in *B. mori* suggerisce una diversa sensibilità dell'epitelio intestinale alla molecola.

Comunque, l'effetto del caprato di sodio sulla R_{sh} dell'intestino larvale di lepidottero è lento e graduale (Figure 2.1 e 2.2), quindi diverso da quello osservato nell'intestino di mammifero, dove il decremento della resistenza indotto dal C10 può essere rapido: in cellule Caco-2 incubate con C10 20 mM si è osservata una riduzione della resistenza pari a circa il 50% del suo valore iniziale dopo soli 5 minuti e inferiore al 10% dopo 20 minuti (Sakai *et al.*, 1997).

2.2 Effetto del C10 sulla permeazione di piccole molecole organiche

Per verificare se il C10 è in grado di aumentare la permeabilità della via paracellulare non solo agli ioni, ma anche alle molecole organiche, il tessuto, montato a foglietto nella camera di Ussing, è stato incubato in presenza delle due molecole fluorescenti proctolin rodaminato (rh-proctolin) (649 Da) e fluoresceina (332 Da) nel comparto luminale, ed è stato misurato il loro passaggio nel comparto emolinfatico dopo differenti tempi di incubazione, in presenza o assenza di C10.

Il pentapeptide proctolin è un neuropeptide identificato nel sistema nervoso di differenti ordini di insetti per il quale è stata proposta una possibile attività come agente di controllo degli insetti dannosi (Bavoso *et al.*, 1995; Fiandra *et al.*, 2010). Il peptide supera la barriera intestinale solo attraverso la via paracellulare (Fiandra *et al.*, 2009) ed è quindi una molecola particolarmente indicata per valutare l'effetto del C10 sulla permeabilità della via paracellulare.

L'intestino è stato incubato per due ore con rh-proctolin in assenza o presenza di C10. Per tutta la durata dell'esperimento, nelle soluzioni di incubazione era presente un cocktail di inibitori delle peptidasi (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 7), per evitare la degradazione del peptide. Al termine dell'incubazione è stata quantificata la presenza di rh-proctolin nel comparto emolinfatico.

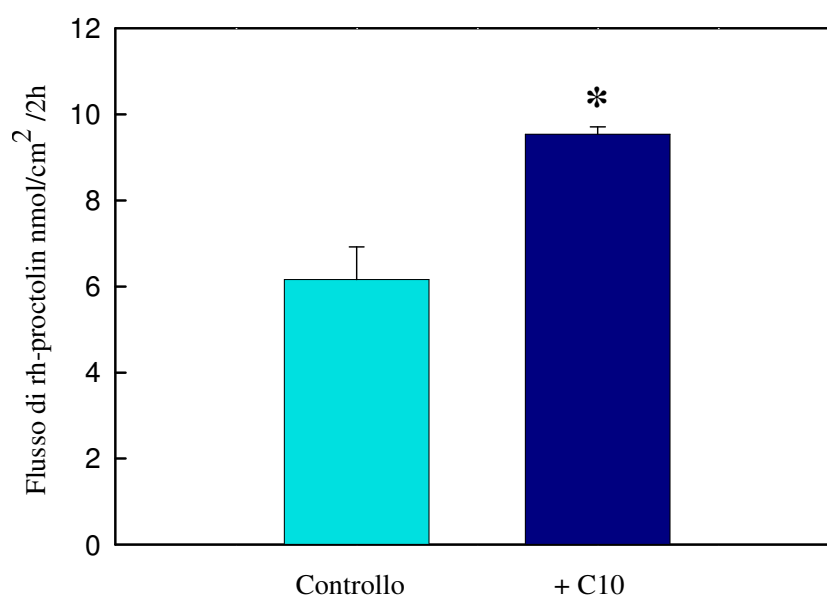


Figura 2.3 Flusso di proctolin rodaminato (rh-proctolin) 130 μ M in assenza (controllo) o in presenza di C10 20 mM nel comparto luminale. Valori medi \pm E.S. di 3 esperimenti. * $P < 0.05$, test del t di Student.

Come mostra la Figura 2.3 il flusso di rh-proctolin è significativamente maggiore in presenza di C10 rispetto al controllo.

Al termine delle incubazioni, gli intestini sono stati rimossi dalle camere di Ussing e analizzati al microscopio confocale. In assenza di C10, il segnale fluorescente dovuto alla presenza di proctolin rodaminato negli spazi intercellulari è piuttosto debole, ad indicare che la permeabilità della SJ al peptide è estremamente bassa (Figura 2.4 A). In presenza di C10, il proctolin è invece abbondantemente diffuso negli spazi intercellulari (Figura 2.4 B), confermando la capacità dell'acido grasso di aumentare la permeabilità della giunzione settata.

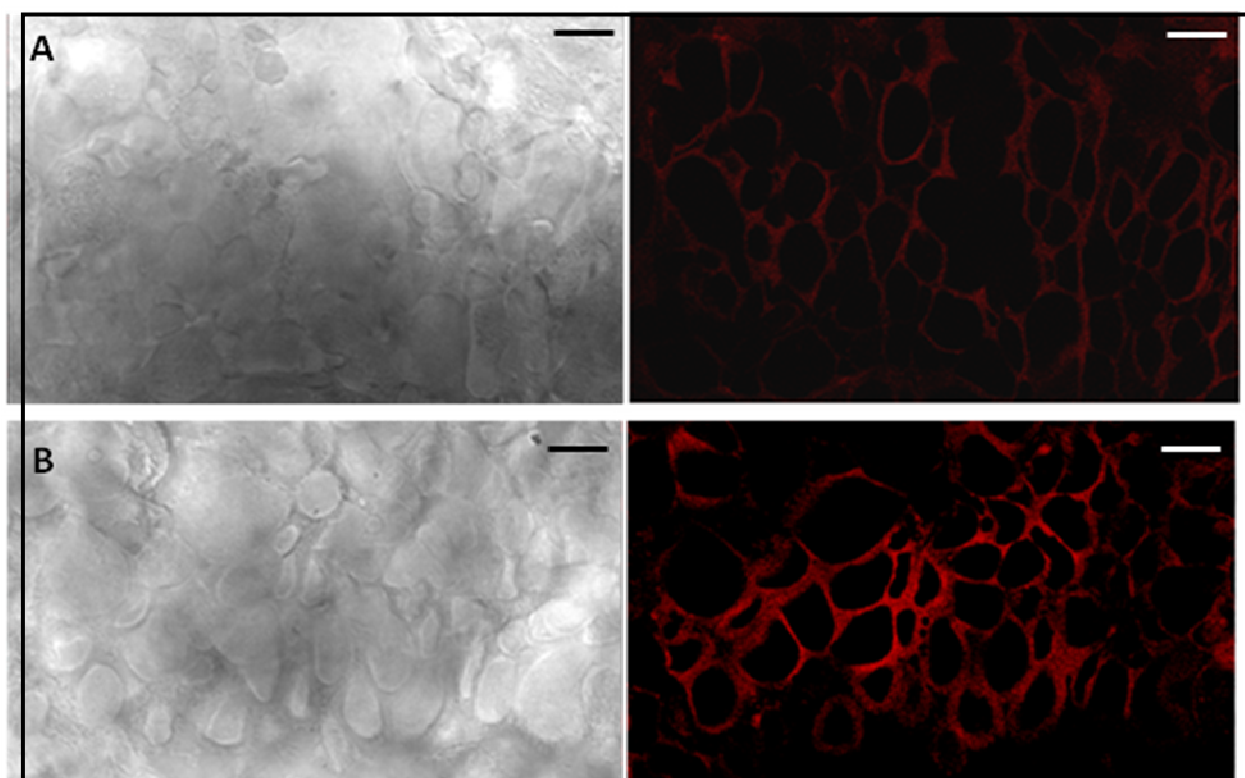


Figura 2.4: Intestini medi larvali di *B. mori* isolati in camere di Ussing e incubati per 2 ore con rh-proctolin (130 μ M) in assenza (A) o in presenza di C10 20 mM (B) nel comparto luminale. Al termine dell'incubazione il tessuto è stato fissato e immediatamente osservato in microscopia confocale. Le immagini riportate si riferiscono a singole sezioni ottiche acquisite al microscopio confocale in campo chiaro e in fluorescenza. Il segnale fluorescente negli spazi intercellulari è molto più intenso quando nel comparto luminale è presente C10. Barra: 20 μ m

L'effetto del C10 è stato valutato anche sul passaggio di fluoresceina. La fluoresceina, infatti, non attraversa la membrana plasmatica delle cellule dell'epitelio intestinale delle larve di *B. mori*: in esperimenti eseguiti nel nostro laboratorio con cellule intestinali isolate incubate per 3 ore con la molecola non si è osservata internalizzazione (dati non pubblicati). Inoltre, il coefficiente di permeabilità apparente della fluoresceina attraverso l'epitelio intestinale delle larve di *B. mori* è basso (Fiandra *et al.*, 2009), poiché in ambiente alcalino, quale quello presente nel lume intestinale *in vivo* (vedi Introduzione, paragrafo 2.2.2) e riprodotto negli esperimenti *in vitro*, la molecola presenta due cariche negative, per cui il suo passaggio è sfavorito dalle deboli cariche fisse negative presenti nel complesso giunzionale (Fiandra *et al.*, 2006).

Il tessuto è stato incubato per due o tre ore con fluoresceina 3 mM nel comparto luminale in assenza (controllo) e in presenza di C10.

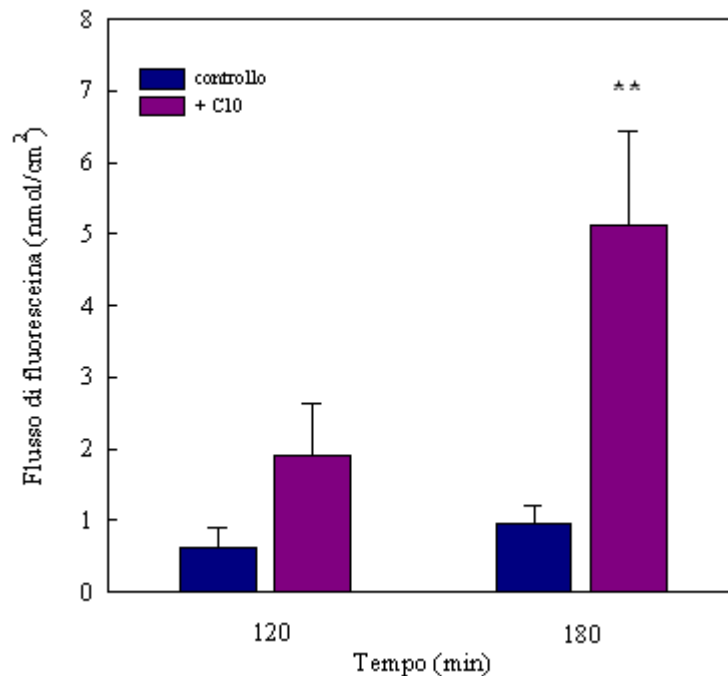


Figura 2.5 Flusso di fluoresceina 3 mM dopo 120 o 180 minuti di incubazione in assenza (controllo) o presenza di C10 20 mM nel comparto luminale. Valori medi \pm E.S. di 3 esperimenti. ** $P < 0,01$ rispetto al controllo (test del t di Student).

La figura 2.5 mostra che il C10 induce un aumento significativo del passaggio di fluoresceina dopo tre ore di incubazione. Nelle incubazioni di due ore è evidente l'indicazione di una maggiore permeabilità della molecola in presenza di caprato di sodio, anche se non statisticamente significativa.

2.3 Analisi della morfologia della giunzione in intestini incubati con C10

Poiché i dati funzionali indicano chiaramente che il caprato di sodio induce un aumento della permeabilità paracellulare, abbiamo esaminato la morfologia fine della giunzione settata in seguito a esposizione a C10.

Gli intestini montati a foglietto nella camera di Ussing sono stati incubati in assenza (controllo) o presenza di C10. Al termine delle incubazioni sono stati prelevati e, ancora appoggiati sul tulle, sono stati fissati in glutaraldeide al 4% per poi essere preparati per la visione al TEM nel laboratorio del Dr. G. Tettamanti (Dipartimento di Biotecnologie e Scienze Molecolari, Università degli Studi dell'Insubria).

Nella figura 2.6 sono riportate le immagini ottenute. Nel pannello A (controllo) la giunzione presenta la tipica organizzazione della giunzione settata, mentre nell'immagine riportata in B è chiaramente visibile a livello della giunzione un ampio scollamento tra le membrane plasmatiche delle due cellule adiacenti.

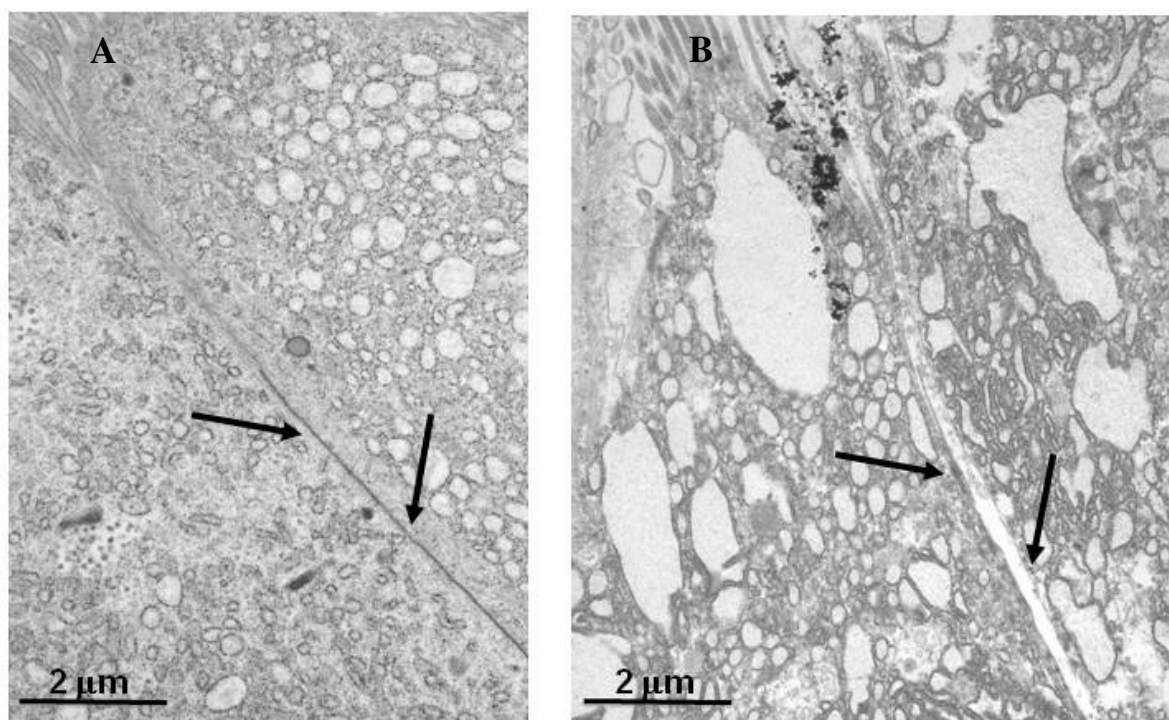


Figura 2.6: Analisi morfologica della giunzione settata dell'intestino medio incubato per 2 ore in assenza (A) o in presenza (B) di C10 20 mM nel comparto luminale. La freccia indica la giunzione.

2.4 Variazione della concentrazione intracellulare di calcio in cellule intestinali incubate con C10

Nell'intestino larvale di *B. mori*, la permeabilità della giunzione settata è modulata dalla variazione della concentrazione intracellulare di calcio (Fiandra *et al.*, 2006), l'evento fondamentale della via di trasmissione del segnale innescata dal C10 in mammifero (riportata in Cano-Cebrián *et al.*, 2005) (vedi Introduzione, paragrafo 2.3.3). Per verificare se anche in lepidottero il C10 determina una mobilitazione del calcio dalle riserve intracellulari, la variazione della concentrazione citosolica del catione in risposta al C10 è stata monitorata nelle cellule intestinali utilizzando la sonda fluorescente Fluo-3 AM. Sono state impiegate cellule isolate ottenute dall'intestino larvale per disaggregazione enzimatica (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 12) caricate con Fluo-3 AM e incubate con o senza C10 2 mM. Le cellule sono poi state osservate al microscopio a fluorescenza per 15 minuti (Figura 2.7).

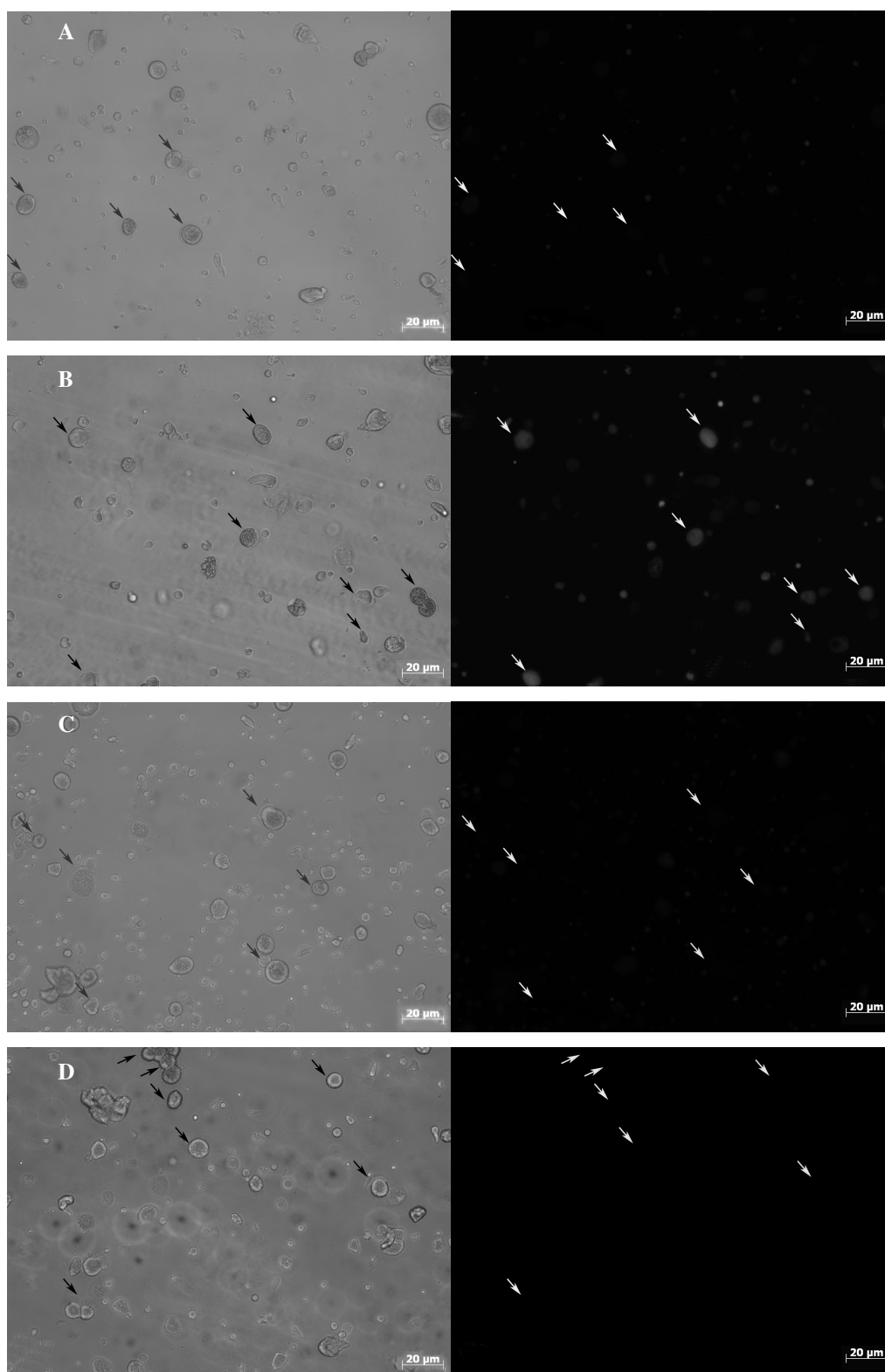


Figura 2.7 Immagini in campo chiaro (a sinistra) e in fluorescenza (a destra) di cellule intestinali ottenute per disaggregazione enzimatica del tessuto e incubate in assenza (A e C) o in presenza (B e D) di C10 2 mM per 5 (A e B) o 10 (C e D) minuti.

Mentre le cellule incubate in assenza di C10 (controllo) presentano un debolissimo segnale fluorescente che non varia per tutta la durata dell'osservazione, come dimostrano le immagini riportate in figura 2.7 A e C, acquisite rispettivamente dopo 5 e 10 minuti di incubazione, le cellule incubate con C10 per 5 minuti (Figura 2.7 B) mostrano un'intensità di fluorescenza nettamente superiore a quella delle cellule controllo incubate per lo stesso periodo di tempo. Dopo 10 minuti di incubazioni in presenza di C10, il segnale fluorescente cala drasticamente (Figura 2.7 D). Possiamo quindi affermare che il C10 causa un aumento transitorio del Ca^{2+} intracellulare nelle cellule intestinali delle larve di lepidottero, analogamente a quanto osservato in mammifero nelle cellule Caco-2 (Kimura *et al.*, 2001).

2.5 Effetto degli inibitori della fosfolipasi C (PLC), del legame calcio-calmodulina e della chinasi attiva sulla catena leggera della miosina (MLCK)

Gli effetti indotti dal C10 sulla permeabilità e sulla morfologia della giunzione dell'intestino larvale di lepidottero (Figure 2.1 e 2.2) e l'incremento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} (Figura 2.7) ci hanno spinto a verificare se la via di segnalazione utilizzata nell'insetto fosse in tutto o in parte simile a quella descritta in mammifero. (Cano-Cebrián *et al.* 2005).

A questo scopo, abbiamo incubato l'intestino larvale in presenza di C10 nel comparto luminale e in assenza (controllo) o in presenza di alcuni inibitori indicati in letteratura come specifici per le proteine chiave (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 5) coinvolte nella via di segnalazione dei fosfoinositidi attivata dal C10 (Cano-Cebrian *et al.* 2005) (vedi Introduzione, Figura 2.7). Le molecole utilizzate sono: l'inibitore della fosfolipasi C (PLC) U73122, l'inibitore del legame calcio-calmodulina W-7, e due inibitori che agiscono sulla chinasi responsabile della fosforilazione della catena leggera della miosina (MLCK), ML7 e PEPTIDE-18.

Abbiamo quindi misurato il valore della R_{sh} nell'intestino montato nella camera di Ussing e perfuso per tre ore. In entrambe le soluzioni di perfusione è stato aggiunto fin dall'inizio uno degli inibitori e, nei controlli, quando necessario, un opportuno volume di DMSO, il solvente organico in cui sono disciolti alcuni degli inibitori. La concentrazione

degli inibitori nelle soluzioni di incubazione, scelte sulla base dei valori di K_i riportati in letteratura (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 5) era: 30 μM per l' U73122, 50 μM per il W-7, 20 μM per l' ML7 e 10 μM per il PEPTIDE-18. Dopo la prima ora di incubazione, in tutti gli esperimenti, è stato aggiunto nel compartimento luminale C10.

Prima di procedere con gli esperimenti con gli inibitori, abbiamo verificato se il DMSO, solvente organico utilizzato per solubilizzare alcuni inibitori, potesse causare alterazioni della resistenza paracellulare. Abbiamo incubato l'intestino larvale di *B.* in presenza e assenza di DMSO aggiunto in un adeguato volume (1.2 % v/v) sia nel comparto luminale che in quello emolinfatico dall'inizio dell'incubazione, registrando le variazioni del valore di R_{sh} per 3 ore (Figura 2.8). Nel grafico sono riportate le variazioni percentuali del valore di resistenza misurato 90 minuti dopo l'inizio dell'incubazione per le due condizioni sperimentali: i valori di resistenza utilizzati per il calcolo saranno $60.2 \pm 2.6 \Omega\text{cm}^2$ per le incubazioni in assenza di DMSO e $61.3 \pm 0.6 \Omega\text{cm}^2$ in presenza di DMSO (media \pm E.S. di almeno 3 esperimenti).

Come si può osservare in figura 2.8, i valori della R_{sh} non sono significativamente diversi nelle due condizioni sperimentali e quindi si può escludere che il DMSO influisca su questo parametro.

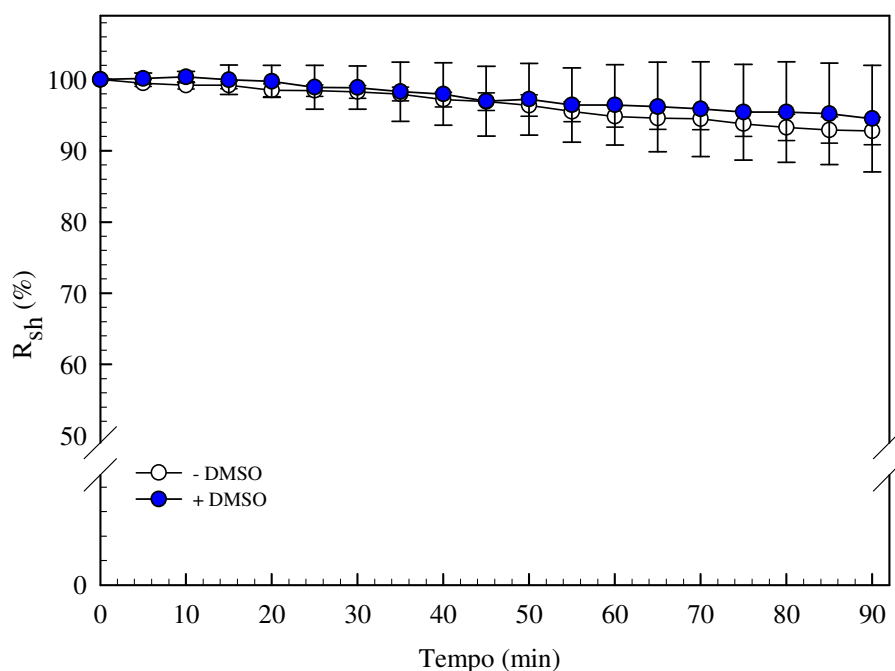


Figura 2.8 Andamento nel tempo della R_{sh} in assenza (controllo) o in presenza di DMSO. Valori medi \pm E.S. di almeno 3 esperimenti.

I grafici riportati nelle figure 2.9, 2.10, 2.11 e 2.12 mostrano l'andamento della R_{sh} , espressa come variazione percentuale rispetto al valore di resistenza misurato dopo 90 minuti di incubazione, in assenza o in presenza dei diversi inibitori. Il tempo 0 corrisponde quindi a 90 minuti dopo l'inizio dell'incubazione e a 30 minuti dopo l'aggiunta del C10.

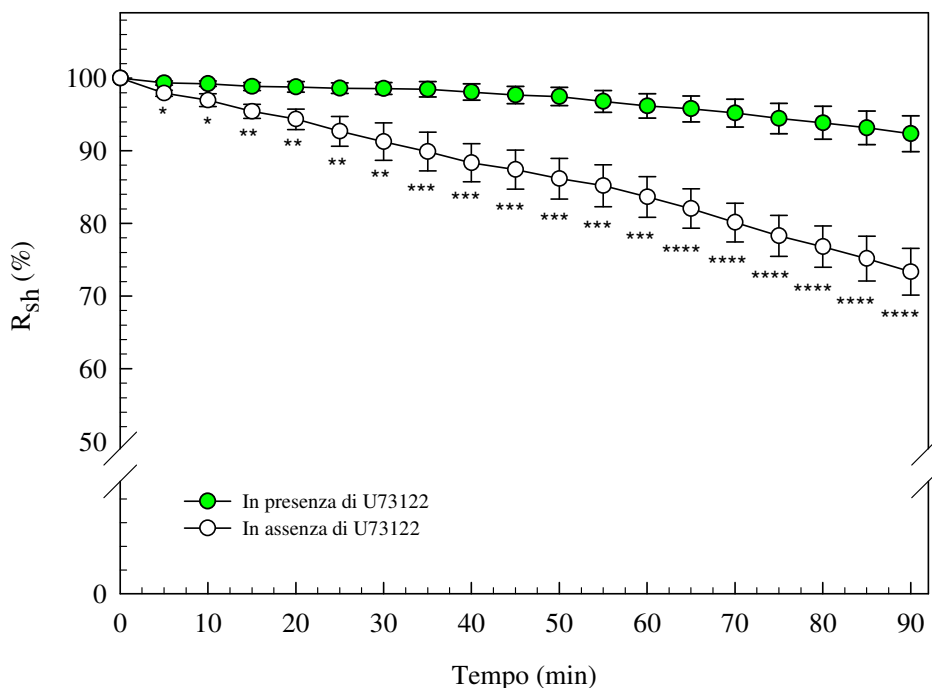


Figura 2.9: Andamento nel tempo della R_{sh} in presenza di C10 20 mM (controllo) o in presenza di C10 20 mM e U73122 30 μ M. Valori medi \pm E.S. di almeno 6 esperimenti. * $P < 0,05$, ** $P < 0,02$, *** $P < 0,01$, rispetto al controllo (test del t di Student). I valori di resistenza misurati 90 minuti dopo l'inizio dell'incubazione erano: $60,7 \pm 0,5 \Omega\text{cm}^2$ per il controllo e $61,3 \pm 0,4 \Omega\text{cm}^2$ per le incubazione in presenza di inibitore.

Nella figura 2.9 è riportato l'effetto dell'U73122. Questa molecola è in grado di inibire la fosfolipasi C, il primo enzima attivato dal C10 in mammifero. Come si osserva dal grafico, la riduzione della R_{sh} indotta da C10 scompare in presenza dell'inibitore. I valori di resistenza misurati nelle due condizioni sperimentali sono tra loro significativamente diversi a partire da 35 minuti dopo l'aggiunta del C10 (nel grafico questo tempo corrisponde al quinto minuto).

Nella figura 2.10 è riportato l'effetto del W-7, molecola che inibisce il legame del calcio alla calmodulina. Anche in questo caso si osserva la scomparsa dell'effetto causato dal C10 sulla R_{sh} . I valori di resistenza nelle due condizioni sperimentali differiscono significativamente a partire da 40 minuti dopo l'aggiunta del C10 (nel grafico questo tempo corrisponde al decimo minuto).

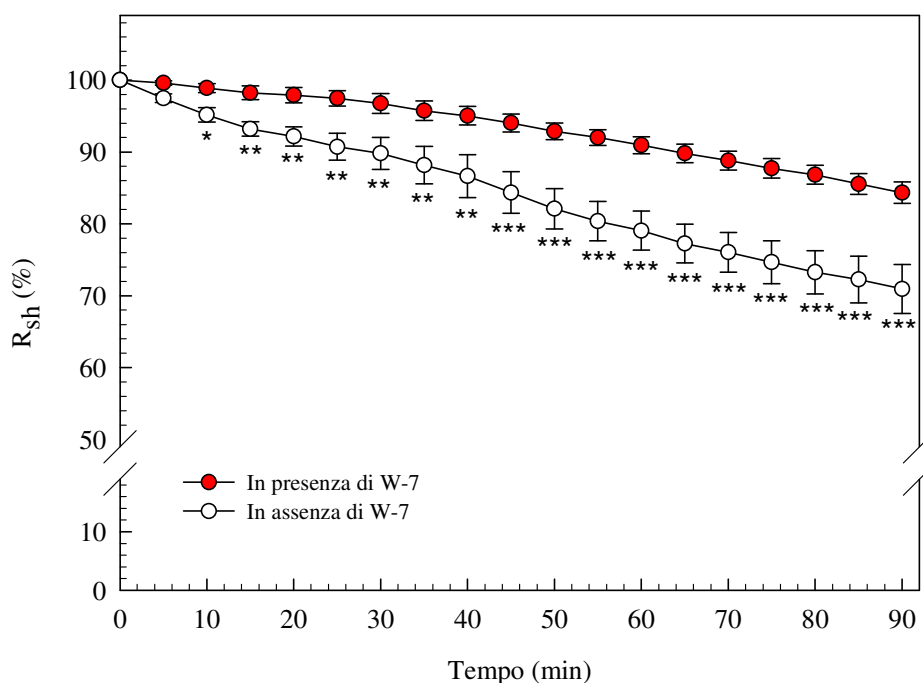


Figura 2.10 Andamento nel tempo della R_{sh} in presenza di C10 20 mM (controllo) o in presenza di C10 20 mM e W-7 50 μ M. Valori medi \pm E.S. di 6 esperimenti. * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.01$; rispetto al controllo (test del t di Student). I valori di resistenza misurati 90 minuti dopo l'inizio dell'incubazione erano: $60.8 \pm 0.5 \Omega\text{cm}^2$ per il controllo e $61.1 \pm 0.5 \Omega\text{cm}^2$ per le incubazione in presenza di inibitore.

Nella figura 2.11 è riportato l'effetto di un primo inibitore della chinasi responsabile della fosforilazione della catena leggera della miosina (MLCK), l'ML7. Nelle incubazioni con solo C10, come atteso, si ha una diminuzione del valore di R_{sh} , mentre l'effetto scompare quando è presente anche l' ML7. I valori di R_{sh} sono significativamente diversi nelle due condizioni sperimentali a partire da 45 minuti dopo l'aggiunta del C10 (nel grafico questo tempo corrisponde al quindicesimo minuto).

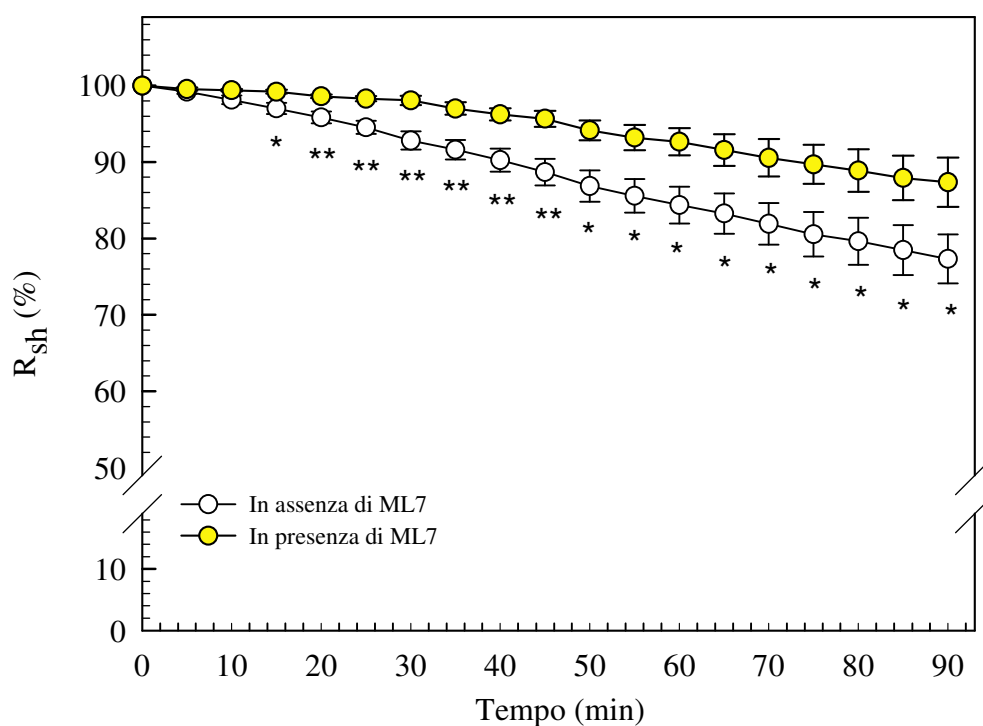


Figura 2.11 Andamento nel tempo della R_{sh} in presenza di C10 (20 mM) (controllo) o di C10 (20 mM) e ML7 20 μ M. Valori medi \pm E.S. di 5 esperimenti. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, rispetto al controllo (test del t di Student). I valori di resistenza misurati 90 minuti dopo l'inizio dell'incubazione erano: $60.9 \pm 0.6 \Omega\text{cm}^2$ per il controllo e $62.2 \pm 1.2 \Omega\text{cm}^2$ per le incubazione in presenza di inibitore.

Analogamente, abbiamo valutato l'effetto del PEPTIDE-18 (Figura 2.12). Anche questo inibitore della MLCK è in grado di annullare l'effetto sulla resistenza paracellulare indotto dal C10, ma in questo caso si osserva una differenza significativa tra le due condizioni sperimentali solo 60 minuti dopo l'aggiunta del C10 (nel grafico questo tempo corrisponde al trentesimo minuto).

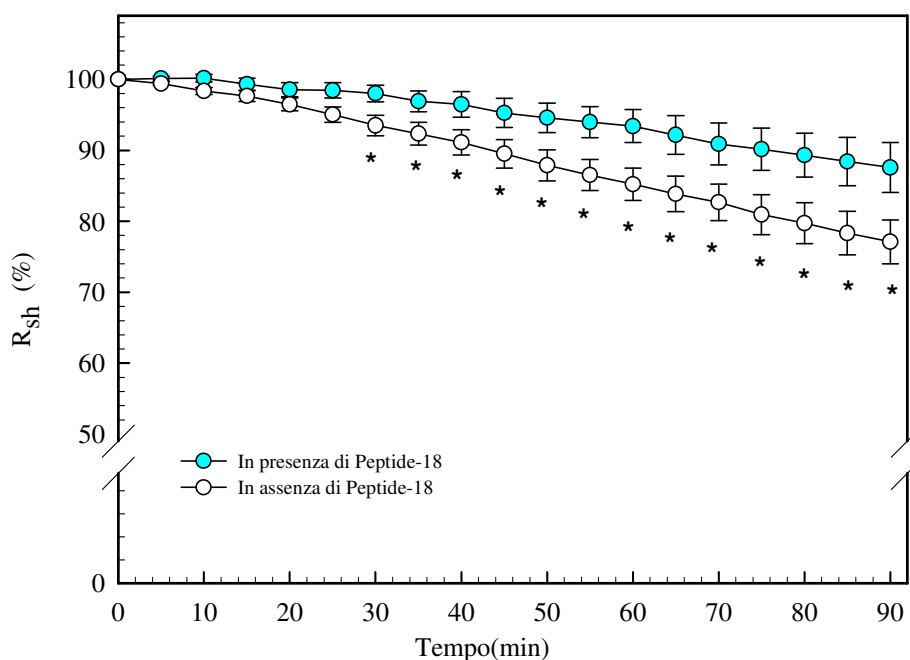


Figura 2.12 Andamento nel tempo della R_{sh} in presenza di caprato di sodio (C10) 20 mM (controllo) o in presenza di C10 20 mM e PEPTIDE-18 10 μ M. Valori medi \pm E.S.. di almeno 5 esperimenti. * $P < 0.05$; rispetto al controllo (test del t di Student). I valori di resistenza misurati 90 minuti dopo l'inizio dell'incubazione e utilizzati per calcolare la variazione percentuale della R_{sh} sono: $61.3 \pm 0.6 \Omega\text{cm}^2$ per il controllo e $62.2 \pm 1.5 \Omega\text{cm}^2$ per le incubazione in presenza di inibitore.

3 Il densovirus di *Junonia coenia* e la sua permeazione attraverso l'intestino medio delle larva suscettibile *Spodoptera frugiperda*

I densovirus infettano gli Artropodi, principalmente insetti nelle fasi larvali, tra cui molte specie dannose per l'agricoltura o vettori di malattie. L'assenza di patogenicità verso i vertebrati rendono questi virus molto interessanti come possibili agenti di controllo biologico.

Circa tre anni fa il nostro laboratorio ha iniziato una collaborazione con la Dr. M. Ogliaastro (Laboratoire de Biologie Intégrative et Virologie, INRA-UMRI, Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier, Francia) con l'obiettivo di indagare il meccanismo di infezione del densovirus di *Junonia coenia* (*JcDNV*) nel lepidottero *Spodoptera frugiperda*. L'infezione avviene per ingestione orale, ma, a differenza di altri densovirus, il *JcDNV* non si replica nelle cellule dell'epitelio intestinale (Mutuel *et al.*, 2010): esse rappresentano solo una barriera che il virus deve superare per raggiungere i tessuti target (cellule muscolari e epitelio tracheale). Per chiarire il meccanismo di infezione di questo virus, è quindi fondamentale capire come riesca a superare il tessuto intestinale.

3.1 Localizzazione di *JcDNV* nell'epitelio dell'intestino larvale e suo effetto sulla resistenza elettrica paracellulare

Esperimenti eseguiti precedentemente nel nostro laboratorio utilizzando cellule intestinali in coltura, hanno chiarito che il *JcDNV* viene rapidamente internalizzato nelle cellule colonnari, ma non in quelle a coppa e nelle cellule staminali, i tre principali tipi cellulari che costituiscono l'epitelio intestinale delle larve di lepidottero.

Per valutare i tempi di internalizzazione e la localizzazione del virus nell'intestino medio larvale di *S. frugiperda*, il tessuto è stato isolato a foglietto sulle camere di Ussing e incubato per 10, 30 e 60 minuti con Cy3-*JcDNV* aggiunto nel comparto luminale dell'apparato di perfusione.

Al termine dell'incubazione i tessuti sono stati smontati dall'apparato di perfusione e preparati per la visione al microscopio confocale. Le immagini acquisite mostrano che già dopo 10 minuti di incubazione le particelle virali sono visibili nel citoplasma delle cellule (Figura 3.1 A); nei tessuti incubati con Cy3-*JcDNV* per 30 minuti (Figura 3.1 B) la fluorescenza si concentra essenzialmente negli spazi intercellulari e in quelli incubati per 60 minuti (Figura 3.1 C) il segnale fluorescente presente nella via paracellulare risulta essere ancora più intenso.

La localizzazione del virus negli spazi intercellulari potrebbe essere dovuta alla capacità del *JcDNV* di modificare la permeabilità della via paracellulare. Per testare questa ipotesi abbiamo registrato la R_{sh} negli intestini montati nella camera di Ussing in assenza e presenza del virus nel comparto luminale. La figura 3.1 D mostra che dopo 10 minuti di incubazione il *JcDNV* causa un decremento significativo della R_{sh} rispetto al controllo (intestini incubati in assenza di *JcDNV*). La diminuzione della resistenza elettrica paracellulare registrata in presenza del virus risulta ancora più evidente per tempi di esposizione maggiori (Figura 3.1 D). Questo calo della resistenza di shunt indica, come detto precedentemente, un incremento della permeabilità delle giunzioni settate agli ioni. Considerando le piccole dimensioni del capsido dei densovirus (20-26 nm), l'aumento della permeabilità della giunzione settata indotta dal virus stesso è sufficiente per permetterne il passaggio attraverso la via paracellulare. Questo risultato è molto interessante perchè la via paracellulare, una via di permeazione attraverso cui il passaggio di sostanze avviene, quando la permeabilità della giunzione lo permette, per libera diffusione, potrebbe essere la via preferenziale utilizzata dal *JcDNV* per superare la barriera intestinale delle larve suscettibili.

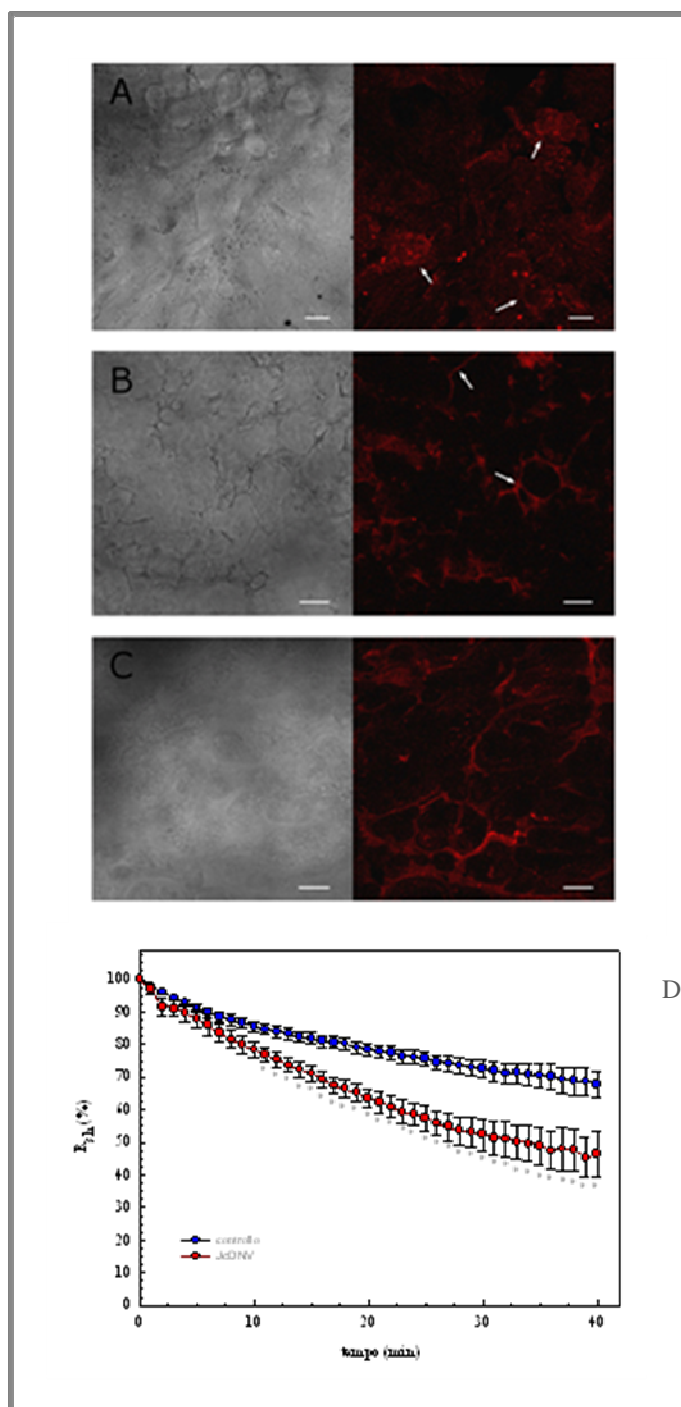


Figura 3.1: A, B, C immagini in campo chiaro (a sinistra) e singole sezioni ottiche ottenute al microscopio confocale (a destra) del tessuto intestinale incubato per 10 (A), 30 (B) o 60 (C) minuti con Cy3-*JcDENV* nel comparto luminale dell'apparato di perfusione. Le frecce indicano la localizzazione delle particelle virali. Barre: 10 μm nelle figure A e B; 20 μm nella figura C.

D: Andamento dei valori della resistenza di shunt in funzione del tempo di incubazione in presenza (simbolo rosso) o in assenza (simbolo blu) di *JcDENV*. I valori della R_{sh} sono espressi come percentuale del valore iniziale: $12.5 \pm 3.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (in assenza del virus) o $9.9 \pm 2.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (in presenza del virus); i valori riportati sono la media \pm E.S. di 3 diversi esperimenti. A partire dall'undicesimo minuto i valori delle due condizioni sperimentali sono significativamente diversi, $P < 0.05$, test del t di Student.

3.2 Effetto del *JcDNV* sulla concentrazione di calcio citosolico

Come precedentemente sottolineato, nell'intestino medio di lepidottero, la modulazione della permeabilità delle giunzioni settate è mediata dall'incremento della concentrazione intracellulare dello ione calcio (Fiandra *et al.*, 2006). Per valutare se il *JcDNV* determina una riduzione della resistenza di shunt perché causa una variazione della concentrazione di calcio nel citosol, abbiamo utilizzato la sonda fluorescente Fluo-3AM. Le cellule ottenute per disaggregazione enzimatica dell'intestino medio delle larve di *S. frugiperda*, caricate con Fluo-3AM (come descritto in Materiali e Metodi, paragrafo 12), sono state incubate per 10 minuti in presenza o in assenza (controllo) del virus e quindi immediatamente osservate al microscopio a fluorescenza. Nella figura 3.2 si può osservare che le cellule controllo (A) mostrano una fluorescenza molto scarsa, nettamente inferiore a quella delle cellule incubate con il virus (B). L'analisi della fluorescenza è stata eseguita solo sulle cellule colonnari poiché, come precedentemente detto, il virus è in grado di entrare soltanto in questo tipo cellulare e non nelle cellule a coppa o nelle cellule staminali, che in entrambe le condizioni sperimentali presentano un segnale fluorescente molto debole o assente. Per ogni condizione sperimentale sono state osservate almeno 200 cellule colonnari: la percentuale di cellule fluorescenti nei campioni di controllo è $22 \pm 1 \%$, mentre quella nei campioni incubati con il virus è $73 \pm 3 \%$ (medie \pm E.S. di 3 differenti esperimenti, $P < 0.001$, test del t di Student). Anche l'intensità della fluorescenza misurata nelle due condizioni è significativamente differente: le cellule del campione controllo presentano un valore di intensità di fluorescenza pari a 1.88 ± 0.13 (u.a.), quelle incubate con *JcDNV*, invece, mostrano un valore di 2.80 ± 0.08 (u.a.) (medie \pm E.S. dei valori calcolati per almeno 100 cellule, $P < 0.001$, test del t di Student). E' quindi possibile concludere che il virus determina un rapido aumento della concentrazione di calcio intracellulare nelle cellule colonnari che ha come conseguenza l'apertura della via paracellulare.

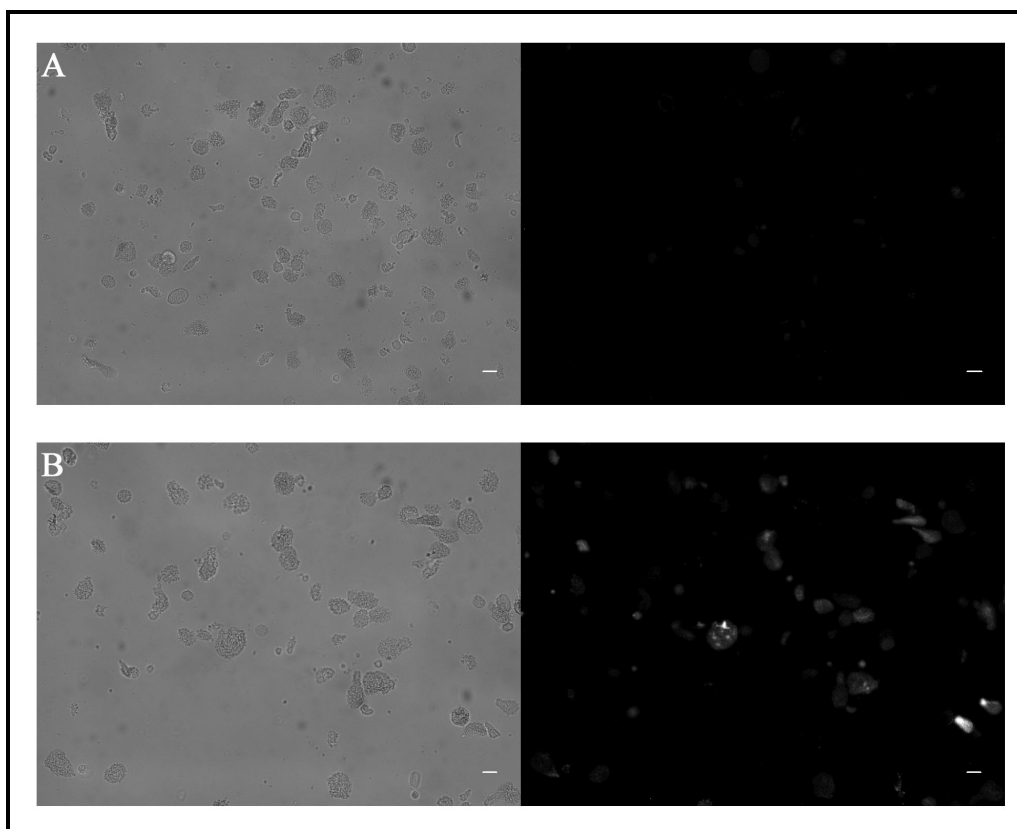


Figura 3.2: Immagini in campo chiaro (a sinistra) e in fluorescenza (a destra) di cellule dell'intestino medio larvale di *S. frugiperda* ottenute per disaggregazione enzimatica del tessuto incubate in assenza (A) o in presenza (B) di *JcDNV* per 10 minuti. Il livello intracellulare di calcio è stato stimato tramite l'utilizzo della sonda fluorescente Fluo-3AM.

Barre: 20 μm .

3.3 Passaggio del *JcDNV* attraverso l'epitelio intestinale di *S. frugiperda*

Dopo aver analizzato la localizzazione di *JcDNV* nell'intestino larvale di *S. frugiperda* e i suoi effetti sulla resistenza elettrica paracellulare, abbiamo misurato, isolando l'intestino medio delle larve di *S. frugiperda* in camere di Ussing, il passaggio del virus dal comparto luminale a quello emolinfatico dell'apparato di perfusione. Gli intestini sono stati incubati per 10 o 30 minuti in presenza del virus nel comparto luminale e al termine dell'incubazione sono state prelevate le soluzioni luminale ed emolinfatica per quantificare il passaggio del virus tramite Real Time qPCR. La quantità di virus che ha

superato l'epitelio intestinale viene espressa come rapporto tra le particelle virali presenti nel comparto emolinfatico e quelle presenti nel comparto luminale. Come si può osservare dal grafico riportato nella figura 3.3, dopo 30 min di incubazione la quantità di particelle virali che ha raggiunto il comparto emolinfatico è significativamente maggiore rispetto a quella misurata dopo 10 minuti. Questo dato è in accordo con i risultati riportati nella figura 3.1: il forte incremento della quantità di *JcDNV* che supera l'epitelio intestinale dopo 30 minuti è dovuto al passaggio del virus attraverso la via paracellulare; il virus, alterando la permeabilità di questa via di permeazione, può attraversare in grande quantità l'epitelio seguendo questo percorso e ciò appare evidente dopo 30 minuti di incubazione (Figura 3.1 B). Al contrario, dopo 10 minuti di incubazione (Figura 3.18 A) il virus è presente solo all'interno delle cellule intestinali.

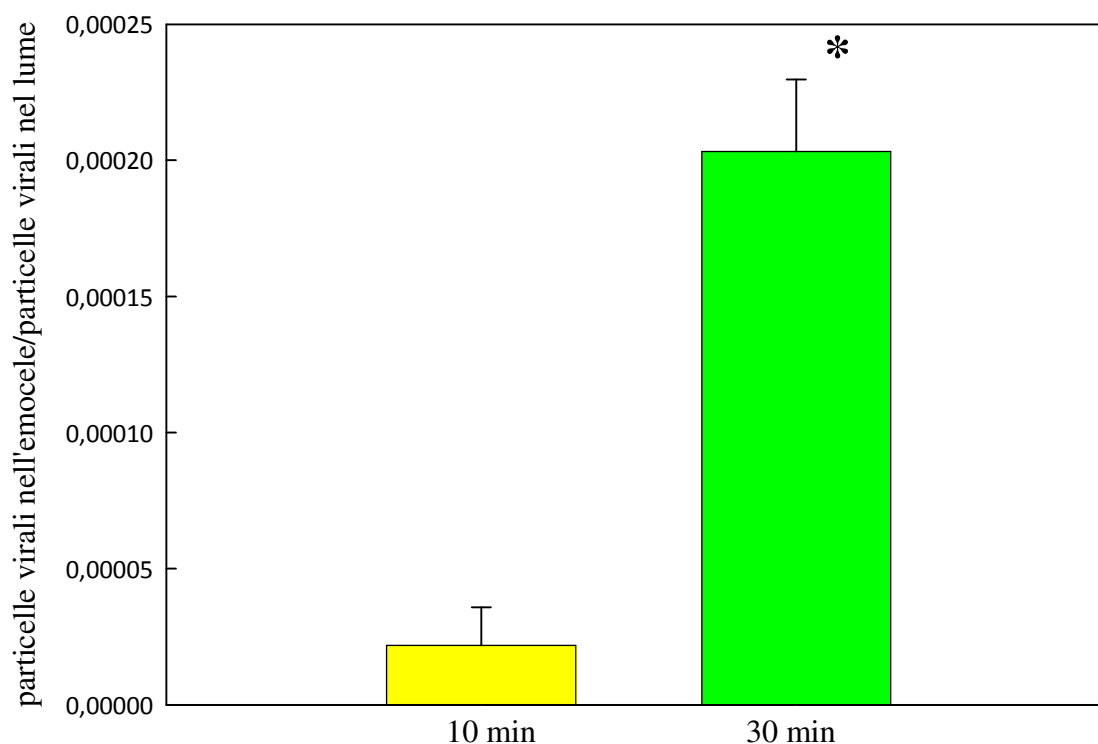


Figura 3.3 Passaggio del *JcDNV* dal comparto luminale a quello emolinfatico dopo 10 minuti (giallo) e 30 minuti (verde) di incubazione. Valori medi \pm E.S. di 3 diversi esperimenti. * $P < 0.05$, test del t di Student.

3.4 Localizzazione del *JcDENV* in presenza o assenza di inibitori specifici dell'endocitosi

Abbiamo anche indagato il meccanismo mediante il quale *JcDENV* viene internalizzato nelle cellule colonnari dell'epitelio intestinale.

Gli intestini larvali di *S. frugiperda* sono stati isolati, aperti a foglietto, montati nella camera di Ussing e preincubati per 30 minuti in assenza (controllo) o presenza di tre inibitori dell'endocitosi: Dynasore (400 μM) che inibisce l'endocitosi mediata da clatrina, Metil- β -ciclodestrina (60 μM) che inibisce l'endocitosi mediata da lipid-raft e Wortmannina (10 μM) una tossina che inibisce l'endocitosi mediata da recettore (vedi Materiali e Metodi paragrafo 9). Nel comparto luminale è stato poi aggiunto il virus e dopo 10 minuti di incubazione gli intestini sono stati rimossi dall'apparato di perfusione e preparati per la visione a microscopia confocale.

Nell'immagine riportata nella figura 3.4 A (controllo) si possono chiaramente osservare particelle virali all'interno delle cellule intestinali (spot rossi). Al contrario, quando il tessuto è stato preincubato con i differenti inibitori il virus non è presente nel citoplasma delle cellule (figura 3.4 B, C, D).

Questi risultati indicano che il *JcDENV* viene internalizzato nelle cellule colonnari mediante differenti meccanismi di endocitosi e probabilmente differenti recettori sono coinvolti nel processo. Si può ipotizzare che l'interazione con i recettori e/o l'ingresso in cellula del virus attivi un pathway intracellulare che porta ad un aumento intracellulare di calcio. Questo secondo messaggero, con un meccanismo ancora da chiarire, determina un aumento della permeabilità della via paracellulare. Questa via di permeazione può essere così utilizzata dal virus per raggiungere i tessuti target all'interno della larva.

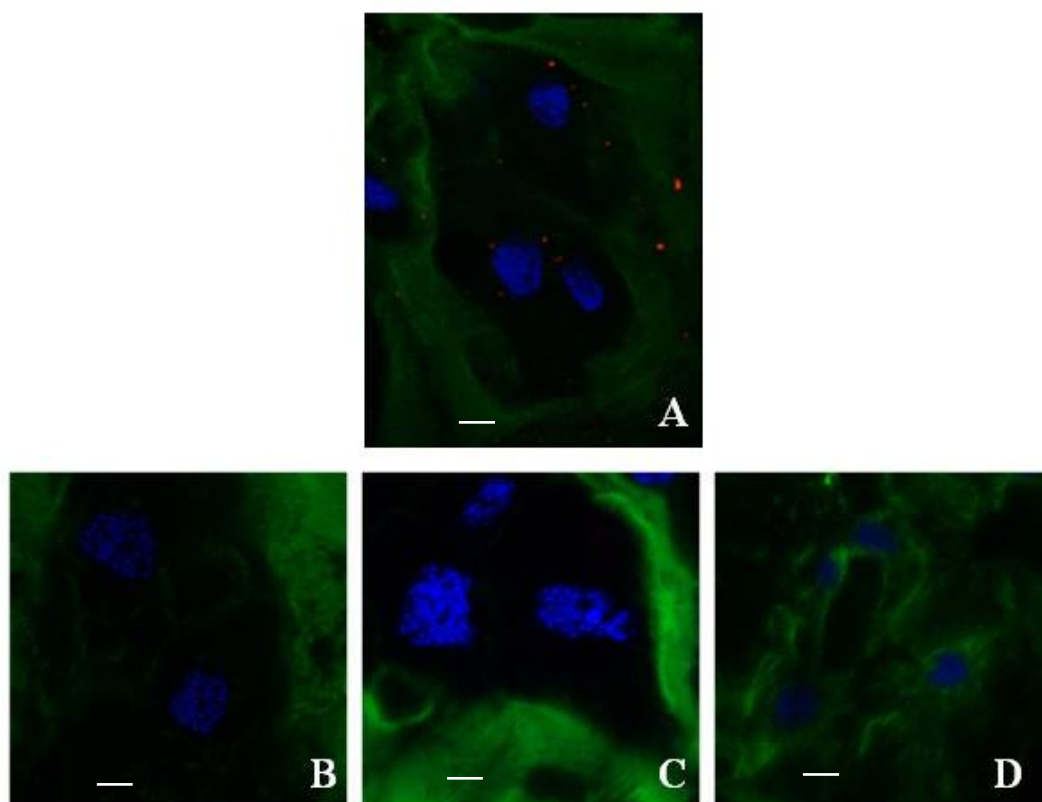


Figura 3.4 Immagini di intestini medi larvali di *S. frugiperda* (singole sezioni ottiche) isolati in camere di Ussing, preincubati per 30 minuti in assenza (**A**) o presenza di differenti inibitori dell'endocitosi: Dynasore (400 μ M, **B**); Metil- β -ciclodestrina (60 μ M, **C**); Wortmannina (10 μ M, **D**) e incubati per 10 minuti con *JcDNV*. Al termine dell'incubazione il tessuto è stato fissato e preparato per la visione in microscopia confocale.

Rosso *JcDNV*; blu: nuclei (DAPI); verde: filamenti di actina (falloidina-FITC).

Barra 20 μ m.

Capitolo quarto

Discussione

Negli ultimi decenni sono stati condotti molti studi finalizzati all'identificazione di nuove molecole ad attività bioinsetticida (Whetstone e Hammock, 2007; Dayan *et al.*, 2009) da utilizzare per una agricoltura meno dipendente dall'uso di insetticidi chimici. L'uso di agenti di controllo di origine biologica espressi in piante transgeniche è certamente una strategia molto promettente (Bale *et al.*, 2008; Gatehouse, 2008), e lo studio delle basi molecolari delle interazioni tra gli insetti e i loro antagonisti naturali rappresenta una possibilità molto allettante per l'isolamento di nuove molecole e geni per il controllo (Beckage e Gelman, 2004, Pennacchio e Strand, 2006, Ferry *et al.*, 2006 e Whetstone e Hammock, 2007). La ricerca viene condotta non solo nella prospettiva di scoprire geni alternativi per la produzione di nuove piante resistenti agli insetti, ma anche con l'intento di sviluppare strategie di somministrazione del bioinsetticida non esclusivamente basate sull'uso di piante transgeniche.

Il contenimento degli insetti dannosi può essere raggiunto non solo utilizzando gli antagonisti naturali e le molecole/geni da loro derivati, ma anche tramite la manipolazione mirata dei percorsi chiave che regolano l'omeostasi fisiologica dell'insetto. La possibilità di manipolarne il metabolismo utilizzando peptidi con funzioni endocrine è apparsa particolarmente interessante. Anche se il peptide/proteina introdotti per ingestione possono subire una più o meno ampia degradazione nel lume intestinale, esistono prove sperimentali convincenti che l'assorbimento di piccoli peptidi e di macromolecole ha effettivamente luogo nell'intestino medio, tramite diversi meccanismi (Bavoso *et al.*, 1995; Kurahashi *et al.*, 2005; Casartelli *et al.*, 2005 e 2007; Fiandra *et al.*, 2009).

La barriera intestinale nella maggior parte degli insetti è costituita dalla membrana peritrofica (MP) e dall'epitelio intestinale. La MP è dunque il primo filtro che deve essere oltrepassato da tutte quelle molecole che devono raggiungere l'ambiente interno dell'insetto stesso. La sua permeabilità, determinata dalla dimensione dei "pori" che la maglia di chitina e le proteine con i proteoglicani ad essa associati definiscono, rappresenta quindi un fattore essenziale affinché venga permesso l'ingresso nell'organismo di sostanza esogene. La MP ha inoltre un ruolo fisiologico primario nella compartimentazione e nel riciclo degli enzimi digestivi (Terra e Ferreira, 2005), essenziale per il pieno sfruttamento delle sostanze alimentari.

Nella prima parte di questa tesi sono state studiate le caratteristiche di permeabilità della MP del lepidottero *H. virescens*, misurando il passaggio di molecole marker, e l'effetto della chitinasi A (ChiA) virale codificata dal virus della nucleopoliedrosi di *Autographa californica* (AcMNPV). I dati ottenuti *in vitro* mostrano che l'incubazione con

ChiA aumenta la permeabilità della MP al blu di metilene (vedi Risultati, Figura 1.1) e al TMOF (vedi Risultati, Figura 1.2). L'effettiva permeabilizzazione dovuta all'attività dell'enzima è stata osservata anche *in vivo*, nelle MP isolate da larve allevate su piante di tabacco esprimenti ChiA (vedi Risultati, Figura 1.3). L'alterazione della permeabilità della MP dovuta alla ChiA induce una maggiore mortalità nelle larve alimentate con le piante geneticamente modificate (Rao *et al.*, 2004). Inoltre, l'associazione dell'enzima con altre molecole potenzialmente nocive, come peptidi ormonali o tossine, potrebbe innalzare la quantità di queste ultime nel microambiente ectoperitrofico, favorendo così un maggiore assorbimento intestinale.

Una volta superata la membrana peritrofica, le molecole che agiscono nell'ambiente interno dell'insetto devono superare l'epitelio intestinale per raggiungere il loro specifico tessuto bersaglio. Le proteine seguono nell'insetto, come in mammifero, la via transcellulare (Casartelli *et al.*, 2005, 2007): la via preferenziale per l'assorbimento dei peptidi sembra essere, invece, la via paracellulare, ossia il canale acquoso delimitato dalla membrana laterale di due cellule adiacenti, la cui permeabilità è regolata dalle giunzioni settate (SJ). Nell'intestino medio delle larve di *B. mori*, la giunzione presenta cariche nette debolmente negative, per cui il passaggio dei cationi è facilitato mentre quello degli anioni è parzialmente sfavorito (Fiandra *et al.*, 2006). Una restrizione alla diffusione paracellulare in questa giunzione è strettamente legata anche alla dimensione dello ione o della molecola permeante (Fiandra *et al.*, 2006, 2009). La permeabilità della SJ, inoltre, può essere regolata da almeno due dei mediatori intracellulari che hanno un effetto noto sulle giunzioni occludenti di mammifero (Madara *et al.*, 1986; Balda *et al.*, 1991; Tai *et al.*, 1996; Pèrez *et al.*, 1997; Karczewski e Groot, 2000): l'aumento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} e di AMP ciclico (Fiandra *et al.*, 2006). Per quanto riguarda la permeabilità dei peptidi, numerosi studi eseguiti in intestino di mammifero hanno dimostrato che queste molecole possono essere assorbite intatte attraverso la via paracellulare (Pappenheimer e Reiss, 1987; Pappenheimer *et al.*, 1994; Yen e Lee, 1995; Pauletti *et al.*, 1997); analogamente, è stato osservato che la cidiastatina 4, una allatostatina formata da otto residui amminoacidici, supera l'intestino larvale di *Manduca sexta* per diffusione attraverso questa via di permeazione (Audsley *et al.*, 2008), così come avviene anche per il proctolin e il TMOF, benché il secondo ormone possa attraversare l'epitelio seguendo anche la via transcellulare (Fiandra *et al.*, 2009). L'insieme di questi dati mette in evidenza che la via paracellulare nell'intestino delle larve di lepidottero potrebbe

effettivamente essere una via preferenziale per la somministrazione di molecole ad attività insetticida a basso peso molecolare, ed è perciò opportuno proseguire la caratterizzazione delle sue proprietà funzionali per individuare strategie atte ad aumentarne la permeabilità. A questo scopo, abbiamo studiato *in vitro* nell'intestino larvale di *B. mori*, l'effetto sulla SJ del caprato di sodio (C10), un modulatore della permeabilità della via paracellulare in mammifero (Cano-Cebrián *et al.*, 2005), e chiarito il suo meccanismo di azione.

Abbiamo innanzitutto valutato la capacità del C10 di modificare la permeabilità della via paracellulare nell'intestino larvale di lepidottero, utilizzando sia *B. mori* che la larva infestante *Spodoptera littoralis*, eseguendo misurazioni della resistenza paracellulare (R_{sh}). In entrambi i casi il C10 ha indotto una riduzione della resistenza paracellulare e, cioè, un aumento della permeabilità ionica attraverso questa via (vedi Risultati, Figure 2.1 e 2.2). Abbiamo approfondito lo studio utilizzando solo l'epitelio intestinale di *B. mori*, un buon sistema modello, osservando che il C10 determina un aumento della permeabilità della SJ alle piccole molecole organiche, come il proctolin rodaminato e la fluoresceina (vedi Risultati, Figure 2.3 e 2.5), che superano l'epitelio intestinale esclusivamente attraverso la sola via paracellulare (Fiandra *et al.*, 2009). L'effetto del C10 nel determinare un aumento della quantità di proctolin e fluoresceina che supera l'epitelio è rilevabile, rispettivamente, dopo 2 e dopo 3 ore di incubazione. L'analisi mediante microscopia confocale di intestini incubati con proctolin rodaminato mostra chiaramente un segnale molto marcato negli spazi intercellulari in seguito all'aggiunta mucosale di caprato di sodio (vedi Risultati, Figura 2.4).

Le analisi morfologiche eseguite al TEM evidenziano chiaramente un marcato cambiamento della struttura della SJ in presenza di C10, con un ampio scollamento delle membrane laterali delle due cellule adiacenti e la presenza di dilatazioni (vedi Risultati, Figura 2.6).

I nostri risultati indicano che in lepidottero intercorre un certo lasso di tempo (almeno 45 minuti) dall'aggiunta di C10 nelle soluzioni di incubazioni all'aumento della permeabilità della via paracellulare sia agli ioni che alle molecole organiche. In mammifero, invece, l'effetto indotto dal C10 sulla permeabilità della giunzione è spesso molto più rapido (Chao *et al.*, 1999). Ciò potrebbe essere dovuto alla diversa organizzazione delle giunzioni occludenti dei vertebrati (TJ) e degli invertebrati (SJ). La TJ è localizzata nella regione apicale delle membrane laterali di due cellule epiteliali adiacenti ed ha una breve estensione (meno di 1 μm): i punti di contatto tra le due cellule sono rappresentati dall'interazione dei domini extracellulari delle due proteine integrali di

membrana claudina e occludina (Furuse *et al.*, 1998), che chiudono lo spazio extracellulare tanto che le membrane laterali delle due cellule adiacenti appaiono in microscopia elettronica in stretto contatto. Superata questa regione, lo spazio interstiziale laterale occupa più del 95% della lunghezza della via paracellulare. La SJ è molto più estesa e prosegue fino ai 2/3 delle membrane laterali di due cellule adiacenti: le membrane laterali non appaiono mai in stretto contatto e si possono osservare numerosi setti, la cui composizione non è ancora stata chiarita così come quella del materiale elettrondenso spesso visibile tra un setto e l'altro. E' stato ipotizzato che proprio i setti possano essere responsabili della funzione di barriera delle giunzioni settate: si tratterebbe di un meccanismo reversibile, che richiama quello di una chiusura lampo, attivato da specifiche vie intracellulari di trasmissione del segnale che porterebbero a una riorganizzazione strutturale della giunzione, con conseguente aumento della permeabilità paracellulare (Beyenbach *et al.*, 2009). Nella giunzione occludente di vertebrato è stato dimostrato che la claudina può dissociarsi dalla membrana plasmatica, migrare nel citoplasma e associarsi nuovamente in pochi minuti (Sasaki *et al.*, 2003). Allo stesso modo, le proteine che formano i setti nella giunzione settata potrebbero riorganizzarsi determinando l'apertura e la chiusura della via paracellulare (Beyenbach *et al.*, 2009): l'identificazione di proteine claudino-simili come la megatrachea e la sinuous nella SJ (Behr *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004) lascia aperta la possibilità che ci possa effettivamente essere sia un turnover che un rimodellamento delle proteine responsabili della permeabilità giunzionale. Nella modificazione dell'organizzazione delle proteine giunzionali giocano sicuramente un ruolo importante gli elementi citoscheletrici che con esse interagiscono, direttamente o indirettamente: la loro destabilizzazione e/o riorganizzazione potrebbe essere un fattore indispensabile. Poiché però la superficie della giunzione settata è molto estesa, i meccanismi di regolazione della permeabilità della via paracellulare potrebbero richiedere molto più tempo rispetto a quelli osservati in mammifero.

Il fatto che il C10 incrementi la permeabilità della via paracellulare anche in insetto è un risultato particolarmente importante in riferimento al potenziale utilizzo di biomolecole organiche a basso peso molecolare ad attività insetticida con target emocelico. La possibile co-somministrazione agli insetti dannosi di una molecola tossica assorbita attraverso la via paracellulare e di una che aumenta la permeabilità di tale via di permeazione, potrebbe migliorare notevolmente l'efficacia rispetto a somministrazioni del solo bioinsetticida, perché si potenzierebbe l'assorbimento della molecola, che potrebbe così raggiungere l'emocele in maggiore quantità.

Abbiamo studiato il meccanismo d'azione del C10 nelle cellule intestinali di lepidottero: in primo luogo abbiamo esaminato se anche in lepidottero la cascata del segnale attivata dal C10 implica la mobilitazione del calcio dai compartimenti intracellulari. Le possibili variazioni della concentrazione citosolica del catione in risposta al C10 sono state monitorate in cellule isolate ottenute tramite disaggregazione enzimatica dell'intestino e abbiamo osservato che le cellule colonnari incubate con C10 mostrano un aumento transiente della concentrazione citosolica di calcio (vedi Risultati, Figura 2.7). Abbiamo quindi utilizzato quattro specifici inibitori di alcune delle proteine chiave coinvolte nella cascata del segnale attivata dal C10 nelle cellule di mammifero (Cano-Cebrián *et al* 2005): l'U73122 che inibisce la PLC, il W-7 che inibisce il legame calcio-calmodulina e i due inibitori ML7 e PEPTIDE18 che bloccano l'attività della MLCK. In presenza di questi quattro inibitori abbiamo osservato la scomparsa dell'effetto indotto dal C10 sulla R_{sh} (vedi Risultati, Figure 2.9, 2.10, 2.11 e 2.12). Quindi i nostri dati indicano che il C10 attiva la PLC, che catalizza la trasformazione del fosfatidilinositolo 4,5-difosfato (PIP₂) in DAG e IP₃. Probabilmente grazie all'azione dell'IP₃, il calcio viene rilasciato dai compartimenti intracellulari, l'ione si lega alla calmodulina, e il complesso attiva la chinasi che fosforila la catena leggera della miosina (MLCK), con la probabile conseguente riorganizzazione del citoscheletro acto-miosinico e quindi l'apertura della giunzione settata. Pertanto, la cascata del segnale attivata dal C10 nelle cellule dell'intestino larvale di lepidottero sembra essere molto simile a quella descritta nelle cellule di mammifero (Cano-Cebrián *et al* 2005; Hayashi e Tomita, 2007).

E' stato recentemente riportato in letteratura (Beyenbach *et al.*, 2009) che un peptide ad attività diuretica determina nei tubuli Malpighiani di *Aedes aegypti* un aumento della permeabilità della via paracellulare mediante l'attivazione della PLC, che porta alla produzione di DAG e IP₃, con conseguente aumento della concentrazione intracellulare di calcio indotta da IP₃, analogamente a quanto osservato da noi. Nei tubuli malpighiani, l'aumento del calcio intracellulare permette il legame della proteinchinasi C (PKC) inattiva al DAG, localizzato in membrana. L'enzima, ora attivato, modificherebbe l'attività di alcune proteine citoscheletriche, destabilizzando l'impalcatura citoscheletrica associata alle proteine giunzionali, causando l'aumento della permeabilità della via paracellulare (Beyenbach *et al.*, 2009). Sebbene non ci sia una descrizione dettagliata di come il citoscheletro interagisca con la giunzione settata, alcuni studi indicano che i filamenti di actina prendono contatto con essa (Lane e Flores 1988, Dallai *et al.*, 1998) e che agenti che disorganizzano questi elementi citoscheletrici danneggiano l'organizzazione dell'intera

giunzione settata (Lane e Flores, 1988, 1990). Inoltre, è stata identificata in *Manduca sexta* una proteina miosino-simile (Bonfanti *et al.*, 1992). Appare quindi evidente che una riorganizzazione del citoscheletro potrebbe essere effettivamente indispensabile per determinare una apertura della via paracellulare in insetto come in mammifero. Ma come la fosforilazione della catena leggera della miosina induca una riorganizzazione degli elementi citoscheletrici connessi alle SJ nell'intestino larvale di lepidottero, determinando un incremento della permeabilità giunzionale, rimane una questione aperta.

Come detto prima, per rispondere alle esigenze di maggior tutela dell'ambiente e della salute umana, negli ultimi decenni hanno avuto notevole impulso le ricerche volte ad individuare, per il controllo degli insetti dannosi, nuove classi di insetticidi e misure di controllo alternative rispetto all'uso di composti chimici di sintesi. Tra questi metodi alternativi, vanno ricordati i densovirus (famiglia Parvoviridae, sottofamiglia Densovirinae), agenti patogeni che colpiscono selettivamente gli artropodi, in particolare gli insetti nelle fasi larvali (Bergoin e Tijssen, 2008).

In questa terza parte abbiamo esaminato, sia in cellule isolate che nell'intestino medio larvale montato in camere di Ussing, come il densovirus di *Junonia coenia* (*JcDNV*) supera l'epitelio intestinale delle larve di *Spodoptera frugiperda*. Dato che l'infezione delle larve avviene per ingestione di particelle virali e che il *JcDNV* non si replica nelle cellule dell'epitelio intestinale, risulta di fondamentale importanza chiarire quale è la strategia adottata dal virus per superare l'intestino larvale e quindi raggiungere i tessuti target.

La strategia messa in atto dal *JcDNV* è molto interessante: abbiamo osservato che, in seguito all'internalizzazione del virus nelle cellule colonnari, si verifica un aumento della permeabilità della via paracellulare (vedi Risultati, Figura 3.1 D) che consente la permeazione del virus attraverso questa via (vedi Risultati, Figura 3.1 B e C). Nella linea cellulare IPLB-Ld 652, derivata dall'ovario del lepidottero *Lymantria dispar*, è stato osservato che una grossa parte del *JcDNV* internalizzato viene indirizzata verso il pathway degradativo intracellulare (Vendeville *et al.*, 2009); se anche nelle cellule dell'intestino larvale la maggior parte delle particelle virali internalizzate venisse indirizzata verso i lisosomi, la permeazione attraverso la via paracellulare rappresenterebbe la principale possibilità per il *JcDNV* di raggiungere l'emocele e quindi i tessuti in cui si replica. Non si può comunque escludere che un certo numero di particelle virali possa raggiungere il comparto emocelico anche per via transcellulare.

Considerando il ruolo chiave dello ione calcio nella modulazione della permeabilità della via paracellulare, abbiamo ipotizzato che il legame del JcDENV alla membrana cellulare e/o la sua internalizzazione nelle cellule colonnari siano in grado di attivare un pathway del segnale che porta all'incremento della concentrazione di questo messaggero intracellulare. I nostri dati dimostrano che questa ipotesi è corretta: l'incubazione delle cellule intestinali isolate ottenute da *S. frugiperda* con JcDENV provoca un incremento transiente della concentrazione del calcio citosolico (vedi Risultati, Figura 3.2).

Abbiamo anche analizzato il passaggio di JcDENV attraverso l'epitelio intestinale isolato in camere di Ussing, incubando gli intestini per 10 e 30 minuti in presenza del virus nel comparto luminale (vedi Risultati, Figura 3.3). Se si confronta il numero di particelle virali che raggiunge il comparto emolinfatico (normalizzato rispetto al numero di particelle virali presenti nel comparto luminale) per unità di tempo, ci si rende conto che la velocità con cui il virus supera l'epitelio intestinale calcolata dopo 30 minuti è significativamente maggiore di quella misurata dopo 10 minuti. I valori sono rispettivamente $6,77 \times 10^{-6} \pm 0,80 \times 10^{-6}$ particelle/min e $2,17 \times 10^{-6} \pm 1,41 \times 10^{-6}$ particelle/min ($P < 0,05$, Test del *t* di Student). Questo risultato è in accordo con i dati precedentemente discussi: il virus determina un aumento della permeabilità della via paracellulare dell'intestino larvale (che diventa significativo dopo 10 minuti di incubazione, vedi Risultati, Figura 3.1 D) tale da consentire il passaggio del virus attraverso questa via. Intestini incubati con JcDENV marcato con Cy3 mostrano, dopo 30 minuti, un importante segnale fluorescente nelle via paracellulare, che conferma il passaggio del virus attraverso questa via (vedi Risultati, Figura 3.1 B).

L'insieme dei risultati ottenuti indica che JcDENV supererà l'intestino larvale, e raggiunge in modo rapido i tessuti in cui si replica, utilizzando come via di permeazione preferenziale la via paracellulare. L'interazione del virus con recettori di membrana e/o la sua internalizzazione nelle cellule colonnari ne alterano la permeabilità attivando, con un meccanismo ancora non noto, un pathway intracellulare del segnale che porta ad un aumento della concentrazione citosolica di calcio, un secondo messaggero che agisce specificamente sulla permeabilità della via paracellulare (Fiandra *et al.*, 2006).

Questi risultati mettono in evidenza la modalità con cui il virus supera la barriera intestinale, ma quali sono i meccanismi coinvolti nella sua internalizzazione? Per rispondere a questa domanda abbiamo incubato gli intestini di *S. frugiperda*, montati nelle camere di Ussing, in presenza di molecole in grado di inibire differenti meccanismi di endocitosi: Dynasore, che inibisce l'endocitosi mediata da clatrina; Metil- β -ciclodestrina

che inibisce l'endocitosi mediata dai lipid-raft; Wortmannina, una tossina che inibisce tutti i meccanismi di endocitosi che prevedono il coinvolgimento di un recettore. Come si può osservare nelle figura 3.4 B, C e D dei Risultati, il virus non entra in cellula in presenza di tali inibitori, dimostrando che differenti meccanismi di endocitosi sono responsabili dell'internalizzazione di *JcDNV* nelle cellule colonnari. Questo dato non deve stupire: è stato dimostrato che per alcuni parvovirus (un genere di virus che appartiene alla stessa famiglia -*Parvoviridae*- a cui appartengono anche i densovirus) l'ingresso in un determinato tipo cellulare è mediato da differenti processi di endocitosi (Bantel-Schaal *et al.*, 2009; Boisvert *et al.* 2010), sebbene per i parvovirus l'endocitosi mediata da clatrina sia il meccanismo più comune (Cotmore and Tattersall, 2007; Harbison *et al.* 2008).

I densovirus sono stati isolati da numerosi ordini di insetti, tra i quali Lepidotteri, Ditteri, Dittiotteri (sottordine Blattoidei), Emitteri, Ortotteri e Odonati (Bergoin e Tijssen, 2008); in molti casi la relazione tra virus e gamma di ospiti infettati (con relativa specificità per il tessuto in cui il virus si replica) è stata ben chiarita, ma i meccanismi di infezione, e quindi i fattori che controllano la specificità verso l'ospite e il tessuto, restano largamente sconosciuti. I nostri risultati permettono di fare luce sugli eventi iniziali coinvolti nell'infezione delle larve di *S. frugiperda* da parte del *JcDNV*, poiché abbiamo chiarito quali strategie mette in atto il virus per raggiungere l'emocele dell'ospite e quindi i suoi tessuti target. Per avere un quadro completo di questi eventi, sarebbe essenziale identificare il/i recettore/i di membrana responsabile/i del riconoscimento del virus e della sua successiva internalizzazione nelle cellule colonnari. Dal momento che la relazione tra ogni virus e il suo recettore è altamente specifica, identificare tale proteina fornirebbe importanti informazioni sul primo passo del complicato meccanismo di infezione di questo densovirus.

Capitolo quinto

Bibliografia

- **Abedi Z.H., Brown A.W.A.** (1961). Peritrophic membrane as a vehicle for DDT and DDE excretion in *Aedes aegypti* larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **54**, 539-42
- **Adang M.J., Spence K.A.** (1983). Permeability of the peritrophic membrane of the Douglas fir tussock moth (*Orygia pseudotsugata*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **75A**, 233-38
- **Appel H.M., Martin M.M.** (1990). Gut redox conditions in herbivorous lepidopteran larvae. *J. Chem. Ecol.*, **16**, 3277-3290
- **Appel H.M.** (1994). The chewing herbivore gut lumen: physicochemical conditions and their impact. In: *Insect-Plant Interaction*, edited by Bernays E.A. Boca Raton, FL: CRC, vol.V, 209-223
- **Appel H.M., Maynes L.W.** (1995). The influence of plant on gut conditions of Gypsy Moth caterpillars. *J. Insect Physiol.*, **41**, 241-246
- **Audsley N., Matthews J., Nachman R.J., Weaver R.J.** (2008). Transepithelial flux of an allatostatin and analogs across the anterior midgut of *Manduca sexta* larvae *in vitro*. *Peptides*, **29**, 286–294
- **Aungst B.J.** (2000). Intestinal permeation enhancers. *J. Pharm. Sci.*, **89**, 429- 442.
- **Azuma M., Harvey W.R., Wieczorek H.** (1995). Stoichiometry of K⁺/H⁺ antiport helps to explain extracellular pH 11 in a model epithelium. *FEBS Lett.*, **361**, 153-156
- **Balda M.S., Gonzales-Mariscal L., Contreras R.G., Macias-Silva M.E., Torres-Marquez J.A., Garcia-Sainz J.A., Cerejido M.** (1991). Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J. Membr. Biol.*, **122**. 193-202

- **Baldwin K.M., Hakim R.S.** (1991). Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molting in the moth *Manduca sexta*. *Tissue Cell*, **23**, 411-422
- **Bale J.S., van Lenteren J.C., Bigler F.** (2008). Biological control and sustainable food production. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **363**, 761-776
- **Bantel-Schaal U, Braspenning-Wesch I, Kartenbeck J.** (2009). Adeno-associated virus type 5 exploits two different entry pathways in human embryo fibroblasts. *J Gen Virol.*, **90**, 317-22
- **Barbehenne R.V., Martin M.M.** (1992). Protective role of the peritrophic membrane in the tannin-tolerant larvae of *Orgyia leucostigma* (Lymantriidae). *J. Insect Physiol.*, **38**, 973-80
- **Barbehenne R.V., Martin M.M.** (1994). Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. *J. Insect Physiol.*, **4**, 303-11
- **Bavoso A., Falabella P., Giacometti R., Jama Halane A., Ostini A., Pennacchio F., Tremblay E.** (1995). Intestinal absorption of proctolin in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera Noctuidae) larvae. *REDIA*, **78**, 173-185
- **Beckage, N.E., Gelman, D.B.,** (2004). Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Ann. Rev. Entomol.*, **49**, 299-330
- **Behr M., Riedel D., Schuh R.** (2003). The claudin-like Megatrachea is essential in septate junctions for the epithelial barrier function in *Drosophila*. *Dev. Cell*, **5**, 611-620
- **Bergoin M., Tijssen P.** (2008). Parvoviruses of arthropods. *Encycl. of Virol.*, **4**, 76-85

- **Bernays E.A., Chamberlain D.J.** (1980). A study of tolerance of ingested tannin in *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.*, **26**, 415-20
- **Bernays E.A., Chamberlain D.J., McCarthy P.** (1980). The differential effects of ingested tannic acid on different species of acridoidea. *Ent. exp. appl.*, **28**, 158-66
- **Bernays E.A., Chamberlain D.J., Leather E.M.** (1981). Tolerance of acridids to ingested condensed tannin. *J. Chem. Ecol.*, **7**, 247-56
- **Beyenbach K.W., Baumgart S., Lau K., Piermarini P.M., Zhang S.** (2009). Signaling to the apical membrane and to the paracellular pathway: changes in the cytosolic proteome of *Aedes* Malpighian tubules. *J. Exp. Biol.*, **212**, 329-340
- **Binnington K. C., Lehane M. J. Beaton C. D.** (1998). The peritrophic membrane. *Microsc. Anat. Invert.*, **11 B**, 747-758
- **Boisvert M, Fernandes S, Tijssen P.**(2010). Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *J Virol.*, **84**, 7782-92
- **Boller T.** (1987). Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives, Vol. 2, eds T. Kosuge and E.W. Nester, pp. 384-414. MacMillan, New York
- **Bonfanti P., Colombo A., Heintzelman M.B., Mooseker M.S., Camatini M.** (1992). The molecular architecture of an insect midgut brush border cytoskeleton. *Eur J. Cell Biol.*, **57**, 298-307
- **Borovsky D.** (2003). Trypsin-modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control. *Journal of Experimental Biology*, **206**, 3869–3875

- **Borovsky D., Meola S.** (2004). Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with Aea-TMOF. *Insect Biochem. and Physiol.*, **55**, 124–139
- **Brandt C.R., Adang M.J., Spence K.D.** (1978): The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata*. *J. Invertebr. Pathol.*, **32**, 12-24
- **Brown K.E., Anderson S.M., Young N.S.** (1993). Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science*, **262**, 114-117
- **Bruemmer A., Scholari F., Lopez-Ferber M., Conway J.F., Hewat E.A.** (2005). Structure of an insect parvovirus (*Junonia coenia* densovirus) determined by cryo-electron microscopy. *J. of Mol. Biol.*, **347**, 791-801
- **Burcham D.L., Aungst B.A., Hussain M., Gorko M.A., Quon C.Y., Huang S.M.** (1995). The effect of absorption enhancers on the oral absorption of the GP IIB/IIIA receptor antagonist, DMP 728, in rats and dogs. *Pharm. Res.*, **12**, 2065-2070
- **Cano-Cebrià M.J., Zornoza T., Granero L., Polache A.** (2005). Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosan and other: a target for drug delivery. *Current Drug Deliv.*, **2**, 9-22
- **Cappellozza L, Cappellozza S, Saviane A, Sbrenna G.** (2005). Artificial diet rearing system for silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera Bombycidae): effect of vitamin C deprivation on larval growth and cocoon production. *Appl. Entomol. Zool.*, **40**, 405-412
- **Carlson J., Suchman E., Buchatsky L.** (2006). Densoviruses for control and genetic manipulation of mosquitoes. *Ad. in Virus Res.*, **68**, 361-392

- **Casartelli M., Fiandra L., Parenti P., Giordana B.** (2001). Multiple transport pathways for dibasic amino acids in the larval midgut of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Biol.*, **31**, 621-632
- **Casartelli M., Corti P., Leonardi M.G., Fiandra L., Burlini N., Pennacchio F., Giordana B.** (2005). Absorption of albumina by the midgut of a lepidopteran larva. *J. Insect Physiol.*, **51**, 933-940
- **Casartelli M., Corti P., Cermenati G., Grimaldi A., Fiandra L., Santo N., Pennacchio F., Giordana B.** (2007). Absorption of horseradish peroxidase in *Bombyx mori* larval midgut. *J. Insect Physiol.*, **53**, 517-525
- **Casartelli M., Cermenati G., Rodighiero S., Pennacchio F., Giordana B.** (2008). A megalin-like receptor is involved in protein endocytosis in the midgut of an insect (*Bombyx mori*, Lepidoptera). *Am. J. Physiol.*, **295**, R1290-R1300
- **Cermenati G., Corti P., Caccia S., Giordana B., Casartelli M.** (2007). A morphological and functional characterization of *Bombyx mori* larval midgut cells in culture. *Invert. Survival J.*, **4**, 119-126
- **Cermenati G., Terracciano I., Castelli I., Giordana B Rao R, Pennacchio F, Casartelli M** (2011). The CPP Tat enhances eGFP cell internalization and transepithelial transport by the larval midgut of *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). *J Insect Physiol.*, **57**, 1689–1697
- **Chao A.C., Nguyen J.V., Broughall M., Griffin A., Fix J.A., Daddona P.E.** (1999): In vitro and in vivo evaluation of effects of sodium caprate on enteral peptide absorption and on mucosal morphology. *Int J Pharm.*, **191**, 15-24
- **Cioffi M.** (1979). The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue Cell*, **11**, 467-79

- **Colombo A., Bonfanti P., Camatini M.** (1993). Actin, α -actin, and vinculin are associated with septate junctions in Insecta. *Cell Motil. Cytoskel.*, **26**, 205-213
- **Cotmore SF, Tattersall P.** (2007). Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv Virus Res.*, **70**, 183-232
- **Dallai R., Lupetti P., Lane N.J.** (1998). The organization of actin in the apical region of insect midgut cells after deep-etching. *J. Struct. Biol.*, **122**, 283-29
- **Dayan F.E., Cantrell C.L., Duke S.O.** (2009). Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 4022-4034
- **De Mets R., Jeuniaux C.** (1962). Sur les substances organiques constituant la membrane peritrophique des insectes. *Archs. Int. Physiol. Biochem.*, **70**, 93-96
- **Deli MA** (2009). Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta.*, **1788**, 892-910
- **Derksen A.C.G., Granados R.R.** (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infectivity. *Virology*, **167**, 242-50
- **Dos Santos I., Fawaz F., Lagueny A.M., Bonini F.** (2003). Improvement of norfloxacin oral bioavailability by EDTA and sodium caprate. *Int. J. Pharm.*, **260**, 1-4
- **Dow J.A.T.** (1984). Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.* **246** (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 15), R633-R635
- **Felton G., Donato K., Del Vecchio R.J., Duffey S.S.** (1989). Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.*, **15**, 2667-2694

- **Felton G., Duffey S.S.** (1991). Reassessment of the role of gut alkalinity and detergency in insect herbivory. *J. Chem. Ecol.*, **17**, 1821-1836
- **Ferry N., Edwards M.G., Gatehouse J., Capell T., Christou P., Gatehouse A.M.R.**, (2006). Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientificperspective. *Trans. Res.*, **15**, 13-19
- **Fiandra L., Casartelli M., Giordana B.** (2006). The paracellular pathway in the lepidopteran larval midgut and its modulation by intracellular mediators. *Comp. Biochem. Physiol.*, **144**, 464- 473
- **Fiandra L., Casartelli M., Cermenati G., Burlini N., Giordana B.** (2009). The intestinal barrier in lepidopteran larvae: permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides. *J. Insect Physiol.*, **55**, 10-18
- **Fiandra L., Casartelli M., Diamante B., Giordana B.** (2010). Proctolin affects gut functions in lepidopteran larvae. *J. Appl. Entomol.*, **134**, 745–753
- **Fitches E, Audsley N, Gatehouse JA, Edwards JP.** (2002). Fusion proteins containing neuropeptides as novel insect control agents: snowdrop lectin delivers fused allatostatin to insect haemolymph following oral ingestion. *Insect Biochem Mol Biol.*, **32**, 1653-61
- **Fitches E, Wilkinson H, Bell H, Bown DP, Gatehouse JA, Edwards JP.** (2004). Cloning, expression and functional characterisation of chitinase from larvae of tomato moth (*Lacanobia oleracea*): a demonstration of the insecticidal activity of insect chitinase. *Insect Biochem Mol Biol.*, **34**, 1037-50
- **Flower N.E., Filshie B.K.** (1975). Junctional structures in the midgut cells of lepidopteran caterpillars. *J. Cell Sci.*, **17**, 221-239

- **Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K. and Tsukita S.** (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.*, **141**, 1539-1550
- **Gatehouse J.A.**, (2008). Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. *Plant Physiol.*, **146**, 881-887
- **Giordana B., Sacchi V.F.** (1977). Extracellular space values and intracellular ionic concentrations in the isolated midgut of *Philosamia cynthia* and *Bombyx mori*. *Experientia*, **33**, 1065–1066
- **Giordana B., Parenti P.** (1994). Determinants for the activity of the neutral amino acid/K⁺ symport in lepidopteran larval midgut. *J. Exp. Biol.*, **196**, 145-155
- **Giordana B., Leonardi M.G., Casartelli M., Consonni P., Parenti P.** (1998). K⁺-neutral amino acid symport of *Bombyx mori* larval midgut: a system operative in extreme conditions. *Am. J. Physiol. (Part A)*, **144**, 464-473
- **Harbison CE, Chiorini JA, Parrish CR** (2008). The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol.*, **16**, 208-14
- **Hardingham T.E., Fosang A.J., Dudhia J.** (1990). Domain structure in aggregating proteoglycans from cartilage. *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 794-96
- **Harvey W.R., Nedergaard S.** (1964). Sodium-independent active transport of potassium in the isolated midgut of the *Cecropia* silkworm. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51**, 757-765
- **Hayashi M., Tomita M.** (2007). Mechanistic analysis for drug permeation through intestinal membrane. *Drug Metab. Pharm.*, **22**, 67-77

- **Ishizawa T., Hayashi M., Awazu S.** (1987). Enhancement of jejunal and colonic absorption of fosfomycin by promoters in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 892-895
- **Jackson R.L., Busch S.J., Cardin A. D.** (1991). Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. *Physiol. Rev.*, **71**, 481-539
- **Jefferes L.A., Roe R.M.** (2008). The movement of proteins across the insect and tick digestive system. *J. Insect Physiol.*, **54**, 319-332
- **Karczewski J., Groot J.** (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions III. Tight junction regulation by intracellular messengers: differences in response within and between epithelia. *Am. J. Physiol.*, **279**, G660-G665
- **Kimura Y., Hosoda Y., Yamaguchi M., Nagano H., Shima M., Adachi S., Matsuno R.** (2001). Effects of Medium-Chain Fatty Acids on intracellular calcium levels and cytoskeleton in human intestinal (Caco-2) cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 743-751
- **Konopinska D. e Rosinski G.** (1999). Proctolin, an Insect Neuropeptide. *J Pept Sci.*, **5**, 533-46
- **Krishnan A., Nair P.N., Jones D.** (1994). Isolation, cloning and characterization of a new chitinase stored in active form in chitin-lined venom reservoir. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20971-76
- **Kukulies J., Komnick H.** (1983). Plasma membranes, cell junctions and cuticle of the rectal chloride epithelia of the larval dragonfly *Aeshna cyanea*. *J. Cell Sci.*, **59**, 159-182

- **Kurahashi H., Atiwetin P., Nagaoka S., Miyata S., Kitajima S., Sugimura Y.,** (2005). Absorption of mulberry root urease to the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **51**, 1055-1061
- **Lane N.J., Flores V.** (1988). Actin filaments are associated with the septate junctions of invertebrates. *Tissue Cell*, **20**, 211-217
- **Lane N.J., Dilworth S.** (1989). Isolation and biochemical characterization of septate junctions: differences between the proteins in smooth and in pleated varieties. *J. Cell Sci.*, **93**, 123-131
- **Lane N.J., Flores V.** (1990). The role of cytoskeletal components in the maintenance of intercellular junctions in an insect. *Cell Tissue Res.*, **262**, 373-385
- **Lehane M. J.** (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.*, **42**, 525-550
- **Lennernäs H., Gjellan R., Hällgren R., Graffner J.** (2002). The influence of caprate on rectal absorption of phenoxymethylpenicillin: experience from an *in vivo* perfusion in humans. *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 499-508
- **Leonardi M.G., Casartelli M., Parenti P., Giordana B.** (1998). Evidence for a low-affinity, high-capacity uniport for amino acids in *Bombyx mori* larval midgut. *Am. J. of Physiol.*, **274**, R1372-R1375
- **Lin W., Anuratha C.S., Datta K., Potrykus I., Muthukrishnan S., Datta S.K.** (1995). Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Biol. Technol.*, **13**, 686-91
- **Lindmark T., Nikkila T., Artursson P.** (1995). Mechanism of absorption enhancement by medium chain fatty acids in intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 958-964

- **Lindmark T., Söderholm J.D., Olaison G., Alvàn G., Ocklino G., Artursson P.** (1997). Mechanism of absorption enhancement in humans after rectal administration of ampicillin in suppositories containing sodium caprate. *Pharm. Res.*, **14**, 930-935
- **Lindmark T., Kimura Y., Artursson P.** (1998). Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**: 362-369.
- **Lukas T. J., Mirzoeva S., Slomczynska U., Watterson D. M.** (1999). Identification of novel classes of protein kinase inhibitors using combinatorial peptide chemistry based on functional genomics knowledge. *J. Med. Chem.*, **42**, 910-919
- **Lytton J., Westlin M., Hanley M.R.** (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps . *J. Biol. Chem.*, **266**, 17067-71
- **Ma T. J., Hoa N T, Tran D. D., Bui V, Pedram A., Mills S. and Merryfield M.** (2000). Cytochalasin B modulation of Caco-2 tight junction barrier: role of myosin light chain kinase .*Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, **279**, 875-885
- **Madara J.L., Barenberg D., Carlson S.** (1986). Effects of cytochalasin D on occluding junctions of absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. *J. Cell Biol.*, **102**, 2125-2136
- **Moffet D.F., Koch A.** (1992). Driving forces and pathways for H⁺ and K⁺ transport in insect midgut goblet cells. *J. Exp. Biol.*, **172**, 403-415
- **Moffett D.F., Cummings S.A.** (1994). Transepithelial potential and alkalization in an *in situ* preparation of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. *J. Exp. Biol.*, **194**, 341-345

- **Moriyama H., Enomoto S., Kato S., Setsuo I.** (1984). Correlation between strong basicità and composition observed in gastric juice of silkworm larvae, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **53**, 506-512
- **Mostov KE, Verges M, Altschuler Y.** (2000). Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Cur. Opinion in Cell Biol.*, **12**, 483–490
- **Muto Y., Nagao T., Urushidani T.** (1997). The putative phospholipase C inhibitor U73122 and its negative control, U73343, elicit unexpected effects on the rabbit parietal cell. *J. of Pharm. and Ex. Therap.*, **282**, 1379-1388
- **Mutuel D, Ravallec M, Chabi B, Multeau C, Salmon JM, Fournier P, Ogliastro M.** (2010). Pathogenesis of *Junonia coenia* densovirus in Spodoptera frugiperda: a route of infection that leads to hypoxia. *Virology*, **403**, 137-144
- **Nachman RJ, Teal PE, Strey A.** (2002). Enhanced oral availability/pheromonotropic activity of peptidase-resistant topical amphiphilic analogs of pyrokinin/PBAN insect neuropeptides. *Peptides*, **23**, 2035-43
- **Noirot C., Noirot-Timotheè C.** (1998). Cell Associations. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, **11A**, 27- 49
- **Palade GE.**(1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.*, **1**, 188–211
- **Palermo L.M., Hueffer K., Parrish C.R.** (2003). Residues in the apical domain of the feline and canine transferrin receptors control host-specific binding and cell infection of canine and feline parvoviruses. *J. of Virol.*, **77**, 8915-8923
- **Pannabecker T.L., Aneshansley D.J., Beyenbach K.W.** (1992). Unique electrophysiological effects of dinitrophenol in Malpighian tubules. *Am. J. Physiol.*, **263**, R609-R614

- **Pappenheimer J.R., Reiss K.Z.** (1987). Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by small intestine of the rat. *J. of Memb. Biol.*, **100**, 123-136
- **Pappenheimer J.R, Dahl C.E., Karnovsky M.L., Maggio J. E.** (1994). Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of d aminoacids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 1942-1945
- **Pauletti G.M., Okumu F.W., Borchardt R.T.** (1997). Effect of size and charge on the passive diffusion of peptides across Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. *Pharm. Res.*, **14**, 164-168
- **Pennacchio F., Strand M.R.**, (2006). Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, **51**, 233-258
- **Pèrez M., Barber A., Ponz F.** (1997). Modulation of intestinal paracellular permeability by intracellular mediators and cytoskeleton. *Can. J. Physiol. Pharm.*, **75**, 287-292
- **Peters W., Heitmann S., D’Haese J.** (1979). Formation and fine structure of peritrophic membranes in the earwig, *Forficula auricularia* (Dermaptera: Forficulidae). *Entomol. Gen.*, **5**, 241-254
- **Peters W.** (1992). Peritrophic Membranes. *Berlin: Springer-Verlag.*
- **Rao R, Fiandra L, Giordana B, de Eguileor M, Congiu T, Burlini N, Arciello S, Corrado G, Pennacchio F.** (2004). AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochem Mol Biol.*, **34**, 1205-13

- **Raof A.A., Ramtoola Z., Mc Kenna B., Yu R.Z., Hardee G., Geary R.S.** (2002). Effect of sodium caprate on the intestinal absorption of two modified antisense oligonucleotides in pigs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **17**, 131-138
- **Regev A., Keller M., Strizhov N., Sneh B., Prudovsky E., Chet I., Ginzberg I., Koncz-Kalman Z., Koncz C., Schell J., Zilberstein A.** (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3581-86
- **Reise Sousa C., Howard J.E., Hartley R., Earley F.G.P., Djamgoz M.B.A.** (1993). An insect epidermal cell line (UMBGE-4): structural and electrophysiological characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106A**, 759-767
- **Reynolds S.E., Samuels R.I.** (1996). Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. *Adv. Insect Physiol.*, **26**, 157-232
- **Rivers C.F., Longworth J.F.** (1972). A non-occluded virus of *Junonia coenia* (Nymphalidae: Lepidoptera). *J. of Invertebrate Pathol.*, **20**, 369-370
- **Ryerse J.S., Purcell J.P., Sammons R.D., Lavrik P.B.** (1992). Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. *Tissue and cell*, **24**, 751-71
- **Sakai M., Imai T., Ohtake H., Azuma H., Otagiri M.** (1997). Effects of absorption enhancers on the transport of model compounds in Caco-2 cell monolayers: assessment by confocal laser scanning microscopy. *J. Pharm. Sci.*, **86**, 779-785
- **Salama NN, Eddington ND, Fasano A.** (2006). Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, **58**, 15-28

- **Santos C.D., Ribeiro A.F., Ferreira C., Terra W.R.** (1984). The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnys ello*). Ultrastructure, fluid fluxes and secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell Tissue Res.*, **237**, 565-574
- **Sasaki K., Yonebayashi S., Yoshida M., Shimizu K., Aotsuka T., Takayama K.** (2003). Improvement in the bioavailability of poorly absorbed glycyrrhizin via various non-vascular administration routes in rats. *Int. J. Pharm.*, **265**, 95-102
- **Schipper N.G.M., Varum K.M., Artursson P.** (1996). Chitosans as absorption enhancer for poorly absorbable drugs. I: influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharmac. Res.*, **13**, 1686-1692
- **Sepehri G., Yaghoobi K., Sheibani V., Shamsizadeh A., Khaksari M.** (2010). The Effects of W7, a Specific Calmodulin Inhibitor, to the Antinociceptive Effects of Morphine in Adrenalectomized Rats. *Am. J. Pharm. Toxicol.*, **5**, 112-118
- **Skaer H., Le B., Maddrell S.H.P., Harrison J.B.** (1987). The permeability properties of septate junction in Malpighian tubules of *Rhoniis*. *J. Cell Sci.*, **88**, 251-267
- **Smith J., Wood E., and Dornish M.** (2004). Effect of chitosan on epithelial cell tight junction. *Pharmac. Res.*, **21**, 43-49
- **Söderholm J.D., Öman H., Blomquist J., Veen J., Lindmark T., Olaison G.** (1998). Reversible increase in tight junction permeability to macromolecules in rat ileal mucosa *in vitro* by sodium caprate, a constituent of milk fat. *Dig. Dis. Sci.*, **43**, 1547-1552
- **Stam J. C., Michiels F., van der Kammen R. A., Moolenaar W. H., Collard J. G.** (1998). Invasion of T-lymphoma cells: cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling. *E. M. B. O. J.*, **17**, 4066-4074

- **Stamm B., D'Haese J., Peters W.** (1978). SDS gel electrophoresis of proteins and glycoproteins from peritrophic membranes of some Diptera. *J. Insect Physiol.*, **24**, 1-8
- **Starratt AN, Brown BE.** (1975). Structure of the pentapeptide proctolin, a proposed neurotransmitter in insects. *Life Sci.*, **17**, 1253-1256
- **Takahashi K., Murakami T., Yumoto R., Hattori T., Higashi Y., Yata N.** (1994). Decanoic acid induced enhancement of rectal absorption of hydrophilic compounds in rats. *Pharm. Res.*, **11**, 1401-1404
- **Tay Y.H., Flick J., Levine S. A., Madara J. L., Sharp G.W.G., Donowitz M.** (1996). Regulation of tight junction resistance in T84 monolayers by elevation in intracellular Ca²⁺: a protein kinase C effect. *J.Membr. Biol.*, **149**, 71-79
- **Tellam R.L.** (1996a). The peritrophic matrix. In *The Insect Midgut*, ed. MJ Lehane, PF Billingsley. London: Chapman & Hall
- **Tellam R.L.** (1996b). Protein motifs in filarial chitinases: an alternative view. *Parasitol. Today*, **12**, 291-92
- **Tepass U., Tanentzapf G., Ward R., Fehon R.** (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Ann. Rev. Genet.*, **35**, 747-784.
- **Terra W.R.** (2001). The origin and function of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Of Insect Biochem. And Physiol.*, **47**, 47-61
- **Terra W.R., Ferreira C.** (1994). Insect digestive enzymes – properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. And Physiol. (Part B)*, **109**, 1-62
- **Terra W.R., Ferreira C.** (2005). Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Compreh. Mol. Insect Sc.*, **4**, 171-224

- **Terra W.T., Ferreira C., Jordao B.P., Dillon R.J.** (1996). Digestive enzyme. In: *Biology of the Insect Midgut*, eds M.J. Lehane and P.F. Billingsley, 153-94. Chapman and Hall, London
- **Tomita M., Hayashi M., Awazu S.** (1995). Absorption-enhancing mechanism of sodium caprate and decanoyl carnitine in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 739-743
- **Tortiglione C., Fogliano V., Ferracane R., Fanti P., Pennacchio F., Maria Monti L., Rao R.** (2003). An insect peptide engineered into the tomato prosystemin gene is released in transgenic tobacco plants and exerts biological activity. *Plant Mol. Biol.*, **53**, 891–902
- **Tuma P.L., Hubbard A.L.** (2003). Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.*, **83**, 871-932
- **Turner J.R., Rill B.K., Carlson S.L., Carnes D., Kerner R., Mrsny R.J., Madara J.L.** (1997). Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am. J. Physiol.*, **273**, C1378-C1385
- **Uchiyama T., Sugiyama T., Quan Y.S., Kotani A., Okada N., Fujita T., Muranishi S., Yamamoto A.** (1999). Enhanced permeability of insulin across the rat intestinal membrane by various absorption enhancers: their intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of n-lauryl- β -D-maltopyranoside. *J.Pharm. Pharmacol.*, **51**, 1241-1250
- **Van Itallie CM, Anderson JM.** (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.*, **68**, 403-29
- **Vendeville A., Ravallec M., Jousset F.X., Devisé M., Mutuel D., López-Ferber M., Fournier P., Dupressoir T., Ogliastro M.** (2009). Densovirus infectious

pathway requires clathrin-mediated endocytosis followed by trafficking to the nucleus. *J. of Virol.*, **9**, 4678-4689

- **Waterhouse D.F.** (1953). The occurrence and significance of the peritrophic membrane, with special reference to adult Lepidoptera and Diptera. *Aust. J. Zool.* **1**, 299-318
- **Watson C.J., Rowland M., Warhust G.** (2001). Functional modelling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **281**, C388-C397
- **Whetstone P.A., Hammock B.D.** (2007). Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control. *Tox.*, **49**, 576-596
- **Wieczorek H., Weerth S., Schindlbeck M., Klein U.** (1989). A vacuolar-type proton pump in a vesicle fraction enriched with potassium transporting plasma membranes from tobacco hornworm midgut. *J. Biol. Chem.*, **264**, 11143-48
- **Wigglesworth V.B.** (1929). Digestion in the tsetse-fly: a study of structure and function. *Parasitol.*, **21**, 288-321
- **Wigglesworth V.B.** (1930). The formation of peritrophic membranes in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. *Q. J. Microsc. Sci.*, **73**, 593-616
- **Wigglesworth V.B.** (1972). The principles of insect physiology. 7th edn, Chapman and Hall, London
- **Williams J.C., Beyenbach K. W.** (1984). Differential effects of secretagogues on the electrophysiology of the Malpighian tubules of the yellow fever mosquito. *J. Comp. Physiol.*, **154**, 301-309

- **Woods D.F., Hough C., Peel D., Callaini G., Bryant P.J.** (1996). Dlg protein is required for junctions structure, cell polarity and proliferation control in *Drosophila epithelia*. *J. Cell Biol.*, **134**, 1469-1482
- **Wu M.V., Schulte J., Hirschi A., Tepass U., Beitel G.J.** (2004). Sinuous is a *Drosophila* claudin required for septate junction organization and epithelial tube size control. *J. Cell Biol.*, **164**, 313-323
- **Yang B., Dong X., Cai D., Wang X., Liu Z., Hu Z., Wang H., Cao X., Zhang J., Hu Y.** (2008). Characterization of the promoter elements and transcription profile of *Periplaneta fuliginosa* densovirus nonstructural genes. *Virus Res.*, **133**, 149-56
- **Yang H.J., Zhou F., Malik F.A., Bhaskar R., Li X.H., Hu J.B., Sun C.G., Miao Y.G.** (2010). Identification and characterization of two chitin-binding proteins from the peritrophic membrane of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Arch Insect Biochem. Physiol.*, **75**, 221-30
- **Yen W.C., Lee V. H.L.**, (1995). Role of Na⁺ in the asymmetric paracellular transport transport of 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-L-Pro-L-Leu-Gly-D-Arg across rabbit colonic segments and Caco-2 cell monolayers. *J. of Pharm. Experim. Therap.*, **275**, 114-119.
- **Yu M.J., Beyenbach K.W.** (2001). Leucokinin and the modulation of the shunt pathway in Malpighian tubules. *J. Insect Physiol.*, **47**, 263–276
- **Yu M.J., Beyenbach K.W.** (2002). Leucokinin activates Ca²⁺-dependent signal pathway in principal cells of *Aedes aegypti* Malpighian tubules. *Am. J. Physiol.*, **283**, F499–F508
- **Yule D.I. and Williams J.** (1992). U73122 Inhibits Ca⁺⁺ oscillation in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20 13830-13835

- **Zhu W., Vandingenem A., Huybrechts R., Vercammen T., Baggerman G., De Loof A., Poulos C.P., Valentza A., Breuer M.** (2001). Proteolytic breakdown of the Neb trypsin modulating oostatic factor (Neb-TMOF) in the Haemolymph of different insects and its gut epithelial transport. *J. Insect Physiol.*, **16**, 1193-1202
- **Zimmermann U., Mehlan D., Peters W.** (1975). Investigations on the transport function and structure of peritrophic membranes of the blowfly *Calliphora Erythrocephala*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **51**, 181-86
- **Zolotarevsky Y., Hecht G., Koutsouris A., Gonzalez D. E., Quan C., Tom J., Mrsny R. J., Turner J. R.** (2002). A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterol.*, **123**, 163-172
- **Zornoza T., Cano M.J., Polache A., Granero L.** (2003). Pharmacology of acamprosate: an overview. *CNS Drug Rev.*, **9**, 359-364