

**UNIVERSITA' DI PISA**  
**FACOLTA' DI AGRARIA**

Tesi di Dottorato di ricerca in "Scienze delle Produzioni Vegetali"  
XXIII ciclo

SSD AGR/12

**INIBITORI DELLA BIOSINTESI DELLE PURINE PER LA TERAPIA  
ANTIVIRALE NEI VEGETALI: NUOVE MOLECOLE, STRATEGIE DI  
POTENZIAMENTO E MECCANISMO DI AZIONE**

**Dott. Andrea Luvisi**

**Tutore**  
**Chiar.mo Prof. Enrico Triolo**

**Presidente**  
**Chiar.mo Prof. Alberto Pardossi**

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

*ad Alice*

*senza la quale niente sarebbe stato possibile*

## RIASSUNTO

I virus rappresentano, per le colture agrarie, un fattore di rischio di primo piano. E' indubbio che la più efficace strategia da attuare per la difesa di una coltura sia, per la bontà dei risultati e per i costi da sostenere, la prevenzione. Ma se l'esclusione o l'*ultima ratio* dell'eradicazione rappresentano necessità recepite anche da capitoli legislativi nazionali ed internazionali, le problematiche relative alle piante *già infette* non possono non trovare qualche risposta. Il recupero di individui di interesse per l'inserimento in programmi di miglioramento o selezione può confidare infatti su strategie di risanamento. Se la termoterapia rappresenta la tattica più perseguita, l'impiego di molecole chimiche di sintesi può rivelarsi efficace per i casi insoluti, grazie anche all'opportunità non secondaria di mutuare alcune *armi* della medicina.

Ad oggi le molecole ascrivibili al gruppo degli inibitori dell'inosina monofosfato deidrogenasi (IMPDH) rappresentano, per la terapia nei vegetali, la risorsa più interessante, ma numerosi sono gli antivirali che, agendo anche su altri enzimi della via biosintetica delle purine entro la quale l'IMPDH agisce, presentano delle potenzialità da accertare. Nel presente lavoro, numerose sono le molecole inedite incluse in un programma di *screening* effettuato su plantule *in vitro* di tabacco infette da Cucumber mosaic virus (CMV) e Tobacco mosaic virus (TMV) e che hanno mostrato efficacia antivirale. Efficacia confermata anche per espianti di vite affetti da Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV 3), e che ha permesso di individuare come gruppo di sicuro interesse la classe molecolare delle tiopurine.

Se mutate dalla medicina umana sembrano essere numerose le molecole investigate nei vegetali, anche la strategia di *potenziamento* mediante la realizzazione di macrocostrutti sembra essere una via teoricamente percorribile. La sintesi di costrutti di acido micofenolico (MPA) a struttura poliammidoammidica non ha prodotto, però, i risultati sperati. Infatti, dalle evidenze sperimentali, sembra emergere la perdita parziale dell'efficacia antivirale dell'MPA sin dalle

prime fasi di produzione dei costrutti, suggerendo l'opportunità di intraprendere questa strategia con differenti molecole meno sensibili all'alterazione strutturale derivante dalla produzione del costrutto.

La chemioterapia nei vegetali, oltre a necessitare di nuovi strumenti o del potenziamento degli esistenti, abbisogna comunque di approfondimenti per quanto concerne i meccanismi di azione e sui fattori che ne influenzano i risultati. Mediante il test di *screening* è stata confermata la difficoltà ad eradicare TMV rispetto ad altri virus: questa peculiarità sembra essere intaccata solo da trattamenti che si prolungano nel tempo e che, seppur non eradicanti, mostrano qualche effetto sul virus. Il TMV sembra, ancora una volta, rappresentare un esemplare campo di prova per implementare le conoscenze virologiche: difatti la sua longevità *in vitro*, comparata a quella del CMV nel presente lavoro ed alla sua nota persistenza, sembra indicare nelle caratteristiche intrinseche del virus e nel suo rapporto con l'ospite un fattore chiave nella risposta chemioterapica, oltre che nell'efficacia del meccanismo di azione dell'antivirale. Meccanismo di azione che, per quanto concerne gli inibitori dell'IMPDH, è stato oggetto di studi specifici al fine di confermarne il ruolo anche nella terapia dei vegetali. I risultati sperimentali evidenziano come l'attività di un presunto inibitore esclusivo dell'IMPDH, quale il tiazofurin, sia parzialmente ridotta dalla somministrazione esogena di una molecola, la guanosina, la cui produzione dovrebbe essere drasticamente diminuita dall'azione dell'antivirale stesso. Seppure questa evidenza non sia conclusiva nell'indagine per la determinazione dell'effettivo meccanismo di azione di questa importante classe di antivirali, rappresenta un primo passo in accordo con quanto rilevato nella sperimentazione medica animale.

## Sommario

1. INTRODUZIONE.....	7
1.1. La chemioterapia come tecnica per il risanamento delle piante: dalla virologia medica alle applicazioni in campo vegetale .....	7
1.2. Gli inibitori dell'inosina monofosfato deidrogenasi (IMPDH) .....	10
1.2.1. <i>Ruolo dell'inibizione dell'IMPDH sulle attività antivirali</i> .....	13
1.3. Inibitori della biosintesi delle purine.....	16
1.3.1. <i>Tiopurine</i> .....	16
1.3.2. <i>L-cisteina derivati</i> .....	18
1.3.3. <i>Deazaguanine</i> .....	18
1.4. Le strategie per il potenziamento degli inibitori dell'IMPDH: i costrutti a base di acido micofenolico.....	20
2. SCOPI DEL LAVORO.....	25
2.1. Obiettivo I: screening antivirale, caso studio su Grapevine Leafroll associated ampelovirus 3 ed approfondimenti su Tabacco mosaic virus .....	25
2.1.1. <i>Screening</i> .....	25
2.1.2. <i>Caso studio</i> .....	27
2.1.3. <i>Approfondimenti su TMV</i> .....	27
2.2. Obiettivo II: le strategie per il potenziamento degli inibitori dell'IMPDH.....	29
2.3. Obiettivo III: ruolo dell'inibizione dell'IMPDH sulle attività antivirali.....	30
3. MATERIALI E METODI.....	32
3.1. Il materiale vegetale oggetto delle indagini.....	32
3.1.1. <i>Produzione delle entità virali e loro infezione</i> .....	32
3.1.2. <i>Allevamento in vitro di espianti di tabacco e vite</i> .....	32
3.2. Produzione dei costrutti a base di acido micofenolico .....	39
3.3. Fitotossicità .....	41
3.4. Trattamenti e test sanitari.....	42
3.4.1. <i>Trattamenti terapeutici</i> .....	42
3.4.2. <i>Saggi immunologici</i> .....	42
3.4.3. <i>RT-PCR</i> .....	44
3.4.4. <i>Test di longevità virale</i> .....	45
3.4.5. <i>Analisi statistica dei dati</i> .....	46
4. RISULTATI .....	47

4.1. Risultati Obiettivo I.....	47
4.1.1 Fitotossicità .....	47
4.1.2. Screening .....	48
4.1.3. Caso studio su vite .....	50
4.1.4. Approfondimenti su <i>Tobacco mosaic virus</i> .....	51
4.2. Risultati Obiettivo II.....	53
4.2.1. Produzione dei costrutti di acido micofenolico.....	53
4.2.2. Fitotossicità .....	54
4.2.3. Screening .....	55
4.3. Risultati Obiettivo III.....	57
4.3.1. Fitotossicità .....	57
4.3.2. Valutazione del ruolo dell'inibizione dell'IMPDH.....	57
5. DISCUSSIONE .....	59
5.1. Obiettivo I.....	59
5.2. Obiettivo II.....	61
5.3. Obiettivo III.....	62
6. CONCLUSIONI .....	64
6. RINGRAZIAMENTI .....	69
7. BIBLIOGRAFIA .....	70

## 1. INTRODUZIONE

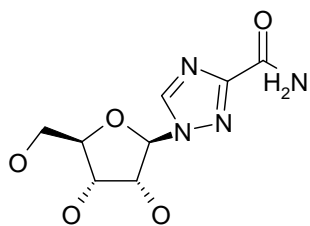
### 1.1. La chemioterapia come tecnica per il risanamento delle piante: dalla virologia medica alle applicazioni in campo vegetale

Nell'ambito delle filiere vivaistiche, al fine di ottenere capostipiti esenti da entità virali, è possibile attuare interventi di terapia antivirale per risanare soggetti infetti. Questi processi risultano essere di fondamentale utilità laddove l'individuazione di un soggetto di interesse sano sia impossibile o limitata, determinando una situazione di scarsa policlonalità per una certa specie.

La chemioterapia rappresenta uno dei possibili interventi di risanamento da virus, il cui impiego nel settore vegetale è attualmente limitato all'ambito sperimentale, diversamente da quanto può essere riscontrato per le applicazioni su uomini ed animali. Difatti, esigue sono le sostanze chimiche, naturali o di sintesi, che ad oggi hanno dimostrato possedere una qualche efficacia nel risanamento da fitovirus (Griffiths *et al.*, 1990), quantomeno se confrontate con le molecole efficaci nel contenimento delle affezioni virali umane. La ricerca in ambito vegetale può, comunque, attingere proficuamente dalle consistenti esperienze condotte nel settore medico e veterinario, considerando, laddove sembra plausibile, quei sistemi infettivi potenzialmente affini al mondo vegetale. Esistono, infatti, delle affinità sia strutturali che in termini di processi replicativi tra taluni virus animali e virus vegetali, quest'ultimi perlopiù caratterizzati da un filamento di RNA, che hanno indotto a sperimentare antivirali umani su organismi vegetali. Il caso esemplificativo è rappresentato dalla ribavirina, o virazolo (1- $\beta$ -D-ribofuranosil-1,2,4-triazolo-3-carbossamide, RB) (Fig. 1), individuata da Sidwell *et al.* (1972). Questa molecola è stata oggetto di numerose indagini fitoiatriche nel corso degli anni, dimostrando proprietà di

risanamento nei confronti di un ampio spettro di fitovirus. Difatti, fin dalle prime sperimentazioni di Shepard negli anni settanta su protoplasti ottenuti da piante di tabacco infette da Potato virus X (Shepard, 1977), è stato ipotizzato un ruolo di preminenza della RB in ambito chemioterapico, ed altre entità virali sono risultate sensibili alla sua azione, come Potato virus S (Conrad, 1991; Faccioli e Colombarini, 1991), Potato virus M (Faccioli e Colombarini, 1991), Tomato spotted wilt virus (De Fazio e Vicente, 1991), Cymbidium mosaic virus (Lim *et al.*, 1993), Odontoglossum ringspot virus (Lim *et al.*, 1993), Potato virus Y (Nascimento *et al.*, 2003), Prunus necrotic ringspot virus (Verma *et al.*, 2004), Grapevine vitivirus A (Panattoni *et al.*, 2007a), solo per citare alcuni esempi.

**Fig. 1.** Ribavirina



Il riferimento a queste positive esperienze di trasferimento di efficacia antivirale dalla virologia medica alla terapia vegetale, induce a ritenere che l'approccio chemioterapico animale possa essere riproposto sui vegetali, laddove i processi metabolici interessati dall'azione di una determinata molecola antivirale ed il genoma del virus presentino delle analogie che ne suggeriscano la fattibilità. A tale proposito, prendendo in esame le molecole di sintesi ad oggi indicate come efficaci nella pratica clinica e classificandole secondo il loro meccanismo di azione (De Clercq, 2004), particolarmente interessanti per le applicazioni in campo vegetale risultano le molecole capaci di agire sulla via biosintetica delle purine, ed in particolare gli inibitori della inosina 5'-monofosfato deidrogenasi (IMPDH). Infatti, tra le molecole il cui meccanismo di azione è – almeno in parte – associabile ad una inibizione dell'IMPDH,



particolare preminenza assume proprio il nucleotide sintetico RB, antivirale che è risultato essere il capostipite di molecole ad esso analoghe dalle efficaci proprietà viricide negli animali.

## 1.2. Gli inibitori dell'inosina monofosfato deidrogenasi (IMPDH)

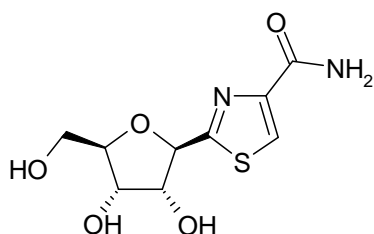
Una strategia potenzialmente efficace atta al risanamento di un sistema vivente, animale o vegetale, contraddistinto da una affezione virale, è l'inibizione di una o più vie metaboliche funzionali per la replicazione dell'acido nucleico virale. In questo contesto possono essere individuate quelle azioni in grado di inibire i processi di trascrizione dei nucleotidi trifosfati (NTP) e, tra queste, l'interferenza nell'attività dell'IMPDH sembra poter essere una delle strategie più efficaci. Infatti, dall'osservazione di cellule tumorali umane, si è potuto rilevare come l'attività dell'enzima sia particolarmente accentuata, facendolo essere un *target* non solo per molecole terapeutiche anticancro (Tricot *et al.*, 1989), ma anche per gli agenti antivirali (Nelson *et al.*, 1990). L'IMPDH catalizza la conversione dell'inosina 5'-monofosfato (IMP) in xantosina 5'-monofosfato (XMP), un precursore fondamentale per la sintesi di guanosina: inibendone l'attività si altera perciò la via biosintetica finalizzata alla produzione di guanosina mono-, di- e tri- fosfato (GMP, GDP, GTP), il cui *pool* intracellulare risulta impoverito (Franchetti *et al.*, 1996).

Oltre alla RB, sono state descritte numerose molecole contraddistinte da proprietà antivirali significative nell'ambito della virologia medica il cui meccanismo di azione preferenziale risulta essere l'inibizione dell'IMPDH, perlopiù suddivise in due gruppi (Jager *et al.*, 2002; De Clercq, 2002): i nucleosidici, quali il tiazofurin (2-β-D-ribofuranosylthiazole-4-carboxamide, TR), prodotto di sintesi, ed i non-nucleosidici, come l'acido micofenolico (6-(4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)-4-methyl-hex-4-enoic acid, MPA), ottenuto dalla fermentazione di diverse specie di *Penicillium* (Fig. 2).

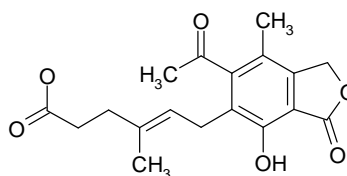
L'importanza di queste due classi di molecole in ambito vegetale è evidenziata dalle proprietà viricide che il TR ha esercitato su Tomato spotted wilt virus (De Fazio e Vincente,

1991) e su Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) (Panattoni *et al.*, 2007b), e dell'acido micofenolico nei confronti di Cucumber mosaic virus (D'Anna, 2006). E' comunque importante sottolineare come questa classificazione delle molecole in base al meccanismo di azione sia pienamente corretta per gli organismi animali, in quanto non sussistono conferme sperimentali in ambito vegetale. Comunque, la riproposta efficacia antivirale e la riproducibilità teorica dei meccanismi di azione, fanno sì che molecole quali RB, TR e MPA siano generalmente considerate inibitori dell'IMPDH.

**Fig. 2.** Tiazofurin ed acido micofenolico



Tiazofurin



Acido micofenolico

Nella terapia medica, la RB è indicata come una delle molecole di riferimento tra gli inibitori dell'IMPDH (Lowe *et al.*, 1977; Muller *et al.*, 1977; Zimmerman e Deepröse, 1978; Balzarini *et al.*, 1991, 1993), capace di ridurre i livelli intracellulari di GTP finanche al 90%. La ribavirina monofosfato (RMP), metabolita attivo prodotto della fosforilazione della RB, è un potente inibitore competitivo dell'IMPDH rispetto all'IMP, il substrato naturale dell'enzima. Infatti, la sua costante di inibizione ( $K_i$ ) nei confronti di diversi enzimi di mammiferi si colloca tra 0,25 e 4  $\mu\text{M}$  (Yamada *et al.*, 1988, 1990), decisamente inferiore – e perciò più affine – alla costante di Michaelis ( $K_m$ ) dell'IMP (18  $\mu\text{M}$ ) o del  $K_i$  del GMP (220  $\mu\text{M}$ ) (Streeter *et al.*, 1973). Similmente alla RB, anche il TR non risulta essere un antivirale direttamente attivo, ma, diversamente da essa, non subisce solo una fosforilazione ma viene successivamente convertito in un analogo del NAD, il tiazofurin-adenina dinucleotide (TAD), presente in alte concentrazioni

in cellule trattate con TR (Gharehbaghi *et al.*, 1994). Il TAD è un potente inibitore dell'IMPDH, con una  $K_i$  di 0,2  $\mu\text{M}$  (Gebeyehu *et al.*, 1985), rendendo plausibile l'ipotesi che il TR eserciti la sua azione viricida bloccando l'attività dell'IMPDH (Parker, 2005). Diversamente da molecole quali la RB ed il suo derivato TR, l'MPA è un potente inibitore specifico dell'IMPDH di tipo non-nucleosidico (Franklin e Cook, 1969). L'affinità dell'MPA nei confronti dell'IMPDH varia considerevolmente, oscillando tra 0,022  $\mu\text{M}$  per gli umani ai 20  $\mu\text{M}$  in *Escherichia coli* (Carr *et al.*, 1993) Anche l'MPA ha dimostrato di essere un potente inibitore dell'IMPDH, con valori di  $K_i$  che oscillano attorno a valori di  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$  (Carter *et al.*, 1969), interagendo direttamente con l'enzima.

E' necessario specificare che queste tre molecole interagiscono differientemente con l'IMPDH non solo in termini di metabolita attivo (RMP, TAD o MPA), ma anche in funzione del loro rapporto con i siti dell'enzima. Infatti, mentre l'RMP interagisce con il sito IMP/XMP, il TAD inibisce l'enzima a livello del sito  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , analogamente a quanto sembra poter fare l'MPA (Franchetti *et al.*, 1996). Per l'MPA, però, è stato anche ipotizzato che esista un sito specifico di legame con l'IMPDH, capace di determinare una modificazione allosterica dell'enzima impedendo il rilascio dell'XMP (Hupe *et al.*, 1986).

Queste evidenze indicano chiaramente come sia l'RMP che il TAD formatosi nelle cellule, piuttosto che l'MPA, siano in grado di competere in misura eccellente con i nucleotidi intracellulari naturalmente abili ad interagire con l'enzima. E' evidente come i virus siano dipendenti dal GTP per la loro replicazione, e privare una entità virale di uno dei quattro nucleotidi richiesti non può che comportare una inibizione del processo replicativo, fenomeno che peraltro può spiegare l'ampio spettro di azione osservato per molecole come la RB. Naturalmente anche le cellule ospiti dipendono dalla presenza di GTP per il corretto svolgimento dei processi replicativi, e l'inibizione dell'IMPDH dettata dalla presenza della RB o TR può risultare tossica per le cellule umane o vegetali: risulta fondamentale, perciò, considerare le

realtà nelle quali la replicazione virale risulti decisamente più sensibile al declino del livello intracellulare di GTP rispetto alle cellule ospiti.

### **1.2.1. Ruolo dell'inibizione dell'IMPDH sulle attività antivirali**

La RB può essere indicata come l'inibitore dell'IMPDH di riferimento, sia per le numerose esperienze positive riscontrate nell'ambito della virologia umana (De Clercq, 2001, 2002), sia per gli incoraggianti riscontri ottenuti per il risanamento di vari binomi ospite/virus in ambito vegetale, seppure in quest'ultimo caso sia probabilmente più opportuno parlare di presunto inibitore dell'IMPDH. Molti studi sono stati condotti per determinare il meccanismo di azione della RB, cercando di correlare la sua capacità di inibire l'IMPDH con le proprietà antivirali, con altrettanto diversificati risultati. Difatti, considerando svariate tipologie di virus di rilievo per la patologia umana (es. influenzali), si è osservato come la concentrazione di GTP intracellulare sia ridotta laddove il livello di RB sia corrispondente a quello capace di indurre una risposta antivirale (Smee *et al.*, 2002). Tale evidenza ben si accosta alle casistiche nelle quali la somministrazione esogena di guanosina sia capace di impedire (almeno parzialmente), l'azione antivirale della RB (Smee *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003). Difatti trattamenti con guanosina sono in grado di supplire all'inibizione dell'IMP andando ad incrementare il *pool* di GTP: la guanosina può portare alla produzione di guanina tramite l'azione della purina nucleoside fosforilasi, convertita poi in GMP dall'enzima ipoxantina/guanina fosforibosil transferasi (HGRTasi), aggirando il blocco dell'IMPDH operato dall'RMP.

La protezione operata dalla guanosina suggerisce, ma non prova pienamente, che l'inibizione dell'IMPDH sia coinvolta nell'attività antivirale della RB, in quanto è significativo come, per alcune entità virali (Vaccinia virus e Virus respiratorio sinciziale), l'attività viricida non sia rallentata o bloccata dalla somministrazione esogena di guanosina (Smee e Mathews, 1986; Robins *et al.*, 1985). Da qui l'ipotesi che altri meccanismi d'azione interessino la RB, e

che un potenziale target possa essere anche l'RNA polimerasi virale (Parker, 2005). Infatti, un ulteriore metabolita attivo della RB, oltre all'RMP, è la ribavirina trifosfato (RTP), un nucleotide analogo potenzialmente in grado – come altri – di interferire con l'RNA polimerasi in tre modi: (a) inibendo l'enzima tramite un rapporto competitivo con il substrato naturale senza diventare a sua volta un substrato per l'enzima; (b) risultando essere un substrato alternativo per la polimerasi causando una terminazione della catena; (c) risultando essere un substrato alternativo per la polimerasi senza causare una terminazione della catena. Nei primi due casi l'RTP – e perciò la RB – avrebbe un potenziale viricida legato all'interruzione del processo replicativo con interruzione della catena di RNA virale. Altrimenti, nel terzo caso, avremmo un genoma virale contenente dei nucleotidi “fraudolenti”, dando luogo al cosiddetto *catastrophe phenomena* (Domingo e Holland, 1994). Numerosi sono gli studi nei confronti di diverse patologie virali in ambito medico per comprendere quale delle tre relazioni coinvolge l'RTP, ma sembra evidente che sia l'inibizione della sintesi dell'RNA che l'induzione di mutazione possano contribuire all'attività della RB (Parker, 2005).

Considerando il TR, diversamente, la sua forma trifosfatata (TTP) sembra formarsi in quantitativi estremamente ridotti (Jayaram *et al.*, 1982), lasciando ipotizzare che l'attività viricida di questa molecola sia perlopiù dovuta alla sua inibizione dell'IMPDH. Analogamente, l'MPA sembra poter agire esclusivamente sull'IMPDH, indicando che la soppressione dei livelli di GTP sia sufficiente ad ottenere l'effetto antivirale (Parker, 2005), anche la molecola non sembra efficace contro il virus dell'epatite C (Zhou *et al.*, 2003), facendo registrare come l'abbattimento di GTP non sia sempre sinonimo di attività antivirale.

In definitiva, per quanto diversificate siano le ipotesi legate ai meccanismi di azione della RB in ambito umano – da un coinvolgimento dell'IMPDH a tre differenti interazioni con l'RNA polimerasi – si può ipotizzare come il ruolo dell'inibizione dell'IMPDH sia significativo per questo antivirale, così come per altre molecole, e che questo meccanismo possa analogamente interessare gli antivirali efficacemente sperimentati sulle piante. Perciò, premettendo che, in

ambito vegetale, tutte le possibili vie di indagine risultano essere inesplorate, seguire il proficuo percorso dalla virologia medica può essere il primo passo da compiere, ricordando comunque che l'inibizione dell'IMPDH non è l'unico bersaglio possibile nella biosintesi delle purine.

## 1.3. Inibitori della biosintesi delle purine

Come precedentemente citato, la molecola maggiormente sperimentata in ambito vegetale per l'indagine delle sue proprietà antivirali è senz'altro la RB, variamente efficace nei confronti di diverse combinazioni ospite-patogeno. Ulteriori indagini hanno interessato il TR, capace di esercitare un'elevata attività viricida su GLRaV-3 in vite, e l'MPA, con risultati variabili. Si tratta perciò di un numero esiguo di molecole efficaci su uno spettro relativamente ristretto di entità virali, ma, per contro, esistono altri gruppi antivirali capaci di agire non soltanto nei confronti dell'IMPDH, ma anche su altri enzimi facenti parte della biosintesi delle purine, le cui proprietà meritano di essere investigate. Di seguito alcuni esempi.

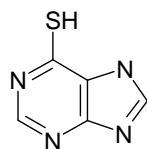
### **1.3.1. Tiopurine.**

Ampiamente utilizzate nelle terapie mediche (Lennard, 1992; Nielsen *et al.*, 2001) le tiopurine sono contraddistinte da un meccanismo di azione associato all'inibizione della biosintesi delle purine. Nella forma 6-mercaptopurina (MP) (Fig. 3) e 6-tioguanina (2-ammino-6-mercaptopurina, 6-TG) le molecole sono convertite dall'ipoxantina fosforibosiltrasferasi (HGPRTase) in tiinosina monofosfato (TIMP) e tioguanosina monofosfato (TGMP), rispettivamente. TIMP e TGMP sono nucleotidi intracellulari in grado di inibire l'enzima IMPDH (Nelson, 1975; Hatse *et al.*, 1999; Elgemeie, 2003), bloccando la conversione dell'IMP in XMP mediante la loro azione come substrati alternativi per l'IMPDH (Gearry e Barclay, 2005). Inoltre, sia il TIMP che la 6-metilmercaptopurina riboside (MMPR) possono andare incontro a metilazione (MTIMP), e similmente a TMGP, sono in grado di inibire la via metabolica abile alla sintesi *de novo* delle purine e delle tiammine, riducendo i livelli di IMP plastidico e mitocondriale (Nelson, 1975; Krynetski *et al.*, 1995; De Abreu *et al.*, 1995). Questo

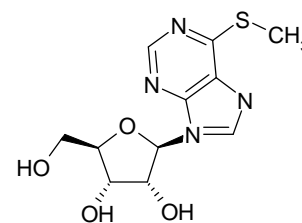


processo metabolico, difatti, necessita della produzione della fosforibosilammina (PRA), per azione della glutammina-5-fosforibosil pirofosfato (PRPP) amidotransferasi sulla PRPP congiuntamente alla guanina (Zrenner *et al.*, 2006). Il TIMP e l'MTIMP sono in grado di inibire l'attività del PRPP amidotransferasi (Koeningsknecht *et al.*, 2007), contribuendo perciò alla riduzione del *pool* di IMP e quindi delle purine utili per la sintesi virale. Gli incrementati livelli di PRPP, indotti dalla presenza di MTIMP o TMGPM determinano incrementi nella biosintesi delle pirimidine, sbilanciandone il rapporto con le purine e causando una riduzione dell'accrescimento cellulare che può portare, dopo lunghe esposizioni, a morte (De Abreu *et al.*, 1995). TIMP e TGMP sono successivamente convertiti in nucleotidi di tioguanina citotossici (TGN), in grado di incorporarsi negli acidi nucleici in forma ridotta (Tidd e Patterson, 1974a, 1974b; Krynetskaia *et al.*, 1999). Infine il TGMP è in grado di inibire l'attività di GMP fosfotrasferasi (Nelson, 1975).

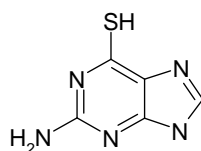
**Fig. 3.** Tiopurine



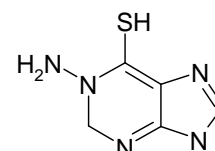
6-mercaptapurina



6-metilmercaptapurina riboside



6-tioguanina (2-ammino-6-mercaptapurina)



1-ammino-6-mercaptapurina

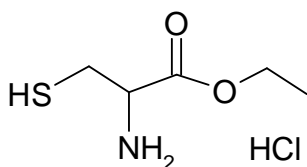
I processi metabolici sui quali la MP agisce sono presenti anche nei soggetti vegetali, permettendoci quantomeno di ipotizzarne una applicazione sperimentale. Infine il TIMP è in

grado di competere per la HGRTasi con la guanosina, riducendone la conversione in guanina (Gearry e Barclay, 2005), un aspetto d'interesse che potrebbe limitare l'ipotizzabile effetto di ripresa virale in seguito a somministrazioni esogene di guanosina (Smee *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003). In definitiva, i tre momenti della sintesi delle purine sui quali potrebbe agire il MP indicano questa molecola come un antivirale potenzialmente efficace anche in campo vegetale.

### **1.3.2. L-cisteina derivati.**

Le molecole appartenenti a questo gruppo (Fig. 4) sono in grado di alterare la biosintesi delle purine, e molecole come L-cisteina etil estere S-(N-metilcarbammato) monoidrocloruro (LCYS) sono in grado di inibire alcuni enzimi che necessitano della presenza dell'L-glutamina, quali la GMP sintasi, la PRPP amidotransferasi ed, in misura minore, la formilglicinamidasi ribonucleotide sintetasi (FGAMasi). La molecola, infatti, risulta essere un antagonista dell'L-glutamina, agendo selettivamente sugli enzimi coinvolti nella biosintesi delle purine (Jayaram *et al.*, 1990).

**Fig. 4.** Derivato dell'L-cisteina



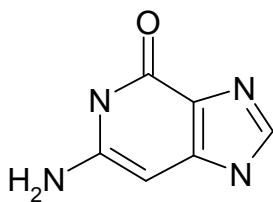
L-cisteina etil estere monoidrocloruro

### **1.3.3. Deazaguanine.**

Sono molecole antitumorali inibitrici del metabolismo delle purine, agendo principalmente sulla sintesi del DNA e delle proteine. In particolare, la 3-deazaguanina (3-DZG)

(Fig. 5) si è rivelata capace di inibire importanti enzimi coinvolti nella sintesi delle purine, in particolar modo l'IMPDH e l'enzima bifunzionale amminoimidazolo carbossammide ribotide formiltransferasi/inosina monofosfato cicloidrolasi (ATIC) (Fig. 6) (Streeter e Koyama, 1976; Rivest *et al.*, 1982). La molecola è quindi capace di alterare i livelli dei trifosfati, in particolare del GTP, riducendolo sino al 15% (Pieper *et al.*, 1986). La 3-DZG non sembra comunque in grado di espletare la sua azione senza essere convertita in una forma attiva: infatti, studi effettuati su cellule ovariche animali deficienti in HGRTasi ed adenina fosforibosiltransferasi (APT), enzimi indicati come possibili responsabili della conversione della 3-DZG in 3-deazaguanina 5'-monofosfato (DMP), mostrano una certa insensibilità nei confronti della molecola, indicando come la 3-DZG necessiti di essere attivata quantomeno a ribonucleotide monofosfato (Saunders e Plunkett, 1983). La molecola sembra inoltre essere anabolizzata ed incorporata nel DNA e nell'RNA delle cellule animali ospiti al posto della guanina, e tale fenomeno è associabile alla diminuzione del tasso di sintesi del DNA ed alla morte cellulare (Pieper *et al.*, 1986).

**Fig. 5.** 3-deazaguanina



## 1.4. Le strategie per il potenziamento degli inibitori dell'IMPDH: i costrutti a base di acido micofenolico

Di interesse per fini chemioterapici nel settore vegetale, sembra poter essere il potenziamento dell'MPA, oltre che per la sua già discreta attività antivirale, per le sue caratteristiche strutturali e la modalità di azione.

L'attività dell'MPA è da ritenersi dose dipendente: a concentrazioni micro molarì può stimolare l'arresto del ciclo cellulare o stimolare l'apoptosi, mentre, a concentrazioni più basse, induce differenziazione. La molecola è in grado di interagire con due isoforme - tipo I o tipo II - dell'IMPDH umana, con un'attività differenziata, in quanto il tipo II è 4,7 volte più sensibile del tipo I, mentre non è nota la sensibilità dell'enzima vegetale nei confronti della molecola. L'MPA è considerato come importante agente antitumorale, e già nel 1972 è stato saggiato su 23 pazienti con un cancro solido ed ematologico refrattario anche se la risposta è stata solo parzialmente positiva. Questo scarso effetto è stato attribuito alla rapida glucuronazione dell'OH fenolico che limita le concentrazioni plasmatiche. Comunque, studi *in vitro* hanno evidenziato un'elevata attività antitumorale dell'MPA, ma la sua rapida metabolizzazione in composti non attivi ne limita fortemente l'attività *in vivo*. In questo contesto molte ricerche sono state effettuate con lo scopo di ottenere derivati di MPA più resistenti alla glucuronazione dell'OH fenolico e quindi maggiormente attivi come antitumorali. I risultati ottenuti hanno contribuito ad evidenziare che le proprietà biologiche dell'MPA sono strettamente dipendenti dalla struttura e piccole modificazioni di essa ne cambiano notevolmente l'attività. I gruppi funzionali ritenuti importanti per esplicitare l'attività biologica di MPA sono l'OH fenolico, il gruppo lattonico ciclico, il COOH e l'isometria geometrica E del doppio legame (Bentley, 2000). In particolare mentre la metilazione dell'OH fenolico o la sua sostituzione con un gruppo tiolico (SH) conduce a prodotti inattivi, la sostituzione dell'OH con un gruppo NH<sub>2</sub> porta a composti che, pur mostrando una

bassa o comparabile attività antitumorale, non sono soggetti a inattivazione metabolica sia in vivo che *in vitro*. Di contro, la sostituzione del ciclo lattonico con altre unità cicliche come un anello a 6 termini o con unità esteree acicliche diminuiscono drasticamente l'attività, così come la sostituzione del gruppo metossilico e metilico sull'anello aromatico rispettivamente con un gruppo etossilico o idrogeno porta a derivati inattivi o a bassa attività. Anche l'idrogenazione del doppio legame presente nell'MPA od il cambio di isometria geometrica da E a Z causa una marcata riduzione dell'attività biologica. Il gruppo carbossilico terminale sembra necessario per l'attività e la sua esterificazione con alcoli a lunga o corta catena produce composti biologicamente inattivi come tali, ma che possono essere considerati come profarmaci che liberano MPA dopo idrolisi *in vivo*. Inoltre la riduzione della funzione carbossilica di MPA conduce all'alcol micofenolico che presenta un'attività di inibizione inferiore (50 volte) rispetto a quella espressa dall'MPA. Questi risultati sono confermati da studi di modellistica molecolare condotti sulla struttura cristallina ottenuta dal legame dell'MPA con l'IMPDH che hanno evidenziato tre aree attive dell'enzima: un'area dove si instaura un'interazione tra il nucleo aromatico ftalimmidico e il nucleo dell'ipoxantina del IMP; un'area dove si instaurano legami ad idrogeno tra l'OH fenolico ed il gruppo lattonico dell'MPA con gli amminoacidi Thr-333, Gln-441 e Gly-326 nei quali il fenolo, il gruppo OH del Thr-333 e l'NH di Gln-441 formano un triangolo di legami ad idrogeno stabilizzato dal ciclo lattonico che instaura legami ad idrogeno con gli amminoacidi Gly-326 e Thr-333; un'area dove si stabilisce sia un'interazione ionica che un legame ad idrogeno fra il carbossile di 1 e l'amminoacido Ser-276 dell'IMPDH (Bentley, 2000).

Tutti i derivati dell'MPA biologicamente attivi derivano da modificazioni della catena laterale e del gruppo carbossilico mentre la porzione aromatica ed il ciclo lattonico rimangono inalterati. Quindi le variazioni strutturali sono progettate tenendo conto del fatto che l'inibizione dell'enzima umano IMPDH da parte di MPA avviene attraverso il cofattore NAD e l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata verso la sintesi di composti in grado di mimare il NAD allo scopo

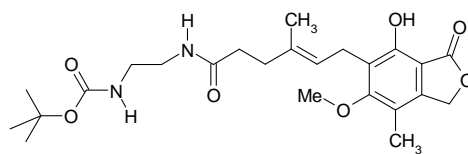
di ottenere derivati dell'MPA, specifici per l'isoforma II, in grado di esplicare una maggiore attività antitumorale ed una minore attività immunosoppressiva. Tra i composti sintetizzati, più promettenti dal punto di vista farmacologico, sono da citare quelli dove MPA è coniugato con l'adenosina-5'-monofosfato (AMP), ma le evidenze sperimentali non sembrano completamente soddisfacenti, al punto di suggerire la necessità di esplorare altre vie.

Un limite all'uso di piccole molecole ad attività farmacologica quali antivirali, può risiedere in una bassa attività ligando-recettore. Questo ostacolo può essere superato cercando di amplificare la risposta biologica, rispetto al singolo composto attivo, attraverso costrutti ad alto peso molecolare caratterizzati dalla connessione di farmaci o composti attivi ad un opportuno *scaffold* avente funzione di solo supporto, in modo da ottenere oligomeri o *cluster*. Queste strutture dendrimetriche, geometricamente ordinate e caratterizzate da un elevato numero di ramificazioni in grado di esporre un certo numero di composti biologicamente attivi, hanno mostrato, negli ultimi dieci anni, potenziali applicazioni biomediche, ad esempio, come *carrier* per il trasporto ed il rilascio controllato di farmaci o, appunto, come *scaffold* per esercitare un'esposizione multipla di sostanze biologicamente attive. L'effetto multivalenza, inteso come capacità di legarsi contemporaneamente a più siti recettoriali, porta al superamento di una eventuale bassa affinità delle interazioni ligando-recettore attraverso un incremento della stabilità del complesso, una modulazione dell'effetto di associazione/dissociazione fra ligando e recettore ed un effetto di concentrazione locale. Questo potenziamento dell'attività biologica per "effetto multivalenza" è stato dimostrato in diversi ambiti biologici (Bezouska, 2002), ed è possibile ipotizzarne l'applicazione non soltanto per numerosi antivirali, ma anche per quelli potenzialmente interessanti in ambito vegetale ma che hanno presentato limiti di efficacia quando somministrati tradizionalmente. Fra i numerosi *scaffolds* riportati in letteratura per svolgere funzioni di supporto (*core*) per una presentazione multivalente di composti farmacologicamente attivi, particolarmente interessanti per semplicità, versatilità e compatibilità biologica, sono le poliammidoammine (PAMAM) (Tomalia, 2004), che rappresentano la classe

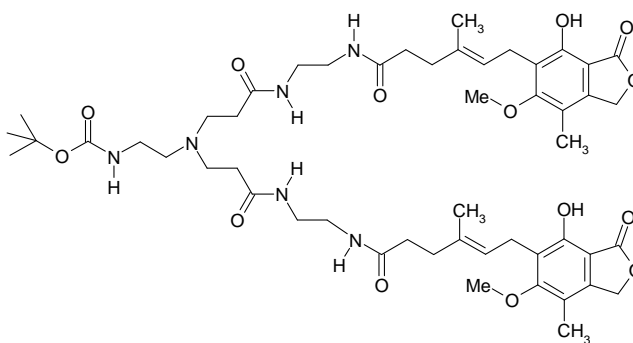
più caratterizzata dal punto di vista delle proprietà chimico-fisiche, oltre ad essere la prima classe commercializzata. L'aspetto più interessante per queste strutture risiede nella possibilità di modularne la crescita e, quindi, la dimensione con semplici processi chimici reiterativi, e nella possibilità di ottenere strutture simmetriche sferiche (dendrimeri) od asimmetriche (cunei o dendroni).

La sintesi di PAMAM a base di MPA è stata approntata dal Dipartimento di Chimica Organica e Biofarmacia dell'Università di Pisa seguendo uno degli approcci chimici più collaudati nella sintesi di matrici PAMAM (Tomalia, 2004). In particolare la preparazione del PAMAM di prima generazione dotato di 2 gruppi amminici terminali (tipo 21) è stata realizzata partendo da un *core* costituito dall'N-Boc-etilediammina commerciale, mentre con un processo reiterativo si sono ottenuti i PAMAM di seconda generazione (4 funzioni amminiche terminali), a loro volta coniugati con unità di MPA (tipo 22) (Fig. 7). L'ammide 30 (Fig. 7) è costituita da una singola molecola di MPA coniugata con N-Boc-etilediammina, ed è stata realizzata per essere utilizzata per valutare l'eventuale alterazione dell'attività antivirale dell'MPA a seguito della reazione di condensazione.

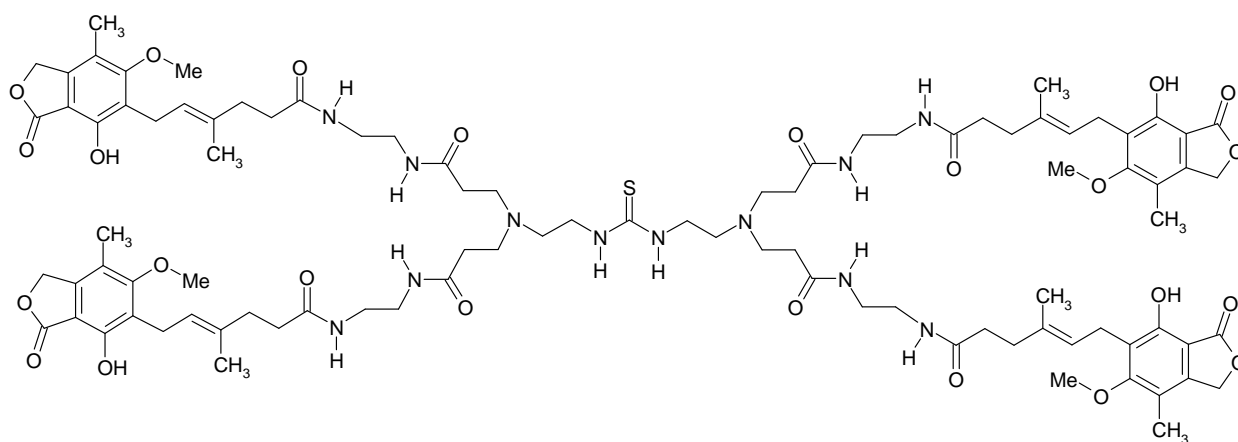
**Fig. 7.** Derivati dell'acido micofenolico



**Ammide 30**



**PAMAM tipo 21**



**PAMAM tipo 22**



## 2. SCOPI DEL LAVORO

### 2.1. Obiettivo I: screening antivirale, caso studio su Grapevine Leafroll associated ampelovirus 3 ed approfondimenti su Tobacco mosaic virus

#### 2.1.1. *Screening*

Oggetto della sperimentazione è stata l'indagine delle capacità di risanamento di alcune molecole che per le loro caratteristiche sono ipotizzabili proprietà antivirali, quali:

- MP
- MMPR
- 1-ammino-6-mercaptopurina (1A-MP)
- 6-TG
- LCYS
- 3-DZG

Scopo di questo *screening* è l'individuazione di molecole con proprietà viricide da affiancarsi alle poche ad oggi individuate per le applicazioni in ambito vegetale. Difatti, l'esiguità del loro numero e l'inefficacia su alcune specie virali indagate, inducono a percorrere ulteriori indagini tra potenziali candidati. Inoltre sembra opportuno indagare classi di molecole la cui azione presunta non sembri esclusivamente legata all'inibizione dell'IMPDH, ma coinvolga altri importanti *target* metabolici.

Lo studio di molecole viricide è stato condotto su numerose entità virali di interesse commerciale e non, ma, per il presente studio, volendo valutare l'efficacia di diversi antivirali e cercare di comprendere taluni meccanismi di azione, la scelta del *target* per un primo *screening* è ricaduta su virus che, per le loro caratteristiche, possono essere considerati di riferimento. Tra i

virus vegetali, *Tobamovirus* è senz'altro uno dei generi più conosciuti e più estesamente indagati, con un ampio *range* di ospiti e di diffusione globale, ed il Tobacco mosaic virus (TMV) ne è considerato il rappresentante, indicandolo come il candidato ottimale per lo *screening* progettuale. Nonostante il TMV sia considerato probabilmente il virus-tipo per eccellenza, è noto come le sue caratteristiche lo rendano, sotto diversi punti di vista, peculiare: difatti, considerando soprattutto i fattori che ne determinano la degradazione anche fuori dall'ospite, come la temperatura, il pH, la presenza di antibiotici (Cheo, 1980), questa entità risulta essere particolarmente resistente rispetto alla maggior parte degli altri virus. E' perciò ipotizzabile che la risposta data dalla somministrazione di un determinato antivirale possa discostarsi da quanto possa essere registrabile per altre entità virali: difatti queste peculiarità sono già note per la RB, la quale sembra inibire l'attività replicativa del TMV senza però eradicarlo in sistemi *in vitro*, nonostante il suo largo spettro di azione (Schulze e Kluge, 1994). Perciò, fermo restando che ogni antivirale necessita di test *ad hoc* per ogni virus, si è ritenuto opportuno allargare l'indagine anche ad un secondo virus quale il Cucumber mosaic virus (CMV), anch'esso ben noto e frequentemente oggetto di interesse, ma che, a differenza del TMV, è contraddistinto da una minore resistenza nei confronti dei fattori di degradazione (Smith, 1975).

Come organismo ospite per lo *screening* è stato scelto il tabacco (*Nicotiana tabacum* L.) nelle sue varietà di Xanthi per i test su CMV e Turkish per le indagini su TMV, in relazione alla capacità di indurre infezioni a carattere sistemico. Il tabacco, difatti, rappresenta una delle specie di riferimento per i test *in vitro*, grazie alla sua velocità di accrescimento ed all'alta vitalità che garantisce in queste specifiche condizioni, risultando essere un organismo ideale per uno *screening*.

### **2.1.2. Caso studio**

Successivamente allo *screening*, le molecole sono state introdotte in un protocollo sperimentale atto a valutarne l'efficacia nei confronti di una entità virale di particolare rilievo agronomico quale il Grapevine leafroll-associated *ampelovirus* 3 (GLRaV 3) su *Vitis vinifera* L. Il virus 3 della vite associato all'accartocciamento fogliare risulta essere il più diffuso ed economicamente rilevante tra le varianti associate al complesso stesso (Gugerli, 2003). Il virus, facente parte della famiglia *Closteroviridae*, genere *Ampelovirus*, è compreso all'interno della più recente legislazione fitosanitaria riguardante la vite (Direttiva Europea 2005/43/CE; DM 8 febbraio 2005; DM 7 luglio 2006; DM 24 giugno 2008).

I presunti antivirali impiegati dallo *screening* su tabacco sono stati somministrati ad espianti *in vitro* di *V. vinifera* cv. Sagrantino naturalmente infette da GLRaV 3.

### **2.1.3. Approfondimenti su TMV**

Il TMV sembra essere un *target* per trattamenti antivirali particolarmente ostico. Al fine di individuare una soluzione in grado di far registrare una sua eradicazione, piante di tabacco infette da TMV sono state sottoposte a cicli terapeutici con un mix di antivirali caratterizzati da presunti meccanismi di azione differenti (RB, TR, 6-TG).

Inoltre, essendo chiaro dalla letteratura come i due virus oggetto dello *screening* diano generalmente risposte molto differenti a seguito di trattamenti antivirali, nel presente lavoro è stato ipotizzato come la persistenza del TMV (Fraenkel-Conrat e Williams, 1955; Broadbent *et al.*, 2008) possa svolgere un ruolo significativo nel rendere difficoltosa la sua eradicazione. E' ipotizzabile infatti che la chemioterapia condotta con le molecole sintetiche ad oggi note non agisca direttamente sul virus, ma esclusivamente sulla sua replicazione. In tal caso, le particelle

virali già presenti prima dell'inizio del trattamento o comunque quelle che si produrranno durante i cicli terapeutici, dovranno necessariamente inattivarsi seguendo il naturale *turn over* affinché si possa definire risanata la pianta. Risulta probabile perciò che un virus ad elevata persistenza possa generare maggiori difficoltà nella sua eradicazione. A tal fine test sulla longevità *in vitro*, nel cui contesto non sono presumibili replicazioni virali, sono stati condotti per comparare CMV e TMV. Inoltre sono stati valutati gli effetti di trattamenti terapeutici di lunga durata, ovvero di 18 cicli, per evidenziare gli effetti antivirali eventualmente mascherati o neutralizzati dall'alta persistenza del virus.

## 2.2. Obiettivo II: le strategie per il potenziamento degli inibitori dell'IMPDH

Oggetto della sperimentazione è stata l'indagine delle capacità di risanamento di alcune molecole derivate dall'MPA e che per le loro caratteristiche sono ipotizzabili proprietà antivirali, quali:

- Ammide 30
- PAMAM 21
- PAMAM 22

L'MPA è stato posto a confronto con il PAMAM tipo 21 e tipo 22, oltre all'ammide 30 per verificare il mantenimento delle proprietà antivirali dell'MPA a seguito della coniugazione con N-Boc-etilediammina. Le molecole sono state somministrate ad espianti *in vitro* di *N. tabacum* cv. Xanthi artificialmente infetti da CMV

## 2.3. Obiettivo III: ruolo dell'inibizione dell'IMPDH sulle attività antivirali

Oggetto della sperimentazione è stata l'indagine della capacità della guanosina esogenamente somministrata alle plantule di inibire l'attività di TR, mediante somministrazione di:

- Guanosina
- TR/guanosina

Seppure i meccanismi di azione di molte molecole con un potenziale viricida siano diversificati e possano risultare tra loro correlati nell'esplicazione della loro azione, l'inibizione dell'IMPDH è uno dei meccanismi più comuni a diverse molecole, come TAD, RMP, MAP, MP, 3-DZG. Più specificatamente, il TAD ed il MAP, due principi attivi che hanno dimostrato interessanti proprietà viricide, sembrano agire pressoché esclusivamente sull'IMPDH. Come precedentemente citato, una metodologia praticata in ambito medico per comprendere l'importanza di questa inibizione per un antivirale, consiste nel somministrare in modo esogeno guanosina ad espianti virosati e sottoposti a terapie di risanamento efficaci, in modo tale da osservare la ripresa del titolo virale qualora l'inibizione dell'IMPDH sia effettivamente la causa dell'attività viricida.

Attualmente nessuna indagine sembra sia mai stata condotta per comprendere uno o più meccanismi di azione coinvolti nel risanamento chimico in ambito vegetale: a tale proposito, saranno condotte delle valutazioni relative a situazioni infettive di CMV su tabacco sottoposto a trattamenti con TR e guanosina, al fine di comprendere il ruolo dell'inibizione dell'IMPDH in questo processo. TR è stata somministrata in dosi inferiori a quelle necessarie per l'eradicazione (Panattoni *et al.*, 2007b) per 3 cicli, in modo da evidenziare l'eventuale effetto della guanosina mediante test immunologici.



## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1. Il materiale vegetale oggetto delle indagini

#### **3.1.1. Produzione delle entità virali e loro infezione**

Piante di tabacco sono state allevate in una serra ferro-vetro ad una temperatura di  $24\pm 2$  °C, con fotoperiodo di 16 h ed in condizioni ottimali di rifornimento idrico, avendo cura di adottare le misure necessarie per escludere possibili trasmissioni accidentali di entità infettive. Raggiunto lo stadio di 6 foglie espanse, sono state inoculate secondo le consuete procedure di trasmissione meccanica per succo (Noordam, 1973). L'inoculazione è stata perciò condotta omogeneizzando i tessuti fogliari di tabacco congelati provenienti da piante infette da TMV e CMV in mortaio freddo con una soluzione di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,03M a pH 7,2 contenente lo 0,3% di dietilditiocarbammato di sodio (Na-DIECA, p:v=1:4). All'estratto grezzo, dopo filtrazione con garza, era aggiunto carborundum ( $0,75 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Le inoculazioni sono state effettuate sulla pagina superiore delle foglie, soggette successivamente a lavaggio con acqua distillata. L'infezione è stata confermata tramite test DAS-ELISA. Una accessione per ogni varietà, mantenuta in *screenhouse* e confermata come esente da virosi tramite test DAS-ELISA, è stata utilizzata per allestire le collezioni di espianti, usati come controllo.

#### **3.1.2. Allevamento in vitro di espianti di tabacco e vite**

Le piante di tabacco infettate come sopra descritto sono state fatte sviluppare per circa 4 settimane, raggiungendo una lunghezza dei germogli di 15-20 cm, utilizzandole per



l'ottenimento di talee uninodali. Queste, dopo essere state lavate in etanolo 70% per 1' e sciacquate con acqua sterile, sono state immerse in una soluzione di ipoclorito di sodio al 16 % con 0,05 ml l<sup>-1</sup> di Tween 20 per 15 minuti. Al termine di questo processo di disinfezione, le talee sono state risciacquate 3 volte con acqua distillata sterile, private di foglioline e frazionate in internodi di circa 1 cm, aventi almeno una gemma. Quindi sono state poste in tubi da saggio contenente 10 ml di substrato agarizzato. Il mezzo di crescita utilizzato è stato quello proposto da Murashige e Skoog (1962), autoclavato alla temperatura di 120 °C per 20', prima di essere utilizzato. Le colture sono state mantenute in una camera di crescita alla temperatura di 23±0,5 °C con un fotoperiodo di 16 ore, assicurato da tubi fluorescenti (Philips TLD 18 W33), capaci di mantenere una intensità luminosa di 50 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Dopo la fase di acclimatazione, la condizione sanitaria di ciascuna plantula è stata saggiata tramite test DAS-ELISA, accertandone lo stato infettivo per la loro destinazione ai trattamenti chemioterapici.

Una accessione di *V. vinifera* cv. Sagrantino naturalmente infetta da GLRaV 3 e conservata in apposita struttura protettiva (*screenhouse*) è stata utilizzata per l'allestimento del materiale *in vitro*. L'accessione, a seguito di test ELISA ed RT-PCR era da ritenersi affetta da GLRaV 3 ed esente da Arabis mosaic virus (ArMV), Grapevine fanleaf virus (GFLV), Grapevine fleck virus (GFkV), Grapevine leafroll associated virus 1, 2 e 7 (GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-7) e dai vitivirus Grapevine virus A (GVA) e Grapevine virus B (GVB). Dalla pianta sono state ottenute talee legnose che, dopo trattamento con Benlate in ragione di 1 g l<sup>-1</sup> e sottoposte a forzatura (Fig. 8; Fig. 9), hanno fornito il materiale necessario per l'allestimento della coltura *in vitro*.

**Fig. 8.** Inizio della fase di forzatura di talee franche di piede di *V. vinifera* cv. Sagrantino



**Fig. 9.** Termine della fase di forzatura di talee franche di piede di *V. vinifera* cv. Sagrantino



Dopo 4 settimane, i germogli sviluppati ad una lunghezza di 15-20 cm, sono state utilizzati per realizzare talee uninodali. Queste, dopo essere state lavate in alcool (70%, 40'') e risciacquate con acqua sterile, sono state immerse in una soluzione di mercurio cloruro (0,2%) e tween (0,05 ml l<sup>-1</sup>) per 10 minuti. Al termine del processo di disinfezione, le talee sono state risciacquate tre volte con acqua sterile, private di foglie, abbozzi di viticci e grappoli, e frazionate in internodi di circa 1 cm di lunghezza provvisti di almeno una gemma. Il materiale è stato quindi posto all'interno di tubi da saggio (Fig. 10; Fig. 11) contenenti 10 ml di substrato agarizzato (Quorin e Lepoivre, 1997) previamente sterilizzato mediante autoclavatura (120°C,

20'). Gli espianti sono stati mantenuti in una camera di crescita alla temperatura di  $23\pm 0,5$  °C con un fotoperiodo di 16 ore, assicurato da tubi fluorescenti (Philips TLD 18 W33) in grado di mantenere una intensità luminosa di  $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Fig. 12). Dopo una iniziale fase di acclimatazione, la condizione sanitaria di ciascuna plantula è stata confermata mediante test ELISA.

**Fig. 10.** Espianti di *V. vinifera* cv. Sagrantino *in vitro*



**Fig. 11.** Particolare di espianto di *V. vinifera* cv. Sagrantino *in vitro*



**Fig. 12.** Camera di crescita per l'allevamento degli espianti di tabacco e vite *in vitro*



## 3.2. Produzione dei costrutti a base di acido micofenolico

L'approccio seguito per la produzione delle strutture dendrimeriche prevede che la coniugazione delle molecole sia basata sulla formazione di legami tioureidici attraverso la coniugazione tra strutture aventi un gruppo isotiocianato e un PAMAM portante gruppi amminici come funzionalità terminali (PAMAM-NH<sub>2</sub>).

La condensazione dell'MPA (1,2 equivalenti) con l'ammina N-Boc-etilediammina (1,0 equivalenti) è stata condotta in dimetilformammide (DMF) anidra, 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide (EDC), N-idrossi-benzotriazolo (HOBt), trietilammina (Et<sub>3</sub>N) e, dopo 21 ore a temperatura ambiente, l'analisi con cromatografia su strato sottile (TLC) ha evidenziato la scomparsa del precursore amminico e la formazione di un prodotto prevalente, visibile alla lampada UV e rivelabile con una soluzione all'0,3% di ninidrina in n-butanol. Dopo l'evaporazione del solvente a pressione ridotta e purificazione flash cromatografica su gel di silice del grezzo di reazione, è stata isolata l'Ammide 30.

Il PAMAM di prima generazione con 2 gruppi amminici terminali (PAMAM 21) è stato prodotto partendo da un "core" costituito dall'*N*-Boc-etilediammina commerciale per trattamento con acrilato di metile seguito da amminolisi con un eccesso di etilendiammina. Quindi si è proceduto alla sua condensazione con l'MPA con il sistema EDC/DMAP (1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide / N,N-dimetilamminopiridina). Dopo 48 ore a temperatura ambiente e l'evaporazione del solvente a pressione ridotta, è stata effettuata una purificazione flash cromatografia su gel di silice del grezzo di reazione.

Per la preparazione del PAMAM 22 si è proceduto alla sintesi del PAMAM 21, sottoposto quindi alla rimozione selettiva del gruppo terzialbutossicarbossilico mediante trattamento con una miscela di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>COOH-H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente. Il trattamento della reazione per semplice evaporazione dei reagenti ha fornito un grezzo sciropposo costituito

esclusivamente ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR) dal derivato ammidico 39 (Ammina 39), isolato come sale dell'acido trifluoroacetico, utilizzato direttamente nella successiva reazione senza ulteriori processi di purificazione. Da parte di esso si ottiene un corrispondente tiocianato a seguito di un trattamento con 2-piridil-tionocarbonato (DPT) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ed eccesso di  $\text{Et}_3\text{N}$ . Il tiocianato è stato direttamente utilizzato nella successiva reazione di coupling con l'Ammina 39. Dopo 43 ore a temperatura ambiente, l'analisi TLC ha evidenziato una completa scomparsa dei prodotti di partenza e la formazione di un prodotto prevalente. L'evaporazione dei solventi a pressione ridotta e la purificazione flash cromatografica su gel di silice del grezzo di reazione hanno consentito di isolare il PAMAM 22.



### 3.3. Fitotossicità

Ogni antivirale è stato valutato in merito alla sua fitotossicità su espianti sani di tabacco e vite, alle concentrazioni di 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 mM nel mezzo di coltura. Le molecole sono quindi state classificate come utilizzabili laddove la mortalità degli espianti fosse stata osservata nel 30% o meno dei casi osservati dopo 3 cicli terapeutici. Il *range* di somministrazione è stato stabilito in relazione alla dose di riferimento di 0,30 mM. Questa concentrazione è stata decisa in relazione all'impiego generalmente ritenuto sostenibile dalla pianta per i più comuni antivirali utilizzati in ambito vegetale, rappresentando un dosaggio elevato per tabacco (Schulze e Kluge, 1994; D'Anna, 2006) che si è dimostrato generalmente sufficiente per evidenziare una potenziale capacità di risanamento. Difatti concentrazioni di ordine di grandezza superiore, seppur talvolta testate, si traducono generalmente in fenomeni di fitotossicità (D'Anna, 2006), alterando profondamente la fisiologia cellulare ed inducendo una elevata mortalità: perciò, una eventuale accentuata attività viricida anche a dosaggi superiori, potrebbe essere imputabile più alle condizioni critiche della cellula che alla effettiva efficacia della molecola. In ogni caso, la concentrazione di 0,30 mM, dovrebbe comunque essere sufficiente per evidenziare un certo margine di risanamento, e laddove questo non si verificasse sembra inopportuno testare dosaggi superiori.

Le molecole non solubili in acqua alle concentrazioni di impiego previste, sono state dissolte in una soluzione acquosa di etanolo al 5%.

L'aggiunta dell'antivirale solubilizzato al mezzo di coltura era preceduto da una filtrazione con filtri di porosità 0,20 µm.

## 3.4. Trattamenti e test sanitari

### **3.4.1. Trattamenti terapeutici**

Il trattamento terapeutico prevedeva 3-6 cicli, ciascuno pari a 15 giorni di crescita degli espianti per tabacco e 30 giorni per vite, su mezzo di coltura addizionato con l'antivirale. Per ogni tipologia di trattamento sono stati approntati 3 blocchi di 15 espianti, sia per tabacco che vite. Dopo ogni singolo ciclo di trattamento, i campioni sono stati sottoposti a verifica dello stato sanitario. Le molecole coinvolte nello *screening* (2.1.1) sono state poste a confronto con la molecola di riferimento RB, mentre per il test dei costrutti di MPA (2.2), le macromolecole sono state poste a confronto con MPA a pari concentrazione. Il test di approfondimento su TMV (2.1.3) è stato condotto mediante 6 cicli con un mix di RB, TR e 6-TG, con concentrazioni delle molecole derivanti dai test di fitotossicità (3.3). Inoltre è stato condotto un test a lunga durata di trattamento (18 cicli) con TR al 50 % del dosaggio massimo.

La valutazione dell'inibizione dell'IMPDH in ambito vegetale (2.3) ha visto la TR come molecola di confronto in dosaggi non eradicanti, oltre che in associazione con guanosina.

### **3.4.2. Saggi immunologici**

La verifica dello stato sanitario è stata effettuata tramite test DAS-ELISA seguendo le procedure messe a punto da Clark e Adams (1977), utilizzando gli anticorpi prodotti da Loewe biochimica. I saggi ELISA sono stati condotti in piastre da 96 pozzetti sensibilizzati per 3 h a 37°C con le IgG purificate da un anticorpo policlonale (Pab) specifico per CMV e TMV (Loewe Biochemica, Germania), diluite 1:200 in un "tampone di sensibilizzazione". Gli anticorpi non adsorbiti sono stati eliminati attraverso un ciclo di 4 lavaggi intervallati da 5' effettuati con

“tampone di lavaggio”. L’antigene è stato preparato mediante omogeneizzazione del tessuto dell’espianto saggiato utilizzando un “tampone di estrazione” in rapporto 1:4 (w/v). Per ogni pozzetto sono stati utilizzati 150 µl di antigene, ed i non adsorbiti sono stati eliminati attraverso un ciclo di 4 lavaggi intervallati da 5’ con “tampone di lavaggio”. Successivamente è stata aggiunta una diluizione 1:200 di IgG coniugato alla fosfatasi alcalina in “tampone di coniugazione” per incubare nuovamente le piastre a 37°C. Infine le piastre sono state sottoposte a lavaggio ed incubazione in presenza del substrato p-nitrofenil fosfato (Sigma Chemical Co.) dissolto ad una concentrazione di 1 mg ml<sup>-1</sup> in “tampone substrato”. Le piastre sono state incubate per 1 h a temperatura ambiente per lo sviluppo della reazione colorimetrica, quantificata mediante lettura fotometrica a 405 nm con un lettore ELISA (Tirtek Multiskan).

E’ stato oggetto di indagine il confronto tra due differenti metodi per la valutazione della risposta dei saggi immunologici, utilizzati generalmente per identificare gli espianti risanati rispetto agli infetti. L’esigenza di questo confronto nasce dalla natura comunque empirica dei metodi individuati, che può portare soprattutto all’individuazione di falsi negativi che sovradimensionano la fase di accertamento successiva ai test immunologici. Il metodo più comunemente diffuso considera positivi al test tutti gli espianti che mostrano un’assorbanza (OD) di due volte o più superiore al controllo sano ( $R=OD \text{ campione}/OD \text{ sano}$ ) (Monette, 1983). Il valore soglia di R pari a 2 corrisponde al discriminante tra gli espianti considerati positivi e negativi. L’R media dei campioni sottoposti a trattamenti antivirali indica l’incidenza del trattamento in relazione al rapporto di assorbanze, ma non è direttamente correlabile alla capacità di risanamento della molecola.

Successive indagini hanno previsto la verifica della condizione sanitaria dei campioni sotto soglia mediante saggi biologici o RT-PCR.

### 3.4.3. RT-PCR

L'RNA totale degli espianti ELISA negativi è stato estratto utilizzando il Plant RNeasy kit fornito dalla Qiagen, in accordo con il protocollo descritto da MacKenzie *et al.* (1997).

Per l'amplificazione di CMV, TMV e GLRaV 3 sono state individuate tre coppie di *primers* (Bertolini *et al.*, 2003; Eybishtz *et al.*, 2010; Turturo *et al.*, 2005), le cui sequenze sono riportate in Tab. 1.

**Tab. 1.** Sequenze nucleotidiche e posizioni delle coppie di oligonucleotidi utilizzati per l'identificazione di CMV.

Primers	Sequenza 5'-3'	Amplicone (bp)
CMV		
CMV1	CTTTCTCATGGATGCTTCTC	885
CMV2	GCCGTAAGCTGGATGGAC	
TMV		
TMV5712F	ATGTCTTACAGTATCACTACTCCATAT	478
TMV6190R	CAAGTTGCAGGACCAGAGGTCC	
GLRaV 3		
LC1	CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT	546
LC2	GTTGTCCCGGGTACCAGATAT	

L'RNA ottenuto è stato amplificato utilizzando la procedura one-step RT-PCR basata sull'uso di OneStep RT-PCR kit fornito dalla Qiagen, utilizzando un DNA termociclature (GenAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystem). Per CMV e TMV il ciclo d'amplificazione prevedeva un primo step a 42°C per 45 minuti, per permettere la trascrizione inversa, seguito da 2 minuti a 94°C e da 40 cicli di amplificazione (94°C per 30'', 50°C per 30'', 72°C per 2'), seguiti da una fase di estensione a 72°C per 7 minuti (Bertolini *et al.*, 2003). Per GLRaV 3 il ciclo di amplificazione prevedeva un primo step a 50°C per 30 minuti, per permettere la trascrizione inversa, seguito da 15 minuti d'incubazione a 95°C e da 35 cicli di amplificazione (92°C per 30'', 52°C per 30'', 72°C per 30''), seguiti da una fase di estensione a 72°C per 7 minuti (Turturo *et al.*, 2005).

I prodotti di PCR sono stati analizzati con elettroforesi su gel d'agarosio 1,5%, colorato con bromuro d'etidio e fotografati su transilluminatore ad UV. La grandezza dei frammenti è stata determinata per confronto con DNA di peso molecolare conosciuto (Invitrogen MBI Fermentas).

#### **3.4.4. Test di longevità virale**

La valutazione dell'infettività di estratti grezzi di foglie infette da CMV e TMV nel tempo è stata effettuata per stimare la longevità *in vitro* di CMV e TMV (Noordam, 1973).

Foglie di tabacco infetto da CMV e TMV (3.1.1) sono state prelevate ed utilizzate per procedere ad inoculazione meccanica su indicatrice erbacea in grado di mostrare lesioni localizzate.

Per il test su CMV, porzioni tissutali provenienti da espunti *in vitro* di tabacco infetto sono state omogeneizzate in tampone fosfato 0,1 M a pH 7,2 in rapporto 1:1. Il succo così ottenuto è stato aliquotato in 6 subcampioni e poi mantenuto a 20°C ed applicato su 6 foglie di 6 piante sane di *Chenopodium amaranticolor* precedentemente cosparse di carborundum per provocare microlesioni e facilitare l'ingresso delle entità virali. Le applicazioni sono state condotte su indicatori utilizzando ogni volta un differente subcampione di estratto grezzo dopo 0, 1, 3, 6, 9, 18 giorni dalla preparazione del succo. Le indicatori utilizzate sono da ritenersi di eguale stadio di sviluppo al momento dell'inoculazione meccanica.

Per il test su TMV, porzioni tissutali provenienti da espunti *in vitro* di tabacco infetto sono state omogeneizzate in tampone fosfato 0,1 M a pH 7,2 in rapporto 1:100 e 1:10000. Il succo così ottenuto è stato aliquotato in 6 subcampioni e poi mantenuto a 20°C ed applicato su 6 mezze foglie di 6 piante sane di tabacco cv. Xanthi-nc precedentemente cosparse di carborundum per provocare microlesioni e facilitare l'ingresso delle entità virali. Le applicazioni sono state condotte su indicatori utilizzando ogni volta un differente subcampione di estratto

grezzo dopo 0, 1, 3, 6, 9, 18 giorni dalla preparazione del succo. Le indicatrici utilizzate sono da ritenersi di eguale stadio di sviluppo al momento dell'inoculazione meccanica.

Le eventuali risposte sintomatologiche per CMV e TMV erano attese nell'arco dei 10 giorni successivi all'inoculazione, registrando il numero di lesioni per cm<sup>2</sup> di superficie fogliare inoculata.

#### ***3.4.5. Analisi statistica dei dati***

Ogni trattamento è stato condotto in triplicato; ogni trattamento è stato effettuato su 15 espianti, i cui effetti sono stati comparati mediante analisi della varianza in disegno randomizzato. Il *Duncan's multiple range test* (P=0,05) è stato effettuato per determinare differenze significative tra i trattamenti.

## 4. RISULTATI

### 4.1. Risultati Obiettivo I

#### 4.1.1 Fitotossicità

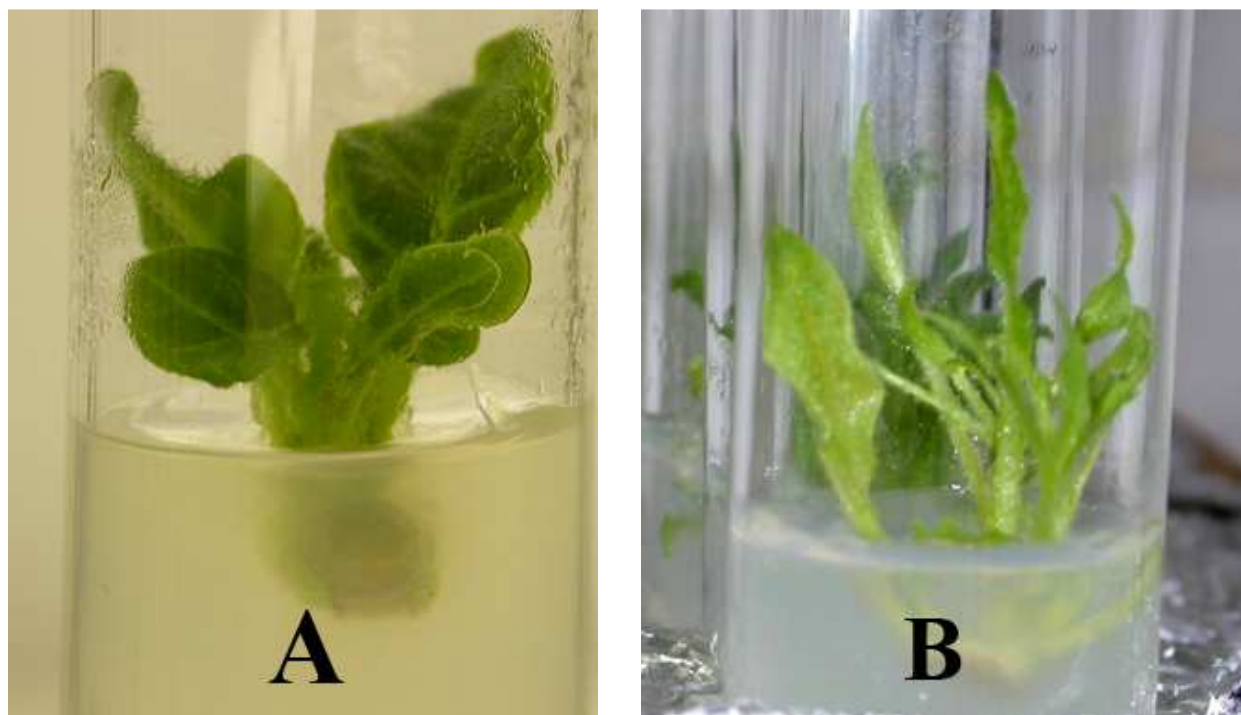
Nessun caso di mortalità dovuto alla tecnica di micropropagazione è stato osservato in piante sane od infette non sottoposte a trattamento terapeutico. In tabacco ed in vite (Tab. 2), un effetto fitotossico inferiore al livello soglia stabilito (Fig. 13) è stato registrato fino a concentrazioni di 0,30 mM per MP, 6-TG, 1A-MP e LCYS, fino a 0,20 mM per MMPR e 3-DZG, fino a 0,10 mM per RB. Si può osservare come, relativamente a ciascun ospite, i derivati dell'MP risultano più fitotossici della molecola originaria a tutti i dosaggi.

Tabella 2. Mortalità (%) osservata per espianti sani di *N. tabacum* cv. Xanthi e *V. vinifera* cv. Sagrantino al termine di 3 cicli di trattamento (90 o 180 giorni, rispettivamente), trattati con presunti antivirali a differenti concentrazioni. RB: ribavirina; MP: 6-mercaptipurina; MMPR: 6-metilmercaptipurina riboside; 6-TG: 6-tioguanina; 1A-MP: 1-ammino-6-mercaptipurina; LCYS: L-cisteina etil estere S-(N-metilcarbammato) monoidrocloruro; 3-DZG: 3-deazaguanina.

Mortalità (%)							
<i>N. tabacum</i> L. cv. Xanthi							
Dosaggio (mM)	RB	MP	6-TG	MMPR	1A-MP	LCYS	3-DZG
0,0	0,0a*	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
0,10	28,9d	0,0a	4,4b	15,5c	6,7b	4,4b	4,4b
0,20	77,7d	0,0a	8,9b	28,9c	11,1b	8,9b	28,9c
0,30	100,0c	17,7a	28,9b	100,0c	26,7b	28,9b	100,0c
0,40	100,0c	57,7a	93,3c	100,0c	77,7b	100,0c	100,0c
<i>V. vinifera</i> L. cv. Sagrantino							
Dosaggio (mM)	RB	MP	6-TG	MMPR	1A-MP	LCYS	3-DZG
0,0	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
0,10	26,7d	0,0a	4,4b	13,3c	6,7b	4,4b	13,3c
0,20	100,0d	0,0a	15,5b	24,4c	13,3b	15,5b	24,4c
0,30	100,0d	17,7a	28,9b	44,4c	26,7b	28,9b	44,4c
0,40	100,0c	35,5a	80,0b	100,0c	77,7b	100,0c	100,0c

\* all'interno di piante omogenee, i valori nella stessa riga seguiti dalla stessa lettera, non differiscono significativamente in accordo al Duncan's multiple range test (P=0.05); dati trasformati come arc sin square root sono stati utilizzati per l'analisi statistica, medie non trasformate sono riportate in tabella.

**Fig. 13.** A) Effetto non fitotossico su espianto di tabacco *in vitro* sottoposto a trattamento con 6-TG; B) Effetto fitotossico su espianto di tabacco *in vitro* sottoposti a trattamento con 6-TG



#### **4.1.2. Screening**

In relazione ai risultati sulla fitotossicità su tabacco, MP, 6-TG, 1A-MP e LCYS sono state somministrate ad una concentrazione di 0,30 mM, mentre il dosaggio di MMPR e 3-DZG è stato fissato a 0,20 mM. La molecola di riferimento, RB, è stata somministrata alla concentrazione di 0,10 mM. I risultati dei test immunologici sono riportati in Tab. 3.

Nessun espianto di tabacco infetto da TMV ha mostrato valori di R inferiori al livello di soglia dopo 6 cicli terapeutici effettuati con le molecole selezionate (dati non mostrati). Dal momento in cui nessun espianto ELISA-negativo è stato individuato, ulteriori saggi molecolari non sono stati effettuati.

Espianti di tabacco infetti da CMV e sottoposti a trattamenti con MP, LCYS e 3-DZG non hanno mostrato letture ELISA in grado di far registrare valori sotto soglia utili per



individuare risposte negative. Diversamente, espianti trattati con MMPR hanno mostrato valori sotto soglia di R, con una percentuale di espianti ELISA negativi del 28,1% rispetto agli iniziali. Similmente, i presunti antivirali 6-TG e 1A-MP sono risultati efficaci contro CMV producendo rispettivamente il 39,4% ed il 48,5% di espianti ELISA-negativi. Gli espianti ELISA-negativi a seguito di trattamento con RB si assestano all'11,1%. Gli espianti ELISA-negativi trattati con 6-TG, 1A-MP, MMPR e RB sono stati quindi sottoposti ad indagini biomolecolari, mentre MP, LCYS e 3-DZG, inefficaci contro TMV e CMV, sono stati esclusi da ulteriori prove di valutazione.

Tabella 3. Percentuale di espianti ELISA-negativi sul totale degli espianti di tabacco infetti da CMV, valutati alla fine di ogni subcoltura (15 giorni) sottoposti a trattamenti con presunti antivirali. IC: controllo infetto non trattato; RB: ribavirina; MP: 6-mercaptipurina; MMPR: 6-metilmercaptipurina riboside; 6-TG: 6-tioguanina; 1A-MP: 1-ammino-6-mercaptipurina; LCYS: L-cisteina etil estere S-(N-metilcarbammato) monoidrocloruro; 3-DZG: 3-deazaguanina.

Subcoltura	Espianti ELISA-negativi (%)							
	IC	RB	MP	MMPR	6-TG	1A-MP	LCYS	3-DZG
I	0,0a*	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
II	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
III	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	4,7b	4,6b	0,0a	0,0a
IV	0,0a	0,0a	0,0a	11,1b	22,2c	30,8d	0,0a	0,0a
V	0,0a	11,1b	0,0a	24,2b	35,3d	41,0e	0,0a	0,0a
VI	0,0a	11,1b	0,0a	28,1c	39,4d	48,5e	0,0a	0,0a

\* i valori nella stessa riga seguiti dalla stessa lettera, non differiscono significativamente in accordo al Duncan's multiple range test (P=0.05); dati trasformati come arc sin square root sono stati utilizzati per l'analisi statistica, medie non trasformate sono riportate in tabella.

Per quanto concerne l'1A-MP e la 6-TG, i saggi biomolecolari non hanno mostrato prodotti di RT-PC nel 38,3 e 41,2% dei campioni ELISA-negativi, valori che corrispondono rispettivamente ad un tasso di risanamento del 15,1 e 20,0% di espianti vitali trattati. D'altra parte, tutte le plantule ELISA-negative derivanti da trattamenti con MMPR hanno prodotto ampliconi delle dimensioni attese. La molecola di riferimento RB ha mostrato capacità di risanamento antivirale nei confronti di CMV nel 4,4% delle plantule trattate.

### 4.1.3. Caso studio su vite

Per quanto concerne i trattamenti su vite infetti da GLRaV 3, MP, LCYS e 3-DZG sono risultati del tutto inefficaci, similmente a quanto verificatosi in tabacco. Anche per quanto riguarda MMPR, 1A-MP e 6-TG si sono registrati risultati ELISA che hanno riflettuto un andamento simile al tabacco: valori di R sotto soglia sono stati calcolati per il 23,3, 63,6 e 84,4% degli espianti, rispettivamente. La RB ha prodotto espianti ELISA-negativi nel 27,3% dei casi (Tab. 4). Gli espianti ELISA-negativi trattati con 6-TG, 1A-MP, MMPR e RB sono stati quindi sottoposti ad indagini biomolecolari, mentre MP, LCYS e 3-DZG, inefficaci contro GLRaV 3, sono stati esclusi da ulteriori prove di valutazione.

Tabella 4. Percentuale di espianti ELISA-negativi sul totale degli espianti di vite infetti da GLRaV 3, valutati alla fine di ogni subcoltura (30 giorni) sottoposti a trattamenti con presunti antivirali. IC: controllo infetto non trattato; RB: ribavirina; MP: 6-mercaptopurina; MMPR: 6-metilmercaptopurina riboside; 6-TG: 6-tioguanina; 1A-MP: 1-ammino-6-mercaptopurina; LCYS: L-cisteina etil estere S-(N-metilcarbammato) monoidrocloruro; 3-DZG: 3-deazaguanina.

Subcoltura	Espianti ELISA-negativi (%)							
	IC	RB	MP	MMPR	6-TG	1A-MP	LCYS	3-DZG
I	0,0a*	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
II	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	2,2b	0,0a	0,0a
III	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	4,7b	7,3c	0,0a	0,0a
IV	0,0a	5,6b	0,0a	13,1c	22,0d	42,9e	0,0a	0,0a
V	0,0a	27,3b	0,0a	27,8b	54,0c	76,4d	0,0a	0,0a
VI	0,0a	27,3b	0,0a	32,3b	63,6c	84,4d	0,0a	0,0a

\* i valori nella stessa riga seguiti dalla stessa lettera, non differiscono significativamente in accordo al Duncan's multiple range test (P=0.05); dati trasformati come arc sin square root sono stati utilizzati per l'analisi statistica, medie non trasformate sono riportate in tabella.

Per quanto concerne l'1A-MP, l'85,7% degli espianti ELISA-negativi non hanno prodotto ampliconi dopo RT-PC, raggiungendo un tasso di eradicazione del 54,6% degli espianti vitali trattati. Similmente, l'88,9% degli espianti ELISA-negativi sottoposti a trattamenti con 6-TG non hanno mostrato prodotti RT-CR, con un tasso di risanamento complessivo del 75,1%. Diversamente, tutti gli espianti ELISA-negativi trattati con MMPR hanno prodotto ampliconi

delle dimensioni attese per GLRaV 3. I tassi di risanamenti per 1A-MP e 6-TG sono stati confermati tramite saggio biomolecolare dopo 6 e 12 mesi dalla fine del ciclo terapeutico. La molecola di riferimento RB ha prodotto il 5,6% degli espianti risanati, in accordo con Panattoni e Triolo (2003).

#### 4.1.4. Approfondimenti su *Tobacco mosaic virus*

Trattamenti terapeutici con una soluzione acquosa contenente 0,10 mM di RB (4.1.1), 0,30 mM di 6-TG), 0,20 mM di TR (4.3.1) sono stati condotti su piante di tabacco infette da TMV. Al termine di 6 cicli terapeutici, nessun espianto di tabacco ha mostrato R sotto soglia, confermando perciò il mantenimento dello stato infettivo.

Il TMV, peraltro, mantiene una inalterata capacità infettiva *in vitro* per almeno 9 giorni alla diluizione più elevata, restando comunque infettivo anche dopo 18 giorni (Tab. 5). Questa caratteristica sembra differire sensibilmente rispetto al CMV, la cui infettività decresce significativamente dopo 3 giorni per annullarsi dopo 9 giorni.

Tabella 5. Infettività espressa come n° di lesioni per cm<sup>2</sup> di foglia inoculata di *Chenopodium amaranticolor* con CMV e di *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc con TMV.

Infettività (n° lesioni/cm <sup>2</sup> )						
Giorni dalla preparazione dell'estratto grezzo di CMV						
Diluizione	0	1	3	6	9	18
1:1	5,1a*	4,8a	1,4b	0,3c	0,0d	0,0d
Giorni dalla preparazione dell'estratto grezzo di TMV						
Diluizione	0	1	3	6	9	18
1:100	10,5a	11,2a	9,8a	10,0a	9,7a	9,9°
1:10000	3,3a	3,4a	3,3a	2,9a	2,8a	1,5b

\* i valori nella stessa riga seguiti dalla stessa lettera, non differiscono significativamente in accordo al Duncan's multiple range test (P=0.05).

Il test relativo alla risposta degli espianti sottoposti a trattamento di lunga durata con TR, ha rivelato come alcune plantule, fino all'11,8 % della totalità trattata, mostrino un esito negativo

al test ELISA (Tab. 6), seppure tali soggetti mantengano, come rilevato dal successivo test RT-PCR, il loro stato infettivo.

Tabella 6. Percentuale di espunti ELISA-negativi sul totale degli espunti di tabacco infetti da TMV, valutati alla fine di ogni subcoltura (15 giorni) sottoposti a trattamenti con presunti antivirali. IC: controllo infetto non trattato; TR: tiazofurin.

<b>Espunti ELISA-negativi (%)</b>		
<b>Subcoltura</b>	<b>IC</b>	<b>TR</b>
I	0,0a*	0,0a
III	0,0a	0,0a
VI	0,0a	0,0a
IX	0,0a	2,5b
XII	0,0a	8,6b
XV	0,0a	11,4b
XVIII	0,0a	11,8b

\* i valori nella stessa riga seguiti dalla stessa lettera, non differiscono significativamente in accordo al Duncan's multiple range test (P=0.05); dati trasformati come arc sin square root sono stati utilizzati per l'analisi statistica, medie non trasformate sono riportate in tabella.

## 4.2. Risultati Obiettivo II

### **4.2.1. Produzione dei costrutti di acido micofenolico**

L'Amide 30 (resa del 70%) è risultata chimicamente pura dopo flash cromatografia. Il composto Amide 30 è stato completamente caratterizzato dal punto di vista chimico-fisico, e gli spettri NMR sono concordi con la struttura proposta. La formazione del legame ammidico è stata confermata, nello spettro protonico registrato in CD<sub>3</sub>CN, da due tripletti slargati a  $\delta$  6,53 e 5,42, attribuibili ai due gruppi NH di tipo ammidico presenti nella struttura. Inoltre la presenza, fra gli altri segnali, di un singoletto a  $\delta$  7,74 (1H), di un tripletto a  $\delta$  5,18 (1H) e di un singoletto a  $\delta$  5,20 (2H), attribuibili rispettivamente all'OH fenolico, al protone olefinico ed al metilene del ciclo lattonico, confermano l'integrità della struttura micofenolica.

La produzione del PAMAM 21 ha registrato una resa del 75%. La molecola è stata completamente caratterizzata dal punto di vista chimico-fisico e gli spettri NMR mono- (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e bidimensionali di omo- ed eterocorrelazione (DEPT-135, COSY, HETCOR) sono concordi con la struttura assegnata. Il PAMAM 21 risulta poco solubile in CD<sub>3</sub>CN e gli spettri sono stati registrati in CD<sub>3</sub>OD contenente il 20% di CDCl<sub>3</sub>, una miscela solvente che non consente di identificare, nello spettro protonico, i segnali dovuti ai protoni legati all'azoto (ammidici e uretanici), probabilmente perché risultati scambiati con il deuterio. Comunque il rapporto, ad esempio, tra gli integrali del segnale relativo ai protoni metossilici ( $\delta$  3,75) e quello attribuito ai protoni metilici del gruppo *t*-butilico ( $\delta$  1,40) è risultato 6:9, un valore perfettamente in accordo con la presenza di due unità micofenoliche nella struttura.

La produzione del PAMAM 22 ha registrato una resa del 68% a partire dal PAMAM 21. La molecola è stata completamente caratterizzata dal punto di vista chimico-fisico e gli spettri

NMR sono concordi con la struttura assegnata. Anche in questo caso, per problemi legati alla solubilità del composto, lo spettro protonico, registrato in CD<sub>3</sub>OD contenente il 20% di CDCl<sub>3</sub>, non ha consentito di identificare i segnali dovuti agli OH fenolici ed ai protoni legati all'azoto (ammidici e tioureici). Nonostante lo spettro protonico di PAMAM 22 risulti piuttosto complesso per la presenza di segnali relativi alle risonanze di ben 126 protoni, una sua interpretazione si è resa possibile sia per la simmetria della struttura in relazione all'analogia con il PAMAM 21, sia utilizzando tecniche NMR bidimensionali di omo- ed eterocorrelazione (COSY, HETCOR). Fondamentale per la determinazione della struttura è stata la presenza nello spettro <sup>13</sup>C NMR, di un segnale a δ 179,8 attribuibile al carbonio quaternario (C=S), in grado di confermare il gruppo tioureidico. Inoltre nello spettro sono stati facilmente identificabili i segnali relativi ai protoni dei gruppi metilenici legati agli azoti tioureidici (CH<sub>2</sub>NHCS) perché più deschermati (δ 3,58) di quelli degli analoghi gruppi legati agli azoti di natura ammidica e amminica (δ 3,37-2,34). Questo permette di valutare i valori degli integrali dei segnali protonici: in particolare il rapporto tra l'integrale del segnale relativo ai protoni metilenici del gruppo CH<sub>2</sub>NHCS e quello del segnale attribuito ai protoni metossilici (δ 3,76) risulta 4:24, un valore perfettamente in accordo con la presenza di quattro unità micofenoliche nella struttura.

#### **4.2.2. Fitotossicità**

L'MPA, così come i costrutti da esso derivati, hanno fatto registrare effetti fitotossici simili e sotto soglia sino alle concentrazioni più elevate (Tab. 7).

Tabella 7. Mortalità (%) osservata per espianti sani di *N. tabacum* cv. Xanthi termine di 3 cicli di trattamento (45 giorni), trattati con presunti antivirali a differenti concentrazioni. MPA: acido micofenolico.

Dosaggio (mM)	Mortalità (%)			
	MPA	Ammide 30	PAMAM 21	PAMAM 22
0,0	0,0a*	0,0a	0,0a	0,0a
0,10	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
0,20	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
0,30	4,4a	6,7a	4,4a	4,4a
0,40	17,7a	15,5a	15,5a	17,7a

\* i valori nella stessa riga seguiti dalla stessa lettera, non differiscono significativamente in accordo al Duncan's multiple range test (P=0.05); dati trasformati come arc sin square root sono stati utilizzati per l'analisi statistica, medie non trasformate sono riportate in tabella.

### 4.2.3. Screening

In relazione alle dosi di MPA impiegate in terapia antivirale (D'Anna, 2006), è stata scelta come dose di utilizzo la concentrazione di 0,30 mM per MPA e relativi costrutti. I risultati dei test immunologici sono riportati in Tab. 8.

Espianti di tabacco infetti da CMV e sottoposti a trattamenti con PAMAM 22 non hanno mostrato letture ELISA in grado di far registrare valori di R sotto soglia. Valori di R in grado di individuare espianti ELISA-negativi sono stati registrati per Ammide 30 e PAMAM 21, rispettivamente per il 13,2 e 7,9% degli espianti vitali trattati. La molecola di riferimento MPA ha prodotto il 24,3% di espianti sotto soglia. Gli espianti ELISA-negativi di Ammide 30, PAMAM 21 e MPA sono stati sottoposti a successive indagini biomedicolari, mentre il PAMAM 22 è stato escluso da ulteriori prove di valutazione.

Tabella 8. Percentuale di espianti ELISA-negativi sul totale degli espianti di tabacco infetti da CMV, valutati alla fine di ogni subcoltura (15 giorni) sottoposti a trattamenti con presunti antivirali. IC: controllo infetto non trattato; MPA: acido micofenolico.

Subcoltura	IC	Espianti ELISA-negativi (%)			
		MPA	Ammide 30	PAMAM 21	PAMAM 22
I	0,0a*	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
II	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
III	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
IV	0,0a	15,5c	6,7b	0,0a	0,0a
V	0,0a	23,3d	11,9c	7,0b	0,0a
VI	0,0a	24,3d	13,2c	7,9b	0,0a

\* i valori nella stessa riga seguiti dalla stessa lettera, non differiscono significativamente in accordo al Duncan's multiple range test (P=0.05); dati trasformati come arc sin square root sono stati utilizzati per l'analisi statistica, medie non trasformate sono riportate in tabella.

La molecola di riferimento MPA non ha mostrato prodotti di RT-PCR nel 66,7% dei campioni ELISA-negativi, facendo registrare una percentuale di risanamento complessivo del 13,3%. Diversamente, l'Ammide 30 non ha mostrato prodotti RT-PCR nel 40,0% degli espianti saggiati, risanando quindi il 4,4% degli espianti trattati. Tutte le plantule ELISA-negative derivanti da trattamenti con PAMAM 21 hanno prodotto ampliconi delle dimensioni attese.



## 4.3. Risultati Obiettivo III

### 4.3.1. Fitotossicità

Il TR ha fatto registrare una elevata fitotossicità, sotto soglia entro la dose di 0,20 mM. Diversamente la guanosina non ha causato morte di espianti in alcun caso durante il test di fitotossicità (Tab. 9).

Tabella 9. Mortalità (%) osservata per espianti sani di *N. tabacum* cv. Xanthi termine di 3 cicli di trattamento (45 giorni), trattati con tiazofurin o guanosina a differenti concentrazioni. TR: tiazofurin.

Dosaggio (mM)	Mortalità (%)	
	TR	Guanosina
0,0	0,0a*	0,0a
0,10	22,2b	0,0a
0,20	26,7b	0,0a
0,30	35,5b	0,0a
0,40	55,6b	0,0a

\* i valori nella stessa riga seguiti dalla stessa lettera, non differiscono significativamente in accordo al Duncan's multiple range test (P=0.05); dati trasformati come arc sin square root sono stati utilizzati per l'analisi statistica, medie non trasformate sono riportate in tabella.

### 4.3.2. Valutazione del ruolo dell'inibizione dell'IMPDH

In relazione alle prove di fitotossicità, la dose di TR limite per la prova sperimentale è stata individuata in 0,20 mM, concentrazione inferiore a quella riportata da Panattoni *et al.*, (2007b) come dose altamente eradicante.

La guanosina è stata somministrata alla dose massima di 0,40 mM al fine di massimizzarne l'eventuale effetto di contrasto al TR.

Il TR ha prodotto il 69,7% di espianti ELISA-negativi per CMV contro il 27,3% quando somministrato in presenza di guanosina (Tab. 10). Tutti gli espianti con R sotto soglia sono stati processati mediante RT-PCR

Tabella 10. Percentuale di espianti ELISA-negativi sul totale degli espianti di tabacco infetti da CMV, valutati alla fine di ogni subcoltura (15 giorni) sottoposti a trattamenti con presunti antivirali. IC: controllo infetto non trattato; TR: tiazofurin.

Subcoltura	Espianti ELISA-negativi (%)			
	IC	Guanosina	TR	TR/guanosina
I	0,0a*	0,0a	0,0a	0,0a
II	0,0a	0,0a	45,0c	10,0b
III	0,0a	0,0a	69,7c	27,3b

\* i valori nella stessa riga seguiti dalla stessa lettera, non differiscono significativamente in accordo al Duncan's multiple range test (P=0.05); dati trasformati come arc sin square root sono stati utilizzati per l'analisi statistica, medie non trasformate sono riportate in tabella.

La totalità degli espianti ELISA-negativi da trattamento con TR ha prodotto ampliconi della dimensione attesa, analogamente a quanto verificatosi in presenza di guanosina. Il dosaggio di TR non è quindi da ritenersi eradicante in 3 cicli terapeutici, ed i suoi effetti sono stati modificati dalla contemporanea presenza di guanosina.

## 5. DISCUSSIONE

### 5.1. Obiettivo I

Risultati interessanti sono stati evidenziati dall'impiego delle tiopurine, mentre i derivati dell'L-cisteina e della deazaguanina non hanno suggerito significative potenzialità antivirali in ambito vegetale.

I più alti livelli di fitotossicità registrati in tabacco e vite con 6-TG e MMPR rispetto ad MP sono in accordo con le evidenze sperimentali in medicina umana (De Abreu *et al.*, 1995), ma in relazione al *range* di dosaggi comunemente impiegati in chemioterapia vegetale, è comunque possibile condurre trattamenti antivirali per più cicli senza incorrere a perdite eccessive di materiale vegetale.

Le molecole selezionate non hanno mai determinato casi di eradicazione di TMV, confermando l'inefficacia dell'MP in tal senso (Kurtzman *et al.*, 1960).

Diversamente, gli espianti infetti da CMV o GLRaV 3 possono essere risanati con derivati dell'MP quali 6-TG e 1A-MP, mentre l'MMPR, seppur sia in grado di interagire con entrambi i virus come mostrano i risultati dell'ELISA, non ha risanato alcuna plantula trattata. I risultati ottenuti con le tiopurine più efficaci sono di particolare interesse in quanto, oltre a registrare tassi di risanamento elevati rispetto a RB, aprono spiragli di interesse su una classe di molecole caratterizzate da presunti meccanismi di azione differenti rispetto ai più noti inibitori dell'IMPDH.

Il fatto che TMV non risulti di semplice eradicazione con molecole di sintesi viene ad evidenziarsi a seguito di trattamenti con mix antivirali a presunta azione differenziata, i quali non consentono comunque di eradicare il virus. Il fenomeno potrebbe essere connesso alle caratteristiche biologiche del virus stesso, come ad esempio la sua persistenza (Fraenkel-Conrat e

Williams, 1955; Broadbent *et al.*, 2008). Il TMV infatti mantiene una elevata capacità infettiva *in vitro* anche alle più elevate diluizioni per periodi di tempo superiori alla durata di un ciclo terapeutico: capacità che viene meno al CMV dopo solo 3 giorni. Questa caratteristica riflette in una certa misura la capacità del TMV a *resistere* nel tempo anche in un ambiente nel quale i processi replicativi sono necessariamente interrotti, quale l'estratto grezzo. E' ipotizzabile perciò che il mantenimento della capacità infettiva di entità virali di TMV nelle plantule sottoposte a trattamento possa supplire al presunto blocco della neosintesi operata da una molecola antivirale. Infatti il test di lunga durata ha mostrato come un antivirale possa comunque agire attivamente nei confronti del virus, seppur senza riuscire ancora ad eradicarlo. La diversa efficacia potrebbe, quindi, essere principalmente confinata alle caratteristiche del virus stesso, piuttosto che ad una differente efficacia dell'antivirale ad inibire i suoi *target*.

## 5.2. Obiettivo II

I risultati ottenuti per quanto concerne la fitotossicità mostrano come l'MPA ed i suoi derivati siano relativamente poco impattanti sulla vitalità degli espianti rispetto ad altri antivirali (4.1.1, 4.3.2). Risulta comunque evidente come i costrutti di MPA risultino meno efficaci sotto il profilo antivirale rispetto alla molecola madre. Specificatamente, all'aumentare delle terminazioni di MPA è stato osservato come la percentuale di espianti ELISA-negativi sia ridotta, fino ad annullarsi nel caso di PAMAM 22. Tale fenomeno è stato confermato dalle indagini biomolecolari, registrando come soltanto nell'Ammide 30 sia mantenuta una certa capacità di risanamento tipica dell'MPA. Ammide che comunque ha prodotto un numero di espianti risanati decisamente inferiore alla molecola madre. Queste evidenze suggeriscono come la via di potenziamento proposta non dia, per l'antivirale selezionato e per le caratteristiche dei costrutti stessi, i risultati desiderati. Seppure la perdita progressiva d'efficacia antivirale da parte di PAMAM 21 e 22 potrebbe lasciar spazio ad ipotesi relative a fenomeni di ingombro sterico che si potrebbero verificare all'aumentare delle terminazioni di MPA, la ridotta efficacia registrata anche per l'Ammide 30 può suggerire altre implicazioni. L'Ammide 30, infatti, risulta costruito in modo tale da non ostruire le più significative zone attive della molecola di MPA (Bentley, 2000), in grado di relazionarsi con l'IMPDH: è evidente comunque che il legame con N-Boc-etilediammina possa comunque *di per se* alterare l'interazione con l'enzima bersaglio riducendo, come di fatti registrato, l'efficacia antivirale dell'MPA.

### 5.3. Obiettivo III

Trattamenti con TR a dosi ritenute non eradicanti, per un numero di cicli relativamente basso, hanno determinato variazioni significative nella risposta ai test immunoenzimatici per CMV, producendo il 69,7% di espianti ELISA-negativi. L'attività della molecola è risultata perciò significativamente impattante nei confronti del virus, che comunque non è stato eradicato come atteso. Somministrando agli espianti analoghe dosi di antivirale ma in contemporanea presenza di dosi relativamente elevate di guanosina, somministrata anch'essa esogenamente agli espianti, l'impatto di TR risulta significativamente diminuito. Difatti, in queste condizioni, meno della metà degli espianti può essere considerato ELISA-negativo rispetto all'azione esercitata dal solo TR.

L'evidenza sperimentale suggerisce come la guanosina *mascheri*, almeno in parte, gli effetti di TR, similmente a quanto riportato nella letteratura medica per RB (Smee *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003). Questa evidenza sperimentale non permette di raggiungere una completa comprensione del meccanismo di azione di un presunto inibitore esclusivo dell'IMPDH nelle piante quale TR: difatti i risultati riportati nel presente lavoro suggeriscono come il TR possa provocare una riduzione nella disponibilità di guanosina utile per il virus, ma necessitano di essere completati da una valutazione sull'effettiva quantità di guanosina presente in una cellula trattata con TR rispetto ad una virosata non trattata.

Inoltre le evidenze sperimentali suggeriscono esclusivamente un rapporto tra TR e guanosina, senza fornire indicazioni sull'effettivo *target* della molecola di sintesi che, potenzialmente potrebbe essere rappresentato da qualsiasi enzima attivo posizionato *a monte* della sintesi ultima della guanosina stessa. E' però altrettanto evidente la stretta similitudine tra le evidenze sperimentali nei vegetali rispetto agli organismi animali per quanto concerne l'applicazione di inibitori dell'IMPDH, per cui l'ipotesi che il TR agisca effettivamente

sull'IMPDH anche nelle piante è tutt'altro che puramente speculativa. In ogni caso, il risultato della ricerca, rappresenta una delle prime evidenze sperimentali dell'inibizione dell'IMPDH nelle piante da parte di una molecola di sintesi somministrata per finalità antivirali.

## 6. CONCLUSIONI

La necessità di disporre di materiale vegetale contraddistinto da un elevato standard sanitario rappresenta per diverse specie vegetali una esigenza riconosciuta dai legislatori da alcuni decenni. Sin dagli anni '60, ad esempio, percorrendo un passo decisivo, l'allora Comunità Economica Europea definì una prima normativa riguardante lo stato sanitario della vite (68/93/EEC) che si è fatta con il tempo sempre più restrittiva. Analoghi passi sono stati condotti relativamente alle piante ornamentali (77/93/EEC) e per gli alberi da frutto (92/34/EEC), con approcci simili intrapresi anche da paesi extraeuropei, come le normative stilate dal *North American Plant Protection Organization* (NAPPO). Sicuramente tra gli agenti patogeni che destano maggiore preoccupazione, e che per questo sono al centro delle differenti normative, un ruolo preminente è ricoperto dai virus. Virus che, nel contempo, colpiscono in natura un'infinità di specie e varietà vegetali la cui eventuale selezione risulta non sempre di facile soluzione. Infatti, mentre la problematica delle affezioni virali assume limitata importanza per le colture propagate per seme, per le piante propagate vegetativamente la questione emerge in tutta la sua importanza. Storicamente, su queste piante, un adeguato livello sanitario nei confronti delle malattie da virus poteva essere assicurato solo dall'applicazione di un accurato lavoro di selezione di individui sani, seguito dalla propagazione del materiale di partenza in modo tale da offrire garanzie sul mantenimento delle condizioni sanitarie iniziali. La selezione sanitaria del germoplasma, anche attraverso gli importanti sviluppi che si sono recentemente consolidati nelle procedure della diagnostica in Virologia vegetale, consente, in genere, l'identificazione in natura di piante con un buon livello sanitario. E' vero, tuttavia, che non riscontrandosi questa condizione, evento d'altra parte non improbabile specialmente se si considerano varietà locali a modesta diffusione, si rende necessario procedere con interventi di risanamento.



La storia dei tentativi di risanamento delle piante infette o di porzioni da esse dalle quali ottenere nuove piante, non ha portato soluzioni miracolose, anche se alcune moderne tecnologie offrono qualche possibilità per superare le non poche difficoltà che si incontrano nel risanamento di piante infette da virus. L'impiego della coltura di tessuti in associazione alla termoterapia o alla chemioterapia forniscono, ad esempio, per i risultati ottenuti, esempi incoraggianti. La loro applicazione, comunque, così come quello di altri interventi, non ha portato ad un chiarimento definitivo dei loro meccanismi di azione, presumibilmente in rapporto alle incomplete conoscenze sui virus da eliminare e sui meccanismi di resistenza presenti nelle piante e, quindi, alle difficoltà di combinare quanto conosciuto su quest'ultimo aspetto e l'azione antivirale che i singoli interventi di terapia possono esprimere.

Il risanamento tende, in ogni caso, ad essere relativamente specifico per ospite e patogeno nella sua efficacia, facendo sì che ogni strategia, e specificatamente ogni particolare applicazione, non possa garantire risultati generalizzati e generalizzabili. Questo sembra ancora più evidente per quanto concerne la chemioterapia, che seppur potendo rappresentare una risorsa alternativa ad altre tecniche di risanamento, ha visto sperimentate un numero esiguo di molecole, ed ancor meno sono quelle che hanno dimostrato capacità di risanamento. Eppure numerosi sono gli antivirali a disposizione per la terapia animale che per le loro caratteristiche potrebbero esplicare azione benefica su piante affette da virosi, e solo una valutazione a più ampio spettro può fornire indicazioni approfondite sull'effettiva potenzialità di questa strategia di risanamento. Ad oggi l'attenzione è stata principalmente rivolta ai cosiddetti inibitori dell'IMPDH, più o meno esclusivi che siano, la cui efficacia è stata evidentemente molto variabile. Tra gli obiettivi del presente lavoro si è cercato di comprendere se i margini di sperimentazione siano in verità più ampi, e se molecole in grado di interagire potenzialmente anche con altri *target* enzimatici possano, entro una certa misura, esprimere qualche efficacia. In effetti, come già evidenziato per molecole del tutto estranee ad una interazione con l'IMPDH quale l'Oseltamivir (D'Anna, 2006; Panattoni *et al.*, 2006), anche presunti antivirali ad azione IMPDH-non esclusiva quali le

tiopurine hanno mostrato una potenzialità come antivirali vegetali di sicuro interesse. E' però altrettanto vero che LCYS, la cui azione non dovrebbe interessare l'IMPDH, non esprima alcun effetto sui soggetti testati, così come la diidrossipropil adenina (Panattoni *et al.*, 2007a.). Queste evidenze, sommate a quanto riportato in letteratura, spingono a confermare il ruolo chiave dell'inibizione dell'IMPDH per quanto concerne la maggior parte degli antivirali di sintesi valutati: ruolo chiave che comunque non è da ritenersi necessariamente esclusivo, come lasciano ipotizzare i risultati delle tiopurine o del diidrossipropil adenina in combinazione con RB (Panattoni *et al.*, 2007a). Il presente lavoro conferma l'assoluta specificità d'efficacia di un antivirale nei confronti della combinazione ospite/virus. E' evidente infatti come per un virus con caratteristiche sicuramente peculiari come il TMV non si registrino eradicazioni significative né con le molecole oggetto del presente studio né con i più comuni antivirali di sintesi riportati in letteratura. Si tratta di un caso-limite che sottolinea la necessità di valutare un presunto antivirale nei confronti di ogni singolo virus che si desidera eradicare, anche in relazione alle sue caratteristiche chimico-fisiche, quali la sua persistenza come mostrato dai test di approfondimento su TMV. Altri elementi, come la quantità di particelle virali presenti nei tessuti dell'ospite, che possono risultare superiori nel caso di infezioni da TMV rispetto che CMV (Cooper e Dodds, 1995), non possono comunque essere ignorate per una comprensione piena della problematica.

Per quanto concerne il ruolo assunto dall'IMPDH nella chemioterapia, seppur ampiamente dimostrato per le molecole indagate in ambito medico, esso risulta esclusivamente ipotizzabile per quanto concerne la chemioterapia vegetale. Se di certo i meccanismi proposti per le cellule animali non sembrano irriproducibili in quelle vegetali, non sono riportate sperimentazioni a supporto. In questo lavoro si è cercato di dare una prima risposta in tal senso, valutando in termini di risposta antivirale l'impatto di una delle più interessanti molecole sulla sintesi di guanosina, fenomeno chiave per gli inibitori dell'IMPDH. Le evidenze sperimentali hanno mostrato come, in effetti, la guanosina esogena supplisca agli effetti antivirali di TR nei

confronti di CMV in tabacco, dando maggior corpo all'ipotesi che il TR esplichi la sua azione antivirale riducendo i livelli di guanosina cellulare. E' evidente che questo risultato non sia di per sé conclusivo nell'interpretazione del meccanismo di azione del TR, in quanto il *target* effettivo dell'antivirale – l'enzima IMPDH od altro – non risulta identificato, pur rappresentando una prima evidenza significativa dell'impatto del TR sul metabolismo cellulare.

Le potenzialità dell'approccio chemioterapico non devono comunque intendersi limitate alla sperimentazione di molecole di sintesi ascrivibili agli inibitori dell'IMPDH di derivazione medica, come mostrano interessanti evidenze derivanti dall'impiego di molecole di origine naturale in piante virosate (Onyilagha *et al.*, 1997; Gibney *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2003). Parimenti, anche per quanto concerne le molecole di sintesi sussiste la possibilità di esplorare altre tipologie di antivirali come i non nucleosidici (De Clercq, 2002). In ogni caso, le nuove molecole, sintetiche o naturali che siano, rappresentano senz'altro un ampio *pool* dal quale attingere, ma non sono necessariamente da intendersi come unica risorsa chemioterapica. Recenti sperimentazioni mediche lasciano spazio a strategie di potenziamento degli antivirali disponibili, cercando di supplire ad alcuni limiti intrinseci. La sintesi di macrocostrutti costituiti da più molecole ad azione antivirale sembra essere una delle vie tese a migliorare l'efficacia di una molecola, ma la strategia necessita di specifici approfondimenti. Nel presente lavoro si è deciso di produrre e testare dei costrutti di nuova concezione a partire da molecole di MPA: la soluzione proposta presentava delle potenzialità teoriche evidenti, ma non ha sortito l'effetto auspicato in quanto è ipotizzabile, in base a quanto emerso dalle prove sperimentali, che la molecola di MPA perda parte della sua efficacia già a seguito della sua unione con il *carrier* che fungerà da legante con altre molecole di MPA. Il risultato, non confortante in sé, non preclude comunque la bontà della strategia, che necessita perciò di affinamenti che mirino *in primis* a non deprimere – o non deprimere eccessivamente – l'efficacia-base del principio attivo e che, quindi, massimizzino l'esposizione del principio attivo stesso nei confronti del *target* enzimatico.

Concludendo, seppur appaiono evidenti ampi spazi di successo per trattamenti chemioterapici grazie all'introduzione di nuove molecole od al potenziamento delle stesse, maggiori soddisfazioni potrebbero emergere dalla comprensione dei loro meccanismi di azione, partendo dalle molecole teoricamente più lineari nella loro attività quali gli inibitori esclusivi dell'IMPDH. Non approfondite sono le dinamiche più macroscopiche quali l'assimilazione stessa degli antivirali da parte della pianta e la loro traslocazione all'interno delle cellule: dinamiche che, se note, potrebbero dare utili suggerimenti per una somministrazione degli antivirali più mirata ed efficace. Altrettanto insufficientemente noto è il modo con il quale un antivirale si lega all'enzima bersaglio, il grado di questa affinità, la presenza di altri *target* secondari e l'attivazione di eventuali processi catabolici in grado di riflettersi sulla vitalità della cellula e, più in generale, sulla pianta. Questi sono aspetti che, alla luce di crescenti evidenze di molecole ad azione antivirale efficace, risultano prioritari al fine di percorrere un passo decisivo per la comprensione e l'attuabilità di un processo di risanamento vegetale mediante molecole di sintesi.

## 6. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare sentitamente il Prof. Enrico Triolo per il contributo di idee, per il supporto costante per il raggiungimento degli obiettivi del presente lavoro e per avermi trasmesso una vivida passione per la Patologia vegetale che ha accompagnato tutta la mia attività di ricerca.

Sono riconoscente alla Dott.ssa Alessandra Panattoni per avermi insegnato le tecniche di risanamento, per la costante presenza e per lo stimolo continuo che ha permesso di affrontare con soddisfazione le sfide del lavoro.

Esprimo gratitudine al Dott. Alberto Materazzi perché mia prima guida sin dalle prime esperienze di ricerca e per la sua costante disponibilità.

Ringrazio il Prof. Giorgio Catelani, la Dott.ssa Felicia D'Andrea, il Dott. Francesco Giorgelli per le idee ed il contributo fattivo per la ricerca sui costrutti di acido micofenolico.

Un grazie sincero va alla Sig.ina Letizia Mazzoni ed alla Sig.ra Grazia Puntoni perché mi sono state di costante ed essenziale aiuto ogni volta che mi sono rivolto a loro in tutti questi anni.

Desidero, infine, ricordare con affetto tutti coloro che, alla Sezione di Patologia Vegetale del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi", mi sono stati vicini e mi hanno sostenuto.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Balzarini, J., Lee, C.K., Herdewijn, P., De Clercq, E., 1991. Mechanism of the potentiating effect of ribavirin on the activity of 2',3'-dideoxyinosine against human immunodeficiency virus. *J. Biol. Chem.* 266, 21509-21514.
- Bentley, R., 2000. Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem. Rev.* 100, 3801-3825.
- Bertolini, E., Olmos, A., Lopez, M.M., Cambra, M., 2003. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* 93(3), 286-292.
- Bezouska, K., 2002. Design, functional evaluation and biomedical applications of carbohydrate dendrimers (glycodendrimers). *Rev. Molecular Biotech.* 90, 269-290.
- Broadbent, L., Read, W.H., Last, F.T., 2008. The epidemiology of tomato mosaic X. Persistence of TMV-infected debris in soil, and the effects of soil partial sterilization. *Ann. Appl. Biol.* 55(3), 471-483.
- Carr, S.F., Papp, E., Wu, J.C., Natsumeda, Y., 1993. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 268, 27268-27290.

- Carter, S.B., Franklin, T.J., Jones, D.F., Leonard, B.J., Mills, S.D., Turner, R.W., Turner, W.B., 1969. Mycophenolic acid: an anti-cancer compound with unusual properties. *Nature* 223, 848-850.
- Cheo, P.C., 1980. Antiviral factor in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44(1), 62-67.
- Clark, M.F., Adams, A.N., 1977. Characteristic of a microplate method of enzyme-linked immunoasorbant assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 375-483.
- Conrad, P.L., 1991. Potato virus S-free plants obtained using antiviral compounds and nodal segment culture of potato. *Am. Potato J.* 68, 507-513.
- Cooper, B., Dodds, J.A., 1995. Differences in the subcellular localization of Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus movement proteins in infected and transgenic plants. *J. Gen. Virol.* 76, 3217-3221.
- D'Anna, F., 2006. Attività antivirale nei confronti di CMV in piante di *N. tabacum* in vitro. In: *Termo- e chemioterapia antivirale in vitro*, Ed. ARACNE, Roma, pp. 98.
- De Abreu, R., Lambooy, L., Vogels-Mentik, E.S., Van Den Heuvel, L., 1995. Thiopurine induced disturbance of DNA methylation in human malignant cells. *Advan. Enzyme Regul.* 35, 251-263.
- De Clercq, E., 2001. Vaccinia virus inhibitors as a paradigm for the chemotherapy of poxivirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 382-397.

- De Clercq, E., 2002. Highlights in the development of new antiviral agents. *Mini Rev. Med. Chem.* 2, 163–175.
- De Clercq, E., 2004. Antivirals and antiviral strategies. *Nat. Rev.* 2, 704–720.
- De Fazio, G., Vicente, M., 1991. Antiphytoviral drugs against tomato spotted wilt virus. *Turrialba* 41(2), 244-253.
- Domingo, E., Holland, J.J., 1994. *The evolutionary biology of viruses*. Ed. Morse, S.S., Raven (NY), pp. 161-184.
- Eybishtz, A., Peretz, Y., Sade, D., Gorovits, R., Czosnek, H., 2010. Tomato yellow leaf curl virus infection of a resistant tomato line with a silenced sucrose transporter gene LeHT1 results in inhibition of growth, enhanced virus spread, and necrosis. *Planta* 231(3): 537-548.
- Elgemeie, G.H., 2003. Thioguanine, Mercaptopurine: Their Analogs and Nucleosides as Antimetabolites. *Curr. Pharm. Des.* 9(31), 2627-42.
- Faccioli, G., Colombarini, A., 1991. PVS and PVM eradication by meristem culture, chemo- and thermotherapy. *Phytoparasitica* 19(3), 251.
- Feng, T.Z., Yan, Q.J., Zhou, L.Y., Wen, L.D., 2003. Effect of anti-virus agent based on natural compounds on pepper virus disease. *Plant Prot.* 29, 33-35.



- Fraenkel-Conrat, H., Williams, R.C., 1955. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. PNAS 41(10), 690-698.
- Franklin, T., Cook, J., 1969. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. Biochem. J. 113, 515-524.
- Franchetti, P., Cappellacci, L., Grifantini, M., 1996. IMP dehydrogenase as a target of antitumor and antiviral chemotherapy. Il farmaco 51(7), 457-469.
- Gearry, R.B., Barclay, M., 2005. Azothiopurine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. J. Gastroenterol. Hepatol. 20, 1149-1157.
- Gebeyehu, G., Marquez, V.E., Vann Cott, A., Cooney, D.A., Kelly, J.A., Jayaram, N.H., Ahluwalia, G.S., Dion, R.L., Wilson, Y.A., Johns, D.G., 1985. Ribavirin, tiazofurin, and selenazofurin: mononucleotides and nicotianamide adenine dinucleotide analogues. Synthesis, structure, and interactions with IMP dehydrogenase. J. Med. Chem. 28, 99-105.
- Gharehbaghi, K., Sreenath, A., Hao, Z., Paull, K.D., Szekers, T., Cooney, D.A., Krohn, K., Jayaram, H.M., 1994. Comparison of biochemical parameters of benzamide riboside, a new inhibitor of IMP dehydrogenase, with tiazofurin and selenazofurin. Biochem. Pharmacol. 48, 1413-1419.
- Gibney, B., French, C.J., Towers, G.H.N., 1997. Virus infection and phenolics in the plant cell: a review and future prospects. Recent Res. Devel. In Phytochem. 1, 387-410.

- Griffiths, H.M., Slack, S.A., Dodds, H.J., 1990. Effect of chemical and heat therapy on virus concentrations in vitro potato plantlets. *Can. J. Bot.* 68, 1515–1521.
- Hatse, S., De Clercq, E., Balzarini, J., 1999. Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. *Biochem. Pharmacol.* 58, 539-555.
- Hupe, D.J., Azzolina, B.A., Behrens, N.D., 1986. IMP dehydrogenase from the intracellular parasitic protozoan *Eimeria tenella* and its inhibition by mycophenolic acid. *J. Biol. Chem.* 261, 8363-8369.
- Jayaram, H.N., Cooney, D.A., Glazer, R.I., Dion, R.L., Johns, D.G., 1982. Mechanism of resistance to the oncolytic C-nucleoside 2- $\beta$ -D-ribofuranosylthiazole-4-carboxamide (NSC286193). *Biochem. Pharmacol.* 31, 2557-2560.
- Jayaram, H.N., Luis, M.S., Plowman, J., Reardon, M.A., Elliott, W.L., Weber, G., 1990. Oncolytic activity and mechanism of action of a novel L-cysteine derivative, L-cysteine, ethyl ester, S-(N-methylcarbamate) monohydrochloride. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 26(2), 88-92.
- Koeningsknecht, M.J., Ramos, I., Downs, D.M., 2007. Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase-independent phosphoribosyl amine synthesis from ribose 5-phosphate and glutamine or asparagine. *J. Biol. Chem.* 282(39), 28379-28384.

- Krynetskaia, N.F., Brenner, T.L., Krynetski, E.Y., Du, W., Panetta, J.C., Evans, W.E., 1999. Msh2 Deficiency Attenuates But Does Not Abolish Thiopurine Hematopoietic Toxicity in Msh2<sup>-/-</sup> Mice. *Mol. Pharmacol.* 64(2), 456-465.
- Krynetski, E.Y., Schuetz, J.D., Galpin, A.J., Ching-Hon, P., Relling, M.V., Evans, W.E., 1995. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(4), 949-53.
- Kurtzman, R.H., Hildebrandt, A.C., Burris, R.H., Riker, A.J., 1960. Inhibition and stimulation of tobacco mosaic virus by purines. *Virology* 10(4), 432-448.
- Lennard, L., 1992. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43(4), 329-39.
- Lim, S.T., Wong, S.M., Goh, C.J., 1993. Elimination of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus from orchids by meristem culture and thin section culture with chemotherapy. *Ann. Appl. Biol.* 122, 289-297.
- Lowe, J.K., Borx, L., Henderson, J.F., 1977. Consequences of inhibition of guanine nucleotide synthesis by mycophenolic acid and virazolo. *Cancer Res.* 37, 736-743.
- MacKenzie, D.J., Mc Lean, M.A., Mukerji, S., Green, M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* 81(2), 222-226.

- Monette, P.L., 1983. Virus eradication through in vitro techniques. The International Plant Propagatoris Society 33, 90-100.
- Muller W.E.G., Maidhof, A., Taschner, H., Zahn, R.K., 1977. Virazole (1-beta-d-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide); a cytostatic agent. *Biochem. Pharmacol.* 26, 1071–1075.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nascimento, L., Pio-Ribeiro, G., Willadino, L., Andrade, G.P., 2003. Stock indexing and Potato Virus Y elimination from potato plants cultivated in vitro. *Scientia Agricola* 60(3), 525-530.
- Nelson, J.A., Carpenter, J.W., Rose, L.M., Adamson, D.J., 1975. Mechanisms of action of 6-thioguanine, 6-mercaptopurine and 8-azaguanine. *Cancer Res.* 35, 2872-2878.
- Nelson, P.H., Eugui, E., Wang, C.C., Allison, A.C., 1990. Synthesis and Immunosuppressive Activity of Some Side-Chain Variants of Mycophenolic Acid. *J. Med. Chem* 33, 833-838.
- Nielsen, O.H., Vainer, B., Rask-Madsen, J., 2001. Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15, 1699-1708.
- Noordam, D., 1973. Identification of plant viruses. *Methods & experiments*. Eds. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc), Wageningen, pp. 207.

- Omyilagha, J.C., Malhotra, B., Elder, M., French, C.J., Towers, G.H.N., 1997. Comparative studies of inhibitory activities of chalcones on tomato ringspot virus (ToRSV). *Can. J. Plant Pathol.* 19, 133-137.
- Parker, W.B., 2005. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Viral Res.* 107, 165-171.
- Panattoni, A., Triolo, E., 2003. Effect of antiviral drugs in *Vitis vinifera* infected explants. In: Proc. 14th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine, Bari, 12-17 September 2003, Italy, 244.
- Panattoni, A., D'Anna, F., Triolo, E., 2006. Improvement in grapevine chemotherapy. Proc. 15th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Stellenbosch, 3-7 April 2006, South Africa, 139-140.
- Panattoni, A., D'Anna, F., Cristani, C., Triolo, E., 2007a. Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and chemotherapy. *J. Virol. Methods* 146, 129-135.
- Panattoni, A., D'Anna, F., Triolo, E., 2007b. Antiviral activity of ti-azofurin and mycophenolic acid against Grapevine Leafroll-associated Virus 3 in *Vitis vinifera* explants. *Antiviral research* 73, 206-211.

- Pieper, R.O., Barrows, L.R., Mandel, G., 1986. Correlation of bio-chemical effects and incorporation of 3-deazaguanine into nucleic acids to cytotoxicity in L1210 cells. *Cancer Res.* 46, 4960-4965.
- Quorin, M., Lepoivre, P., 1977. Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de prunus. *Acta Horticulture* 78, 437-442.
- Rivest R.S, Irwin, D., Mandel, H.G., 1982. 3-Deazaguanine: inhibition of initiation of translation in L1210 cells. *Cancer Res.* 42, 4039-4044.
- Robins, R.K., Revankar, G.R., McKernan, P.A., Murray, B.K., Kirsi, J.J., North, J.A., 1985. The importance of IMP dehydrogenase inhibition in the broad spectrum antiviral activity of ribavirin and selenazofurin. *Adv. Enzyme Reg.* 24, 29-43.
- Saunders, P.P., Plunkett, W., 1983. Metabolism of 3-deazaguanine and 3-deazaguanosine by mammalian cell in vitro. *Fed. Proc.* 42, 2257.
- Schulze, S., Kluge, S., 1994. The mode of inhibition of TMV- and PVX-induced RNA-dependent RNA polymerases by some antiphyto-viral drugs. *J. Phytopathology* 141, 77-85.
- Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Khare, G.P., Allen, L.B., Witkowski, J.T., Robins, R.K., 1972. Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1- $\beta$ -D-ribofuranosil-1,2,4-triazolo-3-carbonylamide. *Science* 177, 705-706.

- Shepard, J.F., 1977. Regeneration of plants from protoplasts of PVX-infected tobacco leaves. *Virology* 78, 261-266.
- Smith, K.M., 1975. Cucumber mosaic virus. In: A textbook of plant virus diseases, Eds. Academic Press, New York and London, pp. 234-252.
- Smee, D.F., Matthews, T.R., 1986. Metabolism of ribavirin in respiratory syncytial virus infected and uninfected cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 117-121.
- Smee, D.F., Bray, M., Huggins, J.W., 2002. Antiviral activity and mode of action studies of ribavirin and mycophenolic acid against orthopoxviruses in vitro. *Antiviral Chem. Chemoter.* 12, 327-335.
- Streeter, D.G., Witkowski, J.T., Khare, G.P., Sidwell, R.W., Bauer, R.J., Robins, R.K., Simon, L.N., 1973. Mechanism of action of 1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole), a new broad spectrum antiviral agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 1174-1178.
- Streeter, D.G., Koyama, H.P., 1976. Inhibition of purine nucleotide biosynthesis by 3-deazaguanine, its nucleoside, and 5'-nucleotide. *Biochem. Pharmacol.* 25, 2413-2415.
- Tidd, D.M., Paterson, A.R.P., 1974a. Distinction between inhibition of purine nucleotide synthesis and the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer Res.* 34, 733-737.

- Tidd, D.M., Paterson, A.R.P., 1974b. A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer Res.* 34, 738-746.
- Tomalia, D.A., 2004. Birth of a new macromolecular architecture: Dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. *Aldrichimica Acta* 37, 39-57.
- Tricot, G., Jayaram, H.N., Lapis, E., Natsumeda, Y., Nichols, C.R., Kneebone, P., Heerema, N., Weber, G., Hoffman, R., 1989. Biochemically Directed Therapy of Leukemia with Tiazofurin, a Selective Blocker of Inosine 5'-Phosphate Dehydrogenase Activity. *Cancer Res.* 49, 3696-3701.
- Torturo, C., Saldarelli, P., Yafeng, D., Digiario, M., Minafra, A., Savino, V., Martelli, G.P., 2005. Genetic variability and population structure of grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *J. Gen. Virol.* 86, 217-224.
- Van Regenmortel, M.H.V., Dubs, M.C., 2000. Serological procedures. *Plant Virus Disease*, 159-214
- Verma, N., Ram, R., Zaidi, A.A., 2004. In vitro production of Prunus necrotic ringspot virus-free begonias through chemo- and thermotherapy. *Scientia Horticulturae* 103, 239-247.
- Yamada, Y., Natsumeda, Y., Weber, G., 1988. Action of the active metabolites of tiazofurin and ribavirin on purified IMP dehydrogenase. *Biochemistry* 27, 2193-2196.
- Yamada, Y., Goto, H., Yoshino, M., Ogasawara, N., 1990. IMP dehydrogenase and action of antimetabolites in human cultured blast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1051, 209-214.



Zhou, S., Liu, R., Baroudy, B.M., Malcom, B.A., Reyes, G.R., 2003. The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus sub-genomic replicon RNA. *Virology* 310, 333-342.

Zimmerman, T.P., Deeproose, R.D., 1978. Metabolism of 5-amino-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'-triphosphates in human blood and L5178Y cells. *Biochem. Pharmacol.* 27, 709-716.

Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., Boldt, R., 2006. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57, 805-836.