



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXXII

Attività antimicrobica di peptidi anticorpali nei confronti di ceppi fungini e batterici resistenti ai farmaci convenzionali

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Stefania Conti

Tutore:

Chiar.mo Prof. Valter Magliani

Dottoranda: Erica Cirrone

A.A. 2016/2017 – 2018/2019

Indice

INTRODUZIONE	4
1. Le infezioni fungine da <i>Candida</i> spp.	6
1.1 Caratteri generali di <i>Candida</i> spp.	7
1.2 Patogenicità di <i>Candida</i> spp.	10
1.2.1 Meccanismi di evasione dal sistema immunitario dell'ospite	11
1.2.2 Formazione di biofilm in <i>Candida</i> spp.	13
1.3 Farmaci antifungini disponibili	16
1.4 Meccanismi di farmaco-resistenza.....	19
2. Le infezioni batteriche da <i>Escherichia coli</i>	21
2.1 Caratteri generali di <i>E. coli</i>	21
2.2 Patogenicità di <i>E. coli</i>	23
2.2.1 Produzione di tossine da parte di ceppi patogeni di <i>E. coli</i>	25
2.2.2 Formazione di biofilm in <i>E. coli</i>	27
2.3 Farmaci antibatterici disponibili	29
2.4 Meccanismi di farmaco-resistenza.....	34
2.4.1 Produzione di β -lattamasi a spettro esteso	35
3. Peptidi di derivazione anticorpale.....	37
3.1 Peptide Killer KP.....	39
3.2 Altri peptidi di derivazione anticorpale.....	42
SCOPO DEL PROGETTO	43
MATERIALI E METODI	45
1. Peptidi di derivazione anticorpale.....	45
2. Ceppi di <i>Candida</i> spp.	45
2.1 Valutazione <i>in vitro</i> dell'attività antifungina di KP mediante saggi di determinazione di unità formanti colonia (UFC)	47
2.2 Valutazione <i>in vitro</i> dell'attività antifungina di KP nel tempo.....	48
2.3 Studio del meccanismo con cui KP esplica la sua attività antifungina mediante microscopia confocale.....	49
2.4 Valutazione dell'inibizione della formazione di biofilm di <i>Candida</i> spp. dopo trattamento con KP.....	50
2.5 Valutazione del profilo apoptotico di <i>Candida</i> spp. dopo trattamento con KP	51
2.6 Valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di <i>Candida</i> spp. dopo trattamento con KP.....	54

3.	Ceppi di <i>E. coli</i>	55
3.1	Valutazione <i>in vitro</i> dell'attività antibatterica di KP e di altri peptidi anticorpali nei confronti di <i>E. coli</i> ES β L mediante saggi di determinazione di unità formanti colonia (UFC)	56
3.2	Valutazione dell'inibizione della formazione di biofilm di <i>E.coli</i> ES β L dopo trattamento con KP e altri peptidi anticorpali	57
3.3	Valutazione mediante microscopia confocale della vitalità del biofilm di ceppi di <i>E. coli</i> ES β L dopo trattamento con il peptide K10T-TT	58
RISULTATI		60
1.	Attività antifungina <i>in vitro</i> di KP nei confronti di <i>Candida</i> spp.....	60
2.	Attività fungicida <i>in vitro</i> del peptide KP nei confronti di <i>Candida</i> spp. nel tempo....	62
3.	Studio del meccanismo con cui KP esplica la sua attività antifungina nei confronti di <i>C. albicans</i> DSY544 mediante microscopia confocale	64
4.	Inibizione della formazione di biofilm in <i>Candida</i> spp. dopo trattamento con KP.....	66
5.	Induzione di apoptosi in cellule di <i>Candida</i> spp. dopo trattamento con KP.....	67
6.	Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di <i>Candida</i> spp. dopo trattamento con KP	69
7.	Attività antibatterica <i>in vitro</i> di KP e di altri peptidi anticorpali nei confronti di ceppi di <i>E. coli</i> ES β L.....	72
8.	Inibizione della formazione di biofilm di ceppi di <i>E. coli</i> ES β L dopo trattamento con KP e altri peptidi anticorpali.....	73
9.	Vitalità del biofilm dei ceppi di <i>E. coli</i> ES β L dopo trattamento con il peptide K10T-TT	76
DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE		82
BIBLIOGRAFIA		88
Appendice		97

INTRODUZIONE

L'"età d'oro della medicina" che ha caratterizzato l'inizio del ventesimo secolo, in cui l'ampio sviluppo e l'impiego di nuovi farmaci antimicrobici hanno permesso di salvare milioni di vite, oggi sembra essersi conclusa. Dagli anni della seconda metà del secolo scorso in cui le malattie infettive costituivano solo una minima percentuale come causa di morte rispetto ad altre malattie non infettive, si è passati all'attuale momento storico in cui si sta assistendo ad un drastico incremento di incidenza delle malattie correlate a microrganismi, soprattutto farmaco-resistenti. Abuso, errate prescrizioni o uso inappropriato degli antibiotici sono solo alcune delle principali cause che hanno portato la maggior parte dei microrganismi ad acquisire resistenza nei confronti di molti farmaci attualmente disponibili, se non tutti. L'insorgenza e la rapida diffusione di nuovi agenti infettivi farmaco-resistenti e al contempo la scarsa disponibilità di nuovi farmaci antimicrobici attivi hanno determinato l'emergere o il ri-emergere di malattie precedentemente sconosciute o fortemente ridimensionate, come la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) e la tubercolosi^(1,2). Le più importanti organizzazioni sanitarie mondiali hanno affermato che la farmaco-resistenza rappresenta un pericolo crescente per la salute pubblica globale (**Figura 1**). Dal 2008, annualmente, si celebra la "Giornata degli Antibiotici", una campagna promossa dal Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle malattie (ECDC) volta alla sensibilizzazione degli operatori sanitari e del pubblico generale sull'uso prudente e moderato degli antibiotici come approccio trasversale nella lotta all'insorgenza della farmaco-resistenza. Le numerose campagne di sensibilizzazione, insieme ad altri frequenti interventi da parte delle più importanti organizzazioni mondiali della sanità, mirano

principalmente alla divulgazione dell'esistenza di un problema attuale e soprattutto globale, che interessa sia paesi industrializzati sia paesi in via di sviluppo e che richiede azioni e interventi da parte anche dei governi. Nel complesso, infatti, il problema delle resistenze ha un impatto non solo sociale ma anche economico: i costi per la cura di pazienti con infezioni causate da microrganismi resistenti sono nettamente superiori rispetto ad altre tipologie di infezioni, inoltre la durata della malattia è maggiore, con necessità di ricoveri prolungati, continui test aggiuntivi e farmaci costosi per debellarla^(3,4,5).

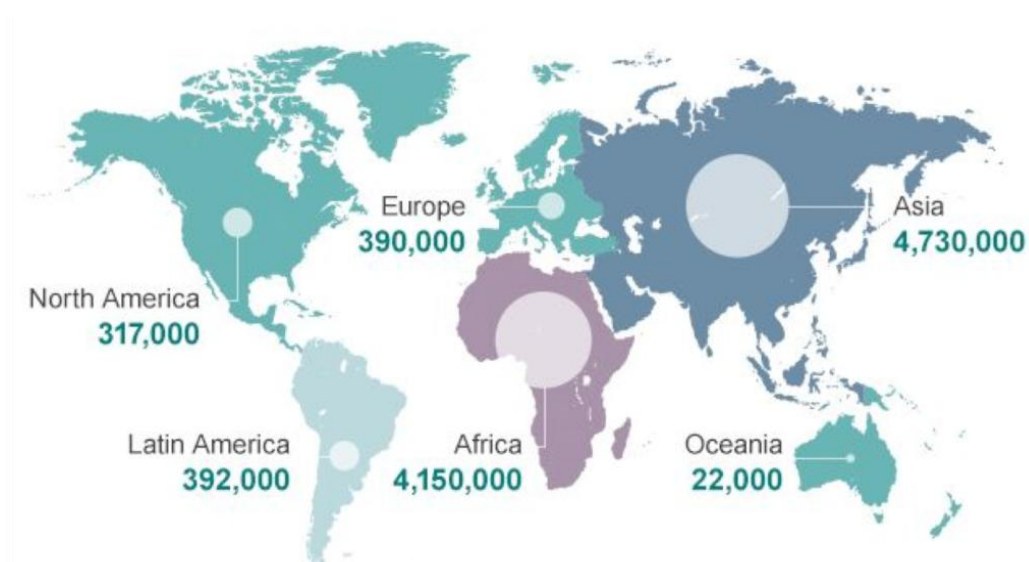


Figura 1. Decessi attribuiti annualmente a microrganismi resistenti. da European Commission, 2018⁽⁵⁾.

I microrganismi acquisiscono la capacità di mettere in atto meccanismi di farmaco-resistenza, solitamente, in seguito a mutazioni genetiche o acquisizione di materiale genetico extra-cromosomico, che consentono la loro sopravvivenza anche in presenza degli antibiotici e la conseguente persistenza nell'organismo, con significativo aumento anche del rischio di diffusione. Fattori genetici ed uso inappropriato di

antibiotici sono le principali cause di questo fenomeno, che porta alla selezione di microrganismi intrinsecamente resistenti o diventati resistenti⁽⁴⁾.

Recentemente, sono stati stimati circa 33.000 decessi annui correlati a questo fenomeno, per cui le campagne di sensibilizzazione condotte ogni anno dalle diverse organizzazioni mondiali della salute sottolineano l'importanza di approcci trasversali, come l'utilizzo appropriato degli antibiotici, la prevenzione delle infezioni e la messa in atto di strategie di controllo in ambiente sanitario⁽⁶⁾.

Nell'attuale situazione di generale aumento d'incidenza delle malattie infettive è stato osservato che, tra queste, soprattutto le infezioni fungine dovute a *Candida* spp. e le infezioni batteriche dovute a *Escherichia coli* sono tra le più diffuse. L'insorgenza e soprattutto la persistenza delle infezioni dovute a queste specie microbiche sono principalmente correlate a meccanismi multipli di resistenza che queste mettono in atto nei confronti di una o più classi di antibiotici. *Candida* spp. in ambiente sanitario/ospedaliero ed *E. coli*, principalmente attraverso la contaminazione delle acque e degli alimenti, rappresentano un serio problema per la salute pubblica, soprattutto per l'assenza di molecole attive e specifiche nei confronti di questi microrganismi resistenti, responsabili di infezioni attualmente considerate tra le più pericolose^(3,4,7).

1. Le infezioni fungine da *Candida* spp.

Negli ultimi decenni incidenza e prevalenza delle infezioni fungine sono aumentate notevolmente, rappresentando, ad oggi, un importante problema per la salute pubblica soprattutto nei soggetti immunocompromessi, legati all'ambiente ospedaliero o infettati da HIV; ciò è dovuto essenzialmente al rapido aumento ed alla diffusione di

agenti patogeni fungini resistenti ed al ristretto numero di molecole antifungine esistenti^(8,9). Le specie appartenenti al genere *Candida* sono miceti lieviti eucarioti, commensali appartenenti al normale microbiota dell'uomo, tra questi in particolare *C. albicans*, che colonizzano in modo asintomatico la cute e le mucose orale, intestinale e urogenitale. Quando il sistema immunitario dell'ospite è compromesso, soprattutto nei pazienti affetti da AIDS o altre patologie per lo più croniche, o sottoposti a terapie chemioterapiche, immunosoppressive o ormonali, queste specie possono diventare patogene opportuniste e causare infezioni sia superficiali sia sistemiche. Diverse specie sono responsabili principalmente di infezioni invasive: più del 90% di queste sono causate da *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Tra queste, *C. albicans* è la più diffusa^(10,11), mentre recentemente *C. glabrata* è emersa come seconda causa più comune di infezioni mucosali nell'uomo⁽¹²⁾.

1.1 Caratteri generali di *Candida* spp.

Lieviti appartenenti al genere *Candida* sono organismi eucarioti unicellulari, chemiosintetici ed eterotrofi, che si riproducono per gemmazione, modalità in cui le cellule figlie appaiono come estensioni della cellula madre che si allungano progressivamente sino a staccarsi. Importante caratteristica che riguarda soprattutto *C. albicans* è la capacità di produrre, in corrispondenza dell'apice cellulare, filamenti tubulari, chiamati tubuli germinativi, che tendono ad allungarsi e ramificarsi per formare quello che viene definito micelio. *C. albicans* si presenta quindi come un fungo polimorfo che può essere presente sotto forma di blastocellule rotondeggianti, oppure di pseudo-ife di forma allungata, di pseudo-miceli o di veri e propri miceli⁽¹³⁾. La coesistenza di tali morfologie cellulari (**Figura 2**) rappresenta uno dei fattori di

patogenicità di *C. albicans* poiché permette la sopravvivenza, la crescita e la disseminazione del lievito all'interno dell'ospite⁽¹⁴⁾.

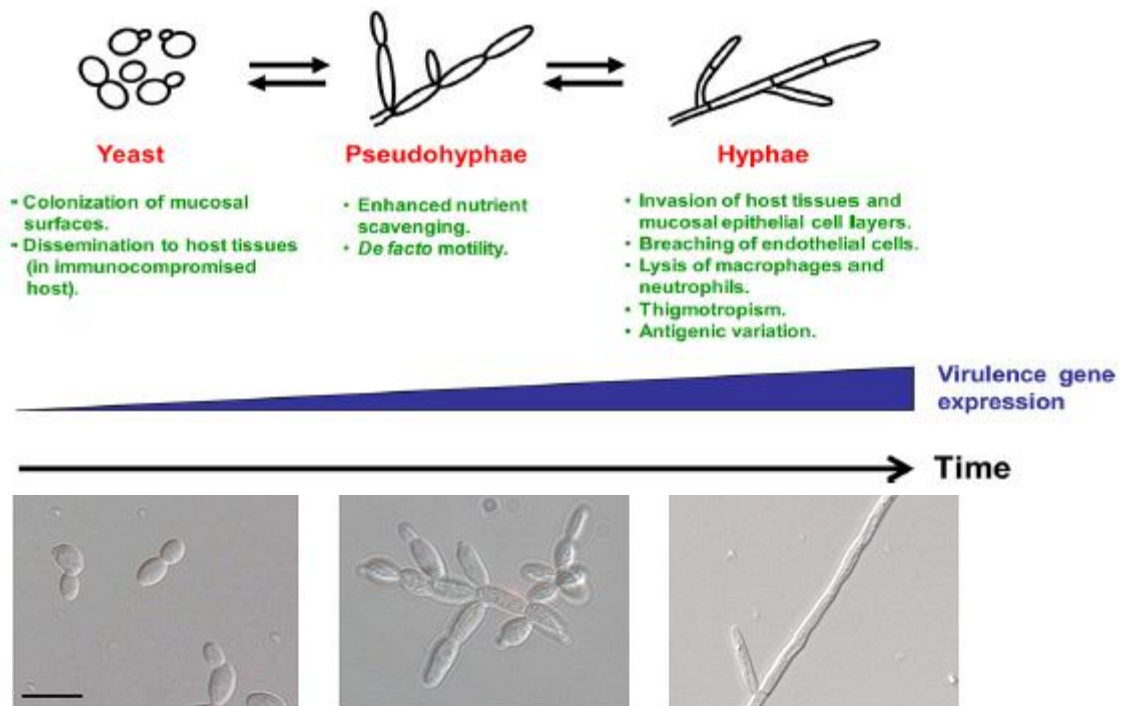


Figura 2. Descrizione delle diverse morfologie di *C. albicans*. da Thompson DS et al., 2011⁽¹⁵⁾.

Ciascuna di tali forme conferisce specifiche caratteristiche funzionali: la forma lievitifforme permette la colonizzazione delle mucose orale, gastrointestinale e genitale, il passaggio alle successive forme di pseudoifa e di ifa è correlato ad un aumento dell'espressione di geni di virulenza che incrementano la capacità di invadere i tessuti rendendo la specie estremamente patogena⁽¹⁵⁾. È stato osservato che non solo segnali intra-cellulari ma anche extra-cellulari permettono l'assunzione di una determinata morfologia⁽¹⁶⁾. La formazione di ife non è stata riscontrata, invece, durante l'invasione e la colonizzazione dei tessuti da parte di *C. glabrata*⁽¹⁷⁾.

Nel riconoscimento dei segnali intra- ed extra-cellulari, nella conseguente induzione del cambiamento morfologico e nella riorganizzazione strutturale a cui va incontro la cellula fungina durante la morfogenesi, le strutture cellulari principalmente

coinvolte sono la membrana plasmatica e la parete. Numerose sono le ricerche riguardanti la membrana plasmatica delle cellule di *Candida* spp. come potenziale target di farmaci antifungini. Essa, infatti, gioca un ruolo chiave nella patogenicità mediante la secrezione di fattori di virulenza, la sintesi dei componenti della parete e la formazione di ife e pseudoife che rendono la specie capace di invadere i tessuti⁽¹⁸⁾. Inoltre, la membrana plasmatica è anche in grado di modificare il proprio potenziale di membrana in presenza di condizioni esterne avverse, permettendo alla cellula di adattarsi all'ambiente del tessuto dell'ospite⁽¹⁹⁾.

Costituente peculiare della membrana plasmatica fungina è l'ergosterolo, derivato dalla demetilazione del gruppo 14- α metilico del lanosterolo, reazione catalizzata dall'enzima 14- α demetilasi, citocromo P450-dipendente, codificato dal gene *ERG11*.

Tale enzima svolge un ruolo cruciale nell'acquisizione della resistenza fungina agli azoli, il cui target è costituito dalla sintesi dell'ergosterolo di membrana. Mutazioni puntiformi, rimodellamento genomico ed iperespressione di *ERG11* sono i principali meccanismi di resistenza di *Candida* spp. agli azoli⁽²⁰⁾.

Altra caratteristica strutturale di *Candida* spp. è la presenza della parete cellulare, che, posta sopra la membrana plasmatica, è una struttura dinamica che garantisce protezione nell'ambiente⁽²¹⁾. Diversamente dalla composizione fosfolipidica della membrana plasmatica, la parete cellulare fungina è composta da un core formato da molecole di $\beta(1,3)$ -glucano, $\beta(1,6)$ -glucano e chitina, intercalate tra di loro, mentre sulla superficie sono esposte mannoproteine e proteine di ancoraggio (**Figura 3**)⁽²²⁾. $\beta(1,3)$ -glucano è composto da uridin-glucosio difosfato la cui polimerizzazione è catalizzata dall'enzima $\beta(1,3)$ -glucan-sintetasi⁽²²⁾.

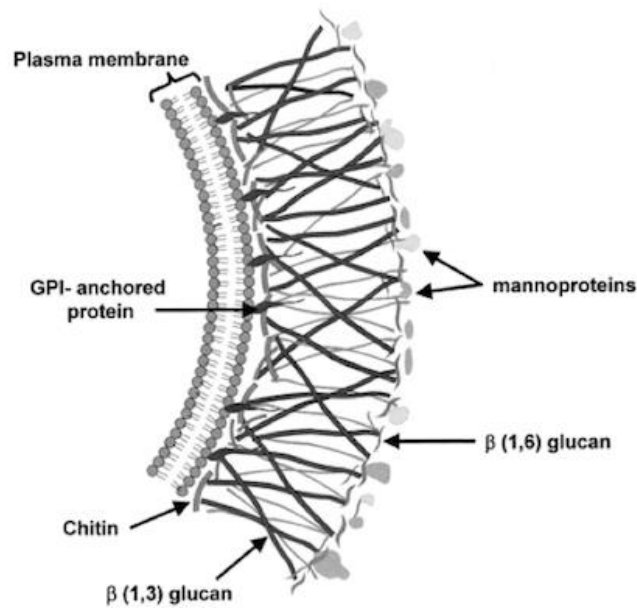


Figura 3. Schema della parete cellulare fungina. da Selitrennikoff CP, 2001⁽²¹⁾.

Le molecole di glucano e di chitina sono gli elementi strutturali principalmente coinvolti nel rimodellamento strutturale della parete in risposta a determinate variazioni dell'ambiente esterno, soprattutto di pH, che si realizzano comunemente a livello delle mucose, conferendo alla cellula fungina la capacità di adattarsi all'ambiente del tessuto ospite^(23, 24). Costituenti della parete cellulare mediano anche il riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'ospite la cui interazione è frequentemente oggetto di studio per lo sviluppo di molecole antimicrobiche aventi come target gli elementi stessi della parete⁽²⁵⁾.

1.2 Patogenicità di *Candida* spp.

Nonostante molte specie di *Candida* spp. vivano usualmente come commensali negli individui sani, queste possono anche essere responsabili di infezioni invasive, soprattutto in seguito ad alterazioni del sistema immunitario dell'ospite o a variazioni ambientali che permettono loro di proliferare molto più velocemente e di esprimere il proprio potenziale di patogenicità. Le infezioni causate da queste specie sono dette

candidosi e possono essere superficiali, se a livello cutaneo o delle mucose, oppure invasive, se profonde e disseminate. Queste ultime sono anche dette candidosi sistemiche e coinvolgono diversi organi, essendo il microrganismo diffuso per via ematica. La trasmissione può essere endogena, se le specie diventano opportuniste in particolari condizioni di vulnerabilità dell'ospite, oppure può essere esogena, se dipende da condizioni esterne all'ospite, quali, ad esempio, l'utilizzo di dispositivi medici contaminati, come cateteri centrali o urinari. I fattori di virulenza principalmente coinvolti nella patogenesi di *Candida* spp. sono: capacità di evasione dal sistema immunitario dell'ospite, capacità di adesione ai tessuti e/o a dispositivi medici con conseguente formazione di biofilm su di essi ed infine la produzione di enzimi idrolitici, quali proteasi e fosfolipasi, che danneggiano i tessuti dell'ospite^(10,11).

1.2.1 Meccanismi di evasione dal sistema immunitario dell'ospite

Microrganismi appartenenti a *Candida* spp. vivono come commensali nell'individuo sano e la loro eventuale invasione di organi e tessuti, conseguente ad un'alterazione dell'equilibrio omeostatico microrganismo/ospite, determina l'insorgenza di candidosi e l'attivazione della risposta immunitaria dell'ospite, che, in condizioni di salute ottimali, riesce a debellare il patogeno⁽²⁶⁾. Specifici recettori, appartenenti alla classe dei "*pattern recognition receptors*" (PRR) presenti sulla superficie di cellule del sistema immunitario innato dell'ospite, permettono il riconoscimento di alcuni componenti della parete cellulare fungina. I recettori maggiormente coinvolti sono i "*toll-like receptors*" (TLR), i recettori della lectina di tipo C (CLR) e i recettori del dominio di oligomerizzazione nucleotidica (NLR); questi riconoscono specifici elementi della parete cellulare fungina e inducono l'attivazione della risposta immunitaria,

mediata in un primo momento dalle barriere fisiche e in un secondo momento da chemochine e citochine proinfiammatorie che determinano il reclutamento dei linfociti e dei macrofagi nel sito di infezione e l'eliminazione del patogeno. La risposta immunitaria dell'ospite nei confronti delle infezioni da *Candida* spp. include quindi sia l'immunità innata che quella adattativa (**Figura 4**)^(27,28).

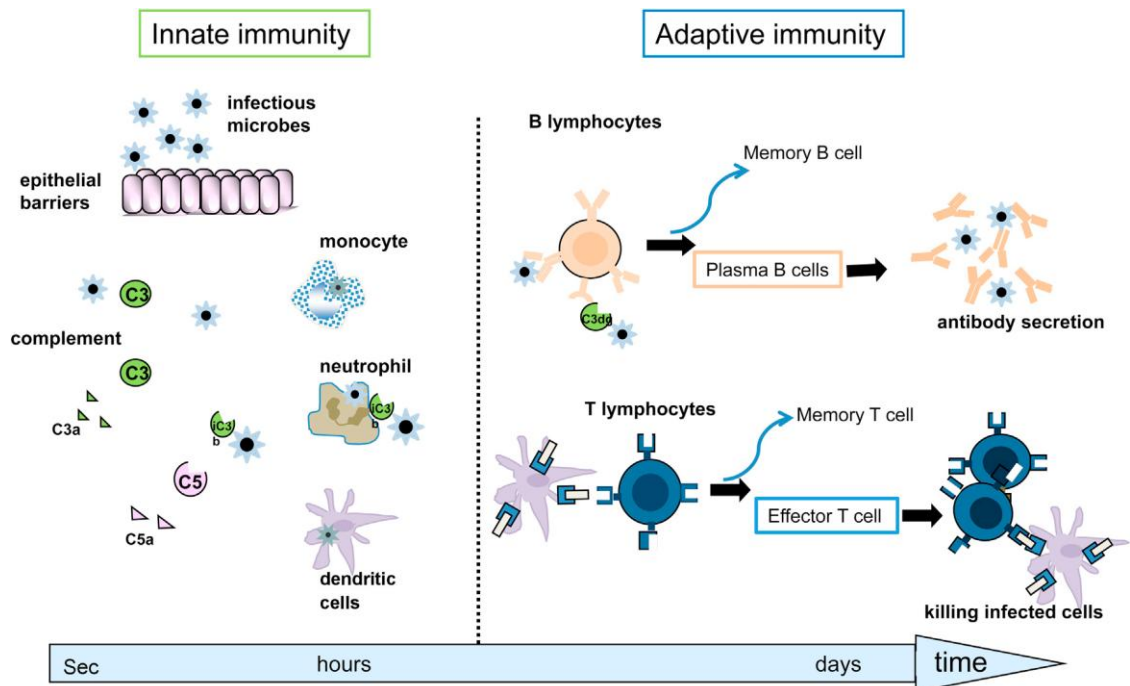


Figura 4. Componenti cellulari appartenenti al sistema immunitario dell'ospite che determinano l'eliminazione di *C. albicans*. da Luo S. et al., 2013⁽²⁸⁾.

Tuttavia, l'agente infettivo può mettere in atto meccanismi strategici di evasione dal sistema immunitario dell'ospite, che permettono l'attraversamento delle barriere tissutali, la disseminazione nei diversi organi e tessuti e di conseguenza l'insorgenza dell'infezione sistemica. I principali meccanismi che *C. albicans* mette in atto per evadere dal sistema immunitario dell'ospite sono:

- Adesione e invasione delle barriere epiteliali e dei tessuti, grazie alle adesine di superficie, alla secrezione di enzimi, quali le aspartil-proteasi secrete ("*secreted*

aspartic proteases", Sap) o alla formazione delle ife, come descritto precedentemente.

- Evasione dal complemento e dalla immunità cellulare, mediante la secrezione di inibitori cellulari specifici oppure l'espressione di antigeni di superficie che impediscono il riconoscimento delle cellule fungine da parte delle cellule del sistema immunitario⁽²⁸⁾.

Lo studio di tali meccanismi può essere utile non solo per una maggiore comprensione del processo infettivo, ma anche per sviluppare ulteriori strategie terapeutiche ed approcci diagnostici.

1.2.2 Formazione di biofilm in *Candida* spp.

Un importante fattore di virulenza di *Candida* spp. è la capacità di formare biofilm, uno strato di cellule fungine strettamente associate ed adese ad una superficie. Le superfici sulle quali si può formare il biofilm possono essere sia biotiche che abiotiche; nel primo caso, la formazione di biofilm sulle superfici mucose, soprattutto da parte di *C. albicans*, permette sia l'evasione dal sistema immunitario dell'ospite sia un incremento della resistenza ai farmaci antifungini, con conseguente possibile insorgenza e permanenza di candidosi sistemiche⁽²⁹⁾; nel secondo caso, la formazione di biofilm su superfici abiotiche, come cateteri, pacemaker o lenti a contatto, è direttamente implicata nelle infezioni correlate a biomateriali. *C. albicans* rappresenta la specie fungina isolata prevalentemente⁽³⁰⁾, ma anche altre specie non-*albicans*, quali *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, si sono dimostrate in grado di formare biofilm⁽³¹⁾. La produzione di biofilm rappresenta una delle più comuni modalità di moltiplicazione microbica, finemente regolata da diversi meccanismi molecolari⁽³²⁾ che

alla fine portano alla formazione di una struttura specifica ed organizzata composta da cellule aderenti ad una superficie, immerse in una matrice extracellulare (ECM)⁽³³⁾; quest'ultima viene spesso considerata come potenziale target per la terapia di malattie infettive correlate alla formazione di biofilm⁽³⁴⁾. Contrariamente all'estesa letteratura che ha riportato studi sui biofilm batterici e la loro descrizione, ancora poche sono le informazioni presenti in letteratura per quanto riguarda i biofilm prodotti da specie fungine⁽³⁵⁾.

La formazione del biofilm è un processo sequenziale che prevede tre fasi organizzate di sviluppo: precoce, intermedia e matura (**Figura 5**):

- 1) La fase precoce consiste nell'adesione delle cellule fungine a superfici dell'ospite o di biomateriali, controllata e indotta da diverse molecole segnale e mediata sia da fattori non specifici, come le forze elettrostatiche, che da specifiche interazioni a livello della superficie delle cellule fungine; tali cellule riconoscono e legano specifici ligandi su superfici dell'ospite.
- 2) La fase di adesione è seguita da una fase intermedia in cui si assiste al prolungamento delle ife ed alla formazione della matrice.
- 3) L'ultima fase di maturazione consiste nella proliferazione delle cellule fungine e nello sviluppo della matrice in un'architettura tridimensionale^(10,30,36).

L'evento successivo alla formazione del biofilm è la dispersione delle cellule fungine dal complesso del biofilm per invadere nuovi siti, ed è soprattutto per quest'ultima fase che il biofilm costituisce un importante fattore di virulenza, essendo in questo modo direttamente responsabile dell'invasione del torrente circolatorio e della disseminazione dell'infezione a carico di tessuti e organi interni^(11,30).

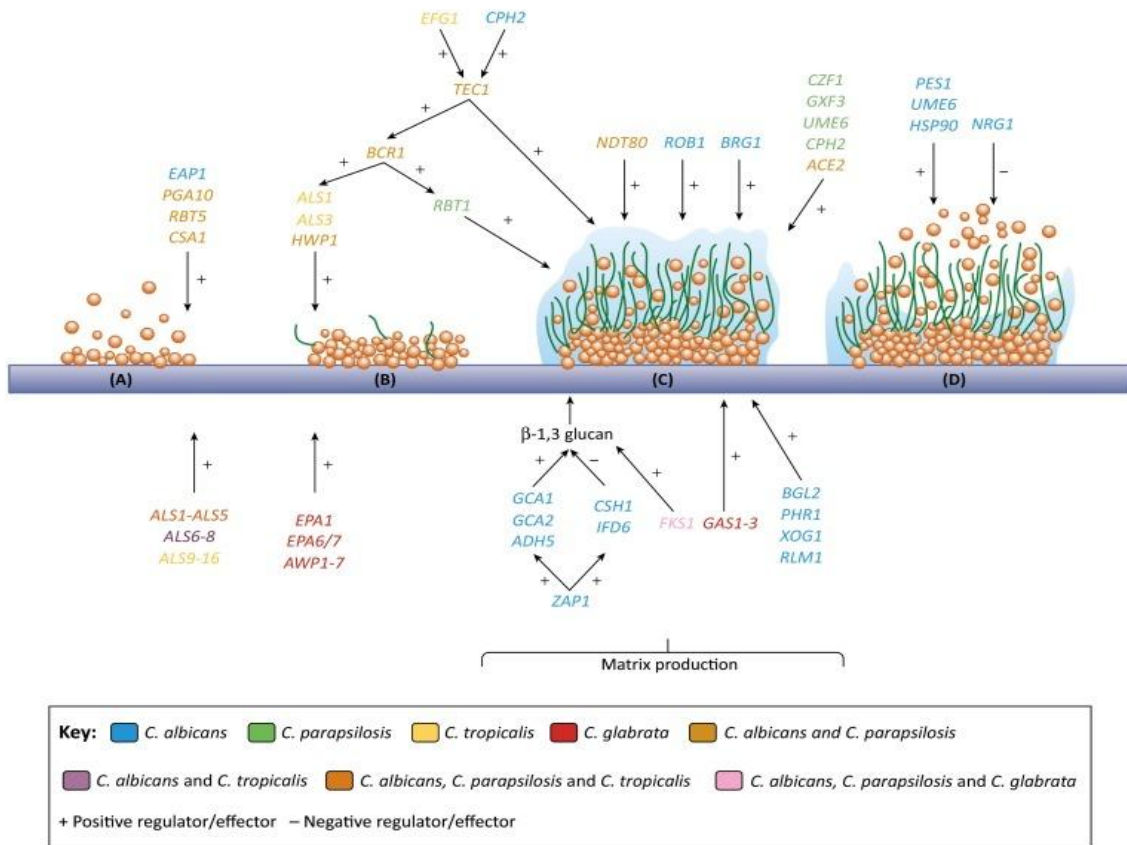


Figura 5. Fasi di formazione di biofilm di *Candida* spp. da Araujo et. al., 2017⁽³⁷⁾.

Anche in condizioni ambientali simili, le diverse specie fungine sviluppano quantità variabili di biofilm; in ogni caso la matrice presente nel biofilm minimizza la penetrazione di molecole antimicrobiche aumentando così la resistenza di *Candida* spp. agli antifungini, dal momento che soltanto la superficie esterna del biofilm viene a diretto contatto con la dose efficace del farmaco⁽³⁸⁾. Inoltre, per i diversi farmaci saggiati sono state osservate concentrazioni minime inibenti (MIC) differenti nelle diverse fasi di sviluppo del biofilm, confermando ulteriormente la tesi che la resistenza fungina sia correlata alla produzione di quest'ultimo; la sua presenza sui dispositivi medici influenza significativamente l'incidenza delle malattie fungine, soprattutto tra i pazienti ricoverati in strutture ospedaliere. In tali casi, per poter rendere efficace la terapia, è spesso necessaria la rimozione del dispositivo⁽³⁵⁾.

1.3 Farmaci antifungini disponibili

Ad oggi c'è un numero limitato di farmaci antifungini disponibili nei confronti delle infezioni fungine invasive. Essendo le cellule fungine eucariotiche, pochi sono i bersagli specifici, differenziati rispetto alle cellule umane, sui quali poter agire; questo spesso si traduce in una scarsa efficacia del farmaco o in una possibile tossicità intrinseca. Tra i possibili bersagli sono da annoverare la membrana cellulare, ed in particolare il suo ergosterolo, e la sintesi di alcuni componenti della parete e degli acidi nucleici.

Solamente quattro classi di farmaci sono più comunemente utilizzate nella pratica clinica: 1) fluoropirimidine, 2) polieni, 3) azoli e 4) echinocandine⁽⁷⁾.

1) Tra le fluoropirimidine, 5-fluorocitosina (5-FC) e 5-fluorouracile (5-FU) sono analoghi strutturali sintetici dei nucleotidi citosina e uracile. Mentre 5-FU è in grado di penetrare anche nelle cellule animali, risultando tossico ed utilizzato solamente come antitumorale, 5-FC possiede importanti proprietà farmacocinetiche, come piccole dimensioni ed elevata idrosolubilità, ed è attiva in seguito alla conversione in 5-FU all'interno della cellula fungina. In particolare, 5-FC è in grado di penetrare solamente nelle cellule fungine, grazie alla presenza di uno specifico trasportatore di membrana (citosin-permeasi) e, una volta all'interno della cellula, viene deaminata, ad opera di una specifica citosin-deaminasi, a 5-FU, che agisce incorporandosi nell'RNA, in sostituzione di UTP, determinando la terminazione prematura delle catene di RNA e, indirettamente, l'inibizione della sintesi proteica. Tuttavia, 5-FC può determinare seri effetti collaterali, quali epatotossicità e lesioni del midollo osseo, e facilmente le cellule fungine possono acquisire resistenza in seguito a mutazioni a carico dei due enzimi

coinvolti nella sua metabolizzazione. Per tali motivazioni, nella pratica clinica 5-FC non viene più utilizzato in monoterapia, ma solamente in combinazione con altri farmaci, più frequentemente con gli azoli.

2) I polieni con attività antifungina sono per la maggior parte prodotti da colture batteriche di *Streptomyces*. Quelli più comunemente utilizzati sono: amfotericina B (AmB), nistatina e natamicina (primaricina). Sono molecole organiche cicliche, con proprietà anfipatiche, per la presenza di doppi legami nel sito idrofobico e di residui ossidrilici nel sito idrofilico. Grazie alla loro peculiare struttura, i polieni sono in grado di legare l'ergosterolo presente nella membrana della cellula fungina e di formare dei pori nel doppio strato fosfolipidico, determinando una destabilizzazione del potenziale di membrana e la conseguente lisi cellulare. La limitazione più importante alla utilizzazione clinica dei polieni è dovuta, oltre che agli elevati costi, alla loro elevata tossicità per l'affinità anche per il colesterolo presente nelle cellule animali. Per alcuni di essi tale tossicità ne preclude l'uso sistemico (solamente uso topico), mentre AmB, pur inducendo effetti collaterali, quale una rilevante nefrotossicità, rappresenta ancora oggi il "*golden standard*" della terapia antifungina sistemica, per il suo ampio spettro d'azione nei confronti di lieviti e muffe e la quasi totale assenza di meccanismi di resistenza. Negli ultimi anni la tossicità di questi farmaci è stata notevolmente attenuata, grazie alla utilizzazione di formulazioni lipidiche. L'uso di AmB rimane comunque limitato all'ambito ospedaliero, oltre che per i costi e la tossicità, anche per le sue caratteristiche farmacocinetiche: il farmaco, infatti, non è idrosolubile e non è assorbito a livello intestinale, per cui può essere somministrato solamente per via endovenosa (o intratecale) con infusione lenta^(7,39).

3) Gli azoli, in particolare i triazoli, sono i farmaci antifungini attualmente più comunemente utilizzati e studiati. Sono molecole organiche cicliche, classificate in imidazoli o triazoli a seconda della presenza di due o tre atomi di azoto legati all'anello azolico. Questi farmaci inibiscono la sintesi dell'ergosterolo attraverso il legame con l'enzima lanosterolo 14- α demetilasi, enzima codificato dal gene *ERG11* e coinvolto nella conversione del lanosterolo in ergosterolo mediante la rimozione del gruppo metilico $-\text{CH}_3$ in posizione 14. La reazione, catalizzata dalla 14- α demetilasi, è correlata al citocromo P450, il cui blocco funzionale si traduce in una inefficienza del sistema enzimatico con conseguente deficit di ergosterolo nella membrana della cellula fungina e alterazione della sua permeabilità^(7,17). Oltre all'inibizione della sintesi dell'ergosterolo di membrana, gli azoli sembrano mediare il loro effetto citostatico o citotossico anche inducendo in *Candida* spp. la produzione di ROS intracellulari, che determinano inibizione della crescita e morte cellulare⁽⁴⁰⁾.

4) Le echinocandine sono derivati sintetici di lipopeptidi, naturalmente prodotti da diverse specie fungine. Questi farmaci inibiscono l'enzima $\beta(1,3)$ -glucan-sintetasi, responsabile della sintesi del $\beta(1,3)$ -glucano, componente strutturale indispensabile per l'integrità della parete cellulare fungina^(7,41), determinando instabilità parietale e conseguente lisi della cellula. Ad oggi, tre molecole appartenenti a questa classe sono più comunemente utilizzate per il trattamento e la prevenzione delle infezioni fungine: caspofungina, micafungina e anidulafungina. Le echinocandine rappresentano la sola nuova classe di antifungini approvata per il trattamento delle infezioni fungine invasive, grazie alla loro scarsa tossicità per la specificità del bersaglio (assente nelle cellule animali) e per il loro largo spettro di attività nei confronti di molte

specie fungine^(7,42). Caspofungina e AmB hanno anche dimostrato una consistente attività *in vitro* contro i biofilm di alcune specie di *Candida*⁽⁴³⁾.

1.4 Meccanismi di farmaco-resistenza

Per resistenza antimicrobica si intende la capacità dei microrganismi di essere o diventare insensibili all'attività dei farmaci utilizzati nei loro confronti. In particolare, tra i miceti alcune specie sono naturalmente resistenti a farmaci antifungini, senza necessariamente essere state precedentemente esposte ad essi, mentre altre specie possono sviluppare resistenza nel tempo⁽⁴⁴⁾ per diversi motivi. Primo fra tutti, l'uso improprio dei farmaci può indurre un'alterazione dell'espressione genica e permettere la sopravvivenza dei microrganismi in presenza di concentrazioni del farmaco alle quali erano precedentemente sensibili⁽⁴¹⁾.

L'inefficacia dei farmaci antifungini precedentemente descritti è spesso dovuta alla acquisizione da parte del fungo di uno o più meccanismi molecolari di resistenza (**Figura 6**), ai quali sono in gran parte dovuti il fallimento delle terapie antifungine e la conseguente necessità di sviluppare efficaci farmaci antifungini innovativi.

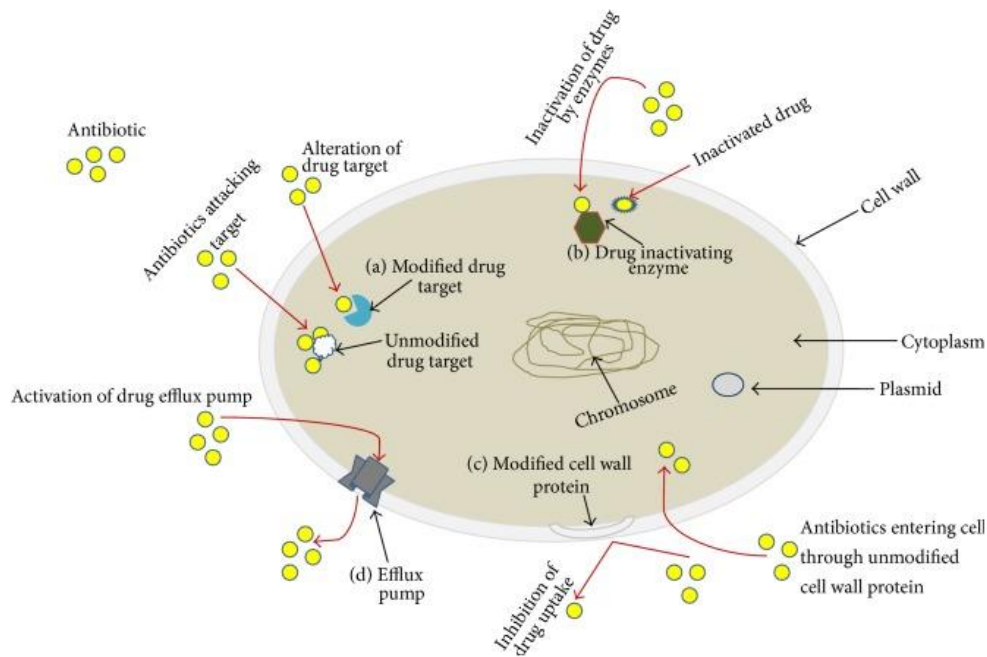


Figura 6. Schema generale di meccanismi di resistenza dei miceti ai farmaci convenzionali. da Kumar S, et al., 2013⁽⁴⁵⁾.

Uno dei meccanismi di resistenza è ad esempio la riduzione dell'accumulo intracellulare di farmaco nella cellula fungina attraverso l'attivazione di geni codificanti trasportatori integrali di membrana che funzionano come pompe di efflusso⁽⁴⁵⁾. La riduzione dell'affinità del farmaco per il target e l'alterazione del metabolismo della cellula fungina sono altri due meccanismi di farmaco-resistenza, tra i più studiati e comuni soprattutto nei confronti degli azoli. La riduzione dell'affinità degli azoli per il loro target è dovuta a una mutazione del gene *ERG11* che codifica per un enzima lanosterolo 14- α demetilasi mutato non più inibito dal farmaco. Allo stesso modo, anche modifiche del pathway di biosintesi dell'ergosterolo attraverso l'inibizione del gene *ERG3* determinano resistenza della cellula fungina al farmaco^(7,46,47). A causa della crescente insorgenza di microrganismi resistenti ai farmaci convenzionali e della capacità dei microrganismi di formare biofilm sui dispositivi medici con un aumento dell'incidenza di infezioni correlate all'ambiente ospedaliero, è sempre più urgente la necessità di ricercare nuove molecole che abbiano efficaci proprietà antifungine.

2. Le infezioni batteriche da *Escherichia coli*

Dal rapporto "Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015" pubblicato dall'ECDC emerge la preoccupante presenza e rapida diffusione in Europa di batteri gram-negativi resistenti, in primo luogo *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*⁽⁴⁾. *E. coli* è un batterio gram-negativo, membro del microbiota intestinale dell'uomo e di altri animali, responsabile di infezioni intestinali ed extraintestinali, quali infezioni del tratto urinario o genitale, meningite neonatale e setticemia, che più frequentemente vengono contratte attraverso il consumo di alimenti o acqua contaminati o entrando in contatto diretto con animali portatori o con le loro feci^(48,49,50).

2.1 Caratteri generali di *E. coli*

E. coli è la principale specie batterica del genere *Escherichia*, appartenente alla famiglia *Enterobacteriaceae*, che vive come commensale nel tratto intestinale dell'uomo e di molti animali, generalmente non determinando l'insorgenza di infezioni. I ceppi commensali, a differenza dei patogeni, mancano di fattori di virulenza e di resistenza, che vengono acquisiti tramite trasferimento genico e rendono il batterio in grado di evadere il sistema immunitario e di infettare e danneggiare l'ospite, determinando diverse patologie. Ceppi patogeni di *E. coli* non fanno solitamente parte del microbiota intestinale umano, ma sono rilevabili in altri animali e nell'ambiente, in cui sopravvivono facilmente, con diffusione e trasmissione prevalentemente attraverso la contaminazione fecale^(51,52). *E. coli* è un batterio Gram-negativo, non sporigeno, di forma bastoncellare e dimensioni variabili tra 0,5-1,5 x 1-3 µm, che si moltiplica alla temperatura ottimale di 37°C e può possedere pili o fimbrie, coinvolti nella adesione del batterio alle superfici mucose. Anaerobio facoltativo, con un metabolismo di tipo

respiratorio e fermentativo, può fermentare glucosio, lattosio e altri zuccheri, con abbassamento del pH e produzione di gas⁽⁵¹⁾.

Essendo Gram-negativo, *E. coli* possiede una parete caratterizzata dalla presenza di una membrana esterna comprendente numerose molecole di lipopolisaccaride (LPS), costituito da 3 diverse regioni: una più esterna, polisaccaridica, che rappresenta l'antigene somatico O (gruppo-specifico), un *core* polisaccaridico centrale piuttosto conservato (antigene comune), ed un lipide A che agisce come endotossina, responsabile delle proprietà tossiche. Al di sotto della membrana esterna si trova uno spazio periplasmatico, in cui sono spesso presenti importanti enzimi (tra questi, enzimi inattivanti gli antibiotici, come le β -lattamasi), ed un sottile strato di peptidoglicano (**Figura 7**)^(51,53,54).

I ceppi di *E. coli* possono essere classificati dal punto di vista sierologico sulla base delle varie combinazioni esistenti tra i tre gruppi principali di antigeni di superficie posseduti: antigene polisaccaridico somatico O, antigene capsulare K (di natura polisaccaridica) e antigene flagellare H (di natura proteica)^(55,56).

Ceppi di *E. coli* possono essere classificati anche dal punto di vista clinico, o sulla base dei fattori di virulenza posseduti, dei meccanismi patogenetici messi in atto, dell'epidemiologia e delle forme cliniche di gravità variabile provocate, che verranno di seguito discusse ed approfondite.

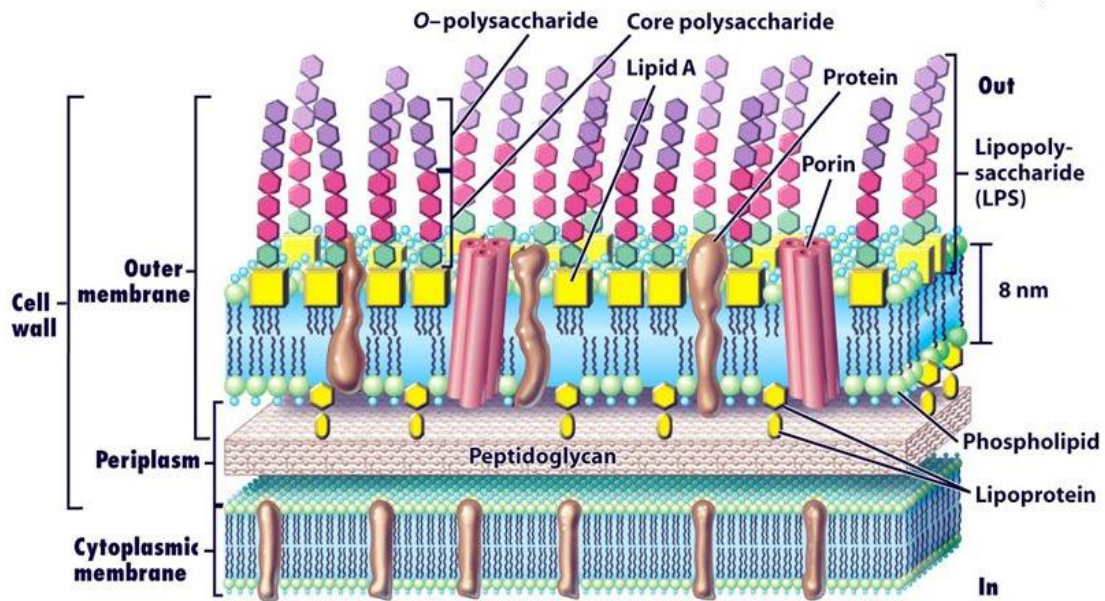


Figure 4-35a Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Figura 7. Parete cellulare dei batteri Gram-negativi. da Madigan MT et Martinko JM., 2006⁽⁵⁴⁾.

2.2 Patogenicità di *E. coli*

Le infezioni aventi come agente eziologico *E. coli* possono avere una localizzazione intestinale o extraintestinale.

- Ceppi patogeni di *E. coli* **intestinali** causano diarrea, gastroenterite e colite aderendo alla mucosa intestinale o invadendola o producendo enterotossine.
- Ceppi patogeni di *E. coli* **extraintestinali** causano infezioni al di fuori dell'apparato intestinale, quali infezioni del tratto urinario (UTI) o del sistema nervoso centrale. Ceppi uro-patogeni possono aderire alle cellule vescicali ed invaderle, formando a volte dei serbatoi di batteri quiescenti che portano all'insorgenza della malattia in un secondo momento, in seguito, ad esempio, ad un abbassamento delle difese immunitarie dell'ospite. *E. coli* responsabile della meningite neonatale è capace di evadere il sistema immunitario ed attraversare la barriera ematoencefalica, causando

la malattia. Osteomieliti e polmoniti sono altre malattie aventi come agente eziologico *E. coli* invasivo di organi diversi dal tratto enterico^(52,57).

E. coli enteropatogeni possono essere suddivisi in diverse categorie:

- *E. coli* enterotossigenico (ETEC)
- *E. coli* produttore di shiga-tossina (STEC)
- *E. coli* enteroemorragico (EHEC)
- *E. coli* enteroinvasivo (EIEC)
- *E. coli* enteropatogeno (EPEC)
- *E. coli* enteroaggregativo (EAEC)
- *E. coli* diffusamente aderente (DAEC)
- *E. coli* aderente/invasivo (AIEC)^(52,58).

Ciascuna categoria possiede fattori di virulenza specifici che si traducono in differenti meccanismi patogenetici messi in atto per sovvertire le funzioni della mucosa intestinale e determinare diversi tipi di malattia enterica. Uno dei meccanismi più rilevanti di patogenicità è rappresentato dalla produzione di enterotossine, in grado di alterare i processi di assorbimento a livello della mucosa intestinale; oppure, come nel caso delle infezioni da *E. coli* EAEC e DAEC/AIEC, in grado di aderire alla mucosa intestinale e/o di invaderla, l'adesione determina l'induzione di eventi di segnalazione cellulare con conseguente infiammazione⁽⁵⁷⁾. Sia i patogeni intestinali che extraintestinali possiedono specifici geni, spesso di origine plasmidica o batteriofagica, che codificano per fattori di patogenicità/virulenza; tali geni sono spesso concentrati in particolari ampie aree del cromosoma, chiamate "isole determinanti la patogenicità" (PAI)⁽⁵²⁾, che possono essere scambiate tra i diversi ceppi tramite trasferimento genico

orizzontale^(49,57). Attraverso questo meccanismo, ceppi di *E. coli* sono anche in grado di acquisire geni per la resistenza antimicrobica, di cui gli animali fungono spesso da serbatoi.

E. coli e *Salmonella*, principali agenti eziologici della malattia gastrointestinale nell'uomo, sono i contaminanti più comunemente rilevati nella carne cruda, per cui, attraverso l'assunzione di cibo contaminato o in seguito al contatto con gli animali o con le loro feci, si può avere la trasmissione diretta del batterio all'uomo⁽⁵⁹⁾. In particolare, STEC e EHEC sono patogeni enterici umani di origine alimentare responsabili di infezioni la cui sintomatologia varia da diarrea e crampi addominali a complicanze come la sindrome emolitico-uremica, che è una conseguenza della produzione della shiga-tossina. La persistenza del batterio nelle acque o nei cibi contaminati dipende spesso dalla capacità del ceppo di formare biofilm, che garantisce protezione dalle condizioni esterne avverse^(59,60). La produzione di tossine ed i meccanismi che portano alla formazione del biofilm in *E. coli*, importanti per la sua patogenicità, verranno approfonditi nei paragrafi successivi.

2.2.1 Produzione di tossine da parte di ceppi patogeni di *E. coli*

La capacità di produrre esotossine è uno dei fattori di patogenicità di *E. coli*. Particolari ceppi sono in grado di produrre diverse tipologie di tossine, con meccanismi d'azione e bersagli specifici: le enterotossine termolabili (LT) alterano la peristalsi e l'assorbimento intestinale; le verocitotossine alterano la permeabilità e l'integrità degli endoteli vascolari provocando edemi e sanguinamenti; infine le citotossine (CNF-I e CNF-II) hanno un'azione necrotizzante e sono coinvolte nelle infezioni extraintestinali⁽⁶¹⁾. Tra i più noti e diffusi ceppi di *E. coli* produttori di enterotossine ci

sono quelli produttori della shiga-tossina o verocitotossina, detti STEC/VTEC, di cui fanno parte anche gli EHEC. Principale causa di diarrea e di sindrome emolitico-uremica nell'uomo, l'infezione da tali ceppi è asintomatica nella maggior parte degli animali, il cui tratto gastroenterico funge in questo modo da serbatoio^(62,63); consumo o manipolazione di cibo o acqua contaminati e contatto con gli animali sono le principali cause di trasmissione all'uomo. Esistono due tipi di shiga-tossina, *stx1* e *stx2*, prodotti da diversi sierotipi, di cui *E. coli* O157:H7 è il più diffuso^(64,65). Anche la patogenicità di ETEC è dovuta alla secrezione di una enterotossina che induce diarrea⁽⁶⁶⁾. È stato osservato che diversi fattori ambientali influenzano l'espressione dei geni che codificano per fattori di virulenza coinvolti nell'insorgenza della malattia, tra cui la produzione dell'enterotossina. Oltre a pH, osmolarità, glucosio e bicarbonato, anche la concentrazione di ossigeno influenza l'espressione dei geni coinvolti nella virulenza attraverso i fattori di trascrizione di fumarato e nitrato reductasi (FNR), che sono inattivi in presenza di ossigeno. L'espressione dei geni che codificano per le enterotossine è repressa in presenza dei fattori FNR, attivi in condizioni anaerobiche, mentre in condizioni aerobiche l'ossigeno lega e inibisce FNR, consentendo l'attivazione dell'espressione genica e la sintesi delle enterotossine. Al contrario, l'espressione dei geni coinvolti nella formazione del biofilm avviene in condizioni invertite, essendo indotta dalle FNR in condizioni anaerobiche⁽⁶⁷⁾. Il trasferimento genico orizzontale mediato da plasmidi o batteriofagi che si realizza tra i diversi ceppi di *E. coli* rende il genoma che codifica per le tossine batteriche altamente flessibile e dinamico, incrementando ulteriormente il potenziale patogenetico del batterio⁽⁶²⁾.

2.2.2 Formazione di biofilm in *E. coli*

Tra i batteri Gram-negativi i maggiori produttori di biofilm sono *Pseudomonas aeruginosa* ed *E. coli*, che per questa capacità sono tra le principali cause di infezioni in ambiente ospedaliero associate all'uso di dispositivi medici, quali i cateteri^(68,69). La produzione del biofilm è una strategia messa in atto per resistere sia agli effetti degli agenti antimicrobici sia a condizioni esterne avverse, determinando una maggiore capacità del batterio di contaminare acqua ed alimenti e di persistere in essi per tempi prolungati. È stato osservato, infatti, che la resistenza multipla agli antibiotici (*multidrug resistance*, MDR) in *E. coli* è frequente soprattutto nei ceppi isolati da carne cruda; inoltre, il 30% di tali ceppi possiede un gene, *fimH*, la cui espressione è correlata a colonizzazione ed invasione dei tessuti e produzione di biofilm⁽⁵⁹⁾. La formazione dello strato di biofilm da parte di *E. coli* è mediata dalla presenza di fimbrie, veri e propri fattori specifici di adesività, che permettono la colonizzazione dei tessuti umani e animali⁽⁷⁰⁾. Geni specifici codificano per queste fimbrie e, in generale, il processo richiede il reclutamento di diversi altri geni coinvolti non solo nella fase di adesione, ma anche nella produzione e maturazione di sostanze polimeriche extracellulari (matrice extracellulare, MEC), che andranno a circondare le cellule batteriche. I geni implicati differiscono tra le diverse categorie di *E. coli*, che di conseguenza mostrano diverse capacità di formazione del biofilm; i ceppi enteroaggregativi sembrano essere i maggiori produttori di biofilm⁽⁵⁸⁾. Sia il processo di formazione che la struttura stessa del biofilm differiscono tra i diversi ceppi isolati, ma, in generale, è importante il ruolo di adesine, fimbrie ed esopolisaccaridi, come poli-N-acetilglucosamina (PGA) e acido colanico⁽⁶⁰⁾. Per le diverse categorie, la formazione e la crescita del biofilm avvengono

attraverso processi sequenziali di adesione, aggregazione cellulare e produzione di MEC, seguiti da dispersione del batterio e colonizzazione del tessuto ospite.

- 1) La fase di adesione dipende dalla presenza di appendici cellulari, come flagelli, pili e fimbrie, che permettono al batterio di superare le forze elettrostatiche presenti sulla superficie cellulare batterica e la superficie di adesione. Nel caso di *E. coli* sono importanti i pili di tipo I, II e P, codificati dall'operone *fim*, che consentono al batterio di aderire alle superfici di ancoraggio dando luogo ad infezioni di diversa natura.
- 2) Alla base dell'aggregazione cellulare e della crescita del biofilm, che seguono la fase di adesione, sta il fenomeno del "quorum sensing", sistema attraverso cui le cellule batteriche comunicano tra di loro. Passaggio fondamentale per la maturazione del biofilm è invece la produzione dell'acido colanico, la sostanza polimerica più abbondante nella MEC, che circonda le cellule di *E. coli* formando lo strato superficiale del biofilm. L'acido colanico è costituito da subunità esosaccaridiche con un'alta prevalenza di fucosio e acido glucuronico, possiede una carica negativa e forma una barriera fisica in grado di proteggere il biofilm di *E. coli* da stress osmotico e ossidativo o da eventuali cambiamenti di temperatura.
- 3) La fase finale di dispersione delle cellule batteriche che si staccano dal biofilm è essenziale per la colonizzazione dei tessuti e la conseguente insorgenza dell'infezione⁽⁶⁹⁾.

Dal punto di vista genotipico, l'espressione dei geni coinvolti nel processo di formazione del biofilm in *E. coli* mostra differenze sostanziali tra le diverse categorie

del batterio, determinando di conseguenza caratteristiche fenotipiche differenti che sono alla base delle infezioni eterogenee di cui il batterio può essere agente eziologico. In misura maggiore o minore a seconda della categoria considerata, la formazione del biofilm richiede l'espressione sequenziale di una serie di geni: *csgA* codifica per proteine coinvolte nelle fasi iniziali di adesione e aggregazione; *fimH* codifica per fimbrie di tipo I; *fliC* codifica per la principale subunità strutturale del flagello; *papC* codifica per le fimbrie di tipo P; *agn43* permette l'adesione tra le cellule batteriche⁽⁵⁸⁾. La capacità di formare biofilm incrementa quindi la patogenicità di *E. coli* dal momento che rende il batterio altamente resistente sia alle difese immunitarie dell'ospite che agli antibiotici e rappresenta per questi motivi una delle ragioni fondamentali del fallimento delle terapie antimicrobiche. È per queste ragioni che è richiesta una ricerca continua di nuove molecole alternative che siano in grado di superare le resistenze batteriche e di ridurre l'incidenza delle malattie dovute ai microrganismi resistenti.

2.3 Farmaci antibatterici disponibili

La possibilità di utilizzare i farmaci antibatterici nella terapia delle malattie infettive è basata essenzialmente sulla loro "tossicità selettiva", ossia la capacità di agire nei confronti delle cellule batteriche senza danneggiare le cellule dell'organismo parassitato; tale caratteristica ha permesso nel XX secolo di avere a disposizione un gran numero di farmaci dotati di notevole efficacia. I farmaci antibatterici, inoltre, sono attivi solo nei confronti di batteri metabolicamente attivi, proprietà che li distingue dai disinfettanti, e possono avere un'azione batteriostatica oppure battericida, a seconda se agiscono arrestando la moltiplicazione batterica o uccidendo i batteri⁽¹³⁾. Farmaci battericidi sono ad esempio cefalosporine, penicilline, carbapenemi, vancomicina e

chinoloni, mentre tra i farmaci batteriostatici sono compresi sulfamidici e tetracicline. Due dati sono importanti nella valutazione del potenziale d'azione di un farmaco antibatterico: la minima concentrazione inibente (MIC) e la minima concentrazione battericida (MBC), indicative della minima concentrazione del farmaco ($\mu\text{g/ml}$) richiesta per arrestare la moltiplicazione o uccidere il batterio, rispettivamente⁽⁷¹⁾. I farmaci antibatterici sono suddivisi in due macro gruppi: gli antibiotici, molecole di origine naturale, ed i chemioterapici, molecole ottenute per sintesi, aventi diversi siti bersaglio nella cellula batterica (**Figura 8**).

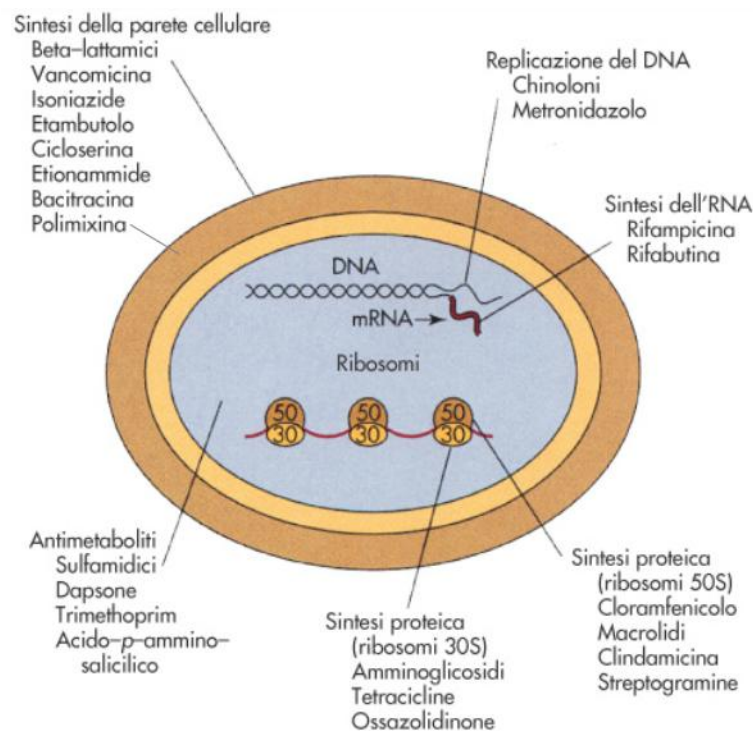


Figura 8. Siti bersaglio di antibiotici e chemioterapici. da Murray PR et al., 2003⁽⁷²⁾.

1) Si definiscono "antibiotici" sostanze naturali prodotte da microrganismi o modificate per sintesi, di basso peso molecolare, caratterizzate dal possedere, a basse concentrazioni (dell'ordine dei $\mu\text{g/ml}$), tossicità antibatterica selettiva e di esplicare la loro azione su microrganismi attivamente metabolizzanti. L'origine delle sostanze antibiotiche è diversa: la maggior parte (circa l'80%) è prodotta da batteri appartenenti

all'ordine degli *Actinomycetales* ed in particolare al genere *Streptomyces*; altri provengono da funghi come *Penicillium* e *Cephalosporium*^(13,72).

- Gli antibiotici β -lattamici (o β -lattamine) sono i farmaci più utilizzati nel trattamento delle infezioni batteriche nell'uomo per l'elevata efficacia, l'ampio spettro d'azione e i ridotti effetti collaterali⁽⁷³⁾. Il loro meccanismo d'azione prevede il legame e l'inibizione delle "*penicillin binding proteins*" (PBP), enzimi che catalizzano la reazione di transpeptidazione nella sintesi del peptidoglicano, con il blocco della formazione dei legami trasversali, instabilità osmotica della parete e morte del batterio per lisi⁽⁷⁴⁾. I membri di questo gruppo di antibiotici sono accomunati dal fatto di possedere nella propria struttura molecolare un anello β -lattamico tetratomico, che agisce da substrato per gli enzimi bersaglio. L'anello lega covalentemente il sito attivo dell'enzima, formando un acil-enzima stericamente inattivo⁽⁷⁵⁾. In base alla struttura molecolare, esistono centinaia di β -lattamici, ma nella pratica clinica le classi più importanti sono penicilline, cefalosporine, carbapenemi e monobattami (**Figura 9**).

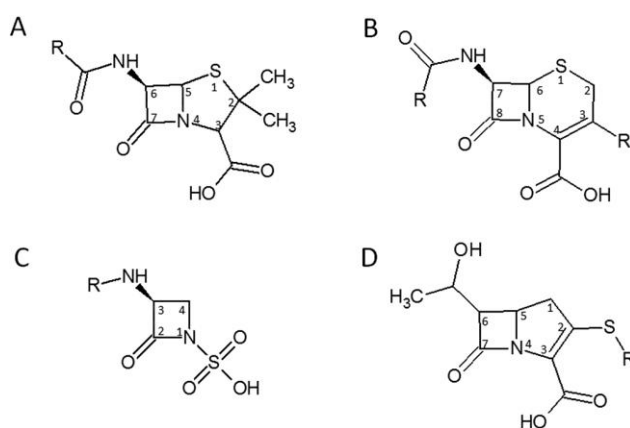


Figura 9. Principali classi di antibiotici β -lattamici. (A) nucleo delle penicilline; (B) nucleo delle cefalosporine; (C) nucleo dei monobattami; (D) nucleo dei carbapenemi. da Palzkill, 2013⁽⁷⁵⁾.

Nelle penicilline (**Figura 9A**) il nucleo fondamentale è l'acido 6-aminopenicillanico, in cui l'anello β -lattamico è fuso ad un anello tiazolidinico a cinque atomi di carbonio; nelle cefalosporine (**Figura 9B**), invece, il nucleo fondamentale è l'acido 7-amino-cefalosporanico e l'anello β -lattamico è fuso ad un anello diidrotiazinico a sei atomi di carbonio. Entrambe le classi si sono dimostrate possedere un ampio spettro d'azione nei confronti di batteri Gram-negativi e Gram-positivi. Come la penicillina, i carbapenemi (**Figura 9D**) possiedono un anello β -lattamico fuso ad un anello a cinque atomi di carbonio ed hanno dimostrato una potente attività antibatterica, per cui sono sempre più largamente utilizzati soprattutto nelle infezioni dovute a batteri multiresistenti. I monobattami (**Figura 9C**) possiedono esclusivamente l'anello β -lattamico e sono attivi soprattutto nei confronti di batteri Gram-negativi aerobi⁽⁷⁵⁾. Contro la maggior parte degli antibiotici β -lattamici i batteri hanno sviluppato diversi meccanismi di resistenza, che comprendono la iperespressione di pompe di efflusso o mutazioni dei geni che codificano per PBP che determinano la produzione di transpeptidasi alterate che i β -lattamici non sono più in grado di legare o legano con minore affinità. Tra i diversi meccanismi di resistenza, particolarmente rilevante è la capacità di molti batteri di produrre enzimi idrolitici, detti β -lattamasi, in grado di rompere l'anello β -lattamico, contribuendo a limitare l'impiego di questa classe di antibiotici. Per superare almeno in parte tale problematica, nella pratica clinica è stato introdotto l'uso di inibitori "suicidi" delle β -lattamasi, come acido clavulanico, sulbactam e tazobactam. Tali inibitori sono in grado di legarsi irreversibilmente alle β -lattamasi, inattivandole; se utilizzati in combinazione con un β -lattamico, sono in grado di impedire la rottura enzimatica dell'anello β -lattamico, mantenendo inalterata l'attività antibatterica del farmaco⁽⁷⁶⁾.

2) Si definiscono "chemioterapici" composti chimici di sintesi, che interferiscono selettivamente con funzioni essenziali specifiche del microrganismo.

- I sulfamidici sono stati i primi chemioterapici efficaci ad essere introdotti per la terapia delle infezioni batteriche nell'uomo. Sono farmaci batteriostatici, attivi nei confronti di batteri sia Gram-positivi sia Gram-negativi. Sono analoghi strutturali dell'acido p-amino-benzoico (PABA), che nei batteri è utilizzato come substrato dall'enzima diidropteroato sintetasi che catalizza una delle fasi della sintesi dell'acido folico, precursore essenziale per la sintesi degli acidi nucleici. I sulfamidici bloccano la moltiplicazione batterica sostituendo il PABA nella reazione di sintesi e la loro elevata selettività è dovuta all'incapacità delle cellule di mammifero di sintetizzare l'acido folico, che devono assumere preformato dall'esterno. Molti approcci terapeutici prevedono l'utilizzo dei sulfamidici in associazione con altri farmaci per potenziarne l'attività: tra questi, il trimethoprim, agendo in una fase successiva (catalizzata dall'enzima diidrofolato-reduttasi) nella sintesi dell'acido folico, è in grado di potenziare l'attività del sulfamidico, rendendo l'associazione battericida.

- Altra classe di farmaci appartenente ai chemioterapici è rappresentata dai chinoloni. La loro azione antibatterica è di tipo battericida, mediata dall'interazione con la girasi (topoisomerasi II) e la topoisomerasi IV, enzimi essenziali per la replicazione del DNA batterico^(13,72). I chinoloni sono stati per la prima volta introdotti nella pratica clinica per il trattamento delle infezioni del tratto urinario ed il primo utilizzato è stato l'acido nalidixico, attivo solamente nei confronti di batteri Gram-negativi⁽⁷⁷⁾. Il possibile ampliamento dello spettro di attività e l'insorgenza di meccanismi di farmaco-resistenza nelle specie batteriche originariamente sensibili hanno reso necessario lo sviluppo di

nuove molecole alternative; l'introduzione dei fluorochinoloni e dei loro derivati ha in parte superato il problema delle resistenze batteriche, in quanto alcuni di essi hanno dimostrato attività battericida nei confronti di un ampio spettro di agenti patogeni^(78,79). Tuttavia, nelle *Enterobacteriaceae* il problema della resistenza ai chinoloni è ancora largamente diffuso, a causa sia di mutazioni a livello dei geni che codificano per l'enzima DNA girasi sia di modifiche della permeabilità della membrana dovute a iperespressione di pompe di efflusso, rendendo complicato il trattamento delle infezioni correlate a specie appartenenti a questa famiglia⁽⁸⁰⁾.

2.4 Meccanismi di farmaco-resistenza

I batteri possono mettere in atto diversi meccanismi per resistere all'azione di un antibiotico a cui originariamente erano sensibili: il termine "antibiotico-resistenza" fa riferimento a questa capacità e rappresenta un serio problema per la salute pubblica mondiale, al quale si devono il fallimento di molte terapie antibatteriche, la diffusione di infezioni nell'uomo e negli animali, ma anche il consistente dispendio economico richiesto per la ricerca di nuove molecole contro cui non siano ancora state sviluppate resistenze^(5,81,82). I meccanismi di resistenza possono essere intrinseci, acquisiti o adattativi: i meccanismi intrinseci sono propri della specie batterica, messi in atto per ridurre l'effetto del farmaco; i meccanismi acquisiti insorgono in seguito a mutazioni spontanee o a trasferimento genico orizzontale, consentendo al singolo batterio di diventare resistente attraverso l'acquisizione di vari meccanismi, quali inattivazione dell'antibiotico, modificazione del bersaglio, ecc.; infine, i meccanismi adattativi prevedono un aumento transitorio della resistenza dovuto alla stimolazione di un gene per la resistenza per cui l'interazione dell'antibiotico stesso con la cellula batterica porta a una riduzione della sensibilità al farmaco^(81,83). E' stato osservato che l'ambiente

esterno gioca un ruolo cruciale nell'espressione dei geni per la resistenza, dal momento che questi non sempre sono espressi a livello fenotipico; è importante quindi capire quali dei meccanismi che coesistono vengono espressi *in vivo* e sulla base di quali particolari condizioni ambientali⁽⁸³⁾. La plasticità genetica, e quindi l'espressione regolata dei geni per la resistenza, permette alla cellula batterica di adattarsi alle condizioni avverse, in questo caso alla presenza degli agenti antimicrobici che hanno superato le prime due barriere difensive rappresentate dal biofilm e dalla parete cellulare, inducendo adattamenti che portano alla sopravvivenza del batterio^(84,85).

Sotto la pressione del crescente uso degli antibiotici, i batteri hanno quindi sviluppato complesse strategie per controbilanciare l'azione del farmaco, come la produzione di enzimi in grado di inattivare le molecole antibiotiche, quali le β -lattamasi, le cui caratteristiche verranno approfondite nel paragrafo successivo. Altri meccanismi possono riguardare mutazioni del gene che codifica per il sito target, che quindi risulterà fenotipicamente alterato, come nel caso della resistenza ai fluorochinoloni (mutazione della girasi); oppure cambiamenti della permeabilità della membrana mediante modifiche strutturali, funzionali o a livello di espressione genica delle porine di membrana che possono determinare una riduzione della penetrazione dell'antibiotico all'interno o un aumento dell'efflusso verso l'esterno della cellula⁽⁸⁴⁾. Nel caso di *E. coli* le porine maggiormente conosciute che modulano la permeabilità della membrana esterna sono OmpA, OmpC e OmpF⁽⁸⁶⁾.

2.4.1 Produzione di β -lattamasi a spettro esteso

Come precedentemente sottolineato, un importante meccanismo di resistenza antimicrobica nelle *Enterobacteriaceae*, soprattutto in *E. coli* e *K. pneumoniae*, è la

produzione di β -lattamasi, comprendenti anche β -lattamasi a spettro esteso (ES β L), AmpC β -lattamasi, metallo- β -lattamasi, carbapenemasi ed oxacillinasi^(73,87). I β -lattamici per molti anni sono stati tra gli antibiotici più efficaci ed utilizzati nel trattamento delle infezioni batteriche, principalmente per la loro modalità d'azione e ridotta tossicità⁽⁷⁶⁾. L'abuso degli antibiotici ha determinato nel tempo la selezione di ceppi, originariamente sensibili, nei quali mutazioni genetiche o acquisizione di geni esogeni accessori hanno determinato l'insorgenza della resistenza. Nei batteri Gram-positivi uno di questi meccanismi è la iperespressione delle PBP, che essendo prodotte in eccesso non possono più essere completamente inibite dal farmaco. Nei batteri gram-negativi il principale meccanismo di resistenza sembra essere la produzione di β -lattamasi. Descritte per la prima volta nel 1940, le β -lattamasi sono prodotte dalla maggior parte dei batteri gram-negativi e agiscono distruggendo il legame ammidico degli antibiotici β -lattamici, rendendo resistenti i batteri produttori^(73,84). Sono enzimi codificati dal gene *bla* ed eventi di trasferimento genico orizzontale tra i diversi ceppi batterici e mutazioni genetiche spontanee hanno consentito negli anni la produzione da parte dei batteri di β -lattamasi strutturalmente e funzionalmente diverse⁽⁸⁸⁾; in particolar modo la sostituzione di due residui amminoacidici nella loro struttura proteica ha reso tali enzimi attivi anche nei confronti delle cefalosporine di terza generazione, diventando β -lattamasi a spettro esteso(ES β L)⁽⁸⁴⁾. Le più note ES β L sono codificate dai geni *bla*_{TEM}, *bla*_{CTXM} e *bla*_{SHV} che conferiscono resistenza verso una varietà di antibiotici β -lattamici⁽⁷³⁾.

L'attuale pratica clinica prevede l'utilizzo degli inibitori delle ES β L, come acido clavulanico, sulbactam e azobactam, in associazione con antibiotici β -lattamici per il trattamento delle infezioni dovute ai microrganismi resistenti. Tuttavia, la pressione

selettiva dovuta all'uso eccessivo degli antibiotici sta accelerando il fenomeno dei cambiamenti strutturali delle β -lattamasi, tali da renderle resistenti anche agli inibitori; questo sottolinea ulteriormente la necessità di sviluppare nuovi antibiotici β -lattamici che siano meno suscettibili all'azione delle ES β L e che abbiano uno spettro d'azione più ampio⁽⁷⁶⁾.

3. Peptidi di derivazione anticorpale

Da diversi anni, presso il laboratorio di Microbiologia e Virologia del Dipartimento di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Parma, sono in corso studi su peptidi di derivazione anticorpale caratterizzati da proprietà antimicrobiche, che potrebbero quindi essere utilizzati per ottenere nuove molecole attive e specifiche nei confronti di ceppi che hanno sviluppato resistenze ai farmaci convenzionali. Gli anticorpi (o immunoglobuline), prodotti nel corso della risposta immunitaria umorale, sono glicoproteine eterodimeriche composte da due catene pesanti (blu) e due catene leggere (arancione), a loro volta costituite da un dominio variabile (V) ed uno costante (C), come schematicamente mostrato in **Figura 10**. I domini V rappresentano i siti di legame per l'antigene e sono costituiti da tre regioni amminoacidiche ipervariabili, chiamate regioni determinanti la complementarietà (*complementarity determining regions*, CDR) e da quattro regioni cornice (*framework regions*, FR)^(13, 89, 90).

peptidi di derivazione anticorpale sono stati aggiunti al gruppo degli AMP per il loro ruolo ben conosciuto nella risposta immunitaria agli agenti infettivi e recentemente stanno emergendo come possibili nuovi agenti terapeutici. Numerosi peptidi sono stati ampiamente ingegnerizzati, sia per ridurre i possibili effetti collaterali relativi alla loro eventuale tossicità, sia, soprattutto, per incrementarne l'attività antimicrobica.

3.1 Peptide Killer KP

Tra i diversi peptidi che sono stati ingegnerizzati negli ultimi anni, il primo ed uno dei più studiati è stato un decapeptide sintetico (AKVTMTCSAS, A10S), chiamato Peptide Killer (*Killer Peptide*, KP), ottenuto dalla sostituzione del primo amminoacido (acido glutammico, E) con alanina (A) nella sequenza di una regione variabile di un anticorpo anti-idiotipico ricombinante a singola catena rappresentante l'immagine interna funzionale di una tossina killer (KT) di *Pichia anomala* (*PaKT*)⁽⁹¹⁾. Precedenti studi avevano mostrato che uno specifico ceppo di *P. anomala* (ATCC96603) esplicava attività antimicrobica nei confronti di un ampio spettro di agenti infettivi mediante la produzione di una KT, in grado di riconoscere e legare selettivamente recettori β -glucanici espressi sulla parete delle cellule fungine sensibili. Nonostante la sua attività antimicrobica *in vitro* sia stata ampiamente dimostrata, non è stato possibile utilizzare direttamente *PaKT* come possibile farmaco, a causa di problematiche legate alla sua instabilità in condizioni fisiologiche, alla sua tossicità e ad altre limitazioni intrinseche; sono quindi stati ottenuti derivati immunologici della KT sulla base del network idiotipico⁽⁹⁶⁾. Sono stati prodotti anticorpi antiidiotipici, naturali, monoclonali e ricombinanti, in grado di mimare l'attività di KT e da uno di essi, ricombinante, è stata ricavata la sequenza per la sintesi di KP, dimostratosi caratterizzato da un ampio spettro

di attività antimicrobica nei confronti di diversi agenti patogeni^(91,97,98,99), tra cui miceti, quali *Candida* spp., *Criptococcus neoformans*⁽¹⁰⁰⁾, *Paracoccidioides*⁽¹⁰¹⁾ e *Malassezia*⁽¹⁰²⁾, protozoi, quali *Leishmania infantum* e *L. major*⁽¹⁰³⁾, *Acanthamoeba*⁽¹⁰⁴⁾ e *Toxoplasma gondii*⁽¹⁰⁵⁾, e virus, quali HIV⁽¹⁰⁶⁾, virus dell'influenza A⁽¹⁰⁷⁾ ed altri⁽¹⁰⁸⁾. Oltre all'attività antimicrobica, KP si è dimostrato esplicare anche un'azione immunomodulatoria, legando in modo dose- e temperatura-dipendente cellule dendritiche e, in misura minore, macrofagi, inducendo modifiche fenotipiche e funzionali con alterazione dell'attività dei linfociti T⁽¹⁰⁹⁾. A permettere il mantenimento dell'attività antimicrobica sono fondamentali i primi 3 amminoacidi localizzati in posizione C-terminale della sequenza peptidica di KP, che mediano l'interazione con specifici recettori β -glucanici localizzati sulla parete delle cellule target, mentre la sostituzione del primo residuo amminoacidico con alanina ha permesso l'ottenimento di una struttura maggiormente stabile rispetto a quella nativa. Infatti, KP è stabile in forma liofilizzata e possiede la capacità di auto-assemblarsi: molecole di KP possono dimerizzare mediante la formazione di ponti disolfuro e i dimeri possono interagire a formare strutture fibrillari altamente organizzate. La reazione di dimerizzazione è fortemente accelerata in presenza di $\beta(1,3)$ -glucano ed è un processo spontaneo, reversibile e temperatura-dipendente, in quanto all'aumentare di quest'ultima le molecole tornano alla conformazione originaria. Questo cambiamento conformazionale influenza le caratteristiche farmacocinetiche di KP e di conseguenza la sua attività. L'assunzione di questo stato conformazionale anche sulla superficie di cellule di *Candida* spp. (**Figura 11**) garantisce protezione *in vivo* dalle proteasi e la lenta cinetica di dissociazione che ne deriva determina un rilascio prolungato nel tempo della forma dimerica attiva del peptide⁽¹¹⁰⁾.

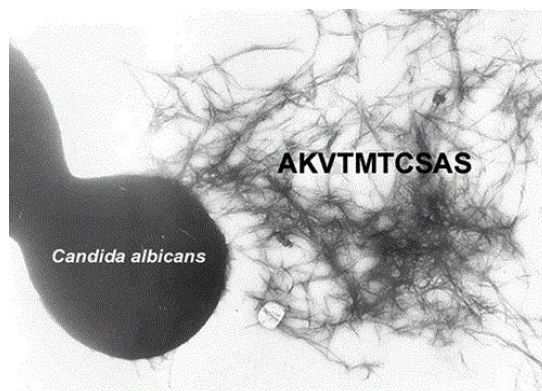


Figura 11. Interazione KP-*C. albicans*. da Pertinhez TA. et al., 2009⁽¹¹⁰⁾.

Recentemente, KP è stato saggiato anche nei confronti del biofilm prodotto da alcuni ceppi di *C. albicans*, in diverse fasi di sviluppo; dopo trattamento con KP è stata osservata una riduzione dell'attività metabolica e della capacità di formare biofilm (Figura 12). Anche l'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) osservata nei ceppi trattati potrebbe indicare un potenziale meccanismo d'azione con cui il peptide esplica la sua attività antimicrobica⁽¹¹¹⁾.

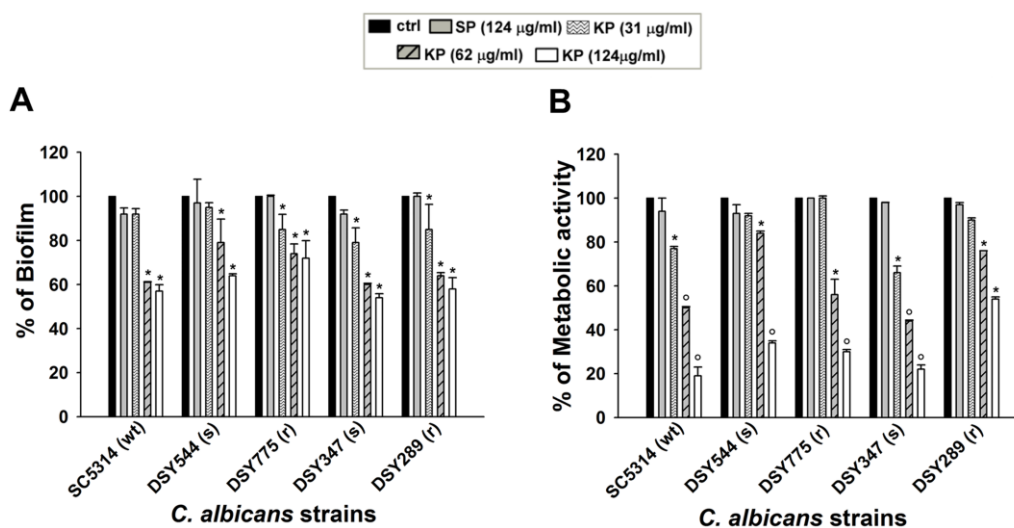


Figura 12. Grafico indicativo della ridotta formazione di biofilm e dell'attività metabolica di ceppi selezionati di *C. albicans* dopo trattamento con KP. da Paulone S. et al., 2017⁽¹¹¹⁾.

Le alterazioni morfologiche cui vanno incontro le cellule trattate con KP, osservate al microscopio elettronico, sono: rigonfiamento della parete cellulare e collasso della membrana cellulare, addensamento della cromatina e frammentazione del

nucleo⁽⁹⁶⁾. Il meccanismo d'azione del peptide non è ancora ben chiaro, ma per le sue peculiari caratteristiche e per il suo largo spettro d'azione rappresenta un potenziale sostituto dei convenzionali agenti antimicrobici contro cui molti ceppi stanno sviluppando resistenze.

3.2 Altri peptidi di derivazione anticorpale

Oltre a KP, sono stati sintetizzati altri peptidi di derivazione anticorpale, alcuni dei quali utilizzati per questo progetto di Dottorato. Un'analisi *in silico* ha permesso di valutare la relazione struttura-attività di questi peptidi, a riconosciuta attività candidacida, espressa come concentrazione efficace 50 (EC₅₀); le sequenze dei peptidi a più elevata attività sono state sottoposte ad allineamenti multipli. È stata in questo modo individuata una sequenza consenso comune che è stata utilizzata per generare, sulla base dei peptidi maggiormente attivi, una libreria peptidica.

Per tutti gli studi KP e gli altri peptidi derivati o meno dalla sua sequenza peptidica sono stati sintetizzati mediante sintesi chimica in fase solida fluoren-9-ilmetossicarbonile (Fmoc), utilizzando un sintetizzatore di peptidi Syro II (MultiSynTech, Germania), presso il centro di Ricerca Interdipartimentale per le Biotecnologie Innovative (CRIBI) dell'Università di Padova. Peptidi grezzi sono stati purificati con un HPLC C18 preparativo in fase inversa, ottenendo peptidi puri all'80 - 90% come misurato in HPLC analitica in fase inversa. La massa molecolare dei peptidi è stata confermata con uno spettrometro di massa MALDI TOF-TOF (modello 4800 - Applied Biosystems).

SCOPO DEL PROGETTO

L'insorgenza di infezioni dovute a microrganismi resistenti ai farmaci convenzionali è un fenomeno sempre più diffuso. Da diversi anni presso l'Unità di Microbiologia e Virologia del Dipartimento di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Parma sono in corso studi su peptidi sintetici che hanno dimostrato di possedere attività antimicrobica nei confronti di un ampio spettro di agenti patogeni eucariotici, procariotici e virali, caratteristica che li rende potenziali agenti antinfettivi alternativi ai farmaci attualmente in uso. Tra i numerosi peptidi sintetizzati a partire da sequenze di anticorpi, un peptide in particolare, chiamato peptide killer (KP), ha dimostrato di esplicare una significativa attività antimicrobica ad ampio spettro e per questo la sua sequenza è stata sottoposta ad analisi strutturali e bioinformatiche che hanno permesso di individuare particolari sostituzioni amminoacidiche per la produzione di diversi peptidi derivati caratterizzati da attività antimicrobica potenzialmente maggiore. Tali derivati sono stati denominati K10S, K10T-TT, K10S-SS e A10K-FF che, insieme a KP, sono stati valutati durante il periodo di questo dottorato nei confronti di ceppi batterici di *E. coli* resistenti ai β -lattamici isolati da campioni alimentari, mentre soltanto KP è stato valutato nei confronti di ceppi fungini appartenenti al genere *Candida* di isolamento clinico, resistenti agli azoli. Oltre che per il fenotipo resistente, questi microrganismi sono stati selezionati anche per la loro capacità di produrre biofilm, proprietà in grado di incrementare sia la loro persistenza nell'ambiente sia la loro resistenza ai composti antimicrobici. I peptidi selezionati per lo studio sono stati quindi saggiati nei confronti di cellule in sospensione (planctoniche) o

nei confronti del biofilm prodotto dai ceppi fungini e batterici selezionati, allo scopo di valutarne l'attività antimicrobica e di indagare gli effetti indotti a livello cellulare.

Il primo ed il secondo anno del dottorato sono stati finalizzati alla valutazione *in vitro* dell'attività di KP nei confronti dei ceppi di *Candida* spp. e alla valutazione dell'attività di KP e dei peptidi da esso derivati nei confronti dei ceppi di *E. coli* selezionati, sia sensibili che resistenti ai farmaci antimicrobici convenzionali, mediante saggi di unità formanti colonia (UFC) su cellule planctoniche. Durante l'ultimo anno è stata valutata la capacità dei ceppi fungini e batterici di produrre biofilm in presenza di KP e di altri peptidi da esso derivati, tra cui K10T-TT, che è stato saggiato per valutare la vitalità del biofilm di alcuni ceppi di *E. coli* al microscopio confocale dopo il trattamento con il peptide. Per i ceppi di *Candida* spp. è stato studiato il meccanismo con cui KP esplica la sua azione antifungina durante le prime ore di trattamento mediante microscopia confocale e sono stati indagati gli eventuali effetti indotti a livello cellulare da KP mediante saggi di valutazione dell'induzione di apoptosi e produzione di specie reattive dell'ossigeno dopo il trattamento con il peptide.

MATERIALI E METODI

1. Peptidi di derivazione anticorpale

In **Tabella 1** sono elencati i peptidi di derivazione anticorpale saggiati in questo studio nei confronti dei ceppi di *Candida* spp. e di *E. coli* ES β L.

Peptide	Sequenza	M.M. (Da)
A10S (KP)	AKVTMTCSAS	998.17
K10S	KKVTMTCSAS	1055.27
K10T-TT	KKVTMTCTAT	1082.54
K10S-SS	KKVSMSCSAS	1026.47
A10K-FF	AQVSLTCFFK	1143.35

M.M., massa molecolare (Dalton).

Tabella 1. Sequenza amminoacidica e massa molecolare (Da) di peptidi di derivazione anticorpale saggiati nei confronti di *Candida* spp. e di *E. coli* ES β L.

2. Ceppi di *Candida* spp.

Un totale di quattro ceppi di *C. albicans*, sei di *C. glabrata* e due di *C. orthopsilosis* sono stati utilizzati per condurre lo studio (**Tabella 2**).

I ceppi di *C. glabrata* e *C. albicans* sono stati ottenuti dall'Istituto di Microbiologia e Virologia dell'Università Cattolica di Roma, mentre i ceppi di *C. orthopsilosis* sono stati ottenuti dal Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa.

Ceppo		Caratteristiche				
<i>C. glabrata</i>						
DSY562	1	Sensibile wild type				
DSY565	2	Resistente wild type				
SFY116 (DSY562 pdr1Δ-P822L)	3	Mutante CgPDR1-deleto contenente l'allele GgPDR1 GOF				
SFY115 (DSY562 pdr1Δ-L280F)	4	Mutante CgPDR1-deleto contenente l'allele GgPDR1 GOF				
SFY93 (DSY562 pdr1Δ)	9	Mutante CgPDR1-deleto				
SFY105 (DSY562 pdr1Δ-T588A)	10	Mutante CgPDR1-deleto contenente l'allele GgPDR1 GOF				
<i>C. albicans</i>						
DSY544	5	Sensibile				
DSY775	6	Resistente contenente l'allele TAC1 G980W e ERG11 E266D				
DSY347	7	Sensibile				
DSY289	8	Resistente contenente l'allele TAC1 A736V e ERG11 Y132H				
<i>C. orthopsilosis</i>		<i>ERG11 seq</i>^a	Fluco	Itraco^b	Posaco	Vorico^a
CO681	11	Y132F	64	0,5	0,25	2
CO686	12	Y132F	32	0,25	0,25	1

^aresistente; ^bsensibile dose-dipendente

Tabella 2. Ceppi di *Candida* spp. utilizzati.

Sono ceppi di isolamento clinico, sensibili o resistenti ai convenzionali antifungini azolici, oppure ceppi mutanti resistenti geneticamente caratterizzati. Mutazioni essenzialmente a carico di *ERG11*, in *Candida* spp. determinano una sovra regolazione dei geni CDR1 e CDR2 che codificano per le pompe di efflusso chiamate *ABC transporter* e giocano un ruolo importante in uno dei meccanismi della resistenza agli azoli⁽¹¹²⁾. In *C. glabrata* queste mutazioni sono chiamate "*gain-of-function*" (GOF) e causano l'insorgenza della resistenza agli azoli con conseguente maggior virulenza⁽¹¹³⁾.

2.1 Valutazione *in vitro* dell'attività antifungina di KP mediante saggi di determinazione di unità formanti colonia (UFC)

Mediante saggi di UFC è stata valutata *in vitro* l'attività fungicida di KP nei confronti dei ceppi fungini selezionati. Il peptide è stato solubilizzato in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione iniziale di 20 mg/ml e successivamente portato a 2 mg/ml in soluzione acquosa. Partendo da una concentrazione di 100 µg/ml, il peptide è stato saggiato a diverse concentrazioni scalari al fine di determinare per ciascun ceppo il valore di EC₅₀, cioè la concentrazione di peptide in grado di uccidere il 50% delle cellule saggiate. I saggi sono stati effettuati prelevando una singola colonia dei ceppi in esame cresciuti su Sabouraud Dextrose Agar (SDA), dopo incubazione per 24 ore a 37°C e risospendendo in 1 ml di acqua le cellule di *C. glabrata* e *C. orthopsilosis*, e in 1 ml di terreno liquido 199 (Sigma-Aldrich, M2154) le cellule di *C. albicans*. Le sospensioni di *C. albicans* sono state quindi incubate a 37°C in agitazione (150 rpm) per 1 ora, per permettere la formazione del tubulo germinativo. Dopo opportune diluizioni, da tutte le sospensioni fungine sono stati prelevati 10 µl per la conta cellulare al microscopio mediante un emocitometro Kova® (HYCOR BioMedical Inc.). Le sospensioni sono state quindi opportunamente diluite in acqua per ottenere la concentrazione desiderata di cellule fungine pari a 4×10^4 cellule/ml. In pozzetti a fondo concavo di piastre da microtitolazione sono stati posti 10 µl delle sospensioni cellulari fungine e portati al volume finale di 100 µl con le concentrazioni desiderate di KP. Le piastre sono state quindi incubate per 6 ore a 37°C. Come controllo di crescita è stato utilizzato lo stesso inoculo cellulare in acqua in assenza di peptide. Dopo il periodo di incubazione, le sospensioni fungine sono state seminate su piastre di SDA e, dopo 24-48 ore di incubazione a 37°C, il numero di UFC è stato determinato utilizzando lo

strumento aCOLyte Colony Counter (PBI International). Ogni saggio è stato eseguito in triplo a scopo statistico. Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate rapportando il numero di CFU su SDA in presenza e in assenza del peptide, la significatività statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo è stata valutata mediante test *t* di Student ed i valori di EC₅₀ sono stati calcolati mediante analisi di regressione non lineare utilizzando il programma GraphPad Prism 4.01 (San Diego, CA USA).

2.2 Valutazione *in vitro* dell'attività antifungina di KP nel tempo

Il protocollo descritto precedentemente è stato adottato anche per la valutazione dell'attività antifungina *in vitro* nel tempo (*time-killing*). Il saggio è stato eseguito monitorando la crescita dopo diversi tempi di incubazione, fino a stimare il tempo minimo richiesto per la morte della maggior parte delle cellule incubate in presenza del peptide. La concentrazione di peptide utilizzata in questi saggi è pari alla minima concentrazione fungicida (MFC), ovvero la concentrazione in grado di uccidere in 6 ore circa il 100% delle cellule saggate, determinata per ciascun ceppo di *Candida* spp. mediante il saggio UFC precedentemente descritto. Sono state utilizzate piastre da microtitolazione da 96-pozzetti a fondo concavo e in ciascun pozzetto sono stati posti 100 µl totali di ciascuna sospensione cellulare diluita alla concentrazione finale di 4×10^4 cellule/ml in presenza o assenza del peptide, saggiato all'opportuna MFC. La conta delle colonie è stata effettuata mediante semina delle sospensioni fungine, dopo diversi tempi di incubazione (30, 60, 120, 240 e 360 minuti) a 37°C, su piastre di SDA, al fine di stimare il tempo richiesto per uccidere la maggior parte delle cellule trattate con il peptide. Anche per questo saggio, come per la UFC, come controlli di crescita e di

attendibilità del saggio sono stati utilizzati un controllo inoculo, con semina immediata su SDA delle cellule di lievito costituenti l'inoculo iniziale (tempo 0, t₀), ed un controllo acqua, con semina su SDA delle cellule di lievito in assenza del peptide dopo 30 minuti, 1, 2, 4 e 6 ore. Il saggio è stato eseguito in triplo a scopo statistico e al termine del saggio le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate utilizzando la formula utilizzata per la UFC.

2.3 Studio del meccanismo con cui KP esplica la sua attività antifungina mediante microscopia confocale

Il meccanismo con cui KP esplica la sua attività antifungina è stato valutato con l'impiego della microscopia confocale. Per la conduzione del saggio sono state selezionate del ceppo *C. albicans* DSY544, sensibili agli azoli, trattate con una concentrazione di KP che ha dimostrato il 30% di attività antifungina dopo 6 h di incubazione. La frazione di KP utilizzata è stata precedentemente coniugata in rapporto 1/1 M con isotiocinato di fluoresceina (FITC) che ha permesso di seguire la localizzazione del peptide durante le fasi del trattamento. Per la conduzione del saggio, il ceppo è stato fatto crescere a 37°C per 24 ore su SDA; 2-3 colonie sono state prelevate e risospese in 5 ml di Yeast Peptone Dextrose Broth (YPDB) (pH 4.5, NaHPO₄ 0.2 M, acido citrico 0.1 M, 2% peptone, 2% destrosio, 1% estratto di lievito) con successiva incubazione a 30°C in agitazione (120 rpm) per una notte. Dopo centrifugazione, le cellule fungine sono state lavate per rimuovere il terreno, risospese in H₂O e contate al microscopio. È stata allestita una sospensione di tali cellule in H₂O alla concentrazione finale di 2 x 10⁷ cellule/ml e 20 µl di tale sospensione sono stati posti su un apposito vetrino, lasciando aderire le cellule per 30 minuti. Il vetrino è stato

poi osservato al microscopio confocale a scansione laser LSM 510 Meta scan integrato con un microscopio invertito Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Jena, Germania), usando una lente a immersione d'olio $40 \times \text{NA}1.3$. Dopo aver scelto un'area del vetrino e scansionato una prima immagine al tempo 0, è stato aggiunto $1 \mu\text{l}$ di KP-FITC ($100 \mu\text{g/ml}$). Tenendo fissa l'area del vetrino scelta, sono state acquisite immagini in tempi diversi, in particolare dopo 10, 20, 30, 90 e 120 minuti di incubazione con il peptide fluoresceinato.

2.4 Valutazione dell'inibizione della formazione di biofilm di *Candida* spp. dopo trattamento con KP

Candida albicans e non-*albicans* sono in grado di formare biofilm, che rappresenta un importante fattore di virulenza, ma anche un potenziale target di farmaci antimicrobici^(30,31,34). Per tale motivo è stata valutata l'eventuale inibizione della formazione di biofilm da parte dei ceppi di *Candida* spp. dopo trattamento con KP. Lo studio è stato condotto utilizzando come riferimento un protocollo sperimentale precedentemente descritto⁽¹¹¹⁾. Per l'esecuzione del saggio, i ceppi sono stati fatti crescere a 37°C per 24 ore su SDA; 2-3 colonie sono state prelevate e risospese in 5 ml di YPDB con successiva incubazione a 30°C in agitazione (120 rpm) per una notte. Dopo centrifugazione, le cellule fungine sono state lavate, risospese in H_2O e contate al microscopio. Sospensioni di tali cellule sono state allestite in RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) + 2% di glucosio alla concentrazione finale di 10^6 cellule/ml e $100 \mu\text{l}$ di ciascuna sospensione sono stati posti in doppio in piastra da 96-pozzetti a fondo piatto e incubati a 37°C per 90 minuti. Trascorso il tempo di incubazione, le cellule di *Candida* spp. non adese al fondo del pozzetto sono state rimosse, mentre il biofilm in

formazione è stato trattato o meno con KP per 6 h a 37°C. Partendo da una concentrazione di 100 µg/ml, il peptide è stato saggiato a diverse concentrazioni scalari al fine di determinare per ciascun ceppo il valore di EC₅₀, cioè la concentrazione di peptide in grado di ridurre del 50% la formazione del biofilm. Trascorso il periodo di incubazione, 100 µl di RPMI 1640 + 2% di glucosio sono stati aggiunti a tutti i pozzetti e la piastra è stata incubata a 37°C per 48 h. La percentuale di biofilm formato è stata poi misurata quantitativamente mediante colorazione con Crystal Violet (CV, Sigma-Aldrich). Dopo aver lavato i pozzetti, le piastre sono state asciugate in stufa a 80°C per 15 minuti e colorate con CV (200 µl/pozzetto), precedentemente diluito con acqua demineralizzata alla concentrazione di lavoro 0,25%, per 45 minuti. Dopo opportuni lavaggi per eliminare l'eccesso di colorante, è stato aggiunto etanolo all'85% (200 µl/pozzetto) e lasciato agire per 10 minuti prima di misurare l'assorbanza a 540 nm. I risultati sono stati espressi come percentuale di riduzione della massa di biofilm rispetto ai controlli di crescita. I dati ottenuti sono stati utilizzati per calcolare l'EC₅₀ dei peptidi.

2.5 Valutazione del profilo apoptotico di *Candida* spp. dopo trattamento con

KP

Dopo la valutazione dell'attività antifungina di KP, l'approccio successivo è stato quello di valutare l'eventuale induzione della morte cellulare programmata (apoptosi) nelle cellule di *Candida* spp. in seguito a trattamento con il peptide, al fine di cercare di chiarire il meccanismo d'azione mediante il quale KP esplica la sua attività antifungina. L'eventuale induzione di apoptosi nelle cellule dei ceppi di *Candida* spp. oggetto di studio è stata valutata con l'impiego del citofluorimetro MuseTM Cell Analyzer (Merck, Millipore), utilizzando il kit MuseTM Annexin V & Death Cell (Merck, Millipore). Lo

strumento si serve di un'ottica microcapillare miniaturizzata per la rilevazione nel campione della fluorescenza cellulare, consentendo di ottenere dati quantitativi relativi a cellule vive, morte, oppure in apoptosi precoce o tardiva, fornendo un'analisi cellulare altamente specifica, sensibile ed accurata. I reagenti utilizzati sono l'Annexina V fluoresceinata, un composto che lega la fosfatidilserina di membrana, e la 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD), un composto in grado di intercalarsi nella doppia elica del DNA delle cellule morte o in apoptosi tardiva. I target cellulari sono quindi strutture caratteristiche delle cellule apoptotiche, che vanno incontro a cambiamenti fisiologici specifici tra cui: esternalizzazione della fosfatidilserina, normalmente presente nella membrana citoplasmatica, che, una volta esposta, viene legata dall'Annexina V; degradazione delle proteine cellulari; compattazione e frammentazione della cromatina nucleare e perdita dell'integrità della membrana, che permette l'ingresso ed il legame della 7-AAD all'acido nucleico (**Figura 13**).

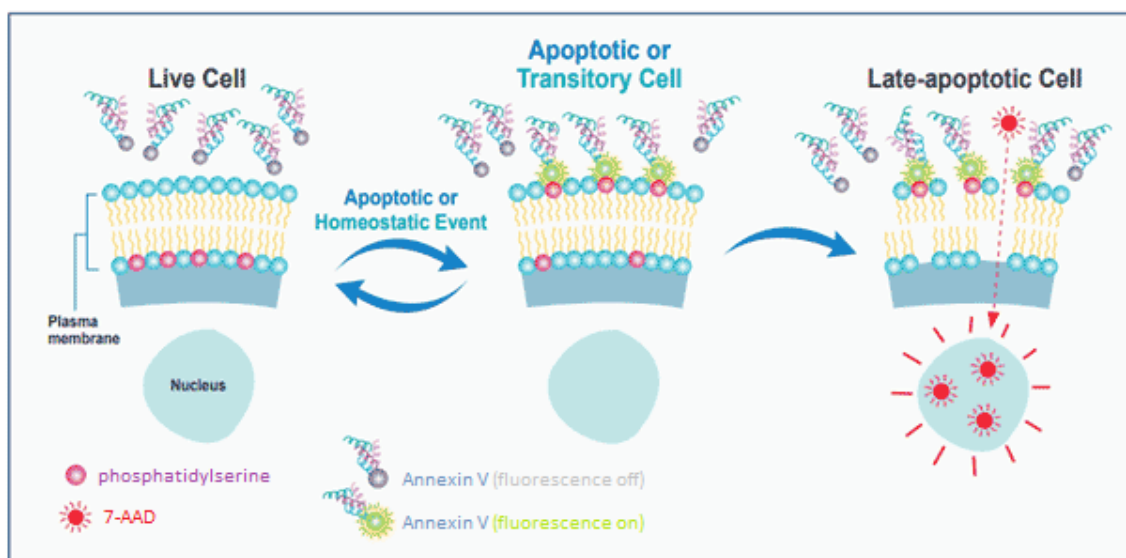


Figura 13. Cambiamenti morfologici della cellula apoptotica. Rappresentazione schematica del legame dell'annexina V fluoresceinata (verde) alla fosfatidilserina (rosa), e della 7-AAD (rosso) al DNA. Figura modificata da <https://www.novusbio.com/products/psiva>.

L'impiego dei due reagenti permette di distinguere quattro popolazioni cellulari

(Figura 14):

- Cellule vive (*live cells*): Annessina V negative e 7-AAD negative
- Cellule in apoptosi precoce (*early apoptotic cells*): Annessina V positive e 7-AAD negative
- Cellule in apoptosi tardiva (*late apoptotic/dead cells*): Annessina V positive e 7-AAD positive
- Cellule morte (*dead cells*): Annessina V negative e 7-AAD positive

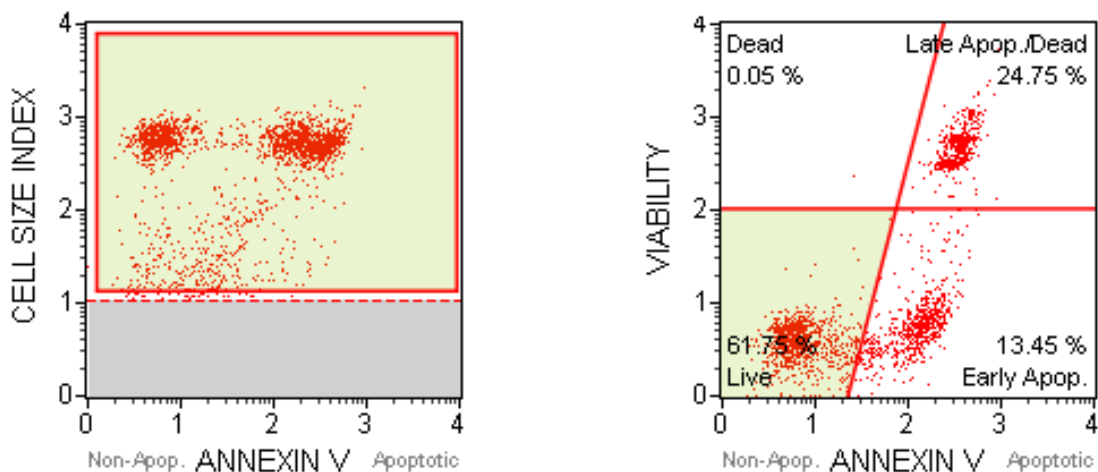


Figura 14. Grafici di distribuzione cellulare in citofluorimetria. Il primo grafico permette una prima discriminazione della popolazione cellulare basata sulle dimensioni cellulari, eliminando l'eventuale presenza di detriti dall'analisi dei risultati; il secondo grafico permette la distribuzione della popolazione precedentemente selezionata nei quattro quadranti in relazione al profilo apoptotico che mostrano: *live* (quadrante inferiore sinistro), *early apoptotic* (quadrante inferiore destro), *dead* (quadrante superiore sinistro), *late apoptotic/dead* (quadrante superiore destro).

Per la conduzione del saggio, i ceppi in esame sono stati fatti crescere su SDA a 37°C per 24 ore; una singola colonia è stata poi prelevata e risospesa in acqua per permettere la conta cellulare al microscopio ottico e la sospensione cellulare è stata opportunamente diluita per ottenere una concentrazione finale di 5×10^5 cellule/ml. Sono stati preparati due diversi inoculi di 220 µl ciascuno: uno per il controllo, contenente solo l'inoculo in acqua, e uno per la valutazione del profilo apoptotico in presenza di KP, contenente l'inoculo ed il peptide ad una concentrazione pari al doppio del valore dell'EC₅₀. Dopo 10 e 100 minuti, a 100 µl di ciascuna condizione sono stati aggiunti altri 100 µl di reagente MuseTM Annexin V & Dead Cell e dopo 20 minuti di incubazione al buio a temperatura ambiente i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro. L'incubazione totale di 30 e 120 minuti ha consentito la valutazione dell'apoptosi precoce e tardiva, rispettivamente. Ogni saggio è stato ripetuto in doppio e, dopo 30 e 120 minuti di incubazione ed opportune diluizioni, ogni sospensione cellulare, sia in assenza che in presenza di KP, è stata seminata in doppio su piastre di SDA per la determinazione del numero di UFC.

2.6 Valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di *Candida* spp. dopo trattamento con KP

Un ulteriore saggio volto alla determinazione del meccanismo d'azione mediante il quale KP esercita la sua attività antifungina è stato quello di valutare l'eventuale produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule di *Candida* spp. dopo trattamento con KP. Lo studio è stato condotto utilizzando come riferimento un protocollo sperimentale precedentemente descritto⁽⁴⁰⁾. Alcune colonie di *Candida* spp. cresciute su SDA per 24 ore a 37°C sono state risospese in 1 ml di H₂O e, dopo

opportune diluizioni, le cellule fungine sono state contate al microscopio con un emocitometro Kova® (HYCOR BIOMEDICAL Inc.). Le sospensioni cellulari sono state diluite alla concentrazione finale di 2×10^7 cellule/ml ed incubate per 30 minuti a temperatura ambiente in presenza o assenza di 4,4 mg/ml di acido ascorbico, un antiossidante, precedentemente solubilizzato in H₂O alla concentrazione di 44 mg/ml. Successivamente, il peptide è stato aggiunto alla concentrazione pari a $20 \times EC_{50}$ in un volume finale di 220 µl, mentre come controllo positivo è stata utilizzata caspofungina alla concentrazione di 20 µg/ml, precedentemente solubilizzata in H₂O alla concentrazione di 1 mg/ml. Le cellule sono state incubate per 30 minuti a 37°C, centrifugate a 15.000 giri per 10 minuti e risospese in Phosphate Buffered Saline (PBS) con 10 µg/ml di 2',7'-Diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA, D6883, Sigma Aldrich), precedentemente solubilizzata in DMSO alla concentrazione di 4 mg/ml. 100 µl di ciascun campione sono stati trasferiti in doppio in piastre multipozzetto nere sterili a fondo piatto e incubati a 37°C. Al tempo iniziale di incubazione (0) e dopo 1, 2, 3 e 4 ore la fluorescenza è stata misurata alla lunghezza d'onda di emissione di 538 nm utilizzando il fluorimetro EnSpire plate reader (PerkinElmer). I restanti 20 µl di ciascuna condizione in eppendorf sono stati incubati a 37°C per 4 ore e dopo opportune diluizioni piastrati in doppio su piastre di SDA.

3. Ceppi di *E. coli*

Un totale di quattro ceppi di *E. coli*, forniti dal Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie dell'Università di Parma, sono stati utilizzati per condurre lo studio (Tabella 3).

Ceppo	Resistenza cefotaxima/ceftazidime	Produzione di biofilm
ATCC25922	Sensibile	Debole
AS3	Resistente	Moderato
AS63	Resistente	Forte
CS160	Resistente	Moderato

Tabella 3. Ceppi di *E. coli* utilizzati.

Si tratta di ceppi isolati da campioni alimentari da suini allevati in modo intensivo per i quali era stata valutata la suscettibilità/resistenza a selezionati antibiotici β -lattamici, in particolare cefalosporine di terza generazione, quali cefotaxima e ceftazidime. Tutti i ceppi isolati erano stati identificati come *E. coli* produttori di β -lattamasi ad ampio spettro (ES β L) resistenti sia a cefotaxima che a ceftazidime, ciascuno con caratteristiche proprie di produzione di biofilm. Il ceppo ATCC25922, sensibile agli antibiotici β -lattamici saggiati, è stato utilizzato come controllo.

3.1 Valutazione *in vitro* dell'attività antibatterica di KP e di altri peptidi anticorpali nei confronti di *E. coli* ES β L mediante saggi di determinazione di unità formanti colonia (UFC)

Mediante saggi di UFC è stata valutata *in vitro* l'attività battericida del peptide KP e dei suoi derivati K10S, K10T-TT, K10S-SS e A10K-FF nei confronti dei ceppi batterici selezionati. Ogni peptide è stato solubilizzato in DMSO alla concentrazione iniziale di 20 mg/ml e successivamente portato a 2 mg/ml in soluzione acquosa. Partendo da una concentrazione di 100 μ g/ml, ogni peptide è stato saggiato a diverse concentrazioni scalari al fine di determinare per ciascun ceppo il valore di EC₅₀, cioè la concentrazione di ciascun peptide in grado di uccidere il 50% delle cellule saggate. I saggi sono stati effettuati prelevando una singola colonia dei ceppi in esame cresciuti su

Mueller-Hinton Agar (MHA), dopo incubazione per 24 ore a 37°C, e risospendendo in 1 ml di acqua le cellule, che sono state poi opportunamente diluite al fine di ottenere una torbidità di 0,5 McFarland. Dopo una prima diluizione 1:200 in Mueller-Hinton Broth (MHB) ed una successiva 1:20 in acqua, 10 µl da quest'ultima sono stati posti in pozzetti a fondo concavo di piastre da microtitolazione e portati al volume finale di 100 µl con le concentrazioni desiderate del peptide saggiato. Le piastre sono state quindi incubate per 5 ore a 37°C. Come controllo di crescita è stato utilizzato lo stesso inoculo cellulare in acqua in assenza di peptide. Dopo il periodo di incubazione, le sospensioni batteriche sono state seminate su piastre di MHA e, dopo 24-48 ore di incubazione a 37°C, il numero di UFC è stato determinato utilizzando lo strumento aCOLyte Colony Counter (PBI International). Ogni saggio è stato eseguito in triplo a scopo statistico. Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate rapportando il numero di UFC su MHA in presenza e in assenza del peptide; la significatività statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo è stata valutata mediante test *t* di Student ed i valori di EC₅₀ sono stati calcolati mediante analisi di regressione non lineare utilizzando il programma GraphPad Prism 4.01 (San Diego, CA USA).

3.2 Valutazione dell'inibizione della formazione di biofilm di *E.coli* ESBL dopo trattamento con KP e altri peptidi anticorpali

È stata valutata la capacità dei ceppi batterici di produrre biofilm in presenza di peptidi anticorpali. Per la conduzione del saggio, i ceppi sono stati fatti crescere a 37°C per 24 ore su MHA, 2-3 colonie sono state prelevate, risospese in 5 ml di Tryptic Soy Broth (TSB) ed incubate a 37°C a 150 rpm per una notte. Al termine del periodo di incubazione le sospensioni batteriche sono state opportunamente diluite al fine di ottenere allo spettrofotometro un OD₅₃₀ di 0.15. 200 µl di ciascuna di queste sospensioni

sono stati posti in doppio in piastra da 96-pozzetti a fondo piatto e incubati a 37°C per 90 minuti. Trascorso il tempo di incubazione, le cellule di *E. coli* non adese al fondo dei pozzetti sono state rimosse mediante lavaggio con 1x PBS, mentre il biofilm in formazione è stato trattato o meno con ogni peptide per 5 h a 37°C. Partendo da una concentrazione di 100 µg/ml, ogni peptide è stato saggiato a diverse concentrazioni scalari al fine di determinare per ciascun ceppo il valore di EC₅₀, cioè la concentrazione di peptide in grado di ridurre del 50% la formazione di biofilm. Trascorso il periodo di incubazione e dopo opportuni lavaggi, 200 µl di TSB sono stati aggiunti a tutti i pozzetti e la piastra è stata incubata a 37°C per una notte. La percentuale di biofilm formato è stata poi misurata quantitativamente mediante la colorazione CV seguendo lo stesso protocollo precedentemente descritto per il biofilm di *Candida* spp.

3.3 Valutazione mediante microscopia confocale della vitalità del biofilm di ceppi di *E. coli* ESβL dopo trattamento con il peptide K10T-TT

Per riprodurre lo scenario di una contaminazione da biofilm batterico di superfici di lavoro negli stabilimenti di macellazione sono state utilizzate delle piastre di acciaio come supporto di crescita di biofilm dei tre ceppi di *E. coli* ESβL (AS3, AS63, CS160) e del ceppo di riferimento *E. coli* ATCC 25922. Per la preparazione dell'inoculo, per ogni ceppo è stata preparata una coltura dopo incubazione per una notte in TSB (Sigma-Aldrich) a 37°C, diluendo poi la sospensione batterica in terreno fresco sino a raggiungere una torbidità di 0,5 McFarland. Le piastre di acciaio (1 cm² × 0,1 cm), precedentemente sterilizzate, sono state incubate per 24 h a 37°C in 600 µl di inoculo. Dopo un lavaggio in acqua, i dischi sono stati trattati con K10T-TT alla concentrazione di 50 µg/ml in 600 µl di acqua per 24 h a 37°C. Come controlli di crescita sono state utilizzate piastre non trattate, incubate in acqua nelle stesse condizioni. Le piastre di

acciaio sono state quindi colorate con un kit per la rivelazione della vitalità di cellule in biofilm (FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit, Invitrogen, Paisley, UK), secondo il protocollo suggerito dal produttore. Il kit è basato sui coloranti fluorescenti Syto 9, che colora in verde le cellule vive, e ioduro di propidio, che penetra nelle cellule morte colorandole di rosso. Dopo colorazione, ogni piastra è stata posizionata in opportune celle per l'osservazione al microscopio confocale a scansione laser LSM 510 Meta scan, integrato con un microscopio invertito Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Jena, Germania), usando una lente a immersione d'olio $40 \times \text{NA}1.3$. Per ogni campione sono stati scansionati quattro campi casuali e le immagini acquisite sono state elaborate e ricostruite tridimensionalmente utilizzando il software del microscopio (modulo Axiovision all'interno della versione 4D 4.5, Carl Zeiss, Jena, Germania). La percentuale di cellule morte in ogni campione è stata calcolata come rapporto tra fluorescenza rossa e fluorescenza totale (verde e rossa), determinato con il software Imaris 7.2 (Bitplane Inc., St. Paul, MN, USA).

RISULTATI

1. Attività antifungina *in vitro* di KP nei confronti di *Candida* spp.

L'attività antifungina *in vitro* del peptide KP è stata valutata mediante saggi di UFC utilizzando concentrazioni scalari del peptide. È stato osservato che KP alle concentrazioni di 100 µg/ml e 10 µg/ml mostrava il 100% di attività per tutti i ceppi, ad eccezione dei mutanti di *C. glabrata* SFY116, SFY115, SFY93 e SFY105 per i quali alla concentrazione di 10 µg/ml del peptide è stata osservata un'inibizione leggermente inferiore, del 98.88%, 98.86%, 95.97% e 96.71%, rispettivamente. L'attività antifungina di KP è stata quindi valutata per tutti i ceppi utilizzando concentrazioni scalari da 5 µg/ml fino a 0.2 µg/ml. I risultati ottenuti hanno permesso di calcolare, mediante analisi di regressione non lineare utilizzando il programma GraphPad Prism, il valore di EC₅₀ di KP, espresso in mol/L, per ciascun ceppo saggiato (**Tabella 4**), corrispondente alla concentrazione alla quale il peptide manifesta il 50% della sua attività.

Ceppo		EC ₅₀ mol/L	Range di confidenza 95%	
<i>C. glabrata</i>				
DSY562	1	1,420 x 10 ⁻⁶	1,251 x 10 ⁻⁶	1,612 x 10 ⁻⁶
DSY565	2	1,377 x 10 ⁻⁶	1,210 x 10 ⁻⁶	1,567 x 10 ⁻⁶
SFY116	3	1,417 x 10 ⁻⁶	1,263 x 10 ⁻⁶	1,589 x 10 ⁻⁶
SFY115	4	1,248 x 10 ⁻⁶	1,058 x 10 ⁻⁶	1,475 x 10 ⁻⁶
SFY93	9	1,342 x 10 ⁻⁶	1,231 x 10 ⁻⁶	1,464 x 10 ⁻⁶
SFY105	10	1,102 x 10 ⁻⁶	1,012 x 10 ⁻⁶	1,200 x 10 ⁻⁶
<i>C. albicans</i>				
DSY544	5	3,765 x 10 ⁻⁷	2,978 x 10 ⁻⁷	4,761 x 10 ⁻⁷
DSY775	6	4,046 x 10 ⁻⁷	3,855 x 10 ⁻⁷	4,247 x 10 ⁻⁷
DSY347	7	3,075 x 10 ⁻⁷	2,695 x 10 ⁻⁷	3,506 x 10 ⁻⁷
DSY289	8	5,005 x 10 ⁻⁷	4,428 x 10 ⁻⁷	5,658 x 10 ⁻⁷
<i>C. orthopsilosis</i>				
CO681	11	6,339 x 10 ⁻⁷	5,874 x 10 ⁻⁷	6,840 x 10 ⁻⁷
CO686	12	3,498 x 10 ⁻⁷	3,015 x 10 ⁻⁷	4,059 x 10 ⁻⁷

Tabella 4. Valori di EC₅₀ di KP nei confronti di cellule planctoniche di *Candida* spp.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che KP esplica la sua attività fungicida a concentrazioni nell'ordine del micromolare per *C. glabrata* e inferiori di circa 10 volte per *C. albicans* e *C. orthopsilosis*. In particolare *C. orthopsilosis* resistente a voriconazolo e fluconazolo è risultata essere particolarmente sensibile all'azione del peptide. Importante notare che tra i ceppi della stessa specie non sono state trovate significative differenze tra gli isolati sensibili e i mutanti resistenti, suggerendo che KP agisca con un meccanismo d'azione diverso da quello degli azoli.

2. Attività fungicida *in vitro* del peptide KP nei confronti di *Candida* spp. nel tempo

La cinetica di uccisione nel tempo dei ceppi selezionati da parte di KP è stata valutata mediante saggi di UFC dopo 30 minuti, 1, 2, 4 e 6 ore di incubazione in presenza di una concentrazione di KP pari alla minima concentrazione fungicida (MCF), stimata per ogni singolo ceppo in base ai risultati ottenuti dai saggi di UFC per il calcolo dell'EC₅₀. Le curve di *time-killing* ottenute nei diversi tempi di incubazione dei ceppi di *C. albicans* con KP alla MCF di 3 µg/ml dimostrano una rapida attività fungicida del peptide, con uccisione delle cellule dell'inoculo maggiore dell'85% per tutti i ceppi dopo 30 minuti di incubazione (**Figura 15**).

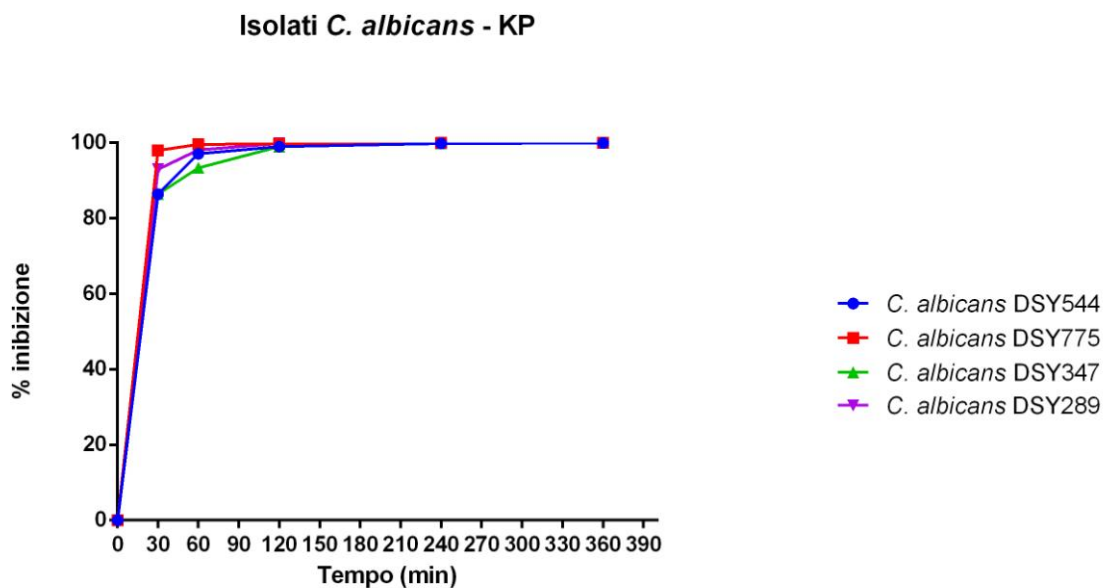


Figura 15. Cinetica di uccisione nel tempo (*time-killing*) di KP nei confronti dei ceppi di *C. albicans* selezionati. Percentuale di uccisione pari all'86,40% (*C. albicans* DSY544), 98% (*C. albicans* DSY775), 86,42% (*C. albicans* DSY347) e 92,98% (*C. albicans* DSY289) dopo incubazione di 30 minuti in presenza di KP alla MCF.

Le curve di *time-killing* ottenute nei diversi tempi di incubazione dei ceppi di *C. glabrata* con KP alla MCF di 10 µg/ml, ad eccezione del ceppo DSY562 per il quale la MCF del peptide è pari a 20 µg/ml, dimostrano un'attività fungicida del peptide ridotta rispetto ai ceppi di *C. albicans* e di *C. orthopsilosis*, ma comunque elevata, con un'uccisione delle cellule dell'inoculo maggiore del 50% per tutti i ceppi dopo 30 minuti di incubazione, ad eccezione del ceppo SFY93 con una percentuale di uccisione di circa il 40% (**Figura 16**).

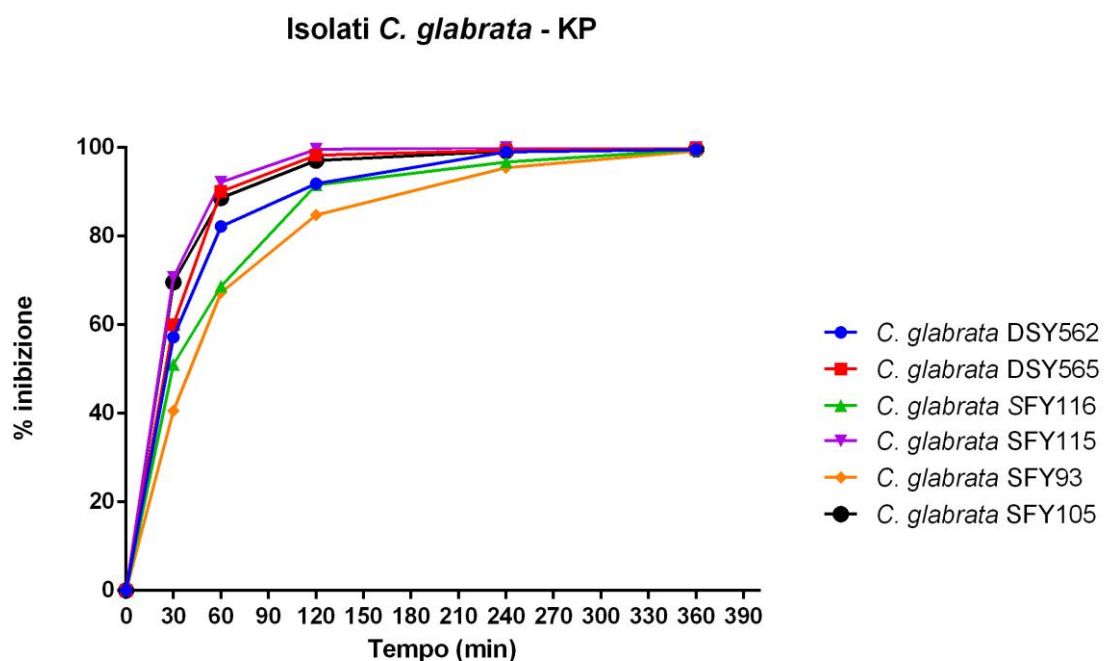


Figura 16. Cinetica di uccisione nel tempo (*time-killing*) di KP nei confronti dei ceppi di *C. glabrata* selezionati. Percentuale di uccisione pari al 57.19% (*C. glabrata* DSY562), 60% (*C. glabrata* DSY565), 51% (*C. glabrata* SFY116), 70.70% (*C. glabrata* SFY115), 40.59% (*C. glabrata* SFY93) e 69.62% (*C. glabrata* SFY105) dopo incubazione di 30 minuti in presenza di KP alla MCF.

Le curve di *time-killing* ottenute nei diversi tempi di incubazione dei ceppi di *C. orthopsilosis* con KP alla MCF di 4 µg/ml per il ceppo CO681 e di 3 µg/ml per il ceppo CO686 dimostrano un'attività fungicida del peptide elevata, pari all'89,57% ed al

78,17% nei confronti dei ceppi CO681 e CO686, rispettivamente, dopo 30 minuti di incubazione (**Figura 17**).

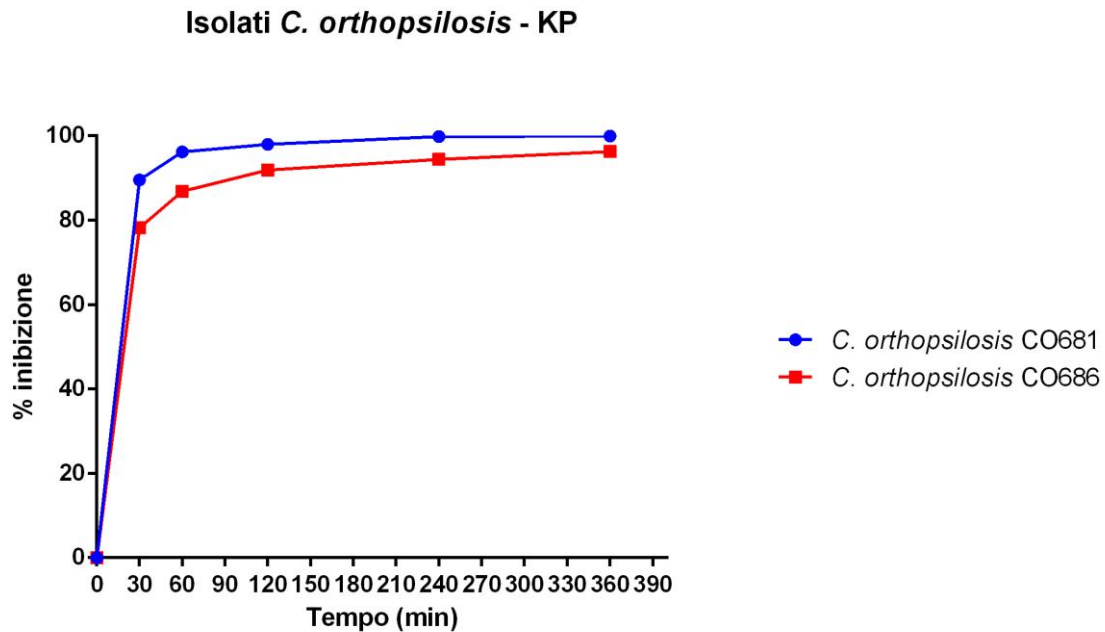


Figura 17. Cinetica di uccisione nel tempo (*time-killing*) di KP nei confronti dei ceppi di *C. orthopsilosis* selezionati.

3. Studio del meccanismo con cui KP esplica la sua attività antifungina nei confronti di *C. albicans* DSY544 mediante microscopia confocale

Mediante l'impiego della microscopia confocale è stato possibile valutare il meccanismo attraverso cui KP esplica la sua attività antifungina durante le prime ore dopo trattamento delle cellule di *C. albicans* DSY544. Venti μ l di sospensione cellulare sono stati posti su apposito vetrino e, dopo aver permesso l'adesione delle cellule fungine, è stata scelta e tenuta fissa un'area del vetrino per permettere la scansione delle

immagini in diversi tempi, in particolare al tempo 0, in assenza del peptide, e dopo 10, 20, 30, 90 e 120 minuti di incubazione con 100 µg/ml di KP-FITC (**Figura 18**).

I risultati preliminari qualitativi acquisiti hanno consentito di osservare che KP, durante i primi 20 minuti di trattamento, sembra legarsi ed accumularsi sulla parete delle cellule trattate.

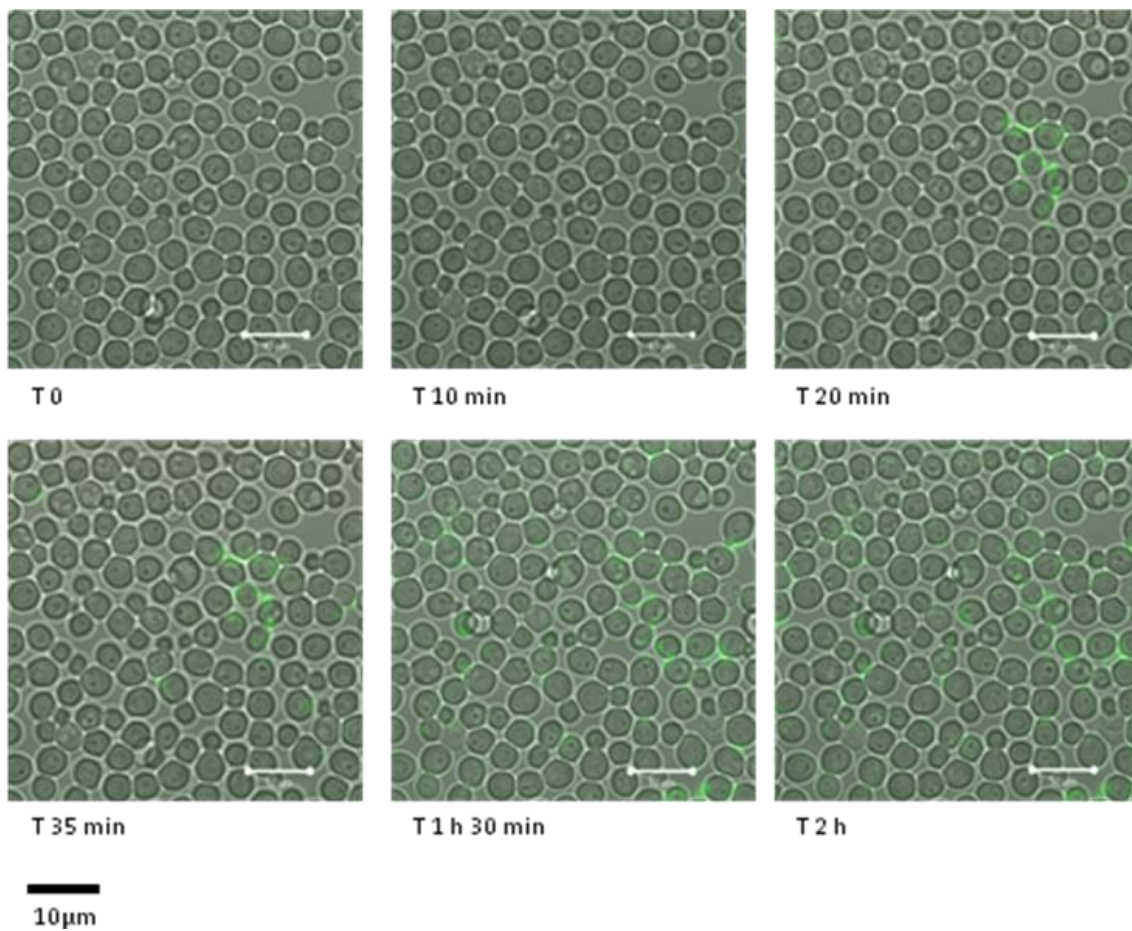


Figura 18. Valutazione dell'attività antifungina di KP nei confronti di *C. albicans* D5Y544 mediante microscopia confocale.

4. Inibizione della formazione di biofilm da parte di *Candida* spp. dopo trattamento con KP

Una volta valutata l'attività antifungina di KP nei confronti delle cellule planctoniche di *Candida* spp, con la definizione del valore di EC₅₀ per ciascun ceppo, è stata valutata anche l'eventuale attività del peptide nei confronti delle cellule che costituiscono il biofilm per i ceppi di *C. glabrata* DSY562, DSY565 e SFY116 e di *C. orthopsilosis* CO681. Partendo da 100 µg/ml, sono state utilizzate concentrazioni scalari di KP ed è stata osservata una riduzione della formazione del biofilm in modo dose-dipendente (**Figura 19**).

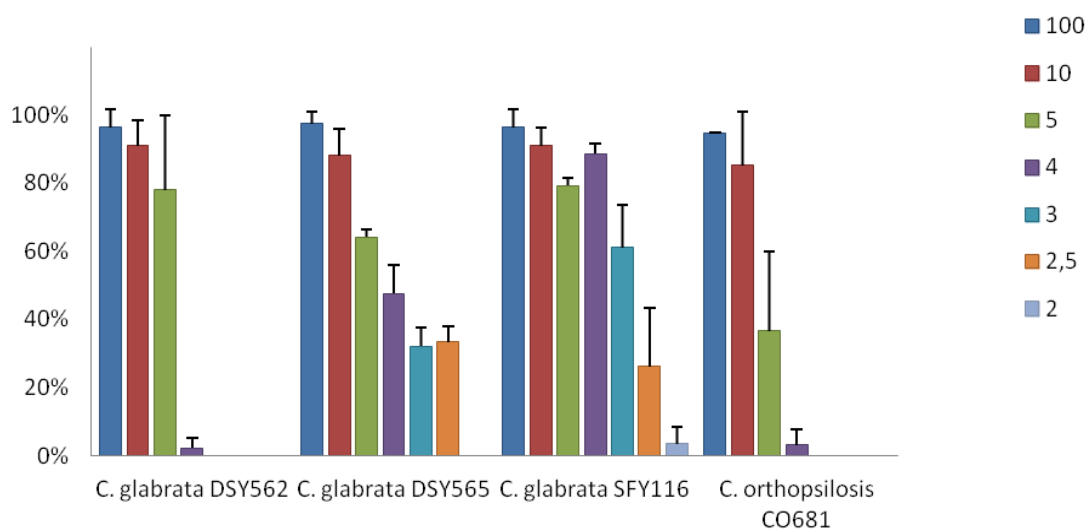


Figura 19. Percentuali di inibizione della formazione di biofilm di *Candida* spp. dopo trattamento con KP.

Per tutti i ceppi oggetto di studio è stata osservata una riduzione della formazione di biofilm dipendente dalla concentrazione di KP utilizzata. In particolare, i biofilm formati dai ceppi DSY565 e SFY116 di *C. glabrata* hanno mostrato una sensibilità anche alle più basse concentrazioni di peptide utilizzate (2,5 e 2 µg/ml). Sono stati calcolati i valori di EC₅₀ di KP anche nei confronti delle cellule del biofilm di ciascun

ceppo, indicativi della concentrazione di peptide necessaria ad inibire il 50% della crescita del biofilm (**Tabella 5**).

Ceppo		EC ₅₀ mol/L	Range di confidenza 95%	
<i>C. glabrata</i>				
DSY562	1	4,740 x 10 ⁻⁶	4,398 x 10 ⁻⁶	5,107 x 10 ⁻⁶
DSY565	2	4,060 x 10 ⁻⁶	3,377 x 10 ⁻⁶	4,883 x 10 ⁻⁶
SFY116	3	2,905 x 10 ⁻⁶	2,586 x 10 ⁻⁶	3,265 x 10 ⁻⁶
<i>C. orthopsilosis</i>				
CO681	11	6,126 x 10 ⁻⁶	4,600 x 10 ⁻⁶	8,157 x 10 ⁻⁶

Tabella 5. Attività anti-biofilm *in vitro*, espressa in EC₅₀, di KP nei confronti del biofilm in formazione di ceppi selezionati di *Candida* spp.

I risultati ottenuti mostrano che KP presenta una buona attività anti-biofilm, nei confronti dei ceppi saggiati, nell'ordine del micromolare, con una attività leggermente migliore nei confronti dei ceppi resistenti di *C. glabrata* rispetto al ceppo sensibile. L'attività del peptide nei confronti del biofilm è risultata di poco inferiore rispetto all'attività nei confronti delle cellule planctoniche, confermando le caratteristiche di resistenza conferite al patogeno da questa organizzazione cellulare.

5. Induzione di apoptosi in cellule di *Candida* spp. dopo trattamento con KP

Al fine di caratterizzare gli eventi cellulari indotti da KP è stata valutata la sua eventuale capacità di indurre apoptosi nelle cellule trattate. Il saggio è stato eseguito per ogni specie su uno dei ceppi resistenti, comparativamente ai controlli sensibili disponibili. Sono stati quindi selezionati due ceppi di *C. albicans* (DSY544 e DSY775), tre di *C. glabrata* (DSY562, DSY565 e SFY116) ed uno di *C. orthopsilosis* (CO681). Per ciascun ceppo è stata utilizzata una concentrazione del peptide pari al doppio del valore di EC₅₀. Di seguito, sono riportati i risultati, corrispondenti alla media dei saggi

effettuati, ottenuti dopo 30 e 120 minuti di trattamento con KP per i ceppi di *C. glabrata*, mentre per i ceppi di *C. albicans* e *C. orthopsilosis* sono riportati solo i risultati ottenuti dopo un trattamento di 30 minuti dal momento che a questo tempo più del 35% delle cellule risultava già in apoptosi (**Tabella 6 e Figura 20**).

CEPPO	KP mol/L	30 minuti Percentuale di cellule in apoptosi	120 minuti
<i>C. albicans</i> DSY544 sensibile	0.75×10^{-6}	35.93 ± 9.1	
<i>C. albicans</i> DSY775 resistente	0.81×10^{-6}	43.59 ± 12.29	
<i>C. glabrata</i> DSY562 sensibile	2.84×10^{-6}	19.42 ± 3.48	46.38 ± 5.39
<i>C. glabrata</i> DSY565 resistente	2.75×10^{-6}	27.63 ± 3.41	65.42 ± 4.32
<i>C. glabrata</i> SFY116 mutante resistente	2.83×10^{-6}	21.07 ± 7.52	60.26 ± 0.01
<i>C. orthopsilosis</i> CO681 resistente	1.27×10^{-6}	90.24 ± 2.45	

Tabella 6. Profilo apoptotico dei ceppi di *Candida* spp.

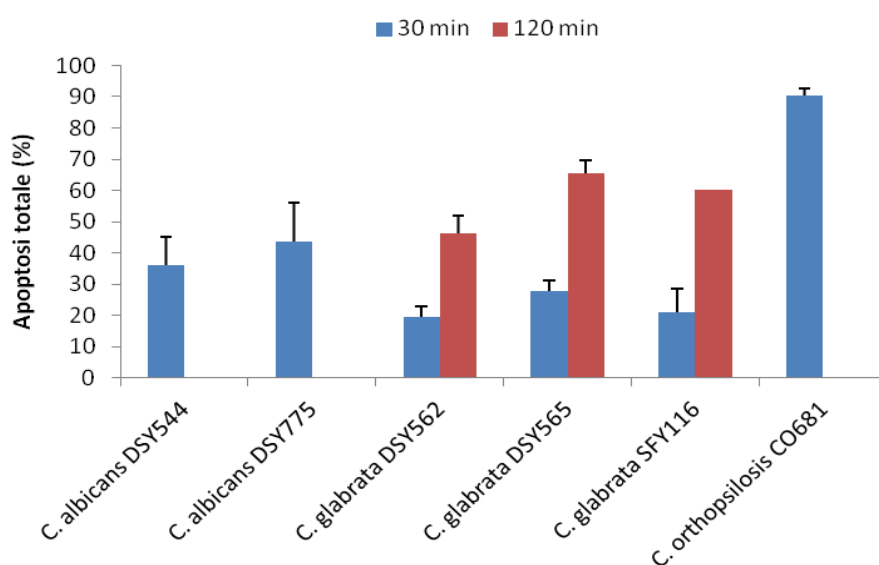


Figura 20. Percentuale di cellule in apoptosi dopo 30 e 120 minuti di trattamento con KP per i ceppi di *C. glabrata* e dopo 30 minuti per i ceppi di *C. albicans* e *C. orthopsilosis*.

6. Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di *Candida* spp. dopo trattamento con KP

Mediante saggi con diclorofluoresceina è stata misurata la produzione di ROS da parte delle cellule di *Candida* spp, in particolare *C. albicans* DSY544 e DSY775, *C. glabrata* DSY562, DSY565 e SFY116 e *C. orthopsilosis* CO681. Per la conduzione del saggio è stata utilizzata una concentrazione di KP (A10S) pari a 20 x EC₅₀ per ciascun ceppo, mentre come controllo positivo è stata usata caspofungina alla concentrazione di 20 µg/ml e ciascuna condizione, compreso il controllo, è stata valutata in assenza (-) e in presenza (+) di acido ascorbico. I risultati ottenuti sono mostrati nelle figure successive (**Figure 21-26**). Per tutti i ceppi è stato osservato un incremento della produzione di ROS all'aumentare del tempo di incubazione con KP ed il dato più significativo è stato ottenuto per i ceppi di *C. albicans*, in cui nelle cellule trattate con KP è stata osservata una produzione di ROS maggiore rispetto a quelle trattate con il controllo positivo caspofungina. In tutte le condizioni, la co-incubazione con l'agente antiossidante acido ascorbico ha permesso di prevenire la formazione dei ROS.

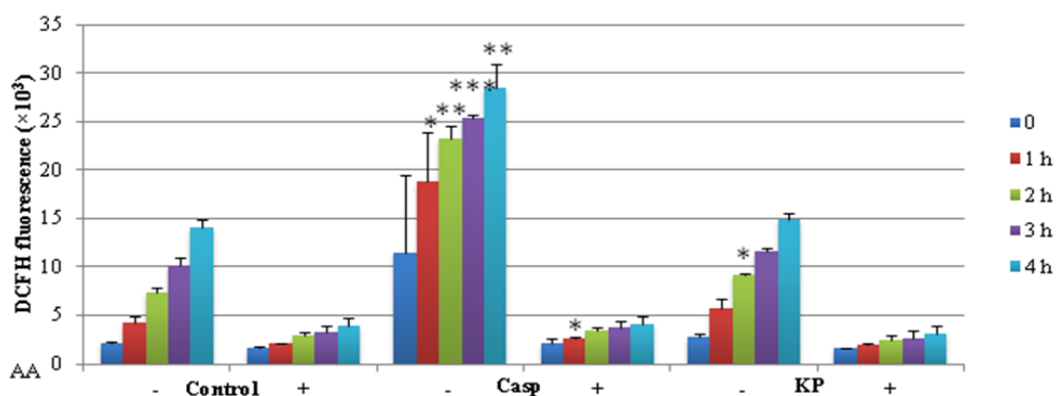


Figura 21. Produzione di ROS da parte di cellule di *C. glabrata* DSY562 dopo trattamento con KP (* = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001).

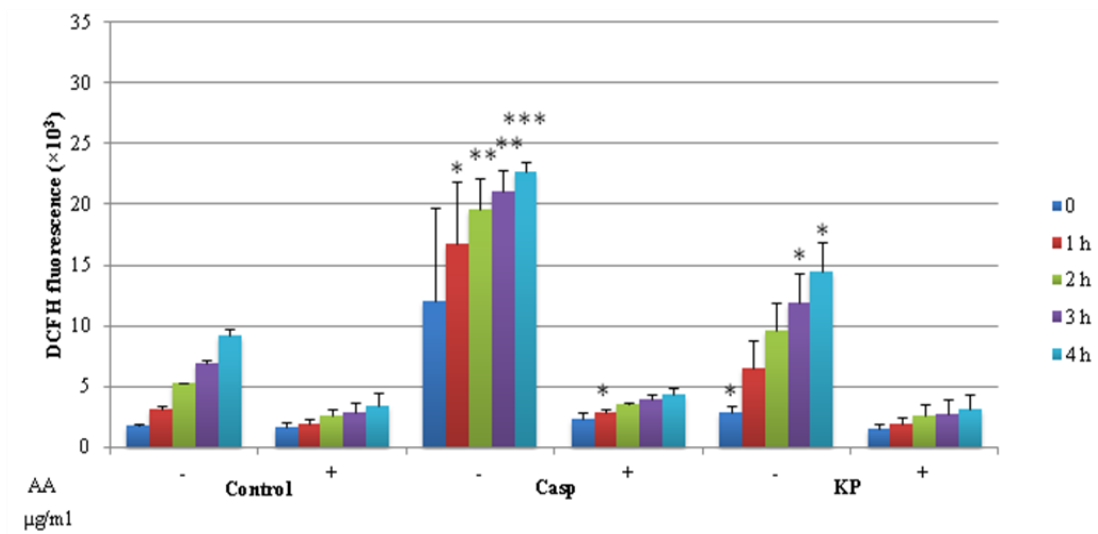


Figura 22. Produzione di ROS da parte di cellule di *C. glabrata* DSY565 dopo trattamento con KP (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

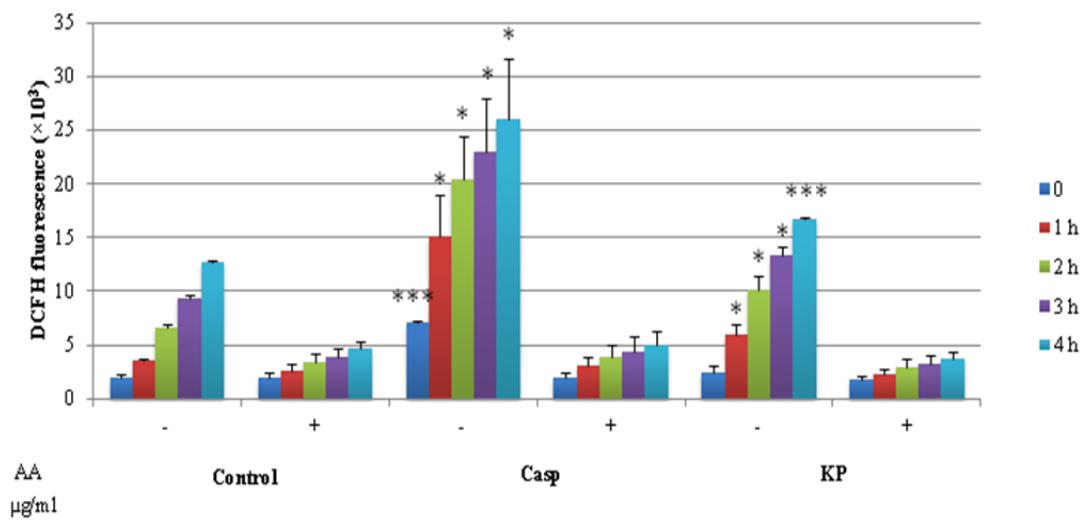


Figura 23. Produzione di ROS da parte di cellule di *C. glabrata* SFY116 dopo trattamento con KP (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

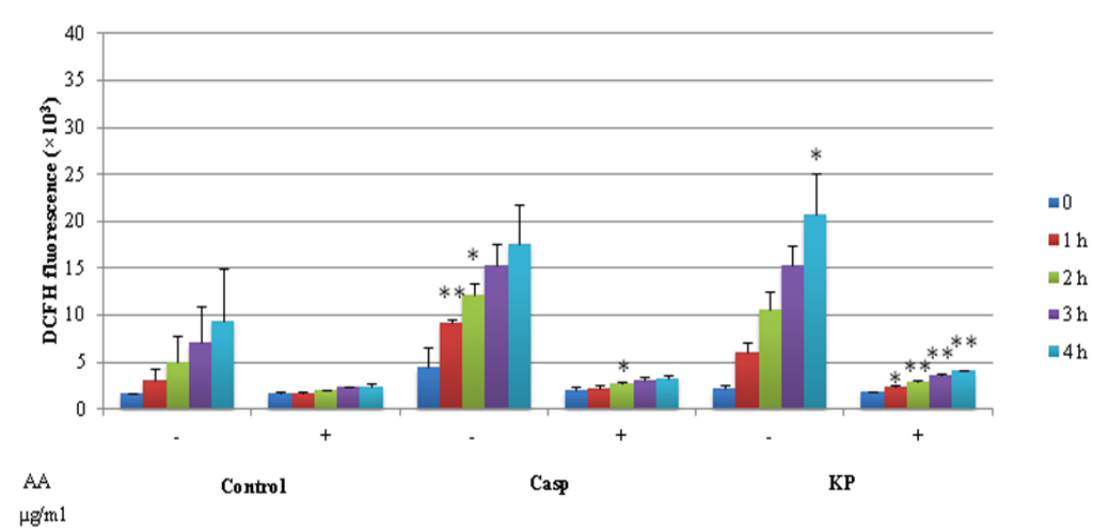


Figura 24. Produzione di ROS da parte di cellule di *C. albicans* DSY544 dopo trattamento con KP (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

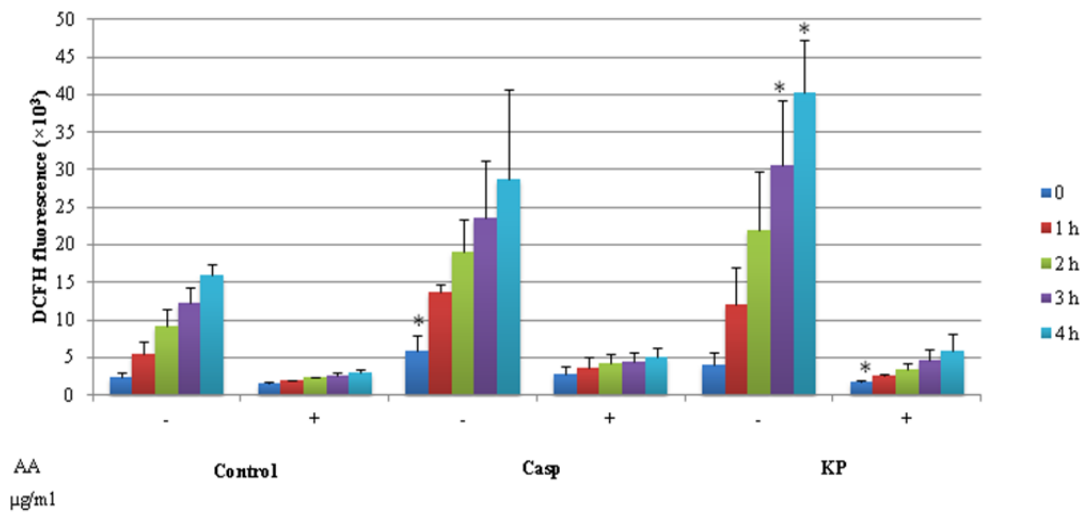


Figura 25. Produzione di ROS da parte di cellule di *C. albicans* DSY775 dopo trattamento con KP (* = $p < 0.05$).

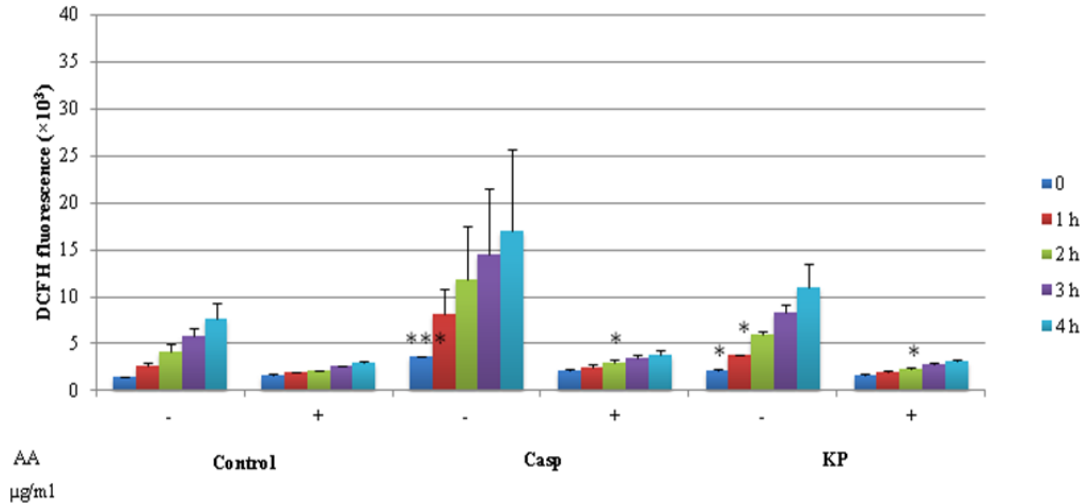


Figura 26. Produzione di ROS da parte di cellule di *C. orthopsilosis* CO681 dopo trattamento con KP (* = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$).

7. Attività antibatterica *in vitro* di KP e di altri peptidi anticorpali nei confronti di ceppi di *E. coli* ES β L

Saggi di unità formanti colonia (UFC) hanno permesso di determinare i valori di EC₅₀ di KP e di altri peptidi di derivazione anticorpale nei confronti delle cellule planctoniche di ciascun ceppo di *E. coli* produttore di β -lattamasi a spettro esteso oggetto di studio. In particolare, a scopo comparativo sono stati selezionati due ceppi resistenti ai β -lattamici e moderati produttori di biofilm, un ceppo resistente e forte produttore di biofilm ed un ceppo di controllo sensibile ai β -lattamici e debole produttore di biofilm.

I risultati ottenuti sono elencati in **Tabella 7**.

Ceppi <i>E. coli</i>	EC ₅₀ [mol/L] × 10 ⁻⁶ (Intervalli di confidenza 95%)				
	KP (AKVTMTCSAS; P.M. 998.17)	K10S (KKVTMTCSAS; P.M. 1055.27)	K10T-TT (KKVTMTCTAT; P.M. 1082.54)	K10S-SS (KKVSMSCSAS; P.M. 1026.47)	A10K-FF (AQVSLTCFFK; P.M. 1143.35)
ATCC 25922	0.309 (0.233-0.375)	0.347 (0.282-0.427)	0.394 (0.312-0.497)	0.195 (0.183-0.209)	0.249 (0.236-0.261)
ESBL AS3	0.848 (0.827-0.870)	0.139 (0.133-0.146)	0.385 (0.367-0.405)	0.587 (0.540-0.639)	1.339 (1.155-1.553)
ESBL AS63	0.751 (0.732-0.770)	0.051 (0.033-0.079)	0.475 (0.427-0.529)	0.203 (0.201-0.205)	4.508 (4.446-4.570)
ESBL CS160	1.099 (1.059-1.142)	0.998 (0.724-1.377)	0.607 (0.488-0.756)	0.149 (0.137-0.162)	2.504 (1.984-3.160)

Tabella 7. Attività battericida *in vitro*, espressa in EC₅₀, di peptidi selezionati contro cellule planctoniche di *E. coli*.

I valori di EC₅₀ ottenuti dimostrano una buona attività battericida nell'ordine di 10⁻⁷ mol/L soprattutto del peptide K10T-TT. Inoltre, KP ha dimostrato di esplicare una maggiore attività per i ceppi batterici rispetto ai ceppi fungini, probabilmente riflettendo diversi meccanismi d'azione.

8. Inibizione della formazione di biofilm di ceppi di *E. coli* ESβL dopo trattamento con KP e altri peptidi anticorpali

Concentrazioni scalari di ciascun peptide sono state saggiate anche nei confronti del biofilm prodotto da *E. coli* in modo da ottenere i valori di EC₅₀ per ciascuno di essi (Tabella 8).

Nei confronti del biofilm formato dai ceppi batterici selezionati i peptidi saggiati hanno mostrato una riduzione dell'attività di circa 100 volte rispetto alle cellule planctoniche ma è stata comunque osservata una significativa riduzione della formazione del biofilm, soprattutto da parte del peptide K10T-TT.

Ceppi <i>E. coli</i>	EC ₅₀ [mol/L] × 10 ⁻⁶ (Intervalli di confidenza 95%)				
	KP (AKVTMTCSAS; P.M. 998.17)	K10S (KKVTMTCSAS; P.M. 1055.27)	K10T-TT (KKVTMTCTAT; P.M. 1082.54)	K10S-SS (KKVSMSCSAS; P.M. 1026.47)	A10K-FF (AQVSLTCFFK; P.M. 1143.35)
ATCC 25922	n. c.	n. c.	49.569 (31.491- 78.039)	89.442 (39.212- 204.00)	37.679 (8.763- 162.07)
ESBL AS3	n. c.	n. c.	13.792 (4.863- 39.093)	26.187 (5.615- 122.17)	29.107 (1.365- 620.63)
ESBL AS63	n. c.	n. c.	39.897 (53.171 – 299.3)	55.569 (9.346- 330.45)	41.055 (7.658- 220.14)
ESBL CS160	n. c.	n. c.	64.774 (37.052 – 113.25)	69.062 (51.205- 93.135)	46.093 (28.102 - 75.62)

n.c., non calcolabile

Tabella 8. Attività battericida *in vitro*, espressa in EC₅₀, di peptidi selezionati contro il biofilm formato da ceppi selezionati di *E. coli*.

Interessante notare che alcuni peptidi attivi nei confronti di cellule di *E. coli* in sospensione di *E. coli* (in particolare i peptidi KP e K10S, derivato da una singola sostituzione amminoacidica nella sequenza di KP) hanno dimostrato invece attività molto ridotta nei confronti del biofilm batterico. Questo diverso comportamento può essere legato al maggior numero di sostituzioni amminoacidiche in K10T-TT rispetto alla sequenza di KP che potrebbe determinare una differenza di cariche distribuite sulla catena peptidica e quindi una differente interazione del peptide con la matrice polisaccaridica del biofilm. In base a tali risultati, è stata presa in considerazione solo l'attività dei peptidi K10T-TT, K10S-SS e A10K-FF nei confronti dei ceppi di *E. coli* ATCC25922, AS3, AS63 e CS160 produttori di ESβL (**Figure 27-29**).

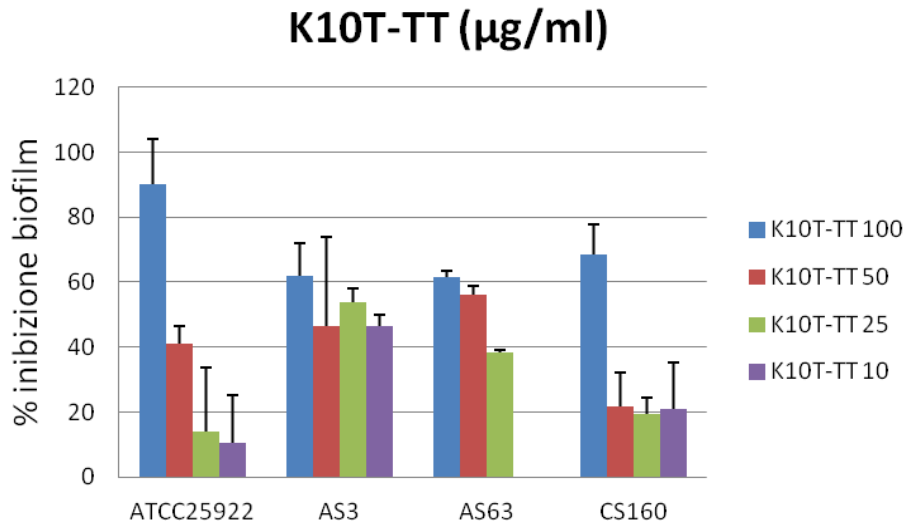


Figura 27. Percentuali di inibizione della formazione di biofilm da parte di ceppi selezionati di *E. coli* dopo trattamento con K10T-TT.

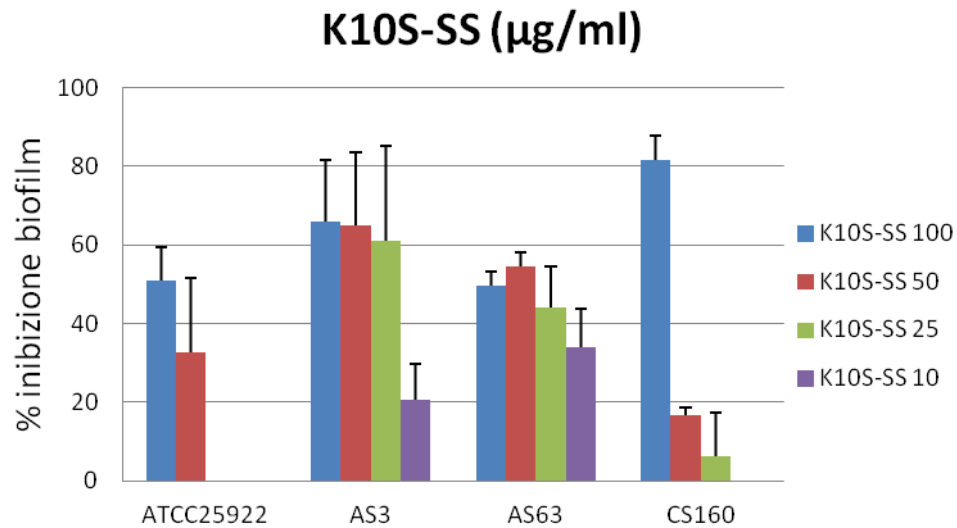


Figura 28. Percentuali di inibizione della formazione di biofilm da parte di ceppi selezionati di *E. coli* dopo trattamento con K10S-SS.

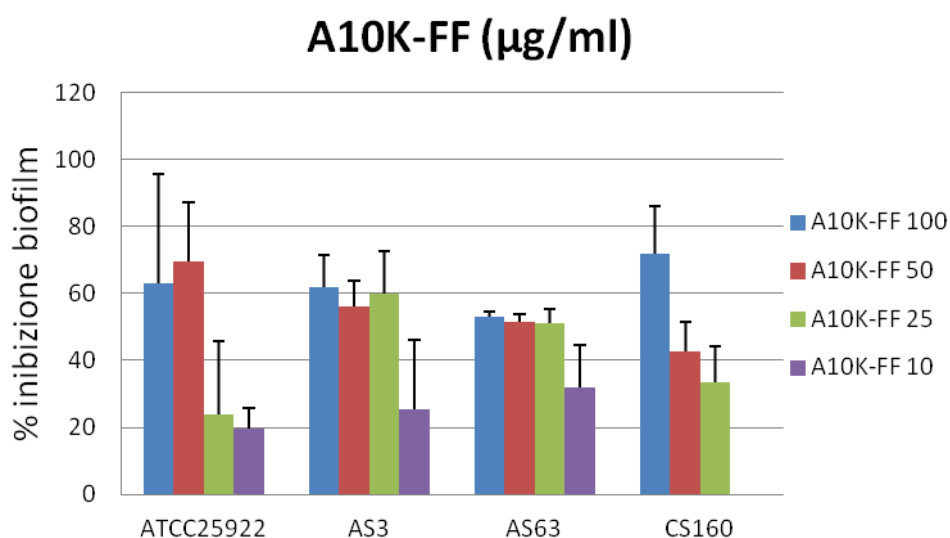


Figura 29. Percentuali di inibizione della formazione di biofilm da parte di ceppi selezionati di *E. coli* dopo trattamento con A10K-FF.

9. Vitalità del biofilm dei ceppi di *E. coli* ES β L dopo trattamento con il peptide K10T-TT

In base ai risultati ottenuti dalle precedenti valutazioni, si è deciso di proseguire gli studi sul peptide K10T-TT mediante l'impiego della microscopia confocale, che ha permesso di valutare la vitalità delle cellule all'interno di biofilm preformati su piastre di acciaio, dopo trattamento. Le osservazioni in microscopia confocale hanno permesso di costruire tridimensionalmente la struttura del biofilm formato da ciascun ceppo batterico oggetto di studio (**Figure 30-33**), in cui è evidente una riduzione del numero di cellule adese alla superficie della piastra di acciaio dopo trattamento con il peptide.

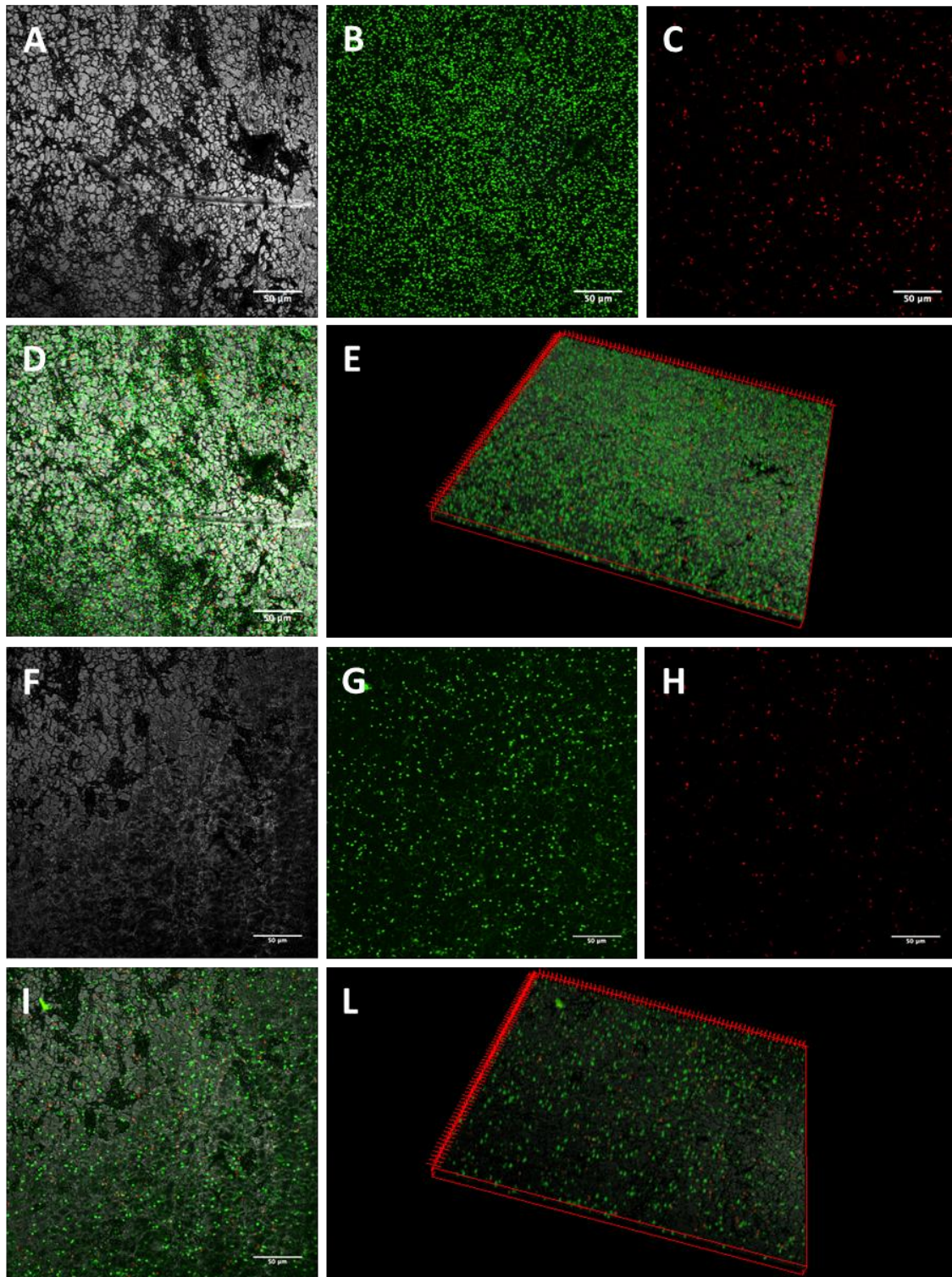


Figura 30. Immagini rappresentative ottenute mediante CLSM per il ceppo *E. coli* ATCC 25922 trattato con K10T-TT (F-L) e non trattato (A-E). In figura sono riportate immagini di sezioni delle piastre di acciaio (A, F), delle cellule vive (fluorescenza verde; B, G), delle cellule morte (fluorescenza rossa; C, H), sovrapposizione dei canali verde e rosso (D, I), ricostruzioni tridimensionali della serie lungo l'asse Z (E, L). Barre, 50 µm.

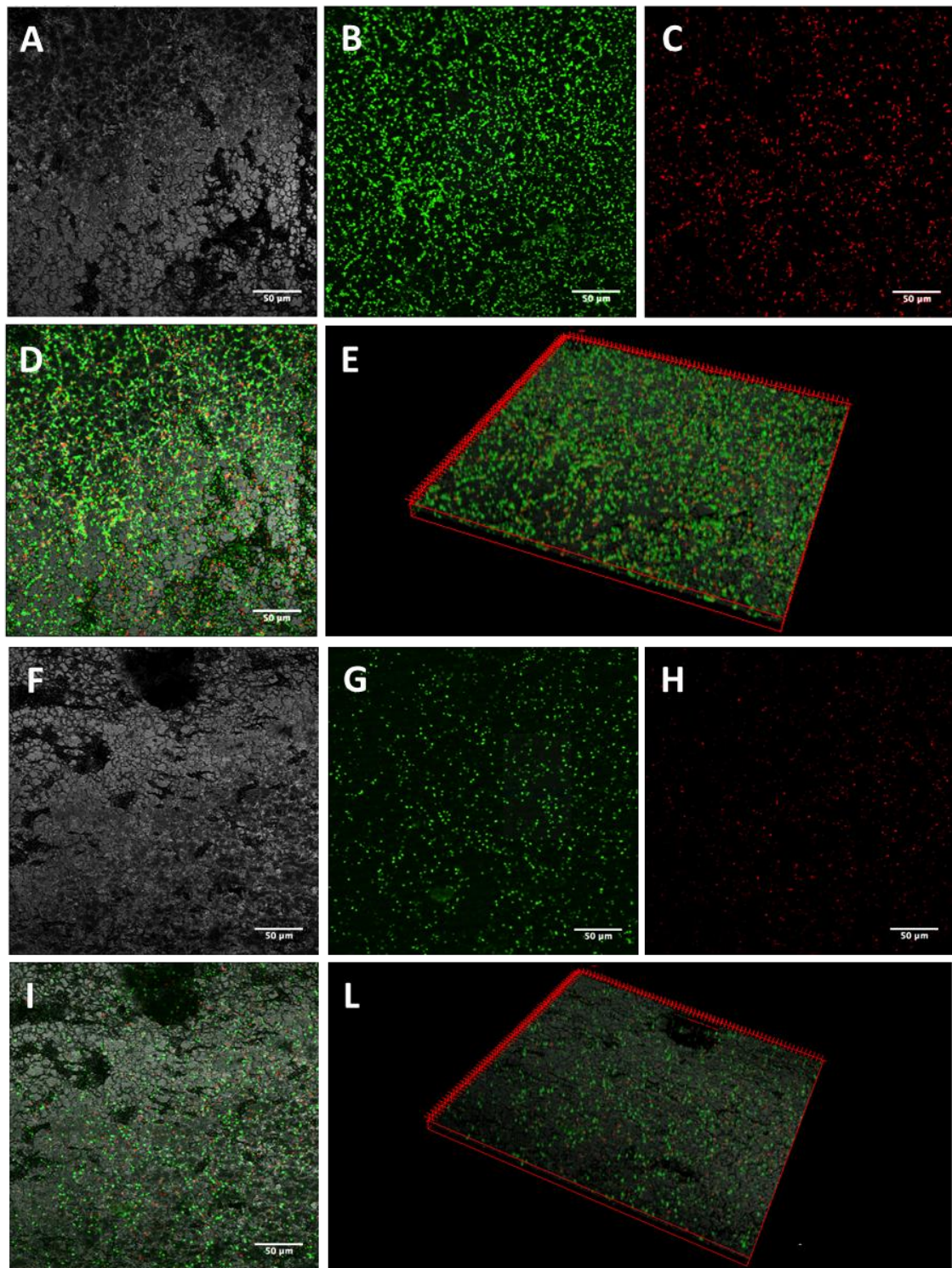


Figura 31. Immagini rappresentative ottenute mediante CLSM per il ceppo *E. coli* AS3 trattato con K10T-TT (F-L) e non trattato (A-E). In figura sono riportate immagini di sezioni delle piastre di acciaio (A, F), delle cellule vive (fluorescenza verde; B, G), delle cellule morte (fluorescenza rossa; C, H), sovrapposizione dei canali verde e rosso (D, I), ricostruzioni tridimensionali della serie lungo l'asse Z (E, L). Barre, 50 µm.

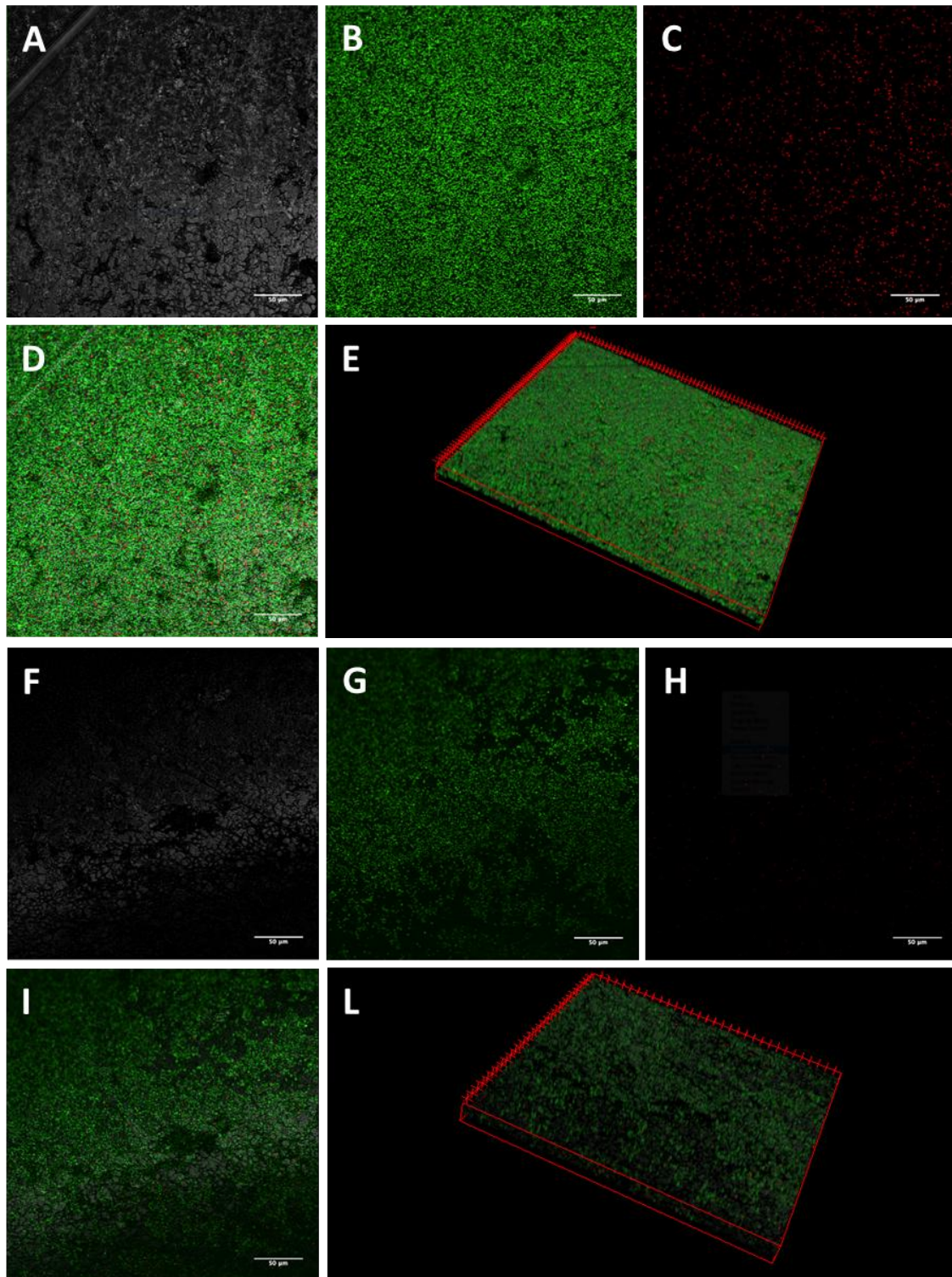


Figura 32. Immagini rappresentative ottenute mediante CLSM per il ceppo *E. coli* AS63 trattato con K10T-TT (F-L) e non trattato (A-E). In figura sono riportate immagini di sezioni delle piastre di acciaio (A, F), delle cellule vive (fluorescenza verde; B, G), delle cellule morte (fluorescenza rossa; C, H), sovrapposizione dei canali verde e rosso (D, I), ricostruzioni tridimensionali della serie lungo l'asse Z (E, L). Barre, 50 µm.

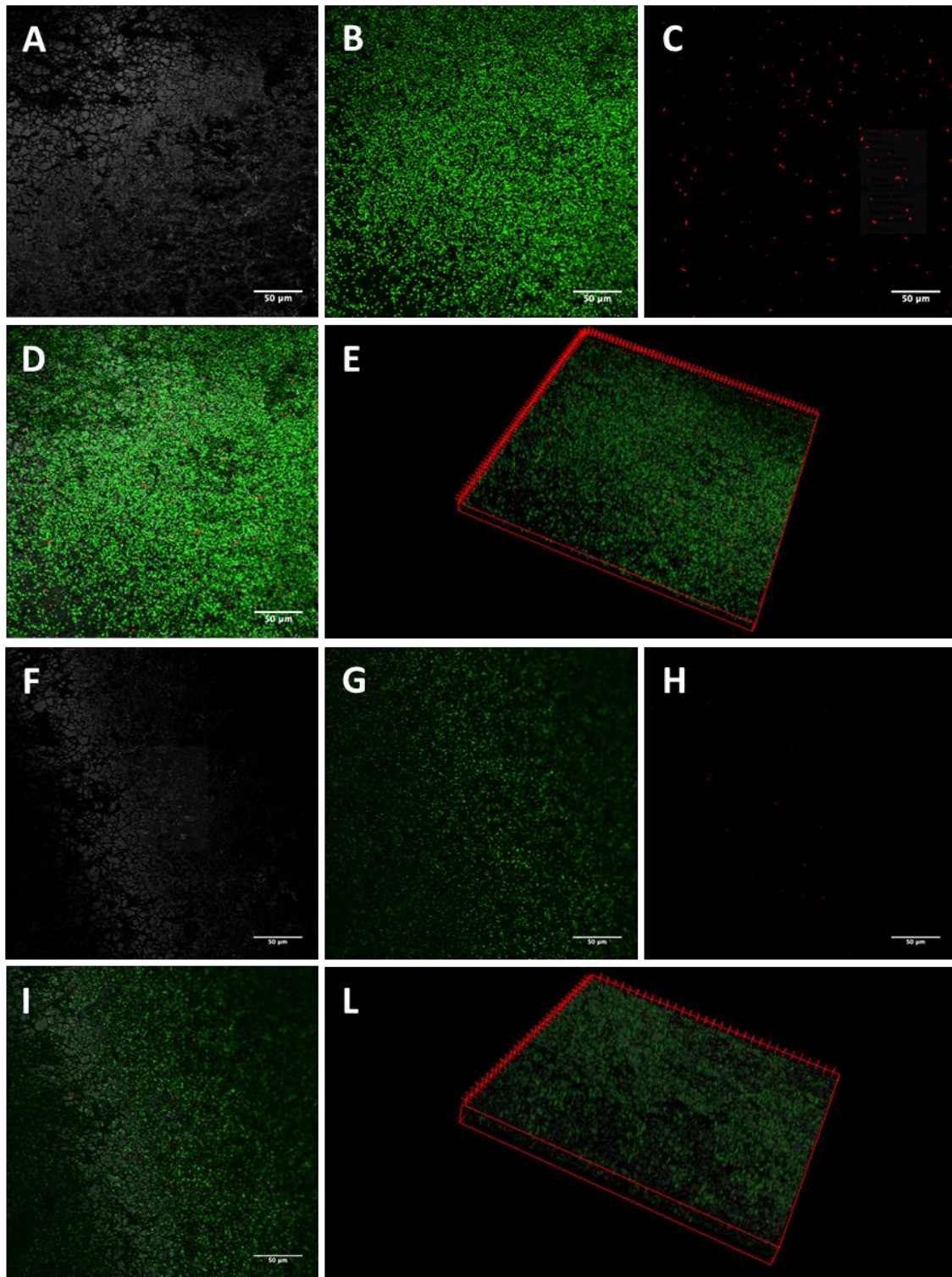


Figura 33. Immagini rappresentative ottenute mediante CLSM per il ceppo *E. coli* CS160 trattato con K10T-TT (F-L) e non trattato (A-E). In figura sono riportate immagini di sezioni delle piastre di acciaio (A, F), delle cellule vive (fluorescenza verde; B, G), delle cellule morte (fluorescenza rossa; C, H), sovrapposizione dei canali verde e rosso (D, I), ricostruzioni tridimensionali della serie lungo l'asse Z (E, L). Barre, 50 μ m.

Mediante software specifici è stata valutata l'intensità di fluorescenza relativa al numero di cellule vive e morte e l'analisi quantitativa di tale intensità ha permesso di rivelare una riduzione del numero delle cellule vitali, mentre il numero delle cellule morte ha mostrato variazioni non significative nei biofilm prima e dopo trattamento (Figura 34).

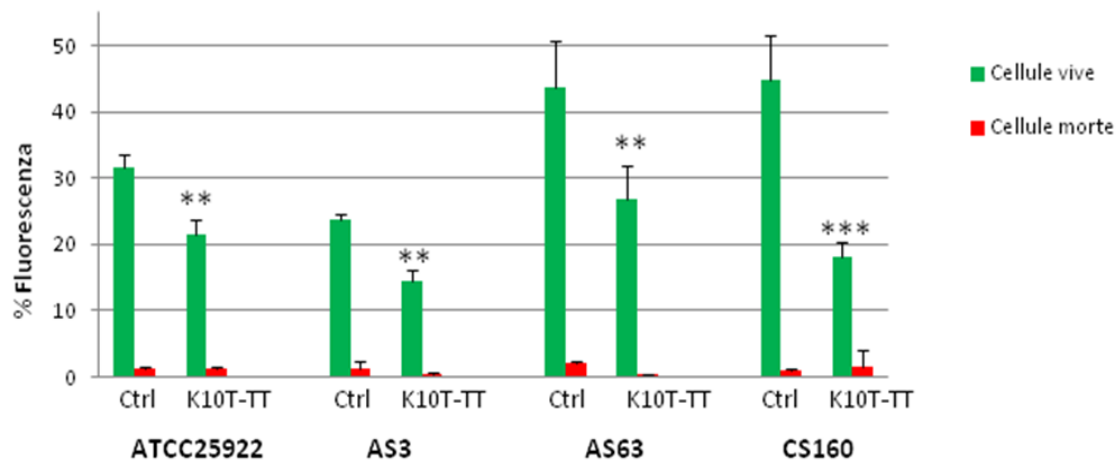


Figura 34. Percentuali di cellule vive e morte del biofilm di ceppi di *E. coli* sensibili o resistenti ai β -lattamici dopo trattamento con K10T-TT (** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

Il progetto di dottorato è stato finalizzato alla valutazione dell'attività antimicrobica che peptidi, derivati da sequenze di regioni costanti e variabili di anticorpi, esplicano nei confronti di alcune specie appartenenti al genere *Candida*, di isolamento clinico e resistenti agli azoli, e di alcuni ceppi di *E. coli* produttori di ES β L isolati da campioni alimentari e resistenti alle cefalosporine di III generazione. È stata valutata in particolar modo l'attività del peptide KP e di altri peptidi sintetizzati a partire dalla sua sequenza amminoacidica. I risultati ottenuti hanno dimostrato che KP è in grado di esplicare una significativa attività candidacida, a concentrazioni micromolari, nei confronti delle cellule in sospensione dei dodici ceppi di *Candida* spp. saggiati; tale attività si è anche dimostrata rapida, soprattutto nei confronti dei ceppi di *C. albicans* e *C. orthopsilosis*, e più lenta, ma comunque significativa, nei confronti dei ceppi di *C. glabrata*. L'osservazione al microscopio confocale delle cellule di *C. albicans* DSY544 trattate con KP fluoresceinato ha fornito dati qualitativi circa il possibile meccanismo d'azione di KP, che è in grado di legarsi alla parete fungina dopo soli 20 minuti di incubazione. Dei dodici ceppi fungini saggiati, ne sono stati selezionati sei, considerando per ogni specie 1 o 2 ceppi resistenti, comparativamente ai controlli sensibili disponibili; in particolare sono stati selezionati due ceppi di *C. albicans* (DSY544 e DSY775), tre di *C. glabrata* (DSY562, DSY565 e SFY116), e uno di *C. orthopsilosis* (CO681), per i quali sono stati studiati gli eventi cellulari indotti dal trattamento con KP. Per tutti i ceppi è stata osservata una mortalità dovuta ad eventi apoptotici precoci, dopo 30 minuti di incubazione con KP, con percentuali variabili: in particolare, del 90% per le cellule di *C. orthopsilosis*, resistenti a fluconazolo e

voriconazolo, e del 35% e 40% per i due ceppi di *C. albicans*, sensibile e resistente agli azoli, rispettivamente. Per le cellule di *C. glabrata* le percentuali erano leggermente inferiori dopo 30 minuti di trattamento, ma comunque superiori al 40% per il ceppo sensibile e 60% per i due ceppi resistenti agli azoli dopo 120 minuti. Dalla misurazione dei ROS intracellulari è emerso che le cellule fungine incubate in presenza di KP producevano ROS in quantità crescenti all'aumentare del tempo di incubazione. L'induzione di apoptosi e di produzione di ROS intracellulari da parte di cellule fungine trattate con KP, indipendentemente dalla loro sensibilità o resistenza agli azoli, fa presupporre che KP espliciti la sua attività antifungina mettendo in atto un meccanismo d'azione differente da quello degli azoli, motivo per cui potrebbe essere considerato come potenziale agente antifungino selettivo per le specie che hanno sviluppato resistenza nei confronti di tali farmaci. KP si è dimostrato attivo anche sulle cellule di *Candida* spp. che costituiscono il biofilm, dal momento che, rispetto al controllo, è stata osservata una diminuzione della produzione di biofilm dopo trattamento con KP per tutti i ceppi fungini oggetto di studio. Dai valori di EC₅₀ di KP per i ceppi selezionati si evince che soprattutto il biofilm prodotto da *C. glabrata* SFY116, caratterizzata da mutazione "*gain-of-function*" (GOF) e resistente agli azoli, è sensibile all'azione di KP, anche se questo manifesta la sua attività ad una concentrazione circa 10 volte superiore rispetto all'attività nei confronti delle cellule planctoniche, confermando la difficoltà del trattamento della complessa organizzazione cellulare del biofilm. KP e altri peptidi da esso derivati, in particolare K10S, K10T-TT, K10S-SS e A10K-FF, saggiate nei confronti di ceppi batterici di *E. coli* ESβL, hanno dimostrato di possedere buona attività antibatterica. I valori di EC₅₀ ottenuti dai saggi UFC dimostrano un'attività antibatterica, a concentrazioni micromolari, di tutti i peptidi saggiate nei confronti delle

cellule in sospensione dei ceppi batterici selezionati. Nei confronti del biofilm batterico è stata osservata una riduzione dell'attività antibatterica di circa 100 volte, per quasi tutti i peptidi. Confrontando i valori di EC_{50} dei peptidi saggiati, tutti i ceppi batterici hanno dimostrato di essere più sensibili al peptide K10T-TT, sia per le cellule planctoniche sia per il biofilm, a differenza di KP e di K10S per i quali non sono state rilevate significative concentrazioni inibenti la formazione del biofilm batterico per nessun ceppo. Questo effetto probabilmente è dovuto alla composizione amminoacidica del peptide K10T-TT, ottenuto da KP mediante diverse sostituzioni amminoacidiche che gli hanno probabilmente conferito una maggiore efficacia. In base ai risultati ottenuti si è deciso di proseguire gli studi sul peptide K10T-TT utilizzando un approccio di microscopia confocale per valutare la vitalità delle cellule all'interno di biofilm preformati dopo trattamento. Questi studi hanno confermato l'attività antibatterica esplicita da K10T-TT, dal momento che l'analisi quantitativa della fluorescenza emessa dalle cellule vive e morte ha rivelato una riduzione del numero delle cellule vitali dopo trattamento con il peptide, mentre è rimasto quasi invariato il numero delle cellule morte. Di conseguenza, la riduzione del numero totale di cellule è probabilmente da attribuire ad un distacco delle cellule uccise dopo trattamento.

I risultati ottenuti, sia nei confronti dei ceppi di *Candida* spp. che nei confronti di *E. coli* ESBL, rendono i peptidi saggiati potenziali agenti antimicrobici alternativi all'utilizzo dei farmaci convenzionali, antifungini e antibatterici.

Come ricordato precedentemente, questo progetto di Dottorato si è inserito in un filone di ricerca pluriennale, che ha riguardato lo studio di numerosi peptidi di derivazione anticorpale. Nel corso degli anni sono emersi dati sempre più convincenti

sulle svariate attività biologiche di tali peptidi e di loro derivati sintetici. Il decapeptide KP, derivato da un anticorpo antiidiotipico ricombinante ad attività antimicrobica, è stato il primo peptide ad essere ampiamente sperimentato, dimostrandosi in grado di esplicare *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*, nei vari modelli di studio considerati, attività antifungina^(91,100,101,102), antiprotozoaria^(103,104,105), antivirale^(106,107,108) ed immunomodulatoria⁽¹⁰⁹⁾. Tali attività sono mediate da meccanismi d'azione diversi e specifici, alcuni dei quali ancora in fase di definizione, ma probabilmente almeno in parte dovuti alle peculiari caratteristiche del peptide, in grado di autoassemblarsi spontaneamente e reversibilmente a formare una rete fibrillare organizzata, da cui la forma dimerica attiva del peptide è rilasciata lentamente nel tempo⁽¹¹⁰⁾.

Sulla base di tali evidenze sperimentali, è stato possibile verificare che anche altri peptidi di derivazione anticorpale possono esplicare attività antimicrobica, antivirale ed antitumorale, con diversi meccanismi d'azione ed indipendentemente da specificità ed isotipo dell'anticorpo parentale, come dimostrato per peptidi sintetici riproducenti le sequenze di regioni determinanti la complementarità (peptidi CDR)^(92,114) e sequenze delle regioni costanti (peptidi Fc)^(93,115).

Tutti questi studi hanno suggerito la possibilità di utilizzare gli anticorpi come fonte inesauribile di peptidi o loro derivati a predeterminata attività antinfettiva, antitumorale o immunomodulatoria, da sperimentare come agenti terapeutici innovativi^(98,116,117,118).

Un recente studio ha dimostrato che anche peptidi sintetici riproducenti i prodotti dei geni J di catene anticorpali lambda e pesanti, con sequenze ricavate da banche dati disponibili, possono esplicare sia *in vitro* che *in vivo* una significativa attività

antifungina, senza alcun effetto emolitico, citotossico o genotossico, come precedentemente verificato anche per altri peptidi anticorpali⁽¹¹⁹⁾.

Il rilievo che all'interno di anticorpi possano essere presenti sequenze amminoacidiche criptiche ("criptidi"), che, una volta sintetizzate *in vitro*, possono esplicare rilevanti attività biologiche, ha suggerito l'ipotesi, attualmente ancora tutta da verificare, che gli anticorpi possano rappresentare il risultato evolutivo della combinazione di geni ancestralmente implicati nella produzione di peptidi dell'immunità innata, con l'acquisizione di nuove caratteristiche specifiche tipiche dell'immunità acquisita.

Si potrebbe ipotizzare un ruolo fisiologico di questi criptidi nella risposta immunitaria? Mentre è difficilmente ipotizzabile che quantità rilevabili di criptidi CDR possano essere rilasciate *in vivo*, nell'organismo in condizioni fisiologiche o patologiche, qualche possibilità potrebbe esserci per criptidi Fc, infatti, nelle sequenze delle regioni costanti di anticorpi possono essere presenti potenziali siti di taglio da parte di proteasi fisiologiche, che potrebbero portare alla liberazione di tali criptidi in quantità significative. La ricerca di tali peptidi in sieri umani mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione non ha consentito di rilevare la presenza di peptidi Fc noti. Tuttavia tale approccio sperimentale ha consentito di rilevare nel siero di individui la presenza, quantitativamente rilevante, di un peptide fosforilato di 40 amminoacidi, sicuramente derivato dalla regione costante di IgM, che, una volta sintetizzato *in vitro*, ha dimostrato di esercitare una potente attività fungicida *in vitro* ed *in vivo* nei confronti di patogeni fungini ed inibitoria *in vitro* ed *ex vivo* sulla replicazione di HIV-1. Queste osservazioni sembrano rilevanti, in quanto

costituirebbero la prova di concetto del ruolo innato che frammenti anticorpali naturali potrebbero esercitare nei confronti di agenti infettivi, suggerendo un possibile ruolo postumo degli anticorpi nella omeostasi antinfettiva ed attenuando notevolmente la distinzione convenzionale tra immunità adattativa e innata. Ovviamente, saranno necessari ulteriori studi e conferme per chiarire questi aspetti, comunque estremamente intriganti⁽¹²⁰⁾.

Studi di microscopia elettronica a trasmissione e scansione potranno essere utili per osservare le alterazioni morfologiche e ultrastrutturali delle cellule fungine e batteriche in seguito al trattamento con i peptidi, così come studi su variazioni dell'espressione genica delle proteine coinvolte nella formazione del biofilm in presenza e assenza di peptidi antimicrobici potranno contribuire alla comprensione del/i meccanismo/i d'azione. Come dimostrato in precedenti studi, peptidi di derivazione anticorpale si sono dimostrati attivi anche *in vivo* e terapeutici in modelli di infezione murini o in *Galleria mellonella*, quindi sufficientemente stabili e privi di qualsiasi tossicità.

Anche i risultati ottenuti durante questo Dottorato sembrano confermare e rafforzare le precedenti osservazioni sulla possibile utilizzazione di peptidi anticorpali o peptidi da essi derivati come potenziali futuri nuovi farmaci antinfettivi o come "*leading compounds*", da cui ottenere molecole con implementate caratteristiche terapeutiche e farmacocinetiche, sfruttando anche la loro notevole duttilità, al variare della sequenza amminoacidica.

BIBLIOGRAFIA

1. Wang H, Dwyer-Lindgren L, Lofgren KT, Rajaratnam JK, Marcus JR, Levin-Rector A, et al. Age-specific and sex-specific mortality in 187 countries, 1970-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2071-94.
2. Cole ST. Who will develop new antibacterial agents? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1645):20130430.
3. World Health Organization 2018 [Available from: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en>].
4. European Centre for Disease Prevention and Control 2018 [Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance>].
5. European Commission. AMR: A major european and global challenge 2018 [Available from: http://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_factsheet_en.pdf].
6. European Centre for Disease Prevention and Control. European Antibiotic Awareness Day. 2018 [Available from: <https://antibiotic.ecdc.europa.eu/en>].
7. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol*. 2012;2012:713687.
8. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):133-63.
9. Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol*. 2014;22(3):120-7.
10. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 1):10-24.
11. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016;18(5):310-21.
12. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1366-77.
13. LaPlaca M. *Principi di Microbiologia Medica*. Esculapio-Edises Ed., XIV ed., 2014.

14. Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* 2002;3(12):918-30.
15. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell.* 2011;10(9):1173-82.
16. Kornitzer D. Regulation of *Candida albicans* hyphal morphogenesis by endogenous signals. *J Fungi (Basel).* 2019;5(1).
17. Vitali A, Vavala E, Marzano V, Leone C, Castagnola M, Iavarone F, et al. Cell wall composition and biofilm formation of azoles-susceptible and -resistant *Candida glabrata* strains. *J Chemother.* 2017;29(3):164-72.
18. Douglas LM, Konopka JB. Plasma membrane organization promotes virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *J Microbiol.* 2016;54(3):178-91.
19. Suchodolski J, Krasowska A. Plasma membrane potential of *Candida albicans* measured by Di-4-ANEPPS fluorescence depends on growth phase and regulatory factors. *Microorganisms.* 2019;7(4).
20. Zhang J, Li L, Lv Q, Yan L, Wang Y, Jiang Y. The Fungal CYP51s: their functions, structures, related drug resistance, and inhibitors. *Front Microbiol.* 2019;10:691.
21. Selitrennikoff CP. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(7):2883-94.
22. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr.* 2017;5(3).
23. Sherrington SL, Sorsby E, Mahtey N, Kumwenda P, Lenardon MD, Brown I, et al. Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. *PLoS Pathog.* 2017;13(5):e1006403.
24. Hall RA. Dressed to impress: impact of environmental adaptation on the *Candida albicans* cell wall. *Mol Microbiol.* 2015;97(1):7-17.
25. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(1):67-78.
26. Duhring S, Germerodt S, Skerka C, Zipfel PF, Dandekar T, Schuster S. Host-pathogen interactions between the human innate immune system and *Candida albicans*-understanding and modeling defense and evasion strategies. *Front Microbiol.* 2015;6:625.
27. van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Netea MG. Adjunctive immunotherapy with recombinant cytokines for the treatment of disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(2):112-9.

28. Luo S, Skerka C, Kurzai O, Zipfel PF. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Immunol*. 2013;56(3):161-9.
29. Yan L, Yang C, Tang J. Disruption of the intestinal mucosal barrier in *Candida albicans* infections. *Microbiol Res*. 2013;168(7):389-95.
30. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119-28.
31. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*. 2009;47(7):681-9.
32. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79.
33. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93.
34. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *J Appl Microbiol*. 2017;122(2):321-30.
35. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001;183(18):5385-94.
36. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(2):255-67.
37. Araujo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. *Trends Microbiol*. 2017;25(1):62-75.
38. Wuyts J, Van Dijck P, Holtappels M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? *PLoS Pathog*. 2018;14(10):e1007301.
39. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003;11(6):272-9.
40. Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokozaawa S, Tsuji N, Yagihashi A, et al. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(10):3113-7.
41. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*. 2015;58 Suppl 2:2-13.
42. Mattiuzzi G, Giles FJ. Management of intracranial fungal infections in patients with haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2005;131(3):287-300.

43. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1773-80.
44. Centers for Disease Control and Prevention 2018 [Available from: <https://www.cdc.gov/fungal>].
45. Kumar S, Mukherjee MM, Varela MF. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Int J Bacteriol.* 2013;2013.
46. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology.* 1999;145 (Pt 10):2701-13.
47. Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Hebart H, et al. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett.* 1997;400(1):80-2.
48. Belanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;62(1):1-10.
49. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):123-40.
50. Buelow E, Bello Gonzalez TDJ, Fuentes S, de Steenhuijsen Pijters WAA, Lahti L, Bayjanov JR, et al. Comparative gut microbiota and resistome profiling of intensive care patients receiving selective digestive tract decontamination and healthy subjects. *Microbiome.* 2017;5(1):88.
51. MS D. *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis* (Second Edition). Elsevier 2013.
52. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 2000;181(5):1753-4.
53. Dehò G, Galli E. *Biologia dei microrganismi.* 2 ed 2014.
54. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. *Biologia dei microrganismi.* Volume 1. Casa Editrice Ambrosiana, 2007.
55. Sarkar S, Ulett GC, Totsika M, Phan MD, Schembri MA. Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2014;9(4):e94786.

56. Fratamico PM, DebRoy C, Liu Y, Needleman DS, Baranzoni GM, Feng P. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2016;7:644.
57. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(1):26-38.
58. Schiebel J, Bohm A, Nitschke J, Burdukiewicz M, Weinreich J, Ali A, et al. Genotypic and phenotypic characteristics associated with biofilm formation by human clinical *Escherichia coli* isolates of different pathotypes. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(24).
59. Bacci C, Vismarra A, Dander S, Barilli E, Superchi P. Occurrence and antimicrobial profile of bacterial pathogens in former foodstuff meat products used for pet diets. *J Food Prot.* 2019;82(2):316-24.
60. Vogeleer P, Tremblay YDN, Jubelin G, Jacques M, Harel J. Biofilm-forming abilities of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates associated with human infections. *Appl Environ Microbiol.* 2015;82(5):1448-58.
61. Bryan A, Youngster I, McAdam AJ. Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Clin Lab Med.* 2015;35(2):247-72.
62. Ercoli L, Farneti S, Ranucci D, Scuota S, Branciarri R. Role of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the swine production chain. *Ital J Food Saf.* 2015;4(2):5156.
63. Sonntag AK, Bielaszewska M, Mellmann A, Dierksen N, Schierack P, Wieler LH, et al. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):8855-63.
64. Bonanno L, Loukiadis E, Mariani-Kurkdjian P, Oswald E, Garnier L, Michel V, et al. Diversity of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11 strains examined via stx subtypes and insertion sites of Stx and EspK bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(11):3712-21.
65. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 2005;365(9464):1073-86.
66. Madhavan TP, Sakellaris H. Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol.* 2015;90:155-97.
67. Crofts AA, Giovanetti SM, Rubin EJ, Poly FM, Gutierrez RL, Talaat KR, et al. Enterotoxigenic *E. coli* virulence gene regulation in human infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(38):E8968-E76.
68. Ivanova K, Ramon E, Hoyo J, Tzanov T. Innovative approaches for controlling clinically relevant biofilms: current trends and future prospects. *Curr Top Med Chem.* 2017.
69. Lavery G, Gorman SP, Gilmore BF. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. *Pathogens.* 2014;3(3):596-632.

70. Rendon MA, Saldana Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vazquez A, Kaper JB, et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(25):10637-42.
71. Kaur P, Agarwal S, Datta S. Delineating bacteriostatic and bactericidal targets in mycobacteria using IPTG inducible antisense expression. *Plos One*. 2009;4(6).
72. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA, editors. *Microbiologia*. 2^o ed2003.
73. Miao ZM, Li S, Wang L, Song WG, Zhou YF. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from outpatients in town hospitals of Shandong Province, China. *Front Microbiol*. 2017;8.
74. Georgopapadakou NH. Penicillin-Binding Proteins and bacterial-resistance to Beta-Lactams. *Antimicrob Agents Ch*. 1993;37(10):2045-53.
75. Palzkill T. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Ann Ny Acad Sci*. 2013;1277:91-104.
76. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):160-+.
77. Gootz TD, Brighty KE. Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance, and clinical aspects. *Med Res Rev*. 1996;16(5):433-86.
78. Jiang D. 4-Quinolone derivatives and their activities against Gram-negative pathogens. *J Heterocyclic Chem*. 2018;55(9):2003-18.
79. Hu YQ, Zhang S, Xu Z, Lv ZS, Liu ML, Feng LS. 4-Quinolone hybrids and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem*. 2017;141:335-45.
80. Dupouy V, Abdelli M, Moyano G, Arpaillange N, Bibbal D, Cadiergues MC, et al. Prevalence of Beta-Lactam and Quinolone/Fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae from dogs in France and Spain-Characterization of ESBL/pAmpC isolates, genes, and conjugative plasmids. *Front Vet Sci*. 2019;6.
81. Arzanlou M, Chai WC, Venter H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochem*. 2017;61(1):49-59.
82. Mukerji S, O'Dea M, Barton M, Kirkwood R, Lee T, Abraham S. Development and transmission of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria in animals and their public health impact. *Essays Biochem*. 2017;61(1):23-35.
83. Hughes D, Andersson DI. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):374-91.
84. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2).

85. Zhou G, Shi QS, Huang XM, Xie XB. The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):21711-33.
86. Choi U, Lee CR. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2019;10.
87. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, et al. Broad-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *Fems Microbiol Rev.* 2010;34(3):295-316.
88. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Ch.* 2010;54(3):969-76.
89. Schroeder HW Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S41-S52.
90. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(4):325-38.
91. Polonelli L, Magliani W, Conti S, Bracci L, Lozzi L, Neri P, Adriani D, De Bernardis F, Cassone A. Therapeutic activity of an engineered synthetic killer antiidiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis. *Infect Immun.* 2003;71(11):6205-12.
92. Polonelli L, Ponton J, Elguezabal N, Moragues MD, Casoli C, Pilotti E, et al. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLoS One.* 2008;3(6):e2371.
93. Polonelli L, Ciociola T, Magliani W, Zanello PP, D'Adda T, Galati S, et al. Peptides of the constant region of antibodies display fungicidal activity. *PLoS One.* 2012;7(3):e34105.
94. Giuliani A, Pirri G, Bozzi A, Di Giulio A, Aschi M, Rinaldi AC. Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(16):2450-60.
95. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238-50.
96. Polonelli L, Magliani W, Ciociola T, Giovati L, Conti S. From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2011;99(1):35-41.
97. Magliani W, Conti S, Ciociola T, Giovati L, Zanello PP, Pertinhez T, et al. Killer peptide: a novel paradigm of antimicrobial, antiviral and immunomodulatory auto-delivering drugs. *Future Med Chem.* 2011;3(9):1209-31.
98. Ciociola T, Giovati L, Sperindè M, Magliani W, Santinoli C, Conti G, et al. Peptides from the inside of the antibodies are active against infectious agents and tumours. *J Pept Sci.* 2015;21(5):370-8.

99. Magliani W, Conti S, Frazzi R, Ravanetti L, Maffei DL, Polonelli L. Protective antifungal yeast killer toxin-like antibodies. *Curr Mol Med*. 2005;5(4):443-52.
100. Cenci E, Bistoni F, Mencacci A, Perito S, Magliani W, Conti S, et al. A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. *Cell Microbiol*. 2004;6(10):953-61.
101. Travassos LR, Silva LS, Rodrigues EG, Conti S, Salati A, Magliani W, Polonelli L. Therapeutic activity of a killer peptide against experimental paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Nov;54(5):956-8.
102. Cafarchia C, Immediato D, Paola GD, Magliani W, Ciociola T, Conti S, Otranto D, Polonelli L. In vitro and in vivo activity of a killer peptide against *Malassezia pachydermatis* causing otitis in dogs. *Med Mycol*. 2014 May;52(4):350-5.
103. Savoia D, Scutera S, Raimondo S, Conti S, Magliani W, Polonelli L. Activity of an engineered synthetic killer peptide on *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. *Exp Parasitol*. 2006 Jul;113(3):186-92.
104. Fiori PL, Mattana A, Dessì D, Conti S, Magliani W, Polonelli L. In vitro acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *J Antimicrob Chemother*. 2006 May;57(5):891-8.
105. Giovati L, Santinoli C, Mangia C, Vismarra A, Belletti S, D'Adda T, et al. Novel activity of a synthetic decapeptide against *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Front Microbiol*. 2018;9:753.
106. Casoli C, Pilotti E, Perno CF, Balestra E, Polverini E, Cassone A, Conti S, Magliani W, Polonelli L. A killer mimotope with therapeutic activity against AIDS-related opportunistic micro-organisms inhibits ex-vivo HIV-1 replication. *AIDS*. 2006;20(7):975-80.
107. Conti G, Magliani W, Conti S, Nencioni L, Sgarbanti R, Palamara AT, Polonelli L. Therapeutic activity of an anti-idiotypic antibody-derived killer peptide against influenza A virus experimental infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(12):4331-7.
108. Sala A, Ardizzoni A, Ciociola T, Magliani W, Conti S, Blasi E, Cermelli C. Antiviral activity of synthetic peptides derived from physiological proteins. *Intervirology*. 2018;61(4):166-173.
109. Cenci E, Pericolini E, Mencacci A, Conti S, Magliani W, Bistoni F, et al. Modulation of phenotype and function of dendritic cells by a therapeutic synthetic killer peptide. *J Leukoc Biol*. 2006;79(1):40-5.
110. Pertinhez TA, Conti S, Ferrari E, Magliani W, Spisni A, Polonelli L. Reversible self-assembly: a key feature for a new class of autodelivering therapeutic peptides. *Mol Pharm*. 2009;6(3):1036-9.
111. Paulone S, Ardizzoni A, Tavanti A, Piccinelli S, Rizzato C, Lupetti A, et al. The synthetic killer peptide KP impairs *Candida albicans* biofilm in vitro. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181278.
112. Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA, Bille J. The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(11):2753-65.

113. Ferrari S, Sanguinetti M, Torelli R, Posteraro B, Sanglard D. Contribution of CgPDR1-regulated genes in enhanced virulence of azole-resistant *Candida glabrata*. *PLoS One*. 2011;6(3):e17589.
114. Gabrielli E, Pericolini E, Cenci E, Ortelli F, Magliani W, Ciociola T, Bistoni F, Conti S, Vecchiarelli A, Polonelli L. Antibody complementarity-determining regions (CDRs): a bridge between adaptive and innate immunity. *PLoS One*. 2009 Dec 4;4(12):e8187.
115. Gabrielli E, Pericolini E, Cenci E, Monari C, Magliani W, Ciociola T, Conti S, Gatti R, Bistoni F, Polonelli L, Vecchiarelli A. Antibody constant region peptides can display immunomodulatory activity through activation of the Dectin-1 signalling pathway. *PLoS One*. 2012;7(8):e43972.
116. Magliani W, Conti S, Cunha RLOR, Travassos LR, Polonelli L. Antibodies as crypts of antiinfective and antitumor peptides. *Curr Med Chem* 2009, 16, 2305-2323.
117. Magliani W, Giovati L, Ciociola T, Sperindè M, Santinoli C, Conti G, Conti S, Polonelli L. Antibodies as a source of anti-infective peptides: an update. *Future Microbiol*. 2015;10(7):1163-75.
118. Ciociola T, Magliani W, Giovati L, Sperindé M, Santinoli C, Conti G, Conti S, Polonella L. Antibodies as an unlimited source of anti-infective, anti-tumour and immunomodulatory peptides. *Sci Prog*. 2014;97(Pt 3):215-33.
119. Polonelli L, Ciociola T, Sperindè M, Giovati L, D'Adda T, Galati S, Travassos LR, Magliani W, Conti S. Fungicidal activity of peptides encoded by immunoglobulin genes. *Sci Rep*. 2017; 7: 10896.
120. Polonelli L, Ciociola T, Elviri L, Zanello PP, Giovati L, Arruda DC, Muñoz JE, Mortara RA, Morace G, Borghi E, Galati S, Marin O, Casoli C, Pilotti E, Ronzi P, Travassos LR, Magliani W, Conti S. A naturally occurring antibody fragment neutralizes infectivity of diverse infectious agents. *Sci Rep*. 2016 Oct 11;6:35018.

Appendice

Durante il corso di dottorato ho avuto modo di trascorrere un periodo di soggiorno all'estero della durata di sei mesi presso il laboratorio di Microbiologia dell'Unità di Bioscienze Orali del Dublin Dental University Hospital (Irlanda), impegnato soprattutto nel campo della microbiologia traslazionale basata principalmente sullo studio di biologia, evoluzione, genomica e meccanismi di resistenza agli antibiotici di ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillina-resistenti (MRSA) e di altre specie di stafilococchi e *Candida*, utilizzando anche nuovi approcci molecolari, quale il sequenziamento dell'intero genoma.

Il progetto di ricerca a cui ho preso parte aveva come oggetto principale lo studio di ceppi di *Staphylococcus epidermidis*, generalmente ritenuti commensali delle mucose delle prime vie respiratorie e della cute e membri del microbiota orale residente, isolati dalla cavità orale di individui sani con impianti dentali; tali ceppi erano caratterizzati dalla presenza o meno nel loro materiale genetico di un elemento mobile codificante per un pathway coinvolto nel catabolismo dell'arginina e per altri fattori in parte non ancora identificati ("*Arginine Catabolic Mobile Element*", ACME), che rappresentano importanti fattori di virulenza. La rilevanza clinica di *S. epidermidis* a livello della cavità orale, in cui comunemente alberga come commensale, è dovuta principalmente alla sua capacità di formare biofilm, contribuendo in tal modo alla formazione della placca dentale, il cui accumulo è associato a malattie orali come la malattia parodontale e la peri-implantite. Dal campionamento di questi distretti è stata riscontrata una notevole prevalenza di ceppi di *S. epidermidis* ospitanti ACME nel proprio genoma ed è stato quindi ipotizzato che questo elemento genetico possa

contribuire alla trasmissibilità e persistenza di tali ceppi a livello di questi siti. ACME è stato ritrovato in *S. epidermidis*, ma anche in ceppi di *S. aureus* MRSA, per cui si ritiene sia in grado di incrementare trasmissibilità, colonizzazione e persistenza di questi ceppi, contribuendo al loro successo evolutivo. ACME ha dimensioni comprese tra 30 e 55 kb ed è associato a 3 cluster genici principali: l'operone *arc*, composto dai geni *arcR/A/D/B/C*; l'operone *opp3*, composto dai geni *opp3A/B/C/D/E*; l'operone *kdp*, scoperto recentemente, composto invece dai geni *kdpE/D/A/B/C*. Ad oggi, sono stati descritti cinque tipi di ACME caratterizzati dalla presenza di uno o più operoni: Tipo I (*arc* e *opp3*), Tipo II (*arc*), Tipo III (*opp3*), Tipo IV (*arc* e *kdp*), Tipo V (*arc*, *opp3* e *kdp*). Precedenti studi avevano rilevato una significativa prevalenza di ceppi di *S. epidermidis* contenenti l'elemento ACME sia nei siti subgingivali di pazienti con peri-implantite sia nelle tasche parodontali di pazienti con malattia parodontale, facendo ipotizzare che ACME possa giocare un ruolo nella colonizzazione della cute umana e nell'evasione dal sistema immunitario dell'ospite, aumentando la trasmissibilità e la persistenza anche dei ceppi MRSA. Effettivamente, diversi studi hanno confermato la trasmissione orizzontale di questo elemento genetico mobile da *S. epidermidis*, che per molto tempo è stato considerato non patogeno, ma che per questa capacità risulta essere un patogeno opportunisto. Durante la mia permanenza a Dublino è stata indagata la prevalenza di ACME nei ceppi considerati, anche per verificare in che modo l'elemento genetico mobile contribuisca alla fitness ed alla trasmissibilità di *S. epidermidis*. In particolare, sui ceppi di *S. epidermidis* isolati da pazienti sani con impianti dentali sono state studiate le curve di crescita in specifici terreni di coltura e la loro capacità di formare biofilm; sono stati, inoltre, condotti saggi di tollerabilità a condizioni variabili di concentrazione salina, pH e presenza di ossigeno, mentre il tipo

di ACME è stato determinato mediante PCR multiple e la diversità genetica tra i diversi tipi è stata rilevata mediante sequenziamento dell'intero genoma batterico. In tutti i siti anatomici campionati, ACME di tipo II era il tipo predominante, insieme, in misura minore, ad ACME di tipo IV. Entrambe queste tipologie di ACME ospitano l'operone *arc*, che insieme a *kdp*, molto probabilmente contribuisce alla sopravvivenza di *S. epidermidis* nell'ambiente orale.

Sia le tasche periodontali che i siti subgingivali costituiscono un ambiente quasi anaerobio e ricco di nutrienti, ideale per l'accumulo di placca dentale da parte del microbiota orale, che con i propri processi metabolici determina anche una diminuzione del pH. Una condizione ambientale simile è stata riscontrata anche negli impianti orali a base di titanio, che rappresentano in questo modo un substrato ideale per la formazione di biofilm da parte delle specie di stafilococco. In questo contesto ambientale, ciascun operone dell'elemento genetico ACME gioca un ruolo importante nella persistenza di *S. epidermidis*. L'operone *arc* codifica per un pathway dell'arginina ($L\text{-arginina} > \text{ornitina} + \text{ammoniaca} + \text{ATP} + \text{CO}_2$), che contribuisce alla regolazione interna del pH degli stafilococchi in condizioni di acidità. L'ATP prodotto, inoltre, è probabilmente benefico per la sopravvivenza dei microrganismi in ambienti poveri di nutrienti e semi-anaerobi, come quello presente nelle tasche parodontali. L'operone *opp3* codifica per un trasportatore oligopeptidico ABC il cui ruolo specifico è ancora sconosciuto, ma che probabilmente gioca un ruolo nell'uptake dei nutrienti; l'operone *kdp* codifica per un sistema di trasporto del potassio che permette la sopravvivenza di *S. epidermidis* a livello della placca dentale, caratterizzata da un'elevata concentrazione di ioni K^+ . Lo scopo dello studio condotto durante la permanenza all'estero è stato, quindi, essenzialmente quello di valutare il ruolo di

ACME in ceppi di *S. epidermidis* isolati dalla cavità orale di individui sani con impianti dentali. Data la composizione chimica di tale cavità, caratterizzata da elevata concentrazione di ioni K^+ e basso pH, è stato utile per la ricerca confrontare fenotipicamente i ceppi isolati di *S. epidermidis* in ambienti con diverse concentrazioni di NaCl e KCl e con diverse condizioni di pH e CO_2 , utilizzando saggi di sopravvivenza all'essiccamento, studio delle curve di crescita e saggi di formazione di biofilm.