

UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN SALUTE ANIMALE

CICLO xxv

ATTIVITA' IN VITRO DI NUOVI ANTIBIOTICI PEPTIDICI

IN VITRO ACTIVITY OF NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Martelli Paolo

Tutor:
Chiar.mo Prof. Cavirani Sandro

Dottorando: Dott.ssa Francesca Ghidini

INDICE

Abstract.....	pg.4
Introduzione	pg.6
Capitolo 1: I peptidi antimicrobici	pg.11
1.1 Caratteristiche dei Peptidi Antimicrobici AMPs.....	pg.11
1.2 Classificazione degli AMPs.....	pg.12
1.2.1 Peptidi contenenti Cys.....	pg.13
1.2.2 Peptidi contenenti un'elevata percentuale di residui specifici.....	pg.16
1.2.3 Peptidi con sequenza lineare ad elevata percentuale di α - elica.....	pg.16
1.3 Meccanismo d'azione degli AMPs.....	pg.19
Capitolo 2: Meccanismo di farmaco-resistenza.....	pg.22
Capitolo 3: Disegno sperimentale dei peptidi antimicrobici.....	pg.24
3.1 Peptidi utilizzati nello studio.....	pg.24
Capitolo 4: Valutazione attività antimicrobica AMPs.....	pg.27
4.1 Peptidi.....	pg.27
4.2 Ceppi batterici.....	pg.28
4.3 Profili di antibiotico-resistenza.....	pg.28
4.4 Preparazione della sospensione batterica.....	pg.30
4.5 Preparazione delle piastre e valutazione della MBC.....	pg.31

4.6 Attività antimicrobica dei peptidi in concentrazioni crescenti di sale.....	pg.32
4.7 Time course dell'attività antimicrobica dei peptidi verso ceppi Gram positivi e Gram negativi.....	pg.32
4.8 Studio combinato.....	pg.33
Capitolo 5.....	pg.34
5.1 Metodica del saggio di permeabilizzazione di membrana mediante stipite di E. coli ML-35pYC.....	pg.34
Capitolo 6: Valutazione della citotossicità dei peptidi.....	pg.36
6.1 Test di emolisi.....	pg.36
Capitolo 7: Risultati.....	pg.38
7.1 Attività antimicrobica.....	pg.38
7.2 Attività antimicrobica in presenza di concentrazioni diverse di sale e EDTA.....	pg.39
7.3 Time course dell'attività antimicrobica dei peptidi verso ceppi Gram positivi e Gram negativi	pg.41
7.4 Studio combinato.....	pg.43
7.5 Test di permeabilizzazione.....	pg.46
7.6 Test di emolisi.....	pg.48
Capitolo 8: Discussione.....	pg.50
Conclusioni.....	pg.56
Bibliografia e sitografia.....	pg.57

ABSTRACT

Antimicrobial-peptide-based therapies could represent a reliable alternative to overcome antibiotic resistance, since they offer some potential advantages such as the rapid microbicidal activity and multiple activity against a broad spectrum of bacterial pathogens.

Three synthetic antimicrobial peptides (AMPs) designed by using proprietary screening software developed *in house* were synthesized and tested against nine reference strains. The AMPs showed structural similarity to cyclic beta-sheet defence peptides. The antimicrobial activity was dose-dependent with a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 0.4-25 µg/ml for Gram negative and 1.72-100 µg/ml for Gram positive. No significant haemolytic activity was observed at 100 µg/ml for all tested peptides. Interestingly, at high salt environment, the antibacterial activity was generally maintained for Gram-negative bacteria. The three tested peptides (AMP2041, AMP72, AMP126) achieve complete bacterial killing in 20 min or less against Gram-negative bacteria, AMP2041 and AMP72 showed at 12.5 µg/ml, a linear time-dependent membrane permeabilization with an equilibrium rate of 22 min and 19 min, respectively, while AMP126 failed to reach equilibrium within the observation period (120 min). In combination with conventional anti-infective agents (levofloxacin or aminoglycosides) AMP126 and AMP2041 showed additive activity in comparison with colistin.

In conclusion, our results suggest (i) high activity against Gram-negative, (ii) low

if any haemolytic activity at 50-100xMIC, (iii) the MIC value of the combination AMPs-conventional antibiotics was lower than MIC of single agents alone, encouraging to conduct further studies on animal models.

INTRODUZIONE

Il trattamento delle malattie infettive con antibiotici rappresenta una delle pietre miliari della medicina umana e veterinaria. La scoperta di nuove molecole antibiotiche ha modificato radicalmente gli aspetti terapeutici e profilattici di malattie gravi e mortali, nonché di patologie infettive e diffuse degli animali a connotazione zoonosica. Nei primi anni '70 si riteneva che virtualmente tutte le infezioni batteriche potessero essere trattate con antibiotici; successivamente si sono manifestati fenomeni di resistenza agli antimicrobici tali da rendere sempre più difficile l'approccio terapeutico anche nei confronti di agenti microbici di banale risoluzione. (Overbye and Barret, 2005).

Attualmente il fenomeno dell'antibiotico resistenza rappresenta un serio problema di Salute Pubblica, tanto che recentemente il gruppo di Esperti Scientifici sui Pericoli Biologici (Scientific Panel on Biological Hazard, BIOHAZ) dell'ESFA ha analizzato i fattori di rischio che contribuiscono all'incidenza, all'emergenza e alla diffusione di batteri produttori di enzimi beta-lattamasi a spettro esteso e beta-lattamasi AmpC (AmpC) che neutralizzano gli effetti di antimicrobici quali penicilline e cefalosporine, antimicrobici di importanza cruciale in medicina veterinaria e umana (Rapporto Riassuntivo Comunitario, EFSA, Il gruppo di esperti scientifici BIOHAZ è giunto alla conclusione che l'uso indiscriminato (o abuso) di antimicrobici costituisce un fattore di rischio per la diffusione di questo tipo di ceppi batterici resistenti. Gli esperti hanno concluso che la riduzione dell'uso generalizzato degli antimicrobici negli animali

da produzione alimentare dovrebbe avere un'elevata priorità nell'UE, dal momento che questi ceppi batterici sono spesso resistenti a molti altri farmaci veterinari di uso comune. Nel valutare le possibili misure di controllo, gli scienziati dell'EFSA raccomandano, tra l'altro, di limitare o porre fine all'uso delle cefalosporine nel trattamento di animali da produzione alimentare come azione di controllo altamente efficace per ridurre i batteri che producono ESBL/AmpC.

Nel 2009 la Infectious Diseases Society of America ha pubblicato una lista di patogeni batterici le cui caratteristiche di antibiotico resistenza condizionano pesantemente la scelta terapeutica. Tra questi, sono compresi batteri Gram positivi, in particolare (*S. aureus* anche con la variante meticillino-resistente (MRSA), *Enterococcus faecium*), e batteri Gram negativi (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*). Non ultimi, sono emersi anche stipiti di Micobatteri estensivamente resistenti (XDR) anche a antimicrobici di seconda linea come fluorochinoloni, kanamicina, amikacina, e capreomicina. Tali stipiti vengono considerati particolarmente pericolosi in quanto risultano difficilmente trattabili con i protocolli terapeutici in uso e sono associati ad un aumento di mortalità nell'uomo.

Secondo il report dell'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC/EMA) pubblicato nel 2009 fenomeni di farmaco-resistenza in *Escherichia coli* si sono manifestati in Europa nei confronti di cefalosporine di terza generazione (CTX-M beta lattamasi), con valori di resistenza negli stipiti italiani fino al 25% degli stipiti. Secondo questi dati, fino al 50% degli stipiti di

S.aureus in Italia sono meticillino-resistenti (TEM-1 – mecA genes) e fino al 50 % degli stipti di *Pseudomonas aeruginosa* risultano resistenti ai carbapenemi (metallo beta-lattamasi). Tale fenomeno ha raggiunto dimensioni talmente preoccupanti che alcuni addetti ai lavori parlano di “*unthinkable scenario of untreatable infections*”.

Il piano d'azione contro la resistenza antimicrobica della Commissione EFSA (2011) prevede una serie di azioni da attuare in collaborazione con i paesi membri dell'UE e individua 7 settori in cui occorre intervenire con urgenza:

- 🕒 garantire un uso adeguato degli antimicrobici nell'uomo e negli animali
- 🕒 prevenire le infezioni microbiche e la loro propagazione
- 🕒 mettere a punto nuovi antimicrobici efficaci o altri strumenti di cura alternativi
- 🕒 collaborare con i partner internazionali per contenere i rischi associati alla resistenza antimicrobica
- 🕒 migliorare il monitoraggio e la vigilanza nella medicina umana e veterinaria
- 🕒 promuovere la ricerca e l'innovazione
- 🕒 migliorare la comunicazione, l'istruzione e la formazione.

Nel 2012, l'OMS ha pubblicato il volume “*The evolving threat of antimicrobial resistance*” dove la dilagante resistenza agli antimicrobici viene spiegata attraverso l'uso improprio di questi medicinali, molto spesso utilizzati senza che se ne presenti una reale indicazione e con posologie scorrette.

Negli ultimi 20 anni, solo due molecole appartenenti a due nuove classi di

antibiotici (linezolid della classe degli oxazolidoni e daptomicina della classe dei lipopetidi) sono state introdotte a fianco di nuovi agenti di classi già esistenti. Al momento, si sta parlando di una vera e propria sfida per lo sviluppo di farmaci antimicrobici (Levy e Marshall, 2004).

Alla luce di queste evidenze risulta particolarmente importante lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici in grado di contrastare il fenomeno della farmaco resistenza.

Un terreno promettente per l'individuazione di nuovi target potenziali per lo sviluppo di nuovi agenti antimicrobici è costituito dallo studio della genomica funzionale dei batteri patogeni che a partire dal 2000 ha messo a disposizione in banche dati un numero sempre maggiore di genomi batterici completamente codificati. (Sommer M., Dantas G., Church, 2009).

Un approccio alternativo è rappresentato dall'impiego di peptidi antimicrobici (AMPs), corte sequenze aminoacidiche prodotte dall'organismo come componente dell'immunità innata. Tali molecole sono evolute nei diversi organismi viventi in un periodo di 2.6 miliardi di anni per combattere le infezioni batteriche. Nelle ultime due decadi diverse centinaia di AMPs sono stati isolati da vertebrati e invertebrati, così come da piante, batteri e funghi. La maggior parte di questi peptidi sono isolati da fonti diverse come macrofagi, neutrofilii, cellule epiteliali, grasso corporeo e tratto riproduttivo. Questi peptidi mostrano una attività antimicrobica ad ampio spettro verso batteri Gram-positivi e Gram-negativi, funghi e virus (Hartmann *et al.*, 2010). Alcuni peptidi hanno inoltre dimostrato attività citotossica anche nei confronti delle cellule tumorali.

Attualmente, possono essere individuate diverse strategie nelle applicazioni terapeutiche dei peptidi: come singoli agenti anti-infettivi, in combinazione con antibiotici convenzionali per promuovere effetti additivi o sinergistici, come agenti immunomodulatori in grado di aumentare l'immunità innata naturale, come agenti in grado di neutralizzare le endotossine per prevenire le complicazioni fatali dello shock.

I peptidi antimicrobici sono caratterizzati da un meccanismo d'azione relativamente non specifico, basato sulla distribuzione delle cariche superficiali di membrana e sulla destabilizzazione della membrana dei batteri. Il meccanismo d'azione battericida generato dall'alterazione della struttura della membrana batterica rende particolarmente difficile l'acquisizione di caratteri di resistenza, poiché la pressione selettiva viene deviata da uno specifico target molecolare.

Nel complesso, i peptidi antimicrobici rappresentano una promettente alternativa terapeutica che sta ricevendo sempre maggiore attenzione dal mondo della ricerca.

CAPITOLO 1

I Peptidi Antimicrobici (AMPs)

1.1 Caratteristiche dei Peptidi Antimicrobici AMPs

I peptidi antimicrobici sono codificati da specifici geni implicati nella risposta immune innata, tipica di tutti gli esseri viventi (Papagianni M., 2003) Un numero sempre crescente di queste molecole è stato isolato da un vasto insieme di sorgenti biologiche, sia da organismi procarioti che eucarioti, incluso l'uomo. Questi peptidi proteggono gli organismi dall'invasione di batteri, protozoi, funghi e virus (Zasloff M.,2002,Boman H.G., 2000). Essi mostrano un'estrema diversità nelle loro strutture primarie e secondarie, e solitamente hanno uno spettro d'azione piuttosto ampio per quanto riguarda l'attività antimicrobica. Studi accurati effettuati da Hans Boman hanno evidenziato che la scarsa selettività e la velocità nell'uccidere i microbi sono caratteristiche peculiari del meccanismo di difesa di tali peptidi, e li rendono una sorta di sistema immunitario "istantaneo" contro l'invasione dei patogeni. Questa risposta immediata alle infezioni svolge un ruolo importante non solo negli invertebrati, la cui difesa dipende esclusivamente da essa, ma anche nei vertebrati superiori, dove entra in azione prima che si attivi l'immunità specifica (Mangoni M.L. *et al*, 2001, Bulet P. *et al*, 2004). Gli AMPs sono presenti in diversi organismi, quali piante, insetti, mammiferi ma soprattutto anfibi, e presentano caratteristiche grosso modo comparabili in funzione dell'attività esplicata.

Pur variando notevolmente nel numero di residui della sequenza che li compongono, da 10 a 40 aminoacidici, presentano caratteristiche comuni. Sono, infatti, tutti peptidi basici, aventi un'elevata percentuale di idrofobicità, e una natura anfipatica. Nascono come pro-peptidi di circa 60-170 residui che subiscono poi processi di maturazione ad opera di specifiche proteasi. I pro-peptidi sono tutti generalmente formati da una sequenza segnale per il reticolo sarcoplasmatico, da una pro-sequenza anionica di lunghezza variabile, il cui ruolo è quello di neutralizzare le cariche positive del peptide rendendolo inattivo, e, ovviamente la sequenza del peptide maturo.

1.2 Classificazione degli AMPs

Studi precedenti attinenti alle caratteristiche degli AMPs, hanno permesso di effettuare una sorta di classificazione che prescindesse dalle specie da cui tali molecole sono state isolate. Pertanto, è stato possibile raggrupparli in tre grandi classi principali, sulla base della composizione e della struttura secondaria:

peptidi contenenti cisteina (Conlona J.M. *et al*, 2008, <http://w3.uniroma1.it/biocmed2/peptidi.html>);

peptidi contenenti un'elevata percentuale di residui specifici;

peptidi contenenti sequenza lineare, elevata percentuale ad α -elica (Ammar B. *et al*, 1998; Simmaco M. *et al*, 1991).

Alla prima classe appartengono peptidi con struttura a foglietto β che presentano un elevato numero di residui di Cys, le cui posizioni sono conservate all'interno delle varie famiglie, come ad esempio le Defensine.

Alla seconda classe appartengono peptidi con elevata percentuale di residui specifici, come nel caso dei peptidi bovini Bac5 e i Bac7, ricchi di Pro e Arg. Infine sono inclusi nella classe di peptidi lineari contenuti un'elevata percentuale di α -elica numerosissimi peptidi antimicrobici quali Cecropine, Magainine, Temporine, Bombinine.

1.2.1 Peptidi contenenti Cys

Fanno parte di questa classe di composti peptidi contenenti ponti disolfuro per la presenza di Cys. In base alla struttura e alla composizione di tali AMPs si è ritenuto opportuno suddividere questo gruppo in 2 sottogruppi, in base al contenuto dei ponti disolfuro:

Peptidi aventi più ponti disolfuro che adottano una struttura a foglietto β .

Defensine: peptidi immagazzinati nei granuli citoplasmatici dei neutrofili di mammifero (topo, ratto, coniglio, uomo), appartengono al primo sottogruppo dei composti contenenti cisteina.

Le α -Defensine sono costituite da 29-30 residui le cui sequenze presentano un elevato numero di arginine e cisteine. Tali molecole sono accumulate nei granuli dei neutrofili in forma attiva e, successivamente vengono rilasciate nei vacuoli

dei fagociti.

E' stato possibile isolare dai neutrofili bovini un gruppo di 13 Defensine, anche definite β -Defensine, avente una sequenza di 38-42 residui al cui interno sono presenti sempre 6 cisteine in posizioni altamente conservate.

Si tratta comunque di peptidi compatti, globulari, formati da 3 foglietti β - antiparalleli, privi di α -elica. I tre ponti disolfuro presenti nella struttura conferiscono rigidità alla stessa. Nonostante presentino delle differenze strutturali con i classici AMPs, le Defensine esplicano la loro azione formando sulla membrana della cellula batterica dei veri e propri pori multimerici che provocano la lisi delle vescicole lipidiche.

Tachiplesine: peptidi sintetizzati dal crostaceo giapponese *Tachypleus tridentatus*, e immagazzinati nei granuli di tali cellule, aventi sequenze di 17-18 residui aminoacidici.

Strutturalmente presentano una struttura a foglietto- β antiparallelo stabilizzata da due ponti disolfuro tra i residui di cisteina 4-17 e 8-13. Attive su cellule funginee e batteriche, gli è stata attribuita la capacità di legare i lipopolisaccaridi della membrana esterna dei Gram-negativi grazie all'interazione dei 4 residui di arginina, caratteristici di tali peptidi, con i gruppi fosforici del glicolipide del LPS.

Peptidi aventi un ponte disolfuro che adottano una struttura a loop.

Bactenecina: peptidi isolati dai neutrofili bovini aventi una sequenza di 12 residui, sono caratterizzati da una struttura ad ansa dovuta alla presenza di un

unico ponte disolfuro. Tali molecole hanno uno spettro d'azione che comprende sia Gram-positivi che Gram-negativi; ma esercitano un'attività citotossica su cellule neuronali e gliali.

Brevinine-1, 2: peptidi isolati dalla pelle della rana coreana *Rana brevipola porsa* e in seguito dalla pelle della *Rana esculenta*, si tratta di peptidi basici aventi, nella regione C-terminale una Cys implicata nella formazione con un ponte disolfuro con un'altra Cys distante 6 residui a monte. La regione N-terminale assume una conformazione ad α -elica amfipatica e il ponte disolfuro dà luogo ad un anello nella regione C-terminale.

Le Brevinine-1 derivano da un precursore di 71 residui, e sono costituite da una sequenza aminoacidica di 24 residui.

Le Brevinine-2 sono, invece, costituite da 28-30 residui amminoacidici e derivano da precursori di 68-74 residui. Tali molecole presentano attività nei confronti di ceppi Gram-positivi e Gram-negativi; ed inoltre le Brevinine-1 esplicano la loro attività anche nei confronti di alcuni lieviti, quali *Candida albicans*. Presentano, però carattere emolitico.

Esculetine: peptidi isolati dalla secrezione ghiandolare cutanea di anfibii del genere *Rana esculenta*, sono state individuate due isoforme di tali molecole, rispettivamente le Esculetine-1 contenenti 46 residui e le Esculetine-2 caratterizzate invece da 37 residui. La presenza di un ponte disolfuro nella struttura, determina la formazione di un anello a sette termini a ridosso dell'estremità C-terminale. Questi peptidi presentano un'elevata attività nei

confronti sia di ceppi Gram-positivi che Gram-negativi.

1.2.2 Peptidi contenenti un'elevata percentuale di residui specifici

Fanno parte di tale classe peptidi aventi un'elevata percentuale di specifici residui, ad esempio Arg, Trp, Pro; che conferiscono loro particolari caratteristiche strutturali.

Apidecine: peptidi isolati dall'emolinfa di *Api mellifera*, sono costituiti da 18 residui caratterizzati da un elevato contenuto di Pro (29%) e di Arg (17%). Sono particolarmente attive contro batteri Gram-negativi.

PR-39: isolato dal maiale e successivamente dall'uomo (FALL-39), è un peptide formato da 39 residui di cui 10 Arg e 19 Pro. Esplica la sua azione bloccando la sintesi del DNA e delle proteine. E' soprattutto attivo nei confronti di ceppi Gram- negativi, inoltre si comporta da fattore di crescita nei confronti delle cellule di mammifero, intervenendo nei processi di cicatrizzazione delle ferite.

Bac-5 e Bac-7: peptidi di diversa lunghezza, isolati dai granuli citoplasmatici dei neutrofilii bovini, presentano una conformazione ad α -elica anfipatica in ambienti idrofobici. Oltre all'attività antimicrobica, inibiscono la replicazione del virus *Herpes simplex*.

1.2.3 Peptidi con sequenza lineare ad elevata percentuale di α - elica.

Appartengono a questa classe la maggioranza di peptidi antimicrobici.

Cecropine: peptidi isolati dalla larva della farfalla *Hyalophora cecropia* sono

state identificate tre diverse classi, rispettivamente: Cecropine A, B, D. Successivamente sono state identificate anche nelle specie animali come il maiale (Cecropina P1).

Si tratta di peptidi lineari basici costituiti da 35-37 residui con un certo grado di omologia nella struttura primaria, pari a circa il 62-65%.

E' stato dimostrato che le Cecropine isolate dagli insetti esplicano la loro attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram-negativi mediante la formazione di canali atti a dissipare il gradiente elettrochimico. Per quanto riguarda la Cecropina P1 è stato, invece, ipotizzato un meccanismo d'azione di tipo detergente in cui i monomeri ad α -elica amfipatica si dispongono a ridosso del doppio strato lipidico in modo tale da disintegrarlo.

Melittine: peptidi isolati dal veleno dell'ape da miele *Apis mellifera*, sono molecole costituite da 26 residui, aventi 5-6 cariche positive con una struttura ad elevata percentuale di α -elica amfipatica. Il meccanismo d'azione identificato per le Melittine è di tipo "Barrel Stave" (paragrafo 1.3), determinano, infatti, la formazione di pori multimerici il cui diametro è di 25-30Å. Tali composti sono noti per il loro elevato potere emolitico. Inoltre evidenze sperimentali hanno dimostrato che possono danneggiare anche cellule eucariotiche, come i fibroblasti di topo, agendo come co-mitogeni.

Magainine: peptidi secreti dalla pelle della rana africana *Xenopus laevis* sono peptidi costituiti da 23 residui. Mostrano attività nei confronti di numerosi ceppi batterici, funghi, protozoi, e alcune linee tumorali, non presentano carattere

emolitico. Il meccanismo d'azione di tali peptidi varia a seconda della concentrazione dello stesso. A basse concentrazioni le Magainine si dispongono parallelamente alle superficie delle teste polari dei fosfolipidi; a concentrazioni elevate, invece, il peptide si dispone perpendicolarmente al doppio strato formando dei canali ionici di tipo "toroidale".

Dermaseptine: peptidi secreti dalla pelle delle rane sudafricane della sottofamiglia *Phyllomedusinae*. Costituite da circa 27 residui presentano un'elevata percentuale di strutturazione ad α -elica amfipatica.

Bombinine: peptidi secreti dalla pelle della *Rana variegata*, sono peptidi aventi attività antimicrobica contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi ed attività citotossica contro gli eritrociti. Queste caratteristiche sono state attribuite originariamente alla Bombinina peptide di 24 residui. Successivamente sono stati isolati dalle ghiandole secretorie della pelle di *Bombina orientalis* 3 peptidi bombinino-simili. Dalla sequenza dei precursori è stata confermata l'esistenza di altri peptidi definiti Bombinine H. Esse sono una classe di peptidi ammidici di 17- 20 residui caratterizzati da una netta carica positiva +3. Le Bombinine H differiscono tra loro per la presenza di Ile o Leu in prima posizione, Ile o D-alloisoleucina in seconda posizione, Leu o Met in ottava. Inoltre la presenza di un D-amminoacido rappresenta la caratteristica peculiare di queste molecole, in quanto, ad oggi non sono mai stati isolati in natura altri composti contenenti D-amminoacidi aventi attività antimicrobica.

Temporine: famiglia di peptidi ammidici lineari basici secreti dalla pelle della

Rana temporaria. Presentano una carica positiva netta a pH neutro e mostrano una certa omologia di sequenza con le Melittine.

1.3 Meccanismo d'azione degli AMPs

Il meccanismo d'azione dei peptidi antimicrobici naturali non è stato completamente chiarito. Si crede che la maggior parte di questi peptidi eserciti la propria azione antimicrobica interagendo con la membrana batterica. Quest'ultima risulta, infatti, prioritariamente formata da notevoli quantità di fosfolipidi carichi negativamente, quali fosfatidilglicerolo, cardiolipina (bisfosfatidilglicerolo) (Gidalevitz D. *et al*, 2003)

Ciò la rende facilmente attaccabile dagli AMPs che possiedono un'elevata carica netta positiva dovuta alla presenza di un gran numero di residui basici (Shai Y. *et al*, 1996; Oren Z. *et al*, 1997).

Un ulteriore fattore destabilizzante la membrana del patogeno è costituito dal potenziale transmembranario delle cellule batteriche, altamente negativo che può facilitare la formazione di canali ionici (Zilberstein D. *et al*, 1979; Vaz Gomes A. *et al*, 1993)

Vi sono diversi meccanismi d'azione ipotizzati per tali peptidi:

“**Barrel stave**”. Meccanismo secondo cui tali peptidi cationici a contatto con le membrane batteriche, si organizzano nella formazione di un poro transmembranario. Tale strutturazione prevede che il lato idrofobico della porzione transmembrana dell' α -elica sia orientato verso i lipidi mentre la porzione idrofila sia

posizionata all'interno del poro. (Ehrenstein G. et al, 1977; Shai Y., 1995) (Figura 1.1 A).

“Carpet like”. Tale meccanismo prevede che il lato carico della catena peptidica interagisca con le teste anioniche dei fosfolipidi della membrana batterica, formando un tappeto che si estende sulla superficie della membrana bersaglio. In tal modo l'area superficiale dello strato lipidico si assottiglia e si espande, in corrispondenza lo strato interno, portando alla distruzione del doppio strato fosfolipidico tramite la formazione di veri e propri disgregati. (Figura 1.1 B) (Shai Y., 1995; Pouny Y. et al, 1992; Shai Y., 1999).

“Toroidal, wormhole”. Il modello toroidale, prevede la curvatura continua da un lato all'altro del doppio strato dei fosfolipidi, in seguito all'interazione del peptide sulla membrana, come all'interno di una ciambella. Le catene peptidiche inizialmente posizionate sulla membrana vengono immerse nell'interfaccia idrofilica/idrofobica e trascinate insieme alle molecole lipidiche del bilayer determinando la formazione di un poro (Figura 1) (Ludtke S. J. et al, 1996; Huang H. W., 2000).

Lo step principale di tutti questi meccanismi prevede l'adsorbimento delle catene peptidiche sull'interfaccia della membrana e la formazione di una struttura secondaria del peptide adsorbito (Chen F.-Y. et al, 2003; Lee M.-T., et al, 2004)

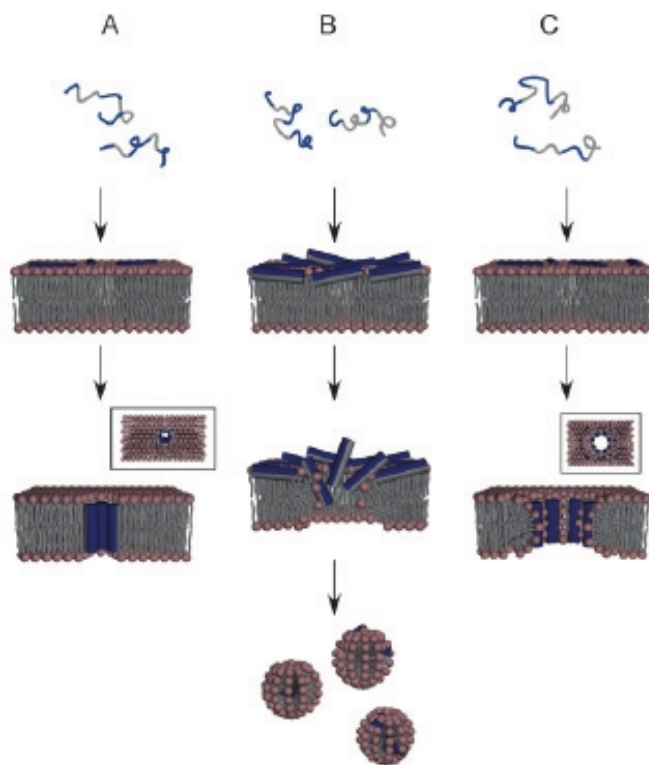


Figura 1 A) meccanismo d'azione "barrel-stave" B) meccanismo d'azione "carpet-like" C) meccanismo d'azione toroidal "wormhole". I peptidi sono rappresentati in blu.

CAPITOLO 2

Meccanismo di Farmaco Resistenza

Conseguenza inevitabile dell'intenso uso di antibatterici sia in campo umano che veterinario è stata lo sviluppo di stipti batterici resistenti agli antibiotici; insorgenza che costituisce un'emergenza sempre più sentita nella terapia antibatterica, tale da condurre la ricerca verso lo sviluppo di nuovi farmaci. Analizzando le cause che inducono i patogeni a sviluppare resistenza, è possibile identificare il realizzarsi di tre processi:

- ✓ il farmaco non raggiunge il suo bersaglio;
- ✓ il farmaco viene inattivato;
- ✓ il bersaglio è alterato.

Particolarmente importante risulta il terzo punto ai fini della resistenza. Le alterazioni del bersaglio, infatti, possono essere dovute a:

- mutazioni del bersaglio naturale stesso (es. resistenza ai fluorochinoloni).
- ✓ modificazioni del bersaglio (es. resistenza ai macrolidi alle tetracicline per protezione ribosomiale).
- ✓ sostituzione, da parte del patogeno, del bersaglio naturale con un'alternativa resistente, (es. resistenza alla meticillina negli

stafilococchi),

quest'ultima situazione determina un'interazione mancata tra il farmaco e il suo target.

Attualmente, la percentuale di patogeni che ha sviluppato resistenza ai classici antibiotici è destinata a crescere. Esempi lampanti sono rappresentati da ceppi quali *Pseudomonas aeruginosa*, che risulta resistente a svariati tipi di antibiotici in quanto privo delle classiche porine ad elevata permeabilità ed ancora *Escherichia coli*, e *Neisseria gonorrhoeae* che presentano sistemi di pompe di estrusione del farmaco impedendone l'azione (Pile J.C., 2004).

Per questo nel corso dell'ultimo decennio, è accresciuto l'interesse nei confronti di composti che potessero agire anche su batteri che sviluppano resistenza. A tale scopo la ricerca ha rivolto la sua attenzione su peptidi antimicrobici già presenti in diverse specie, sia vegetali che animali. Tali composti si sono rivelati essere attivi anche contro ceppi resistenti ai classici antibiotici e ciò conferisce loro un ruolo d'elezione in quanto molecole potenzialmente utilizzabili nelle terapie come agenti anti-infettivi (Overbye K.M. *et al*, 2005).

CAPITOLO 3

Disegno sperimentale dei peptidi antimicrobici

3.1 Peptidi utilizzati nello studio

I peptidi antimicrobici (Antimicrobial peptides, AMPs), nello specifico AMP72, AMP126 e AMP2041 testati nel corso del Dottorato sono frutto della collaborazione tra la Unità Operativa di Malattie Infettive del Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie e il Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Parma e l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, e recentemente oggetto di deposito congiunto Università – Ospedale (MI2012A002263) (brevetto internazionale in fase di stesura). Tali peptidi non sono derivati da peptidi naturali e sono stati disegnati *in silico* mediante un programma scritto in Perl da uno degli inventori per individuare sequenze aminoacidiche a potenziale attività antimicrobica. Questo programma si compone da 4 blocchi: l'unità di generazione delle sequenze (*random aminoacid sequences generation*), una unità di filtro (*first pass sequence filtering*), una unità di screening (*prediction of potential antimicrobial activity*) e una unità di scoring (*second pass sequence filtering*). Il core del programma è rappresentato dall'unità di screening che utilizza 5 reti neurali per individuare quelle sequenze peptidiche con potenziale attività antimicrobica. La percentuale di individuazione di potenziali AMPs si aggira tra lo 0.1% e lo 0.01%. Le sequenze individuate ricalcano le caratteristiche tipiche degli AMPs (carica positiva, idrofobicità, amfipaticità, angolo polare, etc). L'analisi di diverse

centinaia di migliaia di sequenze ha permesso di individuare un pool di un centinaio di candidati. Sono state successivamente sintetizzate da un'azienda che produce peptidi custom le prime 10 sequenze di questa libreria. I peptidi sintetizzati sono caratterizzati da differenti proprietà fisico-chimiche che consentono di rappresentare un ampio spettro di AMPs.

Oggetto di questa tesi di Dottorato è stata la caratterizzazione microbiologica di 3 sequenze peptidiche le cui principali caratteristiche sono illustrate nella tabella di seguito riportata.

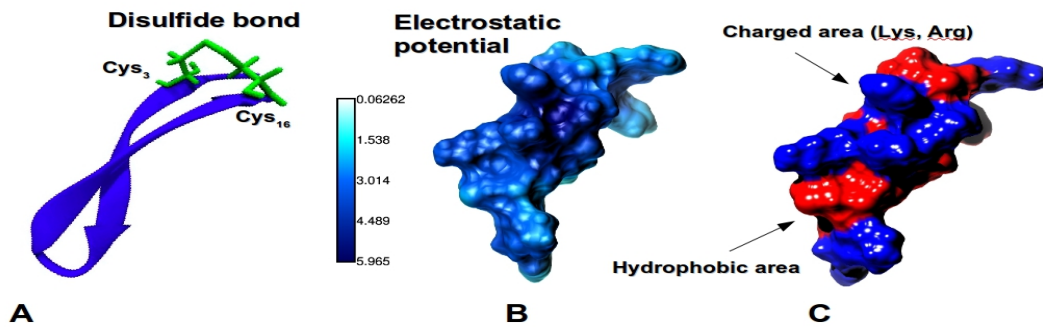
Peptide	Sequence	Mass (estimated [§])	Charge	Hydroph. ratio	Mean Hydr. [°]	Amphipaticity	Lipophilicity	Boman Index*
AMP72	KGCALVKVRGLTKVCK	1814.34 (1816.40) 2249.50	5	52.0%	-1.32	2.11	0.70	0.38
AMP126	KWCRKQWRGVKFIKCV	(2251.48) 2025.48	6	52.0%	-0.92	2.04	3.18	1.81
AMP2041	HKCAKIKWRGVHVKYCA	(2027.50)	7	47.0%	-2.90	3.30	0.29	1.42

Tabella 1. Proprietà fisico-chimiche. [§] stima teorica della massa del peptide. [°] il valore di idrofobicità è stato calcolato utilizzando la scala di consenso combinato secondo Tossi *et al.* (1997); * l'indice di Boman index viene definito come la somma delle energie libere delle rispettive catene laterali ne trasferimento di energia dal cicloesano all'acqua (Boman H.G., 2003).

Le caratteristiche strutturali di questi peptidi sono ottenute da un modello computazionale costruito mediante homology modelling su quello di arenicina1. I peptidi sono caratterizzati da due filamenti costituiti da due foglietti beta antiparalleli stabilizzati da 3 - 6 legami idrogeno intrafilamento e da un ponte disolfuro tra Cys₃ and Cys₁₆ (Figure 2A). Il filamento del foglietto beta è connesso mediante un β -turn di tipo I. La carica dei peptidi varia da +5

(AMP72) fino a +7 (AMP2041). Il potenziale elettrostatico di superficie (Fig. 2B) del peptide rappresentativo AMP 126 ha rivelato grandi aree idrofobiche separate da catene laterali caricate positivamente con arginina e lisina (Figure 2C). Questa distribuzione di aree cariche e idrofobiche è stata determinata dalla una torsione destrorsa della struttura del foglietto beta.

Figure 2A, 2B, 2C. : Struttura dei peptidi di nuova sintesi. (A) La struttura del peptide



rappresentativo AMP2041 mostra due foglietti beta a doppio filamento antiparalleli e un ponte disolfuro (Cys₃-Cys₁₆); (B) potenziale elettrostatico di superficie di AMP2041 (C)superficie idrofobica, rivela le caratteristica distribuzione dell'area carica su AMP2041

CAPITOLO 4

Valutazione attivita' antimicrobica AMPs

In questo capitolo vengono descritte le diverse prove effettuate per valutare l'attività antimicrobica di AMP72, AMP126 e AMP2041. Tali prove sono state effettuate inizialmente in medium ottimali per l'attività dei peptidi (in basse concentrazioni di sali, PB) e successivamente in terreni più complessi, con concentrazioni di sale fisiologiche o parafisiologiche. E' stata valutata inoltre l'attività antimicrobica dei peptidi a concentrazioni fisse in funzione del tempo, utile per rilevare la velocità di azione dei diversi AMPs. Allo scopo di verificare un possibile utilizzo terapeutico di tali peptidi, sono state valutate le potenzialità di sinergia dei peptidi con antibiotici convenzionali utilizzando la metodica di diluizione a scacchiera nei confronti di *P. aeruginosa*.

4.1 Peptidi

Le 3 sequenze peptidiche AMP72, AMP126 e AMP2041, selezionate come indicato precedentemente, sono state sintetizzate dalla SelleckChem (Houston, TX, USA). La purezza dei peptidi (>90%), le sequenze e concentrazioni sono state determinate e fornite da SelleckChem utilizzando le tecniche di HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) e spettroscopia di massa. I peptidi liofilizzati sono stati risospesi in una soluzione tampone di fosfato 10mM (PB, 0.8709g/L K_2HPO_4 , 0.6804g/L KH_2PO_4) alla concentrazione di 1 mg/ml.

4.2 Ceppi batterici

Per le prove condotte durante il periodo di Dottorato sono stati utilizzati i seguenti ceppi batterici, provenienti da Mast Diagnostic (Mast Diagnostic, Germania): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* Meticillino-resistente (MRSA) ATCC 43400, *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637.

4.3 Profili di antibiotico-resistenza

La sensibilità agli antibiotici dei ceppi di riferimento venne valutata usando le metodiche standard di Kirby-Bauer (Quinn PJ *et al*, 1994). I test di diffusione furono completati valutando la sensibilità dei dischetti antibiotati (Mast Diagnostics, Germany). Le sensibilità agli antibiotici sono state calcolate sulla base dei criteri sviluppati dal CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), precedentemente NCCLS (National Committee for Clinical and Laboratory Standards) (CLSI, 2008). Nella valutazione della sensibilità (Tabella 1) agli antibiotici furono inserite 15 classi di antibiotici così come suggerito da EUCAST (2012):

aminoglicosidi: *amikacina, gentamicina, streptomina*

carbapeni: *imipenem;*

cefalosporine (1^a generazione): *cefadroxil*;

cefalosporine (3^a generazione): *ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime*;

macrolidi: *eritromicina*;

penicilline: *ampicillina, amoxicillina*;

combinazioni di penicilline: *amoxicillina + acido clavulanico*;

fenicoli: *cloramfenicolo*;

polipetidi: *colistina*;

rifamicine: *rifaximina*

chinoloni: *ciprofloxacina*;

sulfonamidi: *trimethoprim+ sulfametossazolo*;

tetracicline: *doxyciclina*;

polichetidi: *mupirocina*;

derivati del nitrofurano: *nitrofurantoina*

Nella tabella di seguito riportata vengono illustrate le sensibilità alle diverse

classi di antibiotici degli stipiti batterici testati.

Antibiotic	S. aureus ATCC 25923	MRSA ATCC43400	S. agalactiae ATCC 27956	E. coli ATCC 25922	P. aeruginosa ATCC 27853	S. maltophilia ATCC 13637	S. enteritidis ATCC 13076
Amikacin (30 µg)	11 (R)	24 (S)	--	21 (S)	18 (S)	8 (R)	17 (R)
Amoxicillin (25 µg)	--	--	24 (S)	37 (S)	--	--	38 (S)
Amox. + Clav. Acid (30µg)	16 (R)	11 (R)	22 (R)	30 (S)	0 (R)	16 (R)	30 (S)
Ampicillina (25 µg)	21 (R)	18 (R)	25 (S)	38 (S)	--	--	39 (S)
Cefadroxil (30 µg)	14 (R)	22 (S)	20 (S)	19 (S)	--	--	23 (S)
Ceftriaxone (30 µg)	16 (R)	15 (R)	18 (S)	40 (S)	--	--	31 (S)
Ceftazidime (30 µg)	--	--	--	32 (S)	25 (S)	27 (S)	33 (S)
Cefotaxime (30 µg)	16 (R)	0 (R)	25 (S)	0 (R)	--	--	26 (R)
Ciprofloxacina (5 µg)	17 (R)	0 (R)	--	33 (S)	23 (R)	18 (R)	27 (S)
Chloramphenicol (30 µg)	17 (R)	14 (R)	21 (S)	28 (S)	--	--	31 (S)
Colistin (10 µg)	--	--	--	11 (R)	10 (R)	11 (R)	13 (I)
Doxycycline (30 µg)	23 (S)	27 (S)	19 (R)	--	--	--	--
Erythromycin (15 µg)	14 (R)	0 (R)	17 (R)	--	--	--	--
Gentamicin (10 µg)	10 (R)	11 (R)	--	18 (S)	16 (S)	0 (R)	13 (R)
Imipenem (10 µg)	20 (R)	25 (R)	18 (S)	34 (S)	27 (S)	38 (S)	38 (S)
Mupirocin (5 µg)	17 (R)	0 (R)	--	--	--	--	--
Nitrofurantoin (100 µg)	19 (S)	12 (R)	20 (S)	37 (S)	--	--	32 (S)
Rifaximin (40 µg)	20 (R)	21 (R)	22 (S)	--	--	--	--
Streptomycin (25 µg)	--	--	--	--	--	--	--
Trime.+Sulfamet. (25 µg)	20 (S)	19 (S)	11 (R)	10 (R)	--	18 (S)	10 (R)

Tabella 2. Sensibilità alle diverse classi di antibiotici degli stipiti batterici testati.

4.4 Preparazione della sospensione batterica

Per ogni ceppo di referenza, sono state selezionate, da piastre di agar sangue, da tre a cinque colonie morfologicamente simili e inoculate in provette contenenti 6 ml di brodo Brain Heart Infusion (DIFCO, USA).

Le provette sono state vortexate e incubate a 37°C in agitazione a 225r.p.m. per 3-4 ore, fino al raggiungimento di un grado di torbidità richiesto, uguale o maggiore a 0.5 della scala di Mc Farland. Successivamente la sospensione batterica è stata centrifugata a 1000 giri per 20 minuti. Il pellet di batteri ottenuto è stato risospeso in PB 10mM. La torbidità è stata aggiustata con lo stesso soluzione tampone e verificata misurando l'assorbanza della sospensione allo spettrofotometro. L'assorbanza è stata valutata uguale a 0.5 della scala di Mc Farland quando la densità ottica a 600nm era compresa tra 0.08-0.13. A questo

valore la sospensione batterica contiene approssimativamente 10^8 UFC/ml. Duecento microlitri della sospensione batterica valutata e aggiustata sono stati aggiunti a 19.8 ml di PB 10mM per ottenere una diluizione finale di 1:100. Poi, entro mezz'ora, 0.05 ml di questa sospensione (10^6 UFC/ml) sono stati inoculati in ogni pozzetto di una piastra ELISA, per ottenere una concentrazione finale di batteri di circa 5×10^5 UFC/ml.

4.5 Preparazione delle piastre e valutazione della MBC

Un volume di 50 μ l di peptidi alla concentrazione di 400 μ g/ml è stato posto nella prima riga della piastra. Ad ogni colonna da 1 a 10, sono stati aggiunti 50 μ l di PB 10mM. Sono state effettuate delle diluizioni seriali dalla colonna 1 alla colonna 10, cosicché le concentrazioni del peptide risultassero comprese con tra 200 μ g/ml e 0.4 μ g/ml in ordine seriale decrescente.

Successivamente, in ogni pozzetto, vennero aggiunti 50 μ l di sospensione batterica.

Nella colonna 11, vennero aggiunti 50 μ l di PB 10mM + 50 μ l di sospensione batterica come controllo di crescita, mentre nella colonna 12, vennero aggiunti 100 μ l di PB 10mM come controllo di sterilità. Le piastre sono state incubate per 2 ore a 37°C, e poi 20 μ l di ogni diluizione è stata seminata su agar MC Conkey (DIFCO) per i Gram-negativi e su Triptosio Agar (DIFCO) contenente il 5% di globuli rossi di bovino per i batteri Gram-positivi. Dopo un'incubazione di 24 ore a 37°C le colonie sono state conteggiate. La MBC è stata considerata come la più bassa concentrazione di peptide capace di uccidere il 100% dei batteri.

4.6 Attività antimicrobica dei peptidi in concentrazioni crescenti di sale

Al fine di valutare l'attività antimicrobica dei peptidi testati in ambienti a osmolarità fisiologica o parafisiologica, AMP72, AMP126 e AMP2041 sono stati posti in medium contenenti NaCl a diverse concentrazioni (10 mM, 125 mM, 250mM). L'attività antimicrobica è stata valutata su colture di *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Per la preparazione delle sospensioni batteriche e delle piastre si è proceduto come precedentemente indicato, variando solo la concentrazione salina del tampone impiegato. Dopo un periodo di incubazione di 2 ore, 20 microlitri sono stati prelevati e seminati su adatti terreni. La conta delle CFU è stata effettuata dopo incubazione overnight delle piastre agarizzate.

4.7 Time course dell'attività antimicrobica dei peptidi verso ceppi Gram positivi e Gram negativi

1×10^6 CFU di sospensione batterica in crescita esponenziale sono stati risospesi in 100 μ l di PB 10mM e messi a contatto con i peptidi AMP72, AMP126 e AMP 2041 a valori di MBC e incubati a 37°C. Successivamente 20 μ l sono stati seminati a differenti intervalli di tempo (ogni 5' fino a 30', poi ogni 10' fino a 60'. poi ogni 30' fino a 120') su terreni specifici per le differenti specie batteriche analizzate. I controlli di crescita sono stati allestiti in PB in assenza di

peptide e seminati su terreno solido ad ogni intervallo di tempo per il conteggio delle CFU. Infine, dopo un'incubazione overnight a 37°C, è stato effettuato il conteggio delle colonie.

4.8 Studio combinato

Gli antibiotici convenzionali inseriti in questo test sono amikacina, tobramicina e levofloxacin. È stato utilizzato come antibiotico peptidico di riferimento la colistina. I risultati sono stati espressi come Concentrazione Frazionaria di Inibizione o FIC index. La procedura sperimentale si basa sul synergy-test o test a scacchiera nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. Diluizioni in base 2 di AMP126, AMP2041 o colistina sono stati testati in associazione con diluizioni in base 2 di amikacina, tobramicina e levofloxacin. L'intervallo di concentrazione si è basato su valori di MIC.

Il risultato del test a scacchiera è stato espresso come indice di FIC:

$$\left(\frac{\text{MIC antibiotico}_A \text{ associato}}{\text{MIC antibiotico}_A \text{ da solo}}\right) + \left(\frac{\text{MIC antibiotico}_B \text{ associato}}{\text{MIC antibiotico}_B \text{ da solo}}\right).$$

Per l'interpretazione dei risultati è stato utilizzato il metodo del più basso indice di FIC, riferito al primo pozzetto non torbido dopo una fila di pozzetti torbidi.

La sinergia è stata definita per indici $\text{FIC} \leq 0.5$; l'additività per indici $0.5 \leq \text{FIC} \leq 1.0$; l'indifferenza per indici FIC tra 1 e 4 e l'antagonismo per indici $\text{FIC} > 4$.

CAPITOLO 5

5.1 Metodica del saggio di permeabilizzazione di membrana mediante stipite di E. coli ML-35pYC

Per verificare il meccanismo d'azione battericida esercitato dai diversi AMPs in esame, è stata valutata la capacità di permeabilizzazione delle membrane interna ed esterna di uno stipite di E. coli ingegnerizzato, ML35pYC. Tale batterio presenta nello spazio periplasmatico una β -lattamasi che in presenza di danno alla membrana, viene liberata all'esterno del batterio e consente la degradazione dell'anello beta-lattamico di un antibiotico cromogeno (CENTA). Inoltre, tale batterio esprime costitutivamente a livello citoplasmatico una β -galattosidasi che in seguito a distruzione della membrana interna, viene liberata nel medium circostante consentendo il clivaggio di un substrato cromogeno (ONPG). La valutazione del danno di membrana viene effettuata mediante indagine spettrofotometrica dei derivati cromogeni sopra descritti. Il concomitante aumento di Densità Ottica (O.D.) dei due cromogeni assicura *bona fide* il meccanismo d'azione tipico dei peptidi antimicrobici.

A tal fine, i batteri sono stati seminati in 15 ml di brodo Mueller Hinton (DIFCO) con ampicillina 50 μ g/ml e messi ad incubare per una notte a 37°C. Trecento microlitri di sospensione batterica sono stati aggiunti a 15 ml di una nuova soluzione di Mueller Hinton con aggiunta di ampicillina 50 μ g/ml e lasciati ad incubare per circa 2-3 ore a 37°C: la sospensione è stata centrifugata a 1000xg

per 10 minuti e il pellet risospeso in PB. Sessanta microlitri di una soluzione di CENTA e ONPG a 1.5 e 15 mM, rispettivamente, in PB, precedentemente preparata, sono stati aggiunti a 60 μ l di sospensione batterica e posti in una cuvette contenente 480 μ l di PB. Successivamente è stato aggiunto il peptide alla concentrazione finale di 5 μ M (12.5 μ g/ml) e la cinetica della comparsa del colore è stata seguita per 120 minuti. La cinetica di permeabilizzazione della membrana esterna del batterio è stata valutata ogni 5 min, misurando fotometricamente a 405 nm l'attività della β -lattamasi periplasmatica sull'antibiotico cromogeno CENTA ed a 600 nm l'attività della β -galattosidasi citoplasmatica sul substrato ONPG. I risultati hanno evidenziato la capacità di questi peptidi di permeabilizzare in maniera tempo-dipendente le membrane interna ed esterna del batterio.

CAPITOLO 6

Valutazione della citotossicità dei peptidi

Per valutare la selettività dei peptidi AMP72, AMP126 e AMP2041 nei confronti delle membrane delle cellule batteriche, ne abbiamo esaminato l'attività citotossica alla concentrazione 100 µg/ml verso globuli rossi di montone. Gli eritrociti sono stati incubati in PB con saccarosio 308 mM. La presenza dello zucchero si rende necessaria per mantenere l'osmolarità in un ambito fisiologico, senza alterare l'attività biologica del peptide.

6.1 Test di emolisi

Sangue fresco e eparinizzato di montone è stato centrifugato a 100xg per 15 minuti. Gli eritrociti sono stati lavati tre volte con PBS, centrifugati a 1000xg per 10 minuti, e risospesi in tampone fosfato + saccarosio all'1% a 308mM.

A 100 µl di sospensione di eritrociti sono stati aggiunti 100µl dei peptidi analizzati precedentemente diluiti serialmente in PB (100, 12.5 e 1 µg/ml). Dopo un'ora di incubazione a 37°C la sospensione è stata centrifugata a 1000xg per 5' rimuovere gli eritrociti intatti; 150 µl di sovrinatante sono stati trasferiti nei pozzetti di una piastra ELISA a fondo piatto ed è stata misurata l'assorbanza a 450nm, indicante il rilascio di emoglobina. Il controllo negativo (0% di emoglobina rilasciata) e il controllo positivo (100% di emoglobina rilasciata) sono stati ottenuti utilizzando rispettivamente PB+308mM di saccarosio e 1% di Tween 20.

La percentuale di eritrociti intatti è stata calcolata come segue:

$$\left(1 - \frac{A_{pep} - A_{PB}}{A_{Tween} - A_{PB}}\right) \times 100$$

dove A_{pep} era l'assorbanza a 450nM nei pozzetti contenenti il peptide, A_{PB} l'assorbanza a 450nM nei pozzetti contenente il tampone e A_{Tween} l'assorbanza a 450nM nei pozzetti contenenti la soluzione Tween20. E' stata definita la Hemolytic Concentration 5% (HC5) come la più alta concentrazione del peptide che causa il 5% di rilascio di emoglobina.

CAPITOLO 7

Risultati

7.1 Attività antimicrobica

I peptidi purificati mediante HPLC (indice di purezza dall'85.5 al 93.5%), sono stati utilizzati per determinare la MBC nei confronti di numerosi batteri Gram-negativi e Gram-positivi patogeni per uomo e animali. La tabella 3 mostra i risultati delle MBC sia nei confronti dei batteri Gram-negativi che dei Gram-positivi con concentrazioni di MBC comprese tra 0.4 e 100 µg/ml di peptide.

I peptidi testati mostrano una MBC simile contro *P. aeruginosa* (<5 µg/ml), ed in particolare AMP126 è risultato essere il più potente con una MBC di 0.4 – 0.6 µg/ml.

Inoltre, una elevata attività contro *E. coli* è stata osservata per AMP2041 (1.8µg/ml) e AMP126 (2.2µg/ml). Nei confronti di *Stenotrophomonas maltophilia* solo AMP2041 ha mostrato una MBC inferiore a 10 µg/ml. Nei confronti di *Salmonella enteritidis* AMP2041 e AMP126 hanno presentato un'attività antimicrobica con MBC a 12,5 µg/ml mentre AMP72 si è dimostrato efficace contro *Salmonella* ad una MBC di 3.2 µg/ml. AMP2041 ha mostrato la maggiore attività verso *S. aureus* (3.7µg/ml), mentre AMP126 ha mostrato la minore attività (46.5µg/ml). Solo AMP2041 e AMP72 hanno mostrato elevata attività nei confronti della variante meticillino resistente di *S. aureus* (2.25 and 1.72µg/ml, rispettivamente). Solo AMP126 ha mostrato una potente attività nei confronti di *Streptococcus agalactiae* (2.81 µg/ml). Nessuno dei peptidi testati ha inibito la crescita di *Burkholderia cepacia* e *Enterococcus faecalis* (MIC ≥

100 µg/ml).

Antimicrobial activity [MIC, µg/ml] (Therapeutic Index)									
Bacterial strains									
Peptides	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	MRSA	<i>B.cepacia</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>S.agalactiae</i>	<i>S.enteritidis</i>	<i>S.maltophilia</i>
AMP2041	4.35 (23.0)	1.79 (55.8)	3.71 (27.0)	2.25 (44.4)	≥100 (0.5)	≥100 (0.5)	≥100 (0.5)	10.41 (9.60)	7.0 (14.2)
AMP72	3.30 (30.3)	3.40 (29.4)	6.88 (14.5)	1.72 (58.1)	≥100 (0.5)	≥100 (0.5)	≥100 (0.5)	3.2 (31.2)	18.5 (5.40)
AMP126	0.4 (250)	2.22 (45.1)	46.5 (2.1)	>100 (0.5)	≥100 (0.5)	≥100 (0.5)	2.81 (35.5)	10.81 (9.25)	16.6 (6.02)

Tabella 3 La più bassa concentrazione inibente la crescita dei batteri (MIC) dei peptidi verso diversi ceppi di Gram negativi e Gram positivi. I batteri sono stati pre-incubati in fase logaritmica in brodo BHI fino ad ottenere 10⁶ unità formanti colonie (CFU)/ml. Cinquanta microlitri di soluzione batterica sono stati incubati con 50µl di PB contenente differenti concentrazioni di peptide. La MIC è stata determinata come concentrazione di peptide alla quale non viene osservata crescita batterica. Sono stati eseguiti in doppio tre esperimenti indipendenti.

7.2 Attività antimicrobica in presenza di concentrazioni diverse di sale e di EDTA

L'attività antimicrobica dei peptidi può essere inibita in presenza di fisiologiche concentrazioni di cloruro di sodio e/o cationi divalenti. Allo scopo di capire l'influenza di ioni divalenti (Mg⁺⁺, Ca⁺⁺) e monovalenti (Na⁺) sull'attività di peptidi antimicrobici, è stata valutata l'attività antibatterica in medium contenenti differenti concentrazioni di sali (NaCl, MgCl₂). Come mostrato in tabella 4, l'attività in medium contenente NaCl a diverse concentrazioni era generalmente mantenuta per i batteri Gram-negativi. Alla più alta concentrazione di NaCl utilizzata (250 mM) AMP2041 a 12.5 µg/ml risultava avere la migliore attività con una riduzione del 90% di CFU. Alla stessa concentrazione di NaCl,

AMP126 mostrava ancora una elevata attività (85% a 12.5µg/ml) mentre AMP72 riduceva le CFU solo del 64.2% a 12.5 µg/ml. In generale, una scarsa attività antibatterica era rilevabile contro i batteri Gram-positivi a concentrazione superiori a 125 mM NaCl (<15% vs controllo). La presenza di ioni divalenti ha determinato un marcato decremento dell'attività antibatterica a quasi tutte le concentrazioni di MgCl₂ utilizzate. In particolare, AMP126 è risultato essere il più sensibile alla presenza di Mg⁺⁺ con un aumento della MBC di 100 volte circa quella ottenuta in tampone fosfato. AMP72 non è stato inserito nei test con ioni divalenti a causa della sua bassa attività (64% a 12.5 µg/ml) in presenza di NaCl 250mM. Successivamente, con l'intento di aumentare l'efficacia dei peptidi antimicrobici testati, è stata valutata l'attività dell'acido etilendiamino tetracetico (EDTA) di chelare gli ioni divalenti Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺. Il profilo di attività antimicrobica di AMP126 su *Pseudomonas aeruginosa* mostra come in presenza di ioni divalenti ed EDTA 2mM l'attività antimicrobica (MBC) ritorni a valori prossimi a quelli ottenuti in PB (3.2 vs 4.35 µg/ml). Un significativo aumento di attività è stato rilevato alla concentrazione di 3.2mM di EDTA con un valore di MBC di 50µg/ml e una LD90 di 25µg/ml.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853								
[NaCl]	10mM		50mM		125mM		250mM	
[Peptide]	100µg/ml	12.5µg/ml	100µg/ml	12.5µg/ml	100µg/ml	12.5µg/ml	100µg/ml	12.5µg/ml
AMP72	100%	100%	100%	100%	100%	100%	80.5%	64.2%
AMP126	100%	100%	99.8%	99.4%	99.8%	97.1%	98.1%	85.2%
AMP2041	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.8%	98.3%

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922								
[NaCl]	10mM		50mM		125mM		250mM	
[Peptide]	100µg/ml	12.5µg/ml	100µg/ml	12.5µg/ml	100µg/ml	12.5µg/ml	100µg/ml	12.5µg/ml
AMP72	100%	100%	100%	100%	99.4%	70.6%	44.6%	25.8%
AMP126	100%	100%	100%	99.6%	100%	98.6%	89.6%	85.7%
AMP2041	100%	100%	100%	100%	100%	99.9%	99.5%	67.7%

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923								
[NaCl]	10mM		50mM		125mM		250mM	
[Peptide]	100µg/ml	12.5µg/ml	100µg/ml	12.5µg/ml	100µg/ml	12.5µg/ml	100µg/ml	12.5µg/ml
AMP72	98.2%	87.0%	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%
AMP126	92.0%	<10%	82.0%	<10%	75%	<10%	48.8%	<10%
AMP2041	100%	97.2%	100%	95%	84.5%	<10%	<10%	<10%

Tabella 4 Effetto della concentrazione del sale sulla attività antimicrobica degli AMPs. I ceppi batterici studiati sono stati incubati con 100 and 12.5 µg/ml di peptide antimicrobico in PB a differenti concentrazioni di sale. I valori ottenuti indicano le percentuali di attività antimicrobica nei confronti del controllo di crescita; i controlli sono stati effettuati per ogni concentrazione di sale. I caratteri in grassetto indicano un'attività antimicrobica superiore all' 85%.

7.3 Time course dell'attività antimicrobica dei peptidi verso batteri Gram positivi e Gram negativi

Allo scopo di valutare il perdurare nel tempo dell'efficacia antimicrobica dei peptidi, colture di *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, rappresentativi di specie di Gram-negativi e Gram-positivi, sono state incubate con una concentrazione di 12.5 µg/ml dei peptidi AMP72, AMP126 e AMP2041. I campioni sono stati seminati

ad intervalli tra zero e 120 minuti come precedentemente indicato. La Figura 3 mostra che AMP126 e AMP2041 esercitano una forte attività antimicrobica contro *Pseudomonas aeruginosa* determinando una significativa riduzione del 50% nel conteggio del numero delle CFU entro i dieci minuti dopo l'incubazione del peptide, con una completa attività battericida nei successivi 10 minuti. Per quanto concerne AMP72 la riduzione del 50% delle CFU si ha 30 minuti dopo l'incubazione del peptide, con una totale attività battericida in 90 minuti.

Il numero di *E. coli* si è ridotto del 50% entro i primi 5 minuti utilizzando AMP126, con AMP2041 invece il tempo richiesto per ottenere la riduzione della crescita al 50% è stato di 20 minuti. Risulta interessante notare come AMP72 esibisce un effetto batteriostatico durante i primi 30 minuti di incubazione, a cui segue una rapida fase battericida nei successivi 20 minuti, che si conclude a 50 minuti dall'incubazione con il peptide con la totale assenza di crescita batterica. L'attività mostrata nei confronti di *Staphylococcus aureus* è risultata simile per tutti i peptidi testati. Come si evince dalla Figura 3, notiamo una riduzione del 50% del conteggio delle CFU in 60 minuti, entro 120 minuti dall'incubazione del peptide si osserva un'ulteriore riduzione al 66%. Nessuno dei peptidi utilizzati è stato capace di impedire la totale crescita degli Stafilococchi.

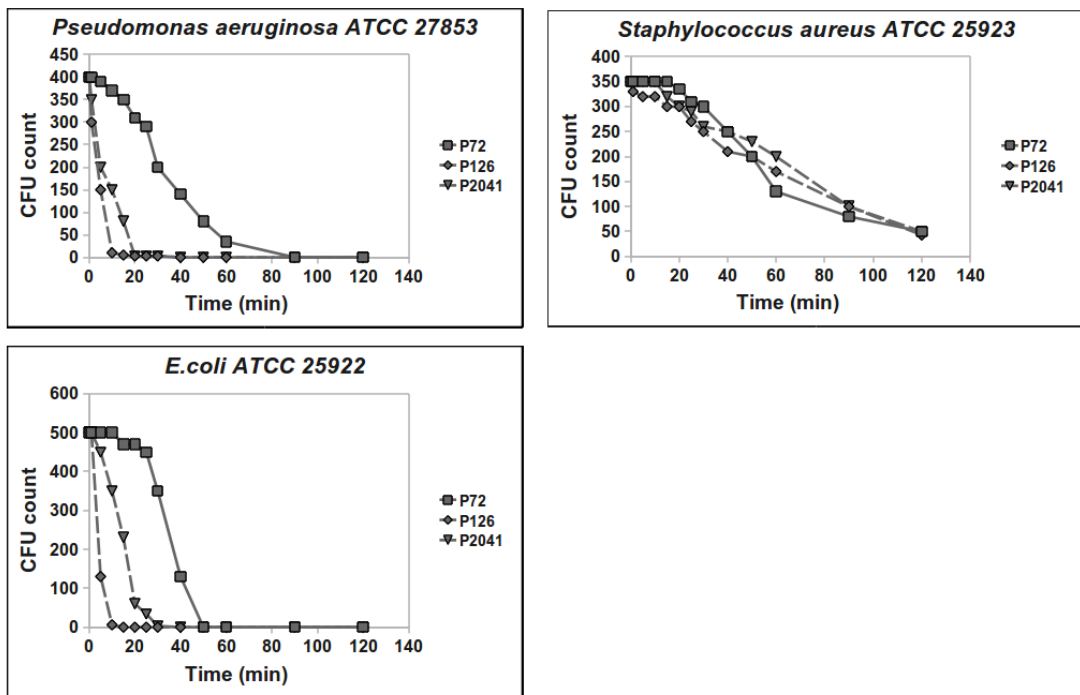


Figure 3 Time-kill kinetic assay. La capacità di uccidere tutti i batteri degli AMPs su batteri rappresentativi per Gram negative e per Gram positivi è stata dimostrata valutando la loro attività battericida tempo-dipendente. I batteri sono stati fatti crescere in fase in brodo BHI (Difco) fino ad ottenere 10^6 unità formanti colonie (CFU)/ml. Cinquanta microlitri di sospensione batterica sono stati incubati insieme a 50 microlitri di PB contenente $12.5 \mu\text{g/ml}$ di peptidi di sintesi (AMP126,AMP72 and AMP2041). Aliquote di $20 \mu\text{l}$ a diversi intervalli di tempo sono stati seminati su piastre di agar McConkey o agar tryptosis agar e incubati per 24h a 37°C .

7.4 Studio combinato

Una promettente strategia preventiva dovrebbe essere rappresentata dalla combinazione di una terapia che utilizza antibiotici di tipo convenzionale capaci di rendere più sensibili i batteri all'attività dei peptidi. Perciò risultò interessante

valutare se levofloxacinina o aminoglicosidi così come amikacinina e tobramicinina potessero influenzare la stabilità dell'OM migliorando o diminuendo l'attività antimicrobica dei peptidi. Le MIC utilizzando levofloxacinina, colistinina, amikacinina e tobramicinina (0.25 – 0.4 µg/ml) contro i ceppi di referenza di *Pseudomonas aeruginosa* hanno dato risultati sovrapponibili al profilo di sensibilità dell'antibiogramma e si sono mantenuti a livelli accettabili di MIC secondo il CLSI (2008). I valori delle MIC sono stati utilizzati per calcolare l'intervallo di concentrazione testato nello studio combinato (vedi Tabella 5). I peptidi arruolati nello studio combinato sono stati AMP126 e AMP2041, mentre sulla base dei risultati ottenuti dal saggio che valutava l'attività antimicrobica in presenza di elevate concentrazioni di sale, il peptide AMP72 è stato escluso da questa indagine.

In questa indagine, abbiamo scelto la colistinina come peptide antibiotico di riferimento per valutare l'eventuale sinergia con gli antibiotici convenzionali precedentemente menzionati. I risultati ottenuti (Tabella 6) non mostrarono un incremento significativo dell'azione della colistinina in associazione ai predetti antibiotici (valore FIC compresi tra 1.05-1.5). In particolare, trattamenti contenenti peptidi dimostrarono che esiste un'interessante attività sinergica con gli antibiotici convenzionali testati. In particolare, AMP126 in associazione all'amikacinina risulta essere l'unione più efficace paragonata alla colistinina (FIC valori di 0.63 contro valori di 1.25). L'associazione ad azione battericida di 0.2 µg/ml di AMP126 con 1 µg/ml di amikacinina ha dato come risultato una FIC di 0.63 indicante l'additività. L'associazione tra AMP126 (0.2 µg/ml) e

levofloxacin (2 µg/ml) ha generato un indice FIC di 0.51, valore elevato vicino al passaggio da additività a sinergismo. Simili risultati sono stati ottenuti per AMP2041 (0.2 µg/ml) e levofloxacin (2 µg/ml), con un indice FIC di 0.52. Al contrario, nessun cambiamento è stato notato, paragonato alla colistina, quando i peptidi sono stati associati alla tobramicina (valore indice FIC 1.25 vs 1.5).

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			
	Acceptable MICs range (µg/ml)*	Tested range (µg/ml)	MIC (µg/ml)
AMIKACIN	1-4	0.125-8	1
COLISTIN	0.25-2	0.06-16	1-2
LEVOFLOXACIN	0.5-4	0.125-8	2-4
TOBRAMYCIN	0.25-1	0.064-256	0.25

Tabella 5. MIC dei diversi antibiotici verso *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *intervalli accettabili come indicato dal CLSI(2008).

	Divalent cation chelator	Conventional Antibiotics		
	EDTA	LEVOFLOXACIN	AMIKACIN	TOBRAMYCIN
COLISTIN		1.12	1.25	1.12
vs				
AMP126		0.51	0.63	1.32
AMP2041		0.52	2.01	1.13

Tabella 6 Checkerboard Combination Assay: effetti dell'associazione degli antibiotici convenzionali con AMP126 or AMP2041 verso *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. La colistina è stata utilizzata come peptide di referenza. Una sospensione di *P. aeruginosa* è stata incubata con diluizioni seriali in base due con antibiotici associate AMPs da 0.25 a 4X la MIC. L'inibizione della crescita è stata valutata da un'ispezione visiva e per l'interpretazione del dato abbiamo utilizzato il metodo del più basso valore dell'indice FIC (Bonapace C.R. et al, 2002). La sinergia è stata definita con un indice FIC più basso di 0.5; l'additività compresa tra 0.5-1; l'indifferenza compresa tra 1-4 e l'antagonismo >4. I caratteri in grassetto indicano l'additività.

7.5 Test di permeabilizzazione

I risultati hanno evidenziato la capacità di AMP72, AMP126 e AMP2041 di permeabilizzare in maniera tempo-dipendente le membrane interna ed esterna del batterio *E. coli* ML-35pYC (Figura 4). Il comportamento dei peptidi ha avuto un andamento lievemente diverso, in particolare per AMP126. Come chiaramente mostrato dalla Figura 4, le incubazioni di *E. coli* ML-35pYC con AMP2041 e AMP72 determinano un rapido aumento della densità ottica raggiungendo un tasso di equilibrio di idrolisi di ONPG (equivalente alla massima estensione sulla membrana del fenomeno di permeabilizzazione) in rispettivamente 22 e 19 minuti. Al contrario AMP126 mostra un lineare incremento della densità ottica tempo-dipendente, senza raggiungere un tasso di equilibrio nel periodo d'osservazione di 120 minuti.

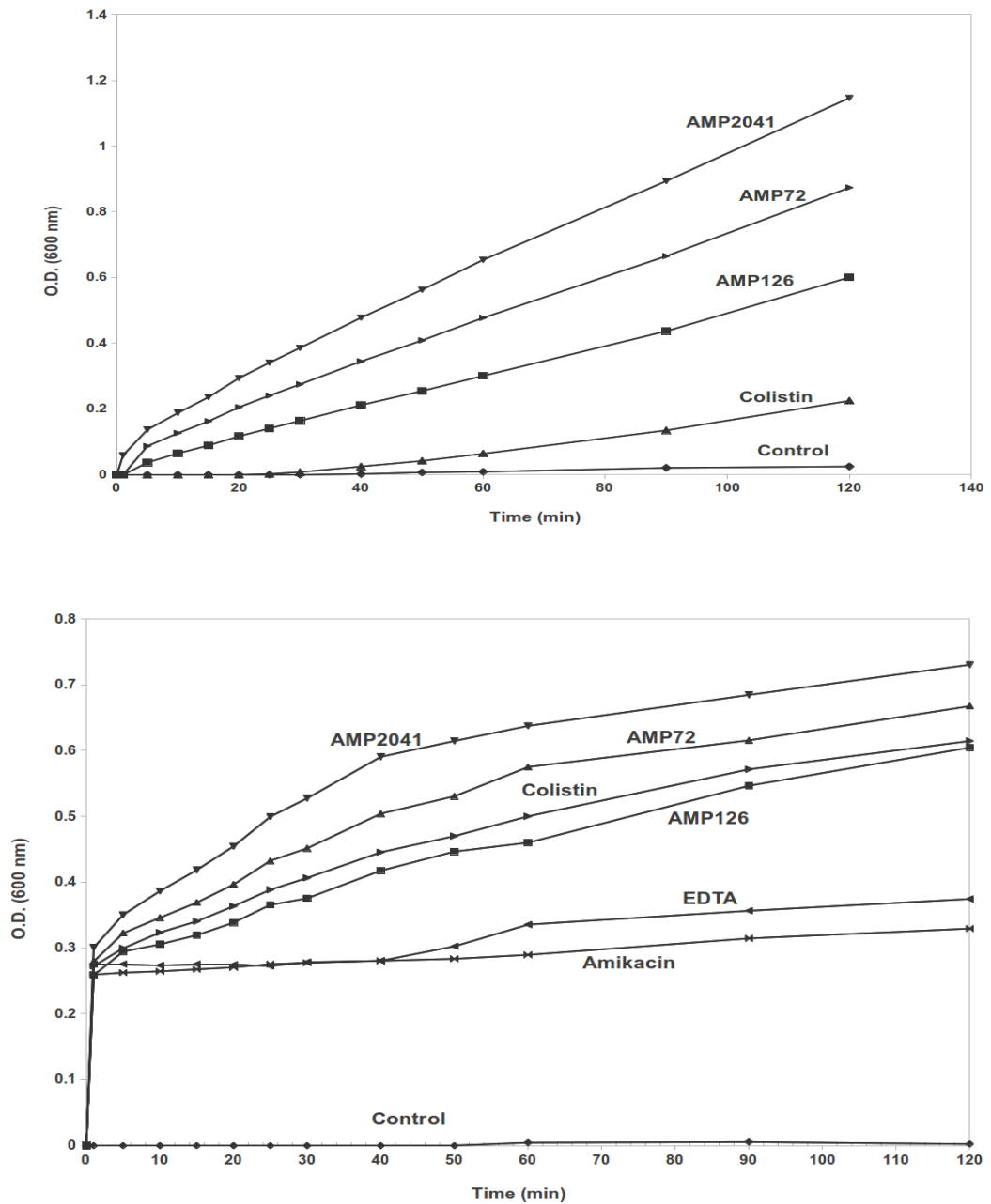


Figura 4. Test di permeabilizzazione mediata dagli AMPs sulla membrana di *E.coli* ML-35 pYC.

(A) La permeabilizzazione della membrane esterna è stata valutata attraverso una lettura allo spettrofotometro a 600 nm smascherando l'attività della β -lattamasi periplasmatica valutata mediante idrolisi di un substrato cromogeno (CENTA) impermeabile alle membrane non danneggiate. (B) La permeabilizzazione della membrane interna è stata valutata attraverso una lettura allo spettrofotometro a 600 nm smascherando l'attività della β -galattosidasi citoplasmatica valutata mediante idrolisi di un substrato cromogeno (ONPG) impermeabile alle membrane non danneggiate. Sessanta microlitri di sospensione batterica di *E.coli* (circa 10^6

CFU/ml) sono stati aggiunti a 60 µl di substrato (15mM) and posti in una cuvette contenente 480 µl di PB. Sono stati presentati gli effetti di AMP2041, AMP126, AMP72, Colistina, EDTA e Amikacina (solo per CENTA) a concentrazioni 12.5 mg/ml.

7.6 Test di emolisi

È noto che numerosi peptidi antimicrobici presentino attività emolitica. Per valutare la citotossicità dei peptidi contro le membrane delle cellule eucariote, abbiamo esaminato la loro attività emolitica verso globuli rossi di montone a concentrazioni di 50, 100 volte superiori la MIC. Dopo un'ora di incubazione si è osservata una scarsa attività emolitica, riscontrata anche nel pozzetto di controllo. Tutti i peptidi testati hanno presentato una attività emolitica non superiore al 5%.

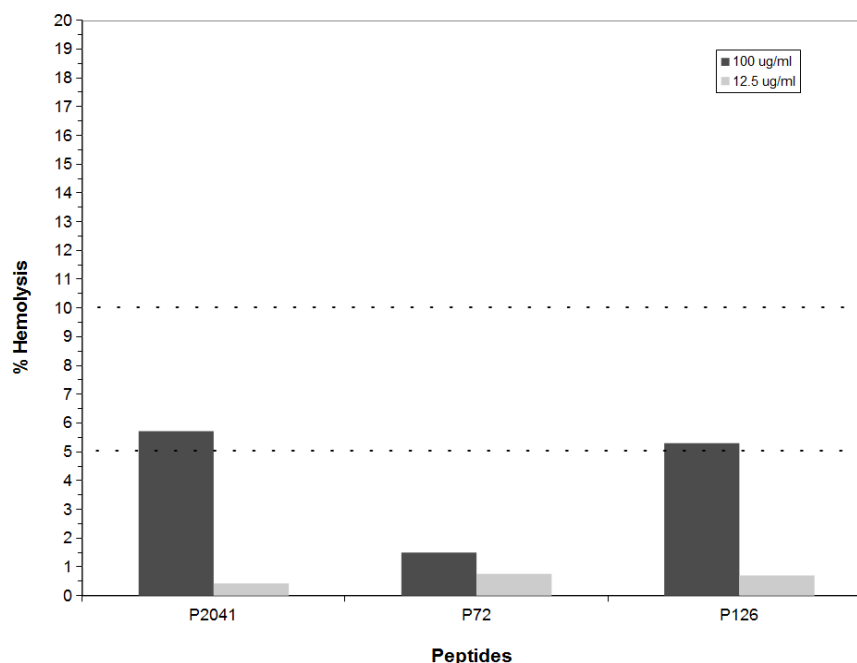


Figure 5. Attività emolitica degli AMPs su globuli rossi di pecora. L'attività emolitica degli AMPs è stata valutata usando globuli rossi di pecora. I globuli rossi sono stati incubati con i

diversi peptidi per 1 h a 37°C e la lisi misurata da un'assorbanza 450 nm leggendo una piastra ELISA. Zero percento e il 100% di emolisi sono state determinate con PB+308 mM Sucose e 0.1% Tween-20, rispettivamente. La percentuale di eritrociti intatti è stata calcolata come segue: $[1 - ((A_{\text{peptide}} - A_{\text{PB}}) / (A_{\text{Tween}} - A_{\text{PB}}))] \times 100$. Tutte le determinazioni delle emolisi sono state effettuate in doppio e sono il risultato di tre determinazioni indipendenti.

DISCUSSIONE

In questo decennio la continua emergenza di ceppi batterici patogeni, resistenti a uno o a diversi antibiotici convenzionali, e di ceppi totalmente resistenti è diventata uno dei più gravi problemi in medicina e veterinaria, proiettandoci nella cosiddetta “era post-antibiotici” (Alanis A.J., 2005).

Questa tendenza ha spinto la ricerca di nuovi e più efficaci agenti anti-infettivi. Tuttora, tra gli agenti sotto studio per usi terapeutici, i peptidi antimicrobici (AMPs) stanno suscitando notevole interesse scientifico (Reddy K.V., 2004).

Tenendo conto delle considerazioni finora effettuate, abbiamo sviluppato, utilizzando un approccio *in silico*, una nuova classe di peptidi antimicrobici e esaminato l'attività battericida contro patogeni epidemiologicamente lontani appartenenti a numerose specie batteriche.

I peptidi hanno dimostrato una differente attività nei confronti di alcuni batteri Gram-negativi e Gram-positivi, eccellente contro i batteri Gram-negativi, in particolare contro *Pseudomonas aeruginosa*. Il peptide AMP126 ha dimostrato una scarsa attività contro i batteri Gram-positivi, ad eccezione di *Streptococcus agalactiae*. I peptidi AMP2041 e AMP72 dimostrarono possedere attività battericida nei confronti di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti in misura simile a quella presentata per i ceppi che non possedevano questa caratteristica di resistenza, evidenziando che il meccanismo di meticillino-resistenza non influenza l'attività dei peptidi che dimostrarono avere un meccanismo d'azione molto diverso dai convenzionali antibiotici.

I test sulla cinetica dell'attività battericida dei peptidi nei confronti di

Pseudomonas aeruginosa e *E.coli* rivelarono che AMP2041 e AMP126 inibiscono completamente la crescita di questi ceppi batterici in meno di 20 minuti. Questi risultati dimostrano che possono esistere delle potenzialità nell'utilizzo dei peptidi AMP2041 e AMP126 nel trattamento delle infezioni batteriche. Studi precedenti hanno suggerito che l'attività di peptidi cationici dipende dalla loro capacità di legarsi attraverso un'interazione elettrostatica alla membrana esterna dei patogeni anionici, e successivamente introdursi nella membrana sfruttando un'interazione di tipo idrofobico (Oren Z. *et al*, 1998). Questo suggerisce che oltre alle componenti strutturali, i peptidi devono possedere una densità carica positivamente e un ottimo bilanciamento tra superficie idrofobica e idrofilica. Inoltre, si ritiene che la conformazione anfifilica dei peptidi possieda un'attività battericida che si esplica attraverso la distruzione delle membrane batteriche.

Il target di molti peptidi cationici è rappresentato dalla membrana citoplasmatica dei batteri, e la depolarizzazione di questa membrana da parte dei peptidi porta alla distruzione del gradiente del potenziale elettrico ($\Delta \Psi$) con conseguente morte della cellula, probabilmente dovuta alla perdita di integrità della membrana. Questo è stato dimostrato per un'elevata gamma di peptidi cationici (Juretic D. *et al*, 1989). I risultati presentati per i peptidi AMP72, AMP126 e AMP2041 evidenziano differenti attività di cinetica di permeabilizzazione e come mostrato in Tabella 2 con *E. coli*, non risultano evidenti correlazioni tra attività antimicrobica e depolarizzazione della membrana citoplasmatica.

In particolare le curve di inibizione totale di crescita dei batteri fatte in

associazione con la prova di depolarizzazione, indicarono che simili studi sulla permeabilizzazione delle membrane citoplasmatiche non corrispondevano a simili indici di attività battericida, così come mostrato per i peptidi AMP72, AMP126 e AMP2041 (Figure 3); per esempio, una significativa riduzione del numero di batteri (tra il 90% e il 99%) sembra avvenire entro i primi minuti dall'aggiunta del peptide AMP126 (Figura 4), in questo lasso di tempo in presenza dei peptidi AMP 2041 e AMP126 la permeabilizzazione della membrana citoplasmatica non era completa ed aveva raggiunto solo il 25% della massima permeabilizzazione possibile. Il passaggio del peptide attraverso la membrana è necessario per aumentare la permeabilità della membrana, questo dovrebbe giustificare il ritardo presente tra la depolarizzazione e l'uccisione del batterio. La permeabilizzazione della membrana si manifesta dopo la morte della cellula batterica e potrebbe essere annoverato tra gli effetti secondario o sussidiari dei peptidi. Questi risultati sono perciò coerenti con la teoria che la permeabilizzazione della membrana citoplasmatica, almeno per il peptide AMP126, non è l'obiettivo primario per l'uccisione dei batteri ma che un certo livello di permeabilizzazione sia richiesto allo scopo di raggiungere l'interno della cellula batterica.

L'inattivazione dell'attività batterica in presenza di sale è dipendente dalla concentrazione di cloruro di sodio. Mentre i peptidi AMP2041 e AMP126 presentano attività sale sensibili simili contro i Gram-negativi, per il peptide AMP72 si è osservata una perdita di attività antibatterica in presenza di elevate concentrazioni di cloruro di sodio. Questo potrebbe essere plausibile in quanto

la più elevata carica positiva posseduta dal peptide AMP2041 rispetto a quella del peptide AMP72 potrebbe avere un ruolo nel modulare l'attività antibatterica in presenza di cloruro di sodio. Un'altra ipotesi è che la distribuzione della carica positiva potrebbe essere determinante per la sensibilità al sale dei peptidi antibatterici. Inoltre, questa attività antibatterica sale-dipendente potrebbe essere spiegata tenendo conto che i peptidi con pochi legami idrogeno intra-backbone soffrono le elevate forze ioniche. L'ambiente con elevate concentrazioni di sale indebolisce le iniziali interazioni elettrostatiche tra i peptidi e le cellule batteriche, riducendo la loro attività battericida come suggerito da Zasloff (2002).

Nel presente studio, le attività antibatterica e emolitica vengono paragonate dopo lo stesso tempo di incubazione e nella stessa soluzione tampone. Considerato che l'uccisione dei batteri e l'attività di emolisi sono ritenute entrambe conseguenze del legame dei peptidi con le cellule, noi abbiamo dimostrato la selettività dei peptidi per i differenti tipi cellulari. In generale, il test di emolisi ha mostrato che i peptidi testati dovrebbero essere relativamente sicuri per le cellule eucariote.

Comunque, le informazioni derivate dalla permeabilizzazione degli eritrociti *in vitro* o le prove di emolisi dovrebbero essere considerate attentamente nel rappresentare la tossicità antimicrobica selettiva del peptide poiché potrebbero non riflettere la sua reale citotossicità *in vivo* (Yeaman M.R. *et al*, 2003).

Nessuna correlazione è stata trovata tra l'attività emolitica e l'anfipaticità media

per residuo (μ) o la carica netta. Questo è in accordo con gli studi di Kiyota *et al.* (1996) e Mor *et al.* (1994) i quali riscontrarono una correlazione positiva tra l'indice di idrofobicità dei peptidi e la loro capacità di emolisi. Si ritiene che sebbene le interazioni elettrostatiche determinino un'iniziale attrazione, le membrane composte da fosfolipidi zwitterionici così come la parete esterna degli eritrociti, potrebbero favorire le interazioni idrofobiche permettendo un inserimento più profondo e un'interazione più potente dei peptidi con componenti lipofili di membrana che determinano efficienti lisi (Dathe M. *et al.*, 1996)

È ben noto, almeno per i batteri Gram-negativi, che l'integrità della membrana esterna (OM) si trova nei cationi bivalenti che legano l'LPS (Vaara M., 1992). Nel caso dei batteri Gram-negativi, i peptidi interagiscono con il lipide A parte dei lipopolisaccaridi (LPS) determinando una disorganizzazione dell'OM attraverso lo spostamento dei cationi bivalenti e conseguentemente distruggendo il doppio strato della membrana esterna. La maggioranza dei peptidi risultano essere relativamente più suscettibili alla presenza di ioni Mg^{2+} , dovuta all'elevata affinità di questi ioni per l'LPS. Perciò le molecole o gli agenti capaci di legare i cationi bivalenti potrebbero essere efficacemente impiegati nel favorire la destabilizzazione della superficie esterna dei batteri. È stato dimostrato che gli antibiotici convenzionali come i chinoloni chelano i cationi bivalenti (Lecomte S. *et al.*, 1994; Marshall A.J. *et al.*, 1994) con un meccanismo simile a quello utilizzato dall'EDTA. Inoltre, è stato documentato per *Pseudomonas aeruginosa* l'antagonismo dell'assorbimento da parte degli

aminoglicosidi dei cationi bivalenti (Mao W. *et al*, 2001).

La chelazione dei cationi bivalenti proposta per i chinolonici non combacia con i risultati ottenuti dalla colistina e quindi non conferma tale attività. Al contrario, l'associazione di levofloxacin con AMP126 o AMP2041 potrebbe favorire o aumentare l'ingresso all'interno della cellula batterica dell'antibiotico convenzionale o dei peptidi o di entrambe. Comunque noi non possiamo escludere completamente le ipotesi che l'aumento o il miglior assorbimento degli antibiotici potrebbero essere il risultato di un'inibizione della biosintesi delle proteine che costituiscono la parete delle cellule.

È interessante notare che i risultati ottenuti coniugando i peptidi antimicrobici con l'amikacina indicano un effetto additivo che non potrebbe essere completamente spiegato dal solo aumento della permeabilità della membrana esterna. In generale, non è stata individuata nessuna sinergia associando i nostri peptidi con aminoglicosidi e chinolonici, antibiotici normalmente esclusi dall'attacco dell'LPS. Quindi, un generale effetto di aumento della permeabilità sull'LPS da parte dei peptidi sembrerebbe non essere sufficiente per permettere il rilevamento di un'interazione di tipo sinergico.

CONCLUSIONI

Noi crediamo che i risultati ottenuti con i nostri peptidi possano aprire una nuova strada per lo sviluppo di nuove alternative terapeutiche o, più verosimilmente, essere utilizzati in associazione con i convenzionali agenti antibatterici rendendoli maggiormente efficaci. L'utilizzo dei peptidi potrebbe risultare utile per rendere maggiormente sensibile la membrana dei batteri agli antibiotici. In questo modo, potrebbero essere condotti ulteriori studi per ricercare la possibilità di ottenere un effetto sinergico dalla combinazione di diversi antibiotici convenzionali con i nostri peptidi nello sforzo di abbassare la concentrazione di utilizzo degli antibiotici, che dovrebbe portare alla diminuzione dell'emergenza delle popolazioni batteriche resistenti a questi antibiotici così come alla riduzione dei costi associati al loro errato impiego.

BIBLIOGRAFIA

Papagianni M., Robosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and application *Biotechnol. Adv.* 2003, 21, 465-499.

Zasloff M., Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature* 2002, 415, 389-395.

Boman H.G., Innate immunity and normal microflora. *Immunol. Rev.* 2000, 173, 5-16.

Mangoni M.L., Miele R., Renda T.G., Barra D., Simmaco M. The synthesis of antimicrobial peptide in the skins of *Rana esculenta* in stimulated by microorganisms. *Faseb. J.* 2001, 15, 1431-1432.

Bulet P., Stocklin R., Menin L. Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 2004, 198, 169-184.

Conlona J.M., Kolodziejekb N., Leprincec J., Vaudryc H., Coquetc L., Jounnec T., Kingf J.D. Characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the Malaysian frogs, *Odorana hosii* and *Hylarana picturata* Anura: Ranidae. *Toxicon* 2008, 52, 465-473.

Ammar B.; Perianin A.; Mor A.; Sarfati G.; Tissot M.; Nicolas P.
Dermaseptin, a peptide antibiotic, stimulates microbicidal activities of polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 247: 870-875.

Simmaco M.; Barra D.; Chiarini F.; Noviello L.; Melchiorri P.; Kreil G.; Richter K. A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*. *Eur. J. Biochem.* 1991, 199, 217-222.

Gidalevitz D., Ishitsuka Y., Muresan A. S., Konovalov O., Waring A. J., Lehrer R. I., Lee K. Y. Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2003, 100, 6302-6307.

Shai Y., Oren Z. Diastereoisomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 7305-730

Oren Z., Hong J., Shai, Y. A repertoire of novel antibacterial diastereomeric

peptides with selective cytolytic activity. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 14643-14649.

Zilberstein D., Schuldiner S., Padan E. Proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells and its relation to active transport of lactose. *Biochemistry* 1979, 18, 669–673.

Vaz Gomes A., de Waal A., Berden J. A., Westerhoff, H. V. Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes. *Biochemistry* 1993, 32, 5365–5372.

Ehrenstein G., Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quart Rev Biophys* 1977, 10, 1–34.

Shai Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem. Sci.* 1995, 20, 460–464.

Pouny Y., Rapaport D., Mor A., Nicolas P., Shai, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 1992, 31, 12416–12423.

Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell nonselective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1462, 55–70.

Ludtke S. J., He K., Heller W. T., Harroun T. A., Yang L., Huang H. W. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 1996, 35, 13723–13728.

Huang H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 2000, 39, 8347–8352.

Chen F.-Y., Lee M.-T., Huang, H. W. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys J* 2003, 84, 3751–3758.

Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. Lee M.-T., Chen F.-Y., Huang H. W. *Biochemistry* 2004, 43, 3590–3599.

Pile JC. Antimicrobial stewardship: optimizing antibiotic use in an era of increasing resistance and rising costs. *J Hosp Med.* 6 Suppl 1:S1-3.

Overbye KM, Barrett JF. Antibiotics: where did we go wrong? *Drug discovery today.* 2005;10:45-52.

Tossi A, Tarantino C, Romeo D. Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1997;250:549-58.

Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of internal medicine*. 2003;254: 197-215.

Quinn PJ, Carter ME, Markey B, GR C. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing; 1994.

CSLI. Performance standards for antimicrobial disks and dilution susceptibility test form isolated from animals. Wayne: Clinical Laboratory Standard Institute; 2008.

Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2002;44:363-6.

Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of medical research*. 2005;36:697-705.

Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*. 2004;24:536-47.

Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 1998;47:451-63.

Juretic D, Chen HC, Brown JH, Morell JL, Hendler RW, Westerhoff HV. Magainin 2 amide and analogues. Antimicrobial activity, membrane depolarization and susceptibility to proteolysis. *FEBS letters*. 1989;249:219-23.

Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*. 2003;55:27-55.

Kiyota T, Lee S, Sugihara G. Design and synthesis of amphiphilic alpha-helical model peptides with systematically varied hydrophobic-hydrophilic balance and their interaction with lipid- and bio-membranes. *Biochemistry*. 1996;35:13196-204.

Mor A, Hani K, Nicolas P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:31635-41.

Dathe M, Schumann M, Wieprecht T, Winkler A, Beyermann M, Krause E, et al. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry*. 1996;35:12612-22.

Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological reviews*. 1992;56:395-411.

Lecomte S, Baron MH, Chenon MT, Coupry C, Moreau NJ. Effect of magnesium complexation by fluoroquinolones on their antibacterial properties. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994;38:2810-6.

Marshall AJ, Piddock LJ. Interaction of divalent cations, quinolones and bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1994;34:465-83.

Mao W, Warren MS, Lee A, Mistry A, Lomovskaya O. MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45:2001-7.

SITOGRAFIA

EFSA:http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/docs/communication_amr_2011_748_en.pdf

<http://w3.uniroma1.it/biocmed2/peptidi.html>.