

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
Dottorato di Ricerca in Microbiologia e Virologia
Ciclo XXVI

IMMUNITÀ INNATA DA DERIVATI DI PROTEINE SIERICHE

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Luciano Polonelli

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Stefania Conti

Dottorando: Pier Paolo Zanello

Indice

Introduzione	1
1. Immunità innata e peptidi antimicrobici	4
1.1. Peptidi cationici con conformazione ad α -elica	8
1.2. Peptidi cationici con conformazione a β -foglietto	9
1.3. Peptidi cationici con struttura ad anello	10
1.4. Peptidi cationici con struttura estesa	10
2. Defensine e Catelicidine	11
3. Modalità d'azione dei peptidi antimicrobici	13
3.1. Il modello carpet	16
3.2. Il modello barrel-stave	16
3.3. Il modello a poro toroidale	17
3.4. Il modello del canale aggregato	17
3.5. Bersagli intracellulari	18
4. I criptidi e il loro potenziale utilizzo terapeutico	20
5. Attività biologiche di peptidi derivati dalla regione variabile di anticorpi	29
6. Attività biologiche di peptidi derivati dalla regione costante di anticorpi	32
7. Scopo della ricerca	35
Materiali e Metodi	
1. Ricerca di peptidi nel siero	37
2. Valutazione dell'attività <i>in vitro</i> dei peptidi selezionati nei confronti di miceti lievitiiformi	38
3. Valutazione della citotossicità e dell'attività emolitica <i>in vitro</i> dei peptidi selezionati	41
4. Valutazione della genotossicità aspecifica dei peptidi selezionati	42
5. Valutazione del profilo apoptotico di cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi selezionati	43
6. Valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno in cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi selezionati	45
7. Coniugazione dei peptidi con isotiocianato di fluoresceina e purificazione mediante HPLC	46

8. Visualizzazione in microscopia confocale a scansione laser di cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con peptidi coniugati con isotiocianato di fluoresceina	46
9. Visualizzazione in microscopia elettronica a scansione di cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi selezionati	48
10. Visualizzazione in microscopia elettronica a trasmissione di cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi selezionati	48
11. Analisi conformazionale dei peptidi selezionati mediante dicroismo circolare	50
12. Valutazione dell'attività terapeutica dei peptidi selezionati in un modello <i>ex vivo</i> di infezione da <i>Candida albicans</i> di mucosa porcina	51
13. Valutazione dell'attività terapeutica dei peptidi selezionati in un modello di infezione sistemica sperimentale da <i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> in larve di <i>Galleria mellonella</i>	53
Risultati	
1. Ricerca dei peptidi nel siero	55
2. Caratteristiche dei frammenti peptidici selezionati	57
3. Attività <i>in vitro</i> dei peptidi selezionati nei confronti di miceti lievitiiformi	60
4. Citotossicità e attività emolitica dei peptidi selezionati	65
5. Attività genotossica aspecifica dei peptidi selezionati	67
6. Profilo apoptotico di cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi K40H e K13L	69
7. Produzione di specie reattive dell'ossigeno in cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi K40H e K13L	71
8. Visualizzazione in microscopia confocale a scansione laser di cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi K40H e K13L coniugati con isotiocianato di fluoresceina	72
9. Visualizzazione in microscopia elettronica a scansione di cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi K40H e K13L	75
10. Visualizzazione in microscopia elettronica a trasmissione di cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi K40H e K13L	77
11. Analisi conformazionale dei peptidi K40H e K13L mediante dicroismo circolare	79
12. Attività terapeutica dei peptidi K40H e K13L in un modello <i>ex vivo</i> di infezione da <i>Candida albicans</i> di mucosa porcina	81

13. Attività terapeutica dei peptidi K40H e K13L in un modello di infezione sistemica sperimentale da <i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> in larve di <i>Galleria mellonella</i>	85
Discussione e conclusioni	89
Bibliografia	93
Ringraziamenti	109

Introduzione

Negli ultimi decenni, l'utilizzo estensivo di antibiotici e l'applicazione di programmi di vaccinazione hanno contribuito alla riduzione della morbosità e della mortalità associate alle malattie da infezione. Tuttavia, queste rappresentano ancora oggi una causa rilevante di morte per l'intera popolazione mondiale.

L'atteggiamento predominante nei confronti del trattamento, controllo e prevenzione di queste malattie durante il ventesimo secolo è stato improntato all'ottimismo (Cohen, 2000). Già nel 1931, Henry Sigerist scriveva: "La maggior parte delle malattie da infezione ... ha ora svelato i propri segreti.... Molte malattie ... sono state completamente eradiccate; altre sono state poste significativamente sotto controllo" (Sigerist, 1971).

Agli inizi del ventesimo secolo, le malattie da infezione rappresentavano la principale causa di morte in tutto il mondo. Negli Stati Uniti, tre malattie – tubercolosi, polmonite e infezioni gastrointestinali – erano responsabili del 30% dei decessi (Centers for Disease Control and Prevention, 1994). In quel periodo, l'aspettativa di vita era di 47 anni, in gran parte a causa dell'alta mortalità infantile per infezioni. Nonostante ciò, morbosità e mortalità associate a queste malattie erano già considerevolmente migliorate nella maggior parte dei paesi sviluppati rispetto ai decenni precedenti. Tra il 1700 e il 1900, infatti, l'aspettativa di vita in Gran Bretagna era aumentata da 17 a 52 anni e la percentuale di morte per tubercolosi era scesa dell'80% grazie al miglioramento generale delle condizioni di vita che aveva portato ad una limitazione della trasmissione della maggior parte delle malattie infettive (Ackerknecht, 1965; McKeown e Lowe, 1966). Questa tendenza epidemiologica è stata notevolmente accelerata a metà del ventesimo secolo in seguito all'introduzione in terapia degli antibiotici. In Inghilterra e nel Galles, il numero dei decessi per febbre da parto, causata da *Streptococcus pyogenes*, è stato ridotto più del 50% grazie all'uso della sulfadiazina e, negli Stati Uniti, il numero di morti per malattie da infezione ha subito un decremento annuo dell'8,2% tra il 1938 e il 1952, ma la diminuzione più rilevante ha riguardato tubercolosi e polmoniti (Armstrong et al., 1999; Garrod et al., 1973). Anche l'influenza delle procedure di vaccinazione è stata estremamente positiva: nel 1952 erano stati registrati negli Stati Uniti più di cinquantamila casi di poliomielite, mentre nel 1965 ne sono stati riportati solo 72 e una malattia un tempo molto rilevante, quale il vaiolo, è stata totalmente eradicata (Centers for Disease Control, 1982).

Tra il 1940 e il 1960, i successi ottenuti nella terapia e nella prevenzione di numerose malattie da infezione, con la scoperta e lo sviluppo degli antibiotici e la diffusione delle vaccinazioni di massa, hanno aumentato l'ottimismo tanto che, nel 1969, William H. Stewart dichiarò al Congresso degli Stati Uniti che era tempo di "chiudere il libro sulle malattie infettive" (Garrett, 1992). In quegli anni, in tutti i paesi industrializzati si è drasticamente ridotta la mortalità per malattie da infezione, rimpiazzate dalle malattie croniche come principali cause di morte (Armstrong et al., 1999). Da allora, un maggior interesse è stato rivolto allo studio delle patologie croniche emergenti, quali le malattie cardiache e le neoplasie, e di conseguenza le risorse destinate alla ricerca per la prevenzione e il controllo delle malattie da infezione sono state minimizzate (Culotta, 1994; Bax, 1997).

L'ottimismo nella lotta alle infezioni che ha prevalso durante i decenni precedenti è stato peraltro messo in dubbio negli anni '80 e '90 del secolo scorso da una serie di epidemie causate da agenti eziologici nuovi o riemergenti, tra cui colera, tubercolosi, febbre gialla e malaria, che hanno riportato le malattie da infezione al centro dell'attenzione degli addetti alla salute pubblica, degli scienziati, dei governanti e dell'intera opinione pubblica. Inoltre, un utilizzo indiscriminato di antibiotici nei paesi industrializzati, peraltro agevolato da facili prescrizioni mediche, ha comportato negli ultimi decenni un notevole incremento della diffusione di microrganismi resistenti ai farmaci. Fenomeni analoghi sono stati osservati sia nei paesi in via di sviluppo, a causa di problematiche igienico-sanitarie, della scarsità di cibo e di acqua potabile, sia nel mondo occidentale, a causa dell'aumento della popolazione anziana e, in generale, di individui immunocompromessi, inclusi quelli con infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV). La comparsa dei fenomeni di resistenza ai farmaci antibatterici è risultata essere molto più rapida rispetto all'introduzione di nuovi agenti terapeutici, con conseguenti effetti per gli individui più vulnerabili e per l'intera società. Dall'introduzione e dall'impiego dei primi antibiotici, avvenuti circa ottanta anni fa, sono state rese commercialmente disponibili dalle industrie farmaceutiche molte sostanze antibatteriche che hanno contribuito a ridurre notevolmente la mortalità e la morbilità causate da molti agenti patogeni (Bax, 1997). Tuttavia, l'incremento della resistenza ai farmaci antimicrobici è ormai diventato un serio problema di portata mondiale. Per tale motivo, è necessario adottare non solo precisi protocolli per l'uso clinico dei farmaci esistenti, ma anche strategie alternative per la progettazione e la produzione di antimicrobici innovativi (Gould, 1999).

Nel 1992, l'Institute of Medicine, riconoscendo queste problematiche, ha pubblicato un

rapporto in cui si definisce come emergente “una infezione nuova, riemergente, o resistente ai farmaci la cui incidenza sia aumentata nelle ultime due decadi, o la cui incidenza minacci di aumentare” (Institute of Medicine, 1992). Il recente incremento della diffusione, incidenza e prevalenza di agenti infettivi emergenti o riemergenti è stato facilitato da altri fattori non previsti o sottovalutati, quali la globalizzazione, i movimenti internazionali di merci ed individui e i cambiamenti climatici che hanno contribuito alla dispersione di vettori in nuove aree del mondo con seri rischi per la salute pubblica. Inoltre, negli ultimi decenni, l'utilizzo terapeutico di chemioterapici antitumorali ed immunosoppressori ha rappresentato un fattore predisponente all'insorgenza di malattie causate da agenti opportunisti, soprattutto di origine fungina (Walsh e Groll, 1999). Nonostante i recenti straordinari progressi in campo economico e medico, soprattutto nei paesi ricchi ed industrializzati, abbiano determinato un significativo aumento delle aspettative di vita, paradossalmente essi hanno rappresentato un importante fattore correlato all'emergenza di malattie da infezione. L'invecchiamento della popolazione rappresenta un fattore che contribuisce ad aumentare il rischio di contrarre molte malattie ad eziologia batterica e fungina, anche in assenza di altre condizioni predisponenti. Contemporaneamente, è in aumento il numero di persone con malattie di base o condizioni che favoriscono l'insorgenza di malattie da infezione, come la malnutrizione nei paesi in via di sviluppo o l'epidemia causata da HIV, principalmente nel continente africano (Ezzell, 2000). Inoltre, neonati prematuri o sotto peso, anziani, individui sottoposti a trapianto, con tumori, infettati da HIV o con difese compromesse o diminuite sono più frequentemente colpiti da infezioni gravi.

La comparsa di ceppi resistenti responsabili di patologie caratterizzate da un'aumentata mortalità ha causato un notevole incremento dei costi per la cura delle malattie da infezione. Per far fronte ai problemi posti dalla diffusione di ceppi batterici resistenti e per trattare in maniera più adeguata i soggetti immunocompromessi, è sempre più urgente sviluppare nuovi agenti terapeutici che abbiano una maggiore selettività e, possibilmente, un meccanismo d'azione diverso da quello degli antibiotici attualmente in uso.

Unitamente alla ricerca di strategie alternative di lotta alle malattie da infezione, la progettazione e lo sviluppo di nuove molecole ad attività antimicrobica, basati su razionali concettualmente innovativi, rappresentano una necessità largamente riconosciuta per un uso futuro nella terapia delle infezioni causate da microrganismi resistenti ai farmaci convenzionali.

1. Immunità innata e peptidi antimicrobici

L'organismo umano è continuamente esposto a infezioni causate da diverse specie microbiche. Tuttavia, il sistema immunitario, costituito da una rete di componenti cellulari e solubili interagenti tra loro, permette di contrastare i potenziali patogeni. La sua funzione è quella di distinguere tra le componenti proprie dell'organismo (self) e quelle estranee (non-self) e di eliminare quelle potenzialmente dannose. Tra le principali entità riconosciute come estranee ci sono alcuni microrganismi, le cellule neoplastiche, i tessuti e gli organi trapiantati ed alcune tossine. Per assolvere alle sue funzioni, il sistema immunitario si avvale di due componenti reciprocamente correlate: l'immunità innata o costitutiva, che rappresenta una prima e più ancestrale linea di difesa anti-infettiva non specifica e immediatamente attiva, e l'immunità adattativa o inducibile, operante attraverso la risposta immune umorale e quella cellulo-mediata.

Una volta oltrepassate le barriere meccaniche (cute e mucose) che rivestono la superficie dell'organismo a contatto con l'ambiente esterno, gli agenti infettanti devono superare una serie di meccanismi di difesa che nel loro insieme rappresentano il sistema dell'immunità innata che, in molti suoi aspetti, ha un riscontro nelle difese antimicrobiche presenti in altri organismi meno o diversamente evoluti rispetto ai vertebrati.

L'immunità innata è presente fin dalla nascita, non necessita di un precedente contatto con l'antigene e non dà luogo a memoria immunitaria. Fanno parte delle difese aspecifiche, oltre alle barriere meccaniche e fisiche, le cellule fagocitarie, le cellule che rilasciano sostanze pro-infiammatorie (basofili, eosinofili e mastociti), le cellule natural killer e le componenti solubili costituite da proteine del complemento, reattanti di fase acuta, citochine e da diverse altre sostanze ad azione antimicrobica ed antivirale presenti nei fluidi biologici.

Tra i "sensori" che condizionano il funzionamento del sistema dell'immunità innata vi sono una serie di recettori presenti sulla superficie di numerosi tipi cellulari e una serie di fattori solubili presenti nei liquidi circolanti e nei liquidi interstiziali dei tessuti. Tra i recettori cellulari sono da menzionare i recettori per il fattore C3b del complemento, presenti sulla superficie dei fagociti professionali, e i Toll-like receptors (TLR), presenti soprattutto su macrofagi, mastociti, cellule dendritiche ed endoteliali. Questi recettori possono essere localizzati sulla membrana citoplasmatica, in prossimità del lato extracellulare, oppure sulla membrana intracellulare, rispettivamente per il riconoscimento di componenti superficiali di microrganismi oppure per il riconoscimento di acidi nucleici virali o microbici.

I fagociti includono le cellule dendritiche, i neutrofili, i monociti (nel sangue) e i macrofagi

(nei tessuti). Ampiamente distribuiti, i macrofagi sono localizzati in maniera strategica nei punti in cui i tessuti sono a contatto con il sangue o con gli spazi cavitari; ne sono un esempio i macrofagi alveolari (nei polmoni), le cellule di Kupffer (nei sinusoidi epatici), le cellule sinoviali (nelle cavità articolari), le cellule microgliali perivascolari (a protezione del sistema nervoso centrale) e i fagociti mesangiali (nei reni). La stimolazione dei macrofagi o dei mastociti attraverso i TLR induce la sintesi e la secrezione di citochine pro-infiammatorie e di vari mediatori lipidici, con l'avvio del processo infiammatorio ed il conseguente reclutamento locale di cellule e fattori solubili in grado di innescare la risposta immune adattativa.

Tra i principali fattori solubili considerati parte integrante dell'immunità innata, negli ultimi decenni sono stati scoperti peptidi evolutivamente conservati, denominati antimicrobial peptides (AMP) di grande interesse per le loro attività antimicrobiche, immunomodulatorie e antivirali (Giuliani et al., 2007; Mc Phee e Hancock, 2005; Mookherjee et al., 2007; Zasloff, 2002). Questi peptidi, inizialmente isolati dalla linfa di insetti, dalla pelle di anfibi e dai granulociti neutrofilici di mammifero, vengono rapidamente prodotti e sono in grado di neutralizzare una vasta gamma di microrganismi, compresi batteri, protozoi e funghi, e virus (Hancock, 2001; Shai, 2002).

La pelle di anfibio si è rivelata una sorgente particolarmente ricca di peptidi, con diverse funzioni sia fisiologiche sia difensive, prodotti e secreti da ghiandole granulari controllate da nervi simpatici che rilasciano il loro contenuto sul dorso dell'animale in risposta a diversi stimoli (Fehlbaum et al., 1996). In seguito, sono stati evidenziati piccoli peptidi anionici (721-823 Da) nelle secrezioni mucose delle vie respiratorie di mammiferi tra cui l'uomo (Brogden et al., 1998 e 1999).

Nell'uomo, esistono un certo numero di proteine con caratteristiche di lectine, in grado di combinarsi a specifici residui glucidici di proteine presenti sulla superficie di microrganismi e virus provvisti di envelope, ed un certo numero di AMP, come defensine e catelicidine, che hanno il compito di proteggere le superfici a contatto con l'esterno da microrganismi e da virus cui siamo continuamente esposti.

Solitamente, gli AMP derivano da pre-propeptidi di maggiori dimensioni che vengono rilasciati in forma matura in seguito a specifici tagli proteolitici effettuati da proteasi intracellulari. E' disponibile in rete un database nel quale, attualmente, sono riportati 2336 AMP di origine naturale, ottenuti da organismi procarioti ed eucarioti, con dimostrata attività biologica (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). La maggior parte degli AMP possiedono caratteristiche comuni, come le piccole dimensioni (12-50 amminoacidi), la presenza di

cariche positive (generalmente da +2 a +9), una struttura anfipatica e affinità per i fosfolipidi carichi negativamente. Gli AMP possono essere caratterizzati sia da un'attività microbica diretta sia da un'attività immunomodulante, per quanto alcuni di essi svolgano preferenzialmente l'una o l'altra delle due attività (Brogden, 2005). A tale proposito, una recente nomenclatura ha suggerito due diversi modi per indicare tali molecole: peptidi ad attività antimicrobica, AMP, se esercitano *in vivo* un'attività antimicrobica diretta, oppure peptidi di difesa dell'ospite (Host Defense Peptides, HDP) nel caso ci si riferisca in modo più ampio alla loro attività nell'ambito dell'immunità innata (Figura 1) (Hancock e Sahl, 2006).

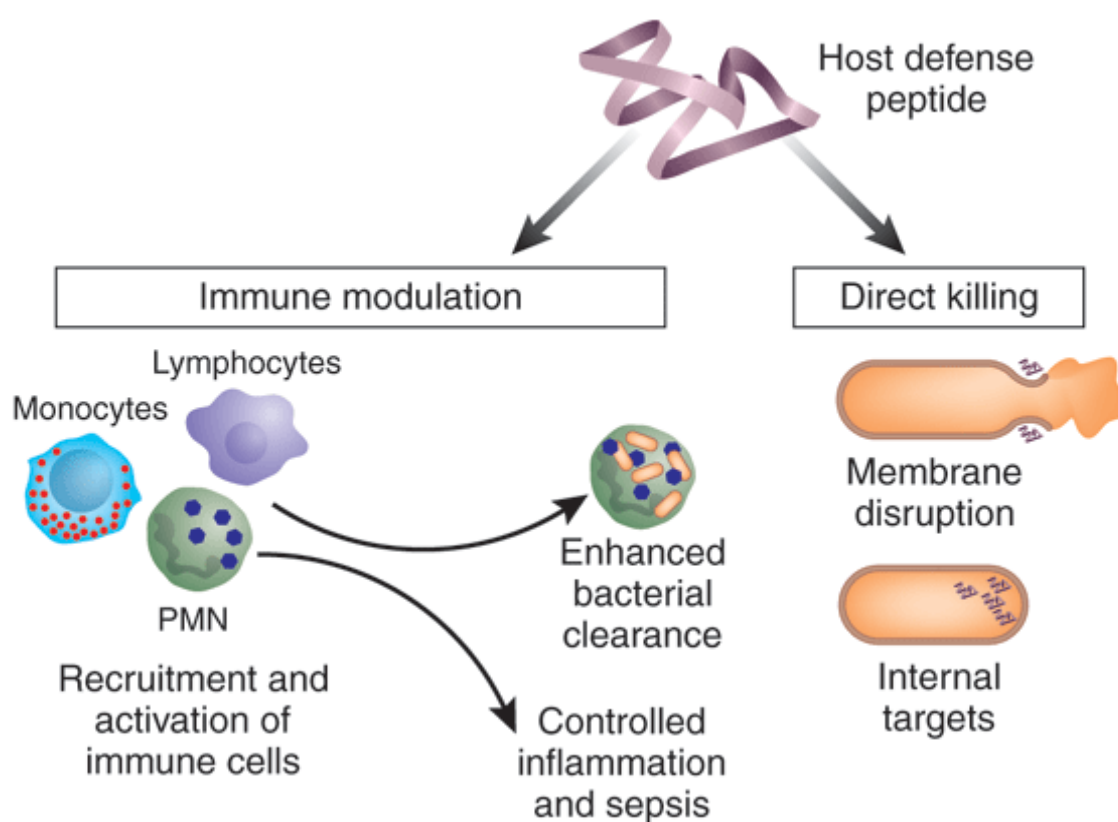


Figura 1. Potenziali attività biologiche dei peptidi di difesa dell'ospite. I peptidi possono esercitare un'attività microbica diretta oppure svolgere un ruolo immunomodulante nell'ambito della risposta immunitaria innata. Nel caso in cui il peptide eserciti un'azione diretta, questa può esplicarsi in seguito ad un danno alla membrana cellulare, oppure al coinvolgimento di bersagli intracellulari. L'azione immunomodulante dei peptidi prevede il reclutamento e l'attivazione di cellule del sistema immunitario, quali linfociti, monociti e leucociti polimorfonucleati, in grado di indurre infiammazione e controllare l'infezione. Da: Hancock e Sahl, 2006.

Gli AMP potrebbero essere suddivisi in diverse categorie in base alla loro origine, dimensione, struttura conformazionale, sequenza amminoacidica, attività biologica e meccanismo d'azione, ma il criterio principale utilizzato per classificarli è rappresentato dalla struttura secondaria.

Su questa base si distinguono quattro classi principali: strutture ad α -elica anfipatiche (tra cui catelicidina umana e magainine), strutture a foglietto β (β -sheet) stabilizzate da due o tre ponti disolfuro (defensine umane), strutture estese (corrispondenti alla struttura dei peptidi analoghi dell'indolicidina) e strutture ad anello (loop) con prevalenza di amminoacidi specifici nella sequenza (gramicidine e defensine cicliche di macaco rhesus) (Figura 2) (Cézard et al., 2011).

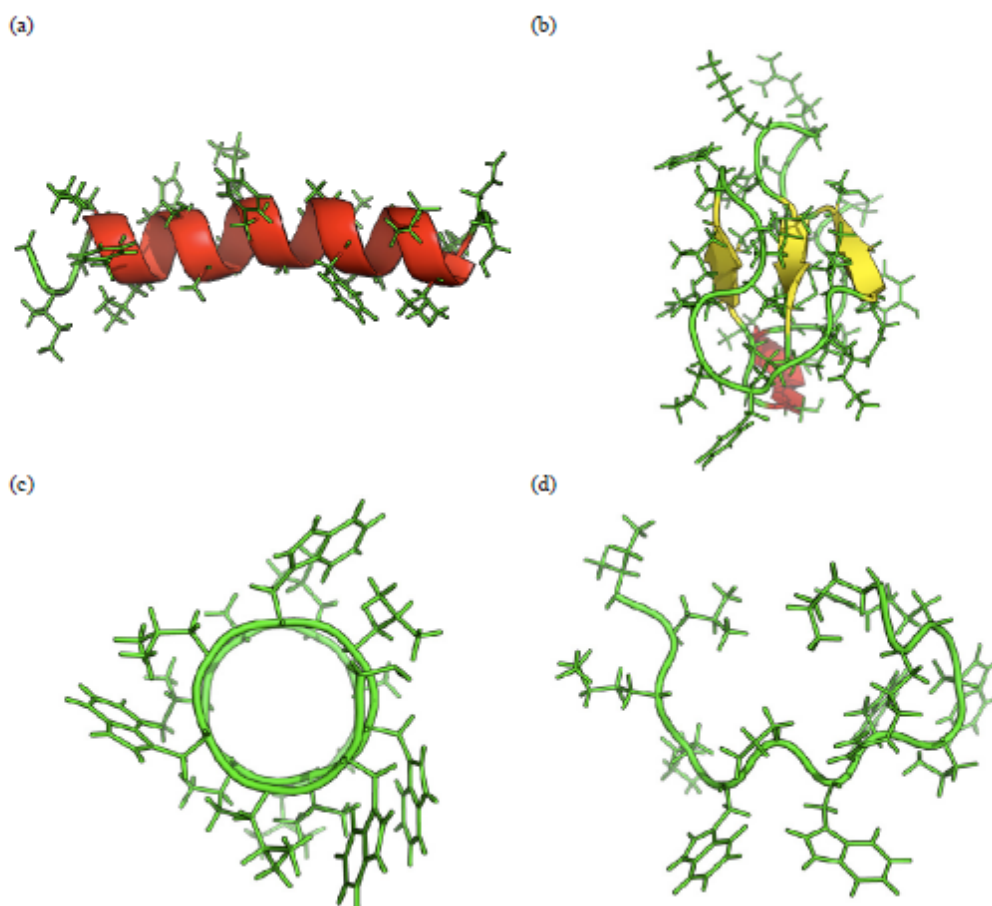


Figura 2. Modello strutturale tridimensionale ottenuto da RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) che rappresenta le quattro principali classi di peptidi cationici descritti. (a) struttura del peptide magainina-2 (PDB ID: 2MAG) rappresentativa dei peptidi ad α -elica; (b) struttura del peptide β -defensina-1 composto da una serie di foglietti β (PDB ID:1KJ5); (c) Struttura ad anello del peptide gramicidina (PDB ID: 1MAG); (d) esempio di un peptide con struttura estesa, corrispondente a CP-11, un analogo dell'indolicidina (PDB ID:1QXQ). Da: Cézard et al., 2011.

Studi recenti hanno tuttavia dimostrato che alcuni AMP possono anche non appartenere ad alcuno dei gruppi descritti, come le ribonucleasi antimicrobiche, o avere caratteristiche di diversi gruppi, come le catelicidine (Ganz, 2004; Zanetti et al., 1995). E' importante sottolineare che, nell'ambito dell'ampia varietà di proteine e peptidi antimicrobici umani, rivestono particolare importanza le defensine, la catelicidina LL-37 e le istatine (De Smet e Contreras, 2005).

Ciascun organismo vivente può produrre AMP appartenenti a diverse classi, oltre che un certo numero di varianti all'interno di una specifica classe. Secondo quanto precedentemente osservato (Hancock e Diamond, 2000) ci sono almeno quattro possibili ragioni per la diversità strutturale osservata tra gli AMP. In primo luogo, per quanto lo spettro di attività di qualsiasi AMP sia piuttosto ampio, ciascuno di essi non risulta attivo contro tutti i patogeni che l'organismo potrebbe incontrare. Per questo motivo, una distinta e talvolta sovrapponibile attività antimicrobica esplicata da diversi AMP aumenta le potenzialità dell'immunità innata. In secondo luogo, AMP con diverse strutture conformazionali e attività biologiche differenziali potrebbero agire in maniera coordinata e sinergica. Inoltre, AMP appartenenti a classi diverse possiedono anche attività chemiotattiche e pro-infiammatorie notevolmente differenti e, infine, differenti tipi cellulari producono AMP diversi potendo complementare vicendevolmente le loro attività.

E' importante considerare che nei confronti di questi peptidi, fino ad ora, non sono stati rilevati significativi fenomeni di resistenza (Hancock et al., 2006). Lo studio e la comprensione dei meccanismi d'azione di queste molecole potrebbe preludere ad una nuova generazione di farmaci antimicrobici, inoltre la loro capacità di uccidere microrganismi multiresistenti ha recentemente suscitato un notevole interesse per un possibile utilizzo clinico (Giuliani et al., 2007).

1.1. Peptidi cationici con conformazione ad α -elica

I peptidi con conformazione ad α -elica rappresentano la classe più numerosa, alla quale appartengono i peptidi cationici più comuni in natura e più studiati, identificati in piante e animali, vertebrati e invertebrati. A questo gruppo appartengono approssimativamente 250 peptidi lineari con attività antibatterica, generalmente composti da un numero di residui amminoacidici inferiore a quaranta. Essi hanno un comportamento altamente anfipatico e possiedono una carica netta positiva. In soluzione acquosa questi peptidi risultano in conformazione random (non strutturata) ed assumono la conformazione ad α -elica solo in

seguito al legame con la membrana batterica sulla quale si adsorbono superficialmente o si inseriscono (Figura 2a).

Appartengono a questa classe le cecropine, isolate per la prima volta nel 1981 dalla falena notturna *Hyalophora cecropia*, da cui hanno assunto il nome, le ceratotossine, derivanti anch'esse da insetti, la bombinina H, la dermaseptina, le magainine, derivanti dalla pelle di anfibi, e le catelicidine presenti in mammiferi (Ganz, 2004; Gennaro e Zanetti, 2000; Kylsten et al., 1990; Marchini et al., 1993; Mignogna et al., 1993). Un'altra tipologia di peptidi appartenenti a questa classe è rappresentata dalle apidaecine, come la melittina, peptidi presenti nel fluido linfatico delle api adulte, che hanno mostrato un ampio spettro di attività nei confronti di batteri, funghi filamentosi e lieviti, compresi alcuni patogeni umani (Casteels et al., 1989).

1.2. Peptidi cationici con conformazione a β -foglietto

Questo gruppo è composto approssimativamente da 250 peptidi con struttura conformazionale a β -foglietto stabilizzata da uno o più ponti disolfuro (Figura 2b). Anche questi peptidi possono essere prodotti da piante e animali, invertebrati e vertebrati, compresi i mammiferi, e a seconda del numero di residui di cisteina e del loro appaiamento possono adottare una conformazione tipica a β -foglietto, a β -forcina oppure mista α -elica/ β -foglietto. Sono peptidi piuttosto compatti, che presentano la conformazione a foglietti β in soluzione acquosa e possono essere ulteriormente stabilizzati dal contatto con le membrane batteriche.

Molti peptidi appartenenti a questa classe sono stati sintetizzati chimicamente e risultano attualmente disponibili in commercio.

Appartengono a questa classe le tachiplesine isolate dal granchio marino *Tachypleus tridentatus* (Nakamura et al., 1988) e peptidi di 16-18 amminoacidi contenenti 2 ponti disolfuro denominate protegrine (Kokryakov et al., 1993). Le protegrine, in particolare, presentano un ampio spettro di attività antimicrobica ed antivirale nei confronti di batteri Gram positivi e Gram negativi, funghi filamentosi e lievitiforimi ed alcuni virus, tra cui HIV-1 (Kokryakov et al., 1993).

Tra i maggiori rappresentanti dei peptidi con struttura a foglietto β sono da annoverare le defensine, presenti nell'emolinfa degli insetti (Lambert et al., 1989), nei fagociti di mammifero, compreso l'uomo (Lehrer et al., 1993), ed in alcune piante (Wang e Wang, 2004).

1.3. Peptidi cationici con struttura ad anello

A questa classe appartengono peptidi ricchi in prolina e arginina che non possono formare strutture anfipatiche a causa dell'elevato numero di residui di prolina presenti, ma che possono adottare una struttura ad elica di proliprolina di tipo II (Cabiaux et al., 1994). Rappresentativo di questa struttura è l'antibiotico gramicidina A (Figura 2c), un peptide lineare prodotto da *Bacillus brevis*, costituito da due unità indipendenti che si connettono testa-testa lungo il doppio strato lipidico per formare un dimero ad α -elica del diametro di 4 Å che permette il passaggio di ioni sodio e potassio attraverso la membrana. Un altro peptide che appartiene a questa classe è la bactenecina, costituito da 12 amminoacidi, isolato dai neutrofilo bovini (Romeo et al., 1988). In particolare, per le bactenecine 5 e 7, isolate dai granuli citoplasmatici di neutrofilo bovini e caratterizzate da un comportamento anfipatico in ambiente idrofobico, è stata osservata un'attività antibatterica ad ampio spettro (Gennaro et al., 1989). In questo gruppo possono essere annoverati anche altri peptidi caratterizzati dalla presenza di cisteine in posizione N- oppure C-terminale, che possono assumere struttura ciclica o a forcina, isolati da pesci e mammiferi tra cui l'uomo, come le epcidine (Park et al., 2001), oppure derivati da artropodi e crostacei come tachiplesina e gomesina (Nakamura et al., 1988; Silva et al., 2000).

Altri esempi di peptidi rappresentativi di questa classe sono quelli derivanti da diverse specie di rana, quali brevinine, esculentine e ranalexina e tanatina (Clark et al., 1994; Fehlbaum et al., 1996). La potenziale applicazione terapeutica di questi peptidi risulta fortemente limitata da un'elevata attività emolitica che spesso accompagna l'interessante attività antimicrobica.

1.4. Peptidi cationici con struttura estesa

A questo gruppo eterogeneo appartengono per lo più peptidi lineari caratterizzati da una sovraespressione di uno o più amminoacidi specifici nella sequenza. A questa classe appartengono circa 90 peptidi che solitamente non mostrano alcuna struttura secondaria né ad α -elica né a β -foglietto. Rappresentativo di questa famiglia è il peptide CP-11 (Figura 2d), anfipatico, analogo dell'indolicidina bovina, che presenta aumentata attività nei confronti di batteri Gram negativi, maggiore carica positiva e struttura conformazionale lineare estesa. Alcuni peptidi appartenenti a questa classe sono ricchi in istidina, come l'istatina presente nella saliva umana, altri in prolina e arginina, come il peptide PR-39, altri ancora in prolina e fenilalanina come nel caso del peptide profenina (Agerberth, 1991, Harwig et al., 1995). La caratteristica principale di questa classe di peptidi è rappresentata dalla flessibilità

conformazionale in soluzione acquosa.

2. Defensine e Catelicidine

Nei mammiferi, le principali famiglie di HDP sono rappresentate dalle defensine e dalle catelicidine.

Le defensine sono state scoperte nel 1983 nel coniglio (Selsted et al., 1983) e, due anni più tardi, sono state trovate anche negli esseri umani (Ganz et al., 1985). Successivamente, sono state isolate anche da piante, invertebrati e microrganismi e soltanto durante l'ultimo decennio sono state caratterizzate in dettaglio. Le defensine sono peptidi cationici con peso molecolare compreso tra 3,5 e 4,5 kDa, anfipatici e costituiti da un numero variabile di residui amminoacidici, tra 12 e 70. Sono ricchi in residui di cisteina e adottano principalmente una struttura a β -foglietto. A seconda della specie considerata, le defensine sono presenti in neutrofili, cellule epiteliali, alcune popolazioni di macrofagi e nelle cellule di Paneth localizzate nell'intestino tenue.

Le defensine di mammifero contengono sei residui di cisteina e sono classificate in tre principali sottoclassi che differiscono tra loro per l'allineamento dei ponti disolfuro stabilizzanti (Schneider et al., 2005).

- α -defensine. Sono stati scoperti circa 50 tipi di α -defensine, sei delle quali sono di origine umana. La loro lunghezza risulta variabile tra 29 e 35 amminoacidi e solitamente adottano una conformazione a triplo foglietto β . I ponti disolfuro sono situati tra i residui Cys¹-Cys⁶, Cys²-Cys⁴ e Cys³-Cys⁵. I neutrofili umani esprimono quattro distinte α -defensine, denominate Human Neutrophil Peptides (HNP) 1-4 (White et al., 1995). Le altre due α -defensine umane, Human Defensins (HD) 5 e 6, si trovano nelle cellule di Paneth dell'intestino tenue e nelle cellule epiteliali (Jones e Bevins, 1992 e 1993).
- β -defensine. Ad oggi sono state isolate circa 90 tipi di β -defensine, costituite da 36 a 50 residui amminoacidici. I legami disolfuro sono presenti tra i residui Cys¹-Cys⁵, Cys²-Cys⁴, Cys³-Cys⁶ e, come le α -defensine, adottano una conformazione a triplo foglietto β . Mediante analisi del genoma umano sono state identificate circa 30 β -defensine, ma solo sei sono state effettivamente trovate *in vivo*. La loro lunghezza è di 41-50 amminoacidi, sono prodotte da cellule epiteliali e vengono denominate Human Beta Defensins (HBD) 1-6 (Ganz, 2003; Schutte et al., 2002). In particolare, HBD-1 è espressa nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio e genitale; HBD-2 è espressa

nella cute e nell'epitelio urinario, gastrointestinale e respiratorio; HBD-3 è la principale defensina cationica espressa in diverse superfici epiteliali e si trova in concentrazioni relativamente elevate nella saliva e nei fluidi cervico-vaginali (Ghosh et al., 2007). HBD-4 è stata rilevata in testicoli, stomaco e utero (Garcia et al., 2001), HBD-5 e 6 sono state rilevate in particolare nell'epididimo (Yamaguchi et al., 2002).

- θ -defensine. Finora solo tre θ -defensine sono state trovate in scimmie e, a differenza delle α - e β -defensine, esse adottano una conformazione circolare attraverso la formazione di ponti disolfuro Cys¹-Cys⁶, Cys²-Cys⁵ e Cys³-Cys⁴ (Tang et al., 1999). Le θ -defensine sono costituite da 18 residui amminoacidici e, pertanto, risultano più piccole rispetto alle α - e β -defensine.

Tra le defensine appartenenti a queste sottoclassi trovate nei mammiferi, solo le α - e le β -defensine sono presenti nell'uomo e, sebbene i loro legami disolfuro differiscano, esse presentano notevoli analogie nella loro struttura tridimensionale (Izadpanah e Gallo, 2005). A queste tre sottoclassi possono essere aggiunte quelle presenti nelle piante e negli insetti:

- defensine di insetti. Contengono un dominio α -elica associato ad una regione a β -foglietto tramite un ponte disolfuro. I loro legami, Cys¹-Cys⁴, Cys²-Cys⁵ e Cys³-Cys⁶, differiscono da quelli osservati nelle defensine di mammiferi. Sono attive preferenzialmente nei confronti dei batteri Gram positivi (Meister et al., 1997).
- defensine vegetali. Vengono comunemente definite tionine, possono contenere fino ad otto cisteine e formare fino a quattro ponti disolfuro. Contengono sia domini ad α -elica sia a β -foglietto.

Anche le catelicidine, come le defensine, rappresentano una famiglia di peptidi antimicrobici naturali cationici. Le catelicidine sono caratterizzate dalla presenza di un dominio altamente conservato in posizione N-terminale di circa 100 residui, denominato "cathelin domain", e da una regione C-terminale dotata di elevata variabilità e di proprietà microbicide (Zaiou et al., 2003). La loro presenza è stata ampiamente riscontrata nei granuli dei neutrofili e in cellule epiteliali di molti invertebrati e vertebrati, inclusi rettili, pesci, uccelli e mammiferi, uomo compreso (Sorensen et al., 1997; Uzzell et al., 2003; Van Dijk et al., 2005; Wang et al., 2008; Zanetti et al., 1995; Zhao et al., 2008). Originariamente scoperte in neutrofili, sono state successivamente ritrovate in diverse specie di mammiferi anche in altre tipologie cellulari, incluse cellule epiteliali, cheratinociti e macrofagi attivati in seguito a contatto con batteri, virus e funghi. Nell'uomo, le catelicidine rivestono particolare importanza nei meccanismi di difesa dell'immunità innata nei confronti delle infezioni batteriche (Nizet et al., 2001).

Le catelicidine derivano da polipeptidi di maggiori dimensioni solitamente presenti nei granuli dei neutrofili e, in seguito alla loro attivazione, il frammento C-terminale viene tagliato dal pro-peptide inattivo e il peptide attivo viene rilasciato nell'ambiente extracellulare (Panyutich et al., 1997).

Tra le catelicidine maggiormente studiate ci sono SMAP-29, uno tra i più potenti peptidi antimicrobici, e LL-37, che attualmente è l'unica catelicidina umana conosciuta. SMAP-29, isolato dalla pecora, è composto da 29 residui amminoacidici, adotta una conformazione ad α -elica anfipatica e mostra una concentrazione minima inibente (CMI) nei confronti di batteri inferiore a 1 $\mu\text{g/ml}$ (Bagella et al., 1995; Mahoney et al., 1995). Come SMAP-29, anche il peptide LL-37 adotta una conformazione ad α -elica anfipatica, ha una carica netta positiva (+7), ed è costituito da 37 amminoacidi. Il precursore della catelicidina umana LL-37 è il peptide cationico antimicrobico-18 (Hcap18), un peptide di 170 amminoacidi con due ponti disolfuro in posizione C⁸⁵-C⁹⁶ e C¹⁰⁷-C¹²⁴, codificato dal gene CAMP localizzato sul cromosoma 3 (Cowland et al., 1995). L'espressione di Hcap18 è stata rilevata nelle cellule del midollo osseo (Harder et al., 2001), nei granuli dei neutrofili e in cheratinociti durante processi infiammatori (Bals et al., 1998; Frohm et al., 1997). Il peptide precursore Hcap18 viene processato nei neutrofili attivati in posizione C-terminale in seguito all'azione di proteasi seriniche, con successivo rilascio di un peptide composto da 37 amminoacidi, contenente due leucine in posizione N-terminale, per questo chiamato LL-37 (Sorensen et al., 2001). LL-37, oltre ad esercitare un'attività antimicrobica ed immunomodulatoria, richiama le cellule del sistema immunitario adattativo in seguito a ferite o processi infettivi, stimola l'angiogenesi e la chemiotassi di neutrofili, monociti e linfociti T. LL-37 è stato riscontrato in molti distretti corporei: in cellule epiteliali del testicolo, gastrointestinali, del tratto respiratorio, nella pelle e nei leucociti (Durr et al., 2006).

3. Modalità d'azione dei peptidi antimicrobici

La modalità d'azione della maggior parte dei peptidi antimicrobici naturali è basata sull'alterazione della membrana della cellula bersaglio con formazione di pori e depolarizzazione (Cézard et al., 2011). In seguito al contatto con la membrana avviene l'inserimento del peptide nel doppio strato lipidico cui segue rottura della membrana plasmatica e perdita di ioni e di metaboliti intracellulari. Tuttavia, un numero crescente di evidenze indica la presenza di meccanismi supplementari o complementari, che prevedono bersagli intracellulari. Così, l'interazione iniziale tra i peptidi e la membrana microbica

consentirebbe loro di penetrare nella cellula per legare molecole intracellulari, con conseguente inibizione della biosintesi della parete cellulare o della sintesi di DNA, RNA o proteine. L'azione dei peptidi antimicrobici dipende essenzialmente da una serie di parametri, quali la sequenza amminoacidica, la concentrazione e i lipidi che compongono la membrana (Peters et al., 2010). La maggior parte degli studi effettuati finora sono stati focalizzati sulla interazione di peptidi cationici con sistemi modello di membrana o con cellule microbiche utilizzando coloranti sensibili al potenziale di membrana e peptidi fluoresceinati (Cézard et al., 2011).

Numerosi studi hanno dimostrato che la carica netta dei peptidi antimicrobici è direttamente correlata con la loro attrazione/interazione con la membrana batterica. Infatti, un peptide antimicrobico cationico, che possiede solitamente una carica netta positiva che va +2 a +9 a pH fisiologico, può interagire facilmente con la superficie batterica carica negativamente per la presenza di gruppi fosfato all'interno del lipopolisaccaride (LPS) nei batteri Gram negativi e all'interno degli acidi lipoteicoici nei batteri Gram positivi. Al contrario, le interazioni dei peptidi cationici con le membrane cellulari di mammifero risultano molto più deboli poiché esse sono ricche in fosfolipidi zwitterionici (privi di carica), come fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e sfingomieline (Yeaman e Yount, 2003). Inoltre, la presenza di colesterolo, un costituente importante delle membrane cellulari di mammifero, può ridurre l'attività dei peptidi antimicrobici neutralizzandoli o stabilizzando il doppio strato lipidico (Matsuzaki, 1999).

I passaggi fondamentali per l'azione antimicrobica degli AMP, dall'associazione con la membrana, al loro inserimento nel doppio strato fosfolipidico, fino alla possibile interazione con bersagli intracellulari, sono riassunti in modo schematico in Figura 3.

L'associazione iniziale dei peptidi cationici con la membrana batterica avviene attraverso interazioni elettrostatiche con il lipopolisaccaride anionico che è stabilizzato da cationi bivalenti come Mg^{2+} e Ca^{2+} . La rimozione di questi ioni o il loro spiazzamento da parte di AMP cationici facilita la formazione di aree destabilizzate attraverso cui il peptide può traslocare all'interno con un processo definito "self-promoted uptake" (Hancock, 1997). Nel caso dei batteri Gram positivi, invece, l'interazione avviene con i gruppi anionici degli acidi teicoici associati al peptidoglicano.

Dopo il legame alla membrana batterica i peptidi possono adottare strutture secondarie energeticamente favorevoli attraverso cambiamenti conformazionali dettati dalla loro idrofobicità (Dennison et al., 2007).

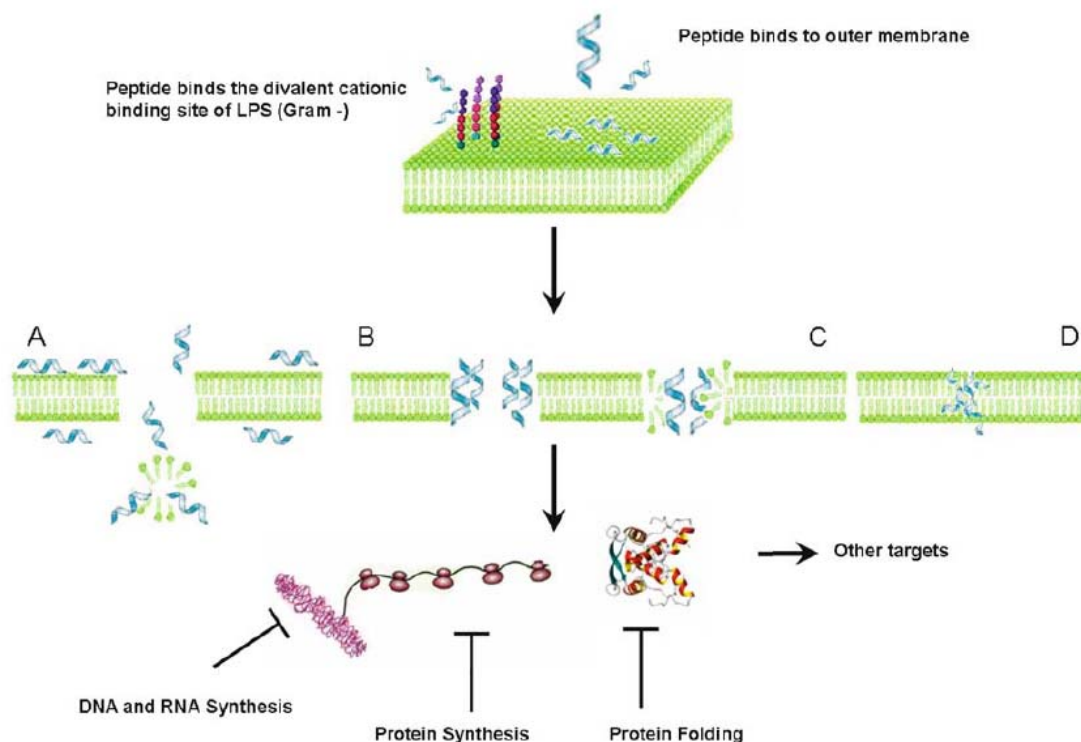


Figura 3. Rappresentazione schematica dei meccanismi proposti per l'attività dei peptidi nei confronti di batteri Gram negativi, che prevede una iniziale associazione dei peptidi antimicrobici con la superficie della membrana esterna carica negativamente. I meccanismi di permeabilizzazione di membrana illustrati includono: (a) modello carpet, (B) modello barrel-stave (C) modello a poro toroidale e (D) modello del canale aggregato. Alcuni monomeri peptidici possono traslocare verso il lato interno della membrana, dissociarsi dai lipidi di membrana, legarsi a molecole polianioniche come DNA o RNA e inibire alcune attività enzimatiche come la sintesi proteica o il folding delle proteine assistito da chaperon molecolari. Da: Giuliani et al., 2007.

L'interazione peptide-membrana presenta aspetti ancora controversi poiché i meccanismi alla base dell'alterazione della membrana risultano complessi e comportano una combinazione di molteplici fattori. E' opportuno tuttavia considerare che la formazione di canali ionici e di pori transmembrana e la rottura estesa della membrana non rappresentano tre distinte modalità d'azione, ma piuttosto una evoluzione graduale dello stesso fenomeno (Dathe e Wieprecht, 1999). In alcuni casi, invece, il peptide non agisce direttamente sulla membrana a formare pori, ma piuttosto si accumula all'interno della cellula batterica con effetti sulle funzioni intracellulari. Gli studi effettuati finora hanno indicato che tutti i peptidi antimicrobici devono comunque interagire con le membrane per poter spiegare la loro attività e che le modalità d'azione possono essere suddivise secondo due principali meccanismi, il primo dei quali

prevede la distruzione della membrana (secondo i modelli carpet, barrel-stave, a poro toroidale e del canale aggregato), mentre il secondo non prevede la rottura della membrana ma l'interazione del peptide con bersagli intracellulari (Powersand e Hancock, 2003):

3.1. Il modello carpet

Nel 1992, Pouny e collaboratori, studiando la dermaseptina S, un peptide cationico anfipatico con struttura ad α -elica isolato dalla pelle di rana, hanno proposto il modello carpet (Pouny et al., 1992). In questo modello, la modalità di azione del peptide prevede inizialmente l'aggregazione al doppio strato fosfolipidico della membrana con un allineamento parallelo alla superficie (Bechinger, 1999). Come dimostrato anche per il peptide ovispirina (Yamaguchi et al., 2001), i peptidi si dispongono con i gruppi idrofobici a contatto con le teste anioniche dei fosfolipidi della membrana batterica, mentre quelli idrofilici sono rivolti verso l'esterno. A concentrazioni sufficientemente elevate, i peptidi si aggregano e la membrana è sottoposta a una significativa deformazione della curvatura che porta alla rottura (Figura 3a).

Il modello carpet non prevede la formazione di pori transmembrana e l'inserimento dei peptidi nel core idrofobico della membrana, ma piuttosto un dissolvimento della membrana per dispersione dei fosfolipidi. Studi di spettroscopia a raggi infrarossi (ATR-FTIR) effettuati sulla cecropina P1, un peptide derivato dalla emolinfa di falena, hanno indicato che inizialmente questo peptide si orienta parallelamente alla membrana, non entra nel core idrofobico, ma genera una destabilizzazione localizzata della membrana. Questo peptide si è rivelato un efficace agente antimicrobico che comporta un'alterazione della membrana batterica e la conseguente rottura causata dall'elevata concentrazione di monomeri sulla superficie (Sitaram e Nagaraj, 1999; Yeaman e Yount, 2003).

3.2. Il modello barrel-stave

Nel 1977 Ehrenstein e Lecar hanno proposto il primo modello per spiegare il meccanismo dell'attività antimicrobica dei peptidi cationici (Ehrenstein e Lecar, 1977). In questo modello, i peptidi si accumulano come monomeri sulla superficie batterica e tendono a disporsi a cerchio parallelamente al doppio strato lipidico. Successivamente, si orientano perpendicolarmente e si inseriscono nel core lipidico della membrana assumendo una forma simile ad un barile le cui doghe sono composte dai peptidi stessi con conformazione ad α -elica (Yang et al., 2001). Durante questo processo, i peptidi subiscono una transizione

conformazionale: le superfici idrofobiche sono rivolte verso l'esterno, cioè verso le catene idrofobiche dei fosfolipidi di membrana, mentre le regioni idrofiliche si dispongono dal lato opposto, formando l'interno del poro. Progressivamente, vengono reclutati nuovi peptidi che adottano una configurazione trans-membrana aumentando le dimensioni dei pori attraverso un processo di auto-aggregazione spontanea. In questo modello, la membrana non viene deformata né piegata durante il processo di inserimento, ma i peptidi inseriti nel doppio strato sono in grado di creare un foro attraverso di essa e di uccidere il microrganismo (Figura 3b).

3.3. Il modello a poro toroidale

Questo terzo modello, proposto da Hancock e Chapple nel 1999, combina le azioni dei modelli barrel-stave e carpet (Hancock e Chapple, 1999). I peptidi aggregano sulla membrana batterica come avviene nel modello carpet e, successivamente, si inseriscono perpendicolarmente in essa provocandone la deformazione (Matsuzaki et al., 1996). A differenza del modello barrel-stave, anche i fosfolipidi di membrana cooperano alla formazione del poro. I peptidi assumono una conformazione ad α -elica e si orientano parallelamente alla superficie della membrana consentendo il legame con le teste polari dei fosfolipidi e causando la curvatura della membrana, mentre le code idrofobiche di questi interagiscono con la superficie idrofobica dei peptidi (Yamaguchi et al., 2002). Anche in questo modello, la formazione di pori sulla membrana conduce inevitabilmente alla sua rottura (Figura 3c).

La differenza con i due modelli precedenti risiede nel fatto che i peptidi antimicrobici rimangono permanentemente legati alle molecole di LPS. Questo tipo di poro transmembrana è indotto da magainine (Matsuzaki et al., 1996), protegrine (Yamaguchi et al., 2002), melittina (Yang et al., 2001) e dal peptide LL-37 (Henzler et al., 2003).

3.4. Il modello del canale aggregato

I modelli barrel-stave, carpet e a poro toroidale prevedono che la morte dei batteri avvenga in seguito alla perdita dell'integrità della membrana causata dagli AMP. Tuttavia, numerosi studi indicano che l'effetto di permeabilizzazione è necessario, ma potrebbe non essere sufficiente a spiegare completamente l'attività antimicrobica dei peptidi (Ganz e Lehrer, 1995). Studi su modelli planari di doppi strati lipidici hanno dimostrato che alterazioni transitorie della conduttanza, indicative della formazione di pori, potevano essere osservate solamente a concentrazioni elevate di peptidi ed ad elevati voltaggi transmembrana, con

scarsa correlazione tra la loro grandezza e il potenziale battericida. Infatti, alcuni peptidi, come la Gramicidina S, causavano la massima depolarizzazione di membrana ad una concentrazione ben al di sotto della CMI, suggerendo che, di per sé, la depolarizzazione di membrana non rappresenta necessariamente l'evento cruciale per l'uccisione dei microrganismi. Per ovviare a questa discrepanza è stato proposto il modello del canale aggregato (Hancock e Chapple, 1999). I peptidi, dopo il legame alle teste polari dei fosfolipidi, si inseriscono nella membrana e si raggruppano in aggregati non strutturati, consentendo la formazione di pori che attraversano la membrana per brevi periodi (Figura 3d). Con questa modalità, gli AMP possono entrare nello spazio intracellulare e, una volta all'interno, possono agire su bersagli cellulari per poter esercitare la loro attività microbica (Wu et al., 1999). Studi di risonanza magnetica nucleare (NMR) effettuati con indolicidina hanno rivelato la formazione di una struttura interessante che comprende un core idrofobico fiancheggiato da due regioni cariche positivamente con formazione di strutture tipiche del canale aggregato (Rozek et al., 2000).

3.5. Bersagli intracellulari

In alcuni casi, la morte dei microrganismi causata da AMP può avvenire anche con pochissima o addirittura nessuna interruzione della continuità strutturale della membrana. Per quanto l'interazione con la membrana cellulare batterica sembri essere il meccanismo di uccisione principale per la maggior parte degli AMP, alcune evidenze sperimentali suggeriscono la presenza di bersagli intracellulari necessari ai peptidi per poter esplicare l'attività antimicrobica (Toke, 2005; Yeaman e Yount, 2003). Tuttavia, non esiste alcun criterio generale per descrivere questi meccanismi in quanto essi sono specifici per ogni AMP.

Diversi studi effettuati utilizzando AMP naturali hanno dimostrato che gli enantiomeri L e D dei peptidi non possiedono uguali attività suggerendo che l'interazione peptide-membrana sia stereo-specifica (Vunnam et al., 1997), come verificato con gli isomeri D di apidaecina (Casteels e Tempst, 1994) e di drosocina (Bulet et al., 1996).

Il meccanismo di traslocazione è comune a molti AMP e in particolar modo a quelli ricchi in prolina/arginina, come PR-39, che è in grado di legarsi alla membrana cellulare senza causare alcun danno e di traslocare all'interno delle cellule uccidendo i batteri attraverso il blocco della sintesi sia di DNA sia di proteine (Boman et al., 1993; Cabiaux et al., 1994).

L'indolicidina bovina ha mostrato di indurre filamentazione in *Escherichia coli*

presumibilmente in seguito ad inibizione della sintesi del DNA (Subbalakshmi e Sitaram, 1998). Alcuni AMP sembrano interferire con processi metabolici dei microrganismi, come l'attacina, ricca in glicina, che ha mostrato di bloccare la trascrizione del gene *omp* in *E. coli* (Carlsson et al., 1991), e magainine e cecropine che, a concentrazione non battericida, inducono nello stesso batterio la trascrizione selettiva dei geni da stress *micF* e *osmY* (Oh et al., 2000). La buforina II, un peptide antimicrobico derivato dall'istone H2A originariamente isolato dal rospo asiatico *Bufo bufo*, inibisce le funzioni cellulari di *E. coli* legandosi a DNA e RNA dopo aver oltrepassato la membrana cellulare (Park et al., 1998 e 2000). Due bacterenecine bovine, Bac5 e Bac7, bloccano la sintesi di proteine e di RNA in *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* e inibiscono la respirazione mitocondriale determinando una diminuzione del contenuto di ATP (Skerlavaj et al., 1990). Si ipotizza che peptidi secreti dagli insetti appartenenti alla classe degli AMP corti ricchi in prolina, come pirrocoricina, apidaecina e drosocina, uccidano i batteri entrando nelle cellule e inibendo il chaperon molecolare DnaK, il quale possiede una funzione co-traduzionale e post-traduzionale per promuovere il corretto ripiegamento delle proteine e inibire la formazione di aggregati proteici citotossici (Otvos et al., 2000). L'uccisione dei batteri e il legame a DnaK sono eventi correlati, come è stato dimostrato da un analogo inattivo della pirrocoricina composta da D-amminoacidi che non risulta più in grado di legare DnaK. Questi inibitori potrebbero rappresentare una nuova e importante classe di agenti antimicrobici in quanto hanno dimostrato di legarsi selettivamente al chaperon molecolare delle cellule procariotiche ma non a quello delle cellule eucariotiche (Chesnokova et al., 2004).

Meccanismi d'azione intracellulari possono agire indipendentemente oppure in sinergia con eventi di permeabilizzazione della membrana.

Le diverse modalità proposte per spiegare l'attività di AMP nei confronti delle cellule microbiche sono riassunte in Figura 4.

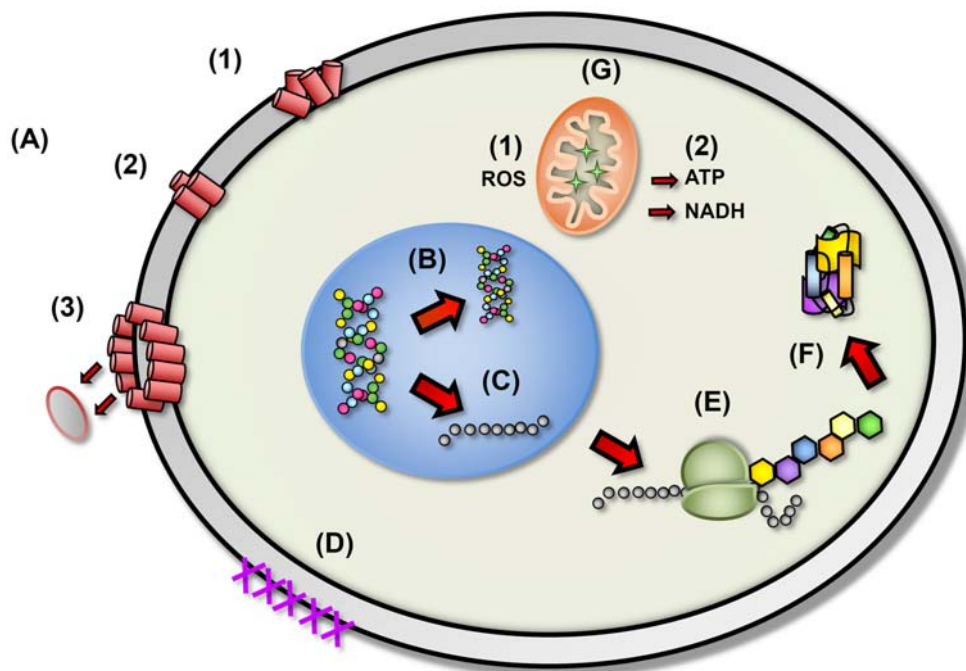


Figura 4. Interazioni di peptidi antimicrobici con la membrana batterica e possibili bersagli intracellulari. (A) Distruzione dell'integrità della membrana cellulare per inserimento casuale (1), allineamento delle sequenze idrofobiche (2) e formazione di pori (3). (B) Inibizione della sintesi di DNA. (C) blocco della sintesi di RNA. (D) Inibizione degli enzimi necessari per l'assemblaggio delle proteine strutturali della parete. (E) Inibizione della funzione ribosomiale e della sintesi proteica. (F) Blocco di chaperon molecolari necessari per il corretto ripiegamento proteico. (G1) Inibizione della respirazione cellulare mitocondriale e induzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). (G2) Perdita dell'integrità della membrana mitocondriale ed efflusso di ATP e NADH. Da: Peters et al., 2010.

4. I criptidi e il loro potenziale utilizzo terapeutico

Il successo ottenuto nella sperimentazione clinica di anticorpi per uso terapeutico ha comportato, nell'ultimo decennio, una ripresa di interesse della comunità scientifica e dell'industria farmaceutica per sostanze di natura proteica di origine biologica. Anche se diversi peptidi approvati come farmaci rappresentavano già nel 2004 un mercato mondiale stimato di 1,1 miliardi di dollari, il potenziale terapeutico dei biofarmaci peptidici è stato e risulta ancora oggi generalmente sottovalutato. Le principali preoccupazioni che contribuiscono a limitare il loro utilizzo riguardano la modalità di somministrazione per iniezione, cui conseguono problematiche relative all'accettazione e all'adesione del paziente alla terapia, ed alcune proprietà farmacologiche, come la breve emivita o la scarsa

biodisponibilità nei tessuti. Tuttavia, i recenti progressi nel campo della biofarmaceutica che hanno aumentato notevolmente la possibilità di generare nuovi farmaci peptidici con migliori proprietà farmacologiche, l'ampliamento delle conoscenze sui possibili bersagli molecolari e la necessità di disporre di alternative all'utilizzo clinico di anticorpi con più favorevole rapporto costo-beneficio fanno presagire una rapida crescita nel campo dei peptidi terapeutici (Ng e Ilag, 2006).

Il proteoma dei mammiferi comprende alcune decine di migliaia di proteine uniche e le funzioni di ciascuna di esse non sono ancora oggi comprese in dettaglio. La semplice valutazione del numero di proteine conosciute, inoltre, sottostima la reale complessità del proteoma (Samir e Link, 2011). Le proteine presentano numerose isoforme, sono soggette ad un'ampia varietà di possibili modificazioni trascrizionali e post-traduzionali ed ogni variante è caratterizzata da una funzione biologica potenzialmente importante (Tyers e Mann, 2003).

Un ulteriore livello di complessità del proteoma è introdotto dagli enzimi proteolitici responsabili di tagli sulla sequenza di proteine in grado di generare peptidi di minori dimensioni. La formazione di peptidi biologicamente attivi da proteine precursori è un fenomeno ampiamente diffuso in natura. Un numero sempre maggiore di evidenze sperimentali dimostra che tagli proteolitici di proteine dotate di attività biologiche possono dare origine a peptidi bioattivi "nascosti" nella sequenza e con attività spesso totalmente diverse da quelle della proteina dalla quale derivano. Questi peptidi sono stati definiti criptidi o cripteine e il loro studio mediante analisi in spettrometria di massa è noto come criptomica (Autelitano et al., 2006; Pimenta e Lebrun, 2007; Ueki, 2007).

La prima evidenza che un peptide bioattivo può essere rilasciato da una proteina precursore di maggiori dimensioni è venuta nel 1977 dallo studio del pro-ormone precursore pro-opiomelanocortina (POMC) che, in seguito a tagli proteolitici ad opera di alcune pro-ormone convertasi (PC-1 e PC-2), dà origine a numerosi criptidi, successivamente identificati, come l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), la β -endorfina, le lipotropine, gli ormoni stimolanti i melanociti (α , β e γ -MSH), il peptide intermedio simile alla corticotropina (CLIP), il peptide N-terminale della pro-opiomelanocortina (N-POMC) e il peptide di giunzione (JP) (Figura 5) (Autelitano et al., 2006; Mains et al., 1977; Smith e Funder, 1988). Tutti questi peptidi risultano coinvolti in complesse risposte biologiche con rilevanza fisiologica e patofisiologica (Raffin-Sanson et al., 2003).

Da allora, sono stati identificati un grande numero di criptidi, di loro precursori e di proteasi coinvolte. In particolare, sono stati scoperti criptidi implicati nella regolazione di una vasta

gamma di processi cellulari tra cui la segnalazione neuronale, la risposta infiammatoria, la risposta immunitaria adattativa e l'angiogenesi (Autelitano et al., 2006).

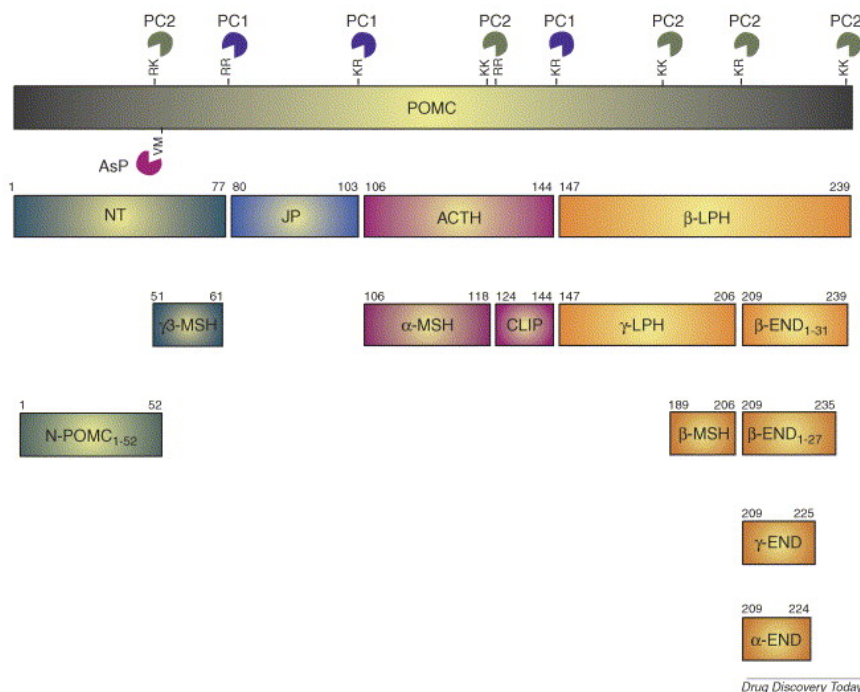


Figura 5. Rappresentazione schematica del processamento del pro-ormone multifunzionale pro-opiomelanocortina (POMC). Gli enzimi pro-ormone convertasi PC1 e PC2 e la proteasi secretoria surrenale AsP effettuano tagli proteolitici differenziali tessuto-specifici dal prodotto iniziale della traduzione. La segmentazione proteolitica di POMC dà origine a più di 12 peptidi distinti e con funzioni diverse, generando un'amplificazione sostanziale del potenziale biologico della singola proteina precursore. I siti di taglio noti sono indicati con le lettere indicative dei residui amminoacidici (R, arginina; K, lisina; V, valina; M, metionina), i numeri si riferiscono alla posizione degli amminoacidi alle estremità dei peptidi generati.

NT, peptide N-terminale; JP, peptide di giunzione; ACTH, ormone adrenocorticotropo; LPH, lipotropina; MSH, ormone melanocita-stimolante; CLIP, peptide intermedio simile alla corticotropina; END, endorfina. Da: Autelitano et al., 2006.

Poiché la presenza e la funzione dei criptidi non può essere prevista con precisione a partire dalla sequenza amminoacidica della proteina parentale, essi rappresentano ancora un aspetto nascosto (criptato) del proteoma umano. Inoltre, può accadere che si conosca il peptide presumibilmente derivato da una proteina precursore di maggiori dimensioni, ma che quest'ultima non sia stata ancora identificata, come nel caso del peptide ricco in

glicina/leucina isolato dalla rana sudamericana *Leptodactylus pentadactylus*, denominato leptoglicina, che ha mostrato attività antimicrobica ed il cui precursore è ancora sconosciuto (Sousa et al., 2009).

Secondo una recente classificazione, i criptidi vengono suddivisi in tre tipi: peptidi con attività biologiche completamente diverse da quelle delle proteine precursori da cui sono derivati *in vivo* per proteolisi naturale (tipo 1), peptidi con attività biologiche correlate a quelle delle proteine precursori da cui sono derivati *in vivo* per proteolisi naturale ma non necessariamente identici ad esse (tipo 2) e peptidi ottenuti *in vitro* mediante digestione proteolitica di proteine precursori che presentano nuove attività biologiche (tipo 3). Criptidi di quest'ultimo tipo o frammenti simili ad essi potrebbero non essere prodotti *in vivo* (Autelitano et al., 2006).

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che criptidi possono derivare da plasminogeno, calreticulina, prolattina, bradichinina, tirosil-tRNA sintetasi, caseina, emoglobina, citocromo, laminina, fattore piastrinico PF4, ormone della crescita, collagene e proteine del latte (Tabella 1) (Autelitano et al., 2006).

Il maggior numero di criptidi finora scoperti deriva da proteine associate alla segnalazione endocrina, proteine della matrice extracellulare, della cascata del complemento e del latte.

Il rilascio proteolitico di peptidi dotati di attività biologica non risulta limitato al pro-ormone POMC, ma è stato dimostrato anche per altri pro-ormoni, compresi i precursori degli oppioidi proencefalina e prodinorfina (Zamir et al., 1984), la prosomatostatina (Benoit et al., 1990), e il precursore dell'ormone di rilascio della tireotropina (Ladram et al., 1994).

E' probabile che peptidi criptici derivati da proteine della matrice extracellulare giochino un ruolo importante come modulatori locali dell'angiogenesi e del rimodellamento tessutale, mentre i criptidi derivati dalle proteine del latte potrebbero avere un ruolo immunomodulatorio e antimicrobico sia nei neonati che negli individui adulti (Autelitano et al., 2006).

Studi recenti hanno dimostrato che il rimodellamento della matrice extracellulare della membrana basale dei vasi sanguigni permette non solo la migrazione extravascolare delle cellule endoteliali, ma anche il rilascio di un gran numero di proteine criptiche, altrimenti "nascoste", che risultano coinvolte nella risposta angiogenica in seguito a danno tessutale, nella guarigione delle ferite e nella reazione patologica indotta dalla crescita tumorale (Davis et al., 2000; Schenk e Quaranta, 2003; Sage, 1997).

Tabella 1. Origine ed attività biologica di criptidi noti

Criptide	Derivazione	Attività biologica del criptide	Proteasi coinvolta	Tipo
Angiostatina	Frammento (38 kDa) del plasminogeno	Anti-angiogenica e antitumorale	Elastasi; MMP-2, 3, 7 e 9	1
Endostatina	Frammento C-terminale (20 kDa) del collagene XVIII	Anti-angiogenica e antitumorale	Elastasi; Catepsina-L e B; MMP-7	1
Tumstatina	Frammento (28 kDa) del dominio NC1 della catena α_3 del collagene di tipo IV	Anti-angiogenica e antitumorale associate a domini distinti	Principalmente MMP-9; anche MMP-2, 3 e 13	1
Endorepellina	Frammento C-terminale (85 kDa) del perlecano	Anti-angiogenica	Plasmina, trombina, MMP-1 e 2	1
Vasostatina	Frammento N-terminale della calreticulina	Anti-angiogenica	Sconosciuta	1
Peptide della prolattina	Frammento N-terminale (16 kDa) della prolattina	Anti-angiogenica	Sconosciuta	1
Peptide della tirosil-tRNA sintetasi	Frammento N-terminale (40 kDa) della tirosil-tRNA sintetasi umana	Angiogenica; chemiotattica nei confronti di leucociti polimorfonucleati	Elastasi	1
Peptide DIII della laminina-5	Frammento della catena γ_2 della laminina-5	Attivazione del recettore del fattore di crescita epidermico; migrazione delle cellule epiteliali	MMP di membrana di tipo 1 e MMP-2	1
Peptide chemiotattico derivato dalla laminina-10	Frammento della catena α_5 della laminina-10	Attivazione e chemiotassi delle cellule infiammatorie	Sconosciuta	1
Trombostatina	Frammento della bradichinina	Inibizione dell'attivazione piastrinica indotta dall' α -trombina	Enzima convertitore dell'angiotensina	1
Casocidina-I	Peptide di 39 aminoacidi derivato dall' α_{s2} -caseina	Antibatterica	Probabilmente proteasi digestive o batteriche	1
Peptidi della β -lattoglobulina	Vari frammenti della β -lattoglobulina del latte	Immunomodulatoria	Proteasi da <i>Lactobacillus</i> sp.	1
Peptide del fattore piastrinico-4	Frammento N-terminale del fattore piastrinico-4	Modulazione della crescita delle cellule endoteliali con aumentata azione inibitoria	Sconosciuta	2
Glypromate (Gly-Pro-Glu)	Tripeptide derivato dalla regione N-terminale del fattore di crescita-1 insulino-simile	Neuroprotettiva; il peptide può attraversare la barriera ematoencefalica	Sconosciuta	2
AOD9604	Frammento C-terminale dell'ormone umano della crescita	Modulazione del metabolismo lipidico	Sconosciuta	3
Caseinofosfopeptidi	Vari frammenti derivati da caseine	Formazione di complessi con fosfato di calcio; rimineralizzazione dello smalto dentale	Tripsina (<i>in vitro</i>); proteasi digestive batteriche (<i>in vivo</i>)	3

MMP, Metalloproteinas di matrice. Da: Autelitano et al., 2006.

Diversi enzimi proteolitici, incluse varie metalloproteinasi della matrice (MMP), serin-proteasi e catepsine, sono responsabili del taglio in punti specifici delle proteine della matrice extracellulare, come i collagene, consentendo il rilascio finemente regolato di criptidi che possono agire localmente come modulatori dell'angiogenesi. Queste proteasi sono in grado di generare *in vivo*, in modo specifico a seconda delle cellule o dei tessuti coinvolti, frammenti peptidici simili e/o parzialmente sovrapponibili (Xu et al., 2001).

Un esempio significativo è rappresentato dal rilascio di diversi polipeptidi criptici, che possono agire come modulatori dell'angiogenesi e della crescita cellulare tumorale, dalle catene α dei collagene. Tra questi, un frammento C-terminale di 20 kDa, derivato da un dominio del collagene XVIII e denominato endostatina, ha mostrato di inibire l'angiogenesi e la crescita *in vivo* di tumori primari e metastatici, dimostrando di avere funzioni biologiche distinte dalla proteina progenitrice (O'Reilly, 1997). Un peptide di 22 kDa, denominato restina, derivante da un dominio del collagene umano XV, ha mostrato un'attività anti-angiogenica differente rispetto a quella dell'endostatina (Ramchandran et al., 1999; Sasaki et al., 2000).

La generazione di criptidi biologicamente attivi da proteine della matrice extracellulare non è limitata esclusivamente alla famiglia dei collagene; anche l'endorepellina, un frammento C-terminale del perlecano, un proteoglicano della membrana basale, funziona come potente inibitore dell'angiogenesi bloccando l'adesione delle cellule endoteliali alla fibronectina e al collagene di tipo I (Mongiat et al., 2003).

Altri peptidi criptici che modulano l'angiogenesi e non derivano da proteine della matrice extracellulare sono l'angiostatina, un frammento di 38 kDa derivato dal plasminogeno, che ha dimostrato di bloccare la neovascolarizzazione e la crescita di tumori metastatici (O'Reilly, 1994), e il peptide di 50 kDa derivato dal taglio proteolitico del fibrinogeno mediato da plasmina, che inibisce la migrazione endoteliale e la formazione del tubulo (Booth-Wilbraham et al., 2000). Il chininogeno ad elevato peso molecolare (HK), una proteina plasmatica con importanti funzioni nella fibrinolisi, nella trombosi e nell'infiammazione, può essere processato dalla proteina plasmatica callicreina per generare bradichinina, un peptide che promuove l'angiogenesi, ed un altro frammento, Hka, che possiede un'attività biologica opposta di inibizione dell'angiogenesi (Guo e Colman, 2005).

Anche molte proteine contenute nel latte, quando vanno incontro a proteolisi fisiologica, possono dare origine ad una moltitudine di peptidi criptici di tipo 1 (Meisel, 2004). In particolare, le caseine, la β -lattoglobulina e la α -lattoalbumina danno origine a peptidi criptici

con differenti attività immunomodulatorie, anti-ipertensive, antimicrobiche e con capacità di complessare i metalli. Tali criptidi possono essere generati *in vivo* sia da proteasi digestive, sia da proteasi associate con la fermentazione microbica, lasciando ipotizzare un loro importante ruolo fisiologico. I frammenti peptidici generati durante la fermentazione del latte ad opera di lattobacilli mostrano attività immunomodulatoria (Leblanc et al., 2004) e inducono la formazione di osso *in vitro* in colture primarie di osteoblasti (Narva et al., 2004). E' stato dimostrato, inoltre, che i peptidi derivati dalla frammentazione proteolitica di α - e β -caseina, α -lattoalbumina e β -lattoglobulina hanno la capacità di interagire con vari recettori degli oppiacei sia come agonisti che come antagonisti (Teschemacher et al., 1997). La digestione pepsinica della lattoferrina bovina genera un peptide denominato Lfn-p in grado di indurre *in vitro* apoptosi in cellule di carcinoma squamoso umano, mentre la digestione triptica di caseine genera diversi fosfopeptidi che possono complessarsi con fosfati di calcio formando caseinofosfopeptidi utili come riserva minerale per l'organismo (Sakai et al., 2005; Reynolds, 1998). Molti studi hanno dimostrato che diversi caseinofosfopeptidi sono generati *in vivo* in seguito all'ingestione di latte, yogurt o caseina e che alcuni di questi peptidi sono assorbiti e possono essere rilevati nel plasma (Chabance et al., 1998; Meisel et al., 2003). Casochinine e lattochine, peptidi prodotti dalla digestione di caseine e di β -lattoglobulina, agiscono inibendo l'enzima angiotensina-convertasi (ACE), regolatore della pressione arteriosa e parte del sistema renina-angiotensina-aldosterone (FitzGerald et al., 2004).

Ai criptidi finora citati sono da aggiungere alcuni frammenti dell'emoglobina con documentata attività antimicrobica (Catiau et al., 2011), quelli ottenuti da alcune proteine battericide (D'Alessio, 2011), dalla proteina ribosomiale L1 di *Helicobacter pylori* (Park e Hahm, 2012), dal lisozima presente nel latte umano (Ibrahim et al., 2011), dalla proteina umana salivare (Gorr et al., 2011) e da trombina (Kasetty et al., 2011), longicina (Galay et al., 2011) e ubiquitina (Pasikowski et al., 2011).

Un criptide di tipo 2 è rappresentato dal frammento N-terminale ottenuto dal fattore piastrinico di tipo 4 (PF-4) che è risultato essere 50 volte più potente dello stesso PF-4 nell'inibire la proliferazione delle cellule endoteliali (Gupta et al., 1995).

I peptidi criptici possiedono enormi potenzialità biologiche e potrebbero essere utilizzati per lo sviluppo di nuovi e rivoluzionari agenti terapeutici con possibili applicazioni per la terapia di diabete, infiammazioni, patologie cardiovascolari e neoplasie. In particolare, frammenti criptici di piccole dimensioni potrebbero dimostrarsi candidati farmaci migliori rispetto alle proteine di maggiori dimensioni, come gli anticorpi, poiché caratterizzati da migliore

penetrazione nei tessuti, aumentata specificità e ridotti costi di produzione. Un esempio emblematico è rappresentato da un frammento peptidico naturale composto da tre amminoacidi (glicina-prolina-glutammato), denominato Glypromate (Neuren Pharmaceuticals), ottenuto in seguito a taglio proteolitico in posizione N-terminale del fattore di crescita 1 insulino-simile (IGF-1), che ha mostrato proprietà neuroprotettive (Sizonenko et al., 2001). Questo tripeptide, classificato come criptide di tipo 2, sembra essere naturalmente generato nel plasma e nel tessuto cerebrale, ha un'attività neuroprotettiva analoga a quella della proteina parentale, ma possiede una aumentata capacità di attraversare la barriera emato-encefalica con vantaggi sia per la captazione cellulare sia per il trasporto verso i tessuti del sistema nervoso centrale. Glypromate non ha superato la sperimentazione di fase III per l'utilizzo clinico; attualmente è in fase II di sperimentazione un suo analogo sintetico, NNZ-2566, che in modelli animali ha mostrato un ampio spettro di effetti neuroprotettivi (Bickerdike et al., 2009). Un peptide derivato dall'ormone α -MSH, classificato come criptide di tipo 1 e denominato CZEN-002 (Zengen Inc/Abiogen Pharma SpA), è entrato in fase II di sperimentazione clinica poiché ha mostrato una significativa attività antimicotica *in vivo*. I ridotti effetti collaterali osservati in seguito a trattamento con CZEN-002 hanno suggerito che questo peptide potrebbe rappresentare una valida alternativa agli antifungini azolici per il trattamento di candidosi vulvovaginali (Catania et al., 2006).

Numerosi studi clinici hanno dimostrato una significativa diminuzione dose-dipendente della pressione sanguigna in seguito a somministrazione orale di peptidi con azione ACE-inibitrice ottenuti da idrolisato di caseina ad opera di enzimi proteolitici di *Lactobacillus helveticus* (Mizuno et al., 2005; Robert et al., 2004). Infine, un peptide di sei amminoacidi, denominato Rotigaptide (GAP-486; Wyeth/Zealand Pharma A/S), derivato dal peptide anti-aritmico (AAP)10 e coinvolto nello stabilizzare le Gap junction di cardiomiociti (Clarke et al., 2006), è attualmente in fase di sviluppo come rappresentante di una nuova classe di farmaci anti-aritmici per il trattamento delle aritmie ventricolari. Rotigaptide potrebbe avere anche una potenziale applicazione nel trattamento dell'osteoporosi, poiché è stato recentemente dimostrato in studi preclinici che le Gap junctions di osteociti sono coinvolte nello sviluppo e nella funzionalità ossea (Jørgensen et al., 2005).

Una possibile applicazione dei peptidi criptici prevede un loro utilizzo come additivi in ambito alimentare. In particolare, i caseinofosopeptidi ottenuti in seguito a proteolisi triptica di caseine hanno dimostrato effetti benefici sulla rimineralizzazione dello smalto dentale quando aggiunti a gomma da masticare o a bevande per sportivi (Iijima et al., 2004;

Ramalingam et al., 2005).

Sono state anche esplorate le possibili applicazioni terapeutiche di criptidi di grandi dimensioni come angiostatina ed endostatina (costituiti rispettivamente da 812 e 184 amminoacidi) derivati da plasminogeno e collagene. L'endostatina è stata valutata in sperimentazioni cliniche di fase I e II come agente antitumorale, con risultati promettenti associati a problemi connessi con la produzione e la somministrazione della molecola che è molto complessa, costosa e presenta problemi di stabilità e solubilità (Eder et al., 2002; Marshall, 2002). La recente scoperta che tutte le attività anti-angiogeniche e antitumorali dell'endostatina sono attribuibili al peptide di 27 amminoacidi localizzato nella regione N-terminale della sequenza potrebbe consentire di ovviare ai problemi di produzione e di somministrazione della molecola originale (Tjin Tham Sjin et al., 2005). Inoltre, un miglioramento dell'efficacia terapeutica dell'endostatina potrebbe essere ottenuto utilizzando un peptide modificato in un singolo amminoacido che è risultato più efficace sia *in vitro* che *in vivo* (Yokoyama e Ramakrishnan, 2004). Infine, nel 2003 è stato dimostrato che le attività anti-angiogenica e antitumorale dell'endostatina sono mantenute anche da corti peptidi sintetici corrispondenti alle sequenze 6-49 (I), 50-92 (II), 93-133 (III) e 134-178 (IV) della molecola umana ed alcuni di essi, che presentano attività fino a 20 volte maggiore rispetto alla proteina parentale, sono stati brevettati (Cattaneo et al., 2003).

Recentemente, è stato valutato anche il potenziale antitumorale dell'angiostatina ed è stata dimostrata un'attività sinergica quando somministrata in combinazione con altri farmaci antitumorali (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00049790). Un'attività anti-angiogenica e antitumorale è stata descritta anche per una proteina ricombinante derivante dal dominio NC1 della catena α_2 del collagene di tipo IV, denominata Angiocol (BioStratum Inc.), per la quale la Food and Drug Administration ha recentemente approvato l'inizio della sperimentazione in pazienti affetti da cancro (Autelitano et al., 2006).

Finora, non è stato facile individuare la presenza di criptidi all'interno della sequenza primaria di proteine e approcci empirici sono stati impiegati per studiare le loro possibili attività biologiche, ma i notevoli progressi della criptomica potranno consentire la ricerca di nuove molecole con metodi bioinformatici. Per quanto i criptidi possano essere considerati una fonte emergente di farmaci, è di cruciale importanza ottenere un miglioramento delle proprietà farmacologiche di questi peptidi perché essi possano essere utilizzati come valida alternativa terapeutica. Le tecnologie che mirano ad evitare la somministrazione endovenosa e ad incrementarne l'emivita rappresentano un nuovo ed intrigante obiettivo dell'industria

biofarmaceutica. La recente approvazione di una preparazione di insulina inalabile rappresenta un esempio delle nuove possibilità di somministrazione di farmaci peptidici. Inoltre, la modificazione dei peptidi con lipoamminoacidi offre una valida alternativa alla fusione con polietilene glicole (PEG) per aumentarne l'emivita (Ng e Ilag, 2006).

L'utilizzo di criptidi per raggiungere bersagli molecolari intracellulari rappresenta un territorio ancora inesplorato nel settore dei farmaci peptidici, che potrebbe offrire nuove opportunità nella cura di molte malattie.

I criptidi recentemente scoperti potrebbero fornire ulteriori strategie per la modulazione terapeutica di una varietà di possibili bersagli e, poiché essi sono derivati da sequenze di proteine endogene naturali, potrebbero offrire alternative terapeutiche relativamente sicure. Come per altri potenziali candidati terapeutici, anche per questi composti sarà necessario affrontare numerose problematiche, in particolare quelle relative alla produzione e al rilascio *in situ*.

Poiché l'utilizzo di peptidi ad azione antimicrobica come nuova strategia terapeutica è stato recentemente suggerito da diversi autori (Hancock e Sahl, 2006; Sato et al., 2006), lo studio di criptidi derivati da anticorpi o da altre proteine presenti nel siero potrebbe aprire interessanti prospettive per la scoperta di nuove molecole con potenzialità anti-infettiva.

5. Attività biologiche di peptidi derivati dalla regione variabile di anticorpi

Gli anticorpi (Ab) o immunoglobuline (Ig), glicoproteine prodotte da linfociti B attivati differenziati in plasmacellule, sono i principali effettori dell'immunità umorale, in grado di riconoscere e legarsi specificamente ad una grande varietà di antigeni (Ag) proteici e polisaccaridici. Nel tempo, gli anticorpi si sono evoluti nei vertebrati come un sofisticato ma versatile meccanismo di difesa dell'ospite (Litman et al., 2005). Grazie al loro elevato livello di specificità per un determinato antigene, trovano applicazione in ambito biotecnologico, medico e di ricerca di base (Carter, 2006). Negli ultimi decenni, è notevolmente aumentato l'uso di anticorpi per la terapia di diverse malattie, grazie all'acquisizione della capacità di produrre anticorpi monoclonali (mAb) su scala industriale (Walsh, 2003, 2006 e 2010). Inoltre, lo sviluppo di innovative metodologie di ingegneria genetica ha permesso la produzione di anticorpi ricombinanti e l'ottenimento di frammenti anticorpali sintetici di minor peso molecolare. Questi ultimi, anche in funzione di una loro più semplice manipolazione genetica, di costi relativamente contenuti e applicabilità in sistemi di espressione, hanno consentito di aprire nuove strade al potenziale uso di peptidi

farmacologicamente attivi derivati da anticorpi (Magliani et al., 2009).

Nella loro forma monomerica più semplice gli Ab sono costituiti da 4 catene glicoproteiche con diverso peso molecolare: 2 catene pesanti H (H, heavy), uguali tra loro, e 2 catene leggere L (L, light), uguali tra loro, caratterizzate da variabilità di sequenze aminoacidiche. Le catene H sono costituite da 4 domini (3 nella regione costante, Fc, ed uno nella regione variabile, Fv) mentre le catene L sono costituite da 2 domini (uno nella regione costante ed uno nella regione variabile). Ogni dominio è costituito da circa 110 aminoacidi. Le catene H sono unite tra loro e alle catene L mediante la formazione di legami disolfuro (da 3 a 14 a seconda della classe di Ig). I domini costanti (COOH-terminali) di ciascuna catena H concorrono alla costituzione della regione costante, comune a tutte le Ig appartenenti alla stessa classe o isotipo (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). I domini variabili di una catena H e di una catena L (NH₂-terminali) concorrono alla costituzione del sito combinatorio; le Ig, nella loro conformazione monometrica, risultano pertanto essere funzionalmente bivalenti per il legame con uno stesso e specifico epitopo (determinante antigenico) dell'Ag.

La digestione con pepsina scinde la molecola dell'Ig in due frammenti: uno chiamato fragment antigen binding (Fab), bivalente, che contiene i siti combinatori per l'Ag, e l'altro chiamato frammento cristallizzabile (Fc).

Nella parte distale del Fab sono presenti, per ogni dominio, tre regioni caratterizzate da elevata variabilità di sequenza aminoacidica, denominate regioni determinanti la complementarità (CDR1, CDR2 e CDR3) responsabili della specificità di legame tra Ag e Ab. La sequenza della porzione Fc, invece, è identica in tutte le molecole di una classe o sottoclasse di Ig e svolge funzioni importanti nella risposta immunitaria, quali l'opsonizzazione e l'attivazione del sistema del complemento attraverso la cosiddetta "via classica".

Studi precedenti, effettuati presso la sezione di Microbiologia del Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio dell'Università degli Studi di Parma, hanno dimostrato che peptidi sintetici con sequenza uguale ai CDR, o i frammenti peptidici ad essi connessi, di un anticorpo anti-idiotipico a singolo filamento (KT-scFv) rappresentante l'immagine interna di una tossina killer ad ampio spettro antimicrobico (KT) prodotta dal lievito *Wyckerhamomyces anomalus*, sono in grado di esercitare un'attività microbica *in vitro* nei confronti di microrganismi sensibili a KT, caratterizzati dalla presenza di specifici recettori sulla parete cellulare principalmente costituiti da β -1,3 glucani (Polonelli et al., 2003).

In particolare, dal KT-scFv è stato individuato e selezionato un decapeptide denominato P6,

dotato di rilevante attività candidacida *in vitro*. Un suo derivato ottenuto mediante sostituzione del primo residuo con alanina, denominato peptide killer (KP), ha dimostrato di essere attivo, *in vitro*, nei confronti di diversi microrganismi e di inibire la replicazione dei virus HIV-1 ed influenzale attraverso differenti meccanismi d'azione; KP ha mostrato, inoltre, un'efficace attività terapeutica in modelli sperimentali di candidosi vaginale e sistemica, criptococcosi disseminata e paracoccidioidomicosi (Casoli et al., 2006; Cenci et al., 2004; Conti et al., 2008; Fiori et al., 2006; Manfredi et al., 2005; Polonelli et al., 2003; Savoia et al., 2006; Travassos et al., 2004). KP ha infine dimostrato modulare l'espressione di molecole costimolatorie e del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) in cellule dendritiche murine, dopo legame selettivo, e di migliorare la loro capacità di indurre la proliferazione dei linfociti (Cenci et al., 2006). Poiché la sequenza del peptide denominato P6 è stata osservata anche all'interno di sequenze di regioni variabili di molti anticorpi, come mostrato da una ricerca nel National Center for Biotechnology Information database mediante Blast, è stato ipotizzato che peptidi sintetici rappresentanti CDR potessero presentare un'attività antifungina indipendentemente dalla specificità dell'anticorpo di origine per un determinato antigene.

Come prova di concetto del potenziale di frammenti anticorpali, sono stati selezionati frammenti derivanti da CDR di Ab ben caratterizzati: due mAb murini (C7 e pc42) e uno umano (HuA). MAb C7 è una IgM polireattiva prodotta nei confronti di una mannoproteina da stress della parete cellulare di *Candida albicans*; mAb pc42 è una IgM, diretta nei confronti di un peptide sintetico contenente l'Ag superficiale del virus dell'epatite B e l'epitopo per i linfociti T-helper della proteina circumsporozoite di *Plasmodium falciparum*, che presenta due CDR, H1 e H2, di sequenza identica ai corrispondenti CDR di mAb C7 e HuA è una IgM specifica per la componente difucosilica dell'Ag del gruppo sanguigno A umano, rappresentativo di Ab ampiamente diffusi nella popolazione, che non condivide nessuna omologia di CDR né con mAb C7 né con mAb pc42.

L'attività biologica di tutti i CDR sintetici è stata valutata in diversi sistemi: a) attività candidacida *in vitro* e terapeutica *in vivo* in un modello murino di candidosi sistemica; b) attività anti-HIV-1 *in vitro* in un modello di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) stimulate con fitoemoagglutinina, ottenute da soggetti sani e infettate con ceppi HIV-1 R5 o X4, ed *ex vivo* in un modello di PBMC ottenuti da pazienti infettati con HIV-1 R5; c) attività antitumorale *in vitro* (citotossica e anti-angiogenica) nei confronti di cellule di melanoma murine ed umane e *in vivo* in un modello murino di colonizzazione da melanoma

metastatico (Polonelli et al., 2008). I CDR hanno mostrato attività fungicida differenziali *in vitro* e/o *in vivo* nei confronti di *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *Scedosporium prolificans*. Per stabilire la rilevanza funzionale di ogni singolo residuo amminoacidico all'interno della sequenza, è stata valutata l'attività biologica dei peptidi ottenuti mediante alanine scanning. I derivati alaninici (alanine substituted derivatives, asd) hanno mostrato un'augmentata, inalterata, o diminuita attività antifungina (Polonelli et al., 2008). CDR hanno inoltre dimostrato differenziali attività antivirale ed antitumorale, *in vitro*, *ex vivo* e/o *in vivo*, suggerendo il coinvolgimento di differenti meccanismi d'azione (Polonelli et al., 2008). I risultati ottenuti hanno dimostrato che le regioni variabili di Ab, indipendentemente dalla specificità per un determinato antigene, potrebbero essere una fonte di peptidi caratterizzati da diverse ed importanti attività biologiche. Sulla base dei dati acquisiti è stata successivamente indagata l'attività biologica di peptidi rappresentativi di frammenti derivati da Fc di diverse classi anticorpali (IgG, IgM e IgA).

6. Attività biologiche di peptidi derivati dalla regione costante di anticorpi

La selezione dei peptidi derivati da Fc di Ig, da studiare per le potenziali attività biologiche, è stata effettuata utilizzando un approccio bioinformatico, in funzione di importanti parametri, quali la lunghezza del peptide, l'alternanza di amminoacidi idrofobici/idrofilici nella sequenza e il punto isoelettrico, e considerando siti di taglio proteolitico specifici "trypsin and chymotrypsin-like". È ampiamente riconosciuto, infatti, che l'interazione con le membrane dei microrganismi di peptidi con carica netta positiva e caratteristica alternanza di aminoacidi idrofilici/idrofobici nella sequenza risulta di fondamentale importanza per la loro attività biologica.

Le sequenze peptidiche selezionate, denominate H4L (sequenza presente in Fc di IgG, IgM e IgA), N10K (sequenza presente in Fc di IgG1) e T11F (sequenza presente in Fc di IgM), sono state sintetizzate e valutate per la potenziale attività biologica *in vitro* nei confronti di cellule fungine e in saggi di tossicità, utilizzando come modello cellule di mammifero (Polonelli et al., 2012).

Saggi per la valutazione dell'attività fungicida sono stati effettuati nei confronti di miceti lievitiiformi, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans* e *Malassezia furfur*, inclusi ceppi resistenti a farmaci antifungini. I peptidi T11F e N10K hanno mostrato una significativa attività fungicida, a livello micromolare, nei confronti di tutti i ceppi saggiati. I valori di concentrazione efficace 50 (EC₅₀, concentrazione di peptide in grado di produrre il 50%

dell'effetto massimale, quindi di uccidere il 50% delle cellule utilizzate come inoculo nel saggio) sono risultati compresi tra 1,004 e 3,584 μM per il peptide N10K e tra 1,54 e 0,115 μM per il peptide T11F. L'attività fungicida di H4L è risultata inferiore nei confronti di tutti i miceti saggiati, infatti alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/ml}$ sono state osservate percentuali di inibizione della crescita variabili tra il 92,04 e il 55,99% (Tabella 2).

Tabella 2. Attività fungicida *in vitro* di peptidi derivati dalla regione costante di anticorpi nei confronti di miceti lievitosi

Ceppi fungini	Attività fungicida					
	N10K (NQVSLTCLVK)		T11F (TCRVDRGLTF)		H4L (HEAL)	
	%*	EC ₅₀ ** [moli/litro] $\times 10^{-6}$ (intervallo di confidenza 95%)	%*	EC ₅₀ [moli/litro] $\times 10^{-6}$ (intervallo di confidenza 95%)	%*	EC ₅₀
<i>C. albicans</i> SC5314	100	1,004 (0,947-1,065)	100	1,540 (1,404-1,689)	84,34	n.d.
<i>C. albicans</i> CA-6	100	2,939 (2,578-3,351)	100	0,518 (0,506-0,531)	57,04	n.d.
<i>C. albicans</i> SA40	100	1,763 (1,670-1,861)	100	0,286 (0,251-0,326)	55,99	n.d.
<i>C. albicans</i> AIDS68	100	1,745 (1,396-2,180)	100	0,295 (0,254-0,341)	59,82	n.d.
<i>C. albicans</i> UM4	100	2,784 (2,622-2,956)	100	0,667 (0,636-0,700)	64,63	n.d.
<i>C. glabrata</i> OMNI32	100	3,584 (3,390-3,788)	100	0,252 (0,245-0,260)	80,49	n.d.
<i>C. neoformans</i> 6995	100	2,948 (2,645-3,288)	100	0,811 (0,632-1,041)	85,08	n.d.
<i>M. furfur</i> 101	100	2,833 (1,900-4,226)	100	0,115 (0,103-0,129)	92,04	n.d.

* % attività inibitoria alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/ml}$; ** EC₅₀, concentrazione in grado di produrre il 50% dell'effetto massimale ; n.d., non determinato. Modificata da: Polonelli et al., 2012.

Gli asd di N10K e T11F hanno mostrato un'aumentata, inalterata, o diminuita attività antifungina. In particolare, la sostituzione dei residui di cisteina, coinvolti nella formazione di ponti disolfuro, ha determinato una perdita significativa dell'attività candidacida, così come, in misura minore, la sostituzione dei residui carichi positivamente. Al contrario, la sostituzione dell'unico residuo carico negativamente di T11F ha determinato un incremento dell'attività candidacida, in accordo con la nozione, comunemente accettata, che la carica netta positiva è un fattore critico per l'attività di AMP.

Come ipotizzabile, i peptidi selezionati, così come i loro asd maggiormente attivi, non hanno mostrato, a concentrazioni significativamente superiori ai valori di EC₅₀, alcun effetto citotossico in colture di cellule LLC-MK2 e non hanno presentato attività emolitica nei

confronti di globuli rossi umani di gruppo 0 Rh⁺ o attività genotossica aspecifica in PBMC umani.

Al fine di acquisire importanti informazioni riguardo alla relazione struttura-attività dei peptidi N10K e T11F, sono stati effettuati studi di dicroismo circolare da cui è stato possibile dedurre la struttura secondaria dei campioni in esame. Analogamente a quanto precedentemente osservato per il peptide KP, in grado di auto-aggregare spontaneamente e reversibilmente con il rilascio della forma dimerica attiva nel tempo, in un processo catalizzato da β -1,3 D-glucano (Pertinhez et al., 2009), gli studi di dicroismo circolare hanno dimostrato anche per il peptide N10K l'aggregazione spontanea in strutture fibrillari. Gli spettri ottenuti nel tempo da una soluzione di N10K sciolto in acqua hanno evidenziato la cinetica di aggregazione del peptide, da una struttura random-coil ad una struttura prevalentemente a β -foglietto. In presenza di cellule di *C. albicans*, lo spettro ottenuto dopo soli 150 minuti di incubazione è risultato indicativo della predominanza di strutture a β -foglietto. Tali osservazioni sono state confermate da successivi studi di microscopia elettronica a trasmissione che hanno mostrato l'aggregazione di N10K in strutture fibrillari (Polonelli et al., 2012). L'alternanza di residui idrofilici e idrofobici, presente nel peptide N10K, rappresenta un requisito fondamentale per l'acquisizione della struttura a β -foglietto e per la conseguente formazione di aggregati di maggiori dimensioni (Charles e Bradley, 2012). La presenza di un maggior numero di residui idrofobici nel peptide N10K può, in parte, spiegare la maggior velocità di aggregazione rispetto a KP. Per il peptide T11F, invece, osservazioni preliminari non hanno evidenziato alcuna capacità di aggregazione, anche variando il solvente della soluzione analizzata.

Lo studio mediante microscopia elettronica a trasmissione di cellule di *C. albicans* trattate con N10K ha permesso di osservare aggregati peptidici in prossimità del lato esterno della parete cellulare e significative alterazioni della morfologia cellulare. Il trattamento con N10K non ha mostrato di indurre lisi cellulare diretta, ma distruzione degli organelli intracitoplasmatici e retrazione del citoplasma, suggerendo l'attivazione di un meccanismo di morte per autofagia.

La valutazione della potenzialità terapeutica del peptide N10K è stata effettuata in modelli sperimentali consolidati di candidosi sistemica e vaginale in topi Balb/c. Il trattamento con N10K ha portato ad un significativo incremento della sopravvivenza degli animali sottoposti ad infezione sistemica e ha determinato una significativa riduzione della carica fungina renale al 12° giorno dall'infezione rispetto agli animali di controllo trattati con un peptide privo di attività candidacida (Polonelli et al., 2012). Nel modello murino sperimentale di candidosi

vaginale, entrambi i peptidi, N10K e T11F, hanno mostrato una significativa attività terapeutica rispetto ad animali di controllo infettati e non trattati.

Il peptide N10K ha inoltre mostrato di possedere attività immunomodulatoria in un modello di monociti umani *in vitro*, essendo in grado di indurre una iper-espressione di Dectina-1, principale recettore deputato al riconoscimento dei β -glucani presenti nella parete dei lieviti. Di conseguenza, è stato osservato un incremento nell'attivazione indotta da β -glucani di p-IkB- α , pSyk e CARD-9 e un aumento della produzione di citochine pro infiammatorie, come IL-6, IL-12p40, IL-1 β e TNF- α , profilo di attivazione che coincide con un potenziamento della fagocitosi di cellule di *C. albicans* non opsonizzate ad opera dei monociti (Gabrielli et al., 2012). Queste evidenze sperimentali lasciano ipotizzare che peptidi di derivazione anticorpale possano esplicare un'attività antimicrobica *in vivo* anche mediante le loro proprietà immunomodulanti.

I risultati ottenuti hanno confermato che le sequenze anticorpali rappresentano una fonte di peptidi caratterizzati da diverse attività biologiche, definibili come criptidi di tipo 3, in quanto potrebbero non essere prodotti naturalmente.

La dimostrazione della presenza, *in vivo*, di frammenti peptidici derivati da Fc dotati di attività antimicrobiche e immunomodulatorie potrebbe aprire un nuovo scenario sulle interazioni tra immunità innata e acquisita.

7. Scopo della ricerca

Oggetto del presente progetto, nell'ambito del Dottorato di Ricerca in Microbiologia e Virologia, XXVI ciclo, è stata la valutazione dell'attività antimicrobica e della potenzialità terapeutica di peptidi, presenti in siero umano, derivati da Ab e da altre proteine sieriche.

Inizialmente, lo scopo è stato quello di ricercare, in campioni di siero umano, la presenza delle sequenze peptidiche N10K e T11F, potenzialmente derivanti da taglio proteolitico di Fc anticorpali. L'analisi in spettrometria di massa ha escluso la presenza di questi peptidi ma ha permesso di ottenere diverse sequenze riferibili a frammenti di proteine sieriche, inclusi Ab, alcune delle quali sono state sintetizzate e valutate per la potenziale attività biologica nei confronti di diverse specie di lieviti, inclusi ceppi resistenti a farmaci antifungini.

Per i peptidi con dimostrata attività antifungina sono stati eseguiti saggi finalizzati alla verifica dell'assenza di citotossicità e di attività emolitica nei confronti, rispettivamente, di cellule LLC-MK2 e di eritrociti umani di gruppo 0 Rh⁺ e, per alcuni di essi è stata, inoltre, verificata l'assenza di attività genotossica aspecifica in un modello di PBMC umani.

Il meccanismo d'azione nei confronti delle cellule fungine dei peptidi risultati maggiormente attivi è stato indagato mediante saggi *in vitro* di uccisione nel tempo (time-killing), studi di citofluorimetria a flusso per la determinazione dell'eventuale induzione di processi apoptotici, saggi per la valutazione della produzione intracellulare di ROS e osservazione in microscopia confocale e microscopia elettronica a scansione e a trasmissione.

Studi in dicroismo circolare sono stati effettuati per la comprensione del rapporto struttura-funzione dei peptidi nel tempo e in dipendenza della temperatura.

Infine, lo studio dell'attività terapeutica *ex vivo* dei peptidi dotati della più elevata attività candidacida *in vitro* è stato effettuato utilizzando frammenti di mucosa orale porcina mantenuti in coltura, mentre per lo studio dell'attività terapeutica *in vivo* dei peptidi selezionati è stato utilizzato il modello di larve del lepidottero *Galleria mellonella*.

La dimostrazione della presenza *in vivo* di frammenti peptidici con attività fungicida consentirebbe di annoverare le proteine sieriche da cui sono derivati, inclusi gli Ab, nell'ampio gruppo di proteine dalle quali possono derivare criptidi di tipo 1, proponendole come possibile fonte di un grande numero di potenziali prototipi per la generazione di nuove classi di farmaci antifettivi, oltre a suggerire un loro nuovo ruolo nell'omeostasi antifungina.

Materiali e Metodi

1. Ricerca di peptidi nel siero

La ricerca di peptidi potenzialmente derivanti da degradazione di Ab e di altre proteine sieriche è stata condotta su 9 sieri umani utilizzando tecniche di cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa in tandem (High Performance Liquid Chromatography-MultiStage/Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS). L'indagine è stata effettuata in collaborazione con la Prof.ssa Lisa Elviri del Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Parma ed è stata orientata, nella prima fase, alla valutazione della presenza nei sieri dei peptidi N10K e T11F e, successivamente, alla ricerca di frammenti derivati da Ab e da altre proteine sieriche. I dati ottenuti sono stati elaborati con un analizzatore ad alta risoluzione LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) e gli spettri di massa dei frammenti peptidici rilevati sono stati processati utilizzando il programma Proteome Discoverer (Thermo Scientific).

Preparazione dei campioni

La preparazione dei campioni di siero da analizzare è stata effettuata diluendo 100 µl di campione, precedentemente filtrato utilizzando filtri di nylon con pori di 0,2 µm, in 100 µl di soluzione denaturante (urea 7 M, tiourea 2 M e DTT 20 mM). Gli agenti riducenti sono stati utilizzati per evitare la dimerizzazione dei peptidi dovuta a ioni di metalli bivalenti comunemente presenti nel siero. I campioni così diluiti, dopo l'aggiunta di 9 ml di acetone freddo, sono stati mantenuti a 4 °C per 1 ora e successivamente centrifugati a 6000 g per 30 min a 25 °C. I precipitati ottenuti sono stati solubilizzati in 2 ml di acetonitrile e HCl (70/30%, v/v), mantenuti in agitazione a 4 °C per 1 ora e successivamente centrifugati a 6000 g per 30 min a 25 °C. I sopranatanti ottenuti sono stati liofilizzati e risospesi in una soluzione acquosa di acido formico 0,1% (v/v) prima dell'analisi in HPLC-MS/MS. I campioni di siero sono stati analizzati in doppio utilizzando un volume di 10 µl.

Cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa

Le analisi in HPLC-MS/MS sono state effettuate mediante il sistema ad alta risoluzione LC-HRMS (Thermo Fisher Scientific), accoppiato ad un analizzatore di massa a trappola ionica lineare LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). La separazione cromatografica è stata effettuata su una fase stazionaria C18 (100 × 2,0 mm, 2,7 µm, 100 Å) (Kinetex, Phenomenex,

Torrance, CA) utilizzando un sistema di solventi a gradiente [(A) acido formico acquoso 0,1% (v/v)/(B) 0,05% (v/v) acido formico in acetonitrile] come segue: 5% di solvente B per 2 minuti, dunque un gradiente lineare dal 5% al 60% di B in 120 minuti alla velocità di flusso di 200 ml min⁻¹. Successivamente, il solvente B è stato aumentato fino al 95% per 15 minuti per pulire la colonna prima della ri-equilibratura. L'analizzatore di massa è stato configurato per collezionare spettri di massa nel range 300-200 m/z e le condizioni spettrometriche di massa sono state così settate: voltaggio dell'elettrospray 3,3 kV; flusso di gas ausiliario 8 (unità arbitrarie), temperatura del capillare 275 °C; voltaggio del capillare 13V e tensione capillare 85V. La soglia per la selezione degli ioni è stata settata a 1E⁶ CPS (colpi per secondo) con un tempo massimo di accumulo degli ioni di 200 ms. Gli ioni più abbondanti sono stati selezionati per la DDA MS/MS a trappola ionica lineare con le seguenti impostazioni: tempo massimo accumulo di ioni 25 ms, tempo di attivazione 10 ms. Il tempo di esclusione dinamica di 60 secondi è stato utilizzato per ridurre al minimo la selezione ridondante di peptidi per MS/MS.

Analisi bioinformatica

Gli spettri ottenuti mediante spettrometria di massa in tandem sono stati processati utilizzando il programma Proteome Discoverer. I dati sono stati processati con una tolleranza di massa sullo ione precursore di 10 ppm e una tolleranza di massa sui frammenti ionici di 0,6 ppm.

2. Valutazione dell'attività *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti di miceti lieviformi

I peptidi selezionati, preparati mediante sintesi in fase solida presso il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Padova, utilizzando un sintetizzatore multiplo SyroII (MultiSynTech GmbH), sono stati valutati *in vitro* per l'attività microbica nei confronti di miceti lieviformi mediante saggi convenzionali di Unità Formanti Colonia (UFC). Ogni saggio è stato eseguito in triplo a scopo statistico (Polonelli et al., 2003).

Attività in vitro nei confronti di Candida albicans e Candida glabrata

Tutti i peptidi selezionati sono stati saggiati preliminarmente nei confronti di un ceppo fungino di riferimento, *C. albicans* SC5314, alla concentrazione di 100 µg/ml. Successivamente, i peptidi che hanno mostrato una buona attività fungicida nei confronti del ceppo di riferimento sono stati saggiati nei confronti di altri ceppi di isolamento clinico, in

particolare: *C. albicans* CA-6, un ceppo ad elevata virulenza ottenuto dalla collezione fungina della Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche dell'Università degli Studi di Perugia; *C. albicans* SA40 e AIDS68, rispettivamente sensibile e resistente al fluconazolo, isolati da una infezione vaginale umana, dalla collezione fungina del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma; *C. albicans* UM4 e *C. glabrata* OMNI32, rispettivamente caspofungina-resistente e fluconazolo-, itraconazolo- e voriconazolo-resistente, dalla collezione fungina del Dipartimento di Salute Pubblica dell'Università degli Studi di Milano.

I peptidi sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido alla concentrazione iniziale di 20 mg/ml e successivamente portati a 2 mg/ml in soluzione acquosa, quindi utilizzati a concentrazioni scalari, a partire da 100 µg/ml, al fine di determinare per ciascun microrganismo il valore di EC₅₀.

I saggi sono stati effettuati prelevando una singola colonia del ceppo in esame cresciuto su Sabouraud Dextrose Agar (SDA) dopo incubazione per 24 ore a 37 °C. Dopo sospensione della colonia in terreno liquido 199 (Sigma-Aldrich, M2154), le cellule di *C. albicans* sono state incubate a 37 °C in agitazione per 1 ora per permettere la formazione del tubulo germinativo. Dopo conta al microscopio mediante un emocitometro Kova[®] (HYCOR BioMedical Inc.), approssimativamente 3×10² cellule sono state risospese in H₂O in presenza delle concentrazioni desiderate di ciascun peptide in un volume finale di 100 µl e le sospensioni sono state incubate per 6 ore a 37 °C. Come controllo di crescita è stato utilizzato lo stesso inoculo cellulare in H₂O in assenza di peptide. Dopo questo periodo, le sospensioni fungine sono state seminate su piastre di SDA e, dopo 48 ore di incubazione a 37 °C, il numero di UFC è stato determinato utilizzando lo strumento aCOLyte Colony Counter (PBI International).

Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate secondo la seguente formula:

$$\% \text{ di inibizione della crescita} = 100 - \frac{\text{N}^\circ \text{ UFC in presenza di peptide}}{\text{N}^\circ \text{ UFC nel controllo}} \times 100$$

La significatività statistica delle differenze tra i gruppi sperimentali e di controllo è stata valutata mediante test *t* di Student. I valori di EC₅₀ sono stati calcolati mediante analisi di regressione non lineare utilizzando il programma GraphPad Prism 4.01 (San Diego, CA, USA).

La procedura descritta è stata adottata anche per la valutazione dell'attività *in vitro* dei peptidi nel tempo (time-killing). Sono stati preparati inoculi fungini alla concentrazione di circa 3×10^3 cellule/ml in provette eppendorf in presenza o in assenza di opportune concentrazioni di peptide e, dopo 30 minuti, 1, 2, 4 e 6 ore di incubazione a 37 °C, 100 µl sono stati seminati su piastre di SDA per la successiva conta del numero di UFC. La concentrazione di peptide da utilizzare nei saggi di time-killing è stata stabilita a partire dalla Minima Concentrazione Fungicida (MCF), la concentrazione di peptide in grado di uccidere in sei ore il 100 % delle cellule dell'inoculo, utilizzando concentrazioni multiple o sottomultiple di questa.

Infine, sono stati effettuati saggi di UFC per valutare l'eventuale neutralizzazione dell'attività fungicida dei peptidi selezionati in presenza di 100 e 200 µg/ml di laminarina, un β-1,3 D-glucano solubile.

Attività in vitro nei confronti di Cryptococcus neoformans e Malassezia furfur

L'attività *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti di *C. neoformans* 6995, un ceppo capsulato di sierotipo A ottenuto dall'Università degli Studi di Perugia, e *M. furfur* 101, un ceppo di isolamento clinico dalla collezione fungina dell'Unità di Microbiologia e Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali dell'Università degli Studi di Parma, è stata valutata mediante saggi di UFC, analogamente a quanto precedentemente descritto con lievi modificazioni.

Cellule di *C. neoformans* 6995 derivate da una singola colonia sviluppatasi su SDA dopo incubazione per 48 ore a 37 °C sono state sospese in terreno liquido, contate al microscopio e risospese in H₂O alla concentrazione di circa 5×10^2 in un volume finale di 100 µl in presenza o in assenza di peptide. Dopo 6 ore di incubazione a 37 °C, le sospensioni fungine sono state seminate su piastre di SDA che sono state incubate per 48-72 ore a 37 °C prima della determinazione del numero di UFC.

Cellule di *M. furfur* 101, derivate da una singola colonia cresciuta su SDA-Tween20 1% (SDA addizionato con 10 ml/l di Tween-20) dopo incubazione per 4 giorni a 30 °C, sono state sospese in terreno liquido, contate al microscopio e risospese in H₂O alla concentrazione di circa 3×10^2 in un volume finale di 100 µl in presenza o in assenza di peptide. Dopo 6 ore di incubazione a 30 °C, le sospensioni fungine sono state seminate su piastre di SDA-Tween20 che sono state incubate per 72-96 ore a 30 °C prima della determinazione del numero di UFC. Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate secondo la formula precedentemente riportata.

3. Valutazione della citotossicità e dell'attività emolitica *in vitro* dei peptidi selezionati

La citotossicità dei peptidi selezionati è stata valutata in un modello di cellule di mammifero coltivate *in vitro* mediante saggio fluorimetrico, utilizzando il composto resazurina o Alamar Blue (CellTiter-Blue, Invitrogen, DAL1100), e nei confronti di globuli rossi umani mediante saggio di emolisi.

Citotossicità in cellule LLC-MK2

Cellule aderenti LLC-MK2 (una linea cellulare derivata dal rene di scimmia) sono state coltivate in terreno Minimum Essential Medium (MEM) addizionato con il 10% di siero bovino fetale (FBS), 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina a 37 °C in atmosfera umida al 5% di CO₂. Le cellule sono state seminate in piastre per colture cellulari da 96 pozzetti alla concentrazione di $1,5 \times 10^5 / \text{cm}^2$, corrispondente a 5×10^4 cellule per pozzetto in un volume di 100 µl. Dopo 24 ore, sono stati aggiunti i peptidi, diluiti in terreno MEM addizionato al 2% di FBS, a concentrazioni comprese tra 25 e 100 µM e le piastre sono state incubate a 37 °C. Cellule coltivate in assenza di peptidi sono state utilizzate come controllo negativo, mentre come controllo positivo è stato utilizzato un peptide a riconosciuta attività citotossica, la melittina, alla concentrazione di 5 µM. Dopo 24 ore, in ogni pozzetto il terreno è stato sostituito con 100 µl di terreno fresco senza siero contenente resazurina alla concentrazione di 44 µM e le piastre sono state reincubate a 37 °C.

La resazurina penetra all'interno delle cellule e viene ridotta a resorufina fluorescente ad opera di enzimi citosolici e mitocondriali in cellule vitali e metabolicamente attive (O'Brien et al., 2000).

La misura della fluorescenza alla lunghezza d'onda di 572 nm è stata effettuata dopo 30 e 60 minuti dopo l'aggiunta di resazurina utilizzando un fluorimetro multipozzetto Wallac 1420 Victor (Perkin Elmer).

La vitalità cellulare è stata espressa come rapporto percentuale T/C dove T rappresenta la media dell'assorbanza delle cellule trattate con i peptidi e C la media dell'assorbanza dei controlli.

Saggio di emolisi

Per la valutazione dell'attività emolitica dei peptidi è stato utilizzato un protocollo descritto in letteratura (Oren e Shai, 1997). I saggi sono stati eseguiti in doppio, in un volume finale di 400 µl, utilizzando globuli rossi umani di gruppo 0 Rh+ al 2,5% in tampone fosfato (PBS) e i

peptidi a concentrazione comprese tra 25 e 100 μM . Come controllo negativo, sono stati utilizzati globuli rossi in PBS in assenza di peptidi e, come controllo positivo, una soluzione 1% di Triton X-100 e il peptide melittina alla concentrazione di 2,5 μM . I campioni sono stati incubati a 37 °C in agitazione blanda (100 rpm) e, dopo 30 minuti e 2 ore, sono stati centrifugati a 800 g per 10 minuti, recuperando ad ogni tempo 100 μl di soprannatante. La lettura dell'assorbanza è stata effettuata in piastre da 96 pozzetti alla lunghezza d'onda di 540 nm. I risultati sono stati espressi come percentuale di globuli rossi non lisati, considerando come assenza di lisi il valore ottenuto nei campioni in assenza di peptide (controllo negativo) e come lisi totale il valore ottenuto in presenza di Triton X-100 (controllo positivo).

4. Valutazione della genotossicità aspecifica dei peptidi selezionati

Per indagare se i peptidi selezionati potessero indurre danno al corredo genetico di cellule umane, è stato effettuato un saggio di attività genotossica aspecifica (versione alcalina del comet assay) in PBMC. Il saggio è stato effettuato in collaborazione con la Prof. ssa Buschini e la Dott. ssa Galati presso il Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli Studi di Parma. Il protocollo di riferimento utilizzato, modificato secondo le esigenze sperimentali, è stato descritto da Singh e collaboratori (Singh et al., 1988). Le cellule, ottenute da un donatore sano di 20 anni di età mediante separazione in gradiente di densità utilizzando il sistema di separazione Lymphoprep, sono state lavate per due volte in tampone di Hanks. I PBMC ottenuti sono stati risospesi alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml in terreno liquido RPMI 1640 addizionato con 10% di siero fetale, 1% di fitoemoagglutinina, 1 mM di L-glutammina, 100 UI di penicillina e 100 $\mu\text{g/ml}$ di streptomina. Successivamente, 1 ml della sospensione cellulare preparata è stata incubata in presenza dei peptidi selezionati, a concentrazioni di 5, 10 e 20 μM , per 2 ore a 37 °C in atmosfera al 5% di CO_2 . Le cellule sono state, quindi, lavate con PBS e poste su vetrini in gel di agarosio. La lisi cellulare è stata ottenuta esponendo le cellule a 4 °C per una notte ad un tampone contenente NaCl 2,5 M, Na_2EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, a pH 10. Dopo trattamento per circa 20 minuti in tampone alcalino (1 mM Na_2EDTA , 300 mM NaOH, pH>13) a 0 °C per permettere lo svolgimento del DNA, l'elettroforesi è stata condotta per 20 minuti (0,78 V/cm, 300 mA) a 0 °C nello stesso tampone con successiva neutralizzazione in Tris-HCl 0,4 M a pH 7,5. Cellule trattate con etilmetansulfonato 2 mM sono state utilizzate come controllo positivo. Per ogni condizione sperimentale sono stati preparati 2 vetrini che sono stati colorati con 0,75 μl di bromuro di etidio (10 $\mu\text{g/ml}$) immediatamente prima della osservazione al microscopio a

fluorescenza (LEICA DMLS) utilizzando un filtro di eccitazione BP 515-560 nm e un filtro di barriera LP 580 nm. I dati sono stati raccolti ed elaborati utilizzando un sistema automatico di analisi delle immagini (Comet Assay III, Perceptive Instruments Ltd). In particolare, sono state analizzate 50 cellule selezionate casualmente per ogni vetrino. In assenza di danno del DNA il materiale genetico cellulare si presenta come un nucleoma rotondo ed omogeneo. In presenza di danno del DNA i frammenti migrati verso l'anodo sono visualizzabili come "coda" della cometa. Per la quantificazione del danno è stata misurata l'intensità luminosa della coda delle comete (tail intensity), espressa come percentuale di materiale genetico frammentato presente nella coda della cometa. E' stata, inoltre, eseguita direttamente dall'operatore una valutazione visiva con attribuzione di ciascuna cometa osservata a una classe di appartenenza (da 0 a 4) a seconda della lunghezza della coda. Lo score visivo è stato calcolato utilizzando la seguente formula:

Score visivo = n° cellule di classe 0 + 2×(n° cellule di classe 1) + 3×(n° cellule di classe 2) + 4×(n° cellule di classe 3) + 5×(n° cellule di classe 4).

5. Valutazione del profilo apoptotico di cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi selezionati

La valutazione dell'eventuale induzione di apoptosi in cellule di *C. albicans* SC5314 in seguito a trattamento con i peptidi selezionati è stata effettuata mediante il citofluorimetro Muse[®] Cell Analyzer (Merck, Millipore), utilizzando il kit Muse[™] Annexin V & Dead Cell (Merck, Millipore).

Lo strumento fornisce un'analisi cellulare ad elevata prestazione utilizzando un'ottica microcapillare miniaturizzata per la rivelazione della fluorescenza cellulare con elevata precisione, sensibilità e accuratezza.

Il kit utilizzato è composto da Annessina V fluoresceinata, un composto che si lega alla fosfatidilserina, un fosfolipide solitamente esposto nella parte interna della membrana citoplasmatica che trasloca sulla superficie esterna della membrana di cellule che si trovano in fase di apoptosi precoce (Figura 6), e da 7-Amino-Actinomycina D (7-AAD) in grado di intercalarsi nella doppia elica di DNA di cellule morenti o in apoptosi tardiva.

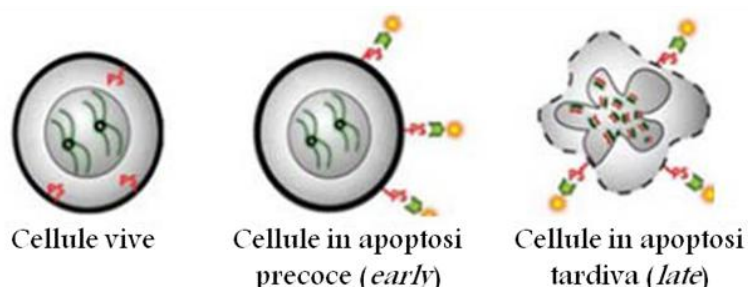


Figura 6. Rappresentazione schematica dell'esposizione verso l'esterno della membrana cellulare del fosfolipide fosfatidilserina (in rosso) e legame con AnnessinaV fluoresceinata (verde e gialla).

L'utilizzo di questa metodica permette di rilevare quattro distinte popolazioni cellulari: cellule non apoptotiche, Annessina V negative e 7-AAD negative; cellule in apoptosi precoce (*early*), Annessina V-positive e 7-AAD negative; cellule in apoptosi tardiva/morte (*late/dead*), Annessina V positive e 7-AAD positive e detriti cellulari (*dead*) Annessina V negative e 7-AAD positive (Figura 7).

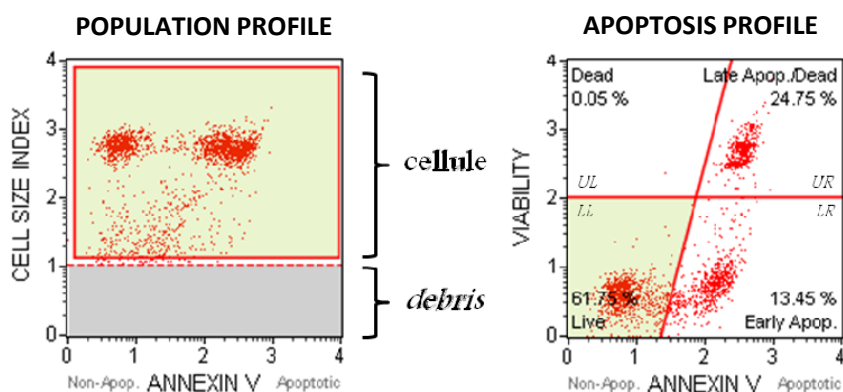


Figura 7. Grafici di distribuzione cellulare in citofluorimetria. Il grafico a sinistra mostra il profilo della popolazione in relazione alle dimensioni delle cellule, permettendone la selezione con l'eliminazione dei detriti cellulari (*debris*) dall'analisi. Il grafico a destra consente di osservare il profilo apoptotico della popolazione cellulare precedentemente selezionata mediante la distribuzione nei quattro quadranti: LL, cellule vive, LR, cellule in apoptosi precoce, UR, cellule in apoptosi tardiva e UL, detriti cellulari.

I saggi sono stati eseguiti a partire da una singola colonia del ceppo in esame cresciuta su SDA dopo incubazione per 24 ore a 37 °C. Dopo opportuna risospensione della colonia in terreno liquido 199, le cellule sono state incubate a 37 °C in agitazione a 150 rpm per circa un'ora, quindi contaminate al microscopio. Un inoculo di circa 5×10^5 cellule/ml in H₂O è stato

messo a contatto con i peptidi risultati maggiormente attivi. Le concentrazioni di peptide utilizzate nel saggio sono state scelte per ottenere dopo 30 minuti di trattamento un numero di cellule vitali in UFC superiore al 70%. Contemporaneamente, sono stati effettuati saggi di UFC per confermare l'attività candidacida dei peptidi utilizzati. I campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente per 10 minuti, quindi a 90 µl delle sospensioni sono stati aggiunti 100 µl di reagente Muse™ Annexin V & Dead Cell e 10 µl di una soluzione acquosa di albumina sierica al 10% come indicato dal protocollo. La miscela di reazione è stata mantenuta al buio a temperatura ambiente per 20 minuti prima della lettura al citofluorimetro. Per controllo, lo stesso numero di cellule è stato trattato con melittina (Park e Lee, 2010) alla concentrazione di 12,5 µM per 3 ore o solamente con il diluente (controllo negativo).

6. Valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno in cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi selezionati

La valutazione della produzione di ROS in cellule di *C. albicans* SC5314 in seguito al trattamento con i peptidi selezionati è stata effettuata secondo un protocollo sperimentale precedentemente descritto (Kobayashi et al., 2002).

Cellule di *C. albicans* SC5314 cresciute su SDA per 24 ore a 37 °C, sospese in PBS alla concentrazione di circa 1×10^7 cellule/ml, sono state incubate per 30 minuti a 30 °C in presenza di 40 µM (20 µg/ml) di 2',7'-Diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA, D6883, Sigma Aldrich). Le cellule sono state successivamente centrifugate a 5000 g per 5 minuti, lavate in PBS per eliminare la DCFH-DA extracellulare in eccesso e risospese in PBS. 90 µl dell'inoculo preparato sono stati distribuiti in provette eppendorf sterili cui sono stati addizionati 10 µl di H₂O o 10 µl di una soluzione acquosa di acido ascorbico, antiossidante in grado di prevenire la formazione di ROS, in modo da ottenere la concentrazione finale di 25 mM nel volume di 100 µl. Dopo mantenimento dei campioni a temperatura ambiente per 30 minuti, è stato effettuato il trattamento con i peptidi selezionati a concentrazione doppia dell'EC₅₀. Cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo, mentre come controllo positivo è stata utilizzata acqua ossigenata alla concentrazione di 1 mM. Ciascun saggio è stato effettuato in doppio. I campioni sono stati trasferiti in pozzetti di piastre sterili per fluorimetria a fondo piatto, che sono state incubate a 37 °C. Al tempo 0, dopo 30 minuti, 1, 2, 4 e 5 ore la fluorescenza è stata misurata alla lunghezza d'onda di emissione di 538 nm utilizzando il fluorimetro EnSpire plate reader (PerkinElmer).

7. Coniugazione dei peptidi con isotiocianato di fluoresceina e purificazione mediante HPLC

I peptidi selezionati sono stati coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC) e purificati mediante HPLC.

I peptidi, inizialmente alla concentrazione di 20 mg/ml in DMSO, sono stati diluiti alla concentrazione finale di 2 mg/ml in carbonato di sodio 0,1 M a pH 9. Il reagente FITC è stato solubilizzato in DMSO anidro alla concentrazione di 1 mg/ml immediatamente prima di essere aggiunto lentamente, in rapporto molare 1:1, alla soluzione peptidica mantenuta in agitazione. La miscela di reazione è stata incubata a 4 °C al buio per 8 ore; successivamente è stato addizionato NH₄Cl alla concentrazione finale di 50 mM, incubando nuovamente per 2 ore a 4 °C. Infine, alla reazione è stato aggiunto xilene cianolo allo 0,1% e glicerolo al 5% e i campioni sono stati conservati a 4 °C sino alla purificazione.

I peptidi coniugati sono stati separati mediante il sistema ÄKTA (GE Healthcare) utilizzando la colonna a fase inversa SOURCE 15RPC (volume 1,66 ml, GE Healthcare), costituita da sfere porose idrofobiche monodisperse di polistirene-divinilbenzene da 15 µm. Su colonna sono stati caricati circa 300 µg di peptide in un volume di 500 µl di acido trifluoroacetico (TFA) 0,065%. La velocità di flusso applicata è stata di 1 ml/min e la eluizione dei campioni è stata effettuata in gradiente di idrofobicità, utilizzando una soluzione di TFA 0,050% in acetonitrile. Durante la procedura di eluizione è stata misurata l'assorbanza alle lunghezze d'onda di 495 nm, 280 nm e 215 nm per monitorare, nelle diverse frazioni eluite, rispettivamente la presenza di FITC, del triptofano (se presente nel peptide) e del legame peptidico. Le frazioni presentanti assorbimento a tutte le lunghezze d'onda sono state raccolte e quantificate. Dopo liofilizzazione con concentratore Speed Vacuum HETOVAC VR-1 (Heto), le polveri di ogni frazione sono state risospese in DMSO alla concentrazione peptidica di 20 mg/ml e saggiate nei confronti del ceppo di *C. albicans* SC5314 in convenzionali saggi di UFC per verificare che l'attività candidacida del peptide fluoresceinato fosse mantenuta rispetto al peptide non fluoresceinato. Le frazioni presentanti una significativa attività candidacida *in vitro* sono state selezionate, unite e conservate a 4 °C al fine di effettuare le successive indagini funzionali/qualitative al microscopio confocale.

8. Visualizzazione in microscopia confocale a scansione laser di cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi coniugati con isotiocianato di fluoresceina

Lo studio in microscopia confocale a scansione laser di blastocellule e cellule in germinazione

vitali di *C. albicans* SC5314 trattate con i peptidi coniugati a fluoresceina è stato effettuato in collaborazione con la Prof.ssa Rita Gatti dell'Unità di Istologia ed Embriologia del Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali dell'Università degli Studi di Parma.

Per l'ottenimento della forma blastocellulare, cellule di *C. albicans* SC5314 prelevate da una colonia cresciuta per 24 ore su SDA sono state inoculate in 10 ml di brodo YPD (1% di estratto di lievito, 2% di peptone e 2% di glucosio, pH 3) e la sospensione è stata mantenuta in agitazione (100 rpm) overnight a 30 °C. Cellule nella forma filamentosa sono state ottenute inoculando 1 ml della coltura in brodo YPD in 10 ml di terreno 199 che sono stati incubati per 60 minuti a 37 °C mantenendo la sospensione in agitazione a 150 rpm. Terminato il periodo di incubazione, entrambe le sospensioni cellulari sono state lavate una volta con acqua centrifugando a 5000 g a temperatura ambiente per 5 minuti. Per entrambe le condizioni sono stati preparate sospensioni di circa 2×10^7 cellule/ml, successivamente unite in rapporto 1:1 per ottenere un inoculo con un uguale proporzione di cellule filamentose e lievitiformenti alla concentrazione finale di 2×10^7 cellule/ml.

In alcuni esperimenti all'inoculo cellulare è stato aggiunto ioduro di propidio (PI), un colorante nucleare per cellule non vitali, alla diluizione finale di 1:1000, partendo da una soluzione iniziale pari a 1 mg/ml. Successivamente, 20 µl della sospensione sono stati depositi su un vetrino all'interno di una apposita cella per la microscopia confocale e dopo 30 minuti è iniziata l'osservazione delle cellule al microscopio confocale LSM 510 Meta scan integrato con il microscopio invertito Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Jena, Germany). In altri saggi, PI è stato aggiunto, direttamente sul vetrino, dopo 4 ore e 45 minuti di trattamento con il peptide coniugato a fluoresceina. In esperimenti selezionati, l'inoculo cellulare è stato pre-trattato con tetrametilrodamina 200 nM, un colorante mitocondriale, prima dell'aggiunta del peptide fluoresceinato.

I peptidi fluoresceinati sono stati aggiunti direttamente sul vetrino alla concentrazione finale desiderata e l'inoculo trattato è stato osservato durante le 4 ore successive a diversi intervalli di tempo (time-laps). Contemporaneamente, sono state preparate diluizioni 1:1000 dei campioni trattati e di controllo e 100 µl sono stati seminati su piastre di SDA per valutare nel saggio di UFC l'attività candidacida dei peptidi fluoresceinati utilizzati.

PI e tetrametilrodamina sono stati eccitati alla lunghezza d'onda di 543 nm (laser He-Ne) e fluoresceina alla lunghezza d'onda di 488 nm (laser Argon).

9. Visualizzazione in microscopia elettronica a scansione di cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi selezionati

Per la visualizzazione mediante microscopio elettronico a scansione sono stati preparati campioni cellulari di *C. albicans* SC5314 partendo da blastocellule e cellule in germinazione in uguale proporzione, come precedentemente descritto, alla concentrazione di 4×10^7 cellule/ml. La reazione è stata allestita in piastre a 96 pozzetti a fondo concavo utilizzando 10 μ l di inoculo cellulare (4×10^5 cellule) e i peptidi alla concentrazione stabilita in un volume finale di 20 μ l. Come controllo è stato utilizzato lo stesso inoculo cellulare in H₂O in assenza di peptidi. Dopo 1 ora, 5 μ l delle sospensioni cellulari trattate e non trattate sono stati prelevate da ciascun pozzetto e posizionate su vetrini di circa 25 mm², cui sono stati aggiunti 5 μ l di fissativo (glutaraldeide 2,5% + NaCacodilato 0,1 M pH 7,4). I vetrini sono stati quindi mantenuti a 4 °C, coperti con 1 ml di fissativo, sino al momento della preparazione per l'osservazione microscopica.

Contemporaneamente sono state preparate diluizioni 1:200 e 1:2000 dei campioni trattati e di controllo e 50 μ l sono stati seminati su piastre di SDA per verificare nel saggio di UFC l'efficacia candidacida dei peptidi nelle condizioni adottate.

I vetrini sono stati lavati in tampone sodio-cacodilato per circa 30 minuti e disidratati mediante serie progressiva di alcoli (25; 50; 75; 90; 100%) per diversi tempi: da 10 a 20 minuti per gli alcoli a minore percentuale e dai 30 ai 40 minuti per gli alcoli 90 e 100%. Successivamente, i campioni sono stati immersi in acetone assoluto 100% e disidratati mediante Critical point dryer* in CO₂ liquida. (31,1 °C – 72,9 atm). Infine, i vetrini sono stati montati su un apposito supporto metallico, metallizzati in oro tramite scarica ionica con Sputtering e visualizzati mediante un microscopio elettronico a scansione Philips 501 (15 kV).

10. Visualizzazione in microscopia elettronica a trasmissione di cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi selezionati

Gli studi mediante microscopio elettronico a trasmissione sono stati effettuati in collaborazione con la Dott.ssa Tiziana D'Adda, dell'Unità di Anatomia ed Istologia Patologica del Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali dell'Università degli Studi di Parma. Sono stati preparati campioni cellulari di *C. albicans* SC5314 partendo da blastocellule e cellule in germinazione in uguale proporzione, come precedentemente descritto.

Il saggio è stato allestito in provette eppendorf sterili, utilizzando 10 μl di inoculo cellulare ($7,5 \times 10^6$ cellule) e i peptidi alle concentrazioni desiderate, in un volume finale di 50 μl . Come controllo è stato utilizzato lo stesso inoculo cellulare in H_2O in assenza di peptidi. I campioni sono stati mantenuti per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo questo periodo, sono state preparate diluizioni 1:200 e 1:2000 dei campioni trattati e di controllo e 50 μl sono stati seminati su piastre di SDA per verificare nel saggio di UFC l'efficacia candidacida dei peptidi nelle condizioni adottate. Al fine di impacchettare le cellule di *C. albicans* per la successiva processazione ed inclusione in resina epossidica, è stata preparata una soluzione di agarosio 1% in H_2O . Una parte della soluzione è stata versata in piastre da 6 cm di diametro per uno spessore di circa 0,5 cm e lasciata solidificare e la rimanente parte è stata mantenuta liquida in stufa a 56 °C fino al successivo utilizzo. Con un bisturi, sono stati creati piccoli pozzetti nello spessore del gel. Al fine di evitare alterazioni della struttura cellulare dovute alla centrifugazione (Wright, 2000), i campioni trattati e di controllo sono stati pre-fissati per 5 minuti con glutaraldeide 5% in tampone fosfato 0,1 M a pH 6,8. Solo dopo la pre-fissazione i campioni sono stati centrifugati a 5000 g per 5 minuti a temperatura ambiente, in modo da ottenere sedimenti cellulari che sono stati trasferiti nei pozzetti creati precedentemente nell'agarosio solidificato. L'agarosio mantenuto liquido in stufa è stato quindi delicatamente versato sulla piastra, facendo attenzione a non disperdere le cellule appena inserite, e, dopo la sua gelificazione, è stata ritagliata la porzione contenente il sedimento cellulare. I cubetti di agar contenenti le cellule *C. albicans* sono stati quindi fissati con glutaraldeide 2,5% in tampone fosfato per 3 ore a temperatura ambiente, quindi lasciati a 4 °C per una notte. La processazione per l'inclusione in resina è iniziata con tre lavaggi ripetuti per tre volte da 30 min ciascuno, in tampone fosfato (0,1 M, pH 6,8), al fine di rimuovere accuratamente il fissativo, seguiti da una post-fissazione per 30 min in una soluzione di tetrossido di osmio (OsO_4 , 1% in H_2O). Dopo accurato lavaggio con lo stesso tampone, è stata effettuata la disidratazione utilizzando concentrazioni crescenti di acetone (25% \times 5 min, 50% \times 5 min, 70% \times 5 min, 95% \times 5 min, 6 cambi di 100% \times 5 min). I lieviti sono notoriamente difficili da infiltrare, pertanto è stato approntato un protocollo di infiltrazione prolungata in resina epossidica Durcupan Araldite ACM1. Sono state dapprima utilizzate miscele aventi un rapporto acetone:resina 2:1 (per 2 ore su agitatore basculante), quindi 1:1 (per una notte su agitatore basculante), successivamente l'infiltrazione è stata effettuata con resina pura (3 \times 2 ore, quindi per una notte). Dopo aver rimosso l'eccesso di agar attorno alle cellule, i campioni sono stati inclusi in resina epossidica Durcupan Araldite ACM2, addizionata di apposito

catalizzatore, e lasciati polimerizzare a 58 °C per 72 ore. Dopo trimming dei blocchetti di resina, il taglio di sezioni semifini (0,75 µm di spessore) e la loro colorazione mediante blu di metilene e safranina ha permesso di valutare la presenza di un adeguato quantitativo di cellule. Dopo selezione delle aree più idonee mediante ulteriore trimming, è stato effettuato il taglio di sezioni ultrafini (80 nm di spessore) mediante ultramicrotomo LKB Ultratome 8801. Tali sezioni, raccolte mediante griglie di rame da 300 maglie, sono state colorate con acetato di uranile (15 min) e citrato di piombo (5 min) ed esaminate mediante microscopio elettronico a trasmissione Philips EM 208S (Fei Europe, Eindhoven, Netherlands).

11. Analisi conformazionale dei peptidi selezionati mediante dicroismo circolare

Per una migliore comprensione del possibile meccanismo d'azione dei peptidi selezionati, al fine di acquisire importanti informazioni riguardo alla relazione struttura-attività, sono stati condotti studi di dicroismo circolare in collaborazione con la dott.ssa Thelma A. Pertinhez, presso il Centro Interdipartimentale Misure “Giuseppe Casnati” (CIM) dell'Università degli Studi di Parma, utilizzando uno Spettropolarimetro Jasco 715 (JASCO International Co. Ltd.), accoppiato ad un sistema per il controllo della temperatura Peltier PTC-348WI. In particolare, sono stati registrati spettri di dicroismo nella regione del lontano UV (190-250 nm), da cui è possibile dedurre la struttura secondaria dei campioni proteici in esame. Inizialmente sono state preparate soluzioni madre in H₂O dei peptidi selezionati alla concentrazione di 2 mg/ml. Per seguire il processo di aggregazione, sono state preparate aliquote diluite delle soluzioni peptidiche fino ad una concentrazione finale di 20 µM. Gli spettri dicroici (grafici dell'ellitticità θ in funzione della lunghezza d'onda) sono stati acquisiti a 20 °C a lunghezze d'onda da 190 a 250 nm, con 4 scansioni, usando cuvette in quarzo da 1 mm (Hellma, type 100-QS). Dopo aver apportato la correzione basale, la misura di ellitticità θ (mdeg) è stata convertita in ellitticità media molare per residuo $[\theta]$ (deg·cm²·dmol⁻¹) secondo l'equazione:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 \times l \times c \times n}$$

con l = cammino ottico della cuvetta (cm), c = concentrazione molare (M) ed n = numero di residui amminoacidici del peptide.

Spettri dei peptidi sono stati acquisiti a diversi intervalli di tempo e dopo aggiunta di laminarina 500 µM, mimotopo dei β -glucani di superficie della parete fungina, di sodio

dodecilsolfato (SDS) 100 mM, un mimotopo micellare di fosfolipidi di membrana, e tetrafluoroetanolo (TFE) 30%, un catalizzatore idrofobico per l'acquisizione della struttura secondaria nativa.

12. Valutazione dell'attività terapeutica dei peptidi selezionati in un modello *ex vivo* di infezione da *Candida albicans* di mucosa porcina

Lo studio dell'attività terapeutica *ex vivo* dei peptidi selezionati è stato effettuato in collaborazione con le Unità di Anatomia ed Istologia Patologica e di Odontostomatologia del Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali dell'Università degli Studi di Parma. La metodologia adottata ha previsto l'utilizzo e il mantenimento in coltura di frammenti di mucosa orale porcina in accordo a un modello sperimentale precedentemente descritto (Ohnemus et al., 2007).

Le biopsie di mucosa orale porcina sono state effettuate immediatamente dopo la soppressione degli animali per scopi alimentari presso il macello Sassi di Colorno, Parma, utilizzando punch circolari del diametro di 8 mm. I prelievi effettuati hanno permesso l'ottenimento di frammenti cilindrici di mucosa e di sottomucosa dello spessore di circa 5 mm. I campioni ottenuti sono stati immersi nella soluzione di trasporto Krebs-Ringer (NaCl 160 mM, KCl 5,5 mM, MgCl₂ 1,2 mM, CaCl₂ 1,5 mM, glucosio 10 mM, HEPES-NaOH 10 mM, pH 7,4) addizionata con penicillina e streptomina 2%. Dopo aver eliminato la porzione di grasso sottomucoso in eccesso, le biopsie sono state posizionate su garze sterili in piastre per colture cellulari da 24 pozzetti contenenti ciascuno 1 ml di DMEM addizionato con idrocortisone 0,5 µg/ml, 5% di siero bovino fetale e penicillina-streptomina 1%. I frammenti di mucosa così posizionati risultano in interfaccia con l'aria nella porzione apicale e a contatto con la garza imbevuta di terreno nella porzione basolaterale (Figura 8). I campioni sono stati incubati in atmosfera umidificata alla temperatura di 37 °C al 5% di CO₂ per 24 ore prima dell'infezione con 10 µl di una sospensione di cellule di *C. albicans* SC5314 semisincronizzate, alla concentrazione di 10⁷ UFC/ml in PBS (10⁵ UFC/mucosa). La procedura di semisincronizzazione è stata effettuata per ottenere cellule fungine nella medesima fase di crescita, quindi una migliore riproducibilità dei risultati. In particolare, cellule di *C. albicans* SC5314 prelevate da colonie cresciute su SDA per 24 ore a 37 °C sono state sospese in 5 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%), lavate per due volte centrifugando a 500 g per 10 min a temperatura ambiente e risospesando in 5 ml di NaCl e, infine, risospese in 5 ml di H₂O e contate. 2×10⁵ cellule sono state quindi inoculate in 10 ml di

terreno liquido YPD e mantenute per 16 ore a 25 °C in agitazione a 150 rpm. Trascorso tale periodo di incubazione, 5 ml della coltura sono stati aggiunti a 5 ml di soluzione fisiologica e centrifugati a 500 g per 10 min. Il sedimento ottenuto è stato lavato per 2 volte e risospeso in 10 ml di H₂O prima di essere contato. Infine, 4×10⁶ cellule sono state inoculate in 10 ml di YPD mantenuti in agitazione a 150 rpm a 37 °C per 24 ore prima della preparazione dell'inoculo da utilizzare per l'infezione (Schaller et al., 2006).



Figura 8. Coltura *ex vivo* dei frammenti di mucosa orale porcina.

Il trattamento con i peptidi selezionati, solubilizzati a 20 mg/ml in DMSO e successivamente portati a 2 mg/ml in H₂O, è stato effettuato dopo 8 e 24 ore dall'infezione fungina, utilizzando 40 µg di peptide in 20 µl di H₂O per ogni campione di mucosa. Come controllo positivo è stato utilizzato un uguale volume di una soluzione di nistatina (Bristol-Myers Squibb S.r.l., Roma) in H₂O alla concentrazione di 230 UI/ml e come controllo negativo un uguale volume di diluente. Per ogni condizione sperimentale sono stati utilizzati tre campioni di mucosa.

Dopo 24 ore dal trattamento i campioni di mucosa porcina sono stati fissati in una soluzione di formalina tamponata al 10% per 48 ore, quindi inclusi in blocchi di paraffina in modo da poterli osservare dalla superficie alla profondità, seguendo metodi istopatologici standard. Da tali blocchi sono state tagliate sezioni istologiche di 3-4 µm che sono state colorate con ematossilina eosina e acido periodico di Schiff (PAS). I preparati istologici colorati sono stati osservati al microscopio ottico Nikon Eclipse 80i, con ingrandimento 4× e 10×.

Su preparati colorati con PAS, l'eventuale infiltrazione di ife fungine è stata graduata

semiquantitativamente come lieve (+), moderata (++) o severa (+++). In ogni prelievo positivo per ife, inoltre, è stata valutata la profondità di infiltrazione dell'epitelio (terzo superiore, metà spessore o tutto spessore).

13. Valutazione dell'attività terapeutica dei peptidi selezionati in un modello di infezione sistemica sperimentale da *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* in larve di *Galleria mellonella*

Per la valutazione dell'attività antifungina *in vivo* dei peptidi, in collaborazione con la Dott.ssa Elisa Borghi e la Prof.ssa Giulia Morace del Dipartimento di Sanità Pubblica, Microbiologia-Virologia del Polo Universitario San Paolo, Università degli Studi di Milano, è stato inizialmente messo a punto un modello di infezione con *C. albicans* SC5314 e *C. neoformans* 6995 in larve di *G. mellonella*. Questo lepidottero, chiamato comunemente tarma maggiore della cera o camola del miele, è utilizzato in micologia sperimentale per lo studio della patogenesi delle infezioni fungine (Fuchs et al., 2010). Per la messa a punto del modello, larve di circa 270-330 mg sono state inoculate con diverse concentrazioni di lieviti. Le cellule fungine, cresciute per una notte in brodo YPD a 30 °C in agitazione a 150 rpm, sono state raccolte per centrifugazione, lavate due volte con PBS e contate. L'inoculo è stato effettuato utilizzando una siringa Hamilton con ago di calibro 26 precedentemente lavata internamente aspirando più volte una soluzione contenente candeggina al 10%, etanolo 100%, H₂O deionizzata e infine PBS. Per ogni gruppo sperimentale sono state selezionate 16 larve, che sono state inoculate direttamente nell'emolinfa, utilizzando come sito di iniezione l'ultima pro-zampa sinistra, con 10 µl di sospensioni cellulari di *C. albicans* SC5314, da 5×10^7 a 1×10^8 cellule/ml, e di *C. neoformans* 6995, da 3×10^7 a $2,5 \times 10^8$ cellule/ml, o di solo PBS per controllo. Le larve sono state successivamente trasferite in piastre Petri pulite, una per ogni gruppo sperimentale, coperte con un foglio di alluminio e incubate a 37 °C per tutta la durata dell'esperimento. Il monitoraggio della sopravvivenza delle larve è stato effettuato quotidianamente, alla medesima ora, utilizzando anche stimoli fisici per l'accertamento della vitalità. Le larve morte sono state rimosse dalla piastra dopo il conteggio. Gli esperimenti preliminari hanno consentito di mettere a punto la procedura di infezione per ottenere la morte della maggior parte delle larve inoculate con il microrganismo di interesse entro 48-72 ore. Successivamente, in gruppi di larve infettate con la corretta concentrazione di cellule di *C. albicans* SC5314 e di *C. neoformans* 6995, è stato effettuato il trattamento con i peptidi selezionati inoculando nell'ultima pro-zampa destra, un'ora dopo l'inoculo infettante, 10 µl di

soluzione contenenti 5 µg di peptide o di solo diluente per controllo.

In alcuni esperimenti di infezione con *C. albicans* SC5314 è stata effettuata anche una seconda somministrazione della stessa quantità di peptide a distanza di 24 ore dalla precedente, utilizzando come sito di iniezione la penultima pro-zampa sinistra.

Per verificare l'assenza di fenomeni di tossicità dei peptidi selezionati, gruppi di animali non infettati sono stati inoculati con 10 µl di solo peptide a concentrazione doppia rispetto a quella utilizzata per la valutazione dell'attività terapeutica.

Le curve di sopravvivenza degli animali infettati, trattati e di controllo, sono state analizzate mediante Mantel-Cox Logrank test.

Risultati

1. Ricerca dei peptidi nel siero

La ricerca mediante HPLC-MS/MS di peptidi potenzialmente derivanti da degradazione di anticorpi e di altre proteine sieriche è stata orientata, nella prima fase, alla valutazione della presenza in 9 sieri ottenuti da donatori delle sequenze N10K e T11F, rappresentative di frammenti delle regioni costanti di IgG e IgM.

Nelle condizioni sperimentali adottate, considerando una soglia limite di sensibilità di 7-10 nM, non è stata rilevata la presenza dei due peptidi. Tuttavia, nei campioni analizzati sono stati evidenziati spettri riferibili a frammenti peptidici potenzialmente derivati da diverse proteine sieriche, compresi Ab, tra cui sono state selezionate, e successivamente sintetizzate, sei sequenze peptidiche (Tabella 3).

Il primo frammento selezionato è stato il peptide denominato K40H, una sequenza peptidica di 40 amminoacidi, derivante dalla catena pesante μ di IgM con modificazioni post-traduzionali rappresentate da due fosforilazioni in T19 e S21. Successivamente, sono stati selezionati altri 5 frammenti peptidici, derivanti da albumina, frammento C4 e C3 del complemento e fibrinogeno, denominati rispettivamente K13L, G17K, S17K, D15R e D15T, la cui presenza nel proteoma di siero umano è risultata già ampiamente documentata (Koomen et al., 2005; Williams et al., 2010; Zheng et al., 2006).

Tabella 3. Peptidi sierici selezionati

Peptide	Sequenza amminoacidica	Caratteristiche dei residui amminoacidici ^b	pI	M.M. (Da)	Carica netta
K40H	KSTKLTCLVTDLTTYDSVpTIpSWTRQNGEAVKTHTNISESH	+++0**00*-0**0-*0*0*0*+**0-00+**0*-**+	6,92	4626,92	2+
K13L	KKLVAASQAALGL	++0000**0000*	10,00	1269,53	2+
G17K	GLEEELQFSLGSKINVK	00---0*0*00*+000+	4,79	1891,13	1-
S17K	SEETKENEGFTVTAEKG	*--*+*-*-00*0*0-0+	4,32	1855,81	3-
D15R	DSGEGDFLAEGGGVR	-*0-0-000-0000+	3,92	1465,48	3-
D15T	DEAGSEADHEGTHST	--00*-0-+-0*+**	4,17	1542,43	3-

^b 0: idrofobico, * polare, + e - residui amminoacidici carichi positivamente e negativamente

pI: punto isoelettrico

M.M.: massa molecolare (Dalton)

2. Caratteristiche dei frammenti peptidici selezionati

Le sequenze aminoacidiche selezionate sono state processate utilizzando il database bioinformatico UniProt (Universal Protein). La ricerca ha permesso di osservare come tutti i frammenti siano derivati con elevata probabilità da proteine normalmente presenti nel siero e, per alcuni di essi, è stato possibile risalire alle proteasi responsabili del taglio specifico. Ciascuna sequenza è stata analizzata, inoltre, con il programma ExPASy Compute PI/MW per la determinazione del punto isoelettrico (pI) e della massa molecolare (M.M.) (Tabella 3). Di seguito sono illustrati alcuni dettagli relativi ai peptidi selezionati e la loro localizzazione (in giallo) all'interno della sequenza della proteina di origine.

K40H

Localizzazione: regione costante CH3 della proteina IgM umana secreta, catena μ

Residui amminoacidici: da 238 a 277

Tagli alle estremità della sequenza K40H non conosciuti

Sequenza in formato FASTA della catena μ e localizzazione di K40H:

```
GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPS
KDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFPVPRDGGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLR
EGKQVGSVGTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPVDPQDTAIRVF
AIPPSFASIFLTKKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSEGER
FTCTVTHTDLPSPLKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGTFSPADV FVQWMQRGQPLSPE
KYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSD TAGT
CY
```

Fonte: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01871>

K13L

Localizzazione: all'interno della sequenza dell'albumina sierica umana in posizione C-terminale

Residui amminoacidici: da 597 a 609, appartenenti ad una regione ad α -elica

Tagli all'estremità N-terminale della sequenza non conosciuti

Sequenza in formato FASTA della proteina albumina sierica e localizzazione di K13L:

```
MKWVTFISLLFLFSSAYSARGVFRDRAHKSEVAHRFKDLGEEFNFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAK
TCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQOE PERNECFLOHKDDNP NLPRLVLRPEVDVMCTA
FHDNEETF LK KYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCA
SLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDSISSK LK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAK
TYETTLEKCCAAADPHECYAKVDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV
SRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTE SLVNR RCFSALEVDETYVPKE
FNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AE EGKKLV
AASQAALGL
```

Fonte: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02768>

G17K

Localizzazione: catena α del frammento C4 del complemento di 766 aa

Residui amminoacidici: da 673 a 689

Tagli alle estremità della sequenza non conosciuti

Sequenza in formato FASTA della catena α del frammento C4 del complemento e localizzazione di G17K:

```
VNFQKAINKELGQYASPTAKRCCQDGVTRLPMMSRCEQRAARVQQPDCREPFLLSCCQFAESLRKKSRRDKGQAGLQ
RALEILQEEDLIDEDDIPVRSFFPENWLWRVETVDRFQILTLWLPSLTTWEIHGLSLSKTKGLCVATPVQLRVF
REFHLHLRLPMSVRRFEQLELRPVLYNYLDKNLTVSVHVSPVEGLCLAGGGGLAQQVLPAGSARPVAFSVVPTA
AAAVSLKVVARGSFVGVDAVSKVLQIEKEGAIHREELVYELNPLDHRGRTLEIPGNSDPNMI PDGDFNSYVRV
TASDPLDTLGSEGALSPGGVASLLRPRGCGEQTMIYLAPTLAASRYLDKTEQWSTLPPETKDHAVDLIQKGYMR
IQQFRKADGSYAAWLSRDSSTWLTAFVLKVLSLAQEQVGGSPPEKLQETSNWLLSQQADGFSQDPCPVLD RSMQG
GLVGNDETVALTAFVTIALHHGLAVFQDEGAEPKQRVEASISKANSFLGKASAGLLGAHAAAITAYALTLTKA
PVDLLGVAHNLMAMAQETGDNLYWGSVTGSQSNAVSPTPAPRNP SDPMPQAPALWIETTAYALLHLLLHEGKAE
MADQASAWLTRQGSFQGGFRSTQDVTVIALDALSAWIASHTTEERGLNVTLSSSTGRNGFKSHALQLNNRQIRGLE
EELQFSLGSKINVKVGGNSKGTLKVLRTYNVLDKNTTCQDLQIEVTVKGHVEYTM EANEDYEDYEDYDELPAKDD
PDAPLQPVTPPLQLFEG
```

Fonte: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0C0L4>

S17K

Localizzazione: all'interno della sequenza del frammento C3c del complemento, catena α

Residui amminoacidici: da 1321 a 1337

Tagli alle estremità della sequenza e proteasi coinvolte: è presente un sito di taglio in posizione 1320 del Fattore I, responsabile del taglio proteolitico di iC3b in C3c e C3f

Sequenza in formato FASTA del frammento C3 del complemento e localizzazione di S17K:

```
MGPTSGPSLLLLLTHLPLALGSPMYSIIITPNILRLESEETMVLEAHDAQGDVPVTVVHDFPGKKLVLSSEKTV
LTPATNHMGNVTFITIPANREFKSEKGRNKFVTVQATFGTQVVEKVVVLSLQSGYLFIQTDKTIYTPGSTVLYRIF
TVNHKLLPVGRTVMVNIENPEGIPVKQDSLSSQNQLGVLPLSWDIPELVNMGQWKIRAYYENSPQQVFSTEFVVK
EYVLPSEFVIVEPTEKFYIYNEKGLEVTITARFLYGGKVEGTAFVIFGIQDGEQRISLPELKRIPIEDGSGEV
VLSRKVLLDGVQNPRAEDLVGKSLYVSATVILHSGSDMVQAERSGIPIVTSPYQIHFTKTPKYFKPGMPFDLMVF
VTNPDGSPAYRVPVAVQGEDTVQSLTQGDGVAKLSINTHPSQKPLSITVTRTKKQELSEAEQATRMTQALPYSTVG
NSNNYLHLSVLRTEL RPGETLNVNFLLRMDRAHEAKIRYYTYLIMNKGRLLKAGRQVREPQDLVVLPLSITTD F
IPSFRLVAYYTLIGASGQREVVADSVVVDKDCVGSLLVVKSGQSEDRQVPVPGQQMTLKI EGDHGARVVLVAVDK
GVFVNLKKNKLTQSKIWDVVEKADIGCTPGSGKYAGVFS DAGLTFSTSSGQQT AQRAELQCPQPAARRRRSVQL
TEKRMDKVGKYPKELRKCCEDGMRENPMRFSCQRRTFISLGEACKKVF LDCCNYITELRRQHARASHLGLARSN
LDEDIIAEENIVSRSEFPESWLWNVEDLKEPPKNGISTKLMNIFLKDSITTWEILAVSMSDKKGI CVADPFEVTV
MQDFFIDLRLPYSVVRNEQVEIRAVLYNYRQNLKVRVELLHNP AFCSLATTKRRHQQT VTI PPKSSLSVPYVI
VPLKTGLQEVEVKAAYVHHFISDGVRKSLKVVPEGIRMNKTVAVRTLDPERL GREGVQKEDI PPADLSDQVPDTE
SETRILLQGT PVAQMTEDAVDAERLKH LI VTPSGCGEQNMIGMTPTVIAVHYLDETEQWEKFGLEKRQGALELIK
KGYTQQLAFRQPSSAFAAFVKRAPSTWLTAYVVKVFSLAVNLI AIDSQVLCGAVKWLILEKQKPDGVFQEDAPVI
HQEMIGGLRNNNEKDMALTAFVLI SLQEAKDICEEQVNSLPGSITKAGDFLEANYMNLQRSYTVAIAGYAL AQMG
RLKGPLLKFLTTAKDKNRWEDPGKQLYNVEATS YALLALLQLKDFDFVPPVVRWLNEQRYYGGYGSTQATFMV
FQALAQYQKDAPDHQELNLDVSLQLPSRSSKITHRIHWESASLLR SEETKENE GFTVTAEGK GQGTLSVVTMYHA
KAKDQLTCNKFDLKVTIKPAPETEKRPQDAKNTMILEICTRYRGDQDATMSILD ISMMTGFPADTDDLKQLANGV
DRYISKYELDKAFSDRNTLI IYLDKVS HSEDDCLAFKVHQYFNVELIQPGAVKVYAYYNLEESCTR FHYHPEKEDG
KLNKLCRDELRCRCAEENCFIQKSDDKVTLEERLDKACEPGVDYVYKTRLVKVQLSNDFDEY IMAIEQTIKSGSDE
VQVGQRTFISPIKCREALKLEKKHYLMWGLSSDFWGEKPNLSYI IGKDTWVEHWPEEDECQDEENQKQCQDLG
AFTESMVVFGCPN
```

Fonte: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01024>

D15R e D15T

Localizzazione: catena α del fibrinogeno di 866 aa

Residui amminoacidici: D15R, o fibrinopeptide A, (FbPA) da 21 a 35; D15T da 605 a 619.

Tagli alle estremità della sequenza e proteasi coinvolte: per D15R (FbPA) sono presenti siti di taglio in posizione 20 e 35 dell'enzima proteolitico trombina che permette l'esposizione dell'estremità N-terminale del fibrinogeno per la formazione del coagulo (Blombaeck et al., 1965). Per il peptide D15T è documentato in letteratura un solo sito di taglio in posizione 602 (anziché 604), dell'enzima plasmina.

Sequenza in formato FASTA della catena α del Fibrinogeno e localizzazione di D15R e D15T:

```
MFSMRIVCLVLSVVGTAWTADSGEGDFLAEGGGVRGPRVVERHQSAKDSWPFCSDEDWNYKCPSGCRMKGLID
EVNQDFTNRINKLKNLFEYQKNNKDSHSLTTNIMEILRGDFSSANNRDNTYNRVSEDLRSRIEVLKRKVIKQVQ
HIQLLQKNVRAQLVDMKRLEVDIDIKIRSCRGSCSRALAREVDLKDYEDQKQLEQVIAKDLLPSRDRQHPLIK
MKPVPDLVPGNFKSQLQKVPPEWKALTDMPQMRMELERPGGNEITRGGSTSYGTGSETESPRNPSSAGSWNSGSS
GPGSTGNRNPGSSGTGGTATWKPSSGPGSTGSWNSGSSGTGSTGNQNPSPRPGSTGTWNPSSERGSAGHWTS
ESSVSGSTGQWHSESGSFRPDSPGSGNARPNPDWGTFFEEVSGNVSPGTRREYHTEKLVTSKGDKELRTGKEKVT
SGSTTTTTRRSCSKTVTKTVIGPDGHKEVTKEVVTSEDGSDCPEAMD LGT LSGIGTLDGFRHRHPDEAAFFDTAST
GKTFPGFFSPMLGEFVSETESRGSESGIF'TN'TKESSSHHPGIAEFPSRGKSSSYSKQFTSSTSYNRGDSTFESKS
YKMADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPVRDCDDVLQTHPSGTQSGIFNKLPGSSKIFSVYCDQETS LGGWLLI
QQRMDGSLNFNRTWQDYKRGFGSLNDEGEGEFWLGNDYLHLLTQRGSVLRVELEDWAGNEAYAEYHFRVGEAE
YALQVSSYEGTAGDALIEGSVEEGAEYTSNNMQFSTFDRDADQWEENCAEVYGGGWYNNCQAANLNGIYYPGG
SYDPRNNSPYEIEINGVVVVSFRGADYSLRAVRMKIRPLVTQ
```

Fonte: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02671>

3. Attività *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti di miceti lievitriformi

Tutti i peptidi selezionati, K40H, K13L, G17K, S17K, D15R e D15T, sono stati saggiati preliminarmente nei confronti del ceppo fungino di riferimento, *C. albicans* SC5314, alla concentrazione di 100 µg/ml. In queste condizioni, i peptidi K40H e K13L hanno mostrato una attività candidacida pari al 100% e G17K pari al 71,9%, mentre S17K, D15R e D15T non hanno mostrato alcuna attività candidacida.

I peptidi attivi nei confronti del ceppo di riferimento sono stati saggiati anche nei confronti di altri ceppi di *C. albicans*, *C. glabrata* e *M. furfur*, inclusi ceppi resistenti a farmaci antifungini. K40H, K13L e G17K sono risultati attivi nei confronti di tutti i ceppi saggiati, con valori di EC₅₀ compresi tra 0,64 µM e 2,74 µM per il peptide K40H, tra 2,48 µM e 7,56 µM per il peptide K13L e tra 13,33 e 33,74 µM per il peptide G17K (Tabella 4).

Tutti i peptidi selezionati sono stati saggiati anche nei confronti di *C. neoformans* 6995, verso il quale hanno mostrato una significativa attività fungicida con valori di EC₅₀ di 0,87 µM per K40H e compresi tra 10,84 µM e 24,83 µM per gli altri peptidi (Tabella 5).

La cinetica di uccisione nel tempo (time killing) di K40H e K13L, i due peptidi risultati maggiormente attivi nei confronti di *C. albicans* SC5314, è stata valutata mediante saggi di UFC dopo 30 minuti, 1, 2, 4 e 6 ore di incubazione in presenza di concentrazioni di 4 µM per il peptide K40H e di 19 µM per K13L (corrispondenti alla minima concentrazione fungicida a 6 ore, MCF) e alle concentrazioni di 2 µM e 1 µM (rispettivamente 1/2 MCF e 1/4 MCF) per il peptide K40H e 9,5 µM e 38 µM (rispettivamente 1/2 MCF e 2×MCF) per il peptide K13L. Le curve di time-killing ottenute dimostrano per il peptide K40H un'attività rapida, con uccisione, alla MCF, di tutte le cellule dell'inoculo già dopo 30 minuti. L'attività candidacida esplicata dal peptide K13L è risultata più lenta, con una riduzione del numero di UFC, rispetto al controllo privo di peptide, pari a circa il 50% dopo 30 minuti di incubazione alla MCF, e graduale durante le 6 ore di incubazione, con un andamento simile a tutte le concentrazioni utilizzate (Figura 9).

L'attività candidacida dei peptidi K40H e K13L è risultata paragonabile nei confronti di cellule di *C. albicans* SC5314 in fase blastocellulare e di germinazione (dati non mostrati).

Infine, l'attività candidacida dei peptidi K13L e K40H, quando saggiati alla MCF in presenza di laminarina alla concentrazione di 200 e 100 µg/ml, è risultata ridotta rispettivamente del 98,87% e 81,43% per K13L e del 54,55% e 40,95% per K40H (Figura 10).

Tabella 4. Attività fungicida *in vitro* dei peptidi sierici K40H, K13L e G17K nei confronti di miceti lievitriformi

Ceppi fungini	K40H		K13L		G17K	
	%*	EC ₅₀ ** [mol/litro] ×10 ⁻⁶ (intervallo di confidenza 95%)	%	EC ₅₀ [mol/litro] ×10 ⁻⁶ (intervallo di confidenza 95%)	%	EC ₅₀ [mol/litro] ×10 ⁻⁶ (intervallo di confidenza 95%)
<i>C. albicans</i> SC5314	100	0,64 (0,61-0,66)	100	4,29 (3,21-5,76)	71,90	18,45 (10,08-33,78)
<i>C. albicans</i> CA-6	100	1,98 (1,92-2,03)	100	6,28 (5,09-7,73)	69,02	33,74 (22,8-49,93)
<i>C. albicans</i> SA40	100	2,04 (1,96-2,12)	100	3,08 (2,50-3,82)	82,14	24,78 (19,64-31,26)
<i>C. albicans</i> AIDS68	100	1,21 (1,10-1,32)	100	2,48 (2,01-3,05)	83,68	28,17 (25,15-31,56)
<i>C. albicans</i> UM4	100	1,93 (1,86-2,00)	100	7,43 (4,39-12,56)	62,85	23,09 (9,28-57,42)
<i>C. glabrata</i> OMNI32	100	1,42 (1,14-1,77)	100	4,45 (4,15-4,76)	97,01	13,94 (19,93-15,04)
<i>M. furfur</i> 101	100	2,74 (2,53-2,96)	100	7,56 (6,51-8,76)	83,92	13,33 (9,69-18,33)

* riduzione percentuale del numero di UFC ottenuta alla concentrazione di 100 µg/ml rispetto al controllo privo di peptide

** EC₅₀, concentrazione efficace 50

Tabella 5. Attività fungicida *in vitro* dei peptidi sierici selezionati nei confronti di *Cryptococcus neoformans* 6995

Peptide	%*	EC ₅₀ ** [moli/litro] × 10 ⁻⁶ (intervallo di confidenza 95%)
K40H	100	0,87 (0,71-1,05)
K13L	100	10,84 (10,77-10,89)
G17K	99,90	11,95 (10,82-13,2)
S17K	99,00	24,83 (23,99-25,69)
D15R	99,40	18,81 (15,37-23,01)
D15T	98,00	19,57 (18,7-20,49)

* riduzione percentuale del numero di UFC ottenuta alla concentrazione di 100 µg/ml rispetto al controllo privo di peptide

** EC₅₀, concentrazione efficace 50

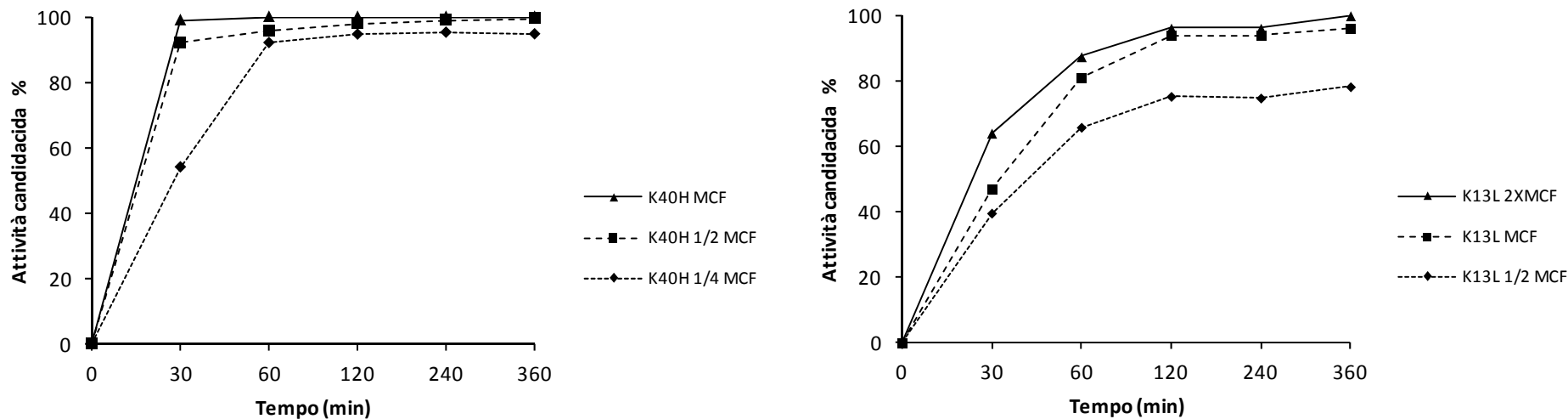


Figura 9. Cinetica di uccisione nel tempo (time killing) dei peptidi K40H (a sinistra) e K13L (a destra) nei confronti di *Candida albicans* SC5314. Cellule di *C. albicans* sono state incubate a 37 °C per 30 minuti, 1, 2, 4 e 6 ore in presenza di K40H e K13L a concentrazioni multiple o sottomultiple della Minima Concentrazione Fungicida (MCF) e poi seminate su agar Sabouraud per la determinazione del numero di Unità Formanti Colonia (UFC). L'attività candidacida è espressa come riduzione percentuale del numero di UFC rispetto al controllo privo di peptide.

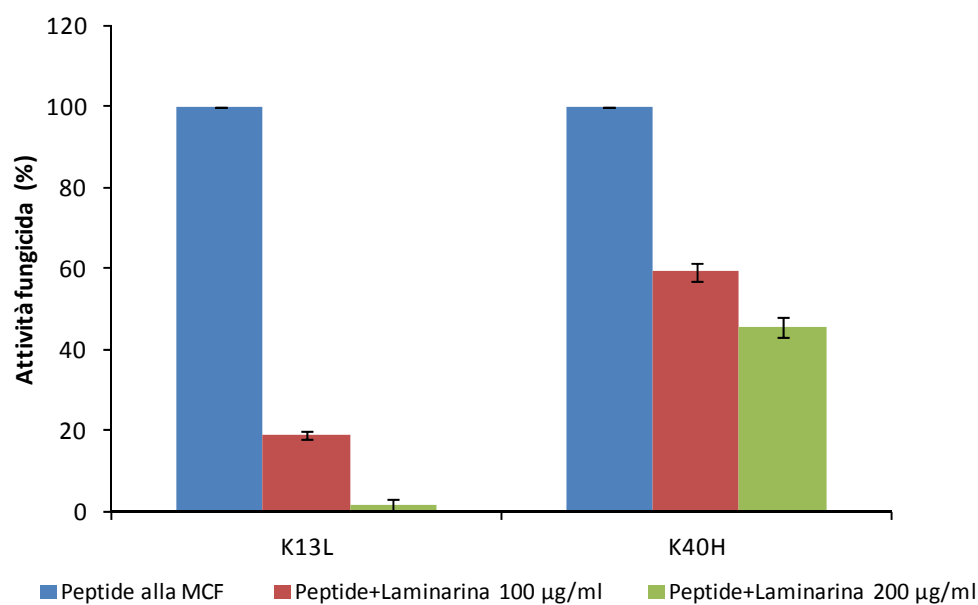


Figura 10. Attività fungicida di K13L e K40H in presenza di laminarina. Cellule di *Candida albicans* SC5314 sono state incubate con i peptidi K13L e K40H alla Minima Concentrazione Fungicida (MCF) in presenza o in assenza di laminarina alla concentrazione di 100 µg/ml e 200 µg/ml e poi seminate su agar Sabouraud per la determinazione del numero di Unità Formanti Colonia (UFC). L'attività fungicida è espressa come riduzione percentuale del numero di UFC rispetto al controllo privo di peptide.

4. Citotossicità e attività emolitica dei peptidi selezionati

La citotossicità di tutti i peptidi sierici selezionati è stata valutata nei confronti di cellule LLC-MK2 in coltura mediante un saggio fluorimetrico che utilizza il composto resazurina come indicatore di vitalità cellulare.

I peptidi K13L, G17K, S17K, D15R e D15T, saggiati alle concentrazioni di 25, 50 e 100 μM , non hanno mostrato alcuna attività citotossica, come pure il peptide K40H, saggiato alle concentrazioni di 25 e 50 μM . La melittina, utilizzata alla concentrazione di 5 μM come controllo positivo, ha ridotto la vitalità cellulare del 93% rispetto alle cellule di controllo non trattate (Figura 11).

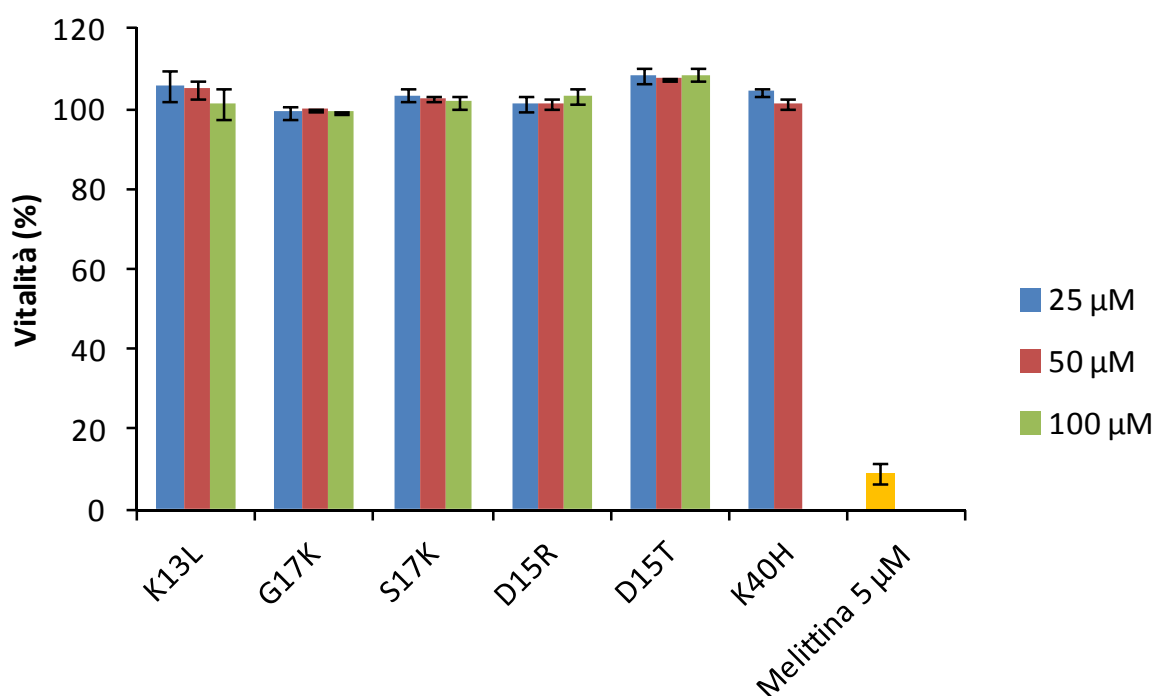


Figura 11. Attività citotossica dei peptidi selezionati. La citotossicità nei confronti di cellule LLC-MK2 è espressa come riduzione percentuale della vitalità cellulare in presenza di diverse concentrazioni di peptide rispetto a cellule di controllo non trattate. La melittina alla concentrazione di 5 μM è utilizzata come controllo positivo.

Nessuno dei peptidi saggiati ha mostrato una significativa attività emolitica nei confronti di globuli rossi umani di gruppo 0 Rh⁺. Anche alla concentrazione massima utilizzata, 50 μM per K40H e 100 μM per tutti gli altri peptidi, è stata osservata una integrità cellulare superiore al 97,5% (Tabella 6). Anche in questo saggio la melittina, utilizzata come ulteriore controllo

positivo, alla concentrazione di 2,5 μM ha causato una emolisi pari al Triton X-100 (dati non mostrati).

Tabella 6. Attività emolitica *in vitro* dei peptidi sierici selezionati nei confronti di globuli rossi umani di gruppo 0 Rh+

Peptide	Globuli rossi non lisati (%)			
	alla concentrazione di peptide (μM)			
	0	25	50	100
K40H	100	99,20	99,51	n.d.
K13L	100	99,03	98,55	97,70
G17K	100	98,80	99,15	98,85
S17K	100	99,06	98,50	97,67
D15R	100	98,83	98,76	98,39
D15T	100	99,10	98,94	98,53

I risultati sono espressi come percentuale di globuli rossi non lisati, considerando come assenza di lisi il valore ottenuto nei campioni in assenza di peptide (controllo negativo) e come lisi totale il valore ottenuto in presenza di Triton X-100 (controllo positivo).

5. Attività genotossica aspecifica dei peptidi selezionati

L'attività genotossica dei peptidi K40H, K13L e G17K, dimostratisi attivi nei confronti di *C. albicans* SC5314, è stata valutata mediante comet assay su PBMC trattati per 2 ore a 37 °C con i peptidi alle concentrazioni di 5, 10 e 20 µM.

I valori di intensità luminosa della coda delle comete (tail intensity), che risultano direttamente proporzionali alla frammentazione del materiale nucleare, non sono risultati significativamente differenti per i PBMC trattati con le diverse concentrazioni di peptidi e i PBMC non trattati, con l'eccezione delle cellule trattate con concentrazioni intermedie, 5 e 10 µM, del peptide K13L, che comunque hanno mostrato valori molto bassi, < 1%, escludendo una significativa attività genotossica nel modello utilizzato (Tabella 7).

Tabella 7. Attività genotossica aspecifica dei peptidi sierici selezionati nei confronti di cellule mononucleate del sangue periferico umane

Peptide	Tail Intensity (%)*			
	alla concentrazione di peptide (µM)			
	0	5	10	20
K40H	0,23 ± 0,14	0,26 ± 0,15	0,23 ± 0,14	0,22 ± 0,04
K13L	0,37 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,59 ± 0,09	0,36 ± 0,22
G17K	0,37 ± 0,04	0,40 ± 0,02	0,34 ± 0,25	0,12 ± 0,05

*percentuale di materiale genetico frammentato presente nella coda della cometa

Anche i valori di score visivo non sono risultati significativamente diversi per i PBMC trattati rispetto a quelli di controllo non trattati (Figura 12).

All'osservazione microscopica, il materiale genetico di cellule trattate con i peptidi, così come quello delle cellule di controllo non trattate, è risultato visualizzabile come nucleomi omogenei a margini ben definiti (testa della cometa), indicativi dell'integrità del DNA.

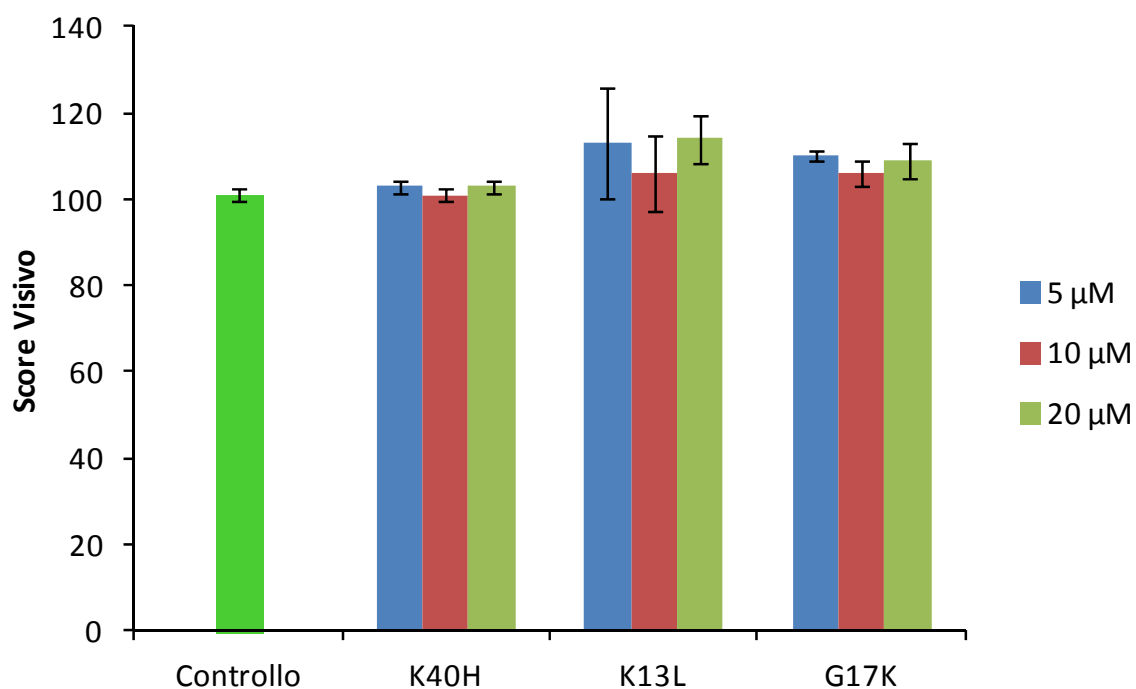


Figura 12. Attività genotossica aspecifica dei peptidi sierici selezionati nei confronti di cellule mononucleate del sangue periferico umane. Lo score visivo è stato calcolato sulla base della valutazione visiva dell'operatore con attribuzione di ciascuna cometa osservata a una classe di appartenenza (da 0 a 4) a seconda della lunghezza della coda che dipende dal grado di frammentazione del materiale genetico (dettagli nella sezione Materiali e Metodi).

6. Profilo apoptotico di cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi K40H e K13L

La valutazione dell'eventuale induzione di apoptosi in cellule di *C. albicans* SC5314 dopo 30 minuti in presenza di K40H alla concentrazione di 1,28 μM e K13L alla concentrazione di 8,58 μM è stata effettuata utilizzando il citofluorimetro Muse^R e il kit MuseTM Annexin V & Dead Cell (Merck, Millipore).

Le concentrazioni di peptide utilizzate nel saggio sono state scelte per ottenere, a 30 minuti, un numero di cellule vitali superiore al 70%.

Nelle condizioni sperimentali adottate, sono risultate in apoptosi lo 0,25% delle cellule contenute nella sospensione di controllo (approssimativamente $5,3 \times 10^5$ cellule/ml) (Figura 13, pannello A). La percentuale di cellule in apoptosi in seguito al trattamento con i peptidi non è risultata significativamente diversa da quella delle cellule di controllo, risultando pari allo 0,5% per K40H (Figura 13, pannello B) e allo 0,25% per K13L (Figura 13, pannello C) delle cellule rilevate, che sono risultate ridotte al 77-80% delle cellule dell'inoculo.

Saggi di UFC, effettuati contemporaneamente seminando 100 μl di una diluizione 1:100 dei campioni trattati e non trattati su SDA, hanno confermato che, dopo 30 minuti, la percentuale di cellule vitali era del 73,91%, per K40H e dell'80,15% per K13L.

In presenza di melittina, utilizzata alla concentrazione di 12,5 μM per 3 ore come controllo positivo, il 22,42% delle cellule rilevate (poco più del 5% rispetto a quelle dell'inoculo iniziale) risultava in apoptosi (Figura 13, pannello D).

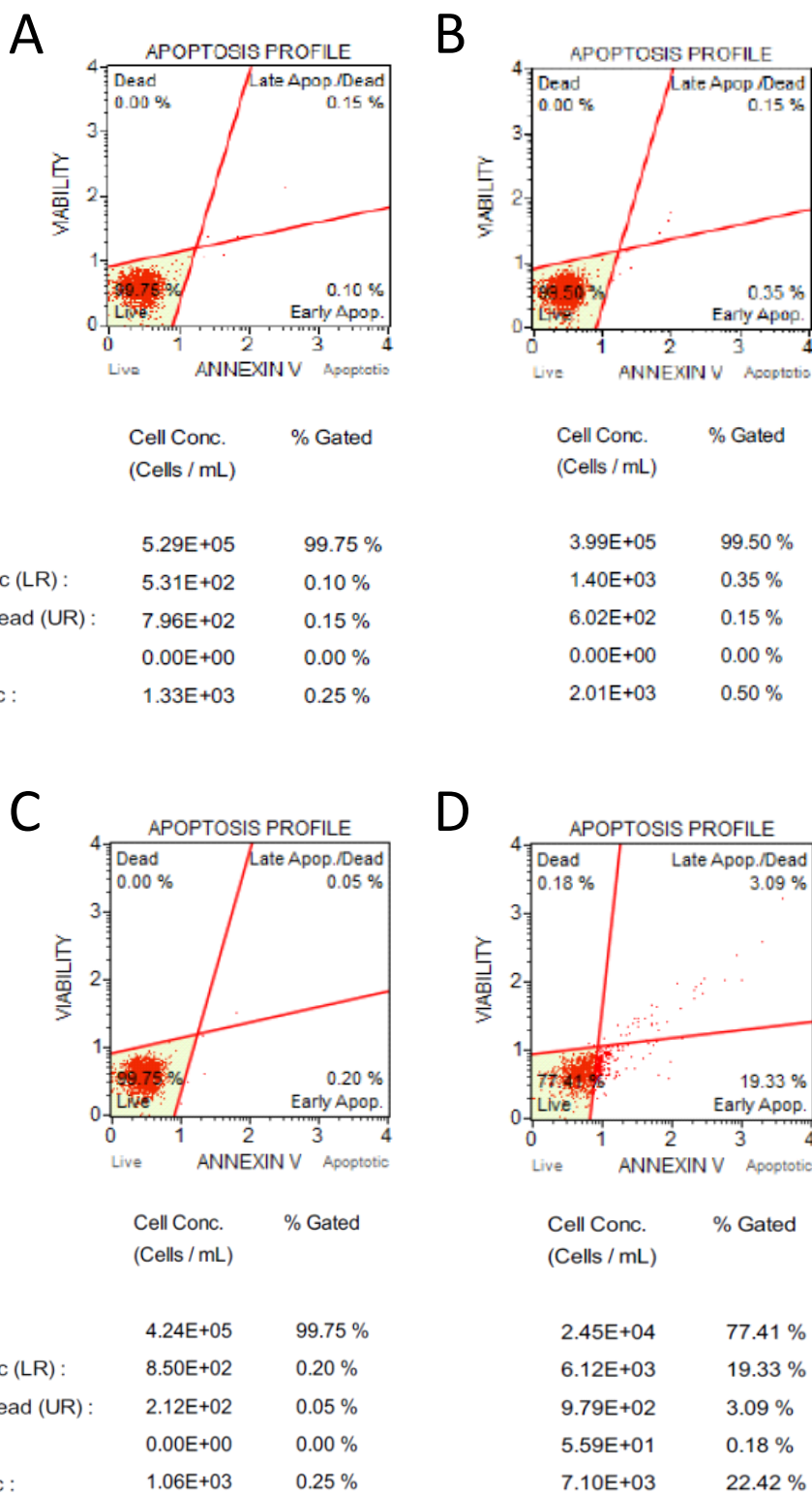


Figura 13. Analisi del profilo apoptotico di cellule di *Candida albicans* SC5314. Cellule incubate in assenza di peptide (pannello A), in presenza di K40H (pannello B), in presenza di K13L (pannello C) e in presenza di melittina, utilizzata come controllo positivo (pannello D).

7. Produzione di specie reattive dell'ossigeno in cellule di *Candida albicans* trattate con peptidi K40H e K13L

La produzione di ROS in cellule di *C. albicans* SC5314 in presenza di K40H alla concentrazione di 1,28 μM e K13L alla concentrazione di 8,58 μM è stata valutata mediante un saggio fluorimetrico. Mentre nei campioni trattati con acqua ossigenata e non pretrattati con acido ascorbico, antiossidante in grado di prevenire la formazione di ROS, è stato osservato un notevole aumento della fluorescenza nel tempo, indicativo di un significativo stress ossidativo intracellulare, in presenza dei peptidi non è stato registrato alcun incremento di fluorescenza nel tempo, indice della mancata produzione di ROS (Figura 14).

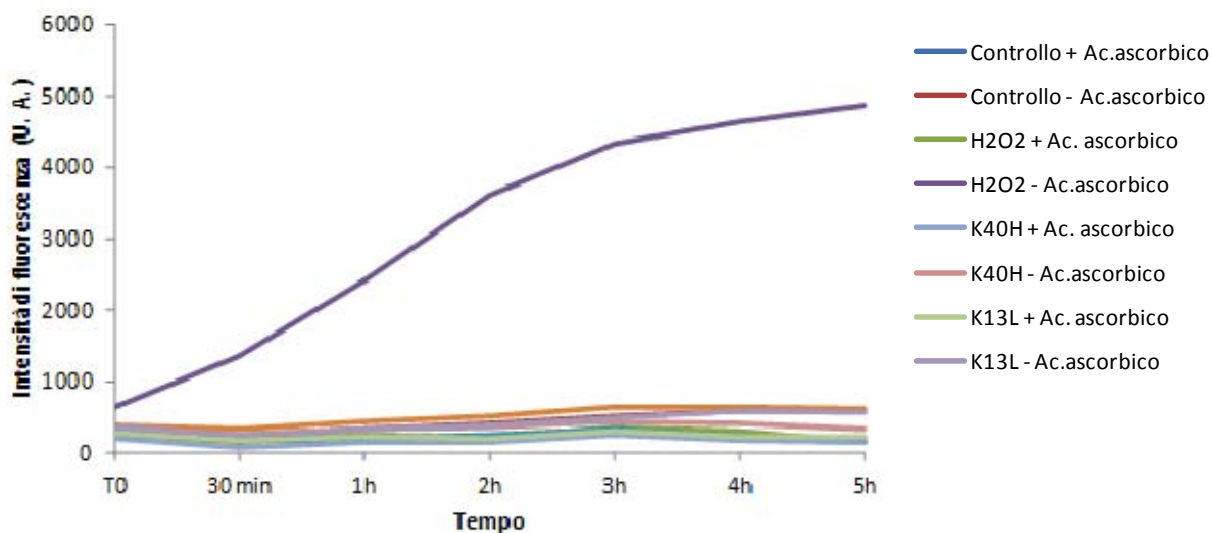


Figura 14: Produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in cellule di *Candida albicans* SC5314. La fluorescenza, indice della produzione di ROS, è stata misurata in cellule fungine di controllo, in presenza di K40H e K13L a concentrazione doppia dell' EC_{50} e in presenza di H_2O_2 alla concentrazione di 1 mM utilizzata come controllo positivo. Per ogni condizione sperimentale è stato effettuato un pretrattamento in presenza e in assenza di acido ascorbico alla concentrazione di 25 mM.

8. Visualizzazione in microscopia confocale a scansione laser di cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi K40H e K13L coniugati con isotiocianato di fluoresceina

Lo studio in microscopia confocale a scansione laser è stato effettuato utilizzando blastocellule e cellule in germinazione di *C. albicans* SC5314 trattate con i peptidi K40H e K13L coniugati a fluoresceina.

Per lo studio del peptide K40H, all'inoculo cellulare utilizzato è stato aggiunto PI e le cellule sono state osservate al microscopio confocale dopo 30 minuti. Il colorante è penetrato rapidamente all'interno delle cellule morte presenti nell'inoculo, che sono risultate pari a circa il 3% delle cellule totali, mentre si è localizzato in prossimità della parete esterna delle cellule vitali. Dopo l'aggiunta, direttamente sul vetrino, del peptide fluoresceinato alla concentrazione finale di 750 µg/ml, il preparato è stato osservato durante le successive 4 ore (Figura 15). Immediatamente dopo l'aggiunta di K40H è stato possibile osservare la comparsa del segnale verde in tutte le cellule, indice della penetrazione del peptide, presumibilmente non dovuta ad un trasporto attivo in quanto l'internalizzazione è stata verificata anche nelle cellule non vitali, come dimostrato dalla sovrapposizione della fluorescenza verde del peptide intracellulare con quella rossa del PI. Nel tempo, è stato osservato un incremento del segnale verde intracellulare, associato all'internalizzazione del PI, indice di danno alla membrana e di morte cellulare dovuta all'azione del peptide. Dopo 220 minuti la maggior parte delle cellule dell'inoculo risultavano morte.

Per lo studio del peptide K13L, le cellule di *C. albicans* SC5314 trattate con il peptide K13L fluoresceinato alla concentrazione di 180 µg/ml sono state osservate a diversi intervalli di tempo (Figura 16, pannelli A-D). Immediatamente dopo l'aggiunta del peptide, è stato possibile osservare la comparsa del segnale verde diffuso nel citoplasma in tutte le cellule morte già presenti nell'inoculo ed una localizzazione in prossimità della parete esterna nelle cellule vitali. Nel tempo è stato osservato un aumento del segnale verde intracellulare, indice della presenza del peptide, localizzato all'interno di organelli intracellulari. L'aggiunta all'inoculo di PI ha permesso di osservare la morte cellulare indotta dall'internalizzazione del peptide. La preincubazione dell'inoculo cellulare con tetrametilrodamina alla concentrazione di 200 nM ha consentito di escludere la localizzazione mitocondriale del peptide (Figura 16, pannelli E-G).

Il saggio di UFC eseguito contemporaneamente sui campioni trattati e di controllo ha confermato l'attività candidacida dei peptidi fluoresceinati utilizzati.

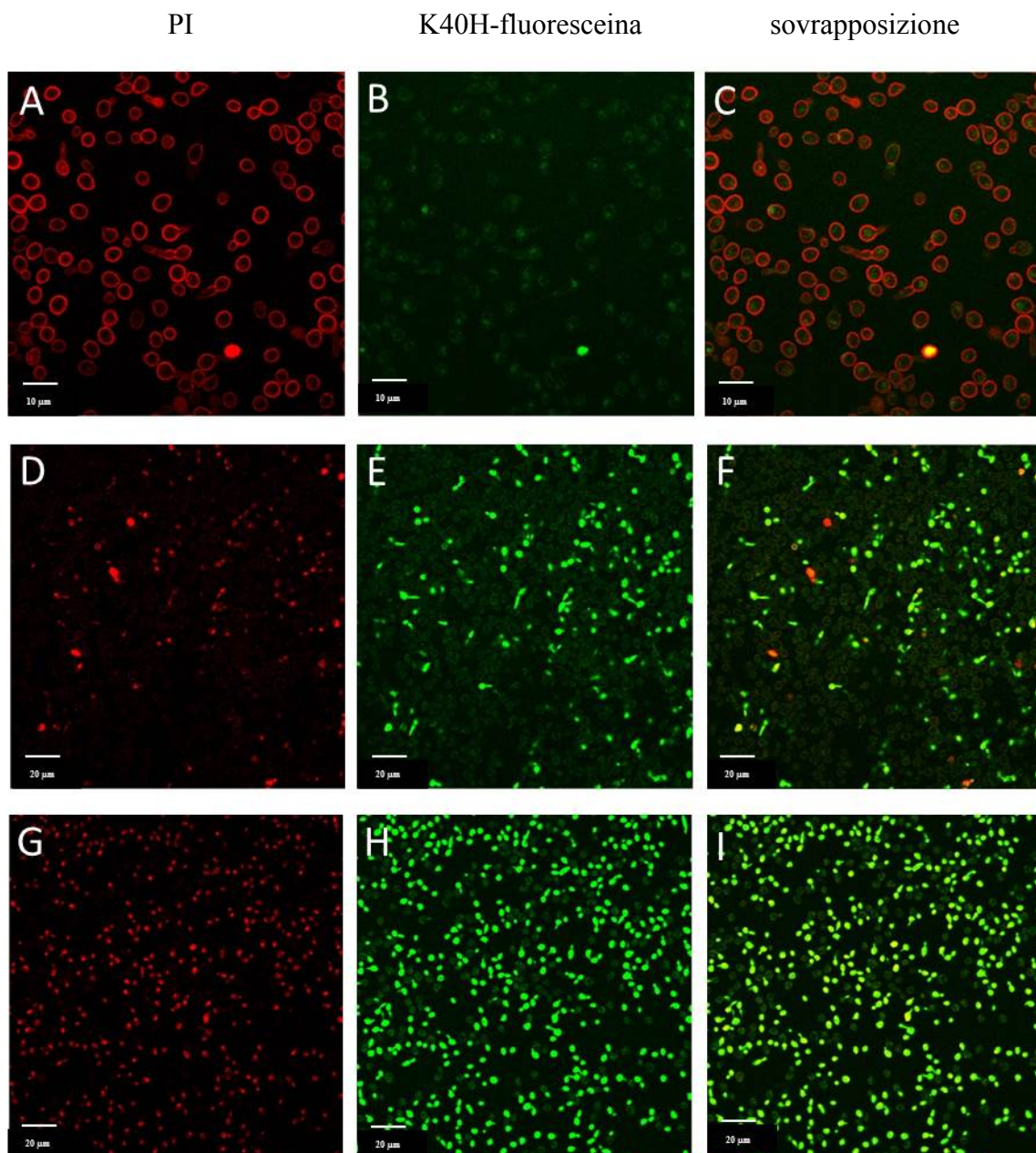


Figura 15. Immagini in microscopia confocale di cellule di *Candida albicans* SC5314 trattate con il peptide K40H coniugato a fluoresceina. L'inoculo cellulare, caricato con ioduro di propidio (PI), è stato trattato con il peptide fluoresceinato alla concentrazione di 750 $\mu\text{g/ml}$. L'osservazione è stata effettuata, previa ulteriore addizione di PI, dopo 45 minuti (pannelli A, B, C), 90 minuti (pannelli D, E ed F) e 220 minuti (pannelli G, H ed I). PI e fluoresceina sono stati eccitati alle lunghezze d'onda di 543 nm (laser He-Ne) e 488 nm (laser Argon), rispettivamente.

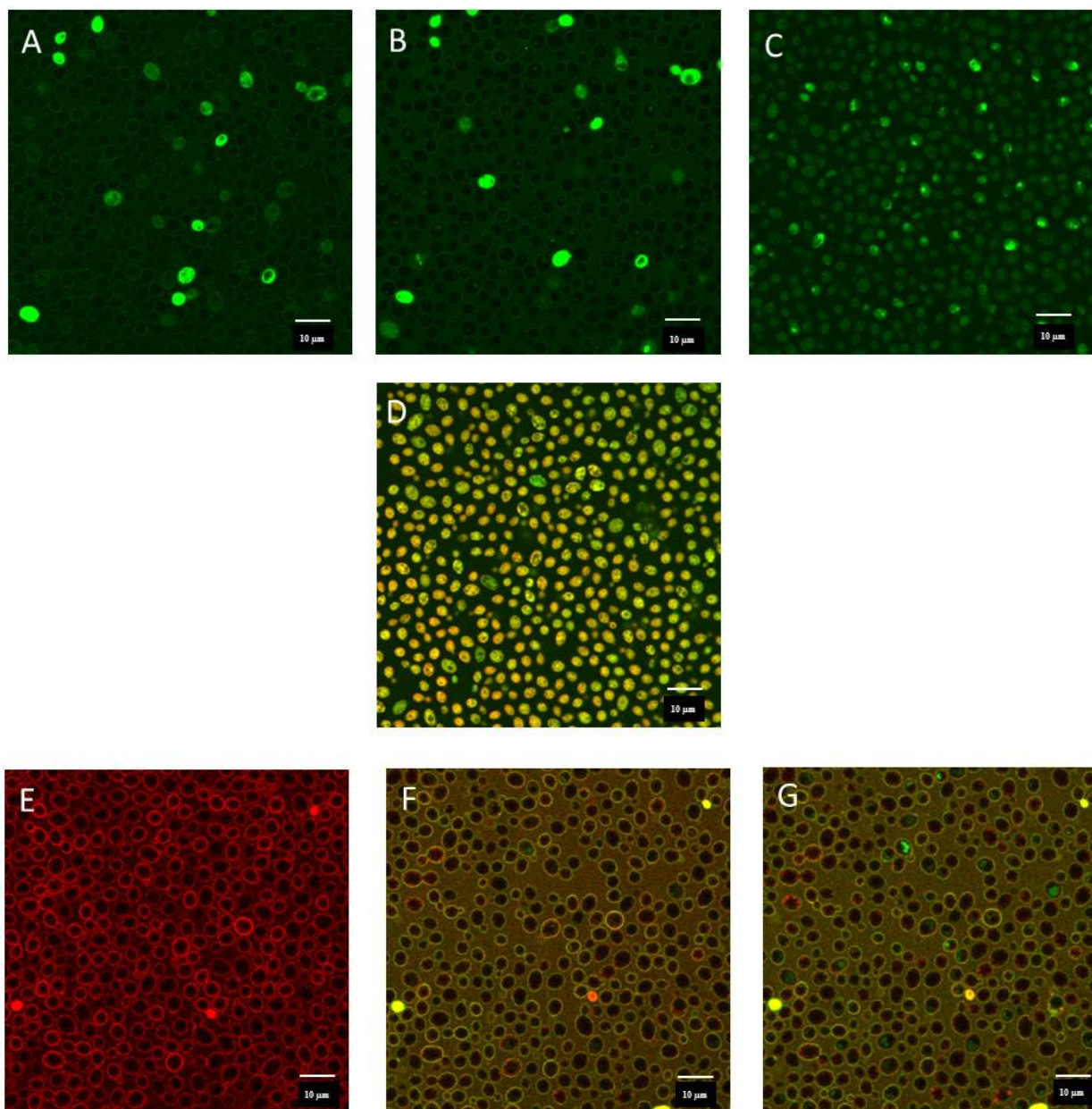


Figura 16. Immagini in microscopia confocale di cellule di *Candida albicans* SC5314 trattate con il peptide K13L coniugato a fluoresceina. L'inoculo cellulare trattato con il peptide fluoresceinato alla concentrazione di 180 µg/ml è stato osservato dopo 5 minuti (pannello A), 1 ora e 15 minuti (pannello B) e 4 ore e 45 minuti (pannello C) prima dell'aggiunta di PI (pannello D). L'inoculo cellulare incubato con tetrametilrodamina alla concentrazione di 200 nM per 1 ora (pannello E) è stato successivamente trattato con il peptide fluoresceinato alla concentrazione di 180 µg/ml e osservato immediatamente dopo l'aggiunta del peptide (pannello F) e dopo 30 minuti (pannello G). PI e tetrametilrodamina sono stati eccitati alla lunghezza d'onda di 543 nm (laser He-Ne) e fluoresceina alla lunghezza d'onda di 488 nm (laser Argon).

9. Visualizzazione in microscopia elettronica a scansione di cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi K40H e K13L

Lo studio in microscopia elettronica a scansione è stato effettuato utilizzando blastocellule e cellule in germinazione di *C. albicans* SC5314 trattate per 1 ora con i peptidi K40H alla concentrazione di 600 µg/ml e K13L alla concentrazione di 250 µg/ml.

L'esame dei campioni (Figura 17) ha permesso di osservare, in comparazione con le cellule di controllo (pannelli A, B e C), alterazioni cellulari riferibili al trattamento con i peptidi. In particolare, in seguito al trattamento con K40H (pannelli D, E e F) è stato possibile osservare nel campione la presenza di numerosi detriti cellulari, molte cellule frammentate (pannello E, freccia) ed altre che, pur mantenendo all'osservazione una morfologia sostanzialmente conservata, mostravano una superficie esterna irregolare per la presenza di aggregati peptidici fibrillari, talvolta avvolgenti completamente le cellule.

Le cellule trattate con K13L (pannelli G, H e I) sono risultate visibilmente danneggiate, con grossolane alterazioni morfologiche, pur non mostrando aggregati peptidici sulla superficie.

Il saggio di UFC eseguito contemporaneamente sui campioni trattati e di controllo ha confermato l'attività candidacida dei peptidi nelle condizioni sperimentali adottate.

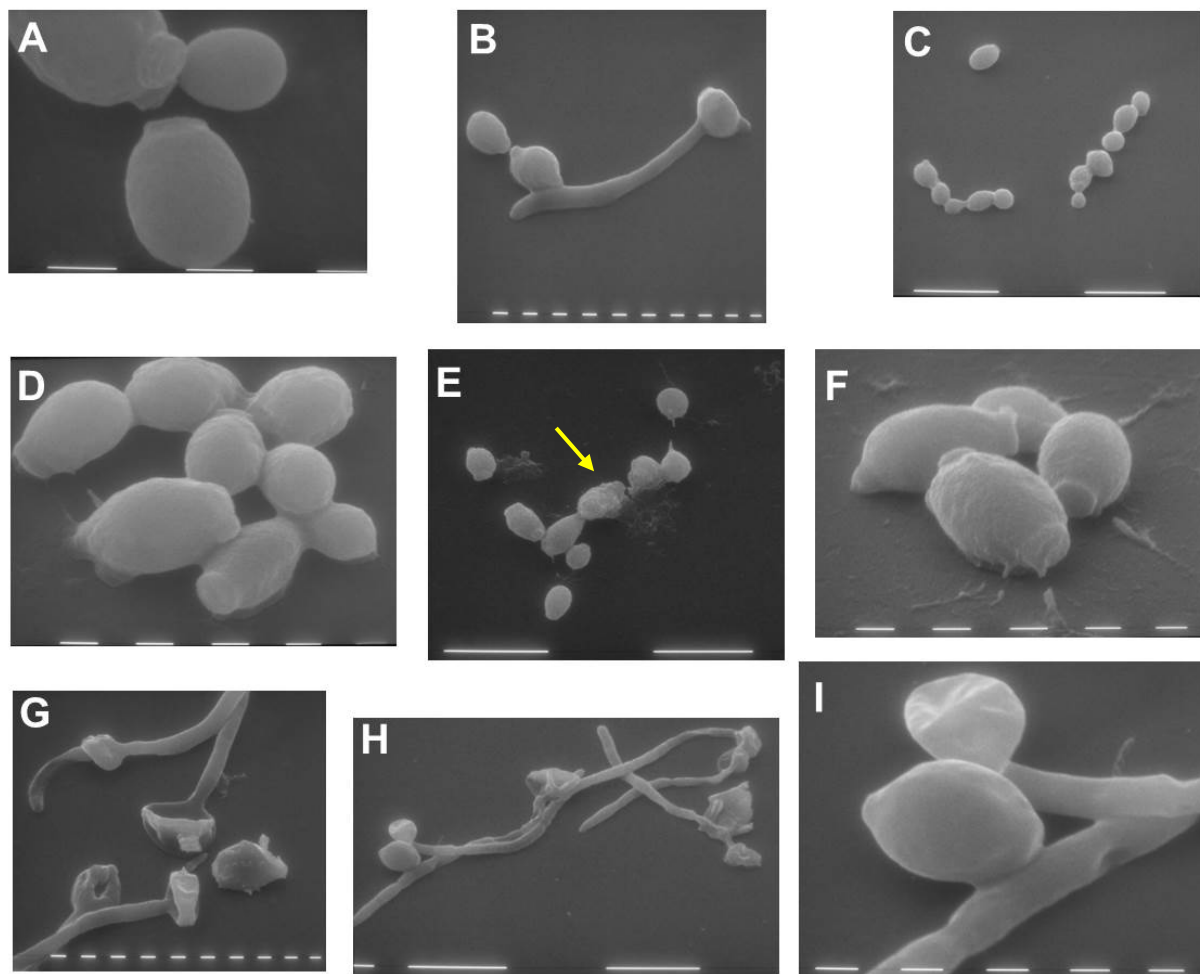


Figura 17. Immagini in microscopia elettronica a scansione di cellule di *Candida albicans* SC5314. Pannelli A, B, C: cellule di controllo; Pannelli D, E, F: cellule trattate per 1 ora con il peptide K40H alla concentrazione di 600 $\mu\text{g/ml}$; Pannelli G, H, I: cellule trattate per 1 ora con il peptide K13L alla concentrazione di 250 $\mu\text{g/ml}$. Barra: 1 μm (pannelli A, B, D, F, G, I); 10 μm (pannelli C, E, H).

10. Visualizzazione in microscopia elettronica a trasmissione di cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi K40H e K13L

Per l'osservazione in microscopia elettronica a trasmissione, blastocellule e cellule in germinazione di *C. albicans* SC5314 sono state trattate per 1 ora con i peptidi K40H alla concentrazione di 600 $\mu\text{g/ml}$ e K13L alla concentrazione di 250 $\mu\text{g/ml}$.

In confronto a cellule di controllo non trattate con il peptide (Figura 18, pannelli A e B), nelle cellule trattate con K40H è stato possibile osservare la presenza di aggregati fibrillari peptidici sulla superficie esterna della cellula, di alterazioni dello strato parietale esterno e di notevole disorganizzazione citoplasmatica con vacuolizzazione (Figura 19, pannelli A, B e C).

Il trattamento delle cellule con K13L, a differenza di K40H, non ha determinato la formazione di aggregati extracellulari, ma ha indotto la formazione di strutture intracellulari di dimensioni variabili, definibili come “microbodies” (perossisomi), formazioni che sono state descritte in lieviti anche in seguito ad uno stress ossidativo cellulare (Figura 20, pannelli A e B).

Il saggio di UFC eseguito contemporaneamente sui campioni trattati e di controllo ha confermato l'attività candidacida dei peptidi nelle condizioni sperimentali adottate.

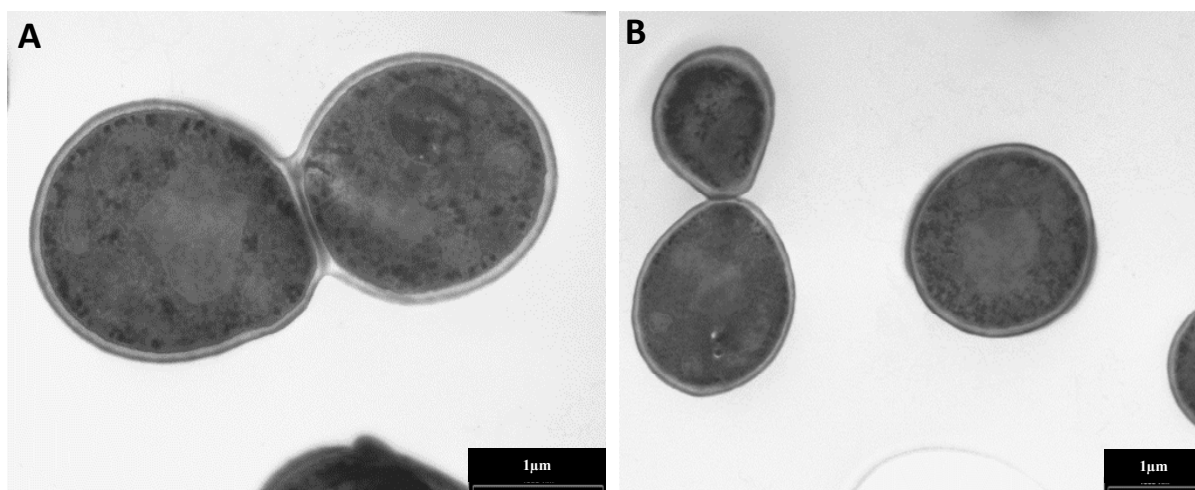


Figura 18. Immagini in microscopia elettronica a trasmissione di cellule di *Candida albicans* SC5314.

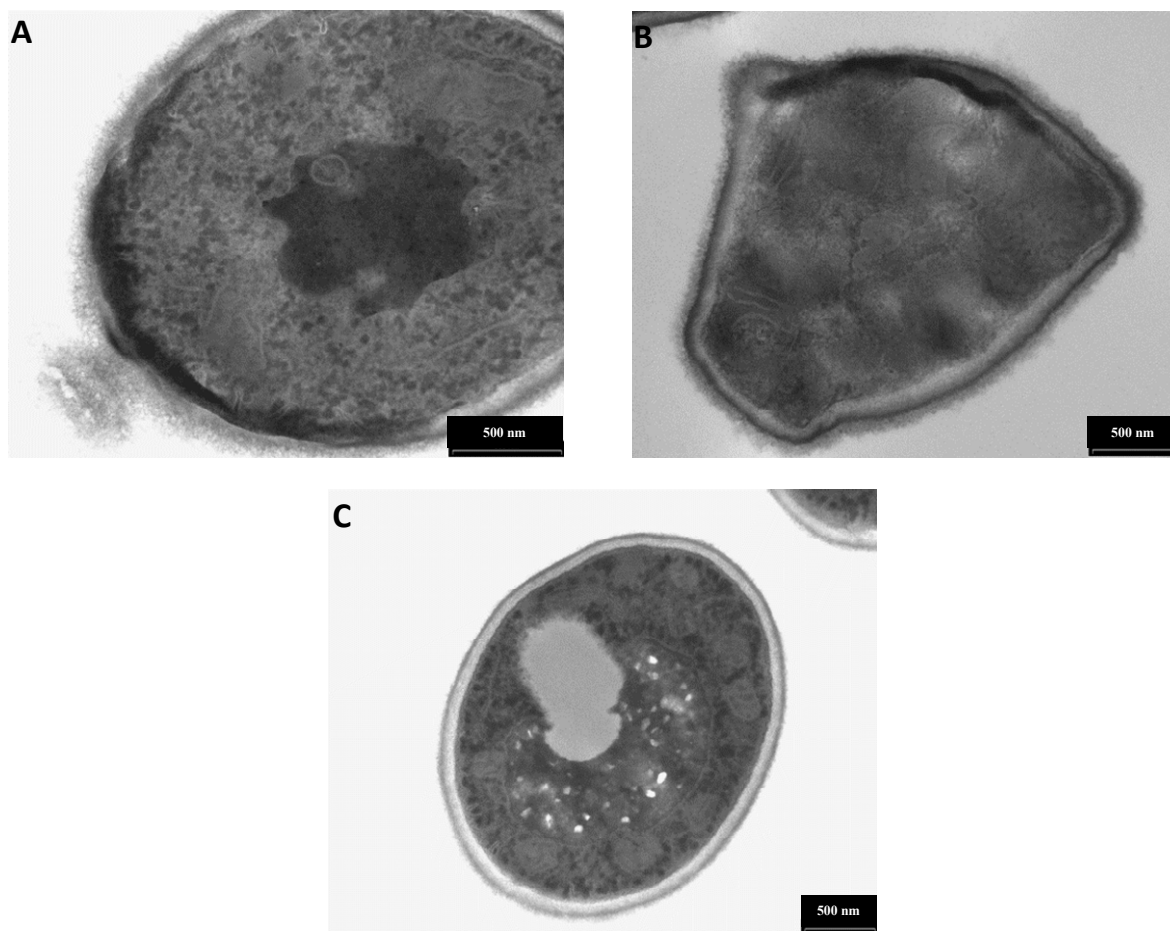


Figura 19. Immagini in microscopia elettronica a trasmissione di cellule di *Candida albicans* SC5314 trattate per 1 ora con il peptide K40H alla concentrazione di 600 $\mu\text{g/ml}$.

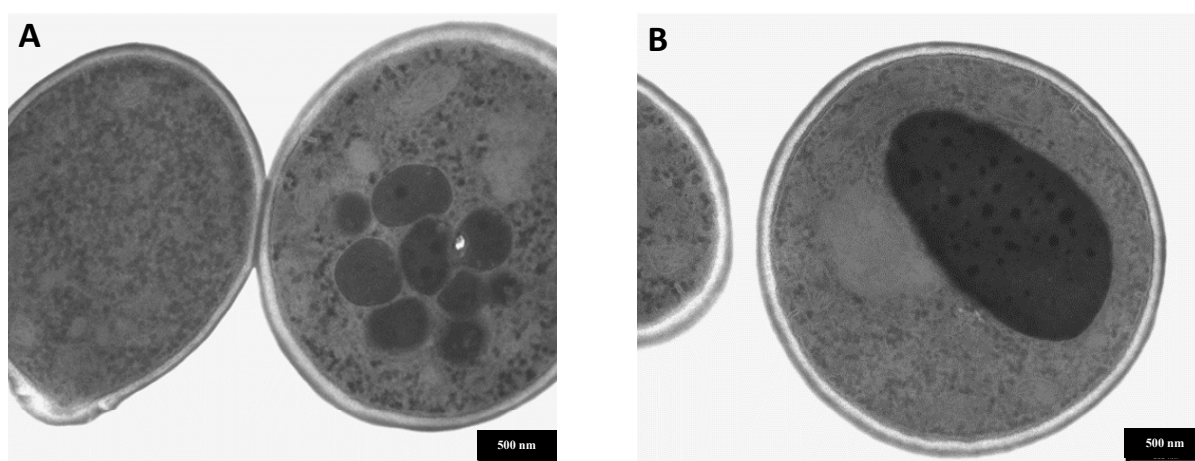


Figura 20. Immagini in microscopia elettronica a trasmissione di cellule di *Candida albicans* SC5314 trattate per 1 ora con il peptide K13L alla concentrazione di 250 $\mu\text{g/ml}$.

11. Analisi conformazionale dei peptidi K40H e K13L mediante dicroismo circolare

Gli studi di dicroismo circolare sono stati condotti al fine di acquisire informazioni sulla relazione struttura-attività dei peptidi K40H e K13L.

Gli spettri registrati hanno consentito di osservare che il peptide K40H in acqua presenta inizialmente una struttura prevalentemente random coil, caratterizzata dal picco negativo a 200 nm, e un picco a 215 nm indicativo di una possibile parziale strutturazione in foglietti β , spettro conservato anche dopo 60 minuti a temperatura ambiente. Dopo 5 giorni di mantenimento a 4 °C, è stata osservata una tendenza alla formazione di strutture β confermata dall'aggiunta alla soluzione peptidica di TFE 30% (Figura 21), suggerendo che K40H sia in grado di aggregare, e che in soluzione possa ripiegarsi su se stesso per adottare la struttura β che normalmente acquisisce all'interno della regione CH3 della catena μ delle IgM. L'aggiunta di laminarina alla soluzione peptidica ha determinato il cambiamento della conformazione, anche se in minor misura, verso la struttura β .

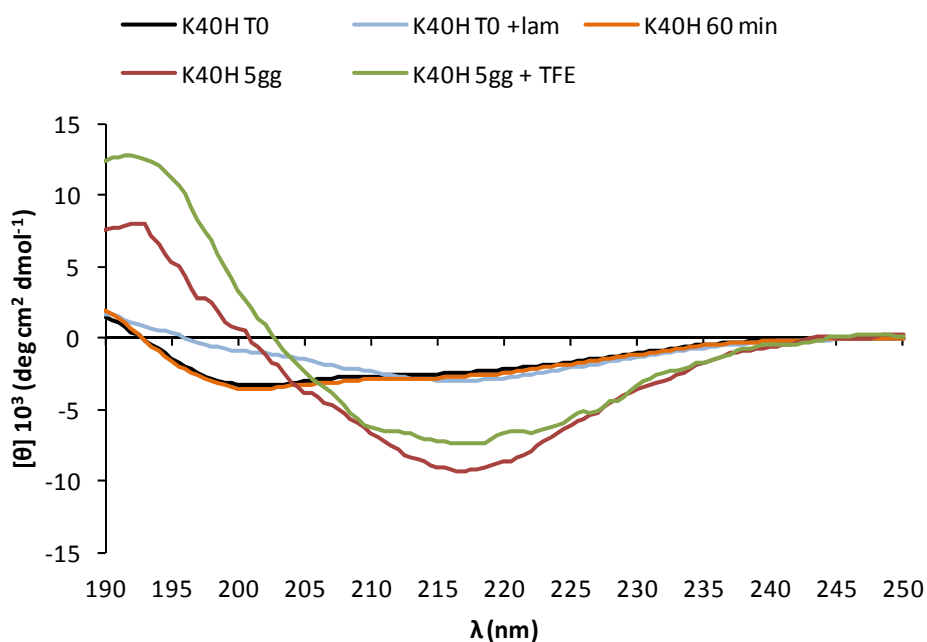


Figura 21. Spettri dicroici del peptide K40H. Sono stati registrati spettri della soluzione di K40H 50 μ M appena solubilizzato (tempo 0, T0), in seguito ad aggiunta di laminarina 500 μ M e dopo 60 minuti a temperatura ambiente e della soluzione peptidica, preparata dalla soluzione madre mantenuta per 5 giorni a 4°C, alla concentrazione di 20 μ M e in seguito ad aggiunta di TFE 30%.

Il peptide K13L ha, invece, mostrato un profilo dicroico caratteristico di una struttura random coil anche dopo 5 giorni di mantenimento a 4°C. In seguito ad aggiunta di SDS 100 µM, peraltro, è stato osservato uno spettro caratteristico di strutture ad α -elica comuni a molti peptidi antimicrobici naturali (Figura 22).

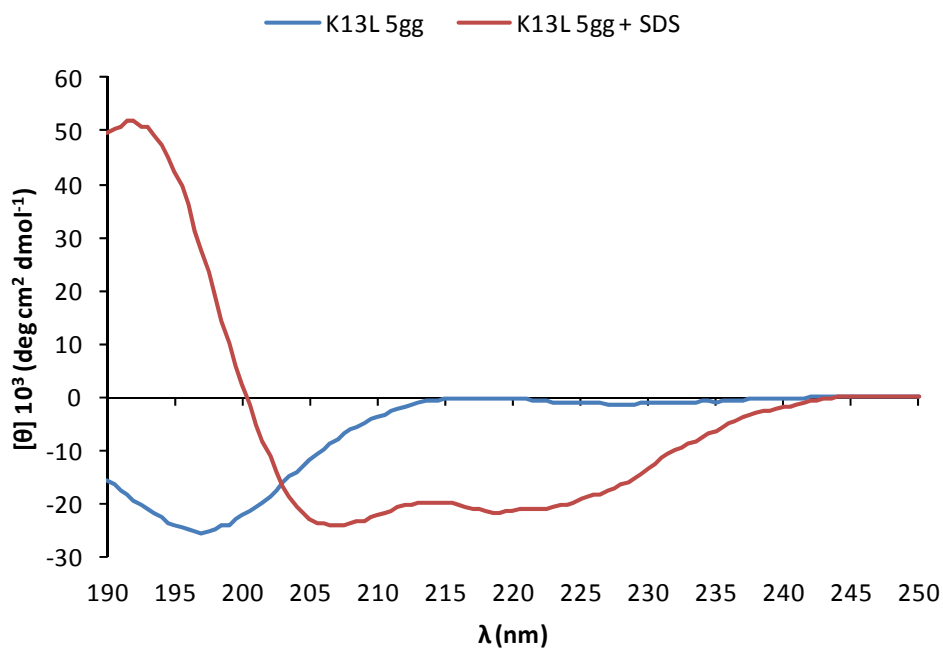


Figura 22. Spettri dicroici del peptide K13L. Sono stati registrati spettri di una soluzione acquosa di K13L, preparata dalla soluzione madre mantenuta per 5 giorni a 4°C, alla concentrazione di 100 µM e alla concentrazione di 50 µM dopo aggiunta di SDS 100 mM.

12. Attività terapeutica dei peptidi K40H e K13L in un modello *ex vivo* di infezione da *Candida albicans* di mucosa porcina

In un modello sperimentale *ex vivo* di infezione con cellule di *C. albicans* SC5314 di frammenti di mucosa orale porcina mantenuti in coltura, è stato valutato, in esperimenti indipendenti, l'effetto del trattamento con i peptidi K40H e K13L considerando, su preparati colorati con PAS, l'entità e la profondità dell'eventuale infiltrazione di ife fungine.

La valutazione della profondità della penetrazione delle ife nello spessore dell'epitelio non ha mostrato significative differenze tra i campioni di controllo e i campioni trattati con K40H o nistatina, in particolare per il trattamento alle 24 ore (Tabella 8).

Tabella 8. Valutazione qualitativa della profondità dell'infiltrazione fungina in un modello di infezione da *Candida albicans* di mucosa orale porcina dopo trattamento con K40H

Profondità dell'infiltrazione*			
Tempo**	Controllo	K40H	Nistatina
8 h	1/3 superiore	Metà spessore	1/3 superiore
24 h	Tutto lo spessore	Tutto lo spessore	Tutto lo spessore

*La valutazione qualitativa è relativa alla presenza di ife fungine nello spessore dell'epitelio: 1/3 superiore, metà spessore, tutto lo spessore.

** tempo intercorso tra l'infezione e l'inizio del trattamento

Il trattamento con K13L, così come quello con nistatina, iniziato a 24 ore di distanza dall'infezione, ha ridotto significativamente la penetrazione delle ife fungine che nel controllo era rilevabile in tutto lo spessore del campione (Tabella 9).

La valutazione semiquantitativa del numero di ife fungine presenti nella mucosa ha permesso di osservare una significativa riduzione dell'infiltrazione, determinata dal trattamento con K40H iniziato sia dopo 8 sia dopo 24 ore dall'infezione, rispettivamente da severa fino a moderata e da moderata a lieve (Tabella 10).

Tabella 9. Valutazione qualitativa della profondità dell'infiltrazione fungina in un modello di infezione da *Candida albicans* di mucosa orale porcina dopo trattamento con K13L

Profondità dell'infiltrazione*			
Tempo**	Controllo	K13L	Nistatina
8 h	1/3 superiore	1/3 superiore	1/3 superiore
24 h	Tutto lo spessore	1/3 superiore	1/3 superiore

*La valutazione qualitativa è relativa alla presenza di ife fungine nello spessore dell'epitelio: 1/3 superiore, metà spessore, tutto lo spessore.

** tempo intercorso tra l'infezione e l'inizio del trattamento

Tabella 10. Valutazione semiquantitativa dell'infiltrazione fungina in un modello di infezione da *Candida albicans* di mucosa orale porcina dopo trattamento con K40H

Entità dell'infiltrazione*			
Tempo**	Controllo	K40H	Nistatina
8 h	+++	++	+
24 h	++	+	+

*La valutazione semiquantitativa è indicata con: + infiltrazione lieve; ++ infiltrazione moderata; +++ infiltrazione severa.

**tempo intercorso tra l'infezione e l'inizio del trattamento.

Anche il trattamento con K13L ha determinato una riduzione dell'infiltrazione fungina, da moderata a lieve quando effettuato dopo 8 ore dall'infezione e da severa a moderata quando effettuato dopo 24 ore dall'infezione (Tabella 11).

Tabella 11. Valutazione semiquantitativa dell'infiltrazione fungina in un modello di infezione da *Candida albicans* di mucosa orale porcina dopo trattamento con K13L

Entità dell'infiltrazione*			
Tempo**	Controllo	K13L	Nistatina
8 h	++	+	+
24 h	+++	++	+

*La valutazione semiquantitativa è indicata con: + infiltrazione lieve; ++ infiltrazione moderata; +++ infiltrazione severa.

**tempo intercorso tra l'infezione e l'inizio del trattamento.

In Figura 23 e 24 sono mostrati preparati istologici colorati con PAS dei frammenti di mucosa infettati con *C. albicans* SC5314 e trattati rispettivamente con il peptide K40H e K13L in comparazione a campioni trattati con nistatina e a campioni infettati e non trattati.

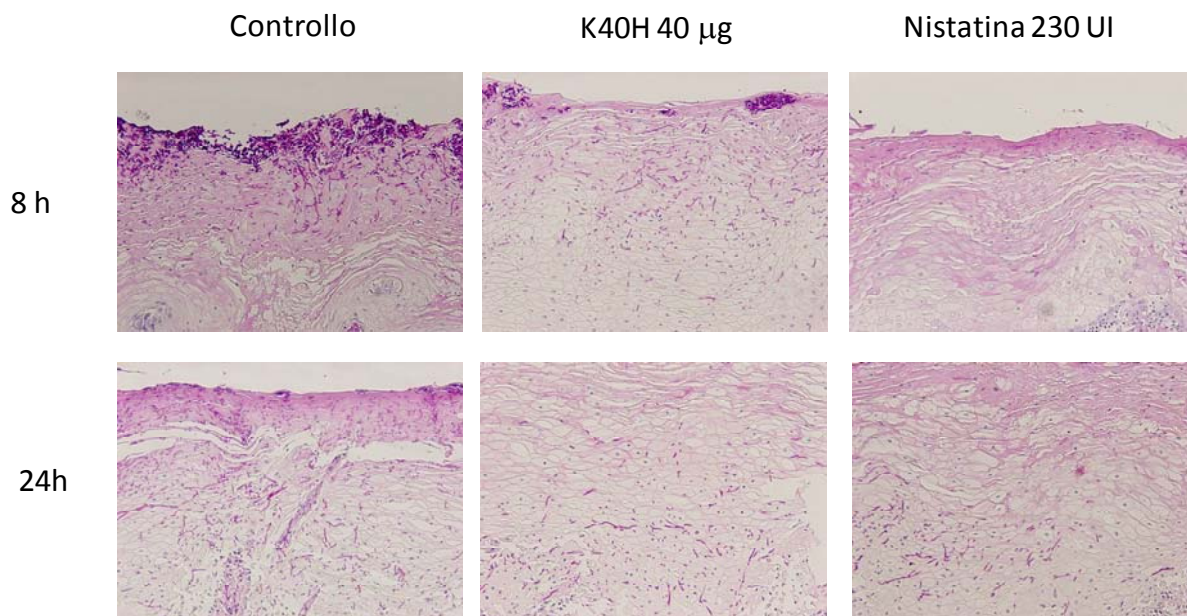


Figura 23. Attività terapeutica del peptide K40H in un modello *ex vivo* di mucosa orale porcina. Campioni non trattati (controllo) e trattati con K40H o con nistatina dopo 8 e 24 ore dall'infezione con *C. albicans* SC5314. Colorazione PAS, ingrandimento 10×.

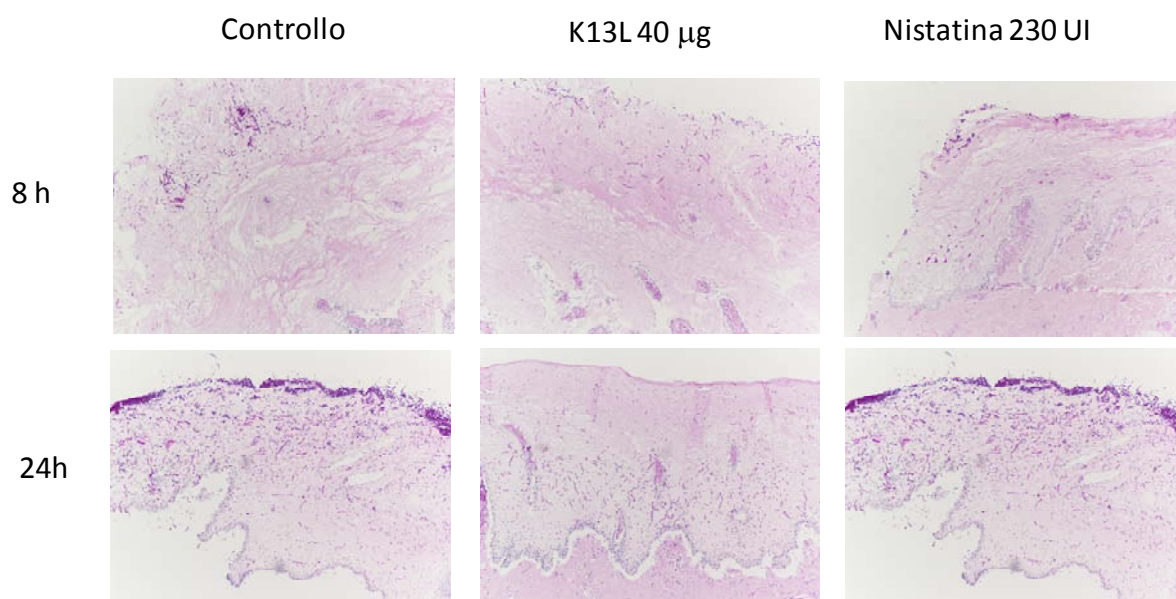


Figura 24. Attività terapeutica del peptide K13L in un modello *ex vivo* di mucosa orale porcina. Campioni non trattati (controllo) e trattati con K13L o con nistatina dopo 8 e 24 ore dall'infezione con *Candida albicans* SC5314. Colorazione PAS, ingrandimento 10 \times .

13. Attività terapeutica dei peptidi K40H e K13L in un modello di infezione sistemica sperimentale da *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* in larve di *Galleria mellonella*

Per la valutazione dell'attività antifungina *in vivo* dei peptidi è stato messo a punto un modello di infezione con *C. albicans* SC5314 e *C. neoformans* 6995 in larve del lepidottero *G. mellonella*.

Esperimenti preliminari hanno consentito di stabilire le concentrazioni degli inoculi fungini, 5×10^5 cellule di *C. albicans* SC5314 per larva e $2,5 \times 10^6$ cellule di *C. neoformans* 6995 per larva, in grado di determinare la morte della maggior parte degli animali nell'arco di 48-72 ore.

Per verificare l'assenza di effetti tossici, sono stati somministrati a due gruppi di animali i peptidi K40H e K13L (10 μ g/larva). Non è stata rilevata una significativa differenza nella sopravvivenza tra il gruppo di animali di controllo, inoculati con soluzione fisiologica, e i gruppi trattati con i peptidi (Figura 25).

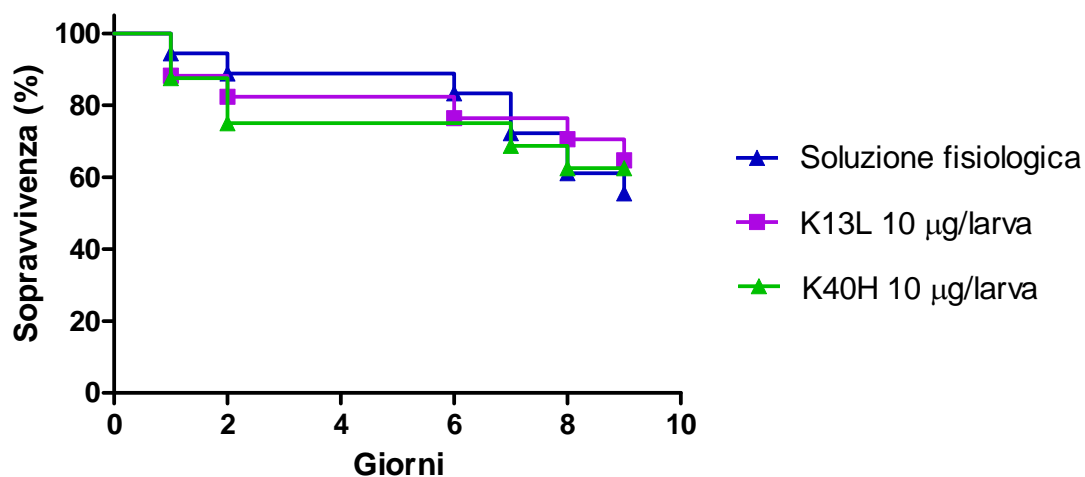


Figura 25. Valutazione della tossicità dei peptidi K40H e K13L in *Galleria mellonella*. I peptidi K40H e K13L sono stati somministrati alla dose di 10 μ g/larva e la sopravvivenza è stata monitorata per i successivi 9 giorni. Come controllo è stato utilizzato un gruppo di animali inoculati con 10 μ l di soluzione fisiologica.

Successivamente, in larve infettate con l'inoculo predeterminato di cellule di *C. albicans* sono stati somministrati, un'ora dopo l'inoculo infettante, i peptidi K40H e K13L alla dose di 5 μ g/larva. La sopravvivenza degli animali trattati è risultata significativamente aumentata rispetto a quella degli animali infettati e inoculati con soluzione fisiologica (Figure 26 e 27).

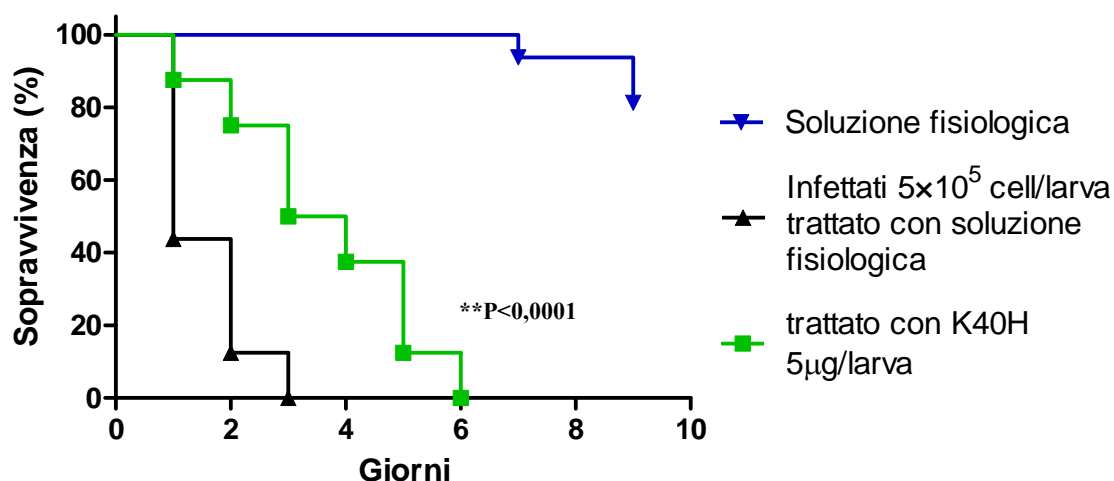


Figura 26. Attività terapeutica *in vivo* del peptide K40H in un modello di infezione sperimentale da *Candida albicans* SC5314 in *Galleria mellonella*. K40H è stato somministrato alla dose di 5 µg/larva dopo 1 ora dall'infezione con 5×10⁵ cellule di *C. albicans*/larva e la sopravvivenza è stata monitorata per i successivi 9 giorni. Come controllo sono stati utilizzati gruppi di animali non infettati, inoculati con soluzione fisiologica, e di animali infettati e trattati con soluzione fisiologica. P, differenza statisticamente significativa tra gruppi di animali infettati trattati con K40H e con soluzione fisiologica.

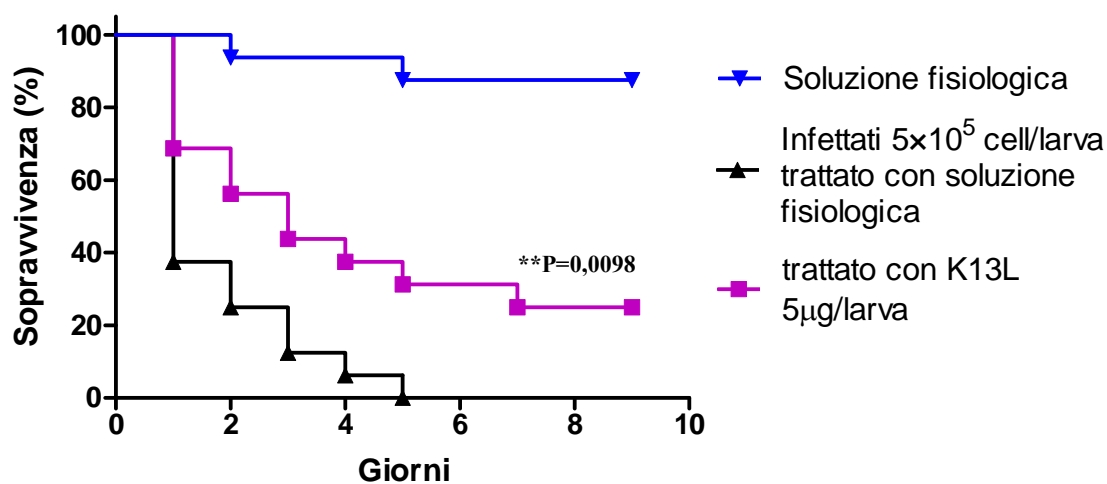


Figura 27. Attività terapeutica *in vivo* del peptide K13L in un modello di infezione sperimentale da *Candida albicans* SC5314 in *Galleria mellonella*. K13L è stato somministrato alla dose di 5 µg/larva dopo 1 ora dall'infezione con 5×10⁵ cellule di *C. albicans*/larva e la sopravvivenza è stata monitorata per i successivi 9 giorni. Come controllo sono stati utilizzati gruppi di animali non infettati, inoculati con soluzione fisiologica, e di animali infettati e trattati con soluzione fisiologica. P, differenza statisticamente significativa tra gruppi di animali infettati trattati con K13L e con soluzione fisiologica.

In altri gruppi di larve infettate, i peptidi K40H e K13L sono stati somministrati in due dosi, ciascuna di 5 µg/larva, un'ora dopo l'inoculo infettante e a 24 ore di distanza. La sopravvivenza degli animali trattati, pur rimanendo significativamente maggiore rispetto a quella degli animali infettati e inoculati con soluzione fisiologica, non è risultata incrementata. Il secondo inoculo sembrerebbe piuttosto rappresentare uno stress ulteriore determinando un aumento, seppur lieve, della mortalità durante il secondo giorno successivo all'infezione (Figura 28).

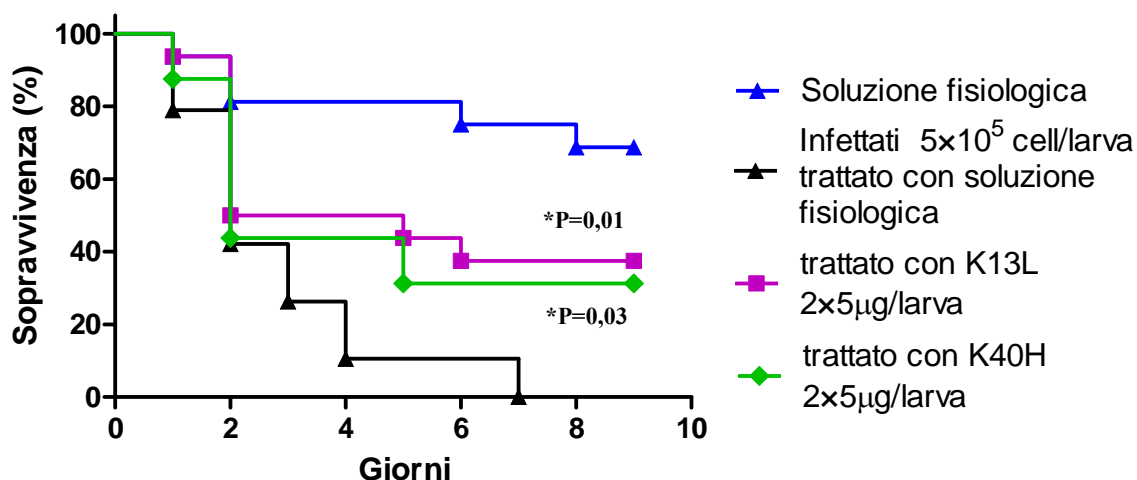


Figura 28. Attività terapeutica *in vivo* dei peptidi K40H e K13L somministrati in due dosi a distanza di 24 ore nel modello di infezione sperimentale da *Candida albicans* SC5314 in *Galleria mellonella*. K40H e K13L sono stati somministrati alla dose di 5 µg/larva dopo 1 ora e 24 ore dall'infezione con 5×10^5 cellule di *C. albicans*/larva e la sopravvivenza è stata monitorata per i successivi 9 giorni. Come controllo sono stati utilizzati gruppi di animali non infettati, inoculati con soluzione fisiologica, e di animali infettati e trattati con soluzione fisiologica. P, differenza statisticamente significativa tra gruppi di animali infettati trattati con i peptidi e con soluzione fisiologica.

Infine, in larve infettate con l'inoculo predeterminato di cellule di *C. neoformans* 6995 sono stati somministrati, un'ora dopo l'inoculo infettante, i peptidi K40H e K13L alla dose di 5 µg/larva. La sopravvivenza degli animali infettati e trattati con K40H, pur mostrando una differenza nel tempo rispetto agli animali infettati e non trattati, non è risultata significativa ($P=0,07$). La sopravvivenza degli animali trattati con il peptide K13L, invece, non ha mostrato differenze rispetto a quella del gruppo di controllo ($P=0,62$) (Figura 29).

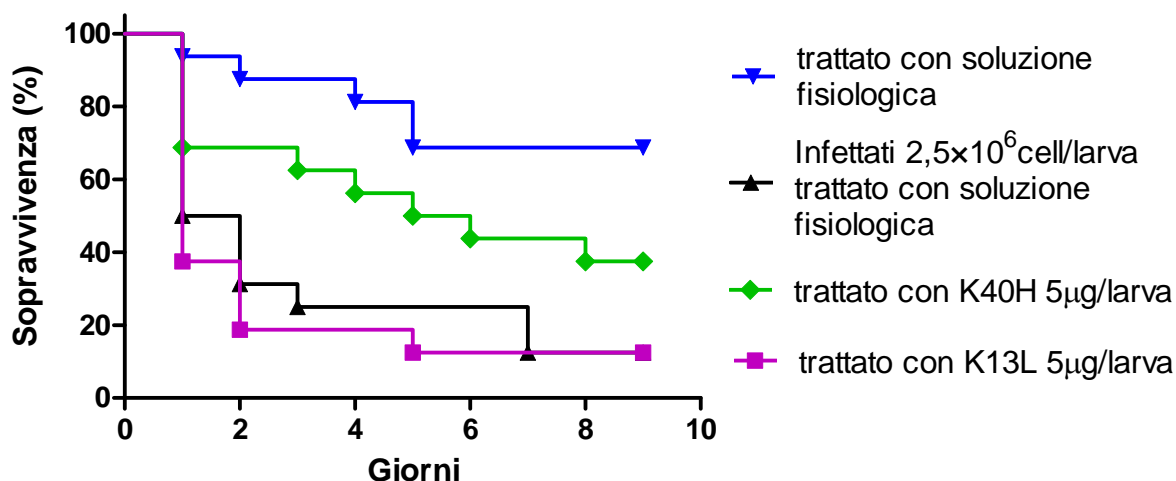


Figura 29. Attività terapeutica *in vivo* dei peptidi K40H e K13L in in modello di infezione sperimentale da *Cryptococcus neoformans* 6995 in *Galleria mellonella*. K40H e K13L sono stati somministrati alla dose di $5 \mu\text{g/larva}$ dopo 1 ora dall'infezione con $2,5 \times 10^6$ cellule di *C. neoformans*/larva e la sopravvivenza è stata monitorata per i successivi 9 giorni. Come controllo sono stati utilizzati gruppi di animali non infettati, inoculati con soluzione fisiologica, e di animali infettati e trattati con soluzione fisiologica.

Discussione e conclusioni

Questo studio è stato focalizzato alla valutazione delle attività biologiche di frammenti peptidici, derivati da proteine sieriche umane, presenti *in vivo*. Mediante un approccio di cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa è stato possibile individuare in campioni di siero frammenti peptidici derivanti sia da Ab sia da altre proteine sieriche. In particolare, sono stati selezionati un peptide di 40 aminoacidi bi-fosforilato, denominato K40H, derivante dalla regione costante CH3 della catena μ di IgM e altri 5 peptidi, denominati K13L, G17K, S17K, D15R e D15T, derivanti da albumina, frammenti C4 e C3 del complemento e fibrinogeno.

Tutti i peptidi hanno mostrato una significativa attività *in vitro* nei confronti di *C. neoformans* 6995, con valori di EC₅₀ compresi tra 0,87 μ M e 24,83 μ M. I peptidi K40H, K13L e G17K hanno inoltre mostrato di possedere attività fungicida, a concentrazioni micromolari, nei confronti di *C. glabrata*, *M. furfur* e di diversi ceppi di *C. albicans*, anche resistenti a comuni farmaci antifungini.

Tra tutti i peptidi selezionati, K40H e K13L sono risultati i più attivi *in vitro*, quindi è stato approfondito lo studio dell'attività candidacida osservata. In seguito al trattamento di cellule di *C. albicans* con entrambi i peptidi non sono stati evidenziati significativi fenomeni apoptotici e di induzione di specie reattive dell'ossigeno.

L'attività candidacida di K13L e K40H è risultata totalmente o parzialmente neutralizzata in presenza di laminarina solubile, suggerendo che per entrambi il legame a β -1,3 D-glucani presenti sulla parete possa rappresentare un evento pregiudiziale per la successiva interazione con le cellule fungine.

L'attività di K40H è risultata molto rapida, come dimostrato dai saggi *in vitro* condotti nel tempo, mentre quella di K13L più lenta e graduale durante le sei ore di incubazione, a tutte le concentrazioni utilizzate.

Nel complesso, gli studi effettuati suggeriscono che l'attività candidacida dei peptidi K40H e K13L sia esplicita con diversi meccanismi.

In dicroismo circolare i peptidi K40H e K13L hanno mostrato differenti proprietà: K40H aggrega nel tempo in caratteristiche strutture a β -foglietto, con un processo catalizzato da laminarina, mentre K13L in soluzione acquosa rimane prevalentemente in struttura non organizzata random-coil e solo in seguito ad aggiunta di SDS forma caratteristiche strutture ad α -elica.

Osservazioni in microscopia elettronica a trasmissione e a scansione hanno dimostrato che K40H, probabilmente in seguito al contatto con β -1,3 D-glucani della parete fungina, tende a formare aggregati fibrillari disposti uniformemente sulla superficie delle cellule di *C. albicans*. Inoltre, nelle cellule trattate con K40H sono state osservate notevoli alterazioni dell'organizzazione cellulare, con vacuolizzazione citoplasmatica e alterazioni dello strato parietale esterno. Tuttavia, gli studi mediante microscopia confocale hanno mostrato che K40H coniugato a fluoresceina entra rapidamente all'interno delle cellule, presumibilmente con un meccanismo di trasporto passivo, e non si localizza in prossimità della parete, ma piuttosto sembrerebbe indurre una perturbazione transitoria. L'ingombro sterico della molecola di fluoresceina o il suo legame ad alcuni residui della sequenza peptidica potrebbero interferire con il processo di aggregazione osservato in microscopia elettronica caratteristico del peptide nativo.

Il peptide K13L, invece, non forma aggregati sulla parete cellulare, entra rapidamente nelle cellule morte e gradualmente all'interno delle cellule vive, presumibilmente con un meccanismo di trasporto attivo. Le osservazioni in microscopia confocale hanno, inoltre, dimostrato che K13L non si localizza nei mitocondri, ma in strutture intracellulari presumibilmente identificabili con i "microbodies", che sono stati descritti come sede dei principali processi enzimatici catalizzati da enzimi deossidativi in grado di scindere il perossido di idrogeno in ossigeno molecolare e acqua. I risultati ottenuti in microscopia elettronica a trasmissione permettono di ipotizzare che il peptide K13L possa indurre la formazione di "microbodies" in *C. albicans*. Anche se in seguito a trattamento con K13L non sono stati osservati quantitativi rilevabili di radicali liberi dell'ossigeno intracellulari, è ipotizzabile, pertanto, che il peptide induca morte cellulare interferendo con i processi fisiologici di detossificazione catalizzati da ossidasi e catalasi presenti nei "microbodies".

L'efficacia dei peptidi K40H e K13L è stata valutata in un modello *ex vivo* di infezione da *C. albicans* in frammenti di mucosa orale porcina mantenuti in coltura, nel quale è stato possibile osservare una diminuzione dell'entità dell'infiltrazione fungina nei frammenti trattati con i peptidi. L'attività terapeutica di K40H e K13L è stata dimostrata *in vivo*, in un modello di infezione sistemica sperimentale in larve del lepidottero *G. mellonella*.

Nello stesso modello *in vivo*, così come nei confronti di cellule di mammifero in coltura, e di eritrociti e PBMC umani *in vitro*, è stata verificata l'assenza di tossicità e di attività genotossica aspecifica di entrambi i peptidi.

In conclusione, peptidi presenti nel siero, derivati da Ab e da altre proteine sieriche, hanno

dimostrato di esplicitare un'efficace attività antimicrobica.

Molte ricerche, nell'ambito della diagnostica, della patologia e della proteomica, sono state focalizzate negli ultimi anni allo studio di frammenti peptidici presenti nel proteoma sierico (Zhang et al., 2013). E' noto che esiste un ampio gruppo di proteine contenenti al loro interno altre unità funzionali (criptidi), che potrebbero essere rilasciate *in vivo* in seguito a tagli proteolitici, dotate di attività biologiche non prevedibili a partire dalla sequenza o dall'attività della proteina precursore (Auteliano et al., 2006; Pimenta e Lebrun, 2007; Ueki et al., 2007; Samir e Link, 2011). L'esistenza di criptidi, nascosti all'interno di una sequenza proteica, sembra essere un fenomeno comune a molte proteine e potrebbe riflettere un meccanismo evolutivo in grado di ampliare la gamma di attività biologiche associate ad una particolare molecola. L'attività di molti frammenti proteici nel proteoma sierico risulta ancora sconosciuta, ma potrebbe rivelare funzioni importanti ed inaspettate. La scoperta di nuovi peptidi criptici bioattivi potrà fornire ulteriori opportunità per la comprensione e la modulazione di vari processi biologici e per eventuali strategie terapeutiche alternative.

Nel siero umano sono presenti decine di migliaia di peptidi di diverso peso molecolare ed è ben noto che endoproteasi ed esoproteasi circolanti nel sangue generano comunemente peptidi dalle frazioni C3 e C4 del complemento, dal fibrinogeno, dalla apolipoproteina E e dalla clusterina (Koomen et al., 2005; Lopez et al., 2005; Marshall et al., 2004; Villanueva et al., 2004; Zheng et al., 2006). Nel proteoma del siero, frammenti di proteine complementari, insulina e fibrinogeno vengono attivati in seguito al clivaggio di un corto peptide dalla sequenza originale che viene successivamente rilasciato nel plasma. Alcuni studi hanno permesso di rilevare un aumento del clivaggio di specifiche proteine in determinati stati patologici, come il frammento del complemento C3f che viene rilasciato da C3 appena prima della destabilizzazione delle placche aterosclerotiche, della formazione di trombi e dell'infarto del miocardio (Weisman et al., 1990; Yasojima et al., 1998). Inoltre, la proteasi umana callicreina 5, un potenziale marcatore sierologico del carcinoma mammario ed ovarico, potrebbe rilasciare fibrinopeptide B da fibrinogeno, angiostatina 4,5 da plasminogeno e il dominio 3 cistatino-simile da chininogeno e digerire alcune componenti della matrice extracellulare liberando peptidi dal collagene, dalla fibronectina e dalla laminina (Michael et al., 2004).

La recente dimostrazione che peptidi sintetici con sequenza corrispondente ai CDR e a frammenti delle regioni costanti delle principali classi di immunoglobuline (IgG, IgM, IgA) possono esercitare attività antimicrobica, antivirale, antitumorale e/o attività

immunomodulatoria *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, presumibilmente mediata da diversi meccanismi d'azione, indipendentemente dalla specificità di appartenenza dell'anticorpo di origine (Polonelli et al., 2008 e 2012; Gabrielli et al., 2012), ha indotto ad indagare sulla possibilità della loro presenza *in vivo*.

Nel complesso, i risultati ottenuti provano che frammenti peptidici presenti nel siero, derivati da Ab e da altre proteine sieriche, sono dotati di attività microbica. Alla luce di questi risultati è possibile supporre che proteine sieriche potrebbero rappresentare una fonte illimitata di peptidi a potenzialità anti-infettiva.

La dimostrazione della presenza *in vivo* di frammenti peptidici ad attività fungicida include anticorpi e albumina nel novero delle proteine dalle quali possono derivare frammenti criptici, nel quale erano già incluse proteine della cascata complementare e fibrinogeno, e potrebbe suggerire un loro nuovo ruolo nell'omeostasi antifungina.

Bibliografia

Ackerknecht EH. 1965. History and Geography of the Most Important Diseases, Hafner, London.

Agerberth B. 1991. Amino acid sequence of PR39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline arginine rich antibacterial peptides. Eur J Biochem 202: 849-854.

Armstrong GL, Conn LA, Pinner Y. 1999. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. J Am Med Assoc 281: 61-66.

Autelitano DJ, Rajic A, Smith AI, Berndt MC, Ilag LL, Vadas M. 2006. The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. Drug Discov Today 11: 306-314.

Bagella L, Scocchi M, Zanetti M. 1995. cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins. FEBS Lett 376: 225-228.

Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. Proc Natl Acad Sci USA 95: 9541-9546.

Bax RP. 1997. Antibiotic resistance: a view from the pharmaceutical industry. Clin Infect Dis 24: S151-153.

Bechinger B. 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. Biochim Biophys Acta 1462: 157-183.

Benoit R, Esch F, Bennett HP, Ling N, Ravazzola M, Orci L, Mufson EJ. 1990. Processing of prosomatostatin. Metabolism 39: 22-25.

Bickerdike MJ, Thomas GB, Batchelor DC, Sirimanne ES, Leong W, Lin H, Sieg F, Wen J, Brimble MA, Harris PW, Gluckman PD. 2009. NNZ-2566: a Gly-Pro-Glu analogue with neuroprotective efficacy in a rat model of acute focal stroke. J Neurol Sci 278: 85-90.

Blombaeck B, Blombaeck M, Grondahl NJ, Guthrie C, Hinton M. 1965. Studies on fibrinopeptides from primates. Acta Chem Scand 19: 1788-1789.

Boman HG, Agerberth B, Boman A. 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. Infect Immun 61: 2978-2984.

Bootle-Wilbraham CA, Tazzyman S, Marshall JM, Lewis CE. 2000. Fibrinogen E-fragment inhibits the migration and tubule formation of human dermal microvascular endothelial cells *in vitro*. Cancer Res. 60: 4719-4724.

Brogden KA, Ackermann M, Huttner KM. 1998. Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. Infect Immun 66: 5948-5954.

- Brogden KA, Ackermann M, Mc Cray PB, Huttner KM. 1999. Differences in the concentrations of small, anionic, antimicrobial peptides in bronchoalveolar lavage fluid and in respiratory epithelia of patients with and without cystic fibrosis. *Infect Immun* 67: 4256-4259.
- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3: 238-250.
- Bulet P, Urge L, Ohresser S, Hetru C, Otvos L. 1996. Enlarged scale chemical synthesis and range of activity of drosocin, an O-glycosylated antibacterial peptide of *Drosophila*. *Eur J Biochem* 238: 64-69.
- Cabiaux V, Agerberth B, Johansson J, Homble F, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM. 1994. Secondary structure and membrane interaction of PR-39, a Pro+Arg-rich antibacterial peptide. *Eur J Biochem* 224: 1019-1027.
- Carlsson A, Engstrom P, Palva ET, Bennich H. 1991. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with *omp* gene transcription. *Infect Immun* 59: 3040-3045.
- Carter PJ. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6: 343-357.
- Casoli C, Pilotti E, Perno CF, Balestra E, Polverini E, Cassone A, Conti S, Magliani W, Polonelli L. 2006. A killer mimotope with therapeutic activity against AIDS-related opportunistic microorganisms inhibits *ex-vivo* HIV-1 replication. *AIDS* 20: 975-980.
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* 8: 2387-2391.
- Casteels P, Tempst P. 1994. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 339-345.
- Catania A, Colombo G, Rossi C, Carlin A, Sordi A, Lonati C, Turcatti F, Leonardi P, Grieco P, Gatti S. 2006. Antimicrobial properties of alpha-MSH and related synthetic melanocortins *Scientific World Journal* 6: 1241-1246.
- Catiau L, Traisnel J, Delval-Dubois V, Chihib NE, Guillochon D, Nedjar-Arroume N. 2011. Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides* 32: 633-638.
- Cattaneo MG, Pola S, Francescato P, Chillemi F, Vicentini LM. 2003. Human endostatin-derived synthetic peptides possess potent antiangiogenic properties *in vitro* and *in vivo*. *Exp Cell Res* 283: 230-236.
- Cenci E, Bistoni F, Mencacci A, Perito S, Magliani W, Conti S, Polonelli L, Vecchiarelli A. 2004. A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. *Cell Microbiol* 6:953-961.
- Cenci E, Pericolini E, Mencacci A, Conti S, Magliani W, Bistoni F, Polonelli L, Vecchiarelli A. 2006. Modulation of phenotype and function of dendritic cells by a therapeutic synthetic killer peptide. *J Leukoc Biol* 79: 40-45.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1994. 1994 Fact Book 7. CDC, Atlanta.

- Centers for Disease Control. 1982. Poliomyelitis Surveillance Summary 1980-1981. CDC, Atlanta.
- Cézard C, Silva-Pires V, Mullié C, Sonnet P. 2011. Antibacterial Peptides: A Review. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Méndez-Vilas A ed., Formatex Microbiology Series N° 3, Vol. 1, pp. 926-937.
- Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jollès P, Fiat AM. 1998. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 80: 155-165.
- Charles JB, Bradley LN. 2012. Self-assembly of amphipathic β -sheet peptides: insights and applications. *Peptide Sci* 98: 169-183.
- Chesnokova LS, Slepnev SV, Witt SN. 2004. The insect antimicrobial peptide, L-pyrrolicorin, binds to and stimulates the ATPase activity of both wild-type and lidless DnaK. *FEBS Lett* 565: 65-69.
- Clark DP, Durell S, Maloy WL, Zasloff M. 1994. Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J Biol Chem* 269: 10849-10855.
- Clarke T, Thomas D, Petersen J, Evans W, Martin P. 2006. The antiarrhythmic peptide rotigaptide (ZP123) increases gap junction intercellular communication in cardiac myocytes and HeLa cells expressing connexin 43. *Brit J Pharmacol* 147: 486-495.
- Cohen ML. 2000. Changing patterns of infectious disease. *Nature* 17: 762-767.
- Conti G, Magliani W, Conti S, Nencioni L, Sgarbanti R, Palamara AT, Polonelli L. 2008. Therapeutic activity of an anti-idiotypic antibody-derived killer peptide against influenza A virus experimental infection. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 4331-4337.
- Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. 1995. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 368: 173-176.
- Culotta E. 1994. Funding crunch hobbles antibiotic resistance research. *Science* 264: 362-363.
- D'Alessio G. 2011. Denatured bactericidal proteins: active per se, or reservoirs of active peptides? *FEBS Lett* 585: 2403-2404.
- Dathe M, Wieprecht T. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 462: 71-87.
- Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meininger GA. 2000. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am J Pathol* 156: 1489-1498.
- De Smet K, Contreras R. 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 27: 1337-1347.

- Dennison SR, Morton LH, Harris F, Phoenix DA. 2007. Antimicrobial properties of a lipid interactive alpha-helical peptide VP1 against *Staphylococcus aureus* bacteria. *Biophys Chem* 129: 279-283.
- Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. 2006. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta Biomembranes* 1758: 1408-1425.
- Eder JP Jr, Supko JG, Clark JW, Puchalski TA, Garcia-Carbonero R, Ryan DP, Shulman LN, Proper J, Kirvan M, Rattner B, Connors S, Keogan MT, Janicek MJ, Fogler WE, Schnipper L, Kinchla N, Sidor C, Phillips E, Folkman J, Kufe DW. 2002. Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. *J Clin Oncol* 20: 3772-3784.
- Ehrenstein G, Lecar H. 1977. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* 10: 1-34.
- Ezzell C. 2000. Care for a dying continent. *Sci Am* 282: 96-105.
- Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, Briand JP, Roussel JP, Letellier L, Hetru C, Hoffmann JA. 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci* 93: 1221-1225.
- Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, Briand JP, Roussel JP, Letellier L, Hetru C, Hoffmann JA. 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci* 93: 1221-1225.
- Fiori PL, Mattana A, Dessì D, Conti S, Magliani W, Polonelli L. 2006. *In vitro* acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *J Antimicrob Chemother* 7: 891-898.
- FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 134: 980-988.
- Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H, Gudmundsson GH. 1997. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 272: 15258-15263.
- Fuchs BB, O'Brien E, El Khouryl JB, Mylonakis E. 2010. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1: 475-482.
- Gabrielli E, Pericolini E, Cenci E, Monari C, Magliani W, Ciociola T, Conti S, Gatti R, Bistoni F, Polonelli L, Vecchiarelli A. 2012. Antibody constant region peptides can display immunomodulatory activity through activation of the Dectin-1 signalling pathway. *PLoS ONE* 7: e43972.
- Galay RL, Maeda H, Aung KM, Umemiya-Shirafuji R, Xuan X, Igarashi I, Tsuji N, Tanaka T, Fujisaki K. 2012. Anti-babesial activity of a potent peptide fragment derived from longicin of *Haemaphysalis longicornis*. *Trop Anim Health Prod* 44: 343-348.
- Ganz T, Lehrer RI. 1995. Defensins. *Pharmacol Ther* 66: 191-205.

- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76: 1427-1435.
- Ganz T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immun* 3: 710-720.
- Ganz T. 2004. Antimicrobial polypeptides. *J Leukoc Biol.* 75: 34-38.
- Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. 2001. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 15: 1819-1821.
- Garrett L. 1992. The next epidemic. In: *AIDS in the World*. Mann JM, Tarantola DJM, Netter TW eds., Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 825-839.
- Garrod LP, Lambert HP, O'Grady F. 1973. *Antibiotic and Chemotherapy*. 4th edition, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Gennaro R, Skerlavaj B, Romeo D. 1989. Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect Immun* 57: 3142-3146.
- Gennaro R, Zanetti M. 2000. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55: 31-49.
- Ghosh SK, Gerken TA, Schneider KM, Feng Z, McCormick TS, Weinberg A. 2007. Quantification of human beta-defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity. *Clin Chem* 53: 757-765.
- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto S. 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol* 2: 1-33.
- Gorr SU, Abdolhosseini M, Shelar A, Sotsky J. 2011. Dual host-defence functions of SPLUNC2/PSP and synthetic peptides derived from the protein. *Biochem Soc Trans* 39: 1028-1032.
- Gould IM. 1999. Stewardship of antibiotic use and resistance surveillance: the international scene. *J Hosp Infect* 43: 253-260.
- Guo YL, Colman RW. 2005. Two faces of high molecular-weight kininogen (HK) in angiogenesis: bradykinin turns it on and cleaved HK (HKa) turns it off. *J Thromb Haemost* 3: 670-676.
- Gupta SK, Hassel T, Singh JP. 1995. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7799-7803.
- Hancock RE, Chapple DS. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1317-1323.
- Hancock RE, Diamond G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8: 402-410.

- Hancock RE, Jenssen H, Hamill P. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19: 491-511.
- Hancock RE, Sahl HG. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 24: 1551-1557.
- Hancock RE. 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* 349: 418-422.
- Hancock RE. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 1: 156-164.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. 2001. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276: 5707-5713.
- Harwig SS, Kokryakov VN, Swiderek KM, Aleshina GM, Zhao C, Lehrer RI. 1995. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Lett* 362: 65-69.
- Henzler KA, Wildman DK, Ramamoorthy A. 2003. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* 42: 6545-6558.
- Ibrahim HR, Imazato K, Ono H. 2011. Human lysozyme possesses novel antimicrobial peptides within its N-terminal domain that target bacterial respiration. *J Agric Food Chem* 59: 10336-10345.
- Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. 2004. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Res* 38: 551-556.
- Institute of Medicine. 1992. *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. National Academic Press, Washington DC.
- Izadpanah A, Gallo RL. 2005. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol* 52: 381-390.
- Jones DE, Bevins CL. 1992. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 267: 23216-23225.
- Jones DE, Bevins CL. 1993. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Letters* 315: 187-192.
- Jørgensen NR, Teilmann SC, Henriksen Z, Meier E, Hansen SS, Jensen JE, Sørensen OH, Petersen JS. 2005. The antiarrhythmic peptide analog rotigaptide (ZP123) stimulates gap junction intercellular communication in human osteoblasts and prevents decrease in femoral trabecular bone strength in ovariectomized rats. *Endocrinology* 146: 4745-4754.
- Kasetty G, Papareddy P, Kalle M, Rydengård V, Mörgelin M, Albiger B, Malmsten M, Schmidtchen A. 2011. Structure-activity studies and therapeutic potential of host defense peptides of human thrombin. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 2880-2890.
- Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokoza S, Tsuji N, Yagihashi A, Watanabe N. 2002. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3113-3117.

- Koomen JM, Li D, Xiao LC, Liu TC, Coombes KR, Abbruzzese J, Kobayashi R. 2005. Direct tandem mass spectrometry reveals limitations in protein profiling experiments for plasma biomarker discovery. *J Proteome Res* 4: 972-981.
- Kokryakov VN, Harwig SS, Panyutich EA, Shevchenko AA, Aleshina GM, Shamova OV, Korneva HA, Lehrer RI. 1993. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett* 327: 231-236.
- Kylsten P, Samakovlis C, Hultmark D. 1990. The cecropin locus in *Drosophila*; a compact gene cluster involved in the response to infection. *EMBO J* 9: 217-224.
- Ladram A, Bulant M, Delfour A, Montagne JJ, Vaudry H, Nicolas P. 1994. Modulation of the biological activity of thyrotropin-releasing hormone by alternate processing of pro-TRH. *Biochimie* 76: 320-328.
- Lambert J, Keppi E, Dimarcq DJ, Wicker C, Reichhart JM, Dunbar B, Lepage P, Van Dorsselaer A, Hoffmann J, Fothergill J. 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 262-269.
- Leblanc J, Fliss I, Matar C. 2004. Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus*-fermented milk. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 1171-1181.
- Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 11: 105-109.
- Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ. 2005. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol* 5: 866-879.
- Lopez MF, Mikulskis A, Kuzdzal S, Bennett DA, Kelly J, Golenko E, Dicesare J, Denoyer E, Patton WF, Ediger R, Sapp L, Ziegert T, Lynch C, Kramer S, Whiteley GR, Wall MR, Mannion DP, Della Cioppa G, Rakitan JS, Wolfe GM. 2005. High-resolution serum proteomic profiling of Alzheimer disease samples reveals disease-specific, carrier-protein-bound mass signatures. *Clin Chem* 51: 1946-1954.
- Magliani W, Conti S, Cunha RL, Travassos LR, Polonelli L. 2009. Antibodies as crypts of anti-infective and antitumor peptides. *Curr Med Chem* 16: 2305-2323.
- Mahoney MM, Lee AY, Brezinski-Caliguri DJ, Huttner KM. 1995. Molecular analysis of the sheep cathelin family reveals a novel antimicrobial peptide. *FEBS Lett* 377: 519-522.
- Mains RE, Eipper BA, Ling N. 1977. Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3014-3018.
- Manfredi M, McCullough MJ, Conti S, Polonelli L, Vescovi P, Al-Karaawi ZM, Porter SR. 2005. *In vitro* activity of a monoclonal killer anti-idiotypic antibody and a synthetic killer peptide against oral isolates of *Candida* spp. differently susceptible to conventional antifungals. *Oral Microbiol Immunol* 20: 226-232.
- Marchini D, Giordano PC, Amons R, Bernini LF, Dallai R. 1993. Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive

accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta: Diptera). *Insect Biochem Mol Biol* 23: 591-598.

Marshall E. 2002. Cancer therapy. Setbacks for endostatin. *Science* 295: 2198-2199.

Marshall J, Jankowski A, Furesz S, Kireeva I, Barker L, Dombrowsky M, Zhu W, Jacks K, Ingratta L, Bruin J, Kristensen E, Zhang R, Stanton E, Takahashi M, Jackowski G. 2004. Human serum proteins pre-separated by electrophoresis or chromatography followed by tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 3: 364-382.

Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K. 1996. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* 35: 11361-11368.

Matsuzaki K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1462: 1-10.

Mc Keown T, Lowe CR. 1966. *An Introduction to Social Medicine*. Davis FA, Blackwell, Philadelphia.

Mc Phee JB, Hancock RE. 2005. Function and therapeutic potential of host defence peptides. *J Pept Sci* 11: 677-687.

Meisel H, Bernard H, Fairweather-Tait S, FitzGerald RJ, Hartmann R, Lane CN, McDonagh D, Teucher B, Wal JM. 2003. Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *Br J Nutr* 89: 351-359.

Meisel H. 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors* 21: 55-61.

Meister M, Lemaître B, Hoffmann JA. 1997. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioessays* 19: 1019-1026.

Michael IP, Sotiropoulou G, Pampalakis G, Magklara A, Ghosh M, Wasney G, Diamandis EP. 2005. Biochemical and enzymatic characterization of human kallikrein 5 (hK5), a novel serine protease potentially involved in cancer progression. *J Biol Chem* 280: 14628-14635.

Mignogna G, Simmaco M, Kreil G, Barra D. 1993. Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *EMBO J* 12: 4829-32.

Mizuno S, Matsuura K, Gotou T, Nishimura S, Kajimoto O, Yabune M, Kajimoto Y, Yamamoto N. 2005. Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *Br J Nutr* 94: 84-91.

Mongiati M, Sweeney SM, San Antonio JD, Fu J, Iozzo RV. 2003. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J Biol Chem* 278: 4238-4249.

Mookherjee N, Rehaume LM, Hancock RE. 2007. Cathelicidins and functional analogues as antiseptic molecules. *Expert Opin Ther Targets* 11: 993-1004.

Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, Tokunaga F, Muta T, Iwanaga S, Niwa M, Takao T, Shimonishi Y. 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J Biol Chem* 263: 16709-16713.

- Narva M, Halleen J, Väänänen K, Korpela R. 2004. Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on bone cells *in vitro*. *Life Sci* 75: 1727-1734.
- Ng JH, Ilag LL. 2006. Cryptic protein fragments as an emerging source of peptide drugs. *IDrugs* 9: 343-346.
- Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, Pestonjamas V, Piraino J, Huttner K, Gallo RL. 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414: 454-457.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267: 5421-5426.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315-328.
- Oh J, Cajal Y, Skowronska EM, Belkin S, Chen J, Van Dyk TK, Sasse RM, Jain MK. 2000. Cationic peptide antimicrobials induce selective transcription of *micF* and *osmY* in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1463: 43-54.
- Ohnemus U, Willers C, Bubenheim M, Horstkotte MA, Houdek P, Fischer F, Schmage P, Moll I, Brandner JM. 2008. An *ex-vivo* oral mucosa infection model for the evaluation of the topical activity of antifungal agents. *Mycoses* 51: 21-29.
- Oren Z, Shai Y. 1997. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. *Biochemistry* 36: 1826-1835.
- Otvos L, Insug O, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, Bulet P, Blaszczyk-Thurin M. 2000. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* 39: 14150-14159.
- Panyutich A, Shi J, Boutz PL, Zhao C, Ganz T. 1997. Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted propeptidases. *Infect Immun* 65: 978-985.
- Park C, Lee DG. 2010. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 170-172.
- Park CB, Kim HS, Kim SC. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 253-257.
- Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC. 2000. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8245-8250.

- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. 2001. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806-7810.
- Park Y, Hahm KS. 2012. Novel short AMP: design and activity study. *Protein Pept Lett* 19: 652-656.
- Pasikowski P, Goździewicz T, Stefanowicz P, Artym J, Zimecki M, Szewczuk Z. 2011. A novel immunosuppressive peptide originating from the ubiquitin sequence. *Pept* 32: 2418-2427.
- Pertinhez TA, Conti S, Ferrari E, Magliani W, Spisni A, Polonelli L. 2009. Reversible self-assembly: a key feature for a new class of autodelivering therapeutic peptides. *Mol Pharm* 6: 1036-1039.
- Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. 2010. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog* 6: e1001067.
- Pimenta DC, Lebrun I. 2007. Cryptides: buried secrets in proteins. *Peptides* 28: 2403-2410.
- Polonelli L, Magliani W, Conti S, Bracci L, Lozzi L, Neri P, Adriani D, De Bernardis F, Cassone A. 2003. Therapeutic activity of an engineered synthetic killer antiidiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis. *Infect Immun* 71: 6205-6212.
- Polonelli L, Ponton J, Elguezabal N, Moragues MD, Casoli C, Pilotti E, Ronzi P, Dobroff AS, Rodrigues EG, Juliano MA, Maffei DL, Magliani W, Conti S, Travassos LR. 2008. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLoS ONE* 3: e2371.
- Polonelli L., Ciociola T., Magliani W., Zanello P.P., D'Adda T., Galati S., De Bernardis F., Arancia S., Gabrielli E., Pericolini E., Vecchiarelli A., Arruda D.C., Pinto M.R., Travassos L.R., Pertinhez T., Spisni A., Conti S. Peptides of the constant region of antibodies display fungicidal activity. 2012. *PLoS ONE* 7: e 34105.
- Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. 1992. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31: 12416-12423.
- Powersand JP, Hancock RE. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24: 1681-1691.
- Raffin-Sanson ML, de Keyzer Y, Bertagna X. 2003. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Eur J Endocrinol* 149: 79-90.
- Ramalingam L, Messer LB, Reynolds EC. 2005. Adding casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to sports drinks to eliminate in vitro erosion. *Pediatr Dent* 27: 61-67.
- Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJF, Segal M, Lu H, Knebelmann B, Sukhatme VP. 1999. Antiangiogenic activity of restin. NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 735-739.

- Reynolds EC. 1998. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Spec Care Dentist* 18: 8-16.
- Robert MC, Razaname A, Mutter M, Juillerat MA. 2004. Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J Agric Food Chem*. 52: 6923-6931.
- Romeo D, Skerlavaj B, Bolognesi M, Gennaro R. 1988. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 263: 9573-9575.
- Rozek A, Friedrich CL, Hancock REW. 2000. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* 39: 15765-15774.
- Sage EH. 1997. Pieces of eight: bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis. *Trends Cell Biol* 7: 182-186.
- Sakai T, Banno Y, Kato Y, Nozawa Y, Kawaguchi M. 2005. Pepsin digested bovine lactoferrin induces apoptotic cell death with JNK/SAPK activation in oral cancer cells. *J Pharmacol Sci* 98: 41-48.
- Samir P, Link AJ. 2011. Analyzing the cryptome: uncovering secret sequences. *AAPS J* 13: 152-158.
- Sasaki T, Larsson H, Tisi D, Welsh CL, Hohenester E, Timpl R. 2000. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *J Mol Biol* 301: 1179-1190.
- Sato AK, Viswanathan M, Kent RB, Wood CR. 2006. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr Opin Biotechnol* 17: 638-642.
- Savoia D, Scutera S, Raimondo S, Conti S, Magliani W, Polonelli L. 2006. Activity of an engineered synthetic killer peptide on *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. *Exp Parasitol* 113: 186-192.
- Schaller M, Zakikhany K, Naglik JR, Weindl G, Hube B. 2006. Models of oral and vaginal candidiasis based on *in vitro* reconstituted human epithelia. *Nat Protoc* 1: 2767-2773.
- Schenk S, Quaranta V. 2003. Tales from the cryptic sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol* 13: 366-75.
- Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. 2005. Human defensins. *J Mol Med* 85: 587-595.
- Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB. 2002. Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2129-2133.
- Selsted ME, Brown DM, DeLange RJ, Lehrer RI. 1983. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J Biol Chem* 258: 14485-14489.

Shai Y. 2002. From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. *Curr Pharm Des* 8: 715-725.

Sigerist HE. 1971. *The Great Doctors 372*. Dover Publications, New York.

Silva PI, Daffre S, Bulet P. 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biol Chem* 275: 33464-33470.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Sheider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 237: 123-130.

Sitaram N, Nagaraj R. 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim Biophys Acta* 1462: 29-54.

Sizonenko SV, Sirimanne ES, Williams CE, Gluckman PD. 2001. Neuroprotective effects of the N-terminal tripeptide of IGF-1, glycine-proline-glutamate, in the immature rat brain after hypoxic-ischemic injury. *Brain Res* 922: 42-50.

Skerlavaj B, Romeo D, Gennaro R. 1990. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by bactenecins. *Infect Immun* 58: 3724-3730.

Smith AI, Funder JW. 1988. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev* 9: 159-179.

Sorensen O, Cowland JB, Askaa J, Borregaard N. 1997. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J Immunol Methods* 206: 53-59.

Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N. 2001. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 97: 3951-3959.

Sousa JC, Berto RF, Gois EA, Fontenele-Cardi NC, Honório JE Jr, Konno K, Richardson M, Rocha MF, Camargo AA, Pimenta DC, Cardi BA, Carvalho KM. 2009. Leptoglycin: a new Glycine/Leucine-rich antimicrobial peptide isolated from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus pentadactylus* (*Leptodactylidae*). *Toxicon* 54: 23-32.

Subbalakshmi C, Sitaram N. 1998. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett* 160: 91-96.

Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted M. 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 286: 498-502.

Teschemacher H, Koch G, Branti V. 1997. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 43: 99-117.

Tjin Tham Sjin RM, Satchi-Fainaro R, Birsner AE, Ramanujam VM, Folkman J, Javaherian KA. 2005. 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH₂-terminal zinc-binding domain of endostatin is responsible for its antitumor activity. *Cancer Res* 65: 3656-3663.

- Toke O. 2005. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Pept Sci* 80: 717-735.
- Travassos LR, Silva LS, Rodrigues EG, Conti S, Salati A, Magliani W, Polonelli L. 2004. Therapeutic activity of a killer peptide against experimental paracoccidiodomycosis. *J Antimicrob Chemother* 54: 956-958.
- Tyers M, Mann M. 2003. From genomics to proteomics. *Nature* 422: 193-197.
- Ueki N, Someya K, Matsuo Y, Wakamatsu K, Mukai H. 2007. Cryptides: functional cryptic peptides hidden in protein structures. *Biopolymers* 88: 190-198.
- Uzzell T, Stolzenberg ED, Shinnar AE, Zasloff M. 2003. Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides* 24: 1655-1667.
- Van Dijk A, Veldhuizen EJ, van Asten AJ, Haagsman HP. 2005. CMAP27, a novel chicken cathelicidin-like antimicrobial protein. *Vet Immunol Immunopathol* 106: 321-327.
- Villanueva J, Philip J, Entenberg D, Chaparro CA, Tanwar MK, Holland EC, Tempst P. 2004. Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 76: 1560-1570.
- Vunnam S, Juvvadi P, Merrifield RB. 1997. Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestine. *J Pept Res* 49: 59-66.
- Walsh G. 2003. Biopharmaceutical benchmarks 2003. *Nat Biotechnol* 21: 865-870.
- Walsh G. 2006. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat Biotechnol* 24: 769-776.
- Walsh G. 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 28: 917-924.
- Walsh TJ, Groll AH. 1999. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl Infect Dis* 1: 247-261.
- Wang Y, Hong J, Liu X, Yang H, Liu R, Wu J, Wang A, Lin D, Lai R. 2008. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PLoS ONE* 3: e3217.
- Wang Z, Wang G. 2004. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res* 32: 590-592.
- Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC Jr, Carson GR, Concino MF, Boyle MP, Roux KH, Weisfeldt ML, Fearon DT. 1990. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis *Science* 249: 146-151.
- White SH, Wimley WC, Selsted ME. 1995. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol* 4: 521-527.
- Williams D, Ackloo S, Zhu P, Bowden P, Evans KR, Addison CL, Lock C, Marshall JG. 2010. Precipitation and selective extraction of human serum endogenous peptides with analysis by quadrupole time-of-flight mass spectrometry reveals posttranslational modifications and low-abundance peptides. *Anal Bioanal Chem* 396: 1223-1247.
- Wright R. 2000. Transmission electron microscopy of yeast. *Microsc Res Tech* 51: 496-510.

- Wu M, Maier E, Benz R, Hancock REW. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38: 7235-7242.
- Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E, Kim JJ, Hangai M, Moon YS, Davis GE, Brooks PC. 2001. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *J Cell Biol* 5: 1069-1079.
- Yamaguchi S, Hong T, Waring A, Lehrer RI, Hong M. 2002. Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a beta-sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry* 41: 9852-9862.
- Yamaguchi S, Huster D, Waring A, Lehrer RI, Kearney W, Tack BF, Hong M. 2001. Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J* 81: 2203-2214.
- Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y. 2002. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol* 169: 2516-2523.
- Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 81: 1475-1485.
- Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. 1998. Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction. *Circ Res* 83: 860-869.
- Yeaman R, Yount NY. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27-55.
- Yeaman R, Yount NY. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27-55.
- Yokoyama Y, Ramakrishnan S. 2004. Improved biological activity of a mutant endostatin containing a single amino-acid substitution. *Br J Cancer* 90: 1627-1635.
- Zaiou M, Nizet V, Gallo RL. 2003. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol* 120: 810-816.
- Zamir N, Palkovits M, Weber E, Mezey E, Brownstein MJ. 1984. A dynorphinergic pathway of Leu-enkephalin production in rat substantia nigra. *Nature* 307: 643-645.
- Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Letters*. 371: 1-5.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
- Zhang AH, Sun H, Yan GL, Han Y, Wang XJ. 2013. Serum proteomics in biomedical research: a systematic review. *Appl Biochem Biotechnol* 170: 774-786.
- Zhao H, Gan TX, Liu XD, Jin Y, Lee WH, Shen JH, Zhang Y. 2008. Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes. *Peptides* 29: 1685-1691.

Zheng X, Baker H, Hancock WS. 2006. Analysis of the low molecular weight serum peptidome using ultrafiltration and a hybrid ion trap-Fourier transform mass spectrometer. *J Chromatogr A* 1120: 173-184.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti i docenti dell'Unità di Microbiologia e Virologia, in particolare la Prof.ssa Stefania Conti e il Prof. Luciano Polonelli per gli insegnamenti ricevuti, la continua disponibilità con la quale hanno seguito la ricerca e per la pazienza e la dedizione nella realizzazione di questo lavoro di tesi. Grazie a loro, il percorso di Dottorato ormai conclusosi ha rappresentato per me un importante momento di crescita professionale.

Ringrazio anche Laura, Martina e specialmente Tecla, il cui supporto è stato importante per la realizzazione di questo lavoro.

Inoltre, vorrei ringraziare tutte le persone che in questi anni hanno collaborato alla ricerca effettuata, mettendo a disposizione strumenti e preziose conoscenze, in particolare: la Prof.ssa Lisa Elviri, Andrea Faccini, la Dott.ssa Serena Galati, la Dott.ssa Elena Ferrari, la Prof.ssa Rita Gatti, Davide Dallatana, la Dott.ssa Tiziana D'Adda, la Dott.ssa Thelma Pertinhez, la Dott.ssa Maddalena Manfredi, il Dott. Domenico Corradi, la Dott.ssa Elisa Borghi e la Prof.ssa Giulia Morace.

Ora, soddisfatto del traguardo raggiunto, delle conoscenze acquisite e degli insegnamenti ricevuti, sono pronto per nuove avventure.