

**Esperimento pilota mirato all'analisi dell'effetto della stimolazione immunitaria su *A. viridis*, finalizzato alla produzione di composti biologicamente attivi.**

## I.A.M.C-CNR di Capo Granitola



**Esperimento pilota mirato all'analisi dell'effetto della stimolazione immunitaria su *A. viridis*, finalizzato alla produzione di composti biologicamente attivi.**

Masullo T.<sup>a</sup>, Bennici C.<sup>a</sup>, Salamone M.<sup>a</sup>, Tagliavia M.<sup>a</sup>, Nicosia A.<sup>a</sup>, Falco F.<sup>a</sup>, Colombo P.<sup>b</sup>, Bonura A.<sup>b</sup>, Cuttitta A.<sup>a</sup>, Mazzola S.<sup>c</sup>

a - Laboratory of Molecular Ecology and Biotechnology, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia;

b - National Research Council, Institute of Biomedicine and Molecular Immunology (IBIM), Via Ugo La Malfa, 153, 90146, Palermo, Italy.

c - Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

## Sommario

1. Introduzione.....	3
2. Descrizione della specie.....	4
3. Reperibilità e stabulazione .....	5
4. Protocollo di processamento e prelievo del tessuto di interesse da individui non stimolati.....	6
4.1 Analisi del pattern proteico.....	6
4.2 Esperimento preliminare di purificazione delle componenti a basso peso.....	6
4.3 Saggi di attività biologica sul campione grezzo non stimolato.....	8
4.4 Esperimenti di stimolazione immunitaria.....	9
4.5 Valutazione microbiologica degli estratti isolati.....	10
4.6 Validazione del protocollo.....	10
5. Ringraziamenti.....	10
6. Decreti e protocolli.....	11
7. Bibliografia.....	11

## 1. Introduzione

L'esperimento mira a valutare l'eventuale attività antibatterica di peptidi prodotti da individui di *Anemonia viridis* in seguito a stimolazione immunitaria e quindi alla realizzazione di un protocollo riproducibile e ottimizzato per la produzione di tali composti.

L'ambiente marino rappresenta una fonte inestimabile di ricchezza in termini di biodiversità differenziandosi sostanzialmente dagli habitat terrestri. La sopravvivenza, infatti, in ambienti estremi ovvero a basse temperature, elevata pressione, oscurità assoluta ed elevata salinità è consentita dalla stabilità di tali fattori che guidano l'evoluzione di tutti gli organismi marini compresi i patogeni procarioti marini. La costante pressione esercitata da agenti microbici potenzialmente dannosi, combinata con il successo evolutivo degli invertebrati marini, suggerisce come il sistema immunitario presente in questi animali sia talmente efficace da determinare l'inibizione e/o l'uccisione di tali batteri.

In particolare gli invertebrati marini hanno conservato un sistema ancestrale di immuno-difesa che vede come principali protagonisti proprio gli peptidi antimicrobici (Edwin et al., 1992; Rinkevich, 1999). A questo proposito, l'efficacia della loro risposta immunitaria si basa unicamente sulla capacità dell'organismo di distinguere il "self non infetto" dal "non self infetto" al fine di innescare una risposta difensiva che non solo mira ad uccidere o a rendere inoffensivo l'agente estraneo, ma è anche in grado di riconoscere ed eliminare le proprie cellule danneggiate o malate.

Considerando le diverse funzioni che i peptidi antimicrobici esercitano, gran parte della ricerca in questo campo è stata focalizzata negli ultimi dieci anni nell'identificazione di nuovi composti antimicrobici capaci di esibire un ampio spettro di attività contro una vasta gamma di microrganismi, che includono batteri Gram-positivi e Gram-negativi, lieviti, funghi, virus, protozoi e parassiti quali i nematodi (Hancock and Sahl, 2006).

## 2. Descrizione della specie

*Anemonia viridis* (Forskål, 1775) (Phylum Cnidari, classe Antozoi, sottoclasse Ottocoralli, ordine Attinari), ampiamente diffusa nel Mediterraneo e lungo le coste atlantiche è caratterizzata dall'aver numerosi e lunghi tentacoli parzialmente retrattili con apici viola (Fig. 1). La base è larga, aderente al substrato e più larga della colonna di norma nascosta dai tentacoli. Raramente supera il diametro di 8-10 cm. La colorazione di base è biancastra o bianco-giallognola. Vive in acque estremamente superficiali, anche a pochi cm di profondità, insinuata in substrati rocciosi. Può sopportare temperature lievemente superiori a 22 °C. Si alimenta di ogni particella organica o piccoli invertebrati, pesci e crostacei che vengono catturati dai tentacoli e poi ingeriti. La riproduzione è prevalentemente sessuale, anche se tuttavia può riprodursi sessualmente tramite scissione. Le uova si osservano fra maggio e luglio. La sua preferenza per fondali ben illuminati è dovuta alla presenza di alghe simbiotici unicellulari nei tentacoli, la cui perdita determina il fenomeno caratteristico del "bleaching" con conseguente morte dell'animale. Le zooxantellae infatti, consentono alle anemoni di vivere in acque oligotrofiche garantendo l'apporto di ossigeno e prodotti fotosintetici ricevendo a loro volta protezione da possibili predatori. La stabilità di tale simbiosi è messa a rischio in condizioni di stress indotto da patogeni o per eccessiva esposizione ai raggi UV.



Fig. 1. *Anemonia viridis*

### 3. Reperibilità e stabulazione

La specie è abbondantemente presente su tutte le coste mediterranee. Il reperimento è dunque possibile durante tutto l'anno dall'ambiente naturale tramite prelievo da parte di operatori.

L'allevamento avviene solo per studi scientifici. In cattività modulando al bisogno alcuni fattori abiotici è facile assistere ai vari sistemi di riproduzione che la specie attua anche in natura.

Le anemoni sono state prelevate dagli scogli sommersi antistanti la costa di Capo Granitola (TP) e sono stati mantenuti in vasche da 1,5 m<sup>3</sup> in vetroresina alimentate da acqua marina proveniente da un pozzo artesiano posto a pochi metri dalla costa. I valori chimico-fisici dell'acqua di pozzo sono stati costantemente monitorati e sono risultati essere gli stessi riscontrati nell'acqua costiera prelevata nel sito di cattura delle anemoni che dista poche decine di metri dal pozzo (Tab.1).

Le anemoni sono state alimentate a giorni alterni con frammenti di pesce e crostacei, rilasciati in corrente nella vasca in modo tale che gli animali potessero con i tentacoli catturare e consumare la quantità di cibo desiderata. L'eccesso di cibo che si depositava sul fondo veniva asportato meccanicamente onde evitare pericolosi accumuli di nutrienti nella vasca di stabulazione.

Tabella 1. Parametri chimico fisici dell'acqua usata per la stabulazione di *A. sulcata*.

Temperatura	Salinità	NO <sup>2</sup> (mg/l)	NO <sup>3</sup>	pH
22 °C	36‰	20	-	8.3

#### 4. Protocollo di processamento e prelievo del tessuto di interesse da individui non stimolati.

Esemplari di *A. viridis* (10 individui) sono stati (secondo quanto riportato da Honma et al., 2005; Hasegawa et al., 2006; Merle et al., 2007; Choresh et al., 2004) omogenati a freddo in presenza di 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 20 mM NaCl, 8 mM EDTA. L'omogenato ottenuto è stato sottoposto a 2 cicli di centrifugazione a 10.000 rpm per 20 min a 4 °C ed è quindi stata prelevata la frazione solubile.

##### 4.1 Analisi del pattern proteico

La frazione solubile è stata analizzata tramite SDS-PAGE (Fig. 2). Come si evince dalla figura si denota la presenza di differenti bande ad alto peso molecolare e di alcune specie a basso peso ed al di sotto dei 10 KDa.

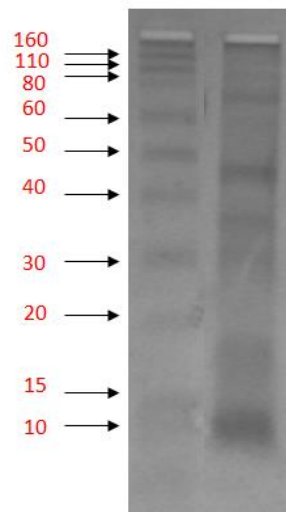


Fig. 2. SDS-PAGE al 10% della frazione solubile: line 1) Molecular Weight Marker, line 2) frazione solubile (14µg).

##### 4.2 Esperimento preliminare di purificazione delle componenti a basso peso.

La frazione solubile è stata dapprima filtrata con filtri sterili da 5 µm (Sartorius), acidificata con 0,1% TFA (acido trifluoroacetico) e quindi caricata (50 mg) su una colonna C18 Sep-Pack (Waters), precedentemente attivata. Una volta caricato il campione, la frazione esclusa è stata

ulteriormente ricaricata sulla stessa colonna per poi conservare la porzione non legata (flow through) a -20 °C per eventuali successive analisi. Di seguito la colonna è stata lavata con 0.1% acido trifluoroacetico (6 mL). Quindi si è passati ad eluire le proteine con 100% metanolo ed 0.1% di acido trifluoroacetico (4 mL) per staccare tutte le componenti legate alla colonna e analizzarle mediante HPLC. Tale frazione è stata successivamente essiccata per evaporazione sotto vuoto al fine di allontanare il metanolo e poi risospesa in 1ml di 0.05% TFA. Un'aliquota di tale campione è stata sottoposta ad HPLC mentre la frazione rimanente è stata liofilizzata, risospesa in acqua e analizzata tramite SDS-PAGE. Quest'ultima mostrava l'evidente arricchimento in termini di proteine a basso peso molecolare (Fig. 3).

Relativamente all'analisi HPLC, il campione (70 µg) è stato caricato su colonna RPC18 2.1x150 mm (5µm silica particles size) (Waters) ed eluito tramite un gradiente di acetonitrile ad una concentrazione massima del 60% (aumento del 10% della concentrazione ogni 10 min) in presenza di acqua e 0.05% di acido trifluoroacetico. La velocità di flusso è stata settata a 0.3 ml/min e usando come detector il PDA si sono registrati i valori di assorbimento alle seguenti lunghezze d'onda: 280 nm e 254 nm. Il cromatogramma evidenziava chiaramente la presenza di picchi attribuibili a popolazioni di proteine a basso peso (Fig. 4).

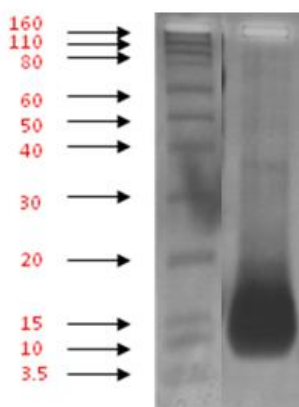


Fig. 3. SDS-PAGE al 10% della frazione purificata da C18: line 1) Molecular Weight Marker, line 2) frazione purificata (28µg).

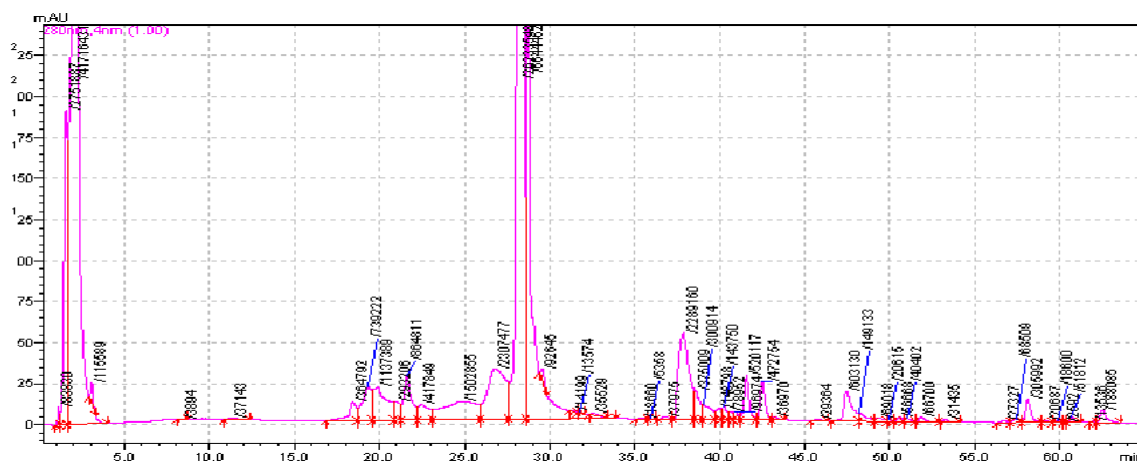


Fig. 4. Cromatogramma del campione in 0.05% acido trifluoroacetico di *A. viridis* (ABS 280nm, scala di riferimento 225 mAU).

### 4.3 Saggi di attività biologica sul campione grezzo non stimolato

L'estratto totale grezzo è stato quindi sottoposto a saggi microbiologici per la valutazione della MIC.

Il saggio è stato eseguito applicando un metodo microbiologico secondo i documenti di riferimento Decreto 10 Marzo 1997 Allegato IX; GURI N. 103 - Serie generale – 6 Maggio 1997; AFSSA- Star Protocol-Screening test for antibiotic residues- LMV/UCM/PO5/11.AN-9/2002. (Ricerca Sostanze Inibenti (Metodo: POS AOAM/28 IZS SI).

Tale metodo è incentrato sulla capacità di certe sostanze di diffondere nell'agar inibendo la crescita dei microrganismi. I campioni sono testati su terreni di coltura contenente agar, preventivamente inoculati con microrganismi test a concentrazione nota. Sono ritenuti positivi quei campioni che presentano un alone di inibizione di crescita > 2 mm.

Per quanto attiene ai microrganismi utilizzati il metodo prevede l'utilizzo di *Bacillus cereus* K250, *Bacillus cereus* BCR50, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*. Inoltre, nell'ambito dello studio sono stati testati anche *Escherichia coli* e *Pseudomonas spp.* L'attività inibente dei campioni, oggetto di studio, è stata effettuata quindi verso i microrganismi sopra elencati che in generale possiamo classificare come appartenenti a: batteri Gram positivi (Bacilli e Micrococchi) e batteri Gram negativi (*Escherichia* e *Pseudomonas*).

I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di attività inibente nei confronti di *Bacillus cereus* K250 da parte dell'omogenato grezzo alla concentrazione di 1 µg/µl.



#### 4.4 Esperimenti di stimolazione immunitaria

Per valutare se in seguito a stimolazione immunitaria negli stessi individui, aumentasse sia in termini qualitativi (ovvero attività su ceppi diversi) che quantitativi (concentrazione) la produzione di sostanze con attività antibatterica si è proceduto alla messa a punto di un esperimento pilota. Sono stati così selezionati 10 individui per ciascun tempo di stimolazione. In ciascuno di questi, a ridosso del disco pedale sono stati iniettati 100  $\mu$ l di una soluzione contenente un pool di batteri Gram +/- (OD 0.7/ml). Il recovery è stato effettuato rispettivamente a 12h, 24h e 48h. Quindi in seguito al prelievo, gli organismi sono stati sciacquati con acqua distillata e separati in tentacoli e piede. Si è quindi proceduto ad effettuare l'omogenizzazione attraverso Turrax (Sigma-Aldrich) sia dei tentacoli che del piede, i quali sono stati risospesi in un definito volume di tampone (peso/volume) costituito da 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM NaCl. Una volta omogenati sono stati sottoposti a due cicli di centrifugazione a 10000 rpm per 20 min. Per 10 animali stimolati si sono ottenuti rispettivamente circa 300mg di proteine totali dai tentacoli per ciascun tempo di stimolazione e 200 mg dal disco pedale, i cui pattern proteici sono mostrati in figura 5.

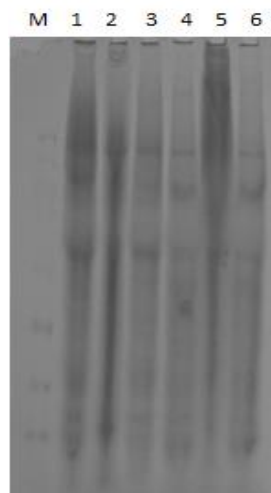


Fig. 5. SDS-PAGE al 15% delle frazioni grezze stimolate a 12, 24 e 48 ore. Line 1) Molecular Weight Marker, line 2) frazione del disco pedale a 12h di stimolazione (6 $\mu$ g); line 3) frazione tentacolare a 12h di stimolazione (6 $\mu$ g); line 4) frazione del disco pedale a 24h di stimolazione (6 $\mu$ g); line 5) frazione tentacolare a 24h di stimolazione (6 $\mu$ g); line 6) frazione del disco pedale a 48h di stimolazione (6 $\mu$ g); line 7) frazione tentacolare a 48h di stimolazione (6 $\mu$ g).

#### **4.5 Valutazione microbiologica degli estratti isolati**

Su tali campioni, ovvero tentacoli e disco pedale sono stati condotti saggi microbiologici finalizzati alla valutazione della MIC, che ha evidenziato un debole alone di inibizione su *E. coli* relativamente alla frazione tentacolare dopo 12 ore dalla stimolazione e una discreta attività inibente verso *M. luteus* sia per le frazioni tentacolari che quelle derivanti dal disco pedale (sempre dopo 12 ore dalla stimolazione).

#### **4.6 Validazione del protocollo**

A validare quanto ottenuto nell'esperimento pilota, si è condotta una stimolazione a 12 ore su 50 individui. In questo caso però i campioni di tentacolo e piede recuperati sono stati sospesi in un definito volume di tampone non contenente EDTA, ovvero in 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM NaCl. Dopo omogenizzazione tramite Turrax e due cicli di centrifugazione, si sono misurate le concentrazioni e valutato il contenuto proteico totale che è risultato essere 2,3g per i tentacoli e 3g per i piedi.

Dalle frazioni ottenute risultava confermata l'attività antimicrobica a carico delle suddette.

#### **5. Ringraziamenti**

Progetto: "Tecnologie e processi per il miglioramento della shelf-life dei prodotti del comparto agroalimentare attraverso l'uso di film edibili innovativi a base pectinica" ("PON FILM-EDIBILI", Cod. PON01\_02286) - CUP: B68F12000360007

## 6. Decreti e protocolli

- Decreto 10 marzo 1997 allegato IX GURI n.103 serie generale 6 maggio 1997
- AFFSA Star Protocol- screening test for antibiotic residues-LMV/UCM/PO5/11AN-9/2002.
- E. Parisi, G.M. Gula, V. Giaccone Antibiotici e chemioterapici nella pratica veterinaria SUMMA n.1 marzo 1986; 13-26
- L. Achene, A. Macrì- Metodo per la ricerca di sostanze inibenti per diffusione in agar – Istituto Superiore di Sanità.

## 7. Bibliografia

Chores O., Loya Y., Muller W.E.G., Wiedenmann J., Azem A. (2004) The mitochondrial 60-kDa heat shock protein in marine invertebrates: biochemical purification and molecular characterization. *Cell Stress & Chaperones*, 9 (1): 38–47.

Edwin, L., Cooper, E., Rinkevich, B., Uhlenbruck, G., Valembois, P. (1992) Invertebrate immunity: another viewpoint. *Scand. J. Immunol.*, 35:247–266.

Hancock, R. E. W., Sahl, H. G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.*, 24:1551–1557.

Hasegawa Y., Honma T., Nagai H., Ishida M., Nagashima Y., Shiomi K. (2006) Isolation and cDNA cloning of a potassium channel peptide toxin from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Toxicon* 48: 536–542

Honma T., Hasegawa Y., Ishida M., Nagai H., Nagashima Y., Shiomi K. (2005) Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata*. *Toxicon* 45: 33–41

Merle P.L., Sabourault C., Richier S., Allemand D., Furla P. (2007) Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic sea anemone. *Free Radical Biology & Medicine* 42: 236–246

Rinkevich, B. (1999) Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *J. Biotechnol.*, 70:133–153.