

Valutazione di effetti citotossici ed emolitici di peptidi ad attività antimicrobica su cellule umane mononucleate del sangue periferico (PBMC) e sulla linea cellulare di adenocarcinoma prostatico PC3

Bonura A.¹, Longo A.¹, Longo V.¹, Vlah S.¹, Masullo T.², Nicosia A.², Tagliavia M.², Salamone M.², Cuttitta A.², Colombo P.¹.

¹Istituto di Biomedicina e di Immunologia Molecolare (IBIM) “Alberto Monroy”

del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Via Ugo La Malfa 153, 90146 Palermo

Italia

² Istituto per l’Ambiente Marino Costiero UOS di Capo Granitola

del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Via Del Mare 3, 91021 Torretta Granitola, Campobello di Mazara (Tp)

Italia

Sommario

1. Introduzione.....	1
2. Peptidi antimicrobici.....	1
3. Cellule utilizzate per il saggio MTS	2
4. Saggio MTS per la valutazione della vitalità cellulare.....	3
5. Test di emolisi	6
6. Bibliografia.....	7

1. Introduzione

Un film edibile è un sottile strato di materiale commestibile, preformato o formato direttamente sull'alimento, usato come rivestimento o inserito tra i diversi componenti dell'alimento stesso [1]. Per le sue peculiari caratteristiche un film edibile è preparato con materiali commestibili e rappresenta una protezione per l'alimento dall'ambiente esterno. È dunque parte integrante dell'alimento, prolungandone la "shelf-life", ovvero il periodo di utilizzo in commercio del prodotto, dunque il tempo utile tra la data di confezionamento e di scadenza. Una maggiore "shelf-life" comporta molteplici vantaggi per tutti i settori coinvolti nella filiera alimentare: chi produce infatti può offrire ai distributori un prodotto con maggiori garanzie di qualità e conservazione, che distribuisce può allungare il periodo di esposizione negli scaffali e di stoccaggio nei magazzini, chi consuma ottiene un prodotto più sicuro e che può essere conservato più a lungo.

I film edibili inoltre sono dotati di proprietà peculiari, infatti conferiscono protezione agli alimenti, costituendo un'interfaccia tra prodotto e ambiente e rallentando il decadimento qualitativo; hanno una natura ecologica perchè non incidono sull'inquinamento ambientale essendo commestibili; sono funzionali, poichè oltre al ruolo di imballaggio, possono assumere funzione antimicrobica e funzionale.

2. Peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici sono peptidi ampiamente espressi negli organismi animali (vertebrati e invertebrati) e nelle piante. Questi composti sono espressi costitutivamente o rapidamente indotti in seguito ad uno stimolo biotico, a differenti livelli cellulari, per interagire direttamente con l'agente infettante e/o per modulare la risposta immunitaria contro i patogeni [2].

Tali peptidi sono oggi classificati in relazione alle loro caratteristiche biochimiche (carica netta) e/ o alle loro caratteristiche strutturali (composizione amminoacidica, struttura lineare o circolare). Nonostante la loro diversità, essi presentano la caratteristica comune di inibire la crescita di un largo spettro di microbi, quali Gram-positivi, Gram-negativi, funghi e in alcuni casi anche virus, tanto da far coniare il termine di "antibiotici naturali".

I peptidi antimicrobici, di natura animale o vegetale, non inducono nei microrganismi patogeni lo sviluppo di meccanismi di resistenza agli antibiotici; essi costituiscono quindi una valida alternativa agli antibiotici tradizionali attualmente in commercio.

Al fine di utilizzare molecole ad attività antimicrobica da aggiungere a film edibili, nel nostro report, sono stati presi in considerazione dei peptidi, già noti per la loro suddetta attività, isolati da fonti naturali. Uno di questi è Sc-1, la cui sequenza aminoacidica è ALYLAIKRR-NH₂: è un peptide costituito da 9 aa, sintetizzato insieme ad altri 4 (ALRLAIKRR-NH₂, ALLLAIKRR-NH₂, AWLLAIKRR-NH₂, AWLLAIKRR-NH₂), modificando un oligopeptide, anch'esso di 9 aa, AHCLAICRK-NH₂ (Ala22 ± Lys30-NH₂), amidato al dominio C-terminale, sintetizzato a partire da una defensina purificata e caratterizzata dalle larve di *Oryctes rhinoceros*, lo scarabeo rinoceronte che reca danno alle Palme da cocco [3]. L'oligopeptide AHCLAICRK-NH₂ è stato sintetizzato sulla base della sequenza aminoacidica dedotta, assunta come una sequenza del sito attivo, in analogia con la sequenza di una defensina isolata dalla larva del coleottero *Allomyrina dichotoma*; inoltre mostra attività antibatterica contro *S. aureus*, *S. aureus* resistente alla meticillina, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. La defensina Sc1 presenta la capacità di legare i lipidi di membrana di numerosi ceppi di *E. coli* e di *S. aureus*.

Un altro peptide studiato è stato il peptide sintetico RC-47, corrispondente alla defensina matura AMP1 (Antimicrobial Peptide 1) di *Vitis vinifera* [4]. AMP-1 presenta un'elevata omologia di sequenza con le defensine delle piante appartenenti al gruppo 3, caratterizzate da un "signal-peptide" in porzione N-terminale (1-30 aa) e dal motivo altamente conservato CX₅₋₁₀CX₄₋₆CX₃CX₉₋₁₅CX₅₋₁₂CXCX₃C [5].

Per saggiare la loro eventuale attività citotossica, si è deciso di sottoporre i peptidi sintetici a saggi di vitalità cellulare come MTS su PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) e sulla linea cellulare PC3 e test di emolisi.

3. Cellule utilizzate per il saggio MTS

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state purificate da campioni di sangue di diversi soggetti, tramite centrifugazione su gradiente di densità, utilizzando il FICOLL (densità 1,077 g/ml) (LYNPHOPREP Axis-Shield-Norway): in tal modo si sfrutta la diversa densità delle cellule del sangue, per separare i PBMC dalle altre componenti che si trovano nel campione.

Sono stati effettuati dei prelievi di sangue in eparina da n=3 soggetti. Per ogni campione è stata effettuata una diluizione 1:1 in terreno HBSS (Hank's balanced salt solution, GIBCO) a cui era stata precedentemente aggiunta una miscela di antibiotici (Penicillina 100U/ml,

Streptomicina solfato 100 µg/ml, INVITROGEN). I campioni di sangue così diluiti sono stati stratificati su un eguale volume di FICOLL e centrifugati a 2500 rpm, a 20°C, per 20 minuti, senza freno. Terminato questo passaggio è stato recuperato l'anello di PBMC; successivamente le cellule sono state sottoposte a tre lavaggi in HBSS e centrifugate a 1500 rpm per 15 minuti a 20°C. Il pellet ottenuto è stato risospeso in HBSS, e le cellule contate utilizzando la camera di Thoma. Le cellule sono state nuovamente centrifugate, e risospese in terreno RPMI 1640 (GIBCO) supplementato con 10% di siero bovino fetale (FBS, INVITROGEN), 1% antibiotico (Penicillina 100 U/ml, Streptomicina solfato 100 µg/ml, INVITROGEN), 1% di Aminoacidi Non Essenziali (AANE - EUROCLONE) e 1% Sodio-piruvato (1 mM EUROCLONE).

I PBMC sono stati piastrati ad una concentrazione di 1.5×10^5 cellule/100 µl in piastre da 96 wells per essere utilizzati nel saggio MTS.

La linea cellulare di adenocarcinoma prostatico PC-3 (NCI-PBCF-CRL1435 Prostate Adenocarcinoma - ATCC™) è stata mantenuta in terreno RPMI 1640 (INVITROGEN) supplementato con 10% di siero bovino fetale (FBS, INVITROGEN), 1% antibiotico (Penicillina 100 U/ml, Streptomicina solfato 100 µg/ml, INVITROGEN), 1% di Aminoacidi Non Essenziali (AANE - EUROCLONE) e 1% Sodio-piruvato (1 mM EUROCLONE), a 37°C in un'atmosfera di CO₂ al 5%. Raggiunta una confluenza dell'80%, le cellule sono state tripsinizzate con tripsina-EDTA (1X - LONZA), piastrate ad una concentrazione di 5×10^3 cellule/100 µl in piastre da 96 wells, per essere utilizzate nel saggio MTS; sono state così incubate a 37°C e al 5% di CO₂ "over night", al fine di consentirne l'adesione.

4. Saggio MTS per la valutazione della vitalità cellulare

La vitalità cellulare in vitro è stata determinata, in triplicato, mediante saggio MTS, utilizzando il kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), che contiene un nuovo composto del tetrazolio, ovvero il 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS) e il reagente PES (phenazine ethosulfate) che si combina con l'MTS per formare una soluzione stabile. Questo saggio sfrutta un metodo colorimetrico al fine di determinare il numero di cellule vitali trattate con un'eventuale sostanza citotossica. Il composto MTS viene ridotto dalle cellule nel prodotto colorato formazano che è solubile nel mezzo di coltura, in una reazione catalizzata delle deidrogenasi mitocondriali delle

cellule metabolicamente attive. La quantità di formazano prodotta, rilevata a 490 nm, è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.

A tale scopo le cellule PC-3 e i PBMC, alle condizioni suddette, sono stati trattati con concentrazioni crescenti (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) dei peptidi RC-47 ed SC-1 e incubati a 37°C e al 5% di CO₂ per 24 e 48 h. Sono stati quindi aggiunti 20 µl della soluzione di MTS, e le cellule sono state nuovamente incubate a 37°C e al 5% di CO₂, per un periodo di tempo compreso fra le 2 h e le 4 h. La lettura è stata effettuata a 490 nm tramite il lettore iMark Plate Reader-BioRad. Il grado di vitalità cellulare è stato determinato attraverso la seguente formula:

$$\% \text{ vitalità} = [\text{OD (490 nm) composto testato} / \text{OD (490 nm) controllo negativo}] \times 100$$

Per entrambi i tipi cellulari, i dati hanno mostrato che le cellule non subiscono un decremento significativo della loro vitalità in seguito al trattamento con concentrazioni crescenti dei peptidi RC-47 e Sc-1 sia a 24 che a 48 ore di trattamento (fig. 1-4).

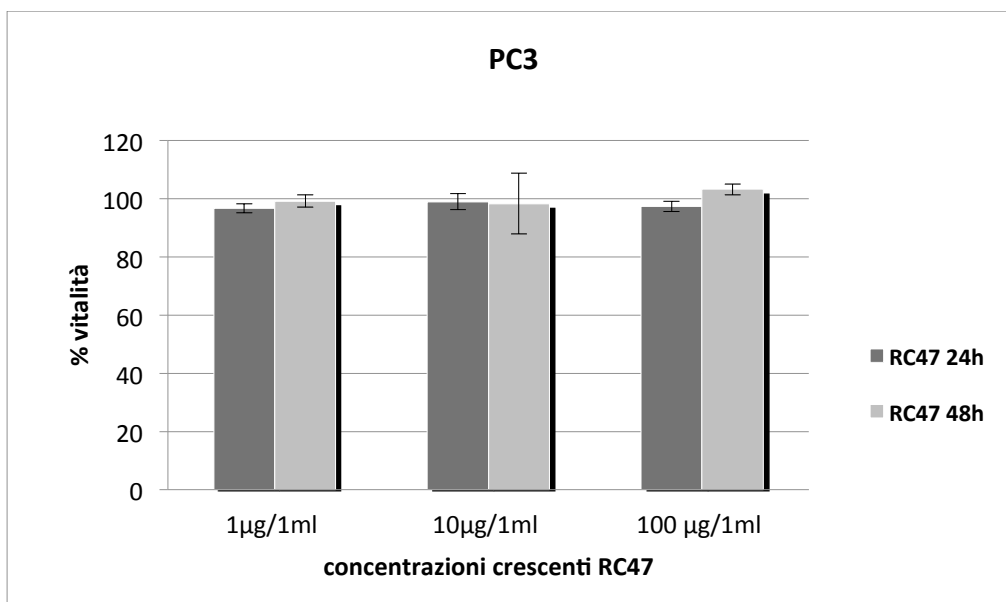


Fig.1: effetto del trattamento con il peptide RC-47 sulla vitalità delle cellule PC3.

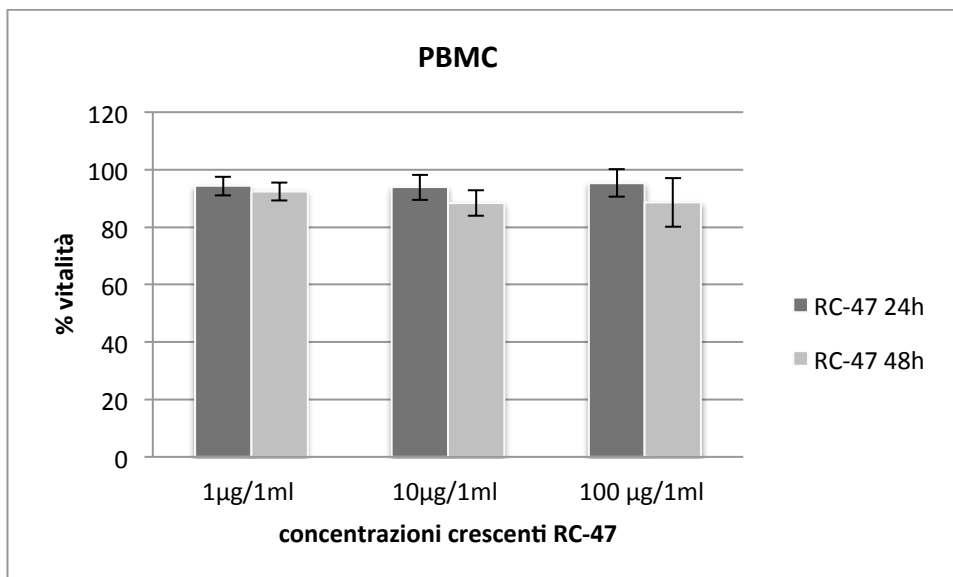


Fig.2: effetto del trattamento con il peptide RC-47 sulla vitalità dei PBMC.

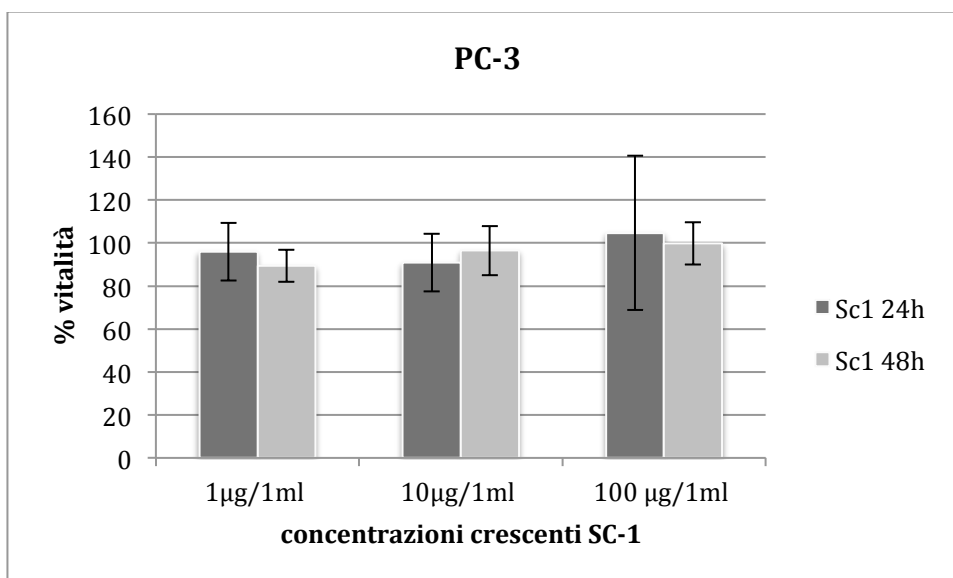


Fig.3: effetto del trattamento con il peptide SC-1 sulla vitalità delle cellule PC-3.

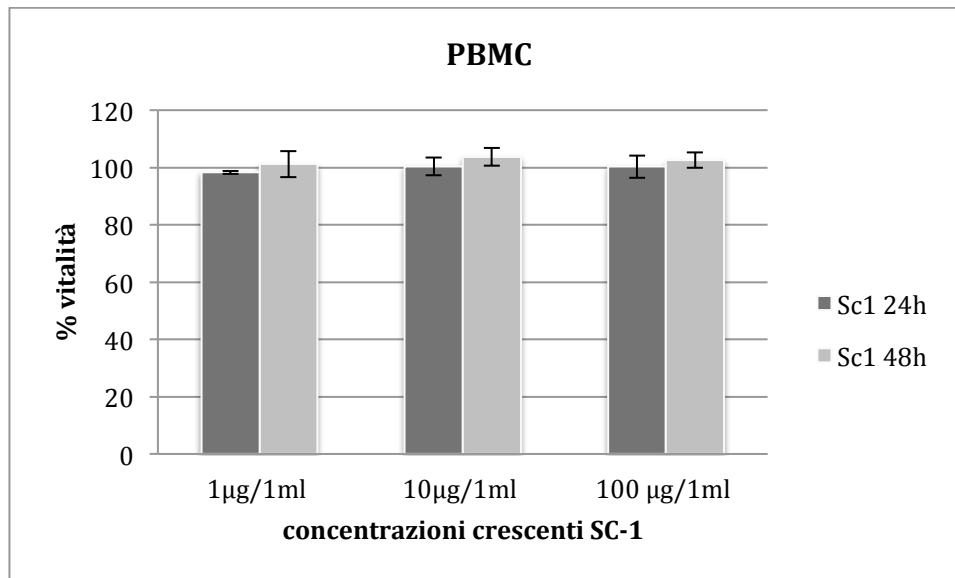


Fig.4: effetto del trattamento con il peptide SC-1 sulla vitalità dei PBMC

5. Test di emolisi

Per il test di emolisi è stato utilizzato sangue in eparina prelevato da un donatore. È stata preparata una soluzione all'8% di eritrociti umani. La concentrazione degli eritrociti è stata controllata leggendo la densità ottica di un emolisato della sospensione cellulare così costituita: 0,5 ml di sangue diluito + 7 ml di acqua distillata. Il valore determinato allo spettrofotometro a 541 nm deve essere pari a 0,7 O.D. Le emazie sono state incubate in duplicato, a 37°C per 30 minuti, con concentrazioni crescenti dei peptidi RC-47 ed SC-1 (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml); come controllo negativo è stato utilizzato PBS 1X e, come controllo positivo, una soluzione 0,1% di Triton X100. La lettura dei campioni è stata effettuata a 415 nm.

La percentuale di emolisi è stata determinata attraverso la seguente formula:

$$\% \text{ emolisi} = [\text{OD (415 nm) composto testato} / \text{OD (415nm) controllo positivo}] \times 10$$

Dall'analisi dei dati non è stata osservata alcuna attività emolitica dei peptidi, infatti i peptidi hanno un'attività emolitica paragonabile a quella del controllo negativo.

6. Bibliografia

- [1] Krochta J.M. and De Mulder-Johnston C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. Vol. 51, N 2, February 1997 - Food Technology.
- [2] Otero-Gonzalez, A. J., Magalhães, B. S., Garcia-Villarino, M., Lo'pez-Abarrategui, C., Sousa, D. A., Dias, S. C., Franco, O. L. "Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control". (2010) *FASEB J.* 24, 1320–1334.
- [3] Ishibashi J., Saido-Sakanaka H., Yang J., Sagisaka A., Yamakawa M. "Purification, cDNA cloning and modification of a defensin from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*". *Eur. J. Biochem.*, 266 (1999) 616-623.
- [4] De Beer A. and Vivier M.A., "Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity". *BMC Plant Biol.* 2008 Jul 8;8:75. doi: 10.1186/1471-2229-8-75.
- [5] Giacomelli L, Nanni V, Lenzi L, Zhuang J, Dalla Serra M, Banfield MJ, Town CD, Silverstein KA, Baraldi E, Moser C. "Identification and characterization of the defensin-like gene family of grapevine". *Mol Plant Microbe Interact.* 2012 Aug;25(8):1118-31. doi: 10.1094/MPMI-12-11-0323.