



Università degli Studi di Palermo

Facoltà di Scienze MM.FF.NN.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche

Chimiche e Farmaceutiche

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE XXIV CICLO (SSD: BIO/05)

Relazione finale di terzo anno

*Ulteriori evidenze di attività antimicrobiche in
invertebrati marini*

Coordinatore:

Ch.^{mo} Prof. Nicolò Parrinello

Tutor:

Ch.^{mo} Prof. Nicolò Parrinello

Dottoranda:

Maria Alessandra Damiano

Co-tutor

Centre National de la Recherche

Scientifique-CNRS-Montpellier

Responsabile scientifico:

Dott.ssa Alessandra Occhialini

Indice

Abstract	4
CAPITOLO 1: Introduzione.....	5
1. INTRODUZIONE.....	6
1.1 ANTIBIOTICI:ATTIVITA' E RESISTENZA.....	8
1.1.1 Possibile impiego dei peptidi antimicrobici come agenti terapeutici.....	9
1.2 L'IMMUNITA' NEGLI INVERTEBRATI	14
1.2.1 Peptidi antimicrobici.....	23
1.2.2 Identificazione di peptidi antimicrobici in invertebrati marini.....	31
1.2.3 Caratteristiche funzionali e meccanismi d'azione nell'immunità innata	33
1.3 ATTIVITA' ANTIMICROBICA DI ESTRATTI CRUDI DI INVERTEBRATI MARINI	41
CAPITOLO 2: Attività antimicrobica di <i>Ciona intestinalis</i> , <i>Cancer pagurus</i> , <i>Procambarus clarkii</i> , <i>Actinia equina</i> e <i>Pelagia noctiluca</i>	45
2.1 OBIETTIVO	46
2.2 PEPTIDI DI <i>Ciona intestinalis</i>	47
2.3 ESTRATTI ACIDI DI <i>Cancer pagurus</i> e <i>Procambarus clarkii</i>	48
2.4 ESTRATTI ACIDI DI <i>Actinia equina</i> e <i>Pelagia noctiluca</i>	49
2.5 TARGET UTILIZZATI NEI SAGGI ANTIMICROBICI.....	49
2.6 Funghi unicellulari	57
CAPITOLO 3:MATERIALI E METODI.....	59
3.1 DEFINIZIONI GENERALI	60
3.2.1 Minima Concentrazione Inibente (CMI).....	60
3.2.2 Concentrazione Minima Battericida (CMB)	60
3.2.3 Batteriostasi e Battericidia.....	60
3.2.4 Antibiogramma	61
3.2.5 Citotossicità	61
3.3.1 Preparazione delle molecole antimicrobiche e degli estratti	63
3.3.2 Preparazione degli antibiotici di controllo.....	68
3.3.3 Valutazione delle concentrazioni delle molecole analizzate	69
3.3.4 Determinazione della CMI per diluzione	70
3.3.5 Determinazione della CMB	74

3.3.6 Analisi statistica	75
3.3.7 Saggio di citotossicità dei campioni testati verso la linea cellulare monocitaria murina: J774-A1	75
CAPITOLO 4: Risultati	76
4.2 Risultati sull'attività antimicrobiche (CMI e CMB) dei campioni estratti da <i>Cancer pagurus</i>	84
4.3 Risultati sull'attività antimicrobica (CMI e CMB) dei campioni estratti da <i>Procambarus clarkii</i>	87
4.5 Risultati sull'attività antimicrobiche (CMI e CMB) dei campioni estratti da <i>Pelagia noctiluca</i>	93
4.6 Risultati: ampicillina e polymixina B, antibiotici controllo utilizzati in parallelo ai test di attività antimicrobica	96
4.7 DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	102
Ringraziamenti.....	109
Bibliografia.....	110

Abstract

The antimicrobial molecules are an abundant group of molecules that are amply distributed in nature, from plants and insects to vertebrate animals, including humans. They are an essential component of the innate immune system for host defence against pathogenic agents of different types. They are often the products of individual genes and circulating cells. In this thesis, based on a bioinformatic analysis, we identified three peptides, members to the family of cathelicidins and to the class of peptides rich in proline (PR-AMPs), that may be generally be considered as the first effectors of the interior defense, acting as natural antibiotics (Scocchi *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2004). We investigate, also, about the possibility of use four extracts from marine invertebrates as possible natural antibiotics. Their small size makes them able to spread rapidly at sites of infection, they are also cheap to synthesize, relatively resistant to denaturation and are less likely to induce resistance. The objective of this doctoral thesis was to deepen the knowledge on the ability of peptides and molecules with antimicrobial activity, initially identified or isolated from different marine invertebrates. The studied peptides show a broad spectrum of activity against a variety of microorganisms such as Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi. Furthermore, it was interesting to determine the cytotoxic activity of peptides and antimicrobial molecules *versus* the murine monocytic cell line *J774-A1* coming from sarcoma of Balb / c mice. The surprising results, especially on the analysis of peptides, make them interesting to understand the mechanisms of innate immunity evolution and trace an original point of view on a new frontier for the control of microbial infections that could, therefore, be a good alternative for their use in biotechnology and in the pharmaceutical field (Schnapp *et al.*, 1996).

CAPITOLO 1: Introduzione

1. INTRODUZIONE

Nel 1800, i primi studi condotti sui metaboliti secondari ottenuti da organismi vegetali hanno dimostrato che la flora terrestre è una ricca risorsa di farmaci (Sondheimer E. and Somojai J. B., 1970), utili nel trattamento di malattie letali come il cancro (taxolo) e le infezioni microbiche (penicilline). Tuttavia, a causa della resistenza sviluppata da alcuni agenti patogeni ai trattamenti farmacologici e degli effetti collaterali delle chemioterapie tradizionali, i ricercatori hanno rapidamente rivolto la loro attenzione a nuove risorse di composti biologicamente attivi quali organismi animali e vegetali marini (Frommann S. and Jas G., 2002; Cragg G. M. and Newman D. J., 2000). Da questi presupposti è chiaro come l'interesse di diverse discipline si sia orientato verso milioni di specie animali e vegetali che popolano l'ambiente marino, costituendo, di fatto, una nuova frontiera di ricerca. Lo sviluppo di nuove tecniche subacquee ha consentito a partire dagli anni sessanta un rapido accesso sia agli organismi che vivono in superficie che a quelli che popolano le acque profonde, rendendoli disponibili alle analisi chimiche. Gli studi condotti hanno già largamente provato che l'habitat marino è una fonte straordinaria di nuovi metaboliti peptidici bioattivi. Molti composti di origine marina sono strutturalmente complessi, caratterizzati da funzionalità uniche e da spiccate attività biologiche. Ciò è ascrivibile alle peculiarità dell'habitat che li ospita, contraddistinto dalla mancanza di luce, dall'alta pressione e concentrazione ionica, dalla variabilità della temperatura, dalla scarsa disponibilità di cibo, ovvero dalla ristrettezza degli spazi vitali. La coesistenza di molti organismi viventi in un territorio limitato, li rende particolarmente competitivi e complessi, indirizzandoli allo sviluppo di adattamenti e comportamenti atti alla salvaguardia della specie, quali: strategie di difesa dalla predazione, dalla proliferazione di specie competitive (Williams D.H. *et al.*, 1989).

Le strategie chimiche di una specie si avvalgono del ricco bagaglio di molecole del suo “metabolismo secondario” comprendente composti come terpeni, alcaloidi, polichetidi, **peptidi**, derivati dell’acido shikimico, glicosidi, steroidi e metaboliti originati da diverse vie biogenetiche (Simmons T. L. *et al.*, 2005). Le condizioni così singolari e distinte degli oceani, rendono varia la chimica dei prodotti ottenuti dagli organismi marini. Inoltre, mentre le risorse terrestri sono considerate abbondantemente esplorate, dal punto di vista farmaceutico e biochimico, l’ambiente marino è un serbatoio di dati pressoché inesplorato, meno dell’1% delle specie marine sono state analizzate e valutate per il loro potenziale utilizzo farmacologico (Capon R. J., 2001; Jaspars M., 1999; Wallace R. W., 1997; Cragg. G. M. *et al.*, 1997).

L’attività di ricerca svolta durante il mio triennio di dottorato si inserisce in un progetto che ha lo scopo di riunire il lavoro scientifico realizzato in due distinti enti di ricerca: l’*Università degli Studi di Palermo Facoltà di Scienze MM.FF.NN. “Dipartimento di Biologia Ambientale e Biodiversità”*, Sezione di Biologia Animale e Antropologia biologica "G. Reverberi"; Coordinatore scientifico Prof.re Nicolò Parrinello e il *Centre National de la Recherche Scientifique-CNRS-Montpellier* (Francia), *Centre d’études d’agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé*; Equipe «*Pathogénie Bactérienne et Stratégies Anti-infectieuses*» sotto la responsabilità scientifica della Dott.ssa Alessandra Occhialini. Le esperienze microbiologiche sono realizzate nel laboratorio P2 e P3 del *Centre d’études d’agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé*, Montpellier.

Il suddetto lavoro è volto ad approfondire le conoscenze, *in vitro*, sulle proprietà antimicrobiche di peptidi antimicrobici (AMP 12-50 ammino acidi) inizialmente isolati dal modello di studio *Ciona intestinalis* ed opportunamente disegnati e sintetizzati. Inoltre, si è voluto indagare sulle eventuali attività inibitorie di campioni

estratti da quattro specie di invertebrati marini: *Cancer pagurus*, *Procambarus clarkii*, *Actina equina* e *Pelagia noctiluca*.

1.1 ANTIBIOTICI: ATTIVITA' E RESISTENZA

Si definisce antibiotico una sostanza di origine naturale prodotta da un microorganismo, capace di ucciderne un altro (IUPAC 1997). In particolare, gli antibiotici sono prodotti chimici di origine biologica o sintetica (chemioterapico) in grado di inibire la crescita batterica (batteriostatico) o di uccidere direttamente il microorganismo (azione battericida).

La maggior parte degli antibiotici di origine naturale è costituita da metaboliti secondari prodotti da specie microbiche (batteri o funghi microscopici) il cui ruolo è la difesa da altri microrganismi presenti nello stesso microambiente.

Il principale problema legato alla categoria dei farmaci ad attività antimicrobica, che impone la continua ricerca di nuovi composti attivi, è il manifestarsi di fenomeni di resistenza. Analizzando le cause che inducono i batteri patogeni a sviluppare resistenza è possibile identificare i processi più importanti:

1. l'antibiotico non raggiunge il suo bersaglio;
2. l'antibiotico viene disattivato;
3. il bersaglio risulta alterato e non interagisce più con l'antibiotico.

In dettaglio, dal momento in cui un antibiotico, dimostratosi efficace nelle varie fasi della sperimentazione clinica, diventa di comune impiego terapeutico, è inevitabile che la sua efficacia si riduca progressivamente. Per la penicillina, i primi fenomeni di resistenza comparvero dopo soli due anni dalla sua introduzione in terapia a metà degli anni '40, come prevedibile quando il meccanismo di resistenza coinvolge un unico determinante genico. Al contrario, la resistenza alla vancomicina iniziò a diffondersi drammaticamente dopo circa 30 anni dalla sua introduzione in terapia,

periodo di tempo necessario ai batteri per diventare resistenti accumulando cinque mutazioni genetiche. I ceppi resistenti iniziano a prevalere sui ceppi parentali, sensibili ad un certo antibiotico, quando la mutazione presente nel genoma consente loro di sopravvivere al trattamento antimicrobico. Il ceppo resistente diventa così la variante dominante nella popolazione e l'antibiotico in questione perde rilevanza terapeutica. Fenomeni di questo tipo sono praticamente garantiti, se un antibiotico viene somministrato a dosi sottoterapeutiche.

Attualmente si è alla ricerca di molecole con attività antimicrobica in grado di eludere questi meccanismi e per questo i peptidi antimicrobici si sono rivelati interessanti. Essi non consentono la selezione di nuovi mutanti resistenti e sono attivi anche contro ceppi batterici resistenti (Thevissen *et al.*, 2000; Ghiselli *et al.*, 2002). La loro capacità è dovuta al fatto che hanno come bersaglio la membrana cellulare batterica, e questa struttura è altamente conservata. Una mutazione genetica in grado di ridisegnarne la composizione lipidica sarebbe una soluzione altamente costosa dal punto di vista evolutivo per la cellula batterica, e quindi di difficile realizzazione (Zasloff, 2002). Lo studio di peptidi antimicrobici presenti in natura, isolati da organismi viventi di origine sia animale che vegetale, rappresenta una nuova strategia contro la minaccia microbica.

1.1.1 Possibile impiego dei peptidi antimicrobici come agenti terapeutici

Nel 1928, Alexander Fleming scoprì la penicillina, il primo antibiotico naturale. A metà degli anni '30, Prontosil, il primo antibiotico commerciale, è diventato disponibile. Dopo la seconda guerra mondiale, le compagnie farmaceutiche hanno condotto ricerche per trovare nuovi antibiotici e fino agli anni '60 sono state scoperte molte nuove classi; la chemioterapia antibiotica era allora nel suo periodo d'oro. Il loro uso era diffuso per un'ampia varietà di patologie causate da batteri, migliorando

notevolmente la qualità della vita. A partire dagli anni '80, è stato osservato un rallentamento della loro efficacia, in quanto è stata rilevata una resistenza a quasi tutti gli antibiotici in uso clinico. In questi ultimi 40 anni, tre nuove classi di antibiotici, attivi solo verso batteri Gram negativi, sono entrati nel mercato. Oggi, più batteri patogeni mostrano un'elevata resistenza a diversi antibiotici, fino al punto di diventare un problema globale e crescente di salute pubblica.

Meccanismi d'azione e resistenza agli antibiotici

Gli antibiotici si distinguono secondo il target batterico sul quale agiscono (Fig. 1):

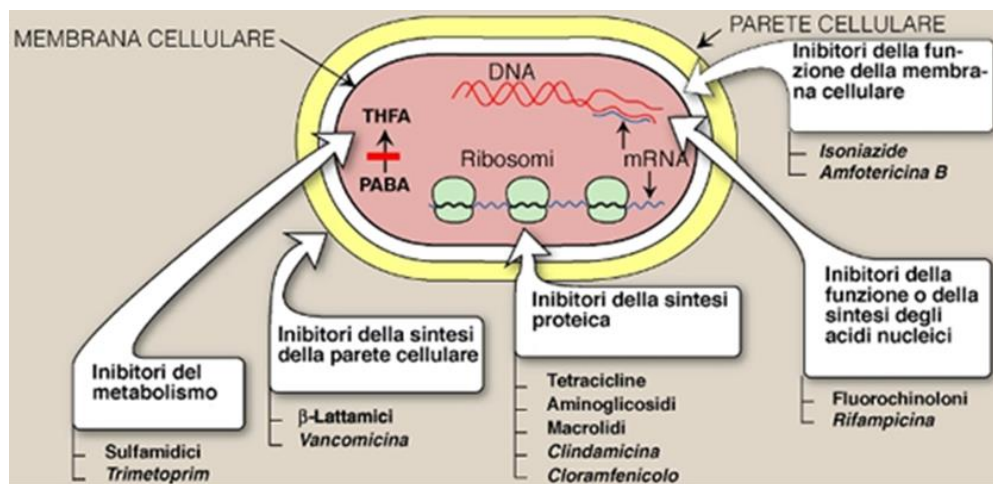


Fig.1. Riproduzione del Meccanismo d'azione degli antibiotici

- a. parete cellulare: β -lattamici (penicilline), cefalosporine, bacitracina, vancomicina...;
- b. membrana plasmatica: polimixine...;
- c. sintesi degli acidi nucleici (DNA o RNA): chinoloni, rifampicina, nitroimidazoli...;
- d. sintesi proteica: aminoglicosidi, tetraciline, cloramfenicolo, macrolidi, clindamicina...;
- e. metabolismo energetico: sulfamidici, isoniazide...

I microrganismi possono principalmente impiegare tre strategie per sviluppare fenomeni di resistenza agli antibiotici (Fig. 2):

1. Produzione di trasportatori di membrana, che determinano l'eliminazione dell'antibiotico dalla cellula. Questi trasportatori, chiamati pompe di efflusso, consentono all'antibiotico di uscire dalla cellula ad una velocità maggiore di quella alla quale esso può diffondere al suo interno. In questo modo la concentrazione di antibiotico rimane sempre inferiore a quella necessaria per avere un effetto antimicrobico. I trasportatori di membrana, impiegati a questo scopo, sono pompe proteiche, che i microrganismi utilizzano per trasportare molecole dall'esterno all'interno della cellula o viceversa.

2. Distorsione o distruzione della porzione attiva dell'antibiotico. Classico esempio di questo secondo meccanismo di resistenza agli antibiotici è l'idrolisi dell'anello β -lattamico delle penicilline e delle cefalosporine da parte dell'enzima β -lattamasi di batteri resistenti (Philippon *et al.*, 1989). In questo modo viene impedita l'interazione degli antibiotici β -lattamici con le *penicillin binding proteins* (PBP), loro targets nei batteri sensibili. Un altro esempio è fornito dagli antibiotici aminoglicosidici, che possono subire modificazioni covalenti (N-acetilazione, O-fosforilazione, O-adenilazione) a livello di alcuni gruppi funzionali della molecola. Gli antibiotici, così modificati dai batteri resistenti, legano l'RNA con bassa affinità, con conseguente minore probabilità di interrompere la sintesi proteica e di determinare la morte del microrganismo (Shaw, 1993).

3. Modificazione della struttura del bersaglio cellulare degli antibiotici. E' questo il meccanismo che, insieme ai trasportatori proteici di membrana, determina la resistenza nei confronti dell'eritromicina. Nei batteri resistenti, la metiltransferasi Erm (Bussiere *et al.*, 1998) metila residui di adenina nella loop della peptidil-

transferasi del componente 23S dell'RNA del ribosoma impedendo il legame al ribosoma e quindi l'attività inibitrice dell'antibiotico.

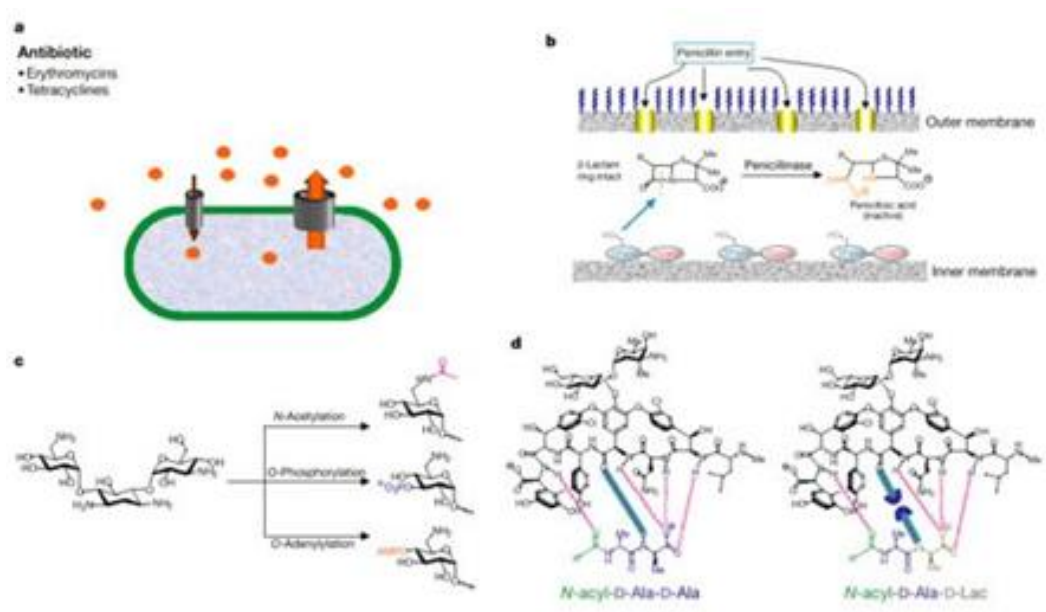


Fig. 2. Principali meccanismi di resistenza sviluppati dai microrganismi nei confronti degli antibiotici tradizionali. a : Per la presenza di pompe di membrana, l'antibiotico viene eliminato dalla cellula prima che sia raggiunta una concentrazione efficace. b :Le b -lattamasi idrolizzano l'anello lattamico di penicilline e cefalosporine, rendendole incapaci di interagire con i loro targets. c : Modificazioni covalenti a carico della kanamicina ne riducono la possibilità di interazione con il ribosoma. d : La sostituzione del dimero DAla- D-Ala del peptidoglicano con il dimero D-Ala-D-Lac riduce l'affinità di legame della vancomicina per il suo target di 1000 volte.

4. Sostituzione del bersaglio dell'antibiotico con una molecola che svolge le medesime funzioni ma con cui l'antibiotico non interagisce.

La diffusione di microorganismi patogeni che hanno sviluppato e sviluppano resistenza a farmaci convenzionali, sta diventando un'emergenza di salute pubblica.

Trovare alternative alla tradizionale chemioterapia antibiotica è fondamentale al fine di bypassare il fenomeno della resistenza batterica ed è stato recentemente evidenziato dal "Centro europeo di prevenzione e controllo delle malattie" - ECDC /

Agenzia europea per i medicinali - EMEA. Le prime osservazioni sulle attività antimicrobiche sono state trovate nelle secrezioni dell'uomo. Da allora, numerose sostanze antimicrobiche sono state isolate da una vasta gamma di organismi, alcuni dei quali mostrano una selettività verso entrambi i batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

Tra tutti gli organismi multicellulari che occupano ambienti ricchi di microbi, gli invertebrati e i vertebrati inferiori evidenziano un considerevole successo nell'eliminare infezioni primarie. Questo perché possiedono potenti peptidi antimicrobici come parte attiva del loro sistema immunitario. Il principale requisito dei peptidi antimicrobici è che sono piccole molecole sintetizzabili in poche ore, a differenza dei componenti della risposta immunitaria adattativa: gli anticorpi. Inoltre, i peptidi possono eliminare due o più patogeni contemporaneamente senza richiedere lo specifico riconoscimento di ognuno (Boman, 1995). In seguito allo sviluppo di ceppi batterici antibiotico-resistenti e per la ridotta disponibilità di antibiotici efficaci, c'è una crescente necessità di identificare peptidi antimicrobici naturali da impiegare per lo sviluppo di terapie alternative (Patrzykat & Douglas, 2003). Diverse caratteristiche dei peptidi antimicrobici li rendono particolarmente interessanti come potenziali strumenti terapeutici:

- Manifestano sinergie con il sistema immunitario acquisito (Tossi *et al.*, 2002);
- Dimostrano ampio spettro di attività contro virus, batteri, funghi e protozoi;
- Uccidono rapidamente (99,9% dei batteri trattati in 20 minuti) (Pierce *et al.*, 1994)
- Sono efficaci contro famiglie di batteri resistenti agli antibiotici;
- Manifestano sinergie con gli antibiotici convenzionali (Hancock & Diamond, 2000; Yan & Hancock, 2001).

Di conseguenza, la capacità di questi composti naturali nell'interazione con i batteri solleva un interesse per le promettenti applicazioni farmacologiche e terapeutiche, in alternativa agli antibiotici.

1.2 L'IMMUNITA' NEGLI INVERTEBRATI

Il sistema immunitario si è evoluto sotto la pressione selettiva imposta da microrganismi invasori. Di conseguenza, tutti gli organismi multicellulari hanno sviluppato vari meccanismi di difesa capaci di essere attivati in seguito ad infezioni, per proteggere l'organismo ospite, distruggendo gli invasori e neutralizzando i loro fattori di virulenza. Questo filogeneticamente antico meccanismo di difesa, noto anche come sistema immunitario innato, usa recettori per il riconoscimento dei patogeni. Questa caratteristica distingue il sistema immunitario innato dall'altra componente dell'immunità, il sistema immunitario adattativo, che si trova solo nei vertebrati (Medzhitov R. and Janeway C.A., 1997).

I primi studi sui meccanismi di difesa degli invertebrati portavano a ritenere che questi animali non possedessero un sistema immunitario a causa della mancanza di immunoglobuline. Tuttavia, in seguito, è stato dimostrato come gli invertebrati nonostante la mancanza dell'immunità acquisita riescono a difendersi nei confronti di invasioni fungine, batteriche, virali e sono in grado di riparare i danni tissutali, mediante un sistema di riconoscimento innato (Roitt, 1994) che utilizza dei recettori in grado di identificare fattori allogenici e xenogenici (Rinkevich B., 1999). Dunque, tutti i metazoi, dal più semplice al più complesso, sono capaci di riconoscere il *self* dal *non self* (Du Pasquier, 2000). Gli invertebrati, per merito della loro semplice struttura e della strategica posizione filogenetica di alcuni di essi, *in primis* i tunicati, rappresentano un modello fondamentale per individuare fasi e processi

nell'evoluzione del sistema immunitario (Parrinello *et al.*, 1977, 1990; Parrinello, 2009).

Nei vertebrati la risposta immunitaria viene distinta in: immunità innata o naturale ed immunità specifica o di tipo adattativo.

Il sistema immunitario adattativo si basa sull'espressione di geni che attivano la ricombinazione (Recombination Activating Genes- RAG), mediante un meccanismo di riarrangiamento somatico durante l'ontogenesi di ciascun organismo, di molecole di riconoscimento come: le immunoglobuline (Ig), i recettori dei linfociti T (TCR) e gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (antigeni - MHC). Questi meccanismi generano un repertorio eterogeneo di recettori per l'antigene con specificità casuale, che sono distribuiti su due tipi di linfociti clonali: T e B. Il recettore del linfocita B è un prototipo degli anticorpi, e il TCR sul linfocita T è responsabile del riconoscimento dell'antigene legato al complesso maggiore di istocompatibilità - MHC (Kasahara *et al.*, 2004). Di conseguenza, la specificità dei recettori espressi su ciascun linfocita non è predeterminata. Tuttavia, l'induzione di una risposta immunitaria è appropriata solo se l'antigene riconosciuto è derivato da, o appartiene, ad un agente patogeno. L'attivazione dei linfociti specifici per gli antigeni *self*, o antigeni ambientali, può provocare rispettivamente malattie autoimmuni e reazioni deleterie di ipersensibilità. Inoltre, la difesa da diversi gruppi di agenti patogeni può richiedere l'induzione di differenti tipi di risposte effettrici. L'attivazione di una risposta effettrice inappropriata che non garantisce una protezione contro il patogeno determina spesso varie patologie immunitarie. Pertanto, la risposta immunitaria adattativa richiede segnali che forniscono informazioni sull'origine dell'antigene e il tipo di risposta indotta. Nel corso degli ultimi anni è stato dimostrato che questi segnali vengono forniti dal sistema

immunitario innato (Hoffman , 1999; Fearon e Locksley , 1996; Medzhitov e Janeway , 1997). La comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della generazione di questi segnali sarebbe fondamentale per lo sviluppo di nuovi approcci nell'immunoterapia per la realizzazione di vaccini.

Il vantaggio selettivo imposto dal riconoscimento immunitario sul genoma dell'ospite implica di solito uno svantaggio selettivo verso il genoma del patogeno. Questo conflitto di interessi dirige l'evoluzione dell'immunità innata verso il riconoscimento dei componenti molecolari degli agenti infettivi. Strutture molecolari che sono essenziali per la sopravvivenza dei microbi non sono soggetti a variazioni nel senso che mutazioni in queste strutture sono letali per i microbi stessi. La conservazione di tali strutture molecolari implica che essi siano condivisi da grandi gruppi di agenti patogeni (Medzhitov and Charles A. Janeway, 1997). Ad esempio, i glicolipidi dei micobatteri, i mannani dei lieviti, i β -1,3 glucani dei funghi, l'RNA a doppia elica dei virus e la struttura generale del lipopolisaccaride (LPS) dei gram negativi sono motivi molecolari condivisi. Un recettore per il lipide A del lipopolisaccaride sarebbe quindi in grado di riconoscere qualsiasi batterio gram negativo. Gli obiettivi del riconoscimento rappresentano modelli molecolari, chiamati PAMPs – sistemi molecolari patogeno-associati (Hoffman , 1999). Gli organismi hanno sviluppato una serie di recettori che possono specificatamente riconoscere i PAMPs e sono definiti recettori di riconoscimento del sistema immunitario innato - PRR. Questa strategia evolutiva dell'ospite impedisce la generazione di mutanti microbici e consente ad un certo numero di recettori di riconoscere una grande varietà di strutture molecolari associati ai patogeni. Inoltre, i PRR sono in grado di allertare l'organismo alla presenza di agenti patogeni, stimolando l'attivazione di diversi segnali endogeni, quali citochine infiammatorie e chemiochine. Tale meccanismo è consentito

dall'espressione delle molecole del PRR sulle cellule effettrici del sistema immunitario innato, incluse le cellule che funzionano come cellule presentanti l'antigene - APC nell'immunità di tipo adattativo, e anche sulle cellule che incontrano per prime i patogeni durante l'infezione, come quelle epitaliali. L'evoluzione del sistema immunitario adattativo ha consentito ai segnali indotti dai recettori PRRs di assumere nuove competenze come il controllo dell'attivazione e differenziazione dei linfociti che portano recettori antigenici clonali specifici (Lemaitre *et al.*, 1997). Un esempio è la conservazione del Toll/NF κ B sistema di difesa dell'ospite rintracciabile in vertebrati ed invertebrati. Nell'adulto di *Drosophila*, il sistema Toll è stato dimostrato indurre peptidi antifungini ed antibatterici al momento dell'infezione mentre nei mammiferi vengono attivate citochine e molecole co-stimolatorie necessarie per l'attivazione della risposta immunitaria adattativa (Fig. 3). Un percorso omologo è presente nel sistema di difesa delle piante, suggerendo un'antica origine dell'immunità non clonale (Hammond-Kosack and Jones, 1997).

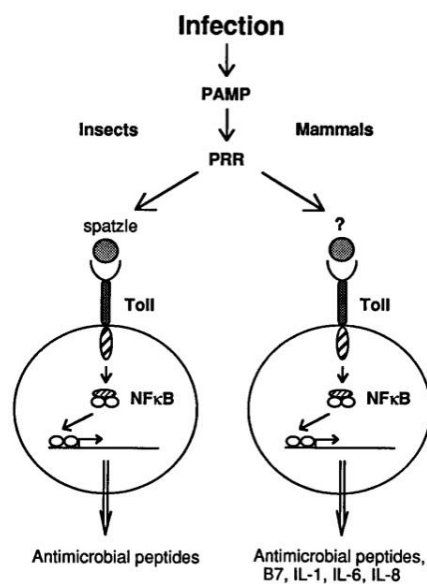


Fig. 3 Antico sistema di riconoscimento dell'ospite (Medzhitov and Janeway 1997)

Il sistema immunitario innato, a differenza di quello specifico, manca di una memoria immunologica basata sulla ricombinazione somatica, e fornisce una risposta più rapida ed efficace nel caso in cui l'organismo venga nuovamente a contatto con lo stesso antigene. Costituisce, infatti, la prima linea di difesa contro batteri, funghi e virus patogeni e si manifesta ad opera di cellule e fattori già presenti nei tessuti (Hoebe *et al.*, 2004). Tale sistema ha evoluto una modalità unica per rispondere agli antigeni di superficie microbici come i lipopolisaccaridi LPS, acidi lipoteicoici, lipoproteine, peptidoglicano (PGN) e (1→3) β-D-glucano (Begum *et al.*, 2000). Come detto, visto che sia i vertebrati che gli invertebrati rispondono entrambi a questi antigeni, è probabile che questo sistema di riconoscimento di tali epitopi sia emerso in una fase precoce nell'evoluzione degli animali (Medzhitov and Janeway, 2000; Aderem and Ulevitch, 2000). Inoltre, un ruolo fondamentale nel sistema immunitario innato è svolto da fattori pleiotropici e multifunzionali, le citochine proinfiammatorie (fattore di necrosi tumorale TNF, interleuchine IL1 e IL6) coinvolte nella proliferazione cellulare, differenziamento, apoptosi e nella stimolazione della sintesi di collagene nella guarigione delle ferite e riparazione dei tessuti. Negli invertebrati sono stati ritrovate molecole umorali citofiliche con analogie funzionali alle citochine dei vertebrati (Beck, 1998; Beshin *et al.*, 2001; Ottaviani *et al.*, 2004).

Il sistema del complemento è una componente molto importante sia delle risposte dell'immunità innata che di quella adattativa. Questo è un sistema multienzimatico sensibile alla temperatura la cui prima funzione scoperta è stata quella "complementare" l'azione degli anticorpi. In effetti, la via classica del complemento può essere attivata dal complesso antigene anticorpo ma esistono altre vie di attivazione quali: quella della mannose binding lectin (MBL) e quella alternativa che

prevedono il legame di componenti del complemento direttamente sulla superficie del patogeno. Indipendentemente dalla via che l'ha causata l'attivazione del complemento porta alla opsonizzazione del patogeno, alla chemotassi delle cellule immunitarie verso l'area di infezione, alla lisi del patogeno per la formazione del complesso di attacco alla membrana MAC, all'attivazione della risposta infiammatoria. Il complemento difende dalle infezioni dovute a batteri piogeni, funghi ed è un anello di congiunzione tra la risposta innata ed adattativa, consentendo la rimozione degli immunocomplessi. Le proteine che costituiscono il sistema del complemento sono più di trenta e distribuite tra proteine plasmatiche e proteine espresse sulla superficie cellulare. L'attivazione del complemento procede secondo un meccanismo a cascata. Le proteine del complemento sono presenti come precursori inattivi in circolo. Il sistema di attivazione a cascata è basato sull'attività proteasica dei suoi stessi membri che agiscono tagliando le altre proteine del sistema. Tutte le vie di attivazione portano in ultima analisi alla formazione del complesso di attacco alla superficie del batterio - MAC che determina la lisi del patogeno. Grazie all'attivazione del sistema si formano anche una serie di altre molecole con importanti funzioni biologiche come i frammenti C3b e C4b che opsonizzano i microrganismi ed i frammenti C3a, C4a e C5a noti anche come anafilotossine che attivano la risposta infiammatoria causando tra l'altro la chemiotassi delle cellule immunitarie al sito infiammatorio (Roitt Ivan M.*et al.*, 2003). Un gran numero di componenti del complemento sono conservati tra i vertebrati superiori e urocordati.

L'immunità innata è generalmente suddivisa in due parti in relazione al tipo di risposta: risposta di difesa umorale e risposta cellulare. La prima linea di difesa è rappresentata da una vera e propria barriera chimico-fisica che si oppone all'invasione da parte del microrganismo, ne sono un esempio le superfici epiteliali come: pelle, branchie ed intestino. Ogni epitelio è ricoperto da uno strato di muco

che è secreto da cellule del calice e che ha la funzione di non far aderire funghi, batteri e parassiti (Pickering and Richards, 1980). Nel caso in cui tali barriere risultino inefficaci, cellule specializzate come monociti, macrofagi, granulociti e cellule citotossiche non specifiche, digeriscono e uccidono i patogeni. Tali cellule sono reclutate, in primo luogo, nel sito d'infezione dalle citochine infiammatorie.

Le risposte umorali sono mediate da composti solubili come proteine e glicoproteine, capaci di distruggere ed inibire la crescita dei microrganismi, che includono tra gli altri, **peptidi antimicrobici (PAM)**, proteasi, transferrine e la proteina 1 di resistenza antivirale al myxovirus (Mx 1) (Aoki *et al.*, 2008). La risposta umorale è coinvolta nella produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI), intermedi reattivi del nitrogeno (RNI) e l'induzione di cascate proteolitiche che causano reazioni di melanizzazione ed attivazione di meccanismi ossigeno-indipendenti (Nappi and Ottaviani, 2000). Molti elementi dell'immunità innata sono conservati. Esempi di alcuni di questi sono: i recettori che riconoscono i patogeni (PRR), i recettori toll-like (TLR), le citochine, le lectine ed i recettori del complemento (CR) (Aoki *et al.*, 2008). Particolare interesse rivestono anche metaboliti secondari come: terpenoidi, alcaloidi, flavonoidi (Croteau *et al.*, 2000).

La risposta cellulare negli invertebrati è basata su reazioni di difesa, tra cui incapsulamento, formazione di noduli e fagocitosi (Wright R. K., 1981). Tali attività sono svolte da vari tipi emocitari, nel dettaglio, cellule specializzate come monociti, macrofagi, granulociti e cellule citotossiche non specifiche che sono in grado di fagocitare i microbi e secernere nell'emolinfa sostanze solubili antimicrobiche e citotossiche (Mitta G. *et al.*, 2000). Durante la reazione della fagocitosi cellule come macrofagi, neutrofili e cellule dendritiche riconoscono l'invasore, lo internalizzano all'interno di fagosomi ed in fine viene ucciso (Fig. 4) (Greenberg and Grinstein, 2002).

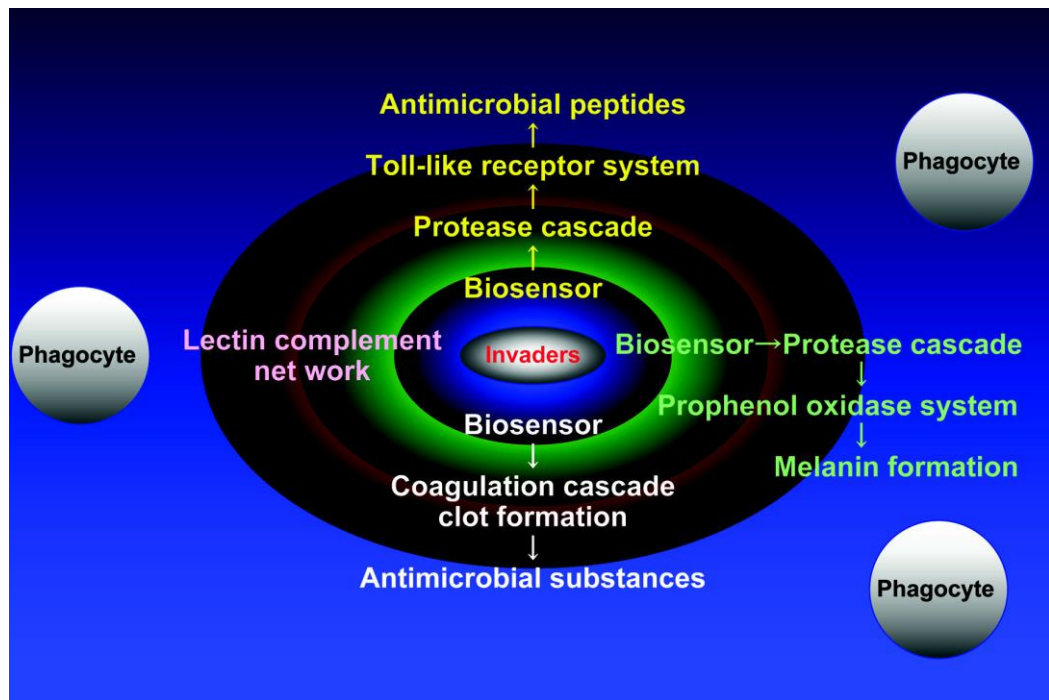


Fig 4 I Principali sistema di difesa negli invertebrati connessi con la fagocitosi. I principali sistemi immunitari innati includono, la coagulazione dell'emolinfa, melanizzazione mediata dalla profenolossidasi, l'espressione di peptidi antimicrobici mediati da recettori Toll-like, il percorso dell'immuno deficienza (IMD), il percorso lectina-complemento mediato dai componenti della parete cellulare batterica (Muta and Iwanaga, 1996, 1998; Inamori et al., 2004; Hoffmann et al, 1999, Cerenins and Söderhäll, 2002; Cooper et al., 2002).

Come detto, tutti gli invertebrati sono in grado di distinguere il *self* dal *non-self* mediante meccanismi molecolari di alloriconoscimento, si presuppone che questi si siano evoluti in modo indipendente. Dunque, diversi gruppi di invertebrati avrebbero sviluppato un proprio sistema di istocompatibilità.

L'urocordato *Ciona intestinalis* è un modello prezioso per approfondire la questione. E' ermafrodita, ma l'autofecondazione normalmente non si verifica, inquanto, le cellule del follicolo accettano solo sperma allogeno. Si può presumere che un recettore, potenzialmente coinvolto nell'*incompatibilità-self*, potrebbe avere sequenza ed espressione variabile in ovociti di diversi individui. Sulla base di questa ipotesi, nuovi modelli sono stati proposti sul codice molecolare di *C. intestinalis* per

individuare la peculiare specificità degli invertebrati in assenza di MHC (Parrinello, 2009).

La fagocitosi nei molluschi, negli artropodi e nei tunicati viene rafforzata dalle lectine plasmatiche e da componenti della cascata della profenolossidasi (Ratcliffe *et al.*, 1985). L'ascidia *Ciona intestinalis* è in grado di formare una capsula determinando la copertura di agenti estranei presenti nella tunica. La reazione inizia con una massima infiltrazione di cellule staminali e granulociti, dalle prime si differenziano cellule coinvolte nella reazione, mentre le seconde effettuano la fagocitosi e/o rilasciano fattori attivi e materiale lisosomiale che contribuisce all'eliminazione della massa estranea. Contemporaneamente, nel tessuto sottostante, si costituisce uno strato misto di cellule e secreti che isolano quella parte della tunica (Parrinello *et al.*, 1997).

Pertanto, tutti questi fattori contribuiscono negli invertebrati alla difesa del *self* contro i microrganismi invasori, in quanto, nell'acqua di mare è possibile contare fino a 10^6 batteri/ml e 10^9 virus/ml (Ammerman J. W. *et al.*, 1984; Austin, 1988). Gli invertebrati sono quindi costantemente esposti ad alte concentrazioni di batteri, funghi e virus, molti dei quali possono essere patogeni. La sopravvivenza degli invertebrati dipende degli efficienti meccanismi antimicrobici che utilizzano per proteggersi contro le infezioni microbiche, suggerendo quindi, che il loro sistema immunitario innato è efficace e robusto (Menzel L. *et al.*, 2002). Già nel 1950 si è tentato di individuare attività antimicrobiche in estratti di organismi marini (Nigrelli *et al.*, 1959). Recenti studi hanno suggerito che molte componenti bioattive isolate da tali organismi potrebbero essere usate come molecole anti-cancro, anti-microbiche, anti-funginee, anti-infiammatori o per altre attività farmacologiche (Gul W. and Hamann M.T., 2005; Mayer A.M.S. and Hamann M.T., 2005).

1.2.1 Peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici sono molecole largamente diffuse in natura, sintetizzati da diversi tessuti e tipi cellulari di organismi appartenenti sia al regno vegetale che animale (Wang & Wang, 2004; Bulet *et al.*, 2004; Boman, 2003; Collinge and Slusarenko, 1987; Dixon e Harrison, 1990; García-Olmedo *et al.*, 1998). Essi rappresentano la prima linea di difesa in grado di uccidere o rallentare la crescita di microorganismi invasore e contribuiscono alla risposta immunitaria innata o aspecifica. Sono codificati da specifici geni, costitutivamente espressi (Boman, H.G, 2000) e rapidamente indotti a diversi livelli cellulari per interagire direttamente contro agenti infettivi e / o modulare immunoreazioni coinvolte nella difesa verso i microorganismi patogeni (Hoffmann *et al.*, 1999; Andres *et al.*, 2007). La composizione aminoacidica, l'anfipaticità, la carica cationica e la taglia attribuiscono ai peptidi la capacità di aumentare la permeabilità anionica delle membrane fosfolipidiche, ed inserendosi all'interno del doppio strato delle membrane dei patogeni formano dei pori mediante una vasta gamma di meccanismi d'azione (Toke, 2005). Sebbene tali peculiarità siano utili per definire canonicamente l'attività di un peptide, in natura esistono delle caratteristiche differenti. La descrizione degli AMP cationici ed anionici risale agli inizi del 1980 (Boman H.G. *et al.*, 1995). Solamente negli ultimi dieci anni, sono stati individuati nei vertebrati, invertebrati e piante dei peptidi anionici AAMPs il cui ruolo è fondamentale nella risposta del sistema immunitario innato con enormi potenzialità nel loro impiego come putativi agenti antimicrobici e con dei meccanismi d'azione il cui potenziale è fondamentale per le applicazioni in campo medico e biotecnologico (Harris F. *et al.*, 2009).

In aggiunta alla loro funzione antimicrobica diretta, hanno ruoli multipli come mediatori dell'infiammazione con impatto sulle cellule epiteliali e cellule

infiammatorie; influenzano vari processi come il rilascio di citochine, la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, la guarigione delle ferite, chemiotassi ed equilibrio tra proteasi e inibitori della proteasi (Beisswenger & Bals, 2005). Il carattere ubiquitario dei peptidi antimicrobici suggerisce il loro ruolo permanente ed essenziale in natura (Joerger, 2003). Sebbene alcuni peptidi abbiano uno spettro limitato di attività verso microrganismi batterici, altri estendono la loro attività antimicrobica verso funghi, parassiti e virus con involucro, protozoi o anche cellule tumorali (Baker *et al.*, 1993; Chinchar *et al.*, 2004; Toke, 2005).

Tale sistema di difesa è stato oggetto di studio a partire dagli anni '80 con la scoperta delle cecropine, peptidi antimicrobici isolati dal baco da seta (*Hyalophora cecropia*). Dopo la scoperta di tali sostanze, altri peptidi antimicrobici sono stati isolati da un elevato numero di organismi e ad oggi più di 2271 di queste sostanze sono state isolate da una serie di organismi filogeneticamente lontani, quali mammiferi, pesci, anfibi, insetti e vegetali (Lehrer *et al.*, 1993; Boman, 1995; Hancock & Chapple, 1999; García-Olmedo F. *et al.*, 2001; Zasloff, 2002; Brogden *et al.*, 2003 Wang G. 2010). Negli invertebrati marini i peptidi antimicrobici sono una fonte poco esplorata.

Caratteristiche strutturali

Considerato l'elevato interesse nel corso dell'ultimo decennio per i peptidi antimicrobici, e la loro valenza nel mondo della ricerca, è necessario soffermarsi sulle proprietà strutturali distintive di tali piccole molecole. I peptidi antimicrobici sono genericamente definiti AMPs (Antimicrobial Peptides), le cui caratteristiche convenzionali ne che influenzano l'attività antimicrobica e la specificità sono:

➤ TAGLIA

Piccole molecole con un peso molecolare tra 1 e 5 kDa. La dimensione di peptidi antimicrobici varia da 6 residui aminoacidici per peptidi anionici a più di 59 residui di aminoacidi per Bac7.

➤ SEQUENZE

I peptidi contengono spesso dei residui aminoacidici basici di lisina o arginina, dei residui idrofobici di alanina, leucina, fenilalanina o triptofano, e altri residui quali isoleucina, tirosina e valina. Alcuni peptidi contengono ripetizioni di aminoacidi. La ratio tra l'idrofobicità e la carica dei residui può variare da 1:1 a 1:2

➤ CARICA

I peptidi anionici sono ricchi di acido aspartico e glutammico ed i peptidi cationici sono ricchi di arginina o lisina e / o di istidina. La carica netta anionica è in un range compresa tra 0 e -7, mentre la carica netta cationica tra +2 e +9.

➤ CONFORMAZIONE E STRUTTURA

I peptidi antimicrobici possono assumere una varietà di strutture secondarie comprese α -eliche e foglietti- β antiparalleli.

➤ IDROFOBICITA'

Questa caratteristica consente ai peptidi antimicrobici idrosolubili di distribuirsi nella membrana del doppio strato lipidico.

➤ ANFIPATICITA'

I peptidi raggiungono la loro conformazione finale presentando un dominio che contiene residui amminoacidici idrofilici allineati lungo un lato e residui amminoacidici idrofobici allineati sul lato opposto della molecola elicoidale, permettendo loro forti interazioni con la membrana batterica carica negativamente (dovuta alla elevata percentuale di grassi nella carattere anionico) (Wang & Wang, 2004; Hancock *et al.*, 2006). Agiscono rompendo le membrane cellulari degli agenti

patogeni, provocandone infine la loro distruzione (Mookherjee & Hancock, 2007). Per i peptidi ad α -elica, l'afipaticità è spesso espressa come un momento idrofobo, che è la somma vettoriale degli indici di idrofobicità. Altri peptidi mostrano spesso separazione spaziale di residui polari ed idrofobici che è meno facile da quantificare.

➤ ATTIVITA'

Ampio spettro di attività contro virus, batteri, funghi e protozoi patogeni (Hancock & Diamond, 2000).

Attualmente, l'inventario dei peptidi antimicrobici comprende oltre 2000 molecole di diversa origine, elencati nelle seguenti banche dati:

- Antimicrobial Sequence Database (AMSDb): <http://www.bbcm.univ.trieste.it>
- Antimicrobial Peptide Database (APD) : <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>
- Antimic: <http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC/> (Brahmachary *et al.*, 2004).

Sebbene gli AMPs siano presenti in diversi organismi, vertebrati e invertebrati, hanno caratteristiche grosso modo comparabili in funzione dell'attività esplicata. Nello specifico, essi presentano caratteristiche comuni, sono, infatti, tutti peptidi basici, aventi una natura anfipatica. Vengono prodotti come pro-peptidi di circa 60-170 residui che subiscono poi processi di maturazione ad opera di specifiche proteasi. I pro-peptidi sono precursori generalmente contenenti:

- una sequenza segnale per il reticolo endoplasmatico;
- una pro-sequenza anionica di lunghezza variabile, che avrebbe la funzione di neutralizzare le cariche positive del peptide rendendolo inattivo;
- la sequenza del peptide maturo.

Classificazione dei peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici sono un gruppo unico e diversificato di molecole divisi in sottogruppi sulla base della loro carica netta, composizione aminoacidica e struttura, considerata come caratteristica fondamentale per la modalità di funzionamento (Göttler *et al.*, 2009). In relazione alla loro carica netta è possibile individuare la seguente classificazione:

1. Peptidi Antimicrobici Cationici (CAMPs). La maggior parte dei peptidi antimicrobici sono cationici (Marshall S.H. *et al.*, 2003), caratterizzati da una tipica carica positiva netta tra +2 e +9 , dalla presenza di pochi o nessun residuo acido, come glutammato e aspartato ed un elevato numero di amminoacidi cationici quali lisina o arginina e / o istidina (Hancock R.E. *et al.*, 2006). I residui aminoacidici idrofobici, come il triptofano e la valina, formano il 30-50% della struttura totale peptide, fondamentale per attribuire al peptide di assumere una struttura tipica anfifiliche in grado di garantire l'interazione con le membrane degli invasori (McPhee, J.B *et al.*, 2005). Questa caratteristica unitamente alla presenza di aree dense di elevata carica positiva consente ai CAMPs di esercitare il loro effetto antimicrobico. In particolare, questo sottogruppo ha ampia diversità strutturale e spettro antimicrobico influenzato principalmente dagli aminoacidi che costituiscono la sequenza primaria del peptide (Thomas S. *et al.*, 2010). Inoltre, a questo sottogruppo appartengono peptidi cationici ad α -elica, con brevi sequenze (maggiori di 40 residui aa), che mancano di cisteina nella loro sequenza (Tossi A. *et al.*, 2000). In soluzioni acquose molti di questi peptidi sono disordinati, ma in presenza di trifluoroetanolo, di micelle di sodio dodecil solfato (SDS), di vescicole fosfolipidi e liposomi, tutta o parte della molecola viene convertita in una α -elica. Tale struttura correla con attività l'antibatterica contro sia Gram-positivi che Gram-negativi (Gennaro R. *et al.*, 2000).

2. Peptidi Antimicrobici Anionici (AAMPs). Sebbene la grande maggioranza dei peptidi antimicrobici sia di natura cationica, un numero significativo di AMP sono anionici; fondamentali armi nella risposta immunitaria innata degli eucariotici (Laforce F.M. *et al.*, 1981; Harris, F. *et al.*, 2009). Gli AAMPs sono ricchi di residui di acido glutammico e aspartico come ad esempio il peptide Maximin-H5 e Dermcidin degli anfibi (Lai R, *et al.*, 2002; Steffen H. *et al.*, 2006). I peptidi antimicrobici anionici comunemente sono costituiti da 5 a 70 residui di aa, e possiedono una carica netta da 0 a -2, anche se la caratterizzazione strutturale ha dimostrato che la forma troncata del peptide B di bovino, definito enkelytin, può possedere una alta carica netta di -7 (Harris F. *et al.*, 2009; Goumon, Y. *et al.*, 2000). Anche se meno comuni, esistono peptidi anionici di 300 residui di lunghezza e con una carica netta di -20 (Diego-Garcia E. *et al.*, 2005; Prochazkova P. *et al.*, 2006). Analogamente alla loro controparte cationica, i peptidi antimicrobici anionici possono adottare diverse strutture anfifiliche come l' α -elica e la conformazione β , garantendo una interazione con la membrana microbica chiave per l'attività. I residui anionici sono altamente conservati, suggerendone una importante funzione. E' stato dimostrato come alcuni peptidi sintetici cationici con dei residui anionici nell'N-terminale disegnati sulla base del genoma di *C. intestinalis*, riescano ad inibire la citotossicità contro eritrociti di mammifero (Fedders H. *et al.*, 2008). Uno svantaggio di molti peptidi antimicrobici anionici è che spesso richiedono cationi, per esempio lo zinco (Zn^{2+}), come cofattore per l'attività biocida (Brogden K.A. *et al.*, 1996). Questo può essere il motivo per cui sono generalmente situati negli epitelii ; siti, la cui secrezione ionica e suscettibilità microbica, sono più elevate. Per esempio peptidi anionici presenti nel tessuto polmonare, hanno mostrato di possedere una maggiore attività contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi in presenza di del cofattore Zn^{2+} (Grubor B. *et al.*, 2006; Schutte B.C. *et al.*, 2002). Tale cofattore agisce come

collegamento tra il peptide antimicrobico anionico e la membrana cellulare microbica anionica, permettendo il trasporto del peptide anionico a bersagli intracellulari, senza danneggiare la struttura della membrana microbica (Brogden K.A. *et al.*, 1996; Brogden K.A. *et al.*, 2003). Altri peptidi anionici hanno il target nei ribosomi, inibendo l'azione della ribonucleasi, causano morte cellulare microbica (Vandendriessche L., 1956; Sela M., 1962).

3. Peptidi neutri. Infine, è interessante notare che i peptidi ad attività antimicrobica, come molti di quelli isolati da piante, sono racchiusi in un sottogruppo in cui la caratteristica fondamentale è quella di essere relativamente ricchi di amminoacidi polari neutri, suggerendo una relazione struttura-attività unica (Hancock and Chapple, 1999).

Un'ulteriore classificazione evidenzia la composizione aminoacidica dei peptidi. A questa divisione fanno parte le defensine e le catelicidine che sono due grandi famiglie di proteine anti-microbiche presenti nei vertebrati ed invertebrati; contribuiscono alla risposta innata nella difesa dell'ospite, agendo sull'integrità della membrana cellulare batterica (De Yang *et al.*, 2000). L'abbondanza dei peptidi, appartenenti ad entrambi i gruppi, si riscontra sia nelle superfici mucose che nei granuli dei fagociti, testimoniando il fondamentale ruolo nella difesa dell'ospite (Bals R. *et al.*, 1999).

4. Defensine HDP (Host Defense Peptides). Le defensine comprendono diverse famiglie di peptidi di difesa dell'ospite sono state individuate in vertebrati, invertebrati e piante. Sono state suggerite delle somiglianze strutturali, funzionali e delle relazioni filogenetiche tra le defensine dei vegetali e degli invertebrati, e tra i diversi tipi di vertebrati, mostrando un'origine comune batterica (Zhu 2007). L' α - e β -defensine sono facilmente riconoscibili per la presenza di aa conservati nella loro sequenza, tra cui 6 residui di cisteina disposti a formare ponti di disolfuro.

5. Catelicidine PR-AMPs (Proline-rich Antimicrobial Peptides). Viceversa, alla famiglia delle catelicidine appartengono dei peptidi antimicrobici particolarmente ricchi di residui di prolina; PR-AMPs (Scocchi *et al.* 2011). Dall'analisi delle sequenze, tale famiglia è generalmente caratterizzata da una regione ben conservata N-terminale (pro-regione), seguita da un dominio altamente variabile C-terminale. Il processo di attivazione del peptide è guidato dall'elastina, tale enzima ha dei siti di taglio che riconosce nei residui Val, Ala e Thr (Fig 5) (Zanetti and Gennaro 1995).

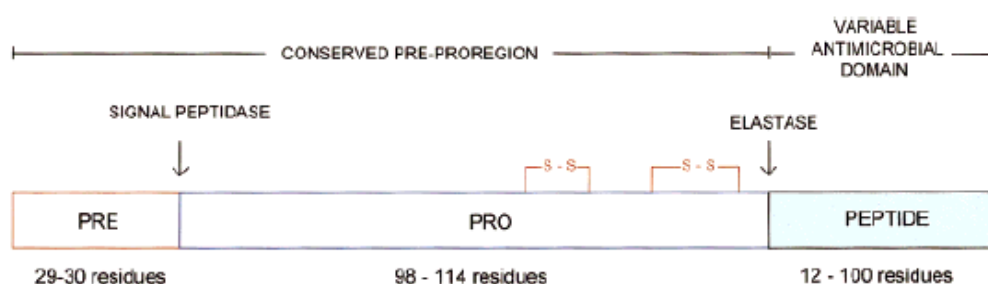


Fig. 5 Rappresentazione schematica di un membro della famiglia delle catelicidine (Fonte Gennaro and Zanetti, 2000).

Le catelicidine rappresentano un unico e abbastanza complesso strumento di difesa dell'ospite. Recenti scoperte indicano che questa famiglia è molto antica, essendo già presente nei vertebrati primitivi. Sembra improbabile che i peptidi PR-AMPs dei vertebrati e degli invertebrati siano evolutivamente legati, tuttavia essi mostrano molte caratteristiche comuni, suggerendo che essi sono un caso di evoluzione convergente con caratteristiche strutturali e funzionali simili:

- Tutti hanno un elevato contenuto di residui di Prolina (dal 25% al 50%);
- A differenza di molti altri AMPs, tutti agiscono attraverso un meccanismo di azione non litico.

La peculiarità degli PR-AMPs è la presenza di un dominio anionico, con brevi motivi ripetuti di tipo PPRX o PRPX dove X è spesso un residuo idrofobico o l'aminoacido Gly, che suggerisce una funzione particolare per la loro attività biologica (Scocchi *et al.* 2011). Infatti, l'attività antimicrobica delle catelicidine mostra un meccanismo

d'azione diverso dalla capacità di rapida permeabilizzazione di membrana esercitata dalla maggior parte degli altri tipi di peptidi antimicrobici. In dettaglio, i PR-AMPs traslocano attraverso la membrana batterica senza danni apparenti e la loro azione è rivolta ad uno spettro ampio di patogeni, come Gram positivi, negativi e funghi (Shamova O. *et al.*, 1999;. Raj, P. A., 1995).

Attualmente, esistono 2308 peptidi antimicrobici (204 isolati da batteri, 296 isolati da piante, e 1715 isolati da animali) depositati nel database APD -The Antimicrobial Peptide Database (Fig 6).

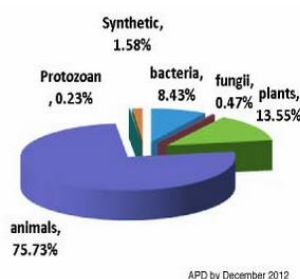


Fig 6 Fonti di peptidi antimicrobici

1.2.2 Identificazione di peptidi antimicrobici in invertebrati marini

E' noto come i peptidi antimicrobici siano diffusi soprattutto in tessuti come l'intestino ed organi respiratori dove l'esposizione a microrganismi patogeni è più probabile (Chisholm J. R. S. *et al.*, 1992). Nel corso degli ultimi dieci anni sono stati individuati negli invertebrati marini alcuni peptidi ad attività antimicrobica. Esempi sono:

Peptidi cationici CAMPs, come:

- Le Clavania A, B, C e D appartengono ad una famiglia di peptidi composti da residui di aa ricchi di istidine cationici isolati da lisati di emociti dell'ascidia solitaria sessile *Styela clava* (Lee I.H. *et al.*, 1997);
- Il peptide sintetico Ci-PAP-A22 cationico, anfipatico, con una struttura ad α -elica, disegnato sulle sequenze EST del tunicato *Ciona intestinalis*. Tale peptide esercita

una potente attività antimicrobica contro un vasto pannel di batteri ed il fungo *Candida albicans*; mediante un meccanismo d'azione in grado di permeabilizzare le loro membrane citoplasmatiche, non ha, inoltre, attività citolitica verso eritrociti di mammifero (Fedders H. and Leippe M, 2008);

➤ Identificati 2 trascritti Ci-MAM-A e Ci-PAPA-A di due putativi geni *Ci-mam* e *Ci-pap*. Usando un anticorpo contro il corrispondente peptide sintetico Ci-PAP-A cationico è stato dimostrato come tale peptide si localizza nella tunica danneggiata di *Ciona intestinalis* (Di Bella M. A *et al.*, 2012);

➤ Nell'anemone di mare, *Actinia equina* è stata individuata una potente equitossina II con attività emolitica e citotossica. L'estremità N-terminale ha delle omologie con il peptide naturale cationico mellitina, ed è in grado di permeabilizzare le membrane dei microorganismi (Belmonte G. *et al.*, 1994).

Peptidi anionici AAMPs:

➤ Peptidi con esclusiva attività antifungale isolati dal plasma dei gamberi, *Penaeus stylirostris* e *Penaeus vannamei*. Tali peptidi mostrano il 95-100% di identità di sequenza con una sequenza C-terminale delle emocianine, indicando che i peptidi isolati sono frammenti fondamentali della proteina respiratoria dei gamberetti (Destoumieux-Garzon D. *et al.*, 2001);

➤ Un nuovo AMP anionico, Scygonadin (Swiss-Prot accession code: Q5D710) con carica netta -1, isolato dal plasma del granchio indiano *Scylla serrata* con una potente attività contro *M. luteus* (Huang W.S. *et al.*, 2006);

➤ Un AAMP, Theromyzin (Swiss-Prot accession code: Q6T6C1) con carica netta -4, è stato isolato dal liquido celomatico dell'anellide *Thermyzon tessulatum* con attività contro *M. luteus* (Tasiemski A. *et al.*, 2004);

➤ Due peptidi: Amblyomma defensin peptide 1 (Swiss-Prot accession code: Q5VJF9), e Amblyomma defensin peptide 2 (Swiss-Prot accession code: Q5VJF8),

purificati a partire dall'emolinfa dell'aracnide *Amblyomma hebraeum* che risulta attivo verso batteri gram positivi e negativi (Harris F. *et al.*, 2009);

➤ Descritti due peptidi anionici Gm anionico peptide 1 (Swiss-Prot accession code: P85211) e Gm anionici peptide 2 (Swiss-Prot accession code: P85216), isolati dalla larva dell'insetto *Galleria mellonella* con carica netta rispettivamente di -4 e -3, attivi verso Gram positivi;

Peptidi appartenenti alla famiglia delle defensine (HDPs):

➤ Negli invertebrati gli HDPs sono stati prevalentemente isolati dall'emolinfa degli insetti (Dimarcq J.L. *et al.*, 1999), aracnidi (Froy O. *et al.*, 2003) e molluschi (Wong JH. *et al.*, 2007).

Peptidi appartenenti alla famiglia delle catelicidine (PR-AMPs)

➤ Le Penaeidins sono di circa 5,5-6,6 kDa, isolate dal lisato di plasma ed emociti del gambero tropicale *Penaeus vannamei*. Queste molecole differiscono dalle altre classi di peptidi antimicrobici in quanto sono composte da residui ricchi in prolina nell'N-terminale e sei cisteine ormanti ponti disolfuro nella parte C-terminale. Le loro attività antibatteriche sono essenzialmente dirette contro batteri Gram positivi , con un meccanismo d'azione ceppo specifico (Destoumieux D., *et al.*, 1997);

➤ Le apidaecine, le drosocine e le pyrrocorticine sono degli PR-AMP isolati dal fluido linfatico delle api (Casteels P, 1989) e da altri imenotteri (Otvos 2002) che mostrano un tratto altamente conservato di otto residui al C-terminale;

➤ Altri PR-AMP sono stati isolati da altri invertebrati come: crostacei (Schnapp *et al* . 1996), anfibi (Li *et al.* 2006) e molluschi (Gueguen *et al* . 2009).

1.2.3 Caratteristiche funzionali e meccanismi d'azione nell'immunità innata

Le caratteristiche funzionali dei peptidi antimicrobici sono le seguenti:

- Assenza di alta specificità, in quanto risultano attivi contro un largo spettro di microorganismi;
- Assenza di un meccanismo di riconoscimento del "self". L'autodistruzione è evitata dalla compartimentalizzazione cellulare dei peptidi che sono conservati in granuli con membrane resistenti e/o sotto forma di pro-peptidi;
- Basso costo energetico, in quanto i peptidi per la loro sintesi necessitano di una quantità di energia inferiore rispetto a quella richiesta all'animale per la complessa attivazione dell'immunità clonale (Zinkernagel R. M. *et. al.*, 1996).

L'immunità innata basata sulla produzione di PAM è caratterizzata da:

- Assenza di memoria
- Velocità di risposta, dovuta all'immediata disponibilità dei peptidi immagazzinati ed alla loro rapida sintesi e diffusione;

Modelli d'azione dei peptidi antimicrobici.

Si sostiene che l'eliminazione del batterio comprenda una o più delle seguenti fasi:

- Depolarizzazione della membrana;
- Inserimento del peptide nella membrana;
- Formazione di pori con conseguente perdita del contenuto intracellulare;
- Aggregazione di diverse eliche per formare un poro;
- Danni specifici a subunità intracellulari fondamentali.

Generalmente, molti peptidi agiscono alterando direttamente la membrana delle cellule bersaglio (Bello J.H. *et al.*, 1982).

Le membrane batteriche sono ricche di fosfolipidi anionici, come la fosfatidilserina ed il fosfatidilglicerolo, ciò determina quindi, un'interazione elettrostatica del peptide carico positivamente con la membrana stessa, che è alla base del successivo effetto di perturbazione del doppio strato (Gidalevitz D., *et al.*, 2003) (Fig. 7).

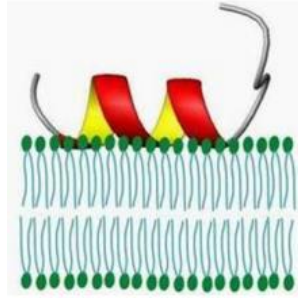


Fig. 7 Esempio di interazione di un AMPs lineare ad α -elica con i fosfolipidi di membrana di un patogeno.

La differente composizione delle membrane è infatti alla base della selettività che alcuni dei peptidi anionici e cationici hanno per le cellule batteriche (Zaslhoff 2002; Powers *et al.* 2003, Lai *et al.* 2009). Le cellule eucariotiche sono caratterizzate da un alto contenuto di fosfolipidi zwitterionici, come la fosfatidilcolina, la sfingomieline e la fosfatidiletanolamina; sono inoltre ricche di colesterolo, assente nei batteri, che sembra inibire l'azione di tali peptidi conferendo una certa resistenza alle membrane. Un altro fattore importante per la selettività è il valore del potenziale di membrana: un potenziale più negativo all'interno della cellula, tipico delle cellule batteriche (100-150 mV), facilita l'interazione del peptide con lo strato lipidico (Y. Shai Z. *et al.*, 1996; Oren Z. *et al.*, 1997).

Nel caso dei batteri Gram-negativi è stato osservato che inizialmente il peptide interagisce con le molecole polianioniche del lipopolisaccaride della membrana esterna ed è poi in grado di permeabilizzarla o di essere captato all'interno. Nel caso dei batteri Gram-positivi il peptide è invece probabilmente attratto dagli acidi teicoici e teicuronici e da altri gruppi anionici che si trovano esternamente allo strato di peptidoglicano (Sherris, 2012).

Sono stati proposti due principali meccanismi generali per spiegare l'effetto conseguente all'interazione dei peptidi con la membrana citoplasmatica:

➤ Effetto "detergente", in cui la struttura anfipatica di tali molecole interagirebbe con il doppio strato lipidico, distruggendone l'organizzazione e determinando la

fuoriuscita dei componenti citoplasmatici; Modello di “Shai- Matsuzaki-Huang” (Matsuzaki, 1999; Yang *et al.*, 2000; Shai, 1999).

➤ La formazione di canali dovuta all’aggregazione dei monomeri di peptide nel doppio strato lipidico.

Il modello di “Shai-Matsuzaki-Huang” (Fig.8) propone che alla base del meccanismo d’azione dei peptidi ci sia l’interazione con la membrana citoplasmatica dei microrganismi, un processo guidato da forze elettrostatiche ed idrofobiche. Come conseguenza di questa interazione, si osservano lo spiazzamento delle molecole lipidiche della membrana e l’alterazione della sua struttura. E’ stata suggerita (Huang, 2000) l’esistenza di un rapporto soglia tra la concentrazione di peptide e la concentrazione dei lipidi di membrana (P/L), al di sopra del quale i peptidi formano veri e propri pori sulla superficie della cellula. Questi pori comporterebbero un abbassamento del gradiente protonico, la fuoriuscita di metaboliti essenziali, il blocco della produzione di ATP e il rallentamento di altri processi metabolici fino all’inevitabile morte della cellula. La maggior parte dei peptidi ad attività antimicrobica opererebbe, quindi, secondo un meccanismo d’azione aspecifico, come confermato dal fatto che l’attività di cecropine e magainine è mantenuta anche quando nella loro sequenza primaria tutti gli aminoacidi della serie L- vengono sostituiti dai corrispondenti aminoacidi della serie D- (Wade *et al.*, 1990; Bessalle *et al.*, 1990). Questo dato conferma che l’interazione della molecola con il suo target non è stereo-specifica, escludendo, quindi, che si possa trattare di una classica interazione farmaco-recettore. Inoltre, la formazione di pori nella membrana, elemento strutturale comune a tutti i tipi di cellule, renderebbe conto dell’ampio spettro d’azione dei peptidi naturali ad attività antibiotica. Molto spesso, infatti, questi composti sono contemporaneamente attivi nei confronti di batteri Gram positivi e Gram negativi, funghi (inclusi i lieviti), parassiti, cellule tumorali ed alcuni

virus come l'Human Immunodeficiency Virus (HIV) e l'Herpes Simplex Virus (HSV). Non mancano, comunque, esempi di peptidi per i quali è stato dimostrato che l'interazione a livello di membrana è necessaria ma non sufficiente per il realizzarsi dell'effetto microbistatico o microbica.

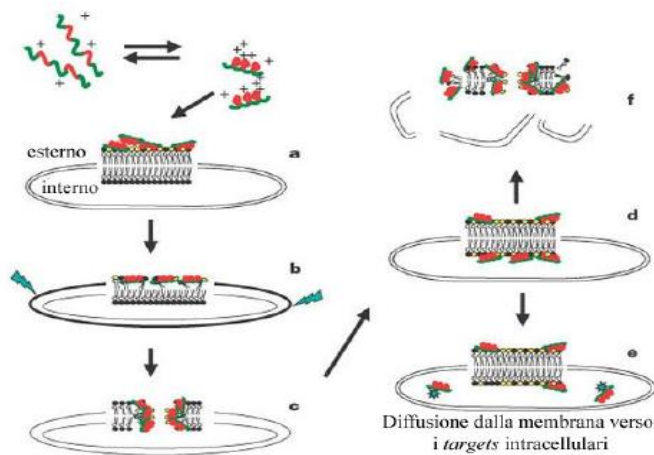


Fig. 8. Meccanismo d'azione di un peptide antimicrobico: Modello di Shai-Matsuzaki-Huang.

(a) Molecole peptidiche si dispongono sulla superficie esterna della membrana, causandone dapprima un assottigliamento (b) e poi la formazione di pori (c). Il passaggio del peptide sul lato interno della membrana (d) comporta la diffusione verso targets intracellulari (e) o il collasso della membrana con conseguente morte della cellula (f).

Il secondo meccanismo è quello che fa leva sulla formazione di un "poro". Tale meccanismo è stato invece supposto dalla presenza di effetti cooperativi tra peptidi e il posizionamento perpendicolare del peptide nella membrana. In alcuni casi è stato proposto un processo in cui il peptide, dopo aver inizialmente ricoperto la membrana con uno strato orientato parallelamente alla superficie, s'inserirebbe perpendicolarmente all'interno una volta raggiunta un'elevata concentrazione. In particolare, tutti hanno inizio con uno step principale che si traduce nell'assorbimento delle catene peptidiche sull'interfaccia della membrana e la formazione di una struttura secondaria del peptide adeso. L'assorbimento della regione iniziale del peptide prelude ad un'espansione ai lati della membrana e ad uno stiramento del core lipidico idrofobico.

Si possono verificare tre diverse tipologie d'azione:

- “*Barrel stave*”. Meccanismo secondo cui un set di peptidi cationici a contatto con le membrane batteriche, si organizza nella formazione di un tunnel transmembrario. Tale strutturazione prevede che il lato idrofobico della porzione transmembrana dell' α -elica sia orientato verso i lipidi mentre la porzione idrofila sia posizionata all'interno del tunnel (Ehrenstein G., *et al.*, 1977; Shai Y, 1995) (Fig. 9 A).
- “*Carpet like*”. Tale approccio prevede che il lato carico della catena peptidica interagisca con le teste anioniche dei fosfolipidi della membrana batterica, strutturandosi nella formazione di un tappeto che si estende sulla superficie della membrana bersaglio. In tal modo l'area superficiale del foglietto esterno si assottiglia e si espande in relazione al foglietto più interno portando alla distruzione del doppio strato fosfolipidico tramite la formazione di veri e propri disgregati. (Fig. 9 B) (Shai Y., 1995; Shai Y., 1999).
- “*Wormhole*”. In accordo con il modello toroidale, in seguito all'interazione del peptide sulla membrana, i fosfolipidi si curvano continuamente da un lato all'altro del doppio strato come all'interno di una ciambella. Le catene peptidiche inizialmente posizionate sulla membrana vengono immerse nell'interfaccia idrofilica/idrofobica e trascinate insieme alle molecole lipidiche del bilayer determinando la formazione di un poro (Fig.9 C) (Ludtke S. J., *et al.*, 1996; Huang H. W., 2000).

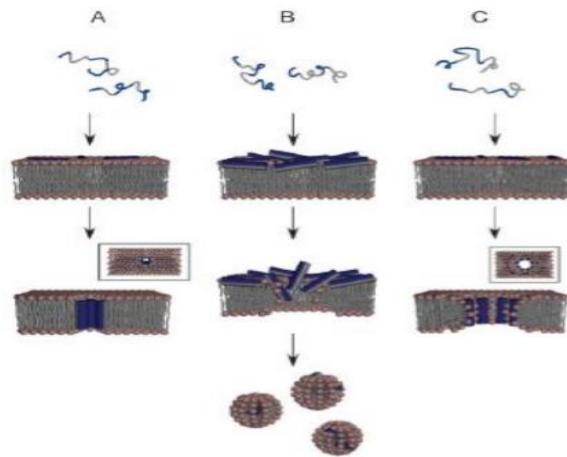


Fig. 9 A) Meccanismo d'azione "barrel-stave". B) Meccanismo d'azione "carpet-like". C) Meccanismo d'azione toroidal "wormhole". I peptidi sono rappresentati in blue.

Sebbene non siano stati ancora del tutto chiariti i meccanismi d'azione, l'ipotesi più accreditata presume che i peptidi esercitino la loro attività mediante "pore forming", che porta alla lisi delle cellule microbiche, vi è una crescente speculazione sul fatto che questo non sia l'unico meccanismo in grado di uccidere i microorganismi. Infatti, è stato osservato come alcuni peptidi abbiano dei bersagli intracellulari, ed è stato proposto un nuovo meccanismo d'azione intracellulare (Fig 10). Alcune prime osservazioni hanno rivelato l'esistenza di siti alternativi di attività come per Bac-7, Buforin II, PR-39 e le Istidine (Gennaro R. and Zannetti M. 2000).

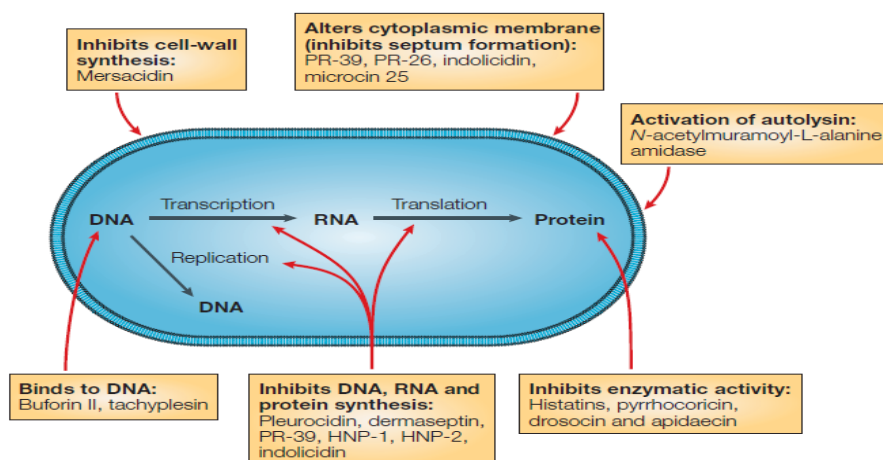


Fig.10 Meccanismo d'azione: attività intracellulare di diversi peptidi antimicrobici. In questa figura Escherichia coli è mostrato come il microrganismo bersaglio (Broden K.A. 2005).

In particolare, i peptidi antimicrobici, ricchi di residui di prolina appartenenti alla famiglia delle catelicidine, uccidono i batteri tramite un processo che, probabilmente, consiste nell'inibire la traduzione proteica e/o la sintesi del DNA. Questo è un meccanismo differente rispetto ai peptidi che formano dei pori nella parete come le cecropine, le magainine, le tachiplesine e le defensine (Sadler K. *et al.*, 2002).

I peptidi ricchi in prolina possono penetrare nelle cellule batteriche in maniera stereoselettiva utilizzando un sistema di trasporto che coinvolge alcune proteine di membrana, o probabilmente mediante un sistema di trasporto multimerico per il quale lo stato di oligomerizzazione ed i recettori intracellulari sono ancora sconosciuti. Una volta interiorizzati, tali peptidi possono interagire con la subunità ATPasi dello chaperone DnaK batterico, o con il suo dominio di legame peptidico (PBD) o entrambi. Da tutti i dati raccolti è possibile costruire un quadro più dettagliato comprendente la fase di contatto con la membrana batterica, la penetrazione nel citoplasma, cui segue l'inattivazione di uno o più bersagli citoplasmatici che non sono ancora stati ben definiti (Fig 11).

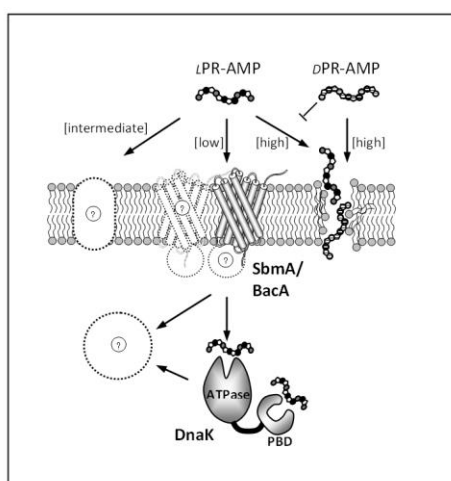


Fig 11. Schematica proposta del meccanismo d'azione degli PR-AMPs (Scocchi *et al.* 2011).

Attualmente, tale modello è questione di dibattito, ma ciò che è chiaro è che questi peptidi sono una fonte non ancora utilizzata come agenti antimicrobici, con nuovi meccanismi d'azione (Harrison F. *et al.*, 2009).

1.3 ATTIVITA' ANTIMICROBICA DI ESTRATTI CRUDI DI INVERTEBRATI MARINI

Nel tempo, un gran numero di organismi marini appartenenti ad una vasta gamma di *phyla* sono stati sottoposti a screening per la ricerca delle attività antimicrobiche. (Borowitzka M.A. and Borowitzka L.J., 1992; Haug *et al.*, 2002; Casas *et al.*, 2010). La conservazione dei metaboliti secondari negli invertebrati marini è spesso legata al loro successo ecologico, nonostante la loro esposizione alla predazione, alla concorrenza per lo spazio ed i nutrienti, all'esposizione ai microbi patogeni predatori (Aceret *et al.*, 2001; Becerro *et al.*, 1998; Burns *et al.*, 2003; Chanas *et al.*, 1996; Epifanio *et al.*, 1999a; Epifanio *et al.*, 1999b; Kubanek *et al.*, 2002; Lindel *et al.*, 2000; Lindquist, 1996; Marin *et al.*, 1998; McClintock and Baker, 1997; O'Neal and Pawlik, 2002; Pawlik *et al.*, 1995; Pisut and Pawlik, 2002; Stachowicz and Lindquist, 1997; Van Alstyne *et al.*, 1994; Vervoort *et al.*, 1998; Waddell and Pawlik, 2000) e alla radiazione solare UV (Bandaranayake *et al.*, 1996; Dionisio-Sese *et al.*, 1997; Dunlap *et al.*, 1986; Stachowicz and Lindquist, 1997). I metaboliti secondari sono gruppi rappresentativi di invertebrati marini in grado di una difesa chimica contro i patogeni. Le attività biologiche osservate negli estratti grezzi di invertebrati marini includono anche attività antibiotiche contro agenti patogeni microbici (Selegim M.H.R. *et al.*, 2007). La recente comparsa di un numero crescente di batteri resistenti agli antibiotici ha stimolato la ricerca di nuovi agenti antimicrobici.

La maggior parte delle molecole attive è prodotta da cellule circolanti e tessuti di tutti i *phyla* studiati ed appartiene a diverse classi strutturali come polieterei, terpeni,

alcaloidi, macrolidi e polipeptidi (Faulkner, D. J. 2000; Blunt *et al.*, 2007). La difesa chimica di invertebrati marini sessili può non solo possedere uno specifico ruolo ecologico o fisiologico, ma può anche esercitare una moltitudine di attività biologiche, come è stato dimostrato per l'estratto crudo della spugna del Mediterraneo *Crambe crambe* che ha una potente azione antibiotica. Tale estratto crudo è chimicamente caratterizzato da guanidina e complessi alcaloidi policiclici (Berlinck *et al.*, 1990; 1992; 1993; Jares-Erijman *et al.*, 1991; 1993a; 1993b). Altri esempi di estratti crudi da spugne marine che mostrano una vasta gamma di attività biologiche sono l'alitoxina e l'amphitoxina, isolati da diverse spugne: *Amphimedon viridis*, *Ampulex compressa*, *Reniera sarai* e *Callyspongia ridleyi* (Berlinck *et al.*, 2004). La natura chimica dei principi attivi degli estratti di alga marina *Anemone multifida* associati all'attività antibiotica rileva la presenza di acidi grassi insaturi, acidi organici e composti di fenolo (José Vitor M. Lima-Filho *et al.*, 2002). Altre analisi sugli estratti crudi di lisati di tessuti di molluschi, *Sepia sp.* e *Loligo sp.*, evidenziano che i principali componenti presenti sono: proteine, aminoacidi, saponine, carboidrati, aldeidi, chetoni, flavoni ed alcaloidi (Zainab Dakhil Degiam and Ali Tahar Abas 2010). Inoltre, è stato effettuato uno screening su 349 estratti crudi da spugne, ascidie, briozoi e octocoralli verso 16 ceppi di batteri antibiotici-resistenti ed isolati diversi nuovi metaboliti secondari biologicamente attivi (Mirna H. R. Seleghim *et al.*, 2007).

Nelle spugne, in particolare, sono stati identificati diversi componenti bioattive derivati da estratti che presentano una vasta gamma di attività quali anti-tumorale (Baslow and Turlapaty, 1969), anti-virale (Carter and Rinehart, 1978), anti-batterica (Sharma and Burkholder, 1967) ed anti-funginea (Phillipson and Rinehart, 1983). Gli estratti crudi mostrano, dunque, un'ampia diversità chimica e sono costituiti da

nucleosidi (Quinn *et al.*, 1980), terpeni (Cimino *et al.*, 1971), peptidi (Stonard e Andersen, 1980), alcaloidi (Braekman *et al.*, 1982), acidi grassi (Morales e Litchfield, 1976), e aminoacidi non naturale (Crews *et al.*, 1986; Inman e Crews, 1989). Inoltre, è stato confermato che estratti crudi da spugne mostrano attività antibatterica contro Gram positivi (Rao P.S. and Parekh K.S., 1981) e potrebbero quindi essere una fonte alternativa per sostituire gli insetticidi sintetici altamente tossici e giocano un ruolo fondamentale nel futuro programma di sviluppo di insetticidi alternativi.

Un certo numero di composti bioattivi è stato isolato da estratti crudi di ascidie, mostrando attività anti-virale (Rinehart *et al.*, 1984), citotossica (Moquin-Patthey and Guyot, 1989) anti-batterica (Azumi *et al.*, 1990) e anti-enzimatica (Sato *et al.*, 1998). Questi estratti crudi sono principalmente composti da diversi derivati di alcaloidi e peptidi (Tadessea M. *et al.*, 2008). Nel 2008 è stata valutata l'attività antimicrobica ed antifunginea di *C. intestinalis*. E' stata rilevata un'elevata attività nella frazione-SPE al 40% e 80% contro batteri (Gram +, Gram -) e funghi, e nessuna attività nella frazione al 10% e nell'estratto crudo totale (Tadessea M. *et al.*, 2008).

Nell'ultimo decennio, sono stati saggiati estratti crudi da crostacei marini, molluschi ed echinodermi, i quali hanno una potenziale proprietà antimicrobica (Haug *et al.*, 2002, Casas *et al.*, 2010; Pasiyappazham R. *et al.*, 2011). In dettaglio, sono state condotte e validate attività antibatteriche contro *E. coli*, *C. glutamicum*, *V. anguillarum* e *S. aureus* in estratti da diversi tessuti ed estratti da emociti di quattro specie di Crostacei decapodi (Haug T. *et al.*, 2002). Nel 2010 è stata confermata l'attività antimicrobica verso cinque specie batteriche appartenenti alla famiglia Enterobacteriaceae di estratti da tessuti di tre specie di Molluschi (Degiam Z.D. and Abas A.T., 2010). Nel 2013 uno studio sull'Echinoderma *Holothuria scabra* ha

messo in luce le attività antibatteriche verso Gram + e Gram – ed attività verso il fungo *C. albicans* di estratti acidi da tessuti effettuati con metodiche differenti. L'attività citotossica è risultata elevata solamente nelle gonadi di *H. scabra* in seguito ad un metodo di estrazione in metanolo (Mohammadizadeh F. *et al.*, 2013).

**CAPITOLO 2: Attività antimicrobica di *Ciona intestinalis*,
Cancer pagurus, *Procambarus clarkii*, *Actinia equina* e
*Pelagia noctiluca***

2.1 OBIETTIVO

Il presente lavoro affronta lo studio di componenti dell'immunità innata di invertebrati marini di diversi livelli filogenetici. A tale scopo viene condotta un'analisi dell'attività antimicrobica ed antifungina di peptidi sintetici disegnati in base ai risultati di uno studio (Vizzini A. *et al.*, 2012) sulla risposta infiammatoria di *Ciona intestinalis* (Tunicata) (Cammarata *et al.*, 2008)

Inoltre, per acquisire nuovi dati su tali attività presenti nelle cellule dell'immunità innata di altri invertebrati marini, si saggiano gli estratti emocitari di *Cancer pagurus*, *Procambarus clarkii* e di tessuti di *Actina equina* e *Pelagia noctiluca*.

Infine, allo scopo di verificare la potenziale trasferibilità in campo terapeutico è stato condotto un test di citotossicità verso cellule della linea cellulare monocitaria murina *J774-A1* proveniente dal sarcoma di topi Balb/c.

2.2 PEPTIDI DI *Ciona intestinalis*

Una strategia d'ibridazione sottrattiva è stata usata per identificare dei geni differenzialmente espressi in individui di *C. intestinalis*; parte degli animali sono stati inoculati con una soluzione di LPS (Lipopolisaccaride), i restanti campioni sono stati utilizzati come controllo e divisi in due gruppi: non trattati ed inoculati con soluzione marina. L'induzione con LPS è correlato con l'up-regolazione e differente localizzazione tissutale di un nuovo gene.

La strategia di ibridazione sottrattiva è stata utilizzata in seguito all'estrazione dell'RNA totale. Tale tecnica è basata su un metodo PCR-based per l'amplificazione selettiva di sequenze differenzialmente espresse, permettendo l'isolamento del trascritto dal tessuto. Sono stati, quindi, identificati e caratterizzati due trascritti: *Ci8short* e *Ci8long*, derivati dalla trascrizione del gene ENSCING00000009651, e che risultano generati dall'utilizzo di due siti di poliadenilazione alternativi (APA). Il trascritto *Ci8long* possiede un dominio di proteina con rilevante omologia verso componenti della famiglia del recettore di trasporto di proteine (RTP), non presente nel trascritto *Ci8short*. Analisi di Real Time PCR e Northern Blot, mostrano un diverso pattern di espressione dei due trascritti. In particolare, *Ci8short* è fortemente attivato dopo induzione con LPS nel faringe di *C. intestinalis*. Inoltre, analisi di ibridizzazione *in situ* evidenziano che l'mRNA *Ci8long* è espresso solamente negli emociti, mentre l'mRNA *Ci8short* è trascritto anche nelle cellule endoteliali dei vasi e nell'epitelio del faringe. In accordo con la constatazione che il faringe dell'ascidia è coinvolto nell'immuno-sorveglianza entrando in contatto con una grande varietà di patogeni, questi risultati hanno dimostrato che la regolazione dell'espressione genica, basata sui diversi siti di poliadenilazione, è una potente strategia ancestrale che influenza sia il livello di espressione che la distribuzione tissutale di trascritti alternativi (Vizzini A. *et al.*, 2012). In questo lavoro, gli autori hanno avanzato

l'ipotesi che tali peptidi, prodotti a seguito di inoculo con LPS, potessero avere attività antimicrobica.

In riferimento alla sequenza amminoacidica del *Ci8short* (73aa), al fine di valutare i parametri chimici/fisici del peptide preso in analisi, è stata effettuata un'analisi bioinformatica mediante l'utilizzo di un sito di predizione: APD2-Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor. (Fig. 12).

Ci8short 1 MTSTVAIPQFFGNYPGVIPGSVPGGIPCIPIGTMPANVPIPTSANGVSYPTVPIQVPIQLPVPVGGGCYNE 73

Fig. 12 Sequenza amminoacidica del peptide *Ci8short*. (Vizzini A. et al., 2012). I residui idrofobici evidenziati in rosso ed i residui di Pro e Gly in blu.

Tale peptide è ascrivibile alla famiglia delle catelicidine. In quanto, ricordiamo che la peculiarità degli PR-AMPs, appartenenti a tale classe, è la presenza di un dominio anionico, con brevi motivi ripetuti di tipo PPRX o PRPX, dove X è spesso un residuo idrofobico o l'aminoacido glicina (Scocchi et al 2011).

In relazione al risultato della predizione bioinformatica, si è voluto indagare sulle attività antimicrobiche di tre piccoli peptidi (27aa, 30aa e 30aa) disegnati ed opportunamente tagliati a partire dalla sequenza intera del peptide *Ci8short*.

Di questi tre piccoli peptidi (mostrati di seguito in Fig. 22) sono state verificate le caratteristiche chimiche/fisiche ed effettuate le analisi funzionali.

2.3 ESTRATTI ACIDI DI *Cancer pagurus* e *Procambarus clarkii*

La ricerca sulle attività antibatteriche dei crostacei si è concentrata principalmente sullo studio del genoma di *Daphnia pulex* che ha contribuito all'identificazione e sequenziamento di molecole bioattive che regolano una vasta gamma di funzioni

fisiologiche, tra cui il cambiamento di colore, le funzioni metaboliche, lo sviluppo, la metamorfosi e la riproduzione (Phoenix D.A. *et al.*,2013).

2.4 ESTRATTI ACIDI DI Actinia equina e Pelagia noctiluca

Gli Cnidari con le proprie tossine continuano ad offrire una gamma di interessanti nuove molecole dirette contro una serie di bersagli biologici. Di recente è stato descritto il primo genoma completo di un anemone di mare *Nematostella vectensis* ed il suo complemento di tossine (Abba J. Castin 2013). Il genoma dell'anemone è stato oggetto di diverse analisi che mettono in luce come potrebbero essere sintetizzate delle molecole bioattive in grado di interagire con i canali di sodio o di potassio (Norton R.S., 2012).

2.5 TARGET UTILIZZATI NEI SAGGI ANTIMICROBICI

Caratteristiche generali

Nello schema di classificazione in cinque regni, i batteri costituiscono il regno dei procarioti e si differenziano dalle cellule di tutti gli altri organismi viventi, chiamati eucarioti, per l'assenza di un nucleo delimitato dalla membrana nucleare. I batteri sono organismi di dimensioni microscopiche caratterizzati dall'assenza di un nucleo morfologicamente definito. Possono avere forma sferica (cocchi), cilindrica (bacilli), a virgola (vibrioni) o a spirale (spirilli). Esistono anche batteri provvisti di ramificazione e filamenti (attinomiceti). Si riconoscono tipi caratteristici di aggregazione batterica: diplococchi, batteri sferici associati a due a due, streptococchi, se sono disposti a formare una catena, stafilococchi, se formano un grappolo. I batteri possono essere statici o muoversi nell'ambiente circostante per mezzo di particolari appendici distribuite sulla superficie cellulare. Un'altra suddivisione molto importante è quella che raggruppa i batteri secondo il livello di temperatura alla quale possono crescere. Si hanno così, per questa suddivisione, tre

sottoclassi che sono i batteri criofili, i batteri mesofili e i batteri termofili. Altre classificazioni seguono criteri quali la reazione alla colorazione di Gram, che divide i batteri in Gram positivi e Gram negativi (Tabella 1) (Fig. 13), la modalità di respirazione (batteri aerobi obbligati stretti, batteri anaerobi obbligati stretti, batteri anaerobi facoltativi e i microaerofili) e di nutrizione (batteri autotrofi ed batteri eterotrofi) e secondo le caratteristiche biochimiche, quali la luminescenza.

Tabella 1 Distinzione tra batteri Gram positivi e Gram negativi (Tortora G.J. et al.,2008)

Componente/struttura	Gram positivi	Gram negativi
Spessore	15-80 nm	8-10 nm
Membrana esterna	Assente	Presente
Peptidoglicano	30-70% del peso della parete	20% del peso della parete
Acidi teicoici	Presenti	Assenti
Proteine	Rare	Presenti
Lipidi	Presenti in poche specie	Presenti
Lipopolisaccaridi	Assenti	Presenti
Lipoproteine	Assenti	Presenti
Catena peptidica:		
Aminoacido in posizione 1	L-Ala	L-Ala
Aminoacido in posizione 2	D-Glu	D-Glu
Aminoacido in posizione 3	L-Lys (più frequente)	M-Dpm
Aminoacido in posizione 4	D-Ala	D-Ala
Legame interpeptidico diretto tra posizione 3 e 4	Raro	Caratteristico
Ponte interpeptidico tra posizione 3 e 4	Frequente	assente
Legame interpeptidico tra la posizione 2 e 4	Raro	assente

Per conferire forma e rigidità alla cellula i batteri possiedono un rivestimento (parete batterica) che ricopre la membrana plasmatica, al suo esterno si trova spesso una sottile capsula composta da polisaccaridi. Infine, impiantati sulla membrana, vi sono i flagelli. Il citoplasma ha caratteristiche analoghe a quello degli altri organismi viventi e lo stesso vale per le reazioni biochimiche. I batteri, inoltre, sono sprovvisti di un nucleo separato dal citoplasma per mezzo di membrana, e mancano anche di cromosomi morfologicamente identificabili: il cromosoma batterico è infatti un'unica molecola di DNA. I batteri, date le loro dimensioni microscopiche e le ridotte

esigenze alimentari ed ambientali, sono gli esseri viventi più diffusi. Sono presenti ovunque: nel terreno, nell'acqua e nell'aria. Sono numerosi anche i batteri parassiti che vivono all'interno di altri organismi. Non tutti sono peraltro patogeni: ad esempio nell'intestino umano sono presenti batteri che si nutrono con i prodotti della digestione. Tali batteri non solo sintetizzano sostanze quali vitamine utili all'organismo umano, ma ostacolano l'attecchimento delle specie patogene.

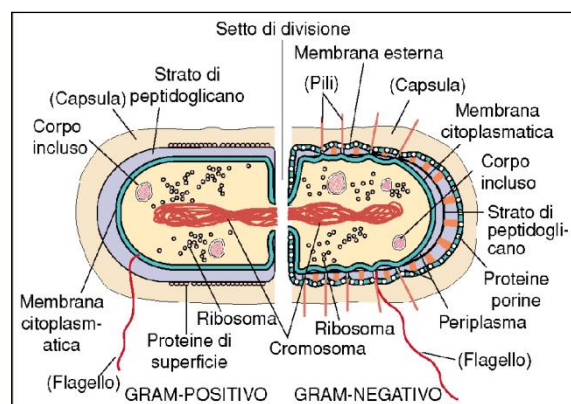


Fig. 13 Differenza tra microorganismi gram positivi e gram negativi (Fisher R.D et al., 2008).

Batteri Gram negativi

a. *Escherichia coli*

L' *E. coli* è un batterio gram-negativo, forma di bastoncello diritto (Fig. 14). La sua temperatura ottimale di sopravvivenza è di 37 °C, vive facilmente nell'intestino dell'uomo e degli animali; è poco resistente a disinfettanti chimici e/o fisici e viene eliminato con la pastorizzazione. Alcune forme sono patogene. Fra di esse le cinque principali sono: l' *E. coli* enterotossigeno (*ETEC*), l' *E. coli* enteropatogenico (*EPEC*), l' *E. coli* enteroinvasivo (*EIEC*), l' *E. coli* enteroaderente (*EAEC*) e l' *E. coli* produttore di verocitotossina (*VTEC*, che comprende anche i ceppi enteroemorragici, *EHEC*).

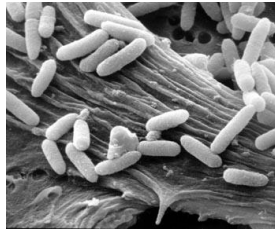


Fig. 14 *E. coli*. Microscopia elettronica a scansione (SEM) (Perry J. et al., 2004).

b. Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa, bacillo mobile gram-negativo, è un patogeno opportunista che frequentemente provoca infezioni nosocomiali come la polmonite, infezioni del tratto urinario (UTI) e batteriemia (presenza di batteri nel sangue) (Fig.15). Questi agenti patogeni sono diffusi in natura, presenti nel suolo, nell'acqua, nelle piante e negli animali (uomo compreso). *P. aeruginosa* è diventato una causa importante di infezioni, specialmente nei pazienti debilitati o immunocompromessi. Infezioni da *Pseudomonas* sono complicate e possono mettere a rischio la vita.

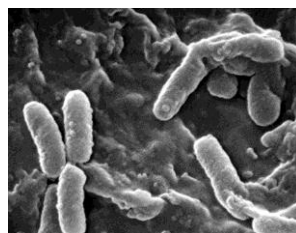


Fig. 15 *P. aeruginosa*. Microscopia elettronica a scansione (SEM) (Perry J. et al., 2004).

c. Brucella abortus e Brucella suis

Brucella è un piccolo coccobacillo gram-negativo, facoltativo ed intracellulare, non mobile, non encapsulato, non sporulato ed aerobico (Tabella 2). Il genere *Brucella* appartiene alla famiglia delle Brucellaceae (Bergey, 1994). *Brucella* fa parte della

classe degli *Alphaproteobacteria* che comprende dei batteri simbiotici e patogeni di mammiferi o di piante. Tra gli agenti patogeni di *Alphaprotéobactéries* mammiferi, si nota il genere *Bartonella*, *Ehrlichia* e *Rickettsia*, che utilizzano vettori con modalità di trasmissione. Con *Bartonella*, *Brucella* è l'unico genere dell'ordine dei *Rhizobiales* in grado di infettare cellule di mammifero. Dieci specie sono attualmente riconosciute nel genere *Brucella*: sei di queste specie sono considerate "classiche": *B. melitensis*, ***B. abortus*** (Fig.16a), ***B. suis*** (Fig. 16b), *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis*; quattro come "nuove": *B. ceti*, *B. pinnipedialis* e recentemente *B. microti* e *B. inopinata*. Questa classificazione si basa principalmente sulla preferenza della scelta dell'ospite, e su qualche carattere microbiologico specifico (Alton G.G. *et al.*, 1988; Corbel M.J. *et al.*, 1984). Tuttavia, è stato proposto che le specie di *Brucella* dovrebbero essere raggruppate come biovar di una singola specie sulla base del DNA (Verger J.M., *et al.*, 1985). Confrontando il genoma di *B. melitensis* (Del Vecchio V.G *et al.*, 2002) e *B. suis* (Paulsen I.T *et al.*, 2002), la classificazione attuale è la seguente:

Tabella 2. *Brucella* (Maurin M., 2005).

Specie	Biovars	Distribuzione	Animale ospite abituale	Patogenicità per l'uomo	Isolamento
<i>B. abortus</i>	1 - 6, 9	Ubiquitaria	Bestiame, ungulati selvatici	Moderato	Bruce, 1897
<i>B. melitensis</i>	1 - 3	Mediterraneo, Medio Oriente	Pecore, capre, ungulati selvatici	Forte	Bruce, 1887
<i>B. suis</i>	1 et 3	America, Asia, Oceania	Suino	Forte	
<i>B. suis</i>	2	Europa centrale e occidentale	Suino, lepre	Basso*	Traum, 1914
<i>B. suis</i>	4	America del Nord, Russia	Renne	Moderato	
<i>B. suis</i>	5	Russia	Roditori selvatici	Forte	
<i>B. canis</i>		Ubiquitaria (frequenze elevate in America del sud)	Cani	Basso	Carmichael & Bruner, 1968
<i>B. ovis</i>		Basso Mediterraneo	Ovini	Nulla	Van Drimmelen, 1953
<i>B. neotomae</i>		Utah (USA)	Roditore del deserto	-	Stoenner & Lackerman, 1957
<i>B. ceti</i>		-	Cetacei (delfini)	-	Ewalt &
<i>B. pinnipedialis</i>		-	Pinnipedi (foche)	**	Ross, 1994
<i>B. microti</i>		Europa centrale	Arvicole	-	Hubaleck, 2007
<i>B. inopinata</i>	1-2	Stati Uniti-Australia	-	-	Baron, 2008

* Pochi casi di infezione umana riportati in letteratura. ** Due casi di infezione umana riportati in pazienti peruviani recentemente emigrati negli Stati Uniti, così come la contaminazione in laboratorio in Gran Bretagna.

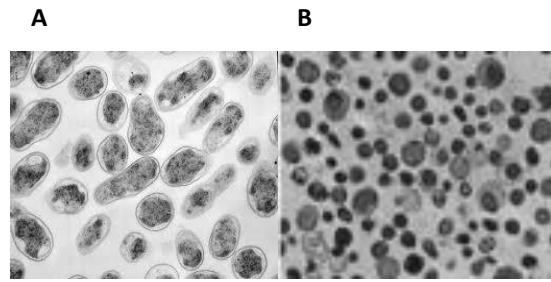


Fig. 16 *B. abortus* (A), *B. suis* (B). Microscopia elettronica a scansione (SEM) (Perry J. et al., 2004).

Batteri Gram positivi

d. Staphylococcus aureus

S. aureus è di forma sferica (0,5-1 μm di diametro), Gram-positivo, immobile, generalmente privo di capsula, asporigeno, anaerobio facoltativo, generalmente catalasi positivo, chemiorganotrofico e alcune sono specie cromogene (Fig. 17). Appartenente alla famiglia Micrococcacea, se osservato al microscopio, appare generalmente disposto in corte catenelle o a grappolo d'uva. *S. aureus* è un batterio presente sulla cute e sulle mucose dell'uomo e di altri mammiferi; è altresì in grado di colonizzare la mammella degli animali produttori di latte (vacche, pecore, capre).

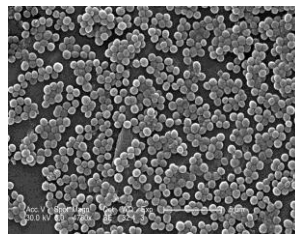


Fig.17. *S. aureus*. Microscopia elettronica a scansione (SEM) (Perry J. et al., 2004).

e. Enterococcus faecalis

Gli Enterococchi sono cocchi Gram-positivi, catalasi negativi, si presentano isolati, doppi o più frequentemente a catena (Fig. 18). Ampiamente distribuiti nell'ambiente, possono, infatti, essere isolati dall'acqua, suolo e piante. Nell'uomo, come negli altri mammiferi ed uccelli, fanno normalmente parte della flora commensale del tratto gastrointestinale e del tratto genitale femminile. Sono almeno dodici le specie di enterococco isolate da infezioni ospedaliere, ma le specie di maggiore importanza clinica sono *E. faecalis* e *E. faecium*. In particolare, numerosi studi indicano che *E. faecalis* rappresenta la specie più virulenta, essendo la causa di circa l'80% delle infezioni enterococciche umane.

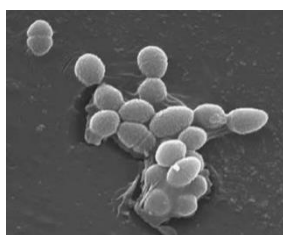


Fig. 18 *E. faecalis*. Microscopia elettronica a scansione (SEM) (Perry J. et al., 2004).

f. Bacillus subtilis

B. subtilis di forma bastoncellare, Gram-positivo, catalasi positivo, aerobi e anaerobi facoltativo (Fig. 19). Una caratteristica distintiva del genere è la formazione di endospore resistenti al calore, che hanno una considerevole importanza nell'ecologia e nella tassonomia degli organismi (Bandow *et al.*, 2002).

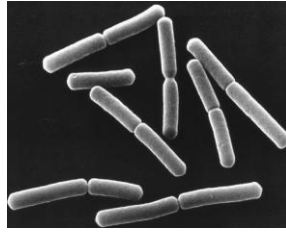


Fig. 19 *B. subtilis*. Microscopia elettronica a scansione (SEM) (Perry J. et al., 2004).

g. Corynebacterium glutamicum

C. glutamicum è un batterio Gram positivo, non mobile, asporigeno (Fig. 20). Esso produce la catalasi ed utilizza il metabolismo fermentativo per degradare i carboidrati. Impiegato a livello industriale per la produzione degli amminoacidi lisina e glutammato, è anche usato per il biorisanamento dell'ambiente e la produzione di plastica biodegradabile. *C. glutamicum* non è un batterio patogeno. Tuttavia, *C. diphtheriae*, specie affine, produce un'esotossina, causa della difterite negli esseri umani.

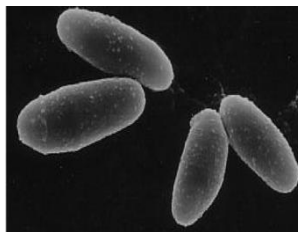


Fig. 20 *C. glutamicum*. Microscopia elettronica a scansione (SEM) (Perry J. et al., 2004).

2.6 Funghi unicellulari

h. Candida albicans

C. albicans è un fungo saprofito di dimensioni comprese tra i 4 e i 6 micro, appartenente alla famiglia dei Saccaromiceti (Fig. 21). Vive normalmente nel cavo orale, nel tratto gastrointestinale, nella pelle, nella vagina e nelle mucose di persone sane. Le colonie di *Candida* appaiono tondeggianti e di colore bianco o crema. Da

questa caratteristica deriva il nome latino *albicans*, che significa biancastro. Si conoscono circa 200 varianti di *Candida* (fonte Istituto Pasteur – Parigi), circa 20 sottospecie sono patogene. Il fungo s’instaura nell’intestino di tutti gli esseri umani poco dopo la nascita e qui rimane sempre presente. In condizioni normali, la *Candida* è benefica per alcuni processi metabolici e biologici e svolge un ruolo importante nella digestione degli zuccheri mediante un processo di fermentazione, oltre all’eliminazione di materia organica morta.

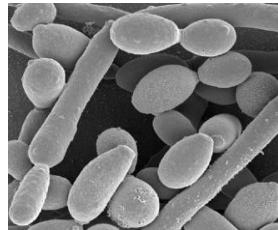


Fig. 21 *C. albicans*. Microscopia elettronica a scansione (SEM) (Perry J. et al., 2004).

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1 DEFINIZIONI GENERALI

3.2.1 Minima Concentrazione Inibente (CMI)

CMI, Concentrazione Minima Inibitoria: La più bassa concentrazione di un agente antimicrobico che impedisce, dopo 18-24 ore di incubazione, la crescita visibile di un dato microrganismo in un terreno di coltura. La concentrazione minima inibitoria viene valutata sulla base di test *in vitro* per la determinazione quantitativa della sensibilità di un microrganismo agli agenti antimicrobici. Questi test sono allestiti preparando diluizioni seriate dell'agente antimicrobico in terreno solido o in brodo contenenti colture del germe da saggiare.

3.2.2 Concentrazione Minima Battericida (CMB)

La più bassa concentrazione di un agente antimicrobico capace di ridurre la popolazione batterica iniziale del 99,99% (riduzione logaritmica di 4) dopo 18-24 ore di incubazione.

3.2.3 Batteriostasi e Battericidia

Un agente antimicrobico è detto batteriostatico se è in grado di inibire o limitare la replicazione batterica senza uccidere il microorganismo. L'utilizzo di questi agenti antimicrobici viene fatto per limitare una infezione batterica, ma non per eliminarla; questo deve essere effettuato dal sistema immunitario dell'ospite. Come illustrato nella parte introduttiva di questa tesi (figura 10), l'inibizione della crescita batterica può avvenire tramite l'interferenza con la replicazione del loro DNA o RNA le sintesi proteica, o disturbando altri aspetti del metabolismo batterico, a seconda dell'antibiotico utilizzato. L'aggettivo "batteriostatico" viene utilizzato in contrapposizione a "battericida", che si riferisce agli antibiotici che invece causano la morte dei microbi, che hanno cioè un'azione irreversibile su batteri in attiva

moltiplicazione. Non vi è tuttavia una distinzione netta tra le due categorie, in quanto, ad esempio, concentrazioni elevate di alcuni agenti batteriostatici risultano essere battericide, mentre concentrazioni basse di alcuni agenti battericidi risultano essere solamente batteriostatiche. Alcuni antibiotici risultano poi essere batteriostatici per alcune specie batteriche, e battericidi per altre. Un'ulteriore complicazione è data dall'acquisizione eventuale di resistenza ad un antibiotico da parte di batteri, che ne annulla l'azione battericida. Alcune modifiche al metabolismo batterico, apportate dall'acquisizione della resistenza ad un antibiotico, possono anche limitare o rallentare la crescita del batterio stesso, rendendo così indirettamente l'antibiotico un blando batteriostatico.

3.2.4 Antibiogramma

Misura *in vitro* dell'attività antimicrobica di una molecola o di una preparazione nei confronti di un microorganismo. Questo test è un presupposto essenziale per una corretta terapia antimicrobica, che permette di conoscere non solo se un farmaco è efficace nei confronti di un certo microorganismo ma anche di stabilire la dose più opportuna da utilizzare. È un metodo quantitativo, semplice, rapido ed economico, valido per microrganismi aerobi a crescita rapida.

3.2.5 Citotossicità

Si definisce “citotossico” l'effetto di un agente di tipo chimico (una molecola), fisico (temperatura, radiazione o onda elettromagnetica) o biologico (una cellula del sistema immunitario) in grado di indurre un danno ad una cellula. I test di citotossicità permettono di valutare la citotossicità di una molecola o di una miscela di molecole. Al fine di testare la citotossicità dei prodotti forniti, in questo studio è stato utilizzato un test semplice basato sull'incorporazione del Trypan blue, colorante in grado di penetrare esclusivamente nelle cellule morte. Le cellule vitali, avendo la

membrana intatta, non permettono la penetrazione del colorante nel citoplasma; al contrario, nelle cellule morte questo penetra facilmente, rendendole distinguibili dalle vive dopo osservazione al microscopio ottico.

3.3.1 Preparazione delle molecole antimicrobiche e degli estratti

Peptidi sintetici di Ciona intestinalis

L'analisi bioinformatica della sequenza *Ci8short* ha rilevato una percentuale in presenza dell'aa prolina del 21% e dell'aa glicina del 13%, una idrofobicità del 36% ed una carica netta totale pari a -1.

Il risultato dell'analisi ottenuto mediante il sito di predizione: APD2-Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor ha mostrato una bassa probabilità che la sequenza intera del peptide *Ci8short* possa avere una attività antimicrobica.

La regione centrale della sequenza intera del *Ci8short* è ascrivibile alla famiglia delle catelicidine a cui appartengono dei peptidi particolarmente ricchi di residui di prolina; PR-AMPs (Scocchi et al., 2011). Tale regione potrebbe, invece, avere la probabilità di essere un peptide con attività antimicrobica.

Pertanto, si è indagato sulle potenziali attività antimicrobiche di tre peptidi (Peptide I: 27aa; Peptide II: 30aa e Peptide III: 30aa) disegnati, dal gruppo di ricerca diretto dal Dott. P. Colombo - CNR Palermo, a partire dalla sequenza intera del peptide *Ci8short*.

Di questi tre peptidi (mostrati di seguito in Fig. 22) sono state verificate le caratteristiche chimiche/fisiche ed effettuate le analisi funzionali.

```
Ci8short  1  MTSTVAIPQFFGNYPGVIPGSVPGGIPCPPIPGTMPPANVPIPTSANGVSYPTVPIQVPIQLPVVPVGGGCYNE  73
          1  MTSTVAIPQFFGNYPGVIPGSVPGGIP  27
                    ****
          22                PGGIPCPPIPGTMPPANVPIPTSANGVSYPT  51
                                *****
          43                                SANGVSYPTVPIQVPIQLPVVPVGGGCYNE  73
```

Fig.22 Allineamento di tre sequenze aminoacidiche a partire dalla sequenza aa di *Ci8short*

Durante la **prima fase** sono state verificate le caratteristiche chimiche/fisiche usando il sito di predizione: APD2-Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor.

In riferimento alla sequenza aa del peptide I in Fig. 23, la percentuale di glicina ed prolina presenti nell'intera sequenza peptidica è del 18%. Il peptide mostra una percentuale di idrofobicità totale del 37% ed una carica netta totale di 0.

Peptide I 1 **MTSTVAIPQFFGNYPGVIPGSVPGGIP** 27

Fig. 23 Sequenza del Peptide I: 27aa. Residui idrofobici evidenziati in rosso, residui di Pro e Gly in blu.

L'analisi della sequenza aa del peptide II in Fig. 24, mostra una percentuale totale di residui di Glicina e di Prolina rispettivamente del 13% e del 30 %, una idrofobicità totale del 30% ed una carica netta pari a 0.

Peptide II 22 **PGGIPCPIPGTMPPANVPIPTSANGVSYPT** 51

Fig.24 Sequenza aa Peptide II 30aa. Residui idrofobici evidenziati in rosso, residui di Pro e Gly in blu.

Lo studio dell'ultima sequenza del peptide III in Fig. 25, evidenzia una presenza di Glicina e Prolina sull'intera sequenza rispettivamente del 13% e del 16%, una idrofobicità della molecola pari al 36% ed una carica netta di -1.

Peptide III 43 **SANGVSYPTVPIQVPIQLPVPVGGGCYNE** 73

Fig.25 Sequenza del Peptide III 30aa. Residui idrofobici evidenziati in rosso, residui di Pro e Gly in blu.

Dunque, anche per questi tre piccoli peptidi è possibile sostenere che sono ascrivibili alla famiglia delle catelicidine, nello specifico alla classe dei peptidi ricchi in Prolina (Scocchi *et al.*, 2011) (Tabella 3).

Tabella 3. Caratteristiche riassuntive dei peptidi antimicrobici analizzati

	Peptide I	Peptide II	Peptide III
<i>Phylum</i>	Chordata		
<i>Classe</i>	Asciidiacea		
<i>Specie</i>	<i>C.intestinalis</i>		
<i>Carica netta</i>	0	0	-1
<i>Taglia (aa)</i>	27	30	30
<i>% Idrofobicità*</i>	37	30	36
<i>Indice di Boman** kcal/mol</i>	-0.64	-0.19	-0.16
<i>Sequenza</i>	MTSTVAIPQFFGNY PGVIPGSVPGGIP	PGGIPCPIPGTMPPA NVPIPTSANGVSYPT	SANGVSYPTVPIQVPIQ LPVVPVGGGCYNE

* La scala di idrofobicità è un valore che definisce la relativa idrofobicità dei residui di amminoacidi. Il valore più positivo è da attribuire al valore più idrofobo degli amminoacidi. Queste scale sono comunemente usate per prevedere la formazione di alfa-eliche.**Indice di Boman: utile per individuare i potenziali legami tra la membrana e le proteine interagenti ed è la somma delle energie libere delle rispettive catene laterali, diviso il numero totale dei residui di un peptide antimicrobico. I valori calcolati sono negativi (tranne per il peptide ibrido), ma il + e - sono invertiti (Boman, H.G., 2003).

La **seconda fase** ha previsto la separazione e la verifica del grado di purezza dei tre peptidi presi in esame. In dettaglio, i peptidi sono stati separati mediante cromatografia a fase inversa (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) utilizzando una colonna Venusil MP C18-5 (4.6x250 mm). Sono stati caricati 5 µl di campione per ogni analisi e la lettura è stata effettuata a 220 nm con un gradiente di

aceto nitrile da 23 a 100% eluita a 1.0 mL/min, per ogni 30 minuti. I prodotti sono stati confermati dalla spettrometria di massa che, chiarendone le proprietà strutturali e chimiche delle molecole, ha evidenziato un grado di purezza di tutti e tre i peptidi pari a $\geq 90\%$. I tre peptidi sono stati liofilizzati e conservati a -20°C .

Nella **terza fase** si è proceduto all'analisi della loro attività antimicrobica.

Estratti acidi di Cancer pagurus

Individui congelati di *C. pagurus* sono stati forniti dall'impresa ittica "Mediterraneo Fish Gel Di Catanzaro Sebastiano" di Palermo. Sono stati sistemati all'interno di vasche refrigerate dello stabulario del Dipartimento di Biologia Animale, e nutriti con pellet e gamberetti e lasciati acclimatare per due settimane. L'animale è stato posto 10 minuti in freezer per anestetizzarlo e sono stati prelevati 3 ml di emolinfa di *C. pagurus* in siringa contenente anticoagulante per granchi (0,45 M NaCl, 0.1M glucose, 30 mM trisodio citrate, 26 mM acido citrico, 10 mM EDTA, pH 4,6). Le cellule sono state pellettate a 1000 xg, contate, lavate in 3,2 % NaCl (1:10), pellettate nuovamente e congelate a -20°C . Per l'estrazione acida da emociti al pellet è stato aggiunto 10% acido acetico in TBS pH 7,4, e il tutto è trasferito in provette policarbonato per essere sonicato 3 volte per 30 sec. Il campione è stato quindi centrifugato a 2500 rpm per 10 minuti ed in fine è stato recuperato il supernatante acido.

Estratti acidi di Procambarus clarkii

Gli esemplari di *P. clarkii* provengono dall'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero U.O. di Capo Granitola. Sono stati sistemati all'interno di vasche refrigerate dello stabulario del Dipartimento di Biologia Animale, nutriti con pellet e gamberetti, e lasciati acclimatare per due settimane. L'emolinfa è stata prelevata inserendo una siringa contenente anticoagulante (NaCl 0,1 M, glucosio 0,1 M, sodium citrato 30 M, acido citrico 26 M, EDTA 10 M; pH 4,6) tra il 2° e il 3° tergite. Si è proceduto all'estrazione acida seguendo il metodo precedentemente descritto da Mercado *et al.*, 2005, con qualche modifica. Gli emociti ($10 \cdot 10^6$) sono stati risospesi in una soluzione 10% di acido acetico (20 mmol/l Tris, 0,5 mol/l NaCl), sonocati (Sonifier-Branson, model B-15; Danbury, CT, USA) per 1 minuto a 0°C e centrifugati a 27 000 giri per 20 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione, il surnatante è stato concentrato con dei microconcentratori (Corning Spin-X UF; Concentrators).

Estratti acidi di Actinia equina

Individui adulti di *A. equina*, antozoo della fascia costiera del Mediterraneo, sono stati prelevati nelle aree di Capo Gallo (Pa); gli animali sono stati quindi trasferiti presso l'acquario del Dipartimento di Biologia Ambientale e Biodiversità, dove sono stati posti in vasche contenenti acqua di mare ossigenata ad una temperatura di 18°C. I tentacoli sono stati recisi ed è stata aggiunta la soluzione di TBS (per preparare i campioni acidi è stato aggiunto il 10% di CH₃COOH). Dopo tre sonicazioni (sonicatore Branson, Model B15, Danbury, CT) di 30 secondi ciascuna, il campione è stato successivamente centrifugato a 13 000 xg per 10 minuti ed è stato recuperato il supernatante.

Estratti acidi di Pelagia noctiluca

Individui congelati di *P. noctiluca* sono stati forniti dal Dipartimento Biologia animale ed Ecologia marina dell'Università di Messina e sono stati conservati a -80°C fino al momento del loro utilizzo. Si è proceduto con l'estrazione dall'ombrella. Una parte dell'ombrella è stata prelevata ed è stata aggiunta la soluzione di TBS (per preparare i campioni acidi è stato aggiunto il 10% di CH_3COOH); dopo un'omogenizzazione in ghiaccio con Ultra – Turrax per 5 minuti il campione è stato centrifugato a 21 000 xg per 20 minuti ed infine è stato recuperato il supernatante.

3.3.2 Preparazione degli antibiotici di controllo

Allo scopo di verificare la sensibilità o resistenza dei ceppi batterici si è scelto di utilizzare parallelamente ad ogni test due antibiotici controllo con caratteristiche differenti.

✓ **Ampicillina.** L'ampicillina è un antibiotico che appartiene al gruppo delle penicilline e alla classe dei β -lattamici. E' una penicillina semisintetica (deriva dalla acilazione del nucleo 6-aminopenicillanico con l'acido alfa-aminofenilacetico) ad ampio spettro. Al pari delle altre penicilline, agisce inibendo alcune funzioni metaboliche essenziali per la sintesi della parete cellulare batterica, esercitando un'attività battericida. Risulta attiva contro numerosi germi Gram-positivi e Gram-negativi quali: *Streptococchi*, *Enterococchi*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* e *Salmonella*. È inattivata dalle beta-lattamasi. Le penicilline inibiscono la crescita batterica interferendo con la sintesi della parete batterica. Questa è costituita da peptidoglicano, un polimero contenente amminozuccheri (N-acetilglucosamina e acido N-acetilmuramico). Le penicilline si legano alle PBP (Proteine leganti le Penicilline,

o Transpeptidasi) in quanto sono analoghi strutturali del substrato di tali proteine, cioè il dimero D-Ala-D-Ala (2 Alanine) che serve per creare i legami crociati fra le catene di peptidoglicano. L'inibizione delle transpeptidasi blocca la costruzione della parete batterica, uccidendo le cellule batteriche in crescita. Alcuni ceppi batterici sono resistenti alle penicilline, per via di enzimi degradanti le penicilline (β -Lattamasi), transpeptidasi alterata, pompe di estrusione (nei Gram-negativi) o impermeabilità al farmaco (mancanza di porine, pori idrofili dei Gram-negativi che il farmaco deve attraversare per raggiungere il bersaglio). In questo lavoro l'ampicillina è stata utilizzata alle concentrazioni iniziali di 50 $\mu\text{g/ml}$ per *P. aeruginosa* ed *E. coli* e di 25 $\mu\text{g/ml}$ per *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *C. glutamicum*, *C. albicans*, *B. abortus* e *B. suis*.

✓ **Polymyxina B.** Antibiotico battericida a spettro ristretto, composto da un peptide ciclico e da una lunga coda idrofoba che agisce come un surfactante cationico. Questa molecola è efficace principalmente sui batteri Gram negativi, in particolare gli *Pseudomonas* e i coliformi, di cui distrugge la struttura della membrana interagendo con i fosfolipidi. La polimixina B è stata usata alla concentrazione iniziale di 400 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.3 Valutazione delle concentrazioni delle molecole analizzate

Le concentrazioni proteiche delle molecole di studio sono state stimate mediante l'utilizzo dello spettrofotometro NanoDrop (Thermo Scientific) che permette la misura dell'assorbanza della luce ad una lunghezza d'onda di $\lambda = 280 \text{ nm}$ (Tabella 4). Il NanoDrop è uno spettrofotometro UV-Visibile, il cui principale vantaggio è di permettere la misura rapida della concentrazione di un volume di solo un μL di un

campione (contenente una concentrazione di proteine o di acidi nucleici flebile a partire da 5 mg/ml).

Tabella 4. Informazioni relative ai campioni forniti.

<i>Provenienza</i>	<i>Campione</i>	[] $\mu\text{g/ml}$	<i>Solvente</i>	<i>Purificazione con HPLC</i>
<i>C. intestinalis</i>	Peptide sintetico I	3,200	2% Et-OH	SI
<i>C. intestinalis</i>	Peptide sintetico II	1,700	2% Et-OH	SI
<i>C. intestinalis</i>	Peptide sintetico III	2,440	2% Et-OH	SI
<i>C. pagurus</i>	Estratto acido da emociti	2,580	TBS	---
<i>P. clarkii</i>	Estratto acido da emociti	730	H ₂ O distillata	---
<i>A. equina</i>	Estratto acido da tentacoli	616,0	TBS	---
<i>P. noctiluca</i>	Estratto acido da umbrella	1,510	TBS	---

3.3.4 Determinazione della CMI per diluizione

I saggi di attività sono eseguiti in brodo liquido Mueller Hinton (Laboratorios Conda, S.A. PRONADISA). Il test è stato eseguito in piastre di microtitolazione a 96 pozzetti con un fondo ad U (Falcon BECTON DICKINSON), con diluizioni di due in due dei campioni testati e su un volume finale di 60 μl . A partire da singole colonie batteriche, viene preparata una sospensione batterica in un terreno liquido

doppiamente concentrato MH 2X , con una densità ottica di 0,12, lunghezza d'onda $\lambda = 600$ nm, misurata mediante Sherwood Scientific Colorimeter, 254 Digital. A questa densità ottica la concentrazione dell'inoculo iniziale è stimata a circa 10^8 batteri /ml. Procedendo con una diluizione di 1/100 si è ottenuta una concentrazione di circa 10^6 batteri/ml. Al fine di stabilire il numero dei batteri viventi, in termini di UFC (Unità Formante Colonia), per ogni esperienza e per ogni ceppo batterico si sono effettuate delle diluizioni seriali in PBS (Phosphate buffered saline 1X, GIBCO Invitrogen) seguite dalla piastrature su scatole Petri di un aliquota di ogni diluizione (100 μ L). Le micropiastre contenenti delle diluizioni seriate delle molecole testate, previa inoculazione con le sospensioni batteriche sono state incubate alla temperatura ottimale di crescita dei batteri bersaglio utilizzati. Le CMI sono state determinate da 3 test indipendenti. In dettaglio, per tutti i microorganismi ad eccezione di *Brucella*, la misura della crescita batterica e la determinazione della CMI sono state rilevate mediante la misura della Densità ottica a $\lambda = 620$ nm ogni 20 minuti dopo agitazione per mezzo di un lettore incubatore di micropiastre (Infinite® 200 PRO series TECAN), e anche visivamente per osservazione della torbidità di ogni pozzetto "test" rispetto ai pozzetti "controlli".

Due tipi di controllo sono stati previsti:

- dei "**controlli positivi di crescita**", pozzetti contenenti le sospensioni batteriche nel brodo di coltura diluito nel solvente ;
- dei "**controlli negativi di crescita**" pozzetti contenenti solamente il mezzo di coltura e il solvente. Questi pozzetti permettono di verificare la sterilità microbiologica dei prodotti usati nel test.

Le misure delle CMI sulle specie del genere *Brucella*, sono state realizzate esclusivamente in modo visivo all'interno del laboratorio autorizzato P3. L'ampicillina (25 μ g/ml; 50 μ g/ml) (Sigma P-A6140), per Gram positivi e Gram

negativi, e la polimixina B (400 µg/ml) (Sigma, P-1004), per i Gram negativi, sono utilizzati come antibiotici di riferimento per validare la tecnica di CMI usata.

Solventi delle molecole antimicrobiche testate

Il solvente utilizzato per le diluzioni seriali (1:2) del prodotto antimicrobico è il medesimo di quello in cui il campione è stato fornito: TBS (Tryptic Soy Broth; NaCl 150 mM; Tris HCl 10 mM, pH 7.4) per gli estratti crudi di *P. noctiluca*, *A. equina*, *C. pagurus*; acqua sterile per gli estratti crudi di *P. clarkii* e *P. lividus* e il rispettivo peptide sintetico, ed infine etanolo 2% (Carlo Erba Reagent, Spa: Et-OH) per i peptidi sintetici di *C. intestinalis* (peptide I, II e III).

Solvente degli antibiotici di controllo

Per gli antibiotici controllo: ampicillina e polimixina B il solvente adoperato, per le diluzioni seriate (1:2) è identico di quello in cui gli stessi sono stati preparati ossia l'acqua sterile.

Ceppi batterici utilizzati

In base alla quantità disponibile, l'efficacia dei prodotti è stata testata al massimo su 9 ceppi batterici di riferimento appartenenti a delle specie patogene o commensali dell'uomo (Tabella 5).

Tabella 5. Informazioni relative ai ceppi microbici

Specie	N° di riferimento	Forma	Colorazione di Gram	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	bacillo	negativo	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	bacillo	negativo	
<i>Brucella abortus</i>	A1, ATCC 23448	coccobacillo	negativo	
<i>Brucella suis</i>	S1, 1330	coccobacillo	negativo	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	cocco	positivo	
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	cocco	positivo	
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 1302	bacillo	positivo	
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372	bacillo	positivo	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	tondeggiate	----	Fungo unicellulare

Preparazione delle sospensioni batteriche utilizzate per l'inoculo

Come già precisato nel precedente paragrafo, a partire da 2 o 3 colonie prelevate su mezzo MH agar (Mueller Hinton, Laboratorios Conda, S.A. PRONADISA), è stata preparata una prima sospensione batterica in brodo MH 2X alla densità ottica di 0,12 alla lunghezza d'onda $\lambda = 600$ nm, (Sherwood Scientific Colorimeter, 254 Digital Scon). Al fine di inoculare i pozzetti con una quantità finale di $5 \cdot 10^5$ - 10^6 UFC/ml, è realizzata una seconda diluizione di 1/100 nello stesso mezzo. Il numero di batteri viventi effettivamente presenti in ogni inoculo è stato misurato per conta delle colonie

dopo diluizioni seriate (1:10) in PBS 1X (Phosphate buffered saline, GIBCO Invitrogen) e semina per spatolamento su tutta la superficie delle piastre Petri contenenti il mezzo MH agarizzato di una aliquota di ogni diluzione (100 µL).

3.3.5 Determinazione della CMB

La CMB è stata misurata dopo 24 ore di contatto tra i batteri e gli antibiotici. La tecnica si basa sulla conta comparativa dei batteri viventi prima e dopo contatto con l'antibiotico. Tale tecnica è stata eseguita in terreno solido MH. Ne consegue da questa misura una classificazione degli antibiotici in 2 gruppi: antibiotici battericidi, il valore della CMB è prossimo alla CMI, ed antibiotici batteriostatici, il valore della CMB è molto distante da quello della CMI.

Lettura della micropiastre

Previa verifica della crescita nei pozzetti relativi al controllo positivo e dell'assenza di tale crescita nei pozzetti corrispondenti al controllo negativo, la CMI è attribuita al pozzetto indicante la concentrazione più flebile, nel quale non c'è una crescita visibile (rispetto al controllo negativo).

Nel caso in cui non ci sia alcun pozzetto altrettanto limpido che il controllo negativo a nessuna concentrazione del prodotto, il prodotto non è considerato efficace alla concentrazione massima testata. Questo risultato si tradurrà con la sigla NT (misura Non Trovata).

Nel caso in cui tutti i pozzetti ad eccezione del controllo positivo siano limpidi, la CMI corrisponde alla concentrazione più bassa testata. Questo risultato non preclude che il prodotto possa essere efficace anche ad una concentrazione inferiore rispetto a quella testata. Tale dato è espresso come $CMI \leq X$ [minima].

3.3.6 Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm della deviazione standard. I dati sono stati analizzati statisticamente mediante l'analisi della varianza (ANOVA) per determinare le differenze tra i gruppi. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il programma SPSS 15.0 mediante il test non parametrico di Siegel-Tukey e le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0,05$.

3.3.7 Saggio di citotossicità dei campioni testati verso la linea cellulare monocitaria murina: J774-A1

In questo test *in vitro*, è stata usata la linea cellulare monocitaria murina J774-A1 fornita dal Le Centre National de la Recherche Scientifique – CNRS di Montpellier (Francia). Tale linea cellulare è messa a contatto per 24 ore con i prodotti derivati da *C. pagurus*, *P. clarkii*, *P. noctiluca*, *A. equina* e *C. intestinalis* o i loro solventi corrispondenti.

Le cellule J774-A1 sono coltivate in una micropiastre (24 pozzetti) con il mezzo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) a 37°C; 5% CO₂, per 24 h (ogni pozzetto conta circa 125.000 cellule). In queste condizioni, le cellule aderiscono al fondo dei pozzetti della micropiastre. Le cellule sono poi incubate con i prodotti forniti alla diluizione di 1/10 ed 1/20 per 24 ore, ed infine colorate con il Trypan blue, e osservate al microscopio ottico per visualizzare e stimare la percentuale di cellule morte di colore blu.

CAPITOLO 4: Risultati

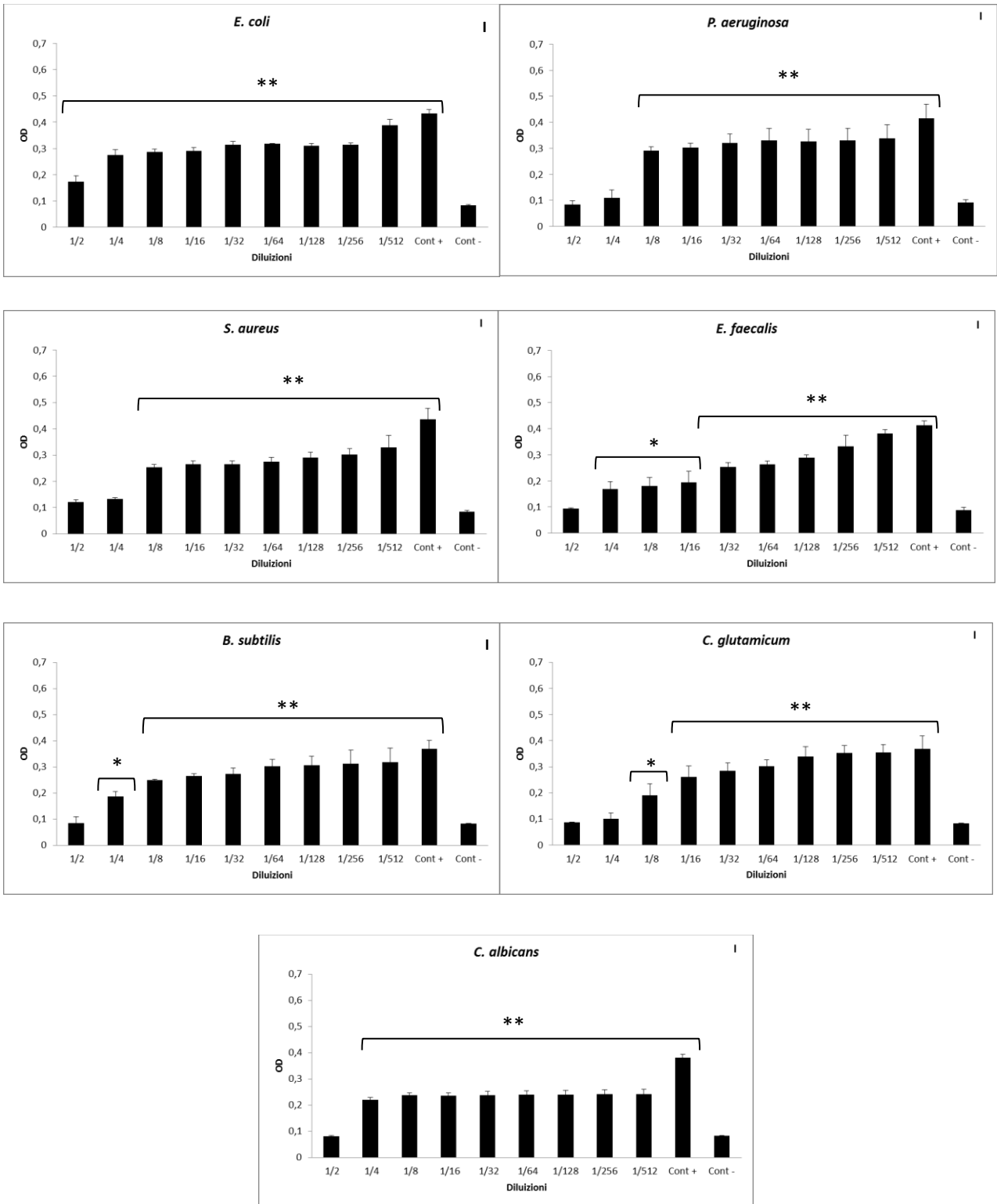
4.1 Risultati sull'attività antimicrobica (CMI e CMB) dei peptidi sintetici di *Ciona intestinalis*

Verso il patogeno Gram - *E. coli* ed il Gram + *S. aureus* non si riscontra alcuna attività antimicrobica per nessuno dei tre peptidi sintetici di *C. intestinalis* alle concentrazioni usate per effettuare i test antimicrobici, rispettivamente di [3,20 mg/ml]i Peptide I, [1,70 mg/ml]i Peptide II e [2,44 mg/ml]i Peptide III (Fig. 25)

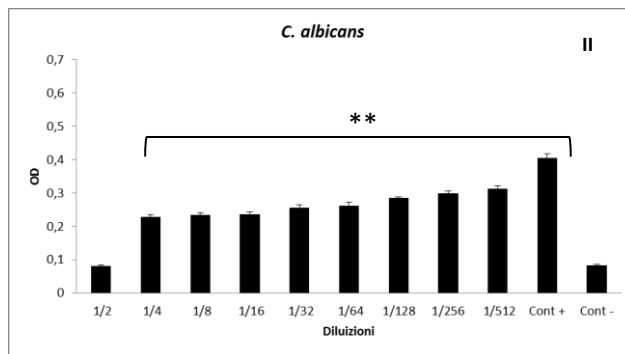
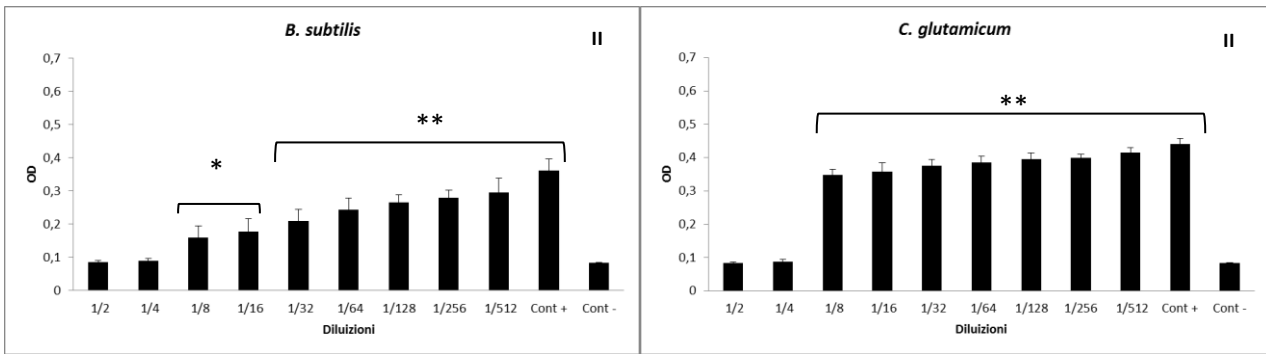
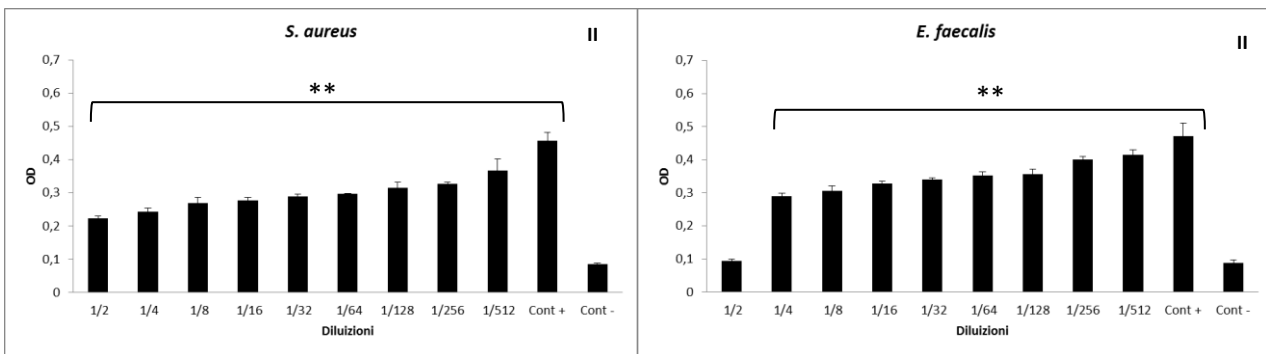
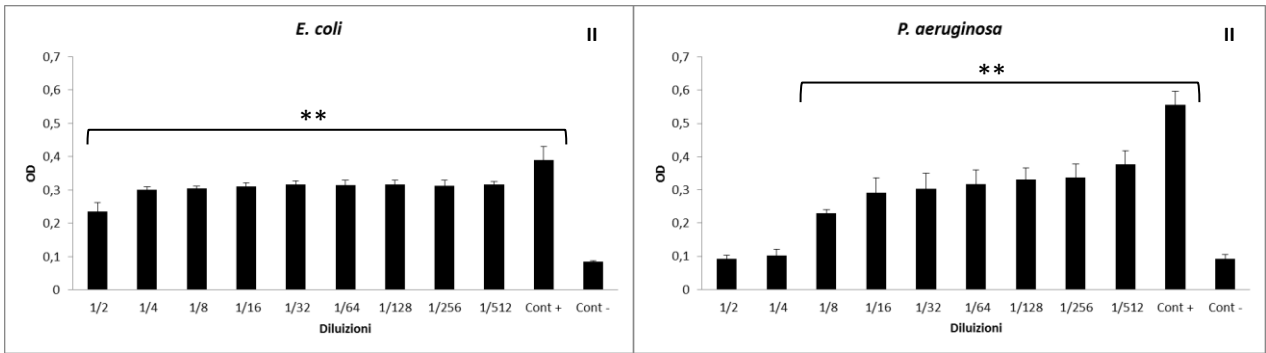
Il **peptide I** ha un'attività battericida sui ceppi Gram +: *E. faecalis*, *C. glutamicum* e sull'eucariote *C. albicans*, ma la CMB non è stata definita in quanto la concentrazione della CMI corrisponde già alla concentrazione massima testata. Si riscontra un'attività battericida sui ceppi Gram -: *P. aeruginosa*, *B. abortus* e Gram + *B. subtilis*. In dettaglio, si nota una riduzione della popolazione batterica finale (CFUf) dello 0,01% rispetto a quella iniziale (CFUi) dopo 24 ore di incubazione. Sul peptide I in analisi, alla concentrazione di 3,20 mg/ml, per i ceppi patogeni Gram – *B. suis* e Gram + *S. aureus* rimane indeterminata l'attività batterica poiché non è stato possibile dedurre la concentrazione della CMB (Tabella 6) (Fig. 26a).

Il **peptide II** presenta un'attività batteriostatica a contatto con il Gram -: *P. aeruginosa* ed il Gram + *C. glutamicum*, giacché la concentrazione della CMI coincide con la CMB. Si constatano, inoltre, delle attività battericide verso il patogeno Gram + *B. subtilis* e l'eucariote *C. albicans*. Suddetto peptide II alla concentrazione di 1,70 mg/ml non ha alcuna attività a contatto con i ceppi: Gram – *B. abortus*, *B. suis* e Gram + *S. aureus* ed *E. faecalis* (Tabella 6) (Fig. 26b).

Il **peptide III** alla concentrazione di 2,44 mg/ml mostra un'attività battericida verso i batteri Gram +: *E. faecalis*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* ed il fungo *C. albicans*. D'altro canto, lo stesso peptide valutato non ha alcuna attività a contatto con i ceppi Gram – *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. abortus*, *B. subtilis* e *S. aureus* (Tabella 6) (Fig. 26c).



B



C

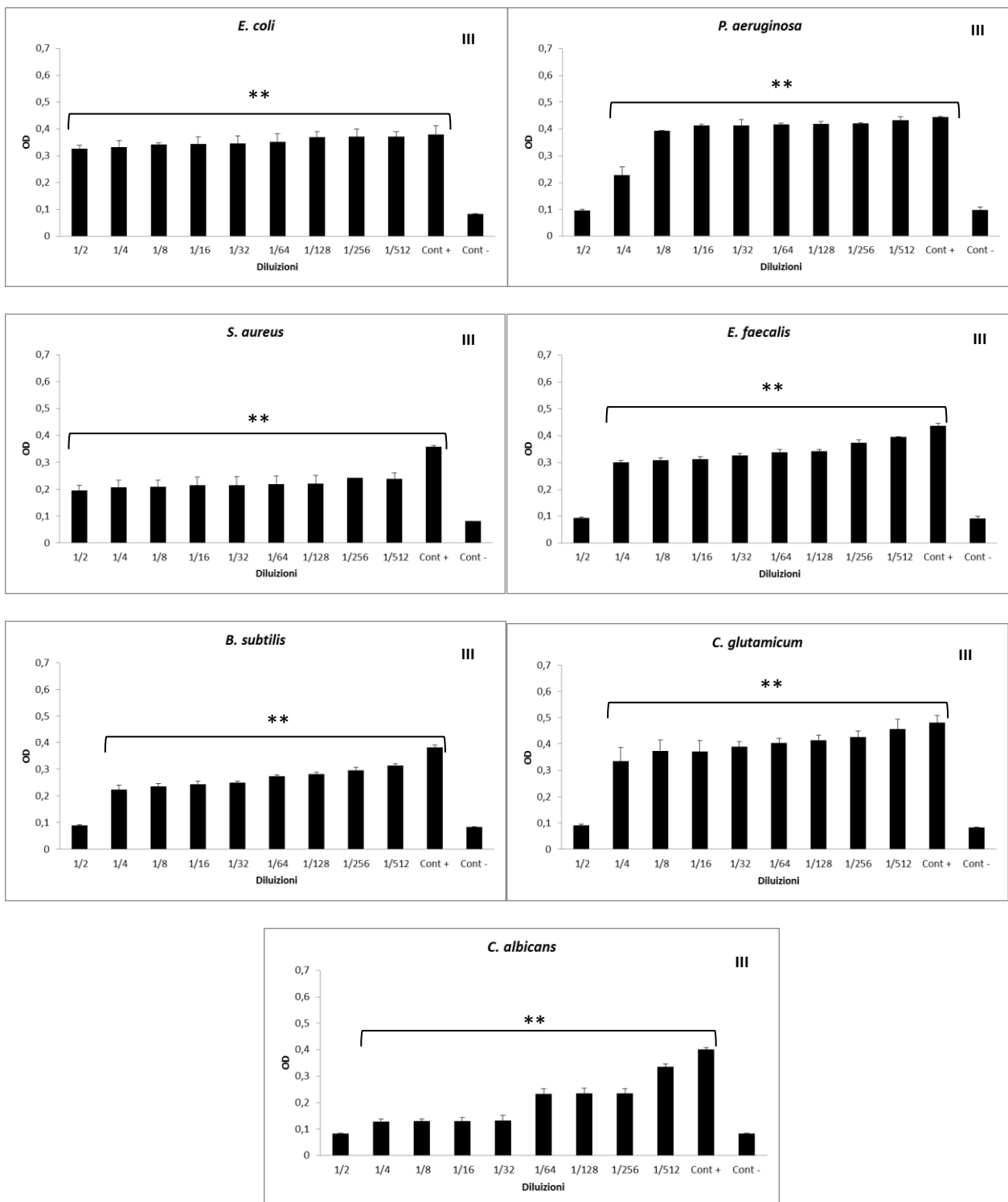


Fig. 25 Effetto inibitorio sulla crescita batterica di *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e *Candida albicans* in presenza di peptidi sintetici I(A), II(B) e III(C) di *C. intestinalis*. Misura della OD_{620 nm} dopo 18 ore di incubazione. Cont + = controllo positivo di crescita: pozzetto contenente la sospensione batterica nel mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. Cont - = controllo negativo di crescita: pozzetto contenente il mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. A partire dalle concentrazioni dei tre peptidi sintetici di *C. intestinalis* [3,20 mg/ml] Peptide I, [1,70 mg/ml] Peptide II e [2,44 mg/ml] Peptide III. Gli asterischi indicano la differenza staticamente significativa tra le diluizioni ed il controllo positivo contro il controllo negativo ($p < 0,001^{**}$, $p < 0,05^*$). Risultati ottenuti da tre ripetizioni indipendenti.

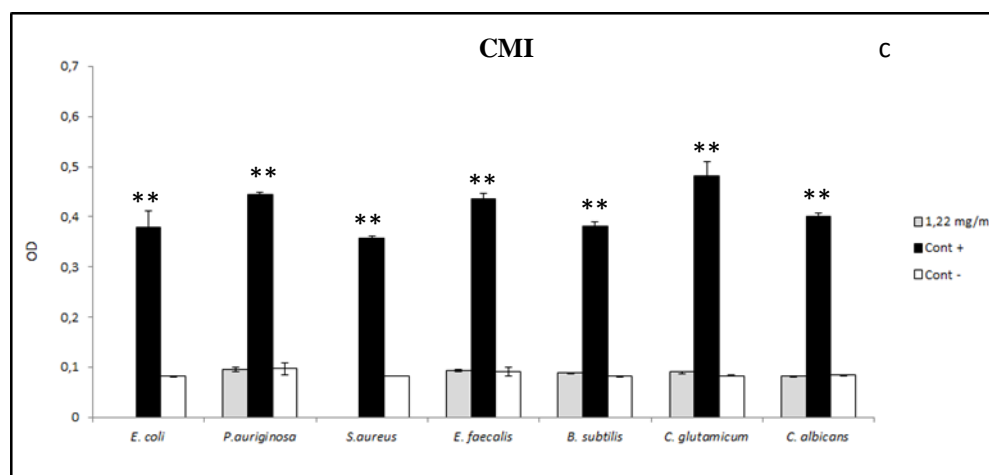
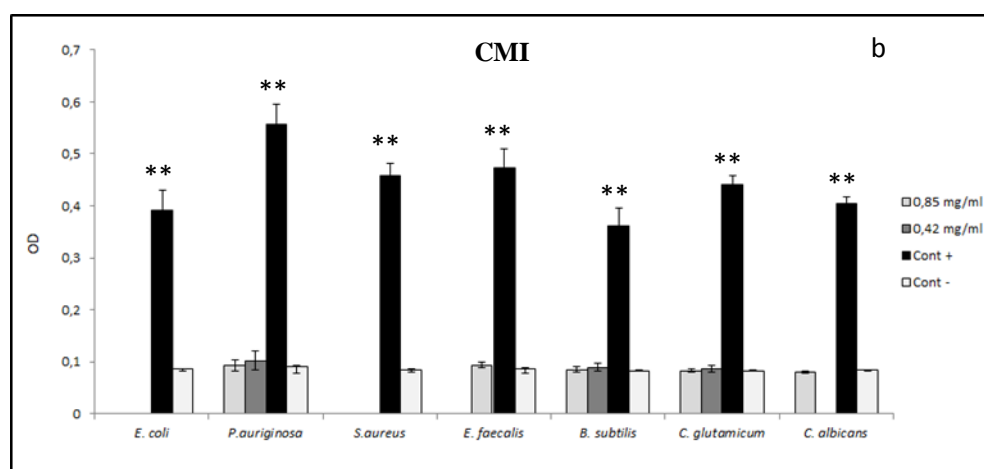
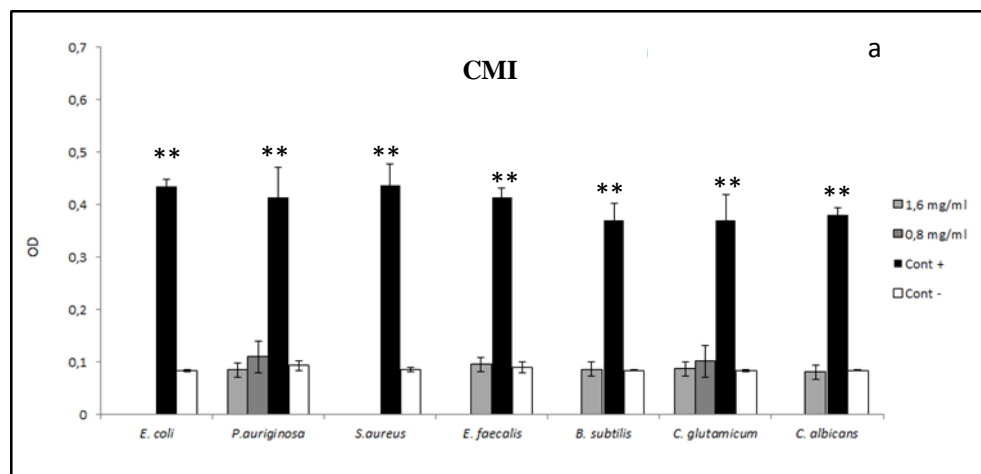


Fig. 26 Grafici riassuntivi sulle attività antimicrobiche del peptide I (a), il peptide II (b) e il peptide III (c) di *C. intestinalis* verso: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e *Candida albicans*.

Tabella 6. Valori delle CMI, CMB e delle citotossicità dei campioni di *C. intestinalis* su *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. abortus*, *B. suis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* e *C. albicans*

		Determinazione dell'attività battericida dopo 24 h di incubazione a 37°C					
	Citotossicità J774-A1 (% mortalità)	Specie batterica	CMI (mg/ml)	CFU/ml (inoculum)	CFU/ml finale	% di mortalità	CMB (mg/ml)
<i>C. intestinalis</i> I [3,20 mg/ml]i	1,6 mg/ml	<i>E. coli</i>	> 1,6	4,9 ± 3*10 ⁵	NT	NT	NT
	2 (2 h) 20 (24 h)	<i>P. aeruginosa</i>	0,8-1,6	5,4 ± 1*10 ⁶	5 ± 1*10 ¹	99,99	1,6
		<i>B. abortus</i>	1,6	4,6 ± 1*10 ⁶	0	100	1,6
		<i>B. suis</i>	0,2	3 ± 1*10 ⁶	NT	NT	NT
		<i>S. aureus</i>	> 1,6	3,1 ± 1*10 ⁶	NT	NT	NT
		<i>E. faecalis</i>	1,6	4,1 ± 3*10 ⁶	4 ± 1*10 ³	99,90	>1,6
		<i>B. subtilis</i>	1,6	1,9 ± 1*10 ⁶	0	100	1,6
		<i>C. glutamicum</i>	0,8-1,6	3,2 ± 1 *10 ⁵	5 ± 1*10 ²	98,84	>1,6
<i>C. albicans</i>	1,6	5 ± 3*10 ⁴	2 ± 1 *10 ¹	99,96	1,6		
<i>C. intestinalis</i> II [1,70 mg/ml]i	0,85 mg/ml	<i>E. coli</i>	> 0,85	5,3 ± 2*10 ⁵	NT	NT	NT
	(2 h) 30 (24 h)	<i>P. aeruginosa</i>	0,42-0,85	4,8 ± 3*10 ⁶	7,5 ± 3*10 ¹	99,98	0,85
		<i>B. abortus</i>	0,11 - 0,2	5 ± 1*10 ⁶	NT	NT	NT
		<i>B. suis</i>	0,11 - 0,2	2,5 ± 1*10 ⁶	NT	NT	NT
		<i>S. aureus</i>	> 0,85	3,1 ± 2*10 ⁶	NT	NT	NT
		<i>E. faecalis</i>	0,85	4 ± 3*10 ⁶	NT	NT	NT
		<i>B. subtilis</i>	0,42-0,85	2 ± 1*10 ⁶	2 ± 1*10 ¹	99,99	0,42-0,85
		<i>C. glutamicum</i>	0,42	3,2 ± 1*10 ⁵	3,5 ± 1*10 ²	99,89	0,85
<i>C. albicans</i>	0,85	4,6 ± 2*10 ⁶	1*10 ¹	99,99	0,85		
<i>C. intestinalis</i> III [2,44 mg/ml]i	1,22 mg/ml	<i>E. coli</i>	> 1,22	6,4 ± 3*10 ⁵	NT	NT	NT
	4 (2 h) 10 (24 h)	<i>P. aeruginosa</i>	1,22	1,8 ± 1*10 ⁶	NT	NT	NT
		<i>B. abortus</i>	0,61 - 1,22	4 ± 1*10 ⁶	NT	NT	NT
		<i>B. suis</i>	0,30	3,5 ± 1*10 ⁶	NT	NT	NT
		<i>S. aureus</i>	> 1,22	6,1 ± 3*10 ⁶	NT	NT	NT
		<i>E. faecalis</i>	1,22	1,7 ± 1*10 ⁶	0	100	1,22
		<i>B. subtilis</i>	1,22	2 ± 1*10 ⁶	5 ± 1*10 ¹	99,99	1,22
		<i>C. glutamicum</i>	1,22	4,6 ± 2*10 ⁵	1*10 ¹	100	1,22
<i>C. albicans</i>	1,22	2,1 ± 1*10 ⁵	2 ± 1*10 ¹	99,99	1,22		

*NT = L'attività inibitrice e/o battericida non è stata trovata alla concentrazione massima testata del prodotto; [i] = concentrazione la più elevata testata. % di mortalità = (1 - CFU/CFU_i) * 100

Test di citotossicità

I risultati dei test di citotossicità dei tre peptidi sintetici disegnati sul modello di *C. intestinalis* a contatto con la linea cellulare macrofagica monocitaria murina *J774-A1* indicano che queste molecole hanno un effetto tossico relativamente ridotto quando sono utilizzati alla concentrazione massima disponibile in questo studio (corrispondente alle CMB più importanti riscontrate). Come per le attività antimicrobiche, i risultati delle attività citotossiche sono stati ricavati da tre ripetizioni sperimentali indipendenti.

Nel dettaglio:

Il **peptide I** alla concentrazione di 1,6 mg/ml ha una percentuale di mortalità del 2% e del 20% rispettivamente dopo 2 e 24 ore di contatto.

Il **peptide II** alla concentrazione di 0,85 mg/ml provoca una mortalità del 5% e del 30 % rispettivamente dopo 2 e 24 ore di contatto.

Il **peptide III** alla concentrazione di 1,22 mg/ml induce una mortalità cellulare del 4% e del 10% dopo 2 e 24 ore di contatto.

4.2 Risultati sull'attività antimicrobiche (CMI e CMB) dei campioni estratti da *Cancer pagurus*

L'estratto acido da emociti di *C. pagurus* presenta un'attività battericida verso tutti i ceppi batterici ed il fungo *C. albicans* utilizzati in questo lavoro. Si nota, in dettaglio, una riduzione della popolazione batterica (CFUf) dello 0,01% rispetto a quella iniziale (CFUi) dopo 18 ore di incubazione. Per i ceppi patogeni di classe 3: *B. abortus* e *B. suis* a partire dalla concentrazione di 2,58 mg/ml dell'estratto acido di *C. pagurus*, non è stato possibile determinare né la CMI né la CMB (Tabella 7) (Fig. 27 e 28).

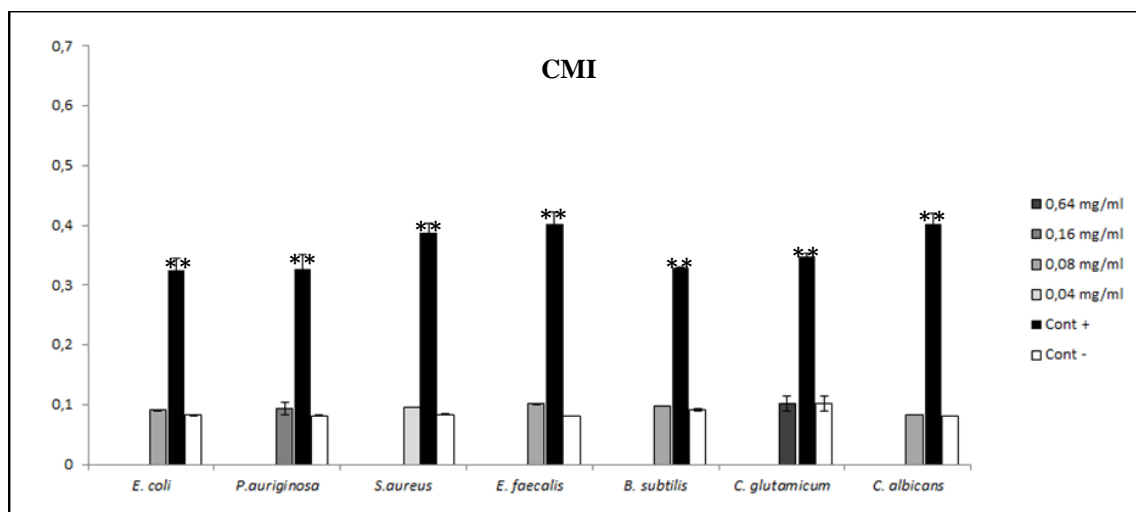


Fig 27 Grafico riassuntivo sulle attività antimicrobiche dell'estratto acido di *C. pagurus* verso: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e *Candida albicans*.

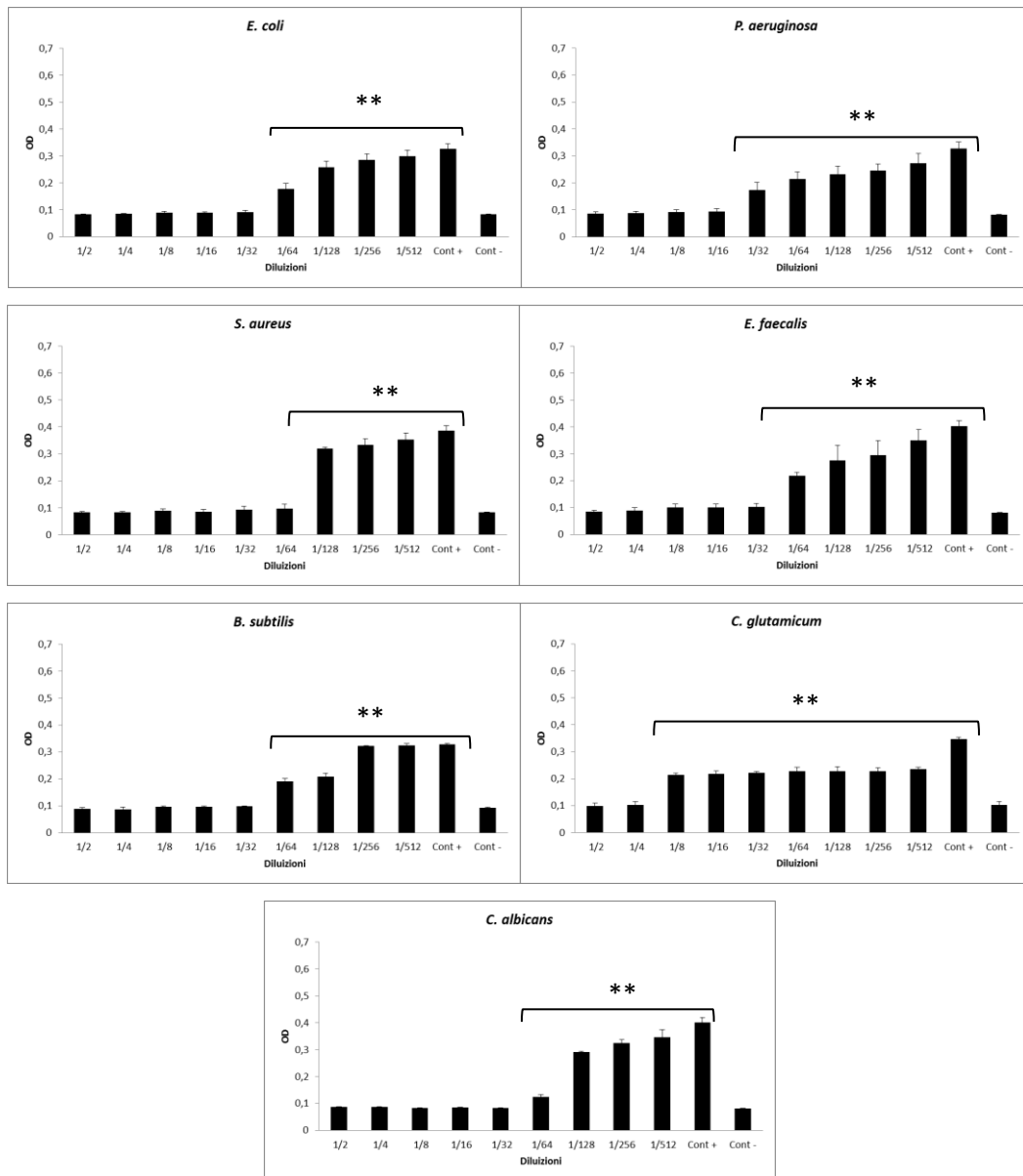


Fig. 28 Effetto inibitorio sulla crescita batterica di *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e *Candida albicans* in presenza di campioni estratti da *C. pagurus*. Misura della OD_{620 nm} dopo 24 ore di incubazione. Cont + = controllo positivo di crescita: pozzetto contenente la sospensione batterica nel mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. Cont - = controllo negativo di crescita: pozzetto contenente il mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. A partire dalla concentrazione degli estratti acidi di *C. pagurus* [2,58 mg/ml]. Gli asterischi indicano la differenza staticamente significativa tra le diluizioni ed il controllo positivo contro il controllo negativo ($p < 0,001^{**}$, $p < 0,05^{*}$).

Tabella 7. Valori delle CMI, CMB e delle citotossicità dei campioni di *C. pagurus* su *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. abortus*, *B. suis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* e *C. albicans*.

		Determinazione dell'attività battericida dopo 24 h di incubazione a 37°C					
* N T	Ciotossicità [0,64 mg/ml] J774-AI (% mortalità)	Specie batterica	CMI (mg/ml)	CFU/ml (inoculum)	CFU/ml finale	% di mortalità	CMB (mg/ml)
<i>P. aeruginosa</i>	$1,6 \cdot 10^{-1}$	$2 \pm 1 \cdot 10^6$	0	100	$1,6 \cdot 10^{-1} - 6,4 \cdot 10^{-1}$		
<i>B. abortus</i>	NT	$5,5 \cdot 10^6$	NT	NT	NT		
<i>B. suis</i>	NT	$3 \pm 1 \cdot 10^6$	NT	NT	NT		
<i>S. aureus</i>	$4,0 \cdot 10^{-2} - 1,6 \cdot 10^{-1}$	$4 \pm 2 \cdot 10^6$	0	100	$6,4 \cdot 10^{-1}$		
<i>E. faecalis</i>	$8,0 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^1$	99,99	>1,29		
<i>B. subtilis</i>	$8,0 \cdot 10^{-2}$	$4,9 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^2$	99,99	$4 \cdot 10^{-2} - 8 \cdot 10^{-2}$		
<i>C. glutamicum</i>	$6,4 \cdot 10^{-1}$	$1,5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^1$	99,99	>1,29		
<i>C. albicans</i>	$4,0 \cdot 10^{-2} - 8,0 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^4$	0	100	$1,5 \cdot 10^{-1}$		

a

*NT = L'attività battericida non è stata trovata alla concentrazione massima testata del prodotto;
[i] = concentrazione la più elevata testata. % di mortalità = $(1 - \text{CFU}_f / \text{CFU}_i) \cdot 100$

Test di citotossicità

L'effetto del prodotto estratto acido di *C. pagurus* sulle linee cellulari monocitarie J774-AI che è il modello target preso in esame in questo studio, alla concentrazione più efficace del prodotto corrispondente alla CMB [0,64 mg/ml], indicano una elevata citotossicità con mortalità del 100%, già dopo 2 ore di contatto con le cellule. I risultati delle attività antimicrobiche e citotossiche sono stati dedotti da tre ripetizioni indipendenti.

4.3 Risultati sull'attività antimicrobica (CMI e CMB) dei campioni estratti da

Procambarus clarkii

L'estratto acido da emociti di *P. clarkii* alla concentrazione di 0,73 mg/ml, dopo 24 h di contatto, ha un'attività battericida nei confronti del patogeno Gram - *E.coli*, in quanto la concentrazione della CMB è superiore a quella della CMI e vi è una riduzione di 4 log tra la CFUf e la CFUi. Tale estratto acido mostra un'attività battericida anche verso i ceppi *S. aureus*, *B. subtilis* e *C. glutamicum* Gram + sebbene non è stato possibile trovare la CMB corrispondente a una riduzione precisa della popolazione batterica (CFUf) dello 0,01% rispetto a quella iniziale (CFUi). Per il Gram - *P. aeruginosa* e l'eucariote *C. albicans* è stato possibile rilevare solamente la CMI alla concentrazione di $1,8 \cdot 10^{-1}$ mg/ml, la CMB ha sicuramente una concentrazione superiore a quella usata in questo studio (Tabella 8) (Fig 29 e 30).

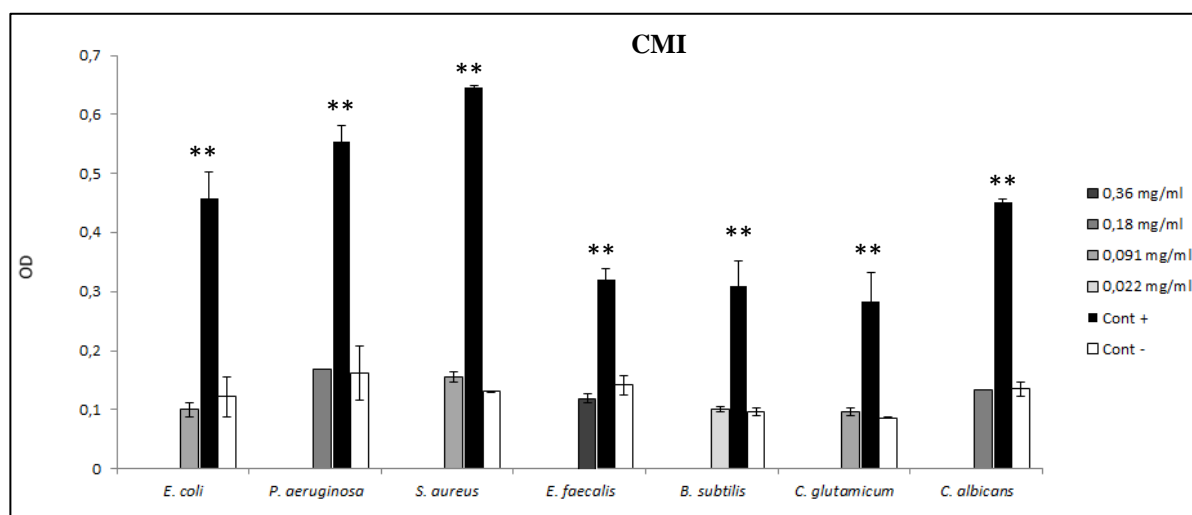


Fig 29 Grafico riassuntivo sulle attività antimicrobiche dell'estratto acido di *P. clarkii* verso: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e *Candida albicans*.

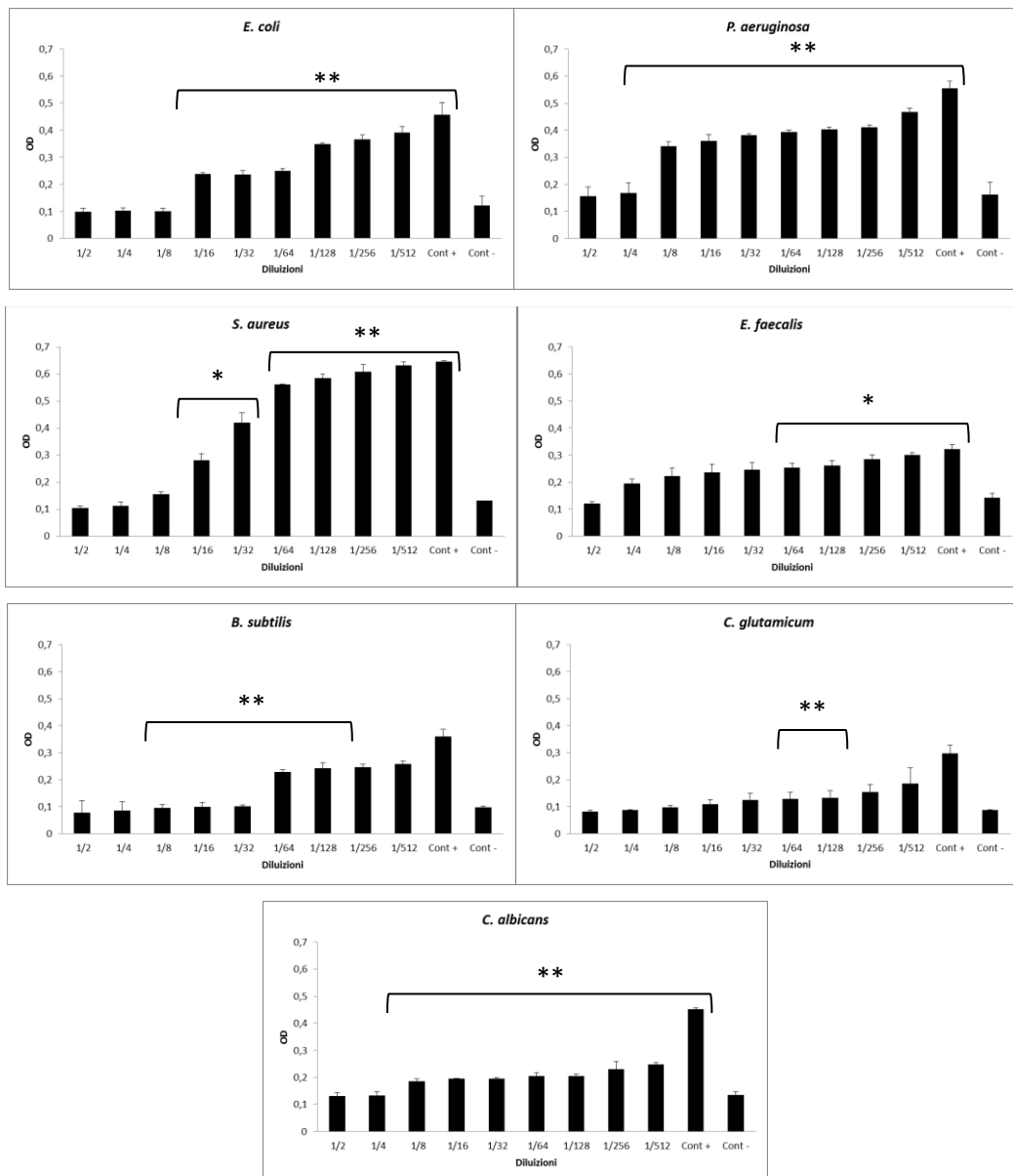


Fig. 30 Effetto inibitorio sulla crescita batterica di *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e *Candida albicans* in presenza di campioni estratti da *P. clarkii*. Misura della $OD_{620\text{ nm}}$ dopo 24 ore di incubazione. Cont + = controllo positivo di crescita: pozzetto contenente la sospensione batterica nel mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. Cont - = controllo negativo di crescita: pozzetto contenente il mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. A partire dalla concentrazione degli estratti acidi di *P. clarkii* [0,73 mg/ml]. Gli asterischi indicano la differenza staticamente significativa tra le diluizioni ed il controllo positivo contro il controllo negativo ($p < 0,001$ **, $p < 0,05$ *). Risultati ottenuti da tre ripetizioni indipendenti.

Tabella 8 Valori delle CMI, CMB e delle citotossicità dei campioni di *P. clarkii* su *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. abortus*, *B. suis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* e *C. albicans*.

* N T	Determinazione dell'attività battericida dopo 24 h di incubazione a 37°C						
	Citotossicità (0,36 mg/ml) J774-A1 (% mortalità)	Specie batterica	CMI (mg/ml)	UFC/ml inoculum	UFC/ml finale	% di mortalità	CMB (mg/ml)
<i>P. clarkii</i> [0,73 mg/ml]i	100 (2 h)	<i>E. coli</i>	$9,1 \cdot 10^{-2}$	$4 \pm 2 \cdot 10^5$	0	100	$1,8 \cdot 10^{-1}$
		<i>P. aeruginosa</i>	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$1,5 \pm 1 \cdot 10^5$	NT	NT	NT
	100 (24 h)	<i>B. abortus</i>	NT	$4 \pm 1 \cdot 10^6$	NT	NT	NT
		<i>B. suis</i>	NT	$3 \cdot 10^6$	NT	NT	NT
	<i>S. aureus</i>	$9,1 \cdot 10^{-2}$	$2 \pm 1 \cdot 10^5$	$2 \pm 1 \cdot 10^1$	99,90	$3,6 \cdot 10^{-1}$	
	<i>E. faecalis</i>	$3,6 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \pm 1 \cdot 10^5$	NT	NT	NT	
	<i>B. subtilis</i>	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$2 \pm 1 \cdot 10^5$	$3 \pm 1 \cdot 10^1$	99,98	$3,6 \cdot 10^{-1}$	
	<i>C. glutamicum</i>	$9,1 \cdot 10^{-2}$	$7,4 \pm 1 \cdot 10^5$	$4 \pm 1 \cdot 10^2$	99,94	$1,8 \cdot 10^{-1}$	
	<i>C. albicans</i>	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$6 \pm 1 \cdot 10^6$	NT	NT	NT	

*NT = L'attività battericida non è stata trovata alla concentrazione massima testata del prodotto;
[i] = concentrazione la più elevata testata. % di mortalità = $(1 - \text{CFUf}/\text{CFUi}) \cdot 100$

Test di citotossicità

I risultati dei test di citotossicità dell'estratto acido da *P. clarkii*, alla concentrazione più efficace della CMB [0,36 mg/ml], sulla linea cellulare macrofagica monocitaria murina J774-A1 mostrano una mortalità del 100% già dopo 2 di contatto.

I risultati delle attività antimicrobiche e citotossiche sono stati dedotti da tre ripetizioni indipendenti.

4.4 Risultati sull'attività antimicrobica (CMI e CMB) dei campioni estratti da *Actinia equina*

L'estratto acido da tentacoli di *A. equina* ha un'attività battericida nei confronti dei ceppi batterici *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* ed il fungo *C. albicans*. In dettaglio, la CMB è superiore alla CMI, presentando una riduzione logaritmica di 4 della popolazione batterica finale (CFUf) rispetto a quella iniziale (CFUi), dopo 18 ore di incubazione con 100-99,99% di mortalità. Per i patogeni Gram - *P. aeruginosa* e Gram + *E. faecalis* hanno un'attività battericida anche se il valore preciso della CMB non è stato trovato. Per i ceppi patogeni Gram -: *B. abortus* e *B. suis*, alla concentrazione dell'estratto acido da tentacoli di *A. equina* non è stato possibile valutare né la CMI né la CMB (Tabella 9) (Fig. 31 e 32).

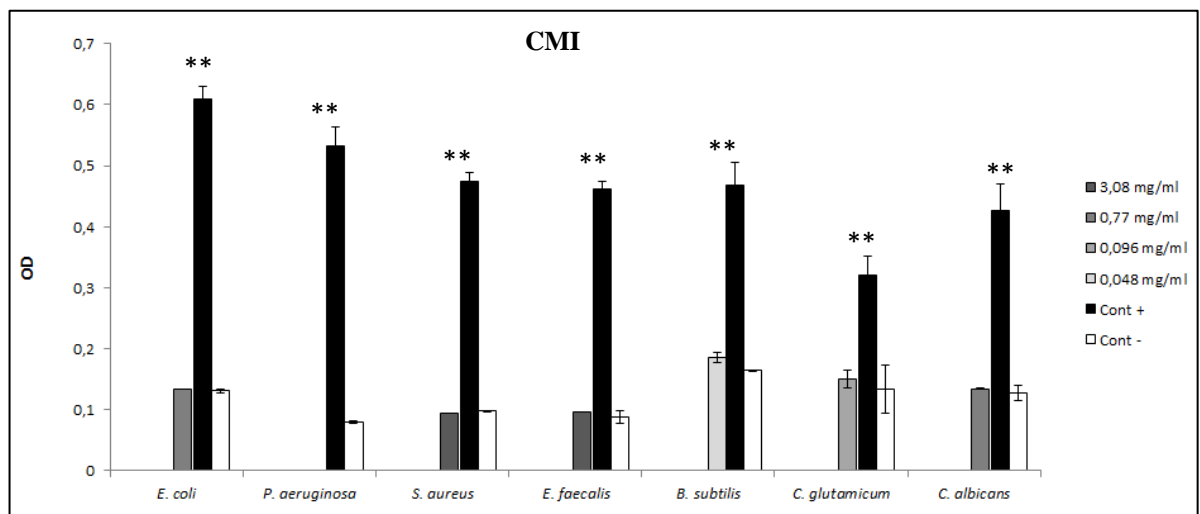


Fig 31 Grafico riassuntivo sulle attività antimicrobiche dell'estratto acido di *A. equina* verso: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e *Candida albicans*.

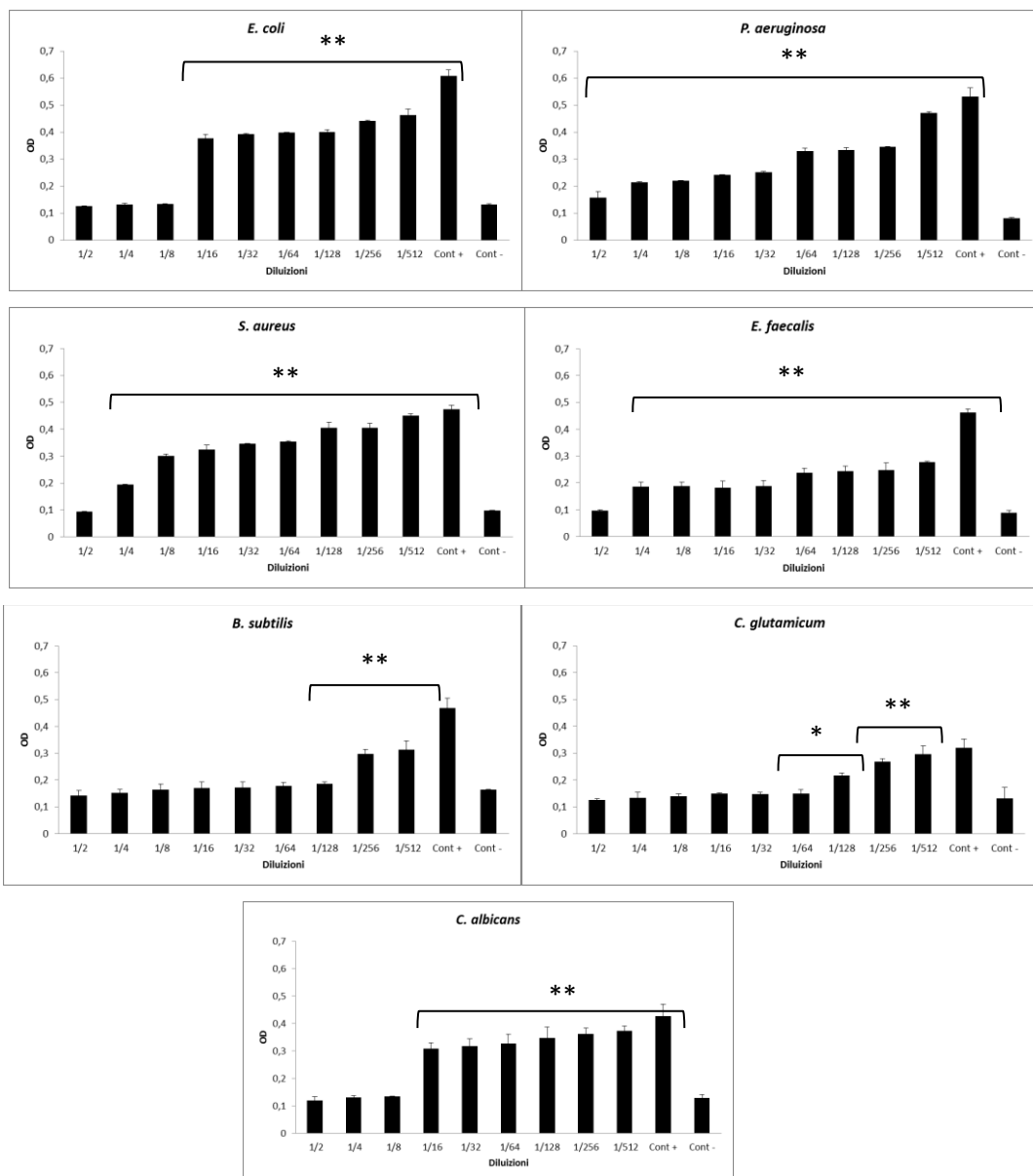


Fig. 32. Effetto inibitorio sulla crescita batterica di *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e *Candida albicans* in presenza di campioni estratti da *A. equina*. Misura della OD_{620 nm} dopo 18 ore di incubazione. Cont + = controllo positivo di crescita: pozzetto contenente la sospensione batterica nel mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. Cont - = controllo negativo di crescita: pozzetto contenente il mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. A partire dalla concentrazione degli estratti acidi di *A. equina* [6,16 mg/ml]. Gli asterischi indicano la differenza staticamente significativa tra le diluizioni ed il controllo positivo contro il controllo negativo ($p < 0,001^{**}$, $p < 0,05^{*}$). Risultati ottenuti da tre ripetizioni indipendenti.

Tabella 9 Valori delle CMI, CMB e delle citotossicità dei campioni di *A. equina* su *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. abortus*, *B. suis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* e *C. albicans*

		Determinazione dell'attività battericida dopo 24 h di incubazione a 37°C					
	Citotossicità (0,19 mg/ml) <i>J774-A1</i> (% mortalità)	Specie batteriche	CMI (mg/ml)	CFU/ml (inoculum)	CFU/ml finale	% di mortalità	CMB (mg/ml)
<i>A. equina</i> [6,16 mg/ml]i	0 (2h) 50 (24h)	<i>E. coli</i>	$7,7 \cdot 10^{-1}$	$4 \pm 1 \cdot 10^6$	0	100	$1,9 \cdot 10^{-1}$
		<i>P. aeruginosa</i>	>3,08	$3 \pm 1 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^4$	99,00	>3,08
		<i>B. abortus</i>	NT	$3 \cdot 10^6$	NT	NT	NT
		<i>B. suis</i>	NT	$2,5 \cdot 10^6$	NT	NT	NT
		<i>S. aureus</i>	3,08	$2 \pm 1 \cdot 10^6$	0	100	3,08
		<i>E. faecalis</i>	3,08	$3,1 \pm 1 \cdot 10^5$	$4 \pm 1 \cdot 10^3$	98,70	3,08
		<i>B. subtilis</i>	$4,8 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \pm 1 \cdot 10^6$	0	100	$1,9 \cdot 10^{-1}$
		<i>C. glutamicum</i>	$9,62 \cdot 10^{-2}$	$4,3 \pm 1 \cdot 10^5$	0	100	$4,8 \cdot 10^{-2}$
		<i>C. albicans</i>	$7,7 \cdot 10^{-1}$	$6,6 \pm 1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^1$	99,99	1,5

NT* = L'attività inibitrice e/o battericida non è stata trovata alla concentrazione massima testata del prodotto;
[i] = concentrazione la più elevata testata. % di mortalità = $(1 - \text{CFUf}/\text{CFUi}) \cdot 100$

Test di citotossicità

I risultati dei test di citotossicità dell'estratto acido di *A. equina*, alla concentrazione più efficace della CMB [0,19 mg/ml], mostrano una flebile attività citotossica tempo dipendente. In dettaglio: 0% e 50% di mortalità dopo 2 e 24 ore di contatto con le cellule eucariotiche macrofagiche linea cellulare *J774-A1*.

I risultati delle attività antimicrobiche e citotossiche sono stati ricavati da tre ripetizioni indipendenti.

4.5 Risultati sull'attività antimicrobiche (CMI e CMB) dei campioni estratti da *Pelagia noctiluca*

Gli estratti acidi da ombrella di *P. noctiluca* alla concentrazione di 1,5 mg/ml, presentano un'attività battericida molto simile sui batteri Gram – (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. abortus*, *B. suis*) e Gram + (*E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. glutamicum*) e l'eucariote *C. albicans* utilizzati in questo studio, in quanto la concentrazione della CMB è superiore rispetto alla CMI. Vi è inoltre una riduzione di 4 log della popolazione batterica finale (CFU_f) rispetto a quella iniziale (CFU_i), dopo 18 ore di incubazione con 99,99-100% di mortalità. L'estratto acido ha, inoltre, un'azione non strettamente battericida sul patogeno Gram + *S. aureus* (Fig. 33 e 34) (Tabella 10).

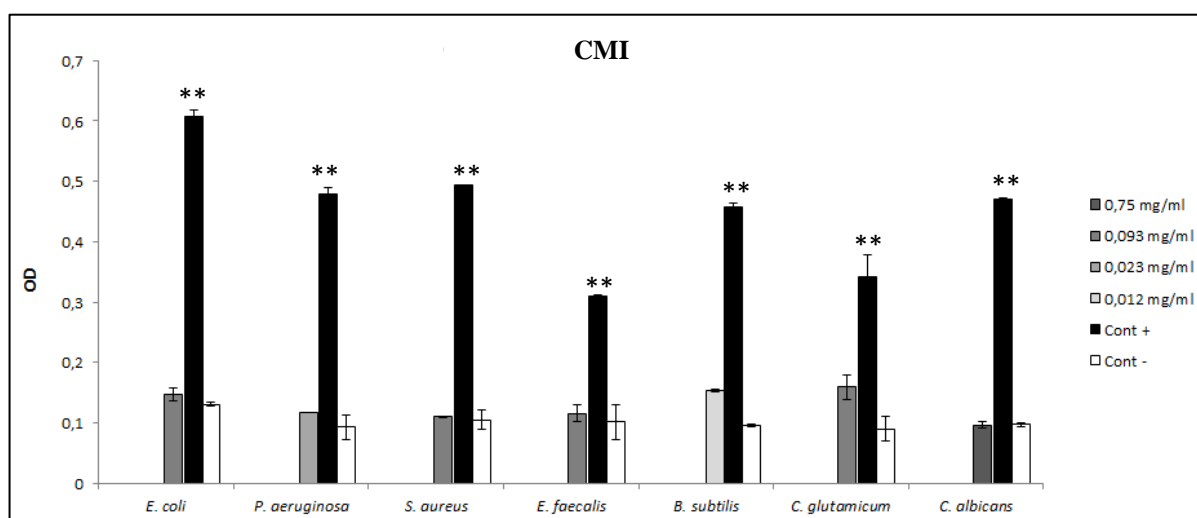


Fig 33 Grafico riassuntivo sulle attività antimicrobiche dell'estratto acido di *P. noctiluca* verso: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e *Candida albicans*.

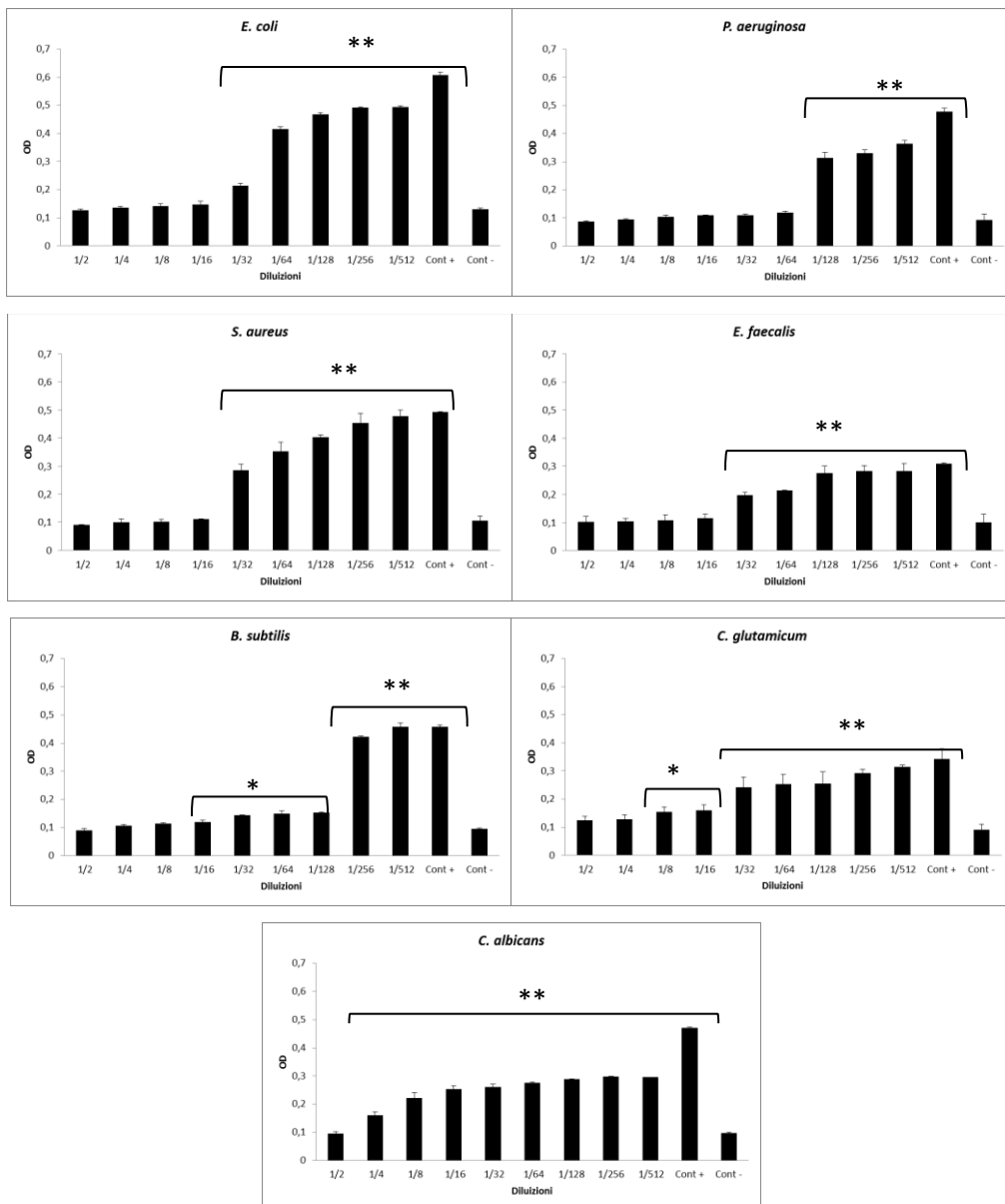


Fig. 34. Effetto inibitorio sulla crescita batterica di *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* e *Candida albicans* in presenza di campioni estratti da *P. noctiluca*. Misura della OD_{620nm} dopo 24 ore di incubazione. Cont + = controllo positivo di crescita: pozzetto contenente la sospensione batterica nel mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. Cont - = controllo negativo di crescita: pozzetto contenente il mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. A partire dalla concentrazione degli estratti acidi di *P. noctiluca* [1,5 mg/ml]. Gli asterischi indicano la differenza staticamente significativa tra le diluizioni ed il controllo positivo contro il controllo negativo ($p < 0,001$ **, $p < 0,05$ *). Risultati ottenuti da tre ripetizioni indipendenti.

Tabella 10 Valori delle CMI, CMB e delle citotossicità dei campioni di *P. noctiluca* su *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. abortus*, *B. suis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* e *C. albicans*.

		Determinazione dell'attività battericida dopo 24 h di incubazione a 37°C					
	Citotossicità (0,18 mg/ml) <i>J774-A1</i> (% mortalità)	Specie batterica	CMI (mg/ml)	UFC/ml (inoculum)	UFC/ml finale	% di mortalità	CMB (mg/ml)
		<i>P. aeruginosa</i>	2,3*10 ⁻²	4,6*10 ⁶	1*10 ¹	99,99	5,75*10 ⁻¹ -9,3*10 ⁻²
		<i>B. abortus</i>	1,1 – 2,3*10 ⁻²	3,9*10 ⁶	2*10 ²	99,99	9,3*10 ⁻² -1,8*10 ⁻¹
		<i>B. suis</i>	1,1*10 ⁻²	5*10 ⁶	2*10 ²	99,99	9,3*10 ⁻²
		<i>S. aureus</i>	9,3*10 ⁻²	1,9*10 ⁶	3,4*10 ²	99,98	1,8*10 ⁻¹
		<i>E. faecalis</i>	9,37*10 ⁻²	3,7*10 ⁶	0	100	7,5*10 ⁻¹ -2,3*10 ⁻²
		<i>B. subtilis</i>	9,37*10 ⁻²	1*10 ⁶	0	100	1,18*10 ⁻¹
		<i>C. glutamicum</i>	0,375	6,8*10 ⁵	0	100	2,3*10 ⁻²
		<i>C. albicans</i>	7,5*10 ⁻¹	8,4*10 ⁵	0	100	1,8*10 ⁻¹

*NT = L'attività inibitrice e/o battericida non è stata trovata alla concentrazione massima testata del prodotto;
[i] = concentrazione la più elevata testata. % di mortalità = (1 – CFU_f/CFU_i) * 100

Test di citotossicità

I risultati dei test di citotossicità del estratto acido da *P. noctiluca*, alla concentrazione corrispondente della CMB [0,18 mg/ml], sulla linea cellulare macrofagica monocitaria murina *J774-A1* evidenziano una elevata citotossicità a partire dalle 2 ore del contatto: 80% di mortalità.

I risultati delle attività antimicrobiche e citotossiche sono stati ricavati da tre ripetizioni indipendenti.

4.6 Risultati: ampicillina e polymixina B, antibiotici controllo utilizzati in parallelo ai test di attività antimicrobica

L'antibiotico ampicillina alla concentrazione di $50 \cdot 10^{-3}$ mg/ml ha un'azione battericida nei confronti dei ceppi batterici Gram – *E. coli*, *P. aeruginosa* e Gram + *B. subtilis* e *C. glutamicum*. Dal momento che si nota una riduzione della popolazione batterica finale (CFUf) dello 0,01% rispetto a quella iniziale (CFUi) dopo 18 ore di incubazione, questa concentrazione corrisponde alla CMB. Questo antibiotico mostra delle chiare attività batteriostatiche a contatto con *B. abortus* e *B. suis* e *S. aureus* e *C. albicans* (Fig. 35).

Nel caso della Polimixina B alla concentrazione iniziale di $4 \cdot 10^{-3}$ mg/ml si ha un'attività battericida a contatto con i patogeni Gram – *E. coli*, *P. aeruginosa* ed il Gram + *S. aureus*, *B. subtilis* e l'eucariote *C. albican*. L'antibiotico ha, ancora, un'attività batteriostatica a contatto i patogeni Gram - *B. abortus* e *B. suis* ed i batteri Gram + *E. faecalis* e *C. glutamicum*.

L'agente antimicrobico che è capace di ridurre la crescita dei batteri, si definisce batteriostatico. L'agente antimicrobico che è in grado di uccidere i patogeni è descritto batteriostatico (Fig. 36).

I risultati delle attività antimicrobiche e citotossiche sono stati ricavati da tre ripetizioni sperimentali indipendenti (Tabella 11).

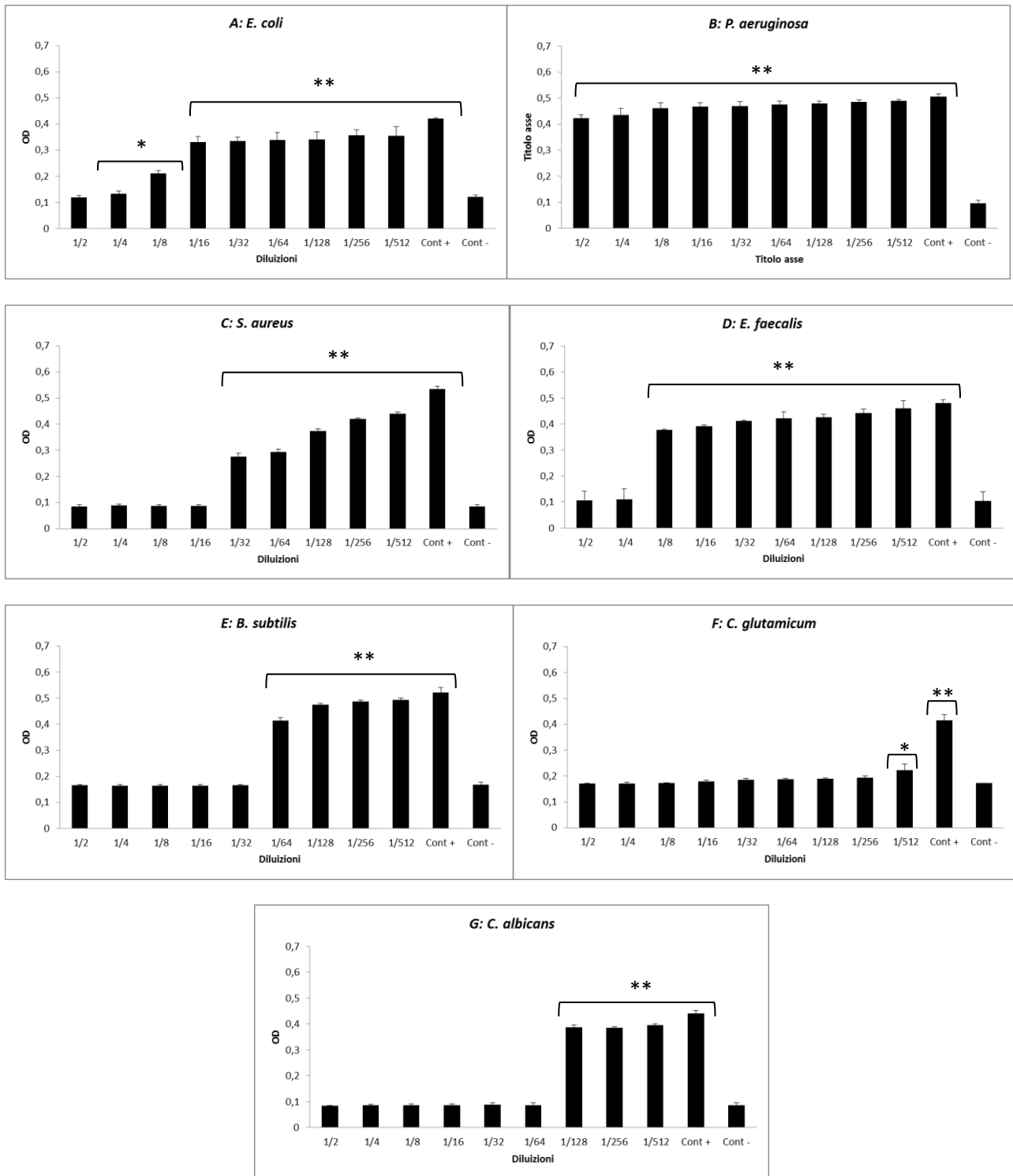


Fig. 35 Amp: Effetto inibitorio dell'ampicillina [50 µg/ml]i su *Escherichia coli* (A) e *Pseudomonas aeruginosa* (B), e di [25 µg/ml]i su *Staphylococcus aureus* (C), *Enterococcus faecalis* (D), *Bacillus subtilis* (E), *Corynebacterium glutamicum* (F) e *Candida albicans* (G). Misura della OD_{620 nm} dopo 24 ore di incubazione. Cont + = controllo positivo di crescita: pozzetto contenente la sospensione batterica nel mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. Cont - = controllo negativo di crescita: pozzetto contenente il mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. A partire dalle due concentrazioni dell'ampicillina 50 µg/ml e 25 µg/ml Gli asterischi indicano la differenza staticamente significativa tra le diluizioni ed il controllo positivo contro il controllo negativo ($p < 0,001$ **, $p < 0,05$ *). Risultati ottenuti da tre ripetizioni indipendenti.

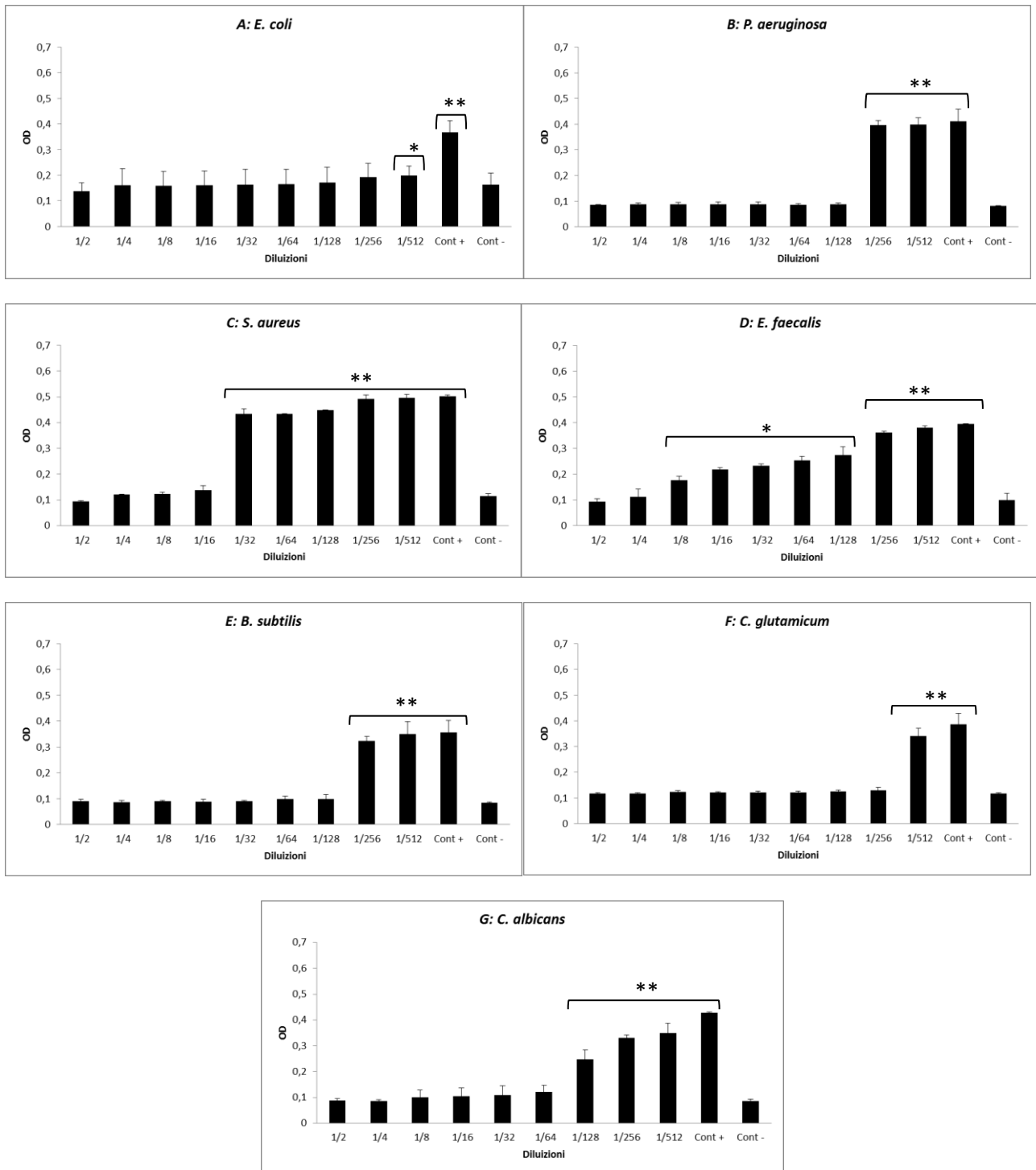


Fig. 36 Poly: Effetto inibitorio della polimixina B [400 µg/ml] su *Escherichia coli* (A) e *Pseudomonas aeruginosa* (B), e di [25 µg/ml] su *Staphylococcus aureus* (C), *Enterococcus faecalis* (D), *Bacillus subtilis* (E), *Corynebacterium glutamicum* (F) e *Candida albicans* (G). Misura della OD_{620 nm} dopo 24 ore di incubazione. Cont + = controllo positivo di crescita: pozzetto contenente la sospensione batterica nel mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. Cont - = controllo negativo di crescita: pozzetto contenente il mezzo di coltura MH 2X ed il solvente. A partire dalla concentrazione della polimixina B 400 µg/ml. Gli asterischi indicano la differenza staticamente significativa tra le diluizioni ed il controllo positivo contro il controllo negativo ($p < 0,001$ **, $p < 0,05$ *). Risultati ottenuti da tre ripetizioni indipendenti.

Tabella 11 Amp e Poly Valori delle CMI e CMB su *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. abortus*, *B. suis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* e *C. albicans*

		Attività Battericida dopo 24 ore di incubazione a 37°C				
	Specie batteriche	UFC/ml (inoculum)	CMI (mg/ml)	UFC dopo 24 h	% di mortalità	CMB (mg/ml)
Ampicillina [25*10 ⁻³ mg/ml]i [50*10 ⁻³ mg/ml]i	<i>E. coli</i>	6,8*10 ⁵ ± 2*10 ⁵	25*10 ⁻³	0	99,99-100	25*10 ⁻³
	<i>P. aeruginosa</i>	3,1 ± 1*10 ⁶	25*10 ⁻³	<10 ⁸	0	≥50*10 ⁻³
	<i>B. abortus</i>	2*10 ⁶	1,56*10 ⁻³	1,9*10 ³	99,90	≥25*10 ⁻³
	<i>B. suis</i>	1,4*10 ⁶	3,12*10 ⁻³	6,8*10 ³	99,51	≥25*10 ⁻³
	<i>S. aureus</i>	1,6*10 ⁶	1,56*10 ⁻³	4,1*10 ²	99,97	1,56*10 ⁻³
	<i>E. faecalis</i>	1,8*10 ⁶	6,25*10 ⁻³	NT	NT	NT
	<i>B. subtilis</i>	2,4*10 ⁶	7,8*10 ⁻⁴	3,2*10 ²	99,99	1,95 *10 ⁻⁴
	<i>C. glutamicum</i>	3,2 ± 2*10 ⁵	9,7*10 ⁻⁵	0	100	9,7*10 ⁻⁵
	<i>C. albicans</i>	1,7*10 ⁴	3,9*10 ⁻⁴	2*10 ¹	99,88	≥25*10 ⁻³
Polymixina (4*10 ⁻³ mg/ml)	<i>E. coli</i>	4,3 ± 1*10 ⁶	1,56*10 ⁻³	0	100	1,56-3,1*10 ⁻³
	<i>P. aeruginosa</i>	5*10 ⁶	3,12*10 ⁻³	2*10 ²	99,99	6,25*10 ⁻³
	<i>B. abortus</i>	2,8*10 ⁶	1,56*10 ⁻³	6,2*10 ²	99,97	6,25
	<i>B. suis</i>	1,7*10 ⁶	6,5*10 ⁻³	8,1*10 ²	99,93	1*10 ²
	<i>S. aureus</i>	1,6 ± 1*10 ⁶	25-50*10 ⁻³	4 ± 1*10 ¹	99,99	25-100*10 ⁻³
	<i>E. faecalis</i>	1,8*10 ⁶	1,56	3,2*10 ²	99,98	6,25
	<i>B. subtilis</i>	2,4*10 ⁶	3,12*10 ⁻³	4*10 ¹	100	1,56*10 ⁻³
	<i>C. glutamicum</i>	6,27*10 ⁶	1,56*10 ⁻³	2,7*10 ¹	99,99	6,25
	<i>C. albicans</i>	1,7*10 ⁴	6,25*10 ⁻³	6,3*10 ¹	100	0,39*10 ⁻³

Test di citotossicità

I prodotti testati presentano una differente citotossicità.

I tre peptidi sintetici di *C. intestinalis* indicano una flebile mortalità che risulta essere tempo dipendente, ~ 27 % dopo 2 ore e ~ 53 % dopo 24 ore di contatto.

Gli estratti acidi da emociti di *C. pagurus* e *P. clarkii* alle concentrazioni testate sono i più tossici a partire dalle 2 ore di contatto.

Gli estratti acidi da tentacoli di *A. equina* mostrano una flebile attività citotossica. Nel dettaglio alle 2 ed alle 24 ore di contatto hanno una tossicità dello 0% e del 50% rispettivamente.

Gli estratti acidi da ombrella di *P. noctiluca* e da celomociti di *P. lividus* hanno una citotossicità che è tempo dipendente, con 100% di mortalità dopo le 24 ore di contatto con le cellule eucariotiche *J774-A1*.

I controlli che sono stati utilizzati sono:

- la Polimixina B a 400 µg/ml risulta avere un forte effetto citotossico rispetto ai prodotti testati poiché a questa concentrazione dopo 24 ore di contatto il 100% delle cellule sono morte. Controllo positivo.
- RPMI, mezzo di coltura con cellule monocitarie *J774-A1*. Controllo negativo per verificare la vitalità delle cellule (20% di mortalità dopo 24 ore) ed escluderne delle apoptosi cellulari.

Il risultato del test di citotossicità (incorporazione del Trypan Blu) sulle linee monocitarie murine *J774* indica che i prodotti analizzati hanno anche un'attività citotossica sulle cellule eucariote alla concentrazione relative alle CMB dei prodotti forniti (Tabella 12).

Tabella 12 riassuntiva del test di citotossicità. Percentuale di mortalità delle linee cellulari monocitarie J774-A1 dopo un contatto di 2 e 24 ore con i prodotti o i loro solventi.

<i>Campioni</i>	Diluizioni	Conc mg/ml	% di mortalità dopo 2h	% di mortalità dopo 24h
<i>Cancer pagurus</i>	1/4	0,64	100	100
<i>Procambarus clarkii</i>	1/2	0,36	100	100
<i>Actina equina</i>	1/32	0,19	0	50
<i>Pelagia noctiluca</i>	1/8	0,18	80	100
<i>Peptide I</i>	1/2	1,6	2	20
<i>Peptide II</i>	1/2	0,85	5	30
<i>Peptide III</i>	1/2	1,22	4	10
<i>Polimixina B</i>	1/10	0,04	89	100
<i>RPMI</i>	1/10	--	10	20

4.7 DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Il primo studio sulla ricerca di molecole ad attività antimicrobica risale al 1981, anno in cui vengono inoculati dei patogeni nella pupa della falena da seta, *Hyalophora cecropia*, e si isolano piccole proteine antimicrobiche (Boman H.G. 1995). Questa ricerca ha indicato che le molecole antimicrobiche sono evolutivamente antiche e prodotte da tutti gli organismi viventi (Harris F. *et al.*, 2009).

Attraverso le analisi molecolari e l'indagine filogenetica è emerso che il motivo strutturale altamente conservato nelle molecole antimicrobiche è quello γ -core, formato dall'aminoacido cisteina (Yount N.Y. and Yeaman, M.R., 2004; Yount N.Y. and Yeaman, M.R., 2006). Questo motivo è composto da due foglietti β antiparalleli, suggerendo, così, che le molecole antimicrobiche di vertebrati, invertebrati, piante e funghi potrebbero avere un antenato comune riconducibile probabilmente ad un origine procariote (Yount N.Y. and Yeaman, M.R., 2006; Yeaman M.R. and Yount N.Y., 2007). In accordo con questa ipotesi, sono state identificate delle molecole ad attività antimicrobica nei *Myxobacteria* (*Anaeromyxobacter dehalogenans* e *Stigmatella aurantiaca*) che hanno mostrato una forte somiglianza nella sequenza e nella struttura con i peptidi fungini. E' stato, dunque, suggerito che tali peptidi batterici potrebbero rappresentare gli antenati degli AMPs eucariotici. Inoltre, è stato mostrato che i geni dei myxobacteria codificano per dei peptidi ancestrali e quindi potrebbero essere implicati nella difesa interna dei primi eucarioti e per lignaggio essere legati alle molecole antimicrobiche attuali (Gao B. *et al.*, 2009; Zhu S., 2007). Appare evidente l'importanza sul piano evolutivistico dello studio di cellule e molecole dell'immunità innata a tutti i livelli filogenetici. Inoltre, non meno importante è la presa d'atto che la biodiversità dell'ambiente marino e la diversità delle sostanze chimiche associate, costituiscono una risorsa illimitata di nuove

sostanze che possono fornire le basi per lo sviluppo di prodotti utilizzabili in campo biomedico e farmacologico.

Ogni anno nella sola Unione Europea oltre 25.000 persone muoiono di infezioni batteriche resistenti agli antibiotici. Questo è l'allarme lanciato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (Oms) Europa, in occasione della Giornata Mondiale della Salute 2011. Secondo l'Oms in Europa si rendono sempre più necessari nuovi antibiotici che possano fare fronte alla diffusione della resistenza battericida, dato che questa rende le infezioni tra cui, ad esempio, quelle del sangue o respiratorie, difficili da curare anche con antibiotici di ultima generazione. Poche classi di antibiotici, ormai, risultano efficaci nei confronti di alcuni batteri patogeni multi-resistenti, e la diffusione a livello mondiale di geni della resistenza è considerata uno scenario di estrema preoccupazione (Bassetti and Righi, 2013).

Inoltre, alla fine degli anni '90 l'*European Confederation of Medical Micology* (ECMM) ha condotto uno studio sull'epidemiologia della candidemia, che ha coinvolto 6 nazioni, compresa l'Italia. Da esso risultata che in Italia l'incidenza di tale infezione è del 70-90% (Tortorano *et al.*, 2002; 2004). Inoltre, la candidosi rappresenta un problema clinico di rilevante entità nella gestione dei pazienti ospedalizzati e immunocompromessi. Per ridurre i tassi di incidenza e mortalità, legati alle patologie da *Candida*, è fondamentale puntare su un approccio che tenga conto sia del quadro epidemiologico che dello shift epidemiologico (acquisizione di nuove resistenze), e che sia basato su farmaci ad ampio spettro e con profilo di tossicità tollerabile.

Da ciò risulta chiaro l'interesse per un'analisi ad ampio raggio sulle attività antimicrobiche-antimicotiche e citotossiche di prodotti dell'immunità innata di invertebrati marini, al fine di superare le predette problematiche e fornire una nuova possibile strategia terapeutica.

Da questo punto di vista, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di analizzare l'attività antimicrobica-antifungina e di testare la citotossicità di componenti cellulari dell'immunità innata estratti da invertebrati marini *C. pagurus*, *P. clarkii* e di tessuti di *P. noctiluca* e *A. equina* forniti da ricercatori dell'Università degli Studi di Palermo, e di tre peptidi sintetici disegnati sulla base della sequenza del mRNA *Ci8short* del tunicato *C. intestinalis*, forniti dal gruppo di ricerca diretto dal Dott. P. Colombo del Consiglio Nazionale delle Ricerche-CNR di Palermo.

La ricerca svolta durante il dottorato in Biologia Animale si colloca nell'ambito di una collaborazione tra l'*Università degli Studi di Palermo*, Coordinatore scientifico Prof. Nicolò Parrinello, il *Centre National de la Recherche Scientifique-CNRS-Montpellier* (Francia), sotto la responsabilità scientifica della Dott. Alessandra Occhialini ed il *Consiglio Nazionale delle Ricerche-CNR* di Palermo, responsabile scientifico Dott. Paolo Colombo.

Nel presente contributo scientifico, l'ipotesi di una potenziale attività antimicrobica della sequenza centrale, riportata come Peptide II, relativa alla sequenza del peptide *Ci8short* (73aa: MTSTVAIPQFFGNYPGVIPGSVPGGI PCPIPGTMPPANVPIPTSANGVSYPTVPIQVPIQLPVVPVGGGCYNE) (Vizzini A. *et al.*, 2012) è stata verificata e dimostrata. Tale attività risulta essere ad ampio spettro rispetto alle attività delle sequenze aminoacidiche a monte ed a valle della sequenza centrale, chiamate Peptide I e III.

L'analisi delle sequenze dei tre peptidi di *C. intestinalis* ha indicato che sono dei peptidi anionici AAMPs ed appartengono alla famiglia delle catelicidine PR-AMPs. Sebbene le ricerche sui peptidi ricchi in prolina, PR-AMPs, indipendentemente dalla carica totale e dalla percentuale d'idrofobicità, non avessero mostrato che tali molecole avessero attività antimicrobica, (Kristen S. *et al.*, 2002), questo studio dimostra come i tre peptidi sintetici con un'alta percentuale di residui di prolina e

glicina con carica totale netta pari a 0 e -1, possono essere considerati una nuova classe di peptidi con attività antimicrobica. D'altro canto mancano ancora dati relativi alla loro struttura completa ed il nostro lavoro ha riguardato l'attività di peptidi sintetici di cui non conosciamo gli altri livelli strutturali che potrebbero essere determinanti per il loro meccanismo d'azione.

Questo è in accordo con le considerazioni riportate nel precedente lavoro di Vizzini A. *et al.*, (2012), i quali utilizzando un meccanismo molecolare di ibridazione *in situ*, mostrano come in seguito all'inoculo di LPS, l'mRNA *Ci8short* è trascritto nel faringe, organo deputato all'immuno-sorveglianza ed i peptidi prodotti potrebbero essere coinvolti nella risposta immunitaria di *C. intestinalis* e potrebbero esercitare azioni antibatteriche-antimicotiche verso un ampio ventaglio di patogeni.

La scelta di patogeni, appartenenti alla classe di bio-rischio 2 e 3, per effettuare i saggi di attività, è stata determinata in previsione di ulteriori studi sulla potenziale utilizzazione dei peptidi espressi da *C. intestinalis* per un'eventuale trasferibilità in campo terapeutico.

In dettaglio, è stato possibile rilevare differenti attività antimicrobiche dei tre peptidi sintetici di *C. intestinalis*, sebbene non vi sia alcuna attività antibatterica verso i patogeni Gram – *E. coli* ed il Gram + *S. aureus*. I dati ottenuti riguardano:

- ✓ L'attività antimicrobica battericida del **peptide I** [3,20 mg/ml] sui ceppi Gram -: *P. aeruginosa*, *B. abortus* e verso ceppi Gram +: *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* e sull'eucariote *C. albicans*. Inoltre, il peptide I alla concentrazione di 1,6 mg/ml, non risulta particolarmente citotossico verso cellule della linea cellulare *J774-A1*. Tale concentrazione è pari alla concentrazione più elevata misurata per la Concentrazione Minima Battericida ed ha una percentuale di mortalità del 2% e del 20% dopo 2 e 24 ore di contatto rispettivamente.

- ✓ Un'attività antimicrobica e battericida verso i Gram + *B. subtilis* e *C. glutamicum*, il Gram – *P. aeruginosa* ed il lievito *C. albicans*. Il **peptide II** alla concentrazione di 1,70 mg/ml ha un'attività batteriostatica a contatto con i bacilli Gram – *B. abortus*, *B. suis* ed il cocco Gram + *E. faecalis* (CMB non definita). Inoltre, il peptide II [0,85 mg/ml], non risulta particolarmente citotossico verso cellule della linea cellulare *J774-A1*, con una mortalità del 5% e del 30 % dopo 2 e 24 ore dal contatto.
- ✓ Un'attività antimicrobica e battericida del **peptide III** [2,44 mg/ml] verso i batteri Gram +: *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. glutamicum*, ed il fungo *C. albicans* ed un'attività inibitrice a contatto con *P. aeruginosa*, *B. abortus* e *B. suis*. Il peptide III [1,22 mg/ml], presenta una mortalità del 4% e del 10% dopo 2 e 24 ore dal contatto con la linea cellulare *J774-A1*.

L'esame dell'attività antimicrobica degli estratti di *C. pagurus*, *P. clarkii*, *P. noctiluca* e *A. equina* non è stata estesa fino all'identificazione dei principi attivi. La scelta delle due specie di cnidari è stata anche intesa come modello invertebrato, filogeneticamente utile alla comprensione dei meccanismi dell'evoluzione dell'immunità innata.

In mancanza di informazioni sui genomi e l'espressione di geni dell'immunità di numerose specie di invertebrati, un approccio della ricerca riguarda l'attività biologica di estratti cellulari e tissutali. D'altro canto per alcune specie, il crostaceo *Daphnia Pulex* e lo cnidario *Nematostella vectensis*, di cui si conosce il genoma peptidi antimicrobici sono stati identificati (Phoenix D.A. *et al.*, 2013; Norton R.S., 2012).

Il nostro lavoro ha messo in evidenza che gli invertebrati marini presi in analisi, posseggono meccanismi di difesa basati su molecole idrosolubili con potenziale attività antimicrobica, che andrebbero isolate e caratterizzate.

I risultati relativi alle analisi degli estratti mettono in luce le seguenti conclusioni:

✓ I prodotti dell'estratto da emociti, cellule dell'immunità, di *C. pagurus*, alla concentrazione testata [2,58 mg/ml], mostrano un'attività battericida verso tutti i ceppi batterici (Gram+ e Gram-) e l'eucariote *C. albicans*, non presentando, invece, nessuna attività verso le due specie di *Brucella* testate. A contatto con la linea cellulare *J774-A1* si ha una percentuale di mortalità del 100% già dopo 2 ore, alla concentrazione di [0,64 mg/ml] corrispondente al valore più elevato della CMB, rilevando così una elevata attività citotossica.

✓ I prodotti dell'estratto da emociti di *P. clarkii* [0,73 mg/ml] hanno un'attività battericida sul batterio Gram negativo *E. coli* e verso tutti i patogeni Gram + usati in questo studio, quali: *S. aureus*, *B. subtilis* e *C. glutamicum*. Non presentano nessuna attività antibatterica verso i Gram -: *P.aeruginosa*, *B. abortus*, *B. suis*, il Gram + *E. faecalis* e l'eucariote *C. albicans*. Inoltre, tali estratti sono altamente citotossici verso la linea cellulare *J774-A*, e causano una mortalità del 100% già dopo 2 ore dal contatto con le cellule, alla concentrazione più efficace della CMB [0,36 mg/ml].

✓ I prodotti dell'estratto da tentacoli di *A. equina* [6,16 mg/ml] mostrano un'attività battericida verso tutti i patogeni Gram – , Gram + e l'eucariote, usati come target. Le analisi sulle attività citotossiche rilevano una mortalità tempo dipendente, alla concentrazione più efficace della CMB testata [0,19 mg/ml]. In dettaglio, 0% e 50% di mortalità dopo 2 e 24 ore, rispettivamente, dal contatto con le cellule macrofagiche della linea cellulare *J774-A1*, mostrando così una meno effettiva attività citotossica.

✓ L'estratto acido da ombrella di *P. noctiluca* [1,5 mg/ml] ha una attività battericida molto simile verso i batteri Gram -, Gram + e l'eucariote. Tale estratto non ha un'attività strettamente battericida verso il Gram + *S. aureus*, quindi si potrebbe trattare di un'attività non specificamente battericida. Il suo effetto citotossico sulle cellule

macrofagiche è abbastanza elevato con una percentuale di mortalità dell'80% già dopo 2 ore dal contatto, alla concentrazione più elevata della CMB [0,19 mg/ml].

In tutti i casi non è possibile pensare ad una correlazione diretta tra attività antibatterica ed attività citotossica degli estratti. In effetti le due attività possono dipendere da molecole diverse presenti negli estratti. Questi dati, comunque, aprono una prospettiva alternativa allo studio di nuove molecole con attività citotossica verso linee tumorali.

In conclusione, lo studio di molecole bioattive degli invertebrati è di particolare interesse per la comprensione di meccanismi dell'immunità innata e della loro evoluzione. Nel presente lavoro, peraltro, emergono indicazioni per lo studio di possibili ruoli e meccanismi d'azione endogeni. Inoltre, va sottolineato che i peptidi espressi e le molecole, con attività antimicrobica- antimicotica e citotossica, presenti negli estratti cellulari e tissutali delle specie esaminate, potrebbero essere anche coinvolti nella modulazione delle risposte immunitarie (Jenssen *et al.*, 2006). In particolare, abbiamo messo in evidenza come peptidi, con caratteristiche anioniche ed appartenenti alla famiglia delle catelicidine ricche in prolina, possano avere attività antimicrobica-antifunginea e presentare una ridotta citotossicità, contrariamente a quanto riportato in letteratura.

I nostri risultati, dunque, potrebbero rappresentare, in considerazione anche dell'allarme lanciato dall'OMS e dal'ECMM, una buona alternativa terapeutica agli antibiotici e agli antisettici per le applicazioni in campo farmacologico e biotecnologico.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare alcune persone per il loro fondamentale contributo, che ha reso possibile la stesura e definizione di questo lavoro di tesi.

La Dott. A. Vizzini, Università degli studi di Palermo e il Dott. P. Colombo, Consiglio Nazionale delle Ricerche-CNR di Palermo, per avere fornito i peptidi sintetici di *C. intestinalis*.

La Prof. D. Parrinello e la Dott. M. A. Sanfratello (Università degli studi di Palermo) per gli estratti di *C. pagurus*.

La Dott. M. Vazzana e la Dott. M. Celi (Università degli studi di Palermo) per gli estratti di *P. clarkii*.

Il Prof. M. Cammarata, la Dott. M. R. Trapani e la Dott. M. G. Parisi (Università degli studi di Palermo) per avere fornito gli estratti di *P. noctiluca* ed *A. equina*.

Ringrazio, inoltre, tutto il gruppo di lavoro coordinato dal Prof. Nicolò Parrinello, dell'Università degli Studi di Palermo, Facoltà di Scienze MM.FF.NN. Dipartimento di Scienze e Tecnologie biologiche Chimiche e Farmaceutiche (Italia) per l'interessante scambio di sapere e per avermi dato la possibilità di svolgere la mia attività di ricerca.

Infine, ringrazio l'équipe *Pathogénie bactérienne et stratégies anti-infectieuses* del Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (Francia).; Responsabile d'équipe: Dott. Stephan KÖHLER (DR INSERM) per l'opportunità di crescita professionale e per avermi fornito tutto ciò che è stato necessario per lo studio delle attività antibatteriche, durante il periodo di sedici mesi nell'ambito del progetto del mio dottorato che ho effettuato presso il loro laboratorio.

Bibliografia

- Abba J. Castin (2013). Handbook of biologically active peptides. Ed 2. Elsevier Inc.
- Aceret T.L., Sammarco P.W., Coll J.C., Uchio Y. (2001). Discrimination between several diterpenoid compounds in feeding by *Gambusia affinis*. *Comp Biochem Physiol* 128C: 55-63.
- Aderem, A. and Ulevitch, R. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Ammerman J. W., Fuhrman J. A., Hagstrom A. and Azam F. (1984). Bacterioplankton growth in seawater. 1. Growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 18:31–39.
- Aoki T., Schweinsberg S., Manasson J., Schedl P. (2008). A stage-specific factor confers Fab-7 boundary activity during early embryogenesis in *Drosophila*. *Mol. Cell. Biol.* 28(3): 1047-1060.
- Austin B (1988). *Marine Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Azumi K., Yokosawa H. and Ishii S. (1990). Halocyamines: novel antimicrobial tetrapeptide like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochemistry.* 29, 159-165.
- Baker M.A., Maloy W.L., Zasloff M., Jacob L.S. (1993). Anticancer Efficacy of Magainin2 and Analogue Peptides. *Cancer Research* 53, 3052-3057.
- Bals R., Weiner D. J., Moscioni A. D., Meegalla R. L., Wilson J. M. (1999). *Infect Immun*, 67, 6084-6089.
- Bandaranayake W.M., Bennis J.E., Bourne D.J. (1996). Ultraviolet absorbing pigments from the marine sponge *Dysidea herbacea*: isolation and structure of a new mycosporine. *Comp Biochem Physiol* 115C: 281-286.

- Baslow M. H. and Turlapaty P. (1969). *In vivo* antitumor activity and other pharmacological properties of halitoxin obtained from the sponge *Haliclona viridis*. P. W. Pharmacol. Soc. 12, 6-8.
- Bassetti M. and Righ E. (2013). Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? American Society of Hematology: pp:428-432.
- Becerro M.A., Paul V.J., Starmer J. (1998). Intracolony variation in chemical defenses of the sponge *Cacospongia sp.* and its consequences on generalist fish predators and the specialist nudibranch predator *Glossodoris pallida*. Mar Ecol Prog Ser 168: 187-196.
- Beck G. (1998). Macrokinins: invertebrate cytokine-like molecules. Front. Biosci. 3: 559-569.
- Begum, N., Matsumoto, M., Tsuji, S., Toyoshima, K. and Seya, T.(2000) The primary host defense system across humans, flies and plants. Current Trends in Immunology, 3, 59-74.
- Beisswenger C. and Bals R. (2005). Functions of Antimicrobial Peptides in Host Defense and Immunity. Current Protein and Peptide Science 6, 255-264.
- Bello J.H., Bello R. and Granados E. (1982). Conformation and aggregation of melittin: dependence on pH and concentration. Biochemistry 21:461–465.
- Belmonte G., Menestrina G., Pederzoli C., Kri I., Guben F., Turk T., MaEek P. (1994). Primary and secondary structure of a pore-forming toxin from the sea anemone, *Actinia equina L.*, and its association with lipid vesicles. Biochimica et Biophysica Acta 1192, 197-204.
- Bentley DR. (1988). Structural superfamilies of the complement system. Expl Clin Immunogenet; 5:69±80.
- Beschin A, Bilej M, Torreele E, De Baetselier P. (2001). On the existence of cytokines in invertebrates. Cell. Mol. Life Sci. 58: 801-814.

- Bessalle R , Kapitkovsky A , Gorea A , Shalit I , Fridkin M . (1990). All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. FEBS Lett. ; 274 (1-2).
- Blunt J. W., Copp B. R., Hu W.-P., Munro M. H. G., Northcote P. T. and Prinsep M. R. (2007). Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 24, 31-86.
- Boman H.G. (2000). “Innate immunity and normal microflora”. Immunol Rev., 173 5-16.
- Boman, H. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity Annu. Rev. Immunol. 13:61–92.
- Borowitzka M.A. and Borowitzka L.J. (1992). Vitamins and fine chemicals from micro algae. In: Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press. Great Britain, pp: 179.
- Braekman J. C., Daloz D., Macedo de Abreu P., Piccinni-Leopardi C., Germain G. and Van Meerssche M. (1982). A novel type of bisquinolizidine alkaloid from the sponge *Petrosia seriata*. Tetrahedron Lett. 23, 4277-80.
- Brogden K. A., Ackermann M. R., McCray P. B. Jr & Huttner K. M. (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 K.A., Ackermann M. & Huttner K. M. (1998). Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. *Infect. Immun.* **66**, 5948–5954.
- Brogden K.A., Ackermann M., McCray P.B., Tack B.F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. Int. J. Antimicrob. Agents 22, 465– 478.

- Brogden K.A., de Lucca A.J., Bland J., Elliott S. (1996). Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 412–416.
- Bulet P., Stöcklin R., Menin L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews* 198, 169-184.
- Burns E., Ifrach I., Carmeli S., Pawlik J.R., Ilan M. (2003). Comparison of anti-predatory defenses of Red Sea and a potential for applied biotechnology. *Electron. J. Biomed.*, 6, 272–284.
- Bussiere D.E. *et al.* (1998). Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry* 37, 7103-12.
- Cammarata M, Arizza V, Cianciolo C, Parrinello D, Vazzana M, Vizzini A, Salerno G, Parrinello N. (2008). The prophenoloxidase system is activated during the tunic inflammatory reaction of *Ciona intestinalis*. *Cell Tissue Res.* Sep;333(3):481-92.
- Capon, R. J. (2001). *Eur. J. Org. Chem.*, 4, 633-645.
- Carter G. T. and Rinehart K. L. (1978). Acarnidines, novel antiviral and antimicrobial compounds from the sponge *Acarnus erithacus* (de Laubenfels). *J. Am. Chem. Soc.* 3 100, 4302-4.
- Casas S.M., Comesaña P, Cao A. and Villalba A. (2011). Comparison of antibacterial activity in the hemolymph of marine bivalves from Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.* 106: 343–345.
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaek M, Tempst P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* 8. p. 2387-2391.
- Cerenius, L. and Söderhäll, K. (2002) Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunology* 12, 421-437.
- Chanas B., Pawlik J.R., Lindel T., Fenical W. (1996). Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). *J Exp Mar Biol Ecol* 208: 185-196.

- Chen J.S. and Zeller R.W. (2011). Genomic studies using the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*. *Computational Science & Engineering Faculty and Students Research Articles*.
- Chinchar V.G., Bryan L., Silphadaung U., Noga E., Wade D., Rollins-Smith, L. (2004). Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology* 323, 268.
- Chisholm J. R. S., and V. J. Smith (1992). Antibacterial activity in the hemocytes of the shore crab *Carcinus maenas*. *J. Mar. Biol. Assoc.* 72:529–542.
- Cimino G., De Stefano S., Minale L. and Fattorusso E. 1971. Furospingin-1, a new C21furanoterpene from the sponges *Spongia officinalis* and *Hippospongia communis*. *Tetrahedron.* 27, 4673-9.
- Collinge, D.B. and Slusarenko, A.J. (1987). Review: Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Molec. Biol.* 9: 389-410.
- Conlon J. M. (2008). Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae. *Peptides*, Volume 29, Issue 10, October , Pages 1815-1819.
- Cooper, E. L., Kauschke, E. and Cossarizza, A. (2002) Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *BioEssays* 24, 319-333.
- Cragg G. M. et Newman D. J. (2000). *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9, 2783-2797.
- Cragg. G. M., Newman D. J. Snader K. M. J. (1997). *Nat. Prod.*, 60, 52-60.
- Crews P., Manes L. V. and Boehler M. (1986). Jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis sp.* *Tetrahedron Lett.* 27, 2797-800.
- Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000). *Natural Products (Secondary Metabolites)*. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds.

- Degiam Z.D. and. Abas A.T. (2010). Antimicrobial activity of some crude marine Mollusca extracts against some human pathogenic bacteria. *Thi-Qar Medical Journal (TQMJ)*: Vol (4) No(3): 142-147.
- Dehal P, Satou Y, Campbell RK, Chapman J, Degnan B, De Tomaso A, *et al.* The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 2002; 298(5601):2157–67.
- Destoumieux D., M. Munoz, P. Bulet, and E. Bachere (2000). Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1260–1271.
- Destoumieux D., P. Bulet, D. Loew, A. VanDorsselaer, J. Rodriguez, and E. Bachere (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Biol. Chem.* 272:28398–28406.
- Destoumieux D., P. Bulet, J. Strub, A. Dorsselaer, and E. Bachere (1999). Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem.* 266:335–346.
- Destoumieux-Garzon D., Saulnier D., Garnier J., Jouffrey C., Bulet P., Bachere E. (2001). Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.*, , 276, 47070-47077.
- Di Bella M. A., Fedders H., Leippe M., De Leo G. (2012). A preliminary study on antimicrobial peptides in the naturally damaged tunic of *Ciona intestinalis* (Tunicata). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. AMéndez-Vilas (Ed).
- Diego-Garcia E., Batista C.V., Garcia-Gomez B.I., Lucas S., Candido D.M., Gomez-Lagunas F., Possani L.D. (2005). The Brazilian scorpion *Tityus costatus* karsch: Genes, peptides and function. *Toxicon*, 45, 273–283.

- Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* 1998;47:465-77.
- Dionisio-Sese M.L., Ishikura M., Maruyama T., Miyachi S. (1997). UV-absorbing substances in the tunic of a colonial ascidian protect its symbiont, *Prochloron*, from damage by UV-B radiation. *Mar Biol* 128: 455-461.
- Dixon, R.A. and Harrison, M.J. (1990). Activation, structure and organization of genes involved in microbial defence of plant. *Adv. Genet.* 28: 165-234.
- Du Pasquier L. 2000. The immune systems of vertebrates and invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 126, Supplement 1, pp. 30-200.
- Dunlap W.C., Chalker B.E., Oliver J.K. (1986). Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef, Great Barrier Reef, Australia. III UV-B absorbing compounds. *J Exp Mar Biol Ecol* 104: 239-248.
- ECDC/EMA Technical Report “The bacterial challenge, time to react”. 2009.
- Ehrenstein G., and H. Lecar (1977). Electrically gated channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* 10:1–34.
- Epand R.M. and Vogel H.J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica and Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology* 1462, 11-28.
- Epifanio R.D., Gabriel R., Martins D.L., Muricy G. (1999a). The sesterterpene variabilin as a fish-predation deterrent in the Western Atlantic sponge *Ircinia strobilina*. *J Chem Ecol* 25: 2247-2254.
- Epifanio R.D., Martins D.L., Villaça R., Gabriel R. (1999b). Chemical defenses against fish predation in three Brazilian octocorals: 11,12-epoxy-pukalide as a feeding deterrent in *Phyllogorgia dilatata*. *J Chem Ecol* 25: 2255-2265.

- Faulkner D. J. (2000). Highlights of marine natural products chemistry (1972–1999). *Nat. Prod. Rep.*, 2000,17, 1-6.
- Fearon DT, Locksley RM. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*; 272:50–4.
- Febles C.I., Arias A. and Gil-Rodriguez M.C. (1995). In vitro study of antimicrobial activity in algae (Chlorophyta, Phaeophyta and Rhodophyta) collected from the coast of Tenerife (in Spanish). *Anuario del Estudios Canarios*, 34: 181-192.
- Fedders H, Leippe M. (2008). A reverse search for antimicrobial peptides in *Ciona intestinalis*: identification of a gene family expressed in hemocytes and evaluation of activity. *Dev. Comp. Immunol.*; 32 (3): 286–298.
- Fedders H, Michalek M, Grötzinger J, Leippe M. (2008). An exceptional salt-tolerant antimicrobial peptide derived from a novel gene family of haemocytes of the marine invertebrate *Ciona intestinalis*. *Biochem. J.*; 416 (1): 65-75.
- Fedders H. and Leippe M. (2008). A reverse search for antimicrobial peptides in *Ciona intestinalis*: Identification of a gene family expressed in hemocytes and evaluation of activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 32, 286–298.
- Fisher R.D, Harvey R., Champe P.C. (2008). *Le basi della microbiologia*. Zanichelli.
- Frommann S. et Jas G. (2002). *Business Briefing: Future Drug Discover.*, 84-90.
- Froy O, Gurevitz M. (2003). Arthropod and mollusk defensins - evolution by exon-shuffling. *Trends Genet*;19:684-7
- Gao B., del Carmen Rodriguez M., Lanz-Mendoza H., and Zhu S. (2009). AdDLP, a bacterial defensin-like peptide, exhibits anti-*Plasmodium* activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **387**, 393–398.
- García-Olmedo, F., Molina, M., Josefa, M.A. and Rodríguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defence peptides. *Biopolymers* 47: 479-491.

- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Hernandez-Lucas, C., Ponz, F., Marana, C., Carmona, M.J., Lopez-Fando, J., Fernandez, J.A. and Carbonero, P. (1989). The thionins: a protein family that includes purothionins, viscotoxins and crambin. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 6: 31-60.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J.M., LopezSolanilla, E., Berrocal-Lobo, M., Poza-Carrion, C., (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.* 498, 219–222.
- Gennaro R. & Zanetti M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55, 31–49.
- Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Mocchegiani F, Orlando F, Kamysz W, Del Prete MS, Lukasiak J, Scalise G, Saba V. (2002). Temporin A as a prophylactic agent against methicillin sodium-susceptible and methicillin sodium-resistant *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection. *J Vasc Surg*; 36(5):1027-30.
- Gidalevitz D., *et al.* (2003). Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 100(11): p. 6302-6307.
- Gottler L. M. and A. Ramamoorthy (2009). "Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan--a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin." *Biochim Biophys Acta* 1788(8): 1680-6.
- Goumon Y., Lugardon K., Gadroy P., Strub J.M., Welters I.D., Stefano G.B., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. (2000). Processing of proenkephalin-a in bovine chromaffin cells. Identification of natural derived fragments by N-terminal sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, 275, 38355–38362.

- Greenberg, S. and Grinstein, S. (2002) Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 136-145.
- Grossa P.S., Al-Sharifb W.Z., Clowb L.A., Smitha L.C. (1999). Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Developmental and Comparative Immunology* 23, 429+442.
- Grubor B., Meyerholz D.K., Ackermann M.R. (2006). Collectins and cationic antimicrobial peptides of the respiratory epithelia. *Vet. Pathol.*, 43, 595–612.
- Gudmundsson G. H., Agerberth B. (1999). *Immunol Methods*, 232, 45–54.
- Gueguen Y, Bernard R, Julie F, Paulina S, Delphine DG, Frank V, Philippe B, Evelyne B. (2009). Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin *Mol. Immunol.* 46. - 2009. - p. 516-522.
- Gul W. and Hamann M.T. (2005). Indole alkaloid marine natural products: An established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases. *Life Sci.*, 78: 442-453.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. (1997). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 575–607.
- Hancock R.E, Diamond G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* Sep;8(9):402-10.
- Hancock R.E.W. and Chapple D.S. (1999). Peptide Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* vol. 43 no. 6 1317-1323.
- Hancock R.E.W., Brown K.L., Mookherjee N. (2006). Host defence peptides from invertebrates - emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* 211, 315-322.
- Harris F., Dennison S.R. and Phoenix D.A. (2009). Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Current Protein and Peptide Science*, 10, 585-606.

- Haug T., A. Kjuul, O. Styrvold, E. Sandsdalen, O. Olsen, and K. Stensvag (2002). Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Cucumaria frondosa*, and *Asteria rubens*. *J. Invertebr. Pathol.* 81:94–102.
- Hickman P.C., Roberts L.S., Keen S.L., Larson A., Eisenhour D.J. IV edizione. McGraw-Hill.
- Hoebe, K., Jansen, E. and Beutler, B. (2004) The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 5, 971-974.
- Hoffman JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*;284:1313–8.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. Jr. and Ezekowitz, R. A. B. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Huang H. W. (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry.* 39:8347–8352.
- Huang W.S., Wang K.J., Yang M., Cai J.J., Li S.J., Wang G.Z. (2006). Purification and part characterization of a novel antibacterial protein Scygonadin, isolated from the seminal plasma of mud crab, *Scylla serrata* (Forsk., 1775). *J. Ex. Mar. Biol. Ecol.*, 339, 37-42.
- Hubert F., Noe'l T. and Roch Ph. (1996) A new member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur J Biochem* 240, 302–306.
- Inamori, K., Ariki, S. and Kawabata, S. (2004) A toll-like receptor in horseshoe crabs. *Immunol. Rev.* 198, 106-115.
- Inman W. and Crews P. (1989). Novel marine sponge-derived amino acids. Conformational analysis of jasplakinolide. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 2822-9.

- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).
- Jaspars, M. (1999). *Chemistry and Industry*, 2, 51-55.
- Jenssen H., Hamill P. and Hancock R.E. W. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, July 2006, p. 491–511 Vol. 19, No. 3.
- Joerger, R.D. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science* 82, 640-647.
- José Vitor M. Lima-Filho, Ana F.F.U. Carvalho, Sissi M. Freitas, Vânia M.M. Melo (2002). Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the Northeastern Brazilian Coast. *Brazilian Journal of Microbiology* 33:311-313.
- Kasahara M, Suzuki T, Du Pasquier L. (2004). On the origin of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Trends Immunol.* 25: 105-111.
- Kubanek J., Whalen K.E., Engel S., Kelly S.R., Henkel T.P., Fenical W., Pawlik J.R. (2002). Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two Caribbean sponges. *Oecologia* 131: 125-136.
- Laforce F.M., Boose D.S. (1981). Sublethal damage of *Escherichia coli* by lung lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 124, 733–737.
- Lai H.Y., Lim Y.Y. and Tan S.P. (2009). Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73, P. 1362-1366.
- Lai H.Y., Yau Y.Y. and Kim K.H. (2010). *Blechnum orientale* Linn - a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, P. 15.

- Lai R., Liu, H., Hui Lee W., Zhang Y. (2002). An anionic antimicrobial peptide from toad. *Bombina Maxima*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295, 796–799.
- Lambris JD., Mavroidis M., Sunyer JO. (1994). Phylogeny of third component of complement, C3. In: Erdei A, editor. *New aspects of complement structure and function*. Austin, Texas: R.G. Landes & Co., p. 15±34.
- Lee I.H., Cho Y. and Lehrer R.I. (1997) Styelins, broadspectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 118, 515–521.
- Lehrer R. I., Lichtenstein A. K. & Ganz T. (1993). Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 105–128.
- Lehrer R. I., Lichtenstein A. K., Ganz T. (1993). *Ann Rev Immunol*, 11, 105–128.
- Lehrer R. I., Tincu J. A., Taylor S. W., Menzel L. P. and Waring A. J. (2003). Natural Peptide Antibiotics from Tunicates: Structures, Functions and Potential Uses. *Integr. Comp. Biol.* 43 (2): 313-322.
- Lemaitre B, Reichhart J-M, Hoffmann JA. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*;94:14614–9.
- Lima-Filho J.V.M., Carvalho A.F.F.U. and Freitas S.M. (2002). Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the Northeastern Brazilian Coast Brazilia *J. Microbiol.*, 33: 311-313.
- Lindel T., Hofmann H., Hochgürtel M., Pawlik J.R. (2000). Structure-activity relationship of inhibition of fish feeding by sponge-derived and synthetic pyrroleimidazole alkaloids. *J Chem Ecol* 26: 1477-1496.
- Lindquist N. (1996). Palatability of invertebrate larvae to corals and sea anemones. *Mar Biol* 126: 745-755.

- Ludtke S. J., K. He W. T. heller, T. A. Harroun, L. Yang, and H. W. Huang (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*. 35:13723–13728.
- Marin A., López M.D., Esteban M.A., Mesegner J., Muñoz J, Fontana A. (1998). Anatomical and ultrastructural studies of chemical defense in the sponge *Dysidea fragilis*. *Mar Biol* 131: 639-645.
- Marshall S.H. and Arenas G. (2003). Antimicrobial Peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and *Caribbean sponges*. I. Chemical defense. *Mar Ecol Prog Ser* 252: 105-114.
- Matsuzaki K, Yoneyama S, Murase O, Miyajima K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochemistry*. (1996) 25;35(25):8450-6.
- Mayer A.M.S. and Hamann M.T. (2005). Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Phys.*, 140C: 256-286.
- McPhee J.B. and Hancock R.E. (2005). Function and therapeutic potential of host defence peptides. *J. Pept. Sci.*, 11, 677–687.
- Medzhitov R. and Janeway C. A. (1997). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell*, Vol. 91, 295–298, October 31
- Menzel L., Lee I., Sjostrand B., and Lehrer R. (2002). Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 26:505–515.
- Mitta G., F. Hubert, E. Dyrinda, P. Boudry, and P. Roch (2000). Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 24:381–393.

- Mitta G.F., Hubert T., Noe'l B. and Roch P. (1999). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem* 265, 71–78.
- Miyata T., Tokunaga F., Yoneya T., Yoshikawa K., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., and Shimonishi Y. (1989). Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J. Biochem.* 106:663–668.
- Miyata T., Tokunaga, F., Yoneya T., Yoshikawa K., Iwanaga S., Niwa M., Takao T. and Shimonishi Y. (1989) Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J Biochem* 106, 663–668.
- Mohammadizadeh F., Ehsanpor M., Afkhami M., Mokhlesi A., Khazaali A., Montazeri S. (2013). Evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of *Holothuria scabra* from the North Coast of the Persian Gulf. *Journal de Mycologie Médicale*.
- Mookherjee N. and Hancock R. (2007). Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 64, 922-933.
- Moquin-Pathey C. and Guyot M. (1989). Grossularine-1 and grossularine-2, cytotoxic α -carboline from the tunicate: *Dendrodoa grossularia*. *Tetrahedron.* 45, 3445-3450.
- Morales R. W. and Litchfield C. (1976). Unusual C24, C25, C26 and C27 polyunsaturated fatty acids of the marine sponge *Microciona prolifera*. *Biochim. Biophys. Acta.* 431, 206-16.
- Muta, T. and Iwanaga, S. (1996a). Clotting and immune defense in Limulidae. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 15, 154-189.

- Muta, T. and Iwanaga, S. (1996b) The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 41-47.
- Nakamura Y., Mathew C. G. P., Sobol H., Easton D. F., Teleniljs H., Bragg T., Chin K., Clark J., Jones C., Lenori G. M., and White R. (1989). Linked markers flanking the gene for multiple endocrine neoplasia type 2A. *Genomics* 5: 199-204.
- Nappi A.J., Ottaviani E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates (2000). *Bioessays.* 22(5), 469-80.
- Nigrelli R.; Jakowsk S. and Carlent I. (1959). Bioactive compounds from sponges, *Zoological*, N.Y., 44: 173.
- Norton R.S. (2012). *Biologically Active Peptides II ed. Sea Anemone Peptides.* Capitolo 60.
- O'Neal W., Pawlik J.R. (2002). A reappraisal of the chemical and physical defenses of Caribbean gorgonian corals against predatory fishes. *Mar Ecol Prog Ser* 240:117-126.
- Oren Z. and Shai Y. (1997). Article Selective Lysis of Bacteria but Not Mammalian Cells by Diastereomers of Melittin: Structure–Function Study. *Biochemistry*, 36 (7), pp 1826–1835.
- Ottaviani E, Malagoli D, Franchini A. (2004). Invertebrate humoral factors: cytokines as mediators of cell survival. In: Beschin A, Muller WEG. (eds), *Invertebrate Cytokines and the Phylogeny of Immunity: Facts and paradoxes.* *Progr. Mol. Subcell. Biol.*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. 34, pp 1-25,.
- Otvos L jr. (2002). The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell Mol Life Sci*, 59. p.1138-1150.
- Papagianni M. (September 2003), "Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications", *Biotechnol Adv* 21 (6): 465–499.

- Parrinello N., (2009). Focusing on *Ciona intestinalis* (Tunicata) innate immune system. Evolutionary implications. ISJ 6: S46-S57
- Parrinello N., De Leo G., Di Bella M.A. (1990). Fine structural observations of the granulocytes involved in the tunic inflammatory-like reaction of *Ciona intestinalis* (Tunicata). J Invertebr Pathol. 56(2), 181-9.
- Parrinello N., Patricolo E., Canicatì C. (1977). Tunicates immunobiology. I. Tunic reaction of *Ciona intestinalis* L. to erythrocyte injection. Biol. Zool. 44,373-383.
- Pasiyappazham R., Namasivayam S., Alagiri S., Vairamani S., Jayalakshmi K. and Annaian S. (2011). *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of methanolic extract from selected species of Cephalopods on clinical isolates. African Journal of Microbiology Research Vol. 5(23), pp. 3884-3889, 23 October, 2011.
- Patrzykat A. and Douglas S. E. (2003) Gone gene fishing: how to catch novel marine antimicrobials. Trends Biotechnol. 21: 362-369.
- Pawlik J.R., Chanas B., Toonen R.J., Fenical W. (1995). Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. Mar Ecol Prog Ser 127: 183-194.
- Perry J., Staley J., Lory S. (2004). Microbiologie. Collection: Sciences Sup, Dunod-912 pages EAN13 : 9782100072347.
- Philippon A., Labia R. & Jacoby, G. (1989). Extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 33, 1131-6.
- Phillipson D. W. and Rinehart K. L. (1983). Antifungal peroxide-containing acids from two Caribbean sponges. J. Am. Chem. Soc. 105, 7735-6.
- Phoenix D.A., Dennison S.R., and Harris F. (2013). Antimicrobial Peptides. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Pickenng AD, Richards RH (1980) Factors influencing the structure, function and blota of the salmonid epldermis. Proc R Soc Ed~nb 79B:93-104.

- Pierce J.J., Weiner R.F: and Vesilind P.A. (1994). Environmental Pollution and Control. 4th Edn., Butterwoeth-Heinemann, Boston.
- Pisut D.P., Pawlik J.R. (2002). Anti-predatory chemical defenses of ascidians: secondary metabolites or inorganic acids? J Exp Mar Biol Ecol 270: 203-214.
- Powers J.-P.S., Rozek A., Hancock R.E.W. (2004). Structure–activity relationships for the β -hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics 1698, 239-250.
- Prochazkova P., Silerova M., Felsberg J., Joskova R., Beschin A., de Baetselier P., Bilej M. (2006). Relationship between hemolytic molecules in Eisenia Fetida earthworms. Dev. Comp. Immunol. 30, 381–392.
- Quinn R. J., Gregson R. P., Cook A. F. and Bartlet R. T. (1980). Isolation and synthesis of 1- methylisoguanisine, a potent pharmacologically active constituent from the marine sponge *Tedania digitata*. Tetrahedron Lett. 21, 567-568.
- Raj P. A., Edgerton, M. FEBS Lett 1995, 368, 526–530.
- Rao P.S. and Parekh K.S. (1981). Antibacterial activity of Indian seaweed extracts. Bot Marina; 24: 577-582.
- Ratcliffe N.A., Rowley A.F., Fitzgerald S.W., Rodes C.P. (1985). Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97, 183-350.
- Reddy K.V.R., Yedery R.D. & Aranha C., 2004. Antimicrobial peptides: Premises and promises. International Journal of Antimicrobial Agents, 24: 536-547.
- Relf J., J. Chisholm, G. Kemp, and V. Smith (1999). Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. Eur. J. Biochem. 264:350–357.
- Rinehart K. L., Shaw P. D., Shield L. S., Gloer J. B., Harbour G. C., Koker M. E. S., Samain D., Schwartz R. E., Tymiak A. A., Weller D. L., Carter G. T., Munro M. H. G., Hughes Jr R. G., Renis H. G., Swynenberg E. B., Stringfellow D. A., Vavra J.J.,

- Coats J. H., Zurenko G. E., Kuentzel S. L., Li L. H., Bakus G. J., Brusca R. C., Craft L. L., Young D. N. and Connor J. L. (1981). Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial, and antineoplastic agents. *Pure & Appl. Chem.* 59, 795-817.
- Rinkevich B., (1999). Invertebrates versus Vertebrates Innate Immunity: In the Light of Evolution. *Scand. J. Immunol.* 50, 456–460
 - Roitt I. (1994). *Essential immunology*. Blackwell Scientific. Publications, Oxford, UK
 - Roitt I. M. and Delves P. J (2003). *The Immune System*. *N Engl J Med* 2000; 343:37-49.
 - Roitt I.M., Brostoff J.; M. David. *Immunologia*, 2003, 496 p., ill., brossura, 5 ed. Editore Zanichelli.
 - Sato H., Tsuda M., Watanabe K. and Kobayashi J. (1998). Rhopaladins A-D, new indole alkaloids from marine tunicate *Rhopalaea sp.* *Tetrahedron.* 54, 8687-8690.
 - Schnapp D., Kemp G.D. & Smith V.J., 1996. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin 7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of Biochemistry*, 240: 532-539.
 - Schutte B.C. and McCray P.B. (2002). [Beta]-defensins in lung host defense. *Annu. Rev. Physiol.*, 64, 709–748.
 - Scocchi M., Tossi A., Gennaro R. (2011). Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action *Cell. Mol. Life Sci.* 68 - p. 2317-2330.
 - Sela M. (1962). Inhibition of ribonuclease by copolymers of glutamic acid and aromatic amino acids. *J. Biol. Chem.*, 237, 418–421.
 - Selegim M. H. R., Lira S. P., Kossuga M. H., Batista T., R.G.S. Berlinck, Hajdu E., Muricy G., da Rocha R. M., do Nascimento G. G. F., Silva M., Pimenta E.F.,

Thiemann O. H., Oliva G., Cavalcanti B.C., Pessoa C., de Moraes M. O., Galetti F. C. S., Silva C. L., de Souza A. O., Shai P.S.Y. and Oren Z. (1996). A Class of Highly Potent Antibacterial Peptides Derived from Pardaxin, A Pore-Forming Peptide Isolated from Moses Sole Fish *Pardachirus marmoratus*. European Journal of Biochemistry Volume 237, Issue 1, pages 303–310.

- Shai Y Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. (2002). Biopolymers 66: 236–248.
- Shamova O., Brogden K. A., Zhao C., Nguyen T., Kokryakov V. N., Lehrer R. I. Infect Immun 1999, 67, 4106–4111
- Sharma G. M. and Burkholder P. R. (1967). Studies on the antimicrobial substances of sponges. II. Structure and synthesis of a bromine-containing antibacterial compound from a marine sponge. Tetrahedron lett. 42, 4147-50.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S. & Miller, G.H. (1993).Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycosidemodifying enzymes. Microbiol Rev 57, 138-63.
- Sherris, 2012. Microbiologia medica. Editore: EMSI.
- Simmons T. L., Andrianasolo E., McPhail K., Flatt P., and W. H. (2005). Gerwick, Molecular Cancer Therapeutics, 4(2), 333.
- Soderhall K., Iwanaga S., and Vasta G. R. (1996). New directions in invertebrate immunology. SOS Publications, Fair Haven, N.J.
- Sondheimer E.et Someone J. B. (1970). Chemical Ecology, Academic Press, New York.
- Stabili L., Pagliara P. and Roch P. (1996). Antibacterial activity in the coelomocytes of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 113, 639–644.

- Stachowicz J.J., Lindquist N. (1997). Chemical defense among hydroids on pelagic Sargassum: predator deterrence and absorption of solar UV radiation by secondary metabolites. *Mar Ecol Prog Ser* 155: 115-126.
- Steffen H., Rieg S., Wiedemann I., Kalbacher H., Deeg M., Sahl H.G., Peschel A., Gotz F., Garbe C., Schittek B. (2006). Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, 2608–2620.
- Stonard R. J. and Andersen R. J. (1980). Celenamides A and B, linear peptide alkaloids from the sponge *Cliona celata*. *J. Org. Chem.* 45, 3687-91.
- Tadessea M., Gulliksen B., Strøm M. B., Styrvolda O. B. and Hauga T. (2008). Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *J. Invertebr. Pathol.* Nov; 99(3):286-93.
- Tasiemski A., Vandenbulcke F., Mitta G., Lemoine J., Lefebvre C., Sautiere P.E., Salzet M. (2004). Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *J. Biol. Chem.*, 279, 30973-30982.
- Taylor K., Barran P. E., Dorin J. R. (2008). Structure–Activity Relationships in b-Defensin Peptides, Interscience Wiley periodicals Inc. *Biopolymers (Pept Sci)* 90: 1-7.
- Taylor S. W., B. Kammerer and E. Bayer. (1997). New perspectives in the chemistry and biochemistry of the tunichromes and related compounds. *Chem. Rev.* 97:333–346.
- Thevissen K., Cammue B. P. A., K. Lemaire, J. Winderickx, R. C. Dickson, R. L. Lester, K. K. A. Ferket, F. Van Even, A. H. A. Parret, and W. F. Broekaert (2000). A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of

Saccharomyces cerevisiae to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). PNAS. vol. 97 no. 17.

- Thomas S., Karnik S., Barai R.S., Jayaraman V.K. (2010). Idicula-Thomas, S. CAMP: A useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.*, 38, D774–D780.
- Tincu J.A. and Taylor S.W. (2004). Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3645–3654.
- Toke O. (2005). Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Peptide Science* 80, 717-735.
- Tomasinsig L. and Zanetti M. (2005). The Cathelicidins – Structure, Function and Evolution. *Current Protein and Peptide Science*, 6, 23-34.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2008). *Elementi di microbiologia*. Pearsin Benjamin Cummings. Cap IV.
- Tortorano AM, Biraghi E, Astolfi A, et al. (2002). European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidaemia: report from one Italian region. *J Hosp Infect*;51(4):297-304.
- Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, et al. (2004). Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospitalbased surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;23:317–322.
- Tossi A, Sandri L. (2002). Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr Pharm Des.*;8(9):743-61. Review.
- Van Alstyne K.L., Wylie C.R., Paul V.J. (1994). Antipredator defenses in tropical Pacific soft corals (Coelenterata: Alcyonacea). II. The relative importance of chemical and structural defenses in three species of *Sinularia*. *J Exp Mar Biol Ecol* 178: 17-34.

- Vandendriessche L. (1956). Inhibitors of ribonuclease activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 347–353
- Vervoort H.C., Pawlik J.R., Fenical W. (1998). Chemical defense of the Caribbean ascidian *Didemnum conchylatum*. *Mar Ecol Prog Ser* 164: 221-228.
- Vizzini A., Bonura A., Parrinello D., Sanfratello MA., Longo V., Colombo P. (2012). LPS Challenge Regulates Gene Expression and Tissue Localization of a *Ciona intestinalis* Gene through an Alternative Polyadenylation Mechanism. *Plos one*: Volume 8: Issue 4.
- Waddell B., Pawlik J.R. (2000). Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators. I. Assays with hermit crabs. *Mar Ecol Prog Ser* 195: 125-132.
- Wade J. B., C. O'Reilly, I. Chandratat (1990). Golden parachutes: CEOs and the exercise of social influence. *Admin. Sci. Quart.* 35 587–603.
- Wah L.K., Jhaumeer-Laulloo S., Yive R.C.K., Bonnard I. and Banaigs B. (2006). Biological and chemical study of some soft corals and sponges collected in Mauritian waters, Western Indian Ocean. *J. Mar. Sci.*, 5: 115-121.
- Wallace R. W. (1997). *Mol. Med. Today*, 3, 291-295.
- Wang Z. and Wang G. (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research* 32, D590-D592.
- Weiss, T. M. *et al.* (2002). Two states of cyclic antimicrobial peptide RTD-1 in lipid bilayers. *Biochemistry* 41, 10070–10076.
- Williams D.H., Stone M.J., Hauck P.R., Rahman S.K. (1989). *J Nat Prod*, 52, 1189–208.
- Wong JH, Xia L, Ng TB. (2007). A review of defensins of diverse origins. *Curr Protein Pept Sci.* 8(5). p. 446-59.
- Wright R. K. (1981). *Urochordates*, vol. 2. Academic Press, Ltd., London, England.

- Yan H, Hancock RE. (2001). Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* ;45(5):1558-60.
- Yang L., Harroun T. A., Weiss T. M., Ding, L. & Huang, H. W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores *Biophys. J* 81,1475-85.
- Yeaman M.R. and Yount N.Y. (2007). Unifying themes in host defence effector polypeptides. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 727–740.
- Yount N.Y. and Yeaman M.R. (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 7363–7368.
- Yount N.Y. and Yeaman M.R. (2006). Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1758, 1373–1386.
- Zainab Dakhil Degiam and Ali Tahar Abas (2010). Antimicrobial activity of some crude marine Mollusca extracts against some human pathogenic bacteria. *Thi-Qar Medical Journal (TQMJ): Vol(4) No(3):2010(142-147)*.
- Zanetti M., Gennaro R., Romeo D. (1995). *FEBS Lett*, 374, 1-5.
- Zasloff M. (1987). "Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15): 5449-53.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415 389-395.
- Zhu S. (2007) Evidence for myxobacterial origin of eukaryotic defensins. *Immunogenetics*, 59, 949–954.
- Zinkernagel R. M., Bachmann M. F., Kündig T. M., Oehen S., Pirchet H., and Hengartner H. (1996). ON IMMUNOLOGICAL MEMORY. *Annual Review of Immunology*. 14: 333-367.