

882492

DR 60/13

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA, BIOFISICA E
CHIMICA DELLE MACROMOLECOLE

DOTTORATO DI RICERCA
IN
CHIMICA BIOLOGICA

- XV CICLO -


Tesi di Dottorato

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA E ANTIFUNGINA
DI PEPTIDI ANTIMICROBICI E LORO
INIBIZIONE DA ESOPOLISACCARIDI DI
PATOGENI POLMONARI

Dottoranda:
Monica BENINCASA 172

Tutore: 
Prof. R. GENNARO
Università degli Studi di Trieste

CS

Coordinatore: 
Prof. R. GENNARO
Università degli Studi di Trieste

ANNO ACCADEMICO 2001-2002

INDICE

INTRODUZIONE**1. Peptidi antimicrobici**

1.1 Peptidi antimicrobici e sistema immunitario	1
1.2 Distribuzione e classificazione dei peptidi antimicrobici	2
1.3 Peptidi antimicrobici derivati dalle catelicidine	7
Peptidi ad α -elica	9
Peptidi ricchi in prolina e arginina	10
Peptidi ricchi in triptofano	11
Peptidi con un ponte disolfuro	11
Peptidi con due ponti disolfuro	12
1.4 Defensine	12
1.5 Potenzialità terapeutiche dei peptidi antimicrobici	14

2. Necessità di nuovi agenti antimicrobici

2.1 Il problema dell'antibiotico-resistenza	16
2.2 Le infezioni fungine	18
2.3 Farmaci antifungini tradizionali	20
2.4 Nuovi farmaci e prospettive future	23

3. Fibrosi cistica

3.1 Fibrosi cistica	26
3.2 Infezioni opportunistiche in pazienti affetti da fibrosi cistica	31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
<i>Burkholderia cepacia</i>	33
3.3 Un importante patogeno polmonare: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35

4. Scopo della tesi

4.1 Scopo della tesi	37
----------------------	----

MATERIALI E METODI**1. Peptidi antimicrobici**

1.1 Sintesi chimica di peptidi	39
1.2 Sintesi in fase solida di LL-37 e del suo frammento 7-37	46
1.3 Rimozione del peptide dalla resina	46
1.4 Purificazione del peptide	47
1.5 Spettrometria di massa	49

1.6	Dosaggio della concentrazione peptidica	49
2.	Terreni e colture	
2.1	Terreni di coltura	51
	Terreno Mueller-Hinton (MH)	51
	Terreno Tryptic Soy Broth	51
	Terreno Sabouraud	51
	Terreno RPMI-1640	51
	Soluzione fisiologica tamponata	52
	Tampone Na-fosfato 10 mM, pH 7.4	52
2.2	Colture di cellule batteriche	52
	Isolamento su terreno solido	52
	Preparazione delle sospensioni batteriche	52
	Curve di crescita batterica	52
2.3	Colture di cellule fungine	53
	Semina su terreno solido	53
	Sospensioni cellulari	53
	Curve di crescita fungina	53
2.4	Ceppi batterici e fungini utilizzati	53
3.	Saggi biologici	
3.1	Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)	55
3.2	Cinetica di uccisione ('Time Killing')	55
3.3	Selezione di mutanti resistenti	56
3.4	Microscopia elettronica a scansione (SEM)	56
3.5	Studio degli effetti del sangue intero, del plasma e del siero sull'attività dei peptidi antimicrobici	58
3.6	Studio della tossicità <i>in vivo</i> dei peptidi antimicrobici	59
3.7	Studio dell'efficacia terapeutica dei peptidi in modelli animali di infezione	59
3.8	Dosaggio dell'ATP intra- ed extracellulare	60
3.9	Saggio di permeabilizzazione della membrana interna di <i>E. coli</i> ML-35	62
3.10	Studio dell'effetto della preincubazione dei peptidi con esopolisaccaridi	64
3.11	Dicroismo circolare	64

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Peptidi antimicrobici

1.1	Peptidi utilizzati	66
-----	--------------------	----

1.2 Sintesi chimica di LL-37 e del suo frammento 7-37	66
1.3 Purificazione e caratterizzazione di LL-37 e del suo frammento	70
2. Attività antibatterica	
2.1 Valutazione dell'attività antibatterica dei peptidi mediante saggi di Minima Concentrazione Inibente (MIC)	75
2.2 Cinetica di uccisione di SMAP-29	81
2.3 Selezione di mutanti resistenti	83
2.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	85
2.5 Effetto del siero e del sangue intero sull'attività antibatterica dei peptidi	87
2.6 Tossicità <i>in vivo</i> dei peptidi	89
2.7 Attività dei peptidi in modelli animali di infezione	89
3. Attività antifungina	
3.1 Valutazione dell'attività antifungina dei peptidi mediante saggi di Minima Concentrazione Inibente (MIC)	96
3.2 Cinetica di uccisione di <i>C. albicans</i> e <i>C. neoformans</i> da parte di BMAP-27, BMAP-28, SMAP-29 e PG-1	100
3.3 Effetti del sangue umano intero, del plasma e del siero delipidato sull'attività antifungina dei peptidi antimicrobici	104
3.4 Dosaggio dell'ATP intra- ed extracellulare	106
3.5 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	109
4. Effetto di esopolisaccaridi batterici	
4.1 Valutazione dell'effetto di esopolisaccaridi sull'attività antimicrobica di peptidi tramite saggi di Minima Concentrazione Inibente (MIC)	112
4.2 Influenza di esopolisaccaridi sulla cinetica di permeabilizzazione di <i>E. coli</i> ML-35	117
4.3 Cinetica di uccisione di SMAP-29, PG-1 e LL-37 in presenza di esopolisaccaridi	118
4.4 Effetto della preincubazione degli esopolisaccaridi da <i>Burkholderia cepacia</i> con i peptidi	124
4.5 Dicroismo circolare	124
5. Studio di mutanti resistenti	
5.1 Selezione di mutanti resistenti ai peptidi ricchi in Pro	129
5.2 Cinetica di uccisione di Bac7(1-35) sul ceppo resistente	130
5.3 Determinazione della MIC di altri peptidi sul ceppo resistente	131
5.4 Caratterizzazione del ceppo resistente	131
5.5 Microscopia elettronica a scansione del ceppo resistente	138

CONCLUSIONI

Conclusioni	140
1.1 Attività antibatterica	140
1.2 Attività antifungina	143
1.3 Effetto di esopolisaccaridi batterici	145
1.4 Studio di mutanti resistenti	147

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia	149
---------------------	-----

INTRODUZIONE

- Cap. 1 Peptidi antimicrobici
- Cap. 2 Necessità di nuovi agenti antimicrobici
- Cap. 3 Fibrosi cistica
- Cap. 4 Scopo della tesi

1.1 Peptidi antimicrobici e sistema immunitario

Nel corso dell'evoluzione, gli organismi viventi hanno sviluppato un complesso di meccanismi di difesa divenuti via via più specializzati, che consentono una risposta rapida ed efficace contro gli agenti patogeni. Tali meccanismi, noti come risposta immunitaria, impediscono l'ingresso e l'eventuale proliferazione di microrganismi esogeni. All'*immunità naturale* o *innata* che, negli invertebrati, rappresenta l'unico sistema di difesa, si affianca, negli organismi superiori, l'*immunità acquisita* o *specificata*.

L'*immunità innata* è costituita dall'insieme delle barriere protettive preesistenti all'esposizione agli agenti patogeni (epiteli), da cellule fagocitiche (macrofagi e neutrofili) e citotossiche (natural killer), da proteine ematiche quali i componenti del sistema del complemento, da vari mediatori dell'infiammazione (ad es. citochine ed eicosanoidi) e dai peptidi antimicrobici prodotti dai fagociti o dalle cellule epiteliali nei siti di maggior esposizione ai microrganismi; tali effettori sono in grado di riconoscere, anche se con un minor livello di specificità rispetto a quelli dell'immunità acquisita, "patterns" molecolari tipici degli agenti invasivi (lipopolisaccaride, fosfolipidi di membrana, polisaccaridi, etc.), assenti o poco rappresentati nelle cellule dell'ospite, permettendo in tal modo di discriminare tra "self" e "non self".

L'*immunità acquisita* è costituita dai meccanismi di difesa indotti o stimolati dall'esposizione a sostanze estranee (antigeni), è caratterizzata dalla capacità di agire in maniera altamente specifica contro microrganismi diversi ed è dotata di "memoria", ossia è in grado di rispondere più intensamente e rapidamente a successive esposizioni allo stesso agente. Tuttavia, il tempo necessario per l'attivazione dei tipi cellulari (linfociti T e B) e per la sintesi dei fattori umorali (anticorpi, linfocine) coinvolti è piuttosto lungo e tale da consentire lo sviluppo dell'infezione, almeno nel caso in cui l'organismo entri in contatto con un determinato antigene per la prima volta; l'immunità innata invece, pur essendo meno specifica, possiede effettori sia cellulari che umorali che possono essere mobilizzati molto rapidamente e che, pertanto, costituiscono la prima risposta all'agente invasivo.

Tra gli effettori dell'immunità innata, un ruolo importante è giocato dai peptidi antimicrobici.

Questi sono molecole relativamente piccole (10÷100 amminoacidi) codificate da un singolo gene, già preformate o rapidamente inducibili [Nissen-Meyer e Nes, 1997; Lehrer e Ganz, 1999; Gennaro e Zanetti, 2000; Lehrer e Ganz, 2002a] e dotate di un ampio spettro d'azione; sono diffusi in tutta la scala evolutiva, dai *phyla* più antichi, dove agiscono come effettori umorali, fino ai mammiferi, nei quali risiedono nei granuli citoplasmatici dei fagociti professionali o sono elaborati a livello degli epitelii cutanei o delle mucose del tratto respiratorio ed intestinale, dove controllano la flora batterica naturale ed assicurano una risposta rapida alle infezioni causate da agenti esogeni [Boman, 1995]. Sebbene la loro specificità non sia elevata, l'interazione con il "self" viene limitata grazie alla localizzazione in specifici compartimenti cellulari e alla capacità di riconoscere molecole bersaglio assenti o poco rappresentate sulle superfici cellulari dell'organismo ospite.

Per le loro caratteristiche e la rapidità d'azione, i peptidi antimicrobici rappresentano un'arma di difesa efficace ed economica per bloccare la proliferazione microbica in attesa di un intervento specifico da parte dell'immunità acquisita [Nicolas e Mor, 1995].

1.2 Distribuzione e classificazione dei peptidi antimicrobici

I primi peptidi antimicrobici sono stati individuati negli anni '40 nei procarioti; da allora ne sono stati identificati e caratterizzati molti altri, prodotti non solo da procarioti, ma anche da piante [Cammue et al., 1994] e da una grande varietà di animali, sia vertebrati che invertebrati [Andreu e Rivas, 1998].

Negli *insetti*, le infezioni microbiche inducono il rilascio di peptidi antibatterici nell'emolinfa o la loro produzione a livello della cuticola esterna e degli epitelii dell'apparato genitale [Boman, 1995].

Gli *anfibi* possiedono delle ghiandole granulari, localizzate nel derma e nella mucosa gastrica, che producono ed immagazzinano peptidi antimicrobici per riversarli poi sulla superficie corporea o nell'apparato digerente [Zasloff, 1987; Zasloff, 1992; Barra e Simmaco, 1995; Simmaco et al., 1998].

Nei *mammiferi*, i peptidi antimicrobici vengono espressi nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio, gastrointestinale e genitourinario o immagazzinati in granuli secretori nei fagociti professionali [Boman, 1995; Lehrer e Ganz, 1999; Gennaro e Zanetti, 2000].

Dagli studi citati e da numerosissimi altri, è quindi evidente che queste molecole sono state trovate in tutti gli organismi nei quali sono state cercate e sono presenti nei siti maggiormente esposti all'invasione microbica (pelle e mucose) o in cellule deputate alla protezione da essa (fagociti).

Sulla base della presenza o assenza di legami disolfuro nella loro struttura, i peptidi possono essere suddivisi in due grandi classi, ciascuna delle quali comprende diversi gruppi e/o famiglie riconosciuti in base a similarità di sequenza e struttura tridimensionale (Fig. 1) [Zanetti et al., 1995; Boman, 1995].

I *peptidi lineari* privi di ponti disolfuro includono le molecole ad α -elica e quelle caratterizzate da un elevato contenuto di uno o due particolari residui amminoacidici; i *peptidi ciclici* si ripartiscono invece in quattro gruppi distinti a seconda del numero di ponti disolfuro di cui sono provvisti.

Malgrado la significativa diversità di sequenza e struttura tra le differenti famiglie di peptidi, ci sono due aspetti che li accomunano:

- ◆ la presenza di un gran numero di residui basici, che conferisce loro una carica netta positiva a pH neutro;
- ◆ la tendenza ad adottare una conformazione anfipatica.

Queste caratteristiche sembrano essere correlate con la modalità d'azione dei peptidi che prevede, nella maggior parte dei casi, il legame e la permeabilizzazione delle membrane delle cellule bersaglio [Zanetti et al., 1995; Oren e Shai, 1998; Tossi et al., 2000].

Tra gli organismi sensibili all'azione dei peptidi vi sono batteri, funghi, protozoi e, in alcuni casi, cellule tumorali o infettate da virus; inoltre, sebbene i meccanismi di uccisione della cellula bersaglio non siano ancora del tutto chiari, si considera ormai certo che il processo abbia inizio con un'interazione elettrostatica tra i peptidi carichi positivamente e le molecole cariche negativamente presenti sulla superficie della cellula stessa (ad es. lipopolisaccaride e fosfatidilglicerolo, tipici costituenti delle membrane batteriche) [Boman, 1995; Zanetti et al., 1995; Hancock e Lehrer, 1998] (Fig. 2).

L'azione selettiva dei peptidi antimicrobici contro batteri e cellule eucariotiche fungine o trasformate è imputabile alla diversa composizione lipidica della loro membrana rispetto a quella delle cellule eucariotiche normali [Nikaido e Vaara, 1985]. Le

membrane cellulari dei mammiferi contengono inoltre il colesterolo, che sembra conferire loro una stabilità tale da prevenire in molti casi la permeabilizzazione ad opera dei peptidi [Maloy e Kari, 1995].

I peptidi antimicrobici vengono in genere sintetizzati a partire da un singolo gene sotto forma di prepeptidi (60÷200 residui) da cui derivano i peptidi maturi in seguito a rimozione sequenziale del peptide segnale e di una proregione di lunghezza variabile. Solitamente, la prosequenza precede il peptide maturo ed è anionica e, in alcuni casi, sembra avere un ruolo nell'indirizzamento e/o nel ripiegamento del peptide stesso [Ganz e Lehrer, 1998].

La proregione è spesso altamente conservata all'interno delle famiglie di peptidi, indice del fatto che membri di ciascuna famiglia possono essere derivati da un unico gene ancestrale per duplicazione e successive modificazioni. Il carattere anionico delle proregioni N-terminali ha inoltre suggerito l'ipotesi di un'interazione elettrostatica con la sequenza cationica C-terminale corrispondente al peptide maturo, al fine di neutralizzarne la tossicità prima che esso sia liberato per taglio proteolitico [Zanetti et al., 1995]. Queste funzioni ne spiegherebbero l'elevato grado di conservazione mantenuto all'interno delle singole famiglie di peptidi.

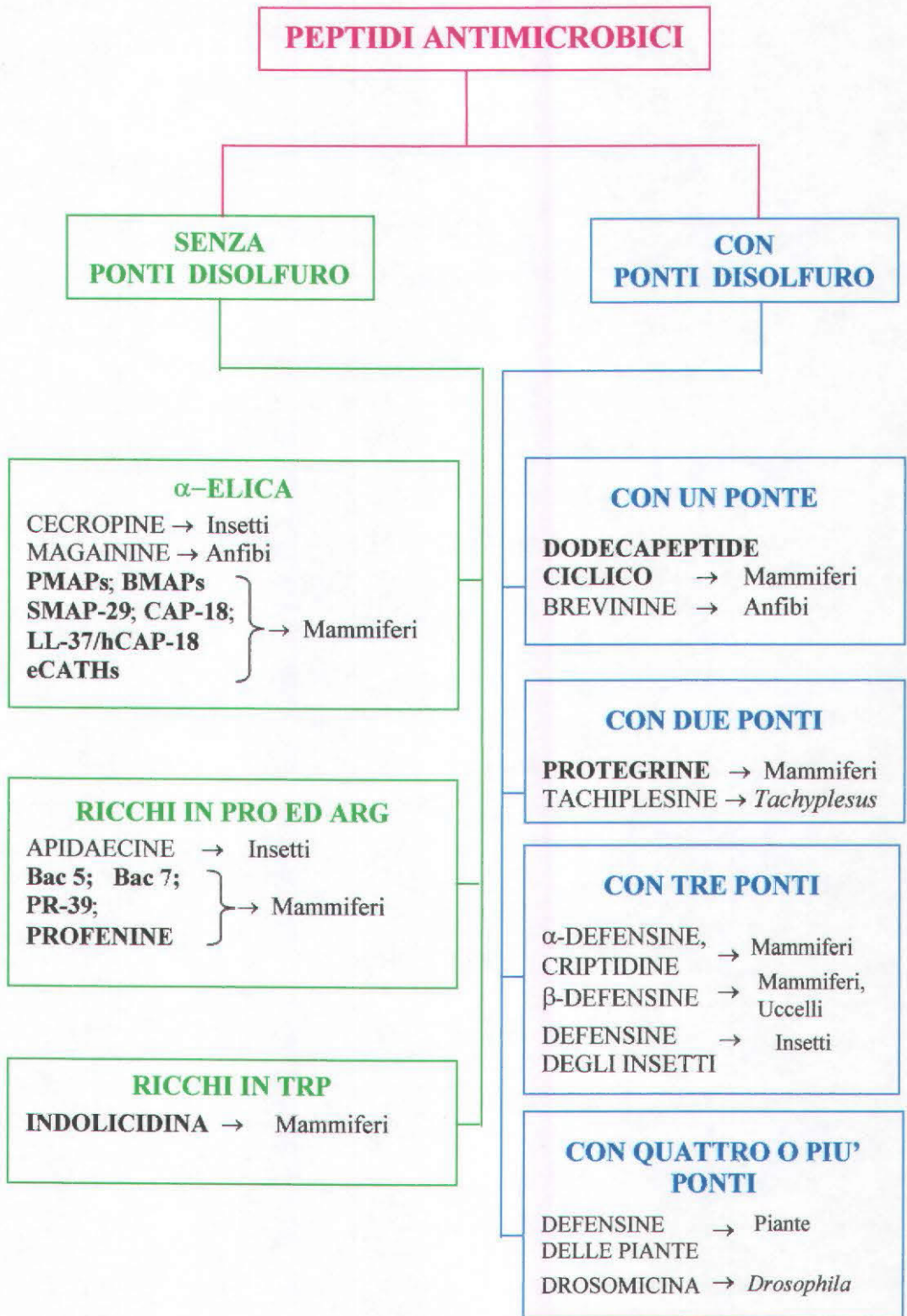


Fig. 1 – Classificazione dei peptidi antimicrobici in base alle caratteristiche strutturali. In grassetto sono evidenziati i peptidi derivati dalle catelicidine.

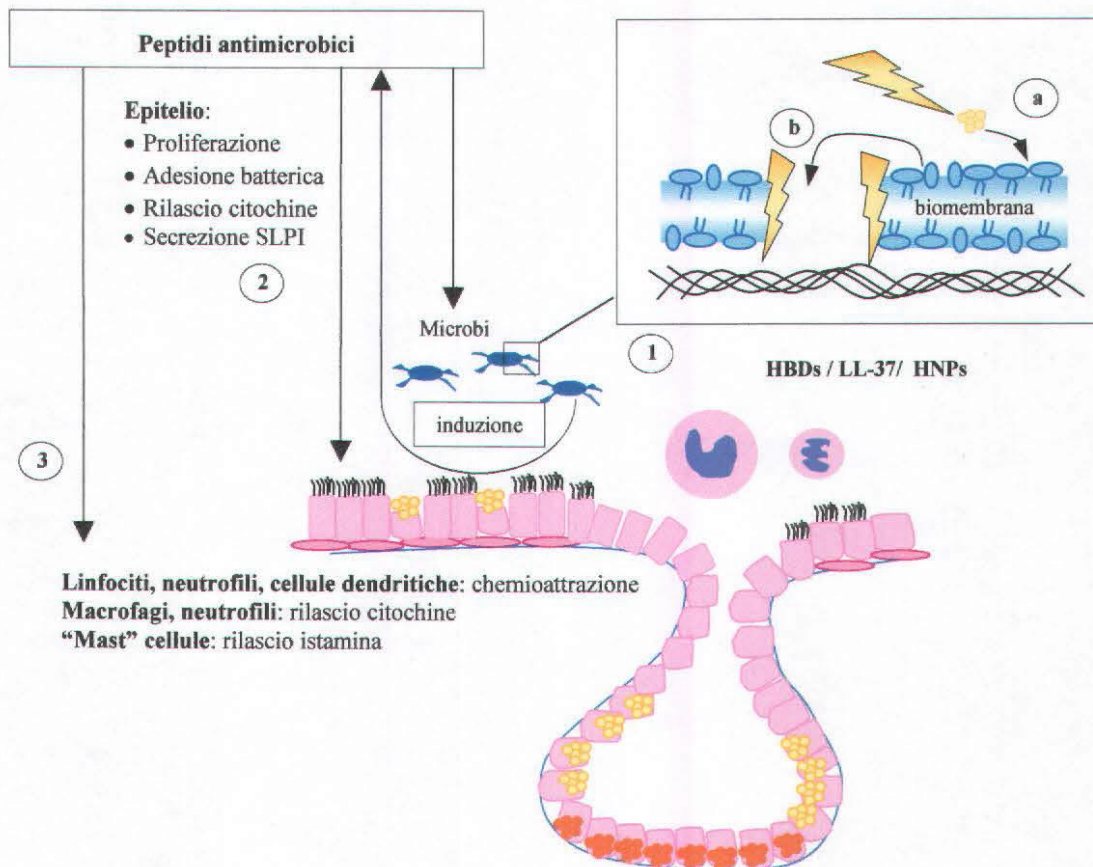


Fig. 2 – Attività di peptidi antimicrobici. In aggiunta alla loro funzione antimicrobica (1), i peptidi hanno altri ruoli nell'infezione e nel processo infiammatorio (2,3). Attraverso interazioni elettrostatiche tra la membrana carica negativamente e i peptidi carichi positivamente (a) questi si associano alla membrana stessa, sia formando pori (b), sia formando strutture planari di superficie ("carpet-like") che destabilizzano la membrana. Nelle vie aeree i peptidi sono sintetizzati da cellule epiteliali e cellule che intervengono nel processo infiammatorio. I peptidi LL-37 e defensine agiscono su queste cellule con un meccanismo a feedback (2,3), influenzando sia il rilascio di mediatori sia processi cellulari quali la proliferazione e la chemiotassi.

HBDs: human β -defensins

HNPs: human neutrophil peptides

1.3 Peptidi antimicrobici derivati dalle catelicidine

Le catelicidine sono precursori di peptidi antimicrobici identificati all'inizio degli anni '90 in cellule mieloidi di mammifero [Zanetti et al., 1993; Zanetti et al., 1995]. I membri appartenenti a questo gruppo sono caratterizzati dalla presenza di una preproregione N-terminale altamente conservata seguita da un dominio C-terminale variabile (12÷100 residui) corrispondente al peptide antimicrobico maturo. La regione N-terminale è costituita da una sequenza segnale (29÷30 residui) e da una proregione (99÷114 residui) all'interno della quale sono presenti quattro cisteine ossidate a formare due ponti disolfuro (Fig. 3).

La proregione all'N-terminale è stata inizialmente sequenziata nel caso di congeneri bovini, e l'analisi in banca dati ha evidenziato un grado di similarità del 70% con una proteina di circa 11 KDa chiamata catelina. Questa proteina era stata isolata da leucociti suini [Ritonja et al., 1989] e, in base ad omologia di sequenza e di struttura, era stata assegnata alla superfamiglia delle cistatine, inibitori delle cisteina-proteinasi. Tale ipotesi è stata successivamente supportata dall'osservazione che catelicidine bovine sono in grado di inibire *in vitro* l'attività della cisteina-proteinasi catepsina L [Verbanac et al., 1993].

Il termine catelicidine è stato quindi scelto per denominare un gruppo di precursori di peptidi antimicrobici con una proregione comune catelina-simile all'N-terminale e con un dominio antimicrobico al C-terminale [Zanetti et al., 1995].

Le catelicidine attualmente note sono oltre una trentina, isolate in diversi mammiferi: bovino [Romeo et al., 1988; Gennaro et al., 1989; Frank et al., 1990; Selsted et al., 1992; Skerlavaj et al., 1996; Gennaro et al. 1998], maiale [Agerberth et al., 1991; Kokryakov et al., 1993; Storici et al., 1994; Tossi et al., 1995], coniglio [Larrick et al., 1991; Tossi et al., 1994], pecora [Bagella et al., 1995, Huttner e Bevins, 1999], uomo [Agerberth et al., 1995], porcellino d'India [Nagaoka et al., 1997], topo [Gallo et al., 1997] e cavallo [Scocchi et al., 1999; Skerlavaj et al., 2001]; nell'uomo è presente un'unica catelicidina codificata da un gene che mappa sul cromosoma 3 [Per rassegne si veda Zanetti et al., 1995; Gennaro e Zanetti, 2000, Lehrer e Ganz, 2002a; Zanetti et al., 2002; Gennaro et al., 2002]. I peptidi che originano da catelicidine hanno sequenze e strutture diverse e non sono ascrivibili ad un'unica famiglia: alcuni assumono infatti una conformazione ad

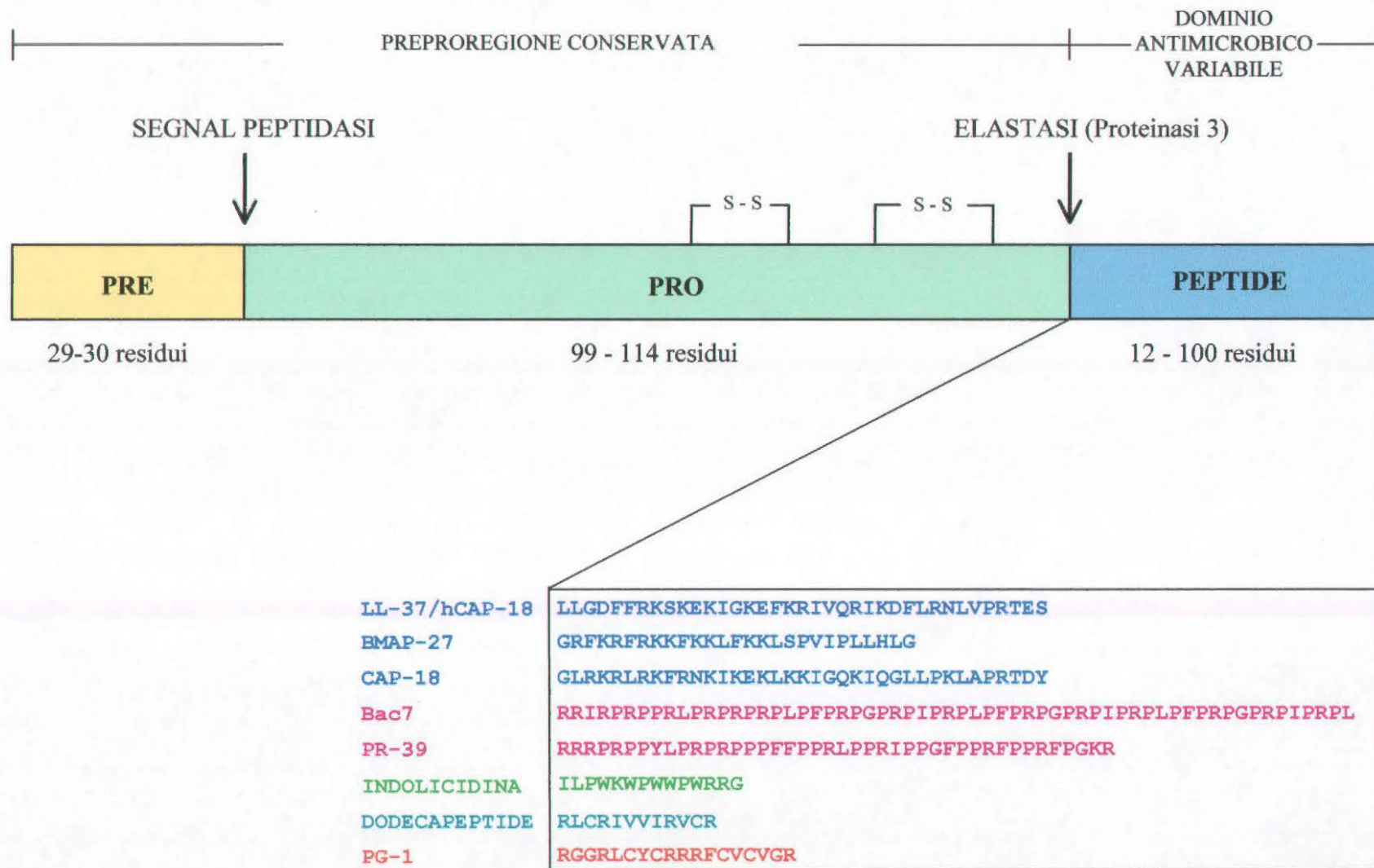


Fig. 3 – Rappresentazione schematica della struttura delle catelicidine. Nel riquadro sono riportate le sequenze di alcuni dei peptidi antimicrobici derivati da catelicidine.

α -elica, altri sono ricchi in prolina e arginina oppure triptofano, altri ancora contengono ponti disolfuro.

Peptidi ad α -elica

I peptidi che possono assumere una conformazione ad α -elica sono i più comuni tra quelli derivati dalle catelicidine. I membri di questo gruppo hanno lunghezza variabile tra 23 e 40 residui amminoacidici, sono altamente cationici per l'elevato contenuto in arginina e lisina, ed assumono una conformazione ad α -elica di tipo anfipatico in presenza di micelle o di un solvente elicogenico come il trifluoroetano; un'eccezione è rappresentata dai peptidi PMAP-37 e LL-37/hCAP18 che assumono la conformazione ad α -elica anche in soluzione acquosa, rispettivamente a pH neutro o in presenza di anioni come bicarbonato e solfato [Tossi et al., 1994; Agerberth et al., 1995; Zanetti et al., 1995; Gennaro e Zanetti., 2000].

I peptidi ad α -elica possono essere a loro volta suddivisi in due sottogruppi a seconda della presenza o assenza di una coda idrofobica C-terminale che può essere amidata e sembra essere coinvolta nella tossicità verso le cellule di mammifero. La sostituzione con residui idrofilici di alcuni residui idrofobici contenuti in questa regione comporta infatti un'evidente riduzione dell'attività emolitica e citotossica riscontrata in tali peptidi [Skerlavaj et al., 1996]. Tra essi si possono citare BMAP-27 e BMAP-28 (Bovine Myeloid Antibacterial Peptide di 27 e 28 residui, rispettivamente), SMAP-29 (Sheep Myeloid Antibacterial Peptide di 29 residui) e PMAP-36 (Porcine Myeloid Antibacterial Peptide di 36 residui); la presenza di una singola cisteina nella coda idrofobica di PMAP-36 porta all'omodimerizzazione in seguito alla formazione di un ponte disolfuro intermolecolare. LL-37/hCAP18 presenta invece una regione idrofobica all'estremità N-terminale, anch'essa coinvolta nella tossicità verso cellule eucariotiche; frammenti sintetici di BMAP-27, BMAP-28 e LL-37/hCAP18, privi della regione idrofobica, hanno dimostrato un aumento della selettività, con notevole riduzione della citotossicità e un'attività antibatterica invariata o solo di poco diminuita [Gennaro e Zanetti, 2000]. In altri peptidi, quali BMAP-34, PMAP-37 e CAP-18 non è presente alcuna regione idrofobica né all'estremità C-terminale né a quella N-terminale [Larrick et al., 1991; Hirata et al., 1994; Tossi et al., 1995; Gennaro et al., 1998].

L'azione di questi peptidi si esplica attraverso la permeabilizzazione delle membrane delle cellule bersaglio; il loro spettro d'azione è in genere ampio, specialmente per quelli che presentano una coda idrofobica, e comprende sia batteri che funghi. I bersagli includono anche linee cellulari normali o tumorali e globuli rossi, verso cui i peptidi esercitano la loro azione a concentrazioni in genere superiori a quelle attive contro i microrganismi; inoltre, le cellule proliferanti e tumorali sono più suscettibili agli effetti tossici dei peptidi rispetto alle cellule normali [Risso et al., 1998; Gennaro e Zanetti, 2000].

LL-37/hCAP-18 è l'unica catelicidina umana ed è stata inizialmente clonata a partire da cDNA preparato da precursori mieloidi isolati da midollo osseo [Agerberth et al., 1995]. Essa viene espressa in cellule mieloidi e tessuti infiammati e, nelle vie aeree, viene prodotta dalle cellule dell'epitelio respiratorio e da ghiandole sierose e secreta nell'ASL ("airway surface liquid"). Essa è inoltre presente, sotto forma di prepropeptide, nei granuli dei neutrofili e va incontro a taglio proteolitico durante la secrezione, probabilmente ad opera della proteinasi 3 [Sorensen et al., 2001]. Il precursore non processato prende il nome di hCAP-18, mentre LL-37 è l'estremità C-terminale biologicamente attiva [Bals, 2000; Bals et al., 1999b; Lysenko et al., 2000; Turner et al., 1998].

Peptidi ricchi in prolina ed arginina

A questo gruppo appartengono le bactenecine Bac5 e Bac7 di derivazione bovina [Gennaro et al., 1989; Frank et al., 1990; Gennaro et al., 2002] e PR-39 e profenine isolate dal maiale [Agerberth et al., 1991; Pungercar et al., 1993]. Nonostante una composizione amminoacidica simile, questi peptidi differiscono per lunghezza e sequenza: Bac5 è lungo 43 residui e presenta la ripetizione di Arg-Pro-Pro intervallata da un residuo apolare; Bac7 è costituito da 60 amminoacidi e mostra tre ripetizioni in tandem caratterizzate dalla presenza di una prolina invariante ogni seconda posizione e da numerose triplette Pro-Arg-Pro intervallate da un residuo idrofobico; PR-39, infine, possiede una sequenza N-terminale simile a quella di Bac7 e numerosi tratti in comune con Bac5 quali le ripetizioni Arg-Pro-Pro (e Pro-Pro-Arg) e l'amidazione all'estremità C-terminale [Agerberth et al., 1991; Gennaro e Zanetti 2000].

L'azione antimicrobica di questi peptidi sembra non implicare un meccanismo di permeabilizzazione della membrana della cellula bersaglio [Boman et al., 1993]. Inoltre,

studi condotti con vari frammenti sintetici di Bac5 e di Bac7, hanno dimostrato che l'estremità N-terminale altamente cationica è fondamentale per l'attività antibatterica dei peptidi stessi, che è richiesta una lunghezza minima per la loro attività biologica, rispettivamente pari a 20 e 16 residui, e che l'estremità C-terminale è priva di attività [Skerlavaj et al., 1999; Gennaro e Zanetti, 2000]. PR-39 svolge inoltre un ruolo importante nella trasduzione di segnali in alcuni processi cellulari quali il processo infiammatorio e l'angiogenesi [Li et al., 2000; Gennaro e Zanetti, 2000].

Peptidi ricchi in triptofano

L'unico peptide appartenente a questo gruppo è l'indolicidina, isolato da granuli citoplasmatici di neutrofilo bovino; il suo precursore è composto da una preproregione di 130 residui amminoacidici seguita da 14 residui costituenti il dominio antimicrobico C-terminale [Del Sal et al., 1992]. Di questi, cinque sono di triptofano e l'ultimo, una glicina, viene perso durante la maturazione post-traduzionale del peptide per dar luogo all'amidazione dell'estremità stessa [Selsted et al., 1992].

L'indolicidina è in grado di permeabilizzare le membrane di batteri e funghi, ha attività emolitica ed è citotossica nei confronti di cellule nucleate di mammifero (linfociti e cellule della glia). La cationicità e l'anfipaticità sono le caratteristiche che rendono il peptide maggiormente selettivo verso le membrane batteriche: studi svolti su analoghi sintetici resi più cationici ed anfipatici hanno infatti evidenziato un conseguente aumento dell'attività antimicrobica ed una diminuzione degli effetti emolitici [Falla e Hancock, 1997].

Peptidi con un ponte disolfuro

Il dodecapeptide ciclico, appartenente a questo gruppo, è stato isolato dai neutrofilo bovino; è composto da dodici amminoacidi, quattro dei quali sono arginine, ed è caratterizzato da una struttura ad anello dovuta alla formazione di un ponte disolfuro tra le cisteine situate in posizione 3 e 11 [Romeo et al., 1988] o, più probabilmente, da due ponti disolfuro intermolecolari che legano tra loro due monomeri, arrangiati in modo parallelo o antiparallelo [Storici et al., 1996]. Esso è attivo sia contro ceppi batterici Gram-positivi che Gram-negativi e mostra una particolare tossicità selettiva nei confronti delle cellule neuronali e gliali [Radermacher et al., 1993].

Peptidi con due ponti disolfuro

Questa classe comprende cinque peptidi molto simili tra loro, isolati da leucociti di maiale ed indicati col nome di protegrine: PG-1, PG-2, PG-3, PG-4 e PG-5 [Kokryakov et al., 1993]. Si tratta di peptidi piccoli (16-18 residui), caratterizzati dalla presenza di due ponti disolfuro che portano ad una conformazione a β -foglietto antiparallelo, e amidati all'estremità C-terminale. Questa struttura conferisce carattere anfipatico alla molecola che risulta organizzata in una regione centrale idrofobica affiancata da due regioni laterali idrofiliche [Gennaro e Zanetti, 2000]. Sebbene tale configurazione ricordi molto quella delle tachiplesine di *Tachyplexus* e di *Limulus*, non è stata osservata alcuna omologia di sequenza nelle preproregioni delle due famiglie di peptidi [Storici e Zanetti, 1993; Aumelas et al., 1996].

Lo spettro d'azione delle protegrine, in particolare PG-1, è molto ampio: sono infatti attive contro ceppi batterici Gram-negativi e Gram-positivi, funghi e virus con mantello. L'azione antimicrobica sembra implicare un meccanismo di permeabilizzazione di membrana: studi compiuti su PG-1 hanno infatti dimostrato che questo peptide è in grado di formare canali anionici in ovociti di *Xenopus laevis* e in doppi strati fosfolipidici planari [Sokolov et al., 1999]. Risultati incoraggianti sono stati inoltre ottenuti da studi *in vivo* in modelli animali di infezione peritoneale [Steinberg et al., 1997].

1.4 Defensine

Le defensine sono peptidi antimicrobici di mammifero isolati per la prima volta da macrofagi di coniglio agli inizi degli anni '80 [Ganz et al., 1990]. Sono peptidi cationici ricchi in arginina e non glicosilati, hanno una massa molecolare che varia tra 3.5 e 4.5 kDa e contengono nella loro sequenza sei residui invariati di cisteina che formano tre ponti disolfuro. In base alla disposizione dei residui di cisteina, dei ponti disolfuro e alla struttura molecolare vengono suddivise in tre classi: α -, β - e θ -defensine [Bals, 2000; Lehrer e Ganz, 2002b].

Le α -defensine sono formate da 29-35 residui, le sei cisteine formano tre ponti disolfuro con connettività 1-6, 2-4 e 3-5, e hanno una struttura secondaria a β -foglietto "triple-stranded" con una β -forcina che contiene residui amminoacidici cationici. Sei α -defensine sono state isolate nell'uomo: a) gli "human neutrophil peptides" 1, 2, 3 e 4

(HNP-1, -2, -3 e -4), localizzati nei granuli azurofilici dei granulociti neutrofili, contribuiscono all'uccisione ossigeno-indipendente dei microrganismi fagocitati; b) le "human defensins" 5 e 6 (HD-5 e 6) sono invece espresse nelle cellule di Paneth dell'intestino tenue e nell'epitelio del tratto urogenitale femminile [Lehrer e Ganz, 1999; Bals, 2000].

Le prime β -defensine sono state invece isolate, oltre 10 anni fa, da granulociti e cellule epiteliali tracheali di bovino [Diamond et al., 1991; Selsted et al., 1993]. Differiscono dalle α -defensine per il numero di residui da cui sono composte (più di 45), per la disposizione dei residui di cisteina e dei ponti disolfuro (connettività delle Cys 1-5, 2-4, 3-6), per una proreazione più corta e meno anionica, e per un contenuto maggiore di lisina piuttosto che arginina. La struttura molecolare pressochè identica e la localizzazione dei geni che codificano per α - e β -defensine sul cromosoma 8p22-8p23, suggeriscono invece la loro comune origine ancestrale [Lehrer e Ganz, 2002b]. La prima β -defensina umana, "human β -defensin-1" (hBD-1), è stata isolata da emofiltrato [Bensch et al., 1995] ed è espressa in maniera costitutiva nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio e urinario [Huttner et al., 1997]. La "human β -defensin-2" (hBD-2), purificata attraverso cromatografia di affinità da cellule epiteliali di pazienti affetti da psoriasi, viene invece prodotta da cellule epiteliali della pelle, del tratto gastrointestinale e respiratorio. Sia hBD-1 che hBD-2 si trovano nell'ASL in concentrazioni dell'ordine dei $\mu\text{g/ml}$ ed hanno un'attività antimicrobica sale-sensibile; viene ipotizzato che in pazienti affetti da fibrosi cistica entrambe siano inattivate dall'elevata concentrazione salina dovuta alla mutazione del canale CFTR (vedi paragrafo 3.1 dell'Introduzione). La "human β -defensin-3" (hBD-3), isolata come l'hBD-2 da cellule epiteliali di pazienti affetti da psoriasi, è invece meno sensibile ai sali ed esercita una buona azione antimicrobica contro *S. aureus* anche a concentrazioni saline fisiologiche [Harder et al., 2001]. Viene espressa nel tessuto muscolare cardiaco e scheletrico, nella cute e nell'epitelio del basso tratto respiratorio (tonsille e trachea), nella placenta e nel timo fetale [Harder et al., 2001]. La "human β -defensin-4" (hBD-4) viene invece prodotta principalmente da cellule del tratto gastrico e genitale maschile in maniera indipendente dalla concentrazione di citochine (IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α) ed è solo per il 20-25% identica a hBD-1, -2 e -3 [Boman, 1998; Bals, 2000; Lehrer e Ganz, 2002b].

Recentemente, una nuova classe di defensine, chiamate θ -defensine per la struttura molecolare circolare, è stata isolata da neutrofili di scimmia *Macacus rhesus*. Il peptide rhesus θ -defensin-1 è prodotto dal legame di due α -defensine troncate e dimostra attività antimicrobica sale-indipendente [Tang et al., 1999]. Al momento non sono disponibili dati che dimostrino la presenza di questi peptidi nelle vie aeree [Bals, 2000].

1.5 Potenzialità terapeutiche dei peptidi antimicrobici

Il meccanismo d'azione dei peptidi antimicrobici naturali e la loro attività ad ampio spettro hanno fatto sì che essi ed i loro analoghi sintetici siano divenuti degli eccellenti candidati per lo sviluppo di nuovi agenti anti-infettivi.

Queste molecole potrebbero avere diverse applicazioni:

- essere impiegate come conservanti nell'industria alimentare in luogo dei tradizionali composti chimici;
- contribuire alla realizzazione di piante transgeniche al fine di selezionare organismi vegetali maggiormente resistenti all'attacco di determinati agenti infettivi;
- essere utilizzate come agenti terapeutici a livello topico e/o sistemico per la cura delle infezioni da microrganismi patogeni.

Le industrie farmaceutiche, che negli ultimi anni avevano abbandonato la ricerca di valide alternative alle sostanze antibiotiche già in uso, si sono da poco nuovamente spinte in questa direzione a causa della sempre crescente diffusione di ceppi multiresistenti alle terapie di comune impiego. È proprio in questo contesto che si inserisce il notevole interesse dimostrato nei confronti dei peptidi antimicrobici. Queste molecole, per le loro caratteristiche, sembrano infatti poter rispondere perfettamente all'esigenza di individuare dei farmaci in grado di risolvere il problema pressante dell'antibiotico-resistenza. Di fondamentale importanza in questo senso è la diversa modalità d'azione di tali sostanze rispetto agli antibatterici ed agli antimicotici tradizionali.

In questi ultimi anni sono stati compiuti numerosi studi volti a trovare una correlazione tra la struttura dei peptidi e la loro attività antimicrobica e finalizzati a potenziare quest'ultima, limitando contemporaneamente gli effetti emolitici e citotossici.

Gli esperimenti realizzati hanno dato dei risultati incoraggianti che hanno portato anche alla sperimentazione clinica di alcuni dei composti studiati [Mosca et al., 2000; Toney, 2002]. Malgrado gli esiti positivi raggiunti è comunque necessario trovare la soluzione ad importanti questioni di ordine pratico prima dell'impiego di questi peptidi in ambito terapeutico. È infatti indispensabile che essi siano dotati di un'elevata stabilità chimica, di adeguate caratteristiche farmacocinetiche e di una limitata, se non nulla, tossicità verso l'organismo ospite. A queste proprietà sarebbe inoltre auspicabile che si affianchino dei sistemi di produzione su larga scala di facile realizzazione e dai costi contenuti. È per quest'ultimo motivo che si sta cercando di applicare, ove possibile, delle procedure alternative alla sintesi chimica, quali tecniche del DNA ricombinante e l'uso di piante o animali transgenici capaci di produrre grandi quantità di peptidi facilmente purificabili [Morassutti et al., 2002].

2.1 Il problema dell'antibiotico-resistenza

Dopo molti anni di quasi completo controllo delle malattie batteriche nei Paesi industrializzati, dovuto in parte ad alcune vaccinazioni e in larga misura alla scoperta e all'uso degli antibiotici, l'ultimo ventennio del secolo è stato caratterizzato da numerose patologie infettive emergenti e riemergenti. In questo scenario, la comparsa e/o la diffusione di resistenza agli antibiotici nella maggior parte dei microrganismi patogeni continua a giocare un ruolo fondamentale: il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è diventato caratteristico di un numero consistente e crescente non solo di patogeni ospedalieri, ma anche di patogeni diffusi in comunità, sia nei Paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo. L'acquisizione della resistenza avviene o per mutazioni spontanee nel patrimonio genetico o, più di frequente, per acquisizione orizzontale di materiale genetico da altri batteri, anche distanti filogeneticamente, tramite plasmidi, trasposoni o altri elementi genetici trasferibili. In questo modo, il ceppo batterico può acquisire un intero pacchetto di geni già prefabbricati, che servono a conferire la resistenza a uno o più antibiotici diversi; il ruolo degli antibiotici è quello di esercitare poi una pressione selettiva, eliminando i batteri sensibili e permettendo a quelli resistenti di emergere e diffondersi [Campana et al., 2002].

Da alcuni anni società scientifiche e organismi internazionali hanno lanciato l'allarme: nella Conferenza di Copenhagen che si è tenuta nel settembre 1998 e a cui hanno partecipato delegati di tutti i paesi dell'Unione Europea, si è ribadito che l'antibiotico-resistenza rappresenta una priorità di sanità pubblica e che è necessario che ciascun Paese sia promotore di iniziative volte a conoscere e controllare il fenomeno [Cassone, 2001].

L'uso indiscriminato di antibiotici a largo spettro in medicina umana e veterinaria e in zootecnia ha portato alla selezione ed emergenza di batteri Gram positivi resistenti ad un sempre maggior numero di molecole, riducendo l'armamentario terapeutico a disposizione nella lotta alle infezioni [Taylor, 1999].

Subito dopo l'introduzione nella clinica della meticillina, iniziarono a comparire ceppi di *Staphylococcus aureus* resistenti a questo farmaco (ceppi MRSA) in ogni parte del mondo [Lowy, 1998], anche se con differenti percentuali. Negli anni '80, negli Stati Uniti, la diffusione di MRSA ha portato ad un maggiore utilizzo, specie nel trattamento

delle sepsi nosocomiali, della vancomicina utilizzata anche per il trattamento delle infezioni da *Clostridium difficile*. MRSA con ridotta sensibilità alla vancomicina sono stati descritti per la prima volta in Giappone nel 1997 [Hiramatsu et al., 1997] ed in seguito in USA e in Francia [CDC, 1997]. Recentemente, in Italia sono stati identificati due ceppi di *S. aureus* eterogeneamente resistenti alla vancomicina [Marchese et al., 2000].

Gli enterococchi, batteri gram-positivi che fanno parte della normale flora del tratto gastrointestinale, possono diventare una vera e propria minaccia per certi pazienti ospedalizzati. Per trent'anni, la vancomicina ha rappresentato l'ultima risorsa per il trattamento delle batteriemie da enterococco; tuttavia, il suo impiego su larga scala ha aumentato la prevalenza di ceppi di enterococchi resistenti. Gli enterococchi rappresentano oggi la seconda causa più comune delle infezioni ematiche contratte nei reparti di terapia intensiva negli ospedali statunitensi. Nel 1999, oltre il 25% delle infezioni da enterococco nei reparti di terapia intensiva sono state causate da ceppi vancomicina-resistenti (VRE), un dato in crescita del 47% rispetto al 1994.

In Europa, la prevalenza di infezioni da VRE è storicamente sempre stata inferiore rispetto agli Stati Uniti; tuttavia negli ultimi dieci anni ceppi VRE sono stati isolati sempre più frequentemente in vari paesi europei [ECCMID, 2002].

Il fenomeno della vancomicina resistenza potrebbe avere quindi gravi ricadute nella sanità pubblica, non soltanto perché spesso associato a fenomeni di multiresistenza, ma anche perché è sperimentalmente dimostrato che i geni della resistenza alla vancomicina possono essere trasferiti ad altre specie microbiche, in particolare *S. aureus*, con conseguenze che potrebbero essere disastrose [Noble et al., 1992; Edmond et al., 1996; Boccia et al., 2002].

L'industria negli ultimi anni non ha investito molto nella ricerca sugli antibiotici; la maggior parte dei composti messi in commercio di recente non rappresentano vere innovazioni, ma solo modifiche di molecole già disponibili [Taylor, 1999].

Per far fronte ai problemi posti dalla diffusione di ceppi resistenti agli antibiotici servono quindi nuovi farmaci e nuove strategie terapeutiche; molti ceppi batterici resistenti agli antibiotici convenzionali sono suscettibili ad alcuni peptidi antimicrobici, che si propongono quindi come ottimi candidati per lo sviluppo di nuovi "lead compounds".

2.2 Le infezioni fungine

I funghi sono organismi eucarioti la cui organizzazione nucleare e citoplasmatica non differisce da quella propria delle altre cellule eucariote. Alcune caratteristiche strutturali e biochimiche sono tuttavia loro peculiari. La membrana fosfolipidica contiene ergosterolo e al suo esterno è presente una parete cellulare rigida, alla cui composizione partecipano essenzialmente polimeri polisaccaridici insolubili, come chitina (polimero della N-acetil-glucosammina) e β -glucani (polimeri del glucosio), insieme a polisaccaridi solubili e glicoproteine che costituiscono i determinanti antigenici di superficie. La parete, essendo una struttura rigida, conferisce stabilità morfologica alla cellula fungina, oltre a mediarne l'interazione con l'ambiente esterno, con le altre cellule e con l'ospite infettato. Attorno a questa, parecchi funghi lievitiiformi possono formare una capsula mucoide di natura polisaccaridica, più o meno spessa; tale capsula è solitamente molto evidente in *Cryptococcus neoformans*.

Molti miceti crescono formando colonie filamentose, per lo più pigmentate; al contrario, altre specie fungine si sviluppano in colonie lisce e glabre: i primi sono i miceti filamentosi (es. *Aspergillus*), le seconde sono i lieviti (es. *Cryptococcus*, *Candida*). Alcuni miceti sono in grado di crescere nell'una o nell'altra forma (dimorfismo), in funzione di fattori ambientali.

Negli ultimi vent'anni le infezioni fungine hanno avuto un incremento esponenziale, paradossalmente anche come conseguenza del progresso in campo medico. Esse si sviluppano più frequentemente in persone il cui sistema immunitario è compromesso (pazienti trapiantati o in chemioterapia, malati di AIDS), che sono state trattate con agenti antimicrobici ad ampio spettro, o soggette a procedure invasive.

Le infezioni fungine sono attualmente un'importante causa di patologia e mortalità nei pazienti ospedalizzati. Ad esempio, negli anni '80, la frequenza delle candidemie nosocomiali è aumentata del 500% e la stessa tendenza è stata mantenuta anche negli anni '90 [Maertens e Boogaerts, 2000], al punto da essere al quarto posto tra le infezioni diagnosticate nelle emocolture. La *Candida* è anche il fungo patogeno più comune nei malati di AIDS.

L'aspergillosi invasiva polmonare è una delle principali cause di mortalità nei pazienti che hanno subito il trapianto del midollo osseo, mentre la polmonite da *Pneumocystis carinii* è causa di morte in molti pazienti affetti da AIDS nel Nord America e in Europa

[Georgopapadakou e Walsh, 1994]. Si prevede che questa tendenza all'aumento delle infezioni fungine continuerà anche nei prossimi anni, a meno di un miglioramento delle misure preventive e/o terapeutiche.

Le *micosi opportunistiche* sono causate da funghi in grado di svolgere azione patogena esclusivamente in ospiti debilitati, immunocompromessi o sottoposti a trattamenti che ne hanno alterato la normale flora microbica, che sono dunque estremamente suscettibili nei confronti di infezioni sostenute da microbi opportunisti endogeni ed esogeni.

Le specie fungine sono più di 100.000, ma solo 50-100 di esse sono patogene per l'uomo, e di queste solo una ventina causano infezioni potenzialmente letali.

Sebbene nel genere *Candida* siano incluse numerose specie distinte, *Candida albicans* è di gran lunga la specie di più comune riscontro nelle candidosi. In condizioni normali, lieviti del genere *Candida* si riscontrano in piccolo numero nella bocca, nel canale alimentare, nella vagina: lo scoppio di una candidosi si verifica solo quando c'è una notevole modificazione della flora microbica normale oppure un significativo disturbo della normale risposta immunitaria. Le terapie più moderne sono responsabili dell'aumento delle infezioni da *Candida* nel corso dell'ultimo ventennio. L'uso di antibiotici che sopprimono la flora normalmente presente è certamente responsabile dell'aumentato numero di infezioni.

Oltre a *C. albicans*, che è la specie isolata nella quasi totalità dei casi di candidosi, una sporadica patogenicità è ammessa per altre specie: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*.

Cryptococcus neoformans è presente nel suolo in ogni parte del mondo; serbatoio di questo microrganismo è l'intestino dei volatili, i quali sono protetti dall'infezione grazie alla loro alta temperatura corporea (40-42 °C), temperatura alla quale il lievito sopravvive senza però riprodursi. Nelle deiezioni essiccate dei volatili, il lievito si mantiene vitale per lunghi periodi di tempo. Poiché il microrganismo entra nel corpo umano per inalazione, l'infezione primaria si manifesta nel polmone. Una polmonite fulminante può sopravvenire in seguito ad invasione del torrente sanguigno, il che porta ad infezioni di molte aree corporee e diversi organi. Nell'uomo la localizzazione più frequente della malattia (criptococcosi) è a livello del sistema nervoso centrale, per il quale il micete dimostra uno spiccato tropismo; rare sono invece le localizzazioni

cutanee ed ossee. Localizzazioni polmonari e meningo-encefaliche sono frequenti in corso di AIDS.

I funghi appartenenti al genere *Aspergillus* sono saprofiti diffusi in ogni ambiente, tanto da risultare tra i più comuni contaminanti delle colture microbiche. La relativa rarità dell'infezione nell'uomo, derivante dall'inalazione di spore, è giustificata dal carattere tipicamente opportunistico della malattia. Infezioni aspergillari opportunistiche sono ad esempio possibili nei leucemici, nei trapiantati d'organo in trattamento antirigetto e nei malati di AIDS.

Rhodotorula rubra viene occasionalmente isolata da polmoni, rene e sistema nervoso centrale di pazienti debilitati. Infine, alcune specie di *Penicillium*, che si ritrovano spesso nel riso ammuffito, sono in grado di elaborare e produrre micotossine; negli animali da esperimento queste tossine producono un grave danno epatico che può andare dalla cirrosi al carcinoma epatico.

[Le notizie riportate sulle patologie fungine sono state tratte principalmente dai seguenti testi: Boyd, 1992; Davis et al., 1993; Poli, 1993; La Placa, 2001].

2.3 Farmaci antifungini tradizionali

Fino a qualche decennio fa, la minaccia delle infezioni fungine non sembrava essere tale da giustificare una ricerca assidua di nuovi antimicotici da parte delle industrie farmaceutiche. Durante gli ultimi vent'anni però, si è potuta osservare un'inversione di tendenza dovuta al notevole incremento delle micosi opportunistiche e non, legato soprattutto all'aumento del numero di soggetti immunocompromessi.

Tra i composti antifungini, i più utilizzati a scopo terapeutico sono i poliene-antibiotici, gli azolo-derivati e gli allilammino-tiocarbammati. Tutti inibiscono la sintesi dell'ergosterolo, lo sterolo presente in maggior quantità nella membrana plasmatica fungina, o semplicemente interagiscono con esso. Altri farmaci usati meno comunemente sono le morfoline, anch'esse implicate nell'inibizione della sintesi dell'ergosterolo, e le fluoropirimidine, che agiscono sulla sintesi degli acidi nucleici [Georgopapadakou e Walsh, 1994] (Fig. 4).

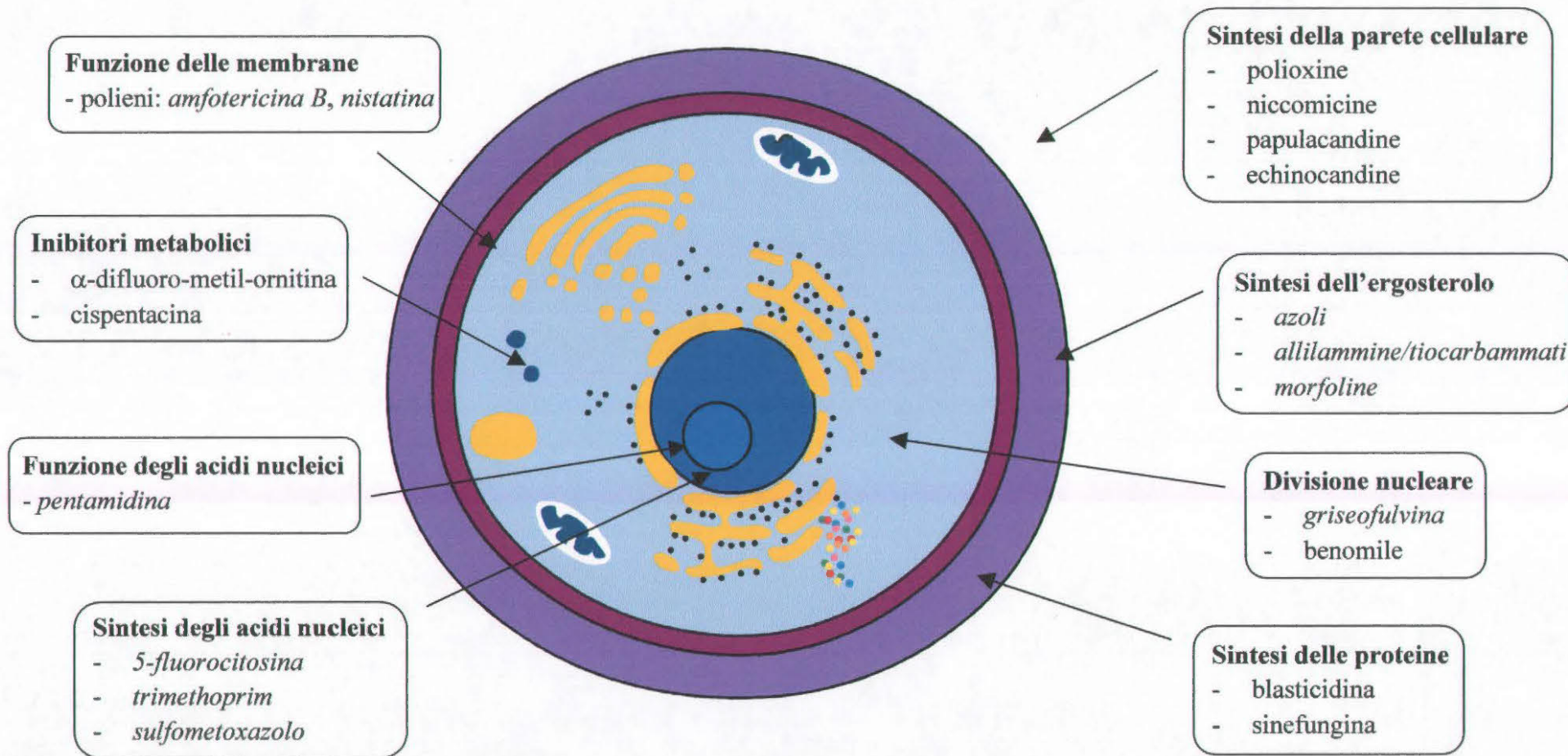


Fig. 4 – Bersagli di farmaci antifungini. I composti usati in clinica sono scritti in corsivo.

I polieni. I poliene-antibiotici, scoperti negli anni '50 e prodotti da specie di *Streptomyces*, hanno un'attività fungicida con uno spettro più ampio rispetto ad altri antifungini in uso. Essi formano un complesso con l'ergosterolo nella membrana plasmatica dei funghi, compromettendone così la funzione; inoltre, causano danni ossidativi che possono contribuire alla loro azione fungicida. Il più noto è l'amfotericina B (AMB), che ha un'affinità maggiore per l'ergosterolo rispetto al colesterolo presente nelle cellule di mammifero: per questo ha una certa selettività per le cellule fungine. In alcuni pazienti ha notevoli effetti collaterali, come la nefrotossicità, che si riduce però nel caso in cui il farmaco venga somministrato in liposomi, in complessi lipidici o in dispersioni colloidali. La nistatina si lega anch'essa all'ergosterolo, destabilizzando la membrana delle cellule fungine. A causa della sua tossicità, è limitata all'uso topico. Sono però in fase di studio nuove formulazioni di questo farmaco, simili alle versioni liposomiali della AMB. La resistenza a questa classe di molecole è associata ad alterazioni negli steroli o nei fosfolipidi di membrana o ad un aumento dell'attività di alcune catalasi, che porta ad una minore suscettibilità ai danni ossidativi [Georgopapadakou e Walsh, 1994; Georgopapadakou, 1998; Di Domenico, 1999].

Gli azoli. Gli azoli, composti totalmente sintetici scoperti negli anni '60, sono classificati come imidazoli o triazoli (la maggioranza), a seconda che presentino due o tre atomi di azoto nell'anello azolico penta-atomico. Essi inibiscono la lanosterolo-14- α -demetilasi citocromo-P450-dipendente, provocando un accumulo di lanosterolo ed altri steroli metilati ed una carenza di ergosterolo, con una conseguente alterazione della membrana cellulare che diventa meno efficiente e più vulnerabile. Sono inoltre diminuite le funzioni ormono-simili dell'ergosterolo, interferendo così con la crescita e la proliferazione cellulare. L'attività di questi composti ad ampio spettro è fungistatica piuttosto che fungicida. Gli effetti tossici sono limitati: possono in alcuni casi influenzare il sistema endocrino, inibendo gli enzimi citocromo-P450-dipendenti dell'ospite coinvolti nella sintesi degli ormoni steroidei. La resistenza a questa classe di farmaci è il risultato di cambiamenti negli steroli di membrana o di mutazioni negli enzimi bersaglio [Georgopapadakou e Walsh, 1994; Georgopapadakou, 1998; Di Domenico, 1999].

Allilammine e tiocarbammati. I composti appartenenti a questa classe, scoperta negli anni '70, sono anch'essi di origine sintetica. Agiscono come inibitori della squalene-

ossidasi, enzima responsabile della ciclizzazione dello squalene in lanosterolo, insieme con la ossisqualene-ciclastasi. L'accumulo di squalene e la carenza di ergosterolo comportano alterazioni della struttura e della funzione della membrana (es. difficoltà nell'apporto di nutrienti). La farmacocinetica di queste sostanze ne limita l'efficacia clinica alle infezioni da dermatofiti, nonostante presentino un ampio spettro d'azione antifungina *in vitro* [Georgopapadakou e Walsh, 1994; Georgopapadakou, 1998; Di Domenico, 1999].

Morfoline. Queste molecole interferiscono con la via biosintetica dell'ergosterolo a più livelli; sono generalmente usate nel trattamento topico di alcune infezioni cutanee [Georgopapadakou e Walsh, 1994; Georgopapadakou, 1998].

Fluoropirimidine. La 5-fluorocitosina (5-FC), sebbene sia un buon fungicida, ha uno spettro d'azione piuttosto limitato ed è usata soprattutto contro le meningiti da *Cryptococcus* e le candidosi diffuse, in combinazione con l'amfotericina B. Essa ha una modalità d'azione ben diversa dai farmaci visti finora: entra nella cellula fungina attraverso una citosina-permeasi, viene deaminata a 5-fluorouracile (5-FU), convertita nel nucleoside trifosfato e incorporata nel RNA dove causa mutazioni missense. Il 5-FU può inoltre essere convertito nel deossinucleoside, che inibisce la timidilato-sintasi e quindi la biosintesi del DNA. La resistenza a questo farmaco è dovuta a mutazioni negli enzimi implicati nel suo meccanismo d'azione [Georgopapadakou e Walsh, 1994; Georgopapadakou, 1998].

2.4 Nuovi farmaci e prospettive future

Nonostante in quest'ultimo decennio sia diventato disponibile un maggior numero di farmaci antifungini, il loro spettro d'azione, la loro efficacia e le loro proprietà farmacocinetiche risultano ancora non ottimali e sono accompagnati da un'elevata tossicità. Molti infatti, pur avendo come bersaglio l'ergosterolo, inibiscono anche la funzione e la biosintesi degli steroli presenti nelle cellule di mammifero, determinando così gravi effetti collaterali nell'ospite. Inoltre, il recente aumento dell'utilizzo di agenti antifungini, in particolare degli azoli, ha portato alla selezione di specie intrinsecamente resistenti e di ceppi divenuti resistenti, pur appartenendo a specie sensibili. È perciò quanto mai necessario individuare nuovi composti e nuovi approcci terapeutici in grado

di contrastare l'emergenza provocata dal continuo espandersi delle infezioni fungine [De Lucca e Walsh, 1999].

Le ricerche sulla patogenesi hanno contribuito ad identificare, come bersagli per gli agenti antimicotici, delle macromolecole di origine fungina di vitale importanza per la crescita o la patogenicità dei funghi, ma ben distinte dalla biochimica dell'organismo ospite, in modo da minimizzare la tossicità. Questi bersagli possono essere fattori di virulenza, componenti strutturali o processi metabolici richiesti dal microrganismo patogeno per la sopravvivenza nell'ospite infettato [Mitchell, 1998]. La parete delle cellule fungine, una struttura essenziale e con funzioni simili a quelle della parete batterica, ma assente nelle cellule di mammifero, è un bersaglio ideale per gli agenti antifungini. Sono già stati individuati inibitori della biosintesi del glucano e della chitina, due importanti componenti della parete cellulare fungina. Bersagli ancora in studio sono le topoisomerasi, il fattore di allungamento 3 (EF-3), le proton-ATPasi della membrana plasmatica e la via dei folati [Georgopapadakou e Walsh, 1994].

Dopo aver individuato i potenziali bersagli fungini, è necessario identificare nuove sostanze naturali o derivate da "*de novo design*" in grado di inibirne l'attività. Successivamente, queste molecole devono essere saggiate contro ceppi patogeni in colture cellulari ed in modelli animali. Solo a questo punto alcuni prodotti potranno essere pronti per la sperimentazione clinica [Mitchell, 1998].

Molte sono le molecole dotate di attività antifungina *in vitro* attualmente in studio per valutarne il potenziale terapeutico e, tra queste, numerose sono di natura peptidica.

Come detto precedentemente, negli ultimi anni, l'ampliarsi delle conoscenze relative all'attività dei peptidi antimicrobici naturali ha consentito una migliore comprensione delle difese intrinseche dell'ospite e ha fornito nuovi approcci per la chemioterapia antifungina.

Infatti, il decennio passato si è reso testimone di un'incredibile crescita nella conoscenza dei peptidi naturali. Alcuni di essi si sono dimostrati dei buoni antimicrobici *in vitro*, senza essere tossici per le cellule di mammifero. La maggior parte dei dati sui peptidi antimicrobici riguarda però la loro attività antibatterica, mentre ancora scarsi sono quelli relativi alla loro attività antifungina. Tuttavia, negli ultimi tempi, numerosi peptidi vengono investigati per il loro potenziale antimicotico, sia tra quelli che agiscono mediante lisi cellulare (ad es. defensine e derivati delle cecropine), sia tra

quelli che interferiscono con la sintesi della parete cellulare o con la biosintesi di componenti essenziali quali il glucano (es. echinocandine, pneumocandine, papulacandine, aureobasidine) o la chitina (es. polioxine, nikkomicine).

Alcune di queste molecole sono ora sottoposte a dettagliati test preclinici, mentre altre hanno già raggiunto la fase dei “trials” di sperimentazione clinica [De Lucca e Walsh, 1999].

Purtroppo, nonostante l’urgente bisogno di un miglioramento nella diagnosi e nella terapia delle infezioni micotiche, le compagnie farmaceutiche, che potrebbero essere in grado di supportare specifici progetti di ricerca nei laboratori universitari o in ambito ospedaliero, sembrano non investire ancora sufficienti risorse per lo sviluppo di nuovi farmaci antifungini.

3.1 Fibrosi cistica

La fibrosi cistica (CF) è una malattia autosomica recessiva con un'incidenza nella popolazione caucasica di 1 su 2500 nati vivi e una frequenza di portatori di 1 su 25. Nel mondo, circa 60.000 sono gli individui affetti dalla malattia, 3000 solo in Italia, e molti di più quelli in grado di trasmetterla in quanto portatori asintomatici del gene mutato [Villari et al., 1999; Saiman et al., 2001].

Il difetto genetico alla base della malattia è un'alterazione a livello del gene localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7, che codifica per una proteina transmembrana di 1480 residui amminoacidici chiamata CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), che appartiene alla famiglia delle ATP Binding Cassette (ABC) e funziona come canale anionico ATP-dipendente esercitando, inoltre, un controllo negativo sul canale per il sodio amiloride-sensibile (ENaC) [Wine, 1999].

Il CFTR è composto da cinque domini: due domini intermembrana (MSD 1 e 2), due che legano nucleotidi (NBD 1 e 2) e uno regolatorio (R). I due domini MSD formano il poro del canale, i domini NBD controllano, attraverso l'idrolisi dell'ATP, l'apertura del canale, mentre la fosforilazione cAMP-dipendente del dominio R determina l'attività del canale stesso [Sheppard Welsh, 1999] (Fig. 5).

La mutazione presente nel 70% circa degli individui CF causa una delezione della fenilalanina in posizione 508 del CFTR, che si manifesta fenotipicamente con disfunzioni a carico delle ghiandole esocrine e degli epitelii, soprattutto a livello dell'apparato respiratorio. Numerose ipotesi sono state formulate al fine di spiegare la patogenesi della malattia, dal momento che non sembra essere ancora chiaro il ruolo del CFTR mutante [Bals et al., 1999a; Guggino, 2001].

La superficie delle vie aeree è ricoperta da un sottile strato fluido chiamato "airway surface liquid" (ASL), in cui numerose ghiandole sottomucose riversano il proprio secreto contenente non solo sali, ma anche proteasi/antiproteasi, ossidanti/antiossidanti, peptidi antimicrobici e anticorpi in grado di inattivare microrganismi patogeni senza danneggiare i tessuti polmonari circostanti (Fig. 6) [Wine, 1999].

Questo strato mucoso viene spinto, attraverso il battito coordinato delle ciglia che ricoprono l'epitelio (la cosiddetta "clearance" muco-ciliare), fino alla cavità orale, ripulendo meccanicamente le vie aeree stesse. Alterazioni nella composizione dell'ASL

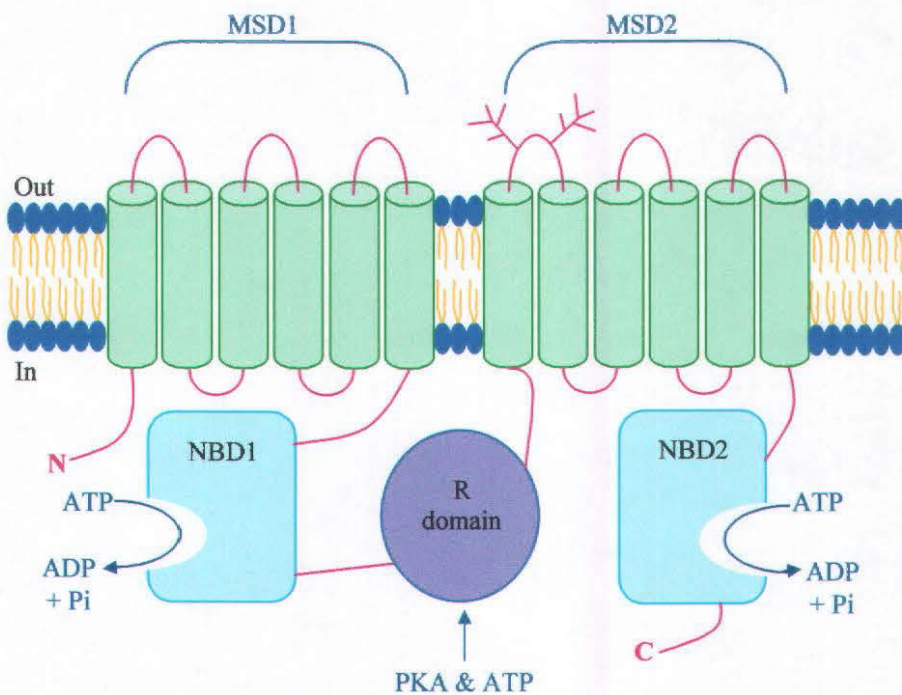


Fig. 5 – Modello di struttura del CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). MSD-1 e 2 (membrane-spanning domains): domini NBD-1 e 2 (nucleotide-binding domains): domini che legano i nucleotidi; R (regulatory domain): dominio regolatorio; PKA: protein chinasi cAMP-dipendente.

sembrano rappresentare la causa principale di mortalità nei pazienti con fibrosi cistica [Robinson e Bye, 2002].

Non è ancora del tutto chiaro quale sia la relazione tra il difetto genico alla base della malattia e le manifestazioni cliniche che conducono a infezioni respiratorie croniche, anche se sono stati proposti due modelli principali, non necessariamente alternativi, per spiegare la colonizzazione batterica delle vie respiratorie in pazienti CF:

- ✓ “*High salt hypothesis*”. Il liquido che normalmente bagna la superficie delle vie aeree sarebbe ipotonico rispetto al plasma in seguito al riassorbimento selettivo di sali da parte delle cellule epiteliali delle vie aeree stesse, presumibilmente impermeabili all’acqua [Matsui et al., 1998; Wine, 1999]; nei pazienti CF, invece, la mutazione del canale CFTR ridurrebbe il riassorbimento di ioni cloro, con conseguente aumento della concentrazione salina nell’ASL e inattivazione dei peptidi antimicrobici naturalmente presenti (LL-37 e defensine), la cui attività è sale-sensibile [Smith et al., 1996; Travis et al., 1999] (Fig. 7a).

- ✓ “*Low volume hypothesis*”. Ci sarebbe una riduzione in volume dell’ASL in seguito alla mancata inibizione da parte del CFTR del canale per il sodio amiloride-sensibile, che porterebbe ad un aumento del riassorbimento di sodio e di acqua per via osmotica da parte delle cellule dell’epitelio respiratorio. Il conseguente aumento della viscosità del muco determinerebbe una diminuzione della “clearance” muco-ciliare, rendendo l’ambiente particolarmente favorevole alla colonizzazione batterica; la presenza di muco residuo renderebbe inoltre difficoltosa la respirazione a causa della riduzione del lume delle vie respiratorie [Matsui et al.1998; Wine, 1999] (Fig. 6 e 7b).

Ipotesi alternative suggeriscono che la mutazione del CFTR potrebbe causare alterazioni delle cellule dell’epitelio respiratorio che interferirebbero direttamente con le difese dell’ospite. Il CFTR, infatti, sembra contribuire alla “clearance” di patogeni come *P. aeruginosa*, fungendo da recettore per i batteri stessi e promuovendone l’internalizzazione nelle cellule dell’epitelio respiratorio; alterazioni del CFTR porterebbero quindi a una “clearance” difettiva [Pier, 2002; Bals et al., 1999a; Albrecht et al., 2002]. Inoltre, è stato proposto che l’incremento di recettori quali l’asialoganglioside-1 (aGM1) osservato sulla superficie apicale delle cellule dell’epitelio respiratorio di pazienti CF, potrebbe facilitare l’adesione e la permanenza dei microrganismi patogeni sull’epitelio stesso [Imundo et al., 1995; Bals et al., 1999a; Albrecht et al., 2002].

In seguito all’iniziale colonizzazione delle vie aeree, si sviluppa da parte dell’ospite una risposta immunitaria, indotta dal lipopolisaccaride (LPS) e da altre componenti delle cellule batteriche, e mediata da citochine (ad es. TNF) ed interleuchine (IL-1, IL-6 e IL-8), che richiamano nel sito dell’infiammazione molti neutrofili; questi a loro volta producono proteasi ed ossidanti che danneggiano ulteriormente il tessuto polmonare circostante. Il DNA rilasciato dalla lisi di neutrofili, cellule epiteliali e batteri, fa aumentare inoltre la viscosità dell’ASL diminuendo ulteriormente la “clearance” muco-ciliare [Bals et al., 1999a].

In altri organi colpiti dalla malattia, tra cui pancreas, intestino, dotti sessuali maschili e ghiandole sudoripare, non si osserva colonizzazione batterica, ma solo alterazioni dovute principalmente al trasporto difettivo del cloro attraverso le cellule epiteliali

[Smith et al., 1996]. A livello pancreatico la secrezione di muco denso rende difficoltoso il rilascio di enzimi nell'intestino, con conseguente alterazione dell'assorbimento intestinale; la mancanza di enzimi digestivi può essere compensata dall'assunzione di farmaci durante i pasti. Le lesioni polmonari restano tuttavia la causa principale delle invalidità e delle morti di pazienti affetti da fibrosi cistica (oltre il 90%).

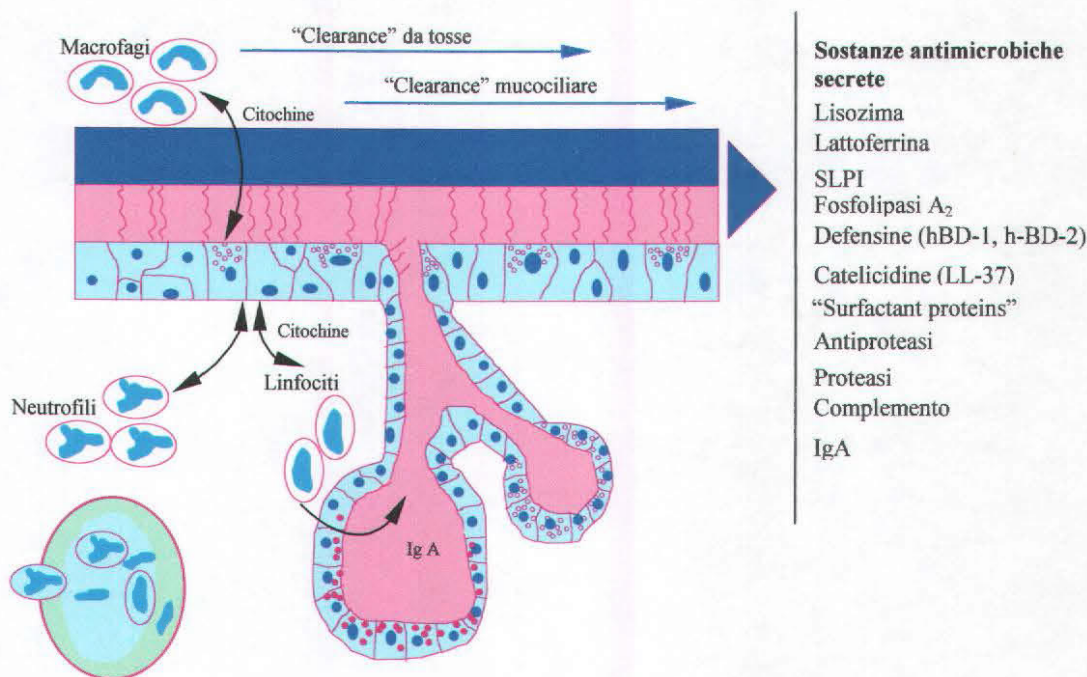


Fig. 6 - Meccanismi di difesa dell'epitelio respiratorio. La tosse e il movimento delle ciglia rimuovono polvere e microrganismi intrappolati nel muco ("mucociliary clearance"). Molte sostanze con attività pro-, anti-infiammatoria e antimicrobica sono secrete dalle cellule epiteliali e funzionano come barriera. Macrofagi, linfociti T e B, neutrofili e cellule epiteliali sono componenti cellulari dell'immunità innata e acquisita.

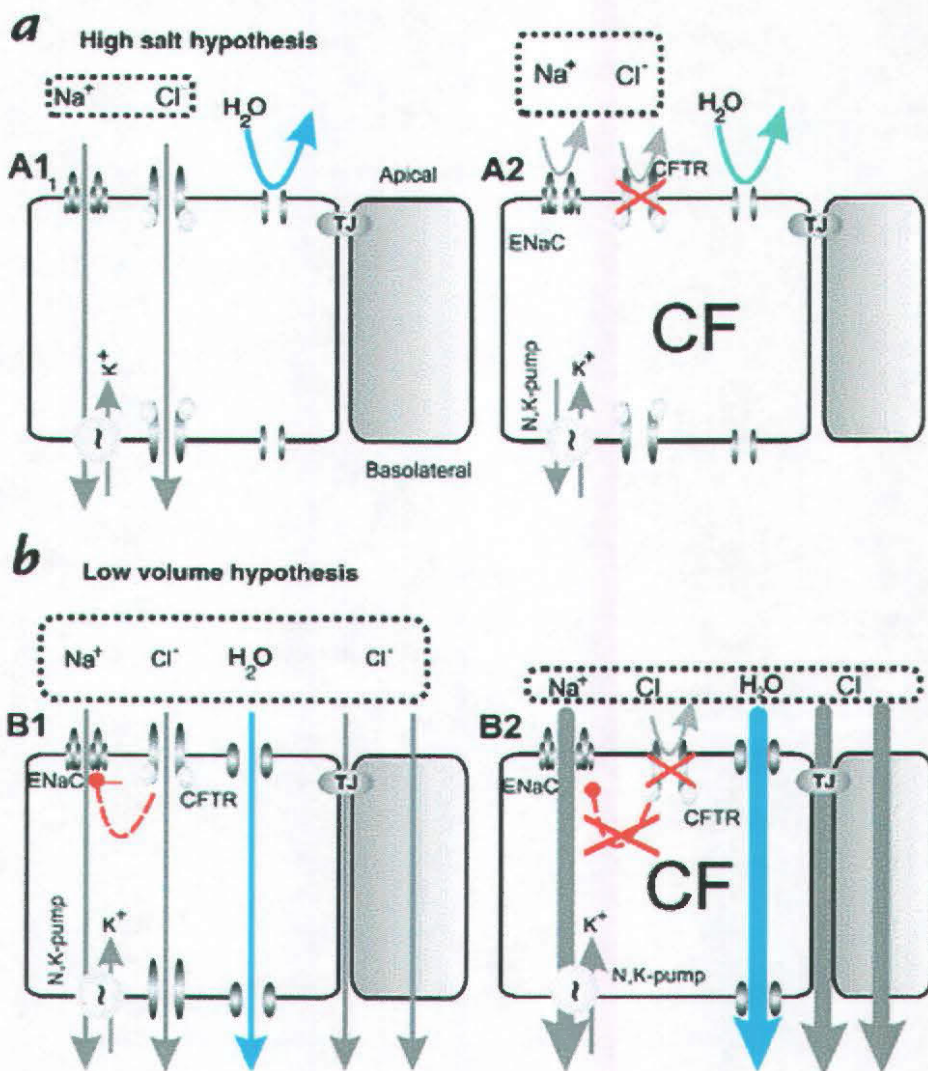


Fig. 7 – Ipotesi sulla diversa composizione dell'ASL in individui sani e affetti da fibrosi cistica. (a) "High salt hypothesis": l'ASL ha, in condizioni normali, una bassa concentrazione di sali (A1), mentre in pazienti CF (A2) si osserva, in seguito alla mutazione del CFTR, un aumento della concentrazione di sali che inibiscono i peptidi antimicrobici naturalmente presenti nel liquido che bagna le vie aeree. (b) "Low volume hypothesis": l'ASL ha una concentrazione di sali pari a quella presente nel plasma (B1). In pazienti CF (B2) la mancata inibizione del CFTR mutato sul canale per il sodio amiloride sensibile (ENaC), porta ad un aumentato riassorbimento di sodio e acqua con conseguente aumento della viscosità del muco e riduzione della "mucociliary clearance".

3.2 Infezioni opportunistiche in pazienti affetti da fibrosi cistica

I pazienti affetti da fibrosi cistica vanno incontro a infezioni polmonari ricorrenti causate principalmente da tre specie batteriche: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa*. La loro presenza tende ad essere correlata con l'età dei pazienti per cui, di solito, nell'infanzia il primo microrganismo ad essere isolato è *S. aureus*, seguito da *H. influenzae*; con l'adolescenza compare nel tessuto polmonare già leso *P. aeruginosa*. Nell'età adulta in questi pazienti sono inoltre presenti, oltre ai microrganismi già citati, anche funghi e virus, con le conseguenti complicazioni cliniche.

Nei primi anni '80 un nuovo patogeno opportunistico del basso tratto respiratorio, noto come *Burkholderia cepacia*, è stato identificato in pazienti CF. In genere, l'apparato respiratorio di pazienti colonizzati da *B. cepacia* è già seriamente danneggiato da precedenti infezioni, perciò si è ipotizzato che questa specie batterica possa essere considerata un marcatore della severità della malattia piuttosto che una causa del suo aggravamento [Gilligan, 1991; Govan et al., 1996].

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa è uno dei microrganismi più studiati per la sua importanza come patogeno nosocomiale; si trova solitamente in ambienti estremamente umidi e talvolta nella microflora normale dell'intestino e della cute; rappresenta la principale causa di infezioni nosocomiali del tratto respiratorio e urinario [Gilligan, 1995; Davis et al., 1993].

La patogenicità del microrganismo è dovuta ad un'ampia gamma di fattori di virulenza tra cui la presenza di fimbrie, fattori di adesione ai tessuti dell'ospite, numerose proteasi, emolisine, endotossina ed esotossine.

Una variante atipica fortemente mucoide di *P. aeruginosa* è associata a infezioni polmonari croniche in individui CF; i polmoni di adolescenti e adulti CF sono colonizzati, nel 70-80% dei casi, da questa variante fenotipica che si contraddistingue per la produzione di un esopolisaccaride che consente ai batteri di aderire uno all'altro formando microcolonie; la matrice anionica costituita dall'esopolisaccaride forma un biofilm che protegge i microrganismi dai fagociti e dall'azione degli anticorpi e del complemento [Gilligan, 1991; Hentzer et al., 2001; Drenkard e Ausubel, 2002; Davis et al., 1993] (Fig. 8). La colonizzazione iniziale delle vie aeree in pazienti CF è

solitamente dovuta al fenotipo "wild-type" non mucoide di *P. aeruginosa*, che evolve poi spontaneamente verso la variante mucoide, predominante durante l'infezione cronica del tessuto polmonare [Singh et al., 2000]. La variante mucoide viene probabilmente selezionata nel corso dell'infezione, in quanto maggiormente resistente alle difese dell'ospite. I danni polmonari sono dovuti, in primo luogo, alla produzione di fattori di virulenza da parte del patogeno stesso (proteasi, esotossine), secondariamente alla risposta immunitaria dell'ospite verso il microorganismo. Clusters di geni coinvolti nella conversione verso il fenotipo mucoide e nella produzione di esopolisaccaride sono stati identificati e mappati sul cromosoma batterico [Govan e Deretic, 1996; Gilligan, 1991].

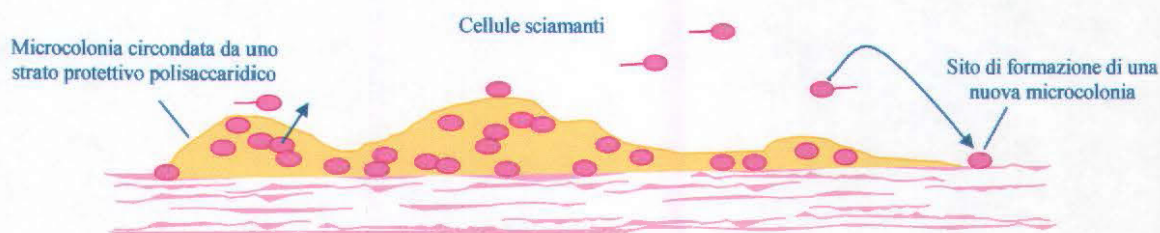


Fig. 8 – Rappresentazione schematica della formazione di microcolonie (biofilm) di *P. aeruginosa*.

L'esopolisaccaride prodotto da *P. aeruginosa* è molto simile a quello prodotto da alcune alghe marine e viene chiamato alginato. L'alginato è un polisaccaride non ramificato composto da blocchi costituiti da corte sequenze di acido mannuronico (ManA)



e corte sequenze di acido guluronico (GulA)



dove n assume al massimo il valore di 20.

Queste sono intervallate da altre sequenze miste, costituite da residui di β -ManA e di α -GulA, entrambi concatenati con legame 1 \rightarrow 4, disposti in modo irregolare; tale polimero, inoltre, presenta un certo grado di acetilazione.

Burkholderia cepacia

Il batterio *Burkholderia cepacia* è stato identificato nel 1950 da Burkholder come fitopatogeno della cipolla ed è stato inizialmente indicato col nome di *Pseudomonas cepacia*. Negli anni '80 è emersa la sua importanza come patogeno nosocomiale in pazienti immunocompromessi e, soprattutto, come patogeno opportunista del tratto respiratorio in pazienti affetti da fibrosi cistica.

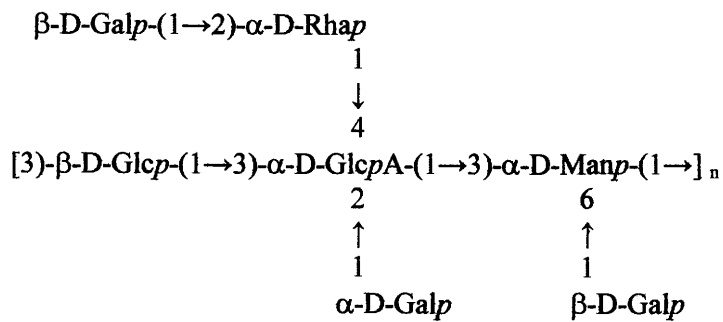
Nel 1992 la specie *P. cepacia*, insieme ad altri microrganismi appartenenti al gruppo di omologia II del genere *Pseudomonas*, è stata riclassificata come appartenente ad un nuovo genere, chiamato *Burkholderia*, sulla base della sequenza dell'rRNA 16S, dei livelli di omologia DNA-DNA, della composizione degli acidi grassi e di varie caratteristiche fenotipiche.

Nel 1997 è stato osservato che i ceppi di *B. cepacia* identificati fino a quel momento, pur presentando somiglianze fenotipiche, mostravano un'eterogeneità a livello di genotipo. In base a tale osservazione sono stati individuati cinque gruppi genomici o genomovars: la maggior parte degli isolati clinici sembra appartenere ai genomovars II, III e IV, mentre i genomovars I e V comprendono soprattutto isolati ambientali [Vandamme et al., 1997]. Studi recenti indicherebbero che gli isolati appartenenti al genomovar III sono strettamente associati ad un alto tasso di mortalità in pazienti CF; l'accurata identificazione dei genomovars quindi riveste una fondamentale importanza dal punto di vista clinico [Whitby et al., 2000].

B. cepacia costituisce oggi un grave problema, soprattutto per i pazienti con fibrosi cistica, per la sua multiresistenza intrinseca a molti degli agenti antimicrobici attualmente in uso. Infatti, sebbene la terapia antibiotica a cui i pazienti CF vengono sottoposti risulta di solito efficace nei confronti di *S. aureus* ed *H. influenzae*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* risultano particolarmente difficili da eradicare. Alcuni dei meccanismi che contribuiscono alla multiresistenza di *B. cepacia* includono una bassa permeabilità della membrana esterna, circa 10 volte meno permeabile a disinfettanti ed agenti antimicrobici di quella di *E. coli*, una β -lattamasi inducibile codificata dal gene *penA* e l'utilizzo della penicillina G come substrato per la crescita [Govan e Deretic, 1996].

Gli unici fattori di virulenza noti sono i fattori di adesione ai tessuti dell'ospite (fimbrie); alcuni isolati di *B. cepacia* producono proteasi, lipasi ed emolisina, anche se

il ruolo di questi fattori nella patogenesi della malattia non è ancora certo [Govan e Deretic, 1996]. Uno dei fattori che sembra essere coinvolto nell'instaurarsi e nel mantenimento dell'infezione è la produzione di esopolisaccaridi che favoriscono la persistenza del batterio a livello polmonare attraverso la formazione di biofilm, caratteristica già nota per *P. aeruginosa*, sulla quale sono stati compiuti numerosi studi. Molto meno si sapeva, fino a pochi anni fa, sugli esopolisaccaridi prodotti da *B. cepacia*. Uno studio iniziato recentemente ha portato alla determinazione della struttura primaria di un esopolisaccaride prodotto da un ceppo mucoide isolato in un ospedale portoghese (IST408). La struttura primaria dell'unità ripetitiva è la seguente:



Si tratta di un eptasaccaride contenente i residui ramnosio (Rha), mannosio (Man), galattosio (Gal), glucosio (Glc) ed acido glucuronico (GlcA). E' abbastanza insolita la presenza di un residuo saccaridico (D-GlcpA) con due catene laterali, sono inoltre presenti due gruppi O-acetile per ogni unità ripetitiva, ma la loro posizione non è stata ancora determinata [Cescutti et al., 2000]. Un polimero identico è prodotto da un ceppo di *B. cepacia* isolato da un paziente CF in cura presso un ospedale di Tolosa e da un ceppo isolato presso l'Ospedale Infantile "Burlo Garofalo" di Trieste (BTS 7) [Cérantola et al., 1999]. E' stato già provato che l'esopolisaccaride prodotto dal ceppo isolato in Portogallo, denominato "cepaciano", ha la capacità di dare soluzioni piuttosto viscosi e di formare aggregati supramolecolari in particolari condizioni di pH e forza ionica. La formazione di questi aggregati porta sicuramente ad un aumento della viscosità delle soluzioni, ma è anche indice della possibilità di formare biofilm che possono spiegare alcuni degli aspetti dell'adesione dei batteri all'epitelio polmonare. I dati relativi al ruolo del pH e della forza ionica sono molto interessanti in quanto l'origine genetica della fibrosi cistica porta ad uno scompenso grave del trasporto di sali

attraverso la membrana cellulare, tanto che il sintomo primo della malattia è una sudorazione particolarmente ricca in sali [Zabner et al., 1998; Cescutti et al., 2000].

Non è invece ancora nota la struttura degli esopolisaccaridi prodotti da altri ceppi di *Burkholderia cepacia* isolati da pazienti del “Burlo Garofalo” di Trieste (BTS 3 e BTS 13); anche se sono stati calcolati i rapporti molari dei monosaccaridi neutri presenti in tali polimeri (Tab. 1).

	BTS 3	BTS13
Rha	1.00	1.00
Man	0.46	1.44
Gal	3.25	24.4
Glc	1.23	0.60
Ara		2.46
GalNAc	0.47	

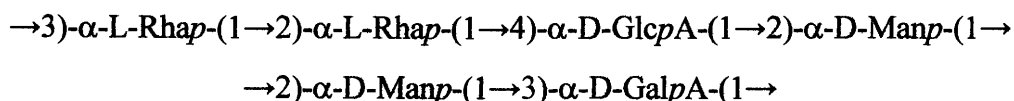
Tab. 1 – Rapporti molari dei monosaccaridi neutri presenti in esopolisaccaridi prodotti da ceppi di *Burkholderia cepacia* (BTS 3 e BTS 13) isolati da pazienti del “Burlo Garofalo” di Trieste.

3.3 Un importante patogeno polmonare: *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae è la più importante specie patogena per l’uomo di tutto il genere *Klebsiella*; può essere isolata dal tratto respiratorio o intestinale del 5% degli individui sani e, frequentemente, causa infezioni secondarie in pazienti affetti da malattie polmonari croniche. Questo microrganismo può causare una polmonite batterica grave e distruttiva, anche se in genere è più frequentemente responsabile di infezioni nosocomiali del tratto urinario o è presente come opportunisto in altre infezioni respiratorie.

Le capacità invasive del microrganismo dipendono essenzialmente dalle proprietà antifagocitarie della capsula: stipiti acapsulati sono infatti avirulenti.

Anche se costituiti da un numero relativamente piccolo di tipi diversi di residui monosaccaridici, i polisaccaridi capsulari di *Klebsiella* presentano una notevole varietà di strutture primarie. Per quanto riguarda il polisaccaride K 40, prodotto da un ceppo mucoide di *K. pneumoniae*, la determinazione della struttura primaria ha stabilito che l’unità ripetitiva lineare esasaccaridica è:



Anche gli esopolisaccaridi prodotti da *K. pneumoniae* danno luogo a soluzioni viscose favorendo così l’adesione del batterio agli epiteli mediante la formazione di biofilm,

primo passo verso l'instaurarsi dell'infezione. [Cescutti et al., 1993; Flaibani et al., 1994]

4.1 Scopo della tesi

L'uso e abuso degli antibiotici e degli antimicotici disponibili ha portato alla selezione di ceppi microbici resistenti ai farmaci, che rappresentano ormai la causa prevalente di infezioni ospedaliere. Inoltre, negli ultimi anni, l'aumento del numero di individui immunodepressi, a causa di terapie immunosoppressive nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo, della chemioterapia e della diffusione dell'AIDS, hanno portato ad un drammatico incremento delle infezioni opportunistiche, soprattutto fungine.

Lo spettro di un ritorno all'era preantibiotica ha recentemente spinto le maggiori aziende farmaceutiche, che per lunghi anni non hanno investito in questa direzione, ad impegnarsi nella ricerca di "lead compounds" per lo sviluppo di nuovi farmaci dotati di attività antimicrobica ad ampio spettro e con meccanismi d'azione alternativi rispetto a quelli dei farmaci tradizionali.

In questo contesto si inseriscono come ottimi candidati i peptidi antimicrobici naturali, facenti parte dell'immunità innata e dotati di un ruolo importante nella difesa dell'organismo ospite.

Una delle finalità del lavoro svolto per questa tesi è stata quella di saggiare l'attività antibatterica e antifungina di peptidi naturali, per valutarne l'eventuale potenziale applicativo.

In primo luogo è stato caratterizzato lo spettro d'azione di alcuni peptidi strutturalmente diversi derivati da catelicidine su un centinaio di ceppi appartenenti a diverse specie, tutti di derivazione nosocomiale e con fenotipo resistente a uno o più antibiotici. Dai dati ottenuti dai saggi *in vitro* è stato possibile ricavare utili indicazioni per i successivi studi *in vivo*, compiuti utilizzando modelli di peritonite acuta in topo.

Successivamente, è stata caratterizzata *in vitro* l'attività dei peptidi contro una vasta gamma di ceppi fungini, per lo più isolati da pazienti immunocompromessi, per valutarne l'eventuale potenziale applicativo in campo antimicotico.

Un ulteriore aspetto considerato è stato lo studio dell'effetto di esopolisaccaridi di patogeni polmonari sull'attività antimicrobica dei peptidi.

Come ricordato nel capitolo 3 dell'Introduzione, la base genetica della fibrosi cistica (CF) è un'alterazione a livello del gene che codifica per la proteina CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) che funziona come canale ionico per il

cloro. La manifestazione clinica più grave nei pazienti CF è rappresentata dall'instaurarsi di infezioni microbiche nelle vie aeree da parte di batteri opportunisti e non che sono la principale causa di morte.

Uno dei fattori che sembra coinvolto nell'instaurarsi e nel mantenimento di queste infezioni è la produzione ed il rilascio da parte di alcuni batteri di esopolisaccaridi, che sono in grado di favorirne poi la persistenza a livello di epitelio polmonare sotto forma di biofilm. E' sembrato interessante valutare la possibilità che gli esopolisaccaridi batterici, in genere anionici, possano inibire i meccanismi di difesa polmonari e contribuire così alla persistenza dell'infezione.

Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare *in vitro* l'effetto che alcuni esopolisaccaridi, prodotti e rilasciati da patogeni polmonari, hanno sull'attività di peptidi antimicrobici appartenenti a diverse classi strutturali, sia umani (LL-37, hBD-1 e hBD-3), presenti anche a livello polmonare, sia da altre specie animali (PG-1 da maiale, SMAP-29 da pecora e Bac7 da bovino). Inoltre, per studiare l'eventuale interazione esopolisaccaridi-peptidi, sono stati compiuti studi di dicroismo circolare dei composti da soli o in miscela.

Infine, si è iniziato lo studio sul meccanismo d'azione di peptidi non membranolitici, che sono in grado di entrare nelle cellule con un meccanismo non permeabilizzante e di interagire presumibilmente con bersagli intracellulari; a tal fine è stata utilizzata la catelicidina bovina Bac7, appartenente al gruppo dei peptidi lineari ricchi in prolina ed arginina, per la selezione di mutanti ad essa resistenti, mediante i quali si potrà, in futuro, cercare di capire quali possono essere i bersagli molecolari dell'azione di questi peptidi.

MATERIALI E METODI

Cap. 1 Peptidi antimicrobici

Cap. 2 Terreni e colture

Cap. 3 Saggi biologici

1.1 Sintesi chimica di peptidi

La tecnica principalmente utilizzata oggi per la sintesi di peptidi è quella in fase solida o di Merrifield, messa a punto negli anni '60.

Ad un primo residuo ancorato direttamente ad un supporto polimerico insolubile (resina), mediante cicli successivi di deprotezione ed accoppiamento, vengono addizionati in maniera sequenziale dal C- all'N-terminale, i residui amminoacidici che vanno a costituire la catena peptidica nascente.

Il supporto polimerico scelto per la sintesi deve essere tale da offrire gruppi funzionali adatti all'ancoraggio del primo amminoacido C-terminale, deve essere chimicamente inerte verso i reagenti ed i solventi usati, non deve interagire con la catena peptidica in formazione e deve possedere stabilità meccanica sufficiente ad un'agevole manipolazione e ad un rapido processo di filtrazione. La quantità di gruppi funzionali presenti sulla resina è definita come grado di sostituzione della resina ed è espressa in mEq/g. In genere, si utilizzano resine polistireniche o poliamidiche sotto forma di sferule del diametro di circa 50 μm , in grado di offrire una buona resistenza a pressioni e flussi elevati e di rigonfiarsi senza ostacolare la crescita della catena peptidica.

Un tipo di resina attualmente molto in uso è la PEG-PS, costituita da un supporto di polistirene (PS) su cui è innestato il polietilenglicole (PEG), al quale viene legato un braccio spaziatore (linker), che serve ad impedire problemi di ingombro sterico, e quindi il residuo C-terminale del peptide. Vengono utilizzati diversi tipi di linkers a seconda del peptide da sintetizzare: il linker acido-labile 5-(4-aminometil-3,5-dimetossifenossi) valerile (PAL) viene ad esempio impiegato nella produzione di peptidi con l'estremità C-terminale amidata.

Basse rese nella sintesi sono spesso da attribuirsi ad un'insufficiente solvatazione della resina e della catena peptidica nascente, con la conseguente formazione di legami intermolecolari tra le catene in allungamento; la formazione di legami intra- ed intermolecolari potrebbe portare al ripiegamento del peptide, con conseguente riduzione dell'accesso al gruppo amminico N-terminale, rendendo così più difficile l'entrata dei successivi amminoacidi. Nella sintesi in fase solida è pertanto necessario che il solvente scelto sia un buon agente solvatante sia per il supporto polimerico sia per il peptide nascente. Questi requisiti vengono soddisfatti da solventi quali la dimetilformammide

(DMF) e l’N-metilpirrolidone (NMP), che permettono una buona solubilità degli amminoacidi protetti e facilitano le reazioni di acilazione, aumentando la velocità di accoppiamento alla resina; vengono inoltre utilizzate miscele di solventi, quali la “magic mixture”, al fine di migliorare la capacità solvatante ed impedire la formazione di legami intra- e intermolecolari a livello del peptide nascente.

I gruppi che prendono parte alla formazione del legame peptidico sono il gruppo amminico dell’amminoacido legato alla catena in formazione e quello carbossilico dell’amminoacido entrante. Per impedire reazioni indesiderate è necessario intervenire sui gruppi laterali reattivi degli amminoacidi mediante *protezione permanente*, rimossa solo dopo completamento della sintesi, e su quelli coinvolti nella formazione del legame peptidico, mediante *protezione temporanea* dell’ α -amminogruppo dell’amminoacido entrante, che viene allontanata dopo la formazione del legame peptidico.

Tradizionalmente, per la protezione temporanea dell’ α -amminogruppo è stato usato il gruppo *tert*-butossicarbonile (*t*-Boc), che è acido-labile e può essere rimosso con acido trifluoroacetico (TFA). L’ambiente acido a cui viene sottoposta ad ogni ciclo la catena peptidica in formazione può provocare però parziali deprotezioni dei gruppi protettivi delle catene laterali degli amminoacidi o il distacco del peptide dalla resina; infatti, nonostante la rottura di tali legami richieda in genere condizioni acide più spinte, sia il legame del peptide con la resina sia il legame dei gruppi protettivi con le catene laterali dei singoli amminoacidi, sono acido-labili.

Tali inconvenienti vengono superati con l’uso del gruppo base-labile 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc) per la protezione del gruppo α -amminico dell’amminoacido entrante, mentre le catene laterali degli amminoacidi sono protette da gruppi acido-labili, secondo un modello definito *chimica ortogonale*. In questo modo è possibile operare in maniera selettiva il distacco delle due protezioni in tempi diversi e con reagenti diversi, impedendo così reazioni indesiderate quali la formazione di peptidi ramificati o il distacco prematuro del peptide nascente dalla resina.

Un aspetto importante da considerare nel corso della sintesi è la scelta dei gruppi protettivi permanenti per le catene reattive laterali presenti in molti amminoacidi. L’utilizzo di un derivato amminoacidico inappropriato può infatti causare problemi durante la sintesi, al momento della rimozione del peptide dalla resina o nei passaggi

successivi di purificazione, con una conseguente diminuzione della resa. Gli amminoacidi che richiedono un'adeguata protezione ed i gruppi protettivi più comunemente utilizzati sono riportati nella Tab. 2 e nella Fig. 10b.

AMMINOACIDI	GRUPPI PROTETTIVI
ARGININA	2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofurano-5-sulfonile (Pbf)
ASPARTATO GLUTAMMATO	<i>t</i> -butilestere (<i>Ot</i> -Bu)
SERINA TIROSINA TREONINA	<i>t</i> -butile (<i>t</i> -Bu)
LISINA TRIPTOFANO	<i>t</i> -butossicarbonile (<i>t</i> -Boc)
ASPARAGINA GLUTAMMINA CISTEINA ISTIDINA	tritele (Trt)

Tab. 2 - Gruppi protettivi usati durante la sintesi dei peptidi.

La sintesi peptidica in fase solida avviene tramite cicli successivi composti dalle seguenti fasi (Fig. 9):

1. deprotezione (distacco del gruppo Fmoc) dell' α -amminoacido dell'ultimo residuo legato alla catena nascente o del primo amminoacido legato alla resina, nel passaggio iniziale;
2. attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido entrante;
3. reazione di acilazione (accoppiamento) per la formazione del legame peptidico;
4. eventuali cicli di lavaggio e di "capping", se necessario, per bloccare gli eventuali α -amminogruppi che non hanno reagito.

La formazione dei legami peptidici viene facilitata dall'aggiunta di attivatori (Fig. 10a) che consentono la formazione di un derivato estereo dell'amminoacido entrante, permettendo così la reazione di condensazione tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido entrante e l'amminogruppo presente sulla catena nascente. Solitamente si usano l'idrossibenzotriazolo (HOBt) in presenza del suo sale di uronio 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio-tetrafluoroborato (TBTU) e di una base quale la diisopropilettilammina (DIPEA) o l'*N*-metilmorfolina (NMM). Recentemente, sono stati introdotti l'*1*-idrossi-7-azabenzotriazolo (HOAt) ed il suo sale

di uronio O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio-esafluorofosfato (HATU), che permettono di incrementare la resa riducendo i tempi di accoppiamento e l'1H-benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pirrolidino)fosfonio esafluorofosfato (PyBOP), utilizzato in presenza di accoppiamenti particolarmente difficili.

Per assicurare una reazione pressochè quantitativa (resa >99%), l'amminoacido, gli attivatori e la base (in proporzione 1:1:1.7) sono introdotti con un eccesso di 6-8 volte rispetto alla sostituzione della resina.

La sintesi in fase solida è limitata dal fatto che la reazione di acilazione, anche se molto efficiente, resta comunque non quantitativa, in quanto ad ogni passaggio si può avere accumulo di sottoprodotti con una conseguente diminuzione della resa; tale diminuzione si può osservare soprattutto in presenza di amminoacidi con catene laterali voluminose (Ile, Leu, Val, Arg e Lys), per i quali l'accoppiamento è reso difficile dall'ingombro sterico.

Studi di previsione sulla difficoltà di ogni accoppiamento vengono effettuati prima di stabilire il protocollo da seguire per la sintesi, utilizzando il programma "Peptide Companion" della CoshiSoft, che calcola il potenziale di aggregazione del peptide da sintetizzare (vedi paragrafo 1.2 di Risultati e Discussione). Vengono presi in considerazione, in particolare, la propensione della catena peptidica ad assumere una conformazione secondaria o ad aggregare con catene vicine o con la stessa resina, la solvatazione della resina e del peptide nascente, le caratteristiche chimiche degli amminoacidi e delle loro catene laterali. Dopo aver individuato i passaggi potenzialmente problematici della sintesi, si cerca di incrementarne la resa ricorrendo ad uno o più dei seguenti espedienti:

- ✱ aumento dell'eccesso di amminoacido entrante rispetto alla sostituzione della resina;
- ✱ aumento della temperatura di sintesi al fine di ridurre le aggregazioni inter- ed intramolecolari e di accelerare le reazioni di acilazione;
- ✱ utilizzo del "capping" dopo l'accoppiamento: i gruppi α -amminici che non hanno reagito vengono bloccati con agenti acetilanti, (ad es. l'anidride acetica);
- ✱ aumento del tempo di accoppiamento;

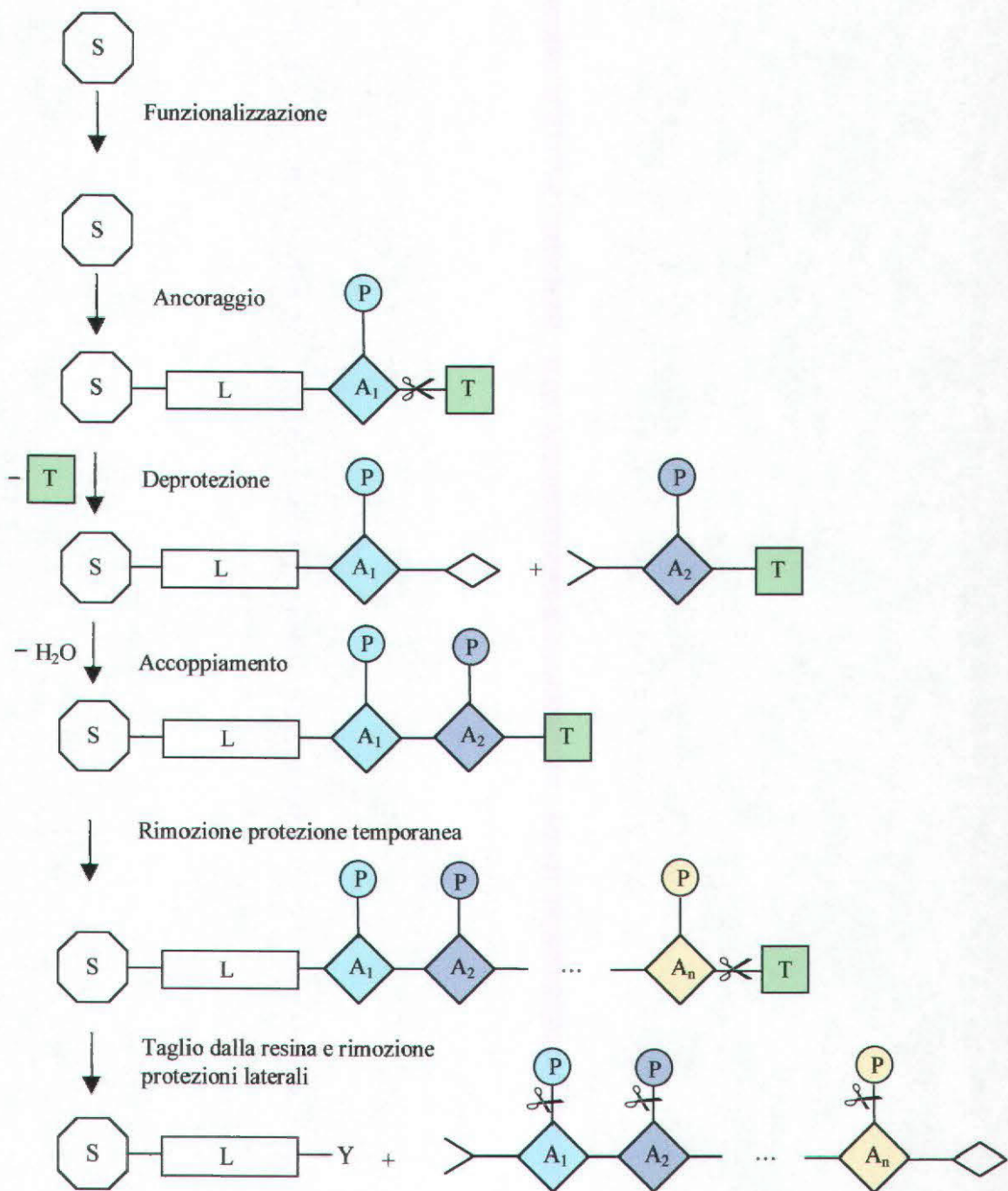






Fig. 9 - Sequenza dei passaggi nella sintesi in fase solida di un peptide.

S = supporto polimerico insolubile (resina)  = gruppo amminico libero
 L = linker
 A = amminoacido
 T = gruppo protettivo temporaneo
 P = gruppo protettivo permanente

 = gruppo carbossilico libero
 = deprotezione in ambiente acido (TFA)
 = deprotezione in ambiente basico (piperidina)

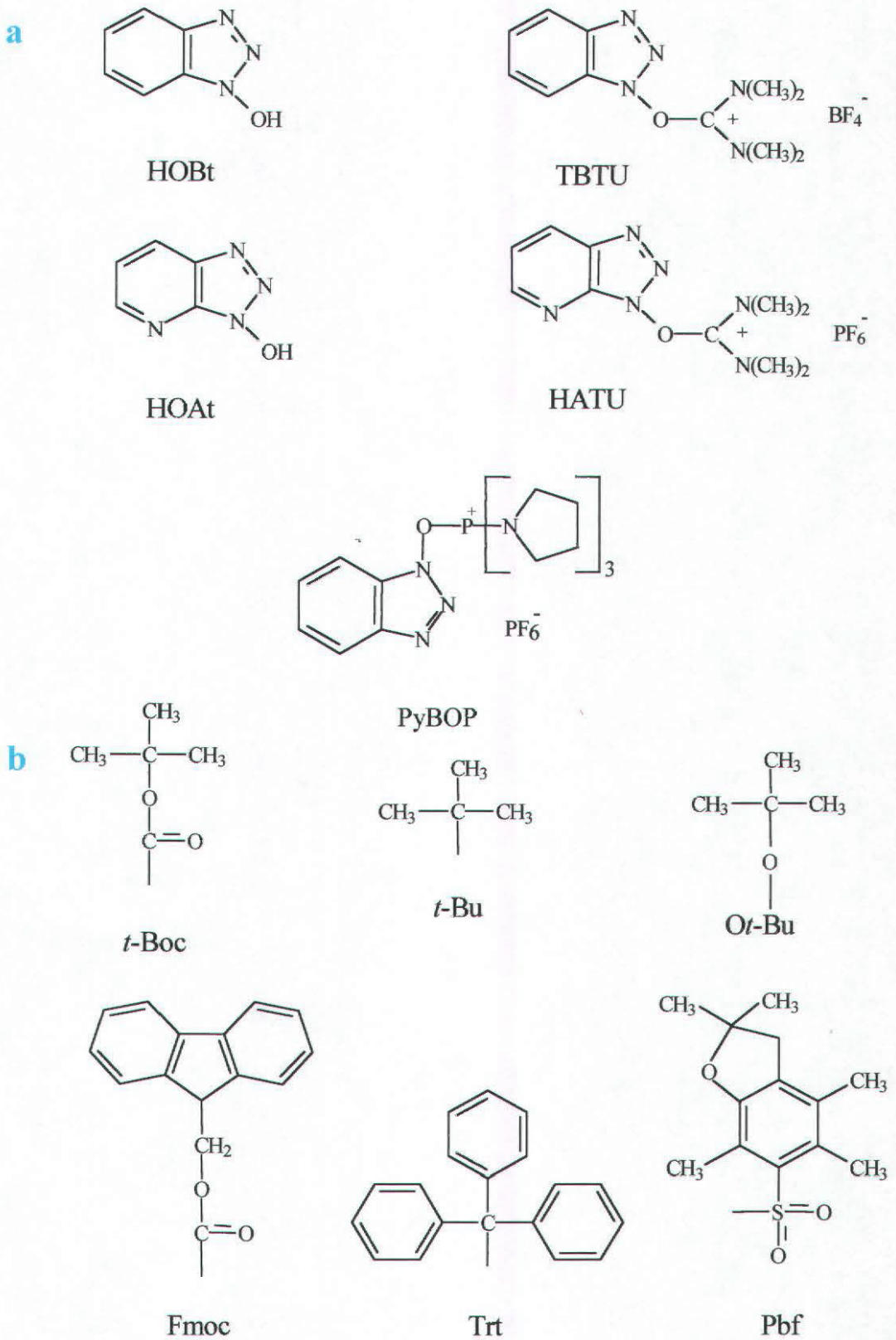


Fig. 10 - Formule di agenti accoppianti (a) e gruppi protettivi (b) usati per la sintesi dei peptidi.

- utilizzo di un doppio accoppiamento, cioè di due cicli successivi di accoppiamento con lo stesso amminoacido senza la rimozione della protezione Fmoc tra un ciclo e l'altro, in modo che il residuo torni in contatto con i gruppi amminici che non hanno reagito;
- impiego di miscele di solventi con una maggiore capacità solvatante per limitare la formazione di strutture secondarie; la “magic mixture” è una di queste miscele ed è composta da dimetilsolfossido (DMSO), N-metilpirrolidone (NMP) e diclorometano (DCM) in parti uguali, ai quali è aggiunto etilencarbonato 2 M e il detergente Triton X-100 all'1%;
- utilizzo di attivatori più efficaci, ad es. HATU o PyBop al posto di HOBt/TBTU; tale sostituzione viene però in genere adottata solo per gli accoppiamenti difficili a causa dei costi elevati di questi reagenti.

La chimica Fmoc possiede inoltre il vantaggio di permettere il monitoraggio spettrofotometrico continuo della sintesi tramite la misurazione dell'assorbimento del gruppo Fmoc a 365 nm, sia nell'amminoacido entrante che nel complesso Fmoc-piperidina che si forma dopo la deprotezione.

Per la sintesi dei peptidi vengono generalmente utilizzati sintetizzatori automatici che consentono sia la programmazione della sintesi sia l'acquisizione dei dati di assorbanza tramite rivelatori pre- e postcolonna, che rendono possibile una valutazione semiquantitativa della resa di ciascuna acilazione. Nel tracciato sono presenti picchi ravvicinati corrispondenti all'entrata ed al ricircolo del Fmoc-amminoacido, la cui intensità e risoluzione diminuisce gradualmente con il procedere della reazione, fino a raggiungere un plateau, che diviene orizzontale al termine della reazione stessa. Dopo il lavaggio della colonna, a causa della completa rimozione dei reagenti, si osserva una diminuzione dell'assorbanza che mostra invece un rapido aumento, misurato dal rilevatore post-colonna, dopo il distacco del gruppo Fmoc dall'amminoacido appena legato. L'area del picco Fmoc è correlata alla resa della sintesi: minore è la diminuzione del picco Fmoc dell'ultimo residuo aggiunto rispetto al precedente, maggiore è la resa.

1.2 Sintesi in fase solida di LL-37 e del suo frammento 7-37

LL-37 è un peptide umano appartenente alla famiglia delle catelicidine espresso nelle cellule della linea mieloide. Esso è presente nei granuli specifici dei neutrofili maturi e, più recentemente, la sua espressione è stata rilevata anche in tessuti infiammati e nell'epitelio del tratto respiratorio [Bals et al., 1999a].

La sintesi di LL-37 è stata effettuata con un sintetizzatore automatico PioneerTM-Peptide Synthesis System. È stato sintetizzato sia il peptide a sequenza completa sia il frammento 7-37, privo dei primi sei residui amminoacidici, al fine di verificare l'importanza della sequenza N-terminale per l'attività antimicrobica del peptide.

La resina utilizzata (Fmoc-Ser-PEG-PS con grado di sostituzione pari a 0.11 mEq/g) è stata impaccata in colonna con DMF. Per la sintesi sono stati utilizzati DMF:NMP (50:50, vol/vol), Triton X-100 1% (vol/vol), etilencarbonato 2 M, piperidina al 20% in DMF, la coppia di attivatori HOBt/TBTU per gli accoppiamenti più semplici, HATU o PyBop insieme a cicli di doppio accoppiamento per quelli particolarmente difficili. Come protezioni per le catene laterali degli amminoacidi sono stati utilizzati i gruppi *Ot*-Bu per il glutammato, *Pbf* per l'arginina, *t*-Bu per la treonina e la serina, *t*-Boc per la lisina e, infine, *Trt* per la glutammina e l'asparagina. Sia gli amminoacidi che gli attivatori sono stati utilizzati in eccesso di 8 volte rispetto alla sostituzione della resina. La sintesi del peptide completo è stata suddivisa in due parti; al termine della prima, un'aliquota della resina con ancorato il frammento 7-37 di LL-37 è stata prelevata per la successiva rimozione del peptide, la parte restante è stata utilizzata per il completamento della sintesi.

1.3 Rimozione del peptide dalla resina

Terminata la sintesi è necessario staccare il peptide dalla resina e rimuovere i gruppi protettivi delle catene laterali degli amminoacidi. Le due operazioni vengono compiute simultaneamente usando una soluzione concentrata di TFA, dal momento che entrambi i tipi di legame sono acido-labili. Alla soluzione di TFA vengono aggiunte delle "molecole spazzino" o "scavengers" quali acqua, fenolo, etanditiolo (EDT), tioanisolo, metanolo e triisopropilsilano (TIS) per evitare eventuali reazioni secondarie dovute ad alcuni gruppi protettivi delle catene laterali, che potrebbero essere liberati come carbocationi reattivi. Dopo 1-3 ore di incubazione con la soluzione di rimozione a

temperatura ambiente, la resina viene filtrata e il peptide viene fatto precipitare con etere al fine di separarlo dagli “scavengers” e dai gruppi protettivi ormai liberi.

Per la rimozione del peptide dalla resina è necessario:

1. preparare una soluzione di rimozione scelta in base alle caratteristiche del peptide e della resina; per LL-37 e il suo frammento 7-37, tale soluzione è stata preparata seguendo le indicazioni fornite dalla Novabiochem, indicate nella Fig. 11 (95% TFA; 2.5% acqua; 2.5% TIS);
2. aggiungere alla resina la soluzione preparata e lasciarla reagire per un tempo adeguato (da 1 a 3 ore);
3. filtrare con pompa a vuoto e lavare la resina più volte con un piccolo volume di TFA recuperando il filtrato;
4. far precipitare il peptide staccato aggiungendo al filtrato un largo eccesso di *tert*-butil-metil-etere, mantenendo sempre le soluzioni in ghiaccio;
5. mantenere la sospensione a -20°C per circa 30 minuti al fine di facilitare la precipitazione;
6. centrifugare a $1000 \times g$ per 10 minuti, recuperare il surnatante e lavare il pellet con etere ghiacciato; ripetere tutto per 3 volte;
7. dopo l'ultimo lavaggio far asciugare il pellet sotto cappa overnight.

1.4 Purificazione del peptide

Dopo la rimozione del peptide dalla resina, il materiale grezzo ottenuto (il cosiddetto “crude”) è stato purificato mediante cromatografia liquida ad alta pressione in fase inversa (RP-HPLC). Questa tecnica consente un'elevata risoluzione grazie all'alto numero di piatti teorici delle colonne utilizzate nelle quali le sferule di resina presentano un diametro molto piccolo; ne consegue la necessità di applicare forti pressioni per vincere la resistenza al fluire del solvente.

La separazione delle sostanze caricate in colonna avviene tramite l'eluizione in tempi diversi mediante l'applicazione di un adeguato gradiente acqua/solvente organico (soluzione A: TFA 0.05% in acqua milliQ; soluzione B: TFA 0.05% in acetonitrile). La resina utilizzata è infatti costituita da sferule di silice a cui sono ancorate delle catene alchiliche più o meno lunghe, che sono in grado di trattenere, tramite interazioni idrofobiche, le sostanze caricate in colonna.

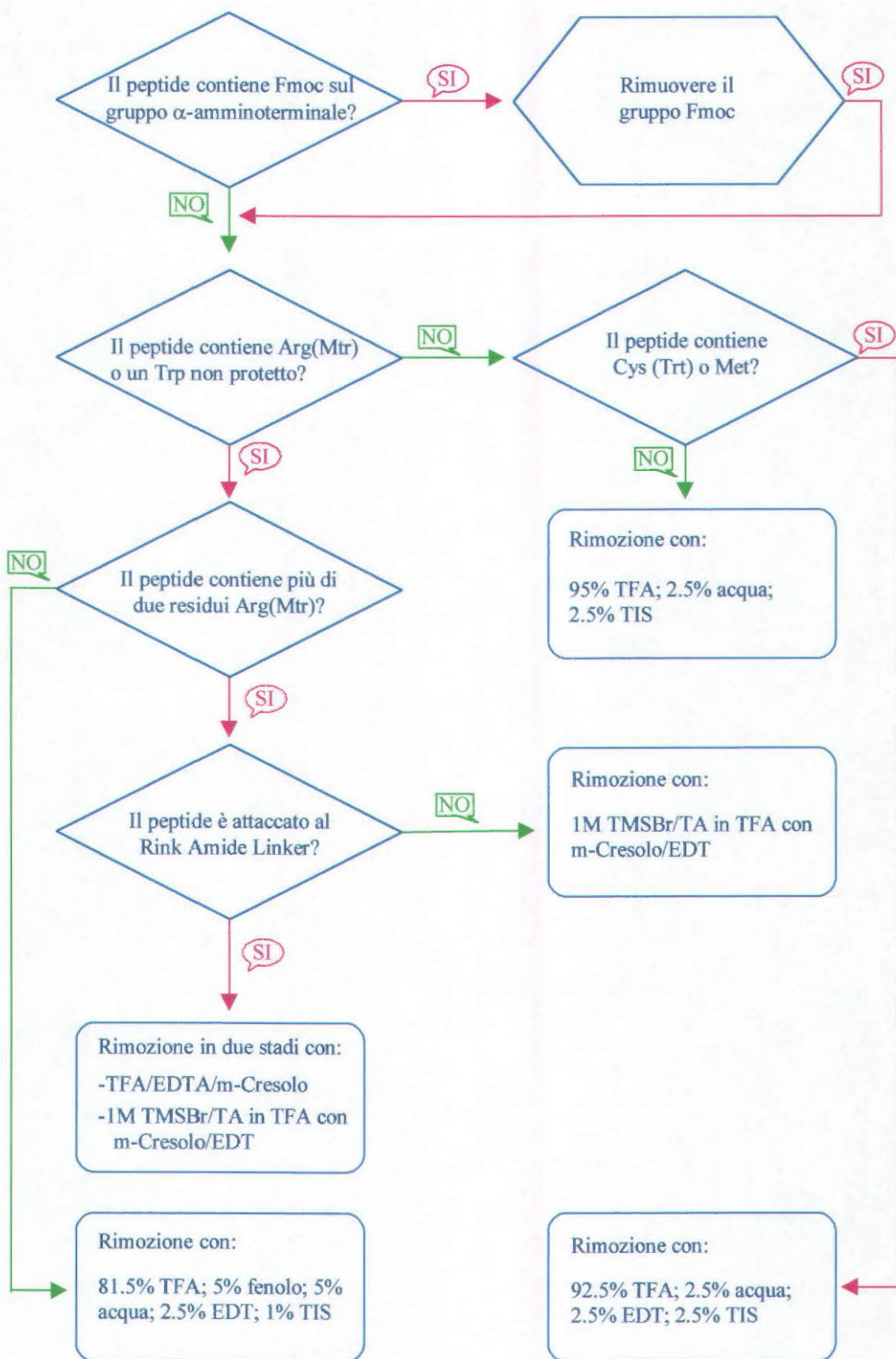


Fig. 11 - Diagramma per la scelta della soluzione di rimozione del peptide dalla resina (Novabiochem).

La separazione cromatografica di LL-37 e LL-37(7-37) è stata effettuata con lo strumento ÄKTA - Amersham Pharmacia Biotech, usando una colonna preparativa (XTerra RP 18 - 7 μm - 19 x 300 mm). Il gradiente adoperato per il peptide e il suo frammento è indicato nella Tab. 3.

I picchi raccolti sono stati centrifugati sottovuoto in Hetovac per eliminare l'acetonitrile, congelati e liofilizzati per la successiva caratterizzazione.

CV	%B
0	0
0.7	25
3.26	70
0.7	80
1	80
0.2	0

Tab. 3 - Gradienti utilizzati nella purificazione di LL-37 e LL-37(7-37). (CV = volumi di colonna; 1 CV = 85 ml; %B = % del solvente B: 0.05% TFA in acetonitrile)

1.5 Spettrometria di massa

La massa molecolare del presente nei picchi principali è stata determinata mediante l'uso di uno spettrometro di massa a ionizzazione electrospray API-1 (Perkin Elmer – SCIEX), al fine di individuare le frazioni cromatografiche contenenti il peptide desiderato. Lo strumento utilizzato consente di generare una serie di ioni multiprotonati del peptide da analizzare, che cadono generalmente in un rapporto di massa/carica compreso tra 400 e 2000 Da. Gli ioni vengono accelerati e attraversano un quadrupolo cui è applicata una differenza di potenziale che cambia nel tempo. Solo gli ioni che hanno un determinato valore di carica specifica raggiungono il rilevatore. Un apposito software permette la ricostruzione delle specie molecolari presenti nel campione analizzato sulla base del segnale prodotto dagli ioni generati.

1.6 Dosaggio della concentrazione peptidica

La concentrazione sia del peptide completo che del suo frammento è stata determinata utilizzando il metodo dell'assorbimento nell'ultravioletto. Questa tecnica sfrutta la capacità degli amminoacidi aromatici (Trp, Phe e Tyr) presenti nei peptidi, di assorbire

nell'ultravioletto a determinate lunghezze d'onda. Le misure spettrofotometriche sono state effettuate in cuvette di quarzo utilizzando uno spettrofotometro PYE UNICAM SP8-400 UV/VIS. Dai valori così ottenuti è stata ricavata la concentrazione delle soluzioni mediante la legge di Lambert-Beer, che correla l'assorbanza con la concentrazione ($\Rightarrow A = \epsilon lc$, dove A è l'assorbanza misurata, ϵ il coefficiente di estinzione molare ($M^{-1}cm^{-1}$) dei residui amminoacidici aromatici presenti nel peptide preso in esame, l il cammino ottico in cm e c la concentrazione ignota della soluzione espressa in moli/litro). I coefficienti di estinzione molare utilizzati per gli amminoacidi sono i seguenti: 5630 per Trp a 280 nm; 1420 e 1280 per Tyr rispettivamente a 275 e 280 nm; 195.1 per Phe a 257.5 nm; 125 per cistina a 280 nm [Edelhoch, 1967; Pace et al., 1995].

Nel caso di LL-37 e LL-37(7-37) le letture spettrofotometriche sono state effettuate a 257.5 nm: infatti, sia il peptide completo che il frammento contengono Phe. I coefficienti di estinzione molare sono stati calcolati in base al numero di residui di Phe presenti e sono pari a 780.4 per LL-37 (4 Phe) e a 390.2 per LL-37(7-37) (2 Phe).

2.1 Terreni di coltura

Terreno Mueller-Hinton (MH)

Il brodo Mueller-Hinton è stato preparato sciogliendo 21 g di terreno disidratato (DIFCO) in un litro di acqua milliQ; per il MH solido, alle stesse quantità sono stati aggiunti 15 g di agar tecnico (DIFCO). Il terreno è stato sterilizzato in autoclave.

Il brodo MH può essere conservato a temperatura ambiente, mentre le piastre di terreno solido vengono mantenute a 4°C.

Terreno Tryptic Soy Broth

Il terreno liquido Tryptic Soy Broth (TSB) è stato preparato sciogliendo 30 g di terreno disidratato (ACUMEDIA) in un litro di acqua milliQ, sterilizzato in autoclave e conservato a temperatura ambiente.

Per i saggi con il peptide LL-37 ed il suo frammento 7-37, la cui attività è sale-sensibile, è stato utilizzato come mezzo di coltura a basso contenuto salino TSB al 20% (vol/vol) in tampone Na-fosfato 10 mM, pH 7.4; per quelli con hBD-1 e hBD-3 è stata usata una percentuale di TSB (vol/vol) in tampone, rispettivamente, dell'1% e del 5%, data la particolare sensibilità ai sali mostrata da questi peptidi.

Terreno Sabouraud

Il terreno liquido è stato preparato sciogliendo in un litro di acqua milliQ 10 g di peptone micologico (OXOID) e 40 g di destrosio (OXOID); per il Sabouraud solido, alle stesse quantità sono stati aggiunti 15 g di agar tecnico n° 3 (DIFCO). Il terreno è stato sterilizzato in autoclave.

Il Sabouraud liquido può essere conservato a temperatura ambiente, mentre le piastre di Sabouraud solido vengono mantenute a 4°C.

Terreno RPMI-1640

Sono stati sciolti 10.4 g di RPMI-1640-MEDIUM (con L-glutamina e senza bicarbonato di sodio, SIGMA) in 800 ml di acqua milliQ; la soluzione è stata portata a pH 7 con acido 3-[N-morfolino]-propan-sulfonico (MOPS) 0.165 M e al volume finale di un litro con acqua milliQ. Il terreno è stato sterilizzato per filtrazione (filtri Millipore da 0.22 µm) e conservato a 4°C.

Soluzione fisiologica tamponata

In un litro di acqua milliQ sono stati sciolti 1.2 g di Na_2HPO_4 (BAKER), 0.22 g di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (BAKER) e 8.5 g di NaCl (BAKER); la soluzione, sterilizzata in autoclave, è conservata a temperatura ambiente.

Tampone Na-fosfato 10 mM, pH 7.4

Il tampone fosfato 10 mM, pH 7.4 è stato preparato sciogliendo 1.38 g di NaH_2PO_4 in acqua milliQ; la soluzione è stata poi portata a pH 7.4 con NaOH 5 M e a volume con acqua milliQ. La sterilizzazione è stata effettuata per filtrazione (filtri Millipore da 0.22 μm). Il tampone può essere conservato a temperatura ambiente.

2.2 Colture di cellule batteriche

Isolamento su terreno solido

Le cellule batteriche sono state strisciate con ansa sterile su capsule Petri contenenti MH solido e incubate a 37°C overnight, per permettere la formazione di colonie visibili. Gli isolamenti così ottenuti possono essere conservati per qualche settimana a 4°C.

Preparazione delle sospensioni batteriche

Le sospensioni cellulari sono state preparate stemperando in 5 ml di brodo MH sterile alcune colonie prelevate con ansa sterile dall'isolamento su piastra, e incubando overnight a 37°C. Per i saggi si utilizzano sospensioni batteriche in fase logaritmica: pertanto, 300 μl di una coltura overnight vengono seminati in 15 ml di brodo MH e fatti crescere per 90-120 min in bagno termostato a 37°C.

Curve di crescita batterica

La densità batterica, espressa come numero di Unità Formanti Colonie (CFU) per ml, viene calcolata misurando la densità ottica a 600 nm della sospensione in fase logaritmica; tale valore letto allo spettrofotometro viene quindi confrontato con quello ottenuto da una curva di taratura precedentemente determinata per lo stesso ceppo.

La curva di taratura si ottiene dopo misurazione a 600 nm della densità ottica di una sospensione in fase logaritmica di crescita, che viene poi opportunamente diluita e seminata su terreno solido per valutare il numero di CFU che si formano dopo incubazione overnight.

2.3 Colture di cellule fungine

Semina su terreno solido

I funghi lievitiforimi (es. *Candida* e *Cryptococcus*) sono stati seminati su capsule Petri contenenti terreno Sabouraud solido ed incubati a 30°C per 48 ore (tempo necessario alla formazione di colonie visibili). I funghi filamentosi (es. *Aspergillus*) sono stati seminati su becchi di clarino di Sabouraud solido ed incubati a 30°C per circa 7 giorni. Le colture così ottenute possono essere conservate per qualche settimana a 4°C.

Sospensioni cellulari

Le sospensioni fungine sono state preparate stemperando in 5 ml di soluzione fisiologica tamponata sterile 4 o 5 colonie di circa 1 mm di diametro, prelevate con ansa sterile dall'isolamento su piastra dopo 48 ore di incubazione a 30°C. Le sospensioni di funghi filamentosi sono state ottenute dopo aggiunta di 3 ml di soluzione fisiologica tamponata direttamente nei becchi di clarino.

Curve di crescita fungina

L'assorbanza di una sospensione di ciascuno dei ceppi fungini utilizzati è stata misurata allo spettrofotometro a 600 nm. Le letture così ricavate sono state messe in relazione con il numero di unità formanti colonie per ml (CFU/ml) ottenuto dopo semina su piastra di opportune diluizioni delle stesse sospensioni.

Per ogni ceppo quindi, dopo lettura dell'assorbanza a 600 nm, è possibile ricavare il numero di cellule per ml, che saranno diluite in modo appropriato per il saggio.

2.4 Ceppi batterici e fungini utilizzati

I ceppi batterici di *E. coli*, *Salmonella* serovar *enteritidis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium* usati in questo studio sono stati isolati dall'ospedale di Cattinara di Trieste e ci sono stati gentilmente forniti dal prof. E. Tonin; si ringrazia poi la dott.ssa P. Cescutti del Dip. BBCM (Università di TS) per i ceppi di *Klebsiella pneumoniae*, e la dott.ssa C. Lagatolla del Dip. di Sc. Biomediche (Università di TS) per i ceppi di *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa*, alcuni dei quali provenienti da soggetti con fibrosi cistica. Il ceppo capsulato di *E. coli* O18:K1:H7 Bort, isolato da un caso di meningite neonatale, ci è stato gentilmente fornito dal dott. P. Abraham del Dept. of Experimental Internal Medicine dell'Università di Amsterdam.

Di tutti i ceppi batterici considerati è noto l'antibiogramma.

I ceppi fungini usati per la valutazione dell'attività antimicotica dei peptidi ci sono stati forniti dal prof. P. De Paoli del Centro di Riferimento Oncologico di Aviano e dal prof. A. Cassone dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma, e comprendono 10 specie di *Candida* (*albicans*, *glabrata*, *parapsilosis*, *humicola*, *tropicalis*, *famata*, *krusei*, *lusitaniae* *guillermondii*, *dublinsiensis*), *Cryptococcus neoformans*, *Pichia etchellsii* e *carsonii*, *Rhodotorula rubra*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp e *Kloeckera apis*. Dall'American Type Culture Collection (ATCC) sono stati acquistati alcuni ceppi usati come riferimento per il dosaggio dell'attività antifungina nei laboratori di Microbiologia clinica.

3.1 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Per determinare la Minima Concentrazione Inibente (MIC), corrispondente alla concentrazione minima alla quale il peptide è in grado di inibire la crescita microbica, è stato eseguito il “Broth Microdilution Susceptibility Test” secondo le linee guida suggerite dal National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Per questo tipo di saggio si utilizzano piastre per micrometodo sterili a 96 pozzetti.

A partire dal secondo pozzetto di ogni fila, sono stati dispensati 50 µl del terreno opportuno, mentre nel primo pozzetto di ogni fila ne è stata messa una quantità pari a $100-x$ µl, dove x corrisponde ai microlitri del peptide da saggiare, aggiunti in modo da ottenere una concentrazione doppia rispetto al valore finale desiderato. Sono state successivamente eseguite delle diluizioni seriali prelevando 50 µl di soluzione dal primo pozzetto e portandoli nel secondo, dove sono stati mescolati al terreno già presente, poi dal secondo al terzo e così via per tutti i pozzetti fino al penultimo. L'ultimo pozzetto di ogni fila, non contenente peptide, funge così da controllo positivo di crescita. Ad ogni pozzetto sono stati poi aggiunti 50 µl di sospensione batterica o fungina, in modo che la densità finale in ogni pozzetto risulti pari, rispettivamente, a circa 2.5×10^5 cellule/ml per i batteri e 5×10^4 cellule/ml per i funghi. Per verificare la densità cellulare, un'aliquota della sospensione aggiunta è stata opportunamente diluita e piastrata per il successivo conteggio delle unità formanti colonie (CFU).

Le piastre per micrometodo così allestite sono state incubate in termostato a 37°C per consentire la crescita batterica, e a 30°C per quella fungina, entrambe rilevabili visivamente come torbidità del terreno o come presenza di un fondello nel pozzetto. Il valore di MIC, corrispondente all'ultimo pozzetto limpido, indica la concentrazione più bassa di peptide in grado di inibire la crescita dei microrganismi.

I saggi di MIC in presenza degli esopolisaccaridi sono stati effettuati sciogliendo i polimeri direttamente nel terreno, in modo da averli nel pozzetto alla concentrazione finale desiderata.

3.2 Cinetica di uccisione (“Time killing”)

Per valutare la cinetica di uccisione delle cellule da parte dei peptidi, sono stati allestiti saggi di “time killing”.

Cinquanta μl di sospensione, alla concentrazione di 5×10^5 cellule/ml per i batteri e 1.5×10^5 cellule/ml per i funghi, sono stati aggiunti in provette tipo Eppendorf contenenti già $100-x \mu\text{l}$ del terreno opportuno e $x \mu\text{l}$ di peptide ($x=0$ per i controlli). Le provette sono state quindi incubate a 37°C (o 30°C per i miceti) in bagno termostato; allo scadere dei tempi prestabiliti, da ciascuna provetta, sono stati prelevati $30 \mu\text{l}$ per eseguire le diluizioni seriali in soluzione fisiologica tamponata, necessarie per la semina su piastra. Le conte vitali dei batteri sono state effettuate dopo incubazione overnight delle capsule Petri a 37°C , mentre quelle dei funghi dopo 48 ore di incubazione a 30°C . In base ai valori ottenuti, si può risalire alla concentrazione cellulare per ml in ogni prova, dopo i diversi tempi d'incubazione delle cellule con il peptide.

3.3 Selezione di mutanti resistenti

Per selezionare eventuali mutanti resistenti all'azione dei peptidi, sono stati utilizzati un ceppo meticillina-resistente di *S. aureus*, un ceppo di *P. aeruginosa*, entrambi trattati con SMAP-29, e il ceppo ML-35 di *E. coli* trattato con Bac7(1-35). I ceppi batterici sono stati trattati in parallelo con antibiotici convenzionali, eritromicina e norfloxacina per *S. aureus*, gentamicina e norfloxacina per *P. aeruginosa*, e streptomicina e acido nalidixico per *E. coli*.

La prova è stata eseguita come un normale saggio di MIC (vedi paragrafo 3.1 di Materiali e Metodi), in cui i batteri inoculati derivavano dal pozzetto corrispondente a $\frac{1}{2}$ della MIC fatti crescere per 2 ore in bagno termostato a 37°C , per raggiungere la fase logaritmica di crescita, prima di eseguire un nuovo saggio di MIC. L'operazione è stata ripetuta per 20 giorni consecutivi, ed i valori di MIC per i peptidi e gli antibiotici usati come controllo, sono stati registrati giorno per giorno, al fine di verificare un eventuale aumento nel loro valore, indice della comparsa di mutanti resistenti.

3.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

L'effetto dei peptidi antimicrobici sulla morfologia delle cellule è stato valutato tramite l'osservazione al microscopio elettronico a scansione (Leica Stereoscan 430i).

Quindici ml di coltura in fase logaritmica di crescita sono stati centrifugati a $1000 \times g$ per 10 min, il surnatante è stato eliminato ed il pellet risospeso in 10 ml di tampone Nafosfati 10 mM pH 7.4 con 100 mM NaCl e 5 mM glucosio. Dopo una successiva centrifugazione per 10 min a $1000 \times g$, il pellet risultante è stato risospeso in 1.5 ml

dello stesso tampone per procedere poi alla lettura spettrofotometrica a 600 nm dalla quale è stata ricavata la densità cellulare.

Una sospensione di 3×10^7 cellule/ml nel tampone con MH all'1% è stata incubata per il tempo voluto a 37° C in assenza/presenza del peptide. Dopo incubazione, le sospensioni sono state fissate in provetta con un egual volume di fissativo, composto da tampone Na-fosfato 0.2 M pH 7.4 e glutaraldeide al 5% (vol/vol). Dopo fissazione overnight a 4°C, ciascun campione è stato filtrato per aspirazione su un filtro Isopore (pori da 0.2 μm) e lavato per tre volte con tampone Na-fosfato 0.1 M pH 7.4 per eliminare la glutaraldeide. I filtri sono stati poi trattati per 60 min a 4°C con tetrossido di osmio all'1%, quindi estesamente lavati con tampone Na-fosfato 0.1 M pH 7.4 contenente 5% saccarosio e successivamente con acqua bidistillata per eliminare il saccarosio ed i sali. Per la disidratazione, i campioni sono stati sottoposti alla seguente serie di lavaggi:

- 3 lavaggi da 5 min con etanolo al 50% (vol/vol);
- 3 lavaggi da 7 min con etanolo al 70% (vol/vol);
- 3 lavaggi da 8 min con etanolo al 96% (vol/vol);
- 3 lavaggi da 10 min con etanolo assoluto.

Per l'adesione delle cellule fungine sono stati utilizzati dei vetrini coprioggetto polilisinati del diametro di 11 mm. E' stata preparata una soluzione stock di polilisina (SIGMA) 5 mg/ml in acqua bidistillata, diluita poi 50x per avere una soluzione 0.1 mg/ml, successivamente filtrata con filtri Millipore da 0.22 μm . I vetrini sono stati immersi per circa 90 min in questa soluzione dopo averli lavati, lasciandoli 30 min in xilene, overnight in acetone e 2 ore in etanolo assoluto, asciugati e sterilizzati alla fiamma. L'eccesso di polilisina è stato rimosso mediante lavaggi con acqua bidistillata sterile.

Sospensioni di *C. neoformans* e *C. albicans* in terreno RPMI-1640, alla concentrazione di 20×10^6 cellule/ml, sono state incubate in bagno termostato a 30°C rispettivamente per 60 min con SMAP-29 e per 120 min con PG-1 alle concentrazioni desiderate (200-x μl di sospensione + x μl di peptide). Aliquote di entrambe le sospensioni sono state incubate in assenza di peptide come controllo negativo.

Da ciascuna sospensione sono stati prelevati 15 μ l, che sono stati depositi su vetrini polilisinati e lasciati a 4°C per circa 2 ore; il liquido in eccesso è stato poi aspirato con carta bibula e sono stati immediatamente aggiunti 15 μ l di glutaraldeide al 4% (vol/vol), diluita in tampone fosfato 0.2 M pH 7.4; il tutto è stato mantenuto a 4°C overnight. I vetrini sono stati sottoposti successivamente a 3 lavaggi con tampone fosfato 0.2 M pH 7.4 per eliminare la glutaraldeide e 2 lavaggi con acqua bidistillata; quindi, per eliminare l'acqua dai campioni, sono stati effettuati i medesimi passaggi nella serie crescente degli alcoli descritta sopra.

I campioni, in etanolo assoluto, sono stati portati alla Sezione di Microscopia Elettronica del Centro Servizi Polivalenti di Ateneo (CSPA) dell'Università di Trieste, dove sono stati sottoposti a punto critico e successiva metallizzazione necessaria per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione. (Si ringrazia per la gentile collaborazione il signor Tito Ubaldini del CSPA.)

3.5 Studio degli effetti del sangue intero, del plasma e del siero sull'attività dei peptidi antimicrobici

Questi esperimenti sono stati compiuti al fine di valutare la possibile inibizione dell'attività antimicrobica dei peptidi da parte di componenti del sangue intero, del plasma e del siero.

Il sangue è stato prelevato con siringa sterile contenente l'appropriata quantità di soluzione anticoagulante ACD (Na-citrato triidrato 22 g/l; acido citrico monoidrato 8 g/l; glucosio monoidrato 24.5 g/l). Il plasma è stato ottenuto mediante centrifugazione del sangue a 1000 x g per 5 min; il siero è stato invece ottenuto centrifugando per 10 min a 500 x g il sangue intero fatto coagulare in provette di vetro per circa un'ora a 37°C.

Per verificare se l'effetto inibitorio del siero fosse correlabile con la sua porzione non lipidica, è stato necessario delipidarlo: la delipidazione è stata effettuata aggiungendo 20 ml di una soluzione contenente butanolo e diisopropiletero in rapporto 40:60 (vol/vol) a 10 ml di siero. La miscela è stata tenuta per 30 min in agitazione a temperatura ambiente e successivamente le fasi separate mediante breve centrifugazione. I lipidi si sono ripartiti nella fase non polare superiore, mentre le proteine e gli altri componenti sono rimasti nella fase limpida inferiore.

I saggi sono stati effettuati seguendo lo stesso protocollo del “time killing”, sostituendo però il terreno con sangue intero, plasma, o siero delipidato e non.

3.6 Studio della tossicità *in vivo* dei peptidi antimicrobici

Per lo studio della tossicità *in vivo* dei peptidi, come pure per gli studi di efficacia terapeutica in modelli di infezione animale, sono stati utilizzati topi inbred Balb/c, in modo da avere individui tra loro geneticamente uguali. I topi erano tutti di sesso maschile, per evitare interferenze dovute agli sbalzi ormonali propri del ciclo femminile.

Gli studi di tossicità sono stati eseguiti iniettando i peptidi in soluzione fisiologica apirogena sia per via intraperitoneale (0.3 ml) sia endovena (0.1 ml). Gruppi di 6-8 topi di circa 20 g sono stati trattati con dosi crescenti di peptide e la loro sopravvivenza comparata a quella di topi trattati allo stesso modo con il solo solvente. Gli animali sono stati nutriti normalmente e seguiti per almeno due settimane. I dati di sopravvivenza alle diverse dosi sono stati utilizzati per ricavare, mediante il diagramma di Litchfield e Wilcoxon, i valori delle concentrazioni di peptide capaci di uccidere il 50% dei topi trattati (LD₅₀).

3.7 Studio dell'efficacia terapeutica dei peptidi in modelli animali di infezione

Lo studio è stato effettuato in due fasi:

1. Messa a punto del modello d'infezione mediante la determinazione della concentrazione minima di batteri in grado di uccidere, in un tempo relativamente breve, oltre il 90% dei topi trattati;
2. Inoculo di una dose batterica letale e trattamento con il peptide, al fine di valutarne l'effetto terapeutico. Gli inoculi sono stati eseguiti in modo sequenziale, prima è stata iniettata la soluzione con i batteri, poi quella con il peptide.

L'efficacia terapeutica *in vivo* dei peptidi è stata saggiata sia in modelli di peritonite acuta provocata per iniezione intraperitoneale, sia in modelli di infezione sistemica (batteriemia) indotta dall'inoculo intravena dei batteri. Questa è stata determinata comparando la sopravvivenza dei topi trattati con batteri e peptide rispetto a quelli trattati con i soli batteri.

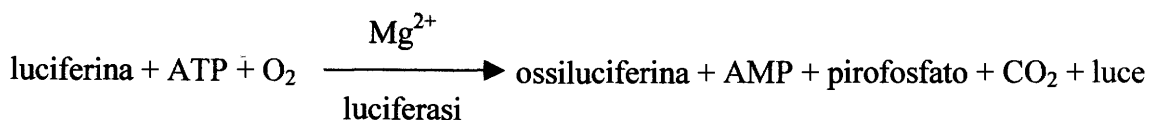
Per questi esperimenti sono stati usati i seguenti ceppi batterici: il ceppo O18:K1:H7 Bort di *E. coli*, il ceppo ATCC 27853 di *P. aeruginosa*, ed un ceppo meticillina-resistente di *S. aureus*. In ogni esperimento, un gruppo di topi è stato trattato solo con fisiologica per verificarne l'assenza di effetti sugli animali.

Per le prove di infezione sistemica, è stato anche effettuato un'esperimento con il ceppo *E. coli* O18:K1:H7 Bort nel quale la sospensione batterica ed il peptide sono stati preincubati per 60 min a 37° C prima dell'iniezione nella vena caudale, per motivi che saranno spiegati nella sezione Risultati e Discussione (paragrafo 2.7).

3.8 Dosaggio dell'ATP intra- ed extracellulare

La concentrazione di ATP intracellulare è un buon indice della vitalità di una cellula. Il dosaggio dell'ATP presente all'interno e all'esterno delle cellule, dopo diversi tempi di trattamento con peptidi a differenti concentrazioni, consente pertanto di valutare un'eventuale azione permeabilizzante dei peptidi sulle membrane e l'entità e la rapidità con cui essa avviene.

Per questi esperimenti è stato utilizzato un kit per la determinazione dell'ATP (Molecular Probes) basato sull'azione della luciferasi sulla luciferina in presenza di ATP:



Sulla base dell'emissione di luminescenza registrata è possibile valutare la quantità di ATP contenuta nel campione analizzato, utilizzando una curva standard ottenuta con quantità note di ATP.

Sono stati preparati 5 ml di soluzione standard di reazione (RSS) con la seguente composizione:

- 4.15 ml di acqua milliQ;
- 0.25 ml di tampone di reazione 20x (500 mM tampone tricina pH 7.8, 100 mM MgSO₄, 2 mM EDTA e 2 mM sodio azide); 0.1 ml di ditiotreitolo (DTT) 100 mM;
- 0.5 ml di luciferina 10 mM;

- 2.5 µl di luciferasi 5 mg/ml in 25 mM Tris-acetato pH 7.8, 0.2 mM ammonio solfato, 15% glicerolo (vol/vol) e 30% etilen-glicole (vol/vol).

Una sospensione fungina in RPMI-1640 (1×10^6 cellule/ml) è stata incubata in bagno termostato a 30°C per 5, 10, 20 e 40 min con SMAP-29 per *C. neoformans* e per 10, 20 e 60 min con PG-1 per *C. albicans* (300-x µl di sospensione + x µl di peptide, in modo da ottenerne la concentrazione finale desiderata; nei controlli x=0). Al termine di ogni incubazione è stata prelevata un'aliquota da ciascuna sospensione per valutare il numero di cellule mediante semina su piastre di Sabouraud. La sospensione cellulare rimasta è stata centrifugata a 5000 x g per 5 min e 50 µl del surnatante raccolto (contenente l'eventuale ATP extracellulare) sono stati aggiunti a 450 µl di tampone 50 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7.8 (TE) bollente. Le provette sono state fatte bollire ulteriormente per circa 3 min e conservate poi in ghiaccio. Dopo l'eliminazione del surnatante, il sedimento cellulare è stato immediatamente congelato immergendo le provette in azoto liquido. Successivamente sono stati aggiunti 1.2 ml di tampone TE bollente. Dopo altri 5 min di bollitura e 5 min di centrifugazione a 5000 x g, il surnatante (contenente l'ATP intracellulare) è stato recuperato e conservato in ghiaccio. Prima di analizzare i campioni così preparati, è stata costruita una retta di taratura misurando con un luminometro (Lumat LB 9501 – Berthold) l'emissione di soluzioni contenenti quantità note di ATP, al fine di verificare l'intervallo di linearità del saggio. Le misurazioni sono state effettuate aggiungendo 50 µl di RSS a 50-x µl di TE + x µl di ATP per la curva di taratura, e a 50 µl di campione per la valutazione dell'ATP intra- ed extracellulare. Per poter eliminare la luminescenza di fondo, è stata misurata l'emissione della RSS (50 µl) in presenza o assenza del mezzo in cui si trovava il campione: 50 µl di TE per la retta di taratura e la misurazione dell'ATP intracellulare, 45 µl di TE + 5 µl di RPMI-1640 per l'ATP extracellulare. La percentuale di ATP rilasciato nel mezzo dopo trattamento con il peptide è stata calcolata nel seguente modo:

$$\frac{E-e}{I} \times 100$$

dove E è la quantità di ATP extracellulare dopo trattamento, e l'ATP extracellulare nei controlli e I il contenuto totale di ATP intracellulare.

3.9 Saggio di permeabilizzazione della membrana interna di *E. coli* ML-35

La capacità dei peptidi antimicrobici di permeabilizzare le membrane biologiche è stata valutata mediante un saggio di permeabilizzazione della membrana interna del ceppo mutante ML-35 di *E. coli*. Questo ceppo, infatti, presenta due mutazioni a livello dell'operone inducibile Lac i cui geni codificano per proteine implicate nel metabolismo del lattosio. Una di queste mutazioni fa sì che il gene *z*, che codifica per l'enzima citosolico β -galattosidasi, sia espresso costitutivamente, l'altra fa sì che il gene *y*, che codifica per la lattosio-permeasi della membrana interna, non sia espresso. In questo ceppo, pertanto, il lattosio e i suoi analoghi β -galattosidici non possono essere traslocati dall'ambiente esterno al citosol, a meno che non avvengano alterazioni della permeabilità della membrana interna (Fig. 12). Tutto ciò può essere sfruttato in un saggio che impieghi un substrato cromogenico non permeante della β -galattosidasi. Quando la membrana batterica è integra, il substrato non entra e non viene in contatto con la β -galattosidasi citoplasmatica, quindi non si ha sviluppo di colore. Viceversa, se la membrana viene permeabilizzata, il substrato penetra nel citoplasma e l'azione della β -galattosidasi porta alla liberazione del cromoforo, che può essere seguita per via spettrofotometrica ad un'opportuna lunghezza d'onda.

Nel saggio di permeabilizzazione indotta dai peptidi su *E. coli* ML-35 è stato utilizzato come substrato cromogenico l'*o*-nitrofenil- β -D-galattopiranoside (ONPG), normalmente non permeante, da cui si libera, per azione della β -galattosidasi, l'*o*-nitrofenolo che assorbe a 405 nm.

I batteri utilizzati, ottenuti come precedentemente descritto (paragrafo 2.2 di Materiali e Metodi), sono stati centrifugati a 1000 x g per 10 min e il pellet è stato risospeso in 15 ml di tampone Na-fosfati 10 mM, pH 7.4 contenente 100 mM NaCl e 5 mM glucosio. Dopo lettura a 600 nm, la sospensione è stata diluita fino ad una concentrazione di 1×10^8 CFU/ml. Ottanta μ l di questa sospensione sono stati aggiunti a 680-x μ l di tampone in presenza/assenza di un'opportuna concentrazione di esopolisaccaride, x μ l di peptide e 40 μ l di ONPG 30 mM (il peptide deve essere aggiunto per ultimo). Le letture sono state eseguite a 405 nm, in cuvette di plastica termostatate a 37 °C, dopo tempi diversi d'incubazione.

E. coli ML-35

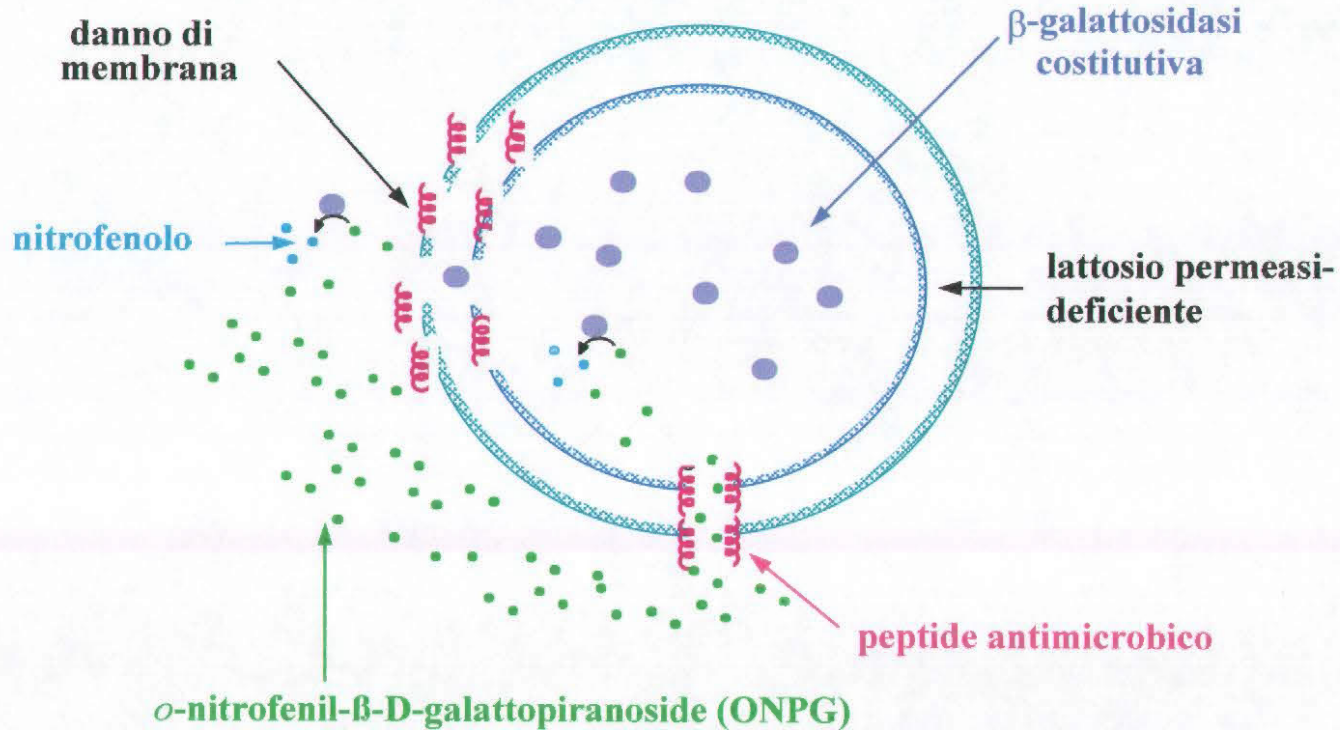


Fig. 12 - Permeabilizzazione della membrana interna di *E. coli* ML-35. Solo un danno di membrana consente di evidenziare l'attività della β -galattosidasi citoplasmatica, costitutivamente espressa, sul substrato cromogenico ONPG, normalmente non permeante a causa di un deficit della lattosio permeasi.

3.10 Studio dell'effetto della preincubazione dei peptidi con esopolisaccaridi

L'effetto della preincubazione degli esopolisaccaridi di *B. cepacia* con i peptidi è stato valutato tramite dei saggi in cui essi, aggiunti al terreno di coltura alla concentrazione di 1 mg/ml, sono stati preincubati a 37°C per 60 min con SMAP-29 (0.5 µM) o PG-1 (2 µM), o per 120 min con LL-37 (5 µM). Le sospensioni batteriche, aggiunte allo scadere della preincubazione, sono state preparate alla concentrazione di 5×10^5 CFU/ml, rispettivamente in brodo MH per i saggi con SMAP-29 e PG-1, e in 20% TSB per quelli con LL-37.

Parallelamente, sono state allestite delle prove di controllo in cui il peptide e la sospensione cellulare sono stati aggiunti contemporaneamente. Da tutte le prove, dopo 60 min di incubazione a 37 °C, sono stati prelevati 30 µl per eseguire le diluizioni seriali in soluzione fisiologica tamponata, necessarie per il conteggio delle colonie formatesi dopo incubazione overnight delle capsule Petri a 37°C.

3.11 Dicroismo circolare

Gli spettri di dicroismo circolare sono stati registrati mediante uno spettropolarimetro monoraggio Jasco J-710, fornito di un software in grado di registrare ed elaborare i dati. Le misure sono state effettuate nell'intervallo di lunghezza d'onda compreso tra 190 e 270 nm, impiegando delle celle in quarzo con cammino ottico di 1 cm.

Gli spettri sono stati registrati sia in acqua sia in tampone fosfato 5 mM pH 7.4, ad una concentrazione di peptide pari a 1.3×10^{-2} mM per SMAP-29, a 1×10^{-2} mM per PG-1 e a 2×10^{-2} mM per LL-37, in presenza di concentrazioni crescenti di esopolisaccaride fino ad un rapporto peptide-polisaccaride 1:1.5, rapporto calcolato per residuo aminoacidico e per unità saccaridica.

I dati ottenuti sono stati espressi in termini di ellitticità molare $[\theta]$ ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$). Il contenuto in α -elica del peptide è stato stimato usando l'equazione semi empirica $([\theta]) / [\theta]_{\alpha}$, dove $[\theta]$ è l'ellitticità molare per residuo, misurata per il peptide a 222 nm e $[\theta]_{\alpha}$ è l'ellitticità molare per residuo misurata per un peptide completamente ad α -elica ed è data da $-40000(1 - 2.5/n)$, dove n è il numero di residui del peptide [Juban et al., 1997].

La registrazione degli spettri e la loro elaborazione è stata eseguita in collaborazione con il dott. Herasimenka del gruppo del prof. Rizzo, presso il Dip. BBCM dell'Università di Trieste.

RISULTATI E DISCUSSIONE

- Cap. 1 Peptidi antimicrobici
- Cap. 2 Attività antibatterica
- Cap. 3 Attività antifungina
- Cap. 4 Effetto di esopolisaccaridi batterici
- Cap. 5 Studio di mutanti resistenti

1.1 Peptidi utilizzati

Negli esperimenti eseguiti per questa tesi è stata studiata l'attività di peptidi antimicrobici, sia derivati da catelicidine sia appartenenti alla famiglia delle defensine. In particolare, sono stati scelti, tra i peptidi derivati dalle catelicidine:

- ❖ SMAP-29 (da pecora), BMAP-27 e BMAP-28 (da bovino), LL-37 (umano) e il suo frammento LL-37(7-37), come rappresentanti dei peptidi ad α -elica anfipatica (Fig. 13);
- ❖ PG-1, di derivazione suina, come appartenente alla classe dei peptidi con due ponti disolfuro e struttura a forcina con “ β -turn” (Fig. 14);
- ❖ Bac7(1-35) e (1-16), frammenti di Bac7, di origine bovina e appartenente alla classe dei peptidi lineari ricchi in prolina e arginina;
- ❖ INDOLICIDINA, di origine bovina, appartenente alla classe dei peptidi lineari ricchi in triptofano;

tra i peptidi appartenenti alla famiglia delle defensine:

- ❖ hBD-1 e hBD-3, di origine umana, con tre ponti disolfuro e struttura a β -foglietto.

Alcuni di questi peptidi, le cui sequenze amminoacidiche sono riportate in Fig. 15, hanno dimostrato di avere una buona attività antibatterica contro ceppi sia Gram-positivi che Gram-negativi [Travis et al., 2000; Gennaro e Zanetti, 2000; Turner et al., 1998; Kalfa et al., 2001; Saiman et al., 2001; Skerlavaj et al., 1999; Lehrer e Ganz, 2002a].

1.2 Sintesi chimica di LL-37 e del suo frammento 7-37

I peptidi utilizzati in questo studio sono stati tutti sintetizzati chimicamente, come riportato nel paragrafo 1.1 di Materiali e Metodi. Come esempio descrivo ora in dettaglio il risultato della sintesi di LL-37 e del suo frammento 7-37.

Il protocollo di sintesi è stato allestito dopo aver analizzato la difficoltà di ciascun accoppiamento mediante il programma “Peptide Companion”, che elabora una rappresentazione grafica del potenziale di aggregazione del peptide, sulla base della

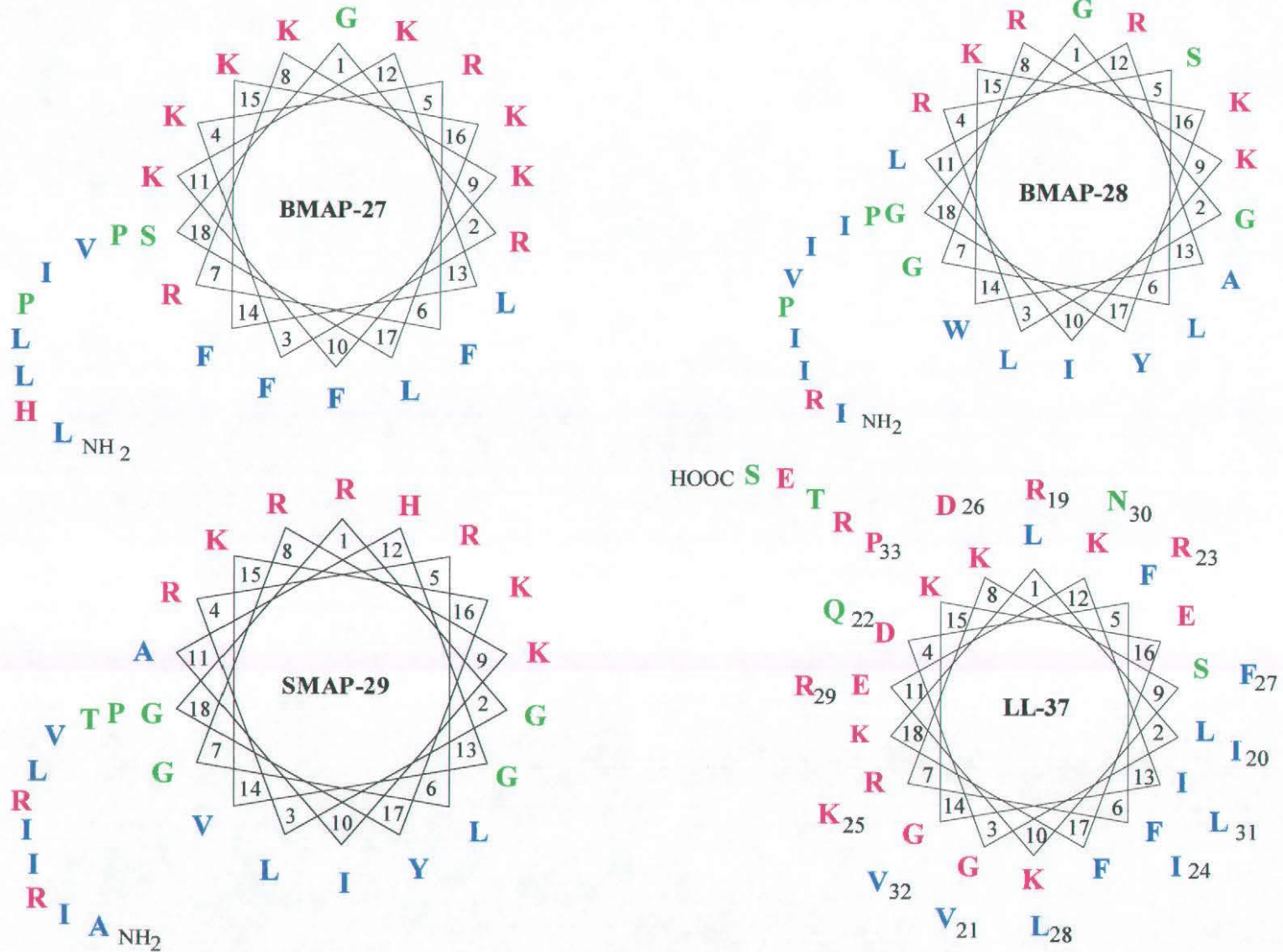


Fig. 13 - Proiezioni “helical wheel” di BMAP-27, BMAP-28, SMAP-29 e LL-37. In blu sono indicati i residui idrofobici, in fucsia quelli carichi e in verde quelli neutri idrofilici o ambigui.

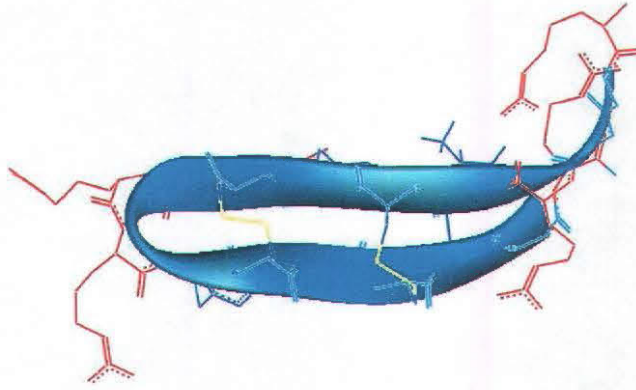


Fig. 14 - Struttura della PG-1: la regione idrofobica è rappresentata in blu, quella idrofila in rosso e i ponti disolfuro in giallo. (tratto dal sito:<http://www.rcsb.org/pdb/>)

SMAP-29: RGLRRLGRKIAHGVKKYGPTVLRIRIA-am

EMAP-27: GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLELHL-am

EMAP-28: GGLRSLGRKILRAWKKYGPIIVPIIRI-am

LL-37: LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES

PG-1: RGGRLC**Y**C**R**R**R**F**C**V**C**VGR-am

Bac7 (1-35): RRIRPRPPRLPPRPPRPLPFPRPGPRPIPRPLPFP

Indolicidina: ILPWKWPWWPWR-am

hBD-1: DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKA-KCCK

hBD-3: GIINTLQKYCRVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSRGRKCCRKK

Fig. 15 - Sequenze amminoacidiche dei peptidi antimicrobici usati in questo studio. In blu sono indicati i residui idrofobici, in fucsia quelli carichi, in verde quelli neutri idrofilici o ambigui e in nero le cisteine con le loro connettività.

sequenza amminoacidica introdotta dall'operatore. Gli accoppiamenti facilmente eseguibili mostrano un potenziale inferiore a 0.9, mentre quelli difficili hanno valori superiori a 1.1. Un potenziale di aggregazione elevato indica la tendenza dei residui a formare legami inter- ed intramolecolari, che possono nascondere il gruppo N-terminale del peptide crescente, rendendolo meno accessibile al gruppo carbossilico dell'amminoacido entrante. Questo avviene soprattutto in presenza di residui amminoacidici idrofobici particolarmente voluminosi, quali valina, leucina, isoleucina e fenilalanina.

Il grafico del potenziale di aggregazione di LL-37 ha segnalato alcuni punti critici (Fig. 16); al fine di rendere più facili tali accoppiamenti, sono stati adottati gli accorgimenti schematizzati nella Tab. 4 ed estesamente descritti nel paragrafo 1.1 di Materiali e Metodi. La sintesi è stata suddivisa in due parti; al termine della prima parte, 1/3 della resina è stato prelevato per il successivo taglio del frammento 7-37, mentre i restanti 2/3 di resina sono stati utilizzati per il completamento della sintesi di LL-37.

Le rese sono state molto buone; la quantità di materiale grezzo ottenuto rispetto alla resa teorica è stata di circa il 90% per il frammento 7-37 e dell'80% per il peptide a sequenza completa.

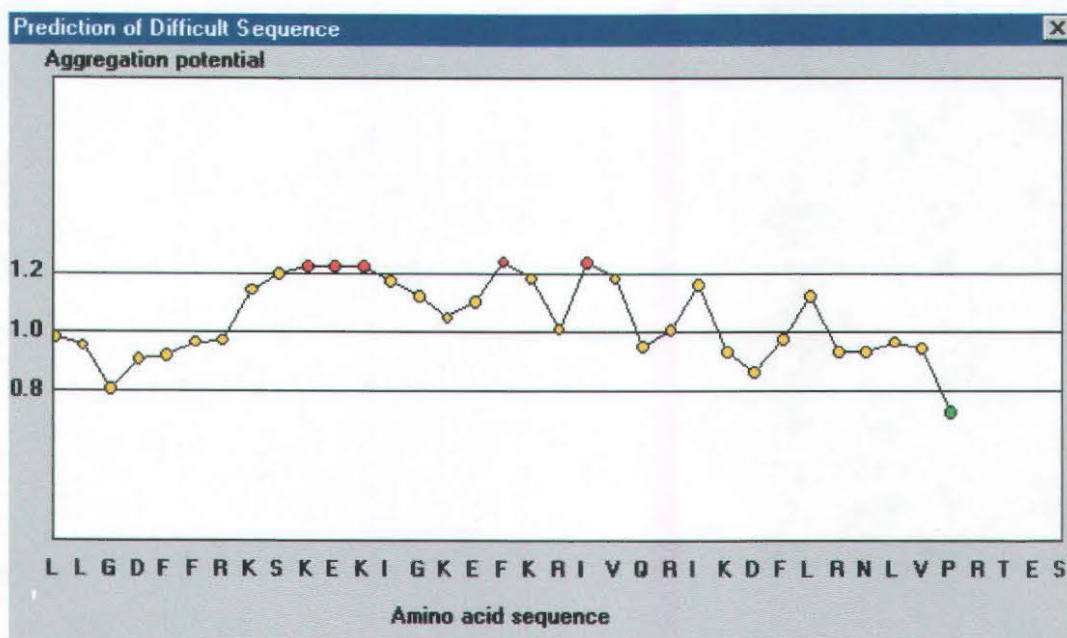


Fig. 16 - Predizione di difficoltà di sintesi di LL-37. I punti in rosso indicano gli accoppiamenti difficili.

RESINA	Fmoc-Ser-PEG-PS
ECESSO DI AMMINOACIDO	8 volte
TEMPERATURA DI SINTESI	T _{amb}
ATTIVATORI	HATU e PyBOP per gli accoppiamenti difficili; HOBt/TBTU per tutti gli altri residui
CICLI DI ACCOPPIAMENTO	Cicli di doppio accoppiamento per quasi tutti i residui
ACCORGIMENTI PARTICOLARI	Lavaggio tra un accoppiamento e l'altro con "magic mixture" (1% Triton X-100, 50:50 DMF:NMP, etilencarbonato 2M)

Tab. 4 - Parametri di sintesi di LL-37 e LL-37(7-37).

1.3 Purificazione e caratterizzazione di LL-37 e del suo frammento

Il materiale grezzo di sintesi, il cosiddetto "crude", ottenuto dopo la rimozione di LL-37 e LL-37(7-37) dalla resina, è stato purificato mediante cromatografia liquida ad alta pressione in fase inversa (RP-HPLC).

I tracciati cromatografici relativi alla purificazione di LL-37 e di LL-37(7-37) (Fig. 17 e 18) mostrano la presenza di un picco nettamente predominante, corrispondente al peptide desiderato, attorniato da altri più piccoli. L'eluato raccolto, relativo al picco maggioritario e ad alcuni picchi minori vicini ad esso, è stato centrifugato sottovuoto in Hetovac per eliminare l'acetonitrile, congelato e liofilizzato per la successiva analisi di massa. Quest'ultima, compiuta con uno strumento a ionizzazione electrospray API-1, ha consentito di individuare le frazioni cromatografiche contenenti il peptide di interesse e il suo frammento, che si sono confermate essere quelle corrispondenti ai picchi principali. Nelle Fig. 19 e 20 sono riportati gli spettri di massa di LL-37 e del frammento 7-37, nei quali è possibile riconoscere la serie delle forme ionizzate multiprotonate del peptide e del frammento. L'analisi indica una massa del prodotto di 4492.37 ± 0.52 Da per LL-37 e di 3800.37 ± 0.98 Da per il frammento, che si accordano molto bene con le masse calcolate, rispettivamente pari a 4493.37 Da e 3800.55 Da.

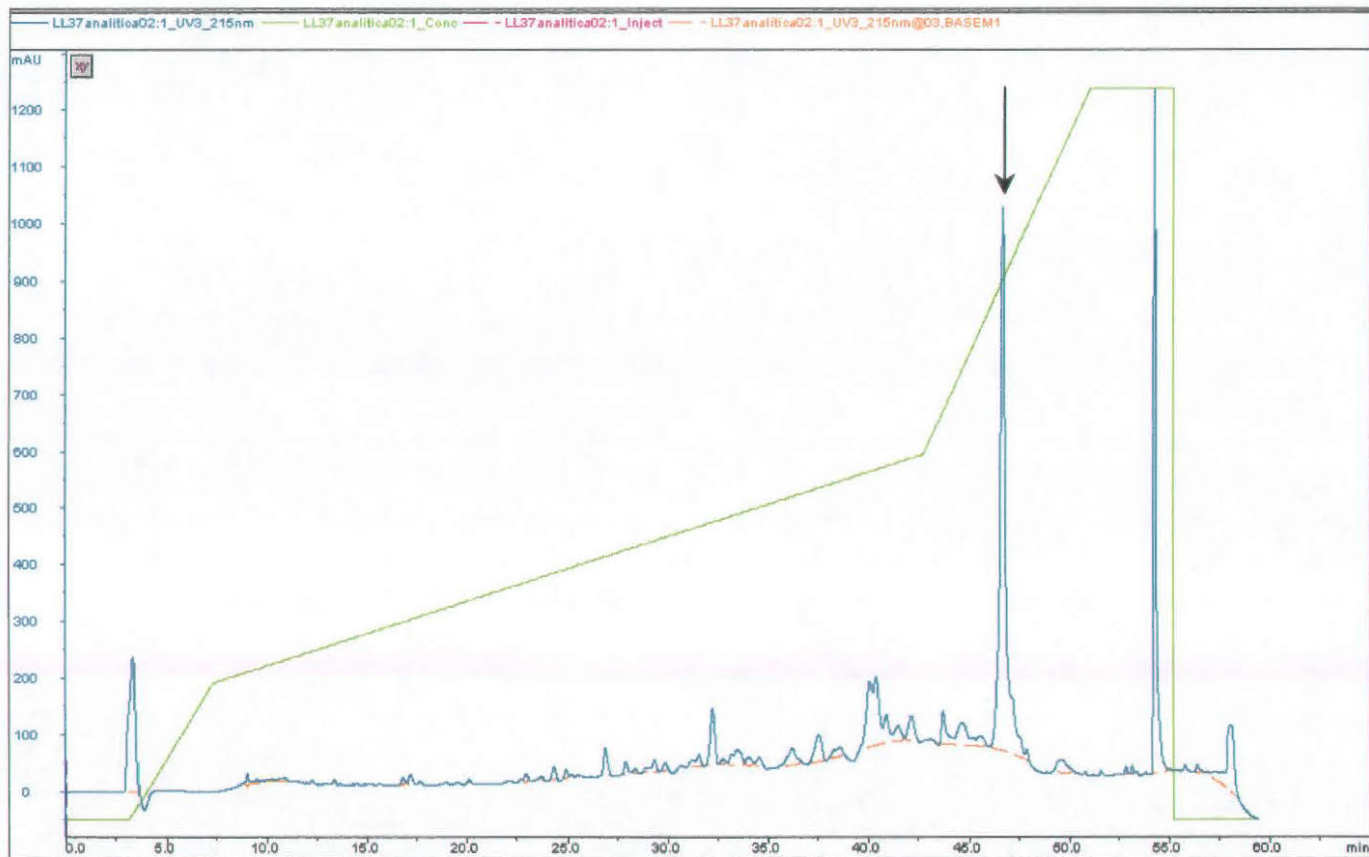


Fig. 17 - Tracciato cromatografico relativo alla purificazione di LL-37 mediante RP-HPLC. L'assorbimento è stato misurato a 215 nm. La freccia indica il picco relativo al peptide d'interesse.

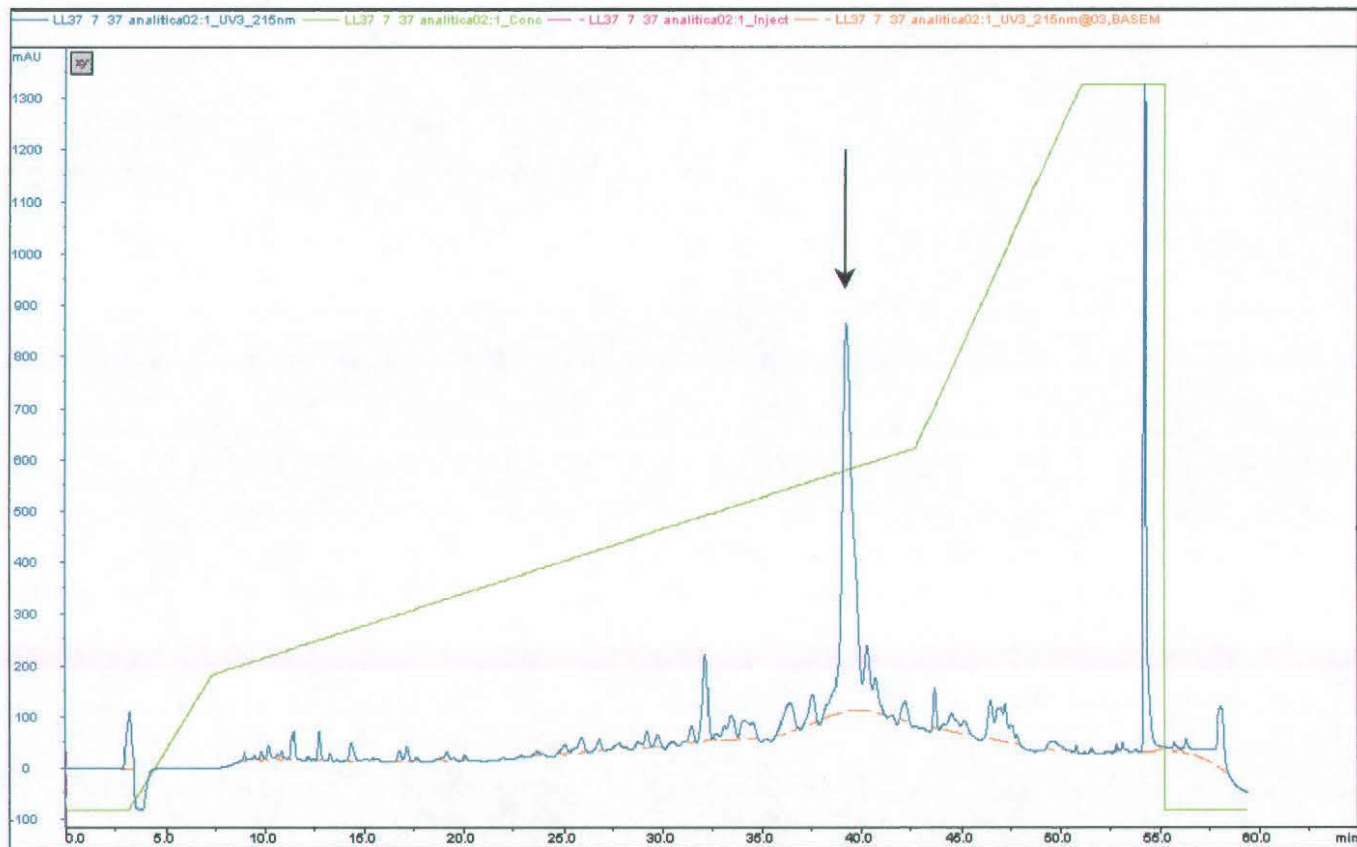


Fig. 18 - Tracciato cromatografico relativo alla purificazione di LL-37(7-37) mediante RP-HPLC. L'assorbimento è stato misurato a 215 nm. La freccia indica il picco relativo al peptide d'interesse.

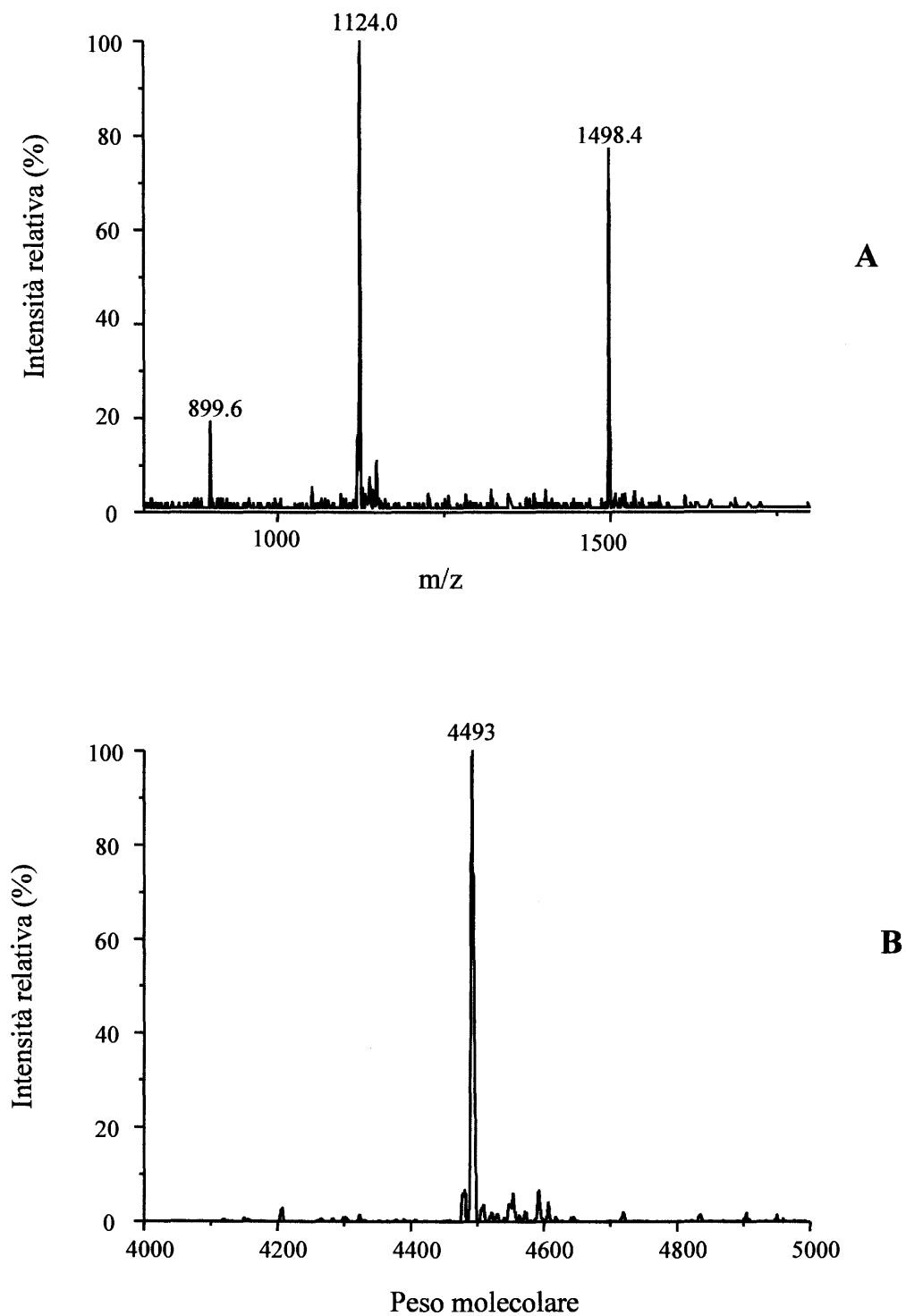


Fig. 19 - Spettro di massa di LL-37 (A) e sua ricostruzione (B). Si possono osservare i picchi con rapporto massa/carica pari a 1498.4, 1124 e 899.6 corrispondenti rispettivamente a ioni del peptide con 3, 4 e 5 cariche.

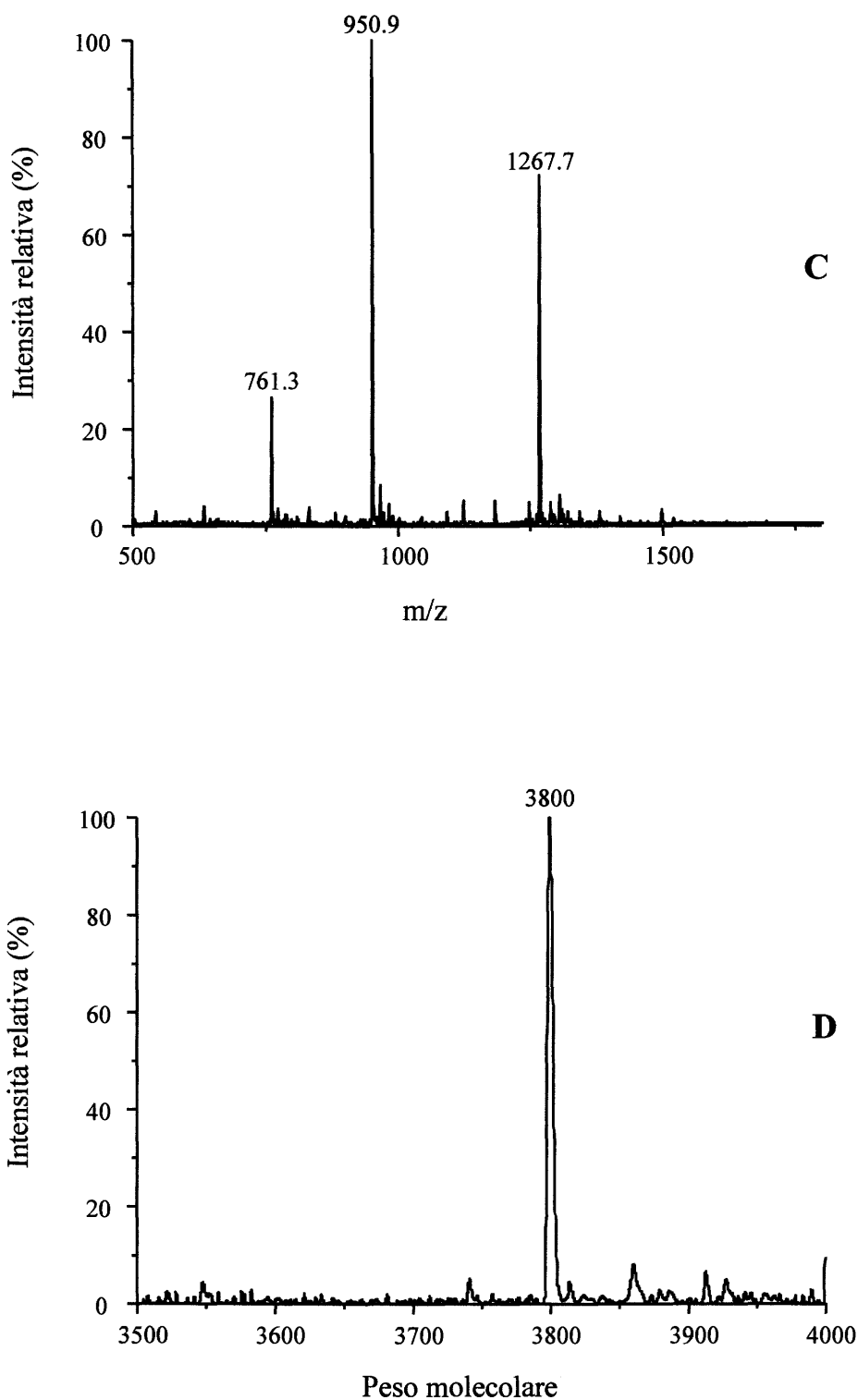


Fig. 20 - Spettro di massa di LL-37(7-37) (C) e sua ricostruzione (D). Si possono osservare i picchi con rapporto massa/carica pari a 1267.7, 950.9 e 761.3 corrispondenti rispettivamente a ioni del peptide con 3, 4 e 5 cariche.

2.1 Valutazione dell'attività antibatterica dei peptidi mediante saggi di Minima Concentrazione Inibente (MIC)

L'attività antibatterica dei peptidi antimicrobici derivati da catelicidine è stata valutata su un ampio spettro di batteri, sia Gram-positivi sia Gram-negativi, tutti di derivazione nosocomiale e molti con antibiotico-resistenza anche multipla.

In primo luogo sono stati allestiti dei saggi di Minima Concentrazione Inibente (MIC), volti a determinare la concentrazione minima di peptide sufficiente ad inibire la crescita batterica. Ad un più basso valore di MIC corrisponde quindi una maggiore efficacia dell'agente antimicrobico in esame.

Dalla Tab. 5 si può notare che SMAP-29 è il peptide più attivo sia verso *S. aureus* sia contro *E. faecalis* presentando, rispettivamente, valori di MIC pari a 0.5-1 μM e 1-2 μM ; PG-1 ha fatto registrare contro entrambe le specie batteriche valori di MIC centrati attorno a 2 μM . BMAP-28 è mediamente attivo contro *S. aureus* (intervallo di MIC 1-4 μM) e verso *E. faecalis* (MIC pari a 4 μM), seguito da BMAP-27, i cui valori di MIC si aggirano attorno al valore di 4 μM per *S. aureus* e di 8-16 μM per *E. faecalis*. In entrambi i casi l'Indolicidina si è dimostrata il peptide meno efficace con valori di MIC più elevati rispetto agli altri peptidi considerati.

Nella Tab. 6, sono riportati i risultati ottenuti su altre specie batteriche Gram-positive, *E. faecium*, *S. epidermidis* e *Streptococcus* spp.: contro *E. faecium* e *S. epidermidis* l'attività antimicrobica migliore è esplicata da SMAP-29, che presenta valori di MIC molto bassi con tutti gli isolati clinici considerati (0.25-0.5 μM). BMAP-28 e PG-1 hanno dimostrato buona efficacia con *E. faecium* (MIC attorno a 1-2 μM), verso il quale risultano invece un po' meno attivi BMAP-27 e Indolicidina.

Anche contro *S. epidermidis*, l'Indolicidina è il peptide con la minor attività antimicrobica, mentre PG-1, BMAP-27 e BMAP-28 presentano un'attività piuttosto elevata (MIC distribuite attorno al valore di 1 μM).

Risultati lievemente diversi sono stati ottenuti con batteri appartenenti al genere *Streptococcus*, con i quali PG-1 è il peptide che ha fornito i valori di MIC più bassi, seguito da SMAP-29 e Indolicidina; meno attivi su questi ceppi si sono rivelati BMAP-28 e BMAP-27.

S. aureus (11 isolati)

		MIC (μM)					
No. di isolati		0.5	1	2	4	8	16
Peptidi	BMAP-27	-	1	-	7	3	-
	BMAP-28	-	5	4	2	-	-
	SMAP-29	7	4	-	-	-	-
	PG-1	1	1	7	2	-	-
	INDOL	-	1	-	5	4	1

E. faecalis (11 isolati)

		MIC (μM)							
No. di isolati		0.5	1	2	4	8	16	32	64
Peptidi	BMAP-27	-	-	-	1	4	3	2	1
	BMAP-28	-	1	1	5	3	1	-	-
	SMAP-29	1	3	6	1	-	-	-	-
	PG-1	1	2	6	1	1	-	-	-
	INDOL	-	-	-	2	1	5	3	-

Tab. 5 - Distribuzione dei valori di MIC di peptidi derivati da catelicidine saggiati su *S. aureus* ed *E. faecalis*. E' riportato il numero di isolati che presentano un dato valore di MIC.

Per quanto riguarda i ceppi Gram-negativi, la Tab. 7 riporta i risultati ottenuti con *S. enteritidis* ed *E. coli*: su entrambe le specie, SMAP-29 e Bac7(1-35) si sono dimostrati i peptidi più efficaci, sebbene qualche ceppo di *E. coli* abbia fatto registrare valori di MIC più elevati per Bac7(1-35). Contro *E. coli*, anche gli altri peptidi saggiati hanno mostrato una buona attività antimicrobica, in particolare PG-1 e BMAP-27 con valori di MIC, rispettivamente, di 0.5-1 μM e 1 μM . Verso *S. enteritidis*, BMAP-27 ha un'elevata attività (MIC pari a 0.5-1 μM), seguito poi da PG-1, BMAP-28 e Indolicidina.

E. faecium (10 isolati)

		MIC (μM)					
No. di isolati		0.5	1	2	4	8	16
Peptidi	BMAP-27	-	-	4	4	-	2
	BMAP-28	-	5	3	2	-	-
	SMAP-29	7	1	2	-	-	-
	PG-1	2	1	3	4	-	-
	INDOL	-	-	2	5	-	3

S. epidermidis (10 isolati)

		MIC (μM)				
No. di isolati		0.25	0.5	1	2	4
Peptidi	BMAP-27	-	1	8	1	-
	BMAP-28	-	1	8	1	-
	SMAP-29	7	3	-	-	-
	PG-1	1	-	9	-	-
	INDOL	-	-	1	8	1

Streptococcus spp. (5 isolati)

		MIC (μM)					
No. di isolati		0.25	0.5	1	2	4	8
Peptidi	BMAP-27	-	-	1	1	2	1
	BMAP-28	-	-	1	-	3	1
	SMAP-29	1	1	3	-	-	-
	PG-1	-	5	-	-	-	-
	INDOL	-	2	2	1	-	-

Tab. 6 - Distribuzione dei valori di MIC di peptidi derivati da catelicidine saggiati su *E. faecium*, *S. epidermidis* e *Streptococcus spp.* (*S. agalactiae* e *S. equinus*). E' riportato il numero di isolati che presentano un dato valore di MIC.

		<i>S. enteritidis</i> (10 isolati)						
		MIC (μM)						
No. di isolati		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8
Peptidi	BMAP-27	-	1	3	6	-	-	-
	BMAP-28	-	-	-	-	-	8	2
	SMAP-29	-	6	4	-	-	-	-
	PG-1	-	-	-	-	2	7	1
	INDOL	-	-	-	-	-	-	10
	Bac 7 (1-35)	7	1	2	-	-	-	-

		<i>E. coli</i> (8 isolati)						
		MIC (μM)						
No. di isolati		0.25	0.5	1	2	4	8	32
Peptidi	BMAP-27	-	3	2	3	-	-	-
	BMAP-28	-	-	1	1	3	3	-
	SMAP-29	6	2	-	-	-	-	-
	PG-1	-	4	4	-	-	-	-
	INDOL	-	-	-	-	5	3	-
	Bac 7 (1-35)	3	1	1	-	-	-	3

Tab. 7 - Distribuzione dei valori di MIC di peptidi derivati da catelicidine saggiati su *S. enteritidis* ed *E. coli*. E' riportato il numero di isolati che presentano un dato valore di MIC.

Dalla Tab. 8 risulta evidente che la miglior attività verso ceppi di *P. aeruginosa* - sia isolati da pazienti con fibrosi cistica (CF) sia non - è quella di SMAP-29 e BMAP-27, con valori di MIC attorno a 0.5-1 μM . PG-1 e BMAP-28 sono mediamente attivi (MIC pari a 2-4 μM), Indolicidina è il peptide meno efficace anche su questa specie batterica (MIC pari a 8-16 μM), mentre Bac7(1-35), la cui efficacia su *P. aeruginosa* è risultata modesta, ha mostrato una notevole dispersione nei valori di MIC negli isolati di *P. aeruginosa* da pazienti CF.

Va comunque sottolineato che non sono state riscontrate variazioni significative nei valori di MIC tra gli isolati CF e non.

P. aeruginosa (11 isolati)

		MIC (μM)						
No. di isolati		0.5	1	2	4	8	16	32
Peptidi	BMAP-27	3	5	3	-	-	-	-
	BMAP-28	-	-	2	7	2	-	-
	SMAP-29	4	5	2	-	-	-	-
	PG-1	-	1	8	2	-	-	-
	INDOL	-	-	-	-	3	4	4
	Bac 7 (1-35)	-	-	1	-	6	2	2

P. aeruginosa (10 isolati da pazienti CF)

		MIC (μM)							
No. di isolati		0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Peptidi	BMAP-27	1	4	4	1	-	-	-	-
	BMAP-28	-	-	-	5	3	2	-	-
	SMAP-29	2	5	1	2	-	-	-	-
	PG-1	-	-	2	-	6	1	1	-
	INDOL	-	-	-	-	1	5	1	3
	Bac 7 (1-35)	-	1	1	2	3	3	-	-

Tab. 8 - Distribuzione dei valori di MIC di peptidi derivati da catelicidine saggiati su *P. aeruginosa* da pazienti CF (in basso) e non (in alto). E' riportato il numero di isolati che presentano un dato valore di MIC.

I risultati ottenuti con *A. baumannii* e *K. pneumoniae* sono riportati in Tab. 9: Bac7(1-35) e SMAP-29 sono i peptidi più attivi con valori di MIC molto bassi su tutti gli isolati considerati (attorno a 0.5 μM); PG-1 ha mostrato un'attività buona verso entrambe le specie (MIC di circa 1 μM), come pure BMAP-27 (MIC pari a 1-2 μM). I peptidi meno efficaci si sono rivelati BMAP-28 e Indolicidina, con valori di MIC attorno a 4 μM .

Un discorso a parte va senza dubbio fatto per *B. cepacia*: contro questa specie nessuno dei peptidi considerati ha mostrato valori di MIC buoni, anche se SMAP-29 è comunque quello che ha dato i risultati migliori. Questo è in totale accordo con la resistenza intrinseca mostrata da questo microrganismo anche nei confronti di antibiotici convenzionali, probabilmente imputabile ad una scarsa permeabilità della membrana esterna [Govan e Deretic, 1996].

A. baumannii (11 isolati)

		MIC (μM)					
No. di isolati		0.25	0.5	1	2	4	8
Peptidi	BMAP-27	-	-	2	9	-	-
	BMAP-28	-	-	-	2	7	2
	SMAP-29	1	5	4	1	-	-
	PG-1	-	2	3	3	3	-
	INDOL	-	-	1	3	5	2
	Bac7(1-35)	-	8	1	1	-	1

K. pneumoniae (12 isolati)

		MIC (μM)					
No. di isolati		0.25	0.5	1	2	4	8
Peptidi	BMAP-27	-	-	7	4	1	-
	BMAP-28	-	-	1	1	8	2
	SMAP-29	7	5	-	-	-	-
	PG-1	-	2	6	3	1	-
	INDOL	-	-	-	2	6	4
	Bac7(1-35)	9	1	2	-	-	-

B. cepacia (9 isolati)

		MIC (μM)			
No. di isolati		8	16	32	>32
Peptidi	BMAP-27	-	3	1	5
	BMAP-28	-	1	3	5
	SMAP-29	1	1	2	5
	PG-1	-	-	2	7
	INDOL	-	-	-	9
	Bac7(1-35)	-	-	-	9

Tab. 9 - Distribuzione dei valori di MIC di peptidi derivati da catelicidine saggiate su *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *B. cepacia*. E' riportato il numero di isolati che presentano un dato valore di MIC.

2.2 Cinetica di uccisione di SMAP-29

I saggi di MIC forniscono dati sull'attività batteriostatica dei peptidi dopo incubazione overnight delle cellule con gli stessi, mentre non danno alcuna indicazione se l'attività è battericida e, nel caso, sulla sua cinetica. Questo è un parametro molto importante per la valutazione dell'efficacia di un agente antimicrobico, in quanto la probabilità di selezionare dei mutanti resistenti è tanto minore quanto più breve è il tempo che esso impiega ad uccidere le cellule bersaglio. Per determinare quindi la cinetica di uccisione dei batteri da parte dei peptidi sono stati allestiti degli esperimenti di "time killing".

Gli esperimenti sono stati condotti con il peptide SMAP-29 che, in generale, ha mostrato valori di MIC più bassi rispetto agli altri peptidi (vedi paragrafo 2.1) [Skerlavaj et al., 1999; Gennaro e Zanetti, 2000], utilizzando il ceppo ML-35 di *E. coli* e un ceppo meticillina-resistente di *S. aureus*, scelti come rappresentanti, rispettivamente, di batteri Gram-negativi e Gram-positivi (Fig. 21). La cinetica di uccisione è stata seguita per 60 min e le concentrazioni di peptide utilizzate corrispondono ai valori di MIC precedentemente determinati.

In questo tipo di saggio i risultati sono letti dopo 16-18 ore, tempo necessario per la comparsa di colonie visibili su piastra, e questo non esclude quindi che il peptide legato alla superficie batterica continui ad agire anche oltre il tempo desiderato. Per ovviare a questo possibile inconveniente, le diluizioni seriali, necessarie per la piastratura dei batteri, sono state fatte in soluzione fisiologica tamponata con alti sali, per impedire l'attacco del peptide ancora libero alla superficie batterica e per rimuovere quello legato in maniera non ancora irreversibile. Gli alti sali sono utilizzati poiché il primo legame dei peptidi alle membrane è di tipo elettrostatico e può essere contrastato da soluzioni saline ad alta forza ionica. Ciò è stato dimostrato per molti peptidi [Gennaro et al, 1989; Turner et al, 1998] ed è stato anche verificato per SMAP-29, conducendo saggi di "time killing" in MH con alti sali (dati non riportati), i quali inibiscono l'uccisione dei batteri da parte dei peptidi.

I risultati riportati in Fig. 21a e 21c indicano che SMAP-29 ha una cinetica di uccisione molto rapida ed è in grado di ridurre il numero di CFU/ml di 3-5 logaritmi già dopo 5 minuti di incubazione, sia con *E. coli* sia con *S. aureus*.

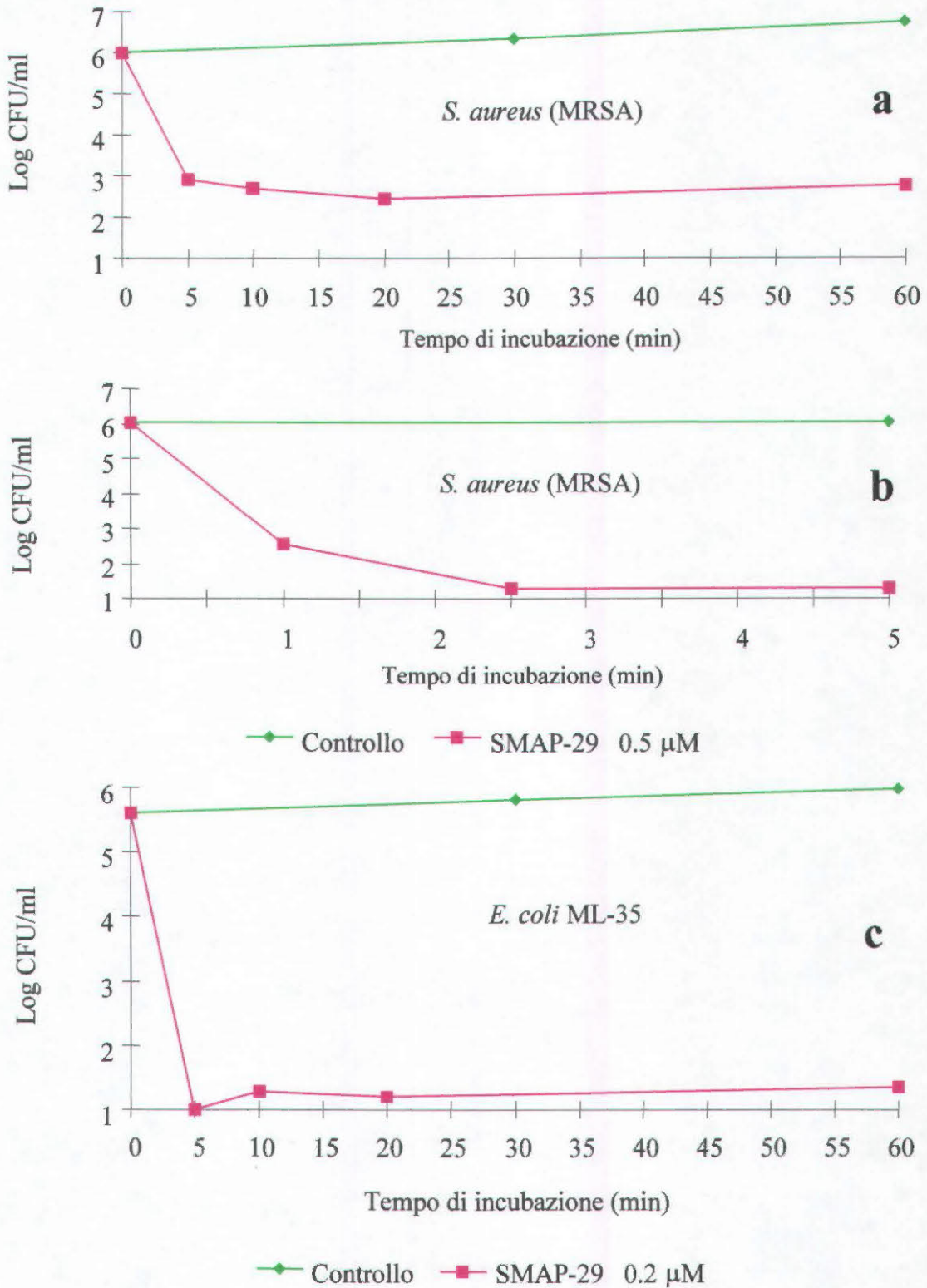


Fig. 21 – Cinetica di uccisione di *S. aureus* ed *E. coli* da parte di SMAP-29. Il saggio è stato allestito in brodo Mueller Hinton. Ai tempi indicati, i batteri sopravvissuti sono stati diluiti in mezzo contenente alti sali (400 mM NaCl + 10 mM MgCl₂) e piastrati per permettere il conteggio delle colonie (CFU).

La cinetica è talmente rapida che sono stati effettuati esperimenti anche con tempi brevissimi di incubazione (Fig. 21b): il peptide sembra quindi legarsi rapidamente e in maniera irreversibile alla superficie del bersaglio, poiché neppure la diluizione in alti sali permette un recupero della vitalità batterica. Questi risultati suggeriscono che, essendo i tempi di uccisione molto rapidi, ci dovrebbero essere scarse probabilità di selezionare mutanti resistenti ai peptidi, a differenza degli antibiotici tradizionali, che spesso agiscono come batteriostatici dando tempo alle mutazioni casuali di determinare la comparsa di cellule resistenti, che vengono poi selezionate in presenza dell'antibiotico.

2.3 Selezione di mutanti resistenti

Come appare evidente dai dati riportati nel paragrafo 2.1, SMAP-29 è risultato il peptide più efficace nei saggi di MIC *in vitro* da me eseguiti. Per questo motivo è stato scelto per eseguire un esperimento volto a selezionare eventuali mutanti resistenti. A tal fine sono stati utilizzati un ceppo meticillina-resistente di *S. aureus* ed un ceppo di *P. aeruginosa*, verso i quali il peptide presenta un valore di MIC pari a 0.5 µM. La prova è stata condotta esponendo entrambi i ceppi, per 20 passaggi seriali (uno al giorno), a concentrazioni di peptide pari a ½ del valore di MIC; parallelamente, i due ceppi batterici sono stati trattati in maniera analoga con antibiotici convenzionali, eritromicina e norfloxacin per *S. aureus* e gentamicina e norfloxacin per *P. aeruginosa*, ed i risultati ottenuti sono riportati in Fig. 22.

Per quel che riguarda *S. aureus* (Fig. 22, in alto), appare evidente che esso sviluppa resistenza verso l'eritromicina e la norfloxacin già dopo il 5° passaggio, a differenza di SMAP-29, il cui valore di MIC rimane invariato per tutta la durata dell'esperimento salvo piccole fluttuazioni non significative, non portando così a selezione di mutanti resistenti alla sua azione.

Un andamento pressochè analogo è stato visto anche con *P. aeruginosa* che, dopo 20 passaggi in presenza di concentrazioni sub-inibenti di SMAP-29, non sviluppa resistenza a questo peptide. Viceversa, nelle stesse condizioni sperimentali, gentamicina e norfloxacin portano a selezione di mutanti resistenti (Fig. 22, in basso).

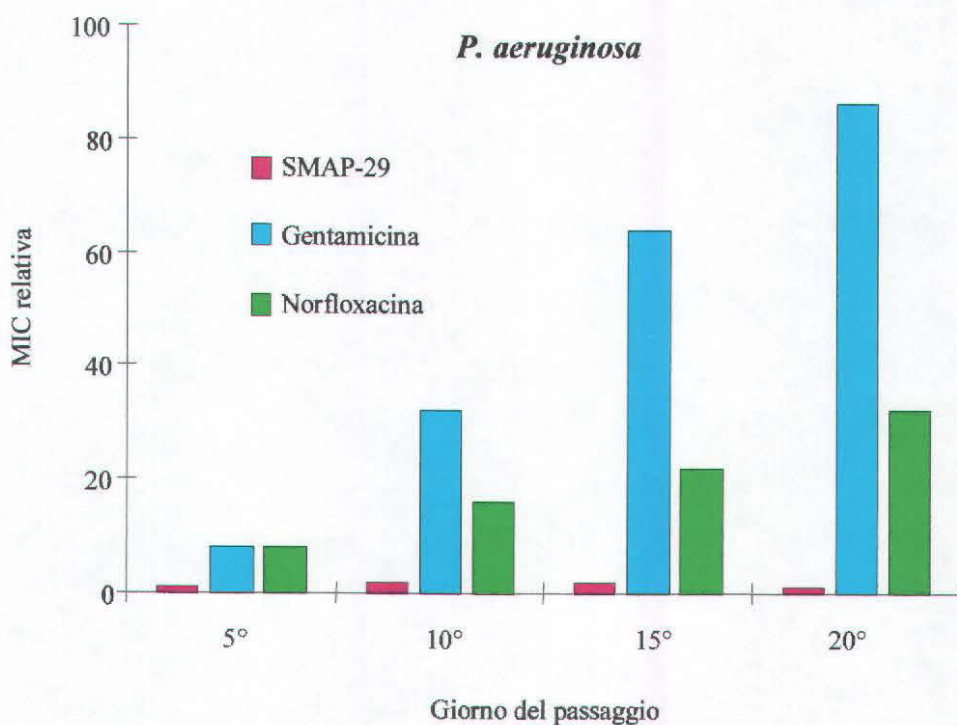
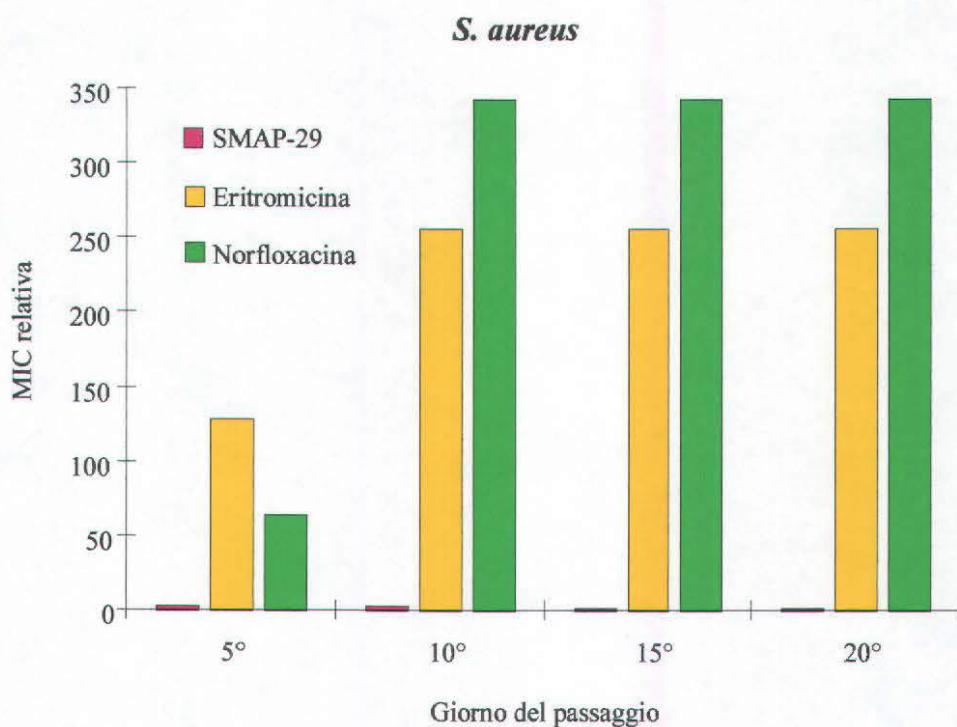


Fig. 22 - Incremento del valore di MIC rispetto a quello iniziale (MIC relativa) per SMAP-29 e antibiotici convenzionali dopo il 5°, 10°, 15° e 20° passaggio seriale di *S. aureus* (MRSA) e *P. aeruginosa* incubati in presenza di concentrazioni subinibitorie dei composti indicati. Un incremento nel valore di MIC indica la selezione di mutanti resistenti.

2.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

E' noto che tutti i peptidi usati per questi esperimenti, eccetto Bac7(1-35), hanno un meccanismo d'azione di tipo membranolitico, come dimostrato da saggi di permeabilizzazione della membrana interna di *E. coli* ML-35 [Skerlavaj et al, 1996]. Per una più chiara visione del danno di membrana causato dai peptidi, i cambiamenti morfologici indotti dall'azione di SMAP-29 su *E. coli* ML-35 e su *S. aureus* (MRSA) sono stati esaminati mediante microscopia elettronica a scansione (SEM).

La Fig. 23 riporta le immagini di *E. coli* e *S. aureus* trattati, rispettivamente, con 2 e 5 μ M SMAP-29 per 30 min: si può osservare, in A e C, che le cellule non trattate hanno una superficie priva di qualsiasi alterazione; al contrario (Fig. 23 B e D), le cellule trattate con il peptide mostrano una superficie rugosa e piena di piccole bolle ("blebs") che denotano il "macroscopico" effetto del peptide. In particolare, i "blebs" sulla superficie di *S. aureus* sono più frequenti nella regione del setto di divisione ed hanno spesso una forma allungata e filamentosa. In *E. coli* invece, essi sono sferoidali e sono spesso accompagnati da veri e propri buchi sulla membrana. Inoltre, è possibile osservare frequenti residui cellulari, probabilmente derivati da lisi indotta dal peptide.

Le immagini ottenute dalla microscopia elettronica a scansione evidenziano che SMAP-29 ha una potente attività di permeabilizzazione delle membrane batteriche. Questa attività è in generale più potente di quella mostrata da altri peptidi antimicrobici nelle stesse condizioni; solo BMAP-27 e BMAP-28 mostrano una capacità permeabilizzante comparabile a quella di SMAP-29, con il quale hanno in comune la presenza di una regione idrofobica al C-terminale [Skerlavaj et al, 1999].

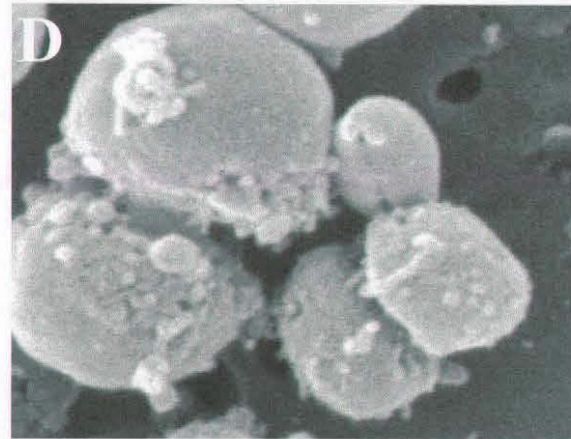
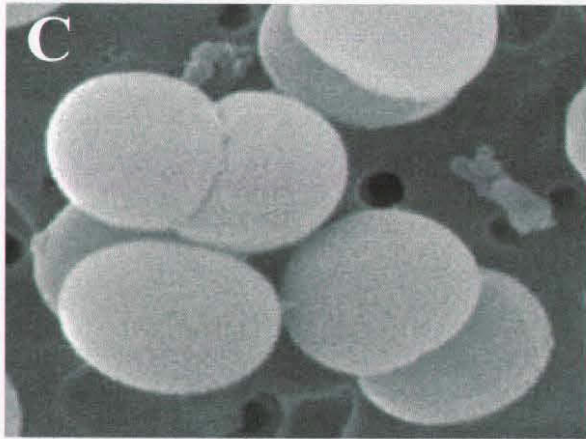
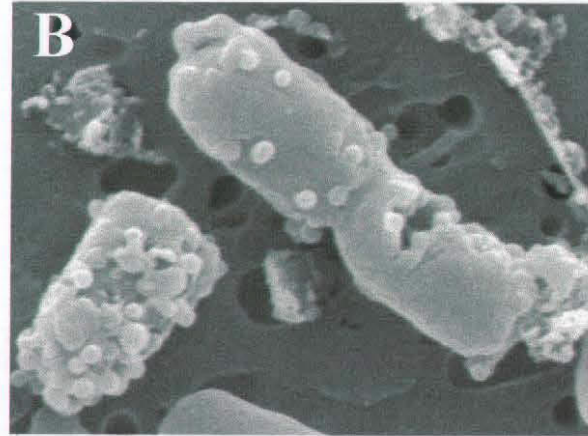
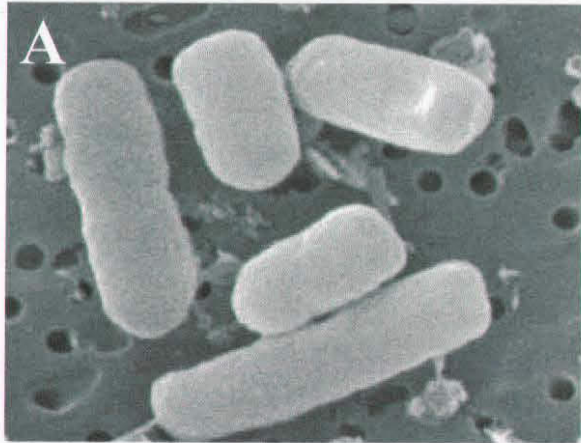


Fig. 23 - SEM di cellule di *E. coli* non trattate (A) e trattate per 30 min a 37°C con 2 μ M SMAP-29 (B); SEM di cellule di *S. aureus* non trattate (C) e trattate per 30 min a 37°C con 5 μ M SMAP-29 (D).

2.5 Effetto del siero e del sangue intero sull'attività antibatterica dei peptidi

Questi saggi sono stati effettuati per valutare se l'attività dei peptidi antimicrobici potesse essere in qualche modo alterata dalla presenza di siero o sangue, sia umano che murino. Esperimenti di questo tipo sono preliminari a quelli sistemici *in vivo*, in quanto è importante stabilire se i peptidi sono in grado di esplicare la loro azione antibatterica anche nei fluidi biologici in cui si verranno a trovare una volta iniettati negli animali.

L'effetto del siero e del sangue sull'attività antimicrobica di SMAP-29 è stato valutato come variazione del numero delle unità formanti colonia (CFU) dopo trattamento con il peptide in presenza/assenza di siero o sangue rispetto alla coltura non trattata; essendo il ceppo *E. coli* ML-35 sensibile all'azione del complemento, è stato utilizzato siero di un individuo C6-deficiente (gentilmente fornito dal prof. F. Tedesco del Dip. di Fisiologia e Patologia dell'Università di Trieste).

I saggi, condotti in presenza di siero umano C6-deficiente, mostrano che l'attività antibatterica di SMAP-29 è quasi completamente inibita in presenza di 50% siero e che buona parte dell'attività viene recuperata aumentando la concentrazione del peptide di 4 volte o inattivando al calore il siero al 50% (Fig. 24).

Si possono per il momento fare solo ipotesi per quel che riguarda il fattore(i) del siero responsabile(i) dell'inibizione dell'attività del peptide: oltre ad una possibile attività proteolitica di fattori della coagulazione o del complemento, si pensa che i peptidi possano legarsi alla frazione lipidica del siero, venendo così sequestrati. Questo sembra essere confermato da esperimenti preliminari in cui il siero delipidato ha mostrato un effetto inibitorio molto meno marcato (dati non riportati).

Il ceppo capsulato di *E. coli* O18:K1:H7 Bort, resistente all'uccisione mediata dal complemento [Pluschke et al., 1983], è stato utilizzato in esperimenti condotti con sangue intero, sia umano che murino. In questi esperimenti, l'attività antibatterica di SMAP-29 è inibita dal sangue e viene completamente ripristinata solo aumentando la concentrazione di peptide da 1.5 a 12 μ M (Fig. 25). Questi esperimenti mostrano che l'attività antibatterica dei peptidi viene significativamente inibita dalla presenza di sangue o siero; risulta quindi necessaria l'identificazione del fattore o dei fattori responsabili dell'inibizione. In ogni caso questi risultati già suggeriscono che questi peptidi potrebbero essere poco efficaci in modelli di infezione sistemica.

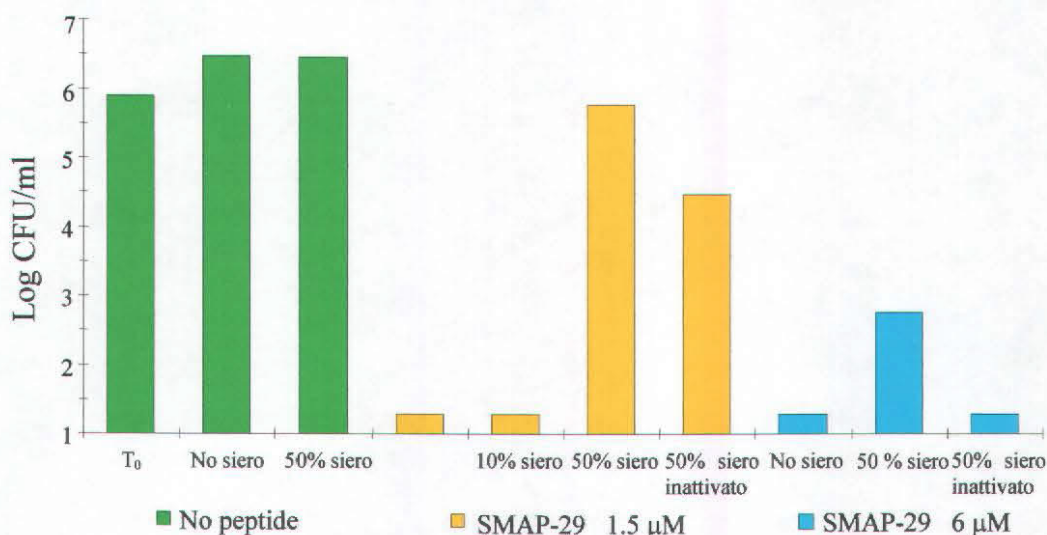


Fig. 24 - Effetto di siero C6-deficiente sull'attività antibatterica di SMAP-29 nei confronti di *E. coli* ML-35. L'effetto del siero sull'attività antibatterica di SMAP-29 è stato valutato mediante incubazione dei batteri in brodo Mueller Hinton in presenza o assenza delle quantità di siero indicate. Dopo 60 min di incubazione a 37°C, i batteri sono stati diluiti e piastrati per permettere il conteggio delle colonie. Il siero inattivato al calore è stato ottenuto dopo 30 min d'incubazione a 56°C.

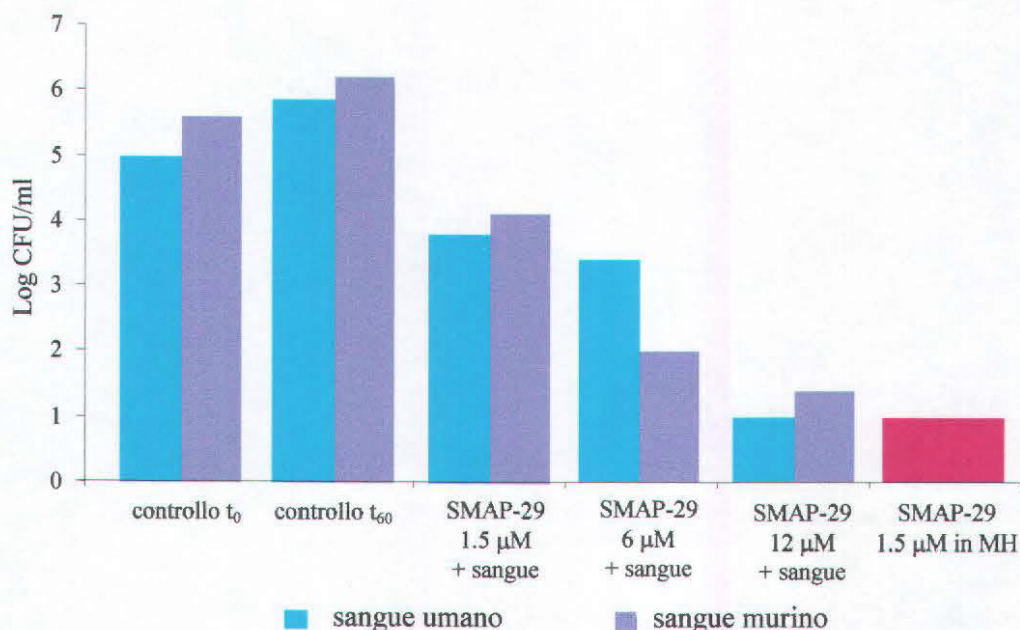


Fig. 25 - Attività antibatterica di SMAP-29 in sangue intero umano e murino, contro *E. coli* O18:K1:H7. Le sospensioni batteriche sono state incubate a 37°C per 60 min, eccetto il controllo t₀; per confronto è riportata l'attività contro lo stesso ceppo in terreno M.H.

2.6 Tossicità *in vivo* dei peptidi

La sperimentazione *in vivo* è stata programmata sulla base dei dati ottenuti dagli esperimenti *in vitro*. Si è deciso di puntare per la sperimentazione *in vivo* soprattutto sui peptidi ad α -elica SMAP-29, BMAP-27 e BMAP-28.

Preliminarmente agli studi in modelli di infezione animale, sono stati eseguiti dei saggi per valutare la tossicità dei peptidi iniettati in topo per via intraperitoneale o endovenosa.

I risultati indicano che i peptidi ad α -elica, iniettati per via intraperitoneale, iniziano ad essere tossici solo a concentrazioni superiori ai 30 mg/kg. I valori di LD₅₀, calcolati secondo Litchfield e Wilcoxon, sono riportati in Tab. 10, e sono molto più elevati delle dosi che risultano terapeutiche via i.p., in generale comprese tra 0.2 e 0.8 mg/kg (vedi oltre paragrafo 2.7).

	Iniezione via i.p.	Iniezione via i.v.
peptide	LD ₅₀ (mg/Kg)	LD ₅₀ (mg/Kg)
SMAP-29	40	5.7
BMAP-28	64	15.2
BMAP-27	64	10.5

Tab. 10 - Tossicità *in vivo* di SMAP-29, BMAP-28 e BMAP-27 iniettati via i.p o i.v. I topi Balb/c (da 6 a 8 topi) sono stati inoculati via i.p. o i.v. con peptidi disciolti in 0.2 ml di soluzione salina apirogena. (LD₅₀ è stata calcolata in accordo con Litchfield e Wilcoxon).

I peptidi sono invece risultati molto più tossici quando iniettati endovena, come riportato nella Tab. 10: tutti e tre i peptidi presentano valori di LD₅₀ molto più bassi di quelli ottenuti per iniezione i.p.; anche in questo caso SMAP-29 risulta essere il più tossico.

2.7 Attività dei peptidi in modelli animali di infezione

Per valutare l'efficacia terapeutica dei peptidi è stato messo a punto un modello di peritonite provocato da iniezione i.p. del ceppo capsulato O18:K1:H7 di *E. coli*, di un ceppo meticillina-resistente di *S. aureus* o di un ceppo di *P. aeruginosa*.

I risultati ottenuti con questo modello di peritonite sono riportati nelle Fig. da 26 a 34. Essi riflettono molto da vicino il comportamento *in vitro* dei peptidi: SMAP-29 infatti, risulta attivo in tutti e tre i modelli utilizzati, proteggendo i topi a dosi comprese tra 0.2 e 0.8 mg/kg (Fig. 30, 31 e 34). Ciò indica un buon indice terapeutico, considerato che il valore di LD₅₀ per questo peptide iniettato per via i.p. è pari a 40 mg/kg. Paradossalmente, in alcuni casi, le dosi maggiori danno una protezione minore, come se alla tossicità batterica si aggiungesse quella del peptide; si veda ad esempio la dose di 0.8 mg/kg per *E. coli* (Fig. 34) e quelle di 1.6 e 3.2 mg/Kg per *P. aeruginosa* (Fig. 30). Visto che ciò sembra accadere solo con batteri Gram-negativi, si potrebbe ipotizzare che dosi elevate di peptide portino alla liberazione di una quantità tossica di LPS, come è stato visto per certi antibiotici nel cosiddetto effetto post-antibiotico. Per quanto concerne BMAP-27 e BMAP-28, il primo risulta particolarmente attivo verso i ceppi Gram-negativi (Fig. 26 e 32) e poco verso *S. aureus* (Fig. 27), mentre il secondo si comporta in modo esattamente opposto, risultando più efficace verso *S. aureus* (Fig. 29) che verso *E. coli* e *P. aeruginosa* (Fig. 33 e 28). Questo comportamento è parallelo a quello mostrato *in vitro*, come indicato dai dati di MIC riportati nelle Tab. 5, 7 e 8 (paragrafo 2.1) e in letteratura [Skerlavaj et al, 1996 e 1999].

Infine, un esperimento pilota è stato effettuato con SMAP-29 in un modello murino di batteriemia provocata da iniezione intravena di una dose letale del ceppo capsulato di *E. coli*. Vista l'elevata tossicità del peptide e l'effetto inibitorio del sangue (vedi paragrafo 2.5), non vi è stata alcuna protezione neppure alla dose di 2.5 mg/kg (Fig. 35). Dosi più elevate non sono state saggiate, poiché corrispondenti a concentrazioni di peptide simili ai valori di LD₅₀. L'ipotesi che la morte dei topi potesse essere dovuta all'effetto tossico dell'LPS eventualmente rilasciato dai batteri per azione del peptide, è stata scartata dopo un esperimento in cui un'iniezione endovena di batteri e peptide, preincubati assieme per 1 ora a 37°C nelle stesse quantità usate nelle prove sopra descritte, non ha provocato la morte di nessuno dei topi trattati.

Da questi dati poco incoraggianti, appare evidente l'inefficacia di questi peptidi ad α -elica nei modelli di batteriemia. Approfonditi studi sul rapporto struttura/attività in questi peptidi saranno necessari per cercare di giungere a composti che, pur conservando l'elevata attività antibatterica, abbiano una minore tossicità e siano poco o nulla inibiti dal sangue.

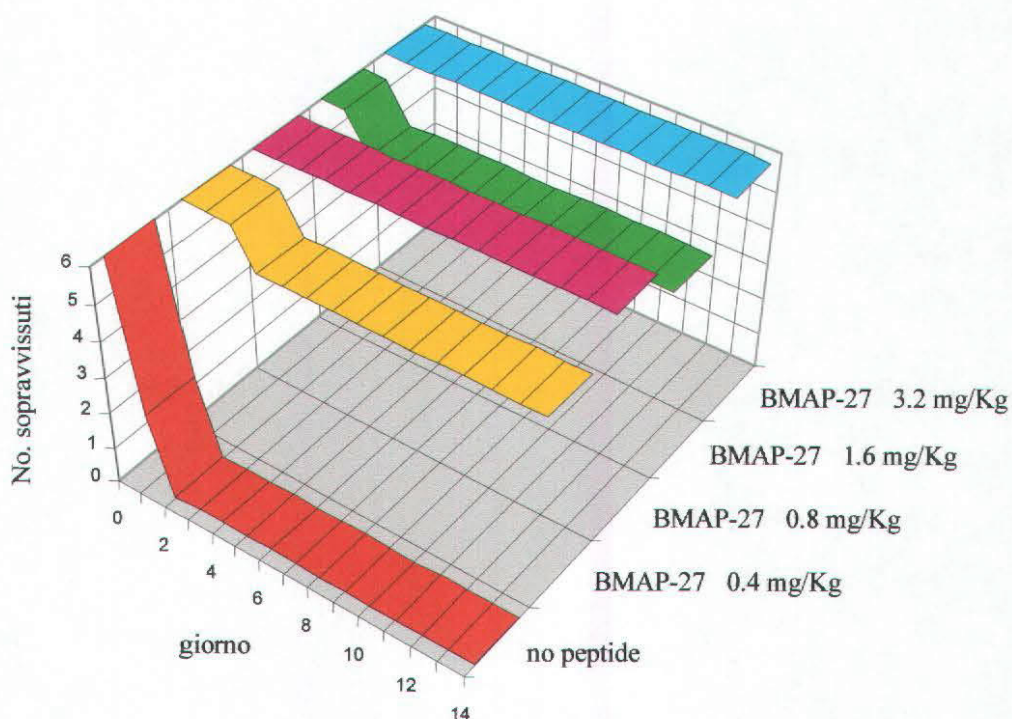


Fig. 26 - Attività *in vivo* di BMAP-27 iniettato via i.p. nei confronti di *P. aeruginosa* (inoculo di 6×10^7 CFU/topo).

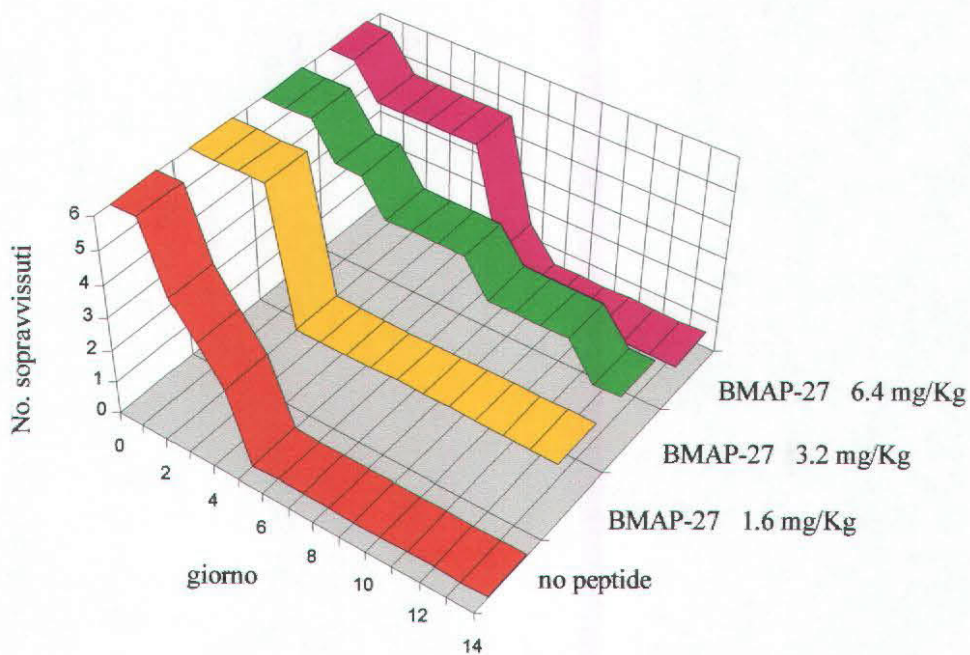


Fig. 27 - Attività *in vivo* di BMAP-27 iniettato via i.p. nei confronti di *S. aureus* (MRSA) (inoculo di 3.6×10^8 CFU/topo).

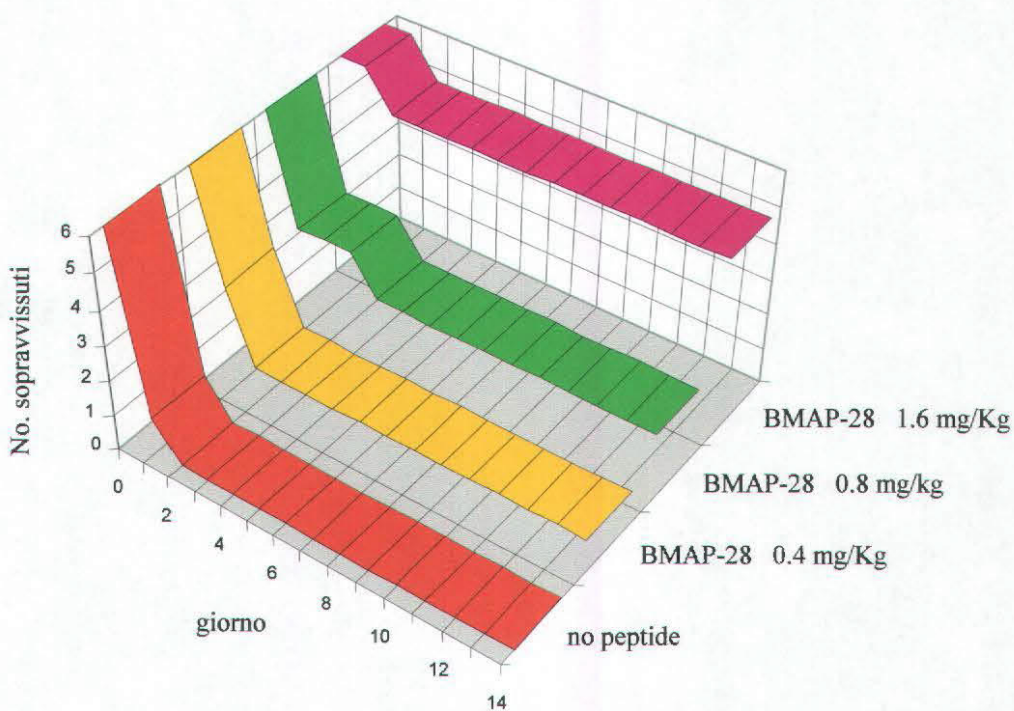


Fig. 28 - Attività *in vivo* di BMAP-28 iniettato via i.p. nei confronti di *P. aeruginosa* (inoculo di 4×10^7 CFU/topo).

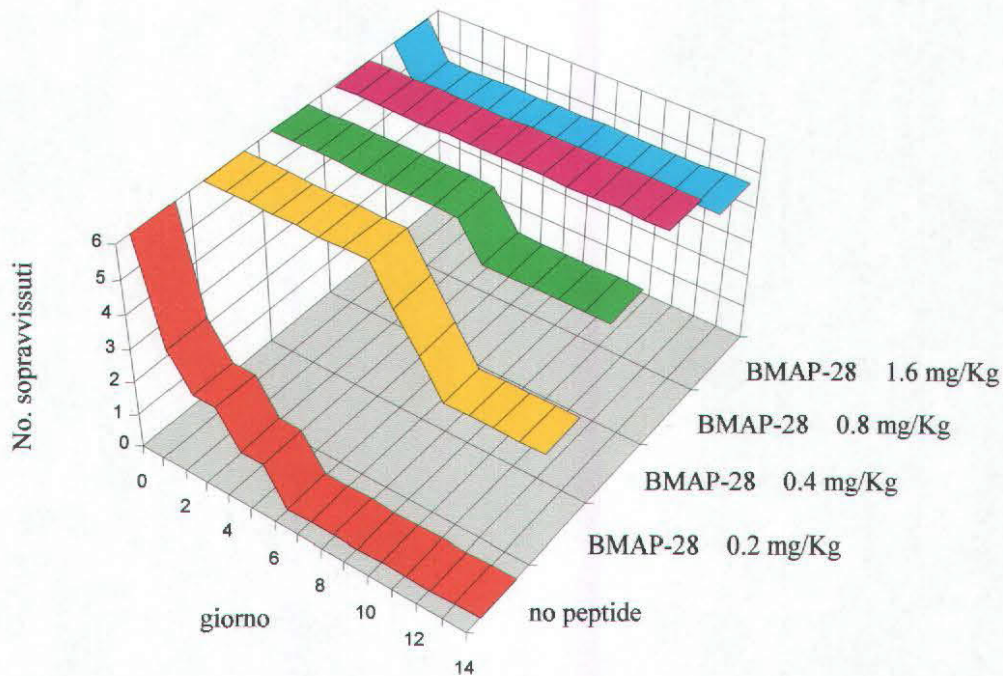


Fig. 29 - Attività *in vivo* di BMAP-28 iniettato via i.p. nei confronti di *S. aureus* (MRSA) (inoculo di 4×10^8 CFU/topo).

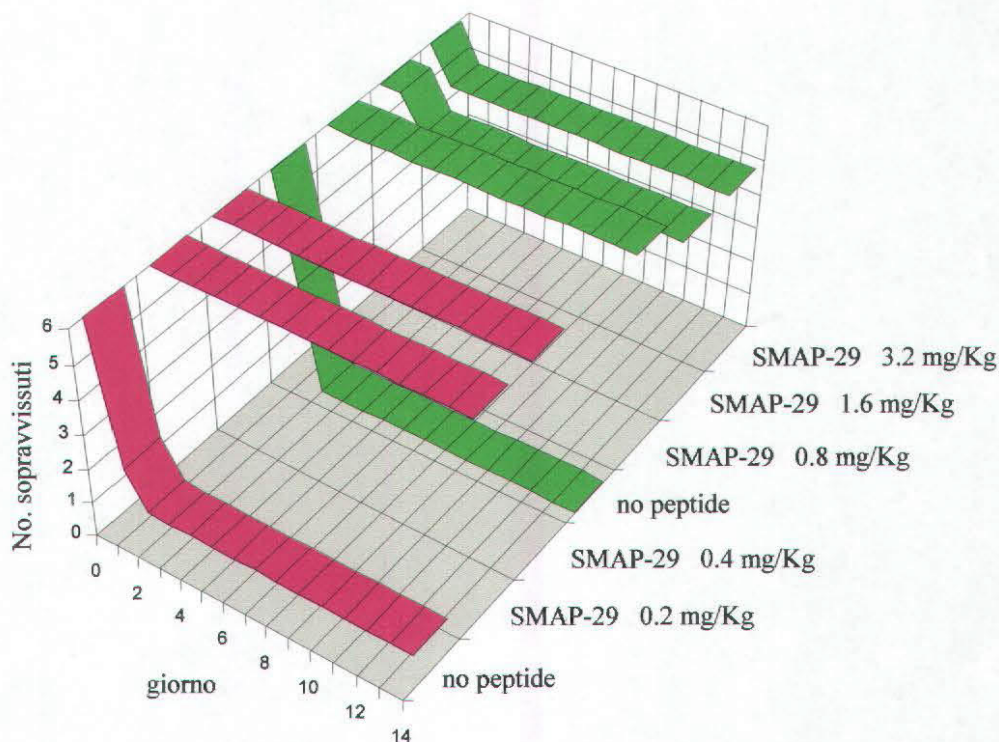


Fig. 30 - Attività *in vivo* di SMAP-29 iniettato via i.p. nei confronti di *P. aeruginosa* (Esp. 1: inoculo di 3×10^7 CFU/topo Esp. 2: inoculo di 1×10^8 CFU/topo).

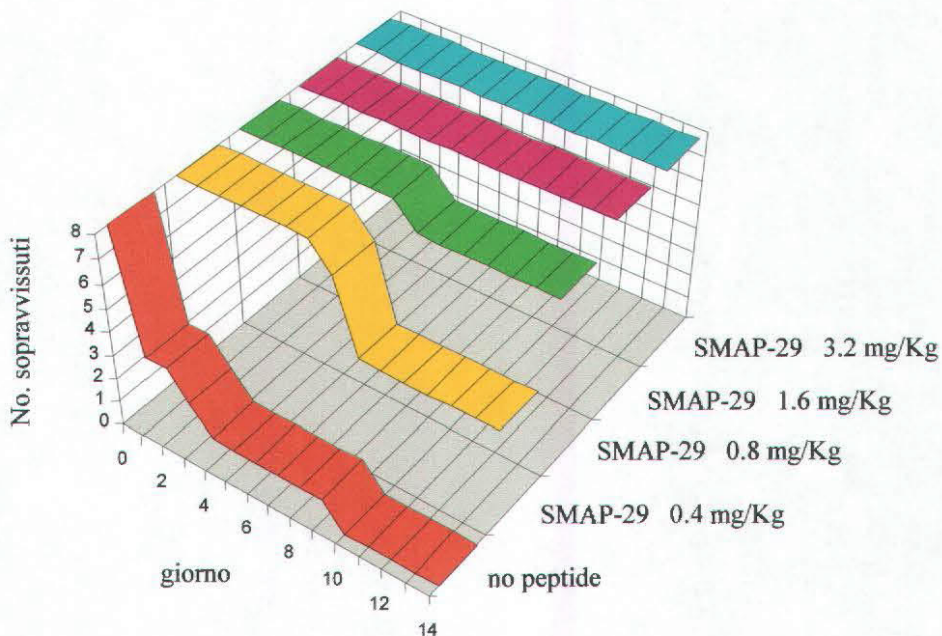


Fig. 31 - Attività *in vivo* di SMAP-29 iniettato via i.p. nei confronti di *S. aureus* (MRSA) (inoculo di 3.6×10^8 CFU/topo).

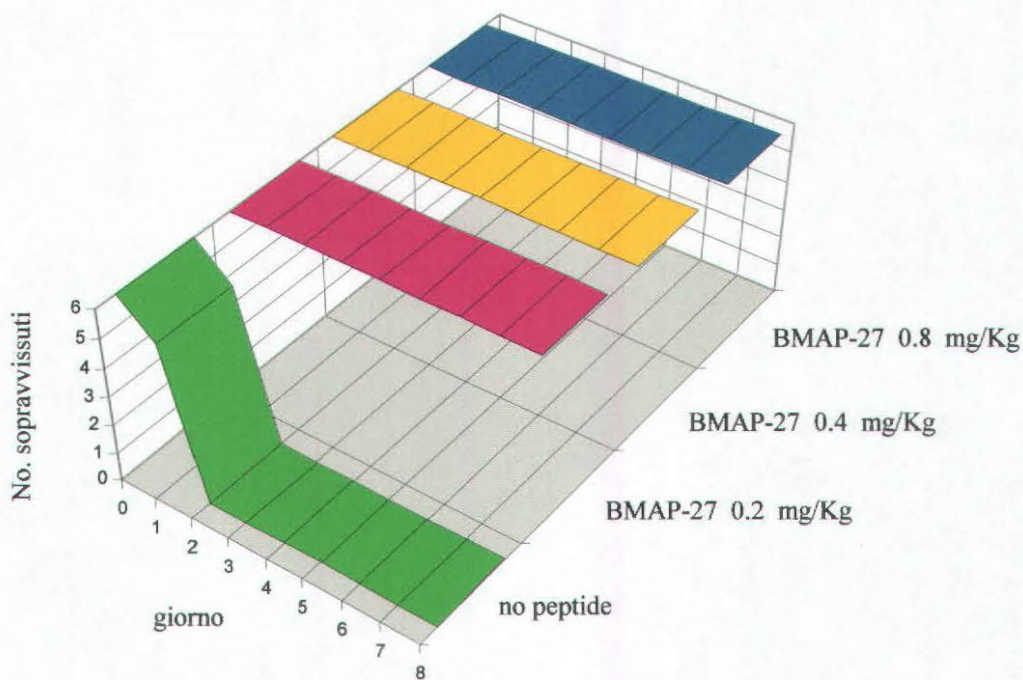


Fig. 32 - Attività *in vivo* di BMAP-27 iniettato via i.p. nei confronti di *E. coli* O18:K1:H7 (inoculo di 7.77×10^4 CFU/topo).

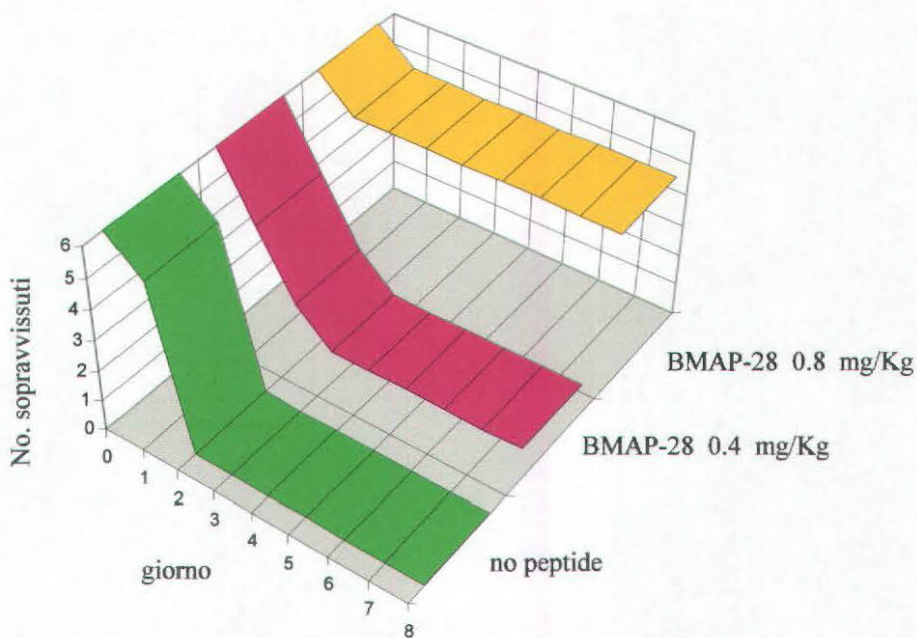


Fig. 33 - Attività *in vivo* di BMAP-28 iniettato via i.p. nei confronti di *E. coli* O18:K1:H7 (inoculo di 7.77×10^4 CFU/topo)

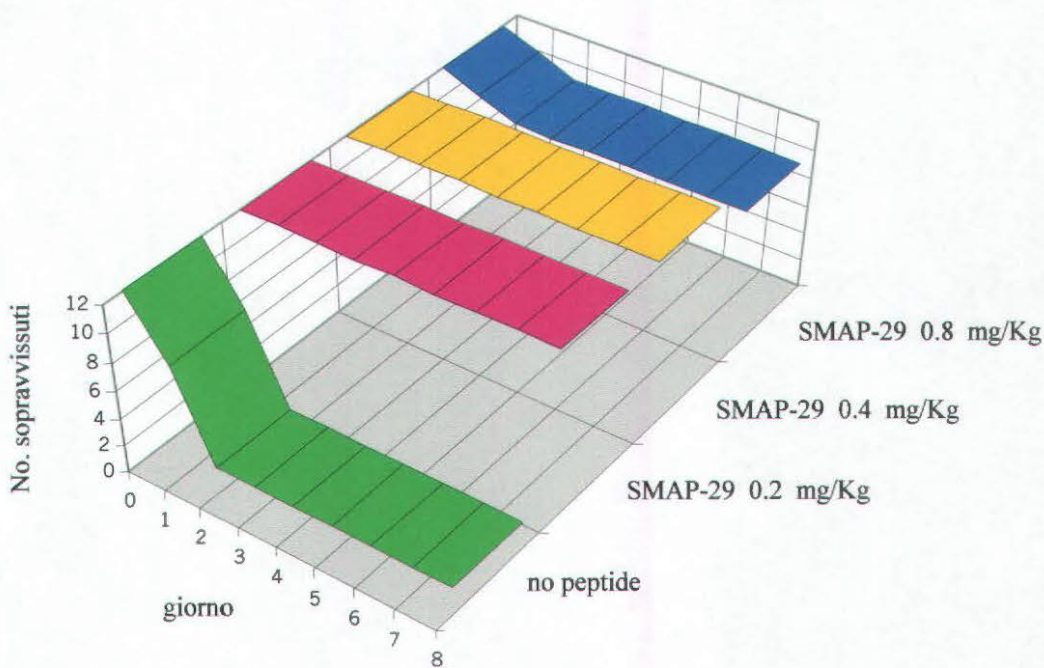


Fig. 34 - Attività *in vivo* di SMAP-29 iniettato via i.p. nei confronti di *E. coli* O18:K1:H7 (inoculo di 7.77×10^4 CFU/topo).

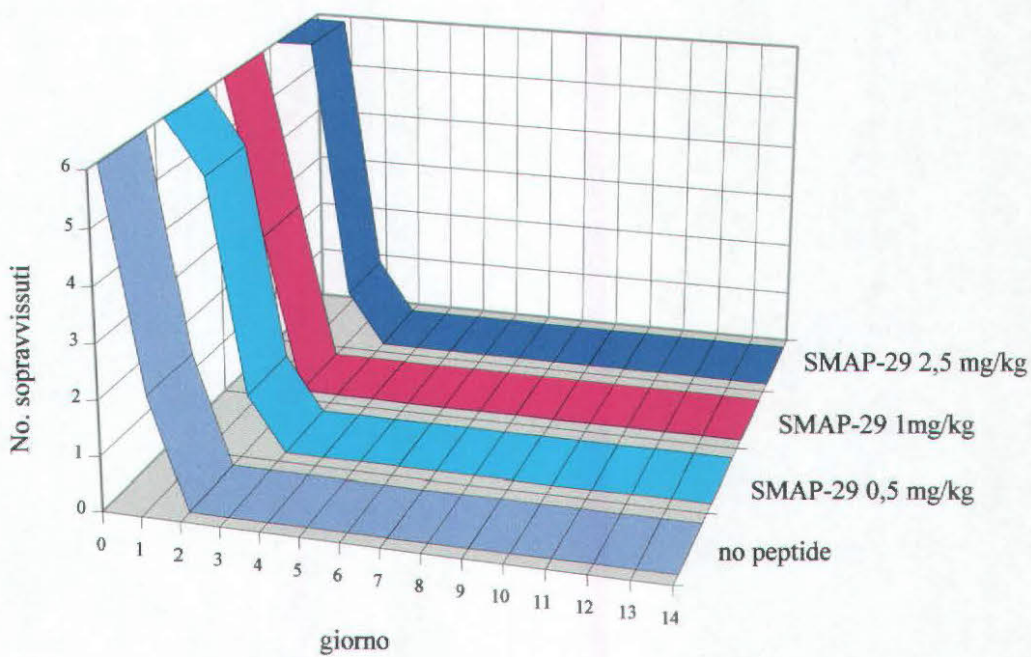


Fig. 35 - Attività *in vivo* di SMAP-29 iniettato via i.v. nei confronti di *E. coli* O18:K1:H7 (inoculo di 13.1×10^6 CFU/topo).

3.1 Valutazione dell'attività antifungina dei peptidi mediante saggi di Minima Concentrazione Inibente (MIC)

L'attività antifungina dei peptidi antimicrobici derivati da catelicidine è stata valutata su 70 isolati clinici; a questi sono stati aggiunti 9 ceppi dall'American Type Culture Collection (ATCC), usati come riferimento per il dosaggio dell'attività antifungina nei laboratori ospedalieri di Microbiologia clinica.

In primo luogo, sono stati allestiti dei saggi di Minima Concentrazione Inibente (MIC), volti a determinare la concentrazione minima di peptide sufficiente ad inibire la crescita dei miceti. In questo lavoro, l'attività è stata considerata elevata per valori di MIC $<2 \mu\text{M}$, buona per valori compresi tra 2 e 8 μM , moderata per 16-32 μM e virtualmente nulla per MIC $>32 \mu\text{M}$.

Le prime prove sono state effettuate con *C. neoformans*, scelto in quanto opportunisto che dà gravi infezioni polmonari e meningoencefaliti nei pazienti con AIDS. La patogenicità di questo fungo è legata alla presenza di una capsula esterna polisaccaridica costituita da 80% glucoronoxilomannano e 20% galattosilmannano.

In Fig. 36 è riportata la distribuzione dei valori di MIC per 17 isolati di *C. neoformans*: tutti i ceppi disponibili sono risultati suscettibili ai peptidi usati, con valori di MIC distribuiti nell'intervallo 0.25-4 μM per la maggior parte dei casi. In particolare, BMAP-27, SMAP-29 e BMAP-28 sono nell'ordine i peptidi più efficaci con valori di MIC centrati attorno a 1 μM , equivalente ad una concentrazione di peptide di circa 3 $\mu\text{g/ml}$. La PG-1 è solo leggermente meno attiva, mentre l'Indolicidina è il peptide meno efficace, pur essendo attivo a concentrazioni comprese tra 2 e 4 μM . Va infine sottolineato che non sono state riscontrate differenze significative nei valori di MIC tra i ceppi ATCC di riferimento capsulati ed i mutanti acapsulati non patogeni, ad indicare che l'azione dei peptidi non è inibita dalla presenza della capsula polisaccaridica esterna.

Successivamente, l'attività è stata saggiata contro *C. albicans* che, come riportato nel paragrafo 2.2 dell'Introduzione, è la causa più frequente di infezioni fungine sia topiche che sistemiche. La distribuzione dei valori di MIC ottenuti su 24 ceppi è illustrata nella Fig. 37: PG-1 è il peptide più attivo contro questa specie, presentando una MIC pari a 4 μM per ben 17 dei 24 ceppi saggiati. Buona attività è mostrata anche da BMAP-28, che

è efficace a valori in genere compresi tra 4 e 16 μM . Per quanto concerne SMAP-29, si nota che i dati sono alquanto dispersi, con alcuni ceppi molto suscettibili all'azione del peptide (MIC di 2-4 μM) e altri virtualmente resistenti (MIC >32 μM). Le ragioni di ciò non sono al momento note, si possono solo fare delle ipotesi che dovranno essere verificate in futuro, come ad esempio il rilascio da parte dei ceppi resistenti di proteasi alle quali SMAP-29 sia più sensibile degli altri peptidi. Minore attività è mostrata da Indolicidina e BMAP-27: i valori di MIC della prima sono tutti compresi tra 8 e 32 μM , mentre nel caso del secondo peptide alcuni ceppi sono resistenti (MIC >32 μM).

Oltre che su *C. neoformans* e *C. albicans*, l'attività dei peptidi è stata saggiata su numerose altre specie di funghi, meno significative dal punto di vista patologico e disponibili in un numero limitato di ceppi.

Dalla Tab. 11, si può notare che PG-1 ha fatto registrare buoni valori di MIC (compresi tra 1 e 8 μM) anche verso le altre specie di *Candida* utilizzate (*parapsilosis*, *glabrata*, *tropicalis*, *guilliermondii*, *krusei*, *humicola*, *lusitaniae*, *famata* e *dublinskiensis*), rivelandosi il peptide più efficace e con il più ampio spettro d'azione tra quelli saggiati. Anche BMAP-28 e SMAP-29 presentano un'attività abbastanza buona verso la gran parte delle specie di *Candida* sopra citate. SMAP-29 non risulta però attivo contro i ceppi di *C. glabrata*, resistenti pure all'azione di BMAP-27 e Indolicidina; questi due peptidi sono inattivi anche contro *C. parapsilosis*, che, al contrario, è particolarmente sensibile a SMAP-29. Un'attenta analisi delle cause della resistenza presentata da queste specie potrebbe essere utile al fine di comprendere più a fondo il meccanismo d'azione dei peptidi in questione e/o la presenza di eventuali fattori di virulenza in questi ceppi.

L'analisi effettuata su alcuni ceppi di *Pichia*, *Rhodotorula*, *Kloeckera* e *Saccharomyces cerevisiae* (anche quest'ultimo isolato da un paziente, nonostante non sia considerato generalmente patogeno), ha messo in evidenza ancora una volta che SMAP-29 e PG-1 son i peptidi con lo spettro più ampio e la migliore attività antifungina (Tab. 11).

Risultati deludenti sono stati invece ottenuti nell'indagine compiuta su un numero limitato di ceppi fungini filamentosi (Tab. 11), la gran parte dei quali risulta resistente a quasi tutti i peptidi (MIC ≥ 32 μM). Infatti, una modesta attività è mostrata solo da PG-1 e BMAP-28, limitatamente ad alcuni degli isolati saggiati.

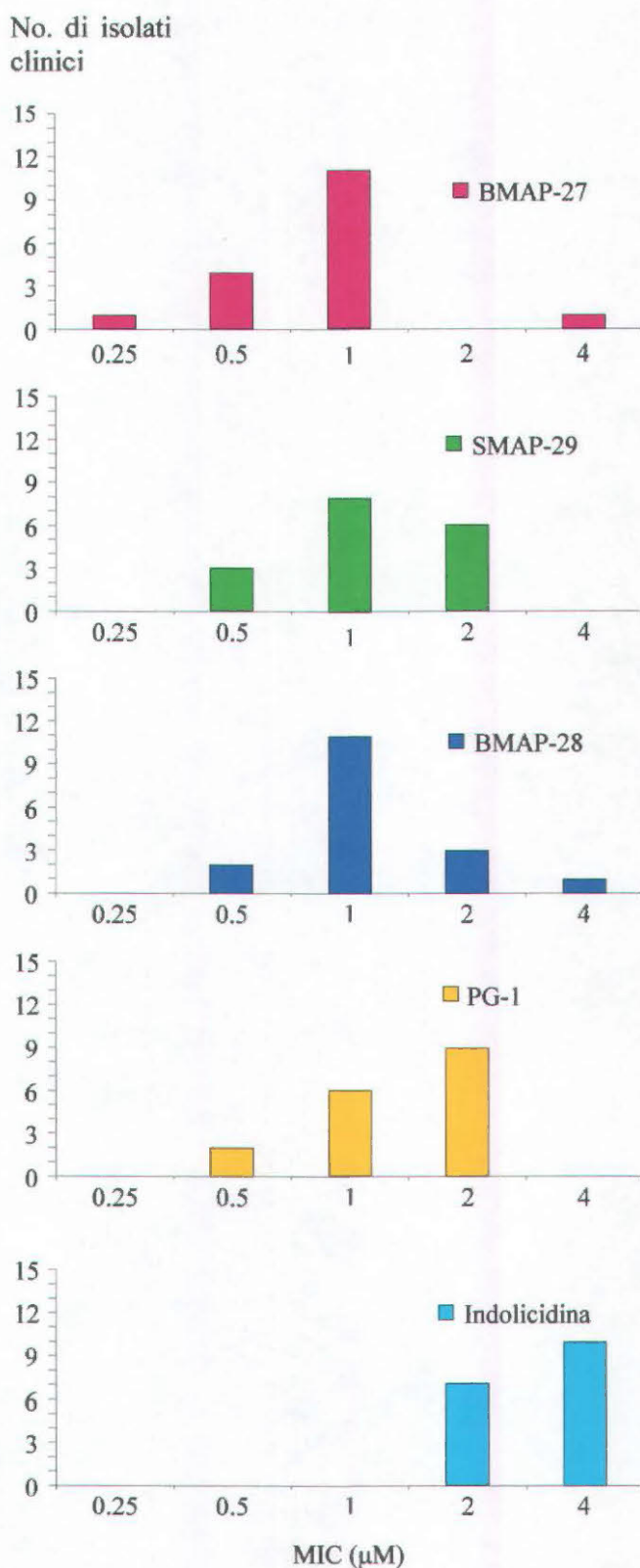


Fig. 36 - Distribuzione dei valori di MIC dei peptidi antimicrobici saggiati su 17 isolati di *C. neoformans*. I valori di MIC (μM), registrati a 48h, sono stati determinati in terreno RPMI-1640 in accordo alle linee guida suggerite dal NCCLS.

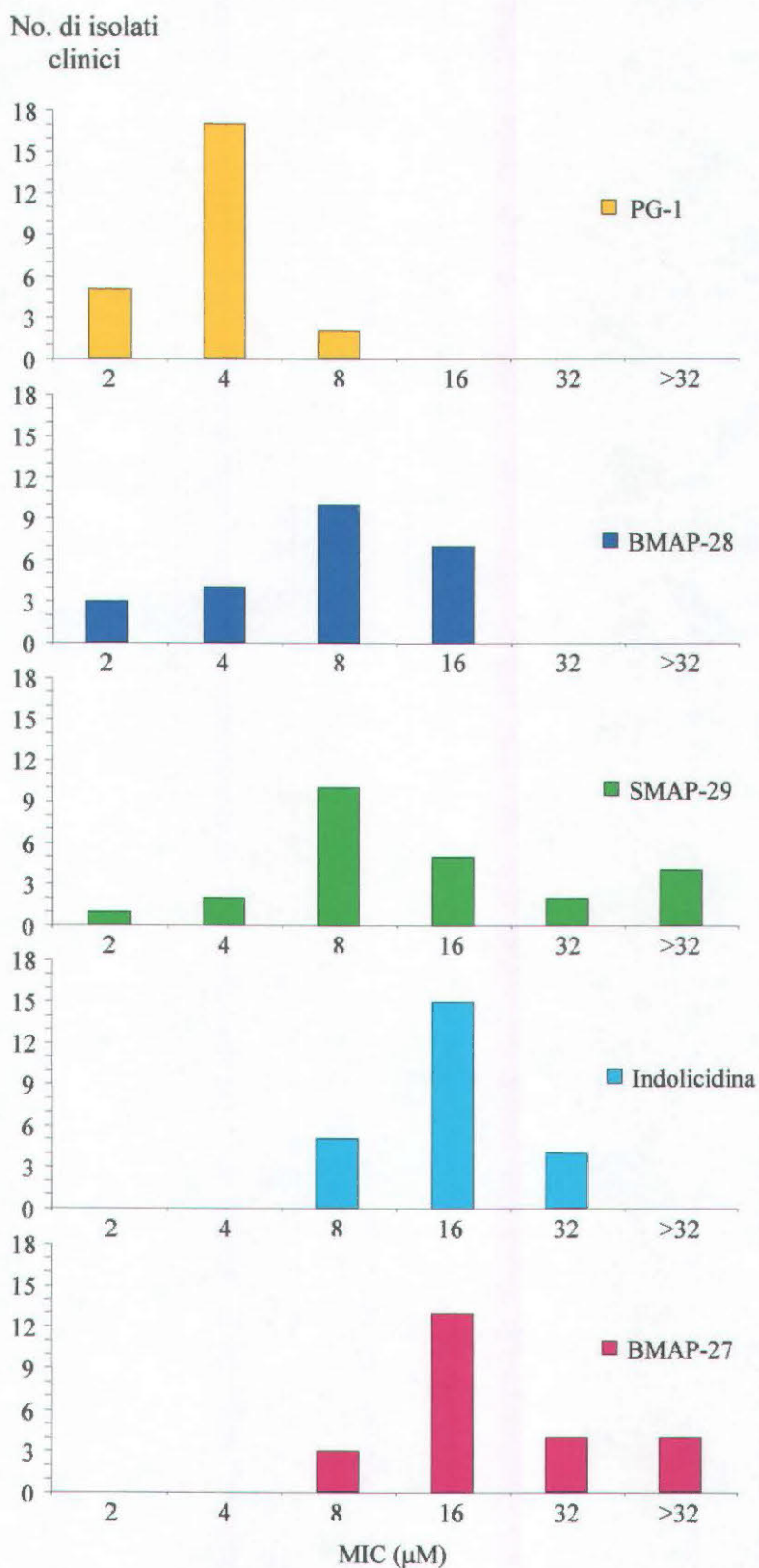


Fig. 37 - Distribuzione dei valori di MIC dei peptidi antimicrobici saggiati su 24 isolati di *C. albicans*. I valori di MIC (μM), registrati a 48h, sono stati determinati in terreno RPMI-1640 in accordo alle linee guida suggerite dal NCCLS.

Intervallo di MIC (μM)

Specie (n° di isolati)	BMAP-27	BMAP-28	SMAP-29	PG-1	INDOL
<i>C. parapsilosis</i> (4)	16->32	8	1-4	1-4	32->32
<i>C. glabrata</i> (6)	32->32	8-16	16->32	2-8	32->32
<i>C. tropicalis</i> (2)	4-16	8-16	4->32	2-8	16->32
<i>C. guilliermondii</i> (1)	4	2	0.5	2	>32
<i>C. krusei</i> (2)	4	2-8	2-4	1-2	8
<i>C. humicola</i> (1)	8	8	16	2	32
<i>C. lusitaniae</i> (1)	16	4	4	2	8
<i>C. famata</i> (2)	2-8	2-4	1-2	2	8-16
<i>C. dubliniensis</i> (1)	32	16	8	2	4
<i>P. etchellsii</i> (2)	>32	16-32	1-2	8	>32
<i>P. carsonii</i> (1)	2	2	0.5	1	8
<i>R. rubra</i> (3)	0.5-4	1-2	0.5-2	1-2	2-8
<i>S. cerevisiae</i> (2)	4-8	4-8	8-16	2-4	8-16
<i>K. apis</i> (2)	16-32	4	4-8	2-4	8-32
<i>Aspergillus</i> spp. (6)	>32	8->32	>32	8->32	>32
<i>Penicillium</i> spp. (2)	32->32	4-16	4->32	2-4	8->32

Tab. 11 - Attività antifungina *in vitro* di peptidi derivati da catelicidine. I valori di MIC (μM), registrati a 48h e riportati come intervallo di attività per il numero di ceppi indicato in parentesi, sono stati determinati in terreno RPMI-1640 in accordo alle linee guida suggerite dal NCCLS.

3.2 Cinetica di uccisione di *C. albicans* e *C. neoformans* da parte di BMAP-27, BMAP-28, SMAP-29 e PG-1

Come già detto nel paragrafo 2.2 in Risultati e Discussione, è importante valutare la rapidità con cui un agente antimicrobico uccide le cellule bersaglio, per limitare la comparsa di mutanti resistenti alla sua azione.

Per determinare la cinetica di uccisione dei funghi da parte dei peptidi sono stati allestiti degli esperimenti di "time killing": in queste prove è stata saggiata l'attività di BMAP-27, BMAP-28, SMAP-29 e PG-1 contro *C. neoformans* e degli ultimi tre contro *C. albicans*. I peptidi e le loro concentrazioni sono stati scelti in base ai risultati ottenuti con gli esperimenti di MIC.

PG-1 è il peptide con la maggior rapidità d'azione contro *C. neoformans* (Fig. 38d). Alla concentrazione di 2 μM , pari alla MIC su questo ceppo, si osserva una riduzione di oltre 2 log nel numero di CFU dopo 5 min di incubazione e di 4 log dopo 60 min. Una virtuale sterilizzazione della sospensione fungina viene raggiunta in appena 5 min, se la concentrazione del peptide è aumentata ad un valore pari a due volte e mezzo la MIC.

Per quanto riguarda SMAP-29, è interessante notare che, sebbene abbia una MIC migliore di quella di PG-1 (0.5 μM vs. 2 μM), la sua attività fungicida, risulta inferiore, pur rimanendo buona. Infatti, per ottenere una diminuzione di 4 log nel numero di CFU in tempi brevi è necessario aumentare la concentrazione di peptide a 10 volte la MIC (Fig. 38a). A dosi inferiori, esso è meno efficace e provoca una diminuzione delle CFU inferiore a 2 log e di circa 4 log per concentrazioni rispettivamente di 2 e 6 volte la MIC, dopo 90 minuti di incubazione. Quanto osservato non fa altro che confermare che il valore di MIC è un indice dell'attività microbistica delle sostanze saggate, non sempre direttamente correlabile alla loro attività microbica.

La cinetica di uccisione di BMAP-27, che complessivamente ha mostrato i migliori valori di MIC contro i 17 ceppi di *C. neoformans* disponibili (Fig. 36), è stata saggiata a concentrazioni pari alla MIC e 4 volte superiori. I risultati ottenuti indicano una buona cinetica di uccisione (Fig. 38b), anche se non paragonabile a quella di PG-1. Infine, l'attività di BMAP-28 in funzione del tempo, saggiata a concentrazioni 3 e 10 volte superiori alla MIC, è inferiore a quella degli altri peptidi, con una riduzione del numero di CFU di partenza di circa 2-3 log dopo 60-90 min di incubazione (Fig. 38c).

La cinetica di uccisione di *C. albicans* è stata valutata solo con i peptidi PG-1, SMAP-29 e BMAP-28, in quanto BMAP-27 si è dimostrato poco o per nulla attivo contro tutti i ceppi saggiati di questa specie (Fig. 39).

Anche in questo caso, PG-1 mostra l'attività migliore. La rapidità di uccisione è direttamente correlata alla concentrazione di peptide utilizzata e una virtuale sterilizzazione è raggiunta dopo 30 min di incubazione con 15 μM PG-1, un valore pari a 7.5 volte la MIC (Fig. 39a). L'attività è buona anche alla concentrazione di 3 μM , valore solo di poco superiore alla MIC, con un calo delle CFU maggiore di 2 log dopo 90 min di trattamento con il peptide. SMAP-29 ha invece con questo ceppo una cinetica

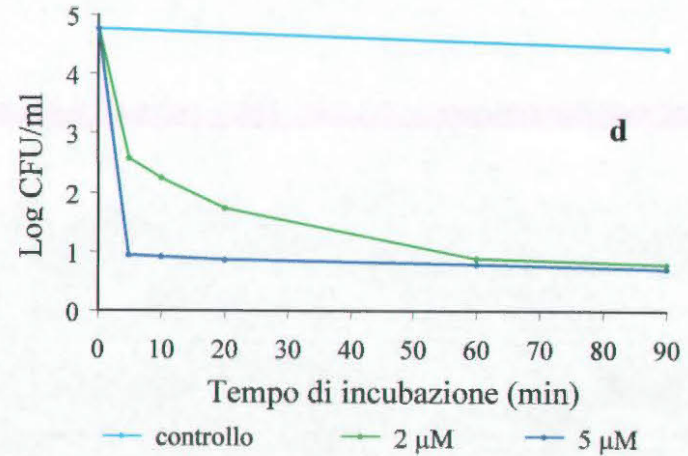
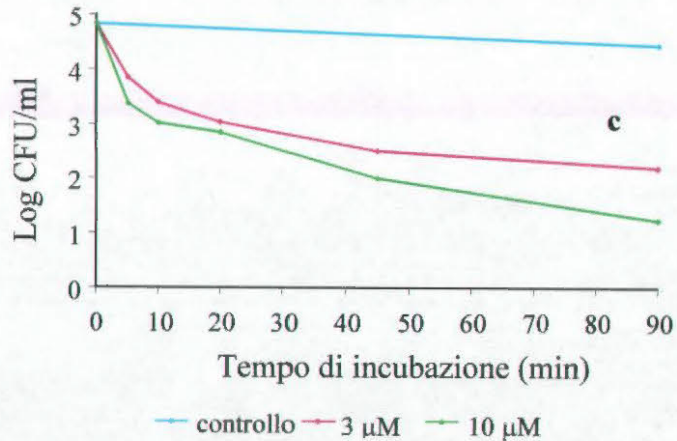
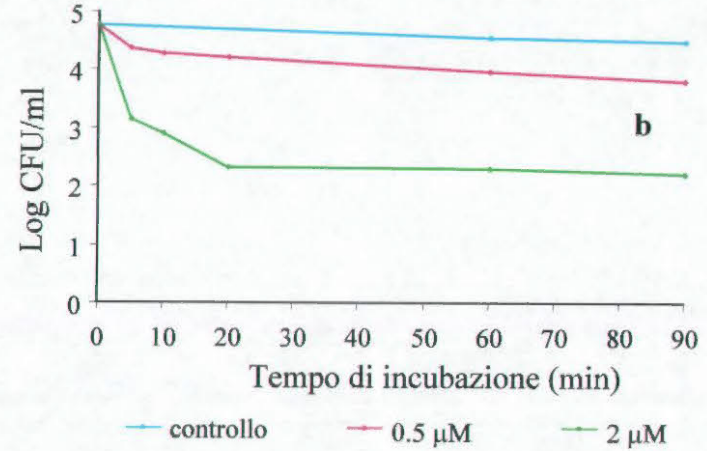
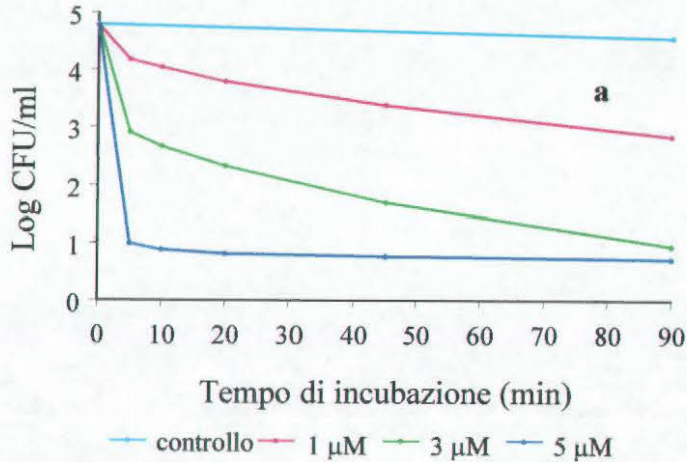


Fig. 38 - Attività fungicida nei confronti di *C. neoformans* di SMAP-29 (a), BMAP-27 (b), BMAP-28 (c) e PG-1 (d). Il saggio è stato allestito in terreno RPMI-1640. Ai tempi indicati, i funghi sopravvissuti sono stati diluiti in soluzione fisiologica tamponata e piastrati per permettere il conteggio delle colonie.

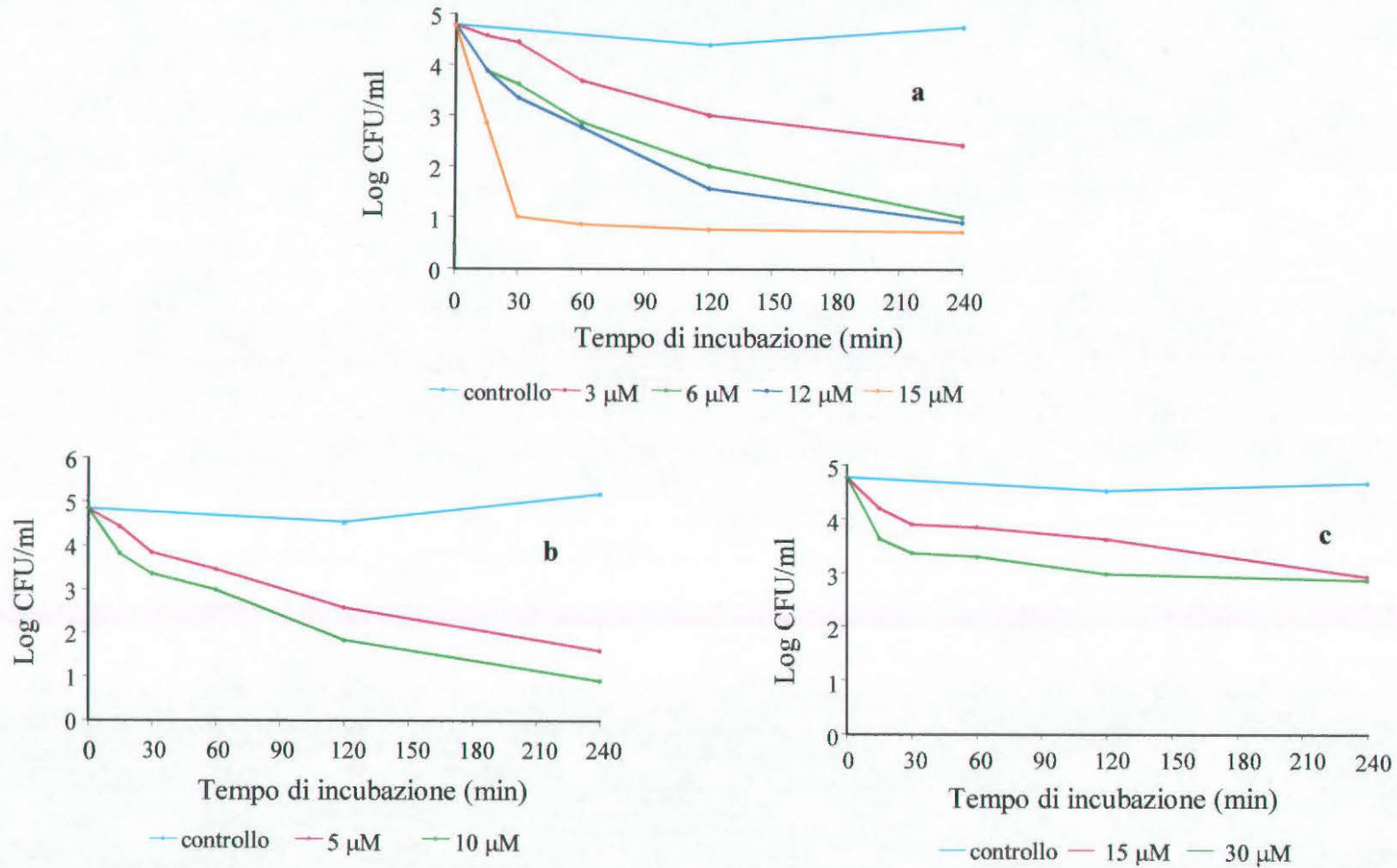


Fig. 39 - Attività fungicida nei confronti di *C. albicans* di PG-1 (a), SMAP-29 (b) e BMAP-28 (c). Il saggio è stato allestito in terreno RPMI-1640. Ai tempi indicati, i funghi sopravvissuti sono stati diluiti in soluzione fisiologica tamponata e piastrati per permettere il conteggio delle colonie.

di uccisione più lenta: alla dose di 10 μ M, equivalente a 10 volte la MIC, impiega infatti circa due ore per causare una diminuzione di 3 log nel numero di CFU/ml e solo dopo 4 ore di incubazione si ha la virtuale sterilizzazione della sospensione cellulare (Fig. 39b). Ancora meno efficace è BMAP-28 (Fig. 39c), che già presentava valori di MIC modesti contro tutte le specie di *Candida* saggiate (Tab. 11).

In conclusione, dai dati di “time killing” ottenuti con *C. neoformans* e *C. albicans*, risulta che PG-1 è il peptide che agisce più rapidamente sui funghi, seguito da SMAP-29 e, per quanto concerne *C. neoformans*, BMAP-27. In ogni caso, l’attività dei peptidi può essere considerata molto rapida, soprattutto a concentrazioni abbastanza superiori ai valori di MIC.

3.3 Effetti del sangue umano intero, del plasma e del siero delipidato sull’attività antifungina dei peptidi antimicrobici

Parallelamente ai saggi di “time killing”, sono stati compiuti degli esperimenti volti a valutare la possibile influenza di sangue umano intero, plasma e siero delipidato sull’attività dei peptidi antimicrobici contro *C. neoformans*. Si è potuto osservare che BMAP-27, BMAP-28, SMAP-29 e PG-1 perdono la loro efficacia sia in sangue intero che in plasma presenti nei saggi al 66.6% (vol/vol) (Fig. 40).

L’attività di BMAP-27 e PG-1 è stata inoltre saggiata in presenza di siero delipidato (66.6% vol/vol), nell’ipotesi che fosse il legame dei peptidi alla frazione lipidica (lipoproteine) ad inibirne l’attività. I risultati hanno anche in questo caso mostrato totale inibizione dell’attività dei peptidi, ad indicare che fattori diversi dalla frazione lipidica sono implicati nell’inattivazione della loro attività antifungina (Fig. 41).

Questi risultati indicano che i peptidi oggetto di questo studio potrebbero avere scarsa efficacia *in vivo* quando iniettati per via endovenosa e suggeriscono l’uso topico come elettivo per un loro eventuale impiego terapeutico.

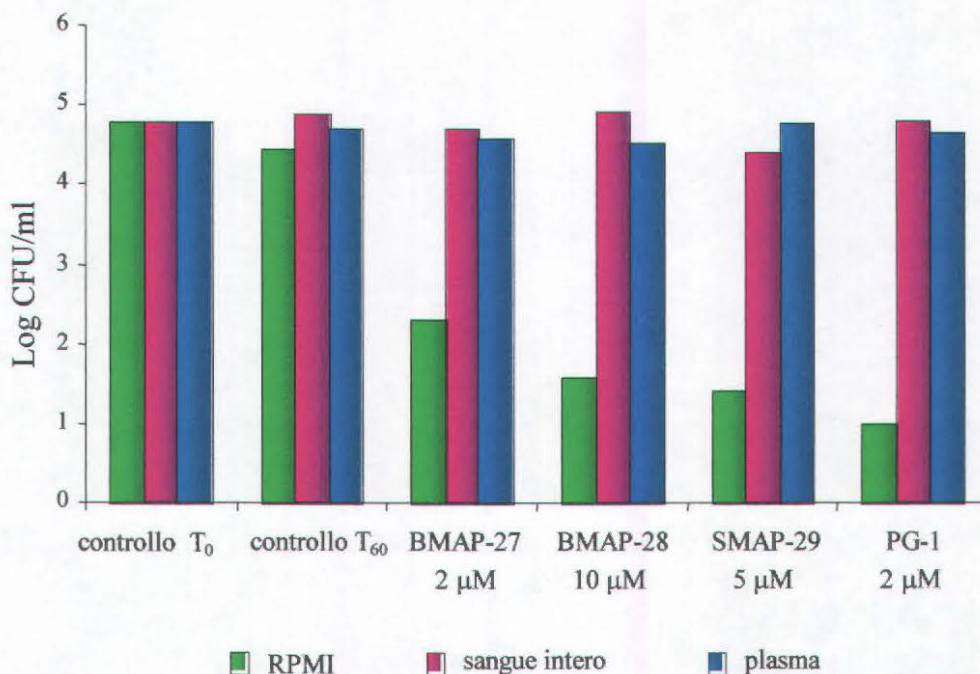


Fig. 40 - Attività di BMAP-27, BMAP-28, SMAP-29 e PG-1 contro *C. neoformans* in presenza di sangue umano intero e di plasma. Il saggio è stato eseguito incubando le cellule per 60 minuti con i peptidi in terreno RPMI-1640, sangue umano intero e plasma; un'aliquota di ciascun saggio è stata prelevata, diluita in soluzione fisiologica tamponata e piastrata per la successiva conta delle unità formanti colonie (CFU).

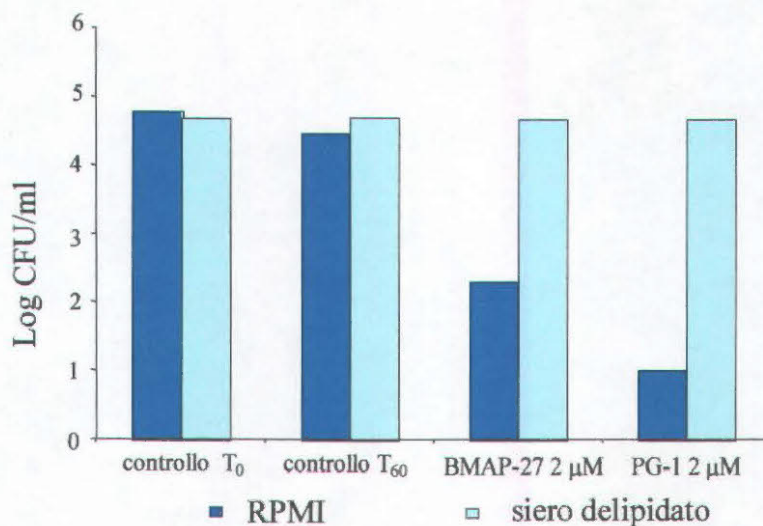


Fig. 41 - Attività di BMAP-27 e PG-1 contro *C. neoformans* in presenza di siero delipidato.

3.4 Dosaggio dell'ATP intra- ed extracellulare

I risultati degli esperimenti di “time killing” sono letti dopo 48 ore di incubazione, necessarie alla comparsa di colonie visibili; è utile quindi affiancare ad essi dei saggi che permettano una valutazione degli effetti immediati del peptide. A tal fine, è stata dosata la concentrazione di ATP intracellulare dopo diversi tempi di trattamento delle cellule fungine con i peptidi, in quanto il contenuto intracellulare di questa molecola è considerato un buon indice della vitalità della cellula [Ånséhn e Nilsson, 1984; Koshlukova et al., 1999]. Si è inoltre deciso di misurare anche la concentrazione extracellulare dell'ATP, nell'ipotesi che questa molecola, facilmente dosabile con altissima sensibilità, possa venir rilasciata a causa di alterazioni della permeabilità di membrana indotte dai peptidi.

In base ai risultati ottenuti dai saggi di MIC e dagli esperimenti di “time killing”, si è ritenuto opportuno valutare gli eventuali effetti immediati di SMAP-29 e PG-1 rispettivamente su *C. neoformans* e *C. albicans*.

Dalla Fig. 42A risulta evidente che già dopo 5 min di trattamento di *C. neoformans* con SMAP-29 alla concentrazione di 6 μ M, il contenuto di ATP intracellulare diminuisce di più del 95%, mentre vi è un parallelo aumento di quello extracellulare di paragonabile entità. Ciò indica che il peptide provoca una rapida alterazione delle caratteristiche di permeabilità della membrana cellulare, che causa la fuoriuscita di ATP dalla cellula. La valutazione del numero delle CFU, eseguita in parallelo utilizzando un'aliquota prelevata dagli stessi campioni usati per il dosaggio dell'ATP, ha indicato una diminuzione nel numero di cellule di circa 2 log rispetto al valore di partenza (Fig. 42B).

Anche nel caso di *C. albicans*, trattata per 10 min con 10 μ M PG-1, si registra una diminuzione di più del 95% dell'ATP intracellulare, mentre la quantità di quello extracellulare aumenta dello stesso valore percentuale (Fig. 43A) e il numero di CFU valutato in parallelo cala di oltre 2 log dopo lo stesso tempo (Fig. 43B). Anche in questo caso, il decremento di ATP intracellulare ed il pari incremento di quello extracellulare suggeriscono la perdita di ATP dalle cellule, dovuta presumibilmente alla rapida azione permeabilizzante del peptide.

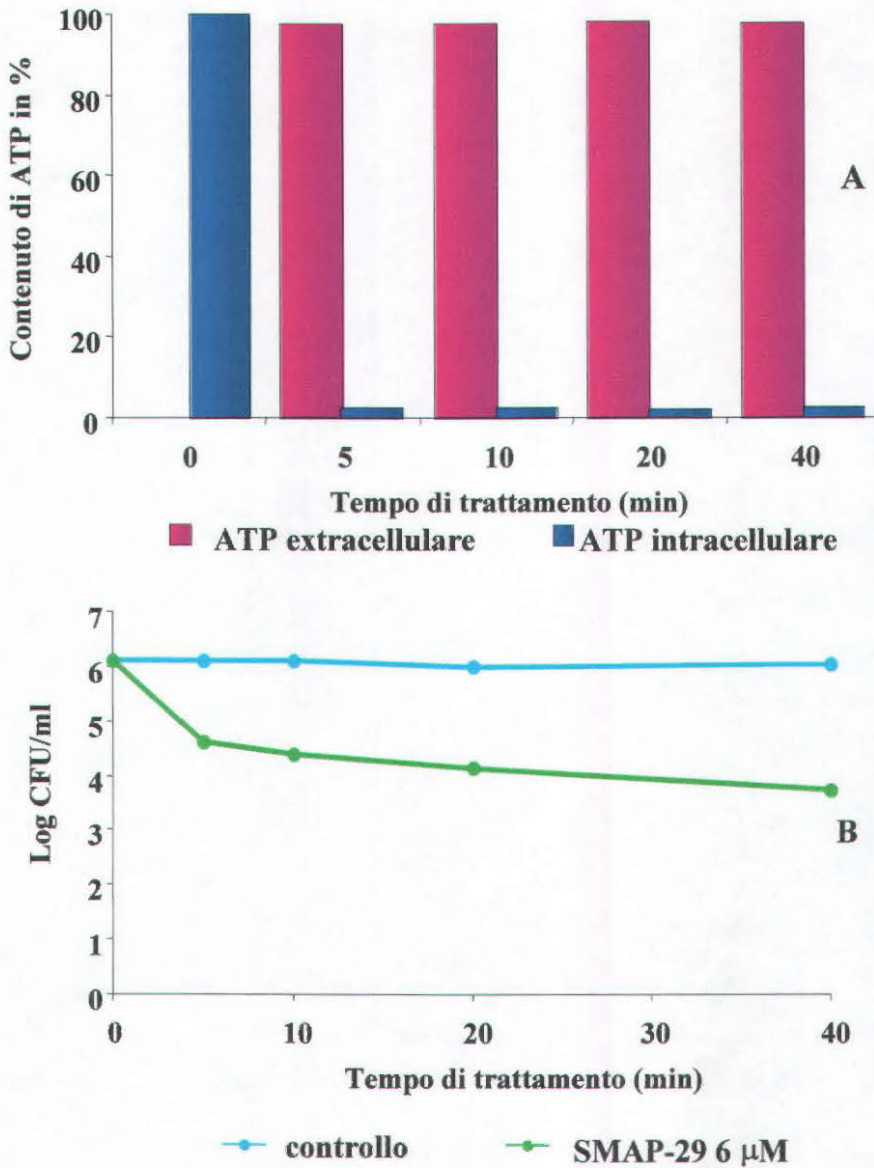


Fig. 42 - Valutazione del rilascio di ATP nel mezzo extracellulare (A) e del numero di CFU (B) dopo trattamento di *C. neoformans* con 6 µM SMAP-29.

Tuttavia si è notata la presenza di ATP extracellulare anche nei controlli, sebbene di entità modesta (< 10% del totale) rispetto a quella osservata dopo trattamento con peptidi. Ciò è verosimilmente ascrivibile ad una diminuita vitalità, causata forse dal passaggio da un mezzo di coltura all'altro, di una frazione della sospensione cellulare di partenza, cosa già osservata nei controlli degli esperimenti di "time killing", nei quali vi è prima una modesta diminuzione del numero delle CFU e poi un aumento a partire da 90-120 min, allorquando le cellule iniziano a dividersi.

Nell'ambito dell'efflusso di ATP causato dal trattamento con PG-1 e SMAP-29, rimane da stabilire se esso derivi da lisi cellulare e sia quindi passivo, o sia mediato, in assenza

di lisi, da canali di membrana presumibilmente associati al trasporto di ATP, ad esempio da membri della famiglia di proteine ABC (“ATP binding cassette”) [Schwiebert et al., 1998]. In questo caso, l’ATP rilasciato all’esterno potrebbe agire attraverso recettori purinergici della famiglia P2Z/P2X₇, causando un’aumentata permeabilità a K⁺ e Cl⁻ e anche lisi cellulare [Di Virgilio, 1995; Di Virgilio, 2000]. Un meccanismo di questo tipo è già stato proposto per le istatine, peptidi ricchi in istidina rilasciati nella saliva e dotati di attività candidastatica [Koshlukova et al., 1999].

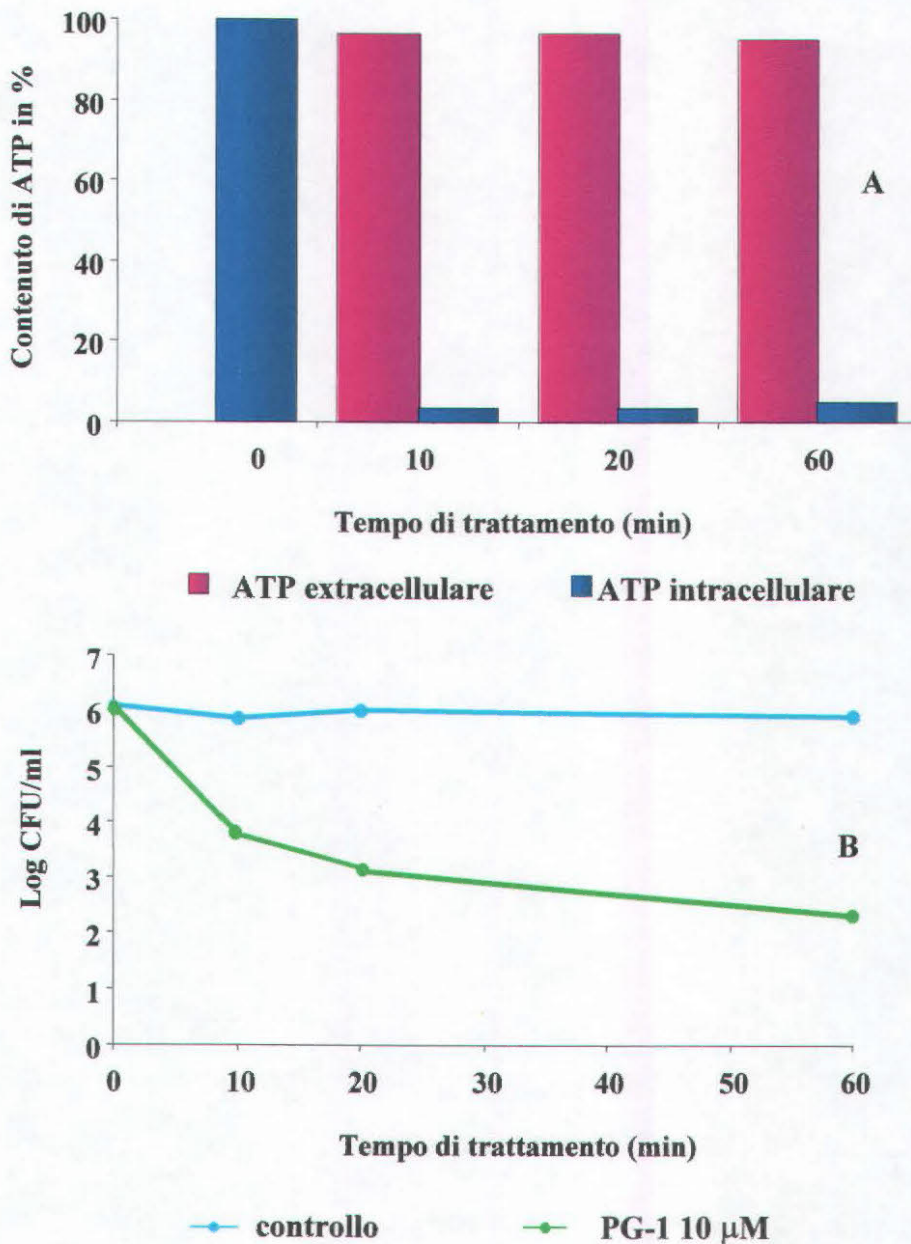


Fig. 43 - Valutazione del rilascio di ATP nel mezzo extracellulare (A) e del numero di CFU (B) dopo trattamento di *C. albicans* con 10 µM PG-1.

3.5 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Il dosaggio dell'ATP intra- ed extracellulare ha chiaramente indicato che i peptidi hanno un rapido effetto sulle caratteristiche di permeabilità della membrana delle cellule fungine. Per valutare morfologicamente le alterazioni indotte dai peptidi a livello della superficie delle cellule, e vedere se queste sono compatibili con un meccanismo litico di rilascio dell'ATP, *C. neoformans* e *C. albicans*, trattati rispettivamente con SMAP-29 e PG-1, sono stati osservati mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). Per questi esperimenti è stato necessario usare una densità cellulare molto più elevata di quella utilizzata per il "time killing" (20×10^6 CFU/ml vs. 1×10^6 CFU/ml); di conseguenza, anche la quantità dei peptidi è stata notevolmente aumentata rispetto ai valori di MIC.

Come si può vedere nella Fig. 44, le cellule di *C. neoformans* non trattate mostrano sulla superficie una tipica struttura in rilievo (foto 1), verosimilmente corrispondente alla capsula polisaccaridica extracellulare [Cleare e Casadevall, 1999]. Questa tende via via a scomparire nelle cellule trattate con concentrazioni crescenti di peptide (foto 2 e 3). Oltre a questo, non appaiono però alterazioni evidenti a livello della superficie, ad esempio formazione di "pori" visibili.

Anche nel caso di *C. albicans*, trattata con PG-1 (Fig. 45), si osservano delle alterazioni della superficie che, da liscia nei controlli (foto 1), diventa via via piena di vescicolazioni ("blebs") all'aumentare della concentrazione del peptide (foto 2 e 3). Anche in questo caso non si osservano rotture evidenti delle cellule che permettano di discriminare con certezza tra un meccanismo litico e non litico di uccisione.

Le osservazioni alla SEM indicano quindi che i peptidi alterano la morfologia della superficie fungina, senza però provocare fratture evidenti nella sua continuità. Per verificare la presenza di "pori" di dimensioni al di sotto del potere di risoluzione della SEM, sarebbe pertanto necessario ricorrere ad esperimenti di esclusione di piccole molecole (es. fluorofori come il propidio ioduro), che vengono escluse dalle cellule integre e vitali ed entrano in quelle con alterazioni di membrana sufficientemente grandi da permetterne l'ingresso passivo.

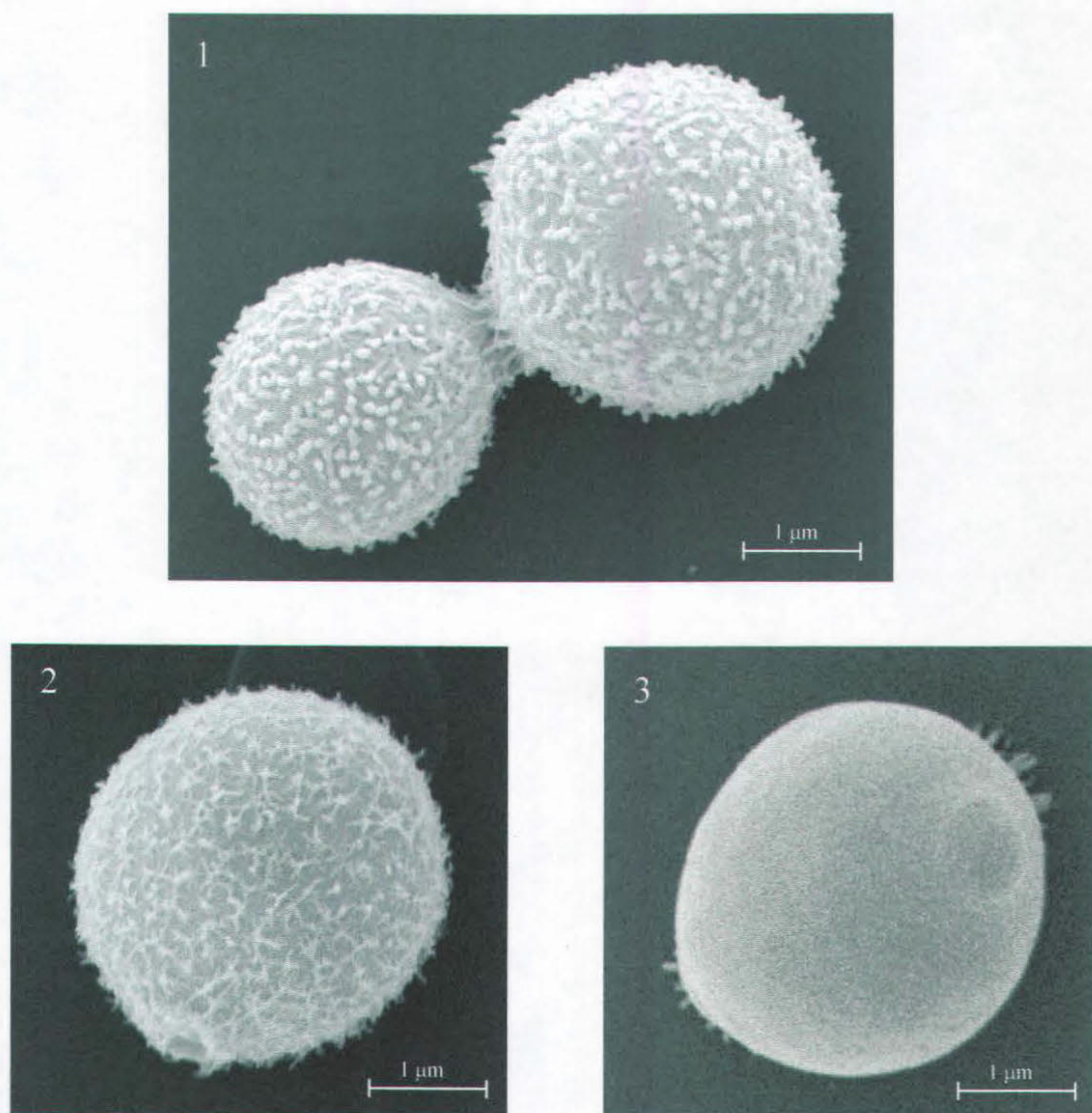


Fig. 44 - Cellule di *C. neoformans* non trattate (1) e trattate per un'ora con SMAP-29 12 μM (2) e 25 μM (3), fotografate al microscopio elettronico a scansione.

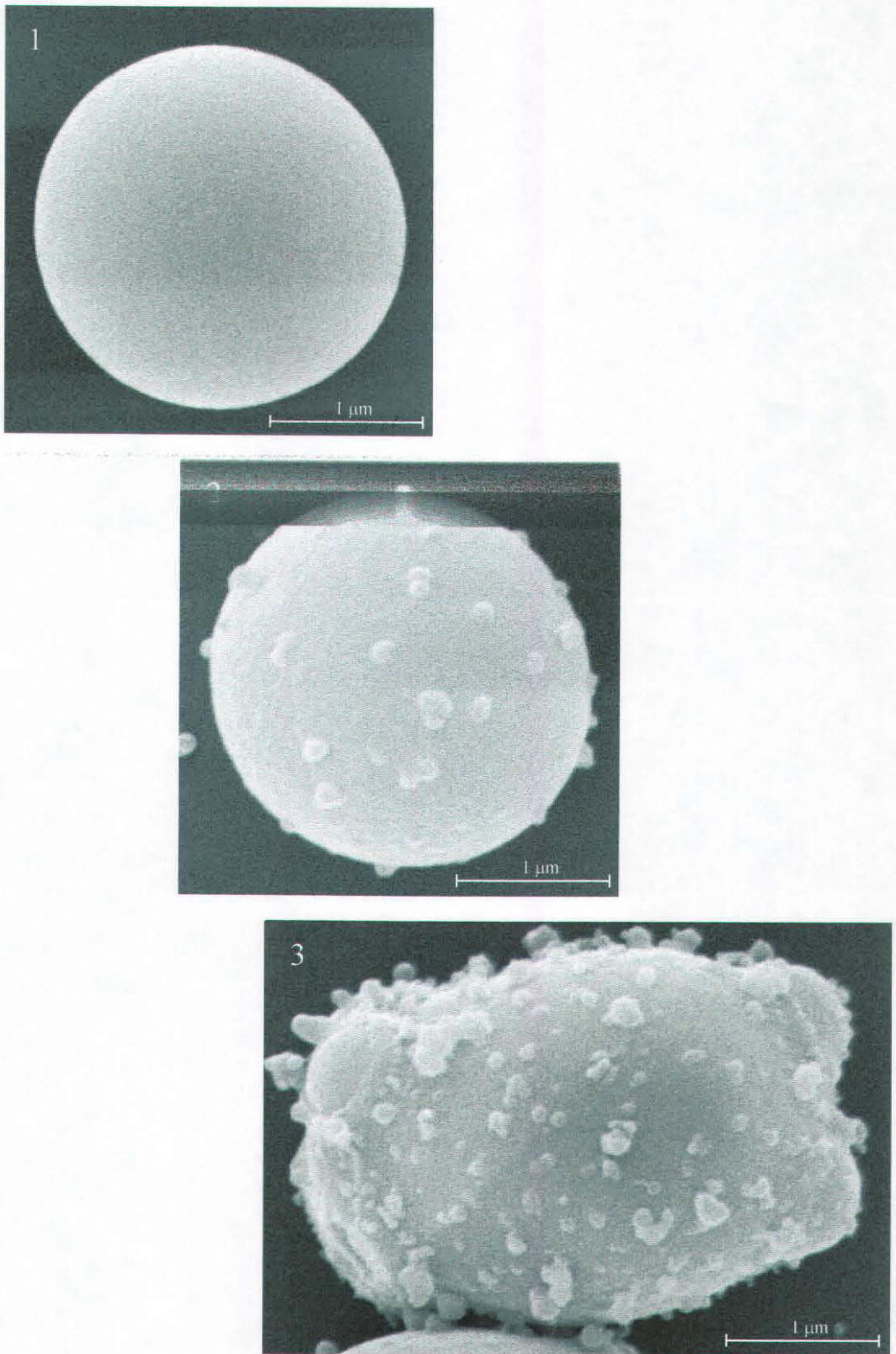


Fig. 45 - Cellule di *C. albicans* non trattate (1) e trattate per due ore con PG-1 40 µM (2) e 80 µM (3), fotografate al microscopio elettronico a scansione.

4.1 Valutazione dell'effetto di esopolisaccaridi sull'attività antimicrobica di peptidi tramite saggi di Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Come già spiegato nei paragrafi 3.1 e 3.2 dell'Introduzione, uno dei fattori che favorisce l'instaurarsi e il mantenimento dell'infezione microbica a livello polmonare nei soggetti CF è la produzione ed il rilascio da parte di alcune specie batteriche di esopolisaccaridi. E' stato provato che questi esopolisaccaridi hanno la capacità di dare soluzioni piuttosto viscosi e di formare aggregati in particolari condizioni; sembra pertanto interessante valutare la possibilità che gli esopolisaccaridi batterici, in genere anionici, possano inibire i meccanismi di difesa polmonari e contribuire così alla persistenza dell'infezione. Lo scopo è quello di valutare *in vitro* l'effetto che alcuni esopolisaccaridi, prodotti e rilasciati da patogeni polmonari, hanno sull'attività di peptidi antimicrobici appartenenti a diverse classi strutturali sia umani (LL-37, hBD-1 e hBD-3), presenti anche a livello polmonare, sia da altre specie animali (PG-1 da maiale, SMAP-29 da pecora e Bac7 da bovino).

Per valutare l'effetto di esopolisaccaridi da patogeni polmonari sull'attività antimicrobica dei peptidi sono stati in primo luogo allestiti dei saggi di MIC, volti a determinare la concentrazione minima di peptide necessaria per inibire la crescita batterica, in presenza o assenza di tali polimeri. Per questi esperimenti è stato utilizzato il ceppo ML-35 di *E. coli*, dimostratosi sensibile all'azione di tutti i peptidi considerati; gli esopolisaccaridi utilizzati sono stati forniti dalla dott.ssa P. Cescutti.

Nella Fig. 46 è mostrato il diverso grado di inibizione di alcuni esopolisaccaridi sull'attività di peptidi appartenenti a diverse classi strutturali: SMAP-29, di origine ovina, quale rappresentante dei peptidi ad α -elica anfipatica; PG-1, di origine suina, con conformazione a β -foglietto stabilizzata da due ponti disolfuro; i frammenti 1-16 e 1-35 di Bac7, di origine bovina e appartenente alla famiglia dei peptidi lineari ricchi in Pro e Arg. Gli esopolisaccaridi BTS 3, BTS 7 e BTS 13 sono prodotti da ceppi di *B. cepacia* isolati da pazienti CF dell'IRCCS "Burlo Garofolo" di Trieste; K 40 deriva da un ceppo mucoide di *K. pneumoniae*, l'alginato (Alg) da un ceppo mucoide di *P. aeruginosa*; il destrano (Dex), polimero neutro del glucosio, è stato usato come controllo negativo di inibizione.

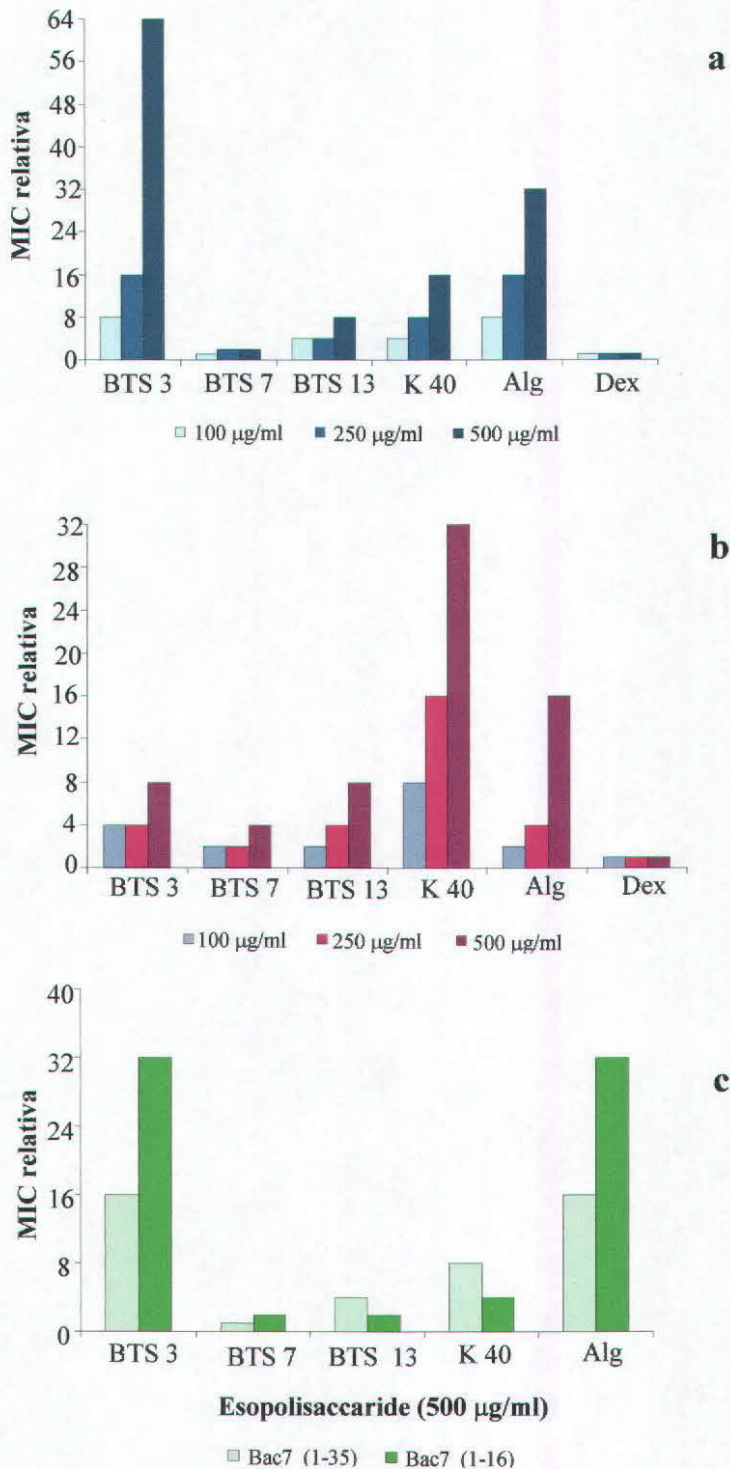


Fig. 46 - Incremento del valore di MIC verso *E. coli* ML-35 per SMAP-29 (a), PG-1 (b), Bac7(1-35) e (1-16) (c), in presenza di diversi esopolisaccaridi. I valori di MIC in assenza di esopolisaccaridi erano rispettivamente di 0.5 µM per SMAP-29, 1 µM per PG-1, 0.5 µM per Bac7(1-35) e 2 µM per Bac7(1-16). I dati riportati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili.

L'attività antimicrobica di SMAP-29 e PG-1 (Fig. 46a e Fig. 46b) è inibita da tutti gli esopolisaccaridi saggiati in maniera dose-dipendente: il valore di MIC di SMAP-29 aumenta, rispettivamente, di 64 e 32 volte in presenza della concentrazione massima di BTS 3 e Alg (500 µg/ml); alla stessa concentrazione K 40 fa aumentare il valore della MIC di 16 volte. Evidente risulta essere l'inibizione di K 40 sull'attività di PG-1 (aumento della MIC pari a 32 volte alla dose massima), mentre lievemente inferiore è l'effetto inibitorio di Alg (aumento di 16 volte del valore di MIC). L'attività antimicrobica di entrambi i peptidi sembra invece essere solo marginalmente influenzata dalla presenza di BTS 7 e BTS 13.

L'effetto degli esopolisaccaridi è stato anche saggiato su due frammenti di diversa lunghezza del peptide Bac7 (frammenti 1-35 e 1-16). I risultati ottenuti sono riportati in Fig. 46c: l'effetto inibitorio di BTS 3 e Alg è maggiore sul frammento 1-16 rispetto al frammento 1-35, un risultato opposto è stato invece osservato con K 40.

Saggi analoghi sono stati compiuti anche in presenza di LL-37, peptide umano con struttura ad α -elica anfipatica appartenente alla famiglia delle catelicidine, e del frammento privo dei primi 6 residui all'N-terminale. L'attività di LL-37 si è dimostrata meno sensibile alla presenza degli esopolisaccaridi e l'effetto inibitorio maggiore è esercitato da Alg (aumento della MIC di 16 volte) (Fig. 47a). Il frammento 7-37 è risultato maggiormente suscettibile all'inibizione da parte degli esopolisaccaridi considerati, sebbene la sua attività antimicrobica risulti comparabile a quella del peptide a lunghezza completa, suggerendo quindi che l'estremità N-terminale non sia rilevante per l'azione del peptide, ma possa avere qualche effetto per la sua interazione con gli esopolisaccaridi (Fig. 48).

L'effetto inibitorio in funzione della concentrazione di esopolisaccaride è stato saggiato per BTS 7, polimero di particolare interesse per il gruppo della dott.ssa P. Cescutti, che si è occupata della caratterizzazione della sua struttura chimica. I dati riportati in Fig. 47b mostrano che l'inibizione aumenta al crescere della concentrazione del polimero, e diventa particolarmente evidente alla concentrazione di 1 mg/ml.

L'attività antibatterica dei peptidi è stata anche valutata su *K. pneumoniae* e su *P. aeruginosa*, produttori di esopolisaccaridi (Tab. 12); questi ultimi però sono stati aggiunti al terreno in quanto non sono prodotti nelle condizioni di saggio. La MIC

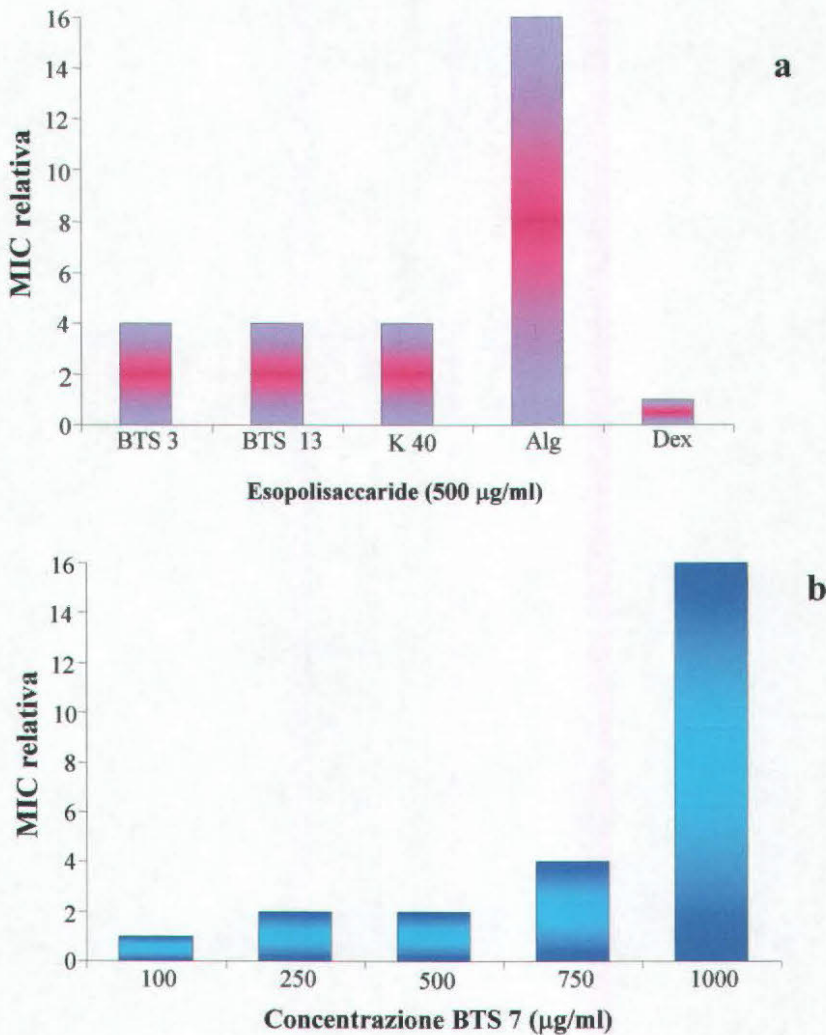


Fig. 47 - Incremento del valore di MIC verso *E. coli* ML-35 per LL-37 in presenza di diversi esopolisaccaridi (a) e di dosi crescenti di BTS 7 (b). Il valore di MIC per LL-37 in assenza di esopolisaccaridi era di 4 µM. I dati riportati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili.

di SMAP-29 e PG-1 su *K. pneumoniae* K 40 aumenta, rispettivamente, di 16 e 8 volte in presenza dell'esopolisaccaride da esso prodotto. Dato l'elevato grado di resistenza mostrato da *B. cepacia*, gli esopolisaccaridi prodotti da questa specie (BTS 3 e BTS 13) sono stati aggiunti al terreno nei saggi di MIC su *P. aeruginosa*: il valore di MIC è aumentato di 32 volte per SMAP-29 e di 8 volte per PG-1. Tali dati indicano che l'effetto inibitorio dei polisaccaridi non è limitato solo all'attività dei peptidi verso *E. coli* ML-35, ma è esteso anche ad altri batteri quali appunto *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

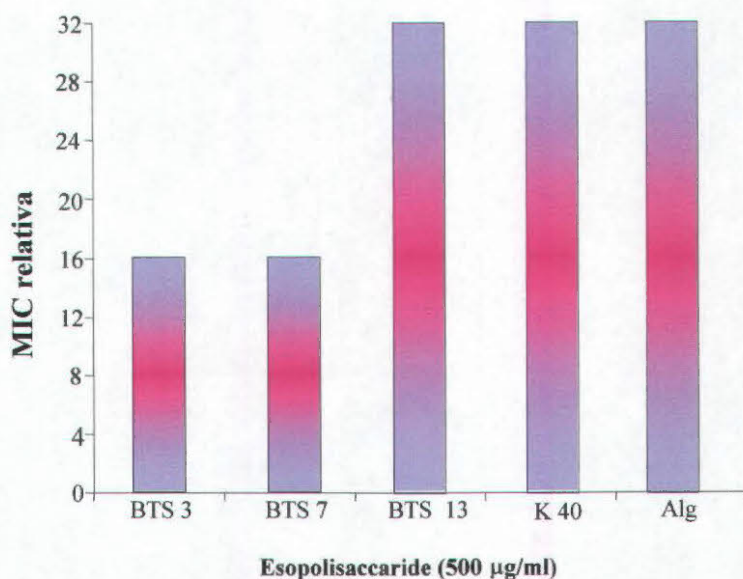


Fig. 48 - Incremento del valore di MIC verso *E. coli* ML-35 per LL-37(7-37) in presenza di diversi esopolisaccaridi. Il valore di MIC per LL-37(7-37) in assenza di esopolisaccaridi era di 2 µM. I dati riportati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili.

	<i>K. pneumoniae</i> K40	
	- K40	+ K40
SMAP-29	0.125	8
PG-1	4	32

	<i>P. aeruginosa</i> *		
	- BTS3/BTS13	+BTS3	+BTS13
SMAP-29	0.5	16	16
PG-1	4	32	32

*Ceppo isolati da pazienti CF

Tab. 12 - Valori di MIC (µM) in presenza/assenza di esopolisaccaridi (500 µg/ml) verso alcuni patogeni polmonari. I numeri riportati corrispondono al valore medio di MIC ottenuto da tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili.

Oltre ai peptidi già citati, l'effetto degli esopolisaccaridi è stato saggiato anche sull'attività di β-defensine umane, in particolare hBD-1 e hBD-3, che vengono espresse anche nel tratto respiratorio, dove si pensa rappresentino un importante meccanismo di difesa.

Nella Fig. 49 sono rappresentati i dati relativi all'incremento del valore di MIC per hBD-3, rilevato in presenza degli esopolisaccaridi considerati. Il polimero Alg, prodotto da *P. aeruginosa*, ha mostrato un notevole effetto inibitorio sull'attività di questo peptide (aumento della MIC di ben 32 volte). L'effetto inibitorio è ancora buono per il polisaccaride K40 (aumento di MIC di 8 volte) ed è invece modesto per BTS 7 (aumento di 4 volte del valore di MIC).

Con questo tipo di saggio non è stato possibile invece quantificare l'effetto inibitorio degli esopolisaccaridi sull'azione antibatterica di hBD-1, dal momento che questo peptide si è dimostrato poco attivo verso *E. coli* già in presenza del solo terreno di coltura (MIC di 64 μM). hBD-1 è infatti un peptide altamente sensibile alla presenza di sali nel mezzo: per tale ragione, le prove sono state effettuate riducendo la percentuale di TSB fino all'1%. Anche con questo espediente però l'attività antibatterica non è migliorata, rendendo impossibile verificare se ci fosse inibizione da parte degli esopolisaccaridi batterici aggiunti nel terreno.

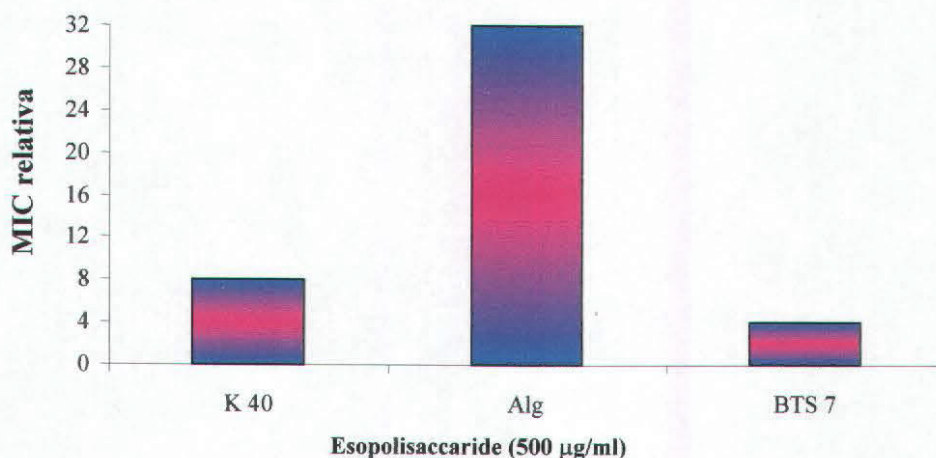


Fig. 49 - Incremento del valore di MIC verso *E. coli* ML-35 per hBD-3 in presenza di diversi esopolisaccaridi. Il valore di MIC per hBD-3 in assenza di esopolisaccaridi era di 2 μM . I dati riportati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili.

4.2 Influenza di esopolisaccaridi sulla cinetica di permeabilizzazione di *E. coli* ML-35

Come detto precedentemente, molti peptidi esplicano la loro attività antimicrobica mediante un meccanismo di permeabilizzazione di membrana delle cellule bersaglio. La cinetica di permeabilizzazione può essere seguita per via spettrofotometrica utilizzando

il ceppo ML-35 di *E. coli*, le cui caratteristiche genetiche lo rendono adatto per tale scopo (vedi paragrafo 3.9 di Materiali e Metodi).

Nella Fig. 50 è rappresentata la cinetica di permeabilizzazione ottenuta con 1 μ m SMAP-29 in presenza/assenza degli esopolisaccaridi BTS 7, Alg e K 40: Alg e K 40 annullano la capacità del peptide di permeabilizzare la membrana interna del batterio, BTS 7 invece la inibisce parzialmente.

Esperimenti analoghi sono stati effettuati anche con PG-1 e LL-37: K 40 annulla quasi totalmente l'azione permeabilizzante di PG-1, mentre Alg e BTS 7 la rallentano, il primo in maniera più efficace del secondo (Fig. 51); per quanto riguarda LL-37, sia Alg che K 40 inibiscono completamente l'azione del peptide, che è invece poco o nulla influenzata da BTS 7 (Fig. 52); discorso analogo può esser fatto anche per il frammento 7-37 di LL-37, nonostante la cinetica di permeabilizzazione mostrata da questo peptide sia più lenta rispetto a quella del peptide a sequenza completa (Fig. 53).

4.3 Cinetica di uccisione di SMAP-29, PG-1 e LL-37 in presenza di esopolisaccaridi

Per determinare la velocità di uccisione di cellule di *E. coli* ML-35 da parte dei peptidi e per valutare le eventuali influenze degli esopolisaccaridi presenti nel mezzo di coltura, sono state eseguite delle prove di “time killing”, volte a evidenziare come la rapidità d'azione dei peptidi antimicrobici possa esser influenzata dalla presenza di tali polimeri di origine batterica.

Nella Fig. 54 è stata riportata la cinetica di uccisione di SMAP-29, PG-1 e LL-37 in presenza di alginato da *P. aeruginosa* e di K 40 da *K. pneumoniae*.

Un decremento di circa 4 log del numero di unità formanti colonie (CFU/ml) è visibile già dopo 5 minuti di trattamento con SMAP-29 e PG-1, indice questo di una rapida attività antibatterica sulle cellule di *E. coli* ML-35. Questa attività risulta invece totalmente annullata dalla presenza nel mezzo di coltura di Alg e K 40 (Fig. 54a e 54b).

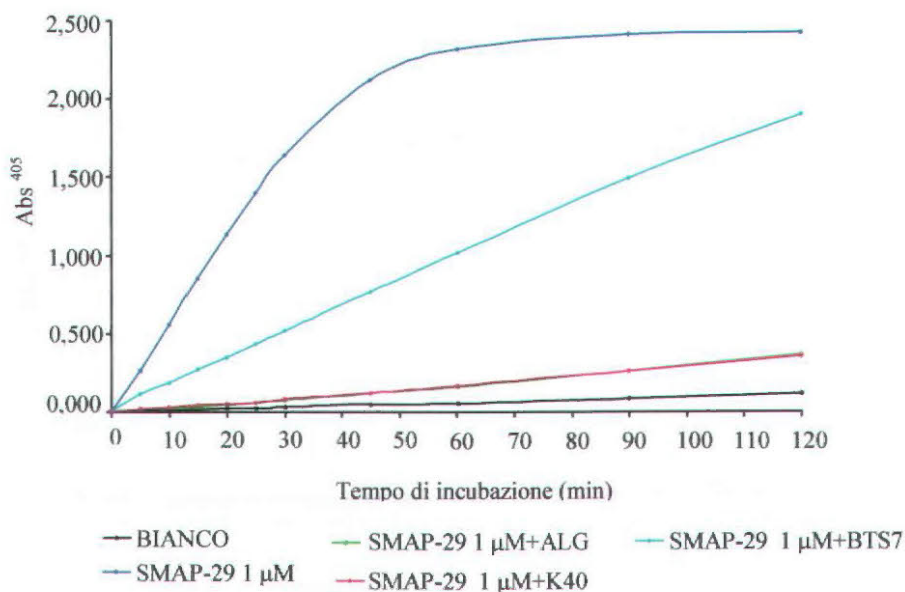


Fig. 50 - Cinetica di permeabilizzazione di SMAP-29 (1 μM) su *E. coli* ML-35 in presenza/assenza di esopolisaccaridi alla concentrazione di 1 mg/ml.

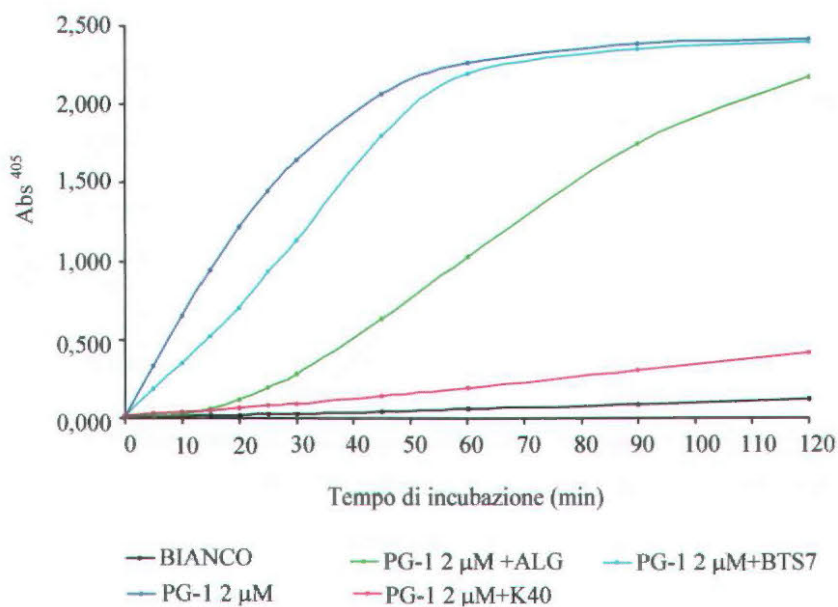


Fig. 51 - Cinetica di permeabilizzazione di PG-1 (2 μM) su *E. coli* ML-35 in presenza/assenza di esopolisaccaridi alla concentrazione di 1 mg/ml.

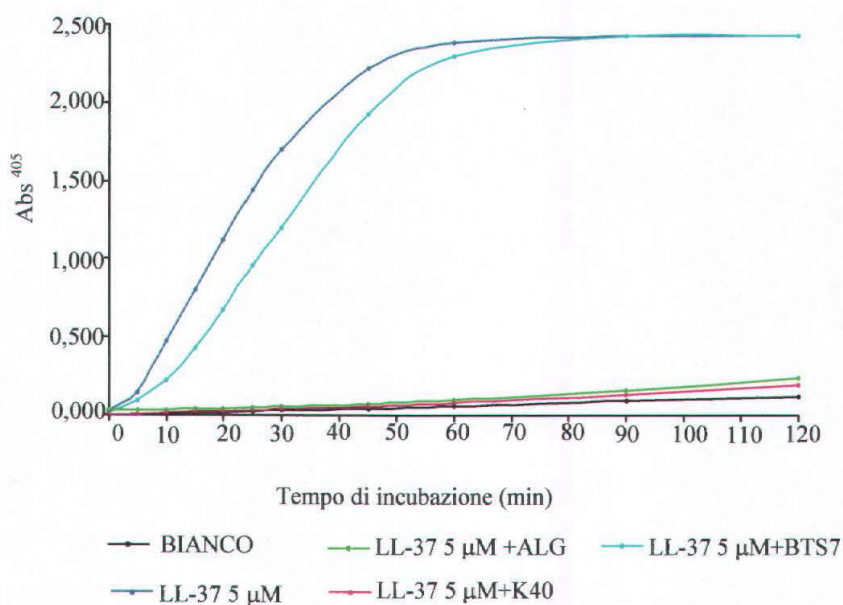


Fig. 52 - Cinetica di permeabilizzazione di LL-37 (5 μM) su *E. coli* ML-35 in presenza/assenza di esopolisaccaridi alla concentrazione di 1 mg/ml.

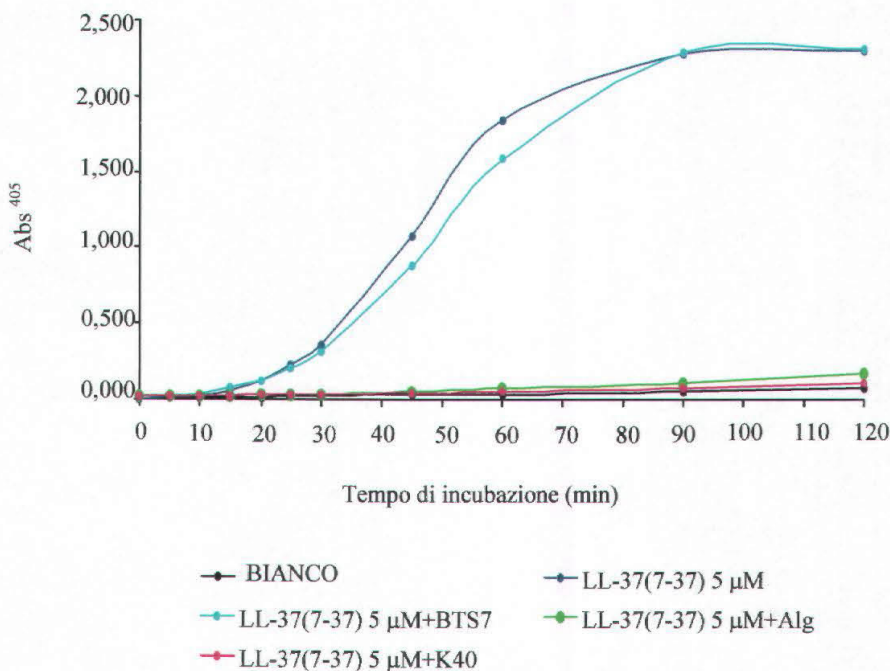


Fig. 53 - Cinetica di permeabilizzazione di LL-37(7-37) (5 μM) su *E. coli* ML-35 in presenza/assenza di esopolisaccaridi alla concentrazione di 1 mg/ml.

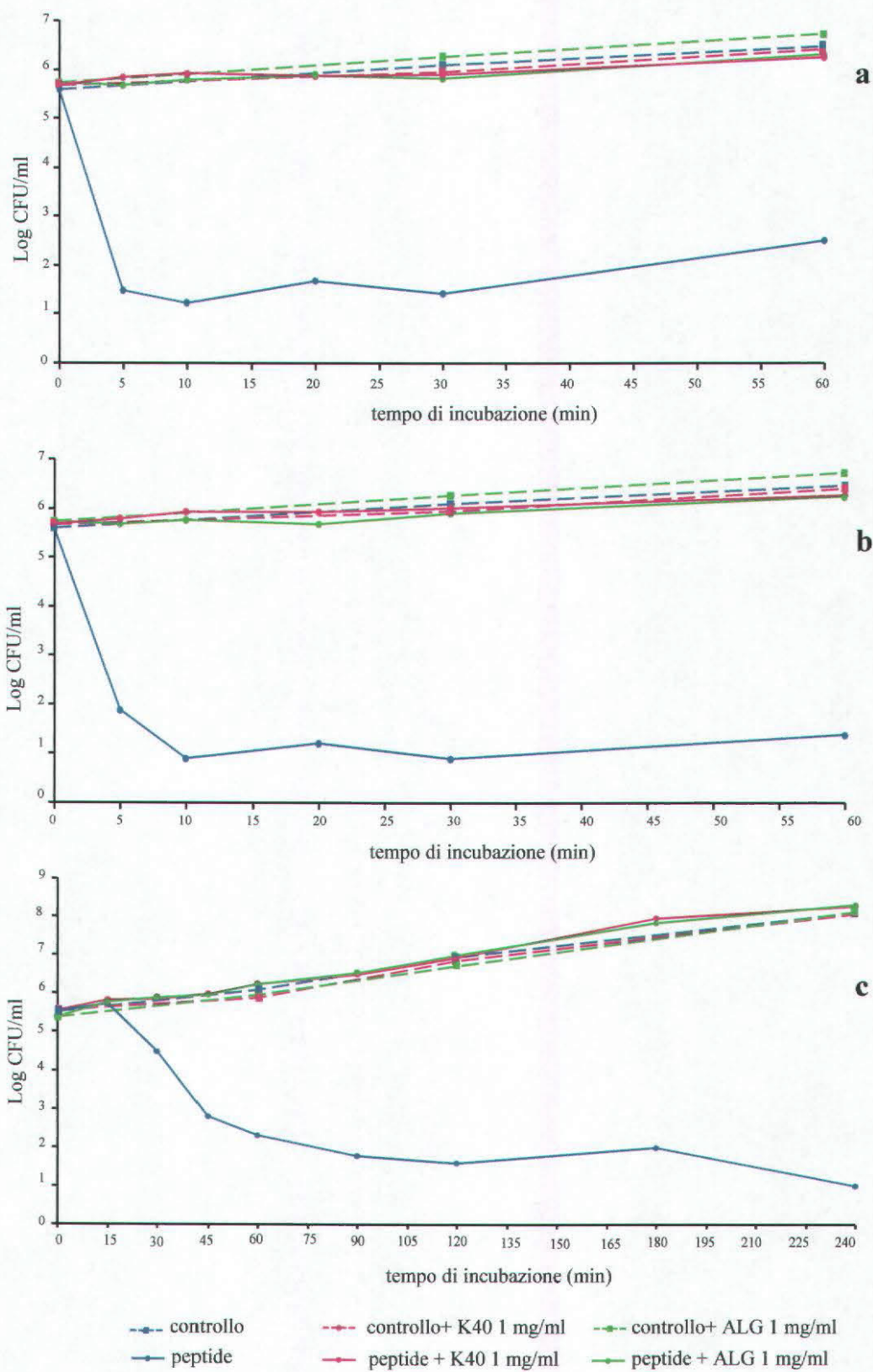


Fig. 54 - Cinetica dell'attività battericida di 0.5 μ M SMAP-29 (a), 2 μ M PG-1 (b) e 5 μ M LL-37 (c) in presenza/assenza nel mezzo di coltura di Alg e K 40.

Gli stessi esopolisaccaridi hanno mostrato un buon livello di inibizione anche sull'attività antimicrobica di LL-37, sebbene questo peptide presenti una cinetica di uccisione più lenta, dal momento che per registrare un decremento di 4 log del numero di CFU/ml sono necessari circa 120 minuti di trattamento (Fig. 54c).

Nella chimica dei polisaccaridi, un parametro importante risulta essere il grado di acetilazione della molecola: deacetilando tali composti, diminuisce infatti la capacità di formare legami idrogeno intra- ed intermolecolari, con conseguente aumento del disordine conformazionale del polimero e decremento della viscosità.

L'alginato prodotto da batteri, diversamente da quello di origine algale, presenta un certo grado di acetilazione che rende quindi la molecola più viscosa: questo sembra essere un sistema elaborato dai batteri per evadere più facilmente le difese immunitarie e per aumentare il livello di resistenza all'azione dei radicali liberi, che perdono la loro reattività legandosi ai gruppi acetile del polimero stesso [Gacesa e Russel, 1990].

Per questo motivo si è ritenuto opportuno eseguire degli esperimenti di “time killing” in presenza sia di esopolisaccaridi nella forma nativa sia in quella deacetilata, per verificare se vi fosse un diverso effetto delle due sull'attività antimicrobica dei peptidi. Per questi esperimenti è stato utilizzato BTS 7, l'unico al momento disponibile in entrambe le forme.

Dalle Fig. 55a, b e c, si può osservare come le due forme di questo esopolisaccaride di *B. cepacia* inibiscano in modo simile l'attività battericida di SMAP-29, PG-1 e LL-37. Questa inibizione è inoltre solo parziale e conferma quanto osservato negli esperimenti di cinetica di permeabilizzazione, nei quali BTS 7 si è dimostrato un debole inibitore dell'azione permeabilizzante dei peptidi saggiati (Fig. 50, 51, 52 e 53).

Il fatto che non siano state rilevate differenze significative tra la forma nativa e quella deacetilata del polimero non si accorda con l'ipotesi che la forma nativa, più viscosa e con maggiori possibilità di instaurare legami idrogeno, possa interagire meglio con i peptidi, bloccandone l'attività in maniera più evidente. Tale ipotesi sarebbe plausibile nel caso in cui i gruppi acetile della molecola fossero posizionati in modo da non formare legami idrogeno intramolecolari, ma fossero invece disponibili per instaurare questo tipo di interazione con altre molecole (ad es. i peptidi); la posizione di questi gruppi chimici non è però ancora nota e quindi, al momento, non è possibile fornire ulteriori spiegazioni.

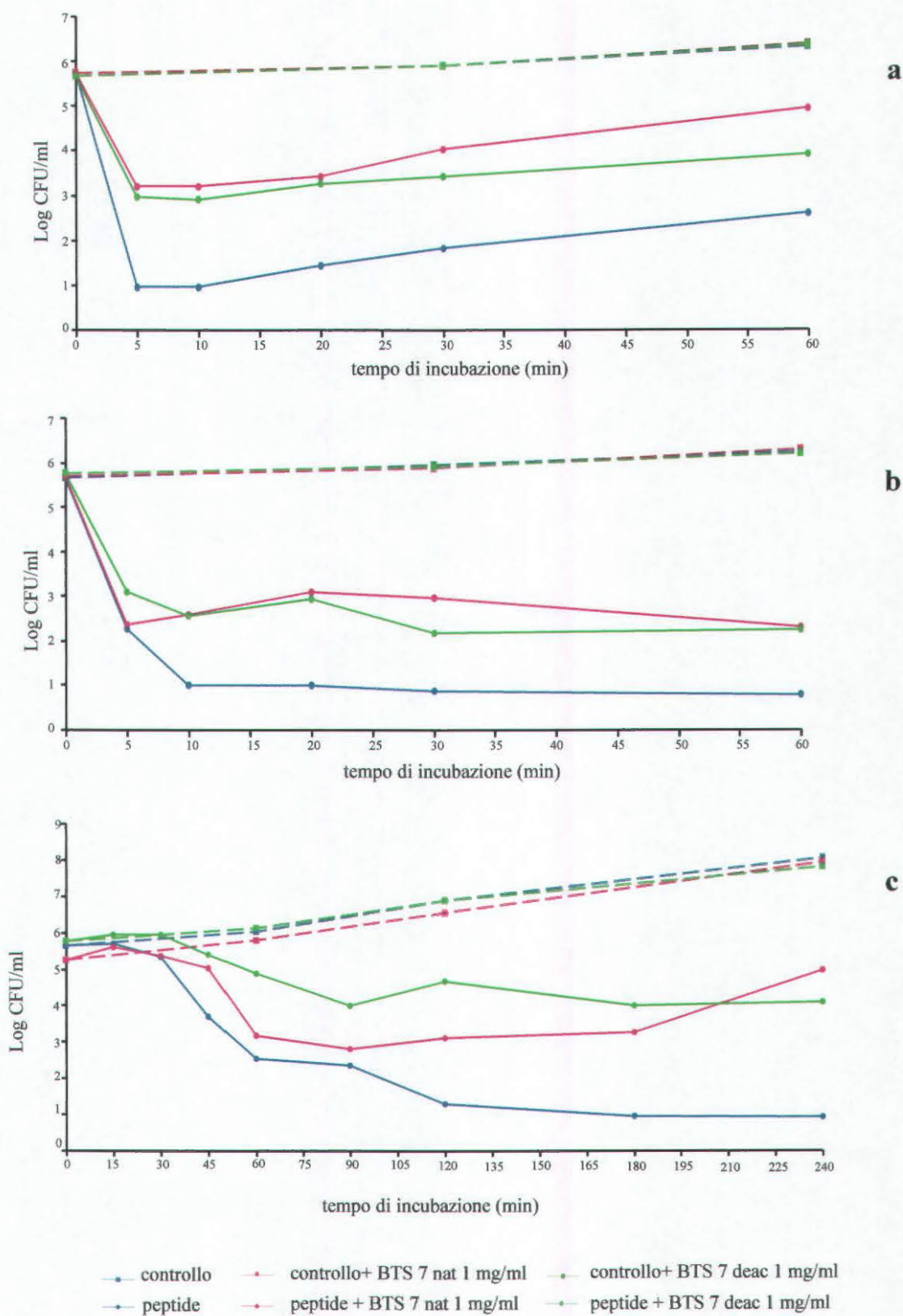


Fig. 55 - Cinetica dell'attività battericida di 0.5 μ M SMAP-29 (a), 2 μ M PG-1 (b) e 5 μ M LL-37 (c) in presenza/assenza nel mezzo di coltura di BTS 7 nativo e deacetilato.

4.4 Effetto della preincubazione degli esopolisaccaridi da *Burkholderia cepacia* con i peptidi

Dagli esperimenti di “time killing” è stato osservato che BTS 7 presenta un livello minore di inibizione dell’attività antimicrobica dei peptidi rispetto a Alg e K 40: si è ipotizzato quindi che questo polimero possa richiedere un tempo di contatto più lungo perché l’interazione con il peptide possa avvenire. Per questo sono stati effettuati esperimenti nei quali BTS 7 e i peptidi sono stati preincubati a 37°C prima dell’aggiunta della sospensione batterica (vedi paragrafo 3.10 di Materiali e Metodi). Tuttavia, anche dopo preincubazione per 60-120 min con i peptidi SMAP-29, LL-37 e PG-1, l’esopolisaccaride BTS 7 non ha mostrato un migliore effetto inibitorio (dati non riportati), mostrando quindi che l’interazione peptide-esopolisaccaride non dipende dal tempo in cui le due specie sono a contatto prima di raggiungere la cellula batterica.

4.5 Dicroismo circolare

La spettroscopia di dicroismo circolare è una tecnica che sfrutta la differenza di coefficiente di estinzione dei gruppi cromofori, che assorbono in un opportuno intervallo di lunghezza d’onda, di una molecola otticamente attiva irradiata, alternativamente, da una radiazione circolarmente polarizzata destra e sinistra [Woody, 1995]. L’effetto della differenza di assorbimento viene misurata dall’ellitticità molare $[\theta]$; tale grandezza è molto sensibile ai cambiamenti conformazionali di molecole otticamente attive.

Mediante questa tecnica spettroscopica si è voluto indagare sul possibile cambiamento conformazionale dei peptidi indotto dalla presenza dei diversi esopolisaccaridi saggati, cambiamento che è anche indice della loro possibile interazione.

La percentuale di α -elica di SMAP-29 aumenta circa del 25% in presenza di K 40 (Fig. 56); lo stesso polimero induce un incremento simile nel contenuto di α -elica di LL-37 (27%) (Fig. 56). In entrambi i casi, tali incrementi sono proporzionali alla quantità di esopolisaccaride aggiunto.

Alla concentrazione più bassa di Alg, si è osservato un aumento di struttura secondaria in SMAP-29 pari all’8%, percentuale che si è poi ridotta parallelamente all’incremento della concentrazione del polisaccaride (Fig. 57). Vista l’elevata densità di carica di Alg, questo fenomeno potrebbe essere dovuto al passaggio in fase acquosa di SMAP-29,

conseguentemente alla dissociazione del complesso polimero-peptide; il peptide è così indotto ad assumere una conformazione “random coil” dall’aumento di forza ionica derivante da aggiunte successive di polisaccaride.

Dalla Fig. 57 risulta evidente il passaggio in α -elica di LL-37 già alla concentrazione più bassa di Alg saggiata; si osserva infatti un aumento nel contenuto di α -elica pari al 23%, che rimane invariato anche in presenza di concentrazioni più elevate di Alg.

SMAP-29 non mostra rilevanti variazioni conformazionali a tutte le concentrazioni di BTS 7 saggiate (Fig. 58); questo concorda con i dati ottenuti dagli esperimenti precedentemente illustrati in cui è stato riscontrato uno scarso effetto inibitorio da parte di questo esopolisaccaride sull’attività antimicrobica del peptide. Una situazione analoga si è verificata anche per il peptide LL-37, il cui contenuto in α -elica non risente della presenza di BTS 7 (Fig. 58).

La conformazione di PG-1 non subisce significativi cambiamenti in presenza dei tre esopolisaccaridi considerati (dati non riportati); gli spettri CD ottenuti presentano la banda tipica di un “ β -turn”, struttura effettivamente presente nel peptide (vedi Fig. 14 in Risultati e Discussione). Questo risultato non è inaspettato in quanto la presenza dei ponti disolfuro stabilizza la conformazione di PG-1, che, a differenza dei peptidi ad α -elica anfipatica, è poco o nulla influenzata da cambiamenti quali la forza ionica e la presenza di solventi organici o di micelle che mimano l’ambiente di membrana.

[Gli spettri CD sono stati registrati in tampone e in acqua, ed hanno fornito risultati analoghi: qui di seguito vengono quindi riportati solo quelli in presenza di tampone].

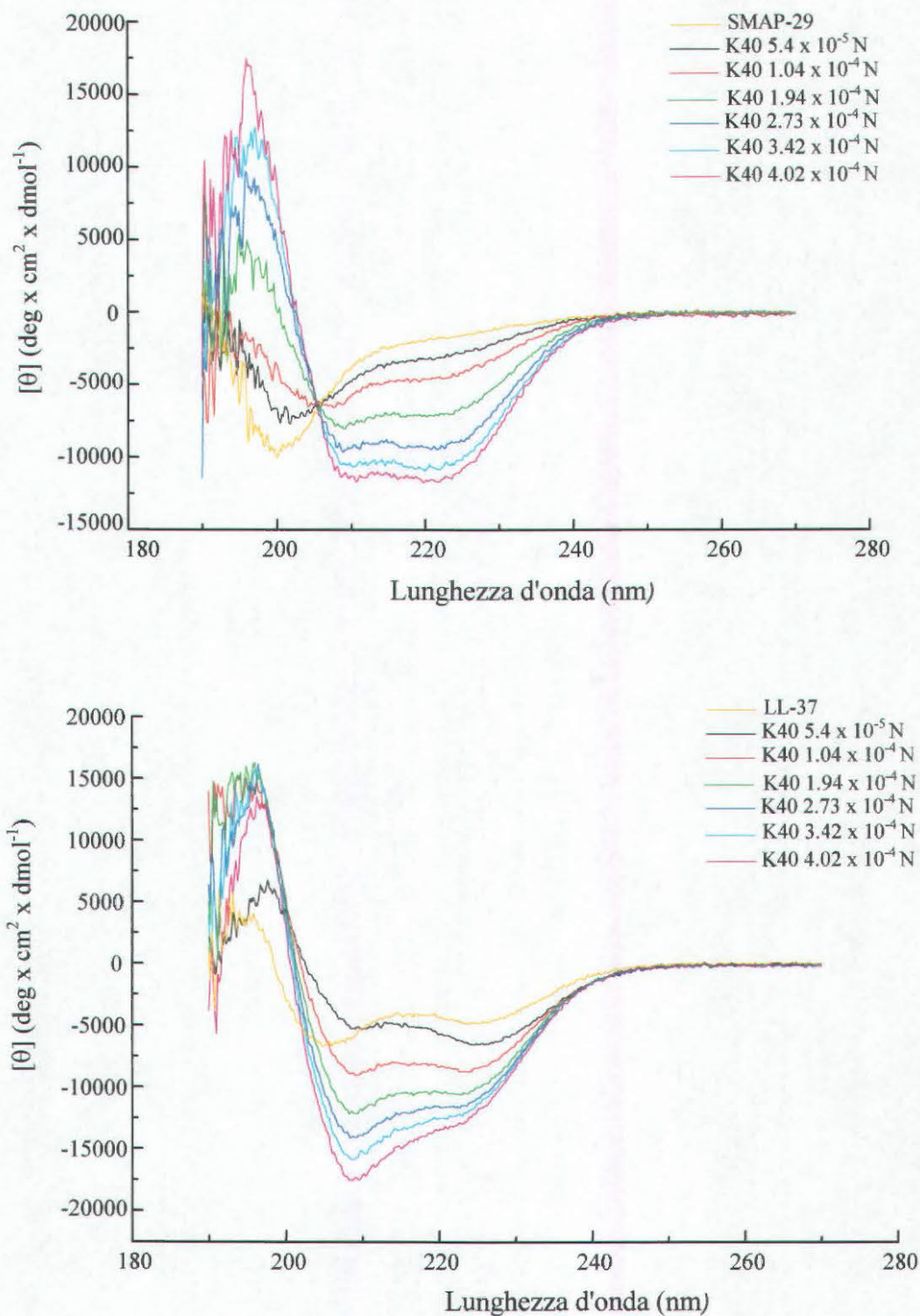


Fig. 56 - Spettri CD in tampone fosfato 5 mM, pH 7.4 di SMAP-29 (1.3×10^{-2} mM) in alto, e di LL-37 (1×10^{-2} mM) in basso, in presenza di concentrazioni crescenti di esopolisaccaride K40 da *Klebsiella pneumoniae*. Gli spettri riportati sono stati ottenuti sottraendo lo spettro del polisaccaride in tampone.

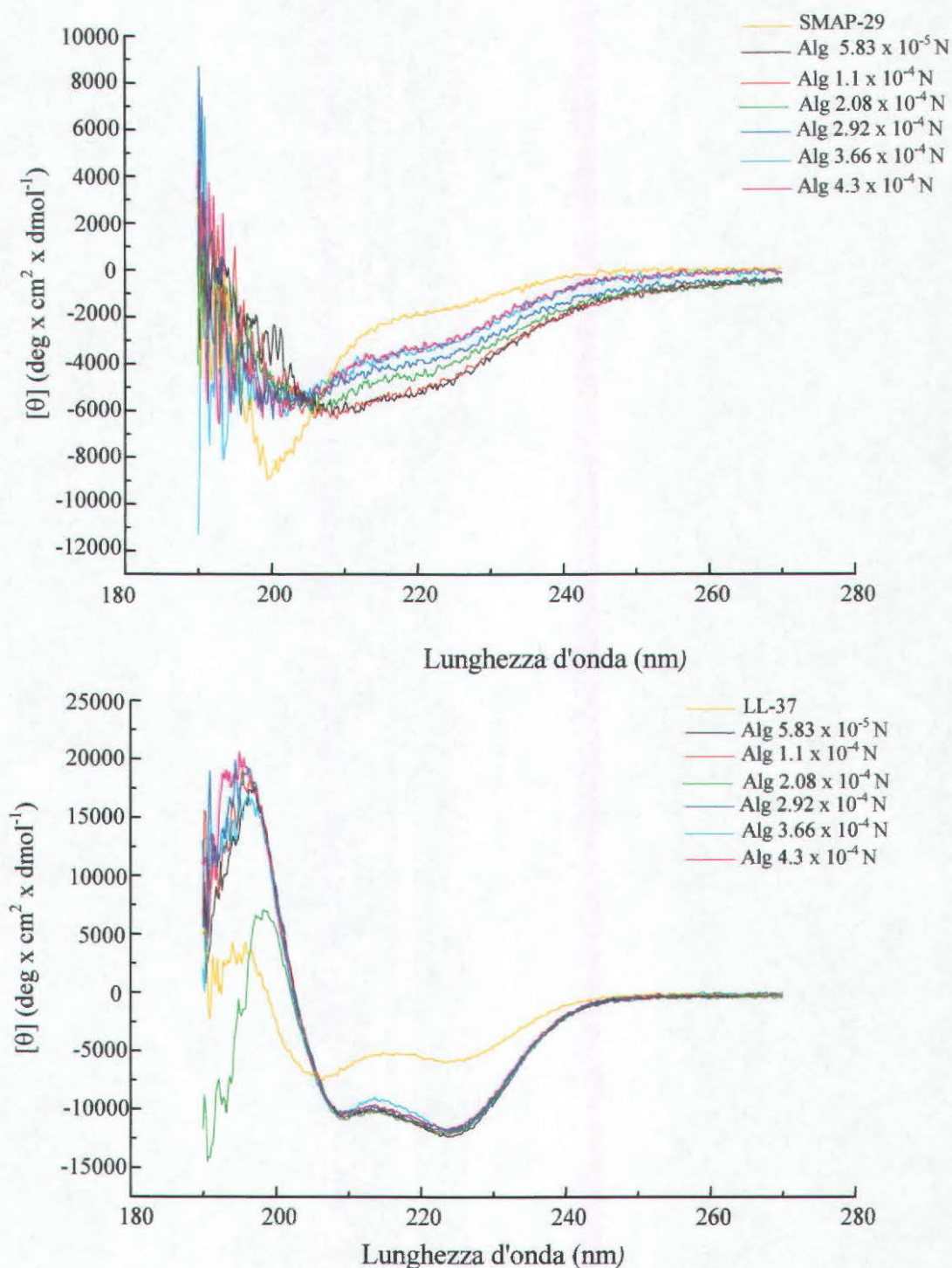


Fig. 57 - Spettri CD in tampone fosfato 5 mM, pH 7.4 di SMAP-29 (1.3×10^{-2} mM) in alto, e di LL-37 (1×10^{-2} mM) in basso, in presenza di concentrazioni crescenti di alginato da *Pseudomonas aeruginosa*. Gli spettri riportati sono stati ottenuti sottraendo lo spettro del polisaccaride in tampone.

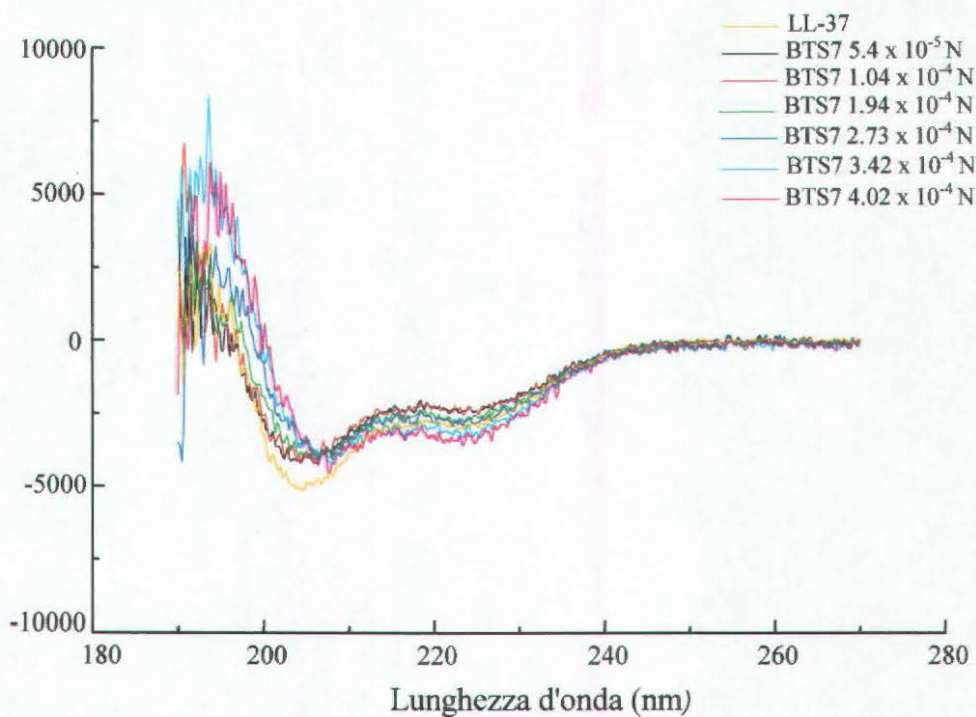
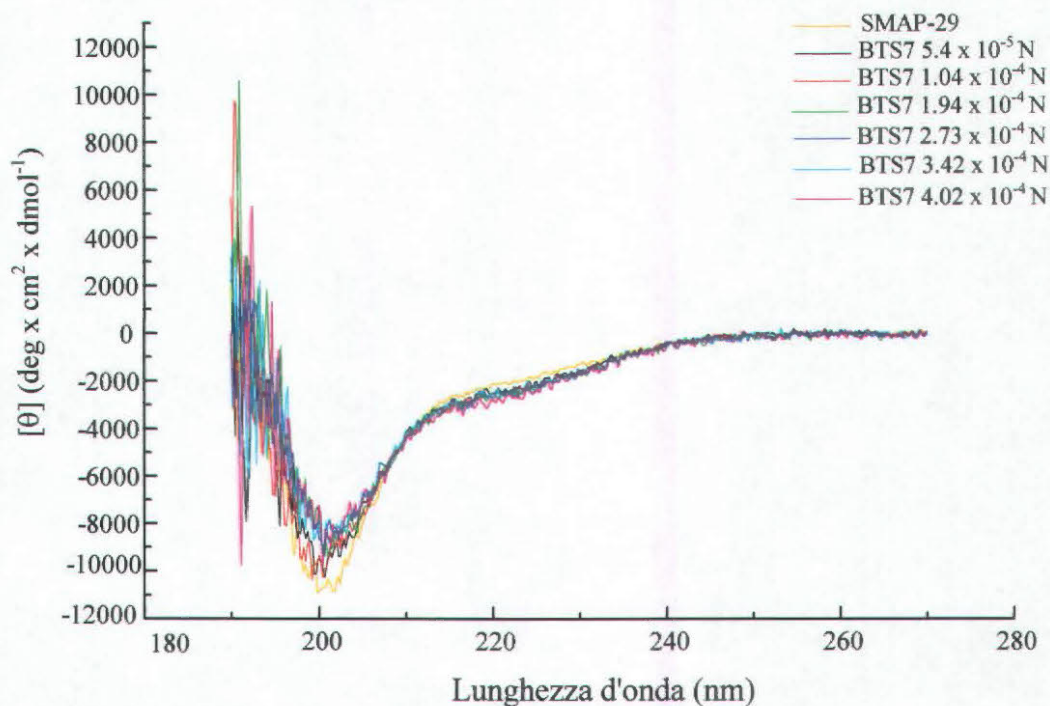


Fig. 58 - Spettri CD in acqua in tampone fosfato 5 mM, pH 7.4 di SMAP-29 (1.3×10^{-2} mM) in alto, e di LL-37 (1×10^{-2} mM) in basso, in presenza di concentrazioni crescenti di esopolisaccaride BTS7 da *Burkholderia cepacia*. Gli spettri riportati sono stati ottenuti sottraendo lo spettro del polisaccaride in tampone.

5.1 Selezione di mutanti resistenti ai peptidi ricchi in Pro

Come riportato nel paragrafo 2.3, SMAP-29 non ha indotto resistenza in *S. aureus* e in *P. aeruginosa* dopo 20 passaggi seriali in presenza di concentrazioni subinibenti di peptide. A differenza di SMAP-29, che agisce sulle cellule bersaglio permeabilizzandone le membrane, altri peptidi agiscono con meccanismi diversi, quali ad esempio l'ingresso nelle cellule in maniera non permeabilizzante e l'interazione con bersagli intracellulari; tra questi peptidi, si può citare la catelicidina bovina Bac7 appartenente al gruppo dei peptidi lineari ricchi in prolina ed arginina.

Visto il diverso meccanismo d'azione, si è pensato quindi di allestire un saggio per l'eventuale selezione di mutanti resistenti a tale peptide, sottoponendo il ceppo ML-35 di *E. coli* a 20 passaggi seriali in presenza del frammento 1-35 di Bac7, ad una concentrazione pari a metà del valore della MIC. Il ceppo è stato trattato in maniera analoga con streptomicina e acido nalidixico ed i risultati ottenuti sono riportati in Fig. 59.

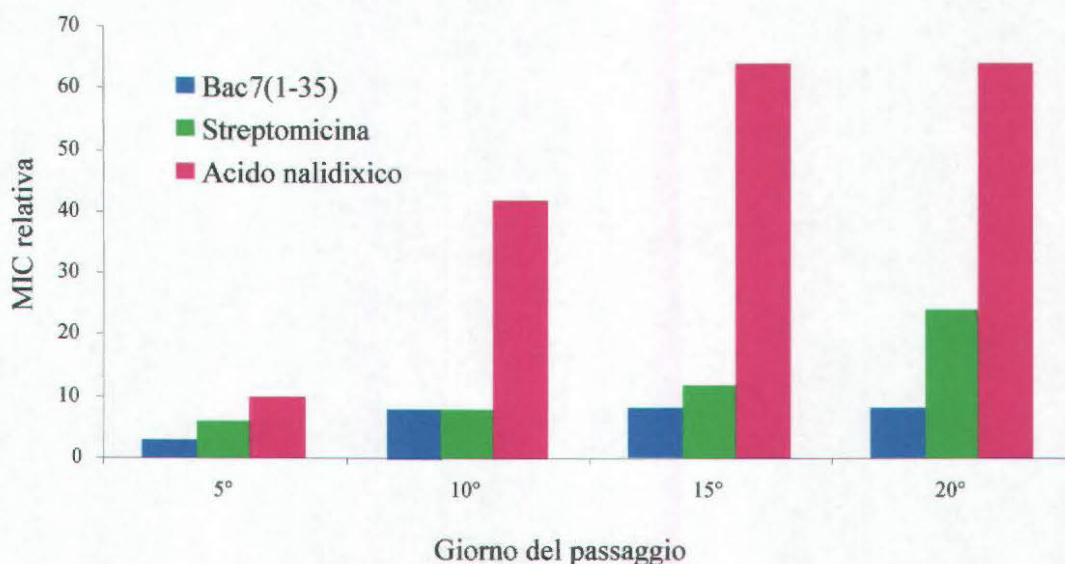


Fig. 59 - Incremento della MIC relativa per Bac7(1-35) e antibiotici convenzionali dopo il 5°, 10°, 15° e 20° passaggio seriale di *E. coli* ML-35 incubato in presenza di concentrazioni subinibitorie dei composti indicati. Un incremento nel valore di MIC relativa indica la selezione di mutanti resistenti.

Dal grafico risulta che la resistenza all'acido nalidixico inizia a manifestarsi già dopo il 5° passaggio, con un incremento di circa 10 volte rispetto al valore iniziale della MIC; a partire dal 10° passaggio, tale incremento si fa via via più evidente.

La resistenza alla streptomicina compare più gradualmente, con un aumento di 24 volte rispetto al valore di partenza della MIC solo dopo il 20° passaggio.

La MIC per Bac7(1-35) aumenta piuttosto gradualmente, fino a raggiungere un valore pari a 4-8 volte quello della MIC iniziale: risulta, pertanto, che la crescita per 20 passaggi consecutivi del ceppo ML-35 in presenza di una concentrazione subinibente di Bac7(1-35), ha permesso di selezionare un mutante con un certo grado di resistenza all'azione di questo peptide. Questo mutante viene di seguito indicato come ML-35 Res.

5.2 Cinetica di uccisione di Bac7(1-35) sul ceppo resistente

Oltre al valore di MIC, si è voluta confrontare la cinetica di uccisione da parte di Bac7(1-35) del ceppo resistente e del ceppo "wild-type" di *E. coli* ML-35; i risultati ottenuti sono riportati in Fig. 60.

Si può notare come la concentrazione più bassa di peptide (1 μM), abbia una cinetica di uccisione piuttosto lenta sul ceppo "wild-type", mentre sembra non interferire con la crescita del mutante resistente; alla concentrazione di 5 μM , l'effetto è ancora più evidente, dal momento che il ceppo selvatico viene ucciso completamente dopo soli 20 min, mentre il resistente ha mostrato un calo nel numero di CFU/ml molto più lento.

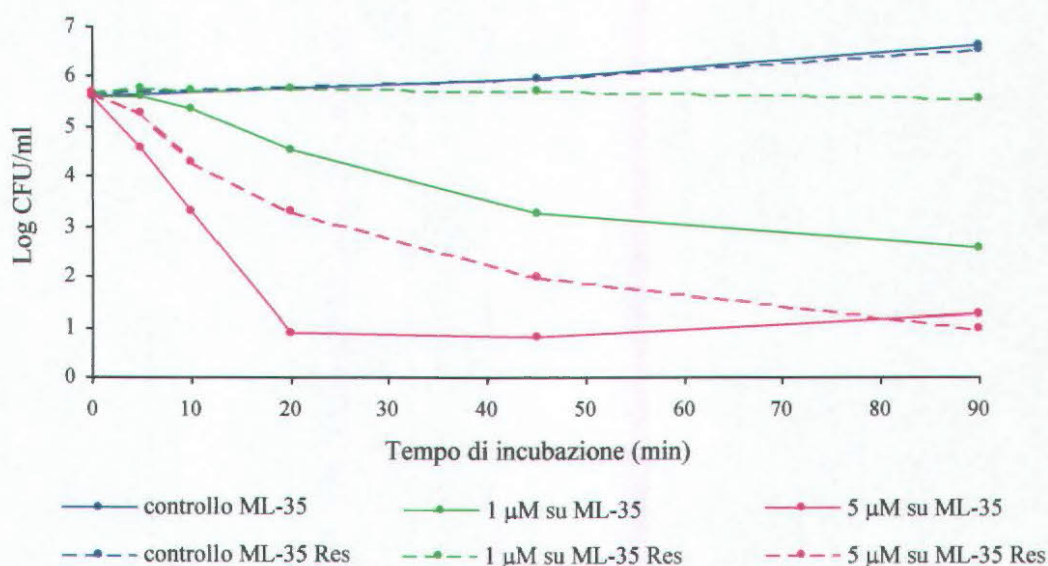


Fig. 60 - Cinetica dell'attività battericida di 1 μM e 5 μM Bac7(1-35) su *E. coli* ML-35 e sul ceppo resistente.

5.3 Determinazione della MIC di altri peptidi sul ceppo resistente

Visto che Bac7(1-35) è un peptide ricco in Pro e Arg, si è pensato di valutare il valore di MIC sul ceppo resistente ML-35 di *E. coli* per altri peptidi analoghi, quali frammenti più corti di Bac7 e alcuni derivati della drosocina e dell'apidaecina, peptidi di insetti anch'essi ricchi in Pro [Castle et al., 1999; Otvos et al., 2000 ; Otvos, 2002 ; Gobbo et al., 2002]. I peptidi di insetto sono stati gentilmente forniti dalla dott.ssa M. Gobbo del Dip. di Chimica Organica dell'Università di Padova.

Nella Fig. 61 è stato riportato, per ogni peptide, il rapporto tra il valore di MIC sul ceppo resistente e quello ottenuto sul ceppo "wild-type".

Appare evidente che anche frammenti più corti di Bac7 risultano meno attivi sul ceppo mutante, mentre per SMAP-29, che agisce con un meccanismo di permeabilizzazione di membrana, non è stata riscontrata alcuna differenza tra i due ceppi. Molto evidente è invece la resistenza mostrata dal mutante nei confronti dell'azione della drosocina e dell'apidaecina e di alcuni loro analoghi sintetici (vedi Tab. 13), in particolare si è osservato un valore di MIC relativa molto elevato per il peptide D e per il peptide 2.

5.4 Caratterizzazione del ceppo resistente

Il ceppo resistente, seminato su terreno solido, sviluppa colonie di due tipi, piccole e grandi; prelevando una singola colonia dell'uno o dell'altro tipo e seminandola su piastra, si ritrovano nuovamente colonie miste: si può vedere dalla Fig. 62 che, seminando i batteri di una colonia grande, si possono ritrovare anche colonie piccole, indicate in B dalla freccia, mentre dopo semina di batteri derivanti da colonia piccola si sviluppano pure colonie grandi (vedi freccia in C); risulta chiaro quindi che possano essere due fenotipi dello stesso ceppo mutante.

Come già riportato nel paragrafo 3.9 di Materiali e Metodi, il ceppo di *E. coli* ML-35 è caratterizzato da due mutazioni a livello del lac-operon: la prima è presente sul gene *z* e rende costitutiva l'espressione della β -galattosidasi, la seconda è localizzata sul gene *y* e causa la non espressione della lattosio permeasi della membrana interna. Tali caratteristiche rendono questo ceppo particolarmente adatto per studi di permeabilizzazione della membrana interna mediante l'uso di un substrato non permeante della β -galattosidasi. Per verificare la presenza di tali marcatori in entrambi i fenotipi del mutante resistente ed escludere quindi possibili inquinamenti, è stata

studiata la cinetica di permeabilizzazione della loro membrana interna ad opera del peptide membranolitico SMAP-29.

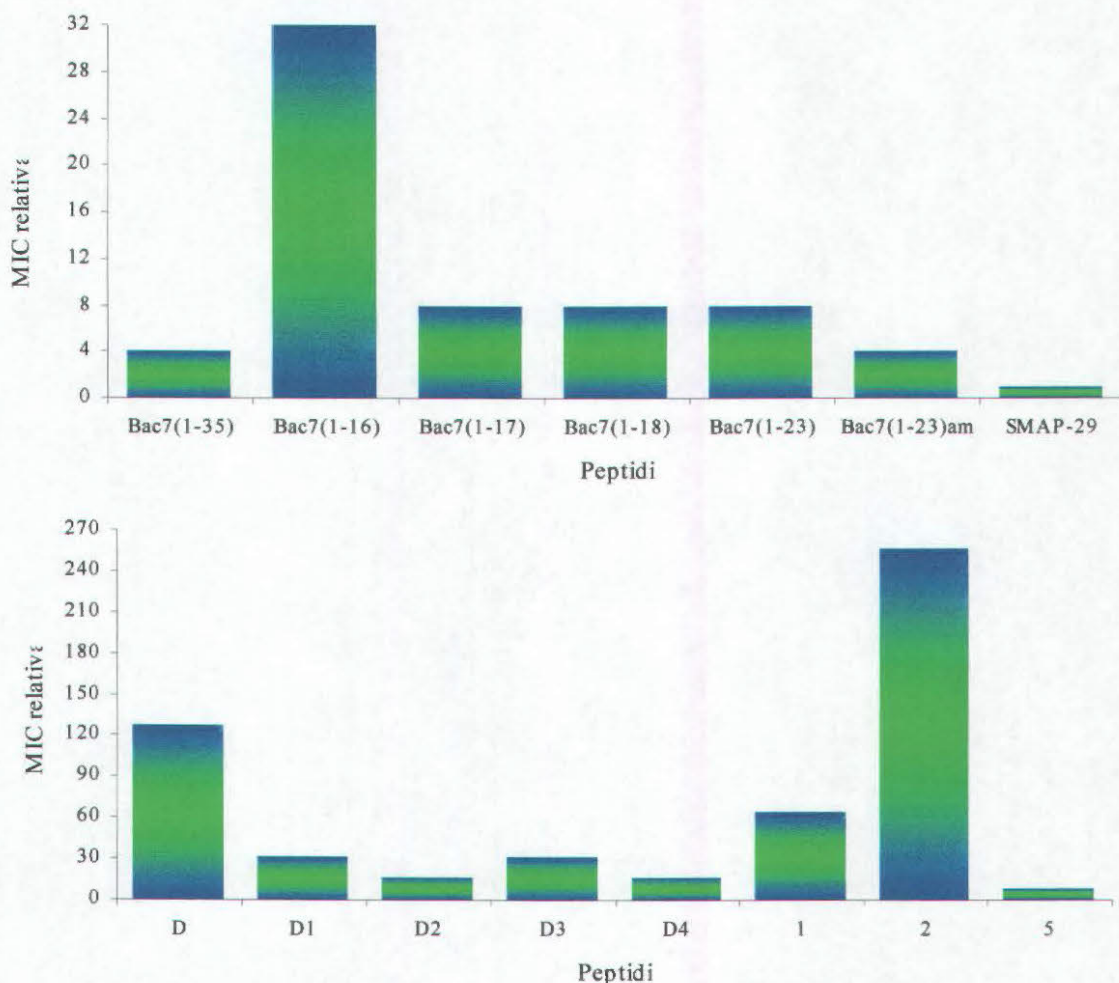


Fig. 61 - Incremento della MIC per il ceppo resistente rispetto al ceppo parentale ML-35 di *E. coli*. Un incremento nel valore di MIC relativa indica resistenza al peptide in esame.

Sigla	Peptide	Sigla	Peptide
D	(α GalNac-Thr ¹¹)Drosocina	D4	[Ala ¹¹ Gal]Drosocina
D1	Drosocina	1	(α Gal-Thr ¹¹)Drosocina
D2	Ala ¹¹ Drosocina	2	(β Gal-Thr ¹¹)Drosocina
D3	[Ala ¹¹ Gal(Ac) ₄]Drosocina	5	Apidaecina Ib

Drosocina: Gly-Lys-Pro-Arg-Pro-Tyr-Ser-Pro-Arg-Pro-Thr-Ser-His-Pro-Arg-Pro-Ile-Arg-Val
Apidaecina Ib: Gly-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Gln-Pro-Arg-Pro-Pro-His-Pro-Arg-Leu

Tab. 13 – Peptidi ricchi in Pro derivati da insetto e loro analoghi sintetici. In basso è riportata la sequenza amminoacidica dei peptidi parentali, drosocina e apidaecina.

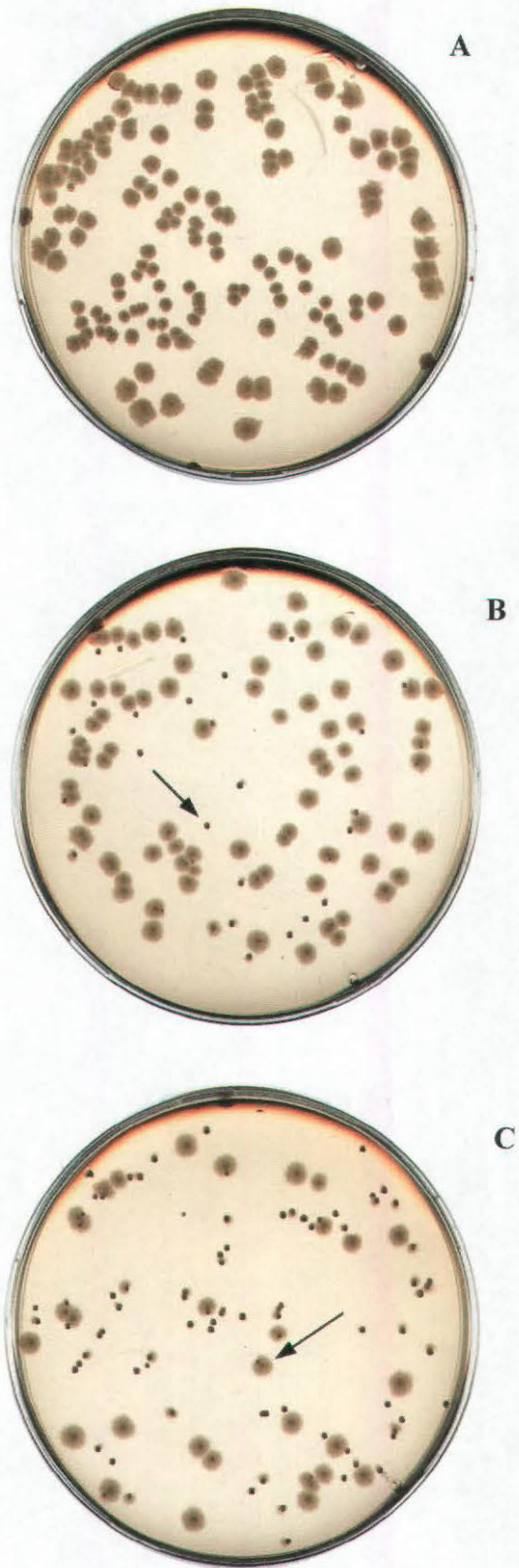


Fig. 62 – Colonie batteriche di *E. coli* ML-35 “wild type” (A), mutante resistente da colonia grande (B) e da colonia piccola (C).

Dalla Fig. 63, risulta evidente che la cinetica di permeabilizzazione di SMAP-29 sul ceppo resistente, sia considerando le colonie piccole sia quelle grandi, e su quello “wild-type”, è identica, mostrando così come le caratteristiche genetiche sfruttate in questo saggio siano presenti nel mutante resistente, e non siano state riscontrate differenze nemmeno tra i batteri derivanti da una colonia piccola o da una colonia grande.

D’altro canto invece, il frammento 1-35 di Bac7 non è in grado di permeabilizzare né il ceppo selvatico né il mutante resistente, indipendentemente se esso derivi da colonia grande o piccola.

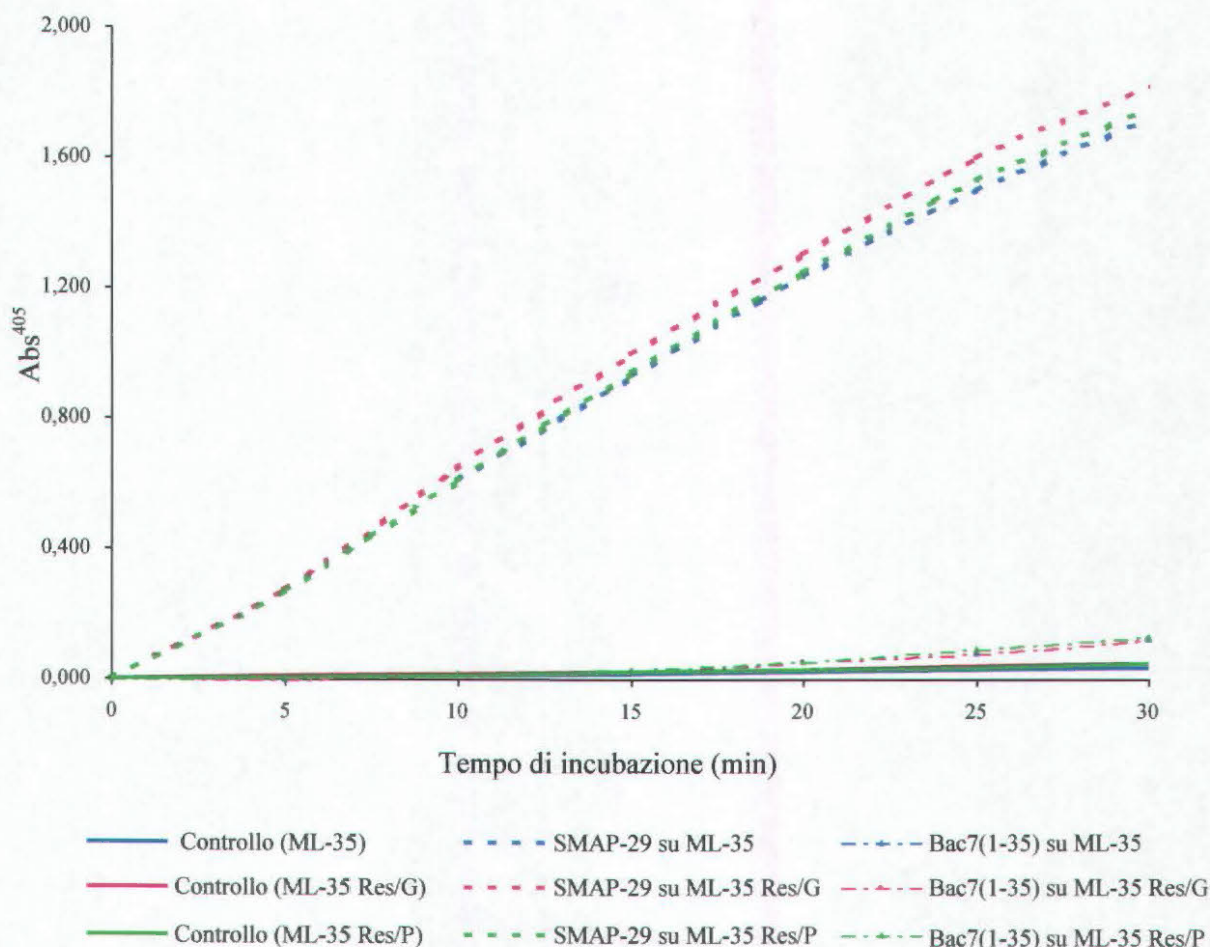


Fig. 63 - Cinetica di permeabilizzazione della membrana interna di *E. coli* ML-35 e del ceppo resistente isolato da colonia grande (G) e piccola (P) da parte di SMAP-29 (1 μ M) e Bac7(1-35) (20 μ M).

Sono stati poi ripetuti con alcuni peptidi dei saggi di MIC con il ceppo resistente, sia da colonia piccola sia da colonia grande; in particolare sono stati scelti il peptide D e il peptide 2, derivati da drosocina, per i quali il grado di resistenza riscontrato è molto elevato (vedi Fig. 61), SMAP-29 come controllo negativo per verificare la “non resistenza”, ed i frammenti 1-35 e 1-16 di Bac7.

Si può vedere dalla Fig. 64 che il rapporto tra il valore di MIC ottenuto con il resistente e con il ceppo selvatico rimane identico sia per i batteri mutanti derivanti da colonia piccola sia per quelli derivanti da colonia grande, per tutti i peptidi considerati.

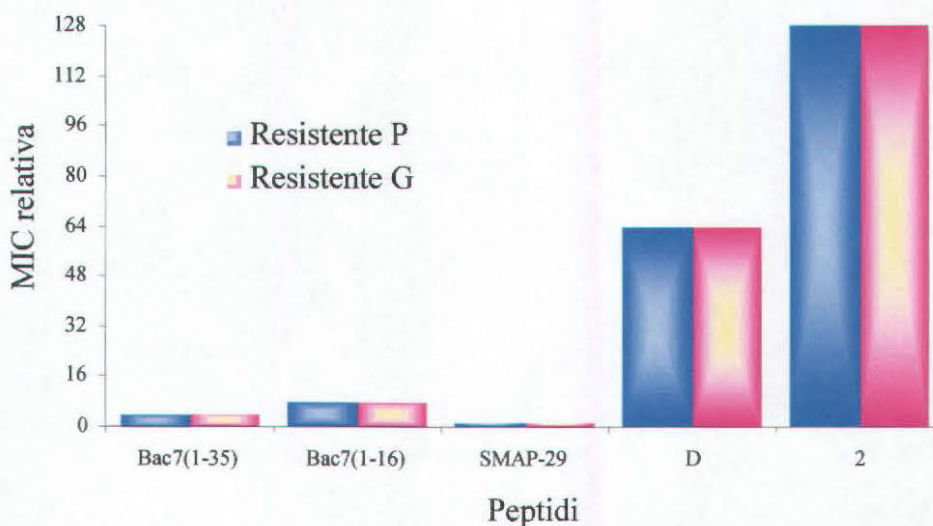


Fig. 64 - Incremento relativo della MIC per il ceppo resistente isolato da colonia piccola e grande rispetto al ceppo ML-35 “wild type” di *E. coli*. Un incremento nel valore di MIC relativa indica resistenza al peptide in esame.

Con i saggi di MIC è possibile stabilire solo se un peptide ha effetto batteriostatico. Pertanto, per verificare se Bac7(1-35) e (1-16) abbiano anche un effetto battericida sulle cellule mutanti e su quelle “wild type”, sono stati condotti esperimenti di “time killing”. Nella Tab. 14 sono riassunti i valori di MIC verso il ceppo selvatico di ML-35 e i ceppi resistenti derivati da colonia piccola e grande, relativi ai due frammenti di Bac7 usati nelle prove di “time killing”.

	MIC (μM)		
	ML-35	ML-35 Res/P	ML-35 Res/G
Bac7(1-35)	0.5	2	2
Bac7(1-16)	4	32	32

Tab. 14 – Valori di MIC (μM) per i frammenti 1-35 e 1-16 di Bac7 verso il ceppo di *E. coli* ML-35 selvatico, mutante da colonia piccola (ML-35 Res/P) e da colonia piccola (ML-35 Res/P).

Dai dati riportati nella Fig. 65 risulta evidente che, a parità di concentrazione di peptide, l'uccisione delle cellule resistenti è in ogni caso molto più lenta rispetto al ceppo parentale.

Nella Fig. 65 in basso è riportata invece la cinetica di uccisione del frammento 1-16 di Bac7, che ha un andamento molto più lento rispetto al frammento 1-35; difatti, ad una concentrazione di peptide pari a 12 volte il valore di MIC, sono stati necessari 180 min di trattamento per ottenere una completa uccisione delle cellule di ML-35 "wild type", mentre per i ceppi resistenti derivanti da colonia grande e piccola, a parità di concentrazione di peptide, lo stesso tempo di trattamento ha provocato soltanto un decremento di circa 2 log del numero di CFU/ml.

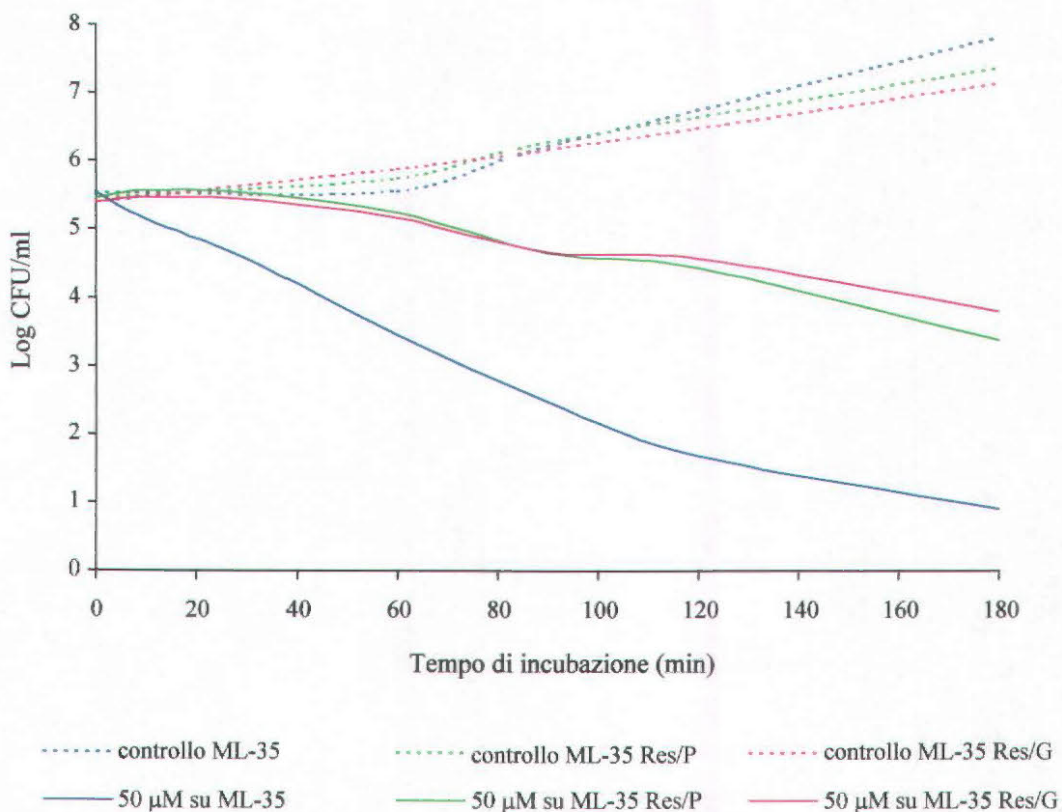
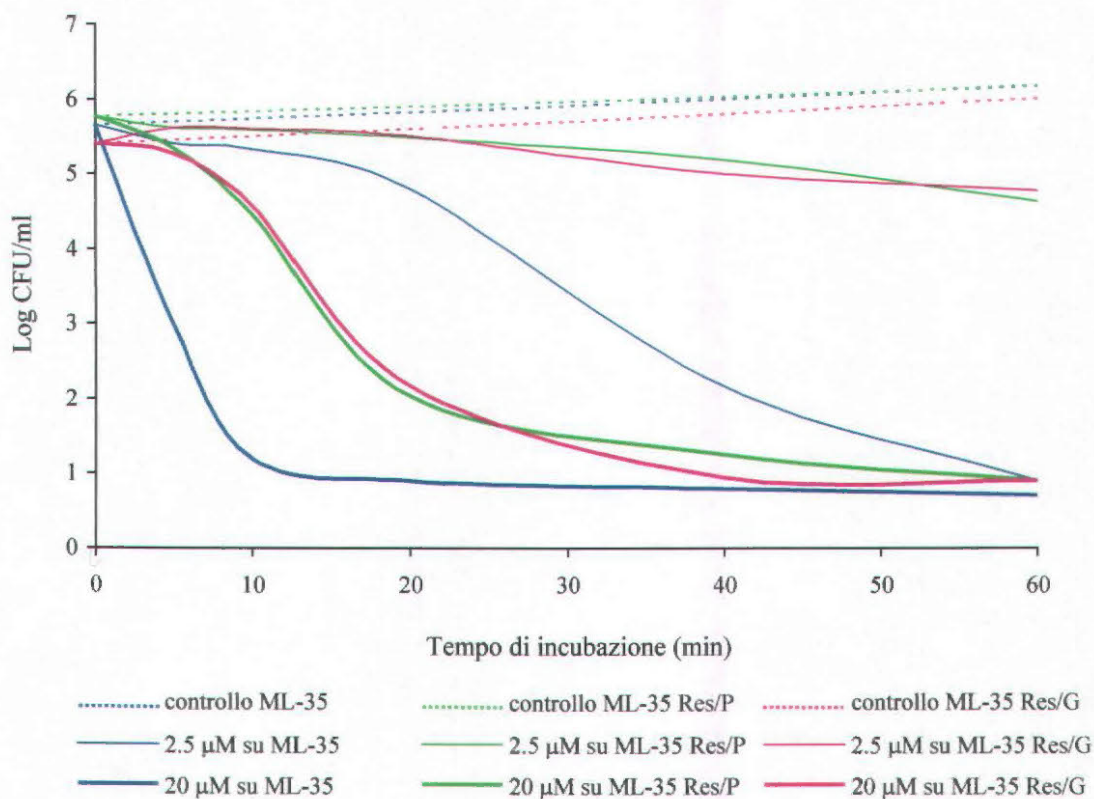


Fig. 65 - Cinetica dell'attività battericida dei frammenti 1-35 (in alto) e 1-16 (in basso) di Bac 7 su *E. coli* ML-35 "wild type" e sui ceppi resistenti derivanti da colonia piccola (P) e grande (G).

5.5 Microscopia elettronica a scansione del ceppo resistente

Viste le differenze riscontrate su piastra per quel che riguarda la morfologia delle colonie formatesi dopo semina del ceppo resistente su terreno solido, si è pensato di indagare se ci potessero essere anche delle differenze riscontrabili a livello di singola cellula, oltre che di colonia. A tal scopo cellule di *E. coli* ML-35 “wild type”, quelle del ceppo resistente derivanti da colonia piccola e quelle derivanti da colonia grande, sono state osservate mediante microscopia elettronica a scansione (Fig. 66).

Nelle foto 1 e 2 è possibile vedere l’aspetto delle cellule del ceppo “wild-type”, che appaiono nella tipica forma a bastoncino e presentano una superficie liscia; le foto 3 e 4 mostrano invece le cellule ottenute da una colonia grande, le quali presentano delle piccole estroflessioni che partono dalla superficie. Tali estroflessioni, però, si fanno decisamente più evidenti nelle foto 5 e 6 che mostrano cellule di una colonia piccola; queste strutture “filamentose” collegano tra loro le cellule le quali risultano “legate” l’una all’altra, assumendo il tipico aspetto di un biofilm [Dewanti e Wong, 1995].

La formazione di biofilm potrebbe quindi essere una possibile spiegazione alla resistenza mostrata dal mutante [Costerton et al., 1999; Lewis, 2001; Mah e O’Toole, 2001; Drenkard e Ausubel, 2002]. Per approfondire le differenze tra ceppo “wild type” e mutante, sarà necessario indagare quali possano essere le proteine espresse in maniera differenziale per poter avere un indizio più chiaro sul possibile bersaglio dei peptidi ricchi in Pro che agiscono con un meccanismo diverso rispetto a quello di permeabilizzazione di membrana.

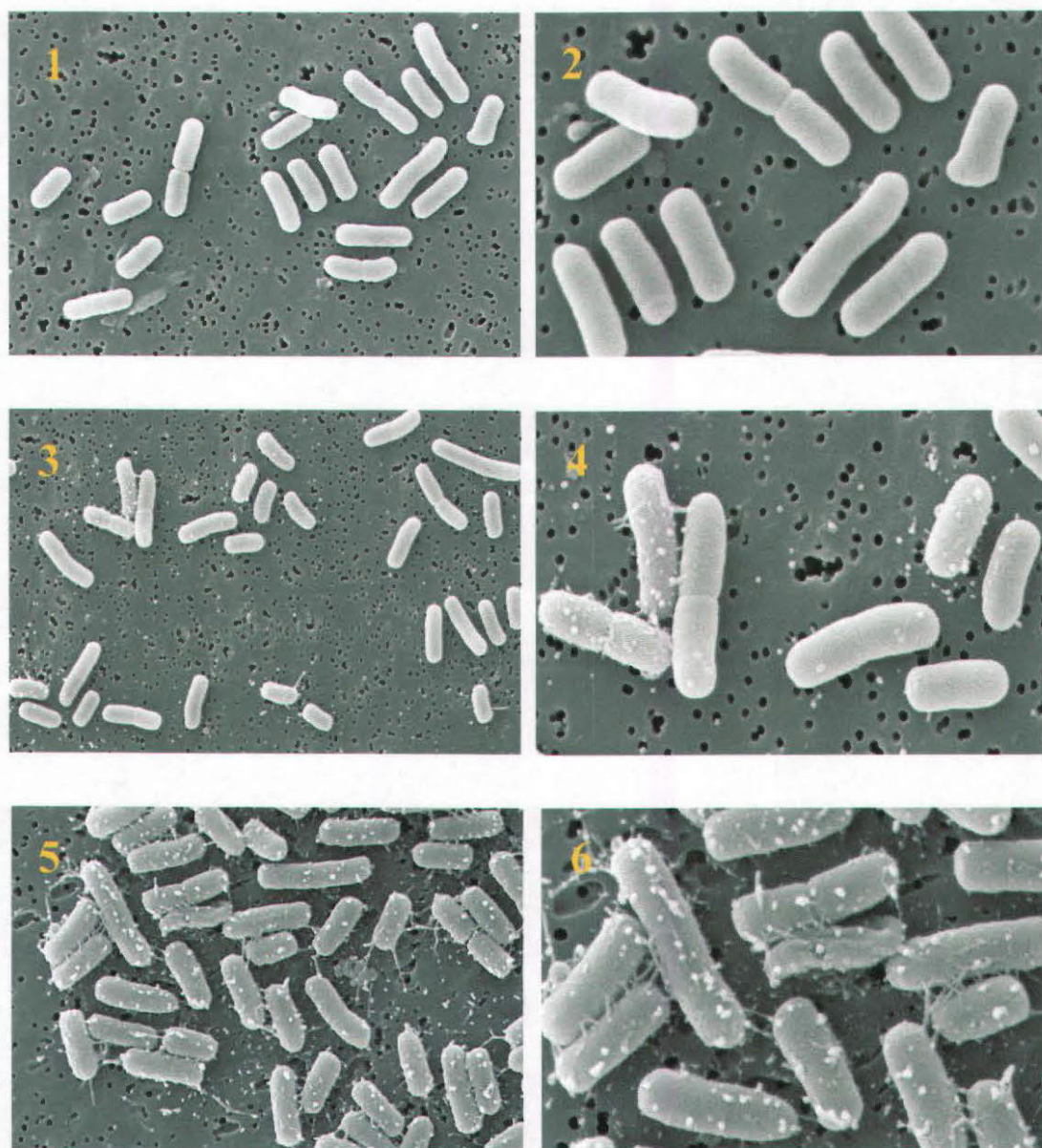


Fig. 66 - SEM di cellule di *E. coli* ML-35 "wild type"(1 e 2), del ceppo resistente isolato da colonia grande (3 e 4) e da colonia piccola (5 e 6).

CONCLUSIONI

1.1 Attività antibatterica

I peptidi dell'immunità innata sono da più parti indicati come potenziali capostipiti di una nuova classe di antibiotici atta a contrastare, almeno per un certo periodo, la sempre più ampia diffusione di ceppi batterici multiresistenti ai farmaci attualmente in uso. Tali indicazioni sono state raccolte da piccole compagnie che sono state create con lo scopo di esplorare il potenziale terapeutico di questi peptidi.

Peptide	Compagnia	Modo d'uso	Applicazione	Fase di sviluppo
Pexiganan (MSI-78)	Magainin (Genaera)	Topico	Ulcere dei piedi in soggetti diabetici	Completata fase III; non approvato da FDA, studi addizionali in corso
MBI-226	Micrologix	Topico	Infezioni da catetere	Fase III
MBI-594	Micrologix	Topico	Acne	Fase II
IB-367 (analogo della protegrina)	Intrabiotics	Orale	Mucosite	Fase III
P-113 (analogo dell'istatina)	Demegen	Orale	Gengivite	Fase II
Eliomicina	Entomed	Sistemico	Antifungino	Preclinico
Lattoferricina umana	AM Pharma	Sistemico	Antibatterico	Preclinico
*BPI	Xoma	Sistemico	Meningite meningococcica	Fase III

*BPI, proteina battericida che incrementa la permeabilità.

Tab. 15 – Peptidi antimicrobici di origine animale in sviluppo commerciale.

Nella Tabella 15 sono riportate le applicazioni e lo stadio di avanzamento dei prodotti che queste compagnie stanno sviluppando. In particolare, negli Stati Uniti, la Magainin Pharmaceuticals (ora rinominata Genaera) ha valutato l'applicazione del peptide MSI-78, un analogo sintetico della magainina 2, nella cura delle infezioni polimicrobiche nelle piaghe dei diabetici [Jacob e Zasloff, 1994]. I risultati ottenuti nella fase III della sperimentazione clinica hanno indicato che questo peptide ha un'attività comparabile a quella della ofloxacina assunta per via orale, l'antibiotico di elezione per questo tipo di infezione. Tuttavia, la Food and Drug Administration non ha approvato l'uso di questo composto, richiedendo ulteriori studi [Zasloff, 2002]. La IntraBiotics ha invece puntato sul peptide IB-367, un analogo sintetico di PG-1, per la cura della mucosite orale, che si sviluppa nei pazienti con cancro trattati con chemioterapia e/o radioterapia [Mosca et al., 2000]. E' stata da poco completata la fase III di sperimentazione clinica, che si

ritiene si sia conclusa con scarso successo, visto che l'azienda ha cambiato le sue linee di sviluppo. Altre piccole compagnie sono sorte più recentemente anche in ambiente universitario, in Canada, negli USA, in Giappone ed in Europa. Come si può notare dalla Tabella 15, quasi tutte le applicazioni prevedono l'utilizzo topico di questi peptidi, ad indicare che quello sistemico pone verosimilmente dei problemi.

In questa prospettiva, una delle finalità di questo lavoro è stata quella di iniziare ad esplorare il potenziale applicativo, come agenti terapeutici, di alcuni peptidi derivati dalla famiglia delle catelicidine. Queste sono costituite da una preproregione altamente conservata seguita da un dominio antimicrobico di lunghezza e sequenza variabili, che viene liberato dopo taglio proteolitico specifico.

Nella prima parte del lavoro è stato valutato lo spettro di attività antimicrobica *in vitro* dei peptidi considerati, la loro rapidità d'azione e la capacità di funzionare in liquidi biologici quali sangue intero o siero.

I risultati ottenuti con saggi di Minima Concentrazione Inibente (MIC), utilizzando ceppi di derivazione nosocomiale che presentavano multiresistenza agli antibiotici convenzionali, hanno evidenziato che tutti i peptidi sono attivi contro la maggior parte dei ceppi considerati; in particolare, il peptide SMAP-29 è il più attivo, con valori di MIC molto buoni, compresi tra 0.5 e 4 μ M. Gli esperimenti di "time killing" con questo peptide hanno evidenziato una cinetica di uccisione estremamente rapida. Un altro punto di forza di SMAP-29 è quello di non portare a selezione di mutanti resistenti alla sua azione, a differenza di quanto osservato in parallelo per antibiotici convenzionali. Tuttavia, la presenza di siero o sangue intero è in grado di inibirne l'azione, e solo un aumento della concentrazione di circa 5 volte riesce a ripristinare l'attività osservata in terreno di coltura.

Nella successiva fase del lavoro è stata valutata la tossicità dei peptidi iniettati in topo per via intraperitoneale o endovena. I risultati ottenuti sono stati contrastanti: da un lato la tossicità via i.p. è risultata più che buona, con valori di LD₅₀ superiori a 40 mg/Kg per SMAP-29, il peptide più tossico tra quelli saggiati; viceversa, i peptidi iniettati via i.v. sono risultati molto più tossici con valori di LD₅₀ compresi tra 4.2 mg/Kg (SMAP-29) e 12.9 mg/Kg (BMAP-28), valori troppo vicini a quelli che si possono presupporre essere quelli terapeutici.

Queste osservazioni e i dati di inibizione dell'attività dei peptidi da parte del sangue hanno indotto quindi a puntare maggiormente su modelli di infezione peritoneale: a tal scopo sono stati messi a punto tre modelli di peritonite acuta in topo provocati da iniezione i.p. di una dose letale di un ceppo capsulato di *E. coli* altamente patogeno, di un ceppo di *P. aeruginosa* e di un isolato clinico di *S. aureus* meticillina-resistente. In tutti i casi, SMAP-29, BMAP-27 e BMAP-28 si sono rivelati efficaci, anche se con differenze tra l'uno e l'altro che riflettono quelle osservate nei saggi *in vitro*. Infatti, SMAP-29, a dosi comprese tra 0.2 e 1.6 mg/Kg, è in grado di proteggere il 100% dei topi trattati con tutti i tre i ceppi usati, BMAP-27 si è dimostrato migliore con i ceppi Gram-negativi e BMAP-28 con quelli Gram-positivi.

L'attività di SMAP-29 è stata anche valutata in un modello di batteriemia provocato per iniezione i.v. del ceppo capsulato di *E. coli*. Come si poteva prevedere dai dati di tossicità i.v. e dall'effetto inibitorio del sangue, questo peptide è risultato inefficace anche alla concentrazione di 2.5 mg/Kg, la dose massima utilizzabile, dato il basso valore di LD₅₀ del peptide.

I dati finora raccolti indicano chiaramente la difficoltà di questi peptidi a funzionare per via sistemica; viceversa, essi si sono dimostrati efficaci in un ambiente ristretto come la cavità peritoneale, nella quale risultano molto meno tossici per l'animale. Naturalmente le ricerche dovranno essere estese a nuovi modelli di infezione: in particolare, visti i risultati ottenuti e le applicazioni previste dalle compagnie sopra citate, si prevede nell'immediato futuro di valutare l'efficacia dei peptidi in altri modelli di infezioni topiche sia batteriche che fungine. Per l'uso sistemico dei peptidi la strada da percorrere è ancora molto lunga; saranno infatti necessari estesi studi sul rapporto struttura/attività, nel tentativo di diminuire la tossicità e l'inibizione da parte di fattori del sangue, mantenendo però invariata l'attività antimicrobica; inoltre, sarebbe opportuno studiare metodi di veicolazione che permettano di superare i problemi di biodisponibilità e tossicità che i peptidi presentano per via sistemica, come ad esempio l'inclusione in liposomi [Ahmad et al., 1995].

1.2 Attività antifungina

Come già sottolineato precedentemente, è impellente trovare composti guida per lo sviluppo di nuovi farmaci antiinfettivi, necessari sia per il diffondersi di ceppi batterici multiresistenti agli antibiotici in uso sia per l'aumento esponenziale delle infezioni fungine, per le quali sono disponibili un numero limitato di farmaci generalmente molto tossici per l'ospite.

In questa prospettiva, parte del lavoro di questa tesi ha avuto lo scopo di iniziare la valutazione, a livello preclinico, dell'attività antifungina di alcuni peptidi derivati da catelicidine, appartenenti a diverse classi strutturali.

Il valore di MIC di ciascun peptide è stato determinato per oltre 70 ceppi, appartenenti ad una ventina di specie fungine, isolate per la maggior parte da pazienti immunocompromessi. Questi sono, infatti, facile bersaglio di infezioni da funghi patogeni e opportunisti, in particolare da *C. albicans*, che è la principale causa di infezioni fungine sia topiche che sistemiche, e da *C. neoformans*, un opportunisto emerso come patogeno in seguito alla pandemia di AIDS. Fortunatamente, le gravi polmoniti ed encefalomeningiti provocate da questo agente nei pazienti con questa immunodeficienza sono in diminuzione in seguito all'introduzione della terapia HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy).

I risultati ottenuti in questo ampio vaglio indicano che tutti i peptidi saggiati sono dotati di attività antifungina, seppur con notevoli differenze tra l'uno e l'altro in efficacia e spettro di attività. Complessivamente, la PG-1 può essere considerata il peptide con la miglior attività antifungina *in vitro*. Essa possiede, infatti, uno spettro molto ampio e una buona attività contro la gran parte dei ceppi utilizzati. Unici ad essere poco suscettibili a questo ed anche agli altri peptidi sono i funghi filamentosi. Molto buoni sono anche lo spettro e l'attività di SMAP-29, spesso migliore di PG-1, ma non attivo contro alcuni ceppi di *C. albicans* e contro *C. glabrata*. BMAP-28 mostra un'attività in genere solo di poco inferiore a quella di SMAP-29, mentre BMAP-27 è il più attivo verso *C. neoformans*. Infine, l'Indolicidina risulta il composto meno attivo tra quelli considerati.

Saggi di "time killing" hanno dimostrato che l'attività dei peptidi è fungicida e non solo fungistatica. La cinetica di uccisione è in genere rapida, con una diminuzione delle CFU di 2-5 log in tempi compresi tra 5 e 90 min, in funzione della concentrazione di peptide.

Esperimenti volti ad evidenziare effetti immediati provocati dai peptidi sulle cellule fungine, hanno messo in evidenza un efflusso di ATP intracellulare nel mezzo a tempi brevi (5 min), ad indicare un'azione sulle caratteristiche di permeabilità della membrana cellulare. Questo rilascio di ATP è accompagnato, a tempi più lunghi, da alterazioni della superficie fungina, come indicato da osservazioni mediante SEM, che verosimilmente riguardano la capsula polisaccaridica e la parete esterna. Non si notano invece alterazioni nella continuità della superficie che possano essere interpretate come causa dell'uscita passiva di molecole intracellulari come l'ATP. Non si può tuttavia escludere che questo rilascio sia causato dalla formazione di alterazioni troppo piccole per essere evidenziate con la microscopia a scansione.

Una possibilità molto più affascinante e tutta da verificare, è che l'efflusso di ATP sia in qualche modo causato da un effetto diretto o indiretto dei peptidi su qualche proteina di membrana che permette il rilascio selettivo di questo nucleotide. Questa potrebbe appartenere alla famiglia delle proteine ABC, e funzionare da canale di membrana associato al trasporto passivo di ATP [Schwiebert et al., 1998], che, una volta rilasciato all'esterno, potrebbe agire attraverso recettori del tipo di quelli purinergici della famiglia P2Z/P2X₇, causando un'aumentata permeabilità a K⁺ e Cl⁻ e lisi cellulare, come ampiamente dimostrato in numerosi sistemi eucarioti [Di Virgilio, 1995; Di Virgilio, 2000]. E' interessante notare che un meccanismo d'azione basato sul rilascio di ATP è stato proposto per le istatine, peptidi ricchi in istidina rilasciati nella saliva e dotati di attività candidastatica [Koshlukova et al., 1999].

In conclusione, gli esperimenti eseguiti indicano che alcuni peptidi, in particolare PG-1 e SMAP-29, per il loro ampio spettro di attività e per la potenza e rapidità d'azione, possono essere considerati come molecole guida per lo sviluppo di nuovi agenti antifungini. Prima di passare a prove su modelli animali di infezioni fungine topiche, visto che l'uso sistemico di questi peptidi è verosimilmente precluso dall'effetto inibitorio di alcuni componenti del sangue, a meno di particolari formulazioni (ad es. liposomi), sarà necessario studiare il loro meccanismo d'azione per vedere se esso è semplicemente litico, come nel caso dell'attività sui batteri, o mediato dal rilascio di ATP, che ha poi un effetto tossico sulle cellule via recettori di tipo purinergico.

1.3 Effetto di esopolisaccaridi batterici

Un ulteriore aspetto del lavoro svolto ha riguardato lo studio dell'effetto di esopolisaccaridi prodotti da patogeni polmonari sull'attività di vari peptidi antimicrobici strutturalmente diversi. Alcuni di questi peptidi sono espressi anche a livello dell'apparato respiratorio umano, dove sono coinvolti nei meccanismi di difesa di questo distretto direttamente a contatto con l'ambiente esterno e, quindi, facilmente colonizzabile da agenti infettivi penetrati mediante la respirazione.

L'attenzione è stata rivolta verso polisaccaridi prodotti da patogeni polmonari quali *P. aeruginosa*, *B. cepacia* e *K. pneumoniae*, i primi due ben noti per la loro capacità di colonizzare gli alveoli dei pazienti con fibrosi cistica, nei quali provocano una grave malattia polmonare causa principale di mortalità, il terzo capace di provocare polmoniti batteriche gravi e distruttive.

E' interessante notare che *P. aeruginosa*, e ancor di più *B. cepacia*, sono considerati batteri opportunisti che difficilmente infettano individui sani. La loro persistenza nei polmoni dei pazienti CF, nonostante l'uso di terapia antibiotica a lungo termine, è spiegata sia con la selezione di varianti antibiotico-resistenti, nel caso di *P. aeruginosa*, sia con l'intrinseca resistenza agli antibiotici tipica di *B. cepacia*, dovuta probabilmente alle caratteristiche di permeabilità delle sue membrane. Inoltre, negli ultimi tempi, gli esopolisaccaridi prodotti da questi batteri sono stati identificati come un nuovo fattore di resistenza: essi infatti permettono la formazione di biofilms, all'interno dei quali piccole comunità batteriche (microcolonie) crescono immerse nella matrice polisaccaridica che le protegge sia dall'azione dei meccanismi di difesa endogeni sia dagli agenti terapeutici esterni [Drenkard e Ausubel, 2002].

Pochi sono gli studi finora effettuati sui meccanismi attraverso i quali gli esopolisaccaridi rendono inefficaci i meccanismi di difesa e, dato il loro elevato contenuto di cariche negative, si è pensato di verificare la loro capacità di inibire *in vitro* l'attività di peptidi antimicrobici naturali, in genere carichi positivamente.

Per questi studi sono stati scelti sia peptidi appartenenti alla famiglia delle catelicidine, SMAP-29 e LL-37 con struttura ad α -elica, PG-1 con due ponti disolfuro e frammenti di Bac7, peptide lineare ricco in prolina e arginina, sia β -defensine, quali hBD-1 e hBD-3. Questa scelta è stata effettuata sia per saggiare peptidi con strutture diverse sia per includere peptidi umani - LL-37, hBD-1 e hBD-3 - che sono espressi a livello

polmonare. Per quanto riguarda gli esopolisaccaridi, sono stati utilizzati alginato prodotto da un ceppo mucoide di *P. aeruginosa*, BTS 3, BTS 7 e BTS 13 da ceppi diversi di *B. cepacia*, tutti isolati da pazienti CF, e il polisaccaride K 40 prodotto dall'omonimo ceppo di *K. pneumoniae*.

L'effetto inibitorio degli esopolisaccaridi sui peptidi è stato studiato utilizzando saggi diversi che valutano l'attività batteriostatica (saggi di MIC), battericida (saggi di "time killing") e l'azione a livello di membrana batterica (saggi di permeabilizzazione con il ceppo ML-35 di *E. coli*). Inoltre, l'eventuale interazione peptidi-polisaccaridi è stata investigata mediante esperimenti di dicroismo circolare.

I risultati ottenuti mostrano chiaramente che esopolisaccaridi batterici sono in grado di inibire *in vitro* l'attività di peptidi antimicrobici, seppure con notevoli differenze tra l'uno e l'altro e rispetto ai peptidi. In particolare, l'alginato da *P. aeruginosa*, che è anche il polisaccaride più carico tra quelli usati, risulta particolarmente efficace nell'inibire tutti i peptidi saggiati, inclusa hBD-3, con un incremento del valore di MIC compreso tra 16 e 32 volte. Questi dati sono confermati anche nei saggi di "time killing" e di permeabilizzazione di membrana. Per quanto riguarda gli esopolisaccaridi da *B. cepacia*, BTS 3, di cui non è ancora nota l'esatta struttura, risulta il più efficace, soprattutto nell'inibire i peptidi lineari ad α -elica (SMAP-29 e LL-37) e quelli ricchi in Pro (frammenti 1-35 e 1-16 di Bac7), mentre BTS 7 e BTS 13, pur avendo una certa attività inibitoria, risultano meno efficaci. L'esopolisaccaride K 40 da *K. pneumoniae*, che ha una densità di carica inferiore rispetto ad alginato e agli esopolisaccaridi di *B. cepacia*, risulta invece particolarmente efficace nell'inibire l'attività di PG-1, pur esplicando una discreta inibizione anche nei confronti degli altri peptidi.

Gli studi di dicroismo circolare hanno permesso di analizzare l'interazione esopolisaccaridi-peptidi seguendo le variazioni dello spettro dei peptidi indotte dalla presenza dei polisaccaridi. Questa tecnica risulta particolarmente utile nel caso di peptidi che possono andare incontro a notevoli variazioni di conformazione, come ad es. quelli ad α -elica anfipatica, che presentano una struttura disordinata in soluzione acquosa e una struttura ad elica in presenza di mezzi anisotropi o di micelle; viceversa, non può dare risposte significative nel caso di peptidi che non presentano rilevanti variazioni conformazionali passando da un solvente all'altro, come nel caso dei peptidi la cui struttura è stabilizzata da ponti disolfuro (ad es. PG-1).

I risultati ottenuti sono stati quindi particolarmente interessanti nel caso dei peptidi ad α -elica LL-37 e SMAP-29, per i quali la presenza di K 40, che ne inibisce l'attività, provoca anche una notevole variazione di conformazione con un aumento del contenuto in α -elica; nessuna variazione di struttura è invece indotta dall'esopolisaccaride BTS 7, che ha un modesto effetto inibitorio sui peptidi. Risultati meno chiari si sono ottenuti per le variazioni di struttura indotte da alginato, un ottimo inibitore dell'attività dei peptidi, per il quale entrano verosimilmente in gioco anche variazioni della forza ionica nel mezzo provocate dalla sua elevata densità di carica.

Come previsto, non si sono invece osservate rilevanti variazioni negli spettri CD di PG-1 in presenza di esopolisaccaridi, ad indicare che l'eventuale legame del peptide a questi polimeri non porta a variazioni della sua struttura.

In conclusione, questi studi hanno permesso di dimostrare che gli esopolisaccaridi prodotti da patogeni polmonari possono inibire l'attività di peptidi antimicrobici dell'immunità innata; i dati ottenuti *in vitro* con saggi molto semplici suggeriscono che almeno parte del ruolo degli esopolisaccaridi nell'instaurarsi e nel persistere di certe infezioni batteriche nei pazienti CF, potrebbe essere dovuto alla loro capacità di inibire i peptidi antimicrobici rilasciati nel fluido alveolare, bloccando così un importante meccanismo di difesa di questo distretto dell'organismo. Inoltre, questi risultati indicano quello che potrebbe essere lo sviluppo di questa ricerca, vale a dire l'utilizzo di modelli *in vitro* di biofilms di esopolisaccaridi che mimino quelli che sono presenti *in vivo* a livello polmonare.

1.4 Studio di mutanti resistenti

La maggior parte dei peptidi antimicrobici agisce sulle cellule bersaglio con un meccanismo di tipo litico, che rende molto improbabile la comparsa di mutanti resistenti, come dimostrato dagli studi condotti con SMAP-29 e sopra riportati. Viceversa, la selezione di mutanti è sembrata molto più probabile per peptidi che agiscono con un meccanismo non litico, quali ad esempio quelli che penetrano nelle cellule senza permeabilizzarle e interagiscono poi con putativi bersagli intracellulari specifici. Tra questi vi sono i peptidi ricchi in prolina di mammiferi e insetti, come ad esempio Bac7, derivato da una catelicidina bovina, e drosocina e apidaecina, isolate da emolinfa rispettivamente di moscerino e ape.

Per questi esperimenti di selezione di mutanti resistenti è stato utilizzato il ceppo ML-35 di *E. coli*, che è stato coltivato per 20 passaggi seriali in presenza di concentrazioni sub-inibenti di Bac7(1-35), un frammento attivo di Bac7. Ciò ha permesso di selezionare un mutante resistente con un valore di MIC aumentato di 4-8 volte e per il quale è stata osservata una cinetica di uccisione molto più lenta rispetto a quella sul ceppo “wild type”. Successivamente, il livello di resistenza del mutante isolato è stato saggiato anche con altri peptidi, quali frammenti più corti di Bac7 e alcuni derivati di drosocina e apidaecina [Castle et al., 1999; Otvos et al., 2000 ; Otvos, 2002 ; Gobbo et al., 2002]. La resistenza osservata verso l'azione di questi peptidi è ancora maggiore di quella per Bac7(1-35), ed è particolarmente elevata per la drosocina e alcuni suoi analoghi sintetici. Viceversa, il ceppo mutante non mostra alcuna variazione di suscettibilità nei confronti del peptide litico SMAP-29.

Per quanto riguarda la morfologia del ceppo mutante rispetto a quello selvatico, le colonie, cresciute su terreno solido, si presentano fenotipicamente diverse; inoltre, il mutante resistente è in grado di formare colonie piccole e grandi, indipendentemente dal fatto che i batteri derivino dall'uno o dall'altro tipo di colonia. Tuttavia, il grado di resistenza dei due fenotipi mutanti è il medesimo, come dimostrato da esperimenti di MIC e da saggi di “time killing” e permeabilizzazione.

Vista la differente morfologia delle colonie, si è pensato di indagare su possibili differenze morfologiche a livello di singola cellula mediante l'utilizzo della microscopia elettronica a scansione. Con tale tecnica è stato possibile osservare nei mutanti la presenza di piccole estroflessioni che partono dalla superficie cellulare e che diventano particolarmente evidenti per le cellule derivanti da colonie piccole; queste strutture “filamentose” collegano tra loro le cellule, le quali risultano disposte l'una accanto all'altra nel tipico aspetto di un biofilm [Dewanti e Wong, 1995]. La formazione di biofilm potrebbe quindi essere una possibile spiegazione della resistenza mostrata dal mutante [Costerton et al., 1999; Lewis, 2001; Mah e O'Toole, 2001; Drenkard e Ausubel, 2002]. Per approfondire le differenze tra ceppo “wild type” e mutante sarà necessario indagare quali possano essere i geni espressi in maniera differenziale nei due ceppi e avere così un indizio più chiaro sul possibile bersaglio di peptidi ricchi in Pro che agiscono con meccanismo non litico.

BIBLIOGRAFIA

- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., Gudmundsson, G. H.** (1995) FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 195-199.
- Agerberth, B., Lee, J. Y., Bergman, T., Carlquist, M., Boman, H. G., Mutt, V., Jörnvall, H.** (1991) Amino acid sequence of PR-39. *Eur J Biochem* **202**, 849-854.
- Ahmad, I., Perkins, W. R., Lupan, D. M., Selsted, M. E., Janoff, A. S.** (1995) Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with *in vivo* antifungal activity. *Biochim Biophys Acta* **1237**, 109-114.
- Albrecht, M. T., Wang, W., Shamova, O., Lehrer, R. I., Schiller, N. L.** (2002) Binding of protegrin-1 to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Respir Res* **3**, 18.
- Andreu, D., Rivas, L.** (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* **47**, 415-433.
- Ansehn, S., Nilsson, L.** (1984) Direct membrane-damaging effect of ketoconazole and tioconazole on *Candida albicans* demonstred by bioluminescent assay of ATP. *Antimicrob Agents Chemother* **26**, 22-25.
- Aumelas, A., Mangoni, M., Roumestand, C., Chiche, L., Despaux, E., Grassy, G., Calas, B., Chavanieu, A.** (1996) Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem* **237**, 575-583.
- Bagella, L., Scocchi, M., Zanetti, M.** (1995) cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins. *FEBS Lett* **376**, 225-228.
- Bals, R.** (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* **1**, 141-150.
- Bals, R., Weiner, D.J., Moscioni, A. D., Meegalla, R. L., Wilson, J. M.** (1999b) Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun* **67**, 6084-6089.
- Bals, R., Weiner, D.J., Wilson, J. M.** (1999a) The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* **103**, 303-307.
- Barra, D., Simmaco, M.** (1995) Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol* **13**, 205-209.
- Bensch, K. W., Raida, M., Magert, H. J., Schulz-Knappe, P., Forssmann, W. G.** (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* **368**, 331-335.

- Boccia, D., D'Ancona, F., Pantosti, A.** (2002) Resistenza alla vancomicina in ceppi invasivi di *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*. Dati preliminari. *BEN Notiziario ISS* Vol. 15, n. 5.
- Boman, H. G.** (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann Rev Immunol* 13, 61-92.
- Boman, H. G.** (1998) Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand J Immunol* 48, 15-25.
- Boman, H. G., Agerberth, B., Boman, A.** (1993) Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* 61, 2978-2984.
- Boyd, R. F.** (1992) *Microbiologia generale*, Ed Medical Books.
- Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Schoofs, H. M. E., Terras, F. R. G., Thevissen, K., Osborn, R., Rees, S. B., Broekaert, W. F.** (1994) Gene-encoded antimicrobial peptides from plants. In: *Antimicrobial peptides, Ciba Foundation Symposium No. 186* (H. G. Boman, J. Marsh, J. A. Goode eds.) J. Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 91-106.
- Campana, S., Taccetti, G., Mergni, G., Farina, S., Cioni, M. L., Festini, F., Repetto, T.** (2002) Development of antibiotic resistance in CF patients colonized by *Pseudomonas aeruginosa*: a retrospective study. *J Cystic Fibrosis* 1, 136.
- Cassone, A.** (2001) Sistemi di sorveglianza della resistenza ai farmaci antimicrobici. Razionale per la formulazione di un consenso sui criteri. *Notiziario ISS* Vol. 14, n. 4.
- Castle, M., Nazarian, A., Yi, S. S., Tempst, P.** (1999) Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *J Biol Chem* 274, 32555-32564.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC).** (1997) *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *United States, MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 46, 765-766.
- Cérantola, S., Lemassu-Jacquier, A., Montrozier, H.** (1999) Structural elucidation of a novel exopolysaccharide produced by a mucoid clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. Characterization of a trisubstituted glucuronic acid residue in a heptasaccharide repeating unit. *Eur J Biochem* 260, 373-383.
- Cescutti, P., Bosco, M., Picotti, F., Impallomeni, G., Leitão, J. H., Richau, J. A., Sa-Correia, I.** (2000) Structural study of the exopolysaccharide produced by clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 1088-1094.
- Cescutti, P., Toffanin, R., Kvam, B. J., Paoletti, S., Dutton, G. G.** (1993) Structural determination of the capsular polysaccharide produced by *Klebsiella pneumoniae*

serotype K40. NMR studies of the oligosaccharide obtained upon depolymerisation of the polysaccharide with a bacteriophage-associated endoglycanase. *Eur J Biochem* **213**, 445-453.

Cleare, W., Casadevall, A. (1999) Scanning electron microscopy of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans* and the effect of glucose on capsular polysaccharide release. *Med Mycol* **37**, 235-243.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.

Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S. (1993) *Microbiologia*, IV edizione, Ed. Zanichelli.

De Lucca, A. J., Walsh, T. J. (1999) Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1-11

Del Sal, G., Storici, P., Schneider, C., Romeo, D., Zanetti, M. (1992) cDNA cloning of the neutrophil bactericidal peptide indolicidin. *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 467-472.

Dewanti, R., Wong, A. C. L. (1995) Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* **26**, 147-164.

Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W. L., Bevins, C. L. (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 3952-3956.

Di Domenico, B. (1999) Novel antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* **2**, 509-515.

Di Virgilio, F. (1995) The P2Z purinoreceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* **16**, 524-528.

Di Virgilio, F. (2000) Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *J Auton Nerv Syst* **81**, 59-63.

Drenkard, E., Ausubel, F. M. (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**, 740-743.

ECCMID. (2002) 12° Congresso Europeo di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive.

Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948-1954.

- Edmond, M. B., Wenzel, R. P., Pasculle, A. W.** (1996) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: perspectives on measures needed for control. *Ann Inter Med* **124**, 329-334.
- Falla, T. J., Hancock, R. E. W.** (1997) Improved activity of a synthetic indolicidin analog. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 771-775.
- Flaibani, A., Leonhartsberger, S., Navarini, L., Cescutti, P., Paoletti, S.** (1994) Solution properties of the capsular polysaccharide produced by *Klebsiella pneumoniae* K40. *Int J Biol Macromol* **16**, 65-70.
- Frank, R. W., Gennaro, R., Schneider, K., Przybylski, M., Romeo, D.** (1990) Amino acid sequences of two proline-rich bacterenecins. *J Biol Chem* **265**, 18871-18874.
- Gacesa, P., Russel, N. J.** (1990) *Pseudomonas* infection and alginates. Biochemistry, genetics and pathology, I edition, Ed. Chapman and Hall.
- Gallo, R. L., Kim, K. J., Bernfield, M., Kozak, C. A., Zanetti, M., Merluzzi, L., Gennaro, R.** (1997) Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem* **272**, 13088-13093.
- Ganz, T.** (2002) Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* **109**, 693-697.
- Ganz, T., Lehrer, R. I.** (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* **10**, 41-44
- Ganz, T., Selsted, M. E., Lehrer, R. I.** (1990) Defensins. *Eur J Haematol* **44**, 1-8.
- Gennaro, R., Scocchi, M., Zanetti, M.** (1998) Biological characterization of a novel mammalian antimicrobial peptide. *Biochim Biophys Acta* **1425**, 361-368.
- Gennaro, R., Skerlavaj, B., Romeo, D.** (1989) Purification, composition, and activity of two bacterenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect Immun* **57**, 3142-3146.
- Gennaro, R., Zanetti, M.** (2000) Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 31-49.
- Gennaro, R., Zanetti, M., Benincasa, M., Podda, E., Miani, M.** (2002) Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Curr Pharm Des* **8**, 763-778.
- Georgopapadakou, N. H.** (1998) Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* **1**, 547-557.

- Georgopapadakou, N. H., Walsh, T. J.** (1994) Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* **264**, 371-374.
- Gilligan, P. H.** (1991) Microbiology of airway disease in patient with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **4**, 35-51.
- Gilligan, P. H.** (1995) *Pseudomonas* and *Burkholderia*, 6th ed., p. 509-519. In: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM PRESS. Washington, DC.
- Gobbo, M., Biondi, L., Filira, F., Gennaro, R., Benincasa, M., Scolaro, B., Rocchi, R.** (2002) Antimicrobial peptides: synthesis and antibacterial activity of linear and cyclic drosocin and apidaecin 1b analogues. *J Med Chem* **45**, 4494-4504.
- Govan, J. R. W., Deretic, V.** (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**, 539-574.
- Govan, J. R. W., Jayne, E. H., Vandamme, P.** (1996) *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol* **45**, 395-407.
- Guggino, W.** Cystic fibrosis salt/fluid controversy: in the tick of it. (2001) *Nat Med* **7**, 888-889.
- Hancock, R.E., Lehrer, R.** (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotic. *Trends Biotechnol* **16**, 82-88.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J. M.** (2001) Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* **276**, 5707-5713.
- Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., Parsek, M. R.** (2001) Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* **183**, 5395-5401.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., Tenover, F. C.** (1997) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **40**, 135-136.
- Hirata, M., Shimomura, Y., Yoshida, M., Morgan, J. G., Palings, I., Wilson, D., Yen, M. H., Write, S. C.** (1994) Characterization of a rabbit cationic protein (CAP 18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity. *Infect Immun* **62**, 1421-1426.
- Huttner, K. M., Bevins, C. L.** (1999) Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defence. *Pediatr Res* **45**, 785-794.
- Huttner, K. M., Kozak, C. A., Bevins, C. L.** (1997) The mouse genome encodes a single homolog of the antimicrobial peptide human beta-defensin 1. *FEBS Lett* **413**, 45-49.

- Imundo, L., Barasch, J., Prince, A., Al-Awqati, Q.** (1995) Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 3019-3023.
- Jacob, L., Zasloff, M.** (1994) Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin. *Ciba Found Symp* **186**, 197-216.
- Juban, M. M., Javadpour, M. M., Barkley, M. D.** (1997) Circular dichroism studies of secondary structure of peptides *In: Antibacterial peptide protocols* **78**, 73-78 Shafer W. M. Ed., Humana Press.
- Kalfa, V. C., Kunkle, R. A., McCray Jr, P. B., Tack, B. F., Brogden, K. A.** (2001) Congeners of SMAP-29 kill ovine pathogens and induce ultrastructural damage in bacterial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 3256-3261.
- Kokryakov, V. N., Harwig, S. S. L., Panyutich, E. A., Shevchenko, A. A., Aleshina, G. M., Shamova, O. V., Korneva, H. A., Lehrer, R. I.** (1993) Protegrins: leucocyte antimicrobial peptides that combine features corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett* **327**, 231-236.
- Koshlukova, S. E., Lloyd, T. L., Araujo, M. W. B., Edgerton, M.** (1999) Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *J Biol Chem* **274**, 18872-18879.
- La Placa, M.** (2001) *Principi di Microbiologia Medica*, IX edizione, Ed. Esculapio
- Larrick, J. W., Morgan, J.G., Palings, I., Hirata, M., Yen, M. H.** (1991) Complementary DNA sequence of rabbit CAP 18: a unique lipopolysaccharide binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **179**, 170-175.
- Lehrer, R. I., Ganz, T.** (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* **11**, 23-27.
- Lehrer, R. I., Ganz, T.** (2002a) Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr Opin Hematol* **9**, 18-22.
- Lehrer, R. I., Ganz, T.** (2002b) Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* **14**, 96-102.
- Lewis, K.** (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 999-1007.
- Li, J., Post, M., Volk, R., Gao, Y., Li, M., Metais, C., Sato, K., Tsai, J., Aird, W., Rosenberg, R. D., Hampton, T. G., Li, J., Sellke, F., Carmeliet, P., Simons, M.** (2000) PR-39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* **6**, 49-55.

- Lysenko, E. S., Gould, J., Bals, R., Wilson, J. M., Weiser, J. N** (2000) Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* **68**, 1664-1671.
- Lowy, F. D.** (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**, 520-532.
- Maertens, J. A., Boogaerts, M. A.** (2000) Fungal cell wall inhibitors: emphasis on clinical aspects. *Curr Pharm Des* **6**, 225-239.
- Mah, T. F. C., O'Toole, G. A.** (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**, 34-38.
- Maloy, L. W., Kari, P. U.** (1995) Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* **37**, 105-122.
- Marchese, A., Balistreri, G., Tonoli, E., Debbia, E. A., Schito, G. C.** (2000) Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. *J Clin Microbiol* **38**, 866-869.
- Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S. H., Gatzky, J. T., Davis, W., Boucher, R. C.** (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* **95**, 1005-1015.
- Mitchell, T.G.** (1998) Medical mycological research and training: needs and opportunities. *ASM News* **64**, 17-22.
- Morassutti, C., De Amicis, F., Skerlavaj, B., Zanetti, M., Marchetti, S.** (2002) Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Lett* **519**, 141-146.
- Mosca, D. A., Hurst, M. A., So, W., Viajar, B. S., Fujii, C. A., Falla, T. J.** (2000) IB-367, a protegrin peptide with *in vitro* and *in vivo* activities against the microflora associated with oral mucositis. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1803-1808.
- Nagaoka, I., Tsutsumi-Ishii, Y., Yomogida, S., Yamashita, T.** (1997) Isolation of cDNA encoding guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 Kda (CAP11) and evaluation of RNA expression during neutrophil maturation. *J Biol Chem* **272**, 22742-22750.
- Nicolas, P., Mor, A.** (1995) Peptides as weapons against microorganism in the chemical defense system of vertebrates. *Ann Rev Microbiol* **49**, 277-304.
- Nikaido, H., Vaara, M.** (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* **49**, 1-32.

- Nissen-Meyer, J., Nes, I.F.** (1997) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Arch Microbiol* **167**, 67-77.
- Noble, W. C., Virani, Z., Cree, R. G.** (1992) Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **72**, 195-198.
- Oren, Z., Shai, Y.** (1998) Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **47**, 451-463.
- Otvos, L. jr.** (2002) The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1138-1150.
- Otvos, L. jr., Bokonyi, K., Varga, I., Otvos, B. I., Hoffman, R., Ertl, H. C. J., Wade, J. D., McManus, A. M., Craik, D. J., Bulet, P.** (2000) Insect peptides with improved protease-resistance protect mice against bacterial infection. *Protein Sci* **9**, 742-749.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T.** (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* **4**, 2411-2423.
- Pier, G. B.** (2002) CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Curr Opin Immunol* **5**, 81-86.
- Pluschke, G., Mayden, J., Achtman, M., Levine, R. P.** (1983) Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect Immun* **42**, 907-913..
- Poli, G., Cucuzza, G., Nicoletti, G.** (1993) *Microbiologia Medica*, Ed UTET.
- Pungercar, J., Strukelj, B., Kopitar, G., Renko, M., Lenarcic, B., Gubensek, F., Turk, V.** (1993) Molecular cloning of a putative homolog of proline/arginine-rich antibacterial peptides from porcine bone marrow. *FEBS Lett* **336**, 284-288.
- Radermacher, S. W., Schoop, V. M., Schluesener, H. J.** (1993) Bactenecin, a leukocytic antimicrobial peptide, is cytotoxic to neuronal and glial cells. *J Neurosci Res* **36**, 657-662.
- Risso, A., Zanetti, M., Gennaro, R.** (1998) Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. *Cell Immunol* **189**, 107-115.
- Ritonja, A., Kopitar, M., Jerala, R., Turk, V.** (1989) Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leukocytes. *FEBS Lett* **255**, 211-214.
- Robinson, M., Bye, P. T. B.** (2002) Mucociliary clearance in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **33**, 293-306.

- Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M., Gennaro, R. (1988) Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem* **263**, 9573-9575.
- Saiman, L., Tabibi, S., Starner, T. D., Gabriel, P. S., Winokur, P. L., Jia, H. P., Mc Cray Jr., P. B., Tack, B. F. (2001) Cathelicidin peptides inhibit multiply antibiotic-resistant pathogens from patient with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2838-2844.
- Schwiebert, E., Egan, M., Guggino, W. (1998) Assays of dynamics, mechanism, and regulation of ATP transport and release: implication for study of ABC transporter function. *Methods Enzymol* **292**, 664-675.
- Scocchi, M., Bontempo, D., Boscolo, S., Tomasinsig, L., Giulotto, E., Zanetti, M. (1999) Novel cathelicidins in horse leukocyte. *FEBS Lett* **457**, 459-464.
- Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y.-Q., Smith, W., Cullor, J. S. (1992) Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* **267**, 4292-4295.
- Selsted, M. E., Tang, Y.-Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W., Henschen, A. H., Cullor, J. S. (1993) Purification, primary structures, and antibacterial activities of β -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem* **268**, 6641-6648.
- Sheppard, D. N., Welsh, M. J. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *J Physiol* **79**, 23-41.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. (1998) Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us. *Biopolymers* **47**, 435-450.
- Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., Greenberg, E. P. (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilm. *Nature* **407**, 762-764.
- Skerlavaj, B., Benincasa, M., Risso, A., Zanetti, M., Gennaro, R. (1999) SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Lett* **463**, 58-62.
- Skerlavaj, B., Gennaro, R., Bagella, L., Merluzzi, L., Risso, A., Zanetti, M. (1996) Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. *J Biol Chem* **271**, 28375-28381.
- Skerlavaj, B., Scocchi, M., Gennaro, R., Risso, A., Zanetti, M. (2001) Structural and functional analysis of horse cathelicidin peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 715-722.

- Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P., Welsh, M. J.** (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **85**, 229-236.
- Sokolov, Y., Mirzabekov, T., Martin, D. W., Lehrer, R. I., Kagan, B. L.** (1999) Membrane channel formation by antimicrobial protegrins. *Biochim Biophys Acta* **1420**, 23-29.
- Sorensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., Borregaard, N.** (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**, 3951-3959.
- Steinberg, D. A., Hurst, M. A., Fujii, C. A., Kung, A. H. C., Ho, J. F., Cheng, F. C., Loury, D. J., Fiddes, J. C.** (1997) Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with *in vivo* activity. *Antimicrob Agents Chemoter* **41**, 1738-1742.
- Storici, P., Scocchi, M., Tossi, A., Gennaro, R., Zanetti, M.** (1994) Chemical synthesis and biological activity of a novel antibacterial peptide deduced from a pig myeloid cDNA. *FEBS Lett* **337**, 303-307.
- Storici, P., Tossi, A., Lenarčič, B., Romeo, D.** (1996) Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursor of antimicrobial peptides. *Eur J Biochem* **238**, 769-776.
- Storici, P., Zanetti, M.** (1993) A cDNA derived from pig bone marrow cells predicts a sequence identical to intestinal antibacterial peptide PR-39. *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 1058-1065.
- Tang, Y.-Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Ouellette, A. J., Selsted, M. E.** (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* **286**, 498-502.
- Taylor, D.J.** (1999) Antimicrobial use in animals and its consequences for human health. *Clin Microbiol Infect* **5**, 119-124.
- Toney, J. H.** (2002) Isegaran (IntraBiotics pharmaceuticals). *Curr Opin Investig Drugs* **3**, 225-228.
- Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A.** (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4-30.
- Tossi, A., Scocchi, M., Skerlavaj, B., Gennaro, R.** (1994) Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett* **339**, 108-112.

- Tossi, A., Scocchi, M., Zanetti, M., Storici, P., Gennaro, R.** (1995) PMAP-37, a novel antibacterial peptide from pig myeloid cells. cDNA cloning, chemical synthesis and activity. *Eur J Biochem* **228**, 941-946.
- Travis, S. M., Anderson, N. N., Forsyth, W. R., Espiritu, C., Conway, B. D., Greenberg, E. P., McCray, P. B., Lehrer, R. I., Welsh, M. J., Tack, B. F.** (2000) Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun* **68**, 2748-2755.
- Travis, S. M., Conway, B. A. D., Zabner, J., Smith, J. J., Anderson, N. N., Singh, P. K., Greenberg, E. P., Welsh, M. J.** (1999) Activity of abundant antimicrobial of the human airway. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**, 872-879.
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J., Lehrer, R. I.** (1998) Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2206-2214.
- Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K., Govan, JR.** (1997) Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1188-1200.
- Verbanac, D., Zanetti, M., Romeo, D.** (1993) Chemotactic and protease-inhibiting activities of antibiotic peptide precursors. *FEBS Lett* **317**, 255-258.
- Villari, P., Iacuzio, L., Vozzella, E. A., Raia, V., Torre, I.** (1999) Epidemiologia di *Burkholderia cepacia* in pazienti con fibrosi cistica: primi risultati di uno studio comprendente la tipizzazione genotipica dei ceppi isolati. *Ann Ig* **11**, 501-506.
- Whitby, P. W., Carter, K. B., Hatter, K. L., LiPuma, J. J., Stull, T. L.** (2000) Identification of members of the *Burkholderia cepacia* complex by species-specific PCR. *J Clin Microbiol* **38**, 2962-2965.
- Wine, J. J.** (1999) The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* **103**, 309-312.
- Woody, R. W.** (1995) Circular Dichroism *In: Methods in enzymology* **246**, 34-70 Kenneth Sauer Ed., Academic Press.
- Zabner, J., Smith, J. J., Karp, P. H., Widdicombe, J. H., Welsh, M. J.** (1998) Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia *in vitro*. *Mol Cell* **2**, 397-403.
- Zanetti, M., Del Sal, G., Storici, P., Schneider, C., Romeo, D.** (1993) The cDNA of the neutrophil antibiotic Bac5 predicts a pro-sequence homologous to a cysteine proteinase inhibitor that is common to other neutrophil antibiotics. *J Biol Chem* **268**, 522-526.

Zanetti, M., Gennaro, R., Romeo, D. (1995) Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* **374**,1-5.

Zanetti, M., Gennaro, R., Skerlavaj, B., Tomasinsig, L., Circo, R. (2002) Cathelicidin peptides as candidates for a novel class of antimicrobials. *Curr Pharm Des* **8**, 779-793.

Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor. *Proc Nat Acad Sci USA* **84**, 5449-5453.

Zasloff, M. (1992) Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr Opin Immunol* **4**, 3-7.

Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.