
**CLONAGGIO ED ESPRESSIONE DI
DEFENSINE DI GRANO: STUDIO DI
UNA LORO POSSIBILE
APPLICAZIONE SIA IN CAMPO
MEDICO CHE VEGETALE**

Dott.ssa Ilaria Ventimiglia

Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XIX ciclo
Indirizzo Biotecnologie Vegetali
Università di Napoli Federico II





**CLONAGGIO ED ESPRESSIONE DI
DEFENSINE DI GRANO: STUDIO DI
UNA LORO POSSIBILE
APPLICAZIONE SIA IN CAMPO
MEDICO CHE VEGETALE**

Dott.ssa Ilaria Ventimiglia

Dottoranda: Dott.ssa Ilaria Ventimiglia

Relatore: Prof. ssa Rosanna Capparelli

Coordinatore: Prof. Gennaro Marino

INDICE

RIASSUNTO	1
SUMMARY	2
1. INTRODUZIONE	7
1.1. IL FRUMENTO	7
1.1.1. Importanza economica del frumento	7
1.1.2. Origine del frumento	7
1.1.3. Cenni sulla struttura e sulla composizione della cariosside	8
1.1.4. Amido	8
1.1.5. Proteine	9
1.1.6. Le puroindoline	9
1.1.7. Le puroindoline come agenti antimicrobici	10
1.2. I PEPTIDI ANTIMICROBICI	11
1.2.1. Caratteristiche generali dei peptidi antimicrobici	11
1.2.2. Peptidi e proteine come fattori dell'immunità innata	12
1.2.3. Caratteristiche generali e meccanismo d'azione dei peptidi antimicrobici	14
1.2.4. Classificazione dei peptidi antimicrobici	15
1.2.5. Defensine	15
1.3. APPLICAZIONI DELLE PROTEINE AD AZIONE ANTIMICROBICA	16
1.4. L'AIUTO DELLE BIOTECNOLOGIE	17
1.5. SCOPO DELLA TESI	19
2. MATERIALI E METODI	20
2.1. Materiali	20
2.1.1. Prodotti da forno	20
2.1.2. Colture batteriche	20
2.2. Produzione di anticorpi	20
2.3. Purificazione degli anticorpi	21
2.4. Estrazione delle proteine totali	21
2.5. Estrazione delle proteine legate ai granuli d'amido	21
2.6. Immunoassorbente	22
2.6.1. Formazione del legame covalente particelle-anticorpo	22
2.6.2. Formazione del legame anticorpo-antigene	22
2.6.3. Rottura del legame anticorpo-antigene e recupero dell'antigene	22
2.7. Test citofluorimetrico	23
2.8. Microscopia a immunofluorescenza	23
2.9. Estrazione del DNA genomico	23
2.10. Sistemi di espressione	24
2.11. Clonaggio nel vettore pET100 dei geni pina e pinb (Hys-PINA, Hys-PINB) ..	25
.....	25
2.12. Clonaggio nel vettore pGEX dei geni pina e pinb (GST-PINA, GST-PINB)...	25
.....	25
2.13. Purificazione di frammenti di DNA da gel di agarosio	26
2.14. Digestione di DNA con enzimi di restrizione	26
2.15. Reazioni di ligazione	26
2.16. Trasformazione con il vettore pET100:PIN	27
2.17. Trasformazione con il vettore pGEX:PIN	27
2.18. Estrazione del DNA plasmidico	28
2.19. Espressione delle Hys-PIN e delle GST-PIN	28

2.19.1.	Preinoculo	28
2.19.2.	Inoculo ed induzione	28
2.19.3.	Cinetica di accumulo della proteina eterologa	29
2.20.	Estrazione delle proteine solubili ed insolubili	29
2.21.	Purificazione e analisi delle Hys-PIN.....	29
2.22.	Purificazione e analisi delle GST-PIN.....	29
2.23.	Procedura di refolding e taglio del tag	30
2.24.	Produzione di anticorpi contro le PIN ricombinanti (rPIN)	30
2.25.	SDS-PAGE.....	31
2.26.	Western Blotting.....	31
2.27.	Test di attività antimicrobica	32
2.28.	Conta in piastra	32
2.29.	Analisi della vitalità batterica mediante microscopia a fluorescenza	32
2.30.	Analisi della vitalità batterica mediante citofluorimetria	33
2.31.	Saggio di attività emolitica delle rPIN	33
2.32.	Saggio di induzione di accumulo di nitriti su linee cellulari di macrofagi trattati con le rPIN.....	33
2.33.	Esperimenti di infezione in vitro con <i>S. epidermidis</i> e analisi della vitalità dei batteri intracellulari dopo il trattamento con le rPIN	34
3.	RISULTATI	35
3.1.	Immunolocalizzazione di PINA e PINB nella cariossida	35
3.2.	Identificazione delle puroindoline nelle preparazioni industriali	35
3.3.	Attività antibatterica delle puroindoline native	36
3.4.	Espressione di Hys-PINA ed Hys-PINB nelle cellule pLysS e BL21*	37
3.5.	Espressione di GST-PINA e GST-PINB nelle cellule DH5 α	37
3.6.	Identità e purezza delle proteine ricombinanti purificate.....	38
3.7.	Refolding delle puroindoline ricombinanti e taglio del tag.....	38
3.8.	Le rPIN inducono in ratto la produzione di anticorpi in grado di riconoscere le puroindoline native	39
3.9.	Attività antibatterica delle rPIN	39
3.10.	Espressione di GST-PINA e GST-PINB nel ceppo ORIGAMI TM B e purificazione di ORIA e ORIB.....	39
3.11.	Taglio della GST e caratterizzazione di ORIA ed ORIB	40
3.12.	Proprietà antimicrobiche ed emolitiche di ORIA ed ORIB	40
3.13.	Analisi dell'attività antimicrobica mediante microscopia a fluorescenza	40
3.14.	Analisi dell'attività antimicrobica mediante citofluorimetria	40
3.15.	Induzione di accumulo di nitriti da parte di ORIA ed ORIB in macrofagi in coltura	41
3.16.	Infezione in vitro delle J774 con <i>S. epidermidis</i> e analisi della vitalità dei batteri intracellulari dopo il trattamento con ORIA ed ORIB	41
4.	DISCUSSIONE	42
5.	BIBLIOGRAFIA	46
6.	TABELLE.....	51
7.	FIGURE	58

RIASSUNTO

I peptidi e le proteine antimicrobiche, strumenti preziosi dell'immunità innata, sono considerati con crescente importanza grazie alla loro capacità di contrastare un ampio spettro di patogeni. Le proteine dell'immunità innata con attività antimicrobica (defensine, catelicidine, royaljelline) si ritrovano sia nel regno animale che in quello vegetale. Due polipeptidi del frumento tenero, la puroindolina a (PINA) e la puroindolina b (PINB), oltre che essere importanti dal punto di vista tecnologico determinando il carattere "hardness", sono proteine ad attività antimicrobica.

E' stata studiata per la prima volta la distribuzione e la localizzazione dei due polipeptidi nelle cariossidi mature. Con l'aiuto di due anticorpi policlonali specifici per ogni PIN è stato possibile correlare la loro localizzazione con il loro ruolo nella cariosside. È stato visto che PINA e PINB non solo hanno la stessa distribuzione spaziale nella cariosside di frumento tenero, ma sono trovate sempre co-localizzate. La loro contemporanea presenza in alcuni compartimenti della cariosside di frumento, ha fatto pensare ad una loro eventuale azione sinergica. A tale scopo sono stati effettuati dei test di attività antimicrobica con entrambe le puroindoline, per ipotizzarne anche il meccanismo d'azione.

La loro attività antimicrobica e la loro naturale presenza nel frumento tenero candida le puroindoline come promettenti agenti antibatterici. Date le difficoltà di purificazione dei due singoli polipeptidi, sono state studiate diverse strategie di clonaggio per ottenere puroindoline ricombinanti biologicamente attive. I risultati migliori sono stati ottenuti clonando separatamente i geni delle puroindoline nel ceppo di espressione ORIGAMI B di *Escherichia coli*. Il batterio ospite è ingegnerizzato appositamente per favorire la corretta formazione dei ponti disolfuro delle proteine ricombinanti nel citoplasma. Con questo nuovo sistema di espressione le puroindoline ricombinanti (ORIA ed ORIB) sono state purificate dalla frazione solubile in forma funzionale. Allo scopo di utilizzare le puroindoline su ceppi batterici multiresistenti responsabili delle infezioni cutanee, è stato visto che alla concentrazione di 30 µg/ml, entrambe le proteine, testate individualmente, hanno inibito del 90% la crescita di *S. epidermidis*. A più alte concentrazioni – ORIA a 125 µg/ml e ORIB a 40 µg/ml – le stesse proteine hanno ucciso la totalità dei batteri. ORIA ed ORIB sono state testate anche in combinazione ed è stato visto che esse si comportano come le proteine in forma nativa. Inoltre è stato dimostrato con test *in vitro* che ORIA ed ORIB non causano infiammazione o emolisi e sono capaci di uccidere i batteri intracellulari.

L'attività biologica del prodotto è stata poi saggiata su diversi patogeni, anche di interesse clinico. Questi risultati sono promettenti per l'utilizzo di queste proteine nel trattamento di infezioni cutanee da *S. epidermidis*. Un'applicazione clinica di ORIA ed ORIB è stata dimostrata dalla loro capacità di uccidere stafilococchi intracellulari a concentrazioni superiori a quelle determinate per i batteri extracellulari. Fenomeni di resistenza nei confronti di proteine e peptidi antimicrobici sono molto improbabili, proprio grazie alla loro rapida azione e selettività verso le membrane. Inoltre, data la diffusa presenza di ceppi di stafilococco antibiotico resistenti, indagare su come ORIA ed ORIB possano rimpiazzare i classici antibiotici nel controllo di *S. epidermidis* è un approccio sensato.

In conclusione, i risultati di questo lavoro suggeriscono che ORIA ed ORIB potrebbero essere utilizzati in preparazioni ad uso topico per curare le infezioni cutanee causate da stafilococchi, dopo ulteriori indagini sulle loro proprietà farmacologiche.

SUMMARY

Innate immunity against invading pathogens is a common feature of all living organisms (Benincasa et al., 2003). Mechanisms of "instant" immunity (Boman, 2003) involve antimicrobial peptides that mostly act against the microbial membrane. The increasing presence of antibiotic-resistant bacterial strains, together with the difficulty the bacteria encounter in overcoming the peptides' mechanism of damage (Benincasa et al., 2003), have rendered antimicrobial peptides a very interesting topic research. Recent studies focused on the identification of new anti-infective agents, with a widely demonstrated toxicity *in situ* and *in vitro*. Since plant seeds are very sensitive to viruses, bacteria and fungi, particularly during maturation and germination, they contain high concentrations of antimicrobial proteins and thus constitute a potential rich reservoir of antimicrobial agents. Many plant proteins are already known for their antimicrobial activity *in vitro* (Boman, 2003; Collinge and Slusarenko, 1987; Dixon e Harrison, 1990; García-Olmedo et al., 1998). These proteins share low-molecular weight, a globular structure with disulfide bonds and the presence of a domain rich in cysteine that confers a high affinity for lipids (García-Olmedo et al., 1998; García-Olmedo et al., 1989; Bohlmann e Apel, 1991). The above named characteristics were found also in two recently discovered wheat seed polypeptides, puroindoline a (PINA) and puroindoline b (PINB). Similar to the other antimicrobial peptides PINs are indeed low-molecular-weight proteins (13kDa) possessing five disulfide bridges (Charnet et al., 2003) and a cysteine-rich structure (Blochet et al., 1993; Dubreil et al., 1998) by which they are able to tightly interact with lipids (Charnet et al., 2003; Blochet et al., 1993). These analogies suggested that PINs could be considered antimicrobial proteins, probably involved in plant defence mechanisms (Charnet et al., 2003). On this purpose some authors (Dubreil et al., 1998) showed that both PINA and PINB have antifungal properties *in vitro*, while Krishnamurthy and Giroux (2001) demonstrated that they could enhance disease resistance in transgenic rice. How they act to defend plants against pathogens is still unknown. It has been recently proposed that PIN toxicity could be related to their ability to interact with cell membranes (Jing et al., 2003), probably causing pores (Charnet et al., 2003) and thus leading to membrane disruption (Krishnamurthy et al., 2001). The aim of this study was to understand the biological role of PINA and PINB and to investigate their possible use as antibacterial agents. We therefore first studied protein distribution and localization in mature kernels, and subsequently tested their toxicity against some Gram-negative and Gram-positive bacterial strains.

The present work, demonstrates for the first time the co-localization of PINA e PINB in the wheat kernel by using antibodies specific to these proteins. Our results do not corroborate previous assumptions according to which the two puroindolines show different localization sites (Dubreil et al., 1998); these proteins are instead both abundantly present in the starchy endosperm and aleurone layer, being highly concentrated in this latter compartment. It has been widely believed that puroindolines have a role in defending the seed against pathogens (Dubreil et al., 1998; Krishnamurthy et al., 2001). Their distribution in the seed seems to agree with this supposed role. We indeed found, for all the cultivars investigated (also those deficient in one of the two puroindolines) that PINA and PINB are highly concentrated in the peripheral cell layer of the kernel, the aleurone, that is attached first by the invading pathogens (García-Olmedo et al., 1998). Furthermore, puroindolines are

also abundant in the endosperm, where several pathogens may arrive by entering the seed through cracks in the aleurone. On the other hand novel antifungal proteins in the Maize endosperm have also been recently reported (Serna et al., 2001). Antimicrobial activity of PINA and PINB was demonstrated *in vitro* against six different bacterial strains: two human and four plant pathogens. Puroindoline MIC value varied within the strains tested; interestingly PINA and PINB needed to reach the same concentration in order to be completely inhibitory. Their toxicity against *E. coli* was also tested at concentrations lower than MIC. At 1/3 the MIC value PINB is much more active than PINA (82% vs. 2%) in inhibiting bacterial growth. At 2/3 the MIC value the two proteins instead show almost the same inhibitory capacity (89% and 84% respectively).

Furthermore, as the two proteins are very similar, (Charnet et al., 2003; Gautier et al., 1994) and found almost always co-localized in the kernel, as seen from the results, we hypothesized a likely synergistic action against bacteria.

This unexpected result suggests a possible cooperation of the two proteins in defending the plant. In this regard Dubreil et al. (1998) have already successfully demonstrated PINs ability to cooperate with a more potent antifungal protein, α -PTH, enhancing its toxicity. They have instead never tested a possible cooperation between PINA and PINB. Our results suggest that the two puroindolines somehow *in vitro* co-operate against pathogens, even though showing a different behaviour when tested for their ability to enhance the toxicity of the other PIN. Particularly PINB as subinhibitory protein considerably enhanced the toxicity of low amounts of PINA (1/3 the MIC). It was instead almost ininfluent when added to higher concentrations of PINA (2/3 the MIC), being indeed able to only slightly lower its MIC. On the contrary, PINA as subinhibitory protein was ineffective when added to PINB at 1/3 the MIC value, whilst could be crucial to obtain complete inhibition when added to PINB at 2/3 the MIC value. We moreover observed that PINA could lower the MIC value of PINB for all the bacteria tested. Summarising it seems that while PINA needs higher concentrations to become a bacterial killer, PINB requires a minor concentration, which would explain the toxicity that it exerts at relatively low concentration (1/3 MIC). At low concentrations PINA looks as unable by itself to inhibit bacterial growth. The presence of PINB in small amounts probably primes bacterial death. Furthermore it appears that once the minimum amount of PINA having activity is reached, the addition of PINB would no longer substantially influence PINA toxicity. On the other hand, PINB inhibitory capacity is enhanced by the presence of PINA only when the former is already at a high concentration. Further studies are needed to clarify the source of these differences. Our results seem however to imply that the two puroindolines could have dissimilar, but in some conditions synergistic mechanisms of action. In this regard PINA has been reported to be able to cause holes in the lipid membrane (Charnet et al., 2003); PINB could instead work in a different, to our knowledge unknown way.

Our results suggest that puroindolines may be considered promising proteins to be used in various future applications. Since PIN are proteins of wheat and thus concomitantly swallowed together with baking products, they could be added to food as preservatives (as already in use for the bacteriocin nisin, Delves-Broughton et al., 1996). In this regard it is interesting noting that in the present paper we reported that PINs are still detectable in food preparation after baking and storage; further experiments are thus needed to test if they are also still active against pathogens. If so, they could even be added to raw materials prior to industrial treatment. Given the increasing problem of resistance to conventional antibiotics (Hancock e Lehrer,

1998), puroindolines could also be investigated as possible therapeutic agents. To assess this, many more experiments should be made, testing the activity of these proteins against several pathogens (also antibiotic resistant strains) and their possible cyto-toxicity against eukaryotic cells *in vitro* and *in vivo*. Such experiments would require large quantities of protein obtainable with difficulty by immuno-adsorbent purifications. We are thus working on the expression of PIN genes in heterologous systems like *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. This could allow us to easily produce large quantities of proteins and thus carry out all appropriate experiments.

The present study may advance our understanding of nature's perfect defence organization, supplying key information as to the possible mechanisms and suggesting possible strategies for dealing with pathogens. The co-existence of two similar proteins, namely the puroindolines, may have provided plants with a more efficient way to kill pathogens, with one protein enhancing the toxicity of the other.

The use of the puroindolines as naturally occurring antimicrobial agents poses the problem of obtaining them in a purified form, in large quantity and at a competitive cost.

In this work we expressed two wheat antimicrobial proteins, named puroindoline a (PINA) and puroindoline b (PINB), in heterologous systems. Bacteria are widely used to express heterologous proteins for use in research and as pharmaceuticals. *E. coli* is a convenient expression system for the production and purification of recombinant proteins, due to its ease of use, high growth and production rates, low cost and availability. However *E. coli* has some disadvantages: success rates for expressing eukaryotic proteins are low, most post-translational modifications are absent, and the product is often in the form of inclusion bodies (Baneyx, 1999). The existing literature regarding protein expression in *E. coli* has focused on the optimization of conditions for individual proteins that frequently differ in their physical and chemical properties. Proteins behave as individuals and respond poorly to generalization. For optimal overexpression results, multiple constructs should be tested for each target protein. Affinity tags are widely used to produce proteins of high purity in a single-step procedure (Nilsson et al., 1997). These tags can influence the behaviour of the fusion protein during various steps of protein expression, purification and utilization. A number of different purification tags have been described, each with different features that influence the stability, solubility and expression level of recombinant proteins in bacteria (Stevens et al., 2001). We sought to examine these properties as they relate to the success of protein purification and employ them in the context of an inexpensive, straightforward method for rapid purification of functional recombinant proteins. We examined the effects of various expression vectors on recombinant puroindolines expression, purification and solution properties to obtain an optimal set of functional proteins. We used two different expression vectors to achieve recombinant puroindoline a (rPINA) and recombinant puroindoline b (rPINB) in order to obtain functional protein. One expression vector used in this work contains a cleavable Hys tag which was developed as an affinity tag, but it is not commonly used to increase solubility. The second expression vector used allows the recombinant proteins fused with Glutathione-S-transferase (GST) to be obtained, which has been shown to increase solubility in *E. coli*.

The data show that the recombinant Hys-tagged puroindolines, Hys-PINA and Hys-PINB, were induced better in BL21* cells than in pLysS cells. In both expression systems the rPINs were detected only in the inclusion bodies. The Hys tag affects protein solubility negatively (Stevens et al., 2001); furthermore the puroindolines

contain cysteine residues and form disulfide bonds that are difficult to correctly refold. We obtained only 33% of properly refolded Hys-puroindolines and the cleavage of the Hys tag was impossible. This led us to use the pGEX/DH5 α system and obtain GST-PINA and GST-PINB as 50% insoluble proteins and 50% soluble proteins. Different elution buffers were used to purify the soluble recombinant puroindolines but eluted GST-PIN were always contaminated by other proteins. When trying to recover GST-PIN from inclusion bodies we were able to solubilize a good amount of GST-PIN (85%) achieving at the same time a high degree of purification. Solubilized GST-PINs were refolded, cleaved without difficulty from the fusion partner and purified PINs were tested for their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

The antimicrobial assay shows MIC values comparable to those of native puroindolines. The results of our study confirm that the functionality of native and recombinant proteins is equivalent. The main advantage of the use of expression systems is the unlimited quantity of the target protein. Puroindoline rescue from the immunosorbent is quite low compared with the rescue of recombinant puroindolines (more than 10 fold less). Also antibodies raised against rPINs similarly recognize native and recombinant forms of puroindolines. This suggests that rPINs are folded like native forms.

Epifluorescence staining tests on *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* confirmed the original hypothesis that, at least PINB, acts by damaging the bacterial membrane. The importance of the work probably goes beyond the results presented here. Given the large spectrum activity of the innate immunity molecules (Hancock e Lehrer, 1998), PINA and PINB may likely be active against other additional bacterial species.

The refolding procedure is difficult and often unproductive. Our results are in this scenery encouraging. We could indeed produce good amounts of correctly refolded puroindolines, having therefore the possibility to further study puroindolines antimicrobial properties and potentiality of application. The only limitation to our approach is the length of solubilization and refolding procedures that require a full working week.

The next step of the work deal with optimization of soluble recombinant protein purification. For this aim a different approach could be to produce the puroindolines in a prokaryotic expression systems more suited to obtaining active soluble properly folded target proteins.

The combined effects of fast growth rate, large population size, high mutation rate, and ability to exchange genes horizontally provide bacteria with an extraordinarily high evolutionary potential. The worldwide spread of antibiotic-resistant strains of bacteria is a demonstration of the remarkable genetic resources of this class of pathogens. In theory, it is possible to continue developing novel antibiotics directed against drug-resistant bacteria. However, inevitably, the pathogens would become resistant to the newly developed drugs. To break this vicious cycle, it is necessary to develop antibacterial strategies alternative to conventional antibiotics. There is evidence that for bacteria it is much more difficult to become resistant to antimicrobial proteins (AMPs) than to synthetic drugs (Zasloff, 2002). Plant AMPs represent therefore a class of potential therapeutics against bacteria (Egorov et al., 2005; García-Olmedo et al., 2001). PINA and PINB have been cloned in the pGEX-4T3 vector and then expressed in Origami cells, an *E. coli* strain engineered to facilitate the disulfide bond formation and correct folding of fusion proteins. The study compares also the antimicrobial activity of native PINA and PINB with that of

recombinant PINA (ORIA) and PINB (ORIB); evaluates the antimicrobial activity of ORIA and ORIB against *S. epidermidis*, in the prospect of a potential use of these molecules for the treatment of skin infections. *S. epidermidis* is in fact resistant to the majority of existing antibiotics (Nishijima et al., 2000) and is becoming more virulent, especially in immunocompromised patients (Mack et al., 1999).

Recombinant puroindolines were tested for their antimicrobial activity showing the same toxicity of native proteins. Preliminary tests were carried out also on *Staphylococcus epidermidis*. The MIC₉₀ against *Staphylococcus epidermidis* was 30 µg/ml for both the recombinant proteins. The bactericidal activity was 125 µg/ml for recombinant puroindoline A and 42 µg/ml for recombinant puroindoline B. Both proteins do not show *in vitro* haemolytic activity or toxicity towards the murine macrophage cell line J774, but they are able to kill intracellular staphylococci.

These results promise well for using these molecules in the treatment of *S. epidermidis* infection. However it is well documented that *S. epidermidis* can internalize and survive within a wide range of mammalian cells (Boelens et al., 2000). It has been suggested that the ability of *S. epidermidis* to reside in an intracellular niche enables long-term colonization of the host and the maintenance of a chronic infective state (Foster, 2005). A clinical application of ORIA and ORIB was also demonstrated by the capacity of the two recombinant proteins to kill intracellular staphylococci at concentrations above those determined for extracellular bacteria.

Numerous studies (Hong et al., 2003; Mattei et al., 1998) indicate the bacterial membrane as the target of the AMP. The results of the flow cytometry experiments described in this study concur with this conclusion. Carboxyfluorescein – the fluorochrome used in this study to stain *S. epidermidis* - is retained inside the cell only if the cell membrane is intact (Charnet et al., 2003; Jing et al., 2003). The fact that carboxyfluorescein-labelled *S. epidermidis* loose fluorescence upon incubation with ORIA or ORIB, indicates that the two AMP destroy the integrity of the bacterial membrane.

The evidence that plant antimicrobial proteins target relatively well conserved bacterial sequences in essential bacterial genes (Zasloff, 2002), suggest the rare emerging of ORIA- or ORIB- resistant staphylococci. Furthermore, given the widespread presence of antibiotic resistant staphylococcal strains (Campoccia et al., 2005; Dreno et al., 2001; Nishijima et al., 2000), we feel that investigating whether ORIA and ORIB can replace classical antibiotics in the control of *S. epidermidis* is a sensible approach.

In conclusion, our results suggest that ORIA and ORIB could be used in topic preparations against skin infections caused by staphylococci, after major investigation of their pharmacological properties. *In vivo* studies about the dermal irritability are needed to determine the toxicity of these proteins in order to propose a topic use, either in prophylactic procedures or in the treatment of staphylococcal infections.

1. INTRODUZIONE

1.1. IL FRUMENTO

1.1.1. Importanza economica del frumento

Il frumento è attualmente la specie più largamente coltivata, in un'area che va dalla Scandinavia all'Argentina, comprendendo anche zone ad una elevata altitudine nelle regioni tropicali e subtropicali. Inoltre, è il prodotto primario più consumato al mondo, di cui circa il 65% viene utilizzato per l'alimentazione umana, il 21% per quella animale, l' 8% come semente ed il restante 6% per altri usi compreso quello industriale (Orth e Shellenberger, 1988).

L'estesa coltivazione del frumento su scala mondiale trova spiegazione nel buon profilo nutrizionale, nella facilità di conservazione e trasporto delle relative cariossidi e nella grande versatilità degli impasti ottenuti mescolando la farina o la semola di frumento ad acqua. Per quanto concerne il profilo nutrizionale, la cariosside di frumento è un'ottima fonte di carboidrati, essendo costituita per l' 80% da amido, ed inoltre presenta un discreto contenuto di fibre, proteine, vitamine e minerali. Il contenuto proteico della cariosside di grano è compreso fra il 10% ed il 18% del peso secco ma, come gran parte delle proteine di origine vegetale, esse sono carenti di alcuni amminoacidi essenziali, quali la lisina ed il triptofano. Tali amminoacidi devono essere integrati nella dieta dall'assunzione di proteine in cui questi amminoacidi sono abbondanti, presenti nella carne, nel pesce, nei formaggi e nelle uova.

Dal punto di vista fisiologico le proteine di frumento sono per la maggior parte proteine di riserva che vengono accumulate nell'endosperma in maturazione e rappresentano una fonte energetica di carbonio ed azoto per l'embrione nelle fasi precoci di germinazione (Shewry, 1995). Per un caso del tutto accidentale e a noi fortunato, le proteine di riserva della cariosside conferiscono proprietà reologiche uniche agli impasti di frumento, andando a formare un complesso proteico denominato *glutine*. Tali caratteristiche reologiche sono responsabili della grande versatilità degli impasti di frumento, permettendone il processamento in una vasta gamma di prodotti, quali la pasta, il pane, il cous-cous, i biscotti e tanti altri, e determinando, quindi, l'alto valore tecnologico proprio delle farine di questo cereale.

1.1.2. Origine del frumento

Tassonomicamente il frumento appartiene al genere *Triticum*, sottotribù *Triticinae*, tribù *Triticeae*, famiglia *Graminaceae*. Il suo centro di origine e differenziazione corrisponde alla zona del Medio Oriente, compresa tra la costa del Mediterraneo e la pianura del Tigri e dell'Eufrate, dove, da studi effettuati su cariossidi ritrovate durante scavi archeologici, ebbe inizio la coltivazione del frumento (*T. monococcum* e *T. dicoccum*) circa 10000 anni fa. Il frumento, come altri cereali, ha avuto un ruolo basilare nello sviluppo delle prime civiltà indoeuropee; nell'Italia preistorica ne erano già coltivati diversi tipi e, dal periodo pre-romano, il frumento divenne uno dei più importanti fattori di sviluppo socioeconomico.

Il frumento coltivato consiste di varie specie, a diverso livello di ploidia (diploidi, tetraploidi, esaploidi, con numero di base $x = 7$) che hanno avuto origine da specie

selvatiche attraverso il fenomeno dell'anfiploidia, un processo in cui polipoidi fertili si sono formati in seguito ad incroci spontanei tra specie selvatiche diploidi e polipoidi aventi un diverso assetto cromosomico (ibridazione), seguiti dal raddoppiamento spontaneo dei cromosomi.

La classificazione dei frumenti è stata, ed è tuttora, oggetto di numerose dispute e di continue revisioni; tali difficoltà derivano principalmente dal vasto numero di specie, sia selvatiche che coltivate, e dall'elevata capacità di incrocio interspecifico. Molti studi sono stati condotti, utilizzando diversi approcci, per scoprire i progenitori selvatici delle specie coltivate e per definire una classificazione.

I frumenti attualmente coltivati appartengono in larga parte a specie tetraploidi ed esaploidi rappresentate rispettivamente da frumenti duri (*T. durum*, AABB) e teneri (*T. aestivum*, AABBDD). Il frumento duro è coltivato, nell'ambito comunitario, solo nei paesi mediterranei (Italia, Francia, Grecia, stati iberici), mentre nel resto del mondo viene coltivato quasi esclusivamente negli Stati Uniti, in Australia ed in alcune zone della Russia, in quanto necessita di particolari condizioni di crescita caratterizzate da climi caldi e secchi. Il frumento duro è utilizzato prevalentemente per la produzione di pasta (di cui l'Italia è il primo produttore mondiale) e di pane, specialmente in alcune regioni dell'Italia meridionale.

Il frumento tenero, invece, presenta una coltivazione più largamente diffusa su scala mondiale, rappresentando il 95% della produzione totale di frumento (Dick e Matsuo, 1988). La grande espansione della coltivazione di frumento tenero rispetto al frumento duro, è in relazione alla sua maggiore adattabilità a diverse condizioni idroclimatiche e alle sue ottime caratteristiche panificatorie che sono state da ultimo correlate alla presenza del genoma D. La maggiore adattabilità a diverse condizioni climatiche trova invece spiegazione nella natura esaploide di questa specie di *Triticum*.

1.1.3. Cenni sulla struttura e sulla composizione della cariosside

Quello che comunemente viene indicato come seme, in realtà è un frutto secco indeiscente denominato cariosside. La cariosside matura è formata da tre parti fondamentali: il germe o embrione, la crusca e l'endosperma (Evers e Millart, 2002). L'endosperma, ricco di amido, rappresenta più dell'80% della massa della cariosside ed è rivestito esternamente da uno strato di cellule aleuroniche ed al suo interno contiene l'embrione (germe di grano) che rappresenta circa il 3% della cariosside. La crusca è formata dagli strati di rivestimento della cariosside (pericarpo all'esterno e residui dei tegumenti seminali all'interno) e dallo strato di aleurone e rappresenta circa il 14% del frutto. Nei cereali la cariosside è la sede di accumulo dei prodotti della fotosintesi e del metabolismo dell'azoto; essa infatti contiene una limitata quantità di proteine (7-15%) e di lipidi (2-9%) ed un elevato contenuto di carboidrati (65-75%) principalmente sotto forma di amido.

1.1.4. Amido

L'amido è la componente principale dell'endosperma di frumento e si accumula in massima parte negli amiloplasti delle cellule aleuroniche in forma semicristallina. L'amido è un polimero di glucosio costituito da due catene glucidiche, l'amilosio e l'amilopectina, che differiscono nella loro lunghezza e nel grado di ramificazione e

sono normalmente presenti in rapporto di 1:3. L'amilosio è caratterizzato principalmente da molecole lineari formate da unità di D-glucosio unite da legami α -glicosidici (1 \rightarrow 4) con un grado di polimerizzazione compreso fra 103 e 104 unità (Ball et al., 1998). L'amilopectina è invece un polimero di glucosio altamente ramificato con circa il 4-5% dei legami glicosidici che sono del tipo α -(1 \rightarrow 6) (Morell et al., 1995; Rahman et al., 2000) e con un grado di polimerizzazione compreso fra 105 e 107 unità.

Studi recenti hanno dimostrato che anche la composizione dell'amido, in particolare la sua struttura e il relativo rapporto amilosio/amilopectina, influenzano le caratteristiche qualitative ed i possibili usi finali della farina di frumento (Lee et al., 2001; Bhattacharya et al., 2002; Morita et al., 2002).

1.1.5. Proteine

Sebbene la composizione dell'amido e la quantità e qualità dei lipidi presenti nella cariosside di grano, siano fattori importanti nel determinare le caratteristiche tecnologiche delle farine, della semole e dei prodotti finiti, le proprietà funzionali uniche degli impasti di frumento sono in massima parte ascrivibili alla frazione proteica, ed in particolare, alle proteine di riserva della cariosside. Una prima classificazione delle proteine della cariosside di frumento realizzata da Osborne (1924), le divideva in quattro gruppi in base alla loro relativa solubilità: albumine (acqua), globuline (soluzioni saline), gliadine (70% EtOH) e glutenine (alcali o acidi diluiti).

Le albumine sono le proteine a più basso peso molecolare, seguite dalle globuline, dalle gliadine ed infine dalle glutenine. Albumine e globuline costituiscono il 20% delle proteine della cariosside e sono rappresentate in massima parte da proteine fisiologicamente attive. Esse sono presenti nell'involucro del seme, nelle cellule aleuroniche e nel germe, mentre sono relativamente poco abbondanti nell'endosperma. Le globuline, in particolare, sono rappresentate maggiormente da enzimi con attività α e β -amilasica, che rivestono un ruolo importante nei processi di lievitazione degli impasti, in quanto catalizzano l'idrolisi dell'amido presente nei granuli danneggiati, producendo i substrati necessari per l'attività fermentativa del lievito.

Le gliadine e le glutenine rappresentano circa l'80% delle proteine della cariosside e sono collettivamente denominate prolammine, in relazione al loro elevato contenuto in prolina e glutammina. Le prolammine sono accumulate esclusivamente nell'endosperma e hanno il ruolo fisiologico di proteine di riserva. Inoltre esse sono i maggiori costituenti del glutine, che è costituito dalla massa visco-elastica che si forma dopo la rimozione dell'amido e delle proteine solubili in acqua e che è responsabile delle proprietà visco-elastiche uniche degli impasti ottenuti da farine di frumento.

1.1.6. Le puroindoline

Le puroindoline, presenti nelle cariossidi di frumento (Jing et al., 2003), sono proteine basiche ricche di cisteine, che, nel loro insieme, costituiscono la friabilina (Morris, 2002).

Questa è una proteina di 13.000 Da (Blochet et al., 1993; Gautier et al., 1994), coinvolta nella sofficità dell'endosperma (Greenwell e Schofield, 1998), presente in maggiore abbondanza sulla superficie dei granuli di amido in grani soft e in quantità minore su quella dei grani hard. Secondo Oda e Schofield (1997), i grani soft e hard contengono approssimativamente la stessa quantità di puroindoline, ma differiscono nella quantità di proteina associata ai granuli d'amido (friabilina), che è elevata nei grani soft e bassa nei grani hard. Sulla base di questi risultati, essi hanno proposto che la tessitura del chicco è determinata esclusivamente dalla parte di friabilina presente sui granuli di amido.

Le puroindoline sono simili al 55%, e sono chiamate PINA (puroindolina a) e PINB (puroindolina b). Grazie alla presenza di un unico dominio ricco di triptofano, esse hanno una forte affinità a legare i lipidi polari (Branlard et al., 2003).

Sulla base di tutte queste informazioni è stata proposta una struttura tridimensionale delle puroindoline (Figura 1)

Nel modello proposto, il dominio ricco di triptofano è incluso nel cappio tra l'elica uno e l'elica due ed è probabilmente in una conformazione a foglietto β (Giroux e Morris, 1997; Lillemo and Morris, 2000).

Le puroindoline rappresentano, quindi, le basi molecolari dell'hardness delle cariossidi di grano, che determina la qualità e l'uso finale del frumento. Quando entrambe le puroindoline sono presenti nel loro stato funzionale, il grano è soft; quando, una delle due puroindoline è assente o la sua funzionalità è alterata da una mutazione, il grano è hard (Morris, 2002).

La funzione biochimica delle puroindoline non è ancora conosciuta, ma è chiaro che sia la puroindolina a che la puroindolina b devono essere presenti nella loro forma funzionale per dare un'endosperma soffice.

Greenblatt et al. (1995) hanno dimostrato che l'interazione di PINA e di PINB con l'amido è mediata dai residui polari lipidici presenti sulla superficie dei granuli di amido purificati. Sulla superficie dei granuli d'amido dei grani soft, i glicolipidi e i fosfolipidi sono abbondanti, mentre sono pochi su quella dei grani hard. Le puroindoline dividono una debole ma significativa omologia di sequenza con le proteine che trasferiscono i lipidi (LTP – lipid transfer protein).

Durante la maturazione dei semi di grano, i granuli di amido in via di sviluppo sono circondati dalla membrana amiloplastica. Un possibile ruolo delle puroindoline nel determinare l'hardness dell'endosperma, potrebbe essere quello di stabilizzare questa membrana lipidica a due strati durante la fase di essiccamento. Durante la disidratazione dell'endosperma le puroindoline preserverebbero la membrana amiloplastica dal collassare totalmente e quindi renderebbero i granuli di amido separati dalla matrice proteica da uno strato sottile di residui di membrana. Nei grani hard, invece, le puroindoline non sarebbero capaci di stabilizzare la membrana durante la maturazione del grano, causando un contatto più diretto e un legame più stretto dei granuli d'amido alla matrice proteica (Lillemo e Morris, 2000).

1.1.7. Le puroindoline come agenti antimicrobici

Le puroindoline sono dotate di una doppia funzione: oltre che influenzare il carattere "hardness" possiedono attività tossica contro diversi patogeni fungini delle piante (Dubreil et al., 1998). PINA ha un dominio ricco in triptofano, che è parzialmente troncato in PINB e che conferisce loro una forte affinità a legare i lipidi polari (Branlard et al., 2003). Ciò che ha indotto a pensare al loro ruolo come proteine

membranotossiche ad azione antimicrobica è stata proprio questa caratteristica (Dubreil et al., 1998; Krishnamurthy e Giroux, 2001). E' stata inoltre ritrovata una duplice forma di queste proteine, una solubile e l'altra associata alle membrane (Dubreil et al., 1998), nella quale possiedono una certa omologia di struttura con le LTPs (lipid transfer proteins) (Broekaert et al., 1997). Le puroindoline sono inoltre ricche di residui aromatici e basici solitamente coinvolti nella tossicità. Un'altra caratteristica delle puroindoline consiste nella loro capacità di aumentare la resistenza alle malattie in piante di riso transgeniche (Krishnamurthy et al., 2001). Ciò indica che le puroindoline svolgono un'importante ruolo nella difesa dei semi di grano contro diversi patogeni. Inoltre, è stato visto che le puroindoline svolgono una potente attività antimicrobica in vitro, e mostrano un effetto inibitorio sinergico sulla crescita di funghi quando utilizzate insieme ad altre proteine antimicrobiche presenti nelle cariossidi di grano (Marion et al., 1994). È stata attribuita, inoltre, un'attività antimicrobica alla puroindolina a, in grado di interagire con le membrane cellulari e di legare fortemente i lipidi polari (Guerneve et al., 1998).

1.2. I PEPTIDI ANTIMICROBICI

Durante gli ultimi dieci anni sono stati isolati moltissimi peptidi biologicamente attivi da un'ampia gamma di organismi comprendenti batteri, piante, insetti, anfibi e mammiferi (Nicolas e Mor, 1995; Zasloff, 2002). Questi peptidi svolgono un ruolo molto importante nei sistemi di offesa e di difesa dei diversi organismi (Boman, 1995).

1.2.1. Caratteristiche generali dei peptidi antimicrobici

Pur variando considerevolmente nel numero di residui, che va dai 10 ai 40 amminoacidi, i peptidi antimicrobici presentano delle caratteristiche comuni. Sono, infatti, peptidi cationici (ricchi di residui di lisina e arginina) e di natura antipatica, in grado di interagire con la membrana cellulare e di distruggerne le normali funzioni formando canali ionici o pori, dissolvendo la membrana come se fossero dei detergenti, o determinando la comparsa di difetti nella membrana stessa (Rinaldi et al., 2002). A tali avvenimenti seguono l'inibizione della sintesi del DNA e delle proteine, eventi che determinano la morte cellulare (Park et al., 1998).

Essi derivano da prepeptidi di circa 60-170 amminoacidi, rilasciati in forma matura da specifiche proteasi (Gautier et al., 1994).

La maggior parte dei precursori contiene:

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

L'importanza dello studio dei peptidi antimicrobici è accresciuta dai fenomeni di resistenza ai tradizionali antibiotici, che sempre maggiormente si verificano oggi, dovuti ad un uso improprio degli stessi. Nei confronti di questi peptidi fino ad ora non si sono verificati fenomeni di resistenza e, pertanto, rappresentano una potenziale alternativa ai classici antibiotici, grazie alla loro rapida azione e alla loro tossicità altamente selettiva (Hancock e Lehrer, 1998).

1.2.2. Peptidi e proteine come fattori dell'immunità innata

Se ci soffermiamo anche per qualche secondo ad osservare dalla nostra finestra l'ambiente che ci circonda, possiamo facilmente renderci conto di quante e quali differenze intercorrano tra le specie viventi presenti sulla Terra, frutto delle molteplici strategie che esse hanno adottato per evolversi nelle condizioni di vita più svariate. In tutti gli ecosistemi ogni organismo ha dovuto sempre proteggersi e contrastare gli attacchi di quelli che avevano adottato una strategia dannosa nei confronti degli altri, sviluppando ciascuno un proprio modo per uscire vincitore da quella sorta di "anello biologico" che è l'evoluzione.

Organismi di tutte le specie, comprendenti batteri, piante, insetti anfibi e mammiferi (Nicolas e Mor, 1995; Zasloff, 2002) producono molecole per proteggersi dagli attacchi esterni. Esse comprendono soprattutto peptidi e proteine, prodotti costitutivamente e in seguito a danno o infezione (Hancock e Lehrer, 1998), che svolgono un ruolo molto importante nei sistemi di difesa e di offesa dei diversi organismi (Boman, 1995).

A lungo considerate dagli immunologi come un retaggio dell'evoluzione, caratteristico delle piante e degli animali meno evoluti (Tossi e Sandri, 2002), recentemente il loro ruolo è stato rivalutato, come parte integrante delle risposte immunitarie innate, le uniche condivise tra i regni animale e vegetale, a dimostrazione della loro grande importanza nel processo evolutivo di organismi multicellulari sempre più complessi (Zasloff, 2002). E' indubbio che moltissime specie, non si sarebbero conservate fino ad oggi, senza quei processi biologici che la Natura ha conservato con meccanismi e modalità molto simili, a dispetto della stragrande variabilità e diversità esistente fra gli organismi di ciascun *Phylum*. Tutto fa pensare che i processi biologici abbiano "voluto" inizialmente convergere verso un primo traguardo evolutivo, che fornisse alle specie viventi una primordiale arma di difesa (Zasloff, 2002) con un'azione non specifica, ma veloce e aggressiva, permettesse loro di difendersi dagli attacchi dei patogeni, per poter proseguire il loro cammino sulla strada dell'evoluzione.

Peptidi e proteine antimicrobiche sono le molecole "effettrici" dell'immunità innata (Boman, 2003). Esse hanno un'importanza doppia: proteggono circa l'80% delle specie animali e tutte le piante, ma giocano un ruolo importante anche nell'immunità degli animali superiori, fornendo una sorta di prima linea di difesa che stimola e coopera attivamente con le risposte immunitarie adattative (Tossi e Sandri, 2002).

Gli organismi viventi si difendono quindi dall'invasione di agenti estranei mediante due tipi di risposte: un'immunità cosiddetta "innata o naturale" e una "acquisita o specifica".

Quest'ultima è l'espressione di uno stato di resistenza dell'individuo all'azione di agenti estranei (antigeni), che si sviluppa in seguito al loro contatto con l'organismo ospite. Le sue caratteristiche fondamentali sono la specificità e la memoria. La prima peculiarità è data dagli anticorpi prodotti dalle plasmacellule, che presentano una forte attività e una forte specificità nei confronti dell'aggressore. La seconda caratteristica, invece, è data dal clone di cellule di memoria che previene le successive infezioni dovute ad un antigene già incontrato in precedenza, con una risposta più forte e rapida (Abbas et al., 2000). Questa immunità, detta anche adattativa, è però apparsa tardivamente nel corso dell'evoluzione, ed esclusivamente nei vertebrati. All'incirca l'80% delle specie animali sopravvive senza questo elaborato sistema di difesa (Ferrandon et al., 2002).

L'immunità innata rappresenta, invece, un meccanismo di difesa preesistente all'incontro con l'antigene. Essa si avvale di diversi fattori meccanici e chimici (cute,

saliva, secrezione gastrica), umorali (lisozima, complemento, interferone), di cellule (fagociti) e della flora batterica commensale. I peptidi antimicrobici rappresentano un'ulteriore via di risposta innata alle infezioni microbiche.

Il sistema innato è caratterizzato da:

- assenza di specificità, in quanto è attivo contro un largo spettro di microrganismi;
- assenza di memoria;
- velocità di risposta, dovuta all'immediata disponibilità dei peptidi immagazzinati ed alla loro rapida sintesi e diffusione;
- assenza di un meccanismo di riconoscimento del "self": l'autodistruzione è evitata dalla compartimentalizzazione cellulare dei peptidi che sono conservati in granuli con membrane resistenti e/o sotto forma di propeptidi;
- basso costo energetico, in quanto i peptidi necessitano per la sintesi di una quantità di energia inferiore a quella richiesta all'animale per la complessa attivazione dell'immunità acquisita (Abbas et al., 2000).

Questo tipo di risposta immunitaria è stato dapprima scoperto nell'emolinfa di un insetto: la farfalla *Hyalophora cecropia*, da cui è stata isolata una famiglia di piccole proteine o peptidi, chiamate Cecropine, caratterizzate da un'intensa attività antimicrobica (Ferrandon et al, 2002). Negli insetti tale sistema è indotto in risposta ad un'infezione microbica, a seguito della quale questi peptidi sono sintetizzati dalle cellule del corpo grasso (l'equivalente del fegato dei mammiferi), liberati nell'emolinfa dell'insetto e diffusi in tutto l'organismo, dove possono distruggere una vasta gamma di microrganismi. È stato dimostrato, inoltre, che sono gli stessi microrganismi che invadono l'organismo ospite ad innescare la sintesi delle sostanze destinate ad annientarli. Ciò indica che gli insetti dispongono di sistemi in grado di rilevare la presenza di un'infezione e che l'allarme viene trasmesso fino alle cellule immunocompetenti che esprimono i geni codificanti per i peptidi antimicrobici (Steiner, 1981). Fino ad oggi sono stati caratterizzati più di 200 peptidi antimicrobici degli insetti, anche in specie di taglia molto piccola come la drosophila e l'anofele (Lemaitre, 1999).

Successivamente sono stati scoperti peptidi analoghi in numerose specie di anfibi, come la rana *Xenopus laevis*, nei quali la produzione di peptidi è costitutiva, anche se vengono rilasciati in risposta ad uno stimolo esterno (Hancock e Lehrer, 1998). La pelle di anfibio si è rivelata una ricca sorgente di tali peptidi con funzioni sia fisiologiche che difensive. Tali componenti sono prodotte e secrete da ghiandole granulari controllate da nervi simpatici che scaricano il loro contenuto sul dorso dell'animale in risposta ad una varietà di stimoli (Zasloff, 2002).

Alcuni di questi peptidi sono farmacologicamente attivi come le ceruleine, le tachichinine, le bradichinine ed i peptidi oppioidi; per molti di questi sono state trovate controparti nel cervello e nel tratto intestinale dei mammiferi. E' stato ipotizzato che tali peptidi possano avere un ruolo nella regolazione dell'equilibrio elettrochimico a livello dell'epitelio di questi anfibi, oltre che di difesa contro predatori e microrganismi. Un sistema simile è stato trovato anche nei mammiferi dove le defensine, una famiglia di peptidi a largo spettro di attività antimicrobica, sono immagazzinate nei granuli citoplasmatici dei neutrofili e nelle cellule di Paneth dell'intestino tenue (Todisco et al., 2002).

Anche le piante sono particolarmente ricche di molecole di difesa. Esse sintetizzano una vasta gamma di peptidi e proteine che permette loro di rispondere in maniera molto veloce ed efficiente ai continui danni inflitti da funghi, batteri e insetti, che normalmente fanno parte del loro ecosistema. Le piante si difendono producendo

grosse quantità di fitoalessine, PR-proteins, chitinasi e β -glucanasi, inibitori di proteasi, proteine che inattivano i ribosomi, e proteine ricche in cisteina. La caratteristica che accomuna quest'ultima classe è la presenza di più ponti disolfuro, che conferiscono a queste proteine una struttura tridimensionale molto stabile e la loro particolare azione specifica contro le membrane degli organismi bersaglio (Broekaert et al., 1997).

Defensine sono state isolate da foglie, fiori, bacelli, tuberi, semi di numerosissime specie e sono probabilmente ubiquitarie nel regno delle piante, fatto che è consistente con il ruolo di difesa che si attribuisce loro (García-Olmedo et al., 1998). Esse sono localizzate principalmente nelle cellule epidermiche, ma si trovano anche nello xilema, nelle cellule stomatali e in quelle che circondano le cavità stomatiche, tutte aree dove avvengono il contatto e le infezioni dei patogeni.

L'immunità innata, dal punto di vista evolutivo, si è sviluppata più precocemente rispetto a quella acquisita; questo sistema di difesa innato, infatti, è l'unico a disposizione dei *phyla* inferiori (artropodi ed insetti). Negli organismi superiori, invece, il sistema innato funge da sistema di difesa complementare, coadiuvando quello acquisito nella difesa contro patogeni occasionali ed obbligati e contro la proliferazione della flora batterica naturale.

1.2.3. Caratteristiche generali e meccanismo d'azione dei peptidi antimicrobici

Molti dei peptidi antimicrobici agiscono alterando direttamente la membrana delle cellule bersaglio (Thevissen et al., 2000).

Le membrane batteriche sono ricche di fosfolipidi anionici, come la fosfatidilserina ed il fosfatidilglicerolo: ciò determina un'interazione elettrostatica del peptide carico positivamente con la membrana stessa, che è alla base del successivo effetto di perturbazione del doppio strato. La differente composizione delle membrane è infatti alla base della selettività che alcuni di questi peptidi hanno per le cellule batteriche. Le cellule eucariotiche, come ad esempio gli ematociti, sono caratterizzate da un alto contenuto di fosfolipidi zwitterionici, come la fosfatidilcolina, la sfingomielinina e la fosfatidiletanolamina. Sono inoltre ricche di colesterolo, assente nei batteri, che sembra inibire l'azione di tali peptidi conferendo una certa resistenza alle membrane. Un altro fattore importante per la selettività è il valore del potenziale di membrana: un potenziale più negativo all'interno della cellula, tipico delle cellule batteriche (100-150 mV), facilita l'interazione del peptide con lo strato lipidico (Bechinger, 1997).

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

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

- un effetto "detergente", in cui la struttura anfipatica di tali molecole interagirebbe con il doppio strato lipidico, distruggendone l'organizzazione e determinando la fuoriuscita dei componenti citoplasmatici;
- la formazione di canali, dovuta all'aggregazione dei monomeri di peptide nel doppio strato lipidico.

Il primo meccanismo è supportato da evidenze di permeabilizzazione del doppio strato in assenza di potenziale di membrana, dall'alta stechiometria di peptide richiesta per ottenere la lisi, in contrasto con lo scarso numero di molecole richieste per la formazione di canali, e da studi strutturali che mostrano come alcuni peptidi adottino prevalentemente una posizione parallela al piano della membrana.

La formazione di un "poro" è stata invece supposta dalla presenza di effetti cooperativi tra peptidi e dal posizionamento perpendicolare del peptide nella membrana. In alcuni casi è stato proposto un processo in cui il peptide, dopo aver inizialmente ricoperto la membrana con uno strato orientato parallelamente alla superficie, si inserirebbe perpendicolarmente all'interno, una volta raggiunta una elevata concentrazione (Gueneve et al., 1998).

Vi sono, comunque, delle eccezioni al meccanismo generale d'azione sulla membrana: la buforina II, isolata dal *Bufo bufo*, è in grado di penetrare nella cellula e di inibire le funzioni cellulari legandosi al DNA e all'RNA (Park et al., 1998). Anche i peptidi ricchi in prolina ed arginina agiscono solitamente in modo differente, in quanto un'alta concentrazione di prolina è incompatibile con la formazione di una struttura anfipatica.

1.2.4. Classificazione dei peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici si possono dividere, per composizione e per struttura secondaria, in tre gruppi principali:

- peptidi contenenti cisteine, che formano nella maggior parte dei casi ponti disolfuro; si distinguono in due sottoclassi:
 - a. peptidi contenenti più ponti disolfuro, che adottano una struttura a foglietto β antiparallelo (defensine, tachiplesine);
 - b. peptidi con struttura a loop, contenenti un solo ponte disolfuro (bactenecine, brevinine, esculentine);
- peptidi che contengono un'alta percentuale di aminoacidi specifici (PR-39, apidecina ed i peptidi bovini ricchi in prolina e arginina Bac5 e Bac7);
- peptidi lineari, che si strutturano ad α -elica in ambiente idrofobico e che assumono struttura random in soluzione.

Questi ultimi rappresentano il gruppo più numeroso e più a fondo studiato, a cui appartengono la maggior parte dei peptidi antimicrobici "classici" e di cui si conoscono moltissimi esempi (cecropine, melittina, magainine, dermaseptine, temporine, bombinine) (Ferrandon et al., 2002).

1.2.5. Defensine

Le defensine sono peptidi immagazzinati nei granuli citoplasmatici dei neutrofili di mammifero (topo, ratto, coniglio, uomo), nelle cellule di Paneth dell'intestino tenue (Todisco et al., 2002) e nell'endosperma dei semi di molte specie vegetali (Jing et al., 2003; Hancock e Lehrer, 1998).

Le α -defensine sono costituite da 29-30 aminoacidi con elevato contenuto di arginina e 6 residui di cisteina, le cui posizioni sono conservate all'interno della famiglia. Queste molecole sono accumulate nei granuli dei neutrofili in forma attiva e sono rilasciate nei vacuoli fagocitici. I neutrofili hanno la capacità di fagocitare e distruggere l'agente invasore: questi peptidi costituiscono, quindi, un meccanismo

ausiliario all'uccisione "ossigeno dipendente" di cui sono responsabili i leucociti (Ashitani et al., 2002).

Dai neutrofili bovini è stato isolato un gruppo di 13 defensine, le β -defensine, lunghe 38-42 residui contenenti sempre 6 cisteine in posizioni conservate, ma diverse dalle α -defensine (Vatta et al., 2000). Simile a questi peptidi è anche il peptide antimicrobico tracheale (TAP), isolato dagli epitelii delle vie aeree bovine (Todisco et al., 2002).

Le defensine sono peptidi compatti, globulari, formati in maggior parte da 3 foglietti β antiparalleli senza α elica; i 3 ponti disolfuro conferiscono una certa rigidità alla struttura. La defensina umana HNP-3 in cristalli forma dei dimeri a forma di cesto la cui base è idrofobica, mentre i bordi contengono le catene polari dell'N- e del C-terminale. Nonostante la differenza strutturale con i classici peptidi antimicrobici che formano pori intermembrana, anche le defensine sono in grado di formare pori multimerici e di indurre così la lisi di vescicole lipidiche. L'anfipaticità è dunque una caratteristica molto conservata, anche nel caso di strutture tridimensionali diverse dalla classica α elica: questo dimostra la sua importanza per l'interazione con la membrana.

Il fatto che peptidi di così diversa composizione e struttura agiscano in modo simile, fa pensare che tali molecole possano essere il prodotto di un'evoluzione convergente.

1.3. APPLICAZIONI DELLE PROTEINE AD AZIONE ANTIMICROBICA

L'uso massivo e indiscriminato degli antibiotici in tutti i campi, e soprattutto in quelli in cui essi non hanno nessuna efficacia, per esempio nella cura alle malattie virali, ha portato negli anni a conseguenze molto gravi. Essi innanzitutto uccidono anche l'utile microflora simbiotica, che complementa il nostro metabolismo e le nostre difese contro gli altri microrganismi patogeni, ma i microrganismi sono capaci di sviluppare resistenze che consentono loro di continuare a crescere in presenza anche di grosse quantità di antibiotico. Cosa ben più grave è che tali resistenze, possono essere inoltre trasmissibili tra i vari microrganismi, fino a generare, come già si è verificato, ceppi "super-resistenti", cioè capaci di resistere a diversi antibiotici: in una situazione del genere rischiamo la vita anche per una comunissima infezione batterica.

Le proteine antimicrobiche rappresentano una potenziale alternativa futura all'uso degli antibiotici in campo sia medico che vegetale e zootecnico. Fenomeni di resistenza nei confronti di proteine e peptidi antimicrobici sono molto improbabili, proprio grazie alla loro rapida azione e selettività verso le membrane. È difficile immaginare un organismo che riorganizzi la composizione della propria membrana cellulare per resistere ad una molecola e ciò è dimostrato dal fatto che sono stati trovati ceppi di batteri dei generi *Morganella* e *Serratia* resistenti, che presentano una minore composizione di acidi grassi nella membrana plasmatica, ma che per lo stesso motivo presentano una fitness molto ridotta (Zasloff, 2002).

Le puroindoline rientrano perfettamente in questo discorso. Come per le altre proteine ad azione antimicrobica, un'impiego delle puroindoline è auspicabile in svariati campi, a partire dalla lotta a numerosi patogeni vegetali, nella sterilizzazione del materiale ospedaliero o nel materiale da imballaggio e altri ancora.

1.4. L'AIUTO DELLE BIOTECNOLOGIE

Un quadro così ampio per il futuro ed esteso impiego di proteine antimicrobiche naturali, al posto dei prodotti di sintesi o degli antibiotici tradizionali, lascia facilmente immaginare la quantità di prodotti che sarebbe necessaria. La possibilità di utilizzare cellule o organismi facilmente manipolabili per l'espressione di geni codificanti proteine di interesse industriale apre la prospettiva alla produzione e la commercializzazione di tali prodotti in tempi e costi contenuti. Il prezzo di vendita di qualunque prodotto industriale dipende infatti dai costi necessari all'intero processo di produzione, compresi quelli relativi alle operazioni connesse con la sua purificazione.

Tra i molti sistemi disponibili per la produzione di proteine eterologhe, il batterio Gram-negativo *Escherichia coli* è uno dei più utilizzati per la sua capacità di crescere rapidamente ad alta densità su terreni poco costosi, per i suoi meccanismi genetici ampiamente conosciuti e per la disponibilità di un gran numero di vettori di clonaggio e di ceppi mutanti ospiti. Sebbene non ci sia nessuna garanzia che il prodotto genico ricombinante sia accumulato in *E. coli* ad alti livelli in una forma completa e biologicamente attiva, molti sforzi sono stati diretti verso il miglioramento della prestazione e della versatilità di questo microrganismo. Il problema maggiore dell'espressione eterologa in *E. coli* è rappresentato dall'incapacità dei microrganismi procarioti di eseguire modifiche post-traduzionali che sono invece presenti nelle proteine eucariotiche, quali la glicosilazione, la fosforilazione, l'acetilazione, l'acilazione, la solfatazione, la maturazione di precursori proteici e la γ -carbossilazione che sono spesso necessarie per la produzione di un prodotto stabile e funzionale (Sørensen e Mortensen, 2005).

Recentemente Novagen ha introdotto sul mercato la serie dei vettori pET per l'espressione di proteine ricombinanti in cellule batteriche. Nel sistema pET, i geni bersaglio sono situati in un plasmide di espressione a medio numero di copie, a valle del promotore della RNA Polimerasi del fago T7, codificata *in trans* dal cromosoma dell'ospite. L'espressione della RNA polimerasi del fago T7 è indotta dall'aggiunta di isopropil β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) al mezzo di coltura batterico e culmina con la trascrizione e traduzione del gene di interesse. La T7 RNA Polimerasi presenta un così elevato grado di processività e selettività per il suo promotore, che incanala la gran parte delle risorse della cellula batterica verso l'espressione della proteina ricombinante, i cui livelli possono raggiungere il 50% delle proteine cellulari totali dopo poche ore di induzione (Studier e Moffat, 1986).

Il vettore prodotto dall'Amersham Biosciences della serie pGEX, permette un'alta espressione, inducibile da IPTG, dei geni fusi con la Glutazione S-transferasi (GST). La proteina fusa alla GST può essere purificata per cromatografia d'affinità utilizzando glutazione immobilizzato. L'alta solubilità della GST aumenta anche la solubilità della proteina target, favorendone l'accumulo all'interno del citoplasma della cellula batterica.

Per quanto riguarda invece i ceppi batterici ospiti, recentemente la Novagen ha introdotto sul mercato il ceppo di *E. coli* ORIGAMI™ B. Quest'ultimo è un ospite esclusivo che promuove la formazione di ponti disolfuro (nel caso ovviamente di proteine eterologhe che ne contengono uno o più di uno) e l'incremento della solubilità e dell'attività della proteina di interesse. Il ceppo ha infatti delle mutazioni a carico del gene della tioredoxina redattasi (*trxB*) e della glutazione redattasi (*gor*), favorendo significativamente la formazione di ponti disolfuro nel citoplasma. Ciò permette che il folding della proteina di interesse avvenga nel citoplasma. Inoltre le

cellule ORIGAMI™ B, derivano dal mutante *lacZY* delle BL21 e permettono un controllo preciso dei livelli di espressione a seconda della concentrazione di IPTG. Il loro genotipo favorisce inoltre la stabilità della proteina eterologa da esprimere.

1.5. SCOPO DELLA TESI

Studi recenti condotti sulle difese immunitarie, hanno rilevato analogie tali da sostenere l'ipotesi di un'origine comune dei meccanismi di difesa innata nel mondo vivente, animale e vegetale. Questi studi potranno condurre allo sviluppo di nuovi farmaci: in un momento in cui si moltiplicano i fenomeni di resistenza agli antibiotici comunemente utilizzati e in cui la scoperta di nuovi antibiotici si fa attendere, l'impiego nell'uomo dei peptidi che difendono gli invertebrati potrebbe diventare una nuova arma efficace contro gli attacchi batterici.

Pertanto, lo scopo del presente lavoro di tesi è stato la produzione ricombinante di puroindoline di grano (PINA e PINB) e il loro utilizzo su cellule batteriche e animali, al fine di determinarne l'attività antimicrobica.

I geni delle puroindoline saranno espressi in diversi vettori di espressione, con cui si andrà a trasformare più di un ospite. In base alle caratteristiche e alla resa finale, si sceglierà il sistema ottimale di espressione.

L'azione antimicrobica delle puroindoline ricombinanti sarà poi saggiata, oltre che su patogeni vegetali e animali, anche sul ceppo di *Staphylococcus epidermidis*, un batterio di interesse clinico che è responsabile, insieme al *Propionibacterium acnes*, dell'*acne vulgaris*. Lo *S. epidermidis* oltre ad essere un microrganismo commensale che si ritrova nella flora normale della pelle umana e delle mucose, solo recentemente è stato considerato un organismo saprofitico (Ferreiròs, 1991). *S. epidermidis* è resistente alla maggior parte degli antibiotici (Nishijima et al., 2000) e sta emergendo come patogeno nosocomiale in pazienti immunocompromessi (Mack et al., 1999), provocando endocarditi, colonizzazione di valvole, setticemia e infezioni del tratto urinario (Rupp, 2001).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Materiali

La cultivar di *Triticum aestivum* L. (Centauro) utilizzata per l'estrazione del DNA è stata fornita gentilmente dal Consorzio Nazionale Sementi (Ravenna, Italia). I ceppi di *Escherichia coli* TOP10, BL21 Star, BL21pLysS e DH5 α sono stati comprati dall'Invitrogen (Milano, Italia). I vettori di espressione pET100/D-TOPO e pGEX-4T-3 sono stati forniti rispettivamente dall'Invitrogen e dall'Amersham Biosciences. Il ceppo ORIGAMITM B di *Escherichia coli* è stato comprato dalla Novagen (San Diego, CA, USA). La linea cellulare J774, una linea tumorale di monociti-macrofagi murini, è stata acquistata all'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA).

Gli anticorpi Rabbit α PINA e Rabbit α PINB sono stati forniti dal Dr. M. Giroux (Università del Montana, Canada).

2.1.1. Prodotti da forno

Sono state utilizzate preparazioni alimentari industriali costituite principalmente da frumento tenero per verificare la presenza delle puroindoline. In particolare sono stati testati 3 differenti snack: il Saccottino (Mulino Bianco), il Plumcake (Parmalat), il Fetta al latte (Kinder); 5 biscotti: Macina e Galletti (Mulino Bianco), Goccioline e Pavesini (Pavesi), fette biscottate (Colussi); 3 diverse tipologie di pane di frumento tenero in cassetta (IPERCOOP). Inoltre, è stato utilizzato pane di frumento duro in cassetta come controllo negativo.

2.1.2. Colture batteriche

Nel presente studio sono stati utilizzati i seguenti ceppi : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Clavibacter michiganensis* come Gram positivi, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas syringae phaseoli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora carotovora* come Gram negativi.

2.2. Produzione di anticorpi

Anticorpi policlonali diretti contro PINA e PINB sono stati prodotti mediante l'immunizzazione di ratti con il peptide sintetico DRASKVIQEAKNLPPR per PINA (Rat α PINA) e GEVFKQLQRAQSLPSK per PINB (Rat α PINB) (Krishnamurthy e Giroux, 2001). Questi peptidi corrispondono alla regione C-terminale della puroindolina matura del grano e sono stati prodotti dal CNR di Avellino.

Per generare anticorpi specifici rivolti contro molecole di piccole dimensioni è necessario legarle a delle macromolecole; in questo sistema la molecola più piccola è denominata aptene, mentre la macromolecola è chiamata carrier. Il complesso aptene-carrier, a differenza dell'aptene libero, si comporta come immunogeno e pertanto è in grado di generare una risposta immune specifica.

La prima immunizzazione del ratto ha previsto l'iniezione del coniugato peptide-carrier, sciolto in una soluzione salina NaCl allo 0.15%, con l'aggiunta dell'adiuvante di Freund. Quest'ultimo è costituito da olio minerale (liquido di paraffina), da un emulsionante e da micobatteri inattivati al calore. L'antigene, in questo modo, è somministrato in forma emulsionata in olio di paraffina che ritarda la processazione dell'antigene, favorendo, in tal modo, una stimolazione continua e prolungata nel tempo. L'emulsione fa aumentare il numero di linfonodi che l'antigene può raggiungere attraverso il sistema linfatico e perciò il numero dei linfociti B potenzialmente attivi. I micobatteri stimolano la produzione di anticorpi creando un'inflammatione a livello locale. Nella seconda e terza immunizzazione è stato, invece, usato un adiuvante incompleto di Freund, costituito solo dall'olio di paraffina.

2.3. Purificazione degli anticorpi

Le IgG sono state purificate utilizzando particelle magnetiche Dynabeads (DYNAL Biotech) PROTEIN G.

100 µl di particelle sono state lavate 3 volte con 1 ml di PBS-EDTA⁻ 0.15 M pH 7.2. Alle particelle, recuperate con l'aiuto di un magnete, sono stati aggiunti 500 µl di siero diluito 1/50. Dopo incubazione di 1 ora a temperatura ambiente in agitazione, le particelle magnetiche sono state lavate 3 volte con PBS. L'eluizione delle IgG è stata condotta utilizzando 30 µl di tampone Citrato 0.1 M pH 2-3. Il pH è stato neutralizzato con 4 µl di TRIS 1M a pH 9. Le particelle sono state lavate 1 volta con PBS-TWEEN 20 allo 0.1% e 3 volte con PBS. È stato poi condotto un ulteriore passaggio di purificazione aggiungendo alle particelle magnetiche il siero precedentemente recuperato.

2.4. Estrazione delle proteine totali

Le cariossidi di frumento sono state frantumate con un macinino e setacciate per ottenere la farina. 100 mg di farina sono stati incubati con 500 µl di un tampone di estrazione del Kit "Duro Test" (Rhône diagnostics) e messi in agitazione per 30 minuti. Il campione è stato poi centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti e si è prelevato il surnatante contenente le proteine. Dall'estratto così ottenuto sono state purificate le puroindoline, poi utilizzate per effettuare test *in vitro*.

2.5. Estrazione delle proteine legate ai granuli d'amido

Le singole cariossidi sono state schiacciate lievemente ed incubate per 30 minuti in 500 µl di 0.1 M NaCl, vortexando ogni 10 minuti (Bettge et al., 1995). Le cariossidi sono state poi pestate per alcuni minuti. Le fibre, il germe e il glutine sono stati spinti in fondo al tubo mentre lo strato superiore, contenente l'amido, è stato trasferito in un nuovo tubo. L'estrazione dell'amido con 0.1 M di NaCl è stata ripetuta per 3 volte per ogni cariosside in modo da recuperare quanto più amido possibile. Tutto l'amido ottenuto è stato centrifugato ed il surnatante ed il pellet sono stati trattati separatamente. Il primo contiene tutte le proteine non associate all'amido. Il pellet è stato invece trattato ulteriormente come già descritto (Bettge et al., 1995) in modo da

estrarre tutte le proteine associate ai granuli d'amido. Le proteine legate all'amido sono state portate a secco e poi ridissolte in 100 µl di PBS.

2.6. Immunoassorbente

La purificazione mediante l'uso di anticorpi specifici è stata eseguita al fine di separare le puroindoline dalle altre proteine della cariosside.

Il saggio consta di 3 parti fondamentali, che sono:

- 1) Formazione di un legame covalente tra l'anticorpo e le particelle di latex che espongono gruppi amminici
- 2) Formazione del legame anticorpo-antigene
- 3) Rottura del legame anticorpo-antigene e recupero dell'antigene.

2.6.1. Formazione del legame covalente particelle-anticorpo

Le particelle di latex (50 µl) sono state preventivamente lavate per 3 volte con PBS. Sono state attivate in agitazione, over-night a temperatura ambiente, con glutaraldeide 8%. La glutaraldeide è stata poi allontanata per centrifugazione e 3 successivi lavaggi con PBS.

Le particelle lavate sono state fatte incubare, in agitazione, con 30 µg di anticorpo per 4-5 ore a temperatura ambiente, in modo da consentire il legame tra il latex e l'anticorpo.

Il tutto è stato poi centrifugato per allontanare l'anticorpo non legato e le particelle sono state trattate con etanolamina e 2% milk, per saturare eventuali siti ancora liberi sulle particelle.

2.6.2. Formazione del legame anticorpo-antigene

Le particelle a cui è stato legato covalentemente l'anticorpo purificato, sono state lavate 2 volte con PBS e poi incubate over-night con 1 ml di estratto proteico (ottenuto come descritto nel paragrafo 2.4), ad una concentrazione (determinata attraverso il saggio Bio Rad) di 1 mg/ml.

La specificità dell'anticorpo utilizzato ci assicura che solo le puroindoline a e b si leghino all'anticorpo, mentre tutte le altre proteine vengono eliminate attraverso 2 successivi lavaggi con PBS.

2.6.3. Rottura del legame anticorpo-antigene e recupero dell'antigene

Il recupero dell'antigene purificato è stato effettuato incubando le particelle con 400 µl di un Tampone Glicina 0.1 M pH 2.5, che determina la rottura del legame antigene-anticorpo e il rilascio dell'antigene in soluzione. La soluzione è stata poi tamponata con 20 µl di PBS pH 8 e poi centrifugata a 10000 rpm per 5 minuti. Il surnatante, contenente le puroindoline purificate, è stato recuperato e, dopo aver determinato la concentrazione proteica mediante il saggio Bio Rad, è stato utilizzato per effettuare saggi *in vitro*.

2.7. Test citofluorimetrico

La citofluorimetria a flusso ha permesso, utilizzando sugli anticorpi specifici, di quantizzare le due puroindoline all'interno della cariosside. Il test citofluorimetrico è stato condotto in tubi di polietilene opportunamente pretrattati con una soluzione fisiologica tamponata (PBS) al 2% di milk blocking solution, allo scopo di rendere inerte il polietilene e di evitare interazioni con il latex.

Circa 40000 particelle di latex da 10 μm di diametro (Poliscience, Milano), sono state sospese in 900 μl di Borato Buffer 0.1 M pH 8.5, e incubate con 100 μl di antigene per 3 ore a temperatura ambiente. Dopo aver centrifugato a 11000 rpm per 5 minuti per eliminare tutto ciò che non si è legato alle particelle di lattice, il pellet è stato ridisciolti in 300 μl di milk 2%. Tale operazione si rende necessaria allo scopo di saturare tutti i siti delle particelle di lattice rimasti liberi, dove l'antigene non si è legato, ed evitare quindi reazioni aspecifiche tra l'anticorpo e le particelle. Dopo aver incubato per 30 minuti a temperatura ambiente, il campione è stato lavato con PBS 0.56 M pH 7.2 e addizionato di 100 μl di antisiero opportunamente diluito, contenente l'anticorpo diretto contro la proteina in analisi. Dopo incubazione per 2 ore in agitazione a temperatura ambiente, un ulteriore lavaggio ha consentito l'allontanamento degli anticorpi che non hanno legato l'antigene. Successivamente è stato aggiunto il secondo anticorpo, rivolto verso il primo (Goat α Rat^{FITC}) alla diluizione 1/500. Dopo incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente e al buio, il campione è stato lavato 2 volte con PBS e sottoposto ad analisi citofluorimetrica.

Di ogni campione è stato analizzato anche il controllo negativo, in cui è stato omesso il primo anticorpo. Ciò che viene rilevato dal citofluorimetro e poi trasformato in segnale digitale, è la fluorescenza data dalle particelle di lattice alle quali si sono legati: l'antigene, l'anticorpo specifico contro l'antigene e il secondo anticorpo fluorescente rivolto verso il primo anticorpo.

I risultati sono stati espressi in termini di mediana, che rappresenta il numero di eventi fluorescenti maggiormente frequenti.

2.8. Microscopia a immunofluorescenza

Le cariossidi mature sono state prima idratate in acqua distillata per un giorno e poi tagliate tangenzialmente. Sono state preparate delle sezioni di 3-4 μm come descritto in letteratura (Cai et al., 2002). Una volta pronte, le sezioni sono state incubate come segue: 30 minuti con 3 % di siero di capra preimmune diluito in PBS (soluzione bloccante, utilizzate anche per diluire gli anticorpi); 2 ore con gli anticorpi primari (α PINA ed α PINB) diluiti 1:50; 30 minuti con PBS/0.2% Tween 20 (T-PBS); 1 ora a 37°C al buio con gli anticorpi secondari (Goat α Rat^{FITC} 466 diluito 1:50 e Goat α Rabbit^{Alexa 594} diluito 1:25). Dopo 30 minuti di lavaggi con T-PBS, I campioni sono stati asciugati su vetrino, montati con Citofluor (Glicerolo-PBS, Agar England) e osservati con un microscopio ottico Zeiss Axiophot. La specificità degli anticorpi è stata valutata incubando i campioni controllo con il siero preimmune. Un ulteriore controllo è stato condotto utilizzando una cultivar di frumento duro.

2.9. Estrazione del DNA genomico

Il DNA è stato estratto da 1 g di tessuto vegetale. Le foglie sono state frantumate finemente in azoto liquido e incubate per 30 minuti a 60°C in un tampone di estrazione (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1% β -mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH 8, 1% PVP). Al campione sono stati poi aggiunti 20 ml di una soluzione Cloroformio: Alcool isoamilico in rapporto 24:1. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti in agitazione, si è proceduti con una centrifugazione a 7000 rpm per 10 minuti. La fase acquosa, contenente gli acidi nucleici, è stata recuperata. La precipitazione degli acidi nucleici è stata effettuata aggiungendo un ugual volume di isopropanolo a freddo ed incubando per 30 minuti a -20° C. Successivamente il campione è stato centrifugato a 7000 rpm per 30 minuti a 4°C. Il surnatante è stato eliminato, e il DNA precipitato è stato sciolto in 100 μ l di acqua. Per eliminare le interferenze dovute alla presenza di RNA, sono stati aggiunti 3 μ l di RNasi (10 mg/ml), incubando per 30 minuti a 37°C.

Per verificare la riuscita dell'estrazione e la bontà del DNA da analizzare, sono stati caricati 10 μ l del campione su un gel d'agarosio allo 0.7% (p/v) colorato con Bromuro di Etidio. Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato visualizzato ai raggi UV ed il campione è stato quantificato mediante confronto con lo standard λ Hind III, grazie al programma Quantity One Gel Doc 2000 (Bio Rad).

2.10. Sistemi di espressione

In questo studio sono stati utilizzati quattro differenti sistemi per esprimere i geni di *pina* e *pinb* (Tabella 1). Sono stati utilizzati due vettori: pET100/D-TOPO (pET100) and pGEX-4T-3 (pGEX).

Nel vettore pET100, i geni bersaglio sono situati in un plasmide di espressione a medio numero di copie, a valle del promotore della RNA Polimerasi del fago T7, codificata *in trans* dal cromosoma dell'ospite. L'espressione della RNA polimerasi del fago T7 è indotta dall'aggiunta di isopropil β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) al mezzo di coltura batterico e culmina con la trascrizione e traduzione del gene di interesse che porta al suo ammino-terminale un tag di sei istidine (6xHys). La presenza di questo tag permette una facile purificazione della proteina su una specifica resina al nichel (Champion pET directional TOPO expression kits instruction manual, Invitrogen).

Il vettore pGEX permette un'alta espressione, inducibile da IPTG, dei geni fusi con la Glutazione S-transferasi (GST). Le proteine di fusione presentano la GST all'ammino-terminale e la proteina di interesse al carbossi-terminale (GST gene fusion system handbook, Amersham Biosciences). La proteina fusa alla GST può essere purificata per cromatografia d'affinità utilizzando glutazione immobilizzato. Inoltre l'alta solubilità della GST aumenta anche la solubilità della proteina target, favorendone l'accumulo all'interno del citoplasma della cellula batterica (<http://www.emb.de/Externalinfo/protein-unit/draft-frames/flowchart>).

Il vettore pET100 è stato prima introdotto nelle cellule TOP10 (per l'analisi del plasmide e la propagazione) e poi negli ospiti BL21 Star (BL21*) e BL21pLysS (pLysS). Le BL21* sono state scelte perchè aumentano la resa proteica in un sistema di espressione basato sul promotore del fago T7. Esse infatti portano un gene (*rne 131*) che codifica per una RNasi E troncata, che non è capace in questo modo di degradare l'mRNA: una più alta resa proteica corrisponde ad un mRNA più stabile. Il ceppo pLysS è stato invece scelto dato che offre la possibilità di esprimere geni tossici che potrebbero risultare in un'azione lievemente inibente nei confronti

della crescita batterica. Esse contengono il plasmide pLysS, che produce il lisozima del fago T7 che si lega all'RNA polimerasi del fago T7 ed inibisce la trascrizione. Questo porta ad una ridotta espressione basale dei geni eterologhi guidati dal promotore T7 (Champion pET directional TOPO expression kits instruction manual, Invitrogen).

Il vettore pGEX è stato invece utilizzato per trasformare cellule competenti di *E. coli* DH5 α (Invitrogen), gli ospiti più comunemente utilizzati per clonaggi di routine, e il ceppo ORIGAMITM B, che promuove la formazione di ponti disolfuro e l'incremento della solubilità e dell'attività della proteina di interesse.

2.11. Clonaggio nel vettore pET100 dei geni *pina* e *pinb* (Hys-PINA, Hys-PINB)

I primer per le Hys-PIN utilizzati per l'amplificazione dei geni di *pina* e *pinb* sono illustrati nella Tabella 2. I primer forward sono stati disegnati in modo da contenere una regione di quattro basi (CACC) complementare alla regione overhang (GTCC) del plasmide pET100. I primer reverse sono stati disegnati in modo da contenere il codone di stop (TTA per *pina* e CTA per *pinb*). La reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 25 μ l contenenti: 1 μ l di templat (corrispondente a 25 ng di DNA per *pina* e 50 ng per *pinb*), 1X Pfu-DNA polimerasi buffer, 0.2 μ M di ogni primer, 0.2 mM di dNTP e 1.25 U di Pfu-DNA polimerasi (tutto della Promega). Il profilo termico comprende un primo step di denaturazione a 95°C per 4 minuti, un secondo step di 30 cicli, ognuno di 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C ed 1 min a 72°C; uno step finale a 72°C per 10 minuti. I prodotti risultanti dall'amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% colorato con Bromuro d'Etidio. I prodotti di PCR (358 bp per *pina* e 364 bp per *pinb*) sono stati purificati da gel di agarosio utilizzando il *Gfx PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences).

2.12. Clonaggio nel vettore pGEX dei geni *pina* e *pinb* (GST-PINA, GST-PINB)

I primer per le GST-PIN utilizzati per l'amplificazione dei geni di *pina* e *pinb* sono riportati nella Tabella 2. I primer forward sono stati disegnati in modo da contenere nell'ordine: il sito di restrizione per EcoR1 (GAATTC) preceduto da due basi ancora (CG), una base (C) per mantenere la cornice di lettura esatta, una regione linker codificante per 4 glicine ed 1 prolina (GGTGGTGGTGGTCCG), per separare meglio la GST e la puoindolina e quindi favorire il loro folding corretto in maniera indipendente. I primer reverse sono stati disegnati in modo da contenere nell'ordine: il sito di restrizione di Xho1 (CTCGAG) preceduto da tre basi ancora (CCG) ed un codone di stop (ATC) solo per *pina* (dato che non è già contenuto nella sequenza). La reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 25 μ l contenenti: 1 μ l di templat (corrispondente a 25 ng di DNA per *pina* e 50 ng per *pinb*), 1X Pfu-DNA polimerasi buffer, 0.2 μ M di ogni primer, 0.2 mM di dNTP e 1.25 U di Pfu-DNA polimerasi (tutto della Promega). Il profilo termico comprende un primo step di denaturazione a 95°C per 4 minuti, un secondo step di 30 cicli, ognuno di 30 secondi a 95°C, 30 secondi alla T di annealing (59°C per *pina* e 54.5°C per *pinb*) ed 1 min a 72°C; uno step finale a 72°C per 4 minuti. I prodotti risultanti dall'amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% colorato con Bromuro d'Etidio. I prodotti di PCR (388 bp per *pina* e 393 bp per *pinb*) sono stati purificati da

gel di agarosio utilizzando il *Gfx PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences).

2.13. Purificazione di frammenti di DNA da gel di agarosio

I prodotti di PCR sono stati purificati da gel di agarosio utilizzando il *Gfx PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences). La porzione del gel contenente il frammento di DNA da purificare viene tagliata con un bisturi e trasferita in un tubo "eppendorf". Si aggiungono 10 µl di "capture buffer" ogni 10 mg di gel e si agita il campione vigorosamente. La miscela viene incubata a 60°C per circa 10-15 minuti in modo da permettere la completa solubilizzazione del gel e quindi trasferita in una mini-colonna. Il campione è quindi centrifugato a 12000 x g per 1 minuto, e la colonna è lavata con 500 µl di "wash buffer" centrifugando per 1 minuto a 12000 x g. Il DNA viene quindi eluito con 50 µl di acqua distillata o TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) e conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

2.14. Digestione di DNA con enzimi di restrizione

Il vettore di espressione pET100 è predigerito e non ha bisogno dello step di ligation. Le digestioni invece per il di DNA del vettore pGEX e dei prodotti di PCR, sono state effettuate in reazioni di 80 µl contenenti 4 µg circa di DNA plasmidico o prodotto di PCR, 3 unità di ogni enzima di restrizione ed un tampone che fornisce le migliori condizioni di funzionamento dell'enzima. La miscela di reazione è incubata a 37°C per 3 ore (DNA plasmidico) o 5 ore (prodotto di PCR). Gli enzimi di restrizione utilizzati sono prodotti di Biolabs, Promega, Gibco BRL ed Invitrogen.

Successivamente il digerito è stato purificato utilizzando il *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (Amersham Biosciences) e 2 µl sono stati caricati su un gel d'agarosio allo 0.7% (p/v) colorato con Bromuro di Etidio. Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato visualizzato ai raggi UV ed il campione è stato quantificato mediante confronto con lo standard λ Hind III, grazie al programma Quantity One Gel Doc 2000 (Bio Rad).

2.15. Reazioni di ligazione

La reazione di ligazione per il clonaggio nel vettore di espressione pET100 è stata condotta seguendo le indicazioni del produttore (Invitrogen). Il plasmide pET100 è predigerito con l'enzima di restrizione topoisomerasi I, che riconosce il sito di taglio 5'-CCCTT | TTCCC-3'. La miscela di ligazione è costituita da: 1 µl di plasmide pET100, 1 µl di Soluzione Salina 10X e 4 µl di inserto 1 ng/µl. La miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per 10 minuti e poi conservata a -20°C. La reazione ha portato ai prodotti di ligazione pET100:PINA e pET100:PINB. Le reazioni di ligazione per il clonaggio nel vettore di espressione pGEX sono state condotte in diversi rapporti tra la concentrazione molare dell'inserto e quella del vettore. In particolare in rapporto equimolare, di 3:1 e di 5:1. Le reazioni sono effettuate in una soluzione contenente l'opportuna concentrazione di frammento e vettore, 4 µl del tampone di diluizione 5X, 10 µl del tampone 2X per la T4 DNA ligasi, 0.1 U di T4

DNA ligasi (Roche) e acqua fino al volume finale di 20 μ l. La miscela di reazione è incubata per 10 minuti a 16°C e poi conservata a -20°C. La reazione ha portato ai prodotti di ligazione pGEX:PINA e pGEX:PINB.

2.16. Trasformazione con il vettore pET100:PIN

La trasformazione di cellule competenti con il pET100:PIN è stata condotta con il metodo dello shock termico. A 50 μ l di cellule competenti One Shot[®] TOP10 sono stati aggiunti 5 μ l della soluzione contenente il plasmide ricombinante (pET100:PIN). Il tutto è stato incubato per 30 minuti su ghiaccio. Successivamente il campione è stato posto per 30 secondi a 42°C ed immediatamente trasferito su ghiaccio. Alla miscela sono stati aggiunti 250 μ l di mezzo S.O.C. (2% Triptone, 0.5% Estratto di lievito, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucosio). Successivamente è stata effettuata un'incubazione in agitazione a 37°C per 1 ora. Un'aliquota (50, 100 e 150 μ l) delle cellule sottoposte a trasformazione è stata spatolata su piastre di LB-agar (Difco) contenenti 100 μ g/ml di ampicillina, successivamente incubate overnight a 37°C.

L'inserzione dei geni *pina* e *pinb* è stata verificata mediante una PCR effettuata stemperando direttamente nella miscela di reazione una colonia cresciuta su terreno selettivo (colony PCR). Sono stati utilizzati a tale scopo il primer forward specifico per il promotore del fago T7 (Invitrogen) ed il primer reverse di *pina* o *pinb*. La presenza dell'inserito e l'orientamento corretto è stato inoltre analizzato mediante sequenziamento. I cloni risultati positivi, esprimenti cioè PINA o PINB fusi al tag N-terminale 6xHys, eliminabile mediante l'uso dell'enterochinasi bovina (EKMax, Invitrogen), sono stati propagati incubandoli overnight a 37°C in LB brodo (Difco) supplementato con ampicillina (100 μ g/ml).

Le cellule competenti BL21* e pLysS sono state trasformate con i plasmidi pET100:PINA o pET100:PINB (20 ng di plasmide per le BL21* e 3 μ g per le pLysS). I trasformanti positivi sono stati analizzati mediante colony PCR. Le cellule BL21* trasformate sono state incubate in agitazione a 37°C in LB brodo arricchito con 1% glucosio e 200 μ g/ml carbenicillina. Le cellule pLysS trasformate sono state incubate in agitazione a 37°C in LB brodo arricchito con 1% glucosio, 100 μ g/ml di ampicillina e 34 μ g/ml cloramfenicolo.

2.17. Trasformazione con il vettore pGEX:PIN

Il prodotto ottenuto dalla reazione di ligazione (pGEX:PIN) è stato introdotto in cellule competenti di *E. coli* DH5 α mediante il metodo dello shock termico. A 20 μ l di cellule competenti DH5 α sono stati aggiunti 3 μ l della soluzione contenente il plasmide ricombinante (pET100:PIN). Il tutto è stato incubato per 30 minuti su ghiaccio. Successivamente il campione è stato posto per 30 secondi a 42°C ed immediatamente trasferito su ghiaccio. Alla miscela sono stati aggiunti 500 μ l di LB brodo (Difco) e successivamente è stata effettuata un'incubazione in agitazione (300 rpm) a 37°C per 1 ora. Un'aliquota (150 μ l) delle cellule sottoposte a trasformazione è stata spatolata su piastre di LB-agar (Difco) contenenti 100 μ g/ml di ampicillina, successivamente incubate overnight a 37°C.

L'inserzione dei geni *pina* e *pinb* è stata verificata mediante colony PCR. Sono stati utilizzati a tale scopo i primer specifici del vettore pGEX forniti dall'Amersham Biosciences. La presenza dell'inserito e l'orientamento corretto è stato inoltre analizzato mediante sequenziamento. I cloni risultati positivi, esprimenti cioè PINA o PINB fusi alla GST (GST-PINA o GST-PINB) ed aventi il sito di riconoscimento per la proteasi trombina fra la GST e la PIN, sono stati propagati incubandoli overnight in agitazione a 37°C in LB brodo (Difco) supplementato con ampicillina (100 µg/ml). Anche le cellule competenti ORIGAMI™ B sono state trasformate con i plasmidi pGEX:PINA e pGEX:PINB con il metodo dello shock termico. I cloni risultati positivi sono stati propagati incubandoli overnight in agitazione a 37°C in LB brodo (Difco) supplementato con ampicillina (100 µg/ml), kanamicina (15 µg/ml) e tetraciclina (12,5 µg/ml).

2.18. Estrazione del DNA plasmidico

L'estrazione plasmidica è stata realizzata tramite il QIAprep-spin Plasmid Kit, che si basa sul metodo della lisi alcalina e sull'adsorbimento del DNA su silice, in presenza di un'alta concentrazione di sali. Il pellet, ottenuto per centrifugazione a 13000 rpm per 5 min da 4 ml di brodocoltura, è stato risospeso in 250 µl di tampone P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.00, 10mM EDTA, 100µg/ml RNasi A), e poi addizionato di 250 µl di tampone di lisi P2 (200 mM NaOH, SDS 1%). Dopo incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 350 µl del tampone N3. Il campione è stato agitato rapidamente per 4-5 volte. La miscela ottenuta è stata incubata 5 min su ghiaccio e poi centrifugata a 13000 rpm per 10 min. Il surnatante è stato quindi trasferito in una colonna QIAprep-spin, che, dopo centrifugazione per 1 min a 13000 rpm, ha permesso l'adsorbimento del DNA alla resina. La colonna è stata lavata, in due fasi successive, con 500 µl di tampone PB e 750 µl di tampone PE, allontanando il liquido sempre mediante centrifugazione. Una seconda centrifugazione di 2 minuti è stata effettuata per eliminare eventuali residui di etanolo. Il DNA è stato quindi eluito aggiungendo 50 µl di acqua tridistillata DNasi e RNasi free e conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

2.19. Espressione delle Hys-PIN e delle GST-PIN

L'espressione delle Hys-PIN (per le BL21* o le pLysS) e delle GST-PIN (per le DH5α o le ORIGAMI™ B) è stata analizzata testando diversi parametri.

2.19.1. Preinoculo

Il preinoculo è stato effettuato ponendo a crescere 1 colonia prelevata da una trasformazione fresca in 50 ml di terreno LB, a cui sono stati aggiunti gli opportuni antibiotici. Il preinoculo è stato posto in agitazione (250 rpm) overnight a 37°C.

2.19.2. Inoculo ed induzione

Un dato volume di terreno LB, a cui sono stati aggiunti gli antibiotici alle opportune concentrazioni, sono stati inoculati con la coltura del preinoculo ottenuta secondo

quanto descritto nel paragrafo 2.18.1 in modo da ottenere una assorbanza iniziale (OD_{600}) pari a 0.05. L'inoculo è stato incubato a due diverse temperature (28-37°C). Dalla coltura sono stati prelevati, in tempi successivi, campioni di 1 ml di cui è stata misurata l'assorbanza. A valori di assorbanza ≥ 0.3 , la coltura è stata indotta aggiungendo isopropil β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) a diverse concentrazioni (0.1-0.5-1mM).

2.19.3. Cinetica di accumulo della proteina eterologa

Al fine di determinare la cinetica di accumulo delle proteine eterologhe espresse, dalla coltura batterica è stato prelevato 1 ml a 0, 1, 2, 3, 4, 16 ore dall'aggiunta di IPTG al mezzo di coltura. Di ciascuna aliquota è stata misurata l'assorbanza a 600 nm, quindi ognuna di esse è stata centrifugata a 12000 rpm per 5 minuti a 4°C e uguali quantità (stessi OD_{600}) di batteri non indotti e indotti è stata caricata su SDS-PAGE per l'analisi dell'espressione proteica.

2.20. Estrazione delle proteine solubili ed insolubili

Una volta stabilite le condizioni ottimali di espressione, i batteri sono stati indotti su scala maggiore (1 litro di coltura). Per ottenere le frazioni solubili ed insolubili la coltura indotta da 1 litro è stata prima centrifugata a 4000 rpm per 20 minuti a 4°C e successivamente il pellet è stato risospeso in 10 ml di tampone A (1% Triton X-100, 2 mM PMSF, 1x di cocktail di inibitori delle proteasi, in PBS). Il pellet disciolto è stato sottoposto a sonicazione (5 volte per 20 secondi con intervalli da 15 secondi). Il campione è stato poi centrifugato a 10000 rpm per 30 minuti a 4°C ottenendo il surnatante (proteine solubili) ed il pellet (proteine insolubili). Il pellet è stato risospeso in 10 ml di tampone A e uguali quantità di surnatante e pellet sono state caricate su SDS-PAGE per l'analisi della solubilità proteica.

2.21. Purificazione e analisi delle Hys-PIN

Le puroindoline ricombinanti sono state purificate mediante l'utilizzo di Ni-NTA spin column come da manuale (Sigma). L'eluizione è stata condotta con tamponi di eluizione denaturanti a pH 5.3 per entrambe le Hys-PIN e le frazioni sono state analizzate mediante SDS-PAGE. Le frazioni contenenti le Hys-PIN sono state raggruppate insieme e trattate per la procedura di refolding.

2.22. Purificazione e analisi delle GST-PIN

Le GST-PIN sono state purificate dalla frazione solubile in batch, utilizzando Glutathione immobilizzato (Glutathione Sepharose 4B), come descritto nel manuale (Amersham Biosciences).

La frazione solubile (prodotta da un litro di coltura batterica indotta) è stata prima incubata con la resina (500 μ l) per 2 ore a 4°C, poi è stata centrifugata a 4000 rpm per 5 minuti a 4°C ed incubata per 20-30-40 minuti a temperatura ambiente con il

tampone di eluizione (50mM Tris-HCl, 10mM glutatione ridotto, pH 8.0). Sono state analizzate diverse condizioni per ottimizzare la purificazione. In particolare, sono stati variati i tempi di incubazione con il tampone di eluizione (da un'ora ad overnight), il volume del tampone di eluizione (da 1 a 3 volumi) e la composizione. In particolare: è stata aumentata la concentrazione di glutatione (20-30mM), aumentata la forza ionica (100mM Tris-HCl), addizionato un detergente non-ionico (0.1% Triton X-100). Proteine non legate alla resina, legate ed eluite sono state analizzate mediante SDS-PAGE.

Per purificare le GST-PIN dalla frazione insolubile, sono stati condotti diversi esperimenti per stabilire le migliori condizioni di solubilizzazione proteica. Sono stati testati diversi tamponi di solubilizzazione a diversi tempi di incubazione per trovare le condizioni migliori che solubilizzassero selettivamente le GST-PIN. A questo scopo abbiamo analizzato le seguenti soluzioni denaturanti: Urea 8M, tampone GuHCl (8 M GuHCl, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 7.4), tampone Urea/Triton (Urea 6M, 1% Triton X-100). Essi sono stati utilizzati da soli o in varie combinazioni. Per 1 litro di coltura abbiamo utilizzato 3 ml di ogni tampone. Il pellet è stato prima lavato 7-8 volte con 10 ml di tampone (1% Triton X-100 in PBS), e poi incubato con la soluzione solubilizzante. Ogni ora 20 µl di ogni campione sono stati centrifugati a 10000 rpm per 45 minuti a 4°C e uguali quantità di surnatante (proteine solubilizzate e del pellet (proteine insolubili) sono state caricate su SDS-PAGE.

2.23.Procedura di refolding e taglio del tag

Sono stati condotti diversi test per mettere a punto le condizioni migliori per un corretto refolding. In un set di esperimenti il refolding è stato condotto dializzando overnight a 4°C le proteine solubilizzate contro tamponi consigliati dalla letteratura (tampone #11 e tampone 16#) (Armstrong et al., 1999). In un altro set di esperimenti le proteine solubilizzate sono state dializzate contro tamponi contenenti concentrazioni decrescenti di agente denaturante e crescenti di glicerolo. Le proteine dializzate sono state poi centrifugate a 10000rpm per 30 minuti a 4°C per permettere la precipitazione di proteine non correttamente ripiegate e analizzate mediante SDS-PAGE.

Le Hys-PIN sottoposte al refolding sono state trattate con l'enterochinasi per eliminare il tag, così come descritto nel foglietto illustrativo (Invitrogen) e la conferma dell'avvenuto taglio è stata analizzata mediante SDS-PAGE.

Le GST-PIN sottoposte al refolding sono state prima legate alla resina Glutathione Sepharose 4B e poi tagliate con la trombina (25U/litro di coltura batterica indotta) come descritto (Amersham handbook).

Dopo 3, 6, 16 ore di incubazione con la trombina, 20 µl di campione sono stati prelevati e centrifugati. Le proteine tagliate (surnatante) come pure le proteine ancora legate alla resina (pellet) sono state caricate su SDS-PAGE. La trombina e la GST libera sono state rimosse dal campione tagliato caricando il prodotto prima sulla resina HiTrap Benzimidine (Amersham Biosciences) e poi sulla Glutathione Sepharose 4B, recuperando da ogni colonna il campione non legato.

2.24.Produzione di anticorpi contro le PIN ricombinanti (rPIN)

Sono stati prodotti anticorpi policlonali rivolti contro le proteine ricombinanti (rPINA ed rPINB) in ratti (Rat α PINA, Rat α PINB). Gli animali hanno ricevuto 4 iniezioni intraperitoneali ad intervalli di 2 settimane. Alla prima iniezione gli animali sono stati immunizzati con 50 μ g di proteina ricombinante emulsionata all'adiuvante completo di Freund. Le successive iniezioni sono state condotte utilizzando l'adiuvante incompleto di Freund. Il siero è stato raccolto 2 settimane dopo l'ultima immunizzazione e analizzato con un test citofluorimetrico. Il test è stato condotto come descritto nel paragrafo 2.6. Come antigene sono stati utilizzati 1 μ g di rPIN o 1 μ g di PIN purificate mediante l'immunoassorbente. Gli antisieri da testare sono stati utilizzati diluendoli 1:100.

2.25.SDS-PAGE

Le analisi di SDS-PAGE sono state condotte utilizzando un apparecchio *Mini-Protean II Cell* (Bio-Rad) e gel di spessore pari a 0,75 mm. La composizione del gel di corsa è la seguente: percentuale di monomeri (T= % acrilammide + % bis-acrilammide) pari al 15% (o al 10%) e di cross-linking (C=100 x [grammi di bis-acrilammide/grammi di acrilammide + grammi di bis-acrilammide]) pari allo 0.5%, 0.36 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS. La composizione del gel spaziatore è la seguente: percentuale di monomeri pari al 3,75% e di cross-linking pari al 2,67%, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS. La polimerizzazione dell'acrilammide è stata indotta utilizzando N,N,N',N'-tetrametilendiammina (TEMED) alla concentrazione finale dello 0.2% ed ammonio persolfato (APS) allo 0.1 %. La corsa è stata condotta ad un voltaggio costante (200 Volts) a temperatura ambiente, in un tampone contenente 0.18 M glicina, 0.025 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS. I gel sono stati colorati con Blu Comassie e analizzati con il Gel Doc 2000 (Biorad). La concentrazione proteica è stata stimata utilizzando il software Quantity One (Biorad).

2.26.Western Blotting

Le analisi di Western Blotting sono state condotte al fine di determinare l'identità delle proteine eterologhe espresse.

Il gel SDS-PAGE, preparato secondo quanto riportato nel paragrafo precedente, è stato trasferito su una membrana PVDF (*Immuno-Blot PVDF membrane* 0.2 μ m, Bio-Rad) utilizzando il *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Il gel è stato trasferito sulla membrana in un tampone contenente 48 mM Tris, 39 mM Glicina, 1.3 mM SDS per 1 ora a 4°C, ad un voltaggio costante pari a 100 V. Terminato il trasferimento, la membrana PVDF è stata posta nella soluzione di bloccaggio (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 5% latte liofilizzato) per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente. La membrana è stata lavata con una soluzione di lavaggio costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20 ed incubata con un anticorpo primario per tutta la notte in agitazione lenta. La membrana è stata successivamente lavata con il tampone di lavaggio sopra indicato ed incubata con l'anticorpo secondario per 1 ora. Per il rilevamento è stato utilizzato il kit di chemiluminescenza della Santa Cruz Biotechnology.

Gli anticorpi utilizzati e le diluizioni sono indicate di seguito: mouse α XPress (Invitrogen) 1:2500, Rat α PIN 1:1000, Mouse α GST 1:1500, Rat α PIN 1:1000, peroxidase-conjugated Goat α Rat IgG (Roche Molecular Biochemicals) 1:20000,

peroxidase-conjugated Goat α Mouse IgG (Roche Molecular Biochemicals) 1:2500. tutti gli anticorpi sono stati diluiti in PBSTM (0.5% Tween 20, 5% latte in polvere in PBS).

2.27. Test di attività antimicrobica

Il ceppo batterico da analizzare è stato inoculato in Bacto Peptone Water al 2%, fino al raggiungimento della fase esponenziale. La concentrazione cellulare è stata calcolata considerando 3.8×10^8 CFU/ml = 1 U, A_{600} . La sospensione cellulare è stata diluita in Bacto Peptone Water al 2%, ottenendo una concentrazione pari a 2×10^6 CFU/ml. 100 μ l di tale inoculo sono stati posti in una piastra di polistirene a 96 pozzetti. Una miscela di puroindoline a e b a diverse concentrazioni, è stata aggiunta in ogni pozzetto. Il saggio è stato condotto incubando i campioni di *S aureus*, *E coli* e *S. epidermidis* per 16 ore a 37°C; per gli altri ceppi batterici in esame il saggio è stato condotto per 36 ore a 30°C. Cambiamenti nella torbidità del mezzo di crescita dovuti alla attività delle proteine, sono stati rilevati effettuando una lettura spettrofotometrica a 540 nm. La percentuale di inibizione delle puroindoline è stata calcolata usando la seguente equazione: % inibizione = [(OD popolazione controllo - OD popolazione trattata)/OD popolazione controllo]x100.

Il controllo negativo è stato effettuato utilizzando del tampone fostato (PBS), mentre il controllo positivo è stato eseguito aggiungendo l'antibiotico appropriato.

E' stata valutata la minima concentrazione inibente (MIC) di PIN necessaria a inibire totalmente la crescita dei ceppi in esame.

Per lo *Staphylococcus epidermidis* invece è stato ottenuto il valore della minima concentrazione inibente di PIN che inibisce la crescita del 90% dei batteri testati (MIC₉₀).

2.28. Conta in piastra

L'attività antibatterica delle rPIN è stata quantificata eseguendo anche dei "killing test" incubando 2×10^7 batteri risospesi in PBS, in presenza o meno di rPINA (125 μ g/ml) o rPINB (40 μ g/ml). Il controllo positivo è stato condotto aggiungendo l'appropriato antibiotico, mentre il controllo negativo aggiungendo acqua. I campioni diluiti serialmente sono stati piastrati su triptone soia agar (Oxoid, Basingstoke Hampshire, UK) in seguito a incubazioni di 15 minuti, 3, 6, 24 ore (Herigstad et al., 2001).

2.29. Analisi della vitalità batterica mediante microscopia a fluorescenza

L'attività antimicrobica delle PIN e delle rPIN è stata testata con la microscopia a fluorescenza su ceppi di *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus epidermidis*. Lo *S. epidermidis* è stato isolato da una ferita infetta e la specie è stata confermata dalla PCR specie-specifica così come descritto in letteratura (Martineau et al.1996). La percentuale di vitalità delle popolazioni batteriche è stata stimata utilizzando il Live/Dead[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes). Il kit consiste nella doppia marcatura delle cellule batteriche con SYTO9 e Ioduro di Propidio. Entrambi i coloranti si legano agli acidi nucleici. Il SYTO9 è permeabile alla

membrana cellulare, e quindi colora le cellule vive; lo Ioduro di Propidio invece non è permeabile e colora gli acidi nucleici solo se la membrana è danneggiata.

In breve, 50 μ l di PBS contenenti 2×10^7 batteri/ml sono stati incubati con 5 μ l di PIN all'opportuna concentrazione (Mauriello et al. 2005). Batteri vivi e morti sono stati contati utilizzando un microscopio a fluorescenza Leica DM RA/RXA con una lampada UV e un obiettivo 100X.

L'attività antibatterica delle rPIN è stata condotta utilizzando due diverse marcature. In particolare 2×10^7 batteri/ml risospesi in PBS sono stati trattati con la concentrazione appropriata di PINA e rPINB (1-40 μ g/ml) per 1 ora. Il controllo negativo è stato effettuato utilizzando del tampone fostato (PBS), mentre il controllo positivo è stato eseguito aggiungendo l'antibiotico appropriato. Le cellule sono state poi marcate con carbosifluoresceina (CFDA) e DAPI (Sigma, St. Louis Missouri, USA) rispettivamente come già descritto in precedenza (Morono et al., 2004). Il CFDA è un colorante vitale, che rilascia fluorescenza solo in cellule vive in cui è ancora presente l'attività esterasica capace di metabolizzare il composto. Il DAPI invece è un marcatore che si lega agli acidi nucleici della cellula, indifferentemente se essa sia viva o morta. Le cellule marcate sono state analizzate in seguito ad eccitazione a 450-490nm (per il CFDA) o 340-380 nm (per il DAPI). Sono state scattate le fotomicrografie con una fotocamera Leica DC 300F. Il tempo di esposizione di 0.2 secondi è stato utilizzato per tutti i campioni.

2.30. Analisi della vitalità batterica mediante citofluorimetria

La vitalità dello *S. epidermidis* dopo il trattamento con le rPIN è stata dimostrata anche mediante analisi citofluorimetrica. 2×10^7 batteri/ml sono stati lavati con acqua sterile, incubati con rPINA o rPINB per 2 ore e poi marcati con 30 nm di SYTO9 e 15 μ M di Ioduro di Propidio (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Dopo 15 minuti di incubazione al buio, i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro. La curva standard è stata costruita come suggerito dal produttore (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

2.31. Saggio di attività emolitica delle rPIN

Le puroindoline ricombinanti sono state analizzate anche per la loro attività emolitica su eritrociti di ratto come descritto in letteratura (Jing et al., 2003). Gli eritrociti sono stati isolati dal sangue (Shipkova et al., 2004) lavati 3 volte con PBS, e aliquote contenenti 10^7 cellule/ml sono state incubate con rPINA (10-150 μ g/ml) o rPINB (2-50 μ g/ml) per 30 minuti a 37°C in agitazione. I campioni sono stati poi centrifugati ed è stata misurata l'assorbanza del surnatante a 540 nm. Nessuna emolisi e l'emolisi totale sono state ottenute trattando gli eritrociti rispettivamente con PBS e con 1% Triton X-100.

2.32. Saggio di induzione di accumulo di nitriti su linee cellulari di macrofagi trattati con le rPIN

La linea cellulare J774 è stata coltivata in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium) supplementato con il 10% di

siero fetale bovino (FCS) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 100 IU/ml di penicillina e 100 IU/ml di streptomina (Cardile et al., 2004).

Una volta cresciute sono state poste in una piastra a 96 pozzetti (10^5 cellule/pozzetto). Le cellule sono state poi incubate (37°C , 5% CO_2) per 3 ore in modo da farle aderire al pozzetto e trattate successivamente con rPINA (10-150 $\mu\text{g/ml}$) o rPINB (2-50 $\mu\text{g/ml}$) per 24, 48 e 72 ore. Il controllo positivo è stato condotto utilizzando 1 $\mu\text{g/ml}$ di LPS al posto delle rPIN. L'accumulo di nitriti (NO_2^- , $\text{nmol}/10^6$ cellule) nel mezzo di coltura è stato determinato dalla reazione di Griess (Cardile et al., 2004).

La vitalità cellulare è stata analizzata mediante un test colorimetrico che permette di stimare il numero delle cellule aventi ancora attività mitocondriale, e quindi la vitalità delle cellule (test MTT). Il test MTT è basato su un indicatore metabolico, il sale solubile di tetrazolo che, nelle cellule vitali, è ridotto nel mitocondrio ad opera di enzimi deidrogenasi attivi, a formare un cristallo insolubile in acqua di color viola. I cristalli solubilizzati sono quantificati con metodo colorimetrico alla lunghezza d'onda di 570 nm (assorbanza del colorante ridotto) con correzione di background a 690 nm (D'acquisto et al., 2001).

2.33. Esperimenti di infezione *in vitro* con *S. epidermidis* e analisi della vitalità dei batteri intracellulari dopo il trattamento con le rPIN

Le cellule della linea J774 sono state distribuite in una piastra da 24 pozzetti (10^5 cellule/pozzetto) ed incubate overnight (37°C , 5% CO_2) in DMEM addizionato con 5% FCS, penicillina (100 IU/ml) e streptomina (100 IU/ml). I pozzetti sono poi stati lavati con DMEM per rimuovere gli antibiotici e le cellule che non hanno aderito. Sono stati aggiunti per ogni pozzetto 500 μl di DMEM addizionato con il 5% di FCS e le cellule sono state poi infettate con *S. epidermidis* (10^4 batteri). La piastra è stata poi centrifugata (750 g per 5 minuti) in modo da facilitare il contatto delle cellule con i batteri e poi incubate per 30 minuti a 37°C con il 5% di CO_2 . I batteri extracellulari sono stati trattati (e quindi uccisi) con la gentamicina (50 $\mu\text{g/pozzetto}$) per 1 ora a 37°C con il 5% di CO_2 . I macrofagi sono stati lavati con 500 μl di DMEM addizionato con gentamicina (50 ng/pozzetto) ed incubati con rPINA o rPINB (1-3 $\mu\text{g/pozzetto}$). In seguito ad incubazione (3-24 ore), le cellule sono state lisate per far fuoriuscire i batteri intracellulari con 50 μl di 0.50% Tween 20. Sono state effettuate delle diluizioni seriali che sono state poi utilizzate per la conta in piastra. I risultati rappresentano la media di 3 repliche. I batteri extracellulari (cresciuti senza le cellule della linea J774) trattati e non trattati con le rPIN sono stati utilizzati come controllo.

3. RISULTATI

3.1. Immunolocalizzazione di PINA e PINB nella cariosside

Esperimenti preliminari di immunomarcatura sono stati condotti per stabilire che i nostri anticorpi riconoscessero, fra tutte le proteine della side, solo le puroindoline e che ogni anticorpo fosse specifico per il polipeptide corrispondente. A tale scopo anticorpi α PINA sono stati utilizzati per colorare sezioni di cultivar Sibilla PINA nulle, mentre anticorpi α PINB sono stati utilizzati per colorare sezioni di cultivar Canadian red PINB nulle. Come si può vedere dalla Figura 2B (gli anticorpi α PINA non cross reagiscono con nessun'altra proteina (inclusa PINB) della cariosside della cultivar Sibilla, confermando la loro ipotizzata specificità. Gli stessi risultati si sono ottenuti quando anticorpi α PINB sono stati utilizzati su sezioni di Canadian red. Una volta valutata l'alta specificità dei nostri antisieri, è stata studiata la localizzazione nello strato aleuronico e nell'endosperma amilifero su sezioni di cariossidi mature. In tutte le cultivar analizzate le puroindoline sono localizzate sulla superficie dei granuli d'amido (segnalato in figura con una punta di freccia), sulla superficie della membrana plasmatica (segnalato in figura con una freccia) e negli spazi intercellulari (segnalato in figura con un asterisco) sia delle cellule dello strato aleuronico che di quelle nell'endosperma (Figure 3 e 4). Nelle cultivar soft analizzate il segnale delle PIN appare più intenso nello strato aleuronico che nell'endosperma (Figura 3). Le due proteine sono entrambi abbondanti e sempre co-localizzate in questi compartimenti. Nello strato aleuronico PINA e PINB sono per lo più trovati associati ai granuli d'amido e alla membrana plasmatica, lungo la quale esse formano uno strato uniforme. Esse sono anche abbondantemente immunolocalizzate negli spazi intercellulari (Figura 3 A, B, C, D). Le puroindoline sono principalmente legate ai granuli d'amido e alla membrana plasmatica anche nell'endosperma amilifero, mentre sono trovate meno frequentemente nella matrice proteica (Figura 3 E, F). Gli esperimenti di immunofluorescenza sono stati condotti con anticorpi α PINA ed α PINB anche su cultivar che non esprimono una delle due puroindoline. Nella cultivar Sibilla (PINA nulla) è stato possibile identificare solamente il segnale rosso, dovuto alla presenza di PINB (Figura 4 A, B). La puroindolina b è stata ritrovata localizzata in concentrazioni maggiori principalmente nello strato aleuronico che nell'endosperma amilifero. In entrambi i compartimenti PINB si localizza sulla superficie dei granuli d'amido e sulla membrana cellulare. Nella cultivar Canadian red, a causa della mancanza di PINB, è stato possibile vedere solo il segnale verde, dovuto alla presenza di PINA (Figura 4 C, D). anche in questa cultivar, la sola puroindolina presente è maggiormente concentrata nelle cellule dell'aleurone, in associazione con i granuli d'amido e la membrana plasmatica.

3.2. Identificazione delle puroindoline nelle preparazioni industriali

Test citofluorimetrici sono stati condotti anche su alcuni prodotti da forno, per identificare la presenza delle PIN anche dopo cottura e conservazione. E' stato possibile con questa tecnica identificare entrambe le puroindoline in tutti i prodotti da forno analizzati. La concentrazione di proteine rilevata è stata variabile fra i prodotti,

probabilmente a causa della diversa tipologia di farina utilizzata per ogni prodotto. Tutti gli snack ed i biscotti testati, di solito prodotti con farina di frumento tenero soft, hanno mostrato un più alto contenuto di puroindoline (corrispondente ad una più alta mediana di fluorescenza, Figura 5 A) rispetto ai campioni di pane in cassetta, di solito prodotti utilizzando frumento tenero hard (Figura 5 B).

In particolare snack e biscotti hanno mostrato valori di mediana compresi fra 20 e 410, mentre i campioni di pane in cassetta hanno mostrato valori di mediana compresi tra 20 e 150. Come già immaginato, nessuna traccia di puroindoline è stata rilevata in campioni di pane di frumento duro.

3.3. Attività antibatterica delle puroindoline native

PINA e PINB sono state in grado di inibire la crescita di tutti i batteri analizzati. Le MIC per ogni batterio sono riportate in Tabella 3 i risultati indicano che PINA e PINB richiedono la stessa concentrazione per essere completamente inibenti. A concentrazioni più basse della MIC le due puroindoline hanno mostrato un diverso comportamento. Come si può vedere dalla Tabella 4 (attività inibente nei confronti di *E. coli*), ad 1/3 del valore della MIC PINA mostra una piccola attività antimicrobica (2%), mentre a 2/3 del valore della MIC questa attività è considerevolmente aumentata (84%). Invece, ad 1/3 del valore della MIC PINB già si comporta come un potente inibitore (82%), e la percentuale di inibizione non incrementa in maniera sostanziale aumentando la concentrazione della puroindolina (89% a 2/3 del valore della MIC).

Quando PINB viene aggiunta in piccole quantità (considerandola in tal modo come proteina subinibitoria) a PINA ad 1/3 del valore della MIC, si è notato un considerevole incremento in tossicità (dal 2% al 14% e 89% per 1 e 5 µg/ml di PINB aggiunti rispettivamente). Quando la stessa quantità di PINB è stata aggiunta a PINA a 2/3 del valore della MIC, si è notato solo un piccolo incremento nell'inibizione, ma non si è mai raggiunta l'inibizione completa (Tabella 4).

Aggiungendo quantità subinibitorie di PINA a PINB è stato osservato che se PINA è aggiunta a PINB ad 1/3 del valore della MIC, l'inibizione non mostra grossi cambiamenti; se PINA è aggiunta a PINB a 2/3 del valore della MIC, l'inibizione diventa totale già aggiungendone 1 µg/ml (Tabella 4).

L'attività antimicrobica delle PIN è stata anche confermata mediante il metodo di diffusione in agar. Alla più bassa concentrazione testata (1/3 del valore della MIC) è stata visibile solo un'inibizione parziale. Alla più alta concentrazione testata (MIC) l'attività delle PIN è stata comparabile a quella dell'antibiotico utilizzato come controllo positivo (Figura 6 A).

Le puroindoline sono anche state saggiate per la loro attività battericida, a concentrazioni variabili fra il valore della MIC e 10 volte la MIC. In Figura 6 B è stata indicata la *killing curve* di PINA su *E. coli*. La figura mostra che al valore della MIC PINA causa solo un debole decremento della popolazione batterica (Fig. 5B). Il numero di batteri viene ridotto a meno di 10 CFU/ml solo con una concentrazione 10X del valore della MIC e dopo 24 ore di incubazione. PINB da lo stesso profilo di PINA. Anche per gli altri batteri testati è necessaria una concentrazione di PIN pari a 10X la MIC per uccidere completamente i batteri.

3.4. Espressione di Hys-PINA ed Hys-PINB nelle cellule pLysS e BL21 *

Le puroindoline ricombinanti aventi la coda di 6xHys, denominate Hys-PINA ed Hys-PINB, sono state espresse come proteine di 18-kDa in due differenti ospiti: le cellule pLysS e BL21*. Dato che le puroindoline hanno una dimostrata attività antibatterica, le pLysS sono state scelte per la loro capacità di esprimere proteine tossiche. I nostri risultati hanno dimostrato che attività antimicrobica delle PIN non influenza la crescita batterica dell'ospite utilizzato (BL21* e pLysS). Esperimenti preliminari in 200 ml di inoculo hanno permesso di stabilire le migliori condizioni per l'espressione della proteina eterologa. E' risultato che per entrambe le Hys-PIN e entrambi gli ospiti la migliore induzione proteica si è avuta inducendo le colture con 1mM di IPTG per 2 ore a 37°C. In queste condizioni entrambe le cellule hanno espresso le Hys-PIN solo nella frazione insolubile. In particolare, per le pLysS abbiamo avuto il 75% di espressione delle Hys-PIN nella frazione insolubile mentre per le BL21* abbiamo avuto l'84% di espressione delle Hys-PIN nella frazione insolubile. L'induzione a 28°C ed overnight non ha aumentato la solubilità proteica. Visto che le pLysS regolano fortemente l'espressione della proteina eterologa, esse fanno esprimere molta meno proteina rispetto alle BL21* (circa 3 volte in meno; Figura 7 A, B). Le BL21* sono state perciò scelte per l'espressione su larga scala e la purificazione. Le Hys-PIN sono state purificate con successo grazie all'utilizzo di colonne "Ni-NTA spin" in condizioni denaturanti (Figura 7 C).

3.5. Espressione di GST-PINA e GST-PINB nelle cellule DH5α

Le puroindoline ricombinanti fuse alla GST, denominate GST-PINA e GST-PINB, sono state espresse come proteine di 38-kDa nel ceppo competente di *E. coli* DH5α. Le stesse condizioni utilizzate per le BL21* (1mM IPTG, 37°C, 2 ore) hanno portato ad un'ottima espressione proteica, comparabile a quella ottenuta nel ceppo BL21* (la concentrazione delle proteine nel campione indotto era circa 4 volte superiore rispetto al campione non indotto). In queste condizioni il 25% delle proteine di fusione erano presenti nella frazione solubile (Figura 8 A) e il 75% era espresso nei corpi di inclusione. Sono state condotte delle prove per aumentare la solubilità proteica variando la temperatura ed il tempo di induzione. A 28°C e con 3 ore di induzione, il 55% della proteina ricombinante si è espressa nella frazione solubile (Figura 8 B). Tempi di induzione minori o maggiori (2, 4, 5 e 16 ore) come pure minori temperature (20-25°C) non hanno contribuito all'incremento in percentuale delle proteine ricombinanti nella frazione solubile.

Le proteine solubili sono state purificate mediante l'uso della Glutathione Sepharose 4B. Come mostrato nella Figura 9, le proteine fuse alla GST sono state legate efficientemente alla resina. Nella fase di eluizione, sfortunatamente si è riuscita a purificare solo una scarsa quantità di proteina e sempre associata ad altre proteine solubili.

Per solubilizzare le proteine insolubili sono stati utilizzati 3 diversi tamponi (incubati overnight a 4°C): Urea 8M, GuHCl ed Urea/Triton. I risultati per tutti i tamponi sono mostrati in Figura 10. Il tampone Urea/Triton solubilizza parzialmente tutte le proteine dei corpi di inclusione (incluse le GST-PIN), e incubazioni a tempi più lunghi (24 ore) non aiutano ad aumentare la solubilizzazione (Figura 10 A). Il tampone Urea 8M è stato capace invece di solubilizzare quasi tutte le proteine insolubili e solo un quantitativo esiguo (6%) delle GST-PIN. Nella frazione insolubile in tal modo è rimasto

il 94% delle GST-PIN insieme ad una proteina di approssimativamente 40-kDa (Figura 10 B). Il tampone GuHCl solubilizza completamente tutte le proteine insolubili, eccetto quella a 40-kDa, la stessa insolubile in Urea 8M. che è stata ritrovata solo parzialmente nel surnatante (Figura 10 B).

Sulla base di questi risultati sono stati combinati i tamponi Urea 8M e GuHCl. Il campione è stato prima incubato overnight con Urea 8M. Dopo centrifugazione, il pellet (contenente quasi tutte le GST-PIN) è stato risospeso in tampone GuHCl ed incubato overnight. Come si può notare dalla Figura 10 B, con questo protocollo è stato possibile recuperare per solubilizzazione l'85% delle GST-PIN dai corpi di inclusione e allo stesso tempo sbarazzarsi di tutte le altre proteine presenti nei corpi di inclusione.

3.6. Identità e purezza delle proteine ricombinanti purificate

Le Hys-PIN e le GST-PIN sono state analizzate mediante Western Immunoblotting. Il saggio, condotto utilizzando anticorpi rivolti contro il tag come pure quelli rivolti contro le puroindoline, ha permesso di valutare l'identità delle proteine ricombinanti. Entrambi gli anticorpi (α tag ed α puroindoline) sono stati in grado di riconoscere specificamente le proteine ricombinanti, non dando alcuna reazione nei confronti di altre proteine del lisato batterico (Figura 11 A, B, C). Inoltre gli anticorpi rivolti contro le PIN identificano le puroindoline native e ricombinanti allo stesso modo (Figura 11 C).

3.7. Refolding delle puroindoline ricombinanti e taglio del tag

La procedura di refolding sia delle Hys-PIN che delle GST-PIN è stata eseguita dializzando le proteine solubilizzate contro tamponi contenenti concentrazioni decrescenti di agente denaturante e concentrazioni crescenti di glicerolo: 4 M GuHCl, 4 mM DTT in PBS; 2 M GuHCl, 3 mM DTT, 5% Glicerolo in PBS; 1 M GuHCl, 1 mM DTT, 10% Glicerolo in PBS; 20% Glicerolo in PBS.

Ogni dialisi è stata condotta per 24 ore a 4°C. le due proteine di fusione, comunque, si sono comportate diversamente quando trattate con la procedura di refolding. Mentre le GST-PIN hanno mostrato una buona percentuale di proteine refoldate (85%, Figura 12 A), le Hys-PIN sono risultate meno inclini a refoldare bene, dando solo un 33% di proteine correttamente refoldate (Figura 13).

Le Hys-PIN e le GST-PIN risultate da una corretta procedura di refolding sono state successivamente trattate per il taglio del tag. Il taglio della coda 6xHys da parte dell'enterochinasi non ha dato buoni risultati anche quando si sono utilizzate 4 unità di enzima (Figura 13). Il taglio della GST è stato invece condotto con successo e sono state ottenute quantità considerevoli di PIN libere dalla GST, come si può notare sia dall'SDS-PAGE (Figura 12 A) che dal Western Immunoblotting (Figura 12 B, C). Come dimostrano chiaramente i risultati, la trombina taglia efficientemente quasi tutte le GST-PIN.

Sono stati ottenuti circa 1.5 mg di PIN libere dal tag GST da un litro di coltura indotta. Dato che le Hys-PIN hanno dato uno scarso risultato nel refolding e che il taglio del tag è stato impossibile da effettuare nelle condizioni testate, gli studi sull'attività antimicrobica delle puroindoline ricombinanti sono state condotte utilizzando le rPIN ottenute dal sistema di espressione pGEX/DH5 α .

3.8. Le rPIN inducono in ratto la produzione di anticorpi in grado di riconoscere le puroindoline native

Gli anticorpi prodotti in ratto contro le puroindoline ricombinanti sono stati testati mediante citofluorimetria utilizzando come antigene sia le puroindoline native che quelle ottenute per via ricombinante. Come si può notare dai risultati, gli anticorpi Rata α PIN hanno riconosciuto sia le puroindoline native che quelle ricombinanti, mostrando la stessa intensità di fluorescenza (stessa mediana, Figura 14 A). Esperimenti uguali sono stati condotti utilizzando gli anticorpi rivolti contro le puroindoline native (Rata α PINA e Rata α PINB). Anche in questo caso non si sono osservate differenze quando le puroindoline native o ricombinanti sono state utilizzate come antigeni (Figura 14 B). I risultati sono stati anche supportati dal Western Immunoblotting.

3.9. Attività antibatterica delle rPIN

Le rPIN sono state esaminate per la loro capacità di inibire la crescita batterica come pure per la loro capacità battericida: sono state calcolate rispettivamente la minima concentrazione inibente (MIC) e la minima concentrazione battericida (MBC). I saggi sono stati condotti come quelli effettuati sulle puroindoline native ed i risultati delle rPIN sono risultati comparabili a quelli delle PIN native. rPINA ed rPINB si comportano come le puroindoline native avendo mostrato la stessa MIC (30 μ g/ml) sia su *Escherichia coli* che su *Staphylococcus aureus* (Tabella 6). Le rPIN hanno mostrato lo stesso comportamento delle native anche quando sono state impiegate in *killing assays*, richiedendo la stessa concentrazione (10x della MIC) per una completa uccisione dei batteri. Allo scopo di investigare il meccanismo d'azione delle puroindoline, esse sono state testate su *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* utilizzando il kit *BacLight*. Immediatamente dopo il contatto (tempo zero) fra *E. coli* e le proteine (1.25 μ g per entrambe le rPIN), sono stati osservati solo debris cellulari (Figura 15 B). rPINB ha funzionato anche a concentrazioni minori, dando il 70% di cellule morte utilizzandolo 10 volte diluito (0.125 μ g) (Figura 15 C), mentre rPINA non ha avuto un'attività rilevante a quella concentrazione. È stato necessario l'utilizzo di maggiori concentrazioni di puroindoline per uccidere cellule di *S. epidermidis*: con 5 μ g di PINB è stato possibile ottenere solo il 56% di cellule morte (Figura 15 E).

3.10. Espressione di GST-PINA e GST-PINB nel ceppo ORIGAMI™ B e purificazione di ORIA e ORIB

Data la difficoltà nella procedura di refolding delle puroindoline ricombinanti, è stato tentato un altro approccio basato sull'utilizzo di un diverso ospite in cui esprimere le proteine eterologhe. In particolare il vettore pGEX:PIN è stato utilizzato per trasformare il ceppo ORIGAMI™ B, adatto all'espressione di proteine ricche in cisteina favorendo la corretta formazione dei ponti disolfuro nel citoplasma.

Entrambe le proteine sono state espresse come proteine di 38-kDa e sono state denominate GST-ORIA e GST-ORIB. Le colture sono state indotte con 1 mM di IPTG

a 28°C per 3 ore. In queste condizioni è stato possibile ottenere il 68% delle proteine di fusione nella frazione solubile (Figura 16).

GST-ORIA e GST-ORIB sono state purificate mediante cromatografia d'affinità mediante la resina Glutathione Sepharose 4B. Questa volta, la purificazione ha permesso di avere una resa di 2.6 mg di proteina ricombinante per litro di coltura indotta. Molto probabilmente la riuscita della messa a punto del sistema di purificazione è stato più semplice grazie alla capacità del ceppo ospite di esprimere in conformazione corretta e funzionalmente la proteina eterologa.

3.11.Taglio della GST e caratterizzazione di ORIA ed ORIB

Le proteine fuse alla GST (2.6 mg) sono state tagliate utilizzando due successive incubazioni overnight con 19 U e 13 U dell'enzima trombina, rispettivamente. La trombina e la GST libera sono state rimosse dal campione tagliato caricando il prodotto prima sulla resina HiTrap Benzimidine e poi sulla Glutathione Sepharose 4B. La resa delle puroindoline ricombinanti (ORIA ed ORIB) è stata di 1.8 e 0.65 mg per litro di coltura indotta, rispettivamente.

3.12.Proprietà antimicrobiche ed emolitiche di ORIA ed ORIB

ORIA ed ORIB sono stati testati per la loro capacità di inibire la crescita di *S. epidermidis* e di lisare eritrociti di ratto. I saggi di inibizione della crescita batterica hanno dimostrato che a 30 µg/ml, ORIA ed ORIB testati individualmente inibiscono la crescita di *S. epidermidis* del 90%.

La conta in piastra ha dimostrato che ORIA (a 125 µg/ml) ed ORIB (a 40 µg/ml) riducono la crescita batterica di 4 log in 15 minuti. Quando l'incubazione è stata protratta per 24 ore, non è stata osservata alcuna crescita batterica.

Inoltre, fino a 150 µg/ml di ORIA o fino a 50 µg/ml di ORIB, le puroindoline ricombinanti non hanno mostrato attività emolitica.

3.13.Analisi dell'attività antimicrobica mediante microscopia a fluorescenza

ORIA ed ORIB a concentrazioni comprese tra 1 µg/ml e 40 µg/ml sono state incubate per 1 ora con *S. epidermidis* (2×10^7 cellule/ml). A 40 µg/ml – la più alta concentrazione testata – ORIA ed ORIB hanno ucciso rispettivamente il 40% ed il 60% dei batteri. I risultati sono mostrati in Figura 17.

3.14.Analisi dell'attività antimicrobica mediante citofluorimetria

2×10^7 cellule/ml di *S. epidermidis*, sono state incubate per 2 ore con concentrazioni di ORIA ed ORIB comprese tra 1 µg/ml e 25 µg/ml. A 20 µg/ml – la concentrazione più alta compatibile con il saggio – ORIA ed ORIB hanno ucciso rispettivamente il 20% ed il 60% dei batteri. I risultati sono mostrati in Figura 18. A concentrazioni maggiori di 20 µg/ml di ORIA ed ORIB, la morfologia dei batteri non era distinta da quella dei debris.

3.15.Induzione di accumulo di nitriti da parte di ORIA ed ORIB in macrofagi in coltura

ORIA ed ORIB non inducono sintesi di ossido nitrico (NO) nella linea cellulare murina di monoliti-macrofagi, quando testate a 10-150 µg/ml (ORIA) o 2-50 µg/ml (ORIB) per 24-72 ore. I risultati sono mostrati in Tabella 7. Rispetto alla sintesi di NO, non è stata individuata nessuna differenza apprezzabile tra le cellule trattate e non con le proteine ricombinanti. Il test di vitalità (test MTT) ha stabilito che – alle più alte concentrazioni utilizzate nel saggio (150 µg/ml per ORIA e 50 µg/ml per ORIB) – i macrofagi rimangono vitali fino a 72 ore.

3.16.Infezione *in vitro* delle J774 con *S. epidermidis* e analisi della vitalità dei batteri intracellulari dopo il trattamento con ORIA ed ORIB

ORIA ed ORIB sono state capaci di penetrare all'interno delle cellule J774 ed uccidere gli stafilococchi intracellulari. Gli esperimenti hanno dimostrato che concentrazioni 10 volte maggiori di ORIA ed ORIB utilizzate per i batteri extracellulari sono in grado di ridurre la crescita batterica di 3 log in 3 ore. Quando l'incubazione è stata protratta fino a 24 ore, non è stata osservato nessun aumento nell'inibizione della crescita batterica (Figura 19).

4. DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi, è stata dimostrata per la prima volta la co-localizzazione di PINA e PINB nella cariosside matura di frumento tenero utilizzando anticorpi policlonali specifici per tali proteine. Questi risultati non sono in linea con precedenti lavori che hanno assunto che le due puroindoline vanno a localizzarsi in siti diversi (Dubreil et al., 1998); queste proteine sono invece entrambi abbondanti nell'endosperma amilifero e nello strato aleuronico, e sono altamente concentrante soprattutto in quest'ultimo. Si è sempre ipotizzato un ruolo importante delle puroindoline nella difesa della cariosside nei confronti dei patogeni (Dubreil et al., 1998; Krishnamurthy et al., 2001). La loro distribuzione nel seme sembra confermare tale ipotesi. E' stato dimostrato, infatti, che in tutte le cultivar analizzate (anche in quelle che non esprimono una delle puroindoline) PINA e PINB sono altamente concentrate nello strato più esterno della cariosside, l'aleurone, che è il primo sito di attacco dei patogeni (Garcia-Olmedo et al., 1998). Inoltre, le puroindoline sono anche abbondanti nell'endosperma, dove molti patogeni possono arrivare entrando nel seme attraverso lesioni nell'aleurone. D'altro canto sono state recentemente scoperte nuove proteine antifungine nell'endosperma del seme di mais (Serna et al., 2001).

E' stata dimostrata l'attività antimicrobica *in vitro* di PINA e PINB contro 6 differenti ceppi batterici: 2 patogeni umani e 4 patogeni vegetali. Il valore della MIC delle puroindoline è stata diversa a seconda del ceppo testato; PINA e PINB hanno bisogno della stessa concentrazione per essere completamente inibitorie (Tabella 3). La loro tossicità contro *E.coli* è stata osservata a concentrazioni anche inferiori alla MIC. Ad 1/3 del valore della MIC PINB è molto più attiva di PINA (82% e 2% rispettivamente) nell'inibire la crescita batterica. A 2/3 del valore della MIC le due proteine mostrano invece la stessa capacità inibitoria (89 e 84% rispettivamente). Inoltre, è stato visto che PINA e PINB non solo hanno la stessa distribuzione spaziale nella cariosside di frumento tenero, ma sono trovate sempre co-localizzate (Figura 3).

Questo risultato inaspettato ha portato a pensare ad una possibile cooperazione delle due proteine nella difesa della pianta. A riguardo Dubreil et al. (1998) hanno già dimostrato con successo la capacità delle PIN di cooperare con una potente proteina antifungina, l' α -PTH, aumentandone la tossicità. Non hanno però mai analizzato una possibile cooperazione fra PINA e PINB. I risultati ottenuti da questo lavoro hanno suggerito che le due puroindoline cooperano in qualche modo *in vitro* contro i patogeni, sebbene abbiano mostrato un comportamento differente quando testate singolarmente come proteine subinibitorie.

In particolare PINB, quando utilizzata come proteina subinibitoria, aumenta la tossicità di PINA adoperata a basse concentrazioni (1/3 del valore della MIC). Invece è risultata ininfluente quando aggiunta già ad alte concentrazioni di PINA (2/3 del valore della MIC), ma capace di abbassare lievemente la sua MIC (Tabelle 4, 5). Al contrario, PINA aggiunta come proteina subinibitoria ad 1/3 del valore della MIC di PINB non è risultata efficiente, mentre è fondamentale per ottenere una completa inibizione della crescita quando aggiunta a 2/3 del valore della MIC di PINB. E' stato osservato inoltre che PINA è in grado di abbassare il valore della MIC di PINB per tutti i batteri testati.

Riassumendo, sembra che mentre PINA richiede più alte concentrazioni per diventare un killer batterico, PINB richiede una concentrazione minore. A basse

concentrazioni PINA sembra non essere capace da sola di inibire la crescita batterica. La presenza di PINB in piccole quantità probabilmente induce per prima la morte dei batteri. Inoltre, sembra che una volta che è stato raggiunto il quantitativo minimo di PINA avente attività, l'aggiunta di PINB non influenzi sostanzialmente la tossicità di PINA. D'altro canto, la capacità inibitoria di PINB è indotta dalla presenza di PINA solo quando la prima è già ad alte concentrazioni. Si dovrebbero condurre ulteriori studi per chiarire il perché di queste differenze. Dai risultati ottenuti si può finora affermare che le due puroindoline possono avere meccanismo d'azione diverso ma in alcune condizioni sinergico. A tal proposito è stato riportato in letteratura che PINA è in grado di causare pori nella membrana lipidica (Charnet et al., 2003); PINB potrebbe invece avere un meccanismo d'azione diverso, a noi sconosciuto.

Le puroindoline possono essere delle proteine promettenti anche dal punto di vista alimentare. Data la loro naturalità e la loro funzione, potrebbero essere utilizzate come preservanti in campo alimentare (come già è possibile per la batteriocina nisina, Delves-Broughton et al., 1996). Al riguardo, è interessante notare che le PIN sono ancora identificabili nelle preparazioni alimentari dopo cottura e conservazione; si dovrebbero condurre ulteriori esperimenti per verificare che la loro attività sia conservata dopo tali processi.

Dato il crescente problema di resistenza agli antibiotici convenzionali (Hancock e Lehrer, 1998), le puroindoline sono state anche considerate come possibili agenti terapeutici. Per valutare questo utilizzo, sono stati condotti anche test di attività antimicrobica su diversi patogeni (anche antibiotico resistenti) e test di citotossicità. Tali esperimenti hanno richiesto una quantità di proteina maggiore di quella che è stata possibile produrre con la tecnica dell'immunoassorbente. Per questo motivo l'attenzione è stata focalizzata sull'espressione eterologa delle PIN.

I batteri sono largamente utilizzati per esprimere proteine eterologhe da utilizzare nella ricerca e come farmaci. *E. coli* è un sistema di espressione conveniente per la produzione e purificazione di proteine ricombinanti, grazie alla facilità d'utilizzo, il tempo di generazione elevato, il basso costo e la facile disponibilità. Comunque *E. coli* ha anche alcuni svantaggi come: la probabilità di successo nell'esprimere proteine eucaristiche è bassa, sono assenti molte modificazioni post-traduzionali, e il prodotto è spesso nella forma di corpi di inclusione (Baneyx, 1999). La letteratura esistente riguardo l'espressione di proteine in *E. coli* ha focalizzato sull'ottimizzazione delle condizioni per proteine individuali che differiscono nelle loro proprietà chimiche e fisiche. Le proteine si comportano come individui e rispondono poco alla generalizzazione. Per ottenere risultati ottimali nell'overespressione, devono essere studiati più costrutti per ogni proteina bersaglio. I tag di affinità sono largamente utilizzati per produrre proteine con un alto grado di purezza in un'unica procedura (Nilsson et al., 1997). Questi tag possono influenzare il comportamento delle proteine di fusione durante i diversi step di espressione, purificazione e utilizzo. Sono stati descritti in letteratura diversi tag, ognuno con diverse caratteristiche che influenzano la stabilità, la solubilità ed il livello di espressione delle proteine nei batteri (Stevens et al., 2001).

Proprio per questo motivo, sono state analizzate in questo lavoro gli effetti dei diversi vettori di espressione sull'espressione, la purificazione e le proprietà di solubilità delle puroindoline ricombinanti. Sono stati utilizzati due diversi vettori di espressione in cui clonare i geni delle PIN: uno esprime la proteina legata ad un tag 6xHys ed uno esprime la proteina di interesse fusa alla Glutathione-S-transferasi (GST), che è capace di incrementare la solubilità della proteina eterologa in *E. coli*. Nonostante

l'utilizzo di una proteina di fusione come la GST, non è stato possibile purificare in modo ottimale le proteine della frazione solubile. Solo le puroindoline ricombinanti fuse alla GST presenti nei corpi inclusi sono state purificate, refoldate e eliminate del tag efficientemente. Le rPIN e le PIN native hanno mostrato lo stesso livello di tossicità nei confronti di *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e gli anticorpi ottenuti contro le rPIN hanno riconosciuto ugualmente le PIN native. Tali risultati hanno suggerito che le rPIN sono foldate come in forma nativa e che hanno la stessa attività biologica contro i patogeni. Il loro meccanismo d'azione non è ancora chiaro, ma sicuramente agiscono danneggiando in qualche modo la membrana dei patogeni. Il danneggiamento della membrana è stato infatti dimostrato dalla capacità dello ioduro di propidio di penetrare nella cellula batterica in presenza di PINB (Figura 15). L'utilizzo delle puroindoline quali agenti terapeutici è diventato ancora più concreto e promettente visto i risultati conseguiti. L'unico limite è stato il protocollo di purificazione. Infatti la solubilizzazione e le procedure di refolding sono risultate troppo lunghe per la resa ottenuta. L'ottimizzazione del protocollo è stata ottenuta trasformando il ceppo di *E. coli* ORIGAMI™ B con il vettore di espressione delle GST-PIN. Il batterio ospite è ingegnerizzato appositamente per favorire la corretta formazione dei ponti disolfuro delle proteine ricombinanti nel citoplasma. Con questo nuovo sistema di espressione le puroindoline ricombinanti (ORIA ed ORIB) sono state purificate dalla frazione solubile in forma funzionale. Allo scopo di utilizzare le puroindoline su ceppi batterici multiresistenti responsabili delle infezioni cutanee, è stato visto che alla concentrazione di 30 µg/ml, entrambe le proteine, testate individualmente, hanno inibito del 90% la crescita di *S. epidermidis*. A più alte concentrazioni – ORIA a 125 µg/ml e ORIB a 40 µg/ml – le stesse proteine hanno ucciso la totalità dei batteri. ORIA ed ORIB sono state testate anche in combinazione ed è stato visto che esse si comportano come le proteine in forma nativa. Inoltre è stato dimostrato con test *in vitro* che ORIA ed ORIB non causano infiammazione o emolisi e sono capaci di uccidere i batteri intracellulari.

Questi risultati sono promettenti per l'utilizzo di queste proteine nel trattamento di infezioni cutanee da *S. epidermidis*. Inoltre è ben documentato che *S. epidermidis* si può internalizzare e sopravvivere in un ampio numero di cellule animali (Boelens et al., 2000). È stato visto che la capacità di *S. epidermidis* di risiedere all'interno della cellula permette la colonizzazione a lungo termine dell'ospite ed il mantenimento di uno stato infettivo cronico (Foster, 2005). Un'applicazione clinica di ORIA ed ORIB è stata dimostrata dalla loro capacità di uccidere stafilococchi intracellulari a concentrazioni superiori a quelle determinate per i batteri extracellulari. Numerosi studi (Hong et al., 2003; Mattei et al., 1998) hanno indicato che il bersaglio delle proteine ad azione antimicrobica (AMP) è la membrana batterica. I risultati degli esperimenti di citofluorimetria con i batteri rafforzano tale ipotesi. La carbossifluoresceina invece – il fluorocromo utilizzato su *S. epidermidis* negli esperimenti di microscopia a fluorescenza – è ritenuta all'interno della cellula solo se la membrana cellulare è intatta (Charnet et al., 2003; Jing et al., 2003). Il fatto che lo *S. epidermidis* marcato con CFDA perda fluorescenza dopo incubazione con ORIA o ORIB, sta ad indicare che le due proteine distruggono l'integrità della membrana batterica.

Fenomeni di resistenza nei confronti di proteine e peptidi antimicrobici sono molto improbabili, proprio grazie alla loro rapida azione e selettività verso le membrane. E' difficile immaginare un organismo che riorganizzi la composizione della propria membrana cellulare per resistere ad una molecola e ciò è dimostrato dal fatto che sono stati trovati ceppi di batteri dei generi *Morganella* e *Serratia* resistenti, che

presentano una minore composizione di acidi grassi nella membrana plasmatici, ma che per lo stesso motivo presentano una fitness molto ridotta (Zasloff, 2002). Inoltre, data la diffusa presenza di ceppi di stafilococco antibiotico resistenti (Campoccia et al., 2005; Dreno et al., 2001; Nishijima et al., 2000), indagare su come ORIA ed ORIB possano rimpiazzare i classici antibiotici nel controllo di *S. epidermidis* è un approccio sensato.

In conclusione, i risultati di questo lavoro suggeriscono che ORIA ed ORIB potrebbero essere utilizzati in preparazioni ad uso topico per curare le infezioni cutanee causate da stafilococchi, dopo ulteriori indagini sulle loro proprietà farmacologiche. Sono necessari studi *in vivo* per determinare la tossicità di queste proteine e proporre un loro uso topico, sia in procedure di profilassi o nel trattamento di infezioni da stafilococco.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. K., Lichtman A.H. , Prober J.S. (2000). Immunologia cellulare e molecolare; 1: 4-15.
- Armstrong, N., de Lencastre, A., Gouaux, E. (1999). A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Sci.* 8(7): 1475-1483
- Ashitani, J.J., H. Mukae, T. Hiratsuka, M. nakazato, K. Kumamoto, S. Matsukara, (2002). Elevated levels (alpha)-defensin in plasma and BAL fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. *Chest*; 121: 519-526.
- Ball, S.G., Van de Wal, M.H.B.J., Visser, R.G.F., (1998). Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends in Plant Science*, 3: 462-467.
- Baneyx F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 411–421
- Bechinger, B., (1997). Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membrane Biol.*; 156: 197-211.
- Benincasa, M., Skerlavaj, B., Gennaro, R., Pellegrini, A. and Zanetti M. 2003. In vitro and in vivo antimicrobial activity of two α -helical cathelicidin peptides and of their synthetic analogs. *Peptides* 242: 1723-1731.
- Bettge AD, Morris CF, Greenblatt GA (1995) Assessing genotypic softness in single wheat kernels using starch granule-associated friabilin as a biochemical marker. *Euphytica* 86: 65-72
- Bhattacharya, M., Erazo-Castrejòn, S.V., Doehlert, D.C., McMullen, M.S., (2002). Staling of bread as affected by waxy wheats flour blends. *Cereal Chemistry*, 79: 178-182.
- Blochet, J.E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay- Peyroula, E., Gautier, M.F., Joudrier, P., Pérolet, M. and Marion, D. (1993). Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cysteine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Lett.* 329: 336-340.
- Boelens, J.J., Dankert, J., Murk, J.L., Weening, J.J., Van der Poll, T., Dingemans, K.P., Koole, L., Laman, J.D., Zaat, S.A.J., (2000). Biomaterial-associated persistence of *Staphylococcus epidermidis* in pericatheter macrophages. *J. Infect. Dis.* 181: 1337-1349.
- Bohlmann, H. and Apel, K. (1991). Thionins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 227-240.
- Boman, H. G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine* 254: 197-215.
- Boman, H.G., (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*; 13: 61-92.
- Branlard, G., Amiour N., Igrejas G., gaborit T., Herbette S., Dardevet M., Marion D., (2003). Diversity of puroindolines as revealed by two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*; 3: 168-174.
- Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, De Samblanx GW, Osborn RW (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci* 16: 297-323
- Cai, G., Faleri, C., Del Casino, C., Hueros, G., Thompson, R.D. and Cresti, M. (2002). Subcellular localisation of BETL-1, -2 and -4 in *Zea mays* L. endosperm. *Sex Plant Reprod.* 15: 85-98.

- Campoccia, D., Montanaro, L., Baldassarri, L., An, Y.H., Arciola, C.R., (2005). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from implant orthopedic infections. *Int. J. Artif. Organs*. 28: 1186-1191.
- Cardile, V., Proietti, L., Panico, A., Lombardo, L., (2004). Nitric oxide production in fluoro-edenite treated mouse monocyte-macrophage cultures. *Oncol. Rep.* 12: 1209-1215.
- Charnet, P., Molle, G., Marion, D., Rousset, M. and Lullien-Pellerin, V. (2003). Puroindolines form ion channels in biological membranes. *Biophys J.* 84: 2416-2426.
- Collinge, D.B. and Slusarenko, A.J. (1987). Review: Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Molec. Biol.* 9: 389-410.
- D'acquisto, F., De Cristofaro, F., Maiuri, M.C., Tajana, G., Carnuccio, R. (2001). Protective role of nuclear factor kappaB against nitric oxide-induced apoptosis in J774 macrophages. *Cell Death Differ.* 8: 144-151.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. and Hugenholtz, J. (1996). Application of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193-202.
- Dick, J.W., Matsuo, R.R., (1988). Durum wheat and pasta products. In: Pomeranz, Y., (ed.): *Wheat: Chemistry and Technology*, vol. II. Am. Ass. Cereal Chem., St. Paul, pp. 507-547.
- Dixon, R.A. and Harrison, M.J. (1990). Activation, structure and organization of genes involved in microbial defence of plant. *Adv. Genet.* 28: 165-234.
- Dreno, B., Reynaud, A., Moyse, D., Habert, H., Richet, H., (2001). Erythromycin-resistance of cutaneous bacterial flora in acne. *Eur. J. Dermatol.* 11: 549-553.
- Dubreil, L., Gaborit, T., Bouchet, B., Galliant, D.J., Broekaert, W.F., Quillien, L. and Marion, D. (1998). Spatial and temporal distribution of the two major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTPe₁) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Sci.* 138: 121-135.
- Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A., Grishin, E.V., (2005). Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides.* 26: 2064-2073.
- Evers, T., Millart, S., (2002). Cereal grain structure and development: some implications for quality. *Journal of Cereal Science*, 36: 261-284.
- Ferrandon, D., Hethu C., Reichhart J.M., (2002). L'immunità innata. *Le Scienze*; 13: 4-9.
- Ferreiròs, C.M., Souto, M.J., Criado, M.T., Suárez, P. (1991). Phage typing and phage induction in carrier and invasive *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Journal of Hospital Infection.* 18: 293-299.
- Foster, T.J., (2005). Immune evasion by Staphilococci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 948-958.
- García-Olmedo, F., Molina, M., Josefa, M.A. and Rodríguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defence peptides. *Biopolymers* 47: 479-491.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Hernandez-Lucas, C., Ponz, F., Marana, C., Carmona, M.J., Lopez-Fando, J., Fernandez, J.A. and Carbonero, P. (1989). The thionins: a protein family that includes purothionins, viscotoxins and crambin. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 6: 31-60.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J.M., Lopez-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., Poza-Carrion, C., (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defense. *FEBS Lett.* 498, 219-222.

- Gautier, M.F., Aleman, M.E., Guirao, A., Marion, D. and Joudrier P. (1994). *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant molecular Biology* 25: 43-57.
- Giroux, M.J., Morris F.C., (1997). A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch surface friabilin. *Theor. Appl. Genet.*; 95: 857-864.
- Greenblatt G.A., Bettege A.D., Morris C.F., (1995). Relationship between endosperm texture and the occurrence friabilin and bound polar lipids on wheat starch. *Cereal Chem.*; 72: 172-176.
- Greenwell, P., Schofield J.D., (1998). A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal. Chem.*; 63: 379-380.
- Guerneve, C. L., M. Seigneuret and D. Marion, (1998). Interaction of the wheat endosperm lipid-binding protein puroindoline-a with phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 360: 179-186.
- Hancock, R. E. W. and Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Tibtech* 16: 82-88.
- Herigstad, B., M. Hamilton, and J. Heersink. (2001). How to optimize the drop plate methods for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Methods* 44: 121-129
- Hong, R.W., Shchepetov, M., Weiser, J.N., Axelsen, P.H., (2003). Transcriptional profile of the *Escherichia coli* response to the antimicrobial insect peptide cecropin A. *Antimicrob. Agents Ch.* 1, 1-6.
- Jing, W., Demcoe, A.R. and Vogel, H.J. (2003). Conformation of a bactericidal domain of puroindoline a: structure and mechanism of action of a 13-residue antimicrobial peptide. *J. Bacteriol.* 185: 4938-4947.
- Krishnamurthy, K. and Giroux, J. (2001). Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice enhances grain softness. *Nat. Biotechnol.* 19: 162-166.
- Krishnamurthy, K., Balconi, C., Sherwood, J.E. and Giroux, M.J. (2001). Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. *Mol. Plant Microbe In.* 14: 1255-1260.
- Lee, M.R., Swanson, B.G., Baik, B.K., (2001). Influence of amylose content on properties of wheat starch and bread-making quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry*, 78: 701-706.
- Lemaitre, B., (1999). *La drosophile: un modèle pour l'étude de la reponse immunitaire innée.* *Mèdecine/Science.* 15.
- Lillemo, M., Morris C.F., (2000). A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theor. Appl. Genet.*; 100: 1100-1107.
- Mack, D., Riedewald, J., Rohde, H., Magnus, T., Feucht, H.H., Elsner, H.A., Laufs, R., Rupp, M.E., (1999). Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect. Immun.* 67: 1004-1008.
- Marion, D., M. F. Gautier, P. Joudrier, M. Ptak, M. Pezolet, M. Forest, D. C. Clark and W. Broekaert, (1994). In processing of the wheat kernel proteins—molecular and functional aspects; 175-180.
- Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG (1996). Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol.* 34(12): 2888-93
- Mattei, C., Elmorjani, K., Molgò, J., Marion, D., Benoit, E., (1998). The wheat proteins puroindoline-a and α 1-purothionin induce nodal swelling in myelinated axons. *Neuro. Report.* 17: 3803-3807.

- Mauriello G, De Luca E, La Storia A, Villani F, Ercolini D (2005) Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology* 41: 464-469
- Morell, M.K., Rahman, S., Abrahams, S.L., Appels, R., (1995). The biochemistry and molecular biology of starch synthesis in cereals. *Aust. J. Plant Physiol.*, 22: 647-660.
- Morita, N., Maeda, T., Miyazaki, M., Yamamori, M., Miura, H., Ohtsuka, I., (2002). Dough and baking properties of high-amylose and waxy flours. *Cereal Chemistry*, 79: 491-495.
- Morono, Y., Takano, S., Miyanaga, K., Tanji, Y., Unno, H., Hori, K., (2004). Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate. *Biotechnol. Lett.* 26: 379-383.
- Morris, C.F., (2002). Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol. Biol.*; 48: 633-647.
- Nicolas, P., and A. Mor, (1995). Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu. Rev. Microbiol.*; 49: 277-304.
- Nilsson J., S. Stahl, J. Lundeberg, M. Uhlen, and P. A. Nygren (1997) Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* 11: 1-16
- Nishijima, S., Kurokawa, I., Katoh, N., Watanabe, K., (2000). The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. *J. Dermatol.* 27: 318-323.
- Oda S., Schofield J.D., (1997). Characterisation of friabilin polypeptides. *Journal of Cereal Science*; 26: 29-36.
- Orth, R.A., Shellenberger, J.A., (1988). Origin, production and utilization of wheat. *Wheat Chemistry and Technology*. Ed. Y. Pomeranz, American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, 1-14.
- Osborne, T.B., (1924). *The vegetable proteins*, 2th ed., Longmans, Green and Co., London.
- Park, C.B., H.S. Kim, and S.C. Kim, (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 244: 253-257.
- Rahman, S., Li, Z., Batey, I., Cochrane, M.P., Appels, R., Morell, M.K., (2000). Genetic alteration of starch functionality in wheat. *Journal of Cereal Science*, 31: 91-110.
- Rinaldi, A.C., M.L. Mangoni, A. Rufo, C. Luzi, D. Barra, H. Zhao, P.K. Kinnunen, A. Bozzi, A. Di Giulio, and M. Simmaco, (2002). Temporin L: antimicrobial, haemolytic and cytotoxic activities, and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles. *Biochem. J.*; 368: 91-100.
- Rupp, M.E., Fey, P.D., Heilmann, C., Götz, F. (2001). Characterization og the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesion in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *The journal of infectious disease.* 183: 1038-1042.
- Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., (2005). Advances genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115: 113-128.
- Serna, A., Maitz, M., O'Connell, T., Santandrea, G., Thevissen, K., Tienens, K., Hueros, G., Faleri, C., Cai, G., Lottspeich, F. and Thompson, R. (2001). Maize and endosperm secretes a novel antifungal protein intu adjacent maternal tissue. *The Plant Journal* 25(6): 687-698.

- Shewry, P.R., (1995). Plant storage proteins. *Biol. Rev.*, 70: 375-426.
- Shipkova, M., Niedmann, P.D., Armstrong, V.W., Oellerich, M., Wieland, E., (2004). Determination of thiopurine methyltransferase activity in isolated human erythrocytes does not reflect putative in vivo enzyme inhibition by sulfasalazine. *Clin. Chem.* 50: 408-414.
- Steiner, H., (1981). *Nature*; 292: 246-248.
- Stevens R. C., S. Yokoyama, and I. A. Wilson (2001) Global efforts in structural genomics. *Science*. 294: 89-92
- Studier, F.W., Moffatt, B.A., 1986. Use of Bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, 189: 113-130.
- Thevissen, K., R.W. Osborn, D.P. Acland, and W.F. Broekaert, (2000). Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*; 13: 54-61.
- Todisco, T., FCCP, C. Tascini, L. Mezzasoma, A. Eslami, (2002). Una b-defensina dell'epitelio bronchiale umano.
- Tossi, A. and Sandri, L. (2002). Molecular diversità in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Current Pharmaceutical Design*; 8: 743-761.
- Vatta, S., M. Boniotto, E. Bevilacqua, A. Belgrano, D. Pirulli, S. Crivella, A. Amoroso, (2000). Human beta defensin 1 gene: six new variants. *Human Mutation*; 15: 582-583.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

6. TABELLE

TABELLA 1. Sistemi di espressione utilizzati per le puroindoline ricombinanti

Costrutto	Vettore	Promotore	Ceppo di <i>E.coli</i>	Prodotto
pET100:PINA	pET100/D-TOPO	T7	BL21 Star pLysS	Hys-PINA
pET100:PINB	pET100/D-TOPO	T7	BL21 Star pLysS	Hys-PINB
pGEX:PINA	pGEX-4T-3	Ptac	DH5 α ORIGAMI TM B	GST-PINA ORIA
pGEX:PINB	pGEX-4T-3	Ptac	DH5 α ORIGAMI TM B	GST-PINB ORIB

TABELLA 2. Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione PCR dei geni delle puroidoline

Nome	Sequenza oligonucleotidica
Hys-PINA-for	5' <u>CACC</u> GATGTTGCTGGCG 3' ↓
Hys-PINA-rev	5' <u>TTA</u> GCCAATAGTGGCGGG 3' ↓ complem to overhang
Hys-PINB-for	5' <u>CACC</u> GAAGTTGGCGGAG 3' ↓ stop codon
Hys-PINB-rev	5' <u>CTA</u> CCAGTAATAGCCACTAG 3' ↓ complem to overhang
GST-PINA-for	5' <u>CG</u> <u>GAATTC</u> <u>C</u> <u>GGTGGTGGTGGTCCG</u> GATGTTGCTGGCGGGG 3' ↓ ↓ ↓ ↓ anchor EcoR1 frame linker region
GST-PINA-rev	5' <u>CCG</u> <u>CTCGAG</u> <u>TCA</u> GCCAATAGTGCCGGGGAT 3' ↓ ↓ ↓ anchor Xho1 stop codon
GST-PINB-for	5' <u>CG</u> <u>GAATTC</u> <u>C</u> <u>GGTGGTGGTGGTCCG</u> GAAGTTGGCGGAGGAG 3' ↓ ↓ ↓ ↓ anchor EcoR1 frame linker region
GST-PINB-rev	5' <u>CCG</u> <u>CTCGAG</u> TCACCAGTAATAGCCACTAG 3' ↓ ↓ anchor Xho1

TABELLA 3. Minima concentrazione delle PIN necessaria per inibire completamente la crescita batterica. I risultati sono rappresentati come la media \pm la deviazione standard.

Ceppo batterico	Valore della MIC di PINA ($\mu\text{g/ml}$)	Valore della MIC di PINB ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Escherichia coli</i>	30 ± 0.204	30 ± 0.316
<i>Staphylococcus aureus</i>	30 ± 0.408	30 ± 0.258
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ,	35 ± 0.816	35 ± 0.632
<i>Pseudomonas syringae</i>	50 ± 0.689	50 ± 0.418
<i>phaseoli</i>		
<i>Erwinia carotovora carotovora</i>	50 ± 0.258	50 ± 0.376
<i>Clavibacter michiganensis</i>	50 ± 0.491	50 ± 0.774

TABELLA 4. Attività inibitoria delle PIN contro *E. coli*. Ogni puroindolina è stata testata, a concentrazioni al di sotto del valore della MIC, da sola e combinata con concentrazioni subinibitorie dell'altra puroindolina. I risultati sono rappresentati dalla media \pm la deviazione standard.

Proteina inibitoria	Proteina subinibitoria (concentrazione)	% inibizione
PINA (1/3 MIC)		2 \pm 1.732
	PINB (1 μ g/ml)	14 \pm 0.764
	PINB (5 μ g/ml)	89 \pm 0.137
PINA (2/3 MIC)		84 \pm 1.312
	PINB (1 μ g/ml)	88 \pm 0.746
	PINB (5 μ g/ml)	90 \pm 1.061
PINB (1/3 MIC)		82 \pm 1.267
	PINA (1 μ g/ml)	82 \pm 0.606
	PINA (5 μ g/ml)	86 \pm 0.254
PINB (2/3 MIC)		89 \pm 0.732
	PINA (1 μ g/ml)	100 \pm 0.001
	PINA (5 μ g/ml)	100 \pm 0.001

TABELLA 5. Attività sinergica delle due puroindoline contro *Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae phaseoli*. PINA e PINB sono state considerate alternativamente la proteina inibitoria e subinibitoria ed è stato calcolata la diminuzione del valore della MIC alle diverse combinazioni di PIN. I risultati sono rappresentati dalla media \pm la deviazione standard.

Ceppo batterico	Proteina inibitoria	Proteina subinibitoria (concentrazione)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Escherichia coli</i>	PINA		30 \pm 0.204
		PINB (1 $\mu\text{g/ml}$)	30 \pm 0.376
		PINB (5 $\mu\text{g/ml}$)	22 \pm 0.355
	PINB		30 \pm 0.316
		PINA (1 $\mu\text{g/ml}$)	20 \pm 0.664
		PINA (5 $\mu\text{g/ml}$)	12 \pm 0.326
<i>Pseudomonas syringae phaseoli</i>	PINA		50 \pm 0.689
		PINB (1 $\mu\text{g/ml}$)	45 \pm 0.535
		PINB (5 $\mu\text{g/ml}$)	35 \pm 0.098
	PINB		50 \pm 0.418
		PINA (1 $\mu\text{g/ml}$)	30 \pm 0.204
		PINA (5 $\mu\text{g/ml}$)	20 \pm 0.641

TABELLA 6. Attività antimicrobica delle puroindoline ricombinanti (rPIN). I risultati rappresentano una media di 6 repliche.

Ceppo batterico	rPINA ($\mu\text{g/ml}$)		rPINB ($\mu\text{g/ml}$)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	30	300	30	300
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	300	30	300

TABELLA 7. Produzione di nitriti in linee cellulari di monoliti-macrofagi murini J774 per 24, 48 e 72 ore con: ORIA, ORIB ed LPS. I risultati sono espressi come la media \pm la deviazione standard di 6 esperimenti condotti in triplicato.

Trattamento	Tempo di incubazione (ore)		
	24	48	72
Nessun trattamento	0.25 \pm 0.02	0.70 \pm 0.09	1.40 \pm 0.08
LPS 1 μ g/ml	1.94 \pm 0.11	38.20 \pm 4.20	34.80 \pm 2.90
ORIA 10 μ g/ml	3.44 \pm 0.41	2.80 \pm 0.36	2.92 \pm 0.53
ORIA 37.5 μ g/ml	2.50 \pm 0.13	2.75 \pm 0.27	3.08 \pm 0.24
ORIA 75 μ g/ml	2.62 \pm 0.21	2.81 \pm 0.40	2.97 \pm 0.33
ORIA 150 μ g/ml	4.88 \pm 0.62	3.18 \pm 0.48	2.60 \pm 0.17
ORIB 2 μ g/ml	4.50 \pm 0.60	3.20 \pm 0.51	3.39 \pm 0.60
ORIB 12.5 μ g/ml	3.19 \pm 0.34	3.17 \pm 0.57	3.88 \pm 0.87
ORIB 25 μ g/ml	3.06 \pm 0.42	2.56 \pm 0.37	4.05 \pm 0.62
ORIB 50 μ g/ml	4.56 \pm 0.58	5.06 \pm 0.45	5.00 \pm 0.25

7. FIGURE



FIGURA 1. Struttura tridimensionale delle puroindoline: quattro alfa eliche connesse con cappi flessibili.

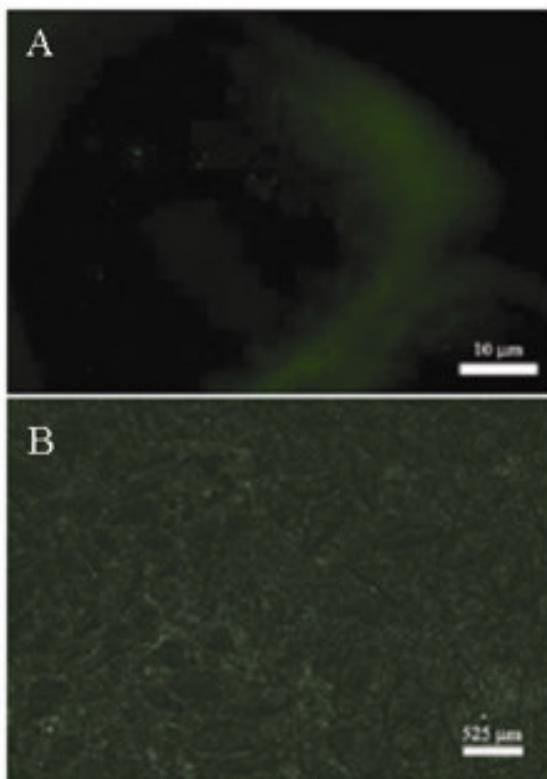


FIGURA 2. Controlli per valutare la specificità degli anticorpi. (A) Sezione della cultivar soft Bilancia marcata con siero di ratto preimmune al posto dell'anticorpo primario. (B) Cultivar Sibilla PINA nulla incubate con gli anticorpi $\text{Rat}\alpha\text{PINA}/\text{G}\alpha\text{Rat}^{\text{FITC } 466}$.

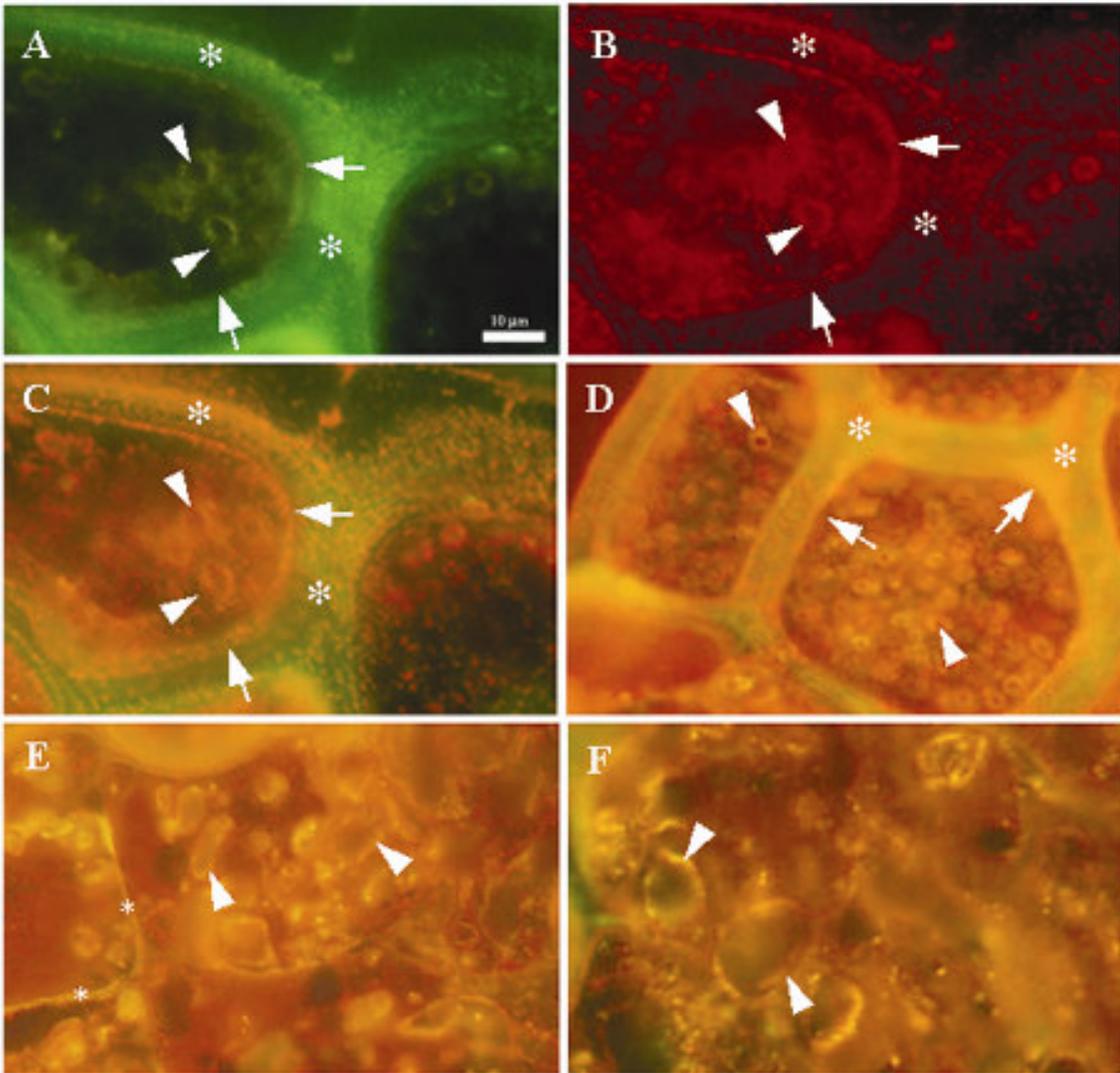


FIGURA 3. Immagine ottenuta a seguito di immunolocalizzazione di PINA e PINB su sezioni di cariossidi della cultivar soft Bilancia. (A) Micrografia fluorescente delle cellule dell'aleurone marcate con $Rat\alpha PINA/G\alpha Rat^{FITC\ 466}$ per l'immunolocalizzazione di PINA. Il campione è stato eccitato a 466 nm (verde); lo spettro di eccitazione è uguale a quello di emissione ed è compreso tra 450 e 517 nm. (B) immagine fluorescente delle cellule dell'aleurone marcate con $Rabbit\alpha PINB/G\alpha Rabbit^{Alexa594}$ per identificare PINB. Il campione è stato eccitato a 594 nm (rosso); lo spettro di eccitazione è compreso tra 519 e 600 nm, mentre quello di emissione è compreso fra 576 e 668 nm. (C) Sovrapposizione delle immagini A e B. I pixel arancioni stanno ad indicare la colocalizzazione delle due proteine (PINA e PINB). (D) immagine rappresentante un'altra sezione dello strato aleuronico. (E, F) Immagini sovrapposte che mostrano come PINA e PINB si localizzano nell'endosperma. In tutte le immagini gli asterischi stanno ad indicare lo spazio intracellulare, le frecce indicano la membrana cellulare, le punte delle frecce indicano i granuli d'amido.

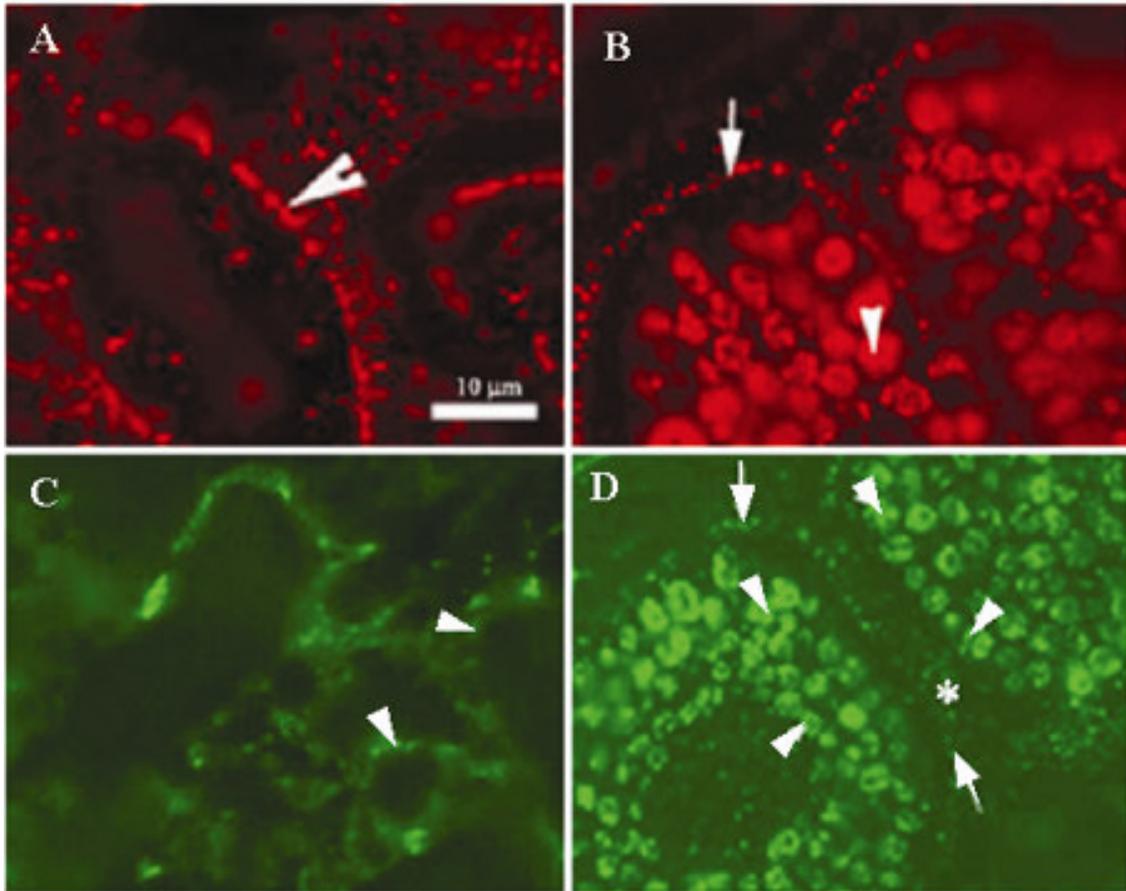


FIGURA 4. immunolocalizzazione con anticorpi specifici per PINA e PINB su cariossidi di due cultivar che non esprimono ritivamente PINA (Sibilla) e PINB (Canadian red). (A, B) Immunolocalizzazione eseguita su cariossidi della cultivar Sibilla: (A) accumulo di PINB (rosso) nelle cellule dello strato aleuronico, (B) accumulo di PINB nell'endosperma. (C, D) Immunolocalizzazione eseguita su cariossidi della cultivar Canadian red: (C) accumulo di PINA (verde) nelle cellule dello strato aleuronico, (B) accumlo di PINA nell'endosperma amilifero. Gli asterischi stanno ad indicare lo spazio intracellulare, le frecce indicano la membrana cellulare, le punte delle frecce indicano i granuli d'amido.

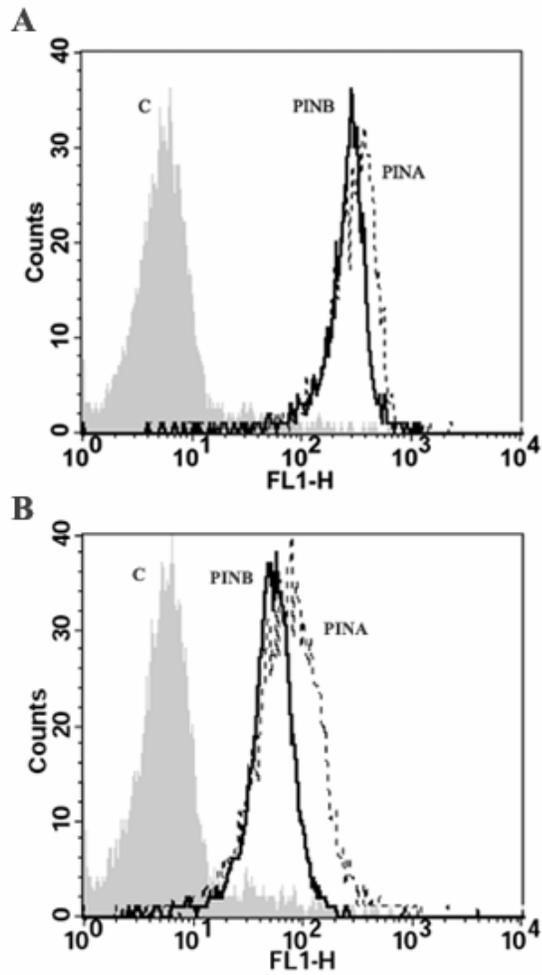


FIGURA 5. Identificazione citofluorimetrica delle PIN nelle preparazioni alimentari. Il quantitativo di PIN è espresso come mediana di fluorescenza (FL1-H). (A) estratto proteico del biscotto Macina. (B) Estratto proteico di pane in cassetta. C = controllo (campione che non esprime le puroindoline: pane di frumento duro).

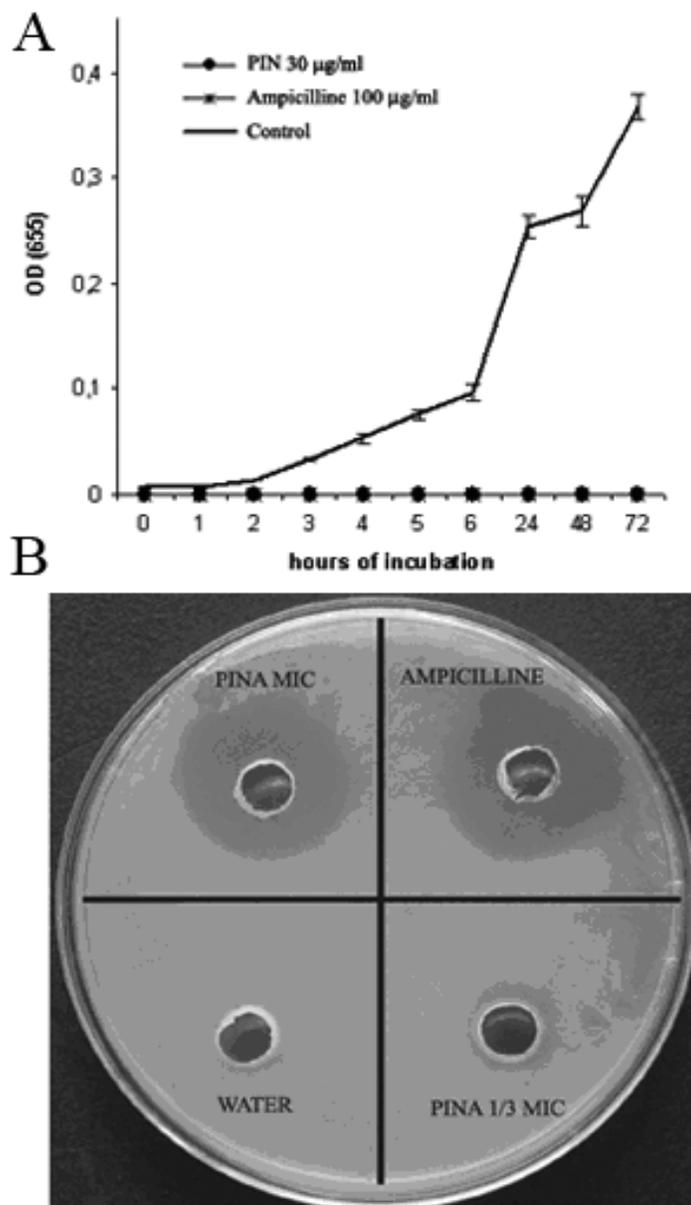


FIGURA 6. The amount of PINA activity against *E. coli*. (A) Killing-curve in funzione del tempo di *E. coli* utilizzando il valore della MIC di PINA (30 µg/ml), 10 volte il valore della MIC di PINA (300 µg/ml), e l'ampicillina (100 µg/ml). (B) Test dell'alone di inibizione: PINA al valore della MIC mostra un alone di inibizione comparabile a quello dell'antibiotico (2.22 cm e 2.33 cm rispettivamente).

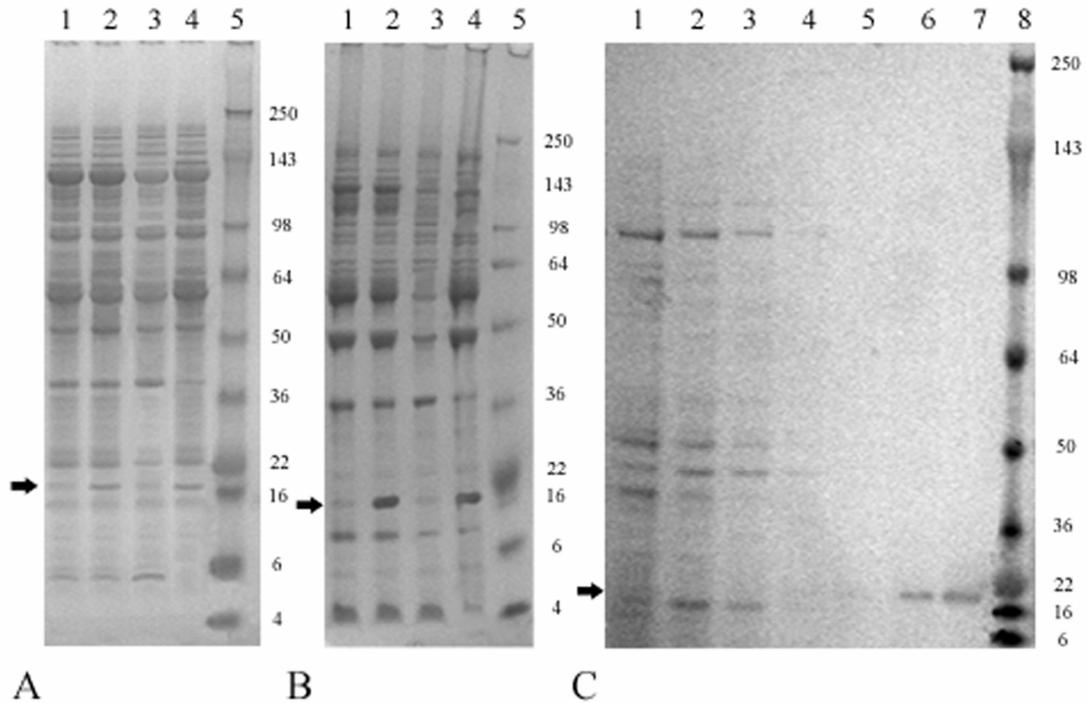


FIGURA 7. Espressione e purificazione delle Hys-PIN. (A) SDS-PAGE 4-12% (in Tris-Glicina) dell'espressione delle Hys-PIN nelle pLysS. Linea 1: campione non indotto, linea 2: campione indotto, linea 3: proteine solubili, linea 4: proteine insolubili, linea 5: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen). (B) SDS-PAGE 4-12% (in Tris-Glicina) dell'espressione delle Hys-PIN nelle BL21*. Linea 1: campione non indotto, linea 2: campione indotto, linea 3: proteine solubili, linea 4: proteine insolubili, linea 5: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen). (C) SDS-PAGE 4-12% (in Tris-Glicina) delle Hys-PIN (espresso in BL21*) purificate per cromatografia d'affinità. Linea 1, 2: lavaggio a pH 7.2, linea 3-5: lavaggio a pH 6, linea 6,7: eluizione a pH 5.3, linea 8: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen). Le frecce indicano le Hys-PIN.

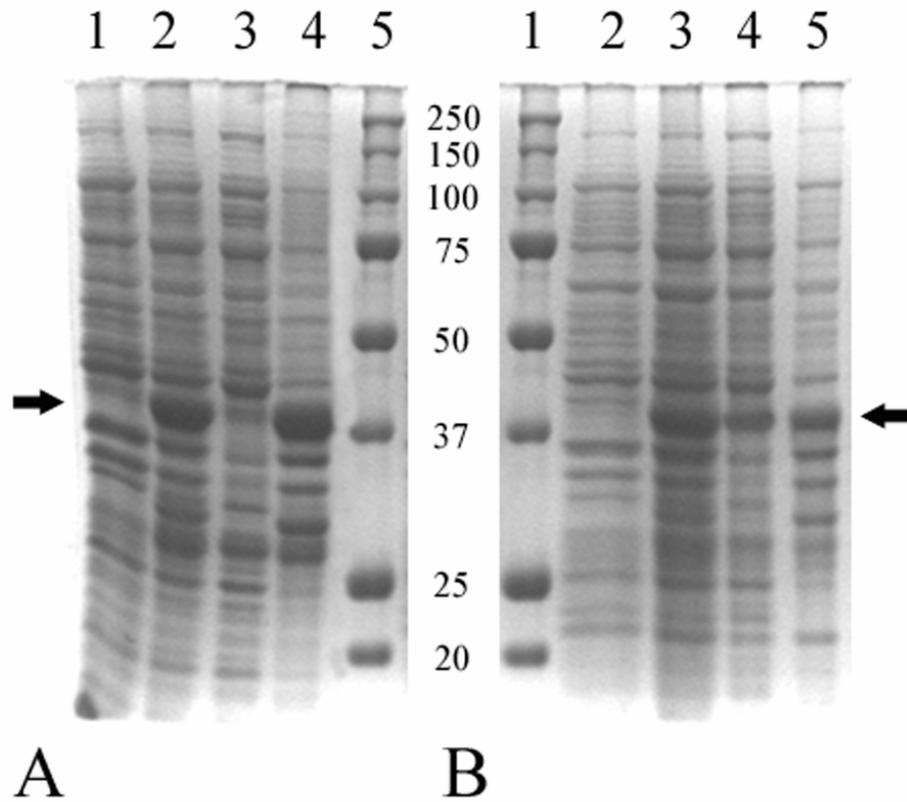


FIGURA 8. Espressione delle GST-PIN nelle DH5 α . (A) SDS-PAGE (4-10% in Tris-Glicina) dell'espressione delle GST-PIN a 37°C. Linea 1: campione non indotto, linea 2: campione indotto, linea 3: proteine solubili, linea 4: proteine insolubili, linea 5: marker Precision Plus protein standards (Biorad). (B) Espressione delle GST-PIN a 28°C. Linea 1: marker Precision Plus protein standards (Biorad), linea 2: campione non indotto, linea 3: campione indotto, linea 4: proteine solubili, linea 5: proteine insolubili. Le frecce indicano le GST-PIN.

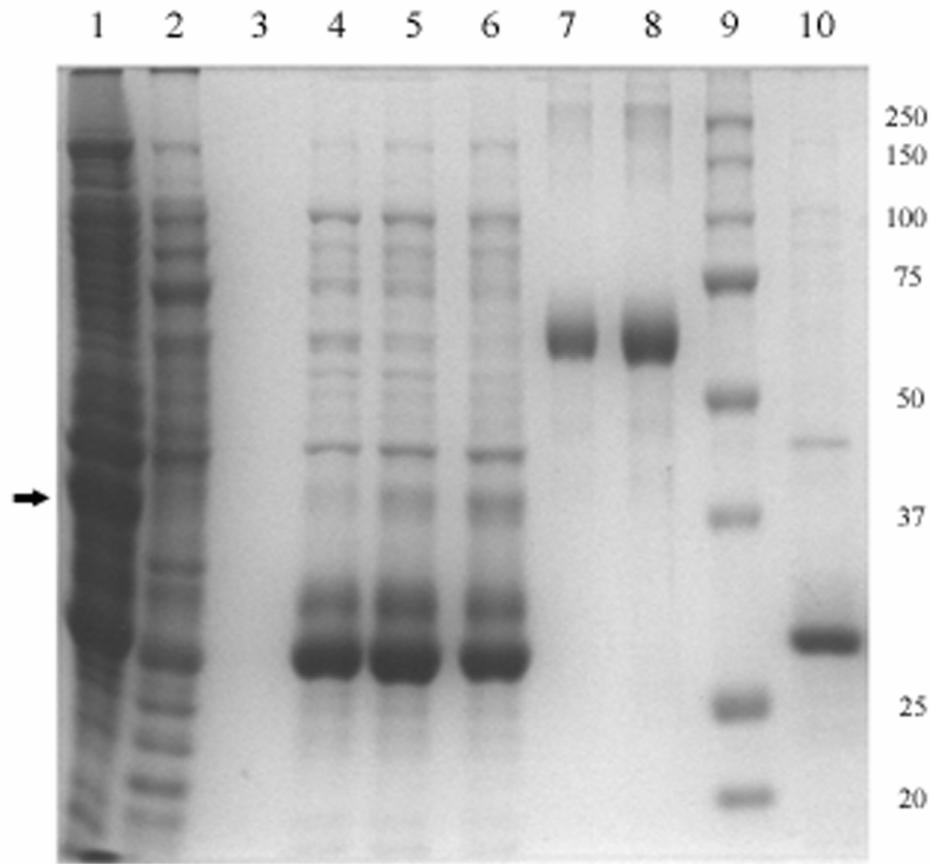


FIGURA 9. SDS-PAGE (4-10% in Tris-Glicina) della purificazione delle GST-PIN. Linea 1: campione legato alla resina, linea 2: campione non legato alla resina, linea 3: vuota, linea 4: campione eluito con tampone di eluizione (50mM Tris-HCl, 10mM glutatione ridotto, pH 8.0), linea 5: campione eluito con tampone di eluizione avente una concentrazione maggiore di glutatione (30mM), linea 6: campione eluito con tampone di eluizione con l'aggiunta di un detergente non ionico (0.1% Triton X-100), linee 7, 8: standard di BSA (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rispettivamente), linea 9: marker Precision Plus protein standards (Biorad), linea 10: campione eluito con tampone di eluizione avente una maggiore forza ionica (100mM Tris-HCl). Le frecce indicano le GST-PIN.

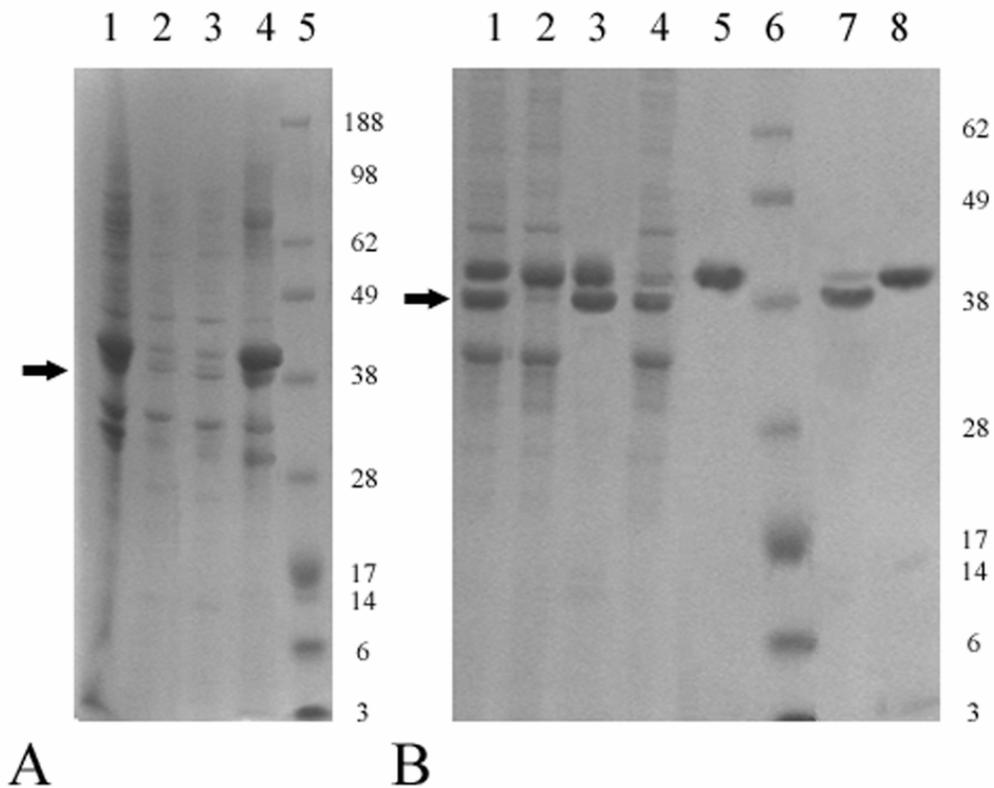


FIGURA 10. Solubilizzazione delle GST-PIN dai corpi di inclusione con differenti tamponi. (A) SDS-PAGE (4-12% in MES) della solubilizzazione delle GST-PIN con tampone Urea/Triton. Linea 1: proteine dei corpi di inclusione, linea 2: proteine solubilizzate dopo un'incubazione overnight, linea 3: proteine solubilizzate dopo 24 ore di incubazione, linea 4: proteine rimaste insolubili, linea 5: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen). (B) SDS-PAGE (4-12% in MES) della solubilizzazione delle GST-PIN con tamponi Urea e GuHCl. Linea 1: proteine dei corpi di inclusione, linea 2: proteine solubilizzate dopo un overnight con Urea, linea 3: proteine rimaste insolubili, linea 4: proteine solubilizzate dopo un overnight con tampone GuHCl, linea 5: proteine rimaste insolubili, linea 6: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen), linea 7: proteine solubilizzate dopo un trattamento prima con Urea 8M e poi con, linea 8: proteine rimaste insolubili. Le frecce indicano le GST-PIN.

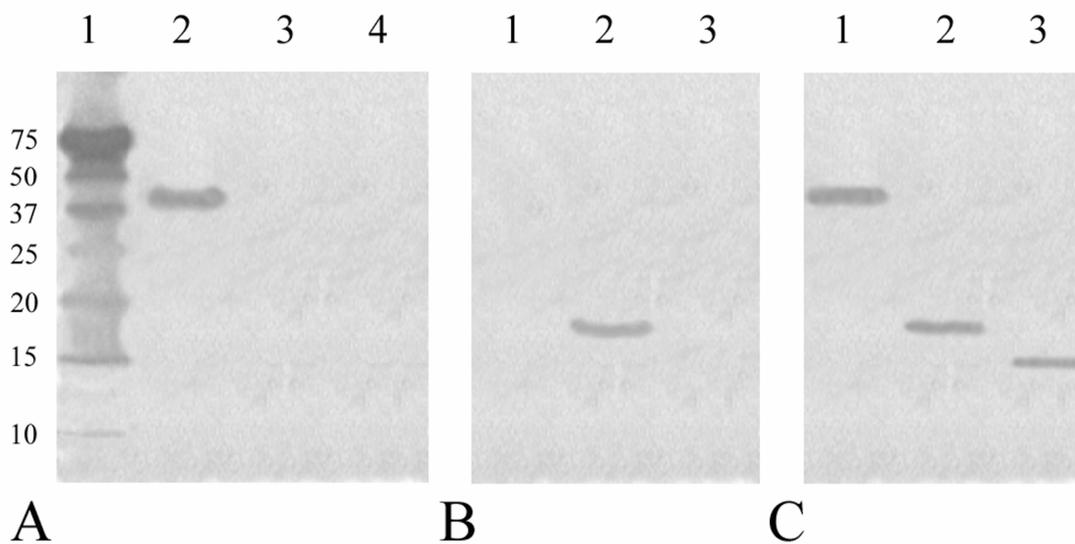


FIGURA 11. Risposta immune specifica generate nei confronti delle puroindoline ricombinanti. (A) Immunoblotting eseguito utilizzando Mouse α GST come anticorpo primario. Linea 1: marker Precision Plus protein standards (Biorad), linea 2: GST-PIN, linea 3: Hys-PIN, linea 4: puroindolina nativa. (B) Immunoblotting eseguito utilizzando Mouse α XPress come anticorpo primario. Linea 1: GST-PIN, linea 2: Hys-PIN, linea 3: puroindolina nativa. (C) Immunoblotting eseguito utilizzando Rat α PIN come anticorpo primario. Linea 1: GST-PIN, linea 2: Hys-PIN, linea 3: puroindolina nativa.

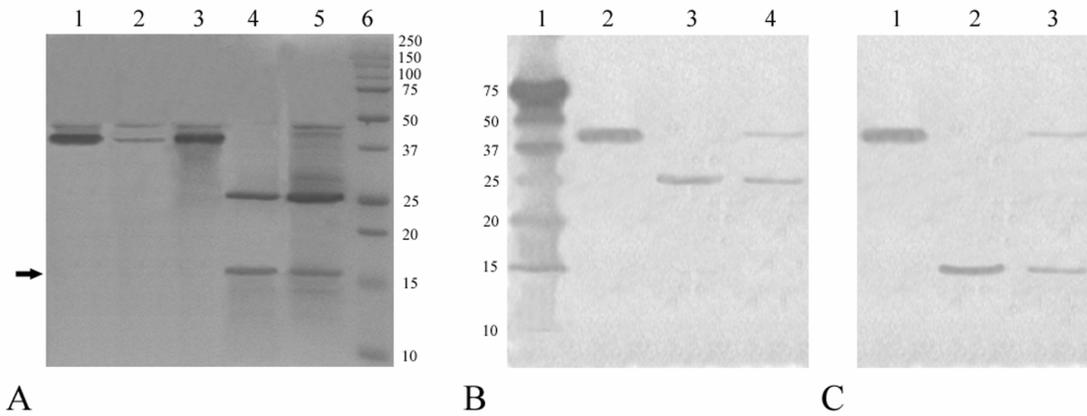


FIGURA 12. (A) SDS-PAGE (4-15% in Tris-glicina) del refolding delle GST-PIN e del taglio con la trombina. Linea 1: proteina refoldata, linea 2: proteina non foldata, linea 3: proteine refoldate legate alla resina Glutathione Sepharose 4B, linea 4: proteine tagliate dalla trombina ed eluite dalla resina, linea 5: proteine rimaste sulla resina dopo il taglio con la trombina, linea 6: marker Precision Plus protein standards (Biorad). Le frecce indicano la proteina tagliata. (B) Western immunoblotting eseguito utilizzando Mouse α GST come anticorpo primario. Linea 1: Marker Precision Plus protein standards (Biorad), linea 2: proteine refoldate legate alla resina Glutathione Sepharose 4B, linea 3: proteine tagliate dalla trombina ed eluite dalla resina, linea 4: proteine rimaste sulla resina dopo il taglio con la trombina. (C) Western immunoblotting eseguito utilizzando Rat α PIN come anticorpo, linea 1: proteine refoldate legate alla resina Glutathione Sepharose 4B, linea 2: proteine tagliate dalla trombina ed eluite dalla resina, linea 3: proteine rimaste sulla resina dopo il taglio con la trombina.

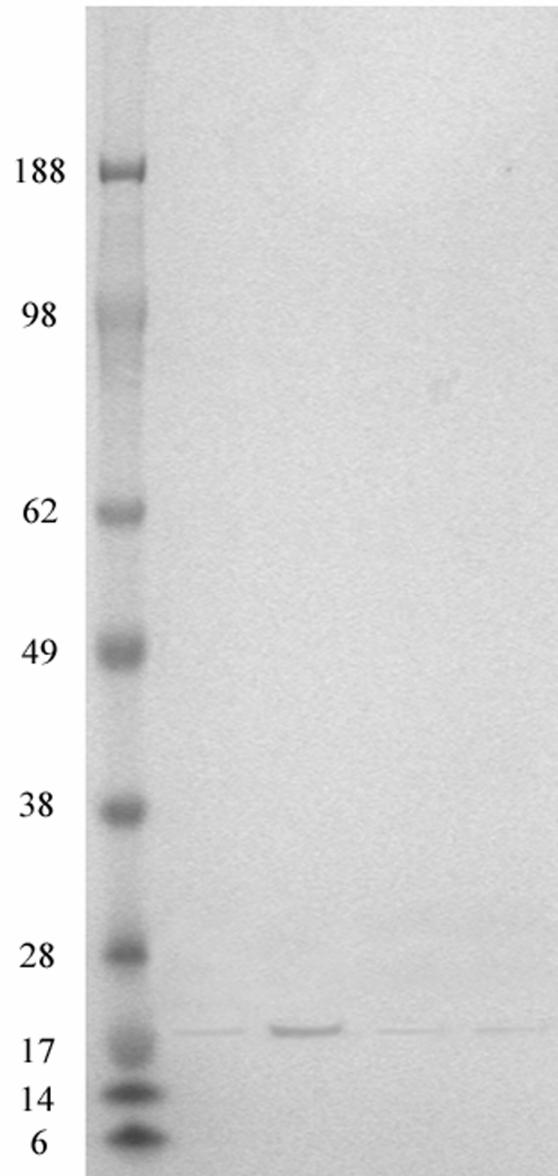


FIGURA 13. SDS-PAGE (4-12% in MES) del refolding delle Hys-PIN e del taglio con l'enterochinasi. Linea 1: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen), linea 2: proteine refoldate, linea 3: proteine non foldate, linea 4: Hys-PIN incubate con 1 unità di enterochinasi, linea 5: Hys-PIN incubate con 4 unità di enterochinasi.

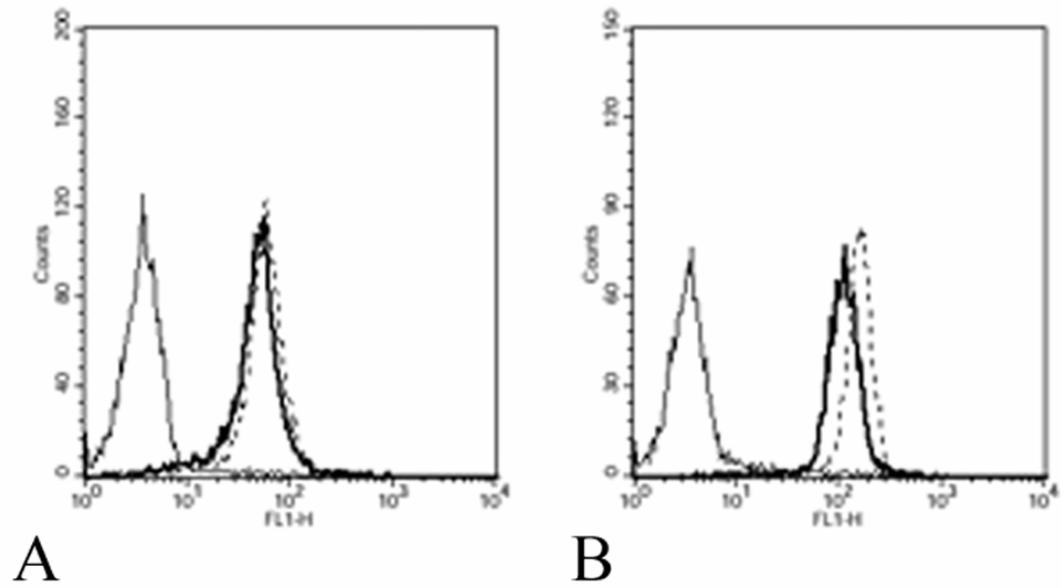


FIGURA 14. Profilo citofluorimetrico delle puroindoline native (linea continua) e ricombinanti (linea tratteggiata). (A) Rat α PIN utilizzato come anticorpo primario. (B) Rat α PIN utilizzato come anticorpo primario. I risultati sono rappresentati come mediana di fluorescenza (FL1-H).

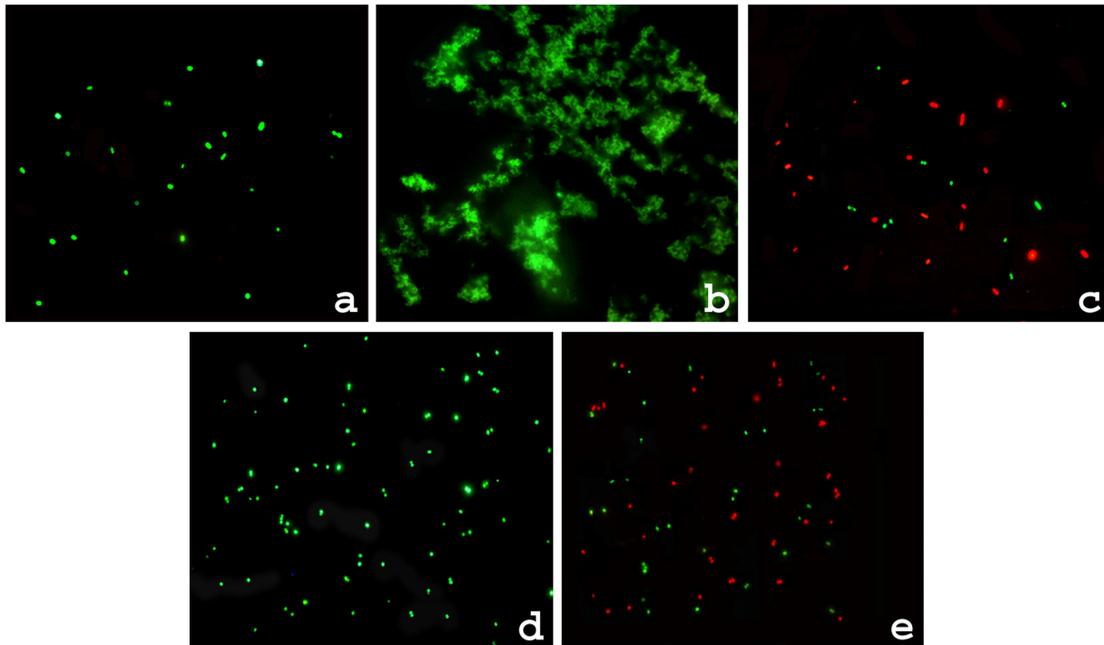


FIGURA 15. Marcatura vitale di *E. coli* e *S. epidermidis* trattati con le PIN. (A) *E. coli* non trattato utilizzato come controllo. (B) Debris cellulari osservati dopo un'incubazione di *E. coli* con alte concentrazioni di PIN (1.25 µg). (C) Cellule vive e morte di *E. coli* osservate in presenza di concentrazioni di PINB inferiori (10 volte minori). (D) *S. epidermidis* non trattato utilizzato come controllo. (E) Cellule vive e morte di *S. epidermidis* osservate in presenza di 5 µg di PINB.

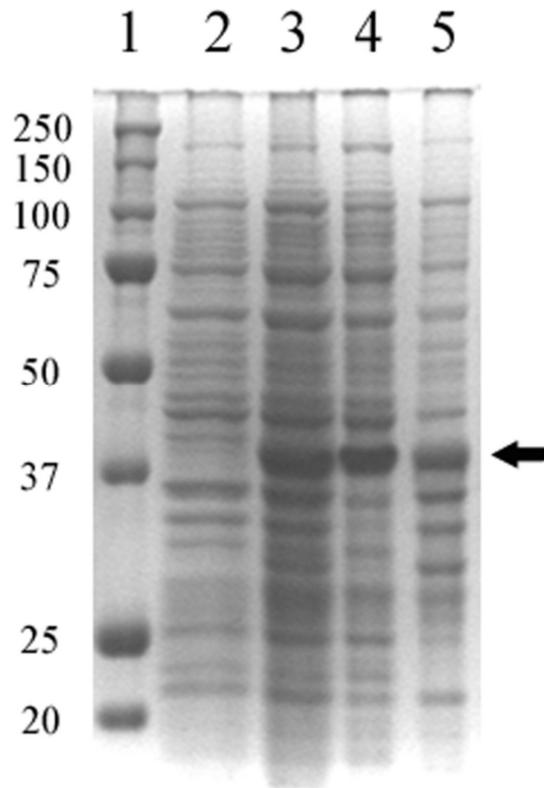


FIGURA 16. SDS-PAGE (4-12% in Tris-Glicina) dell'espressione di GST-ORIA nelle Origami a 28°C. Linea 1: marker Precision Plus protein standards (Biorad); linea 2: campione non indotto, linea 3: campione indotto, linea 4: proteine solubili, linea 5: proteine insolubili. Le frecce indicano GST-ORIA. L' SDS-PAGE di GST-ORIB ha dato un pattern di espressione molto simile.

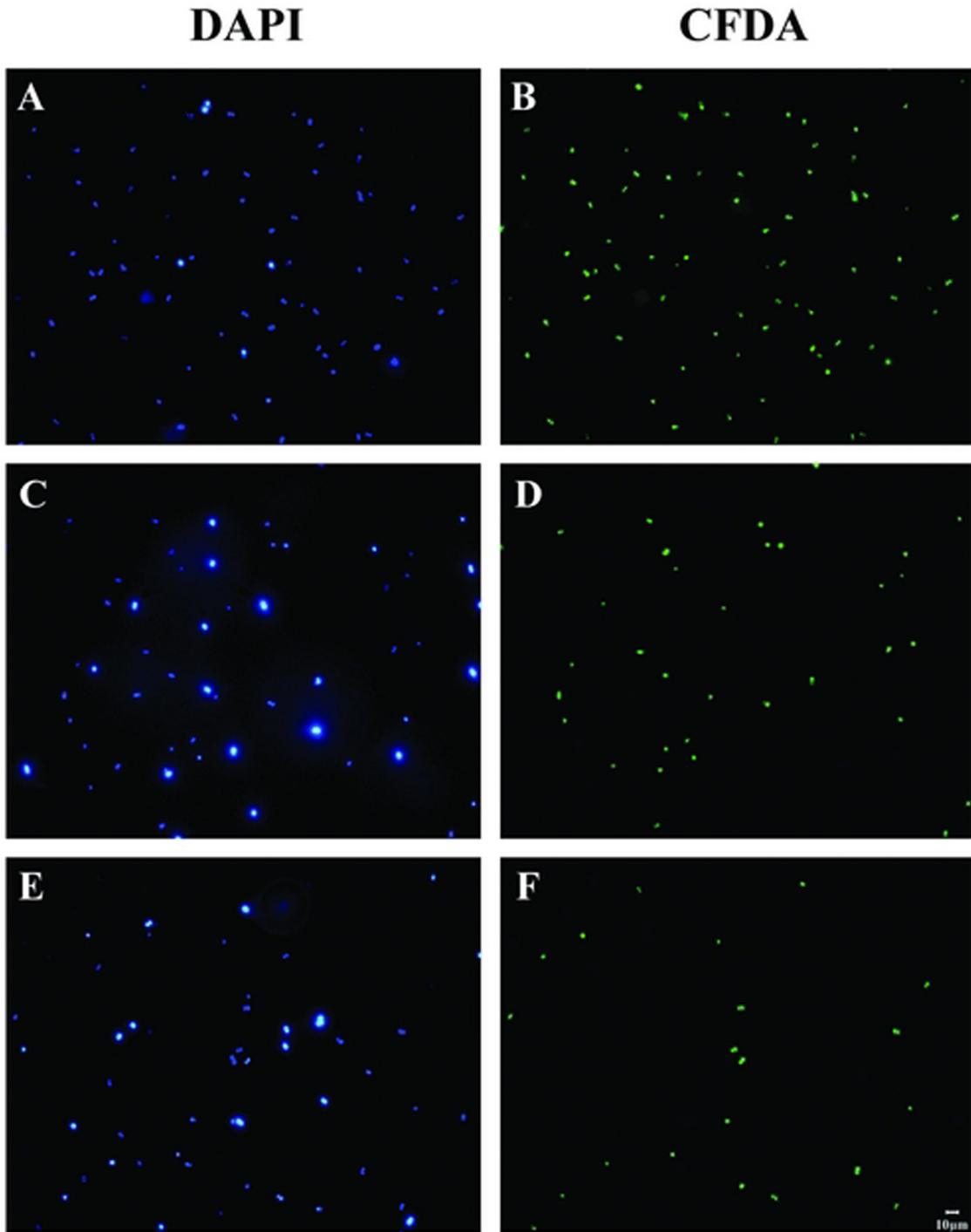


FIGURA 17. *S. epidermidis* doppiamente marcato con DAPI (che colora cellule vive e cellule morte) e CFDA (che colora solo le cellule vive). (A, B) Controllo (batteri non trattati); (C, D) batteri trattati con ORIA e (E, F) con ORIB. I marcatori CFDA e DAPI sono stati visualizzati per eccitazione alla luce blu ed UV, rispettivamente.

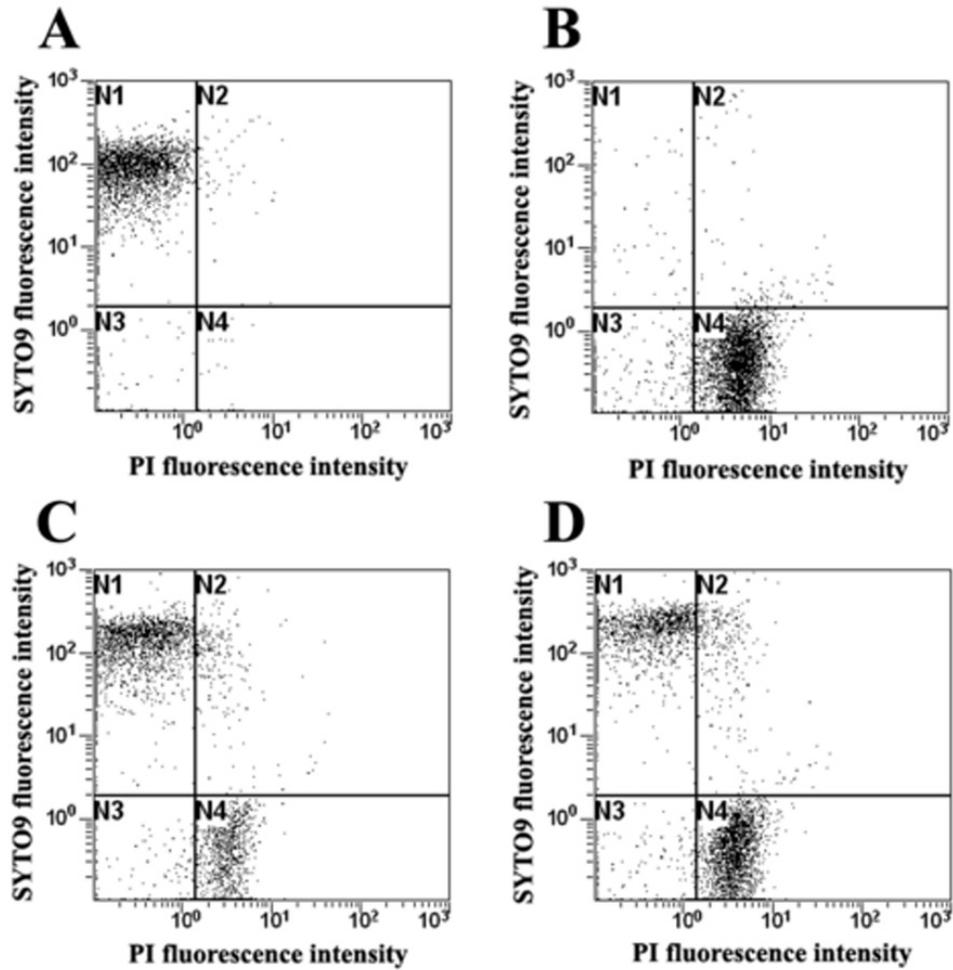


FIGURA 18. Citogramma a due parametri di 5000 eventi di una popolazione batterica di *S. epidermidis* trattata e non trattata con le puroindoline ricombinanti. (A) Batteri non trattati (controllo negativo); (B) batteri fissati in 70% isopropanolo (controllo positivo); (C) batteri trattati con ORIA; (D) batteri trattati con ORIB.

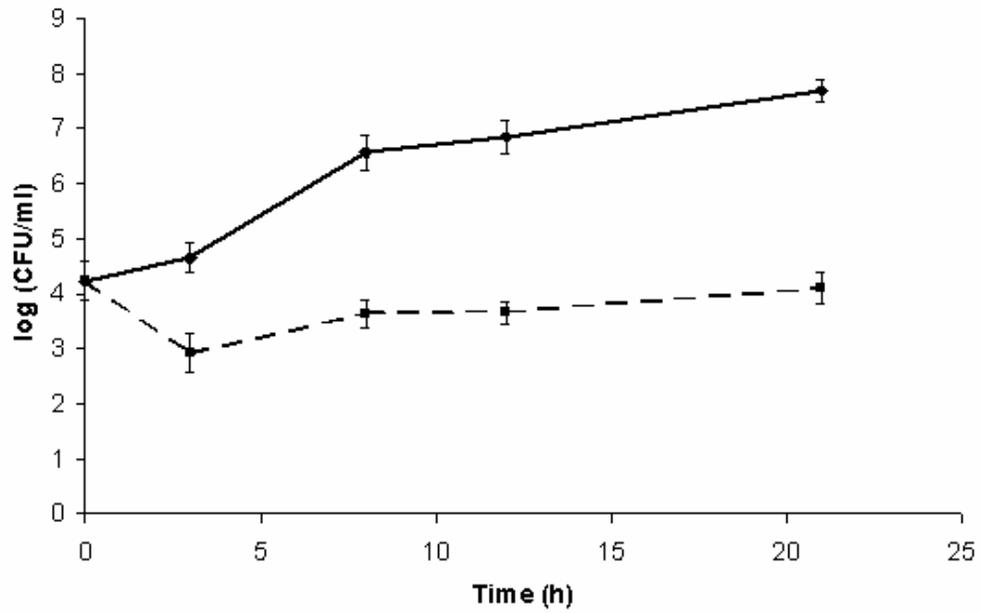


FIGURA 19. Conta in piastra di *S. epidermidis* intracellulare trattato (linea tratteggiata) o no (linea continua) con ORIA. Le analisi sono state eseguite anche con ORIB, dando risultati comparabili.