
STUDIO DI PEPTIDI ANTIMICROBICI DELL'IMMUNITÀ INNATA: POSSIBILI APPLICAZIONI IN CAMPO MEDICO E AGRO-ALIMENTARE

Dott.ssa Raffaella Ripa

Dottorato in Scienze Biotecnologiche –XXIII ciclo
Indirizzo Biotecnologie vegetali
Università di Napoli Federico II



Dottorato in Scienze Biotecnologiche –XXIII ciclo
Indirizzo Biotecnologie vegetali
Università di Napoli Federico II



STUDIO DI PEPTIDI ANTIMICROBICI DELL'IMMUNITÀ INNATA: POSSIBILI APPLICAZIONI IN CAMPO MEDICO E AGRO-ALIMENTARE

Dott.ssa Raffaella Ripa

Dottoranda: Raffaella Ripa

Relatore: Prof.ssa Rosanna Capparelli

Coordinatore: Prof. Giovanni Sannia

***Ai mie genitori, che hanno reso
possibile i miei studi.***

***A Mario e Nicola con cui sto iniziando
Un nuovo percorso di vita.***

***A Rosa ed a tutti coloro
che hanno creduto in me.***

INDICE

RIASSUNTO	pag.	1
ABSTRACT	pag.	2
WIDE SUMMARY	pag.	3
1. INTRODUZIONE	pag.	7
1.1. ANTIBIOTICO RESISTENZA	pag.	7
1.2. PEPTIDI NATURALI AD ATTIVITA' ANTIMICROBICA	pag.	8
1.2.1. La scelta degli AMP	pag.	9
1.2.2. Selettività e ampio spettro di attività	pag.	9
1.2.3. Velocità di azione degli AMP	pag.	10
1.2.4. Capacità di interazione degli AMP con altre molecole	pag.	11
1.2.5. Azione nei confronti di setticemia e della sepsi	pag.	11
1.3. MECCANISMO D'AZIONE DEI PEPTIDI ANTIMICROBICI	pag.	12
1.4. CLASSIFICAZIONE DEI PEPTIDI ANTIMICROBICI	pag.	14
1.5. SELEZIONE DEI PEPTIDI	pag.	15
1.5.1. Temporine	pag.	15
1.5.2. Royal-Jelline	pag.	17
2. SCOPO DELLA TESI	pag.	18
2.1. OBIETTIVI DELLA RICERCA	pag.	18
2.1.1. Applicazioni in campo farmacologico	pag.	18
2.1.2. Applicazioni in campo agro-alimentare	pag.	19
2.1.3. Altre applicazioni	pag.	19
2.2. SEDE DI SVOLGIMENTO DEL DOTTORATO	pag.	20
3. MATERIALI E METODI	pag.	21
3.1. SINTESI DEI PEPTIDI	pag.	21
3.1.1. Sintesi in fase solida dei peptidi	pag.	21
3.1.2. Derivazione dei peptidi con fluorocromi	pag.	23
3.1.3. Dicroismo Circolare	pag.	23

3.2. TEST IN VITRO	pag.	23
3.2.1. Trasformazione batterica	pag.	24
3.2.2. Test di attività antimicrobica	pag.	24
3.2.3. Test al MOF ed al SEM sui batteri	pag.	25
3.2.4. Test dell'alone di inibizione	pag.	25
3.3. TEST IN VIVO	pag.	26
3.3.1. Sopravvivenza murina e monitoraggio della carica microbica negli organi bersaglio	pag.	26
3.3.2. Saggio di tossicità	pag.	27
3.3.3. Saggio di microscopia ottica su organi murini	pag.	27
3.3.4. Emocromo e formula leucocitaria	pag.	27
3.3.5. Rilevamento dei livelli di citochine negli organi	pag.	28
4. RISULTATI	pag.	30
4.1. SINTESI DEI PEPTIDI	pag.	30
4.2. STUDI EFFETTUATI SULLE TEMPORINE	pag.	31
4.2.1. Temporina A e B analizzati singolarmente	pag.	31
4.2.2. Attività di Temporine A e B in sinergia	pag.	32
4.3. STUDI EFFETTUATI SULLE ROYAL-JELLINE	pag.	44
4.4. SINERGIE TRA PEPTIDI DIVERSI	pag.	45
5. DISCUSSIONE	pag.	47
6. CONCLUSIONE	pag.	49
7. BIBLIOGRAFIA	pag.	50

RIASSUNTO

I peptidi antimicrobici sono un gruppo abbondante e diversificato di molecole attive della risposta immunitaria che costituisce la prima linea di difesa contro i patogeni. Sono definite anche AMP (antimicrobial peptides) e sono prodotti in molti tessuti e tipi di cellule di organismi quali piante, insetti anfibi e dagli organismi superiori. La loro composizione amminoacidica e le loro caratteristiche chimico-fisiche correlate alla struttura consentono loro di interagire in maniera selettiva con il doppio strato lipidico della membrana batterica causando la morte dei microrganismi. I peptidi antimicrobici sembrano avere un alto potenziale d'attività sui ceppi batterici patogeni per l'uomo, essendo in grado di agire singolarmente e in miscela sulle cellule batteriche e non inducendo fenomeni di antibiotico-resistenza, come i farmaci attualmente in uso.

Una delle più ricche fonti naturali di peptidici antibiotici sono le secrezioni degli Anfibi e degli insetti prodotte per difendere l'organismo dagli insulti esterni. Questo lavoro di tesi ha visto l'analisi degli analoghi sintetici di alcune di queste piccole molecole, lineari, con struttura secondaria ad α -elica e con carica netta positiva, come le Temporine, presenti sulla pelle della rana rossa europea (*Rana temporaria*) e le Royal-jelline, tra i più piccoli peptidi attivi presenti in natura, rilasciate nella pappa reale prodotta dalle api nutrici (*Apis mellifera*). L'attività di ricerca svolta durante l'attività di dottorato si colloca nell'ambito del progetto DEFENCE. Studi relativi al meccanismo d'azione di queste molecole sono stati condotti nei confronti di patogeni opportunisti, coinvolti in infezioni nosocomiali o associati a tossinfezioni alimentari, hanno mostrato la capacità di alterare la permeabilità della membrana della cellula bersaglio, ed in alcuni casi di agire sinergicamente. In particolare è stato analizzato un analogo sintetico della Temporina B (TB-YK), che presenta un'azione sinergica con la Temporina A e con Royal-Jellina 1 esercitando attività antimicrobica in vitro. Inoltre il mix di Temporina A e Temporina B (TB-YK) è stato analizzato in vivo su organi modello (topo) per verificare la capacità di proteggere l'animale contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi e di esplicare un'azione anti-infiammatoria modulando l'espressione delle citochine.

Lo scopo di questo studio è stato quindi quello di identificare gli AMP che presentano il migliore indice terapeutico sia per la protezione da infezioni batteriche sia da componenti batteriche (LPS) agenti primari della patogenesi da sepsi, al fine di una loro applicazione in campo farmacologico e agro-alimentare come *active-packaging* in grado di aumentare la *shelf-life* di prodotti alimentari.

ABSTRACT

The antimicrobial peptides are a large and diversified group of effector molecules of the innate immune response and constitute the first line of defense against the pathogens. The AMPs (antimicrobial peptides) are produced by several tissues and cell types in plants and in animal species like insects, amphibians and vertebrate. Their aminoacid composition and their chemical-physical characteristics linked with structural characteristics, allow them to act with the lipid bilayer of the bacterial membrane, causing the death of microorganisms. The antimicrobial agents seem to have an high potential action on bacterial pathogens for humans, because they are able to act in a selective and combined manner. Moreover they do not induce the phenomenon of antibiotic-resistant on bacteria, which is a quite common factor in traditional antibiotics.

One of the richest natural sources of peptide antibiotics are the secretions of the amphibians and the molecules produced by insects to the defense from external insults. Therefore, it was decided to analyze some of these molecules, which have small size, strong α -helix structure, and positive net charge, such as Temporins, from the skin of the European red frog (*Rana temporaria*). The second type of analyzed molecules are Royal-Jelline, produced by cephalic glands of nurse bees (*Apis mellifera*). The research activities, carried out during the PhD, is part of the DEFENCE project. Studies about the action mechanism of these molecules against opportunistic pathogens, involved in nosocomial infections or associated with food poisoning, have shown their ability to alter the membrane permeability of the target cell, and to act synergistically. In particular, we used a synthetic analogue of Temporin B (TB-KK), which becomes able to act in synergy with Temporin A and Royal-Jellina 1. In addition, the mix of Temporin A and Temporin B (KK-TB) was analyzed in live on model organisms (mice) to determine their ability to protect the animal against Gram-positive and Gram-negative and to exert an anti-inflammatory activities, modulating the expression of inflammatory cytokines.

Purpose of this study is the identification of peptides, which have the best therapeutic index for protection both from bacterial infections and bacterial components (LPS), main agents of the sepsis pathogenesis. A further aim is finding a possible application of these peptides is in pharmacology end agro-industries, as an active-packaging component to increase shelf-life of alimentary products.

WIDE SUMMARY

Recently scientific research has been focused on antimicrobial peptides called AMPs, present in nature. They can exert antimicrobial activity against different pathogens, harmful to human health and to food quality. These peptides are an abundant and diversified group of active molecules, that belongs to the innate immune system, which is the first line of defense against external bodies. AMPs are small molecules of varying lengths, containing about 10 - 40 amino-acids. They are produced in many tissues and cell types of plants, insects and amphibians, playing an important role in immunity of higher organisms. Their amino-acid composition and their chemico-physical characteristics related to the structure, allow them to interact selectively with the lipidic bilayer membrane of the bacterial preferring prokaryotes then eukaryotes.

They seem to have a broad spectrum of action on pathogenic bacteria to humans, being able to act on them individually and in combination with different mechanisms from those of common medications. In fact, antibiotic resistance phenomena is not induced, even if it usually occur for antibiotics currently in use. In addition to bactericidal activity, the AMPs also have antiviral, antifungal, anticancer and immunomodulatory activities.

About a thousand of antimicrobial peptides have been isolated and characterized until now. One of the richest natural sources of antibiotics peptide are the secretions of the amphibians and the molecules produced by insects to the defence from external insults. The analysis of some of these small molecules found in nature have shown that they are linear in an aqueous solution and assume a secondary structure for α -helix, when in contact with lipidic membranes.

In this work the attention was focused on two molecules, belong from organisms phylogenetically distant. We considered Temporins, peptides with a composition of 10-14 amino-acids, amidated at the C-terminal, containing 1 or 2 basic residues, produced and released in granular glands of the skin of the European red frog (*Rana temporaria*). In particular the analyzed peptides are Temporin A (TA) and Temporin B (TB) that show antimicrobial activity, especially against Gram-positive bacteria.

The second type of analysed molecules are Royal-Jellins (RJ), that are the smallest active peptides found in nature, composed by about 8 – 9 amino-acids, produced by cephalic glands of nurse bees (*Apis mellifera*) and then released in royal jelly, with positive net charge (+1 or +2) and a lot of hydrophobic residues. They are divided into RJ-1, RJ-2 and RJ-3, which have a leucine residue; they are amidated at the C-terminal and show antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

The research activities, carried out during the PhD, are part of the DEFENCE project. Studies about the action mechanism of these molecules against opportunistic pathogens, involved in nosocomial infections or associated with food poisoning, have shown their ability to alter the membrane permeability of the target cell and to act synergistically. In particular, we used a synthetic analogue of Temporin B (TB-KK), which becomes able to act in synergy with Temporin A and Royal-Jellin 1, exerting antimicrobial activity in vitro. In addition, the mix of Temporin A and Temporin B (KK-TB) was analysed in live on model organisms (mice) to determine their ability to

protect the animal against Gram-positive and Gram-negative and to exert an anti-inflammatory activities, modulating the expression of inflammatory cytokines.

Purpose of this study is the identification of peptides, which have the best therapeutic index for protection both from bacterial infections and bacterial components (LPS), main agents of the sepsis. A further aim is finding a possible application of these peptides in pharmacology and agro-industries, as an active-packaging component to increase shelf-life of alimentary products.

Moreover analogues of Temporins and Royal-Jellins have been studied to determine which are the characteristics involved in target recognition by peptides, improving its antimicrobial activity and reducing any cytotoxic effect. A further aim is finding a possible application of these peptides is in pharmacology end agro-industries, as an active-packaging component to increase shelf-life of alimentary products.

The peptides were obtained through "solid-phase synthesis" using Fmoc chemistry, then some of them was modified by the addition of amino-acids. To distance the fluorophore from the peptide and to prevent degradation of the same peptide, two lysine or two lysine and two β Alanine were added to the N-terminal of Temporin B, two Glicine and one Tryptofano were added to the C-terminal of Royal-Jellin. Once we changed the amino-acid sequence of Temporin B, we carried out the study of secondary structure of TB wild-tipe and TB-KK by circular dichroism (CD) both in environments mimetic of bacterial membranes and in phosphate buffer.

All peptides were tested in vitro on bacteria Gram-positive and Gram-negative. These bacteria were *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* sv. paratyphi B, *Salmonella enterica* sv. typhimurium and *Escherichia coli*. Tests of antimicrobial activity, which have the purpose of assessing the therapeutic index of peptides, allowed us to establish the Minimal Inibition Concentration able to give 100% of inhibition of microbial growth after 16 hours of observation (MIC100). For the peptides used in combination, the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) was also calculated as an index of synergy. The antimicrobial activity was also analysed using the alone assay on Petri plates of LB agar medium. The peptides were also made fluorescent to perform imaging studies, using Microscopy of Fluorescence (MOF). The Temporin A was linked to rhodamine isothiocyanate (TA-Rho) and Temporin B to fluorescein isothiocyanate (TB-FITC). Then they were observed in both single and combined conditions. The peptide action on biological membranes was also observed by scanning electron microscopy (SEM).

The in vivo assays were performed using albino mice as model organisms of the strain BALB/c aged between 4 and 8 weeks and weight of 25-30 g. The mice were infected with a lethal concentration of bacteria (10^7 CFU/mouse for *Staphylococcus aureus* and 10^6 CFU/mouse for *Salmonella enterica* sv. Paratyphi B), immediately after infection, the mix of Temporin A and Temporin B modified at the C-terminal (TAwt 75-100 μ g/mouse + TB-KK 35 μ g/mouse) was given to them. The survival of animals and bacteria in target organs was monitored for 30 days, either through microbial counts and through observation of the colonies on the tissue of the body (the bacterium *Salmonella enterica* sv. Typhimurium was transformed with the gene coding for GFP). Hemolysis assays were performed on blood cells, to highlight the lack of toxicity of the peptides tested against eukaryotic cells. It was also analysed blood count with differential count of the animals, which was compared with the reference standard in order to test abnormalities. Finally, it was evaluated the ability of the peptides to act in the short and long term in the modulation of inflammatory phase proteins such as cytokines (IL4, IL6, TNF- α and INF- γ), one of the main leaders of the pathophysiology of inflammation and sepsis. These proteins were

evaluated by analysis of cDNA, obtained from RNA of cells of target organs and analysed by RT-PCR. The same set of experiments was also performed in vivo distancing temporally (of 6 days) the infection of the animals with sub-lethal doses of bacteria (10^6 CFU/mouse for *Staphylococcus aureus* and 10^5 CFU/mouse for *Salmonella enterica* sv. paratyphi B) from the administration of the mixture of peptides. In this case, the survival of animals, microbial load in target organs and the development of pro-inflammatory cytokines IL4, IL6, TNF- α and INF γ were also monitored.

In their natural form both Temporin A and Temporin B tested in vitro, were found to be more active against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) than against Gram-negative (*Salmonella enterica* sv. paratyphi B, *Salmonella enterica* sv. typhimurium and *Escherichia coli*). Moreover the antimicrobial activity of the Royal-jelline was tested individually in their natural form or in chemical modifications on the same bacteria, finding that the Royal-jelline wild tipe were less active than the modified form (RJ-GGY). The CD spectra of Temporin B peptides and their modified analogues showed that both peptides have a peak, that is indicative of the random-coil conformation in aqueous environment, and assume a helical conformation in the presence of mimetic compounds of biological membranes. Thus the Temporin B seems to act on the acid component of membrane phospholipids. The activity assays carried out on modified Temporin B (TB-KK) showed the lowering of the MIC for antimicrobial activity, particularly against Gram-negative bacteria. Furthermore the alone assays confirmed the ability of peptides to inhibit bacterial growth in plate.

Similarly, various combinations of wild-tipe Temporin A, modified Temporin B (TB-KK and TB-KK β A β A) and modified Royal-Jellins (RJ1-GGY) tested in vitro showed that the peptides mix have a synergistic action against various bacteria, with a FIC index lower than 0.5. The bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* sv. paratyphi B were used for observation of the MOF of peptides mix TAwt and TB-KK and this shows that the peptides position themselves in correspondence with the bacterial membranes. Then SEM images were obtained, they showed the ability of the mix of Temporin to drill the bacterial membrane, In fact we can see the damage to the bacterial surface leading and the overflow of the cytoplasmic liquid. These two bacteria were also used in subsequent experiments in vivo to evaluate the therapeutic activity in the model organism.

Before to give the mix, it was satisfied that there was not an hemolytic activity observed for the analysed peptides. The thresholds were: 35 μ g/ml for TB-KK β A β A and 30 μ g/ml for TB-KK. The treatment of mice with Temporin mix (TA-wt 75-100 μ g/mause and TB-KK 35 μ g/mouse) for both bacteria showed an increase of survival of infected mice of 100% and lowering the microbial load in target organ such as kidney for *Staphylococcus aureus* and the liver and intestinal tract to *Salmonella enterica* sv. paratyphi B. Mice infected and treated after 24 hours showed all the symptoms of inflammation due to infection (swelling of the spleen, liver and mesenteric lymph nodes) while animals treated with the mixture of peptides do not show such symptoms. The disappearance of colonies on the target organs and tissues of animals infected with *Salmonella enterica* sv. Typhimurium GFP and then treated was then observed. The blood cell count of the infected and treated mice did not show a significant alteration of the total number of red and white blood cells. It was not had a change in the expression levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, IL-4, INF γ on the contrary was had in untreated specimens. These levels remain constant and this indicate a more balance between TH1 and TH2. Thus the

mixture of Temporin would appear modulate the expression of these pro-inflammatory cytokines by decreasing the inflammatory action in the animal. For long-term experiments (after 6 days of infection with sub-lethal dose of bacteria), both bacteria sterilization of the organs of animals after 5 days of peptides administration and a gradual decrease in the levels of cytokines (TNF- α , IL-6, IL-4, INF- γ) until the same levels of expression of not infected mice were obtained.

In particular, thanks to this study, we can say that the peptides Temporin A, Temporin B and Roiale-jellina1 have a powerful antimicrobial activity: The TAwT and TBwT showed a bacteriostatic/bactericidal activity on Gram-positive (10-30 $\mu\text{g/ml}$) and on Gram-negative bacteria (125 to 400 $\mu\text{g/ml}$) already after 4 hours; The TB changed to N-terminal (TB-KK and TB-KK $\beta\text{A}\beta\text{A}$) was more effective against Gram-negative bacteria (10 - 25 $\mu\text{g/ml}$) compared to TBwT activity (125 to 400 $\mu\text{g/ml}$); the RJ1 modified in C-terminal (RJ1-GGY) was more effective (30 to 200 $\mu\text{g/ml}$) than RJ1wt (400 to 800 $\mu\text{g/ml}$).

There was evidence of two synergies: TAwT + TB-KK and TB-KK + RJ1- GGY. We showed that non-toxic doses of TAwT + TB-KK *in vivo* are able to reduce the mortality of individuals, to reduce the microbial growth in organs and to interact with the inflammatory response acquired, modulating the inflammation. The AMPs could be potential therapeutic agents to combat bacterial infections especially of antibiotic-resistant strains and against sepsis, or as natural preservatives in the manufacture of food products with increased shelf-life.

1. INTRODUZIONE

1.1 ANTIBIOTICO RESISTENZA

Nel secolo scorso l'impiego di antibiotici è risultato estremamente importante per combattere le infezioni causate dai batteri, trattando efficacemente malattie gravi, anche mortali. Negli ultimi decenni però, il loro utilizzo, inappropriato ed eccessivo, in medicina umana, veterinaria e in agricoltura ha portato allo sviluppo di microrganismi resistenti ai farmaci e ad un rapido aumento della loro frequenza.

L'antibiotico-resistenza, sta diventando un grave problema di salute pubblica, sempre più sentito in ambiente sanitario. La maggior parte dei ceppi batterici è resistente ad un gran numero di agenti antimicrobici di uso più comune, come i macrolidi, gli aminoglicosidi e le cefalosporine di ultima generazione. Hanno destato preoccupazione, le conseguenze dovute alla comparsa in ambiente ospedaliero di ceppi di del batterio *Staphylococcus aureus* meticillina-resistenti (MRSA). Il problema del trattamento di gravi infezioni da ceppi meticillina-resistenti è stato efficacemente risolto ricorrendo all'utilizzo di un altro antibiotico: la vancomicina. Di recente però ceppi di *Enterococcus* e *Staphylococcus* sono diventati resistenti alla vancomicina.

Nel 2009 il rapporto dell'Ecdc (*European Centre for Disease Prevention and Control*) e dell'Emea (*European Medicines Agency*), ha messo in luce la grave disparità esistente tra l'aumento della frequenza di ceppi dell'antibiotici-resistenti e la produzione di nuovi farmaci in grado di affrontare tale emergenza. Secondo questo rapporto la resistenza agli antibiotici è in rapida ascesa, ed interessa sia batteri Gram-positivi che Gram-negativi. Essa raggiunge e addirittura supera il 25% in diversi Paesi dell'Unione Europea. Di particolare importanza, risulta anche l'aumento crescente della resistenza dell'*Escherichia coli* agli antibiotici comunemente usati.

L'antibiotico-resistenza ha grande rilevanza anche dal punto di vista alimentare, si pensi alle tossinfezioni alimentari di cui è responsabile alla *Salmonella*. Secondo l'Ecdc (*Centro Europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie*), l'Efsa (*Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare*), l'Emea (*Agenzia Europea per i Medicinali*) e lo Scenihl (*Comitato Scientifico sui rischi per la salute emergenti*), nel rapporto condiviso e presentato nel "**Joint Opinion on antimicrobial resistance (Amr) focused on zoonotic infections**" (2009), la Salmonellosi è la seconda tossinfezione alimentare più diffusa nell'uomo. L'Efsa riporta che dal 2005 al 2006 la resistenza all'acido nalidixico in *Salmonella enterica* è cresciuta dal 13% al 15%, mentre la resistenza alla ciprofloxacina si è mantenuta stabile tra lo 0,4% e lo 0,6%. Nonostante ciò la globalizzazione e l'apertura delle frontiere commerciali dei prodotti alimentari verso nuovi Paesi nel mondo, rende difficile la comparazione dei dati dello sviluppo di antibiotico-resistenza.

Analizzando le cause che inducono i batteri patogeni a sviluppare resistenza è possibile identificare i processi più importanti:

1. Il farmaco non raggiunge il suo bersaglio;
2. Il farmaco viene disattivato;
3. Il bersaglio risulta alterato.

Attualmente si è alla ricerca di molecole con attività antimicrobica in grado di eludere questi meccanismi e per questo i peptidi antimicrobici si sono rivelati interessanti. Essi non consentono la selezione di nuovi mutanti resistenti, e sono attivi anche contro ceppi batterici resistenti (*Thevissen et al., 2000; Ghiselli et al 2002*).

La loro capacità è dovuta al fatto che hanno come bersaglio la membrana cellulare batterica, e questa struttura è altamente conservata. Una mutazione genetica in grado di ridisegnarne la composizione lipidica sarebbe una soluzione altamente costosa dal punto di vista evolutivo per la cellula batterica, e quindi di difficile realizzazione. Anche la distruzione del peptide ad opera di proteasi è un processo difficile da realizzare perché questi peptidi non contengono nessuna sequenza segnale che possa differenziarli da altre proteine cellulari (*Zasloff, 2002*).

Lo studio di peptidi antimicrobici presenti in natura, isolati da organismi viventi di origine sia animale che vegetale, rappresenta una nuova strategia contro la minaccia microbica.

1.2 PEPTIDI NATURALI AD ATTIVITA' ANTIMICROBICA

Lo sviluppo di molecole in grado di difendere l'uomo da agenti patogeni è in continua evoluzione. Negli ultimi anni la ricerca si è rivolta verso peptidi antimicrobici presenti in natura, AMP (Antimicrobial peptides) che appartengono al sistema immunitario innato, in grado di esercitare un'azione antimicrobica contro diversi patogeni dannosi per la salute dell'uomo e per la qualità degli alimenti.

Gli AMP di origine naturale sono piccole molecole di lunghezza variabile, contenenti dai 10 ai 50 amminoacidi. Essi costituiscono la prima linea di difesa degli organismi contro una grande varietà di agenti esterni (*Boman H.G. 2003*) ed hanno una doppia valenza, perché oltre a proteggere circa l'80% delle specie animali inferiori e tutte le piante dall'attacco dei patogeni, giocano un ruolo importante anche nell'immunità degli organismi superiori collegando i meccanismi delle immunità innata ed acquisita (*Vizioli et al., 2002*). Hanno un ampio spettro di azione e agiscono a livello delle membrane cellulari batteriche con meccanismi diversi da quelli dei comuni farmaci, nei confronti delle quali difficilmente i batteri sviluppano meccanismi di resistenza (*Thevissen et al., 2000; Boman H.G. 2003, Levy et al. 2004*). La loro sintesi è di tipo ribosomiale, a differenza di quella degli antibiotici classici realizzati da funghi e procarioti che comprende una serie di passaggi successivi catalizzati ognuno da un enzima particolare (*Papagianni et al 2003*). Oltre all'attività battericida gli AMP presentano anche una attività antivirale, antifungina (*Lai Y. et al., 2009*) antitumorale (*Tomasinsig L. et al., 2006*) e immunomodulatoria (*Jerala R. et al., 2004; McPhee et al., 2005*).

Negli ultimi 15 anni molti peptidi antimicrobici sono stati caratterizzati e isolati da una serie di organismi come piante, invertebrati, anfibi e mammiferi. Molti di essi

sono localizzati in epitelio di piante, insetti o mammiferi, in quei tessuti in cui sono più frequenti le invasioni da patogeni (*Schroder et al., 1999*). Altri possono abbondare in cellule circolanti come in granuli emocitari rilasciati nel plasma dopo stimolazione batterica o nei leucociti dei mammiferi (Toh et al., 1991). L'immunità innata peptidomediata ha il vantaggio di possedere un basso costo di produzione, in termini di tempo e di energia, ed una rapida velocità di risposta e differisce dall'immunità adattativa, presente soltanto negli organismi più complessi, quali i vertebrati, basata essenzialmente sull'azione delle immunoglobuline e dei linfociti (*Zasloff M. et al., 2002*).

Il sistema di difesa degli AMP è stato oggetto di studio a partire dagli anni '60, quando furono descritte per la prima volta le defensine, una famiglia di proteine antimicrobiche ubiquitarie (*Zeya et al. 1966*). Da allora, molti altri peptidi antimicrobici, con effetti simili, sono stati scoperti, caratterizzati e isolati da un elevato numero di organismi viventi. Ad oggi più di mille peptidi sono stati isolati da una serie di organismi filogeneticamente lontani tra loro (*Wang et al., 2009*).

1.2.1 La scelta degli AMP

I peptidi antimicrobici del sistema immunitario innato sono considerati potenziali agenti antimicrobici per sviluppo di nuove applicazioni utili alla tutela della salute dell'uomo, poiché essi potrebbero diventare un'arma efficace contro gli attacchi batterici. Gli AMP giocano dunque, un ruolo chiave nella difesa dell'organismo, disponendo e sviluppando misure protettive contro le infezioni e organizzando diverse strategie di difesa contro i patogeni. Diverse sono le caratteristiche che rendono i peptidi antimicrobici potenziali strumenti terapeutici:

- a) dimostrano specificità verso le cellule procariotiche;
- b) mostrano ampio spettro d'azione contro virus, batteri, funghi e protozoi;
- c) manifestano sinergie con gli antibiotici convenzionali (*Fassi et al 2006; Lüders et al 2003*) e con altri peptidi antimicrobici (*Capparelli et al. 2009*);
- d) manifestano sinergie con il sistema immunitario acquisito (Tossi et al., 2002);
- e) sono efficaci contro batteri resistenti agli antibiotici, non causano la selezione di nuovi mutanti resistenti.

1.2.2 Selettività e ampio spettro di attività degli AMP

La specificità degli AMP verso le cellule procariotiche rispetto alle cellule eucariotiche, è una caratteristica molto importante. Il peptide è in grado di agire selettivamente in quanto ci sono delle differenze di carica e di composizione tra le membrane citoplasmatiche degli eucarioti superiori e quelle dei procarioti e dei funghi. Le membrane cellulari batteriche risultano infatti formate principalmente da una notevole quantità di fosfolipidi, quali fosfatidilserina, fosfatidilglicerolo e bisfosfatidilglicerolo che sono carichi negativamente (*Gidalevitz et al., 2003*), mentre le membrane delle cellule eucariotiche sono composte da fosfatidilcolina, sfingomielina e colesterolo, tutte molecole che a pH fisiologico presentano carica neutra (*Yeama et al., 2003*).

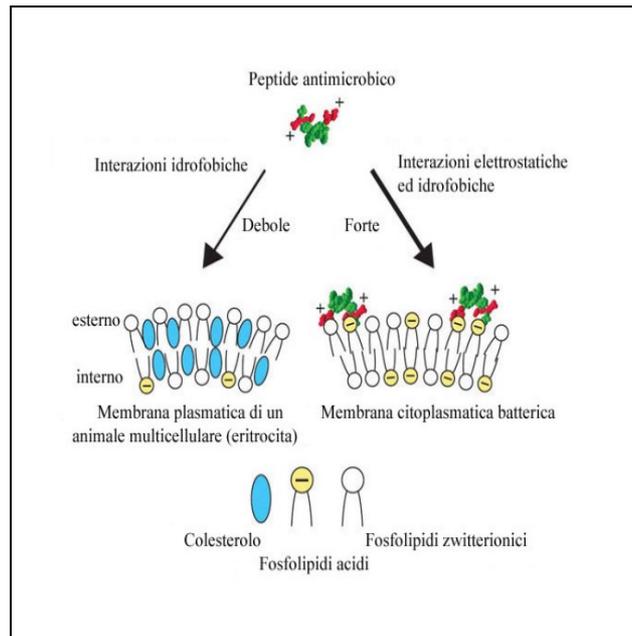


Figura 1: Differenza nella composizione della membrana citoplasmatica di organismi eucariotici e procariotici. A tali differenze è imputabile il meccanismo di selettività dei peptidi antimicrobici

La maggior parte degli AMP possiedono carica netta positiva per la presenza di residui basici distribuiti lungo la catena peptidica. Tale carica positiva consentirà ai peptidi di formare dei legami di natura elettrostatica con i fosfolipidi anionici presenti sulle membrane microbiche (Shai et al 1996; Oren et al, 1998; Maher et al., 2006). Un'altra caratteristica che incide sulla selettività dei peptidi antimicrobici è il basso potenziale transmembrana delle cellule eucarioti, -15 mV, a fronte di un valore di -140 mV per le cellule procariote, (Hancock & Diamond, 2000).

Sebbene l'azione degli AMP risulti selettiva essa può essere considerata ad ampio spettro poiché si esplica su un'ampia gamma di organismi, batteri Gram-positivi e Gram-negativi, ma anche su virus, funghi e protozoi patogeni e persino contro cellule tumorali (Hoskin et al., 2008) in quanto essi agiscono secondo un meccanismo d'azione che non comprende una classica interazione molecola-recettore (Bulet et al., 2004).

1.2.3 Velocità di azione degli AMP

I peptidi dell'immunità innata sono in grado di agire contro gli agenti infettanti in maniera rapida. Nei mammiferi agiscono ancor prima che la risposta anticorpale o cellulo-mediata sia stata attivata completamente, i batteri sono già uccisi dopo 20 minuti dal trattamento con gli AMP (Piers et al., 1994). Per la maggior parte degli insetti si è evidenziato che il livello di peptidi antimicrobici in circolo è relativamente basso in condizioni normali e che esso aumenta rapidamente anche di cinque volte in poche ore solo dopo l'esposizione a contaminati patogeni (Hoffmann, 1996; Levy et al., 2004). Per altre specie, come i molluschi e gli anfibi, i peptidi dell'immunità innata sono sempre presenti ad una concentrazione elevata nell'organismo, anche in assenza di un insulto esterno, in quanto una piccola variazione dei parametri

ambientali può indurre una risposta immunitaria (*Mitta et al., 2000; Malagoli et al., 2007*).

1.2.4 Capacità di interazione degli AMP con altre molecole

I peptidi antimicrobici sono capaci interagire con altre molecole, siano esse antibiotici convenzionali o altri peptidi antimicrobici (*Hancock & Diamond, 2000; Rosenfeld et al., 2006*). In natura alcuni AMP sono presenti in più isoforme prodotte all'interno dello stesso tessuto, ma non tutte con la stessa attività antimicrobica. La produzione di un gran numero di AMP strutturalmente simili all'interno dello stesso organismo è una strategia naturale per aumentare lo spettro di attività antimicrobica. Alcuni peptidi mostrano da soli un'attività antimicrobica buona, altri da soli si mostrano completamente incapaci di agire su batteri ma possono presentare una rilevante attività antimicrobica se utilizzati in combinazione con tra loro o con altri peptidi (*Scott et al., 1999*).

1.2.5 Azione nei confronti di setticemie e della sepsi

Gli AMP possono direttamente distruggere i patogeni ma possono anche modulare le risposte del sistema immunitario (*Scott 2007*).

Gli organismi viventi superiori si difendono dall'attacco di agenti estranei mediante due tipi di risposte quella dell'immunità "innata" ed dell'immunità "acquisita". L'immunità innata rappresenta un meccanismo di difesa preesistente all'incontro con il patogeno, mentre l'immunità acquisita è l'espressione di uno stato di resistenza all'azione di agenti esterni (antigeni) sviluppata in seguito al loro contatto con l'ospite. I peptidi antimicrobici sono parte dell'immunità innata, e si attivano prima della risposta immunitaria acquisita, cooperando poi con le molecole della stessa (*Tossi e Sandri, 2002*).

Oltre all'attività antimicrobica diretta, gli AMP possono attivare la chemiotassi, la neutralizzazione degli effetti delle citochine e la stimolazione di cellule del sistema immunitario, come i monociti circolanti e le cellule che presentano l'antigene (APC). Sono in grado di modulare la produzione di citochine e la liberazione di istamina, e di migliorare l'angiogenesi, accelerando la guarigione delle ferite (*Salzet et al., 2002; Chen et al., 2004*). La correlazione tra la gravità della malattia e il livello di produzione degli AMP è stata dimostrata in diversi studi, così come l'espressione aumenta di molti AMP durante l'infezione e l'infiammazione (*Bals et al., 1999; Schittek et al., 2008; Niyonsaba et al., 2009*). Tutti questi fattori rendono gli AMP in grado di modulare la risposta infiammatoria contrastando e riducendo le complicanze della sepsi, sindrome clinica caratterizzata dalla presenza sia di infezione che di una risposta infiammatoria sistemica esagerata, sia chimica che cellulare (SIRS, definizione dell'*International Sepsis Definitions Conference, Levy et al., 2001*), e questo stato di iperattività del sistema immunitario può evolversi fino a condurre l'individuo alla morte.

A causa della sua natura particolarmente aggressiva e multifattoriale, la sepsi costituisce la principale causa di decessi nelle terapie intensive, con tassi di mortalità

dal 20% per la sepsi al 60% per lo shock settico (Bone R C et al., 1992). Negli Stati Uniti l'incidenza della sepsi è 240 per 100 000 abitanti che costituisce un enorme aumento dei costi di ricovero e cura, e la mortalità va dal 25% al 70%, a seconda della gravità (Feezer et al 2006). Il trattamento della sepsi in maniera rapida e tempestiva permette di aumentare notevolmente la possibilità di sopravvivenza dei pazienti colpiti da questa patologia.

1.3 MECCANISMO D'AZIONE DEI PEPTIDI ANTIMICROBICI

Lo studio del meccanismo d'azione degli AMP è di fondamentale importanza per comprendere come possano interagire i peptidi antimicrobici con le membrane batteriche. La composizione lipidica della membrana batterica potrebbe modulare l'interazione dei peptidi con le membrane stesse modificando le caratteristiche chimico-fisiche. Il meccanismo con cui i peptidi interagiscono con le membrane lipidiche è stato già oggetto di studio.

Anche la sequenza amminoacidica del peptide ha un ruolo rilevante, la presenza di un amminoacido rispetto ad un altro potrebbe essere in grado di rendere il peptide più o meno attivo contro i microrganismi patogeni (Zhao et al. 2002). Da precedenti studi è stata rilevata l'esistenza di un rapporto soglia tra la concentrazione di peptide e la concentrazione di lipidi di membrana al di sopra del quale le molecole di peptide formano dei pori sulla superficie della cellula (Boman et al., 1994), comportando un abbassamento del gradiente protonico, la fuoriuscita di molecole dal citoplasma, il blocco della produzione di ATP e il rallentamento di altri processi metabolici fino alla morte della cellula microbica (Huang, 2000).

Sembra che ci sia dapprima un'associazione tra i peptidi e la superficie della membrana batterica, determinata da interazioni elettrostatiche (Zhao et al., 2001). Tali interazioni dipendono dalla tipologia di amminoacidi (anionico o cationico) della sequenza peptidica, e dalla struttura della superficie batterica che risulta infatti differente tra i batteri Gram-positivi che possiedono una capsula polisaccaridica e acidi teicoici e lipoteicoici, e i batteri Gram-negativi con fosfolipidi anionici e lipopolisaccaridi (LPS). Quando le interazioni elettrostatiche non si possono instaurare a causa dell'elevata distanza tra i gruppi carichi, la struttura secondaria del peptide (α -elica o β -foglietto) gioca un ruolo importante. Molti peptidi non hanno preferenze conformazionali in soluzione, ma assumono una struttura a loro caratteristica in prossimità della membrana batterica mediante un meccanismo di ripartizione-ripiegamento.

Studi recenti hanno mostrato numerose ipotesi di interazione specifica con la membrana batterica, dovute alla struttura anfipatica del peptide (Yang et al., 2001), alla perdita di potenziale elettrico negativo della membrana che porta alla formazione di canali ionici (Westerhoff et al., 1989; Vaz Gomes et al., 1993), o all'attivazione di idrolasi che degradano la parete cellulare (Bierbaum et al., 1985).

Sono stati sviluppati tre diversi e più importanti modelli di interazione: il modello "barrel-stave", e "carpet-like" a cui in un secondo momento si è aggiunto il modello "toroidal pore".

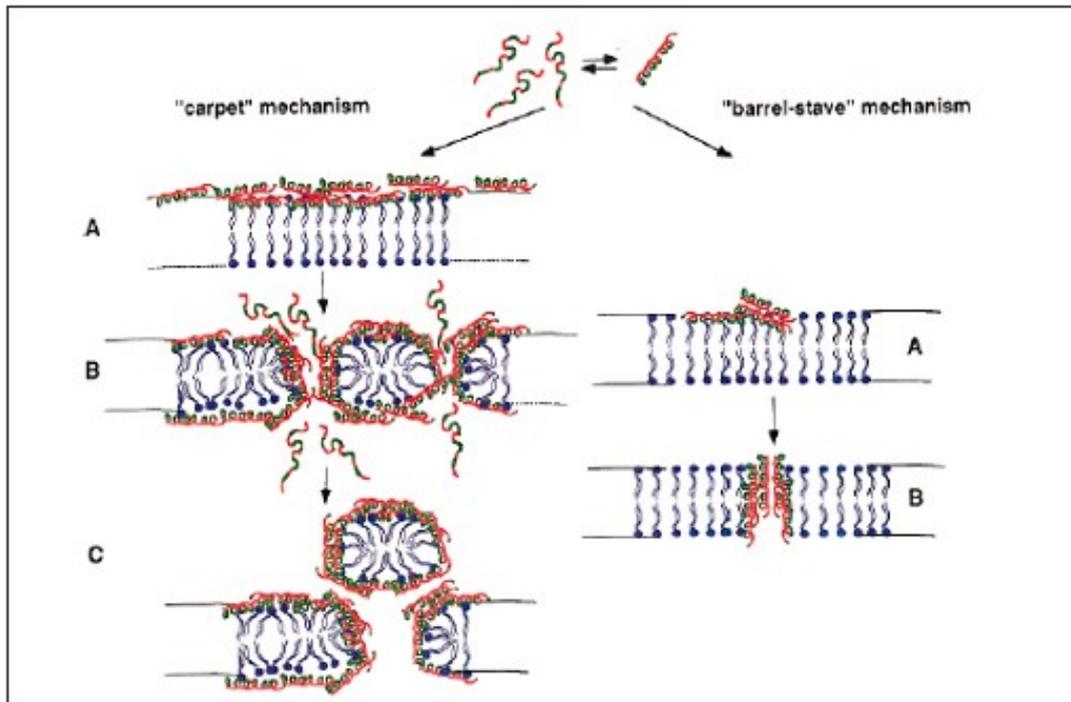


Figura 2: Possibili meccanismi d'azione dei peptide ad attività antimicrobica. (Oren, Z. & Shai, Y. 1998).

Il modello "barrel-stave" prevede la formazione di un poro nel cuore idrofobico della membrana, che sono creati mediante un assemblaggio circolare di peptidi in modo che i loro domini idrofobici puntino verso le catene lipidiche della membrana.

Il modello "carpet-like" prevede inizialmente un'associazione del peptide con la superficie della membrana. Quindi la regione carica del peptide interagisce con i fosfolipidi anionici della membrana e tali interazioni determinano la rottura dell'impaccamento lipidico ed il disfacimento della struttura (Oren et al., 1998; Shai et al 2002).

Il modello "toroidal pore", presenta anch'esso la formazione di pori nella membrana, ma in questo caso i fosfolipidi si curvano completamente nel doppio strato, andando da un lato all'altro e le teste polari formano dei contatti con i peptidi inseriti attraverso la membrana. In questo processo le linee del doppio strato diventino una struttura continua (Matsuzaki et al, 1996).

Il modello "toroidal pore" è una ipotesi intermedia tra i due modelli precedentemente descritti, ed in alcuni casi è difficile stabilire una distinzione netta tra i vari modelli. Inoltre, molti AMP hanno una azione detergente ad elevate concentrazioni, indipendentemente dal meccanismo d'azione che si ha a bassa concentrazione (Sato e Feix, 2006; Chang et al., 2008).

Nel modello "barrel-stave" e "toroidal pore" il peptide inserendosi nella membrana a livello transmembrana causa un riarrangiamento delle teste polari dei fosfolipidi che devono fare spazio alla parte idrofobica del peptide, e pertanto possono essere trasferite all'interno della membrana. È noto che i residui di Tirosina e Triptofano, presenti al C-terminale o al N-terminale e non nel segmento centrale del peptide, danno un'elevata tendenza a ripartirsi all'interfaccia favorendo la realizzazione del modello "barrel-stave". Anche i tratti ad α -elica favoriscono il meccanismo "barrel-stave", in cui i residui vengono giustamente direzionati. Così non vengono formati

solamente dei pori ma dei fasci di eliche che interrompono il *continuum* della membrana.

Nel modello “carpet-like” non occorre una riorganizzazione della membrana. La tipologia degli aggregati è meno definita, per cui è più difficile prevedere quali proprietà molecolari possano favorire il meccanismo. Sicuramente l’interazione potrebbe dipendere dalla struttura del peptide e dai meccanismi di ripartizione-ripiegamento. Inoltre amminoacidi come Triptofano sono in grado di aumentare l’affinità di legame alla membrana, ed esercitano un effetto stabilizzante sulla struttura secondaria (Herbig et al., 2005).

Altri meccanismo d’azione potrebbero riguardare l’interazione dei peptidi con molecole presenti nella cellula o con recettori di membrana, in grado di causare l’inibizione della sintesi del DNA o l’alterazione dell’attività enzimatica e delle proteine batteriche, eventi che possono provocare la morte cellulare o almeno l’inibizione della replicazione batterica (Park et al., 1998).

1.4 CLASSIFICAZIONE DEI PEPTIDI ANTIMICROBICI

Pur variando considerevolmente nella dimensione e struttura secondaria, i peptidi antimicrobici presentano caratteristiche comuni; la maggior parte presenta una carica netta positiva a pH neutro e la tendenza a formare strutture anfipatiche in ambiente idrofobico, caratteristiche che consentono ai peptidi di interagire con la membrana cellulare e distruggerne le normali funzioni formando canali ionici o pori, dissolvendo la membrana come se fossero dei detergenti, o determinando la comparsa di danni nella membrana stessa (Rinaldi A.C. et al., 2002).

Gli AMP derivano da pro-peptidi di circa 60-170 amminoacidi e sono rilasciati poi in forma matura in seguito all’azione di specifiche proteasi che producono sequenze amminoacidiche di un numero variabile di residui che va dai 10 ai 40 (50) amminoacidi (Gautier, M.F. et al., 1994).

La maggior parte dei precursori contiene:

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

La specificità dei peptidi antimicrobici si basa sulle differenze in carica e composizione lipidica tra le membrane delle cellule procariotiche e le membrane delle cellule eucariotiche. La membrana delle cellule eucariotiche è ricca di lipidi zwitterionici mentre quella delle cellule procariotiche è ricca di lipidi carichi negativamente che possono essere legati dai peptidi antimicrobici cationici. Sono stati anche isolati peptidi anionici estratti da fluidi broncoalveolari, che agiscono in presenza di zinco come co-fattore, attivi contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi, inclusa *P.aeruginosa* (Brogden K.A. et al., 2007).

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

- 1) 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):
- 2) peptidi che contengono un'alta percentuale di aminoacidi specifici (PR-39, apidecina e i peptidi bovini ricchi in prolina e arginina Bac5 e Bac7);
- 3) peptidi lineari, che si strutturano ad α -elica in ambiente idrofobico e che non hanno preferenze conformazionali in una soluzione tampone sodio fosfato.

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), (*Steiner et al., 1981; Demchenko et al., 1986; Zasloff et al., 1987; Mor et al., 1991; Mignogna et al., 1993*).

Alcuni peptidi antimicrobici sono coinvolti in diversi sistemi di difesa naturale dell'ospite. Ad esempio le puroindoline, proteine antimicrobiche del grano, facenti parte della famiglia delle defensine, sono dotate di doppia funzione: oltre a possedere un'attività antimicrobica contro diversi tipi di parassiti e funghi delle piante (*Dubreil et al., 2002; Capparelli et al., 2005; Capparelli et al., 2006*), sono anche responsabili dell'hardness delle cariossidi del grano (Giroux & Morris, 1997 e 1998).

1.5 SELEZIONE DEI PEPTIDI

Data la vastità del campo di indagine è stata effettuata una ricerca per valutare quali fossero i peptidi con le caratteristiche migliori da poter prendere in considerazione. Si è scelto di puntare l'attenzione su quei peptidi che presentassero piccole dimensioni, con una sequenza lineare e una struttura ad α -elica. Queste sono infatti le principali caratteristiche affinché essi possano essere incorporato nella membrana lipidica. Per cui oltre la scelta del peptide era importante stabilire anche quale delle sue isoforme potesse essere presa in considerazione. Nello specifico, sono stati scelti:

- Temporina A e B (TA - TB)
- Royal-jelline (RJ1 - RJ2 - RJ3).

Si è quindi proceduto ad effettuare un'analisi accurata delle caratteristiche dei peptidi. Su tali presupposti, è stata effettuata la progettazione di analoghi di peptidi, la loro sintesi chimica, caratterizzazione e analisi dell'attività antimicrobica.

1.5.1 Le Temporine

Le Temporine sono peptidi anfipatici, costituiti da 10-14 amminoacidi, prodotti dalle ghiandole granulari e rilasciati nella pelle della rana rossa europea (*Rana Temporaria*) (*Simmaco et al., 1996*).

Questi peptidi tendono ad assumere una struttura elicoidale a contatto con membrane batteriche. Sebbene non siano stati ancora del tutto chiariti i meccanismi d'azione delle Temporine si ipotizza che tale caratteristica sia responsabile della la formazione di pori sulla membrana batterica.

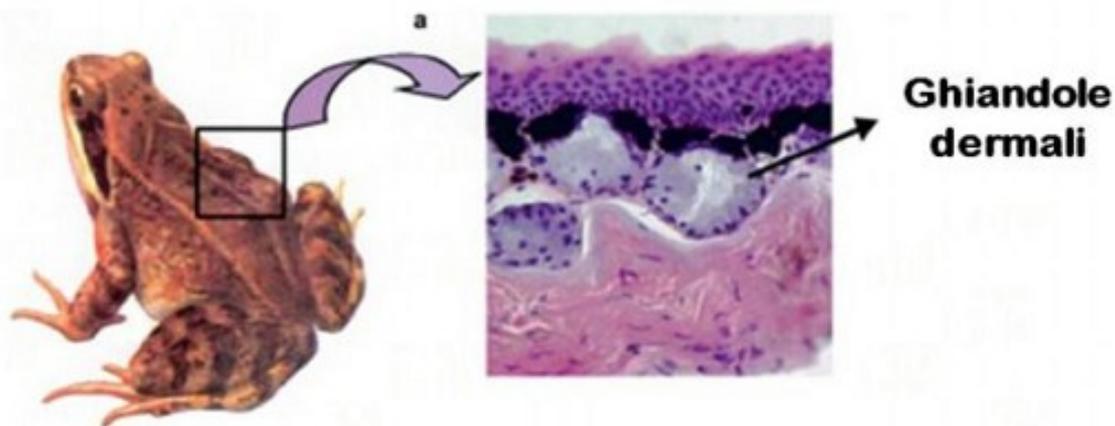


Figura 3: Ghiandole dermali di *Rana Temporaria*

Le Temporine presentano una carica netta positiva, che varia da +1 a +3 a pH neutro, dovuta alla presenza di 1 o 2 residui basici, a seconda dell' isoforma isolata che determina una differenza nella capacità antimicrobica del peptide (Mangoni et al., 2000). Le Temporine sono attive prevalentemente nei confronti dei batteri Gram-positivi, tra cui gli *Staphilococchi* ed *Enterococchi* meticillina e vancomycine-resistenti. La isoforme A, B ed L sono le più attive, ma la Temporina L è l'unico membro della famiglia che mostra un'attività antibatterica sia contro i Gram-positivi che contro i Gram-negativi (Giacometti et al., 2006).

Peptide	Sequenze
Temporina A	FLPLIGRVLSGIL-La
Temporina B	LLPIVGNLLKSL-La
Temporina C	LLPILGNLLNGL-La
Temporina D	LLPIVGNLLNSL-La
Temporina E	VLPIIGNLLNSL-La
Temporina F	FLPLIGRILNGIL-La
Temporina G	FFPVIGRILNGIL-La
Temporina H	LSP---NLLKSL-La
Temporina K	LLP---NLLKSL-La
Temporina L	FVQWFSKFLGRI-La

Tabella 1: Sequenze peptidiche delle varie isoforme di temporina. Da letteratura, quelle che risultano avere un'azione antimicrobica più marcata sono la Temporina A, B ed L (modificata da Simmaco et al., 1996).

La sintesi dei peptidi è regolata dal fattore NF- κ B/I κ B α stimolata dalla presenza di microrganismi patogeni (Mangoni et al., 1998) che rende tali molecole in grado di controllare la flora naturale degli animali (Boman, 2000).

Visualizza dizionario dettagliato

La Temporina A (FLPLIGRVLSGIL-NH₂) e Temporina B (LLPIVGNLLKSL-NH₂), sono in grado di agire prevalentemente sui batteri Gram-positivi, su diverse specie di *Candida* e contro le due forme morfologiche di parassiti protozoi del genere *Leishmania* (Mangoni et al. 2004; Mangoni et al. 2005). Esse presentano una

sequenza amminoacidica costituita da 13 residui con una carica positiva netta a pH neutro pari a +2, mostrano inoltre una bassa tossicità verso le cellule eucariotiche (Mangoni et al., 2000).

1.5.2 Le Royaljelline

Le Royal-jelline di ape (*Apis mellifera*) fanno parte della famiglia MRJP come le proteine gialle della *Drosophila* (Albert & Kludiny 2004).

Sono peptidi presenti nella pappa reale, prodotta dalle ghiandole cefaliche delle api nutrici (*Apis mellifera*). Si tratta di piccole sequenze di circa 8-9 amminoacidi con carica netta positiva (+1 o +2) e con molti residui idrofobici. Si distinguono di peptidi di piccole dimensioni e sono presenti in natura diverse isoforme come la Royal-jellina-1 (PFKLSLHL-NH₂), la Royal-jellina-2 (TPFKLSLHL-NH₂) e la Royal-jellina-3 (EPFKLSLHL-NH₂). Tutte e tre dimostrano un'attività antimicrobica sia contro i batteri Gram-positivi e Gram-negativi, sia contro i funghi. Esiste anche una Royal-jellina-4 (TPFKLSLH-NH₂) ma questa, sembra non avere azione antibatterica. La sostanziale differenza tra le tre Royal-jelline sopra indicate e la Royal-jellina-4 consiste nella presenza di un residuo di Leucina in forma amidata al C-terminale nelle prime tre isoforme, l'ultima invece, la RJ4 presenta una Istidina al posto della Leucina al C-terminale e a questa sostituzione potrebbe essere dovuta la sua non attività (Fontana et al, 2004).

2. SCOPO DELLA TESI

2.1 OBIETTIVI DELLA RICERCA

La progettazione, la sintesi chimica e l'analisi degli aspetti conformazionali e dell'attività antimicrobiche, sia in vitro che in vivo, di AMP naturali di diversa origine (anfibi - Temporine / insetti - Royal-jellina) stati oggetto dello studio. Sono state valutate le attività sia su batteri di tipo nosocomiali (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), sia su batteri dannosi in campo agro-alimentare (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*), e in grado di causare nell'uomo tossinfezioni alimentari.

Sono stati studiati anche analoghi della T B e RJ con lo scopo di determinare quali fossero le caratteristiche chimico-fisiche coinvolti nel riconoscimento da parte del peptide del bersaglio, nel potenziamento della sua attività antimicrobica e nella riduzione dell'eventuale effetto citotossico.

2.1.1 Applicazioni in campo farmacologico

Lo scopo principale di questa ricerca è quello di identificare e testare i peptidi che presentano il migliore indice terapeutico sia per la protezione da infezioni batteriche sia dalle componenti stesse del batterio patogeno (quali LPS o acidi teicoici) che possono risultare tossici e che sono quindi considerati gli agenti primari della patogenesi della sepsi.

Per il campo farmacologico gli obiettivi da analizzare al fine di rendere queste molecole sicure per l'uomo sono molteplici. Infatti non è sufficiente ottenere informazioni riguardo l'azione dei peptidi sui ceppi batterici sia Gram-positivi che Gram-negativi di rilevante interesse clinico, andando ad evidenziare le capacità di interagire con le membrane biologiche dei batteri, in condizioni standard e visualizzare tali effetti tramite test in vitro, e di microscopia ottica ed elettronica. È necessario anche effettuare tutte quelle analisi che vanno a verificare se, e come il peptide possa interagire con le cellule dell'ospite.

Si è scelto di utilizzare un modello animale di infezione come *gold-standard* da rapportare alla patologia umana, per verificare la possibilità di utilizzare i peptidi studiati come terapia alternativa agli antibiotici attualmente in uso. Sono state effettuate esperimenti in grado di evidenziare la presenza del microrganismo patogeno infettante, sia a livello sistemico, sia la sua localizzazione a livello di organi

bersaglio. Si è proceduto poi con il saggiare l'effetto sinergico, in vitro ed in vivo, dell'attività antimicrobica dei peptidi più interessanti.

Infine è sembrato opportuno valutare la capacità del peptide di intervenire nella modulazione della risposta infiammatoria, di proteine della fase pro-infiammatoria e della fase acuta dell'infiammazione. In particolare sono state indagate l'espressione delle citochine da parte di cellule immunitarie, queste proteine sono considerate tra i maggiori indicatori della fisiopatologia dell'infiammazione e della sepsi.

La realizzazione di questi obiettivi permetterà di ampliare la conoscenza delle proprietà antimicrobiche ed antinfiammatorie degli AMP selezionati, per la progettazione di nuovi farmaci a base peptidica e con azione antinfettiva o antisettica da usare singolarmente o in combinazione.

2.1.2 Applicazioni in campo agro-alimentare

Un ulteriore obiettivo di questo studio è stato quello di ricercare studiare un'eventuale applicazione degli AMP in campo agro-alimentare. La ricerca degli ultimi anni si è rivolta con attenzione crescente verso la possibilità di ottenere cibi con un grado di sicurezza sempre maggiore, con l'obiettivo principale di ridurre quanto più possibile l'utilizzo di conservanti di sintesi e contemporaneamente aumentare la *shelf-life* dei prodotti alimentari.

Si propone quindi la possibilità di utilizzare gli AMP contro batteri che normalmente sono causa di infezioni e tossinfezioni alimentari nell'uomo che si possono sviluppare negli alimenti prima e durante le fasi lavorazione e di conservazione.

I peptidi antimicrobici possono essere utilizzati in associazione con film già adoperati in campo industriale, i quali possono essere edibili, derivati dell'amido e della cellulosa, estratti da piante e alghe o esopolisaccaridi (EPS) di origine microbica, oppure film plastici.

2.1.3 Altre applicazioni

La ricerca degli ultimi anni si è rivolta con attenzione crescente anche verso la possibilità di utilizzare gli AMP in numerosi campi correlati alle attività umane. Infatti molte infezioni croniche e acute delle vie respiratorie o dell'apparato laringo-faringeo come otiti, sinusiti, tonsilliti sono causate da agenti patogeni delle mucose in grado di formare biofilm (*Schillaci 2009*).

Anche la prevenzione di infezioni da batteri in grado di colonizzare ambienti a ridotta tensione di ossigeno quali quello dei cateteri intratecali suscita grande interesse. Infezioni da batteri patogeni Gram-positivi *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* rappresentano più del 50% delle specie isolate da pazienti con infezioni da dispositivo medico-associati (*Donelli et al., 2007*). La scoperta di agenti anti-infettivi attivi non solo contro i microrganismi planctonici, ma anche contro i biofilm rappresenta un importante obiettivo. L'uso di peptidi naturali da utilizzare singolarmente o in sinergia contro questa tipologia di patogeni può essere un nuovo ed interessante approccio per l'utilizzo degli stessi come agenti antimicrobici.

2.2 SEDE DI SVOLGIMENTO DEL DOTTORATO

Le attività di ricerca riguardanti i peptidi antimicrobici dell'immunità innata (AMP) sviluppate durante il percorso del Dottorato si collocano nell'ambito del progetto DEFENCE, un progetto più ampio che considera con grande interesse la possibilità di utilizzare gli antibiotici dell'immunità innata come farmaci per combattere le infezioni batteriche nell'uomo, al posto di quelli attualmente in uso. Il lavoro di ricerca è stata svolta presso il Laboratorio di Immunologia del Dipartimento di Scienze del Suolo delle Piante dell'Ambiente e delle Produzioni animali, della Facoltà di Agraria dell'Università "Federico II" di Napoli. Inoltre per rendere il lavoro più completo sono state effettuate delle collaborazioni con i Laboratori del Dipartimento di Scienze Biologiche dell'Università "Federico II" di Napoli dove è stata effettuata la sintesi dei peptidi studiati, e con l'Istituto Nazionale Tumori di Napoli " Fondazione G Pascale "

3. MATERIALI E METODI

3.1 SINTESI DEI PEPTIDI

I peptidi analizzati, la Temporina A e B e la Royal Jellina, sono presenti in natura rispettivamente nella pelle *Rana temporaria*, e nella pappa reale. Questi AMP possono essere isolati attraverso metodologie di purificazione da materiale naturale, non sempre facile da reperire. Si è ricorsi alla sintesi chimica, tecnica più semplice per ottenere il prodotto in breve tempo.

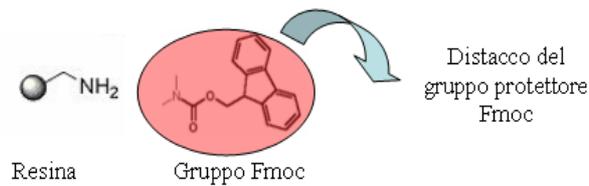
3.1.1 Sintesi in fase solida dei peptidi

I peptidi sono stati sintetizzati con sintesi in fase solida (*Merrifield R.B. 1963*), usando la chimica Fmoc (fluorenilmetilossicarbonile) che permette la protezione selettiva dei gruppi funzionali (*Coin et al., 2007*). Viene utilizzato un supporto polimerico non solubile, cioè una “resina solida”. Il peptide rimane adeso alla superficie del supporto per l'intera durata del ciclo di sintesi, permettendo di sostituire le operazioni di purificazione intermedie con semplici lavaggi in DMF (Dimetilformammide), all'interno di un piccolo reattore.

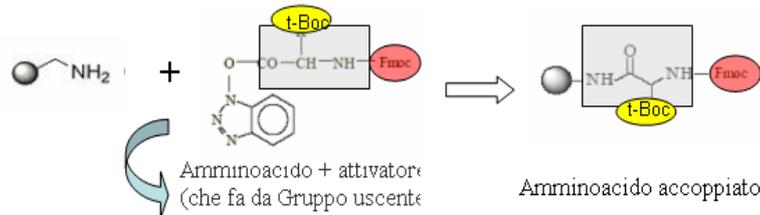
La resina utilizzata è la Rink-ammide-4-methyl (MBHA) da 0,63 mmol/g, prodotto dalla Novabiochem (Gibbs-town, NJ, USA), ed è rigonfiata con un solvente organico, **dimetilformammide** (DMF) della LabScan (Dublin, Ireland), con due lavaggi di flusso di 25 secondi ciascuno all'interno del reattore, dove avvengono tutti i successivi passaggi. I peptidi sono stati sintetizzati con cicli di accoppiamento, acetilazione e deprotezione dei gruppi funzionali.

Gli amminoacidi (10eq.) vengono preattivati per 5 minuti in presenza di N-Hydroxybenzotriazole 0,5 M (HOBT) (8eq) e O-benzotriazole-N,N,N',N',-tetrametiluronium-hexafluoro-fosfato (HBTU) (8eq) della Novabiochem (Gibbs-città, NJ, USA) in soluzione con DMF e N-diisopropylethylamine (DIPEA) (30eq) e accoppiati per 60 minuti. La copertura dei siti non reagenti (NH₂) viene effettuata con una soluzione di anidride acetica 15%, DIPEA 15% e DMF 70%, per 5 minuti, seguito da due lavaggi di flusso (25 secondi ciascuno) con DMF. La deprotezione viene eseguita con una soluzione di piperidina al 20% in DMF per 7 minuti. Alla fine della sintesi, la resina viene lavata con diclorometano (DCM) e asciugata sotto vuoto. I peptidi vengono separati dalla resina e allontanati i gruppi protettori presenti con un trattamento acido, una soluzione di acido trifluoroacetico (TFA), silano triisopropile (TIS) e acqua (90/5/5) per 90 minuti a temperatura ambiente. Tutti i restanti reagenti sono prodotti dalla Fluka (Milano, Italia).

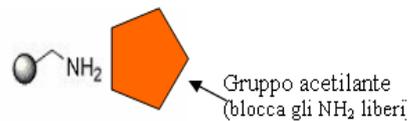
A: Deprotezione



B: Accoppiamento



C: Copertura



D: Distacco

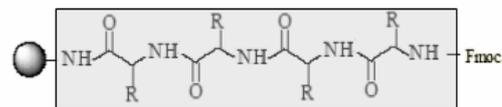


Figura 4: La sintesi in fase solida prevede la successione di tre fasi cicliche: A) Deblock o reazione di deprotezione, per allontanare il gruppo protettore Fmoc, lasciando così scoperto l'estremità N-terminale. B) Accoppiamento, stimolata da un attivatore (HOBt/HBTU) i quali si legano all'amminoacido e si comporta da gruppo uscente nella formazione del legame peptidico. C) Acetilazione con chiusura di tutti i legami che non hanno reagito. D) Distacco al termine della sintesi, il polipeptide viene allontanato dal supporto di resina e dai gruppi di protezione, e fatto precipitare.

I peptidi sono stati identificati mediante **Liquid chromatography-mass spectrometry** (LC-MS) eseguita su un LC-MS Thermo Finnigan con una sorgente electrospray (MSQ) e su di una colonna (150 x 4.6 mm) Phenomenex Jupiter 5 μ C18 300 Å. I peptidi sono stati purificati tramite RP-HPLC preparativa, e caratterizzati mediante RP-HPLC analitica, su una colonna Phenomenex Jupiter 10 μ Proteo 90 Å (250x10 mm). Il gradiente utilizzato per la purificazione è stato: acqua isocratica 30% con 0,1% di TFA per 5 minuti, seguita da un gradiente crescente di acetonitrile dal 30 all' 80% in acqua con 0,1% TFA, per 30 minuti. L'analisi dei prodotti ottenuti è dovuto alla presenza di un gruppo aromatico in almeno un amminoacido del peptide, la cui lettura è possibile a 280 nm.

I peptidi sono stati infine liofilizzati in una soluzione di CH₃COOH ed acqua (1:1).

Al fine di stabilire i requisiti strutturali responsabili dell'attività antibatterica ed emolitica sono state effettuate opportune modifiche dei residui amminoacidici alla struttura dei peptidi tali da migliorare la loro capacità di azione nei confronti dei microrganismi (Capparelli et al 2009).

3.1.2 Derivatizzazione dei peptidi con fluorofori

La reazione di derivatizzazione con i fluorocromi è stata attuata sui peptidi ancora legati alla resina per renderli visibili al Microscopio Ottico. Le molecole rese fluorescenti sono state la Temporina A con Rodamina-isotiocianato e la Temporina B con Fluoresceina-isotiocianato. Due β alanines (β A) o due Lisine (K), o entrambi gli amminoacidi, sono stati aggiunti all'estremità N-terminale -KK o - $\beta\beta$ KK, prima della Fluoresceinazione o Rodaminazione al fine di distanziare i peptidi dai fluorocromi (Edman P. 1950). I coloranti sono stati aggiunti ad una concentrazione di 10 eq (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La reazione di accoppiamento è stata tenuta a temperatura ambiente per 2 ore, in agitazione. La resina è stata lavata con DMF, DCM ed etere etilico e poi seccata sotto vuoto. I peptidi sono stati distaccati dalla resina e deprotetto mediante trattamento della resina con una soluzione di TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5 v/v/v per 90 minuti. I peptidi sono stati infine precipitati in etere etilico freddo, analizzato mediante LC-MS e purificato mediante HPLC.

3.1.3 Dicroismo circolare

È stata effettuata l'analisi conformazionale della struttura secondaria dei peptidi sintetizzati, mediante la tecnica del Dicroismo Circolare (CD) in ambiente acquoso e mimetico di membrana (Cantor et al., 1980). Tutti gli spettri CD dei peptidi modificati sono stati rilevati con lo spettropolarimetro Jasco J- 715, dotato di Peltier Jasco PTC-423S/15, utilizzando una celletta da un 1 cm alla temperatura di 25°C. I peptidi, in concentrazioni di 5 μ M, sono stati sciolti in due soluzioni differenti: una soluzione tampone sodio fosfato 10 mM pH 7.4 e una soluzione tampone sodio fosfato 10 mM pH 7.4 contenente sodio dodecil solfato SDS 20mM. Gli spettri sono stati ottenuti come media di otto scansioni, acquisita nel range 320-195 nm e riportati in mdeg/nm (Zhao et al., 2002).

3.2 TEST IN VITRO

Staphylococcus aureus A170, *Staphylococcus aureus* A172, *Staphylococcus aureus* 7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* sierovar paratyphi B, *Salmonella enterica* sierovar typhimurium, *Escherichia coli* sono stati isolati da pazienti ricoverati presso la Facoltà di Medicina dell'Università "Federico II" di Napoli. I campioni sono stati confermati da saggi PCR in grado di identificare geni tipici della specie ricercata. I geni analizzati sono stati: Sea per *Staphylococcus aureus*, MonoA per *Listeria monocytogenes*, Abe per *Salmonella enterica* sierovar Paratyphi, Flic per *Salmonella enterica* sierovar Typhimurium, e SAT per *Escherichia coli*.

I batteri sono stati cresciuti a 37°C in Triptone Soya brodo TSB (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) o Luria-Bertani brodo LB (*Salmonella enterica*

sierovar Paratyphi, *Salmonella enterica* sierovar Typhimurium e *Escherichia coli*) (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD) fino alla fase esponenziale (OD_{600 nm} = 0,6-0,8). Successivamente sono stati centrifugati (10 min a 8x10³ g), lavati e risospesi in soluzione salina (0.15 M NaCl) ad una concentrazione di 10⁶ -10⁷ CFU/ml.

3.2.1 Trasformazione batterica

Il gene per la proteina fluorescente verde (GFP) è stato clonato nei siti Hind-III e PstI del plasmide pUC19, il quale è stato introdotto tramite un processo di trasformazione batterica nella *Salmonella enterica* sierovar Paratyphi B (isolato clinico 0404572) mediante elettroporazione (Cormack BP, et al 1997).

I batteri sono stati coltivati fino alla fase logaritmica in brodo LB, lavati con il 10% di glicerolo in acqua bi-distillata, sospesi alle concentrazione di 10³ CFU/ml e mescolati con 1 mg di DNA plasmidico. Una frazione (di 40 ml) è stata elettroporata a 1,75 kV/cm, 800 Ω, e 25 μF.

Dopo l'elettroporazione i batteri trasformati sono stati incubati per 30 minuti a 37°C in 1 ml di LB brodo integrato con saccarosio 0,3M. I batteri sono stati poi posti su piastre di LB agar, contenenti 100 mg/ml di ampicillina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) in grado di selezionare le colonie trasformate.

3.2.2 Test di attività antimicrobica

I batteri sono stati coltivati rispettivamente in TSB per i batteri Gram-positivi o in LB brodo per i batteri Gram-negativi a 37°C fino al raggiungimento della fase esponenziale, corrispondente ad una densità ottica (OD_{600 nm}) compreso tra 0,6 e 0,8. I campioni sono poi centrifugati a 8000 g per 10 minuti, lavati con soluzione fisiologica, e sospesi in brodo Muller Hinton (MH) alla concentrazione di circa 10⁶ CFU/ml; 60 μL dell' inoculo sono stati posti, in una piastra di polistirene multiwell da 96 pozzetti (concentrazione batterica di 10⁵ CFU/pozzetto). I peptidi disciolti in acqua sono stati testati: TA in quantità comprese tra 100 e 500 μg; TB in quantità comprese tra 100 e 500 mg; RJ1-RJ2-RJ3: da 100 a 600 mg; Peptidi modificati:TB-KK, TB-KKβAβA, RJ1GGY, RJ2GGY e RJ3GGY da 5 a 200 mg), in modo da avere un volume finale di 100 ml per ogni pozzetto.

La piastra così preparata e con l'aggiunta di campioni controllo negativo (solo batterio e MH) e bianco (solo MH) è incubata a 37°C per 20 ore. Le misurazioni della crescita microbica sono state effettuate mediante un lettore di micropiastre modello 680 (Biorad, Hercules, CA) con una lettura spettrofotometrica a 655 nm (Capparelli et al, 2005), in modo da valutare la minima concentrazione di antimicrobico (MIC) in cui si ha il 100% di inibizione della crescita batterica. Il valore di MIC è stato ottenuto utilizzando le percentuali di inibizione, calcolate con la seguente formula: $[(OD_{controllo} - OD_{bianco}) - (OD_{attività} - OD_{bianco}) / (OD_{controllo} - OD_{bianco})] \times 100$

Sono state valutate tutte potenziali sinergie tra peptidi, ottenute con combinazioni di diverse Temporine, o analoghi di Temporine e Royal-jelline. Su tali accoppiamenti è stato possibile anche calcolare la *Fractional Inhibitory Concentration* (FIC) o indice di sinergia. I valori di FIC sono stati calcolati con la seguente formula:

$$FICa + FICb = MICa/MICa + MICb/MICb$$

dove “A e B” sono le concentrazioni in sinergia e “a e b” le concentrazioni singole (Rosenford et al. 2006). Il valore ottenuto viene interpretato in questo modo:

<0,5 = sinergia;

tra 0,51 - 4,0 = nessuna interazione;

> 4,0 = antagonismo.

Il test di attività antimicrobica sopra descritto non ci da informazioni sulla eventuale capacità battericida dei peptidi per cui tale parametro viene misurato prelevando da ogni campione un'aliquota di 100 µl, e piastrando le relative diluizioni seriali su piastre di terreno agarizzato TSA o LB-agar ed incubando tali piastre Petri a 37°C *overnight*. Se sulle piastre non si osserva la crescita di colonie batteriche allora il peptide esercita un'azione battericida oltre che batteriostatica, se invece dopo l'incubazione sono presenti colonie sulla piastra allora l'azione del peptide potrà essere considerata batteriostatica.

3.2.3 Test al MOF e al SEM sui batteri

I batteri ai quali sono stati aggiunti i peptidi fluorescenti sono stati osservati tramite microscopia a fluorescenza (MOF) per ottenere immagini dell'interazione del peptide con le membrane biologiche, sia con trattamento con il singolo peptide che in miscela.

L'azione dei peptidi sulle membrane biologiche dei diversi batteri di interesse (*Staphylococcus aureus* o *Salmonella enterica* sierotipo paratyphi B; 10⁶ CFU/60 ml) è stata osservata anche al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM).

Una quantità predefinita di peptide (5 mg TA + 8 mg TB-KK per *Staphylococcus aureus* e 100 mg TA + 4 mg TB-KK per *Salmonella enterica* sierotipo paratyphi B, in un volume totale di 40 ml) è stata mescolata su di un vetrino da microscopio al rispettivo batterio, incubato in 2,5% di glutaraldeide *overnight*, e lavati per 1 h con concentrazioni crescenti di etanolo in successione (20%, 40%, 60% 70% 90% 100%). I vetrini vengono lasciati ad essiccare a 37°C per 15 minuti e poi osservati al Microscopio Zeiss SEM (Evo 40, Jena, Germania).

3.2.4 Test dell'alone di inibizione

L'attività antimicrobica è stata analizzata anche mediante un saggio dell'alone di inibizione su piastre Petri con terreno di coltura del tipo LB Agar.

Le diverse colture batteriche sono state inoculate in brodo di coltura LB fino a raggiungere una concentrazione di 10⁸-10⁹ CFU/ml. Un'aliquota di 250 µl di sospensione è stata portata ad una concentrazione di 2 x10⁵ CFU/ml in terreno LB Agar, e miscelata con 3 ml di *soft agar* (Sigma) 0,7% a 45°C. Il *soft agar* contenente la coltura batterica è stato riversato su piastre Petri (9 cm di diametro) contenenti 10 ml di LB Agar e solidificate a temperatura ambiente. Sulle piastre sono stati effettuati dei fori circolari equidistanti in cui sono stati inoculati diluizioni seriali di AMP (10 ml/pozzetto) sia singolarmente che in combinazione. Le piastre sono state quindi incubate a 37°C *overnight*.

In seguito è stato misurato l'alone di inibizione (mm) presente attorno ai fori di inoculo e calcolata la percentuale di inibizione. Il controllo positivo di inibizione è stato eseguito inoculando l'antibiotico specifico per il batterio in esame, invece per controllo negativo è stato utilizzato PBS.

3.3 TEST IN VIVO

Sono stati effettuati dei test in vivo per stabilire se gli AMP sono in grado di esercitare attività antimicrobica in un sistema complesso: un organismo vivente. Il modello murino offre la possibilità di testare i peptidi in un ambiente pre-clinico, potendo valutare la loro attività come agenti antimicrobici e antinfiammatori.

Sono stati quindi utilizzati esemplari di topi albini del ceppo balb/c. Tali esemplari avevano le seguenti caratteristiche: una età compresa tra 4 e 8 settimane; un peso variabile intorno ai 25/30 grammi.

I Parametri di stabulazione utilizzati durante il mantenimento degli animali sono stati: temperatura costante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$); cicli di 12 ore luce-buio; disponibilità di acqua e cibo (Ciriani et al., 2005; Buras et al., 2005). I topi sono stati infettati per via endovenosa con dosi letali (10^8 CFU/topo per *Staphylococcus aureus* e 10^7 CFU/topo per *Salmonella enterica* sierovar paratyphi B) o sub-letali (10^7 CFU/topo per *Staphylococcus aureus* e 10^6 CFU/topo per *Salmonella enterica* sierovar paratyphi B) di batterio a seconda delle condizioni richieste dall'esperimento. Dopo l'infezione, ai topi sono stati somministrati i diversi AMP, precedentemente testati in vitro, valutando il decorso dell'infezione nei topi trattati rispetto a quelli infettati e non trattati con i peptidi antimicrobici.

3.3.1 Sopravvivenza murina e monitoraggio della carica microbica negli organi bersaglio

Con questa tipologia di test è stata valutata dell'efficacia degli AMP in modelli animali di infezione da batteri Gram-negativi (*Staphylococcus aureus*) o da Gram-positivi (*Salmonella enterica* sierovar paratyphi B). L'infezione è stata effettuata mediante la somministrazione del batterio per via endovenosa, a diversi tempi dall'infezione (contemporaneamente o dopo 6 giorni dall'infezione), sono state iniettate le combinazioni (TAWt $75 \mu\text{g}$ /topo + TB mod $35 \mu\text{g}$ /topo e TAWt $100 \mu\text{g}$ /topo + TB mod $35 \mu\text{g}$ /topo) di peptidi antimicrobici disciolto in una soluzione salina (0,15 M di NaCl).

I topi sono stati osservati nel tempo, per controllare la sopravvivenza e per valutare lo stato di salute degli organismi sono stati presi in considerazione i parametri vitali inerenti all'infezione (la motilità, il peso e la temperatura corporea).

Dall'animale (24 animali/gruppo) è stato prelevato del tessuto dall'organo bersaglio, effettuando i prelievi con intervalli regolari di tempo (ogni 24 ore) dopo l'infezione ed il trattamento con gli AMP, per studiare l'evoluzione dell'infezione. Gli

organi bersaglio prelevati e osservati sono stati i reni in caso di *Staphilococcus aureus*, e il fegato ed il tratto gastro-intestinale per la *Salmonella enterica*.

L'organo prelevato (1 grammo di tessuto) è stato omogeneizzato in 1 ml di soluzione fisiologica (PBS) e diluiti serialmente in soluzione salina (0,15 M di NaCl).

Il calcolo delle Unità Formanti Colonia (CFU) sono state valutate su piastre Petri selettive per il batterio ricercato (Baird Parker-agar per *Staphilococcus aureus* e XLT agar-4 per *Salmonella enterica*). Le piastre sono state incubate per *overnight* a 37°C, e poi è stata effettuata la conta delle colonie batteriche. I tassi di sopravvivenza dei topi sono stati analizzati utilizzando *il test esatto di Fisher*, e la conta batterica è stata analizzata utilizzando *test t di Student*.

3.3.2 Saggio di tossicità

Per evidenziare l'assenza di tossicità dei peptidi AMP contro le cellule eucariotiche, sono stati effettuati dei test di emolisi su cellule di mammifero: eritrociti murini. I globuli rossi sono stati ottenuti da sangue intero (500 µL) prelevato dalla coda degli animali.

Il campione viene lavato 3 volte con PBS centrifugato a 1600 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente, e le cellule vengono poi sospese in PBS ad una concentrazione di 10^7 cellule in 300 µl. Gli antimicrobici vengono preparati alla concentrazione di cui si desidera testare l'attività, in un volume di 300 µl, vengono uniti alle cellule e incubati per 1 ora a 35°C. Poi vengono di nuovo centrifugati a 1600 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente, per far precipitare la frazione corpuscolare. Infine il surnatante viene misurato tramite lettura spettrofotometrica ad un OD di 540 nm. La percentuale di emolisi dei peptidi viene calcolata applicando la seguente formula:

$$(\text{ODcampione} - \text{ODbianco} / \text{ODtriton} - \text{ODbianco}) \times 100$$

Il controllo negativo è effettuato tramite un campione di eritrociti sospesi in soluzione PBS, che danno 0% di emolisi ed il controllo positivo è dato da campione di eritrociti incubati con una soluzione di 1% di triton (100x) che dà il 100% di emolisi.

3.3.3 Saggi di microscopia ottica su organi murini

I topi sono stati infettati con batteri in grado di esprimere la proteina fluorescente GFP, ed appena dopo l'infezione, sono stati trattati con gli AMP.

Le colonie batteriche sviluppatesi nei tessuti sono state osservate direttamente sul tessuto dell'organo bersaglio dei topi trattati e non trattati, potendo così mettere in evidenza le differenze osservate.

L'osservazione è avvenuta dopo 3, 4, 5 e 6 giorni dall'infezione, utilizzando lo strumento macrofluo-Leica (Wetzlar, Germania), e le immagini ottenute sono state analizzate grazie alle applicazioni *software* Leica 3.1.0.

3.3.4 Emocromo e formula leucocitaria

L'emocromo e la formula leucocitaria sono stati eseguiti sul sangue intero prelevato da topi infetti e trattati con gli AMP. I risultati ottenuti sono stati confrontati con standard di riferimento per verificare la presenza o meno di alterazioni dei parametri ematologici. Tali valori sono stati determinati con lo strumento Am45 (Melet Schloesing, Osny, Francia).

3.3.5 Rilevamento dei livelli di citochine negli organi

Per verificare l'andamento dell'infezione in vivo si è osservato il comportamento delle citochine, proteine che hanno un importante ruolo nel modulare la risposta infiammatori ad una infezione batterica nel topo, così come nell'uomo. Il loro comportamento può essere infatti up-regolato o di down-regolato in presenza dell'infezione batterica, a seconda dell'interazione con gli AMP.

Per l'esperimento sono stati selezionati gruppi di 4 topi. Un gruppo di topi è stato utilizzato come controllo positivo, in quanto essi sono stati infettato per via endovenosa con *Salmonella enterica* sierotipo paratyphi B e non trattato. Un secondo gruppo è stato infettato sempre tramite un'iniezione con *Salmonella enterica* sierotipo paratyphi B e successivamente trattato, con gli AMP nelle dosi necessarie a contrastare l'azione batterica (*TAwt 75 µg /topo + TB mod 35 µg/topo e TAwt 100 µg /topo + TB mod 35 µg/topo*) disciolti in 100 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,15 M). Un terzo gruppo di topi è stato utilizzato come Naive.

L'RNA totale è stato isolato dal fegato dei topo trattati dopo 3, 6, 24 e 48 ore dall'infezione, con il protocollo di utilizzo del Trizol (Invitrogen, Milano, Italia). L'RNA ottenuto è stato sospeso in acqua distillata DNAsi-RNasi-free (Promega, Madison, WI), e ne è stata misurata la concentrazione (assorbanza a 260nm) e la purezza (rapporto A260/A280 superiore a 1,9). L'RNA (1 ug) è stato nuovamente trattato con una DNAsi-RNasi-free per eliminare tutte le possibili contaminazioni del campione, e poi viene effettuata una PCR con primer specifici per il gene GAPDH. I primer che utilizzati per la PCR sono i seguenti.

PRIMER	SEQUENZA
GAPDH Fw	5' TTCACCACCATGGAGAAGGC 3'
GAPDH Rv	5' GGCATGGACT GTGGTCATGA 3'
IL-6 Fw	5' AAAGAGTTGTGCA ATGGCAATT 3'
IL-6 Rv	5' CAGTTTGGTAGCATCCATCAT 3'
TNF-α Fw	5' TCTCAGCCTCTTCTCATTCTCCT 3'
TNF-α Rv	5' GTCTGGGCCATAGAACTGATG 3'
IL-4 Fw	5' AATGTACCAGGAGCCATATCCAC 3'
IL-4 Rv	5' TCACTCTCTGTGGTGTTCTTCGT 3'
IFN-γ Fw	5' AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG 3'
IFN-γ Rv	5' GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG 3'

Tabella 2: Elenco dei primer utilizzati per amplificare il cDNA

È stata effettuata una trascrizione inversa per ottenere il cDNA corrispondente al RNA estratto, con ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) e oligo (dT)₁₈. L'analisi quantitativa della concentrazione del cDNA, corrispondente alle citochine di interesse è stata effettuata mediante PCR quantitativa in tempo reale (RT-PCR).

Vengono utilizzati 50 ng di cDNA, con una master mix SYBR-Green 1x (Applied Biosystems, Milano) in uno strumento Step-One Applied Biosystems (Applied Biosystems, Milano). Le reazioni sono state eseguite con 20 µl di campione, ed in triplice copia. Il profilo termico utilizzato è di seguito riportato:

$\left\{ \begin{array}{l} 95\text{ }^{\circ}\text{C per 10 min} \\ 95\text{ }^{\circ}\text{C 45 cicli di 15 secondi} \\ 60\text{ }^{\circ}\text{C per 45 secondi} \\ 60\text{ }^{\circ}\text{C per 1 minuto} \\ 95\text{ }^{\circ}\text{C per 15 secondi} \end{array} \right.$
0,3°C in più in ogni fase della curva di fusione.

Questo esperimento ha consentito di quantificare la concentrazione delle citochine (IL-6, TNF- α , IL-4 e INF- γ) in quanto esse sono i maggiori responsabili della fisiopatologia della risposta infiammatoria e della sepsi. I livelli di citochine sono stati analizzati utilizzando il *test t di Student*.

4. RISULTATI

4.1 SINTESI DEI PEPTIDI

Sono stati presi in considerazione i peptidi ad attività antimicrobica quali la Temporina A e B e le Royal-Jelline, ottenuti tramite metodologie di sintesi in fase solida. Tutti i peptidi vengono ottenuti mediante l'uso di monomeri, assemblati con l'utilizzo della chimica Fmoc.

Lo scopo è quello di ottenere dei peptidi che possano avere attività antimicrobica ed interagire con le membrane batteriche così come i peptidi naturali. Le molecole ottenute e le loro sequenze peptidiche sono riportate nella tabella seguente:

Peptide	Sequenza amminoacidica	Massa	
		Calcolata	Trovata
Temporina A	H-FLPLIGRVLSGIL-NH ₂	1396.7	1396.3
Temporina B	H-LLPI VGNLLKSLL- NH ₂	1554.9	1554.7
Royal jellein I	PFKISIH ₂ L-NH ₂	900,2	900,1
Royal jellein II	TPFKISIH ₂ L-NH ₂	1001,4	1001,0
Royaljellein III	EPFKISIH ₂ L-NH ₂	1029,8	1029,2

Tabella 3: *Elenco dei peptidi utilizzati*

Le modifiche sono state apportate sulla sequenza della Temporina B. L'analisi della struttura del peptide ha suggerito che le modifiche apportate provocano il potenziamento della sua attività antimicrobica. La temporina B è stata modificata con l'aggiunta di un residuo di Tirosina all'N-terminale della molecola, per conferire al peptide un pattern di assorbimento a 280 nm in grado di dare la misura di concentrazione del peptide.

Successivamente sono stati aggiunti due ulteriori residui positivi a carico dell'estremità N-terminale della Temporina B, due Lisine, per facilitare l'interazione elettrostatica del peptide con i fosfolipidi carichi negativamente, ottenendo in tal modo una Temporina B modificata KK (TB-KK). Infine per limitare gli effetti di degradazione durante i lavaggi in TFA (Edman 1950), sono stati aggiunti altri due amminoacidi, delle β Alanina alla Temporina B dando vita ad un peptide modificato Temporina B modificato KK β A β A (TB-KK β A β A).

Peptide	Sequenza amminoacidica	Massa	
		Calcolata	Trovata
Temporina B (KK β A β A)	KK β A β A-YLLPI VGNLLKSLL -NH ₂	1953,4	1953,7

Temporina B (KK)	KK-YLLPI VGNLLKSLL- NH ₂	1811,3	1812,8
Temporina A Rho	Fluo-βA-FLPLIGRVLSGIL-NH ₂	2295,4	2294,3
Temporina B FITC	Fluo-KKβAβA-YLLPI VGNLLKSLL-NH ₂	2342,8	2343,2
Royal jellein I - mod	PFKISIHl-GGY-NH ₂	1231,3	1231,4
Royal jellein II - mod	TPFKISIHl-GGY-NH ₂	1332,5	1332,3
Royaljellein III - mod	EPFKISIHl-GGY-NH ₂	1360,1	1360,5

Tabella 4: Elenco dei peptidi modificati utilizzati_

Anche le Royal-jelline sono state modificate al fine di aumentare la loro capacità di interagire biologica. Le modifiche hanno comportato nell'aggiunta di due amminoacidi, una Glicina ed una Tirosina (GGY) all'estremità C-terminale del peptide. I peptidi modificati prodotti e poi utilizzati sono riportati nella tabella seguente. I peptidi sono quindi stati testati per individuare quelli che fossero più interessanti da un punto di vista farmacologico.

4.2 STUDI EFFETTUATI SULLE TEMPORINE

L'attività antimicrobica delle Temporine A e B è stata testata tramite esperimenti in vitro ed in vivo sia singolarmente che in varie combinazioni. Tali test erano volti a valutare l'indice terapeutico dei peptidi, e la loro capacità di essere utilizzati singolarmente o in sinergia, quale sostituto dei farmaci antibiotici attualmente in uso.

Sono state quindi testate sia la sequenza dei peptidi corrispondenti alla forma naturale, sia quelli che presentavano delle modifiche.

4.2.1 Temporina A e B analizzate singolarmente

Nella loro forma naturale sia Temporina A che Temporina B sono risultati essere più attive contro i batteri Gram-Positivi (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) che contro i Gram-negativi (*Salmonella enterica* sierovar paratyphi B, *Salmonella enterica* sierovar typhimurium ed *Escherichia coli*). I valori delle MIC 100 (*Minimal Inibition Concentration*) rilevate per i diversi ceppi batterici dopo le 16 ore di osservazione, sono stati riportati nella tabella seguente. Si è evidenziato da tale test che la Temporina A è stata più attiva contro i batteri Gram-positivi (MIC: 10-50 mg/ml) che contro Gram-negativi (MIC: 125-400 mg/ml) mentre la Temporina B è stata attiva contro i batteri Gram-positivi (MIC: 15-50 mg/ml), nella stessa misura della Temporina A ma solo a concentrazioni molto elevate contro i batteri Gram-negativi. Inoltre entrambi i peptidi sono risultati avere un'azione batteriostatica e non battericida contro i batteri Gram-negativi.

BATTERI	TEMP A	TEMP A	TEMP B	TEMP B
		[] battericida		[] battericida
Gram-positivi				

Staphylococcus aureus A170	10	25	25	30
Staphylococcus aureus A172	20	50	25	30
Staphylococcus aureus 7	10	12,5	15	50
Listeria monocytogenes	30	50	20	30
Gram-negativi				
Salmonella paratyphi B	400	/	> 400	/
Salmonella typhimurium	270	/	400	/
Escherichia coli	125	/	200	/

Tabella 5: MIC100 di Temporine A e B wt misurati in $\mu\text{g/ml}$ a rispettiva concentrazione battericida di partenza di 1×10^5 CFU/pozzetto

Una volta apportate le modifiche alla sequenza amminoacidica di Temporina B, lo studio della struttura secondaria del peptide Temporina B *wild-type* e i peptidi Temporine B modificati, sono stati effettuati tramite Dicroismo Circolare (CD), sia in ambienti mimetici di membrane batteriche che in tampone fosfato.

Gli spettri CD dei peptidi Temporina B e rispettivi analoghi hanno mostrato che la temporina B presenta un minimo a 200 nm indicativa di una conformazione random-coil, quando si trova in un tampone sodio fosfato a pH 7.4. assume una conformazione elicoidale, con due minimi a circa 209 e 222 nm quando si trovano in presenza di SDS.

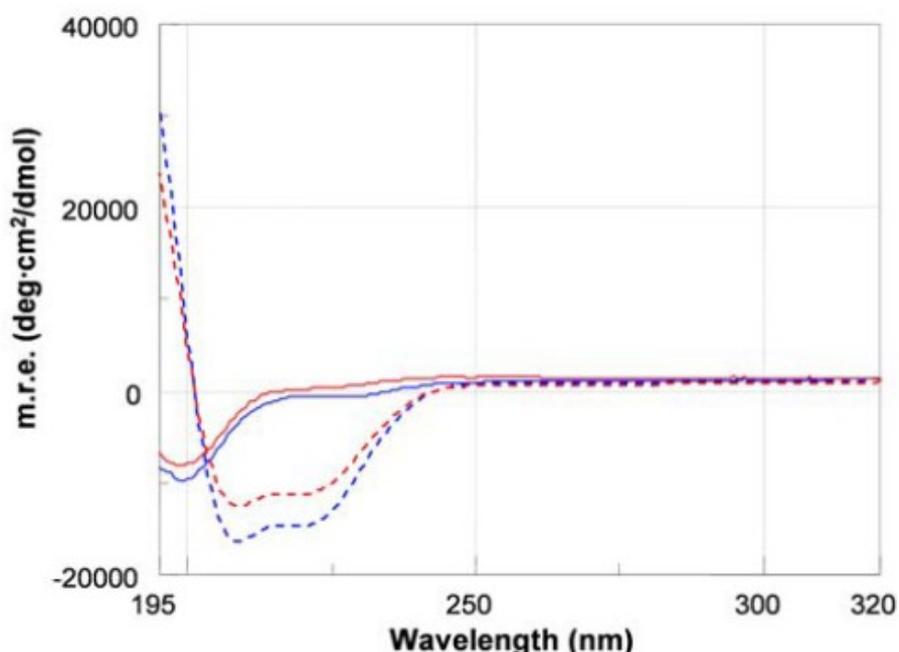


Figura 5: Spettri CD di TB-wild-type (linea blu continua) e TB-KK β A β A (linea rossa continua) in Sodio Fosfato buffer a pH 7.4; TB-wild-type (linea blu tratteggiata) e TB-KK β A β A (linea rossa tratteggiata) in Sodio Fosfato buffer con aggiunta di SDS a pH 7.4

La Temporina B sembrerebbe quindi agire sulla componente acida dei fosfolipidi di membrana (Zhao et al., 2002).

I Test di attività svolti sulla Temporina B modificata all'estremità N-terminale hanno mostrato dei miglioramenti nell'attività antimicrobica soprattutto nei confronti dei batteri Gram-negativi, come indicato dai dati riportati nella tabella seguente.

BATTERI	TB-KK βAβA	TB-KKβAβA [] battericida	TB-KK	TB-KK [] battericida
Gram-positivi				
Staphylococcus aureus A170	20	20	20	50
Staphylococcus aureus A172	20	20	25	50
Staphylococcus aureus 7	20	20	10	50
Listeria monocytogenes	10	20	10	20
Gram-negativi				
Salmonella paratyphi B	10	25	20	30
Salmonella typhimurium	10	30	10	30
Escherichia coli	20	20	20	30

Tabella 6: MIC100 di Temporina B modificate misurati in µg/ml a rispettiva concentrazione battericida di partenza di 1×10^5 CFU/pozzetto

Anche il test dell'alone di inibizione ha confermato la capacità dei peptidi di inibire la crescita batterica in piastra. I risultati alle concentrazioni delle MIC hanno dato un diametro di inibizione calcolato in cm, pari al 100% dell'inibizione.

4.2.2 Attività della Temporina A e B in sinergia

Sono stati effettuati test utilizzando gli AMP in differenti concentrazioni. La Temporina A e B wild-tipe, usate in miscela, in test in vitro non hanno dato risultati di sinergia, né fenomeni di additività della loro azione, per cui non sembrano avere la capacità di interagire tra di loro.

Invece varie combinazioni di Temporina A wild-tipe (500-100 mg / ml), con gli analoghi della Temporina B modificata al N-terminale per l'aggiunta di diversi amminoacidi (TB-KK e TB-KKβAβA) ha evidenziato che la miscela di questi due peptidi (TAwt + TB-KK) testati a varie concentrazioni (3-50 mg/ml) mostrano un'azione sinergica, sia contro i batteri Gram-positivi che contro i Gram-negativi, come riportato nella tabella seguente (Tab. 7).

Tra tutti i test effettuati con i batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) e Gram-negativi (*Salmonella enterica* sierovar paratyphi B e sierovar typhimurium, *Escherichia coli*), si sono avuti maggiori percentuali di inibizione della crescita batterica con *Staphylococcus Aureus*, e con *Salmonella enterica* sierosa paratyphi B, con rispettive MIC, ed in cui si aveva un valore di FIC inferiore a 0,5.

Batteri	TA+TB-KK
---------	----------

<i>Staphylococcus aureus</i> A170	5 + 8
FIC	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> A172	8 + 5
FIC	0,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	10 + 3
FIC	0,6
<i>Salmonella e. paratyphi B</i>	100 + 4
FIC	0,45
<i>Escherichia coli</i>	50 + 5
FIC	0,6

Tabella 7: MIC100 di *Temporina A* originale + *Temporina B* modificata (TB-KK) misurati in $\mu\text{g/ml}$ e rispettivo calcolo della FIC a concentrazione battericida iniziali di 10^5 CFU/pozzetto

I due batteri *Staphylococcus aureus* A170, e *Salmonella enterica* sierosa paratyphi B sono stati utilizzati negli esperimenti successivi al fine di visualizzare l'effetto dei peptidi sulle membrane biologiche. I peptidi sono stati legati a fluorocromi fluorescenti al fine di poter effettuare ulteriori studi di microscopia e per poter quindi evidenziare la loro presenza sulla superficie batterica. La *Temporina A* è stata legata alla rodamina-isotiocianato (TA-Rho) in grado di emettere nella lunghezza d'onda del rosso, e la *Temporina B* è stata legata a sua volta alla fluoresceina-isotiocianato (TB-FITC) in grado di emettere nella lunghezza d'onda del verde. Prima della marcatura sono stati aggiunti al N-terminale ai peptidi i residui Lisina e β -Alanina, per distanziare il fluorocromo dal peptide, e per impedire la degradazione del peptide stesso (Edman 1950).

I peptidi ottenuti sono stati a loro volta sottoposti a test di attività antimicrobica per verificare la normale funzionalità della molecola dopo la modifica. I batteri trattati con i peptidi fluorescenti sono stati quindi osservati al Microscopio Ottico a Fluorescenza, per mettere in evidenza l'interazione degli AMP con i batteri. Diverse combinazioni dei peptidi sono stati testati e le combinazioni che hanno consentito una migliore visualizzazione dei batteri sono state le seguenti: 6 $\mu\text{g/ml}$ di TAwt-Rho e 9 $\mu\text{g/ml}$ di TB-KK β A β A-FIC su *Staphylococcus aureus* 170; 15 $\mu\text{g/ml}$ di TAwt-Rho e 20 $\mu\text{g/ml}$ di TB-KK β A β A-FIC su *Salmonella enterica* sierosa paratyphi B.

Ciò che si è evidenziato nelle immagini di seguito riportate è che vi è una corrispondenza tra la fluorescenza e la posizione dei batteri nel campo di osservazione. Ciò può indicare che i peptidi vadano a posizionarsi in corrispondenza delle membrane batteriche.

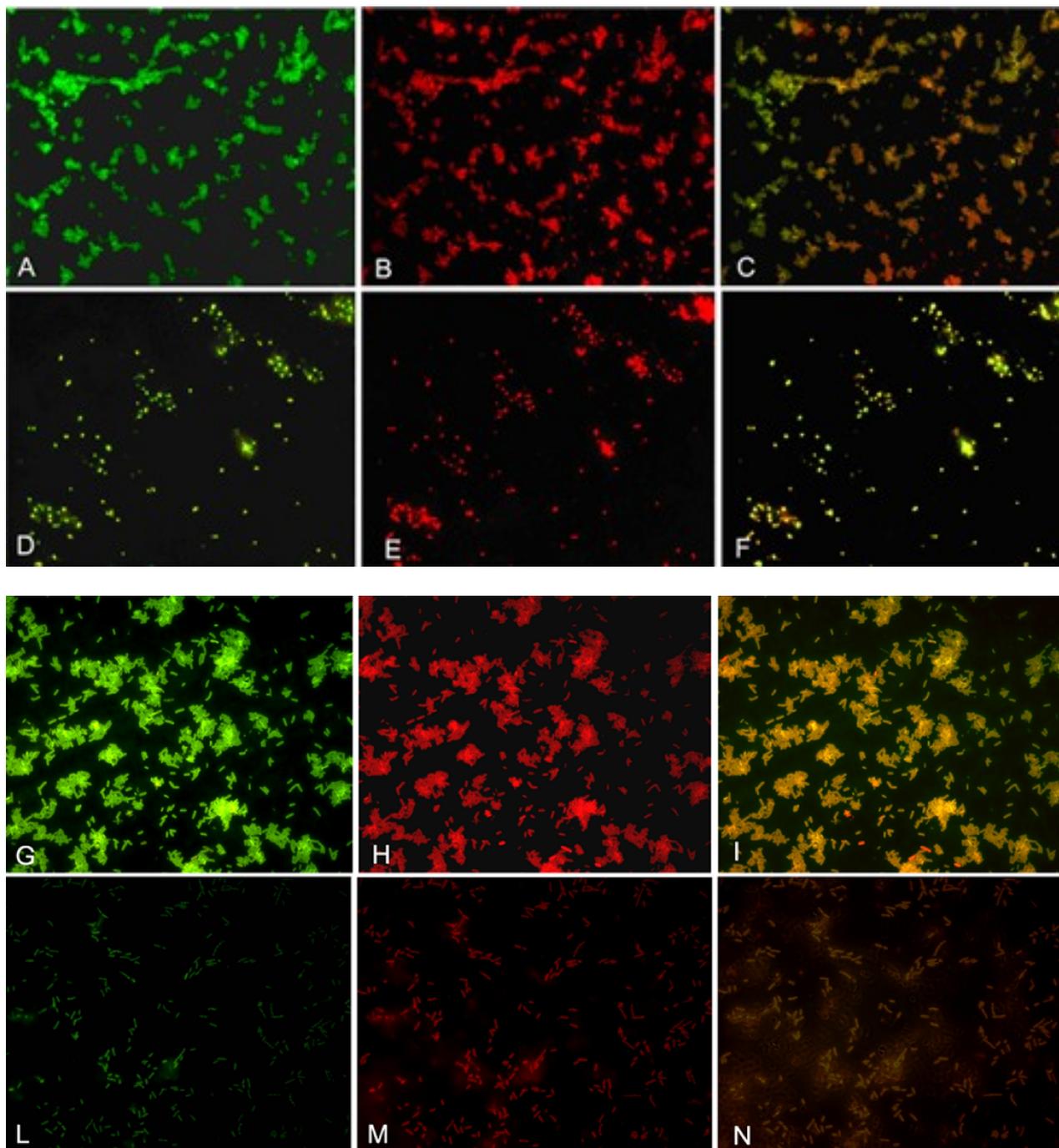


Figura 6: Immagini al Microscopio Ottico a Fluorescenza ottenute utilizzando peptidi marcati con fluorocromi. I primi sei riquadri mostrano il batterio *Staphylococcus aureus* A170 in cui: ABC sono batteri marcati con TAwT-Rho 6µg/ml + TB-KKβAβA-FIC 9µg/ml, e DEF sono i Corrispondenti controlli. I secondi sei riquadri mostrano il batterio *Salmonella e. paratyphi B* in cui: GHI sono batteri marcati con TAwT-Rho 15µg/ml + TB-KKβAβA-FIC 20 µg/m, ed LMN sono i Corrispondenti controlli.

Anche il Test dell'alone di inibizione ha mostrato che il diametro dell'inibizione della crescita batterica sulla piastra è più ampio quando il TAwT e TB-KKβAβA sono messi in combinazione tra loro, rispetto a quando i peptidi vengono testati singolarmente, conferma le ipotesi finora individuate.

Gli stessi batteri sono stati preparati per essere sottoposti al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM). Nelle immagini ottenute dall'osservazione dei campioni è stata evidenziata la capacità della miscela di Temporine (TA wild-tipe 8µg/ml e TB-KKβAβA 5µg/ml) di perforare la membrana batterica. Nei campioni trattati è infatti possibile distinguere in alcuni punti il danneggiamento della superficie batterica con conseguente riversamento del liquido citoplasmatico, che corrisponde ad un disfacimento della membrana cellulare, condizione incompatibile con la vita del batterio. Nei campioni non trattati con la miscela di peptide le membrane batteriche appaiono integre.

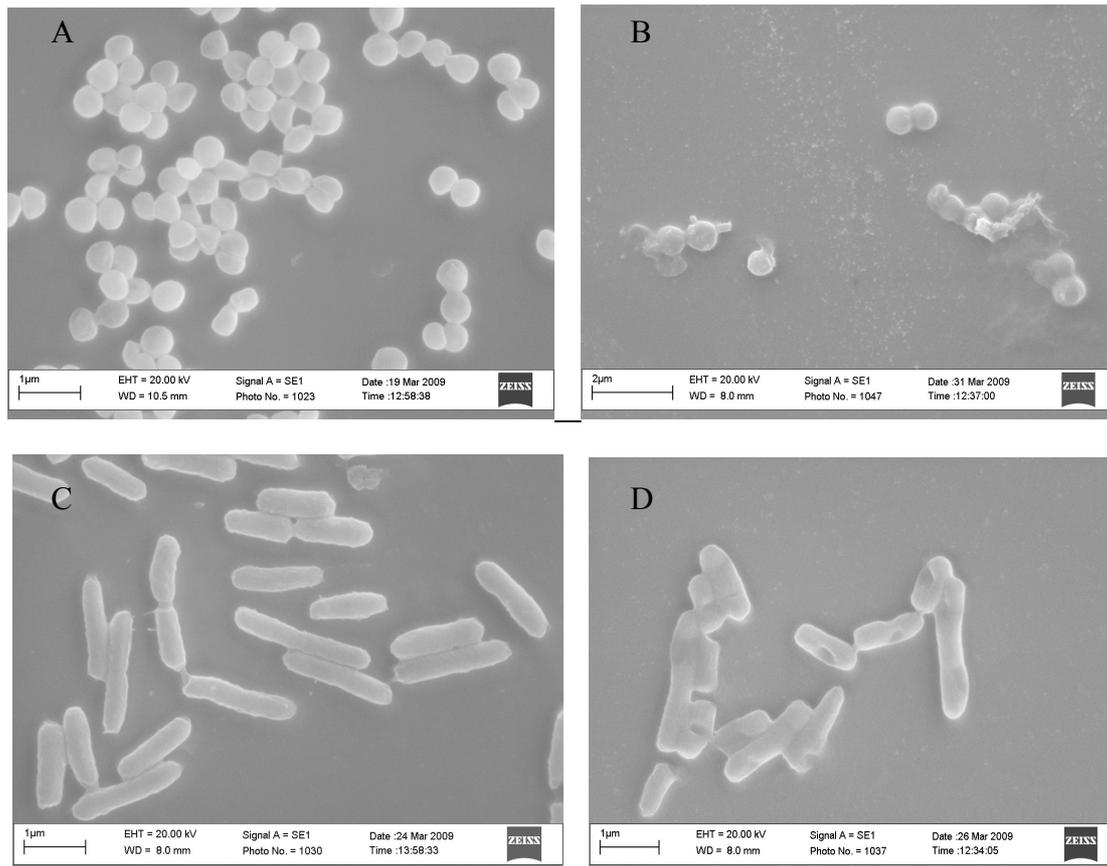


Figura 7: Immagini al SEM per *Staphylococcus aureus* (A: controllo, B: batterio + TAwT 8µg/ml +TB-KK 5 µg/ml) e per *Salmonella e. paratyphi B* (C: controllo D: batterio + TAwT 100 µg/ml + TB-KK 4 µg/ml)

Sulla base dei risultati ottenuti si è deciso di effettuare prove in vivo utilizzando topi del ceppo Balb/c, sui quali venivano praticate delle infezioni con i batteri *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) o con *Salmonella enterica* (Gram-negativo), e trattati con diverse miscele di Temporina A e Temporine B modificate (TB-KK e TB-KKβAβA).

Prima di procedere con infezioni in vivo è stata valutata la attività emolitica dei peptidi. È stato riscontrato che essi hanno una lieve attività emolitica, le cui soglie di tolleranza sono: 35 µg/ml per la Temporine B modificata (KKβAβA), e 30 µg/ml per la Temporina B modificata (KK).

I primi esperimenti con i topi (24 animali/gruppo) sono stati effettuati infettando gli animali con una concentrazione letale di batterio (10^7 CFU/topo per *Staphylococcus aureus* A170, e 10^6 CFU/topo per *Salmonella enterica* sierovar paratyphi B), ed

immediatamente dopo l'infezione è stato somministrato il mix di Temporine capace di agire in sinergia (TAwt + TB-KK β A β A). Gli individui trattati sono stati monitorati per 30 giorni.

Le concentrazioni di AMPs utilizzate sono state TAwt 75 μ g/topo e TB-KK 35 μ g/topo per *Staphylococcus aureus* A170, e TAwt 100 μ g/topo + TB-KK 35 μ g/topo per *Salmonella enterica* sierovar paratyphi B.

Per entrambi i batteri si è quindi riscontrato l'aumento della percentuale di sopravvivenza dei topi infettati del 100% come mostrato nei grafici di seguito riportati (FIG 8 e 9).

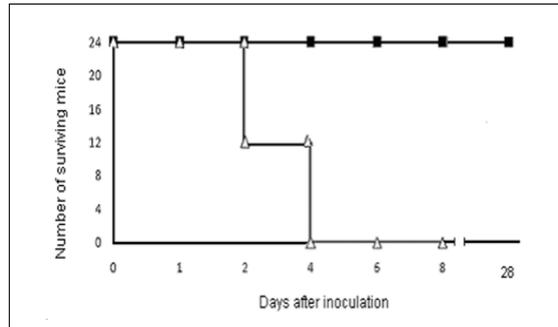


Figura 8: Sopravvivenza murina dopo infezioni con batterio *Staphylococcus aureus* A170 10^7 CFU/topo (dose letale dopo 4 giorni).

Attività: individui infettati e trattati TAwt_t 75 μ g/topo e TB mod. 35 μ g/topo

Controllo: individui infettati e non trattati

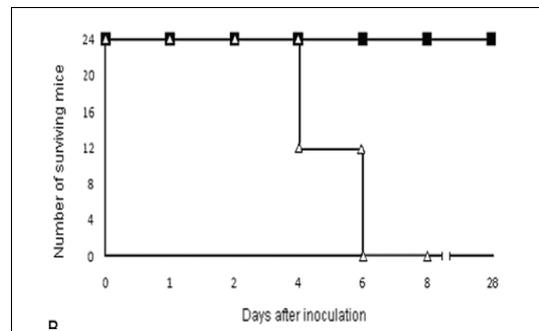


Figura 9: Sopravvivenza di topi infettati con batterio *Salmonella enterica* sierovar paratyphi B 10^6 CFU/topo (dose letale dopo 6 giorni).

Attività: individui infettati e trattati con TAwt 100 μ g/topo e TB-KK 35 μ g/topo

Controllo: individui infettati e non trattati



È stata poi misurata la carica batterica all'interno degli organi bersaglio degli animali infettati, sia per il batterio *Staphylococcus aureus* A170 (mix TA-wt 75 μ g/topo e TB-KK 35 μ g/topo), sia per *Salmonella enterica* sierovar paratyphi B (mix TA-wt 100 μ g/topo e TB-KK 35 μ g/topo). Il trattamento con la miscela di Temporine è stato somministrata immediatamente dopo l'infezione.

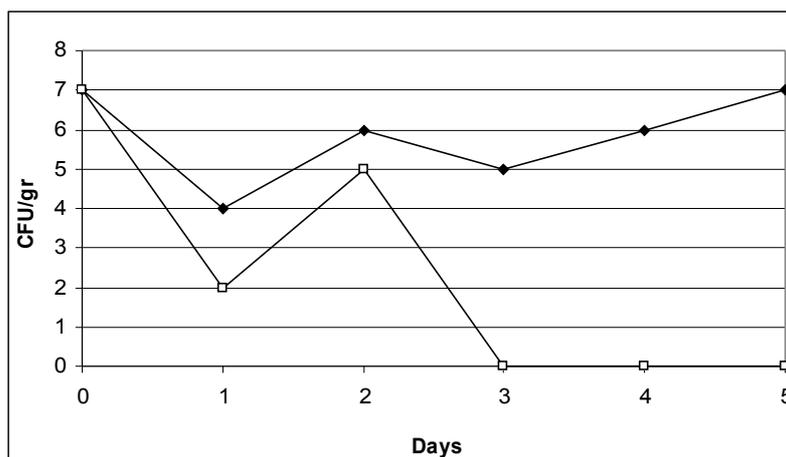
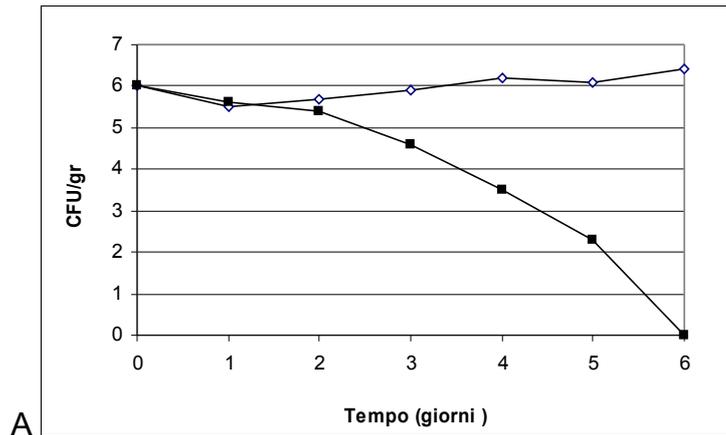


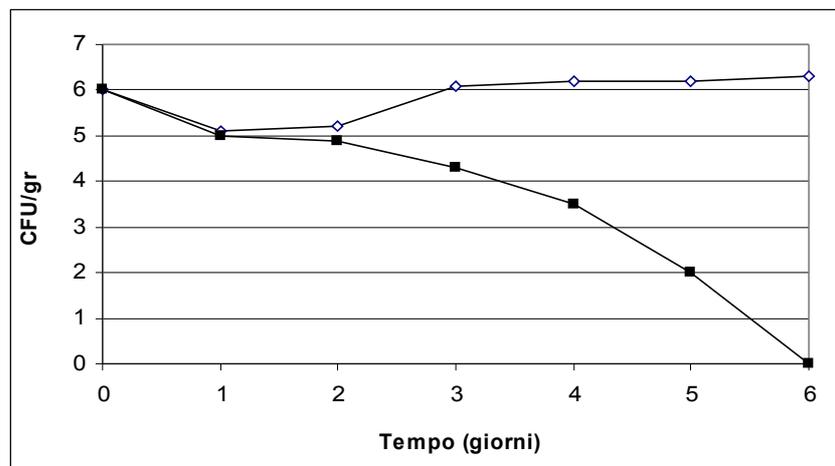
Figura 10: Monitoraggio della carica batterica di *Staphylococcus aureus* A170 10^7 CFU/topo, (dose letale dopo 4 giorni dall'infezione) con TAwT $75\mu\text{g}$ /topo + TB mod $35\mu\text{g}$ /topo. Organo: Rene

□ Attività di *Staphylococcus aureus* A170 +AMPs
 ● Controllo di *Staphylococcus aureus* A170

Il trattamento ha comportato un abbassamento della carica microbica riscontrata nell'organo bersaglio per entrambi i batteri. In particolare abbiamo per *Staphylococcus aureus* A170 una carica microbica misurata nel rene, che si abbassa di 2 unità logaritmiche dopo 2 giorni, e la completa sterilità dell'organo dopo 3 giorni dall'infezione, come viene mostrato nel grafico (FIG 10). Un risultato simile si è ottenuto anche con il batterio *Salmonella enterica* sierovar paratyphi B in cui si nota la diminuzione della carica microbica negli organi bersaglio, quali fegato e tratto intestinale, pari ad un decremento di 2 unità logaritmiche dopo 2 giorni dall'infezione, e alla completa sterilità dell'organo dopo 6 giorni dall'infezione, come viene evidenziato nei grafici riportati di seguito (FIG. 11).



A



B

Figura 11: Monitoraggio della carica batterica di *Salmonella enterica* sv. paratyphi B 10^6 CFU/topo, (dose letale dopo 6 giorni dall'infezione) con TAwT $100 \mu\text{g}$ /topo + TB mod $35 \mu\text{g}$ /topo.

A) Organo bersaglio: Fegato

Attività *S. enterica* sv.

Controllo *enterica* sv..

paratyphi B+ AMPs

paratyphi B

B) Organo bersaglio: Intestino

Attività *S. enterica* sv.

Controllo *enterica* sv..

paratyphi B+ AMPs

paratyphi B

In maniera parallela alla conta batterica in piastra è stata osservata la condizione degli altri organi. I topi infettati con *Salmonella enterica* sierovar paratyphi (10^6 CFU/topo), 24 ore dopo l'infezione mostravano ingrossamento della milza, del fegato e dei linfonodi mesenterici a causa della infiammazione, mentre i topi infettati con il patogeno stesso e subito dopo trattati con la miscela di peptidi mostravano solo lievi cambiamenti morfologici negli organi.

Mediante l'utilizzo dello strumento Leica macrofluor è stata quindi osservata la presenza di colonie negli organi bersaglio (fegato e tratti gastro-intestinale) dopo 5 giorni dall'infezione, grazie all'utilizzo di *Salmonella enterica* sierovar paratyphi B trasformate con il gene per l'espressione della proteina GFP. Si è evidenziato quindi la presenza di colonie negli organi dei topi non trattati con la presenza di una evidente fluorescenza.

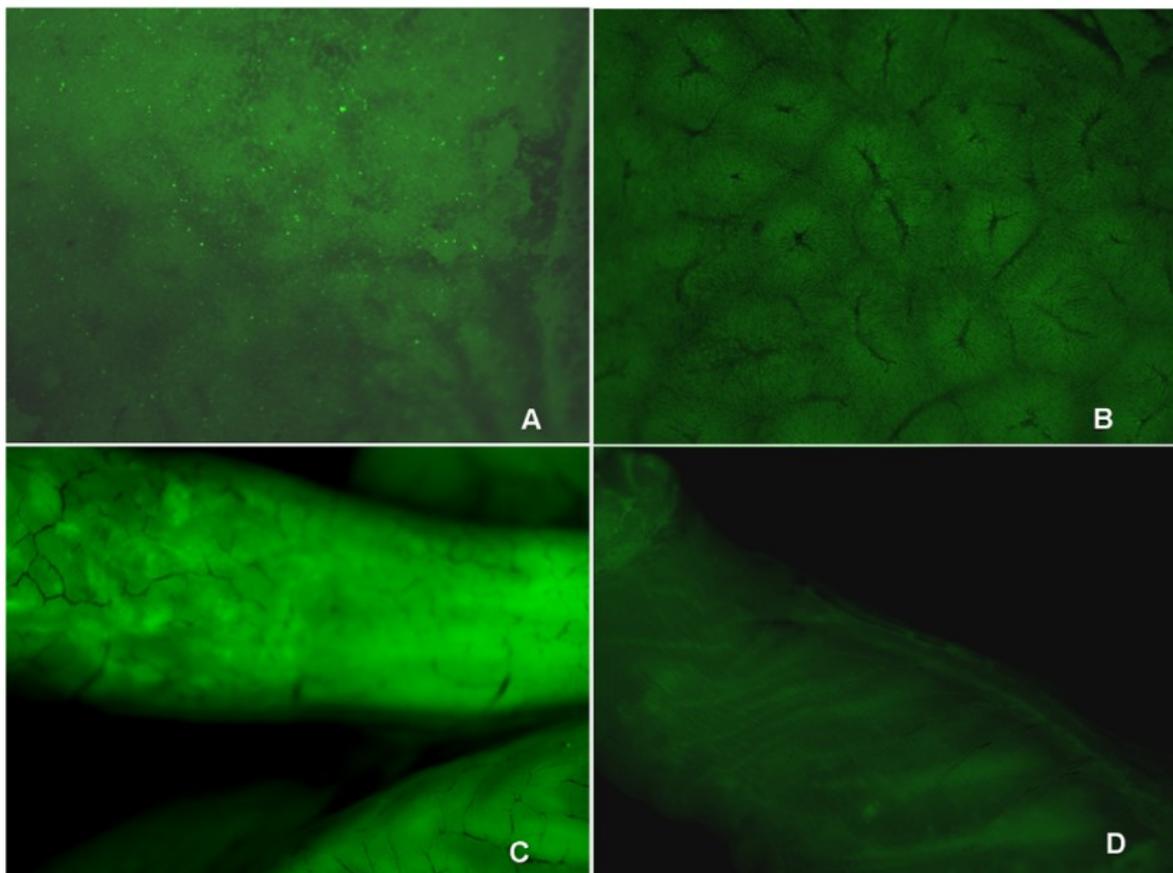


Figura 12: Monitoraggio della carica batterica di *Salmonella enterica* sierovar *Paratyphi B GFP* in Fegato (A): non trattato (B): trattato e con TAwT+TB-kk - ed intestino (C): non trattato (D): trattato con TAwT+TB-kk.

Si può notare che negli organi degli animali trattati con peptidi antimicrobici TA + TB-KK la fluorescenza diminuiva nettamente grazie al trattamento.

L'analisi dei parametri del sistema circolatorio come la riduzione dei globuli rossi, la ridotta concentrazione di emoglobina, così come la diminuzione totale dei leucociti e l'aumento percentuale dei neutrofili e degli eosinofili, indicano una risposta del sistema immunitario ad una infezioni in corso. Per cui si ha una attenuazione di questi parametri nel controllo negativo.

La formula leucocitaria dei topi trattati non mostra invece una alterazione del numero totale di globuli rossi e di globuli bianchi significativa, ne un notevole variazione nel numero di neutrofili ed eusinofili, indice che le temporine è in grado di intervenire sulla manifestazione dell'infezione in corso.

	Controllo negativo S. enterica	Attività S. enterica TB	Attività S. enterica TA + TBm	Valore di riferimento
Globuli				
Bianchi	1,23 m/mm ³	8,4 m/mm ³	3,43 m/mm ³	4-15 m/mm ³
Linfociti	38,1%	67,6%	51,9%	30-90%
Monociti	12,7%	8,8%	20,2%	0-10%
Neutrofili	40,8%	23,3%	26,5%	5-40%
Eosinofili	8,1%	0,2%	0,8%	0-1,5 %
Basofili	0,3%	0,1%	0,6%	0-1,5 %
Globuli rossi	10,93 M/mm ³	9,29 M/mm ³	7,63 M/mm ³	7-12 M/mm ³
MCV	46,8 fl	46,8 fl	48,3 fl	45-50 fl
HCT	51,1%	43,4%	36,8%	39-49%
MCH	12,6 pg	12,1 pg	11,9pg	10-12pg
MCHC	27,0 g/dl	26,0 g/dl	24,7 g/dl	-
RDW	10,9	13,8	19,7	-
Hb	13,8 g/dl	11,3g/dl	9,1 g/dl	12-16 g/dl
Piastrine	611 m/mm ³	343 m/mm ³	335 m/mm ³	300-500 m/mm ³
MPV	5,8 fl	6,5 fl	6,8 fl	6-7 fl
PDW	6,2	7,2	7,5	-

Tabella 9: Emocromo e formula leucocitaria dei topi trattati e non trattati con la miscela di peptidi e i valori di riferimento.

Per monitorare l'evolversi dell'infiammazione negli animali sono state monitorati i livelli di espressione delle citochine (TNF- α , IL-6, IL-4, INF- γ) nel rene di topi infettati con *Staphilococcus aureus* (10^6 CFU/topo) mediante rtq-PCR.

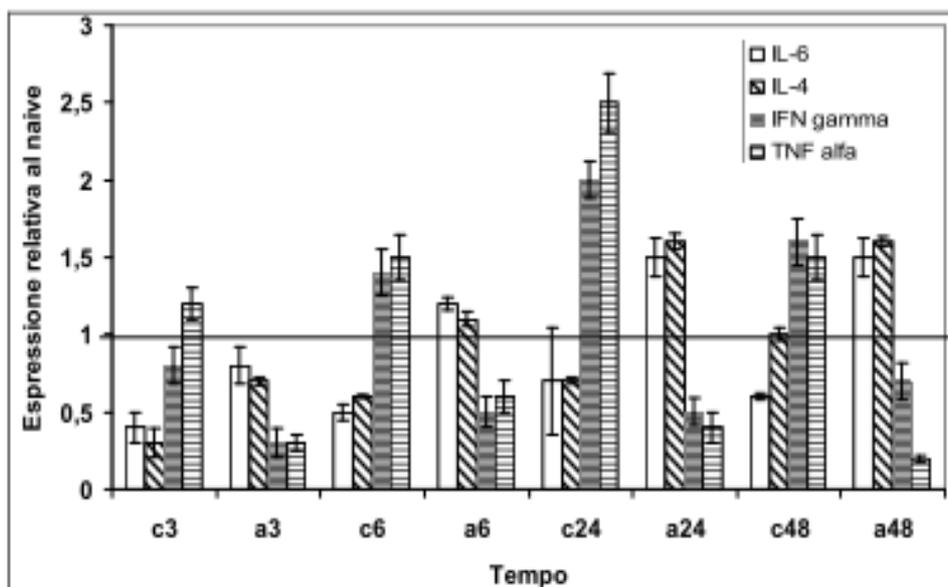


Figura 13: Valori per le proteine pro-infiammatorie misurati tramite misurazione dei livelli di espressione del RNA in cellule del rene. Parametri espressi come media un relazione al valore del naive

I topi trattati, rispetto a quelli non trattati, hanno mostrato livelli più bassi delle citochine pro-infiammatorie TNF- α e INF- γ già dopo 6 ore dall'infezione e soprattutto a 24 ore in cui si ha un picco. Le citochine IL-4 ed IL-6 hanno sia un'azione sia pro- che anti-infiammatoria a seconda che siano sovra o sottoesprese. I topi trattati hanno mostrato alti livelli di queste citochine già dopo 6 ore, che rimangono costanti anche a 24 e 48 ore, indicativa di una risposta più equilibrata tra T_H1 e T_H2.

Sono stati effettuati esperimenti somministrando ai topi una dose sub-letale di batterio (10^6 CFU/topo per *Staphylococcus aureus* A170, e 10^5 CFU/topo per *Salmonella enterica* sierovar paratyphi B) per poi andare ad iniettare la miscela di peptidi a 6 giorni di distanza dall'infezione.

La combinazione TAwT 75 μ g/topo e TB-kk 35 μ g/topo si è mostrata efficace nella sterilizzazione degli animali entro 5 giorni dalla somministrazione dei peptidi, per entrambi i batteri come indicato nei grafici seguenti.

E' stata monitorata anche la temperatura corporea degli animali infettati ed in quelli trattati, riscontrando un aumento considerevole di quest'ultima nei topi infetti rispetto a quelli trattati con la Temporina.

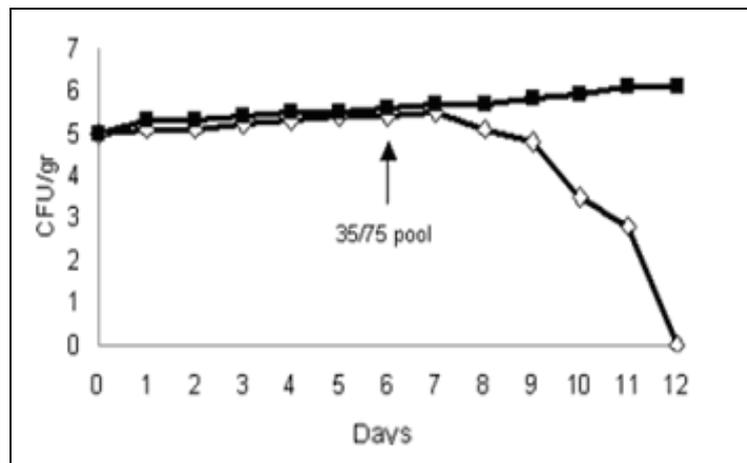


Figura 14: Monitoraggio della carica batterica di *Staphylococcus aureus*, 10^6 CFU/topo, dose sub-letale, trattati con TAwT 75 μ g/topo+TB-kk 35 μ g/topo.

Organo bersaglio: Rene.

● Controllo *Staphylococcus aureus*
 ▲ Attività *Staphylococcus aureus* A170 +AMPs

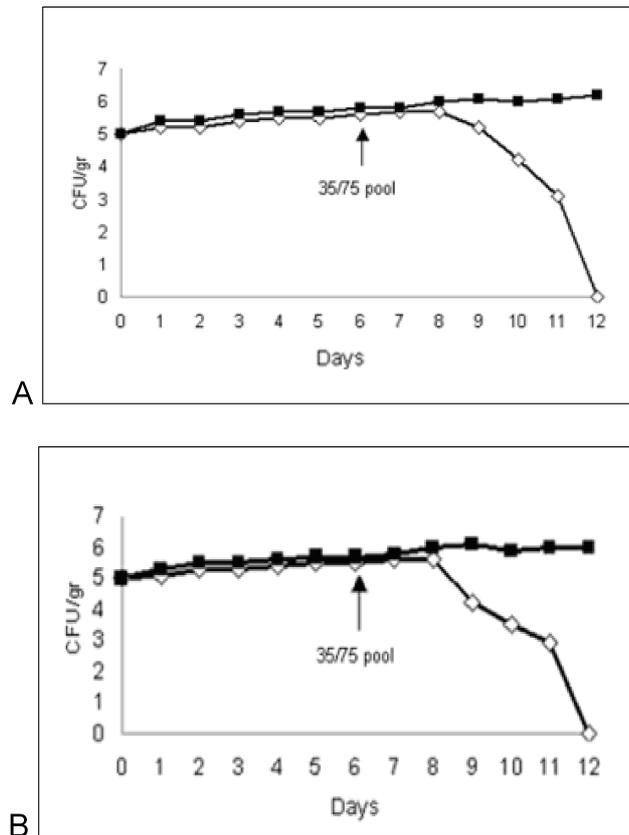


Figura 15: Monitoraggio della carica batterica di *Salmonella e. paratyphi B* riscontrata nel fegato. Concentrazione batterica di partenza 10^5 CFU/topo, dose sub-letale e trattamento dopo 6 giorni dall'infezione. Mix di peptidi TAwT 75 μ g/topo+ TB-kk 35 μ g/topo.

A) Organo bersaglio: Fegato

Controllo *S. enterica* sv.

Attività enterica sv.

paratyphi B+ AMPs

paratyphi B

B) Organo bersaglio: Intestino

Controllo *S. enterica* sv.

Attività *S. enterica* sv.

paratyphi B+ AMPs

paratyphi B

Per monitorare l'attività anti-infiammatoria del Temporine sono state monitorate anche le citochine TNF- α , IL-6, IL-4, INF- γ nelle condizioni di infezione con la dose sub-letale di batterio. I topi sono stati infettati con *Salmonella enterica* sierotipo paratyphi B (10^5 CFU/topo), e trattati con Temporine (miscela TAwT 75 μ g/topo+ TB-kk 35 μ g/topo) dopo 6 giorni.

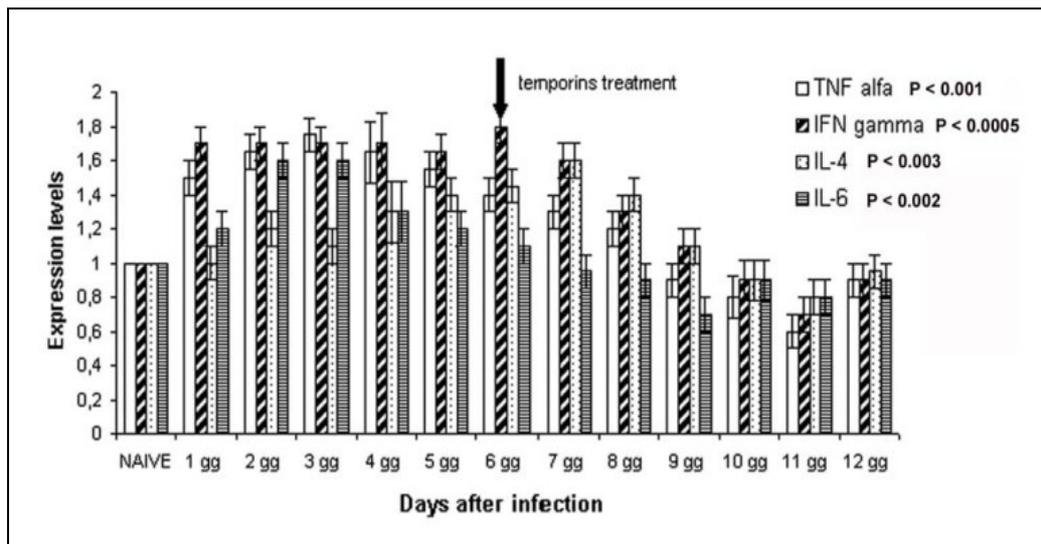


Figura 16: livelli di espressione di citochine TNF- α , IL-6, IL-4, INF- γ misurati tramite RT-PCR in cellule del rene. Ogni istogramma rappresenta il valore medio misurato in 2 topi, ognuno testato in triplicato ed è in relazione al valore del naive.

I livelli di espressione di citochine nel fegato sono stati monitorati quotidianamente mediante rtq-PCR fino a 12 giorni. L'esperimento mostra una graduale diminuzione dei livelli di citochine con il trascorrere dei giorni, a partire dal trattamento con le citochine, fino ad arrivare entro 5 giorni ai stessi livelli di espressione presenti nel topo non infettato. La miscela di Temporine (TAwt 75 $\mu\text{g}/\text{topo}$ e TB-kk 35 $\mu\text{g}/\text{topo}$) sembrerebbe modulare l'espressione di alcune citochine diminuendo l'azione infiammatoria nell'organismo.

Visualizza dizionario dettagliato

4.3 STUDI EFFETTUATI SULLE ROYAL-JELLINE

L'attività antimicrobica delle Royal-jelline, è stata testata sia individualmente, che in varie combinazioni, e nella loro forma naturale o in modificazioni chimiche.

I batteri contro cui le Royal-jelline sono state testate sono stati gli stessi utilizzati per gli studi sulle Temporine: Gram-Positivi (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) e Gram-negativi (*Salmonella enterica* sierovar paratyphi B e sierovar typhimurium, *Escherichia coli*).

Nella loro forma analoga ai peptidi naturali le Royal-jelline sono risultate essere poco attive. I valori delle MIC 100 rilevate dopo le 16 ore di osservazione sono stati riportati di seguito in tabella.

	RJ1	RJ2	RJ3
BATTERI			
Gram-positivi			
Staphylococcus aureus A170	> 400	> 400	> 400
Staphylococcus aureus A172	400	> 400	> 400
Staphylococcus aureus 7	400	> 400	> 400
Listeria monocytogenes	200	> 400	> 400
Gram-negativi			
Salmonella paratyphi B	400	> 600	> 600
Salmonella typhimurium	400	> 600	> 600
Escherichia coli	200	> 400	300

Tabella 10: MIC100 di Royal-jelline 1, 2 e 3 misurata in µg/ml

I peptidi sono stati quindi modificati mediante l'aggiunta di 3 amminoacidi nella formula di struttura (GGY) posizionati all'estremità C-terminale, al fine di aumentare la loro capacità di interagire con le membrane batteriche. Per quanto riguarda l'attività antimicrobica apportata da diverse combinazioni di peptidi RJ1, RJ2 ed RJ3 e dei rispettivi peptidi analoghi modificati, non si sono evidenziati effetti sinergici tra le molecole ma effetti di additività. Ciò potrebbe indicare che essi agiscono indipendentemente l'uno dall'altro.

	RJ1-GGY	RJ2-GGY	RJ3-GGY
BATTERI			
Gram-positivi			
Staphylococcus aureus A170	120	200	150
Staphylococcus aureus A172	80	150	100
Staphylococcus aureus 7	100	100	100
Listeria monocytogenes	120	200	200
Gram-negativi			
Salmonella paratyphi B	80	200	100
Salmonella typhimurium	80	100	100
Escherichia coli	30	200	100

Tabella 11: MIC100 di Royal-jelline 1, 2 e 3 modificate con la presenza degli amminoacidi (GGY) posizionati all'estremità C-terminal, misurati in µg/ml.

4.4 SINERGIE TRA PEPTIDI DI DIVERSA NATURA

Nei successivi esperimenti sono state effettuate prove di sinergie tra Temporine e Royal-jelline. Gli studi effettuati hanno evidenziato che i due peptidi miscelati tra loro, sono in grado di dare una discreta attività antibatterica rispetto a quando vengono usati singolarmente. Nella tabella seguente sono stati riportati i risultati dei Test di attività antimicrobica in cui minime concentrazioni di peptidi hanno dato il 100% di inibizione della carica batterica (MIC100 di A + B). Sono stati calcolati anche gli indici FIC per verificare le condizioni in cui si aveva un effetto sinergico ($FIC \leq 0,5$) come riportato in tabella.

Batteri		TA + RJ1	TB +	TB-kk + RJ1mod
<i>Staphilococcus Aureus A170</i>	FIC	6 + 100 0,85	11 + 50 0,56	2 + 20 0,50 sin
<i>Staphilococcus Aureus A 172</i>	FIC	/	/	2 + 30 0,45 sin
<i>Listeria monocitogenes</i>	FIC	6 + 50 0,45 sin	6 + 100 0,80	3 + 50 0,50 sin
<i>Salmonella Typhimurium</i>	e. FIC	110 + 80 0,60	/	2 + 8 0,50 sin
<i>Salmonella paratyphi B</i>	e. FIC	/	/	2 + 24 0,50 sin
<i>Escherichia coli</i>	FIC	60 +40 0,68	/	3 + 10 0,50 sin

Tabella 12: MIC100 di sinergie tra Temporine e Royal-jellina 1, sia modificati che non modificati, misurati in µg/ml e rispettivi valori di FIC.

5. DISCUSSIONE

Gli analoghi di Temporine A e B sono stati studiati in vitro, e la loro attività batteriostatica e battericida su batteri Gram-positivi (10-50 µg/ml) e sui Gram-negativi (125- 400 µg/ml) era evidente già dopo 4 ore. Inoltre la Temporina B è risultata essere capace di esplicare un'azione antimicrobica contro i batteri Gram-negativi solo a concentrazioni elevate (in alcuni casi maggiore di 400 µg/ml). Anche il test dell'alone di inibizione ha confermato la capacità dei peptidi di inibire la crescita batterica.

La maggior parte delle modifiche strutturali sono state apportate proprio nel peptide Temporina B, aggiungendo alcuni amminoacidi, quali KK e KKβAβA, all'estremità N-terminale della molecola. Tali piccole alterazioni della struttura sono state in grado di influenzare fortemente le sue proprietà nell'azione batteriostatica e battericida. Il peptide modificato risulta essere molto più efficace sui batteri Gram-negativi (10 - 25 µg/ml) rispetto alla TB originale (200 - 400 µg/ml).

Per ottenere dettagli sulla struttura secondaria dei peptidi e per dimostrare che l'aggiunta della coda KKβAβA nei derivati fluorescenti non influenza la struttura secondaria del peptide, è stata effettuata una analisi CD su TB e TB-KKβAβA in tampone sodio-fosfato (PBS) a pH 7.4 e in tampone sodio-fosfato (PBS) + Sodio Dodecil Solfato (SDS) pH 7.4. L'SDS è ampiamente utilizzato per simulare la carica negativa della membrana batterica. Questa analisi mostra che entrambi i peptidi non hanno una struttura secondaria definita in tampone fosfato, mentre assumono una conformazione α-elicoideale in SDS. Questi risultati suggeriscono che l'aggiunta della sequenza KKβAβA al N-terminale non altera la struttura secondaria del peptide stesso e sia TB che TB-KKβAβA hanno una struttura secondaria definita solo quando interagiscono con le membrane batteriche. Inoltre, il confronto degli spettri CD di Temporina B qui descritti, e quelli di Temporina A riportati in letteratura (*Carotenuto et al 2008*) indica che i peptidi hanno la stessa attività e la stessa conformazione. L'aggiunta dei due residui positivi di Lisina all'N-terminale conferisce all'analogico della TB-KK una forte sinergia se miscelato con la Temporina A originale sia su ceppi batterici Gram-positivi che Gram-negativi.

Le alterazioni della membrana dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi (*Staphylococcus aureus A170* e *Salmonella enterica* sierotipo paratyphi B) e gli effetti sulla vitalità e sulla morfologia delle cellule batteriche apportate dall'utilizzo di questi due peptidi, sono stati studiati mediante Microscopio Ottico a Fluorescenza (MOF) e Microscopia elettronica (SEM). Dopo un trattamento con i rispettivi coloranti in grado di conferire fluorescenza ai peptidi a varie lunghezze d'onda (rodamina e fluoresceina) i batteri (*Staphylococcus aureus A170* e *Salmonella enterica* sierotipo Paratyphi B) sono stati visualizzati al MOF. La combinazione di TA-Rho e TB-Fluo ha evidenziato la corrispondenza tra la fluorescenza e la posizione dei batteri nel campo visivo, mostrando la predilezione dei peptidi per le membrane batteriche.

Risultati analoghi si sono ottenuti visualizzando la membrana batterica mediante la microscopia elettronica (SEM). Si è evidenziato con entrambi i tipi di batteri e le stesse combinazioni di TA e di TB-KKβAβA precedentemente indicate, che il trattamento causa il danneggiamento delle membrane batteriche nei campioni

trattati, con la rottura della membrana e riversamento del liquido citoplasmatico, rispetto a quelli non trattati. Questo può essere il risultato di una grave perturbazione delle membrane batteriche. Anche il Test dell'alone di inibizione conferma che la combinazione di TA e TB-KK β A β A è più attiva rispetto all'utilizzo dei peptidi da soli.

Studi di attività emolitica di varie concentrazioni di peptide TA e TB-KK β A β A effettuati sui globuli rossi del topo sono stati utili per osservare che le miscele di peptidi non fossero dannose per le cellule eucariotiche. Tali studi, inoltre, hanno rivelato che una miscela di peptidi di 100 μ g/topo di TA e 35 μ g/topo di TB-KK β A β A è il limite massimo in cui la miscela non determina un effetto emolitico (*Rinaldi et al., 2002*). La miscela somministrata alla concentrazione di dopo una dose letale di batterio (75/35 per *Staphylococcus aureus*, e 100/35 per *Salmonella enterica* P.B.), hanno ridotto la mortalità degli animali del 100%. Inoltre, la stessa miscela, somministrata 7 giorni dopo l'infezione a topi infettati con una dose sub-letale di suddetti batteri, sterilizza il 100% degli animali entro un periodo di 3-6 giorni.

La sterilità è stata raggiunta nel sangue e gli organi bersaglio, i reni, nel caso di infezione da *Staphylococcus aureus*, ed il fegato ed il tratto gastrointestinale nel caso di *Salmonella enterica* P.B. In nessun caso sono stati osservati batteri resistenti alle concentrazioni 75/35 e 100/35 somministrate agli animali durante gli esperimenti. Questi risultati suggeriscono che la membrana batterica, bersaglio delle Temporine, è una componente cellulare che i batteri non possono modificare facilmente per acquisire resistenza. Questo risultato assume grande valore alla luce della crescente incidenza di batteri con antibiotico resistenza.

Le Temporine hanno evidenziato anche un notevole effetto anti-infiammatorio in vivo, il peptide sarebbe in grado di contrastare la sepsi. Inoltre i peptidi testati sembrano modulare l'infiammazione attraverso l'espressione di citochine coinvolte nella risposta infiammatoria. Di particolare rilievo l'espressione del IL-6, una citochina nota per controllare il livello delle citochine pro-infiammatorie quali TNF- α e INF- γ senza interferire con l'espressione delle citochine IL-4 (*Xing et al., 1998*).

L'attività antimicrobica delle Royal jelline, è stata testata sia singolarmente, che in varie combinazioni, e nella loro forma naturale e modificate chimicamente. Nella loro forma naturale le Royal-jelline sono risultate essere poco attive (400-800 μ g/ml).

Gli analoghi del peptide modificati all'estremità C-terminale presentano 3 amminoacidi, due Glicine ed una Tirosina (GGY). Le RJ-(GGY) si sono mostrate più efficaci (30- 200 μ g/ml) rispetto alle RJ native.

Al fine di verificare la possibilità di un'azione sinergica tra peptidi di diversa natura sono state combinati tra loro Temporine e Royal-jelline, e sono stati testati sia sui batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) sia sui Gram-negativi (*Salmonella enterica* sierovar paratyphi B e sierovar typhimurium, *Escherichia coli*). Gli studi effettuati hanno evidenziato che la miscela TB-KK + RJ1-GGY è in grado di dare un'attività antibatterica sinergica rispetto a quando i peptidi vengono usati singolarmente. Essi inoltre hanno mostrato non avere attività emolitica alle concentrazioni testate.

6. CONCLUSIONE

I peptidi presi in considerazione in questo studio (Temporina A e B e della Royal-jelline) presentano una potente attività antimicrobica in vitro. Questi peptidi possono essere considerati dei modelli per la progettazione futura di nuove terapie contro le malattie infettive soprattutto in vista della crescente resistenza dei microrganismi ai farmaci attualmente disponibili sul mercato.

In conclusione possiamo affermare che: Le TA e TB mostrano un'azione batteriostatica/battericida su Gram-positivi (10-30 µg/ml) e sui Gram-negativi (125-400 µg/ml) già dopo 4 ore; Le TB modificate al N-terminale (TB-KK e TB-KKβAβA) si è mostrato più efficace sui Gram-negativi (10- 25 µg/ml) rispetto alla TBwt (125- 400 µg/ml); Le RJ modificate al C-terminale (RJ1-GGY) si mostrano più efficaci (30 - 200 µg/ml) rispetto alle RJwt (400 - 800 µg/ml).

Si sono inoltre evidenziate due combinazioni di peptidi in grado di agire in maniera sinergica contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi quali TA + TB-KK e TB-KK + RJ1-GGY. Infine è stata analizzata in vivo una di queste due sinergie verificando che dosi non tossiche di TA + TB-KK in vivo sono in grado di abbattere la mortalità degli individui modello infettati a cui viene somministrata, di diminuire la carica microbica a livello di organi e di interagire con la risposta infiammatoria acquisita modulando l'infiammazione.

Questi peptidi potrebbero essere considerati potenziali agenti terapeutici per contrastare le infezioni batteriche nell'uomo specie dei ceppi antibiotico-resistenti e contro la sepsi, o come conservanti naturali per la fabbricazione di prodotti alimentari con una maggiore *shelf-life*.

7. BIBLIOGRAFIA

- Albert S, Klaudiny J. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. *J Insect Physiol.* 2004;50(1):51-9.
- Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun.* 1999;67:6084–6089.
- Bierbaum G, Sahl HG. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol.* 1985 Apr;141(3):249-54.
- Boman HG. Antimicrobial peptides. Chairman's opening remarks. *Ciba Found Symp.* 1994;186:1-4.
- Boman HG. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev.* 2000 Feb; 173:5-16. Review.
- Boman HG - Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. (2003) *J Intern Med* 254:197-215.
- Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA.* 1992 Dec 23-30;268(24):3452-5. Review.
- Brogden KA, Nordholm G, Ackermann M. Antimicrobial activity of cathelicidins BMAP28, SMAP28, SMAP29, and PMAP23 against *Pasteurella multocida* is more broad-spectrum than host species specific. *Vet Microbiol.* 2007 Jan 17;119(1):76-81.
- Bulet P, Menin L. "Anti-microbial peptides: from invertebrate to vertebrates." (2004) *Immunol. Rev.* 198 169-184.
- Buras J, Holzmann B, Sitkovski M. (2005). Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 855- 865
- Capparelli R, Romanelli A, Iannaccone M, Nocerino N, Ripa R, Pensato S, Pedone C, Iannelli D, (2009) - Synergistic antibacterial and anti-inflammatory activity of temporin A and modified temporin B in vivo – *Plos*
- Capparelli R, Amoroso MG, Palumbo D, Iannaccone M, Faleri C, Cresti M.- **Two plant puuroindolines colocalize in wheat seed and in vitro synergistically fight against pathogens.** (2005); *Plant Mol Biol* 58(6):857-67.
- Capparelli R, Palumbo D, Iannaccone M, Ventimiglia I, Di Salle E, Capuano F, Salvatore P, Amoroso MG. **Cloning and expression of two plant proteins: similar antimicrobial activity of native and recombinant form.** (2006); *Biotechnol Lett.* 28(13):943-9.
- Capparelli R, Ventimiglia I, Palumbo D, Nicodemo D, Salvatore P, Amoroso MG, Iannaccone M. **Expression of recombinant puuroindolines for the treatment of staphylococcal skin infections (acne vulgaris).** (2007); *J Biotechnol.* 20;128(3):606-14.

- Carotenuto, A.; Malfi, S.; Saviello, M.R.; Campiglia, P.; Gomez-Monterrey, M.I.; Mangoni, M.L.; Marcellini Herculani Gaddi, M.; Novellino, E.; Grieco, P.J. *Med. Chem.* "A Different Molecular Mechanism Underlying Antimicrobial and Hemolytic Actions of Temporins A and L". (2008). 51, 2354-2362.
- Chen Q, Wade D, Kurosaka K, Wang ZY, Oppenheim JJ, Yang D. Temporin A and related frog antimicrobial peptides use formyl peptide receptor-like 1 as a receptor to chemoattract phagocytes. (2004) *J Immunol.* 15;173(4):2652-9. PubMed PMID: 15294982.
- Ciriani O, Giacometti A, Ghiselli R, Kamisz W, Orlando F, Macchegiani F, Silvestri C, Lucci A, Lucasiak J, Saba V, Scalise G, (2005) – Temporin A alone and in combination with imipenem reduced in a mouse model of Staphylococcal sepsis - *J Infect Dis* 192(9);1613-20
- Coin I, Beyermann M, Bienert M. - Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. - *Nat Protoc.* 2007;2(12):3247-56.
- Cormack BP, Bertram G, Egerton M, Gow NA, Falkow S, et al. (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143 (Pt 2): 303–311.
- Dai M, Ziesman S, Ratcliffe T, Gill RT, Copley SD. Visualization of protoplast fusion and quantitation of recombination in fused protoplasts of auxotrophic strains of *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2005 Jan;7(1):45-52.
- Demchenko AP, Kostrzhevskaja EG. [Melittin: structure, properties, interaction with a membrane]. *Ukr Biokhim Zh.* 1986 Sep-Oct;58(5):92-103. Review.
- Donelli G, Francolini I, Romoli D, Guaglianone E, Piozzi A, Raganath C, Kaplan JB. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrob Agents Chemother.* (2007);51(8):2733-40.
- Dubreil L, Biswas SC, Marion D. Localization of puroindoline-a and lipids in bread dough using confocal scanning laser microscopy. *J Agric Food Chem.* 2002 Oct 9;50(21):6078-85.
- Edman P (1950) Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica.* 283–293.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy European Medicines Agency (EMA), London, United Kingdom. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), Brussels, Belgium - **Joint Opinion on antimicrobial resistance (Amr) focused on zoonotic infections**" (2009) - *EFSA Journal* 2009; 7(11):1372 Question No. EFSA-Q-2008-781. doi:10.2903/j. efsa. 2009. 1372 European Medicines Agency Reference EMEA/CVMP/447259/2009
- Fassi Fehri L, Wróblewski H, Blanchard A. Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis*. *Antimicrob Agents Chemother.* (2007);51(2):468-74. Epub 2006 Nov 13.
- Feezor R, Oberholzer C, Baker H, Novick D, Rubinstein M, Moldawer L, Pribble J, Souza S, Dinarello C, Ertel W, Oberholzer A. (2006). Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun* 71: 5803-5813.
- Fontana R, Mendes MA, Monson de Souza B, Konno K, Marcondes César LM, Malaspina O, Palma MS – Jelleines: a family of antimicrobial peptides

from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*) - *Peptides* 25 (2004) 919–928

- Gautier MF, Aleman ME, Guirao A, Marion D, Joudrier P. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol Biol.* 1994 Apr;25(1):43-57
- Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, Orlando F, et al. Interaction of antimicrobial peptide temporin L with lipopolysaccharide in vitro and in experimental rat models of septic shock caused by gram-negative bacteria. (2006) *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2478–2486.
- Gidalevitz D; Ishitsuka Y; Muresan A S; Konovalov O; Waring A J; Lehrer R I; Lee K Y. - Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes.- (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100: 6302–6307
- Giroux MJ, Morris CF. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26;95(11):6262-6
- Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Mocchegiani F, Orlando F, Kamysz W, Del Prete MS, Lukasiak J, Scalise G, Saba V. Temporin A as a prophylactic agent against methicillin sodium-susceptible and methicillin sodium-resistant *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection. *J Vasc Surg.* 2002;36(5):1027-30.
- Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 2000 Sep;8(9):402-10. Review.
- Herbig M.E., Weller K., Krauss U., Beck-Sickinger A.G., Merkle H.P. and Zerbe O., Membrane surface-associated helices promote lipid interactions and cellular uptake of human calcitonin-derived cell penetrating peptides. *Biophysical Journal*, Dec. 2005, 89(6): 4056-4066.
- Hoffmann JA, Reichhart JM, Hetru C. Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol.* 1996 Feb;8(1):8-13. Review.
- Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Feb;1778(2):357-75. Review.
- Huang CJ, Favre I, Moczydlowski E. Permeation of large tetra-alkylammonium cations through mutant and wild-type voltage-gated sodium channels as revealed by relief of block at high voltage. *J Gen Physiol.* 2000 Apr;115(4):435-54.
- Jerala R, Porro M. Endotoxin neutralizing peptides. (2004) *Curr Top Med Chem.*;4(11):1173-84. Review.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003 Apr;29(4):530-8.
- Levy SB, Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10: S122- S129
- Levy F, Rabel D, Charlet M, Bulet P, Hoffmann JA, Ehret-Sabatier L. Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. *Biochimie.* 2004 ;86(9-10):607-16.
- Li Z, Zhang S, Zhang J, Liu M, Liu Z. Vitellogenin is a cidal factor capable of killing bacteria via interaction with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Mol Immunol.* 2009 Oct;46(16):3232-9

- Lüders T, Birkemo GA, Fimland G, Nissen-Meyer J, Nes IF. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* (2003);69(3):1797-9.
- Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009 Mar;30(3):131-41.
- Maher S, McClean S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2006 28;71(9):1289-98.
- Malagoli D, Casarini L, Sacchi S, Ottaviani E. **Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis** (2007) *Fish Shellfish Immunol.*23(1)171-7
- Mangoni ML Miele R, Renda TG, Barra D and Simmaco M, -Molecular cloning of a bombin gene from *Bombina orientalis*: detection of NF-kappaB and NF-IL6, binding sites in its promoter. (1998) *FEBS Lett.* 431: 23-28.
- Mangoni ML, Rinaldi AC, Di Giulio A, Mignogna G, Bozzi A, Barra D, Simmaco M Structure Function-relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin *Eur J Biochem.* 267, 1447-1454
- Mangoni ML, Papo N, Barra D, Simmaco M, Bozzi A, Di Giulio A and Rinaldi AC Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. (2004) *Biochem J* 380: 859- 865.
- Mangoni ML, Saugar JM, Dellisanti M, Barra D, Simmaco M, Rivas L. **Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity.** *J Biol Chem.* 2005 14;280(2):984-90.
- Matsuzaki K, Yoneyama S, Murase O, Miyajima K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochemistry.* (1996) 25;35(25):8450-6.
- McPhee JB, Hancock RE. Function and therapeutic potential of host defence peptides. *J Pept Sci.* 2005 Nov;11(11):677-87. Review.
- Merrifield, "Solid Phase Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide", *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, 2149-2154
- Mignogna G, Simmaco M, Kreil G, Barra D. - Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *EMBO J.* 1993 Dec;12(12):4829-32.
- Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. **Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity.** *FEBS Lett.* (2000) Dec 15;486(3):185-90. Review.
- Mor A, Nguyen VH, Delfour A, Migliore-Samour D, Nicolas P. Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry.* 1991 Sep 10;30(36):8824-30.
- Niyonsaba F, Suzuki A, Ushio H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. The human antimicrobial peptide dermcidin activates normal human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 2009;160:243-249.
- Oren, Z. & Shai, Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47, 451-463.
- Papagianni M (2003) Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv* 21: 465-499.

- Park SH, Chiu YH, Jayawardena J, Roark J, Kavita U, Bendelac A. Innate and adaptive functions of the CD1 pathway of antigen presentation. *Semin Immunol.*1998 Oct;10(5):391-8. Review.
- Piers KL, Hancock RE. The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 1994 Jun;12(6):951-8.
- Rinaldi AC, Mangoni ML, Rufo A, Luzi C, Barra D, et al. (2002) Temporin L: antimicrobial, haemolytic and cytotoxic activities, and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles. *Biochem J* 368: 91–100
- Rosenfeld Y, Barra D, Simmaco M, Shai V, Mangoni ML (2006) A synergism between temporins toward gram-negative bacteria overcomes resistance imposed by the lipopolysaccharide protective layer. *J Biol Chem* 281: 28565-28574
- Salzet M. Antimicrobial peptides are signaling molecules. *Trends Immunol.* 2002; 23(6):283-4.
- Sato H, Feix JB. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* (2006);1758(9):1245-56.
- Schillaci D, Arizza V, Parrinello N, Di Stefano V, Fanara S, Muccilli V, Cunsolo V, Haagensen J.J.A, Molin S - Antimicrobial and antistaphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus* (2009)
- Schitteck B, Paulmann M, Senyurek I, Steffen H. The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases.(2008)*Infect. Disord. Drug Targets.*;8:135–143.
- Scott M G, Yan H, Hancock RE. Biological properties of structurally related alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Infect Immun.* (1999) ;67(4):2005-9.
- Scott M G, Dullaghan E, Mookherjee N, Glavas N, Waldbrook M, Thompson A, Wang A, Lee K, Doria S, Hamill P, Yu J J, Li Y , Donini O, Guarna M M,Finlay B B, North J R & Hancock R E W An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response - (2007) *Nature Biotechnology* 25, 465 - 472
- Schroder, J.M. - Epithelial peptide antibiotics.- (1999) *Biochem Pharmacol* 57;121-134.
- Shai Y., Oren Z., **Diastereoisomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides.** - (1996) *J Biol Chem.* 1996 Mar 29;271(13):7305-8.
- Shai Y Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. (2002) *Biopolymers* 66: 236–248.
- Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, et al. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. (1996) *Eur J Biochem* 242: 788–792.
- Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature.*1981 Jul 16;292(5820):246-8.
- Thevissen K, Osborn RW, Acland DP, Broekaert WF. **Specific binding sites for an antifungal plant defensin from *Dahlia (Dahlia merckii)* on fungal cells are required for antifungal activity.**(2000) *Mol Plant Microbe Interact.* Jan;13(1):54-61.
- Toh, Y., Mizutani, A., Tokunaga, F., Muta, T. and Iwanaga, S. Morphology of the granular hemocytes of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus*

- tridentatus and immunocytochemical localization of clotting factors and antimicrobial substances. (1991) *Cell Tissue Res.* 266, 137-147.
- Tomasinsig L, Skerlavaj B, Papo N, Giabbai B, Shai Y, Zanetti M.- Mechanistic and functional studies of the interaction of a proline-rich antimicrobial peptide with mammalian cells. (2006) *J Biol Chem.* 6;281(1):383-91.
 - Tossi A, Sandri L. Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr Pharm Des.* 2002;8(9):743-61. Review.
 - Vaz Gomes, A.; de Waal, A.; Berden, J. A.; Westerhoff, H. V. - Biochemistry **Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes.** (1993), 32, 5365–5372.
 - Vizioli, J. & Salzet, M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. (2002) *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 494–496
 - Wang G, Li X, Wang Z. APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. (2009) *Nucleic acids Res.*;37:D933–D937.
 - Westerhoff HV, Juretić D, Hendler RW, Zasloff M. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Sep;86(17):6597-601
 - Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, lei X, Achong M. (1998) IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101: 311-320.
 - Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L. & Huang, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores (2001) *Biophys J* 81,1475-85
 - Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance". *Pharmacol. Rev.* 2003, 55, 27–55.
 - Zasloff M Antimicrobial peptides of multicellular organisms.(2002) *Nature* 415: 389-395.
 - Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1987);84(15):5449-53.
 - Zeya HI, Spitznagel JK. Antimicrobial specificity of leukocyte lysosomal cationic proteins. *Science.* 1966 Nov 25;154(752):1049-51.
 - Zhao, H., Mattila, J. P., Holopainen, J. M. & Kinnunen, P. K. Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. (2001) *Biophys. J.* 81, 2979–2991.
 - Zhao H, Rinaldi A, di Giulio A, Simmaco M, Kinnunen P K.. Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model biomembranes. Comparison of temporin B and L (2002) *Biochemistry* 41: 4425-4436.

Dottorato in Scienze Biotecnologiche
XXIII ciclo

Dottoranda: Raffaella Ripa

Docente guida: Rosanna Capparelli

Pubblicazioni

- Capparelli R, Romanelli A, Iannaccone M, Nocerino N, Ripa R, Pensato S, Pedone C, Iannelli D, (2009) - Synergistic antibacterial and anti-inflammatory activity of temporin A and modified temporin B in vivo – Plos
- G. Orefice, N. Nocerino, C. Avitabile, R.C. Montella, R. Ripa, C. Pedone , A. Romanelli , e R. Capparelli - STUDI SU PEPTIDI ANALOGHI DELLA TEMPORINA B Giornate scientifiche 2010

Dottorato in Scienze Biotecnologiche
XXIII ciclo

Dottoranda: Raffaella Ripa
Docente guida: Rosanna Capparelli

Sedi di svolgimento del Dottorato

- Laboratorio di Immunologia del Dipartimento di Scienze del Suolo delle Piante dell'Ambiente e delle Produzioni animali, della Facoltà di Agraria dell'Università "Federico II" di Napoli. (svolgimento della totalità del dottorato)
- Laboratori del Dipartimento di Scienze Biologiche dell'Università "Federico II" di Napoli (2 mesi)
- Istituto Nazionale per lo studio e la cura dei Tumori "Fondazione G. Pascale" – Napoli (2 mesi)

Synergistic Antibacterial and Anti-Inflammatory Activity of Temporin A and Modified Temporin B In Vivo

Rosanna Capparelli^{1*}, Alessandra Romanelli², Marco Iannaccone¹, Nunzia Nocerino¹, Raffaella Ripa¹, Soccorsa Pensato², Carlo Pedone², Domenico Iannelli¹

1 Department of Soil, Plant, Environment and Animal Production Sciences, University of Naples "Federico II"- School of Biotechnological Sciences, Napoli, Italy, **2** Department of Biological Sciences, University of Naples "Federico II"- School of Biotechnological Sciences, Napoli, Italy

Abstract

Temporins are antimicrobial peptides secreted by the granular glands of the European red frog (*Rana temporaria*). They are 10–14 amino acid long polypeptides active prevalently against gram positive bacteria. This study shows that a synthetic temporin B analogue (TB-YK), acquires the capacity to act in synergism with temporin A and to exert antimicrobial and anti-inflammatory activity in vivo against gram positive and gram negative bacteria. Administration of 3.4 mg/Kg of temporin A (TA)+1.6 mg/Kg TB-YK, given to individual mice concurrently with a lethal dose of bacteria (gram positive or negative), rescued 100% of the animals. More importantly, the same doses of temporins, administered one week after experimental infection with a sub lethal dose of bacteria, sterilized 100% of the animals within 3–6 days. Also, it is described an animal model based on the use of sub lethal doses of bacteria, which closely mimics bacterial infection in humans. The model offers the possibility to test in a preclinical setting the true potential of TA and TB-YK in combination as antimicrobial and anti-inflammatory agents.

Citation: Capparelli R, Romanelli A, Iannaccone M, Nocerino N, Ripa R, et al. (2009) Synergistic Antibacterial and Anti-Inflammatory Activity of Temporin A and Modified Temporin B In Vivo. PLoS ONE 4(9): e7191. doi:10.1371/journal.pone.0007191

Editor: Joseph El Khoury, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, United States of America

Received: July 1, 2009; **Accepted:** August 11, 2009; **Published:** September 28, 2009

Copyright: © 2009 Capparelli et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work was supported by the "Futuro in Ricerca di Base" FIRB-Defens grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: capparelli@unina.it

Introduction

Antimicrobial peptides (AMP) are essential components of the innate immune system of plants and animals, including humans [1]. AMPs, though highly different in size and secondary structure, display important common characteristics, such as a net positive charge at neutral pH, the ability to interact with the bacterial membrane and kill a large spectrum of bacteria [2]. The worldwide phenomenon of bacterial resistance to conventional antibiotics has made urgent the search for antibacterial drugs active against antibiotic-resistant bacteria [3]. AMPs are among the most promising candidates, in view of their small size (which simplifies their chemical synthesis), a large spectrum of activity against gram positive and gram negative bacteria, and limited toxicity towards eukaryotic cells [4,5]. In particular, temporins are AMPs produced and secreted by the granular glands of the European red frog (*Rana temporaria*) [6,7]. They are amphipathic α -helical polypeptides, 10–14 amino acid long, containing only 1 or 2 positively charged amino acids (R or K). These peptides are amidated at the C-terminus as a result of an enzymatic post-translational reaction [8]. Temporins are active prevalently against gram positive bacteria, including methicilline and vancomycine-resistant staphylococci and enterococchi, and are non toxic on mammalian cells. Temporin L, which contains an arginine and a lysine residue in the sequence, is the only member of the family which exhibits antibacterial activity against both gram positive and negative bacteria [9]. Interestingly temporins A and B, in combination with Temporin L, show anti-bacterial activity against

Gram negative bacteria [10]. The mechanism of action of temporins has not entirely been clarified; it has been shown that the sequence, the charge distribution, the secondary structure all influence the ability of the peptides to interact with bacterial membranes; cationic AMPs preferentially interact with the negatively charged bacterial membranes by altering the membrane permeability [11,12]. In Gram negative bacteria the microbial wall is surrounded by the lipopolysaccharide layer (LPS), which represents a further hurdle for the peptides before the cytoplasmic membrane. It has been demonstrated that Temporins A and B oligomerize when they reach the LPS, suggesting that the inactivity of these peptides towards Gram negative bacteria may be due to the oligomerization process which in turn hampers the peptide uptake [10]. In contrast, Temporin L disaggregates when in contact with the LPS; furthermore it is also able to inhibit oligomerization of temporin A and B, allowing for the translocation of these peptides in the Gram negative inner membrane. Data recently reported on AMPs derived from a combinatorial library suggest that the antimicrobial activity of AMP is related to the ability of the peptide to destabilize membranes by partitioning into membrane interfaces and disturbing the organization of the lipids [13].

Few analogues of temporins have been investigated so far [14–17]. Dimeric Temporin A was shown to have antimicrobial activity also towards both the Gram negative bacteria *E.coli*, unlike the wt Temporin A [16]. The temporin A P3N analogue exhibits improved ability to lyse human red blood cells as compared to wt Temporin A and an improved antimicrobial activity especially

against Gram-positive bacterial strains and *Candida* [15]. In vitro experiments showed that the D isomer of Temporin B is active against several anaerobic bacteria and is also stable in the fecal milieu, suggesting it can be employed for the treatment of the *Clostridium difficile*. [17] The effect of Temporin A was also studied *in vivo* in a mouse model of *Staphylococcus sepsis*; it was found that the peptide reduces the lethality rates and bacterial growth, the antibacterial activity is enhanced when Temporin A was used in combination with the antibiotic Imipenem [18].

The present article demonstrated by *in vitro* and *in vivo* experiments that synthetic temporin A (in its native form) and a temporin B analogue act synergistically against the majority of gram positive and gram negative bacteria tested. Notably, the combination of the two temporins is active against methicillin-resistant strains of *S. aureus*.

Materials and Methods

Synthesis of antimicrobial peptides

The amino acids used for the peptide synthesis, Fmoc- β -Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH -, the Rink amide MBHA and the activators N-Hydroxybenzotriazole (HOBT) and O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU) were from Novabiochem (Gibbstown, NJ, USA). Acetonitrile (ACN) was from Reidel-deHaen (Seelze, Germany) and dry N,N-dimethylformamide (DMF) from LabScan (Dublin, Ireland). All other reagents were from Fluka (Milan, Italy). LC-MS analyses were performed on a LC-MS Thermo Finnigan with an electrospray source (MSQ) on a Phenomenex Jupiter 5 μ C18 300 Å, (150 \times 4.6 mm) column. Purification was carried out on a Phenomenex Jupiter 10 μ Proteo 90 Å (250 \times 10 mm) column. Peptides were synthesized on a Rink amide 4-methyl benzhydrylamine (MBHA) resin (0.63 mmol/g) using repetitive cycles of coupling, capping and deprotection. Amino acids (10 eq.) were preactivated for 5 min in the presence of a 0.5 M hydroxybenzotriazole (HOBT) and O-benzotriazole-N,N,N,N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU) (9.8 eq.) in dimethylformamide (DMF) solution and N,N-diisopropylethylamine (DIPEA) (30 eq) and coupled for 60 minutes. The resin was washed with DMF (two flow washes, 25 s each). Capping was performed with a solution of acetic anhydride/DIPEA/DMF (15/15/70 v/v/v) for 5 min, followed by two flow washes (25 s each) with DMF. Deprotection was performed with a solution of piperidine in DMF (20/80; v/v) for seven minutes. The resin was washed with DMF (two flow washes of 25 s each). At the end of the synthesis, the resin was washed with dichloromethane and dried in vacuum. The peptides were cleaved off the resin and deprotected by a treatment with a solution of trifluoroacetic acid (TFA)/triisopropyl silane (TIS)/H₂O (90/5/5) (90 minutes at room temperature). Peptides were purified using the following gradient: isocratic 30% water containing 0.1% TFA (5 min), followed by a gradient of 30–80% acetonitrile in water containing 0.1% TFA (30 min). Lyophilized peptides were dissolved in H₂O/CH₃COOH (1/1; v/v) and lyophilized again. All peptides were characterized by electrospray mass analysis.

Peptide labelling

Reactions with fluorophores were carried out on peptides still anchored to the resin. Two β alanines (β A) were added at the N-terminus of TB-YK and TA before labelling. [19] Fluorescein isothiocyanate or rhodamine isothiocyanate (10 eq; Sigma-

Aldrich, Milan, Italy) were dissolved in the minimum volume of dry DMF containing DIPEA (30 eq) and incubated for 2 hours at room temperature in the dark with the resin bound peptides. The resin was then washed with DMF, and the peptide cleaved off the resin, deprotected and purified as described above.

Circular dichroism

Circular dichroism (CD) spectra were recorded on a Jasco J-715 spectropolarimeter, equipped with a Jasco Peltier PTC-423S/15, using a 1 cm quartz cell. Spectra were recorded in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 and in 10 mM sodium phosphate, 20 mM sodium dodecyl sulphate (SDS) buffer pH 7.4 at 25°C. Peptides concentration was 5 μ M. Spectra were obtained as an average of eight scans, acquired in the range 320–195 nm. All spectra are reported in molar ellipticity per residue (mre) vs wavelength (nm).

Bacteria

The study included the following species: *Staphylococcus aureus* (isolate A170, A172, 007), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Paratyphi, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Escherichia coli*. Isolates were obtained from patients hospitalized at the Medical School of the University of Naples. Specimen were confirmed by PCR assay of the genes *sea* (*S. aureus*), *Mowd* (*L. monocytogenes*), *abe* (*S. enterica* serovar Paratyphi), *FliC* (*S. enterica* serovar Typhimurium), *sat* (*E. coli*) [20–23]. Bacteria were grown at 37°C in TSB medium (*S. aureus* and *L. monocytogenes*) or LB medium (the remaining bacterial species) (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD), harvested while in exponential phase (OD₆₀₀ nm; 0.6–0.8), centrifuged (8 \times 10⁵ g for 10 min), washed with saline (0.15 M NaCl) and resuspended in saline (10⁶–10⁷ CFU/ml).

S. enterica transformation. The green fluorescent protein (GFP) gene was cloned into the HindIII-PstI sites of the pUC19 plasmid. The plasmid was then introduced into *S. enterica* serovar Paratyphi B (isolate 0404572) by electroporation as described [24]. Briefly, bacteria were grown to mid-log phase in LB broth, washed with 10% glycerol in double distilled H₂O, suspended at 10¹² cells/ml and mixed with 1 μ g of DNA. An aliquot (40 μ l) was pulsed at 1.75 kV/cm, 800 Ω , and 25 μ F. Following electroporation, the transformed bacteria were incubated for 30 min at 37°C in 1 ml LB broth supplemented with 0.3 M sucrose. Bacteria were then spread on LB agar plates containing 100 μ g/ml ampicillin (Sigma-Aldrich, Milan, Italy).

Mice

Experiments were carried out on females BALB/c mice (aged 8–10 weeks) at the animal facility of the University of Naples. Untreated mice were infected intravenously with bacteria (*S. aureus*: 10⁷ CFU/mouse and *S. enterica* serovar paratyphi: 10⁶ CFU/mouse). Treated mice were infected (as just described) and immediately after were given intravenously the antimicrobial peptide combination (3.4 mg/Kg TA+1.6 mg/Kg TB-YK in saline (0.15 M NaCl). One gram of infected organs - the kidneys in the case of infection with *S. aureus*; liver and gastro intestinal (GI) tract in the case of infection with remaining bacteria - was homogenised in 1 ml saline and serially diluted in saline. CFU were evaluated by plating each dilution on Baird Parker agar (to detect the *S. aureus*) or XLT-4 agar (to detect the remaining bacteria). Plates were incubated overnight at 37°C.

Antibacterial activity

Bacteria were grown at 37°C in TSB (*S. aureus* and *L. monocytogenes*) or in LB medium (the remaining bacterial species),

harvested while in exponential phase (OD_{600} nm; 0.6–0.8), centrifuged (8×10^3 g for 10 min), washed with saline, resuspended in Muller Hinton (MH) broth at the concentration of approximately 10^9 CFU/ml and distributed, in triplicate, into 96 well plates (60 μ l/well), mixed with twofold dilutions of the antimicrobial (TA: 5–100 μ g, 40 μ l/well; TB-YK: 4–100 μ g, 40 μ l/well; TA 5 μ g+TB-YK 8 μ g, 40 μ l/well) and incubated at 37°C for 20 h. The minimal concentration of the antimicrobial at which 100% inhibition of growth was observed (MIC_{100}) was determined by measuring the absorbance at 600 nm (Biorad microplate reader model 680, Hercules, CA). The antibacterial activity was measured by spotting an aliquot (10 μ l) of each well on TSA or LB agar and counting the CFU. A potential synergism between temporins was evaluated by adding combinations of two temporins in a serial twofold dilutions (TA: 5–100 μ g; TB-YK: 4–100 μ g; 40 μ l/well) to wells containing 10^5 CFU/well in 60 μ l. The presence of synergism was established as described [10].

Inhibition zone assay

Bacteria were grown as described above, suspended in LB (2×10^7 CFU/ml), mixed with 3 ml of 0.7% soft agar (Sigma) and poured on Petri dishes containing 10 ml LB agar. Serial dilutions of the antimicrobial (TA and TB-YK) alone or in combination were deposited into holes (10 μ l/well) made into the agarose bed. Plates were then incubated at 30°C for 12 h.

Electron microscopy

Bacteria (*S. aureus* or *S. enterica* serovar Paratyphi; 10^6 CFU/60 μ l) were mixed on a microscope slide with the antimicrobial combination (*S. aureus*: 5 μ g TA+8 μ g TB-YK in a total volume of 40 μ l; *S. enterica* serovar Paratyphi: 100 μ g TA+4 μ g TB-YK in a total volume of 40 μ l), incubated overnight in 2.5% glutaraldehyde and then treated for 1 h, in succession, with 20%, 40%, 60% ethanol and overnight with 70% ethanol. The slides were finally washed with 90% and 100% ethanol for 1 h, dried at 37°C for 15 min and observed with the SEM Zeiss microscope (Evo 40, Jena, Germany).

Test of the haemolytic activity of the antimicrobials

The temporins were tested individually for their haemolytic activity using mouse red blood cells. The blood was collected from the tail of the animals and centrifuged (4×10^2 g for 3 min). The erythrocytes were washed with saline, suspended at 3×10^6 erythrocytes/ml, mixed with the peptide combination (75 μ g TA+35 μ g TB-YK in 100 μ l saline) and incubated for 1 h at 37°C. The haemolytic activity was measured according to the formula $OD_{peptide} - OD_{negative\ control} / OD_{positive\ control} - OD_{negative\ control} \times 100$ where the negative control (0% haemolysis) was represented by erythrocytes suspended in saline and the positive control (100% haemolysis) was represented by the erythrocytes lysed with 1% triton X100 [25].

Real time PCR of pro-inflammatory cytokines

Two groups of mice (4 mice/group) were infected intravenously with *S. enterica* serovar Paratyphi. One group of mice was used as untreated control, while the second group was injected intravenously with the antimicrobial (3.4 mg/Kg TA+1.6 mg/Kg TB-YK; 75 μ g TA+35 μ g TB-YK in 100 μ l, in saline) immediately after infection. Total RNA was isolated from mouse liver at 3, 6, 24 and 48 h after treatment by using Trizol reagent (Invitrogen, Milan, Italy). RNA was suspended in RNase-DNase free distilled water, assessed for concentration (by measuring the absorbance at 260 nm) and purity (by ascertaining that the A_{260}/A_{280} ratio was >1.9).

RNA (1 μ g) was then treated with 1U RNase-free DNase (Promega, Madison, WI). DNA contamination of RNA samples was excluded by PCR with primers specific for the *gapdh* gene. Reverse transcription was carried out with ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) and oligo(dT)₁₈. Real-time PCR was performed on 50 ng cDNA, using 1x master mix SYBR-Green (Applied Biosystem, Milan) in a StepOne Applied Biosystem instrument (Applied Biosystem, Milan). Reactions were performed in 20 μ l in triplicate with the following thermal profile: 95°C for 10 min and 45 cycles of 15 s at 95°C and 45 s at 60°C; 1 min at 60°C; 15 s at 95°C plus 0.5°C at each step of the melting curve. PCR primers (0.2 μ M each) were as follows: GAPDH forward, 5' TTCACCACCATGGAGAAGGC 3'; GAPDH reverse, 5' GGC-ATGGACT GTGGTCATGA 3'; IL-6 forward, 5' AAAGAGT-TGTGCA ATGGCAATT 3'; IL-6 reverse, 5' CAGTTTGGT-AGCATCCATCAT 3'; TNF- α forward, 5' TCTCAGCCT-CCTCTC ATTCTCT 3'; TNF- α reverse, 5' GTCTGGGCCATA-GAACTGATG 3'; IL-4 forward, 5'AATGTACCAGGAG CCA-TATCCAC 3'; IL-4 reverse, 5' TCACTCTCTGTGGTGT-CTTCGT 3'; IFN γ forward, 5' AGCGGCTGACTGAACCTA-GATTGTAG 3'; IFN- γ reverse, 5' GTCACAG TTTTTCAGCTG TATAGGG 3'.

Other methods

Leukocytes formula and haemachrome of mice were determined with the Am45 instrument (Melet Schloosing, Osny, France). Mice infected with GFP-labelled bacteria were analysed using the Leica macrofluor instrument (Wetzlar, Germany) equipped with the Leica application suite 3.1.0 software. Survival rates of mice were analyzed using Fisher's exact test. Bacterial counts and cytokines levels were analyzed using Student's t test.

Results

Synthesis and circular dichroism characterization of the peptides

Antimicrobial peptides were synthesised by standard solid phase technique and characterized by LC-MS. Analysis of the temporin B structure suggested some modifications that potentially might have improved its use. First, one extra tyrosine residue was added to the N-terminus of the temporin B. This modification conferred to the peptide a distinctive absorption pattern at 280 nm. The concentration of the peptide could thus be measured precisely. Second, studies of the interaction between the temporin B and biomembrane models have shown that temporin B forms a complex with the acidic phospholipid component of the membrane [26]. The addition of two extra positive charged lysine residues to the N-terminus of the temporin B, to give TB-YK, was therefore thought to facilitate the electrostatic interaction with the negatively charged phospholipids. For the in vivo studies peptides need to be labelled with fluorescent dyes; we obtained temporin A derivatized with rhodamine (TA-Rho) and Temporin B derivatized with a fluoresceine (TB-Fluo). Before labelling, to prevent degradation of the peptide, two β alanines (β A) were added at the N-terminus of temporins [19]. The secondary structure of TB and TB-YK β A analogue was studied by CD in phosphate buffer and phosphate buffer plus SDS. CD spectra of the peptides in sodium phosphate buffer pH 7.4 showed a minimum close to 200 nm, indicative of a random coil conformation. In contrast, in SDS both peptides assumed an α helical conformation, as suggested by the minima around 209 and 222 nm (Figure 1).

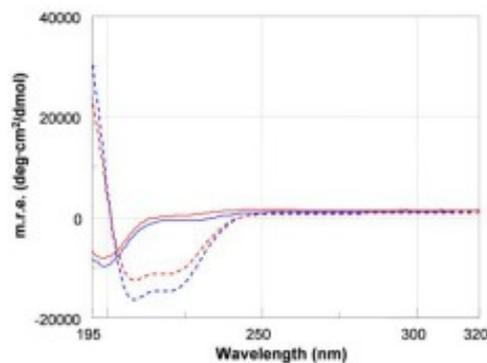


Figure 1. CD spectra of: TB (blue, continuous line), TB-YKβA (red continuous line) in Sodium Phosphate buffer pH 7.4 (-); TB (blue dashed line) and TB-YKβA (red dashed line) in Sodium Phosphate buffer-SDS pH 7.4.
doi:10.1371/journal.pone.0007191.g001

In vitro experiments

The study examined the antimicrobial activity of the synthetic temporins A and B in their native forms, and of the temporin B following chemical modifications (Table 1); the latter temporin was studied alone and in combination with native temporin A. The native temporin A was more active against gram positive (MIC: 10–30 µg/ml) than against gram negative (MIC: 125–400 µg/ml) bacteria (Table 2); the native temporin B and TB-Y were active against gram positive bacteria (approximately to the same extent as temporin A), but totally inactive against gram negative bacteria (data not shown). Also, tested in different ratios, the two native temporins did not display synergism. Instead TB-YK exhibited antimicrobial activity either against gram positive and gram negative bacteria (Table 2). Remarkably, when modified TB-YK (at 4–8 µg/ml) was used in combination with the native temporin A (at 5–100 µg/ml), a strong synergism was observed against gram positive as well as against gram negative bacteria (Table 2). Electron microscopy showed the ability of the combination of TA and TB-YK to perforate the bacterial membrane (Figure 2). The labelled peptides, TA-Rho and TB-Fluo, were employed in

Table 1. Amino acid sequence and molecular mass of the temporins used in the study.

Peptide	Amino acid sequence	Molecular mass	
		Calculated	Found
TA	H-FLPLGRVLSGIL-NH ₂	1396.7	1396.3
TB	H-LLPI VGNLLKSL- NH ₂	1391.8	1391.2
TB-Y	H-YLLPI VGNLLKSL- NH ₂	1554.9	1554.7
TB-YK	KKYLLPIVGNLLKSL- NH ₂	1811.3	1812.8
TB-YKβA	H-βAβA KKYLLPI VGNLLKSL- NH ₂ (βA = βAla)	1953.4	1953.7
TA Rho	Rho-βAβA KK FLPLGRVLSGIL-NH ₂ (βA = βAla)	2295.4	2294.3
TB Fluo	Fluo-βAβA KK YLLPI VGNLLKSL- NH ₂ (βA = βAla)	2342.8	2343.2

doi:10.1371/journal.pone.0007191.t001

fluorescence light microscopy experiments. Several combinations of the peptides were tested; the combinations which allowed for a better visualization of the bacteria were 6 µg TA+9 µg TB-YK on *S.aureus* 170 and 15 µg TA+20 µg TB-YK on *S.aureus* Paratyphi. The end product of temporins' activity, bacterial fragmentation, is illustrated in Figure 3. An independent experimental approach, the inhibition zone test, confirmed the synergism between the two temporins (Figure 4).

In vivo experiments

On the basis of the results described above, the therapeutic potential of the TA in combination with TB-YK was tested in a mouse model. The test, if successful, offered the possibility to assess the potential clinical use of the two temporins against septic shock caused by gram positive or gram negative bacteria. Several combinations of the two temporins displayed the capacity to protect mice from lethal doses of bacteria. Among these, the combination of 3.4 mg/Kg TA 0.54 mM in saline +1.6 mg/Kg TB-YK 0.19 mM in saline/mouse (75 µg TA+35 µg TB in 100 µl saline) was chosen for further studies because provided the highest surviving rate of mice infected with gram positive and gram negative bacteria and did not display haemolytic activity. This temporin combination, used in all the experiments to be described, will be referred to as the 75/35 pool. Two groups of mice (24 animals/group; untreated groups) were infected intravenously with *S. enterica* serovar Paratyphi (10⁶ CFU/mouse) or *S. aureus* A170 (10⁷ CFU/mouse), respectively. Two more groups of mice (24 animals/group; treated groups) were infected by the same procedure and, immediately after, treated with the 35/75 pool. Untreated mice died all within 4–6 days. The treated mice were all alive 28 days after the temporin treatment. (Figure 5). In an independent experiment, 2 mice infected and then treated as above (untreated mice) and 2 mice infected and then treated as above (treated mice) were sacrificed at daily intervals to monitor the bacterial load in the target organs (liver and GI tract of mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi; the kidneys of mice infected with *S. aureus*). Treated mice cleared *S. aureus* or *S. enterica* serovar Paratyphi within 3 (Figure 6A) or 6 (Figure 6B–C) days from temporin treatment, respectively. Untreated mice, instead, remained heavily infected till the time of death (Figure 6A–C). The results demonstrated the efficacy of the 35/75 pool in vivo. Remarkably, the 35/75 pool was active against the methicillin-resistant *S. aureus* A170 strain.

Efficacy of delayed treatment with the 35/75 pool

Typically, bacterial infections are caused by a small initial inoculum. Therefore, to be clinically useful, temporins must be effective when started several days after infection. To see whether the 35/75 pool displayed this potential, mice were infected with a sub-lethal dose of bacteria (10⁵ CFU/mouse) and one week later treated with the 35/75 pool. The 10⁵ CFU/mouse dose was the inoculum that the innate immune system of the animal could not rapidly control. Again, the pool was effective in sterilizing the animals within 5 days (Figure 7).

The peptide pool protects from inflammation

Mice infected with *S. enterica* serovar Typhimurium (10⁶ CFU/mouse; untreated mice), 24 hours after infection displayed enlarged spleen, liver, and mesenteric lymph nodes because of inflammation, while mice infected with the same pathogen and immediately after treated with the 35/75 pool (treated mice) displayed only minor morphological changes in the organs. Untreated mice displayed also significant changes of the following parameters, indicative of a systemic immune response to infection: reduced number of red blood cells and leukocytes, reduced haemoglobin concentration and

Table 2.

Bacterial species/strains	MIC			FIC index ^a
	TA	TB-YK	TA+TB-YK	
Gram+				
<i>Staphylococcus aureus</i> A170	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml+8 µg/ml	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> A172	20 µg/ml	25 µg/ml	8 µg/ml+5 µg/ml	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> 007	10 µg/ml	10 µg/ml	8 µg/ml+3 µg/ml	1.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	30 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml+3 µg/ml	0.6
Gram-				
<i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi	400 µg/ml	20 µg/ml	100 µg/ml+4 µg/ml	0.4
<i>Escherichia coli</i>	125 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml+5 µg/ml	0.6

^aThe FIC indices were interpreted as follows: ≤ 0.5 , synergy; > 0.5 , no interaction. doi:10.1371/journal.pone.0007191.t002

red blood cell volume, (Table 3). Elevated body temperature and elevated levels of circulating lipopolysaccharide (LPS)-binding protein and serum amyloid A (data not shown) characterized the untreated (but not the treated) mice.

Treated mice, compared to the untreated ones, showed lower levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and INF- γ and higher levels of the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-6, indicative of a more balanced Th1/Th2 response (Figure 8). To

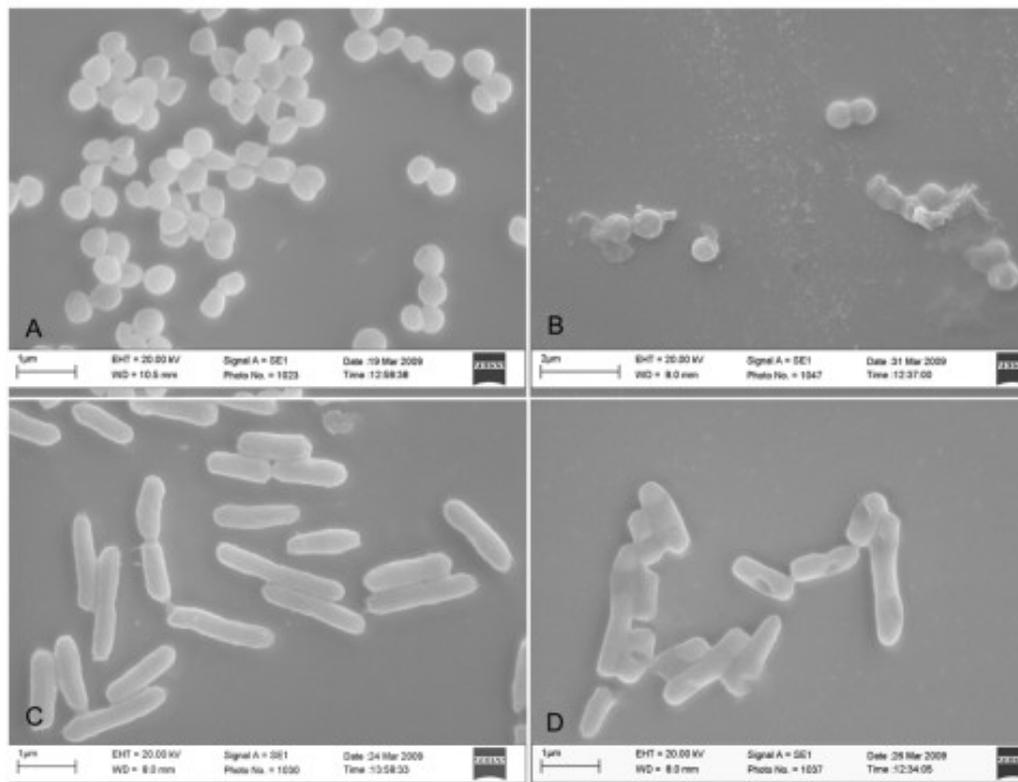


Figure 2. Temporins initiate their antibacterial activity by drillings holes in the bacterial membrane. A: *S. aureus* A170, untreated; B: *S. aureus* A 170 treated for 10 min with TA (8 µg/ml) plus TB-YK (5 µg/ml) (B); C: *S. enterica* serovar Paratyphi B untreated; D: *S. enterica* serovar Paratyphi B treated for 10 min with TA (100 µg/ml) plus TB-YK (4 µg/ml). doi:10.1371/journal.pone.0007191.g002

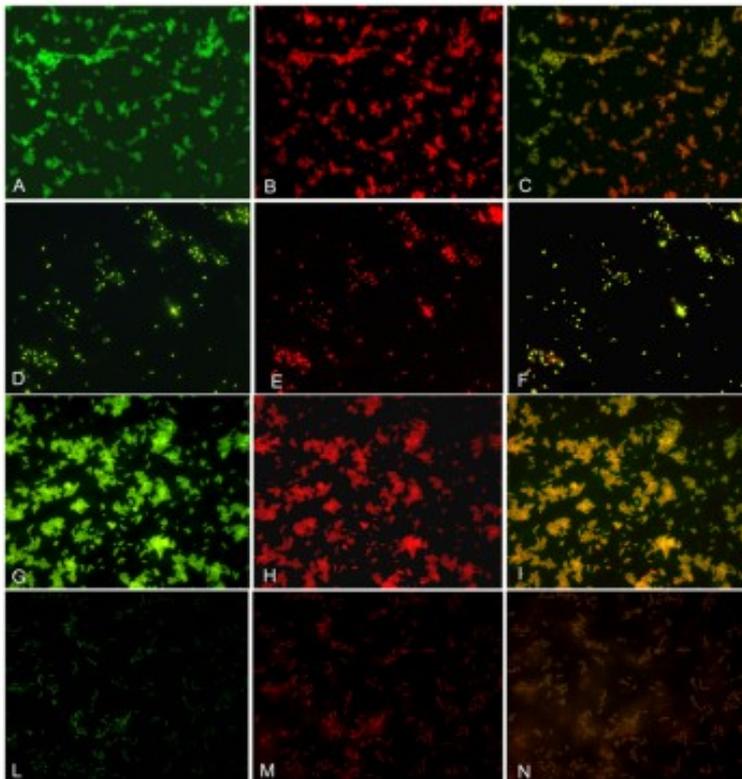


Figure 3. Detection of total, viable and membrane-perturbed bacteria using temporin A or temporin B labeled with rhodamine isothiocyanate or fluorescein isothiocyanate respectively. A–C: *S. aureus* A 170 plus TA-Rho 6 μ g plus TB-Fluo 9 μ g; D–F: *S. aureus* A170 plus fluorescein isothiocyanate or rhodamine isothiocyanate (control); G–I: *S. enterica* serovar Paratyphi B plus TA-Rho 15 μ g plus TB-Fluo 20 μ g; L–N: *S. enterica* serovar Paratyphi B plus fluorescein isothiocyanate or rhodamine isothiocyanate (control). doi:10.1371/journal.pone.0007191.g003

study the anti-inflammatory activity of temporins under conditions that more closely reproduce bacterial infection in humans, the experiment was repeated using a small initial inoculum of bacteria.

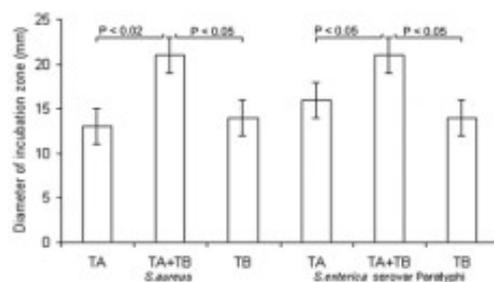


Figure 4. Synergism between TA and TB-YK temporins. The diameter of the inhibition was measured after 24 h incubation. doi:10.1371/journal.pone.0007191.g004

Mice were infected with *S. enterica* serovar Typhimurium (10^5 CFU/mouse) and 6 days later treated with the 35/75 pool. The cytokine expression levels in the liver were monitored daily by RT-PCR. The experiment demonstrated that temporins bring the levels of the cytokines back to those of naive mice within 5 days (Figure 9). The experiments on cytokines as described in this paragraph were repeated on mice infected with *S. aureus* and yielded very similar results.

Mice were infected with a sub-lethal dose of *Salmonella GFP* 10^6 CFU/mouse and immediately treated with the 35/75 pool. 24 hours later, the animals were sacrificed and intestine and liver were extracted. Observation of the organs at the Macroflu microscope revealed a reduction in the fluorescence of the treated mice, as compared to untreated mice, which further confirms the efficacy of the pool 35/75. (Figure 10)

Discussion

The antimicrobial activity of temporin A and a temporin B analogue has been investigated in vitro and in vivo. Results reported here highlight how small alterations of the native

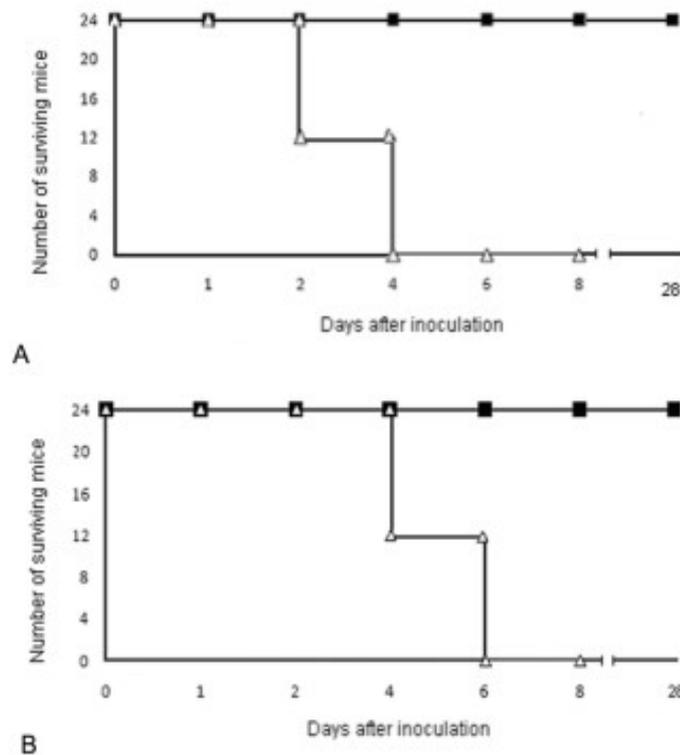


Figure 5. In vivo antibacterial activity of temporins. The 35/75 pool of temporins, given concurrently with bacteria, rescue 100% of mice infected with a lethal dose of *S. aureus* A170 10^7 CFU/mouse (A: mice infected with *S. aureus* A170 and immediately treated with TA plus TB-YK (closed box) and mice infected with *S. aureus* A170 (open triangle) or a lethal dose of *S. enterica* serovar Paratyphi 10^9 CFU/mouse (B: Mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B and immediately treated with TA plus TB-YK (closed box) and mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B (open triangle))
doi:10.1371/journal.pone.0007191.g005

temporin B primary structure can influence dramatically its properties. Addition of two extra positive charged lysine residues at the N-terminus conferred to the analogue (TB-YK) a strong synergism with the native temporin A (Table 2).

In order to get details on the secondary structure of the peptides and to demonstrate that addition of the β A β AKK tail in the fluorescent derivatives does not influence the secondary structure of the peptides, CD analysis was carried out on TB and TB-YK β A in sodium phosphate buffer pH 7.4 and in sodium phosphate plus sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer pH 7.4. The SDS is widely used to mimic the negatively charged bacterial membrane. The CD spectra obtained show that TB and TB-YK β A do not have a defined secondary structure in the absence of SDS, while they assume an α helical conformation in SDS. These results suggest that: a) addition of the sequence β A β AKK at the N-terminus of TB does not alter the secondary structure of the peptide and b) both TB and TB-YK β A assume a defined secondary structure when interact with membranes. Furthermore, a comparison of the CD spectra of temporin B described here and temporin A reported in the literature indicates that the peptides have both the same conformation [15].

Alterations of the bacterial membrane for Gram positive and Gram negative bacteria and the effects on vitality and morphology of cells were investigated by electron microscopy and fluorescence

light microscopy. Treatment of both *S. aureus* A170 (Figure 2A–B) and *S. enterica* serovar Paratyphi B (Figure 2C–D) with combinations of TA and TB-YK results in severe perturbation of the membrane, as demonstrated by Figure 2 in which holes in the membranes are clearly visible. Analogous results are obtained visualizing the bacterial membrane by fluorescent light microscopy after treatment of the *S. aureus* A170 and *S. enterica* serovar Paratyphi B with combinations of TA-Rho and TBFluo. (Figure 3). When the same bacteria are treated with the fluorescent dyes (Rhodamine and fluoresceine), no damage is evident.

The inhibition zone assay confirms that the combination of TA and TB-YK is more potent than the single peptides: the inhibition diameter of the bacterial growth on the plate is wider when the TA and TB-YK are pooled than when peptide each is tested.

Studies of the haemolytic activity of various TA/TB-YK combinations carried out on mouse red blood cells revealed that the pool 35/75 had no haemolytic effect, unlike the wt TA and TB and other temporins [27,28].

The 35/75 pool, given concurrently with a lethal dose of bacteria (gram positive or negative), rescued 100% of the animals (Figure 5). More importantly, the same pool, administered one week after experimental infection with a sublethal dose of bacteria, sterilized 100% of the animals within 3–6 days (Figure 6).

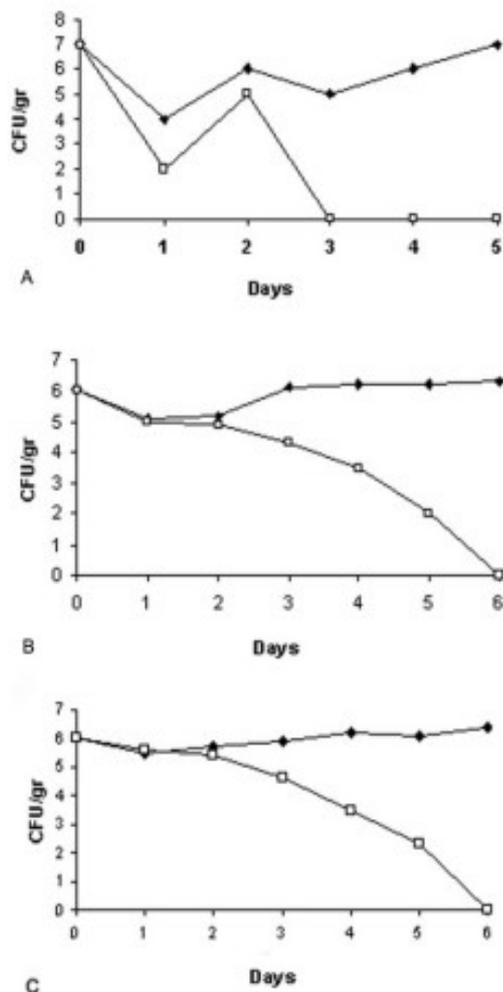


Figure 6. Temporins sterilize mice experimentally infected with *S. aureus* A170 or *S. enterica* serovar Paratyphi B. The 35/75 pool of temporins, given concurrently with bacteria, sterilize mice infected with a lethal dose (10^7 CFU/mouse) of *S. aureus* A170 (A: kidneys from mice infected with *S. aureus* A170 (closed rhomb) and kidneys from mice infected with *S. aureus* A170 and immediately after treated with TA plus TB-YK (open box), or a lethal dose (10^6 CFU/mouse) of *S. enterica* serovar Paratyphi B (B: gastro intestinal tract from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B (closed rhomb) and gastro intestinal tract from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B and immediately treated with TA plus TB-YK (open box); (C: liver from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B (closed rhomb) and liver from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B and immediately treated with TA plus TB-YK (open box). doi:10.1371/journal.pone.0007191.g006

Sterilization was attained in the blood and the target organs (liver and GI tract in the case of infection with *S. enterica* serovar Paratyphi; the kidneys in the case of infection with *S. aureus*) without bacterial rebound. In none of the experiments did the 35/75 pool cause adverse effects due to rapid lysis of bacteria. These results were observed in the case of infection with gram positive (*S. aureus*)

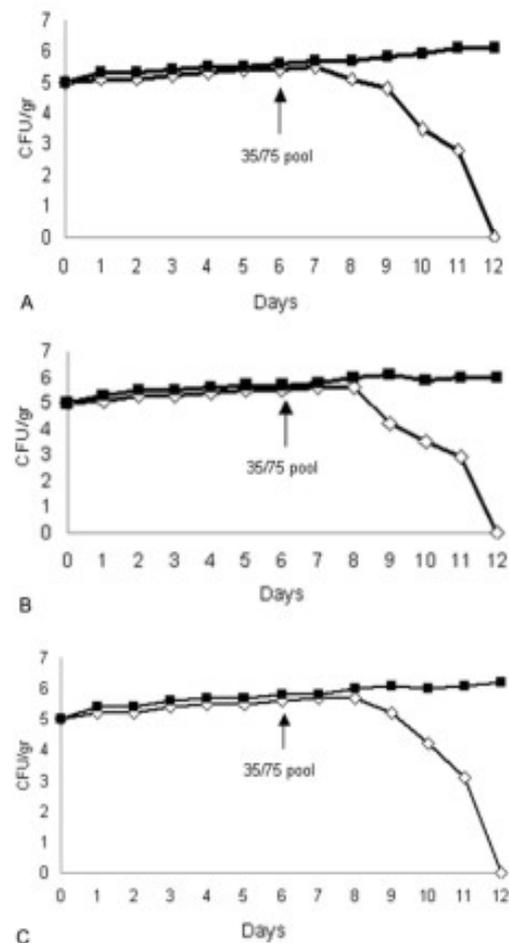


Figure 7. Temporins are effective in vivo when given 7 days after experimental infection. Mice were infected with a sub-lethal dose (10^5 CFU/mouse) of *S. aureus* A170 (A) or a sub-lethal dose (10^5 CFU/mouse) of *S. enterica* serovar Paratyphi B (B–C) and 6 days later were treated with the 35/75 pool of temporins. A: kidneys from mice infected with *S. aureus* A170 (closed box) and kidneys from mice infected with *S. aureus* A170 and treated after 6 days with TA plus TB-YK (open rhomb); B: gastro intestinal tract from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B (closed box) and gastro intestinal tract from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B and treated after 6 days with TA plus TB-YK (open rhomb); C: liver from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B (10^5 CFU/mouse) (closed box) and liver from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B (10^5 CFU/mouse) and treated after 6 days with the TA plus TB-YK (open rhomb). doi:10.1371/journal.pone.0007191.g007

or gram negative (*S. enterica* serovar Paratyphi) pathogens. The general significance of these data invites an objective assessment of A and B temporins as antimicrobials.

Temporins displayed also a remarkable anti-inflammatory activity in vivo. Sepsis, an overzealous inflammatory response to infection, is increasingly common and frequently lethal. In the USA the incidence of sepsis is 240 per 100 000 population and the fatality rates range from 25% to 70%, depending on severity and

Table 3. Haematological parameters of mice naive (no infected or treated), infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B (10^6 CFU/mouse), or infected and treated with temporin A(75 μ g/mouse) plus temporin B (35 μ g/mouse).

	Naive	Untreated	Treated
Leukocytes	8,29 \pm 0,56 m/mm ³	1,23 \pm 3,5 m/mm ³	3,43 \pm 0,56 m/mm ³
Lymphocytes	26,6 \pm 2,4%	38,1 \pm 1,1%	51,9 \pm 1,8%
Monocytes	13,5 \pm 0,5%	12,7 \pm 0,4%	20,2 \pm 1,5%
Neutrophils	59,9 \pm 0,9%	40,8 \pm 0,6%	26,5 \pm 1,26%
Eosinophils	0%	8,1 \pm 0,5%	0,8 \pm 0,1%
Basophils	0%	0,3 \pm 0,6%	0,6 \pm 0,3%
Erythrocytes	11,57 \pm 0,7 m/mm ³	10,93 \pm 1,7 m/mm ³	7,63 \pm 2,2 m/mm ³
MCV(mean corpuscular volume)	43,8 \pm 2,7 fl	46,8 \pm 2,2 fl	48,3 \pm 4,4 fl
HCT (hematocrit)	50,6 \pm 4,3%	51,1 \pm 4,2%	36,8 \pm 3,1%
MCH (mean concentration haemoglobin)	12,7 \pm 1,9 pg	12,6 \pm 2,5 pg	11,9 \pm 1,2 pg
MCHC(mean corpuscular haemoglobin concentration)	29 \pm 2,1 g/dl	27 \pm 3,1 g/dl	24,7 \pm 2,8 g/dl
RDW(width distribution red cells)	10,4 \pm 2,4%	10,9 \pm 0,5%	19,7 \pm 2,2%
Hb(hemoglobin)	14,7 \pm 1,9 g/dl	13,8 \pm 1,8 g/dl	9,1 \pm 0,9 g/dl
Platelets	462 \pm 15,2 m/mm ³	611 \pm 13,7 m/mm ³	335 \pm 19,7 m/mm ³
MPV(mean volum platelets)	6,1 \pm 0,3 fl	5,8 \pm 0,9 fl	6,8 \pm 1,1 fl
PDW(width distribution platelets)	7,2 \pm 0,6%	7,2 \pm 0,7%	7,2 \pm 1,2%

P<0,05.

doi:10.1371/journal.pone.0007191.t003

comorbidity [29]. Also, sepsis from gram positive bacteria has matched that of sepsis from gram negative bacteria [30]. In this context, the anti-inflammatory activity displayed by the 35/75 pool represents a valuable result, especially since directed against gram positive and gram negative bacteria. As to the mechanism leading to the control of inflammation, it appears important the role of IL-6, a cytokine known to control the level of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and INF- γ) without interfering with the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-4 [31]. High doses of bacteria

commonly administered to experimental animals cause rapid lysis by complement. This leads to a potential model of intoxication with endotoxins rather than a true model of sepsis [32]. The approach adopted in this study is exempt from this drawback since mice were infected with a small initial bacterial inoculum.

In the course of this study, a large number of mice were infected with different bacterial species. In no case bacterial colonies resistant to the 35/75 pool were recovered. In vitro experiments aimed at isolating mutants resistant to the 35/75 pool were also

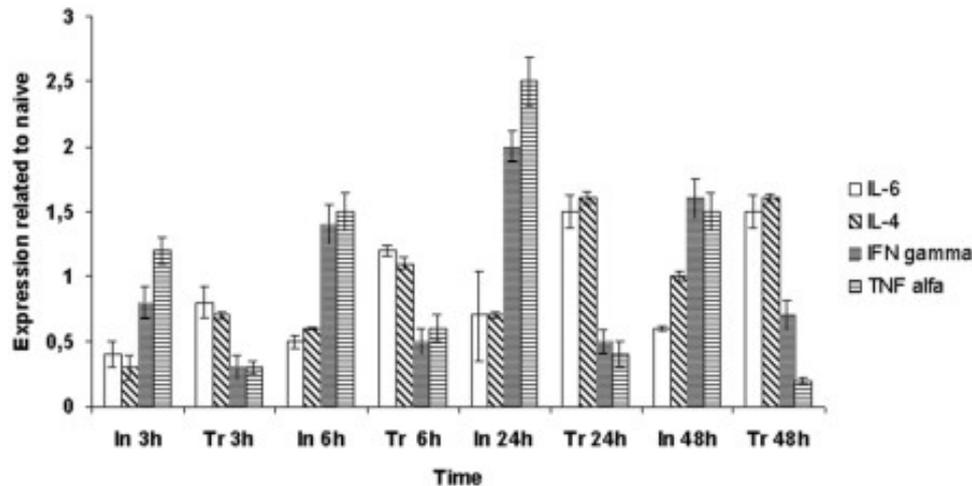


Figure 8. Expression levels of cytokine genes in mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B (10^6 CFU/mouse) (In) or infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B (10^6 CFU/mouse) and immediately after treated with the 35/75 pool of temporins (Tr). doi:10.1371/journal.pone.0007191.g008

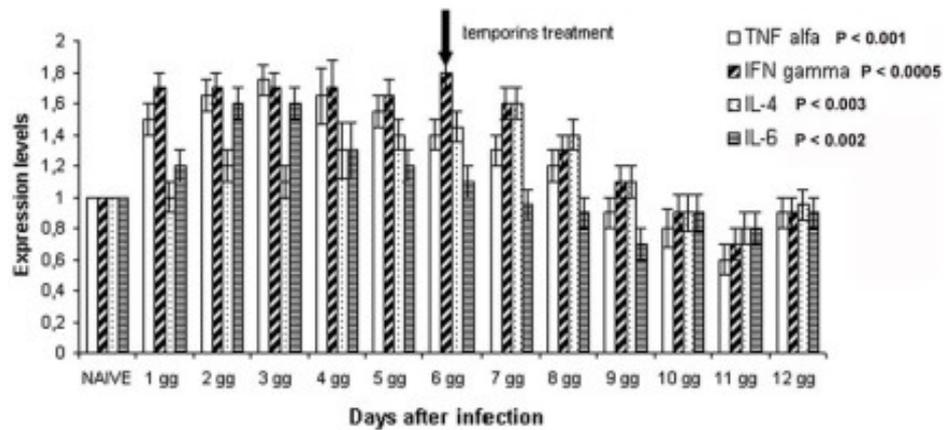


Figure 9. Expression levels of cytokine genes in mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B (10^5 CFU/mouse) and 6 days lose treated with temporins (35/75 pool). Each histogram represents the mean value measured in 2 mice, each one tested in triplicate. doi:10.1371/journal.pone.0007191.g009

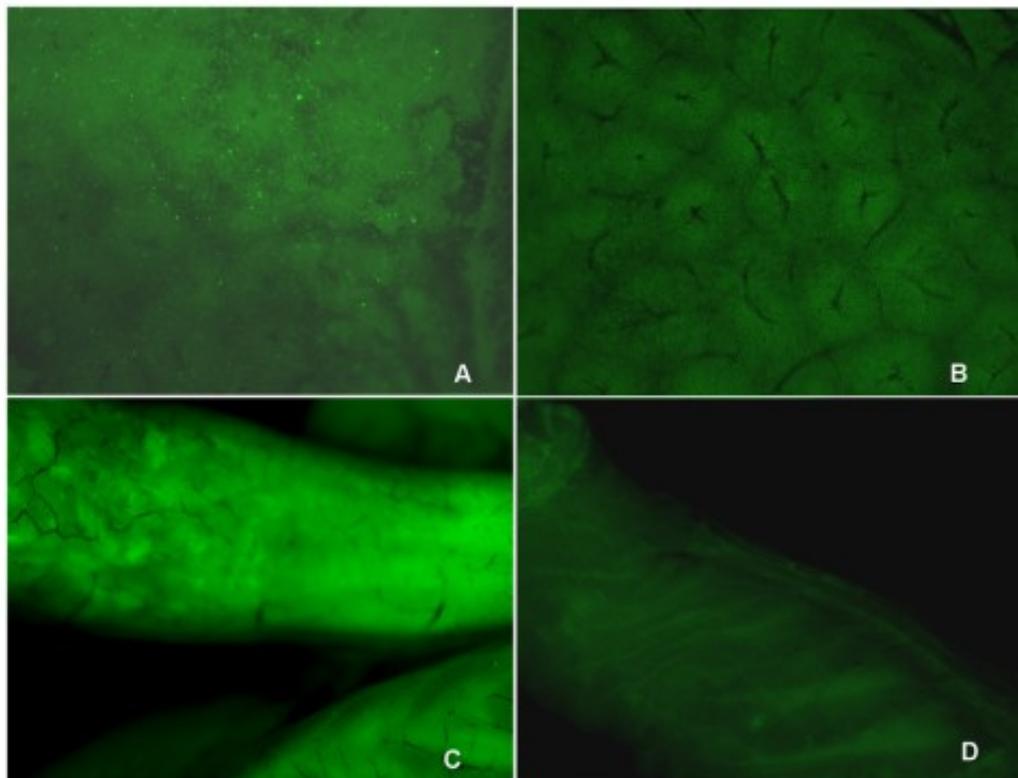


Figure 10. Mice infected with GFP-labelled bacteria were analysed using the Leica macrofluor instrument (Wetzlar, Germany) equipped with the Leica application suite 3.1.0 software. A: liver from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B; B: liver from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B and immediately treated with TA plus TB-YK; C: gastro-intestinal tract from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B; D: gastro-intestinal tract from mice infected with *S. enterica* serovar Paratyphi B and immediately treated with TA plus TB. doi:10.1371/journal.pone.0007191.g010

inconclusive. These results suggest that the bacterial membrane (the target of temporins) is a cellular component that bacteria cannot alter easily in order to gain resistance. This finding assumes great value in the light of the increasing incidence of antibiotic resistance.

In conclusion, the article provides evidence that temporin B, following limited alterations of its primary structure, acquires the capacity to act in synergism with temporin A and to exert antimicrobial and anti-inflammatory activity *in vivo* against gram positive and gram negative bacteria. The animal model described

closely mimics bacterial infection in humans. This model offers the possibility to test in a preclinical setting the true potential of temporins as antimicrobial and anti-inflammatory agents.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RC. Performed the experiments: AR MI NN RR SP. Analyzed the data: RC AR NN DL. Contributed reagents/materials/analysis tools: CP DI. Wrote the paper: RC AR.

References

- Zadoff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389–395.
- Boman HG (2003) Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 254: 197–215.
- Levy SB, Marshall B (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10: S122–S129.
- Papagiani M (2003) Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv* 21: 465–499.
- Hancock RE (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 1: 156–164.
- Simmaco M, Mignogna G, Canofini S, Miele R, Mangoni ML, et al. (1996) Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur J Biochem* 242: 788–792.
- Lu Y, Li J, Yu H, Xu X, Liang J, et al. (2006) Two families of antimicrobial peptides with multiple functions from skin of redbellied torrent frog, *Amolops lobonoi*. *Peptides* 27: 3003–3009.
- Beauby AF, Smyth DG (1991) Peptide amidation. *Trends Biochem Sci* 16: 112–115.
- Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mochegiani F, Orlando F, et al. (2006) Interaction of antimicrobial peptide temporin L with lipopolysaccharide *in vitro* and in experimental rat models of septic shock caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2470–2480.
- Rosenfeld Y, Barra D, Simmaco M, Shai Y, Mangoni ML (2006) A synergism between temporins toward Gram-negative bacteria overcomes resistance imposed by the lipopolysaccharide protective layer. *J Biol Chem* 281: 28563–28574.
- Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462: 53–70.
- Shai Y (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66: 236–248.
- Rathinakumar R, Wallenhorn WF, Winsley WC (2009) Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. *J Am Chem Soc* 131: 7609–7617.
- Conlon JM, Al-Ghaferi N, Abeshum B, Leprince J (2007) Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. *Methods* 42: 349–357.
- Carstenano A, Malli S, Savio MR, Campiglia P, Gomez-Monterrey I, et al. (2006) A different molecular mechanism underlying antimicrobial and hemolytic actions of temporins A and L. *J Med Chem* 49: 2354–2362.
- Hajakka H, Raitanen J, Korjano T, Lankinen H, Kussela P, et al. (2001) Synthesis and antimicrobial activity of the symmetric dimeric form of Temporin A based on 3-N,N-dip(3-aminopropyl)amino propanoic acid as the branching unit. *Bioorg Med Chem* 9: 1601–1607.
- Oh H, Heilberg M, Wade D, Edlund C (2000) Activities of synthetic hybrid peptides against anaerobic bacteria: aspects of methodology and stability. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 60–72.
- Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Kampay W, Orlando F, et al. (2005) Temporin A alone and in combination with imipenem reduces lethality in a mouse model of staphylococcal sepsis. *J Infect Dis* 192: 1615–1620.
- Edman P (1950) Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica* 283–291.
- Becker K, Roth R, Peters G (1998) Rapid and specific detection of toxicogenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol* 36: 2548–2553.
- Robert A, Hein I, Rauch M, Lehner A, Yoon B, et al. (1999) Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 65: 4638–4642.
- Hong Y, Liu T, Lee MD, Hofacre CJ, Maier M, et al. (2008) Rapid screening of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative alleleotyping PCR targeting the O and H antigens. *BMC Microbiol* 8: 170.
- Ananias M, Yano T (2008) Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res* 41: 877–883.
- Cormack BP, Bertram G, Egerton M, Gow NA, Falkow S, et al. (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143 (Pt 2): 303–311.
- Lee J, Choi Y, Woo ER, Lee DG (2009) Isocryptosin, a novel membrane-active antifungal compound from *Selaginella tamariscina*. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 676–680.
- Zhao H, Rinaldi AC, Di Guido A, Simmaco M, Kinnunen PK (2002) Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model biomembranes. Comparison of temporins B and L. *Biochemistry* 41: 4425–4436.
- Rinaldi AC, Mangoni ML, Rafo A, Luzzi C, Barra D, et al. (2002) Temporin L: antimicrobial, haemolytic and cytotoxic activities, and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles. *Biochem J* 360: 91–100.
- Mangoni ML, Rinaldi AC, Di Guido A, Mignogna G, Bozzi A, et al. (2000) Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *Eur J Biochem* 267: 1447–1454.
- Terhlarche M, Almog Y, Rosenman RS, Smith TS, Hackam DG (2006) Statins: panacea for sepsis? *Lancet Infect Dis* 6: 242–248.
- Forsar RJ, Oberholzer C, Baker HV, Novick D, Rubinstein M, et al. (2003) Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun* 71: 3005–3013.
- Xing Z, Gaukio J, Cox G, Rasmann H, Jordana M, et al. (1998) IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101: 311–320.
- Barrs JA, Holmann B, Sukovsky M (2005) Animal models of septic setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 4: 854–865.