

RELAZIONE ASSEGNO PER LA COLLABORAZIONE AD ATTIVITÀ DI RICERCA (TIPOLOGIA B)

“CARATTERIZZAZIONE DELL’ ATTIVITÀ BIOLOGICA DI MOLECOLE BIOATTIVE DA ESTRATTI DI SCARTI ITTICI”

**PO INTERREG V-A ITALIA MALTA PROGETTO BYTHOS –
“BIOTECHNOLOGIES FOR HUMAN HEALTH AND BLUE GROWTH”**

Negli ultimi anni, la consapevolezza della limitatezza delle risorse animali e la necessità di approcci sempre più eco-friendly nella gestione delle risorse stanno attuando un cambiamento culturale nelle modalità di trattamento degli scarti alimentari. Infatti, questi cominciano a essere ritenuti non più scarti dispendiosi ma biomasse con un alto potenziale economico. Inoltre, gli scarti alimentari, ed in particolare quelli dell'industria ittica, possiedono caratteristiche importanti quali l'essere fonte di differenti composti macromolecolari, che includono carboidrati, proteine, lipidi e molecole bioattive (Ravindran and Jaiswal, 2016), l'essere rinnovabili, poco costosi e vantaggiosi in termini di processi produttivi (El Mekawy et al., 2013).

Partendo da tali premesse, la ricerca scientifica e industriale hanno largamente esplorato la possibilità di ottenere, dagli scarti alimentari, energia, biocarburanti, enzimi, antiossidanti e nuovi materiali capaci di trasformare un problema in una risorsa remunerativa.

Gli scarti della lavorazione del pesce costituiscono, a oggi, un'enorme quantità di biomassa che, però, non è adeguatamente utilizzata.

I dati del 2016 mostrano che la produzione globale di pesce è salita a circa 170 milioni di tonnellate proveniente, per il 53%, dall'acquacoltura e per la restante parte dalle attività di pesca propriamente dette (Resources and Food, 2019). Ovviamente numeri sempre maggiori di produzione ittica corrispondono a un aumento proporzionale di scarti che vanno gestiti e opportunamente smaltiti. Tecnologie e modelli di sviluppo industriale che possano migliorare resa ed efficienza del trattamento degli scarti dell'industria ittica devono essere incoraggiati e sviluppati anche in termini di diminuzione dei processi di inquinamento correlati (Kurniasih et al., 2018).

Gli scarti e i rifiuti degli allevamenti ittici creano delle alterazioni ecosistemiche attraverso la riduzione della biomassa, densità e diversità del benthos, plankton e nekton e la modifica delle naturali reti trofiche adiacenti il sito (Arvanitoyannis and Kassaveti, 2008).

Il progetto Bythos (Biotechnologies for human health and blue growth), nella sua formulazione iniziale, prevedeva la creazione di un sistema di gestione dello scarto del pesce e dei sottoprodotti dell'industria ittica che, attraverso la creazione di un laboratorio condiviso tra Sicilia e Malta, potesse dare un risvolto economicamente sostenibile, attraverso l'estrazione e produzione di principi e sostanze bioattive, a quegli elementi che sarebbero altrimenti avviati a smaltimento (Figura 1).



Figura 1. Rappresentazione schematica del progetto Bythos. Lo scarto ittico, che altrimenti sarebbe convogliato in discarica, è utilizzato per l'estrazione di molecole e composti di interesse economico

Un'importante tematica per la quale la scoperta, lo studio e la caratterizzazione di nuove molecole sono di vitale importanza è quella che riguarda la resistenza agli antibiotici.

RESISTENZA ANTIBIOTICA

La resistenza agli antibiotici può essere considerata come la capacità dei microrganismi di alcune specie di sopravvivere, o anche moltiplicarsi, in presenza di concentrazioni di antimicrobici di regola sufficienti per inibire o uccidere microrganismi della stessa specie. Nelle ultime decadi l'uso non sempre corretto degli antibiotici convenzionali è stato corresponsabile dello sviluppo, da parte di batteri patogeni, di fenomeni di resistenza. Nonostante la stretta osservanza delle norme di sterilità ed igiene, le infezioni nosocomiali sono sempre più difficili da trattare e rappresentano un grave problema con conseguenti aumenti dei tassi di mortalità (Bereket et al., 2012). Germi responsabili di infezioni anche assai gravi e pericolose per la vita, quali *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinobacter baumannii* ed altri Gram-negativi, enterococchi, stafilococchi, pneumococchi, hanno frequentemente raggiunto in diversi ambienti un tale grado di multiresistenza da diventare intrattabili anche con i più recenti antimicrobici (Levy and Marshall, 2004). Problemi di primo piano sono posti dagli enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE), dagli stafilococchi meticillino-resistenti (MRSA), dai bacilli Gram-negativi che elaborano β -lattamasi ad ampio spettro, da pneumococchi penicillino- ed eritromicino-resistenti, senza parlare delle serie preoccupazioni connesse alla multiresistenza del *Mycobacterium tuberculosis*. Lo sviluppo di resistenza è stato molto veloce negli ultimi anni; in ospedali statunitensi, la percentuale di VRE è salita da 0,3% nel 1989 a valori tra 4,9 e 10% nel 1993 (segnalazioni di 9,1% nel 1994) (House of Lords, 1997-98) e nelle unità di terapia intensiva dallo 0,4% (nel 1989) al 13,6% nel 1993 (4); in grossi ospedali universitari statunitensi, la percentuale di MRSA tra ceppi di *Staphylococcus aureus* è salita dall'8% nel 1986 al 40% nel 1992; in New York City la percentuale è del 50%; dati ottenuti da 17 Paesi europei danno recentemente un valore di circa il 60% (Cohen and Tartasky, 1997).



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
BIOLOGICHE CHIMICHE E FARMACEUTICHE (STEBICEF)

Pericoloso, anche se non quantificato, si profila il passaggio della resistenza alla vancomicina da enterococchi (VRE) a stafilococchi, per il largo impiego dell'antibiotico in pazienti con infezioni da MRSA (Gold and Moellering, 1996; Goossens, 1998).

L'osservazione che alcuni ceppi batterici non risultavano sensibili a determinati antibiotici risale ai primordi della terapia antibiotica. Ad esempio, la penicillina era inattiva nei confronti dei ceppi batterici gram negativi: ciò può essere spiegato con la complessità strutturale di questo gruppo di batteri, dovuta alla presenza di una membrana esterna che impedisce il passaggio dell'antibiotico all'interno della cellula batterica.

Accanto a questa resistenza naturale, ben presto si osservò la comparsa di una resistenza acquisita in ceppi batterici che precedentemente venivano inibiti o uccisi da un determinato antibiotico.

L'insorgenza di resistenza venne presto osservata dopo l'introduzione della penicillina: infatti, vennero isolati ceppi di *S. aureus* resistenti a quest'antibiotico.

Il cattivo uso, l'abuso e l'eccessivo uso degli antibiotici (anche in campo alimentare), ha determinato la selezione di ceppi resistenti agli antibiotici.

Negli anni '70 il fenomeno della resistenza era legato soprattutto ai ceppi batterici gram negativi isolati in ambiente ospedaliero. Il recente isolamento di ceppi nosocomiali di *S. aureus* vancomicina-resistenti è l'ultimo di una catena d'eventi che hanno reso la resistenza agli antibiotici uno dei problemi sanitari di maggiore rilevanza mondiale. Come abbiamo visto, *S. aureus* divenne molto presto resistente alla penicillina e proprio per combattere questi ceppi venne messo a punto l'antibiotico meticillina che non viene inattivato dalle β -lattamasi (enzimi prodotti dai batteri resistenti per inattivare la penicillina). Per parecchi anni la meticillina è risultata efficace nel contrastare i ceppi di *S. aureus* resistenti ai β -lattamici e ciò fino alla comparsa di ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina (ceppi MRSA) che divennero una delle principali cause di infezione in ambiente ospedaliero. A questo punto, per contrastare le infezioni sostenute da ceppi MRSA, è stata utilizzata con successo, a partire dagli anni '80, la vancomicina, attiva contro questi ceppi e contro altri gram positivi. Per questo motivo, il recente isolamento (in Giappone nel 1997 e in Europa nel 1999) di ceppi di *S. aureus* a sensibilità intermedia nei confronti della vancomicina (ceppi VISA) o di ceppi resistenti alla vancomicina (ceppi VRSA) ha destato grande allarme: questa informazione è stata diffusa anche dai mass-media che hanno parlato di isolamento di un "nuovo superbatterio". All'improvviso si paventava il pericolo di trovarsi sprovvisti d'efficaci antibiotici contro questi batteri. L'introduzione nella terapia delle malattie infettive di nuovi antibiotici e la comparsa di

DOTT. LUIGI INGUGLIA



ceppi resistenti a questi stessi antibiotici, vanno quasi di pari passo: una continua corsa agli “armamenti” (nuovi cannoni contro nuove corazze).

Esaminiamo le cause che sono all’origine dell’insorgenza della resistenza acquisita; alla base vi sono due meccanismi genetici fondamentali:

I. mutazione e selezione

II. scambio e acquisizione di geni della resistenza tra ceppi e specie.

Il primo meccanismo è di tipo “darwiniano”: alla pressione selettiva esercitata nell’ambiente dall’antibiotico, sopravvive, all’interno di una popolazione batterica sensibile, la cellula batterica resistente che riproducendosi darà origine a una popolazione resistente. La resistenza è dovuta a una mutazione (le mutazioni compaiono nell’ordine di una ogni 10^7 divisioni cellulari) e verrà trasmessa “verticalmente” al clone.

Negli anni '50 in Giappone, vennero isolati, in seguito ad una epidemia di dissenteria, dei ceppi di *Shigella* che presentavano una resistenza multipla a quattro antibiotici (cloramfenicolo, streptomina, tetraciclina e sulfamidici). Poiché una mutazione spontanea è un evento che “capita” ogni 10^7 divisioni, la probabilità che la resistenza multipla fosse dovuta a mutazioni spontanee era estremamente remota ($1/10^{28}$); la multifarmaco resistenza era dovuta all’acquisizione di geni per la resistenza. In questo caso, la trasmissione dell’informazione genetica legata alla resistenza avviene anche “orizzontalmente”: ceppi sensibili ricevono geni da ceppi resistenti.

L’isolamento nei ceppi resistenti di plasmidi, cioè di informazione genetica extracromosomica, non fondamentale per la cellula batterica, ma che conferisce alle cellule caratteristiche vantaggiose dal punto di vista selettivo (es. geni per la resistenza agli antibiotici) e di fattori che permettono la trasmissione di tali geni (fattore RTF), sta alla base di questa forma di resistenza agli antibiotici.

I batteri si scambiano geni attraverso i meccanismi di coniugazione, trasformazione e trasduzione, dando luogo a nuovi ricombinanti. Nel caso della resistenza acquisita, la coniugazione è il principale mezzo di diffusione di elementi genetici mobili (plasmidi e trasposoni). Esaminiamo cosa accade a livello fenotipico, con quali meccanismi si manifesta la resistenza agli antibiotici in un ceppo multifarmaco resistente.

I principali meccanismi biochimici di resistenza sono i seguenti:

I. inattivazione dell’antibiotico

II. alterazione della struttura bersaglio



III. espressione di un bersaglio alternativo

IV. modificazione della permeabilità.

Alla base del primo meccanismo c'è la sintesi di enzimi che inattivano gli antibiotici. Questo meccanismo è tipico della resistenza ai β -lattamici e venne descritta immediatamente dopo l'introduzione della penicillina in seguito all'isolamento di ceppi di *S. aureus* resistenti.

La β -lattamasi prodotta dai ceppi resistenti, idrolizza l'anello β -lattamico, convertendo l'acido 6-amminopenicillanico (la struttura base della penicillina) in un prodotto inattivo l'acido penicilloico.

Le β -lattamasi vengono prodotte sia dai gram positivi che dai gram negativi; sebbene la funzione sia identica vi sono diverse differenze. Nei gram negativi le β -lattamasi sono costitutive, cioè vengono normalmente prodotte, e inattivano sia le penicilline che le cefalosporine. Nei gram positivi la sintesi delle β -lattamasi è indotta dalla presenza dello stesso antibiotico ed inoltre risultano efficaci solo nei confronti delle penicilline. In ceppi di *S. aureus* resistenti è stata isolata e caratterizzata una proteina di membrana che funge da segnale nell'espressione genica della β -lattamasi. Questa proteina transmembranaria a contatto con l'antibiotico si autoscinde, dando origine ad un frammento proteolitico che inattiva il repressore trascrizionale del gene che codifica la β -lattamasi: in questo modo il gene che porta l'informazione per la β -lattamasi (*blaZ*) può essere espresso (Archer and Bosilevac, 2001).

Meccanismi di inattivazione dell'antibiotico ad opera di enzimi, sono comuni nella resistenza agli aminoglicosidici (streptomina, kanamicina, amikacina ecc.) e al cloramfenicolo. I primi possono essere acetilati, fosforilati o adenilati con conseguente inattivazione dovuta al loro mancato accumulo all'interno della cellula batterica e all'impossibilità di legarsi alle molecole bersaglio.

Il cloramfenicolo può essere inattivato dall'enzima CAT (cloramfenicolo acetil transferasi) che acetila i gruppi idrossilici della molecola rendendola non tossica per la cellula batterica. Alla base della resistenza alla meticillina troviamo, invece, l'espressione di geni, a localizzazione cromosomale, per le proteine che legano la penicillina (PBP) di tipo modificato, definite PBP2a.

L'espressione genica per le PBP2a è sotto il controllo di un complesso di geni denominati *mec* (nucleo *mec*). Il gene *mec A* porta l'informazione per la proteina PBP2a, il gene *mec I* esprime una proteina che reprime l'espressione del *mec A*, infine il *mec RI* codifica l'espressione di una proteina che funge da co-induttore del gene *mec A*. Questo complesso di geni ha una localizzazione



cromosomale, ma presenta anche elementi genetici mobili (inserzione di sequenza-trasposoni) che vengono utilizzati per la diffusione attraverso plasmidi.

Anche nel caso della resistenza alla meticillina è stata recentemente isolata e caratterizzata una proteina segnale transmembranaria. Il meccanismo è analogo a quanto visto per l'attivazione dell'espressione genica delle β -lattamasi: l'interazione tra la proteina segnale e l'antibiotico innesca un processo di autoscissione proteolitica che dà origine a un frammento proteico che inattivando il gene *mec I*, promuove l'espressione del gene *mec A* (Zhang et al., 2001). La cellula batterica, grazie alle PBP2a con attività transpeptidasiche e transglicolasiche, riesce a sintetizzare un peptidoglicano anche in presenza di meticillina, poiché l'affinità tra quest'ultimo e le PBP2a è molto scarsa.

La resistenza alla vancomicina è un esempio di resistenza fondata sulla produzione di un bersaglio alternativo. Infatti il precursore N-acetilmuramico-pentapeptide della parete in accrescimento, anziché avere la terminazione D-ALA-D-ALA presenta un dimero D-ALA-D-LATTATO. Questa terminazione ha un'affinità per la vancomicina parecchie volte inferiore rispetto a quella della terminazione-bersaglio usuale: in questo modo, il ceppo resistente riesce a costruire il proprio peptidoglicano.

Analizziamo le basi genetiche della resistenza alla vancomicina. Nei ceppi di *Enterococcus* vancomicina-resistenti è presente un complesso di geni (operone *van A*) localizzato nel trasposone Tn1546 che viene veicolato dal plasmide pIP816. Il trasposone presenta sette geni *van* ed inoltre una trasposasi e una resolvasi necessari per il movimento del trasposone stesso.

Cinque geni *van S*, *R*, *H*, *A*, e *X* sono richiesti per la resistenza alla vancomicina. I geni *van* sono stati clonati, sequenziati e caratterizzati in base alla funzione coinvolta nella resistenza. Il *vanH* codifica un enzima che riduce il piruvato (o α -ketobutirrato) a D-lattato (o D-idrossi-butirrato), il *vanA* codifica un enzima simile alla normale ligasi che sintetizza D-Ala-D-Ala, ma che produce il depsipeptide D-Ala-D-lattato (o D-Ala-D-idrossibutirrato). Il depsipeptide è aggiunto al substrato UDP-MurNac-tripeptide (L-Ala-D-Glu-L-Lys) dallo stesso enzima (MurF) che normalmente aggiunge D-Ala-D-Ala. Il *vanX* codifica una dipeptidasi che può rompere il D-Ala-D-Ala, ma ha scarsa attività sul D-Ala-D-lattato e D-Ala-D-idrossibutirrato.

L'attività del *vanX*, inoltre, è di assicurare una sostituzione quantitativa di D-Ala-D-lattato per D-Ala-D-Ala nel peptidoglicano che risulta in una diminuzione dell'affinità di legame tra la vancomicina e il peptidoglicano stesso (10). Il *vanY* codifica una D-carbossipeptidasi penicillina-insensibile che rimuove il dipeptide D-Ala-D-Ala dal UDP-MurNac-pentapeptide, precursore del

peptidoglicano, ma ha bassa attività sui precursori dei pentapeptidi contenenti C-terminale D-lattato o D-Ser.

La funzione del *vanZ* non è ancora conosciuta, ma non è richiesta per la resistenza ai glicopeptidi. L'espressione dei geni *van* è controllata dai geni *vanS* e *vanR* i cui prodotti genici formano un sistema regolatore a due componenti. Il prodotto del *vanS* è il "sensore" istidina chinasi che viene fosforilata in risposta ad un segnale che viene dal legame della vancomicina alla parete cellulare; in seguito a tale legame si forma un precursore o un prodotto di demolizione che funge da segnale .

Il prodotto genico di *vanS* contiene un dominio che attraversa la membrana, ciò suggerisce l'interazione tra la proteina e il segnale a livello di membrana. Il gruppo fosfato sul VanS viene poi trasferito al secondo componente "risponditore" proteina VanR, ad un residuo di aspartato che è conservato nei membri della famiglia di proteine regolatrici di risposta. Il fosfo-VanR agisce da regolatore trascrizionale permettendo la trascrizione dei promotori che giacciono a monte dei *vanH* e a monte dei *vanS*. Quindi, il sistema *VanSR* regola la sintesi delle proteine VanH, VanA, VanX, VanY, e VanZ come pure la sua stessa sintesi (Figura 2 e Figura 3).

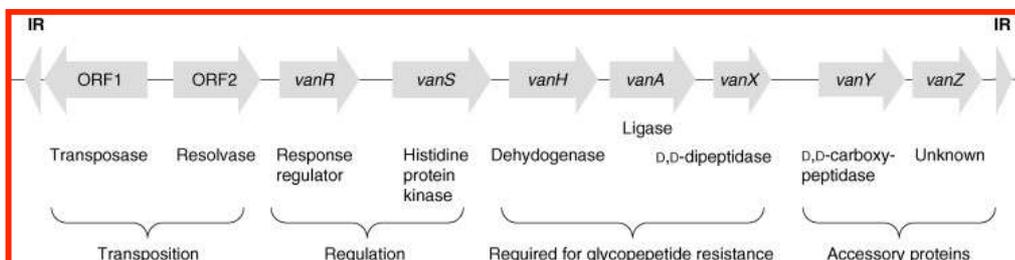


Figura 2. Schema esemplificativo dell'operone *vanA*

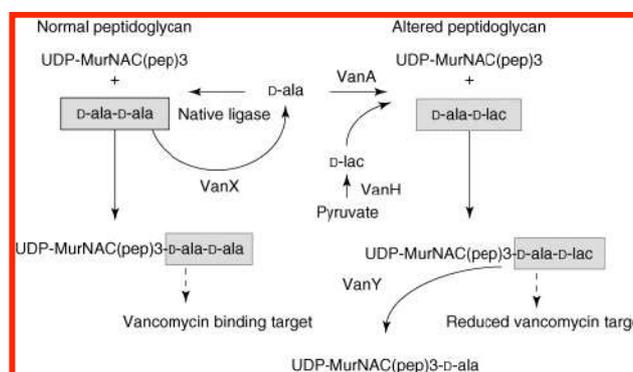


Figura 3. Schema del meccanismo della resistenza alla vancomicina conferito dall'operone *vanA*. A sinistra viene rappresentato il normale pathway per la sintesi dei peptidoglicani in cui due residui di D-alanina vengono legati per formare il precursore. L'operone *vanA* codifica una D,D-dipeptidase (*VanX*) che scinde il precursore nei due residui di D-alanina. La deidrogenasi *VanH* converte il piruvato in lattato che, sotto l'azione della ligasi *VanA*, forma il D-alanil-D-lattato. Questo prodotto diviene il nuovo precursore e viene incorporato nel peptidoglicano. Diversamente dalla D-alanil-D-alanina, il D-alanil-D-lattato non lega la vancomicina fornendo così un meccanismo di resistenza all'antibiotico.



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



Un meccanismo di resistenza legato alla permeabilità di membrana è tipico dei ceppi resistenti alla tetraciclina. Sia nei gram positivi, che negli enterobatteri sono stati identificati dei geni, a localizzazione plasmidica, che codificano sistemi di efflusso (proteine tet efflux). Questi geni denominati *tet* sono di classe A-E negli enterobatteri, di classe K-L nei gram positivi.

I prodotti dei geni *tet* sono delle proteine transmembrinarie che trasportano attivamente le tetracicline dall'interno all'esterno della cellula batterica, impedendo l'accumulo dell'antibiotico.

Un altro esempio di resistenza legata a modificazioni della permeabilità di membrana, è quella dei ceppi di *P.aeruginosa* resistenti all'antibiotico imipenem. Infatti nei ceppi sensibili a questo antibiotico è presente una porina definita DR che permette il passaggio, attraverso la membrana esterna, dell'antibiotico. I ceppi di *P.aeruginosa* resistenti allo imipenem sono sprovvisti di tale porina.

Pompe di efflusso non specifiche, ma in grado di espellere antibiotici di varie strutture chimiche, sono presenti in importanti patogeni (*N gonorrhoeae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ecc.) multifarmaco resistenti.

Alcune di queste “multidrug resistance pumps” sono state caratterizzate sia a livello genico (geni *mdtA*) che a livello fenotipico, localizzazione e identificazione dei residui aminoacidici coinvolti nel trasporto del farmaco (Putman et al., 2000).

BIOFILM

Le infezioni batteriche sono la principale causa di morbilità e mortalità negli ospedali e molte di queste infezioni possono essere imputate a ceppi di stafilococchi. Questi sono batteri Gram-positivi, sessili, non sporigeni, e possono essere facilmente riconosciuti per la loro caratteristica forma sferica e la capacità di formare aggregati. Gli stafilococchi causano infezioni croniche a causa della loro capacità di aderire a diverse superfici e di formare una matrice chiamata biofilm. Questa struttura permette ai batteri di resistere anche in condizioni nutritive estreme e di resistere all'azione degli antibiotici (Kiedrowski and Horswill, 2011). Sebbene non vi sia un modello universalmente riconosciuto del ciclo di formazione di un biofilm, vi sono comunque delle caratteristiche comuni (Figura 4).

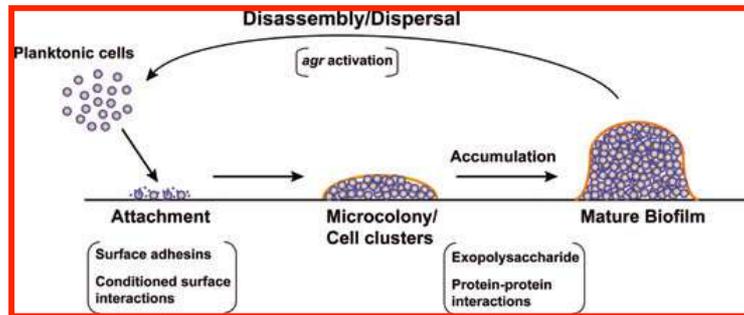


Figura 4. Schema di un ciclo di formazione di un biofilm

Il punto iniziale consiste nell'attacco delle cellule batteriche alla superficie che, in vitro, avviene in circa 1-2 ore. Questa fase è seguita da uno stato intermedio in cui le cellule si aggregano in piccoli cluster, chiamati microcolonie, sulla superficie d'interesse. Quando le condizioni di crescita lo permettono, le microcolonie maturano in un biofilm adulto che possiede tutte le caratteristiche specifiche di quel particolare tipo di matrice. Lo stadio finale prevede l'instaurarsi di meccanismi attivi e passivi che portano ad una dispersione dei batteri dal biofilm verso forme di vita planctonica per la creazione di un successivo biofilm. Dopo che il biofilm si è formato, si sviluppa una significativa eterogeneità a livello molecolare. In alcuni *S. aureus*, più del 60% delle cellule totali presenta varianti fenotipiche. In particolare si possono riscontrare delle "small colony variants" (SCV) che presentano un metabolismo ridotto, associato alla capacità di resistenza antibiotica. Sono state inoltre identificate delle "persister cells", cellule dormienti che non vanno incontro a divisioni. Queste diverse tipologie cellulari costituiscono una sorta di divisione del lavoro che contribuisce allo sviluppo di resistenza in ambienti ostili. I batteri inglobati nel biofilm sembrano esistere in una sorta di fase stazionaria in cui la trascrizione, traduzione e duplicazione sono marcatamente ridotte. La matrice del biofilm è costituita da polisaccaridi, proteine e DNA extracellulare (eDNA). La componente polisaccaridica è generalmente composta da adesina polisaccaridica intercellulare (PIA) o N-acetil- glucosamina polimerica (PNAG). Quest'ultimo è un polimero di almeno 130 unità di β -1,6 N-acetil-glucosamina, per lo più deacetilato, la cui produzione è a carico del *locus icaADBC* presente nella maggior parte di *S. aureus* e *S. epidermidis*. Comunque l'espressione dell'*icaADBC* varia notevolmente cosicché alcuni ceppi producono grandi quantità di polisaccaride mentre altri ne producono quantità difficilmente evidenziabili. In quest'ultimo caso vi è un incremento della componente proteica come costituente della matrice. Nel biofilm possono anche essere presenti endopeptidasi come la lisostafina, e componenti aggiuntivi, importanti soprattutto per l'adesione,



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
BIOLOGICHE CHIMICHE E FARMACEUTICHE (STEBICEF)

come gli acidi teicoici. Inoltre *S. epidermidis* produce e secerne acido poli- γ -DL- glutammico (PGA) che facilita la sopravvivenza durante l'infezione.

PEPTIDI ANTIMICROBICI

In questo contesto, i peptici antimicrobici (AMP) sembrerebbero offrire una valida alternativa nella lotta contro il fenomeno della multi-resistenza e della formazione del biofilm. I peptidi antimicrobici sono piccoli polipeptidi costituiti da meno di cento amminoacidi. I peptidi antimicrobici sono molecole largamente diffuse in natura, sintetizzate da organismi appartenenti sia al regno vegetale sia animale. Essi rappresentano la prima linea di difesa contro molti patogeni e contribuiscono alla risposta immunitaria innata o aspecifica. Tale sistema di difesa è stato oggetto di studio a partire dagli anni '80 con la scoperta delle cecropine, peptidi antimicrobici isolati dal baco da seta (*Hyalophora cecropia*). Dopo la scoperta di tali sostanze, altri peptidi antimicrobici sono stati isolati da un elevato numero di organismi filogeneticamente lontani, quali mammiferi, pesci, anfibi e insetti (Broden et al., 2003; Lehrer et al., 1993; Nicolas and Mor, 1995; Nijnik and Hancock, 2009). I peptidi antimicrobici sono genericamente definiti AMPs (antimicrobial peptides). Sono molecole piccole (generalmente dai 12 a 50 amminoacidi) con un ampio spettro di attività contro virus, batteri, funghi e protozoi patogeni. Nonostante l'enorme diversità di sequenze e strutture, la maggior parte degli AMP mostra una carica positiva (da +2 a +9) e strutture secondarie e terziarie differenti. Per esempio, le magainine, le cecropine e le catelicidine, sono caratterizzate da strutture ad α -elica, le epcidine e le α -defensine, da foglietti β , le β -defensine umane e vegetali da un misto di α -eliche e foglietti β . In aggiunta alla loro azione nel combattere microrganismi patogeni, gli AMP hanno un' importante ruolo nell'immunità innata e adattativa che include l'induzione e modulazione di citochine e chemochine pro-infiammatorie, chemotassi, apoptosi, inibizione della risposta infiammatoria, reclutamento e stimolazione della proliferazione dei macrofagi, neutrofili, eosinofili, e linfociti T (Nijnik and Hancock, 2009).

La diversità di tipologie d'azione suggerisce la possibilità che gli AMP agiscano attraverso molteplici meccanismi. Il primo ad essere identificato è stato quello che prevede il legame degli AMP al doppio strato lipidico e la conseguente distruzione dello stesso. Successivamente si è visto che gli AMP possono anche agire attraverso interazioni con target intracellulari o interferendo con processi differenti cellulari tra cui la sintesi nucleotidica, proteica e della parete batterica (Broden, 2005).



Tutte le membrane biologiche sono fondamentalmente costituite da un mosaico di proteine e fosfolipidi. In alcuni organismi, steroli e gliceridi contribuiscono anche loro alla topologia della superficie e all'architettura biochimica delle biomembrane. Il costituente fondamentale delle membrane biologiche è il doppio strato lipidico, strutturato normalmente in code idrofobe, rivolte verso l'interno della membrana, e teste idrofile rivolte i comparti intra ed extra-cellulare. Comunque le membrane dei procarioti e quelle delle cellule eucariotiche differiscono significativamente. Per esempio la fosfatidilcolina e la fosfatidiletanolamina non hanno una carica netta così come la sfingomielinina. Gli steroli come il colesterolo e l'ergosterolo (sterolo presente soprattutto nei miceti), presenti fondamentalmente nelle membrane degli eucarioti, hanno anch'essi carica netta neutra. Al contrario il fosfatidilglicerolo, la fosfatidilserina e la cardiolipina possiedono una carica netta negativa. La carica netta di una membrana biologica dipende quindi dalla stechiometria e dall'architettura fosfolipidica. Membrane biologiche composte maggiormente da fosfatidilglicerolo, cardiolipina o fosfatidilserina tendono ad avere una forte elettronegatività e si è visto che questa composizione è propria della membrana di batteri patogeni. Al contrario, le membrane citoplasmatiche di mammiferi hanno generalmente una carica netta neutra e sono composte da fosfolipidi quali fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina o sfingomielinina. Gli steroli presenti nelle membrane possono ulteriormente differenziare le cellule fungine e quelle di mammifero da quelle dei procarioti. La composizione qualitativa delle membrane biologiche fornisce quindi un valido target attraverso i microbi possono agire e viceversa. Infatti alcune tossine microbiche, per esempio, riescono ad agire sulle membrane di cellule eucariotiche lasciando intatte quelle degli organismi da cui provengono. La streptolisina O, la listeriolisina, la perfringolisina e la pneumolisina agiscono su membrane che possiedono colesterolo (Palmer, 2001), potendo quindi danneggiare le membrane di quasi le cellule di mammifero. La composizione e le caratteristiche strutturali delle membrane procariotiche ed eucariotiche non sono statiche né simmetriche. Per esempio soltanto il 2% della fosfatidiletanolamina totale degli eritrociti bovini è orientata verso il comparto extracellulare (Florin-Christensen et al., 2001). Di conseguenza, anche la carica e l'anfipaticità degli strati interni ed esterni delle membrane variano considerevolmente e le differenze in elettronegatività così generate influenzano ulteriormente l'affinità dei peptidi antimicrobici verso le biomembrane. Inoltre l'interazione dei peptici antimicrobici con le membrane fosfolipidiche può accentuare l'asimmetria e il rimodellamento delle membrane microbiche. Per esempio si è dimostrato che un peptide di polylysina (Lasch et al., 1998) induce la 1,2-dimiristoil-fosfatidiletanolamina batterica a segregare in domini distinti che accentuano l'asimmetria in seno al doppio strato lipidico.



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
BIOLOGICHE CHIMICHE E FARMACEUTICHE (STEBICEF)

Un'altra differenza fondamentale tra le cellule microbiche e quelle degli organismi superiori consiste nella separazione delle cariche tra la faccia intracellulare e quella extracellulare della membrana citoplasmatica. Questo gradiente elettrochimico, dovuto al flusso protonico che attraversa la membrana, è chiamato potenziale di membrana ($\Delta\phi$). La differenza nel $\Delta\phi$ tra alcuni microrganismi e le cellule ospite può fornire un ulteriore dato che spieghi la selettività dei peptidi antimicrobici nei confronti dei batteri patogeni. Cellule di mammifero possiedono un $\Delta\phi$ che va da -90 a -110mV mentre i batteri patogeni, cresciuti in fase logaritmica, normalmente mostrano un $\Delta\phi$ che va da -130 a -150 mV. Questa significativa differenza di potenziale elettrochimico si ipotizza possa essere un ulteriore parametro di selettiva tossicità da parte dei peptidi antimicrobici.

Un altro fattore di selettività è dato dal fatto che i peptidi antimicrobici possano subire delle modifiche conformazionali in rapporto al loro legame con il proprio target. Si è esaminata l'influenza della conformazione sull'attività litica degli AMP (Tam et al., 2000). In questi studi, sono state saggiate le attività antimicrobiche e di tossicità su cellule umane di analoghi ciclici e non della protegrina-1, un peptide antimicrobico cationico di 18 amminoacidi. Saggi microbiologici hanno messo in evidenza per la protegrina ciclica un profilo di azione contro Gram-positivi, Gram-negativi, funghi e contro il virus. Rispetto alla protegrina 1, l'analogo ccPG-3 (cyclic- tricystine protegrin) mostrava un decremento di 10 volte dell'attività emolitica umana ed un aumento di 30 volte dell'attività membranolitica contro i target patogeni. Di contro un analogo della protegrina ciclica mancante di ponti disolfuro mostrava un profilo antimicrobico e citotossico paragonabile alla protegrina 1. Il dicroismo circolare mostrava però che anche l'analogo ciclico stabilizzato da ponti disolfuro formava strutture a foglietto β . Questi risultati suggeriscono come il cambiamento conformazionale successivo al legame iniziale con il target modifica l'attività del peptide antimicrobico. Ulteriori studi hanno implementato le conoscenze sulle basi strutturali della tossicità selettiva degli AMP (Unger et al., 2001). Fondamentalmente si sono analizzate le interazioni tra le forme cicliche e lineari della melittina (un AMP estratto dal veleno d'ape) e delle magainina su modelli di membrana *in vitro*. Il peptide ciclico era meno efficiente nel legame iniziale con la membrana fosfolipidica rispetto alla controparte lineare anche se, alle rispettive concentrazioni di legame, gli analoghi ciclico e lineare mostravano un' effetto paragonabile di permeabilizzazione. Inoltre, quando si trovavano legati alla membrana, i peptidi ciclici subivano una modifica conformazionale che li portava ad assumere circa il 75% della struttura ad α -elica del peptide lineare. Un ulteriore dato estratto da questi studi era relativo al fatto che l'analogo ciclico della melittina mostrava un aumento nell'attività antibatterica ed una ridotta attività emolitica, mentre

DOTT. LUIGI INGUGLIA



l'analogo della magainina mostrava attività opposta. Queste osservazioni suggeriscono come la struttura degli AMP influisca sull'interazione iniziale dei peptidi con la membrana biologica e la conseguente azione distruttiva. Ulteriori studi hanno messo in evidenza come anche la struttura quaternaria influisca sulla tossicità selettiva degli AMP (Oren et al., 1999). La catelicidina umana LL-37 è un peptide antimicrobico tossico sia per i batteri che per cellule di mammifero. Questo peptide esiste in soluzione, a bassa concentrazione, sia come monomero che come oligomero in equilibrio tra loro. L'equilibrio si spostava verso la forma oligomerica quando, *in vitro*, si trova a contatto sia con membrane zwitterioniche (come quelle dei mammiferi) che elettronegative (come quelle batteriche) ed è proprio questa la forma con attività tossica.

CARATTERISTICHE STRUTTURALI DEGLI AMP

Un requisito essenziale per qualsiasi peptide antimicrobico o agente terapeutico, come già sottolineato, deve essere la sua selettiva tossicità verso i propri target, sfruttando l'affinità verso uno o più determinati microbici che siano facilmente accessibili, come le membrane, e relativamente immutati nel tempo. Tra i parametri strutturali maggiormente studiati vi sono:

- I. La conformazione.
- II. La carica.
- III. L'idrofobicità.
- IV. Il momento idrofobico.
- V. L'anfipaticità.
- VI. L'angolo polare.

Conformazione.

Sebbene i peptidi antimicrobici differiscano notevolmente nella loro sequenza, è possibile catalogarli per struttura tridimensionale. I due gruppi più numerosi sono costituiti da peptidi con strutture ad α -elica e foglietti β , e la maggior parte dei peptidi rimanenti può essere catalogata come peptidi arricchiti in uno o più residui amminoacidici (per esempio ricchi in prolina-arginina o triptofano). I peptidi ad α -elica sono abbondanti nei fluidi extracellulari di insetti e rane. Spesso hanno una conformazione non struttura che diviene ad α -elica quando si trovano a contatto con la membrana fosfolipidica. I peptidi con struttura a foglietti β mostrano differenze sostanziali a livello



di sequenza amminoacidica ma possiedono caratteristiche comuni in termini di anfipaticità, con domini idrofilici ed idrofobici distinti.

Carica.

Molti dei peptidi antimicrobici sono caratterizzati da carica netta positiva compresa tra +2 e +9 e possono contenere domini cationici ben definiti. Questa caratteristica è molto importante per l'iniziale attrazione elettrostatica dei peptidi antimicrobici alla membrana batterica e per la selettività dell'interazione tra AMP e patogeni rispetto alle cellule ospite. La correlazione tra caratteristiche cationiche degli AMP e attività antimicrobica è stata dimostrata in numerosi studi (Bessalle et al., 1992; M Dathe et al., 1997; Matsuzaki et al., 1998) ma non è completamente lineare. Vi sono infatti esempi di relazioni dirette, indirette o addirittura opposte (Bessalle et al., 1992). All'interno di un certo range, l'aumento della carica cationica dei peptidi è generalmente associato a un aumento nell'attività antimicrobica. Studi con due analoghi della magainina, in cui i parametri d'idrofobicità e la struttura secondaria non subivano variazioni, hanno mostrato, in relazione ad aumento di carica da +3 a +5, un'accresciuta attività antibatterica contro Gram positivi e negativi (Dathe et al., 2001). Comunque esiste un limite all'aumento della carica oltre il quale non vi aumento di attività. Negli studi appena descritti, un aumento di carica da +6 a +7 porta a un aumento della capacità emolitica e una diminuzione dell'attività antimicrobica. Questo potrebbe essere dovuto alla forte interazione che si crea tra il peptide e le teste fosfolipidiche che impedisce al peptide di traslocare all'interno della cellula.

Anfipaticità e momento idrofobico.

La maggior parte degli AMP forma strutture anfipatiche quando interagisce con le membrane target. L'anfipaticità può essere realizzata attraverso differenti strutture secondarie ma la più semplice è quella dell' α -elica (Figura 5).

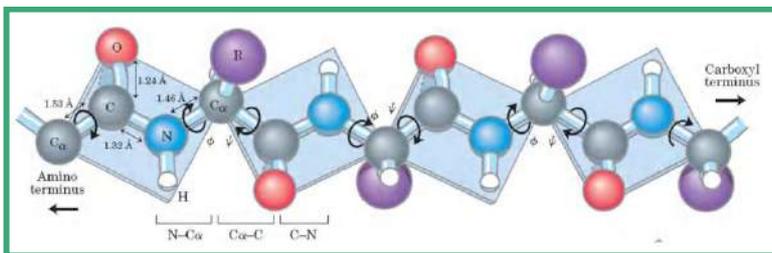


Figura 5. Modello schematico di struttura α -elica.

L' α -elica presenta 3.6 residui per giro ed è stabilizzata da legami idrogeno che si formano tra il gruppo C=O di un residuo n ed il gruppo NH del residuo n+4. L' α -eliche antipatica sono



strutturate in modo da avere un lato della superficie costituito prevalentemente da catene laterali idrofobiche e l'altro lato da catene idrofiliche. L'anfipaticità riflette quindi le abbondanze relative tra domini idrofobici ed idrofilici di una proteina. Una misura quantitativa di questa caratteristica è data dal momento idrofobico che viene calcolato come la somma vettoriale delle idrofobicità dei singoli aminoacidi, standardizzata su un'elica ideale (Eisenberg, 1984). L'aumento del momento idrofobico comporta un significativo aumento dell'attività permeabilizzante ed emolitica contro membrane target, come si evince da esperimenti condotti su eritrociti umani, mentre produce effetti modesti sull'interazione tra il peptide e membrane fortemente negative. I peptidi antimicrobici con strutture a β -foglietto sono anch'essi anfipatici. Sono frequentemente strutturati in sequenze antiparallele e stabilizzati da ponti disolfuro. Questa struttura alquanto rigida promuove la multimerizzazione, limitando così l'esposizione delle facce idrofobiche verso l'ambiente idrofilico. Molti AMP con struttura a β -foglietti esistono come dimeri in soluzione acquosa, come per esempio la defensina umana HNP-3.

Idrofobicità.

L'idrofobicità di un peptide è definita come la percentuale di residui idrofobici in seno ad un peptide e risulta essere di circa il 50% nella maggior parte degli AMP. L'idrofobicità è una caratteristica essenziale per l'interazione con le membrane in quanto essa governa la capacità di ripartirsi all'interno del doppio strato lipidico. Sebbene l'idrofobicità sia richiesta per la permeabilizzazione delle membrane, aumentati valori di questo valore correlano con aumentata tossicità e perdita della specificità antimicrobica. La relazione tra idrofobicità e permeabilizzazione delle membrane fu studiata utilizzando una serie di analoghi della magainina in cui le caratteristiche di carica, struttura ad α -elica e momento idrofobico venivano mantenuti costanti (M Dathe et al., 1997). Fondamentalmente si vide che variazioni dell'idrofobicità non avevano effetti rilevanti sul legame e permeabilizzazione di vescicole di fosfatidilglicerolo (fosfolipide con carica netta negativa) mentre risultavano 60 volte più potenti su vescicole di fosfatidilcolina (fosfolipide con carica netta neutra/fosfatidilglicerolo (in rapporto di 3:1) e 300 volte più potenti su vescicole di sola fosfatidilcolina.

Angolo polare.

L'angolo polare è una misura della proporzione tra la faccia polare e apolare di un' α -elica peptidica (Figura 6).

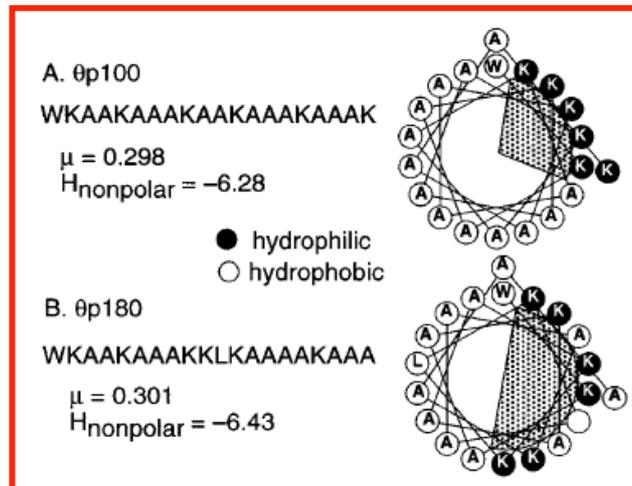


Figura 6. Esempi di angolo polare

Per esempio in un ipotetico peptide con struttura ad α -elica in cui una faccia sia completamente costituita da residui polare e la faccia opposta da residui non polari, l'angolo polare risulta essere di 180° . Un aumento delle proporzioni dei residui apolari nell'elica produce una diminuzione dell'angolo polare ed è stato visto, in numerosi studi eseguiti su peptidi naturali e sintetici, che una diminuzione dell'angolo polare corrisponde ad un aumento della capacità di permeabilizzazione delle membrane (Margitta Dathe et al., 1997; Uematsu and Matsuzaki, 2000). L'angolo polare è stato anche messo in relazione alla stabilità e alla emivita dei pori che i peptidi creano sulle membrane. Sono stati utilizzati a questo scopo due modelli di peptidi con angolo polare rispettivamente di 100° e 180° e in cui le altre caratteristiche chimico-fisiche venivano mantenute costanti. Questi studi hanno dimostrato, in vitro, che i peptidi con angolo polare più piccolo inducevano una maggiore permeabilizzazione della membrana e aumentavano la velocità di formazione dei pori ma la stabilità dei pori era inferiore. Quindi un angolo polare inferiore implica un minor numero di pori ma una maggiore stabilità degli stessi, probabilmente derivante dal maggior numero di peptidi che costituiscono il poro ed una conseguente migliore attività antimicrobica come si evince dal risultato mostrato in Figura 7.

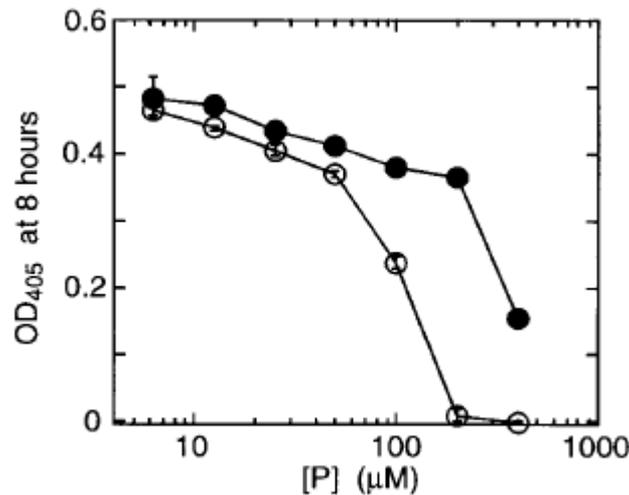


Figura 7. Attività antimicrobica contro cellule di *E. coli* (106 CFU/ml) dei peptidi con angolo polare di 100° (□) e 180° (●).

Meccanismo d'azione.

Sono stati proposti differenti modelli per spiegare il processo di permeabilizzazione della membrana ad opera dei peptidi antimicrobici (Figura 8).

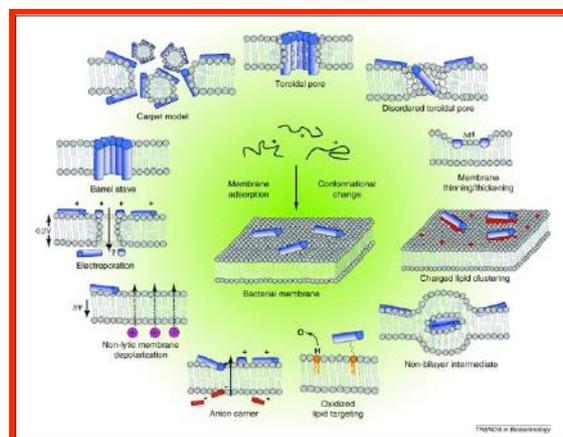


Figura 8. Schema degli eventi che possono avvenire sulla membrana citoplasmatica batterica dopo l'iniziale assorbimento degli AMP. Questi eventi non sono necessariamente mutuamente esclusivi. I peptidi che si trovano a ridosso della membrana raggiungono una concentrazione soglia, superata la quale, si inseriscono nel doppio strato lipidico per formare, in modo stocastico, sia i pori del modello "barrel-stave" che solubilizzare la membrana in micelle (modello "carpet") che formare pori lipido-proteici, come nel modello dei "toroidal pores".

Data la variabilità dell'ultrastruttura delle membrane batteriche, un determinato peptide potrebbe agire attraverso differenti meccanismi e i più accreditati modelli di interazione sono:

- il modello "barrel-stave";
- il modello "toroidal pore";
- il modello "carpet-like".

Nel primo modello, “barrel-stave” (Figura 9), un numero variabile di peptidi si localizzano per formare una struttura, simile ad un barile, che delimita un poro acquoso. In questo modello, le superfici idrofobiche delle α -eliche o dei β -foglietti sono rivolte verso l’esterno del poro, sul lato che guarda alle catene lipidiche della membrana mentre i residui idrofilici sono rivolti verso l’interno della struttura (Breukink and De Kruijff, 1999; Ehrenstein and Lecar, 1977).

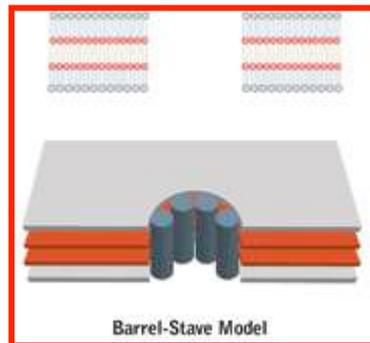


Figura 9. Schema esemplificativo del modello “Barrel-stave”.

L’evento iniziale nella formazione di questo tipo di pori è il legame del peptide sulla superficie della membrana, molto probabilmente in forma di monomero. Dopo il legame, il peptide induce un cambiamento conformazionale di transizione nella membrana, forzando le teste polari, che si assottiglia. A questo punto la porzione idrofobica del peptide si inserisce nella membrana e il posizionamento delle cariche positive facilita il processo. Quando la concentrazione dei peptidi monometrici raggiunge un valore soglia, si ha un’aggregazione che consente alla struttura di inserirsi maggiormente in profondità nel doppio strato lipidico e di adottare una conformazione transmembranaria. Ulteriori aggiunte di monomeri peptidici tendono ad accrescere le dimensioni del poro.

Il secondo modello, quello del “toroidal pore” (Figura 10), è quello meglio caratterizzato.

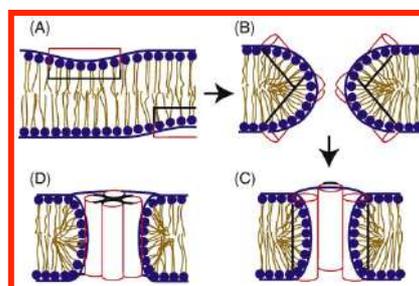


Figura 10. Schema del modello “Toroidal pore”.

La differenza fondamentale rispetto al modello precedente, è che in questo meccanismo i lipidi della membrana sono intercalati insieme ai peptidi nel canale transmembranario, formando così un



complesso supramolecolare. Le eliche peptidiche sono inizialmente orientate parallelamente alla superficie della membrana; i residui idrofobici dei peptidi spiazzano le teste polari dei fosfolipidi e inducono una curvatura nella membrana (Hara et al., 2001). Raggiunto un determinato valore soglia del rapporto peptide/lipidi (nel caso della magainina questo valore è di 1:30), i peptidi si orientano perpendicolarmente alla superficie della membrana e possono cominciare ad associarsi. Caratteristiche peculiari di questi pori includono taglia ridotta del poro, breve emivita, selettività ionica e relazione inversa tra stabilità e carica peptidica.

L'ultimo modello, il "carpet mechanism" (Figura 11), rappresenta un modello di permeabilizzazione, da parte di peptidi antimicrobici, paragonabile a quello prodotto da detersivi.

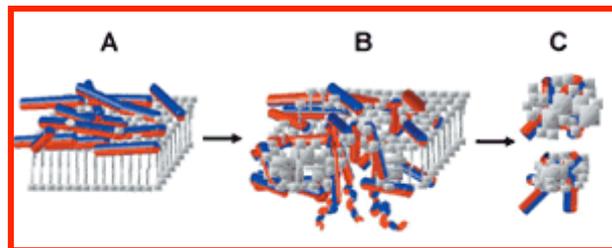


Figura 11. Schema esemplificativo del "carpet mechanism".

I peptidi che agiscono attraverso questo meccanismo non sono comunque detersivi indiscriminati. Inizialmente vi è un accumulo di AMP che deve raggiungere elevate concentrazioni per portare a cambiamenti nella fluidità di membrana e alla sua conseguente distruzione. Il processo non necessariamente avviene con formazione di canali o inserimento dei peptidi nel core idrofobico della membrana (Shai, 2002; Shai and Oren, 2001).

Gli AMP esplicano la loro azione attraverso effetti multipli e simultanei in accordo con la loro generalmente rapida e potente attività antimicrobica. Tale azione è spesso microbica e porta alla distruzione dell'integrità di membrana degli agenti patogeni. Nonostante la grande diversità di sorgente, composizione e conformazione, il meccanismo d'azione attraverso cui agiscono i differenti AMP prevede dei punti di contatti tra tutte le diverse possibilità che, in sintesi, sono:

- una interazione iniziale tra peptidi e membrana, che può avvenire, per esempio, attraverso legami elettrostatici e/o idrofobici;
- raggiungimento di una concentrazione peptidica soglia;

- perturbazione transiente o prolungata della membrana che porta ad eventi di depolarizzazione e permeabilizzazione e disfunzione diretta o indiretta;
- traslocazione attraverso la membrana per accedere e inibire target intracellulari.

Il progetto di ricerca

Durante il primo anno del mio progetto di ricerca, teso a validare l'opportunità di estrarre principi bioattivi con un valore economico nel campo dell'industria cosmetica, farmacologica, nutraceutica o di altri campi economicamente sostenibili, ho potuto mettere a punto un processo iniziale che è iniziato con l'analisi qualitativa dello scarto ittico per arrivare all'estrazione di molecole bioattive (Figura 12).

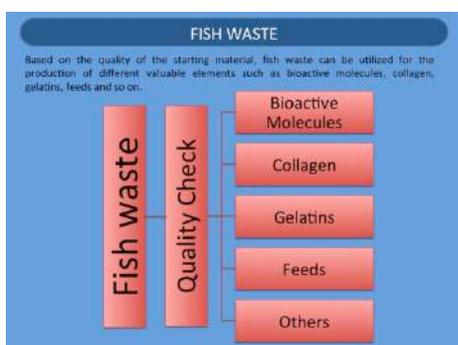


Figura 12. Rappresentazione schematica delle tipologie di molecole che è possibile estrarre a partire dallo scarto ittico.

In particolare, ho analizzato gli scarti provenienti da diverse sedi di produzione e, a tal proposito, è stato necessario definire una serie di elementi chiave, in termini di controllo qualità, che sono stati trasmessi agli operatori della raccolta al fine di ottimizzare tale processo. Nello specifico, dopo aver ricevuto dei campionamenti di difficile gestione in termini qualitativi e quantitativi (Figura 13), è stato richiesto di effettuare campionamenti del materiale ittico di dimensioni ridotte (1,5-2kg/cad.), sottovuoto e accompagnati da informazioni rilevanti quali, per esempio, la provenienza, la specie ittica, la data di lavorazione, la data di conferimento all'operatore (Figura 14).



Figura 13. Esempio di campionamento non corretto.



Figura 14. Esempio di campionamento corretto.

Successivamente, anche in considerazione delle ulteriori necessità dettate dall'organizzazione progettuale, dalle dinamiche partenariali e dall'indirizzo generale del progetto, guidato dalla opportuna scelta di strategici deliverable, ci siamo concentrati su tre tipologie di scarto ittico costituite da scarto monospecie di *Engraulis encrasicolus*, di *Thunnus thynnus*, e da uno scarto senza alcuna specificità ittica, teso ad esplorare la possibilità di utilizzo dello scarto di provenienza dal mondo della ristorazione o dell'attività di vendita al dettaglio (Figura 15).



Figura 15. Tipologie di scarto ittico definite ai fini dei processi di estrazione

Il processo di estrazione delle molecole bioattive, con particolare riferimento agli AMP, è stato definito e suddiviso in due fasi. La prima parte, propedeutica alla fase estrattiva vera e propria, consiste nella omogenizzazione, bollitura, filtraggio e sedimentazione del campione. Tale pre-trattamento termina con la separazione dell'omogenato in una fase lipidica, un'idrofila e una solida (Figura 16). La componente idrofila, prevalentemente costituita da proteine, è stata quindi liofilizzata ed utilizzata per le ulteriori analisi antimicrobiche.



Figura 16. Rappresentazione del processo di pretrattamento. L'omogenato ottenuto dai resti ittici, dopo bollitura e filtraggio, viene lasciato sedimentare così da avere la suddivisione nelle tre fasi idrofoba, idrofila e solida. La fase idrofila è sottoposta al processo di liofilizzazione.

Per verificare l'esistenza di attività antimicrobica del liofilizzato prodotto a partire dai resti ittici misti e saggiarne la relativa efficienza, è stata calcolata la Minimum Inhibitory Concentration (MIC). In particolare sono stati utilizzati quattro ceppi batteri Gram + e Gram - d'interesse farmacologico - cosmetico, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*.

Per tutti i ceppi, il valore della MIC è risultato paragonabile e corrispondente a 80 mg/ml.

A questo punto, l'estratto proteico è stato sottoposto ad una ulteriore estrazione con acido acetico per allontanare le componenti non acidofile e arricchire l'estratto di peptidi antimicrobici utilizzando l'ormai consolidata esperienza del laboratorio del professore Arizza (Arizza and Schillaci, 2016; Schillaci et al., 2012; Spinello et al., 2018).

Dopo aver ottenuto l'estratto acido e averlo liofilizzato, è stata calcolata la MIC per tale componente utilizzando i ceppi batterici già descritti. Il valore ottenuto è di 12 mg/ml, con un potenziamento dell'attività antimicrobica di circa 6,5 volte.

Tali esperimenti sono stati ripetuti utilizzando gli estratti, totale e acido, del campione costituito da *Engraulis encrasicolus* e, sorprendentemente, i valori della MIC sono risultati essere equivalenti per entrambe le tipologie di molecole.

Successivamente abbiamo voluto capire se gli estratti totali e acidi del campione monospecie potessero avere un ruolo nell'inibizione della formazione del biofilm, che come precedentemente descritto conferisce ai batteri peculiari caratteristiche di resistenza. I dati ottenuti sono di estremo interesse poiché confermano il ruolo antimicrobico degli estratti dagli scarti ittici anche a livello dell'inibizione della formazione del biofilm. Come si evince dalla Tabella 1, i risultati mostrano un'importante attività antibiofilm già a concentrazioni più basse rispetto a quelle ottenute dai valori di MIC arrivando, per esempio, a valori d'inibizione della formazione del biofilm del 92.5% e

79.3% su *Staphylococcus aureus* utilizzando, rispettivamente, l'estratto totale e l'estratto acido alla concentrazione di 5mg/ml.

	Percentuale di Inibizione formazione biofilm alla concentrazione di 5mg/ml		Inibizione formazione del biofilm (IC ₅₀ in mg/ml)	
	Estratto totale	Estratto acido	Estratto totale	Estratto acido
<i>Sa</i> 25923	92.5	79.3	0.70	0.54
<i>Pa</i> 15442	70.0	53.8	0.32	0.89
<i>Ef</i> 29212	55.9	57.6	2.7	3.7
<i>Ec</i> 25922	55.1	52.7	1.3	3.5

Tabella 1. Valori percentuali di inibizione della formazione del biofilm utilizzando gli estratti totali e acidi alla concentrazione di 5mg/ml e determinazione della concentrazione inibente la formazione del 50% del biofilm (IC₅₀) su *Staphylococcus aureus* (*Sa* 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa* 15442), *Enterococcus faecalis* (*Ef* 29212), *Escherichia coli* (*Ec* 25922).

Inoltre per ogni tipologia di estratto è stata determinata la concentrazione alla quale vi è una inibizione di formazione del biofilm del 50%. Tali dati sono riportati in Tabella 1 e mostrano un'efficacia estremamente interessante che comunque necessita di essere debitamente confermata.

La capacità antimicrobica degli estratti totale e acido di *Engraulis encrasicolus* è stata ulteriormente studiata sotto il punto di vista dell'attività d'inibizione di un biofilm preformato (Tabella 2).

	Percentuale d'inibizione di biofilm preformato da 24h			
	Estratto totale		Estratto acido	
	100 mg/ml	80 mg/ml	25mg/ml	12.5mg/ml
<i>Sa</i> 25923	74.6	71.7	58.9	34.7
<i>Pa</i> 15442	-	-	48	39.4
<i>Ef</i> 29212	36.4	28.1	77.5	36.5
<i>Ec</i> 25922	51.3	46.3	73.3	29.2

Tabella 2. Valori percentuali di inibizione del biofilm preformato utilizzando gli estratti totali, alla concentrazione di 100 mg/ml e 80mg/ml, e acidi, alla concentrazione di 25 mg/ml e 12.5 mg/ml su *Staphylococcus aureus* (*Sa* 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa* 15442), *Enterococcus faecalis* (*Ef* 29212), *Escherichia coli* (*Ec* 25922).

Anche questo saggio ha mostrato dati sorprendentemente interessanti sull'attività antimicrobica degli estratti totali e acidi degli scarti della industria ittica e aprono una strada interessante per lo sviluppo di prodotti cosmetico- farmacologici di alto interesse commerciale.

Sono altresì necessarie ulteriori conferme delle attività descritte, un'analisi della presenza di metalli pesanti e successive analisi di stabilità per conferire maggiore certezza alla realistica ipotesi della creazione di un prodotto commerciale a partire dagli scarti ittici.

Bibliografia

Archer GL, Bosilevac JM. Signaling antibiotic resistance in staphylococci. *Science* (80-) 2001; 291:1915–6.

Arizza V, Schillaci D. Echinoderm antimicrobial peptides: the ancient arms of the deuterostome innate immune system. 2016.

Arvanitoyannis IS, Kassaveti A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *Int J Food Sci Technol* 2008; 43:726–45.

Bereket W, Hemalatha K, Getenet B, Wondwossen T, Solomon A, Zeynudin A, et al. Update on bacterial nosocomial infections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012:1039–44.

Bessalle R, Haas H, Gorla A, Shalit I, Fridkin M. Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:313–7.

Breukink E, De Kruijff B. The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1999; 1462:223–34.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:238–50.

Brogden KA, Ackermann M, McCray PB, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22:465–78.

Cohen FL, Tartasky D. Microbial resistance to drug therapy: a review. *Am J Infect Control* 1997; 25:51–64.

Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* 2001; 501:146–50.

Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL, et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett* 1997; 403:208–12.

Dathe Margitta, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL, et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett* 1997; 403:208–12.

Ehrenstein G, Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* 1977; 10:1–34.

Eisenberg D. Three-Dimensional Structure of Membrane and Surface Proteins. *Annu Rev Biochem* 1984; 53:595–623.

ElMekawy A, Diels L, De Wever H, Pant D. Valorization of Cereal Based Biorefinery Byproducts: Reality and Expectations. *Environ Sci Technol* 2013; 47:9014–27.

Florin-Christensen J, Suarez CE, Florin-Christensen M, Wainszelbaum M, Brown WC, McElwain TF, et al. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:7736–41.

Gold HS, Moellering RC. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* 1996; 335:1445–54.

Goossens H. Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci: Differences between the United States and Europe. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19:546–51.

Hara T, Mitani Y, Tanaka K, Uematsu N, Takakura A, Tachi T, et al. Heterodimer formation

DOTT. LUIGI INGUGLIA

- between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: A cross-linking study. *Biochemistry* 2001; 40:12395–9.
- Kiedrowski MR, Horswill AR. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1241:104–21.
- Kurniasih SD, Soesilo TEB, Soemantojo R. Pollutants of Fish Processing Industry and Assessment of its Waste Management by Wastewater Quality Standards. In: 1st SRICOENV 2018. 2018.
- Lasch P, Schultz CP, Naumann D. The influence of poly-(L-lysine) and porin on the domain structure of mixed vesicles composed of lipopolysaccharide and phospholipid: An infrared spectroscopic study. *Biophys J* 1998; 75:840–52.
- Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: Antimicrobial and Cytotoxic Peptides of Mammalian Cells. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:105–28.
- Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 2004; 10:S122–9.
- Matsuzaki K, Mitani Y, Akada KY, Murase O, Yoneyama S, Zasloff M, et al. Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa. *Biochemistry* 1998; 37:15144–53.
- Nicolas P, Mor A. Peptides as Weapons Against Microorganisms in the Chemical Defense System of Vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:277–304.
- Nijnik A, Hancock R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg Health Threats J* 2009; 2.
- Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: Relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 1999; 341:501–13.
- Palmer M. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 2001; 39:1681–9.
- Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:672–93.
- Ravindran R, Jaiswal AK. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends Biotechnol* 2016; 34:58–69.
- Resources AG, Food FOR. the State of the World ' S Aquatic Genetic Resources. 2019.
- Schillaci D, Vitale M, Cusimano MG, Arizza V. Fragments of beta-thymosin from the sea urchin *Paracentrotus lividus* as potential antimicrobial peptides against staphylococcal biofilms. *Thymosins Heal Dis Ii* 2012; 1270:79–85.
- Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolym - Pept Sci Sect* 2002; 66:236–48.
- Shai Y, Oren Z. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* 2001; 22:1629–41.
- Spinello A, Cusimano MG, Schillaci D, Inguglia L, Barone G, Arizza V. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of a Recombinant Fragment of β -Thymosin of Sea Urchin *Paracentrotus lividus*. *Mar Drugs* 2018; 16.
- Tam JP, Wu C, Yang JL. Membranolytic selectivity of cystine-stabilized cyclic protegrins. *Eur J Biochem* 2000; 267:3289–300.



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



Uematsu N, Matsuzaki K. Polar angle as a determinant of amphipathic α -helix-lipid interactions: A model peptide study. *Biophys J* 2000; 79:2075–83.

Unger T, Oren Z, Shai Y. The effect of cyclization of magainin 2 and melittin analogues on structure, function, and model membrane interactions: Implication to their mode of action. *Biochemistry* 2001; 40:6388–97.

Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci. *Science* (80-) 2001; 291:1962–5.

Palermo, 24/02/2020

Luigi Inguglia

DOTT. LUIGI INGUGLIA