

# PEPTIDI ANTIMICROBICI: UNA NATURALE DIFESA DELL'ORGANISMO E UNA POTENZIALE TERAPIA

Sonia Melino (a), Ridvan Nepravishta (a), Francesca Mondello (b), Maurizio Petruzzelli (c), Maurizio Paci (a)

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università "Tor Vergata", Roma

(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Dipartimento di Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti

## Introduzione

I peptidi antimicrobici naturali (AMP) fanno parte del sistema di difesa innato dell'ospite, hanno generalmente un ampio spettro d'azione e la loro attività si esplica nei confronti di batteri, funghi e virus. Diversi studi hanno dimostrato la possibilità di utilizzare i peptidi antimicrobici come agenti antinfettivi e nella profilassi delle malattie trasmesse per via sessuale (es. HIV, *Neisseria*, *Chlamidia*, ecc.). Attualmente si conoscono più di 500 differenti peptidi, isolati da vari organismi dagli insetti all'uomo. Molti organismi secernono diversi tipi di peptidi sulle loro superfici epiteliali creando "cocktail antimicrobici" ad ampio spettro (1). Nei vertebrati sono prodotti in abbondanza principalmente a livello della mucosa esterna (occhi, apparato genitourinario, pelle, polmoni) e dalle cellule di Paneth nel tratto intestinale del duodeno. Gli AMP hanno generalmente una natura cationica e vanno incontro a modifiche post-traduzionali prima della secrezione. Infatti sono sintetizzati in forma di precursori con una sequenza segnale e con sequenze che, neutralizzando la carica positiva del peptidi, ne riducono la tossicità all'interno della cellula che lo sintetizza. Tali sequenze vengono eliminate durante la secrezione, portando alla formazione del peptide biologicamente attivo. Sono peptidi prevalentemente di natura cationica e molti con caratteristiche anfipatiche, classificati in base alla struttura secondaria in 4 gruppi: 1) alfa eliche lineari di 20-30 aminoacidi (come la magainina, cecropine, ecc.); 2) peptidi ricchi di Pro-Arg (come le bactenecine bac 5 e 7); 4) peptidi ricchi di ponti disolfuro a struttura alfa o a struttura beta (es. le defensine). Molti AMP hanno caratteristiche anfipatiche e in genere, tali peptidi esplicano la loro attività antimicrobica agendo a livello della membrana cellulare dei microrganismi. Grazie alla regione cationica sono in grado di interagire con le membrane cariche negativamente, come quelle microbiche, mentre la regione idrofobica ne permette la penetrazione o la formazione di pori con strutture dette a "toroide" o a "barrel-stave", che destabilizzando la membrana inducono la morte del microrganismo (1). In generale i peptidi antimicrobici sono in grado di svolgere un'azione selettiva interagendo con le membrane batteriche caratterizzate dalla prevalenza di fosfolipidi acidi sul lato esterno della membrana. Pertanto questo meccanismo d'azione rende particolarmente difficile lo sviluppo di resistenza agli AMP da parte dei microrganismi, dato che l'insorgenza della resistenza sarebbe determinabile solo con un evento estremamente raro di riarrangiamento nell'organizzazione fosfolipidica della membrana. Il crescente problema dello sviluppo di resistenza ai convenzionali antibiotici pone quindi in primo piano lo studio relativo alla possibilità di utilizzare gli AMP nella terapia antimicrobica, inoltre, tali composti potrebbero potenziare l'azione dei convenzionali antibiotici favorendone la penetrazione all'interno del microrganismo. Pertanto, recentemente molte industrie farmaceutiche si sono interessate allo sviluppo di farmaci antibatterici e antifungini aventi gli AMP come principio attivo e molti di questi prodotti sono attualmente in fase clinica, o loro immissione sul mercato è

di recente approvazione, come nel caso di un farmaco per la candidosi orale contenente il peptide P113 (2), un peptide analogo dell'istatina 5. La famiglia delle istatine (3), insieme a quella delle defensine (4) e delle catelicidine (5), è una delle tre famiglie di AMP più rappresentative prodotte nei mammiferi.

## Studi sul meccanismo d'azione antimicrobica dell'istatina 5 e analoghi

Le istatine sono una famiglia di circa 12 peptidi lineari di natura cationica distinguibili elettroforeticamente e ricchi di istidina, che nel caso dell'istatina 5 risulta essere il 29% dell'intera composizione aminoacidica. Le istatine 1 e 3 sono i prodotti primari dei geni *his1* e *his2* localizzati sul cromosoma 4 umano nella banda q13, tali geni sono espressi solo nella parotide e nelle ghiandole submandibolari (3). Le istatine trovate nella saliva sono derivanti dalla proteolisi delle istatine 1 e 3 (Tabella 1).

**Tabella 1. Sequenza amminoacidica delle istatine presenti nella saliva umana**

Tipo di istatina	Sequenza amminoacidica
Istatina 1	DSpHEKRHHGYRRKFHEKHSHSHREFPFYGDYGSNYLYDN
Istatina 2	RKFHEKHSHSHREFPFYGDYGSNYLYDN
Istatina 3	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHSHSHRGYRSNYLYDN
Istatina 4	RKFHEKHSHSHRGYRSNYLYDN
Istatina 5	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHSHSHRGY
Istatina 6	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHSHSHRGYR
Istatina 7	KFHEKHSHSHRGY
Istatina 8	RKFHEKHSHSHRGY
Istatina 9	KFHEKHSHSHRGYR
Istatina 10	KFHEKHSHSHRGYR
Istatina 11	KRHHGYKR
Istatina 12	KRHHGYK

I primi studi relativi all'attività antibatterica delle istatine risalgono al 1984 quando Mackay ad altri (6) misero in evidenza che le istatine possiedono un'attività batteriostatica e battericida nei confronti di *Streptococcus mutans*. Le istatine sono in grado di inibire la crescita microbica nella cavità orale, possedendo un'attività battericida e batteriostatica, pH dipendente, nei confronti di *S. mutans*, *Staphylococcus aureus* ed essendo in grado di inibire la coaggregazione di *Porfiromonas gengivalis* e *Streptococcus mitis* (7). Nell'ultima decade molto interesse ha suscitato il potere antimicotico di questa famiglia di peptidi e, in particolare, dell'istatina 5 (24 aa), che risulta essere il peptide antimicrobico più attivo tra le istatine naturali. L'istatina 5, infatti, è in grado di inibire la conversione di *Candida albicans* dalla forma vegetativa allo stato germinato, e di determinarne la morte a concentrazioni fisiologiche (15-30  $\mu$ M) (8). Possiede, inoltre, sia un'attività fungicida che fungistatica nei confronti di *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* and *Neurospora crassa*. Quale sia il meccanismo di azione dell'istatina 5 nell'indurre tale attività candidacida, e in generale antifungina, non è al momento ancora noto. Tale peptide non esplica la sua attività inducendo la formazione di pori nella membrana, come avviene per altri AMP, ma si pensa che la sua azione possa essere determinata mediante un processo *multi-step*, che include un' iniziale interazione del peptide con una proteina presente sulla parete di *Candida* chiamata Ssa1/2p, che ne media l'entrata

nella cellula (9). Studi di microscopia a fluorescenza hanno messo in risalto che il target dell'istatina 5 all'interno della cellula di *C. albicans* è il mitocondrio (10) e in particolare si è osservato che all'interazione del peptide con la membrana mitocondriale segue il blocco della catena respiratoria. Si pensa che l'istatina 5 possa indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e in tal modo causare danni a livello della catena respiratoria (11). Recenti studi hanno messo in evidenza che l'istatina 5 è in grado di alterare il funzionamento del trasportatore di ioni potassio Trk1p ed è stato ipotizzato che quest'ultimo possa essere il target molecolare dell'istatina 5 nel determinare la morte cellulare di *C. albicans* (12). Studi strutturali e funzionali da noi effettuati su Hist5 (13), e sul peptide suo analogo ATCUN-C16 (10), hanno messo in luce nuove proprietà di questo peptide correlate alla sua capacità di legare ioni metallici (Figura 1). Sono stati effettuati studi di caratterizzazione strutturale volti a valutare l'interazione di tale peptide con ioni metallici mediante l'uso di tecniche spettroscopiche (Dicroismo Circolare, Risonanza Magnetica Nucleare, spettrometria di massa ESI) (14, 15) mettendo in evidenza un tipo di coordinazione caratteristica del motivo strutturale di legame per gli ioni metallici, chiamato Amino terminal-  $\text{Cu}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ - motif (ATCUN-motif): è stato, inoltre, possibile rivelare, mediante spettri CD nella far UV, e spettri 2D NMR l'influenza del legame degli ioni -  $\text{Cu}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$  sulla stabilità strutturale del peptide. Studi funzionali hanno rivelato la capacità del peptide ATCUN-C16 di legare con elevata affinità e di idrolizzare il DNA. È ormai noto che tri- o tera- peptidi, caratterizzati dalla presenza del motivo ATCUN, sono in grado indurre l'idrolisi del DNA in presenza di ioni rame e acido ascorbico, o nichel e monoperossifalato di magnesio, generando una specie ossidante, non diffusibile, che determina un danno a livello del deossiribosio del DNA con conseguente scissione ossidativa (16-17). Dai dati da noi ottenuti risulta, inoltre, che l'attività nucleasica di questo AMP sia anche potenziata da un'azione idrolitica determinata dalla presenza del motivo EHXXH legante lo zinco (13, 14). Tali proprietà, non solo permettono una migliore comprensione del meccanismo di attività antimicrobica di questa famiglia di AMP salivari, ma anche ne ampliano le possibilità d'impiego come agenti terapeutici. Attualmente, nel nostro laboratorio sono in corso studi volti a valutare l'utilizzo di questi peptidi salivari, e di loro analoghi, come potenziali agenti antivirali e antitumorali.

## Istatina 5

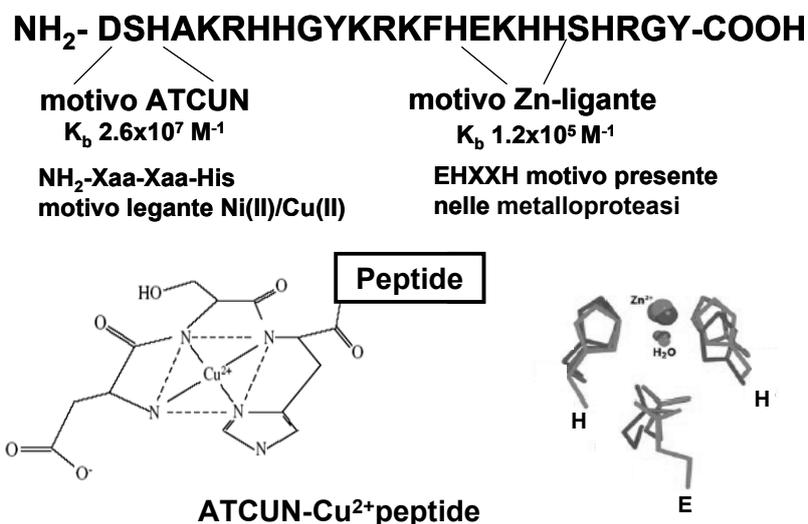


Figura 1. Motivi strutturali leganti ioni metallici presenti nell'Hist5

## Bibliografia

1. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415(6870):389-95.
2. Rothstein DM, Spacciopoli P, Tran LT, Xu T, Roberts FD, Dalla Serra M, Buxton DK, Oppenheim FG, Friden P. Anticandida activity is retained in p-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1367-73.
3. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotidsecretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1988; 263:7472-77.
4. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387(6636):861.
5. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jornvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000;96:3086-93.
6. MacKay BJ, Pollock JJ, Iacono VJ, Baum BJ. Isolation of milligram quantities of a group of histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. *Infect Immun* 1984;44:688-94.
7. Murakami Y, Nagata H, Amano A, Takagaki M, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Aimoto, S. Inhibitory effects of human salivary histatins and lysozyme on coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mitis*. *Infect Immun* 1991;9:3284-6.
8. Tsai H, Bobek LA. Studies of the mechanism of human salivary histatin-5 candidacidal activity with histatin-5 variants and azole-sensitive and -resistant *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997;41:2224-28.
9. Edgerton M, Koshlukova SE, Lo TE, Chrzan BG, Straubinger RM, Raj PA. Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1998;273:20438-47.
10. Helmerhorst EJ, Breeuwer P, van't Hof W, Walgreen-Weterings E, Oomen LC, Veerman EC, Amerongen AV, Abee T. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* 1999;274:7286-91.
11. Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:14637-42.
12. Baev D, Rivetta A, Vylkova S, Sun JN, Zeng GF, Slayman CL, Edgerton M. The TRK1 potassium transporter is the critical effector for killing of *Candida albicans* by the cationic protein, Histatin 5. *J Biol Chem* 2004;279:55060-72.
13. Melino S, Rufini S, Sette M, Morero R, Grottesi A, Paci M, Petruzzelli R. Zn<sup>2+</sup> ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. *Biochemistry* 1999;38:9626-33.
14. Melino S, Gallo M, Trotta E, Mondello F, Paci M, Petruzzelli R. Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5. *Biochemistry* 2006;45:15373-83.
15. Cabras T, Patamia M, Melino S, Inzitari R, Messana I, Castagnola M, Petruzzelli R. Pro-oxidant activity of histatin 5 related Cu(II)-model peptide probed by mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:277-84.
16. Lau SJ, Kruck TP, Sarkar B. A peptide molecule mimicking the copper (II) transport site of human serum albumin. A comparative study between the synthetic site and albumin. *J Biol Chem* 1974;249:5878-84.
17. Jin Y, Cowan JA. DNA cleavage by copper- atcun complexes. factors influencing cleavage mechanism and linearization of dsDNA. *J Am Chem Soc* 2005;127:8408-15.