

Direzione Operativa Sierologia IZS LT

“Nuove prospettive nello sviluppo di sostanze ad attività leishmanicida: messa a punto di peptidi antimicrobici ad attività leishmanicida esposti sulla superficie esterna di nanoparticelle virali vegetali”

Progetto di ricerca corrente del Ministero della Salute

IZS LT 07/12 RC

Responsabile scientifico:

Gladia Macrì

SINTESI IN ITALIANO

“Nuove prospettive nello sviluppo di sostanze ad attività leishmanicida: messa a punto di peptidi antimicrobici ad attività leishmanicida esposti sulla superficie esterna di nanoparticelle virali vegetali”

Parole chiave: *Leishmania infantum*, peptidi antimicrobici, nanoparticelle virali vegetali

Obiettivi

Vista la continua espansione della leishmaniosi canina in Italia e la mancanza, ad oggi, di una formulazione vaccinale sicuramente efficace, un metodo per combattere la malattia è il controllo e il killing del parassita nel soggetto infetto che potrebbe essere attuato esponendo AMPs (*antimicrobial peptides*, AMPs) con attività leishmanicida sulla superficie esterna di CVNPs (*chimeric virus nanoparticles*) basate sul virus vegetale TBSV (*Tomato bushy stunt virus*) e il PVX (*Potato virus X*) per verificarne l'attività leishmanicida e l'assenza di attività citotossica nei confronti di eritrociti di cane. I risultati ottenuti potrebbero essere utilizzati in futuro per la formulazione di nuovi prodotti ad attività leishmanicida.

Materiali e Metodi

Il presente progetto di ricerca ha previsto l'esposizione di differenti AMPs con attività microbica sulla superficie esterna di nanoparticelle virali chimeriche (*chimeric virus nanoparticles*, CVNPs) basate sui virus vegetali *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (Grasso *et al.*, 2013) e *Potato virus X* (PVX) (Lico *et al.*, 2006; Marconi *et al.*, 2006) e la valutazione dell'attività antimicrobica delle chimere prodotte e caratterizzate contro alcuni ceppi batterici e contro i promastigoti di *Leishmania infantum*. L'impiego delle nanoparticelle virali vegetali (*plant virus nanoparticles*, pVNPs) per la produzione degli AMPs potrebbe avere un duplice vantaggio: i) le CVNPs, presentanti l'AMP di interesse fuso alla proteina CP, verrebbero sintetizzate direttamente dalle piante, comportando di conseguenza una notevole riduzione dei costi di produzione, in quanto gli AMPs finora testati sono

prevalentemente sintetizzati chimicamente e ii) l'esposizione, con un'elevata densità, dell'AMP di interesse su tali gabbie molecolari potrebbe favorire la biodisponibilità, la stabilità e la protezione del peptide dalla proteolisi, rispetto al mero utilizzo di AMPs nudi estratti dall'organismo di interesse e così somministrati.

Risultati

A tal proposito, è stato effettuato un attento studio bibliografico volto all'individuazione degli AMPs più promettenti, valutando non solo il loro potenziale leishmanicida e battericida testato *in vitro*, rispettivamente, contro entrambe le forme replicative del protozoo *Leishmania* e contro altri microrganismi batterici patogeni, ma anche la loro attività citotossica nei confronti degli eritrociti.

Tra tutti, sono stati selezionati i peptidi Temporina A, Temporina B, Bombinina H2 ed Esculentina 1b (1,18).

Mediante le tecnologie standard del DNA ricombinante, sono state realizzate le chimere TBSV-TempA, TBSV-TempB, TBSV-BombH2, PVX-Sma-TempA, PVX-Sma-TempB, PVX201-2A-TempA, PVX201-2A-TempB e PVX201-2A-Esc.

I peptidi Temporina A e Temporina B sono stati fusi ad entrambi i virus vegetali, perché per le temporine non è nota quale sia l'estremità del peptide coinvolta nella funzionalità microbica, mentre è accertato che per la bombinina H2 è l'estremità C-terminale (Simmaco *et al.*, 2009) (è stato scelto per tale peptide solo il vettore basato sul TBSV perché in esso l'estremità C-terminale della CP è esposta esternamente), e per l'esculentina 1b (1,18) l'estremità N-terminale (Mangoni *et al.*, 2003) (è stato scelto per tale peptide solo il vettore basato sul PVX perché in esso l'estremità N-terminale della CP è esposta sulla superficie esterna del virione).

Le prove di infettività condotte mediante inoculazione su piante di *N. benthamiana* di 6-8 settimane, hanno mostrato che le uniche chimere risultate replicative ed infettive sono state tutte quelle basate sul TBSV e la chimera PVX201-2A-Esc.

Solo esse sono state caratterizzate a livello proteico e dell'acido nucleico, dopo aver effettuato una purificazione su piccola scala.

Innanzitutto, contrariamente a quanto atteso, la resa delle CVNPs è stata bassa: 14,8 µg/g per TBSV-TempA e TBSV-TempB, 120 µg/g per TBSV-BombH2 e 16,8µg/g per PVX201-2A-Esc. Ciò probabilmente è dovuto alla presenza di tali sequenze eterologhe che hanno influenzato la normale infettività delle chimere.

Inoltre le successive analisi di caratterizzazione (SDS-PAGE seguito da colorazione con nitrato d'argento, Western Blotting e analisi RT-PCR) hanno evidenziato che le uniche chimere risultate stabili e presentanti correttamente l'intero peptide antimicrobico sulla superficie esterna del virione sono state TBSV-TempB, TBSV-BombH2 I e PVX201-2A-Esc.

Specialmente le analisi RT-PCR, hanno evidenziato infatti che nella chimera TBSV-TempA c'è stato un riarrangiamento a livello genomico che ha portato alla perdita di 11 dei 13 amminoacidi originari del peptide eterologo, mentre la chimera TBSV-BombH2, stabile nella prima generazione di infezione, nella seconda generazione ha mostrato una ricombinazione genomica che ha portato alla perdita di 15 dei 20 amminoacidi originari del peptide.

Pertanto per i successivi saggi di attività sono state purificate su media scala solo le chimere TBSV-TempB, TBSV-BombH2 I e PVX201-2A-Esc.

Inizialmente sono stati condotti saggi per diluizione con lo scopo di individuare le potenzialità microbicide di tali chimere contro il batterio Gram negativo *E. coli* (ceppo XL1-Blue) e Gram positivo *B. megaterium*.

I dati più promettenti sono stati ottenuti con la chimera TBSV-TempB che, alla concentrazione testata (0,610 µM di peptide), ha provocato il 20% di morte dei batteri *B. megaterium* e la chimera PVX201-2A-Esc che sul batterio *E. coli*, con 0,581 µM di peptide nel saggio, ha causato il 30% di mortalità (tabella 1 e 2).

NOME	SEQUENZA PEPTIDE	M.W. (g/mol)	PATOGENO	µg CVNPs	µg PEPTIDE	µmol PEPTIDE
TBSV-TempB	LLPIVGNLLKSL	1393	<i>E. coli</i>	31,8	1,065	0,763
			<i>B. megaterium</i>	25,4	0,852	0,61
PVX201-2A-Esc	GIFSKLAGKKLKNLLISG	1887	<i>E. coli</i>	140	1,096	0,581
			<i>B. megaterium</i>	105	0,822	0,435

Tabella 1. Peptidi antimicrobici esposti sulla superficie esterna delle pVNP chimeriche utilizzati per il saggio batterico. Per ogni peptide è riportata la sequenza amminoacidica, il peso molecolare (Sito Expsy), la quantità di CVNPs e le corrispondenti µmol di peptide utilizzate nel saggio.

CAMPIONE	PATOGENO	I (µ ± σ)
TBSV-wt	<i>E. coli</i>	0
	<i>B. megaterium</i>	0
TBSV-TempB	<i>E. coli</i>	0
	<i>B. megaterium</i>	21,6±1,4
PVX201-wt	<i>E. coli</i>	73,4±1,4
	<i>B. megaterium</i>	0
PVX201-2A-Esc	<i>E. coli</i>	30,3±5,0
	<i>B. megaterium</i>	0

Tabella 2. Percentuale di inibizione ottenuta dai saggi di attività. Nella prima colonna è riportato il campione utilizzato, nella seconda sono riportati i microrganismi su cui è stato eseguito il test, nella terza è riportata la percentuale di inibizione.

Successivamente è stato messo a punto il saggio MTT per testare le potenzialità leishmanicide di tali CVNPs contro i promastigoti di *L. infantum*. Alle concentrazioni testate, le chimere non hanno causato la mortalità dei protozoi. Probabilmente ciò potrebbe essere dovuto alle basse concentrazioni del peptide impiegate nel saggio (Tabella 3).

CHIMERA	µg CVNPs	µM PEPTIDE	% MORTALITA'
TBSV-TempB	6	1,44	0
TBSV-BombH2	20	5,37	0
PVX201-2A-Esc	28	1,16	0

Tabella 3. Percentuale di inibizione della crescita ottenuta dal saggio MTT allestito sui promastigoti di *L. infantum*. Nella prima colonna è riportata la chimera utilizzata, nella seconda e terza la quantità di CVNPs e le corrispondenti µmol di peptide utilizzate nel saggio, nella quarta è riportata la percentuale di inibizione della crescita.

Discussione e Conclusioni

Le chimere da noi utilizzate non hanno fornito i risultati attesi sull'efficacia nell'indurre la mortalità dei promastigoti di *L. infantum* alle concentrazioni testate. Vista la difficoltà di ottenere un'alta resa delle CVNPs *in planta*, rispetto ai dati presenti in letteratura, sono state utilizzate concentrazioni

micromolari del peptide antimicrobico estremamente basse e forse questa potrebbe essere la causa della non-attività riscontrata con le CVNPs testate. Inoltre nei lavori pubblicati in genere vengono utilizzati differenti ceppi di *Leishmania* rispetto a quello impiegato nei seguenti saggi (*L. infantum*) ed è noto che gli agenti leishmanicidi potrebbero agire diversamente nei vari ceppi e forme del protozoo.

Infatti in letteratura è noto che il peptide temporina B (Mangoni *et al.*, 2005) e Bombinina H2 (Mangoni *et al.*, 2006) sono in grado di causare la morte del 50% dei promastigoti di *L. donovani* (LC50) a 8,6 μ M e 7,3 μ M, rispettivamente, mentre non sono riportati dati di attività per il peptide Esculentina 1b (1,18). Le Unità Operative intendono proseguire le attività svolte allestendo nuovamente il saggio con quantità maggiori di CVNPs, e testando a concentrazioni maggiori, il virus PVX201-wt per saggiare l'attività leishmanicida, visti i promettenti risultati contro il batterio *E. coli* e infine valutando *in vitro* anche il possibile effetto emolitico tossico delle CVNPs nei confronti degli eritrociti di cane.

Bibliografia

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J (2004) Canine Leishmaniasis Advances in Parasitology 57:1-88.

Gradoni L (2015) Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. Veterinary Parasitology 208 94-100.

Grasso S, Lico C, Imperatori F, Santi L (2013) A plant derived multifunctional tool for nanobiotechnology based on Tomato bushy stunt virus. Transgenic Res 22 (3):519-535.

Lico C, Capuano F, Renzone G, Donini M, Marusic C, Scaloni A, Benvenuto E, Baschieri S (2006) Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. J Gen Virol 87 (Pt 10):3103-3112.

Mangoni ML, Fiocco D, Mignogna G, Barra D, Simmaco M (2003) Functional characterisation of the 1-18 fragment of esculentin-1b, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. Peptides 24 (11):1771-1777.

Marconi G, Albertini E, Barone P, De Marchis F, Lico C, Marusic C, Rutili D, Veronesi F, Porceddu A (2006) In planta production of two peptides of the Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of potato virus X. BMC Biotechnol 6:29.

Simmaco M, Kreil G, Barra D (2009) Bombinins, antimicrobial peptides from *Bombina* species. Biochim Biophys Acta 1788 (8):1551-1555.