

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA  
Dottorato di Ricerca in Microbiologia e Virologia  
Ciclo XXVII

*Analisi dell'attività  
antimicrobica ed antivirale  
dei prodotti di geni codificanti gli anticorpi*

*Coordinatore:*  
Chiar.mo Prof. Luciano Polonelli

*Tutor:*  
Chiar.mo Prof. Valter Magliani

*Dottoranda:* Martina Sperindè

<b>Indice</b> .....	<b>1</b>
<b>Introduzione</b> .....	<b>5</b>
Gli anticorpi.....	6
Cenni storici .....	6
Funzione e struttura.....	8
Struttura dei <i>loci kappa, lambda e heavy</i> umani .....	10
Meccanismo di ricombinazione somatica dei geni V(D)J.....	11
Cambiamento di classe .....	17
Diversificazione e variabilità.....	21
Ruolo degli anticorpi nella immunoprotezione antinfettiva.....	23
Anticorpi ricombinanti e peptidi anticorpali antimicrobici .....	26
Peptide killer.....	28
Peptidi CDR.....	31
Peptidi Fc.....	32
<b>Scopo della Ricerca</b> .....	<b>35</b>
<b>Materiali e Metodi</b> .....	<b>37</b>
Selezione e sintesi di peptidi e proteine codificati da sequenze appartenenti a diversi loci della famiglia genica delle immunoglobuline.....	38
Selezione delle sequenze corte.....	38
Selezione delle sequenze lunghe .....	38
Ceppi microbici utilizzati .....	39
Saggi biologici.....	39
Valutazione dell'attività microbica <i>in vitro</i> dei peptidi selezionati .....	39
Attività nei confronti di lieviti.....	39
Attività nei confronti di muffe .....	40
Attività nei confronti di batteri.....	40
Saggi di time killing dei peptidi L12P e L18R nei confronti di cellule di <i>Candida albicans</i> .....	41
Valutazione dell'attività <i>in vitro</i> dei peptidi L12P e L18R nei confronti di cellule di mammifero ....	42
Attività emolitica.....	42
Attività citotossica.....	42
Attività genotossica .....	43
Valutazione dell'attività terapeutica dei peptidi L12P ed L18R in un modello di candidosi sistemica sperimentale .....	45
Analisi della tossicità <i>in vivo</i> dei peptidi L12P e L18R.....	46
Studi in circolo dei peptidi L12P e L18R .....	47
Studi di microscopia su cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi L12P e L18R.....	48

Microscopia elettronica a trasmissione .....	48
Microscopia elettronica a scansione .....	49
Microscopia confocale a scansione laser .....	50
Studio degli effetti biologici indotti dai peptidi L12P e L18R in cellule di <i>Candida albicans</i> .....	51
Produzione di specie reattive dell'ossigeno .....	51
Morte cellulare per apoptosi .....	52
Studio dell'attività <i>in vitro</i> dei peptidi L12P ed L18R nei confronti di HIV .....	52
Clonaggio ed espressione delle sequenze nucleotidiche "lunghe" .....	53
Preparazione delle sequenze .....	53
Digestioni enzimatiche preparative delle sequenze .....	54
Reazione di ligazione tra le sequenze geniche di interesse e il vettore pET-28.....	55
Trasformazione delle cellule batteriche con la reazione di ligazione.....	56
Selezione dei cloni positivi contenenti l'inserito .....	56
Selezione dei cloni positivi contenenti l'inserito nel corretto orientamento .....	57
Prova di solubilità .....	58
Espressione e recupero della proteina IgM CH <sub>4</sub> dai corpi di inclusione .....	58
<b>Risultati</b> .....	<b>61</b>
Selezione e sintesi di peptidi codificati da sequenze appartenenti a differenti loci della famiglia genica delle immunoglobuline .....	62
Sequenze corte .....	62
Sequenze lunghe.....	63
Valutazione dell'attività microbica <i>in vitro</i> dei peptidi selezionati .....	65
Attività nei confronti di lieviti.....	65
Attività nei confronti di muffe .....	67
Attività nei confronti di batteri .....	68
Saggi di time killing dei peptidi L12P e L18R nei confronti di cellule di <i>Candida albicans</i> .....	69
Valutazione dell'attività <i>in vitro</i> dei peptidi selezionati nei confronti di cellule di mammifero.....	70
Attività emolitica .....	70
Attività citotossica .....	70
Attività genotossica .....	71
Valutazione dell'attività terapeutica dei peptidi L12P ed L18R in un modello di candidosi sistemica sperimentale .....	73
Analisi della tossicità <i>in vivo</i> dei peptidi L12P e L18R.....	75
Studi in dicroismo circolare dei peptidi L12P e L18R .....	76
Studi di microscopia su cellule di <i>Candida albicans</i> trattate con i peptidi L12P e L18R .....	79
Microscopia elettronica a trasmissione .....	79

Microscopia elettronica a scansione .....	81
Microscopia confocale a scansione laser .....	83
Studio degli effetti biologici indotti dai peptidi L12P e L18R in cellule di <i>Candida albicans</i> .....	86
Produzione di specie reattive dell'ossigeno .....	86
Morte cellulare per apoptosi .....	88
Studio dell'attività <i>in vitro</i> dei peptidi L12P ed L18R nei confronti di HIV .....	92
Clonaggio ed espressione delle sequenze nucleotidiche "lunghe" .....	94
<b>Discussione .....</b>	<b>99</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>109</b>
<b>Appendice.....</b>	<b>123</b>



## *Introduzione*

## Gli anticorpi

### Cenni storici

Gli anticorpi (Ab), o immunoglobuline (Ig), sono conosciuti sin dal 1890, quando Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato descrissero per la prima volta la loro attività nei confronti delle tossine tetanica e difterica.

Somministrando il siero di animali ai quali erano state precedentemente inoculate dosi subletali di tossina difterica, fu possibile per la prima volta curare la difterite e, il 20 dicembre 1891, dichiarare guarito un bambino trattato. La componente proteica di tale siero venne definita inizialmente “antitossina” in relazione all’azione neutralizzante nei confronti delle tossine prodotte da batteri. I due studiosi dimostrarono, inoltre, che tale siero possedeva non solo proprietà terapeutiche, perché in grado di indurre la guarigione se iniettato ai primi sintomi della malattia, ma anche preventive, in caso di rischio di esposizione all’agente causale (**von Behring 1890, Casadevall 1995**). Per questa scoperta von Behring vinse il Premio Nobel per la Medicina nel 1901, aprendo una nuova prospettiva per la cura delle malattie da infezione come citato nella motivazione: “...for his work on serum therapy, especially its application against diphtheria, by which he has opened a new road in the domain of medical science and thereby placed in the hands of the physician a victorious weapon against illness and deaths...”.

La teoria dell’immunità umorale, proposta successivamente da Kitasato, secondo la quale un mediatore presente nel siero reagisce con un antigene (Ag) estraneo portò, nel 1897, lo scienziato tedesco Paul Ehrlich (1854-1915) ad ipotizzare, per descrivere l’interazione Ag-Ab, la cosiddetta “side-chain theory”, simile a quella proposta, nel 1894, da Hermann Emil Fischer (1852-1919) per gli enzimi, secondo la quale una specifica regione degli enzimi si combina con il substrato. Ehrlich ipotizzò l’esistenza di particolari recettori, presenti sulla superficie delle cellule, capaci di legare in maniera specifica le tossine con un meccanismo analogo ad un sistema “chiave-serratura”, determinando la produzione degli Ab (**Davies 1993**). Egli per primo utilizzò il termine “antikörper” (anticorpi) nelle conclusioni del suo fondamentale articolo “Experimentelle Untersuchungen über Immunität” (Studi sperimentali sull’immunità) pubblicato nell’ottobre del 1891 su *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. Questo termine non fu subito accettato dalla comunità scientifica internazionale, ma ne furono proposti molti altri (Immunkörper, Amboceptor, Zwischenkörper, substance sensibilisatrice, Desmon, philocytase, fixateur, Immunisin).

Almroth Edward Wright (1861-1947) suggerì, nel 1904, una nuova teoria secondo la quale gli Ab solubili presenti nel siero “preparassero i batteri” marcandoli per essere così riconosciuti ed eliminati attraverso la fagocitosi. Tale teoria era il frutto della fusione di due correnti di pensiero emergenti in quegli anni riguardo le difese naturali dell’organismo nei confronti degli agenti patogeni: la teoria cellulare e quella umorale. La prima, sostenuta dallo studioso russo Ilya Ilyich Metchnikoff (1845-1916), che lavorava presso l’Istituto Pasteur, prevedeva che ogni organismo, se invaso da un corpo estraneo, provvedesse ad eliminarlo grazie a particolari cellule dette “fagociti”, che contenevano, al loro interno, enzimi digestivi. In antitesi, la teoria umorale,

sostenuta da studiosi tedeschi come Ehrlich, affermava che fosse il siero a causare l'eliminazione dei batteri.

Continuando i suoi studi presso il laboratorio del Saint Mary's Hospital Medical School di Londra, Wright denominò "potere opsonico", dal termine dal greco "opsonô" (preparare il cibo), la proprietà del sangue, caratterizzata, appunto, dalla presenza di opsonine nei fluidi corporei. Egli sosteneva che attraverso la misura del cosiddetto "indice opsonico", ovvero il rapporto tra il potere opsonico del sangue dell'individuo in esame e quello di uno normale, preso come riferimento, si potesse diagnosticare la maggior parte delle infezioni (**Wright 1909, Turk 1994**). Oggi è noto che le opsonine possono essere Ab specifici di tipo IgG1 e IgG3, che ricoprono il microrganismo e sono riconosciuti dai fagociti, oppure sono prodotti, soprattutto C3b, derivanti dall'attivazione del complemento, a cui si riferiva Wright parlando del componente termolabile delle opsonine.

Nel 1923, un giovane chimico diventato microbiologo, Michael Heidelberger (1888-1991), e il suo mentore Oswald Theodore Avery (1877-1955) scoprirono che alcuni zuccheri presenti sui batteri venivano riconosciuti dal sistema immunitario, una scoperta che aprì la strada all'immunochimica. Agli inizi del 1900, decenni prima della scoperta della penicillina, la polmonite da *Streptococcus pneumoniae* era una delle maggiori cause di morte e l'unico trattamento efficace era la somministrazione di siero antipneumococcico (**Heater 2005**). Nel 1917, i microbiologi Alphonse Dochez (1882-1964) e Oswald Theodore Avery dell'Istituto Rockefeller osservarono che *S. pneumoniae* rilasciava, durante la crescita, una "soluble specific substance", che veniva ritrovata nel sangue e nelle urine di uomini e conigli poco dopo aver contratto l'infezione, e che tale sostanza non veniva degradata dalla bollitura, dalla precipitazione con alcool, dall'acetone e dalla digestione con tripsina (**Dochez 1917**). Studi successivi, basati sulla purificazione di tali prodotti batterici dal siero, permisero di capire che si trattava di materiale di natura polisaccaridica, differente a seconda del ceppo batterico analizzato, che poteva essere precipitato con siero immune anti-*S. pneumoniae* (**Heidelberger 1923 e 1924**).

Le proprietà biochimiche dell'interazione di legame Ag-Ab sono state esaminate più in dettaglio da John Marrack (1886-1976) (**Marrack 1934**). Linus Pauling (1901-1994) confermò la teoria chiave-serratura proposta da Ehrlich, mostrando che l'interazione tra Ab e Ag dipendeva più dalla loro configurazione sterica che dalla loro composizione chimica "all antibody molecules contain the same polypeptide chains as normal globulin, and differ from immunoglobulin only in the configuration of the chain; that is, in the way that the chain is coiled in the molecule" (**Pauling 1940**).

Astrid Fagreaus, in conclusione della sua tesi di Dottorato, stabilì che le cellule B, in qualità di plasmacellule, sono le responsabili della produzione degli Ab (**Fagreaus 1948**) e, nel 1959, James Gowen dimostrò il ruolo dei linfociti nella risposta immune umorale e cellulo-mediata.

Successivamente, Gerald Edelman e Joseph Gally determinarono la struttura della catena leggera degli Ab e realizzarono che fosse la stessa proteina descritta nel 1845 da Henry Bence Jones



(**Edelman 1960, 1961, 1962a**). Edelman scoprì, inoltre, che gli Ab sono composti da catene leggere e pesanti legate da ponti S-S (**Edelman 1962b**).

Rodney Porter caratterizzò le regioni “fragment antigen binding” (Fab) e “crystallizable fragment” (Fc) delle IgG (**Porter 1950 e 1959**) e, nel 1972, ricevette il Premio Nobel per la Medicina insieme a Gerald Edelman, per aver determinato l'esatta struttura chimica degli Ab (**Porter 1973**). Successivamente, David Givol e colleghi riuscirono a caratterizzare il frammento variabile (Fv) di Ab ed a produrre la più piccola porzione di Ab ancora capace di conservare la sua attività (**Hochman 1973**).

Gli studi preliminari sugli Ab sono stati focalizzati su IgM e IgG, ma altri isotipi erano già stati precedentemente identificati, quali le IgA secretorie, descritte da Thomas Tomasi in un articolo apparso su *Science* nel 1963 (**Chodirker 1963, Tomasi 1992**), le IgD descritte da David S. Rowe e John L. Fahey (**Rowe 1965**) e le IgE da Kimishige Ishizaka e Teruko Ishizaka (**Ishizaka 1966**).

Susumu Tonegawa scoprì il meccanismo di rimescolamento genetico, denominato “riarrangiamento genico delle cellule”, utilizzato per la produzione del vastissimo repertorio di Ab specifici da parte dei linfociti B (**Tonegawa 1976**) e, per tale scoperta, venne insignito del Premio Nobel nel 1987.

### **Funzione e struttura**

Gli Ab sono glicoproteine dotate di una struttura quaternaria la cui funzione, nel sistema immunitario, è quella di riconoscere e legare gli Ag.

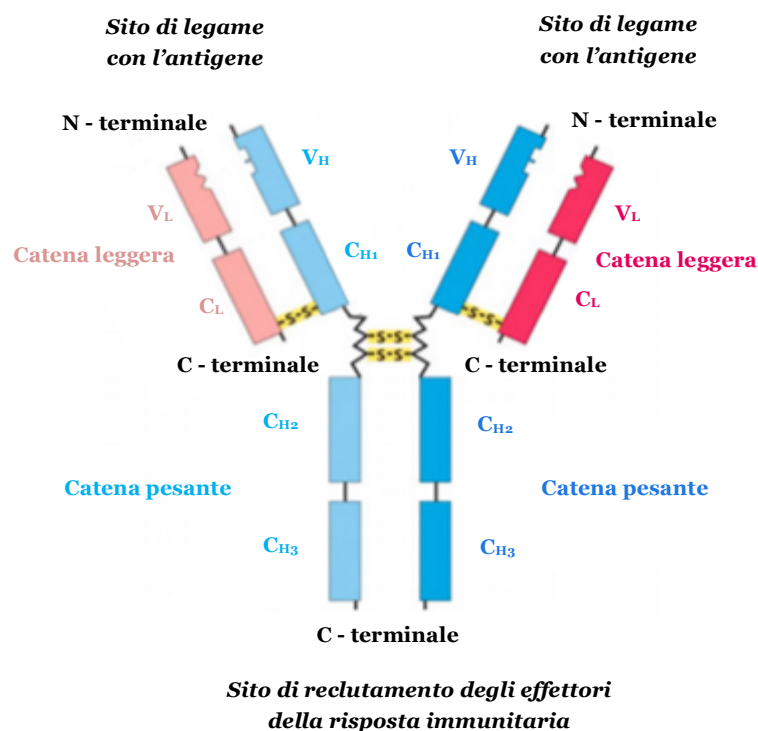
Gli Ab possiedono, sostanzialmente, due funzioni principali: la capacità di riconoscimento di un determinato epitopo presente sull'Ag bersaglio, a cui si legano in maniera specifica, ed il reclutamento di altri componenti del sistema immunitario, come i macrofagi ed il sistema del complemento. Tali funzioni sono esplicate da domini distinti all'interno di ogni molecola di Ab, nelle regioni variabile (V) e costante (C), rispettivamente.

La struttura di base degli Ab è rappresentata da un complesso tetramerico costituito dall'associazione di due catene pesanti, dette heavy (H, circa 50 kDa), e di due catene leggere, light (L, 25 kDa), rispettivamente uguali tra loro e presenti in quantità equimolare (**Edelman 1991**). Le singole catene sono, a loro volta, formate da una regione C e da una regione V. Ognuna delle due catene L è costituita da un dominio VL ed uno CL, mentre ciascuna catena H è formata da un dominio VH e da 3 o 4 domini CH. La regione C è situata nella porzione carbossi-terminale ed è comune a tutti gli Ab della stessa classe essendo deputata all'interazione con cellule del sistema immunitario e con il complemento. La regione V è invece localizzata nella porzione ammino-terminale degli Ab, è responsabile del legame con l'Ag ed è diversa per ogni Ig.

La caratteristica forma ad Y degli Ab è garantita dalla presenza di un numero variabile di ponti disolfuro tra le catene; in particolare, l'unione dei domini C-terminali delle due catene H costituisce

la base della Y, mentre i bracci sono formati dall'unione dei domini N-terminali delle catene H con le catene L. La presenza dei legami disolfuro tra le catene è stata elegantemente dimostrata da Edelman che, trattando IgG ed IgM con sostanze riducenti e solventi come urea 6M, ottenne una drastica riduzione del loro peso molecolare dimostrando così che gli Ab possiedono una struttura multicateneria anziché a singola catena come si era creduto fino a quel momento (**Edelman 1959**). Già in precedenza, peraltro, vi erano evidenze che gli Ab fossero bivalenti ovvero capaci di legare due molecole antigeniche alla volta e che fossero presenti in differenti classi (**Marrack 1934, Pedersen 1945**).

All'interno di ciascun dominio V sono presenti 3 regioni note come "complementarity determining regions", CDR1, CDR2 e CDR3, localizzate a livello del sito di legame con l'Ag e caratterizzate da una estrema variabilità di sequenza e di struttura. Queste sequenze, definite "regioni ipervariabili", sono responsabili del riconoscimento e del legame specifico Ab-Ag. Tra di esse sono localizzate le cosiddette "regioni cornice" che si ripiegano formando una struttura a foglietti  $\beta$  intervallati ad anse corrispondenti invece alle sequenze ipervariabili (**Figura 1**).



**Figura 1.** Struttura di base di un anticorpo in cui si evidenziano le due catene leggere e le due catene pesanti ciascuna formata da una regione variabile ( $V_L$  e  $V_H$ ) ed una costante ( $C_L$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). Ogni catena è formata da un'estremità N-terminale responsabile del legame con l'antigene, mentre la porzione terminale della catena pesante è deputata al reclutamento di altri componenti della risposta immunitaria. Le due catene pesanti sono tenute insieme da due o più ponti disolfuro, mentre un ulteriore ponte disolfuro lega ogni singola catena L ad una catena H, determinando la caratteristica forma ad Y.

Un Ab bivalente monomero può essere scisso dall'enzima papaina con la produzione di due frammenti identici di legame per l'Ag (Fab) e del frammento Fc, che determina la classe anticorpale di appartenenza o isotipo. Il frammento Fc determina le proprietà biologiche dell'Ab, quali capacità di attraversare la placenta, distribuzione tissutale, emivita nel siero, trasporto nelle secrezioni e capacità di attivazione del complemento.

La classe anticorpale di appartenenza è determinata dalle catene H:  $\alpha$  (IgA),  $\delta$  (IgD),  $\epsilon$  (IgE),  $\gamma$  (IgG) e  $\mu$  (IgM). Le catene L, invece, possono essere di tipo *kappa* ( $k$ ) o *lambda* ( $\lambda$ ), ma nello stesso Ab entrambe le catene devono appartenere alla stessa classe (**Janeway 2001, Stracan2012**).

### **Struttura dei loci *kappa*, *lambda* e *heavy* umani**

Nel suo discorso in occasione dell'assegnazione del premio Nobel, Edelman scrisse: "Two challenging questions confronted those attempting chemical analyses of antibody molecules at that time. First, did the observed heterogeneity of antibodies reside only in the conformation of their polypeptide chains as was then widely assumed, or did this heterogeneity reflect differences in the primary structures of these chains, as required implicitly by the clonal selection theory? Second, if the heterogeneity did imply a large population of molecules with different primary structures, how could one obtain the homogeneous material needed for carrying out a detailed structural analysis?" (**Edelman 1972**).

Oggi è noto che, grazie alla combinazione di più catene polipeptidiche, viene garantita la generazione di un numero di strutture anticorpali differenti così ampio da coprire l'intero spettro antigenico presente in natura. Inoltre, ciascuna catena polipeptidica è il prodotto della combinazione di un enorme repertorio genico da cui hanno origine tutte le innumerevoli Ig. In particolare, i numerosi geni delle Ig umane sono organizzati in 3 cluster genici, formati da un numero variabile di esoni intervallati da regioni non codificanti (introni), chiamati *locus H*, localizzato sul cromosoma 14, *locus k*, sul cromosoma 2 e *locus  $\lambda$* , sul cromosoma 22.

Dalla combinazione degli esoni presenti in questi *loci* si producono tutte le Ig (circa  $10^{11}$ ) presenti in natura. I due cluster che codificano per la catena L,  $k$  e  $\lambda$ , sono costituiti da diversi segmenti genici: il segmento V che codifica per 95-101 amminoacidi, cioè la maggior parte della regione V, il segmento Joining (J), che codifica per circa 13 amminoacidi di connessione, ed il segmento C, codificante per la porzione C di  $k$  o  $\lambda$ . A monte di essi è presente un esone detto Leader (L) che guida l'RNA messaggero (mRNA) corrispondente alla catena L verso la via secretoria. Il *locus H* ha una struttura molto simile, ma possiede in aggiunta una quarta regione detta Diversity (D). Il *locus  $\lambda$*  comprende 29 esoni nella regione V e 4 sia nella regione J che nella C, mentre il *locus k* comprende 40 esoni nella regione V, 5 nella J e soltanto uno nella C. Allo stesso modo il *locus H* comprende numerosi esoni VH (51), 6 JH ed ulteriori 27 esoni nella regione D.

Gli esoni facenti parte della regione C del *locus H* (uno per ogni classe di Ig:  $C\alpha$ ,  $C\mu$ ,  $C\gamma$ ,  $C\delta$ ,  $C\epsilon$ ) determinano, invece, la classe di appartenenza dell'Ab (**Janeway 2001**).

### Meccanismo di ricombinazione somatica dei geni V(D)J

Gli Ab sono prodotti da linfociti B differenziati, le plasmacellule, mediante un meccanismo di riarrangiamento genico, detto ricombinazione somatica, durante il quale gli introni vengono eliminati e le varie sequenze V(D)J e C codificanti per le regioni V e C degli Ab, vengono a ritrovarsi vicine.

I linfociti B non sono attivi fino a quando vengono stimolati dal legame di un particolare Ag ai recettori presenti sulla loro superficie, costituiti da IgM monomeriche o IgD. Solo in seguito a questo evento essi si trasformano in cellule proliferanti e differenziate (plasmacellule) capaci di produrre Ab specifici per quel determinato Ag. Questa teoria, conosciuta con il nome di “selezione clonale”, è stata formulata per la prima volta negli anni '50 dagli scienziati Frank Macfarlane Burnet e Niels Jerne ed ha aperto la strada ad una serie di nuovi interrogativi che fecero dell'immunologia una delle materie più studiate di quegli anni: “...The [clonal selection] theory requires at some stage in early embryonic development a genetic process for which there is no available precedent” (**Jerne 1955, Burnet 1957 e 1959**). Burnet, riformulando la teoria di Jerne, propose un processo di “randomizzazione”, seguito da una selezione antigenica di cloni produttori di Ab complementari, che potrebbe spiegare l'immensa diversità delle risposte immunitarie osservate *in vivo*. Questi studi teorici, riguardanti un processo fino ad allora sconosciuto, offrirono una elegante base molecolare per le successive scoperte sulla ricombinazione V(D)J e sul ruolo delle proteine codificate dai “recombination-activating genes” (RAG) (**Jung 2004**).

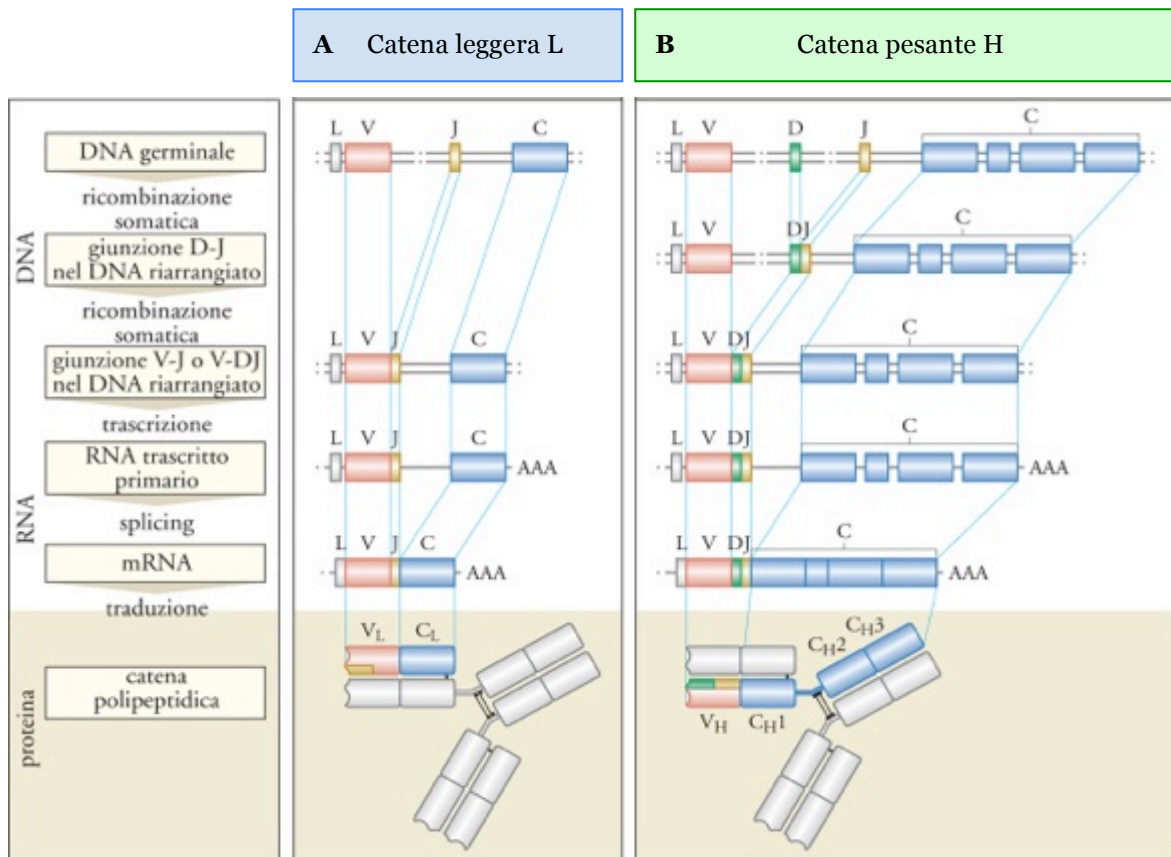
Lo studio del meccanismo di regolazione della ricombinazione V(D)J risale, infatti, a più di 50 anni fa e fu direttamente susseguente alla scoperta di Burnet riguardo la selezione clonale. Già negli anni '60, William J. Dreyer e Claude J. Bennet formularono una teoria riguardante la formazione degli Ab basata su un meccanismo di riarrangiamento del DNA (**Dreyer 1965**) e, successivamente, Cesar Milstein osservò che le regioni V e C si trovavano in posizione contigua all'interno dell'mRNA (**Milstein 1974**). Le sequenze geniche che codificano per le regioni C e V degli Ab, infatti, sono separate da una considerevole distanza all'interno delle cellule, eccetto che nei linfociti B in cui il riarrangiamento del DNA avviene nell'ontogenesi precoce. Questa scoperta risale a quasi quarant'anni fa quando fu studiato il riarrangiamento genico delle Ig in organismi murini usando l'analisi di restrizione, molto diffusa in quegli anni. Il DNA, ottenuto da cellule embrionali e da una linea cellulare di plasmocitoma, è stato digerito con un enzima di restrizione ed i frammenti contenenti sequenze corrispondenti a regioni V e C sono stati identificati mediante ibridazione con campioni radiomarcanti di mRNA specifici per tali regioni estratti dalla linea cellulare. Nei campioni di DNA estratti da embrioni di topo le sequenze corrispondenti alle regioni V e C si trovavano su frammenti genici separati, mentre nel DNA estratto da cellule B proliferanti le sonde marcate ibridavano con lo stesso frammento, dimostrando che le regioni dei geni V e C in queste cellule erano adiacenti. Un simile comportamento è stato osservato in cellule umane in esperimenti successivi (**Hozumi 1976, Waldmann 1987, Tonegawa 1988**). Questo risultato ha mostrato che il DNA genomico viene riarrangiato nelle cellule somatiche di tipo B mediante un meccanismo oggi conosciuto come ricombinazione somatica o ricombinazione V(D)J. Prove dirette di tale

riarrangiamento furono successivamente fornite grazie alla tecnica del clonaggio molecolare, che consentì una comparazione tra la linea germinale e riarrangiata di segmenti genici della regione V di una catena L  $k$  e  $\lambda$  (**Brack 1978, Seidman 1978**). Negli anni seguenti, inoltre, risultò chiaro che la regione V è determinata dall'associazione di una serie di differenti geni provenienti dalle regioni V e J, la cui associazione combinatoriale è alla base della variabilità degli Ab (**Valbuena 1978, Weigert 1978**). Attraverso l'analisi delle sequenze proteiche, fu identificata, poco dopo, una regione aggiuntiva del *locus H*, la regione D, localizzata tra i segmenti V e J (**Early 1980, Schilling 1980**).

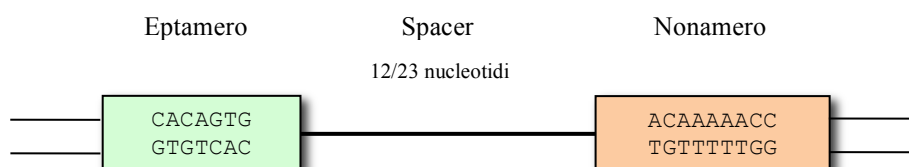
Nel caso della catena L, ogni dominio V è codificato da due frammenti genici: quello della regione V e quello della regione J. Durante il meccanismo di ricombinazione sono questi i primi frammenti ad essere avvicinati creando un segmento continuo di DNA che codificherà per l'intera regione V. I geni J e D sono separati dai geni C soltanto da DNA non codificante e vengono uniti ad essi dopo la trascrizione genica, grazie al meccanismo di RNA *splicing*, formando così un trascritto completo che verrà tradotto nella catena leggera (**Figura 2**, pannello A). La regione V della catena H è, invece, formata da tre frammenti genici: oltre ad essere codificata dai geni V e J, possiede anche la regione D, che è situata tra le altre due. Durante il meccanismo di ricombinazione genica, sono dapprima uniti il frammento J e il frammento D e, successivamente, viene avvicinato anche un frammento V, completando così la formazione di un gene codificante per la regione V della catena H, pronto per essere trascritto. Analogamente a quanto accade per la regione V della catena L, lo *splicing* dell'RNA porta all'unione dell'RNA per la regione C con la produzione dell'mRNA maturo successivamente tradotto nella catena H completa (**Figura 2**, pannello B).

E' quindi a partire dalle innumerevoli combinazioni ottenibili dall'associazione dei diversi frammenti V, D e J facenti parte dei *loci k e  $\lambda$  che si generano moltissimi "geni completi", che verranno trascritti e porteranno alla formazione delle regioni V delle catene H e L degli Ab. Ogni regione V può quindi associarsi ad uno dei geni della regione C del *locus H*,  $C\alpha$ ,  $C\gamma$ ,  $C\mu$ ,  $C\delta$  e  $C\epsilon$ , aumentando così ulteriormente la variabilità degli Ab e spiegando, almeno in parte, il loro sorprendente numero. Gli Ab, essendo proteine extracellulari, possiedono la regione Leader situata a monte della regione V che permette loro di essere indirizzate verso il pathway secretorio.*

Oggi è noto che il riarrangiamento delle regioni V(D)J è regolato dalla presenza di particolari regioni conservate adiacenti ai punti in cui ha inizio la ricombinazione. Tali regioni sono costituite dalla sequenza eptamerica 5'-CACAGTG-3', che è sempre contigua alle regioni codificanti ed è seguita da uno spaziatore di 12 o 23 nucleotidi seguiti, a loro volta, da una sequenza nonamerica formata dai residui 5'-ACAAAACC-3'. Ognuna di queste sequenze, mostrate in **Figura 3**, contiene alcuni residui che hanno un ruolo fondamentale nel garantire lo svolgimento del processo; esse sono conosciute con il nome di "recombination signal sequences" (RSS) (**Sakano 1979, Steen 1997**).



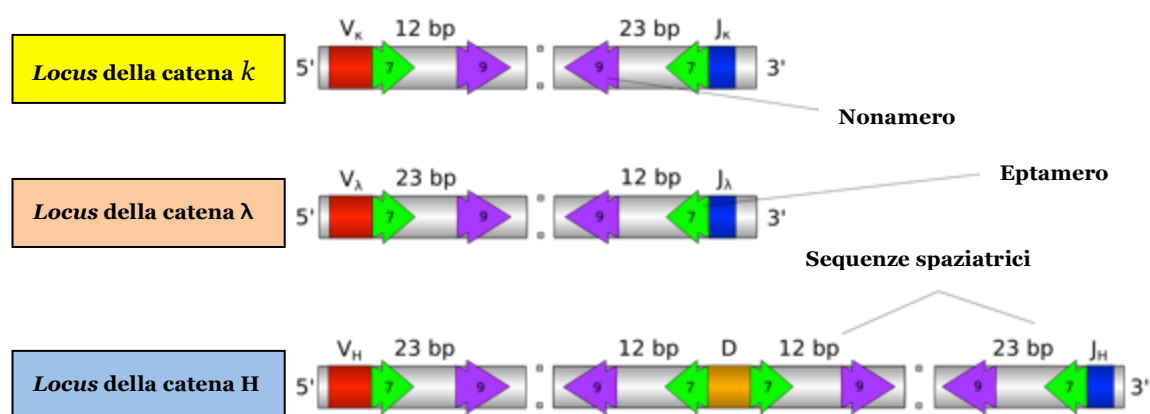
**Figura 2.** Formazione delle regioni codificanti per la catena leggera e pesante degli anticorpi. (Pannello **A**) Un gene della regione V e uno della regione J vengono uniti per formare la regione variabile completa della catena leggera. La regione costante è codificata da geni della regione C che sono uniti alla regione variabile mediante RNA *splicing* che rimuove gli introni presenti tra la regione Leader (L) e V e tra la J e la C. (Pannello **B**) Le catene pesanti sono invece codificate da un segmento genico aggiuntivo ovvero la regione D: per prima cosa sono uniti un gene D e un gene J e successivamente la regione V formando un segmento VDJ completo codificante per la regione variabile della catena pesante. A questo punto, gli introni presenti tra i 4 blocchi della regione costante, quelli tra il primo blocco della regione costante e il gene J e tra il gene L e V sono rimossi mediante il meccanismo di *splicing* dell'RNA.



**Figura 3.** Struttura di una sequenza segnale di ricombinazione RSS. Una sequenza conservata di 7 amminoacidi e una di 9 fiancheggiano i segmenti genici codificanti per la regione variabile della catena pesante e della catena leggera. Tra di esse è compreso uno spazio tra 12 e 23 nucleotidi.

La ricombinazione segue la cosiddetta regola 12/23, cioè essa può avvenire soltanto tra frammenti genici localizzati sullo stesso cromosoma fiancheggiati l'uno da uno spaziatore di 12 nucleotidi e l'altro di 23 nucleotidi. Queste RSS sono presenti a monte o a valle dei segmenti V, D e J (Figura 4):

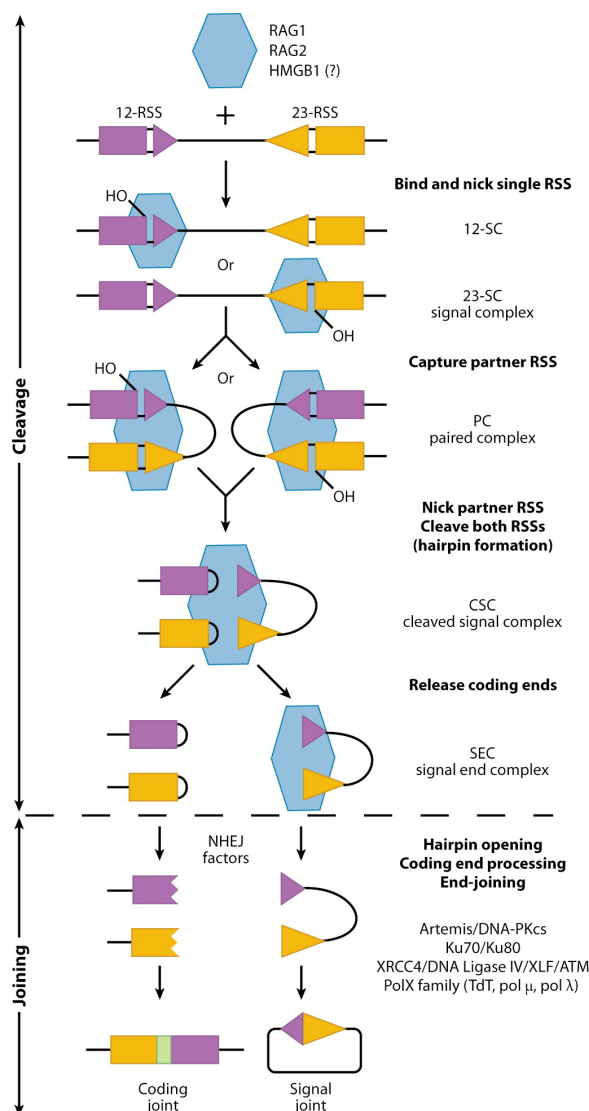
1. segmenti V: presentano alla loro estremità 3' un eptamero seguito da uno spaziatore di 12 nucleotidi per la catena  $k$  e da 23 nucleotidi per la catena  $\lambda$  e la catena H;
2. segmenti J: sono preceduti da un eptamero e un nonamero spaziati da 12 nucleotidi nelle catene  $\lambda$  e da 23 nucleotidi nelle altre due;
3. segmenti D (presenti solo nelle catene H): sono preceduti e succeduti da un nonamero e un eptamero separati da un sequenza di 12 nucleotidi.



**Figura 4.** Sequenze conservate di eptameri, nonameri e sequenze spaziatrici che fiancheggiano i loci  $k$ ,  $\lambda$  e  $H$ . La ricombinazione può avvenire soltanto tra sequenze geniche che possiedono, da una parte, uno spaziatore di 23 residui e, dall'altra, uno di 12 (regola del 12/23).

Nelle catene L, dove la ricombinazione avviene fra V e J, le RSS a valle del segmento V sono spaziate da 12/23 nucleotidi, mentre quelle a monte di J da 23/12 nucleotidi in base al tipo di catena. Nelle catene H, invece, le RSS a valle di V sono sempre spaziate da 23 nucleotidi così come quelle a monte di J. In questo caso, la ricombinazione avviene prima tra D e J e, successivamente, anche V viene unito (Jung 2004). Il meccanismo di riarrangiamento genico è simile per le catene H ed L, eccetto per il fatto che per la prima è necessario un passaggio aggiuntivo.

Il meccanismo di ricombinazione V(D)J è costituito da due eventi fondamentali (Figura 5): rottura del DNA e successiva riunione delle estremità (Bogue 1996).



**Figura 5.** Il meccanismo di ricombinazione V(D)J è innescato da un taglio al doppio filamento da parte delle proteine RAG1 e RAG2 in prossimità di una sequenza 12-RSS e di una 23-RSS su filamenti opposti. A questo punto le proteine catalizzano la formazione di una struttura a forcina in cui le sequenze presenti sullo stesso filamento di DNA si ritrovano una di fronte all'altra (PC). Le stesse proteine dopo aver operato un taglio sui due filamenti (CSC), determineranno la fine del processo (SEC) (da **Schatz 2011**).

Il processo di ricombinazione è innescato, infatti, da un taglio al doppio filamento di DNA (double strand break, DBS) ad opera delle proteine RAG1 e RAG2 che si legano prima ad una sequenza RSS (12/23) e poi all'altra (**Jones 2002, Mundy 2002**). Tali proteine sono codificate da geni specifici attivi nei linfociti e si assemblano in un tetramero chiamato ricombinasi V(D)J. RAG1 funge da endonucleasi di restrizione, mentre RAG2 favorisce l'interazione con altri fattori importanti per la ricombinazione; insieme contribuiscono a tenere stabile la struttura ad anello. Tali proteine determinano un avvicinamento delle sequenze 12 RSS e 23 RSS una di fronte all'altra (paired complex, PC), formando un complesso sinaptico multisubunità ed operando il taglio del doppio



filamento con successiva transesterificazione diretta usando il residuo 3'-OH formatosi in seguito al taglio (**McBlane 1995, van Gent 1995 e 1996**). Il numero di basi dello spaziatore, 12 o 23, non è casuale poiché corrisponde ad uno o due giri dell'elica di DNA e ciò permette agli enzimi di agire simultaneamente sia sull'eptamero che sul nonamero. Dopo il taglio, gli enzimi trattengono le due estremità del DNA ripiegato in una struttura a forcina in un complesso segnalatore del taglio (cleaved signal complex, CSC). A questo punto, le estremità del DNA codificanti vengono liberate, mentre le sequenze segnale rimangono unite alle proteine RAG in un complesso segnalatore di fine (signal end complex, SEC). Nel caso della ricombinazione ad inversione, le RSS rimangono più a valle nel DNA. Le sequenze codificanti e segnale vengono riorganizzate, processate e riparate, evento da cui si generano di solito estremità segnale precise ed estremità codificanti imprecise. Da studi più recenti e ancora in fase di approfondimento, è emerso che in tale processo intervengono altre attività enzimatiche la cui funzione è però ancora parzialmente sconosciuta (**Schatz 2011**).

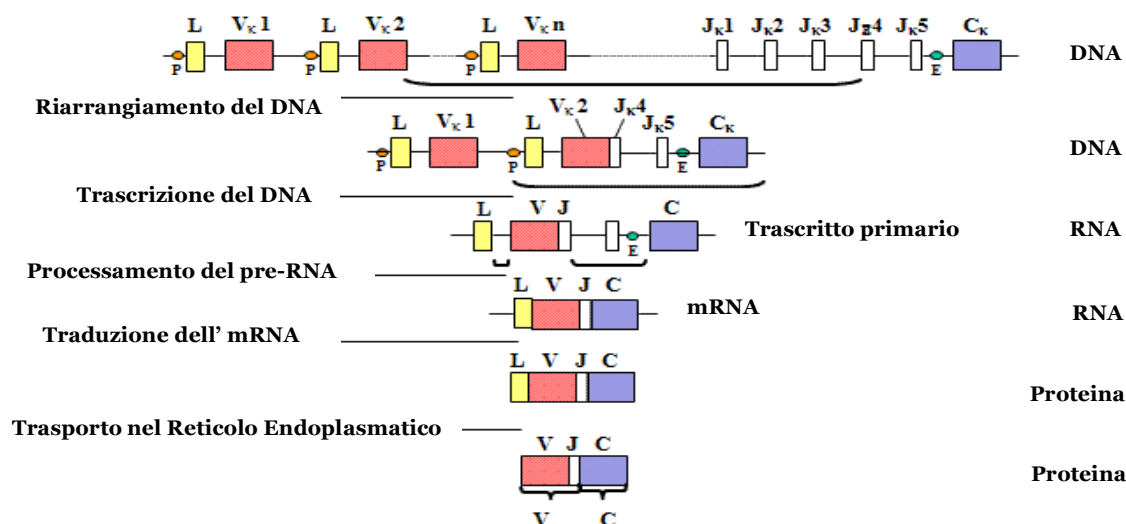
Evidenze genetiche e biochimiche suggeriscono che la formazione di un complesso tra la proteina Artemis ed una chinasi DNA-dipendente (DNA-PKcs) determini il ripiegamento del DNA in una struttura a forcina (**Ma 2002**). Le sequenze codificanti e le sequenze segnale sono riunite attraverso un meccanismo di riparazione di giunzioni non omologhe (non-homologous end joining NHEJ), coinvolgendo altre 5 proteine: Ku70, Ku80, XRCC4, DNA ligasi 4 ed un fattore simile a XRCC4 (XLF, detto anche Cernunnos) (**Mansilla-Soto 2003, Lieber 2008**). A questo punto, alcuni membri della famiglia delle DNA polimerasi X contribuiscono ad una ulteriore diversificazione riparando le estremità codificanti attraverso un meccanismo di aggiunta di nucleotidi indipendente dal DNA stampo (**Yamnich 2010**).

In questo processo, sono coinvolte altre due proteine, chiamate "high mobility group" (HMG1 e HMG2), la cui attività resta ancora parzialmente sconosciuta, anche se *in vitro* esse sembrano determinare un aumento dell'efficienza di taglio delle proteine RAG (**Fugmann 2000, Gellert 2002**).

La ricombinazione V(D)J non può avvenire in cellule differenti dai linfociti B, anche perché nel processo sono coinvolti numerosi enzimi, alcuni dei quali presenti solo in questo tipo di cellule; enzimi simili presenti in tutte le cellule sono normalmente coinvolti nella riparazione del DNA e nella ricombinazione non omologa.

La ricombinazione V(D)J provoca l'avvicinamento di sequenze enhancer a valle del segmento V alle sequenze promotrici presenti a monte. La conseguenza di questo riarrangiamento è che i geni diventano trascrizionalmente attivi, perché un promotore associato al gene V viene portato vicino ad un enhancer che è posizionato nell'introne tra il gene J e C. Non appena la trascrizione inizia, a partire dal promotore, viene prodotto un pre-mRNA che contiene le sequenze L, V, J e C intervallate da introni. Questo pre-mRNA viene successivamente rielaborato nel nucleo tramite splicing con rimozione degli introni presenti. Dopo traduzione dell'mRNA maturo sui ribosomi, le catene polipeptidiche sono trasportate nel lume del reticolo endoplasmatico, dove la catena L

viene assemblata con una catena H e l'Ig viene secreta secondo la normale via secretoria (**Figura 6**).



**Figura 6.** Meccanismo di maturazione dell'mRNA codificante per la regione variabile delle catene pesanti e leggere delle immunoglobuline. In seguito al riarrangiamento genico della regione variabile, il gene viene a trovarsi in prossimità di un *enhancer* che determina la trascrizione ad alti livelli di un pre-mRNA. Il trascritto subisce quindi un processamento che grazie all'eliminazione degli introni lo trasforma in un mRNA maturo pronto per essere tradotto in proteina. Successivamente la proteina, una volta raggiunto il reticolo endoplasmatico, subirà un taglio proteolitico che determinerà l'eliminazione della regione leader e sarà indirizzata verso la via secretoria.

Si pensa che il meccanismo di ricombinazione V(D)J si sia generato circa 500 milioni di anni fa a partire da proteine codificate da trasposoni. È stato, infatti, dimostrato che le sequenze segnale per la ricombinazione sono derivate da sequenze terminali ripetute ed invertite di antichi trasposoni appartenenti alla superfamiglia Transib; inoltre, la triade catalitica DDE della proteina RAG1 è presente anche nella trasposasi Transib come parte di un motivo conservato (**Kapitonov 2005**).

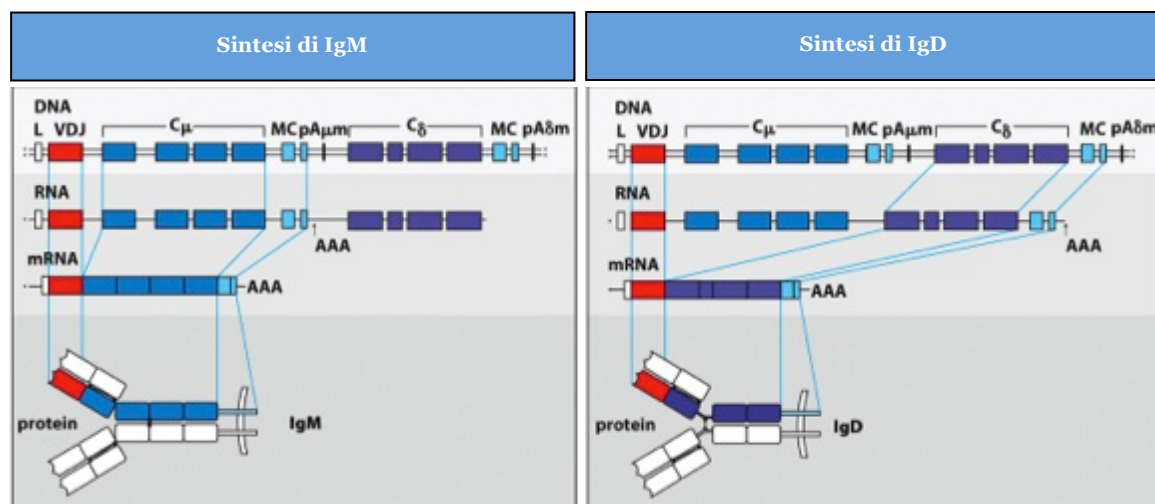
### Cambiamento di classe

I geni della regione V espressi da ogni linfocita B sono determinati nella differenziazione precoce e non possono essere modificati da successivi meccanismi di ricombinazione, eccetto che dal meccanismo di ipermutazione somatica; dunque ogni singolo linfocita B esprimerà la stessa catena V per tutta la sua vita. Al contrario, per quanto riguarda i geni della regione C, essi possono essere espressi in maniera differente durante la maturazione e la successiva proliferazione dei linfociti. Ogni linfocita B, infatti, produce per primi Ab di tipo IgM e, solo successivamente nella risposta

immunitaria, la stessa catena V associata alle IgM potrà essere invece assemblata in IgG, IgA o IgE. Il meccanismo che regola il cambiamento di classe degli Ab è noto come cambiamento di isotipo o isotype switching.

La regione C delle Ig è formata da un grande cluster di circa 200 kb situato al sito 3' del segmento JH. Ogni gene della regione C è diviso in esoni che corrispondono ai domini delle Ig complete. In seguito al riarrangiamento del DNA, gli esoni della regione C codificanti per la catena  $\mu$  si trovano vicini alla regione dei geni JH che, in questa fase di sviluppo dei linfociti B, si trova vicino al gene V. In assenza del meccanismo di isotype switching, dal gene riarrangiato viene prodotto un trascritto corrispondente alla regione  $\mu$  della catena H in cui ogni gene JH rimane compreso tra il gene V completo e il gene  $C_\mu$  che verrà rimosso solo dopo il processamento dell'mRNA. Le regioni  $\mu$  sono le prime ad essere espresse perché le IgM sono le prime Ig ad essere prodotte durante la maturazione dei linfociti B.

Immediatamente dopo il 3' del gene  $\mu$  si trova il gene  $\delta$  codificante per la catena H delle IgD. Le IgD sono co-espresse con le IgM nella maggior parte dei linfociti B, ma, nonostante ciò, questi Ab sono secreti in piccole quantità e la loro funzione è sconosciuta. Le cellule che stanno esprimendo IgM e IgD non sono ancora andate incontro ad isotype switching; questo processo, una volta innescato, infatti, risulta irreversibile. Queste cellule producono, invece, due differenti trascritti, uno che termina dopo gli esoni  $\mu$  dando origine alla catena  $H_\mu$ , mentre l'altro contiene sia gli esoni  $\mu$  che  $\delta$ , ma i primi sono rimossi per generare un mRNA maturo codificante per la catena  $H_\delta$  (Figura 7).

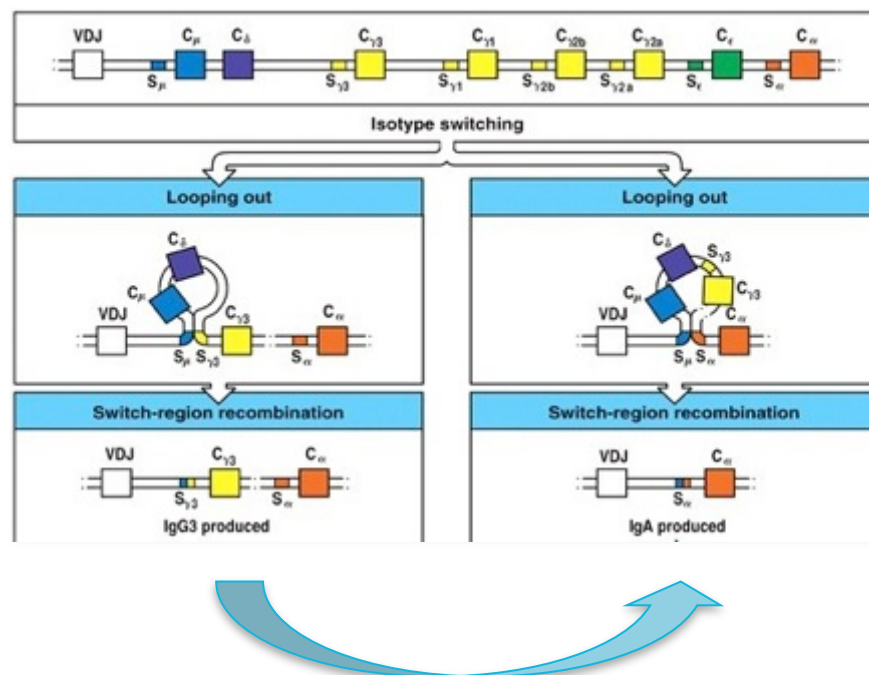


**Figura 7.** La trascrizione dei geni  $\delta$  e  $\mu$  può terminare alternativamente in due siti, uno situato dopo la regione dei geni  $\mu$  in corrispondenza del sito di poliadenilazione pA1, l'altro dopo i geni della regione  $\delta$  in corrispondenza dell'altro sito di poliadenilazione pA2. I trascritti che terminano al sito pA2 sono processati per rimuovere gli esoni della regione  $H_\mu$  dando origine ad un mRNA codificante per la catena  $\delta$ .

La quantità di IgM o IgD prodotte dipende quindi dai meccanismi di regolazione che interessano i siti pA1 e pA2 e dallo splicing dell'RNA.

Il passaggio alla produzione degli altri isotipi avviene soltanto dopo che i linfociti B sono stati stimolati dal legame con l'Ag attraverso un meccanismo specifico determinato da un segmento ripetuto di DNA, detto switch region, posizionato tra il segmento VDJH riarrangiato e il gene  $\mu$  e a un sito equivalente sottostante ai geni C codificante per ognuno degli altri isotipi eccetto che per il gene  $\delta$ . La regione switch  $\mu$  ( $S_\mu$ ) consiste di circa 150 ripetizioni della sequenza [(GAGCT) $n$ (GGGGT)] ( $n=3-7$ ). Le sequenze delle altre regioni switch ( $S_\gamma$ ,  $S_\alpha$ , e  $S_\epsilon$ ) differiscono, ma contengono tutte sequenze ripetute.

Quando un linfocita B passa dalla co-produzione di IgM e IgD alla produzione di IgG, avviene una ricombinazione tra le regioni  $S_\mu$  e  $S_\delta$ , le regioni codificanti per  $C_\mu$  e  $C_\delta$  sono delete e viene prodotto un trascritto dal gene ricombinato che codifica per la catena pesante  $\gamma$ . Alcune cellule della progenie produttrice di IgG possono successivamente andare incontro ad ulteriore switching per produrre un isotipo differente, per esempio IgA. Alternativamente, la ricombinazione può avvenire tra  $S_\mu$  e una delle regioni switch presenti dopo i geni  $\gamma$  così che le cellule passano dalla produzione di una IgM a quella di una IgA o IgE (**Figura 8**).



**Figura 8.** Le sequenze ripetute di DNA che regolano l'isotype switching si trovano a monte di ogni gene della regione costante delle immunoglobuline ad eccezione dei geni  $\delta$ . Il meccanismo si verifica tra queste sequenze ripetute o attraverso particolari segnali con l'eliminazione della regione compresa tra le sequenze che sono state unite.

Tutti gli eventi di switch recombination producono geni che codificano per proteine funzionali perché le sequenze switch si trovano negli introni e non possono provocare frame shifts. La ricombinazione che riguarda le catene H è differente da quella delle catene L, innanzitutto perché ogni evento di isotype switching dà origine ad un prodotto funzionale e non richiede segnali di ricombinazione o la partecipazione di enzimi. Essa avviene in seguito alla stimolazione da parte dell'Ag non durante lo sviluppo dei linfociti B e non è un processo casuale, ma è regolato dai linfociti B.

Dopo l'incontro con i corrispondenti Ag, i linfociti B attivati iniziano ad esprimere in grandi quantità una citidina deaminasi indotta dall'attivazione (activation-induced deaminase, AID). Tale enzima, in concomitanza all'azione di altri enzimi, tra cui una uracile DNA glicosilasi e una endonucleasi che taglia nei siti apurinici e apirimidinici (AP endonuclease), effettua due tagli al doppio filamento di DNA a livello delle due regioni S selezionate. Il DNA compreso tra esse viene successivamente eliminato dal cromosoma, rimuovendo gli esoni delle catene H  $\mu$  o  $\delta$  indesiderati e permettendo la sostituzione con un segmento  $\gamma$ ,  $\alpha$  o  $\epsilon$ . Le estremità libere del DNA si ricongiungono con un processo chiamato "giunzione delle estremità non omologhe" per collegare l'esone del dominio V, presente a valle, all'esone desiderato a monte codificante per il dominio C della catena H dell'Ab. In assenza di giunzione delle estremità non omologhe, le estremità libere di DNA possono essere ricongiunte da una via alternativa basata sulla micromologia. Con l'eccezione di IgM e IgD, un linfocita B esprime una sola classe anticorpale.

Sulla base della struttura delle porzioni C delle catene H, gli Ab vengono quindi classificati in cinque classi.

Le IgG, caratterizzate dalla presenza della catena H $\gamma$ , sono molecole monomeriche che si trovano nel sangue, nei liquidi interstiziali, nella placenta, ed hanno una emivita di circa 23 giorni. Sono i principali Ab che si trovano nel sangue (rappresentandone il 70-75%) ed hanno diverse funzioni, quali attivazione del complemento, opsonizzazione, inibizione dei linfociti B, e sono, inoltre, coinvolti nell'immunità neonatale e mediano la citotossicità cellulare Ab-dipendente.

Le IgM, caratterizzate dalla presenza della catena H $\mu$ , sono secrete in forma pentamerica e sono i primi Ab ad essere prodotti dopo l'attivazione dei linfociti B in seguito al loro contatto con l'Ag. Si trovano nel sangue ed hanno una emivita di 5 giorni; attivano il complemento e hanno proprietà agglutinanti. In forma monomerica fungono da recettori per i linfociti B e rappresentano il 10% degli Ab presenti nell'organismo.

Le IgA, caratterizzate dalla presenza della catena H $\alpha$ , rappresentano il 15-20% degli Ab, si possono trovare sotto forma di monomeri, dimeri o trimeri, e vengono rilevate nelle secrezioni mucose, nel latte materno e nel sangue in cui rappresentano una linea di difesa primaria. Hanno una emivita di 6 giorni e sono coinvolte nell'immunità e nella protezione delle mucose da agenti infettivi, nell'attivazione del sistema del complemento, per via alternativa, e sono debolmente opsonizzanti.

Le IgE, caratterizzate dalla presenza della catena H $\epsilon$  e secrete come monomeri, si trovano nel sangue e nei tessuti di soggetti allergici ed hanno una emivita di 2 giorni. Si legano a mastociti e basofili dove fungono da recettore per l'Ag e sono coinvolte nei processi allergici e nella difesa da elminti.

Infine le IgD, caratterizzate dalla presenza della catena H $\delta$  ed anch'esse secrete come monomeri, si trovano nel sangue e sui linfociti B insieme alle IgM come recettori per l'Ag ed hanno emivita di 3 giorni. Rappresentano meno dell'1% degli Ab presenti nell'organismo e la loro funzione non è ancora stata completamente chiarita.

### **Diversificazione e variabilità**

I domini variabili e costanti degli Ab, come già detto, sono codificati da numerosi geni diversi, ma sicuramente non sufficienti a giustificare il così elevato numero di Ig differenti presenti in natura.

In passato esistevano due diverse teorie per spiegare la grande varietà di Ab: la teoria della "linea germinale", secondo la quale esiste un gene per ogni Ab, e quella delle "mutazioni della linea somatica" che sostiene, invece, che alla base della diversità ci sia l'insorgenza di mutazioni nei geni della regione V. Oggi, conoscendo struttura e meccanismo di formazione degli Ab, queste teorie sono completamente sorpassate, tuttavia la ricombinazione V(D)J non è sufficiente da sola a giustificare una così ampia variabilità anticorpale. Dopo il riarrangiamento genico, determinato dalla ricombinazione V(D)J, intervengono infatti altri meccanismi noti come "ipermutazione somatica" e "conversione genica" che riguardano i geni della regione V ed il cambiamento di classe per la regione C.

In sostanza, diversificazione e variabilità degli Ab sembrano determinate da diversi fattori:

#### Elevato numero di geni V

I geni V, D e J sono presenti in copia multipla ed ognuno di essi può essere incorporato nella regione V di una Ig. Dalla loro combinazione si possono generare molteplici combinazioni di Ab. Nell'uomo ci sono circa 40 geni funzionali  $V_k$  e 5  $J_k$  e quindi circa 200 possibili combinazioni per la catena L  $k$ . Analogamente per la catena  $\lambda$  si possono formare 116 catene diverse (29  $V_\lambda$  e 4  $J_\lambda$ ). Per la catena H, potendo essere codificata da 51 geni  $V_H$ , 27 geni  $D_H$  e 6  $J_H$ , sono possibili 8.000 diverse regioni V. In totale, moltiplicando tutte le possibili combinazioni di regioni V per quelle della regione C ( $316 \times 8.000$ ) si ottengono  $2,5 \times 10^6$  differenti Ab. Questo fenomeno è anche noto come "diversità combinatoriale" e dipende anche dalla frequenza con cui ognuno di questi geni può essere trascritto.

#### Ricombinazione somatica VJ e VDJ

Poichè è la casualità a determinare quali geni delle regioni V e J per la catena L, e V, J e D per la catena H si uniscono, ci sono molteplici possibili combinazioni di geni V(D)J che danno origine ad un grande numero di Ab.

### Diversità giunzionale

La ricombinazione tra geni VJ e VDJ non è sempre perfetta e la diversità può derivare da errori che si verificano durante il processo che porta la regione V accanto alle regioni J per la catena L o la regione V vicino alla regione D per la catena H. Si stima che queste inesattezze, che si verificano nella terza regione ipervariabile, possano addirittura triplicare la diversità generata dalle giunzioni VJ o VDJ (**Alt 1982**).

### Inserzione o delezione della regione N o P

Alla giunzione tra segmenti D e J si verifica spesso l'inserimento o l'eliminazione di una serie di nucleotidi. I nucleotidi aggiuntivi sono conosciuti con il nome di nucleotidi P o N. I primi sono così chiamati perché comprendono sequenze palindromiche aggiunte alla fine del segmento genico e sono codificati da uno stampo. Dopo il taglio, infatti, l'enzima *Artemis*, apre le hairpin consentendo ad un altro enzima di modificare le basi alle terminazioni. L'aggiunta o rimozione di nucleotidi è possibile perché Artemis, nell'aprire le hairpin, taglia in modo asimmetrico, per cui uno dei due tratti di DNA è più corto dell'altro e deve essere esteso con nucleotidi complementari a quelli del tratto più lungo. I nucleotidi N (non template encoded), invece, sono aggiunti da una deossinucleotide transferasi terminale (TdT), un enzima che catalizza la polimerizzazione casuale di circa 20 nucleotidi nel DNA senza la necessità di uno stampo, aumentando ulteriormente la variabilità. Dal momento che la quantità di nucleotidi inseriti o deleti è casuale, essi possono determinare una variazione del "reading frame" della regione codificante che può quindi generare codoni di stop prematuri (**Alt 1982**).

### Associazione combinatoriale

Ogni linfocita B umano è capace di sintetizzare qualsiasi catena H ed L. Pertanto, diverse combinazioni di catene H ed L all'interno di un linfocita B umano incrementano ulteriormente la diversità.

### Ipermutazione somatica

Il DNA può essere ulteriormente riarrangiato dalla introduzione di mutazioni nelle regioni V, in particolare nella sequenza che codifica per la seconda regione ipervariabile; si tratta dell'unico meccanismo in cui la specificità di una Ig può essere alterata dopo la ricombinazione somatica dando origine a geni funzionali per le catene H o L (**Fanning 1996, Janeway 2001**).

### Multispecificità

Un Ab può, a volte, reagire con più di un determinante antigenico con struttura simile, rendendosi responsabile di reazioni crociate.

### Isotype switching

Il cambiamento di classe anticorpale o "isotype switching" è, invece, un processo che riguarda la catena H e che determina la formazione delle 5 classi di Ab (IgM, IgA, IgG, IgE ed IgD),

ognuna caratterizzata da una specifica struttura e funzione con differenze significative nella sequenza genica, nel numero e nella dislocazione dei ponti disolfuro, nel numero dei domini C e nella quantità di molecole oligosaccaridiche presenti. Tutti questi processi vengono regolati dall'enzima AID che sembra catalizzare anche il meccanismo di *editing* del DNA (Muramatsu 2000, Petersen-Mahrt 2002).

### **Ruolo degli anticorpi nella immunoprotezione antinfettiva**

Il ruolo cruciale degli Ab nella immunoprotezione antinfettiva è ben conosciuto ed è alla base dell'efficacia delle strategie di immunoprofilassi attiva (vaccinazione) e passiva (sieroprofilassi). Negli ultimi decenni, inoltre, gli Ab, in particolare nelle loro forme monoclonale e ricombinante, sono emersi come una importante classe di agenti terapeutici "biologici", soprattutto nel campo dei tumori, delle malattie autoimmuni e di altri disordini immunologici, ma anche, seppure in minor misura, nel campo delle malattie infettive, rappresentando la classe di agenti terapeutici in più rapida crescita (Dimitrov 2009, Beck 2010, Nelson 2010).

Gli Ab possono riconoscere e legare specificamente epitopi antigenici ed agire direttamente neutralizzando attività biologiche, come nel caso di tossine e virus, o indirettamente attivando funzioni effettrici, quali il complemento, l'opsonizzazione e la citotossicità cellulo-mediata. Più recentemente sono stati descritti Ab che possono esplicare attività catalitica (ad es. peptidasica) (Nevinsky 2010) e attività microbicide dirette (Magliani 2005, Brena 2007). Questa capacità di uccidere direttamente microrganismi sensibili è stata descritta come una nuova funzione delle Ig, suggerendo l'esistenza di una famiglia di Ab con attività antibiotica, definiti "antibiocorpi" (Polonelli 1988 e 1991, Magliani 2005). Tra di essi sono paradigmatici Ab microbicidi immagine interna del sito attivo di una tossina killer (KT) prodotta dal lievito *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*), caratterizzati da un ampio spettro di attività antimicrobica, comprendente microrganismi procarioti ed eucarioti. Molti studi hanno infatti dimostrato che i lieviti sono in grado di produrre esotossine o KT capaci di uccidere altri lieviti o microrganismi sensibili, che presentano specifici recettori parietali (KTR), senza un contatto diretto tra le cellule. I lieviti produttori sono invece totalmente resistenti alle proprie KT (Magliani 1997a). Tale fenomeno fu descritto per la prima volta in un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* capace di secernere una sostanza che, rilasciata nel terreno, impediva la crescita di altri ceppi della sua stessa specie (Bevan 1963). Le KT sono glicoproteine ampiamente diffuse in natura, di dimensioni variabili da 5.000 a 100.000 Dalton (Da), codificate da geni cromosomici o da elementi genetici accessori di alcuni lieviti e caratterizzate da differenti meccanismi d'azione e caratteristiche chimico-fisiche. I sistemi killer di lievito sono codificati da diversi determinanti genetici che possono essere acquisiti sia orizzontalmente che verticalmente. In *S. cerevisiae* e *Ustilago maydis*, ad esempio, la produzione di KT è determinata da RNA a doppio filamento incapsidato in particelle intracellulari virus-simili non infettive, in *Kluyveromyces lactis* da un plasmide a DNA a doppio filamento, mentre in *Williopsis mrakii* dipende da geni cromosomici. Le KT possono esplicare diversi meccanismi d'azione nei vari sistemi di lievito; ad esempio possono determinare aumento della permeabilità della membrana agli ioni come in *S. cerevisiae* e *P. kluyveri*, oppure taglio



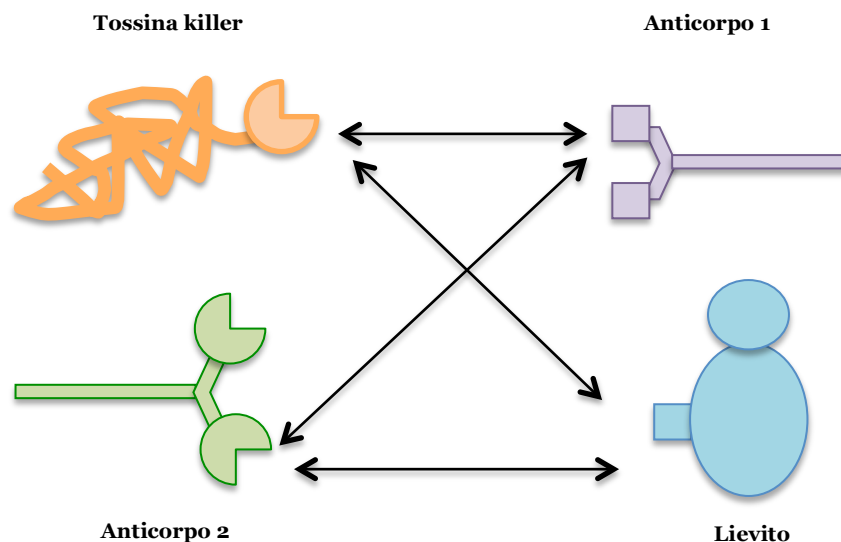
endonucleolitico di RNA e DNA a singolo filamento o di DNA a doppia elica come in *U. maydis*. Alternativamente, possono determinare inibizione dell'adenilato-ciclastasi, come in *K. lactis*, o interagire con i KTR  $\beta$ -glucanici sulle cellule sensibili in *W. Anomalus* e *W. mrakii* (**Magliani 1997a**).

In particolare, una glicoproteina di 105 kDa prodotta da *Pichia anomala* (ora *Wickerhamomyces anomalus*) ATCC 96603 (*PaKT*) ha mostrato caratteristiche peculiari, quale la capacità di esercitare un'attività microbica ad ampio spettro nei confronti di vari ceppi fungini come *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *Pneumocystis carinii* ed altri ceppi di *P. anomala* (**Magliani 1997a**). Nonostante il suo meccanismo d'azione non sia ancora del tutto chiarito, si pensa che il suo bersaglio molecolare siano i  $\beta$ -1,3-glucani presenti sulla parete cellulare dei ceppi fungini determinando la morte delle cellule (**Magliani 2008a**).

La loro attività ad ampio spettro ha fatto sì che queste tossine siano state ampiamente sfruttate nelle industrie fermentative e alimentari per controllare le contaminazioni (**Lowes 2000**), nella tecnologia del DNA ricombinante (**Eiden-Plach 2004**), e nella tipizzazione di microrganismi sia in campo medico che industriale (**Polonelli 1983, Buzzini 2007**). Una delle applicazioni più innovative poteva essere rappresentata dal loro utilizzo nello sviluppo di nuovi farmaci antimicrobici in alternativa a quelli tradizionali, frequentemente caratterizzati da fenomeni di resistenza o di perdita di efficacia, ma tale prospettiva fu subito scoraggiata da alcune peculiarità chimico-fisiche di queste tossine (immunogenicità, tossicità, termolabilità), che hanno reso impraticabile il loro utilizzo in questo campo, come dimostrato per *PaKT* (**Pettoello-Mantovani 1995**). L'unica applicazione concreta in cui sembrano poter essere utilizzate è l'uso topico nella terapia di infezioni cutanee causate, ad esempio, da *Malassezia furfur*, come dimostrato in diversi modelli animali (**Polonelli 1986**).

Alla luce di queste evidenze, è stata successivamente adottata la strategia di produrre dei derivati immunologici delle KT, ideati in modo tale da conservare le peculiarità della molecola originale, ma ovviando a tutte le problematiche ad essa associate (**Polonelli 1987, Magliani 2008b**). Tali derivati sono stati ottenuti sulla base della teoria del network idiotipico formulata da Niels Jerne (**Jerne 1974**). Secondo tale teoria, nel corso di una risposta immunitaria nei confronti di un Ag vengono prodotti Ab specifici, che a loro volta stimolano la produzione di Ab anti-idiotipici (anti-Id), che possono rappresentare l'immagine interna dell'Ag. L'Ab, quindi, può funzionare contemporaneamente da Ab, in grado di riconoscere e legare un determinato Ag, e da Ag in grado di stimolare la produzione di Ab anti-Id. Anche se l'Ab anti-Id deve essere considerato non tanto l'esatta riproduzione topologica dell'Ag, bensì una sua riproduzione funzionale, dati cristallografici evidenziano come un certo Ab possa interagire con il proprio Ag e con il corrispondente Ab anti-Id mediante gli stessi residui amminoacidici. Per questo Ab anti-Id possono essere considerati immagine interna dell'Ag ed essere direttamente utilizzati come vaccini anti-Id o, a volte, essere anche in grado di mimare l'attività biologica dell'Ag (**Herlyn 1989, Bhattacharya-Chatterjee 1991**). Attraverso l'approccio del network idiotipico è stato possibile riprodurre l'attività

antimicrobica di PaKT, come schematizzato in **Figura 9** (Cassone 1997, Magliani 1997b, 2004, 2008a e b, Polonelli 1997).



**Figura 9.** Teoria del network idiotipico. L'immagine mostra la tossina killer, l'anticorpo 1, che rappresenta l'Ab neutralizzante la tossina killer, l'anticorpo 2, che rappresenta l'Ab anti-idiotipico (immagine interna della tossina killer) e il lievito sensibile avente sulla superficie il recettore per la tossina killer.

Tali Ab immagini interne di KT (KAb) sono stati successivamente rilevati in diverse condizioni sperimentali e naturali. Ad esempio, in seguito a vaccinazione idiotipica sperimentale parenterale o intravaginale con un mAb (mAb KT4) neutralizzante PaKT, sono stati prodotti KAb sierici o secretori in differenti specie animali (coniglio, topo, ratto). Una volta purificati mediante cromatografia di affinità, tali KAb si sono dimostrati candidacidi *in vitro* e capaci di conferire immunoprotezione passiva in topi nei confronti di candidosi sistemica e vaginale, suggerendo una potenzialità di tale approccio vaccinale (Polonelli 1988, 1993 e 1994). KAb, inoltre, sono stati rilevati in fluidi vaginali animali ed umani in seguito ad infezioni sperimentali o naturali, rispettivamente, con cellule di *C. albicans* aventi recettori per PaKT (PaKTR), essenzialmente costituiti da  $\beta$ -1,3-glucani (Polonelli 1996). Sebbene la rilevanza clinica di tali KAb debba ancora essere chiarita, essi potrebbero far parte del repertorio anticorpale prodotto in risposta ad infezioni o immunizzazioni con microrganismi presentanti PaKTR e svolgere un ruolo nella immunoprotezione, come attestato dal loro ampio spettro d'azione antimicrobica *in vitro* e dalla loro significativa attività terapeutica nei confronti di diverse infezioni sperimentali quando trasferiti passivamente ad animali sia normali che immunodeficienti. In *C. albicans*, i  $\beta$ -1,3-glucani, costituenti in tutto o in parte i PaKTR, sono preferenzialmente espressi sulla superficie delle cellule in gemmazione ed in particolare sui tubuli germinativi, dove sono temporaneamente esposti durante la neosintesi della parete (Magliani 2008a). In effetti, il ruolo immunoprotettivo di Ab

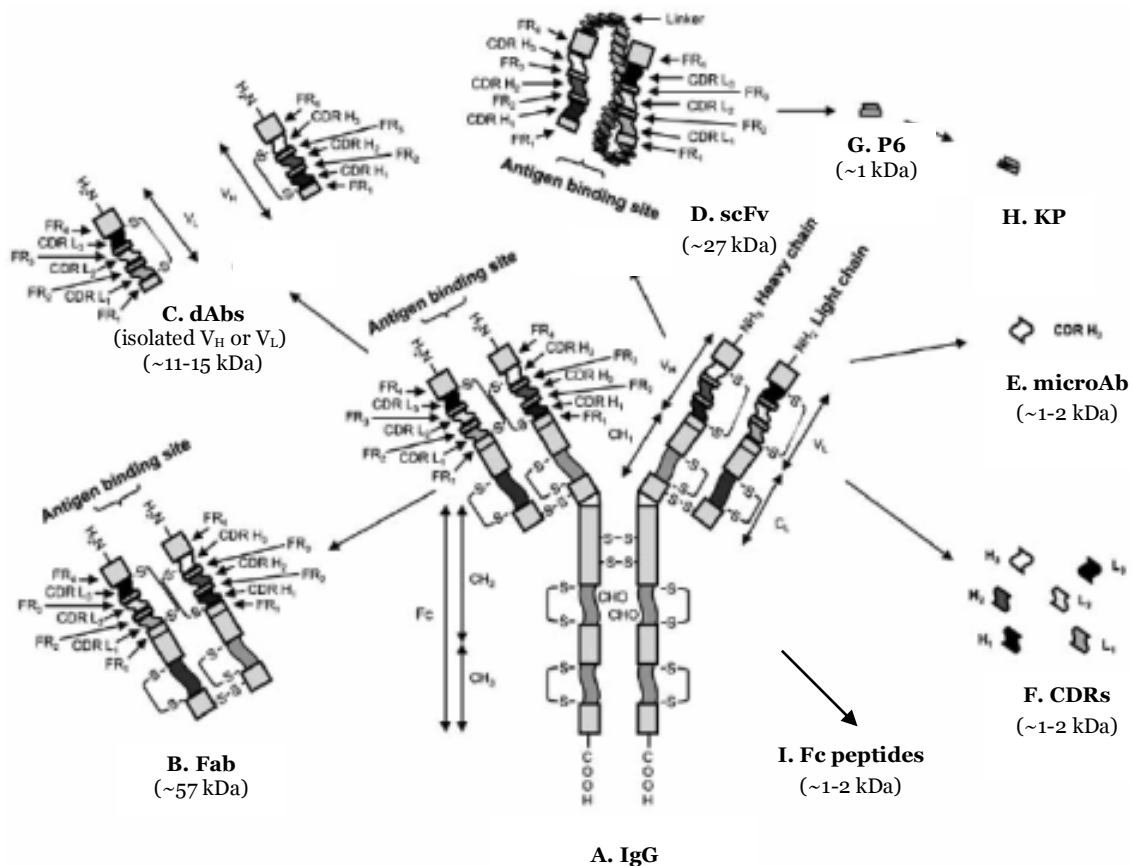
anti- $\beta$ -1,3-glucani è stato ripetutamente confermato. Un vaccino sperimentale costituito da laminarina, un  $\beta$ -1,3-glucano solubile, coniugata al tossoide difterico, si è dimostrato in grado di proteggere animali nei confronti di candidosi vaginale e sistemica e di aspergillosi disseminata. Ab monoclonali e policlonali anti- $\beta$ -1,3-glucano hanno mostrato un ampio spettro di attività microbica *in vitro*, nei confronti di *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*, e si sono dimostrati protettivi quando trasferiti passivamente ad animali non immunizzati (**Bromuro 2002**, **Torosantucci 2005**, **Rachini 2007**). E' stato possibile produrre KAb ricombinanti in piante, suggerendo una loro potenziale utilizzazione come agenti profilattici nei confronti di un ampio spettro di agenti fitopatogeni (**Donini 2005**, **Capodicasa 2011**). L'uso di Ab marcati con radioisotopi e diretti nei confronti di Ag fungini comuni è stato proposto come nuovo approccio immunoradioterapico nei confronti di infezioni fungine gravi per le quali non esistano terapie soddisfacenti (**Bryan 2012**). L'uso terapeutico di Ab, tuttavia, non è esente da problematiche e criticità, quali immunogenicità, sicurezza, possibile tossicità e particolare farmacocinetica, che possono limitarne campo di applicazione ed efficacia. I tentativi compiuti finora, quali umanizzazione di mAb murini (Ab chimerici) o la produzione di mAb umani, hanno consentito di ridurre l'immunogenicità e quindi le reazioni avverse dell'organismo umano nei confronti di Ab terapeutici, ma non hanno risolto completamente le problematiche. Un ulteriore approccio è stato quello di ridurre le dimensioni molecolari di tali potenziali agenti terapeutici, mediante la produzione di Ab ricombinanti o di peptidi derivati da diverse regioni della molecola anticorpale.

## Anticorpi ricombinanti e peptidi anticorpali antimicrobici

Lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante e di specifici sistemi di espressione ha consentito l'ingegnerizzazione degli Ab e la produzione di numerosi loro derivati, in grado di mantenere in gran parte la specificità dell'intero Ab, ma con dimensioni notevolmente ridotte (**Holt 2003**, **Hudson 2003**, **Holliger 2005**, **Hoogenboom 2005**, **Donzeau 2007**, **Buckler 2008**, **Mondon 2008**, **Schirrmann 2008**). In **Figura 10** sono schematizzati alcuni dei numerosi frammenti derivati da Ab, caratterizzati da differente formato, peso molecolare, affinità, specificità e valenza ed essenzialmente privi della regione Fc e quindi delle sue funzioni effettrici. Senza entrare nella descrizione dettagliata di tali derivati anticorpali, l'attenzione verrà focalizzata su alcuni di essi che hanno dimostrato di possedere interessanti attività biologiche, in particolare nei confronti di agenti infettivi.

Uno dei formati più consolidati degli Ab ricombinanti è rappresentato dai frammenti variabili a singolo filamento (scFv, **Figura 10D**), le cui dimensioni (~27 kDa) sono essenzialmente ridotte al sito di legame per l'Ag. Le regioni VH e VL, infatti, sono legate insieme da un peptide linker flessibile che permette di mantenere l'originale specificità di legame per l'Ag in un singolo polipeptide. Un interessante scFv (H6), prodotto e selezionato nei confronti di mAb KT4, precedentemente ricordato, si è mostrato in grado di mimare PaKT, essendo caratterizzato da un ampio spettro di attività microbica *in vivo* e/o *in vitro* nei confronti di agenti patogeni sia

procarioti che eucarioti, caratterizzati dal possesso di PaKTR parietali (Magliani 1997b, Conti 1998, Beninati 2000, Conti 2000, Conti 2002). Le modalità di produzione di scFv permettono, tra l'altro, di avere a disposizione anche le sequenze geniche codificanti, consentendone ulteriori manipolazioni, quali sequenziamento, mutagenesi e produzione di molecole multivalenti. Ad esempio, diversi scFv sono stati legati tra loro direttamente o mediante due domini C a formare molecole multimeriche, multifunzionali ed anche multispecifiche ("diabodies", "triabodies", "tetrabodies" o "minibodies", rispettivamente).



**Figura 10.** Rappresentazione schematica di una IgG e di costrutti con attività biologica da essa derivati. (A) **IgG**: regioni variabili ( $V_H$ ,  $V_L$ ), che conferiscono la specificità di legame all'antigene.  $C_L$ ,  $C_H$ : domini costanti; CDR (1, 2 e 3): domini ipervariabili, detti "complementarity determining regions"; S-S: ponti disolfuro; Fc: frammento cristallizzabile; CHO: glicani legati a Fc. (B) **Fab**: "fragment antigen binding" (~57 kDa), costituito dalla catena L e dai primi 2 domini della catena H. (C) **dAbs**: "single domain Abs" (~11-15 kDa), catene  $V_H$  e  $V_L$  isolate. (D) **scFv**: "single chain fragment variable" (~27 kDa), costituito da  $V_H$  fusa con  $V_L$  mediante un linker polipeptidico flessibile. (E) **microAb**: costituito da peptidi derivati da CDR H3. (F) **CDR peptides**: costituiti da peptidi sintetici riproducenti ciascuno una CDR. (G) **P6** (EKVTMTCSAS; ~1 kDa), peptide sintetico comprendente i primi 3 amminoacidi della CDR L1 (SAS) di un scFv killer. (H) **KP** (AKVTMTCSAS; ~1 kDa), peptide killer, ottenuto da P6 mediante sostituzione con alanina del primo amminoacido. (I) **Fc peptides** (~1-2 kDa), peptidi sintetici derivati dalla regione Fc. Modificata da Magliani 2009.

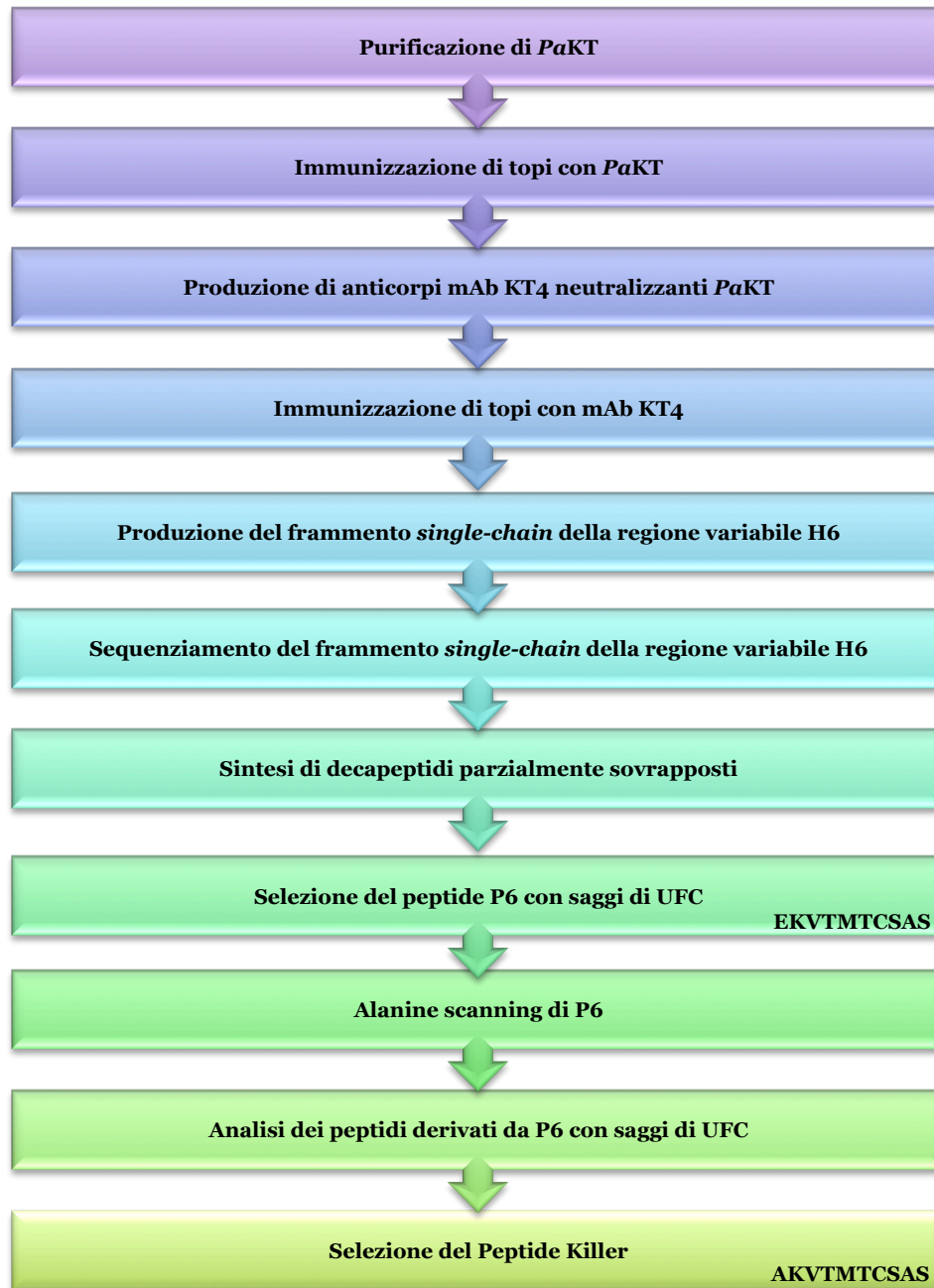
L'osservazione che in alcune specie animali (camelidi e squali) ed in alcune malattie umane possono essere prodotte catene H o domini VH e VL isolati, ancora in grado di legare l'Ag, ha portato alla produzione di frammenti più piccoli, quali i "domain Abs" (dAbs, ~11-15 kDa, **Figura 10C**), costituiti da 3 CDR in grado di conferire specificità ed affinità di legame e favorevoli proprietà biofisiche, quali solubilità e stabilità. Tali dAbs, anche ulteriormente ingegnerizzati, sono stati proposti quali possibili agenti terapeutici in diverse condizioni cliniche (**Holt 2003**). La coniugazione di questi derivati anticorpali con radioisotopi, farmaci citotossici, tossine ed enzimi è stata proposta per aumentare la loro efficacia terapeutica, con minori effetti collaterali, soprattutto nel campo della terapia antitumorale (**Carter 2008**). Le dimensioni più contenute, peraltro, pur consentendo a tali molecole di penetrare più facilmente all'interno di cellule bersaglio, possono comportare una eliminazione più rapida a livello renale con una emivita particolarmente breve. Anche in questo caso, la possibilità di loro manipolazione ha consentito di ottenere derivati pegilati, coniugati a proteine seriche o polimerici, a vita media prolungata per migliorarne le proprietà farmacocinetiche (**Presta 2008**).

Come precedentemente ricordato, i siti di legame per l'Ag sono localizzati nelle regioni V delle catene H (VH) ed L (VL), dove sono collocate le 6 CDR ipervariabili H1-3 ed L1-3. Le CDR, inframmezzate alle quali si trovano le 4 regioni cornice, che servono a mantenerle nel corretto orientamento, sono particolarmente coinvolte nel contatto diretto con l'Ag formando una superficie ad esso stericamente complementare. Affinità e specificità del riconoscimento antigenico sembrano chiaramente correlate con più elevati contenuti di alcuni particolari amminoacidi, quali tirosina, serina e glicina (**Birtalan 2008**). Anche se tutte e 6 le CDR di un Ab cooperano nel riconoscimento dell'Ag, la CDR H3 è quella più variabile in lunghezza e sequenza e sembra fornire il maggior contributo al sito di legame, costituendo la maggior parte della superficie di contatto con l'Ag, con una specificità determinata da un limitato numero di residui amminoacidici (**Padlan 1995**). Sulla base di tali osservazioni, sono stati sintetizzati piccoli peptidi derivati da sequenze CDR H3, chiamati "microAb", di ~1-2 kDa (**Figura 10E**), in grado di mantenere le proprietà di legame dell'Ab parentale ed anche di esplicare attività biologiche, quali neutralizzazione di virus o attività antitumorale *in vitro* ed *in vivo* (**Bourgeois 1998, Park 2000, Dorfman 2006, Qiu 2007**).

## Peptide killer

Tranne che per la CDR H3, poco era noto sull'attività biologica di peptidi derivati da altre CDR o da sequenze cornice. Nel tentativo di stabilire una correlazione tra sequenza amminoacidica ed attività antimicrobica di scFv H6, numerosi peptidi, inclusi i 6 riproducenti le sue CDR (**Figura 10F**) e molti decapeptidi con sequenza sovrapposta di due amminoacidi ad esse correlati, sono stati sintetizzati e saggiati *in vitro* nei confronti di cellule di *C. albicans*, scelta come modello di microrganismo sensibile. Tra tutti i peptidi saggiati, uno, chiamato P6 (EKVTMTCSAS, **Figura 10G**), comprendente i primi 3 amminoacidi di CDR L1 (SAS), si è dimostrato il più attivo. Sottoposto ad "alanine scanning", P6 ha consentito di ottenere un decapeptide definito "killer"

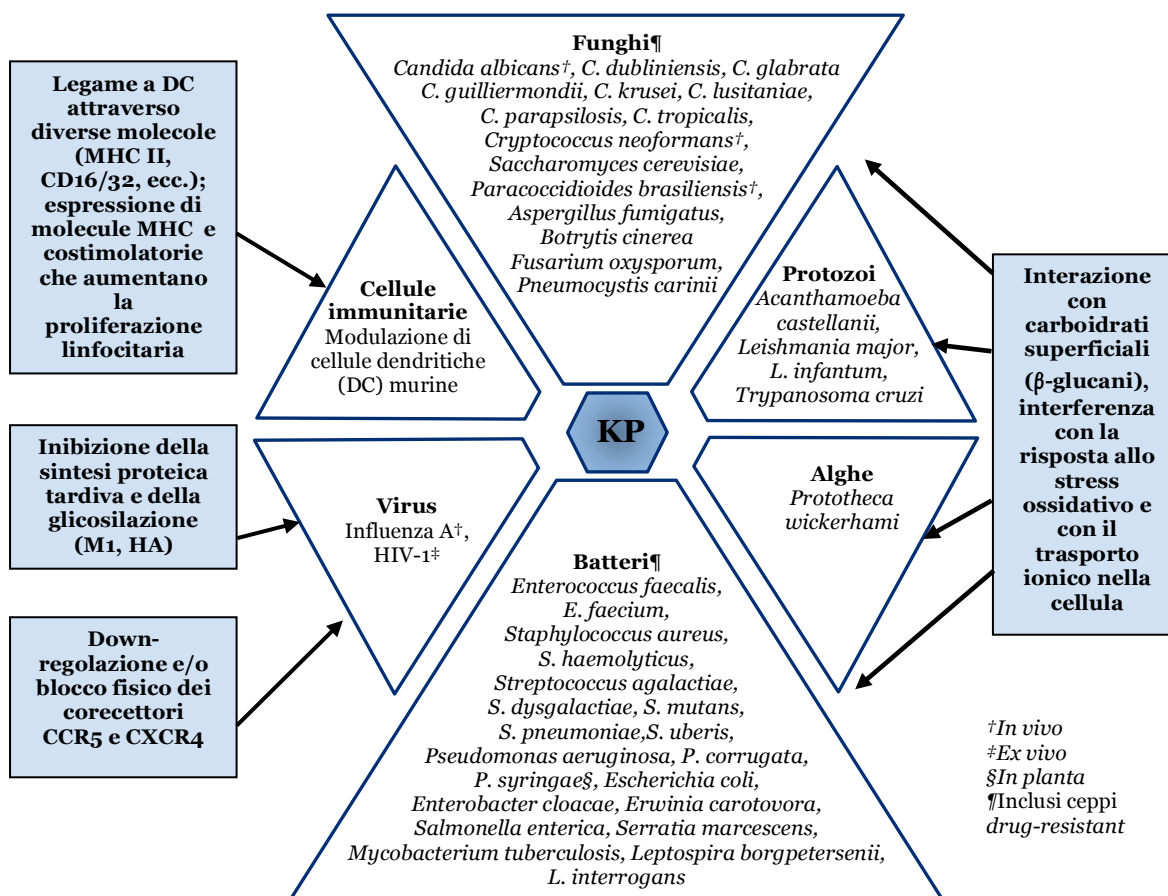
(KP, AKVTMTCSAS, P.M. 998.2, **Figura 10H**), con una alanina (A) al posto del primo amminoacido, acido glutammico (E), caratterizzato da una significativamente aumentata attività candidacida, specificamente inibita da  $\beta$ -1,3-glucano (**Polonelli 2003**). L'approccio metodologico utilizzato per ottenere KP è schematicamente illustrato in **Figura 11**.



**Figura 11.** Rappresentazione schematica dell'approccio metodologico utilizzato per ottenere KP a partire dalla tossina killer di *Pichia anomala* (ora *Wickerhamomyces anomalus*, PaKT).

In studi successivi è stato possibile caratterizzare l'ampio spettro di attività antimicrobica ed antivirale *in vitro*, *in vivo*, *in planta* e/o *ex vivo*, nei confronti di miceti, alghe, batteri, protozoi e

virus di rilevante interesse medico e/o agrario, e l'attività immunomodulante nei confronti delle cellule dendritiche, mediate da diversi meccanismi d'azione, come schematicamente mostrato in **Figura 12** (Cenci 2006, Magliani 2008a, 2008b, 2009 e 2011). KP ha dimostrato, inoltre, di possedere alcune caratteristiche chimico-fisiche peculiari, che presumibilmente possono giustificare la significativa attività *in vivo* a prescindere dalle ridotte dimensioni.



**Figura 12.** Attività antimicrobica, antivirale ed immunomodulatoria di KP, *in vivo*<sup>†</sup>, *ex vivo*<sup>‡</sup>, *in planta*<sup>§</sup> e/o *in vitro*, con differenti meccanismi d'azione (modificata da Magliani 2011).

KP, infatti, è molto stabile in forma liofilizzata e, quando solubilizzato in condizioni non riducenti, dimerizza facilmente per formazione di ponti disolfuro. La forma dimerica, che rappresenta l'unità funzionale, è in grado di assemblarsi spontaneamente e reversibilmente a formare una rete organizzata di fibrille simile ad un idrogel, dalla quale la forma attiva viene rilasciata nel tempo. Tale processo è fortemente accelerato dalla presenza di β-1,3-glucano solubile (laminarina) o di cellule di *C. albicans* che espongono β-1,3-glucano sulla parete. KP è stato perciò proposto come paradigmatico di una nuova classe di peptidi caratterizzati da "autodelivering" (Pertinhez 2009).

Poiché, come verificato nei databases disponibili, la sequenza di P6, il peptide da cui è stato derivato KP, è presente nella regione V di molti altri Ab non correlati, e peptidi sintetici

riproducenti le CDR di scFv H6 si erano dimostrati candidacidi, è stato ipotizzato che peptidi correlati a CDR potessero esplicare qualche attività biologica indipendentemente dalla specificità dell'Ab di appartenenza. Tale condizione è stata effettivamente verificata con numerosi peptidi sintetici riproducenti le CDR di Ab non correlati con diverse specificità antigeniche (peptidi CDR).

## Peptidi CDR

Numerosi peptidi, corrispondenti alle CDR di diversi mAb disponibili o le cui sequenze erano depositate in banche dati, sono stati sintetizzati e sperimentati (**Polonelli 2008**). In particolare, i mAb sono stati selezionati sulla base di caratteristiche di seguito brevemente riportate:

- mAb C7 (IgM murina), diretto nei confronti di una mannoproteina da stress della parete di *C. albicans*, selezionato in quanto si era dimostrato candidacida ed in grado di inibire adesione e filamentazione del lievito;
- mAb pc42 (IgM murina), diretto nei confronti di un peptide sintetico contenente l'Ag di superficie del virus dell'epatite B fuso con un epitopo per la stimolazione dei linfociti T-helper derivato dalla proteina circumsporozoite di *Plasmodium falciparum*, selezionato per avere CDR H1 ed H2 in comune con mAb C7;
- mAb HuA (IgM umana), diretto nei confronti dell'Ag difucosilico del gruppo sanguigno A umano, selezionato in quanto rappresentativo di Ab largamente diffusi nella popolazione umana e per non avere alcuna omologia di sequenza con le CDR di mAb C7 e mAb pc42.

Tutti i peptidi corrispondenti alle CDR, caratterizzati da diversa composizione amminoacidica e lunghezza (da 5 a 17 amminoacidi; P.M. da 653 a 1887 Da), sono stati sintetizzati e saggiati *in vitro* nei confronti di *C. albicans* e di altri agenti patogeni fungini e batterici, quali *C. neoformans*, *A. fumigatus* e ceppi clinici multiresistenti di *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, dimostrandosi significativamente attivi. Peptidi derivati mediante sostituzione amminoacidica con alanina, usati come surrogati di mutazioni puntiformi naturali, hanno mostrato attività microbicida inalterata, aumentata o diminuita. Alcuni di essi, saggiati su cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) infettate *in vitro* o provenienti da un individuo già infettato da HIV-1 (*ex vivo*), si sono dimostrati in grado di inibire la replicazione virale soprattutto di ceppi che utilizzano il corecettore CCR5 (R5). Probabilmente il meccanismo d'azione è da ascrivere ad omologie di sequenza tra peptidi CDR e proteine virali, quali reverso-trascrittasi e Rev, con interferenza sul ciclo replicativo virale. Alcuni peptidi CDR, inoltre, soprattutto mAb C7/pc42 H2, si sono dimostrati in grado di inibire *in vitro* la crescita di cellule tumorali, quali linee cellulari di melanoma murino ed umano e cellule leucemiche. Ancor più significativamente, alcuni peptidi CDR si sono dimostrati terapeutici nei confronti di candidosi sperimentali invasive ed in un modello murino di colonizzazione polmonare da cellule di melanoma. Apparentemente, l'attività biologica dei peptidi sembra essere largamente indipendente dalla specificità dell'Ab di provenienza e riguarda peptidi derivati anche da CDR1 e CDR2 di entrambe le catene H ed L



(**Polonelli 2008**). Il meccanismo d'azione antitumorale è stato, in alcuni casi, recentemente chiarito ed è risultato da ascrivere all'interazione dei peptidi CDR con la  $\beta$ -actina del citoscheletro, con sua successiva polimerizzazione, produzione di ioni superossido ed apoptosi. Tale attività si è dimostrata specifica anche nei confronti di altre linee cellulari tumorali, senza alcuna citotossicità nei confronti di cellule non tumorali o *in vivo* (**Arruda 2012**).

Sulla base di tali risultati, studi analoghi sono stati condotti con altri peptidi CDR. Peptidi derivati da mAb HuA e da un mAb murino (MoA), diretto nei confronti dello stesso epitopo antigenico, ma senza alcuna omologia di sequenza tra loro, sono stati valutati per le loro attività candidacida ed immunomodulatoria. Mentre solamente HuA L3 si è dimostrato candidacida *in vitro*, HuA L3 e MoA H3 si sono dimostrati in grado di stimolare la produzione di IL-6 o IL-6 e TNF- $\alpha$ , rispettivamente, in splenociti e macrofagi peritoneali murini. MoA H3, in particolare, veniva internalizzato nei macrofagi peritoneali determinando l'attivazione del pathway PI3K-Akt, la produzione di TNF- $\alpha$  e l'espressione di TLR-4. Pur essendo privo di attività candidacida diretta, MoA H3 si è dimostrato terapeutico in un modello murino di candidosi sistemica, suggerendo un ruolo determinante della sua potente attività immunomodulatoria (**Gabrielli 2009**).

Ancor più recentemente, peptidi CDR derivati da due mAb anti-melanoma hanno dimostrato di esplicare attività antitumorale nei confronti di cellule di melanoma *in vitro*, inducendo apoptosi ed inibizione della proliferazione cellulare, e nei confronti di cellule epiteliali, inibendone la proliferazione (inibizione della angiogenesi) (**Dobroff 2010**).

Complessivamente, peptidi CDR hanno quindi mostrato di poter esplicare diverse attività biologiche (antimicrobica, antivirale, immunomodulatoria, antitumorale), senza presentare omologie di sequenza con peptidi antimicrobici naturali ("antimicrobial host defense peptides", HDP) inclusi in banche dati, quali Antimicrobial Peptide Database (The Antimicrobial Peptide Database 2012), suggerendo che peptidi di derivazione anticorpale potrebbero rappresentare una sorgente praticamente illimitata di peptidi antinfettivi ed antitumorali utilizzabili in quanto tali o per l'identificazione di nuovi bersagli per nuovi approcci terapeutici nel campo delle malattie infettive e dei tumori.

## Peptidi Fc

Sebbene di notevole interesse, tutte le precedenti osservazioni sui peptidi di derivazione anticorpale avrebbero potuto essere di importanza relativa da un punto di vista immunologico, in quanto sembrava improbabile che essi potessero essere rilasciati *in vivo*, ed in quantità significative, nel corso della degradazione fisiologica degli Ab. Sono stati perciò individuati, sintetizzati e saggiati *in vitro* ed *in vivo* diversi peptidi con sequenze identiche a frammenti della regione costante di Ab (Peptidi Fc, **Figura 10I**), appartenenti a diverse classi (IgG, IgM, IgA). In particolare, i peptidi sono stati selezionati sulla base delle seguenti caratteristiche: lunghezza massima di 12 amminoacidi, probabilità di loro produzione per clivaggio della regione Fc da parte di proteasi fisiologiche (tripsina e chimotripsina), presenza di amminoacidi conservati (tra Ig umane ed

animali), punto isoelettrico, alternanza nella sequenza di amminoacidi idrofobici/idrofilici. Tutte le sequenze di Fc sono state rilevate nel database Protein Information Resource (PIR) (<http://pir.georgetown.edu>) e la selezione dei peptidi effettuata utilizzando diversi supporti informatici analitici: in particolare,

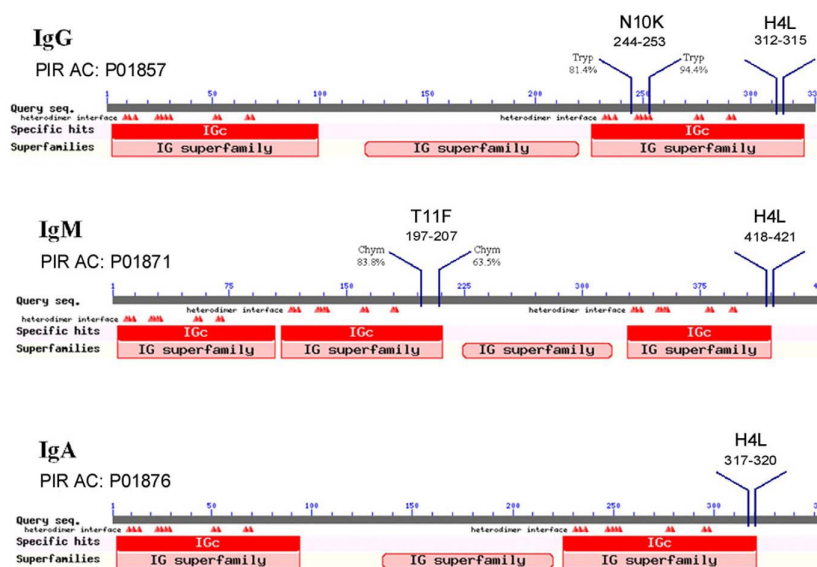
BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);

ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>);

ExPASy Proteomics Tools (<http://expasy.org/tools/>);

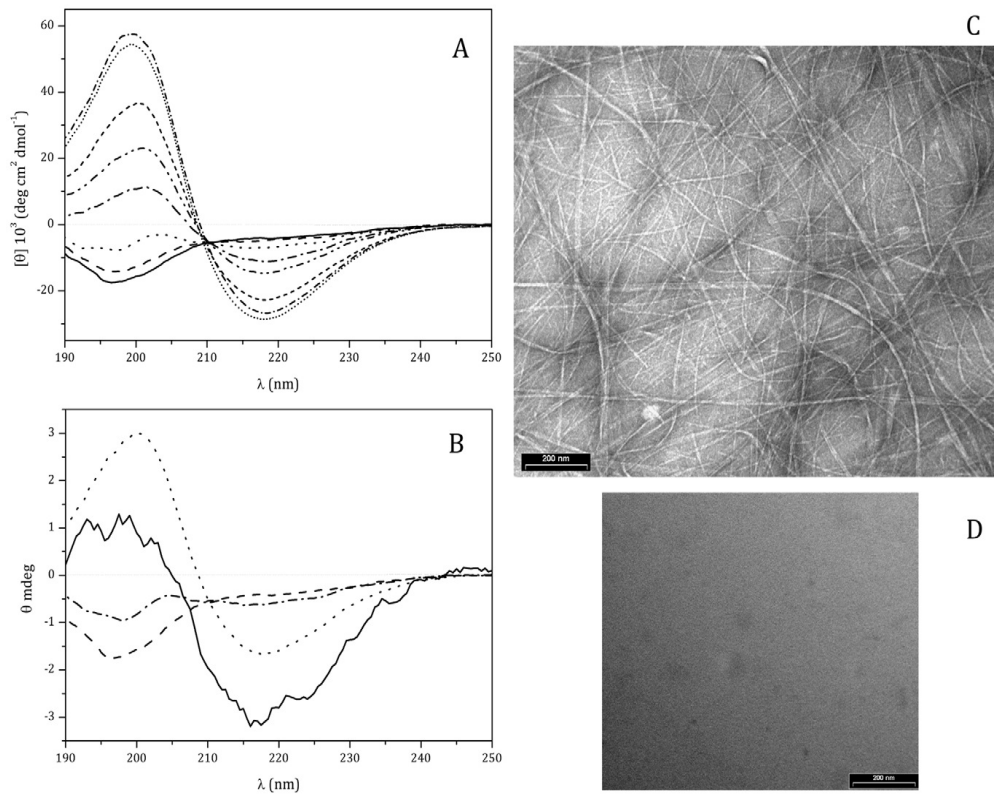
The Sequence Manipulation Suite 2 (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>).

Al termine di tale selezione, sono stati individuati tre peptidi, H4L (di 4 amminoacidi, comune a tutte le classi anticorpali considerate), N10K (di 10 amminoacidi, comune a tutte le IgG1) e T11F (di 11 amminoacidi, comune a tutte le IgM), la cui localizzazione nelle regioni Fc è schematicamente mostrata in **Figura 13 (Polonelli 2012)**.



**Figura 13.** Localizzazione dei peptidi selezionati nelle regioni Fc di differenti classi anticorpali.

Tali peptidi Fc si sono dimostrati fungicidi *in vitro* nei confronti di lieviti patogeni, quali *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans* e *M. furfur*, inclusi ceppi resistenti a caspofungina e triazoli. Il peptide N10K, in particolare, oltre a possedere attività *in vitro*, si è dimostrato terapeutico in modelli murini di candidosi vaginale e sistemica. Come evidenziato da studi di dicroismo circolare e microscopia elettronica (**Figura 14**), N10K si è dimostrato in grado di autoaggregare, passando nel tempo da una conformazione casuale ad una struttura fibrillare a foglietto  $\beta$ , e tale caratteristica potrebbe concorrere, analogamente a quanto precedentemente verificato con KP, alla sua attività *in vivo*.



**Figura 14.** Caratterizzazione della transizione conformazionale di N10K mediante dicroismo circolare (CD) ed elettromicroscopia (EM). **A.** Spettri CD di N10K (100 mM) in acqua, in funzione del tempo (da 0, 1, 3, 5, 7, 20 ore a 6, 20 giorni, progressivo passaggio da una struttura random coil ad una struttura organizzata). **B.** N10K (1 mM) dopo diversi tempi di incubazione (0, 150, 570 minuti, linee tratteggiate) e in associazione con *C. albicans* (150 minuti, linea continua). **C.** EM di N10K dopo 20 giorni a 4°C. **D.** EM di un peptide negativo di controllo nelle stesse condizioni sperimentali (da **Polonelli 2012**).

Peptidi derivati da Ab, potenzialmente rilasciabili *in vivo* per proteolisi fisiologica delle Ig, potrebbero rappresentare un link tra immunità innata ed adattativa, concorrendo alla risposta immunitaria nei confronti di infezioni e tumori (**Polonelli 2012**).

## *Scopo della Ricerca*

Il presente progetto di Dottorato di Ricerca si è posto lo scopo di selezionare peptidi e/o proteine codificati da geni coinvolti nella sintesi degli Ab, al fine di verificarne eventuali attività biologiche (antimicrobica, antivirale, immunomodulatoria e/o antitumorale) e di indagarne il meccanismo d'azione nella provocante ipotesi che gli Ab siano il risultato dell'aggregazione e della combinazione di peptidi codificati da geni che, ancestralmente, erano deputati a funzioni immunitarie intrinseche.

Tale ipotesi potrebbe consentire di stabilire una forte correlazione tra immunità innata e adattativa, che vedrebbe gli Ab come il prodotto di un processo evuzionistico in cui l'associazione di molecole ad attività aspecifica potrebbe aver dato origine a molecole ad attività specifica. La liberazione di peptidi dotati di attività biologica indipendente da quella dell'Ab di appartenenza, in seguito a degradazione fisiologica delle Ig, potrebbe, inoltre, giustificare l'apparente ridondanza quantitativa della produzione di Ig.

La ricerca dei peptidi di derivazione anticorpale finora considerati è consistita nell'identificazione di corte sequenze amminoacidiche di Ab presenti in banche dati per risalire alle sequenze nucleotidiche per esse codificanti, con un approccio del tipo "dalla proteina al genoma". L'evidenza che sia la regione C che quella V degli Ab possano contenere "criptidi", ovvero peptidi caratterizzati da diverse attività biologiche, quale quella antimicrobica, ha suggerito piuttosto lo sviluppo di un nuovo approccio "dal genoma alla proteina" (Ng 2006, Pimenta 2007, Ueki 2007, Samir 2011). In questo progetto di Dottorato di Ricerca, per ricercare potenziali sequenze proteiche che mostrassero attività biologiche di interesse, si è partiti dai numerosissimi geni facenti parte del complesso cluster genico che codifica per gli Ab.

Come precedentemente ricordato, i geni per le Ig umane sono organizzati in diversi clusters, i loci H, k e  $\lambda$ , localizzati su diversi cromosomi. La riorganizzazione genica susseguente alla proliferazione e maturazione dei linfociti B determina una riorganizzazione degli esoni presenti in questi loci che porta alla produzione della grandissima varietà di Ab presenti in natura. Sulla base dei risultati ottenuti negli anni precedenti con peptidi di derivazione anticorpale (KP, peptidi CDR e peptidi Fc) e delle esperienze tecnico-informatiche acquisite, ci si è proposti di selezionare nuovi peptidi e/o proteine di derivazione anticorpale da valutare per attività biologica, sulla base dell'analisi delle sequenze proteiche codificate da geni appartenenti alla famiglia delle Ig (in particolare, geni V, D e C per la catena L e V, D, J e C per la catena H) presenti nelle banche dati disponibili. Sfruttando le precedenti esperienze, la selezione si è basata sull'analisi delle caratteristiche chimico-fisiche dei peptidi/proteine di derivazione anticorpale, quali lunghezza e peso molecolare, presenza di cariche positive e carica netta, punto isoelettrico, pattern idrofobico/idrofilico, presenza di cisteine (possibile formazione di ponti disolfuro), presenza di amminoacidi conservati in varie specie animali e presenza di particolari motivi amminoacidici.

Sulla base di questi presupposti, l'obiettivo dei tre anni di lavoro è stato quello di indagare eventuali attività antimicrobiche ed antivirali *in vivo* e/o *in vitro* di alcuni peptidi e proteine codificati dai geni V, D e J delle Ig umane ed eventualmente chiarirne il meccanismo d'azione.

## *Materiali e Metodi*

## **Selezione e sintesi di peptidi e proteine codificati da sequenze appartenenti a diversi loci della famiglia genica delle immunoglobuline**

La prima parte dello studio ha riguardato l'analisi delle sequenze proteiche codificate da geni appartenenti alla famiglia delle Ig umane. In particolare, la ricerca è stata focalizzata sui geni V, D e C per la catena L e V, D, J e C per la catena H. Per la ricerca delle sequenze, interamente riportate in appendice, è stata utilizzata la banca dati PIR "Protein Information Resource" (<http://pir.georgetown.edu/>); le sequenze amminoacidiche ottenute, in base alla loro lunghezza, sono state suddivise in peptidi (meno di 20 amminoacidi) e proteine (superiori a 20 amminoacidi). I peptidi selezionati sono stati ottenuti mediante sintesi chimica allo stato solido di tipo Fmoc, utilizzando un sintetizzatore di peptidi Syro II (MultiSynTech, Germania), presso il Centro di Ricerca Interdipartimentale e di Servizi di Biotecnologie Innovative (CRIBI) dell'Università degli Studi di Padova. Per quanto riguarda le proteine, invece, avendo una lunghezza notevole, si è deciso di ricorrere all'espressione mediante la tecnologia del DNA ricombinante per ridurre notevolmente i costi di sintesi e di purificazione.

### **Selezione delle sequenze corte**

La selezione dei peptidi, ricavati dal sito [www.expasy.org/tool/](http://www.expasy.org/tool/) utilizzando i softwares Compute pI/MW e Protparam, si è basata sulle seguenti caratteristiche: peso molecolare, lunghezza (max 20 amminoacidi), presenza di cariche positive, carica netta, punto isoelettrico, pattern idrofobico/idrofilico, presenza di residui conservati, presenza di particolari motivi amminoacidici e di cisteine. Tali caratteristiche sono state ritenute di particolare rilevanza sulla base delle precedenti esperienze con altri peptidi di derivazione anticorpale (KP, peptidi CDR, peptidi Fc), che si sono dimostrati in grado di instaurare interazioni ioniche e/o idrofobiche/idrofiliche con la parete cellulare o la membrana plasmatica di microrganismi (**Polonelli 2012**).

### **Selezione delle sequenze lunghe**

Per le proteine, invece, la selezione ha tenuto conto di altri fattori; grazie al programma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), è stata valutata la conservazione della sequenza anche in altri organismi differenti dall'uomo, poiché tale caratteristica potrebbe rispecchiare la loro importanza a livello evolutivo, che ne potrebbe aver determinato la conservazione in quanto indispensabili da un punto di vista funzionale. E' stata verificata, inoltre, la presenza di siti di taglio da parte di proteasi, quali tripsina e chimotripsina, fisiologicamente responsabili della degradazione delle Ig e precedentemente ipotizzate essere potenzialmente coinvolte nella produzione di peptidi Fc (**Polonelli 2012**).

## Ceppi microbici utilizzati

Per la valutazione dell'attività fungicida e/o battericida dei peptidi selezionati sono stati utilizzati i seguenti ceppi microbici: *C. albicans* SC5314, ceppo di laboratorio di riferimento; *C. albicans* SA40 e AIDS 68, ceppi rispettivamente sensibile e resistente al fluconazolo, isolati da un'infezione vaginale umana e provenienti dalla collezione fungina del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma; *C. albicans* CA6, ceppo altamente virulento proveniente dalla collezione fungina della Sezione di Microbiologia del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Perugia, le cui caratteristiche sono state ampiamente descritte (**Bistoni 1986**); *C. albicans* UM4, ceppo resistente a caspofungina e *C. glabrata* OMNI32, ceppo itraconazolo, voriconazolo e fluconazolo resistente, provenienti dalla collezione fungina del Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano; *C. neoformans* 6995, ceppo capsulato di sierotipo A dalla collezione fungina dell'Università degli Studi di Perugia; *M. furfur* 101, isolato clinico della collezione dell'Università degli Studi di Parma; un isolato clinico di *Rhizopus oryzae* ed i ceppi di collezione *A. fumigatus* ATCC MYA 1163, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 25853 e *S. aureus* ATCC 29213.

## Saggi biologici

I peptidi sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO) ad una concentrazione di 20 mg/ml e successivamente diluiti in acqua distillata sterile ad una concentrazione di 2 mg/ml. I peptidi sono stati inizialmente saggiati ad una concentrazione di 100 µg/ml nei confronti di *C. albicans* SC5314 e, sulla base dei risultati ottenuti, sono stati analizzati a concentrazioni progressivamente decrescenti per determinare il valore di EC<sub>50</sub> (concentrazione efficace 50, cioè il valore della concentrazione di peptide capace di determinare l'uccisione del 50% delle cellule utilizzate nell'inoculo) per ciascun microrganismo saggiato.

## Valutazione dell'attività microbica *in vitro* dei peptidi selezionati

L'attività microbica dei peptidi selezionati è stata saggiata *in vitro* usando un convenzionale saggio di unità formanti colonia (UFC), come precedentemente descritto (**Polonelli 2003**).

### Attività nei confronti di lieviti

I ceppi di lievito sono stati coltivati per circa 20 ore a 37°C su Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Fluka Sigma-Aldrich) (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans*) o su SDA supplementato con 1% Tween 20 (*M. furfur*). Alcune colonie di ciascun ceppo sono state diluite in medium 199 (M199, Sigma-Aldrich) e, dopo ulteriore opportuna diluizione, le cellule sono state contate con il microscopio ottico, utilizzando una camera conta-cellule Kova® (Hycor Biomedical Inc.). Nel caso dei ceppi di *C. albicans*, la sospensione cellulare in 199 è stata incubata a 37°C in agitazione per



1 ora prima del conteggio, per consentire alle cellule la filamentazione, ovvero la formazione del tubulo germinativo. Circa 400 cellule di *C. albicans*, *C. glabrata* e *M. furfur* e  $10^3$  cellule di *C. neoformans* sono state poi trasferite in pozzetti a fondo concavo di piastre microtiter e incubate in assenza (controlli di crescita) o presenza di differenti concentrazioni dei peptidi in un volume finale di 100  $\mu$ l. Dopo incubazione per 6 ore a 37°C, l'intero contenuto dei singoli pozzetti è stato seminato sulla superficie di piastre di SDA e il conteggio delle UFC è stato eseguito, utilizzando lo strumento Acolyte Colony Counter (PBI International), dopo 48 ore di incubazione a 37°C per *C. albicans* e *C. glabrata* e 48/72 ore nelle stesse condizioni per *C. neoformans* e *M. furfur*.

#### **Attività nei confronti di muffe**

I ceppi di *A. fumigatus* ATCC MYA-1163 e *R. oryzae* sono stati coltivati in SDA a 30°C per 5 giorni ed i loro conidi sono stati prelevati dalle rispettive colonie e risospesi in acqua. Dopo il conteggio al microscopio ottico, circa 400 cellule sono state incubate a 30°C per una notte (overnight, ON) in pozzetti a fondo concavo di piastre microtiter in assenza (controlli di crescita) o presenza di diverse concentrazioni del peptide di interesse. Dopo semina su SDA le UFC sono state contate dopo 48 ore di incubazione a 30°C.

#### **Attività nei confronti di batteri**

I ceppi batterici selezionati sono stati coltivati su Mueller Hinton agar (MHA, Fluka, Sigma-Aldrich) a 37°C per 24 ore. Colonie di ciascun ceppo sono state inoculate in 2 ml di soluzione fisiologica (SF), valutando la concentrazione cellulare con un turbidimetro fino a raggiungere il valore di 0,5 McFarland, corrispondente a  $1,5 \times 10^8$  cellule/ml. Per la preparazione dell'inoculo finale, la sospensione batterica è stata preliminarmente diluita 1:200 in MH brodo (MHB) e poi 1:20 in acqua (diluizione finale 1:4000). Successivamente, 10  $\mu$ l di questa sospensione sono stati trasferiti in pozzetti a fondo concavo di piastre microtiter, in assenza (controlli di crescita) o presenza di diverse concentrazioni del peptide di interesse in un volume finale di 100  $\mu$ l. Dopo incubazione per 5 ore a 37°C, l'intero contenuto dei singoli pozzetti è stato seminato sulla superficie di piastre di MHA e la conta del numero di UFC è stata eseguita dopo 24 ore di incubazione a 37°C.

Tutti i saggi sono stati eseguiti in triplo per fini statistici.

Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate secondo la seguente formula:

$$\text{Inibizione della crescita (\%)} = 100 - (\text{n}^\circ \text{ UFC in presenza di peptide} / \text{n}^\circ \text{ UFC controllo acqua}) \times 100$$

La significatività statistica della differenza del numero di UFC, rilevato per ciascuna delle tre piastre appartenenti a ciascun gruppo, è stata valutata mediante il test *t* di Student. I valori di EC50 sono stati calcolati utilizzando il programma GraphPad Prism 4.01, (San Diego, CA, Stati Uniti d'America), attraverso l'analisi di regressione non lineare.

Analizzando i risultati ottenuti, si è deciso di procedere con gli studi di microscopia, dicroismo circolare, determinazione delle attività apoptotica, genotossica e terapeutica soltanto con i peptidi risultati più attivi negli esperimenti *in vitro* appena descritti, ovvero L12P ed L18R.

## **Saggi di time killing dei peptidi L12P e L18R nei confronti di cellule di *Candida albicans***

Il saggio di time killing dei peptidi L12P e L18R è stato condotto utilizzando il ceppo fungino di riferimento *C. albicans* SC5314. Sono stati eseguiti 3 diversi saggi utilizzando tempi di incubazione decrescenti fino a riuscire a stimare il tempo minimo richiesto per la morte della maggior parte delle cellule incubate in presenza dei peptidi di interesse.

Il ceppo di *C. albicans* SC5314 è stato incubato ON in SDA a 37°C. Alcune colonie sono state inoculate in 1 ml di terreno M199 e incubate per 1 ora a 37°C in agitazione (150 rpm) per consentirne la filamentazione. Dopo opportuna diluizione, le cellule sono state contate al microscopio ottico, utilizzando la camera conta-cellule Kova®, e circa  $4 \times 10^2$  di esse sono state successivamente trasferite in pozzetti di piastre microtiter a fondo concavo ed incubate in presenza di 5 µg/ml dei peptidi L12P e L18R, minima concentrazione fungicida (minima concentrazione di peptide capace di uccidere il 100% delle cellule incubate), in un volume finale di 100 µl.

Dopo incubazione a 37°C per differenti intervalli di tempo in tre saggi distinti:

- 30 minuti, 1 ora, 2 ore, 4 ore e 6 ore
- 10, 20 e 30 minuti
- 5 e 10 minuti

l'intero contenuto dei singoli pozzetti è stato seminato in altrettante piastre di SDA e la conta delle UFC è stata effettuata, utilizzando lo strumento aCOLyte Colony counter, dopo 48 ore di incubazione a 37°C.

Come controlli di crescita e di attendibilità del saggio, sono stati utilizzati un controllo inoculo, con semina immediata su SDA delle cellule di lievito costituenti l'inoculo iniziale (tempo 0,  $t_0$ ), ed un controllo acqua, con semina delle cellule di lievito su SDA a 37°C in assenza di peptide, dopo 30 minuti, 1, 2, 4 e 6 ore di incubazione per il primo saggio e dopo 30 minuti per il secondo. Nel terzo saggio tale controllo non è stato preparato dal momento che in 10 minuti le cellule non avrebbero avuto il tempo di replicarsi.

Tutti i saggi sono stati eseguiti in triplo a scopo statistico.

Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate seguendo la seguente formula:

$$\text{Inibizione della crescita (\%)} = 100 - (\text{n}^\circ \text{ UFC in presenza di peptide} / \text{n}^\circ \text{ UFC controllo acqua}) \times 100$$

La significatività statistica della differenza del numero di UFC, rilevata per ciascuna delle tre piastre appartenenti ad ogni gruppo, è stata valutata mediante il test *t* di Student.

## **Valutazione dell'attività *in vitro* dei peptidi L12P e L18R nei confronti di cellule di mammifero**

I peptidi selezionati sono stati saggiati per rilevare eventuali loro attività emolitica nei confronti di emazie umane, citotossica nei confronti di cellule animali e genotossica nei confronti di linfociti umani.

### **Attività emolitica**

L'attività emolitica è stata valutata nei confronti di globuli rossi umani appena raccolti (gruppo o Rh<sup>+</sup>, hRBC), utilizzando un protocollo convenzionale (**Oren 1997**). Brevemente, hRBC sono stati lavati 3 volte con tampone fosfato (PBS) mediante centrifugazione per 10 minuti a 1300 g e risospesi in PBS. Successivamente, i peptidi selezionati sono stati saggiati alla concentrazione finale di 50, 100, 250 e 500 µM, nei confronti di hRBC (2,5% in PBS) in un volume finale di 200 µl. Dopo incubazione a 37°C in agitazione a 100 rpm per 30 minuti e 2 ore, i campioni sono stati centrifugati a 800 g per 10 minuti, e 100 µl di surnatante per ciascuna condizione sono stati trasferiti in pozzetti di piastre microtiter e sottoposti a misurazione dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 540 nm, per monitorare l'emoglobina rilasciata e quindi il grado di emolisi. PBS privo di peptidi e una soluzione di Triton X-100 (1%), addizionati alla stessa quantità di hRBC, sono stati usati come controlli negativo e positivo, rispettivamente. A ciascun risultato è stato sottratto il valore di assorbanza rilevato per il controllo PBS, riportando i dati in una scala percentuale che va dal 100% di emolisi, relativa ai campioni contenenti Triton X-100 in cui si osserva la completa lisi dei globuli rossi (controllo positivo), allo 0% relativo ai campioni con solo PBS (assenza di emolisi, controllo negativo).

### **Attività citotossica**

La citotossicità è stata saggiata su cellule epiteliali di rene di scimmia (LLC-MK2), analizzando la capacità di queste cellule, trattate con i peptidi o di controllo, di convertire resazurina nel componente fluorescente resorufina, come indicatore della loro vitalità, utilizzando alamarBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen) (**O'Brien 2000**). Le cellule, coltivate in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) supplementato con 10% di siero bovino fetale (FBS), 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina, sono state seminate in triplo in piastre microtiter da 96 pozzetti ad una concentrazione di  $1,5 \times 10^5/cm^2$  ed incubate in assenza ed in presenza di peptidi a diverse concentrazioni (500, 250, 100 e 50 µM) in terreno con 2% di FBS per 24 ore a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>. Cellule in terreno senza peptidi e cellule incubate con melittina (5 mM) sono state utilizzate rispettivamente come controlli negativo e positivo (**Steiner 1981, Wachinger 1998**). Al termine di tale periodo di incubazione, le cellule sono state ulteriormente incubate in presenza di resazurina (44 mM) in terreno privo di siero a 37°C; dopo 30 e 60 minuti,

la fluorescenza è stata misurata a 572 nm con un fluorimetro multipozzetto (Wallac Victor2 1420 Multilab Contatore, Perkin Elmer). La trasformazione di resazurina nel componente fluorescente è direttamente proporzionale alla quantità di cellule metabolicamente attive e quindi vitali. La vitalità cellulare è stata espressa come percentuale del rapporto T/C, dove T rappresenta l'assorbanza media di cellule trattate con i peptidi e C l'assorbanza media dei controlli.

### **Attività genotossica**

Per verificare se i peptidi d'interesse potessero indurre danni al genoma, è stato effettuato il Comet test o test della cometa su PBMC, che permette di individuare danni strutturali al DNA e/o eventuali mutazioni cromosomiche. Tale analisi, che è stata svolta in collaborazione con la Prof.ssa Anna Maria Buschini e la Dott.ssa Serena Galati presso il Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli Studi di Parma, consente di rilevare frammenti cromosomici che, a seconda delle condizioni sperimentali, possono formarsi in seguito a rotture del singolo filamento di DNA (SSB, single strand breaks) o del doppio filamento (DSB, double strand break). Il Comet test è stato eseguito come descritto da Singh et al., con lievi modifiche (versione alcalina del Comet assay convenzionale) (**Singh 1988**).

In particolare, il Comet test è stato condotto in 5 fasi principali:

➤ Separazione dei linfociti

Linfociti umani ottenuti da donatori giovani sono stati isolati da sangue periferico eparinizzato mediante centrifugazione in gradiente di densità. Il numero di linfociti è stato inizialmente valutato con osservazione al microscopio ottico di una sospensione ottenuta aggiungendo 10 µl di sangue intero a 190 µl (1:20) di soluzione di Türk fredda (violetto di genziana, acido acetico e acqua distillata). L'acido acetico contenuto nella soluzione di Türk determina la lisi dei globuli rossi, mentre il colorante evidenzia i leucociti. Il sangue intero è stato quindi trasferito in una provetta Falcon e diluito in rapporto 1:1 con soluzione tampone di Hanks (HBSS, Lonza) che permette il corretto mantenimento del pH e del bilancio osmotico. La soluzione è stata agitata delicatamente capovolgendo la provetta e conservata a temperatura ambiente (RT). Sono state preparate alcune provette contenenti 3 ml di Lymphoprep™ Density Gradient Medium su cui sono stati lentamente stratificati 6 ml di sangue diluito. Mediante centrifugazione a 1.200 g per 20 minuti a 20°C, i componenti ematici cellulari sono stati separati lungo il gradiente in ragione della loro densità; in particolare, con una pipetta Pasteur è stato recuperato l'anello di linfociti, che appare bianco e denso, e risospeso delicatamente in un volume finale di 8 ml di HBSS a 37°C. I linfociti sono stati nuovamente centrifugati a 500 g per 10 minuti a 20°C e risospesi in un volume finale di 6 ml di HBSS.

➤ Allestimento delle colture

Dopo il lavaggio con HBSS, i linfociti sono stati nuovamente centrifugati a 500 g per 10 minuti a 20°C e risospesi in 1 ml di RPMI completo (10% FBS, 1% fitoemoagglutinina, 1 mM L-glutamina,

100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina, 37°C). Per ogni campione da saggiare è stato quindi preparato 1 ml di una sospensione di 10<sup>6</sup> linfociti (10<sup>6</sup> cell/ml), trasferendolo in una provetta Eppendorf (2 per ogni trattamento effettuato). Le cellule sono state quindi incubate a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> per circa 2 ore e successivamente trattate con i peptidi L12P e L18R, utilizzati alla concentrazione di 5 e 10 µM per altre 2 ore nelle stesse condizioni (37°C e 5% CO<sub>2</sub>).

➤ Allestimento dei vetrini

Allo scadere del trattamento, 200 µl di sospensione sono stati trasferiti in una nuova provetta Eppendorf e centrifugati a 3.000 rpm per 1 minuto. Il pellet è stato risospeso in 90 µl di low melting agar (LMA), trasferito su vetrino, coperto con un coprioggetto ed incubato in frigorifero per 15 minuti. È stato quindi tolto il coprioggetto, trasferendo sul vetrino altri 90 µl di sospensione cellulare preparata in LMA come precedentemente descritto. Successivamente, i vetrini sono stati immersi senza coprioggetto in giarine con soluzione di lisi (2,5 M NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, pH 10), con successiva incubazione a 4°C ON.

➤ Elettroforesi

Il giorno successivo si è proceduto con l'elettroforesi. Nella cella elettroforetica, disposta su ghiaccio, è stato introdotto un buffer alcalino a pH>13 (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH) fino al riempimento della parte sottostante il piano di appoggio dei vetrini. Questi sono stati disposti sul lato inferiore della cella (con il fondo del vetrino verso il polo positivo rosso), aggiungendo altro buffer elettroforetico fino alla loro completa immersione. Dopo 20 minuti (fase di precorsa) è stato acceso l'alimentatore a corrente costante (fase di corsa) a 300 mA (0,78 V/cm) per altri 20 minuti e, successivamente, i vetrini sono stati irrorati con 2 ml di Tris-HCl 0,4 M pH 7,5, lasciando agire la soluzione per qualche minuto. I vetrini sono stati quindi asciugati nella parte inferiore, immersi per 3 minuti in etanolo e disposti su di un vassoio a RT per consentire l'evaporazione di tutto l'etanolo residuo.

➤ Lettura dei vetrini

Il giorno successivo si è proceduto alla lettura dei vetrini. I vetrini sono stati preventivamente colorati con 0,75 µl di bromuro d'etidio (10 µg/ml) appena prima della lettura e quindi analizzati con un microscopio a fluorescenza (Leica DMLS) con un filtro di eccitazione BP 515-560 nm e un filtro di barriera LP 580 nm. I dati sono stati ottenuti con un sistema automatico di analisi delle immagini (Comet Assay III, Perceptive Instruments Ltd) analizzando in maniera casuale 50 cellule per ogni vetrino. La migrazione del DNA e, quindi, la percentuale di danno al genoma sono state valutate in base alla lunghezza della "coda della cometa" o comet tail.

L'analisi è stata effettuata anche direttamente dall'operatore assegnando un punteggio visivo in una classe da 0 a 4 a seconda della lunghezza della coda della cometa.

Il risultato visivo è stato calcolato con la seguente formula:

$$\text{Partitura visiva} = n^{\circ} \text{ di cellule in classe 0} + 2 \times n^{\circ} \text{ di cellule in classe 1} + 3 \times n^{\circ} \text{ di cellule in classe 2} \\ + 4 \times n^{\circ} \text{ di cellule in classe 3} + 5 \times n^{\circ} \text{ di cellule in classe 4}$$

## **Valutazione dell'attività terapeutica dei peptidi L12P ed L18R in un modello di candidosi sistemica sperimentale**

L'attività terapeutica *in vivo* dei peptidi L12P e L18R è stata valutata, come prova di concetto, nei confronti di candidosi sistemiche utilizzando un modello d'infezione sperimentale, costituito da larve di *Galleria mellonella*, la comune camola del miele.

Sono stati condotti una serie di esperimenti preliminari per ottimizzare il sistema, e solo successivamente si è proceduto alla valutazione dell'attività terapeutica *in vivo* dei peptidi L12P e L18R che avevano mostrato la maggiore attività *in vitro* nei confronti di vari ceppi di *C. albicans*.

Le larve sono state conservate al buio a 4°C per un massimo di 7 giorni e, al momento dell'uso, sono state pesate, formando gruppi con animali di peso simile (400 ± 20 mg), scartando le larve poco turgide e con macchie sulla cuticola. Utilizzando metodologie analoghe ad altre precedentemente descritte per lo studio della patogenesi di infezioni fungine (**Fuchs 2010**), ogni singola larva è stata infettata con cellule di *C. albicans* SC5314. Cellule di lievito prelevate da una singola colonia cresciuta su SDA, dopo incubazione ON a 37°C, sono state risospese in 10 ml di terreno 199 ed incubate a 37°C per 1 ora in agitazione (150 rpm) per consentirne la filamentazione. Dopo 2 lavaggi con SF, centrifugando per 5 minuti a 5.000 g per eliminare il surnatante, le cellule sono state diluite (1:20), contate con il microscopio ottico utilizzando la camera conta-cellule Kova®, ed utilizzate per l'allestimento di una sospensione di 5×10<sup>7</sup> cellule/ml, in modo tale che ogni larva, inoculata con 10 µl, venisse infettata con 5×10<sup>5</sup> cellule di *C. albicans*. Sulla base di esperimenti preliminari che hanno consentito di non osservare alcuna differenza tra esperimenti effettuati con larve trattate con sospensioni fungine o soluzioni peptidiche allestite in acqua invece che in SF, in tutti gli esperimenti è stata utilizzata acqua distillata sterile nella preparazione sia dell'inoculo che delle soluzioni peptidiche.

L'inoculo nelle larve è stato effettuato mediante iniezione nella penultima pro-zampa a sinistra direttamente nell'emolinfa con una siringa Hamilton con ago fisso 26G, pulita accuratamente ogni 8 iniezioni con lavaggi sequenziali in candeggina 10%, etanolo 100%, H<sub>2</sub>O deionizzata e PBS. Dopo circa 1 ora dall'infezione, le larve sono state nuovamente inoculate con 5 µg di peptide L12P o L18R in 10 µl a partire da soluzioni dei peptidi pari a 0,5 mg/ml. La seconda iniezione è stata effettuata in una diversa posizione, in particolare nell'ultima pro-zampa di sinistra.

Come controlli sono state utilizzate: larve non trattate (NT), per valutare la mortalità fisiologica (controllo della mortalità casuale); larve inoculate con SF (controllo SF), due volte con 10 µl a distanza di 1 ora per verificare se le iniezioni potessero causare un tasso di mortalità aggiuntiva

(controllo della mortalità associata all'iniezione); larve infettate e non trattate (INT, controllo infezione), in cui un gruppo di larve è stato inoculato con 10 µl di sospensione di *C. albicans* e dopo 1 ora con 10 µl di SF (controllo della mortalità associata all'infezione).

I campioni sono stati preparati secondo il seguente schema:

	SF	<i>C. albicans</i> (5×10 <sup>7</sup> cellule/ml)	Peptidi (0,5 mg/ml)
<b>Controlli NT</b>	-	-	-
<b>Controlli SF</b>	<b>10 + 10 µl</b>	-	-
<b>Controlli INT</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>	-
<b>Infezione e trattamento con L12P</b>	-	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>
<b>Infezione e trattamento con L18R</b>	-	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>

Le larve trattate e di controllo sono state incubate al buio a 37°C in piastre Petri e monitorate per 9 giorni. Le curve di sopravvivenza sono state valutate con il test Mantel-Cox Logrank.

Esperimenti preliminari hanno permesso di sviluppare il protocollo d'infezione che permette di osservare la morte della maggior parte delle larve di controllo INT, inoculate con *C. albicans*, entro 48-72 ore.

## **Analisi della tossicità *in vivo* dei peptidi L12P e L18R**

L'eventuale tossicità *in vivo* dei peptidi L12P e L18R è stata valutata utilizzando il sistema modello rappresentato da *G. mellonella*.

Le larve, conservate al buio a 4°C per pochi giorni, sono state pesate formando gruppi da 16 animali di peso simile (460 ± 20 mg), scartando quelle che presentavano un aspetto sofferente o una morfologia alterata, ad es. particolari pigmentazioni. Ciascuna larva è stata inoculata direttamente nell'emolinfa attraverso la penultima pro-zampa di sinistra con 5 µg dei peptidi in 10 µl, a partire da una soluzione pari a 0,5 mg/ml. L'inoculo è stato effettuato con una siringa Hamilton con ago fisso 26G, accuratamente lavata ogni 8 iniezioni con lavaggi sequenziali in candeggina 10%, etanolo 100%, H<sub>2</sub>O deionizzata e PBS.

Come controllo, è stato anche inoculato un gruppo di larve con 10 µl di SF.

I campioni sono stati preparati secondo il seguente schema:

	SF	Peptidi (0,5 mg/ml)
<b>Controllo SF</b>	10 µl	
<b>Trattamento con L12P</b>	-	10 µl
<b>Trattamento con L18R</b>	-	10 µl

Le larve trattate ed un ulteriore gruppo di controllo non trattate sono state incubate al buio a 37°C e monitorate per 9 giorni.

Le curve di sopravvivenza sono state calcolate con il test Mantel-Cox Logrank.

## Studi in dicroismo circolare dei peptidi L12P e L18R

Per indagare il possibile meccanismo d'azione dei peptidi L12P e L18R ed ottenere maggiori informazioni sulla relazione struttura-attività, è stata condotta un'analisi conformazionale mediante dicroismo circolare in collaborazione con la Dr. ssa Thelma A. Pertinhez presso il Centro Interdipartimentale Misure "Giuseppe Casnati" (CIM) dell'Università di Parma.

Sono stati registrati spettri di dicroismo circolare nel lontano UV, nell'intervallo spettrale 190-250 nm con 4 scansioni, con uno spettropolarimetro Jasco 715 (JASCO International Co. Ltd.) accoppiato ad un sistema regolatore di temperatura Peltier PTC-348WI, utilizzando cuvette di quarzo da 1 mm (Hellma, type 100-QS) a 20°C (Polonelli 2012). Dopo aver apportato la correzione basale, la misura di ellitticità  $\theta$  (mdeg) è stata convertita in ellitticità media molare per residuo  $[\theta]$  (deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>) secondo l'equazione:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 \times l \times c \times n}$$

con  $l$  = cammino ottico della cuvetta (cm),  $c$  = concentrazione molare (M) ed  $n$  = numero di residui amminoacidici del peptide.

Sono stati, in questo modo, acquisiti gli spettri di dicroismo di L12P e L18R sciolti in acqua (50 µM) in assenza e in presenza di: sodio dodecil solfato (SDS) 100 mM, quale mimotopo micellare di fosfolipidi di membrana, lipopolisaccaride (LPS) 0,1%, quale componente della membrana esterna dei batteri Gram negativi, laminarina 250 µM, quale mimotopo dei  $\beta$ -glucani di superficie della parete fungina, e tetrafluoroetanolo (TFE) al 30%, quale catalizzatore idrofobico per l'acquisizione della struttura secondaria nativa.



## Studi di microscopia su cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi L12P e L18R

### Microscopia elettronica a trasmissione

Gli studi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) sono stati eseguiti in collaborazione con la Dott.ssa Tiziana D'Adda, dell'Unità di Anatomia ed Istologia Patologica del Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali dell'Università degli Studi di Parma.

Per l'analisi, è stata utilizzata una sospensione cellulare di *C. albicans* SC5314 ottenuta miscelando, in ugual proporzione, blastocellule e cellule in germinazione, come precedentemente descritto. In particolare, 10 µl di una sospensione  $7,5 \times 10^8$  cellule/ml sono stati incubati in assenza (controllo negativo) o presenza di peptidi alla concentrazione di 125 µg/ml per 1 ora a RT, in un volume finale di 50 µl.

Trascorso il tempo necessario di incubazione con i peptidi, per evitare alterazioni della struttura cellulare dovute a centrifugazione (**Wright 2000**), il campione di controllo ed i trattati sono stati prefissati per 5 minuti con 5% glutaraldeide in tampone fosfato (0,1 M, pH 6,8). Le sospensioni sono state quindi centrifugate a 5.000 g per 5 minuti a RT per ottenere un pellet cellulare. Per l'impacchettamento delle cellule di *C. albicans*, trattate per l'inclusione nella resina epossidica, è stata preparata una soluzione di agarosio 1%, successivamente versata in piastre da 6 cm di diametro per uno spessore di circa 0,5 cm. Una volta solidificato, nell'agar sono stati ricavati con un bisturi piccoli pozzetti in cui è stato trasferito il pellet cellulare precedentemente ottenuto. Il rimanente agarosio 1%, mantenuto a 56°C, è stato utilizzato per coprire i pozzetti e lasciato solidificare. Successivamente, la porzione contenente il pellet cellulare è stata tagliata e fissata con glutaraldeide al 2,5% in tampone fosfato per 3 ore a RT, poi incubata a 4°C ON. I cubetti di agarosio contenenti il pellet sono stati quindi lavati per 30 minuti per tre volte in tampone fosfato per rimuovere il fissativo, e post-fissati per 30 minuti in una soluzione di tetrossido di osmio all'1%. La disidratazione è stata eseguita mediante immersione in acetone a concentrazioni progressivamente crescenti (25% per 5 minuti, 50% per 5 minuti, 70% per 5 minuti, 95% per 5 minuti e 6 cambi a 100% per 5 minuti). Per infiltrare le cellule di *C. albicans* nella resina epossidica, processo notoriamente piuttosto complicato, è stato preparato un protocollo di infiltrazione prolungata in resina epossidica Ducurpan Araldite ACMI che consiste nell'utilizzare prima miscele con rapporto acetone:resina di 2:1 per 2 ore su agitatore basculante, poi con rapporto 1:1 ON su agitatore basculante ed infine, 3 volte per 2 ore con resina pura e successivamente lasciando agire ON. Una volta rimosso l'eccesso di agarosio attorno alle cellule, i campioni sono stati inclusi in resina epossidica Durcupan Araldite ACM2 addizionata ad un catalizzatore adeguato, e lasciati polimerizzare a 58°C per 72 ore. In seguito a *trimming* dei blocchetti, sono state create sezioni semifini (0,75 µm) che sono state colorate con blu di metilene e safranina per controllare se le cellule fossero presenti in quantità sufficiente. Le regioni più idonee sono state selezionate mediante ulteriore *trimming* e sono state eseguite sezioni ultrasottili (80 µm) con un

ultramicrotomo (LKB Ultratome 8801). Tali sezioni, raccolte mediante griglie di rame da 300 maglie, sono state colorate con acetato di uranile per 15 minuti e citrato di piombo per 5 minuti ed osservate con un microscopio elettronico a trasmissione EM 208S (Fei Europa, Eindhoven, Olanda).

Come controllo, per verificare l'attività candidacida dei peptidi nelle condizioni adottate con il saggio di UFC, 50 µl di una diluizione 1:200 e 1:2000 dei campioni trattati e di controllo sono stati seminati su SDA.

### **Microscopia elettronica a scansione**

La visualizzazione mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) di cellule fungine trattate con i peptidi d'interesse è stata condotta in collaborazione con il Sig. Davide Dallatana del Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali dell'Università degli Studi di Parma.

In particolare, è stato preparato un inoculo di  $4 \times 10^7$  cellule/ml di *C. albicans* SC5314, unendo in rapporto 1:1 cellule in forma blastocellulare e filamentosa ottenute con differenti trattamenti: le blastocellule sono state ottenute sospendendo una colonia cresciuta su SDA per 24 ore in 10 ml di brodo YPD (estratto di lievito 10 g/l, D-glucosio 20 g/l, peptone 20 g/l, tutti forniti da Fluka, Sigma-Aldrich, e dissolti in 1 litro di acqua distillata, prima di essere autoclavati a 121°C per 15 minuti) ed incubando in agitazione (100 rpm) a 30°C ON; le forme filamentose sono state invece ottenute inoculando 1 ml della stessa coltura in YPD in 10 ml di M199 ed incubando per 1 ora a 37°C in agitazione a 150 rpm. Il saggio è stato quindi allestito incubando 10 µl della sospensione cellulare così preparata in assenza (controllo negativo) ed in presenza di peptidi alla concentrazione stabilita (125 e 250 µg/ml) per 1 ora in un volume finale di 20 µl, utilizzando piastre microtiter da 96 pozzetti a fondo concavo. Dopo incubazione, 5 µl di ogni sospensione cellulare sono stati posti su vetrini di circa 25 mm<sup>2</sup>, a cui sono stati aggiunti 5 µl di fissativo (2,5% di glutaraldeide e sodio cacodilato 0,1 M, pH 7,4). I vetrini sono stati quindi mantenuti a 4°C, coperti con 1 ml di fissativo.

I vetrini sono stati lavati in tampone sodio cacodilato per circa 30 minuti e disidratati con soluzioni alcoliche progressive (25, 50, 75, 90, 100%) per tempi diversi: da 30 a 40 minuti per gli alcoli 90 e 100% e da 10 a 20 minuti per soluzioni con alcoli in percentuale inferiore. Successivamente, i campioni sono stati lavati in acetone 100% e disidratati mediante Critical point dryer in CO<sub>2</sub> liquida (31,1°C e 72,9 atm). Infine, i vetrini sono stati fissati su un supporto per il rivestimento con oro per essere metallizzati tramite scarica ionica con Sputtering e visualizzati con un microscopio elettronico a scansione Philips 501 (15 kV) (Polonelli 2012).

Per verificare e quindi confermare l'attività candidacida dei peptidi nelle condizioni adottate con il saggio di UFC, 50 µl di una diluizione 1:200 e 1:2000 di ogni campione sono stati seminati su piastre SDA.

### Microscopia confocale a scansione laser

Gli studi di microscopia confocale a scansione laser sono stati svolti in collaborazione con la Prof.ssa Rita Gatti dell'Unità di Istologia ed Embriologia del Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali dell'Università degli Studi di Parma.

I peptidi L12P e L18R, utilizzati negli studi di microscopia confocale, sono stati coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC), e successivamente purificati mediante HPLC in collaborazione con la Prof.ssa Elena Ferrari dell'Unità di Biochimica del Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali dell'Università degli Studi di Parma.

In particolare, 300 µg di ciascun peptide ad una concentrazione di 20 mg/ml in DMSO sono stati diluiti alla concentrazione di 2 mg/ml in carbonato di sodio 0,1 M, pH 9. FITC è stato disciolto in DMSO anidro ad una concentrazione di 1 mg/ml immediatamente prima dell'uso ed aggiunto in rapporto molare di 1:1 alla sospensione peptidica in aliquote di 5/10 µl alla volta, mescolando delicatamente la soluzione dopo ogni aggiunta. La miscela di reazione è stata incubata a 4°C al buio per 8 ore e successivamente è stato aggiunto NH<sub>4</sub>Cl ad una concentrazione finale di 50 mM, incubando nuovamente ON a 4°C. I peptidi coniugati, conservati a 4°C fino al momento della purificazione, sono stati separati utilizzando il sistema ÄKTA (GE Healthcare), che prevede l'uso di una colonna a fase inversa SOURCE 15RPC (volume 1,66 ml, GE Healthcare), costituita da sfere porose idrofobiche monodisperse di polistirene-divinilbenzene da 15 µm. La soluzione è quindi stata aggiunta in un volume di 500 µl di acido trifluoroacetico (TFA) allo 0,065%. La velocità di flusso applicata è stata di 1 ml/minuto e l'eluizione dei campioni è stata eseguita in gradiente di idrofobicità, utilizzando una soluzione di 0,050% TFA in acetonitrile. Durante l'eluizione sono stati misurati i valori di assorbanza a 495 nm, 280 nm e 215 nm per monitorare nelle varie frazioni eluite la presenza di FITC, di triptofano (se presente nella sequenza amminoacidica del peptide) e del legame peptidico. Le frazioni che presentavano assorbimento a tutte le lunghezze d'onda esaminate sono state raccolte e quantificate. Dopo la liofilizzazione con concentratore Speed Vacuum HETOVAC VR-1 (Heto), le polveri corrispondenti a ciascuna frazione (conservate a 4°C fino al momento dell'utilizzo) sono state sciolte in DMSO ad una concentrazione finale del peptide di 2 mg/ml, stimando approssimativamente l'area sottesa da ciascun picco come quantità di peptide in ogni frazione. Le soluzioni sono state conservate a 4°C.

Cellule del ceppo *C. albicans* SC5314 cresciute su SDA per 24 ore sono state incubate in 5 ml di brodo YPD in agitazione (100 rpm) ON a 30°C. Dopo due lavaggi con acqua distillata e centrifugazione per 5 minuti a 5000 g a RT, la sospensione cellulare è stata opportunamente diluita (1:200) e contata per ottenere una sospensione di  $2 \times 10^7$  cellule/ml. Successivamente, 20 µl di tale sospensione sono stati posti in una speciale cella per microscopia confocale e dopo 30/45 minuti le cellule sono state osservate al microscopio confocale LSM 510 Meta scan integrato con il microscopio invertito Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Jena, Germania). Un piccolo volume di peptidi fluoresceinati (2 µl di una sospensione 2 mg/ml) è stato aggiunto direttamente sul vetrino ad una concentrazione finale di circa 200 µg/ml e le cellule sono state osservate a diversi intervalli di

tempo (time laps). Dopo circa 45 minuti di incubazione con i peptidi fluoresceinati, è stato aggiunto ioduro di propidio (PI) alla diluizione finale di 1:1000 da una soluzione iniziale di 1 mg/ml. PI viene eccitato alla lunghezza d'onda di 543 nm (laser He-Ne) e la fluoresceina alla lunghezza d'onda di 488 nm (laser argon).

Come controllo, 50 µl di una diluizione 1:5000 di una sospensione preparata parallelamente di cellule trattate e di controllo (non trattate) è stata seminata su piastre SDA a diversi tempi, corrispondenti agli intervalli cui sono state acquisite le immagini, per confermare l'attività candidacida dei peptidi fluoresceinati.

## **Studio degli effetti biologici indotti dai peptidi L12P e L18R in cellule di *Candida albicans***

### **Produzione di specie reattive dell'ossigeno**

La capacità di indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata analizzata in cellule di *C. albicans* SC5314 in seguito al trattamento con i peptidi selezionati secondo protocolli sperimentali precedentemente descritti a cui sono state apportate alcune modifiche (Kobayashi 2002, Maurya 2011).

In particolare, alcune colonie di *C. albicans* SC5314 cresciute su SDA per 24 ore a 37°C sono state risospese in acqua e diluite in modo da ottenere un inoculo di circa  $2 \times 10^7$  cellule/ml. Successivamente, 100 µl della sospensione cellulare sono stati incubati per 30 minuti a 37°C in assenza ed in presenza di acido ascorbico (AA) alla concentrazione di 4,4 mg/ml per verificare se le proprietà antiossidanti di questa molecola potessero ridurre la produzione di ROS; nei campioni in cui non è stato aggiunto, AA è stato sostituito con un egual volume di acqua. I campioni sono stati quindi incubati a RT per 30 minuti. Successivamente, ai campioni, trattati e non trattati con AA, sono stati aggiunti i peptidi L12P (15 e 20 µg/ml) ed L18R (20 e 30 µg/ml). Come controllo positivo, alcune sospensioni cellulari, trattate e non trattate con AA, sono state incubate in presenza di caspofungina alla concentrazione di 20 µg/ml, antifungino noto per la sua capacità di indurre ROS in cellule di *C. albicans* (Hao 2013). Trascorsi 30 minuti, i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 5000 g ed il pellet così ottenuto è stato risospeso in 220 µl di PBS a cui è stata aggiunta 2',7'-Diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA, D6883, Sigma Aldrich) sciolta in PBS alla concentrazione di 10 µg/ml appena prima di essere utilizzata. Un volume di 100 µl di ciascun campione è stato quindi trasferito in doppio in pozzetti a fondo piatto di piastre sterili per fluorimetria, successivamente incubate a 37°C. Al tempo 0 e dopo 1, 2, 4 ore di incubazione con DCF-DA, la fluorescenza alla lunghezza d'onda di emissione di 535 nm è stata misurata utilizzando il fluorimetro EnSpire *plate reader* (PerkinElmer). DCF-DA in presenza di cellule vitali subisce la rimozione dei gruppi acetato e in presenza di ROS si trasforma in una molecola fluorescente. L'intensità della fluorescenza di DCF, misurata alla lunghezza d'onda di eccitazione di 475 nm e di emissione di 535 nm, corrisponde ai livelli di ROS intracellulari.

Per controllare l'attendibilità del saggio, 50 µl di una diluizione 1:5000 di ciascuna reazione è stata seminata su SDA ed il giorno successivo si è proceduto con la conta delle UFC.

### **Morte cellulare per apoptosi**

La possibile induzione di apoptosi da parte dei peptidi L12P e L18R è stata valutata su cellule di *C. albicans* SC5314, utilizzando lo strumento Muse™ *Cell Analyzer* (Merck Millipore) ed il kit Muse™ *Annexin V & Dead Cell Assay* (Merck Millipore).

Per il saggio, cellule di lievito, prelevate da una singola colonia cresciuta su SDA dopo incubazione per 24 ore a 37°C, sono state sospese in terreno M199 ed incubate a 37°C per 1 ora in agitazione (150 rpm). Le cellule sono state recuperate e lavate due volte con acqua, centrifugando per 5 minuti a 5000 g e risospesando il pellet cellulare in acqua. Dopo opportuna conta al microscopio con emocitometro Kova®, 5×10<sup>5</sup> cellule/ml sono state sospese in acqua in presenza dei peptidi alla concentrazione di 5 µg/ml in 100 µl di volume finale. Come controllo, lo stesso numero di cellule è stato risospeso in 100 µl di acqua in assenza di peptide. Dopo 10 minuti di incubazione a RT, sono stati prelevati 90 µl di sospensione a cui sono stati aggiunti 10 µl di BSA al 10% e 100 µl di reagente Muse™ *Annexin V & Dead Cell Assay*. Dopo 20 minuti di incubazione al buio a RT, sono stati acquisiti i dati al citofluorimetro.

Prima di procedere con l'analisi dei peptidi di interesse, il protocollo è stato ottimizzato studiando con tale strumento il processo apoptotico indotto da KP, peptide già in precedenza dimostratosi in grado di indurre apoptosi in cellule fungine trattate. Studi di TEM, infatti, avevano evidenziato alterazioni interne in cellule di *C. albicans* trattate con KP riconducibili al processo apoptotico, quali rigonfiamento della parete cellulare con formazione di una regione centrale elettrondensa, collasso della membrana plasmatica, condensazione della cromatina e frammentazione del nucleo (Magliani 2008 b, 2009, 2011 e 2012, Polonelli 2011).

Per ottimizzare il metodo sono state saggiate diverse condizioni di lavoro, relative a concentrazione del peptide, quantità di cellule e tempi di incubazione.

### **Studio dell'attività *in vitro* dei peptidi L12P ed L18R nei confronti di HIV**

L'eventuale attività antivirale dei peptidi selezionati è stata valutata *in vitro* nei confronti del virus HIV-1, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Dr. Claudio Casoli, presso il Dipartimento di Scienze Cliniche L. Sacco, Sezione di Malattie Infettive e di Immunopatologia dell'Università di Milano.

Inizialmente è stata valutata la vitalità cellulare mediante un saggio con AlamarBlue. In particolare, PBMC, provenienti da sangue periferico di individui sani, sono stati coltivati alla concentrazione di 2×10<sup>6</sup> cellule/ml in terreno RPMI 1640 supplementato con il 10% di FBS, 1% di glutammina e 20 UI/ml di interleuchina-2 ricombinante (rIL-2), in piastre da 96 pozzetti, per 24 ore prima del

trattamento. I peptidi sono stati aggiunti a concentrazioni crescenti (1, 10 e 20 µg/ml), con successiva incubazione per 24 ore. Il reagente AlamarBlue (Biosource International, Inc.) è stato quindi aggiunto al 10% v/v e le reazioni sono state incubate per 4 ore a 37 °C. L'assorbanza è stata quindi misurata alla lunghezza d'onda di 570 e 595 nm con un lettore di piastre ELISA (Tecan Sunrise Absorbance Reader), utilizzando come valore di base (bianco) quello ottenuto con AlamarBlue aggiunto al terreno RPMI completo.

Per verificare l'attività anti-HIV-1 dei peptidi, i PBMC ottenuti da tre donatori sani sono stati isolati mediante centrifugazione in gradiente di densità su Ficoll, mescolati in pool e coltivati in terreno RPMI 1640 (10% FBS, 1% glutammina e 1% di penicillina/streptomicina). Prima dell'infezione le cellule sono state stimulate per 24 ore con Fitoemagglutinina (PHA 5 mg/ml) e successivamente con rIL-2 (20 UI/ml). I PBMC sono stati infettati con virus HIV IIIB (X4, linfocitotropico) o BaL (R5, monocitotropico) (molteplicità di infezione 0,5, 4 ore), e, dopo essere stati lavati due volte, sono stati coltivati in piastre da 96 pozzetti per 14 giorni in presenza dei peptidi (10 µg/ml), aggiunti insieme a 20 U/ml di rIL-2 al tempo 0 e dopo 7 giorni. I PBMC sono stati raccolti all'8° e 12° giorno dall'infezione e la replicazione virale è stata valutata misurando la concentrazione dell'Ag p24 nei surnatanti colturali, mediante HIV p24 ELISA Ultrasensitive detection kit (PerkinElmer, Inc.).

## **Clonaggio ed espressione delle sequenze nucleotidiche “lunghe”**

Le sequenze “lunghe” (convenzionalmente considerate costituite da più di 20 amminoacidi), una volta selezionate in accordo con i criteri precedentemente descritti, sono state sintetizzate chimicamente (Eurofins, Italia) e successivamente clonate all'interno del vettore di espressione pET-28. I ricombinanti così ottenuti sono stati introdotti e fatti esprimere in cellule di *E. coli* BL21 codonPlus (Stratagene), nel tentativo di ottenere sufficienti quantità di proteina da saggiare per l'eventuale attività antimicrobica ed antivirale.

### **Preparazione delle sequenze**

Le due sequenze lunghe selezionate, codificate dai geni IGKC e IgM CH<sub>4</sub>, sono state preventivamente modificate aggiungendo alle estremità 5' e 3' la sequenza corrispondente al sito di restrizione dell'enzima NdeI a cui è stato anteposto all'estremità 3' il codone di stop TAA. Inoltre la loro sequenza nucleotidica è stata ottimizzata per facilitarne l'espressione in cellule batteriche. Le sequenze sintetizzate direttamente all'interno del sito MCS (multiple cloning site) del plasmide pEX-A sono state introdotte in cellule di *E. coli* DH10 (F<sup>-</sup> endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ (ara, leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)λ) (Invitrogen).

**Digestioni enzimatiche preparative delle sequenze**

Da colture di cellule DH10 così trasformate sono state eseguite preparazioni dei plasmidi pEX-A contenenti i geni di interesse utilizzando il Kit Qiagen Plasmid Midi, con successiva digestione preparativa, secondo le reazioni riportate di seguito:

	<b>Tipo e Concentrazione</b>	<b>Quantità</b>
<b>DNA plasmidico</b>	pEX-A IgM CH <sub>4</sub> (680 ng/μl)	15 μl
<b>Enzima di restrizione</b>	NdeI (12 U/μl)	2 μl
<b>Buffer</b>	Buffer M (10 x)	6 μl
<b>Acqua DNAsi free</b>		Vf 60 μl
Incubazione a 37°C per 3 ore		

	<b>Tipo e Concentrazione</b>	<b>Quantità</b>
<b>DNA plasmidico</b>	pEX-A IGKC (200 ng/μl)	60 μl
<b>Enzima di restrizione</b>	NdeI (20 U/μl)	5 μl
<b>Buffer</b>	Buffer M (10 x)	7,5 μl
<b>Acqua DNAsi free</b>		Vf 75 μl
Incubazione a 37°C per 3 ore		

Il processo di digestione ad opera dell'enzima NdeI è stato inattivato incubando le reazioni a 65°C per 20 minuti. Le reazioni di digestione sono state quindi caricate su gel d'agarosio all'0,8-1% e le bande con le dimensioni attese, corrispondenti agli inserti di circa 400 coppie di basi (bp), sono state excise dal gel, eluite servendosi del Kit Qiagen QIAquick Gel Extraction e successivamente quantificate caricando una certa quantità dei campioni su un nuovo gel d'agarosio.

Parallelamente, da una coltura di cellule Xl1B trasformate con il vettore vuoto pET-28 his tag (che permette di esprimere una proteina con un tag di istidine dopo il codone di stop) è stata eseguita una preparazione del vettore pET-28, utilizzando il Kit Qiagen Plasmid Midi, con successiva analoga digestione:

	<b>Tipo e Concentrazione</b>	<b>Quantità</b>
<b>DNA plasmidico</b>	pet-28 (190 ng/μl)	60 μl
<b>Enzima di restrizione</b>	NdeI (20 U/μl)	5 μl
<b>Buffer</b>	Buffer M (10 x)	7,5 μl
<b>Acqua DNAsi free</b>		Vf 75 μl
Incubazione a 37°C per 3 ore		

Il processo di digestione ad opera dell'enzima NdeI è stato inattivato incubando le reazioni a 65°C per 20 minuti. Il materiale così ottenuto è stato interamente incubato, senza essere quantificato, in una reazione di defosforilazione. Questa reazione è stata effettuata per impedire che il vettore potesse richiudersi durante la successiva reazione di ligazione, originando falsi cloni positivi privi degli inserti di interesse.

La reazione è stata preparata secondo il seguente schema:

	<b>Tipo e Concentrazione</b>	<b>Quantità</b>
<b>DNA plasmidico</b>	pet-28 digerito con NdeI	50 µl
<b>Buffer</b>	Buffer (10 x)	6 µl
<b>DNA Ligasi</b>	Calf intestinal fosfatasi	0,3 + 0,3+0,3 µl aggiunti ogni 30 min
<b>Acqua DNAsi free</b>		Vf 60 µl
Incubazione a 37°C per 3 ore		

Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 1/10 del volume di acetato di sodio (3M pH 5,2), 2,5 volumi di etanolo al 96% conservato a 4°C e 1 µl di glicogeno e, dopo vigorosa agitazione, il preparato è stato posto per 15 minuti a -80°C per consentire la precipitazione del DNA. Trascorso tale periodo, il DNA precipitato è stato centrifugato per 30 minuti a 4°C e, una volta eliminato il surnatante, è stato lavato con 1 ml di etanolo al 70% per 20 minuti a 4°C. Eliminato l'etanolo in eccesso, il DNA è stato risospeso in 30 µl di acqua apirogena DNAsi free e quantificato.

### **Reazione di ligazione tra le sequenze geniche di interesse e il vettore pET-28**

Gli inserti purificati ed il vettore sono stati caricati in una reazione di ligazione con un rapporto molare vettore/inserto di 1:5, riportata di seguito:

	<b>Tipo e Concentrazione</b>	<b>Quantità</b>
<b>DNA plasmidico</b>	pET-28 digerito con NdeI e defosforilato (50 ng/µl)	1 µl
<b>Inserto</b>	IgM CH <sub>4</sub> digerito con NdeI (20 ng/µl)	4 µl
<b>ATP</b>	10 mM	1 µl
<b>Buffer</b>	Buffer T4 DNA ligase NEB (10 x)	1 µl
<b>DNA Ligasi</b>	T4 DNA ligase NEB (400U/µl)	0,5 µl
<b>Acqua DNAsi free</b>		Vf 10 µl
Incubazione a 15°C ON		



	<b>Tipo e Concentrazione</b>	<b>Quantità</b>
<b>DNA plasmidico</b>	pet-28 digerito con NdeI e defosforilato (10 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
<b>Inserito</b>	IGKC digerito con NdeI (10 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<b>Buffer</b>	Buffer T4 DNA ligase NEB (10 x)	1,5 $\mu$ l
<b>DNA Ligasi</b>	T4 DNA ligase NEB (350 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<b>Acqua DNAsi free</b>		Vf 15 $\mu$ l
Incubato a temperatura ambiente ON		

Dopo la reazione di ligazione il DNA è stato precipitato secondo il protocollo descritto precedentemente e risospeso in 10  $\mu$ l.

### **Trasformazione delle cellule batteriche con la reazione di ligazione**

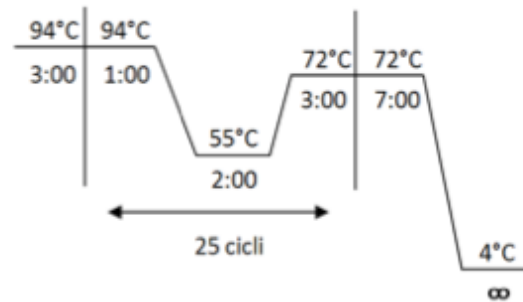
Il DNA (1  $\mu$ l) proveniente dalle reazioni di ligazione è stato utilizzato per trasformare, mediante elettroporazione, cellule di *E. coli* BL21 codonPlus, particolarmente indicate per una efficiente espressione di proteine eterologhe. Le cellule trasformate sono state seminate su Luria Bertani (LB) agar, addizionato con opportuni antibiotici, preparato sciogliendo in un litro di acqua 10 g di NaCl, 10 g di triptone, 15 g di agar e 10 g di estratto di lievito, aggiungendo NaOH 2N fino ad ottenere un pH uguale a 7,0, e sterilizzando in autoclave per 15 minuti a 121°C.

### **Selezione dei cloni positivi contenenti l'inserto**

Per verificare quali cloni contenessero effettivamente l'inserto, è stata utilizzata una reazione polimerasica a catena (PCR) condotta secondo il seguente protocollo:

	<b>Tipo e Concentrazione</b>	<b>Quantità</b>
<b>DNA</b>	Direttamente da colonia	
<b>Primer plus</b>	PET PCR plus (25 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
<b>Primer minus</b>	PET PCR minus (25 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
<b>DNA polimerasi</b>	Go Taq polimerasi	0,25 $\mu$ l
<b>Buffer</b>	Buffer Go Taq Green (5 x)	5 $\mu$ l
<b>dNTP</b>	10 mM	0,75 $\mu$ l
<b>Acqua DNAsi free</b>		Vf 25 $\mu$ l

Di seguito invece sono riportate le temperature di denaturazione, appaiamento, allungamento, e termine di ciascuno dei 25 cicli ed i relativi tempi di incubazione espressi in minuti.



### Selezione dei cloni positivi contenenti l'inserto nel corretto orientamento

La reazione di PCR ha permesso di stabilire quali cloni contenessero l'inserto, ma trattandosi di un clonaggio di tipo non direzionato da quest'analisi non sarebbe stato possibile distinguere i cloni contenenti l'inserto nella direzione corretta. Quindi, i cloni BL21 codonPlus trasformati, risultati positivi in PCR, sono stati sottoposti ad una prova di espressione assumendo che quelli contenenti l'inserto al contrario non esprimessero un prodotto proteico o, in caso di espressione, quest'ultimo non fosse delle dimensioni attese.

Varie singole colonie sono state prelevate dalla piastra dei trasformanti ed inoculate separatamente in 5 ml di LB, supplementato con gli opportuni antibiotici (LB + antibiotici), ed incubate ON in agitazione a 37°C. Parte della coltura (100 µl) è stata inoculata in 10 ml di LB + antibiotici con successiva incubazione in agitazione a 37°C fino al raggiungimento di una densità ottica (OD) compresa tra 0,5 e 0,7 (circa 2 ore). Parte di tale coltura (1 ml) è stata prelevata per essere utilizzata come campione non indotto (NI), mentre alla restante brodocoltura è stato aggiunto isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) 1 mM, con successiva ulteriore incubazione a 37°C di entrambi i campioni. Dopo circa 2 ore, 500 µl della coltura indotta (I) e 500 µl di quella NI sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 5 minuti e, dopo eliminazione del surnatante, i due campioni sono stati risospesi in 30 µl di Tris-HCl 10 mM e 10 µl di SB 4x. I campioni sono stati fatti bollire in termo block a 100°C per 5-10 minuti e 20 µl di questi sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) al 15% a 25 mA. Dopo circa 1 ora di corsa il gel è stato immerso in una soluzione colorante di Coomassie Brilliant Blue in agitazione per almeno 30 minuti, poi sciacquato ed immerso in soluzione decolorante. La visualizzazione delle bande proteiche ha consentito di individuare la presenza della proteina con le dimensioni molecolari attese.

Da alcuni cloni positivi sono state preparate minipreparazioni plasmidiche (Kit *Qiagen* Plasmid Mini) ed i campioni sono stati inviati alla ditta Macrogen per il sequenziamento.

Composizione delle soluzioni utilizzate per i gel di poliacrilamide:

*Stacking gel buffer 4x*: 6 g tris in 100 ml di acqua distillata (dH<sub>2</sub>O), pH 8,8

*Tampone elettrodoico*: 3 g di tris in 1 litro di dH<sub>2</sub>O, 1,8 g di glicina e 10 ml di SDS 10%

*Running gel buffer 4x*: 36,3 g di tris in 200 ml di dH<sub>2</sub>O, pH 8,8

*Acrilammide 30%*: 58,4 g di acrilammide e 1,6 g di bisacrilammide in 200 ml di dH<sub>2</sub>O

*Soluzione colorante:* 0,5 g di comassie brilliant blue, 14 ml di acido acetico e 100 ml di etanolo in 200 ml di dH<sub>2</sub>O

*Soluzione decolorante:* 20 ml di acido acetico e 40 ml di etanolo al 96% in 200 ml di dH<sub>2</sub>O

*SB 4x:* 2 ml di stacking gel buffer, 4 ml di SDS 10%, 400 µl di β-mercaptoetanol, 800 µl di blu di bromofenolo 0,5% e 2,8 ml di glicerolo al 100% in 10 ml di dH<sub>2</sub>O.

### **Prova di solubilità**

Per controllare la localizzazione della proteina eterologa espressa all'interno delle cellule batteriche, è stata condotta una prova di solubilità.

La coltura indotta (vedi protocollo induzione) è stata centrifugata a 3500 rpm per 15 minuti (opzionale: fare un lavaggio con 1 ml di Tris-HCl 10 mM a pH 8,0) e, dopo eliminazione del surnatante, il pellet è stato risospeso in 1 ml di buffer di lisi (Tris HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M, PMSF 0,5 mM da vortexare bene fino alla limpidezza, Benzamidina 0,5 mM, Leupeptina 1 µM, Pepstatina 1 µM). La soluzione è stata quindi incubata per 10 minuti a RT e successivamente 20 minuti in ghiaccio. Al campione è stato aggiunto Fast Break con successiva sonicazione con 15 impulsi da potenza 65 con 3 minuti di pausa in ghiaccio. Il campione è stato poi centrifugato per 15 minuti a 4°C a 14.000 rpm ed il surnatante è stato prelevato ed introdotto in una nuova Eppendorf. Il pellet è stato quindi risospeso in 1 ml di Tris-HCl 10 mM a pH 8. Dai 4 campioni, corrispondenti 2 al pellet (I e NI) e 2 al surnatante (I e NI), sono stati prelevati 30 µl ai quali sono stati aggiunti 10 µl di SB 4x. I campioni sono stati fatti bollire in termoblock a 100°C per 5-10 minuti e 20 µl di questi sono stati sottoposti a (PAGE) (25 mA). Dopo circa 1 ora di corsa il gel è stato posto in agitazione nella soluzione colorante per almeno 30 minuti, poi sciacquato e immerso in soluzione decolorante.

### **Espressione e recupero della proteina IgM CH<sub>4</sub> dai corpi di inclusione**

Una volta verificata la presenza della proteina IgM CH<sub>4</sub> nella frazione sedimentabile della coltura batterica indotta, si è proceduto con il recupero del prodotto proteico dai corpi di inclusione.

#### ➤ Fase di frazionamento

Il pellet ottenuto in seguito alla sonicazione della coltura è stato risospeso in 25 ml di Soluzione 1 (2M Urea, 20 mM Tris HCl pH 8, 0,5 M NaCl, 2% Triton X-100) ed è stato nuovamente sonicato per 20 minuti con 3 secondi di impulso e 6 di pausa. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 10.000 rpm a 4°C, il pellet è stato lavato con 25 ml di Soluzione 1 e sottoposto a sonicazione con lo stesso procedimento per 5 minuti. I campioni sono stati quindi centrifugati 10 minuti a 10.000 rpm a 4°C ed il surnatante è stato eliminato.

➤ Fase di rinaturazione

I corpi di inclusione così ottenuti sono stati risospesi in 5 ml di Soluzione 2 (20 mM Tris HCl pH 8, 0,5 M NaCl, 6 M Guanidinio Idrocloruro, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoetanololo pH 8), mantenuti in agitazione per 1 ora e quindi centrifugati per 15 minuti a 10.000 rpm a 4°C, con recupero finale del surnatante.



## *Risultati*

## Selezione e sintesi di peptidi codificati da sequenze appartenenti a differenti loci della famiglia genica delle immunoglobuline

Sulla base delle precedenti esperienze, la parte iniziale della ricerca è consistita nella selezione di proteine e peptidi appartenenti ai diversi *loci* genici ( $\lambda$ ,  $k$  e  $H$ ) della famiglia delle Ig umane, utilizzando la banca dati PIR "Protein information resource". La ricerca, condotta tenendo conto delle proprietà chimico-fisiche e della conservazione anche in organismi diversi dall'uomo, ha consentito l'identificazione di 9 sequenze amminoacidiche, 4 corte (meno di 20 amminoacidi) e 6 lunghe (più di 20 amminoacidi).

### Sequenze corte

La selezione dei peptidi, riportati in **Tabella 1**, è stata effettuata, grazie all'utilizzo dei programmi bioinformatici Compute pI/MW e Protparam, in base ad alcune caratteristiche chimico-fisiche che precedentemente avevano permesso l'individuazione di altri peptidi di derivazione anticorpale di cui sono state riscontrate proprietà immunomodulanti ed immunoterapeutiche (**Polonelli 2012**).

**Tabella 1.** Caratteristiche dei peptidi selezionati.

Caratteristiche dei peptidi selezionati							
Peptide	Locus	n° aa	M.M.	Sequenza	Pattern <sup>a</sup>	pI	Carica
<b>L12P</b>	Lambda	12	1.494,7	LCLRNWDQGHPR	000+++*0-+0	8,26	2+
<b>W12K</b>	Kappa	12	1.393,7	WTFGQGTKVEIK	0*00*0*+0-0+	8,59	2+
<b>G10S</b>	Heavy	10	983,2	GYCSGGSCYS	00**00**0*	5,51	0
<b>L18R</b>	Heavy	18	2.068,1	LLVLRSLGPWHPGHCLLR	0000+*0000+00+*00+	10,35	4+

<sup>a</sup> o, idrofobico; \*, polare; + e -, residui carichi positivamente e negativamente

M.M., massa molecolare (Dalton); pI, punto isoelettrico; Carica, carica netta a pH fisiologico

Tali caratteristiche sono di fondamentale importanza poiché è stato riconosciuto che l'interazione, sia ionica che idrofobica/idrofilica, di piccoli peptidi con la parete cellulare o la membrana plasmatica di microrganismi o con virus sembra essere un presupposto indispensabile per eventuali effetti antimicrobici e/o antivirali. Un esempio è KP, caratterizzato da un punto isoelettrico pari a 8,23, carico quindi positivamente a pH fisiologico, e da una perfetta alternanza di residui amminoacidici idrofobici ed idrofilici nella sua sequenza.

## Sequenze lunghe

Al contrario, per la produzione delle 6 proteine o sequenze lunghe, denominate IGLC1, IGKC, V<sub>5-1</sub>, IGKV<sub>4-1</sub>, IGHV<sub>1-2</sub> e IgM-CH<sub>4</sub>, è stata scelta l'espressione ricombinante, visti i costi e le problematiche che avrebbe comportato la sintesi chimica.

Le proteine sono state selezionate, mediante l'utilizzo del programma BLAST, anche in base alla conservazione della loro sequenza in organismi diversi dall'uomo, poiché questa caratteristica potrebbe rispecchiare una loro rilevanza a livello evolutivo, che potrebbe averne determinato la conservazione nei vari processi evolutivi, perché indispensabili da un punto di vista funzionale. Per queste sequenze, inoltre, è stata anche verificata la presenza di siti di taglio (PeptideCutter di ExPASy) da parte di proteasi, come tripsina e chimotripsina, fisiologicamente responsabili della degradazione delle Ig, la cui azione era già stata suggerita essere alla base della potenziale produzione di peptidi Fc ad azione immunomodulante ed immunoterapeutica (**Polonelli 2012**).

Le sequenze geniche e proteiche prescelte sono riportate di seguito:

### ➤ IGLC1 locus lambda

CAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAACAAGGCCACAC  
TAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAA  
GGCGGGAGTGGAGACCACCAAACCCCTCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTG  
ACGCCCCGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGA  
CAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

#### *Proteina codificata:*

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSL  
TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

### ➤ IGKC locus kappa

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG  
TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG  
TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG  
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA  
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

#### *Proteina codificata:*

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLL  
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC



➤ V5-1 locus lambda

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCCCGCTGTCATCTGCCTTGCTGGGAGCCTCGATCAAGCTCACCTGCACCCTAA  
 GCAGTGAGCACAGCACCTACCCATCGAATGGTATCAACAGAGACCAGGGAGGTCCCCCAGTATATAATGAA  
 GGTAAAGAGTGATGGCAGCCACAGCAAGGGGGACGGGATCCCCGATCGCTTCATGGGCTCCAGTTCTGGGGCT  
 GACCGCTACCTCACCTTCTCCAACCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGAGTATCACTGTGGAGAGAGCCACACGA  
 TTGATGGCCAAGTCGGTTGA

*Proteina codificata:*

LPVLTQPPSASALLGASIKLTCTLSSEHSTYTIIEWYQQRPRSPQYIMKVKSDGSHSKGDGIPDRFMGSSSGA  
 DRYLTFNLSQSDDEAEYHCGESHTIDGQVG

➤ IGKV<sub>4-1</sub> locus kappa

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGT  
 CCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCC  
 TCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCT  
 GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATT  
 ATAGTACTCCT

*Proteina codificata:*

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS  
 GTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTP

➤ IGHV<sub>1-2</sub> locus heavy

ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGC  
 AGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCAC  
 CGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCCTAAC  
 AGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTACCAGTACCAGGGACACGTCCATCAGCACAG  
 CCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGTCGTGTATTACTGTGCGAGA

*Proteina codificata:*

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFYGYMHWRQAPGQGLEWMGRINPN  
 SGGTNYAQKRFQGRVTSTRDTSISTAYMELSLRSDDTVVYYCAR

➤ IGM CH<sub>4</sub> locus heavy

GTGGCCCTGCACAGGCCCGATGTCTACTTGCTGCCACCAGCCGGGAGCAGCTGAACCTGCGGGAGTCGGCCA  
 CCATCACGTGCCTGGTGACGGGCTTCTCTCCCGCGACGTCTTCGTGCAGTGGATGCAGAGGGGGCAGCCCTT  
 GTCCCCGGAGAAGTATGTGACCAGCGCCCCAATGCCTGAGCCCCAGGCCCGGTACTTCGCCACAGC  
 ATCCTGACCGTGTCCGAAGAGGAATGGAACACGGGGGAGACCTACACCTGCGTGGCCCATGAGGCCCTGCCCA  
 ACAGGGTCACCGAGAGGACCGTGGACAAGTCCACCGGTAAACCCACCCTGTACAACGTGTCCCTGGTCATGTC  
 CGACACAGCTGGCACCTGCTAC

*Proteina codificata:*

VALHRPDVYLLPPAREQLNLRRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHS  
 ILTVSEEEWNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

## Valutazione dell'attività microbica *in vitro* dei peptidi selezionati

L'attività microbica *in vitro* dei peptidi selezionati è stata valutata mediante saggio di determinazione di unità formanti colonia (UFC) inizialmente sul ceppo fungino di riferimento *C. albicans* SC5314. Ogni saggio, condotto in triplo a scopo statistico, è stato eseguito, inizialmente, incubando le cellule del ceppo in esame in assenza ed in presenza dei peptidi di interesse alla concentrazione di 100 µg/ml. Per i peptidi la cui attività a tale concentrazione è risultata essere superiore all'85% nei confronti di *C. albicans* SC5314 sono state saggiate concentrazioni via via decrescenti e si è quindi proceduto con la determinazione del valore di EC<sub>50</sub>, ovvero la concentrazione di peptide capace di uccidere il 50% delle cellule inoculate. I risultati ottenuti in termini di UFC sono stati convertiti nelle rispettive percentuali di inibizione calcolate rispetto al controllo.

### Attività nei confronti di lieviti

Come mostrato in **Tabella 2**, tra i peptidi selezionati soltanto L12P e L18R hanno mostrato un'attività fungicida di rilievo nei confronti del ceppo di *C. albicans* SC5314, mentre il peptide W12K è risultato essere meno attivo mostrando una percentuale di inibizione di circa il 60%. Il peptide G10S, invece, non ha mostrato alcuna attività nelle condizioni di saggio adottate.

**Tabella 2.** Attività fungicida dei peptidi L12P, W12K, G10S e L18R alla concentrazione di 100 µg/ml nei confronti del ceppo fungino di riferimento *C. albicans* SC5314, riportata in termini di percentuale di inibizione della crescita.

Attività nei confronti di <i>C. albicans</i> SC5314	
Peptide	% di inibizione
<b>L12P</b>	100,00
<b>W12K</b>	58,31
<b>G10S</b>	0,00
<b>L18R</b>	100,00

I peptidi L12P ed L18R, risultati più attivi, sono stati quindi saggiati nei confronti di altri ceppi fungini appartenenti allo stesso genere, ovvero *C. albicans* SA40, *C. albicans* CA6, *C. albicans* MGUM CASR4, *C. albicans* AIDS68 e *C. glabrata* OMNI32, comprendenti anche ceppi resistenti

ad alcuni dei farmaci antifungini attualmente disponibili. L'analisi di questi nuovi ceppi di *Candida* è stata condotta inizialmente saggiando i peptidi più attivi alla concentrazione di 5 µg/ml, concentrazione precedentemente dimostratasi in grado di uccidere il 100% delle cellule di *C. albicans* SC5314 (minima concentrazione fungicida). L'attività fungicida dei peptidi è stata valutata anche nei confronti dei ceppi di *M. furfur* e *C. neoformans* 6995.

Come si può notare dai dati riportati in **Tabella 3**, i peptidi mostrano un'attività molto simile nei confronti dei vari ceppi di *Candida*, ma anche nei confronti dei ceppi di *M. furfur* e *C. neoformans*.

**Tabella 3.** Attività fungicida *in vitro* dei peptidi L12P e L18R nei confronti dei ceppi di *C. albicans*, *C. glabrata*, *M. furfur* e *C. neoformans*.

Ceppo fungino	Attività fungicida			
	L12P		L18R	
	%*	EC50**	%*	EC50**
<i>C. albicans</i> SC5314	100	4,893 (4,450 – 5,382)	100	4,431 (4,371 – 5,493)
<i>C. albicans</i> CA-6	100	5,556 (5,221 – 5,912)	100	2,939 (2,916 – 2,963)
<i>C. albicans</i> SA40	100	5,372 (5,306 – 5,439)	100	3,149 (2,711 – 3,658)
<i>C. albicans</i> AIDS68	100	5,012 (4,679 – 5,370)	100	4,485 (4,347 – 4,626)
<i>C. albicans</i> UM4	100	6,271 (5,342 – 7,359)	100	4,542 (4,138 – 4,985)
<i>C. glabrata</i> OMNI32	100	5,465 (5,200 – 5,744)	100	3,556 (3,392 – 3,730)
<i>M. furfur</i> 101	100	6,579 (5,742 – 7,540)	100	5,266 (4,726 – 5,86)
<i>C. neoformans</i> 6995	100	3,639 (3,533 – 3,748)	100	1,878 (1,803 – 1,956)

\*%, percentuale di inibizione dei peptidi a 100 µg/ml rispetto al controllo acqua.

\*\*EC50, concentrazione efficace 50; (95% intervallo di confidenza) [moli/litro] × 10<sup>-7</sup>.

Nonostante i peptidi W12K e G10S fossero risultati molto meno attivi verso il ceppo di riferimento sono stati comunque saggiati nei confronti degli altri ceppi fungini. Come si evince dai risultati mostrati in **Tabella 4**, il peptide G10S mostra una scarsa attività fungicida nei confronti di tutti i ceppi analizzati, mentre W12K risulta attivo soltanto verso *C. neoformans* 6995 e *C. albicans* SA40. Una discreta attività fungicida è stata osservata anche nei confronti di *C. albicans* AIDS68 di cui però non è stato calcolato il valore di EC50 in quanto la percentuale di inibizione è risultata inferiore all'85%, alla concentrazione di peptide pari a 100 µg/ml.

**Tabella 4.** Attività fungicida *in vitro* dei peptidi W12K e G10S nei confronti dei ceppi di *C. albicans*, *C. glabrata*, *M. furfur* e *C. neoformans*.

Attività fungicida				
Ceppo fungino	W12K		G10S	
	%*	EC50**	%*	EC50**
<i>C. albicans</i> SC5314	58,31	n.d.	0	n.d.
<i>C. albicans</i> CA-6	62,37	n.d.	12,86	n.d.
<i>C. albicans</i> SA40	89,00	3,53 (3,15 – 3,95)	13,78	n.d.
<i>C. albicans</i> AIDS68	82,93	n.d.	18,40	n.d.
<i>C. albicans</i> UM4	50,13	n.d.	24,70	n.d.
<i>C. glabrata</i> OMNI32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>M. furfur</i> 101	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>C. neoformans</i> 6995	100	1,291 (1,143 – 1,458)	66,61	n.d.

\*%, percentuale di inibizione dei peptidi a 100 µg/ml rispetto al controllo acqua

\*\*EC50, concentrazione efficace 50; (95% intervallo di confidenza) [moli/litro] × 10<sup>-5</sup>.

n.d., non calcolato.

#### Attività nei confronti di muffe

Nessuno dei 4 peptidi saggiati ha mostrato una significativa inibizione nei confronti dei ceppi di *R. oryzae* e *A. fumigatus*. In **Tabella 5** sono riportate le percentuali di inibizione rilevate in presenza dei peptidi alla concentrazione di 100 µg/ml.

**Tabella 5.** Percentuali di inibizione *in vitro* rilevate per i peptidi L12P, W12K, G10S e L18R, alla concentrazione di 100 µg/ml, nei confronti di *R. oryzae* e *A. fumigatus*.

Attività antimicotica				
Ceppi fungini	L12P	W12K	G10S	L18R
<i>R. oryzae</i>	28,33%	24,35%	21,72%	23,20%
<i>A. fumigatus</i> ATTC MYA-1163	3,50%	4,51%	3,57%	0,00%

### Attività nei confronti di batteri

I 4 peptidi sono stati quindi saggiati anche nei confronti di alcuni ceppi batterici di collezione: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *K. pneumoniae* ATCC 700603, e *P. aeruginosa* ATCC 25853.

Come riportato in **Tabella 6**, tali ceppi sono risultati tutti sensibili al peptide L18R, di cui è stato quindi calcolato il valore di EC50; analogamente, il peptide L12P ha mostrato un'attività battericida di rilievo nei confronti dei ceppi saggiati, eccetto che nei confronti di *S. aureus*, unico batterio gram positivo analizzato.

**Tabella 6.** Attività battericida *in vitro* dei peptidi L12P e L18R nei confronti dei ceppi di *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

Ceppi batterici	Attività battericida			
	L12P		L18R	
	%*	EC50**	%*	EC50**
<b><i>E. coli</i> ATCC 25922</b>	99,88	5,287 (4,961 – 5,635)	100	0,986 (0,939 – 1,035)
<b><i>S. aureus</i> ATCC 29213</b>	55,31	n.d.	98,78	3,381 (3,081 – 3,711)
<b><i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603</b>	85,80	711,2 (431,1 - 1173,1)	100	3,401 (3,224 – 3,588)
<b><i>P. aeruginosa</i> ATCC 25853</b>	100	10,98 (6,23 – 19,36)	100	0,788 (0,665 - 0,934)

\*%, percentuale di inibizione dei peptidi a 100 µg/ml rispetto al controllo acqua.

\*\*EC50, concentrazione efficace 50; (95% intervallo di confidenza) [moli/litro] × 10<sup>-7</sup>.

n.d., non calcolato.

In **Tabella 7** sono mostrati i valori di EC50 per i peptidi W12K e G10S nei confronti dei ceppi di *E. coli* e *P. aeruginosa*. Per il ceppo di *S. aureus* non è stato calcolato il valore di EC50, perchè alla concentrazione di 100 µg/ml W12K e G10S hanno mostrato una percentuale di inibizione della crescita batterica rispettivamente di 58,68% e 54,75%, mentre per *K. pneumoniae* il valore di EC50 è stato calcolato solo per il peptide G10S dimostratosi più attivo.

**Tabella 7.** Attività battericida *in vitro* dei peptidi W12K e G10S nei confronti dei ceppi di *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

Ceppi batterici	Attività battericida			
	W12K		G10S	
	%*	EC50**	%*	EC50**
<i>E. coli</i> ATCC 25922	97,37	0,740 (0,675 – 0,811)	96,73	2,396 (2,037 – 2,829)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	58,68	n.d.	54,75	n.d.
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	79,73	n.d.	83,82	0,788 (0,665 - 0,934)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25853	96,98	1,67 (1,466 – 1,903)	86,52	2,512 (2,26 – 2,792)

\*% percentuale di inibizione dei peptidi a 100 µg/ml rispetto al controllo acqua.

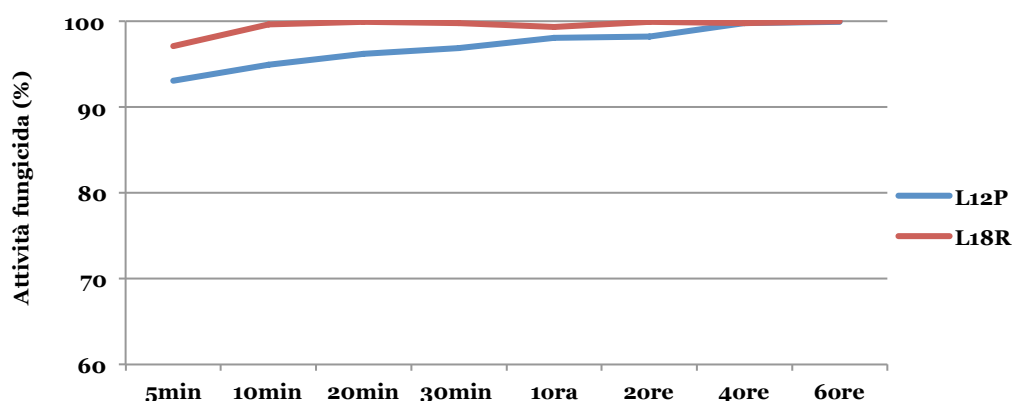
\*\*EC50, concentrazione efficace 50; (95% intervallo di confidenza) [moli/litro] × 10<sup>-5</sup>.

n.d., non calcolato.

## Saggi di time killing dei peptidi L12P e L18R nei confronti di cellule di *Candida albicans*

L'attività fungicida dei peptidi L12P e L18R è stata monitorata nel tempo nei confronti del ceppo fungino *C. albicans* SC5314. L'analisi è stata condotta mediante saggio di UFC, incubando le cellule fungine in presenza dei peptidi alla concentrazione di 5 µg/ml per diversi intervalli di tempo. I risultati ottenuti in termini di UFC sono stati convertiti nelle rispettive percentuali di inibizione calcolate rispetto al controllo.

Come mostrato in **Figura 15**, quasi tutte le cellule risultavano morte già dopo 5 minuti di incubazione in presenza di entrambi i peptidi.



**Figura 15.** Attività fungicida nel tempo dei peptidi L12P e L18R nei confronti di *C. albicans*.

## Valutazione dell'attività *in vitro* dei peptidi selezionati nei confronti di cellule di mammifero

I peptidi L12P, W12K, G10S e L18R sono stati saggiati per valutare loro eventuali attività emolica, citotossica e genotossica, nei confronti di emazie umane con un saggio fluorimetrico, cellule di rene di scimmia con un saggio colorimetrico e linfociti umani con un Comet test, rispettivamente.

### Attività emolitica

L'attività emolitica dei 4 peptidi analizzati è stata valutata nei confronti di globuli rossi umani appena raccolti, utilizzando concentrazioni di peptide pari a 50, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$ , largamente superiori rispetto a quelle dimostrate microbiologicamente attive. Dopo incubazione in agitazione per 30 minuti e 2 ore, l'emoglobina rilasciata, e quindi il grado di emolisi, sono stati valutati mediante lettura spettrofotometrica del surnatante, rispetto ai controlli negativo (emazie trattate con PBS, assenza di emolisi) e positivo (emazie trattate con Triton X-100, 100% di emolisi).

Come mostrato in **Tabella 8**, la percentuale di globuli rossi lisati (% di emolisi) è risultata inferiore a 1% in presenza di tutti e 4 i peptidi, sia dopo 30 minuti che dopo 2 ore di incubazione, eccetto per il peptide L18R che ha determinato percentuali di emolisi più elevate, fino ad un massimo di circa il 10% alla concentrazione più elevata dopo 120 minuti.

**Tabella 8.** Valutazione dell'attività emolitica *in vitro* dei peptidi selezionati.

Saggio emolitico (% di emolisi)								
Peptidi	50 $\mu\text{M}$		100 $\mu\text{M}$		250 $\mu\text{M}$		500 $\mu\text{M}$	
	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min
<b>L12P</b>	0,32	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>W12K</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,16	0,00
<b>G10S</b>	0,00	0,59	0,00	0,00	0,10	0,51	0,53	0,98
<b>L18R</b>	0,00	4,40	0,00	5,80	0,00	7,54	0,20	9,66

I valori sono espressi in una scala percentuale in cui lo 0% rappresenta una totale assenza di emolisi corrispondente al trattamento con solo PBS, mentre il 100% rappresenta emolisi completa (Triton X-100).

### Attività citotossica

L'eventuale attività citotossica dei peptidi è stata valutata mediante un saggio fluorimetrico con resazurina, incubando per 24 ore  $5 \times 10^4$  cellule LLC-MK2 per pozzetto in piastre microtiter con diluizioni seriali dei peptidi. La rilevazione della vitalità cellulare è stata effettuata con resazurina, molecola che, se metabolizzata dalle cellule, si trasforma nel componente fluorescente resorufina;

sulla base dell'intensità di fluorescenza rilevata per ogni pozzetto è stato così possibile rilevare la quantità di cellule vitali.

La vitalità cellulare è stata espressa come rapporto percentuale T/C, in cui T rappresenta la media dell'assorbanza delle cellule trattate con i peptidi e C la media dell'assorbanza dei controlli. Tutti i peptidi, incubati insieme alle cellule alla concentrazione di 50, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$  per 24 ore, non hanno mostrato alcun effetto citotossico significativo, in quanto la vitalità cellulare, rilevata dopo l'aggiunta di resazurina, risultava compresa tra l'84 ed il 100% sia a 30 che a 60 minuti (**Tabella 9**).

**Tabella 9.** Valutazione della citotossicità *in vitro* dei peptidi selezionati.

Saggio di vitalità cellulare (% di cellule vitali)								
Peptidi	50 $\mu\text{M}$		100 $\mu\text{M}$		250 $\mu\text{M}$		500 $\mu\text{M}$	
	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
<b>L12P</b>	98,73	92,12	97,72	90,10	100,00	93,30	100	94,15
<b>W12K</b>	99,59	98,34	98,15	96,11	100,21	101,44	102,29	102,90
<b>G10S</b>	100,00	97,54	100,00	96,08	97,58	95,32	99,71	96,05
<b>L18R</b>	99,50	97,04	100,00	100,57	90,55	97,62	84,26	88,75

La vitalità cellulare è espressa come rapporto percentuale T/C, dove T rappresenta la media dell'assorbanza delle cellule trattate con i peptidi e C la media dell'assorbanza dei controlli. In questo caso il valore 100% rappresenta il 100% di cellule vitali, mentre lo 0% la totale lisi cellulare.

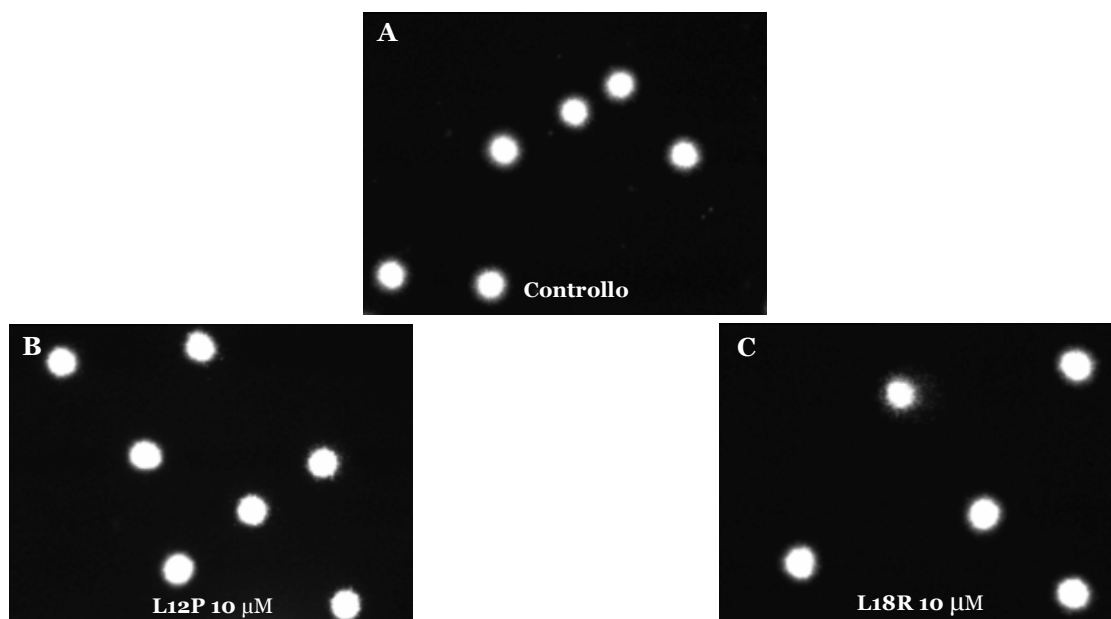
### Attività genotossica

La capacità dei peptidi L12P e L18R di causare danni al DNA è stata valutata mediante il saggio della cometa o Comet test utilizzando PBMC umani di donatori in giovane età. I PBMC sono stati incubati con i peptidi alla concentrazione di 5 e 10  $\mu\text{M}$ , valori superiori alla minima concentrazione fungicida (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Le cellule trattate sono state stratificate su vetrino con agar a bassa temperatura di fusione e sottoposte ad elettroforesi del DNA con un buffer a pH superiore a 13, che permette la rilevazione di tutte le eventuali rotture sia al singolo che al doppio filamento sotto forma di comet tail intensity o lunghezza della coda della cometa.

Le cellule visualizzate su vetrino, ormai private dalla soluzione di lisi di ogni componente cellulare eccetto che del loro genoma, possono mostrare una struttura più o meno tondeggianti e definita che rispecchia lo stato del loro DNA. Se la cellula, infatti, in seguito al trattamento con i peptidi di interesse, avesse subito un danno genotossico mostrerebbe una struttura centrale poco compatta da cui dipartirebbero a raggiera tanti frammenti di diverse dimensioni che costituiscono segmenti più o meno grandi di DNA staccatisi dalla doppia elica in corrispondenza di una anomalia, mostrando quindi la forma classica di una cometa. La presenza di cellule tonde e compatte nei preparati



trattati con i peptidi, mostrati in **Figura 16** B e C, rispetto ai controlli (A), è indice di un genoma integro e, quindi, di assenza di genotossicità.



**Figura 16.** Cellule mononucleate del sangue sottoposte a test della cometa. Le cellule sono state accuratamente isolate da sangue umano, contate ed incubate ( $1 \times 10^6$  cellule) per 2 ore con i peptidi L12P e L18R alla concentrazione  $10 \mu\text{M}$ . Le cellule trattate sono state quindi stratificate su vetrino e sottoposte ad elettroforesi in tampone elettroforetico a pH 13; i vetrini sono stati successivamente analizzati con microscopio a fluorescenza. In **A** è mostrato il controllo (cellule non trattate), mentre in **B** e **C** sono mostrate le cellule dopo incubazione con i peptidi.

Dall'analisi è emerso che i peptidi non manifestano particolari effetti sul genoma come si può osservare dai risultati riportati in **Tabella 10**.

**Tabella 10.** Risultato dello score visivo relativo a cellule mononucleate del sangue incubate per 2 ore con i peptidi di interesse.

Risultato dello score visivo*		
Concentrazioni	L12P	L18R
0 $\mu\text{M}$	104 $\pm$ 2,83	104 $\pm$ 2,83
5 $\mu\text{M}$	109 $\pm$ 4,24	106 $\pm$ 1,00
10 $\mu\text{M}$	103 $\pm$ 1,41	103 $\pm$ 1,41

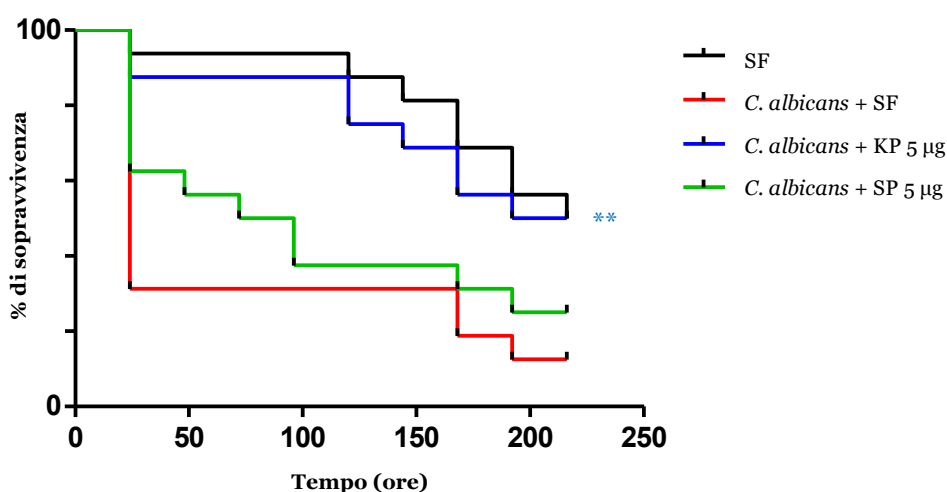
\*Score visivo =  $n^\circ$  cellule di classe 0 +  $2 \times$ ( $n^\circ$  cellule di classe 1) +  $3 \times$ ( $n^\circ$  cellule di classe 2) +  $4 \times$ ( $n^\circ$  cellule di classe 3) +  $5 \times$ ( $n^\circ$  cellule di classe 4). L'attribuzione di ciascuna cometa osservata a una classe di appartenenza (da 0 a 4) dipende dalla lunghezza della coda.

## Valutazione dell'attività terapeutica dei peptidi L12P ed L18R in un modello di candidosi sistemica sperimentale

L'attività terapeutica dei peptidi L12P, W12K, G10S e L18R è stata valutata preliminarmente utilizzando larve di *G. mellonella*.

Prima di procedere con i peptidi d'interesse, questo nuovo modello di infezione sistemica sperimentale è stato preliminarmente saggiato, utilizzando larve infettate con *C. albicans* SC5314 e trattate con il peptide killer KP, utilizzando come controllo negativo il peptide scramble SP (Polonelli 2003). Tale sistema modello, infatti, richiedeva che venissero opportunamente verificati e selezionati alcuni parametri, quali, ad esempio, la quantità di cellule di *C. albicans* SC5314 da inoculare, la concentrazione di peptide da utilizzare nel trattamento, i tempi di incubazione, il peso delle larve e le modalità di infezione.

Dopo una serie di esperimenti preliminari, è stato adottato il seguente protocollo sperimentale. Ciascuna larva è stata infettata con  $5 \times 10^5$  cellule di *C. albicans* SC5314, successivamente trattata con 5 o 7,5  $\mu\text{g}$  di KP o SP e monitorata per i 9 giorni successivi. Le curve di sopravvivenza sono state ottenute con il programma GraphPad Prism ed il confronto tra le curve per i diversi gruppi è stato effettuato con il test Mantel-Cox Logrank; i risultati sono mostrati in **Figura 17**.

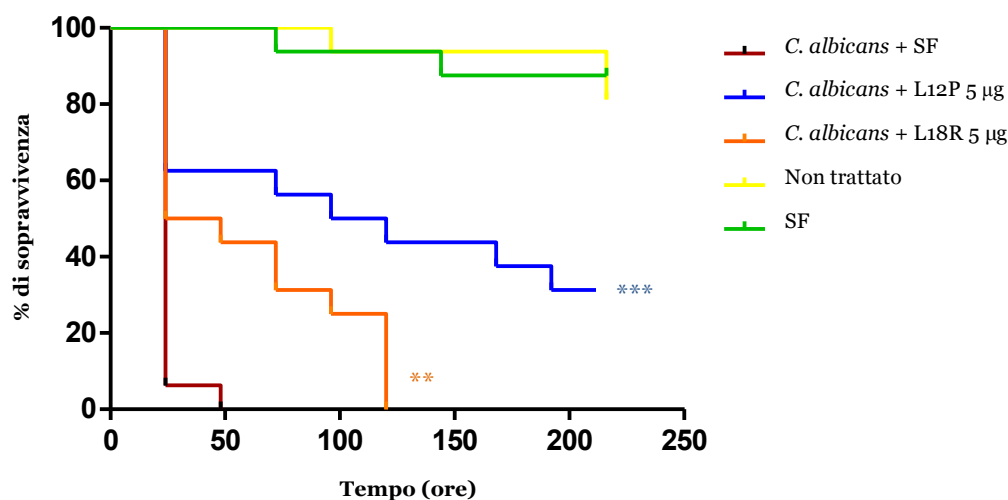


**Figura 17.** Percentuale di sopravvivenza delle larve di *G. mellonella* infettate con  $5 \times 10^5$  cellule di *C. albicans* SC5314 e trattate con KP. La sopravvivenza delle larve infettate e trattate con 5  $\mu\text{g}$  di KP dopo 1 ora dall'infezione è stata monitorata per 9 giorni. Gruppi di larve trattate con soluzione fisiologica (SF) o con 5  $\mu\text{g}$  del peptide irrilevante SP sono stati utilizzati come controlli. Un ulteriore gruppo di controllo non infettato e trattato con SF è stato incluso nell'analisi (SF: 10  $\mu\text{l}$  di SF).

Le differenze rilevate per le curve di sopravvivenza sono risultate significative (\*\*\*) tra il gruppo di larve infettate trattate con KP, o non infettate e non trattate (SF), rispetto a quelle infettate trattate con SF ( $P < 0,001$ ) o SP ( $P < 0,05$ ).

Successivamente, utilizzando lo schema sperimentale messo a punto, è stata valutata l'eventuale attività terapeutica dei peptidi L12P e L18R, peptidi risultati più attivi *in vitro*. Le larve sono state prima infettate con  $5 \times 10^5$  cellule del ceppo *C. albicans* SC5314 e, successivamente, trattate con i peptidi L12P e L18R alla concentrazione di 5  $\mu\text{g/ml}$ . Le larve sono state monitorate per 9 giorni, al termine dei quali è stata calcolata la significatività del test mediante il programma GraphPad Prism ed il test Mantel-Cox Logrank.

Come atteso, il confronto tra i gruppi di larve inoculate con SF e quelle infettate con *C. albicans* è risultato significativo. Inoltre, confrontando la sopravvivenza delle larve infettate con *C. albicans* con quella delle larve infettate e trattate con i peptidi d'interesse è stato possibile riscontrare differenze statisticamente significative sia per il peptide L18R (\*\*) sia per L12P (\*\*\*), dimostrando l'attività terapeutica dei due peptidi (**Figura 18**). Come atteso, è stata, inoltre, osservata la morte di tutte le larve infettate e non trattate (controllo infezione) nei primi 3 giorni dopo l'inoculo.



**Figura 18.** Percentuale di sopravvivenza delle larve di *G. mellonella* monitorate per 9 giorni. Gruppi di larve ( $n=16$ ) inoculate con  $5 \times 10^5$  cellule di *C. albicans* SC5314 o con 10  $\mu\text{l}$  di SF sono stati utilizzati come controllo positivo e negativo. Il confronto delle curve di sopravvivenza tra i diversi gruppi è stato effettuato utilizzando il test Mantel-Cox Logrank e la differenza tra i gruppi rispetto ai controlli è risultata significativa sia per il peptide L12P (\*\*\*) che per L18R (\*\*) (\*\*\*) $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,02$ ). Un ulteriore gruppo di controllo non infettato e non trattato è stato incluso nell'analisi.

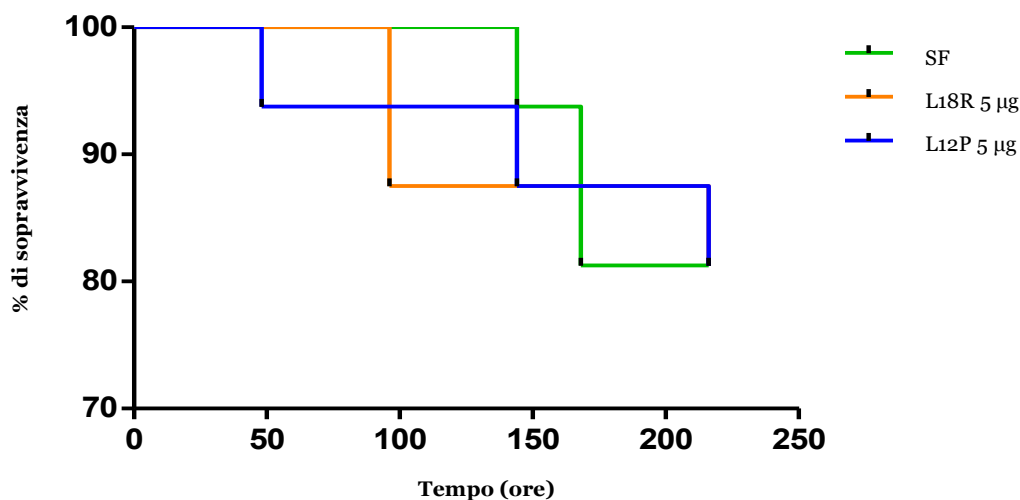
Come controlli sono stati utilizzati:

- ❖ un gruppo di larve non infettate e non trattate, per monitorare la mortalità fisiologica delle larve (non trattato);
- ❖ un gruppo di larve non infettate ed inoculate con SF per due volte per controllare l'eventuale mortalità dovuta all'iniezione (SF);
- ❖ un gruppo di larve infettate con *C. albicans* SC5314, non trattate con i peptidi ma con SF, utilizzato come controllo di infezione positivo (*C. albicans* + SF).

## Analisi della tossicità *in vivo* dei peptidi L12P e L18R

Parallelamente, è stata verificata la potenziale tossicità *in vivo* dei peptidi di interesse.

Il saggio è stato effettuato utilizzando larve di *G. mellonella* non infettate e trattate con i peptidi L12P e L18R alla concentrazione di 5 µg/ml. Al termine dei 9 giorni di osservazione, la significatività del test è stata calcolata con il programma GraphPad Prism confrontando le curve di sopravvivenza mediante test Mantel-Cox Logrank. Come si può osservare in **Figura 19**, i due peptidi non hanno mostrato alcuna tossicità significativa *in vivo*.

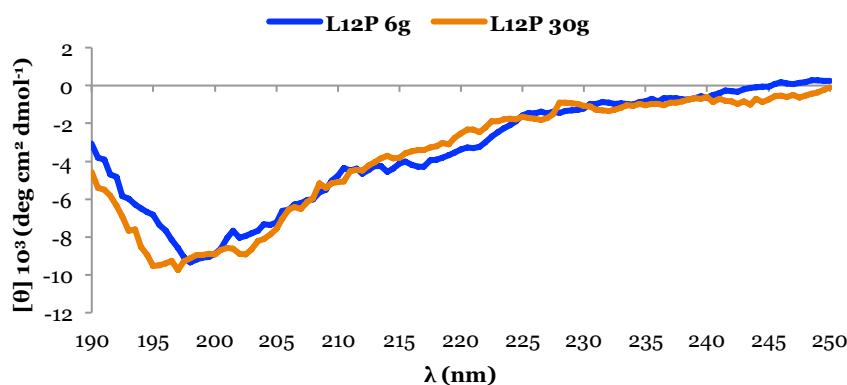


**Figura 19.** Percentuale di sopravvivenza delle larve di *G. mellonella* monitorate per 9 giorni. Gruppi di larve (n=16), non infettate, sono state inoculate con 5 µg di peptide L12P o L18R o con 10 µl di SF. Il confronto delle curve di sopravvivenza tra i diversi gruppi è stato effettuato mediante test Mantel-Cox Logrank; la differenza tra i gruppi è risultata non significativa.

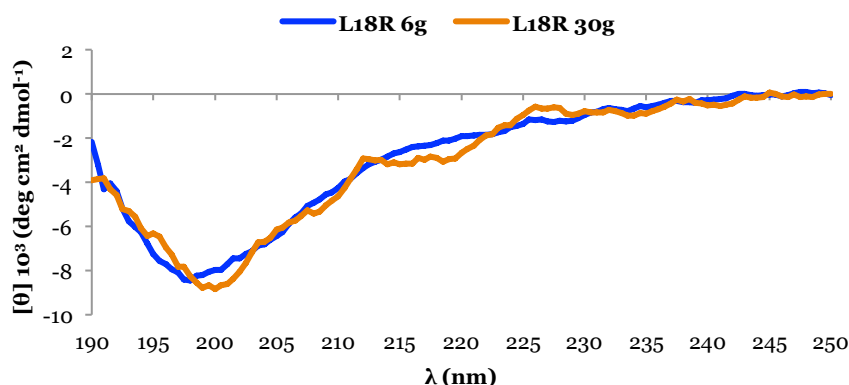
## Studi in dicroismo circolare dei peptidi L12P e L18R

Per acquisire maggiori informazioni sul rapporto struttura-funzione dei peptidi, e quindi sul loro meccanismo d'azione, sono stati condotti studi di dicroismo circolare (CD) con i peptidi L12P ed L18R, utilizzando differenti condizioni sperimentali. In particolare, sono stati registrati gli spettri nella regione del lontano UV (190-250 nm), dai quali è possibile rilevare la presenza di eventuali foglietti  $\beta$  o  $\alpha$  eliche. Gli spettri CD di soluzioni acquose dei peptidi alla concentrazione di 50  $\mu\text{M}$  sono stati acquisiti mediante lettura allo spettropolarimetro, e i grafici sono stati costruiti convertendo la misura di ellitticità  $\theta$  (mdegree) in ellitticità molare  $[\theta]$  ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ).

L'analisi ha evidenziato che i peptidi sciolti in acqua presentano inizialmente una struttura random coil, caratterizzata da un picco negativo a 200 nm; tale struttura viene conservata anche dopo 30 giorni dalla solubilizzazione, come si può notare dalla sovrapposizione della curva blu (peptide sciolto da 6 giorni) e arancione (peptide sciolto da 30 giorni) nelle **Figure 20 e 21**. Le soluzioni peptidiche sono state conservate a 4°C e l'analisi è stata condotta a RT.

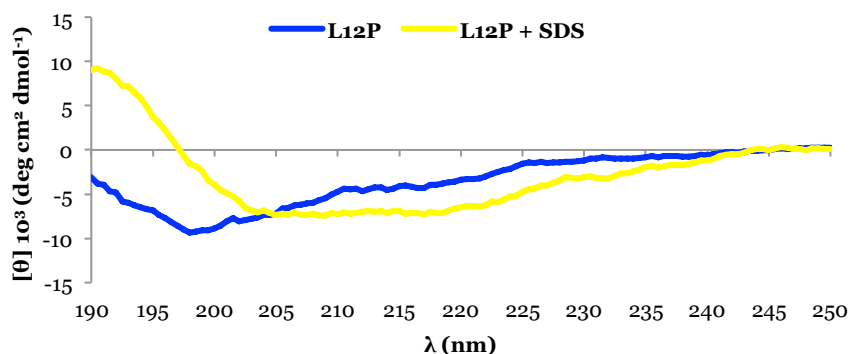


**Figura 20.** Spettri dicroici del peptide L12P acquisiti a 20°C. Sono stati registrati spettri di soluzioni acquose 50  $\mu\text{M}$  di L12P, mantenute a 4°C, dopo 6 e 30 giorni dalla solubilizzazione.



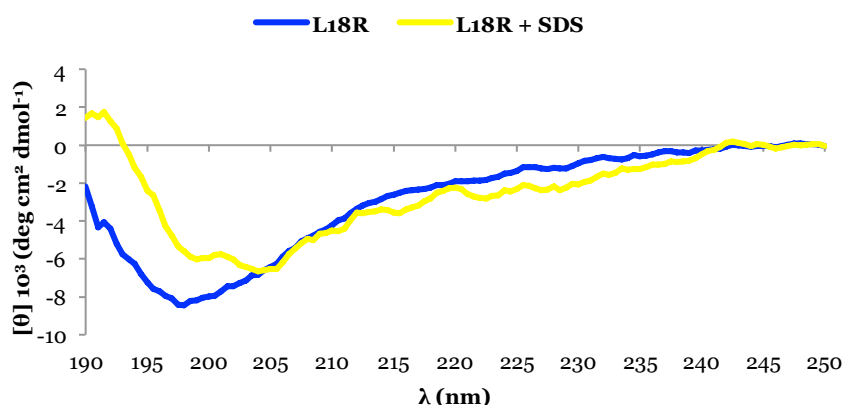
**Figura 21.** Spettri dicroici del peptide L18R acquisiti a 20°C. Sono stati registrati spettri di soluzioni acquose 50  $\mu\text{M}$  di L18R, mantenute a 4°C, dopo 6 e 30 giorni dalla solubilizzazione.

Il peptide L12P, che in acqua aveva mostrato un profilo dicroico caratteristico di una struttura random coil anche dopo 30 giorni di mantenimento a 4°C, in seguito ad aggiunta di SDS 100 mM, modifica leggermente lo spettro, presentando due picchi a circa 205 e 220 nm che, anche se non molto marcati, sono tipici di una struttura ad  $\alpha$  elica comune a molti peptidi antimicrobici naturali (Figura 22).



**Figura 22.** Spettri dicroici del peptide L12P acquisiti a 20°C. Sono stati registrati spettri di soluzioni acquose 50  $\mu$ M di L12P solubilizzate da 6 giorni e conservate a 4°C, con e senza l'aggiunta di SDS 100 mM.

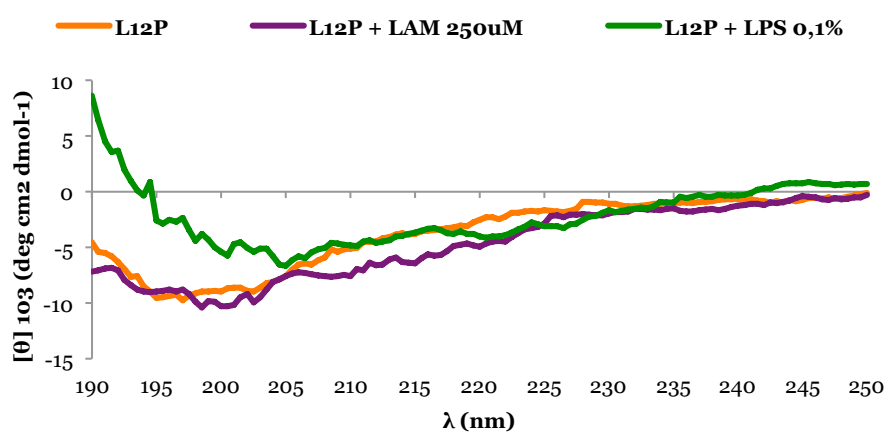
Un comportamento molto simile è stato osservato per il peptide L18R, avente anch'esso una struttura random coil dopo 30 giorni dallo scioglimento. Anche in questo caso in presenza di SDS si osservano due picchi, uno in corrispondenza di 200 nm e l'altro di 205 nm (curva gialla) (Figura 23).



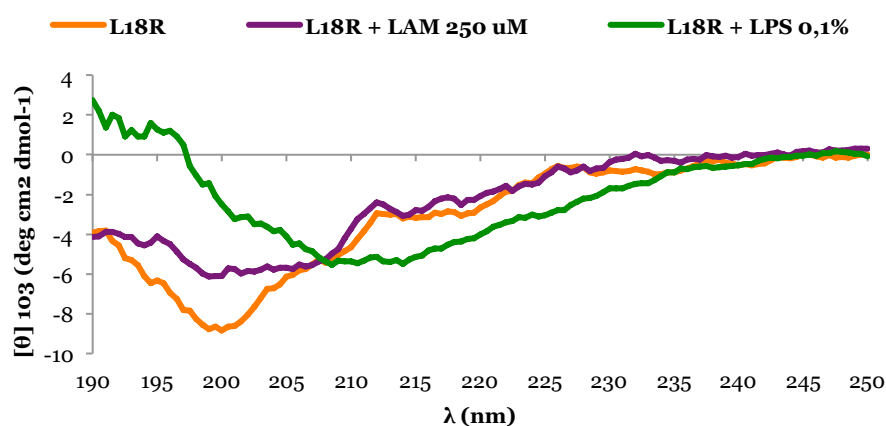
**Figura 23.** Spettri dicroici del peptide L18R acquisiti a 20°C. Sono stati registrati spettri di soluzioni acquose 50  $\mu$ M di L18R solubilizzate da 6 giorni e conservate a 4°C, con e senza l'aggiunta di SDS 100 mM.

Tale comportamento suggerisce che i peptidi subiscano un cambio conformazionale in presenza di SDS, un mimotopo dei fosfolipidi, e quindi, un analogo cambio conformazionale a contatto con la membrana cellulare di microrganismi.

Altri esperimenti hanno evidenziato che entrambi i peptidi cambiano conformazione in una struttura lievemente più organizzata in presenza di LPS 0,1%, suggerendo una possibile interazione con la parete cellulare di batteri Gram-negativi. Allo stesso modo, una leggera modifica nella struttura random coil dei peptidi è stata osservata in presenza di laminarina 250  $\mu\text{M}$ , mimotopo dei  $\beta$ -glucani presenti sulla superficie cellulare di *C. albicans* (Figure 24 e 25).



**Figura 24.** Spettri dicroici del peptide L12P acquisiti a 20°C. Sono stati registrati spettri di soluzioni acquose 50  $\mu\text{M}$  di L12P solubilizzate da 30 giorni e conservate a 4°C, senza e con l'aggiunta di LPS 0,1% e LAM 250  $\mu\text{M}$ .



**Figura 25.** Spettri dicroici del peptide L18R acquisiti a 20°C. Sono stati registrati spettri di soluzioni acquose 50  $\mu\text{M}$  di L18R solubilizzate da 30 giorni e conservate a 4°C, senza e con l'aggiunta di LPS 0,1% e LAM 250  $\mu\text{M}$ .

## **Studi di microscopia su cellule di *Candida albicans* trattate con i peptidi L12P e L18R**

### **Microscopia elettronica a trasmissione**

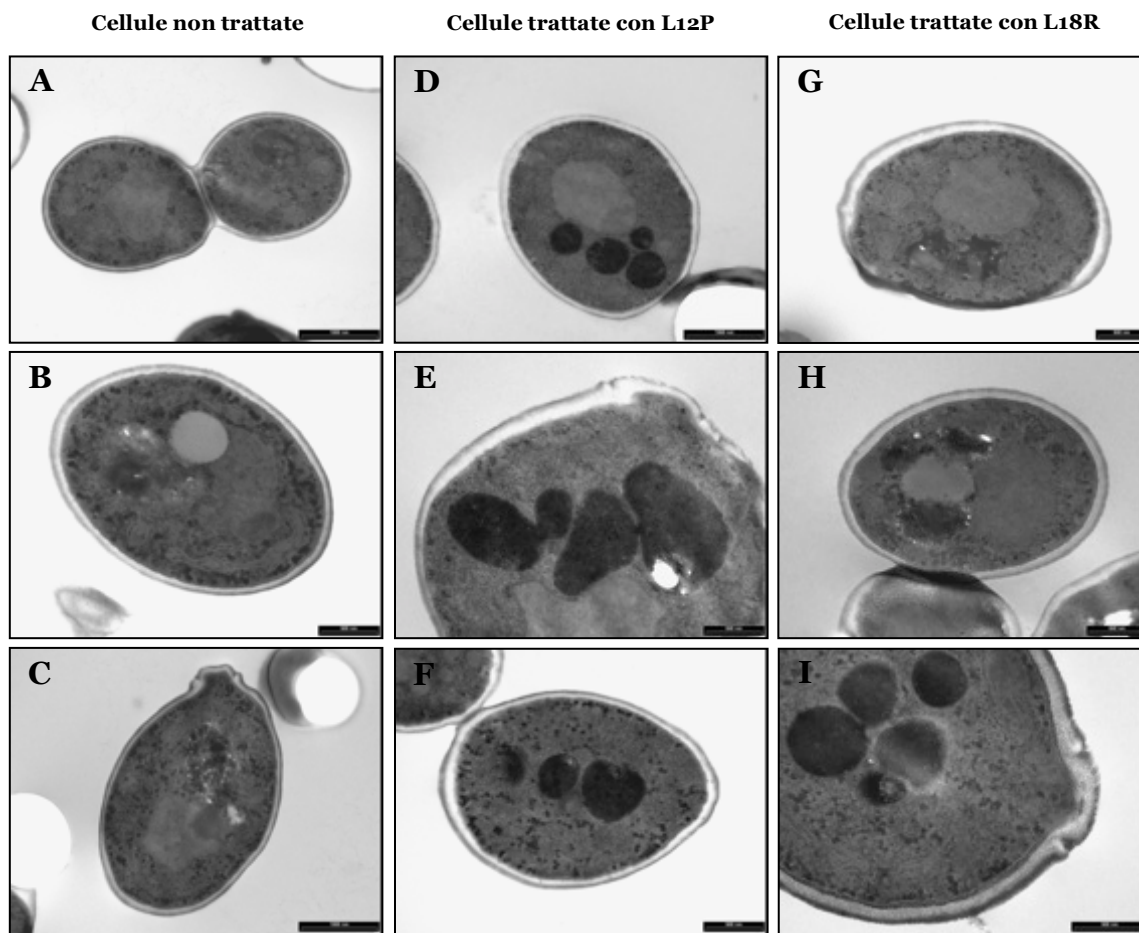
Gli studi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) hanno permesso di osservare alterazioni morfologiche e strutturali delle cellule fungine, sia in forma blastocellulare che filamentosa, trattate con i peptidi alla concentrazione di 125 µg/ml per 1 ora.

I campioni trattati ed i controlli sono stati impacchettati in una soluzione di agarosio 1% ed una volta fissati sono stati lavati e disidratati per l'inclusione nella resina epossidica con un protocollo di infiltrazione prolungata. La resina è stata quindi tagliata in sezioni ultrasottili che sono state raccolte mediante griglie di rame da 300 maglie e colorate con acetato di uranile per l'osservazione con il microscopio elettronico.

Il trattamento delle cellule con i peptidi L12P ed L18R non ha evidenziato né la formazione di aggregati extracellulari né una evidente alterazione nella struttura delle cellule non ancora completamente distrutte, ma ha indotto la formazione di strutture intracellulari, definibili come "microbodies" o perossisomi, descritte in cellule di lievito anche in seguito a stress ossidativo, che in microscopia appaiono come strutture tondeggianti scure di dimensioni variabili osservabili in **Figura 26**, nei pannelli D, E, F e G. Una leggera alterazione è osservabile alla superficie di alcune cellule (pannelli G e H). Le cellule del controllo (pannelli A, B e C) presentano, invece, una struttura tondeggiante e compatta.

Come atteso, i saggi di UFC eseguiti contemporaneamente sui campioni trattati e di controllo hanno confermato l'attività candidacida dei peptidi nelle condizioni sperimentali adottate.





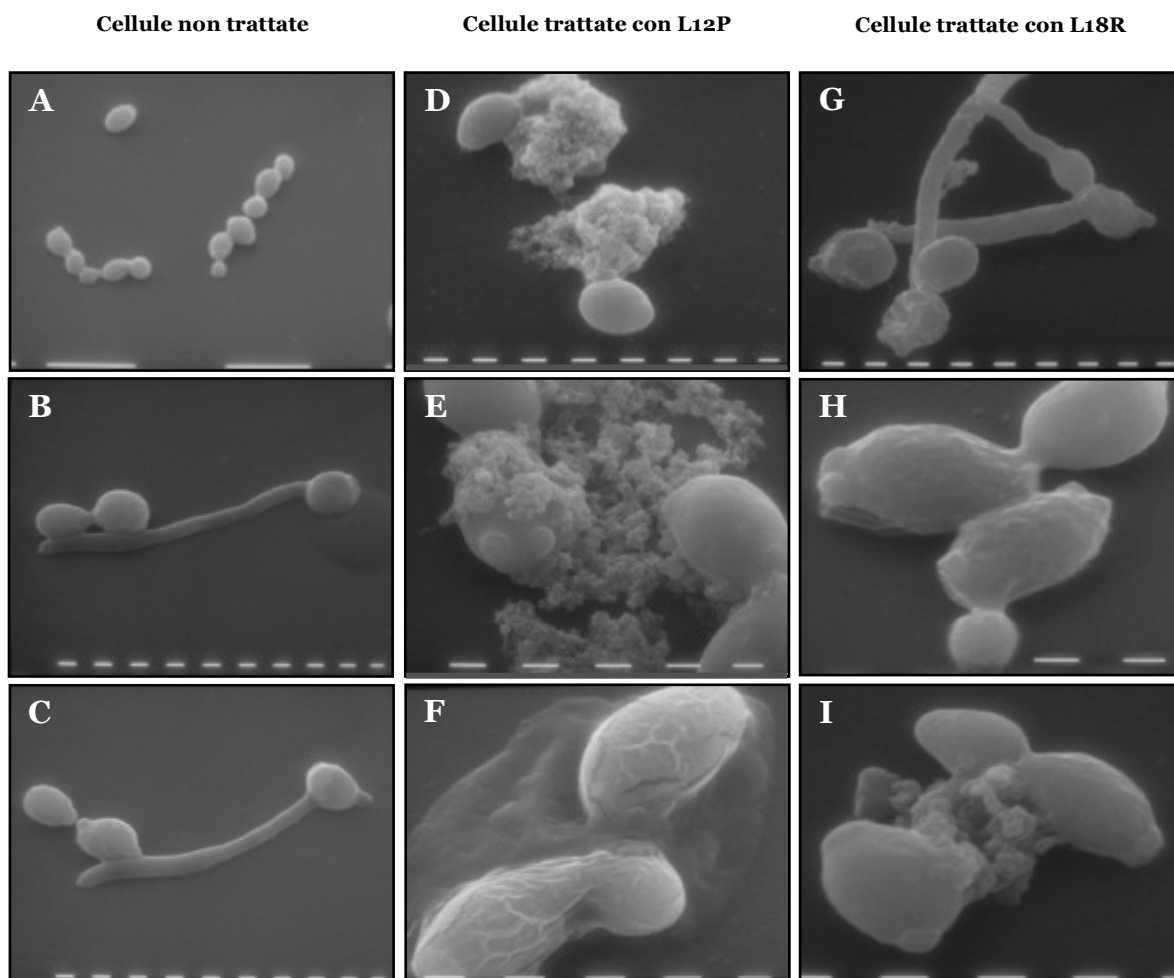
**Figura 26.** Immagini in microscopia elettronica a trasmissione di cellule di *C. albicans* SC5314 trattate per 1 ora con i peptidi L12P e L18R alla concentrazione di 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pannelli **A**, **B**, **C**: cellule di controllo; Pannello **D**, **E**, **F**: cellule trattate con L12P; Pannelli **G**, **H**, **I**: cellule trattate con L18R. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Microscopia elettronica a scansione**

Cellule fungine trattate con i peptidi di interesse sono state osservate mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). Le cellule sono state preparate unendo in rapporto 1:1 cellule in forma blastocellulare e filamentosa ottenute con differenti trattamenti e sono state incubate per 1 ora in assenza ed in presenza dei peptidi alla concentrazione di 125 o 250 µg/ml. Dopo incubazione, 5 µl di ogni sospensione cellulare sono stati posti su vetrini di circa 25 mm<sup>2</sup>, ed i preparati, una volta lavati e fissati, sono stati osservati al microscopio elettronico.

L'osservazione dei campioni trattati con i peptidi ha consentito di rilevare la presenza di detriti che potrebbero corrispondere a materiale fuoriuscito dalle cellule, oppure a resti di cellule completamente distrutte, come si osserva in **Figura 27**, pannelli D, E ed I. Alcune cellule appaiono sgonfie e i filamenti distorti (pannello G), mentre altre (pannelli H e F) appaiono completamente avvolte da una patina, probabilmente costituita da depositi peptidici. Al contrario le cellule del controllo appaiono turgide e ben delineate (pannelli A, B e C).

Come atteso, i saggi di UFC eseguiti contemporaneamente sui campioni trattati e di controllo hanno confermato l'attività candidacida dei peptidi nelle condizioni sperimentali adottate.



**Figura 27.** Immagini in microscopia elettronica a scansione di cellule di *C. albicans* SC5314 trattate per 1 ora con i peptidi L12P e L18R a differenti concentrazioni. Pannelli **A, B, C**: cellule di controllo; Pannello **D**: cellule trattate con L12P a 250 µg/ml; Pannelli **E, F**: cellule trattate con L12P a 125 µg/m; Pannelli **G, H, I**: cellule trattate con L18R a 125 µg/m. Barra: 1 µm.

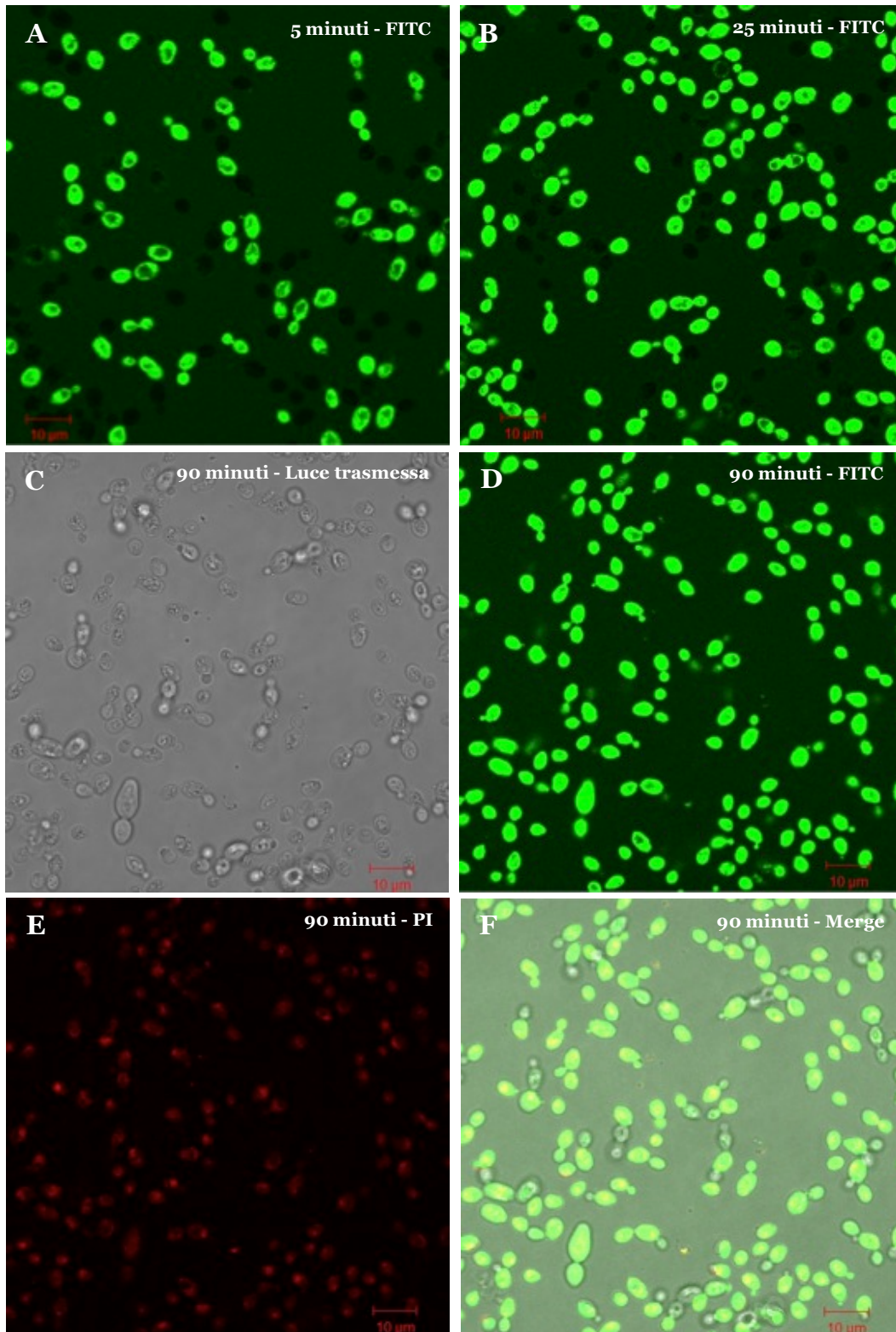
### Microscopia confocale a scansione laser

Lo studio in microscopia confocale a scansione laser è stato effettuato utilizzando blastocellule di *C. albicans* SC5314 trattate con i peptidi L12P e L18R coniugati a fluoresceina alla concentrazione di 200 µg/ml ed osservate per differenti intervalli di tempo.

Dalle immagini mostrate in **Figura 28** si può osservare che il peptide L12P-FITC entra rapidamente nelle cellule; infatti, già dopo 5 minuti di incubazione in circa il 50% delle cellule appare una fluorescenza verde. Inizialmente, il peptide sembra entrare in maniera non omogenea, ma poi diffonde rapidamente e, dopo soli 25 minuti, la maggior parte delle cellule appare fluorescente. Dopo 90 minuti di trattamento, le cellule sono tutte completamente fluorescenti e non più vitali, come confermato dall'internalizzazione del PI. Nel tempo, è stato osservato un incremento del segnale verde intracellulare, associato all'internalizzazione del PI.

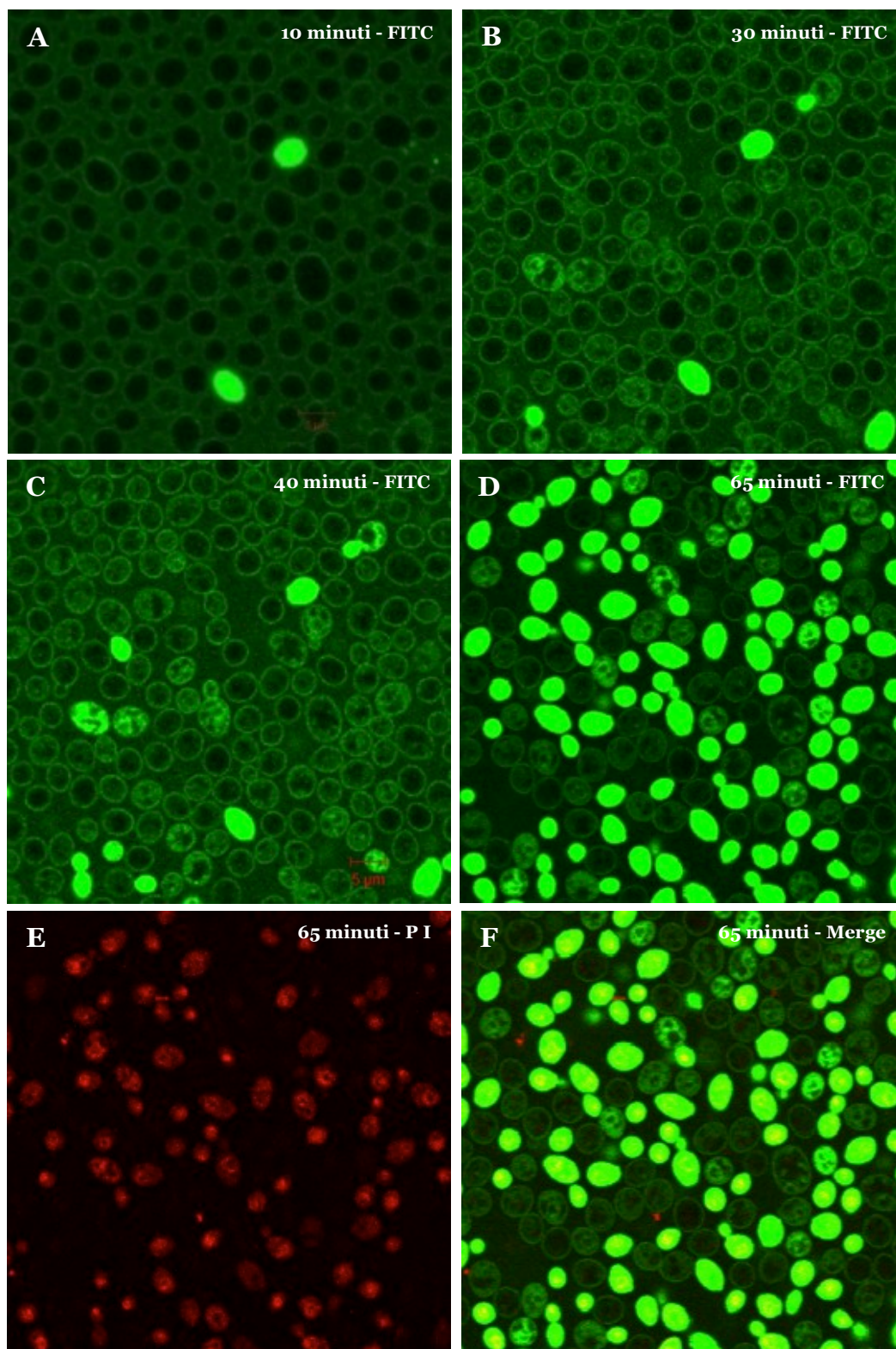
Un comportamento molto simile è stato osservato per il peptide L18R-FITC: dopo 10 minuti dall'aggiunta, il peptide si trova localizzato sulla superficie delle cellule, in cui penetra dopo pochi minuti. Dopo 30 minuti di trattamento, la quasi totalità delle cellule sembra aver internalizzato il peptide, che inizialmente si localizza, poi si diffonde omogeneamente nella cellula. Dopo 40 minuti, il peptide si concentra ulteriormente nelle cellule che sono ormai tutte fluorescenti e dopo 65 minuti la maggior parte delle cellule risulta morta, come confermato dall'internalizzazione del PI (**Figura 29**).

Come atteso, i saggi di UFC eseguiti contemporaneamente sui campioni trattati e di controllo hanno confermato l'attività candidacida dei peptidi nelle condizioni sperimentali adottate.



**Figura 28.** Immagini in microscopia confocale di blastocellule di *C. albicans* SC5314 trattate con il peptide L12P-FITC. Le cellule sono state trattate con il peptide alla concentrazione di 200 µg/ml e l'osservazione è stata effettuata dopo 5 minuti (pannello **A**: FITC), 25 minuti (pannello **B**: FITC) e 90 minuti (pannello **C**: luce trasmessa, **D**: FITC, **E**: PI, **F**: Merge). PI e fluoresceina sono stati eccitati alle lunghezze d'onda di 543 nm (laser He-Ne) e 488 nm (laser Argon), rispettivamente.





**Figura 29.** Immagini in microscopia confocale di cellule di *C. albicans* SC5314 trattate con il peptide L18R-FITC. Le cellule sono state trattate con il peptide alla concentrazione di 200 µg/ml e l'osservazione è stata effettuata dopo 10 minuti (pannello **A**: FITC), 30 minuti (pannello **B**: FITC) 40 minuti (pannello **C**: FITC) e 65 minuti (pannello **D**: FITC, **E**: PI, **F**: Merge). PI e fluoresceina sono stati eccitati alle lunghezze d'onda di 543 nm (laser He-Ne) e 488 nm (laser Argon), rispettivamente.

## Studio degli effetti biologici indotti dai peptidi L12P e L18R in cellule di *Candida albicans*

### Produzione di specie reattive dell'ossigeno

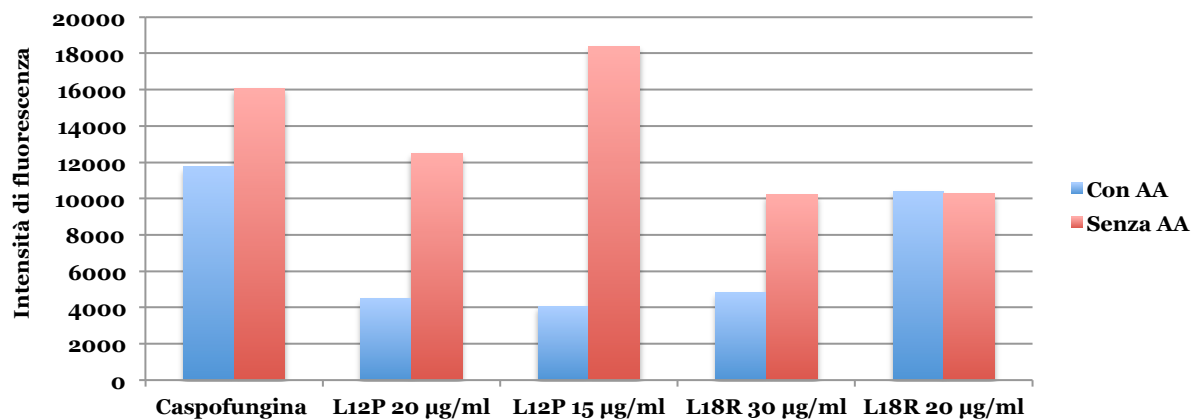
La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata valutata in cellule di *C. albicans* SC5314 trattate con i peptidi L12P ed L18R mediante un saggio fluorimetrico che sfrutta la conversione nelle cellule vive della DCF-DA nella molecola fluorescente DCF, la cui intensità di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di ROS in soluzione.

In particolare, una sospensione cellulare di *C. albicans* è stata incubata per 30 minuti a 37°C in assenza ed in presenza di AA. Successivamente i campioni sono stati incubati per 30 minuti con i peptidi L12P (15 e 20 µg/ml) ed L18R (20 e 30 µg/ml), utilizzando come controllo positivo un campione trattato con caspofungina alla concentrazione di 20 µg/ml.

Le cellule sono state centrifugate, risospese in PBS ed incubate in presenza di DCF-DA. Al tempo 0 e dopo 1, 2 e 4 ore di incubazione con DCF-DA, per seguire lo sviluppo della reazione, si è proceduto alla lettura della fluorescenza utilizzando un fluorimetro (EnSpire plate reader, PerkinElmer) alla lunghezza d'onda di emissione di 535 nm.

I dati ottenuti al completamento della reazione (4 ore) hanno dimostrato che il peptide L12P, alla concentrazione di 20 µg/ml, risulta in grado di indurre la formazione di ROS in cellule di *C. albicans* in misura maggiore rispetto alla caspofungina utilizzata alla stessa concentrazione. Lo stress ossidativo rilevato risulta meno intenso quando il peptide è stato saggiato alla concentrazione maggiore, condizione in cui aumenta il numero di cellule morte nello stesso periodo di incubazione. Anche il peptide L18R è risultato capace di indurre la formazione di ROS nelle cellule trattate in misura simile ad entrambe le concentrazioni saggate. Come atteso, i campioni pretrattati con AA, con l'unica eccezione di quello trattato con L18R alla concentrazione di 20 µg/ml, mostrano una riduzione dell'intensità di fluorescenza e quindi della produzione di ROS (**Figura 30**).

I saggi di UFC eseguiti contemporaneamente sui campioni trattati e di controllo hanno confermato l'attività candidacida attesa dei peptidi nelle condizioni sperimentali adottate.



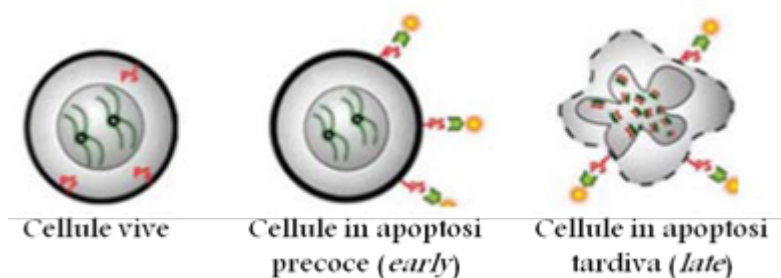
**Figura 30.** Produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in cellule di *C. albicans* SC5314 non trattate e trattate per 30 minuti con caspofungina 20 µg/ml o con i peptidi L12P ed L18R alle concentrazioni indicate. Le sospensioni cellulari sono state incubate per 30 minuti in assenza (Senza AA) ed in presenza di acido ascorbico (Con AA) alla concentrazione di 4,4 mg/ml prima dell'aggiunta di caspofungina o dei peptidi. Dopo 4 ore di incubazione con DCF-DA 10 µg/ml, si è proceduto alla lettura della fluorescenza utilizzando un fluorimetro (EnSpire plate reader, PerkinElmer) alla lunghezza d'onda di emissione di 535 nm. Al valore di assorbanza di ciascun campione è stato sottratto il valore del bianco (campione non trattato).



### Morte cellulare per apoptosi

La capacità dei peptidi L12P e L18R di indurre morte cellulare per apoptosi è stata valutata utilizzando lo strumento Muse™ Cell Analyzer ed il relativo kit, mediante saggio dell'Annexina V. L'analisi è stata condotta su cellule di *C. albicans* SC5314 sia sotto forma di blastocellule integre che di protoplasti.

L'apoptosi è un processo di morte cellulare programmata che si verifica naturalmente e che permette di regolare e controllare la crescita e la proliferazione cellulare. In seguito alla ricezione di particolari segnali le cellule sono capaci di avviare processi intracellulari che inducono cambiamenti fisiologici caratteristici nella loro struttura, come, ad esempio, la traslocazione della fosfatidilserina. Tale fosfolipide di membrana è solitamente esposto nella parte interna della membrana plasmatica, ma, quando una cellula va incontro ad apoptosi, viene traslocato all'esterno della membrana. Qui può essere facilmente riconosciuto e legato dall'Annexina V, una proteina che lega i fosfolipidi in modo calcio-dipendente con elevata affinità per la fosfatidilserina (**Figura 31**).

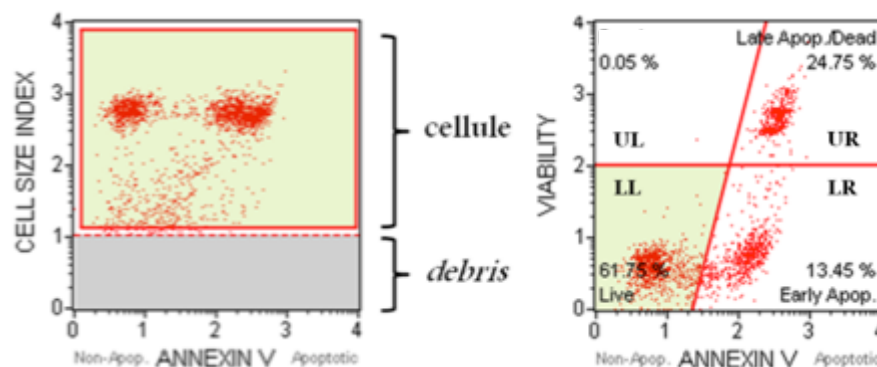


**Figura 31.** Traslocazione delle molecole di fosfatidilserina sulla superficie esterna della membrana cellulare, a cui può legarsi facilmente Annexina V marcata con un fluoroforo per la rilevazione.

Il saggio Muse™ Annexin V & Dead cell sfrutta tale principio per rilevare la presenza di cellule apoptotiche. Nel saggio viene anche utilizzato un marcatore di morte cellulare (7-ammino-actinomicina D, 7-AAD), capace di penetrare all'interno delle cellule dopo la fase iniziale di apoptosi (cellule in apoptosi tardiva o morte), ma non in quelle integre, e quindi utile quale indicatore dell'integrità strutturale della membrana cellulare.

Questo tipo di saggio permette quindi di rilevare quattro distinte popolazioni cellulari:

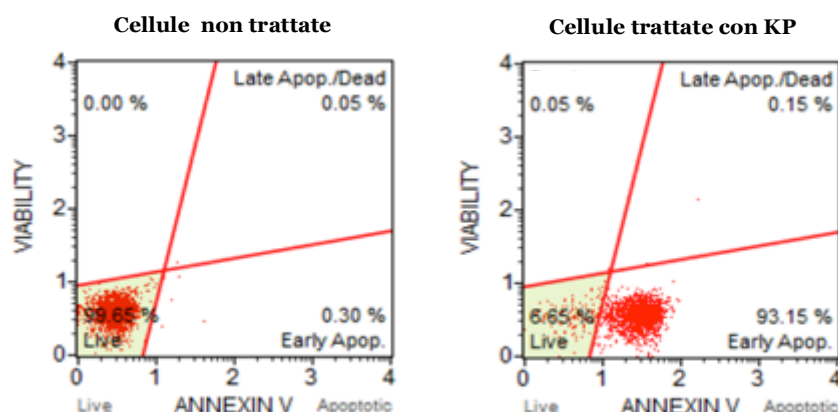
- ❖ Cellule non apoptotiche: Annexina V-negative (-) e 7-AAD-negative (-);
- ❖ Cellule in apoptosi precoce (early): Annexina V-positive (+) e 7-AAD (-);
- ❖ Cellule in apoptosi tardiva (late) e morte: Annexina V (+) e 7-AAD (+);
- ❖ Detriti cellulari (debris): Annexina V (-) e 7-AAD (+) (**Figura 32**).



**Figura 32.** Il primo *plot* a sinistra presenta un filtro, che permette di eliminare i detriti (*debris*) in base alle dimensioni cellulari. Il secondo *plot* a destra consente di distribuire statisticamente la popolazione cellulare in quadranti: vive (LL), early apoptotiche (LR), late apoptotiche (UR) e debris (UL).

Prima di procedere con l'analisi dei peptidi di interesse, lo strumento Muse™ Cell Analyzer è stato sperimentato con cellule di *C. albicans* SC5314 trattate con il peptide KP, del quale era stata precedentemente dimostrata la capacità di indurre apoptosi in tali cellule, per mettere a punto sistema e protocollo di lavoro (periodi di incubazione, concentrazioni e tipi cellulari) e per valutare se i risultati ottenuti potessero essere attendibili ed applicabili anche per altri peptidi.

Al fine di valutare qualitativamente e quantitativamente il processo apoptotico, sono state saggiate concentrazioni scalari di KP a partire da 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In **Figura 33** sono mostrati i risultati ottenuti in uno degli esperimenti eseguiti con KP alla concentrazione di 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



**Figura 33.** Esternalizzazione di fosfatidilserina in cellule di *C. albicans* SC5314 in presenza di 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di KP.  $5 \times 10^5$  cellule/ml sono state incubate in assenza (sinistra) e in presenza (destra) di KP in 100  $\mu\text{l}$  di volume finale per 10 minuti a RT. Successivamente, a 90  $\mu\text{l}$  di sospensione sono stati aggiunti 10  $\mu\text{l}$  di BSA 10% e 100  $\mu\text{l}$  di reagente Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay; dopo incubazione per 20 minuti a RT al buio sono state effettuate le letture al citofluorimetro Muse™ Cell Analyzer.

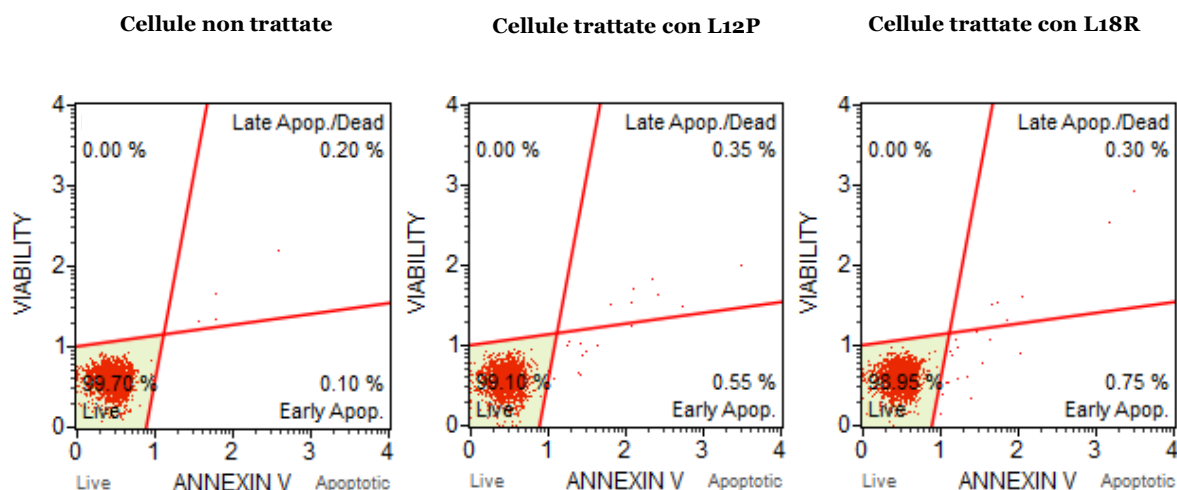
Come è possibile osservare dai dati riportati in **Tabella 11**, il peptide è stato in grado di indurre apoptosi in dipendenza della sua concentrazione; in particolare, oltre il 90% delle cellule sono risultate in apoptosi precoce già a partire da una concentrazione di KP pari a 2 µg/ml.

**Tabella 11.** Distribuzione tra le diverse popolazioni delle cellule di *C. albicans* SC5314 trattate con diverse concentrazioni di KP.

KP (µg/ml)	Profilo apoptotico delle cellule									
	Vitali		Apoptosi precoce		Apoptosi tardiva		Debris		Apoptosi Totale	
	cell/ml	%	cell/ml	%	cell/ml	%	cell/ml	%	cell/ml	%
<b>10</b>	4,60×10 <sup>2</sup>	0,15	3,06×10 <sup>5</sup>	99,85	0,00	0,00	0,00	0,00	3,06×10 <sup>5</sup>	99,85
<b>5</b>	1,64×10 <sup>3</sup>	0,50	3,27×10 <sup>5</sup>	99,50	0,00	0,00	0,00	0,00	3,27×10 <sup>5</sup>	99,50
<b>2,5</b>	8,48×10 <sup>3</sup>	3,97	2,04×10 <sup>5</sup>	95,72	6,44×10 <sup>2</sup>	0,30	0,00	0,00	2,05×10 <sup>5</sup>	96,03
<b>2</b>	1,73×10 <sup>4</sup>	6,65	2,42×10 <sup>5</sup>	93,15	3,93×10 <sup>2</sup>	0,15	1,31×10 <sup>2</sup>	0,05	2,43×10 <sup>5</sup>	93,30
<b>1,5</b>	6,75×10 <sup>4</sup>	22,43	2,33×10 <sup>5</sup>	77,52	0,00	0,00	1,53×10 <sup>2</sup>	0,05	2,33×10 <sup>5</sup>	77,52
<b>1,25</b>	6,69×10 <sup>4</sup>	22,75	2,26×10 <sup>5</sup>	76,90	8,82×10 <sup>2</sup>	0,30	1,47×10 <sup>2</sup>	0,05	2,27×10 <sup>5</sup>	77,20
<b>1</b>	2,11×10 <sup>5</sup>	79,32	5,21×10 <sup>4</sup>	19,56	2,70×10 <sup>3</sup>	1,01	2,70×10 <sup>2</sup>	0,10	5,48×10 <sup>4</sup>	20,58
<b>0,5</b>	2,82×10 <sup>5</sup>	99,25	1,85×10 <sup>3</sup>	0,65	2,85×10 <sup>2</sup>	0,10	0,00	0,00	2,13×10 <sup>3</sup>	0,75
<b>0</b>	4,38×10 <sup>5</sup>	99,70	1,10×10 <sup>3</sup>	0,25	2,20×10 <sup>2</sup>	0,05	0,00	0,00	1,32×10 <sup>3</sup>	0,30

Una volta verificate le condizioni di saggio e la riproducibilità ed attendibilità dei risultati ottenuti con KP, tali condizioni sono state utilizzate anche per il saggio dei due peptidi L12P e L18R alla concentrazione di 5 µg/ml, pari alla minima concentrazione fungicida. Come si può osservare dai grafici riportati in **Figura 34** e dai dati in **Tabella 12**, né il peptide L12P né L18R inducono morte cellulare per apoptosi in cellule di *C. albicans* SC5314. Tale risultato risulta tutt'altro che sorprendente dal momento che i peptidi sono capaci di indurre la morte di quasi la totalità delle cellule con essi incubate in meno di 30 minuti, tempo sicuramente troppo breve per innescare i meccanismi apoptotici.

Come atteso, i saggi di UFC eseguiti contemporaneamente sui campioni trattati e di controllo hanno confermato l'attività candidacida dei peptidi nelle condizioni sperimentali adottate.



**Figura 34.** Esternalizzazione di fosfatidilserina in cellule di *C. albicans* SC5314 in presenza di 5 µg/ml di L12P ed L18R.  $5 \times 10^5$  cellule/ml sono state incubate in assenza (a sinistra) o in presenza di L12P (al centro) o L18R (a destra) in 100 µl di volume finale per 10 minuti a RT. Successivamente, a 90 µl di sospensione sono stati aggiunti 10 µl di BSA 10% e 100 µl di reagente Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay; dopo incubazione per 20 minuti a RT al buio sono state effettuate le letture al citofluorimetro Muse™ Cell Analyzer.

**Tabella 12.** Distribuzione tra le diverse popolazioni delle cellule di *C. albicans* SC5314 non trattate (-) e trattate con i peptidi L12P e L18R.

Profilo apoptotico delle cellule										
Peptide	Vitali		Apoptosi precoce		Apoptosi tardiva		Debris		Apoptosi Totale	
	cell/ml	%	cell/ml	%	cell/ml	%	cell/ml	%	cell/ml	%
-	$6,39 \times 10^5$	99,70	$6,41 \times 10^2$	0,10	$1,28 \times 10^3$	0,20	0,00	0,00	$1,92 \times 10^3$	0,30
<b>L12P</b>	$2,65 \times 10^5$	98,95	$2,01 \times 10^3$	0,75	$8,05 \times 10^2$	0,30	0,00	0,00	$2,82 \times 10^3$	1,05
<b>L18R</b>	$3,89 \times 10^5$	99,10	$2,16 \times 10^3$	0,55	$1,37 \times 10^2$	0,35	0,00	0,00	$3,53 \times 10^3$	0,90

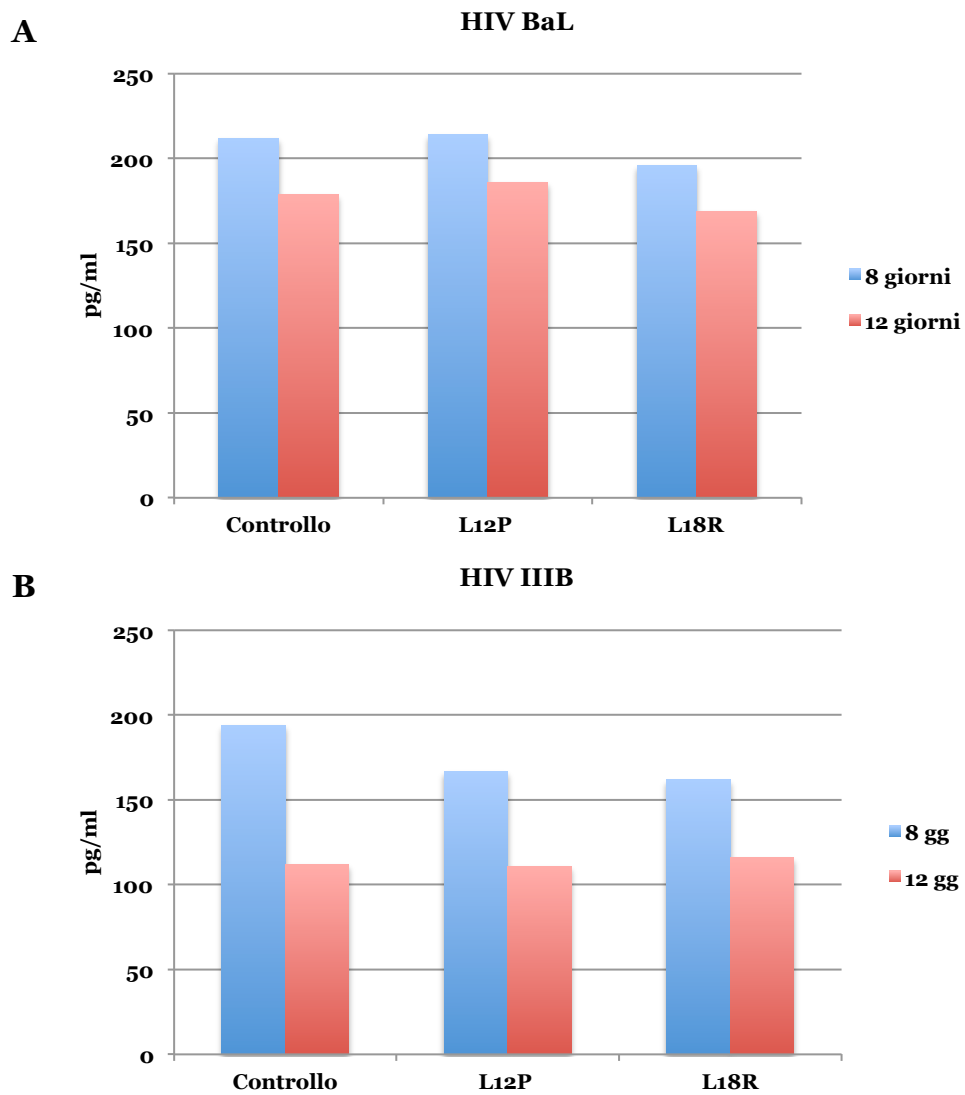
La morte delle cellule in seguito al trattamento con i peptidi si rileva dal calo della concentrazione cellulare rispetto al controllo come riportato in tabella.

## Studio dell'attività *in vitro* dei peptidi L12P ed L18R nei confronti di HIV

In collaborazione con il gruppo di ricerca del Dr. Claudio Casoli del Dipartimento di Scienze Cliniche L. Sacco, Sezione di Malattie Infettive e di Immunopatologia dell'Università di Milano, sono stati intrapresi studi finalizzati a valutare la potenziale attività *in vitro* dei peptidi L12P e L18R nei confronti di HIV-1.

Inizialmente è stata valutata la potenziale citotossicità dei peptidi L12P e L18R, a concentrazioni crescenti (1, 10 e 20 µg/ml), nei confronti di PBMC ottenuti dal sangue periferico di individui sani. La vitalità cellulare è stata determinata mediante saggio con AlamarBlue, effettuando misure dell'assorbanza a 570 nm e 595 nm. I due peptidi saggiati non hanno mostrato effetti citotossici nei confronti dei PBMC quando saggiati a concentrazioni comprese tra 1 e 20 µg/ml; in relazione a tale osservazione, la dose intermedia (10 µg/ml) è stata selezionata per tutti i successivi esperimenti.

L'attività anti-HIV-1 è stata valutata utilizzando PBMC da donatori sani purificati e stimolati per 24 ore con Fitoemagglutinina e, dopo l'infezione, con rIL-2. I PBMC sono stati infettati con un ceppo linfocitotropico (HIV IIIB) o con un ceppo monocitotropico (BaL), con successiva coltivazione per 14 giorni aggiungendo il peptide in esame insieme a rIL-2 al tempo 0 e dopo 7 giorni. I soprannatanti colturali sono stati raccolti dopo 8 e 12 giorni dall'infezione e la replicazione virale è stata valutata misurando in essi la concentrazione dell'Ag p24 mediante uno specifico saggio ELISA. I risultati mostrati rappresentano i valori medi di Ag p24 ottenuti da due esperimenti indipendenti e con ogni saggio condotto in triplo a scopo statistico. Come mostrato in **Figura 35**, nei ripetuti saggi *in vitro* i peptidi L12P e L18R non hanno mostrato una significativa attività inibente nei confronti di entrambi i ceppi virali, in quanto la replicazione virale è sembrata pressoché normale (HIV BaL, Pannello A) o leggermente, ma non significativamente, ridotta (HIV IIIB, Pannello B), in particolare dopo 8 giorni di incubazione.



**Figura 35.** Attività *in vitro* dei peptidi L12P e L18R nei confronti di HIV-1. PBMC infettati con HIV Bal (A) e III B (B) sono stati trattati con i peptidi ai giorni 0 e 7.

## Clonaggio ed espressione delle sequenze nucleotidiche “lunghe”

Tra le 5 sequenze lunghe selezionate, si è scelto di iniziare con il clonaggio delle prime due denominate IgM CH<sub>4</sub> e IGKC riportate di seguito in direzione 5'-3':

>IgM CH<sub>4</sub>

↓  
 CATATG GTTGGCGCTGCATCGTCCGGATGTCTACCTCTTACCGCCAGCTCGTGAACAGCTGAACCTTCGCGAAT  
 CTGCGACGATTACGTGCCTGGTAACCGGGTTTTCCCCAGCGGATGTGTTTGTCCAGTGGATGCAACGTGGTCA  
 GCCGTTATCGCCCGAGAAGTACGTGACCTCAGCACCGATGCCTGAACCGCAAGCTCCTGGTCGGTATTTCCGCC  
 CATTCGATCCTGACGGTGAGTGAAGAGGAGTGGAATACTGGCGAAACCTATACCTGTGTTGCACACGAAGCCC  
 TGCCGAATCGCGTAACTGAACGCACCGTTGACAAAAGCACAGGCAAACCCACCCCTGTACAACGTGAGCTTGGT  
 CATGAGCGATACAGCCGGAACGTGCTAT TAA CATATG  
 ↑

>IGKC

↓  
 CATATG ACGGTTGCAGCTCCGTCTGTGTTCATTTTCCCTCCAAGCGATGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCGT  
 CTGTGGTATGCCTGCTCAACAACCTTTTACCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTGGACAATGCGTTACA  
 AAGCGGCAATTCCAGGAATCAGTCACCGAACAGGATTCGAAAGACAGCACCTATTCCCTGTCAAGCACGTTG  
 ACTCTGTGCGAAAAGCCGATTACGAGAAACACAAGGTGTATGCCTGTGAGGTAACCCATCAAGGGCTTAGTAGCC  
 CGGTTACCAAGTCGTTTAAACCGCGGTGAATGC TAA CATATG  
 ↑

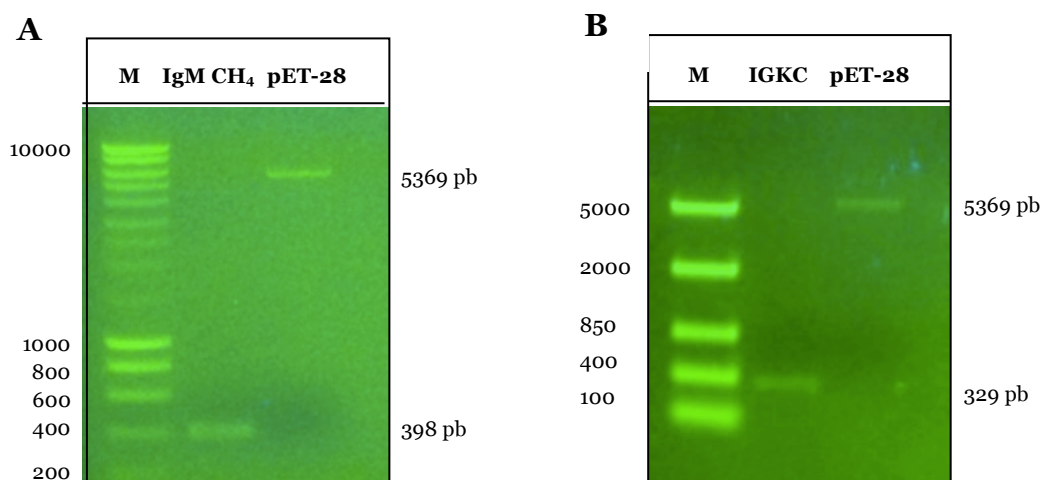
Le sequenze sono state modificate aggiungendo alle estremità 5' e 3' una sequenza nucleotidica (evidenziata in verde), corrispondente al sito di restrizione riconosciuto dall'enzima NdeI, a cui è stato anteposto il codone di stop TAA (evidenziato in rosso) all'estremità 3'.

Le sequenze sono state fatte sintetizzare e clonare nel plasmide vettore pEX-A, all'interno del sito MCS (multiple cloning site), da una ditta specializzata. I ricombinanti pEX-A IgM CH<sub>4</sub> e pEX-A IGKC sono stati trasformati in cellule *E. coli* DH10, dalle quali è stata ottenuta una preparazione plasmidica purificata, utilizzando il Kit Qiagen Plasmid Midi.

I vettori contenenti i geni di interesse IgM CH<sub>4</sub> e IGKC sono quindi stati sottoposti a digestione preparativa, che è stata caricata su gel d'agarosio; le bande ottenute delle dimensioni attese di circa 400 e 300 pb rispettivamente (corrispondenti agli inserti), sono mostrate in **Figura 36** (Pannello A, colonna 2 e Pannello B, colonna 2, rispettivamente) e sono state successivamente eluite servendosi del Kit Qiagen QIAquick Gel Extraction.

Parallelamente il vettore di clonaggio pET-28 è stato digerito allo stesso modo con l'enzima NdeI e la banda corrispondente è stata eluita su gel d'agarosio con lo stesso kit. Il vettore pET-28 e le

sequenze corrispondenti ai geni di interesse, sono state quindi caricate su gel d'agarosio per la quantificazione e il controllo delle dimensioni (**Figura 36**, Pannelli A e B, colonne 3).



**Figura 36.** Gel di agarosio, visualizzati tramite trans-illuminatore, per il controllo delle bande di migrazione ottenute dopo digestione con l'enzima di restrizione NdeI dei costrutti pEX-A IgM CH<sub>4</sub> (pannello A, colonna 2) e pEX-A IGKC (pannello B, colonna 2) e del plasmide di clonaggio pET-28 (pannelli A e B, colonne 3) e loro purificazione mediante eluizione da gel di separazione. M: pannello **A**, colonna 1, marker SmartLadder, Eurogentec; pannello **B**, colonna 1, marker FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range.

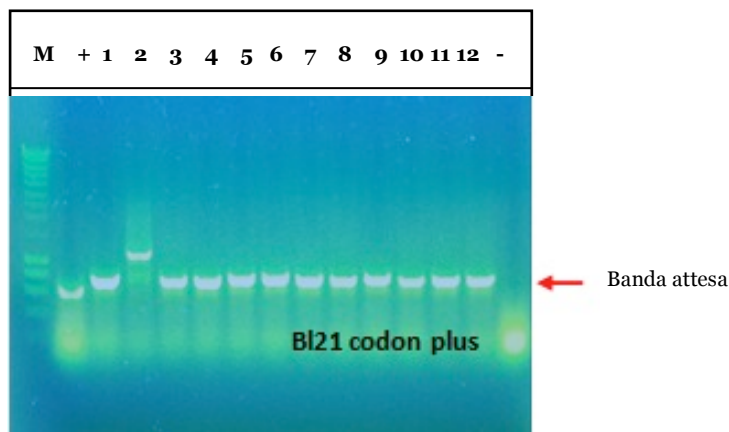
Successivamente il vettore pET-28 è stato sottoposto ad una reazione di defosforilazione utilizzando la fosfatasi CIP, per evitare che durante la reazione di ligazione esso potesse richiudersi dando origine a cloni falsi positivi. Dopo precipitazione e risospensione, una piccola aliquota del vettore così trattato è stata caricata su gel d'agarosio per la quantificazione (dati non mostrati).

Successivamente, pET-28 digerito con l'enzima di restrizione NdeI e defosforilato e gli inserti IgM CH<sub>4</sub> e IGKC sono stati miscelati con un rapporto molare vettore/inserto di 1:5 in due distinte reazioni di ligazione ed i costrutti così ottenuti sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule *E.coli* BL21 codonPlus mediante elettroporazione.

La trasformazione delle cellule con la reazione di ligazione IGKC pET-28 non ha prodotto colonie, probabilmente perché la proteina risulta tossica per le cellule BL21 codonPlus.

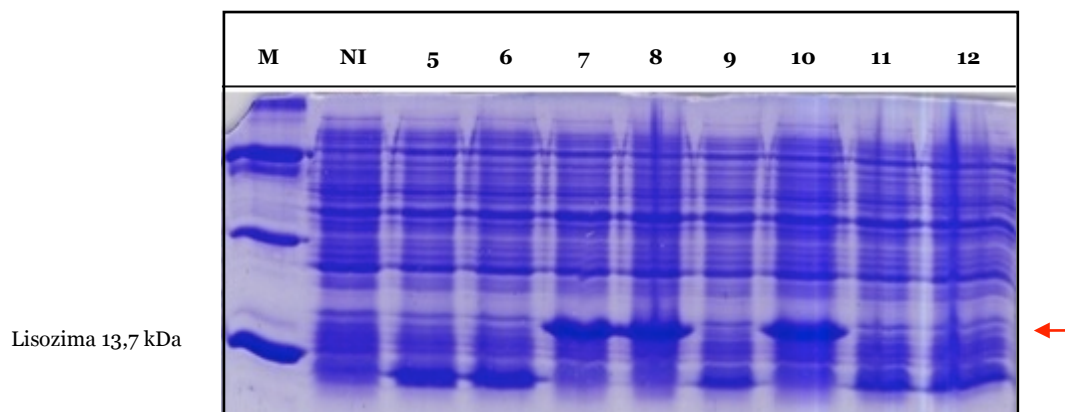
Al contrario, sulle piastre di terreno selettivo contenenti kanamicina su cui sono state seminate le cellule elettroporate con il costrutto IgM CH<sub>4</sub> pET-28, sono cresciute un certo numero di colonie. In seguito, mediante PCR, è stato verificato quali cloni contenessero effettivamente l'inserto; come rilevato su gel di agarosio e mostrato in **Figura 37**, diversi cloni BL21 codonPlus: pET-28 IgM CH<sub>4</sub> sono risultati positivi alla reazione (campioni dal 3 al 12).





**Figura 37.** Gel di agarosio in cui è stata caricata una reazione di PCR condotta su 12 trasformanti BL21 codonPlus: pET-28 IgM CH<sub>4</sub> (da 1 a 12). M: Marker, +: controllo positivo, 1-12: campioni, -: controllo negativo.

Alcuni dei cloni risultati positivi sono stati dunque selezionati per una prova di espressione per controllare quali di essi possedessero l'inserito nel corretto orientamento (**Figura 38**).



**Figura 38.** Gel di poliacrilamide al 15% (poiché la proteina ha una dimensione di circa 16 kDa) in cui sono stati caricati: M: Marker, NI: clone non indotto e cloni indotti (campioni 5-12).

Analizzando il gel di proteine, si osserva la presenza di due prodotti proteici, uno corrispondente alla sequenza proteica di interesse, indicata dalla freccia, l'altra di circa 10 kDa, prodotta dai cloni contenenti l'inserito inserito al contrario, che migra al di sotto della banda del lisozima (13,7 kDa), utilizzato come controllo di P.M.

Le sequenze dei due prodotti genici sono riportate di seguito:

Sequenza amminoacidica IgM CH<sub>4</sub> inserita nell'orientamento corretto:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVQWQMRGQPLSPE  
KYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVAHEALPNRV TERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTA  
GTCY

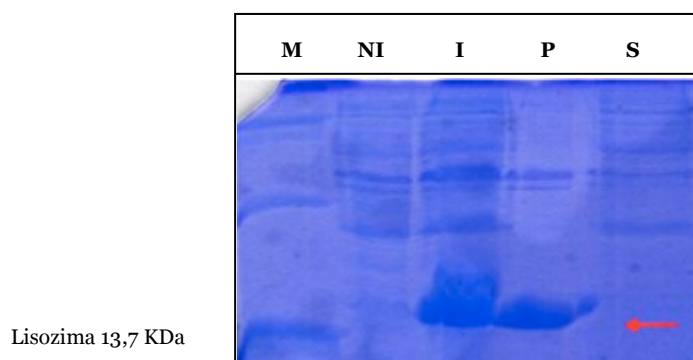
N°aa= 150      Peso molecolare = 16624,71 Da

Sequenza amminoacidica IgM CH<sub>4</sub> inserita nell'orientamento inverso:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLIARSGCIAHDQAHVVQGGFACAFVNGAFSYAIRQGFVCNTGIGFASIPLLF  
THRQDRMGEIPTRSLRFRHRC

N°aa= 94      Peso molecolare = 10340 Da

Uno dei cloni positivi è stato selezionato ed è stata quindi condotta una prova di solubilità per controllare la localizzazione della proteina ricombinante all'interno delle cellule batteriche trasformate. La frazione del pellet è stata separata dal surnatante ed i campioni sono stati caricati su gel di poliacrilamide al 15%, poiché la proteina ha una dimensione attesa di circa 16 KDa. Dall'analisi è risultato che la proteina si trova nel pellet cellulare (banda indicata dalla freccia) ed è quindi insolubile (**Figura 39**).



**Figura 39.** Gel di poliacrilammide al 15% su cui sono stati caricati: M: Marker, NI: clone non indotto (linea 2), I: clone indotto (linea 3) e le relative frazioni di pellet (P, linea 4) e surnatante (S, linea 5).

Si è dunque proceduto alla produzione di una minipreparazione plasmidica di alcuni cloni positivi mediante il Kit Qiagen Plasmid Mini ed i campioni sono stati inviati alla ditta Macrogen per il sequenziamento. La sequenza nucleotidica IgM CH<sub>4</sub> clonata nel vettore pET-28 è risultata corretta e priva di errori.

La proteina è stata espressa anche in altri tipi cellulari, quali cellule *E. coli* Origami 2 (tetraciclina e cloramfenicolo resistenti; crescita a 37°C; Novagen), che possiedono mutazioni nei geni *trxB* (tioredoxina riduttasi) e *gor* (glutathione riduttasi), che sembrano facilitare la formazione di ponti disolfuro e quindi l'espressione di proteine che richiedono la formazione di tali ponti per il corretto *folding*, e *E. coli* cellule SHuffle T7 (cloramfenicolo resistenti; crescita a 30°C; NewEngland Biolabs), esprimenti costitutivamente la isomerasi DsbC che favorisce il corretto folding citoplasmatico delle proteine. Neppure in questi esperimenti la proteina è risultata solubile.

## *Discussione*

Negli ultimi decenni, le malattie da infezione sono tornate prepotentemente alla ribalta. L'aumento di incidenza di microrganismi e virus multiresistenti, l'emergenza e riemergenza di vecchi e nuovi agenti eziologici, i timori per la globalizzazione di agenti infettivi altamente pericolosi, come ad esempio di recente i virus influenzali ed il virus Ebola, il rischio di diffusione intenzionale di agenti infettivi da parte di bioterroristi, ed il continuo aumento di individui immunocompromessi, o comunque debilitati, altamente sensibili a patogeni opportunisti, rappresentano alcune delle situazioni più problematiche per la salute pubblica a livello mondiale, evidenziando la necessità urgente di nuovi approcci terapeutici efficaci.

Il ruolo cruciale degli Ab nell'immunoprotezione antinfettiva è ben noto da molti anni ed è alla base dell'efficacia delle strategie di vaccinazione e di sieroprofilassi. Sulla base di tali conoscenze, negli ultimi decenni gli Ab sono emersi come una nuova ed importante classe di agenti terapeutici, della quale milioni di pazienti in tutto il mondo hanno già beneficiato, in particolare nella terapia di tumori, malattie autoimmuni e di altri disturbi immunologici, rappresentando la classe di agenti terapeutici in più rapida crescita (**Dimitrov 2009, Beck 2010, Nelson 2010**).

Anche se terapie e profilassi a base di Ab hanno, per il momento, trovato limitate applicazioni nel campo delle malattie da infezione, tali approcci potrebbero fornire nuove opzioni terapeutiche nei confronti di patogeni per i quali attualmente non sono disponibili terapie efficaci. L'uso terapeutico degli Ab, tuttavia, non è esente da alcune problematiche e criticità, come l'antigenicità, la tossicità e la farmacocinetica, che possono limitarne il campo di applicazione e l'efficacia. Infatti, nonostante la produzione dei mAb ed i progressi nella tecnologia del DNA ricombinante abbiano permesso la generazione di Ab umani o ingegnerizzati, con miglioramenti significativi in termini di immunogenicità e sicurezza, mantenendo la specificità originaria ma con dimensioni notevolmente ridotte (**Holt 2003, Hudson 2003, Holliger 2005, Hoogenboom 2005, Donzeau 2007, Buckler 2008, Mondon 2008, Schirrmann 2008, Gong 2013**), sono state segnalate gravi reazioni avverse associate al trattamento con mAb e la sicurezza assoluta di ogni lotto di Ab è difficile da garantire (**Liu 2014**). La fragilità degli Ab, che sono deperibili e richiedono refrigerazione, nonché somministrazione sistemica, rappresenta un ulteriore ostacolo alla loro diffusione, contribuendo al loro elevato costo.

Nel campo delle malattie infettive ci possono essere alcune preoccupazioni aggiuntive. Molti agenti patogeni sono antigenicamente variabili, così un uso ampiamente diffuso di terapie a base di Ab potrebbe produrre una pressione selettiva sulle popolazioni microbiche con la comparsa di mutanti "escape", Ab-resistenti. L'uso di cocktail di Ab e la terapia anticorpale combinata con la chemioterapia potrebbero ridurre questa eventualità. Particolare attenzione deve essere prestata anche alla scelta degli Ab antinfettivi, poiché mAb in grado di peggiorare il decorso di una malattia sono stati segnalati nei confronti di tossine (**Maddaloni 2004**) batteri (**Little 2011**) funghi (**Bromuro 2002**) e virus (**Nicasio 2012**). Più recentemente, sono stati proposti approcci innovativi, come la radioimmunoterapia, sfruttando la capacità di Ab, dopo il legame ad Ag

microbici, di liberare radionuclidi che emettono radiazioni citocide (**Dadachova 2005, Bryan 2012**). In questo scenario, peptidi derivati da Ab potrebbero rappresentare una promettente proposta terapeutica in termini di immunogenicità, tossicità e sicurezza, rispetto agli Ab o loro derivati ricombinanti.

In precedenti studi era stato dimostrato che peptidi mimanti una KT di lievito, quale KP, nonché peptidi riproducenti le CDR (peptidi CDR) o frammenti delle regioni costanti (peptidi Fc) di alcuni Ab possono esplicare attività antimicrobica, antivirale, antitumorale e/o immunomodulante, indipendentemente dalla specificità o isotipo dell'Ab e dalla regione dell'Ab da cui derivano (**Polonelli 2003, 2008 e 2012, Gabrielli 2009 e 2012, Dobroff 2010, Arruda 2012**).

I peptidi studiati nel presente progetto di Dottorato, selezionati sulla base dell'analisi di peptidi codificati da geni appartenenti a differenti *loci* della superfamiglia delle Ig umane, hanno mostrato una differenziata, significativa attività *in vitro* nei confronti degli agenti fungini e batterici saggiati. Due dei peptidi, L12P ed L18R, in particolare, hanno mostrato una significativa attività già a bassissime concentrazioni nei confronti di vari ceppi di *Candida*, quali *C. albicans* SC5314, *C. albicans* SA40, *C. albicans* CA6, *C. albicans* UM4, *C. albicans* AIDS68 e *C. glabrata*, ma anche nei confronti di *C. neoformans*, *M. furfur*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, indipendentemente dalla presenza di resistenze a farmaci antimicrobici convenzionali. Inoltre, L12P e L18R hanno mostrato una significativa attività terapeutica nei confronti di candidosi sistemica sperimentale in larve di *G. mellonella*, un lepidottero fornito soltanto dell'immunità innata. Tali peptidi hanno, tuttavia, mostrato scarsa attività nei confronti di HIV, anche se ulteriori studi saranno necessari per verificare l'attività in differenti condizioni sperimentali.

Dagli studi condotti per verificare l'eventuale tossicità dovuta ai peptidi, mediante test di vitalità *in vitro* con cellule LLC-MK2, saggio emolitico nei confronti di emazie umane e Comet test su linfociti umani, così come *in vivo* su larve di *Galleria*, è emerso che i peptidi non mostrano alcuna tossicità, neppure a concentrazioni largamente superiori rispetto alla minima concentrazione microbicida.

Saggi di time killing hanno evidenziato che i peptidi sono capaci di uccidere la maggior parte delle cellule fungine molto rapidamente con un meccanismo d'azione al momento non del tutto chiarito; sembra tuttavia, di poter escludere la possibilità che i peptidi possano indurre apoptosi, come ulteriormente confermato dai saggi in citofluorimetria.

Esperimenti di dicroismo circolare hanno permesso di rilevare che i due peptidi maggiormente significativi, L12P ed L18R, in soluzione assumono una conformazione random coil stabile, che si conserva anche dopo 30 giorni. In seguito all'aggiunta di SDS, i peptidi sembrano assumere una conformazione riconducibile ad una struttura ad  $\alpha$  elica, comune a molti peptidi antimicrobici naturali. Questo dato suggerisce che tali peptidi possano subire un analogo cambiamento conformazionale in seguito al contatto con la membrana cellulare, essendo l'SDS un mimotopo dei

fosfolipidi. Anche in presenza di LPS i due peptidi cambiano conformazione, suggerendo una analoga possibile interazione con la parete cellulare di batteri Gram-negativi. Similmente, una leggera modifica nella conformazione random coil dei peptidi è stata osservata in presenza di laminarina, un mimotopo dei  $\beta$ -glucani presenti sulla superficie cellulare di *C. albicans* e di altri agenti fungini.

L'acquisizione di immagini tridimensionali di cellule di *C. albicans* trattate con i peptidi L12P e L18R, mediante microscopia elettronica a scansione, ha consentito di osservare nei preparati la presenza di detriti che potrebbero corrispondere a materiale fuoriuscito dalle cellule o a ciò che rimane di cellule completamente distrutte. Le cellule non ancora distrutte, inoltre, appaiono avvolte da una patina probabilmente riconducibile ad aggregazioni dei peptidi che rivestono completamente le cellule.

Il trattamento delle cellule fungine con i peptidi, come osservato in microscopia elettronica a trasmissione, ha evidenziato nelle cellule non ancora completamente distrutte la formazione di strutture intracellulari di dimensioni variabili, definibili come "microbodies" o perossisomi. I microbodies sono organelli che si possono formare in cellule vegetali, animali ed in protozoi. Si tratta di vescicole di forma sferica che si trovano nel citoplasma, di dimensioni che variano tra 0,2-1,5  $\mu\text{m}$  di diametro. Sono circondati da una singola membrana a doppio strato fosfolipidico e contengono una matrice di materiale intracellulare comprendente enzimi del ciclo del glicolato, catalasi e ossidasi e altre proteine; non sembrano contenere materiale genetico che consenta loro di autoreplicarsi (**De Duve 1966**). Tali strutture sono state descritte in cellule di lievito anche in seguito ad uno stress di tipo ossidativo (**Antonenkov 2010, Del Rio 2011**); entrambi i peptidi infatti si sono dimostrati in grado di indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno nelle condizioni sperimentali adottate.

Le osservazioni effettuate in microscopia a fluorescenza laser hanno confermato un meccanismo di killing molto rapido per entrambi i peptidi. In particolare L12P, dopo una prima localizzazione sulla superficie cellulare, sembra entrare molto rapidamente nelle cellule. Dopo soltanto 1 ora di trattamento queste ultime appaiono completamente fluorescenti e non più vitali, come confermato dalla sovrapposizione del segnale rosso del PI con quello verde della fluoresceina. Analogamente, il peptide L18R penetra dopo pochi minuti nelle cellule, localizzandosi in una particolare zona prima di diffondere omogeneamente nella cellula, determinandone la morte dopo poco più di 1 ora.

Dai risultati ottenuti emerge che i due peptidi sembrano esplicare la loro attività in maniera simile, determinando l'uccisione delle cellule trattate con estrema rapidità. Tale comportamento potrebbe suggerire che i peptidi siano probabilmente capaci di formare dei pori nella membrana delle cellule trattate e successivamente siano in grado di penetrare e diffondere uniformemente all'interno delle cellule stesse. Come confermato in citofluorimetria, i peptidi, in un intervallo di tempo così breve, non dovrebbero essere in grado di indurre radicali modifiche nelle cellule trattate, escludendo un meccanismo di tipo apoptotico, che richiederebbe tempi più lunghi.

Sulla base di precedenti osservazioni sull'attività antitumorale di alcuni peptidi anticorpali (**Polonelli 2008, Dobroff 2010, Arruda 2102**), anche i peptidi analizzati in questo studio sono stati indagati per tale attività, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Luiz R. Travassos della Sezione di Oncologia Sperimentale del Dipartimento di Microbiologia, Immunologia e Parassitologia dell'Università Federale di San Paolo, Brasile. In particolare, l'attività *in vitro* dei peptidi L12P, W12K, G10S e L18R è stata valutata nei confronti della linea cellulare di melanoma B16F10-Nex2, utilizzando un test di vitalità cellulare con Trypan Blue. I 4 peptidi si sono mostrati tutti attivi nei confronti della linea cellulare saggiata, con qualche differenza tra loro non significativa.

L'attività dei 4 peptidi è stata ulteriormente valutata *in vivo* utilizzando un modello murino di colonizzazione metastatica con cellule singeniche vitali B16F10-Nex2. Successivamente al trattamento con i peptidi dopo 1, 3, 5, 7, 9 e 11 giorni dall'inoculo delle cellule tumorali, il sacrificio dei topi ed il prelievo dei loro polmoni, dopo 23 giorni, hanno consentito di valutare la colonizzazione metastatica, mediante conta dei noduli melanocitici. Il trattamento con ciascuno dei 4 peptidi ha determinato una significativa riduzione del numero di noduli melanocitici per polmone, confermando l'attività anti-melanoma precedentemente osservata *in vitro*. Degno di nota è il fatto che il peptide G10S, che *in vitro* aveva mostrato la minor attività battericida e fungicida, è risultato uno dei più attivi nel modello di melanoma murino.

Attualmente, sono in corso ulteriori studi per saggiare l'attività dei peptidi *in vitro* ed *ex vivo* nei confronti del virus HIV, utilizzando differenti protocolli sperimentali e, in collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof.ssa Anna Vecchiarelli della Sezione di Microbiologia del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche dell'Università degli Studi di Perugia, si stanno valutando le loro potenziali proprietà immunomodulanti nei confronti delle cellule del sistema immunitario murino. Inoltre, saranno proseguiti gli studi sulla attività antitumorale *in vitro* ed *in vivo*, per tentare di chiarirne il meccanismo d'azione. Analogamente, si procederà alla valutazione dell'attività terapeutica dei peptidi in larve di *G. melonella* anche nei confronti di infezioni sperimentali sostenute da agenti batterici, per valutare l'attività antimicrobica in assenza di interferenze dovute al sistema immunitario (**Cotter 2000, Kavanagh 2004**).

Dal momento che i geni codificanti gli Ab sono molto variabili in dimensioni, in questo studio sono state identificate anche proteine molto più grandi dei peptidi sperimentati. Tuttavia, dato che fino ad oggi non è stato possibile ottenere l'espressione in forma solubile di tali proteine "lunghe", saranno effettuati ulteriori tentativi, utilizzando differenti protocolli di espressione in differenti microrganismi o tipi cellulari, quali *E. coli* SHuffle T7 o Origami 2 e *Pichia pastoris*. Anche se molto probabilmente, a causa delle loro dimensioni, lo studio di tali proteine non sarà esente da problematiche e difficoltà ed esse non potranno essere sfruttate per la produzione di nuovi farmaci antimicrobici, tuttavia, potranno essere utili per identificare eventuali nuovi bersagli nelle cellule microbiche e supportare, almeno in parte, le ipotesi teoriche formulate sull'evoluzione degli Ab.



Quanto osservato finora rende plausibile la possibilità di sfruttare peptidi derivati da Ab per lo sviluppo di nuovi farmaci antimicrobici, sulla base della loro attività antimicrobica sia *in vivo* che *in vitro* e la mancanza di tossicità per cellule di organismi superiori. Potrebbero essere utilizzati approcci simili a quelli che hanno consentito la rapida ascesa di peptidi antimicrobici naturali, quale nuova classe di potenziali agenti terapeutici in diverse condizioni cliniche, ad esempio nel campo della oftalmologia o nella terapia di infezioni in pazienti neutropenici affetti da fibrosi cistica. Le ridotte dimensioni dei peptidi antimicrobici, infatti, determinano una loro minore immunogenicità e maggior capacità di penetrazione nelle cellule, rispetto agli Ab convenzionali, anche se questo comporta una accelerata eliminazione a livello renale, responsabile della loro emivita piuttosto breve (**Hancock 2006, Marr 2006, Pereira 2006, Sato 2006, McGregor 2008, Guani-Guerra 2010, Silva 2013, Brandt 2014**).

Dal momento che tali peptidi si sono mostrati molto promettenti, potrebbero essere utilizzati per ottenere derivati amminoacidici mediante “alanine scanning” o sostituzioni amminoacidiche singole o multiple mirate, che potrebbero determinare variazioni rilevanti dell’attività, come già precedentemente osservato con altri peptidi di derivazione anticorpale (**Polonelli 2003, 2008 e 2012**). In questo scenario, quindi, gli Ab potrebbero rappresentare una fonte inesauribile di peptidi antinfettivi e/o antitumorali, potendo essere considerati come veri e propri criptidi, ovvero peptidi biologicamente attivi contenuti (nascosti) in proteine di più grandi dimensioni (**Samir 2011**).

Un’altra più intrigante osservazione, che potrebbe derivare dai risultati dello studio di ricerca del Dottorato, sembra essere quella del loro significato in termini evolutivisti. Essi sembrerebbero, infatti, supportare l’ipotesi secondo la quale i geni codificanti per le regioni V (*locus k* e *locus λ*) e C (*locus heavy*) delle Ig, in cui sono presenti numerose regioni codificanti intervallate da introni, e che oggi sono organizzati in 3 diversi cluster genici presenti su cromosomi diversi, potrebbero essere costituiti da un insieme di geni che ancestralmente codificavano per proteine o peptidi con altre funzioni biologiche, quali attività antimicrobica o antitumorale. In particolare, inizialmente, questi geni potrebbero aver avuto la funzione di codificare per peptidi e proteine caratterizzati da diverse attività biologiche non specifiche e, solo successivamente nel corso dell’evoluzione, essersi associati in una complessa superfamiglia genica che attualmente presiede alla sintesi degli Ab, caratterizzati da un’attività fortemente specifica. Questa teoria sarebbe ulteriormente supportata dal fatto che sono già stati descritti diversi peptidi dotati di interessanti attività biologiche, potenzialmente derivanti dalla digestione enzimatica di IgG o IgM o da intere regioni funzionali delle Ig, come i peptidi CDR derivati dalla regione V o i peptidi Fc derivati dalla porzione C di Ab (**Polonelli 2008 e 2012**).

L’elevata frequenza di peptidi bioattivi, peptidi CDR e Fc e prodotti di geni codificanti Ab, derivanti dagli Ab o ad essi correlati, apre interessanti prospettive da almeno due diversi punti di vista. In primo luogo, come già in precedenza sottolineato, queste osservazioni suggeriscono che gli Ab potrebbero rappresentare una fonte inesauribile di peptidi antinfettivi, antitumorali ed immunomodulanti, fornendo molecole di partenza per ideare nuovi strumenti terapeutici diretti nei confronti di bersagli specifici in diverse malattie umane. Come già ampiamente dimostrato,

molti peptidi biologicamente attivi sono stati sintetizzati dalla sequenza di Ab, indipendentemente dalla loro specificità o isotipo. Le sequenze di Ab depositati in banche dati sono ampiamente disponibili per selezionare qualsiasi peptide di interesse da saggiare per eventuali attività biologiche. Peptidi sintetici di piccole dimensioni possono essere prodotti facilmente ed a basso costo, ed ulteriormente ingegnerizzati ed ottimizzati chimicamente per ottenere derivati più attivi e stabili. Varianti chimiche, quali asds, D-enantiomeri, peptidi contenenti amminoacidi non naturali resistenti alle proteasi o nuovi gruppi funzionali, o coniugati con farmaci convenzionali, radionuclidi o composti citotossici, potrebbero essere sintetizzati per influenzare positivamente bioattività, stabilità nei confronti della proteolisi, farmacocinetica, e/o farmacodinamica, aumentando così il potenziale terapeutico di queste molecole.

Anche se i peptidi sono generalmente considerati scarsi candidati come farmaci, a causa della loro bassa biodisponibilità orale e la propensione ad essere rapidamente metabolizzati, nuove recenti strategie di sintesi e percorsi alternativi di somministrazione hanno permesso lo sviluppo di farmaci a base di peptidi, quali ormoni, agonisti o antagonisti di recettori implicati in oncologia e nell'infiammazione, e peptidi antimicrobici. Molti di essi sono ora commercializzati o rappresentano grandi promesse per il futuro prossimo (**Vlieghe 2010**). Un'ulteriore possibilità potrebbe essere la progettazione e la sintesi di peptidi consenso identificati sulla base delle relazioni struttura-attività del gran numero di peptidi anticorpali bioattivi finora descritti, nel tentativo di ottimizzare e migliorare la loro attività biologica e stabilità. Tali studi sono attualmente in corso.

Ci sono ancora diversi aspetti da chiarire sui peptidi anticorpali. Il più rilevante è legato al loro meccanismo molecolare di azione. Molto peculiare è il caso di KP, finora il peptide anticorpale antinfettivo più studiato. La sua attività ad ampio spettro microbica ed antivirale *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* e *in planta*, anche nei confronti di ceppi multi-resistenti ai farmaci convenzionali, e la sua attività immunomodulante nei confronti di cellule dendritiche murine sono mediate da differenti meccanismi di azione (**Magliani 2011**). Il meccanismo d'azione di peptidi anticorpali antitumorali appare ben delineato (**Dobroff 2010**, **Arruda 2012**, **Figueiredo 2014**). Minori conoscenze sono disponibili per altri peptidi anticorpali antinfettivi. Gli studi in corso chiariranno almeno alcuni di questi aspetti.

Anche l'uso potenziale di peptidi anticorpali come agenti terapeutici necessita ancora di risposte sperimentali. Alcuni peptidi mostrano *in vivo* adeguate caratteristiche di stabilità e di farmacocinetica per raggiungere concentrazioni terapeutiche in diversi modelli animali di infezioni sperimentali e tumori. Mentre la loro non tossicità è stata chiaramente dimostrata, in termini di effetti citotossici *in vivo* e su cellule di mammifero *in vitro*, altri aspetti, come l'impatto sul microbiota endogeno, la possibile selezione di mutanti resistenti, ed i profili di farmacocinetica e di sicurezza, richiedono ancora ulteriori ricerche, sottolineando la necessità di procedere con cautela.

Un'ulteriore e più intrigante implicazione, correlata ai peptidi anticorpali, è la possibilità che almeno alcuni di essi possano essere liberati *in vivo* mediante proteolisi fisiologica, prefigurando così una funzione biologica degli Ab oltre la loro emivita. Se questo fosse vero, peptidi bioattivi

derivati da Ab dovrebbero essere rilevati in fluidi biologici di individui, aprendo un nuovo scenario sul ruolo degli Ab nell'immunità e nell'omeostasi sulla base della possibilità che frammenti anticorpali possano agire come effettori della risposta immunitaria antinfettiva e/o antitumorale in un modo che ricorda molecole dell'immunità innata. Anche se l'analisi completa del proteoma/peptidoma umano è un compito arduo, metodi analitici molto sensibili, come la spettrometria di massa, stanno permettendo di rilevare nel sangue centinaia di migliaia di peptidi endogeni. Anche se l'origine, il ruolo fisiologico ed il significato della maggior parte di questi peptidi in diverse condizioni cliniche sono in gran parte ancora da chiarire (**Zhu 2011**), il rilevamento di criptidi derivati da Ab potrebbe essere di assoluto rilievo.

Studi in corso, utilizzando un metodo di spettrometria di massa multistadio in cromatografia liquida ad elevata risoluzione con ionizzazione elettrospray, hanno fino ad ora fallito nel rilevare, nel siero di individui, qualcuno dei peptidi CDR e Fc precedentemente descritti. Tuttavia, altri peptidi derivati da Ab sono stati rilevati. Uno di essi, un fosfopeptide di 40 amminoacidi derivante dalla regione C di IgM, è caratterizzato da un'attività fungicida *in vitro* ed *in vivo* senza alcun effetto tossico o genotossico nei confronti di cellule di mammifero (osservazioni non pubblicate). Queste osservazioni sarebbero in accordo con altre pubblicate molti anni fa, a partire dal 1970, e relative al rilievo nel siero di individui di un tetrapeptide (TKPR) stimolante la fagocitosi, denominato tuftsina, derivante dal dominio CH2 del frammento Fc di tutte e 4 le classi di IgG. Tale peptide potrebbe essere rilasciato dall'Ab parentale in seguito all'azione di due enzimi specifici (una tuftsina-endocarbossipeptidasi splenica ed una leucochinasi presente sulla membrana dei macrofagi) (**Najjar 1970**). Numerosi studi hanno mostrato che la tuftsina è caratterizzata da un ampio spettro di attività biologiche, comprendenti attività immunostimolatoria, neurotrofica, antimicrobica ed antitumorale *in vitro* ed *in vivo* (**Siemion 1999**). Complessivamente, tutte queste osservazioni sembrano fugare qualsiasi dubbio sulla produzione effettiva di peptidi anticorpali *in vivo*. Questo potrebbe sfumare la tradizionale distinzione tra immunità innata ed adattativa e supportare l'ipotesi che il sistema immunitario, durante l'evoluzione, potrebbe aver adottato meccanismi non convenzionali per la difesa dell'ospite nei confronti di infezioni microbiche e tumori.

Molto deve ancora essere valutato per confermare queste osservazioni e correlazioni ipotetiche, tuttavia i dati attualmente disponibili suggeriscono l'assegnazione agli Ab di nuove, rilevanti funzioni. Indubabilmente, comunque, essi possono rappresentare una fonte illimitata di strutture di partenza per la progettazione razionale di una nuova classe di composti terapeutici antimicrobici, antivirali, immunomodulanti ed antitumorali, da utilizzare da soli o in sinergia con i farmaci esistenti.

In un'epoca di recrudescenza delle malattie da infezione, sempre più dovute a microrganismi e virus patogeni multi-resistenti, difficili da trattare o incurabili, e di diffusa incidenza dei tumori, la necessità di ottenere nuovi composti terapeutici efficaci è sempre più pressante. Peptidi derivati da Ab e altri peptidi antimicrobici naturali potrebbero rappresentare una promettente alternativa (**Cruz 2014, Steckbeck 2014**). Facilità di produzione e di manipolazione a basso costo e

disponibilità di nuovi sistemi di espressione e di somministrazione dovrebbero favorire l'ottenimento di una nuova generazione di agenti terapeutici in condizioni di buone pratiche di fabbricazione.



## *Bibliografía*

- Alt F.W., Baltimore D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4118–22, 1982.
- Antonenkov V.D., Grunau S., Ohlmeier S., Hiltunen J.K. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 525-37, 2010.
- Arruda D.C., Santos L.C., Melo F.M., Pereira F.V., Figueiredo C.R., Matsuo A.L., Mortara R.A., Juliano M.A., Rodrigues E.G., Dobroff A.S., Polonelli L., Travassos L.R.  $\beta$ -Actin-binding complementarity-determining region 2 of variable heavy chain from monoclonal antibody C7 induces apoptosis in several human tumor cells and is protective against metastatic melanoma. *J. Biol. Chem.* 287, 14912-22, 2012.
- Beck A., Wurch T., Bailly C., Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 345-52, 2010.
- Beninati C., Oggioni M.R., Boccanera M., Spinosa M.R., Maggi T., Conti S., Magliani W., De Bernardis F., Teti G., Cassone A., Pozzi G., Polonelli L. Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat. Biotechnol.* 18, 1060–4, 2000.
- Bevan E.A., Makower M. The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc. XIth Int. Congr. Genet.* 1, 202–3, 1963.
- Bhattacharya-Chatterjee M., Foon K.A., Kohler H. Anti-idiotypic monoclonal antibodies as vaccines for human cancer. *Int. Rev. Immunol.* 7, 289-302, 1991.
- Birtalan S., Zhang Y., Fellouse F.A., Shao L., Schaefer G., Sidhu S.S. The intrinsic contributions of tyrosine, serine, glycine and arginine to the affinity and specificity of antibodies. *J. Mol. Biol.* 377, 1518-28, 2008.
- Bistoni F., Vecchiarelli A., Cenci E., Puccetti P., Marconi P., Cassone A. Evidence for macrophage-mediated protection against lethal *Candida albicans* infection. *Infect. Immun.* 51, 668-74, 1986.
- Bogue M., Roth D.B. Mechanism of V(D)J recombination. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 175-80, 1996.
- Bourgeois C., Bour J.B., Aho L.S., Pothier P. Prophylactic administration of a complementarity-determining region derived from a neutralizing monoclonal antibody is effective against respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice. *J. Virol.* 72, 807-10, 1998.
- Brack C., Hiramama M., Lenhard-Schuller R., and Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15, 1–14, 1978.
- Brandt C.R. Peptide therapeutics for treating ocular surface infections. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 30, 691-9, 2014.

- Brena S., Omaetxebarria M.J., Elguezabal N., Cabezas J., Moragues M.D., Pontón J. Fungicidal monoclonal antibody C7 binds to *Candida albicans* Als3. *Infect. Immun.* 75, 3680-2, 2007.
- Bromuro C., Torosantucci A., Chiani P., Conti S., Polonelli L., Cassone A. Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine. *Infect. Immun.* 70, 5462-70, 2002.
- Buckler D.R., Park A., Viswanathan M., Hoet R.M., Ladner R.C. Screening isolates from antibody phage-display libraries. *Drug Discov. Today* 13, 318-24, 2008.
- Bryan R.A., Guimaraes A.J., Hopcraft S., Jiang Z., Bonilla K., Morgenstern A., Bruchertseifer F., Del Poeta M., Torosantucci A., Cassone A., Nosanchuk J.D., Casadevall A., Dadachova E. Toward developing a universal treatment for fungal disease using radioimmunotherapy targeting common fungal antigens. *Mycopathologia* 173, 463-71, 2012.
- Burnet F.M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Austr. J. Sci.* 20, 67-9, 1957.
- Burnet F.M. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity, Vanderbilt University Press, Nashville, Tennessee, 1959.
- Buzzini P., Turchetti B., Vaughan-Martini A.E. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Res.* 7, 749-60, 2007.
- Capodicasa C., Chiani P., Bromuro C., De Bernardis F., Catellani M., Palma A.S., Liu Y., Feizi T., Cassone A., Benvenuto E., Torosantucci A. Plant production of anti- $\beta$ -glucan antibodies for immunotherapy of fungal infections in humans. *Plant Biotechnol. J.* 9, 776-87, 2011.
- Carter P.J., Senter P.D. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Cancer J.* 14, 154-69, 2008.
- Casadevall A., Scharff M.D. Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* 21, 150-61, 1995.
- Cassone A., Conti S., De Bernardis F., Polonelli L. Antibodies, killer toxins and antifungal immunoprotection: a lesson from nature? *Immunol. Today* 18, 164-9, 1997.
- Cenci E., Pericolini E., Mencacci A., Conti S., Magliani W., F. Bistoni., Polonelli L., Vecchiarelli A. Modulation of phenotype and function of dendritic cells by a therapeutic synthetic killer peptide. *J. Leukoc. Biol.* 79, 40-5, 2006.
- Chodirker W.B., Tomasi T.B. jr. Gamma-globulins: quantitative relationships in human serum and nonvascular fluids. *Science* 142, 1080-1, 1963.



- Conti S., Fanti F., Magliani W., Gerloni M., Bertolotti D., Salati A., Cassone A., Polonelli L. Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal, and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *J. Infect. Dis.* 177, 807–11, 1998.
- Conti S., Magliani W., Arseni S., Dieci E., Frazzi R., Salati A., Varaldo P.E., Polonelli L. *In vitro* activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant gram-positive cocci. *Mol. Med.* 6, 613–9, 2000.
- Conti S., Magliani W., Arseni S., Frazzi R., Salati A., Ravanetti L., Polonelli L. Inhibition by yeast killer toxin-like antibodies of oral streptococci adhesion to tooth surfaces in an ex vivo model. *Mol. Med.* 8, 313–7, 2002.
- Cotter G., Doyle S., Kavanagh K. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27, 163-9, 2000.
- Cruz J, Ortiz C., Guzmán F., Fernández-Lafuente R., Torres R. Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. *Curr. Med. Chem.* 21, 2299-321, 2014.
- Dadachova E., Casadevall A. Antibodies as delivery vehicles for radioimmunotherapy of infectious diseases. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 1075-84, 2005,
- Davies D.R., Chacko S. Antibody Structure. *Acc. Chem. Res.* 26, 421-7, 1993.
- De Duve C., Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46, 323-57, 1966.
- Del Rio L.A. Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. *Arch. Biochem. Biophys.* 506, 1-11, 2011.
- Dimitrov D.S., Marks J.D. Therapeutic antibodies: current state and future trends - is a paradigm change coming soon? *Methods Mol. Biol.* 525, 1-27, 2009.
- Dobroff A.S., Rodrigues E.G., Juliano M.A., Friaça D.M., Nakayasu E.S., Almeida I.C., Mortara R.A., Jacysyn J.F., Amarante-Mendes G.P., Magliani W., Conti S., Polonelli L., Travassos L.R. Differential antitumor effects of IgG and IgM monoclonal antibodies and their synthetic complementarity-determining regions directed to new targets of B16F10-Nex2 melanoma cells. *Transl. Oncol.* 3, 204-17, 2010.
- Dochez A.R., Avery O.T. The elaboration of specific soluble substance by Pneumococcus during growth. *J. Exp. Med.* 26, 477–93, 1917.
- Donini M., Lico C., Baschieri S., Conti S., Magliani W., Polonelli L., Benvenuto E. Production of an engineered killer peptide in *Nicotiana benthamiana* by using a potato virus X expression system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6360-7, 2005.

- Donzeau M., Knappik A. Recombinant monoclonal antibodies. *Methods Mol. Biol.* 378, 14-31, 2007.
- Dorfman T., Moore M.J., Guth A.C., Choe H., Farzan M. A tyrosine-sulfated peptide derived from the heavy-chain CDR3 region of an HIV-1-neutralizing antibody binds gp120 and inhibits HIV-1 infection. *J. Biol. Chem.* 281, 28529-35, 2006.
- Dreyer W.J., Bennett J.C. The molecular basis of anti- body formation: a paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 864-69, 1965.
- Early P., Huang H., Davis M., Calame K., Hood L. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981-92, 1980.
- Edelman G.M. Dissociation of  $\gamma$ -globulin. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3155-6, 1959.
- Edelman G.M. Studies on the structure of the gamma globulins, Doctoral Dissertation, The Rockefeller Institute, 1960.
- Edelman G.M. Antibody structure and molecular immunology. Nobel Lecture, December 12, 1972.
- Edelman G.M. Antibody structure and molecular immunology. *Scand. J. Immunol.* 34, 1-22, 1991.
- Edelman G.M. Benecerraf B. On Structural and Functional relations between antibodies and proteins of the gamma-sistem. *Biochem.* 48, 1035-42, 1962a.
- Edelman G.M. Gally J.A. The Nature of Bence- Jones Proteins. *J. Exp. Med.* 116, 207-27, 1962b.
- Edelman G.M., Poulik M.D. Studies on structural units of the gamma- globulins. *J. Exp. Med.* 113, 861-84, 1961.
- Eiden-Plach A., Zagorc T., Heintel T., Carius Y., Breinig F., Schmitt M.J. Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 961-6, 2004.
- Fagraeus A. The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *J. Immunol.* 58, 1-13, 1948.
- Fanning L.J., Connor A.M., Wu G.E. Development of the immunoglobulin repertoire. *Clin. Immunol. Immunopatol.* 79, 1-14, 1996.
- Figueiredo C.R., Matsuo A.L., Massaoka M.H., Polonelli L., Travassos L.R. Anti-tumor activities of peptides corresponding to conserved complementary determining regions from different immunoglobulins. *Peptides* 59, 14-9, 2014.

- Fuchs B.B., O'Brien E., El Khouryl J.B., Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1, 475-82, 2010.
- Fugmann S.D., Lee A.I., Shockett P.E., Villey I.J., Schatz D.G. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 495-527, 2000.
- Gabrielli E., Pericolini E., Cenci E., Monari C., Magliani W., Ciociola T., Conti S., Gatti R., Bistoni F., Polonelli L., Vecchiarelli A. Antibody constant region peptides can display immunomodulatory activity through activation of the Dectin-1 signalling pathway. *PLoS ONE* 7, e43972, 2012.
- Gabrielli E., Pericolini E., Cenci E., Ortelli F., Magliani W., Ciociola T., Bistoni F., Conti S., Vecchiarelli A., Polonelli L. Antibody complementarity-determining regions (CDRs): a bridge between adaptive and innate immunity. *PLoS ONE* 4, e8187, 2009.
- Gellert M. V(D)J recombination: rag proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 7, 1101-32, 2002.
- Gong R., Xiao G. Engineered antibody variable and constant domains as therapeutic candidates. *Pharm. Pat. Anal.* 2, 637-46, 2013.
- Guani-Guerra E.T., Santos-Mensoza S.O., Lugo-Reyes S.O., Teran L.M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.* 135, 1-11, 2010.
- Hancock R.E., Sahl H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24, 1551-7, 2006.
- Hao B., Cheng S., Clancy C.J. and Hong Nguyen M. Caspofungin Kills *Candida albicans* by Causing both Cellular Apoptosis and Necrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 326-32, 2013.
- Heater L. Van Epps. How Heidemberg and Avery sweetened immunology. *J. Exp. Med.* 202, 1306, 2005.
- Heidelberger M., Avery O.T. The soluble specific substance of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 38, 73-9, 1923.
- Heidelberger M., Avery O.T. The soluble specific substance of pneumococcus. Second paper. *J. Exp. Med.* 40, 301-17, 1924
- Herlyn D., Wettendorff M., Koprowski H. Modulation of patient's immune response by anti-idiotypic antibodies. *Int. Rev. Immunol.* 4, 347-57, 1989.
- Hochman J., Inbar D., Givol D. An active antibody fragment (Fv) composed of the variable portions of heavy and light chains. *Biochem.* 12, 1130-5, 1973.

- Holliger P., Hudson P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1126-36, 2005.
- Holt L.J., Herring C., Jespers L.S., Woolven B.P., Tomlinson I.M. Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol.* 21, 484-90, 2003.
- Hoogenboom H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* 23, 1105-16, 2005.
- Hozumi N., Tonegawa S. Evidence for somatic re-arrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 3628-32, 1976.
- Hudson P.J., Souriau C. Engineered antibodies. *Nat. Med.* 9, 129-34, 2003.
- Ishizaka K., Ishizaka T., Hornbrook M.M. Physico-chemical properties of human reaginic antibody: IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* 97, 75-85, 1966.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. Immunobiology 5<sup>th</sup> edition. The immune system in health and disease. Ed. Garland Science, 2001.
- Jerne N.K. The natural-selection theory of antibody formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41, 849-57, 1955.
- Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* 125, 373-89, 1974.
- Jones J.M., Gellert M. Ordered assembly of the V(D)J synaptic complex ensures accurate recombination. *EMBO J.* 21, 4162-71, 2002.
- Jung D., Alt F.W. Unraveling V(D)J Recombination: Review Insights into Gene Regulation. *Cell* 116, 299-311, 2004.
- Kapitonov V.V., Jurka J. RAG1 Core and V(D)J recombination signal sequences were derived from Transib Transposon. *PLoS Biol.* 3, e181, 2005.
- Kavanagh K., Reeves E.P. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 101-12, 2004.
- Kawasaki K., Minoshima S., Nakato E., Shibuya K., Shintani A., Schmeits J.L., Wang J., Shimizu N. One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res.* 7, 250-61, 1997.
- Kobayashi D., Kondo K., Uehara N., Otokozawa S., Tsuji N., Yagihashi A., Watanabe N. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3113-17, 2002.

- Lieber M.R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* 283, 1-5, 2008.
- Little S.F., Webster W.M., Fisher D.E. Monoclonal antibodies directed against protective antigen of *Bacillus anthracis* enhance lethal toxin activity *in vivo*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62, 11-22, 2011.
- Liu L., Li Y. The unexpected side effects and safety of therapeutic monoclonal antibodies. *Drugs Today (Barc.)* 50, 33-50, 2014.
- Lowes K.F, Shearman C.A., Payne J., MacKenzie D., Archer D.B., Merry R.J., Gasson M.J. Prevention of spoilage in feed and food by yeast the yeast mycocin HMK. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1066-76, 2000.
- Ma Y.U., Pannicke K., Schwarz K., Lieber M.R. Hairpin opening and overhang processing by an artemis/DNA-dependent protein kinase complex in non homologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781-94, 2002.
- Maddaloni M., Cooke C., Wilkinson R., Stout A.V., Eng L., Pincus S.H. Immunological characteristics associated with the protective efficacy of antibodies to ricin. *J. Immunol.* 172, 6221-8, 2004.
- Magliani W., Conti S., Ciociola T., Giovati L., Zanello P.P., Pertinhez T., Spisni A., Polonelli L. Killer peptide: a novel paradigm of antimicrobial, antiviral and immunomodulatory auto-delivering drugs. *Future Med. Chem.* 3, 1209-31, 2011.
- Magliani W., Conti S., Cunha R.L.O.R., Travassos L.R., Polonelli L. Antibodies as Crypts of Antiinfective and Antitumor Peptides. *Curr. Med. Chem.* 16, 2305-23, 2009.
- Magliani W., Conti S., De Bernardis F., Gerloni M., Bertolotti D., Mozzoni P., Cassone A., Polonelli L. Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity. *Nat. Biotechnol.* 15, 155-58, 1997b.
- Magliani W., Conti S., Frazzi R., Ravanetti L., Maffei D.L., Polonelli L. Protective antifungal yeast killer toxin-like antibodies. *Curr. Mol. Med.* 5, 443-52, 2005.
- Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L. Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 369-400, 1997a.
- Magliani W., Conti S., Giovati L., Maffei D.L., Polonelli L. Anti-beta-glucan-like immunoprotective candidacidal antiidiotypic antibodies. *Front. Biosci.* 13, 6920-37, 2008a.
- Magliani W., Conti S., Giovati L., Zanello P.P., Sperindè M., Ciociola T., Polonelli L. Antibody Peptide based antifungal immunotherapy. *Front. Microbiol.* 3, 1-7, 2012.

- Magliani W., Conti S., Salati A., Vaccari S., Ravanetti L., Domenico L., Maffei D., Polonelli L. Therapeutic potential of yeast killer toxin-like antibodies and mimotopes. *FEMS Yeast Res.* 5, 11-18, 2004.
- Magliani W., Conti S., Travassos L.R., Polonelli L. From yeast killer toxins to antibiobodies and beyond. *FEMS Microbiol. Lett.* 288, 1-8, 2008b.
- Mansilla-Soto J., Cortes P. VDJ Recombination: Artemis and its *in vivo* role in hairpin opening. *J. Exp. Med.* 197, 543-47, 2003.
- Marr A.K., Gooderham W.J., Hancock R.E. Antimicrobial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 468-72, 2006.
- Marrack J.R. The Chemistry of Antigens and Antibodies. *J. Phys. Chem.* 38, 989-9, 1934.
- Maurya K.I., Pathak S., Sharma M., Sanwal H., Chaudhary P., Tupe S., Deshpande M., Singh Chauhan V., Prasad R. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. *Peptides* 32, 1732-40, 2011.
- McBlane J.F., van Gent D.C., Ramsden D.A., Romeo C., Cuomo C.A., Gellert M., Oettinger M.A. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387-95, 1995.
- McGregor D.P. Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 616-19, 2008.
- Milstein C., Brownlee G.G., Cartwright E.M., Jarvis J.M., and Proudfoot N.J. Sequence analysis of immunoglobulin light chain messenger RNA. *Nature* 252, 354-59, 1974.
- Mondon P., Dubreuil O., Bouayadi K., Kharrat H. Human antibody libraries: a race to engineer and explore a larger diversity. *Front. Biosci.* 13, 1117-29, 2008.
- Mundy C.L., Patenge N., Matthews A.G., Oettinger M.A. Assembly of the RAG1/RAG2 synaptic complex. *Mol. Cell. Biol.* 22, 69-77, 2002.
- Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai Y., Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-63, 2000.
- Najjar V.A., Nishioka K. 'Tuftsin': a natural phagocytosis stimulating peptide. *Nature* 228, 672-73, 1970.
- Nelson A.L., Dhimolea E., Reichert J.M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 767-74, 2010.

- Nevinsky G.A., Buneva V.N. Natural catalytic antibodies in norm, autoimmune, viral, and bacterial diseases. *ScientificWorldJournal* 10, 1203-33, 2010.
- Ng JH, Ilag LL. Cryptic protein fragments as an emerging source of peptide drugs. *IDrugs* 9, 343-46, 2006.
- Nicasio M., Sautto G., Clementi N., Diotti R.A., Criscuolo E., Castelli M., Solforosi L., Clementi M., Burioni R. Neutralization interfering antibodies: a “novel” example of humoral immune dysfunction facilitating viral escape? *Viruses* 49, 1731-52, 2012.
- O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. Investigation of the AB (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421-6, 2000.
- Oren Z., Shai Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. *Biochemistry* 36, 1826-35, 1997.
- Padlan E.A., Abergel C., Tipper J.P. Identification of specificity determining residues in antibodies. *FASEB J.* 9, 133-9, 1995.
- Park B.W., Zhang H.T., Wu C., Berezov A., Zhang X., Dua R., Wang Q., Kao G., O'Rourke D.M., Greene M.I., Murali R. Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables P185HER2/neu tyrosine kinases *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 18, 194-8, 2000.
- Pauling L. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* 62, 2643-57, 1940.
- Pedersen, K.O. Ultracentrifugal Studies on Serum and Serum Fractions, Uppsala, Almqvist and Wiksell, 1945.
- Pereira H.A. Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7, 229-34, 2006.
- Pertinhez T.A., Conti S., Ferrari E., Magliani W., Spisni A., Polonelli L. Reversible self-assembly: a key feature for a new class of autodelivering therapeutic peptides. *Mol. Pharm.* 6, 1036-9, 2009.
- Petersen-Mahrt S.K., Harris R.S., Neuberger M.S. AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 418, 99-105, 2002.
- Pettoello-Mantovani M., Nocerino A., Polonelli L., Morace G., Conti S., Di Martino L., De Ritis G., Iafusco M., Guandalini S. *Hansenula anomala* killer toxin induces secretion and severe acute injury in the rat intestine. *Gastroenterology* 109, 1900-6, 1995.
- Pimenta D.C., Lebrun I. Cryptides: buried secrets in proteins. *Peptides* 28, 2403-10, 2007.

- Polonelli L., Archibusacci C., Sestito M., Morace G. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J. Clin. Microbiol.* 17, 774-80, 1983.
- Polonelli L., De Bernardis F., Conti S., Boccanera M., Magliani W., Gerloni M., Cantelli C., Cassone A. Human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies. *J. Immunol.* 156, 1880-5, 1996.
- Polonelli L., Ciociola T., Magliani W., Zanello P.P., D'Adda T., Galati S., De Bernardis F., Arancia S., Gabrielli E., Pericolini E., Vecchiarelli A., Arruda D.C., Pinto M.R., Travassos L.R., Pertinhez T.A., Spisni A., Conti S. Peptides of the constant region of antibodies display fungicidal activity. *PLoS ONE* 7, e34105, 2012.
- Polonelli L., Conti S., Gerloni M., Magliani W., Castagnola M., Morace G., Chezzi C. "Antibiobodies": antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. *J. Med. Vet. Mycol.* 29, 235-42, 1991.
- Polonelli L., De Bernardis F., Conti S., Boccanera M., Gerloni M., Morace G., Magliani W., Chezzi C. & Cassone C. Idiotype intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like antiidiotypic antibodies. *J. Immunol.* 152, 3175-82, 1994.
- Polonelli L., Lorenzini R., De Bernardis F., Gerloni M., Conti S., Morace G., Magliani W., Chezzi C. Idiotype vaccination: Immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. *Scand. J. Immunol.* 37, 105-10, 1993.
- Polonelli L., Lorenzini R., De Bernardis F., Morace G. Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 96, 103-7, 1986.
- Polonelli L., Magliani W., Ciociola T., Giovati L., Conti, S. From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 99, 35-41, 2011.
- Polonelli L., Magliani W., Conti S., Bracci L., Lozzi L., Neri P., Adriani D., De Bernardis F., Cassone A. Therapeutic activity of an engineered synthetic killer antiidiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis. *Infect. Immun.* 71, 6205-12, 2003.
- Polonelli L., Morace G. Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 25, 460-2, 1987.
- Polonelli L. & Morace G. Yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 26, 602-4, 1988.
- Polonelli L., Pontón J., Elguezabal N., Moragues M.D., Casoli C., Pilotti E., Ronzi P., Dobroff A.S., Rodrigues E.G., Juliano M.A., Maffei D.L., Magliani W., Conti S., Travassos L.R. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLoS ONE* 3, e2371, 2008.



- Polonelli L., Seguy N., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Cantelli C., Magliani W., Cailliez C. Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4, 142–6, 1997.
- Porter R.R. The formation of a specific inhibitor by hydrolysis of rabbit antiovalbumin. *Biochem.* 46, 479–84, 1950.
- Porter R.R. The Hydrolysis of Rabbit  $\gamma$ -Globulin and Antibodies with Crystalline Papain. *Biochem.* 73, 119–26, 1959.
- Porter R.R. Structural studies of immunoglobulins. *Science* 18, 713–6, 1973.
- Presta L.G. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 460–70, 2008.
- Qiu X.Q., Wang H., Cai B., Wang L.L., Yue S.T. Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting. *Nat. Biotechnol.* 25, 921–9, 2007.
- Rachini A., Pietrella D., Lupo P., Torosantucci A., Chiani P., Bromuro C., Proietti C., Bistoni F., Cassone A., Vecchiarelli A. An anti-beta-glucan monoclonal antibody inhibits growth and capsule formation of *Cryptococcus neoformans in vitro* and exerts therapeutic, anticryptococcal activity *in vivo*. *Infect. Immun.* 75, 5085–94, 2007.
- Rowe D.S., Fahey J.L. A new class of human immunoglobulin normal serum IgD. *J. Exp. Med.* 121, 185–99, 1965.
- Samir P., Link A.J. Analyzing the cryptome: uncovering secret sequences. *AAPS J.* 13, 152–8, 2011.
- Sakano H., Hüppi K., Heinrich G., Tonegawa S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 280, 288–94, 1979.
- Sato A.K., Viswanathan M., Kent R.B., Wood C.R. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 638–42, 2006.
- Schatz P.P., Swanson P.C. V(D)J recombination: Mechanism of Initiation. *Annu. Rev. Genet.* 45, 167–202, 2011.
- Schilling J., Clevinger B., Davie J.M., Hood L. Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments. *Nature* 283, 35–40, 1980.
- Schirrmann T., Al-Halabi L., Dübel S., Hust M. Production systems for recombinant antibodies. *Front. Biosci.* 13, 4576–94, 2008.

- Seidman J.G., Leder A., Edgell M.H., Polsky F., Tilghman S.M., Tiemeier D.C., Leder P. Multiple related immunoglobulin variable-region genes identified by cloning and sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3881–5, 1978.
- Siemion I.Z., Kluczyk A. Tuftsin: on the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery. *Peptides* 20, 645-74, 1999.
- Silva N.C., Sarmiento B., Pintado M. The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology. *Int. J. Antimicrob. Agents* 41, 5–10, 2013.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Sheider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 237, 123-130, 1988.
- Steen S.B., Gomelsky L., Speidel S.L., Roth D.B. Initiation of V(D)J recombination *in vivo*: role of recombination signal sequence in formation of single and paired double-strand breaks. *EMBO J.* 16, 2656-64, 1997.
- Steckbeck J.D., Deslouches B., Montelaro R.C. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? *Expert Opin. Biol. Ther.* 14, 11-4, 2014
- Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., Boman H.G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246-8, 1981.
- Stracan T., Read A.P. *Genetica molecolare umana*. Ed. Zanichelli, 2012.
- The Antimicrobial Peptide Database. <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (Accessed 22 November 2012).
- Tomasi T.B. The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system. *Immunol. Today* 13, 416-8. 1992
- Tonegawa S. Reiteration frequency of immunoglobulin light chain genes: Further evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 203-7, 1976.
- Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. *Biosci. Rep.* 8, 3-26, 1988.
- Torosantucci A., Bromuro C., Chiani P., De Bernardis F., Berti F., Galli C., Norelli F., Bellucci C., Polonelli L., Costantino P., Rappuoli R., Cassone A. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J. Exp. Med.* 202, 597-606, 2005.
- Turk J.L. Almroth Wright-phagocytosis and opsonization. *J. R. Soc. Med.* 87, 576-7, 1994.
- Ueki N., Someya K., Matsuo Y., Wakamatsu K., Mukai H. Cryptides: functional cryptic peptides hidden in protein structures. *Biopolymers* 88, 190–8, 2007.

- Valbuena O., Marcu K.B., Weigert M., and Perry R.P. Multiplicity of germline genes specifying a group of related mouse k chains with implications for the generation of immunoglobulin diversity. *Nature* 276, 780–4, 1978.
- van Gent D.C., McBlane J.F., Ramsden D.A., Sadofsky M.J., Hesse J.E., Gellert M. Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system. *Cell* 81, 925–34, 1995.
- van Gent D.C., Mizuuchi K., and Gellert M. Similarities between initiation of V(D)J recombination and retroviral integration. *Science* 271, 1592–4, 1996.
- Vlieghe P., Lisowski V., Martinez J., Khrestchatsky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today* 15, 40-56, 2010.
- Von Behring E., Kitasato S. [The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890]. *Mol. Immunol.* 28, 1319-20, 1991.
- Wachinger M., Kleinschmidt A., Winder D., Von Pechmann N., Ludvigsen A., Neumann M., Holle R., Salmons B., Erfle V., Brack-Werner R. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of Human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J. Gen. Virol.* 79, 731-40, 1998.
- Waldmann T.A. The arrangement of immunoglobulin and T-cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Adv. Immunol.* 40, 247-321, 1987.
- Weigert M., Gatmaitan L., Loh E., Schilling J., and Hood L. Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. *Nature* 276, 785–90, 1978.
- Wright A.E. *Studies on Immunisation*. London: Constable, 1909.
- Wright R. Transmission electron microscopy of yeast. *Microsc. Res. Tech.* 51, 496-510, 2000.
- Yamtich J., Swesy J.B. DNA Polymerase family X: Structure and cellular role. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1136-50, 2010.
- Zhu P., Bowden P., Zhang D., Marshall J.G. Mass spectrometry of peptides and proteins from human blood. *Mass Spectrom. Rev.* 30, 685-732, 2011.

# Appendice

## **Cromosoma 22 – Locus lambda**

### ✓ **Frammento V (Kawasaki 1997)**

#### >A2MYD6 A2MYD6\_HUMAN V1-2 protein (Fragment) [Homo sapiens]

QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTA  
SLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNF

#### >A2MYD5 A2MYD5\_HUMAN V2-6 protein (Fragment) [Homo sapiens]

SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVPLVIYRDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLT  
ISRAQAGDEADYYCQVWDSSTA

#### >A2MYD4 A2MYD4\_HUMAN V2-7 protein (Fragment) [Homo sapiens]

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVPLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLT  
ISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNH

#### >A2MYD3 A2MYD3\_HUMAN V1-18 protein (Fragment) [Homo sapiens]

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVHWYQQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDQFSGSKSGTSA  
SLAITGLQSEDEADYYCKAWDNSLNA

#### >A2MYD2 A2MYD2\_HUMAN V1-19 protein (Fragment) [Homo sapiens]

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSAT  
LGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAG

#### >A2MYD1 A2MYD1\_HUMAN V4-4 protein (Fragment) [Homo sapiens]

QPVLTQPSSHSASSGASVRLTCLMLSSGFSVGFDFWIRWYQQKPGNPPRYLLYHSDSNKGQSGVPSRFSGSND  
ASANAGILRISGLQPEDEADYYCGTWHSNSKT

#### >A2MYDo A2MYDo\_HUMAN V1-17 protein (Fragment) [Homo sapiens]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNVYVWYQQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSAS  
LAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGP

#### >A2MYC9 A2MYC9\_HUMAN V4-3 protein (Fragment) [Homo sapiens]

QPVLTQPTSLASASPGASARLTCTLRSGINLGSYRIFWYQQKPEPPRYLLSYSDSSKHQSGVPSRFSGSKD  
ASSNAGILVISGLQSEDEADYYCMIWHSSAS

#### >A2MYC8 A2MYC8\_HUMAN V5-2 protein (Fragment) [Homo sapiens]

QPVLTQPPSASASLGASVTLTCTLSSGYSNYKVDWYQQRPGKGRFVVMRVGTGGIVGSKGDGIPDRFVVLGSG  
LNRYLTIKNIQEEDSDYHCGADHGSGSNFV

#### >AoM8Q7 AoM8Q7\_HUMAN V2-1 protein (Fragment) [Homo sapiens]

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVPLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLT  
ISGTQAMDEADYYCQAWDSSTA

#### >Q5NV92 Q5NV92\_HUMAN V5-6 protein (Fragment) [Homo sapiens]

QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSGHSSYAIAWHQQQPEKGRPYLMKLNSDGHSHKGDGIPDRFSGSSSGA  
ERYLTISSLQSEDEADYYCQTWGTGI

#### >Q5NV91 Q5NV91\_HUMAN V2-19 protein (Fragment) [Homo sapiens]

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDVLAKKYARWFQQKPGQAPVPLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGTTVTLT  
ISGAQVEDEADYYCYSAADNNL

#### >Q5NV90 Q5NV90\_HUMAN V2-17 protein (Fragment) [Homo sapiens]

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKPGQAPVPLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGTTVTLT  
ISGVQAEDEADYYCQADSSGTYP

>Q5NV89 Q5NV89\_HUMAN V1-7 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QSALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSQYQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRFGSKSGNTA  
 SLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSSTF

>Q5NV88 Q5NV88\_HUMAN V1-22 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDRFGSIDSSNS  
 ASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSN

>Q5NV87 Q5NV87\_HUMAN V4-6 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 RPVLTQPPSLSASPGATARLPCTLSDDLVSVGKMFQYQKPGSSPRLFLYHYSDDKQLGPGVPSRVSGSKE  
 TSSNTAFLLISGLQPEDEADYYCQVYESSAN

>Q5NV86 Q5NV86\_HUMAN V1-20 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNIVGNQGAAWLQHQHPPKLLSYRNNNRPSGISERFSASRSGNTAS  
 LTITGLQPEDEADYYCSALDSSLSA

>Q5NV85 Q5NV85\_HUMAN V2-8 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 SYELTQPHSVSVATAQMARITCGGNNIGSKAVHWYQQKPGQDPVLVIYSDSNRPSGIPERFGSNPGNTATLT  
 ISRIEAGDEADYYCQVWDSDDHP

>Q5NV84 Q5NV84\_HUMAN V1-3 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QSALTPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMIDVSKRPSGVPDRFGSKSGNTA  
 SLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSYTF

>Q5NV83 Q5NV83\_HUMAN V3-3 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QAVVTQEPPLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGHYPIYWFQKPGQAPRTLIYDTSNKHSWTPARFGSLLGGKA  
 ALTLGGAQPEDEAEYYCLLSYSGAR

>Q5NV82 Q5NV82\_HUMAN V4-2 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QAVLTQPSLSASPGASASLTCTLRSGINVTYRIYWYQKPGSPPQYLLRYKSDSKQQGSGVPSRFSGSKD  
 ASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSSAS

>Q5NV81 Q5NV81\_HUMAN V1-16 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFGSKSGTSAS  
 LAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGP

>Q5NV80 Q5NV80\_HUMAN V3-2 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QTVVVTQEPPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGYYPNWFQKPGQAPRALIYSTSNKHSWTPARFGSLLGGKA  
 ALTLGSGVQPEDEAEYYCLLYYGAQ

>Q5NV79 Q5NV79\_HUMAN V5-4 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QPVLTQSSSASASLGSVVKLTCTLSGGHSSYIIAWHQQPGKAPRYLMKLEGGSGSYNKGSGVPDRFGSSSSGA  
 DRYLTIISNLQFEDEADYYCETWDSNT

>Q5NV75 Q5NV75\_HUMAN V2-15 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 SYELTQLPSVSVSPGQTARITCSGDVLGENYADWYQKPGQAPLVIYEDSERYPGIPERFGSTSGNTTTLT  
 ISRVLTEDEADYYCLSGDEDNP

>Q5NV74 Q5NV74\_HUMAN V2-14 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFGSNSGNTATLT  
 ISRVEAGDEADYYCQVWDSDDHP

>Q5NV73 Q5NV73\_HUMAN V2-13 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYASWYQKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFGSSSGNTASLT  
 ITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHL

>Q5NV70 Q5NV70\_HUMAN V1-11 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QSVLTQPPSVSEAPRQRTVITCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLPSGVSDRFSGSKSGTSAS  
 LAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN

>Q5NV69 Q5NV69\_HUMAN V1-13 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSA  
 SLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGS

>Q5NV68 Q5NV68\_HUMAN V4-1 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QPVLTQPPSSSASPGESARLTCTLPDINVGSYNIYWYQQKPGSPPRYLIIYYSDSDKGGQSGVPSRFSGSKD  
 ASANTGILLISGLQSEDEADYYCMIWPSNAS

>Q5NV67 Q5NV67\_HUMAN V1-11 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPKAPKLLIYYDDLLPSGVSDRFSGSKSGTSAS  
 LAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGP

>Q5NV66 Q5NV66\_HUMAN V1-9 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QSALTQPPFVSGAPGQSVTISCTGTSSDVGDYDHFVWYQKRLSTTSRLLIYNVNTRPSGISDLFSGSKSGNMA  
 SLTISGLKSEVEANYHCSLYSSSYTF

>Q5NV65 Q5NV65\_HUMAN V1-5 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSYNRVSWYQQPPGTAPKLMIYEVSNRPSGVPDRFSGSKSGNTA  
 SLTISGLQAEDEADYYCSLYTSSSTF

>Q5NV64 Q5NV64\_HUMAN V2-11 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 SYELTQPPSVSVSLGQMARITCSGEALPKKYAYWYQQKPGQFPVLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGTIVTLT  
 ISGVQAEDEADYYCLSADSSGTYP

>Q5NV63 Q5NV63\_HUMAN V1-4 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTA  
 SLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTL

>Q5NV62 Q5NV62\_HUMAN V3-4 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 QTVVVTQEPSPFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYYPWYQQTPGQAPRTLIYSTNTRSSGVPDRFSGSILGNKA  
 ALTITGAQADDESYYCVLYMGSGIS

>Q5NV61 Q5NV61\_HUMAN V5-1 protein (Fragment) [Homo sapiens]  
 LPVLTQPPSASALLGASIKLTCTLSSEHSTYTIWYQQRPRSPQYIMKVKSDGSHSKGDGIPDRFMSSSGAD  
 RYLTFSNLQSDDEAEYHCGESHIDGQVG

✓ **Frammento J**

**IGLJ1; immunoglobulin lambda joining 1** (prima di C1)

Map: 22q11.2

>ENA|BAA20023|BAA20023.1 Homo sapiens (human) hypothetical protein : Location:1..38  
 TTATGTCTTCGGAAGCTGGGACCAAGGTCACCGTCCT

Proteina:

LCLRNWDQGHRP

**IGLJ2; immunoglobulin lambda joining 2** (prima di C2)

Map: 22q11.2

>ENA|BAA20025|BAA20025.1 Homo sapiens (human) hypothetical protein : Location:1..38  
 TGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCT

Proteina:

CGIRRRDQADRP

**IGLJ3; immunoglobulin lambda joining 3** (prima di C3)

Map: 22q11.2

>ENA|BAA20027|BAA20027.1 Homo sapiens (human) hypothetical protein : Location:1..38  
 TTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCT

Proteina:

LGVRRRDQADRP

**IGLJ7; immunoglobulin lambda joining 7 (prima di C7)**

Map: 22q11.2

&gt;ENA|BAA20900|BAA20900.1 Homo sapiens (human) hypothetical protein : Location:1..38

TGCTGTGTTTCGGAGGAGGCCACCCAGCTGACCGCCCTCG (T-A-C-G)

Proteina:

CCVRRRHFPADRPR

✓ **Frammento C****IGLC1; immunoglobulin lambda constant 1 (Mcg marker)**

Map: 22q11.1-q11.2 (EMBL-Bank)

&gt;ENA|X51755|X51755.1 Human lambda-immunoglobulin constant region complex (germline) :

Location:4008..4327

CAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTCCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAACAAGGCCACAC  
TAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAA  
GGCGGGAGTGAGACCACCAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTG  
ACGCCCCGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGA  
CAGTGGCCCCACAGAATGTTTCATAG

Proteina:

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSL  
TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS\***IGLC2; immunoglobulin lambda constant 2 (Kern-Oz- marker)**

Map: 22q11.1-q11.2 (EMBL-Bank)

&gt;ENA|J00253|J00253.1 Homo sapiens immunoglobulin lambda light chain C2 region (IGLC2) gene, partial cds. : Location:30..349

CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACAC  
TGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTTGAAAGCAGATAGCAGCCCCGTCAA  
GGCGGGAGTGAGACCACACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTG  
ACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGA  
CAGTGGCCCCACAGAATGTTTCATAG

Proteina:

QPKAAPSVTTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSL  
TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS\***IGLC3; immunoglobulin lambda constant 3 (Kern-Oz+ marker)**

Map: 22q11.1-q11.2 (EMBL-Bank)

&gt;ENA|J00254|J00254.1 Homo sapiens immunoglobulin lambda light chain C3 region (IGLC3) gene, partial cds. : Location:1..315

CCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCACCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGG  
TGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTTCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGC  
GGGGGTGGAGACCACACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACG  
CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAG  
TTGCCCTACGGAATGTTTCATAG

Proteina:

QPKAAPSVTTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSL  
TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS\***IGLC6; immunoglobulin lambda constant 6 (Kern+Oz- marker, gene/pseudogene)**

Map: 22q11.1-q11.2 (EMBL-Bank)

&gt;ENA|J03011|J03011.1 Homo sapiens immunoglobulin lambda light chain C6 region (IGLC6) gene, partial cds. : Location:1..321

GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCATCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCA  
CACTGGTGTGCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGAAAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGT  
CAACACGGGAGTGAGACCACACACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGC  
CTGACGCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGA  
AGACAGTGGCCCCGTCAGAATGTTTCATAG

Proteina:

GQPKAAPSVTTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSL  
LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS\*

**IGLC7; immunoglobulin lambda constant 7**

Map: 22q11.1-q11.2 (EMBL-Bank)

&gt;ENA|CAA36053|CAA36053.1 Homo sapiens (human) hypothetical protein : Location:1..320

CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACCTCTGTTCCCACCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACAC  
 TGGTGTGTCTCGTAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAA  
 GGTGGGAGTGGAGACCACCAAACCCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTATGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTG  
 ACGCCCAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCGGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGA  
 CAGTGGCCCCCTGCAGAATGCTCTTAG

Proteina:

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAFTVAWKADGSPVKVGVETTKPSKQSNKYAASSYLSL  
 TPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAEC

**Cromosoma 2 – Locus kappa**✓ **Frammento V****Gene name: IGKV; immunoglobulin kappa variable (esoni 131-185, 311-606)**

Map: 2p12

&gt;ENA|K01322|K01322.1 Human Ig germline kappa L-chain V-region gene (HK146), V-kappa-1. :

Location:131..185-311..605

ATGGACATGAGGGTCTCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGTGACATCC  
 AGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGGCA  
 GGGTATTAGCAGCTGGTTAGCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCA  
 TCCAGTTTGCAGAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA  
 GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCCT

Proteina:

MDMRVLAQQLGLLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRARQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAA  
 SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYP

**IGKV1-5; immunoglobulin kappa variable 1-5 (esoni 122-176, 302-597) hk102**

Map: 2p12

&gt;ENA|J00245|J00245.1 Homo sapiens Ig kappa chain V-region (IGKV) gene, partial cds. :

Location:1..800

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGACATCC  
 AGATGACCCAGTCTCCTCCACCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCTGGGCGCAGTCA  
 GAGTATTAGTAGCTGGTTGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGATGCC  
 TCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCA  
 GCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCACCTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCT

Proteina:

MDMRVPAQLLGLLLLLLWLPGAKCDIQMTQSPSTLSASVGDVRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDA  
 SSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCQQYNSYS

**Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 precursor (V: 1384-1720; J1: 1684-1720)  
kappa immunoglobulin subgroup V kappa II**

Klobeck H.G., et al. Human immunoglobulin kappa light chain genes of subgroups II and III.  
 Nucleic Acids Res. 1985 Sep 25; 13:6499-513

Map: 2

>ENA|CAA77315|CAA77315.1 Homo sapiens (human) kappa immunoglobulin subgroup  
**V kappa II** : Location:1..397

ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCCCAGGATCCAGTGGGGATGTTGTGATGA  
 CTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCT  
 CGTATACAGTGATGAAACACCTACTTGAATTGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATT  
 TATAAGGTTTCTAACCGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTGAGGACTGATTTACAC  
 TGAAAATCAGCAGGCTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGGTACACACTGGTCTGGAC  
 GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA

Proteina:

MRLPAQLLGLLLMLWVPGSSGDVMTQSPSLPVLTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPQSPRRLI  
 YKVSNRDVGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQGTGTHSWTFGQGTKEIK



**SEQUENZA SEGNALE SEGMENTO J****Ig kappa chain V-III region IARC/BL41 precursor (V: 615-936; J2: 900-936)**

Klobeck H.G., et al. Human immunoglobulin kappa light chain genes of subgroups II and III. Nucleic Acids Res. 1985 Sep 25; 13:6499-513

Map: 2

>ENA|Z00021|Z00021.1 H.sapiens rearranged DNA for kappa immunoglobulin subgroup V kappa III : Location:615..936

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGCGCCACTCTCTCCTGCAGGG  
CCAGTCAGAGTGTAGCAGCAACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACGTGGCCAGTCTCCCAGGCTCCTCATCCG  
TGATGCATCCAGCAGGGCCAATGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC  
ATCATCAGTAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCTCAGCAGTATAGTACCTCACCGTACACTT  
TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Proteina:

EIVLTQSPGTLTSLSPGESATLSCRASQSVSSNLAWYQQKRGQSPRLLIIRDASSRANGIPDRFSGSGSGTDFTL  
IISRLEPEDFAVYYCQQYSTSPYTFGQGTKLEIK

**IGKV4-1; immunoglobulin kappa variable 4-1 (V: 377-679)**

Klobeck H.G., et al. Subgroup IV of human immunoglobulin K light chains is encoded by a single germline gene. Nucleic Acids Res. 13(18): 6515-29 (1985)

Map: 2p12

>ENA|Z00023|Z00023.1 H.sapiens germline gene for kappa-immunoglobulin subgroup V kappa IV : Location:377..679

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGT  
CCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAATACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCC  
TCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCT  
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCTCAGCAATATT  
ATAGTACTCCT

Proteina:

DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS  
GTDFTLTITISLQAEDVAVYYCQQYYSTP

**Ig kappa chain V-IV region JI precursor (Burkitt lymphoma derived cell line JI) (V: 1812-2150)**

>ENA|Z00022|Z00022.1 H.sapiens rearranged gene for kappa immunoglobulin subgroup V kappa IV : Location:1812..2150

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGT  
CCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAATACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCC  
TCCTAAGTTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCT  
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCTCAGCAATATG  
ATACTATTCCCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT

Proteina:

DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS  
GTDFTLTITISLQAEDVAVYYCQQYDTIPTFGGGTKVEIKR

✓ **Frammento J****J1 segment (vedi 1684-1720 di V2)**

TGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Proteina:

WTFGQGTKVEIK

**J2 segment (vedi 900-936 di V3) PIR**

TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Proteina:

YTFGQGTKLEIK

**Ig kappa chain J segment (J-kappa-2) – human (GenPept)**

>gi|106524|pir||S23639 Ig kappa chain J segment (J-kappa-2) - human  
YTFGQGTKLEIKRK

**Ig kappa chain J segment (J-kappa-3) – human (GenPept)**

>gi|106525|pir||S23640 Ig kappa chain J segment (J-kappa-3) - human  
FTFGPGTKVDIKR

**Ig kappa chain J segment (J-kappa-4) – human (GenPept)**

(coded\_by="D90161.1:<557..>595)

>gi|220083|dbj|BAA14193.1| unnamed protein product [Homo sapiens]  
LTFGGGKVEIKR

**J kappa 5 – partial - human (GenPept)**

>gi|220085|dbj|BAA14191.1| J kappa 5 [Homo sapiens]  
ITFGQTRLDIKR

✓ **Frammento C****IGKC; immunoglobulin kappa constant (esoni 131-185, 311-606)**

Map: 2p12

>ENA|J00241|J00241.1 Homo sapiens immunoglobulin kappa chain constant region (IGKC) gene, partial cds. : Location:334..656

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTG  
TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG  
TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG  
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA  
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

Proteina:

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTL  
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\*

**Cromosoma 14 – Locus heavy**

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?TAXID=9606&CHR=14&MAPS=genec,ugHs,genes\[105191066.75%3A107349540.00\]-r&QSTR=3492\[gene\\_id\]&QUERY=uid\(-2146580659\)&CMD=TXT#1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?TAXID=9606&CHR=14&MAPS=genec,ugHs,genes[105191066.75%3A107349540.00]-r&QSTR=3492[gene_id]&QUERY=uid(-2146580659)&CMD=TXT#1)

✓ **Frammento V****IGHV1-2; immunoglobulin heavy variable 1-2 (V: 126-171, 258>562)**

Map: 14q32.33

>ENA|CAB56703|CAB56703.1 Homo sapiens (human) hypothetical protein: Location:1..351

ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGC  
AGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTAC  
CGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCCTAAC  
AGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCAGTACCAGGGACACGTCCATCAGCACAG  
CCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGTCTGTATTACTGTGCGAGA

Proteina:

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGRINPN  
SGGTNYAQKFKGRVTSRDTSSISTAYMELSRLSDDTVVYYCAR

**IGHV2-5; immunoglobulin heavy variable 2-5 (1-46,<133-444) (NCBI-Gene)**

>gi|224589805:c106494577-106494134 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5

ATGGACACACTTTGCTCCACGCTCCTGCTGCTGACCATCCCTTCATGGGTCTTGTCCCAGATCACCTTGAAGG  
AGTCTGGTCTTACGCTGGTGAACCCACACAGACCCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAG  
CACTAGTGGAGTGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACCTATTTAT  
TGGAATGATGATAAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAAC  
AGGTGGTCCCTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACACAGA

Proteina:

MDTLCSTLLLLLTIPSWVLSQITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEWLALIY  
WNDDKRYSPSLKSRLLITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAHR

**IGHV3-23; immunoglobulin heavy variable 3-23 (precursore) (V: 29-74, 179>482)**

Map: 14q32.33

&gt;ENA|AAA58735|AAA58735.1 Homo sapiens (human) partial immunoglobulin heavy chain variable region precursor: Location:1..350

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGTTGG  
 AGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAG  
 CAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGT  
 GGTGGTAGCACATACTACGGAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCAAGAGACAATCCAAGAACACGC  
 TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG

Proteina:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS  
 GGSTYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA

**IGHV4-4; immunoglobulin heavy variable 4-4 (1-46,129-432) (NCBI-Gene)**

Map: 14q32.33

&gt;gi|224589805:c106478539-106478108 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5

ATGAAACACCTGTGGTCTTCTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTCCCTGTCCAGGTGCAGCTGCAGG  
 AGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCATCAG  
 TAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATCTATAACAGT  
 GGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTGAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCT  
 CCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

Proteina:

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYTS  
 GSTNYPNPSLKS RV TMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

**IGHV5-51; immunoglobulin heavy variable 5-51 (1-46,130-436) (NCBI-Gene)**

Map: 14q32.33

&gt;gi|224589805:c107035162-107034727 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5

ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTCTGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGC  
 AGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTAC  
 CAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGT  
 GACTCTGATACCAGATACAGCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCC  
 CCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGA

Proteina:

MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMGI IYPG  
 DSDTRYSPSPFQGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR

✓ **Frammento D****IGHD1-1 immunoglobulin heavy diversity 1-1**

&gt;gi|224589805:c106385377-106385361 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GGTACAACCTGGAACGACC

Proteina:

GTTGTT

**IGHD1-7 immunoglobulin heavy diversity 1-7**

&gt;gi|224589805:c106375782-106375766 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GGTATAACTGGAACCTACC

Proteina:

GITGTT

**IGHD1-20 immunoglobulin heavy diversity 1-20**

&gt;gi|224589805:c106357065-106357049 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GGTATAACTGGAACGACC

Proteina:

GITGTT

**IGHD1-26 immunoglobulin heavy diversity 1-26**

>gi|224589805:c106346911-106346892 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GGTATAGTGGGAGCTACTACC

Proteina:

GIVGATT

**IGHD2-2 immunoglobulin heavy diversity 2-2**

>gi|224589805:c106382715-106382685 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GGATATTGTAGTAGTACCAGCTGCTATGCC

Proteina:

GYCSSTSCYA

**IGHD2-8 immunoglobulin heavy diversity 2-8**

>gi|224589805:c106373099-106373069 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GGATATTGTACTAATGGTGTATGCTATACC

Proteina:

GYCTNGVCYT

**IGHD2-21 immunoglobulin heavy diversity 2-21**

>gi|224589805:c106354436-106354409 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GCATATTGTGGTGGTGACTGCTATTCC

Proteina:

AYCGGDCYS

**IGHD2-15 immunoglobulin heavy diversity 2-15**

>gi|224589805:c106363845-106363815 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GGATATTGTAGTGGTGGTAGCTGCTACTCC

Proteina:

GYCSGGSCYS

**IGHD3-10 immunoglobulin heavy diversity 3-10**

>gi|224589805:c106370385-106370355 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

TATTACTATGGTTCGGGGAGTTATTATAAC

Proteina:

YYYGSGSYYN

**IGHD3-9 immunoglobulin heavy diversity 3-9**

>gi|224589805:c106370569-106370539 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

TATTACGATATTTGACTGGTTATTATAAC

Proteina:

YYDILTGYYN

**IGHD3-16 immunoglobulin heavy diversity 3-16**

>gi|224589805:c106361528-106361492 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

TATTATGATTACGTTTGGGGGAGTTATCGTTATACC

Proteina:

YYDYVWGSYRYT

**IGHD3-22 immunoglobulin heavy diversity 3-22**

>gi|224589805:c106351919-106351889 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

TATTACTATGATAGTAGTGGTTATTACTAC

Proteina:

YYYDSSGYYY

**IGHD3-3 immunoglobulin heavy diversity 3-3**

>gi|224589805:c106380248-106380218 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GTATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTATAC

Proteina: VLRFLEWLLY

**IGHD4-4 immunoglobulin heavy diversity 4-4**

>gi|224589805:c106379096-106379081 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GACTACAGTAACTAC

Proteina:

DYSNY

**IGHD4-17 immunoglobulin heavy diversity 4-17**

>gi|224589805:c106360381-106360366 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GACTACGGTGACTAC

Proteina:

DYGDY

**IGHD5-12 immunoglobulin heavy diversity 5-12**

>gi|224589805:c106368529-106368507 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GTGGATATAGTGCTACGATTACC

Proteina:

VDIVATIT

**IGHD5-18 immunoglobulin heavy diversity 5-18**

>gi|224589805:c106359419-106359400 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GTGGATACAGCTATGGTTACC

Proteina:

VDTAMVT

**IGHD5-5 immunoglobulin heavy diversity 5-5**

>gi|224589805:c106378135-106378116 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GTGGATACAGCTATGGTTACC

Proteina:

VDTAMVT

**IGHD6-6 immunoglobulin heavy diversity 6-6**

>gi|224589805:c106376286-106376269 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GAGTATAGCAGCTCGTCC

Proteina:

EYSSSS

**IGHD6-13 immunoglobulin heavy diversity 6-13**

>gi|224589805:c106367020-106367000 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GGGTATAGCAGCAGCTGGTAC

Proteina:

GYSSSWY

**IGHD6-19 immunoglobulin heavy diversity 6-19**

>gi|224589805:c106357577-106357557 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GGGTATAGCAGTGGCTGGTAC

Proteina:

GYSSGWY

**IGHD6-25 immunoglobulin heavy diversity 6-25**

>gi|224589805:c106347414-106347397 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GGGTATAGCAGCGGCTAC

Proteina:

GYSSGY

**IGHD7-27 immunoglobulin heavy diversity 7-27**

>gi|224589805:c106331771-106331761 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

CTAACTGGG

Proteina:

LTG

**Nota:** le sequenze IGHD5-24, IGHD4-23, IGHD1-14 e IGHD4-11 non sono funzionali.

✓ **Frammento J**

**IGHJ1**

>gi|224589805:c106331668-106331615 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GCTGAATACTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT

Proteina:

AEYFQHWGQGTTLVTVSSG

**IGHJ2**

>gi|224589805:c106331461-106331407 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

CTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGG

Proteina:

LLVLRSLGPHWPGHCLLR

**IGHJ3**

>gi|224589805:c106330846-106330795 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

GATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCAGGT

Proteina:

DAFDIWGQGTMTVTVSSG

**IGHJ4**

>gi|224589805:c106330472-106330423 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

ACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGGTG

Proteina:

TTLTTGAREPWSPSPQV

**IGHJ5**

>gi|224589805:c106330074-106330022 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

ACAACCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGGTG

Proteina:

TTGSTPGAREPWSPSPQV

**IGHJ6**

>gi|224589805:c106329470-106329406 Homo sapiens chromosome 14, GRCh37.p5 Primary Assembly

ATTACTACTACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTA

Proteina:

ITTTTTTWTSGAKGPRSPSPQV

✓ **Frammento C**

**IGHM; immunoglobulin heavy constant mu****CH1**

>ENA|X14940|X14940.1 Human C mu gene for IgM heavy chain exons CH1-4, secretory

Location:233..544

AGTGCATCCGCCCAACCCTTTTCCCCCTCGTCTCCTGTGAGAATTCCCCGTCGGATACGAGCAGCGTGGCCG  
TTGGCTGCCTCGCACAGGACTTCCTTCCCGACTCCATCACTTTGTCTGGAAATACAAGAACAACCTCTGACAT  
CAGCAGTACCCGGGGCTTCCCATCAGTCTTGAGAGGGGGCAAGTACGCAGCCACCTCACAGGTGCTGCTGCCT  
TCCAAGGACGTGCAGGGCACAGACGAACACGTGGTGTGCAAAGTCCAGCACCCCAACGGCAACAAAGAAA  
AGAACGTGCCTCTTCCA

Proteina:

SASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLP  
SKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLP

**CH2**

>ENA|X14940|X14940.1 Human C mu gene for IgM heavy chain exons CH1-4, secretory :

Location:631..966

ATTGCCGAGCTGCCTCCCAAAGTGAGCGTCTTCGTCCCACCCCGCGACGGCTTCTTCGGCAACCCCCGCAAGT  
CCAAGCTCATCTGCCAGGCCACGGGTTTCAGTCCCCGGCAGATTCAGGTGTCTGGCTGCGCGAGGGGAAGCA  
GGTGGGGTCTGGCGTACCACGGACCAGGTGCAGGCTGAGGCCAAAGAGTCTGGGGCCACGACCTACAAGGTG  
ACCAGCACACTGACCATCAAAGAGAGCGACTGGCTCGGCCAGAGCATGTTACCTGCCGCGTGGATCACAGGG  
GCCTGACCTTCCAGCAGAATGCGTCTCCATGTGTGTCCCC

Proteina:

IAELPPKVSFVFPVPRDGFNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKV  
TSTLTIKESDWLQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVF

**CH3**

>ENA|X14940|X14940.1 Human C mu gene for IgM heavy chain exons CH1-4, secretory :

Location:1212..1531

CAAGACACAGCCATCCGGGTCTTCGCCATCCCCCATCCTTTGCCAGCATCTTCCTCACCAAGTCCACCAAGT  
TGACCTGCCTGGTACAGACCTGACCACCTATGACAGCGTGACCATCTCCTGGACCCGCCAGAATGGCGAAGC  
TGTGAAAACCCACACCAACATCTCCGAGAGCCACCCCAATGCCACTTTCAGCGCGTGGGTGAGGCCAGCATC  
TGCGAGGATGACTGGAATTCCGGGGAGAGGTTACAGTGCACCGTGACCACACAGACCTGCCCTCGCCACTGA  
AGCAGACCATCTCCCGGCCCAAGGGT

Proteina

QDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTLCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKHTHTNISESHPNATFSAVGEASI  
CEDDWNSEGERFTCTVTHTDLPSPLKQTI SRPKG

**CH4**

>ENA|X14940|X14940.1 Human C mu gene for IgM heavy chain exons CH1-4, secretory :

Location:1710..2096

GTGGCCCTGCACAGGCCCGATGTCTACTTGTCTGCCACCAGCCCGGGAGCAGCTGAACCTGCGGGAGTCGGCCA  
CCATCACGTGCCTGGTGACGGGCTTCTCTCCCGCGACGTCTTCGTGCAGTGGATGCAGAGGGGGCAGCCCTT  
GTCCCCGGAGAAGTATGTGACCAGCGCCCCAATGCCCTGAGCCCCAGGCCCGGTACTTCGCCCACAGC  
ATCCTGACCGTGTCCGAAGAGGAATGGAACACGGGGGAGACCTACACCTGCGTGGCCCATGAGGCCCTGCCCA  
ACAGGGTACCGAGAGGACCGTGGACAAGTCCACCGGTAAACCCACCCTGTACAACGTGTCCCTGGTCATGTC  
CGACACAGCTGGCACCTGCTAC

Proteina:

VALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHS  
ILTVSEEEWNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

**IGHG1 immunoglobulin heavy constant gamma****CH1**

&gt;sp|P01857|1-98

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS  
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV**CH2**

&gt;sp|P01857|111-223

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK**CH3**

&gt;sp|P01857|224-330

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVDFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**IGHA1 immunoglobulin heavy constant alpha 1****CH1**TCCCCGACCAGCCCCAAGGTCTTCCCGCTGAGCCTCTGCAGCACCCAGCCAGATGGGAACGTGGTCATCGCCT  
GCCTGGTCCAGGGCTTCTTCCCCAGGAGCCACTCAGTGTGACCTGGAGCGAAAGCGGACAGGGCGTGACCGC  
CAGAAACTTCCCACCCAGCCAGGATGCCCTCCGGGGACCTGTACACCACGAGCAGCCAGCTGACCCTGCCGGCC  
ACACAGTGCCTAGCCGGCAAGTCCCGTGACATGCCACGTGAAGCACTACACGAATCCCAGCCAGGATGTGACTG  
TGCCCTGCCCA**Proteina:**SPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFPPQEPVSVTWSESGQVGTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPA  
TQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCP**CH2**CCCTCAACTCCACCTACCCCATCTCCCTCAACTCCACCTACCCCATCTCCCTCATGCTGCCACCCCGACTGT  
CACTGCACCGACCGGCCCTCGAGGACCTGCTCTTAGGTTTCAGAAGCGAACCTCACGTGCACACTGACCGGCCT  
GAGAGATGCCTCAGGTGTCACCTTACCTGGACGCCCTCAAGTGGGAAGAGCGCTGTTCAAGGACCACCTGAG  
CGTGACCTCTGTGGCTGCTACAGCGTGTCCAGTGTCTGCCGGGCTGTGCCGAGCCATGGAACCATGGGAAGA  
CCTTCACTTGCACTGCTGCCTACCCCGAGTCCAAGACCCCGCTAACCGCCACCCCTCTCAAAATCC**Proteina:**PSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPE  
RDLGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKFTTCTAAYPESKTPLTATLSKS**CH3**AACACATTCCGGCCCGAGGTCCACCTGCTGCCGCCGCCGTCGGAGGAGCTGGCCCTGAACGAGCTGGTGACGC  
TGACGTGCCTGGCACGCGGCTTCAGCCCCAAGGACGTGCTGGTTCGCTGGCTGCAGGGGTACAGGAGCTGCC  
CCGCGAGAAGTACCTGACTTGGGCATCCCGGC  
AGGAGCCCAGCCAGGGCACCACCACCTTCGCTGTGACCAGCATACTGCGCGTGGCAGCCGAGGACTGGAAGAA  
GGGGGACACCTTCTCCTGCATGGTGGGCCACGAGGCCCTGCCGCTGGCCTTCACACAGAAGACCATCGACCGC  
TTGGCGGGTAAACCCACCCATGTCAATGTGTCTGTTGTTCATGGCGGAGGTGGACGGCACCTGCTACTGA**Proteina:**NTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTVASRQEPSQGTTFVAVTS  
ILRVAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY\*