

Abstract

I peptidi antimicrobici (AMP) sono componenti del sistema immunitario innato. Si tratta di molecole selezionate positivamente nel corso dell'evoluzione. Gli AMP hanno un ampio spettro di attività verso batteri, funghi e virus e vengono studiati come alternative agli antibiotici tradizionali.

L'obiettivo principale di questo lavoro era la progettazione di nuovi peptidi lineari, capaci di contattare le membrane cellulari dei patogeni più comuni. In questo lavoro, sequenze di peptidi antimicrobici sono state ottenute da un'accurata ricerca bibliografica e collezionate in Yadamp (<http://yadamp.unisa.it/>), un database di AMP sviluppato di recente nel laboratorio in cui questo progetto è stato condotto. In Yadamp ci sono informazioni riguardanti nomi dei peptidi, sequenze aminoacidiche, lunghezza, presenza di ponti disolfuro, data di scoperta, attività e tassonomia. Sono inoltre elencate le proprietà chimico-fisiche più importanti. Questo database è soprattutto focalizzato sull'attività dei peptidi. I valori sperimentali di MIC (la più bassa concentrazione di un agente antimicrobico che inibisce la crescita di un microrganismo) sono ottenuti da un'attenta lettura degli articoli scientifici. In questo lavoro, 1009 sequenze di AMP sono state aggiunte a Yadamp. Il database attualmente contiene 3142 sequenze di peptidi antimicrobici per le quali sono stati calcolati 573 descrittori molecolari. In aggiunta, questo progetto puntava a cercare nuovi descrittori molecolari. Yadamp è una risorsa per le analisi di correlazione struttura-attività (QSAR) in quanto permette di creare sottoinsiemi di AMP, omogenei in uno, due o più parametri. L'ipotesi di lavoro era che AMP con caratteristiche fisico-chimiche simili, potessero condividere lo stesso meccanismo d'azione. Pertanto, analisi con algoritmi genetici (GA), reti neurali artificiali (ANN) e analisi di classificazione sono state eseguite su sottoinsiemi omogenei di AMP. Sono stati studiati peptidi antimicrobici con attività nei confronti di cinque diversi microrganismi: *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (batteri Gram +), *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (batteri Gram -) e *Candida albicans*

(fungo saprofito). Sono stati ottenuti numerosi modelli predittivi di attività, ciascuno dei quali convalidato attraverso efficaci tecniche statistiche. Questi modelli ottenuti hanno fornito una prima idea sul probabile meccanismo d'azione che adottano i peptidi antimicrobici studiati. Ad esempio, i risultati suggeriscono che la carica e l'idrofobicità degli amminoacidi sono fattori importanti per l'interazione dei peptidi alle membrane target. Tuttavia, i descrittori 1D e 2D attualmente disponibili non riescono a catturare tutte le proprietà dei peptidi. Gli AMP sono molecole estremamente flessibili e quando interagiscono con le membrane bersaglio subiscono cambiamenti conformazionali. Di conseguenza, uno degli obiettivi di questo progetto era anche quello di trovare nuovi descrittori molecolari di AMP. Ad esempio, nel laboratorio in cui è stato condotto questo progetto, è stato sviluppato un nuovo software di docking molecolare (www.yada.unisa.it). L'idea era di usare YADA per calcolare l'energia di binding peptide-peptide, peptidi-recettori e peptidi-lipidi. Tutti i modelli ottenuti dagli studi computazionali sono stati implementati nel tool "Yadamp predict" (<http://yadamp.unisa.it/predict.aspx>). Questo strumento permette ai ricercatori di avere una predizione dell'eventuale attività di sequenze amminoacidiche ignote.

In questo lavoro, sono state generate 10000 sequenze amminoacidiche attraverso un calcolo combinatorio. Il tool "Yadamp predict" ha permesso la predizione dell'interazione tra queste sequenze e le membrane di specifici patogeni Gram + e Gram -. I risultati hanno suggerito una specificità di tre sequenze nei confronti delle membrane dei batteri Gram +. I peptidi p458 (WMLKKFRWMF), p459 (KILGKLWKWVK) e p460 (KILKKIKKLLW), sono stati sintetizzati per poter svolgere ulteriori analisi. I 3 peptidi contenevano triptofano, amminoacido aromatico con picchi massimi di assorbimento e di emissione di 280 nm e ~ 360 nm, rispettivamente. Mediante analisi di assorbanza e fluorescenza è stato monitorato il binding delle tre sequenze a vescicole unilamellari di 400 nm con diversa composizione lipidica. I risultati suggeriscono che i tre peptidi legano prevalentemente le vescicole che mimano le membrane dei batteri Gram +. Probabilmente, essi legano le membrane target mediante un meccanismo d'azione che non dipende solo dalla carica, ma anche dai cambiamenti strutturali che si verificano a livello della membrana lipidica in seguito al binding. I punti salienti

del meccanismo di interazione di queste molecole alle membrane target sono stati chiariti da simulazioni di dinamica molecolare eseguite nel laboratorio del professore Stefano Piotto (dati non mostrati).

Questi risultati supportano il meccanismo d'azione proposto e aprono la strada a un design innovativo e più focalizzato di peptidi antimicrobici.