



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari  
Dipartimento Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche - STEBICEF  
BIO/19 – Microbiologia generale

## STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

IL DOTTORE  
**Alberto Sutura**

IL COORDINATORE  
**Prof.ssa Patrizia Diana**

IL TUTOR  
**Prof.ssa Anna Maria Puglia**

IL CO TUTOR  
**Dott. Giuseppe Gallo**

CICLO XXX  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2018





## **Prefazione**

Questa tesi di dottorato adempie ai requisiti del programma di dottorato di ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari, XXX ciclo. Le attività sono state svolte presso il Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologie del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) dell'Università di Palermo nel periodo compreso tra gennaio 2015 e dicembre 2017. Il lavoro di ricerca è stato curato dalla Prof.ssa Anna Maria Puglia, dai Proff. Roberto Scaffaro e Francesca D'Anna e dal dott. Giuseppe Gallo, Docenti presso l'Università di Palermo.

Desidero esprimere la mia sincera gratitudine a tutti coloro che hanno contribuito scientificamente al raggiungimento dei risultati e degli obiettivi descritti in questa tesi.



## Abstract

The emergence of multi-drug resistant (MDR) bacterial strains is an urgent problem derived from the widespread and uncontrolled use of antibiotics. Therefore, new arrays of lead compounds exerting antimicrobial activity are necessary to contrast the spreading of MDR pathogens. Between 1980 and 2003, the interest in scientific research programs aimed to the new drug discovery by large pharmaceutical companies progressively decreased due to increasing costs in the respect of i) the low discovery rate of new leads, ii) the small amounts of product recovery needing process optimization and, finally, iii) regulatory obstacles associated with long-lasting pre-clinical and clinical trials for therapeutic use. Anyhow, during this time, natural products and synthetic compounds have contributed almost equally to the development of all drugs approved for therapeutic use including antibiotics.

This PhD thesis describes results obtained in the within of two different topics related to the need of new antibiotics, in particular the development of:

1. strategies aimed at increment of antibiotic yield obtained from producing bacterial strains by fermentation;
2. novel synthetic compounds with antimicrobial activity.

Concerning the topic (1), actinomycetes, Gram-positive filamentous mycelial bacteria, are very prolific sources of naturally bioactive molecules, including most of clinically relevant antibiotics as well as a wide range of enzymes of industrial interest, with *Streptomyces* strains the major producers. The industrial production of bioactive molecules by actinomycetes, is performed in bioreactors using liquid growth media (i.e. submerged fermentations). However, the submerged fermentation does not reproduce the usual lifestyle of terrestrial actinomycetes which usually grow on the surface of organic or inorganic matters. In fact, one of the most frequent factors that negatively affects bio-production yield is the formation of mycelial clumps or pellets. As a consequence, immobilization of filamentous microorganisms in submerged fermentations for the production of biologically active compounds has become an attractive strategy. In this PhD thesis, three different supports were tested to perform immobilized-cell cultivations using *Streptomyces coelicolor* as a model actinomycete for the study of antibiotic production. Indeed, *S. coelicolor* produces different bioactive compounds, including the water-soluble blue-pigmented actinorhodin (ACT) and mycelium-associated red-pigmented undecylprodigiosin (RED). In particular, polycaprolactone (PCL), polyethylene glycol (PEG), and sodium chloride (NaCl) with different grain sizes were used to prepare PCL/PEG/NaCl blends in the melt. These blends were then leached to obtain PCL-based porous membranes with different porous size that were used as solid support for the growth of *S. coelicolor* in submerged cultivations. The results showed that ACT production is strongly dependent on the pore size. In particular, pore diameters ranging from 90 to 110  $\mu\text{m}$  were associated with an two-fold improvement in volumetric production of ACT if compared to conventional (i.e. planktonic cell) submerged liquid cultures.



The second kind of devices for cell-immobilization was obtained by electrospinning method. So, the use of electrospun polycaprolactone (PCL) and polylactic acid (PLA) membranes, subjected or not to O<sub>2</sub>-plasma treatment (PCL- or PLA-plasma), implied that *S. coelicolor* immobilized-cells produced more than 4-fold ACT yield in comparison with free-cell cultivations, with PLA-plasma membranes as the most effective ones. Indeed, immobilized-cells created a dense “biofilm-like” mycelial network on all kinds of membranes as observed by scanning electron microscope (SEM). In addition, ACT, produced by immobilized cells, was adsorbed on the PLA fibers of membranes by Raman spectroscopy. In addition, a differential proteome analysis, based on two dimensional Difference In Gel Electrophoresis (2D-DIGE) and mass spectrometry (MS) analyses, was carried out to highlight metabolic and molecular processes differentially regulated in immobilized- and planktonic-cell cultivations. The third kind of supports used for cell-immobilization was represented by two types of expanded perlite. In particular, Randalite W9™ (RW9) and Randalite W7™ (RW7), which differ in the degree of permeability and in the porosity, were chosen. Likewise other support, mycelial cells form a biofilm-like network on RW9, as showed by SEM observation. The quantitative analysis of antibiotic production revealed that *S. coelicolor* immobilized-cells on RW9 stimulated the production of ACT and RED, about 1.6 times more than control. It was also analyzed the production level of calcium-dependent antibiotic (CDA) by evaluating Randalite W7 and W9 antimicrobial activity by means of microbiological assay. Like before, RW9 shows more than 3.5 fold inhibition in comparison with planktonic cells.

Moreover, PLA-based membranes and expanded perlite were used to perform immobilized-cell fermentation using selected industrial bacterial in collaboration with a Zoetis Manufacturing Italia S.R.L. from Catania.

In addition to topic (1), the Antarctic bacterial strain *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 was also investigated. Indeed, this microorganism is a model for cold-adapted bacteria and is currently exploited for numerous biotechnological applications. Interestingly, this bacterium has been reported to be able to inhibit the growth of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) strains, opportunistic pathogens responsible for the infection of immune-compromised patients. Most likely, this occurs through the synthesis of several different compounds, including Volatile Organic Compounds (VOCs), whose nature and characteristics are currently mostly unknown. Bcc growth inhibition capability is deeply linked to the medium used to cultivate *P. haloplanktis* TAC125. Therefore, proteomic data were used in order to highlight metabolic and molecular processes differentially regulated in *P. haloplanktis* TAC125 associated to capability of inhibiting Bcc growth.

Regarding topic (2), in the last few years, the chemical synthesis of novel chemotherapeutical leads is evolving thanks to possibility to design molecules with desired physical-chemical and, thus, biological properties. The imidazolium salts, recently proven effective to inhibit bacterial and/or cancer cell growth, possess an amphiphilic nature that is conferred by the imidazolium cation having a polar head generally coupled with aliphatic side chains.



So, an array of 23 diimidazolium organic salts (DOS) has been synthesised and used to investigate their antimicrobial activity. In particular, salts based on the 3,3'-di-*n*-alkyl-1,1'-(1,*n*-phenylenedimethylene)-diimidazolium cation and differing in the alkyl chain length on the imidazolium ion, the isomeric substitution on the aromatic spacer and in the anion nature were used. The antimicrobial activity was investigated using both Gram-negative (*Escherichia coli*) and Gram-positive (*Kokuria rhizophila*, *Staphilococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) strains. Data obtained demonstrate that biological activity is the result of the combined action of both cation and anion structure. In general, the cation hydrophobicity plays the most significant role with structural features of the anion becoming more relevant in the presence of shorter alkyl chain on the cationic head.

Moreover, diimidazolium-based organic salts, bearing peptides or amino acids as anions have been synthesised and tested for their gelling ability in biocompatible solvents. These low molecular weight salts were successfully used as gelators in phosphate buffered saline (PBS) solution and ionic liquids. Furthermore, bioassays revealed that the obtained diimidazolium organic salts possessed antimicrobial activity, against Gram-negative and Gram-positive tester strains. In particular and noteworthy, the diimidazolium organic salts exerted a bactericidal capability, which was retained even if they are included in the gel phase. Thus, a novel kind of bioactive soft material was obtained that could be fruitfully employed as a non-covalent coating exerting antibacterial capability.



## Indice

<b>Prefazione</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Indice</b> .....	v
<b>Premessa</b> .....	1
<b>Bibliografia</b> .....	3
<b>1° Capitolo: Strategie innovative di immobilizzazione di cellule batteriche al fine di incrementare la produzione di molecole biologicamente attive</b> .....	4
<b>1.1 Introduzione</b> .....	4
1.1.1 Produzione di antibiotici in attinomiceti e strategie per il miglioramento della resa.....	4
1.1.2 Differenziamento morfo-fisiologico in <i>S. coelicolor</i> .....	7
1.1.3 Regolazione ed organizzazione dei geni responsabili della biosintesi di antibiotici in <i>S. coelicolor</i> ..	9
<b>1.2 Scopo dell'attività di ricerca</b> .....	14
<b>1.3 Risultati e Discussioni</b> .....	15
<b>1.3.1 Effetto delle membrane di PCL/PEG sulla produzione di actinorodina in colture di <i>Streptomyces coelicolor</i></b> .....	16
1.3.1.1 Morfologia delle membrane porose di PCL/PEG.....	16
1.3.1.2 Immobilizzazione di <i>S. coelicolor</i> M145 sulle membrane porose di PCL/PEG.....	17
1.3.1.3 Effetto delle membrane di PCL/PEG sulla biosintesi di ACT e di proteine... ..	18
<b>1.3.2 Colture di cellule immobilizzate di <i>Streptomyces coelicolor</i> su membrane di fibre elettrofilate di PCL o PLA</b> .....	21
1.3.2.1 Struttura delle membrane porose di fibre elettrofilate di PCL e PLA, trattate o meno all'O <sub>2</sub> -plasma.....	21
1.3.2.2 Immobilizzazione di <i>S. coelicolor</i> sulle membrane porose di fibre elettrofilate di PCL e PLA, trattate o meno al plasma.....	24
1.3.2.3 Produzione di ACT e RED in colture di cellule di <i>S. coelicolor</i> immobilizzate sulle membrane porose di fibre elettrofilate di PCL e PLA, trattate o meno al plasma.....	25
1.3.2.4 Analisi proteomica differenziale.....	27
<b>1.3.3 Immobilizzazione di cellule di <i>Streptomyces coelicolor</i> su perlite espansa per il miglioramento della produzione di antibiotici</b> .....	40
1.3.3.1 Randalite: perlite espansa con caratteristiche porose.....	40
1.3.3.2 Immobilizzazione di cellule di <i>S. coelicolor</i> su perlite espansa.....	41
1.3.3.3 Produzione di ACT, RED e CDA nelle colture con micelio immobilizzato su perlite espansa.....	43
1.3.3.4 Analisi delle proteine totali estratte dal micelio immobilizzato su perlite espansa.....	45



1.3.3.5 Analisi morfologica delle colture di <i>S. coelicolor</i> mediante SEM.....	46
<b>1.4 Conclusioni</b> .....	48
<b>1.5 Materiali e Metodi</b> .....	51
Ceppi utilizzati.....	51
Terreni di coltura.....	51
Soya Flour Mannitol medium (SFM).....	51
R2YE.....	51
R5A sucrose-free.....	51
Luria Bertani.....	51
Soluzioni di Randalite.....	51
Randalite™ RW9.....	51
Randalite™ RW7.....	51
Buffers.....	52
Fissativo di Karnowsky per microscopia elettronica a scansione.....	52
Fissativo per microscopia elettronica a scansione.....	52
Soluzioni usate per l'analisi 2D-Differential Gel Electrophoresis.....	52
Preparazione generale.....	52
Preparazione di una sospensione di spore.....	52
Condizioni di crescita.....	52
Sterilizzazione delle membrane in PCL/PEG.....	53
Sterilizzazione delle membrane in PCL e PLA trattate o meno al plasma.....	53
Metodo di estrazione delle proteine.....	53
Determinazione della concentrazione delle proteine totali mediante Saggio di Bradford (Bradford 1976).....	54
Preparazione del campione per l'osservazione mediante Scanning Electron Microscopy (SEM).....	54
SDS-PolyAcrylamide gel electrophoresis.....	54
Marcatura delle proteine con CyDye.....	55
Isoelectric focusing (IEF).....	55
Visualizzazione delle proteine ed analisi delle immagini.....	56
Identificazione proteica.....	56
Quantizzazione della produzione di antibiotici.....	57
Saggio per l'estrazione dell'ACT totale (Hopwood, 2007).....	57
Saggio per l'estrazione del RED (Hopwood, 2007).....	58
Saggio per la valutazione dell'antibiotico calcio dipendente (CDA) (Hopwood, 2007).....	58
<b>1.6 Bibliografia</b> .....	59





<b>2° Capitolo: Analisi proteomica e bioinformatica per l'identificazione di possibili cluster genici per la sintesi di composti bioattivi in <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125</b> .....	65
<b>2.1 Introduzione</b> .....	65
2.1.1 <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125: un organismo modello per i batteri psicrofili.....	65
2.1.2 Analisi di modelli teorici di crescita di <i>PhTAC125</i> .....	67
2.1.3 Sintesi di composti bioattivi.....	69
2.1.4 Analisi genomica dei cluster per la sintesi composti bioattivi.....	71
<b>2.2 Scopo dell'attività di ricerca</b> .....	73
<b>2.3 Risultati e Discussioni</b> .....	75
2.3.1 Analisi antiSMASH.....	75
2.3.2 Analisi proteomica differenziale di <i>PhTAC125</i> .....	75
2.3.3 Proteine differenzialmente abbondanti.....	77
2.3.4 Analisi genomica dei pathway mediante BioCyc.....	85
<b>2.4 Conclusioni</b> .....	88
<b>2.5 Materiali e Metodi</b> .....	90
Ceppi utilizzati.....	90
Buffers.....	90
Soluzioni usate per l'analisi 2D-Differential Gel Electrophoresis.....	90
Preparazione generale.....	90
Metodo di estrazione delle proteine.....	90
Determinazione della concentrazione delle proteine totali mediante Saggio di Bradford (Bradford 1976).....	91
SDS-PolyAcrylamide gel electrophoresis.....	91
Marcatura delle proteine con CyDye.....	91
Isoelectric focusing (IEF).....	91
Visualizzazione delle proteine ed analisi delle immagini.....	92
Identificazione proteica.....	93
<b>2.6 Bibliografia</b> .....	94
<b>3° Capitolo: Studio dell'attività biologica di nuove molecole di sintesi chimica</b> .....	98
<b>3.1 Introduzione</b> .....	98
3.1.1 Uso dei sali di imidazolio di-cationici come molecole con attività antimicrobica ed antitumorale.....	98
3.1.2 Uso di gel supramolecolari come possibili candidati con attività antimicrobica.....	99
<b>3.2 Scopo dell'attività di ricerca</b> .....	103
<b>3.3 Risultati e Discussioni</b> .....	105
<b>3.3.1 Gli effetti dei cambiamenti strutturali sull'attività antimicrobica dei sali di di-imidazolio</b> .....	106



3.3.1.1	Caratteristiche strutturali dei DOS.....	106
3.3.1.2	Attività antibatterica dei sali organici di diimidazolio.....	107
<b>3.3.2</b>	<b>Idro- ed ionogel supramolecolari: uno studio delle loro proprietà ed attività antibatteriche.....</b>	<b>115</b>
3.3.2.1	Attività antibatterica dei DOS.....	115
3.3.2.2	Attività antimicrobica di fasi gel.....	119
<b>3.4</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>123</b>
<b>3.5</b>	<b>Materiali e metodi.....</b>	<b>125</b>
	Ceppi utilizzati.....	125
	Preparazione generale.....	125
	Test di diffusione dell'agar.....	125
	Saggi quantitativi in liquido.....	125
<b>3.6</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>127</b>



## Premessa

### **Necessità di nuove molecole con attività antimicrobica come sviluppo scientifico, economico e sociale**

Lo sviluppo degli antibiotici ha altamente contribuito alla crescita demografica ed al miglioramento della qualità della vita negli ultimi 75 anni. Gli antibiotici sono una classe di molecole che riconoscono specificamente bersagli molecolari di cellule batteriche e sono quindi dotati di un buon profilo di sicurezza e tollerabilità. Tuttavia, la comparsa di ceppi batterici sia Gram-positivi sia Gram-negativi multiresistenti a diverse classi di antibiotici sta limitando l'efficacia clinica della maggior parte degli antibiotici attualmente in uso. Di fatti, è proprio l'utilizzo inappropriato degli antibiotici che ha favorito la selezione ed una vasta e rapida diffusione di ceppi batterici resistenti ai composti attualmente in commercio e ciò rende critico il trattamento di una gamma sempre più ampia di infezioni abbastanza comuni da contrarre. Pertanto, nuove tipologie di antibiotici sono assolutamente necessarie per superare il problema delle resistenze. Negli ultimi venti anni i prodotti di origine naturale ed i composti di sintesi chimica hanno contribuito quasi ugualmente allo sviluppo di farmaci utilizzati in terapia medica, includendo nel novero anche gli antibiotici (Bérdy *et al.*, 2012; Newman *et al.*, 2016).

I batteri resistenti ai farmaci sono responsabili di circa 25.000 decessi all'anno solo in Europa. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha messo in evidenza il rischio del genere umano di soccombere nella lotta contro gli agenti patogeni in un recente dossier sulla resistenza agli antibiotici da parte di batteri patogeni comuni chiamati con l'acronimo "patogeni ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*).

La resistenza agli antibiotici ha costi molto elevati anche in termini economici; è stato stimato che il mancato trattamento delle infezioni resistenti ai farmaci, nel 2009 ha avuto un costo di € 1,5 miliardi in Europa (European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency, 2009) e 5 miliardi di \$ negli Stati Uniti (Infectious Diseases Society of America, 2004). Le infezioni nosocomiali hanno una incidenza del 5% negli Stati Uniti (Centers for Disease Control and Prevention, 2015), del 7,1% in Europa e del 15,5% nei paesi in via di sviluppo (Allegranzi *et al.*, 2011). Spesso le infezioni contratte negli ospedali sono dovute alla capacità degli agenti patogeni di crescere come biofilm sulle superfici dei dispositivi medici quali ad es. i cateteri urinari o altri dispositivi in generale. Inoltre le infezioni limitano anche l'impianto di dispositivi medici, come le protesi ortopediche, richieste da un numero crescente di pazienti anziani.

L'introduzione di nuove classi di molecole ad azione antibiotica, di origine naturale o sintetica, o la modifica chimica e quindi funzionale di classi di antibiotici già in uso potrebbe portare al superamento dei meccanismi biomolecolari che permettono la resistenza al trattamento con gli antibiotici attualmente in uso (Jovetic *et al.*, 2003; Biondi *et al.*, 2008; Donadio *et al.*, 2010; Lazzarini *et al.*, 2010). Sfortunatamente, gli attuali investimenti delle aziende farmaceutiche per lo sviluppo di nuovi antibiotici o di versioni modificate



di quelli già utilizzati sono largamente ridotti nonostante la rinnovata emergenza. Gli sforzi nel campo della ricerca, purtroppo, hanno portato all'introduzione di pochi nuovi antibiotici, e tra questi, poche nuove classi chimiche di antibiotici (Donadio *et al.*, 2010; Newman *et al.*, 2016).

Pertanto, nuove strategie che permettano da un lato l'aumento della resa della produzione di molecole farmaceutiche a costi contenuti ed economicamente sostenibili, e dall'altro la progettazione di molecole che agiscano in maniera batterio-specifico potrebbero avere un grande impatto sul piano scientifico, economico e sociale. In questa tesi di dottorato di ricerca sono riportati i risultati inerenti a due principali tematiche entrambe correlate alla necessità di sviluppare strategie per facilitare la scoperta di nuove molecole ad attività antibiotica. In particolare, sono stati condotti studi finalizzati allo sviluppo di:

1. metodi per il miglioramento della produzione di molecole biologicamente attive biosintetizzate da batteri produttori;
2. nuove molecole di sintesi con attività antimicrobica migliorata.



## Bibliografia

- Allegranzi B., Bagheri Nejad S., Combescure C., Graafmans W., Attar H., Donaldson L., Pittet D. (2011) Burden of endemic health-care associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 377(9761), 228–241.
- Bérdy J. (2012) Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)*. Aug;65(8):385-95.
- Biondi N., Tredici M.R., Taton A., Wilmotte A., Hodgson D.A., Losi D., Marinelli F. (2008) Cyanobacteria from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactivities. *J Appl Microbiol*, Jul;105(1):105-15.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2015) Healthcare-associated Infections (HAIs) – The Burden.
- Donadio S., Maffioli S., Monciardini P., Sosio M., Jabes D. (2010) Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *J Antibiot (Tokyo)*, Aug;63(8):423-30.
- European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency. (2009) ECDC/EMA Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react.
- Infectious Diseases Society of America. (2004) Bad Bugs, No Drugs. As Antibiotic Discovery Stagnates. A Public Health Crisis Brews.
- Jovetic S., de Bresser L., Tramper J., Marinelli F. (2003) Deacylation of antibiotic A40926 by immobilized *Actinoplanes teichomyceticus* cells in an internal-loop air-lift bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 32, Issue 5, 8 April 2003, Pages 546-552.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Dec;78(3-4):399-405.
- Newman D.J., Cragg G.M. (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*, 79, 629–661.

## Capitolo 1

### Strategie innovative di immobilizzazione di cellule batteriche al fine di incrementare la produzione di molecole biologicamente attive

#### 1.1 Introduzione

##### 1.1.1 Produzione di antibiotici in attinomiceti e strategie per il miglioramento della resa

La maggior parte (circa l'80%) degli antibiotici di uso corrente di origine naturale è prodotto dagli attinomiceti (Bérdy, 2005 e 2012), ossia batteri filamentosi Gram-positivi che vivono sia in ambienti terrestri che acquatici. Negli attinomiceti la biosintesi degli antibiotici è accoppiata con un complesso programma di sviluppo morfologico e fisiologico, come dimostrato in *Streptomyces coelicolor*, un ceppo usato come modello di studio, produttore di vari metaboliti biologicamente attivi (Fig. 1.1) tra cui i due antibiotici pigmentati, actinorodina (ACT) ed undecilprodigiosina (RED), l'antibiotico Calcio-dipendente (CDA) e la metilenomicina (MM) (van Keulen *et al.*, 2014).

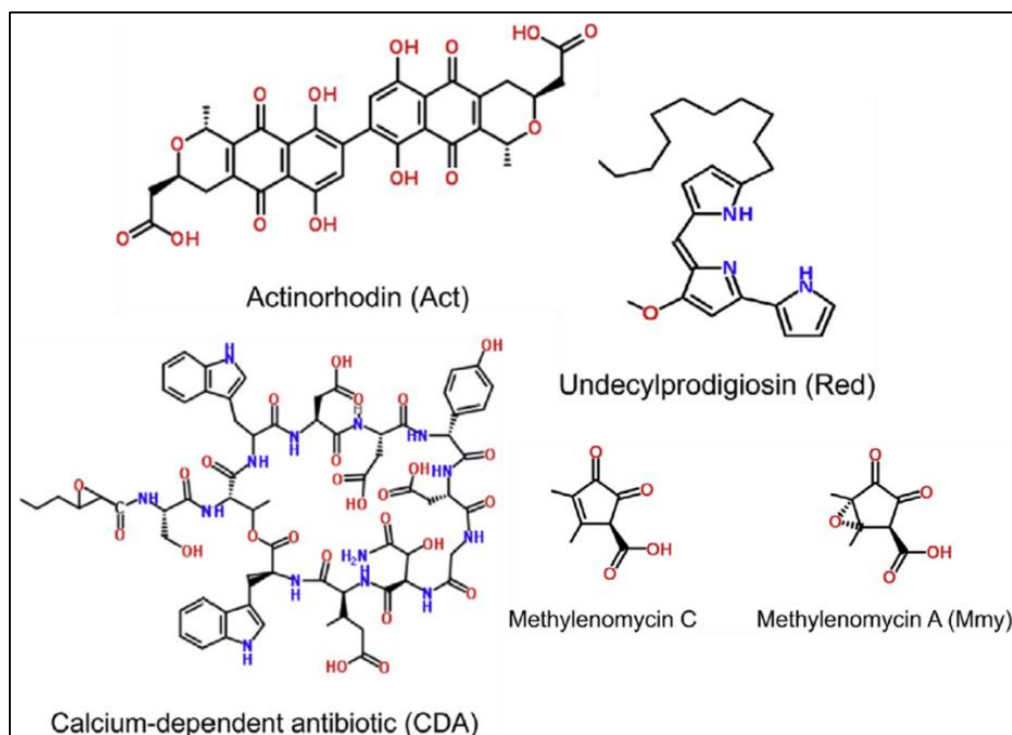


Figura 1.1 - Metaboliti ad azione antibiotica prodotti da *S. coelicolor*.

A livello industriale, la produzione di antibiotici da attinomiceti avviene mediante fermentazioni in bioreattori in terreno liquido che richiedono la messa a punto di protocolli per migliorare la resa produttiva e ridurre i costi in considerazione del fatto che in generale i metaboliti biologicamente attivi sono prodotti in basse quantità (Parekh *et al.*, 2000). Uno dei passaggi limitanti per lo studio e l'introduzione nella pratica

terapeutica di nuovi antibiotici è proprio la necessità di ottenere delle buone rese di produzione a costi contenuti. L'analisi e l'ottimizzazione dei processi fermentativi focalizzano solitamente sia gli aspetti prettamente chimico-fisici del processo, ovvero la composizione del mezzo di coltura, il pH, il grado di agitazione, la disponibilità di ossigeno e nutrienti, ma soprattutto i parametri biofisici del ceppo in crescita. Tra questi, la formazione di aggregati e pellet influenza negativamente le quantità di biomassa e le attività metaboliche su cui si basa la produzione di biomolecole nel caso degli attinomiceti filamentosi (Wentzel *et al.*, 2012; Rioseras *et al.*, 2013).

Secondo il normale modello di sviluppo e in riferimento alla natura di questi organismi (cioè batteri che crescono adesi ad un substrato, che eventualmente degradano), gli attinomiceti manifestano fasi caratteristiche che comprendono germinazione da spore, formazione di micelio substrato, sviluppo di ife aeree e, infine, sporulazione (Puglia *et al.*, 1995; Manteca *et al.*, 2010). Queste fasi di differenziamento morfologico corrispondono ad altrettante fasi della cinetica di crescita caratterizzata da: i) una prima fase di crescita rapida (*rapid growth 1* o RG1) durante la quale si forma il micelio substrato; ii) una fase di arresto transitorio della crescita (*transition* o T) dove si instaurano gli eventi di regolazione genica che determinano la formazione del micelio aereo; iii) una seconda fase di crescita rapida (*rapid growth 2* o RG2) dove si accresce il micelio aereo e iv) una fase stazionaria (S) durante la quale avviene la sporulazione. La produzione dei metaboliti biologicamente attivi inizia solitamente in fase T e/o RG2. Quando vengono coltivati in un terreno liquido, invece, gli attinomiceti non vanno incontro ad un evidente differenziamento morfologico (Manteca *et al.*, 2008; Yagüe *et al.*, 2014). In queste condizioni, infatti, si formano comunque delle ife, che, tuttavia, non sono attribuibili a nessuno dei due tipi di micelio (substrato e aereo). Queste ife conferiscono una complessa architettura al micelio stesso, in quanto si interconnettono tra loro formando delle strutture (Fig. 1.2 A) via via sempre più ramificate e compatte, dall'aspetto glomerulare, note come pellet (Fig. 1.2 B), che si accrescono in senso radiale (Manteca *et al.*, 2008).

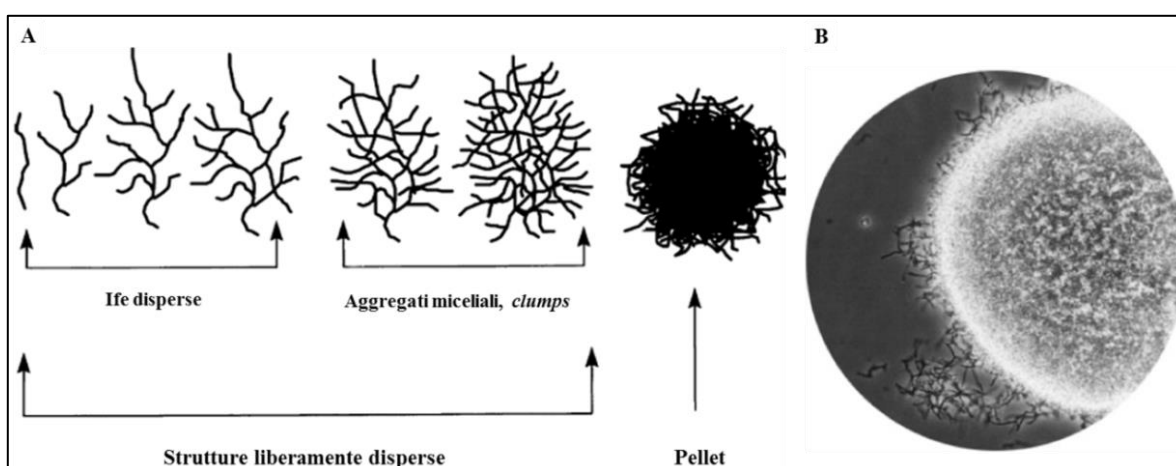


Figura 1.2 - A) Schema illustrativo dell'evoluzione delle forme di aggregazione delle ife in colture liquide di *S. coelicolor*; B) Immagine al microscopio ottico che raffigura un tipico pellet prodotto dal ceppo.



I pellet hanno, inoltre, un impatto negativo sull'eventuale aumento dei costi per il trattamento della biomassa stessa, che a causa della sua così complessa morfologia, richiede tecniche e strumentazioni avanzate per la sua separazione dal terreno di crescita e per l'estrazione dei metaboliti (Kim *et al.*, 2001). La crescita a pellet presenta stadi di sviluppo eterogenei: nelle porzioni più esterne delle strutture glomerulari, infatti, la crescita è continua, perché supportata dalla disponibilità di ossigeno e nutrienti, mentre, invece, nelle porzioni centrali si registrano fenomeni di affamamento ed ipossia, dovuti alla deplezione di tali sostanze che, a causa della complessa organizzazione del pellet, non riescono ad arrivare alle cellule site più internamente che, quindi, vanno irrimediabilmente e precocemente incontro a morte (Olmos *et al.*, 2013). I pellet, infatti, aumentano drammaticamente la viscosità del mezzo, evento che si ripercuote sulle condizioni di crescita del batterio, in quanto aumenta lo "shear stress" e comporta una riduzione del trasferimento del calore, dell'ossigeno e dei nutrienti fra le cellule (Ulgen and Mavituna, 1998). Nonostante non si verifichi alcun differenziamento di tipo morfologico, in terreno liquido la cinetica di crescita presenta le fasi RG1, T, RG2 e S, con la produzione di antibiotici che inizia alla fine della fase T e continua durante la fase RG2 come avviene in terreno solido.

Nonostante gli antibiotici prodotti da *S. coelicolor* non abbiano un utilizzo in ambito farmaceutico, poter disporre di una conoscenza dettagliata dei meccanismi che regolano la loro biosintesi può favorire lo sviluppo di metodiche atte a migliorarne la produzione nel caso di ceppi industriali, i cui prodotti sono usati in terapia. Esperimenti di ingegneria genetica e clonaggio molecolare, volti a modificare l'assetto genetico dei microrganismi, rappresentano sicuramente il primo approccio strategico per incrementare la produzione di antibiotici da parte dei ceppi produttori, in prima linea degli streptomiceti. *S. coelicolor* è un batterio che ampiamente si presta a tali applicazioni e la sua versatilità genetica può essere sfruttata per la creazione di ceppi ingegnerizzati "superproduttori" (Baltz, 2011) o per modificare chimicamente molecole di opportuno interesse (Walsh, 2002).

In aggiunta, anche l'ottimizzazione delle condizioni di crescita e del tipo di nutrienti rappresenta un buon punto di partenza per il suddetto scopo. Recenti studi hanno, per esempio, evidenziato, per quanto riguarda *S. coelicolor*, che esso registri un miglioramento delle attività morfologiche e metaboliche ed un aumento della produzione di ACT in mezzi di crescita minimi in cui sia stato aggiunto triptofano. Questo amminoacido, infatti, è in grado di stimolare l'espressione dei geni deputati alla sua stessa biosintesi, nonché di alcuni geni caratteristici di alcune fasi del metabolismo secondario, come la produzione di antibiotici, in particolare l'ACT, ma anche il CDA (Palazzotto *et al.*, 2015).

In riferimento ai processi fermentativi, in particolare, nuovi approcci per il miglioramento della produzione di antibiotici sono volti a ricreare le condizioni di crescita tipiche degli habitat naturali degli attinomiceti, dal momento che le fermentazioni in terreno liquido non rappresentano il loro ideale stile di vita. È stato osservato che il suolo rappresenti il tipico ambiente di crescita di questi batteri ed è stato altrettanto precisato il fatto che essi preferiscano l'adesione a substrati solidi, organici od inorganici, per espletare al meglio tutte le loro attività differenziative e metaboliche. Sulla base di queste premesse,





L'immobilizzazione cellulare, infatti, offre numerosi vantaggi rispetto alle colture libere, come per esempio una maggiore densità cellulare, un aumento della diffusione e distribuzione di nutrienti ed ossigeno per la biomassa, un aumento della stimolazione del metabolismo, una maggiore protezione da effetti tossici da parte, ad esempio, di metaboliti intermedi dei processi metabolici - il cui accumulo nel mezzo influisce negativamente sul metabolismo e sulla crescita - determinando, quindi, un generale aumento della bio-produttività (Kim *et al.*, 2001; Ndlovu *et al.*, 2015). In base al tipo di interazione che si instaura tra il supporto (*scaffold*) ed il batterio ed in base alla natura del supporto utilizzato, le tecniche di immobilizzazione suggerite negli ultimi anni sono diverse: flocculazione, adsorbimento su superfici, legami covalenti ai carrier, incapsulamento e nanocoating.

In riferimento all'utilizzo di diverse tipologie di supporto che si sono dimostrate mezzi efficienti per l'incremento delle produzioni antibiotiche da parte di *S. coelicolor*, in particolare, sono stati recentemente adoperati come supporti per l'immobilizzazione cellulare sia composti naturali, come capsule di alginati (López-García *et al.*, 2014), sia strutture porose create appositamente con polimeri organici (Ndlovu *et al.*, 2015).

### 1.1.2 Differenziamento morfo-fisiologico in *S. coelicolor*

Gli streptomiceti sono batteri Gram-positivi oligotrofi, con un alto contenuto di GC nel loro DNA, appartenenti al phylum degli Actinobacteria (Bentley *et al.*, 2002; Borodina *et al.*, 2005), e facenti parte dell'ordine degli Actinomycetales (Stackebrandt *et al.*, 1997). Gli actinobatteri, commensali non dannosi con l'eccezione di alcune specie patogene, hanno una morfologia variabile da coccoide e bastoncellare a filamentosa, sono batteri del suolo ubiquitari e costituiscono una componente significativa della popolazione microbica del terreno. Il loro caratteristico odore di terreno è dovuto alla produzione di composti terpenoidi, chiamati geosmine. Sono in gran parte mesofili, aerobi e chemiorganotrofi, in grado di utilizzare un'ampia gamma di fonti di carbonio ed azoto: questa duttilità permette a questi microrganismi di occupare un ruolo importante nella decomposizione e nella biotrasformazione della materia organica. Gli streptomiceti, in particolare, sono contraddistinti da una versatilità metabolica che li rende sia adattabili alle condizioni di laboratorio, sia manipolabili ed utilizzabili nei processi produttivi industriali. Gli streptomiceti abitualmente crescono in ambienti con quantità limitata di nutrienti dove vivono in competizione con numerosi altri microrganismi. Nell'ambiente del suolo, gli streptomiceti sono batteri cruciali a causa della loro vasta gamma di processi metabolici e biotrasformazioni. Questi includono la degradazione dei resti insolubili di altri organismi, come la lignocellulosa e la chitina (tra i biopolimeri più abbondanti al mondo), rendendo così gli streptomiceti organismi centrali nel riciclaggio del carbonio (Bentley *et al.*, 2002). Insolitamente per i batteri, gli streptomiceti presentano un complesso sviluppo multicellulare, con differenziazione dell'organismo in "elementi" distinti (Flärdh and Buttner, 2009; Jani *et al.*, 2014). È noto, infatti, che lo sviluppo degli streptomiceti sia di tipo multicellulare e presenti due diverse forme di strutture miceliali: un micelio substrato (o vegetativo) ed un micelio aereo (o riproduttivo) (Granozzi *et al.*, 1990; Kieser *et al.*, 2000), dal quale

successivamente le ife daranno origine a catene di spore, assicurando la diffusione della specie (Chater *et al.*, 2010). Le ife del micelio vegetativo sono, in realtà, dei compartimenti multigenomici, poiché la replicazione del DNA, spesso non è seguita dalla divisione cellulare, per cui si formano lunghe camere contenenti più copie cromosomiche.

In terreno solido, il ciclo vitale di *S. coelicolor* (Fig. 1.3) inizia quando una spora, in presenza di un'adeguata sorgente di nutrienti, comincia a germinare. Dalla germinazione della spora si originano delle ife che, ramificandosi, penetrano nel terreno formando un complesso network cellulare, il micelio substrato (Elliot *et al.*, 2008).

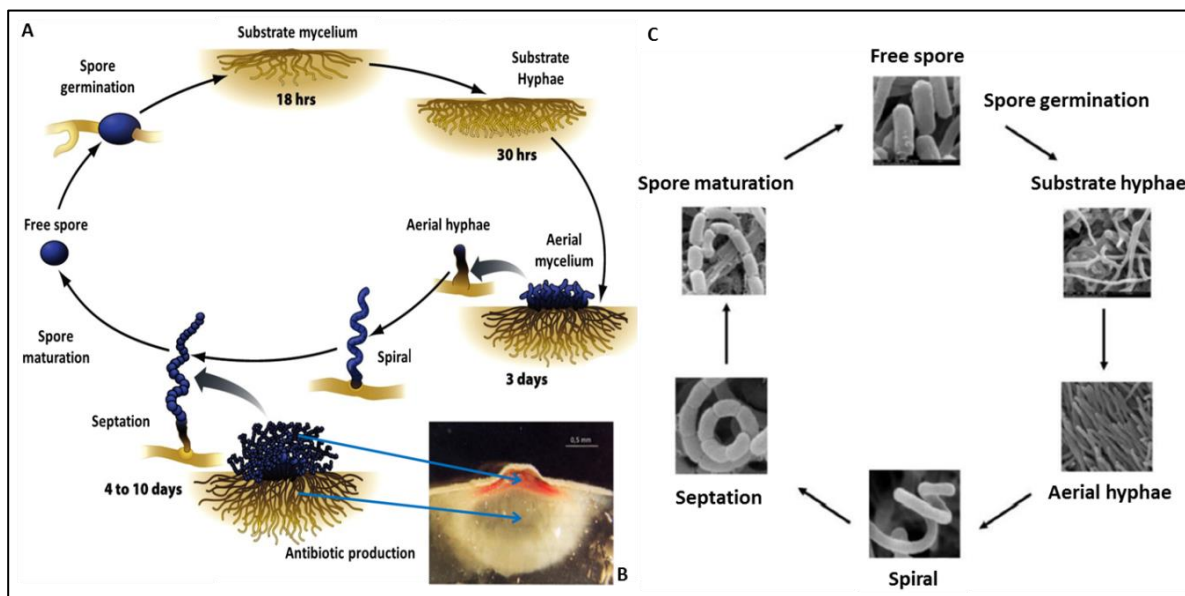


Figura 1.3 - A) Ciclo vitale di *S. coelicolor*; B) Dettaglio di una colonia del ceppo sezionata verticalmente per mostrare le due tipologie di micelio; C) Immagini, ottenute al microscopio elettronico a scansione (SEM), delle varie fasi di crescita del batterio.

Le ife si accrescono rapidamente per estensione della parete batterica nella loro porzione apicale ed, allo stesso tempo, si ramificano anche lateralmente formando una fitta e compatta rete di filamenti interconnessi. Questo tipo di accrescimento è funzionale per l'apporto trofico del batterio, in quanto gli permette di assumere dal suolo tutti i nutrienti di cui necessita. Quando il micelio vegetativo ha raggiunto una certa dimensione, si verifica un arresto della crescita indotto da segnali di stress intra- ed extracellulari, come l'elevata densità cellulare e condizioni sfavorevoli, dovute per lo più a carenze nutrizionali e limitazioni di ossigeno nelle parti più interne della colonia e ciò porta *S. coelicolor* ad intraprendere un complesso programma di differenziazione. In questo stadio, infatti, delle ife aeree si accrescono verso l'alto dal micelio substrato, grazie ai nutrienti che ottengono dalla morte programmata di cellule del micelio vegetativo (Miguélez *et al.*, 1999).

Il micelio substrato presenta delle ife idrofiliche ed è macroscopicamente caratterizzato da una superficie liscia e traslucida; il micelio aereo, invece, possiede delle ife idrofobiche - rese tali grazie alla

formazione di un rivestimento proteico idrorepellente, noto come *rodlet layer* (Claessen *et al.*, 2006) - che si presentano dapprima bianche e successivamente grigie, a causa della formazione delle spore. L'eventuale germinazione delle spore che si formano permette al batterio di riprendere il ciclo.

### 1.1.3 Regolazione ed organizzazione dei geni responsabili della biosintesi di antibiotici in *S. coelicolor*

*S. coelicolor* possiede un cromosoma lineare di 8.667.507 paia di basi (Fig. 1.4). La distribuzione genica presenta un core comprendente approssimativamente metà del cromosoma ed una coppia di braccia cromosomici. Quasi tutti i geni essenziali, come quelli per la divisione cellulare, la replicazione del DNA, la trascrizione, la traduzione e la biosintesi degli amminoacidi, si trovano nel core. Al contrario, i loci che codificano per funzioni non essenziali, come alcuni metaboliti secondari ed esoenzimi idrolitici si trovano nelle braccia (Bentley *et al.*, 2002).

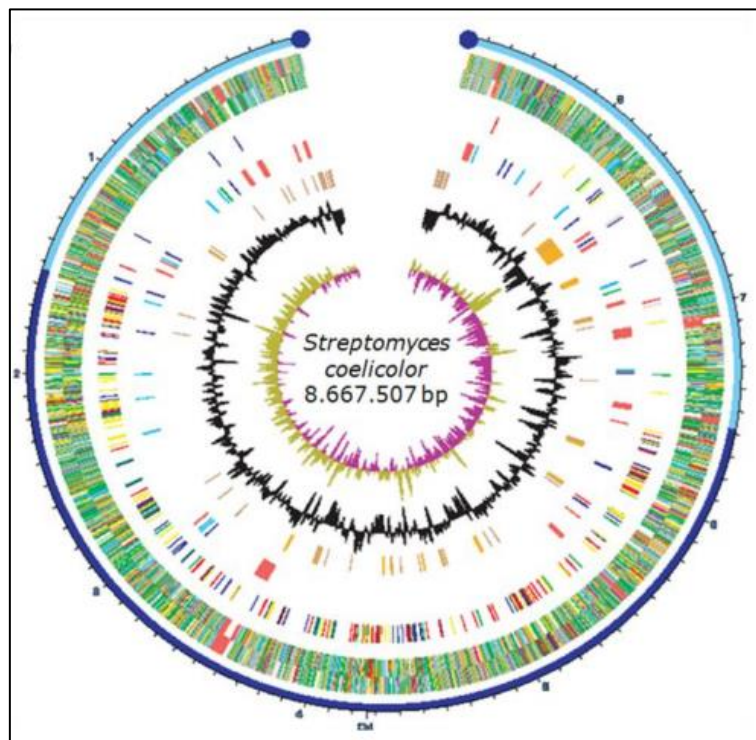


Figura 1.4 - Cromosoma lineare di *S. coelicolor*.

In particolare, nelle 7825 ORF annotate nel genoma sono inclusi i geni che, suddivisi in ben 29 *cluster*, codificano per gli enzimi coinvolti nella sintesi di metaboliti biologicamente attivi, denominati anche secondari perché non indispensabili per la vita del microrganismo. Questi *cluster* sono distribuiti sul cromosoma con preponderanza nelle braccia.

*S. coelicolor* produce svariati tipi di molecole, tra le quali geosmine (terpenoidi responsabili del caratteristico odore di terreno del batterio), polichetidi, siderofori,  $\gamma$ -butirrolattoni, acidi grassi, oligopirroli e deossizuccheri. Tra i metaboliti secondari ad azione antibiotica produce, come già detto, l'ACT, il RED, il CDA e la MM (van Keulen *et al.*, 2015).

L'ACT, benzoisocromanechinone derivato dei polichetidi, è un composto con una modesta attività antibiotica. La sintesi dell'ACT consiste nella condensazione, da parte di una polichetide sintasi (PKS), di un'unità starter di acetil-CoA con sette di malonil-CoA, per formare una catena polichetidica lineare (un octachetide) che rappresenta lo scheletro carbonioso dell'antibiotico (Taguchi *et al.*, 2000). L'ACT funge da indicatore di pH, presentando due caratteristiche pigmentazioni in base al valore del pH del mezzo in cui si trova: a valori inferiori a 7, esso assume una colorazione rossa ed è poco solubile in solventi polari mentre a valori superiori a 7, vira sul blu e diventa solubile in solventi polari (Rudd and Hopwood, 1979). *S. coelicolor* sintetizza due forme di ACT: una intracellulare, ed una extracellulare, nota come  $\gamma$  actinorodina, responsabile della colorazione blu del terreno in cui viene fatto crescere il batterio (Bystrykh *et al.*, 1996). Il nome della specie è stato attribuito proprio in riferimento a tale colorazione (Liu *et al.*, 2013). Il caratteristico colore blu è stato, inoltre, sfruttato per identificare mutanti di *S. coelicolor* con deficit nella biosintesi di questo antibiotico (Rudd and Hopwood, 1979) e per la mappatura ed il clonaggio del suo *cluster* genico (Malpartida and Hopwood, 1986).

Il *cluster* genico dell'ACT (Fig. 1.5), denominato *act*, consta di circa 22 kb e contiene cinque regioni, ciascuna contenente, a sua volta, una o più ORF: la regione actII, la regione actIII, la regione che comprende actI, actIV, actVII e actVB, la regione actVA e la regione actVI (Fernández-Moreno *et al.*, 1994).

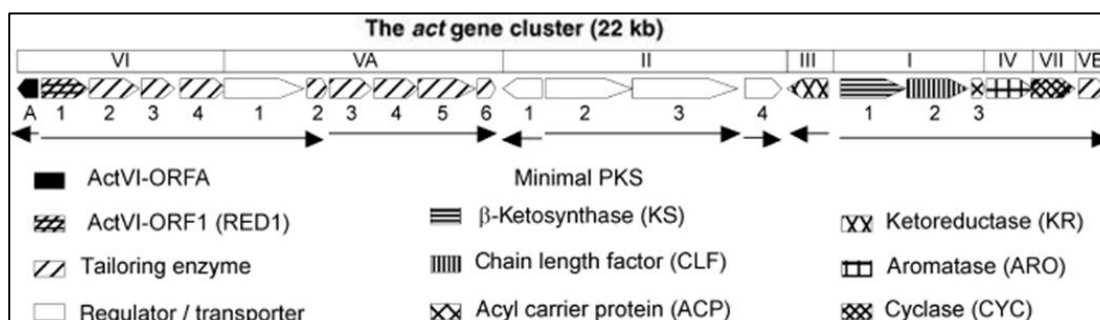


Figura 1.5 - Organizzazione schematica del *cluster* genico *act*.

L'espressione delle varie ORF è completamente dipendente da ActII-ORF4, attivatore trascrizionale, membro della famiglia delle "Streptomyces antibiotic regulatory proteins" (SARPs), proteine paraloghe che mostrano un'elevata specificità nella regolazione della produzione di antibiotici negli attinomiceti. La regione del promotore di actII-ORF4 è un target diretto per circa otto proteine regolatrici della biosintesi dell'ACT e, tra le più importanti, figurano: AdpA (regolatore pleiotropico della produzione di antibiotico), LexA (regolatore della risposta ai danni al DNA), DasR (mediazione globale risposta alla N-acetilglucosamina), AbsA2 (repressore della sintesi antibiotica), DraR e AfsQ1 (attivatori che rispondono all'eccesso di azoto), AtrA (attivatore trascrizionale che si lega anche ai target associati al metabolismo dell'acetil-CoA, precursore dell'ACT) ed il repressore dell'operone xiloso ROK7B7 (SCO6008) (Fig. 1.6) (Liu *et al.*, 2013).

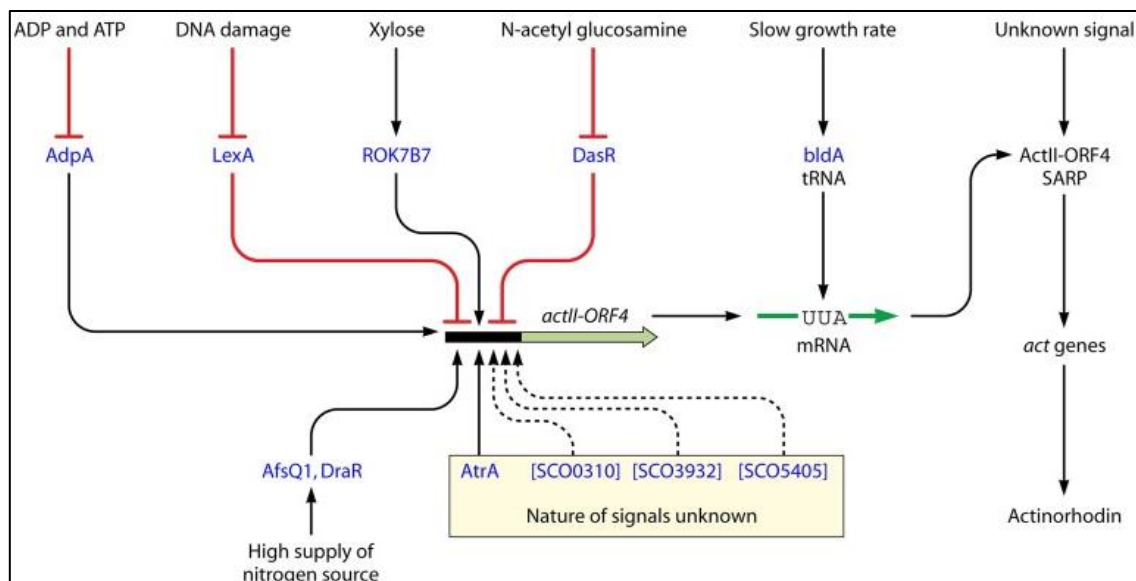


Figura 1.6 - Schema della regolazione dell'espressione del gene actII-ORF4 mediante il legame alla regione promotrice di proteine regolatrici che mediano l'azione di stimoli specifici.

L'antibiotico undecilprodigiosina o "pigmento rosso", RED, è il componente principale della famiglia delle prodigiosine prodotte da *S. coelicolor* (Tsao *et al.*, 1985). Le prodigiosine costituiscono una famiglia di composti tripirrolici dalla pigmentazione rosso-arancio che destano particolare interesse grazie alle loro proprietà immunosoppressive ed antitumorali, ma anche antifungine ed antimalariche (Williamson *et al.*, 2006). *S. coelicolor* produce un mix di composti intracellulari caratterizzato da un rapporto di 2:1, rispettivamente per l'undecilprodigiosina (che presenta una struttura lineare) e la butil-metacicloeptilprodiginina (che possiede una struttura circolare) (Tsao *et al.*, 1985; Williamson *et al.*, 2006). La struttura del RED è costituita da un'unità di prolina, una di glicina, una di serina e diverse di acetato, unite tra loro attraverso un *pathway* biosintetico che culmina con la condensazione dei prodotti finali di due diverse vie, ovvero il 2-metil-3-n-amil-pirrolo (MAP) e il 4-metossi-2,2'-bipirrolo-5-carbossialdeide (MBC) (Cerdeño, 2001).

Il *cluster* genico del RED (Fig. 1.7), denominato *red*, è costituito da 23 geni organizzati in 4 unità trascrizionali (White and Bibb, 1997; Williamson *et al.*, 2006).

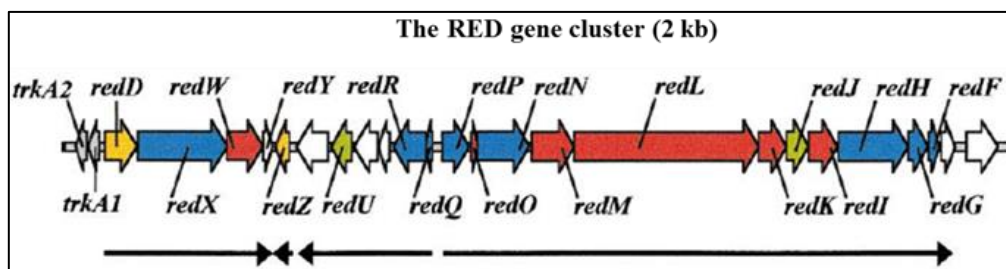


Figura 1.7 - Cluster genico responsabile della sintesi del RED.

Due di questi geni, *redD* e *redZ* (in giallo in Fig. 1.7) sono i principali regolatori del *pathway* biosintetico. Il gene *redD* codifica per l'attivatore trascrizionale per l'espressione di tutti i geni biosintetici e *redZ* funge da attivatore dello stesso *redD* (White and Bibb, 1997). Dei rimanenti ventuno geni, sei (in rosso in Fig. 1.7) sono coinvolti nel *pathway* per la biosintesi di MBC, otto (in blu in Fig. 1.7) per quello deputato alla biosintesi di MAP e due (in verde in Fig. 1.7) sono geni housekeeping. Le proteine codificate dagli ultimi cinque geni (in bianco in Fig. 1.7) non manifestano similarità con alcuna proteina nota ed il loro ruolo è, quindi, sconosciuto (Cerdeño *et al.*, 2001).

L'antibiotico CDA fa parte di una classe di lipopeptidi acidi, che include il noto antibiotico daptomicina, che agiscono legandosi e distruggendo le membrane plasmatiche dei Gram-positivi (Lakey *et al.*, 1983; Strieker and Marahiel, 2009). Il CDA deve il suo nome al fatto che la sua azione antibiotica si esplica solo in presenza di ioni calcio. Esso, infatti, è considerato un composto ionoforo, perché lega selettivamente ioni trans-membrana e forma dei canali che, attraversando il doppio strato lipidico, li trasportano all'interno della cellula, inducendone la lisi (Lakey *et al.*, 1983). La struttura del CDA è quella di un undecapeptide lattone-ciclico che, insieme ad una catena N-terminale 2,3-epossiesanoica, contiene diversi aminoacidi non proteino-genici, tra i quali D-4-idrossifenilglicina, D-3-fosfoidrossiasparagina e L-3-metil acido glutammico. A causa della presenza di tali residui, il CDA è considerato un peptide non ribosomale (NRP), la cui biosintesi avviene mediante l'azione di una NRP sintetasi (NRPS) che catalizza il legame peptidico tra i residui aminoacidici non proteino-genici, partendo da un'unità starter di trans-2,3-epossiesanoil tioestere (Krass *et al.*, 2012). Quest'ultimo, con la sua porzione N-terminale, facilita la penetrazione del lipopeptide nella membrana plasmatica dei Gram-positivi (van Keulen *et al.*, 2015). Elemento importante nella struttura del CDA è il dominio di legame con il calcio, DXDG, indispensabile per la sua attività antibiotica (Strieker and Marahiel, 2009).

Il *cluster* genico del CDA, denominato *cda*, (Fig. 1.8) consta di circa 82 kb e contiene 40 ORFs (Hojati, 2002).

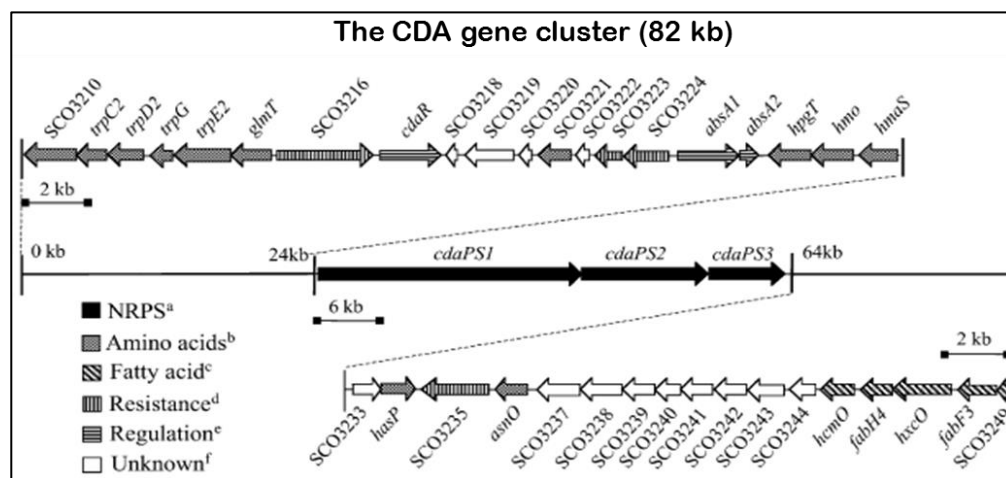


Figura 1.8 - Organizzazione schematica del cluster genico *cda*.



La biosintesi del CDA viene attivata da una SARP codificata dal gene *cdaR*. Altri regolatori, sono i geni *absA1* e *absA2*, che codificano rispettivamente per un'istidina protein chinasi che funge da sensore di membrana ed il suo target, un regolatore della risposta, la cui fosforilazione aumenta la sua efficienza di legame e repressione del promotore di *cdaR* (Liu *et al.*, 2013).

La metilenomicina, infine, è un antibiotico i cui geni responsabili della biosintesi sono localizzati nel plasmide lineare SCP1. Il ceppo utilizzato per questo studio, *S. coelicolor* M145, derivato del ceppo A3 (2), non possiede tale plasmide, motivo per cui questo antibiotico non è stato analizzato nel presente lavoro.



## 1.2 Scopo dell'attività di ricerca

Gli actinomiceti sono una fonte molto prolifica di molecole biologicamente attive, con gli streptomiceti i principali produttori. Infatti *S. coelicolor* è un ceppo modello che produce almeno quattro antibiotici come l'actinorodina o l'undecilprodigiosina ed, inoltre, dovrebbe essere in grado di produrre altri metaboliti bioattivi come suggerito dall'analisi del genoma. Gli eventi di regolazione che controllano la produzione di antibiotici sono stati ampiamente studiati in questo ceppo e mostrano che la produzione di antibiotici viene generata come risposta a segnali intra- o extracellulari legati a perturbazioni nel metabolismo, alle modalità di risposta allo stress o alla limitazione dei nutrienti.

Lo stile di vita degli streptomiceti è di solito caratterizzato da una crescita adesa prevalentemente sulla superficie della materia organica. Per cui la coltivazione in un mezzo liquido spesso porta alla formazione di biomassa a pellet che influenza negativamente la bioproduzione poiché i pellet sono caratterizzati da un gradiente di diffusione di sostanze nutritive e di ossigeno. Quindi una sfida molto interessante è trovare nuove strategie alternative per le fermentazioni in terreno liquido al fine di migliorare la produzione di biomolecole che vengono solitamente prodotte a piccole quantità o anche per attivare la produzione delle cosiddette molecole criptiche.

A tal fine il mio dottorato di ricerca si pone l'obiettivo di validare supporti innovativi di immobilizzazione cellulare in *S. coelicolor* valutando i) gli effetti sulla crescita e sulla produzione di antibiotici e ii) la stimolazione delle attività fisiologiche e metaboliche del microrganismo mediante lo studio delle proteine differenzialmente abbondanti. In particolare sono stati saggiati tre diversi supporti porosi che, caratterizzati da ridotti costi di produzione, differivano per caratteristiche chimico-fisiche, strutturali e morfologiche:

1. tre membrane porose in PCL/PEG aventi diverse dimensioni dei pori;
2. due membrane porose in PCL e PLA, trattate o meno al plasma, fabbricate mediante la procedura dell'elettrospinning;
3. due differenti tipologie di perlite espansa, commercialmente denominata Randalite: RW9 e RW7.





## 1.3 Risultati e Discussioni

I risultati e le discussioni sono suddivisi in tre capitoli intitolati:

**1.3.1** Effetto delle membrane di PCL/PEG sulla produzione di actinorodina in colture di *Streptomyces coelicolor*;

**1.3.2** Colture di cellule immobilizzate di *Streptomyces coelicolor* su membrane di fibre elettrofilate di PCL o PLA;

**1.3.3** Immobilizzazione di cellule di *Streptomyces coelicolor* su perlite espansa per il miglioramento della produzione di antibiotici.

### 1.3.1 Effetto delle membrane in PCL/PEG sulla produzione di actinorodina in colture di *Streptomyces coelicolor*

I risultati descritti in questo capitolo sono stati pubblicati in:

Scaffaro R., Lopresti F., Sutura A., Botta L., Fontana R.M., Puglia A.M., Gallo G. Effect of PCL/PEG-Based Membranes on Actinorhodin Production in *Streptomyces coelicolor* Cultivations. *Macromol. Biosci.*, 16(5):686-93, 2016.

#### 1.3.1.1 Morfologia delle membrane porose di PCL/PEG

Negli ultimi decenni, c'è stato un crescente interesse verso l'uso di polimeri porosi sintetici biodegradabili come supporti per le colture cellulari (Scaffaro *et al.*, 2012, 2016c). È noto che alcuni poliesteri come l'acido polilattico (PLA), il policaprolattone (PCL), l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), ed i loro copolimeri presentano bioattività. Per questa ragione, essi sono ampiamente studiati per applicazioni biomediche come l'ingegneria tissutale (Meneghello *et al.*, 2009; Nadjari *et al.*, 2014).

In particolare, il PCL è un poliestere alifatico sintetico biodegradabile, frequentemente utilizzato per le applicazioni biomediche (Scaffaro *et al.*, 2013, 2016c). Di recente, miscele di poliesteri con polietilenglicole (PEG) sono stati usati per migliorare la biocompatibilità al fine di ridurre l'adsorbimento delle proteine tramite repulsione sterica, per controllare il tasso di degradazione, per migliorare l'idrofilicità, e per migliorare la flessibilità, la resilienza ed i processi di fusione dei polimeri (Scaffaro *et al.*, 2016c). Attualmente, gli effetti delle strutture porose di PCL come supporti per l'immobilizzazione cellulare in bioprocessi produttivi non sono mai stati riportati in letteratura.

In questo lavoro, le membrane porose di PCL/PEG sono state preparate usando tre differenti granulometrie per il cloruro di sodio (NaCl) al fine di ottenere tre differenti dimensioni del diametro e valutare la differente architettura dei pori del supporto. Questo è stato effettuato poiché l'influenza della struttura dei pori sull'attività metabolica delle cellule è stata riportata in diversi studi (Scaffaro *et al.*, 2012, 2016c; Ndlovu *et al.*, 2015).

In Fig. 1.9a è mostrata una micrografia della membrana di PCL/PEG ottenuta per miscelazione di PCL e PEG e granuli di NaCl di 400-600  $\mu\text{m}$  (M500); la struttura porosa è caratterizzata da pori ben interconnessi con una distribuzione multimodale: sono presenti macropori da 400 a 600  $\mu\text{m}$  e micropori di circa 20  $\mu\text{m}$  dovuti alle particelle cristalline fratturate in piccole particelle durante il processo di miscelazione e di lisciviazione del PEG (Scaffaro *et al.*, 2016a,c). Quando la membrana è preparata con NaCl compreso tra 75 e 125  $\mu\text{m}$  (M100, in Fig. 1.9b) la struttura dei pori cambia drasticamente; in realtà, si può osservare la presenza di travi con diametro medio di 45  $\mu\text{m}$  ed i pori appaiono altamente interconnessi. Ogni trave è separata da pori che vanno da 2 a 5  $\mu\text{m}$  dovuto alla solvatazione della fase polimerica del PEG, parzialmente miscibile in PCL (Scaffaro *et al.*, 2012, 2016c). Infine, la terza morfologia ottenuta con granuli di NaCl inferiori a 65  $\mu\text{m}$  (M50, Fig. 1.9c) è caratterizzata dalla grande quantità di pori circa 40  $\mu\text{m}$  di diametro,

circondato da pareti molto sottili. Ogni parete presenta diversi micropori da 2 a 5  $\mu\text{m}$  ragionevolmente dovuti alla fase di solvatazione del PEG.

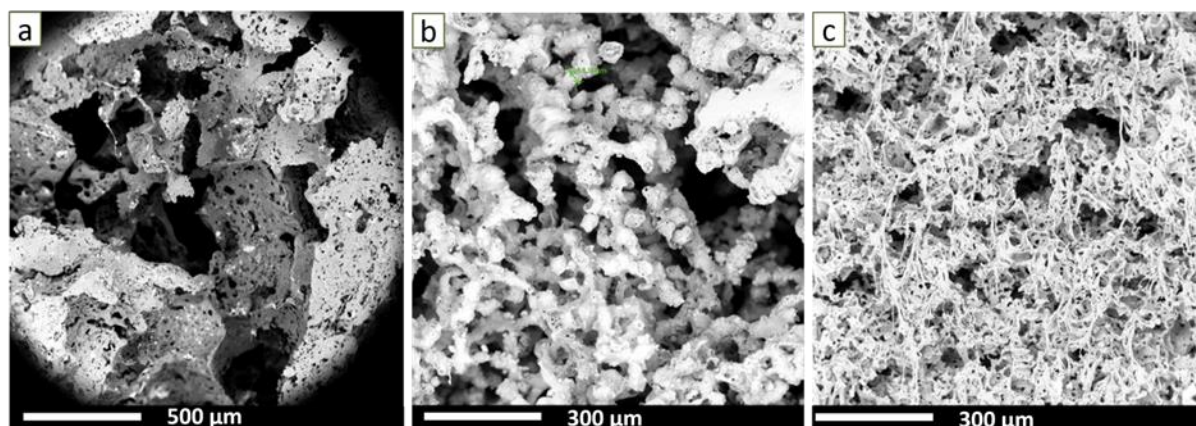


Figura 1.9 – Immagini SEM di membrane, ottenute dalla miscelazione e successiva lisciviazione del sistema PCL/PEG con particelle di NaCl di differente granulometria, denominate M500 (a), M100 (b) e M50 (c) sulla base delle dimensioni medie dei pori.

### 1.3.1.2 Immobilizzazione di *S. coelicolor* M145 sulle membrane porose di PCL/PEG

In via preliminare, le membrane M100 sono state usate per saggiare la capacità del micelio di aderire, penetrare e crescere all'interno delle stesse. Le colture sono state riprodotte utilizzando una piastra multiwell da 96 pozzetti contenente per ogni pozzetto una membrana di PCL/PEG, una densa sospensione di spore ( $10^8 \text{ mL}^{-1}$ ) di *S. coelicolor* ed un terreno di coltura ricco, R2YE, adatto per la produzione di ACT (Kieser *et al.*, 2000). L'esperimento è stato condotto saggiando procedure differenti per l'inoculo batterico. In particolare sono state effettuate le seguenti procedure: i) 10  $\mu\text{L}$  di sospensione di spore in una soluzione acquosa di glicerolo (20% v/v) sono stati inoculati direttamente sulla porzione apicale delle membrane di PCL/PEG già poste in pozzetti contenenti 250  $\mu\text{L}$  di R2YE; ii) 50  $\mu\text{L}$  di sospensione di spore sono state preparate usando tre differenti soluzioni acquose composte da glicerolo 4% (v/v), da glicerolo 20% (v/v), e da glicerolo-polipropilene glicole (4%-0,02% v/v) e poi inoculati nella parte inferiore del pozzetto contenente la membrana di PCL/PEG asciutta. In tutti i casi, le multiwell inoculate sono state tenute in condizioni statiche per tre ore per consentire l'assorbimento delle spore da parte della membrana; nel caso (ii) 250  $\mu\text{L}$  di terreno R2YE sono stati poi aggiunti in ciascun pozzetto. Infine, tutte le multiwell sono state incubate in agitazione orbitale (200 rpm) per cinque giorni a 30 °C. Dopo 3, 4 e 5 giorni di incubazione la parte interna ed esterna delle membrane di PCL/PEG sono state osservate mediante SEM (Fig. 1.10). In particolare, il micelio di *S. coelicolor* risultava immobilizzato sui pori della superficie esterna formando un denso e fitto strato cellulare (Fig. 1.10 a,a'); per quanto riguarda la porzione interna, il micelio batterico risultava penetrato all'interno delle membrane di PCL/PEG per circa 200  $\mu\text{m}$  (Fig. 1.10 b,b') e raramente è stata osservata la presenza di micelio a 600  $\mu\text{m}$  dalla superficie della membrana (Fig. 1.10 c,c').

L'osservazione al SEM non ha evidenziato differenze di immobilizzazione del micelio rispetto le diverse procedure di inoculo saggiate, piuttosto il posizionamento apicale della sospensione di spore ha

comportato una ristretta distribuzione del micelio sulle membrane di PCL/PEG coincidente con il punto di inoculo. Quindi le successive fermentazioni, finalizzate a studiare l'effetto dell'immobilizzazione delle cellule batteriche e la produzione di metaboliti secondari, sono state eseguite collocando le membrane di PCL/PEG nei pozzetti della multiwell contenente 10  $\mu\text{L}$  di spore ( $10^8 \text{ mL}^{-1}$ ) in una soluzione di glicerolo acquoso (20% v/v) e 240  $\mu\text{L}$  di terreno di coltura liquido R2YE.

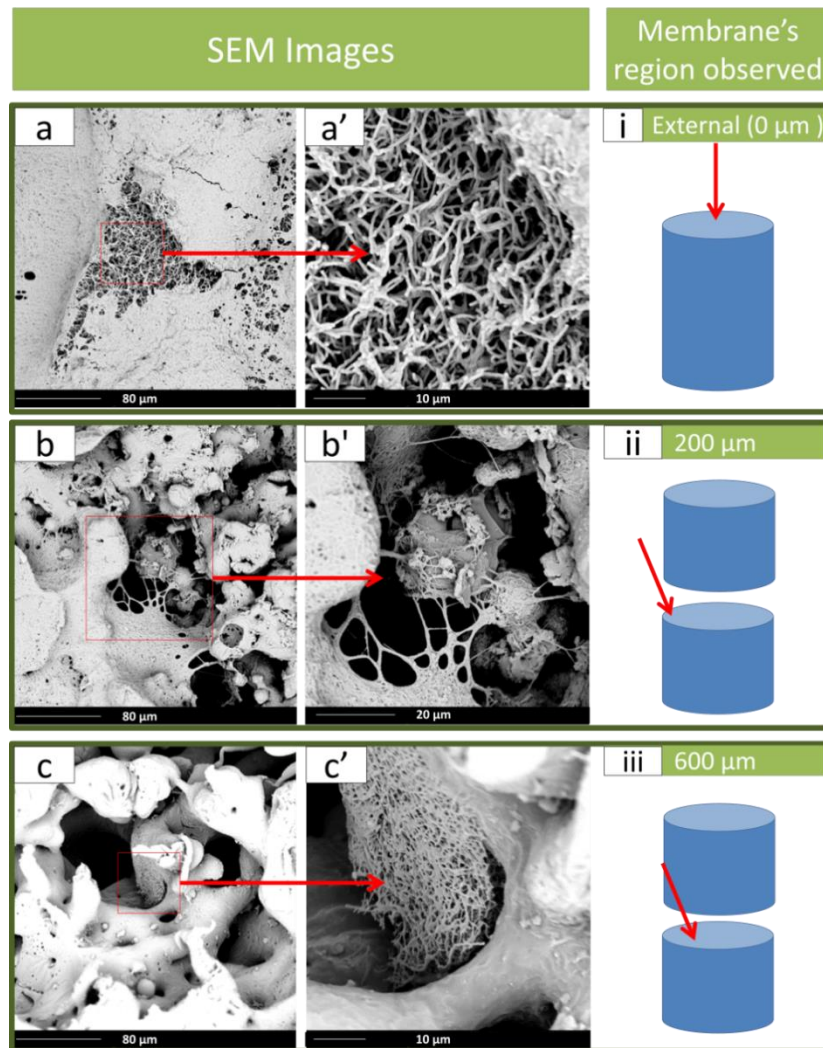


Figura 1.10 - Immagini SEM della porzione interna ed esterna della membrana M100 dove è stato immobilizzato il micelio di *S. coelicolor*. (a,a') immagini della superficie esterna delle M100 a diverso ingrandimento; (b,b') micelio osservato a 200  $\mu\text{m}$  di profondità dalla superficie esterna delle M100; (c,c') micelio osservato nella parte interna della membrana a 600  $\mu\text{m}$  di profondità dalla superficie esterna delle M100; i, ii, iii sono la rappresentazione schematica della porzione della membrana osservata al SEM.

### 1.3.1.3 Effetto delle membrane di PCL/PEG sulla biosintesi di ACT e di proteine

*S. coelicolor* è stato incubato in multiwell da 96 pozzetti, come sopra descritto, utilizzando tre membrane di PCL/PEG con dimensione medie dei pori di 50, 100 e 500  $\mu\text{m}$ , rispettivamente, come supporto per eseguire colture di cellule immobilizzate. L'effetto dell'immobilizzazione e della differente dimensione

dei pori è stato monitorato determinando il contenuto totale di proteine cellulari e la produzione di ACT utilizzando, come controllo, colture convenzionali di *S. coelicolor* condotte in parallelo.

La crescita batterica è stata misurata determinando il contenuto proteico totale estratto dal micelio libero e da quello immobilizzato sulle membrane di PCL/PEG cresciuto in ciascun pozzetto della multiwell (Fig. 1.11). Dopo 3-4 giorni di crescita è stato osservata una cinetica simile per tutte le diverse colture. Dopo 4 giorni di crescita le colture immobilizzate mostrano un andamento cinetico presumibilmente ancora in fase esponenziale mentre la coltura controllo presenta un andamento stazionario. In particolare, a 5 giorni di incubazione è stato riscontrato un incremento proteico di circa 1,4 volte nel micelio immobilizzato sulle membrane M50 e M100 rispetto alla coltura controllo, rivelando una migliore capacità di sintesi proteica da parte delle colture immobilizzate.

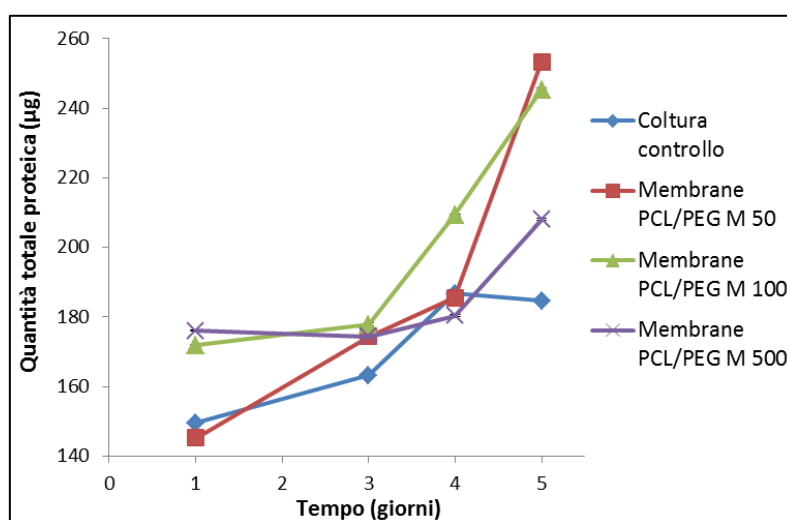


Figura 1.11 - Cinetica di crescita di *S. coelicolor* in colture immobilizzate. Il contenuto proteico cellulare totale è stato estratto dal micelio immobilizzato su PCL/PEG M50, M100 e M500, rispettivamente, a diversi tempi di crescita. Le colture planctoniche sono state usate come condizione controllo. I valori sono riportati come media di tre colture; la deviazione standard è riportata con le barre verticali.

Per quanto riguarda la produzione del metabolismo secondario, è stata calcolata la quantità totale di ACT prodotta dalle cellule libere e dal micelio immobilizzato su PCL/PEG in ciascun pozzetto della multiwell. Durante il tempo di analisi, la resa massima di ACT è stata ottenuta dopo 5 giorni di crescita utilizzando le M100. In questo caso, è stato riscontrato un aumento del contenuto di ACT di circa il doppio rispetto alle colture controllo (Fig. 1.12). Al contrario, la più bassa resa di produzione è stata ottenuta utilizzando la membrana M500 (Fig. 1.12).

Sulla base di questi dati, è stato effettuato uno scale-up in tubi tester contenenti 1 mL di terreno R2YE ed utilizzando le membrane con dimensione dei pori di 50 e 100 µm come supporto per l'immobilizzazione del micelio. In dettaglio, una sospensione di spore di *S. coelicolor* alla concentrazione finale di  $10^8$  mL<sup>-1</sup> è stata inoculata in 1 mL di R2YE assieme a tre membrane. Il controllo era rappresentato da colture allestite in

parallelo ad eccezione delle membrane di PCL/PEG. I tubi tester sono stati incubati a 30 °C a 200 rpm e dopo 3 e 5 giorni di crescita è stato effettuato il dosaggio dell'ACT sul mezzo di coltura.

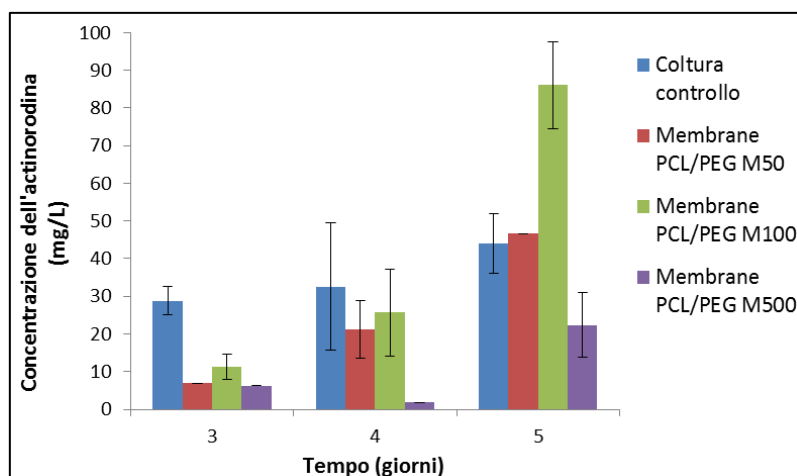


Figura 1.12 - Produzione di ACT, estratto da colture immobilizzate su PCL/PEG M50, M100 e M500, rispettivamente. Le colture planctoniche sono state usate come condizione controllo. I valori sono riportati come media di tre misurazioni indipendenti; la deviazione standard è riportata con le barre verticali.

In accordo con le prove condotte su microscala, è stato osservato un incremento della produzione solo quando sono state utilizzate membrane di PCL/PEG con una dimensione dei pori di 100  $\mu\text{m}$  (Fig. 1.13). In particolare, è stato mostrato un incremento di 1,5 e 1,7 volte in presenza delle membrane M100 rispetto alle colture controllo dopo 3 e 5 giorni di crescita, rispettivamente. Al contrario, l'uso delle membrane M50 ha determinato una resa produttiva di ACT simile a quella delle colture controllo.

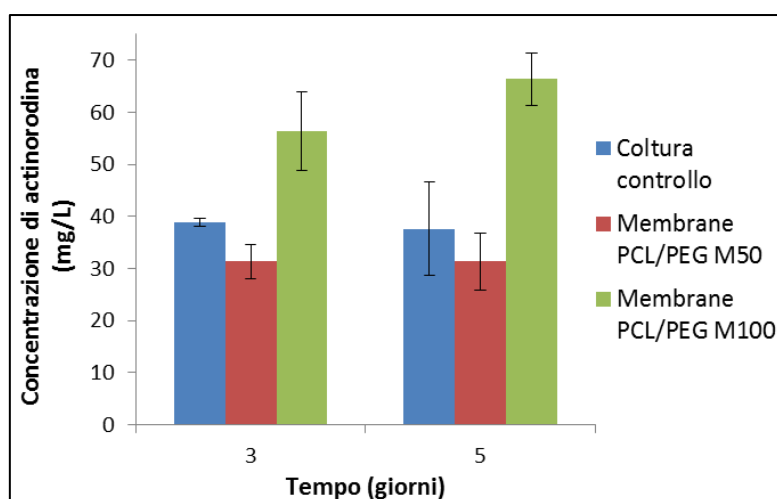


Figura 1.13 - Produzione di ACT, rilasciata nel mezzo dalle colture immobilizzate su PCL/PEG M50 e M100. Le colture planctoniche sono state usate come condizione controllo. I valori sono riportati come media di tre colture indipendenti; la deviazione standard è riportata come barre verticali.



### 1.3.2 Colture di cellule immobilizzate di *Streptomyces coelicolor* su membrane di fibre elettrofilate di PCL o PLA

I risultati descritti in questo capitolo sono stati pubblicati in:

Scaffaro R., Lopresti F., Sutera A., Botta L., Fontana R.M., Gallo G. Plasma modified PLA electrospun membranes for actinorhodin production intensification in *Streptomyces coelicolor* immobilized-cell cultivations. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1;157:233–241.

#### 1.3.2.1 Struttura delle membrane porose di fibre elettrofilate di PCL e PLA, trattate o meno all'O<sub>2</sub>-plasma

Il PLA ed il PCL sono poliesteri, che possono essere usati come biomateriali (Liu *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012; Lo Re *et al.*, 2015; Scaffaro *et al.*, 2016a,c, 2017b,c,d,e) nelle applicazioni mediche quali l'ingegneria tissutale (Scaffaro *et al.*, 2016c,d), il rilascio controllato di farmaci (Scaffaro *et al.*, 2013) ma anche per l'intensificazione dei bioprocessi (Yang *et al.*, 2001; Ndlovu *et al.*, 2015; Scaffaro *et al.*, 2016b, 2017b). La struttura porosa, la bagnabilità, l'energia superficiale (SE) e la composizione chimica delle superfici di questi materiali hanno un impatto significativo sull'interazione con le cellule vitali. Infatti, la superficie della maggior parte dei polimeri sintetici è idrofoba e mostra un basso valore di SE, che influisce negativamente sulle interazioni cellula-polimero (Zandén *et al.*, 2012). Tra i vari approcci proposti per la modifica della superficie di questi polimeri, il plasma a bassa pressione ha avuto una grande importanza scientifica ed industriale (Zandén *et al.*, 2012; Moraczewski *et al.*, 2016). Il plasma può essere descritto come un mezzo energetico composto da radiosfere, atomi, elettroni, ioni caricati positivamente e negativamente e molecole derivanti da una fonte energetica esterna (Maio *et al.*, 2014).

Strutture porose composte da fibre elettrofilate di PCL e PLA sono state fabbricate mediante la tecnica dell'“electrospinning” che è processo produttivo di filatura elettrostatica che permette, nell'industria dei polimeri, di ottenere filamenti continui di materiale sintetico del diametro straordinariamente piccolo, anche inferiore al micron (Li and Xia, 2004). Le membrane ottenute presentano un film (Fig. 1.14) di spessore compreso fra gli 80 e 110 µm ed un peso tra i 17 ed i 22 mg per una lunghezza di 8 cm.



Figura 1.14 - Esempio di membrana porosa di fibre elettrofilate di PCL lunga circa 8 cm.

Le membrane sono state utilizzate per condurre colture di cellule immobilizzate di *S. coelicolor*. In particolare, le membrane sono state utilizzate al fine di valutare una correlazione tra la loro struttura e/o

composizione chimica (Ndlovu *et al.*, 2015) ed una corrispondente risposta fisiologica da parte del microrganismo immobilizzato.

Le immagini SEM mostrano una morfologia omogenea delle membrane che risultano composte da fibre di dimensione compresa tra 0,2 e 1  $\mu\text{m}$  per le membrane a base di PCL (Fig. 1.15 A-C) e tra 1 e 5  $\mu\text{m}$  per le membrane a base di PLA (Fig. 1.15 D e E).

Inoltre, ad alcune membrane è stato eseguito il trattamento al plasma di ossigeno per apportare modifiche chimiche alla superficie del polimero che lo rendessero maggiormente idrofilico. Preliminarmente, è stato studiato l'effetto del trattamento al plasma sulla morfologia delle nanofibre di PLA. Le immagini SEM dei supporti porosi di PLA e PLA-plasma sono mostrati in Fig. 16 (a, b, a', b'), indicando che tutte le fibre sono orientate in modo casuale ed i loro diametri sono nell'ordine di grandezza di nanoscala.

Più in dettaglio, dalla Fig. 1.16 (a) è possibile osservare che le fibre della membrana presentano un diametro omogeneo in tutta la superficie. Le stesse caratteristiche morfologiche possono essere osservate per le fibre delle membrane di PLA-plasma. Gli inserti in Fig. 1.16 (a' e b') sono micrografie delle membrane ottenute ad un ingrandimento maggiore. I dati mostrano che entrambi i supporti sono caratterizzati da fibre lisce con diametro di circa 1  $\mu\text{m}$ .

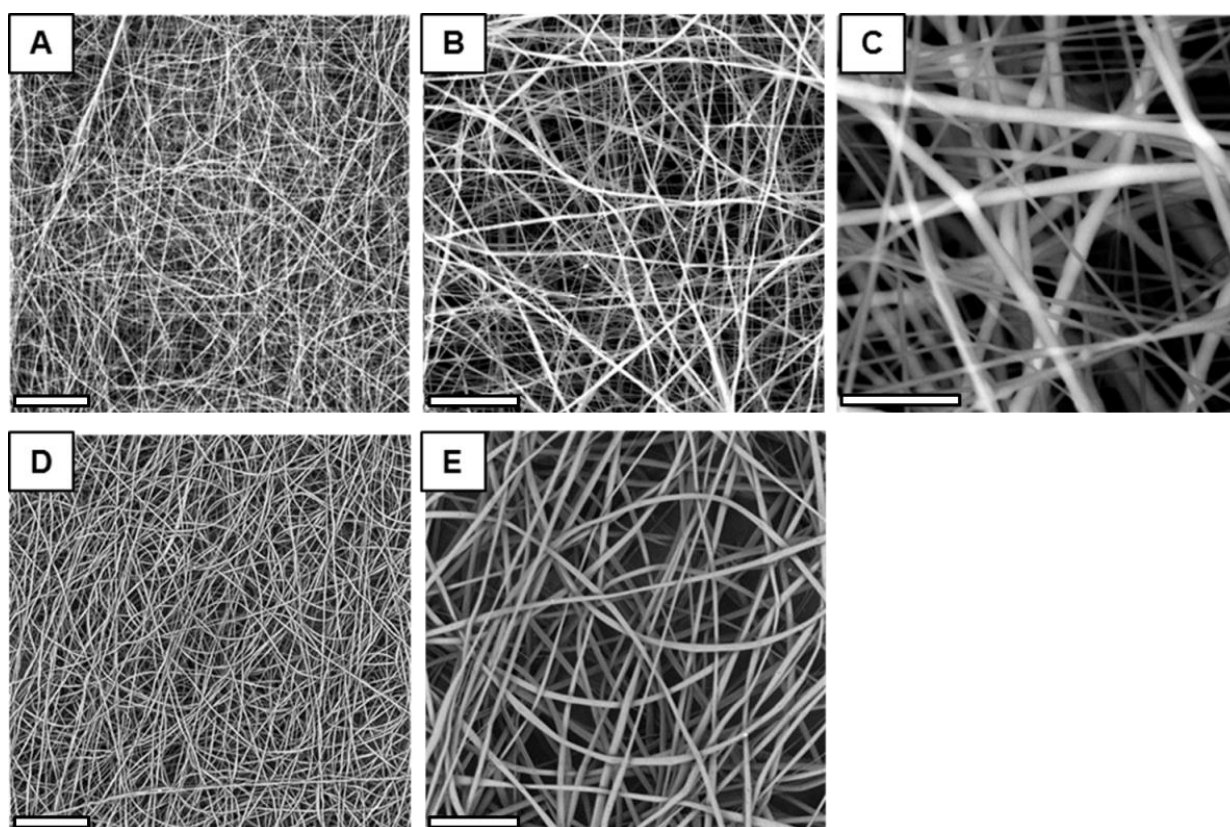


Figura 1.15 - Immagini SEM di membrane di PCL (A - C) e PLA (D e E) a diverso ingrandimento: A e D) 500X; B e E) 2000X; C) 10000X. La barra di scala è: A e D) 100  $\mu\text{m}$ ; B e E) 30  $\mu\text{m}$ ; C) 8  $\mu\text{m}$ .

Dall'analisi delle immagini, condotte dal gruppo di Scaffaro *et al.*, 2017a, è stato possibile quantificare la distribuzione della grandezza del diametro ed il diametro medio delle fibre. I risultati, mostrati in Fig. 1.16



(c, d), hanno rivelato che entrambe le strutture porose di PLA e PLA-plasma sono caratterizzati da un picco, riguardante il diametro delle fibre, che si registra intorno a  $0,9 \mu\text{m}$  ed una dimensione media del diametro di  $0,85 \pm 0,33$  e  $0,91 \pm 0,37 \mu\text{m}$  rispettivamente. Infatti, la Fig. 1.16 (c, d) ha rivelato una simile distribuzione dei diametri per entrambe le membrane porose, dimostrando pertanto che, nelle condizioni selezionate, il trattamento al plasma non induce cambiamenti significativi nella morfologia delle nanofibre di PLA.

In generale, la modifica al plasma agisce su substrati polimerici attraverso eventi di eccitazione, deionizzazione e dissociazione mediante i radicali liberi che inseriscono, generano o rimuovono gruppi funzionali in superficie. L'effetto atteso del trattamento al plasma di ossigeno per le membrane di PCL e PLA è un processo combinato di modifica ed attacco per mezzo di reazioni con i radicali dell'ossigeno. È spesso usato per migliorare l'adesione dei rivestimenti, la bagnabilità, la bio-compatibilità ed altre proprietà correlate alla superficie dei polimeri. Tuttavia, durante l'invecchiamento, il PLA-plasma perde parzialmente la sua idrofilicità con il trascorrere del tempo, a causa della migrazione delle molecole a basso peso molecolare verso la superficie delle membrane trattate (Moraczewski *et al.*, 2016). Per questo motivo, tutte le caratterizzazioni sono state eseguite 1 ora dopo il trattamento con plasma.

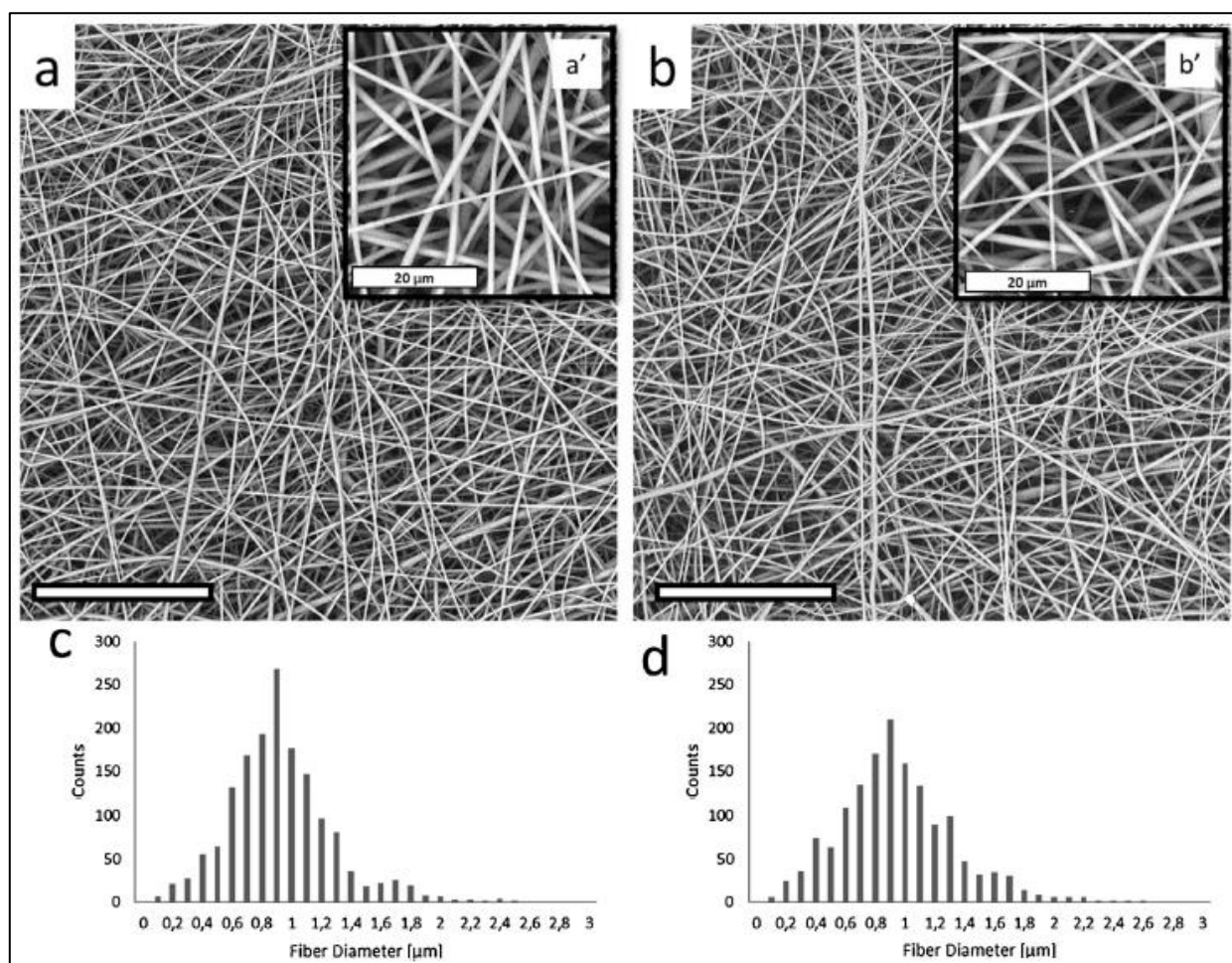


Figura 1.16 – Immagini SEM delle membrane: a, a') PLA e b, b') PLA-plasma. La barra di scala è  $80 \mu\text{m}$ . Distribuzione delle dimensioni del diametro delle membrane: c) PLA e d) PLA-plasma.

### 1.3.2.2 Immobilizzazione di *S. coelicolor* sulle membrane porose di fibre elettrofilate di PCL e PLA, trattate o meno al plasma

In via preliminare, i quattro tipi di membrane sono state usate per testare la capacità del micelio di *S. coelicolor* di aderire e crescere sulla loro superficie ed infine penetrare nello spessore tra le due facce a partire da un inoculo di spore. Le colture sono state riprodotte utilizzando beute da 50 ml contenenti 7 membrane di PCL o PLA con il relativo trattamento al plasma, una densa sospensione di spore ( $5 \cdot 10^7$ ) di *S. coelicolor* in una soluzione di glicerolo acquosa (20% v/v) e 10 ml di terreno di coltura ricco R5A, adatto per la produzione di ACT (Kieser *et al.*, 2000). Le colture immobilizzate sono state condotte in modo da avere per ciascuna condizione di crescita un rapporto massimo di circa il 10% (v/v) fra il volume del terreno di coltura e quello delle membrane. Le beute inoculate sono state incubate in agitazione orbitale (200 rpm) per sette giorni a 30 °C. Le colture sono state effettuate in triplicato per le membrane di PCL e PCL-plasma o PLA e PLA-plasma, e la capacità di produrre i metaboliti secondari ACT e RED è stata monitorata utilizzando colture controllo di *S. coelicolor* condotte mediante cellule libere.

Pertanto, dopo 3, 5 e 7 giorni di incubazione, i due tipi di membrane di PLA sono state osservate al SEM (Fig. 1.17 a - f). Queste osservazioni hanno dimostrato che le membrane di PLA sono già ricoperte da un fitto e denso strato di micelio simile ad un biofilm dopo 3 giorni di crescita (Fig. 1.17 a, d).

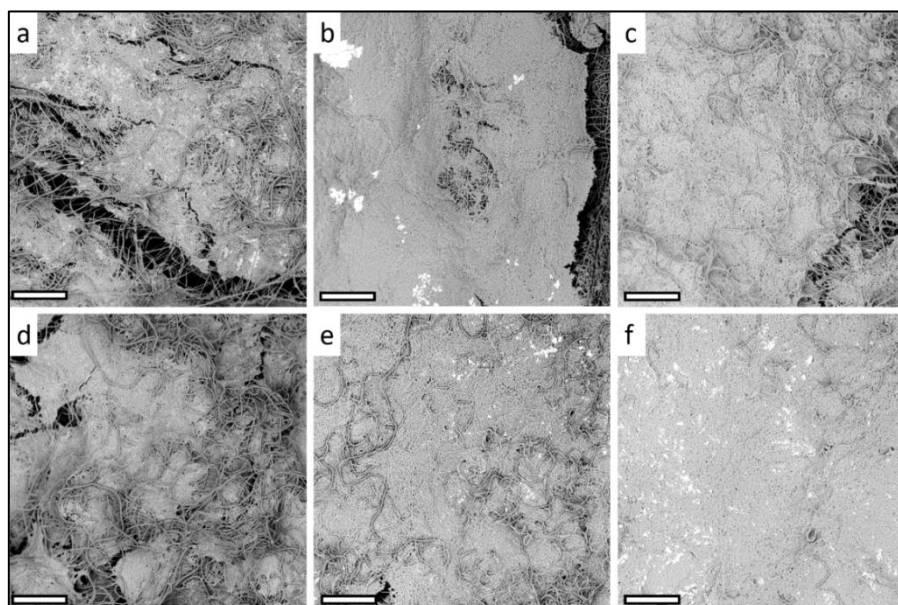


Figura 1.17 – Immagini SEM di *S. coelicolor* adeso sulla membrana di PLA dopo 3 (a), 5 (b) e 7 (c) giorni e di PLA-plasma dopo 3 (d), 5 (e) e 7 (f) giorni. Scala grafica 100  $\mu$ m.

Infatti, le modalità di crescita sulle nanofibre di PLA (Fig. 1.18) richiamano lo stile di vita di *Streptomyces* in cui le ife crescono adese alla superficie delle ife fungine (Chater *et al.*, 2010) che sono principalmente composti da chitina e chitosano. Pertanto, si potrebbe supporre che, nonostante le differenze di composizione, la capacità di aderire alle matrici fibrose organiche naturali o di sintesi, che possiedono

residui polari (idrossili, carbonili e carbossili) e apolari (metili o acetili), è una caratteristica delle ife di *S. coelicolor*.

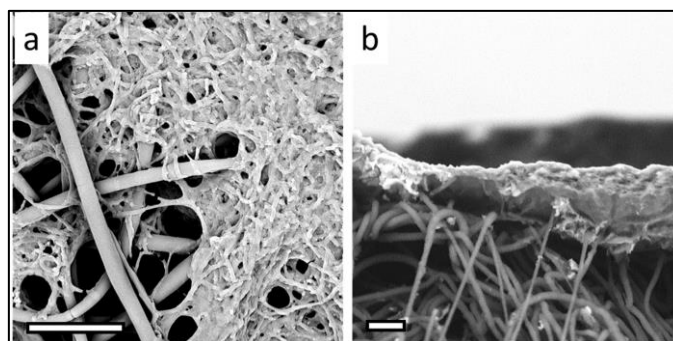


Figura 1.18 - Immagini SEM di: a) ife di *S. coelicolor* che aderiscono ed avvolgono la membrana di PLA-plasma dopo 3 giorni. Scala grafica 6µm; b) Sezione trasversale della membrana di PLA-plasma ed ife di *S. coelicolor* che aderiscono e penetrano all'interno di essa.

### 1.3.2.3 Produzione di ACT e RED in colture di cellule di *S. coelicolor* immobilizzate sulle membrane porose di fibre elettrofilate di PCL e PLA, trattate o meno al plasma

Le possibili relazioni tra gli effetti biologici dell'immobilizzazione delle cellule miceliali ed il tipo di membrana con le differenze chimiche dovute al trattamento con O<sub>2</sub>-plasma sono state monitorate valutando i livelli di produzione di ACT e RED. In questi esperimenti, colture planctoniche di *S. coelicolor* sono state utilizzate come condizione di controllo. Le analisi effettuate a 3, 5 e 7 giorni di incubazione hanno rivelato che durante il tempo di incubazione c'è stato un progressivo e relativo incremento della resa di ACT per tutte le colture con micelio immobilizzato, indipendentemente dal tipo di membrana, con le rese massime di ACT ottenute dopo 5 giorni di incubazione utilizzando le membrane di PLA-plasma, con la quantità di antibiotico che rimane essenzialmente invariata nei giorni successivi (Fig. 1.19).

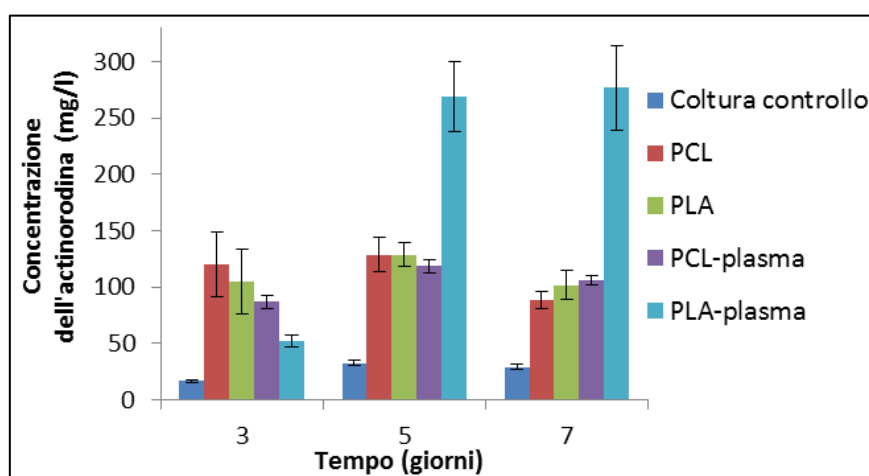


Figura 1.19 - Produzione di ACT, estratta da colture immobilizzate su PCL, PLA, PCL-plasma e PLA-plasma. Le colture planctoniche sono state usate come condizione controllo. I valori sono riportati come media di misurazioni di valori ottenuti da tre colture parallele; la deviazione standard è riportata con le barre verticali.

Sulla base del risultato ottenuto, per verificare se la migliore performance in termini produttivi da parte del micelio immobilizzato sulla membrana in PLA-plasma fosse specifica per la sola ACT è stata saggiata anche la produzione di RED prendendo in esame solamente i due tipi di membrane in PLA. Per quanto riguarda il confronto con la condizione di controllo, i valori massimi di RED sono stati quattro e cinque volte superiori usando le membrane di PLA e PLA-plasma, rispettivamente (Fig. 1.20).

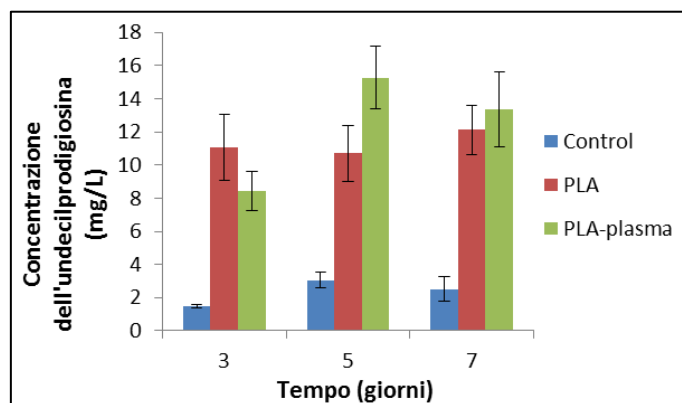


Figura 1.20 - Produzione di RED, estratta da colture immobilizzate su PLA e PLA-plasma. Le colture planctoniche sono state usate come controllo. I valori sono riportati come media di misurazioni di valori ottenuti da tre colture parallele; la deviazione standard è riportata con le barre verticali.

Questo risultato è interessante poiché rivela la specificità dell'effetto di notevole incremento sull'ACT in presenza delle membrane PCL-plasma. Inoltre, l'incremento della resa di RED, metabolita secondario associato al micelio, non va di pari passo alle differenze, modeste ma apprezzabili, della resa in biomassa, come analizzato dalle rispettive quantità del contenuto di proteine cellulari totali (Fig. 1.21), suggerendo quindi che le membrane di PLA e PLA-plasma potrebbero specificamente stimolare determinati fattori cellulari che innescano la produzione di RED.

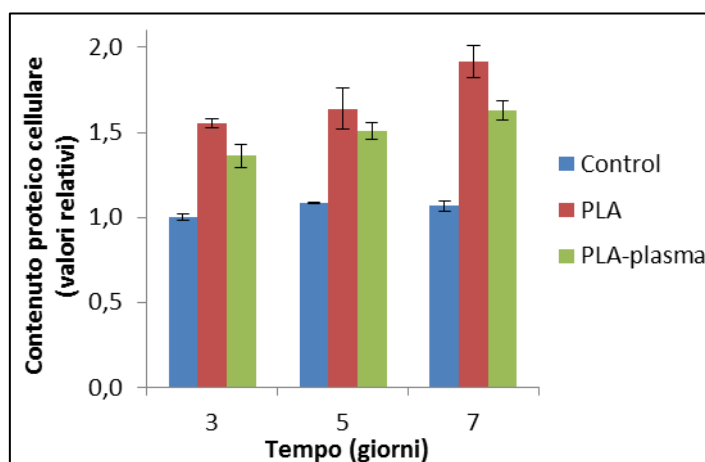


Figura 1.21 – Profilo di accumulo del contenuto proteico cellulare ottenuto da colture immobilizzate di *S. coelicolor* su PLA e PLA O<sub>2</sub>-plasma. Le colture planctoniche sono state usate come controllo. I valori sono riportati come media di valori ottenuti da tre colture parallele; la deviazione standard è riportata con le barre verticali.

In definitiva, le massime quantità di ACT sono state approssimativamente cinque volte superiori utilizzando le matrici di PCL, PCL-plasma e PLA e dieci più alte usando le membrane di PLA-plasma, rispetto alle colture controllo, suggerendo così un chiaro e specifico effetto positivo delle membrane di PLA trattate all'O<sub>2</sub>-plasma sulla resa di ACT. È interessante notare che circa l'80% dell'ACT totale, metabolita diffusibile, non è libero nel mezzo di coltura, ma è associato ai vari tipi di membrane, come è osservabile dal colore azzurro caratteristico e dimostrato dai saggi quantitativi spettrofotometrici e dalla spettroscopia Raman. I dati quantitativi sono stati estrapolati dalla sommatoria della resa di ACT ottenuta dalle differenti membrane con il micelio immobilizzato ed i corrispondenti mezzi di coltura. Infatti, a causa dell'associazione dell'ACT e delle cellule miceliali di *S. coelicolor* alle membrane porose, non è possibile discriminare i singoli contributi di ACT intra- ed extracellulari rispetto alla resa totale per ciascuna coltura. In definitiva, è stato possibile ipotizzare che l'ACT extracellulare sia assorbita da entrambi i tipi di membrane nanofibrose, sulla base di alcune indagini preliminari che hanno confermato la capacità delle membrane di PLA e PLA-plasma di assorbire l'ACT solubilizzata in una soluzione di KOH 1N. Per confermare questo dato sono stati registrati spettri Raman sulle membrane di PLA in seguito alla fermentazione e sull'ACT trattata con KOH 1N. Lo spettro Raman ha identificato un segnale sovrapponibile con una banda a circa 1220 cm<sup>-1</sup> (Fig. 1.22).

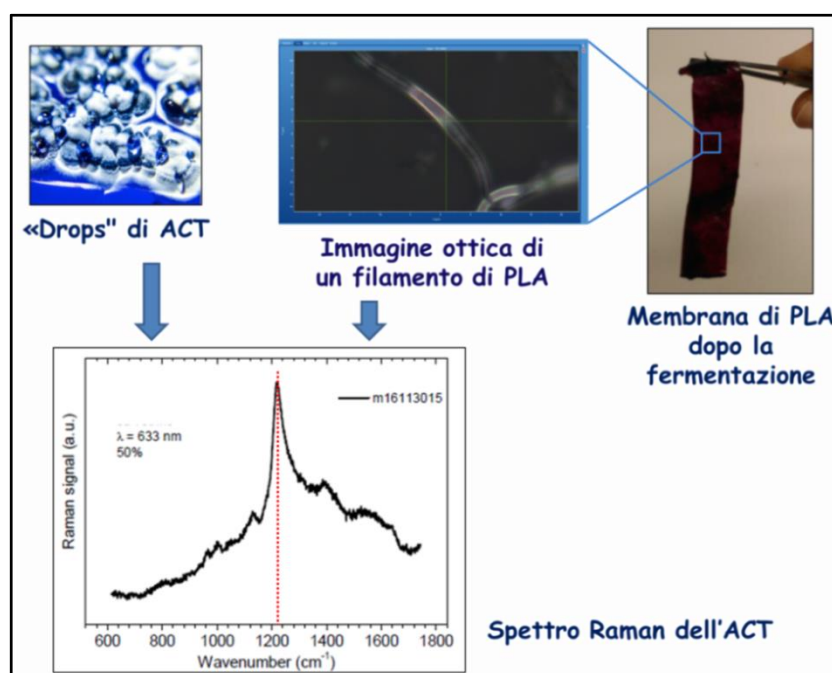


Figura 1.22 - Spettro Raman dell'ACT prodotta da *S. coelicolor*.

#### 1.3.2.4 Analisi proteomica differenziale

Per comprendere l'effetto sulla fisiologia e sui processi molecolari scaturiti dall'immobilizzazione cellulare di *S. coelicolor* sulle matrici di sintesi, è stata effettuata un'indagine dettagliata sui cambiamenti proteomici associati alla crescita in presenza delle membrane di PLA e PLA-plasma a cinque giorni di fermentazione. A tal fine, è stata effettuata una combinazione di esperimenti basati sulla 2D-DIGE e

successiva spettrometria di massa, comparando le colture miceliali planctoniche con il micelio immobilizzato sulle membrane di PLA e PLA-plasma, rispettivamente, in seguito alla crescita avvenuta in terreno liquido ricco R5A. Le proteine sono state estratte come descritto nella sezione dei materiali e metodi. La separazione delle proteine in base al punto isoelettrico (IEF) è stata effettuata utilizzando strip di 18 cm con un gradiente non lineare di pH compreso tra 3 e 10. Dopo essere state separate sulla base del pI (IEF), le proteine sono state separate in base al loro peso molecolare (Mw). Al termine di un'analisi 2D-PAGE si ottiene dunque un elettroferogramma delle proteine separate secondo i due criteri.

Ogni spot presente nell'elettroferogramma rappresenta una proteina che possiede come coordinate i valori di pI (asse X) e Mw (asse Y). Questi due valori sono determinati non solamente dalla struttura primaria delle proteine ma anche dalle modifiche post-traduzionali. Le immagini, tramite il programma ImageMaster 2D platinum 7.0, sono state sottoposte ad un'analisi dei profili globali di espressione proteica sia in termini di presenza/assenza che in termini di abbondanza delle spot sulla mappa bidimensionale. L'analisi ha evidenziato un profilo differenziale di espressione per un totale di 145 spot (Fig. 1.23), ovvero proteine differenzialmente abbondanti (up- o down-regolati) in maniera statisticamente significativa di almeno 1,3 volte, calcolato come volume della spot mediante analisi ANOVA ( $P \leq 0,005$ ).

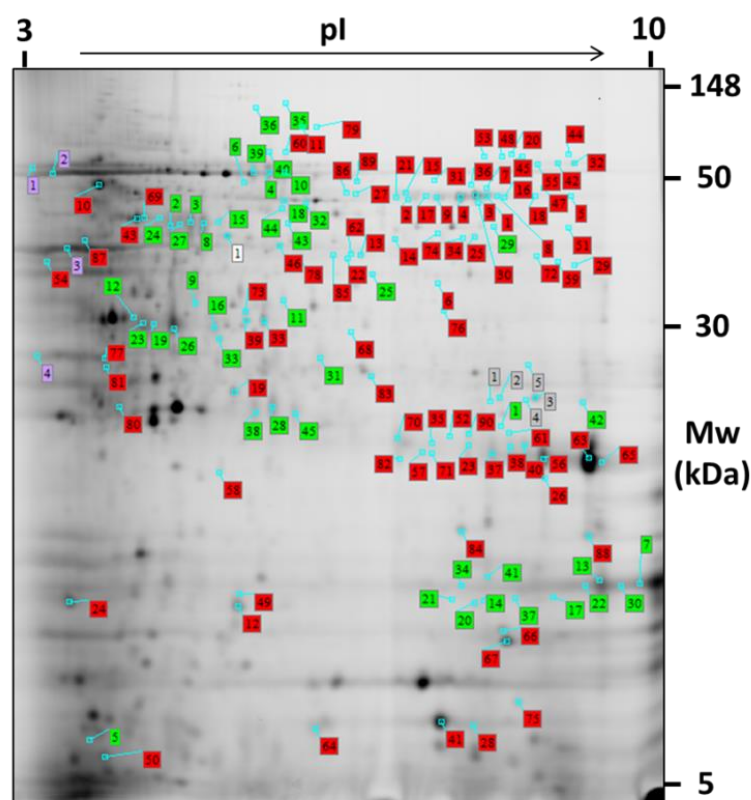


Figura 1.23 - Elettroferogramma bidimensionale delle proteine di *S. coelicolor* differenzialmente abbondanti nelle cellule planctoniche (Plan) rispetto a quelle immobilizzate. Bianco: 1 spot proteica down-regolata in Plan vs PLA-plasma; viola: 4 spot proteiche up-regolate in Plan vs PLA; grigio: 5 spot proteiche down-regolate in Plan vs PLA; verde: 45 spot proteiche down-regolate in Plan vs PLA e PLA-plasma; rosso: 90 spot proteiche up-regolate in Plan vs PLA e PLA-plasma.



Confrontando la rappresentazione delle spot nelle due differenti condizioni di crescita sperimentale testate, è evidente che l'immobilizzazione su un supporto poroso determina una differente espressione proteica, come confermato dalle 135 spot differenzialmente abbondanti quando il ceppo è cresciuto in presenza delle membrane di PLA o PLA-plasma, invece, solamente 1 e 9 spot sono risultate differenziali in presenza delle membrane di PLA-plasma e PLA, rispettivamente (Fig. 1.24).

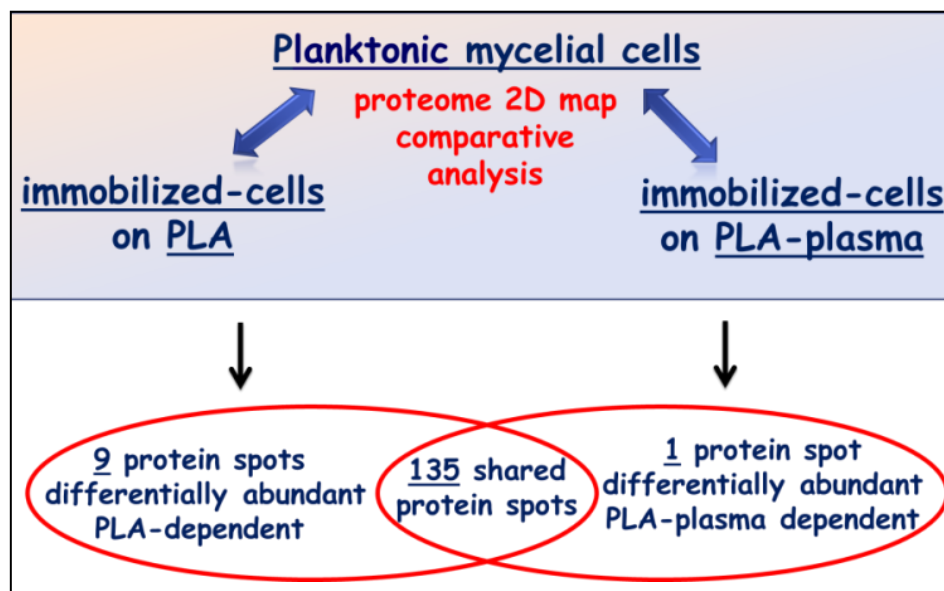


Figura 1.24 – Rappresentazione delle spot proteiche di *S. coelicolor* differenzialmente abbondanti durante la crescita sulle membrane di PLA e PLA-plasma.

Tramite spot-picking manuale sono state accuratamente prelevate e sono state identificate mediante nLC-ESI-LIT-MS/MS 91 spot. Le 87 proteine differenziali identificate sono state poi raggruppate funzionalmente in 13 gruppi secondo la classificazione riportata su specifici database di *gene ontology* (<http://www.genome.jp/tools/blast/>; [ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/S\\_coelicolor/classwise.txt](ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/S_coelicolor/classwise.txt); [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome); <http://www.uniprot.org/>) (Tab. 1.1).

Queste categorie comprendevano proteine con attività amminopeptidasi, proteine ribosomali, proteine implicate nell'assemblaggio dell'ATP-sintasi, proteine dell'assemblaggio dei complessi responsabili della sintesi, del folding, delle modifiche o del turn-over proteico, proteine del metabolismo dei nucleotidi, del metabolismo secondario, del metabolismo dei cofattori e delle vitamine, di ossidoriduzione e della degradazione di composti aromatici. La loro distribuzione relativa alla crescita sulle membrane di PLA e PLA-plasma è riportata rispettivamente in Fig. 1.25 A e B.

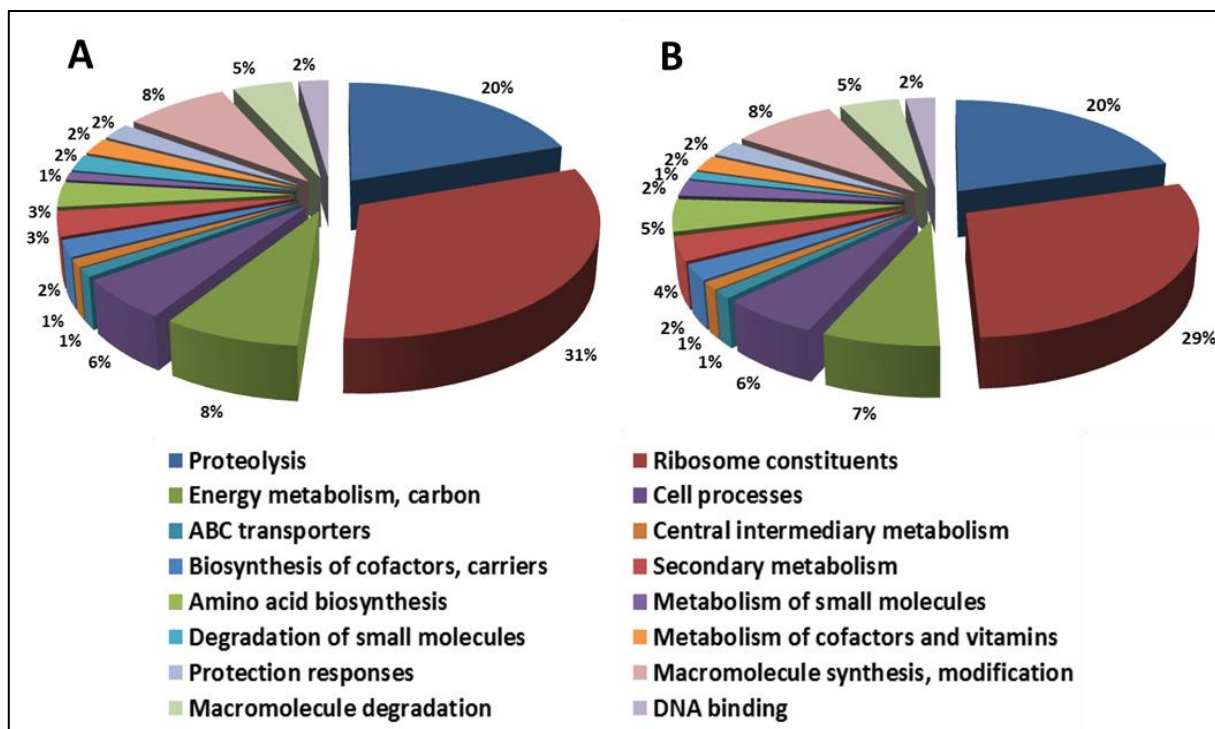


Figura 1.25 - Distribuzione in classi funzionali delle proteine differenzialmente abbondanti espresse nelle colture immobilizzate sulle membrane di PLA (A) e PLA-plasma (B).

Una rappresentazione schematica delle specie proteiche up- o down-regolate, nelle cellule planctoniche rispetto a quelle immobilizzate (Fig. 1.26 A e B), ha rivelato che tutte le proteine correlate al metabolismo di cofattori e vitamine, al metabolismo e degradazione di piccole molecole, alla biosintesi di cofattori, agli intermedi del metabolismo ed un ABC transporter sono overespresse nelle condizioni di crescita in cui il ceppo ha aderito ai due differenti supporti porosi. Dall'altra parte, la maggior parte delle specie proteiche che coinvolgono i *pathway* implicati sulla sintesi/modifica e sul corretto folding e degradazione delle proteine, sul metabolismo del carbonio e sulla proteolisi risultano downespresse nella condizione di crescita immobilizzata; invece, le proteine differentemente regolate che sono implicate nella sintesi/modifica/degradazione delle macromolecole, nel legame al DNA, nei processi di detossificazione e nei processi cellulari risultano equamente distribuiti tra up- e down-regolazione. Infine, per quanto riguarda il *pathway* che converge sul metabolismo secondario, è stata riscontrata una proteina up-regolata e due isoforme di un'altra specie down-regolate in entrambe le colture immobilizzate.



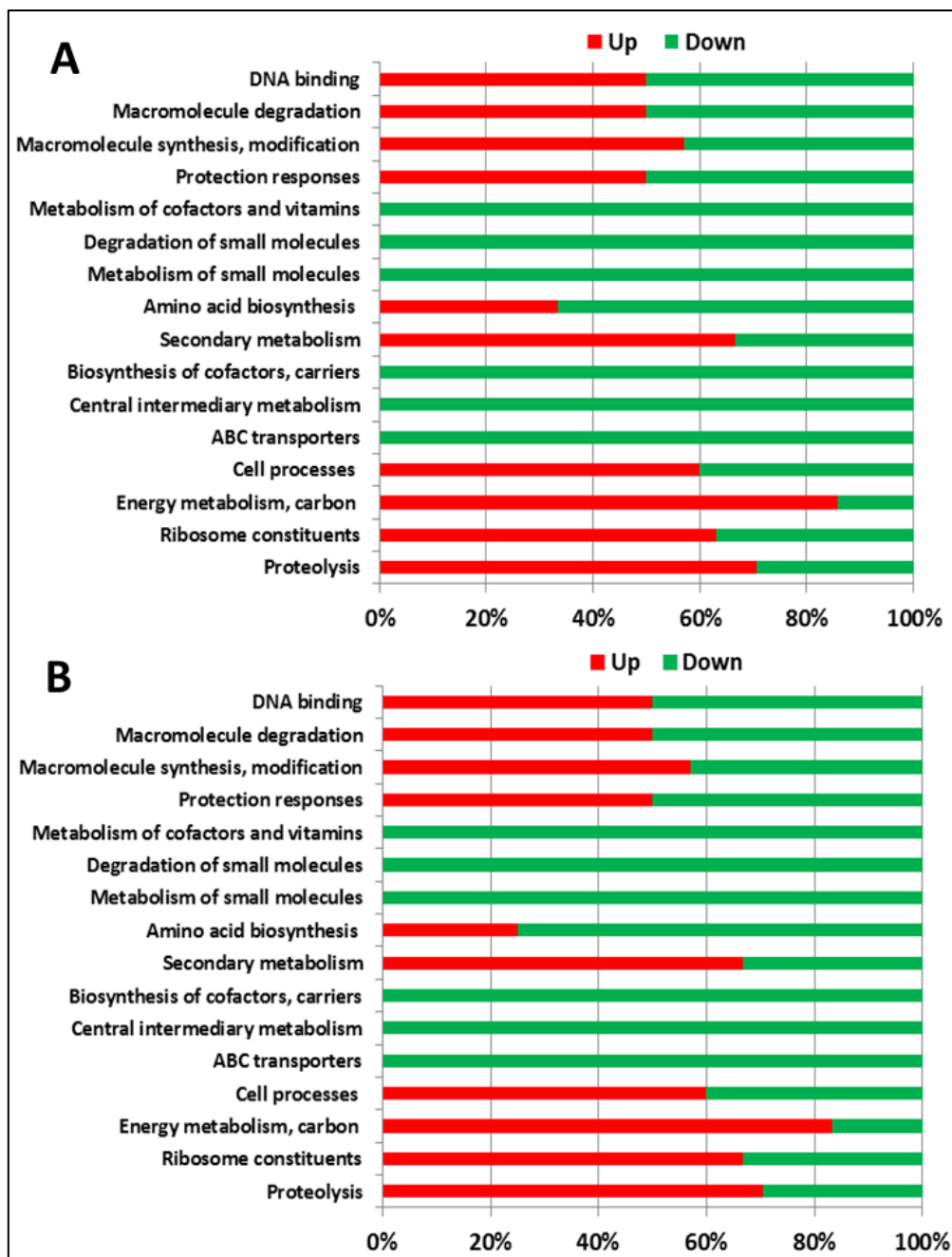


Figura 1.26 - Distribuzione quantitativa delle proteine differenzialmente abbondanti espresse in seguito alla crescita sulle membrane di PLA (A) e PLA-plasma (B) in base alla loro distribuzione in classi funzionali proteiche.

Diverse proteine identificate sono state trovate in diverse isoforme e quindi sono state selezionate come spot multiple. Al fine di comprendere il network, che correla le interazioni proteina-proteina, stimolato dalla crescita di *S. coelicolor* su un supporto solido è stato usato il database STRING (Szklarczyk *et al.*, 2017). In Fig. 1.27 (A) è raffigurata la rete di interazioni proteina-proteina dipendente dalla crescita sulle membrane elettrofilate di PLA e PLA-plasma, in cui è possibile osservare un gruppo di proteine biologicamente connesse, che hanno stabilito una fitta trama di interazioni tra di loro.

L'analisi di arricchimento funzionale, eseguita mediante i tool di ontologia genica, ha permesso di comprendere i meccanismi molecolari alla base delle risposte cellulari attivate in seguito alla crescita sulla

matrice porosa. La Fig. 1.27 (B) mostra i principali *cluster* proteici coinvolti nei differenti processi biologici (metabolismo primario, biosintesi degli antibiotici, metabolismo delle macromolecole e biosintesi delle sostanze organiche), nelle funzioni molecolari (attività catalitica, attività idrolasica, capacità di legare gli acidi nucleici e costituenti strutturali del ribosoma) e nelle componenti cellulari (citoplasma, ribosoma, complessi macromolecolari e complesso dell'ATP-sintasi).

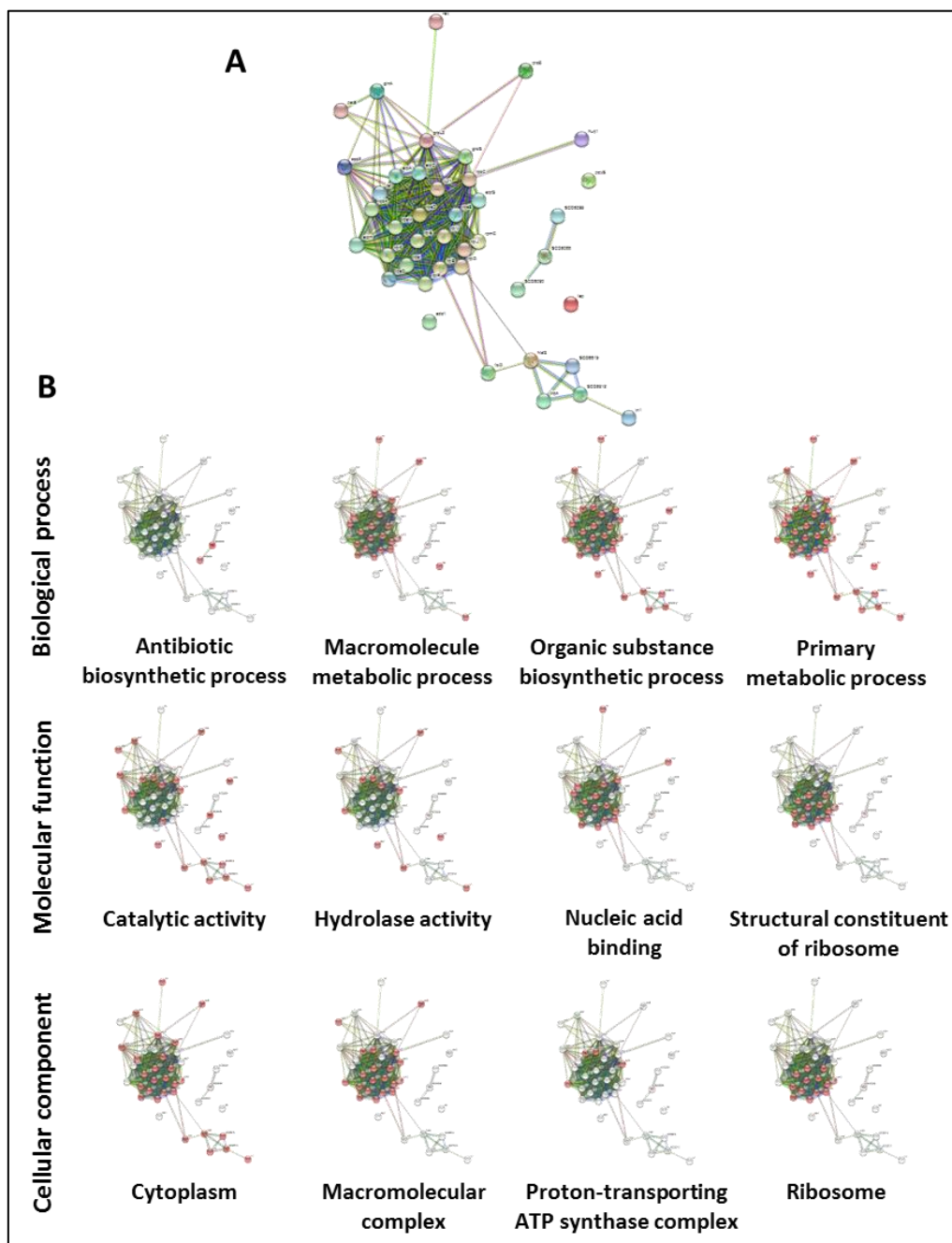


Figura 1.27 – Network delle interazioni proteina-proteina: (A) interazioni funzionali delle proteine differenzialmente abbondanti espresse in seguito alla crescita sulle membrane di PLA e PLA-plasma generate dall’algoritmo di STRING. Le interazioni più forti sono rappresentate da linee più spesse; (B) interazioni funzionali delle proteine suddivise in base alla loro rappresentanza nei processi cellulari, nelle funzioni molecolari e nelle componenti cellulari. Per ogni gruppo le proteine coinvolte sono evidenziate in rosso.



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

PROTEIN SPOT	PROTEIN DESCRIPTION	GENE NAME	LOCUS NAME	KEGG ORTHOLOGY	EXPRES. VALUE PLANC. CELLS/PLA IMM. CELLS	EXPRES. VALUE PLANC. CELLS/PLA-O2 IMM. CELLS	PROTEIN ACCESSION	Theoretical Mw (kDa)	Theoretical pI	FUNCTIONAL CLASS	METABOLIC PATHWAY/CELLULAR FUNCTION
1	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		7,06	6,38	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
3	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		4,44	5,35	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
4	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		10,3	9,09	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
7	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		3,43	3,56	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
8	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		5,18	5,33	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
9	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		7,55	6,14	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
16	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		4,7	4,67	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
35	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		3,33	3,25	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
39	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		3,31	2,81	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
46	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		1,89	1,89	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
53	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		-2,38	-2,28	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
66	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		-2,03	-2,06	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
92	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		-2,13	-2,15	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

100	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		-2,07	-1,94	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
124	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		-1,99	-1,78	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
138	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		2,02	2,45	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
144	Tripeptidyl aminopeptidase (SCO1230)	tap	WP_011027660		2,36	1,65	TAP_STRCO	58,955	8,3	Tripeptide aminopeptidase activity	Proteolysis
20	50S ribosomal protein L4 (SCO4703)	rplD	WP_003974266	K02926	2,52	3,96	RL4_STRCO	23,629	10,03	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
29	50S ribosomal protein L18 (SCO4718)	rplR	WP_003974252	K02881	1,78	2,92	RL18_STRCO	13,570	10,61	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
42	30S ribosomal protein S2 (SCO5624)	rpsB	WP_011030348	K02967	2,14	3,28	RS2_STRCO	33,602	5,17	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
86	30S ribosomal protein S2 (SCO5624)	rpsB	WP_011030348	K02967	1,86	2,03	RS2_STRCO	33,602	5,17	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
106	30S ribosomal protein S2 (SCO5624)	rpsB	WP_011030348	K02967	2,86	2,37	RS2_STRCO	33,602	5,17	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
111	30S ribosomal protein S2 (SCO5624)	rpsB	WP_011030348	K02967	-2,21	1	RS2_STRCO	33,602	5,17	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
136	30S ribosomal protein S2 (SCO5624)	rpsB	WP_011030348	K02967	-2,46	-2,37	RS2_STRCO	33,602	5,17	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
142	30S ribosomal protein S4 (SCO1505)	rpsD	WP_031035730	K02986	-3,22	-3,1	RS4_STRCO	23,654	10,15	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
34	30S ribosomal protein S9 (SCO4735)	rpsI	WP_003974238	K02996	-5,8	-5,28	RS9_STRCO	18,688	9,24	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
105	30S ribosomal protein S13 (SCO4727)	rpsM	WP_004984507	K02952	2,29	2,68	RS13_STRCO	14,211	11,2	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

33	30S ribosomal protein S15 (SCO5736)	rpsO	WP_031046275	K02956	2,49	3,05	RS15_STRCO	10,784	11,13	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
56	30S ribosomal protein S15 (SCO5736)	rpsO	WP_031046275	K02956	-5,93	-5,3	RS15_STRCO	10,784	11,13	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
13	50S ribosomal protein L2 (SCO4705)	rplB	WP_003974264	K02886	5,84	7,46	RL2_STRCO	30,589	11,39	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
49	50S ribosomal protein L2 (SCO4705)	rplB	WP_003974264	K02886	2,69	3,85	RL2_STRCO	30,589	11,39	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
54	50S ribosomal protein L2 (SCO4705)	rplB	WP_003974264	K02886	-3,11	-2,89	RL2_STRCO	30,589	11,39	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
85	50S ribosomal protein L4 (SCO4703)	rplD	WP_003974266	K02926	-4,22	-3,83	RL4_STRCO	23,629	10,03	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
130	50S ribosomal protein L4 (SCO4703)	rplD	WP_003974266	K02926	-2,14	1	RL4_STRCO	23,629	10,03	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
50	50S ribosomal protein L5 (SCO4714)	rplE	WP_030788262	K02931	3,58	2,94	RL5_STRCO	20,840	9,69	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
88	50S ribosomal protein L5 (SCO4714)	rplE	WP_030788262	K02931	3,43	4,32	RL5_STRCO	20,840	9,69	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
101	50S ribosomal protein L5 (SCO4714)	rplE	WP_030788262	K02931	2,88	4	RL5_STRCO	20,840	9,69	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
103	50S ribosomal protein L6 (SCO4717)	rplF	WP_003974253	K02933	2,75	3,52	RL6_STRCO	19,168	9,85	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
133	50S ribosomal protein L6 (SCO4717)	rplF	WP_003974253	K02933	1,49	1	RL6_STRCO	19,168	9,85	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
143	50S ribosomal protein L10 (SCO4652)	rplJ	WP_003974311	K02864	2,28	2,33	RL10_STRCO	18,635	8,78	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
104	50S ribosomal protein L18 (SCO4718)	rplR	WP_003974252	K02881	2,38	2,9	RL18_STRCO	13,570	10,61	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

73	50S ribosomal protein L22 (SCO4707)	rplV	WP_011029825	K02890	-5,14	-4,67	RL22_STRCO	12,788	10,44	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
97	50S ribosomal protein L22 (SCO4707)	rplV	WP_011029825	K02890	-5,24	-4,78	RL22_STRCO	12,788	10,44	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
51	50S ribosomal protein L29 (SCO4710)	rpmC	WP_017949657	K02904	4,15	4,65	RL29_STRCO	8,396	6,59	Ribosomal proteins - synthesis, modification	Ribosome constituents
23	ATP synthase subunit alpha (SCO5371)	atpA	WP_003973626	K02111	3,16	3,14	ATPA_STRCO	57,449	4,98	ATP-proton motive force	Energy metabolism, carbon
32	ATP synthase subunit alpha (SCO5371)	atpA	WP_003973626	K02111	1,52	1,31	ATPA_STRCO	57,449	4,98	ATP-proton motive force	Energy metabolism, carbon
139	ATP synthase subunit alpha (SCO5371)	atpA	WP_003973626	K02111	-2,7	-2,96	ATPA_STRCO	57,449	4,98	ATP-proton motive force	Energy metabolism, carbon
69	ATP synthase subunit beta (SCO5373)	atpD	WP_003973624	K02112	1,58	1	ATPB_STRCO	52,260	4,76	ATP-proton motive force	Energy metabolism, carbon
76	ATP synthase gamma chain (SCO5372)	atpG	WP_003973625	K02115	2,17	2,3	ATPG_STRCO	32,969	5,95	ATP-proton motive force	Energy metabolism, carbon
123	ATP synthase gamma chain (SCO5372)	atpG	WP_003973625	K02115	2,29	2,23	ATPG_STRCO	32,969	5,95	ATP-proton motive force	Energy metabolism, carbon
132	ATP synthase subunit delta (SCO5370)	atpH	WP_003973627	K02113	1,91	2,47	ATPD_STRCO	29,165	6,88	ATP-proton motive force	Energy metabolism, carbon
10	60 kDa chaperonin 2 (SCO4296)	groL2	WP_003974678	K04077	2,58	2,54	CH602_STRCO	56,795	4,79	Chaperones and folding catalysts	Cell processes
31	60 kDa chaperonin 2 (SCO4296)	groL2	WP_003974678	K04077	-4	-2,92	CH602_STRCO	56,795	4,79	Chaperones and folding catalysts	Cell processes
83	60 kDa chaperonin 2 (SCO4296)	groL2	WP_003974678	K04077	1,97	1,42	CH602_STRCO	56,795	4,79	Chaperones and folding catalysts	Cell processes
28	10 kDa chaperonin (SCO4761)	groS	WP_003974211	K04078	-3,17	-3,05	CH10_STRCO	10,940	4,65	Chaperones and folding catalysts	Cell processes
78	10 kDa chaperonin (SCO4761)	groS	WP_003974211	K04078	2,19	2,7	CH10_STRCO	10,940	4,65	Chaperones and folding catalysts	Cell processes
99	Phosphate import ATP-binding protein PstB (SCO4139)	pstB	WP_019326775	K02036	-2,75	-2,54	PSTB_STRCO	28,377	5,57	Transport/binding proteins	ABC transporters



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

38	Adenosine deaminase 1 (SCO4901)	add1	WP_003974072	K01488	-3,6	-3,35	ADD1_STRCO	44,105	5,43	Nucleotide interconversions	Central intermediary metabolism
43	Bifunctional protein FoD (SCO4824)	foID	WP_093456836	K01491	-3	-2,77	FOLD_STRCO	30	5,91	Folic acid	Biosynthesis of cofactors, carriers
63	Bifunctional protein FoD (SCO4824)	foID	WP_093456836	K01491	-4,05	-3,72	FOLD_STRCO	30	5,91	Folic acid	Biosynthesis of cofactors, carriers
62	Actinorhodin polyketide putative beta-ketoacyl synthase 2	SCO5088	WP_011030048	K05552	-3,3	-3,19	KASB_STRCO	42,638	5,35	Antibiotic biosynthetic process	Secondary metabolism
95	Actinorhodin polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase	SCO5090	WP_011030049	K05554	2,55	2,23	CYPK_STRCO	34,758	5,96	Antibiotic biosynthetic process	Secondary metabolism
137	Actinorhodin polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase	SCO5090	WP_011030049	K05554	1,98	2,65	CYPK_STRCO	34,758	5,96	Antibiotic biosynthetic process	Secondary metabolism
26	Glutamine synthetase (SCO2198)	glnA	WP_003976617	K01915	-4	-3,72	GLN1B_STRCO	52,592	5,1	Glutamine biosynthetic process	Amino acid biosynthesis
68	Glutamine synthetase (SCO2198)	glnA	WP_003976617	K01915	1	-2,3	GLN1B_STRCO	52,592	5,1	Glutamine biosynthetic process	Amino acid biosynthesis
70	ATP phosphoribosyltransferase (SCO1438)	hisG	WP_003977387	K00765	-4,42	-4,25	HIS1_STRCO	31	5,12	Histidine biosynthetic process	Amino acid biosynthesis
121	Tryptophan synthase alpha chain (SCO2036)	trpA	WP_003976780	K01695	2,14	2,52	TRPA_STRCO	27,806	4,88	Tryptophan synthase activity	Amino acid biosynthesis
75	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase 1 (SCO5212)	aroA1	WP_003973760	K00800	-2,33	-2,5	ARO1_STRCO	45,880	5,17	Chorismate biosynthetic process	Metabolism of small molecules
24	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase 2 (SCO6819)	aroA2	WP_011031206	K00800	-3,64	-3,53	ARO2_STRCO	46,729	5,19	Chorismate biosynthetic process	Metabolism of small molecules
61	Probable acetoacetyl-coA thiolase	SCO5399	WP_011030221	K00626	2,25	2,31	Q9L2C1_STRCO	40,156	5,11	Fatty acids	Degradation of small molecules



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

55	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS (SCO1523)	pdxS	WP_003977304	K06215	-4,35	-4,19	PDXS_STRCO	32,296	5,15	Pyridoxal phosphate biosynthetic process	Metabolism of cofactors and vitamins
74	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS (SCO1523)	pdxS	WP_003977304	K06215	-4,43	-4,33	PDXS_STRCO	32,296	5,15	Pyridoxal phosphate biosynthetic process	Metabolism of cofactors and vitamins
82	Superoxide dismutase [Fe-Zn] 1 (SCO2633)	sodF1	WP_003976168	K04564	-4,37	-4,33	SODF_STRCO	23,513	5,15	Detoxification	Protection responses
128	Superoxide dismutase [Fe-Zn] 1 (SCO2633)	sodF1	WP_003976168	K04564	1,9	1,81	SODF_STRCO	23,513	5,15	Detoxification	Protection responses
58	Elongation factor Tu-1 (SCO4662)	tuf1	WP_011029795	K02358	2,51	4,12	EFTU1_STRCO	43,811	5,01	Proteins - translation and modification	Macromolecule synthesis, modification
84	Elongation factor Tu-1 (SCO4662)	tuf1	WP_011029795	K02358	-3,25	-2,81	EFTU1_STRCO	43,811	5,01	Proteins - translation and modification	Macromolecule synthesis, modification
107	Elongation factor Tu-1 (SCO4662)	tuf1	WP_011029795	K02358	1,89	2,89	EFTU1_STRCO	43,811	5,01	Proteins - translation and modification	Macromolecule synthesis, modification
122	Elongation factor Tu-1 (SCO4662)	tuf1	WP_011029795	K02358	-3,08	-2,75	EFTU1_STRCO	43,811	5,01	Proteins - translation and modification	Macromolecule synthesis, modification
116	Elongation factor Ts (SCO5625)	tsf	WP_003973385	K02357	2,52	2,8	EFTS_STRCO	29,944	5,51	Proteins - translation and modification	Macromolecule synthesis, modification
141	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha (SCO4729)	rpoA	WP_053661878	K03040	2,52	2,91	RPOA_STRCO	36,730	4,66	RNA synthesis, modification, DNA transcript	Macromolecule synthesis, modification
140	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' (SCO4655)	rpoC	WP_003974308	K03046	-2,06	-2,14	RPOC_STRCO	145,199	6,44	RNA synthesis, modification, DNA transcript	Macromolecule synthesis, modification
11	Probable ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit (SCO3373)	clpC	WP_010907619	K03696	3,01	4,17	CLPC_MYCLE	93,944	5,6	Degradation of proteins, peptides, glycoproteins	Macromolecule degradation
112	Tricorn protease homolog 1 (SCO2549)	tri1	WP_011028423	K08676	-2,57	-2,09	TRI1_STRCO	115,577	5,47	Degradation of proteins, peptides, glycoproteins	Macromolecule degradation





STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

114	Tricorn protease homolog 1 (SCO2549)	tri1	WP_011028423	K08676	-2,15	-1,95	TRI1_STRCO	115,577	5,47	Degradation of proteins, peptides, glycoproteins	Macromolecule degradation
129	Proteasome subunit beta (SCO1644)	prcB	WP_003977182	K03433	1,91	2,21	PSB_STRCO	30,067	4,92	Degradation of proteins, peptides, glycoproteins	Macromolecule degradation
36	DNA-binding protein HU 1 (SCO2950)	hup1	WP_003950507	K03530	2,61	3,49	DBH1_STRCO	9,845	9,45	Regulation of nucleic acid-templated transcription	DNA binding
108	Redox-sensing transcriptional repressor Rex (SCO3320)	rex	WP_003975516	K01926	-2,63	-2,46	REX_STRCO	26,850	5,46	Response to redox state	DNA binding

Tabella 1.1 - Proteine differenzialmente abbondanti di *S. coelicolor* espresse nelle colture immobilizzate sulle membrane di PLA e PLA-plasma.

### 1.3.3 Immobilizzazione di cellule di *Streptomyces coelicolor* su perlite espansa per il miglioramento della produzione di antibiotici.

#### 1.3.3.1 Randalite: perlite espansa con caratteristiche porose

La perlite espansa è una polvere naturale (Fig. 1.28) ottenuta dall'espansione termica della perlite, una roccia silicea di origine vulcanica che, se viene portata ad elevate temperature, prossime al suo punto di rammollimento, ossia lo stato termodinamico in cui un solido, con un punto di fusione non definito, comincia a modificare il proprio stato di aggregazione da solido a fluido.



Figura 1.28 - Perlite espansa.

L'espansione è legata alla presenza di acqua rimasta confinata nella porosità chiusa della roccia per effetto del repentino raffreddamento in fase di fuoriuscita del magma. Quando la roccia viene sottoposta a temperature comprese tra gli 870 e i 1100 °C, in apposite fornaci, l'acqua contenuta all'interno dei suoi granuli evapora, determinandone l'espansione volumetrica e generandovi internamente delle bolle che conferiscono alla roccia espansa l'eccezionale leggerezza che la caratterizza (Ciullo *et al.*, 1996; Perlite italiana s.r.l.®). La perlite espansa è un prodotto stabile e resistente agli attacchi biologici e non presenta fenomeni di degrado o di marcescenza, anche dopo lunghi periodi di conservazione. Dal punto di vista chimico, essa è composta prevalentemente da SiO<sub>2</sub> (>75%), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (11 - 14%), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,5 - 1,5%), Na<sub>2</sub>O (3 - 6%), K<sub>2</sub>O (2 - 4%), CaO (1 - 2%), MgO (0 - 0,5%); ha un pH che può assumere valori tra 6,5 e 8, è insolubile in acqua e presenta un caratteristico colore bianco (Perlite italiana s.r.l.®).

La struttura dei granuli di questa polvere, evidenziata nelle immagini ottenute al SEM (Fig. 1.29), è caratterizzata da una peculiare organizzazione a celle dalle forme poligonali, che ricorda quasi l'assetto tipico di un comune alveare (Fig. 1.29 A, B), con la differenza che tali camere sono inizialmente chiuse e non comunicanti, ma lo diventano successivamente in seguito all'inevitabile frantumazione delle suddette strutture (Fig. 1.29 C, D), a causa dell'immensa fragilità e volatilità della polvere, senza comunque avere ripercussioni sulle sue distintive qualità (Wang *et al.*, 2009).

La coesistenza di porosità aperte (canalicoli che costituiscono una fitta rete) e chiuse (celle e cavità isolate) dona alla roccia un alto potere traspirante e allo stesso tempo una struttura altamente impermeabile all'acqua nel nucleo del granulo. Grazie alle sue particolari caratteristiche ed ai suoi bassi costi di produzione, la perlite espansa presenta svariati utilizzi, soprattutto in ambito industriale, come materiale

isolante, come supporto per l'alleggerimento di manufatti, come carica minerale e filler per plastiche, gomme e vernici, come assorbente nelle bonifiche ambientali e di serbatoi, in orticoltura come mezzo di radicamento e condizionatore del suolo (Ciullo *et al.*, 1996). La sua struttura porosa ne promuove altresì l'utilizzo come coadiuvante di filtrazione in numerose operazioni industriali. Il termine "filtrazione" è solitamente riferito alla separazione di diversi elementi dal mezzo fluido in cui sono sospesi: tali elementi potrebbero essere anche composti biologici, come cellule, enzimi, aggregati proteici, ma anche agenti inorganici e inquinanti (Wang *et al.*, 2015). In commercio esistono diverse gamme di particolato che differiscono per il grado di porosità, di permeabilità, di densità, di luminescenza ed assorbimento.

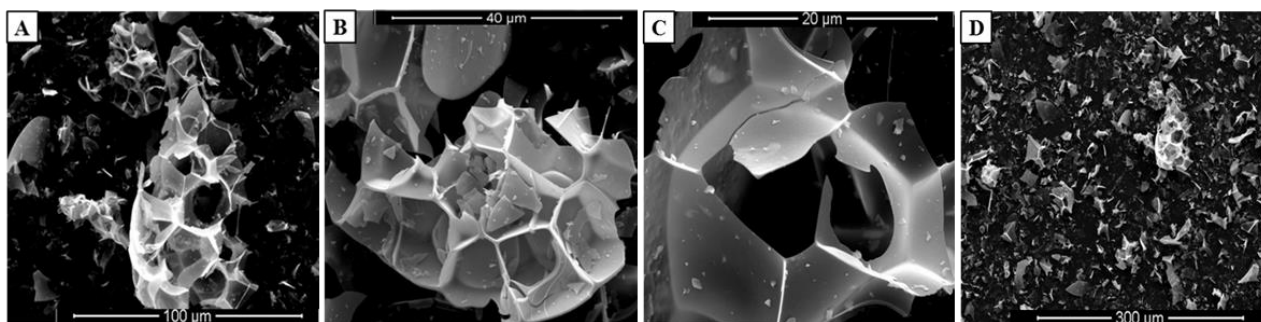


Figura 1.29 - Immagini SEM di Randalite™ W9 a diverso ingrandimento: A) 1000X; B) 2500X; C) 5000X; D) 300X.

### 1.3.3.2 Immobilizzazione di cellule di *S. coelicolor* su perlite espansa

Alla luce dei risultati riportati in letteratura (Ndlovu *et al.*, 2015; Scaffaro *et al.*, 2016b, 2017a), è ormai noto che i sistemi porosi utilizzati per l'immobilizzazione batterica, migliorino la crescita del microrganismo e ne aumentino la bioproduttività. In riferimento a ciò, si è scelto di verificare l'adeguatezza della perlite espansa, selezionata proprio per la sua struttura porosa, come supporto da utilizzare per immobilizzare cellule di *S. coelicolor*.

Le due tipologie di perlite espansa utilizzate sono note anche con il loro nome commerciale come Randalite™ W9 (RW9) e Randalite™ W7 (RW7) e differiscono per il grado di permeabilità, con valori rispettivamente di 0,75 e 0,36 DARCY (Winkelman mineraria s.r.l.®), e per la porosità. La RW9, in particolare, presenta dei pori dalle dimensioni di 33,90 µm (Wang *et al.*, 2009). Le polveri sono state analizzate singolarmente e, di ciascuna di esse, è stata preparata una soluzione stock, dalla concentrazione di 50 mg/mL. Per ogni polvere sono state allestite colture a due diverse concentrazioni (0,5 mg/mL e 5 mg/mL) per valutare l'effetto che la quantità della Randalite potesse avere sull'attività metabolica del ceppo.

Nello specifico, le colture sono state preparate utilizzando beute da 50 mL, in cui sono stati aggiunti 9 mL di terreno liquido R5A, la Randalite ed una densa sospensione di spore ( $5 \cdot 10^7$ ) di *S. coelicolor*. In particolare, per quanto riguarda le colture con la concentrazione più bassa di Randalite (0,5 mg/mL), nelle beute corrispondenti sono stati aggiunti 100 µL di sospensione prelevati dallo stock di partenza e 0,9 mL di acqua distillata sterile, mentre per quelle con la concentrazione maggiore (5 mg/mL), il volume dello stock utilizzato è stato di 1 mL. Per quanto concerne, invece, le colture planctoniche (usate come controllo), esse

sono state allestite mediante l'aggiunta, nello stesso tipo di beute, delle medesime quantità sia del terreno che di spore del ceppo, senza l'aggiunta di Randalite, portando ad un volume finale di 10 mL con acqua sterile. Tutte le colture sono state incubate a 30 °C in agitazione orbitale (200 rpm) per una settimana. Ad intervalli di due, tre, sei e sette giorni sono stati effettuati dei prelievi per monitorare l'andamento della coltura e condurre le relative analisi.

L'osservazione macroscopica delle colture (Fig. 1.30) permette di cogliere sostanziali differenze non solo tra le cellule libere e quelle immobilizzate, ma anche tra le colture con i due tipi di perlite espansa.

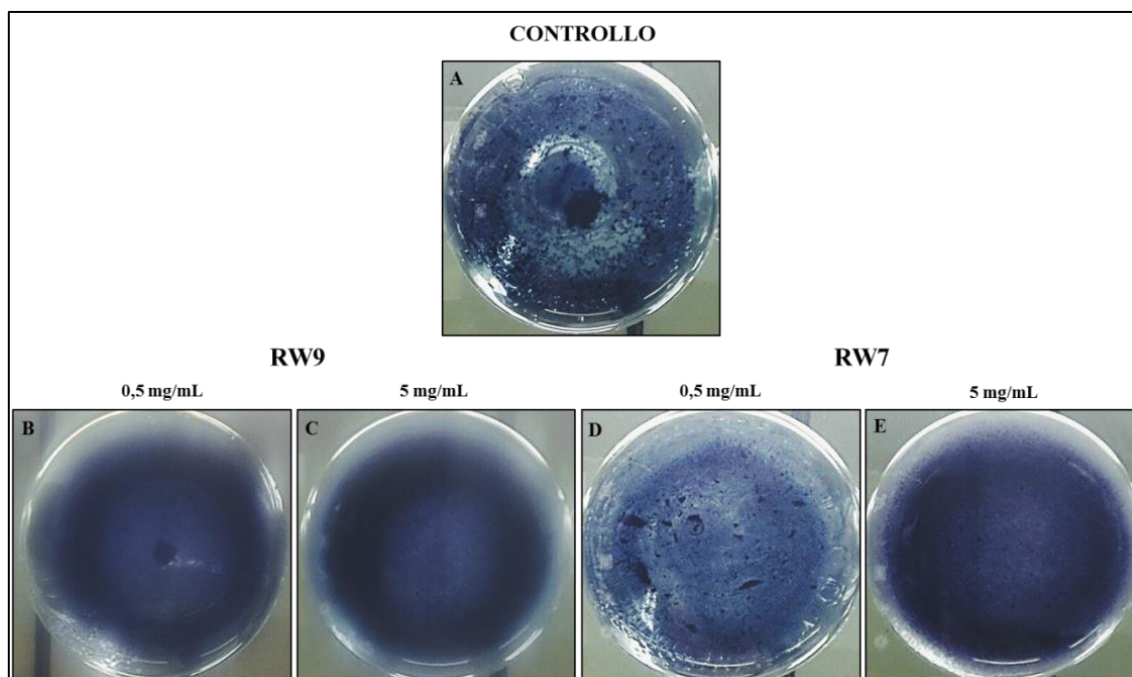


Figura 1.30 - Colture liquide di *S. coelicolor* (visualizzazione del fondo della beuta) dopo sei giorni di crescita.

Le colture libere presentano una caratteristica crescita a pellet, evidenziando al sesto giorno (Fig. 1.30 A) un aumento del numero di strutture glomerulari rispetto ai primi giorni di incubazione. Le cellule immobilizzate sulla matrice porosa (Fig. 1.30 B, C, D ed E), invece, esibiscono una maggiore diffusione ed omogeneità nella sospensione evidenziando così una drastica diminuzione della crescita a pellet rispetto al controllo. Queste osservazioni confermano l'ipotesi che il micelio, aderendo alla matrice porosa a disposizione, abbia ridotto la formazione di addensamenti cellulari.

Anche la differente porosità dei due supporti ha avuto ripercussioni sulla modalità di crescita del batterio. Le colture con il micelio immobilizzato sulla RW9 (Fig. 1.30 B e C) mostrano una crescita quasi del tutto priva di pellet: gli unici agglomerati presenti sono visibili nelle beute in cui è stata aggiunta la concentrazione più bassa di Randalite (Fig. 1.30 B, piccolo pellet visibile al centro della beuta, come formazione sferica dalla colorazione più intensa rispetto al resto) e completamente assenti in quella con un quantitativo maggiore di Randalite.

In quest'ultima condizione, infatti, le colture hanno l'aspetto di una densa sospensione dalla consistenza granulata, dovuta all'insolubilità della perlite espansa in soluzione, ma non v'è traccia di glomeruli che, invece, si apprezzano nelle colture libere ed in quelle in cui è stata utilizzata la RW7. Le cellule immobilizzate su RW7, infatti, hanno formato molti più pellet quando è stata utilizzata la concentrazione più bassa (Fig. 1.30 D) rispetto alle omologhe RW9; mentre nel caso delle colture contenenti una concentrazione più alta di Randalite (Fig. 1.30 E), l'aspetto è quasi simile alle colture RW9 corrispondenti, anche se esse appaiono più opache e si intravede comunque qualche piccolo addensamento. Tali osservazioni evidenziano il diverso atteggiamento del ceppo in seguito allo sfruttamento di un differente supporto di crescita: la matrice a porosità più alta ha permesso un maggiore accomodamento sulla stessa da parte del microrganismo, il quale ha beneficiato di questa condizione per crescere in maniera omogenea; l'altra polvere, invece, ha avuto un effetto non paragonabile al precedente, in quanto la minore porosità ha indotto la formazione dei pellet, a causa della minore superficie di adesione offerta al batterio.

### 1.3.3.3 Produzione di ACT, RED e CDA nelle colture con micelio immobilizzato su perlite espansa

Per valutare la capacità di produzione dei metaboliti secondari, sono stati eseguiti dei prelievi delle colture dopo due, tre, sei e sette giorni di crescita e, seguendo i relativi protocolli, sono stati estratti i due antibiotici pigmentati prodotti dal microrganismo, cioè l'ACT ed il RED.

L'analisi quantitativa ha evidenziato una produzione di ACT, da parte del micelio immobilizzato su RW9, di circa 1,6 volte in più rispetto al controllo già a partire dal secondo giorno e fino al settimo giorno di incubazione (Fig. 1.31a). La produzione da parte delle colture immobilizzate su RW7, invece, non ha manifestato alcun incremento rispetto alle colture controllo (Fig. 1.31b).

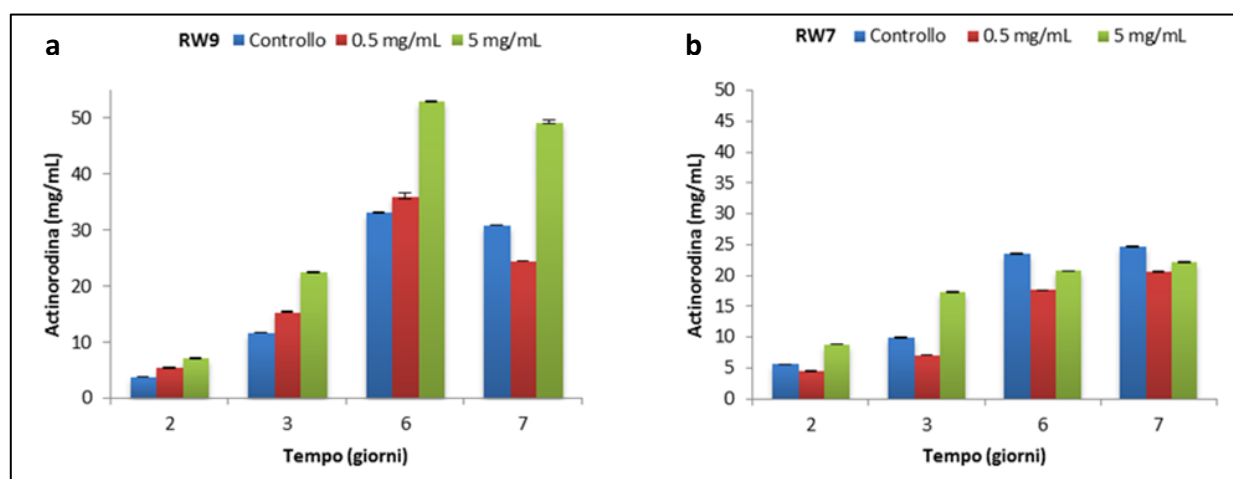


Figura 1.31 - Produzione di ACT ottenuta da cellule di *S. coelicolor* immobilizzate su RW9 (a) e su RW7 (b). Colture planctoniche usate come controllo. I valori sono riportati come media di valori ottenuti da tre colture parallele; le deviazioni standard sono riportate come barre verticali.

In seguito alle analisi effettuate per estrarre l'ACT, le biomasse di *S. coelicolor* sono state opportunamente trattate per l'estrazione del RED. La densità ottica ha messo in evidenza, anche in questo

caso, una resa migliore da parte delle colture trattate con la Randalite a maggior porosità. I dati riportati in grafico (Fig. 1.32a) mostrano che le colture con cellule immobilizzate su RW9, rispetto al controllo, hanno prodotto RED nella misura di circa 2,7 volte in più al secondo giorno e di 1,6 volte in più dal terzo al settimo giorno. Il micelio adeso sulla RW7, invece, non ha registrato alcun incremento rispetto alle colture planctoniche (Fig. 1.32b).

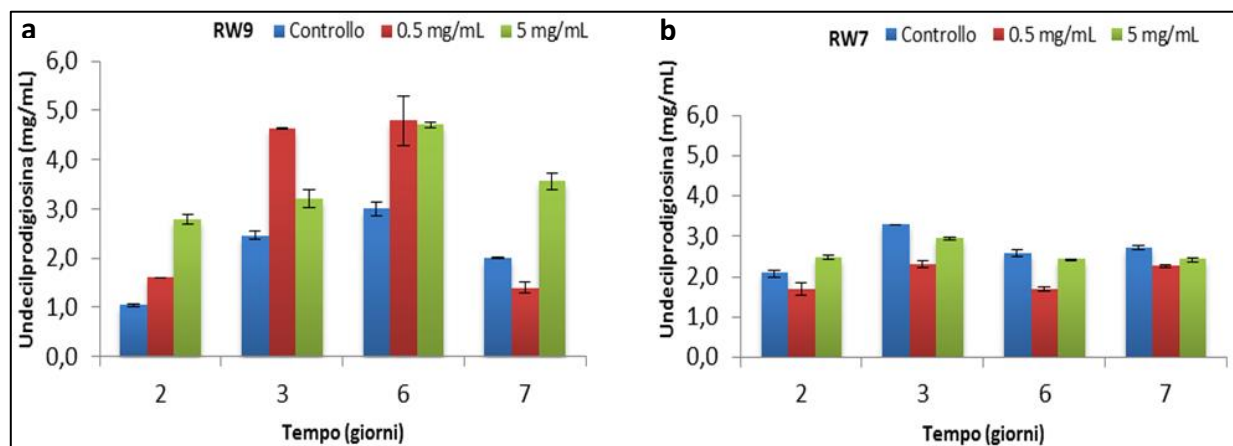


Figura 1.32 - Produzione di RED ottenuta da cellule di *S. coelicolor* immobilizzate su RW9 (a) e su RW7 (b). Le colture planctoniche sono state usate come condizione controllo. I valori sono riportati come media di valori ottenuti da tre colture parallele; le deviazioni standard sono riportate come barre verticali.

Parallelamente ai saggi quantitativi per la resa di ACTe RED, si è optato di analizzare i livelli di produzione dell'antibiotico extracellulare calcio-dipendente (CDA) valutando la sua azione antibiotica mediante un saggio microbiologico.

Per questo esperimento, sono state allestite piastre di terreno agarizzato con il ceppo tester *K. rhizophila* sulle quali sono stati selettivamente depositati l'induttore del CDA, cioè una soluzione di nitrato di calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), ed opportune aliquote del surnatante ricavato dalla coltura batterica in esame contenente il CDA prodotto da *S. coelicolor* dopo 48 ore di incubazione. Come controllo negativo sono state preparate colture tester senza nitrato di calcio ma con aliquote del surnatante ottenuto dalla coltura del microrganismo. Per escludere la possibilità che l'attività antibiotica fosse dovuta all'azione di altri composti biologicamente attivi prodotti da *S. coelicolor*, sono state misurate le aree degli aloni di inibizione della crescita sia nelle piastre con l'induttore che in quelle prive. In tal modo, per poter risalire all'attività antibatterica del CDA, i valori ottenuti dalle misurazioni effettuate sulle piastre indotte sono stati normalizzati con quelli ottenuti dalle piastre non trattate con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . I risultati ottenuti hanno permesso di avere una stima comparativa della quantità di CDA prodotto.

Dai grafici riportati in Fig. 1.33a, si evidenzia la maggiore produzione di antibiotico da parte delle cellule cresciute in presenza di RW9 con valori di circa 3,5 volte in più rispetto al controllo, invece, non si osserva alcun incremento da parte delle colture in RW7 (Fig. 1.33b).

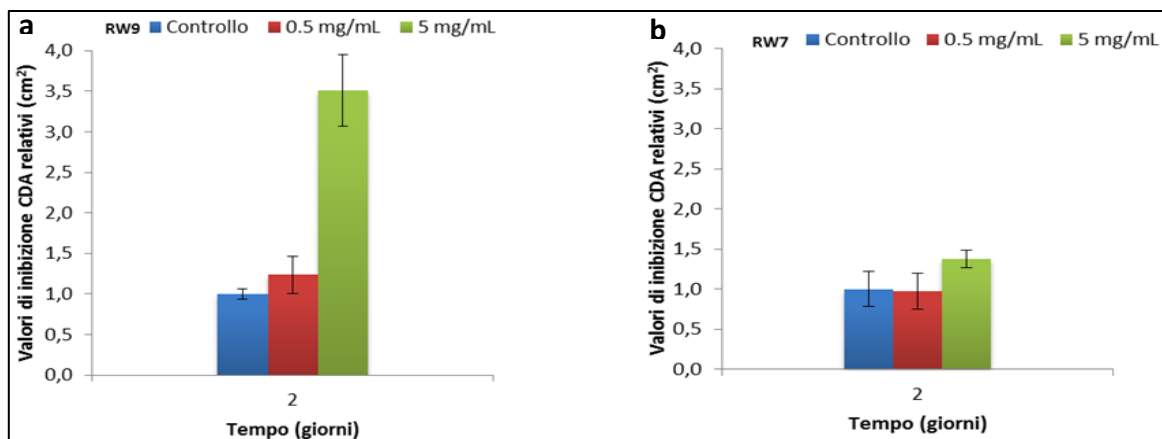


Figura 1.33 - Produzione di CDA ottenuta da cellule di *S. coelicolor* immobilizzate su RW9 (a) e su RW7 (b). Le colture planctoniche sono state usate come condizione controllo. I valori sono riportati come media di valori ottenuti da tre colture parallele; le deviazioni standard sono riportate come barre verticali.

### 1.3.3.4 Analisi delle proteine totali estratte dal micelio immobilizzato su perlite espansa

Sulla base dei risultati ottenuti attraverso le indagini condotte sulle cellule di *S. coelicolor* immobilizzate sulle due differenti matrici porose, si è scelto di proseguire le successive analisi con le biomasse ricavate dalle colture incubate con RW9, dal momento che questa si è rivelata la tipologia di matrice più performante per tutti e tre gli antibiotici quantizzati.

Pertanto, le colture di *S. coelicolor* sono state appositamente trattate per la preparazione di un estratto proteico per ricavare una stima della biomassa prodotta. La tempistica di crescita selezionata per queste analisi è stata ristretta ai tre, sei e sette giorni di incubazione e le estrazioni sono state effettuate sia sulle cellule immobilizzate su RW9 che su quelle controllo. La quantizzazione delle proteine (Fig. 1.34) ha indicato una quantità di biomassa e, quindi, una crescita, paragonabile tra cellule immobilizzate e cellule planctoniche.

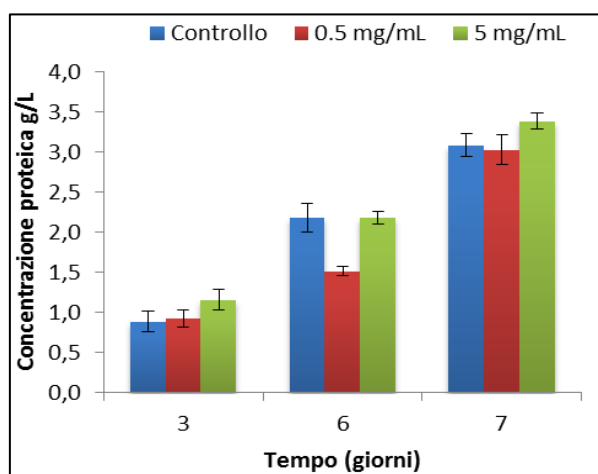


Figura 1.34 - Contenuto proteico estratto dal micelio di *S. coelicolor* immobilizzato su RW9, con colture planctoniche usate come condizione controllo. I valori sono riportati come media di valori ottenuti da tre colture parallele; le deviazioni standard sono riportate come barre verticali.



Non sono, infatti, rilevabili sostanziali differenze tra le colture immobilizzate e le colture controllo suggerendo che la matrice porosa non abbia alcuna influenza sulla resa della biomassa.

### 1.3.3.5 Analisi morfologica delle colture di *S. coelicolor* mediante SEM

Come ultimo step di analisi, si è deciso di concludere il lavoro con un'indagine al SEM per studiare la morfologia del micelio in questa differente condizione di crescita e valutare le modalità di adesione sfruttate dal microrganismo nei confronti del supporto poroso. I campioni analizzati al microscopio sono stati selezionati relativamente ai tempi di incubazione più rappresentativi dell'intera coltura, ovvero il terzo e il sesto giorno, per entrambe le concentrazioni della RW9. È stata, inoltre, condotta un'analisi di controllo sulla Randalite tal quale, dispensata nel terreno di coltura utilizzato per la crescita del ceppo, per verificare l'eventuale reazione della matrice al suddetto mezzo.

Le immagini ottenute mostrano innanzitutto come la struttura tipica dei granuli rimanga la medesima anche in soluzione con il terreno di coltura, in assenza di *S. coelicolor* (in riferimento alla Fig. 1.29). Le cellule immobilizzate (Fig. 1.35), invece, manifestano un'adesione massiva al supporto, sfruttandone quasi completamente ogni singola componente.

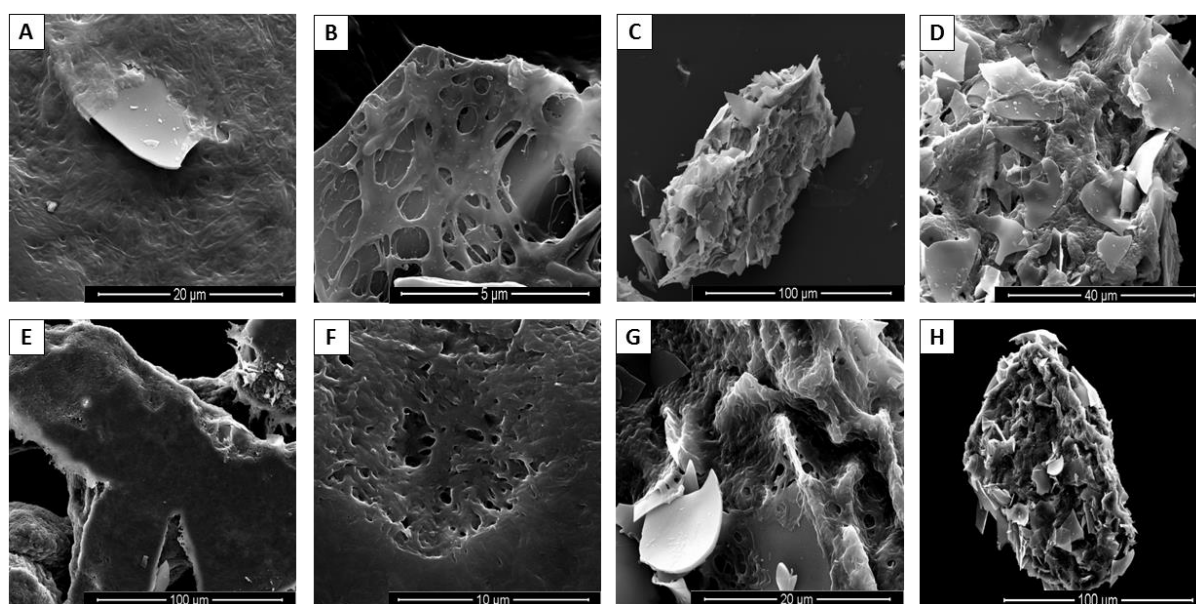


Figura 1.35 - Immagini SEM, a diverso ingrandimento, del micelio di *S. coelicolor* immobilizzate su RW9: A) 5000X, 3°g-0,5 mg/mL; B) 20000X, 3°g-0,5 mg/mL; C) 1000X, 3°g-5 mg/mL; D) 2500X, 3°g-5 mg/mL; E) 1000X, 6°g-0,5 mg/mL; F) 10000X, 6°g-0,5 mg/mL; G) 5000X, 6°g-5 mg/mL; H) 1000X, 6°g-5 mg/mL.

Fondamentalmente le differenze apprezzabili tra il terzo e il sesto giorno sono minime, fatta eccezione per la quantità di biomassa che, ovviamente, è copiosa al sesto giorno. Mettendo a confronto le colture trattate con le due concentrazioni, si evidenzia in maniera abbastanza evidente come il microrganismo abbia utilizzato tutta la matrice porosa a disposizione per la sua crescita: in particolare con la concentrazione di 0,5 mg/mL, le immagini mostrano una sorta di amalgama compatta tra la superficie della Randalite e le cellule di





*S. coelicolor* e, difficilmente, si riconoscono i singoli granuli della polvere, proprio perché completamente occupati dalla crescita a confluenza delle cellule miceliali. Con la concentrazione di Randalite di 5 mg/mL, invece, data la maggior quantità di superficie del supporto disponibile per la crescita a disposizione, nonostante la situazione sia omologa alla precedente, si riescono ad intravedere dei granuli che non sono stati del tutto ricoperti dalle ife di *S. coelicolor*.



## 1.4 Conclusioni

I punti cardine delle biotecnologie microbiche industriali comprendono il riscontro economico, l'equilibrio tra domanda ed offerta, la radicale innovazione tecnologica (Bull *et al.*, 2000); il successo delle loro applicazioni dipende, prima di tutto, dalla comprensione dei meccanismi molecolari e fisiologici che stanno alla base della produzione di metaboliti, nonché dall'ottimizzazione delle condizioni in cui tale processo avviene. Negli ultimi anni, le fermentazioni batteriche hanno acquisito una notevole rilevanza in merito ai loro vantaggi dal punto di vista economico ed ambientale (Subramaniyam and Vimala, 2012) ed oggi rappresentano una delle metodiche più efficienti e veloci per la produzione di biomolecole di interesse commerciale. Gli approcci sperimentali volti all'ottimizzazione dei processi e dei parametri di sviluppo dei cicli di fermentazione che sfruttano i batteri produttori vengono oggi progettati cercando di riprodurre in maniera quanto più fedele possibile le loro condizioni di crescita ideali. L'immobilizzazione cellulare su appositi supporti si è rivelata una vincente tattica per aggirare e cercare di ridurre le problematiche che insorgono nei processi produttivi.

Gli attinomiceti producono un'ampia varietà di metaboliti secondari, che include approssimativamente i due terzi di tutti gli antibiotici di origine naturale usati clinicamente (Bérdy, 2005 e 2012). Questi microrganismi, pertanto, sono stati e continuano ad essere tutt'oggi oggetto di studio in ambito biotecnologico, nella prospettiva di poter così contribuire significativamente alla ricerca e scoperta di nuovi agenti terapeutici (Donadio *et al.*, 2010; Lazzarini *et al.*, 2010; Chater *et al.*, 2016). Tuttavia, uno dei limiti maggiori che compromette la ricerca, lo sviluppo e la successiva introduzione in terapia di nuove molecole con attività antibiotica è il fatto che tali molecole sono prodotte in quantità significativamente bassa. Questo aspetto, sommato a tutti gli ostacoli di natura tecnico-scientifica e legislativa, rende poco attrattiva da un punto di vista economico la ricerca di nuovi antibiotici di origine naturale. Pertanto, nuove strategie volte all'incremento della produzione di antibiotici potrebbero rendere più sostenibile economicamente gli studi volti alla scoperta ed alla caratterizzazione di nuove molecole.

Gli studi condotti in questo lavoro hanno messo in evidenza la bontà e la capacità dei tre differenti supporti utilizzati per incrementare la produzione dei metaboliti secondari in *S. coelicolor*, utilizzato come modello di studio. Partendo dai supporti in PCL/PEG, passando per le membrane in PCL e PLA soggette o meno al trattamento al plasma di O<sub>2</sub>, fino ad arrivare alla matrice porosa della Randalite, tutti i supporti utilizzati si sono rivelati efficaci per l'immobilizzazione batterica attraverso l'adesione. In particolare, le spore, inoculate nel terreno di crescita, erano in grado di germinare, aderire e colonizzare la superficie della struttura porosa formando un denso strato di crescita miceliale simile ad un biofilm. Con questo studio è stato dimostrato che questa crescita simile al biofilm ha avuto una modesta ma apprezzabile influenza positiva sulle rese della biomassa e, soprattutto, un significativo impatto positivo sulla produzione dei metaboliti bioattivi ACT, RED e CDA in confronto alle colture planctoniche. Ciò potrebbe rappresentare una notevole opportunità per le produzioni industriali poiché avere a disposizione un ceppo che, grazie



all'immobilizzazione, registri un aumento della produzione di antibiotici, pur mantenendo gli stessi livelli di biomassa, comporterebbe sicuramente una consistente riduzione dei costi per il trattamento della biomassa stessa per l'estrazione e lo stoccaggio di tali metaboliti.

La crescita su un supporto micro- o nanofibroso riproduce il contatto tra una superficie ed il micelio, che è la naturale modalità di crescita di questo tipo di microrganismi che in genere crescono adesi alla superficie di materia organica, come le ife fungine (Chater *et al.*, 2010) od inorganica, come sabbia silicea (Toume *et al.*, 2014) e, di conseguenza, promuove un trasferimento più efficiente di ossigeno e sostanze nutritive (Žur *et al.*, 2016). Infatti, l'apporto di ossigeno è stato dimostrato essere uno dei più importanti fattori che regolano sia l'avvio sia i livelli di produzione degli antibiotici, in diversi attinomiceti, incluso *S. coelicolor* (Elibol *et al.*, 1995; Mehmood *et al.*, 2011). Inoltre, uno studio recente ha indicato che l'ACT potrebbe essere prodotta per attenuare l'eccessiva fosforilazione ossidativa, portando così ad una riduzione della generazione di ATP in condizioni di rallentamento della crescita. A tale riguardo, l'incremento della produzione di ACT osservato in modo specifico sulle membrane di PLA-plasma è molto interessante e si potrebbe pensare che il trattamento della membrana con O<sub>2</sub>-plasma possa portare all'intrappolamento dell'O<sub>2</sub> nei pori delle membrane, avendo così un ulteriore effetto positivo sull'ossigenazione delle colture che porta ad un più alto tasso di respirazione e quindi ad una produzione di antibiotici più elevata. Inoltre, un'altra possibile spiegazione potrebbe coinvolgere direttamente la produzione dell'ACT per mezzo di specifici segnali cellulari eventualmente attivati a livello dei recettori della membrana cellulare, grazie al contatto delle fibre di PLA-plasma che sono ricche di gruppi carbossilici ed ossidrilici.

Difatti, poiché le colture condotte in presenza delle membrane di PLA e PLA-plasma hanno dato un risultato più performante in termini di resa di produzione di ACT, è stata effettuata l'analisi proteomica delle biomasse ottenute dalla crescita del microrganismo sui due tipi di membrane in PLA, con l'obiettivo di rivelare i *pathway* metabolici ed i processi cellulari che risentivano della presenza di un supporto poroso, quale matrice di adesione durante lo sviluppo morfo-fisiologico del ceppo.

Inoltre, un recente lavoro ha dimostrato che colture di *Streptomyces lividans*, in cui si faceva uso di nanofibre elettrofilate di natura organica depositate su piastre di agar o immerse in mezzi liquidi, risultavano positivamente influenzate in termini di crescita e della produzione di antibiotici, con un miglioramento da due a sei volte rispetto alle condizioni di coltura standard (Moffa *et al.*, 2017). Quindi, prestando attenzione all'effetto esercitato sul metabolismo secondario, da parte delle nanofibre nelle colture batteriche, questi risultati aprono degli scenari interessanti verso la progettazione di sistemi di coltura per microrganismi basati su nanostrutture organiche.

Infine, anche se la validità di queste strutture porose deve essere confermata in ceppi industriali ed in applicazioni su larga scala, questi studi incoraggiano fortemente l'uso di supporti per le colture liquide di batteri filamentose, quali gli attinomiceti, nei bioreattori. L'utilizzo di queste matrici opportunamente funzionalizzate potrebbe, inoltre, essere intesa in futuro come una nuova strategia per la valorizzazione delle filiere di ricerca, sviluppo e produzione delle cosiddette molecole "criptiche" la cui esistenza è desunta



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

mediante lo studio della sequenza del genoma ma che nelle condizioni di laboratorio e/o industriali convenzionali non sono prodotte dai microrganismi o del tutto o in quantità rivelabili.



## 1.5 Materiali e Metodi

### Ceppi utilizzati

*Streptomyces coelicolor* M145 (ATCC BAA-471)

*Kokuria rhizophila* ATCC 9341

### Terreni di coltura

#### Soya Flour Mannitol medium (SFM)

20 g di Agar, 20 g di Mannitolo, 20 g di Farina di soia, acqua distillata 1000 ml.

#### R2YE

103 g di Saccarosio, 0,25 g di  $K_2SO_4$ , 10,12 g di  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 10 g di Glucosio, 0,1 g di Difco Casamino Acids, 5 g di Estratto di lievito, acqua distillata 800 ml. Dopo aver autoclavato, aggiungere le seguenti soluzioni sterili: 10 ml di  $KH_2PO_4$  (0,5%), 80 ml di  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (3,68%), 15 ml di L-prolina (20%), 100 ml di TES buffer (5,73% pH 7,2), 2 ml di Elementi in tracce\* e 5 ml di NaOH (1N) (non è necessario sterilizzare).

\*Elementi in tracce: 40 mg di  $ZnCl_2$ , 200 mg di  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 10 mg di  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , 10 mg di  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 10 mg di  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ , 10 mg di  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ , acqua distillata 1000 ml.

#### R5A sucrose-free

0,25 g di  $K_2SO_4$ , 10,12 g di  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 10 g di Glucosio, 0,1 g di Difco Casamino Acids, 2 mL di Elementi in tracce\*, 5 g di Estratto di lievito, 21 g MOPS, acqua distillata 1000 ml. Aggiungere KOH affinché il pH abbia un valore di 6,8.

\*Elementi in tracce: 40 mg di  $ZnCl_2$ , 200 mg di  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 10 mg di  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , 10 mg di  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 10 mg di  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ , 10 mg di  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ , acqua distillata 1000 ml.

#### Luria Bertani

10 g di bacto triptone, 5 g di Estratto di lievito, 5 g di NaCl, acqua distillata 1000 ml. Se agarizzato, aggiungere 17 g di Agar prima di autoclavare.

#### Soluzioni di Randalite

##### Randalite™ RW9

500 mg di RW9, 10 mL di Acqua Mq. Sterilizzare in autoclave (120°C, 1 atm, 30 min)

##### Randalite™ RW7

500 mg di RW7, 10 mL di Acqua Mq. Sterilizzare in autoclave (120°C, 1 atm, 30 min)



## Buffers

### Fissativo di Karnowsky per microscopia elettronica a scansione

Paraformaldeide 4%, glutaraldeide 2%, PBS 1X, Etanolo 15%.

### Fissativo per microscopia elettronica a scansione

PBS 1X, Glutaraldeide 4%, Etanolo 15%.

## Soluzioni usate per l'analisi 2D-Differential Gel Electrophoresis

Washing solution: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 7 µg/ml pepstatina e 4 µg/ml benzamidina.

IEF buffer: 7 M urea, 2 M Thiourea, 1 M Tris-HCl and 4 % w/v CHAPS.

Equilibration buffer A: 6 M urea, 30 %v/v glycerol, 2 %w/v SDS, 0.05 M Tris-HCl pH 6,8 e 1%w/v DTE.

Equilibration buffer B: 6 M urea, 30 %v/v glycerol, 2 %w/v SDS, 0.05 M Tris-HCl pH 6,8 e 1.25%w/v iodoacetamide.

SDS electrophoresis buffer 10X: 250 mM Tris-HCl, 1,92 M glycine, SDS 1%.

## Preparazione generale

### Preparazione di una sospensione di spore

Il recupero di spore di *S. coelicolor* dalle piastre Petri di SFM è stato eseguito come descritto da Kieser *et al.*, 2000, ma con alcune modifiche. La superficie della piastra è stata raschiata con una spatola usando 3-6 ml di acqua. La sospensione di spore è stata recuperata e quindi filtrata mediante una siringa di plastica contenente una lana di cotone. La sospensione è stata centrifugata per 10 minuti a 3000 rpm/min, il supernatante è stato versato e le spore sono state risospese in una soluzione acquosa di glicerolo al 20% v/v.

## Condizioni di crescita

1. Sia per le colture libere che per quelle immobilizzate sono state usate multiwell da 96 pozzetti contenenti per pozzetto 250 µl di R2YE, una sospensione di  $10^8$  spore ed una membrana porosa in PLC;
2. Sia per le colture libere che per quelle immobilizzate sono stati usati tubi tester contenenti ciascuno 1 ml di R2YE, una sospensione di  $10^8$  spore e tre membrane porose in PLC;
3. Sia per le colture planctoniche che per quelle immobilizzate sono state usate flask da 50 ml contenenti 10 ml di R5A, una sospensione di  $5 \cdot 10^7$  spore e 7 membrane in PCL o PLA sottoposte o meno al trattamento al plasma;



4. Sia per le colture planctoniche che per quelle immobilizzate sono state usate flask da 50 ml contenenti 10 ml di R5A, una sospensione di  $5 \cdot 10^7$  spore e due diverse tipologie di Randalite (RW9 e RW7) a due differenti quantità (0,5 e 5 g/ml di coltura).

Le colture sono state incubate a 30 °C in condizioni statiche (per il punto 1) o in uno shaker orbitale a 200 rpm (per i punti 2, 3 e 4). Sono state preparate tre serie indipendenti della coltura (replicati biologici) e processati ad intervalli regolari stabiliti.

#### **Sterilizzazione delle membrane in PCL/PEG**

Le membrane in PCL/PEG sono state trattate con etanolo (99,8%) per 1 h. Quindi, sono state lavate tre volte utilizzando acqua distillata sterile ed asciugate o.n. a 30 °C in piastre Petri per preservarne le condizioni sterili. Per confermare la sterilità, le membrane trattate con etanolo sono state poste in provette sterili contenenti terreno di fermentazione batterica ed incubate a 30 °C in un agitatore orbitale (200 rpm). Diverse aliquote sono state raccolte a differenti tempi (24, 48, 72, 96 e 120 h) di incubazione, seminate su un terreno di crescita agarizzato ed incubate a 30 °C per l'ispezione della crescita microbica.

#### **Sterilizzazione delle membrane in PCL e PLA trattate o meno al plasma**

Le membrane in PCL e PLA, soggette o meno al plasma, sono state trattate con etanolo 70% (v/v) in acqua distillata sterile per 1 h su uno shaker orbitale (50 rpm). Poi sono state lavate tre volte in acqua distillata sterile. Per confermare la sterilità, le membrane trattate con etanolo sono state collocate in flask sterili contenenti terreno di coltura batterica ed incubati a 30 °C su un shaker orbitale (200 rpm). Aliquote del terreno di coltura sono state raccolte a diversi periodi di incubazione (24, 48, 72, 96 e 120 h), piastrate su un substrato di crescita agarizzato ed incubati a 30 °C o.n. per l'ispezione microbica.

#### **Metodo di estrazione delle proteine**

Le proteine totali sono state estratte dalla biomassa dei campioni delle colture in triplicato per ogni condizione sperimentale come descritto da Palazzotto *et al.*, 2015. Per rimuovere le tracce di terreno di crescita, le biomasse sono state risospese in 1 ml di soluzione di lavaggio e centrifugati tre volte a 4000 rpm per 10 min. Dopo la risospensione in soluzione di lavaggio contenente 0,3% SDS, il micelio è stato distrutto mediante sonicazione in ghiaccio (output control 4,  $4 \times 15$  s, Vibra Cell, USA). I campioni sono stati poi bolliti (5 min) e raffreddati su ghiaccio (15 min). Per eliminare DNA e RNA è stata aggiunta una mix di DNase (100 µg/ml) e RNasi (50 µg/ml) al lisato cellulare ed incubato in ghiaccio per 20 minuti. I detriti cellulari e le cellule non rotte sono state separate mediante centrifugazione a 15000 g per 15 minuti a 4 °C. Dopo la dialisi in acqua distillata a 4 °C, le proteine sono state sottoposte a precipitazione in acetone (3:1 v/v) o.n. a -20 °C per rimuovere metaboliti e pigmenti batterici solubilizzati. Successivamente le proteine sono state risospese nel tampone per l'isoelettrofocalizzazione (IEF) pH 8,4 e conservate a -80 °C fino all'uso.



La concentrazione totale delle proteine è stata determinata mediante il saggio di Bradford. La qualità degli estratti proteici è stata valutata mediante gel di poliacrilammide al 12% (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE).

### **Determinazione della concentrazione delle proteine totali mediante Saggio di Bradford (Bradford 1976)**

La quantizzazione delle proteine totali estratte è stata condotta mediante l'utilizzo delle istruzioni e dei reagenti presenti nel kit Protein Determination Reagent (USB Corporation). I valori delle concentrazioni dei campioni proteici si ottengono sulla base di una curva di calibrazione costruita utilizzando concentrazioni nel range 5 - 120 µg di siero di albumina bovina (BSA).

### **Preparazione del campione per l'osservazione mediante Scanning Electron Microscopy (SEM)**

Le osservazioni SEM (Phenom ProX, PhenomWorld) sono state effettuate per analizzare le matrici, utilizzate come supporto per la crescita di *S. coelicolor*, prima e dopo l'immobilizzazione cellulare. Le membrane in PCL/PEG ed in PCL e PLA, soggette o meno al trattamento al plasma, contenenti il micelio immobilizzato sono state trattate a differenti tempi di crescita con un buffer phosphate-saline (PBS, Sigma Aldrich) e successivamente immerse nella soluzione di fissaggio di Karnowsky (PBS, 2% glutaraldeide e 4% paraformaldeide) per 15 min; successivamente il reagente è stato rimosso ed i campioni sono stati trattati con etanolo 15% per 5 min. Prima dell'analisi SEM, le matrici contenenti i batteri fissati sono state fatte asciugare a 30 °C.

In seguito i campioni sono stati fissati su un supporto in alluminio utilizzando un nastro ad anidride carbonica e sottoposti alla doratura (Sputtering Scancoat Six, Edwards) al fine di evitare il rilascio elettrostatico del test. I campioni sono stati infine fissati su uno stoppino in alluminio utilizzando nastro ad anidride carbonica e poi sputter ricoperti d'oro (Sputter-ing Scancoat Six, Edwards) al fine di evitare l'accumulo di cariche elettrostatiche che disturberebbero la rivelazione del fascio di elettroni secondari, generati a seguito dell'impatto del fascio elettronico primario, proveniente dalla sorgente, con il campione.

La stessa procedura è stata condotta per effettuare le osservazioni SEM sul micelio adeso alla Randalite W9 e W7. L'unica eccezione è rappresentata dalla soluzione di fissaggio che prevedeva 2/3 lavaggi della coltura con PBS 1X, fissaggio con glutaraldeide 4% in agitazione per 5 - 10 min e disidratazione del campione con etanolo 15% per 3 min. Anche in questo caso i campioni sono stati fatti essiccare a 30 °C.

### **SDS-PolyAcrylamide gel electrophoresis**

La separazione delle proteine su SDS-PAGE è stata eseguita con il sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell di BioRad, come descritto da Sambrook *et al.*, 1989. Sono state utilizzate lastre di vetro con distanziatore integrato di 0,75 mm e gel di risoluzione del 12 - 15% acrilammide.

I gel di SDS-polyacrylamide sono stati colorati con Silver Blue Stain.



### Marcatura delle proteine con CyDye

I campioni proteici sono stati marcati per l'analisi 2D-DIGE utilizzando il kit minimal labelling CyDye™ DIGE (GE Healthcare, Svezia) secondo le raccomandazioni del produttore. In breve, la ricostituzione di CyDye è stata effettuata aggiungendo 5 µl di dimetilformammide anidra 99,8% (DMF) ad ogni fiala di 5 nmol di fluoroforo per preparare la soluzione stock. 50 µg di campioni proteici sono stati marcati con 400 pmol di CyDye in ghiaccio per 30 min. La reazione di marcatura è stata interrotta mediante aggiunta di 0,5 µl di lisina 10 mM. Due campioni per ogni condizione sono stati marcati utilizzando i fluorofori Cy3 o Cy5. Lo scambio di fluorofori è stato eseguito per eliminare la distorsione specifica del colorante. Inoltre, un pool di proteine standard, marcato con il fluoroforo Cy2, è stato generato combinando uguale quantità di campioni.

### Isoelectric focusing (IEF)

La metodica IEF consente di separare le proteine in base al loro punto isoelettrico (pI). Per l'IEF, la soluzione di reidratazione DeStreak (GE Healthcare) contenente un gradiente (IPG) 0,5% v/v di buffer (GE Healthcare) a pH immobilizzato e 20 mM DTT (Sigma Aldrich) è stato aggiunto a ciascuna miscela fino ad un volume finale di 340 µl. L'IEF è stata eseguita, come descritto in precedenza (Gallo *et al.*, 2010), utilizzando IPG-strips da 18 cm con un range di pH 3 - 10 non lineare (GE Healthcare) mediante un apparecchio Ettan IPGphor III (GE Healthcare) a specifici parametri di voltaggio (Tab. 1.1).

Fase	Volt	Tempo in ore	Tipo di voltaggio
<i>Reidratazione</i>	————	<i>1:00</i>	————
<i>I</i>	<i>30 V</i>	<i>10:00</i>	<i>Step</i>
<i>II</i>	<i>200 V</i>	<i>1:00</i>	<i>Step</i>
<i>III</i>	<i>300 V</i>	<i>0:30</i>	<i>Step</i>
<i>IV</i>	<i>3500 V</i>	<i>3:00</i>	<i>Gradiente</i>
<i>V</i>	<i>3500 V</i>	<i>1:00</i>	<i>Step</i>
<i>VI</i>	<i>8000 V</i>	<i>0:30</i>	<i>Gradiente</i>

Tabella 1.1 - Programma IEF.

Dopo l'IEF, le strip IPG sono state incubate con un buffer di equilibrizzazione (6 M urea, 30% v/v glicerolo, 2% w/v SDS e 0,05M Tris-HCl pH 6,8) contenente 2% w/v di DTE per 10 min; i gruppi tiolici sono stati quindi bloccati da un'ulteriore incubazione con buffer di equilibrizzazione contenente 2,5% w/v di iodoacetamide. Secondo il protocollo Laemmli, le proteine, dopo essere state separate in base al pH, sono state separate utilizzando SDS-PAGE al 12%, a 10 °C, mediante Ettan Dalt six (GE Healthcare), con un



settaggio di 40  $\mu$ A per gel e 110 V. I gel 2D sono stati acquisiti con uno scanner di immagini DIGE (GE Healthcare) per rilevare le proteine marcate con le cianine. La risoluzione delle immagini è stata eseguita con le seguenti impostazioni: pixel 100  $\mu$ m e 0,650; 0,680 e 0,550 secondi/pixel come tempo di esposizione per Cy2, Cy3, Cy5, rispettivamente.

### **Visualizzazione delle proteine ed analisi delle immagini**

L'analisi differenziale dei gel è stata eseguita usando il software Image Master 2D Platinum 7.0 DIGE (GE Healthcare) secondo le istruzioni del produttore. Dopo essere state rilevate, le spot proteiche sono state successivamente accoppiate. L'analisi quantitativa viene realizzata ricavando il volume di ogni spot, calcolando come funzione integrale della densità ottica (O.D.) sull'area. In questo modo si può analizzare il differente grado di abbondanza tra *spot* che riflette il livello d'espressione proteica in un campione.

Per normalizzare i valori vengono usati i volumi relativi, ossia il volume di una singola *spot* dato come valore percentuale sul totale dei volumi di ogni *spot* e nell'analisi DIGE tale volume è poi ulteriormente normalizzato per il valore delle *spot* marcate con il Cy2. Per ottenere la migliore corrispondenza automatica del gel è necessario identificare almeno 50 punti di riferimento in ogni gel. I punti di riferimento sono stati scelti come gli stessi punti presenti in ciascun gel utilizzando come riferimento l'immagine standard interna. Per eseguire l'analisi quantitativa differenziale, è stata creata la cartella di classi che definisce una classe per ciascuna serie di gel. Confrontando le classi e quindi i gel all'interno di tali classi, è stata calcolata la variazione di espressione proteica tra i diversi campioni biologici. Le spot proteiche che mostravano una variazione di 1,5 volte nel volume della spot, con un valore ANOVA statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), sono state considerate differenzialmente abbondanti.

Per identificare le spot proteiche di interesse, è stata eseguita una raccolta manuale dai gel sviluppati con la colorazione argentica (Shevchenko A. *et al.*, 1996). In particolare, ogni gel è stato incubato con 250 ml di soluzione di fissaggio contenente metanolo, acido acetico ed acqua deionizzata (in rapporto 40:10:50) in agitatore orbitale per 30 min. Dopo questa fase sono stati eseguiti quattro lavaggi in acqua deionizzata. Successivamente i gel sono stati sensibilizzati usando una soluzione di tiosolfato di sodio 0,08% (w/v) per 5 minuti e sciacquati con due lavaggi in acqua deionizzata. Quindi i gel sono stati incubati in una soluzione argentica 0,4% per 1 h a 4 °C. Dopo i gel sono stati sviluppati con una soluzione di formaldeide 0,04% (v/v) e di carbonato di sodio 2% (w/v).

### **Identificazione proteica**

Come riportato in precedenza, le spot proteiche sono state tagliate dai gel 2D, alchilate, digerite con tripsina ed identificate mediante la spettrometria di massa (Gallo *et al.*, 2010). In particolare, le miscele peptidiche sono state trattate con  $\mu$ Zip-TipC18 (Millipore, USA) usando 50% v/v acetonitrile/5% v/v acido formico come eluente prima dell'analisi nLC-ESI-LIT-MS/MS. La digestione mediante tripsina è stata analizzata usando uno spettrometro di massa LTQ XL (Thermo, USA) dotato di una sorgente di



nanotrasmissione Proxeon collegata ad un EasynanoLC (Thermo, USA). Le miscele peptidiche sono state separate mediante una colonna Easy C18 (10 - 0,075 mm, 3  $\mu$ m) (Thermo, USA). Le fasi mobili erano 0.1% v/v acido formico acquoso (solvente A) e 0,1% v/v acido formico in acetonitrile (solvente B), con portata totale di 300 nL/min. Il gradiente lineare è stato avviato 20 minuti dopo il caricamento del campione; il solvente B è passato dal 5% al 35% in 15 minuti, dal 35% al 95% in 2 min. Gli spettri sono stati acquisiti in un range m/z 400-1800. L'acquisizione è stata controllata da una procedura di scansione di ioni valutando i dati sui tre ioni più abbondanti, consentendo l'esclusione dinamica (conteggio ripetuto 1 e durata di esclusione 60 s); la finestra di isolamento di massa e l'energia di collisione sono stati impostati a m/z 3 ed al 35%, rispettivamente.

La versione 2.2.06 del motore di ricerca MASCOT (Matrix Science, Regno Unito) è stata utilizzata per identificare le spot proteiche dal database NCBI contenente anche sequenze proteiche per *S. coelicolor*, utilizzando dati nLC-ESI-LIT-MS/MS. La ricerca nel database è stata eseguita scegliendo la tripsina come enzima proteolitico, con un valore massimo di mancato taglio di 2, riguardo la carbamidometilazione di Cys e l'ossidazione di Met come modificazione fissa e variabile, rispettivamente. I candidati con almeno 2 peptidi assegnati con un punteggio individuale MASCOT > 25, entrambi corrispondenti a P < 0,05 per un'identificazione significativa, sono stati ulteriormente valutati dal confronto con i loro valori di massa e pI, utilizzando i dati sperimentali ottenuti da 2D-DIGE.

I risultati dell'identificazione MS sono stati usati per eseguire uno studio di Gene Ontology. I *pathway* metabolici sono stati ricostruiti utilizzando i database di proteine KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

## **Quantizzazione della produzione di antibiotici**

### **Saggio per l'estrazione dell'ACT totale (Hopwood, 2007)**

Per quantificare la produzione totale di actinorodina (extra- ed intracellulare), un'aliquota delle colture è stata prelevata a specifici tempi e trattata con KOH 1N (concentrazione finale), centrifugata a 6000 rpm per 7 min ed è stata misurata la produzione di antibiotico mediante lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 640 nm.

Al contrario di quanto osservato nelle colture cellulari planctoniche, nel caso delle colture immobilizzate sulle differenti membrane, l'ACT non si è accumulata nel terreno di crescita, ma è risultato assorbito dalle membrane di PCL o PLA, trattate al plasma o meno, come evidenziato dal caratteristico colore blu delle stesse. Quindi, per valutare quantitativamente quest'ultimo aspetto le membrane portanti il micelio immobilizzato e l'ACT sono state separate dal terreno di fermentazione. Pertanto, le membrane di PCL o PLA, trattate al plasma o meno, sono state trattate con KOH 1N per estrarre ACT totale, vale a dire sia i) ACT extracellulare (cioè rilasciata dalle cellule immobilizzate ed assorbita dalle membrane); e ii) ACT intracellulare (cioè ancora all'interno delle cellule miceliali immobilizzate), il resto della coltivazione (terreno di coltura ed eventuale cellule planctoniche) è stata trattata anch'essa con KOH (1N). Per rimuovere



la componente insolubile delle membrane, i campioni trattati con KOH sono stati centrifugati (13.000 rpm 5 min). La concentrazione di ACT è stata quantificata spettrofotometricamente a 640 nm usando il coefficiente di estinzione molare del composto puro ( $\epsilon_{640} - 25.320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Per le colture di cellule immobilizzate, la concentrazione di ACT è stata calcolata combinando i risultati dell'estrazione dalle membrane PLA o PLA e dal resto delle medesime colture.

#### **Saggio per l'estrazione del RED (Hopwood, 2007)**

Al fine di analizzare il RED legato al micelio, la porzione insolubile ottenuta dalle colture immobilizzate e planctoniche dopo il trattamento con KOH è stata lavata tre volte utilizzando una soluzione di Tris-HCl (1 M, pH 7,5). In seguito, il RED è stato solubilizzato usando HCl 0,5 M in metanolo (60 min, mescolando per inversione) e quantificato spettrofotometricamente a 530 nm utilizzando il coefficiente di estinzione molare del composto puro ( $\epsilon_{530} - 100.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### **Saggio per la valutazione dell'antibiotico calcio dipendente (CDA) (Hopwood, 2007)**

Per eseguire i dosaggi di produzione del CDA, un'aliquota delle colture è stata prelevata a specifici tempi, centrifugata a 6000 rpm per 7 min ed un volume noto di surnatante è stato spottato su un overlay di LB soft agar contenente 100  $\mu\text{l}$  di una sospensione ( $\text{OD}_{600} 1 - 1,2$ ) di *K. rhizophila* con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  12 mM. Le piastre con agar solidificate vengono incubate a 37 °C per una notte. La produzione di CDA è stata rilevata come zona di inibizione, assente in mancanza di  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , della crescita di *K. rhizophila*.



## 1.6 Bibliografia

- Baltz R.H. (2011) Strain improvement in actinomycetes in the postgenomic era. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38 (6), 657-666.
- Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeño-Tárraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabbinowitsch E., Rajandream M.A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B.G., Parkhill J., Hopwood D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, May 9;417(6885):141-7.
- Bérdy J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*. Jan;58(1):1-26.
- Bérdy J. (2012) Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)*. Aug;65(8):385-95.
- Borodina I., Krabben P., Nielsen J. (2005) Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Res*, Jun;15(6):820-9.
- Bull A., Ward A., Goodfellow M. (2000) Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(3):573–606.
- Bystrykh L.V., Fernández-Moreno M.A., Herrema J.K., Malpartida F., Hopwood D.A., Dijkhuizen L. (1996) Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol*, 178:2238-2244.
- Cerdeño A.M., Bibb M.J., Challis G.L. (2001) Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chemistry & Biology*, Aug;8(8):817-29.
- Chater K.F., Biró S., Lee K.J., Palmer T., Schrempf H. (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Rev.* 34 171–198.
- Chater K.F. (2016) Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Res*, Nov 30;5:2795.
- Ciullo PA. (1996) ‘Perlite’ in Industrial minerals and their uses. Noyes Publishing, pp.52–54.
- Claessen D., de Jong W., Dijkhuizen L., Wösten H.A.B. (2006) Regulation of *Streptomyces* development, reach for the sky! *Trends Microbiol*, 14:313-319.
- Donadio S., Maffioli S., Monciardini P., Sosio M., Jabes D. (2010) Sources of novel antibiotics--aside the common roads. *Appl Microbiol Biotechnol*, Dec;88(6):1261-7.
- Elibol M., Mavituna F. (1995) Effect of perfluorodecalin as an oxygen carrier on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, May-Jun;43(2):206-10.



- Elliot M.A., Buttner M.J., Nodwell J.R. (2008) Multicellular development of *Streptomyces Myxobacteria*: Multicellularity and Differentiation. ASM Press, Herndon, VA, pp. 419–438.
- Fernandez-Moreno M.A., Martinez E., Caballero J.L., Ichinose K., Hopwood D.A., Malpartida F. (1994) DNA sequence and functions of the actVI region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Biol Chem*, 269:24854–24863.
- Flardh K., Buttner M.J. (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol*, 7(1):36-49.
- Hopwood DA. (2007) *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. Oxford University Press, New York..
- Gallo G., Alduina R., Renzone G., Thykaer J., Bianco L., Eliasson-Lantz A., Scaloni A., Puglia A.M. (2010) Differential proteomic analysis highlights metabolic strategies associated with balhimycin production in *Amycolatopsis balhimycina* chemostat cultivations. *Microb Cell Fact.*, 9:95–95.
- Gallo G., Renzone G., Alduina R., Stegmann E., Weber T., Lantz AE., Thykaer J., Sangiorgi F., Scaloni A., Puglia AM. (2010) Differential proteomic analysis reveals novel links between primary metabolism and antibiotic production in *Amycolatopsis balhimycina*. *Proteomics*, 10:1336–1358.
- Gallo G., Renzone G., Palazzotto E., Monciardini P., Arena S., Faddetta T., Giardina A., Alduina R., Weber T., Sangiorgi F., Russo A., Spinelli G., Sosio M., Scaloni A., Puglia A.M. (2016) Elucidating the molecular physiology of lantibiotic NAI-107 production in *Microbispora* ATCC-PTA-5024. *BMC Genomics.*, 17:42.
- Granozzi C., Billetta R., Passantino R., Sollazzo M., Puglia AM. (1990) A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol*, 136(4):713-6.
- Hojati Z., Milne C., Harvey B., Gordon L., Borg M., Flett F., Wilkinson B., Sidebottom P.J., Rudd B.A., Hayes M.A., Smith C.P., Micklefield J. (2002) Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chem Biol*, Nov;9(11):1175-87.
- Jani C., Tocheva E.I., McAuley S., Jensen A., Nodwell J. (2014) *Streptomyces*: A Screening Tool for Bacterial Cell Division Inhibitors. *Journal of Biomolecular Screening*, Vol. 20(2) 275–284.
- van Keulen G., Dyson P.J. (2014) Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Adv Appl Microbiol*, 89:217-66.
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*, International Microbiology, vol. 3.
- Kim C., Chang Y.K., Chun G.T, Jeong Y.H, Lee S.J. (2001) Continuous culture of immobilized *Streptomyces* cells for kasugamycin production. *Biotech. Prog.*, 17:453–461.



- Kraas F.I., Giessen T.W., Marahiel M.A. (2012) Exploring the mechanism of lipid transfer during biosynthesis of the acidic lipopeptide antibiotic CDA. *FEBS Letters* 586 283–288.
- Lakey J.H., Lea E.J.A., Rudd B.M., Wright H.M., Hopwood D.A. (1983) A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3 (2) which requires calcium for its activity. *Gen Microbiol*, 129, 3565-3573.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Dec;78(3-4):399-405.
- Li D., Xia Y. (2004) Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Advanced Materials*.; 16 (14):1151–1170.
- Liu G., Chater K.F., Chandra G., Niu G., Tan H. (2013) Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1):112-143.
- Liu S.-J., Kau Y.-C., Chou C.-Y., Chen J.-K., Wu R.-C., Yeh W.-L. (2010) Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing. *J.Memb. Sci.*, 355:53–59.
- López-García M.T., Rioseras B., Yagüe P., Álvarez J.R., Manteca Á. (2014) Cell immobilization of *Streptomyces coelicolor*: effect on differentiation and actinorhodin production. *Int Microbiol*, Jun; 17(2):75–80.
- Lo Re G., Lopresti F., Petrucci G., Scaffaro R. (2015) A facile method to determine pore size distribution in porous scaffold by using image processing. *Micron*, 76:37–45.
- Maio A., Botta L., Tito A.C., Pellegrino L., Daghetta M., Scaffaro R. (2014) Statistical study of the influence of CNTs purification and plasma functionalization on the properties of polycarbonate-CNTs nanocomposites. *Plasma Process. Polym.*, 11:664–677.
- Malpartida F., Hopwood D.A. (1986) Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.*, 205:66–73.
- Manteca A., Álvarez R., Salazar N., Yagüe P., Sánchez J. (2008) Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 74:3877-3886.
- Manteca A., Jung J.R., Schwämmle V., Jensen O.N., Sanchez J. (2010) Quantitative proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* nonsporulating liquid cultures demonstrates a complex differentiation process comparable to that occurring in sporulating solid cultures. *Journal of Proteome Research*, 9, 4801–4811 480.
- Mehmood N., Olmos E., Goergen J.L., Blanchard F., Ullisch D., Klöckner W., Büchs J., Delaunay S. (2011) Oxygen supply controls the onset of pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks. *Biotechnol Bioeng*, Sep;108(9):2151-61.
- Meneghello G., Parker D.J., Ainsworth B.J., Perera S.P., Chaudhuri J.B., Ellis M.J., De Bank P.A. (2009) Fabrication and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid)/polyvinyl alcohol blended hollow fibre membranes for tissue engineering applications. *J. Memb. Sci.*, 344, 55.



- Miguélez E.M., Hardisson C., Manzanal M.B. (1999) Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol*, May 3;145(3):515-25.
- Moffa M., Pasanisi D., Scarpa E., Marra A.R., Alifano P., Pisignano D. (2017) Secondary Metabolite Production from Industrially Relevant Bacteria is Enhanced by Organic Nanofibers. *Biotechnol J*, Nov;12(11).
- Moraczewski K., Stepczyńska M., Malinowski R., Rytlewski P., Jagodziński B., Zenkiewicz M. (2016) Stability studies of plasma modification effects of polylactide and polycaprolactone surface layers. *Appl. Surf. Sci.* 377 228–237.
- Ndlovu T.M., Ward A.C., Glassey J., Eskildsen J., Akay G. (2015) Bioprocess intensification of antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in micro-porous culture. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, 49, 799.
- Nedjari S., Eap S., Hébraud A., Wittmer C.R., Benkirane-Jessel N., Schlatter G. (2014) Electrospun honeycomb as nests for controlled osteoblast spatial organization. *Macromol. Biosci.*, Nov;14(11):1580-9.
- Olmos E., Mehmood N., Haj Husein L., Goergen J.L., Fick M., Delaunay S. (2013) Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioproc Biosyst Eng*, 36:259-272.
- Palazzotto E., Renzone G., Fontana P., Botta L., Scaloni A., Puglia A.M., Gallo G. (2015) Tryptophan promotes morphological and physiological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(23):10177-89.
- Parekh S., Vinci V.A., Strobel R.J. (2000) Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(3), 287-301.
- Perlite italiana s.r.l. (<http://www.perlite.it/>).
- Puglia AM., Vohradsky J., Thompson CJ. (1995) Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, Aug;17(4):737-46.
- Rioseras B., López-García M.T., Yagüe P., Sánchez J., Manteca A. (2013) Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. *Bioresource Technol*, 151:191-198.
- Rudd B.M., Hopwood D.A. (1979) Genetics of Actinorhodin Biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of General Microbiology*, 114(1):35-43.
- Sambrook J., Fritsch EM. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scaffaro R., Lo Re G., Rigogliuso S., Ghersi G. (2012) 3D polylactide-based scaffolds for studying human hepatocarcinoma processes *in vitro*. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 13, 045003.





- Scaffaro R., Botta L., Sanfilippo M., Gallo G., Palazzolo G., Puglia A.M. (2013) Combining in the melt physical and biological properties of poly(caprolactone) and chlorhexidine to obtain antimicrobial surgical monofilaments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Jan;97(1):99-109.
- Scaffaro R., Lopresti F., Botta L., Rigogliuso S., Ghersi G. (2016a) Preparation of three-layered porous PLA/PEG scaffold: relationship between morphology, mechanical behavior and cell permeability. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 54:8-20.
- Scaffaro R., Lopresti F., Sutera A, Botta L, Fontana RM, Puglia AM, Gallo G. (2016b) Effect of PCL/PEG-Based Membranes on Actinorhodin Production in *Streptomyces coelicolor* Cultivations. *Macromol. Biosci.*, 16(5):686-93.
- Scaffaro R., Lopresti F., Botta L., Rigogliuso S., Ghersi G. (2016c) Melt Processed PCL/PEG Scaffold With Discrete Pore Size Gradient for Selective Cellular Infiltration. *Macromol. Mater. Eng.* 301(2):182–190.
- Scaffaro R., Lopresti F., Botta L., Rigogliuso S., Ghersi G. (2016d) Integration of PCL and PLA in a monolithic porous scaffold for interface tissue engineering. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 63:303–313.
- Scaffaro R., Lopresti F., Sutera A., Botta L., Fontana R.M., Gallo G. (2017a) Plasma modified PLA electrospun membranes for actinorhodin production intensification in *Streptomyces coelicolor* immobilized-cell cultivations. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 157 233–241.
- Scaffaro R., Lopresti F., Catania V., Santisi S., Cappello S., Botta L., Quatrini P. (2017b) Polycaprolactone-based scaffold for oil-selective sorption and improvement of bacteria activity for bioremediation of polluted water: Porous PCL system obtained by leaching melt mixed PCL/PEG/NaCl composites: Oil uptake performance and bioremediation efficiency. *Eur. Polym. J.*, 91:260–273
- Scaffaro R., Lopresti F., Maio A., Botta L., Rigogliuso S., Ghersi G. (2017c) Electrospun PCL/GO-g-PEG structures: Processing-morphology-properties relationships. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 92:97–107.
- Scaffaro R., Maio A., Lopresti F., Botta L. (2017d) Nanocarbons in Electrospun Polymeric Nanomats for Tissue Engineering: A Review. *Polymers* 9(2):76.
- Scaffaro R., Botta L., Lopresti F., Maio A., Sutera F. (2017e) Polysaccharide nanocrystals as fillers for PLA based nanocomposites. *Cellulose*, 24:447–478.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.*;68(5):850-8.
- Stackebrandt E., Rainey F.A, Ward-Rainey N.L. (1997) Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria classis nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 479-491.



- Strieker M., Marahiel M.A. (2009) The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics. *ChemBioChem*, 10, 607–616.
- Subramaniam R., Vimala R. (2012) Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int J Sci Nat*, 3: 480-486.
- Szklarczyk D., Morris J.H., Cook H., Kuhn M., Wyder S., Simonovic M., Santos A., Doncheva N.T., Roth A., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*, Jan 4; 45: D362–D368.
- Taguchi T., Itou K., Ebizuka Y., Malpartida F., Hopwood D.A., Surti C.M., Booker-Milburn K.I., Stephenson G.R., Ichinose K. (2000) Chemical characterisation of disruptants of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) actVI genes involved in actinorhodin biosynthesis. *J Antibiot*, 53: 144–152.
- Toume K., Tsukahara K., Ito H., Arai M.A., Ishibashi M. (2014) Chromomycins A2 and A3 from Marine Actinomycetes with TRAIL Resistance-Overcoming and Wnt Signal Inhibitory Activities. *Mar Drugs*. Jun; 12(6): 3466–3476.
- Tsao S.W., Rudd B.A., He X.G., Chang C.J., Floss H.G. (1985) Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *J. Antibiot.*, 38, 128–131.
- Ulgen K.O., Mavituna F. (1998) Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) culture in a batch bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotech*, 73 243–250.
- Walsh C.T. (2002) Combinatorial Biosynthesis of Antibiotics: Challenges and Opportunities. *Chem Bio Chem*, 1;3(2-3):125-34.
- Wang B., Smith T.R., Masters A.L., Danvers N.J.K. (2009) Micronized Perlite Filler Product United States Patent, US20060075930 A1.
- Wang X., Wang X., Liu M., Bu Y., Zhang J., Chen J., Zhao J. (2015) Adsorption synergic biodegradation of diesel oil in synthetic seawater by acclimated strains immobilized on multifunctional materials. *Marine Pollution Bulletin*, 92 195–200.
- Wentzel A., Sletta H., Stream Consortium, Ellingsen T.E., Bruheim P. (2012) Intracellular Metabolite Pool Changes in Response to Nutrient Depletion Induced Metabolic Switching in *Streptomyces coelicolor*. *Metabolites*, Feb 17;2(1):178-94.
- White J., Bibb M. (1997) bldA dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *J Bacteriol*, 197:627–633.
- Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J., Salmond G. (2006) The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4 887–899.
- Winkelman mineraria s.r.l. ([https://www.enochimiki.gr/Randalite\\_W\\_9](https://www.enochimiki.gr/Randalite_W_9)).
- Yagüe P., Rodríguez-García A., López-García M.T., Martín J.F., Rioseras B., Sánchez J., Manteca A. (2014) Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating



cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS One*, 8:e60665.

- Yang S.S., Yueh C.Y. (2001) Oxytetracycline production by immobilized *Streptomyces rimosus*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 34:235–242.
- Zandén C., Voinova M., Gold J., Mörsdorf D., Bernhardt I., Liu J. (2012) Surface characterisation of oxygen plasma treated electrospun polyurethane fibres and their interaction with red blood cells. *Eur. Polym. J.*, 48:472–482.
- Zhou H., Lawrence J.G., Bhaduri S.B. (2012) Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: A review. *Acta Biomater.*, 8:1999–2016.
- Żur J., Wojcieszńska D., Guzik U. (2016) Metabolic Responses of Bacterial Cells to Immobilization. *Molecules*, 21(7), 958.

## 2° Capitolo

### Analisi proteomica e bioinformatica per l'identificazione di possibili *cluster* genici per la sintesi di composti bioattivi in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125

#### 2.1 Introduzione

##### 2.1.1 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125: un organismo modello per i batteri psicrofili

*P. haloplanktis* TAC125 è un batterio marino psicrofilo antartico con una morfologia bastoncellare ricurva, dalle dimensioni comprese fra 1,5 e 3,0  $\mu\text{m}$ , dotato di motilità grazie alla presenza di un flagello. È un Gram-negativo appartenente al phylum Proteobacteria ed alla classe dei Gamma-proteobacteria. Le specie appartenenti al genere *Pseudoalteromonas* originariamente facevano parte del genere *Alteromonas* ma sono state successivamente riclassificate come *Pseudoalteromonas*, sulla base dell'analisi delle sequenze 16S rRNA (Gauthier *et al.*, 1995). *P. haloplanktis* TAC125 (*PhTAC125*) è stato isolato da un campione d'acqua di mare costiero antartico prelevato nella zona della Base francese Dumont d'Urville, Terre Adélie (66°40' lat. S; 140°01' long. E), Stazione scientifica permanente lungo la costa orientale dell'Antartide (Gauthier *et al.*, 1995). Come è noto l'ambiente marino antartico è caratterizzato da un clima rigido con temperature costanti che raramente superano 0 °C ma ciò nonostante è un ambiente in grado di ospitare molte forme di vita ed in particolare un'ampia varietà di microrganismi. La popolazione batterica che abita le aree costiere antartiche appartiene soprattutto ai generi *Flexibacter*, *Bacteroides* e *Cytophaga* e di alfa- e gamma-proteobatteri (Bowman *et al.*, 1997) con una maggiore rappresentatività (più del 50%) dei batteri isolati ed identificati in tale contesto appartenenti ai gamma-proteobatteri (Brinkmeyer *et al.*, 2003). Ciò lascia dunque presumere che tali batteri eterotrofi in questo ambiente estremo giochino un ruolo chiave nel ciclo biogeochimico del carbonio. In particolare un numero consistente di batteri isolati in tali aree geografiche è rappresentato da *PhTAC125* che è divenuto così un organismo modello nello studio dell'adattamento dei batteri psicrofili alla vita alle basse temperature ed in particolare per la caratterizzazione di una serie di proteine che hanno consentito tale adattamento.

Il genoma di *PhTAC125* è stato sequenziato (Médigue *et al.*, 2005). Come molti proteobatteri marini, è costituito da due cromosomi circolari. Le sequenze codificanti rappresentano l'88,6% delle sequenze del cromosoma I e l'87,3% del cromosoma II. Il sequenziamento del genoma di *PhTAC125* ha rivelato 9 *cluster* per rRNA e un gran numero di geni per tRNA (106 geni). Si ipotizza che il grande numero di geni codificanti rRNA e tRNA possa contribuire all'adattamento dei batteri psicrofili al freddo e sostenere la crescita rapida dell'organismo in tali condizioni. Recentemente, tuttavia, è stato suggerito che un alto numero di geni per rRNA rifletta una strategia ecologica dei batteri per rispondere meglio alle perturbazioni ambientali legate alle risorse nutrizionali (Klappenbach *et al.*, 2000). Dall'analisi del sequenziamento del genoma del ceppo *PhTAC125* sono quindi emersi aspetti genomici peculiari messi in relazione con delle caratteristiche



metaboliche come l'adattamento a variazioni periodiche nell'abbondanza di nutrienti (Médigue *et al.*, 2005). Partendo dunque dall'analisi genomica, l'attenzione è stata rivolta allo studio delle molecole biologiche e dei *pathway* molecolari in grado di conferire questa straordinaria capacità di crescita in tali condizioni estremamente selettive. Questo microrganismo è così divenuto un valido modello di studio dell'adattamento al freddo ed un sistema alternativo per l'overespressione di proteine eterologhe in grado di conferire una eccezionale capacità di crescita rapida alle basse temperature (Duilio *et al.*, 2004; Cusano *et al.*, 2006; Wilmes *et al.*, 2010; Ripa *et al.*, 2012; Corchero *et al.*, 2013). Una prima analisi proteomica ha condotto all'identificazione di una serie di enzimi che hanno mostrato, come atteso, un'intensa attività catalitica alle basse temperature e con una bassa energia di attivazione rispetto alle controparti dei ceppi mesofili e termofili (Marx *et al.*, 2007). La disponibilità di tali informazioni di partenza ed un crescente interesse rivolto alla sempre più approfondita conoscenza delle caratteristiche molecolari e metaboliche ha permesso, nel corso dell'ultimo decennio, una più ampia analisi della fisiologia cellulare di questo ceppo batterico. Uno studio (Piette *et al.*, 2011) ha permesso di evidenziare che processi cellulari quali la sintesi proteica, il folding delle proteine, il mantenimento dell'integrità della membrana e processi coinvolti nelle attività antiossidanti in *PhTAC125* sono regolati positivamente a 4 °C. Inoltre è stato messo in evidenza che la velocità di divisione cellulare di questo ceppo batterico alla temperatura di 16 °C è più di tre volte quella di *Escherichia coli* sottoposto a condizioni di crescita simili. La versatilità dell'ospite è stata ampiamente utilizzata per la creazione di ceppi geneticamente ingegnerizzati ai fini del miglioramento della produzione di proteine (Parrilli *et al.*, 2008; Giuliani *et al.*, 2012; Ripa *et al.*, 2012). Si è cercato quindi di utilizzare questo ceppo come ospite per l'espressione di proteine indirizzate verso specifici compartimenti cellulari, ed in particolare per l'espressione sulla membrana plasmatica di frammenti anticorpali a singola catena (Giuliani *et al.*, 2014), o ancora per l'espressione di proteine di secrezione (Parrilli *et al.*, 2008). È stata anche utilizzata la capacità di questo ceppo batterico di resistere alle specie reattive dell'ossigeno (Parrilli *et al.*, 2010). La versatilità di questo microrganismo ha suggerito molti spunti applicativi tanto da essere ampiamente utilizzato nei più svariati ambiti biotecnologici divenendo un microrganismo di elezione. Infatti, un'applicazione interessante è l'impiego di *PhTAC125* nell'ambito della bioremediation (Papa *et al.*, 2008; Parrilli *et al.*, 2010). Tuttavia sussiste la necessità di implementare ulteriormente le conoscenze dei processi metabolici e fisiologici di questo microrganismo al fine di migliorare le attuali possibilità applicative ed ampliarle ulteriormente.

### 2.1.2 Analisi di modelli teorici di crescita di *PhTAC125*

Il batterio antartico *P. haloplanktis* TAC125 è stato isolato da un campione d'acqua marina prelevato da un contesto ambientale caratterizzato da freddo perenne. Esso è in grado di crescere in un'ampia gamma di temperature (dai 4 °C ai 25 °C) ed a 20 °C si registra la sua minore velocità di divisione cellulare. Purtroppo le conoscenze del metabolismo di crescita alle basse temperature sono ancora largamente da approfondire. Potrebbero infatti rivelare funzionalità biologicamente rilevanti, come ad esempio il ruolo del riscaldamento

globale sulla vita dei microrganismi negli oceani antartici. Capire l'influenza delle perturbazioni esterne sui parametri di crescita di questo microrganismo potrebbe ampliare gli orizzonti applicativi. La variazione di temperatura rappresenta il più evidente e diretto parametro che regola la crescita di *PhTAC125*. Sono stati adottati approcci *in silico* volti a simulare reazioni chimiche che all'interno della cellula avvengono in risposta a variazioni di temperatura al fine di valutare gli effetti di tale perturbazione esterna sulle regolazioni metaboliche (Fondi *et al.*, 2015). È stata condotta un'analisi del bilancio di flusso (Flux Balance Analysis, FBA) al fine di creare dei modelli predittivi sui *pathway* metabolici per ottenere così un panorama globale delle reazioni cellulari in condizione di massima crescita batterica. Il modello basato sul genoma, denominato iMF721, così costruito, contiene informazioni su 721 ORFs (20,7%). Con l'obiettivo di valutare i cambiamenti metabolici dipendenti dalle variazioni di temperatura, sono stati integrati due set di dati di abbondanza proteica ottenuti dopo la crescita a 4 °C e 18 °C rispettivamente. Da questo approccio è emersa una riduzione generale del metabolismo di *PhTAC125* in seguito alla riduzione della temperatura. Tuttavia un andamento opposto con il diminuire della temperatura si registra nel caso del metabolismo di degradazione degli amminoacidi, importanti fonti di carbonio, e del metabolismo di biosintesi degli acidi grassi (Fig. 2.1), che ricoprono un ruolo cruciale nel mantenimento della fluidità della membrana e della sua permeabilità.

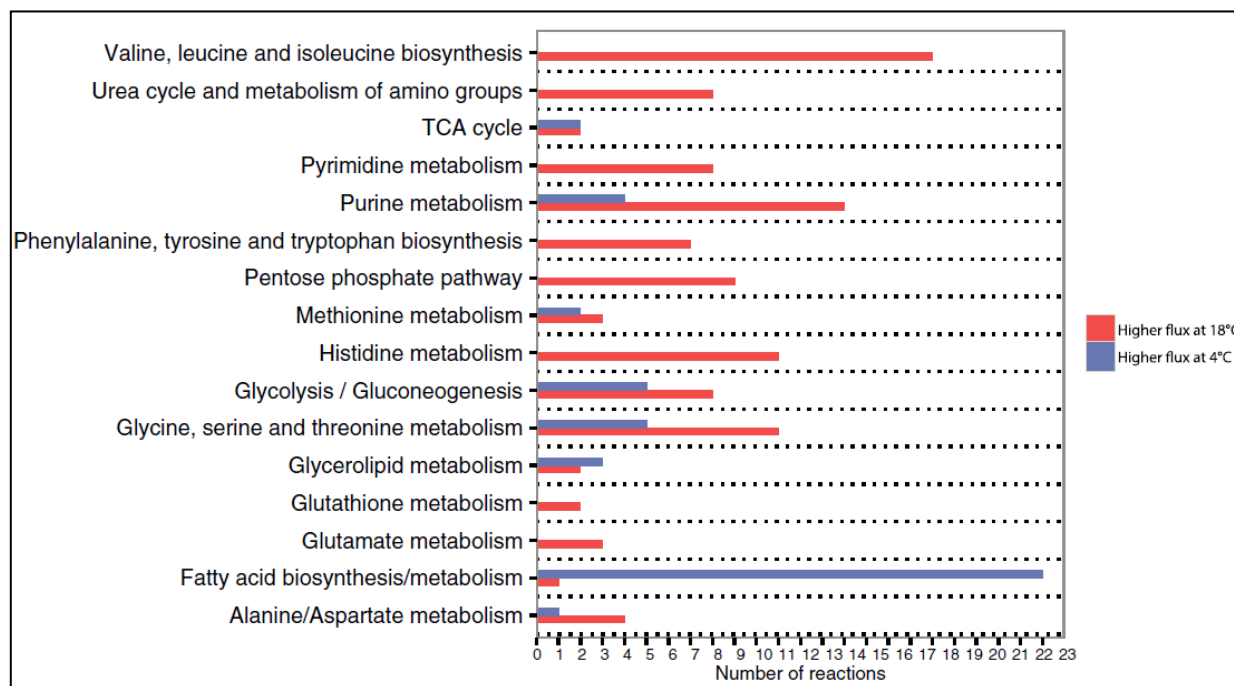


Figura 2.1 - Reazioni delle quali si registra un incremento (in blu) o un decremento (in rosso) a seguito della variazione di temperatura da 18 a 4 °C.

Con un approccio analogo di modellizzazione, è stata valutata l'influenza di diverse fonti di carbonio sulla crescita ed è stato modellizzato il metabolismo del batterio (Wilmes *et al.*, 2010).

### 2.1.3 Sintesi di composti bioattivi

Il genere *Pseudoalteromonas* è una fonte promettente di molecole bioattive tra cui antifungini, antibatterici, antimicotici ed agenti citotossici (Bowman, 2007). In particolare, recenti studi hanno prospettato la possibilità di utilizzare la loro capacità di sintesi di molecole volatili ad attività antibiotica per scopi farmaceutici. I composti organici volatili sintetizzati da microrganismi (mVOCs) appartengono a differenti classi chimiche come alcol, esteri, idrocarburi, terpeni, chetoni, composti contenenti zolfo e acidi carbossilici e derivano da differenti *pathway* biosintetici. Tipicamente sono molecole lipofile a basso peso molecolare (Fig. 2.2).

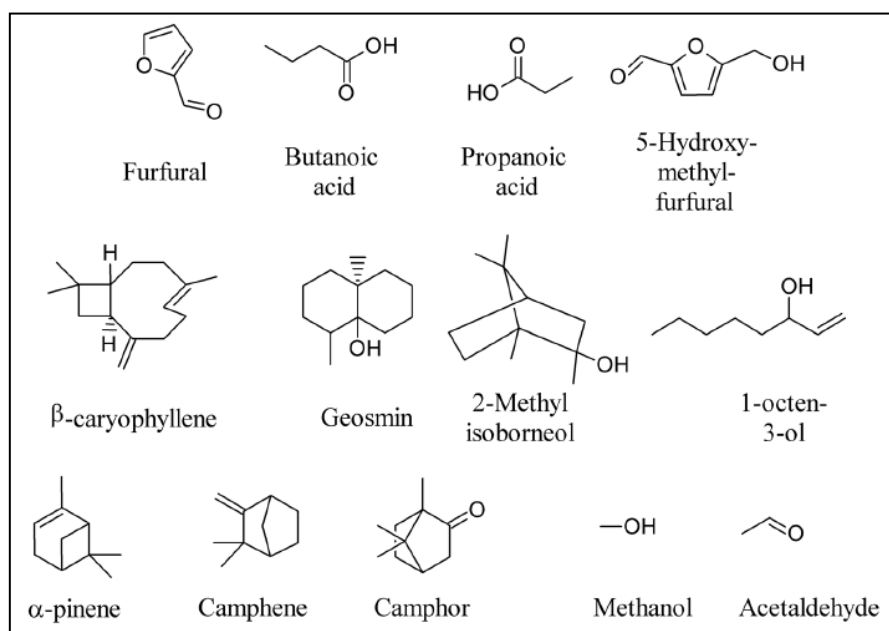


Figura 2.2 - Strutture dei più comuni mVOCs.

Uno studio (Parrilli *et al.*, 2009) ha indagato il meccanismo di secrezione di questi composti in *PhTAC125* mettendo in evidenza il ruolo svolto dal Sistema di Secrezione di Tipo II (T2SS), che nei batteri Gram-negativi è uno dei macchinari proteici di secrezione che permette la secrezione di proteine. In *PhTAC125* il T2SS è codificato da geni organizzati in un unico *cluster* genico (Fig. 2.3), localizzato nel cromosoma più grande.

In natura gli mVOCs sono responsabili nella comunicazione fra organismi diversi giocando un importante ruolo nell'interazione batteri-piante, batteri-funghi e batteri-batteri (Kanchiswamy *et al.*, 2015). Negli ultimi anni è cresciuto sempre più l'interesse nei confronti di questi composti, data la capacità di queste molecole di inibire la crescita di altri microrganismi. Gli mVOCs trovano applicazione in vari campi. Ad esempio, in agricoltura si sono rivelati come una valida ed ecosostenibile alternativa all'uso dei comuni pesticidi, fungicidi e battericidi, dimostrando di contribuire alla protezione delle piante dai patogeni, migliorando così la produzione. L'interesse nei confronti degli mVOCs riguarda soprattutto applicazioni in campo biomedico e farmacologico.

È noto, inoltre, che i batteri appartenenti al genere *Pseudoalteromonas* possiedono attività inibitoria contro la crescita del complesso batterico *Burkholderia cepacia* (Bcc) (Papaleo *et al.*, 2013), che è responsabile delle complicanze polmonari nella fibrosi cistica. La fibrosi cistica è una malattia genetica ereditaria dovuta ad una mutazione del gene codificante per la proteina CFTR che è coinvolta nella regolazione del flusso di ioni ed acqua attraverso la membrana plasmatica. I pazienti affetti da tale patologia sono soggetti all'insorgenza di bronchiti o broncopolmoniti ricorrenti, causate da infezioni batteriche croniche, con il progressivo deterioramento della funzionalità respiratoria. L'aspettativa di vita dipende quindi dall'evoluzione di queste complicanze polmonari. Attualmente il trattamento delle infezioni respiratorie associate alla fibrosi cistica consiste nella somministrazione di antibiotici e, negli stati più avanzati della malattia, al possibile trapianto polmonare. Tuttavia, considerato che i microrganismi responsabili delle infezioni polmonari sviluppano una resistenza al trattamento con antibiotici, vi è un sempre maggiore interesse volto all'identificazione di nuovi composti con attività antibiotica. È in tale contesto che si inserisce il ruolo chiave dei batteri antartici nell'inibizione della crescita batterica del Bcc, attraverso la produzione di composti organici volatili. Tuttavia la produzione degli mVOCs è influenzata dalle condizioni di crescita, ed in particolare dalla presenza/assenza di ossigeno e dalla composizione del terreno di coltura. Per tale motivo è necessario conoscere le condizioni ottimali di crescita batterica al fine di incrementare la sintesi dei composti bioattivi ed ottenere migliori successi nella produzione industriale.

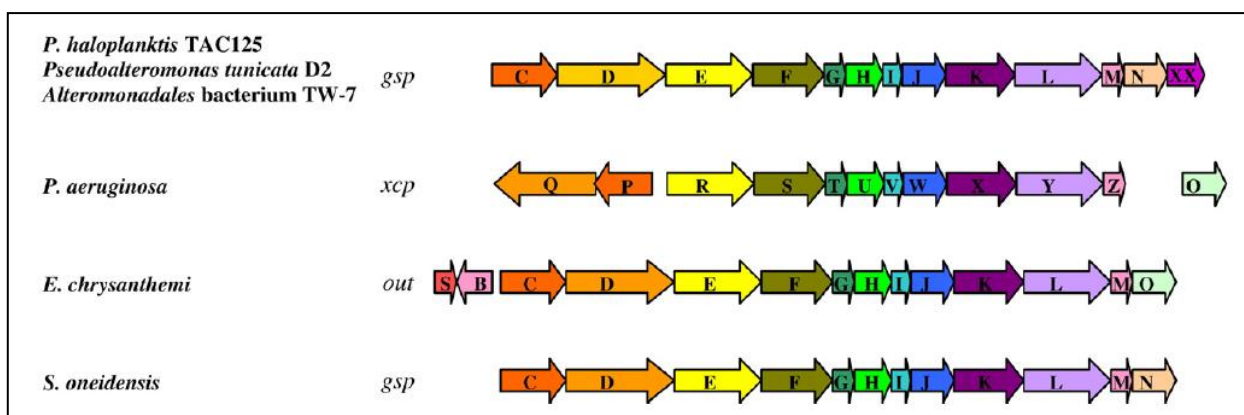


Figura 2.3 - Cluster genico del Sistema di Secrezione di Tipo II (T2SS) di *PhTAC125*. Sono anche rappresentati i cluster di altre specie batteriche, scelte per la stretta relazione filogenetica con *PhTAC125* (*S. oneidensis*) o perché hanno un sistema T2SS ampiamente caratterizzato.

Il ceppo *PhTAC125* produce molecole che inibiscono la formazione di biofilm di diversi stafilococchi (Papa *et al.*, 2013). La potente capacità inibitoria di questi composti è stata riscontrata soprattutto nei confronti dei ceppi di *Staphylococcus epidermidis*. Inoltre *PhTAC125* è in grado di produrre VOCs che interferiscono fortemente con la crescita del complesso batterico Bcc (Maida *et al.*, 2015). Questa sintesi può essere influenzata dai differenti mezzi di crescita in termini di quantità di ciascun mVOC prodotto. In particolare, per stabilire se l'inibizione fosse dovuta solamente alla produzione di mVOCs o ad una combinazione di molecole diffusibili e mVOCs sono state usate piastre Petri con o senza un setto centrale. Il



ceppo *PhTAC125* è stato inizialmente cresciuto per 4 giorni a 21 °C, quindi è stato strisciato in una metà di una piastra Petri, contenente TYP o MA, poi incubata a 21 °C per 4 giorni. I dati ottenuti dimostrano che, quando vengono utilizzate piastre Petri prive del setto centrale, la crescita dei ceppi bersaglio (Bcc) è inibita. In particolare, il più alto ed il più basso grado di inibizione del Bcc da parte di *PhTAC125* si riscontrano rispettivamente in TYP ed MA. Differenti risultati, invece, sono stati ottenuti utilizzando piastre Petri con un setto centrale. In questo caso, infatti, il mezzo di coltura in cui *PhTAC125* inibisce la crescita del Bcc è il TYP mentre, al contrario, sul mezzo MA non è in grado di inibire la crescita del target (Fig. 2.4).

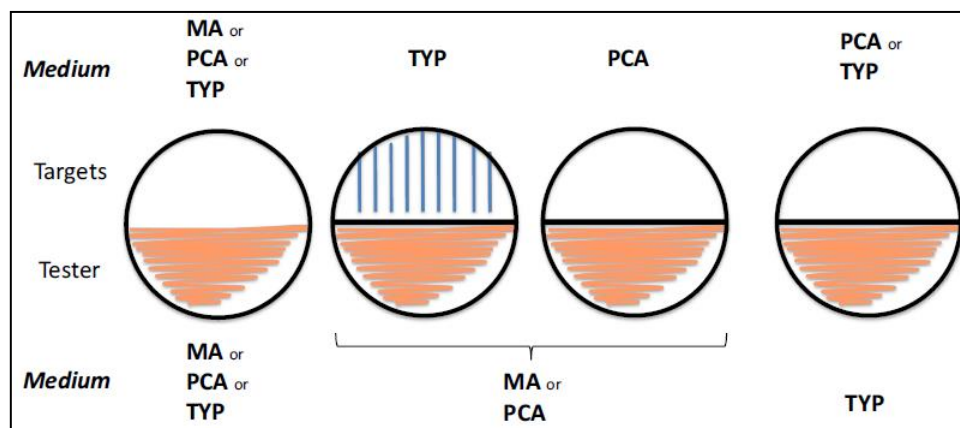


Figura 2.4 - Rappresentazione schematica dei risultati ottenuti utilizzando piastre Petri senza e con un setto centrale sull'inibizione della crescita del Bcc.

Quindi il ceppo *PhTAC125* è sicuramente in grado di produrre antibiotici diffusibili anti Bcc in terreno MA ed antibiotici mVOCs anti Bcc in terreno TYP. La natura di questi composti è attualmente in fase di studio.

#### 2.1.4 Analisi genomica dei *cluster* per la sintesi composti bioattivi

Molti microorganismi producono metaboliti secondari con proprietà di interesse farmacologico, come molecole ad attività antibiotica o antitumorale. Per decenni identificare e caratterizzare questi composti bioattivi è stato laborioso ed ha richiesto procedure con tempi lunghi. Il rapido incremento delle tecnologie volte al sequenziamento dell'intero genoma degli organismi ha permesso una più rapida identificazione di tali molecole bioattive, mediante l'ausilio di piattaforme bioinformatiche che, in parallelo con gli avanzamenti delle metodiche e tecnologie della chimica analitica, sono in grado di accelerare la caratterizzazione di questi composti. Approcci bioinformatici hanno portato all'individuazione di nuove molecole bioattive e ad una più approfondita caratterizzazione dei metaboliti secondari e dei processi molecolari implicati nella loro sintesi e nel loro rilascio. Gli approcci bioinformatici sono possibili principalmente per due motivi:

- la maggior parte delle molecole bioattive è sintetizzata attraverso reazioni catalizzate da Poliketide Synthase (PKS) o da Non Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) (Arias *et al.*, 2011) oppure sono

batteriocine, ossia proteine e peptidi sintetizzati per via ribosomale e suddivise in colicine e microcine, prodotte da batteri Gram-negativi (Yang *et al.*, 2014), e lantibiotici, che presentano residui di lantionina e/o metil-lantionina e sono prodotti da batteri Gram-positivi (Arias *et al.*, 2011);

- i geni deputati alla sintesi degli antibiotici sono raggruppati in grandi isole o *cluster*.

Pertanto gli strumenti bioinformatici di predizione dei *cluster* biosintetici si basano, in generale, sulla combinazione di metodi probabilistici basati sulle analisi di omologia di sequenza dei geni noti per la produzione di determinati metaboliti bioattivi. In questo modo possono venir definiti i) la funzione dei possibili geni biosintetici, ii) l'estensione del *cluster* genico e iii) la natura ed anche la struttura della molecola bioattiva. Una delle piattaforme più complete, in grado di mettere in risalto molecole polichetidiche, peptidi non ribosomali e batteriocine è Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell (antiSMASH) (Weber *et al.*, 2015) (Fig. 2.5).

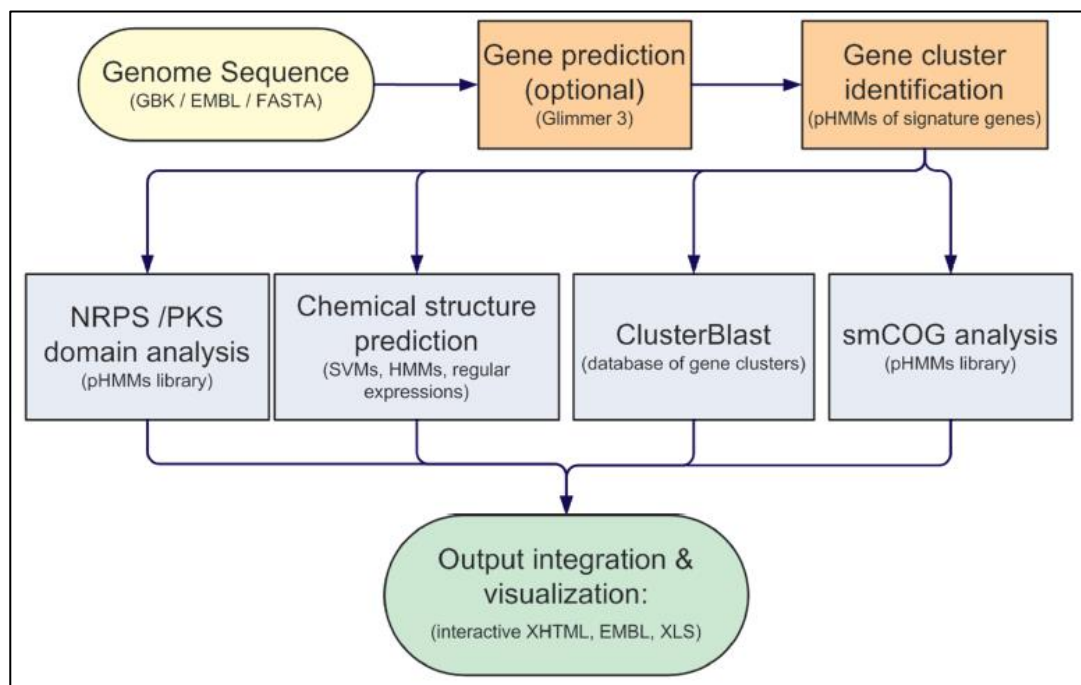


Figura 2.5 - Rappresentazione schematica di un'analisi antiSMASH per l'identificazione di *cluster* genici coinvolti nella sintesi di polichetidi, peptidi non ribosomali e batteriocine.

Le piattaforme bioinformatiche tuttora disponibili non sono ancora in grado di offrire strumenti predittivi per la biosintesi di mVOCs. Per identificare le specifiche vie biosintetiche occorre conoscerne la struttura chimica e risalire alle possibili reazioni biochimiche coinvolte nella formazione dei precursori e nelle successive modifiche attraverso l'interrogazione di database di vie metaboliche come KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) e BioCyC (<https://biocyc.org/>) (Bhatter *et al.*, 2017).



## 2.2 Scopo dell'attività di ricerca

Recenti studi condotti sui microrganismi antartici hanno prospettato la possibilità di utilizzare la loro capacità di sintesi di composti bioattivi (come molecole ad attività antibiotica) a fini farmaceutici. Il batterio antartico *Pseudoalteromonas sp.* TB41 produce dei composti organici volatili (mVOCs) interessanti (Romoli *et al.*, 2011) che come altri mVOCs prodotti da altri batteri comprendono composti di natura chimica differente le cui funzioni ecologiche e cellulari nei batteri produttori sono ancora da chiarire (Claeson 2006; Humphris *et al.*, 2002). Tuttavia, gli mVOCs di *Pseudoalteromonas sp.* TB41 inibiscono in maniera peculiare la crescita del complesso batterico *Burkholderia cepacia* che è responsabile della fibrosi cistica (Romoli *et al.*, 2011).

Il batterio antartico *P. haloplanktis* TAC125, utilizzato come modello per lo studio dei meccanismi di adattamento alle basse temperature a livello molecolare, genetico e metabolico (Medigue *et al.*, 2005; Piette *et al.*, 2010; Fondi *et al.*, 2015), produce molecole che inibiscono la formazione di biofilm di diversi stafilococchi (Papa *et al.*, 2013). *P. haloplanktis* TAC125 sintetizza molecole bioattive diffusibili e volatili in grado di inibire la crescita del Bcc, in dipendenza dalle condizioni sperimentali.

La fermentazione microbiologica, sfruttata per produrre molecole bioattive a livello industriale, implica uno studio dettagliato della fisiologia del ceppo per l'ottimizzazione della produzione. Di recente, la costituzione di consorzi di laboratori ha permesso approcci più sistematici e razionali rispetto quelli empirici basati principalmente sulla variazione della composizione del mezzo di coltura (Gallo, 2013). In particolare, l'avvento delle tecnologie "-omiche" ha cambiato l'approccio investigativo ed ha accelerato i tempi di studio per ottenere le risposte desiderate. La proteomica è lo strumento più informativo fra le "-omiche", poiché può dare risposte inerenti la regolazione dei livelli di abbondanza dei prodotti genici, le loro modifiche post-traduzionali, le interazioni e distribuzione topologica. Inoltre, il raggruppamento funzionale delle proteine può fornire un quadro sulle vie biochimiche e sui processi cellulari che avvengono come risposta cellulare ad una particolare condizione, fase di crescita o di perturbazione. Pertanto lo studio del proteoma può rivelare eventi molecolari o segnali metabolici che attivano o arrestano la produzione di molecole bioattive e le cascate dei regolatori che controllano i geni biosintetici.

In particolare, *P. haloplanktis* è capace di esercitare un'attività anti Bcc mediante la produzione di mVOCs soltanto se cresciuto su terreno TYP, mentre su terreno MA tale attività si verifica ugualmente ma solo attraverso molecole diffusibili. La natura di queste molecole non è stata ancora determinata. Tuttavia il potenziale biochimico e biosintetico del ceppo può essere studiato sulla base delle informazioni contenute nelle sequenze dei due cromosomi, cromosoma I e cromosoma II, che sono disponibili on line presso il database di NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), rispettivamente con identificativo NC\_007481.1 e NC\_007482.1. Partendo da tali premesse, lo scopo del presente lavoro è stato:

- condurre un'analisi bioinformatica sul genoma del ceppo per l'individuazione di vie metaboliche e possibili *cluster* genici associati alla sintesi di composti bioattivi;



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

- effettuare un'analisi proteomica, a partire da biomasse cresciute rispettivamente su terreno TYP e MA, al fine di individuare proteine differenzialmente abbondanti possibilmente correlate all'attività anti Bcc.

## 2.3 Risultati e Discussioni

### 2.3.1 Analisi antiSMASH

L'analisi mediante antiSMASH ha rivelato che *PhTAC125* possiede 14 *cluster* genici nel cromosoma I e 3 *cluster* genici nel cromosoma II per la sintesi di metaboliti biologicamente attivi (Fig. 2.6).

Identified secondary metabolite clusters				
Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster
The following clusters are from record NC_007481.1:				
Cluster 1	Cf_putative	416337	425598	Emulsan_biosynthetic_gene_cluster (9% of genes show similarity)
Cluster 2	Cf_putative	488463	492012	-
Cluster 3	Cf_putative	583881	595393	-
Cluster 4	Cf_putative	901610	915241	-
Cluster 5	Cf_putative	919218	939889	-
Cluster 6	Bacteriocin	1238082	1248939	-
Cluster 7	Cf_fatty_acid	1437261	1459168	Xenoclyoins_biosynthetic_gene_cluster (37% of genes show similarity)
Cluster 8	Cf_putative	1526099	1540158	-
Cluster 9	Cf_putative	1668649	1675923	-
Cluster 10	Cf_fatty_acid	1885511	1906749	-
Cluster 11	Cf_fatty_acid	2192719	2213930	Alterochromides_biosynthetic_gene_cluster (9% of genes show similarity)
Cluster 12	Cf_putative	2249030	2262575	-
Cluster 13	Cf_putative	2270745	2281801	-
Cluster 14	Cf_putative	2455167	2461170	-
Identified secondary metabolite clusters				
Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster
The following clusters are from record NC_007482.1:				
Cluster 1	Cf_fatty_acid	345034	366113	-
Cluster 2	Arylpolyene	443864	487450	APE_Vf_biosynthetic_gene_cluster (40% of genes show similarity)
Cluster 3	Cf_putative	513908	519903	-

Figura 2.6 - Analisi antiSMASH del cromosoma I (NC\_007481.1) e II (NC\_007482.1).

In particolare, tra i *cluster* genici identificati, 4 hanno similarità con *cluster* genici che sintetizzano prodotti noti quali Emulsan, Xenoclyoins, Alterochromides e Arylpolyene. Emulsan è un polisaccaride acilato ad alto peso molecolare (Mnif and Ghribi, 2015), Xenoclyoins è una molecola con attività insetticida (Proschak *et al.*, 2014) e Alterochromides è un lipopeptide (Ross *et al.*, 2015). Gli Aril polieni sono invece una classe di pigmenti, strutturalmente simili ai carotenoidi, con un ruolo nella protezione dalle specie reattive dell'ossigeno (Schöner *et al.*, 2016). Un *cluster* genico (il numero 6) sarebbe invece responsabile della sintesi di una batteriocina non ancora caratterizzata.

### 2.3.2 Analisi proteomica differenziale di *PhTAC125*

La capacità del ceppo antartico *P. haloplanktis* TAC125 di sintetizzare composti organici volatili ad attività antibatterica in grado di inibire la crescita del complesso Bcc è stata correlata alle diverse condizioni

di crescita, ed in particolare al terreno utilizzato per la crescita batterica, come è stato precedentemente descritto in questo lavoro. È stata condotta un'analisi proteomica differenziale sulle proteine totali, estratte dalle biomasse ottenute da replicati biologici, di *PhTAC125* cresciuto su due differenti terreni agarizzati (TYP/MA) per mezzo di un'analisi 2D-DIGE seguita dalla spettrometria di massa, al fine di identificare le proteine differenzialmente espresse alle due diverse condizioni di crescita. L'analisi proteomica comparativa per la valutazione delle differenze in termini di abbondanza proteica è infatti indispensabile al fine di evidenziare meccanismi molecolari e vie metaboliche associate alla sintesi di mVOCs con lo scopo ultimo di migliorare le capacità di sintesi del ceppo e dunque la resa di tali composti organici utili all'inibizione di cellule del Bcc. L'analisi proteomica è stata condotta sulle proteine totali ottenute da sei pool di biomasse del ceppo cresciuto in TYP e MA dopo 96h di incubazione. Per l'IEF sono state usate strip IPG (GE Healthcare) di 18 cm con gradiente di pH non lineare compreso tra 3 e 10. È stato scelto un range di pH ampio per includere nell'analisi più proteine possibili. Tale gradiente è stato scelto in accordo con un precedente studio sul proteoma di *PhTAC125* (Wilmes *et al.*, 2011) ed anche in accordo con una mappa proteomica-2D virtuale basata sulle ORF predette (Hiller *et al.*, 2003) che ha evidenziato che molte proteine del ceppo hanno un punto isoelettrico (pI) compreso fra 3 e 10 (Fig. 2.7).

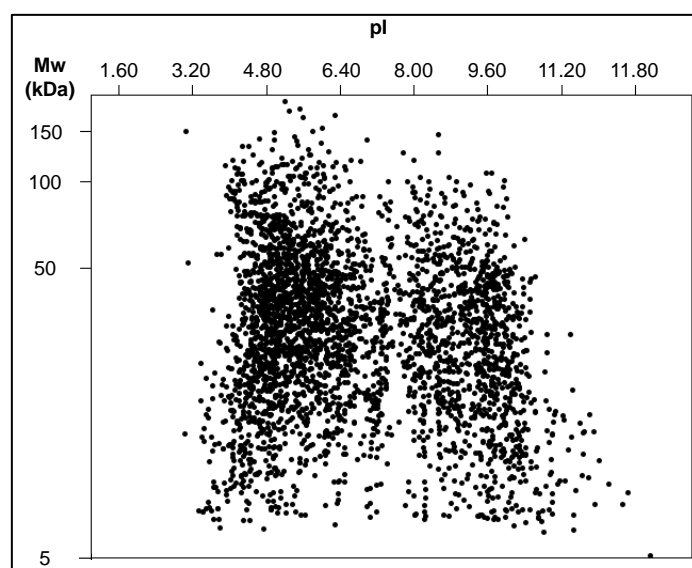


Figura 2.7 - Mappa proteomica-2D virtuale di *PhTAC125*.

Dopo essere state separate sulla base del pI (IEF), le proteine sono state separate in base al loro peso molecolare (Mw). Al termine di un'analisi 2D-PAGE si ottiene dunque un elettroferogramma delle proteine separate secondo i due criteri (Fig. 2.8). Ogni spot presente nell'elettroferogramma rappresenta una proteina che possiede come coordinate i valori di pI (asse X) e Mw (asse Y). Questi due valori sono determinati non solamente dalla struttura primaria delle proteine ma anche dalle modifiche post-traduzionali. Le immagini, tramite il programma ImageMaster 2D platinum 7.0, vengono sottoposte ad un'analisi dei profili globali di

espressione proteica sia in termini di presenza/assenza che in termini di abbondanza delle spot sulla mappa bidimensionale.

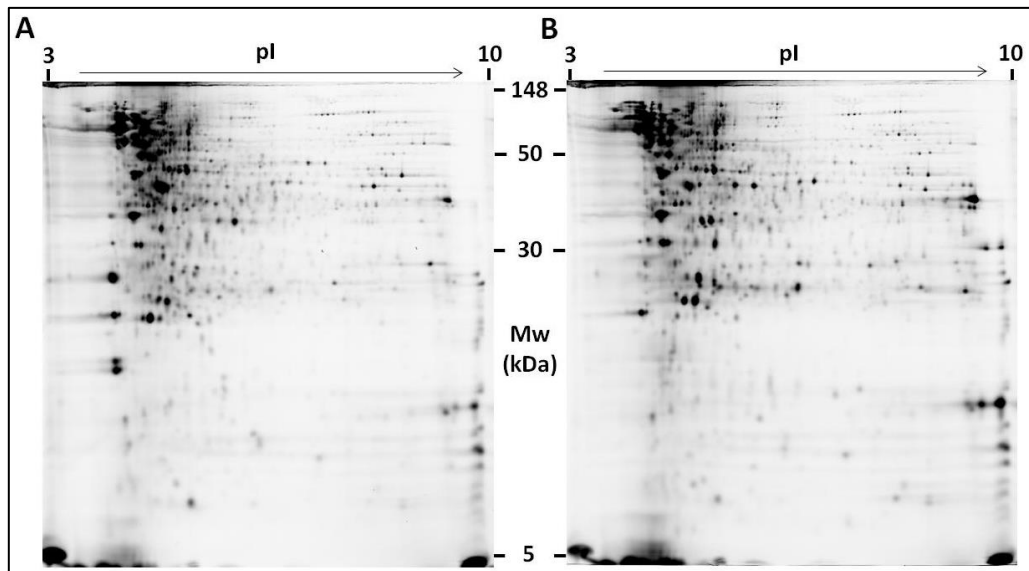


Figura 2.8 - Elettroferogrammi delle proteine di *PhTAC125* espresse in TYP (A) ed in MA (B).

L'analisi ha evidenziato un profilo differenziale di espressione per un totale di 103 spot (Fig. 2.9), ovvero proteine che risultano essere differenzialmente abbondanti in maniera statisticamente significativa di almeno 2 volte, calcolato come volume della spot mediante analisi ANOVA ( $P \leq 0,005$ ).

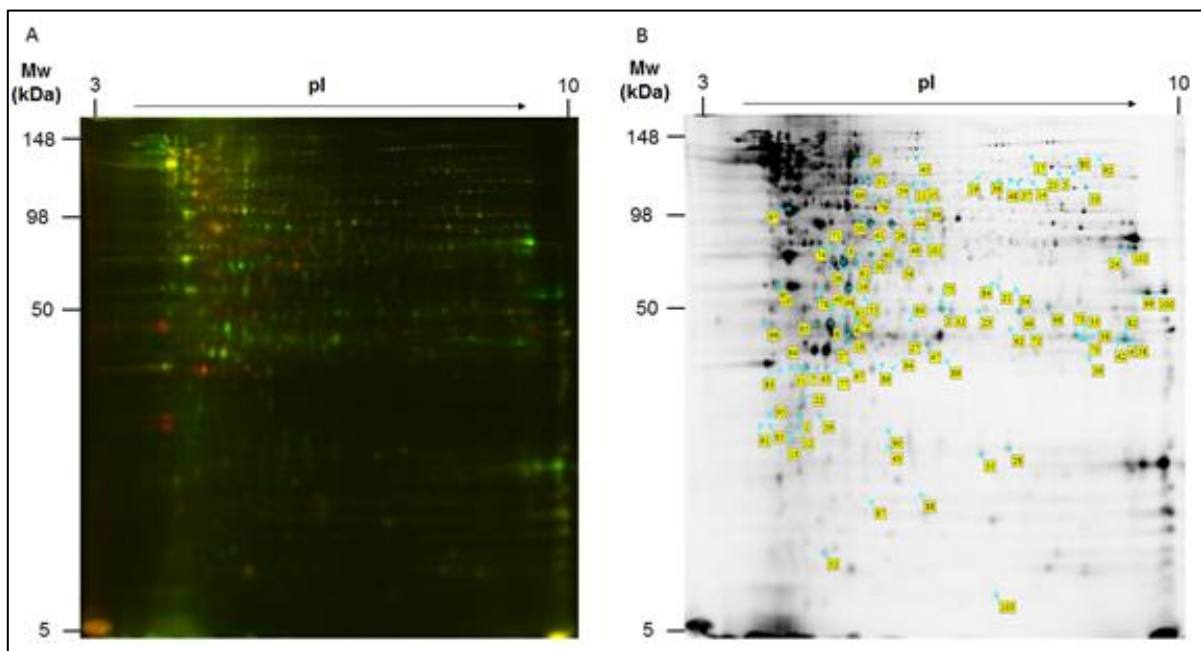


Figura 2.9 - Mappa 2D rappresentativa delle proteine differenzialmente abbondanti del ceppo *PhTAC125*. (A) Immagine ottenuta dal *merge* delle proteine estratte dal ceppo cresciuto in MA (in rosso) e TYP (in verde). (B) Elettroferogramma delle proteine di *PhTAC125* differenzialmente abbondanti.

Tramite *spot-picking* manuale sono state accuratamente prelevate 101 spot identificate mediante nLC-ESI-LIT-MS/MS. Le informazioni ottenute dall'analisi di spettrometria di massa sono state utilizzate per studi bioinformatici, mediante l'utilizzo delle informazioni contenute in banca dati, volti al raggruppamento delle proteine differenzialmente abbondanti in classi funzionali basate sul loro ruolo biologico. Ciò ha permesso di definire in quali processi molecolari e *pathway* metabolici sono coinvolte queste proteine differenzialmente espresse alle due diverse condizioni di crescita al fine di costruire mappe metaboliche che possano chiarire quali vie sono correlate con la sintesi di mVOCs.

### 2.3.3 Proteine differenzialmente abbondanti

Con l'ausilio della bioinformatica è stato possibile condurre un'analisi che ha permesso di attribuire un ruolo funzionale alle proteine. Delle 101 spot, 2 non sono state identificate mediante spettrometria di massa (spot 21 e 83). Delle 99 spot identificate, 36 risultano essere up-regolate e 63 down-regolate in TYP rispetto a MA.

Le proteine identificate sono state assegnate ad una classe funzionale sulla base del ruolo biologico. La funzione delle proteine identificate è stata associata mediante "protein BLAST" su NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ed ExpASY (<https://www.expasy.org/>). Dall'analisi bioinformatica è emerso che le proteine differenzialmente abbondanti appartengono alle seguenti classi funzionali: proteine implicate nel trasporto, proteine implicate nella sintesi proteica (costituenti strutturali del ribosoma), proteine implicate in diversi processi molecolari di regolazione (regolazione trascrizionale, risposta trasduzionale, risposta allo stress, folding delle proteine), proteine del metabolismo energetico, proteine del metabolismo energetico del carbonio, proteine del metabolismo amminoacidico, proteine coinvolte nella maturazione delle proteine, proteine coinvolte nel metabolismo di molecole antibiotiche, proteine non ancora caratterizzate e proteine non assegnate a nessuna delle precedenti classi funzionali, alle quali è stata assegnata una funzione putativa mediante comparazione con proteine ortologhe (altre) (Fig. 2.10) (Tab. 2.1).

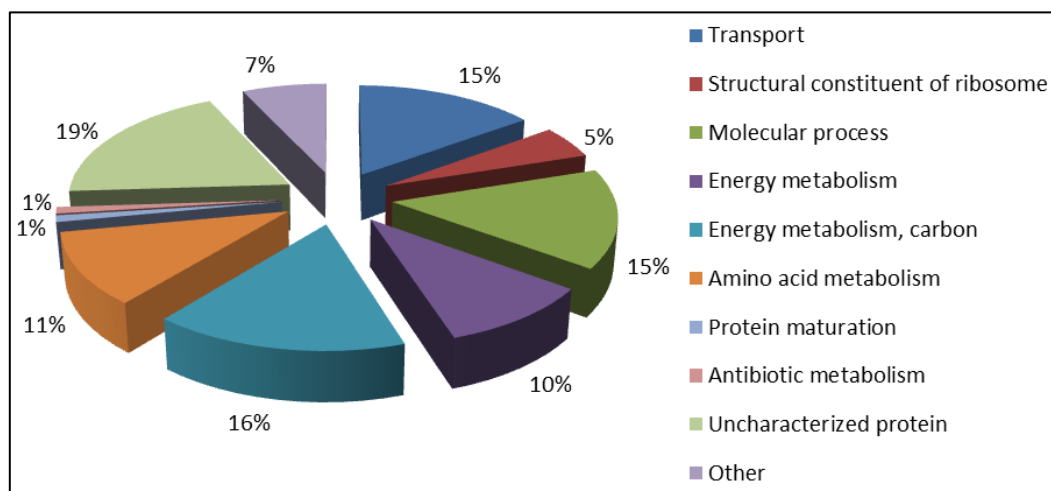


Figura 2.10 - Distribuzione in classi funzionali delle proteine differenzialmente abbondanti espresse dal ceppo *PhTAC125* cresciuto in MA e TYP.





STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

PROTEIN SPOT	PROTEIN DESCRIPTION	GENE NAME	LOCUS NAME	EXPRESSION VALUE TYP/MA	PROTEIN ACCESSION	Theoretical Mw (kDa)	Theoretical pI	FUNCTIONAL CLASS	METABOLIC PATHWAY/CELLULAR FUNCTION
2	Phosphate import ATP-binding protein PstB	pstB	PSHAa0311	-19.69	PSTB_PSEHT	30.862	5.74	Transport	ABC transporters
75	Phosphate import ATP-binding protein PstB	pstB	PSHAa0311	-6.05	PSTB_PSEHT	30.862	5.74	Transport	ABC transporters
34	Putative ATP-binding component of ABC transport system	PSHAa2297	PSHAa2297	-2.21	Q3IHV4_PSEHT	34.239	6.27	Transport	ABC transporters
99	Putative phosphate ABC transporter	PSHAa0599	PSHAa0599	-2.36	Q3ILL3_PSEHT	35.134	9.34	Transport	ABC transporters
100	Putative phosphate ABC transporter	PSHAa0599	PSHAa0599	-13.70	Q3ILL3_PSEHT	35.134	9.34	Transport	ABC transporters
42	Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LolD	lolD	PSHAa0599	-2.78	LOLD_PSEHT	24.981	8.53	Transport	ABC transporters
22	Required for outer membrane integrity, uptake of group A colicins, and translocation of phage DNA	pal	PSHAa1870	-2.83	Q3IJ17_PSEHT	19.902	5.17	Transport	
64	Required for outer membrane integrity, uptake of group A colicins, and translocation of phage DNA	pal	PSHAa1870	2.81	Q3IJ17_PSEHT	19.902	5.17	Transport	
95	Required for outer membrane integrity, uptake of group A colicins, and translocation of phage DNA	pal	PSHAa1870	3.79	Q3IJ17_PSEHT	19.902	5.17	Transport	
9	Putative Outer membrane porin	PSHAa2567	PSHAa2567	-4.17	Q3IG54_PSEHT	33.551	4.57	Transport	Porin
19	Putative TonB-dependent receptor protein	PSHAa2407	PSHAa2407	-2.05	Q3II68_PSEHT	76.929	6.13	Transport	
11	Uncharacterized protein	PSHAa1983	PSHAa1983	-2.41	Q3IIS7_PSEHT	66.919	6.08	Transport	
4	Uncharacterized protein	PSHAb0520	PSHAb0520	-10.63	Q3ICH3_PSEHT	28.082	9.15	Transport	Vesicle-mediated transport
58	Uncharacterized protein	PSHAb0520	PSHAb0520	-3.21	Q3ICH3_PSEHT	28.082	9.15	Transport	Vesicle-mediated transport
82	Uncharacterized protein	PSHAb0520	PSHAb0520	-4.41	Q3ICH3_PSEHT	28.082	9.15	Transport	Vesicle-mediated transport



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

68	30S ribosomal protein S2	rpsB	PSHAa2036	-2.24	RS2_PSEHT	26.827	6.61	Structural constituent of ribosome	Translation
27	30S ribosomal protein S4	rpsD	PSHAa2807	-2.08	RS4_PSEHT	23.526	9.9	Structural constituent of ribosome	Translation
38	30S ribosomal protein S4	rpsD	PSHAa2807	-2.80	RS4_PSEHT	23.526	9.9	Structural constituent of ribosome	Translation
70	30S ribosomal protein S4	rpsD	PSHAa2807	-2.28	RS4_PSEHT	23.526	9.9	Structural constituent of ribosome	Translation
88	50S ribosomal protein L19	rplS	PSHAa0947	2.46	RL19_PSEHT	13.321	10.49	Structural constituent of ribosome	Translation
30	Putative universal stress protein	uspE	PSHAa1851	-2.71	Q3IHG9_PSEHT	34.373	5.39	Molecular process	Stress response
59	Stress response DNA-binding protein Dps	dps	PSHAa2456	-2.24	Q3IFV3_PSEHT	18.919	5.02	Molecular process	Stress response
35	Small heat shock protein	ibpB	PSHAa0992	-2.86	Q3IJ58_PSEHT	16.549	6.08	Molecular process	Stress response
52	10 kDa chaperonin	groS	PSHAa0260	-5.16	CH10_PSEHT	10.275	5.19	Molecular process	Protein folding
16	Putative two-component response regulator	PSHAa2620	PSHAa2620	-3.63	Q3IFC4_PSEHT	33.108	5.3	Molecular process	Signal transduction systems
31	Uncharacterized protein	PSHAa1214	PSHAa1214	-3.37	Q3IKP5_PSEHT	73.860	5.34	Molecular process	Serine protein kinase
69	Uncharacterized protein	PSHAa1214	PSHAa1214	-2.33	Q3IKP5_PSEHT	73.860	5.34	Molecular process	Serine protein kinase
1	Ribosome-binding factor A	rbfA	PSHAa0998	-7.11	RBFA_PSEHT	18.702	4.62	Molecular process	Processing of 16S rRNA
47	Putative orphan protein	PSHAb0053	PSHAb0053	-2.57	Q3ICS7_PSEHT	24.577	5.69	Molecular process	tRNA (cmo5U34)-methyltransferase
45	DNA gyrase subunit B	gyrB	PSHAa0004	-2.32	Q3IDE7_PSEHT	90.905	5.6	Molecular process	DNA topoisomerase type II (ATP-hydrolyzing)
33	Putative transcriptional regulator, LuxR family	PSHAa2918	PSHAa2918	-3.48	Q3IJW5_PSEHT	24.954	7.71	Molecular process	Regulation of transcription
73	Putative transcriptional regulator, LuxR family	PSHAa2918	PSHAa2918	-2.35	Q3IJW5_PSEHT	24.954	7.71	Molecular process	Regulation of transcription



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

90	Elongation factor Tu 2	tuf2	PSHAa2911	2.00	EFTU2_PSEHT	43.425	4.95	Molecular process	Translation elongation factor, Protein biosynthesis
67	Uncharacterized protein	PSHAa1751	PSHAa1751	2.78	Q3IH76_PSEHT	22.712	5.22	Molecular process	Cellular response to oxidative stress
48	Uncharacterized protein	PSHAb0092	PSHAb0092	-2.43	Q3ICW3_PSEHT	63.730	6.21	Molecular process	Putative protein with acetate and butyrate kinase domain
62	Electron transfer flavoprotein beta-subunit (Beta-ETF) (Electron transfer flavoprotein small subunit) (ETFSS)	etfB	PSHAa1618	4.28	Q3IGU2_PSEHT	27.014	6.23	Energy metabolism	Electron carrier
72	Electron transfer flavoprotein beta-subunit (Beta-ETF) (Electron transfer flavoprotein small subunit) (ETFSS)	etfB	PSHAa1618	2.93	Q3IGU2_PSEHT	27.014	6.23	Energy metabolism	Electron carrier
93	Electron transfer flavoprotein beta-subunit (Beta-ETF) (Electron transfer flavoprotein small subunit) (ETFSS)	etfB	PSHAa1618	2.59	Q3IGU2_PSEHT	27.014	6.23	Energy metabolism	Electron carrier
7	Superoxide dismutase [Fe]	sodB	PSHAa1215	5.80	SODF_PSEHT	21.294	4.97	Energy metabolism	Superoxide dismutase
51	Superoxide dismutase [Fe]	sodB	PSHAa1215	6.26	SODF_PSEHT	21.294	4.97	Energy metabolism	Superoxide dismutase
63	Superoxide dismutase [Fe]	sodB	PSHAa1215	3.77	SODF_PSEHT	21.294	4.97	Energy metabolism	Superoxide dismutase
14	Uroporphyrinogen-III synthase HemD (N terminal)/Uroporphyrin-III C-methyltransferase (C terminal)	hemDX	PSHAa0099	-3.21	Q3IF71_PSEHT	68.317	6.54	Energy metabolism	Uroporphyrinogen III methyltransferase / synthase
37	Uroporphyrinogen-III synthase HemD (N terminal)/Uroporphyrin-III C-methyltransferase (C terminal)	hemDX	PSHAa0099	-2.10	Q3IF71_PSEHT	68.317	6.54	Energy metabolism	Uroporphyrinogen III methyltransferase / synthase
43	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	ribH	PSHAa2371	2.28	RISB_PSEHT	16.137	5.46	Energy metabolism	Riboflavin metabolism



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

28	Putative peroxiredoxin	bcpA	PSHAa1122	-2.58	Q3IKF6_PSEHT	18.189	6.21	Energy metabolism	Oxidoreductases
3	Transaldolase	talB	PSHAa2559	-7.10	Q3IG49_PSEHT	35.240	5.23	Energy metabolism, carbon	Pentose phosphate pathway
26	Transaldolase	talB	PSHAa2559	-4.53	Q3IG49_PSEHT	35.240	5.23	Energy metabolism, carbon	Pentose phosphate pathway
61	Transaldolase	talB	PSHAa2559	-2.35	Q3IG49_PSEHT	35.240	5.23	Energy metabolism, carbon	Pentose phosphate pathway
77	ATP synthase subunit delta	atpH	PSHAa3011	2.24	ATPD_PSEHT	19.084	5.3	Energy metabolism, carbon	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit delta
97	ATP synthase subunit beta	atpD	PSHAa3008	-2.62	ATPB_PSEHT	49.915	4.74	Energy metabolism, carbon	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit beta
44	Biotin carboxylase (A subunit of acetyl-CoA carboxylase)(ACC)	accC	PSHAa0266	-2.02	Q3IDS9_PSEHT	49.349	5.86	Energy metabolism, carbon	Biotin carboxylase
20	Pyruvate dehydrogenase E1 component	aceE	PSHAa0391	-2.70	Q3IIH8_PSEHT	99.690	5.29	Energy metabolism, carbon	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)
40	Malate dehydrogenase	mdh	PSHAa2658	2.47	MDH_PSEHT	32.014	4.97	Energy metabolism, carbon	L-malate dehydrogenase
56	Alcohol dehydrogenase, propanol-preferring	adhP	PSHAb0511	2.63	Q3ICG9_PSEHT	36.428	5.5	Energy metabolism, carbon	Alcohol dehydrogenase (NAD)
60	Citrate synthase	prpC	PSHAa1774	2.56	Q3IHA3_PSEHT	41.908	5.36	Energy metabolism, carbon	2-methylcitrate synthase
76	Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	PSHAa1457	PSHAa1457	2.84	Q3IGC9_PSEHT	28.476	5.27	Energy metabolism, carbon	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase
79	Fumarate hydratase class I	fumB	PSHAa1166	2.32	Q3IKJ3_PSEHT	55.223	5.49	Energy metabolism, carbon	Fumarate hydratase
81	Succinyl-CoA transferase, subunit A	PSHAa1447	PSHAa1447	2.27	Q3IGB3_PSEHT	25160	5.17	Energy metabolism, carbon	3-oxoacid CoA-transferase



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

101	3-ketoacyl-CoA thiolase	fadA	PSHAa0010	2.01	FADA_PSEHT	41.234	5.74	Energy metabolism, carbon	Acetyl-CoA C-acyltransferase
98	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	prs	PSHAa1054	-2.00	Q3IK99_PSEHT	34.497	5.25	Energy metabolism, carbon	5-phosphoribose 1-diphosphate biosynthetic process
17	Uncharacterized protein	PSHAa0709	PSHAa0709	-2.73	Q3IF79_PSEHT	100.678	6.57	Energy metabolism, carbon	Polysaccharide biosynthesis protein PelA
29	Periplasmic serine endoprotease	degQ	PSHAa2536	-3.72	Q3IG22_PSEHT	47.572	5.71	Amino acid metabolism	Serine-type endopeptidase
41	Periplasmic serine endoprotease	degQ	PSHAa2536	-2.93	Q3IG22_PSEHT	47.572	5.71	Amino acid metabolism	Serine-type endopeptidase
92	Uncharacterized protein	PSHAa2646	PSHAa2646	2.13	Q3IFE2_PSEHT	104.540	8.42	Amino acid metabolism	Serine-type peptidase
49	Acetylnornithine aminotransferase	argD	PSHAb0428	2.63	Q3IC89_PSEHT	43.302	5.61	Amino acid metabolism	Biosynthesis of amino acids
54	Putative cytosol aminopeptidase	PSHAa2388	PSHAa2388	3.39	Q3II36_PSEHT	55.116	5.68	Amino acid metabolism	Metalloexopeptidase, Glutathione metabolism
66	Putative cytosol aminopeptidase	PSHAa2388	PSHAa2388	2.50	Q3II36_PSEHT	55.116	5.68	Amino acid metabolism	Metalloexopeptidase, Glutathione metabolism
71	Leucine dehydrogenase	bcd	PSHAa1167	3.69	Q3IKJ2_PSEHT	44.509	5.36	Amino acid metabolism	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis / degradation
74	Leucine dehydrogenase	bcd	PSHAa1167	2.44	Q3IKJ2_PSEHT	44.509	5.36	Amino acid metabolism	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis / degradation
55	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	PSHAa1459	PSHAa1459	2.79	Q3IGC7_PSEHT	32.904	6.21	Amino acid metabolism	L-valine degradation
84	Putative glutathione S-transferase	PSHAb0103	PSHAb0103	2.43	Q3ICX8_PSEHT	36.883	6.07	Amino acid metabolism	Transferase
36	Uncharacterized protein	PSHAa1400	PSHAa1400	-2.25	Q3IL77_PSEHT	68.160	5.96	Amino acid metabolism	Metalloprotease
32	Methionine aminopeptidase (MAP) (Peptidase M)	map	PSHAa2037	-2.36	Q3IIZ8_PSEHT	29.160	5.76	Protein maturation	Methionine aminopeptidase; contains a divalent metal, usually cobalt
50	Putative enzyme for maturation of Microcin B17 and degradation of CcdA	pmbA	PSHAa2747	-2.19	Q3IJE3_PSEHT	47.778	5.34	Antibiotic metabolism	Metalloprotease



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

53	Uncharacterized protein	PSHAa1856	PSHAa1856	-2.11	Q3IHG4_PSEHT	64.548	8.5		Hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds
15	Uncharacterized protein	PSHAa2610	PSHAa2610	-2.23	Q3IFB2_PSEHT	68.880	6.49		
23	Uncharacterized protein	PSHAa0042	PSHAa0042	-2.99	Q3IF16_PSEHT	25.066	6.38		
46	Uncharacterized protein	PSHAa0042	PSHAa0042	-2.62	Q3IF16_PSEHT	25.066	6.38		
18	Uncharacterized protein	PSHAa1187	PSHAa1187	-3.84	Q3IKM2_PSEHT	28.866	5.63		
57	Uncharacterized protein	PSHAa1187	PSHAa1187	-2.28	Q3IKM2_PSEHT	28.866	5.63		
65	Uncharacterized protein	PSHAa1187	PSHAa1187	-3.44	Q3IKM2_PSEHT	28.866	5.63		
86	Uncharacterized protein	PSHAa1187	PSHAa1187	7.52	Q3IKM2_PSEHT	28.866	5.63		
89	Uncharacterized protein	PSHAa1187	PSHAa1187	2.43	Q3IKM2_PSEHT	28.866	5.63		
94	Uncharacterized protein	PSHAa1187	PSHAa1187	2.54	Q3IKM2_PSEHT	28.866	5.63		
5	Uncharacterized protein	PSHAa2683	PSHAa2683	-5.63	Q3IFJ3_PSEHT	76.039	7.96		
25	Uncharacterized protein	PSHAa2683	PSHAa2683	-2.87	Q3IFJ3_PSEHT	76.039	7.96		
80	Uncharacterized protein	PSHAa2683	PSHAa2683	-3.98	Q3IFJ3_PSEHT	76.039	7.96		
6	Uncharacterized protein	PSHAa1187	PSHAa1187	-5.21	Q3IKM2_PSEHT	28.866	5.63		
8	Uncharacterized protein	PSHAa1187	PSHAa1187	-5.45	Q3IKM2_PSEHT	28.866	5.63		
13	Uncharacterized protein	PSHAa1244	PSHAa1244	-3.97	Q3IKT5_PSEHT	20.508	5.5		
96	Uncharacterized protein	PSHAa1921	PSHAa1921	3.43	Q3IIM9_PSEHT	29.728	4.38		
102	Uncharacterized protein	PSHAa1643	PSHAa1643	-2.43	Q3IGW7_PSEHT	42.180	8.66		
91	Uncharacterized protein	PSHAa1244	PSHAa1244	5.53	Q3IKT5_PSEHT	20.508	5.5		
10	Putative orphan protein	PSHAa0397	PSHAa0397	-2.07	Q3IIH2_PSEHT	29.049	4.89		
24	Putative orphan protein	PSHAa2321	PSHAa2321	-2.36	Q3IHX9_PSEHT	39.713	8.27		
85	Putative orphan protein	PSHAb0241	PSHAb0241	15.58	Q3ID94_PSEHT	20.545	5.2		
87	Putative osmC-like protein	PSHAb0381	PSHAb0381	2.02	Q3IC34_PSEHT	14.240	5.33		
78	Putative orphan protein	PSHAa0397	PSHAa0397	1.99	Q3IIH2_PSEHT	29.049	4.89		
12	Putative orphan protein	PSHAb0241	PSHAb0241	-3.71	Q3ID94_PSEHT	20.545	5.2		

Tabella 2.1 - Proteine differenzialmente abbondanti di *PhTAC125* cresciuto in MA e TYP.

Per avere una visione di insieme delle proteine up- e down-regolate alle due diverse condizioni di crescita (TYP/MA), le proteine di ciascuna classe funzionale sono state suddivise in base al loro profilo di abbondanza (Fig. 2.11).

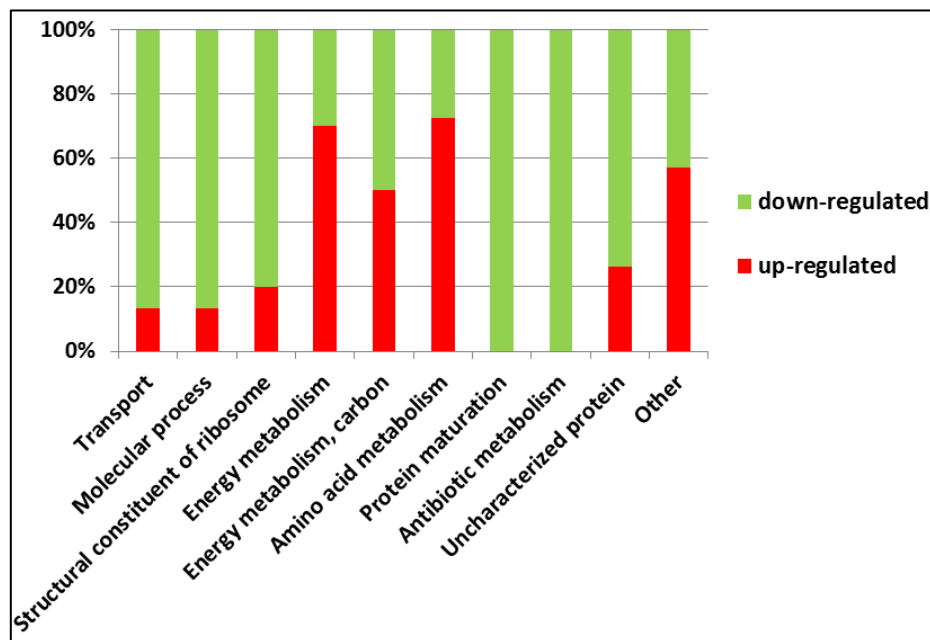


Figura 2.11 - Classi proteiche differenzialmente abbondanti del ceppo *PhTAC125* cresciuto in MA e TYP.

Questa analisi evidenzia come su terreno TYP vi sia un'up-regolazione di proteine del metabolismo energetico, del metabolismo amminoacidico e di proteine alle quali è stata assegnata una funzione putativa, che sono state classificate come "altre". Risultano invece down-regolate proteine implicate nel trasporto, proteine implicate nella sintesi proteica (costituenti strutturali del ribosoma), proteine implicate in diversi processi molecolari di regolazione, proteine coinvolte nella maturazione delle proteine, proteine coinvolte nel metabolismo di molecole antibiotiche e proteine non ancora caratterizzate.

Risulta invece una uguale distribuzione di proteine up- e down-regolate per quanto riguarda la classe funzionale delle proteine del metabolismo energetico del carbonio. Tuttavia, all'interno di questa classe sono up-regolate le proteine implicate in processi di utilizzazione del glucosio ed in particolare nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), come, ad esempio, la malato deidrogenasi (mdh), enzima che catalizza l'ultima reazione del ciclo dell'acido citrico, ossidando il malato ad ossalacetato. Invece, in questa classe funzionale, sono down-regolate soprattutto le proteine implicate nella via dei pentoso-fosfati come, ad esempio, la transaldolasi (talB).

### 2.3.4 Analisi genomica dei *pathway* mediante BioCyc

Eseguita l'analisi proteomica differenziale sulle proteine espresse dal ceppo *PhTAC125* cresciuto su due differenti terreni (TYP/MA) e valutate le differenze in termini di abbondanza proteica delle proteine espresse nelle due differenti condizioni di crescita, è stata eseguita un'analisi, condotta mediante BioCyc



(<https://biocyc.org/>), sul ruolo delle proteine up- e down-regolate e sui *pathway* che maggiormente sono perturbati nello *switch* da una condizione di crescita all'altra. Tale analisi è dunque in grado di fornire informazioni sui *pathway* metabolici che sono presumibilmente associati alla sintesi di composti bioattivi.

Dall'analisi è emerso che nel ceppo *PhTAC125* cresciuto su terreno TYP, rispetto a MA, vi è una up-regolazione di un gran numero di proteine coinvolte in processi di utilizzazione delle fonti di energia. In particolare risultano up-regolate proteine coinvolte nell'utilizzazione del glucosio implicate nella fermentazione del piruvato, come, ad esempio, la malato deidrogenasi (*mdh*), enzima del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). Significativa è anche l'up-regolazione dell'enoil-CoA idratasi/carnitina racemasi (PSHAa1457), proteina appartenente ad una superfamiglia di enzimi coinvolti nella fermentazione degli acidi grassi, e della proteina alcol deidrogenasi (*adhP*), che converte gli alcol in aldeidi o chetoni in numerosi processi metabolici. Queste ultime due proteine sono anche coinvolte in *pathway* metabolici di degradazione degli amminoacidi ed in particolare nel *pathway* di degradazione della L-valina. Dall'analisi è emersa l'up-regolazione di proteine coinvolte nel trasferimento degli elettroni, come ad esempio la *beta*-flavoproteina (*etfB*). Le proteine ETF sono funzionalmente classificate in due categorie: ETF *housekeeping*, coinvolte soprattutto nell'ossidazione degli acidi grassi, ed ETF prodotte da alcuni procarioti in specifiche condizioni di crescita, ovvero accettori di elettroni dall'ossidazione di specifici substrati. Sono up-regolate anche proteine coinvolte nella protezione dalle specie reattive dell'ossigeno, come la superossido dismutasi (*sodB*), implicata nella degradazione dei radicali superossidi, con un importante ruolo nella protezione dallo stress ossidativo.

Dall'analisi è invece emersa una down-regolazione della componente E1 della piruvato deidrogenasi (*aceE*), che catalizza la decarbossilazione ossidativa del piruvato ad acetil-coA, e della transaldolasi (*talB*), implicata nella via dei pentoso-fosfati. È emerso che i *pathway* metabolici che maggiormente risentono della condizione di crescita, e dunque dello *switch* da una condizione all'altra, sono *pathway* implicati nella protezione dalle specie reattive dell'ossigeno, nella degradazione del glicogeno e nella *beta*-ossidazione degli acidi grassi.

Sulla base dell'analisi proteomica condotta, nel presente lavoro è stata effettuata un'indagine, volta ad individuare quali proteine, tra quelle differenzialmente abbondanti nelle due diverse condizioni di crescita, sono codificate da geni appartenenti ai *cluster* genici per la sintesi di composti bioattivi. Quattro proteine (Tab. 2.2) sono risultate putativamente implicate nel metabolismo di composti bioattivi. Di queste, tre sono state associate a questa funzione mediante analisi antiSMASH ed una mediante NCBI. Due proteine (PSHAb0381 e PSHAb0428) sono implicate nel metabolismo degli Aril polieni e risultano up-regolate in TYP. Due proteine (PSHAa2747 e PSHAa1187) sono invece implicate nel metabolismo delle batteriocine, peptidi sintetizzati per via ribosomale con attività antibiotica. In particolare, PSHAa1187 è una proteina associata al sistema di trasporto TonB, coinvolto nel riconoscimento della microcina al livello della membrana esterna dei batteri Gram-negativi.





<b>Prodotti putativamente implicati nel metabolismo di composti bioattivi</b>	<b>Locus name</b>	<b>Metabolic pathway/cellular function</b>
Putative OsmC-like protein	PSHAb0381	Putative peroxiredoxin OsmC-like protein*
Acetylornithine aminotransferase	PSHAb0428	Ornithine biosynthesis*
Putative enzyme for maturation of Microcin B17 and degradation of CcdA	PSHAa2747	Peptidase
Uncharacterized protein	PSHAa1187	TonB transport system-associated periplasmic protein*

\*analisi antiSMASH

Tabella 2.2 - Proteine putative del ceppo *PhTAC125* implicate nel metabolismo di composti bioattivi.

Tale analisi antiSMASH, in relazione ai dati della proteomica svolta, ha consentito di comprendere quali proteine differenzialmente abbondanti possono essere ricondotte ai *cluster* genici di interesse.



## 2.4 Conclusioni

Gli ambienti estremi come l'Antartide offrono l'opportunità di indagare su un'ampia gamma di biodiversità microbica potenzialmente caratterizzata da capacità metaboliche - come la biosintesi di antibiotici - che rimangono ancora in gran parte da esplorare (Lo Giudice *et al.*, 2007; Biondi *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2009).

Il batterio *PhTAC125* è capace di sintetizzare molecole bioattive con attività antibiotica in grado di inibire la crescita del Bcc. Il presente studio è stato motivato dall'evidenza che il ceppo mostra capacità di sintesi di mVOCs soltanto se cresciuto a determinate condizioni sperimentali. Infatti su terreno di crescita TYP il ceppo produce composti volatili in grado di inibire il Bcc mentre su MA tale inibizione si verifica mediante produzione di molecole diffusibili. In questo lavoro è stata eseguita un'analisi proteomica differenziale, per mezzo della 2D-DIGE, delle proteine totali espresse da *PhTAC125* in TYP e MA, per comprendere quali proteine sono differenzialmente abbondanti alle due diverse condizioni di crescita. Le proteine sono poi state identificate mediante spettrometria di massa ed assegnate a diverse classi funzionali sulla base del ruolo biologico. È stato così possibile conoscere in quali *pathway* molecolari e metabolici sono implicate le proteine up- e down-regolate, e dunque quali *pathway* sono differenzialmente regolati alle due diverse condizioni di crescita. Dal presente studio è emerso che nel ceppo *PhTAC125* cresciuto su terreno TYP rispetto a MA vi è una up-regolazione di un gran numero di proteine coinvolte in processi di utilizzazione delle fonti di energia. In particolare risultano up-regolate proteine coinvolte nell'utilizzazione del glucosio, nella fermentazione degli acidi grassi e nella degradazione degli amminoacidi, in particolare del L-valina. Sono up-regolate anche proteine coinvolte nella protezione dalle specie reattive dell'ossigeno, implicate nella degradazione dei radicali superossidi, con un importante ruolo nella protezione dallo stress ossidativo. Da ciò è stato possibile dedurre che la condizione di crescita in cui il ceppo è in grado di produrre composti volatili con attività antibiotica è quella in cui il ceppo si trova a crescere in un terreno ricco di nutrienti ed in una condizione di stress ossidativo.

Mediante un'analisi antiSMASH, associata all'analisi proteomica svolta, è stato possibile individuare putative proteine implicate nel metabolismo di composti bioattivi. Due di queste proteine risultano implicate nel metabolismo degli Aril polieni e due proteine risultano invece implicate nel processamento delle microcine. Tuttavia, sebbene tale studio abbia permesso di individuare possibili candidati implicati nella sintesi di composti bioattivi, ulteriori analisi sono necessarie. Un'ulteriore interessante sviluppo del presente lavoro potrebbe infatti essere la manipolazione genica del ceppo al fine di ottenere mutanti per poter meglio chiarire il ruolo di questi composti nell'inibizione del Bcc. Nel presente lavoro non sono invece stati individuati prodotti putativi implicati nella sintesi di mVOCs. Al fine di comprendere meccanismi implicati nella sintesi di composti volatili anti Bcc sono necessarie ulteriori indagini ed approfondimenti. Ciò permetterà di predire l'effetto delle perturbazioni genetiche e/o ambientali (delezioni o over-espressioni geniche/substrati di crescita) sulla produzione degli mVOCs. Partendo da tale studio, è infatti auspicabile, in



STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUZIONE E LO SVILUPPO DI MOLECOLE  
AD ATTIVITÀ ANTIBIOTICA DI ORIGINE NATURALE O DI SINTESI CHIMICA

prospettiva futura, la costruzione di ceppi mutanti ed il disegno di terreni di crescita sempre più ottimizzati, con lo scopo di migliorare la produzione di molecole bioattive a livello industriale.



## 2.5 Materiali e Metodi

### Ceppi utilizzati

*Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125

### Buffers

#### Soluzioni usate per l'analisi 2D-Differential Gel Electrophoresis

- Washing solution: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 7 µg/ml pepstatina e 4 µg/ml benzamidina;
- IEF buffer: 7 M urea, 2 M Thiourea, 1 M Tris-HCl and 4 % w/v CHAPS;
- Equilibration buffer A: 6 M urea, 30 % v/v glycerol, 2 % w/v SDS, 0.05 M Tris-HCl pH 6,8 e 1% w/v DTE;
- Equilibration buffer B: 6 M urea, 30 % v/v glycerol, 2 % w/v SDS, 0.05 M Tris-HCl pH 6,8 e 1.25% w/v iodoacetamide;
- SDS electrophoresis buffer 10X: 250 mM Tris-HCl, 1,92 M glycine, SDS 1%.

### Preparazione generale

#### Metodo di estrazione delle proteine

Le proteine totali sono state estratte dalla biomassa dei campioni delle colture in triplicato per ogni condizione sperimentale come descritto da Palazzotto *et al.*, 2015. Per rimuovere le tracce di terreno di crescita, le biomasse sono state risospese in 1 ml di soluzione di lavaggio e centrifugate tre volte a 4000 rpm per 10 min. Dopo la risospensione in soluzione di lavaggio contenente 0,3% SDS, il micelio è stato distrutto mediante sonicazione in ghiaccio (output control 4,  $4 \times 15$  s, Vibra Cell, USA). I campioni sono stati poi bolliti (5 min) e raffreddati in ghiaccio (15 min). Per eliminare DNA e RNA è stata aggiunta una mix di DNase (100 µg/ml) e RNasi (50 µg/ml) al lisato cellulare ed incubato in ghiaccio per 20 minuti. I detriti cellulari e le cellule non rotte sono state separate mediante centrifugazione a 15.000 g per 15 minuti a 4 °C.

Dopo la dialisi in acqua distillata a 4 °C, le proteine sono state sottoposte a precipitazione in acetone (3:1 v/v) o.n. a -20 °C per rimuovere metaboliti e pigmenti batterici solubilizzati. Successivamente le proteine sono state risospese nel tampone per l'isoelettrofocalizzazione (IEF) pH 8,4 e conservate a -80 °C fino all'uso. La concentrazione totale delle proteine è stata determinata mediante il saggio di Bradford. La qualità degli estratti proteici è stata valutata mediante gel di poliacrilammide al 12% (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE).



### **Determinazione della concentrazione delle proteine totali mediante Saggio di Bradford (Bradford 1976)**

La quantizzazione delle proteine totali estratte è stata condotta mediante l'utilizzo delle istruzioni e dei reagenti presenti nel kit Protein Determination Reagent (USB Corporation). I valori delle concentrazioni dei campioni proteici si ottengono sulla base di una curva di calibrazione costruita utilizzando concentrazioni nel range 5 - 120 µg di siero di albumina bovina (BSA).

### **SDS-PolyAcrylamide gel electrophoresis**

La separazione delle proteine su SDS-PAGE è stata eseguita con il sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell di BioRad, come descritto da Sambrook *et al.*, 1989. Sono state utilizzate lastre di vetro con distanziatore integrato di 0,75 mm e gel di risoluzione del 12 - 15% acrilammide. I gel di SDS-polyacrylamide sono stati colorati con Silver Blue Stain.

### **Marcatura delle proteine con CyDye**

I campioni proteici sono stati marcati per l'analisi 2D-DIGE utilizzando il kit minimal labelling CyDye™ DIGE (GE Healthcare, Svezia) secondo le raccomandazioni del produttore. In breve, la ricostituzione di CyDye è stata effettuata aggiungendo 5 µl di dimetilformammide anidra 99,8% (DMF) ad ogni fiale di 5 nmol di fluoroforo per preparare la soluzione stock. 50 µg di campioni proteici sono stati marcati con 400 pmol di CyDye in ghiaccio per 30 min. La reazione di marcatura è stata interrotta mediante aggiunta di 0,5 µl di lisina 10 mM. Due campioni per ogni condizione sono stati marcati utilizzando i fluorofori Cy3 o Cy5. Lo scambio di fluorofori è stato eseguito per eliminare la distorsione specifica del colorante. Inoltre, un pool di proteine standard, marcato con il fluoroforo Cy2, è stato generato combinando uguale quantità di campioni.

### **Isoelectric focusing (IEF)**

La metodica IEF consente di separare le proteine in base al loro punto isoelettrico (pI). Per l'IEF, la soluzione di reidratazione DeStreak (GE Healthcare) contenente un gradiente (IPG) 0,5% v/v di buffer (GE Healthcare) a pH immobilizzato e 20 mM DTT (Sigma Aldrich) è stato aggiunto a ciascuna miscela fino ad un volume finale di 340 µl. L'IEF è stata eseguita, come descritto in precedenza (Gallo *et al.*, 2010), utilizzando IPG-strips da 18 cm con un range di pH 3 - 10 non lineare (GE Healthcare) mediante un apparecchio Ettan IPGphor III (GE Healthcare) a specifici parametri di voltaggio (Tab. 2.3).

Dopo l'IEF, le strip IPG sono state incubate con un buffer di equilibratura (6 M urea, 30% v/v glicerolo, 2% w/v SDS e 0,05 M Tris-HCl pH 6,8) contenente 2% w/v di DTE per 10 min; i gruppi tiolici sono stati quindi bloccati da un'ulteriore incubazione con buffer di equilibratura contenente 2,5% w/v di iodoacetamide. Secondo il protocollo Laemmli, le proteine, dopo essere state separate in base al pH, sono state separate utilizzando SDS-PAGE al 12%, a 10 °C, mediante Ettan Dalt six (GE Healthcare), con un



settaggio di 40  $\mu$ A per gel e 110 V. I gel 2D sono stati acquisiti con uno scanner di immagini DIGE (GE Healthcare) per rilevare le proteine marcate con le cianine. La risoluzione delle immagini è stata eseguita con le seguenti impostazioni: pixel 100  $\mu$ m e 0,650; 0,680 e 0,550 secondi/pixel come tempo di esposizione per Cy2, Cy3, Cy5, rispettivamente.

Fase	Volt	Tempo in ore	Tipo di voltaggio
<i>Reidratazione</i>	_____	1:00	_____
<i>I</i>	30 V	10:00	<i>Step</i>
<i>II</i>	200 V	1:00	<i>Step</i>
<i>III</i>	300 V	0:30	<i>Step</i>
<i>IV</i>	3500 V	3:00	<i>Gradiente</i>
<i>V</i>	3500 V	1:00	<i>Step</i>
<i>VI</i>	8000 V	0:30	<i>Gradiente</i>

Tabella 2.3 - Programma IEF.

### Visualizzazione delle proteine ed analisi delle immagini

L'analisi differenziale dei gel è stata eseguita usando il software Image Master 2D Platinum 7.0 DIGE (GE Healthcare) secondo le istruzioni del produttore. Dopo essere state rilevate, le spot proteiche sono state successivamente accoppiate. L'analisi quantitativa viene realizzata ricavando il volume di ogni spot, calcolando come funzione integrale della densità ottica (O.D.) sull'area. In questo modo si può analizzare il differente grado di abbondanza tra *spot* che riflette il livello d'espressione proteica in un campione.

Per normalizzare i valori vengono usati i volumi relativi, ossia il volume di una singola *spot* dato come valore percentuale sul totale dei volumi di ogni *spot* e nell'analisi DIGE tale volume è poi ulteriormente normalizzato per il valore delle *spot* marcate con il Cy2. Per ottenere la migliore corrispondenza automatica del gel è necessario identificare almeno 50 punti di riferimento in ogni gel. I punti di riferimento sono stati scelti come gli stessi punti presenti in ciascun gel utilizzando come riferimento l'immagine standard interna. Per eseguire l'analisi quantitativa differenziale, è stata creata la cartella di classi che definisce una classe per ciascuna serie di gel. Confrontando le classi e quindi i gel all'interno di tali classi, è stata calcolata la variazione di espressione proteica tra i diversi campioni biologici. Le spot proteiche che mostravano una variazione di 1,5 volte nel volume della spot, con un valore ANOVA statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), sono state considerate differenzialmente abbondanti.

Per identificare le spot proteiche di interesse, è stata eseguita una raccolta manuale dai gel sviluppati con la colorazione argentica (Shevchenko A. *et al.*, 1996). In particolare, ogni gel è stato incubato con 250 ml di soluzione di fissaggio contenente metanolo, acido acetico ed acqua deionizzata (in rapporto 40:10:50) in agitatore orbitale per 30 min. Dopo questa fase sono stati eseguiti quattro lavaggi in acqua deionizzata.



Successivamente i gel sono stati sensibilizzati usando una soluzione di tiosolfato di sodio 0,08% (w/v) per 5 minuti e sciacquati con due lavaggi in acqua deionizzata. Quindi i gel sono stati incubati in una soluzione argentica 0,4% per 1 h a 4 °C. Dopo i gel sono stati sviluppati con una soluzione di formaldeide 0,04% (v/v) e di carbonato di sodio 2% (w/v).

### Identificazione proteica

Come riportato in precedenza, le spot proteiche sono state tagliate dai gel 2D, alchilate, digerite con tripsina ed identificate mediante la spettrometria di massa (Gallo *et al.*, 2010). In particolare, le miscele peptidiche sono state trattate con  $\mu$ Zip-TipC18 (Millipore, USA) usando 50% v/v acetonitrile/5% v/v acido formico come eluente prima dell'analisi nLC-ESI-LIT-MS/MS. La digestione mediante tripsina è stata analizzata usando uno spettrometro di massa LTQ XL (Thermo, USA) dotato di una sorgente di nanotrasmissione Proxeon collegata ad un EasynanoLC (Thermo, USA). Le miscele peptidiche sono state separate mediante una colonna Easy C18 (10 - 0,075 mm, 3  $\mu$ m) (Thermo, USA). Le fasi mobili erano 0.1% v/v acido formico acquoso (solvente A) e 0,1% v/v acido formico in acetonitrile (solvente B), con portata totale di 300 nL/min. Il gradiente lineare è stato avviato 20 minuti dopo il caricamento del campione; il solvente B è passato dal 5% al 35% in 15 minuti, dal 35% al 95% in 2 min. Gli spettri sono stati acquisiti in un range m/z 400-1800. L'acquisizione è stata controllata da una procedura di scansione di ioni valutando i dati sui tre ioni più abbondanti, consentendo l'esclusione dinamica (conteggio ripetuto 1 e durata di esclusione 60 s); la finestra di isolamento di massa e l'energia di collisione sono stati impostati a m/z 3 ed al 35%, rispettivamente.

La versione 2.2.06 del motore di ricerca MASCOT (Matrix Science, Regno Unito) è stata utilizzata per identificare le spot proteiche dal database NCBI contenente anche sequenze proteiche per *S. coelicolor*, utilizzando dati nLC-ESI-LIT-MS/MS. La ricerca nel database è stata eseguita scegliendo la tripsina come enzima proteolitico, con un valore massimo di mancato taglio di 2, riguardo la carbamidometilazione di Cys e l'ossidazione di Met come modificazione fissa e variabile, rispettivamente. I candidati con almeno 2 peptidi assegnati con un punteggio individuale MASCOT > 25, entrambi corrispondenti a P < 0,05 per un'identificazione significativa, sono stati ulteriormente valutati dal confronto con i loro valori di massa e pI, utilizzando i dati sperimentali ottenuti da 2D-DIGE.

I risultati dell'identificazione MS sono stati usati per eseguire uno studio di Gene Ontology. I *pathway* metabolici sono stati ricostruiti utilizzando i database di proteine KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).



## 2.6 Bibliografia

- Arias A., Craig M., Fickers P. (2011) Gram-positive antibiotic biosynthetic clusters: a review. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, Vol. 2, p 977-986.
- Bhattar P., Raman K., Janakiraman V. (2017) Elucidating the biosynthetic pathways of volatile organic compounds in *Mycobacterium tuberculosis* through a computational approach. *Mol Biosyst*, 13(4):750-755.
- Biondi N., Tredici M.R., Taton A., Wilmotte A., Hodgson D.A., Losi D., Marinelli F. (2008) Cyanobacteria from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactivities. *J Appl Microbiol*, Jul;105(1):105-15.
- Bowman J.P., McCammon S.A., Brown M.V., Nichols D.S., McMeekin T.A. (1997) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:3068–3078.
- Bowman J.P. (2007) Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs*, 5 (4), 220-241.
- Brinkmeyer R., Knittel K., Jürgens J., Weyland H., Amann R., Helmke E. (2003) Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:6610–6619.
- Claeson A.S. (2006) Volatile organic compounds from microorganisms. Umea University Medical Dissertation, New Series No. 1052.
- Corchero J.L., Gasser B., Resina D., Smith W., Parrilli E., Vázquez F., Abasolo I., Giuliani M., Jäntti J., Ferrer P., Saloheimo M., Mattanovich D., Schwartz S. Jr, Tutino M.L., Villaverde A. (2013) Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics. *Biotechnol Adv.*, 31:140–153.
- Cusano A.M., Parrilli E., Marino G., Tutino M.L. (2006) A novel genetic system for recombinant protein secretion in the Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Microb. Cell Fact.*, 5:40.
- Duilio A., Tutino M.L., Marino G. (2004) Recombinant protein production in Antarctic Gram-negative bacteria. *Methods Mol. Biol.*, 267:225–237.
- Fondi M., Maida I., Perrin E., Meller A., Mocali S., Parrilli E., Tutino M.L., Liò P., Fani R. (2015) Genome-scale metabolic reconstruction and constraint-based modelling of the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Environ Microbiol.*, Mar;17(3):751-66.
- Gallo G., Alduina R., Renzone G., Thykaer J., Bianco L., Eliasson-Lantz A., Scaloni A., Puglia A.M. (2010) Differential proteomic analysis highlights metabolic strategies associated with balhimycin production in *Amycolatopsis balhimycina* chemostat cultivations. *Microb Cell Fact.*, 9:95–95.





- Gallo G., Renzone G., Alduina R., Stegmann E., Weber T., Lantz AE., Thykaer J., Sangiorgi F., Scaloni A., Puglia AM. (2010) Differential proteomic analysis reveals novel links between primary metabolism and antibiotic production in *Amycolatopsis balhimycina*. *Proteomics*, 10:1336–1358.
- Gallo G. (2013) Coupling Proteomics and Fermentation Technology for the Improvement of Bioactive Molecule Production Yield in Actinomycetes. *Fermentation Technology*, 2:e118.
- Gauthier G., Gauthier M., Christen R. (1995) Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45:755–761.
- Giuliani M., Parrilli E., Pezzella C., Rippa V., Duilio A., Marino G., Tutino M.L. (2012) A novel strategy for the construction of genomic mutants of the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Methods Mol Biol*, 824:219–233.
- Giuliani M., Parrilli E., Sannino F., Apuzzo G.A., Marino G., Tutino M.A. (2014) Recombinant production of a single-chain antibody fragment in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98:4887–4895.
- Hiller K., Schobert M., Hundertmark C., Jahn D., Munch R. (2003) JVirGel: calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic Acids Research*, 3862–3865.
- Humphris S.N., Bruce A., Buultjens E., Wheatley R.E. (2002) The effects of volatile microbial secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. *FEMS Microbiol Lett*, May 7;210(2):215-9.
- Kanchiswamy C.N., Malnoy M., Maffei M.E. (2015) Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, 6:151.
- Klappenbach J.A., Dunbar J.M., Schmidt T.M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:1328–1333.
- Lo Giudice A., Brilli M., Bruni V., De Domenico M., Fani R., Michaud L. (2007) Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea). *FEMS Microbiol Ecol. Jun*;60(3):383-96.
- Lobry J.R., Louarn J.M. (2003) Polarisation of prokaryotic chromosomes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6:101–108.
- Maida I., Bosi E., Fondi M., Perrin E., Orlandini V., Papaleo M.C., Mengoni A., de Pascale D., Tutino M.L., Michaud L., Lo Giudice A., Fani R. (2015) Antimicrobial activity of *Pseudoalteromonas* strains isolated from the Ross Sea (Antarctica) versus Cystic Fibrosis opportunistic pathogens. *Hydrobiologia*, 761:443–457.
- Marx J.C., Collins T., D'Amico S., Feller G., Gerday C. (2007). Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms. *Mar. Biotechnol.*, (NY) 9:293–304.



- McLean M.J., Wolfe K.H., Devine K.M. (1998) Base composition skews, replication orientation, and gene orientation in 12 prokaryote genomes. *J. Mol. Evol.*, 47:691–696.
- Médigue C., Krin E., Pascal G., Barbe V., Bernsel A., Bertin P.N., Cheung F., Cruveiller S., D'Amico S., Duilio A., Fang G., Feller G., Ho C., Mangenot S., Marino G., Nilsson J., Parrilli E., Rocha E.P., Rouy Z., Sekowska A., Tutino M.L., Vallenet D., von Heijne G., Danchin A. (2005) Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res*, Oct;15(10):1325-35.
- Mnif I., Ghribi D. (2015) High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. *World J Microbiol Biotechnol*, (5):691-706.
- Okada K., Iida T., Kita-Tsukamoto K., Honda T. (2005) Vibrios commonly possess two chromosomes. *J. Bacteriol.*, 187: 752–757.
- Palazzotto E., Renzone G., Fontana P., Botta L., Scaloni A., Puglia A.M., Gallo G. (2015) Tryptophan promotes morphological and physiological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(23):10177-89.
- Papa R., Parrilli E., Sannia G. (2008) Engineered marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125: a promising micro-organism for the bioremediation of aromatic compounds. *Journal of Applied Microbiology*, ISSN 1364-5072.
- Papa R., Parrilli E., Sannino F., Barbato G., Tutino M.L., Artini M., Selan L. (2013) Anti-biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Res Microbiol*, Jun;164(5):450-6.
- Papaleo M.C., Romoli R., Bartolucci G., Maida I., Perrin E., Fondi M., Orlandini V., Mengoni A., Emiliani G., Tutino M.L., Parrilli E., de Pascale D., Michaud L., Lo Giudice A., Fani R. (2013) Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria. *N Biotechnol*, 30:824–838.
- Parrilli E., De Vizio D., Cirulli C., Tutino M.L. (2008) Development of an improved *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 strain for recombinant protein secretion at low temperature. *Microb Cell Fact*, 7:2.
- Parrilli E., Giuliani M., Tutino M.L. (2009) General Secretary Pathway from marine Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Marine Genomics*, 123–128.
- Parrilli E., Papa R., Tutino M.L., Sannia G. (2010) Engineering of a psychrophilic bacterium for the bioremediation of aromatic compounds. *Bioengineered Bugs*, 1:3, 213-216.
- Piette F., D'Amico S., Struvay C., Mazzucchelli G., Renaut J., Tutino M.L., Danchin A., Leprince P., Feller G. (2010) Proteomics of life at low temperatures: trigger factor is the primary chaperone in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Mol Microbiol.*, Apr;76(1):120-32.
- Piette F., D'Amico S., Mazzucchelli G., Danchin A., Leprince P., Feller G. (2011) Life in the Cold: a Proteomic Study of Cold-Repressed Proteins in the Antarctic Bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Applied and environmental microbiology*, 3881–3883.



- Proschak A., Zhou Q., Schöner T., Thanwisai A., Kresovic D., Dowling A., French-Constant R., Proschak E., Bode H.B. (2014) Biosynthesis of the insecticidal xenocyoins in *Xenorhabdus bovienii*. *Chembiochem.*, 15(3):369-72.
- Ripa V., Papa R., Giuliani M., Pezzella C., Parrilli E., Tutino M.L., Marino G., Duilio A. (2012) Regulated recombinant protein production in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Methods Mol Biol*, 824:203–218.
- Rojas J.L., Martín J., Tormo J.R., Vicente F., Brunati M., Ciciliato I., Losi D., Van Trappen S., Mergaert J., Swings J., Marinelli F., Genilloud O. (2009) Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites. *Mar Genomics*, Mar;2(1):33-41.
- Romoli R., Papaleo M.C., de Pascale D., Tutino M.L., Michaud L., Lo Giudice A., Fani R., Bartolucci G. (2011) Characterization of the volatile profile of Antarctic bacteria by using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, Oct;46(10):1051-9.
- Ross A.C., Gulland L.E., Dorrestein P.C., Moore B.S. (2015) Targeted capture and heterologous expression of the *Pseudoalteromonas alterochromide* gene cluster in *Escherichia coli* represents a promising natural product exploratory platform. *ACS Synth Biol.*, 4(4):414-20.
- Schöner T.A., Gassel S., Osawa A., Tobias N.J., Okuno Y., Sakakibara Y., Shindo K., Sandmann G., Bode H.B. (2016) Aryl Polyenes, a Highly Abundant Class of Bacterial Natural Products, Are Functionally Related to Antioxidative Carotenoids. *Chembiochem.*, 17(3):247-53.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.*;68(5):850-8.
- Weber T., Blin K., Duddela S., Krug D., Kim H.U., Brucoleri R., Lee S.Y., Fischbach M.A., Müller R., Wohlleben W., Breitling R., Takano E., Medema M.H. (2015) antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res*, 43(W1):W237-43.
- Wilmes B., Hartung A., Lalk M., Liebeke M., Schweder T., Neubauer P. (2010) Fed-batch process for the psychrotolerant marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Microb Cell Fact*, 9:72.
- Wilmes B., Kock H., Glagla S., Albrecht D., Voigt B., Markert S., Gardebrecht A., Bode R., Danchin A., Feller G., Hecker M., Schweder T. (2011) Cytoplasmic and Periplasmic Proteomic Signatures of Exponentially Growing Cells of the Psychrophilic Bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Applied and environmental microbiology.*, 1276–1283.
- Yang S.C., Lin C.H., Sung C.T., Fang J.Y. (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol*, 26;5:241.

## Capitolo 3

### Studio dell'attività biologica di nuove molecole di sintesi chimica

#### 3.1 Introduzione

##### 3.1.1 Uso dei sali di imidazolio di-cationici come molecole con attività antimicrobica ed antitumorale

La sintesi chimica sta emergendo come una potenziale strategia per sconfiggere ceppi batterici resistenti agli antibiotici correnti, infatti, circa il 50% di tutti i farmaci approvati per uso terapeutico negli ultimi venti anni è sintetizzato chimicamente. In effetti, l'uso di composti chimici nuovi potrebbe essere associato con nuovi meccanismi d'azione antibatterica che così aggirerebbero le strategie di resistenza più diffuse. Il numero esiguo di prodotti chimici di sintesi per uso terapeutico e con attività antibiotica, come ad esempio i chinoloni, sono destinati ad aumentare grazie ai progressi in chimica ed in chimica combinatoriale che permette di progettare molecole con specifici requisiti in termini di proprietà chimico-fisiche e, di conseguenza, anche biologiche (Newman *et al.*, 2016). Inoltre, essa potrebbe rappresentare un vantaggio significativo nella riduzione dei costi di produzione, offrendo un'ampia varietà di sistemi per testare ed aumentare la possibilità di individuare nuove specie attive.

I sali organici (OS) soddisfano tutti i criteri sopra elencati. La maggior parte di loro, noti anche come liquidi ionici (IL) (cioè sali con temperatura di fusione inferiore a 100 °C), sono stati considerati solventi ecologici alternativi a quelli organici convenzionali grazie alla loro bassa volatilità ed infiammabilità (Gorke *et al.*, 2010; Amde *et al.*, 2015). Essi mostrano interessanti proprietà chimico-fisiche, come la bassa corrosività e la capacità di comportarsi da lubrificanti, importanti per le applicazioni industriali. La loro ampia diffusione ha portato parallelamente un crescente interesse nei confronti della loro attività biologica (Cho *et al.*, 2016; Thamke and Kodam, 2016). Questo è il motivo per cui negli ultimi anni sono stati presi in considerazione i OS monocationici grazie alla loro attività antibatterica ed antiproliferativa (Alberto *et al.*, 2011; Coleman *et al.*, 2012). I dati finora riportati in letteratura hanno analizzato gli effetti derivati dalle strutture cationiche ed anioniche.

Come agenti antibatterici, agiscono principalmente come i sali quaternari di ammonio, quindi, agiscono sulla membrana cellulare dei batteri. In effetti, come conseguenza delle interazioni di Coulomb, sono in grado di interagire con le membrane cellulari ed, a seconda della loro idrofobicità, potrebbero attraversare le stesse e di conseguenza causare la rottura del doppio strato fosfolipidico (Riduan and Zhang, 2013; Zheng *et al.*, 2016).

Per quanto riguarda l'effetto citotossico, diversi studi hanno analizzato l'uso dei sali di imidazolio come agenti antitumorali. Tuttavia, essi sono stati impiegati principalmente come complessi metallici formati dai corrispondenti carbeni N-eterociclici (Mercesa e Albrecht, 2010) mentre il loro uso diretto è stato scarsamente investigato.



Dalle considerazioni di cui sopra, sembra evidente che la sintonizzazione delle proprietà chimico-fisiche dei OS, attraverso modifiche che coinvolgono la struttura del catione e/o la natura dell'anione rappresenta la chiave per ottenere nuovi composti attivi in campo biomedico.

Le proprietà chimico-fisiche di cui sopra possono essere monitorate ancora più efficacemente con i sali organici dicationici (DOS). Anzi, in questo caso, insieme con i cambiamenti strutturali del catione o dell'anione, si può agire anche a livello dello spaziatore interposto tra le teste ioniche (D'Anna and Noto, 2014). L'analisi delle proprietà chimico-fisiche dei DOS mostrano che le loro caratteristiche sono completamente diverse da quelle dei corrispondenti OS monocationici. Ad esempio, hanno spesso una più elevata stabilità termica ed una minore solubilità nei solventi organici convenzionali. Inoltre, recentemente sono stati presi in considerazione, grazie al loro basso peso molecolare come gelator per l'ottenimento di fasi gel con potenziali applicazioni sia biomediche che ambientali (D'Anna *et al.*, 2014; Rizzo *et al.*, 2014). Di conseguenza, potrebbe essere interessante avere informazioni sulla loro attività antimicrobica ed antiproliferativa. Di recente, parecchi studi si stanno occupando delle attività antibatteriche ed antiproliferative dei sali di imidazolio prendendo in esame l'attività biologica di sali di di- o, anche, di poli-imidazolio (Rajakumar *et al.*, 2008; Al-Mohammed *et al.*, 2015).

DOS sono stati confrontati con peptidi antibatterici, molecole cationiche che hanno la regione idrofobica spazialmente separata da quella carica (Vidal *et al.*, 2014). Rispetto ai sali monocationici, la presenza della seconda testa carica dovrebbe giustificare un aumento dell'idrofilicità e conseguentemente una minore tossicità per le cellule eucariotiche. Ciò potrebbe favorire una maggiore selettività contro i batteri senza compromettere le cellule umane.

In definitiva, l'applicazione dei DOS in campo biomedico potrebbe risolvere i seguenti quesiti: i) l'uso dei DOS è davvero più vantaggioso rispetto a quello dei monocationici?, ii) quali sono i fattori che determinano l'attività biologica tra le diverse caratteristiche strutturali? e iii) può la struttura dei DOS consentire di superare i problemi di bassa specificità frequentemente rivendicata per i peptidi antibatterici o per i farmaci che agiscono come agenti antiproliferativi nelle linee tumorali umane? Quindi, per trovare una risposta a queste domande, in questo lavoro sono stati saggiati una serie di sali dicationici di imidazolio al fine di testare la loro attività antibatterica nei confronti di ceppi batterici tester. In particolare, l'attività antimicrobica è stata saggiata contro il ceppo Gram-negativo, *E. coli* e, tre ceppi Gram-positivi, *K. rhizophila*, *S. aureus* e *B. subtilis*, che sono tra i più comuni ceppi utilizzati nel campo della ricerca farmacologica (Soni *et al.*, 2015; Gallo *et al.*, 2016).

### 3.1.2 Uso di gel supramolecolari come possibili candidati con attività antimicrobica

Aumenta sempre più la richiesta di nuovi composti, che possono essere impiegati come rivestimento e che esercitano un'attività antibatterica, in campo scientifico e tecnologico, passando dall'assistenza sanitaria (Veiga and Schneider, 2013; Cloutier *et al.*, 2015) alla conservazione delle opere d'arte (Ditaranto *et al.*, 2011), da materiali di costruzione innovativi (Kumar *et al.*, 2008) al settore tessile (Dangee *et al.*, 2015; Zille



*et al.*, 2015), cosmetico, farmaceutico (Tian *et al.*, 2007; Scaffaro *et al.*, 2015) e dell'industria alimentare (Valverde *et al.*, 2005; Durango *et al.*, 2006; Conte *et al.*, 2013). Quindi, questa esigenza ha stimolato un interesse crescente nella preparazione di nuovi composti di rivestimento caratterizzati dalla presenza di peptidi antibiotici (Tew *et al.*, 2010; Dangee *et al.*, 2015), di nanoparticelle di argento (Krizsan *et al.*, 2014) e di composti cationici o di polimeri (Krizsan *et al.*, 2014; Parthasarathy *et al.*, 2015; Cancemi *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda l'ottenimento di materiali antimicrobici, questi composti potrebbero essere legati covalentemente alla superficie (Tiller *et al.*, 2001) o ancorati tramite interazioni non covalenti come con i colori ad olio (Lin *et al.*, 2003; Milovic *et al.*, 2005). In entrambi i casi è essenziale evitare il loro rilascio nell'ambiente e presentare un'alta efficienza, un ampio spettro di attività, un'attività a lungo termine, una buona biocompatibilità, bassi costi ed una facile sintesi. Questo è il motivo per cui negli ultimi anni, tra gli agenti antibatterici sviluppati, sono stati presi in considerazione composti cationici, come piridinio, ammonio, sali di imidazolio e fosfonio. Questi sali organici sono stati frequentemente paragonati ai peptidi antibatterici. In effetti, come i peptidi antimicrobici, essi sono in grado di compromettere l'integrità della membrana cellulare dei batteri ed, in base alla loro idrofobicità, potrebbero attraversare le membrane cellulari con conseguente rottura del doppio strato di membrana (Demberelnyamba *et al.*, 2004; Riduan *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016). In questo contesto, alcuni sali di imidazolio, usati come ligandi per metalli di transizione, sono stati recentemente applicati come agenti antibatterici (Elshaarawy and Janiak, 2014), mentre alcuni oligomeri di imidazolio ed i loro corrispondenti gel hanno esercitato un'uccisione ultraveloce di diversi ceppi batterici e funghi (Riduan *et al.*, 2016). Inoltre, una serie di tensioattivi di ammonio si sono dimostrati capaci di esercitare una buona attività antibatterica e citotossica (Du *et al.*, 2015).

In generale, i composti cationici mostrano proprietà biocide contro un ampio spettro di batteri e questo ha indotto il loro uso come agenti detergenti e disinfettanti nei prodotti alimentari e nelle industrie farmaceutiche e negli ospedali (Krizsan *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2015). Se sono usati per questo scopo, dovrebbe essere trovato un giusto equilibrio tra l'idrofobicità e la carica. In effetti, l'elevata idrofobicità di catene alchiliche molto lunghe (> C12) potrebbe favorire la loro aggregazione e prevenire l'interazione con il target della cellula batterica. Nei sistemi policationici, questo problema potrebbe essere risolto grazie alla presenza di cariche positive che dovrebbero ostacolare le interazioni idrofobiche ed aumentare l'affinità per la testa idrofilica del doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare attraverso le interazioni elettrostatiche. Tuttavia, l'eccesso di cariche positive indebolirebbe l'affinità idrofobica con la coda fosfolipidica, che è il principale fattore che controlla le proprietà antimicrobiche.

Frequentemente, questi composti cationici sono molto attivi nella loro forma libera, ma la loro efficacia può essere ridotta quando vengono immobilizzati come rivestimenti antibatterici (Pang *et al.*, 2015). Per tale motivo, gli idrogel polimerici vengono studiati da molto tempo (Hoque *et al.*, 2015; Irwansyah *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2015; Pascual *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Diversamente, per questo scopo, pochi studi sono stati effettuati sui gel supramolecolari formati da semplici sali organici (Pandurangan *et al.*, 2014; Irwansyah

*et al.*, 2015). L'uso di gel supramolecolari in questo campo potrebbe rappresentare una grande sfida, perché a differenza di quelli polimerici, sono formati da piccole molecole che possono essere sintetizzate in pochi passaggi. Queste molecole sono definite come gelator a basso peso molecolare (LMWG) e sono in grado di intrappolare un solvente grazie alla formazione di una rete tridimensionale stabilita attraverso interazioni supramolecolari (Sangeetha *et al.*, 2005). Per quanto riguarda i gel polimerici, quelli supramolecolari sono termoreversibili ed in alcuni casi sono anche in grado di riformarsi dopo una perturbazione meccanica (Mukhopadhyay *et al.*, 2010; Ohsedo *et al.*, 2013), entrambe proprietà vantaggiose.

Il nostro obiettivo è stato quello di ottenere gel supramolecolari da sali organici (D'Anna *et al.*, 2012, 2013 e 2014; Rizzo *et al.*, 2016), e quindi, abbiamo deciso di testare la capacità di gelificazione di alcuni nuovi sali organici di diimidazolio, valutando la loro capacità antibatterica sia come composti puri (disciolti in soluzione di DMSO), sia sotto forma di gel (nella forma dei corrispondenti materiali soft). In particolare, in studi recenti avevano sintetizzato DOS quali il 3,3'-di-*N*-dodecil-1,1'-(1,4-fenilendimetilene) diimidazolio ([*p*-C<sub>12</sub>im]<sup>+</sup>) come testa cationica ed alcuni derivati amminoacidi come anioni. Così, abbiamo combinato un catione con una comprovata capacità di gelificazione (D'Anna *et al.*, 2012) con anioni biocompatibili come *L*-isoleucinato ([*L*-Ile]<sup>-</sup>), *L*-fenilalaninato ([*L*-Phe]<sup>-</sup>) ed un derivato dipeptidico, *D*-alanil-*D*-alaninato ([*D*-Ala-*D*-Ala]<sup>-</sup>) (Fig. 3.1).

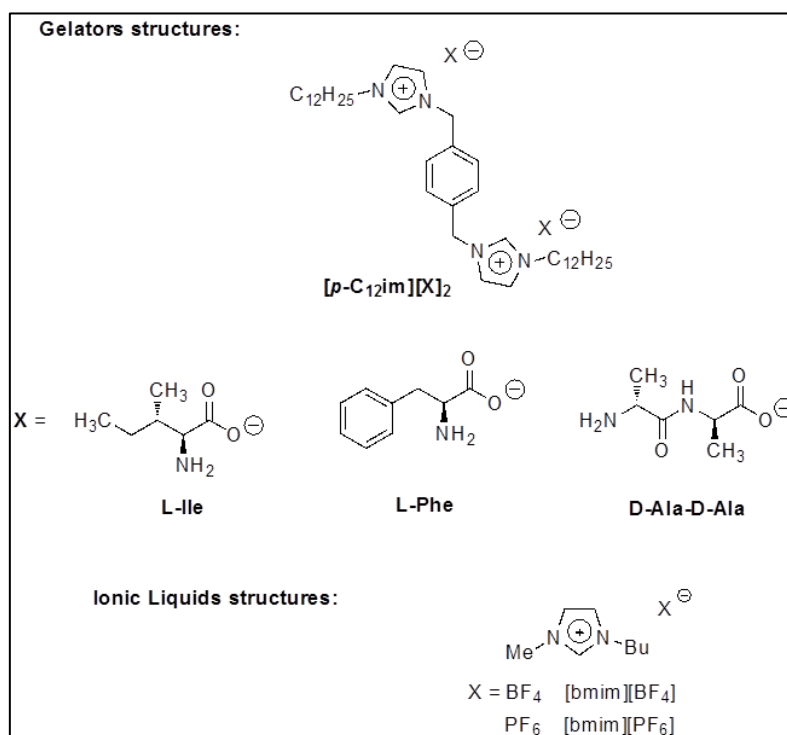


Figura 3.1 - Sali di diimidazolio utilizzati come gelator e struttura dei liquidi ionici.

In particolare, è stato recentemente segnalato che l'*L*-isoleucina opportunamente funzionalizzata può essere usata come agente antibatterico negli idrogel (Irwansyah *et al.*, 2015). L'utilizzo di un anione con un anello aromatico, come quello derivato dalla *L*-fenilalanina, potrebbe consentire di studiare come le proprietà



del gel possono essere influenzate dalla presenza di possibili interazioni  $\pi$ - $\pi$  tra il catione e l'anione. Dall'altro lato, la scelta del dipeptide [ $D$ -Ala- $D$ -Ala] ha origine dal suo ruolo microbiologico, in quanto rappresenta la frazione finale della catena penta-peptidica del precursore del peptidoglicano coinvolto nella biosintesi e maturazione delle pareti cellulari procariotiche. Se opportunamente modificato, [ $D$ -Ala- $D$ -Ala] ha anche mostrato un'attività antibatterica (Azam *et al.*, 2014).

Gli IL sono sali organici con temperature di fusione inferiori a 100 °C che attualmente stanno sostituendo i convenzionali solventi grazie alla loro bassa volatilità, infiammabilità e maggiore capacità catalitica favorita dalla loro struttura supramolecolare (Plechkova and Seddon, 2008; Dupont, 2011; Hallett and Welton, 2011). Quando gli IL sono inclusi in una matrice di gel, il sistema è riconosciuto come ionogel. Questo termine comprende una vasta gamma di materiali che vanno dai sistemi ibridi caratterizzati dalla presenza di un IL all'interno di una rete silicea (Le Bideau *et al.*, 2011; Delahaye *et al.*, 2012; Nayeri *et al.*, 2015; Garaga *et al.*, 2016), ai gel polimerici intercalati con IL e complessi metallici (Lunstroot *et al.*, 2009; Zijkowski *et al.*, 2012) e, molto recentemente, ai gel supramolecolari (Maršavelsk *et al.*, 2015; Ueki *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Solamente pochi esempi di ionogel polimerici o di metallo-gel sono stati usati in applicazioni biologiche (Trivedi *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2015), così abbiamo sviluppato una procedura semplice per formare ionogel supramolecolari per scopi biologici. Quindi, abbiamo riportato una serie di gel, formati da IL come solventi di gelificazione e sali di diimidazolio come gelator, esercitanti un'attività antibatterica.

L'attività antibatterica dei DOS liberi e gelificati è stata valutata mediante saggi microbiologici utilizzando ceppi batterici Gram-positivi (*K. rhizophila*, *B. subtilis*) e Gram-negativi (*E. coli*), che sono tra i più comuni tra quelli usati nel settore della scoperta di farmaci e nella ricerca di antimicrobici (Russo *et al.*, 2016). In particolare, è stata investigata la concentrazione minima inibente dei DOS liberi, cioè che riduce il 90% della crescita batterica ( $MIC_{90}$ ), ed il tempo di uccisione ( $t_k$ ), cioè il tempo necessario per ridurre di oltre il 90% la vitalità delle cellule batteriche, rispetto a quelle non trattate. Il mantenimento della capacità antimicrobica dei DOS nelle fasi gel è stata valutata contro i ceppi batterici tester incubati in colture solide e liquide.



### 3.2 Scopo dell'attività di ricerca

L'esigenza di contrastare i fenomeni di resistenza agli antibiotici spinge la ricerca ad individuare nuove strategie e/o nuove molecole di interesse farmaceutico che possano essere più efficaci delle attuali molecole in commercio. Recentemente, in letteratura è stato riportato che i complessi formati da sali di diimidazolio con ioni Fe (III) e Mn (III), mostrano un'elevata attività antimicrobica contro *S. aureus* e *B. subtilis*, mentre mostrano effetti meno evidenti contro *E. coli* e *Candida albicans* (Elshaarawy *et al.*, 2014).

D'altro canto, sono stati anche riportati dati relativi all'attività antimicrobica da parte di alcuni sali di diimidazolio contro i batteri Gram-positivi, come risultato della loro inserzione nella membrana lipidica alterandone la permeabilità. Tali sali mostrano una MIC abbastanza bassa, in particolar modo contro *Bacillus thuringiensis* e *Listeria seeligeri* (Vidal *et al.*, 2014).

In questo studio è stata valutata l'attività antimicrobica di alcuni sali di diimidazolio che differiscono per la lunghezza della catena alchilica, la sostituzione isomerica sullo spaziatore centrale e per la forma, la struttura e l'abilità coordinante dell'anione. In base a tali risultati e della capacità di derivati amminoacidici di dar vita a fasi gel con attività antimicrobica, si è deciso di associare ad una struttura cationica con provata abilità gelificante, quale quella dei cationi di imidazolio separati da spaziatore *p*-xilenico (Fig. 3.2), anioni derivanti da amminoacidi e dipeptidi.

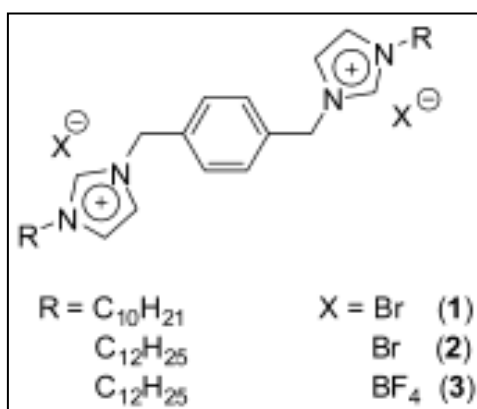


Figura 3.2 - Struttura generale dei sali di diimidazolio.

I sali sintetizzati differiscono quindi per l'amminoacido usato come anione, in particolare derivati dell'isoleucina e della fenilalanina, e dei corrispondenti amminoacidi con gruppo protettivo Fmoc; questi ultimi utilizzati per testare l'influenza dovuta alla presenza di gruppi aromatici nella formazione delle fasi gel. Infine, si è deciso di impiegare anche l'anione del dipeptide D-ala-D-ala per la sua importanza nei processi di biosintesi e maturazione della parete cellulare procariotica (Azam *et al.*, 2014).

Dopo aver ottenuto e caratterizzato i gel supramolecolari è stato condotto uno studio sull'attività antimicrobica sia dei gel che dei sali da cui essi derivano, al fine di mettere in luce le possibili differenze derivanti dall'organizzazione supramolecolare dei sali all'interno della matrice gelatinosa. È noto, infatti che,



l'involucro della cellula batterica è una struttura multistrato complessa che serve a proteggere questi organismi dall'ambiente che li circonda. Gli involucri cellulari della maggior parte dei batteri rientrano in due grandi gruppi. I batteri Gram-negativi sono circondati da una sottile parete cellulare di peptidoglicano, a sua volta rivestita da una membrana esterna contenente lipopolisaccaride. I batteri Gram-positivi, invece, mancano della membrana esterna, ma a differenza dei Gram-negativi sono circondati da uno strato di peptidoglicano molto spesso ed attraversato da lunghi polimeri anionici di acido teicoico, che attraversando completamente la parete, si pensa abbiano un ruolo importante nella patogenesi. La diversa composizione degli involucri esterni delle cellule dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi può far presupporre che l'attività antimicrobica dei sali e dei gel potrebbe dare effetti diversi a seconda del tipo di microrganismo su cui verranno testati (Silhavy *et al.*, 2010).

Per tale motivo sono stati scelti ceppi batterici appartenenti ad entrambe le classi, quali *E. coli* (Gram-negativo), *K. rhizophila*, *S. aureus* e *B. subtilis* (Gram-positivi), per condurre analisi sull'attività antimicrobica dei sali e dei gel mediante:

- i) saggi di inibizione della crescita batterica su terreno solido in piastre Petri;
- ii) determinazione della concentrazione minima inibente il 90% delle cellule batteriche (MIC<sub>90</sub>);
- iii) studio della cinetica di morte dei ceppi batterici.



### **3.3 Risultati e Discussioni**

I risultati e le discussioni sono suddivisi in due capitoli intitolati:

**3.3.1** Gli effetti dei cambiamenti strutturali sull'attività antimicrobica ed anti proliferativa dei sali di diimidazolio;

**3.3.2** Idro- ed ionogel supramolecolari: uno studio delle loro proprietà ed attività antibatteriche.

### 3.3.1 Gli effetti dei cambiamenti strutturali sull'attività antimicrobica dei sali di di-imidazolio

I risultati descritti in questo capitolo sono già stati pubblicati in:

Cancemi P., Buttacavoli M., D'Anna F., Feo S., Fontana R.M., Noto R., Sutera A., Vitale P., Gallo G. The effects of structural changes on the anti-microbial and anti-proliferative activities of diimidazolium salts. *New Journal of Chemistry*, c6nj03904a.

#### 3.3.1.1 Caratteristiche strutturali dei DOS

Sono stati testati una serie di DOS che differivano per tre caratteristiche strutturali (Fig. 3.3): nella lunghezza della catena alchilica sullo ione di imidazolio, nella sostituzione isomerica sullo spaziatore aromatico e nella natura dell'anione. Tutti i sali usati erano basati sul catione di diimidazolio 3,3'-di-*n*-alchil-1,1'-(1,*n*-fenilendimetilene).

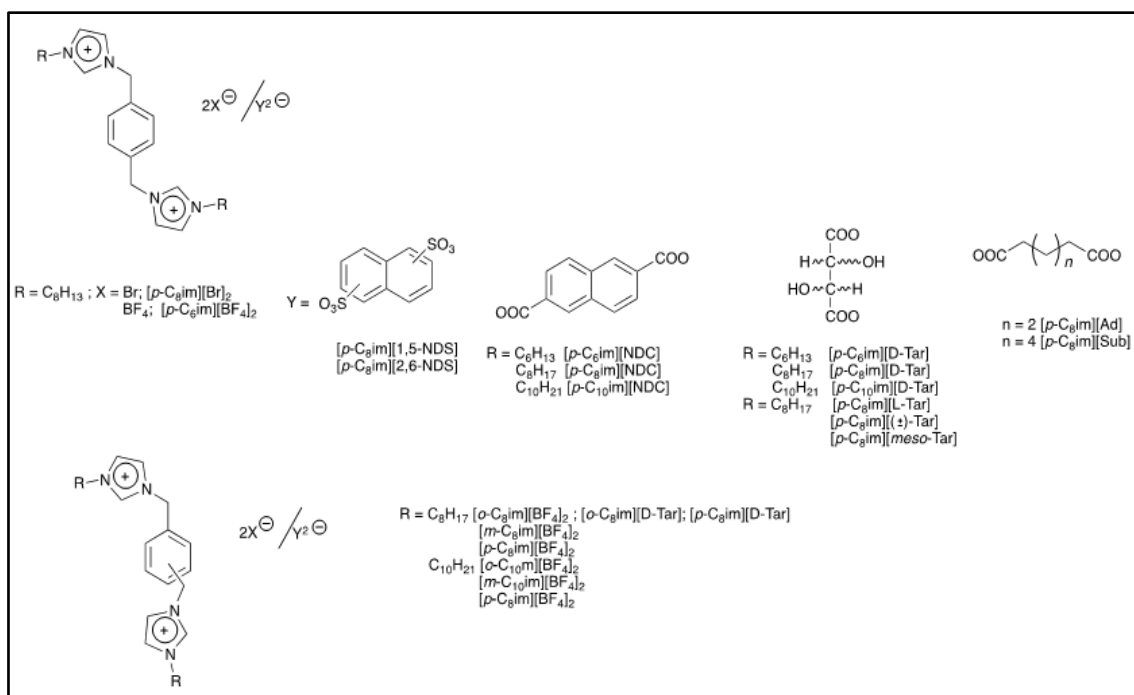


Figura 3.3 – Struttura dei sali di-cationici di imidazolio testati.

In primo luogo, usando il catione  $[p-C_8im]^{2+}$ , è stato analizzato il contributo dell'anione considerando sia mono- che di-anioni. I monoanioni sono i più utilizzati nella preparazione di IL ( $[Br]$  e  $[BF_4]$ ) e differiscono per dimensione, forma e distribuzione della carica. I dianioni sono sia alifatici che aromatici, quelli aromatici portano il naftalene come spaziatore. Loro differiscono nella sostituzione isomerica ( $[1,5-NDS]$ ,  $[2,6-NDS]$ ) e nella natura della carica di testa ( $[2,6-NDS]$  e  $[2,6-NDC]$ ). Questi fattori che agiscono sulla distribuzione della carica dell'anione potrebbero indurre significativi cambiamenti nell'attività biologica. Gli anioni alifatici hanno catene alchiliche di diversa lunghezza:  $C_4$  per  $[Tar]$ ,  $C_6$  per  $[Ad]$  e  $C_8$  per  $[Sub]$ . Ciò può influenzare la flessibilità e la lipofilità dell'anione. Tra questi,  $[Tar]$  mostra il più basso



grado di lipofilità ed i suoi stereoisomeri potrebbero consentire la valutazione del ruolo svolto da una differente stereochimica. È interessante notare che [Ad] e [Sub] hanno un numero di unità metileniche tra i carbossilati che ricorda perfettamente il numero di atomi di carbonio che separano i gruppi sulfonato in [1,5-NDS] e [2,6-NDS]. Questo potrebbe rappresentare un'ulteriore valutazione dell'effetto di flessibilità dell'anione.

In studi di correlazione struttura-attività (QSAR), oltre agli effetti elettronici, sono prese in considerazione anche la lipofilità, le dimensioni e la forma delle molecole biologicamente attive. L'importanza di queste caratteristiche strutturali è spesso valutata usando i parametri  $E_s$  e  $\pi$  (Wang *et al.*, 2015; Danishuddin and Khan 2016).

In questo lavoro, il ruolo svolto dalla lipofilità nel determinare l'attività biologica è stata analizzata usando sali basati su [BF<sub>4</sub>], [D-Tar] e [2,6-NDC], aventi sullo ione di imidazolio catene alchiliche di diversa lunghezza ([C6im<sup>2+</sup>], [C8im<sup>2+</sup>] e [C10im<sup>2+</sup>]). In questo caso, gli anioni scelti sono rappresentativi del graduale aumento di idrofobicità. L'effetto della lunghezza della catena alchilica è una delle caratteristiche principali analizzate durante lo studio dell'attività biologica dei sali di imidazolio. Tuttavia, l'influenza della lunghezza potrebbe cambiare in funzione della natura del nucleo centrale. Questo è il motivo per cui sono stati valutati tutti i fattori indicati sopra.

Inoltre, per la valutazione del ruolo svolto dalla forma del catione, abbiamo approfittato della possibilità di avere diversi isomeri del catione. Di conseguenza, per i sali basati su [BF<sub>4</sub>] e per i derivati dell'ottimetilimidazolio e del decilimidazolio, è stata misurata sia l'attività antiproliferativa che antibatterica in presenza degli isomeri *orto*, *meta* e *para*.

Infine, per capire se l'attività biologica fosse dovuta esclusivamente alle caratteristiche dell'anione o fosse il risultato dell'azione combinata della struttura dell'anione e del catione, sono stati condotti alcuni test con i sali di sodio, quali ([Na][BF<sub>4</sub>], [Na]<sub>2</sub>[D-Tar] e [Na]<sub>2</sub>[2,6-NDC]).

### 3.3.1.2 Attività antibatterica dei sali organici di diimidazolio

L'attività antimicrobica dei DOS è stata valutata contro un ceppo Gram-negativo (*E. coli*) e tre ceppi Gram-positivi (*K. rhizophila*, *S. aureus* e *B. subtilis*). I test sono stati eseguiti a diverse concentrazioni e l'attività è stata valutata preliminarmente usando la tecnica di diffusione dell'agar (Fig. 3.4).

Successivamente è stata eseguita una valutazione quantitativa dell'attività anti-batterica attraverso la misurazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC). In particolare, i valori di MIC<sub>90</sub> di ciascun DOS rispetto ai ceppi testati sono stati determinati spettrofotometricamente come la concentrazione più bassa che inibisce almeno il 90% della crescita batterica rispetto ad una coltura non trattata (Fig. 3.5 e Tab. 3.1).

In generale, i valori di MIC<sub>90</sub> sono cambiati in funzione delle caratteristiche strutturali dei DOS e dei ceppi testati. Considerando i risultati ottenuti, si è registrato il valore più basso di MIC<sub>90</sub> (0,13 μM) per [*p*-C10im][2,6-NDC] nei confronti di *K. rhizophila* mentre i DOS sono risultati per lo più inefficaci contro *S.*

*aureus*. Inoltre, tra gli altri ceppi testati, i valori di MIC<sub>90</sub> diminuiscono secondo il seguente trend: *E. coli* ≥ *B. subtilis* ≥ *K. rhizophila*.

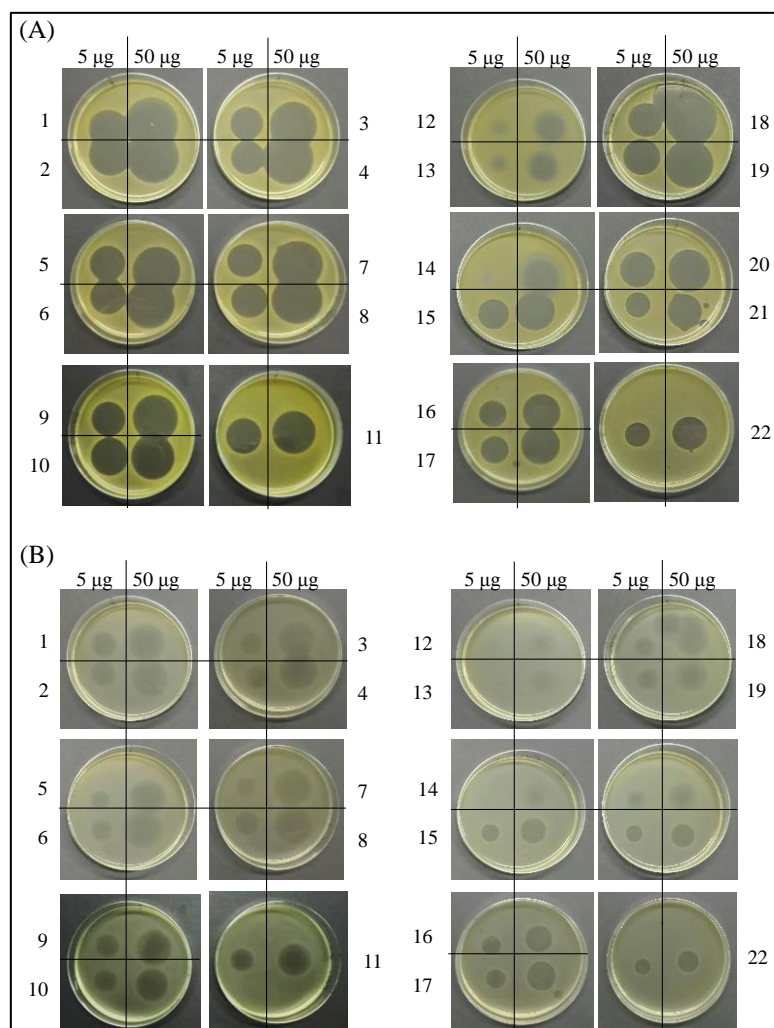


Figura 3.4 – Attività antibatterica dei DOS usando *K. rhizophila* (A) e *E. coli* (B) come ceppi modello. I numeri in (A) e (B) si riferiscono a: 1) [*p*-C8im][Br]<sub>2</sub>; 2) [*p*-C8im][2,6-NDC]; 3) [*p*-C8im][1,5-NDS]; 4) [*p*-C8im][2,6-NDS]; 5) [*p*-C8im][Ad]; 6) [*p*-C8im][Sub]; 7) [*p*-C8im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub>; 8) [*p*-C8im][± Tar]; 9) [*p*-C8im][meso-Tar]; 10) [*p*-C8im][L-Tar]; 11) [*p*-C8im][D-Tar]; 12) [*p*-C6im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub>; 13) [*p*-C6im][D-Tar]; 14) [*p*-C6im][2,6-NDC]; 15) [*p*-C10im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub>; 16) [*p*-C10im][D-Tar]; 17) [*p*-C10im][2,6-NDC]; 18) [*o*-C8im][D-Tar]; 19) [*o*-xil-(oim)2][2,6-NDC]; 20) [*m*-C8im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub>; 21) [*m*-C10im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub>; 22) [*o*-C10im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub>.

Pertanto, la tendenza di cui sopra sembra indicare che i DOS saggati funzionano in modo specie-specifico evidenziando una certa specificità per *K. rhizophila*, noto formalmente come *Micrococcus luteus*, che è un importante ceppo che dal punto di vista industriale viene solitamente designato come un ceppo di controllo della qualità in saggi di risposta per una varietà di composti antibiotici (Tang and Gillevet 2003). Ad ogni modo, per comprendere più dettagliatamente i fattori che agiscono sull'attività antimicrobica dei DOS, sono stati analizzati step-by-step i valori di MIC<sub>90</sub> in dipendenza dei cambiamenti strutturali dei DOS a partire dalla natura anionica (Fig. 3.6).

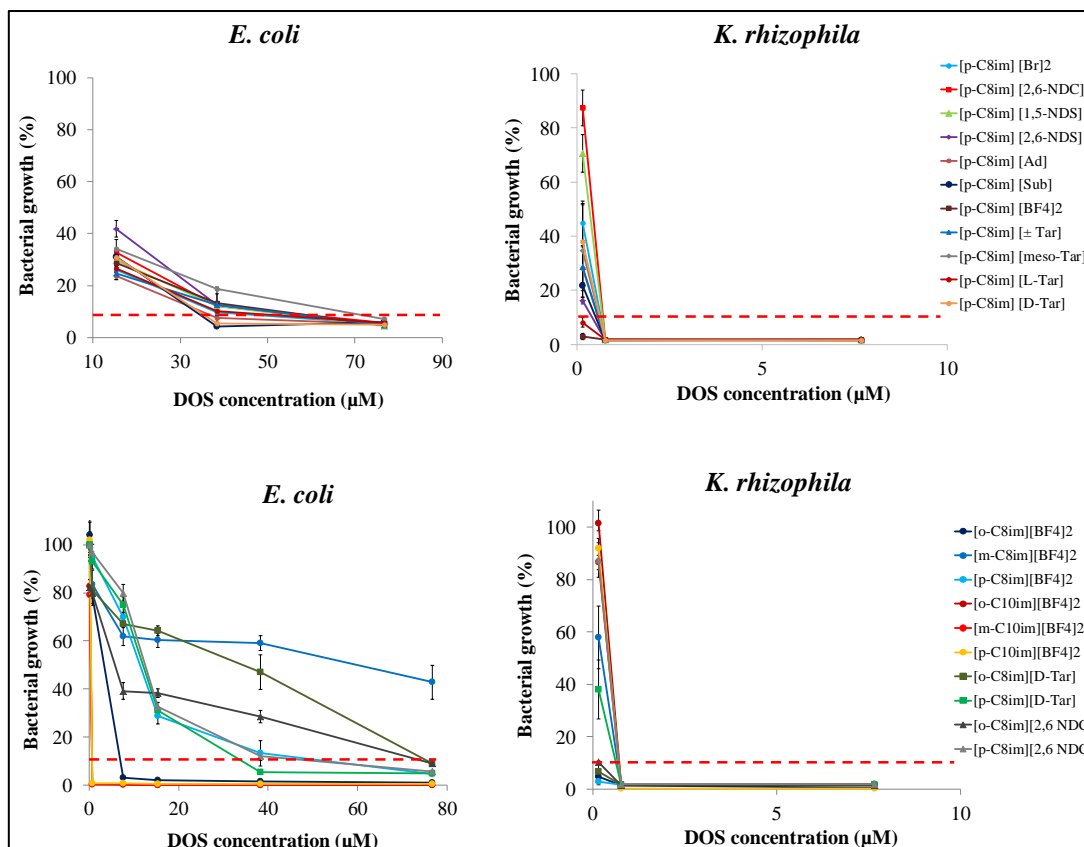


Figura 3.5 - Calcolo della MIC<sub>90</sub> mediante la determinazione della crescita batterica effettuata spettrofotometricamente a 600 nm. I valori di crescita sono riportati come percentuale OD rispetto alle colture non esposte (condizione controllo) e sono stati calcolati come media di tre repliche biologiche indipendenti. Le barre verticali rappresentano la deviazione standard. La linea rossa tratteggiata rappresenta la soglia percentuale per la valutazione della MIC<sub>90</sub>.

DOS	Gram-negative	Gram-positive		
	<i>E. coli</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
	μM (μg/mL)	μM (μg/mL)	μM (μg/mL)	μM (μg/mL)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][Br] <sub>2</sub>	40 (25)	0.8 (0.5)	*	40 (25)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][2,6-NDC]	74 (50)	0.7 (0.5)	*	15 (10)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][1,5-NDS]	66 (50)	0.7 (0.5)	*	33 (25)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][2,6-NDS]	67 (50)	0.7 (0.5)	*	33 (25)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][Ad]	41 (25)	0.8 (0.5)	*	16 (10)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][Sub]	39 (25)	0.8 (0.5)	*	16 (10)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][BF <sub>4</sub> ] <sub>2</sub>	78 (50)	0.2 (0.1)	*	39 (25)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][±Tar]	82 (50)	0.8 (0.5)	*	41 (25)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][meso-Tar]	82 (50)	0.8 (0.5)	*	41 (25)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][L-Tar]	41 (25)	0.2 (0.1)	*	16 (10)
[ <i>p</i> -C <sub>8</sub> im][D-Tar]	41 (25)	0.8 (0.5)	*	16 (10)
[ <i>p</i> -C <sub>6</sub> im][BF <sub>4</sub> ] <sub>2</sub>	*	86 (50)	*	*
[ <i>p</i> -C <sub>6</sub> im][D-Tar]	*	45 (25)	*	*
[ <i>p</i> -C <sub>6</sub> im][2,6-NDC]	*	161 (100)	*	160 (100)

[ <i>p</i> -C <sub>10</sub> im][BF <sub>4</sub> ] <sub>2</sub>	0.7 (0.5)	0.7 (0.5)	72 (50)	0.7 (0.5)
[ <i>p</i> -C <sub>10</sub> im][D-Tar]	7 (5)	0.7 (0.5)	75 (50)	0.7 (0.5)
[ <i>p</i> -C <sub>10</sub> im][2,6-NDC]	7 (5)	0.7 (0.5)	68 (50)	0.1 (0.1)
[ <i>o</i> -C <sub>8</sub> im][BF <sub>4</sub> ] <sub>2</sub>	8 (5)	0.2 (0.1)	*	39 (25)
[ <i>o</i> -C <sub>8</sub> im][D-Tar]	81 (50)	0.2 (0.1)	*	8 (5)
[ <i>o</i> -C <sub>8</sub> im][2,6-NDC]	74 (50)	1 (0.1)	*	7 (5)
[ <i>m</i> -C <sub>8</sub> im][BF <sub>4</sub> ] <sub>2</sub>	157 (100)	0.8 (0.5)	*	8 (5)
[ <i>m</i> -C <sub>10</sub> im][BF <sub>4</sub> ] <sub>2</sub>	0.7 (0.5)	0.7 (0.5)	36 (25)	7 (5)
[ <i>o</i> -C <sub>10</sub> im][BF <sub>4</sub> ] <sub>2</sub>	0.7 (0.5)	0.7 (0.5)	14 (10)	7 (5)

\* No bacterial growth inhibition at the maximal concentration (100 µg/mL) tested.

Tabella 3.1 – Valori di MIC<sub>90</sub> dei DOS nei confronti dei differenti ceppi batterici tester.

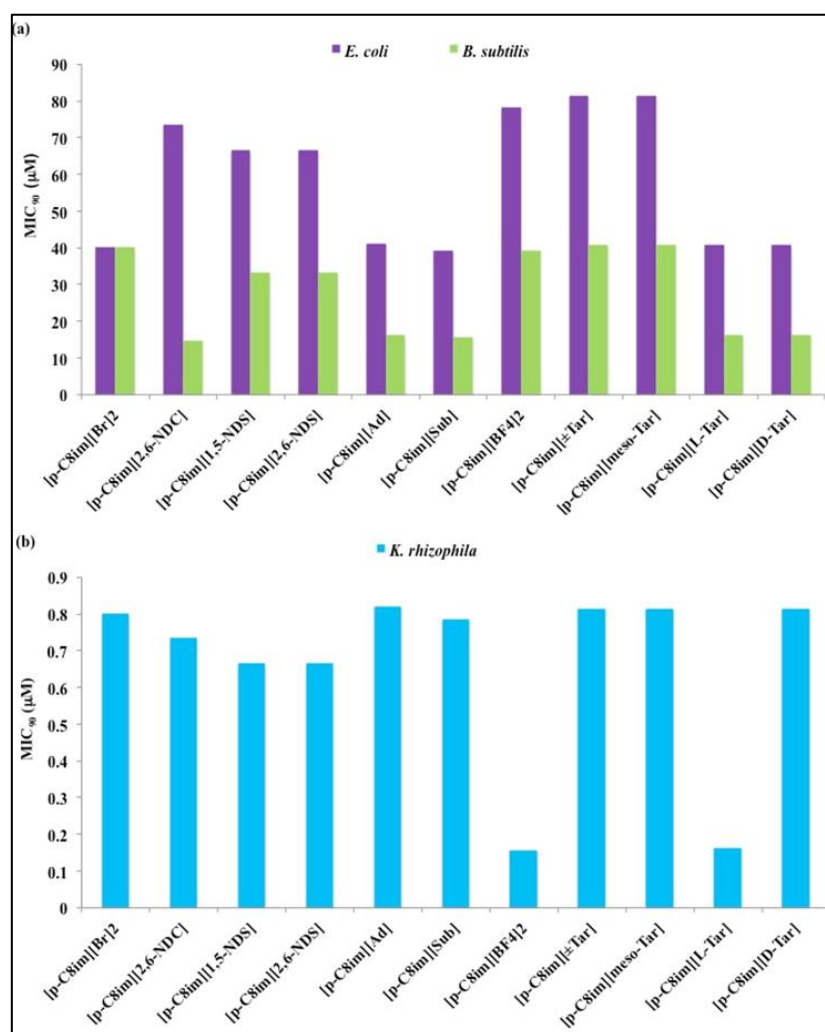


Figura 3.6 - Plot dei valori DI MIC<sub>90</sub> valutata sui ceppi batterici tester indicati in funzione della diversa natura dell'anione dei DOS.

A causa della mancata risposta al trattamento con i DOS, *S. aureus* non è stato preso in considerazione in questa analisi. Nel caso di *K. rhizophila*, non ci sono state differenze significative in funzione della natura dei diversi anioni ad eccezione degli anioni [BF<sub>4</sub>] e [L-Tar] che hanno mostrato la migliore efficacia. In



maniera interessante, i DOS che legavano l'anione [*L*-Tar] hanno mostrato una delle attività più efficaci contro *E. coli* e *B. subtilis*. Tuttavia, i valori di MIC<sub>90</sub> ottenuti contro questi ultimi due ceppi hanno rivelato generalmente un'attività più pronunciata in dipendenza dell'anione rispetto a quella ottenuta nei confronti di *K. rhizophila*. In particolare, l'attività dei DOS nei confronti di *E. coli* e *B. subtilis* sembra risentire della presenza degli anioni carbossilato e sulfonato, come ottenuto dal più basso valore di MIC<sub>90</sub> osservato per i sali basati su [*L*-Tar], [Ad], [Sub] e [*D*-Tar]. Inoltre, in entrambi i casi, l'attività antibatterica aumenta andando dalla forma meso e racemica dei sali basati su [Tar] a quelli stereoisomerici.

L'attività antibatterica è risultata inoltre migliorata all'aumentare dell'idrofobicità del catione, come dimostrato dai valori di MIC<sub>90</sub> passando dai sali basati su [*p*-C<sub>6</sub>im] ai corrispondenti basati su [*p*-C<sub>10</sub>im] (Fig. 3.7).

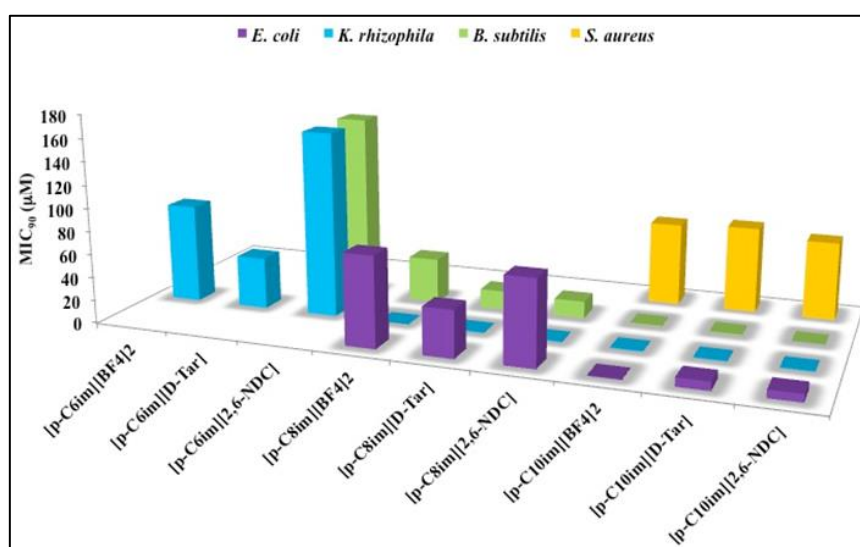


Figura 3.7 - Plot dei valori di MIC<sub>90</sub> nei confronti dei ceppi batterici tester indicati in funzione della diversa lunghezza della catena alchilica sullo ione imidazolio.

Sorprendentemente, l'aumento della lunghezza della catena alchilica degli ioni di imidazolio ha determinato l'attività antibatterica dei DOS anche contro *S. aureus* che è risultato insensibile agli altri DOS testati con catene alchiliche C6 o C8. Questi dati confermano ulteriormente l'importanza dell'idrofobicità, rispetto alle altre caratteristiche chimico-fisiche, rispecchiando anche altri lavori scientifici che descrivono l'attività antimicrobica dei sali di imidazolio (Zheng *et al.*, 2016). Per avere una migliore valutazione dei nostri risultati, abbiamo confrontato i valori di MIC<sub>90</sub> ottenuti con i nostri DOS con quelli riportati in letteratura per i sali di imidazolio monocationici ed oligomerici. In particolare, sono stati presi in considerazione i derivati dell'ottilimidazolio legati agli ioni bromuro e tetrafluoroborato che sono stati usati come agenti antimicrobici contro *E. coli*, *S. aureus* e *B. subtilis* (Tang and Gillevet 2003; Liu *et al.*, 2012; Riduan *et al.*, 2016). Il confronto con i suddetti studi ha mostrato che l'attività antimicrobica dei nostri DOS era intermedia tra quella corrispondente al bromuro di 1-ottilimidazolio ed al tetrafluoroborato e quella

misurata in presenza di oligomeri di ottilimidazolio, mostrando che l'alternanza dello ione imidazolio e dello spaziatore aromatico esercita un effetto positivo sull'attività biologica testata.

Inoltre, l'attività anti-batterica è stata influenzata dalla sostituzione isomerica sulla struttura del catione in modo specie-specifico, mostrando una relazione con la lunghezza della catena alchilica degli ioni di imidazolio (Fig. 3.8).

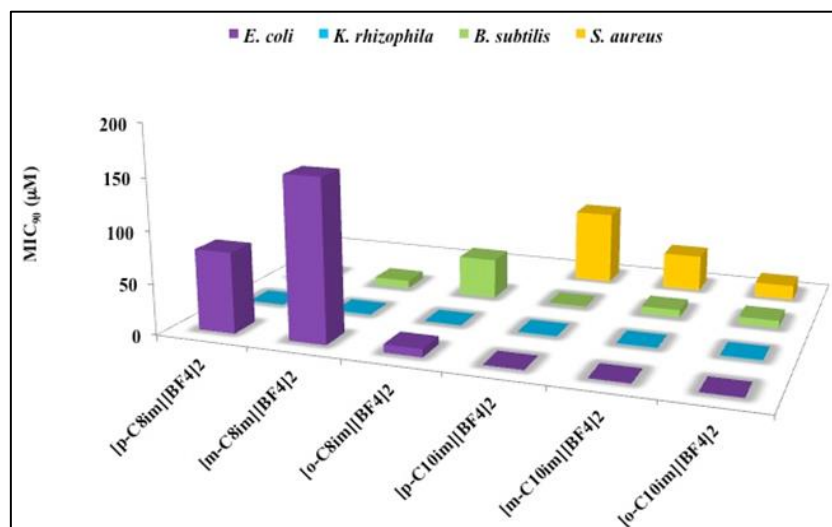


Figura 3.8 - Plot dei valori MIC<sub>90</sub> nei confronti dei ceppi batterici tester indicati in funzione della diversa sostituzione isomerica sull'anello aromatico.

Infatti, nel caso dei batteri Gram-positivi, l'ingombro sterico e la non-coplanarità delle teste cationiche, come conseguenza dell'aumento della repulsione elettrostatica andando dagli isomeri *p*- a quelli *o*-, giocava un ruolo secondario nel determinare l'azione battericida come misurato dai valori di MIC<sub>90</sub> che non variano in modo determinante. Al contrario, i DOS con catena alchilica C8 hanno mostrato un aumento di venti volte dei valori di MIC<sub>90</sub>. Tuttavia, nella maggior parte dei casi in cui sono stati osservati i cambiamenti, l'*o*-isomero ha dato valori di MIC<sub>90</sub> più bassi.

Considerando il loro modo di agire, si presume che i sali di imidazolio si comportino come i sali di ammonio quaternario interagendo con la membrana batterica ed inducendo una successiva perdita dell'integrità della membrana ed un aumento della permeabilità (Dembereinyamba *et al.*, 2004). Quindi questa capacità antibatterica è strettamente legata alle proprietà tensioattive e possiede un comportamento simile ai peptidi antimicrobici per i quali l'attività antibatterica può essere considerata come il risultato di un meccanismo a due step: i) l'avvicinamento della testa cationica alla membrana cellulare carica negativamente ed ii) il successivo trasporto della coda idrofobica attraverso la membrana cellulare che causa la sua distruzione ed il rilascio dei costituenti intracellulari (Rabea *et al.*, 2005; Daniel *et al.* 2008). Basandoci sulla figura 3.8, l'efficacia dei composti ionici può essere considerata come il risultato dell'azione combinata della quantità di cariche delocalizzate che, a sua volta, dipende anche dall'interazione catione-anione, e dell'idrofobicità della coda.



Tuttavia, i fattori che influenzano la capacità dei diversi DOS di raggiungere e riconoscere la membrana cellulare e/o i target intracellulari possono essere presi in considerazione, specialmente quando l'idrofobicità non è la principale caratteristica che esercita l'attività antimicrobica dei DOS. In particolare, la presenza di una membrana esterna nei batteri Gram-negativi potrebbe spiegare la maggiore tolleranza di *E. coli* rispetto a *B. subtilis* e *K. rhizophila* (Kawai *et al.* 2009; Gravel and Schmitzer 2017). In effetti, la parete cellulare differisce, in termini di: i) spessore del peptidoglicano e ponti interpeptidici e ii) proteine associate al peptidoglicano ed enzimi che, in diversi batteri Gram-positivi, potrebbero influenzare l'effetto dei DOS in modo specie-specifico così come è stato osservato per *S. aureus*, *B. subtilis* e *K. rhizophila* (Gatlin *et al.*, 2006). Inoltre, una complessa risposta biochimica associata a numerosi cambiamenti fenotipici riguardante la tolleranza ai sali di imidazolio è stata recentemente descritta - includendo un aumento del ciclopropano nella membrana cellulare, l'up-regolazione di trasportatori osmoprotettori e delle pompe per l'efflusso dei farmaci, e la down-regolazione di porine di membrana - che dipende dalla presenza di geni di risposta allo stress e dalla regolazione della loro espressione (Khudyakov *et al.*, 2012). A parte alcune discrepanze dovute ai protocolli ed alle procedure sperimentali, l'effetto specie-specifico o persino specifico al ceppo non è inusuale per i sali di imidazolio o di diimidazolio e loro derivati, ed altri composti antimicrobici (Demberelnyamba *et al.*, 2004; Butorac *et al.*, 2011; Iwai *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2016). Riguardo a quest'ultimo aspetto, possono essere presi in considerazione, come esempio, l'Ampicillina e la Nisina, due antibiotici ampiamente utilizzati, che esercitano entrambi la loro attività antimicrobica compromettendo l'integrità della parete cellulare batterica, ma agendo su due diversi passaggi della biosintesi del peptidoglicano. In particolare, i valori di MIC riportati dell'antibiotico beta-lattamico Ampicillina, che inibisce gli enzimi coinvolti nella transpeptidizzazione del peptidoglicano, varia da 0,03 a 0,25 e 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  contro *K. rhizophila*, *S. aureus* ed *E. coli*, rispettivamente (Coleman *et al.*, 2012). D'altra parte, le MIC riferite al lantibiotico Nisina, che interagisce con il lipide II inibendo la transglicosilazione del peptidoglicano e che è anche in grado di produrre dei pori nella membrana cellulare batterica, sono 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  contro *S. aureus* e 0,01  $\mu\text{g mL}^{-1}$  contro *E. coli* e *B. subtilis* (El-hadedy and El-gammal 2014).

Complessivamente i nostri dati confermano l'importanza dell'idrofobicità per ottenere DOS ad ampio spettro antimicrobico e suggerisce un approccio empirico ceppo-specifico per sviluppare il miglior composto agendo sulle altre caratteristiche chimico-fisiche come già suggerito da Gravel *et al.* Questa considerazione è corroborata dalla valutazione dell'indice di selettività (SI) dei composti isomerici con DOS che legavano lo ione  $[\text{BF}_4]$  ed aventi catene alchiliche C8 (Tab. 3.2), calcolato come il rapporto tra valori che inibivano il 50% della proliferazione ( $\text{IC}_{50}$ ) a 24 h nei confronti della linea cellulare mammaria non tumorale HB2 ed i valori di  $\text{MIC}_{90}$  contro *E. coli*, *K. rhizophila* e *B. subtilis*, rispettivamente (Krátký *et al.*, 2012).

In effetti, questo studio ha rivelato risultati soddisfacenti (valore dell'indice SI maggiore di 10) per  $[o\text{-C8im}][\text{BF}_4]_2$  se si considerano tutti e tre i ceppi testati. Tuttavia, in base al criterio di attività specie-specifico, dei risultati soddisfacenti sono stati ottenuti anche per  $[m\text{-C8im}][\text{BF}_4]_2$  quando si considera *K. rhizophila* e *B. subtilis* e per  $[p\text{-C8im}][\text{BF}_4]_2$  se l'analisi è limitata a *K. rhizophila*.



	<b>HB2 IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>SI (HB2<sub>IC50</sub>/MIC<sub>90</sub> <i>E. coli</i>)</b>	<b>SI (HB2<sub>IC50</sub>/MIC<sub>90</sub> <i>K. rhizophila</i>)</b>	<b>SI (HB2<sub>IC50</sub>/MIC<sub>90</sub> <i>S. aureus</i>)</b>	<b>SI (HB2<sub>IC50</sub>/MIC<sub>90</sub> <i>B. subtilis</i>)</b>
	24 h	24 h			
<b>[p-C<sub>8</sub>im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub></b>	82.3±7.5	1.05	411.5	/	2.11
<b>[m-C<sub>8</sub>im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub></b>	117.6±3.7	0.75	147	/	14.7
<b>[o-C<sub>8</sub>im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub></b>	>391.9	48.99	1959.5	/	10.05

Tabella 3.2 – Valori di IC<sub>50</sub> della linea cellulare mammaria non tumorale (HB2) a 24 h di [*p*-C<sub>8</sub>im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub>, di [*m*-C<sub>8</sub>im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub> e [*o*-C<sub>8</sub>im][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub> e SI (HB2<sub>IC50</sub>/MIC<sub>90</sub> *E. coli*), (HB2<sub>IC50</sub>/MIC<sub>90</sub> *K. rhizophila*), (HB2<sub>IC50</sub>/MIC<sub>90</sub> *S. aureus*) e (HB2<sub>IC50</sub>/MIC<sub>90</sub> *B. subtilis*).

### 3.3.2 Idro- ed ionogel supramolecolari: uno studio delle loro proprietà ed attività antibatteriche

I risultati descritti in questo capitolo sono già stati pubblicati in:

Rizzo C., Arrigo R., Dintcheva N.T., Gallo G., Giannici F., Noto R., Sutera A., Vitale P., D'Anna F. Supramolecular Hydro- and Ionogels: A Study of Their Properties and Antibacterial Activity. Chem. Eur. J., 2017, 23, 1 – 16.

#### 3.3.2.1 Attività antibatterica dei DOS

Soluzioni di DOS in DMSO e IL (usati come solventi per gelificazione) sono stati testati per la loro attività antimicrobica nei confronti di un ceppo Gram-negativo (*E. coli*) e due ceppi Gram-positivi (*K. rhizophila* e *B. subtilis*). Preliminarmente, sono stati effettuati dei test microbiologici spottando su un overlay, contenente i differenti ceppi batterici tester, 1 e 10  $\mu$ L di soluzione in DMSO contenenti 1 e 10  $\mu$ g di un singolo DOS o 1, 10 e 25  $\mu$ g di un singolo IL. Un volume di 10  $\mu$ L di DMSO puro è stato usato come controllo negativo per accertare che l'attività antimicrobica fosse dovuta esclusivamente alla solubilizzazione dei componenti. Questa analisi ha rivelato che i DOS sintetizzati possedevano un'attività antibatterica, valutata come alone di inibizione della crescita batterica (Fig. 3.9).

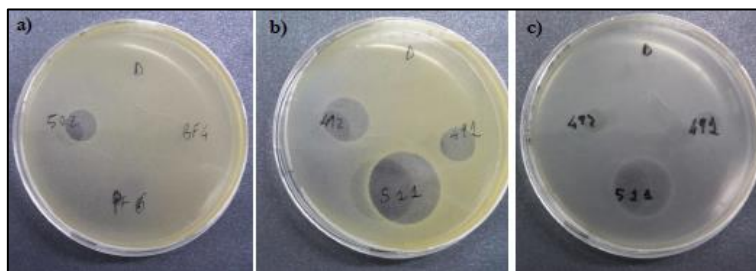


Figura 3.9 - Attività antimicrobica dei singoli componenti dei gel mediante il test di diffusione su agar eseguito utilizzando a), b) *K. rhizophila* e c) *E. coli*. D = DMSO, 502 = [*p*-C12im][D-Ala-D-Ala]<sub>2</sub>, BF4 = [bmim][BF<sub>4</sub>], PF6 = [bmim][PF<sub>6</sub>], 491 = [*p*-C12im][L-Ile]<sub>2</sub>, 492 = [*p*-C12im][L-Phe]<sub>2</sub>. Dopo incubazione o.n. a 37 °C, la presenza di aloni chiari indica l'inibizione della crescita batterica a causa del composto spottato sull'overlay batterico.

Al contrario, gli IL non hanno alcun effetto sulla crescita batterica alle concentrazioni utilizzate. Quindi, è stata eseguita una valutazione quantitativa dell'efficacia antibatterica analizzando i valori di MIC<sub>90</sub> di ciascun DOS e IL nei confronti dei ceppi tester. I valori di MIC<sub>90</sub> sono stati determinati spettrofotometricamente come la concentrazione più bassa, che inibisce almeno il 90% della crescita batterica in colture liquide paragonate alle colture non trattate usate come controllo.

I valori di MIC<sub>90</sub> sono riportati nella Tab. 3.3, mentre un grafico della percentuale della crescita batterica in funzione della concentrazione del DOS o degli IL è riportato nella Fig. 3.10.

In base a dati riportati in letteratura (DembereInyamba *et al.*, 2004), l'attività antibatterica può essere attribuita alla capacità del catione di interagire con la membrana cellulare batterica attraverso i cationi endogeni. In seguito le interazioni con i componenti della membrana citoplasmatica possono causare la

rottura della membrana e la perdita di materiale citoplasmatico. La catena idrofobica ha la funzione fondamentale di interagire con la porzione idrofobica interna del doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare e, come precedentemente riportato, questo processo è favorito in presenza di lunghe catene alchiliche (Sharma *et al.*, 2015).

	MIC <sub>90</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) <i>E. coli</i>	MIC <sub>90</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) <i>K. rhizophila</i>	MIC <sub>90</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) <i>B. subtilis</i>
[p-C <sub>12</sub> im][L-Ile] <sub>2</sub>	3	0.5	3
[p-C <sub>12</sub> im][L-Phe] <sub>2</sub>	3	0.5	3
[p-C <sub>12</sub> im][D-Ala-D-Ala] <sub>2</sub>	3	0.5	3

Tabella 3.3 - MIC<sub>90</sub> dei DOS nei confronti di *E. coli*, *K. rhizophila* e *B. subtilis*.

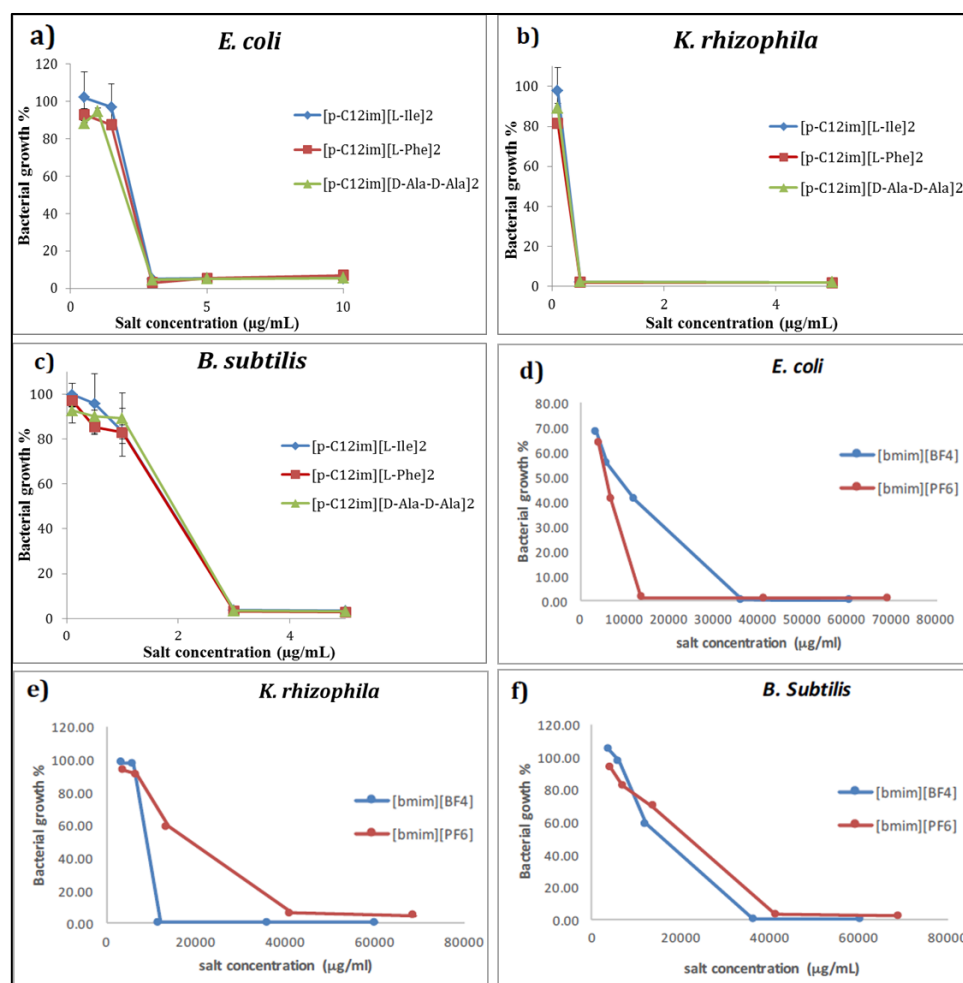


Figura 3.10 - Percentuale di crescita batterica in funzione della concentrazione di DOS e IL in colture di *E. coli* (a-d), *K. rhizophila* (b-e) e *B. subtilis* (c-f). I valori medi, calcolati come media di tre repliche, sono riportati come percentuale di OD<sub>600</sub> rispetto alle colture non trattate. Le deviazioni standard sono mostrate come barre verticali.

I risultati dei test antibatterici possono essere analizzati considerando i ceppi batterici e la struttura dei gelator. In generale, i valori di MIC<sub>90</sub> dei DOS non sono cambiati in funzione della natura dell'anione. Di recente, lo stesso comportamento è stato confermato dall'analisi dell'attività antibatterica di alcuni DOS in funzione sia della natura anionica che della lunghezza della catena alchilica, rivelando che il ruolo

dell'anione diventa determinante solo in presenza di catene alchiliche corte, cioè inferiori a C10 (Cancemi *et al.*, 2017). Nel presente lavoro in cui è usato un catione di dodecilimidazolio, la totale perdita dell'effetto anionico può essere spiegata alla luce del fenomeno sopra menzionato.

Un'analisi dei dati ottenuti in funzione dei ceppi batterici dimostra che i sali testati sono in grado di esercitare un'azione batterica specie-specifica. In effetti, in tutti i casi ed indipendentemente dalle differenze tra batteri Gram-positivi e Gram-negativi, i valori di MIC<sub>90</sub> non variano passando da *E. coli* a *B. subtilis*. Tuttavia, nel caso dei batteri Gram-positivi, è stato preso in considerazione il significativo calo dei valori di MIC<sub>90</sub> per *K. rhizophila*. È interessante notare, dal confronto con i dati precedentemente riportati in letteratura, che nel caso di *E. coli* e *B. subtilis*, i sali saggiati in questo lavoro hanno una maggiore efficacia antibatterica rispetto a quelli riportati in letteratura per alcuni oligomeri di imidazolio (Liu *et al.*, 2012; Riduan *et al.*, 2016).

Al fine di avere una profonda comprensione dell'efficienza antibatterica dei sali testati, è stata analizzata la cinetica di vitalità batterica, esponendo le cellule batteriche ad una quantità di DOS uguale al corrispondente valore di MIC<sub>90</sub>. Sebbene la vitalità di tutti i ceppi tester è risultata abolita del 100% dopo 24 ore di esposizione per tutti i DOS testati, lo studio della cinetica di vitalità ha evidenziato le differenze sull'efficacia battericida dei DOS in termini di tempi di uccisione ( $t_k$ ), cioè il tempo necessario per avere oltre il 90% dei batteri uccisi rispetto a quelli non trattati (Fig. 3.11; Tab. 3.4).

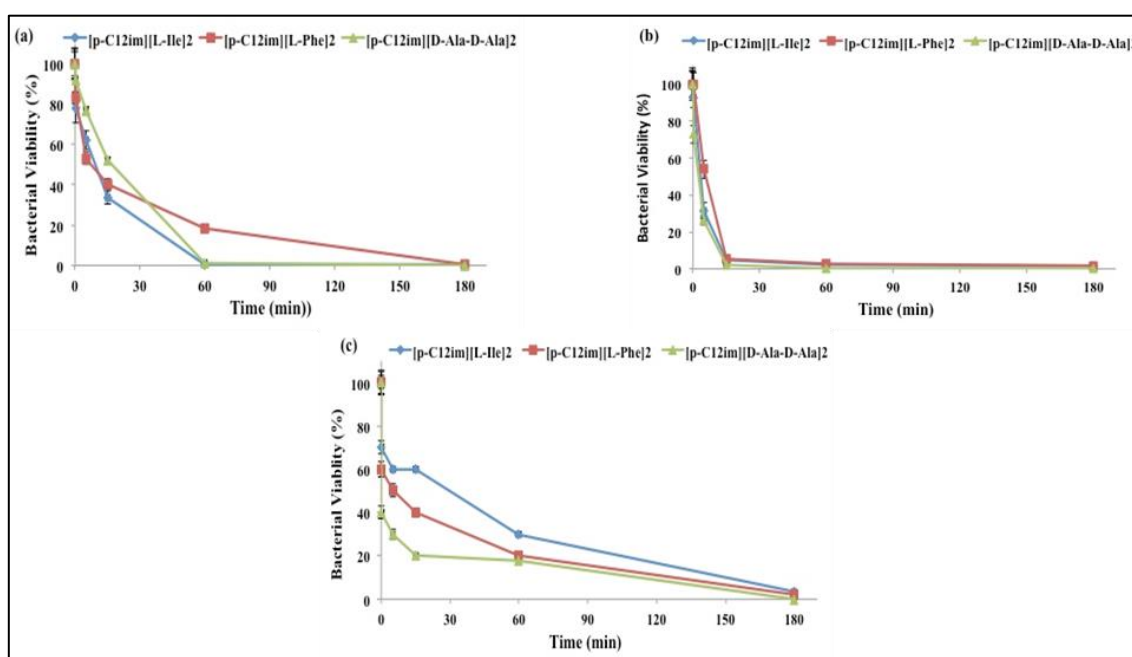


Figura 3.11 - Vitalità batterica (%), in funzione del tempo, delle colture di a) *E. coli*, b) *K. rhizophila* e c) *B. subtilis* trattate con una quantità di DOS corrispondente alla MIC<sub>90</sub>. I valori medi, calcolati dopo 0; 0,16; 5; 15; 60 e 180 min di esposizione ai DOS ed ottenuti da tre repliche, sono riportati come percentuale rispetto alle cellule non trattate (0 min). Le deviazioni standard sono mostrate come barre verticali.



In generale, l'analisi dei grafici indica che il  $t_k$  aumenta secondo la seguente tendenza: *K. rhizophila* < *E. coli* < *B. subtilis*. Ancora una volta, questa tendenza rimarca l'azione specie-specifica dei sali testati, come evidenziato dalle differenze significative di  $t_k$  rilevate tra *K. rhizophila* (15 min) e *B. subtilis* (3 ore).

bacterial strain	salt	concentration [ $\mu$ g/mL]	Time (min)	%(CFU/mL)	Time killing
<i>E. coli</i>	<b>[p-C12im][L-Ile]<sub>2</sub></b>	3	0	100±8	60 min
			0.16	78±7	
			5	62±5	
			15	34±3	
			60	0.73±0.38	
			180	0.48±0.25	
	<b>[p-C12im][L-Phe]<sub>2</sub></b>	3	0	100±6	180 min
			0.16	83±3	
			5	53±3	
			15	40±2	
			60	18.3±0.6	
			180	0.25±0.02	
	<b>[p-C12im] [D-Ala-D-Ala]<sub>2</sub></b>	3	0	100±7	60 min
			0.16	92±7	
			5	77±2	
			15	52±2	
			60	1.11±0.08	
			180	0	
<i>K. rhizophila</i>	<b>[p-C12im][L-Ile]<sub>2</sub></b>	0.5	0	100±9	15 min
			0.16	92±5	
			5	32±4	
			15	4.8±1.0	
			60	2.1±0.3	
			180	1.5±0.2	
	<b>[p-C12im][L-Phe]<sub>2</sub></b>	0.5	0	100±7	15 min
			0.16	100±6	
			5	54±5	
			15	5.7±1.5	
			60	2.7±0.4	
			180	1.8±0.1	
	<b>[p-C12im] [D-Ala-D-Ala]<sub>2</sub></b>	0.5	0	100±8	15 min
			0.16	73±5	
			5	26±2	
			15	2.4±0.6	
			60	0	
			180	0	
<i>B. subtilis</i>	<b>[p-C12im][L-Ile]<sub>2</sub></b>	3	0	100±5	180 min
			0.16	70±3	
			5	60±1	
			15	60±1	
			60	30±1	
			180	3.5±0.1	
	<b>[p-C12im][L-Phe]<sub>2</sub></b>	3	0	100±3	180 min
			0.16	60±3	
			5	50±3	
			15	40±2	
			60	20.0±0.5	
			180	2.0±0.3	
	<b>[p-C12im] [D-Ala-D-Ala]<sub>2</sub></b>	3	0	100±5	180 min
			0.16	40±3	
			5	30±3	
			15	20±1	
			60	18.0±0.5	
			180	0	

Tabella 3.4 - Percentuale di CFU/mL determinata tramite le colture di ceppi tester dopo esposizione alla MIC<sub>90</sub> dei DOS in funzione del tempo. I valori medi, ottenuti calcolando la media di tre repliche, sono determinati rispetto alle cellule batteriche non trattate (0 min).



Nel caso dei batteri Gram-positivi,  $t_k$  è risultata indipendente dalla natura dell'anione dei sali testati. Diversamente, se viene preso in considerazione *E. coli*,  $t_k$  diminuisce seguendo la seguente tendenza:  $[\text{L-Ile}] \approx [\text{D-Ala-D-Ala}] < [\text{L-Phe}]$ , evidenziando una migliore capacità degli anioni alifatici nel favorire una rapida azione antibatterica.

Un confronto dei dati ottenuti in questo lavoro con quelli riportati in letteratura evidenzia che i nostri DOS agiscono in tempi più lunghi rispetto agli oligomeri antibatterici di imidazolio descritti da Zhang *et al.* Tuttavia, i valori di  $t_k$  rilevati da noi sono paragonabili a quelli riportati utilizzando peptidi antibatterici e nanoparticelle d'argento modificate, che sono in grado di agire in un range temporale che va da minuti a ore (Madkour *et al.*, 2009; Engler *et al.*, 2012; Boyce 2013). D'altra parte, prendendo in considerazione i dati ottenuti con *E. coli* e confrontandoli con quelli riportati in letteratura in cui si fa uso dei liquidi ionici come antibatterici, è stato riscontrato una maggiore efficacia di azione dei nostri sali basati su  $[\text{L-Ile}]$  e  $[\text{D-Ala-D-Ala}]$  (60 e 180 minuti per i nostri composti di sintesi, rispettivamente) (Guo *et al.*, 2015). Incoraggiati da questi risultati ottenuti per i gelator, è stata studiata l'attività di fasi gel.

### 3.3.2.2 Attività antimicrobica di fasi gel

Per valutare se i DOS gelificati fossero in grado di mantenere la loro capacità antibatterica, sono stati eseguiti dei saggi microbiologici mediante prove di diffusione su agar eseguiti saggiando 10 e 50  $\mu\text{L}$  di gel su un overlay batterico eseguito su una piastra di LB agar. Tutti i gel hanno mostrato attività antibatterica (Fig. 3.12), visibile mediante gli aloni di inibizione della crescita batterica, indicando che il coinvolgimento dei sali nella struttura supramolecolare dei gel non ha inficiato la loro attività microbiologica.

In Fig. 3.13 sono riportati i valori dell'area calcolata dalle zone di inibizione, sia in funzione della natura che della quantità di gel per tutti i ceppi testati. Basandoci sui dati precedentemente analizzati per i sali liberi, le fasi gel hanno mostrato un'attività specie-specifica come indicato dall'area più grande delle zone di inibizione misurate per  $[\text{p-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/[\text{bmim}][\text{BF}_4]$  e  $[\text{p-C}_{12}\text{im}][\text{L-Phe}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$  nei confronti di *E. coli*,  $[\text{p-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/[\text{bmim}][\text{BF}_4]$  nei confronti di *K. rhizophila* e  $[\text{p-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/\text{PBS}$  (1X) nei confronti di *B. subtilis*.

In seguito, ulteriori studi sono stati condotti sugli ionogel testando la loro capacità antimicrobica contro colture batteriche liquide (Fig. 3.14a), ma gli idrogel in PBS (1X) sono stati esclusi, poiché non erano in grado di resistere al contatto con il mezzo di coltura liquido. Come gel di riferimento sono stati testati  $[\text{p-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/[\text{bmim}][\text{BF}_4]$ ,  $[\text{p-C}_{12}\text{im}][\text{L-Phe}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$  e  $[\text{p-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ ; nel primo caso, però, è stata osservata una leggera diminuzione del volume del gel a causa della natura idrofilica di  $[\text{bmim}][\text{BF}_4]$ . Questo ci ha indotto ad evitare il suo uso con le colture liquide. Al contrario, gli ionogel in  $[\text{bmim}][\text{PF}_6]$  sono risultati resistenti alle colture liquide in LB.

Successivamente la vitalità batterica è stata valutata spottando 10  $\mu\text{L}$  di coltura batterica trattata o meno, e le relative diluizioni seriali su piastre di LB-agar che sono state incubate per una notte a 37 °C. Curiosamente, nelle piastre di LB-agar è stata osservata la completa assenza di colonie batteriche dalle colture trattate (Fig. 3.14b), mentre delle colonie batteriche sono cresciute dalle colture controllo (Fig.

3.14c), mantenendo in tal modo le proprietà battericide osservate per i soli DOS. Questa caratteristica battericida è stata mantenuta anche dopo cinque, venti e trenta giorni dalla preparazione dei gel.

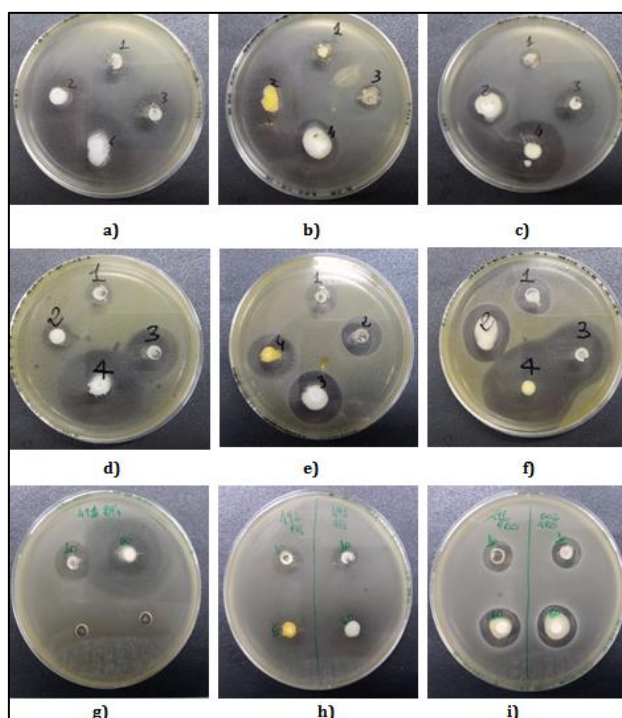


Figura 3.12 - Attività antimicrobica dei gel sui ceppi tester di *E. coli* (a-c), *K. rhizophila* (d-f) e *B. subtilis* (g-i). a-f) gli spot 1 e 3 corrispondono a 10  $\mu$ L di gel, gli spot 2 e 4 corrispondono a 50  $\mu$ L di gel. a), d) 1 e 2 sono gli spot di  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ , 3 e 4 sono gli spot di  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/[\text{bmim}][\text{BF}_4]$ ; b), e) 1 e 2 sono gli spot di  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Phe}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ , 3 e 4 sono gli spot di  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/\text{PBS}$  (1X); c), f) 1 e 2 sono gli spot di  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{D-Ala-D-Ala}]_2/\text{PBS}$  (1X). In (g-h) 10 e 50  $\mu$ L di gel sono stati spottati nella parte superiore ed inferiore della piastra come indicato. g) 491 BF4 corrisponde a  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/[\text{bmim}][\text{BF}_4]$ ; h) 492 PF6 corrisponde a  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Phe}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ , 491 PF6 corrisponde a  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ ; i) 491 PBS corrisponde a  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/\text{PBS}$  (1X), 502 PBS corrisponde a  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{D-Ala-D-Ala}]_2/\text{PBS}$  (1X).

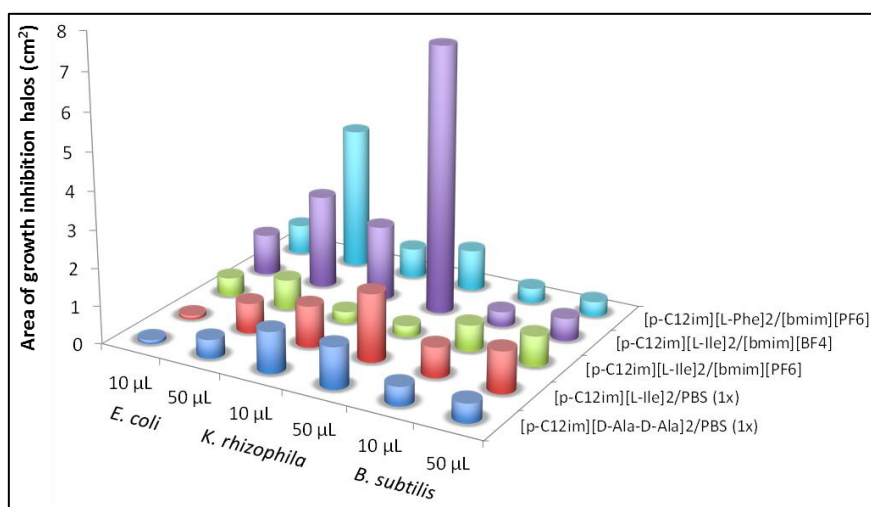


Figura 3.13 - L'area degli aloni di inibizione della crescita batterica è riportata in funzione dei gel usati e dei ceppi testati. I valori medi sono calcolati dalla media di tre repliche.

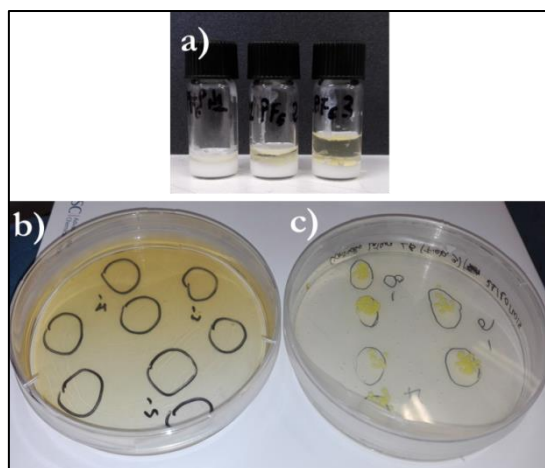


Figura 3.14 - a) Aliquota di 250  $\mu\text{L}$  al 7% in peso dello ionogel  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$  sovrapposto ad aliquote di colture batteriche da 100, 250 e 500  $\mu\text{L}$ ; b) piastre di LB-agar in cui non è cresciuta nessuna colonia batterica in seguito ad esposizione per 24 h allo ionogel al 7% in peso  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Ile}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ ; sono state spottate aliquote da 10  $\mu\text{L}$  di diluizioni 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , rispettivamente; c) piastre di LB-agar in cui sono cresciute le colonie batteriche da colture non esposte utilizzate come controllo; sono state spottate aliquote da 10  $\mu\text{L}$  di diluizioni  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ , rispettivamente.

Per ottenere un confronto quantitativo tra i DOS liberi e gelificati, sono stati analizzati i valori  $t_k$  del gel  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Phe}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ . La scelta è ricaduta su questo gel poiché il corrispondente DOS libero era l'unico a mostrare delle differenze nella sua cinetica di morte, in particolare, una capacità di uccidere più lentamente nel caso di *E. coli*. Nella Fig. 3.15, è mostrata la percentuale di vitalità batterica in funzione del tempo per tutti i ceppi testati.

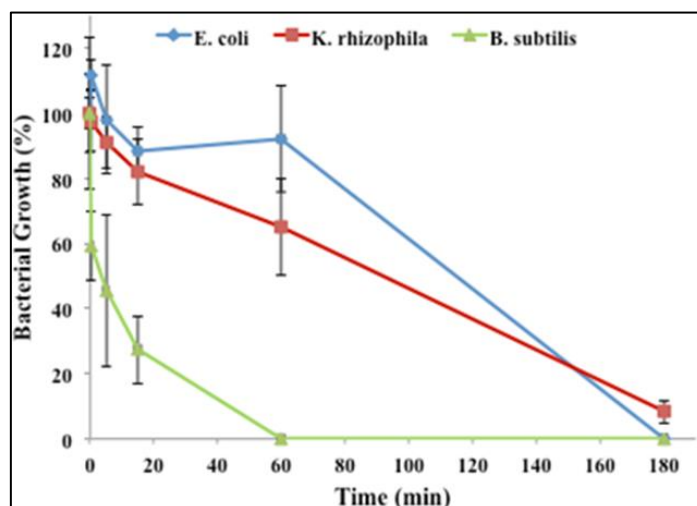


Figura 3.15 - Cinetica della percentuale di vitalità batterica in colture dei ceppi tester a) *E. coli*, b) *K. rhizophila* e c) *B. subtilis* esposti al gel  $[p\text{-C}_{12}\text{im}][\text{L-Phe}]_2/[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ . I valori medi, calcolati dopo 0; 0,16; 5; 15; 60 e 180 minuti di esposizione e la media di tre repliche, sono riportati come percentuale rispetto alle cellule non trattate (0 min). Le deviazioni standard sono mostrate come barre verticali.

Analizzando i grafici sopra raffigurati notiamo un andamento specie-specifico perché la velocità di azione del composto gelificato aumenta contro *K. rhizophila* ( $t_k = 15$  e 180 min per il DOS libero e gelificato,

rispettivamente), rimane uguale per *E. coli* ( $t_k = 180$  min sia per il DOS libero che per quello gelificato) e diminuisce per *B. subtilis* ( $t_k = 180$  e 60 min per il DOS libero e gelificato, rispettivamente), suggerendo, di conseguenza, meccanismi di azione differenti per il DOS libero e gelificato. Sebbene gli aspetti meccanicistici molecolari devono essere chiariti in futuro, considerando il DOS libero/gelificato ed i ceppi tester in questione, possiamo affermare che il nostro composto gelificato esercita un'azione antibatterica comparabile ai liquidi ionici basati sull'imidazolio come riportato in letteratura (Guo *et al.*, 2015 e 2016).

Ulteriori controlli, per verificare un possibile rilascio di IL nella fase acquosa, sono stati eseguiti mettendo a contatto il terreno di coltura LB con gli ionogel e, successivamente, eseguendo delle analisi NMR a diversi intervalli di tempo. Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  sono stati registrati utilizzando un composto di riferimento ad una data concentrazione; in definitiva i segnali NMR non hanno influenzato lo spettro del gelator in  $\text{D}_2\text{O}$ .

L'analisi dei valori sopra riportati dimostra che la quantità di IL nella coltura liquida a  $t = 180$  min (il più alto valore di  $t_k$ ) era circa il 3% della quantità totale ( $16000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) di IL nella fase gel. Questo valore era vicino al valore di  $\text{MIC}_{90}$  di  $[\text{bmim}][\text{PF}_6]$  contro *E. coli* ( $13800 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; Tab. 3.5), ma significativamente inferiore a quello ricavato per *K. rhizophila* e *B. subtilis* ( $41100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; Tab. 3.5).

IL	$\text{MIC}_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>E. coli</i>	$\text{MIC}_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>K. rhizophila</i>	$\text{MIC}_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>B. subtilis</i>
<b><math>[\text{bmim}][\text{BF}_4]</math></b>	36,300	12,100	36,300
<b><math>[\text{bmim}][\text{PF}_6]</math></b>	13,800	41,100	41,400

Tabella 3.5 -  $\text{MIC}_{90}$  di IL nei confronti di *E. coli*, *K. rhizophila* e *B. subtilis*.

Questo risultato suggerisce un contributo all'attività antimicrobica dovuto all'IL rilasciato nei confronti del ceppo Gram-negativo, anche se questo non trova riscontro nell'effetto osservabile su  $t_k$ . D'altro canto, nel caso di batteri Gram-positivi, la quantità di IL rilasciata potrebbe non essere significativa in termini di attività antimicrobica.

Nel complesso, i nostri risultati dimostrano che la struttura supramolecolare del gel non abolisce l'attività antibatterica dei DOS. Tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini meccanicistiche per comprendere l'esatta natura e le specifiche interazioni tra i gel, i componenti rilasciati e la specificità dei ceppi batterici. L'osservazione sopra descritta concorda con quella osservata da Gunnlaugsson *et al.*, che riportano una maggiore attività di fasi gel rispetto a quella dei gelator, ipotizzando che la struttura supramolecolare complessiva potrebbe dare origine a più interazioni tipo legami ad idrogeno che potrebbero instaurarsi con la parete cellulare batterica e possibilmente distruggerla o prevenirne la formazione.



### 3.4 Conclusioni

Nel complesso, i risultati ottenuti in questo lavoro hanno dimostrato che il pannello di DOS utilizzato è in grado di esercitare degli interessanti effetti antimicrobici. Il confronto tra i dati raccolti per i DOS testati ed alcuni sali di sodio corrispondenti, ha messo in evidenza la piena correlazione tra struttura ed attività biologica. Infatti, il confronto ha dimostrato che l'attività biologica è il risultato di un'azione combinata della struttura del catione e dell'anione. L'analisi della correlazione tra caratteristiche strutturali e l'attività biologica delinea la diversa rilevanza dei fattori menzionati sopra a seconda della cellula bersaglio. In particolare, per quanto riguarda l'azione anti-proliferativa, l'idrofobicità gioca il ruolo più determinante e potrebbe essere responsabile della diversa abilità dei DOS di interagire con i lipidi della membrana cellulare. Tuttavia, il contributo principale sembra derivare dai cationi con l'effetto anionico che diventa rilevante solo in presenza di una catena alchilica corta (C6 e C8).

Nello specifico, quando è stata valutata l'attività antimicrobica, sono state ottenute varie tendenze, infatti l'attività biologica può essere considerata come risultato dell'azione combinata di idrofobicità ed il grado di interazione catione-anione che a sua volta è dovuto alla delocalizzazione della carica dell'anione. Tuttavia, la specificità dei fattori analizzati merita ulteriori indagini meccanicistiche in funzione i) della struttura della parete batterica cellulare che può contrastare la diffusione di composti nocivi, come la presenza della membrana esterna nei batteri Gram-negativi e/o la differenza nell'ultrastruttura della parete cellulare, e ii) dell'attività dei trasportatori dei farmaci che può aumentare la tolleranza delle cellule batteriche nei confronti dei DOS tossici (Ruegg *et al.*, 214). Sebbene un confronto completo non possa essere eseguito, poiché la maggior parte degli anioni utilizzati in questo lavoro non sono mai stati utilizzati per la preparazione dei sali monocationici, si possono ipotizzare alcune considerazioni sui sali basati su [Br] e [BF<sub>4</sub>] (Kumar *et al.*, 2009). Alcuni anni fa, sono stati raccolti alcuni dati sui valori di MIC<sub>90</sub> utilizzando l'1-metil-3-naftilimidazolio tetrafluoroborato, il cloruro e l'1-alcossimetil-3-ottilimidazolio tetrafluoroborato contro *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus* (Pernak *et al.*, 2003). Nel nostro studio, sono stati ottenuti valori di MIC<sub>90</sub> superiori a quelli determinati nel lavoro in cui hanno usato sali di diimidazolio con [Br] e [BF<sub>4</sub>] ed aventi catene alchiliche di lunghezza comparabile (Pernak *et al.*, 2003; Malhotra and Kumar, 2010). Nel complesso, questi studi sottolineano il ruolo positivo esercitato da tali composti strutturalmente simili ai nostri sali, anche se sono meno attivi rispetto ad alcuni oligomeri di imidazolio preparati di recente (Liu *et al.*, 2012; Riduan *et al.*, 2016).

In conclusione, i nostri DOS sintetizzati rappresentano un promettente nuovo antimicrobico, sfruttabile per lo sviluppo di diverse applicazioni in ambito biologico ed, in prospettiva, potrebbero essere incorporati nella struttura di composti specifici per i microrganismi (Gravel and Schmitzer, 2017). La delucidazione dei target molecolari dei DOS rappresenta un'ulteriore ed importante sfida per migliorare, controllare e sfruttare le loro attività biologiche.



Per quanto riguarda i gel supramolecolari, i dati raccolti in questo lavoro hanno dimostrato che unendo le proprietà dei cationi di diimidazolio con quelle di anioni amminoacidici è possibile ottenere nuovi sali organici, che sono in grado di comportarsi sia come gelator a basso peso molecolare che come composti antibatterici. Questi sali organici sono in grado di formare sia idro- che ionogel. I dati raccolti hanno mostrato che le proprietà dei DOS e delle corrispondenti fasi gel sono influenzate dalla differente natura degli anioni. Infatti, i sali con un più alto grado di ordine strutturale o i gel con temperature di fusione più elevate sono stati ottenuti con anioni in grado di formare interazioni  $\pi$ - $\pi$  ([L-Phe]) o aventi più siti per la formazione di legami idrogeno ([D-Ala- D-Ala]). Naturalmente la diversa natura degli anioni influenza la morfologia delle fasi gel, presentando una consistenza più densa in presenza di anioni con amminoacidi aromatici e domini sferulitici in presenza di anioni dipeptidici. Quest'ultimo anione è in grado di promuovere un processo di gelificazione più rapido e dà origine ad una fase gel che mostra un'alta resistenza al flusso.

È interessante notare che alcuni dei materiali soft ottenuti hanno capacità di autoriparazione e questa proprietà può essere molto importante per quanto riguarda le applicazioni delle fasi gel. A questo proposito, i sali organici utilizzati in questo lavoro hanno mostrato una pronunciata attività antibatterica contro ceppi Gram-positivi e Gram-negativi. Come conseguenza della presenza di una lunga catena alchilica sullo ione di imidazolio, l'attività antibatterica dei DOS non dipende dalla struttura dell'anione (Cancemi *et al.*, 2017). Tuttavia, i dati suggeriscono un effetto specie-specifico come evidenziato dal confronto tra i risultati raccolti per i ceppi Gram-positivi e Gram-negativi. Interessantemente, l'attività antibatterica non è abolita in seguito all'inclusione dei DOS nella rete supramolecolare delle fasi gel, indicando il verificarsi di interazioni con la parete cellulare batterica anche in questa fase condensata. In particolare, tutte le fasi gel testate hanno mantenuto l'attività battericida per un lungo periodo ed in maniera specie-specifica. La combinazione delle caratteristiche chimico-fisiche ed antimicrobiche di queste fasi gel ci consentono di valutarne l'utilizzo per future applicazioni, come rivestimenti non covalenti per tutti i materiali in cui l'inibizione della crescita batterica è una caratteristica desiderata (Klibanov, 2007; Li *et al.*, 2011).

In linea di principio, tutti i gel ottenuti possono essere utilizzati come rivestimenti non covalenti, in quanto possono essere applicati come colori ad olio. La limitazione sul loro uso potrebbe essere dovuta alla temperatura nel caso degli idrogel, o al contatto con una fase acquosa nel caso degli ionogel basati sul [bmim][BF<sub>4</sub>]. Nonostante ciò, nel caso degli ionogel, la bassa tensione di vapore e l'alta stabilità termica del solvente intrappolato nella matrice gelatinosa rappresentano una garanzia della stabilità e dell'attività a lungo termine per il rivestimento non covalente. Questi vantaggi svolgono un ruolo significativo nel caso di [p-C12im][L-Ile]<sub>2</sub>/[bmim] [PF<sub>6</sub>], che coniuga una prestazione ottimale, da un punto di vista antibatterico, ad una buona stabilità termica, alta resistenza al flusso, capacità di autoripararsi e stabilità al contatto con un ambiente acquoso.



## 3.5 Materiali e Metodi

### Ceppi utilizzati

*Escherichia coli* K12 DH10B (Invitrogen)

*Kokuria rhizophila* ATCC 9341

*Bacillus subtilis* ATCC 6051

*Staphylococcus aureus* ATCC 29213

### Preparazione generale

#### Test di diffusione dell'agar

- **Sali di diimidazolio:** sono stati usati 10 mL di soft-agar - cioè 0,7% (w/v) bactoagar (Difco) in Brodo Luria Bertani (LB) (Invitrogen) - contenente  $10^8$  -  $10^9$  cellule batteriche (unità formanti colonie o CFU) di un ceppo tester scelto per ottenere un overlay batterico (Baldi *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2016). Due differenti quantità di DOS, 5 e 50  $\mu\text{g}$  sono state direttamente spottate sull'overlay batterico sulla piastra agarizzata. Gli aloni di inibizione della crescita, provenienti da tre replicati indipendenti per ogni ceppo, sono stati misurati dopo l'incubazione notturna a 37 °C. Il DMSO, utilizzato per solubilizzare i DOS, è stato preliminarmente testato per valutarne la tossicità batterica.
- **Idro- ed ionogel supramolecolari:** sono stati usati 10 mL di soft-agar - cioè 0,7% (w/v) bactoagar (Difco) in Brodo Luria Bertani (LB) (Invitrogen) - contenente  $10^8$  -  $10^9$  cellule batteriche (unità formanti colonie o CFU) di un ceppo tester scelto per ottenere un overlay batterico (Baldi *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2016). I sali sono stati solubilizzati in DMSO a concentrazioni di 1 e 25  $\text{mg mL}^{-1}$  per i DOS ed i IL, rispettivamente. I gel sono stati utilizzati con il 7% in peso di gelator. Volumi di 5 e 10 ml delle soluzioni stock dei sali sono stati direttamente spottati sull'overlay batterico per valutare la loro attività antibatterica, mentre volumi di 10 e 50  $\mu\text{L}$  di gel sono stati spottati in pozzetti precedentemente creati nell'overlay batterico. Gli aloni di inibizione della crescita, provenienti da tre replicati indipendenti per ogni ceppo, sono stati misurati dopo l'incubazione notturna a 37 °C. Il DMSO, utilizzato per solubilizzare i sali, ed i IL sono stati preliminarmente testati per valutarne la tossicità batterica.

#### Saggi quantitativi in liquido

- **Sali di diimidazolio:** sospensioni differenti di 1 mL di terreno di crescita LB, contenente  $10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  di ciascun ceppo tester, sono stati incubati in multiwell da 24 pozzetti sterili (37 °C, 200 rpm) con diverse concentrazioni di ciascun DOS (Baldi *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2016). Le colture batteriche non trattate sono state utilizzate come condizione controllo. Ogni coltura è stata eseguita in triplicato. Dopo 24 ore di incubazione, i valori  $\text{MIC}_{90}$  sono stati determinati spettrofotometricamente come concentrazione minima tra quelli testati che hanno inibito il 90%



della crescita batterica ( $MIC_{90}$ ) rispetto alla coltura non trattata in termini di densità ottica (OD) misurata a 600 nm. Il DMSO, utilizzato per solubilizzare i DOS, è stato preliminarmente testato per valutare l'inibizione della crescita in 1 mL di terreno liquido LB. In particolare, il DMSO è stato testato alla concentrazione di 5% v/v, che è maggiore della concentrazione massima di DMSO (3,3% v/v) utilizzata per la solubilizzazione dei DOS impiegati nei test con le cellule batteriche. Un test statistico (ANOVA) è stato eseguito per valutare il significato ( $p < 0,05$ ) delle misurazioni spettrofotometriche utilizzando il software XLSTAT (Addinsoft). Ogni misurazione è stata ottenuta da tre repliche biologiche e tecniche.

- **Idro- ed ionogel supramolecolari:** sospensioni differenti di 1 ml di terreno di crescita LB, contenente  $10^6$  CFU  $ml^{-1}$  di ciascun ceppo tester, sono stati incubati in multiwell da 24 pozzetti sterili (37 °C, 200 rpm) con diverse concentrazioni di ciascun DOS che vanno da 0 a  $10 \mu g ml^{-1}$  come concentrazione finale (Baldi *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2016). Le colture batteriche non trattate sono state utilizzate come condizione controllo. Dopo 24 ore di incubazione, i valori  $MIC_{90}$  sono stati determinati spettrofotometricamente come concentrazione minima tra quelli testati che hanno inibito il 90% della crescita batterica ( $MIC_{90}$ ) rispetto alla coltura non trattata in termini di densità ottica (OD) misurata a 600 nm. Il DMSO, utilizzato per solubilizzare i sali, ed i IL sono stati preliminarmente testati per valutare l'inibizione della crescita in 1 mL di terreno liquido LB. In particolare, il DMSO è stato testato alla concentrazione di 5% v/v, che è maggiore della concentrazione massima di DMSO (1% v/v) utilizzata per la solubilizzazione dei DOS impiegati nei test con le cellule batteriche. Inoltre, l'attività battericida dei DOS è stata valutata mediante diluizioni seriali di ciascuna coltura. A diversi tempi (0; 0,16; 5; 15; 60; 180 e 1440 min) 10  $\mu l$  di ciascuna coltura e le loro diluizioni seriali sono state poste su piastre di terreno agarizzato LB ed incubate per una notte a 37 °C per la conta delle cellule vitali in termini di CFU. L'attività battericida dei DOS gelator è stata valutata mettendo 100, 250 e 500  $\mu L$  del terreno di crescita LB contenente ciascun ceppo tester ( $10^6$  CFU  $mL^{-1}$ ) sulla superficie dei diversi ionogel disposti sul fondo delle fiale. Le colture sono state incubate per 24 h a 37 °C e successivamente 10  $\mu l$  di ciascuna coltura e le loro diluizioni seriali sono state usate per la conta delle cellule vitali in termini di CFU come descritto sopra. Nel caso di  $[p-C12im][L-Phe]_2/[bmim][PF_6]$ , a diversi tempi (0; 0,16; 5; 15; 60; 180 e 1440 min) 10  $\mu l$  di ciascuna coltura e le loro diluizioni seriali sono state usate per la conta delle cellule vitali in termini di CFU. Colture in parallelo eseguite in fiale senza gel sono state utilizzate come controllo. Ogni coltura è stata eseguita in triplicato. Un test statistico (ANOVA) è stato eseguito per valutare il significato ( $p < 0,05$ ) delle misurazioni spettrofotometriche utilizzando il software XLSTAT (Addinsoft). Ogni misurazione è stata ottenuta da tre repliche biologiche e tecniche.





### 3.6 Bibliografia

- Alberto E.E., Rossato L.L., Alves S.H., Alves D., Braga A.L. (2011) Imidazolium ionic liquids containing selenium: synthesis and antimicrobial activity. *Org Biomol Chem*, Feb 21;9(4):1001-3.
- Al-Mohammed N.N., Alias Y., Abdullah Z. (2015) Bis-imidazolium and benzimidazolium based gemini-type ionic liquids structure: synthesis and antibacterial evaluation. *RSC Adv*, 5, 92602–92617.
- Amde M., Liu J.F., Pang L. (2015) Environmental Application, Fate, Effects, and Concerns of Ionic Liquids: A Review. *Environ Sci Technol*, Nov 3;49(21):12611-27.
- Azam S.S., Abbasi S.W., Akhtar A.S., Mirza M. (2014) Comparative modeling and molecular docking studies of d-Alanine:d-alanine ligase: a target of antibacterial drugs. *Med. Chem. Res.*, 23, 4108–4137.
- Baldi F., Daniele S., Gallo M., Paganelli S., Battistel D., Piccolo O., Faleri C., Puglia A.M., Gallo G. (2016) Polysaccharide-based silver nanoparticles synthesized by *Klebsiella oxytoca* DSM 29614 cause DNA fragmentation in *E. coli* cells. *BioMetals*, 29, 321–331.
- Boyce J.M. (2013) Update on hand hygiene. *Am J Infect Control*, May;41(5 Suppl):S94-6.
- Butorac R.R., Al-Deyab S.S., Cowley A.H. (2011) Syntheses, structures and antimicrobial activities of bis(imino)acenaphthene (BIAN) imidazolium salts. *Molecules*, Apr 15;16(4):3168-78.
- Cancemi P., Buttacavoli M., D'Anna F., Feo S., Fontana R.M., Noto R., Sutera A., Vitale P., Gallo G. (2017) The effects of structural changes on the anti-microbial and anti-proliferative activities of diimidazolium salts. *New J. Chem.*, 41, 3574–3585.
- Cho C.W., Park J.S., Stolte S., Yun Y.S. (2016) Modelling for antimicrobial activities of ionic liquids towards *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* using linear free energy relationship descriptors. *J Hazard Mater*, Jul 5;311:168-75.
- Cloutier M., Mantovani D., Rosei F. (2015) Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. *Trends Biotechnol*. Nov;33(11):637-52.
- Coleman D., Spulak M., Garcia M.T., Gathergood N. (2012) Antimicrobial toxicity studies of ionic liquids leading to a 'hit' MRSA. *Green Chem.*, 14, 1350–1356.
- Conte A., Longano D., Costa C., Ditaranto N., Ancona A., Cioffi N., Scrocco C., Sabbatini L., Contk F., Del Nobile M.A. (2013) A novel preservation technique applied to fiordilatte cheese. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 19, 158–165.
- Dangge G., Xiyang D., Chen C., Bin L., Jianzhong M. (2015) Synthesis of Polymer Quaternary Ammonium Salt Containing Epoxy Group/Nano ZnO Long-Acting Antimicrobial Coating for Cotton Fabrics. *Ind. Eng. Chem., Res.*, 54, 10560–10567.
- Daniel V.P., Murukan B., Kumari B.S., Mohanan K. (2008) Synthesis, spectroscopic characterization, electrochemical behaviour, reactivity and antibacterial activity of some transition



- metal complexes with 2-(N-salicylideneamino)-3-carboxyethyl-4,5-dimethylthiophene. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, Jul;70(2):403-10.
- Danishuddin, Khan A.U. (2016) Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design. *Drug Discov Today*, Aug;21(8):1291-302.
  - D'Anna F., Vitale P., Marullo S., Noto R. (2012) Geminal imidazolium salts: a new class of gelators. *Langmuir*, Jul 24;28(29):10849-59.
  - D'Anna F., Vitale P., Ferrante F., Marullo S., Noto R. (2013) The Gelling Ability of Some Diimidazolium Salts: Effect of Isomeric Substitution of the Cation and Anion. *ChemPlusChem*, 78, 331–342.
  - D'Anna F., Rizzo C., Vitale P., Lazzara G., Noto R. (2014) Dicationic organic salts: gelators for ionic liquids. *Soft Matter*, Dec 14;10(46):9281-92.
  - D'Anna F., Noto R. (2014) Di- and Tricationic Organic Salts: An Overview of Their Properties and Applications. *Eur. J. Org. Chem.*, 4201–4223.
  - Delahaye E., Gobel R., Lobbicke R., Guillot R., Sieber C., Taubert A. (2012) Silica ionogels for proton transport. *J. Mater. Chem.*, 22, 17140–17146.
  - Demberelnyamba D., Kim K.S., Choi S., Park S.Y., Lee H., Kim C.J., Yoo I.D. (2004) Synthesis and antimicrobial properties of imidazolium and pyrrolidinium salts. *Bioorg Med Chem*, Mar 1;12(5):853-7.
  - Ditaranto N., Loperfido S., van der Werf I., Mangone A., Cioffi N., Sabbatini L. (2011) Synthesis and analytical characterisation of copper-based nanocoatings for bioactive stone artworks treatment. *Anal Bioanal Chem*, Jan;399(1):473-81.
  - Du Y., Yu M., Ge J., Ma P.X., Chen X., Lei B. (2015) Development of a Multifunctional Platform Based on Strong, Intrinsically Photoluminescent and Antimicrobial Silica-Poly(citrates)-Based Hybrid Biodegradable Elastomers for Bone Regeneration. *Adv. Funct. Mater.*, 25, 5016–5029.
  - Dupont J. (2011) From molten salts to ionic liquids: a "nano" journey. *Acc Chem Res*, Nov 15;44(11):1223-31.
  - Durango A.M., Soares N.F.F., Andrade N.J. (2006) Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 17, 336–341.
  - El-hadedy D.E., El-gammal E.W. (2014) Cloning of nis gene and Nisin purification from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Fc2. *Afr. J. Biotechnol.*, 13, 4711–4719.
  - Elshaarawy R.F., Janiak C. (2014) Toward new classes of potent antibiotics: synthesis and antimicrobial activity of novel metallosalicylidene-imidazolium salts. *Eur J Med Chem*, Mar 21;75:31-42.
  - Engler A.C., Wiradharma N., Ong Z.Y., Coady D.J., Hedrick J.L., Yang Y.-Y. (2012) Polymeric Materials with Antimicrobial Activity: From Synthesis to Applications *Nano. Today*, 7, 201–222.



- Garaga M.N., Persson M., Yaghini N., Martinelli A. (2016) Local coordination and dynamics of a protic ammonium based ionic liquid immobilized in nano-porous silica micro-particles probed by Raman and NMR spectroscopy. *Soft Matter*, Mar 7;12(9):2583-92.
- Gatlin C.L., Pieper R., Huang S.T., Mongodin E., Gebregeorgis E., Parmar P.P., Clark D.J., Alami H., Papazisi L., Fleischmann R.D., Gill S.R., Peterson S.N. (2006) Proteomic profiling of cell envelope-associated proteins from *Staphylococcus aureus*. *Proteomics*, Mar;6(5):1530-49.
- Gorke J., Srien F., Kazlauskas R. (2010) Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2010, 15, 40–53.
- Gravel J., Schmitzer A.R. (2017) Imidazolium and benzimidazolium-containing compounds: from simple toxic salts to highly bioactive drugs. *Org Biomol Chem*, Feb 1;15(5):1051-1071.
- Guo J., Xu Q., Zheng Z., Zhou S., Mao H., Wang B., Yan F. (2015) Intrinsically Antibacterial Poly(ionic liquid) Membranes: The Synergistic Effect of Anions. *ACS Macro Lett*, 4, 1094–1098.
- Guo J., Wang W., Hu J., Xie D., Gerhard E., Nisic M., Shan D., Qian G., Zheng S., Yang J. (2016) Synthesis and characterization of anti-bacterial and anti-fungal citrate-based mussel-inspired bioadhesives. *Biomaterials*, Apr;85:204-17.
- Hallett J.P., Welton T. (2011) Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis. *Chem Rev*, May 11;111(5):3508-76.
- Hoque J., Akkapeddi P., Yadav V., Manjunath G.B., Uppu D.S., Konai M.M., Yarlagadda V., Sanyal K., Haldar J. (2015) Broad spectrum antibacterial and antifungal polymeric paint materials: synthesis, structure-activity relationship, and membrane-active mode of action. *ACS Appl Mater Interfaces*, Jan 28;7(3):1804-15.
- Irwansyah I., Li Y.Q., Shi W., Qi D., Leow W.R., Tang M.B., Li S., Chen X. (2015) Gram-positive antimicrobial activity of amino acid-based hydrogels. *Adv Mater*, Jan 27;27(4):648-54.
- Iwai N., Nakayama K., Kitazume T. (2011) Antibacterial activities of imidazolium, pyrrolidinium and piperidinium salts. *Bioorg Med Chem Lett*, Mar 15;21(6):1728-30.
- Joshi N., Rawat K., Solanki P.R., Bohidar H.B. (2015) Biocompatible laponite ionogels based non-enzymatic oxalic acid sensor. *Sens Biosensing Res*, 5, 105–111.
- Kawai M., Yamada S., Ishidoshiro A., Oyamada Y., Ito H., Yamagishi J. (2009) Cell-wall thickness: possible mechanism of acriflavine resistance in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, Mar;58(Pt 3):331-6.
- Khudyakov J.I., D'haeseleer P., Borglin S.E., DeAngelis K.M., Woo H., Lindquist E.A., Hazen T.C., Simmons B.A., Thelen M.P. (2012) Ionic Liquids in the Biorefinery Concept: Challenges and Perspectives. *Proc. Natl. Acad., Sci. U. S. A.*, 109, E2173–E2182.
- Klibanov A.M. (2007) Permanently microbicidal materials coatings. *J. Mater. Chem.*, 17, 2479–2482.



- Krátký M., Vinšová J., Volková M., Buchta V., Trejtnar F., Stolaříková J. (2012) Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *Eur J Med Chem*, Apr;50:433-40.
- Krizsan A., Volke D., Weinert S., Sträter N., Knappe D., Hoffmann R. (2014) Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome. *Angew Chem Int Ed Engl*, Nov 3;53(45):12236-9.
- Kumar A., Vemula P.K., Ajayan P.M., John G. (2008) Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nat Mater*, Mar;7(3):236-41.
- Kumar R.A., Papaiconomou N., Lee J.M., Salminen J., Clark D.S., Prausnitz J.M. (2009) In vitro cytotoxicities of ionic liquids: effect of cation rings, functional groups, and anions. *Environ Toxicol*, Aug;24(4):388-95.
- Le Bideau J., Viau L., Vioux A. (2011) Ionogels, ionic liquid based hybrid materials. *Chem Soc Rev*, Feb;40(2):907-25.
- Li P., Poon Y.F., Li W., Zhu H.Y., Yeap S.H., Cao Y., Qi X., Zhou C., Lamrani M., Beuerman R.W., Kang E.T., Mu Y., Li C.M., Chang M.W., Leong S.S., Chan-Park M.B. (2011) A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. *Nat Mater*, Feb;10(2):149-56.
- Lin J., Qiu S., Lewis K., Klivanov A.M. (2003) Mechanism of bactericidal and fungicidal activities of textiles covalently modified with alkylated polyethylenimine. *Biotechnol Bioeng*, Jul 20;83(2):168-72.
- Liu L., Huang Y., Riduan S.N., Gao S., Yang Y., Fan W., Zhang Y. (2012) Main-chain imidazolium oligomer material as a selective biomimetic antimicrobial agent. *Biomaterials*, Nov;33(33):8625-31.
- Lunstroot K., Driesen K., Nockemann P., Van Hecke K., Van Meervelt L., Görller-Walrand C., Binnemans K., Bellayer S., Viau L., Le Bideau J., Vioux A. (2009) Lanthanide-doped luminescent ionogels. *Dalton Trans*, Jan 14;(2):298-306.
- Madkour A.E., Dabkowski J.M., Nusslein K., Tew G.N. (2009) Fast disinfecting antimicrobial surfaces. *Langmuir*, Jan 20;25(2):1060-7.
- Malhotra S.V., Kumar V. (2010) A profile of the in vitro anti-tumor activity of imidazolium-based ionic liquids. *Bioorg Med Chem Lett*, Jan 15;20(2):581-5.
- Maršavelski A., Smrečki V., Vianello R., Žinić M., Moguš-Milanković A., Šantić A. (2015) Supramolecular Ionic-Liquid Gels with High Ionic Conductivity. *Chemistry*, Aug 17;21(34):12121-8.
- Mercsa L., Albrecht M. (2010) Beyond catalysis: N-heterocyclic carbene complexes as components for medicinal, luminescent, and functional materials applications. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1903-1912.



- Milović N.M., Wang J., Lewis K., Klivanov A.M. (2005) Immobilized N-alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed. *Biotechnol Bioeng*, Jun 20;90(6):715-22.
- Mukhopadhyay P., Fujita N., Takada A., Kishida T., Shirakawa M., Shinkai S. (2010) Regulation of a real-time self-healing process in organogel tissues by molecular adhesives. *Angew Chem Int Ed Engl*, Aug 23;49(36):6338-42.
- Nayeri M., Nygård K., Karlsson M., Maréchal M., Burghammer M., Reynolds M., Martinelli A. (2015) The role of the ionic liquid C6C1ImTFSI in the sol-gel synthesis of silica studied using in situ SAXS and Raman spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys*, Apr 21;17(15):9841-8.
- Newman D.J., Cragg G.M. (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*, 79, 629–661.
- Ohsedo Y., Miyamoto M., Tanaka A., Watanabe H. (2013) Synthesis of a new squarylium alkylamide family and its organogelation ability. *New J. Chem.*, 37, 2874–2880.
- Pandurangan K., Kitchen J.A., Blasco S., Paradisi F., Gunnlaugsson T. (2014) Supramolecular pyridyl urea gels as soft matter with antibacterial properties against MRSA and/or *E. coli*. *Chem Commun (Camb)*, Sep 25;50(74):10819-22.
- Pang L.Q., Zhong L.J., Zhou H.F., Wu X.E., Chen X.D. (2015) Grafting of ionic liquids on stainless steel surface for antibacterial application. *Colloids Surf B Biointerfaces*, Feb 1;126:162-8.
- Parthasarathy A., Pappas H.C., Hill E.H., Huang Y., Whitten D.G., Schanze K.S. (2015) Conjugated Polyelectrolytes with Imidazolium Solubilizing Groups. Properties and Application to Photodynamic Inactivation of Bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces*, Dec 30;7(51):28027-34.
- Pascual A., Tan J.P., Yuen A., Chan J.M., Coady D.J., Mecerreyes D., Hedrick J.L., Yang Y.Y., Sardon H. (2015) Broad-spectrum antimicrobial polycarbonate hydrogels with fast degradability. *Biomacromolecules*, Apr 13;16(4):1169-78.
- Pernak J., Sobaszekiewicz K., Mirska I. (2003) Anti-microbial activities of ionic liquids. *Green Chem*, 5, 52–56.
- Plechkova N.V., Seddon K.R. (2008) Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem Soc Rev*, Jan;37(1):123-50.
- Rabea E.I., Badawy M.E., Rogge T.M., Stevens C.V., Höfte M., Steurbaut W., Smagghe G. (2005) Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives. *Pest Manag Sci*, Oct;61(10):951-60.
- Rajakumar P., Sekar K., Shanmugaiah V., Mathivanan N. (2008) Synthesis of some novel imidazole-based dicationic carbazolophanes as potential antibacterials. *Bioorg Med Chem Lett*, Aug 1;18(15):4416-9.
- Riduan S.N., Zhang Y. (2013) Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. *Chem Soc Rev*, Dec 7;42(23):9055-70.



- Riduan S.N., Yuan Y., Zhou F., Leong J., Su H., Zhang Y. (2016) Ultrafast Killing and Self-Gelling Antimicrobial Imidazolium Oligomers. *Small*, Apr 13;12(14):1928-34.
- Rizzo C., D'Anna F., Marullo S., Vitale P., Noto R. (2014) Two-Component Hydrogels Formed by Cyclodextrins and Dicationic Imidazolium Salts. *Eur. J. Org. Chem.*, 1013–1024.
- Rizzo C., D'Anna F., Noto R., Zhang M., Weiss R.G. (2016) Insights into the Formation and Structures of Molecular Gels by Diimidazolium Salt Gelators in Ionic Liquids or "Normal" Solvents. *Chemistry*, Aug 1;22(32):11269-82.
- Ruegg T.L., Kim E.M., Simmons B.A., Keasling J.D., Singer S.W., Lee T.S., Thelen M.P. (2014) An auto-inducible mechanism for ionic liquid resistance in microbial biofuel production. *Nat Commun*, Mar 26;5:3490.
- Russo M., Meli A., Sutera A., Gallo G., Chillura Martino D., Lo Meo P., Noto R. (2016) Photosynthesized silver–polyaminocyclodextrin nanocomposites as promising antibacterial agents with improved activity. *RSC Adv.*, 6, 40090–40099.
- Sangeetha N.M., Maitra U. (2005) Supramolecular gels: functions and uses. *Chem Soc Rev*, Oct;34(10):821-36.
- Scaffaro R., Botta L., Gallo G., Puglia A.M., (2015) Influence of Drawing on the Antimicrobial and Physical Properties of Chlorhexidine-Compounded Poly(caprolactone) Monofilaments. *Macromol. Mater. Eng.*, 300, 1268–1277.
- Sharma A., Prakash P., Rawat K., Solanki P.R., Bohidar H.B. (2015) Antibacterial and Antifungal Activity of Biopolymers Modified with Ionic Liquid and Laponite. *Appl Biochem Biotechnol*, Sep;177(1):267-77.
- Silhavy T.J., Kahne D., Walker S. (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. May;2(5):a000414.
- Soni I., Chakrapani H., Chopra S. (2015) Draft Genome Sequence of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Genome Announc*, Sep 24;3(5). pii: e01095-15.
- Tang J.S., Gillevet P.M. (2003) Reclassification of ATCC 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, Jul;53(Pt 4):995-7.
- Tew G.N., Scott R.W., Klein M.L., Degrado W.F. (2010) De novo design of antimicrobial polymers, foldamers, and small molecules: from discovery to practical applications. *Acc Chem Res*, Jan 19;43(1):30-9.
- Thamke V.R., Kodam K.M. (2016) Toxicity study of ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bromide on guppy fish, *Poecilia reticulata* and its biodegradation by soil bacterium *Rhodococcus hoagii* VRT1. *J Hazard Mater*, Dec 15;320:408-416.
- Tian J., Wong K.K., Ho C.M., Lok C.N., Yu W.Y., Che C.M., Chiu J.F., Tam P.K. (2007) Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*, Jan;2(1):129-36.



- Tiller J.C., Liao C.J., Lewis K., Klivanov A.M. (2001) Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proc Natl Acad Sci U S A*, May 22;98(11):5981-5.
- Trivedi J., Rao K.S., Kumar A. (2014) Facile preparation of agarose–chitosan hybrid materials and nanocomposite ionogels using an ionic liquid via dissolution, regeneration and sol–gel transition. *Green Chem*, 16, 320–330.
- Ueki T., Usui R., Kitazawa Y., Lodge T.P., Watanabe M. (2015) Thermally Reversible Ion Gels with Photohealing Properties Based on Triblock Copolymer Self-Assembly. *Macromolecules*, 48, 5928–5933.
- Valverde J.M., Valero D., Martínez-Romero D., Guillén F., Castillo S., Serrano M. (2005) Novel edible coating based on aloe vera gel to maintain table grape quality and safety. *J Agric Food Chem*, Oct 5;53(20):7807-13.
- Veiga A.S., Schneider J.P. (2013) Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection. *Biopolymers*. Nov;100(6):637-44.
- Vidal M., Elie C.-R., Campbell S., Claing A., Schmitzer A.R. (2014) Biologically active binaphthol-scaffolded imidazolium salts. *MedChemComm*, 5, 436–440.
- Wang T., Wu M.B., Lin J.P., Yang L.R. (2015) Quantitative structure-activity relationship: promising advances in drug discovery platforms. *Expert Opin Drug Discov*, Dec;10(12):1283-300.
- Wang X., Yang Q., Cao Y., Zhou J., Hao H., Liang Y., Hao J. (2016) Ionogels of a Sugar Surfactant in Ionic Liquids. *Chem Asian J*, Mar 4;11(5):722-9.
- Zhao C., Li X., Li L., Cheng G., Gong X., Zheng J. (2013) Dual functionality of antimicrobial and antifouling of poly(N-hydroxyethylacrylamide)/salicylate hydrogels. *Langmuir*, Feb 5;29(5):1517-24.
- Zheng Z., Xu Q., Guo J., Qin J., Mao H., Wang B., Yan F. (2016) Structure-Antibacterial Activity Relationships of Imidazolium-Type Ionic Liquid Monomers, Poly(ionic liquids) and Poly(ionic liquid) Membranes: Effect of Alkyl Chain Length and Cations. *ACS Appl Mater Interfaces*, May 25;8(20):12684-92.
- Zijkowski B., Bleek K., Twamley B., Fraser K.J., Byrne R., Diamond D., Taubert A. (2012) Magnetic Ionogels (MagIGs) Based on Iron Oxide Nanoparticles, Poly(N-isopropylacrylamide), and the Ionic Liquid Trihexyl(tetradecyl)phosphonium Dicyanamide. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 5245–5251.
- Zille A., Fernandes M.M., Francesko A., Tzanov T., Fernandes M., Oliveira F.R., Almeida L., Amorim T., Carneiro N., Esteves M.F., Souto A.P. (2015) Size and Aging Effects on Antimicrobial Efficiency of Silver Nanoparticles Coated on Polyamide Fabrics Activated by Atmospheric DBD Plasma. *ACS Appl Mater Interfaces*, Jul 1;7(25):13731-44.