

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI PADOVA
Facoltà di Scienze MMFFNN
Dipartimento di Scienze Biomediche



Studio biochimico sul trasporto di molecole potenzialmente dannose per l'organismo da parte dei batteri *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*.

Premessa

Questo studio è nato dalla collaborazione tra la Centrale del latte di Vicenza ed il laboratorio del Prof. Toninello (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova).

La Centrale del latte di Vicenza si è rivolta al Prof. Toninello per approfondire le conoscenze a livello biochimico sulle proprietà dei suoi prodotti ed in particolare sugli yogurt e sui probiotici. Sono stati quindi presi in esame gli specifici ceppi di *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* presenti nei prodotti della Centrale del latte di Vicenza.

La prima parte di questo lavoro è iniziata in marzo 2011 e si è conclusa in luglio 2013, con la fine del dottorato della Dott.ssa Pamela. Successivamente, nel Febbraio 2014 è cominciata una seconda parte del lavoro, da parte della Dott.ssa Silvia Grancara, che si è interrotta nel Maggio 2014, con la fine del suo post-doc.

I risultati preliminari dello studio sono stati esposti al Congresso FEBS “Mechanisms in Biology” tenutosi a San Pietroburgo (Luglio 2013) da parte della Dott.ssa Martinis e pubblicati sul FEBS Journal (Volume 280, Supplemento s1, pagine 1–661). I risultati successivi, invece, sono stati presentati dalla Dott.ssa Grancara al “Third International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives” a Ubatuba in Brasile, nel 2014.

Introduzione

I probiotici sono stati classificati dal Ministero della Salute quali microrganismi viventi che, se assunti in dosi adeguate, sono in grado di apportare dei benefici alla salute dell'ospite. Numerosi microrganismi inseriti nella categoria dei probiotici sono batteri lattici appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Streptococcus* e altri come *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* e *Saccaromyces* [Linee Guida Ministero della Salute, 2004]. Uno dei benefici clinici maggiormente dimostrato dei probiotici riguarda la prevenzione ed il trattamento di diarrea acuta ed associata agli

antibiotici ed evidenza crescente ne attesta un ruolo potenziale nei trattamenti delle allergie e dei disturbi intestinali, epatici e metabolici. Questi effetti positivi sono generalmente attribuiti alla loro abilità nel regolare la permeabilità e la flora intestinale, migliorare la barriera immunitaria dell'intestino ed equilibrare il bilancio tra citochine pro ed anti-infiammatorie [Fontana et al., 2013]. Evidenze scientifiche hanno inoltre dimostrato che l'assunzione di *L. acidophilus*, attraverso il consumo di lattici fermentati, è in grado di ridurre significativamente il numero di batteri putrefattivi fecali, quali ad esempio coliformi, ed aumenta il numero di lattobacilli presenti nell'intestino. Questo suggerisce quindi che supplementi di *L. acidophilus* abbiano effetti benefici sulla microecologia dell'intestino dell'ospite, sopprimendo gli organismi putrefattivi che sono probabilmente coinvolti nella produzione di promotori tumorali e pre-carcinogeni putativi [Reddy e Rivenson, 1993].

Le poliamine (spermina, spermidina e putrescina) sono amine alifatiche e componenti essenziali di tutte le cellule viventi. Dati i molteplici effetti esibiti da queste molecole nella crescita, funzione e proliferazione cellulare, queste molecole risultano essere attualmente di grande interesse scientifico [Atiya Ali et al., 2011]. Le sopracitate amine esibiscono infatti un duplice effetto a livello cellulare: sono essenziali per la crescita ed il differenziamento cellulare, ma sono anche implicate nella crescita tumorale e nel processo infiammatorio, in quanto alte concentrazioni delle stesse sono state riscontrate in tessuti neoplastici ed in proliferazione [Wallace and Fraser, 2004].

Il pool di poliamine dell'organismo è mantenuto da tre fonti: quella endogena, quella composta dall'attività dei microorganismi intestinali (in alcuni casi infatti i batteri presenti nel lume dell'intestino possono contribuire al pool di poliamine del corpo, ma solitamente questo contributo è negligibile) e quella esogena (attraverso la dieta) [Bardocz et al., 2001]. Le nostre diete contengono significative quantità di amine e derivati, presenti naturalmente o come risultato dei processi di cottura e conservazione dei cibi. Questo ampio e vario gruppo di composti include le poliamine che sono infatti presenti in tutti i tipi di alimenti e vengono rapidamente assunte dall'intestino dei mammiferi. Per questo motivo un nuovo ramo della ricerca scientifica si è sviluppato grazie al riconoscimento dell'importanza delle poliamine assunte attraverso la dieta per mezzo delle azioni AIR e COST fondate dall'Unione Europea con lo scopo di studiare le poliamine presenti nei cibi, determinarne la quantità e l'assunzione giornaliera ed il ruolo di queste molecole nella terapia contro il cancro [Bardocz e White, 2005].

E' inoltre necessario sottolineare che la fonte esogena legata all'alimentazione fornisce la maggior quantità di poliamine ed è quindi di primaria importanza per il mantenimento delle normali funzioni fisiologiche dell'organismo. Evidenze scientifiche hanno dimostrato che con l'età il livello di poliamine decresce in diversi organi animali ed è stato quindi suggerito che il mantenimento del livello di poliamine attraverso la dieta sia fondamentale per il funzionamento di diversi organi durante la vecchiaia. D'altra parte l'effetto promotore sulla crescita cellulare esercitato dalle poliamine, come sopra citato, può avere anche effetti negativi in relazione allo sviluppo tumorale [Atiya Ali et al., 2011].

In letteratura è ampiamente riportato che l'organismo modello *E. coli* possiede diversi trasportatori per le poliamine. Il sistema di "uptake" prevede un sistema spermidina-preferenziale ed uno putrescina-specifico [Igarashi e Kashiwagi, 2010]. E' inoltre stato dimostrato che alcuni lattobacilli

sono in grado di assumere diversi tipi di amine (tra le quali le amine eterocicliche la cui assunzione è correlata all'insorgenza di diversi tumori) [Terahara et al., 1997].

Dato che l'assunzione dei probiotici attraverso la dieta è stata spesso associata ad una riduzione di varie forme di tumori (tra i quali quello all'intestino), questo studio vuole analizzare il sistema di trasporto delle poliamine da parte dei batteri *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, utilizzando i ceppi batterici presenti nei prodotti della Centrale del latte di Vicenza. A tal fine, è doveroso sottolineare che la via biosintetica delle poliamine è una via metabolica molto antica ed evolutivamente conservata, ed è perciò presente in tutti gli organismi. Inoltre, in relazione alle specie, le proporzioni relative dei differenti composti variano e possono raggiungere anche concentrazioni millimolari. Nel nostro studio è stato analizzato il trasporto della spermidina e della putrescina, ma non della spermina, poiché evidenze scientifiche attestano la mancanza di una via sintetica per la spermina nei batteri e la capacità di alcuni ceppi di sintetizzarne una variante, la thermospermina [Minguet et al., 2008].

Materiali e Metodi

I batteri presi in esame per questo studio sono i seguenti:

- Streptococcus thermophilus*
- Lactobacillus bulgaricus*
- Lactobacillus acidophilus*

gentilmente forniti dalla Centrale del latte di Vicenza in forma liofilizzata in buste chiuse. E' quindi doveroso sottolineare che i batteri utilizzati per questo studio appartengono agli stessi ceppi realmente presenti nei prodotti della Centrale del latte di Vicenza.

Tutti i batteri sono stati risospesi in peptone buffer e poi piastrati su piastre di agar M17 per *S. thermophilus* e MRS acidificato per *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*.

S. thermophilus e *L. acidophilus* sono stati incubati aerobicamente mentre *L. bulgaricus* è stato incubato anaerobicamente, a 37°.

Dopo l'incubazione (rispettivamente di 42h per *S. thermophilus* e di 65 per *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*) le cellule sono state raccolte e sottoposte a due lavaggi con acqua (cioè è avvenuto per mezzo di centrifugazioni a 4000 rpm per 5 minuti e risospensioni del pellet così ottenuto).

Il pellet ottenuto alla fine dei lavaggi è stato poi risospeso in acqua ed è stato effettuato il dosaggio proteico delle proteine tramite il metodo di Bradford.

In seguito sono state allestite le prove per la valutazione del trasporto delle poliamine (marcate con il radioisotopo 14 del carbonio) nel tempo da parte dei batteri (presenti alla concentrazione di 1mg/ml) in acqua. E' stato valutato il trasporto di spermidina e putrescina alla concentrazione di 250µM utilizzando il metodo precedentemente descritto da Toninello e collaboratori [1985], con alcune modifiche.

E' stata inoltre eseguita l'analisi della quantità di poliamine inizialmente contenute all'interno dei batteri tramite gas/massa (in collaborazione con l'Università La Sapienza di Roma) e tramite HPLC

(in collaborazione con l'Università di Torino). Per ogni ceppo sono state allestiti due campioni a diverse concentrazioni. I campioni sono stati trattati con acido perclorico 0,2M e sonicati per garantirne la rottura. Il surnatante così ottenuto (contenente le poliamine rilasciate dai batteri) è stato analizzato. Allo stesso modo sono stati analizzati anche i mezzi di coltura ed il buffer peptone.

Lo studio è stato eseguito dalla Dott.ssa Pamela Martinis e coordinato dal Prof. Antonio Toninello.

Risultati

Come mostrato in tabella 1, per quanto riguarda la putrescina, il ceppo maggiormente efficiente nel trasporto risulta essere *S. thermophilus* (con una media di 54 nmol/mg di proteina trasportate in 30 minuti) mentre *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* ne trasportano una quantità inferiore (media di 27 nmol/mg di proteina in 30 minuti). L'esperimento effettuato con prelievi nel tempo (a 1, 15 e 30 minuti di incubazione) ha dimostrato inoltre un aumento nel tempo della quantità di poliamina presente all'interno dei batteri per quanto riguarda *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* evidenziando un accumulo tempo-dipendente della stessa. Ciò non si è verificato per *L. acidophilus*. E' stato inoltre eseguito un esperimento volto a discriminare le quantità di poliamina realmente internalizzate dai batteri rispetto a quelle legate esternamente alle membrane. Per tutti i batteri analizzati è risultato che circa il 50% delle nanomoli precedentemente descritte sono realmente internalizzate.

<i>Tempo (min)</i>	<i>S. thermophilus (42h)</i>	<i>L. bulgaricus (65h)</i>	<i>L. acidophilus (65h)</i>
1	31 nmol/mg ±0.15	21 nmol/mg ±0.44	36 nmol/mg ±0.29
15	48 nmol/mg ±0.63	21 nmol/mg ±0.24	27 nmol/mg ±0.11
30	54 nmol/mg ±0.47	27 nmol/mg ±0.59	27 nmol/mg ±0.21

Tab. 1 Quantità di putrescina (250 µM) trasportata dai batteri a diversi intervalli di tempo

Il trasporto della spermidina è mostrato in tabella 2. I ceppi maggiormente efficiente nel trasporto risultano essere *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (con una media di 39 nmol/mg di proteina trasportate) mentre *L. acidophilus* ne trasportano una quantità inferiore (media di 21 nmol/mg di proteina). L'esperimento effettuato con prelievi nel tempo (a 1, 15 e 30 minuti di incubazione) ha dimostrato nuovamente un accumulo tempo-dipendente della quantità di poliamina da parte di *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* mentre ciò non si è verificato per *L. acidophilus*. Anche in questo caso per tutti i batteri analizzati è risultato che circa il 50% delle nanomoli precedentemente descritte sono realmente internalizzate.

<i>Tempo (min)</i>	<i>S. thermophilus (42h)</i>	<i>L. bulgaricus (65h)</i>	<i>L. acidophilus (65h)</i>
1	24 nmol/mg ± 0.35	25 nmol/mg ±0.13	21 nmol/mg ±0.18
15	35 nmol/mg ± 0.37	38 nmol/mg ±0.76	20 nmol/mg ±0.21
30	39 nmol/mg ±0.63	39 nmol/mg ±0.41	21 nmol/mg ±0.17

Tab. 2 Quantità di spermina (250 µM) trasportata dai batteri a diversi intervalli di tempo

Le analisi gas/massa e HPLC (i cui risultati sono significativamente simili) hanno valutato le quantità di putrescina, cadaverina, spermidina, acetilspermidina e spermina presenti nei 3 ceppi, nei mezzi di coltura e nel buffer peptone. La media è mostrata in Tab. 3

Nei mezzi di coltura e nel buffer peptone sono presenti tutte le poliamine sopra elencate tranne l'acetilspermidina. Tutti i ceppi batterici presentano al loro interno tracce delle poliamine elencate (nel range compreso tra 0,04 e 1 nmol/mg di proteina per quanto riguarda putrescina, cadaverina e spermidina) mentre quantità inferiori di spermina e acetilspermidina sono state riscontrate (range compreso tra 0,002 e 0,2 nmol/mg di proteina).

	<i>putrescina nmol/mg</i>	<i>cadaverina nmol/mg</i>	<i>spermidina nmol/mg</i>	<i>acetilspermidina nmol/mg</i>	<i>spermina nmol/mg</i>
<i>L. acidophilus</i>	0,07 ±0.0001	0,06 ±0.0011	1,01 ±0.0158	0,2 ±0.0028	0,002 ± 0.00003
<i>L. bulgaricus</i>	0,06 ± 0.0004	0,21 ± 0.0014	0,24 ± 0.0046	0,05 ± 0.0003	0,1 ± 0.0006
<i>S. thermophilus</i>	0,12 ±0.0021	0,04 ±0.0008	0,6 ± 0.011	0,15 ± 0.0009	0,23 ± 0.0034
<i>MRS</i>	si	si	si	--	si
<i>MI7</i>	si	si	si	--	si
<i>Buffer Peptone</i>	si	--	si	--	si

Tab. 3 Contenuto di poliamine presente nei batteri dopo la raccolta

Discussione dei risultati, conclusioni preliminari e prospettive future.

I dati riguardanti il trasporto di putrescina e spermidina indicano in primo luogo la capacità dei ceppi batterici presenti nei prodotti della Centrale del latte di Vicenza di legare tali molecole e successivamente di internalizzarle (circa il 50% delle nanomoli di poliamina legate alle membrane viene trasportato all'interno della cellula). Questo dato è significativo se rapportato alle quantità internalizzate dai mitocondri (filogeneticamente vicini in termini evolutivi ai batteri) ed evidenzia una buona efficienza di trasporto delle poliamine, soprattutto da parte di *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. La discriminazione tra le quantità legate esternamente alle membrane e quelle trasportate all'interno delle cellule risulta essere di primaria importanza per questo studio poiché i composti che vengono internalizzati sono in seguito utilizzati per i normali processi fisiologici della cellula e quindi vengono metabolizzati. Nel caso specifico dell'ospite umano e della sua flora batterica, le quantità di poliamine che vengono internalizzate sono realmente sottratte all'organismo ospite dalle cellule batteriche. In quest'ottica, nella condizione in cui grandi quantità di poliamine siano ingerite con la dieta, l'azione dei batteri, assunti tramite il consumo dei prodotti della Centrale del latte di Vicenza, si inserirebbe in un processo di omeostasi e di controllo delle concentrazioni di poliamine presenti nell'organismo umano.

Di notevole interesse risulta il dato relativo alle quantità di poliamine presenti in partenza all'interno dei batteri in quanto benché la spermina, come descritto in precedenza, non sia una tipica poliamina batterica, l'analisi eseguita ne ha riscontrato la presenza all'interno delle cellule. Considerando che tale molecola risulta presente nei mezzi di coltura, così come nel buffer peptone, il fatto che sia stata riscontrata nei batteri suggerisce prima di tutto la presenza di trasportatori preferenziali sulle membrane degli stessi, e quindi di trasportatori che seppur preferibilmente trasportino determinate poliamine, siano in grado all'occorrenza di trasportarne anche altre. Questo risultato apre nuovi potenziali scenari di indagine scientifica in quanto suggerisce la capacità dei batteri presenti nei prodotti della Centrale del latte di Vicenza di trasportare anche molecole non naturalmente presenti nell'organismo, quali per esempio amine modificate dai processi di cottura e conservazione dei cibi.

Un altro dato significativo riguarda la presenza della poliamina acetilspermidina nelle cellule batteriche. Evidenze scientifiche hanno infatti dimostrato che significative quantità di amine acetilate vengono riscontrate in seguito all'aggiunta di grandi quantità di poliamine nel mezzo di coltura [Tabor e Tabor, 1985]. La reazione di acetilazione delle poliamine è notoriamente un meccanismo di escrezione utilizzato dalle cellule per eliminare le molecole in eccesso o potenzialmente dannose [Casero e Marton, 2007]. Alla luce di questi dati, il meccanismo suggerito in precedenza di controllo ed escrezione/eliminazione delle molecole potenzialmente dannose da parte dei batteri presenti nei prodotti della Centrale del latte di Vicenza viene rafforzato.

I risultati ottenuti in questa prima fase della ricerca mettono chiaramente in evidenza che le poliamine naturali possono essere trasportate nei batteri, previo un consistente binding iniziale sulla membrana plasmatica. Un risultato importante da ottenere sarebbe l'individuazione del meccanismo molecolare di questo trasporto, in modo da poter studiare l'utilizzazione di eventuali effettori positivi naturali che lo possano incrementare. Considerando l'origine simbiotica dei mitocondri

quali batteri ancestrali che hanno invaso le cellule, è possibile ipotizzare che il meccanismo presente nei probiotici sia molto simile a quello presente nella membrana interna mitocondriale. Si tratta di un canale che presenta due barriere asimmetriche di energia e che funziona in base al potenziale elettrico di membrana. Quindi, ogni effetto in grado di aumentare tale parametro faciliterebbe il trasporto delle poliamine all'interno del probiotico.

Come accennato in precedenza, a seconda delle condizioni metaboliche dell'organismo le poliamine possono esibire effetti completamente diversi, addirittura opposti, cioè possono avere effetti protettivi contro la produzione da parte di altri composti di specie reattive dell'ossigeno (ROS) mediante un effetto scavenger, come descritto dal gruppo di Casero della Johns Hopkins University (Ha et al. 1998) e sperimentato nel nostro laboratorio nei mitocondri isolati (Sava et al. 2006). Oppure, le poliamine possono diventare esse stesse produttrici di ROS tramite la loro ossidazione da parte di enzimi ossidasici quali la poliamina ossidasi e la spermina ossidasi. Tali enzimi, presenti nelle cellule, ossidando le poliamine producono, tra gli altri, composti altamente tossici quali aldeidi, perossido d'idrogeno, anione superossido e radicale idrossilico che in certi casi, i sistemi di sicurezza presenti nella cellula (superossido dismutasi, glutatione perossidasi, catalasi, NADH deidrogenasi, vitamina E, etc.) non sono in grado di smaltire. Tali prodotti tossici possono portare a morte cellulare per apoptosi e necrosi. Un obiettivo da raggiungere nel prossimo futuro sarà, quindi, quello di studiare il destino delle poliamine entrate nel probiotico ed eventualmente utilizzare effettori che abbiano l'effetto di ROS scavenger nel probiotico.

I dati sperimentali ottenuti in questo lavoro suggeriscono, inoltre, un nuovo intrigante scenario su cui indagare riguardante l'utilizzazione dei probiotici. E' notorio il fatto che quando le carni vengono cotte ad elevate temperature, i composti azotati presenti (creatina, aminoacidi, poliamine, etc.) producono le amine eterocicliche. Diverse tipologie di queste amine sono legate allo sviluppo di alcuni tipi di cancro, tra cui quello al colon, alla prostata e allo stomaco. In effetti è stato individuato sperimentalmente che amine eterocicliche iniettate negli animali sono in grado di produrre tumori.

Osservando la struttura molecolare di queste amine si nota che assieme alla presenza di gruppi imminici carichi positivamente ci sono anelli aromatici eterociclici che dovrebbero favorire il trasporto attraverso le membrane mitocondriali delle cellule ma anche le membrane plasmatiche dei probiotici. In tal caso dovrebbe instaurarsi una competizione sull'internalizzazione di questi prodotti tossici che la presenza di elevate quantità di probiotici dovrebbe limitarne l'assunzione da parte dell'organismo.

Risultati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che tali ammine possono essere trasportate nei probiotici anche se il limitato numero di esperimenti non ha permesso una loro catalogazione né la distinzione di quale sia il più efficace. Di sicuro questi esperimenti sono incoraggianti per il prosieguo della ricerca che, come accennato sopra potrebbe fornire risultati di grande interesse per l'utilizzazione dei suddetti probiotici.

Referenze

- Atiya Ali M, Poortvliet E, Strömberg R, Yngve A. (2011) Polyamines in foods: development of a food database. *Food Nutr Res.* 14:55.
- Bardocz S, Grant G, MacDonald A, Walker TJ, Pusztai A, Coutts J, Glass H. (2001) Polyamines in food and food processing. In: COST Action 917. Biogenically active amines in food, vol V.
- Bardocz S, White A. (2005) Food, polyamines and cancer research. In: COST Action 917. Biogenically active amines in food, vol VII.
- Casero RA Jr, Marton LJ. (2007) Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 6:373-90.
- Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. (2013) Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr.* 2:S35-50.
- Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RA Jr. (1998) The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11140-5.
- Igarashi K, Kashiwagi K. (2010) Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol Biochem.* 48:506-12.
- Linee Guida, Ministero della Salute 2004.
- Minguet EG, Vera-Sirera F, Marina A, Carbonell J, Blázquez MA. (2008) Evolutionary diversification in polyamine biosynthesis. *Mol Biol Evol.* 25:2119-28.
- Reddy BS, Rivenson A. (1993) Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res.* 53:3914-8.
- Sava IG, Battaglia V, Rossi CA, Salvi M, Toninello A. (2006) Free radical scavenging action of the natural polyamine spermine in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 41:1272-81.
- Tabor CW, Tabor H. (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev.* 49:81-99.
- Terahara M, Meguro S, Kaneko T. (1997) Effects of lactic acid bacteria on binding and absorption of mutagenic heterocyclic amines. *Biosci. Biotech. Biochem* 62: 197-200.
- Toninello A, Di Lisa F, Siliprandi D, Siliprandi N. (1985) Uptake of spermine by rat liver mitochondria and its influence on the transport of phosphate. *Biochim Biophys Acta* 815:399–404.
- Wallace HM, Fraser AV (2004) Inhibitors of polyamine metabolism: review article. *Amino acids.* 26: 353-65.

E' in fase di preparazione un lavoro *in extenso* da pubblicare sulla rivista Amino Acids (Impact Factor 3,29).

Padova, 11/05/2016

Prof. Toninello Antonio

Dott.ssa Grancara Silvia

Dott. ssa Martinis Pamela