

Evaluation of the biological activity of two attacins from the stick insect *Carausius morosus*

S. Picchietti¹, F. Buonocore¹, A. De Carolis¹, F. Massaro¹, A. R. Taddei², M. Gerdol³, A. Miccoli¹, P. Roberto Saraceni¹, G. Scapigliati¹, A. M. Fausto¹

¹Dept. for Innovation in Biological, Agro-food and Forest systems (DIBAF), University of Tuscia, Largo dell'Università snc, 01100 Viterbo, Italy

²Center of Large Equipments, Section of Electron Microscopy, University of Tuscia, Largo dell'Università Snc, 01100 Viterbo, Italy

³Dept. of Life Sciences, University of Trieste, 34127, Trieste, Italy

Insects produce a wide repertoire of antimicrobial peptides (AMPs) as crucial effectors of the innate immunity. AMPs from insects include several families which can be classified according to their structure and/or function. Attacins are a rather heterogeneous group of AMPs, rich in glycine residues, and active mainly against Gram-negative bacteria. Herein, sequences of two putative AMPs, named Cm3610 and Cm3021, belonging to the attacin family, were identified *in silico* from the transcriptome of the stick insect *Carausius morosus*. After *in vivo* immuno-stimulation with bacterial and fungal elicitors, qPCR analysis indicated significant higher expression of these peptides in *C. morosus* fat bodies, Malpighian tubules, brain, gut and hemocytes, compared to unstimulated specimens. The Cm3610 and Cm3021 mature region was synthesized, and the specific bioactivity evaluated *in vitro*. The membranolytic activity of the peptides was investigated on Gram-negative (i.e., *Escherichia coli*) and Gram-positive (i.e., *Bacillus cereus*) bacterial models: Cm3610 altered the permeability of membrane in *B. cereus*, while Cm3021 was not effective on either *E. coli* or *B. cereus*. Neither peptide showed any haemolytic activity against mammalian erythrocytes. Moreover, the individual and combined effects of the peptides was evaluated towards primary human fibroblast (FB789) and murine melanoma (B16F10) cell lines. Of note, Cm3610 peptide exhibited significant cytotoxic activity against the B16F10 cells, without affecting FB789 viability. Otherwise, Cm3021 peptide significantly decreased the viability of both cell lines. The combined exposure of cells to Cm3610 and Cm3021 peptides did not cause any synergistic cytotoxic effects. These results open interesting perspectives on the possible application of Cm3610 peptide for biomedical applications.

Valutazione dell'attività biologica di due attacine dell'insetto stecco *Carausius morosus*

S. Picchietti¹, F. Buonocore¹, A. De Carolis¹, F. Massaro¹, A. R. Taddei², M. Gerdol³, A. Miccoli¹, P. Roberto Saraceni¹, G. Scapigliati¹, A. M. Fausto¹

¹*Dept. for Innovation in Biological, Agro-food and Forest systems (DIBAF), University of Tuscia, Largo dell'Università snc, 01100 Viterbo, Italy*

²*Center of Large Equipments, Section of Electron Microscopy, University of Tuscia, Largo dell'Università Snc, 01100 Viterbo, Italy*

³*Dept. of Life Sciences, University of Trieste, 34127, Trieste, Italy*

Gli insetti producono un ampio repertorio di peptidi antimicrobici (AMP) come effettori cruciali dell'immunità innata. Gli AMP degli insetti appartengono a diverse famiglie che possono essere classificate in base alla loro struttura e/o funzione. Le attacine sono un gruppo piuttosto eterogeneo di AMP, ricche di residui di glicina, e attive principalmente contro i batteri Gram-negativi. In questo lavoro, le sequenze di due presunti AMP, denominati Cm3610 e Cm3021, appartenenti alla famiglia delle attacine, sono state identificate *in silico* dal trascrittoma dell'insetto stecco *Carausius morosus*. Dopo immunostimolazione *in vivo* con elicitivi batterici e fungini, l'analisi qPCR ha indicato un'espressione significativamente più elevata di questi peptidi nei corpi grassi, nei tubuli malpighiani, nel cervello, nell'intestino e negli emociti di *C. morosus*, rispetto ai campioni non stimolati. La regione matura dei peptidi Cm3610 e Cm3021 è stata sintetizzata e la bioattività specifica è stata valutata *in vitro*. L'attività membranolitica dei peptidi è stata studiata su modelli batterici Gram-negativi (es. *Escherichia coli*) e Gram-positivi (es. o *B. cereus*): Cm3610 alterava la permeabilità della membrana in *B. cereus*, mentre Cm3021 non era efficace né su *E. coli* né su *B. cereus*. Nessuno dei due peptidi ha mostrato alcuna attività emolitica contro gli eritrociti di mammifero. Inoltre, gli effetti individuali e combinati dei peptidi sono stati valutati nei confronti di linee cellulari primarie di fibroblasti umani (FB789) e di melanoma murino (B16F10). Da notare che il peptide Cm3610 ha mostrato una significativa attività citotossica contro le cellule B16F10, senza influenzare la vitalità delle cellule FB789. Al contrario, il peptide Cm3021 ha ridotto significativamente la vitalità di entrambe le linee cellulari. L'esposizione combinata delle cellule ai peptidi Cm3610 e Cm3021 non ha causato alcun effetto citotossico sinergico. Questi risultati aprono interessanti prospettive sulla possibile applicazione del peptide Cm3610 per applicazioni in ambito biomedico.