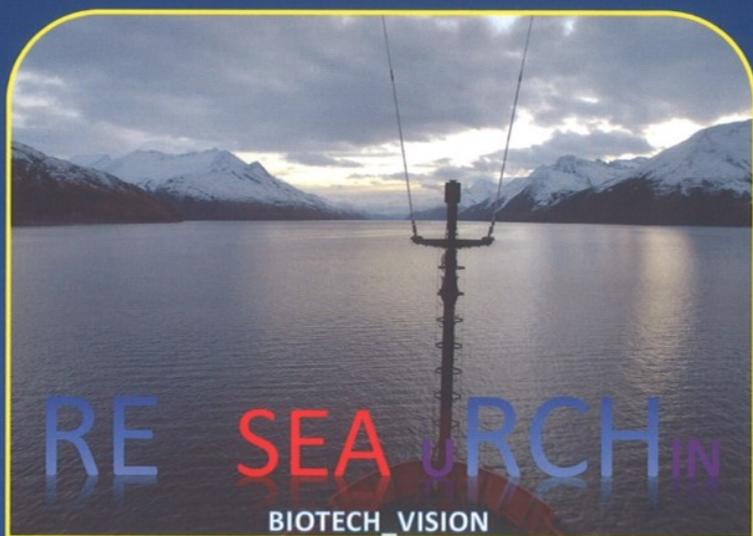


DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE
XXIX CICLO

Christian Galasso

**Marine Biotechnology:
a sea of new resources and solutions for ocean
and human health**



Università degli Studi di Napoli
Federico II



Dipartimento
Medicina Veterinaria
Produzioni Animali



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



**DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE
XXIX CICLO**

Tesi

**“Marine Biotechnology:
a sea of new resources and solutions for ocean
and human health”**

Candidato
Christian Galasso

Tutor
Dott.ssa Giovanna
Romano

Co-Tutor
Dott.ssa Clementina
Sansone

Coordinatore
Prof. Giuseppe Cringoli

(English version)

The marine environment covers nearly the 70% of the earth surface. Furthermore, oceans contain a very rich and still unexplored biodiversity. Only the 10% of the total marine organisms living in the oceans are now identified and studied for various applications. Thus, the oceans represent one of most valuable natural resource. For this reason, the exploration of the marine ecosystem constitutes a European priority, within research strategies, in parallel with the creation of conservation and protection programs for keeping the ocean healthy for future generations, through an eco-friendly exploitation of marine resources. Starting from an ecological and holistic approach, all marine biodiversity will provide a sea of resources for biotechnological applications. In particular, marine organisms have several potential applications in the biotechnology field, for the discovery of new pharmaceuticals, nutraceuticals, cosmetics, food and feed, aquaculture methods and technologies, biomaterials, bioenergy, biomonitoring and bioremediation.

In this experimental study, I addressed two aspects of the use of marine resources for biotechnological applications: a) the development of marine model organisms as useful molecular tool for *in vitro* eco-toxicological studies and for *in situ* assessment of ocean health; b) the discovery of new marine natural products from marine microalgae for biomedical applications.

The sea urchin *Paracentrotus lividus* was studied as marine model organism in order to develop a new tool to evaluate the effect of stressors in the marine environment. Using a bioinformatic approach, twelve genes involved in some of the main cell death pathways were identified from sea urchin *P. lividus* genome: Pl_Aifm1, Pl_Ripk, Pl_Tnfr16, Pl_Tnfr19/27, Pl_Bax, Pl_Bcl2, Pl_Parp, Pl_Becn, Pl_Pink, Pl_Ulk1/2 and Pl_Ulk3. Embryos treated with heptadienal, a bioactive compound from marine diatoms, activated programmed caspase-independent cell death (extrinsic apoptosis) with simultaneous involvement of selective autophagic

mechanism (called mitophagy). These results are in accordance with molecular analysis obtained for human tumor cell line treated with the same marine compound. In fact, A549 cells activated, after treatment with heptadienal, extrinsic apoptosis with the simultaneous trigger of autophagic pathway.

The study of the potential of marine microalgae for biotechnological applications focused on antiproliferative and antioxidant activities. In detail, the microalga *Alexandrium andersoni* showed anticancer effect against two tumour cell lines; the crude extract of *Tetraselmis suecica* showed a strong scavenging and repairing effect after oxidative damage.

Results obtained demonstrated, from one hand, that the sea urchin *P. lividus* can represent a suitable model organism for the assessment of induction of cell death mechanisms by chemical extracts or pure compounds, but also as molecular tool for *in situ* studies of chemical contaminants or anthropogenic stressful factors that can interfere with the marine ecosystem. On the other hand, results obtained with two marine microalgae (*A. andersoni* and *T. suecica*) confirmed the enormous potential of marine microalgae for the identification of new natural products with possible applications for pharmaceutical and cosmeceutical industries.

(Italian version)

La superficie terrestre è ricoperta per quasi il 70% dall'ecosistema marino. Inoltre, gli oceani ospitano una ricca ed ancora poco esplorata biodiversità. Attualmente, solo il 10% degli organismi che vivono nell'ambiente marino sono stati identificati e studiati per varie applicazioni. Per queste ragioni, gli oceani rappresentano una tra le più preziose risorse naturali. La profonda esplorazione dei vari ecosistemi marini costituisce attualmente una priorità per l'Unione Europea, nel contesto delle nuove strategie di ricerca. L'obiettivo principale riguarda la creazione di programmi di conservazione e protezione ambientale, utili a salvaguardare la salute dei nostri mari per le future generazioni, ma al contempo stabilire dei processi per un uso ecosostenibile delle risorse marine. Partendo da un approccio ecologico ed olistico, la biodiversità marina può offrire un mare di risorse per l'uomo e per le sue applicazioni biotecnologiche. In particolare, gli organismi marini hanno già dimostrato o posseggono enorme potenziale per applicazioni di tipo biotecnologico, nel settore della farmacologica, nutraceutica, cosmeceutica, cibo funzionale, nuove tecnologie per l'acquacoltura, biomateriali, bioenergia, biomonitoraggio e biorimediazione ambientale. Questo studio sperimentale prende in considerazione due aspetti fondamentali dell'uso di risorse marine per applicazioni biotecnologiche: a) lo sviluppo e la caratterizzazione di un organismo modello marino come strumento molecolare laboratoriale per studi eco-tossicologici *in vitro* e per monitoraggio *in situ* dello stato di salute degli ambienti marini costieri; b) l'identificazione di nuovi composti naturali con potenziali applicazioni biomediche, a partire dalle microalghe marine.

Un approccio bioinformatico è stato usato per identificare nel genoma del riccio di mare *Paracentrotus lividus* le sequenze codificanti per alcuni fattori chiave coinvolti nei principali pathway di morte cellulare programmata: apoptosi estrinseca, apoptosi intrinseca ed autofagia (compreso un meccanismo autofagico specifico, chiamato mitofagia). I geni identificati sono: Pl_Aifm1, Pl_Ripk, Pl_Tnfr16, Pl_Tnfr19/27, Pl_Bax,

PI_Bcl2, PI_Parp, PI_Becn, PI_Pink, PI_Ulk1/2 and PI_Ulk3. Gli embrioni del riccio di mare *P. lividus* sono stati trattati con diverse concentrazioni di 2-*trans*,4-*trans* eptadienale e successivamente è stato analizzato l'effetto a livello molecolare. In particolare, l'eptadienale attiva una morte cellulare programmata (senza il coinvolgimento delle caspasi) ed un meccanismo mitofagico, i quali operano in sinergia. Questi risultati molecolari sono sovrapponibili con il pattern di attivazione genica ottenuto in seguito al trattamento di una linea cellulare umana con il medesimo composto puro. Infatti, la linea cellulare A549 attiva, in seguito al trattamento con eptadienale, un meccanismo di apoptosi estrinseca con la simultanea induzione della via autofagica.

Il lavoro sperimentale si è anche concentrato sullo studio del potenziale biotecnologico delle microalghe marine, quali fonti di nuovi composti naturali. In dettaglio, il dinoflagellato *Alexandrium andersoni* ha mostrato un potente effetto antiproliferativo su due linee tumorali umane, mentre un estratto crudo ottenuto dalla microalga *Tetraselmis suecica* possiede una forte attività di radical-scavenging ed è responsabile dell'attivazione dei meccanismi di riparo dal danno ossidativo. I risultati ottenuti, descritti in questo lavoro di tesi, dimostrano da un lato che il riccio di mare *P. lividus* può rappresentare un valido organismo modello per la valutazione dei meccanismi molecolari di morte indotti da estratti chimici o molecole pure, ed inoltre può essere utilizzato come tool molecolare per studi *in situ* atti alla valutazione dell'impatto sugli ecosistemi marini di contaminanti chimici o di fattori antropocentrici in grado di interferire con i processi biologici ed ecologici dei nostri mari. Dall'altro lato, i risultati ottenuti dai due microorganismi marini (*A. andersoni* e *T. suecica*) rivelano l'enorme potenziale delle microalghe marine nell'identificazione di nuovi composti naturali dalla maggiore efficacia, con applicazioni per le industrie farmaceutiche e cosmeceutiche.