

Gli antibiotici

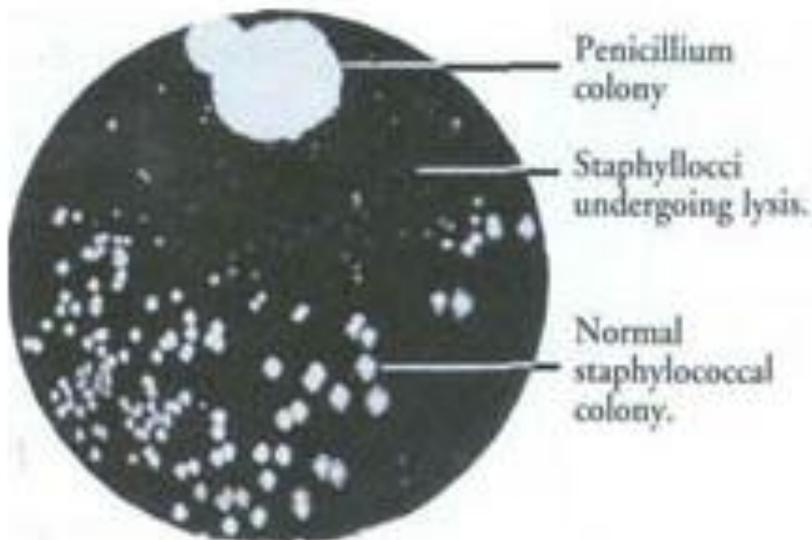
sostanze antimicrobiche naturali prodotte da molti funghi e batteri, attive contro altri microrganismi in quanto ne inibiscono la crescita o ne provocano la morte.

La PENICILLINA

Alexander Fleming, un medico scozzese che stava studiando dei ceppi di stafilococco scoprì il primo antibiotico nel 1928



L'osservazione di Fleming



Accidentalmente cadde sulla piastra una spora di *Penicillium notatum*, una muffa che si sviluppò sulla piastra assieme ai ceppi di stafilocco.

Dal momento che intorno alla muffa non crescevano i batteri Fleming ne dedusse che la muffa produceva una sostanza ad azione antibatterica che definì PENICILLINA

Nel 1939 Florey, Chain ed il biochimico Heatley riuscirono a purificare la penicillina e si osservò che iniettata in topi infettati da streptococco determinava la sopravvivenza di tutti gli animali

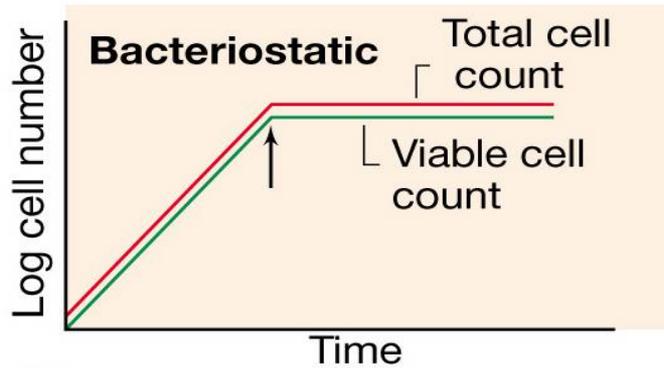
Nel 1942 usata per la prima volta nell'uomo

Premio Nobel a Fleming, Florey and Chain nel 1945

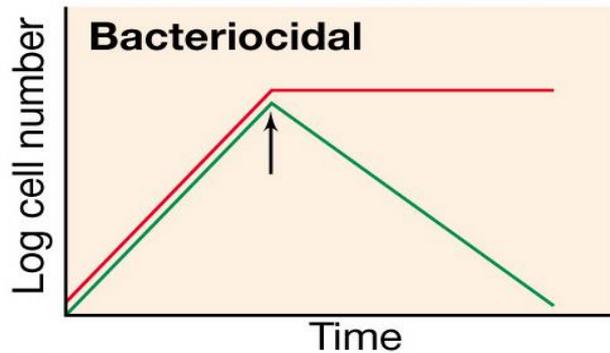
Nel 1944 Waskmann purificò da un batterio del suolo *Streptomyces griseus* la streptomicina in seguito ad uno screening di massa di batteri e funghi del suolo

Un anno dopo furono isolate da microrganismi del suolo cloramfenicolo, neomicina, e tetraciclina.

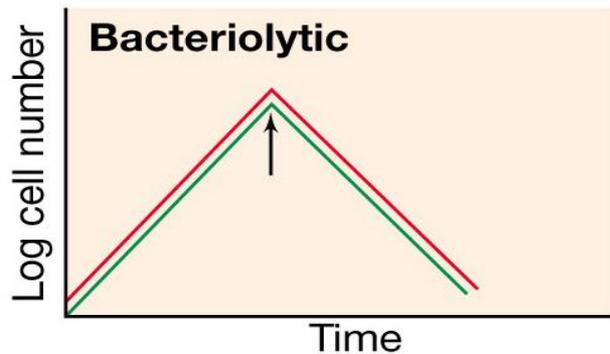
Premio Nobel a Waskmann nel 1952



(a)



(b)



(c)

Gli agenti antimicrobici possono avere diverse modalità d'azione:

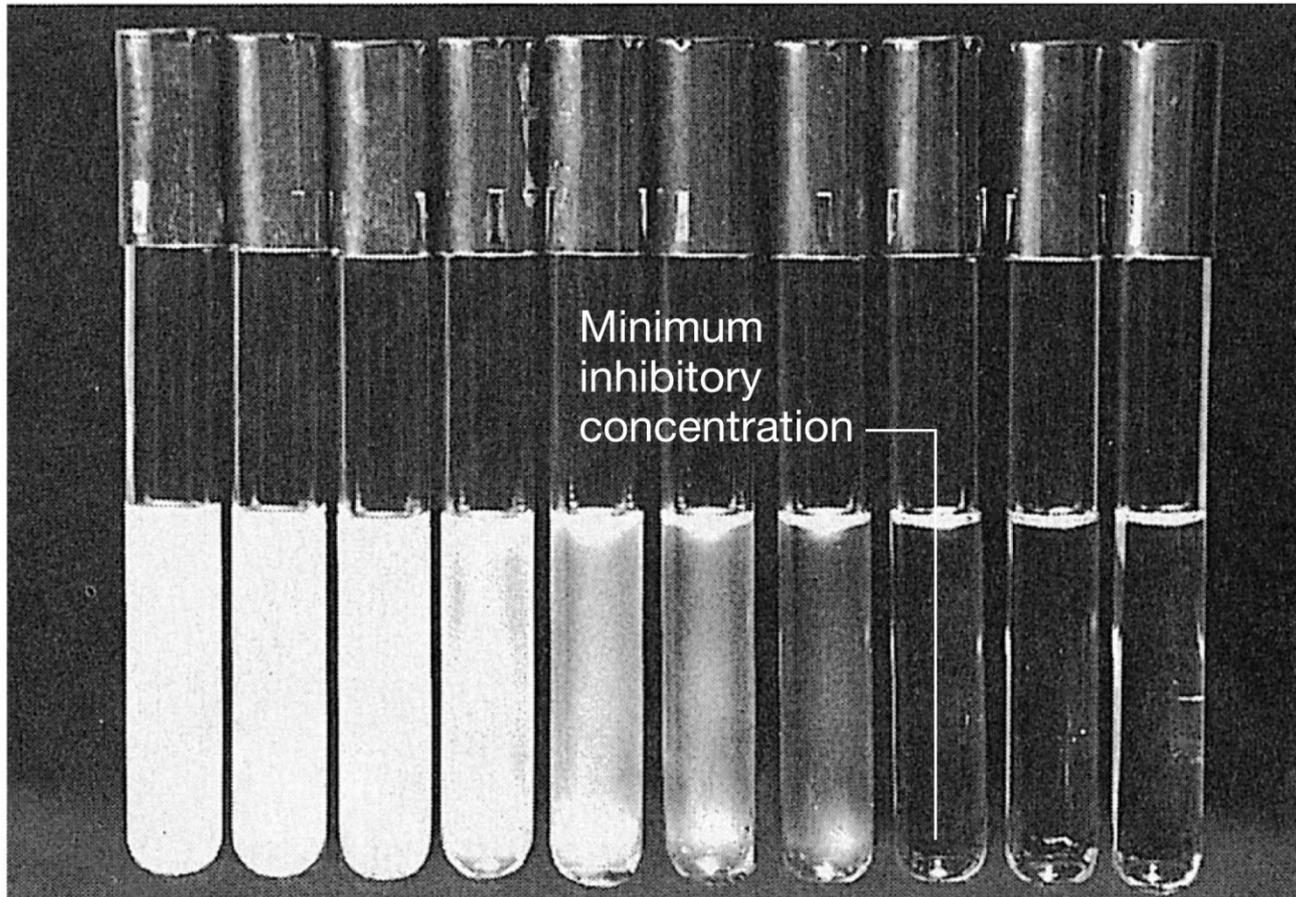
batteriostatica: legano in modo lasso il bersaglio (gli antibiotici che inibiscono la sintesi proteica)

battericida: legano irreversibilmente il bersaglio cellulare

batteriolitica: provocano la lisi del batterio (gli antibiotici che agiscono sulla parete)

- **batteriostatici** sono inibitori della sintesi proteica ed agiscono prevalentemente legandosi ai ribosomi. Quando la concentrazione del batteriostatico diminuisce i ribosomi si liberano dall'inibitore e la crescita può riprendere
- **battericidi** si legano in maniera irrisversibile ai loro bersagli e non vengono rimossi per diluizione provocano la morte senza causarne la lisi e il rilascio del contenuto cellulare
- **batteriolitici** determinano la morte della cellula provocandone la lisi (diminuzione del n.di cellule e della torbidità) tra questi gli antibiotici che inibiscono la sintesi della parete cellulare come la penicillina.

Determinazione dell'attività di un antibiotico mediante la ricerca della **M**inima **C**oncentrazione **I**nibente (**MIC**)

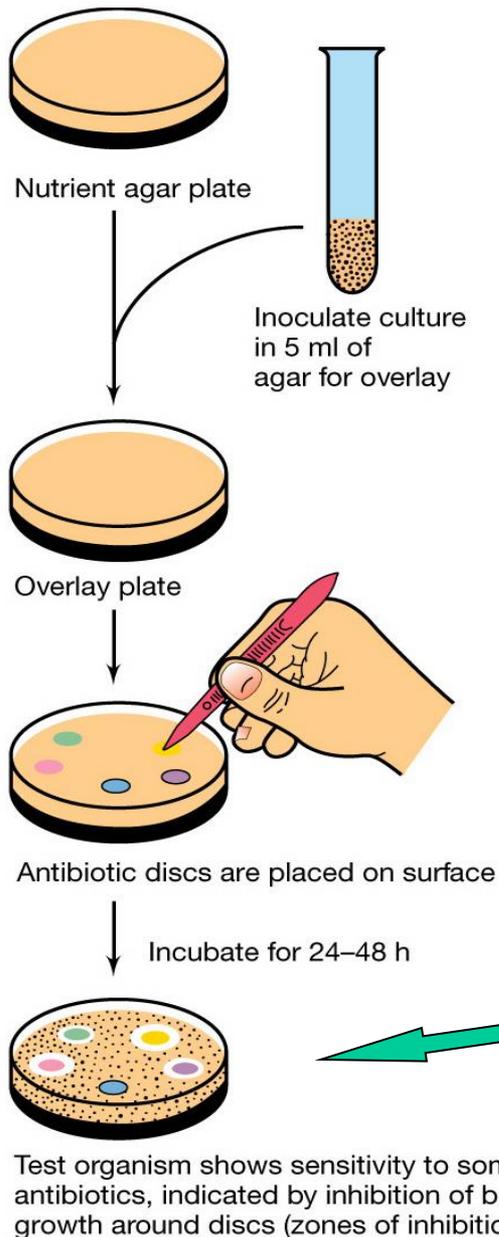


T. D. Brock

Analisi della torbidità di una coltura

Antibiogramma

Si utilizza per determinare l'attività di un antibiotico verso un microrganismo patogeno



Test organism shows sensitivity to some antibiotics, indicated by inhibition of bacterial growth around discs (zones of inhibition) after incubation

Analisi degli aloni di inibizione

I batteri crescono nel terreno formando una patina opaca. L'antibiotico presente nel dischetto diffonde impedendo la crescita dei batteri



Gli antibiotici appartengono al gruppo dei metaboliti secondari

I metaboliti secondari sono molecole organiche a basso PM prodotte da piante animali e batteri.

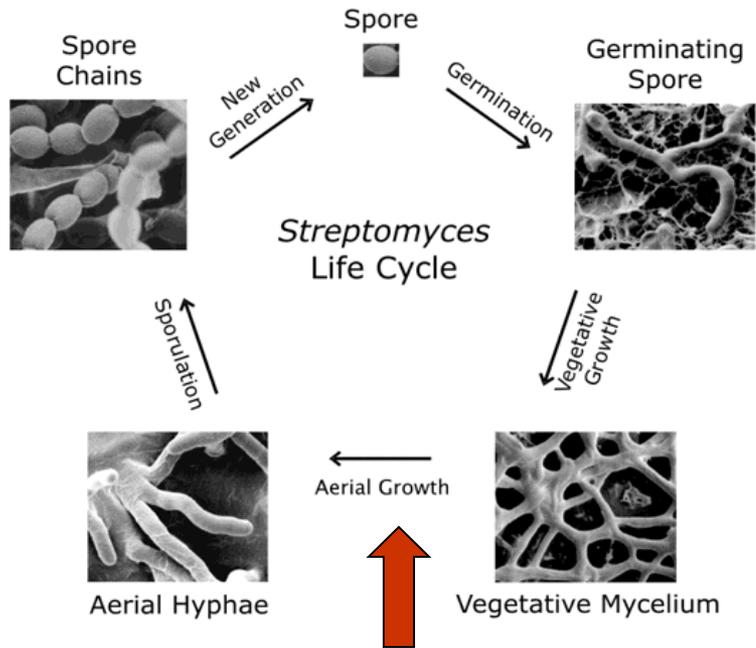
Che caratteristiche hanno ?

- Non sembrano essere essenziali per la vita della cellula
- Sono prodotti solo da un limitato numero di Batteri
- Sintetizzati per sintesi non ribosomiale

Quale ruolo svolgono?

- Attività antibatterica
- Stimolazione della sporulazione
- Stimolazione della crescita
- Induzione di biofilm

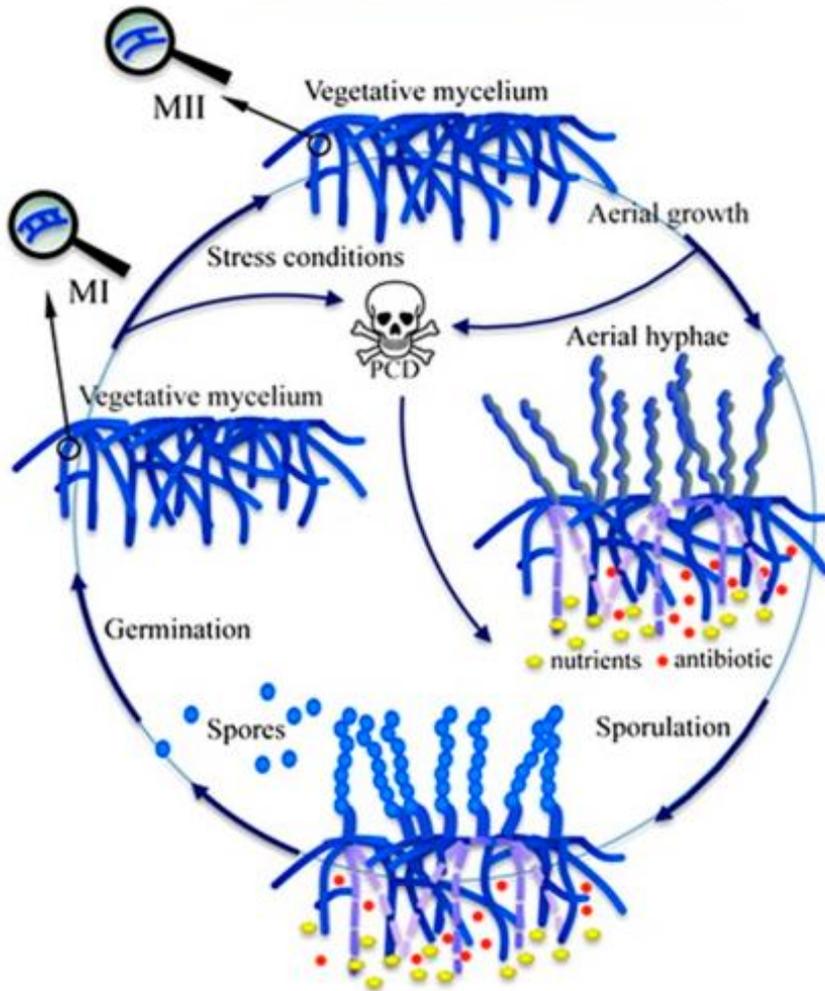
La produzione di antibiotici negli Streptomiceti



Interessante esempio di differenziamento nei batteri in quanto abbiamo all'interno della colonia le cellule del micelio aereo che differenzieranno in spore mentre quelle del micelio vegetativo forniranno nutrimento alle ife aeree.

La produzione di antibiotici avviene durante il differenziamento morfologico da parte del micelio vegetativo ovvero quando comincia a produrre il micelio aereo e le spore.
Gli antibiotici sono metaboliti secondari non essenziali per la crescita vegetativa ..

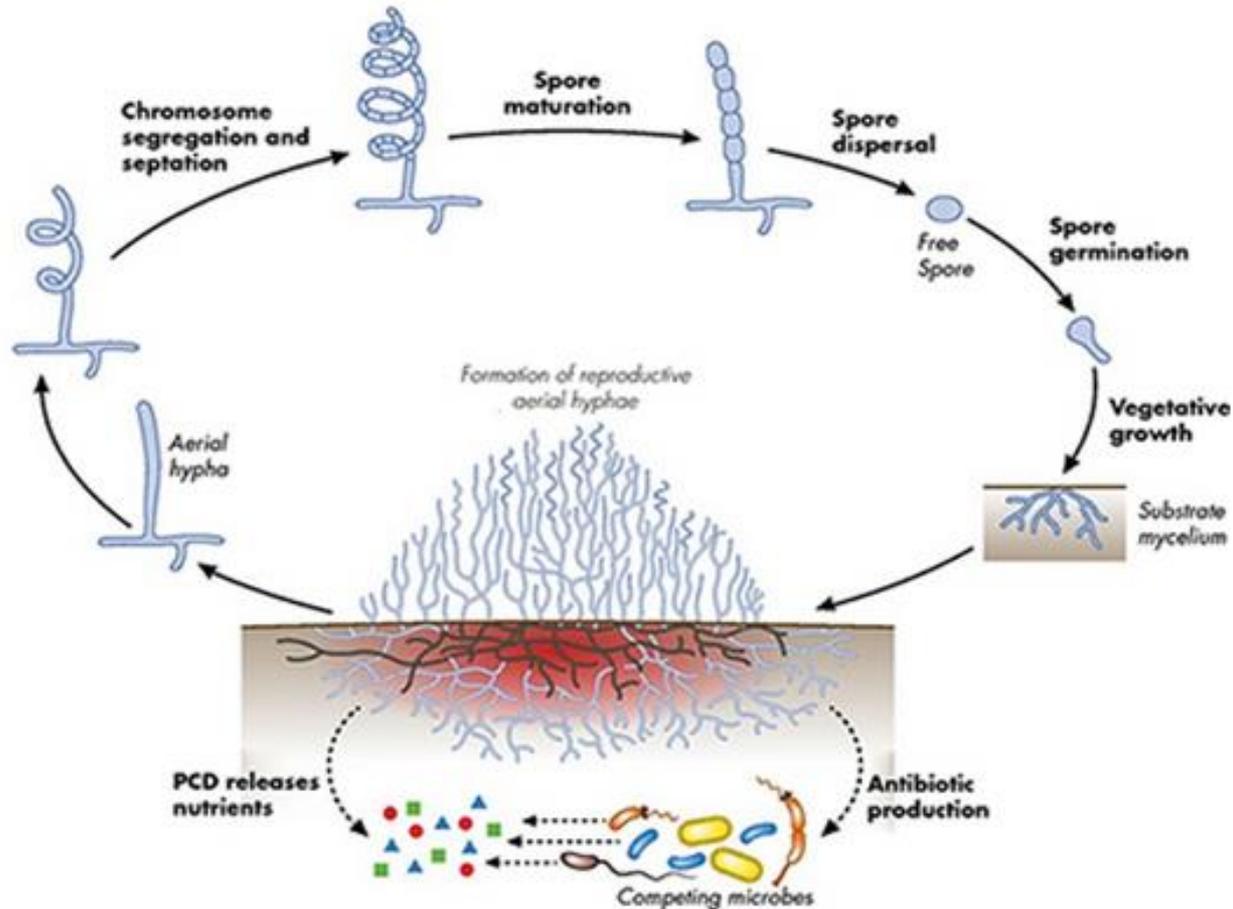
Life cycle of *Streptomyces*



In condizioni di stress una parte delle cellule del micelio vegetativo (MI) va incontro a PCD (Programmed Cell Death) ovvero Morte Cellulare Programmata mentre altre cellule rimangono vitali (MII).

Nel processo di PCD, una parte delle cellule MII muoiono rilasciando sostanze nutrienti che serviranno per nutrire le cellule del micelio aereo che si sta sviluppando a partire dalle cellule MII che sono rimaste vitali .

Le cellule apicali delle ife aeree si differenzieranno in spore che poi si diffonderanno nel terreno



Antibiotici sono prodotti dalle cellule del micelio per proteggere dai batteri competitori i nutrienti rilasciati dalle cellule del micelio morte in seguito a PCD (Programmed Cell Death)

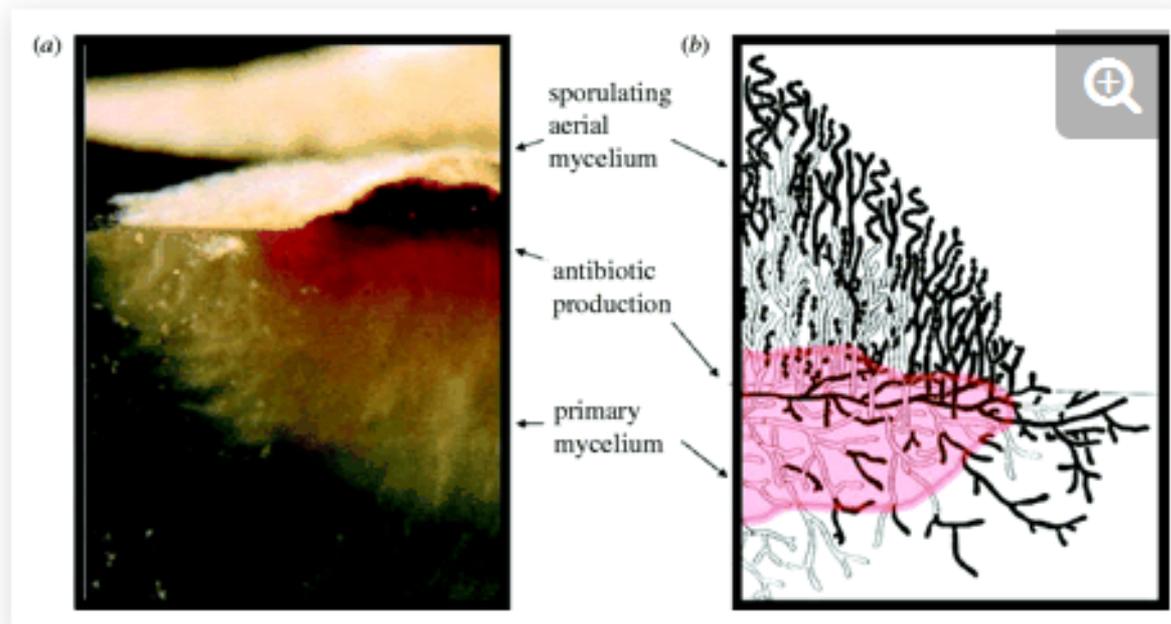


Figure 1

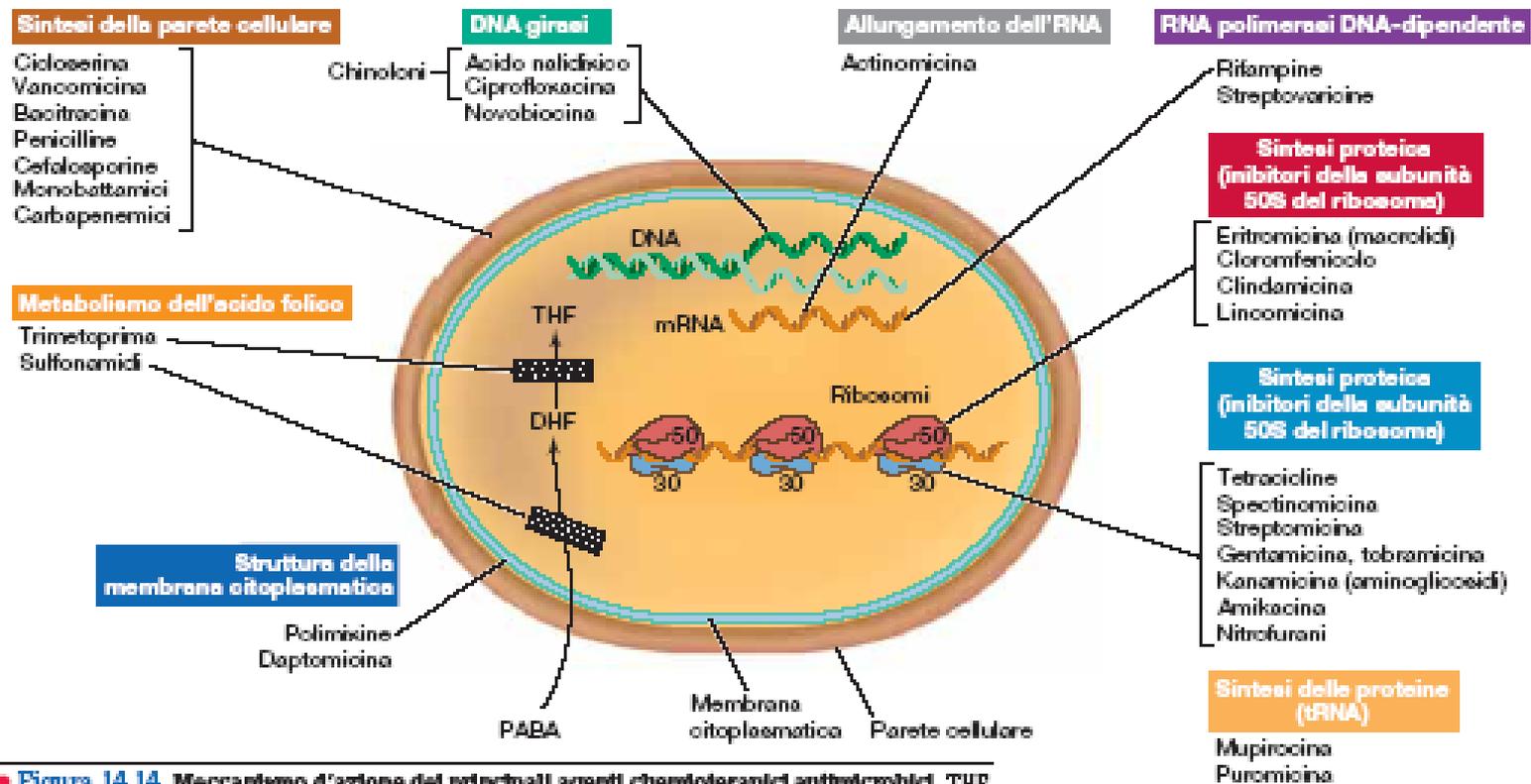
[Download figure](#) | [Open in new tab](#) | [Download powerpoint](#)

(a) Vertical sections through a *Streptomyces* colony. Photograph of colony growing on agar (courtesy of Jamie Ryding). (b) Diagram indicating how antibiotic production in the lower part of the colony can protect the nutrients released from dead cells (white) so that they can support aerial growth and sporulation. Living cells are shown as black (after **Wildermuth 1970**).

Antibiotici sintetizzati da Streptomyces

Classe chimica	Nome	Attivo contro:
Aminoglicosidici:	Streptomicina Spectinomomicina Neomicina	Batteri Gram- M.tuberculosis, N.gonorrhoeae Ampio spettro, tossico
Tetracicline	Tetraciclina Clorotetraciclina	Ampio spettro Gram-, Gram+, e rickettsie, clamidie, Mycoplasma
Macrolidi	Eritromicina Clindamicina	Gram+, Legionella Anaerobi obbligati
Polieni	Nistaina	Funghi
----	Cloramfenicolo	Ampio spettro (febbre tifoide)

I bersagli degli antibiotici nella cellula batterica



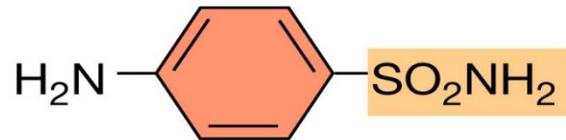
• **Figura 14.14** Meccanismo d'azione dei principali agenti chemioterapici antimicrobici. THF, tetraidrofolato; DHF, diidrofolato; mRNA, RNA messaggero; tRNA, RNA transfer.

Gli analoghi dei fattori di crescita

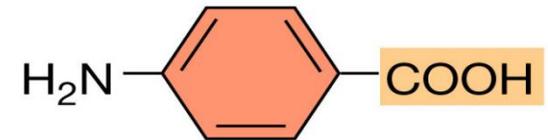
- sono composti sintetici simili ai fattori di crescita
- ma non vengono utilizzati dalla cellula

Sulfonamide

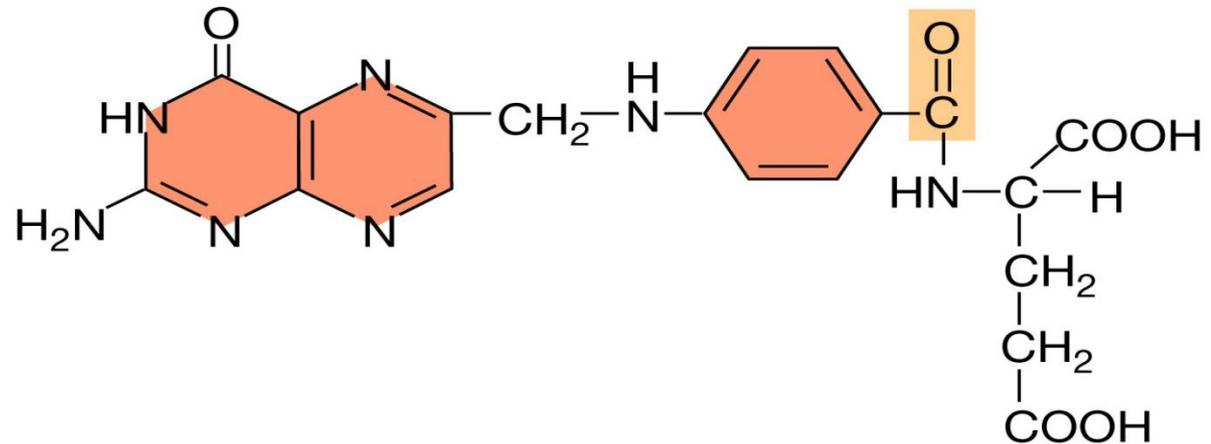
è un analogo dell'acido para-aminobenzoico che è un costituente dell'acido folico (Vit.B9)



(a) Sulfanilamide

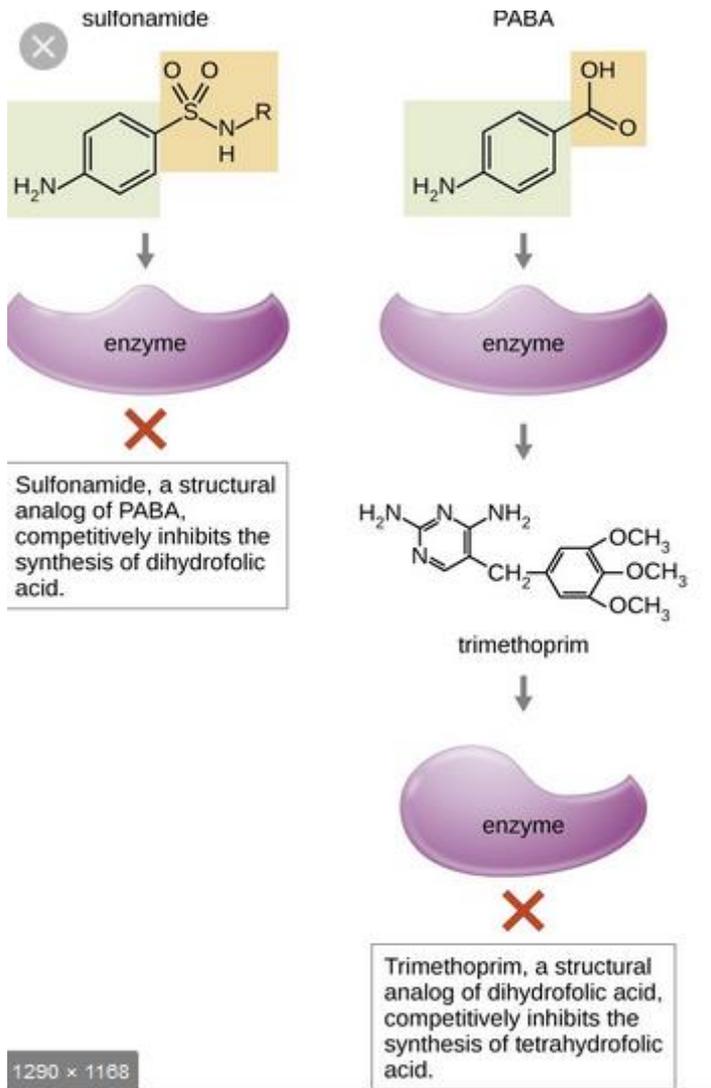


(b) *p*-Aminobenzoic acid



(c) Folic acid

Meccanismo d'azione dei sulfamidici



Quando la sulfonamide penetra nella cellula batterica compete con l'acido p-amminobenzoico (PABA) per il sito attivo di un enzima coinvolto nella sintesi dell'acido folico determinando una diminuzione di questo composto nella cellula.

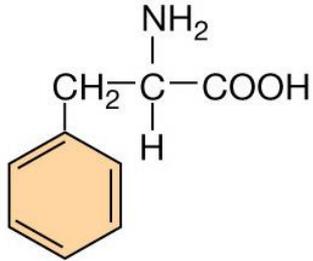
L'acido folico è essenziale per la sintesi delle purine e delle pirimidine (sintesi di DNA ed RNA) e di altri componenti cellulari

L'inibizione della sintesi di acido folico determina un'inibizione della crescita batterica e morte del batterio.

Attivo solo contro i batteri in quanto gli animali superiori devono procurarsi l'acido folico attraverso la dieta.

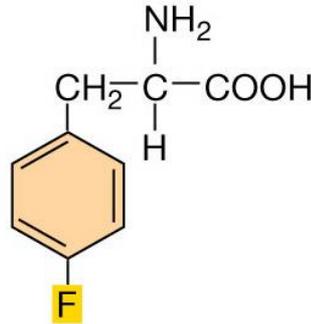
Trimetoprim ha un meccanismo simile

Composto naturale



Phenylalanine
(an amino acid)

Analogo

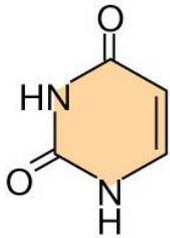


p-Fluorophenylalanine

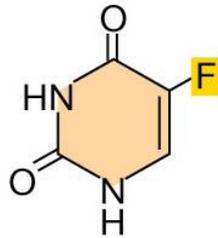
L'analogo è ottenuto per addizione di un atomo di fluoro o di cromo.

Fluoro è un atomo piccolo che non altera la struttura globale della molecola ma ne altera le proprietà chimiche

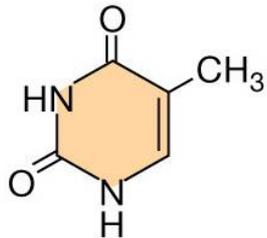
Gli analoghi delle basi sono molto tossici



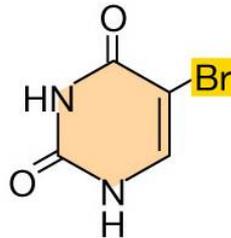
Uracil
(an RNA base)



5-Fluorouracil
(a uracil analog)



Thymine
(a DNA base)

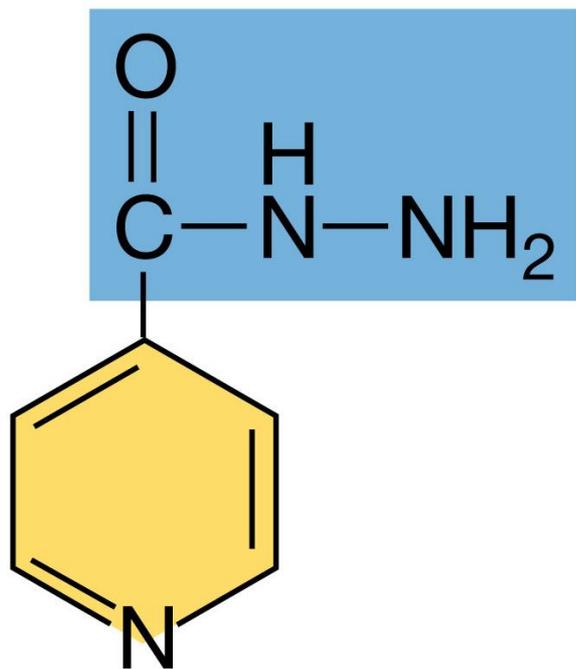


5-Bromouracil
(a thymine analog)

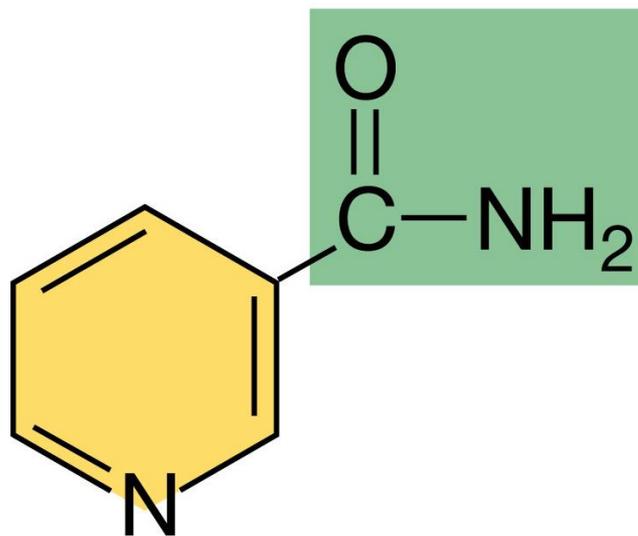
Struttura dell'**isoniazide**, un'idrazide dell'acido isonicotinico (analogo della nicotinamide)
efficace agente contro la tubercolosi interferisce con la sintesi dell'acido micolico specifico della parete del micobatterio

Analogo

Fattore di crescita



Isoniazid



Nicotinamide

Antibiotici che inibiscono la sintesi proteica

Aminoglicosidi

- Streptomina
- Neomicina
- Kanamicina

Meccanismo d'azione

Si legano ai ribosomi subunità 30S e provocano un'interazione non corretta tra codone e anticodone

Tetraciclina

Si legano ai ribosomi 30S e impediscono il legame dell'aminoacil tRNA al ribosoma

Cloramfenicolo

Inibisce la formazione del legame peptidico

Eritromicina

Previene la traslocazione inibendo il rilascio del tRNA dal sito P

Oxazolidinoni

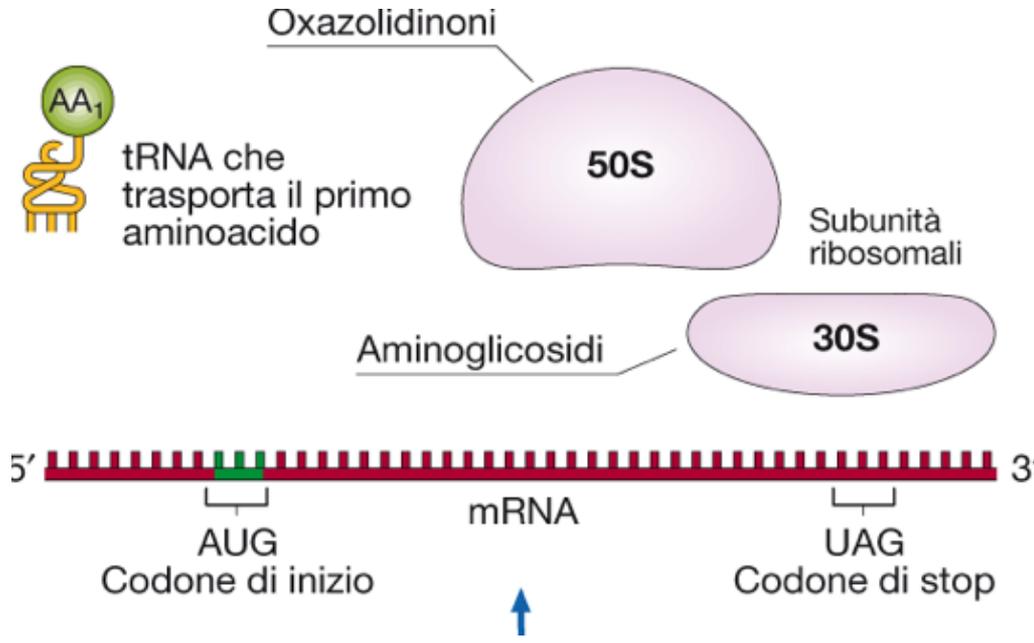
Inibiscono la formazione del ribosoma

Lincomicina

Clindamicina

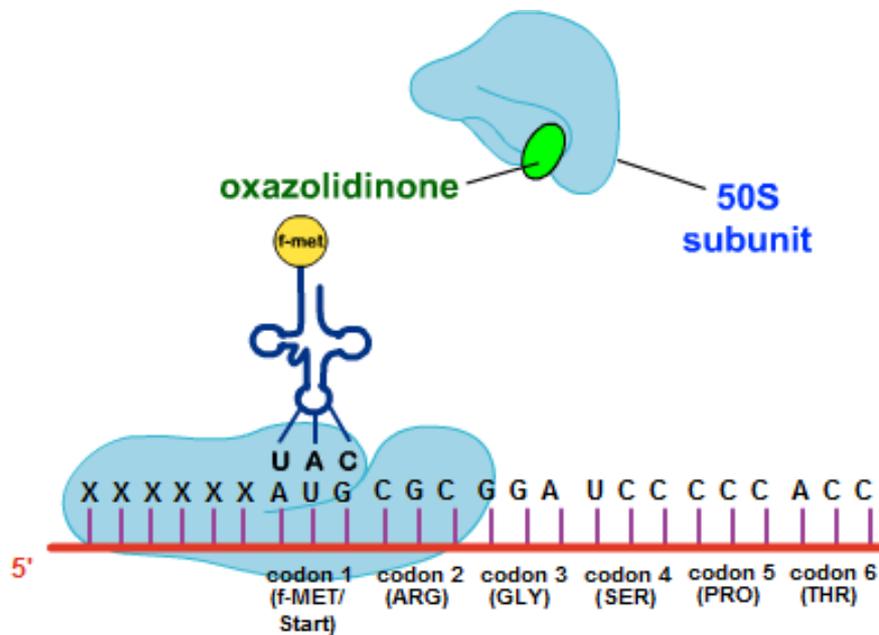
Agiscono sui ribosomi subunità 50S e inibiscono l'inizio della sintesi proteica

Gli oxazolidinoni



Sono una classe di antibiotici che prevengono la formazione del complesso d'inizio tra fMet-tRNA, mRNA e ribosoma.

Linezolid lega il ribosoma interagendo con RNA23S ed impedendo la formazione del ribosoma 70S.



Resistenza dovuta a

- a mutazioni nel DNA per RNA 23S: alcune mutazioni conferiscono resistenza incrociate in quanto alterano i siti di legame anche di cloramfenicolo o streptonigramina.
- al gene *cfr* che codifica metiltransferasi che modifica RNA 23 S (A2503) localizzato su diversi plasmidi e conferisce resistenza anche ad altri antibiotici (cloramfenicolo et al.)

AMINOGLICOSIDICI

- contengono aminozuccheri legati mediante legame glicosidici ad altri aminozuccheri.

sintetizzati da *Streptomyces*: streptomicina (utilizzata sin dal 1944) kanamicina, neomicina
da *Micromonospora purpurea* gentamicina

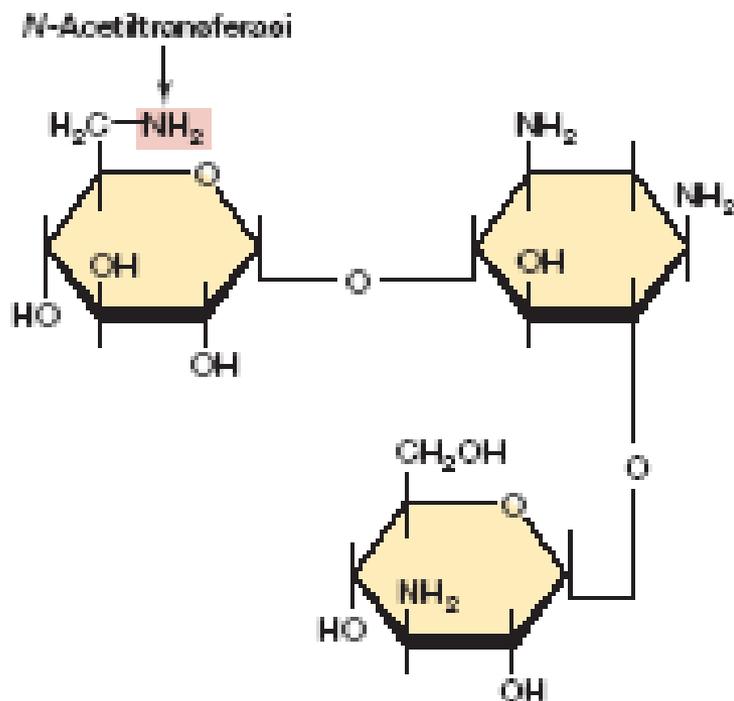
Si legano alla subunità minore del ribosoma interferendo con la fase di inizio e di allungamento della sintesi proteica:

Blocco completo del processo

Errata lettura del messaggio

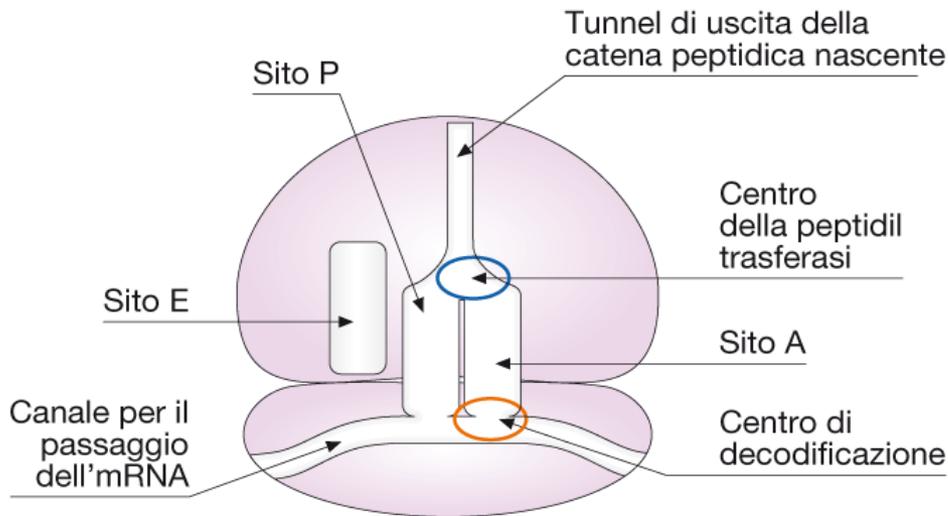
Attività batteriocida più accentuata verso Gram-

Struttura della kanamicina un tipico antibiotico aminoglicosidico



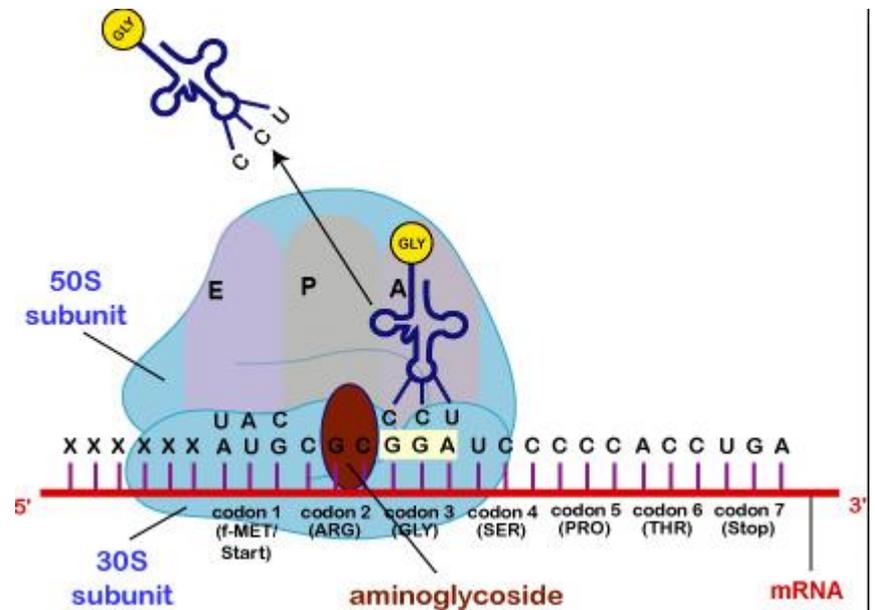
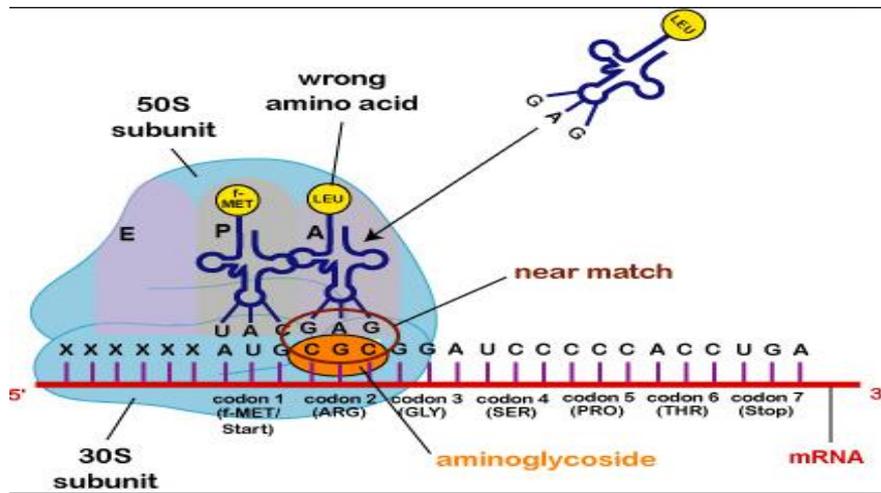
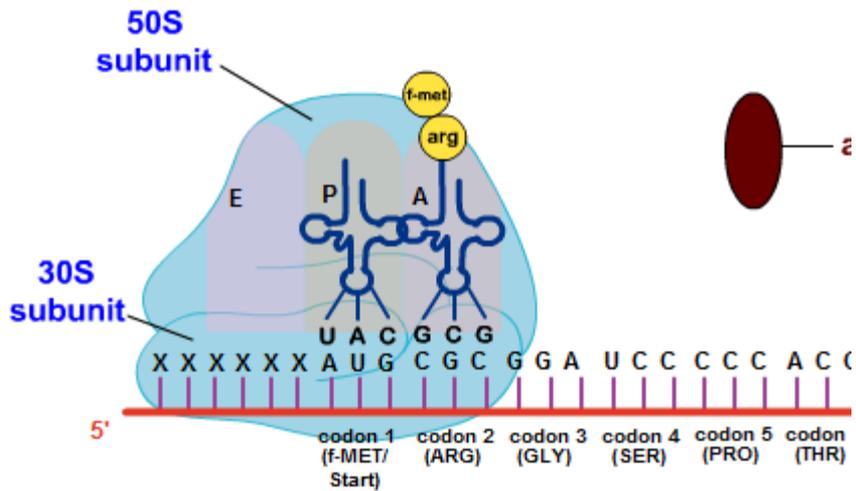
-
- **Figura 14.21** La kanamicina, un antibiotico aminoglicosidico. Gli amminozuccheri sono in giallo. La freccia indica il sito modificato dalla *N*-acetiltransferasi, codificata da un plasmide di resistenza (vedi par. 14.12). Una volta acetilato l'antibiotico è inattivo.

Gli aminoglicosidici si legano al sito A della subunità 30S ribosomiale in un sito cruciale per il controllo della fedeltà traduzionale del ribosoma impedendo il corretto riconoscimento tra tRNA e mRNA.

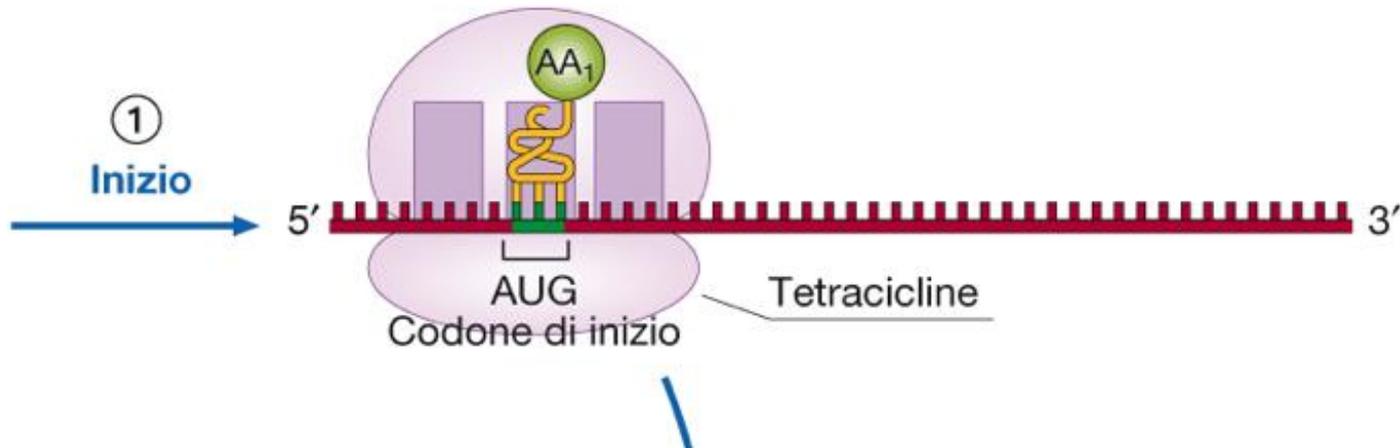


Resistenza dovuta a:

- Bassa permeabilità
- Mutazioni nelle proteine ribosomiali
- Inattivazione enzimatica mediante fosforilazione, acetilazione o adelinazione.



Le tetracicline



Inibiscono la sintesi proteica durante la fase di allungamento legandosi reversibilmente alla subunità 30S del ribosoma e bloccando l'accesso del aminoacil-tRNA sul sito A del ribosoma.

Resistenza è associata a:

Pompe ad efflusso

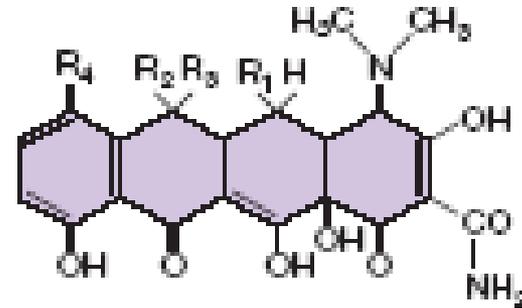
Sistemi di protezione ribosomiale

Inattivazione enzimatica

TETRACICLINE

Prodotte da varie specie di *Streptomyces*

Struttura comune costituita da 4 anelli naftacenici a cui sono legati vari gruppi. Esistono varianti semisintetiche clortetraciclina per aggiunta di atomi (Cl) o ossitetraciclina per aggiunta gruppo ossidrilico (OH)



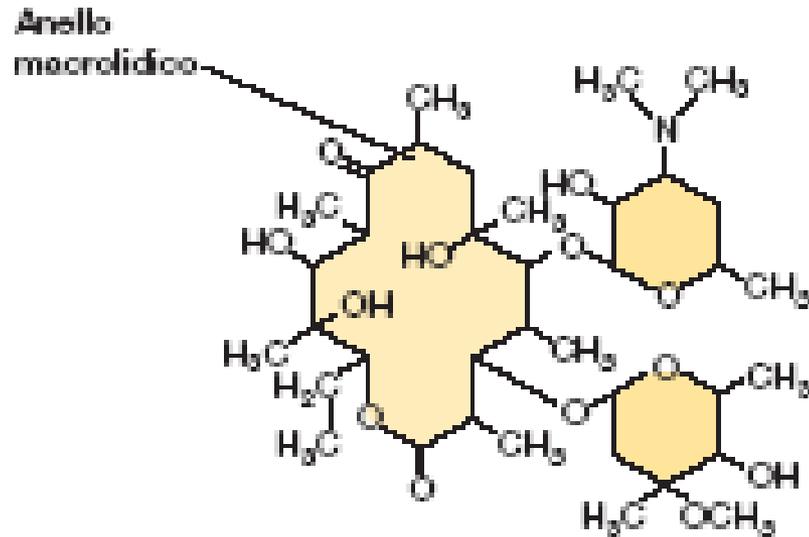
Analoghi delle tetraciclina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Tetraciclina	H	OH	CH ₃	H
7-Clortetraciclina (aureomicina)	H	OH	CH ₃	Cl
5-Ossitetraciclina (terramicina)	OH	OH	CH ₃	H

• **Figura 14.23** La tetraciclina. Gli analoghi semisintetici della tetraciclina sono antibiotici molto importanti.

MACROLIDI

Contengono un anello lattonico con 12-22 atomi di carbonio (macrolattoni) unito ad uno o più zuccheri .Utilizzati sin dal 1950 .Prototipo è la eritromicina

Esiste una grande varietà dovuta sia a variazioni dell'anello sia degli zuccheri



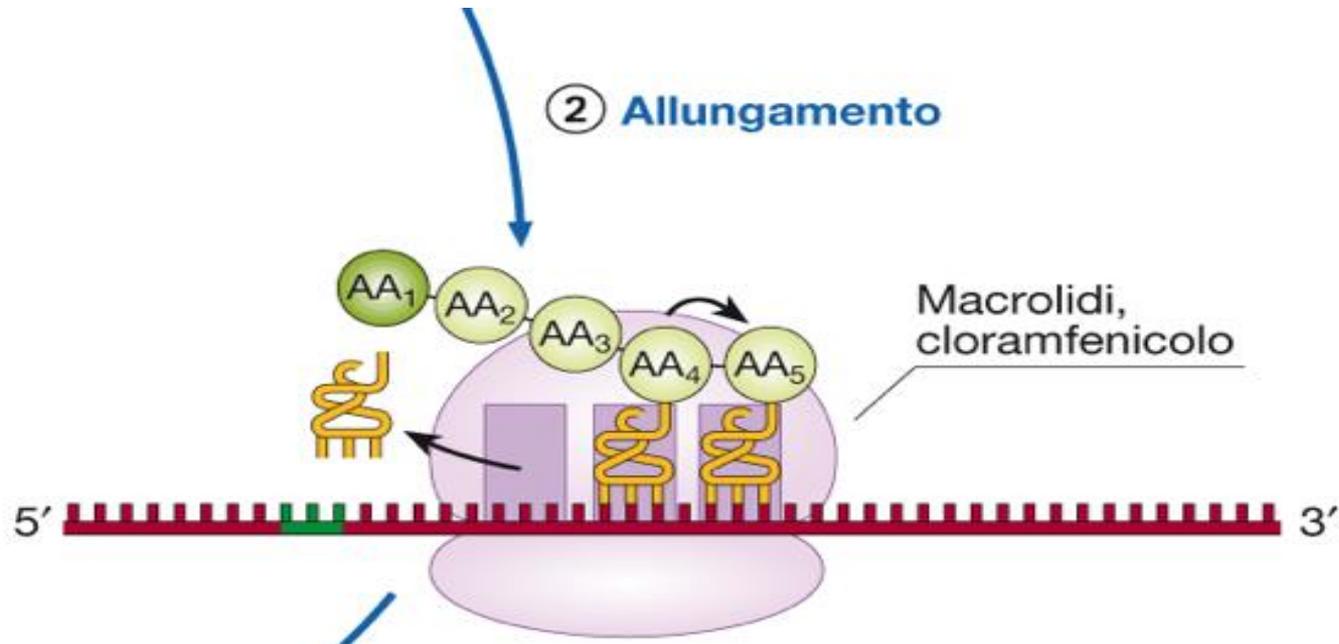
• **Figura 14.22** L'eritromicina, un antibiotico macrolidico. L'eritromicina è un antibiotico a largo spettro molto usato.

ERITROMICINA

Eritromicina è l'antibiotico macrolidico più conosciuto sintetizzato da *Streptomyces erythraeus*

Svolge un'azione batteriostatica e si lega all'rRNA 23S della subunità 50S per inibire l'allungamento della catena peptidica durante la sintesi proteica

Antibiotico ad ampio spettro

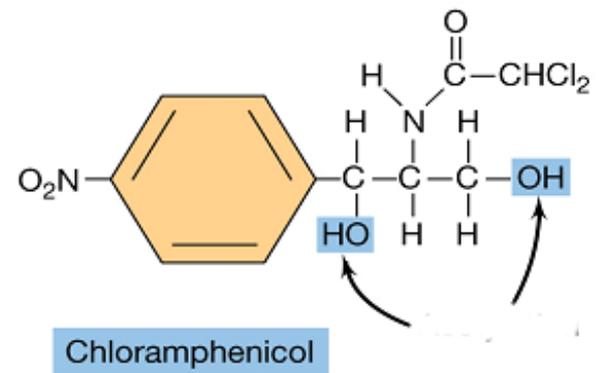


CLORAMFENICOLO

Originariamente isolato di *Streptomyces venezuelae* è ora ottenuto per sintesi chimica.

Analagamente all'eritromicina si lega all'rRNA 23S della subunità 50S del ribosoma: inibisce la peptidil trasferasi e svolge un'azione batteriostatica

Spettro d'azione molto ampio anche se è piuttosto tossico



Antibiotici che inibiscono la sintesi della parete

Penicilline

- Ampicillina
- Carbenicillina

Cefalosporine

Meccanismo d'azione

Previene la formazione di legami crociati tra le subunità di peptidoglicano

Cicloserina

Inibisce la isomerizzazione da L- a D-alanina

Bacitracina

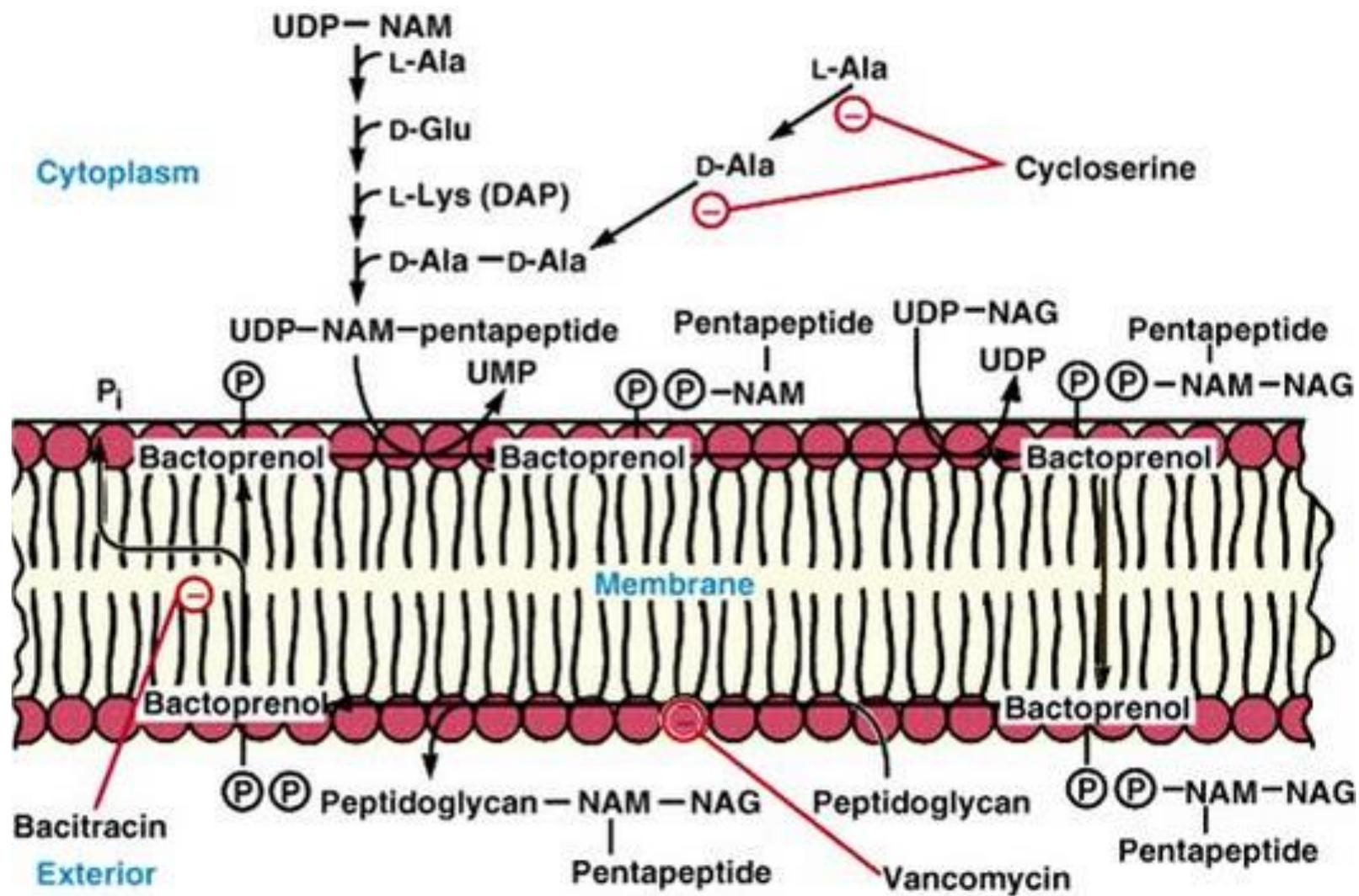
Inibisce il trasporto della componente peptidoglicanica nella parete cellulare

Vancomicina

Interferisce con la sintesi della parete legandosi alla D-alanina-D-alanina

Isoniazide

Inibisce la sintesi di acido micolico richiesto per la formazione della parete cellulare nei micobatteri



I principali antibiotici che agiscono a livello della biosintesi delle unità strutturali del peptidoglicano sono:

la cicloserina inibisce l'attività dell'enzima Isomerasi che determina la sintesi delle D-Ala

la fosfomicina inibisce l'enzima MurA responsabile della biosintesi del UDP-NAM

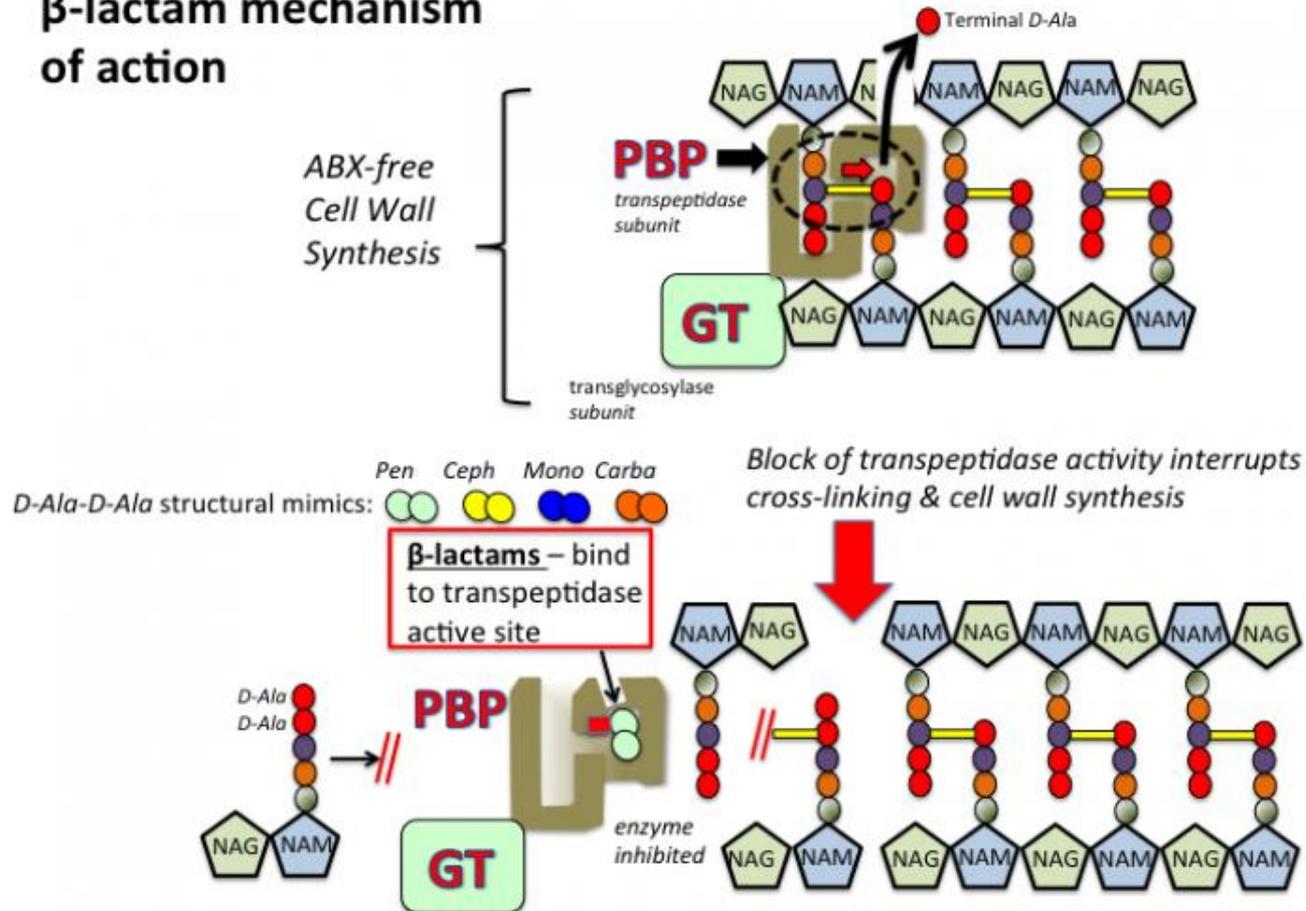
la bacitracina che impedisce il riciclaggio delle molecole di bactoprenolo necessario per il trasporto del LIPIDE II attraverso la membrana

Antibiotici che inibiscono la reazione di transpeptidazione:

Penicilline

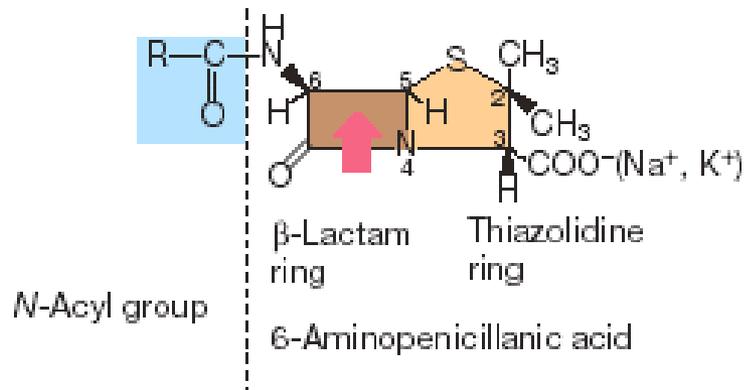
Vancomicina

β -lactam mechanism of action



Mechanism of action of beta-lactam antibiotics. **Top:** In the absence of drug, transpeptidase enzymes (also known as Penicillin Binding Proteins; PBP) in the cell wall catalyze cross-links between adjacent glycan chains, which involves the removal of a terminal D-alanine residue from one of the peptidoglycan precursors (highlighted by the broken oval). Glycosyltransferases (GT), which exist as either separate subunits, or tightly associated with transpeptidases (e.g. as is the case for PBP-2) create covalent bonds between adjacent sugar molecules NAM & NAG. The net result of covalent bonds between both the peptide and sugar chains creates a rigid cell wall that protects the bacterial cell from osmotic forces that would otherwise result in cell rupture. **Bottom:** Beta-lactam antibiotics, which include penicillins (Pen), cephalosporins (Ceph), monobactams (Mono) and carbapenems (Carba) bear a structural resemblance to the natural D-Ala-D-Ala substrate for the transpeptidase, and exert their inhibitory effects on cell wall synthesis by tightly **binding to the active site of the transpeptidase (PBP)**. NAG: N-acetylglucosamine; NAM: N-acetylmuramic acid.

I β -lattamici più importanti sono i derivati della penicillina G



Designazione	Gruppo <i>N</i> -Acile
PENICILLINA NATURALE Benzilpenicillina (penicillina G) Attiva sui Gram-positivi, sensibile alle β -lattamasi	
PENICILLINE SEMISINTETICHE Meticillina Stabile in ambiente acido, resistente alle β -lattamasi Oxacillina Stabile in ambiente acido, resistente alle β -lattamasi	
Ampicillina Ampio spettro di attività (specialmente contro i batteri Gram-negativi), stabile in ambiente acido, resistente alle β -lattamasi	
Carbenicillina Ampio spettro di attività (specialmente contro <i>Pseudomonas aeruginosa</i>), stabile in ambiente acido ma inefficiente per via orale, sensibile alle β -lattamasi	

VANCOMICINA

Antibiotico glicopeptidico prodotto da *Streptomyces orientalis*

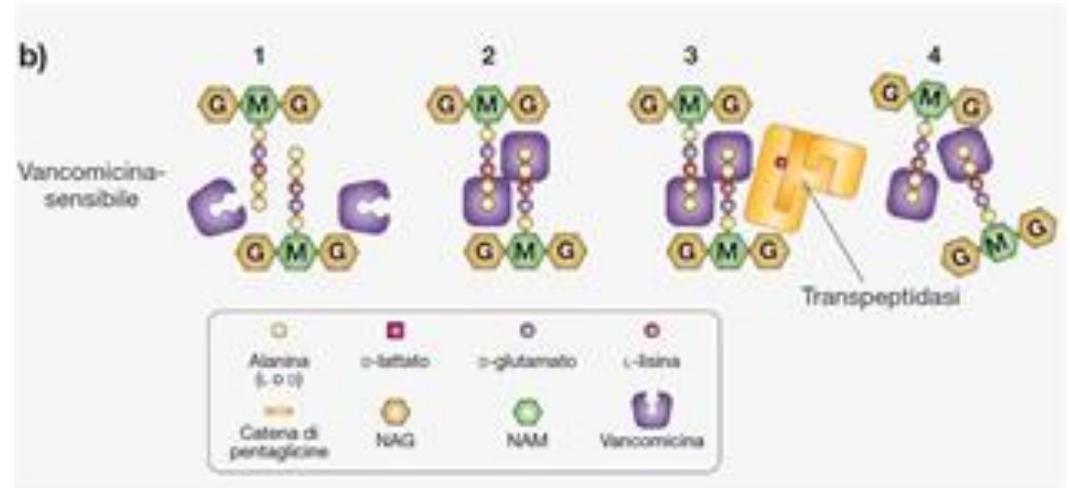
Molecola costituita da un peptide e da un disaccaride

La vancomicina blocca la sintesi del peptidoglicano inibendo la transpeptidazione che permette la formazione di legami crociati.

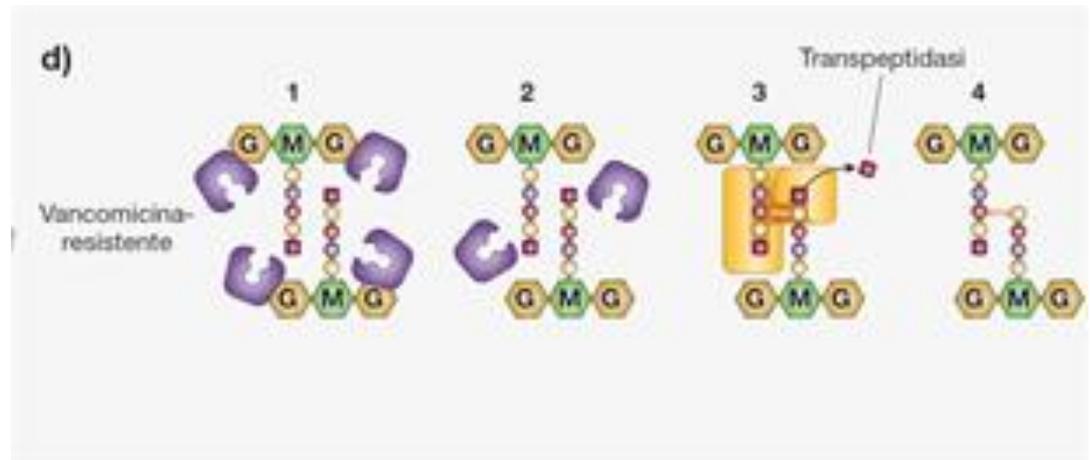
La porzione peptidica della vancomicina si lega specificatamente alla porzione D-alanina-D-alanina del pentapeptide e blocca la transpeptidasi.

I glicopeptidi come la Vancomicina hanno un meccanismo di azione differente....

Essi, infatti si legano al dipeptide di D-Ala e non permettono alla PBP utilizzarlo per la transpeptidazione

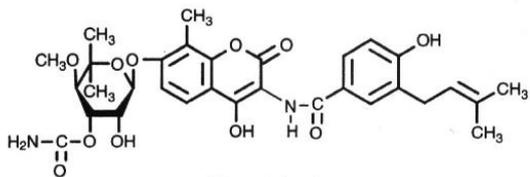


I meccanismi di resistenza si basano sulla modificazione della prima D-Ala in D-Lattato

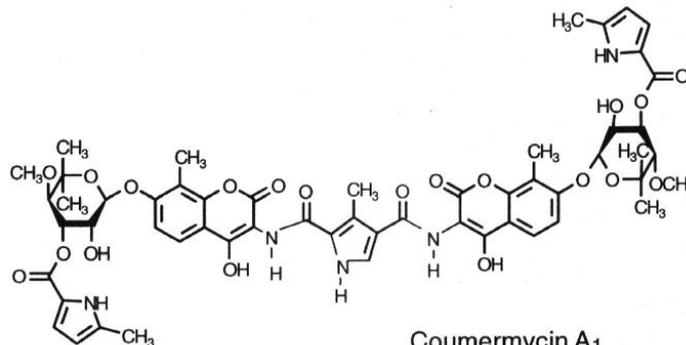


Antibiotici che inibiscono le DNA girasi

Coumarins

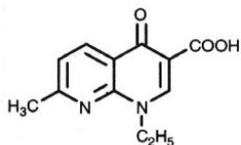


Novobiocin

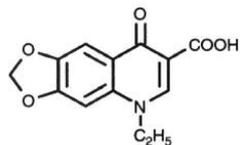


Coumermycin A1

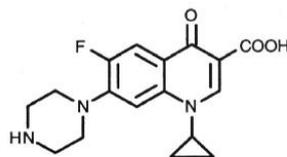
Quinolones



Nalidixic acid

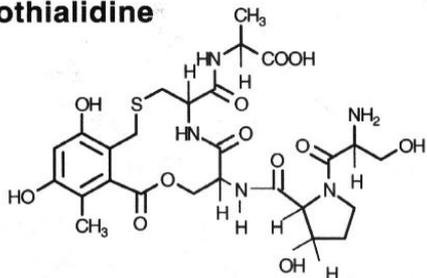


Oxolinic acid

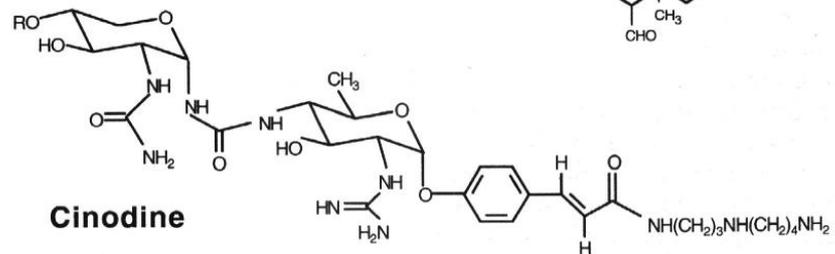
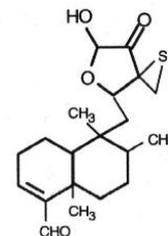


Ciprofloxacin

Cyclothialidine



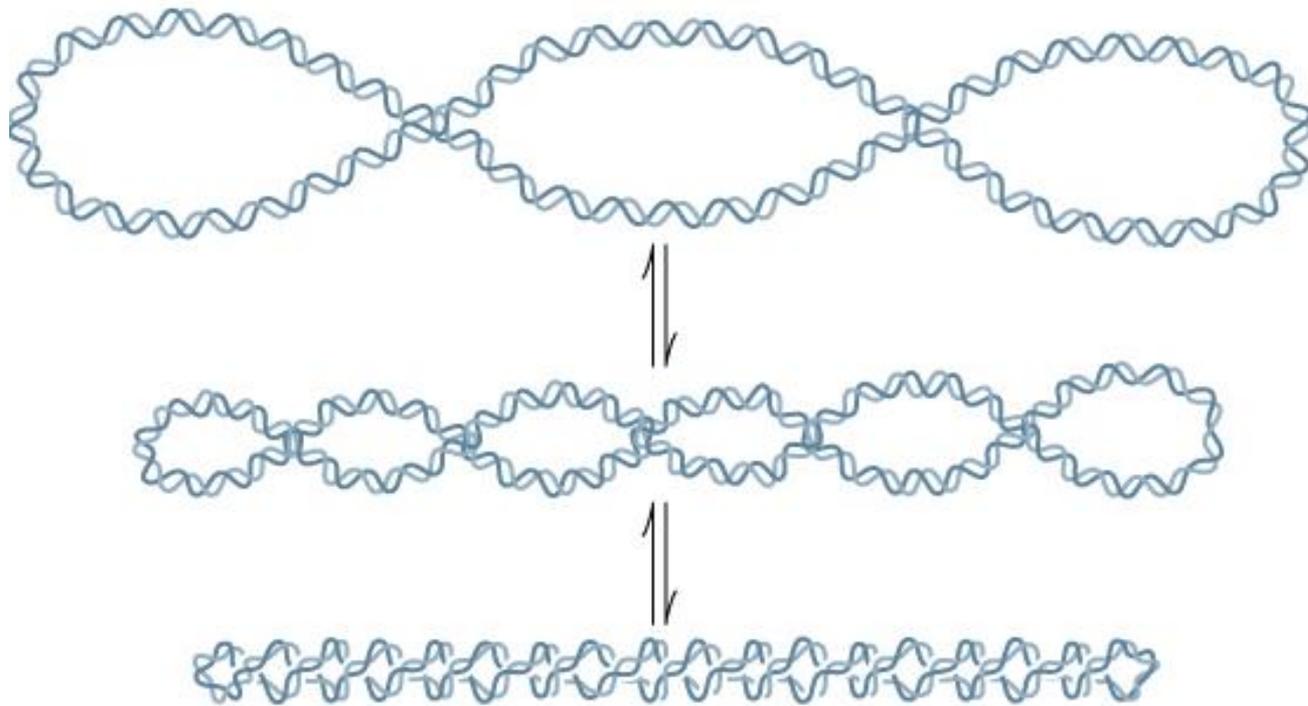
Clerocidin



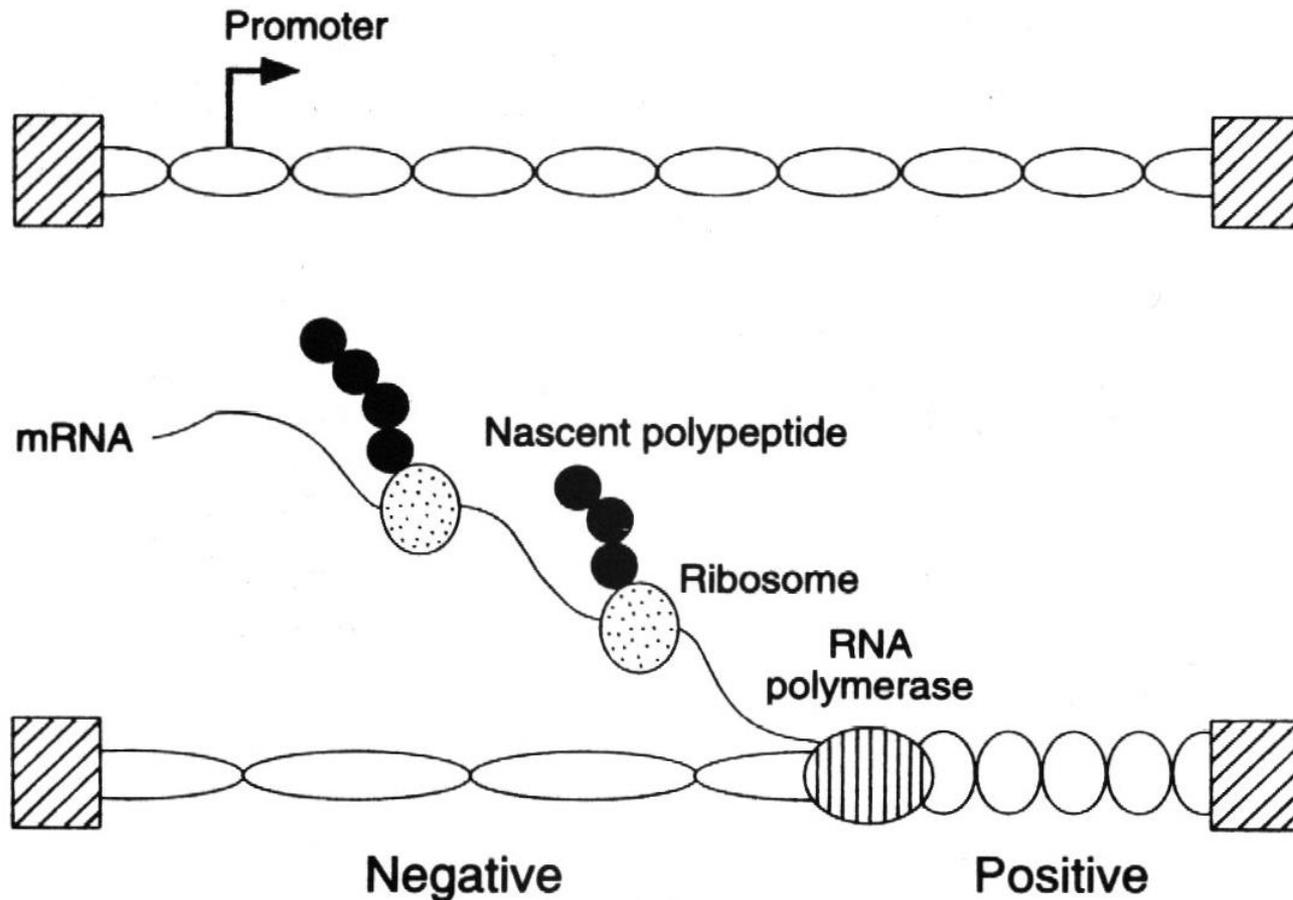
Cinodine

Superavvolgimento SUPERCOILING

Il progressivo aumento del grado di superavvolgimento del DNA produce una molecola altamente compattata



I processi di trascrizione possono alterare il livello di superavvolgimento del DNA

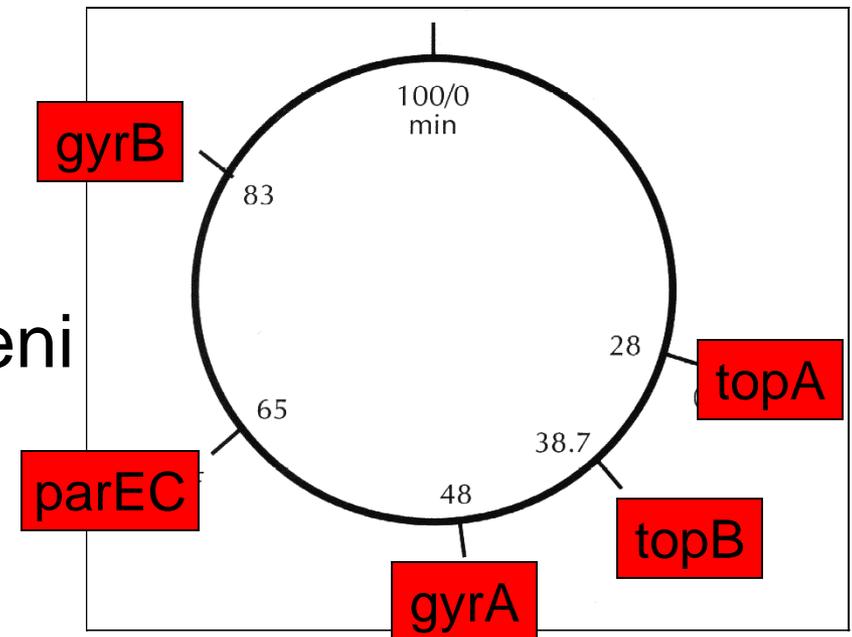


Le topoisomerasi

- Sono enzimi coinvolti nel controllo del superavvolgimento del DNA
- Catalizzando la rottura e riunione dei filamenti possono modificare il numero di legami di un determinato dominio consentendo l'interconversione tra topoisomeri.
- Le topoisomerasi agiscono catalizzando la rottura e successiva riunione dei legami fosfodiesterici del DNA e possono essere classificate come
 - **attività di tipo I** se cambiano lo stato topologico del DNA agendo su singolo filamento
 - **attività di tipo II** se invece operano su entrambe i filamenti

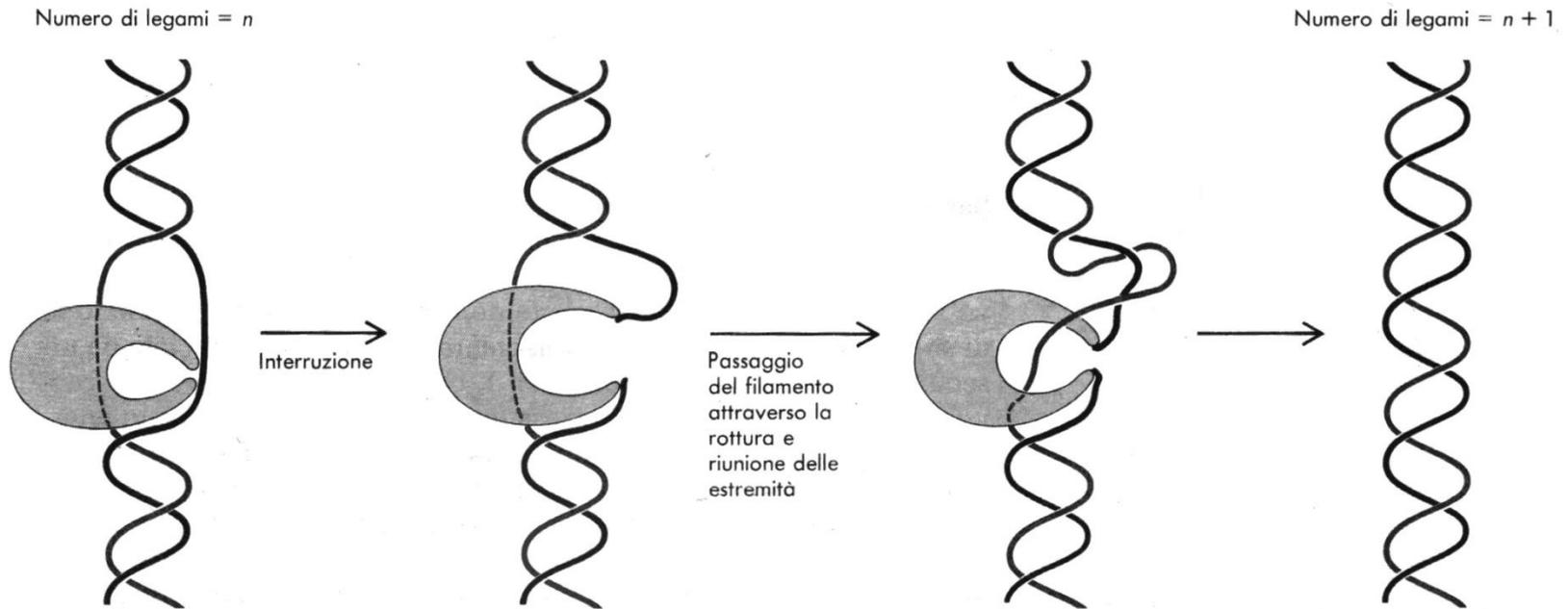
	Subunità	pM (kDa)	Tipo	Geni
Topoisomerasi I	α	105	I	topA
Girasi (topoII)	$\alpha 2\beta 2$	105(a)95(b)	II	gyrA,gyrB
Topoisomerasi III	α	73.2	I	topB
Topoisomerasi IV	$\alpha 2\beta 2$	75(a) 66.8(b)	II	parC,parE

DNA topoisomerasi in E.coli
posizione sulla mappa dei geni



Le topoisomerasi di tipo I

- l'enzima fa passare uno dei due filamenti di DNA attraverso la rottura e poi salda le estremità interrotte
- non richiede ATP



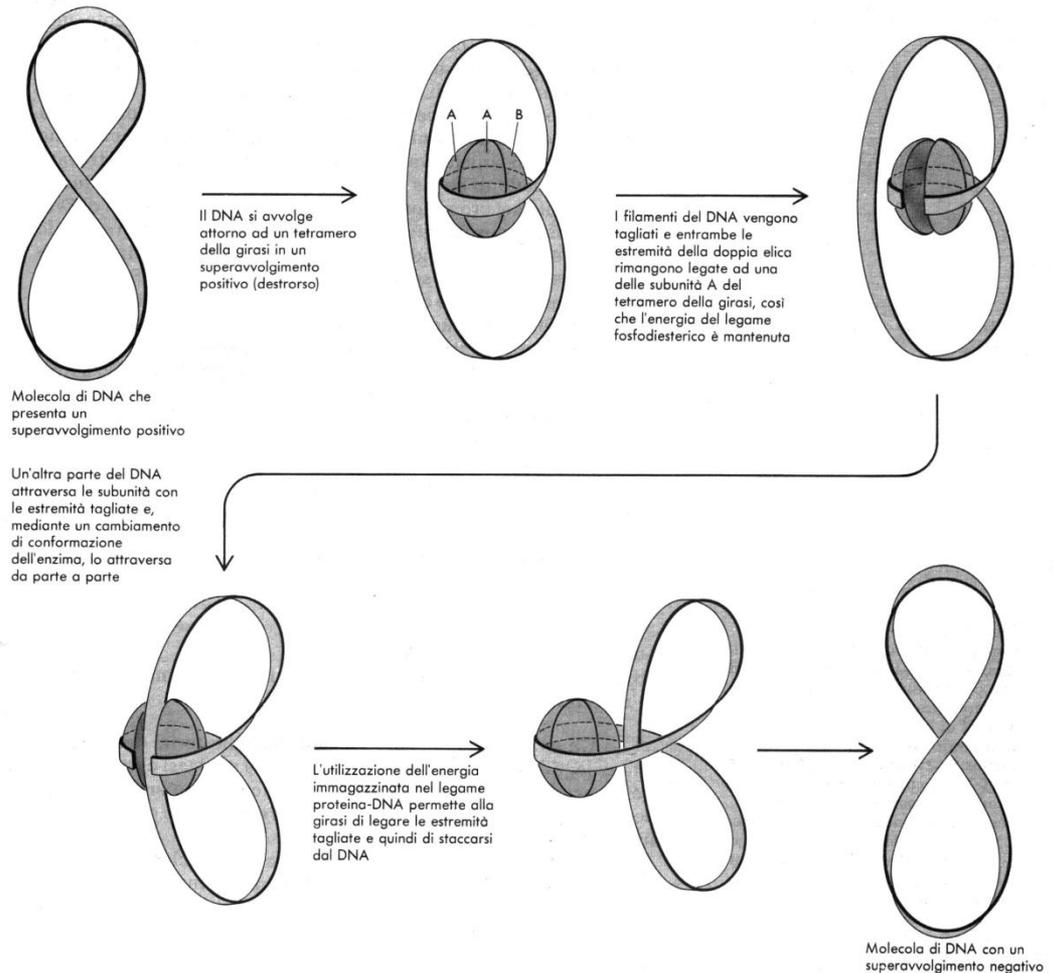
1. Avvolgimento di circa 200 bp del DNA attorno all'enzima

2. Il legame dell'ATP da inizio alla reazione di taglio su entrambi i filamenti: l'estremità 5-P di ciascun filamento viene legata covalentemente da un residuo di tirosina della subunità A dell'enzima

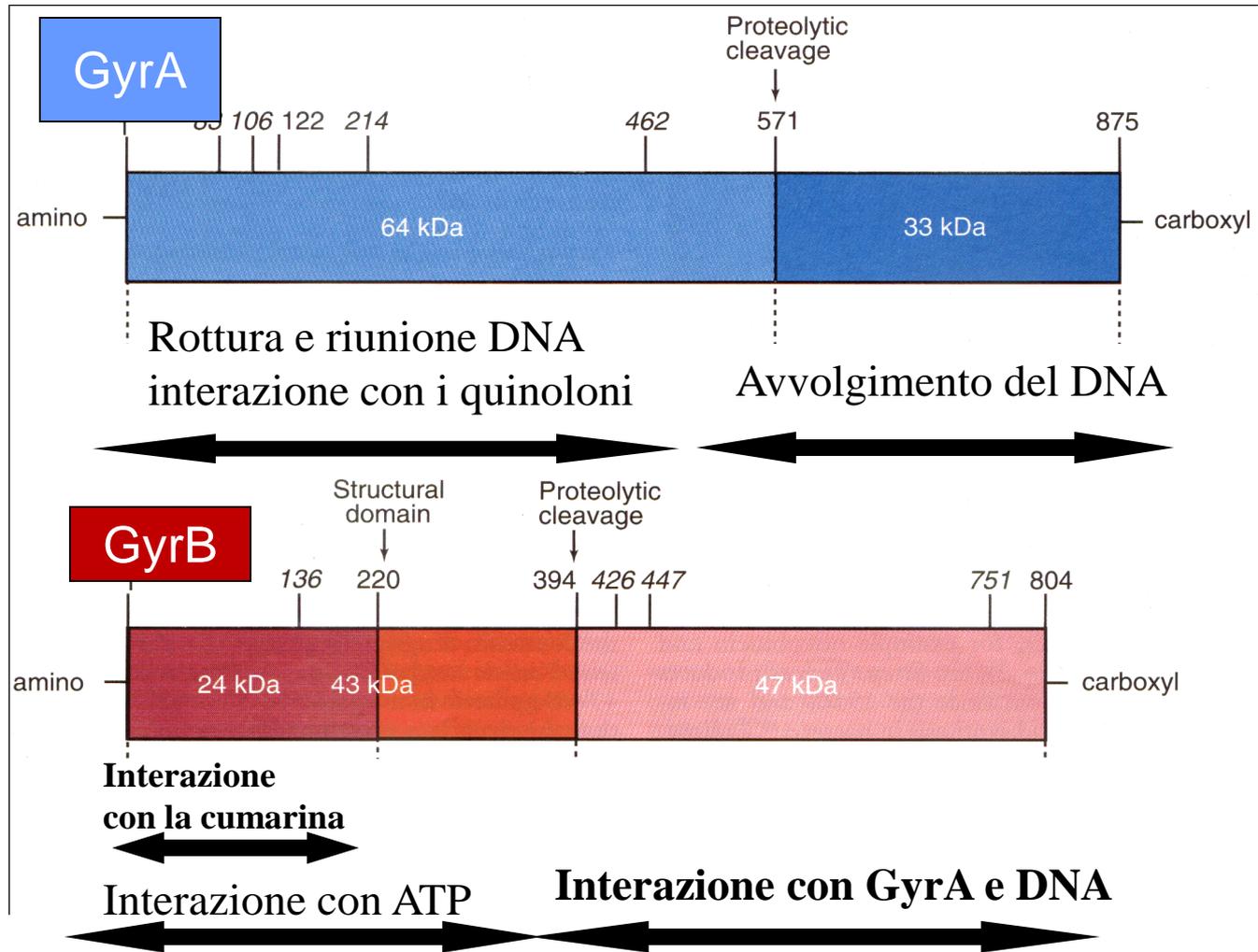
3. il passaggio di un segmento di DNA a doppia elica attraverso tale rottura e riunione dei filamenti

4. Idrolisi dell'ATP libera il segmento di DNA coinvolto.

La DNA girasi

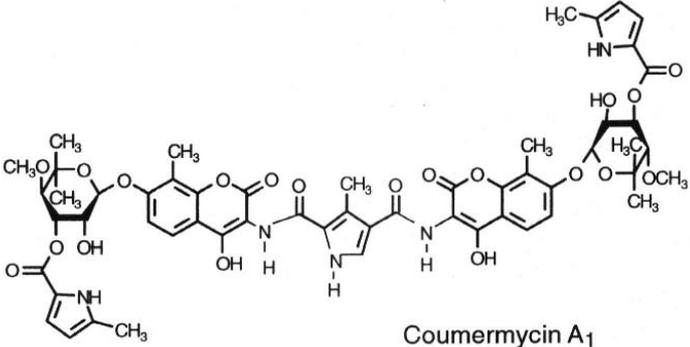
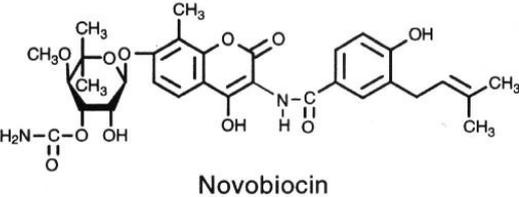


Struttura del complesso enzimatico GyrA/GyrB



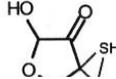
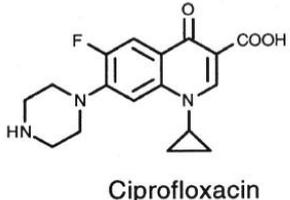
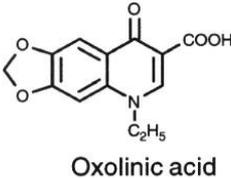
Antibiotici che inibiscono le DNA girasi

Coumarins



GyrB

Quinolones



GyrA

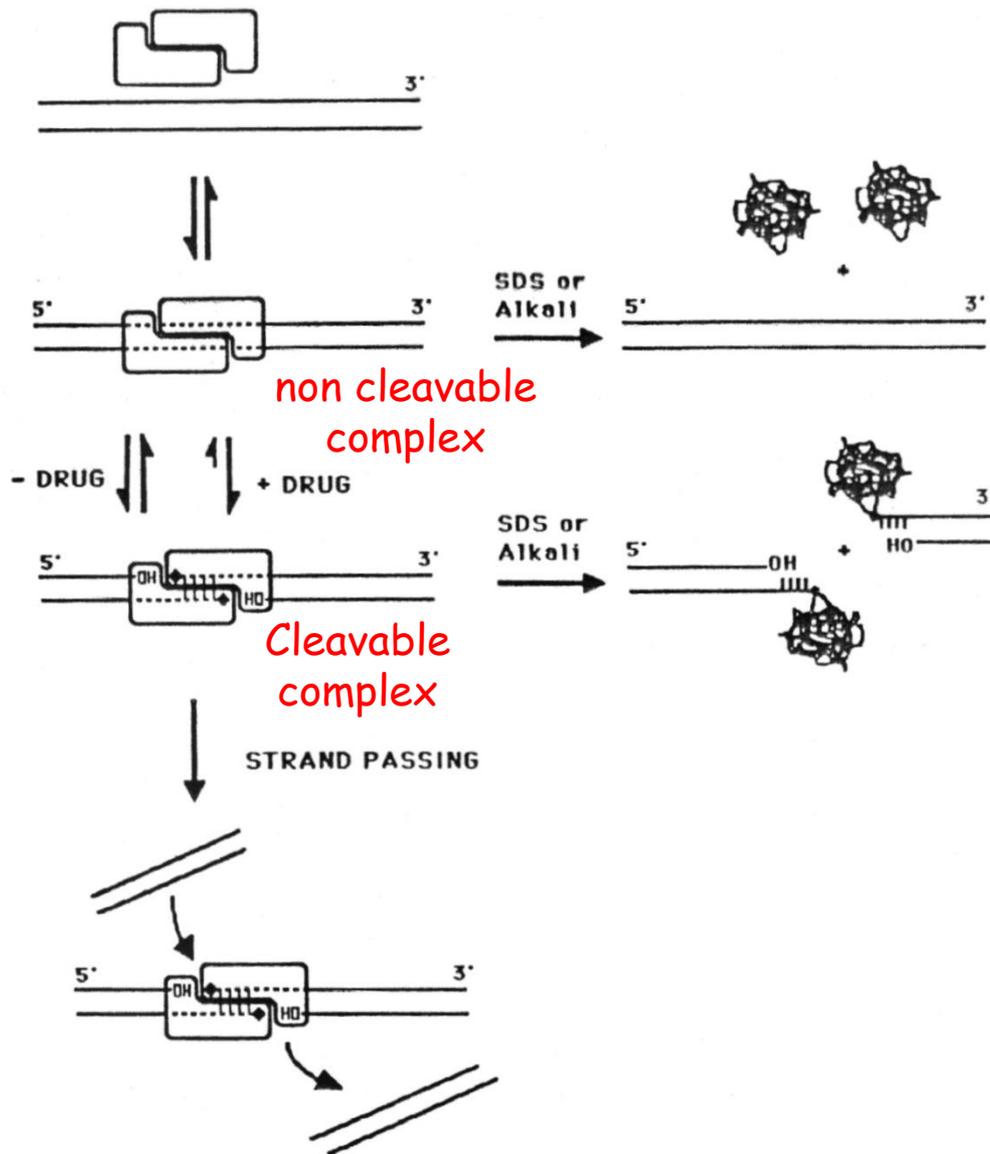
I quinoloni agiscono su GyrA

I quinoloni come acido nalidixico, acido oxolinico hanno come bersaglio la subunità GyrA nell'intermedio di reazione.

La subunità GyrA risulta legata covalentemente al 5' del DNA tramite una tirosina (Tyr122) localizzata nel sito attivo.

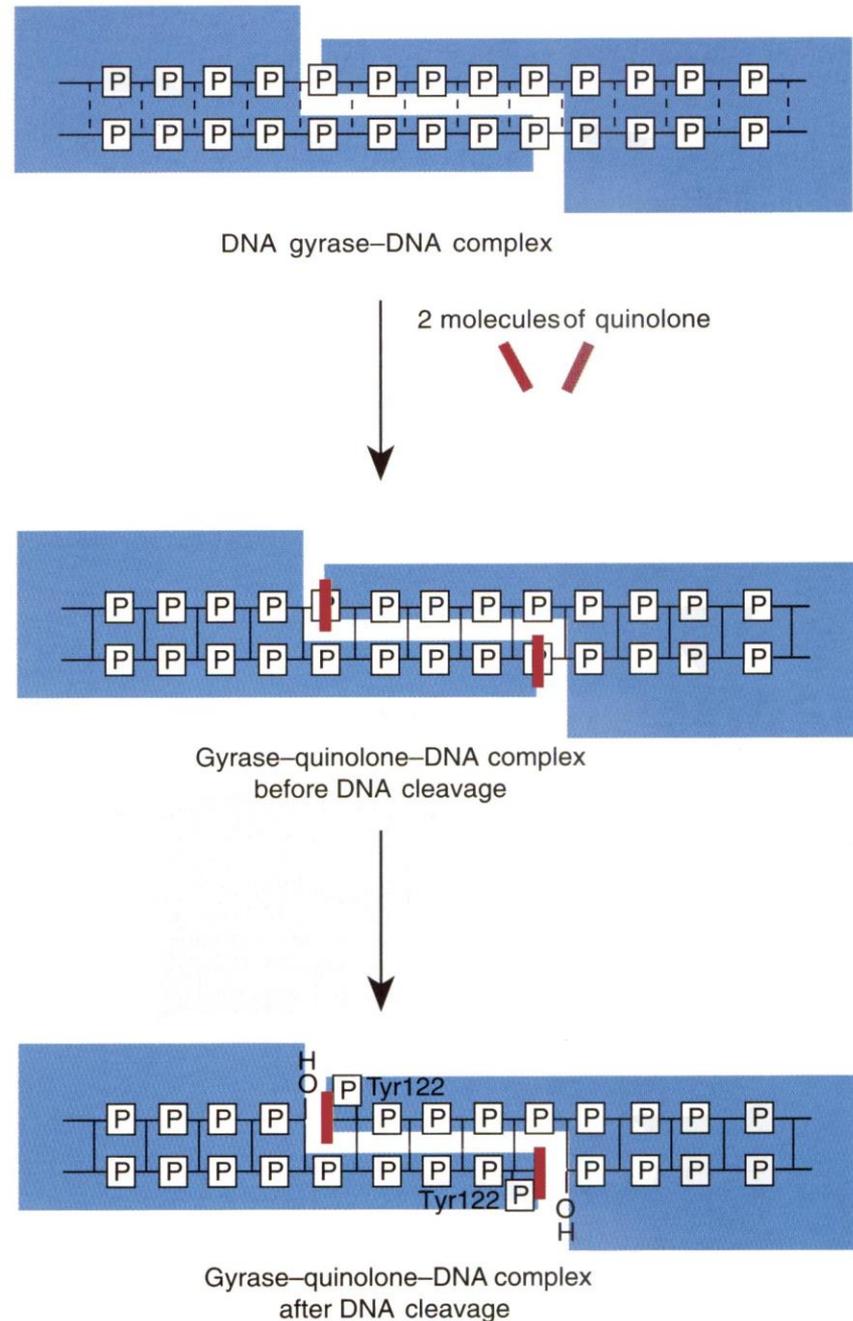
I quinoloni agiscono stabilizzando l'intermedio di reazione CLEAVABLE COMPLEX costituito da girasi e DNA tagliato.

L'inibitore si intercala nello spazio internucleotidico in prossimità del legame fosfodiesterico che in seguito sarà tagliato dall'enzima



La girasi si lega covalentemente all'estremità 5' del DNA e forma due complessi in rapido equilibrio tra loro dovuti il primo al riconoscimento dell'enzima sul target e il secondo ad un legame tra enzima e DNA

Meccanismo d'azione
dei chinoloni :
stabilizzano il
complesso aperto
inducendo
frammentazione del
DNA



Le Coumarine agiscono su GyrB

Le coumarine come la novobiocina e la coumermicina prodotte da *Streptomyces* agiscono bloccando la reazione ATPasi catalizzata da GyrB.

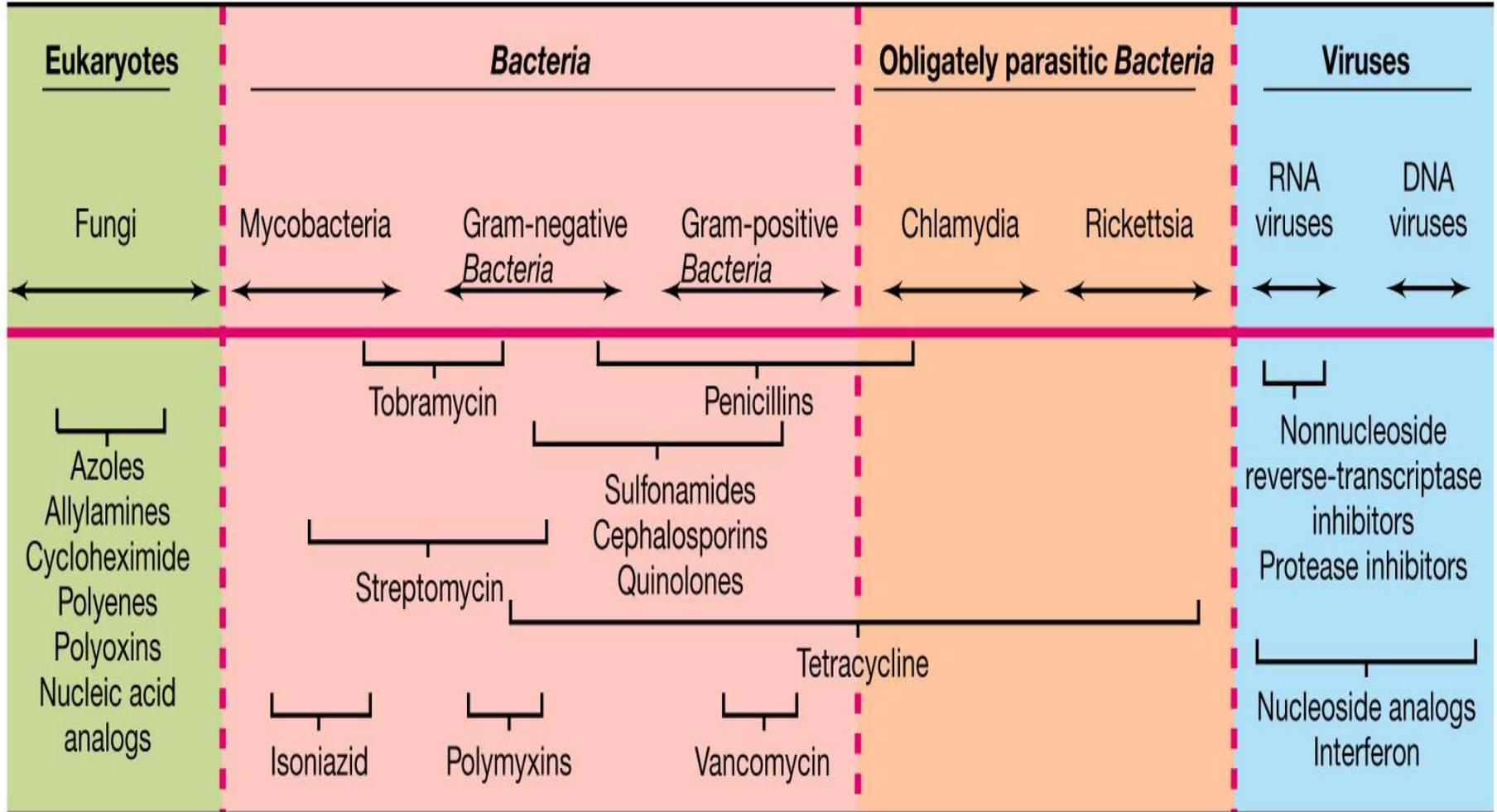
L'analisi dell'estremità N terminale di GyrB mostra che la proteina possiede un'attività ATPasica sensibile alla coumarina.

La coumarina compete con l'ATP nel suo sito di legame ostacolando il superavvolgimento del DNA.

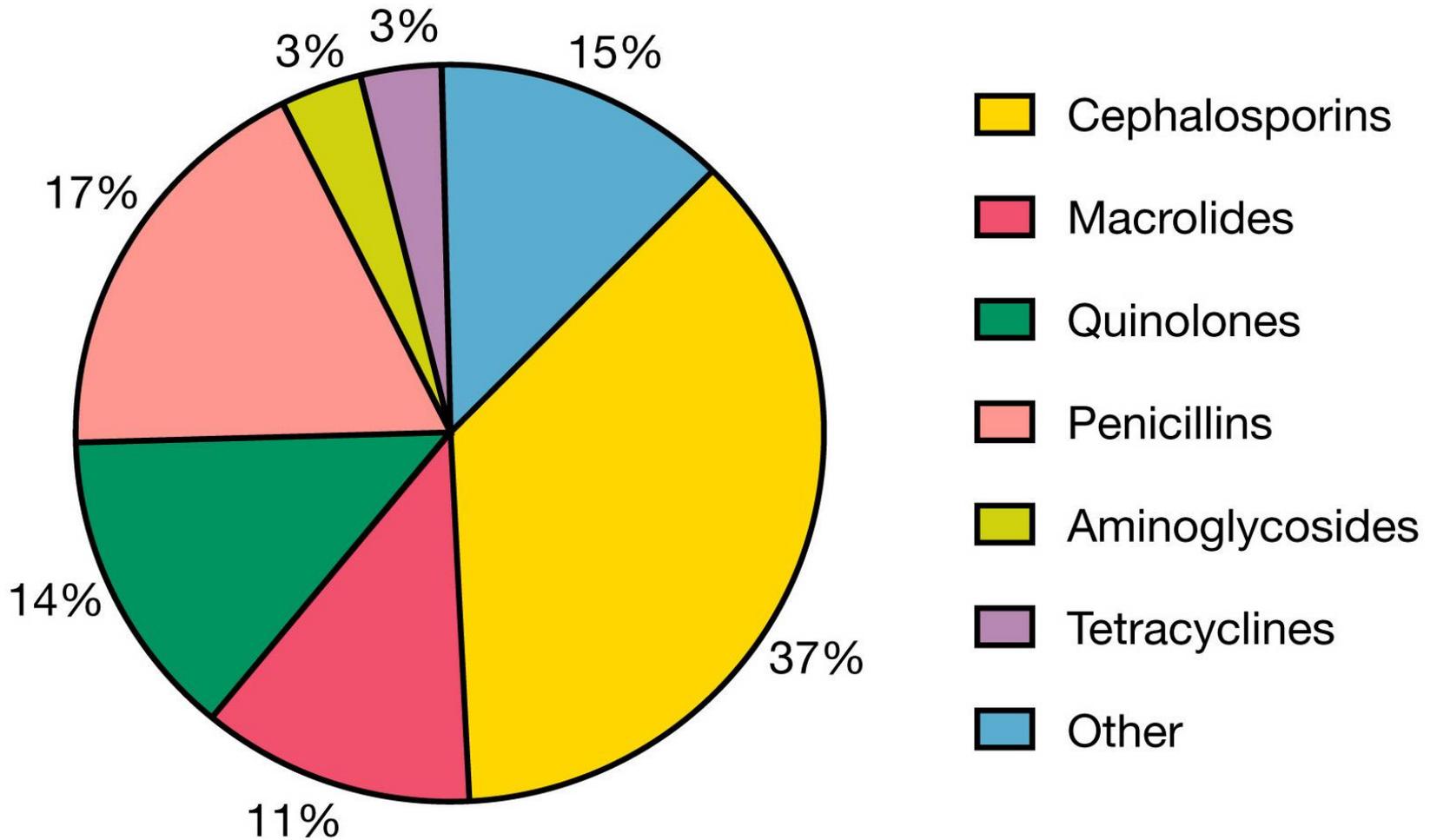
Limitata permeabilità

Tossicità verso le cellule eucariotiche

Spettro d'azione antimicrobica di alcuni composti: importanza della tetraciclina, streptomicina e penicilline

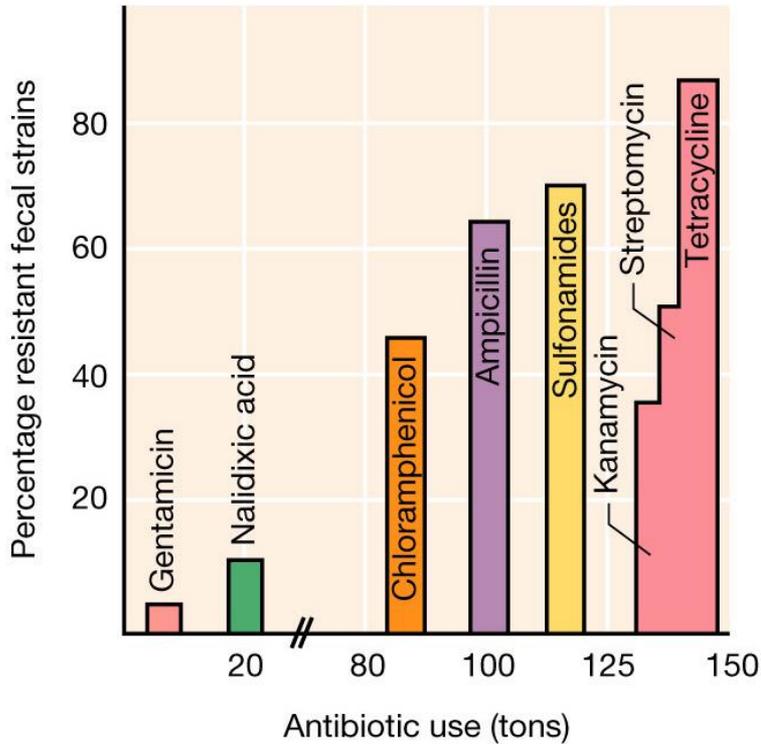


Percentuale di utilizzazione degli antibiotici



Comparsa di batteri resistenti agli antibiotici

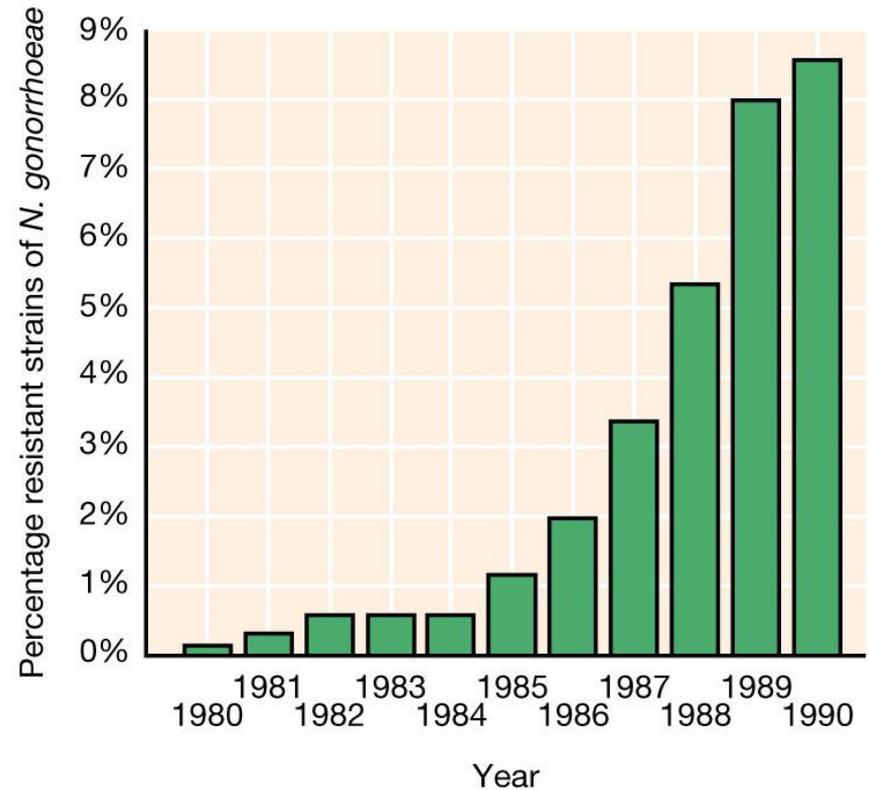
Correlazione tra quantità di antibiotico usata e percentuale batteri resistenti



(a)

Pazienti affetti da diarrea

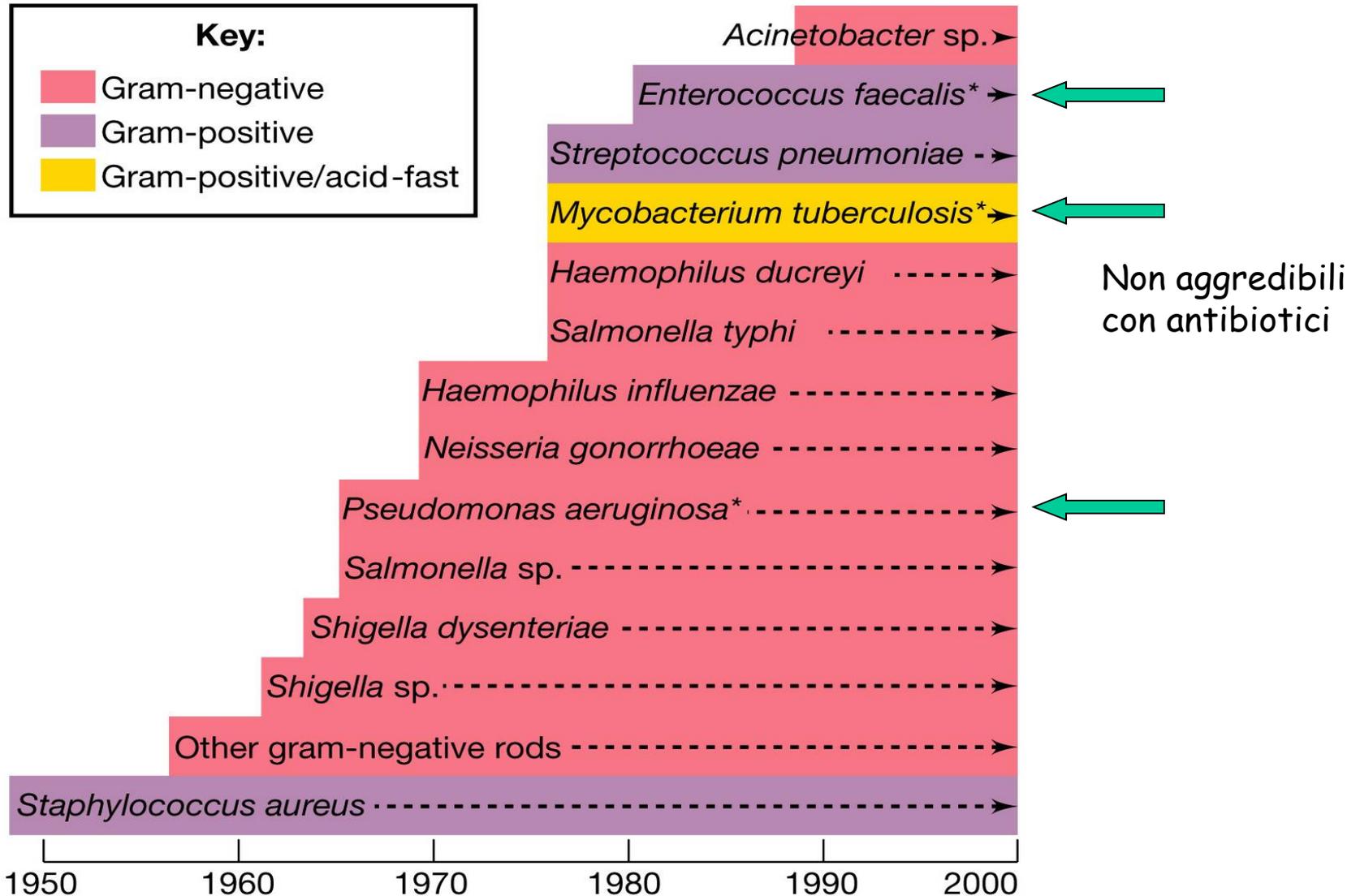
Incremento rapido di ceppi antibiotico resistenti



(b)

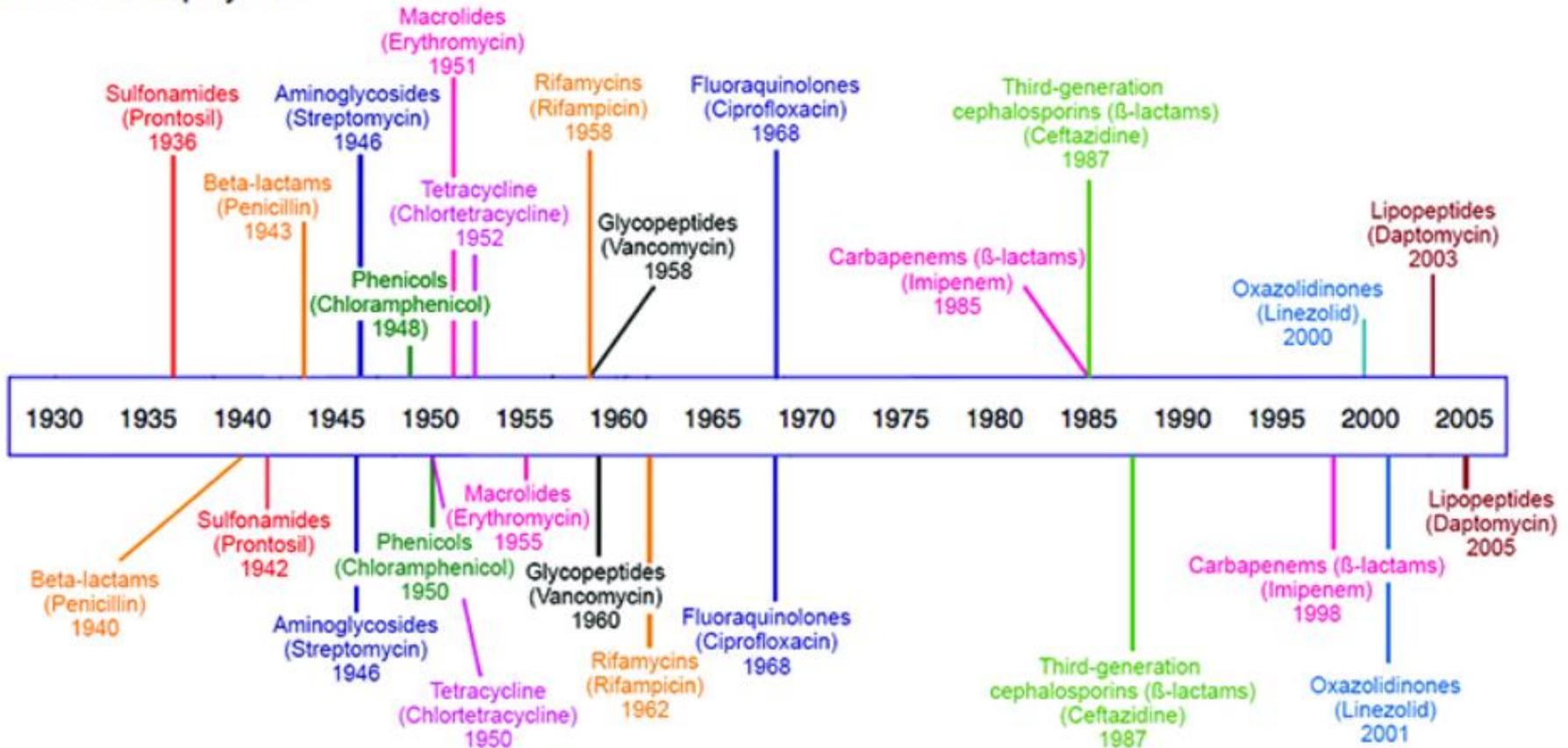
Pazienti affetti da gonorrea

Comparsa negli ultimi anni di ceppi antibiotico resistenti



Scoperta degli antibiotici ed insorgenza dell'antibiotico resistenza

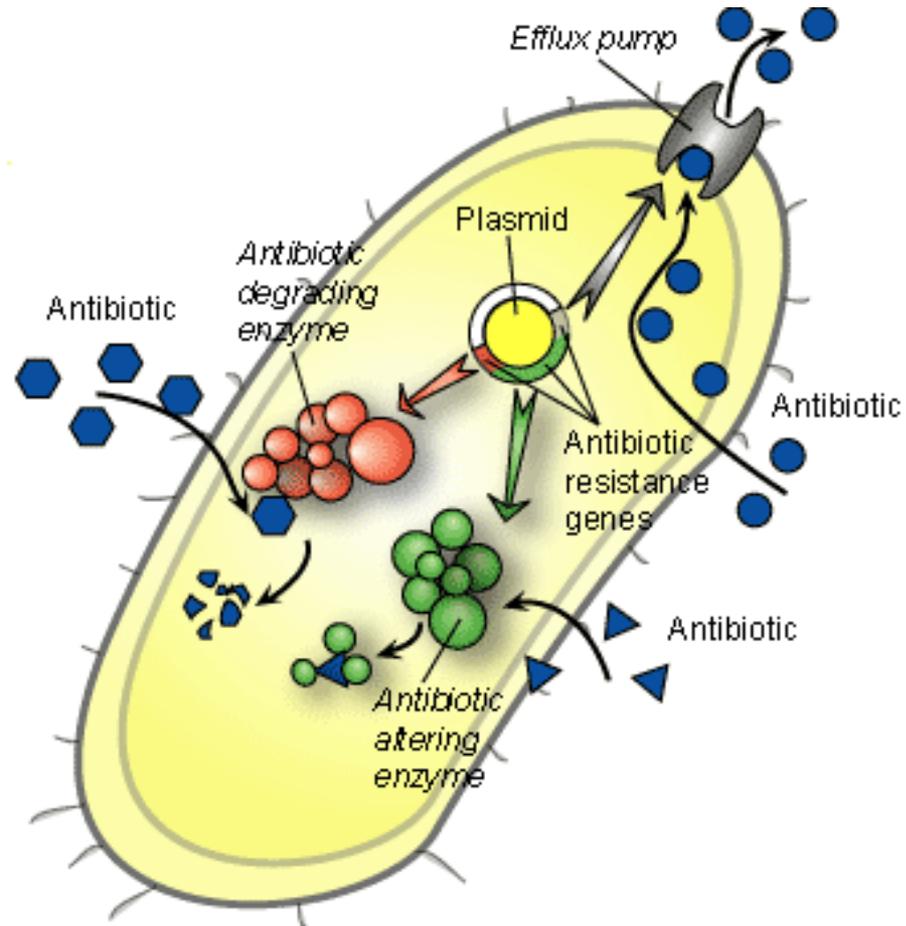
Antibiotic deployment

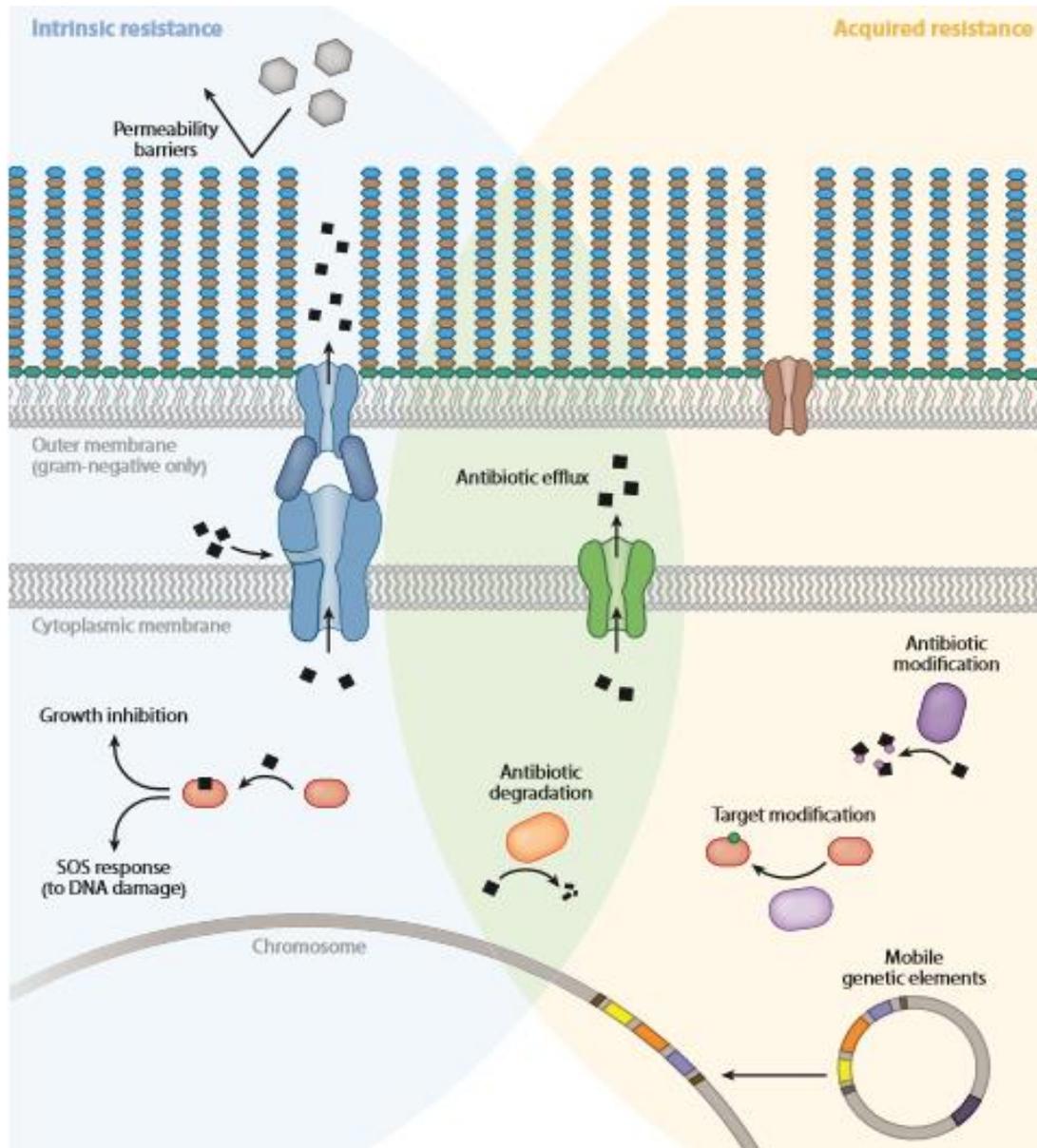


Antibiotic resistance observed

Notare come sia rallentata la scoperta di nuovi antibiotici negli ultimi anni

Le strategie di antibiotico resistenza

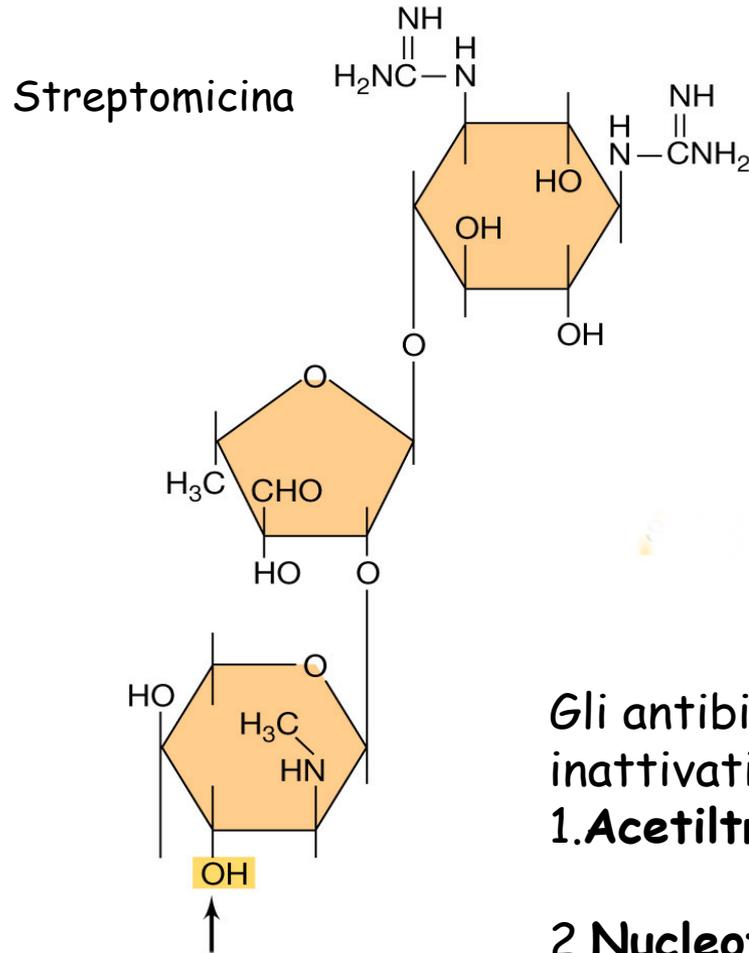




Principali meccanismi d'insorgenza dell'antibiotico resistenza nei batteri

1. Modificazione dell'antibiotico che diviene inattivo
2. Modificazione del bersaglio che diviene insensibile
3. Blocco dell'entrata dell'antibiotico nella cellula
4. Eliminazione dell'antibiotico intracellulare tramite pompe ad efflusso
5. Reazione di pathways alternativi a quelli bloccati dall'antibiotico

1. Modificazione dell'antibiotico che diviene inattivo



Enzimi codificati da geni presenti su elementi genetici mobili (plasmidi, Tn, Int) possono modificare l'antibiotico rendendolo inattivo

Gli antibiotici aminoglicosidici possono essere inattivati da

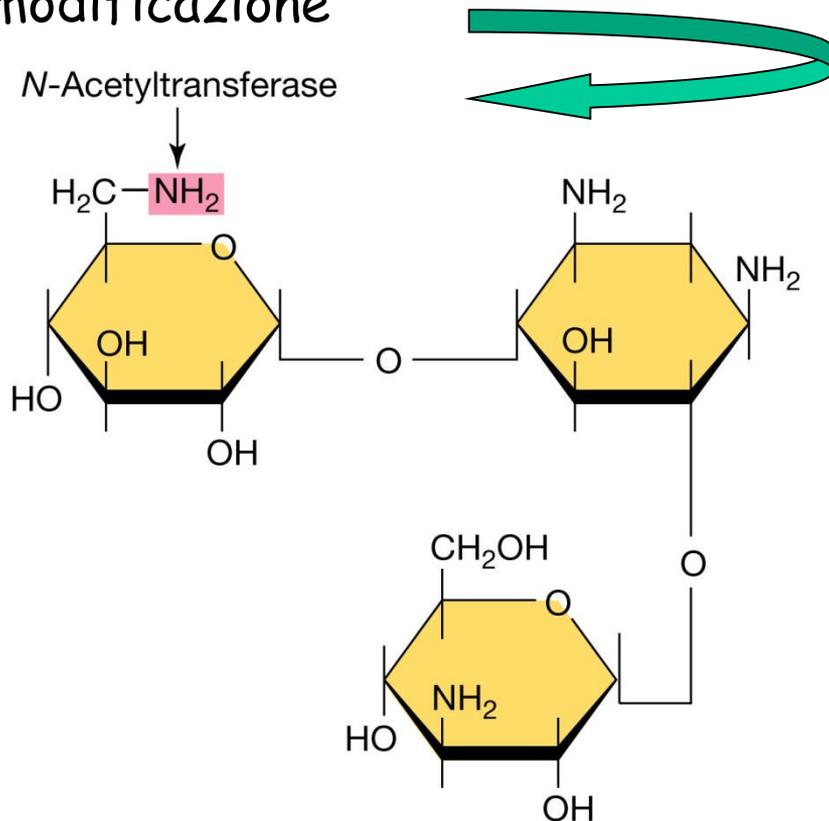
1. **Acetiltransferasi** che acetilano gli aminogruppi

2. **Nucleotidtransferasi** che trasferiscono un residuo nucleotidico sull'antibiotico

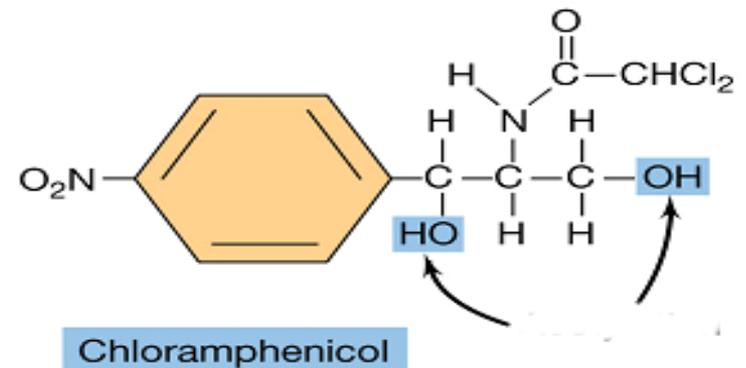
3. **Fosfotransferasi** che fosforilano uno o più residui idrossilici sull'antibiotico

1. Modificazione dell'antibiotico che diviene inattivo

Struttura della **kanamicina**, un antibiotico aminoglicosidico
Numerosi plasmidi contengono geni in grado di inattivare la kanamicina mediante **modificazione**

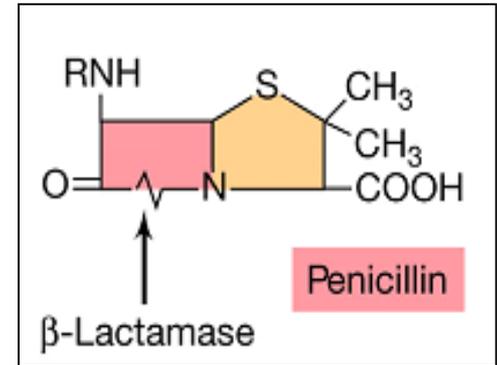


Anche il cloramfenicolo viene inattivato per acetilazione. Il gene *cat* presente in numerosi plasmidi e trasposoni codifica per un enzima definito **cloramfenicolo acetiltransferasi** in grado di legare 1 o 2 gruppi acetile derivati dal acetil-S-coenzima A ai gruppi idrossilici del cloramfenicolo. Il cloramfenicolo acetilato non si lega più al ribosoma

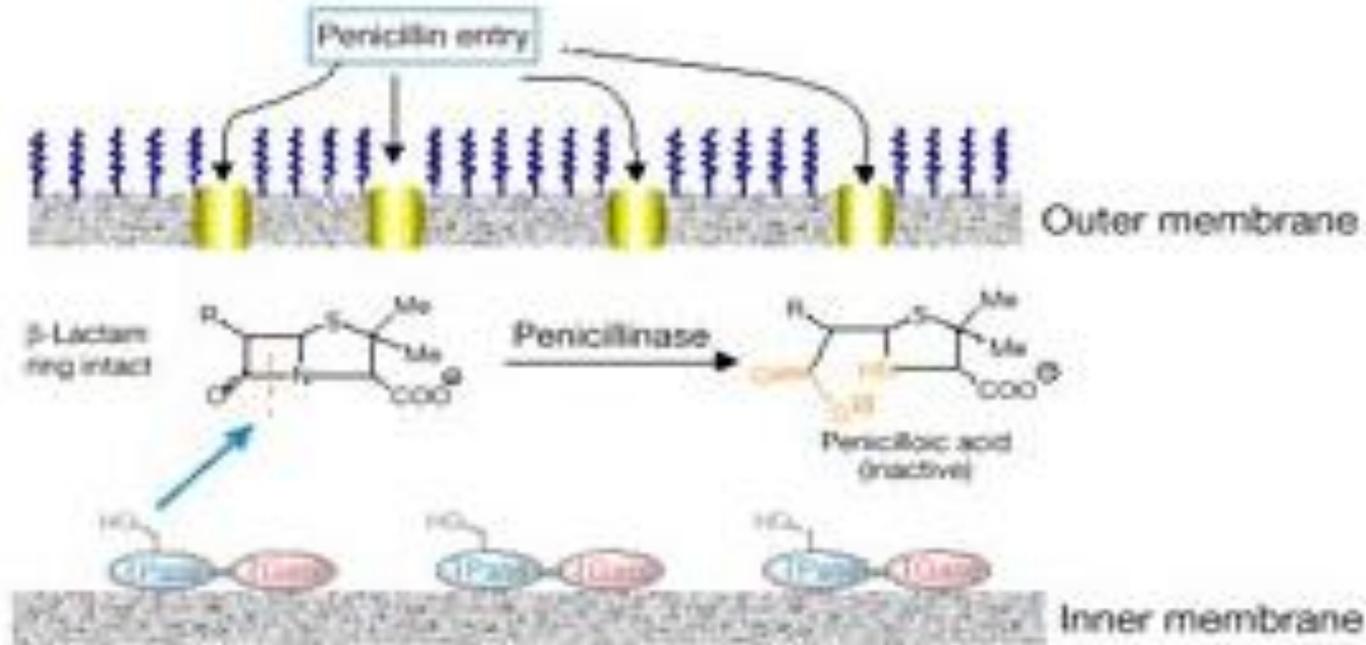


1. Modificazione dell'antibiotico che diviene inattivo

Le B-lattamasi o penicillinasi sono enzimi localizzati nello spazio periplasmatico in grado di tagliare l'anello β lattamico della penicillina rendendola inattiva. I geni che codificano per questi enzimi sono localizzati su elementi mobili (spesso definita ampicillina-resistenza Ap^r)



b



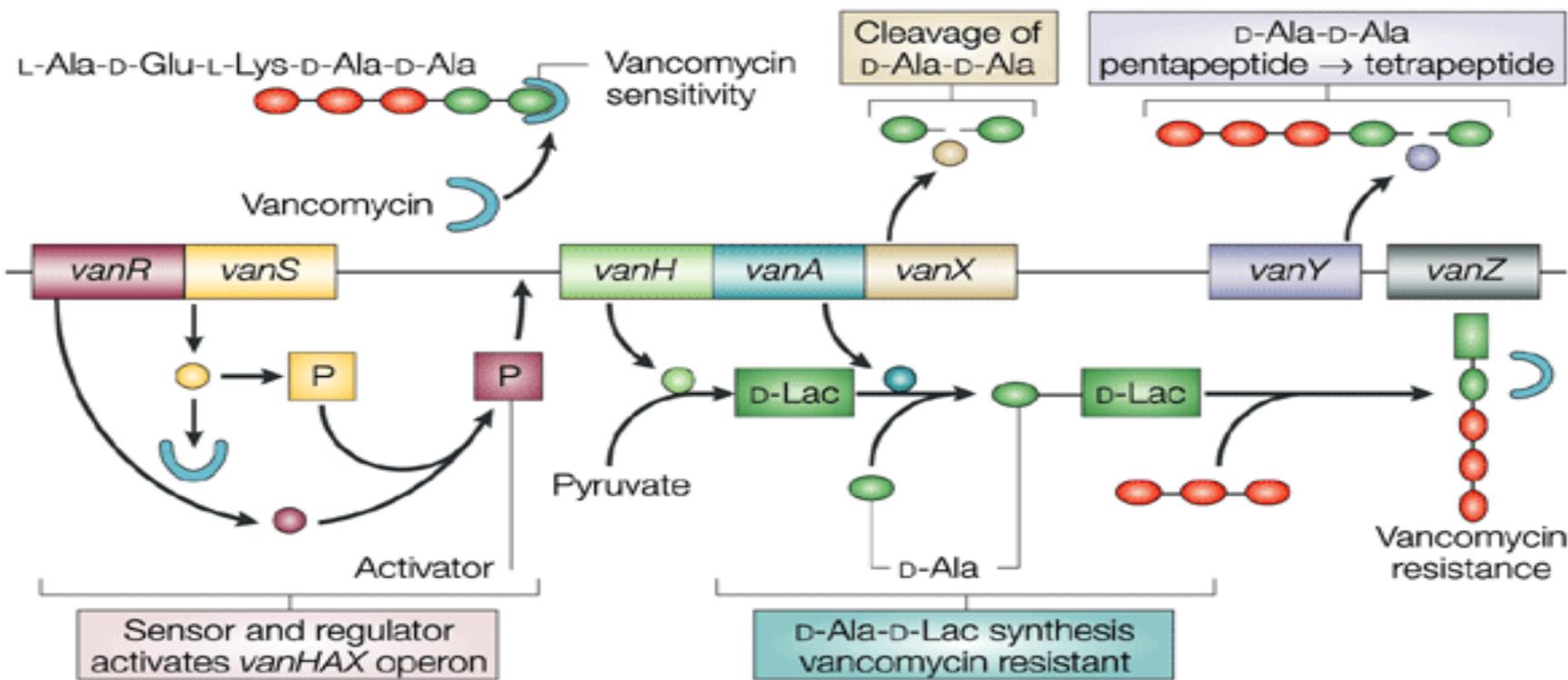
2. Modificazione del bersaglio che diviene insensibile

Resistenza alla vancomicina

dovuta alla presenza di un sistema contenente i geni che codificano varie tappe del processo di modificazione del bersaglio della vancomicina costituito dai due residui di D-Ala presenti nel residuo peptidico del peptidoglicano

Viene alterata la struttura del pentapeptide legato al NAM

D-Ala-D-Ala in **D-Ala D-X** dove **X** può essere lattato, serina o altri AA



Un sistema a 2 componenti **VanS- VanR** attiva l'operone *vanHAX* in presenza di vancomicina. VanS è il sensore che si fosforila e poi fosforila il regolatore VanR. VanH è una deidrogenasi che riduce il piruvato a D-lattato. VanA è la ligasi che catalizza la formazione del legame estere tra D-Ala e D-Lac. La vancomicina non si lega a D-Ala-D-Lac e pertanto la cellula diviene resistente. VanX è una dipeptidasi che idrolizza il dipeptide D-Ala-D-Ala in modo che non sia sensibile alla vancomicina. Infine VanY è una D,D-carboxypeptidasi che idrolizza il residuo terminale di D-alanina dal precursore pentapetidico se l'eliminazione del D-Ala-D-Ala da parte di VanX non è completa. In questo modo D-Ala-D-Lac sostituisce il dipeptide D-Ala-D-Ala.

2. Protezione ribosomiale

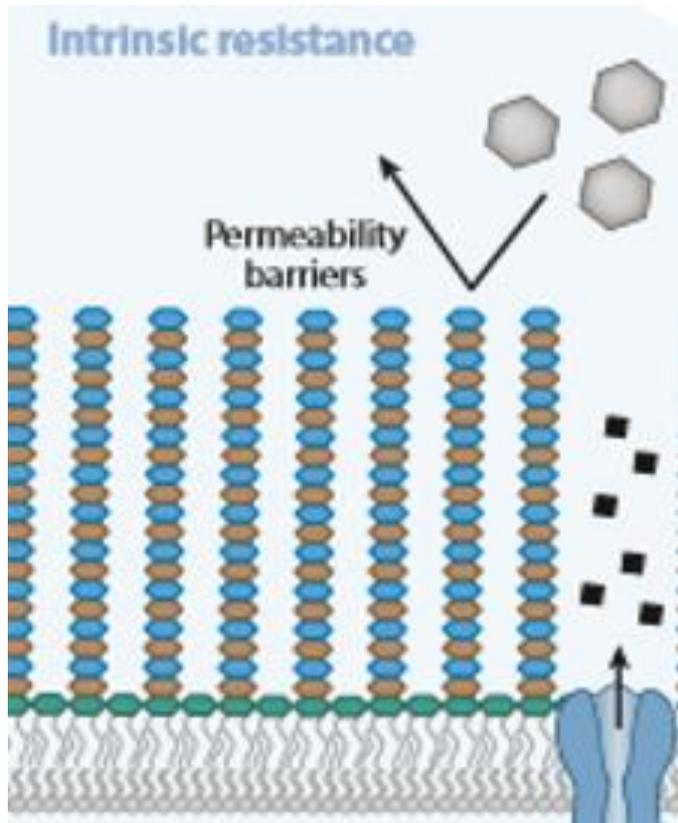
La protezione ribosomiale è dovuta alla presenza di geni che codificano per proteine che interagendo con i ribosomi ne riducono l'affinità per la tetraciclina

TetM è una proteina citoplasmatica con attività GTPasica. Il gene *tetM* localizzata su un elemento trasponibile Tn916 molto diffuso

TetM è simile strutturalmente ai fattori di allungamento EF-Tu ed EF-G e compete con EF-G per lo stesso sito di legame ai ribosomi.

E' in grado di mediare il rilascio della tetraciclina dal ribosoma con un meccanismo GTP-dipendente.

3. Blocco dell'entrata dell'antibiotico nella cellula



Alcuni batteri sono intrinsecamente resistenti a molti antibiotici in quanto le loro strutture di superficie (LPS, capsula) costituiscono una barriera impermeabile al passaggio di molecole

4. Eliminazione dell'antibiotico intracellulare tramite pompe ad efflusso

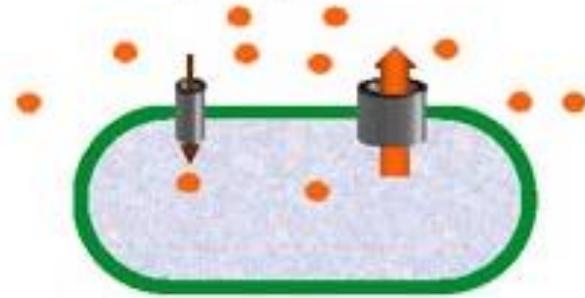
a

Antibiotic

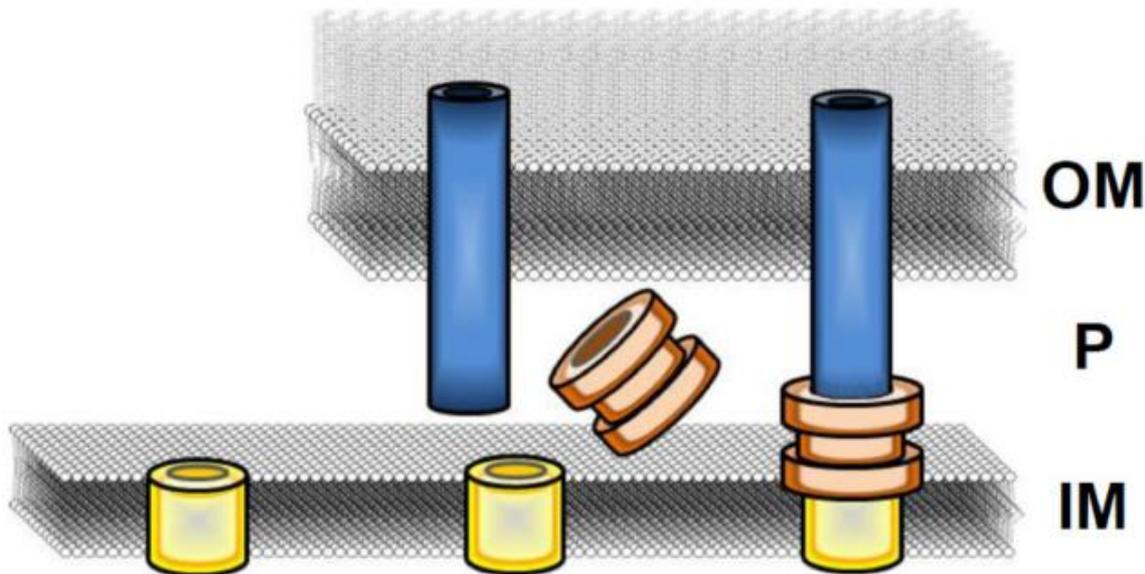
- Erythromycins
- Tetracyclines

Resistance mechanism

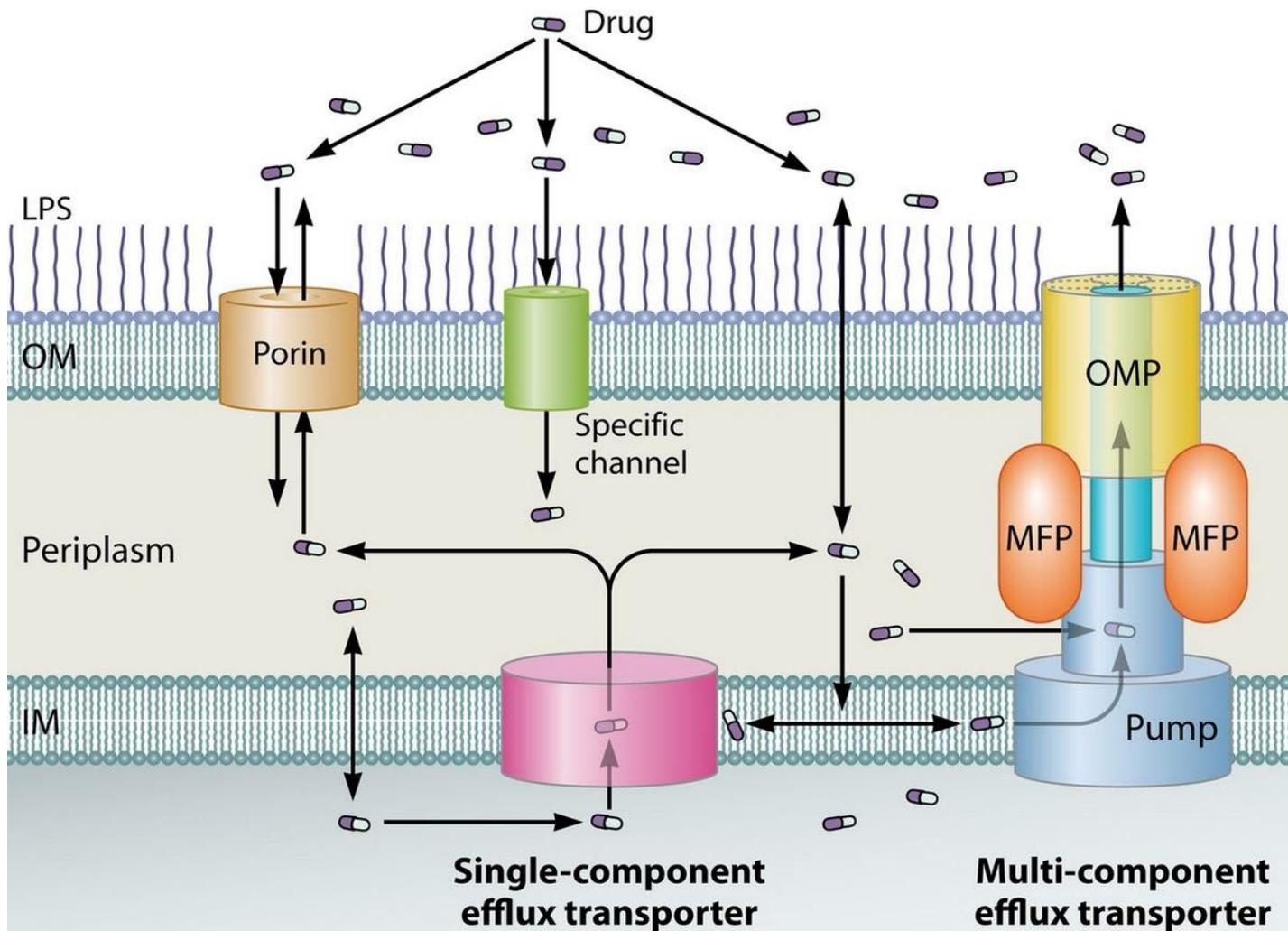
Bacteria manufacture protein pumps that pump the antibiotic out so that it does not accumulate to a high enough internal concentration to block protein synthesis



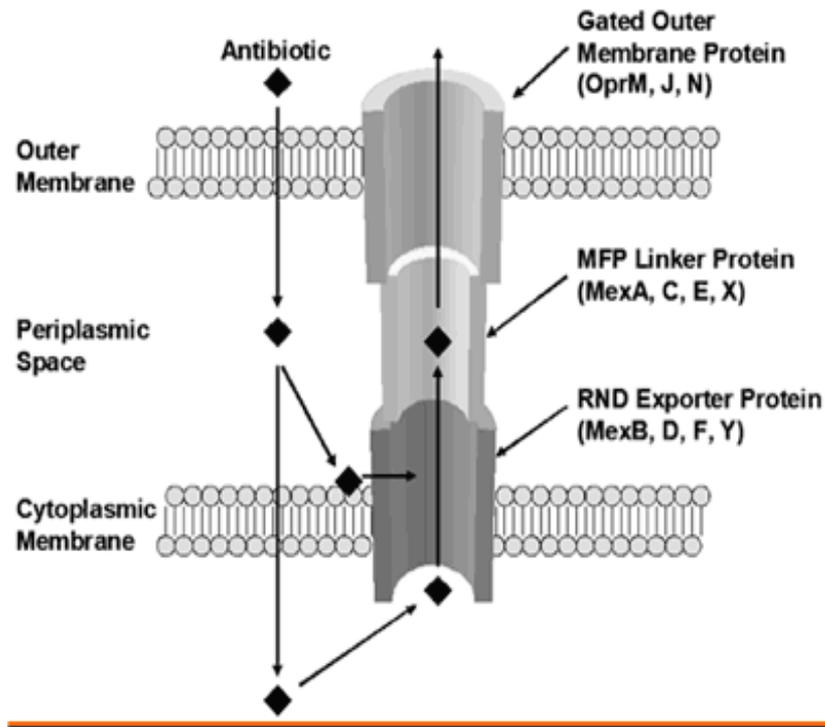
d



Pompe ad efflusso possono essere a singolo componente o multipartite



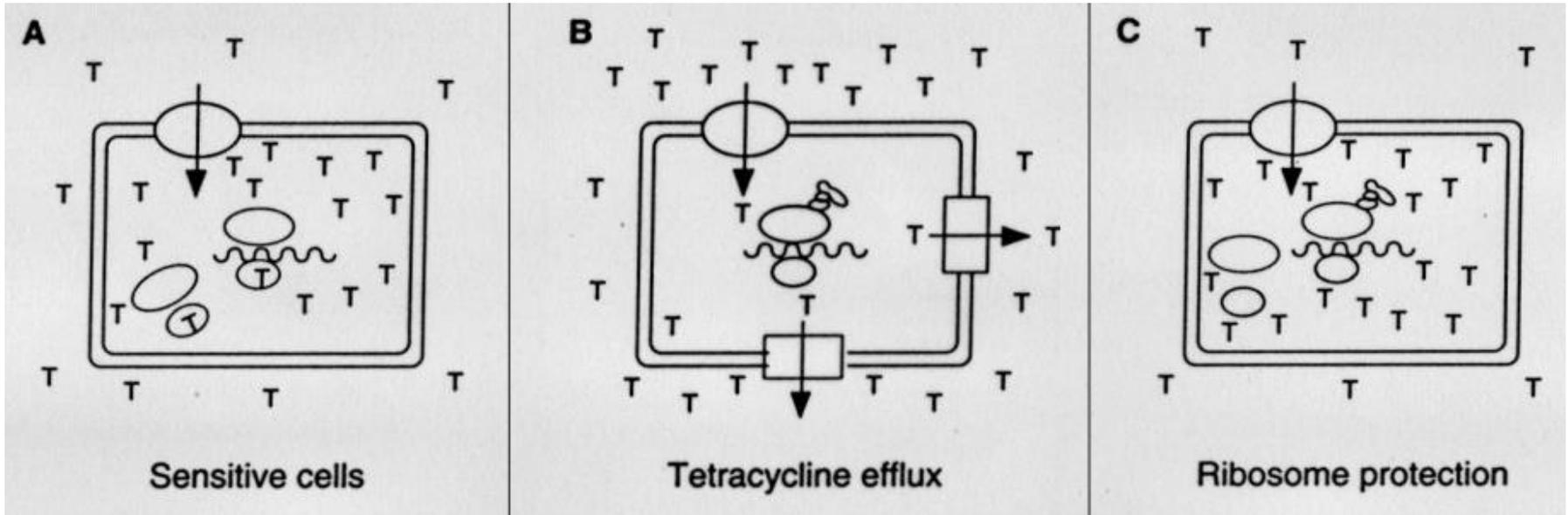
Le pompe ad efflusso sono energia-dipendenti (mediati da forza protonmotrice) e possono essere organizzate in 3 componenti: una proteina di esportazione RND localizzata nella I.M., una proteina di fuoriuscita localizzata nella O.M. e una proteina di membrana di fusione (MFP) che lega la proteina RND con la proteina di fuoriuscita

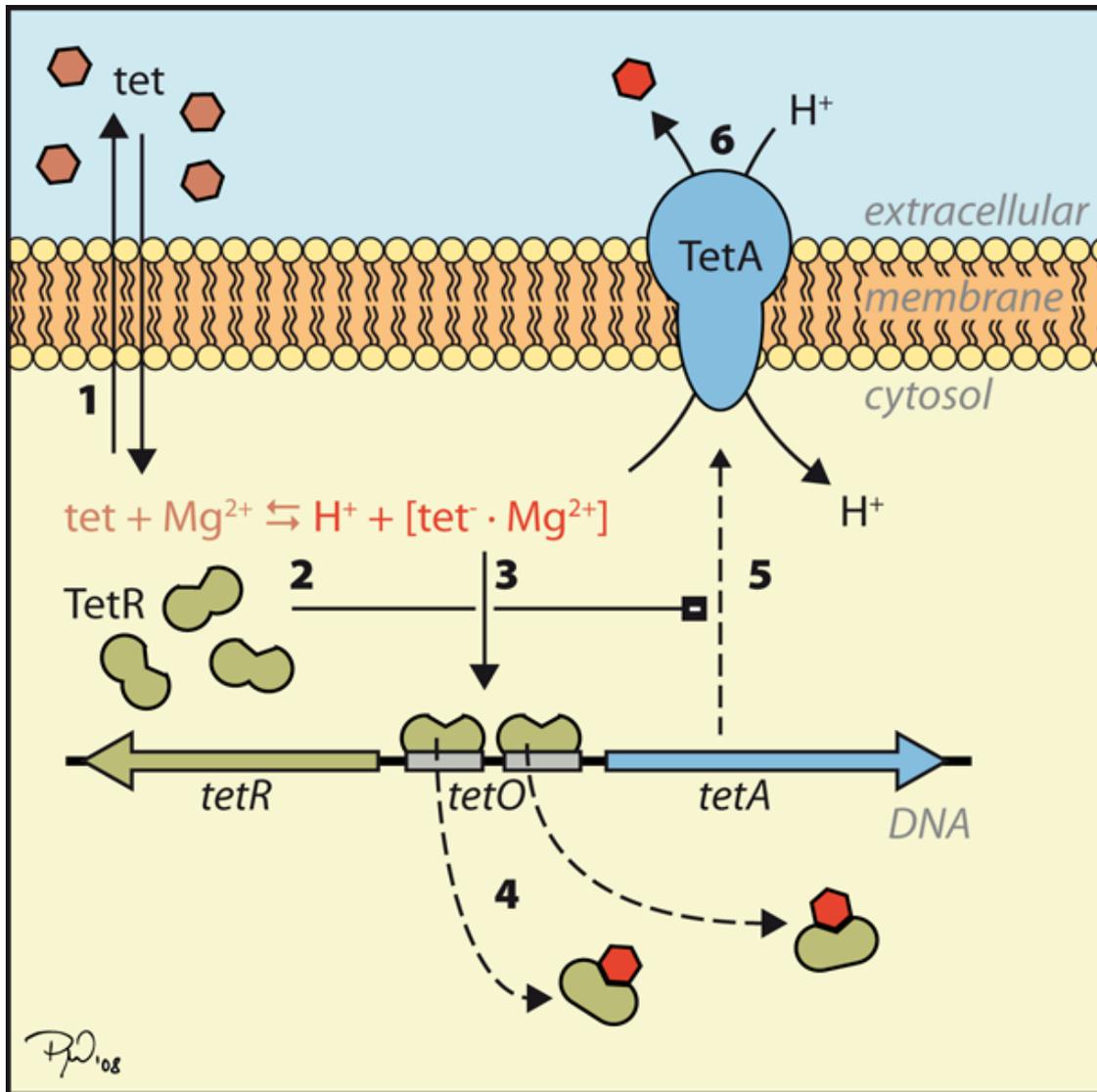


Le pompe ad efflusso possono generare multi resistenza in quanto sono in grado di espellere numerosi antibiotici

La resistenza alla tetraciclina

1. Pompa ad efflusso in grado di far fuoriuscire l'antibiotico





Bacterial Tetracycline Resistance

- 1 Tetracyclines (tet) are hydrophobe molecules and enter cells by passive diffusion.
- 2 In absence of tet, the repressor TetR prevents transcription of the *tetA* gene but also its own synthesis through binding to the operator sequence *tetO*.
- 3 In the cytosole, tet forms complexes with bivalent metal ions such as magnesium.
- 4 Such a complex binds to TetR, which thereby changes its own conformation and dissociates from the operator sequence.
- 5 Subsequently, the antiporter TetA but also TetR is synthesized.
- 6 TetA exports $[\text{tet}\cdot\text{Mg}^{2+}]+\text{H}^+$ complexes out of the cytosol and imports protons at the same time. After tet is removed, remaining TetR proteins bind to the *tetO* sequence again and deactivate expression of *tetR* and *tetA*. ■

Not drawn to scale! Cell wall, mRNA, and proteins that are involved in transcription and translation have been omitted for simplicity. Only a part of the DNA is shown.

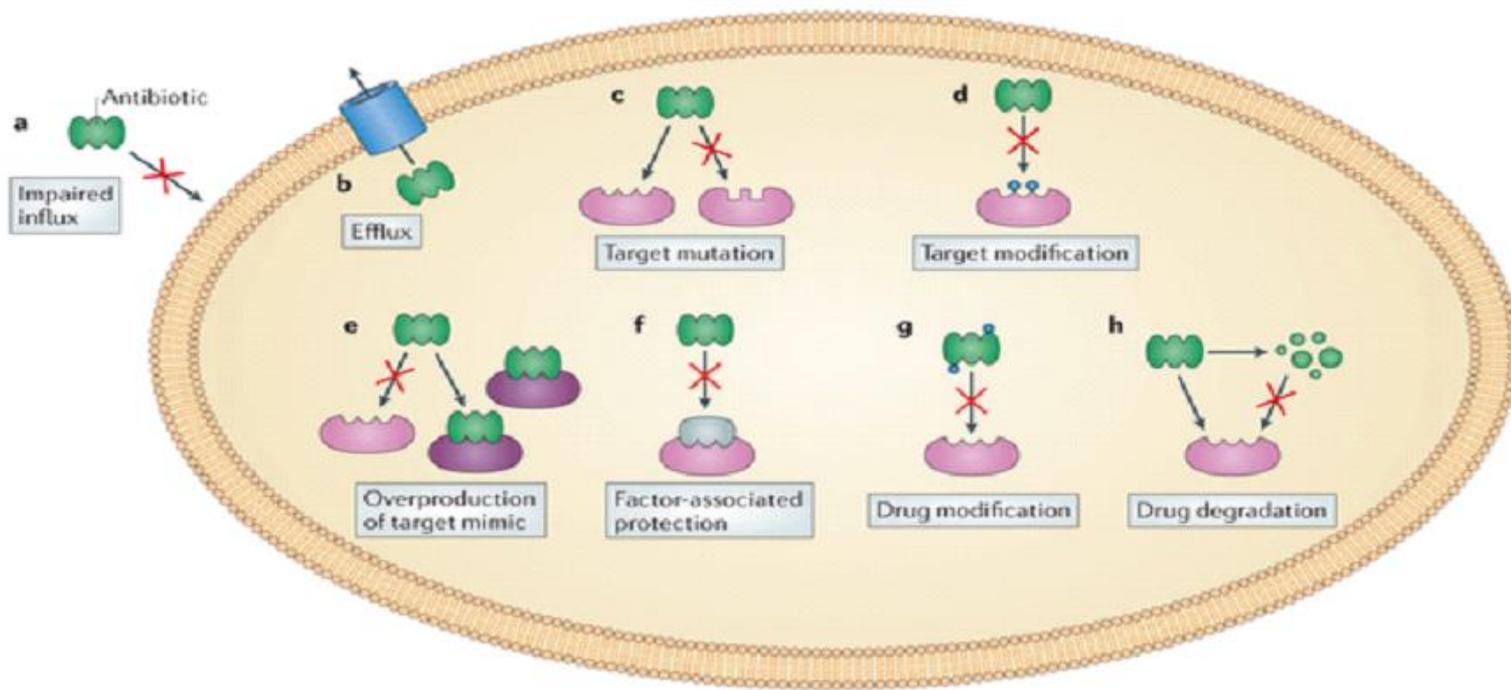
5. Reazione di pathways alternativi a quelli bloccati dall'antibiotico

Elevata insorgenza di resistenza ai sulfonamidici

Resistenza può dipendere da :

1. l'espressione di geni mutati che mantengono l'affinità per il substrato naturale PABA (acido para-amino benzoico) ma non legano i sulfamidici
2. Un aumento della quantità intracellulare di PABA
3. un aumento dell'enzima diidropteroato sintetasi (DHPS) che catalizza la sintesi del diidropteroato, un intermedio della sintesi di acido folico
4. Alterazioni nel metabolismo tali da permettere di adsorbire l'acido folico preformato dall'esterno

Meccanismi di resistenza agli antibiotici che hanno come bersaglio i ribosomi



I meccanismi sono vari: a) incapacità dell'antibiotico di penetrare nella cellula; b) efflusso attivo dell'antibiotico dalla cellula; c) mutazioni o d) modificazioni del bersaglio (RNA ribosomiale o proteine del ribosoma) che diminuiscono l'affinità dell'antibiotico per il bersaglio; e) iperproduzione di una molecola che mima il bersaglio in modo tale da diminuire l'effettiva concentrazione dell'antibiotico e lasciare libero il bersaglio; f) sintesi di una proteina in grado di rimuovere l'antibiotico dal bersaglio; g e h) modificazione o degradazione dell'antibiotico