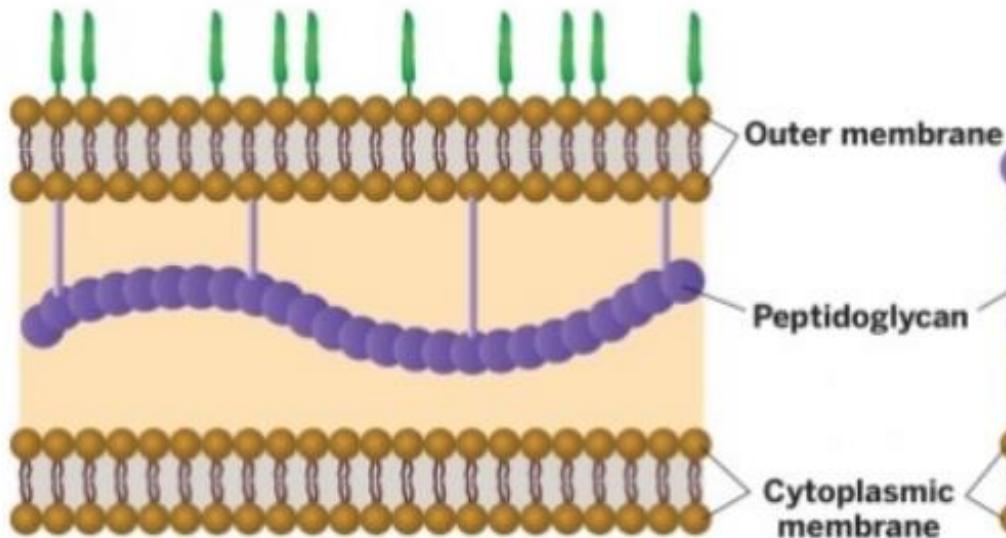
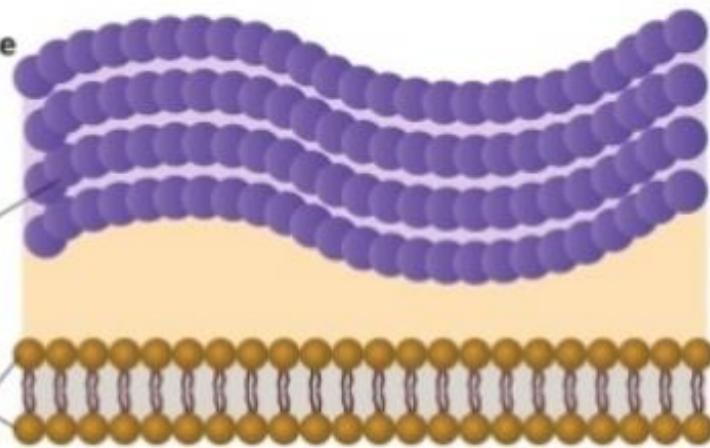


La parete nei Batteri

GRAM-NEGATIVE



GRAM-POSITIVE



Peptidoglicano (o mureina)

Componente fondamentale della parete cellulare
un enorme polimero composto da subunità identiche.

- due derivati polisaccaridici

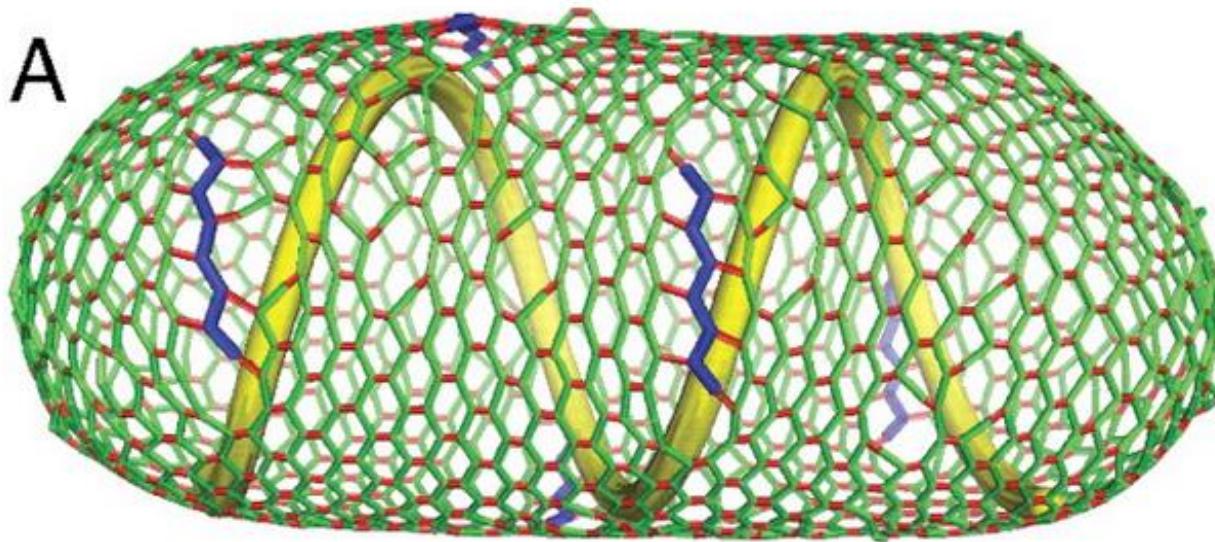
N-acetilglucosammina e l'acido N-acetilmuramico

ed alcuni aminoacidi tra i quali

- acido D-glutammico
- D-alanina
- acido meso -diamminopimelico

che non si trovano mai nelle proteine.

I D-aminoacidi hanno un azione protettiva contro l'attacco della maggior parte delle peptidasì

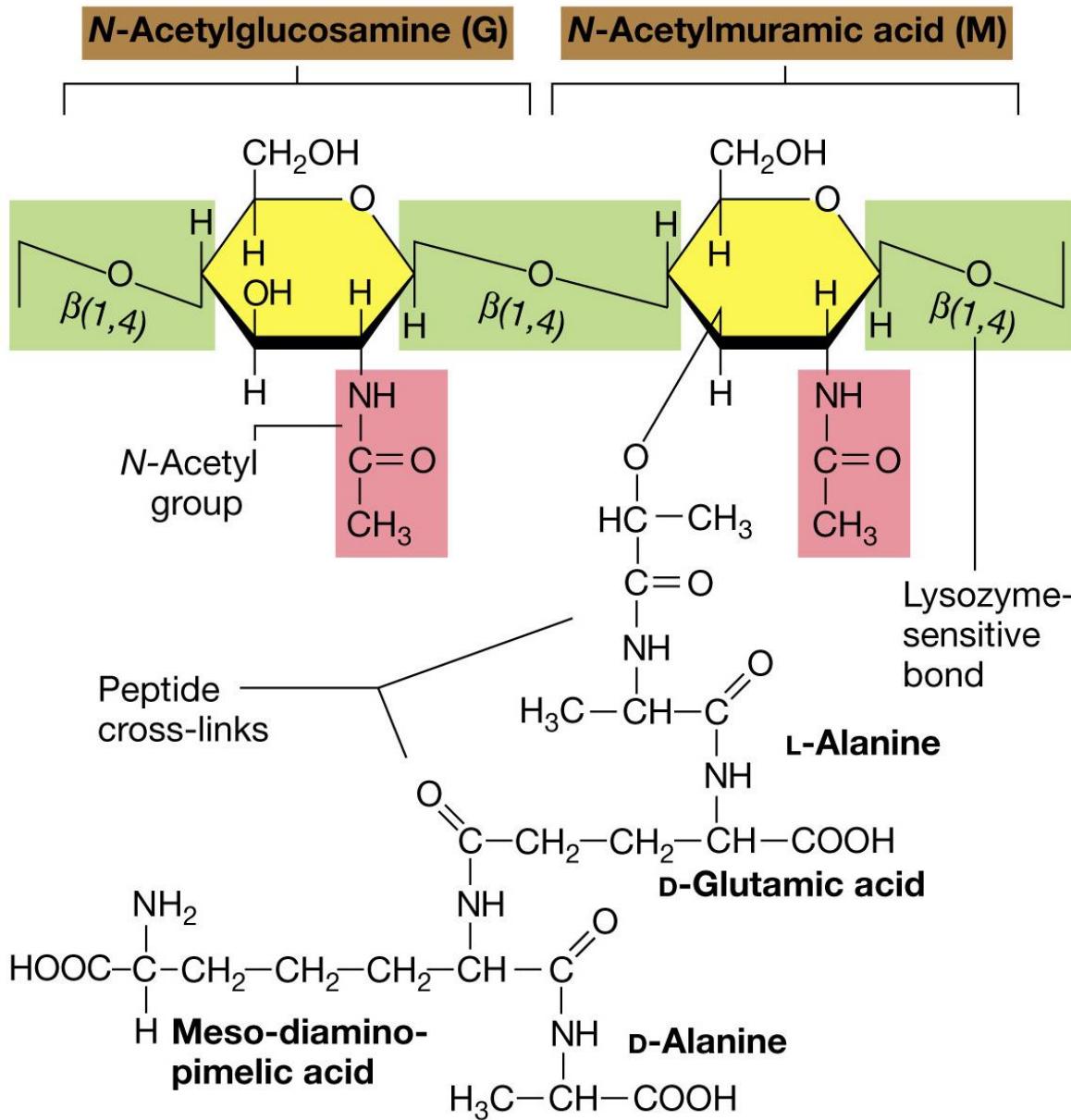


Il peptidoglicano può essere considerato come una struttura a rete che avvolge la cellula batterica

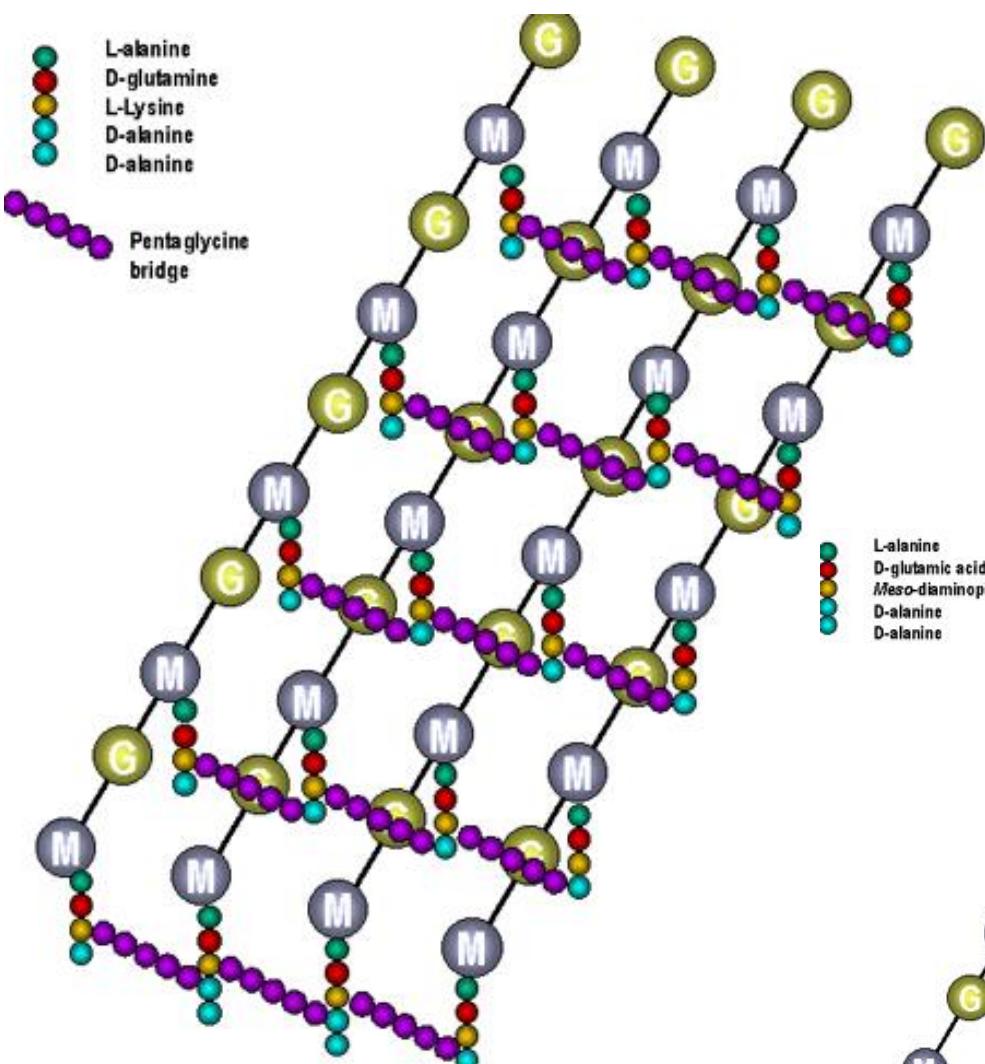
In blu messo in evidenza un pezzetto della catena di NAG e NAM

In rosso la componente petidica

I componenti fondamentali del peptidoglicano



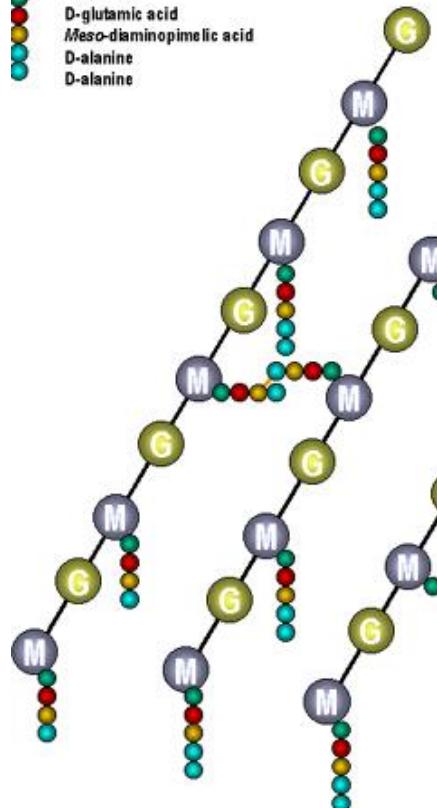
L-alanine
D-glutamine
L-Lysine
D-alanine
D-alanine



Peptidoglicano di
Staphylococcus aureus
Gram+ e

Escherichia coli
Gram-

L-alanine
D-glutamic acid
Meso-diaminopimelic acid
D-alanine
D-alanine



Lipoprotein
E.coli peptidoglycan

Classificazione più recente suddivide i Batteri in

MONODERMI

DIDERMI

Tenendo conto della presenza o meno di una membrana esterna al peptidoglicano che non sempre ha la struttura e composizione chimica del LPS (ovvero della membrana esterna dei Gram negativi)

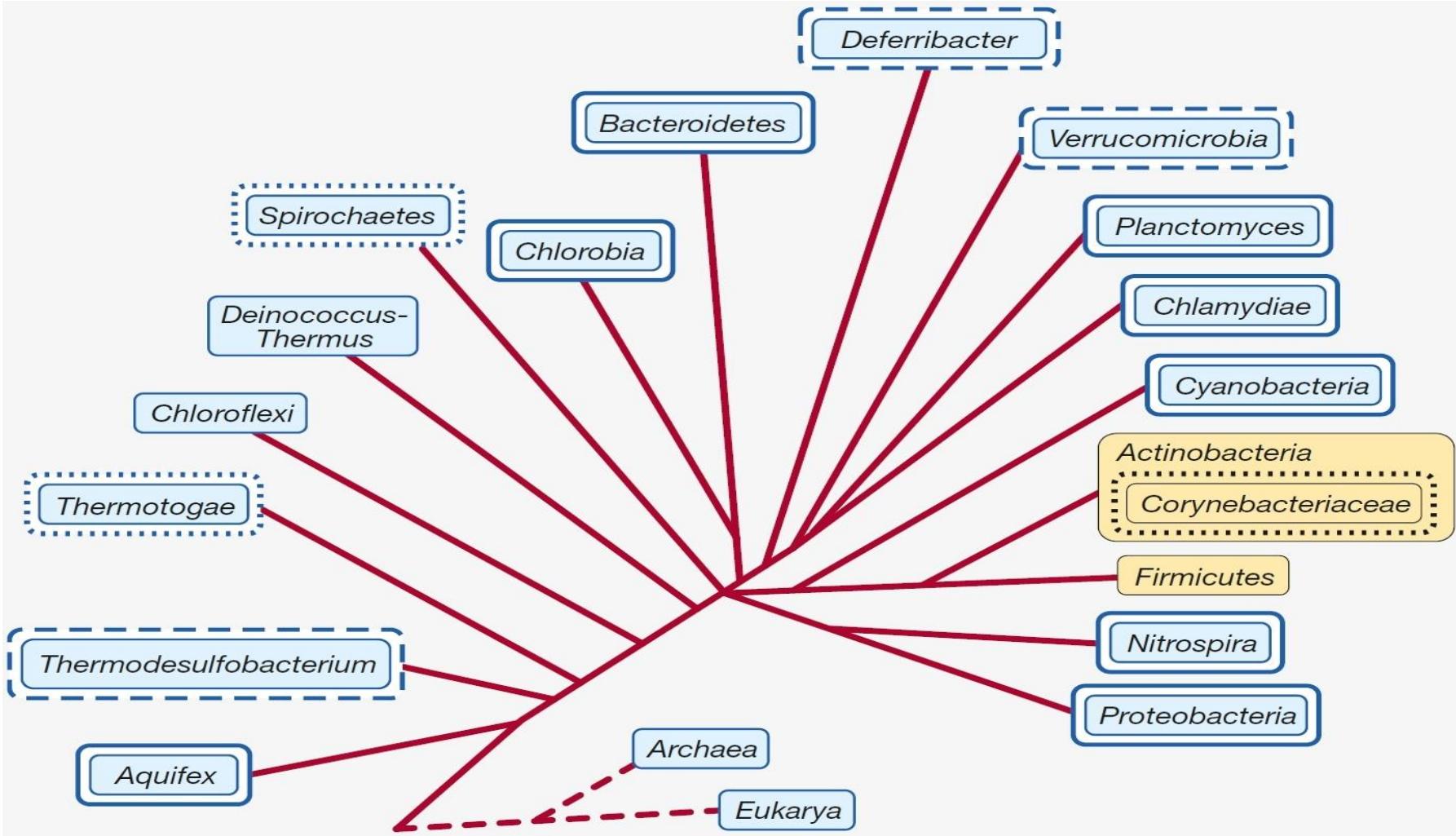
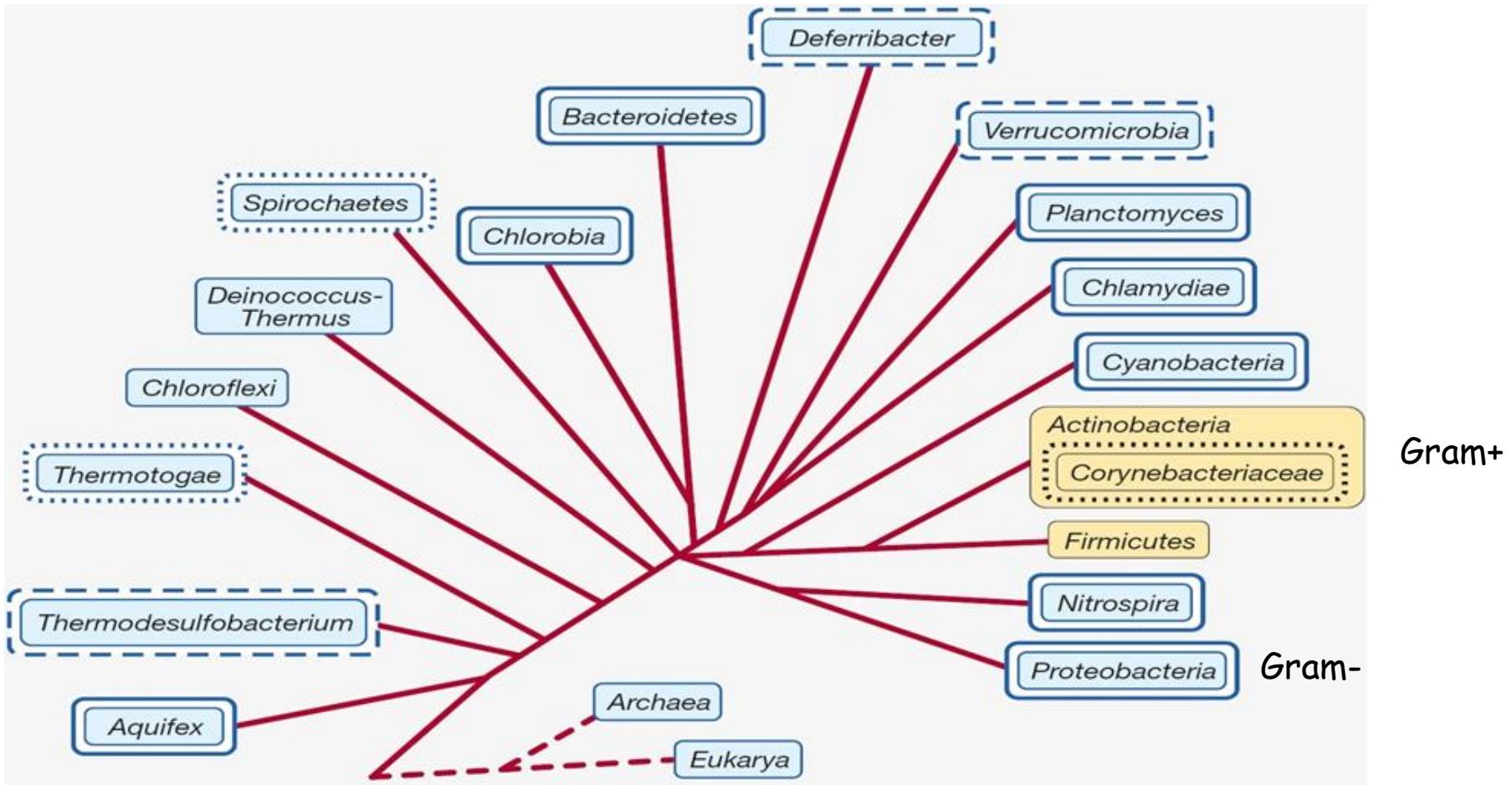


Figura S2.9-1 DISTRIBUZIONE DI MONODERMI E DIDERMI NELL'ALBERO FILOGENETICO DEI BACTERIA. Il dendrogramma illustra i principali phyla batterici. I gruppi dei batteri Gram positivi sono indicati da un *riquadro giallo*. I monodermi sono rappresentati circondati da una *linea continua*. I didermi sono rappresentati circondati da una *doppia linea*: la *linea continua spessa* indica la presenza di LPS nella membrana esterna; la *linea tratteggiata spessa* indica che gli organismi possiedono l'informazione per sintetizzare LPS ma non ci sono evidenze sperimentali che dimostrino la presenza di LPS associato alla membrana esterna; la *linea punteggiata* indica che la membrana esterna ha una composizione lipidica differente.



Giallo Gram +

Monodermi linea blu continua

Didermi doppia riga blu

Se continua contiene LPS _____

Se tratteggiata potrebbe sintetizzare LPS (dal'analisi genoma) ma non lo fa -----

Se punteggiata altra composizione della membrana esterna (no LPS)

Nei Firmicutes Gram+ trovati batteri didermi con tipo LPS!!!

Biosintesi del Peptidoglicano

-grande macromolecola

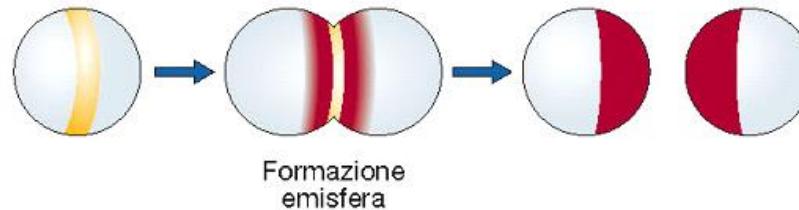
-I componenti sono sintetizzati nel citoplasma

-Non vi sintesi ex novo ma i componenti vengono aggiunti ad un peptidoglicano persistente

-le ultime reazioni avvengono nello spazio periplasmatico

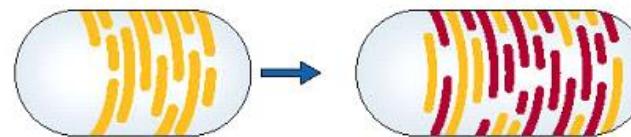
a) Cocchi

Divisione

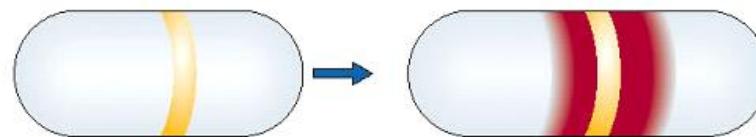


b) Bastoncelli (comune)

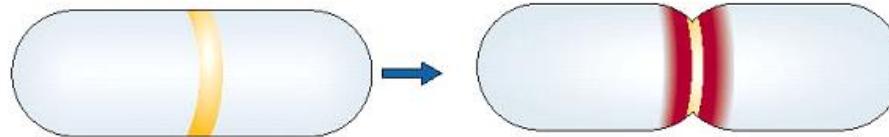
Allungamento
del cilindro



Allungamento
pre-divisione



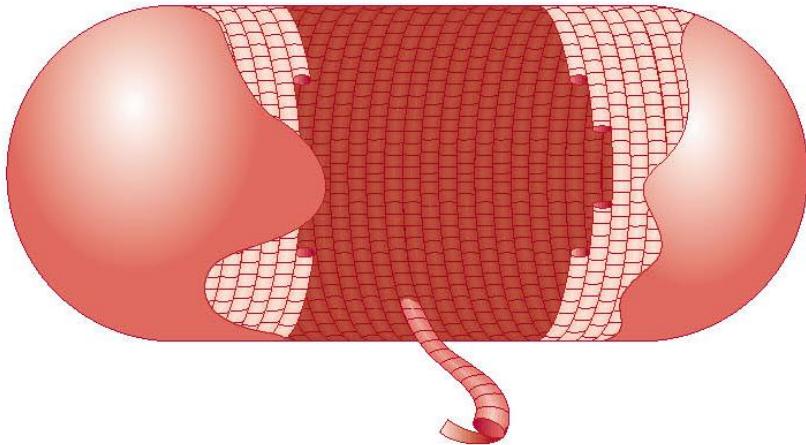
Divisione



Quando
avviene la
sintesi della
parete?

I batteri a forma cocciode sintetizzano la parete soltanto al momento della divisione. Ogni cellula figlia possiede un nuovo emisfero di peptidoglicano neosintetizzato durante la divisione .

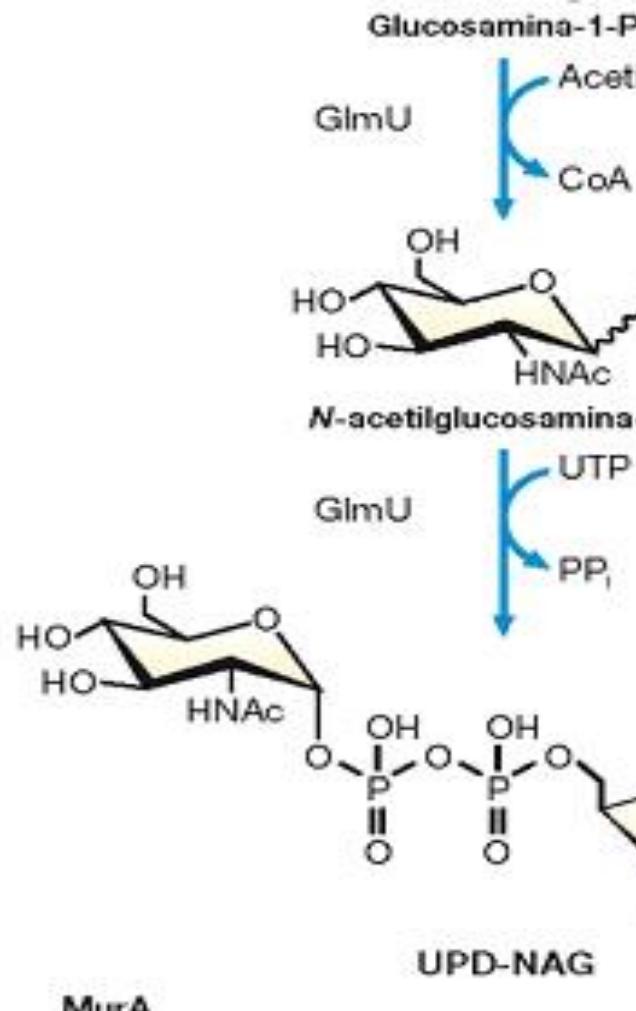
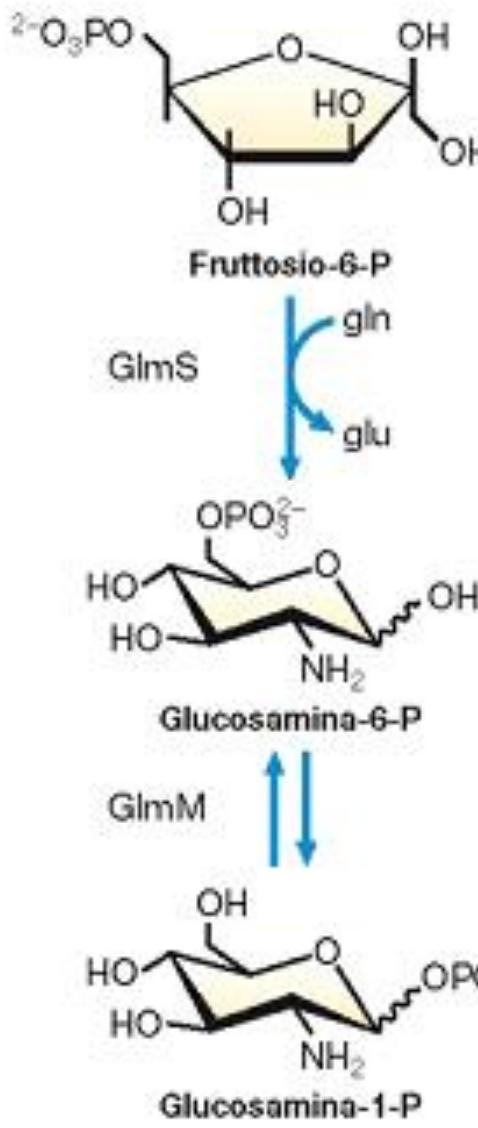
La maggior parte dei batteri bastoncellari può avere 2 fasi di allungamento. la prima è inserimento di monomeri di parete in modo sparso tra i due poli che rimangono inerti. La seconda al momento della divisione FtsZ dipendente intorno all'anello Ftz.



Come è organizzato il peptidoglicano intorno alla cellula:

Un modello recente propone che i filamenti di glicano siano associati in fibre

Avvolte ad elica formando dei cavi che avvolgono la cellula

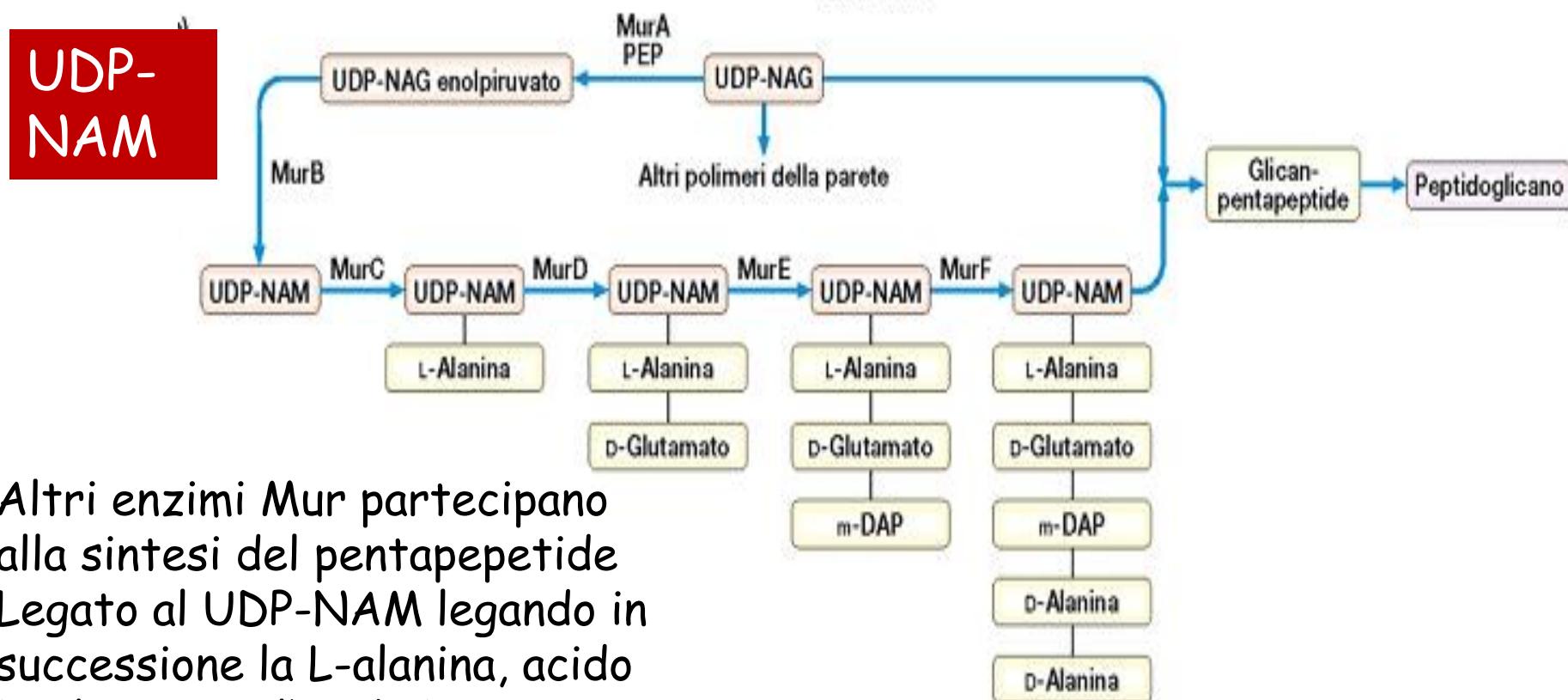


UDP-NAG

MurA
Nel citoplasma la sintesi di UDP- NAG avviene a partire dal fruttosio-6-P e UTP.
Gli enzimi GlnS- GlnM-GlmU catalizzano la sintesi di UDP-NAG a partire da fruttosio

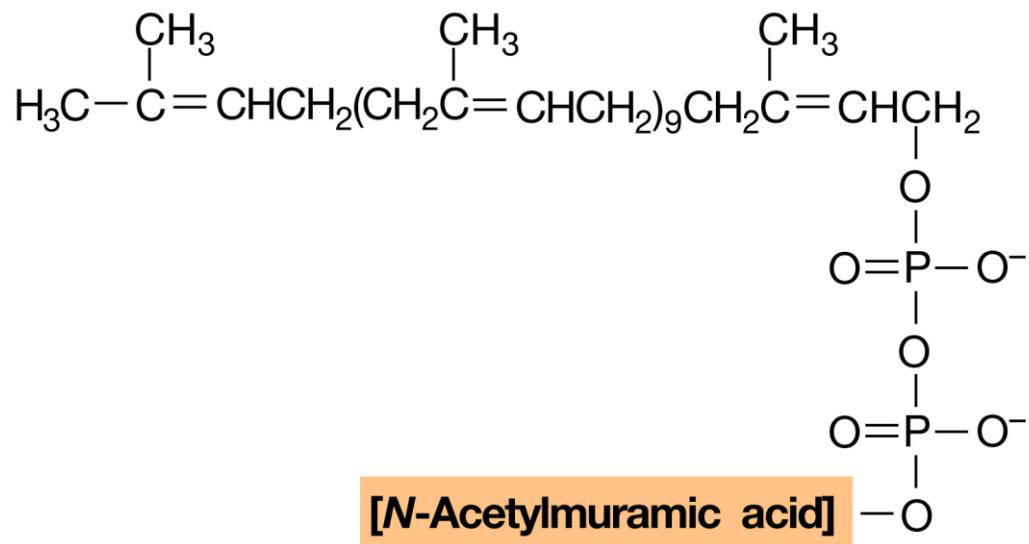
La sintesi dell' UDP-NAM è catalizzata dagli enzimi MurA e MurB a partire dall'UDP-NAG in presenza di fosfoenol piruvato(PEP). Il PEP viene trasferito al UDP-NAG da MurA e successivamente MurB lo trasforma in UDP-NAM.

La fosfomicina inibisce MurA.



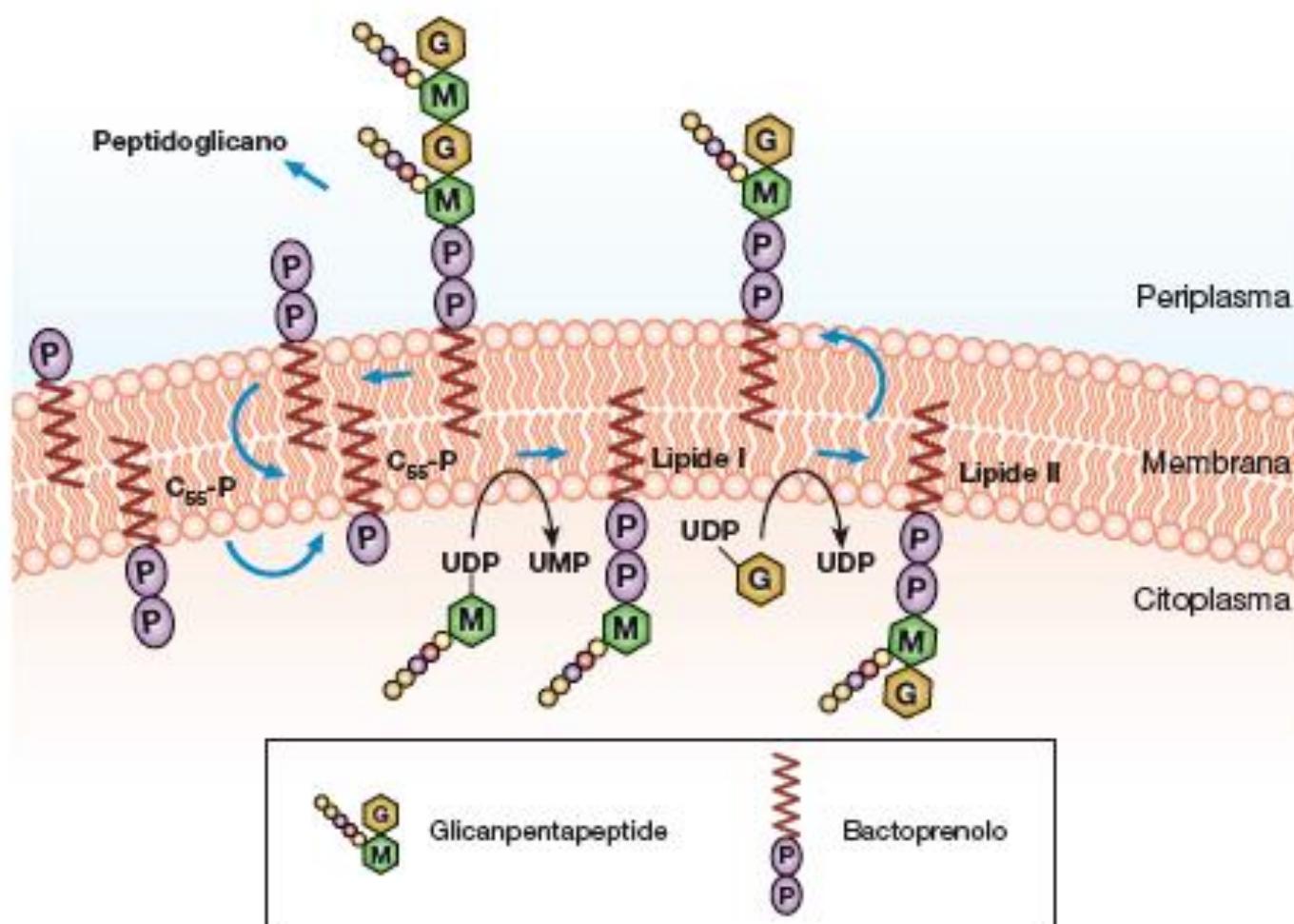
Altri enzimi Mur partecipano alla sintesi del pentapeptide Legato al UDP-NAM legando in successione la L-alanina, acido D-glutamico, l'acido D-aminopimelico o lisina mentre le ultime 2 D-alanine vengono aggiunte insieme

Il trasporto dei precursori del peptidoglicano attraverso la membrana citoplasmatica viene facilitato dal bactoprenolo (undacaproenoilfosfato)

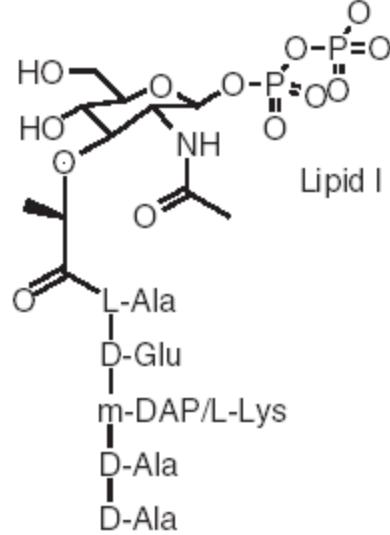
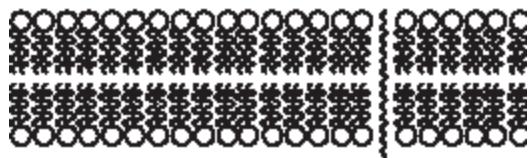


Bactoprenolo è un alcol a 55 atomi di C fortemente idrofobico che lega il precursore del peptidoglicano costituito da NAM-NAG e pentapeptide.

Fasi della biosintesi del peptidoglicano

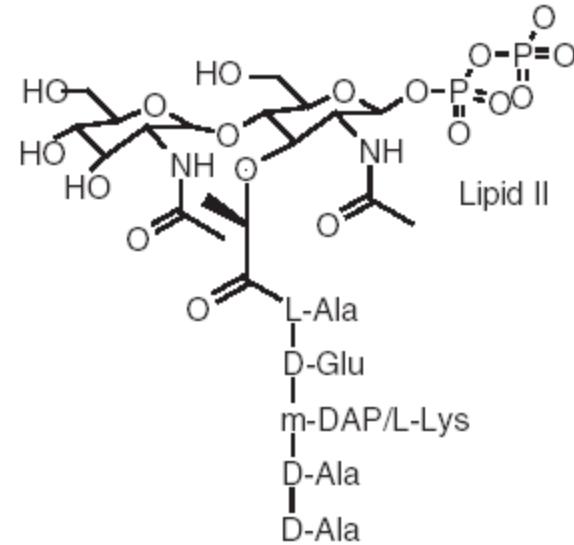
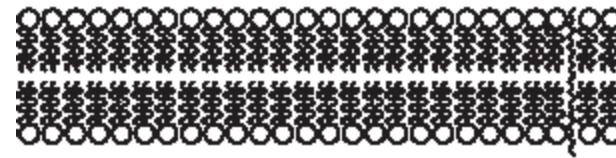


- Il bactoprenolo raggiunto il periplasma interagisce con gli enzimi che intervengono nell'inserzione dei precursori nel punto di crescita e nella catalisi dei legami glicosidici



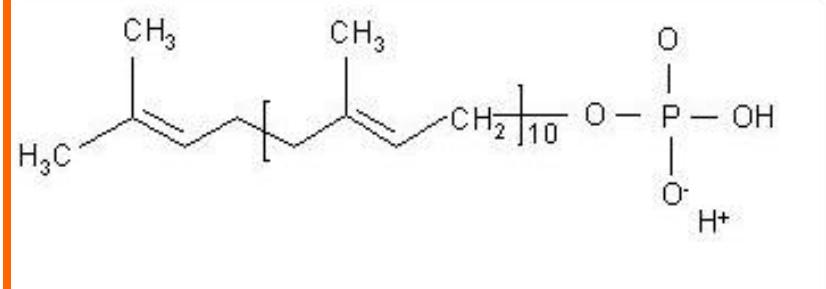
MurG

-UMP
+UDP-NAG



LIPIDE I

Bactoprenolo



Viene definito Lipide I il complesso UDP+ NAM+pentapeptide che diventa Lipide II in seguito all'aggiunta del NAG

Lipide I

Il NAM-peptide si lega al bactoprenolo formando il cosiddetto Lipide I. Il lipide I viene legato da una molecola di NAG formando così il Lipide II (che è il monomero del peptidoglicano).

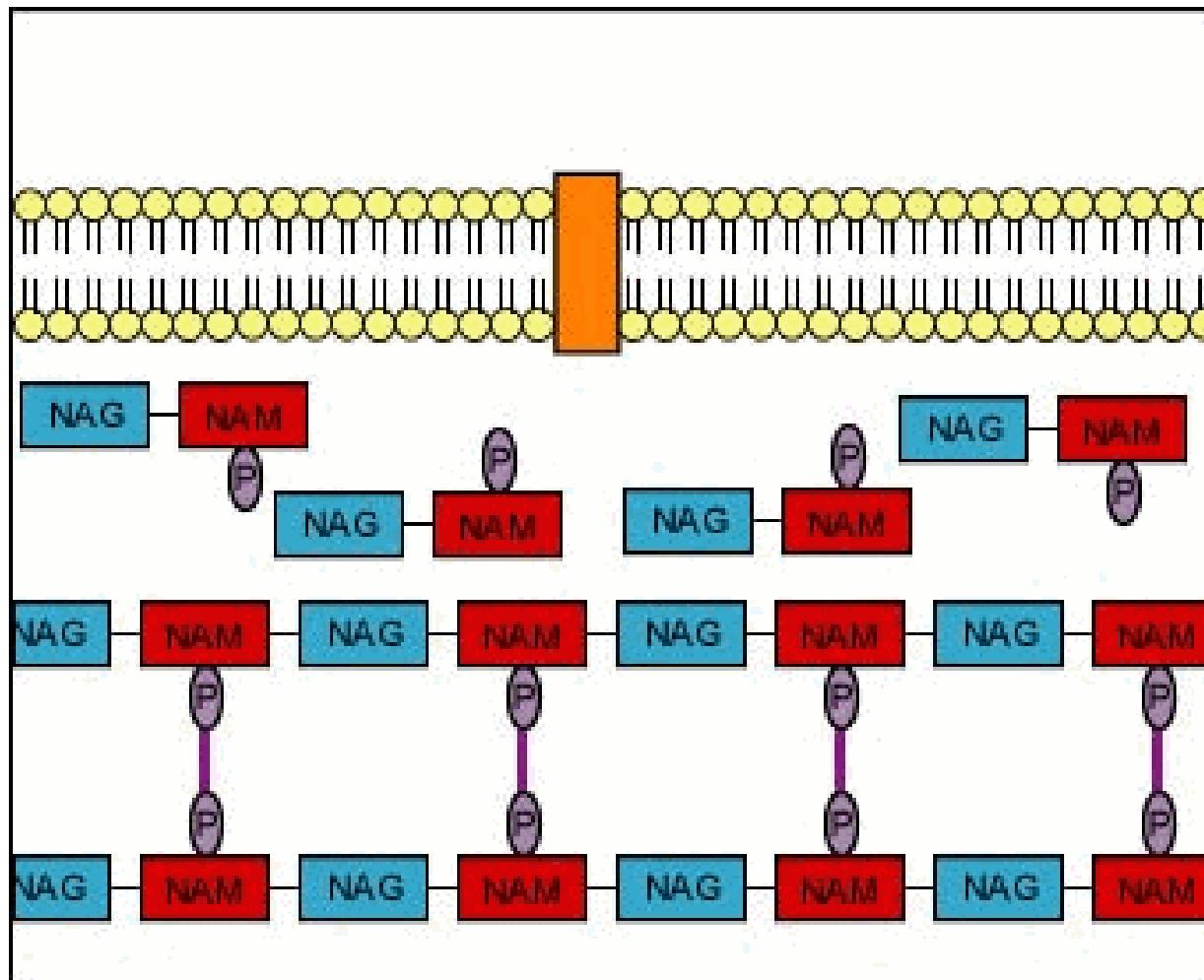
Lipide II

Una volta attraversata la membrana citoplasmatica avviene la polimerizzazione dei monomeri (lipide II) ad opera delle transglicosilasi che catalizzano la formazione dei legami glicosidici tra il nuovo monomero e il glicano nascente.

Il bactoprenolo una volta donato il monomero di glicano viene defosforilato e ribaltato sulla faccia interna della membrana citoplasmatica per dare avvio ad un nuovo ciclo.

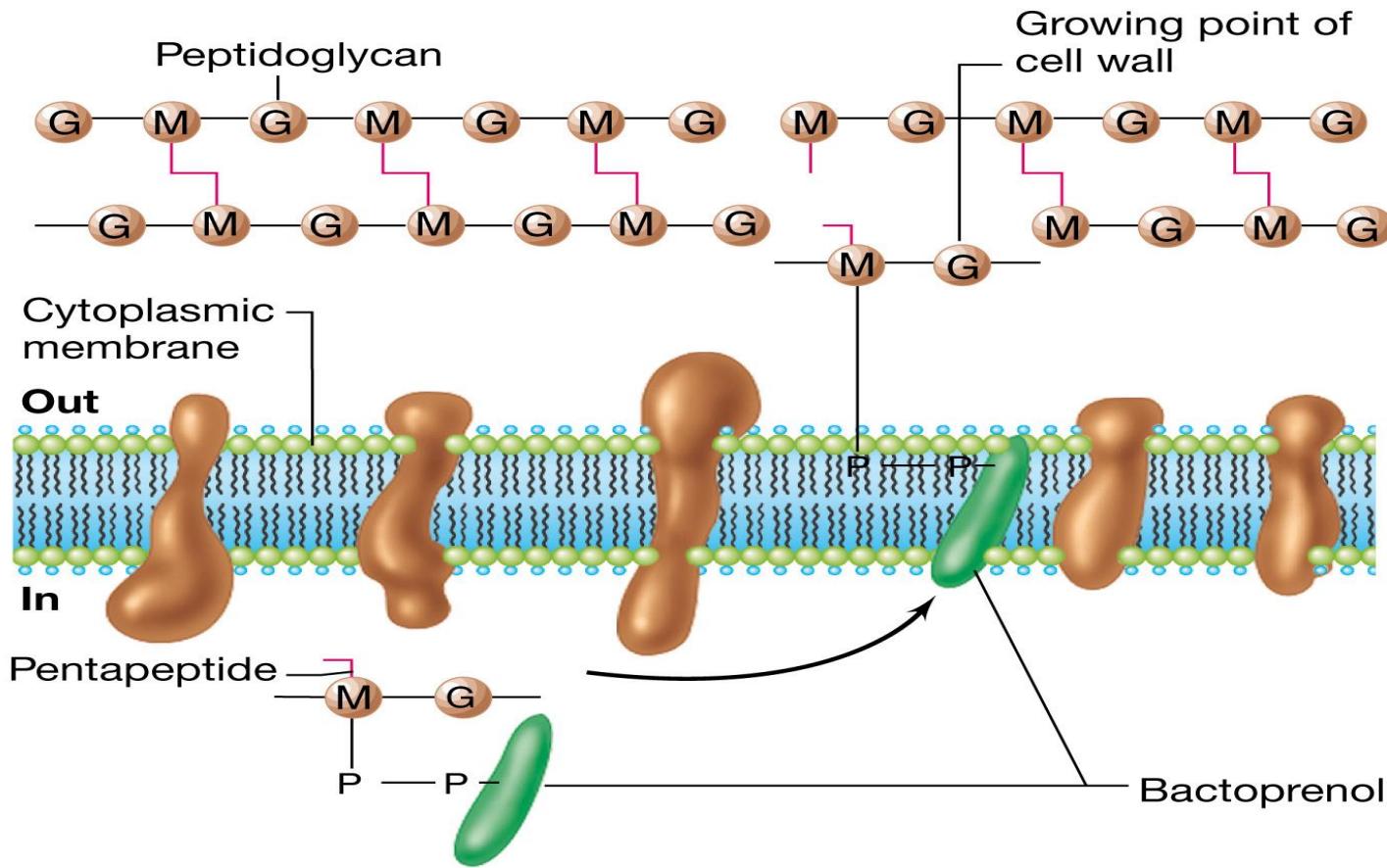
La bacitracina inibisce questa tappa impedendo la defosforilazione del bactoprenolo priorfosfato.

Processo di incorporazione delle nuove unità nel peptidoglicano



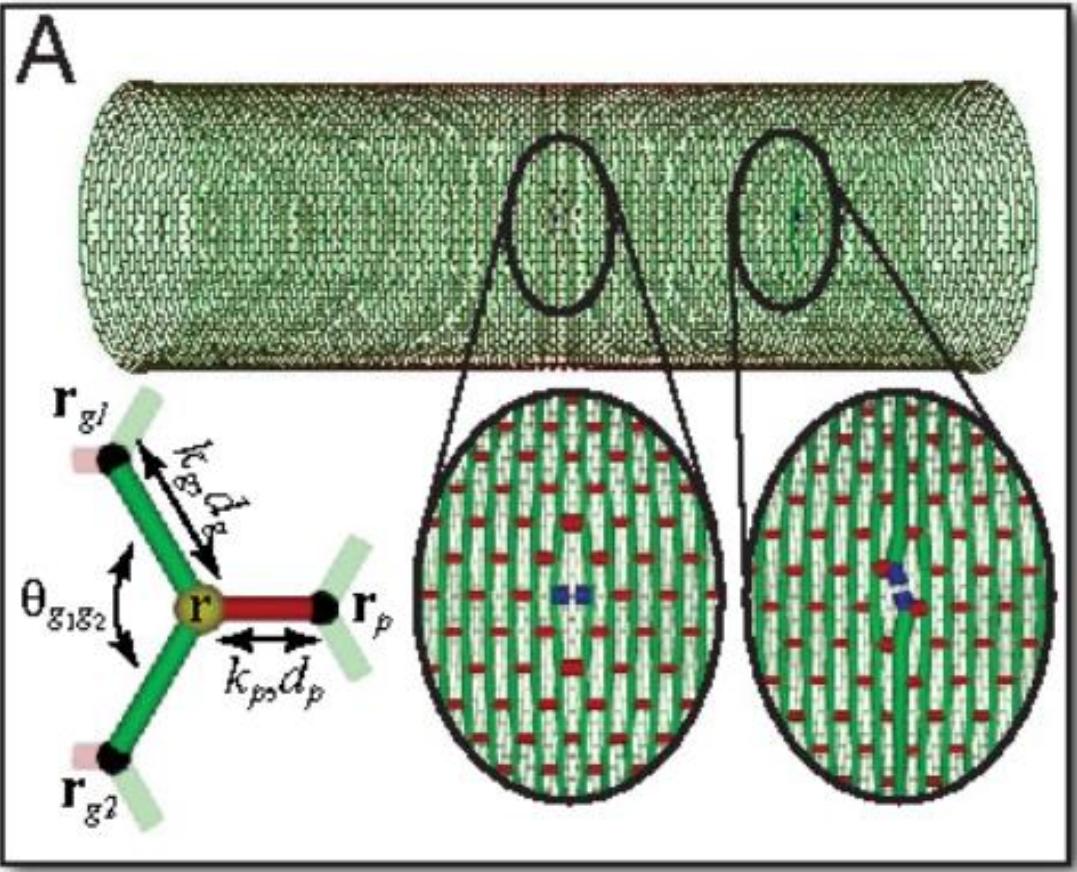
Gli enzimi che sono responsabili dell'assemblaggio del peptidoglicano sono:

- Autolisina
- PBPs



Durante la crescita cellulare la sintesi di peptidoglicano richiede rottura controllata del peptidoglicano persistente da parte delle **autolisine** e inserzione di nuovi precursori.

- Il bactoprenolo raggiunto il periplasma interagisce con gli enzimi che intervengono nell'inserzione dei precursori nel punto di crescita e nella catalisi dei legami glicosidici



PBP (Penicillin Binding Protein)

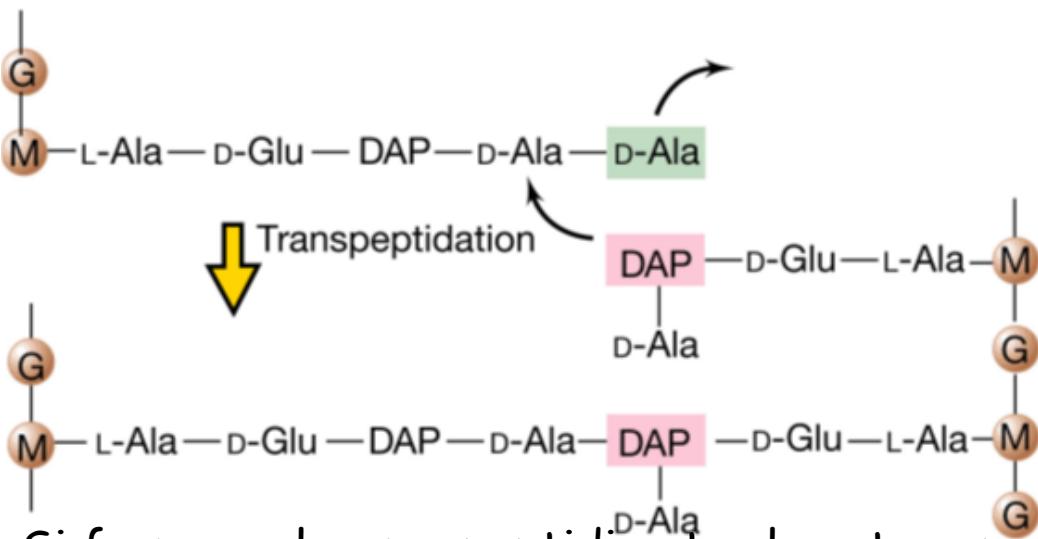
Sono gli enzimi responsabili della reazione di trans-peptidazione tra i residui peptidici dei NAM.

Molti microrganismi (in particolare patogeni) sono dotati di 4-8 PBP differenti.

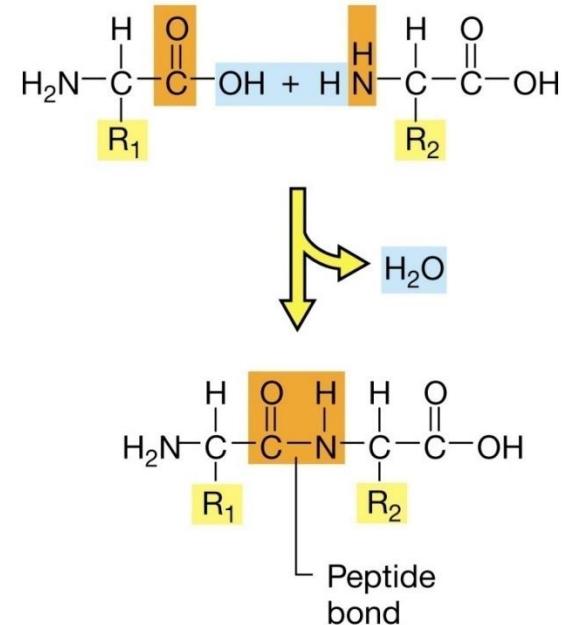
In generale ne sono state identificate molte e sono state suddivise in due famiglie: HMWPBP (~ 80 kDa) e LMWPBP (~ 30 kDa) ...

Le HMWPBP sono spesso dotate anche dell'attività trans-glicosilasica responsabile del "legame" tra le unità esportate (NAM-NAG-NAM-NAG-etc)

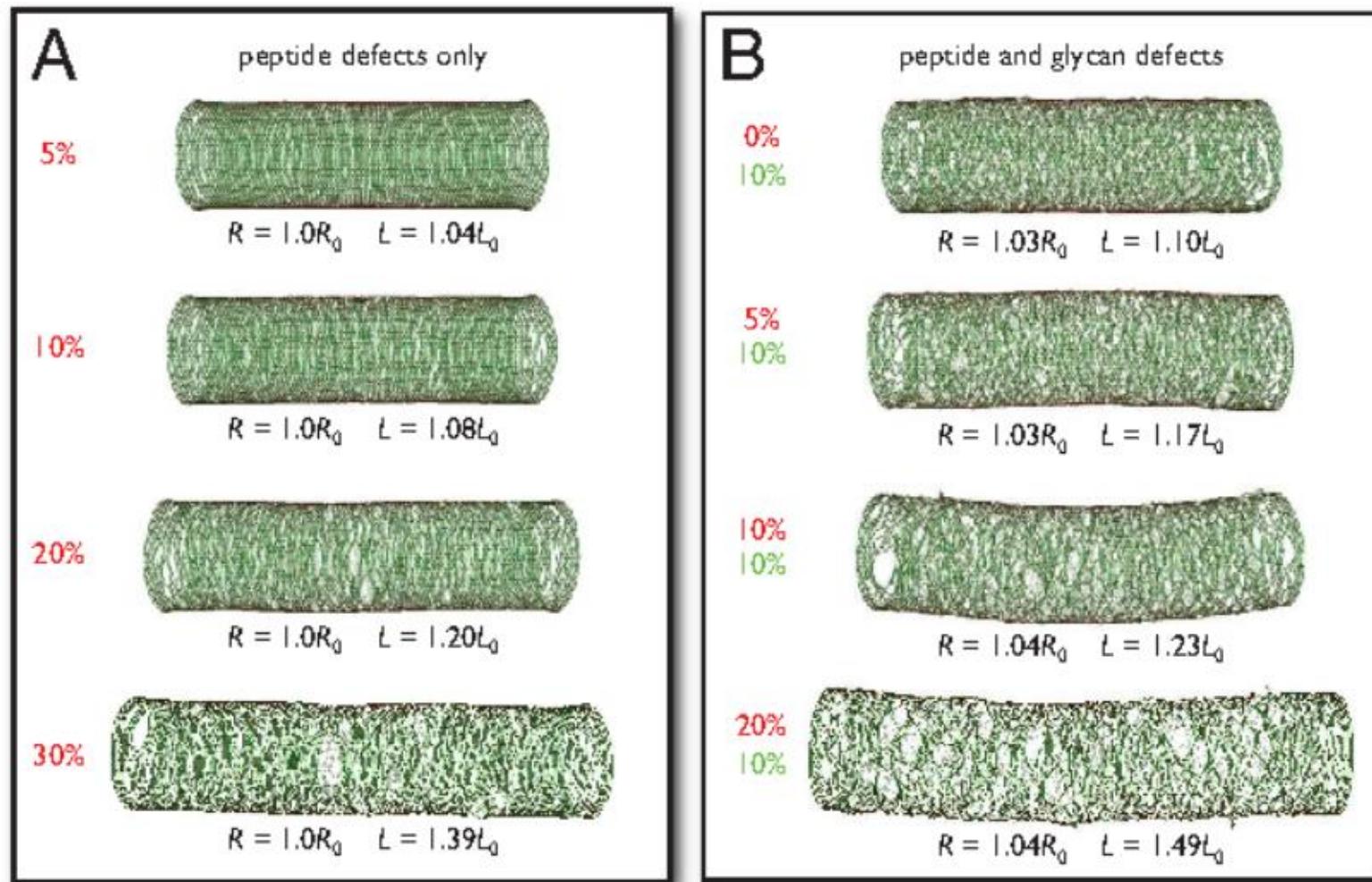
L'ultima tappa della sintesi del peptidoglicano è la **transpeptidazione** ovvero la formazione di un legame peptidico tra due AA delle catene peptidiche



Si forma un legame peptidico tra la catena pentapeptidica del nuovo monomero e il tetrapeptide di una catena di glicani adiacente. Il legame peptidico tra le due D-alanine terminali viene trasferito al gruppo aminico libero del DAP (o L-Lisina) creando un legame crociato e il rilascio della D-alanina terminale.



La reazione di transpeptidazione avviene ad opera delle transpeptidasi nello spazio periplasmatico.



Robustness of the shape of a model cell with peptidoglycan defects. (A and B) Upon removal of an increasing concentration of randomly chosen peptide bonds (A) or peptide and glycan bonds (B), the cell wall maintains an approximately cylindrical shape, with slightly increased dimensions as indicated. The peptide and glycan defect concentrations are shown as percentages in red and green, respectively. The glycan defects in B create large pores in the cell wall;

Gli antibiotici

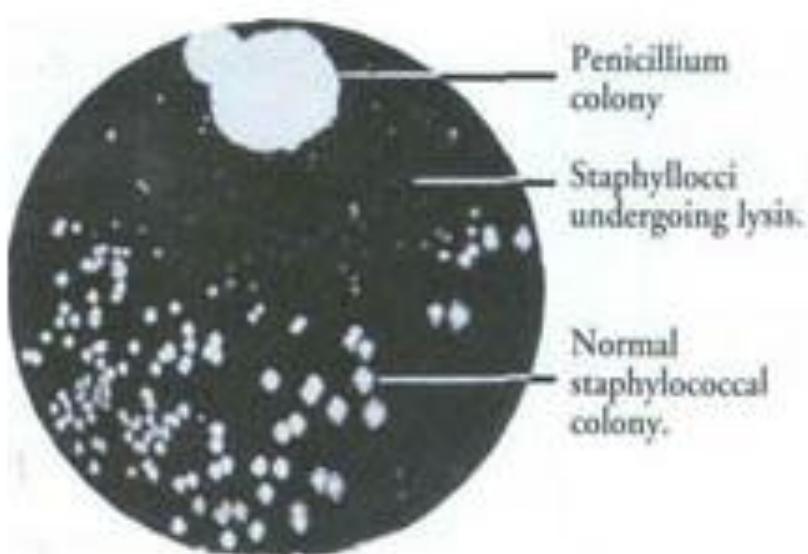
sostanze antimicrobiche naturali prodotte da molti funghi e batteri, attive contro altri microrganismi in quanto ne inibiscono la crescita o ne provocano la morte.

La PENICILLINA

Alexander Fleming, un medico scozzese che stava studiando dei ceppi di stafilococco scoprì la 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 stafilococco.

Dal momento che intorno alla muffa non crescevano i batteri Fleming ne dedusse che la muffa produceva una sostanza con 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 stafilococco determinava la sopravvivenza di tutti gli animali
Nel 1942 usata per la prima volta nell'uomo

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.

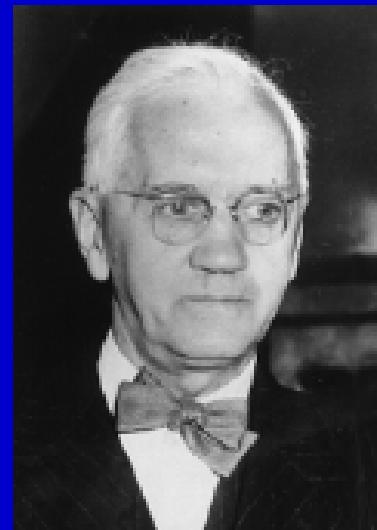
The Golden Age of Antibiotics

	Discovery	Introduction
1930	1929 Penicillin	
	1932 Sulphonamides	
1940	1938 Gramicidin	
	1942 Streptomycin & Bacitracin	Penicillin
1950	1943 Cephalosporins	
	1947 Chloramphenicol & Chlorotetracycline	
1960	1949 Neomycin	
	1948 Trimethoprim	
1970	1948 Oxytetracycline	
	1952 Erythromycin	
	1956 Vancomycin	
	1957 Kanamycin	
	1961 Nalidixic acid	Methicillin
	1963 Gentamicin	Ampicillin
	1964	Cephalosporins
	1966	Doxycycline
	1967 Clindamycin	
	1968	Trimethoprim
	1971 Tobramycin	
	1972 Cephamycins & Minocycline	

History of antibiotics - 6

Penicillin- the first antibiotic - 1928

- **Alexander Fleming** observed the killing of staphylococci by a fungus (*Penicillium notatum*)
- observed by others - never exploited
- Florey & Chain purified it by freeze-drying (1940) - Nobel prize 1945
- first use in a patient: 1942
- World War II: saved 12-15% of lives



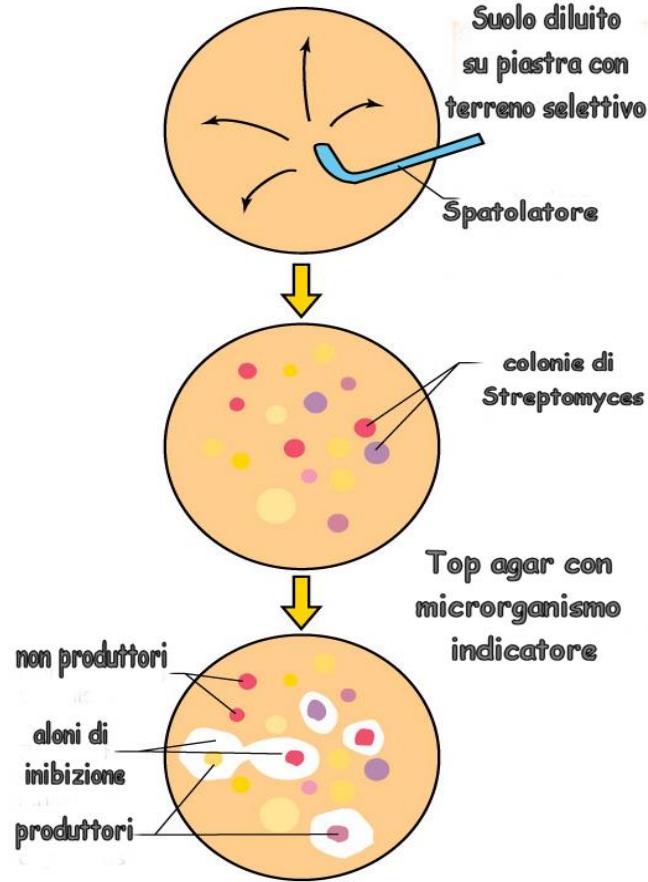
History of antibiotics - 7

- Selman Waksman - Streptomycin (1943)
 - active against all Gram-negatives
 - **first antibiotic active against *Mycobacterium tuberculosis***
 - most severe infections were caused by Gram-negatives and *Mycobacterium tuberculosis*
 - extracted from *Streptomyces*
 - 20 other antibiotics, incl. neomycin, actinomycin



Nobel prize

1952



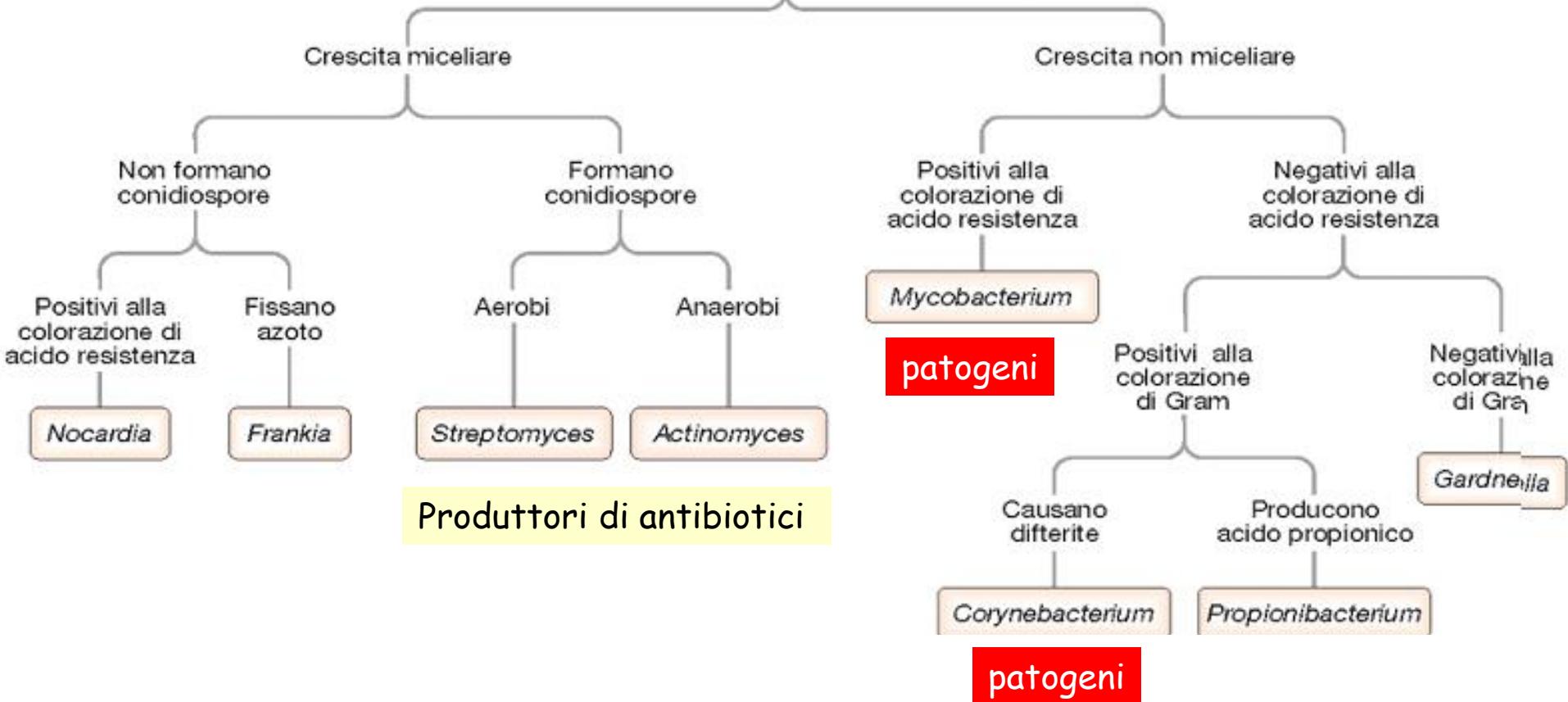
(a)

Isolamento e selezione di ceppi di *Streptomyces* produttori di antibiotici da campioni di suolo utilizzando un batterio sensibile come indicatore

Actinobacteria



Gram positivi ad alto contenuto in GC



Antibiotici sintetizzati da Streptomyces

Classe chimica	Nome	Attivo contro:
Aminoglicosidici:	Streptomicina Spectinomicina 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

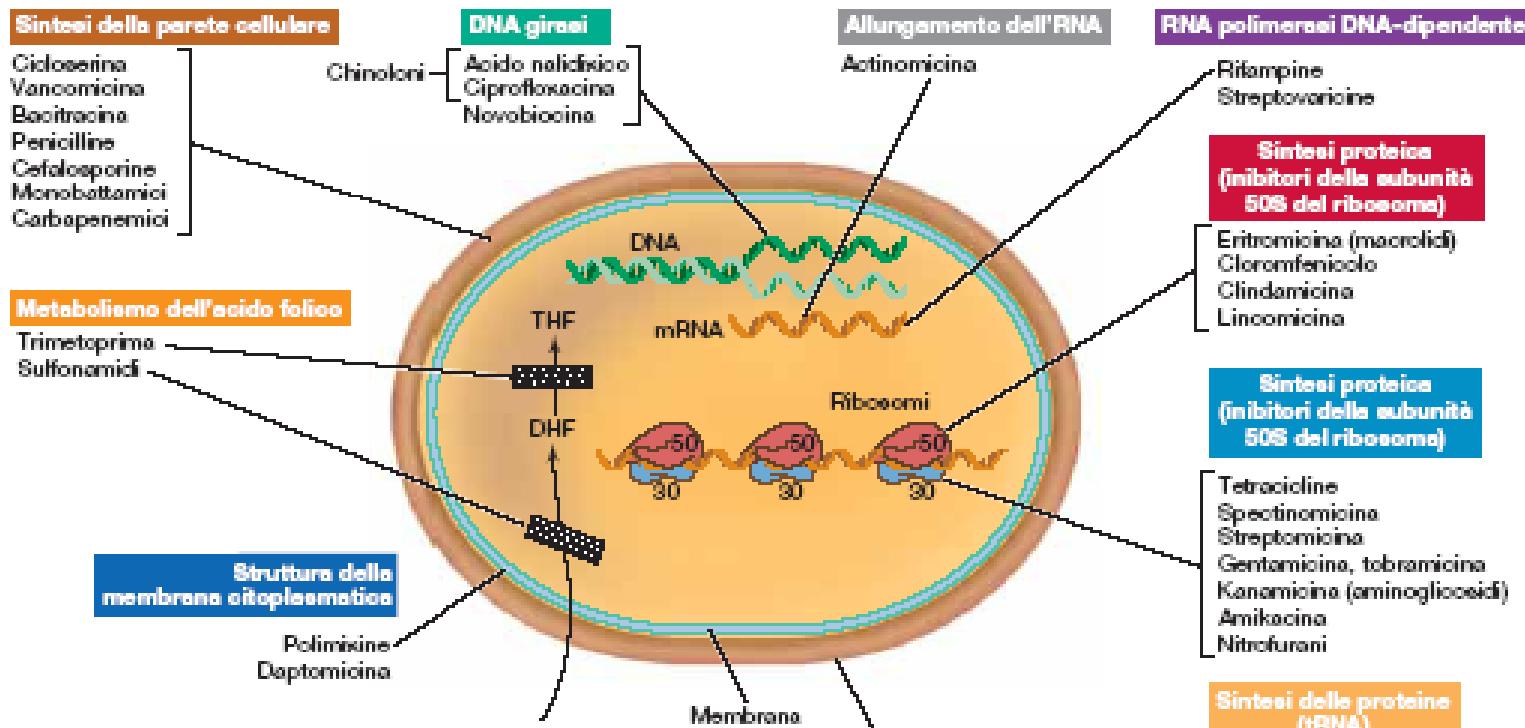
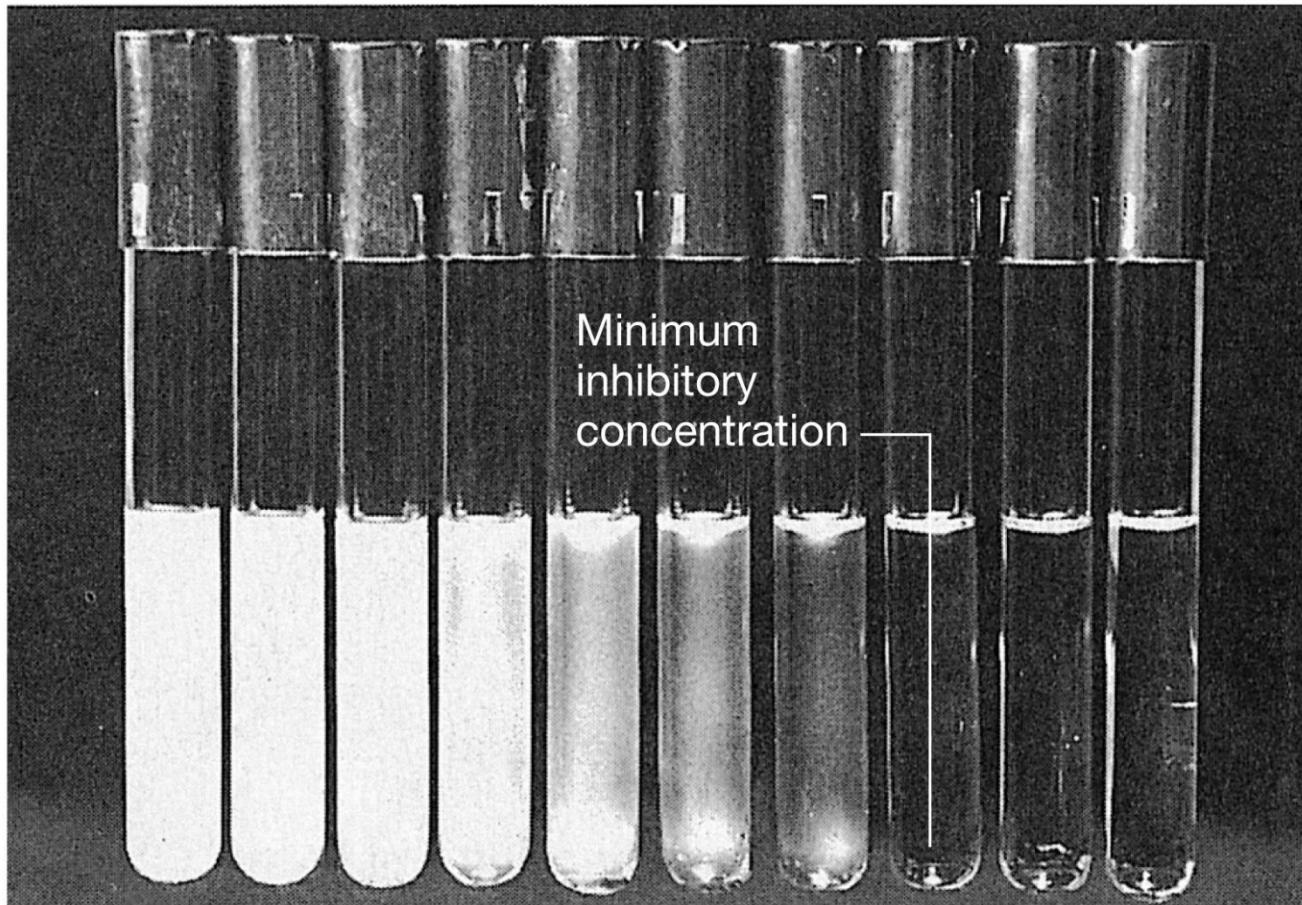


Figura 14.14 Meccanismo d'azione dei principali agenti chemioterapici antimicrobici. THF, tetraidrofolato; DHF, diidrofolato; mRNA, RNA messaggero; tRNA, RNA transfer.

Determinazione dell'attività di un antibiotico mediante la ricerca della **Minima Concentrazione Inibente (MIC)**



T. D. Brock

Analisi della torbidità di una coltura

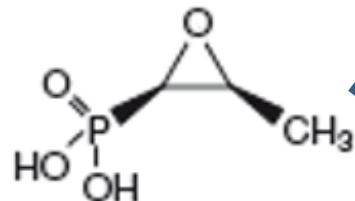
I principali antibiotici che agiscono a livello della biosintesi delle unità strutturali del peptidoglicano sono:

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

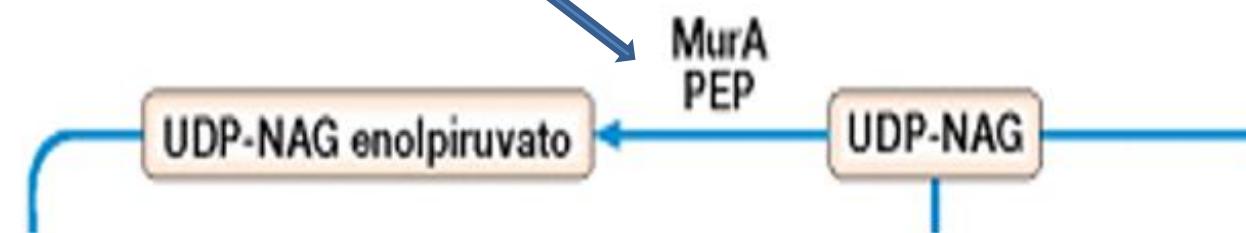
la cicloserina inibisce l'attività dell'enzima Isomerasi che determina la sintesi delle D-Ala

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

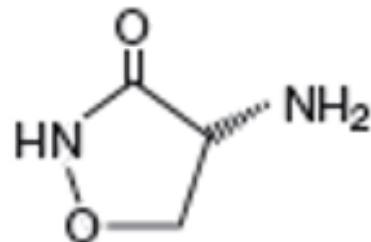
a) Fosfomicina



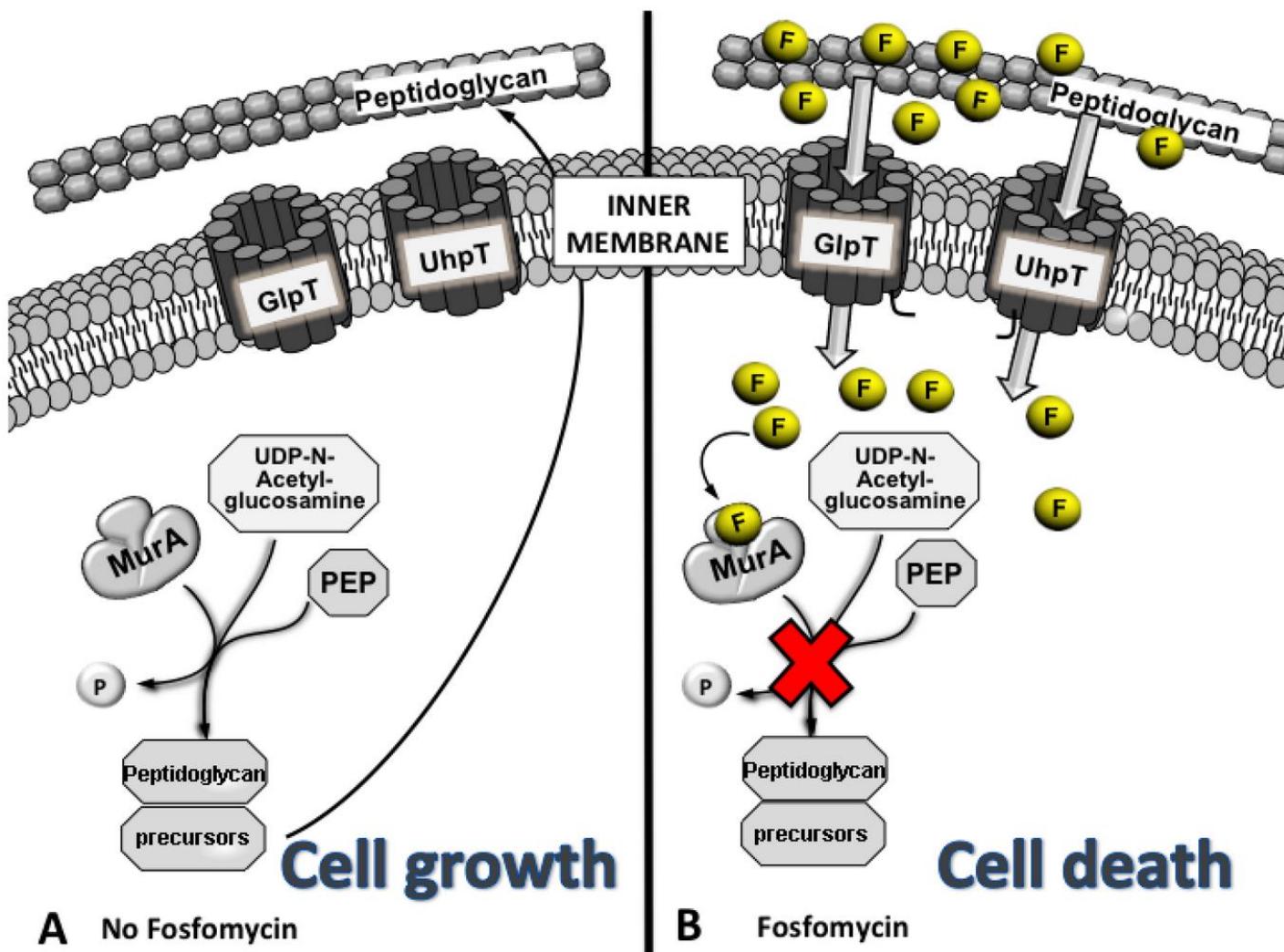
Fosfomicina: analogo strutturale del fosfoenolpiruvato e si lega all'enzima fosfoenolpiruvasi che catalizza la reazione di condensazione con UDP-N acetiglucosamina per formare enoilN-acetylglucosamina precursore

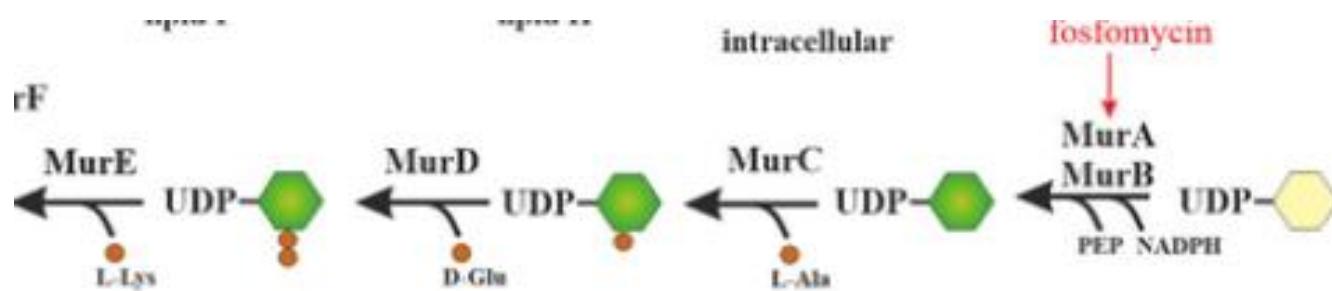
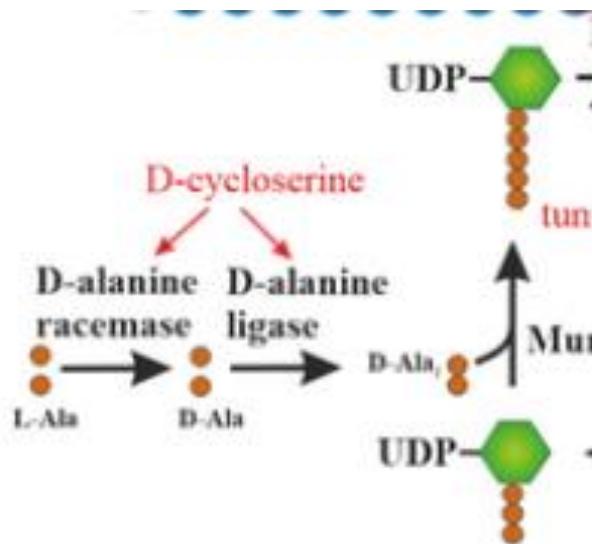


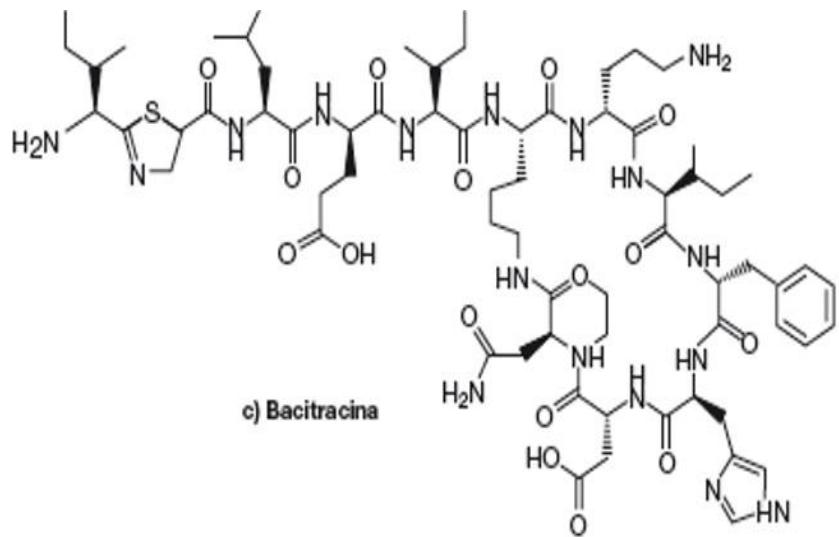
b) Cicloserina



Cicloserina: analogo strutturale della D-alanina interferisce con la sintesi del dimero D-alanina-D-alanina inibendo l'enzima alanin racemasi che converte L-alanina in D alanina e l'enzima D-alanil.D-alanina sintetasi che catalizza la formazione del legame peptidico tra le 2 D-alanine.

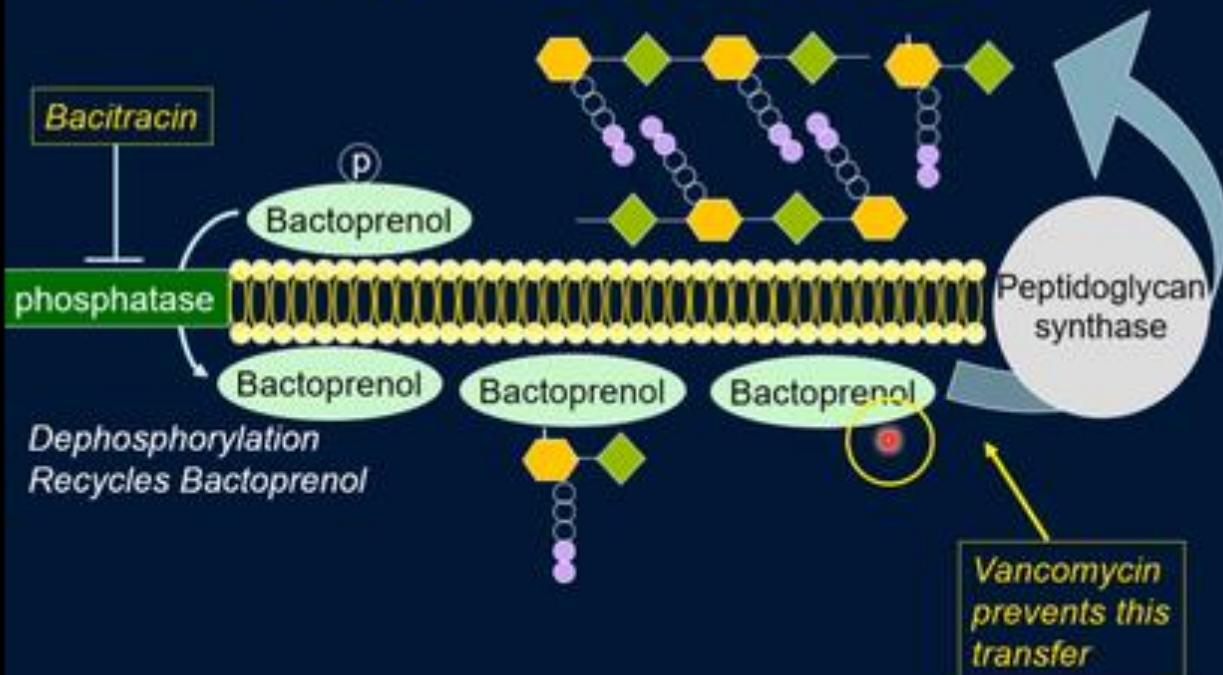


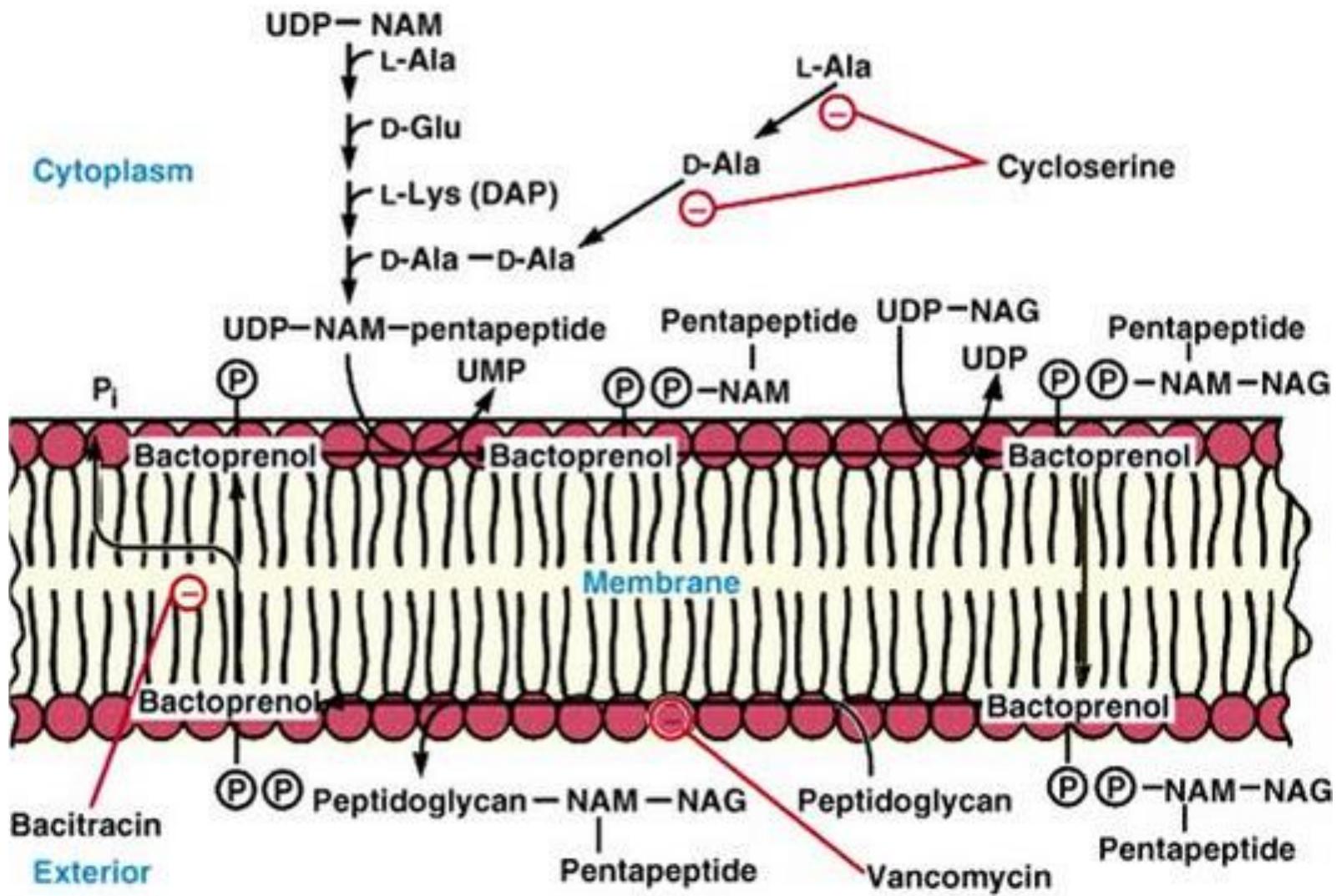




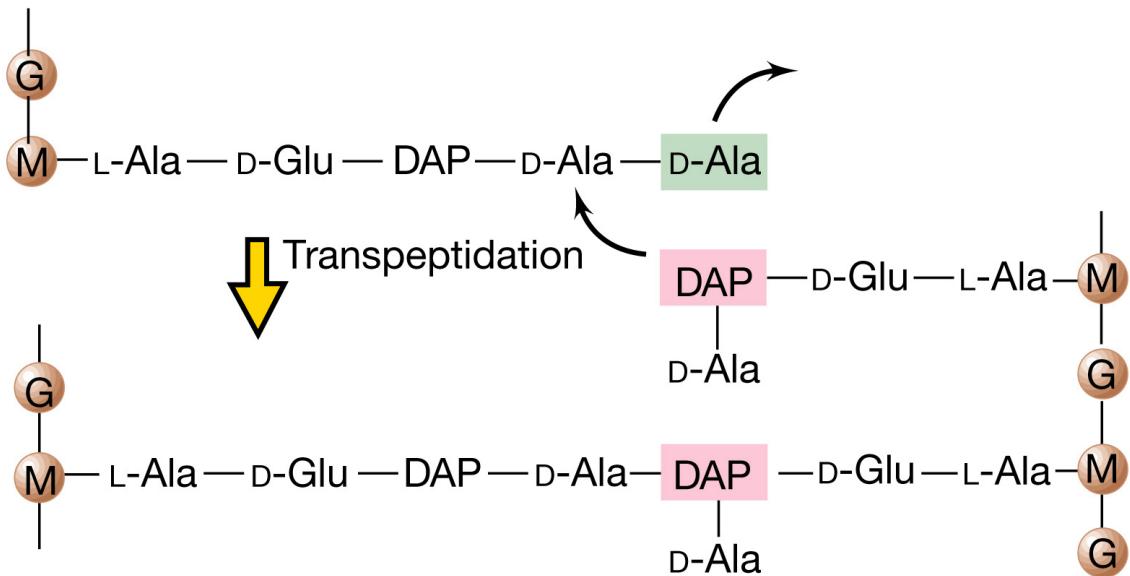
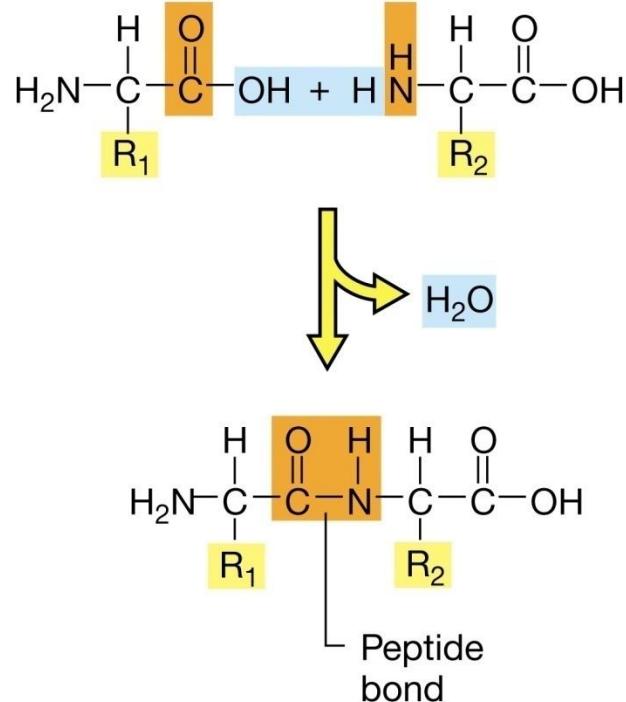
La bacitracina è un antibiotico polipeptidico che si lega al bactoprenolo interferendo con la defosforilazione del bactoprenolo pirofosfato, impedendo la traslocazione di unità di PG dal citoplasma all'esterno. Nella forma pirofosfato il bactoprenolo non è attivo (attivo solo se monofosfato)

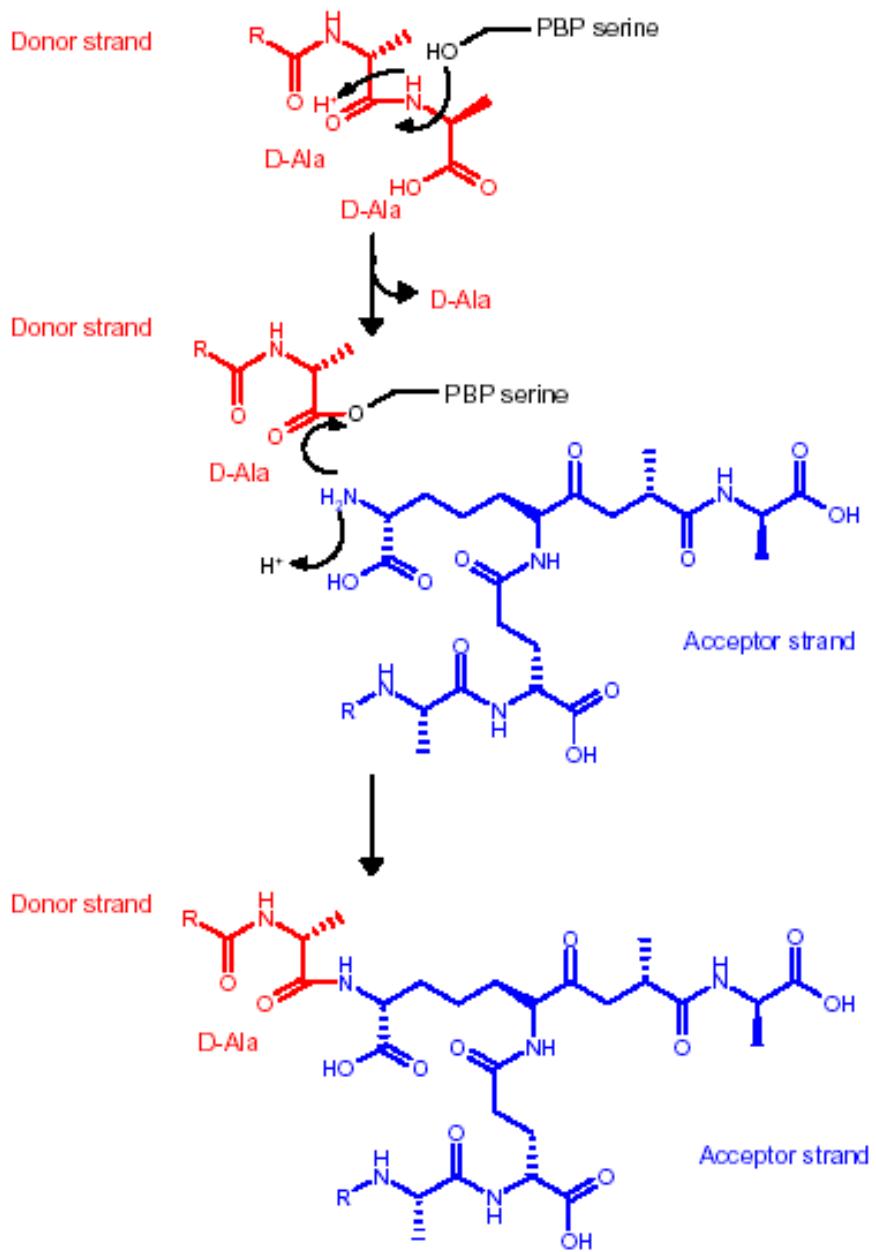
Stage 2: Elongation and Transfer





L'ultima tappa della sintesi del peptidoglicano è la **transpeptidazione** ovvero la formazione di un legame peptidico tra due AA delle catene peptidiche





Le PBP sono in grado di effettuare la reazione di transpeptidazione riconoscendo il dimero di D-Ala terminale, eliminando l'ultimo residuo di D-Alanina e formando un intermedio covalente che trasferirà il legame al gruppo di DAP o L-Lys di un secondo penta peptide

....

Tutte le PBP presentano attività transpeptidasica nel dominio C-terminale (dominio PB che lega la penicillina)

Alcune sono bifunzionali ed hanno un'attività transglicosilasi nel loro dominio N-terminale

Penicillin-binding Proteins

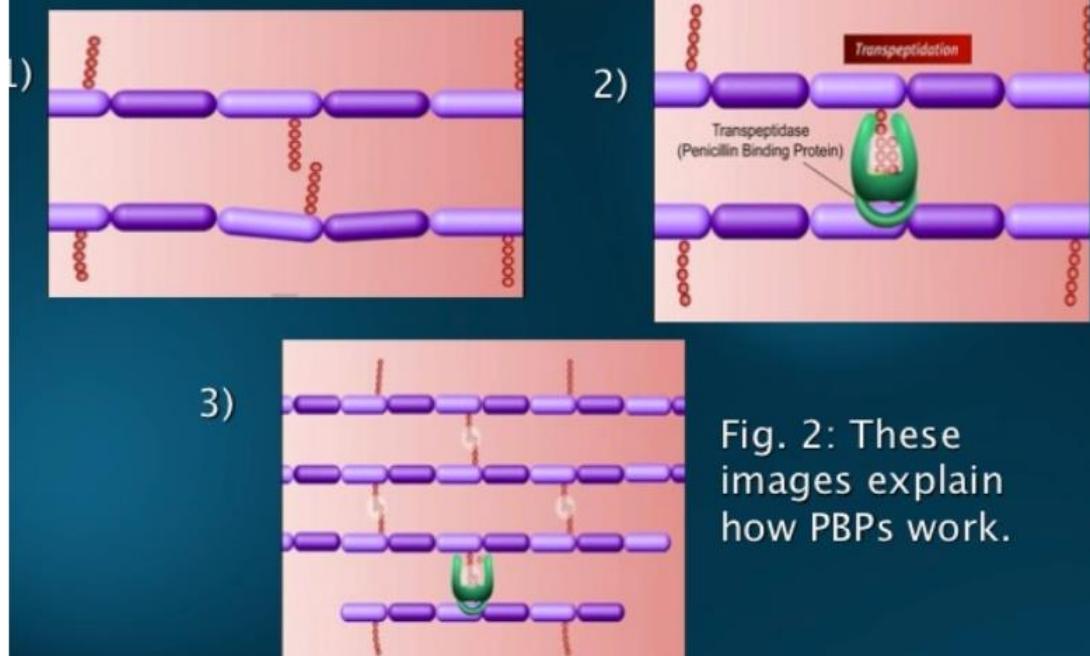


Fig. 2: These images explain how PBPs work.

[http://www.youtube.com/
watch?v=qBdYnRhdWcQ](http://www.youtube.com/watch?v=qBdYnRhdWcQ)

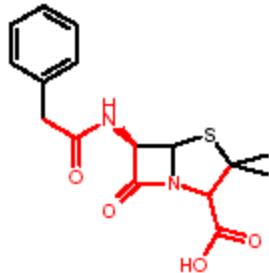
Questa fase della sintesi del peptidoglicano prevede l'esistenza di almeno due classi di antibiotici in grado di inibire la reazione di transpeptidazione:

- **I β -lattamici (pennicilline)**
- **I glicopeptidi (Vancomicina)**

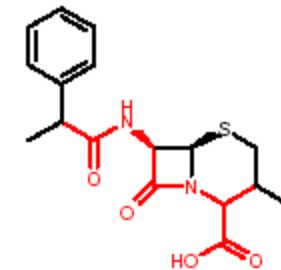
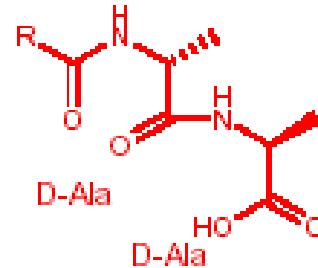
Queste due classi di antibiotici agiscono in maniera differente....

I β -lattamici sono dotati di una struttura che richiama quella presentata dal dimero di D-Ala..

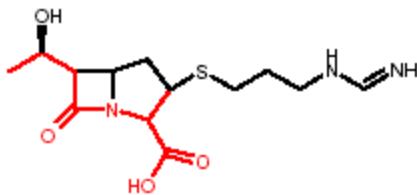
In questo modo essi possono legarsi al sito attivo delle PBP ed impedirne il funzionamento



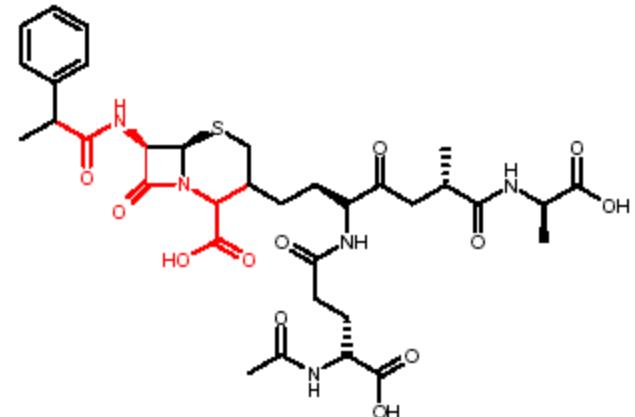
Penicillina G

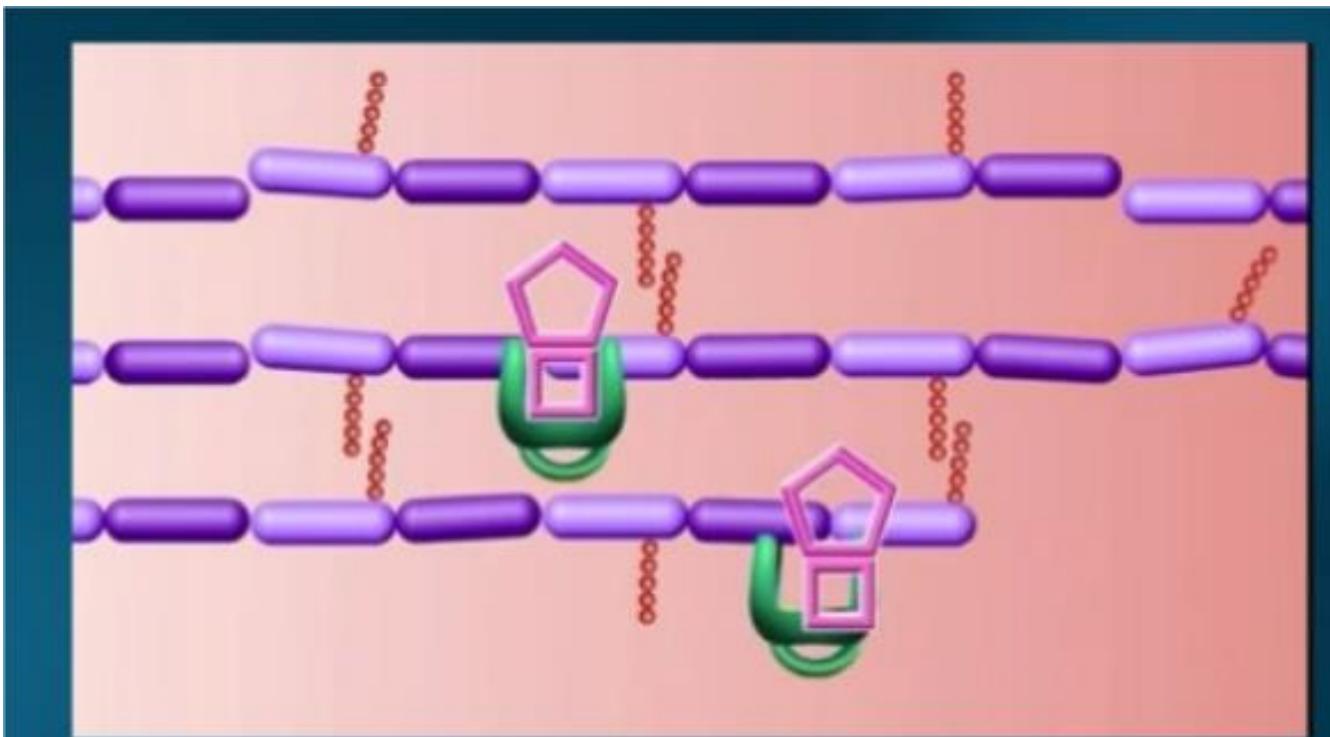


Cefalosporine



Carbapenem Imipenem



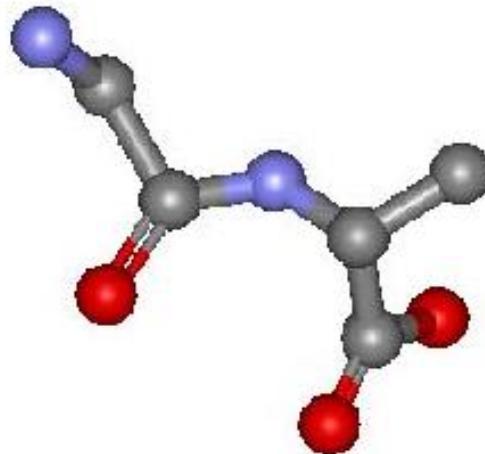


[http://www.youtube.com/
watch?v=qBdYnRhdWcQ](http://www.youtube.com/watch?v=qBdYnRhdWcQ)

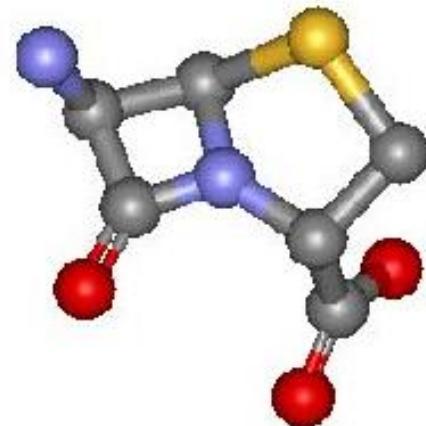
Fig. 4: Explains how
beta-lactam antibiotics
work

Omologia strutturale tra

2 D-ALANINA

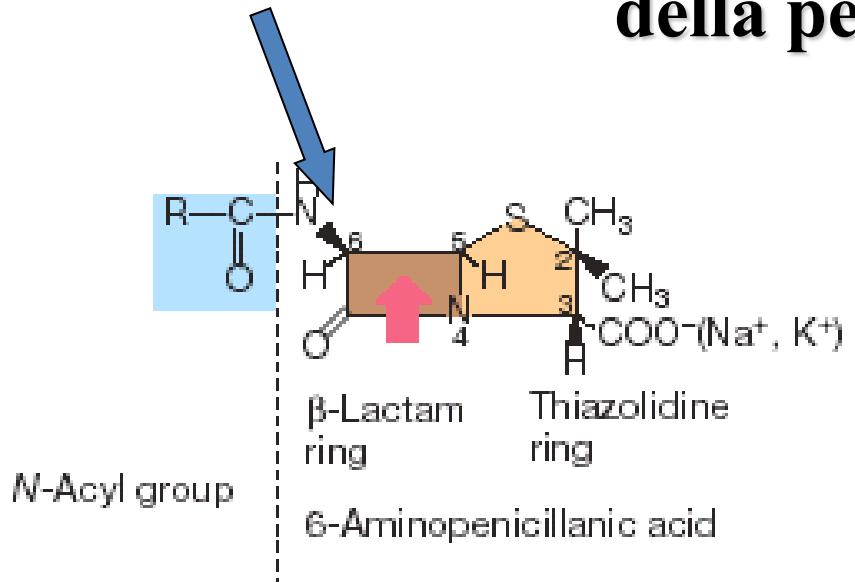


PENICILLINA



La reazione di transpeptidazione è il bersaglio della penicillina in quanto vi è omologia strutturale tra le 2 D-Alanina e la PENICILLINA

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



Le penicilline costituite da acido 6-aminopenicillanico legato a differenti catene laterali.

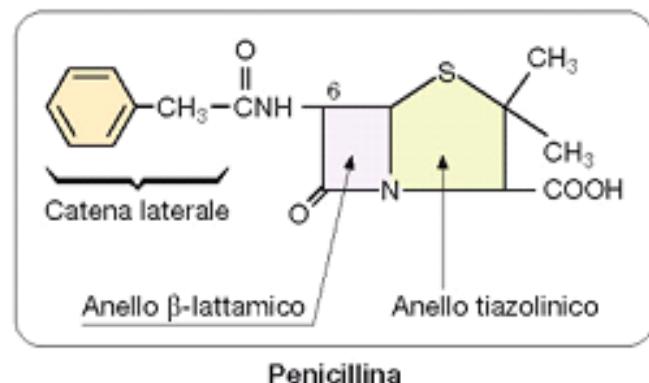
La penicillina G è prodotta da *Penicillium crysogenum* attiva su Gram+.

Sostituzione in posizione 6 hanno dato origine ad un'ampia gamma di composti

Designazione	Gruppo N -Acile
PENICILLINA NATURALE Benzilpenicillina (penicillina G) Attiva sui Gram-positivi, sensibile alle β -lattamasi	<chem>CC(=O)c1ccccc1</chem>
PENICILLINE SEMISINTETICHE Meticillina Stabile in ambiente acido, resistente alle β -lattamasi	<chem>CC(=O)c1ccc(O)c(O)c1</chem>
Oxacillina Stabile in ambiente acido, resistente alle β -lattamasi	<chem>CC(=O)c1ccc2c(c1)ONC2</chem>
Ampicillina Ampio spettro di attività (specialmente contro i batteri Gram-negativi), stabile in ambiente acido, resistente alle β -lattamasi	<chem>CC(=O)Nc1ccccc1</chem>
Carbenicillina Ampio spettro di attività (specialmente contro <i>Pseudomonas aeruginosa</i>), stabile in ambiente acido ma inefficiente per via orale, resistente alle β -lattamasi	<chem>CC(=O)C(=O)c1ccccc1</chem>

LE PENICILLINE

a)

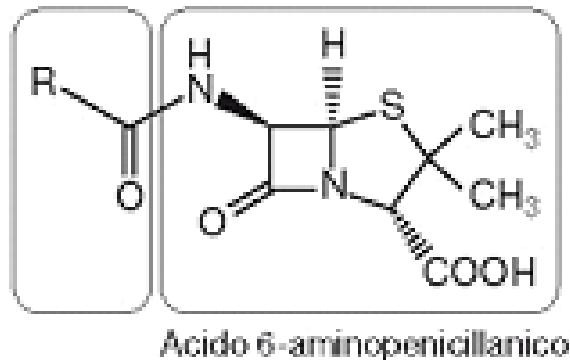


Penicillina

Le varie sostituzioni hanno permesso di ampliare lo spettro di azione variando l'affinità con le PBP e la permeabilità

b) Gruppo delle penicilline

Gruppo N-acile

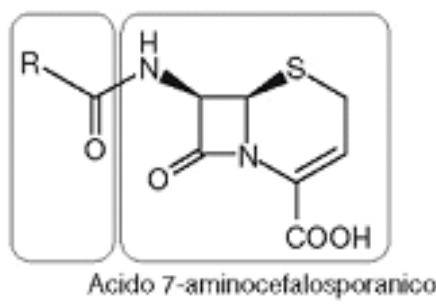
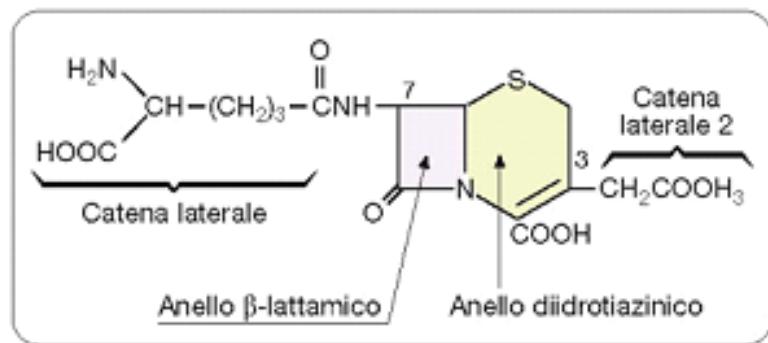
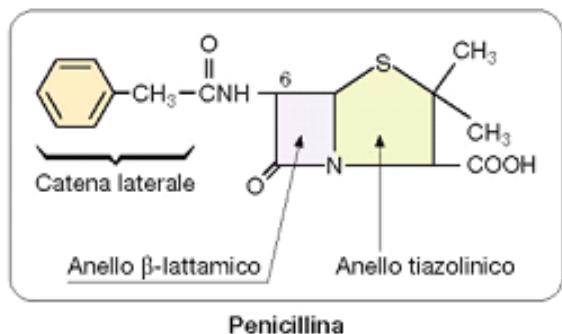


Acido 6-aminopenicillanico

Gruppo N-acile	Designazione
	Penicillina G
	Meticillina
	Oxacillina
	Ampicillina

CEFALOSPORINA C simili alle Penicillina prodotte da un fungo *Cephalosporium acremonium*.

4)



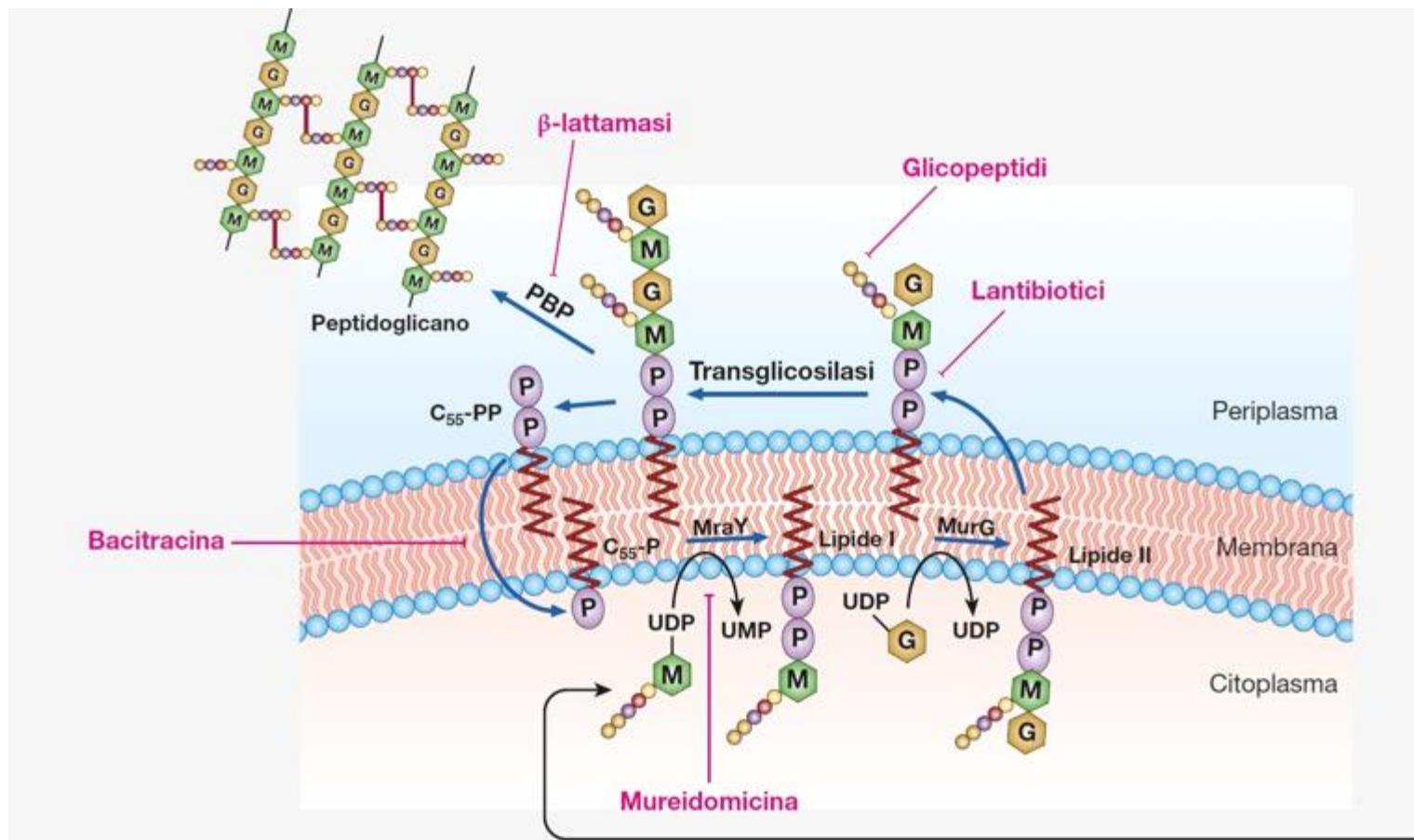
Dalla cefalosporina C derivano tutte le cefalosporine con spettro sempre più ampio.

Contengono acido 7-aminocefalosporanico costituito da

anello β -lattamico
anello diidrotiazinico

Lo sviluppo di questi antibiotici che contengono radicali laterali in posizione 3 e 7 ha portato all'ampliamento dello spettro di azione.

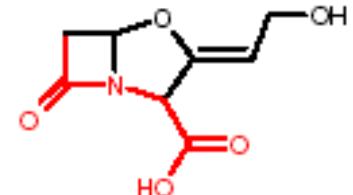
Si è passati quindi da uno spettro d'azione ristretto ad un numero limitato di patogeni ad ampio spettro d'azione che include microrganismi multi resistenti tra cui *P.aeruginosa*.



I meccanismi di resistenza agli antibiotici β -lattamici sono di tre tipi:

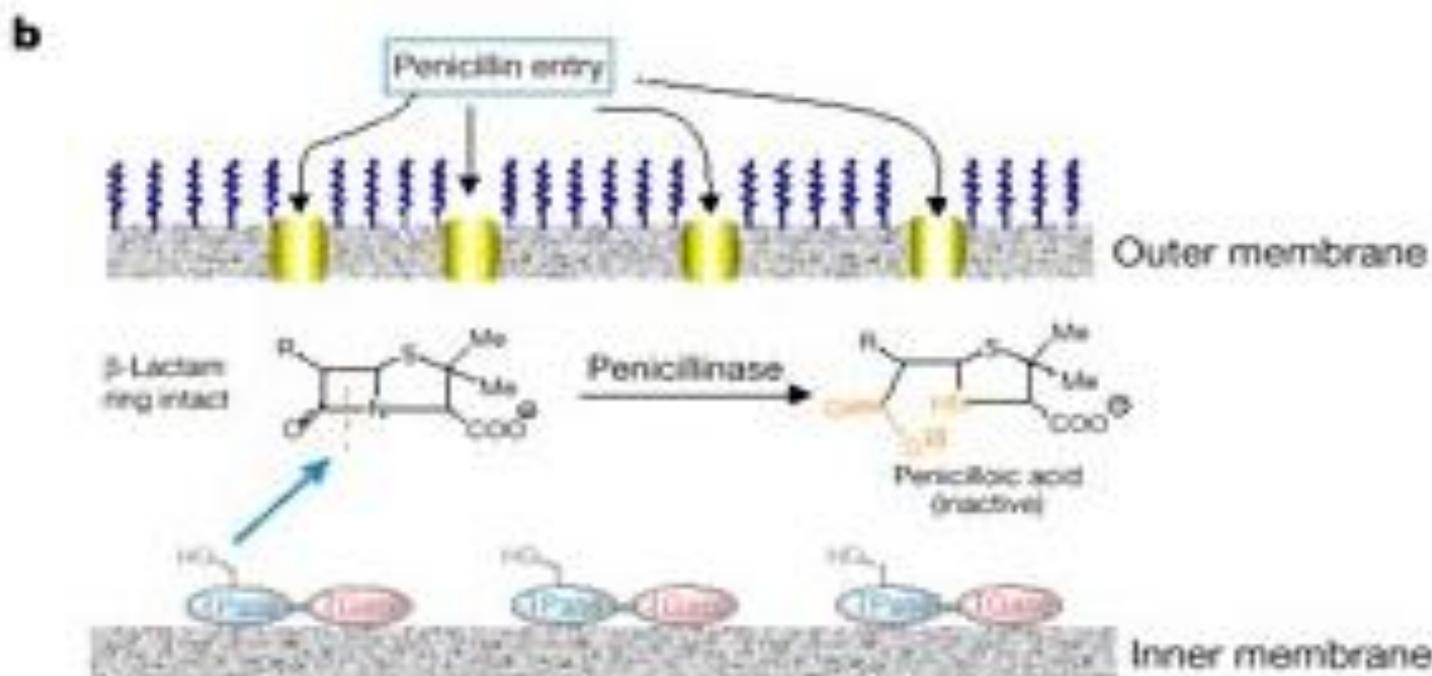
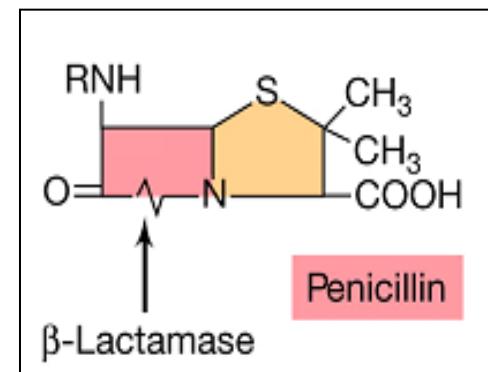
- **Modificazione della permeabilità**
- **Mutazione del sito attivo della PBP inibita**
- **Sintesi da parte del batterio di una β -lattamasi**

Per contrastare il terzo caso (più frequente) si possono utilizzare delle molecole in grado di inibire l'attività delle β -lattamasi, come è in grado di fare l'acido clavulanico



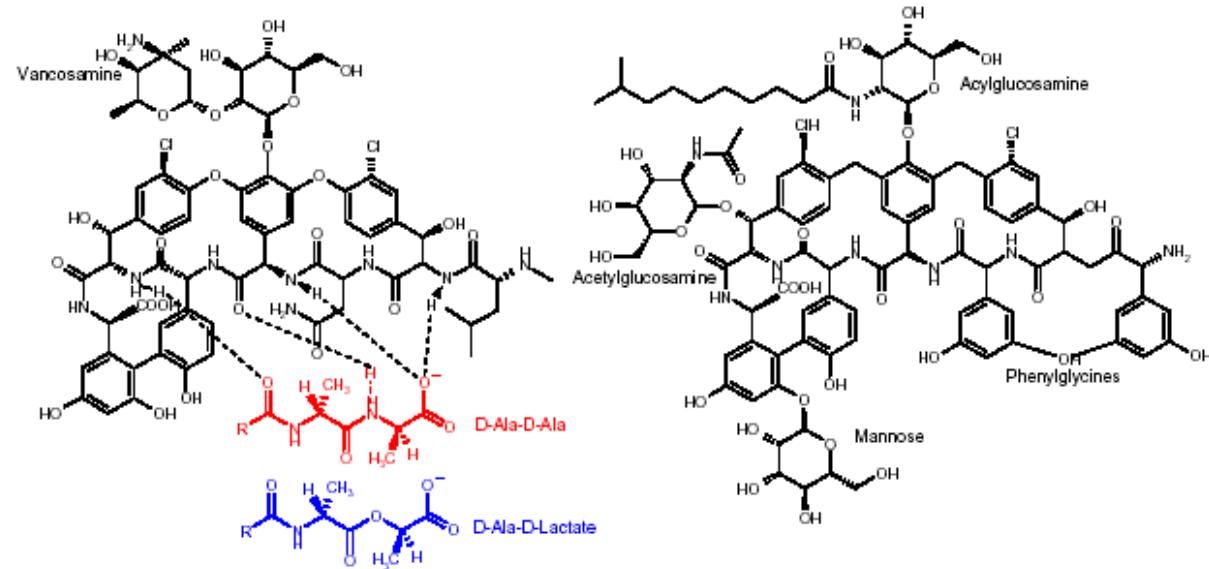
1. Modificazione dell'antibiotico che diviene inattivo

Le β -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)

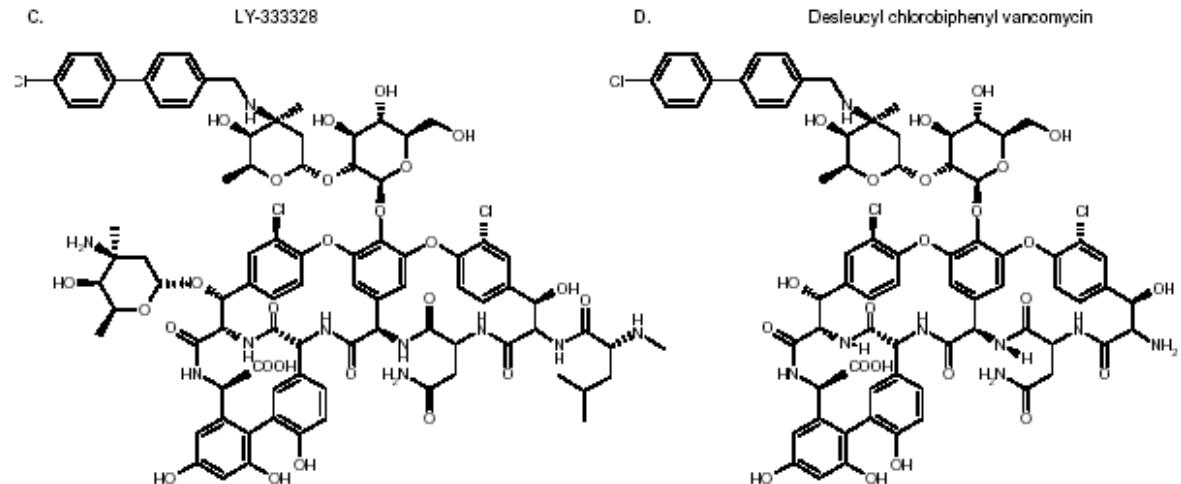


I glicopeptidi come la Vancomicina hanno un meccanismo di azione differente....

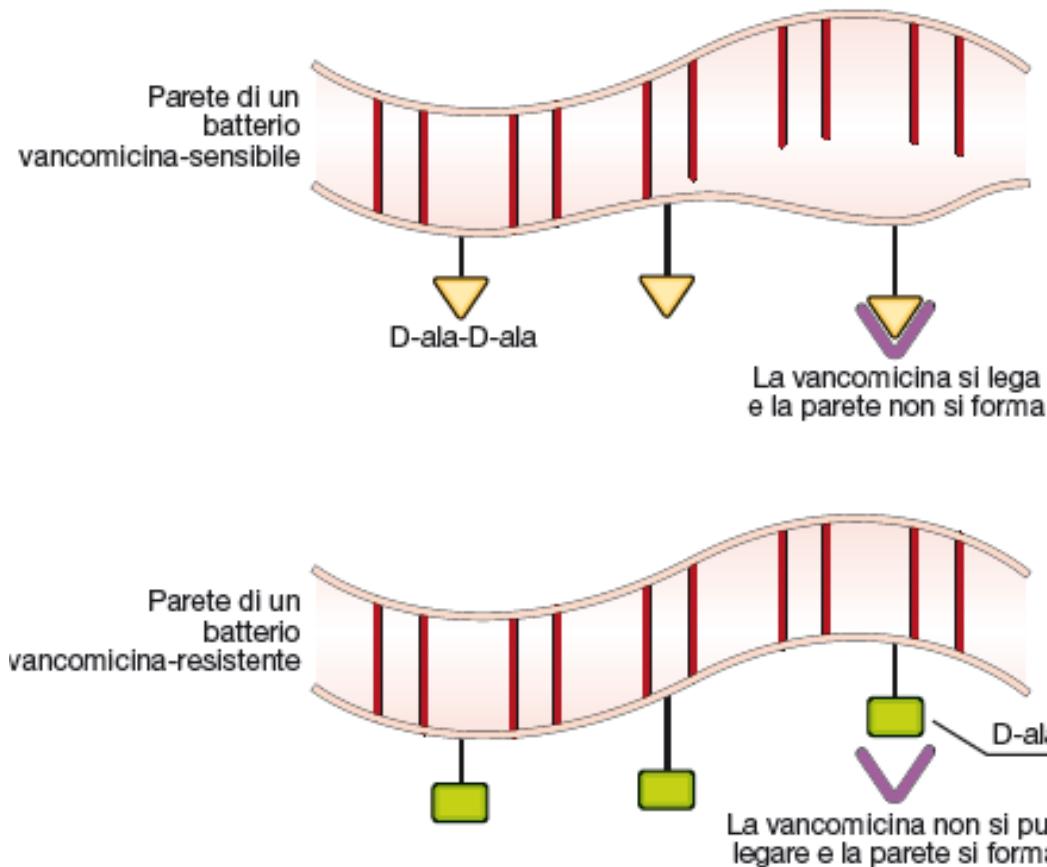
Essi, infatti si legano al dipeptide di D-Ala e non permettono alla PBP utilizzarlo per la transpeptidazione



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



Meccanismo di azione della vancomicina



Non agisce sugli enzimi ma interferisce con la polimerizzazione legandosi all'estremità C-terminale del dímero D-ala-D-ala dell' NAM-pentapeptide legato al bactoprenolo.

a)

Impedisce quindi il riconoscimento da parte delle transpetidasie. Non passa la membrana esterna dei Gram+ , importante negli *Staphylococcus aureus* MDRA

b)

Come gli antibiotici β lattamici (β) e la vancomicina (G) inibiscono le PBP

