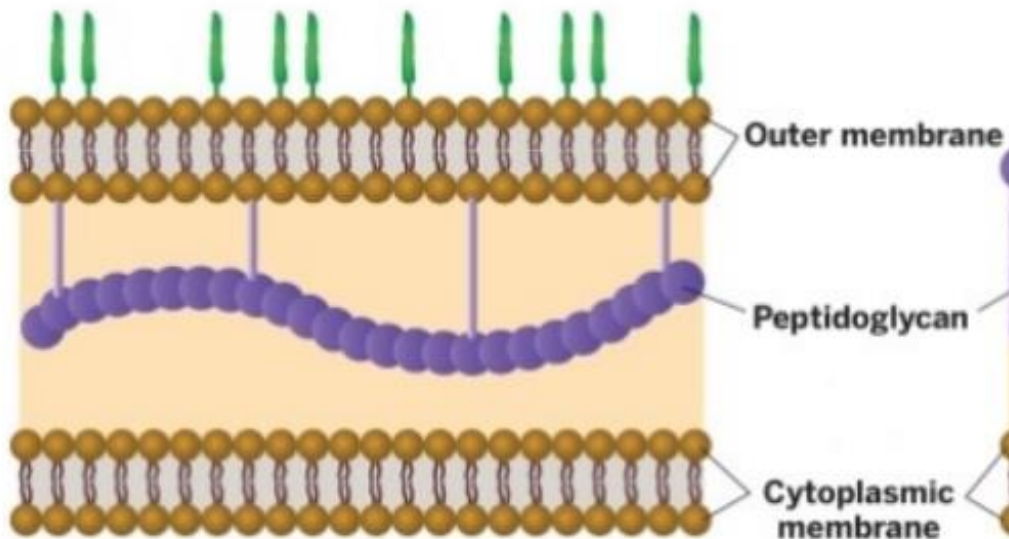
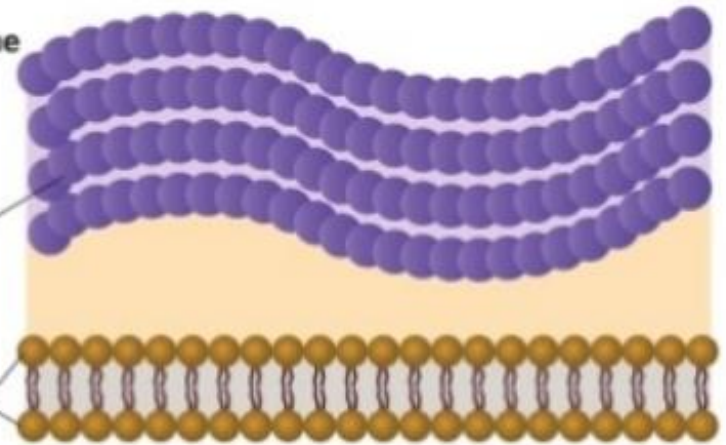


# La parete nei Batteri

## GRAM-NEGATIVE



## GRAM-POSITIVE



# Peptidoglicano (o mureina)

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

- due derivati polisaccaridici

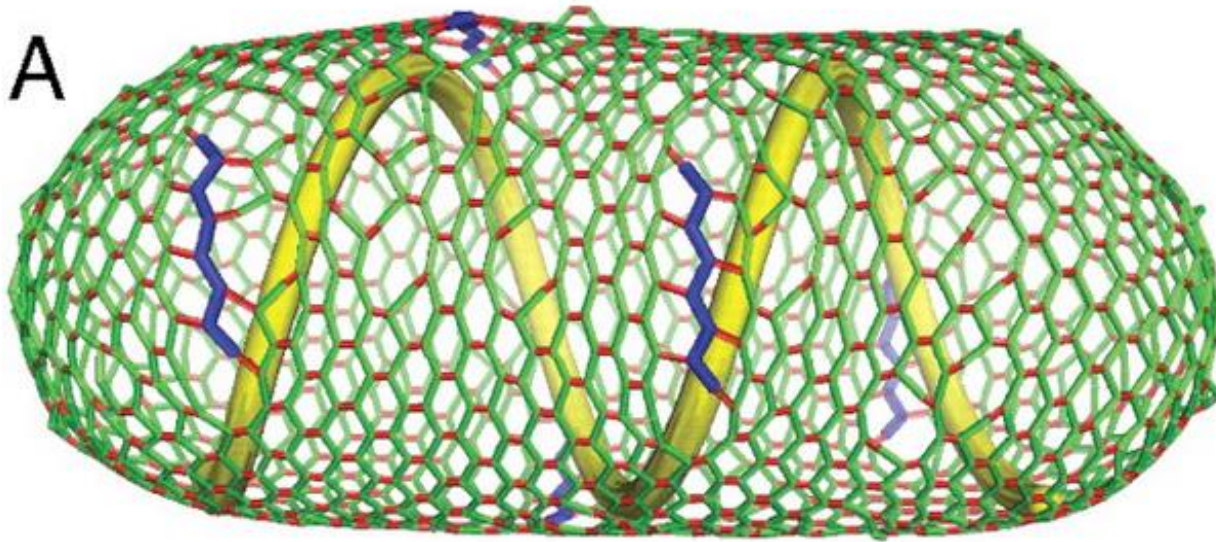
N-acetilglucosammina e l'acido N-acetilmuramico

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 peptidasi

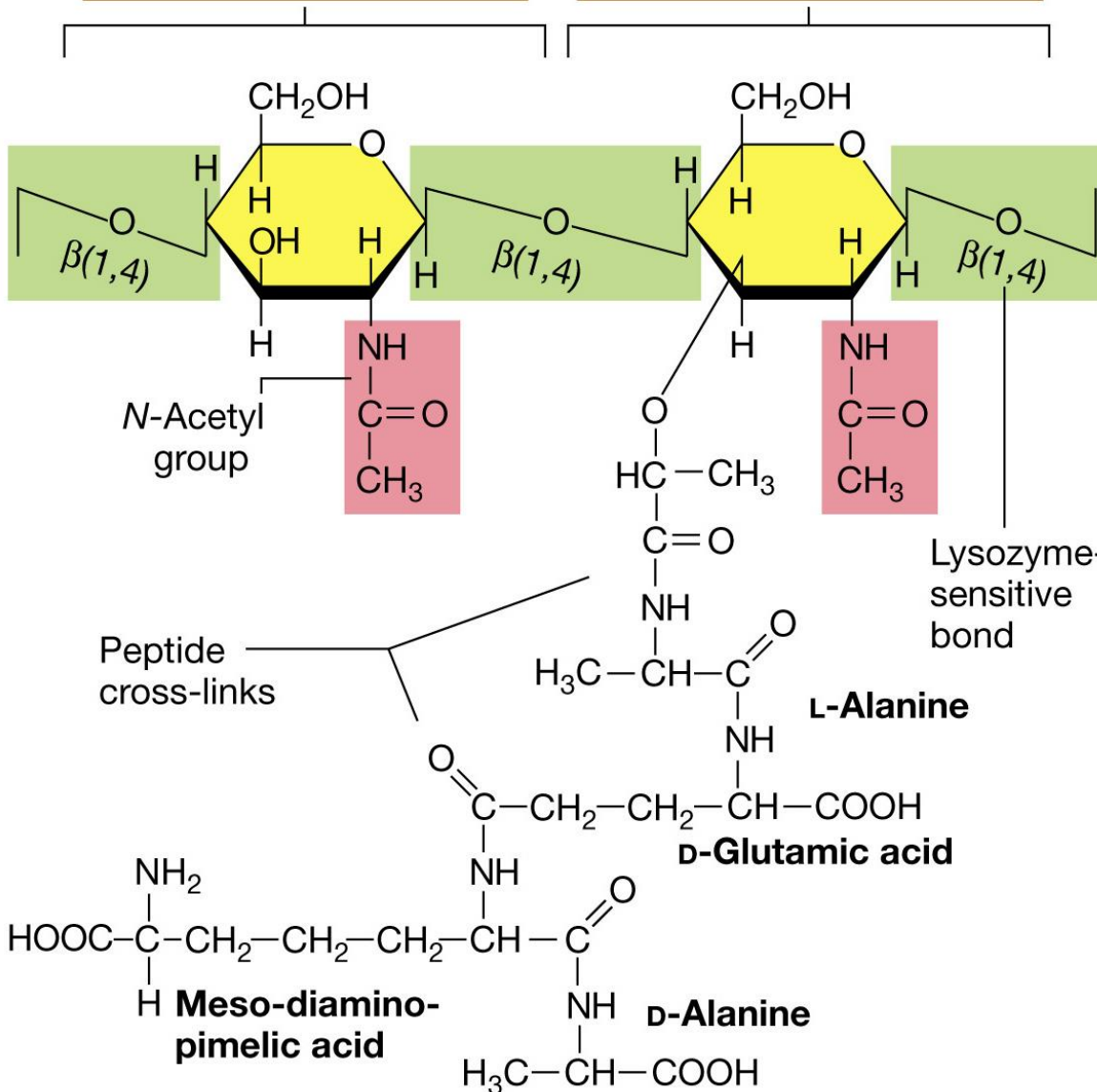


Il peptidoglicano può essere considerato come una struttura a rete che avvolge la cellula batterica  
In blu messo in evidenza un pezzetto della catena di NAG e NAM  
In rosso la componente peptidica

# I componenti fondamentali del peptidoglicano

**N-Acetylglucosamine (G)**

**N-Acetylmuramic acid (M)**



**NAM**

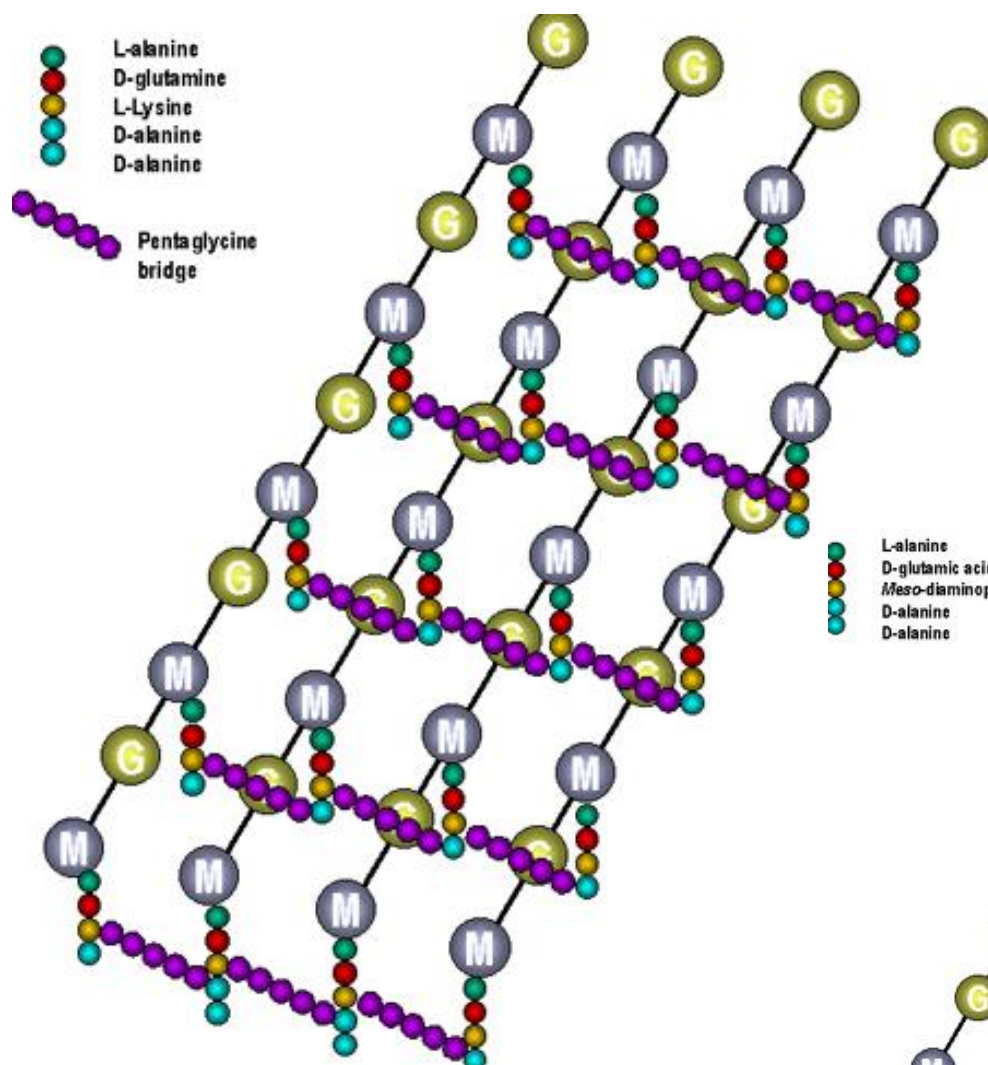
**L-alanina**

**Acido D-glutammico**

**Acido diaminopimelico o L-Lisina**

**D-Alanina**





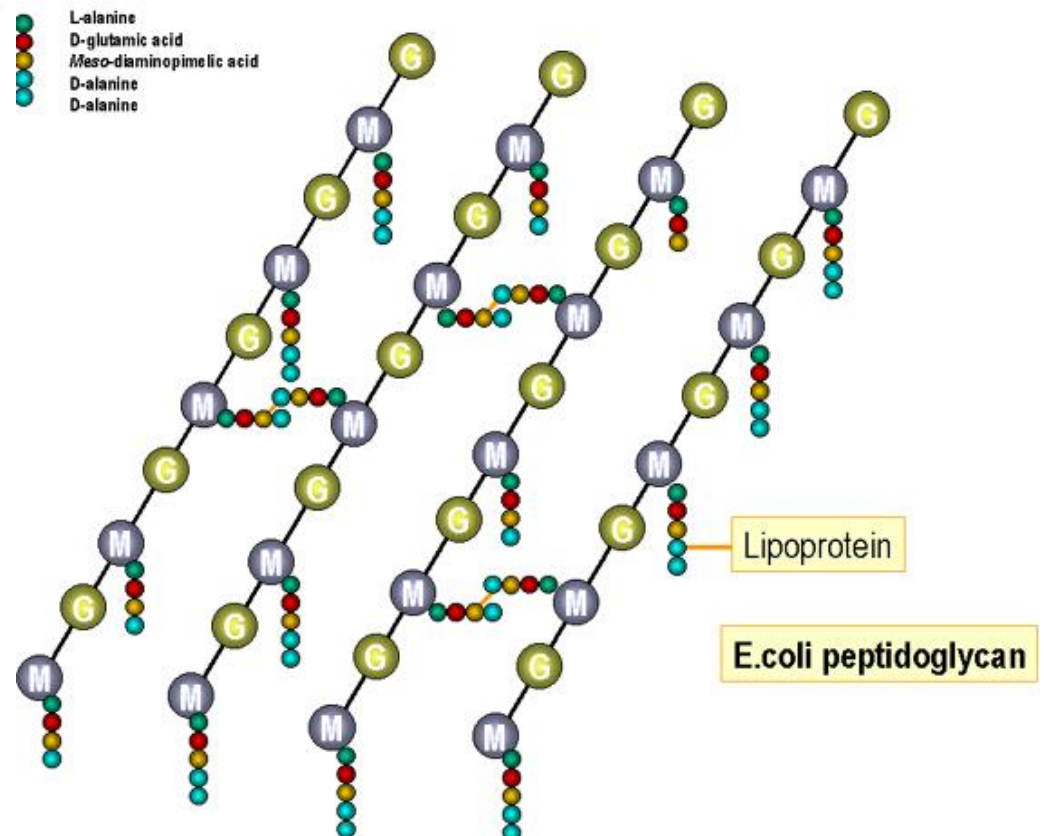
Peptidoglicano di

*Staphylococcus aureus*

← Gram+ e

*Escherichia coli*

Gram-

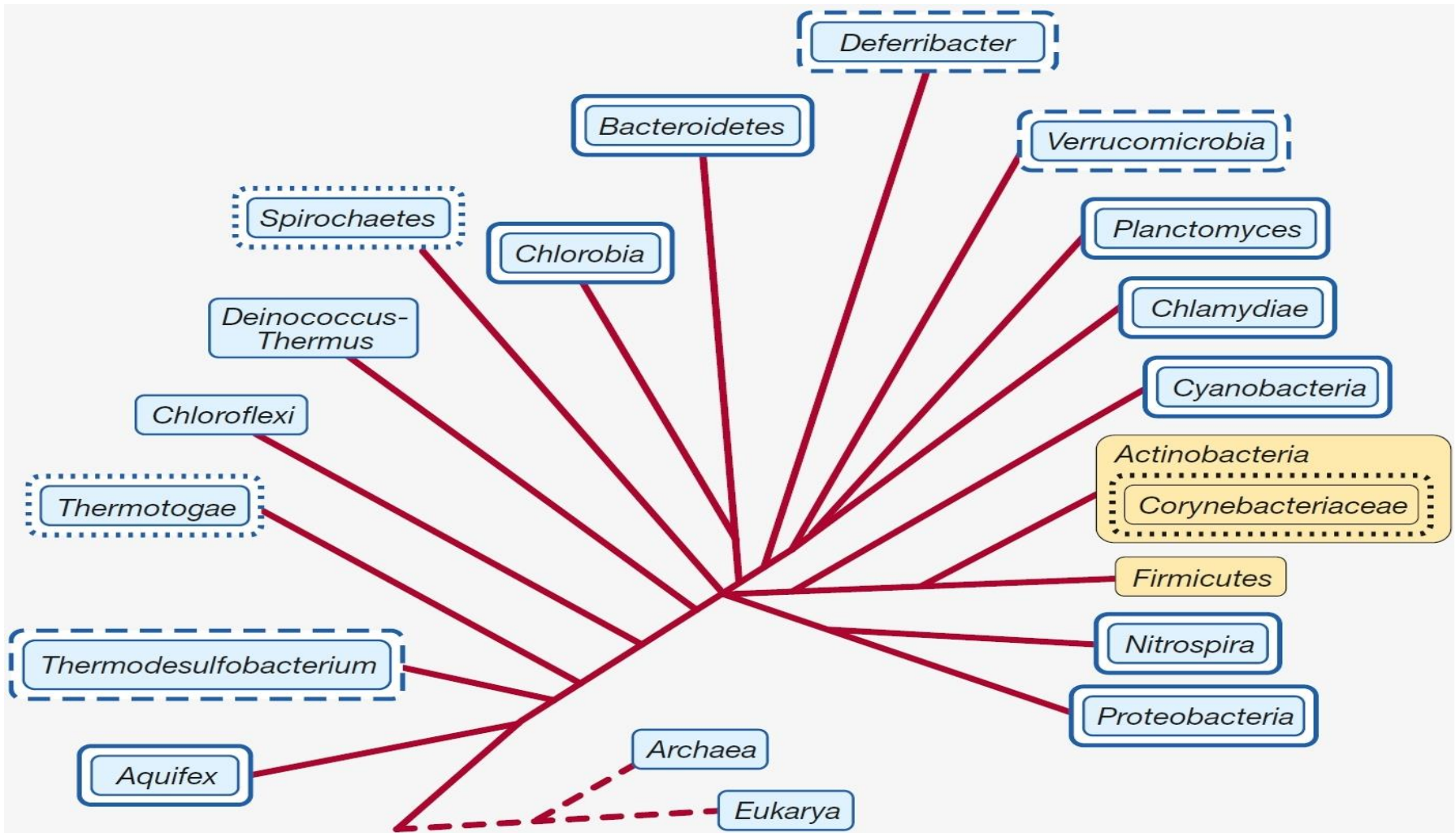


Classificazione più recente suddivide i Batteri in

MONODERMI

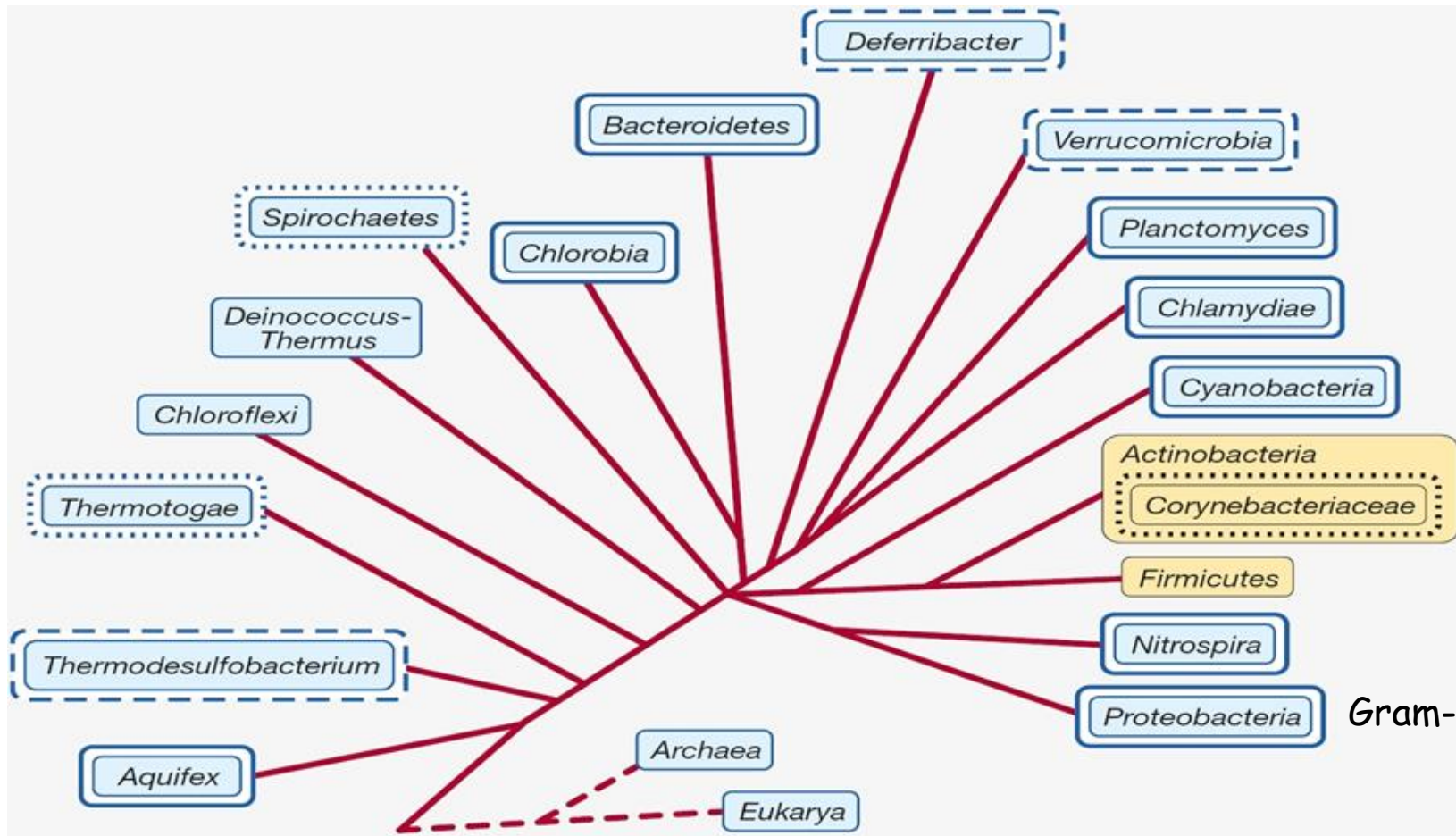
DIDERMI

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.





Gram+

Gram-

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) .....

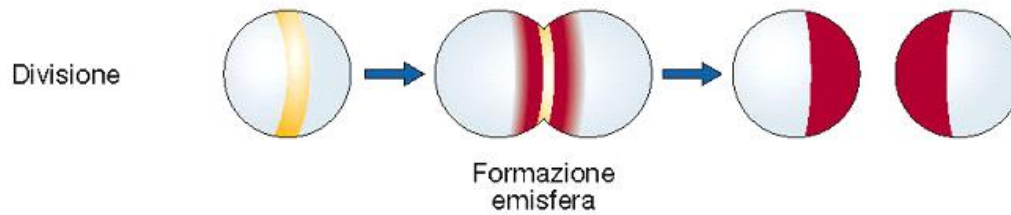
Nei Firmicutes Gram+ trovati batteri didermi con tipo LPS!!!



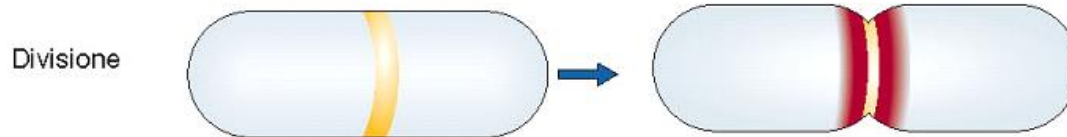
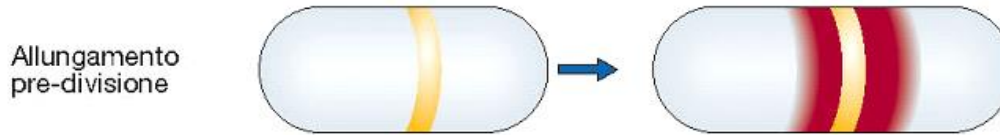
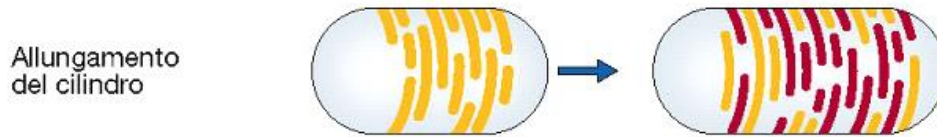
# Biosintesi del Peptidoglicano

- 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**



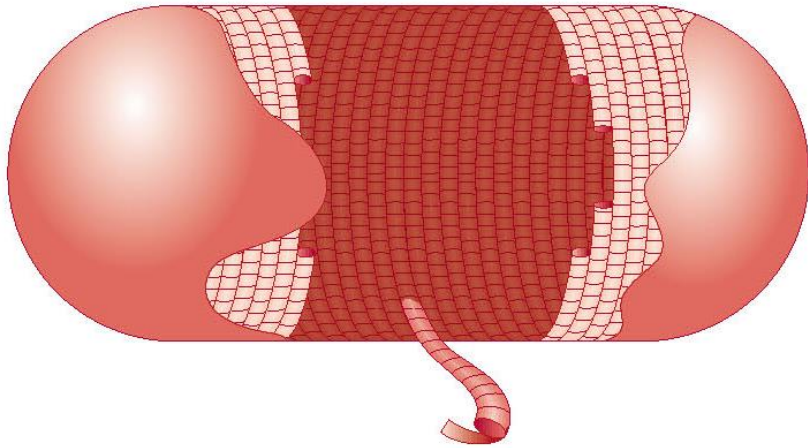
b) **Bastoncelli (comune)**



Quando avviene la sintesi della parete?

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

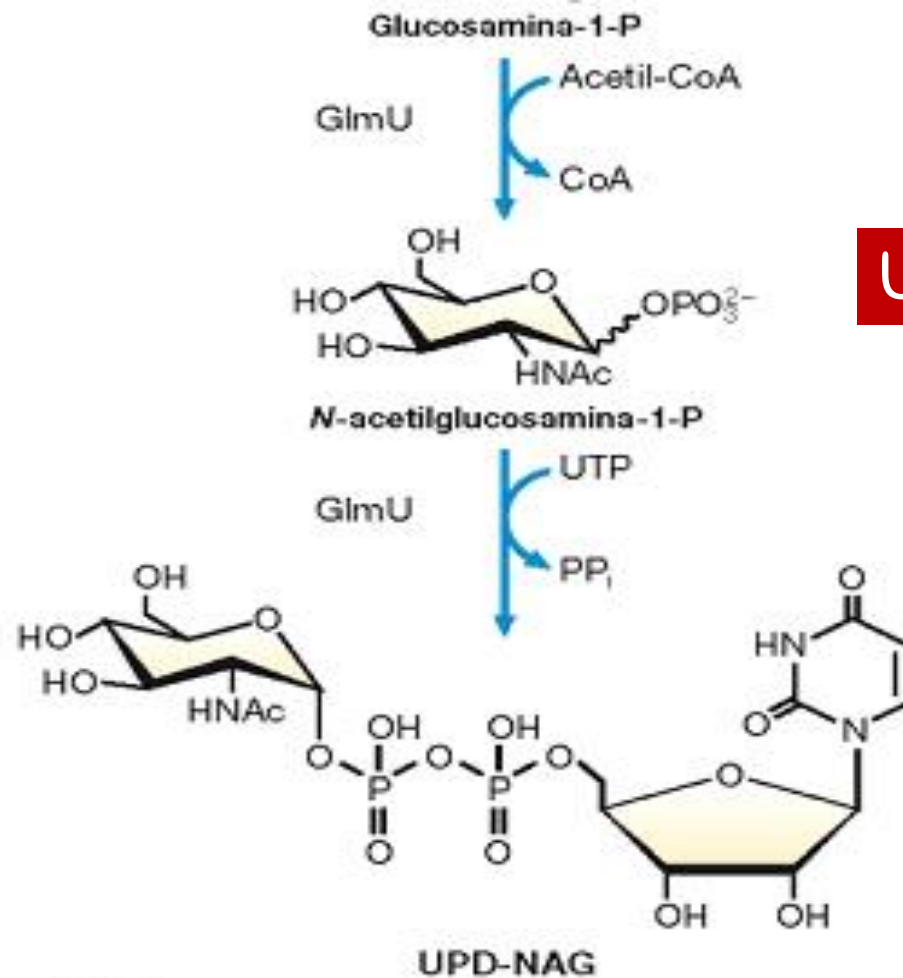
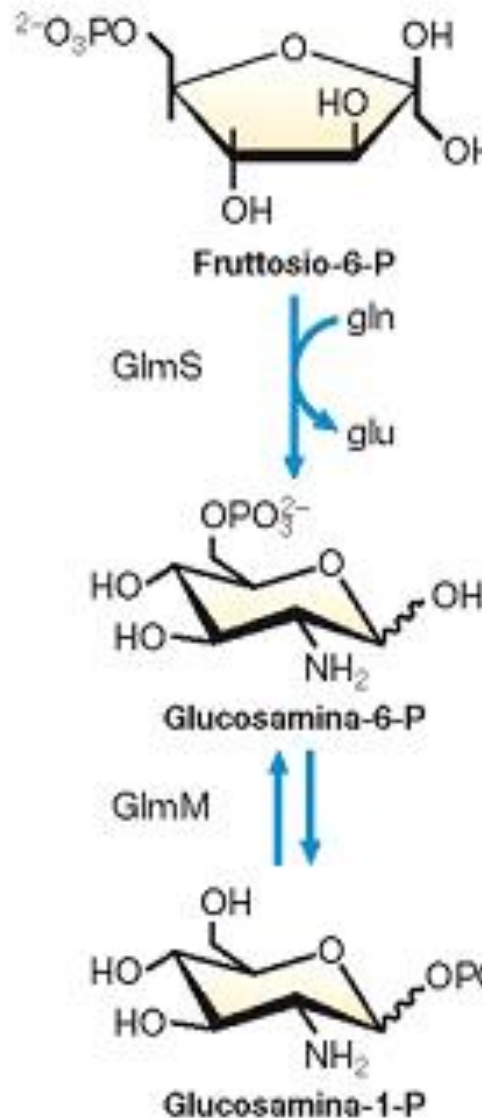
La maggior parte dei batteri bastoncellari può avere 2 fasi di allungamento. la prima è inserimento di monomeri di parete in modo sparso tra i due poli che rimangono inerti. La seconda al momento della divisione FtsZ dipendente intorno all'anello Ftz.



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



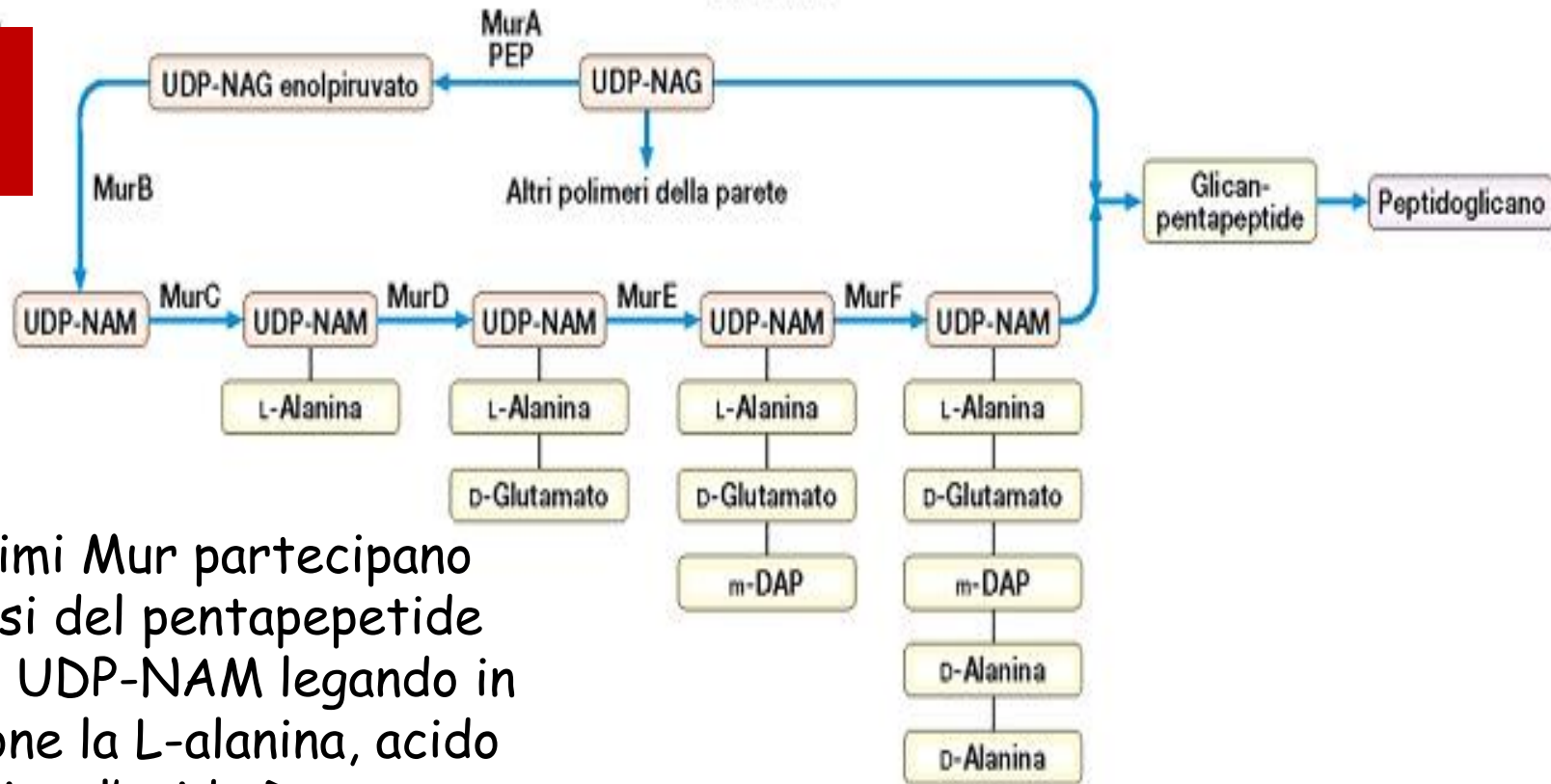
UDP-NAG

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



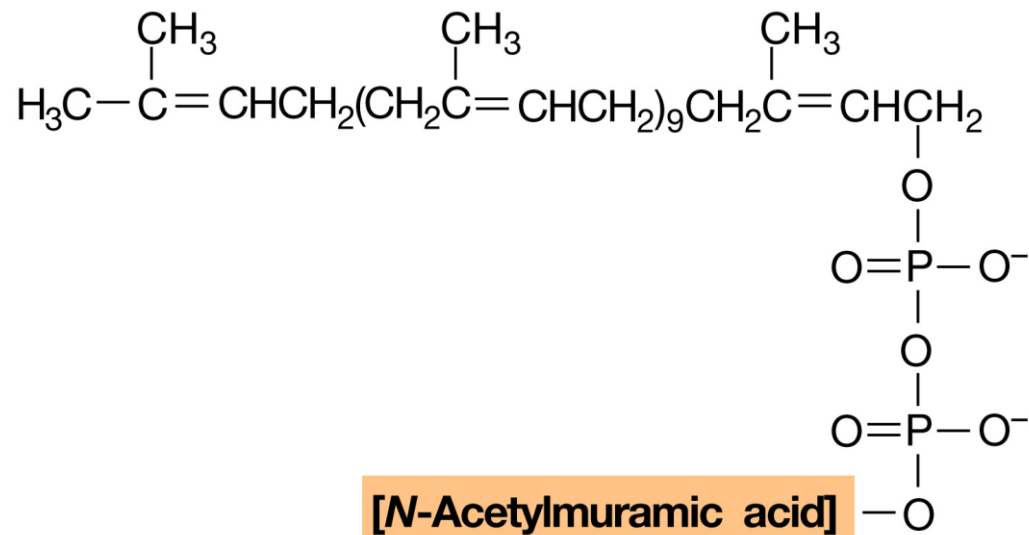
La sintesi dell' UDP-NAM è catalizzata dagli enzimi MurA e MurB a partire dall'UDP-NAG in presenza di fosfoenol piruvato(PEP). Il PEP viene trasferito al UDP-NAG da MurA e successivamente MurB lo trasforma in UDP-NAM. La fosfomicina inibisce MurA.

UDP-  
NAM



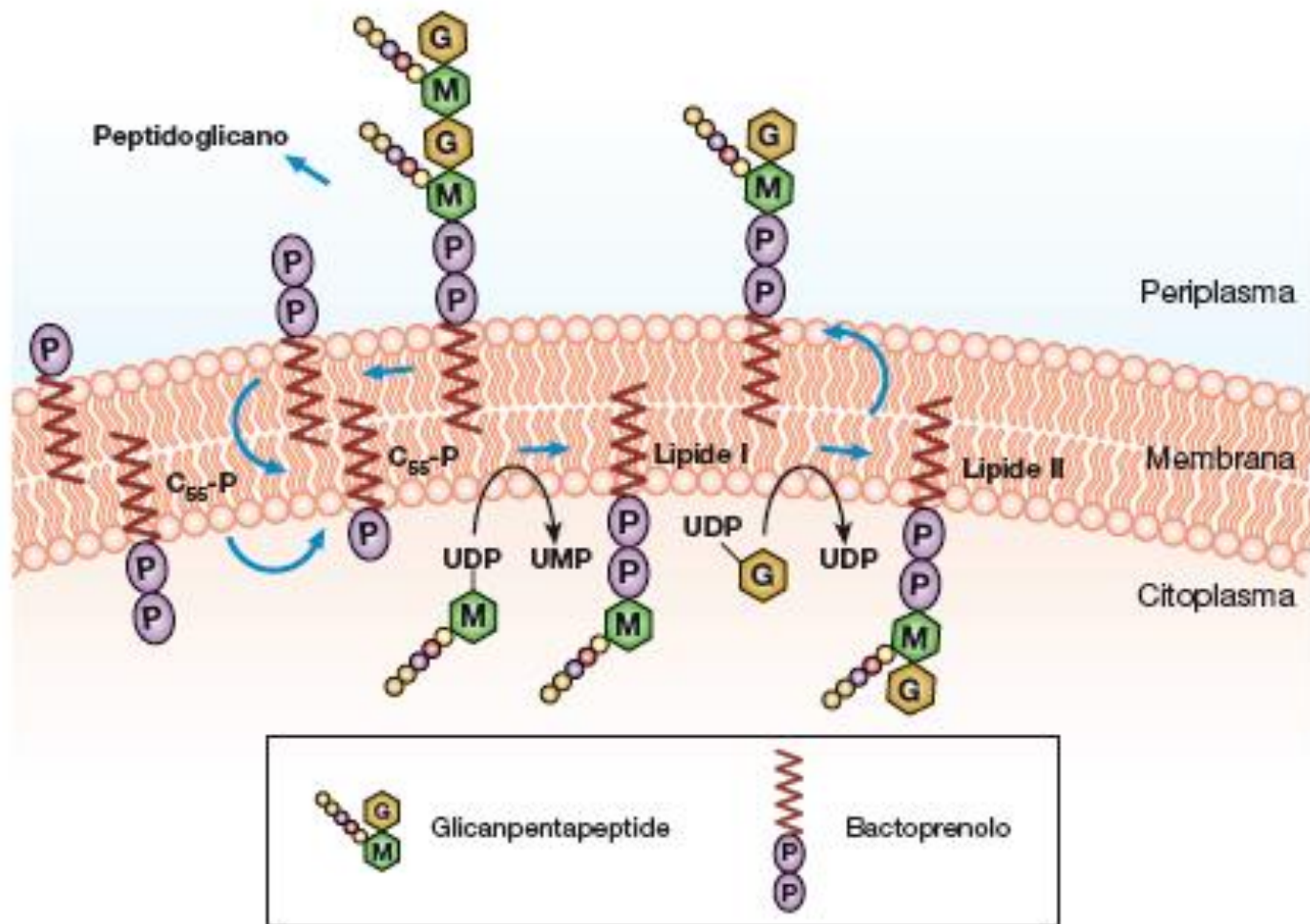
Altri enzimi Mur partecipano alla sintesi del pentapeptide. Legato al UDP-NAM legando in successione la L-alanina, acido D-glutamico, l'acido D-aminopimelico o lisina mentre le ultime 2 D-alanine vengono aggiunte insieme.

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

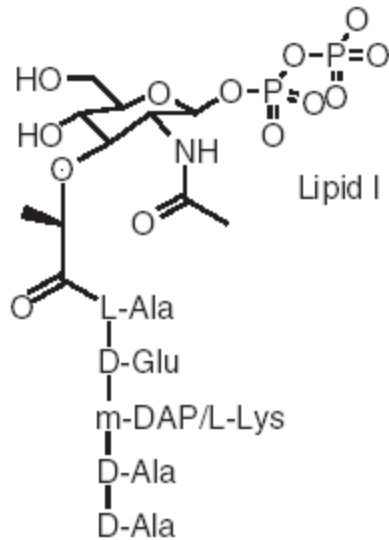
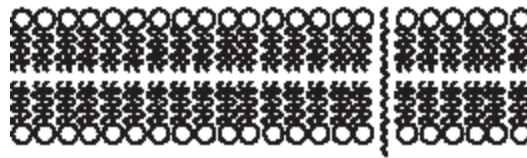


Bactoprenolo è un alcol a 55 atomi di C fortemente idrofobico che lega il precursore del peptidoglicano costituito da NAM-NAG e pentapetide.

# Fasi della biosintesi del peptidoglicano

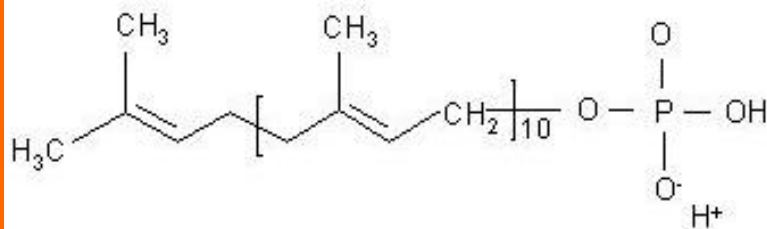


- Il bactoprenolo raggiunto il periplasma interagisce con gli enzimi che intervengono nell'inserzione dei precursori nel punto di crescita e nella catalisi dei legami glicosidici



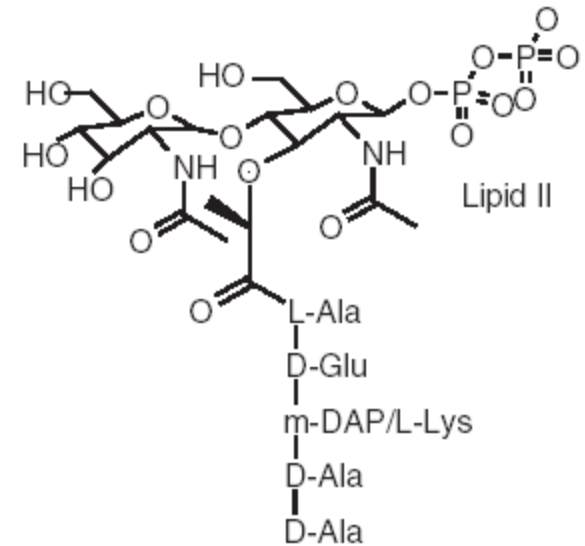
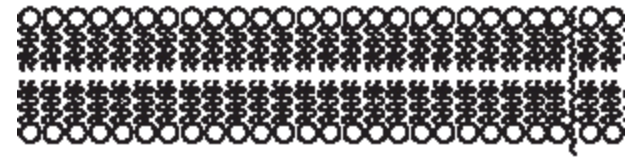
**LIPIDE I**

## Bactoprenolo



**-UMP**

**+UDP-NAG**



**LIPIDE II**

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).

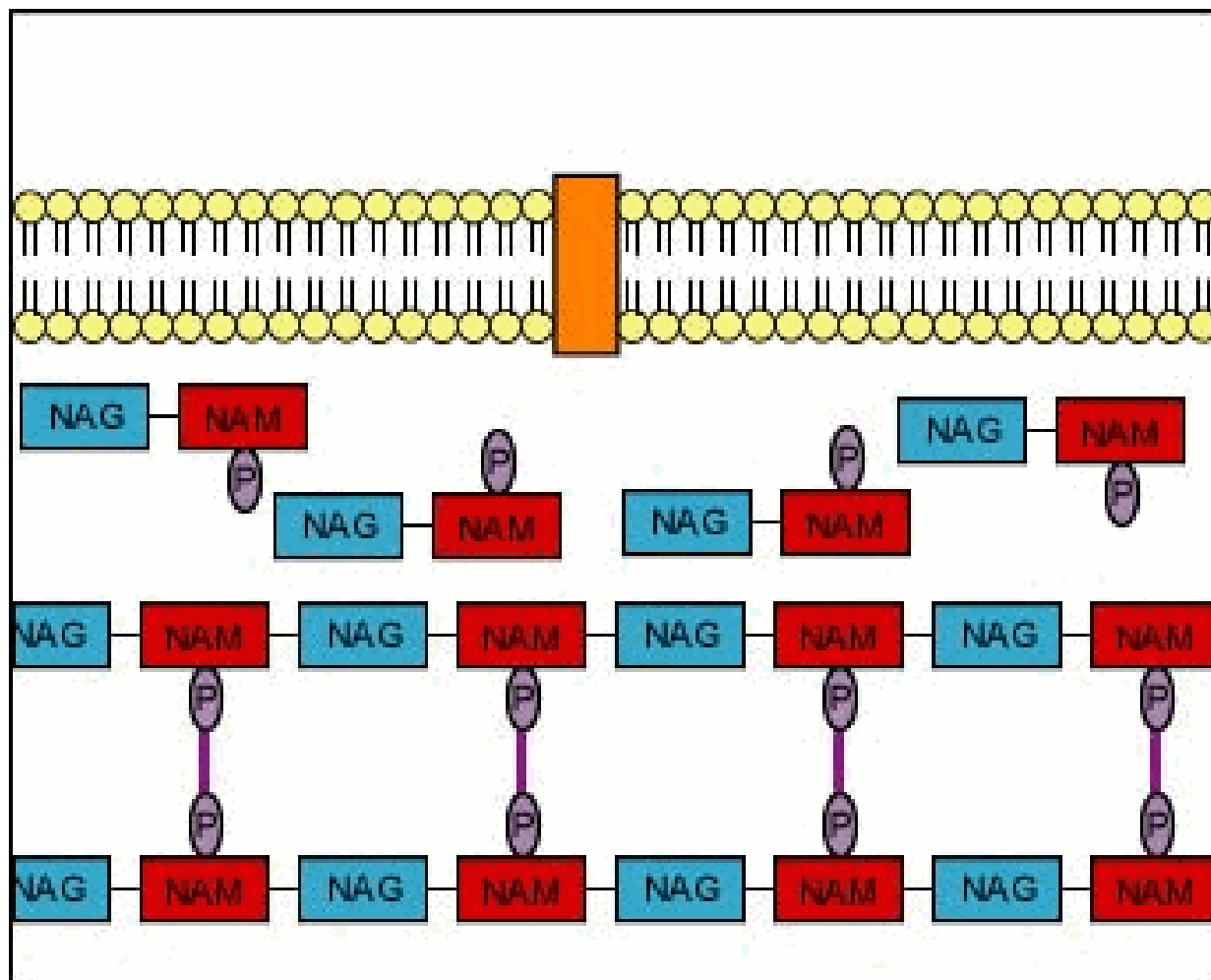
## Lipide II

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.

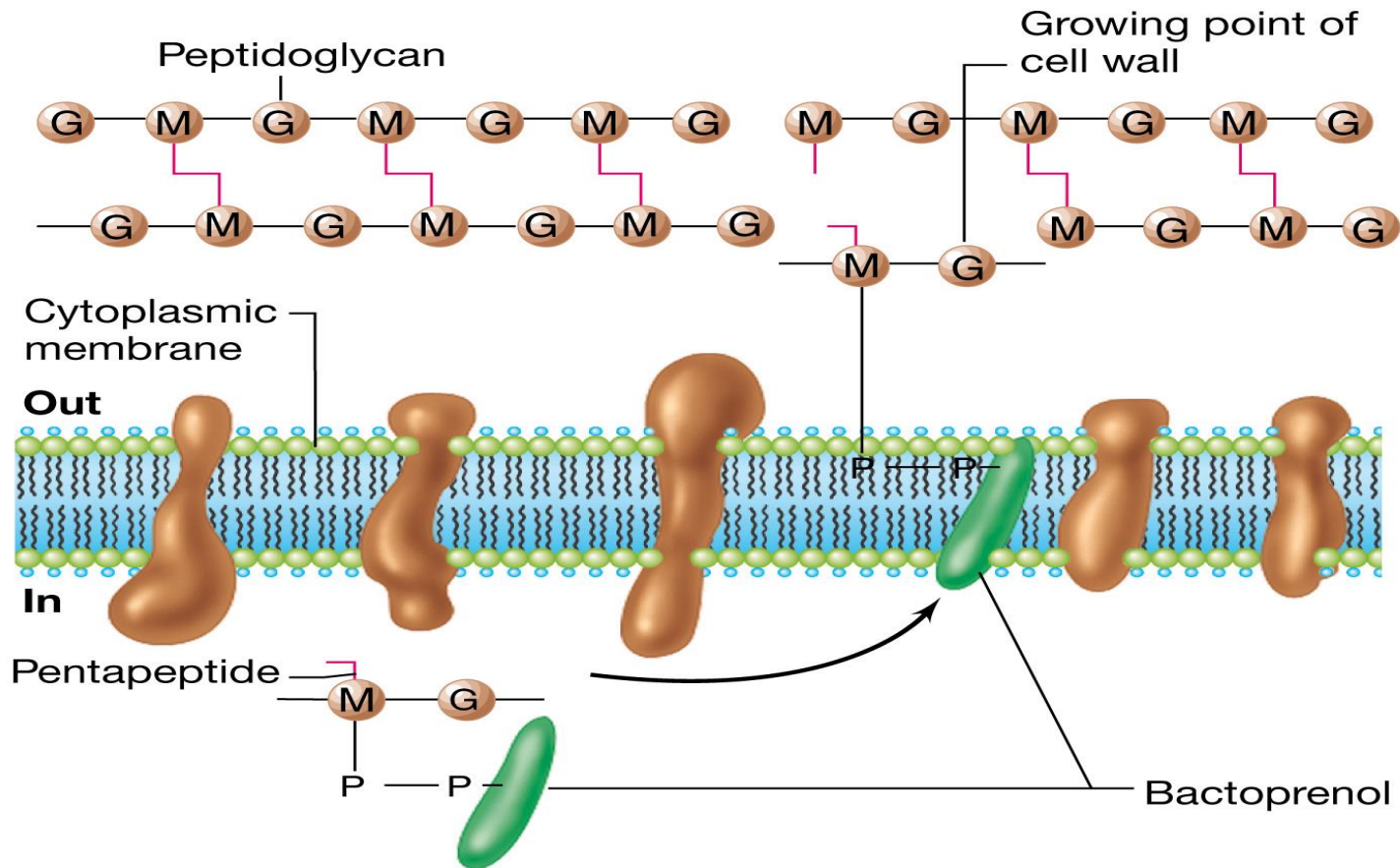
La bacitracina inibisce questa tappa impedendo la defosforilazione del bactoprenolo priorfosfato.

# Processo di incorporazione delle nuove unità nel peptidoglicano



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

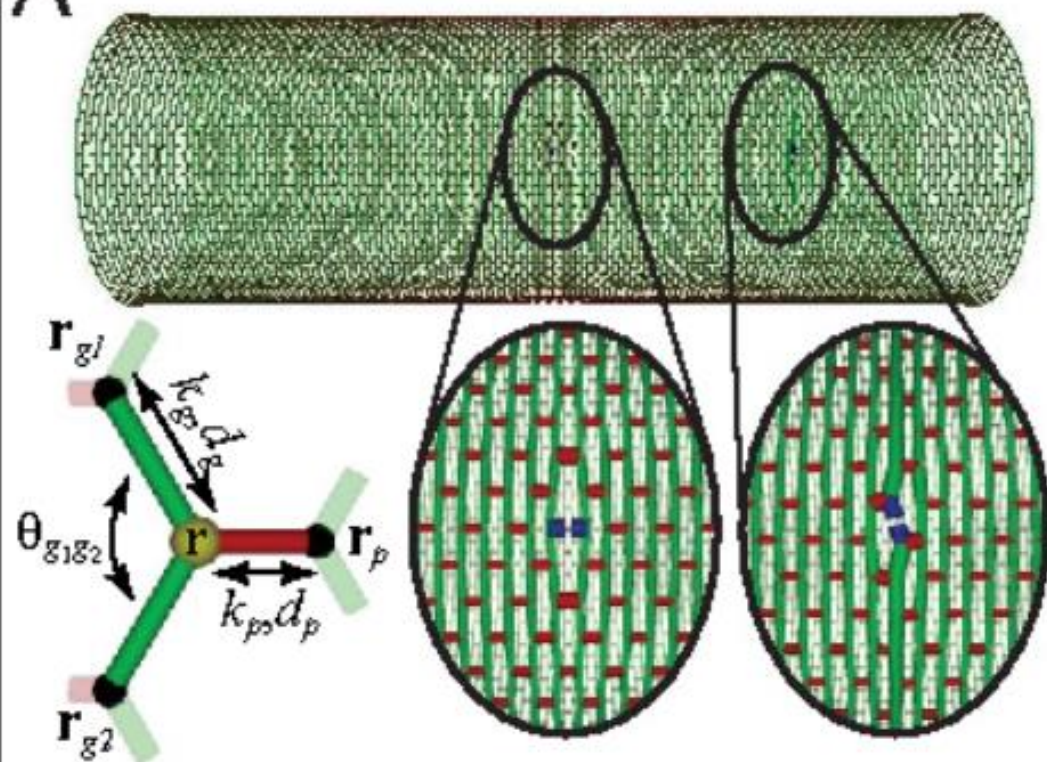
- Autolisina
- PBPs



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

A





## PBP (Penicillin Binding Protein)

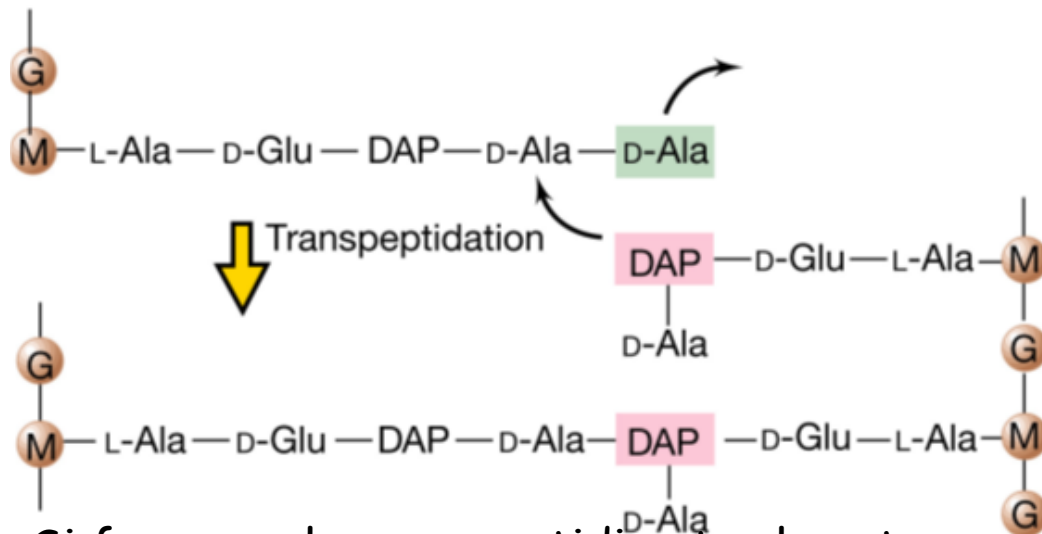
Sono gli enzimi responsabili della reazione di trans-peptidazione tra i residui peptidici dei NAM.

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

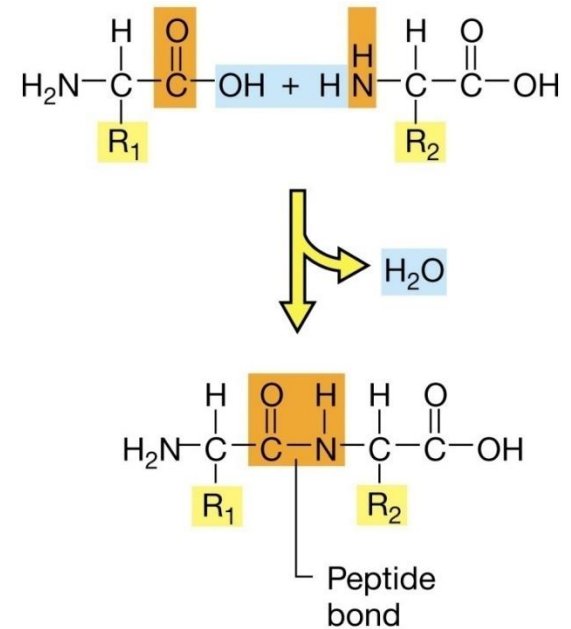
In generale ne sono state identificate molte e sono state suddivise in due famiglie: HMWPBP (~ 80 kDa) e LMWPBP (~ 30 kDa) ...

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

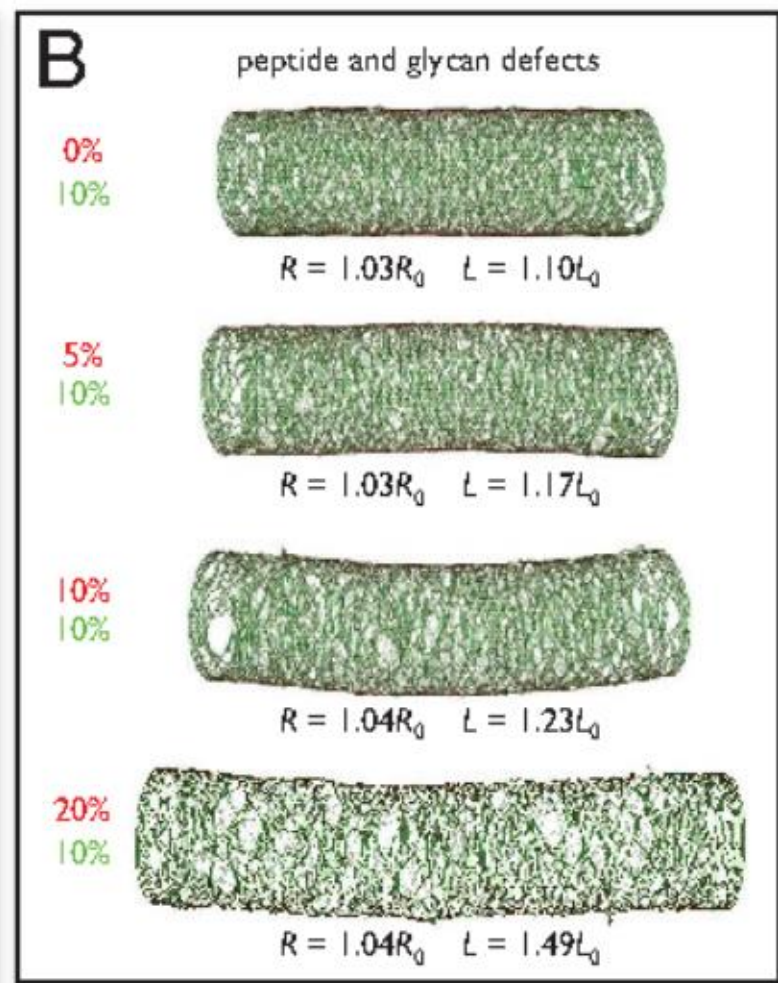
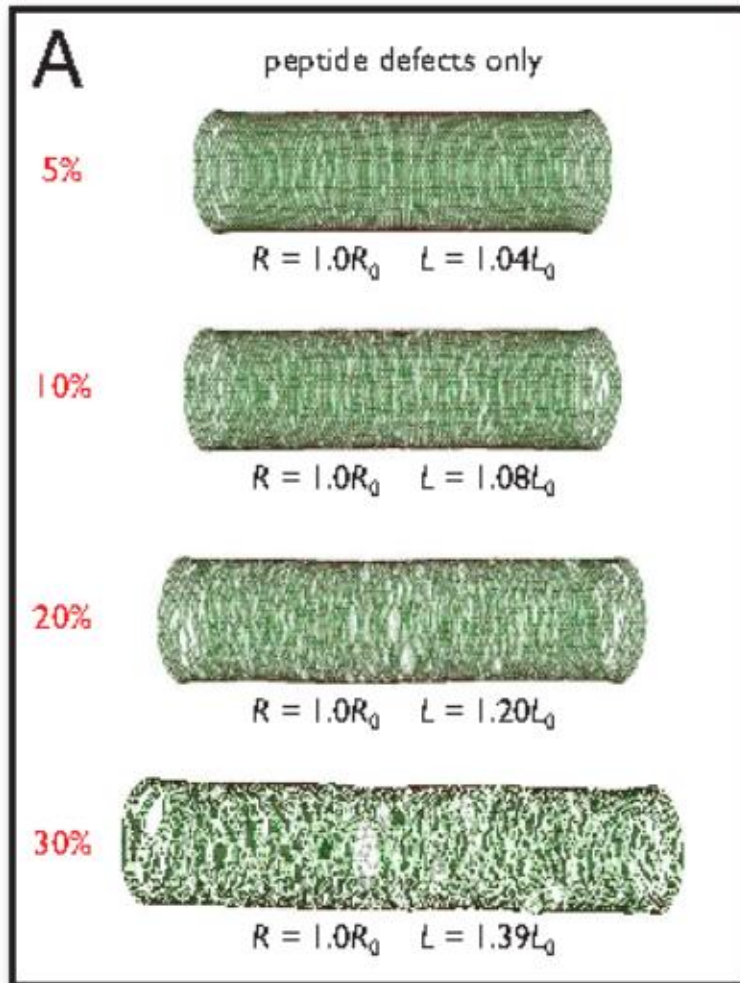
L'ultima tappa della sintesi del peptidoglicano è la **transpeptidazione** ovvero la formazione di un legame peptidico tra due AA delle catene peptidiche



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

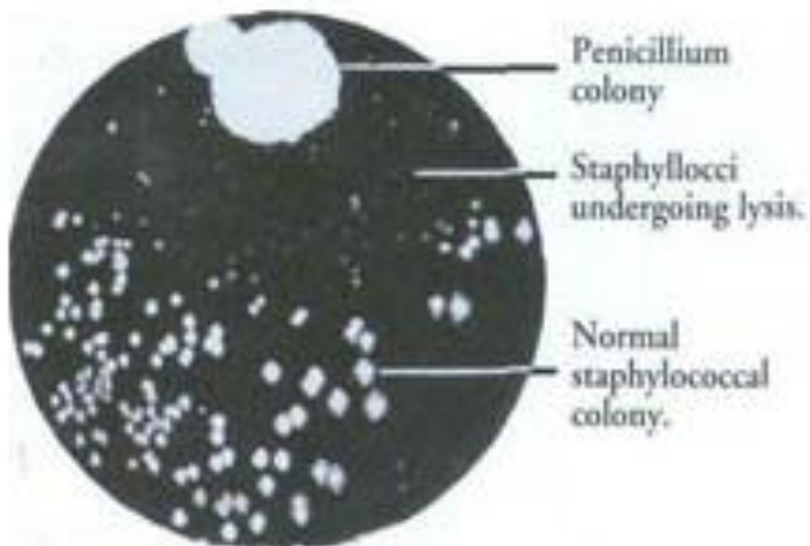
sostanze antimicrobiche naturali prodotte da molti funghi e batteri, attive contro altri microrganismi in quanto ne inibiscono la crescita o ne provocano la morte.

# La PENICILLINA

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



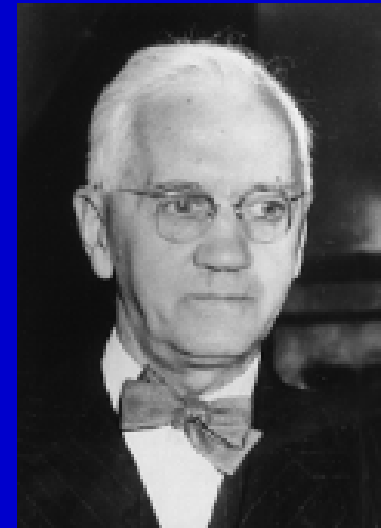
# The Golden Age of Antibiotics

		Discovery	Introduction
1930	1929	Penicillin	
	1932	Sulphonamides	
1940	1939	Gramicidin	
	1942		Penicillin
	1943	Streptomycin & Bacitracin	
	1945	Cephalosporins	
	1947	Chloramphenicol & Chlorotetracycline	
	1949	Neomycin	
1950	1948	Trimethoprim	
		Oxytetracycline	
	1952	Erythromycin	
	1956	Vancomycin	
	1957	Kanamycin	
1960			Methicillin
	1961	Nalidixic acid	Ampicillin
	1963	Gentamicin	
	1964		Cephalosporins
	1966		Doxycycline
	1967	Clindamycin	
	1968		Trimethoprim
1970	1971	Tobramycin	
	1972	Cephameycins & 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

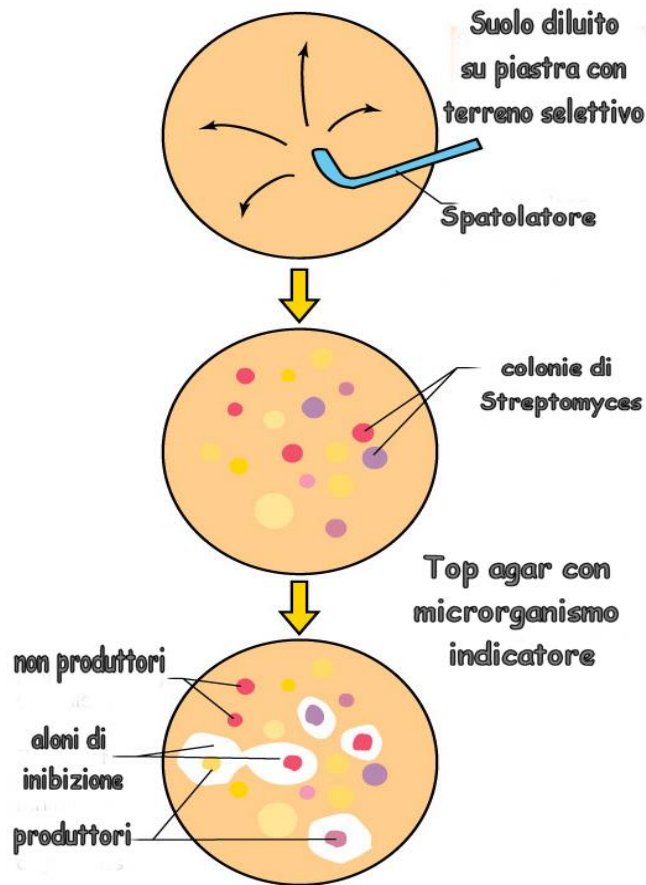
- Selman Waksman - Streptomycin (1943)

- 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



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

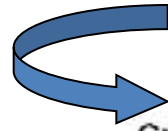


M. T. Madigan

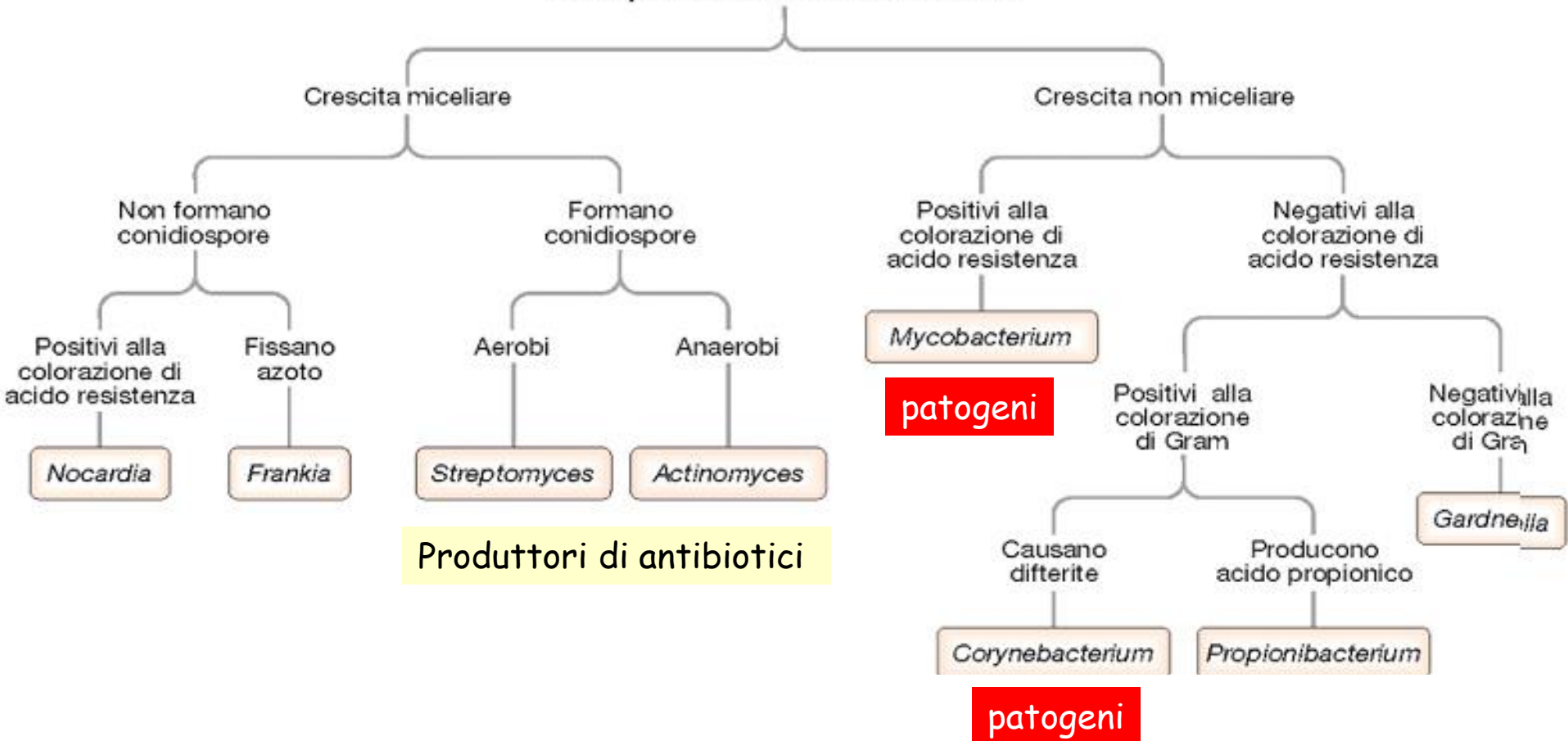
(a)



# Actinobacteria



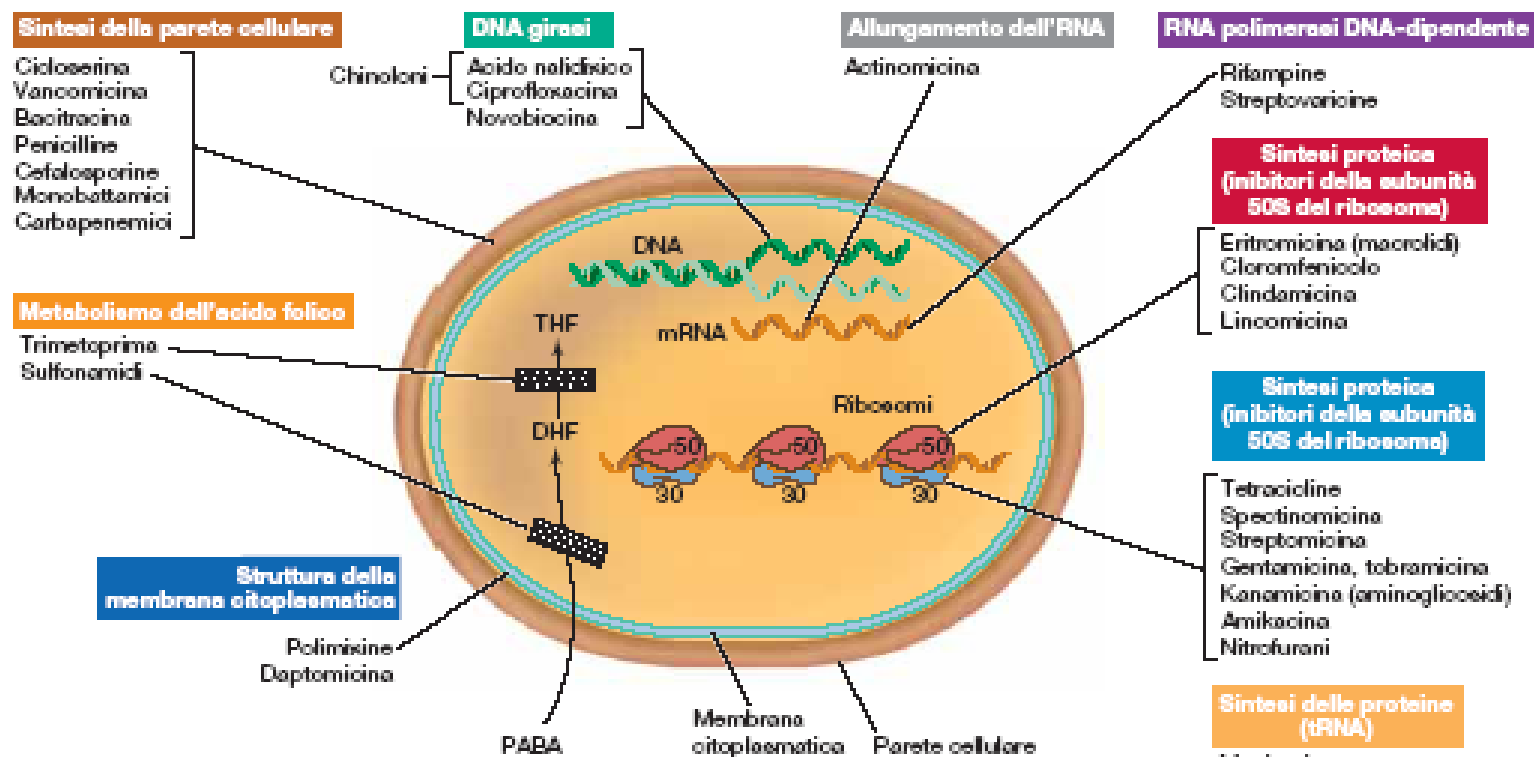
Gram positivi ad alto contenuto in GC



# Antibiotici sintetizzati da Streptomyces

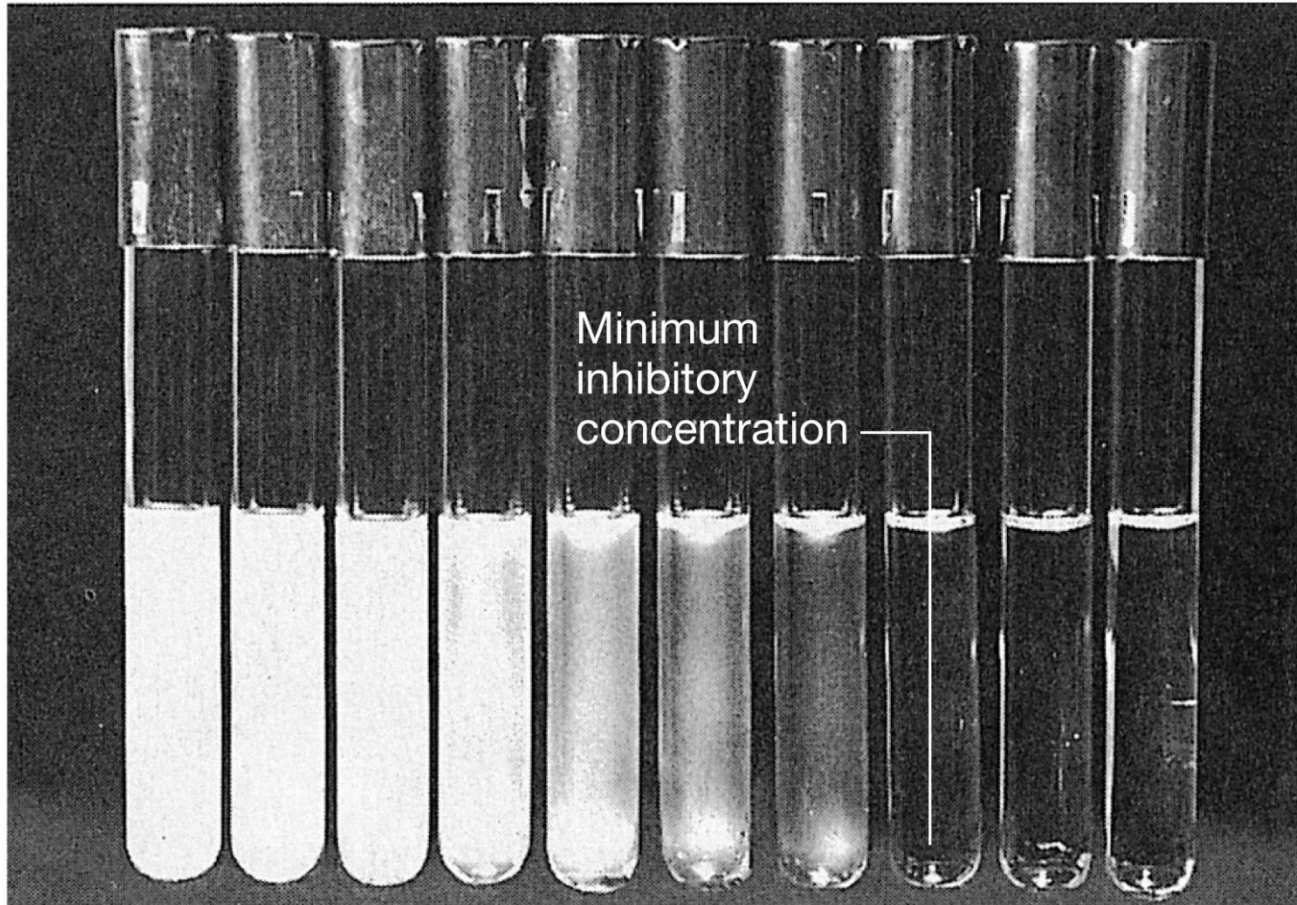
Classe chimica	Nome	Attivo contro:
Aminoglicosidici:	Streptomicina	Batteri Gram-
	Spectinomina	M.tuberculosis, N.gonorrhoeae
	Neomicina	Ampio spettro, tossico
Tetracicline	Tetraciclina	Ampio spettro Gram-, Gram+, e rickettsie, clamidie, Mycoplasma
	Clorotetraciclina	
Macrolidi	Eritromicina	Gram+, Legionella
	Clindamicina	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, diidrofollato; 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:

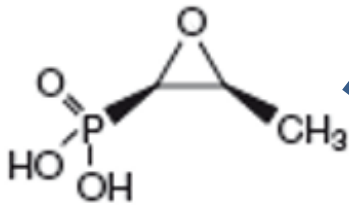
la fosfomicina inibisce l'enzima MurA responsabile della biosintesi del UDP-NAM ....

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



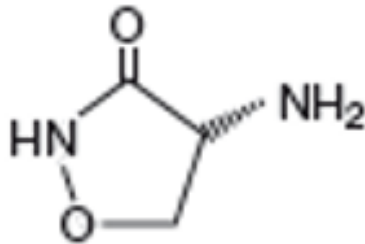
a) Fosfomicina



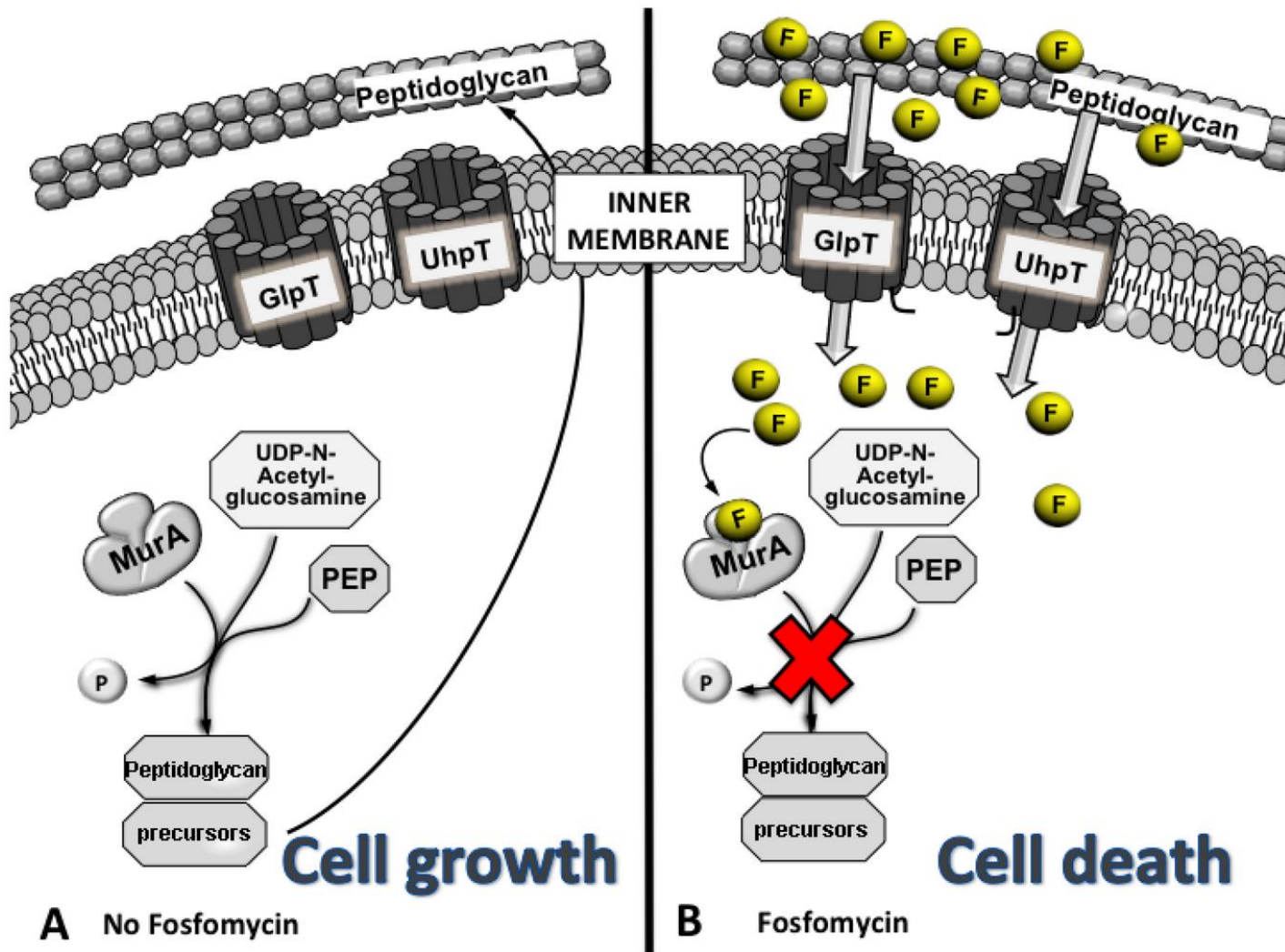
**Fosfomicina:** analogo strutturale del fosfoenolpiruvato e si lega all'enzima fosfoenolpiruvasi che catalizza la reazione di condensazione con UDP-N acetilglucosamina per formare enoilN-acetilglucosamina precursore

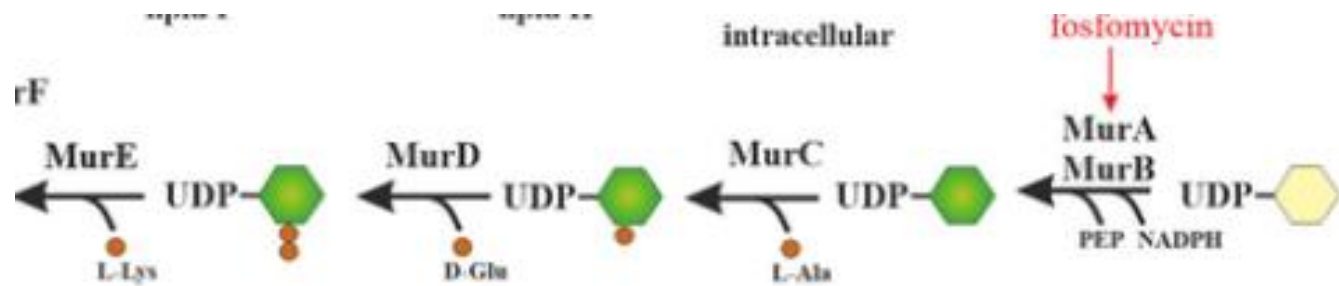


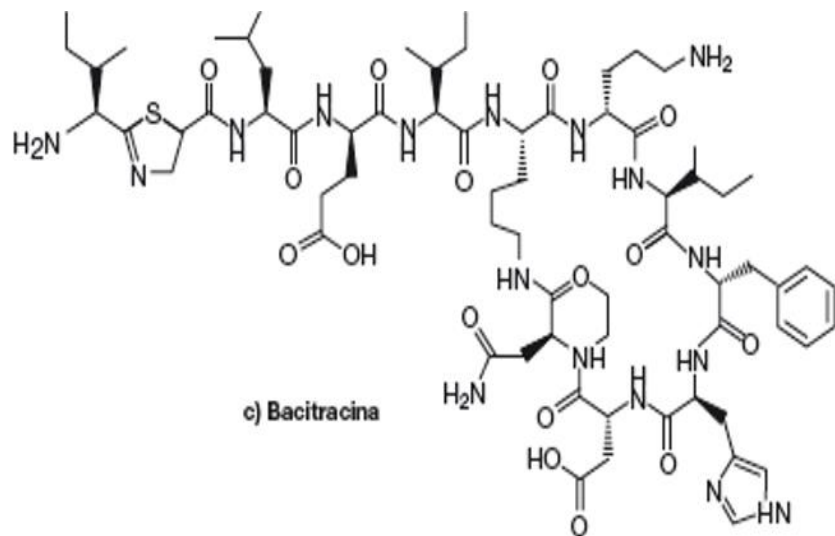
b) Cicloserina



**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.

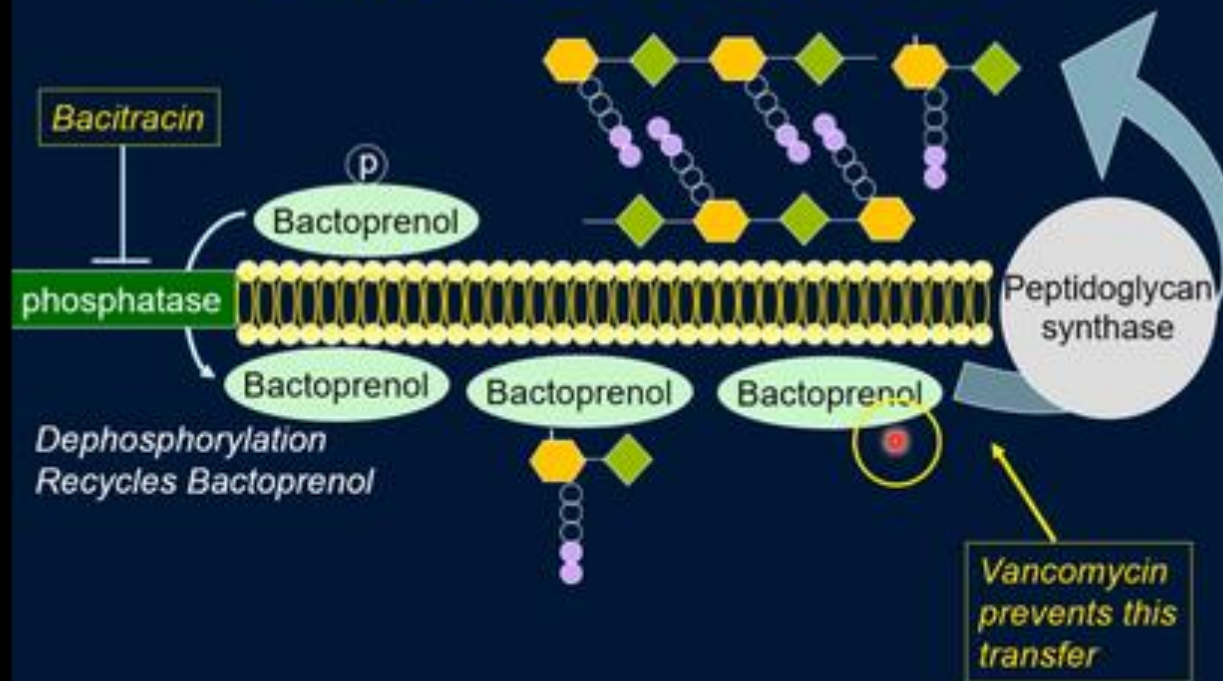




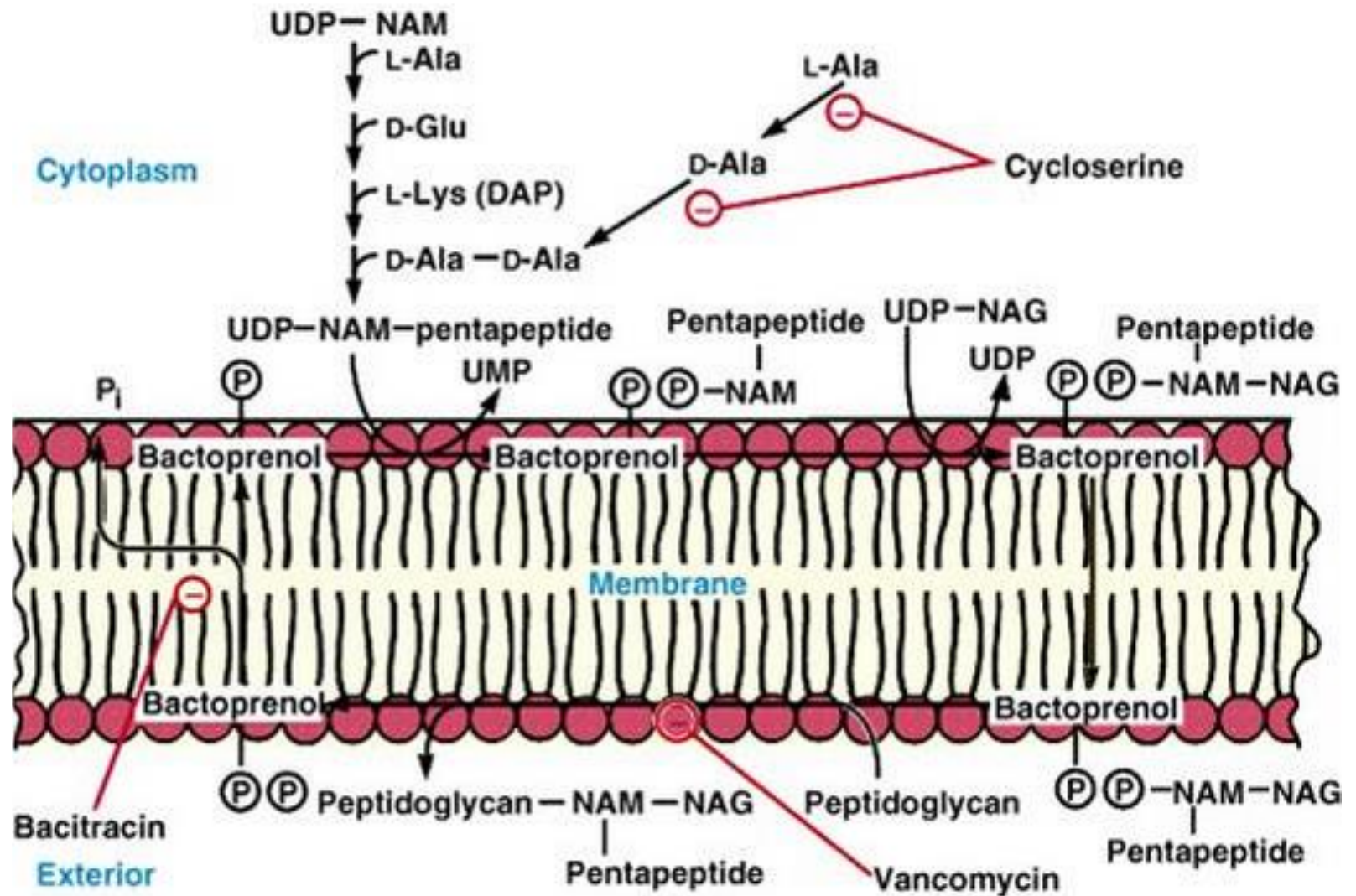


La bacitracina è un antibiotico polipeptidico che si lega al bactoprenolo interferendo con la defosforilazione del bactoprenolo pirofosfato, impedendo la traslocazione di unità di PG dal citoplasma all'esterno. Nella forma pirofosfato il bactoprenolo non è attivo (attivo solo se monofosfato)

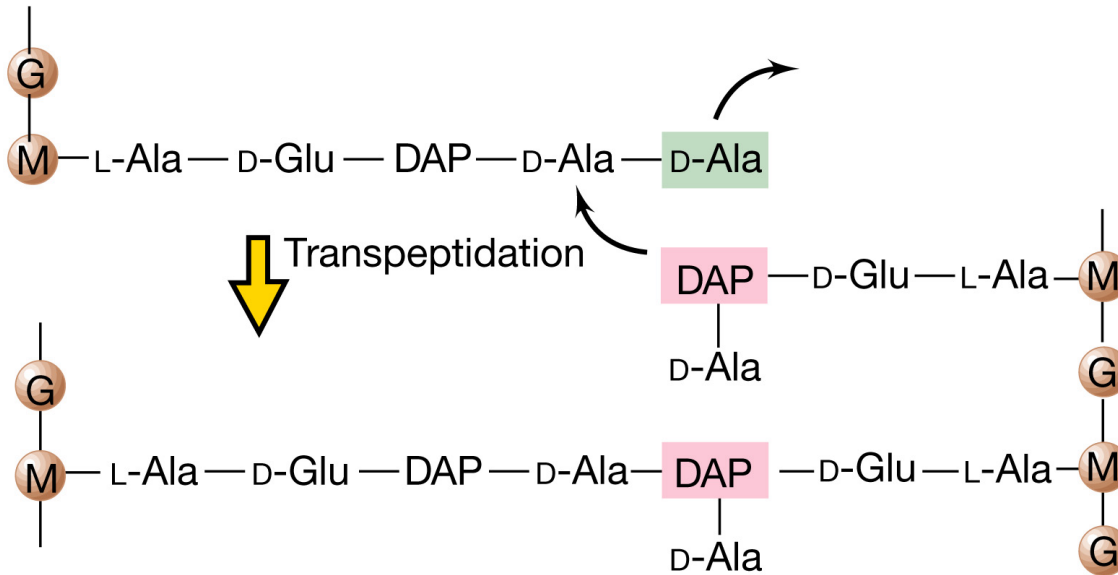
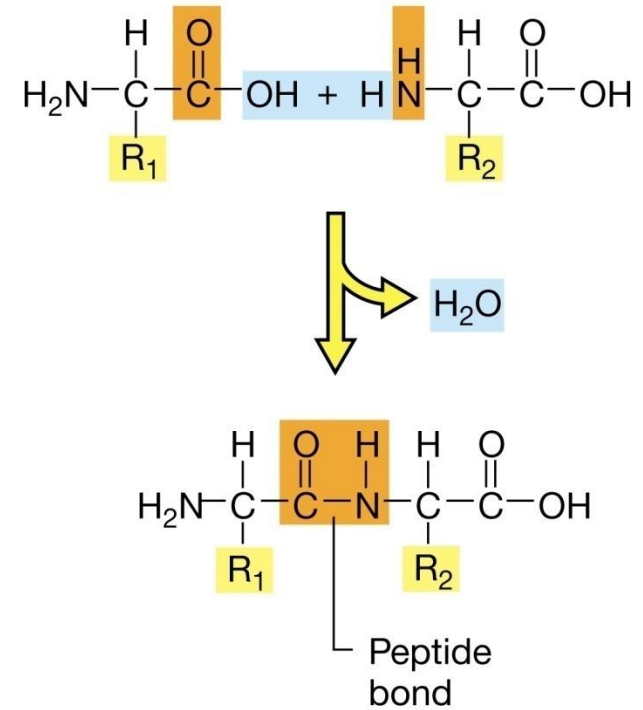
## Stage 2: Elongation and Transfer

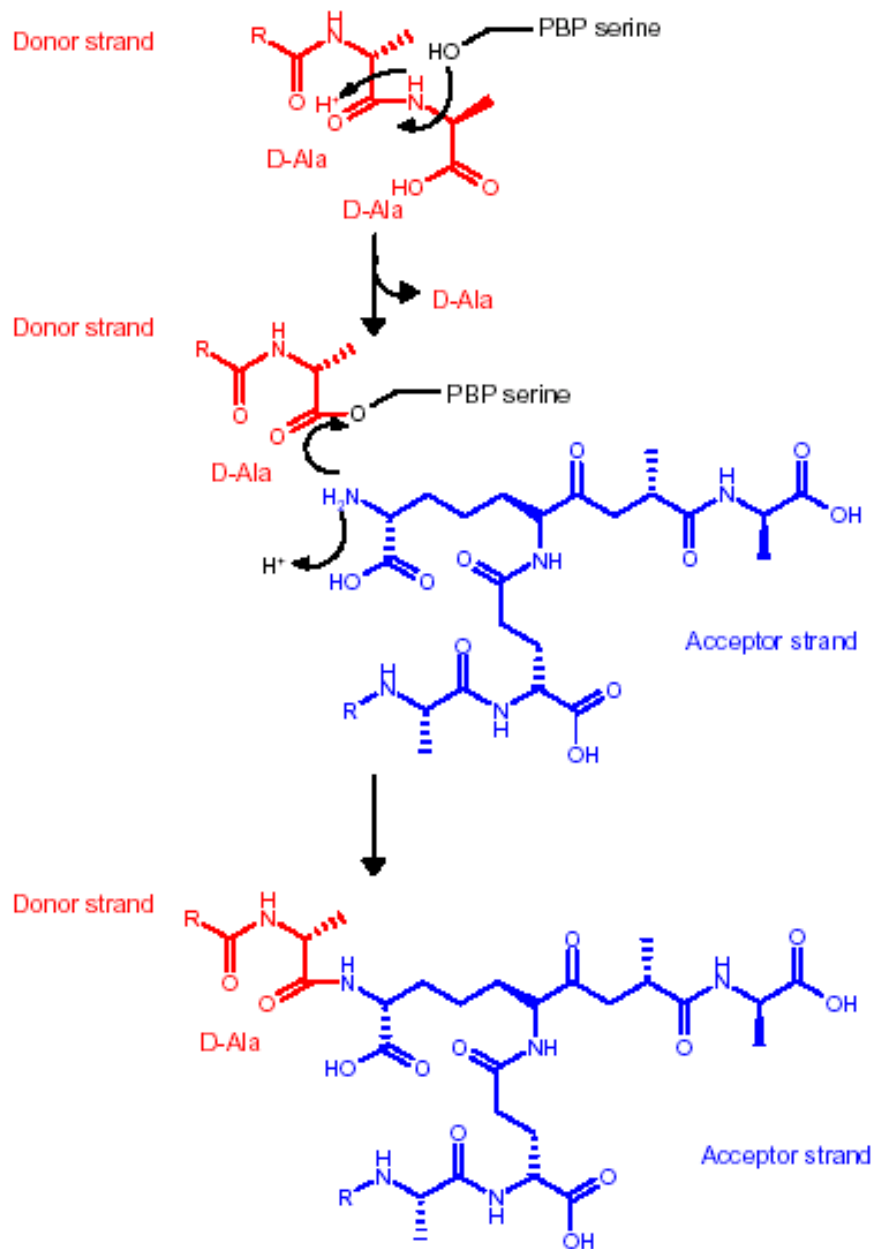






L'ultima tappa della sintesi del peptidoglicano è la **transpeptidazione** ovvero la formazione di un legame peptidico tra due AA delle catene peptidiche





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 transpeptidasi 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

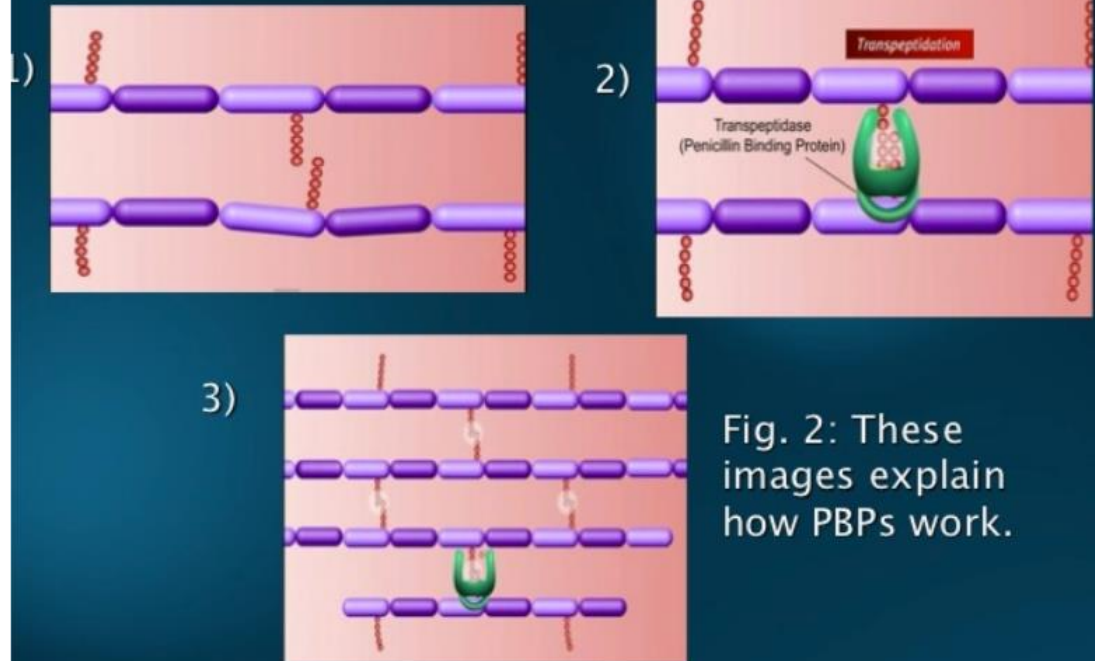


Fig. 2: These images explain how PBPs work.

<http://www.youtube.com/watch?v=qBdYnRhWcQ>

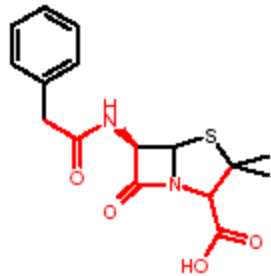
**Questa fase della sintesi del peptidoglicano prevede l'esistenza di almeno due classi di antibiotici in grado di inibire la reazione di transpeptidazione:**

- I  $\beta$ -lattamici (pennicilline)**
- I glicopeptidi (Vancomicina)**

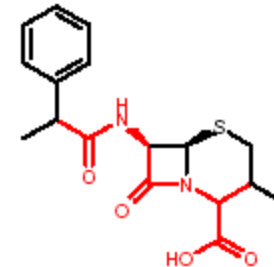
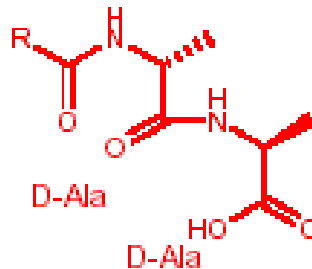
**Queste due classi di antibiotici agiscono in maniera differente....**

**I  $\beta$ -lattamici sono dotati di una struttura che richiama quella presentata dal dimero di D-Ala..**

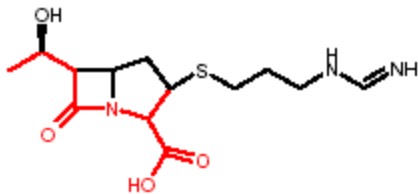
**In questo modo essi possono legarsi al sito attivo delle PBP ed impedirne il funzionamento**



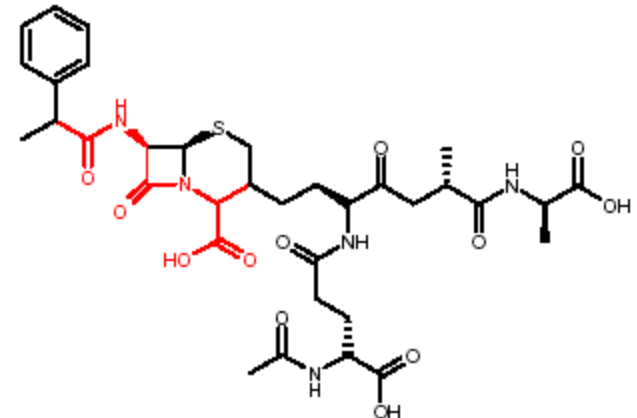
**Penicillina G**



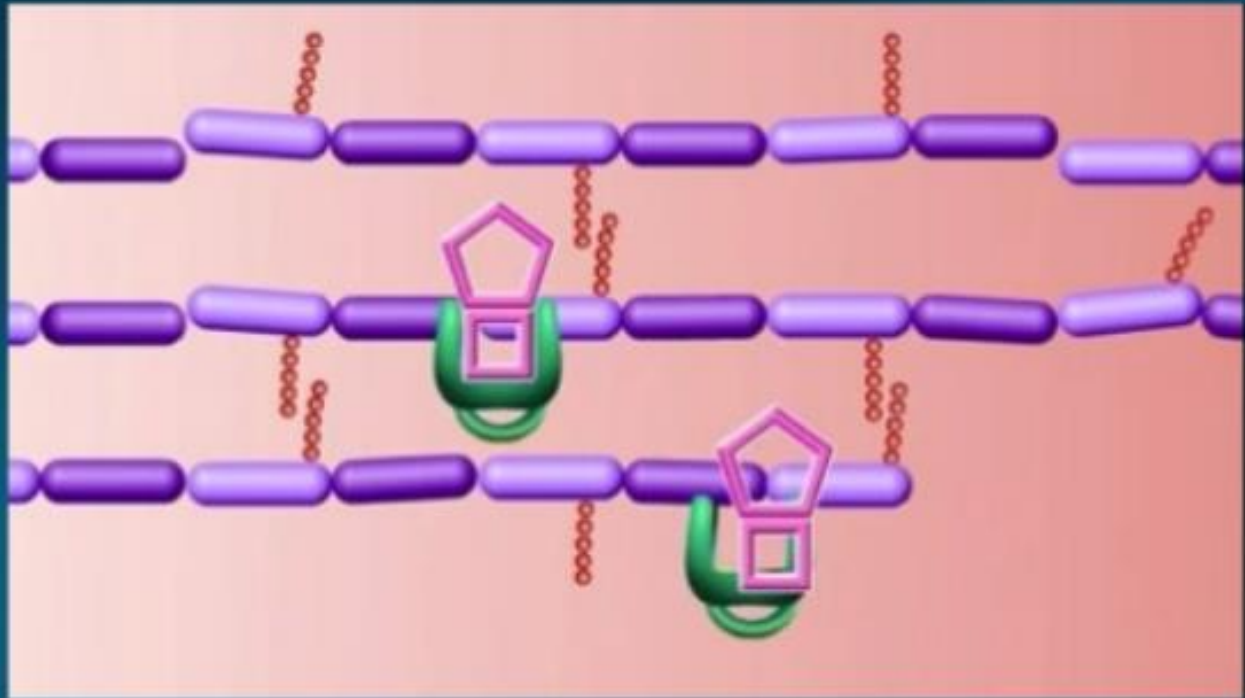
**Cefalosporine**



**Carbapenem Imipenem**





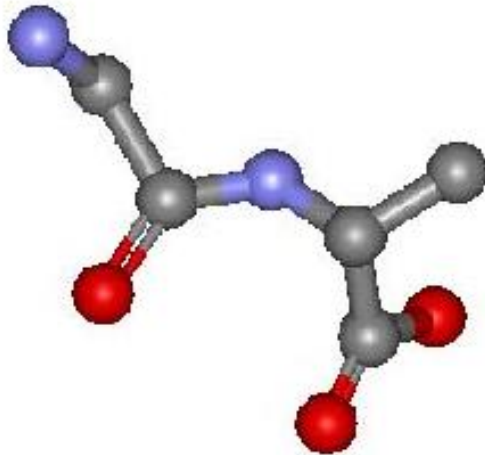


<http://www.youtube.com/watch?v=qBdYnRhDWcQ>

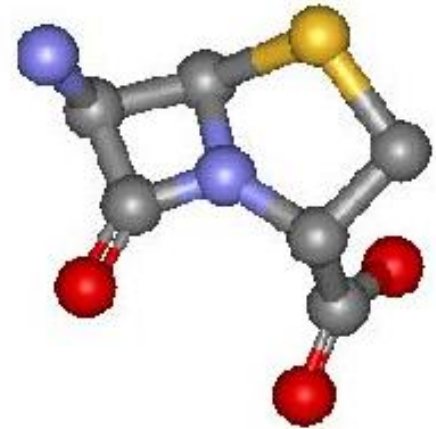
Fig. 4: Explains how  
beta-lactam antibiotics  
work

## Omologia strutturale tra

2 D-ALANINA

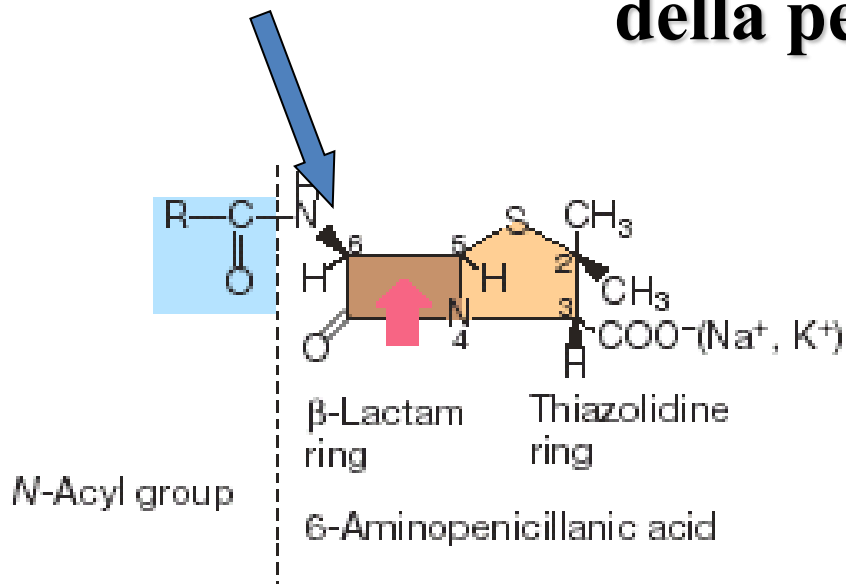


PENICILLINA



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

# I $\beta$ -lattamici più importanti sono i derivati della penicillina G



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

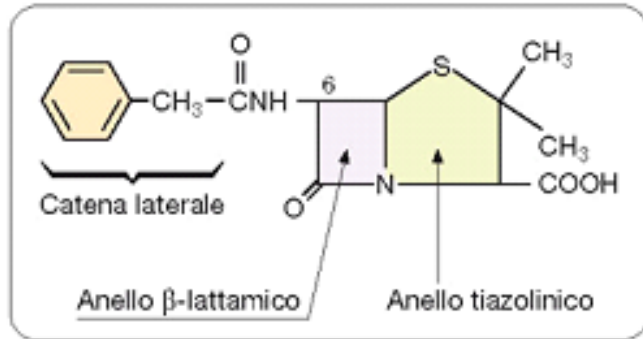
La penicillina G è prodotta da *Penicillium crysogenum* attiva su Gram+.

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

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

# LE PENICILLINE

a)

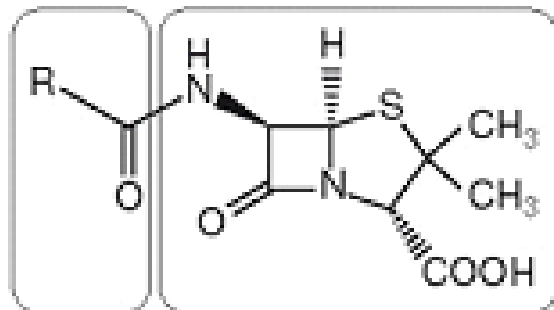


Penicillina

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

b) Gruppo delle penicilline

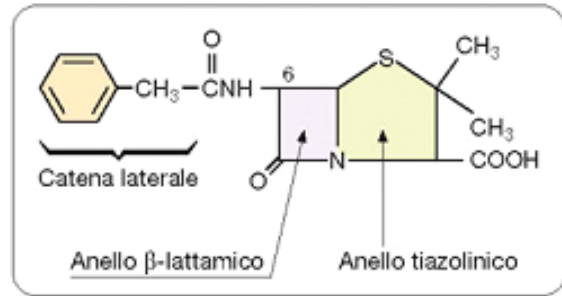
Gruppo N-acile



Acido 6-aminopenicillanico

Gruppo N-acile	Designazione
<chem>c1ccccc1CC(=O)N</chem>	Penicillina G
<chem>COc1ccccc1C(=O)N</chem>	Meticillina
<chem>CC1OC(=O)N1c2ccccc2</chem>	Oxacillina
<chem>Nc1ccccc1CC(=O)N</chem>	Ampicillina

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

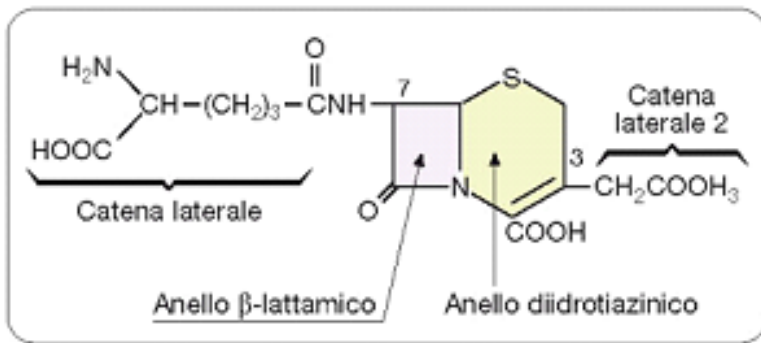


Penicillina

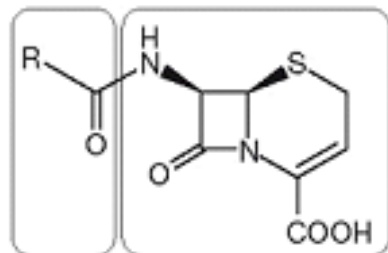
Dalla cefalosporina C derivano tutte le cefalosporine con spettro sempre più ampio.

Contengono acido 7-aminocefalosporanico costituito da

**anello B-lattamico**  
**anello diidrotiazinico**



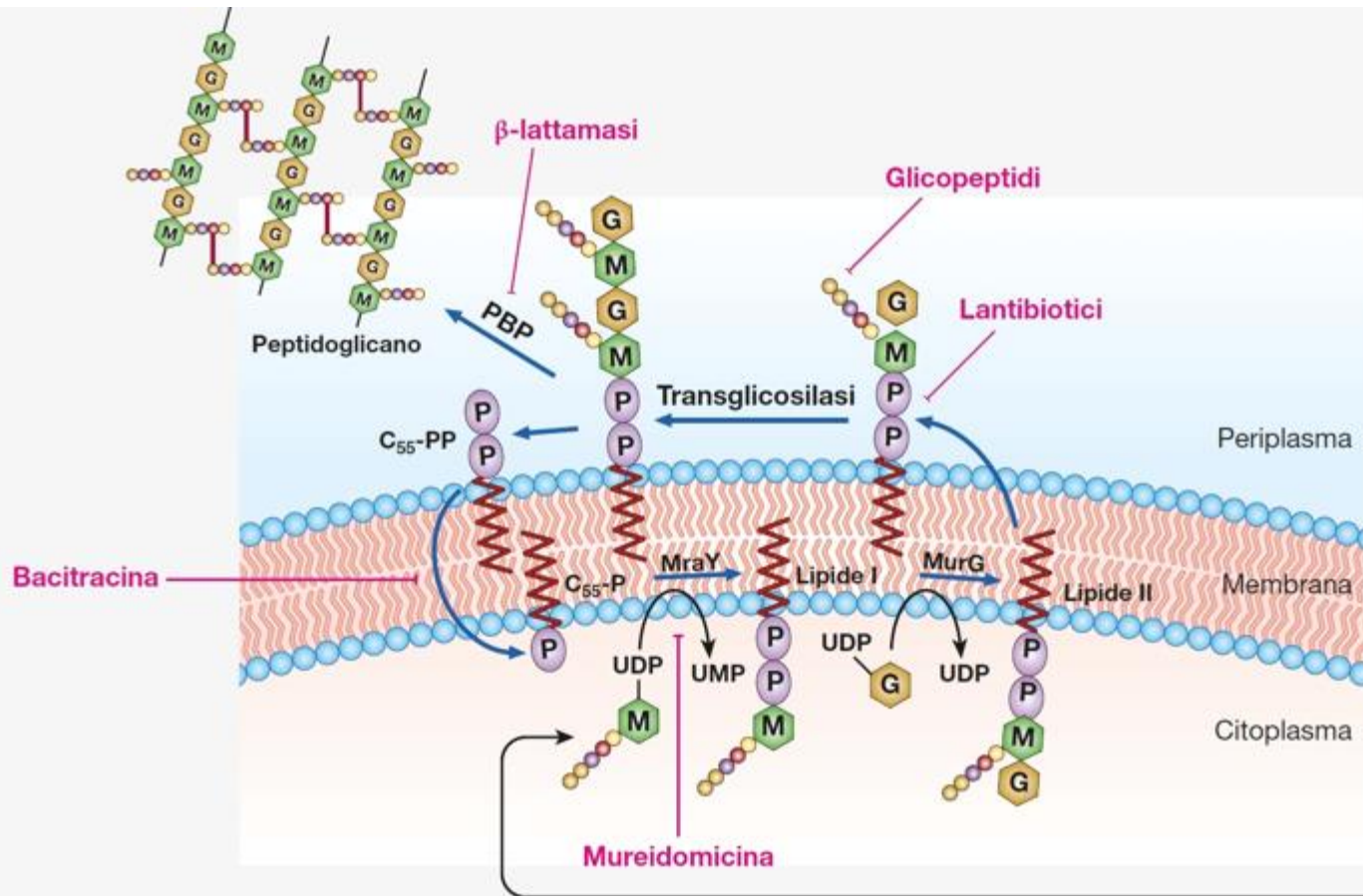
Cefalosporina



Acido 7-aminocefalosporanico

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*.

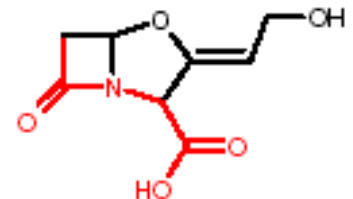




**I meccanismi di resistenza agli antibiotici  $\beta$ -lattamici sono di tre tipi:**

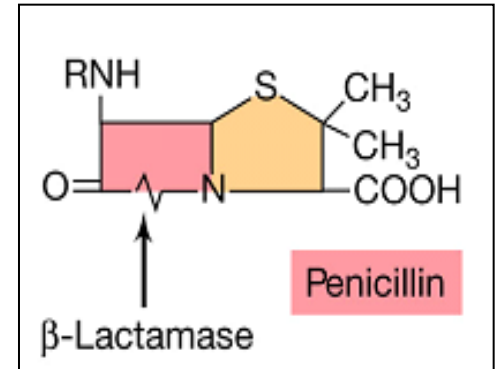
- **Modificazione della permeabilità**
- **Mutazione del sito attivo della PBP inibita**
- **Sintesi da parte del batterio di una  $\beta$ -lattamasi**

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

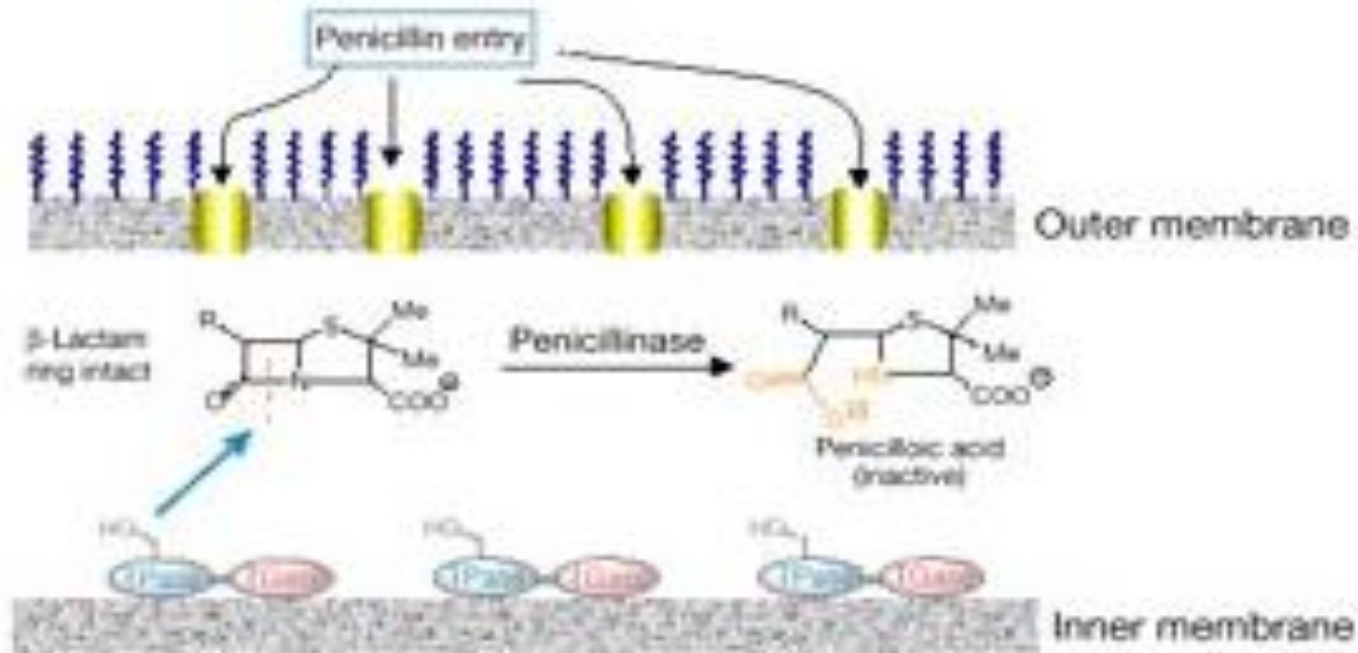


# 1. Modificazione dell'antibiotico che diviene inattivo

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

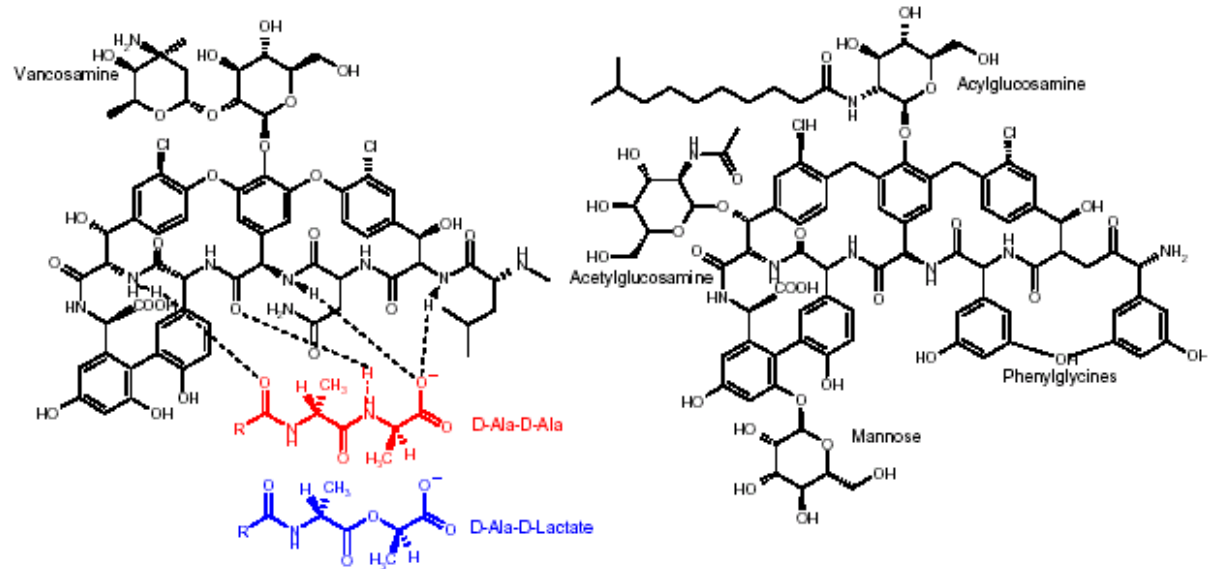


b

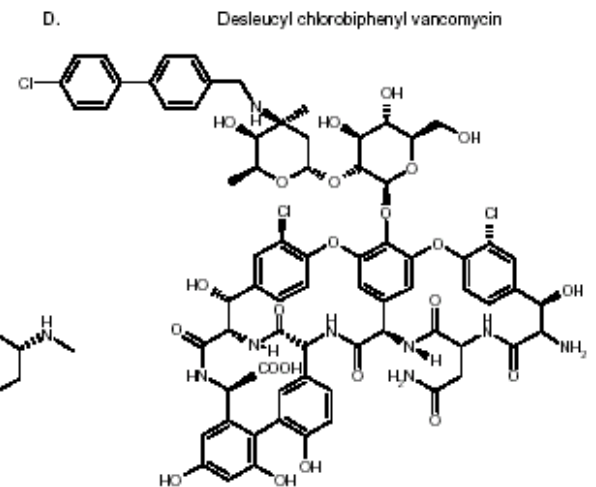
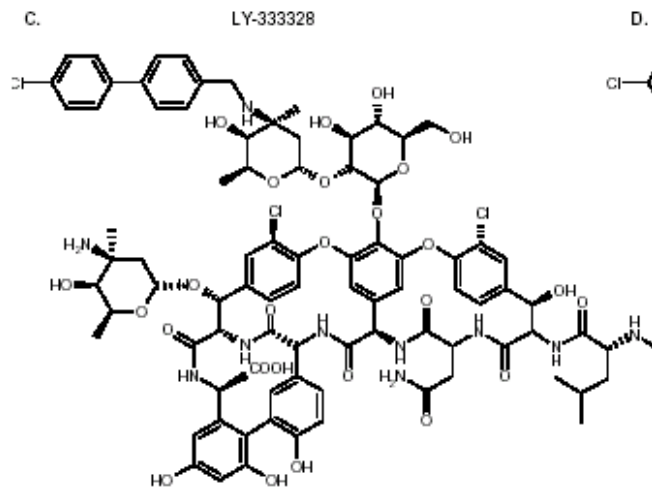


# I glicopeptidi come la Vancomicina hanno un meccanismo di azione differente....

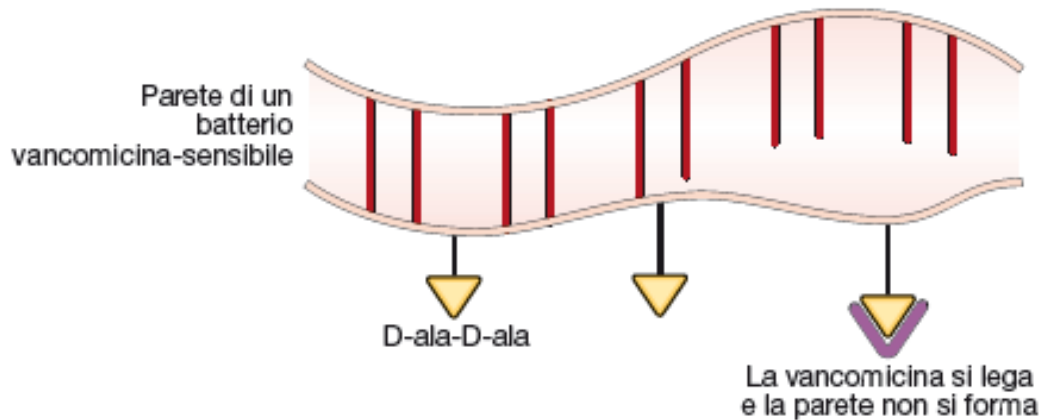
Essi, infatti si legano al dipeptide di D-Ala e non permettono alla PBP utilizzarlo per la transpeptidazione



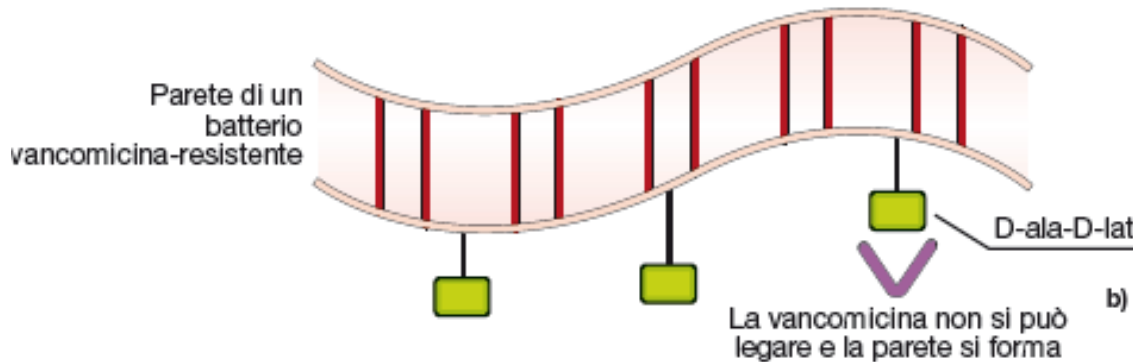
I meccanismi di resistenza si basano sulla modificazione della prima D-Ala in D-Lattato ....



# Meccanismo di azione della vancomicina



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



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

Come gli antibiotici  $\beta$  lattamici ( $\beta$ ) e la vancomicina (G) inibiscono le PBP

