

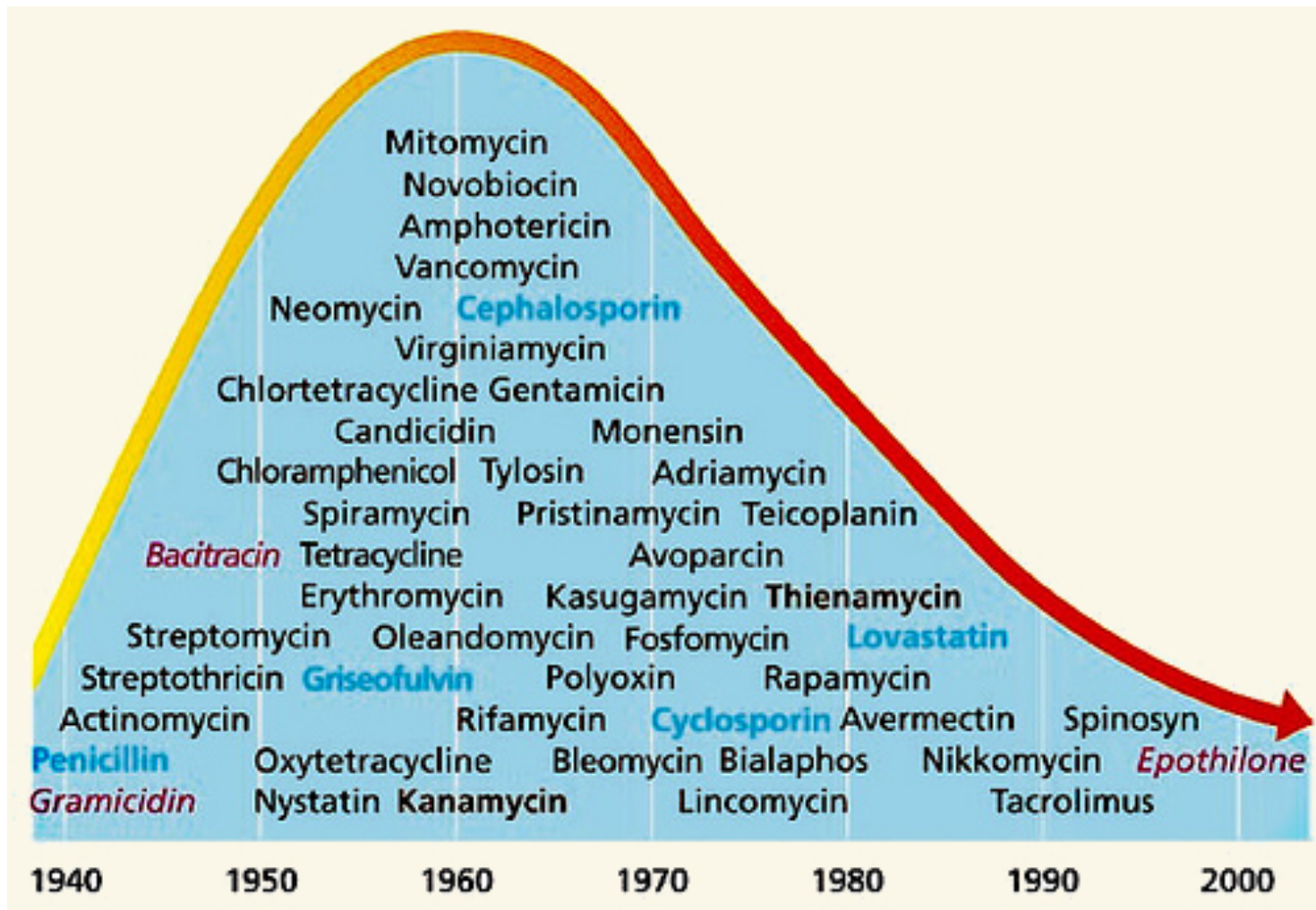


Strategie antimicrobiche alternative agli antibiotici

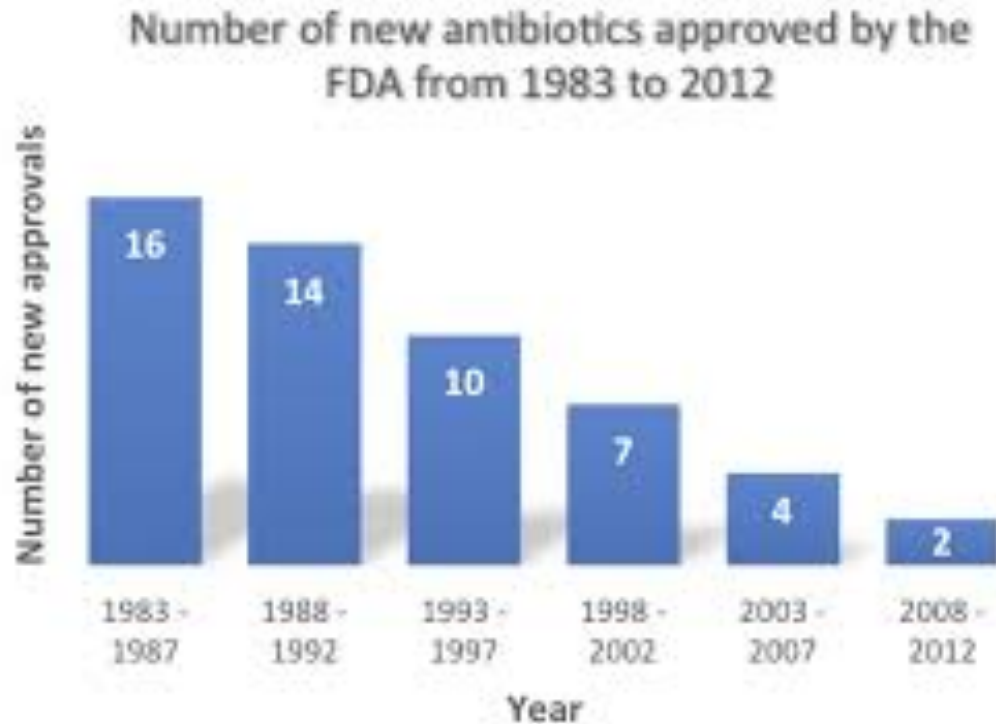
Giordano Rampioni

Università degli Studi Roma Tre - Dipartimento di Scienze
Laboratorio di Biotecnologie dei Microrganismi

A partire dagli anni 60', si è assistito ad una graduale diminuzione dei nuovi antibiotici introdotti in commercio. Produrre un nuovo antibiotico costa molto (ci vogliono anni), e i microrganismi diventano presto resistenti.



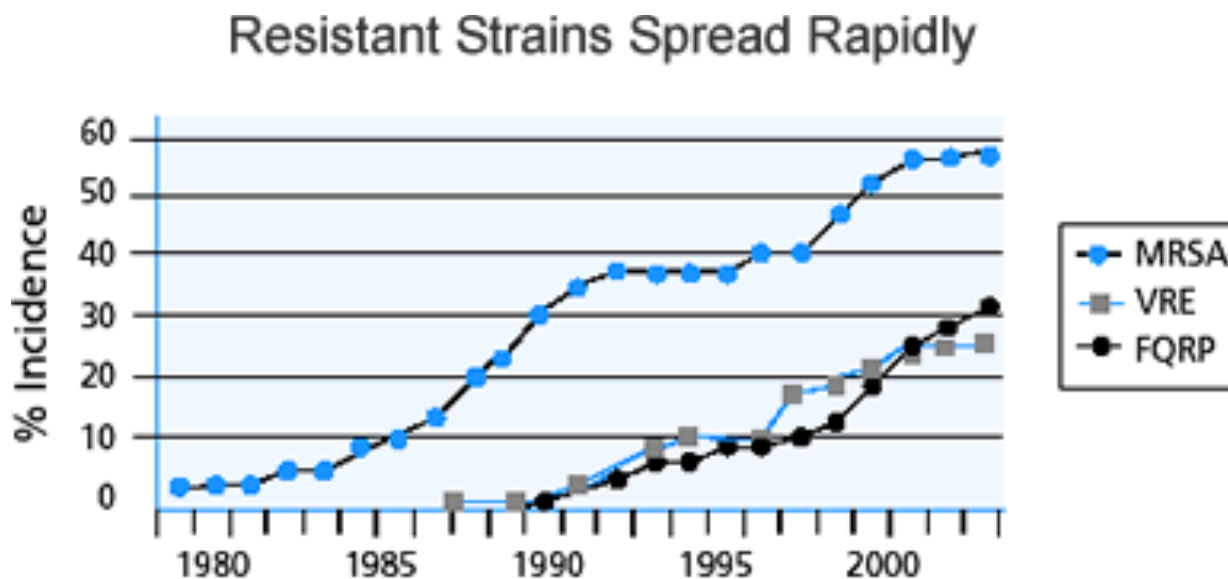
A partire dagli anni 60', si è assistito ad una graduale diminuzione dei nuovi antibiotici introdotti in commercio. Produrre un nuovo antibiotico costa molto (ci vogliono anni), e i microrganismi diventano presto resistenti.



Numero dei nuovi farmaci antimicrobici approvati dalla *US FDA* tra il 1983 e 2012 (Boucher *et al.*, 2013)

Strategie antibatteriche alternative agli antibiotici

In parallelo, le resistenze antibiotiche sono sempre più diffuse, e la percentuale di microrganismi resistenti agli antibiotici in commercio cresce vertiginosamente.



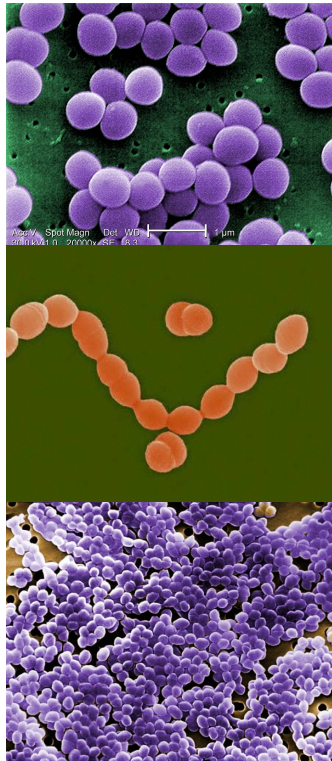
Source: Centers for Disease Control and Prevention

MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*

VRE = Vancomycin-resistant Enterococci

FQRP = Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

L'antibiotico-resistenza pone un serio problema sanitario ed economico



Negli Stati Uniti, nel 2013:

Staphylococcus aureus resistente alla meticillina

80.000 infezioni; **11.000** decessi

Streptococcus pneumoniae resistente ai farmaci
 clinicamente rilevanti

1.200.000 infezioni; **7.000** decessi

Enterococchi resistenti alla vancomicina

20.000 infezioni; **1.300** decessi

La spesa annua stimata relativa all' insorgenza delle resistenze agli antibiotici è di circa **1,5 miliardi di euro** nell' Unione Europea, e di **5 miliardi di dollari** negli Stati Uniti d' America.

L'emergenza di microrganismi patogeni resistenti agli antibiotici è un problema sanitario ed economico mondiale, e ormai se ne stanno accorgendo anche al di fuori del mondo scientifico.

panorama

3 Aprile 2013

SCENARI FRONTIERE



I CINQUE MICROBI CHE FANNO PAURA

CRE La sigla sta per Carbapenem resistant enterobacteriaceae, enterobatteri (causano malattie intestinali) resistenti alla famiglia di antibiotici carbapenemici: una classe potente di farmaci che all'inizio uccideva i bacilli resistenti alla penicillina. Ora però i batteri hanno sviluppato un enzima che li rende resistenti anche a questo antibiotico. I Cre possono essere fatali nel 50 per cento dei casi.

MRSA Il nome lungo è stafilococco aureo, resistente alla metilicina. È un batterio responsabile di molte infezioni e resistente anche a penicillina e cefalosporine. Si diffonde con estrema facilità, soprattutto negli ospedali, e l'infezione può diventare molto pericolosa.

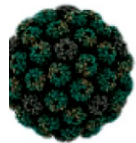
CLOSTRIDIUM DIFFICILE Provoca diarrea (la sua diffusione è raddoppiata nel giro di tre anni) e l'antibiotico vancomicina sta perdendo efficacia. Il batterio contamina letti e pareti, dove può sopravvivere per mesi, e colpisce soprattutto i pazienti anziani.

E. COLI L'escherichia coli ha modificato un suo gene che lo rende quasi indistruttibile. Provoca infezioni urinarie, meningite, peritonite, setticemia. Il gene della resistenza è trasmesso facilmente ad altri batteri.

BACILLO DI KOCH È il batterio della tbc. Dopo la tbc, Mdr, multidrug resistant (resistente a molti farmaci), ora i medici devono far fronte alla tbc Tdr, total drug resistant, emergente soprattutto in Africa. Se dovesse diffondersi anche nei paesi occidentali, sarebbe un disastro.

L'invasione dei batteri resistenti a tutto

Infezioni un tempo guaribili stanno uccidendo milioni di persone nel mondo. Perché i vecchi antibiotici non funzionano più e i nuovi non arrivano.



Io curo ogni giorno, questi malati colpiti dai superbatteri. Su uno di loro, con un'infezione respiratoria da Acinobacter resistente, ho provato almeno una ventina di antibiotici: tutti inutili. Così ho iniziato a usarne uno vecchio, la polymixina. Porta a insufficienza renale e alla fine alla dialisi. Non ho però alternative». È quanto racconta nel suo blog (su *Scientific American*) Judi Stone, specialista in malattie infettive del Maryland. La sua battaglia quotidiana in corsia è quella, ormai, di tutti i medici che si occupano di malattie infettive, in ogni parte del mondo.

I medici, in generale, non sono una categoria che ama spargere allarmi. In questo caso la parola che usano è «apocalisse sanitaria». Infezioni un tempo facili da debellare stanno diventando un incubo: la gente rico-

mincia a morire di tbc, malattie respiratorie, infezioni intestinali, setticemia. Incubo, «nightmare bacteria», è anche il termine utilizzato dai Centers for disease control di Atlanta, il maggiore centro mondiale di osservazione sulle malattie infettive. E pochi giorni fa le autorità sanitarie inglesi, in un documento che ha fatto scalpore, hanno definito la resistenza agli antibiotici «una minaccia catastrofica».

Come si è arrivati a tutto ciò? Che i batteri imparino a sopravvivere ai farmaci non è una novità. Fino a qualche anno fa lo scenario era più o meno questo: i microbi sviluppano resistenza, vengono messi a punto nuovi antibiotici che per un po' funzionano, i batteri ridiventano pericolosi, arrivano altre molecole e così via. «Era una fase in cui la ricerca di nuovi farmaci sembrava non finire mai e i medici li hanno prescritti per anni

con eccessiva facilità. Ma ora i batteri vanno più in fretta della nostra capacità di trovare contromisure» avverte Ercole Concia, direttore della Clinica di malattie infettive dell'Università di Verona che, sul fenomeno dei supermicrobi, si dichiara pessimista. «Le resistenze stanno accelerando, mentre le aziende hanno abbandonato la ricerca di antibiotici».

Se tra il 1980 e il 1990 sono stati introdotti 40 nuovi antibiotici, nel decennio successivo il numero è crollato a sette. Il motivo? Non sono remunerativi, all'industria conviene di più investire in statine, antitumorali, terapie per malattie croniche. Qualche anno fa la Pfizer aveva messo a punto un antibiotico di grande potenza, poi bloccato perché in 11 casi aveva dato problemi al fegato. «Se fosse stato un antitumorale, sarebbe stato approvato. Ma per gli antibiotici non è accettato un

rischio alto di tossicità. Giusto, ma l'eccessivo rigore in quel caso ha reso inutile ogni sforzo».

Le prime vittime di questa emergenza sanitaria sono i pazienti immunodepressi. «Se si ammala un adulto sano, con le poche armi spuntate che abbiamo riusciamo a farlo guarire» racconta Concia. «Il dramma è dei pazienti anziani o con difese immunitarie deboli. Ho un trapiantato di fegato, per esempio, che ha sviluppato una setticemia resistente a molti antibiotici. Il paradosso è che la nostra medicina ultramoderna rischia di essere vanificata da infezioni con le quali non siamo più capaci di curare. Dobbiamo inventarci nuove soluzioni in tempi brevi, ci vuole uno sforzo congiunto di aziende farmaceutiche, ospedali e medici che operano sul territorio. Altrimenti non ne usciamo».

(Daniela Mattalia)

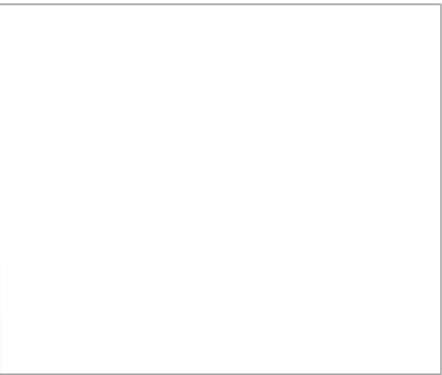


L'EMERGENZA

I super-batteri devastanti Vecchie infezioni tornano a uccidere

L'Oms lancia l'allarme: «La minaccia dei germi resistenti ai farmaci è in atto in tutto il globo. Senza un'azione urgente malattie curabili saranno di nuovo letali»

SALUTE (+1) ▾



SALUTE
Boom di domande per l'eterologa 3400 richieste in 22 giorni



Il succo di ciliegia, rimedio efficace contro l'insonnia degli anziani



VIAGGI
Le terrazze più belle di Roma

Molti scienziati credono che ci troviamo già nella “*post-antibiotic era*”.
In UK l’antibiotico-resistenza è stata inserita tra le emergenze nazionali, al pari del riscaldamento globale. Anche la WHO (World Health Organization) si sta muovendo nella stessa direzione.

nature REVIEWS

MICROBIOLOGY

Access

To read this article in full you may need to log in, make a payment or gain access through a site license (see right).

[nature.com](#) > [Journal home](#) > [Table of Contents](#)

Research Highlight

Nature Reviews Microbiology **11**, 146 (March 2013) | doi:10.1038/nrmicro2983





Entering a post-antibiotic era?

Christina Tobin Kåhrström

Although microbiologists have been ringing the alarm bell for years, the threat of antibiotic resistance recently reached new prominence in the popular press following a declaration by Britain's chief medical officer, Sally Davies, that the issue should be added to the list of national emergencies.

To read this article in full you may need to log in, make a payment or gain access through a site license (see right).

ARTICLE TOOLS

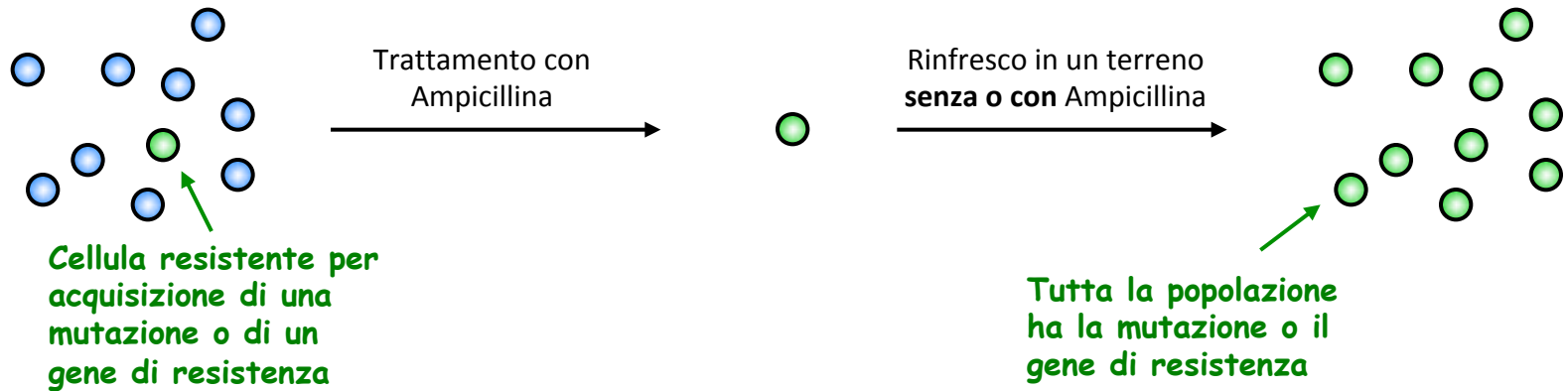
-  Send to a friend
-  Export citation
-  Rights and permissions
-  Order commercial reprints

SEARCH PUBMED FOR

▶ Christina Tobin Kåhrström

Possiamo vincere la guerra contro i patogeni ?

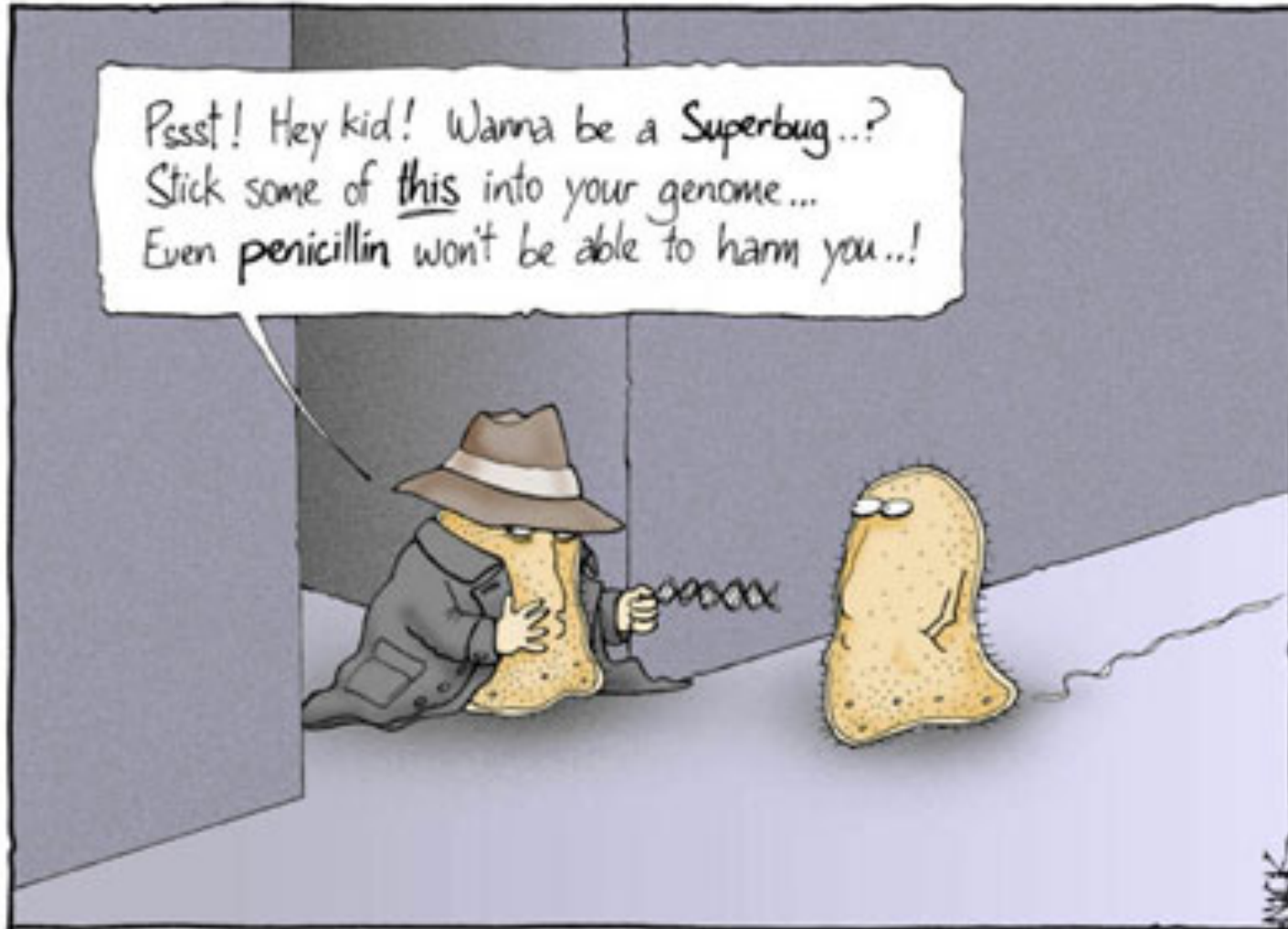
I problemi principali sono l'elevata capacità dei batteri di acquisire resistenze e la fortissima pressione selettiva generata dall'uso di antibiotici tradizionali.



In una popolazione batterica basta un resistente per dar vita ad una popolazione di resistenti. L'unico resistente può sfruttare le risorse di una nicchia priva di competitori!

Possiamo vincere la guerra contro i patogeni ?

Inoltre, gli **antibiotici** sono **molecole di origine naturale**, pertanto i microrganismi in natura hanno già evoluto meccanismi di antibiotico resistenza prima che gli antibiotici vengano introdotti sul mercato.



Possiamo vincere la guerra contro i patogeni ?

Lo sviluppo di antibiotico resistenze è un processo evolutivo inevitabile.

NATURE REVIEWS | **MICROBIOLOGY** 300 | APRIL 2014 | VOLUME 12

 **ANTIBIOTIC ALTERNATIVES — OPINION**

Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs?

Richard C. Allen, Roman Popat, Stephen P. Diggle and Sam P. Brown

Lo situazione è peggiorata dal fatto che molto spesso gli antibiotici vengono utilizzati in modo eccessivo ed inappropriato.



Cosa possiamo fare ?

Sicuramente sarebbe importante sviluppare nuovi antibiotici, ma possiamo immaginare che anche per questi si possano sviluppare in fretta nuovi sistemi di resistenza (non è una soluzione a lungo termine). Uno dei problemi è che molti antibiotici sono sviluppati sulla base di antibiotici prodotti dai microrganismi, per i quali già esistono in natura meccanismi di resistenza.

**Forse non per tutti gli antibiotici i batteri possono sviluppare resistenza! (?)
Il caso del Teixobactin.**

A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance

Losee L. Ling^{1*}, Tanja Schneider^{2,3*}, Aaron J. Peoples¹, Amy L. Spoering¹, Ina Engels^{2,3}, Brian P. Conlon⁴, Anna Mueller^{2,3}, Till F. Schäberle^{3,5}, Dallas E. Hughes¹, Slava Epstein⁶, Michael Jones⁷, Linos Lazarides⁷, Victoria A. Steadman⁷, Douglas R. Cohen¹, Cintia R. Felix¹, K. Ashley Fetterman¹, William P. Millett¹, Anthony G. Nitti¹, Ashley M. Zullo¹, Chao Chen⁴ & Kim Lewis⁴

Antibiotic resistance is spreading faster than the introduction of new compounds into clinical practice, causing a public health crisis. Most antibiotics were produced by screening soil microorganisms, but this limited resource of cultivable bacteria was overmined by the 1960s. Synthetic approaches to produce antibiotics have been unable to replace this platform. Uncultured bacteria make up approximately 99% of all species in external environments, and are an untapped source of new antibiotics. We developed several methods to grow uncultured organisms by cultivation *in situ* or by using specific growth factors. Here we report a new antibiotic that we term teixobactin, discovered in a screen of uncultured bacteria. Teixobactin inhibits cell wall synthesis by binding to a highly conserved motif of lipid II (precursor of peptidoglycan) and lipid III (precursor of cell wall teichoic acid). We did not obtain any mutants of *Staphylococcus aureus* or *Mycobacterium tuberculosis* resistant to teixobactin. The properties of this compound suggest a path towards developing antibiotics that are likely to avoid development of resistance.

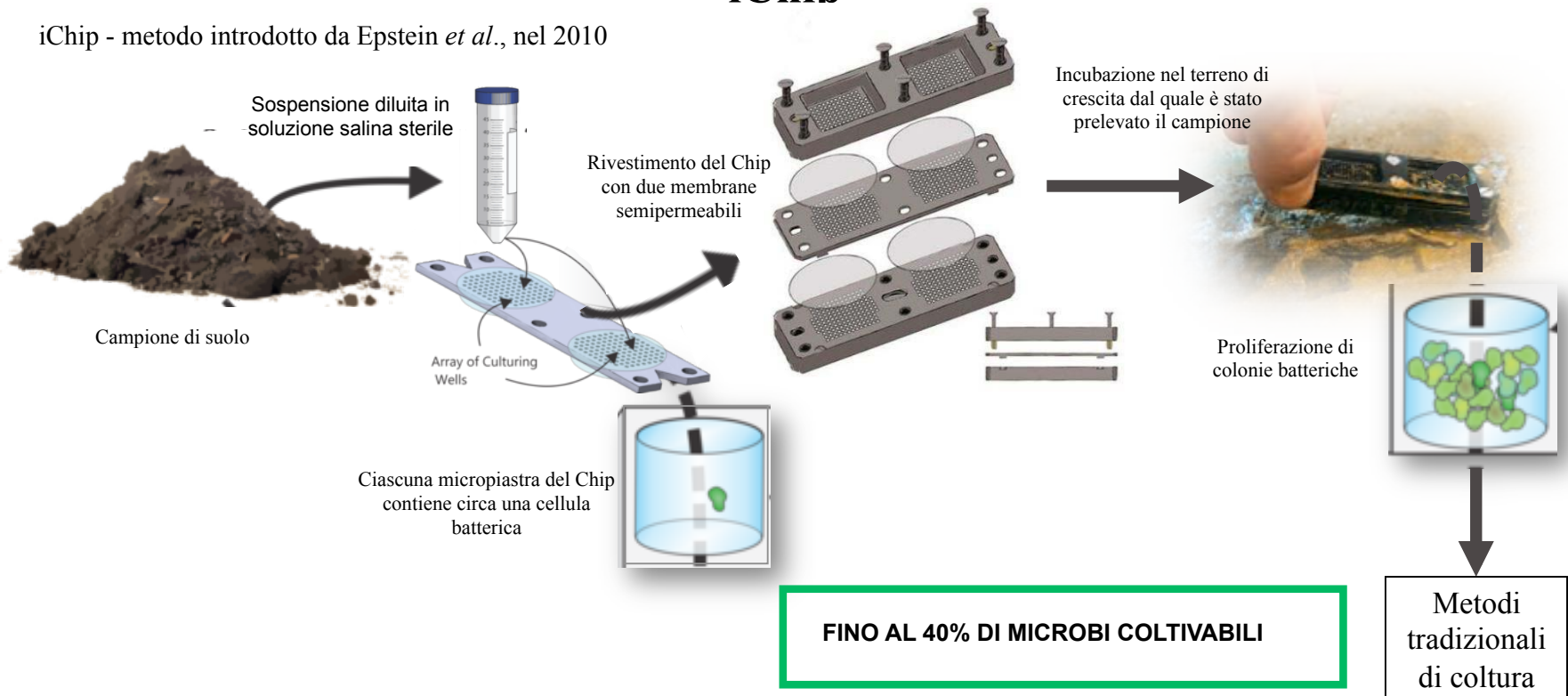
Eleftheria terrae produce un nuovo antibiotico, il Teixobactin

I ricercatori hanno fatto crescere dei ceppi batterici non coltivabili mediante una nuova metodica, chiamata iChip. In questo modo hanno identificato un nuovo batterio, *Eleftheria terrae*, in grado di produrre un antibiotico attivo contro i batteri patogeni Gram-positivi.

Questo antibiotico, chiamato Teixobactin, interferisce con la sintesi della parete interagendo con il lipide II ed il lipide III.

iChip

iChip - metodo introdotto da Epstein *et al.*, nel 2010



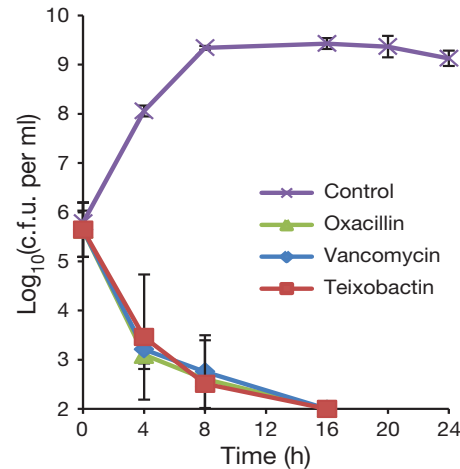
Eleftheria terrae produce un nuovo antibiotico, il Teixobactin

Table 1 | Activity of teixobactin against pathogenic microorganisms

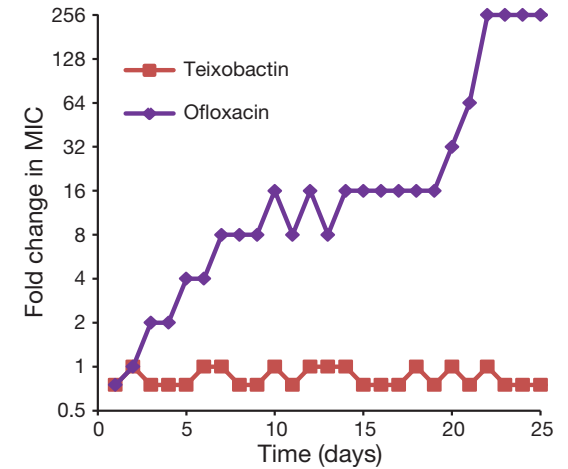
Organism and genotype	Teixobactin MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
<i>S. aureus</i> (MSSA)	0.25
<i>S. aureus</i> + 10% serum	0.25
<i>S. aureus</i> (MRSA)	0.25
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE)	0.5
<i>Enterococcus faecium</i> (VRE)	0.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (penicillin ^R)	≤ 0.03
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.06
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.12
Viridans group streptococci	0.12
<i>B. anthracis</i>	≤ 0.06
<i>Clostridium difficile</i>	0.005
<i>Propionibacterium acnes</i>	0.08
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0.125
<i>Haemophilus influenzae</i>	4
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	25
<i>Escherichia coli</i> (asmB1)	2.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>32

The MIC was determined by broth microdilution. MSSA, methicillin-sensitive *S. aureus*; VRE, vancomycin-resistant enterococci.

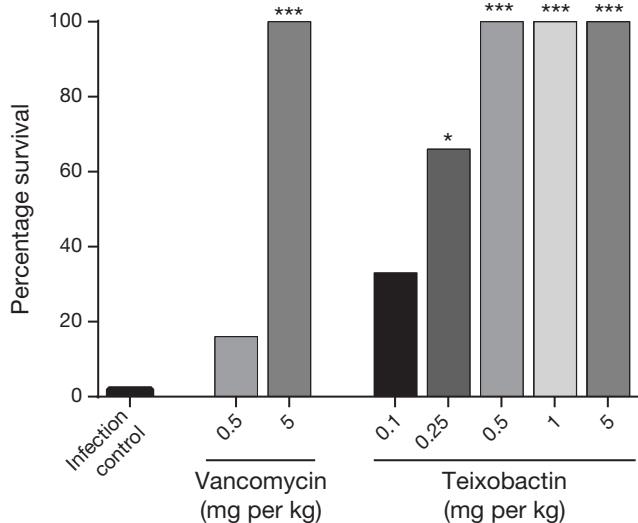
Inibizione crescita *S. aureus*



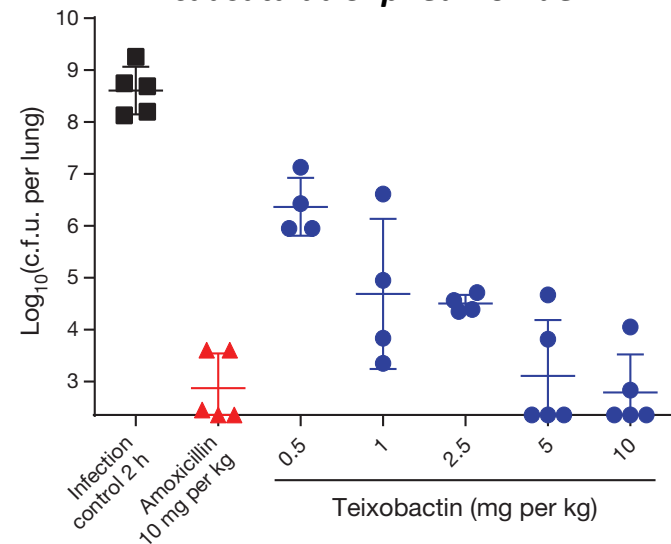
Non sono stati selezionati resistenti di *S. aureus*



Setticemia in topo causata da *S. aureus* MRSA



Infezione polmonare in topo causata da *S. pneumoniae*



Quali altre strategie antimicrobiche si stanno perseguendo?

Una strategia perseguita è quella di rendere di nuovo efficaci antibiotici che non lo sono più.

Adiuvanti ed inibitori delle pompe d'efflusso

Sinergie con composti naturali o sintetici

Si possono anche immaginare nuovi farmaci che impongano una ridotta pressione selettiva, e che quindi non portino all'emergenza di resistenze.

Molecole xenobiotiche

Inibitori della virulenza

Adiuvanti degli antibiotici

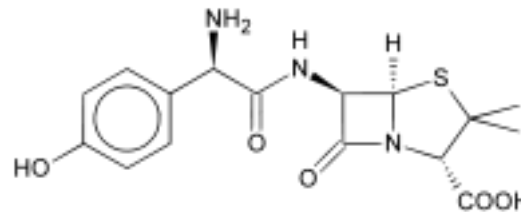
Tra i più noti meccanismi di resistenza agli antibiotici c'è la produzione di enzimi che inattivano tali molecole. Ad esempio, la resistenza agli antibiotici β -lattamici è in molti casi dovuta all'espressione di β -lattamasi, enzimi che degradano ed inattivano tali antibiotici.

Da molti anni vengono utilizzati inibitori delle β -lattamasi in associazione con antibiotici β -lattamici per ovviare a tale meccanismo di resistenza.

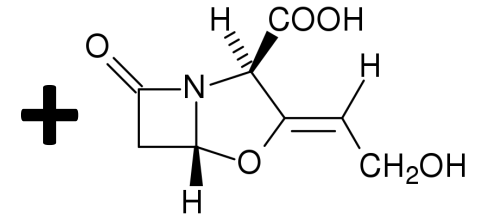
Ad esempio, il farmaco Augmentin contiene la amoxicillina, un antibiotico β -lattamico, e l'acido clavulanico, un inibitore delle β -lattamasi.



amoxicillina



acido clavulanico



Le pompe d'efflusso e la resistenza agli antibiotici

Le pompe d'efflusso sono uno dei maggiori determinanti di resistenza agli antibiotici nei microrganismi, ed agiscono estrudendo l'antibiotico all'esterno della cellula batterica.

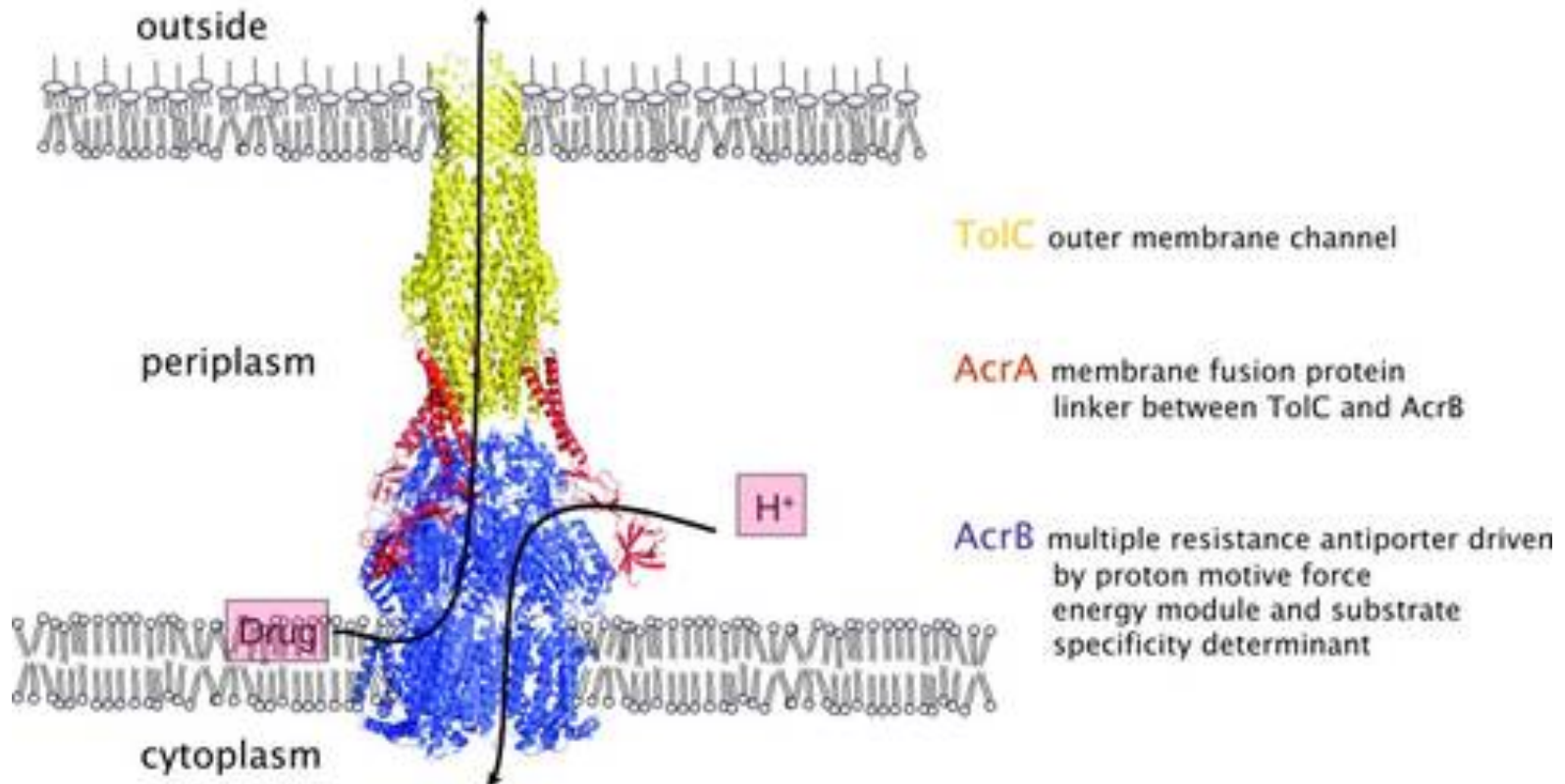
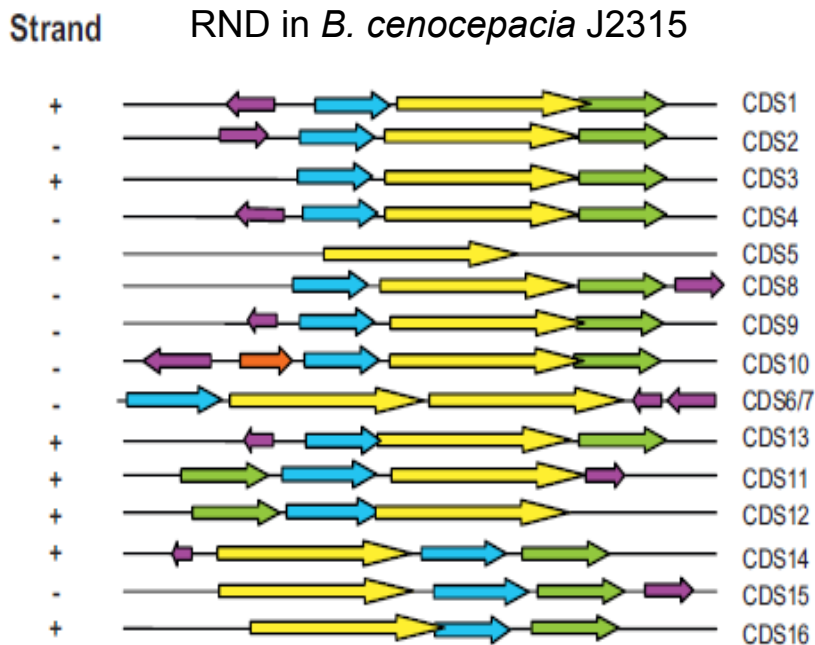


Figure 1: Schematic Drawing of the AcrAB-TolC antibiotic efflux pump of *Escherichia coli*. The inner membrane component AcrB (blue) is both the substrate specificity determinant and the energy module of the AcrA/AcrB/TolC efflux system. Drugs are transported from the outer leaflet of the inner membrane via a coupled drug/proton antiport mechanism. TolC (yellow) forms a channel in the outer membrane. AcrA (red) is an adaptor connecting AcrB and TolC.

Le pompe d'efflusso e la resistenza agli antibiotici

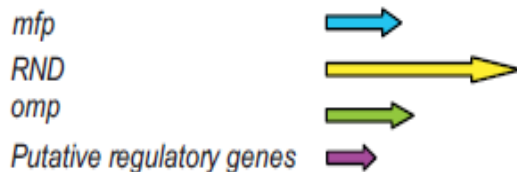
I primi studi sulle pompe di efflusso per gli antibiotici sono state condotte per la resistenza alla tetraciclina in *E. coli*. La resistenza alla tetraciclina è dovuta al gene *tet*, che codifica per una pompa di efflusso per questo antibiotico. Il gene *tet* è presente su diversi trasposoni e plasmidi (si propaga facilmente tra i microrganismi).

Alcuni batteri hanno un vasto arsenale di pompe di efflusso e sono **multiresistenti**.



Le pompe d'efflusso che portano alla resistenza agli antibiotici appartengono a diverse famiglie:

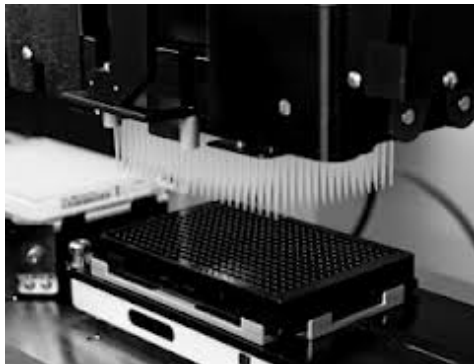
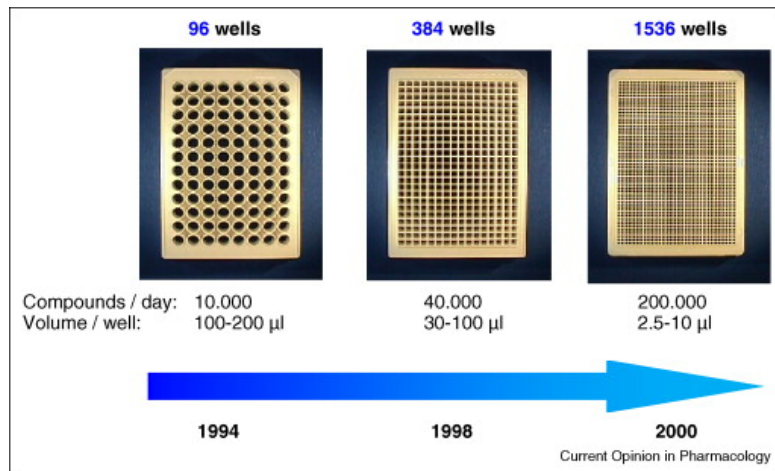
- 1) major facilitator (MF) superfamily (proton-drug antiport)
- 2) resistance-nodulation-division (RND) family (proton-drug antiport)
- 3) small multi-drug resistance (SMR) family (proton-drug antiport)
- 4) ATP binding cassette (ABC) family (ATP hydrolysis)
- 5) multiple antibiotic and toxin extrusion (MATE) family (proton or sodium antiport)



Come identificare nuovi inibitori delle pompe d'efflusso?

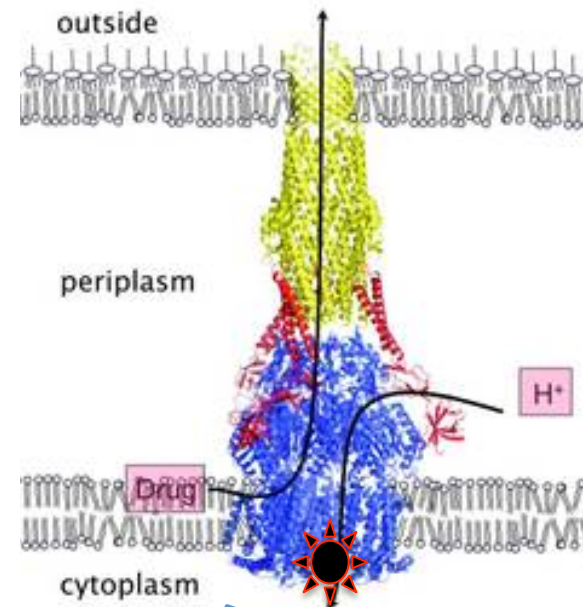
Come per i nuovi antibiotici (e molti altri farmaci), si possono seguire due vie distinte:

Screening random di composti di derivazione naturale o sintetica. Molte volte questo è preceduto da test di citotossicità.



Si testano migliaia di composti contenuti in "libraries random" per la loro attività. Spesso questo *screening* è robotizzato.

Design razionale di composti di sintesi sulla base di informazioni strutturali del target. Bisogna conoscere i bersagli molecolari.



Molecola con una struttura tale da legarsi alla pompa d'efflusso ed inibirne l'attività.

Le pompe d'efflusso e la resistenza agli antibiotici

Gli inibitori delle pompe d'efflusso possono dissipare il gradiente protonico o inibire direttamente la pompa d'efflusso.

Agenti che dissipano il gradiente protonico: carbonil cianide *m*-clorofenilidrazone (CCCP), valinomicina e dinitrofenolo (DNP). Sono citotossici per le cellule superiori!

La reserpina ed il verapamil sono esempi di inibitori delle pompe d'efflusso per i quali non è noto il bersaglio molecolare. Anche questi composti, però, sono attivi a concentrazioni che non possono essere utilizzate in terapia in quanto tossiche.

Alcuni inibitori delle pompe d'efflusso interagiscono direttamente con una delle componenti molecolari di tali pompe. Una delle prime molecole di tale classe ad essere identificata, ed una delle più studiate, è la fenilalanina arginil β -naftilamide (PA β N). Questa molecola inibisce alcune pompe d'efflusso della famiglia RND, ma come per la maggior parte degli inibitori identificati fino ad oggi, anche il PA β N è tossico.

Lo studio degli inibitori delle pompe d'efflusso mira a produrre nuovi composti con maggiore attività inibitoria e/o ridotta attività citotossica (questi due parametri sono correlati tra loro). Le molecole trovate fino ad ora sono impiegate come *scaffold* per lo sviluppo di analoghi con maggiore attività e/o con minore citotossicità.

Le pompe d'efflusso e la resistenza agli antibiotici

Gli inibitori delle pompe d'efflusso potrebbero ridurre anche la virulenza in alcuni batteri patogeni.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Effect of efflux pump inhibition on *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome and virulence

Received: 21 March 2017

Accepted: 29 August 2017

Published online: 12 September 2017

Giordano Rampioni¹, Cejoice Ramachandran Pillai^{1,3}, Francesca Longo¹, Roslen Bondi¹, Valerio Baldelli¹, Marco Messina¹, Francesco Imperi², Paolo Visca¹ & Livia Leoni¹

Investigation of the well characterized EPI PAβN on *P. aeruginosa* virulence

i. PAβN affects *P. aeruginosa* transcriptome

A. Up-regulated genes

PA number ^a	Gene name ^a	Fold change ^b	Product name ^a
PA0509 [*]	<i>nirN</i>	2.27	NirN
PA0510 [*]	<i>nirE</i>	2.33	NirE
PA0511 [*]	<i>nirJ</i>	2.23	hemed ₁ biosynthesis protein NirJ
PA0514 [*]	<i>nirL</i>	2.3	hemed ₁ biosynthesis protein NirL
PA0516 [*]	<i>nirF</i>	2.3	hemed ₁ biosynthesis protein NirF
PA0517 [*]	<i>nirC</i>	3.53	probable <i>c</i> -type cytochrome precursor
PA0518 [*]	<i>nirM</i>	3.32	cytochrome <i>c</i> ₅₅₁ precursor
PA0519 [*]	<i>nirS</i>	4.48	nitrite reductase precursor
PA0523 [*]	<i>norC</i>	2.87	nitric-oxide reductase subunit C
PA0524 [*]	<i>norB</i>	5.51	nitric-oxide reductase subunit B
PA0525 [*]	<i>norD</i>	2.19	probable denitrification protein NorD
PA1901 [§]	<i>phzC1/C2</i>	2.24	phenazine biosynthesis protein PhzC
PA1902 [§]	<i>phzD1/D2</i>	2.26	phenazine biosynthesis protein PhzD
PA1903 [§]	<i>phzE1/E2</i>	2.22	phenazine biosynthesis protein PhzE
PA1904 [§]	<i>phzE1/E2</i>	2.11	probable phenazine biosynthesis protein
PA2593	<i>qteE</i>	2.06	quorum threshold expression element, QteE
PA3392 [*]	<i>nosZ</i>	2.16	nitrous-oxide reductase precursor
PA4810 [*]	<i>fdnI</i>	2.22	nitrate-inducible formate dehydrogenase, γ subunit

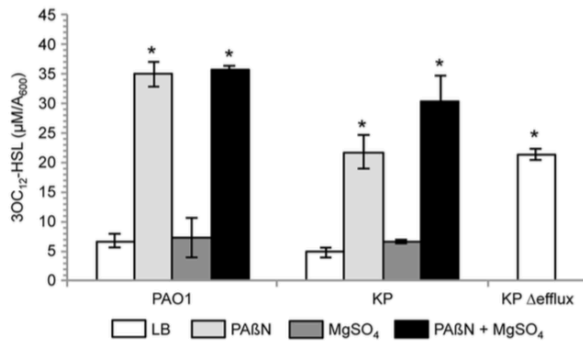
B. Down-regulated genes

PA number ^a	Gene name ^a	Fold change ^b	Product name ^a
PA0672 [†]	<i>hemO</i>	-4.81	hemeoxygenase
PA0676 [†]	<i>vreR</i>	-4.85	sigma factor regulator, VreR
PA0707	<i>toxR</i>	-2.12	transcriptional regulator ToxR
PA1245	<i>aprX</i>	-3.44	AprX
PA1912 [†]	<i>femI</i>	-2.35	ECF sigma factor, FemI
PA2385 [†]	<i>pvdQ</i>	-2.98	3OC ₁₂ -homoserine lactone acylase PvdQ
PA2386 [†]	<i>pvdA</i>	-3.97	L-ornithine N ⁵ -oxygenase
PA2394 [†]	<i>pvdN</i>	-2.85	PvdN
PA2395 [†]	<i>pvdO</i>	-2.32	PvdO
PA2396 [†]	<i>pvdF</i>	-3.22	pyoverdinesynthetase F
PA2397 [†]	<i>pvdE</i>	-3.16	pyoverdine biosynthesis protein PvdE
PA2398 [†]	<i>fpvA</i>	-2.03	ferripyoverdine receptor
PA2399 [†]	<i>pvdD</i>	-3.32	pyoverdinesynthetase D
PA2400 [†]	<i>pvdJ</i>	-3.36	PvdJ
PA2413 [†]	<i>pvdH</i>	-3.58	L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase
PA2424 [†]	<i>pvdL</i>	-3.73	PvdL
PA2425 [†]	<i>pvdG</i>	-2.58	PvdG
PA2426 [†]	<i>pvdS</i>	-10.48	sigma factor PvdS
PA2570	<i>lecA</i>	-2.42	LecA
PA3377 [‡]	<i>phnJ</i>	-21.1	conserved hypothetical protein
PA3407 [†]	<i>hasAp</i>	-4.15	heme acquisition protein HasAp
PA3530 [†]	<i>bfd</i>	-2.54	bacterioferritin-associated ferredoxinBfd
PA4221 [†]	<i>fpvA</i>	-2.52	Fe(III)-pyochelin outer membrane receptor precursor
PA4224 [†]	<i>pchG</i>	-2.05	pyochelin biosynthetic protein PchG
PA4225 [†]	<i>pchF</i>	-2.26	pyochelinsynthetase
PA4226 [†]	<i>pchE</i>	-2.06	dihydroaeruginosic acid synthetase
PA4228 [†]	<i>pchD</i>	-2.09	pyochelin biosynthesis protein PchD
PA4230 [†]	<i>pchB</i>	-2.69	salicylate biosynthesis protein PchB
PA4468	<i>sodM</i>	-11.65	superoxide dismutase
PA4470	<i>fumC1</i>	-8.96	fumaratehydratase
PA4708 [†]	<i>phuT</i>	-3.17	heme-transport protein, PhuT
PA4709 [†]	<i>phuS</i>	-3.37	PhuS
PA4710 [†]	<i>phuR</i>	-4.65	heme/hemoglobin uptake outer membrane receptor PhuR
PA5360 [‡]	<i>phoB</i>	-15.28	two-component response regulator PhoB
PA5365 [‡]	<i>phoU</i>	-9.4	phosphate uptake regulatory protein PhoU
PA5366 [‡]	<i>pstB</i>	-14.02	ATP-binding component of ABC phosphate transporter
PA5367 [‡]	<i>pstA</i>	-14.17	membrane protein component of ABC phosphate transporter
PA5369 [‡]	<i>pstS</i>	-23.49	periplasmic phosphate-binding protein, PstS

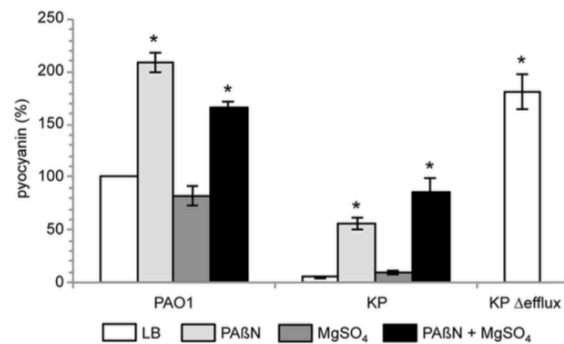
Investigation of the well characterized EPI PAβN on *P. aeruginosa* virulence

ii. PAβN affects the production of *P. aeruginosa* virulence traits

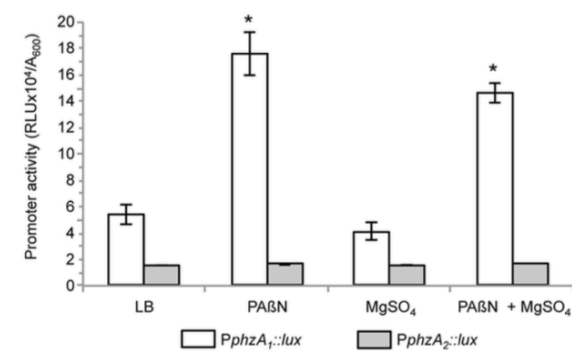
3OC₁₂-HSL production



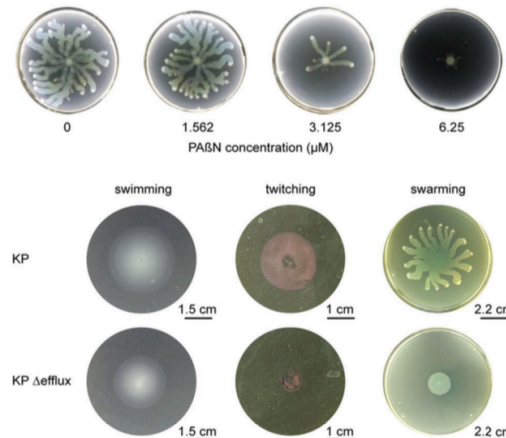
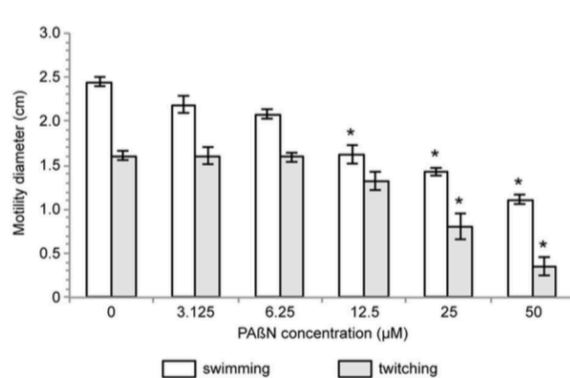
Pyocyanin production



Activity of the pyocyanin genes



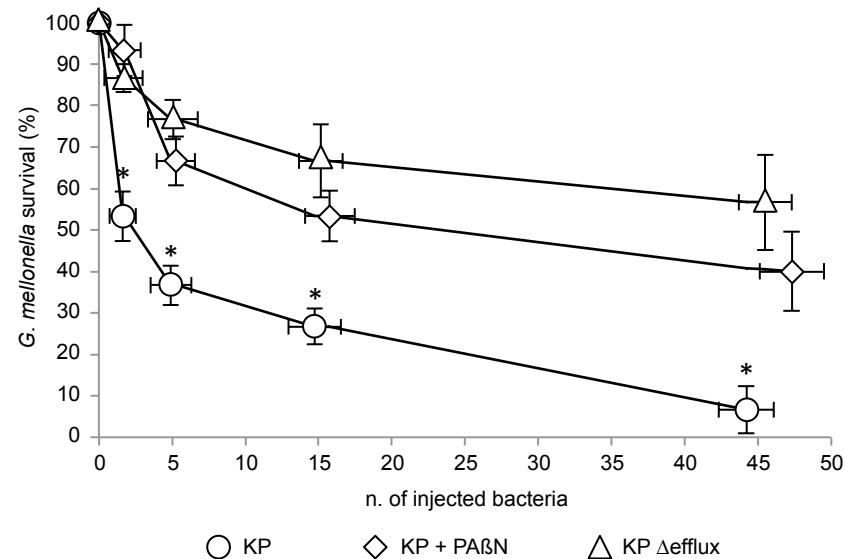
Motility phenotypes



Investigation of the well characterized EPI PA β N on *P. aeruginosa* virulence

*iii. PA β N reduces *P. aeruginosa* in vivo pathogenic potential*

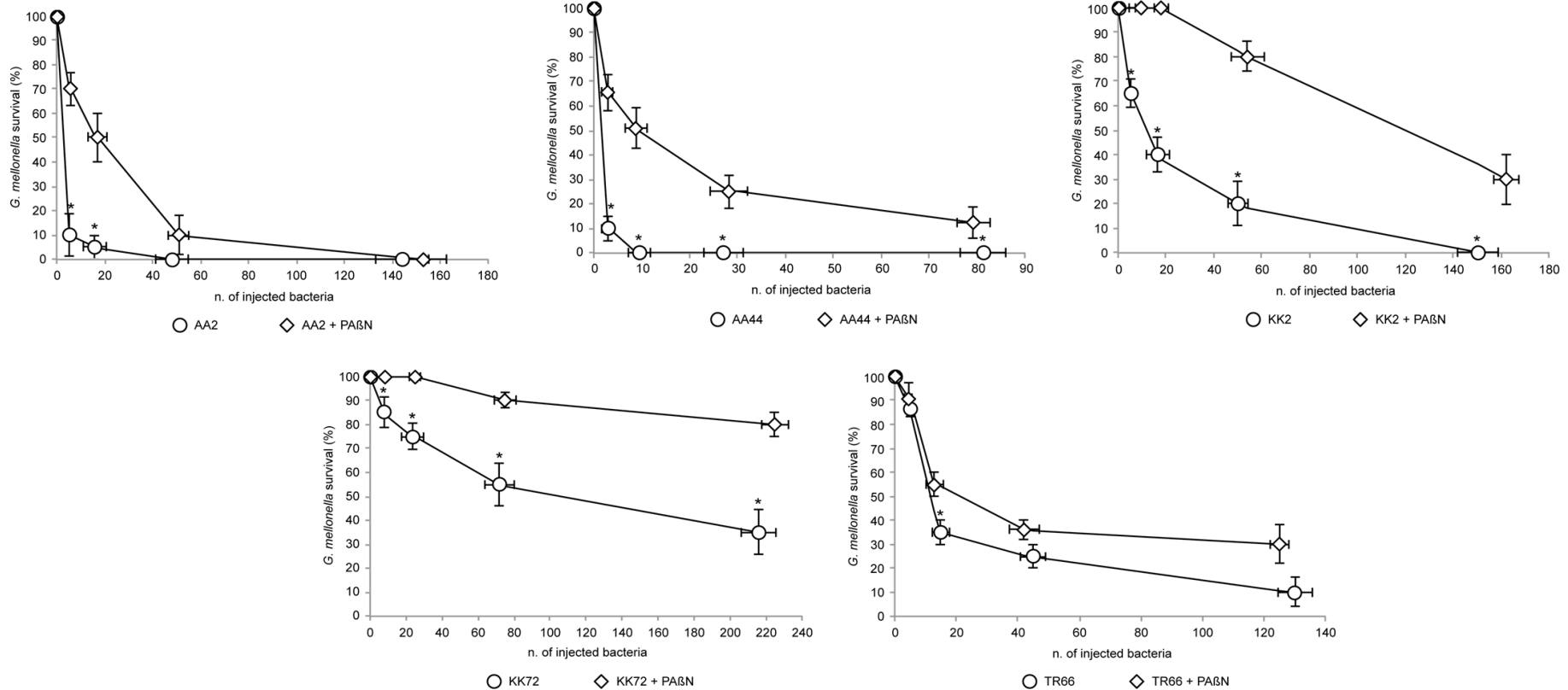
Galleria mellonella killing assay



The deletion of the efflux pumps results in a decrease of *P. aeruginosa* virulence

Investigation of the well characterized EPI PA β N on *P. aeruginosa* virulence

iv. PA β N reduces *in vivo* pathogenic potential of *P. aeruginosa* clinical isolates



Gli inibitori delle pompe di efflusso sembrano ridurre la virulenza in diversi batteri patogeni



Multidrug Efflux Pumps at the Crossroad between Antibiotic Resistance and Bacterial Virulence

*Manuel Alcalde-Rico, Sara Hernando-Amado, Paula Blanco and José L. Martínez**

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Axel Cloeckaert,
French National Institute
for Agricultural Research, France

Reviewed by:

Jessica M. A. Blair,
University of Birmingham, UK
Kunihiko Nishino,
Osaka University, Japan

***Correspondence:**

José L. Martínez

Multidrug efflux pumps can be involved in bacterial resistance to antibiotics at different levels. Some efflux pumps are constitutively expressed at low levels and contribute to intrinsic resistance. In addition, their overexpression may allow higher levels of resistance. This overexpression can be transient, in the presence of an effector (phenotypic resistance), or constitutive when mutants in the regulatory elements of the expression of efflux pumps are selected (acquired resistance). Efflux pumps are present in all cells, from human to bacteria and are highly conserved, which indicates that they are ancient elements in the evolution of different organisms. Consequently, it has been suggested that, besides antibiotic resistance, bacterial multidrug efflux pumps would likely contribute to other relevant processes of the microbial physiology. In the current article, we discuss some specific examples of the role that efflux pumps may have in the bacterial virulence of animals' and plants' pathogens, including the processes of intercellular communication. Based in these evidences, we propose that efflux pumps are at the crossroad between resistance and virulence of bacterial pathogens. Consequently, the comprehensive study of multidrug efflux pumps requires addressing these functions, which are of relevance for the bacterial–host interactions during infection.

Quali altre strategie antimicrobiche si stanno perseguendo?

Una strategia perseguita è quella di rendere di nuovo efficaci antibiotici che non lo sono più.

Adiuvanti ed inibitori delle pompe d'efflusso

Sinergie con composti naturali o sintetici

Si possono anche immaginare nuovi farmaci che impongano una ridotta pressione selettiva, e che quindi non portino all'emergenza di resistenze.

Molecole xenobiotiche

Inibitori della virulenza

Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy

Linda Ejim^{1,2}, Maya A Farha^{1,2}, Shannon B Falconer^{1,2}, Jan Wildenhain³, Brian K Coombes^{1,2}, Mike Tyers³, Eric D Brown^{1,2*} & Gerard D Wright^{1,2*}

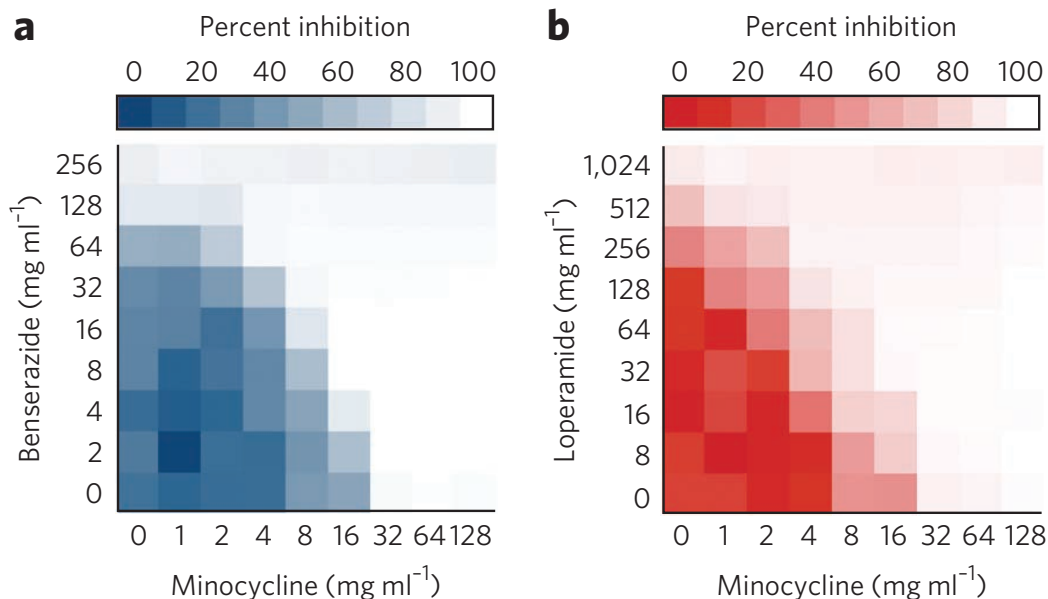
In questo lavoro è stato investigato il potenziale di 1.057 composti appartenenti ad una banca di *FDA-approved drugs* (composti già approvati per l'uso nell'uomo) di aumentare l'effetto dell'antibiotico minociclina, una tetraciclina, su ceppi di *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. L'uso di banche di *FDA-approved drugs* può drasticamente abbreviare i tempi (ed i costi) per il trasferimento del composto dal laboratorio all'uso clinico. Questo approccio si definisce SOSA (Selective Optimization of Side Activities) approach, o anche drug-repurposing.

Con questo screening sono stati identificati diversi composti con effetto sinergico alla minociclina: 35 per *S. aureus*, 41 per *E. coli* e 6 per *P. aeruginosa*.

Tali composti non hanno un effetto antibiotico *per se*, e sono utilizzati per il trattamento di patologie non connesse alle infezioni batteriche.

Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy

Linda Ejim^{1,2}, Maya A Farha^{1,2}, Shannon B Falconer^{1,2}, Jan Wildenhain³, Brian K Coombes^{1,2}, Mike Tyers³, Eric D Brown^{1,2*} & Gerard D Wright^{1,2*}



Ad esempio, la benserazide, un inibitore dell'enzima DOPA carbossilasi, normalmente utilizzato nel trattamento del morbo di Parkinson, diminuisce la MIC della minociclina nei confronti di *P. aeruginosa*. Lo stesso vale per la loperamide, un antidiarroico (in Italia commercializzato come Imodium).

Una strategia perseguita è quella di rendere di nuovo efficaci antibiotici che non lo sono più.

Adiuvanti ed inibitori delle pompe d'efflusso

Sinergie con composti naturali o sintetici

Quali limitazioni potrebbero essere insite in tali approcci?

Come per gli antibiotici tradizionali, gli inibitori delle pompe d'efflusso ed i composti adiuvanti esercitano una forte pressione selettiva sulla popolazione microbica, e possono pertanto portare ad una rapida insorgenza di ceppi resistenti.

Inoltre, in molti casi, l'impatto di tali molecole sulla fisiologia dei microrganismi non è caratterizzato nel dettaglio. Cosa succede se un adiuvante o un inibitore di una pompa d'efflusso, ad esempio, aumentano la virulenza di un patogeno ?

Quali altre strategie antimicrobiche si stanno perseguendo?

Una strategia perseguita è quella di rendere di nuovo efficaci antibiotici che non lo sono più.

Adiuvanti ed inibitori delle pompe d'efflusso

Sinergie con composti naturali o sintetici

Si possono anche immaginare nuovi farmaci che impongano una ridotta pressione selettiva, e che quindi non portino all'emergenza di resistenze.

Molecole xenobiotiche

Inibitori della virulenza

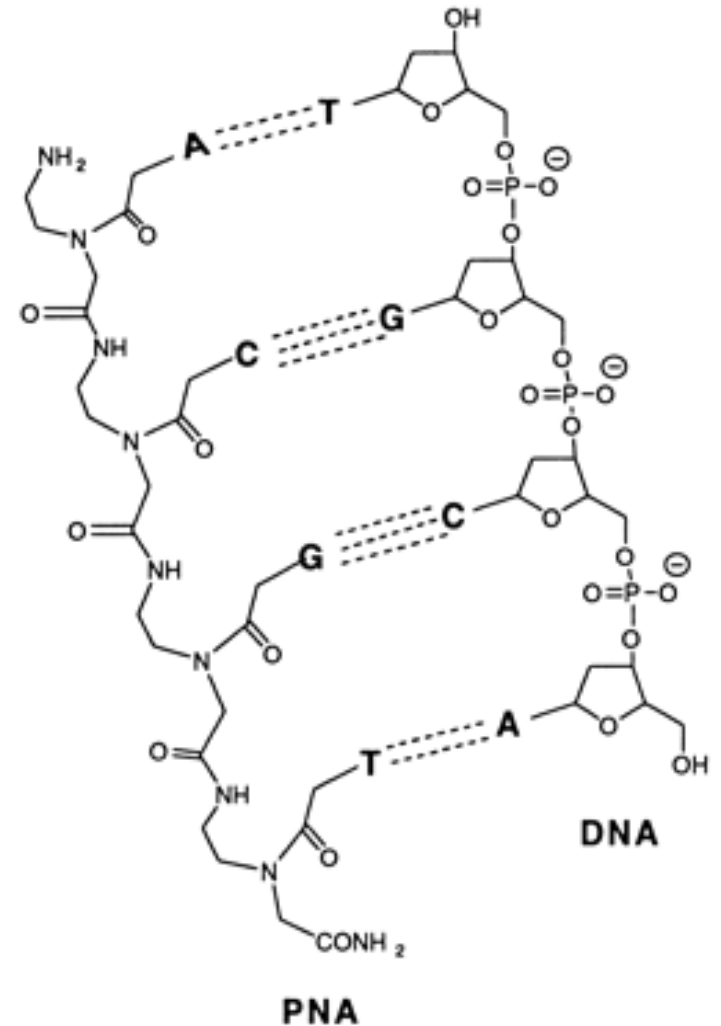
Gli acidi peptidonucleici (PNA)

I PNA sono polimeri organici analoghi agli acidi nucleici in cui lo scheletro zuccherofosfato è completamente sostituito da una struttura pseudo peptidica.

I PNA sono in grado di appaiarsi con molecole di DNA o RNA complementari.

I PNA non possono essere degradati da nucleasi o proteasi.

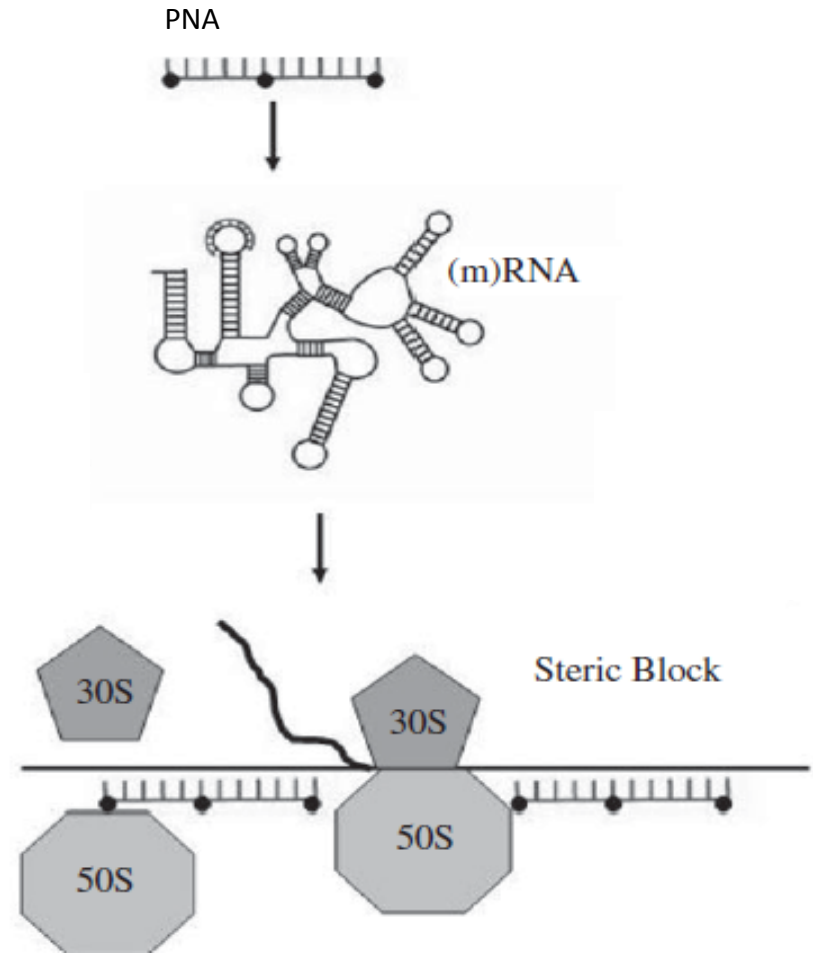
Il legame PNA/DNA o PNA/RNA è più stabile di quello DNA/DNA o DNA/RNA.



I PNA per la terapia antisense antibatterica

In base alla loro sequenza i PNA possono appaiarsi con determinati mRNA bersaglio, inibendone la traduzione.

Se questi mRNA codificano per proteine essenziali alla crescita del microrganismo, i PNA avranno un effetto antimicrobico.



Strategie antisenso basate su PNA sono state utilizzate con successo per inibire la crescita di una vasta gamma di batteri patogeni

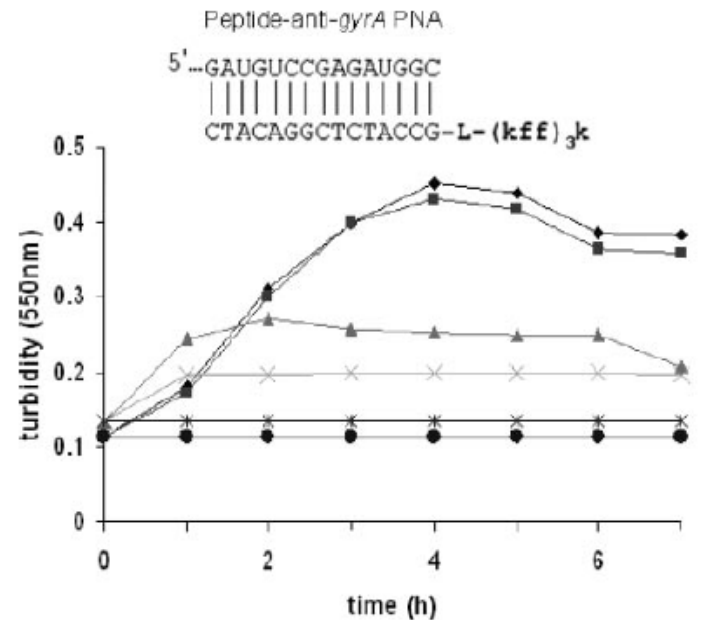
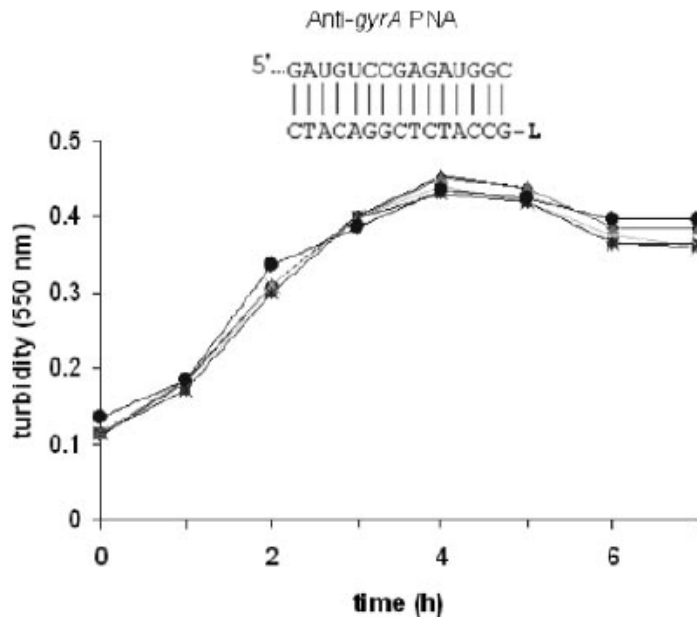
	Microrganismi	Gene bersaglio	Proteina codificata	Referenze
Gram-negativi	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>rpoD</i>	RNA polimerasi, subunità σ^{70}	Bai <i>et al.</i> (2012) <i>Biomaterials</i> 33:659-667.
	<i>Brucella suis</i>	<i>polA</i>	DNA polimerasi I, necessaria per la replicazione del DNA	Rajasekaran <i>et al.</i> (2013) <i>Int J Antimicrob Agents</i> 41:358-362.
	<i>Escherichia coli</i>	<i>folA</i>	Diidrofolato reduttasi, sintesi dell'acido folico	Dryselius <i>et al.</i> (2005) <i>J Antimicrob Chemother</i> 56:97-103.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>murA</i>	Proteina coinvolta nella sintesi del peptidoglicano	Mondhe <i>et al.</i> (2014) <i>PLoS ONE</i> 9:1-8.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>acpP</i>	Proteina trasportatrice di gruppi acili, essenziale per la biosintesi degli acidi grassi	Ghosal e Nielsen (2012) <i>Nucleic Acid Ther</i> 22:323-334.
	<i>Salmonella enterica ser. Typhimurium</i>	<i>murA</i>	Proteina coinvolta nella sintesi del peptidoglicano	Mondhe <i>et al.</i> (2014) <i>PLoS ONE</i> 9:1-8.
	<i>Shigella flexneri</i>	<i>rpoD</i>	RNA polimerasi, subunità σ^{70}	Bai <i>et al.</i> (2012) <i>Biomaterials</i> 33:659-667.
Gram-positivi	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>ftsZ</i>	Proteina coinvolta nella divisione cellulare	Mondhe <i>et al.</i> (2014) <i>PLoS ONE</i> 9:1-8.
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>rpoA</i>	RNA polimerasi, subunità α	Alajlouni e Seleem (2013) <i>Nucleic Acid Ther</i> 23:363-367.
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>inhA</i>	Reduttasi coinvolta nell'allungamento degli acidi grassi	Kulyté <i>et al.</i> (2005) <i>J Mol Microbiol Biotech</i> 9:101-109.
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>fmhB</i>	Proteina coinvolta nella sintesi del peptidoglicano	Nekhotiaeva <i>et al.</i> (2004) <i>Mol Ther</i> 10:652-659.
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>gyrA</i>	DNA girasi, subunità A, parte del processo replicativo del DNA	Patenge <i>et al.</i> (2013) <i>Mol Ther Nucleic Acids</i> 2:1-9.

Ingresso dei PNA nelle cellule batteriche

L'ingresso dei PNA nelle cellule è normalmente molto limitato.

Perché i PNA possano entrare nelle cellule, questi devono essere coniugati a *Cell Penetrating Peptides*, come ad esempio $(KFF)_3K$ o $(RXR)_4XB$.

Effetto di un PNA anti-*gyrA* sulla crescita di *K. pneumoniae*.



Come disegnare PNA efficaci

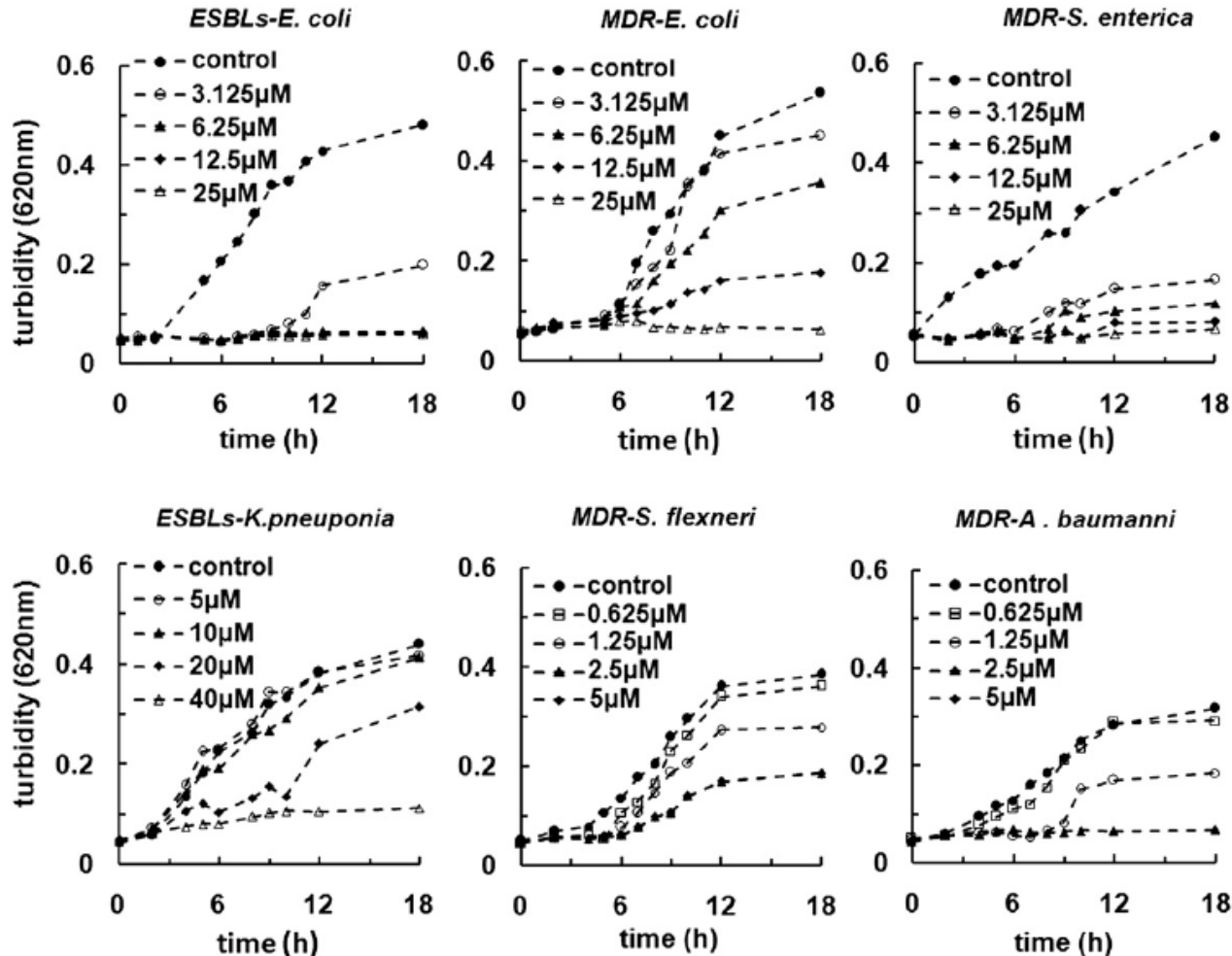
**Si possono generare PNA ad ampio spettro d'azione o
specie-specifici**

A seconda del grado di conservazione della loro sequenza bersaglio, si possono disegnare PNA:

- **ad ampio spettro d'azione:** in grado di inibire la crescita di patogeni appartenenti a generi e specie differenti;
- **specie-specifici:** approccio mirato, inibiscono la crescita di un solo patogeno senza creare disbiosi nel microbiota dell'ospite.

PNA ad ampio spettro d'azione

Un PNA disegnato su una regione conservata dell'mRNA del gene *rpoD* è in grado di inibire la crescita di diversi patogeni Gram-negativi, anche antibiotico resistenti.



PNA specie-specifici

Se si prede in esame una regione dell'mRNA non conservata, si possono disegnare PNA in grado di inibire in modo selettivo la crescita di una sola specie batterica.

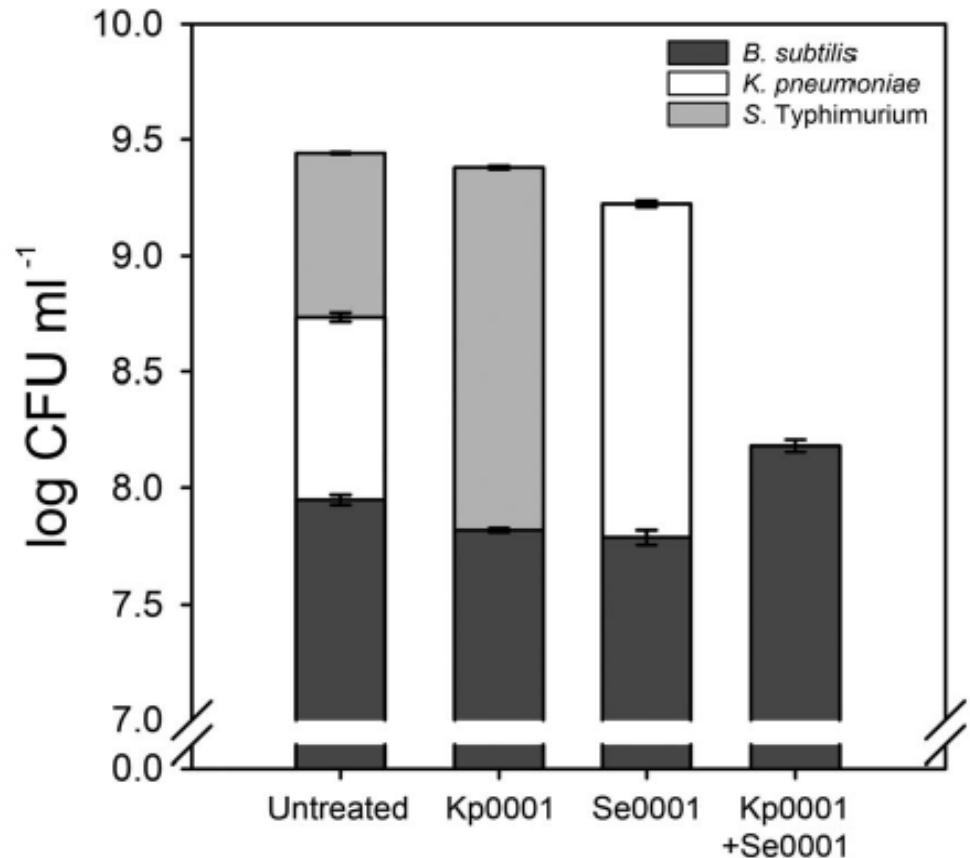
I PNA Kp0001 e Se0001 sono disegnati sulla stessa regione del gene *murA*, che codifica per un enzima necessario alla sintesi del peptidoglicano.

PNA Kp0001:

- appaiamento perfetto con l'mRNA del gene *murA* di *K. pneumoniae*;
- 2 mismatch con l'mRNA del gene *murA* di *B. subtilis* e *S. enterica* ser. Typhimurium.

PNA Se0001:

- appaiamento perfetto con l'mRNA del gene *murA* di *S. enterica* ser. Typhimurium;
- 2 mismatch con l'mRNA del gene *murA* di *B. subtilis* e *K. pneumoniae*.



I PNA non sono citotossici

Affinché i PNA possano essere utilizzati come farmaci contro le infezioni batteriche, questi non devono essere tossici per le cellule superiori.

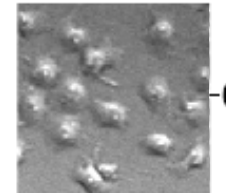
Nonostante siano disponibili ancora pochi dati a riguardo, i PNA non sembrano avere effetti di citotossicità su cellule HeLa.

Colonna di sinistra: cellule HeLa trattate con un PNA disegnato per inibire l'espressione del gene *acpP* (codificante per una proteina essenziale alla sintesi di acidi grassi) di *E. coli*.

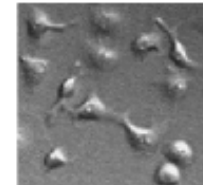
Colonna di destra: cellule HeLa infettate con *E. coli* e trattate con lo stesso PNA.



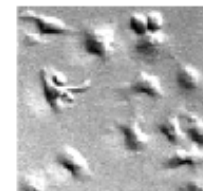
Cellule HeLa
+ PNA



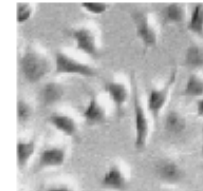
0



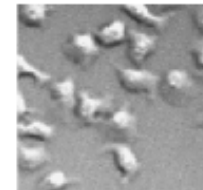
1



2



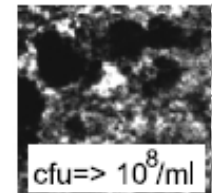
5



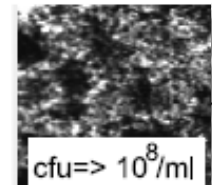
20

PNA treatment μM

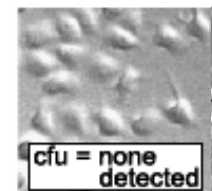
Cellule HeLa
+ PNA + *E. coli*



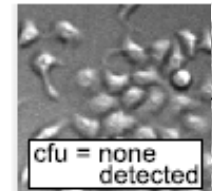
0



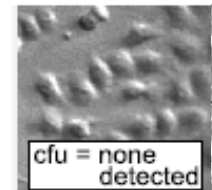
1



2



5



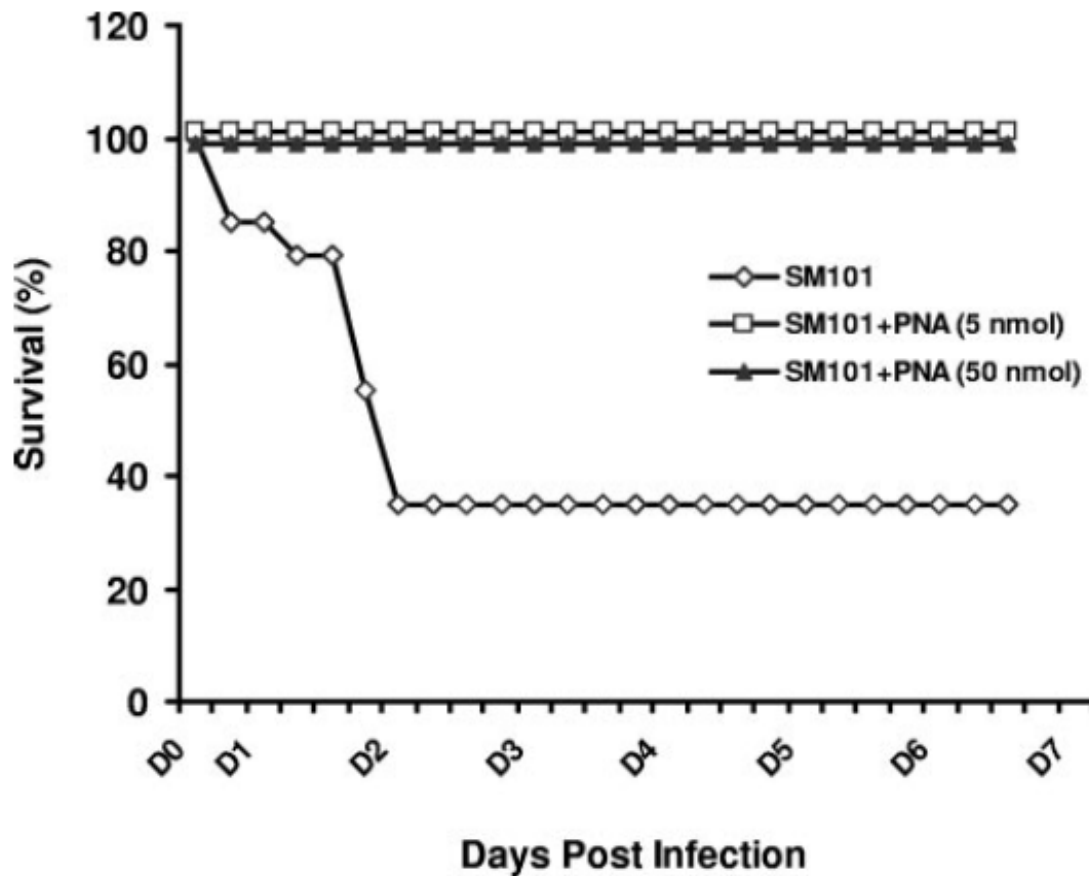
20

PNA treatment μM

I PNA sono efficaci in modelli *in vivo*

Affinché i PNA possano essere utilizzati come farmaci contro le infezioni batteriche, questi devono essere efficaci *in vivo*.

I primi risultati sono incoraggianti.



Sopravvivenza di topi infettati da *E. coli* SM101 (somministrato mediante iniezione intraperitoneale) in seguito al trattamento con un PNA anti-*acpP*.

Quali altre strategie antimicrobiche si stanno perseguendo?

Una strategia perseguita è quella di rendere di nuovo efficaci antibiotici che non lo sono più.

Adiuvanti ed inibitori delle pompe d'efflusso

Sinergie con composti naturali o sintetici

Si possono anche immaginare nuovi farmaci che impongano una ridotta pressione selettiva, e che quindi non portino all'emergenza di resistenze.

Molecole xenobiotiche

Inibitori della virulenza

Inibizione della virulenza

Una strategia alternativa per ridurre il potenziale patogeno dei microrganismi è quella di inibirne la produzione di fattori di virulenza, anziché la crescita.

Si crede che questa strategia possa consentire al sistema immunitario di risolvere l'infezione, imponendo una limitata pressione selettiva per l'insorgenza di mutanti resistenti agli agenti anti-virulenza.



Small-Molecule Inhibitor of *Vibrio cholerae* Virulence and Intestinal Colonization

Deborah T. Hung,* Elizabeth A. Shakhnovich,
Emily Pierson, John J. Mekalanos

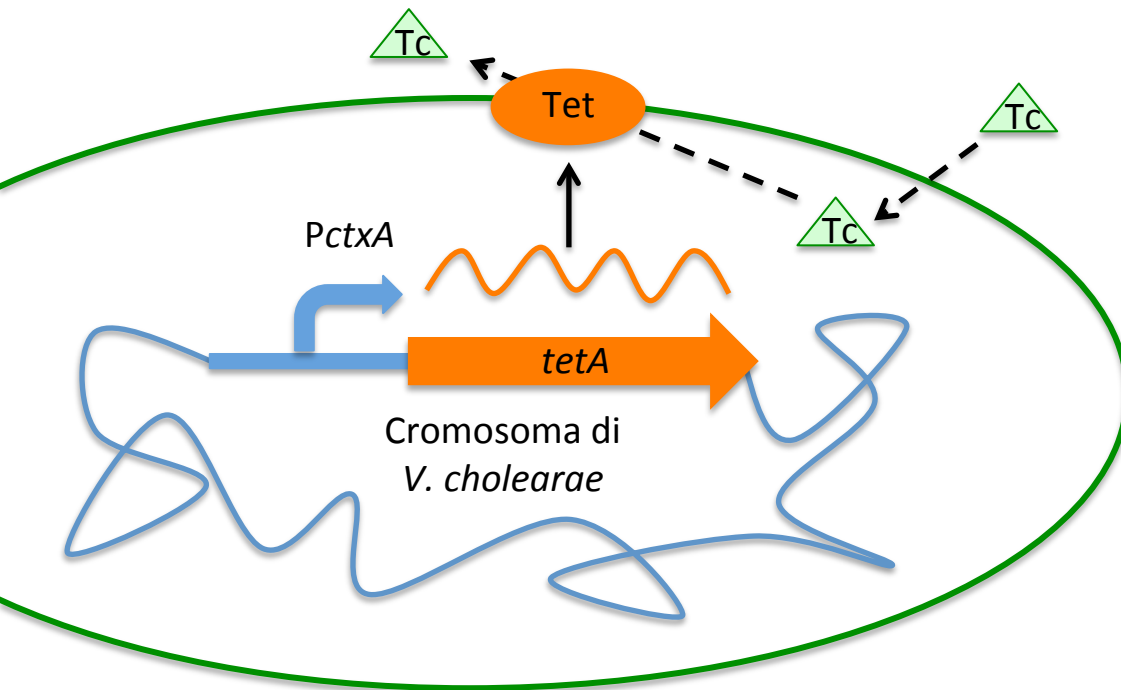
Increasing antibiotic resistance requires the development of new approaches to combating infection. Virulence gene expression in vivo represents a target for antibiotic discovery that has not yet been explored. A high-throughput, phenotypic screen was used to identify a small molecule 4-[N-(1,8-naphthalimide)]-n-butyric acid, virstatin, that inhibits virulence regulation in *Vibrio cholerae*. By inhibiting the transcriptional regulator ToxT, virstatin prevents expression of two critical *V. cholerae* virulence factors, cholera toxin and the toxin coregulated pilus. Orogastric administration of virstatin protects infant mice from intestinal colonization by *V. cholerae*.

La virstatina come composto anti-virulenza in *V. cholerae*

Nel lavoro di Mekalanos e collaboratori sono stati testati 50.000 composti della library Chembridge Research Laboratories per identificare inibitori della produzione di fattori di virulenza in *V. cholerae*.

Come sistema reporter è stato utilizzato un ceppo di *V. cholerae* O395 nel cui cromosoma era stato inserito il gene per la resistenza alla tetraciclina *tetA* sotto il controllo del promotore *PctxA* della tossina colerica.

Crescendo il ceppo reporter in microtiter in presenza di tetraciclina e dei composti della *library*, era possibile identificare inibitori della trascrizione del promotore *PctxA* (e verosimilmente della produzione di tossina colerica) come sensibili alla tetraciclina.



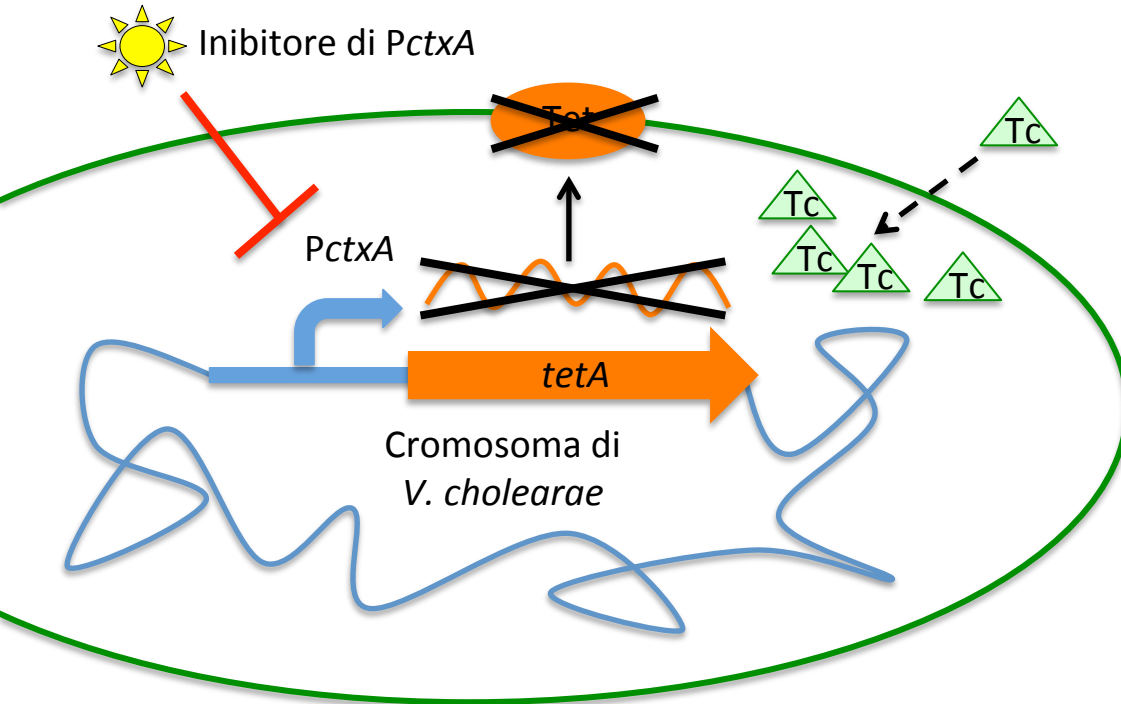
Se il promotore *PctxA* è attivo, il ceppo reporter di *V. cholerae* esprime il gene *tetA*, e di conseguenza è in grado di crescere in presenza di tetraciclina.

La virstatina come composto anti-virulenza in *V. cholerae*

Nel lavoro di Mekalanos e collaboratori sono stati testati 50.000 composti della library Chembridge Research Laboratories per identificare inibitori della produzione di fattori di virulenza in *V. cholerae*.

Come sistema reporter è stato utilizzato un ceppo di *V. cholerae* O395 nel cui cromosoma era stato inserito il gene per la resistenza alla tetraciclina *tetA* sotto il controllo del promotore *PctxA* della tossina colerica.

Crescendo il ceppo reporter in microtiter in presenza di tetraciclina e dei composti della *library*, era possibile identificare inibitori della trascrizione del promotore *PctxA* (e verosimilmente della produzione di tossina colerica) come sensibili alla tetraciclina.

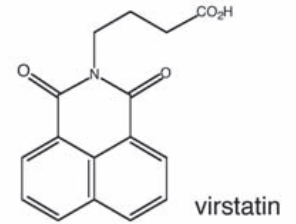


In presenza di una molecola che inibisca l'attività del promotore *PctxA*, il ceppo reporter di *V. cholerae* non esprimerà il gene *tetA*, e di conseguenza non sarà in grado di crescere in presenza di tetraciclina.

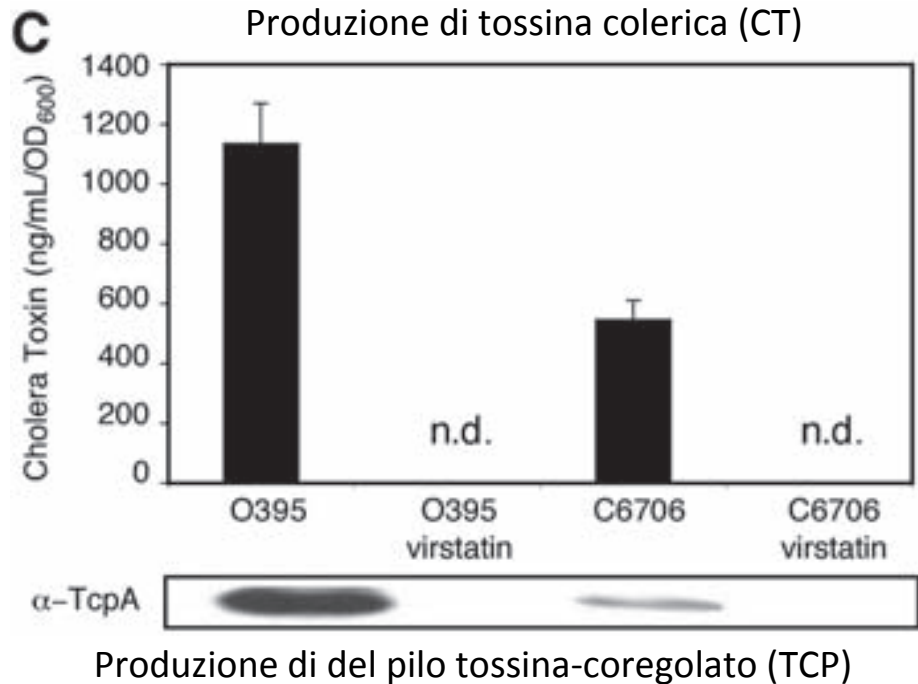
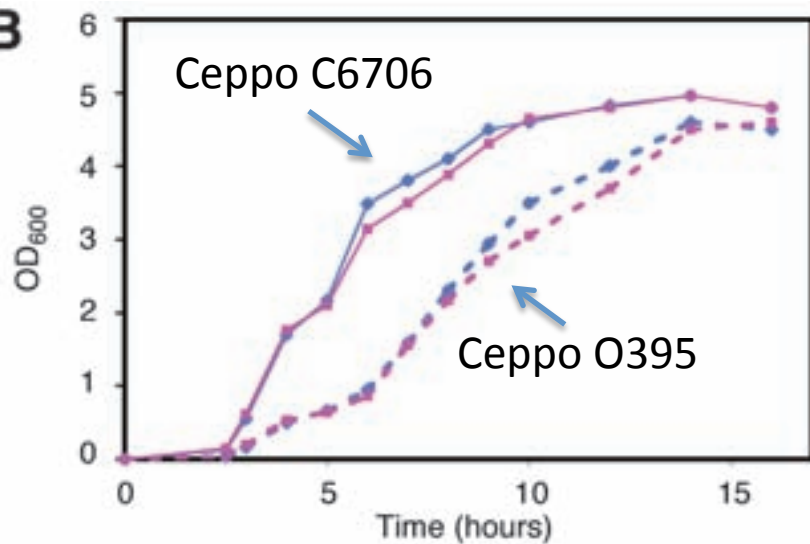
La virstatina come composto anti-virulenza in *V. cholerae*

15 composti rendevano sensibile il ceppo reporter alla tetraciclina, ma non alteravano la crescita del batterio in assenza dell'antibiotico.

Tra questi è stata studiata in dettaglio la virstatina.



Curve di crescita senza virstatina (blu) o con virstatina (rosa)



Nei ceppi O395 e C6706, la virstatina non ha effetto sulla crescita, ma abolisce la produzione di tossina colerica (CT) e del pilo tossina-coregolato (TCP).

La virstatina come composto anti-virulenza in *V. cholerae*

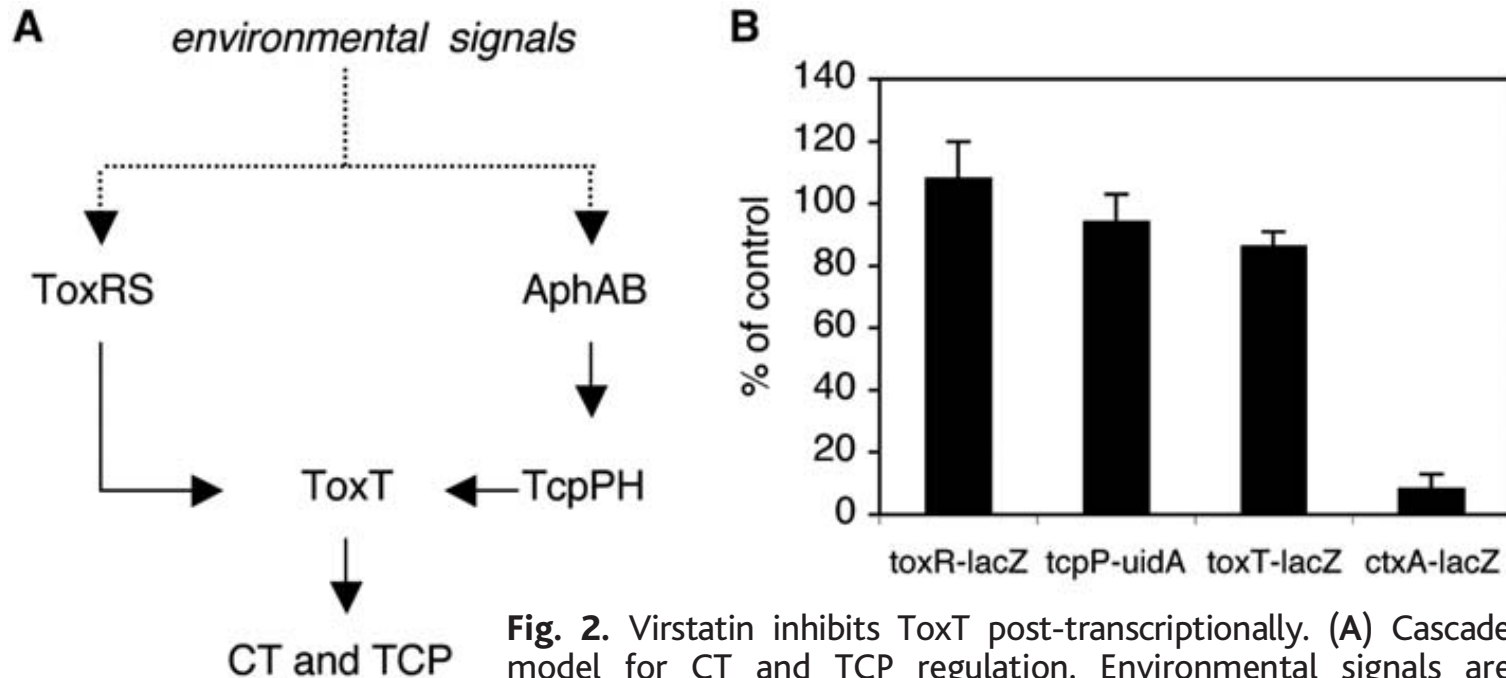


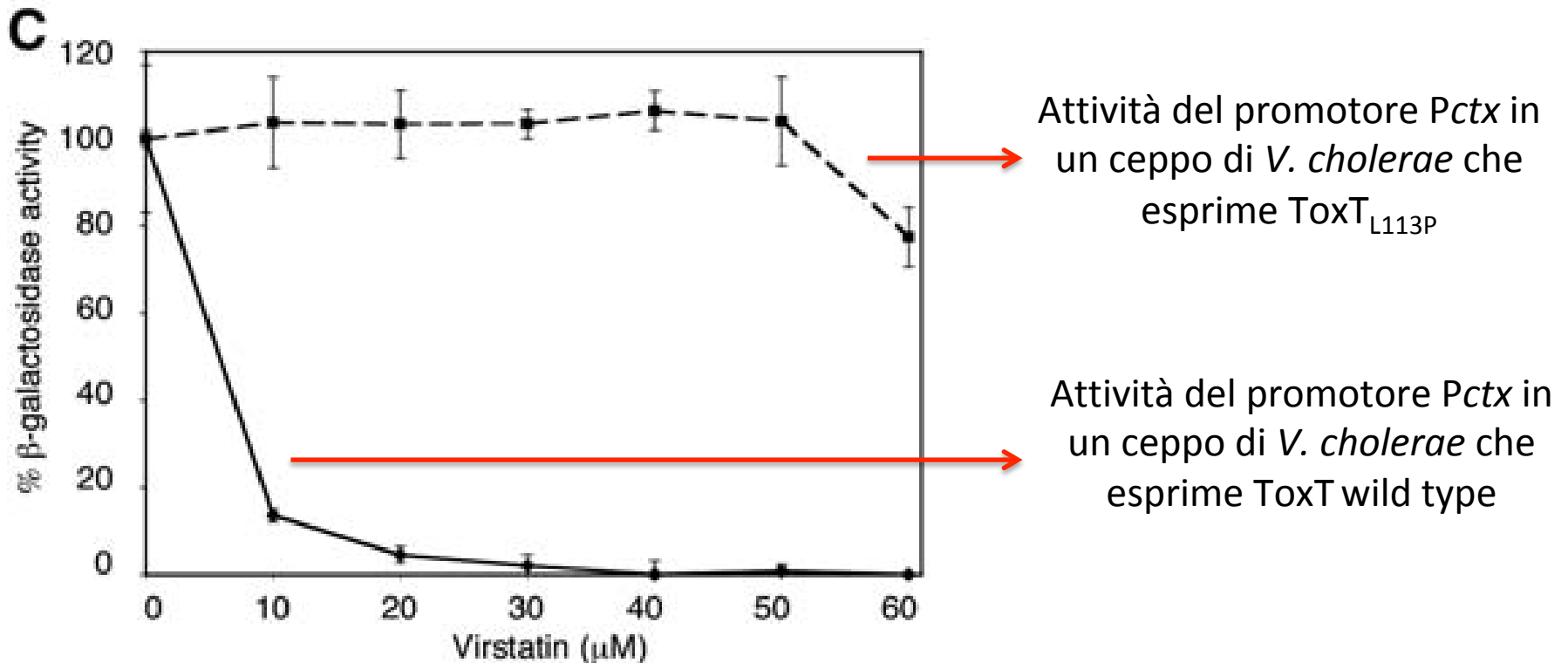
Fig. 2. Virstatin inhibits ToxT post-transcriptionally. **(A)** Cascade model for CT and TCP regulation. Environmental signals are transduced by AphAB, TcpPH, and ToxRS, of which the latter two transcriptionally activate *toxT*. ToxT then activates *ctx* and *tcp* transcription. **(B)** Virstatin inhibits *ctx* but not *toxR*, *tcpP*, or *toxT* transcription. Transcriptional reporter strains (O395) were grown overnight under virulence-inducing conditions (pH 6.5 and 30°C) in the presence of DMSO control or virstatin (50 μ M). Transcriptional fusions of *toxR*, *toxT*, and *ctxA* with *lacZ* were assayed for β -galactosidase activity. A transcriptional fusion of *tcpP* with *uidA* was assayed for β -glucuronidase activity. Data are presented as the percentage of reporter activity in the presence of virstatin compared to the DMSO control. Error bars represent the standard deviation for samples performed in triplicate.

La virstatina non altera la trascrizione dei regolatori del promotore *Pctx*. Un'analisi microarray ha dimostrato che la virstatina inibisce la trascrizione dei circa 20 geni noti per essere attivati da ToxT.

La virstatina come composto anti-virulenza in *V. cholerae*

Studi successivi hanno dimostrato che la virstatina lega il regolatore ToxT e ne inibisce l'attività.

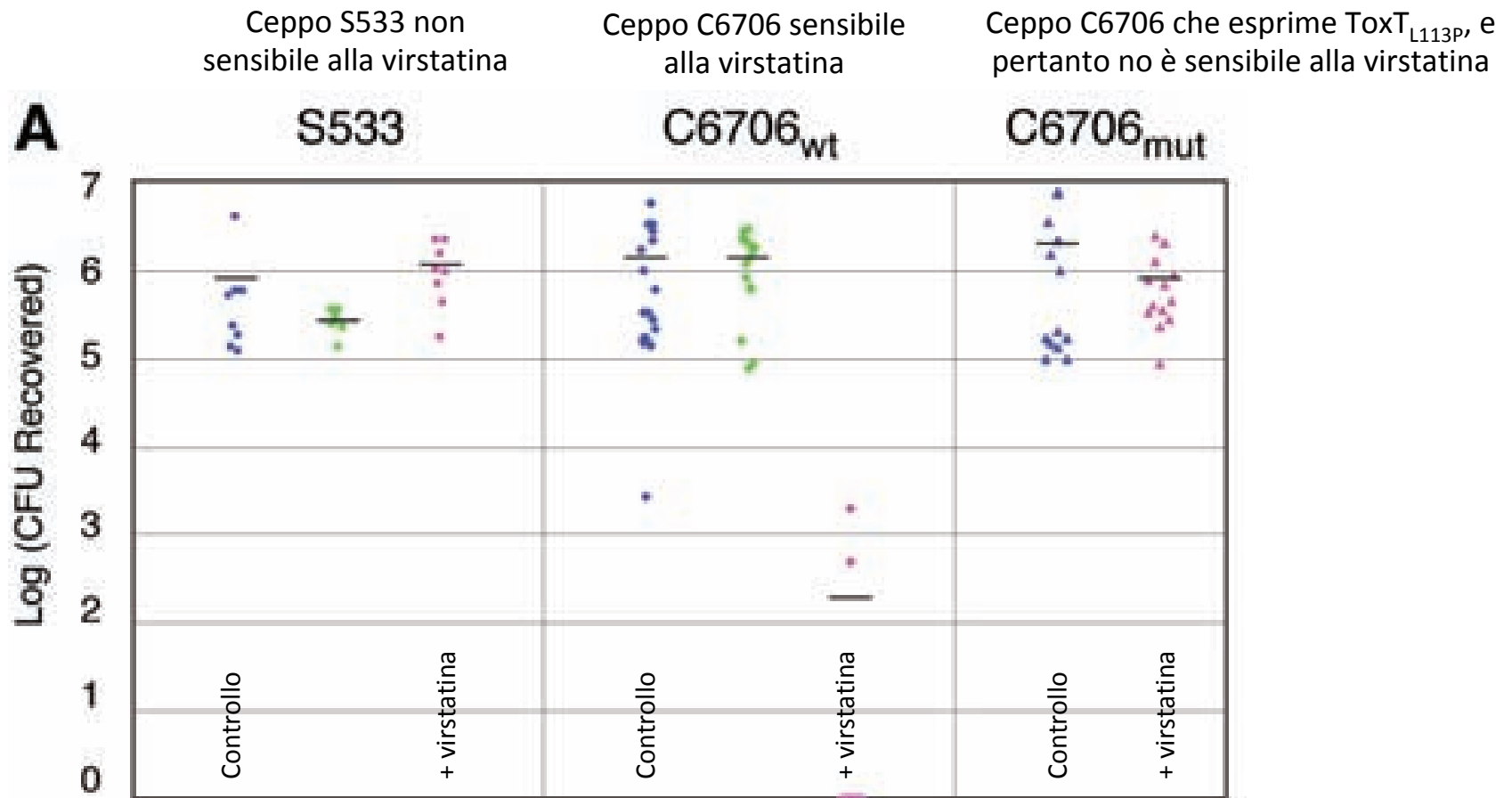
È stato identificato un ceppo di *V. cholerae*, S533, che non è sensibile alla virstatina. Questo ceppo esprime una variante mutata di ToxT, ToxT_{L113P}, che non lega la virstatina, e che quindi non è inibita da tale molecola.



La virstatina come composto anti-virulenza in *V. cholerae*

La virstatina riduce il potenziale di *V. cholerae* di colonizzare l'intestino in un modello di infezione murino.

Purtroppo la virstatina non è attiva verso i ceppi che esprimono la variante mutata di ToxT.



La virstatina come composto anti-virulenza in *V. cholerae*

In conclusione, abbiamo visto come la virstatina possa ridurre la capacità di *V. cholerae* di colonizzare l'intestino dell'ospite. Ciò è dovuto all'inibizione dell'attività del regolatore trascrizionale ToxT, che in presenza di virstatina non è in grado di attivare la trascrizione dei geni codificanti per CT e CTP, due dei maggiori fattori di colonizzazione e virulenza in questo patogeno.

Purtroppo, possono emergere mutazioni in ToxT che lo rendono insensibile alla virstatina.

L'approccio di inibire la virulenza anziché la crescita è ancora valido ?

Quale sarà la pressione selettiva esercitata dall'ambiente sui ceppi di *V. cholerae* resistenti alla virstatina ?

Cosa succede in microrganismi in cui la virulenza è multifattoriale ?

Il quorum sensing e la sociomicrobiologia

Dalla prima osservazione e descrizione dei batteri ad opera di Antoni van Leeuwenhoek nel 1667, per centinaia di anni si è ritenuto che i batteri fossero entità individuali, senza interazioni sociali con altri organismi, il cui unico scopo era quello di riprodurre sé stessi. Questo concetto è evidente nelle parole del grande scienziato francese François Jacob:

“E’ perfettamente possibile immaginare un universo alquanto noioso, senza sesso, senza ormoni, e senza sistema nervoso; un universo popolato solo da cellule individuali che si riproducono ad infinitum. Infatti, questo universo esiste, è quello formato da una coltura batterica.”

François Jacob, 1973 - Premio Nobel per la medicina nel 1965 insieme a Jacques Monod e André Lwoff per le scoperte riguardanti il controllo genico della sintesi di virus ed enzimi.



Il quorum sensing e la sociomicrobiologia

In realtà, già nel 1965, sulla prestigiosa rivista scientifica *Nature* era stato pubblicato un lavoro rivoluzionario dello scienziato ungherese Alexander Tomasz.

In questo lavoro Tomasz dimostrò che l'ingresso nella fase di competenza (la capacità di acquisire DNA esogeno) di una popolazione di *Streptococcus pneumoniae* dipende da un fattore extracellulare prodotto e secreto dalle stesse cellule di *S. pneumoniae*.

Solo 30 anni dopo è stato dimostrato che il fattore di competenza descritto da Tomasz come un *"hormone-like factor"* è un polipeptide modificato.

Con un'incredibile capacità intuitiva e lungimiranza, nel suo lavoro Tomasz scrisse:

"Poiché l'attivatore - il composto chimico prodotto dai batteri - sembra imporre un elevato grado di omogeneità fisiologica nella popolazione di pneumococchi rispetto al loro stato di competenza, si è portati a credere che in questo caso la popolazione possa agire come una singola entità biologica, con un considerevole grado di coordinazione tra i suoi membri. Mi chiedo se questo tipo di controllo non possa essere operativo anche in altri fenomeni microbici."

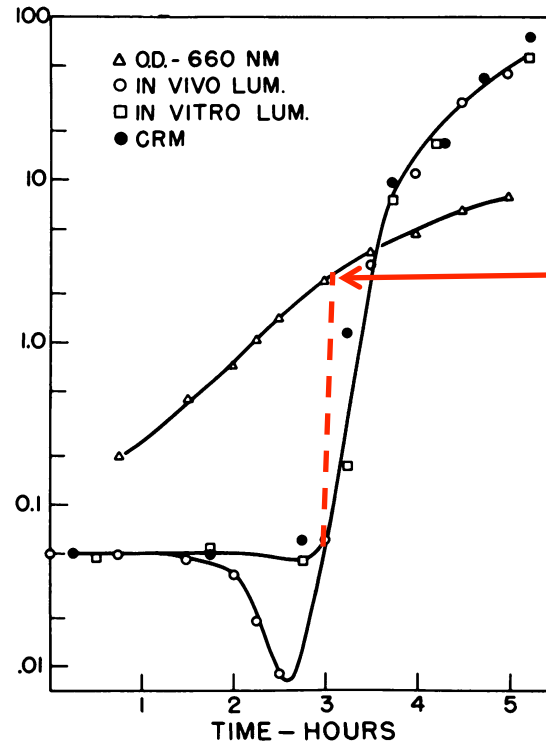


A. Tomasz, attualmente a capo del laboratorio di *Microbiologia e Malattie Infettive* alla Rockefeller University, NY, USA.

Il quorum sensing e la sociomicrobiologia

Cinque anni dopo, nel 1970, Hasting e collaboratori pubblicarono un articolo sulla rivista scientifica *Journal of Bacteriology* in cui descrivevano come l'emissione di bioluminescenza nel batterio *Vibrio fischeri* fosse dipendente dalla densità cellulare della coltura formata da tale batterio; *V. fischeri* emetteva bioluminescenza solo ad alte densità cellulari, ma non quando le cellule erano diluite nel mezzo colturale.

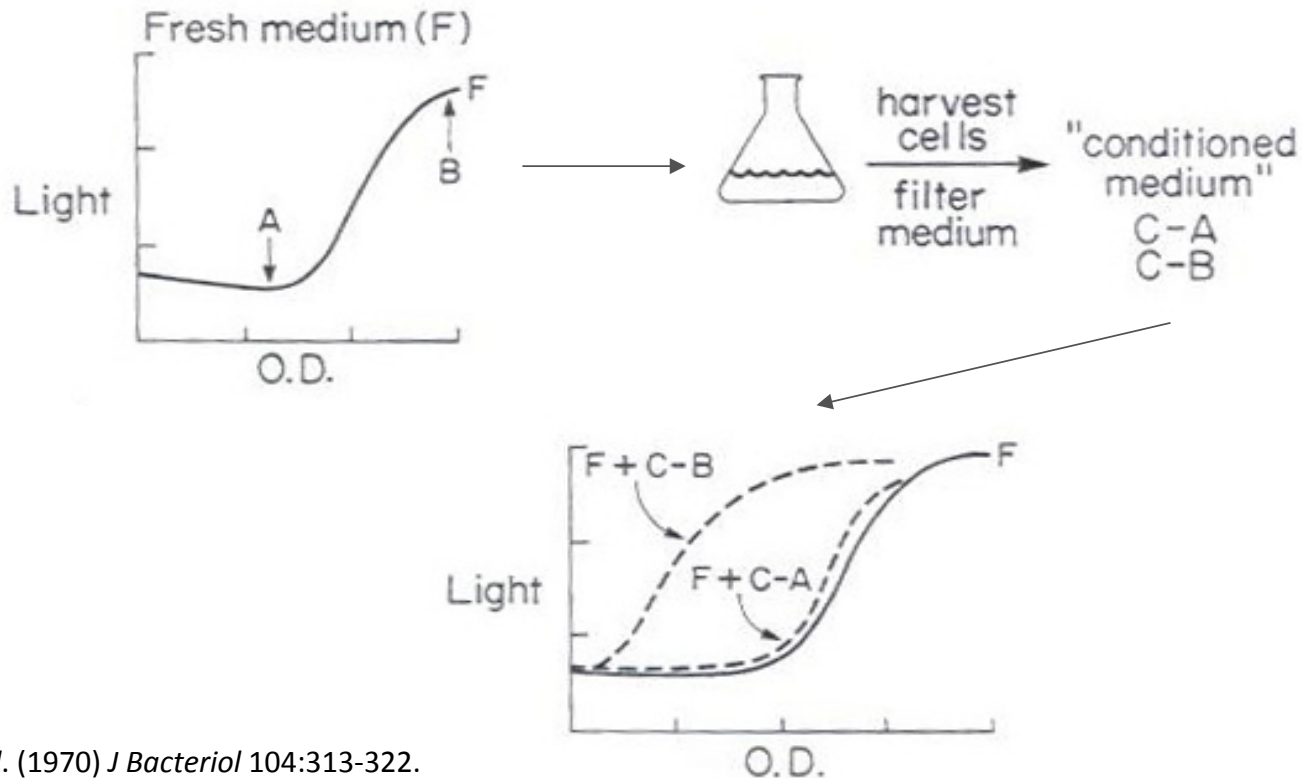
culture of *V. fischeri*



Bioluminescence is emitted only at high cell density

Il quorum sensing e la sociomicrobiologia

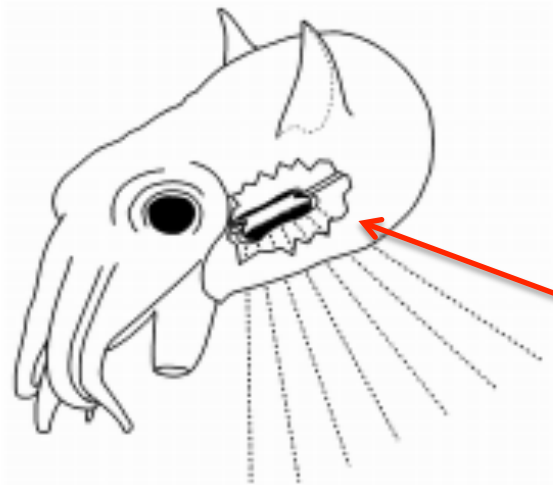
Inoltre, i ricercatori dimostrarono che era possibile indurre bioluminescenza in una coltura di *V. fischeri* a bassa densità cellulare aggiungendo al terreno di crescita il mezzo colturale proveniente da una coltura dello stesso batterio ad alta densità cellulare, privato delle cellule batteriche. Quindi i batteri producevano una molecola che si accumulava nel mezzo di coltura durante la crescita, e quando raggiungeva una certa concentrazione era in grado di attivare l'emissione di bioluminescenza.



Il quorum sensing e la sociomicrobiologia

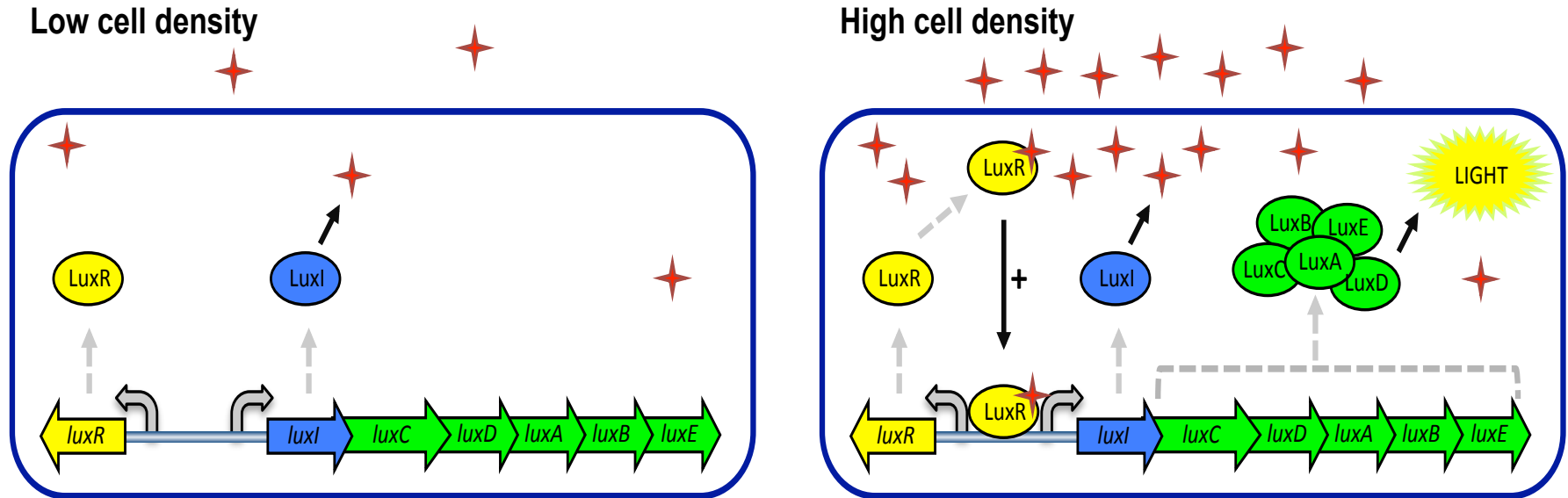
V. fischeri è un batterio marino che al calare del sole colonizza l'organo della luce della seppia *Euprymna scolopes*, dove trova una nicchia ecologica protetta e ricca di nutrimento, e dove può quindi crescere fino a raggiungere un'alta densità cellulare. L'emissione di luce da parte di *V. fischeri* maschera l'ombra che la seppia proietterebbe altrimenti sul fondale, dovuta alla luce della luna. In questo modo *V. fischeri* riduce il tasso di predazione di *E. scolopes* da parte di predatori bentonici.

Euprymna scolopes



Organo della luce
colonizzato da
V. fischeri

Meccanismi di quorum sensing

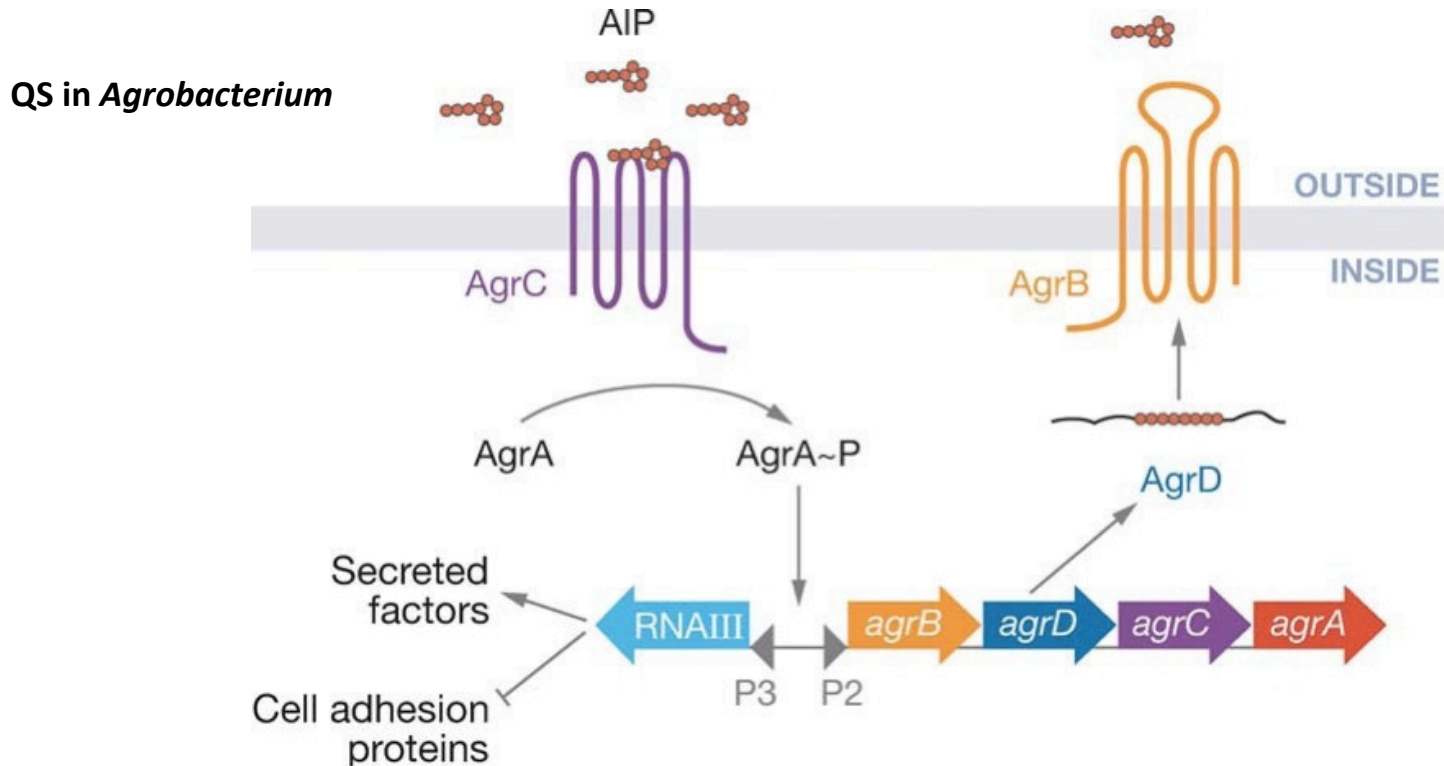


La sintasi LuxI, codificata dal gene *luxI*, produce la molecola segnale 3OC₆-HSL, che viene secreta nel mezzo colturale. La concentrazione di 3OC₆-HSL aumenta nel mezzo in modo proporzionale alla crescita batterica, fino a raggiungere una concentrazione soglia alla quale è in grado di legare il recettore intracellulare LuxR.

Il complesso LuxR/3OC₆-HSL lega alcuni promotori bersaglio, tra cui il promotore dell'operone *luxICDABE*, aumentandone lo stato di attivazione. L'aumento nei livelli trascrizionali di *luxI* genera un'amplificazione del segnale (feedback positivo), e la trascrizione dei geni *luxCDABE* (emissione di bioluminescenza).

Meccanismi di quorum sensing

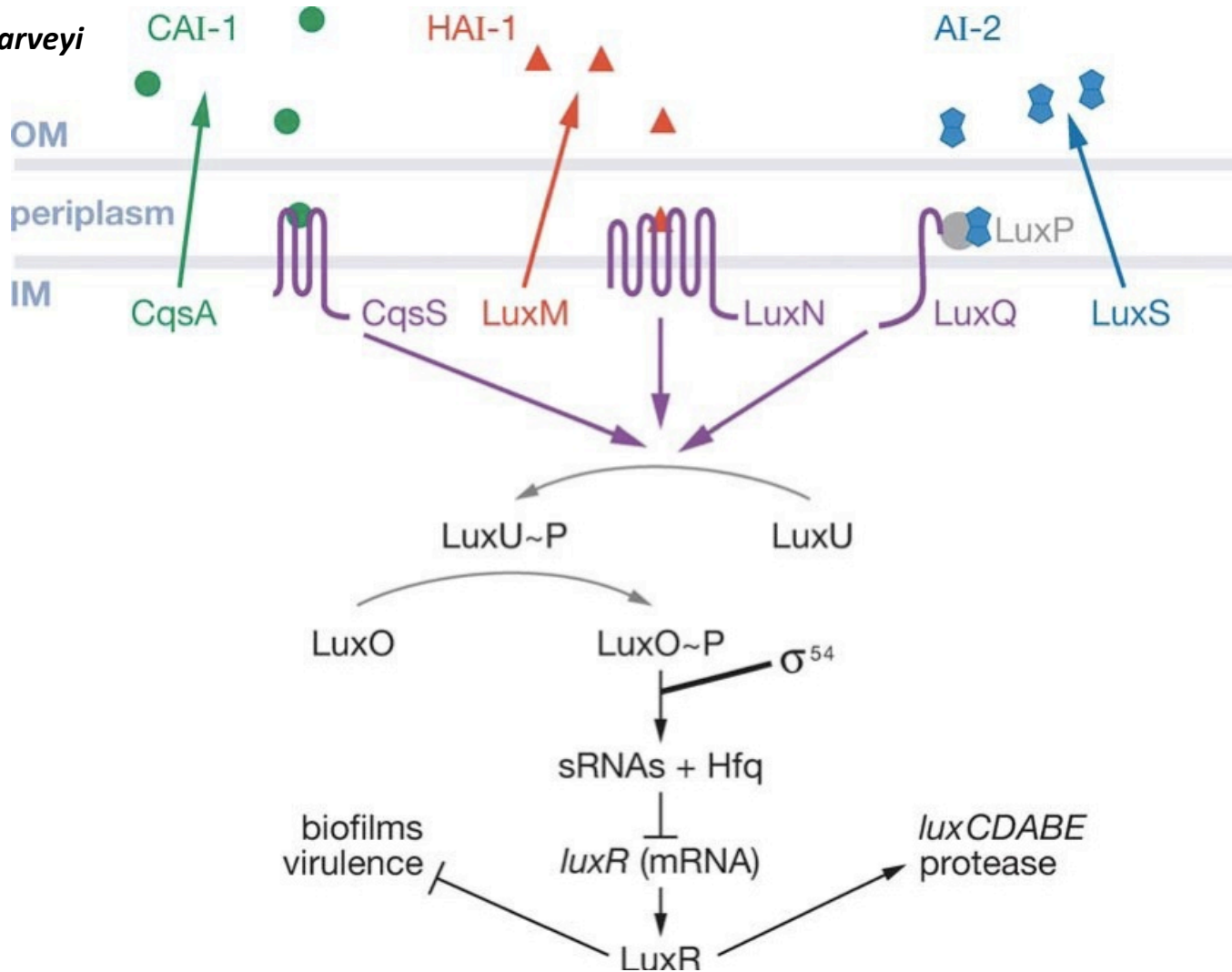
Le molecole segnale più diffuse nei batteri Gram-positivi sono piccoli peptidi, spesso ciclici e modificati. In questo caso la molecola segnale è espressa in forma di pro-peptide non attivo all'interno della cellula. Una proteina di membrana processa il pro-peptide e lo esporta nel mezzo colturale. Qui il peptide attivo è in grado di interagire con un sensore di membrana. Questo segnale viene trasdotto all'interno della cellula mediante una cascata di fosforilazione che attiva il regolatore di risposta di un sistema a due componenti. Il regolatore fosforilato regola l'espressione di geni bersaglio.



Meccanismi di quorum sensing

In alcuni batteri il QS si basa sulla produzione di una singola molecola segnale, mentre altri batteri producono diverse molecole segnale... sono poliglotti!

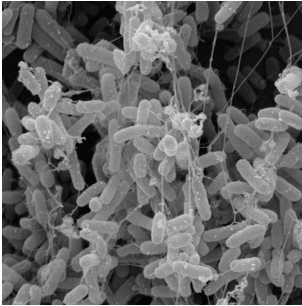
QS in *Vibrio harveyi*



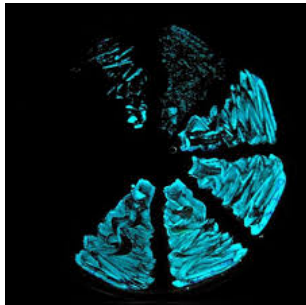
Molti batteri comunicano mediante il quorum sensing

Il sistema di comunicazione intercellulare noto come **quorum sensing (QS)**, controlla attività di gruppo in molti batteri.

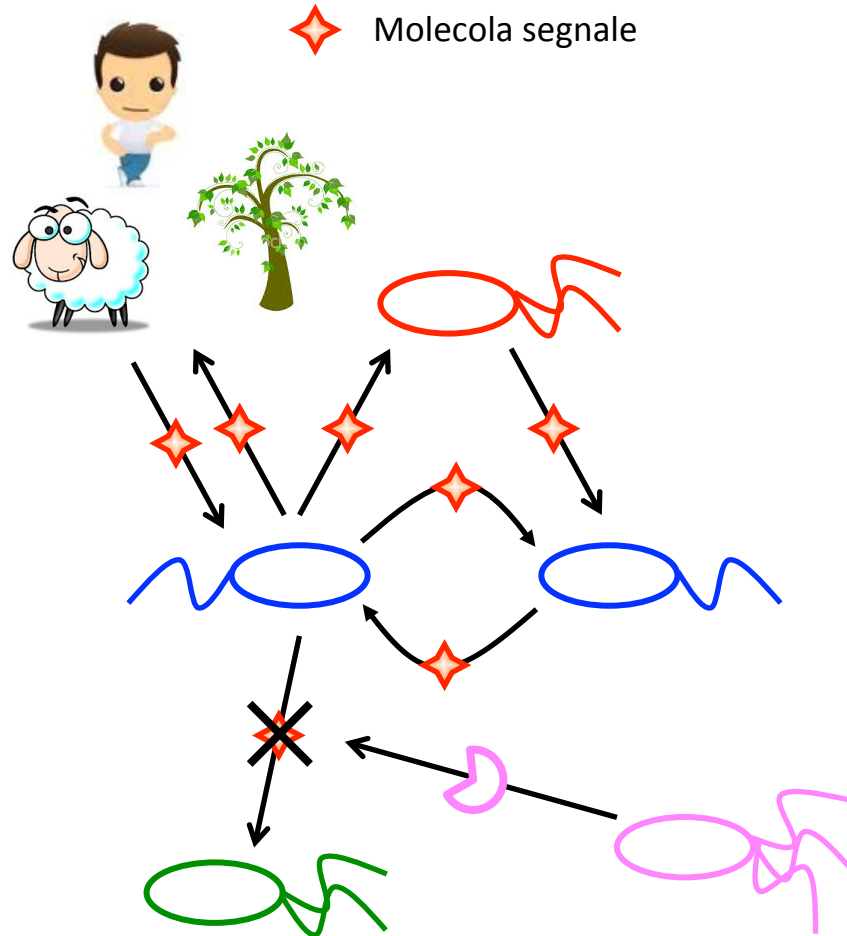
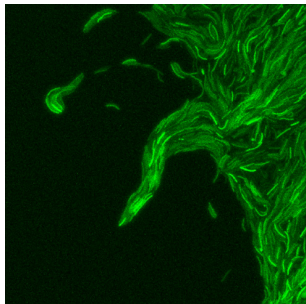
Biofilm



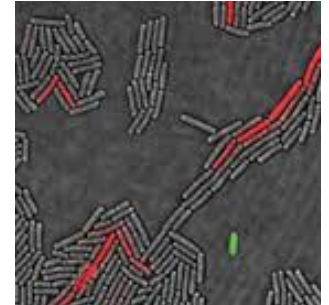
Bioluminescenza



Movimenti collettivi



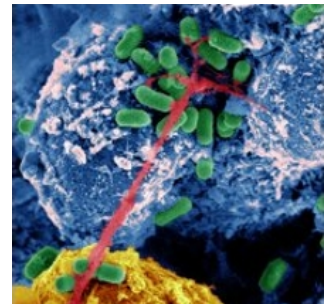
Differenziamento



Metaboliti secondari

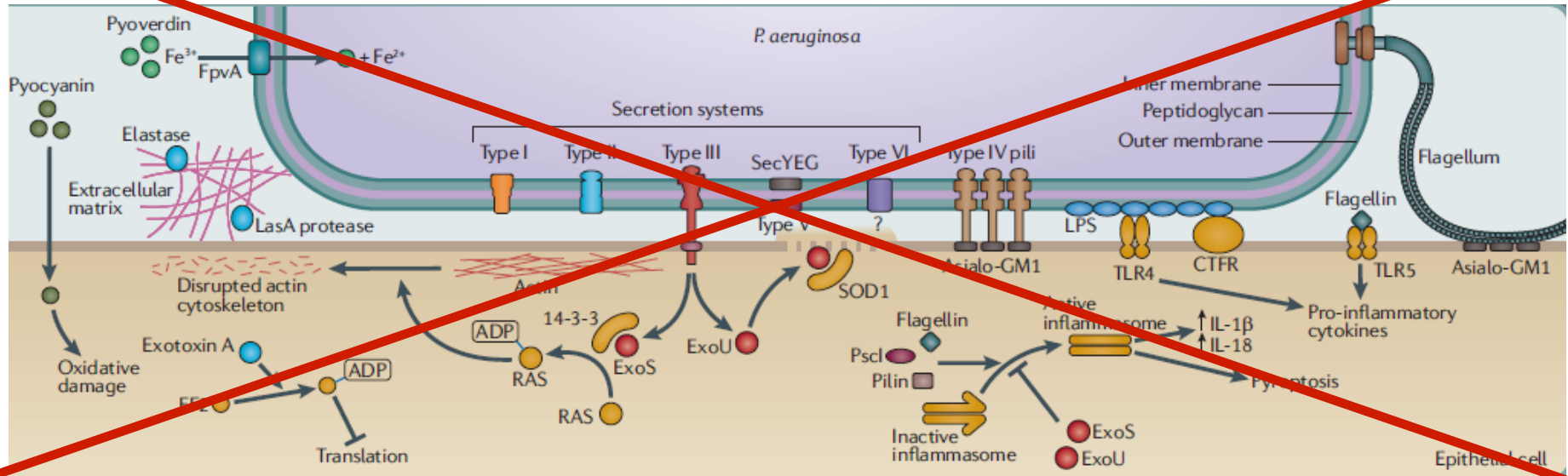


Interazione con l'ospite



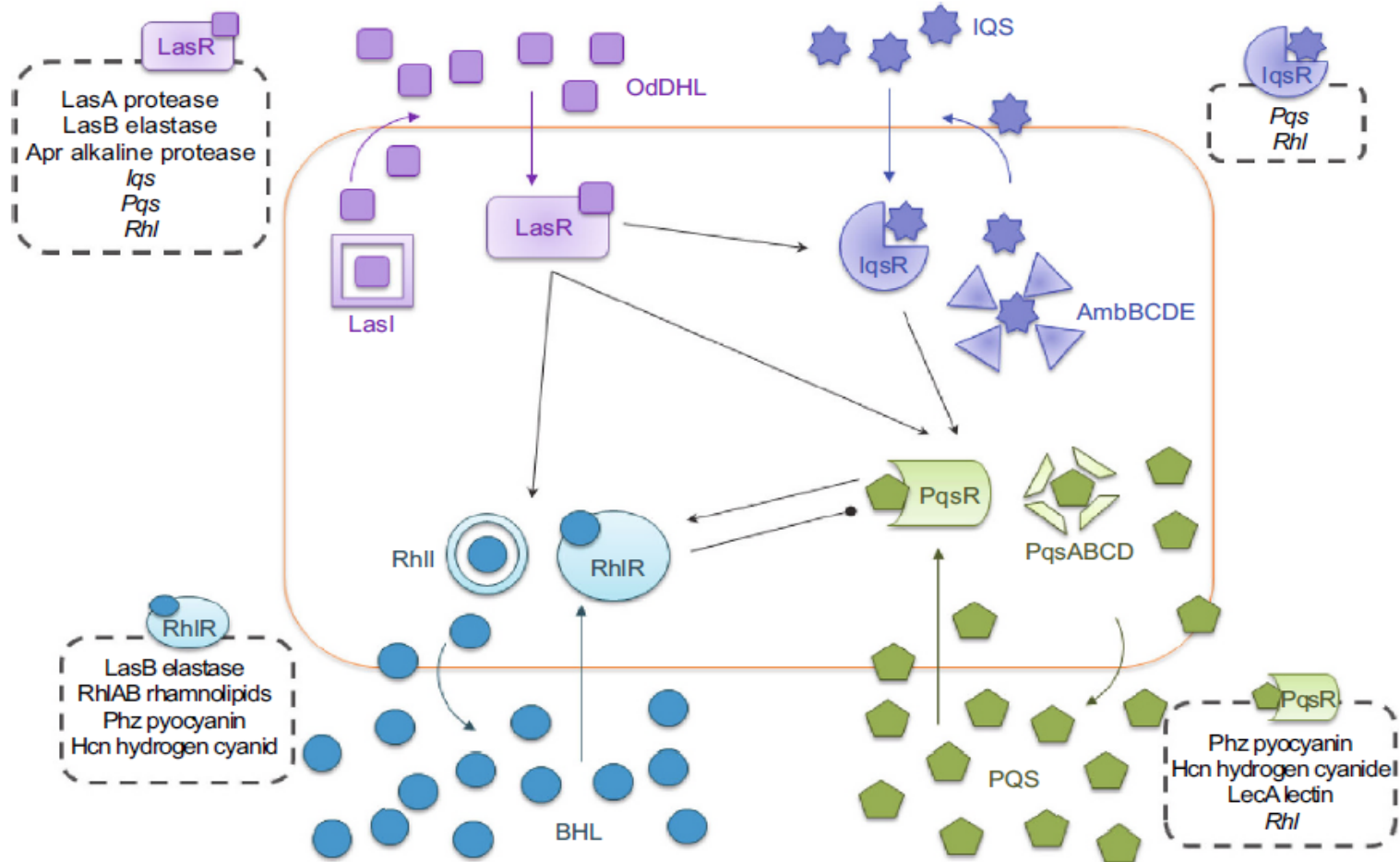
In molti batteri il quorum sensing controlla la produzione di fattori di virulenza e la formazione di biofilm

inibitore —| QS



Quorum sensing e virulenza in *P. aeruginosa*

In *P. aeruginosa* diversi sistemi di QS coordinano la produzione di fattori di virulenza e la formazione di biofilm.



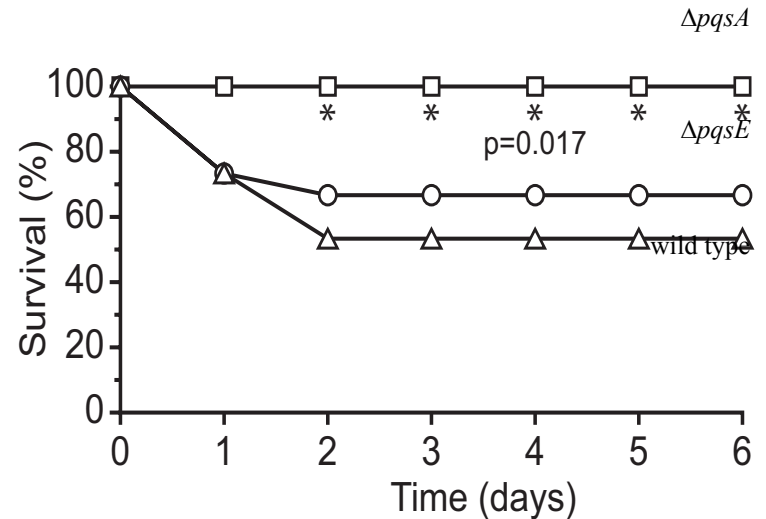
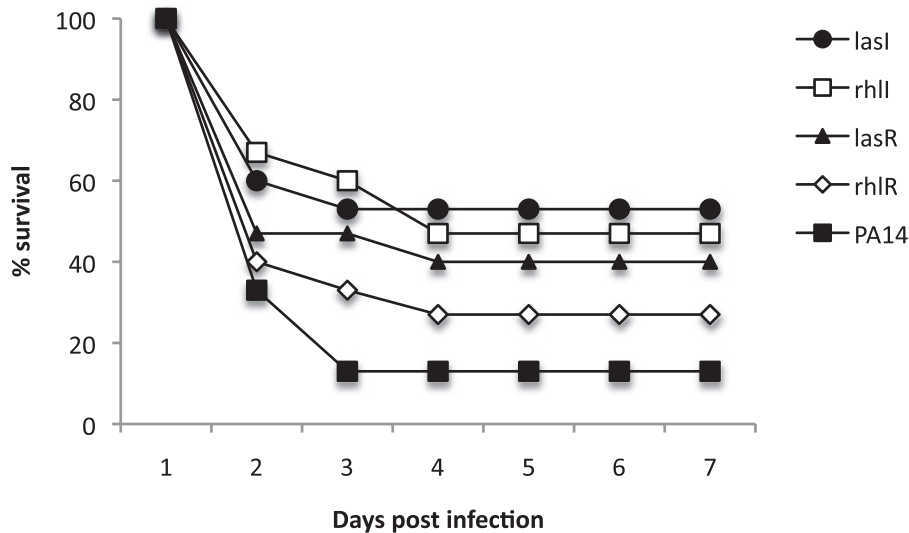
Quorum sensing e virulenza in *P. aeruginosa*

In *P. aeruginosa* diversi sistemi di QS coordinano la produzione di fattori di virulenza e la formazione di biofilm.



Ceppi di *P. aeruginosa* mutanti nei sistemi di QS sono meno virulenti dei ceppi parentali in differenti modelli d'infezione animali e vegetali.

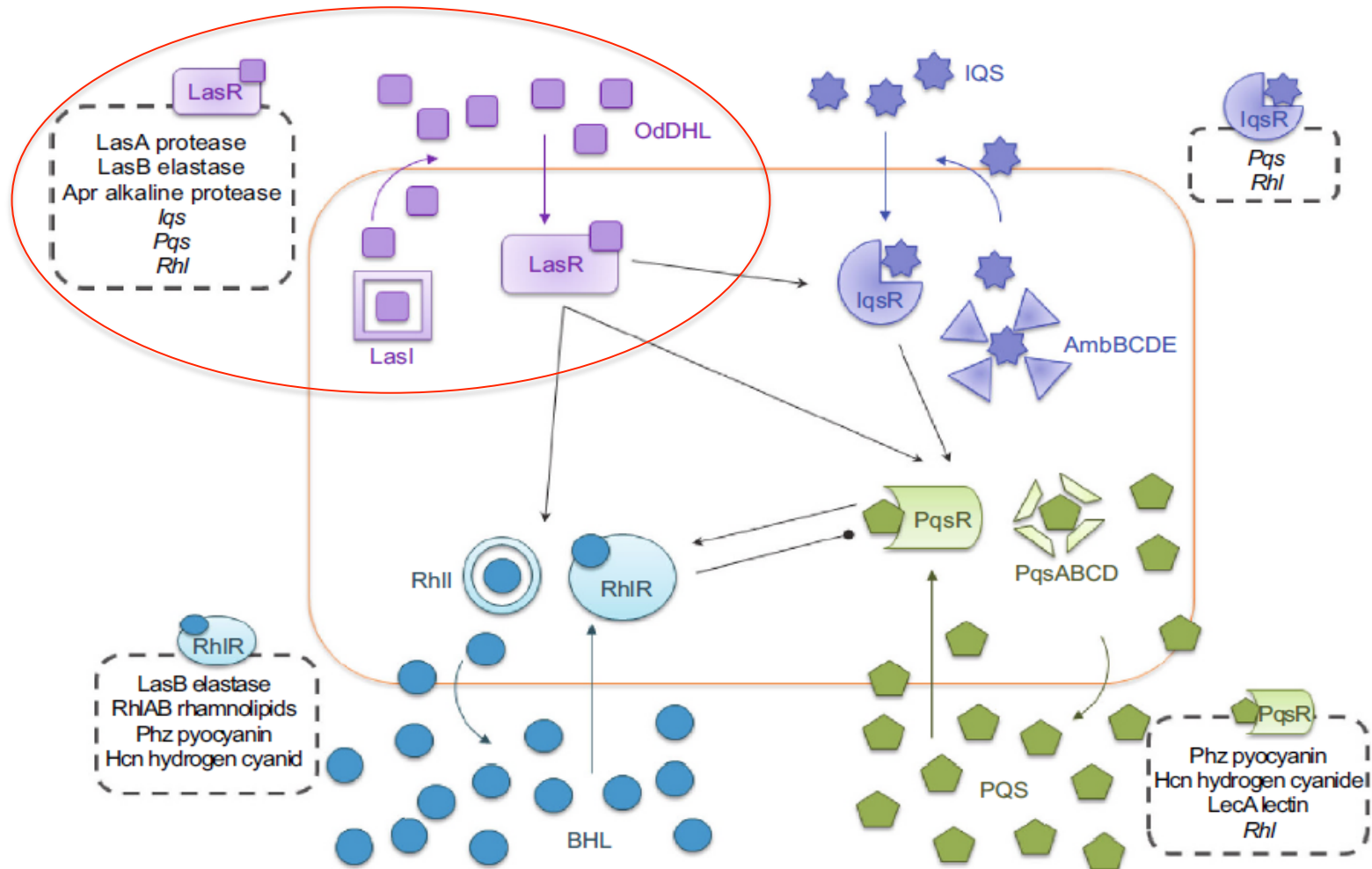
Infezione in modello murino di ferita da ustione.



PERTANTO IL QS E' UN PROMETTENTE BERSAGLIO TERAPEUTICO

Quorum sensing e virulenza in *P. aeruginosa*

In *P. aeruginosa* diversi sistemi di QS coordinano la produzione di fattori di virulenza e la formazione di biofilm.



Il furanone C-30

L'alga rossa australiana *Delisea pulchra* mostra una ridotta colonizzazione batterica sulla propria superficie.

Tale inibizione è risultata essere mediata da alcuni metaboliti secondari, chiamati furanoni. Le molecole dei furanoni sono composte da un anello eterociclico pentatomico, furano, con una catena acilica sul carbonio 3, un atomo di bromo sul carbonio 4 e una catena laterale variabile sul carbonio 5.



Figura 6 a – Delisea pulchra.

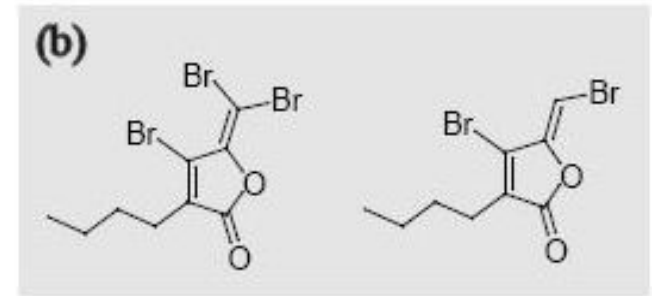
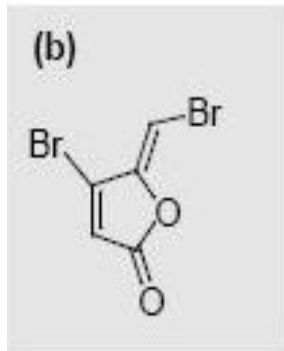


Figura 6b – Furanoni naturali (modificata da Suga e Smith, 2003).

D. pulchra produce almeno 30 diversi furanoni che sono contenuti in speciali vescicole e rilasciati a livello della superficie del tallo. La concentrazione dei furanoni è inversamente proporzionale al grado di colonizzazione batterica. I furanoni inibiscono il QS perché, legandosi ai recettori LuxR-like, ne inducono una rapida degradazione.

Il furanone C-30

Nel laboratorio del Prof. Givskov, in Danimarca, sono stati sintetizzati degli analoghi strutturali dei furanoni prodotti da *D. pulchra*, come il furanone C-30.



Il furanone C-30 riduce la produzione di fattori di virulenza in *P. aeruginosa* senza alterarne la crescita.

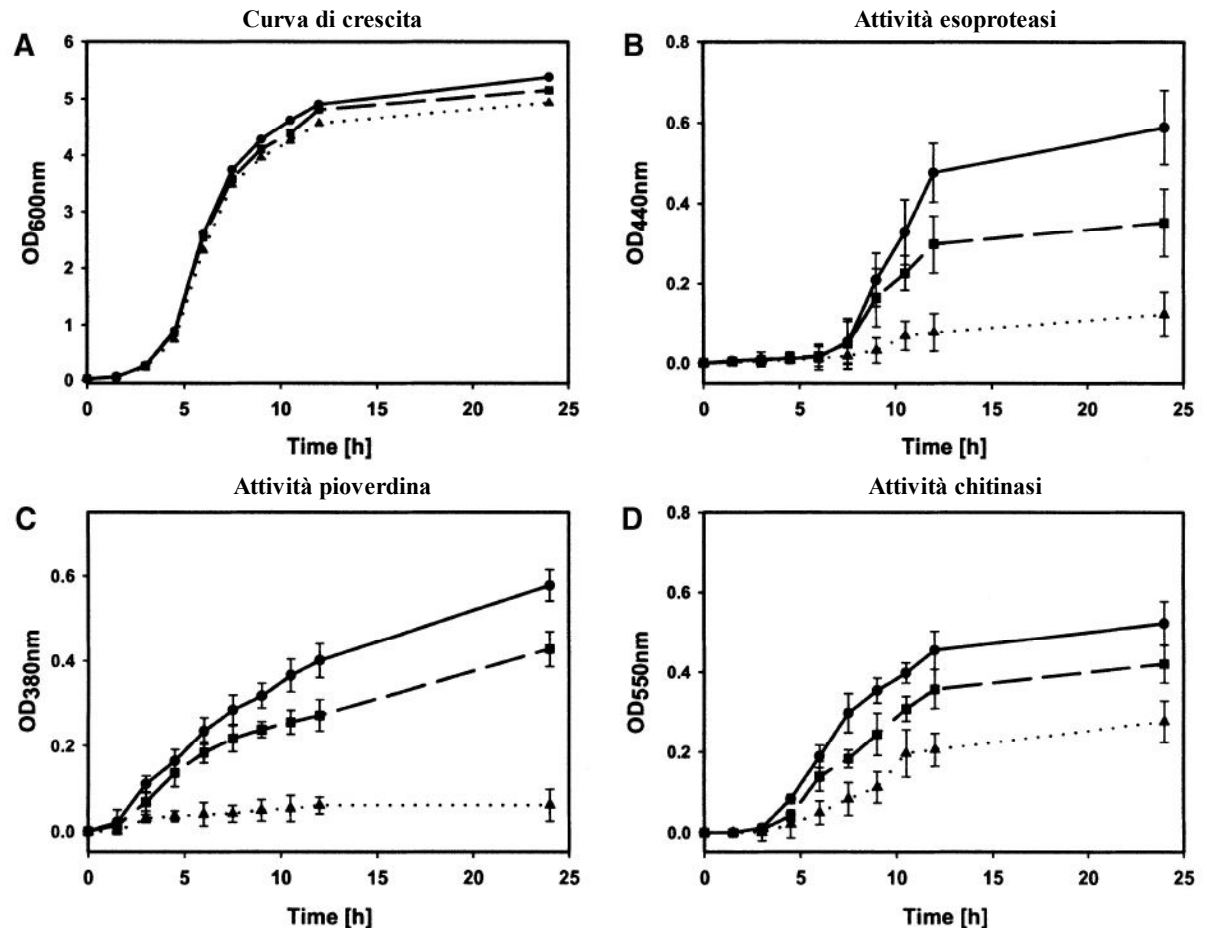


Figura 8 – Influenza del furanone C-30 sulla crescita e la produzione di fattori di virulenza di *P. aeruginosa* PAO1. La linea continua indica colture cresciute in assenza di inibitore, la linea tratteggiata quelle cresciute con 1 μM e quella punteggiata colture cresciute con 10 μM di furanone (modificata da Hentzer *et al.*, 2003).

Il furanone C-30

Un'analisi per *high-density oligonucleotides microarray* ha permesso di stabilire che il furanone C-30 reprime la trascrizione di circa 90 geni in *P. aeruginosa*.

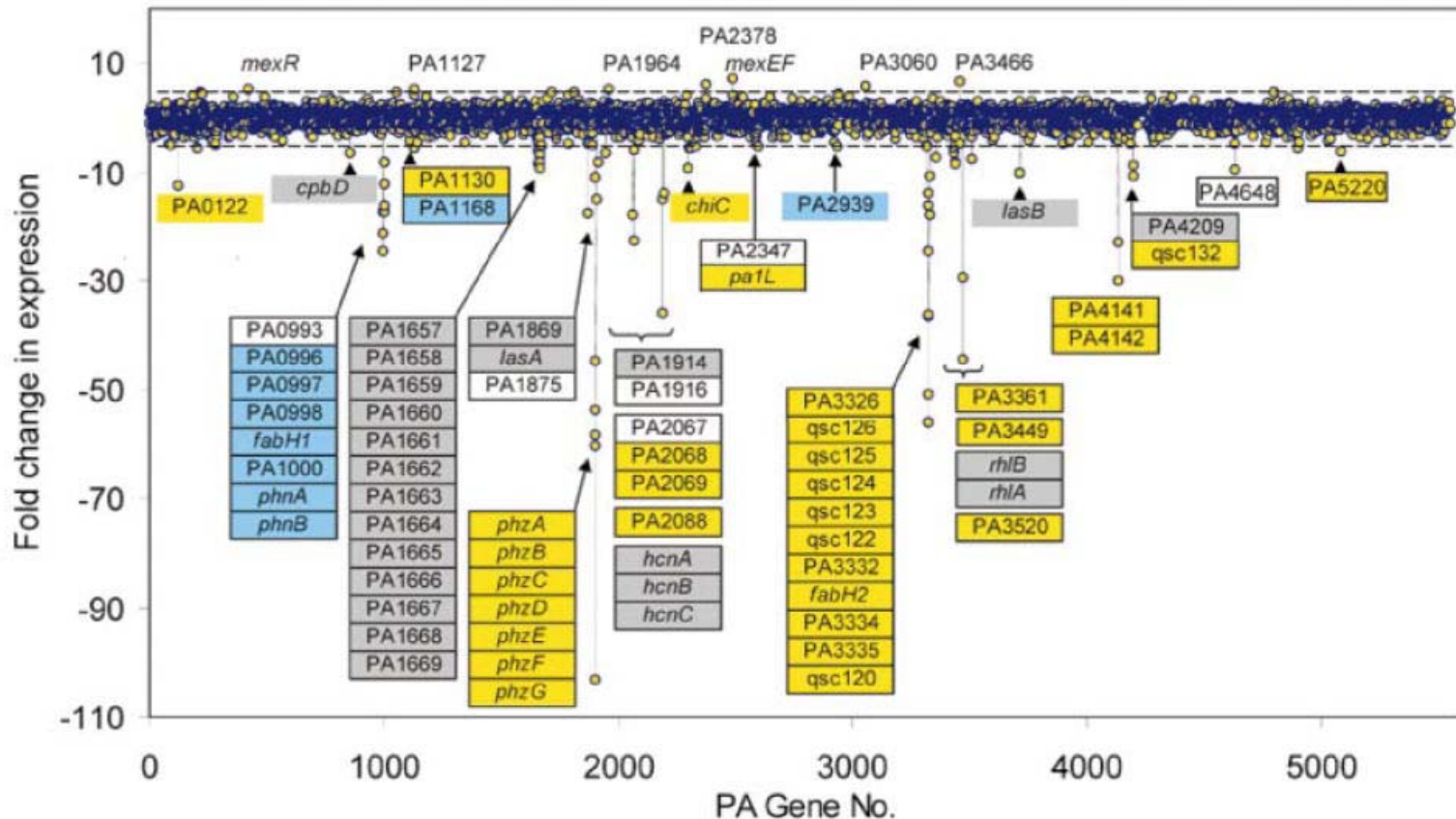


Figura 9 – Effetto del furanone C-30 sul profilo d'espressione del genoma di *P. aeruginosa*. Nell'asse delle ordinate è riportato il rapporto dei livelli d'espressione nel ceppo cresciuto in presenza di furanone e nel controllo cresciuto in sua assenza. Quindi valori positivi indicano i geni indotti dal C-30 e valori negativi indicano i geni repressi da C-30. Le linee tratteggiate contengono i geni attivati o repressi di almeno 5 volte rispetto al controllo. I geni indicati sono quelli la cui espressione è significativamente influenzata dall'inibitore. In blu sono riportati i geni controllati solo da LasR; in grigio quelli attivati sia da LasR che RhlR; in giallo quelli controllati solo da RhlR. In bianco i geni la cui espressione è significativamente influenzata dal C-30, ma non controllati da QS (modificata da Hentzer *et al.*, 2003).

Il furanone C-30

Un'analisi per *high-density oligonucleotides microarray* ha permesso di stabilire che il furanone C-30 reprime la trascrizione di circa 90 geni in *P. aeruginosa*. L'80% di questi geni è attivato dal QS.

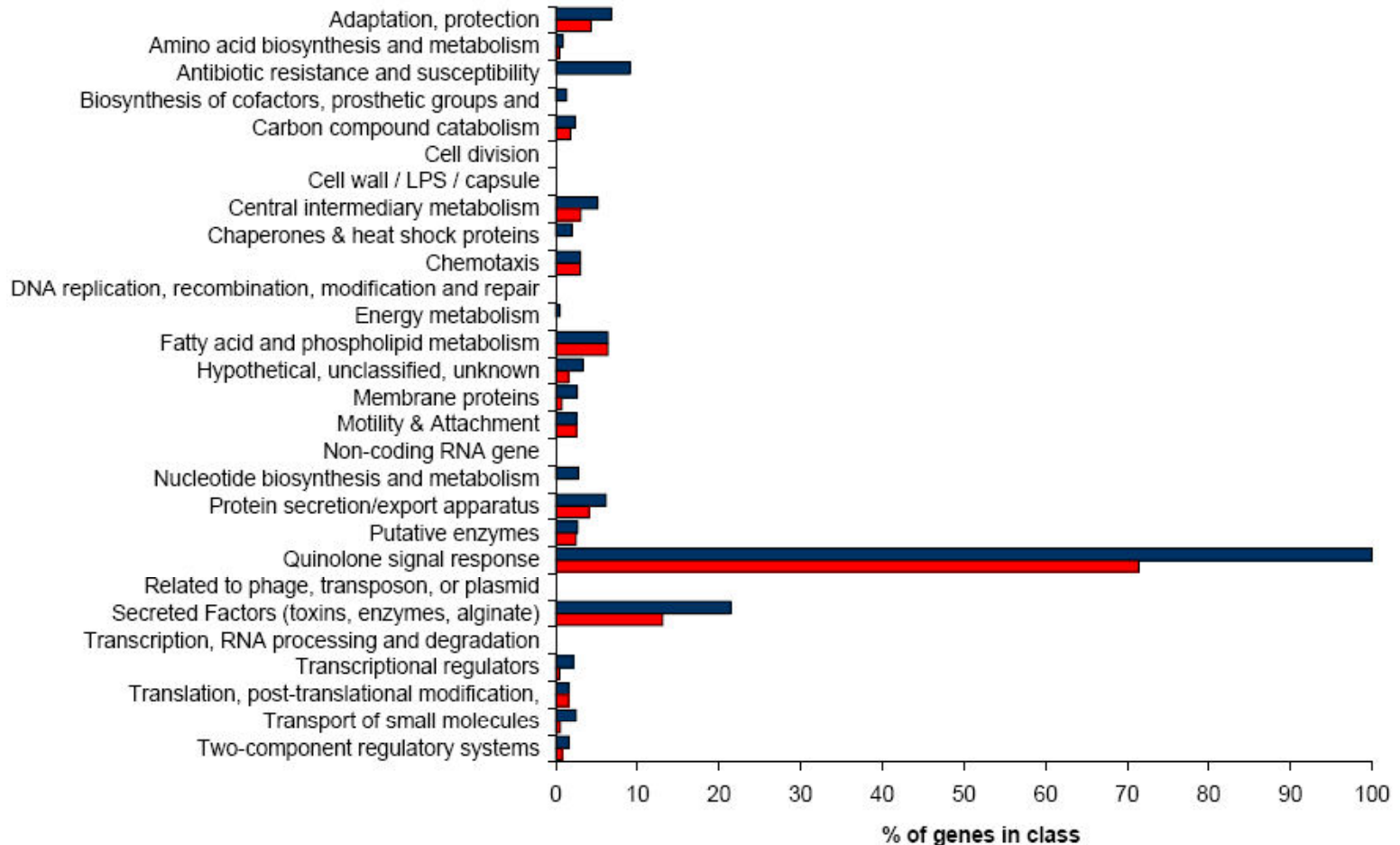


Figura 10 – Percentuale dei geni attivati da QS (blu) e repressi da C-30 (rosso) suddivisi in gruppi funzionali (Hentzer *et al.*, 2003 - suppl. data).

Il furanone C-30

Il furanone C-30 rende il biofilm più sensibile agli antibiotici.

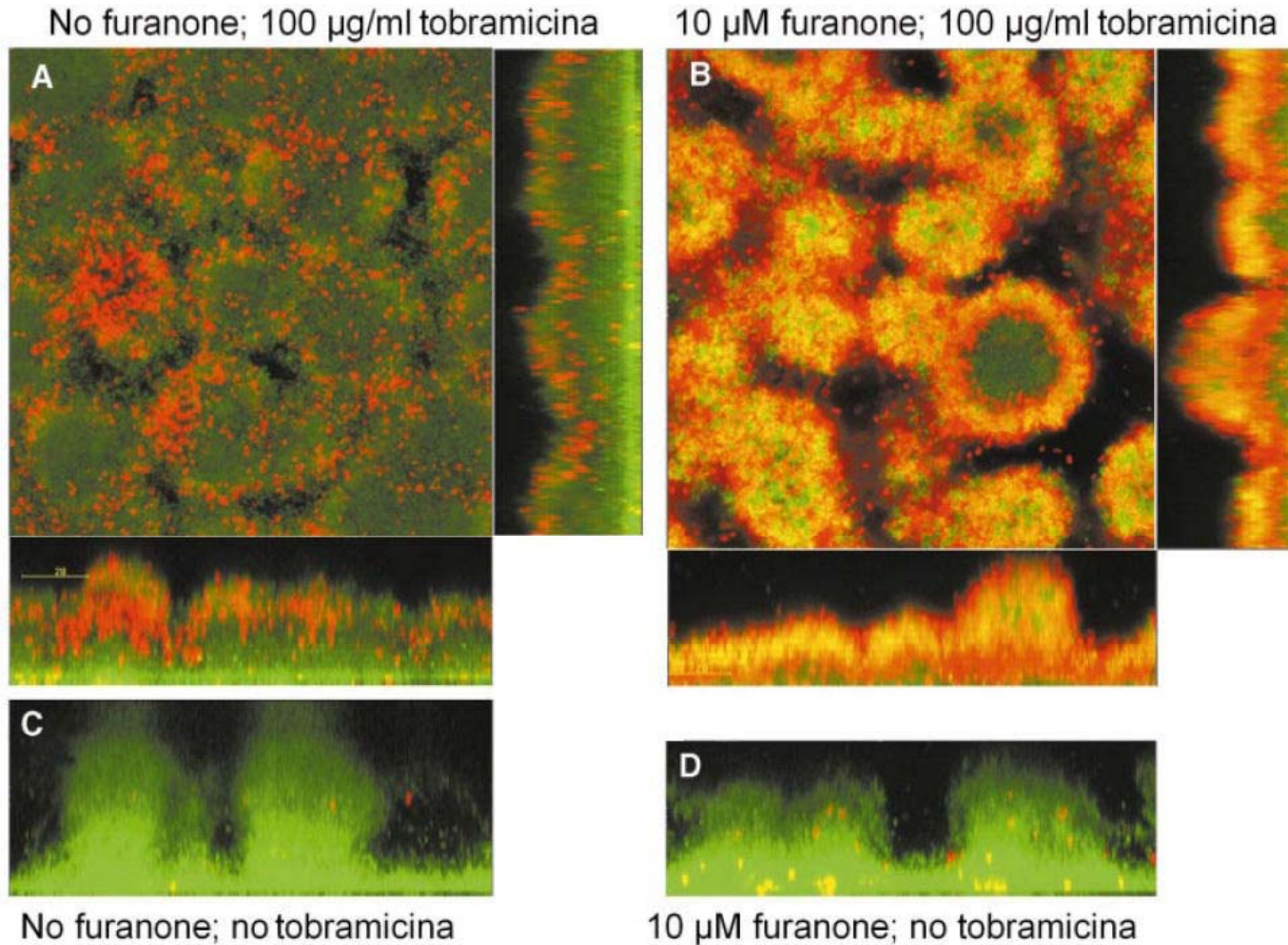
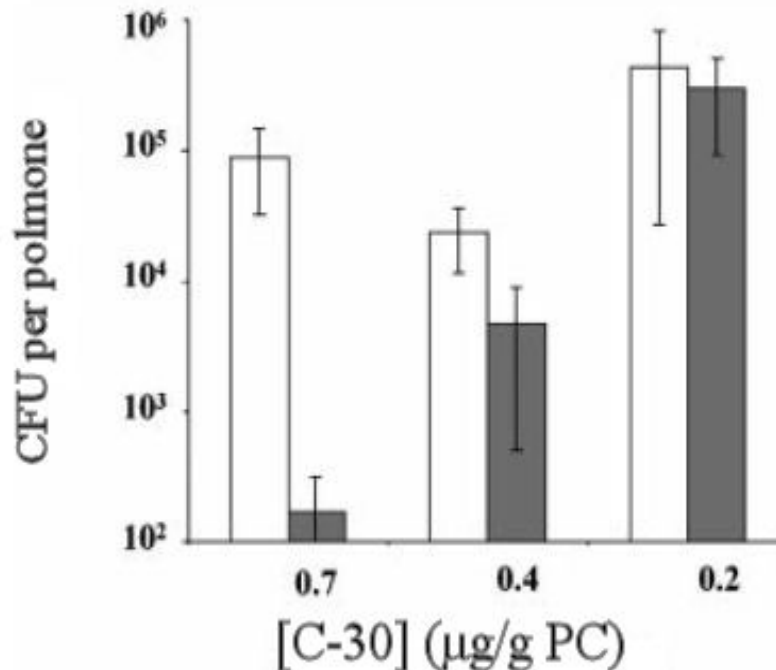


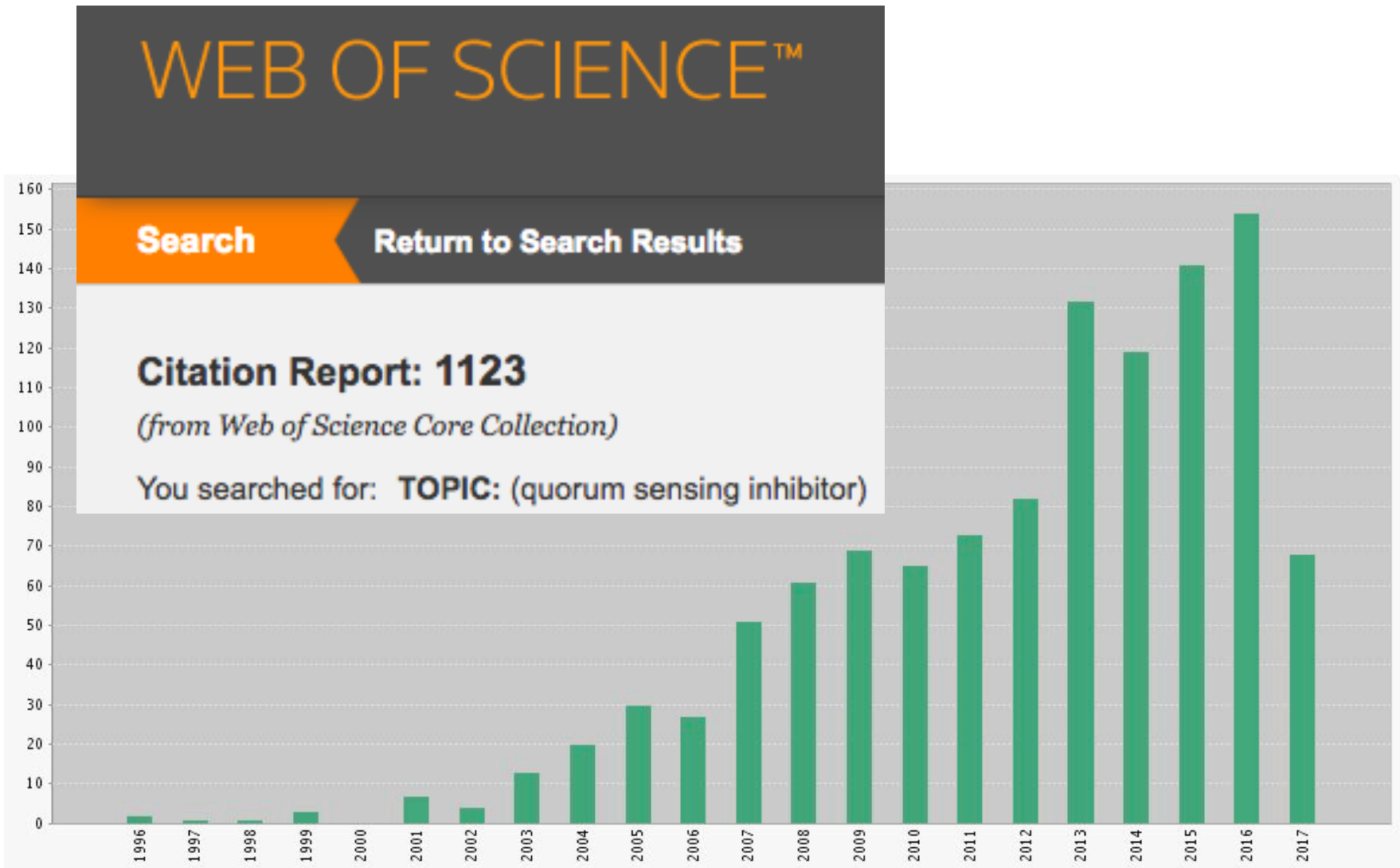
Figura 12 – Sensibilità alla tobramicina del biofilm di PAO1. Dopo 3 giorni di crescita i biofilms vengono esposti a 100 µg/ml di tobramicina per 24 ore. La vitalità delle cellule è stata rilevata usando un LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kit: le aree rosse sono cellule morte e le aree verdi sono cellule vive. (A) 100 µg/ml di tobramicina, (B) furanone 10µM e tobramicina 100 µg/ml, (C) assenza di furanone e tobramicina e (D) furanone 10µM. Immagini ottenute al SCLM, vedi testo (modificata da Hentzer *et al.*, 2003)

Il furanone C-30

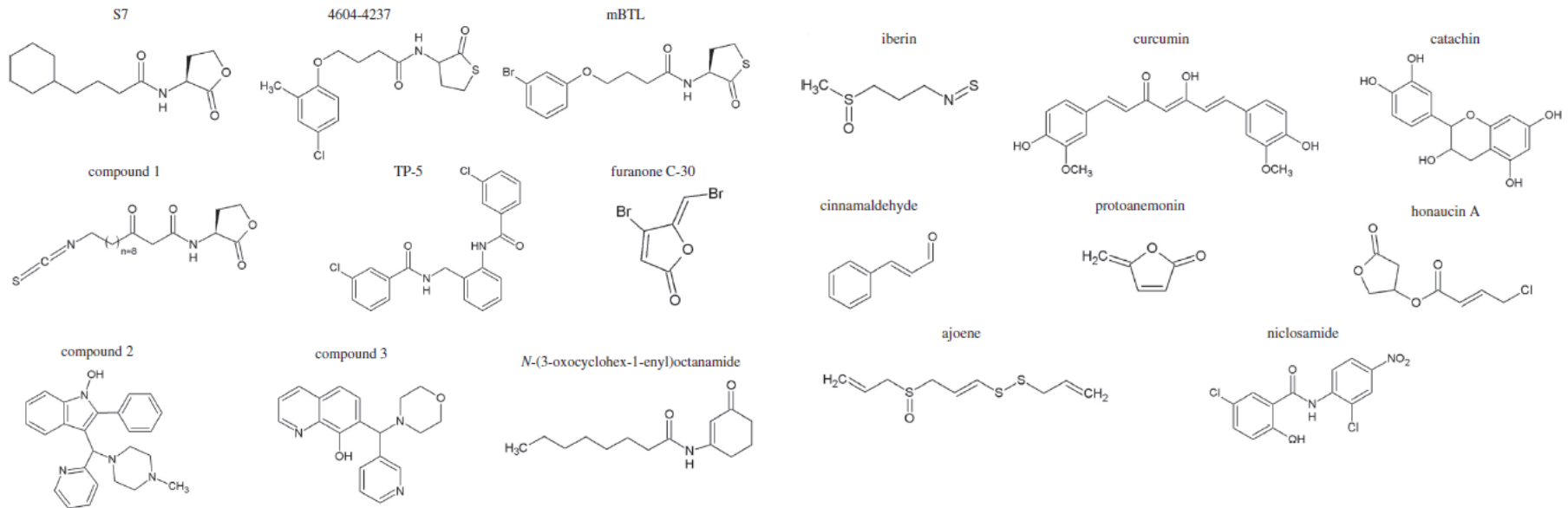
Venti topi sono stati infettati con *P. aeruginosa* PAO1 al giorno zero e suddivisi in due gruppi da dieci individui. I due gruppi di topi sono stati trattati con iniezioni di furanone C-30 ($\sim 0.7 \mu\text{g/g PC}$) o di soluzione salina (placebo), rispettivamente, ad intervalli di 8 ore per i tre giorni successivi. Sette giorni dopo l'infezione i polmoni sono stati rimossi, omogeneizzati e piastrati per la determinazione delle CFU. Gli animali trattati con il furanone C-30 mostrano una riduzione del numero di batteri pari a tre ordini di grandezza rispetto ai controlli. L'efficacia del trattamento è direttamente collegata alla concentrazione dell'inibitore come mostrano altri due esperimenti simili ma che hanno utilizzato furanone $\sim 0.4 \mu\text{g/g PC}$ e $\sim 0.2 \mu\text{g/g PC}$.



Finora sono stati pubblicati più di 1100 lavori inerenti l'inibizione del QS (100/anno in media dal 2013)



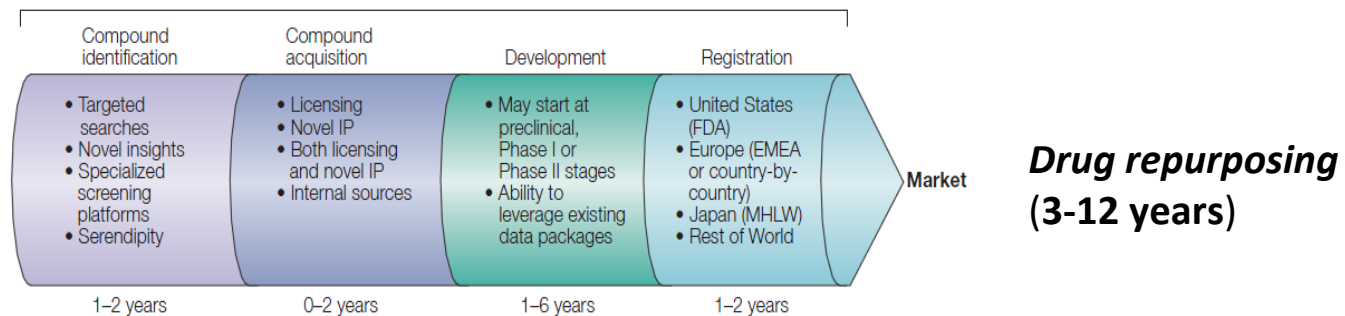
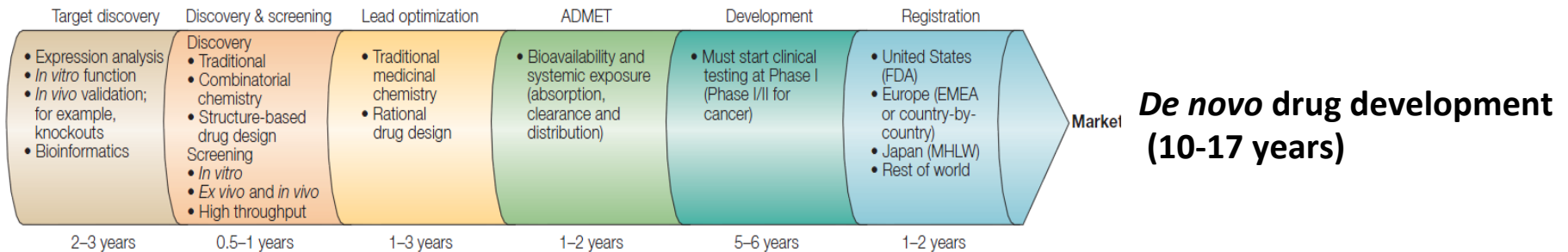
Sono state edentificate molte molecole diverse che inibiscono il QS in vari batteri patogeni



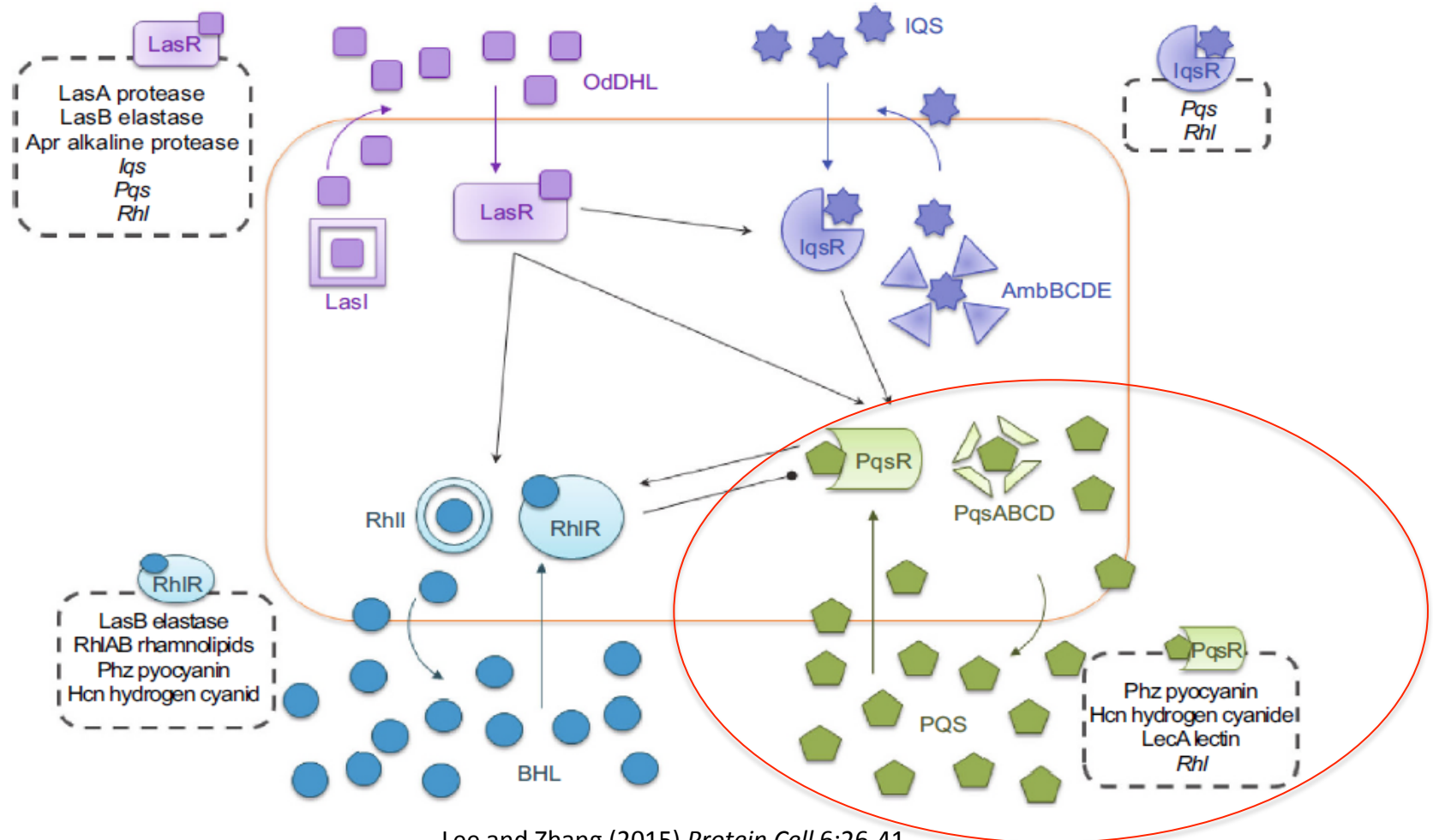
Sfortunatamente, la maggior parte di queste molecole no ha buone proprietà farmacologiche

Il drug repurposing

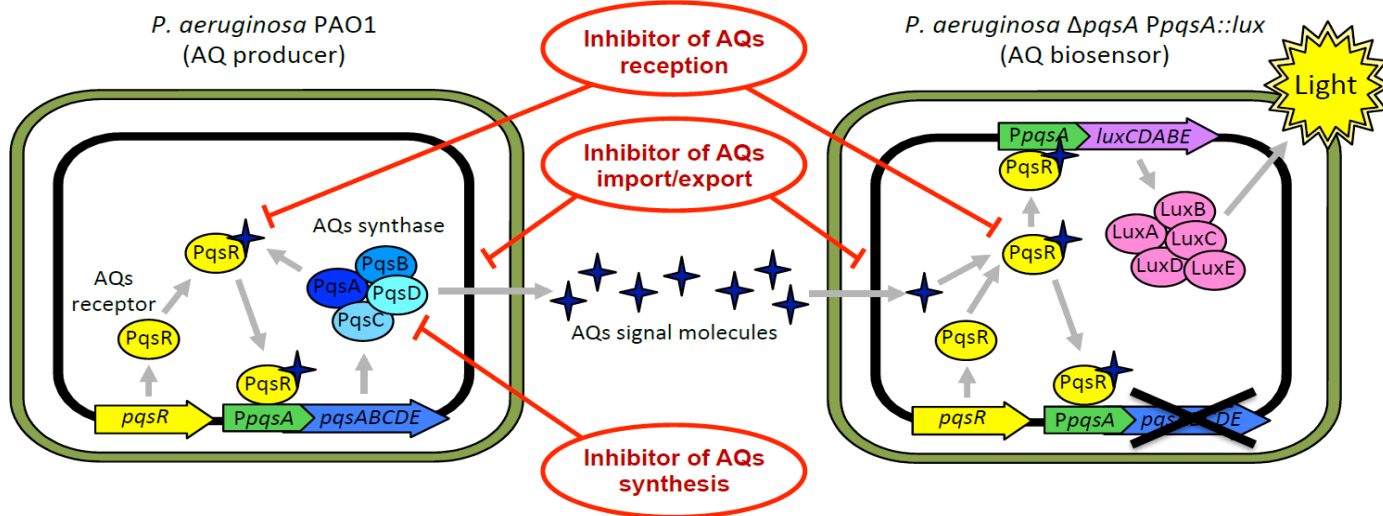
Questa strategia si basa sull'utilizzo di "vecchi" farmaci già approvati per l'uso nell'uomo per il trattamento di altre patologie (*off-target*).



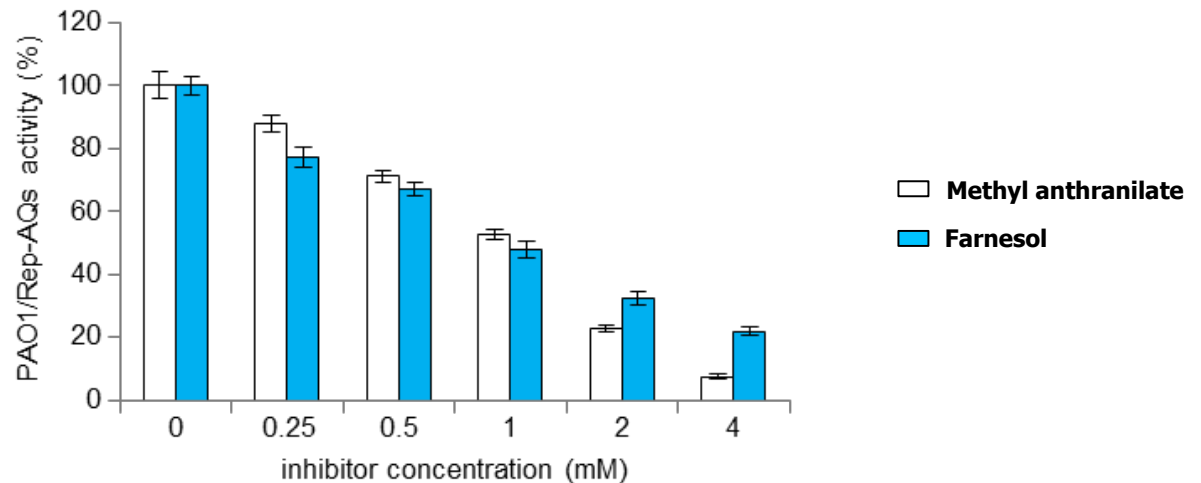
Identificazione di inibitori *FDA-approved* del sistema di QS *pqs* in *Pseudomonas aeruginosa*



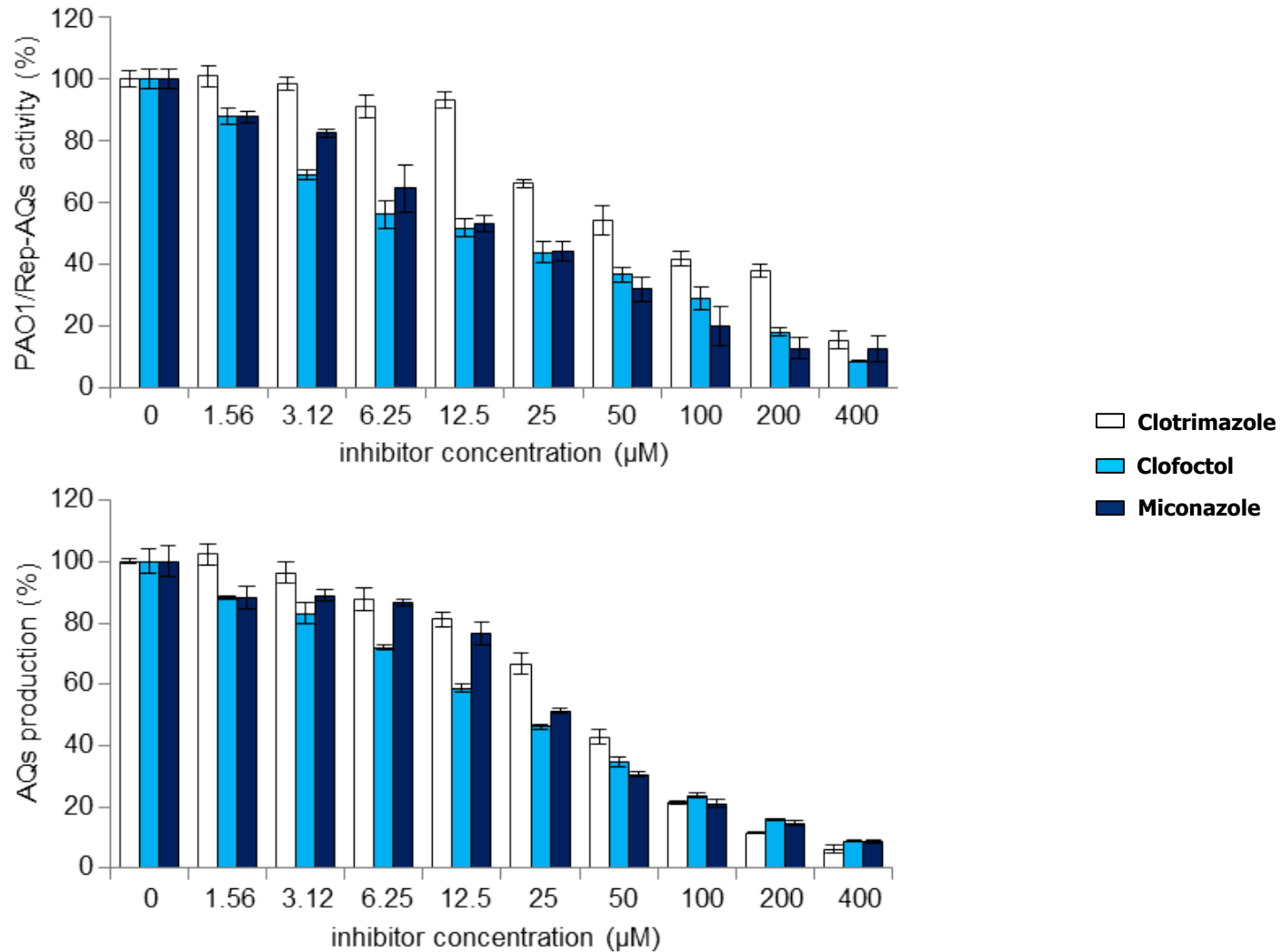
Identificazione di inibitori *FDA-approved* del sistema di QS *pqs* in *Pseudomonas aeruginosa*



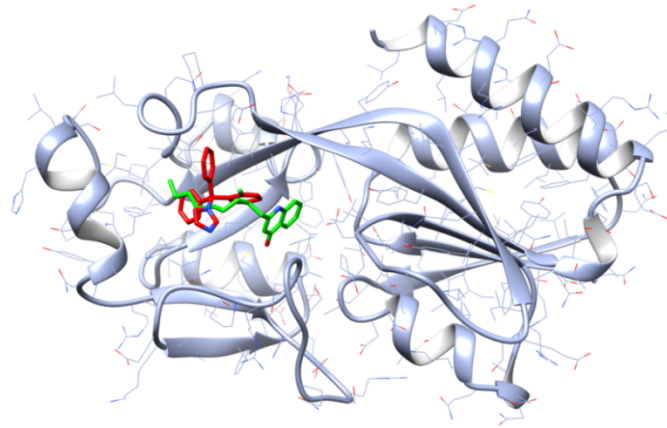
PHARMAKON
PHARMACEUTICALS



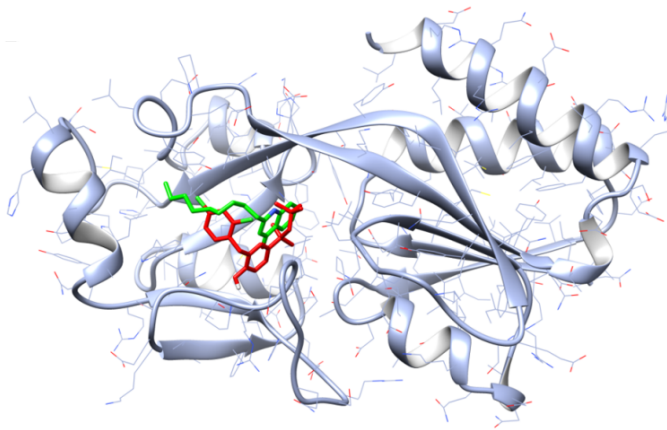
Identificazione di inibitori *FDA-approved* del sistema di QS *pqs* in *Pseudomonas aeruginosa*



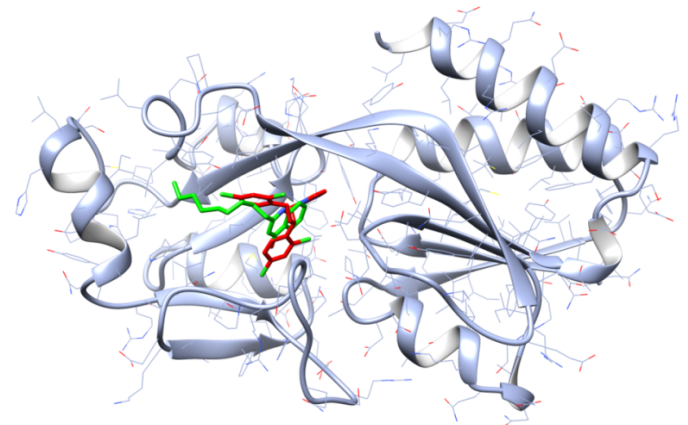
Identificazione di inibitori *FDA-approved* del sistema di QS *pqs* in *Pseudomonas aeruginosa*



Clotrimazole

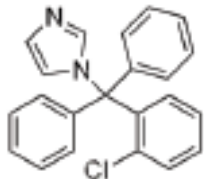
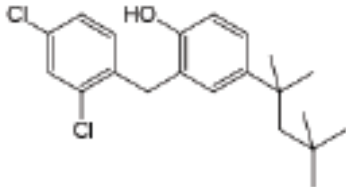
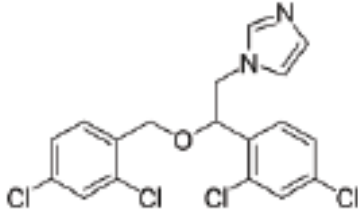


Clofoctol

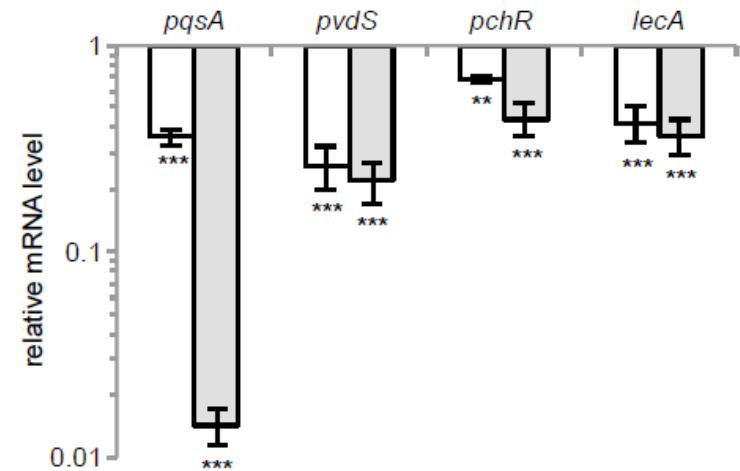
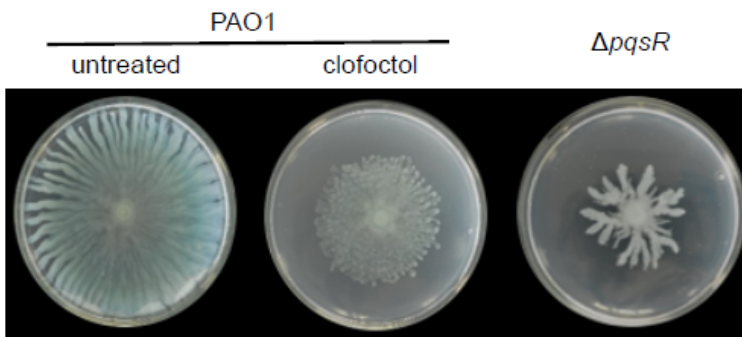
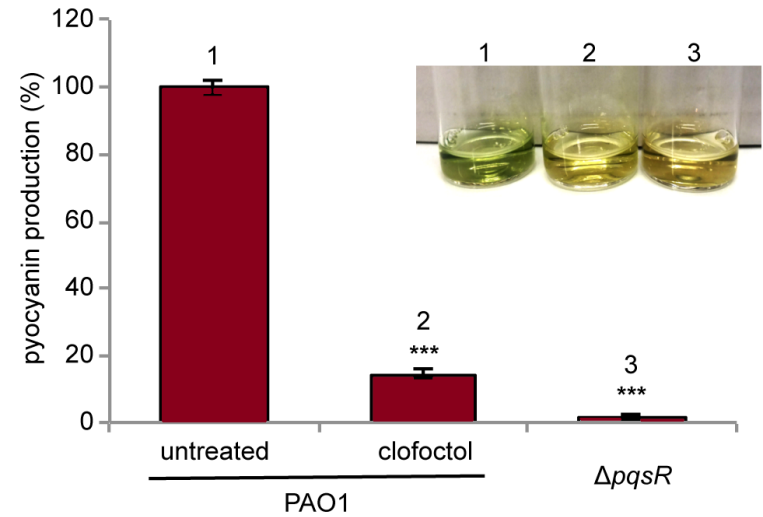
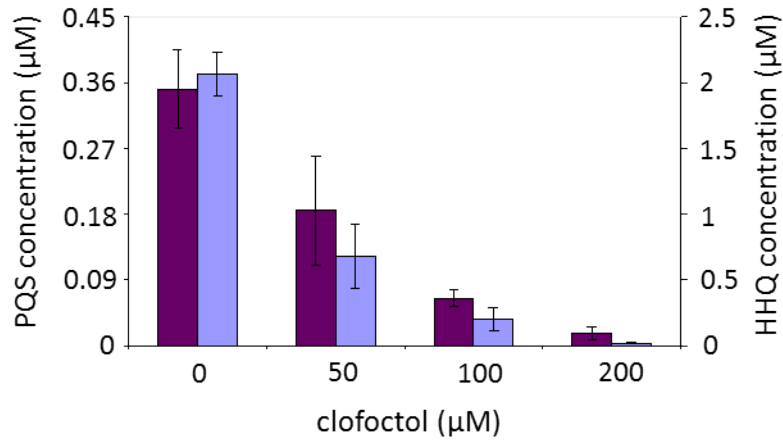


Miconazole

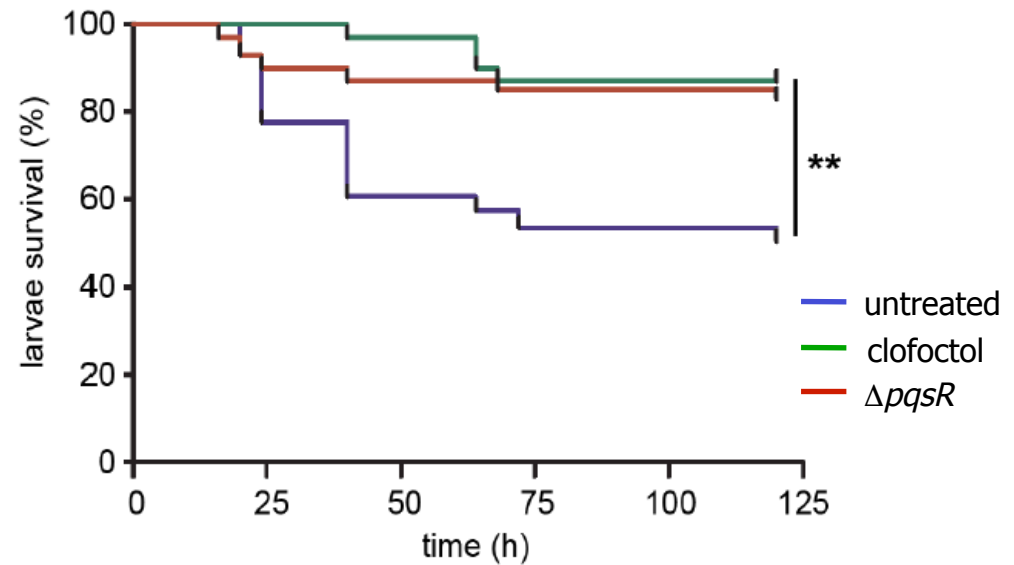
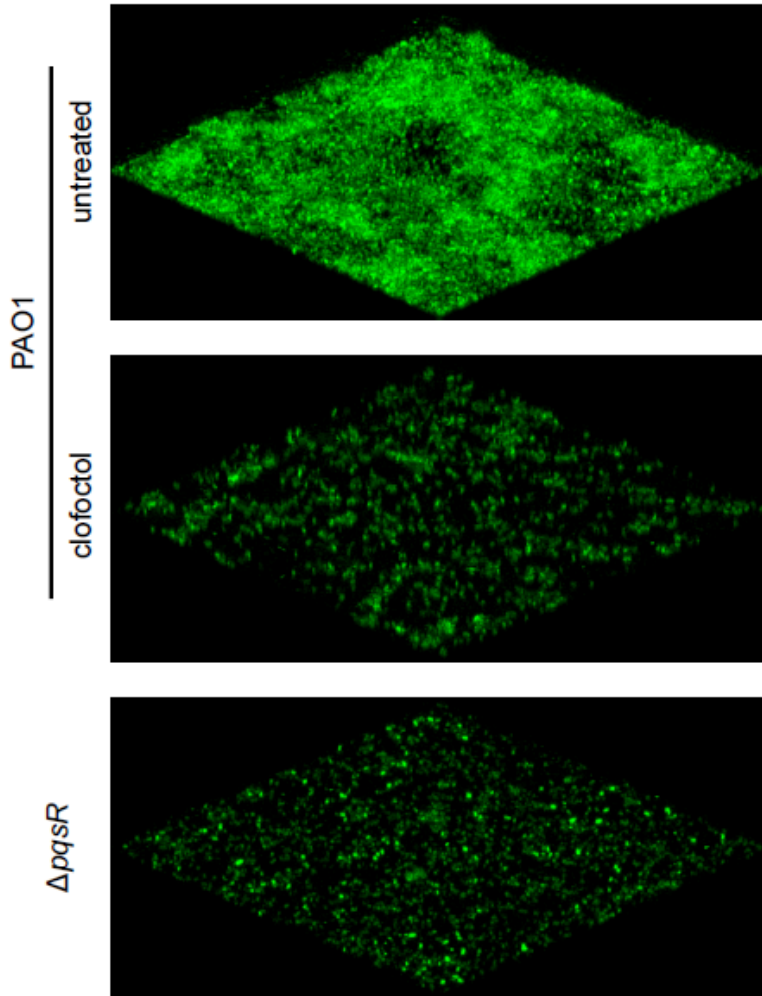
Il clofoctol è l'inibitore più promettente

Drug name	Property	Structure	IC ₅₀	ΔG
Clotrimazole	Antifungal		39	-8.4
Clofoctol	Antibacterial		20	-9.8
Miconazole	Antifungal		27	-8.5

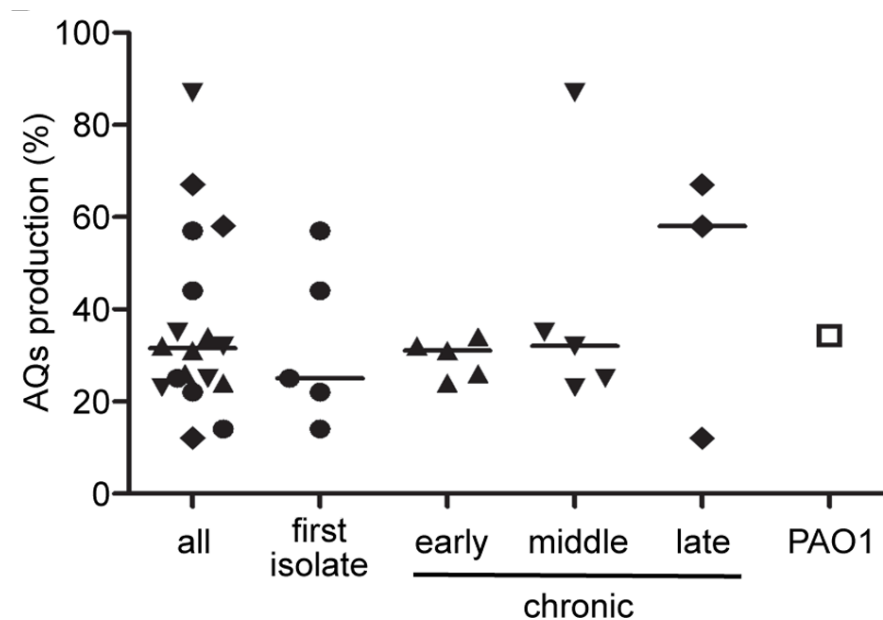
Il clofoctol è l'inibitore più promettente




Il clofoctol è l'inibitore più promettente



Il clofoctol è l'inibitore più promettente



Editor: Silverman	Section: Mechanisms of Action: Physiological Effects	Designation: T
----------------------	---	-------------------


 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
 Antimicrobial Agents and Chemotherapy®

MECHANISMS OF ACTION:
PHYSIOLOGICAL EFFECTS



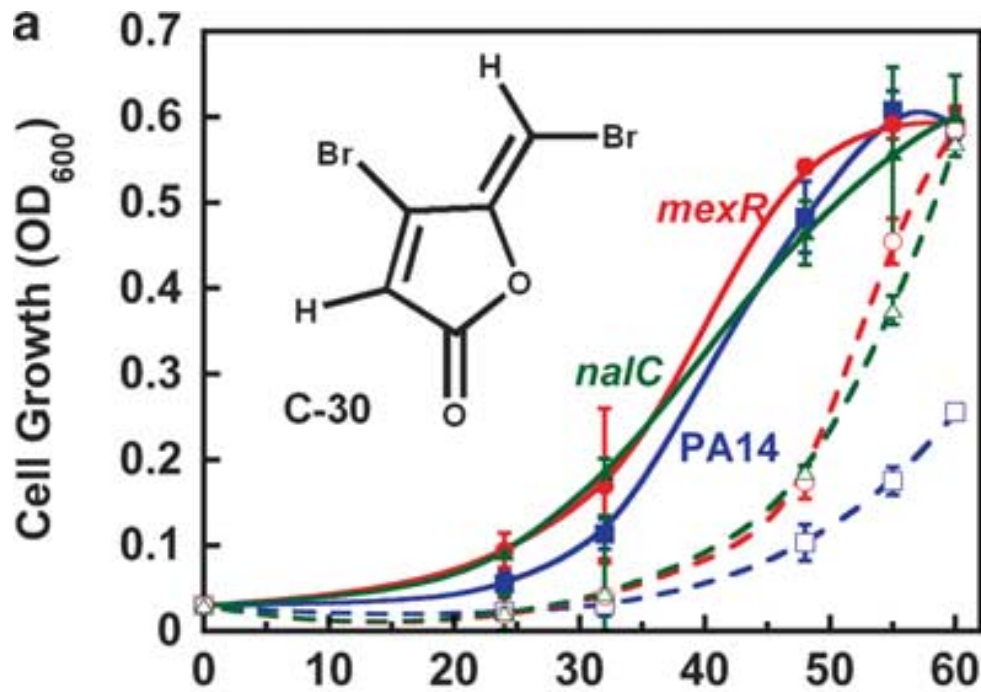
Identification of FDA-Approved Drugs as Antivirulence Agents Targeting the *pqs* Quorum-Sensing System of *Pseudomonas aeruginosa*

Francesca D'Angelo,^a Valerio Baldelli,^a Nigel Halliday,^b Paolo Pantalone,^b Fabio Polticelli,^{a,c} Ersilia Fiscarelli,^d Paul Williams,^b Paolo Visca,^a Livia Leoni,^a  Giordano Rampioni^a

Resistenza agli inibitori del QS

Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds

Toshinari Maeda^{1,2,8}, Rodolfo García-Contreras^{3,4,8}, Mingming Pu^{1,8}, Lili Sheng^{1,5}, Luis Rene Garcia⁶, Maria Tomás⁷ and Thomas K Wood^{1,6}



In *P. aeruginosa* l'enzima coinvolto nella degradazione di adenosina è regolato dal QS. In presenza di un inibitore del QS, come il furanone C-30, tale enzima non è espresso e *P. aeruginosa* non può crescere in terreno minimo con adenosina come unica fonte di carbonio.

Alcune mutazioni (es. *nalC* o *mexR*) ripristinano la capacità di *P. aeruginosa* di crescere su adenosina come unica fonte di carbonio.

Resistenza agli inibitori del QS

Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds

Toshinari Maeda^{1,2,8}, Rodolfo García-Contreras^{3,4,8}, Mingming Pu^{1,8}, Lili Sheng^{1,5}, Luis Rene Garcia⁶, Maria Tomás⁷ and Thomas K Wood^{1,6}

Conclusione: I batteri possono sviluppare resistenza agli inibitori del QS.

Forse però bisognerebbe valutare un aspetto importante di tale approccio sperimentale: l'adenosina viene degradata intra-cellularmente, perciò se un batterio riesce a degradare l'adenosina anche in presenza del furanone C-30, questo è l'unico in grado di crescere nell'intera popolazione. Essendo la resistenza all'inibitore del QS geneticamente determinata, dopo poco il clone resistente darà vita ad una popolazione di batteri resistenti al composto anti-QS.

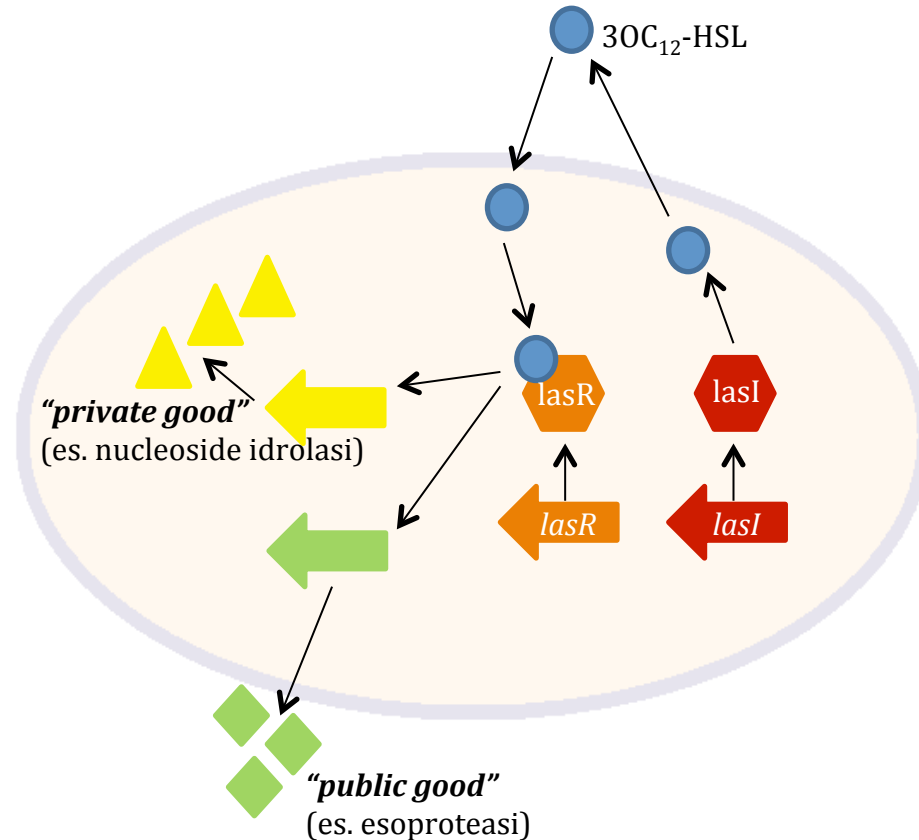
In tali condizioni sperimentali, che differenza c'è tra un inibitore del QS ed un antibiotico tradizionale? Ovviamente nessuna. Il sistema sperimentale adottato pone una forte selezione per resistenti, i quali possono avvantaggiarsi della loro capacità di crescere in una popolazione di cellule sensibili al furanone C-30.

Ma questo sistema sperimentale è realistico?

Resistenza agli inibitori del QS

È importante sottolineare che in *P. aeruginosa*, come in molti altri batteri, il QS regola l'espressione sia di enzimi e proteine intra-cellulari (come la nucleoside idrolasi necessaria a degradare l'adenosina), sia di fattori secreti all'esterno della cellula, o esoprodotti (come l'esoproteasi necessaria a degradare la BSA).

Poiché gli enzimi e le proteine intra-cellulari conferiscono un vantaggio solo al batterio che li produce, questi vengono definiti "beni privati", o "**private goods**". Al contrario, gli esoprodotti sono fruibili da tutti i membri della popolazione, e pertanto vengono definiti "beni comuni", o "**public goods**".



Resistenza agli inibitori del QS

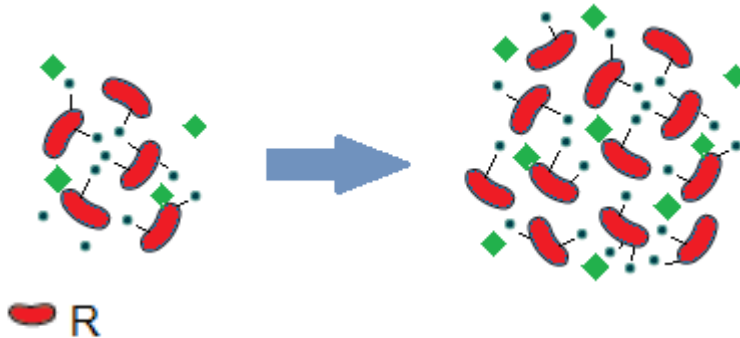
The Sociomicrobiology of Antivirulence Drug Resistance: a Proof of Concept

Brett Mellbye and Martin Schuster

Department of Microbiology and Molecular and Cellular Biology Program, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA

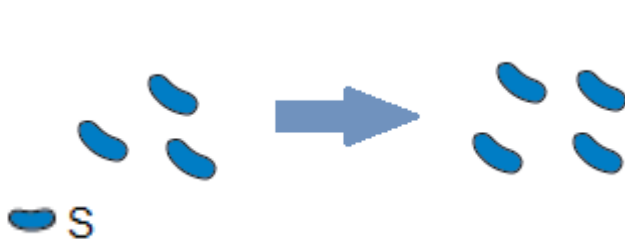
Monocoltura del ceppo resistente all'inibitore del QS.

Cresce perché può produrre le esoproteasi necessarie a degradare extracellularmente la BSA.



Monocoltura del ceppo sensibile all'inibitore del QS.

Non cresce perché non può produrre le esoproteasi necessarie a degradare extracellularmente la BSA.



La crescita in un terreno contenente BSA come unica fonte di carbonio richiede la produzione di *"public goods"* QS-regolati.

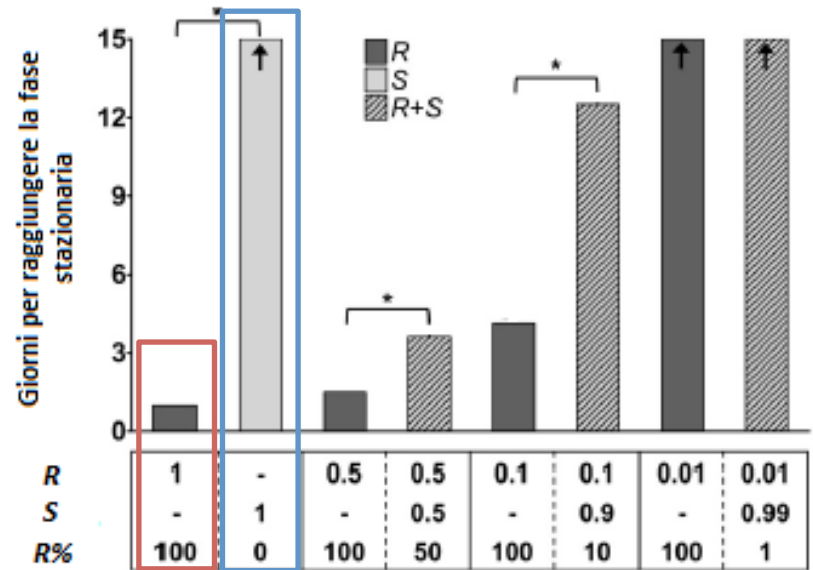


Immagine modificata da Mellbye e Schuster, (2011)

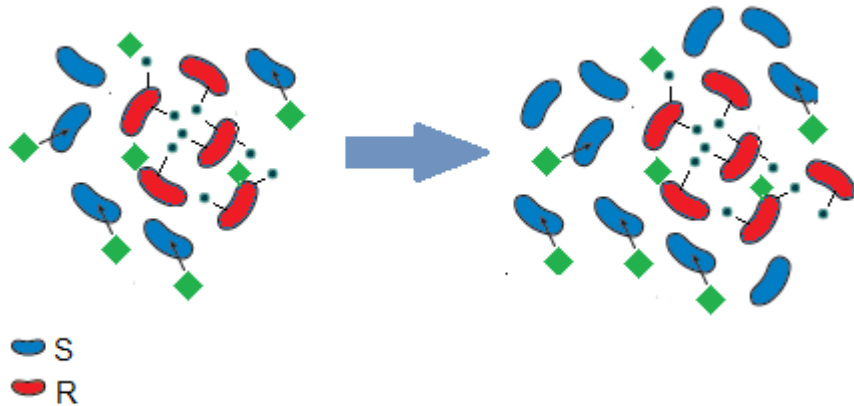
Resistenza agli inibitori del QS

The Sociomicrobiology of Antivirulence Drug Resistance: a Proof of Concept

Brett Mellbye and Martin Schuster

Department of Microbiology and Molecular and Cellular Biology Program, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA

Nelle co-culture contenenti sia il ceppo sensibile all'inibitore del QS, sia il ceppo resistente a tale farmaco, si osserva un ritardo significativo della crescita rispetto alle monoculture allestite con il solo ceppo resistente.



La crescita in un terreno contenente BSA come unica fonte di carbonio richiede la produzione di *“public goods”* QS-regolati.

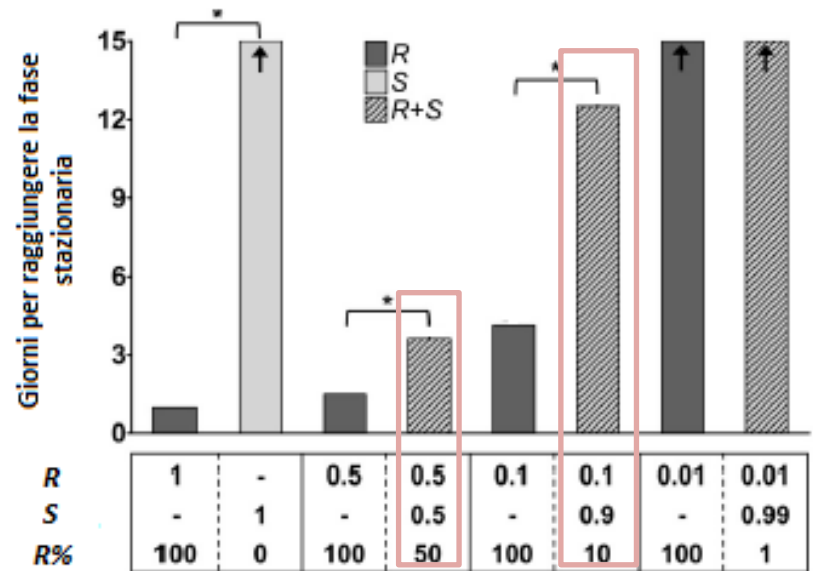


Immagine modificata da Mellbye e Schuster, (2011)

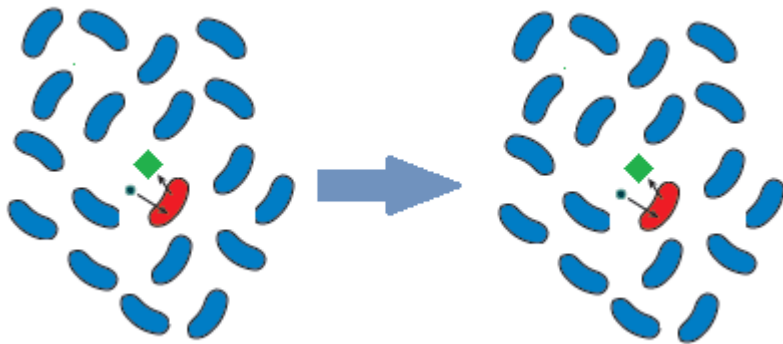
Resistenza agli inibitori del QS

The Sociomicrobiology of Antivirulence Drug Resistance: a Proof of Concept

Brett Mellbye and Martin Schuster

Department of Microbiology and Molecular and Cellular Biology Program, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA

Quando il ceppo resistente all'inibitore del QS è presente in percentuale ridotta all'interno della co-coltura (99% individui sensibili all'inibitore e 1% di individui resistenti all'inibitore), i "beni comuni" prodotti dal ceppo resistente non sono sufficienti a sostenere la crescita della popolazione. Pertanto, il ceppo resistente non ha alcun vantaggio riproduttivo e non emerge all'interno della popolazione.



S
R

La crescita in un terreno contenente BSA come unica fonte di carbonio richiede la produzione di "public goods" QS-regolati.

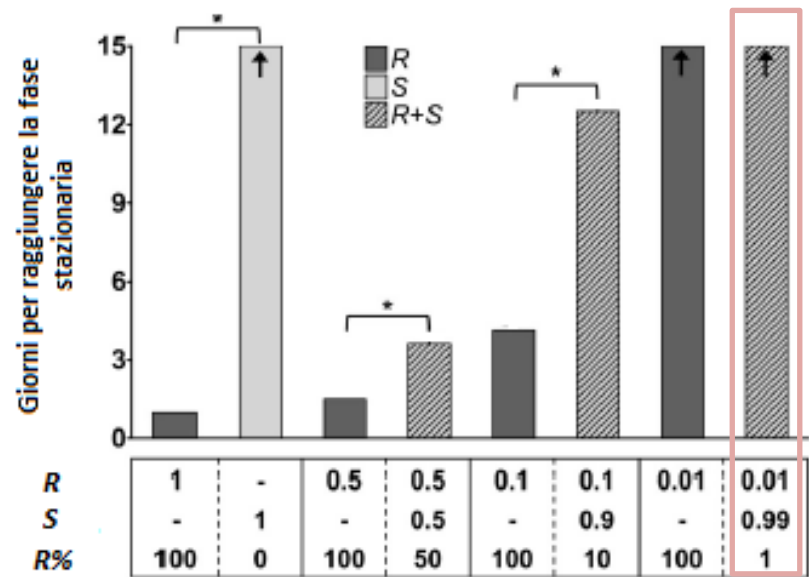


Immagine modificata da Mellbye e Schuster, (2011)

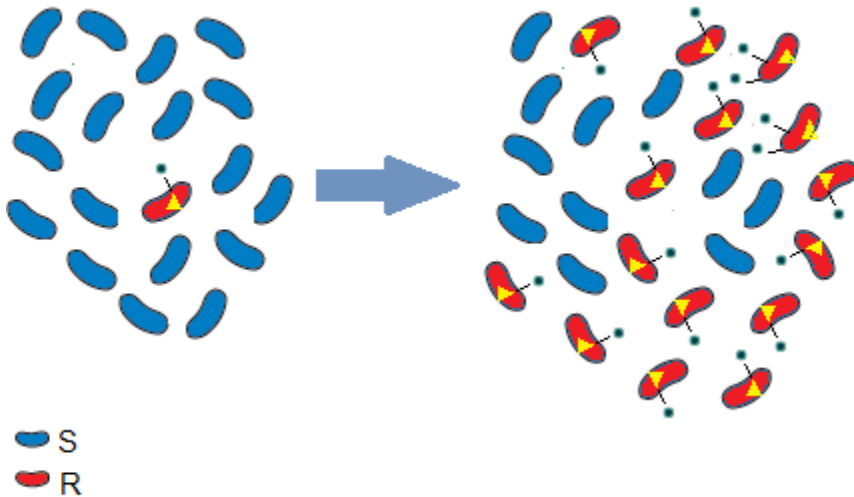
Resistenza agli inibitori del QS

The Sociomicrobiology of Antivirulence Drug Resistance: a Proof of Concept

Brett Mellbye and Martin Schuster

Department of Microbiology and Molecular and Cellular Biology Program, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA

In questo terreno di crescita, i ceppi resistenti all'inibitore del QS hanno un vantaggio riproduttivo rispetto ai membri sensibili all'interno della popolazione. Pertanto, i ceppi resistenti, anche se presenti in quantità ridotte all'interno della popolazione, tendono ad emergere.



La crescita in un terreno contenente adenosina come unica fonte di carbonio richiede la produzione di *"private goods"* QS-regolati.

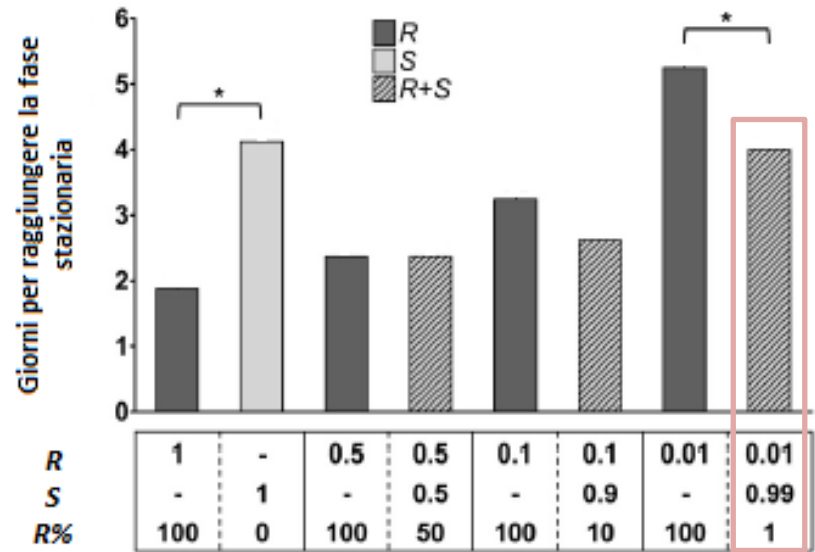


Immagine modificata da Mellbye e Schuster, (2011)

Resistenza agli inibitori del QS

The Sociomicrobiology of Antivirulence Drug Resistance: a Proof of Concept

Brett Mellbye and Martin Schuster

Department of Microbiology and Molecular and Cellular Biology Program, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA

In questo terreno di crescita, i ceppi resistenti all'inibitore del QS hanno un vantaggio riproduttivo rispetto ai membri sensibili all'interno della popolazione. Pertanto, i ceppi resistenti, anche se presenti in quantità ridotte all'interno della popolazione, tendono ad emergere.

La crescita in un terreno contenente adenosina come unica fonte di carbonio richiede la produzione di "private goods" QS-regolati.



Il "conflitto sociale" tra ceppi resistenti e sensibili all'inibitore del QS ha un ruolo rilevante nel limitare l'emergenza di ceppi resistenti solo quando gli inibitori del QS colpiscono il carattere sociale e cooperativo del QS.

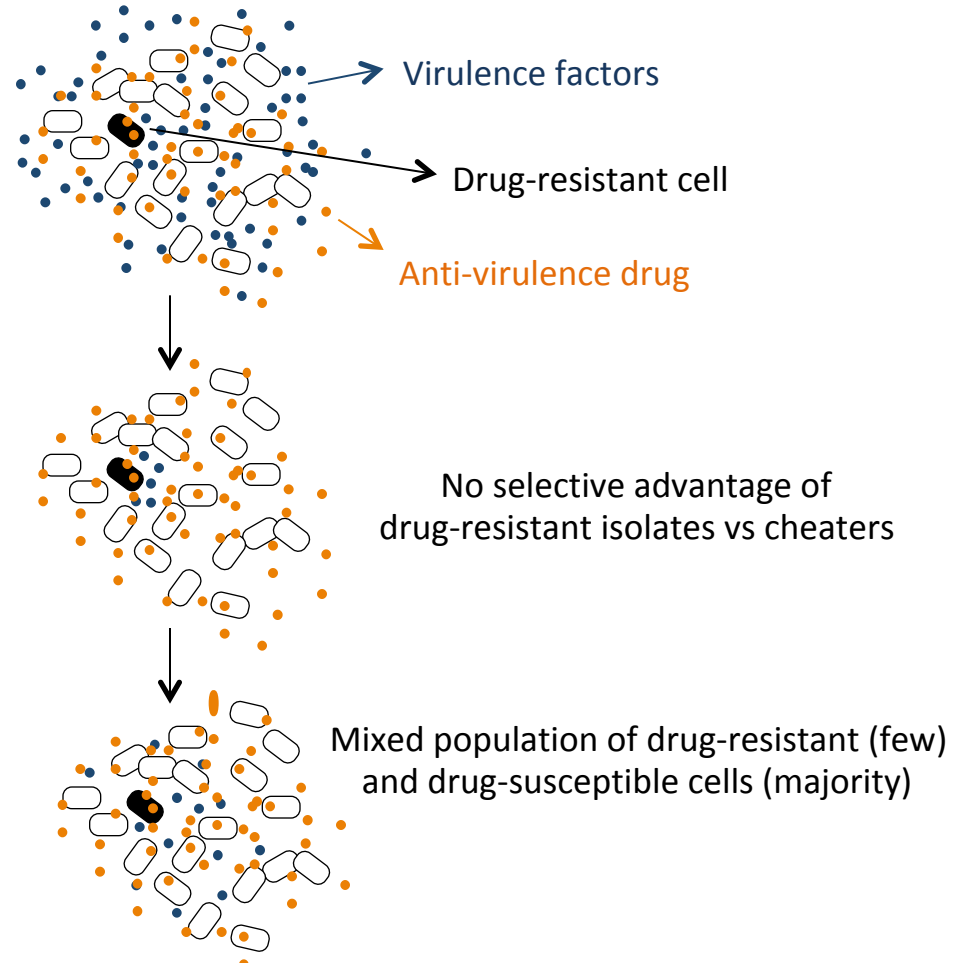
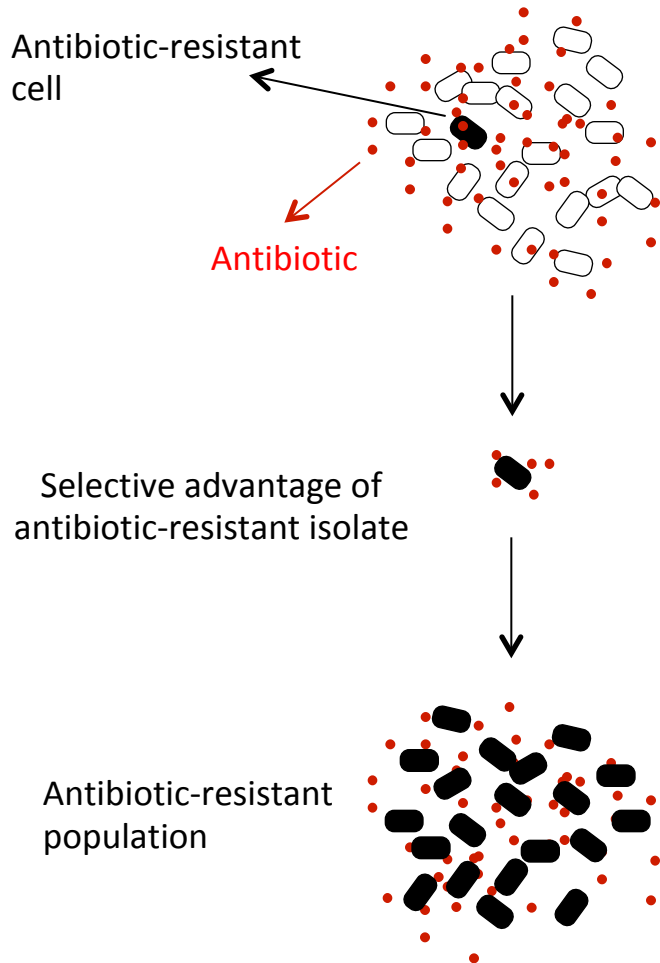
S
R

Immagine modificata da Mellbye e Schuster, (2011)

Conventional antibiotics

vs

Anti-virulence drugs



Lecture consigliate

- Allen RC, Popat R, Diggle SP, Brown SP (2014) Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nat Rev Microbiol* 12:300-308.
- Baugh S, Phillips CR, Ekanayaka AS, Piddock LJ, Webber MA (2014) Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 69:673-681.
- Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ (2014) Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol* 9:1165-1177.
- D'Angelo F, Baldelli V, Halliday N, Pantalone P, Polticelli F, Fiscarelli E, Williams P, Visca P, Leoni L, Rampioni G (2018) Identification of FDA-approved drugs as antivirulence agents targeting the *pqs* quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 62(11).
- Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, Luisi BF (2018) Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol* 16:523-539.
- Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, Brown ED, Wright GD (2011) Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol* 7:348-350.
- Hense BA, Schuster M (2015) Core principles of bacterial autoinducer systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:153-169.
- Narenji H, Gholizadeh P, Aghazadeh M, Rezaee MA, Asgharzadeh M, Kafil HS (2017) Peptide nucleic acids (PNAs): currently potential bactericidal agents. *Biomed Pharmacother* 93:580-588.
- Rampioni G, Leoni L, Williams P (2014) The art of antibacterial warfare: Deception through interference with quorum sensing-mediated communication. *Bioorg Chem* 55:60-68.
- Rampioni G, Visca P, Leoni L, Imperi F (2017) Drug repurposing for antivirulence therapy against opportunistic bacterial pathogens. *Emerging Topics in Life Sciences* 1:13-22.