

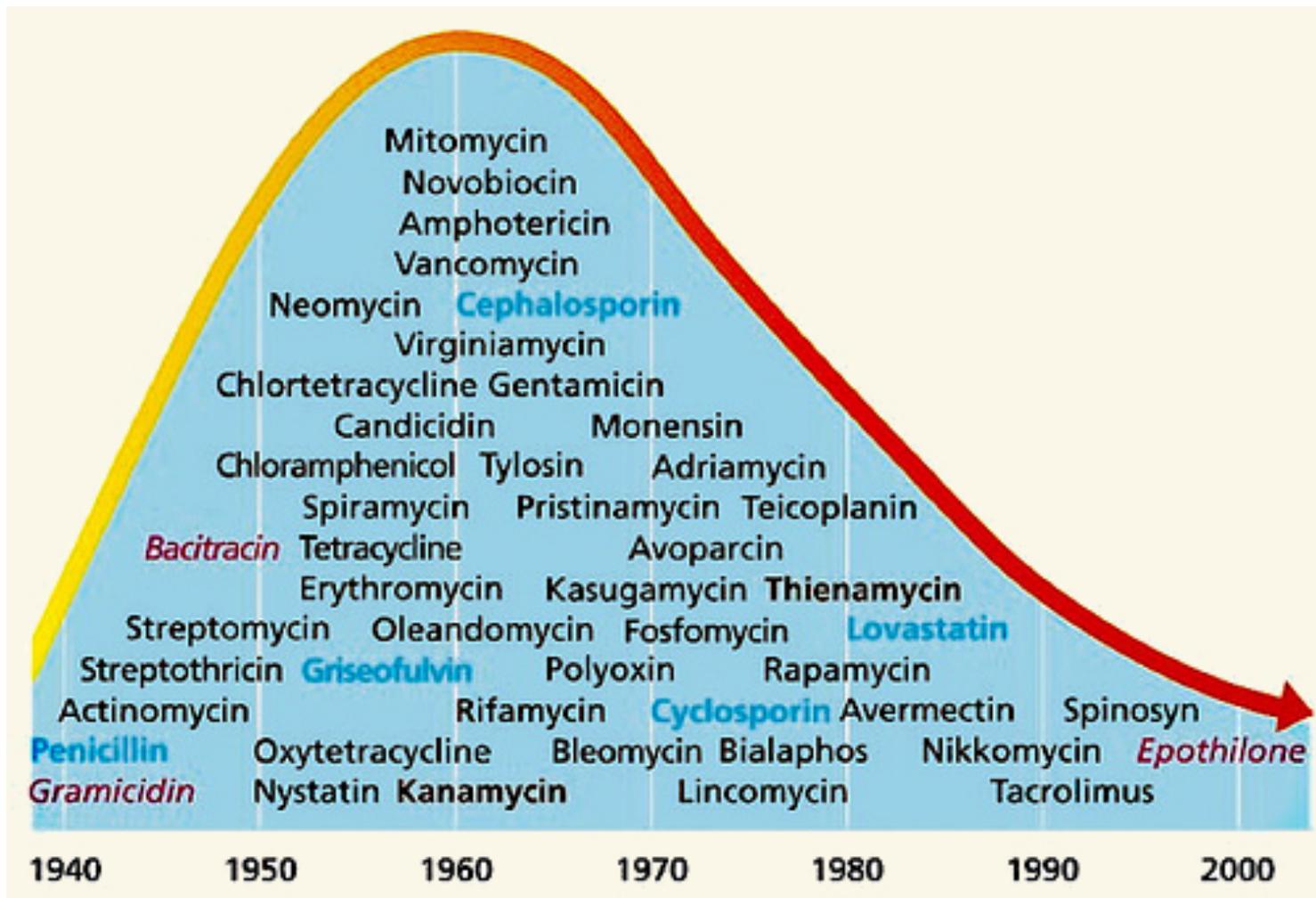


Strategie antimicrobiche alternative agli antibiotici

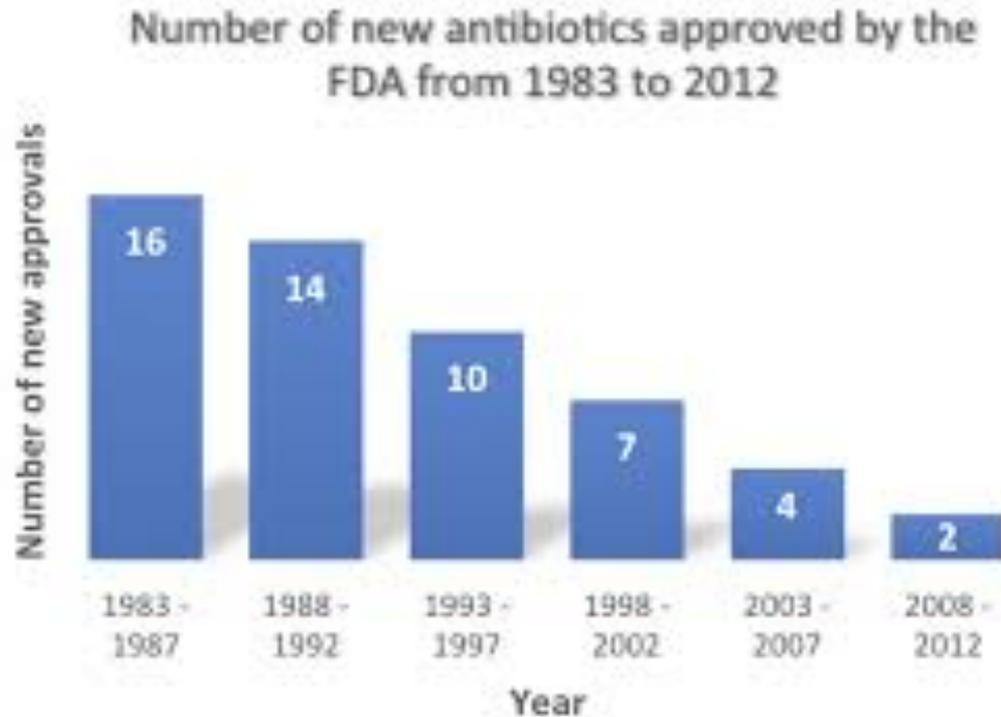
Giordano Rampioni

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)

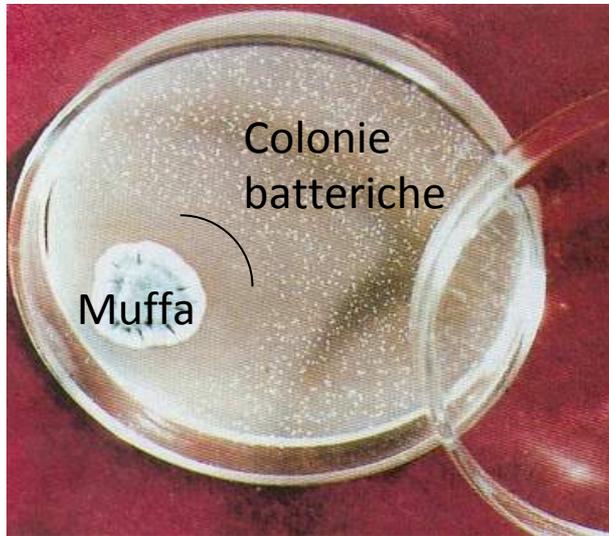
I batteri evolvono rapidamente resistenza agli antibiotici

Sir Alexander Fleming



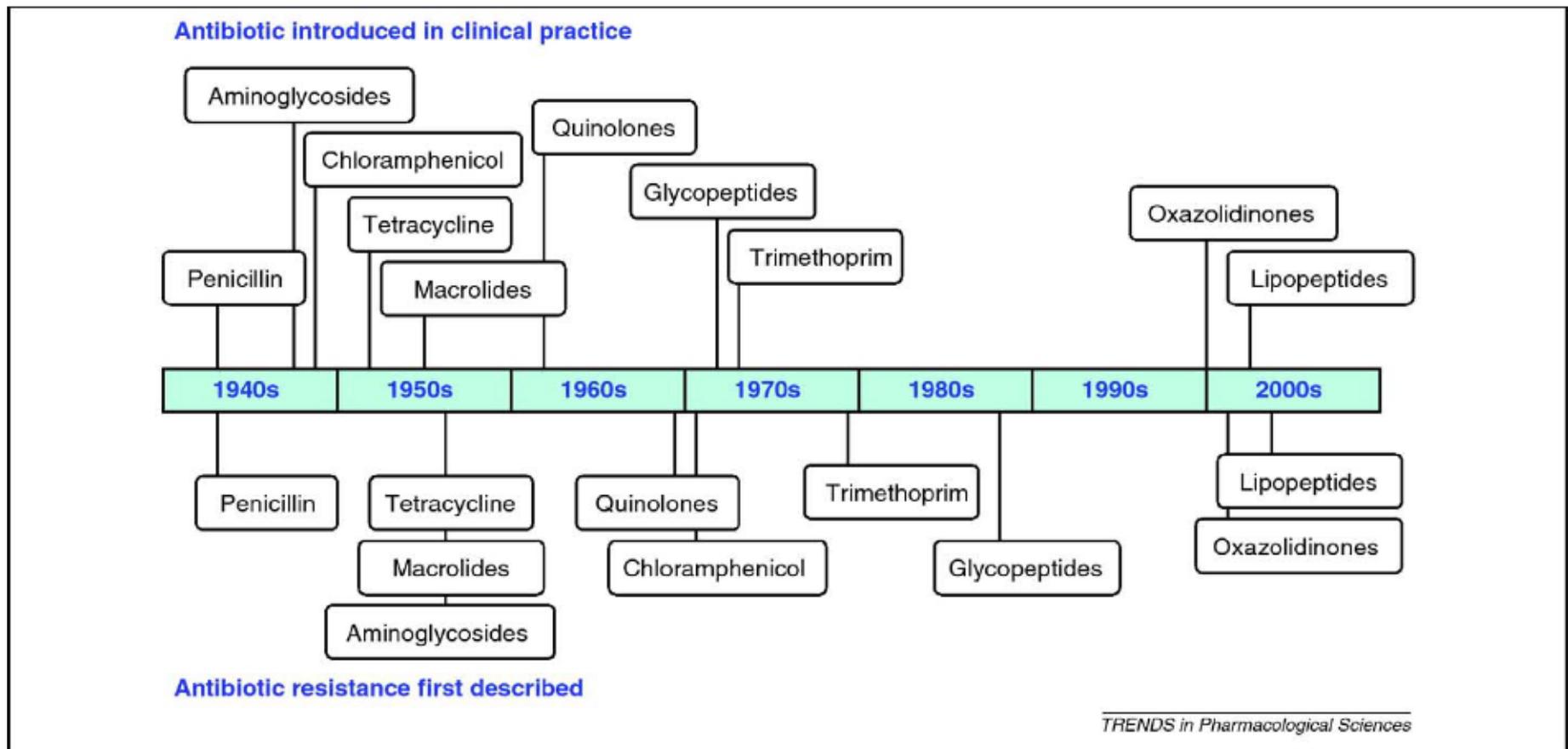
«There is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant»

(lettura magistrale in occasione del premio Nobel 1945)



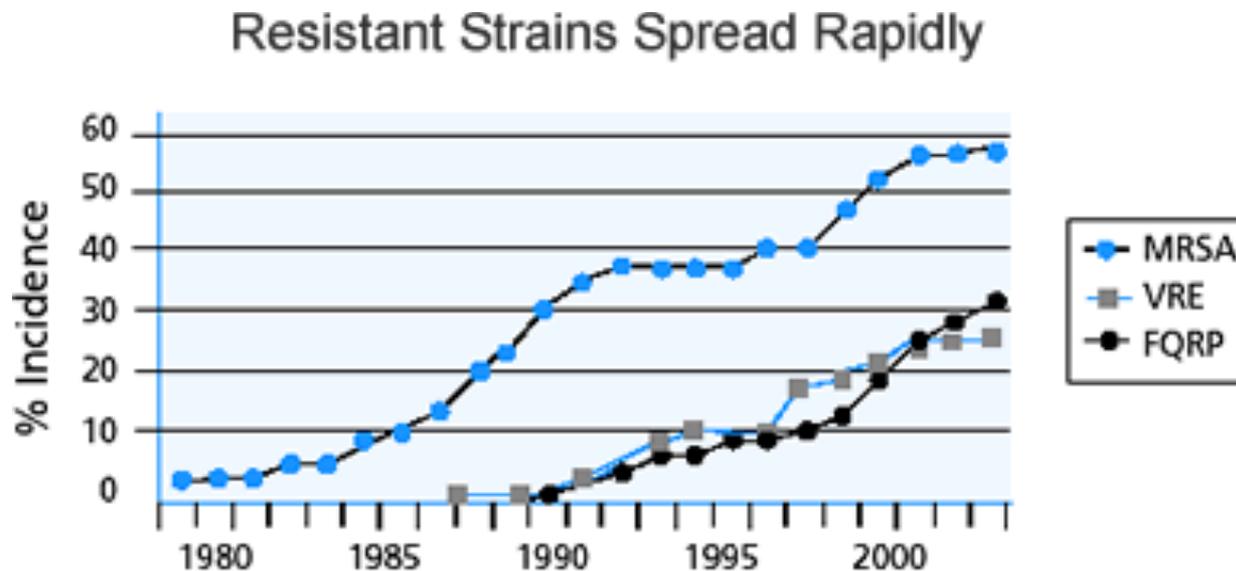
I batteri evolvono rapidamente resistenza agli antibiotici

Ad ogni scoperta di un nuovo antibiotico segue il rapido sviluppo di resistenze.



I batteri evolvono rapidamente resistenza agli antibiotici

Le resistenze antibiotiche sono sempre più diffuse, e la percentuale di microrganismi resistenti agli antibiotici in commercio cresce vertiginosamente ogni anno.



Source: Centers for Disease Control and Prevention

MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*

VRE = Vancomycin-resistant Enterococci

FQRP = Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Questo è solo un esempio!

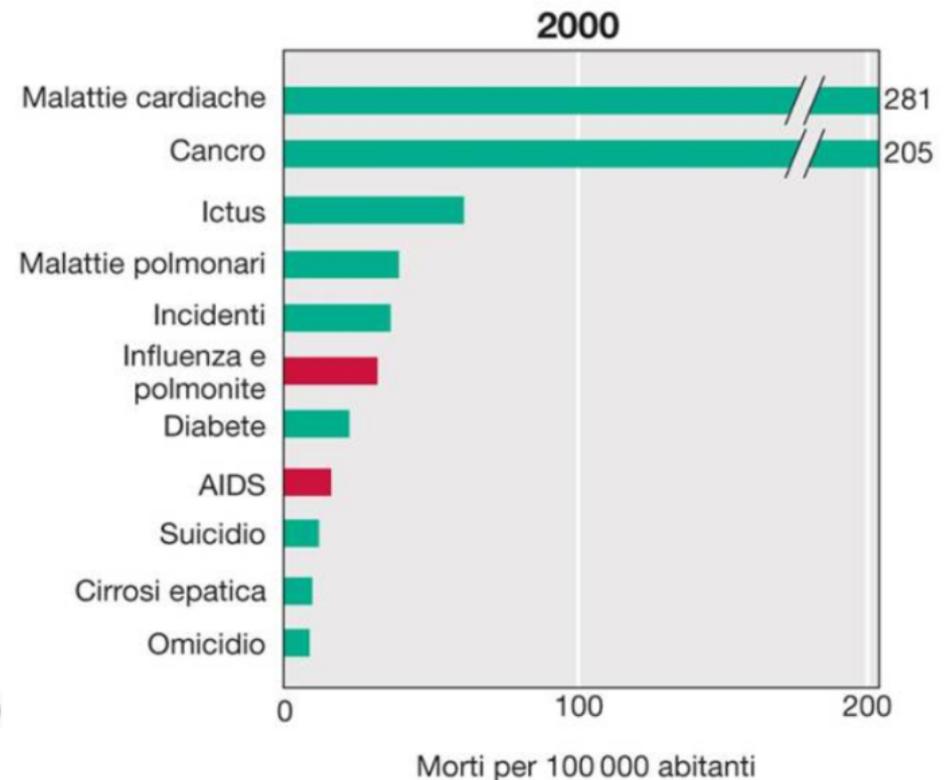
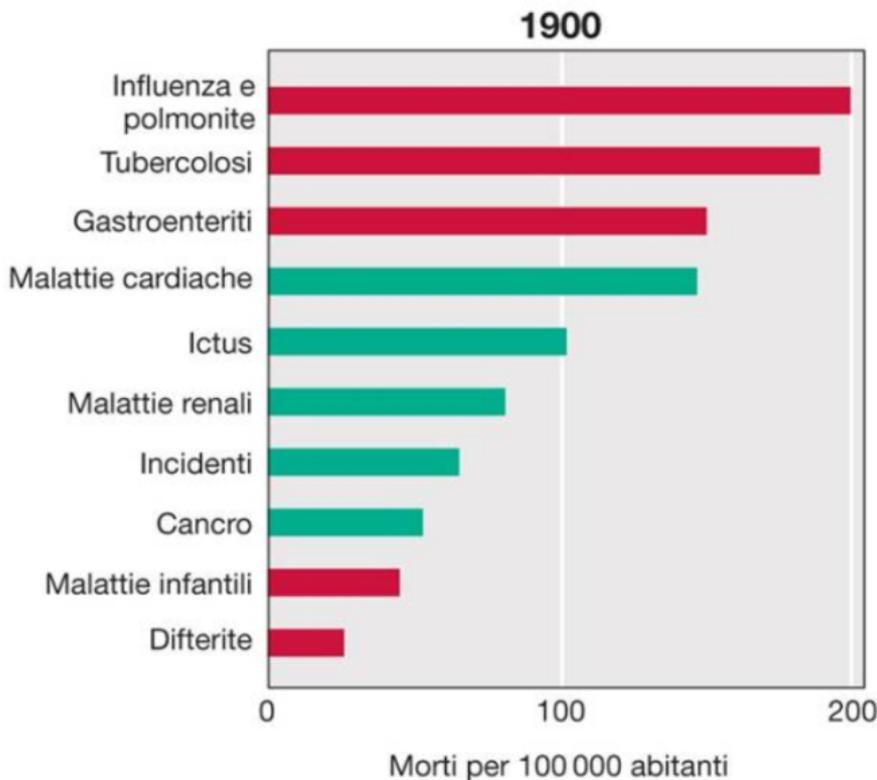
I batteri evolvono rapidamente resistenza agli antibiotici

Fino al 1900 le malattie infettive erano la principale causa di morte nel mondo.

Aspettativa di vita (media)

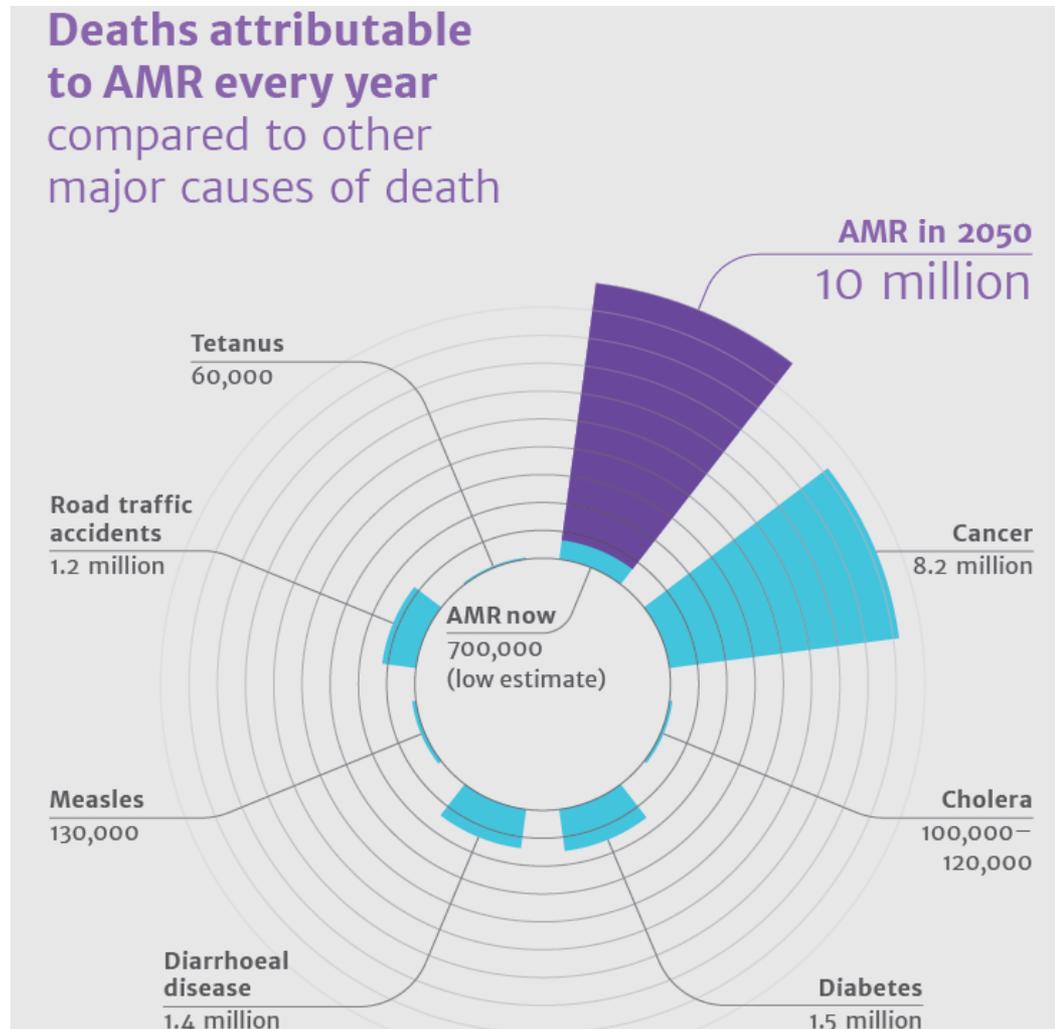
1900 = 47 anni

2000 = 80 anni



I batteri evolvono rapidamente resistenza agli antibiotici

Se non prendiamo provvedimenti per limitare il problema dell'antibiotico-resistenza, le infezioni causate da batteri patogeni resistenti agli antibiotici nel 2050 torneranno ad essere la prima causa di morte nel mondo.



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.

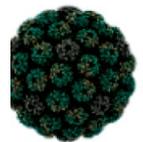
CLOSTRIDIUM DIFFICILE Provoca diarrea (la sua diffusione è raddoppiata nel giro di tre anni) e l'antibiotico vancomicina sta perdendo efficacia. Il batterio contamina letti e pareti, dove può sopravvivere per mesi, e colpisce soprattutto i pazienti anziani.

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 lo 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)

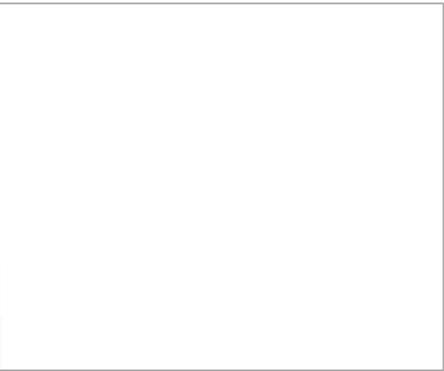
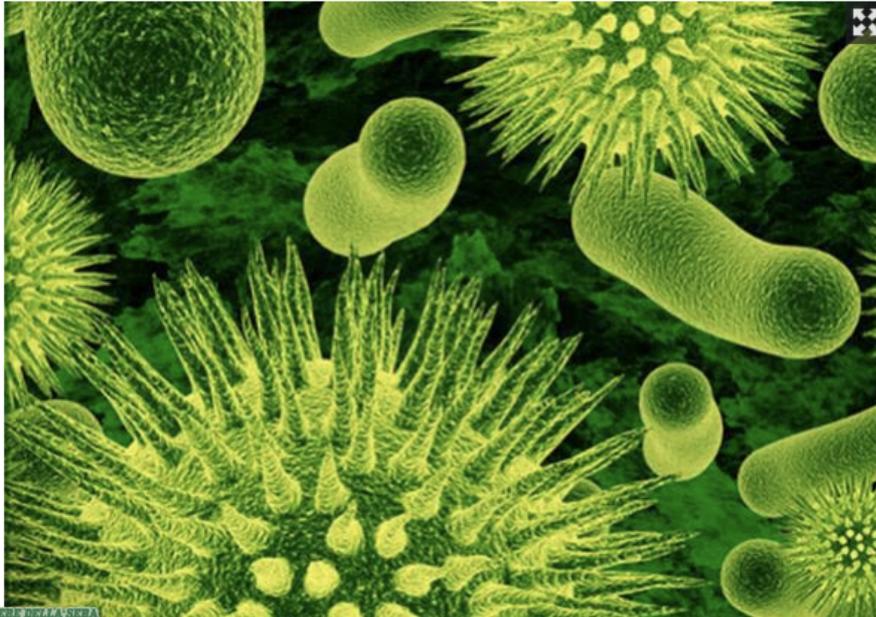


L'EMERGENZA

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



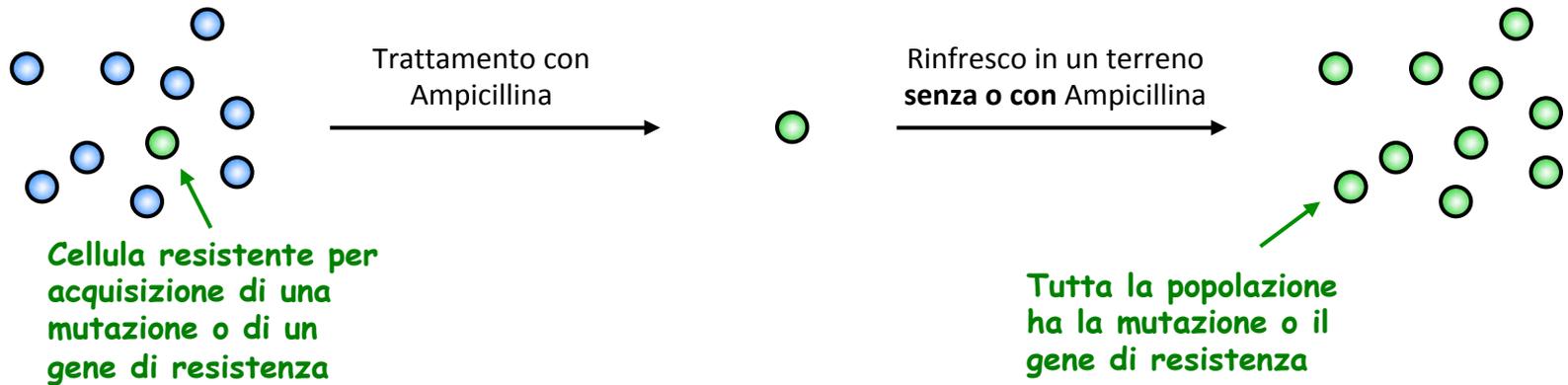
Il succo di ciliegia, rimedio efficace contro l'insonnia degli anziani



VIAGGI
Le terrazze più belle di Roma

Possiamo vincere la guerra contro i patogeni ?

I problemi principali legati all'antibiotico resistenza sono la fortissima pressione selettiva generata dall'uso di antibiotici e l'elevata capacità dei batteri di evolvere resistenze.



L'emergenza di microrganismi resistenti agli antibiotici è un tipico processo di selezione Darwiniana. In una popolazione batterica basta una cellula resistente all'antibiotico per dar vita ad una popolazione di cellule resistenti.

L'unico batterio resistente può sfruttare tutte le risorse di una nicchia ecologica che improvvisamente diventa priva di competitori!

Possiamo vincere la guerra contro i patogeni ?

Inoltre i batteri hanno una capacità molto elevata di acquisire geni di resistenza.



Dobbiamo anche considerare che gli antibiotici sono prodotti dai microrganismi in natura, dove sono presenti anche i geni di resistenza ad essi!

Possiamo vincere la guerra contro i patogeni ?

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



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

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

Cosa possiamo fare ?

Sicuramente sarebbe importante sviluppare nuovi antibiotici, ma questa strada è molto complessa per vari motivi:

- 1) la capacità di microrganismi naturali di produrre nuovi antibiotici è stata esplorata in modo esaustivo negli anni, specialmente mediante metodiche colturali. Scarsi risultati sono stati ottenuti mediante metodiche di metagenomica (es. malacidina A);
- 2) è possibile effettuare degli screening *in vitro* per valutare se molecole di una data libreria sono in grado di inibire dei bersagli molecolari essenziali alla crescita di un batterio, ma è sempre più difficile identificare nuovi bersagli molecolari selettivi per l'inibizione della crescita di batteri patogeni. Inoltre, molecole attive *in vitro* spesso non sono attive *in vivo*;
- 3) le grandi case farmaceutiche non investono più nella ricerca di nuovi antibiotici perché i costi necessari allo sviluppo di tali molecole potrebbe non essere ripagato dal loro impiego limitato nel tempo, a causa della rapida emergenza di resistenze, ma si possono esplorare nuovi approcci anche in ambito accademico.

Cosa possiamo fare ?

Nuove metodiche hanno recentemente portato alla scoperta di un nuovo antibiotico, per cui non sono stati ancora identificati meccanismi di resistenza.

**Forse i batteri non possono sviluppare resistenza verso tutti gli antibiotici?
Su questo ci sono ancora molti dubbi.**

Il caso del Teixobactin

A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance

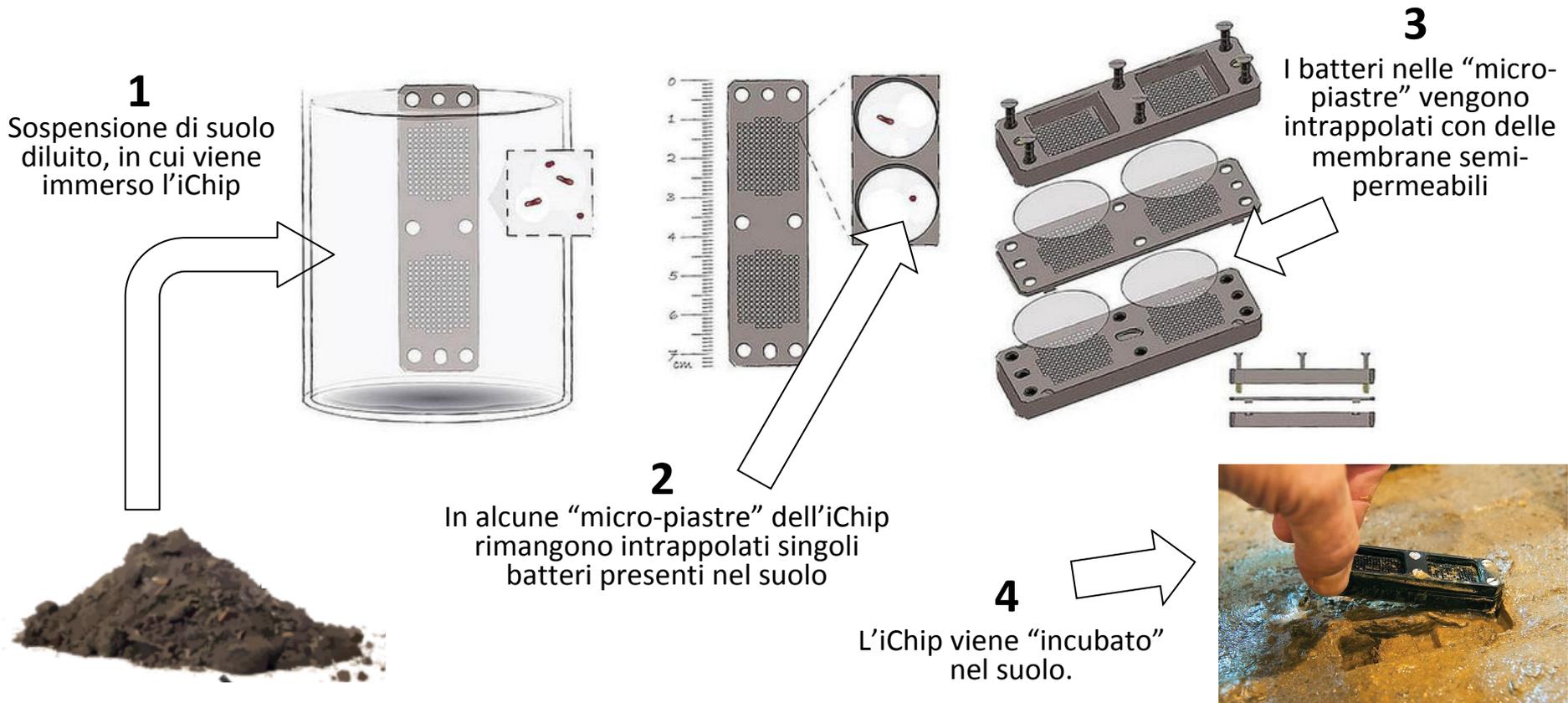
Losee L. Ling^{1*}, Tanja Schneider^{2,3*}, Aaron J. Peoples¹, Amy L. Spoering¹, Ina Engels^{2,3}, Brian P. Conlon⁴, Anna Mueller^{2,3}, Till F. Schäberle^{3,5}, Dallas E. Hughes¹, Slava Epstein⁶, Michael Jones⁷, Linos Lazarides⁷, Victoria A. Steadman⁷, Douglas R. Cohen¹, Cintia R. Felix¹, K. Ashley 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.



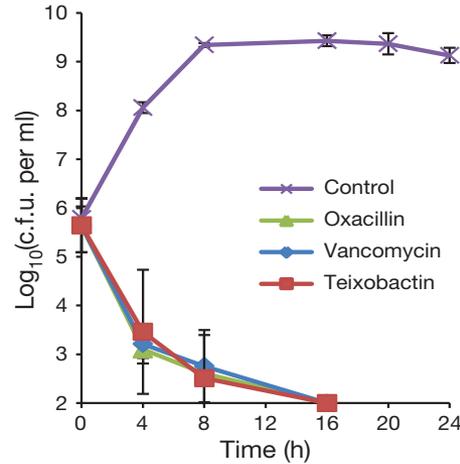
Eleftheria terrae produce un nuovo antibiotico, il Teixobactin

Table 1 | Activity of teixobactin against pathogenic microorganisms

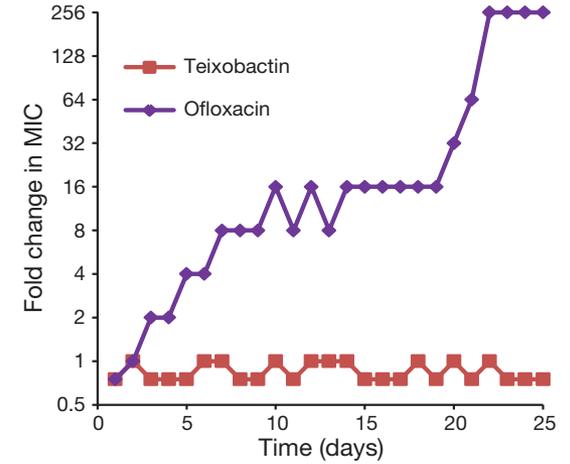
Organism and genotype	Teixobactin MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
<i>S. aureus</i> (MSSA)	0.25
<i>S. aureus</i> + 10% serum	0.25
<i>S. aureus</i> (MRSA)	0.25
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE)	0.5
<i>Enterococcus faecium</i> (VRE)	0.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (penicillin ^R)	≤ 0.03
<i>Streptococcus 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.

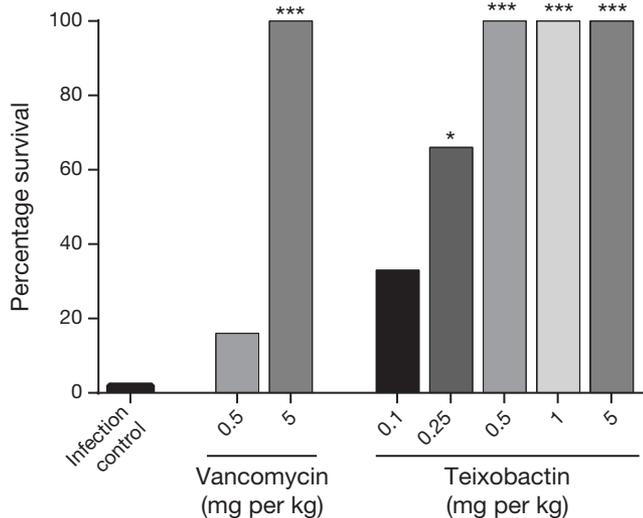
Inibizione crescita *S. aureus*



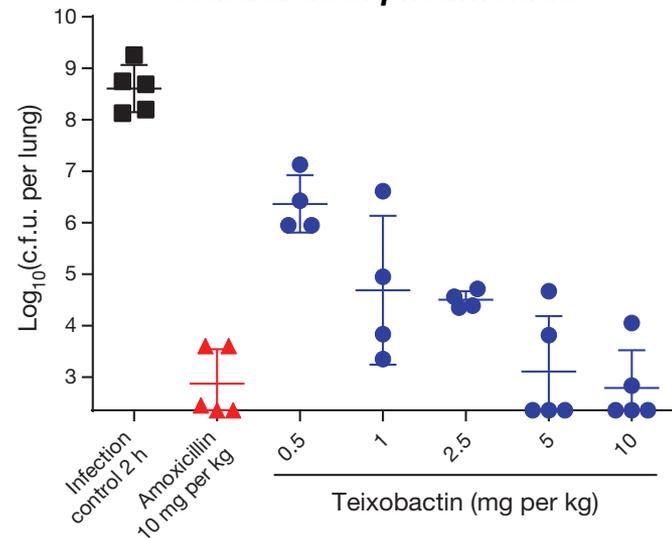
Non sono stati selezionati resistenti di *S. aureus*



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

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 – Inibitori di meccanismi di resistenza

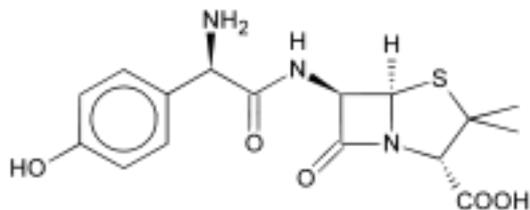
Tra i più noti meccanismi di resistenza agli antibiotici c'è la produzione di enzimi che inattivano tali molecole. Ad esempio, la resistenza agli antibiotici β -lattamici è in molti casi dovuta all'espressione di β -lattamasi, enzimi che degradano ed inattivano tali antibiotici.

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

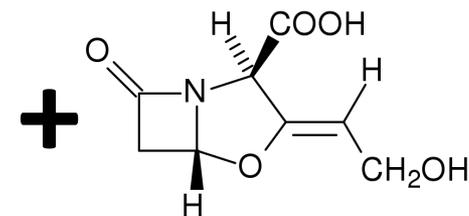
Ad esempio, il farmaco Augmentin contiene la amoxicillina, un antibiotico β -lattamico, e l'acido clavulanico, un inibitore delle β -lattamasi.



amoxicillina



acido clavulanico



Negli ultimi anni è molto attiva la ricerca di inibitori delle carbapenemasi, enzimi che inattivano gli antibiotici carbapenemi (es. imipenem, meropenem, etc...).

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.

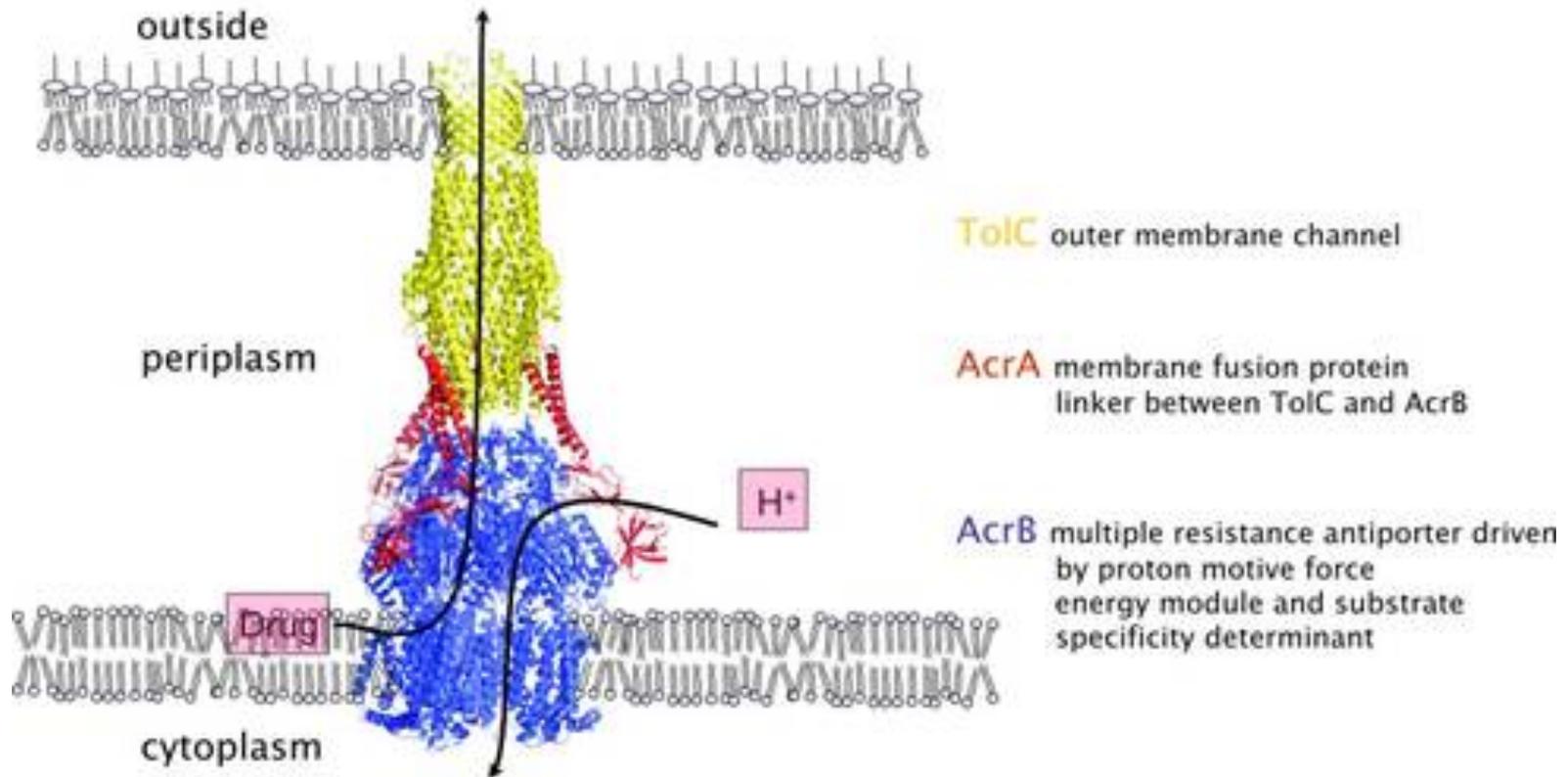
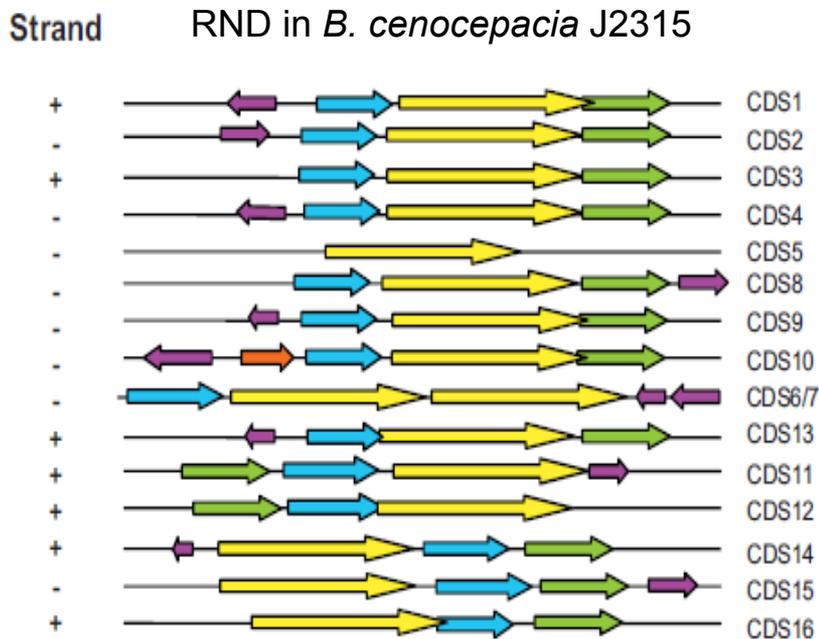


Figure 1: Schematic Drawing of the AcrAB-TolC antibiotic efflux pump of *Escherichia coli*. The inner membrane component AcrB (blue) is both the substrate specificity determinant and the energy module of the AcrA/AcrB/TolC efflux system. Drugs are transported from the outer leaflet of the inner membrane 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:

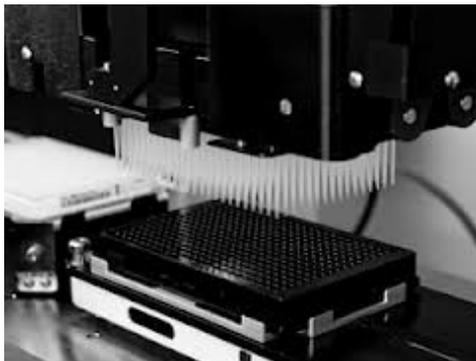
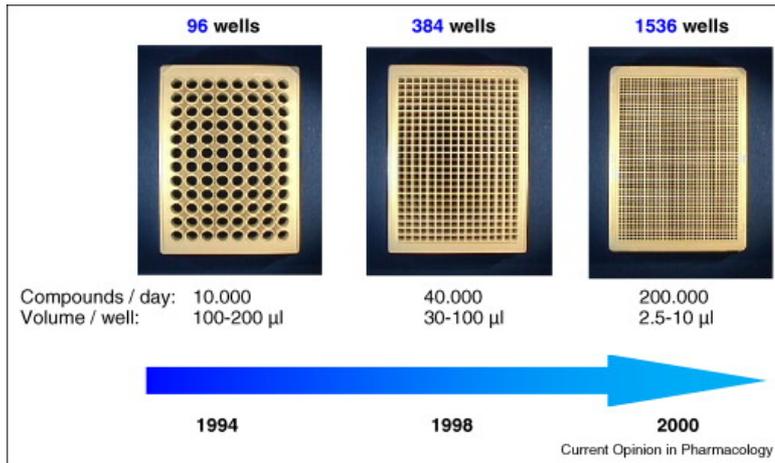
- 1) major facilitator (MF) superfamily (proton-drug antiport)
- 2) resistance-nodulation-division (RND) family (proton-drug antiport)
- 3) small multi-drug resistance (SMR) family (proton-drug antiport)
- 4) ATP binding cassette (ABC) family (ATP hydrolysis)
- 5) multiple antibiotic and toxin extrusion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

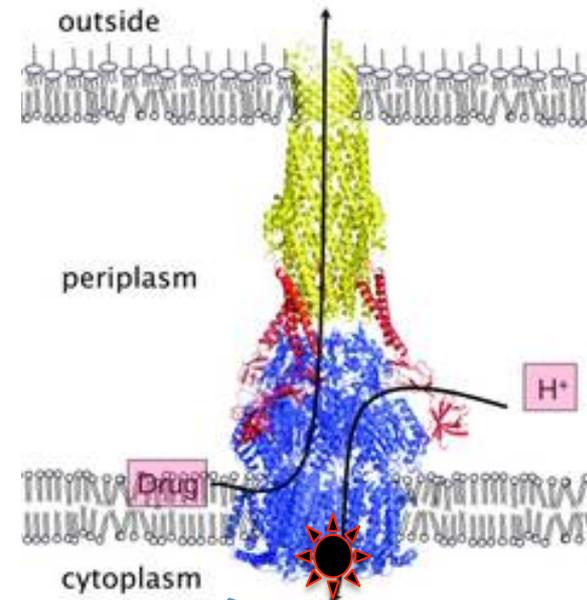


Screening random di composti di derivazione naturale o sintetica. Molte volte questo è preceduto da test di citotossicità.



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.

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.

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 1057 composti appartenenti ad una *library* 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.

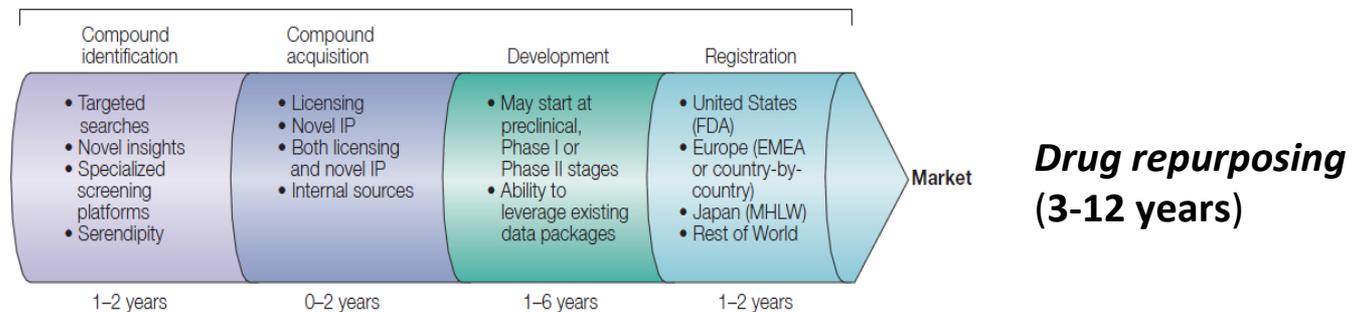
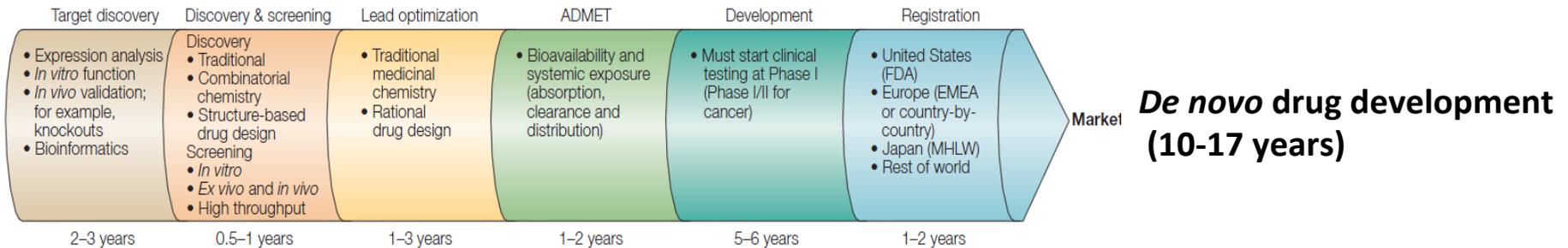
Questo approccio si definisce *drug-repurposing*.

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*.

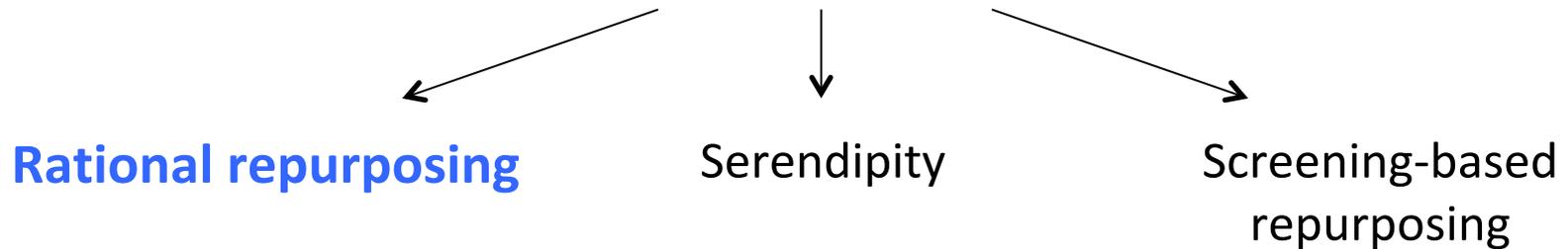
Tali composti non hanno un effetto antibiotico *per se*, e sono utilizzati per il trattamento di patologie non connesse alle infezioni batteriche.

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*).



II *drug repurposing*

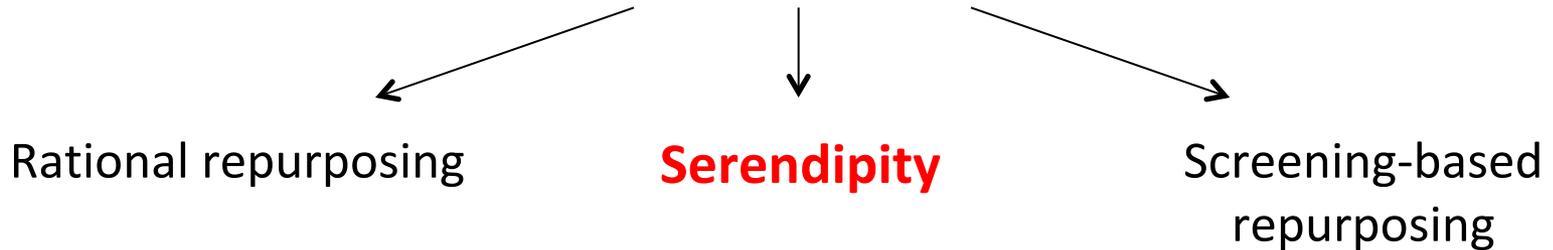


Alteration of uracil metabolism reduces biofilm formation in *P. aeruginosa*.

This led the researchers to screen uracil analogues for biofilm-inhibitory activity against *P. aeruginosa*.

Results highlighted a potent anti-biofilm effect of 5-fluorouracil, a drug currently used in the therapy of solid tumours.

II *drug repurposing*

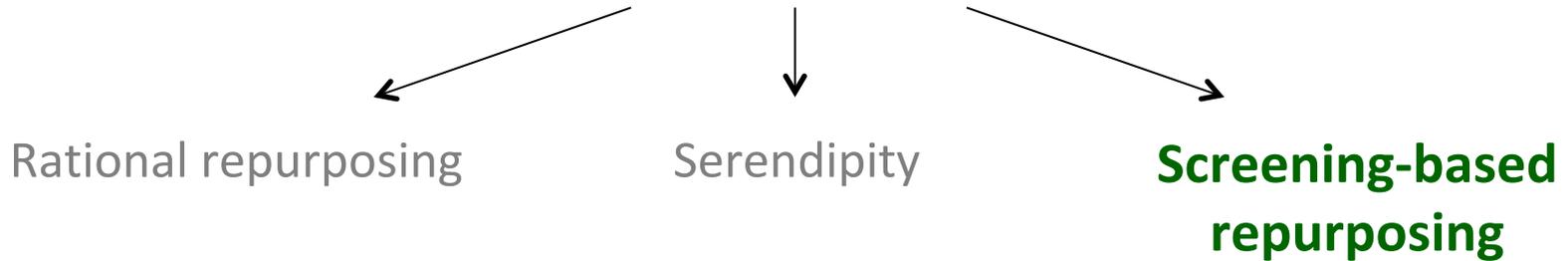


Sildenafil [developed in 1980s as a drug for angina pectoris (chest pain)]

The desired cardiovascular effects were not observed in clinical trials,
but participants described **AN INTERESTING SIDE EFFECT !!**



II drug repurposing



A collection of highly diverse drugs is screened for side activities of interest



The hit compound(s) could be either directly tested in clinical studies or used as a starting point for specific drug optimization programs.

To use this strategy a feasible biosensor biosensor system ins required.

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 1057 composti appartenenti ad una *library* 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.

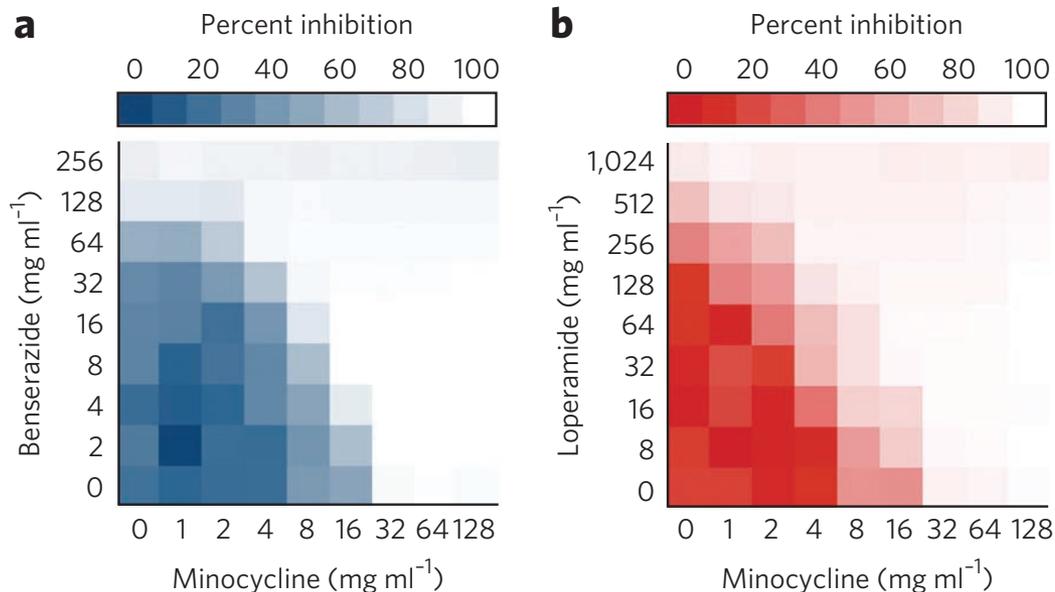
Questo approccio si definisce *drug-repurposing*.

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

Quali limitazioni potrebbero essere insite in tale approccio?

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

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

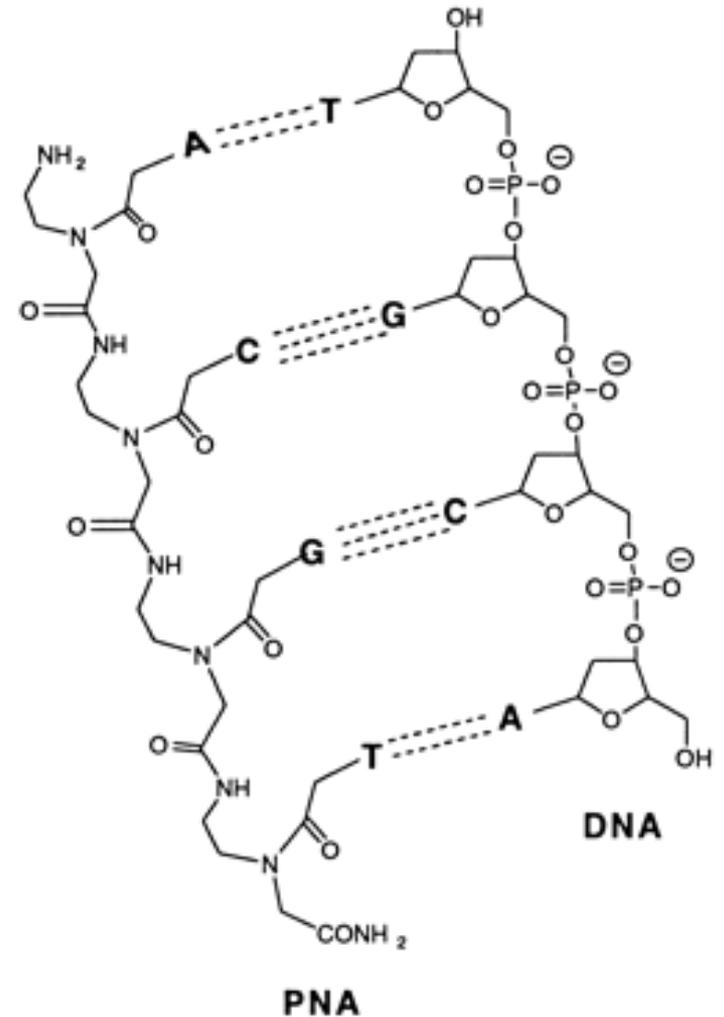
Gli acidi peptidonucleici (PNA)

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.

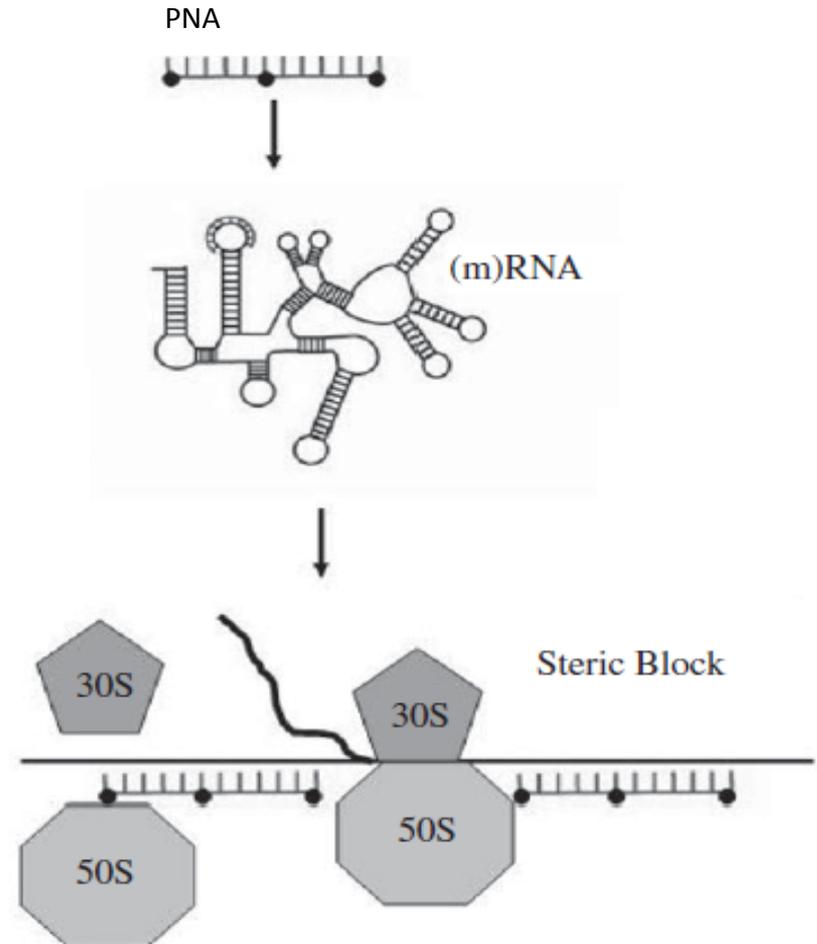
Il legame PNA/DNA o PNA/RNA è più stabile di quello DNA/DNA o DNA/RNA.



I PNA per la terapia antisenso 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

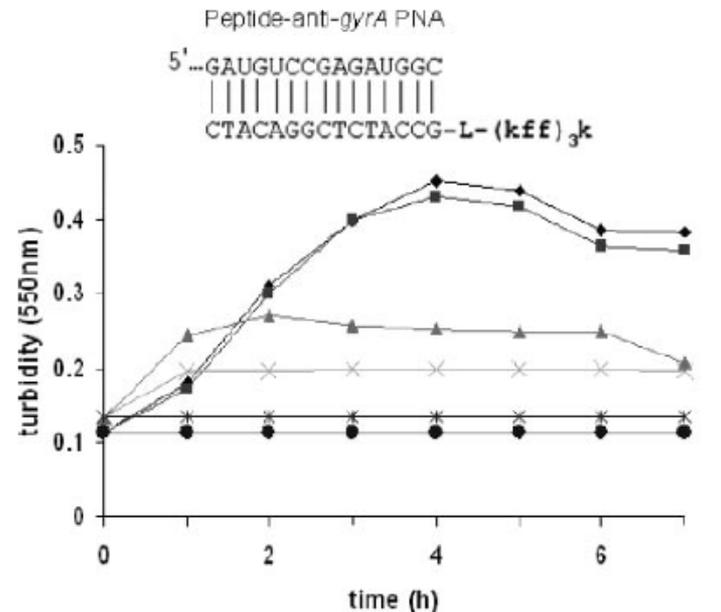
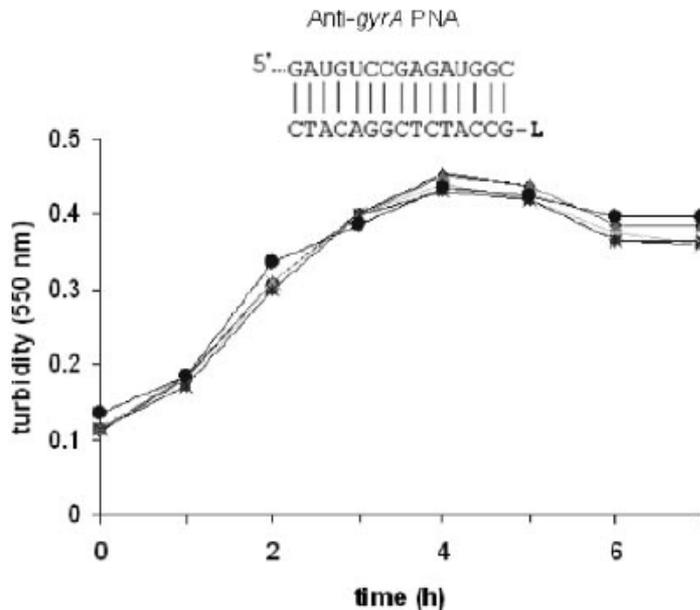
	Microrganismi	Gene bersaglio	Proteina codificata	Referenze
Gram-negativi	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>rpoD</i>	RNA polimerasi, subunità σ^{70}	Bai <i>et al.</i> (2012) <i>Biomaterials</i> 33:659-667.
	<i>Brucella suis</i>	<i>polA</i>	DNA polimerasi I, necessaria per la replicazione del DNA	Rajasekaran <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	Alajjlouni 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	Kulytė <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

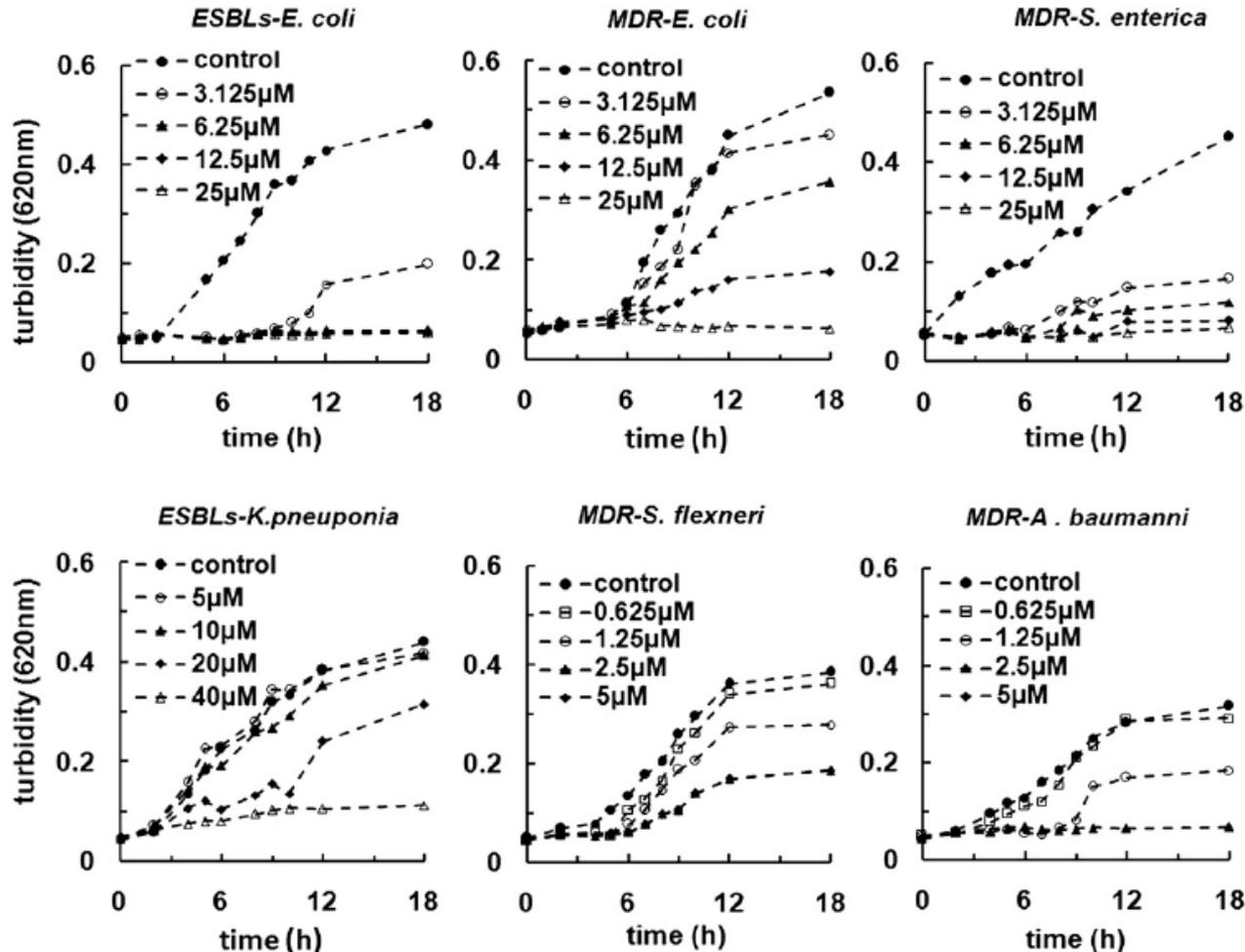
**Si possono generare PNA ad ampio spettro d'azione o
specie-specifici**

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.

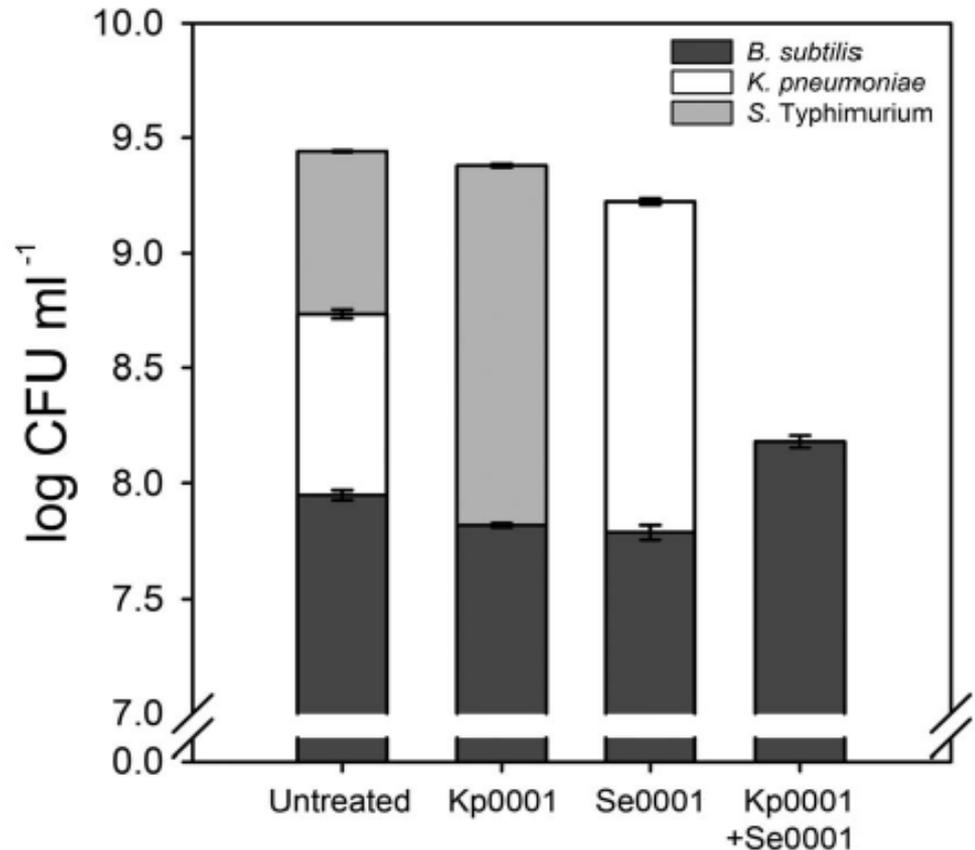
I PNA Kp0001 e Se0001 sono disegnati sulla stessa regione del gene *murA*, che codifica per un enzima necessario alla sintesi del peptidoglicano.

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.

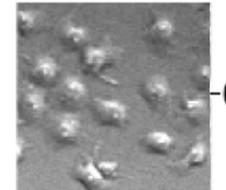
Nonostante siano disponibili ancora pochi dati a riguardo, i PNA non sembrano avere effetti di citotossicità su cellule HeLa.

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*.

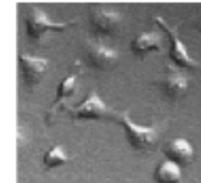
Colonna di destra: cellule HeLa infettate con *E. coli* e trattate con lo stesso PNA.



Cellule HeLa
+ PNA



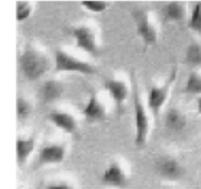
0



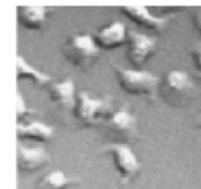
1



2



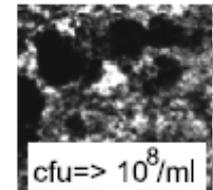
5



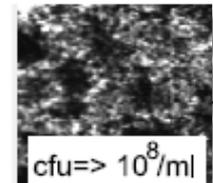
20

PNA treatment μM

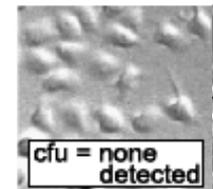
Cellule HeLa
+ PNA + *E. coli*



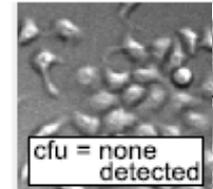
0



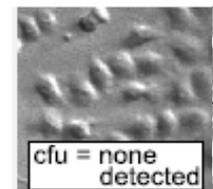
1



2



5



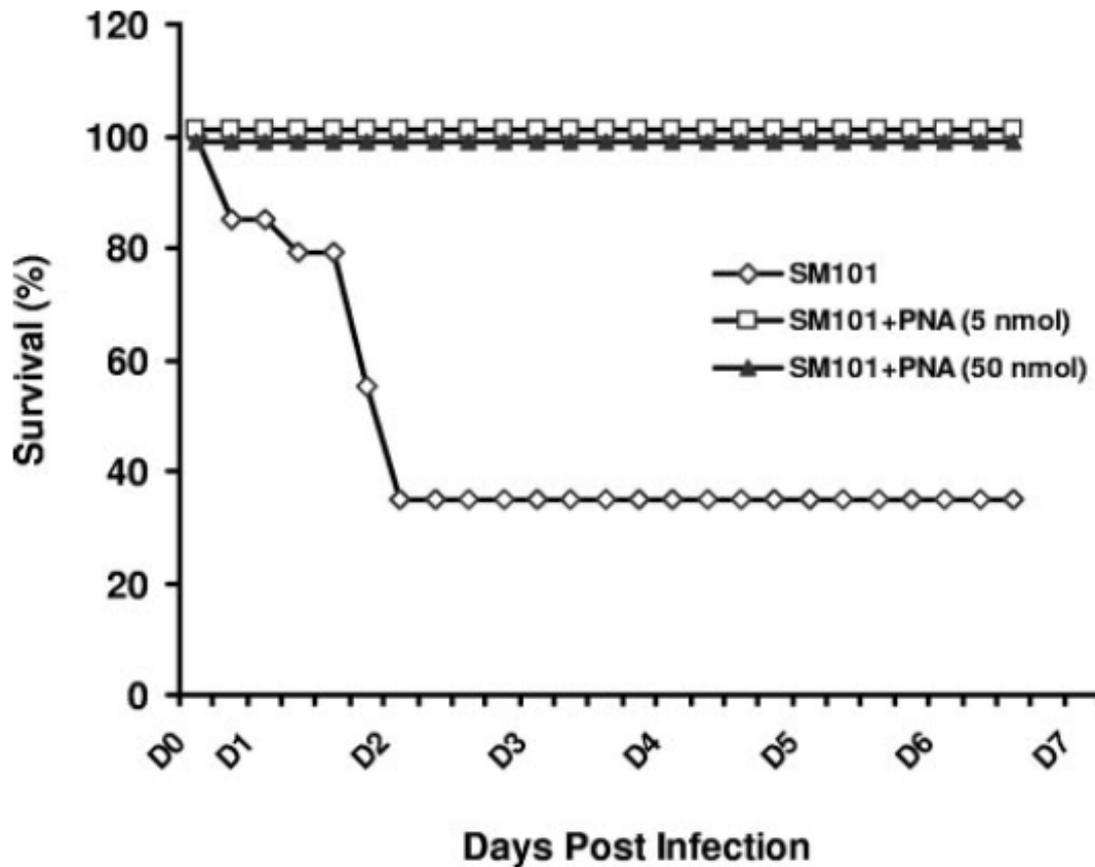
20

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

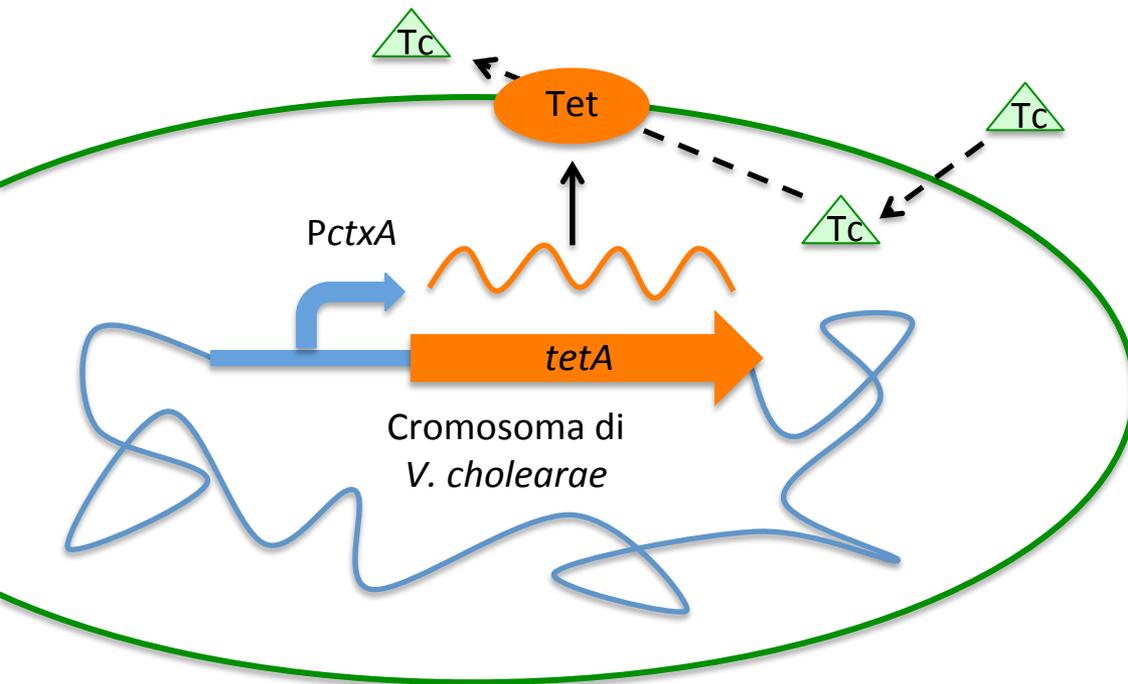
Increasing antibiotic resistance requires the development of new approaches to combating infection. Virulence gene expression in vivo represents a target for antibiotic discovery that has not yet been explored. A high-throughput, phenotypic screen was used to identify a small molecule 4-[N-(1,8-naphthalimide)]-n-butyric 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.



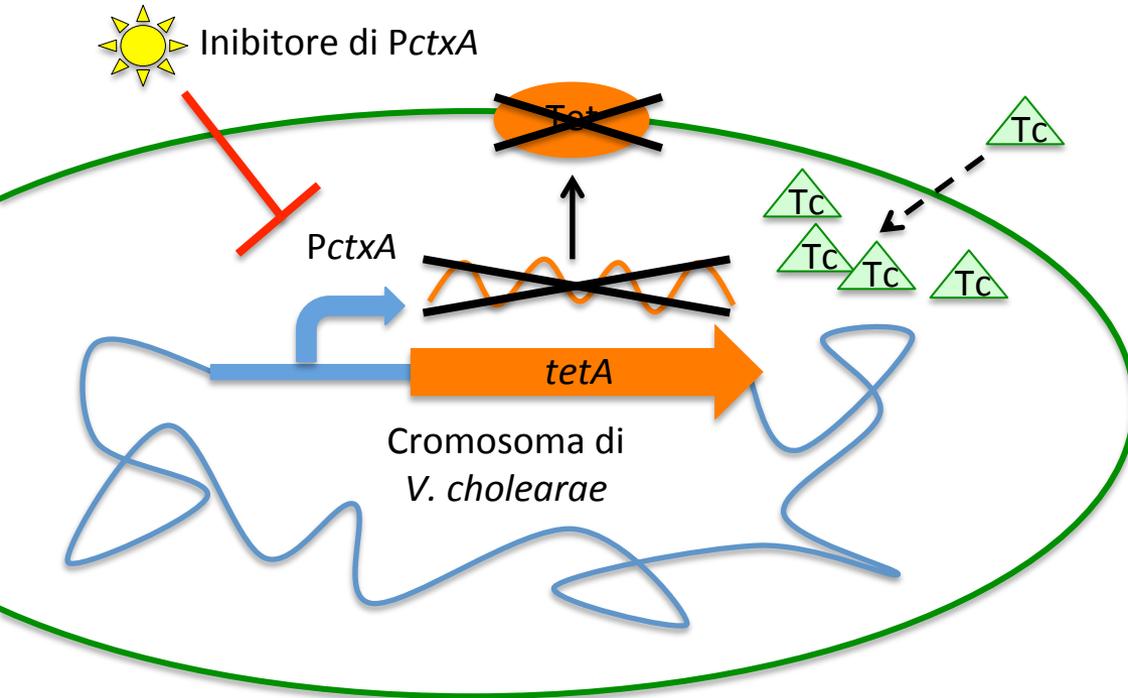
Se il promotore *PctxA* è attivo, il ceppo reporter di *V. cholerae* esprime il gene *tetA*, e di conseguenza è in grado di crescere in presenza di tetraciclina.

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.

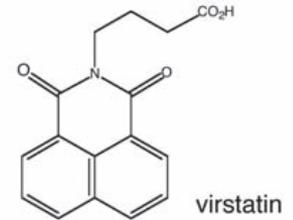


In presenza di una molecola che inibisca l'attività del promotore *PctxA*, il ceppo reporter di *V. cholerae* non esprimerà il gene *tetA*, e di conseguenza non sarà in grado di crescere in presenza di tetraciclina.

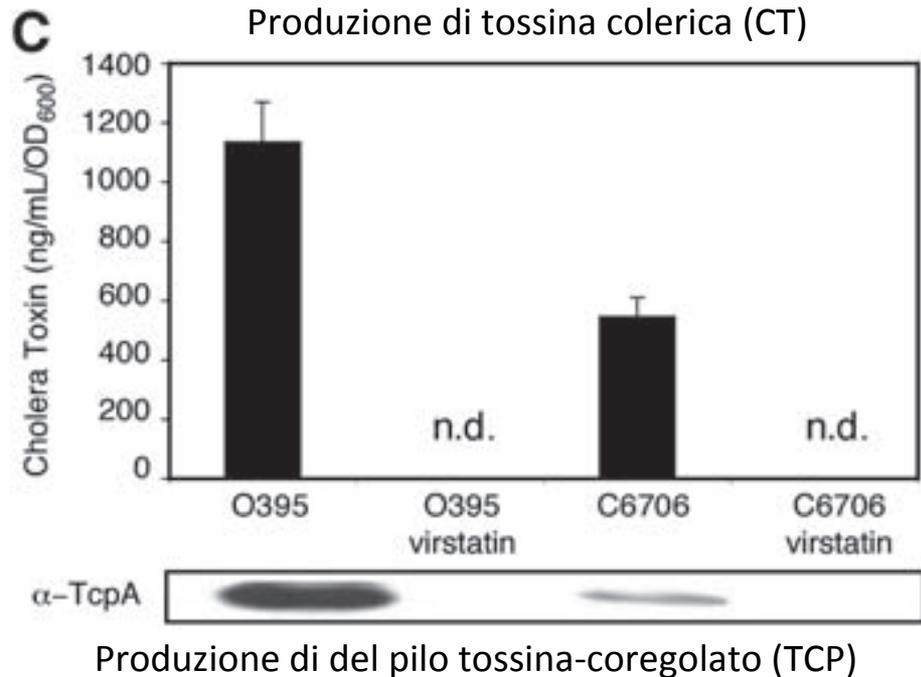
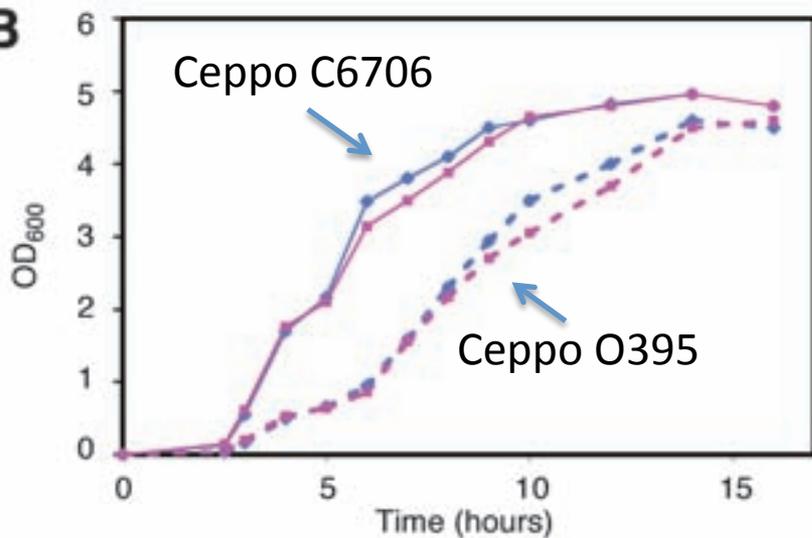
La virstatina come composto anti-virulenza in *V. cholerae*

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*

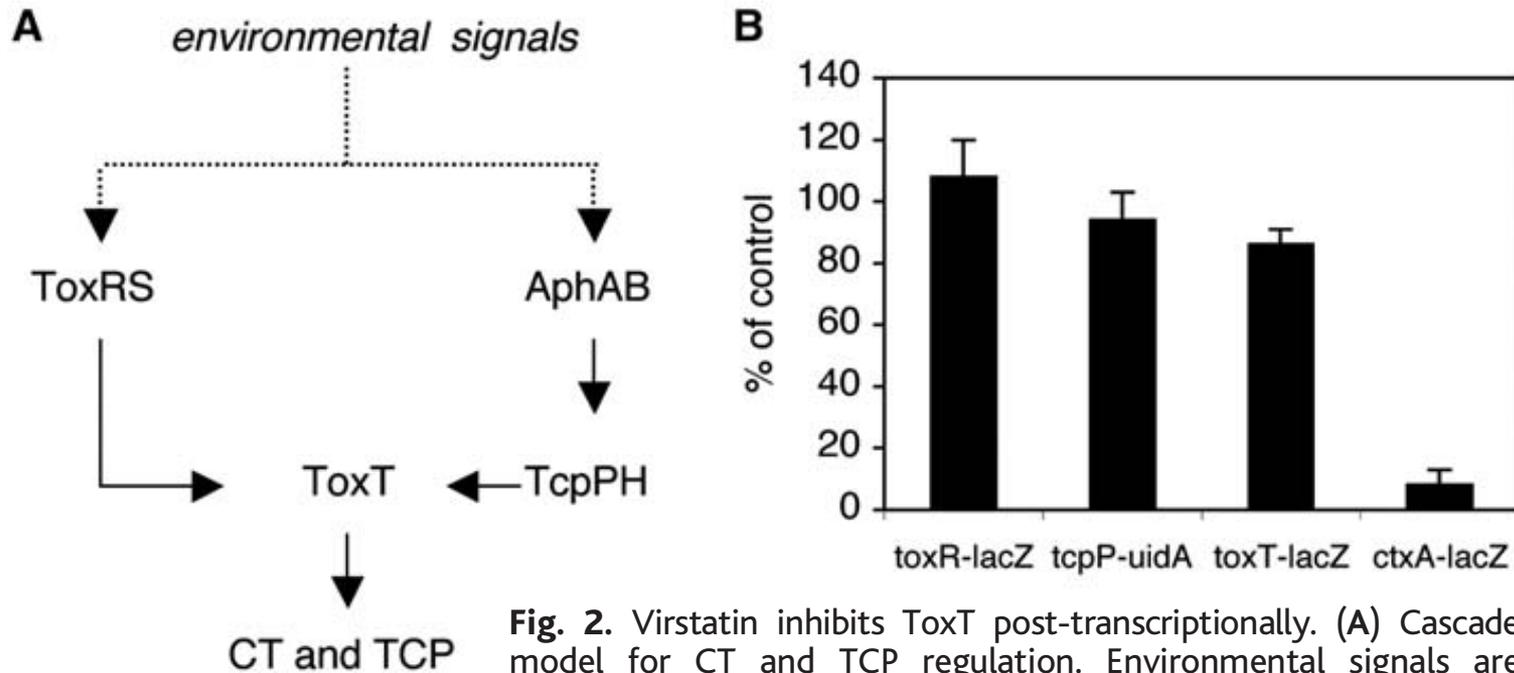


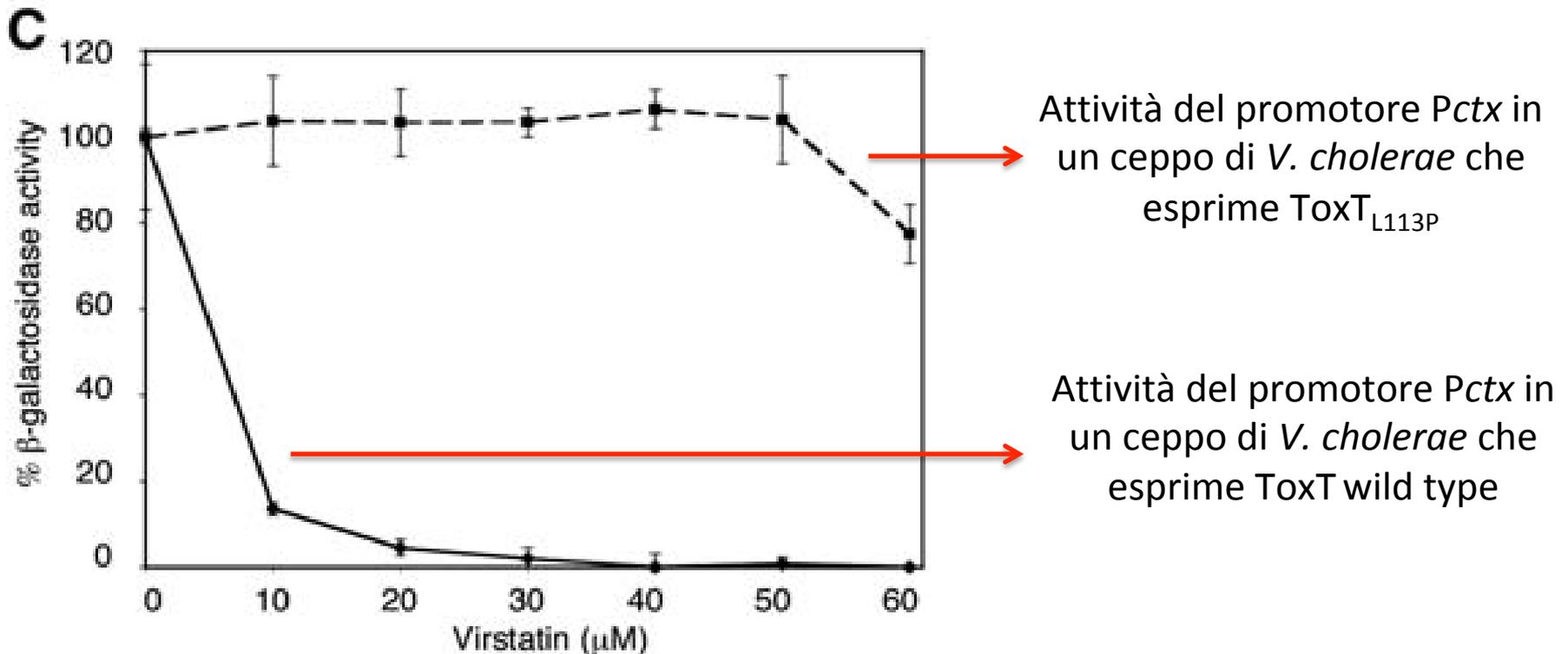
Fig. 2. Virstatin inhibits ToxT post-transcriptionally. **(A)** Cascade model for CT and TCP regulation. Environmental signals are transduced by AphAB, TcpPH, and ToxRS, of which the latter two transcriptionally activate *toxT*. ToxT then activates *ctx* and *tcp* transcription. **(B)** Virstatin inhibits *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.

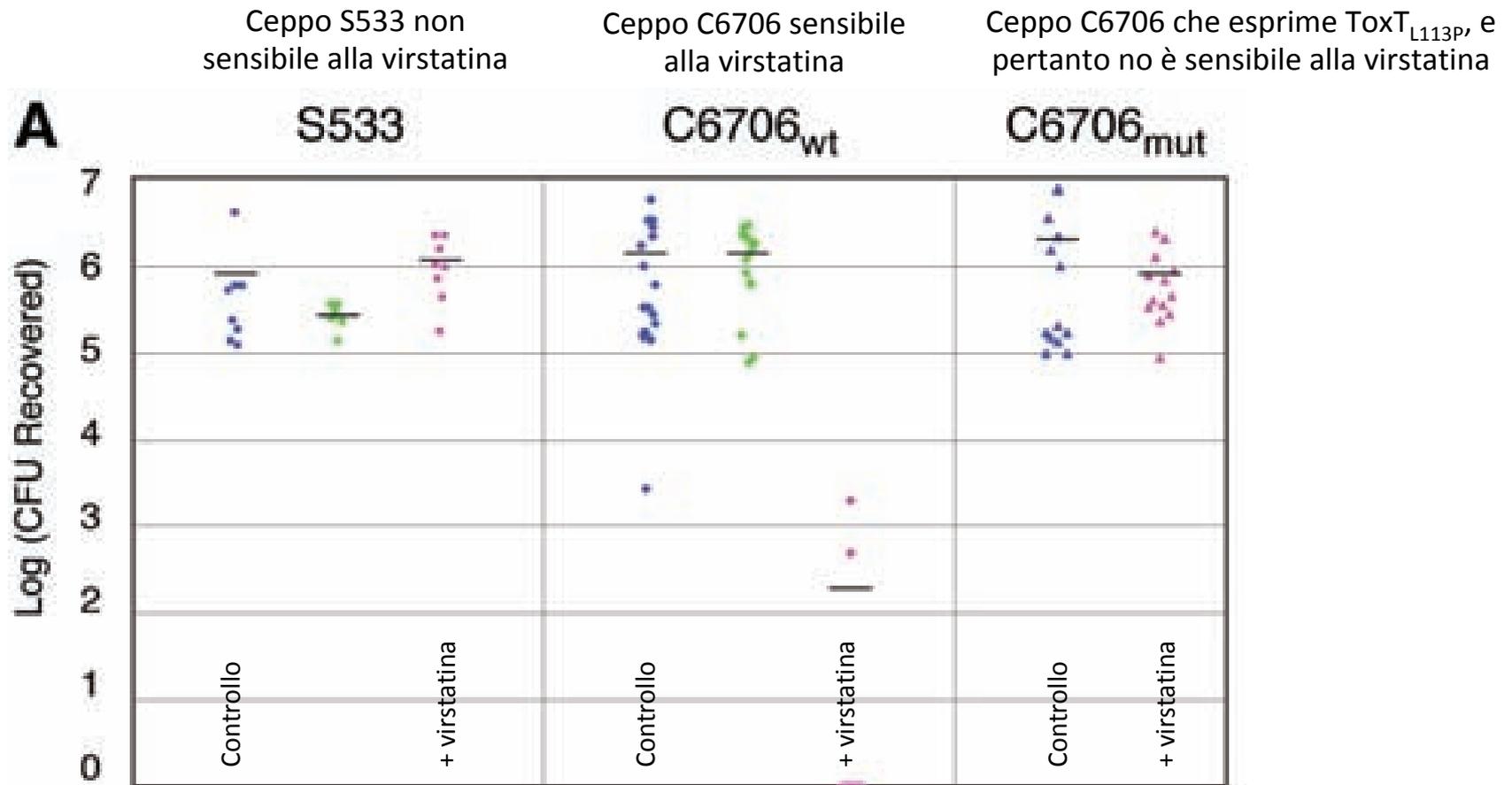
È stato identificato un ceppo di *V. cholerae*, S533, che non è sensibile alla virstatina. Questo ceppo esprime una variante mutata di ToxT, ToxT_{L113P}, che non lega la virstatina, e che quindi non è inibita da tale molecola.



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 ?

Inibizione della virulenza in *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa...

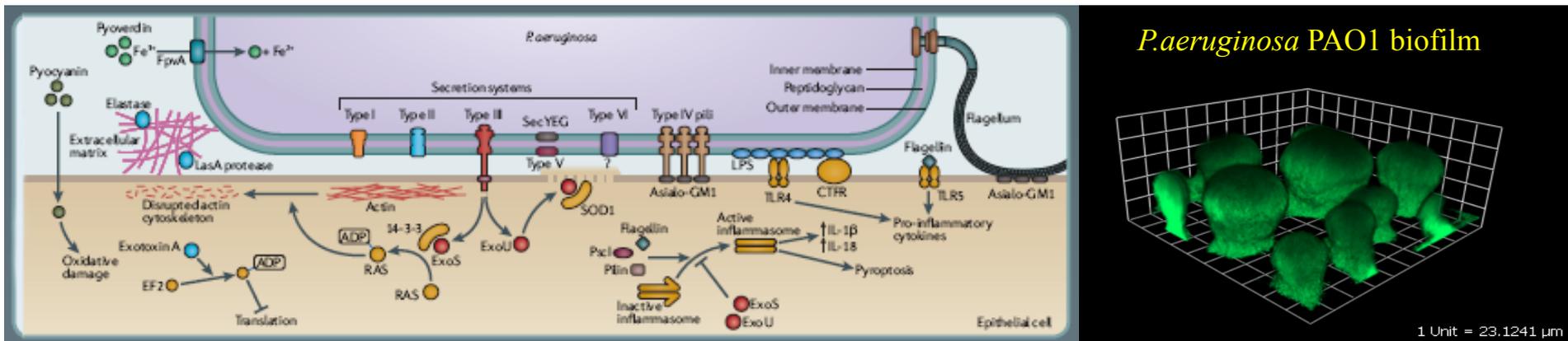
...è un patogeno opportunisto umano che causa infezioni sia acute che croniche in pazienti immunocompromessi e ospedalizzati

...è la principale causa di morte nei pazienti affetti da fibrosi cistica

...produce una vasta gamma di fattori di virulenza

...è molto resistente all'azione degli antibiotici :

- resistenza intrinseca (proprietà di membrana, pompe d'efflusso, etc...)
- formazione di biofilm



In *P. aeruginosa* la produzione di fattori di virulenza e la formazione di biofilm sono regolati da un fenomeno di comunicazione molecolare noto come quorum sensing.

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

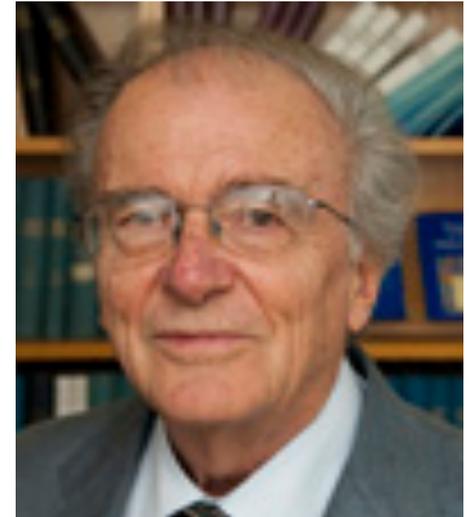
In realtà, già nel 1965, sulla prestigiosa rivista scientifica *Nature* era stato pubblicato un lavoro rivoluzionario dello scienziato ungherese Alexander Tomasz.

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."

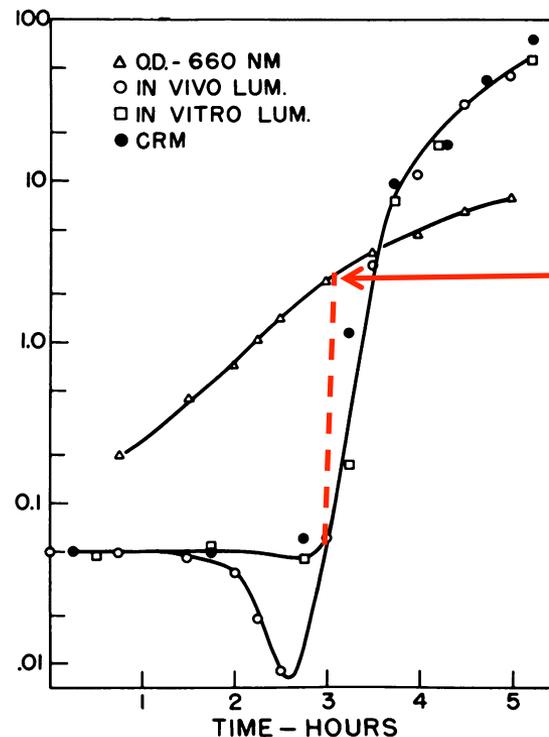


A. Tomasz, attualmente a capo del laboratorio di *Microbiologia e Malattie Infettive* alla Rockefeller University, NY, USA.

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*

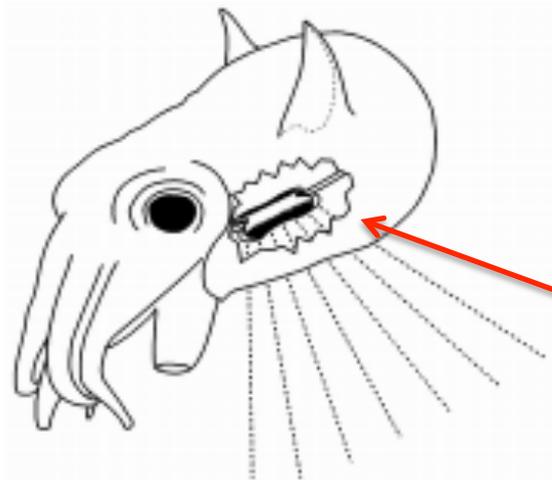


Bioluminescence is emitted only at high cell density

Il quorum sensing e la sociomicrobiologia

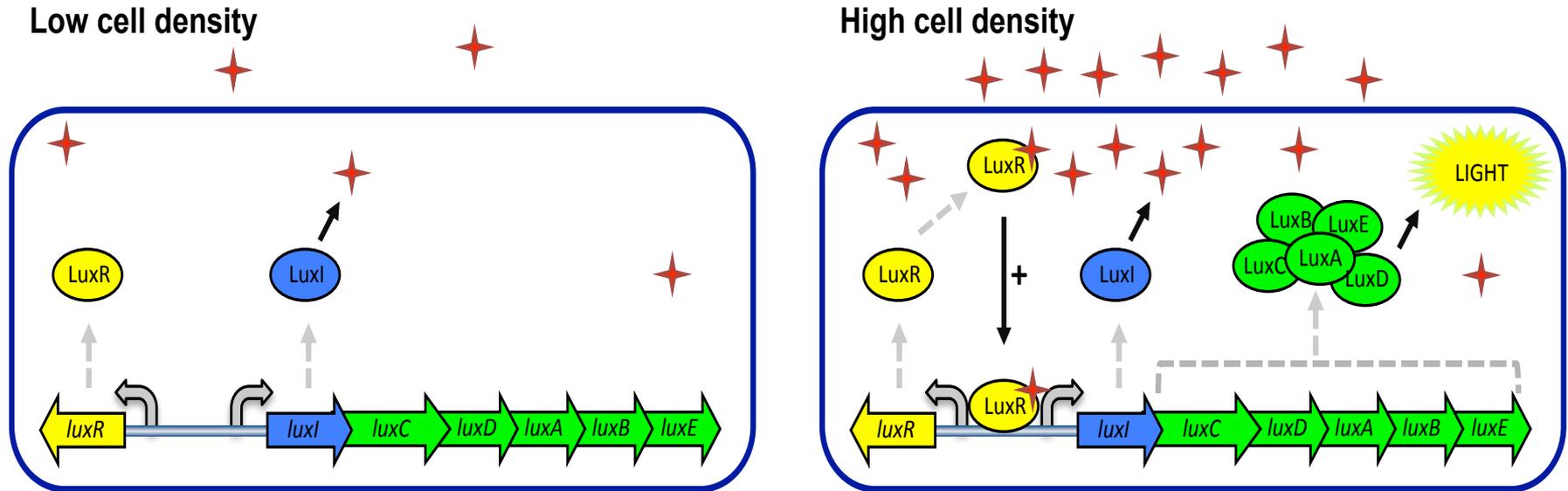
V. fischeri è un batterio marino che al calare del sole colonizza l'organo della luce della seppia *Euprymna scolopes*, dove trova una nicchia ecologica protetta e ricca di nutrimento, e dove può quindi crescere fino a raggiungere un'alta densità cellulare. L'emissione di luce da parte di *V. fischeri* 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

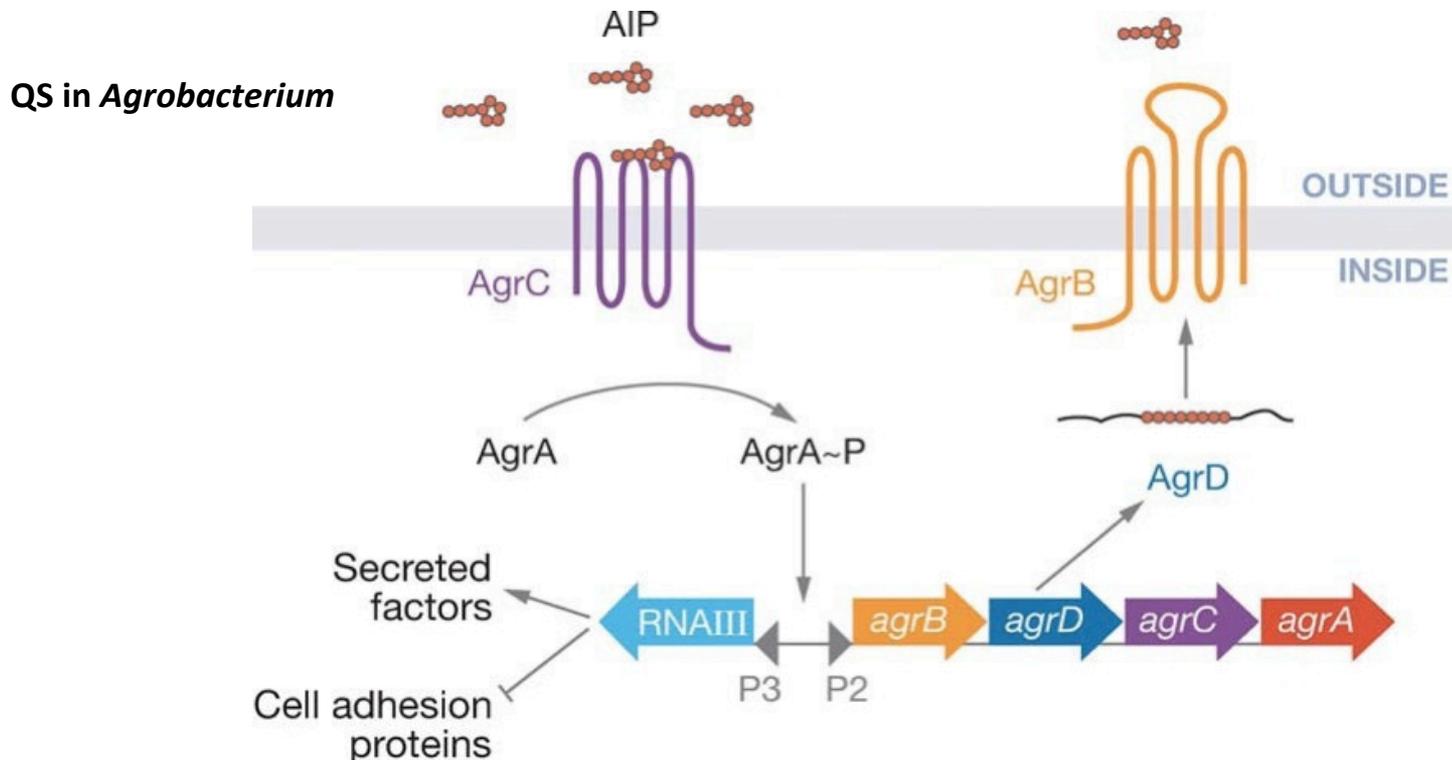


La sintasi LuxI, codificata dal gene *luxI*, produce la molecola segnale 3OC₆-HSL, che viene secreta nel mezzo colturale. La concentrazione di 3OC₆-HSL aumenta nel mezzo in modo proporzionale alla crescita batterica, fino a raggiungere una concentrazione soglia alla quale è in grado di legare il recettore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

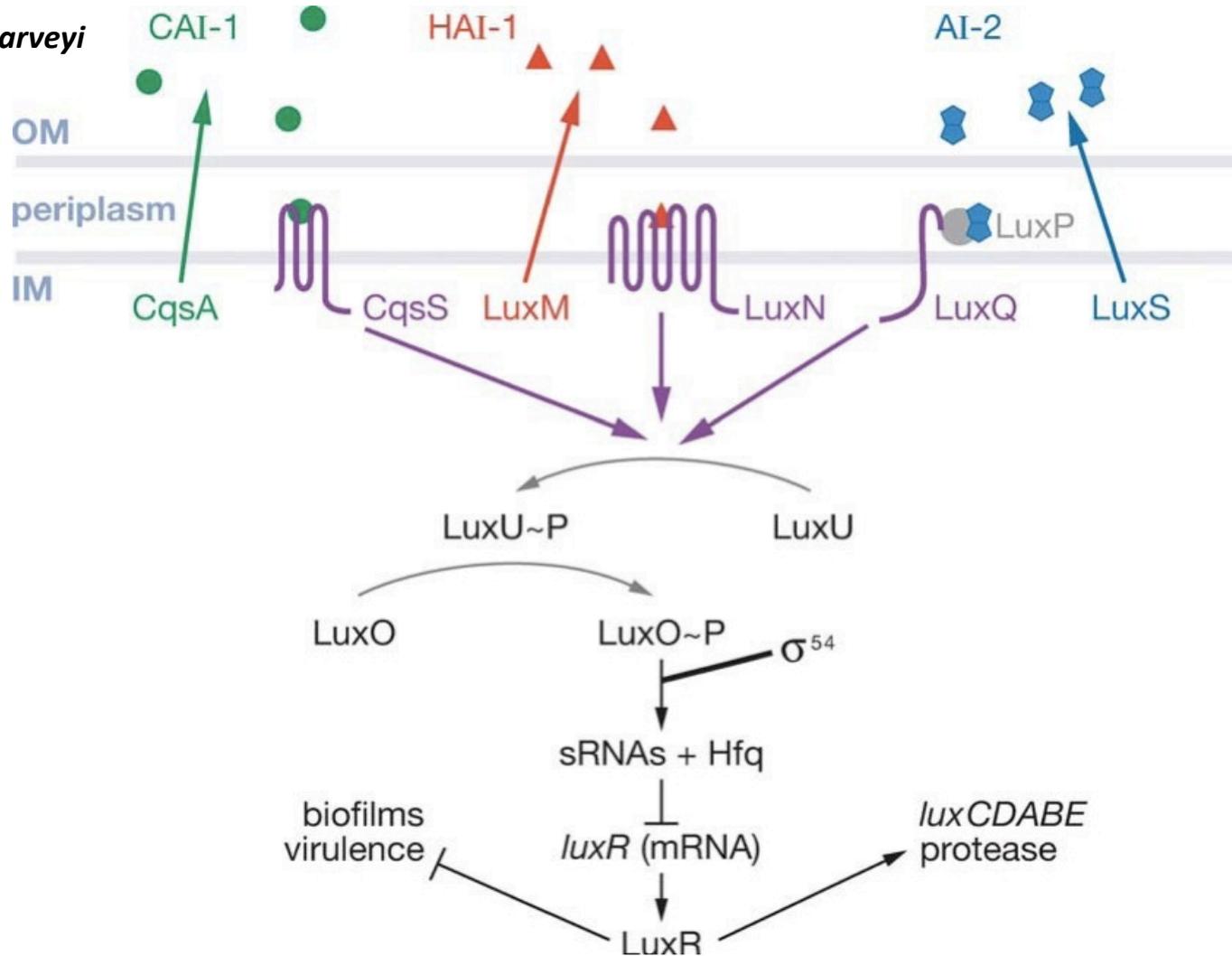
Le molecole segnale più diffuse nei batteri Gram-positivi sono piccoli peptidi, spesso ciclici e modificati. In questo caso la molecola segnale è espressa in forma di pro-peptide non attivo all'interno della cellula. Una proteina di membrana processa il pro-peptide e lo esporta nel mezzo colturale. Qui 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!

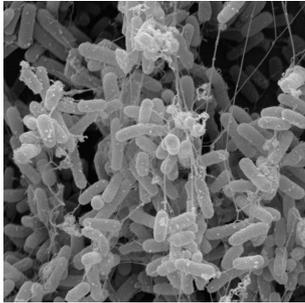
QS in *Vibrio harveyi*



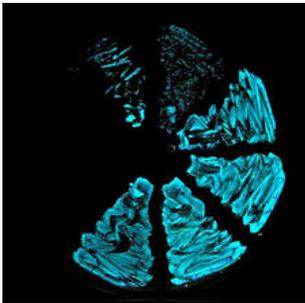
Molti batteri comunicano mediante il quorum sensing

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

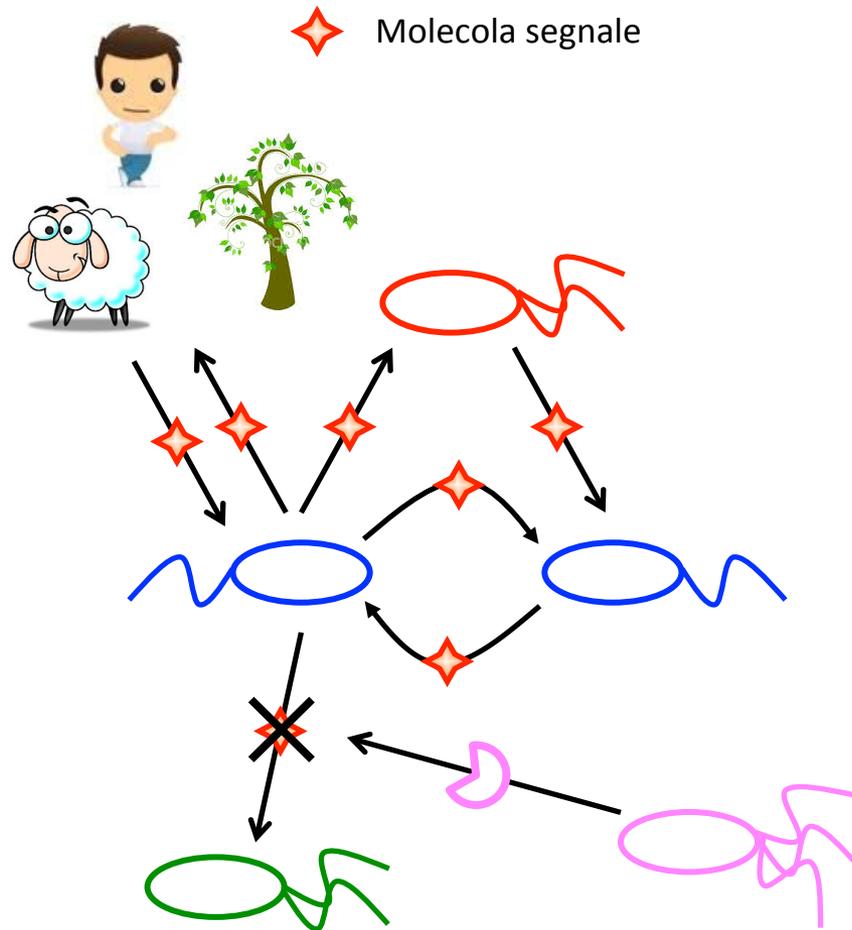
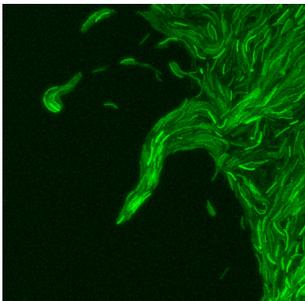
Biofilm



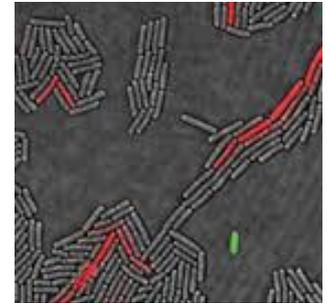
Bioluminescenza



Movimenti collettivi



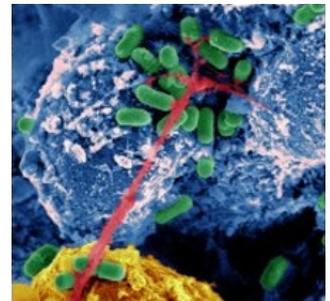
Differenziamento



Metaboliti secondari

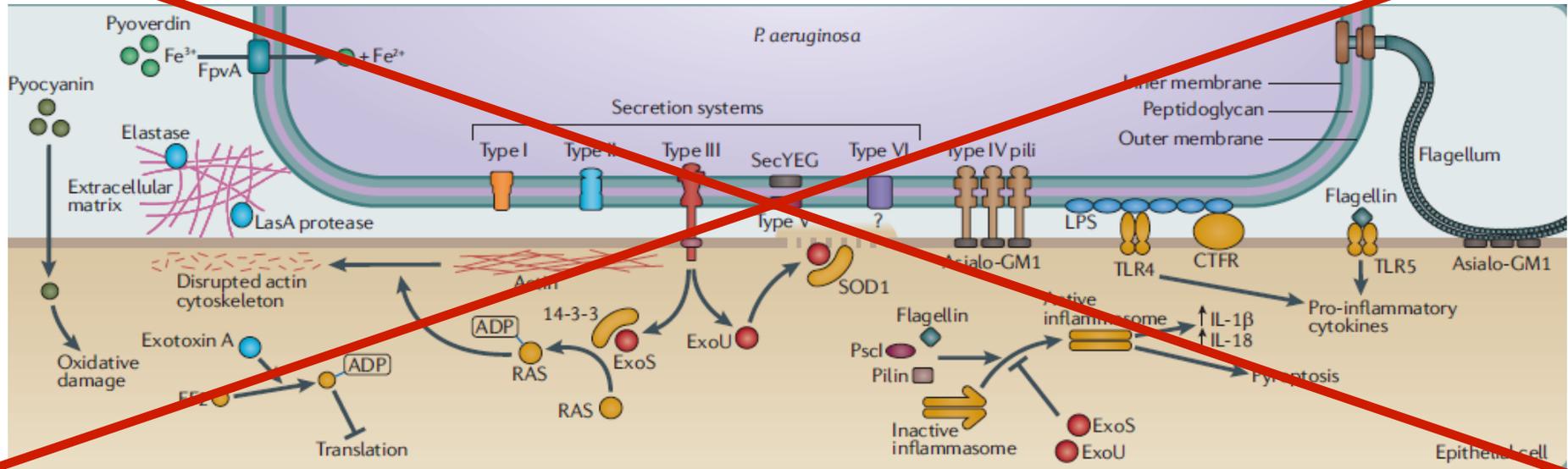


Interazione con l'ospite



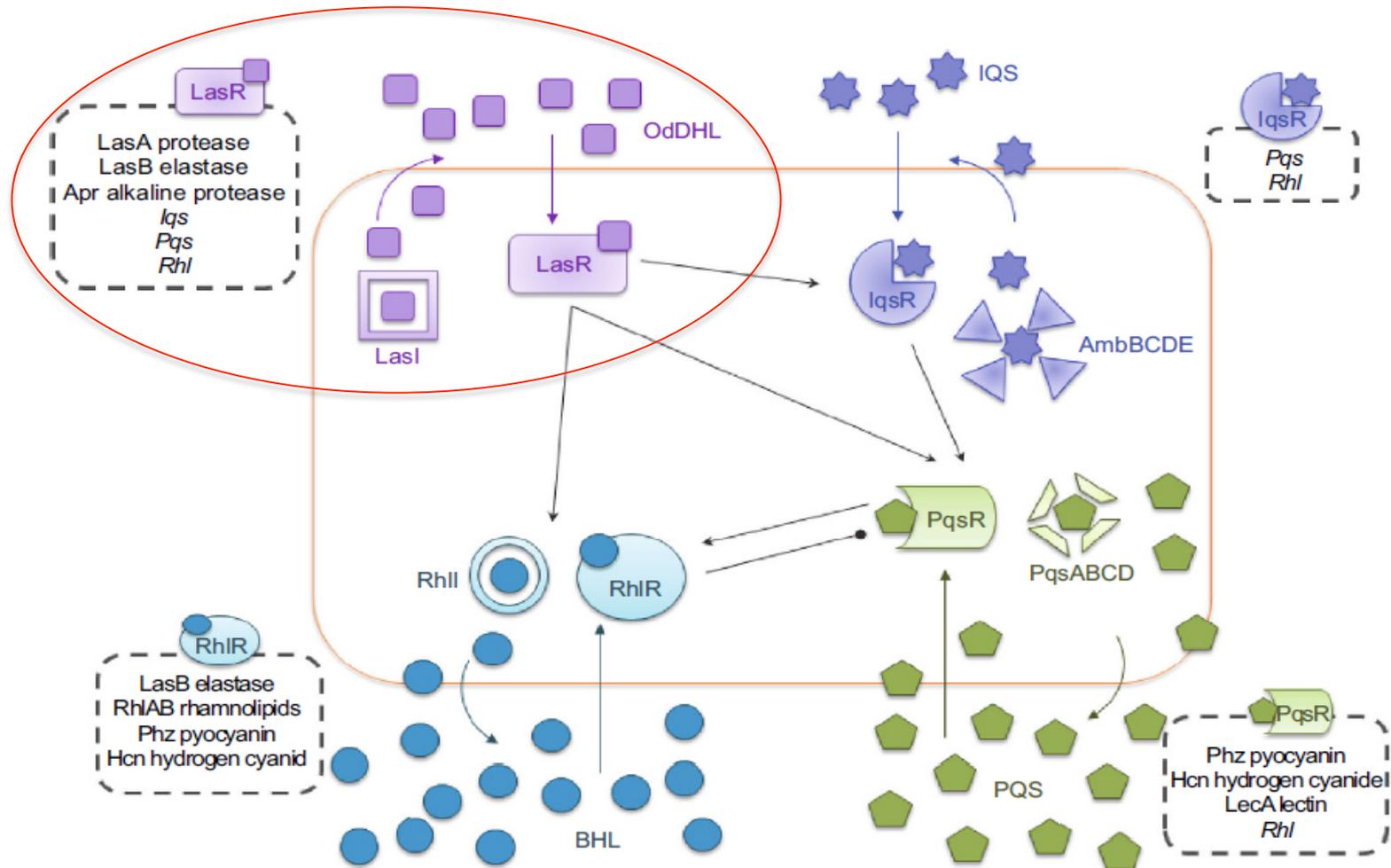
In molti batteri il quorum sensing controlla la produzione di fattori di virulenza e la formazione di biofilm

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.



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.

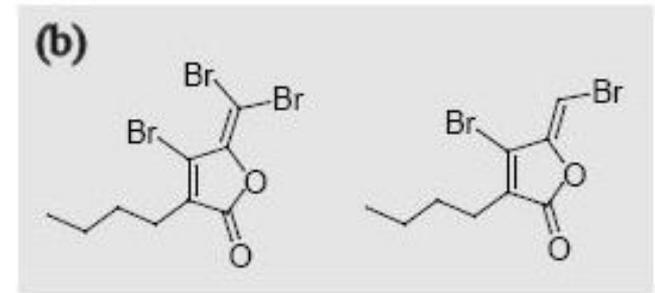
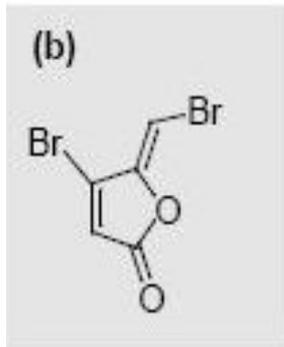


Figura 6b – Furanoni naturali (modificata da Suga e Smith, 2003).

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.

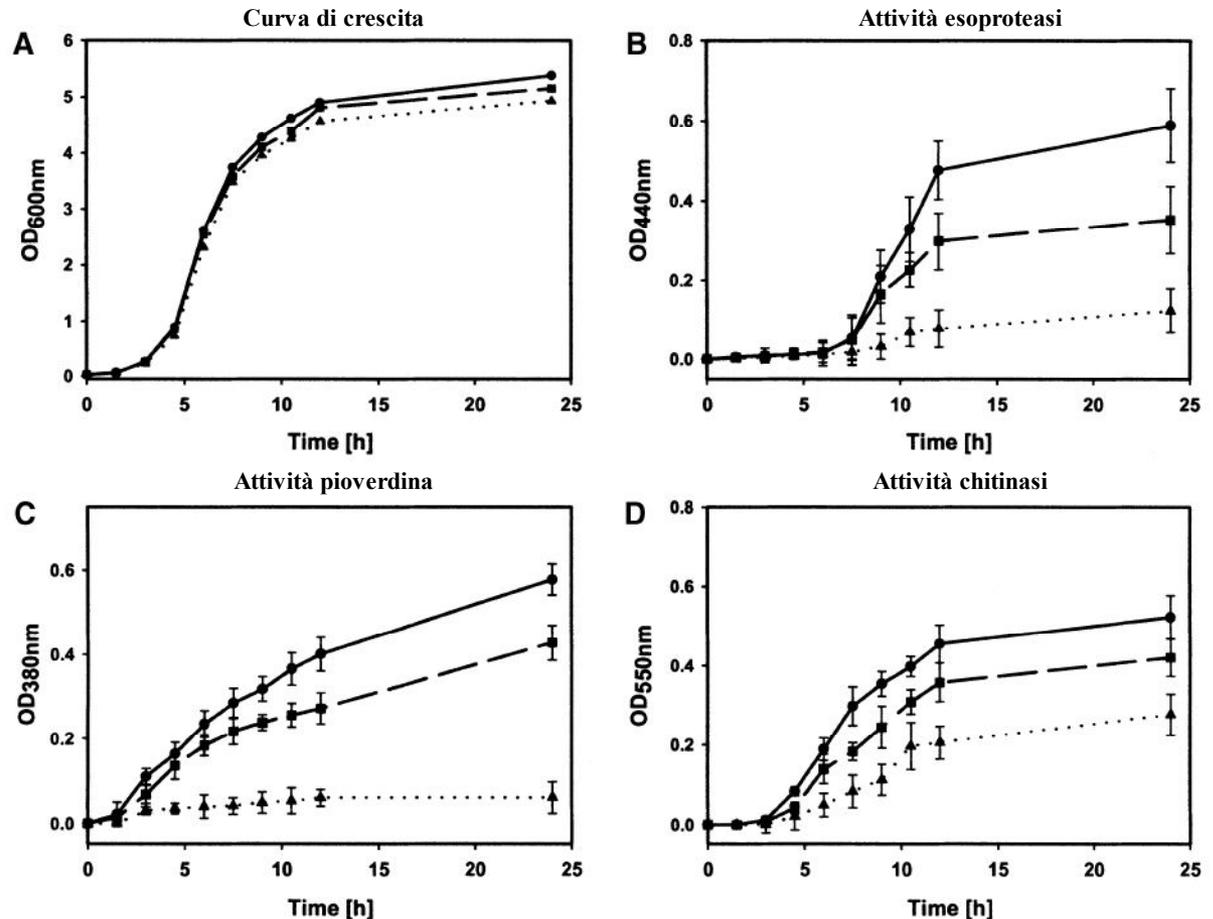


Figura 8 – Influenza del furanone C-30 sulla crescita e la produzione di fattori di virulenza di *P. aeruginosa* PAO1. La linea continua indica colture cresciute in assenza di inibitore, la linea tratteggiata quelle cresciute con 1 μM e quella punteggiata colture cresciute con 10 μM di furanone (modificata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

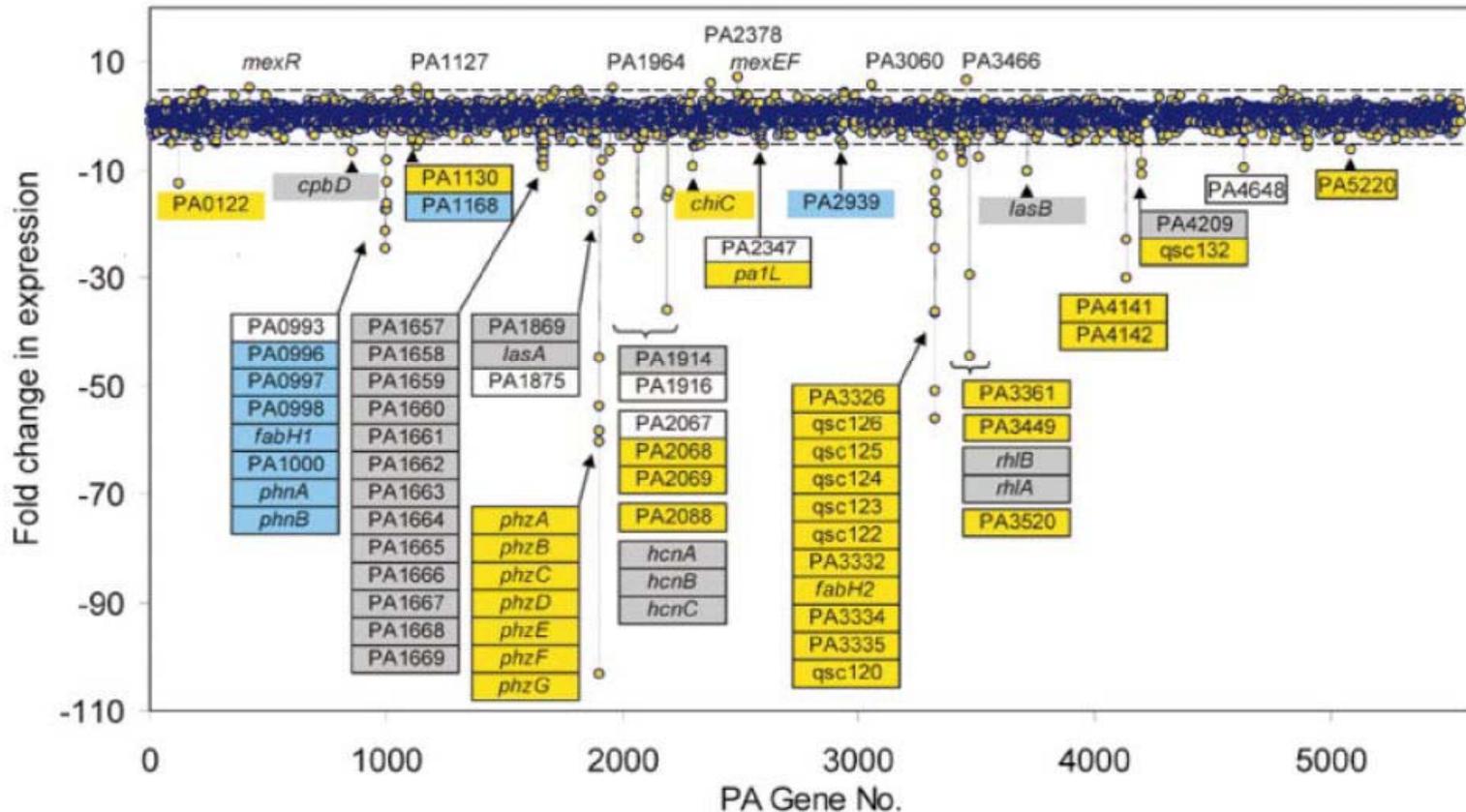


Figura 9 – Effetto del furanone C-30 sul profilo d'espressione del genoma di *P. aeruginosa*. Nell'asse delle ordinate è riportato il rapporto dei livelli d'espressione nel ceppo cresciuto in presenza di furanone e nel controllo cresciuto in sua assenza. Quindi valori positivi indicano i geni indotti 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.

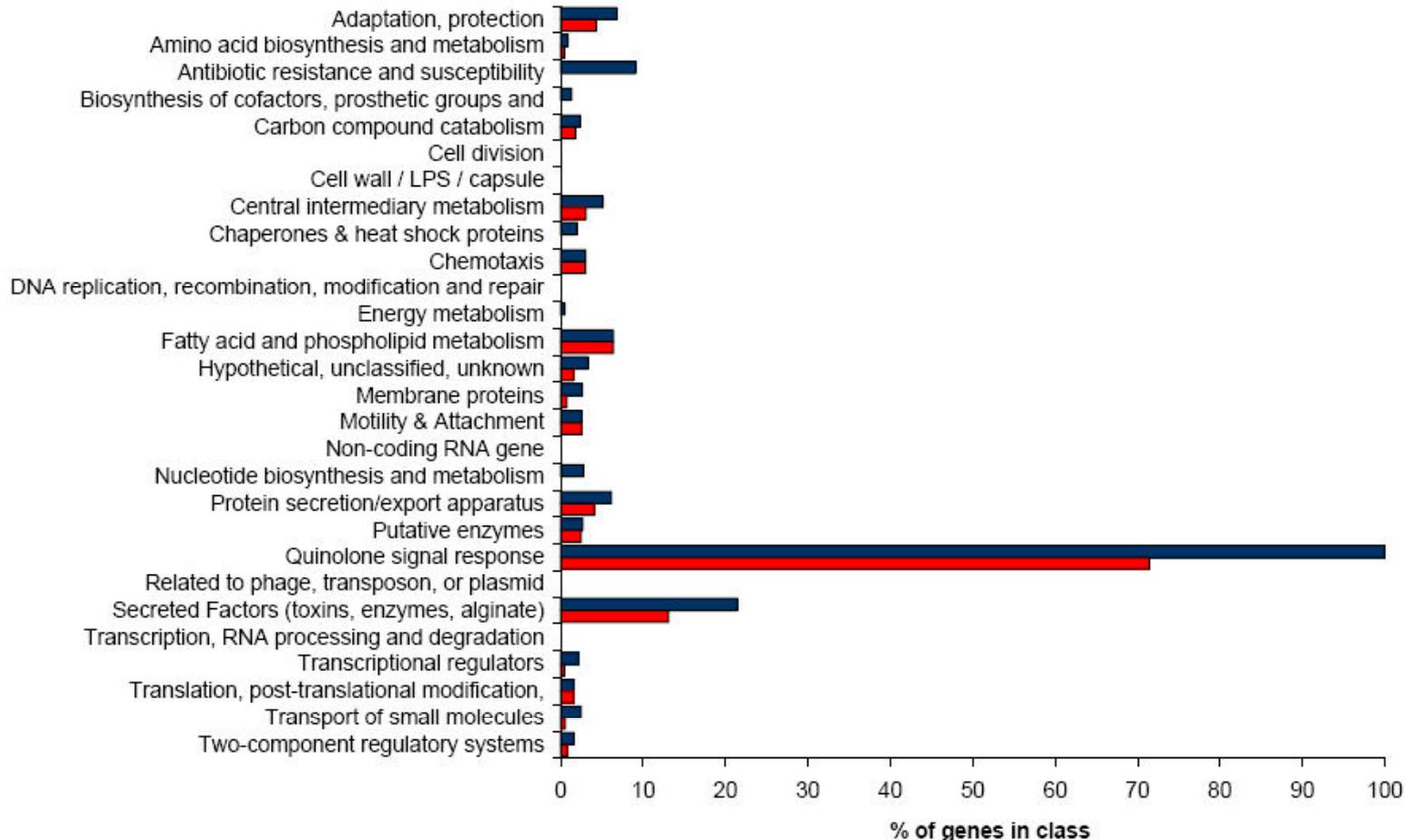


Figura 10 – Percentuale dei geni attivati da QS (blu) e repressi da C-30 (rosso) suddivisi in gruppi funzionali (Hentzer *et al.*, 2003 - suppl. data).

Il furanone C-30

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

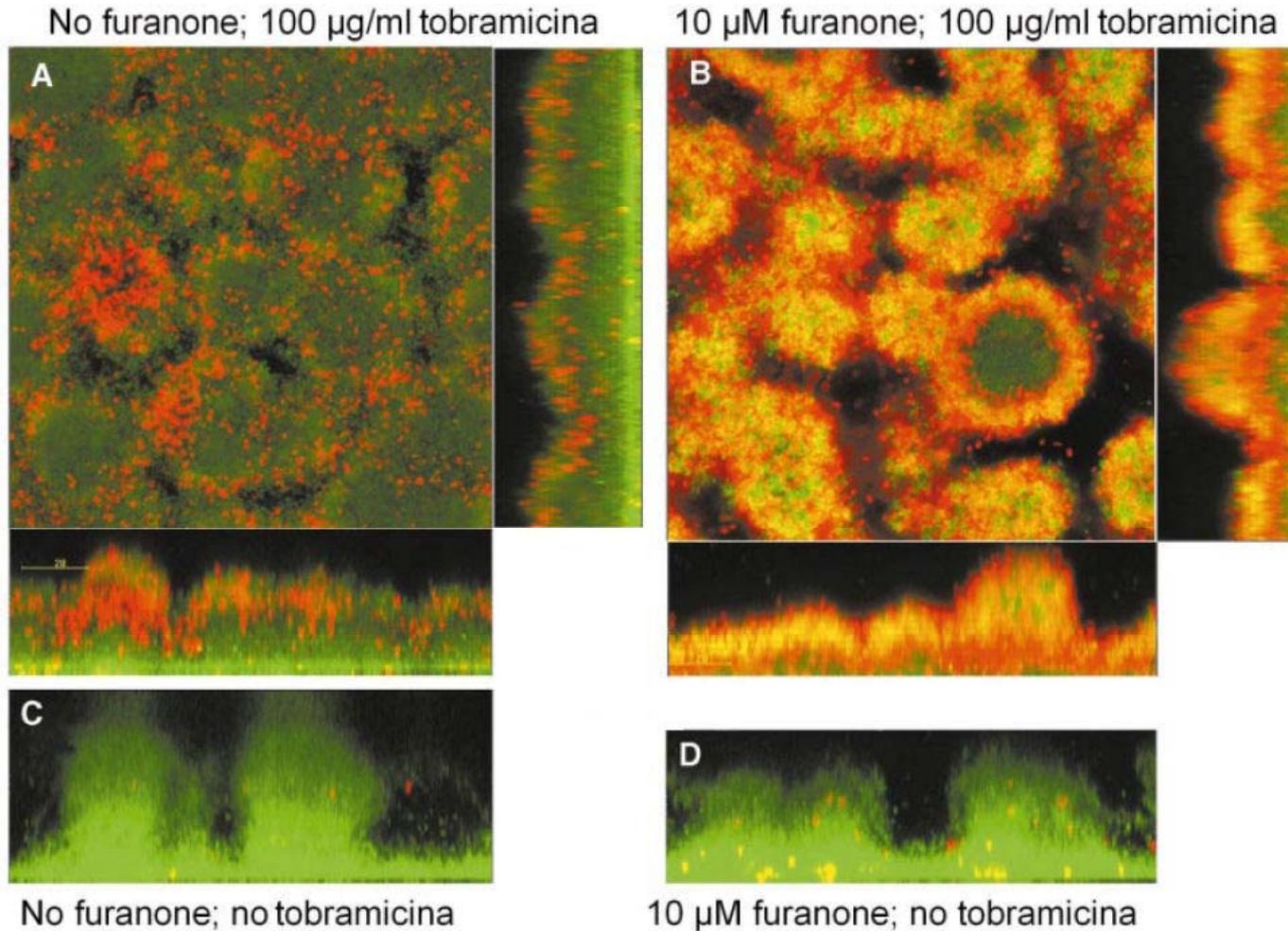
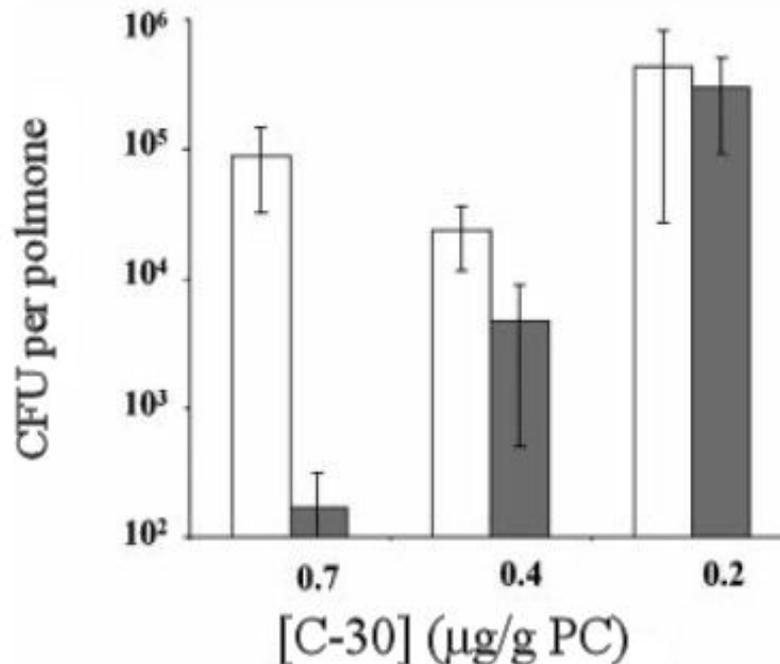


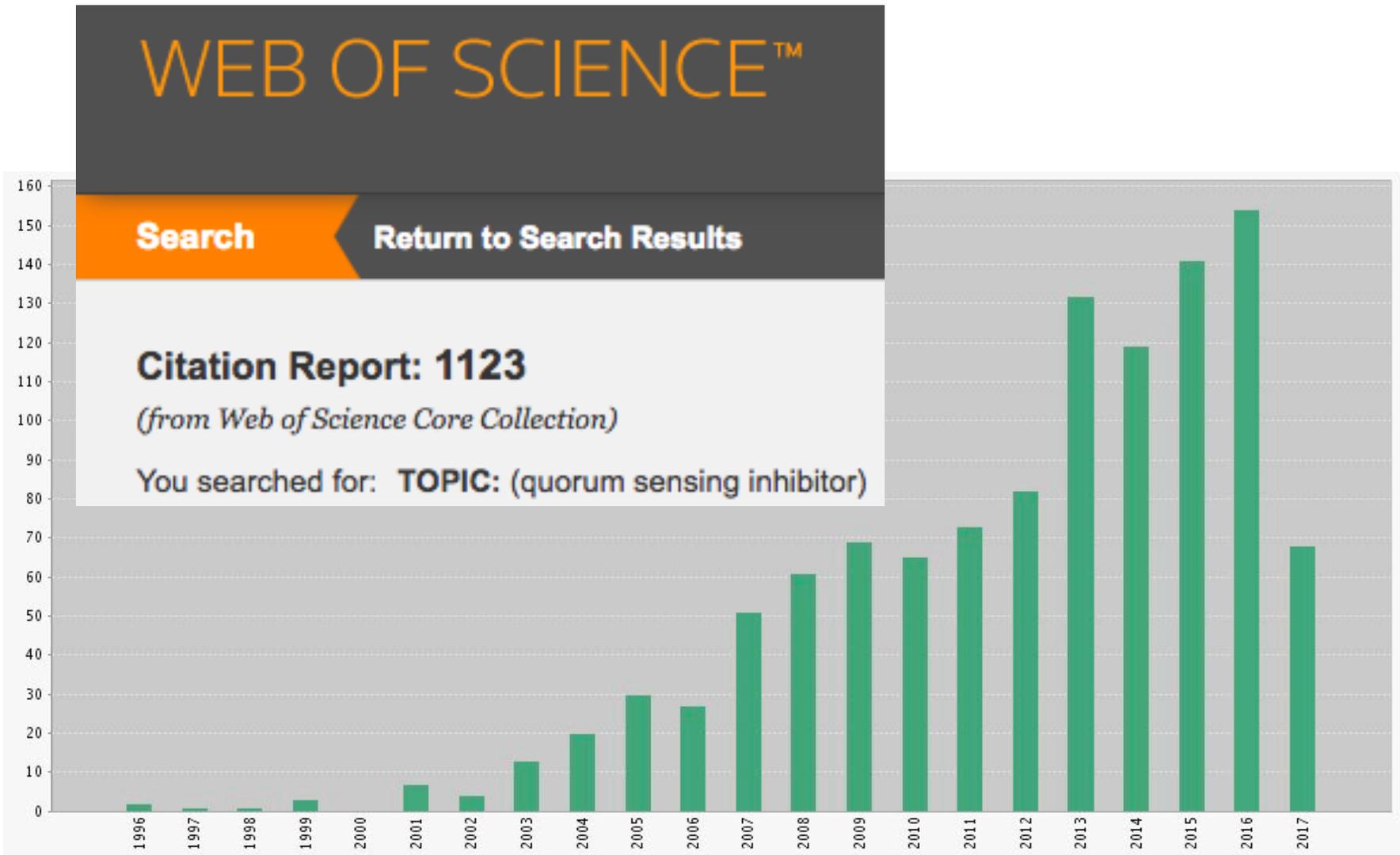
Figura 12 – Sensibilità alla tobramicina del biofilm di PAO1. Dopo 3 giorni di crescita i biofilms vengono esposti a 100 µg/ml di tobramicina per 24 ore. La vitalità delle cellule è stata rilevata usando un LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kit: le aree rosse sono cellule morte e le aree verdi 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

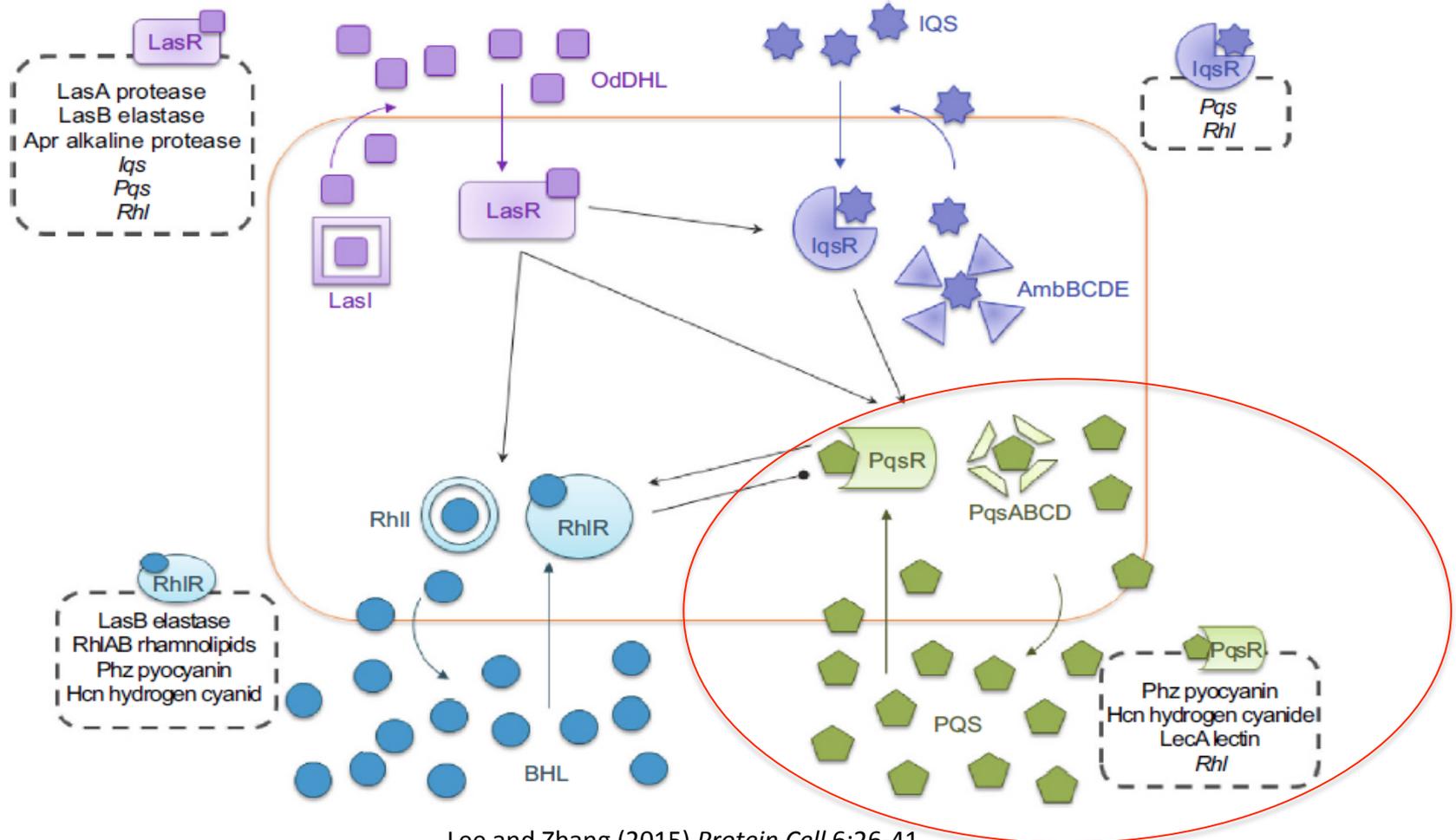
Venti topi sono stati infettati con *P. aeruginosa* PAO1 al giorno zero e suddivisi in due gruppi da dieci individui. I due gruppi di topi sono stati trattati con iniezioni di furanone C-30 ($\sim 0.7 \mu\text{g/g PC}$) o di soluzione salina (placebo), rispettivamente, ad intervalli di 8 ore per i tre 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 $\sim 0.2 \mu\text{g/g PC}$.



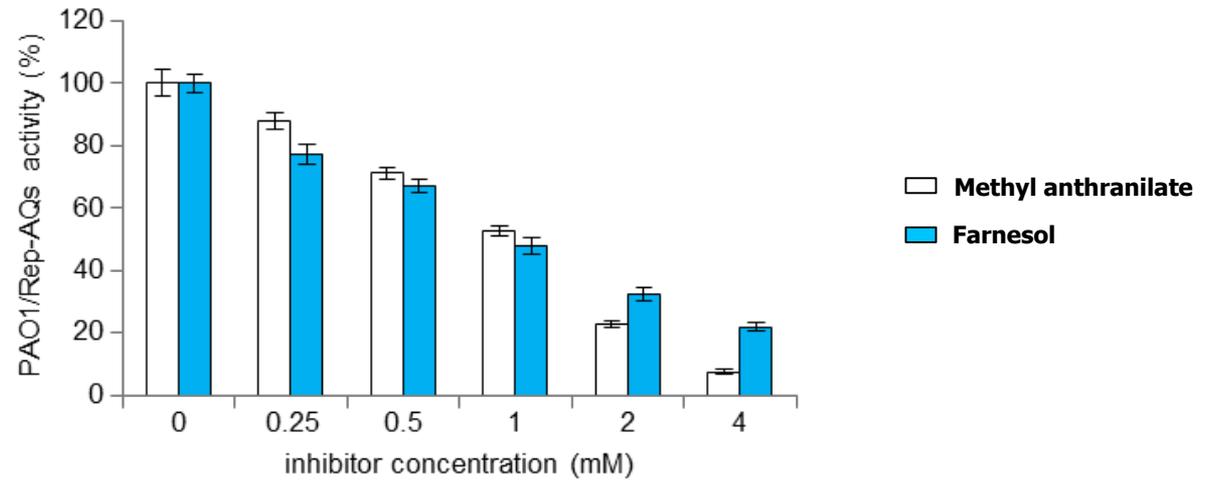
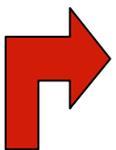
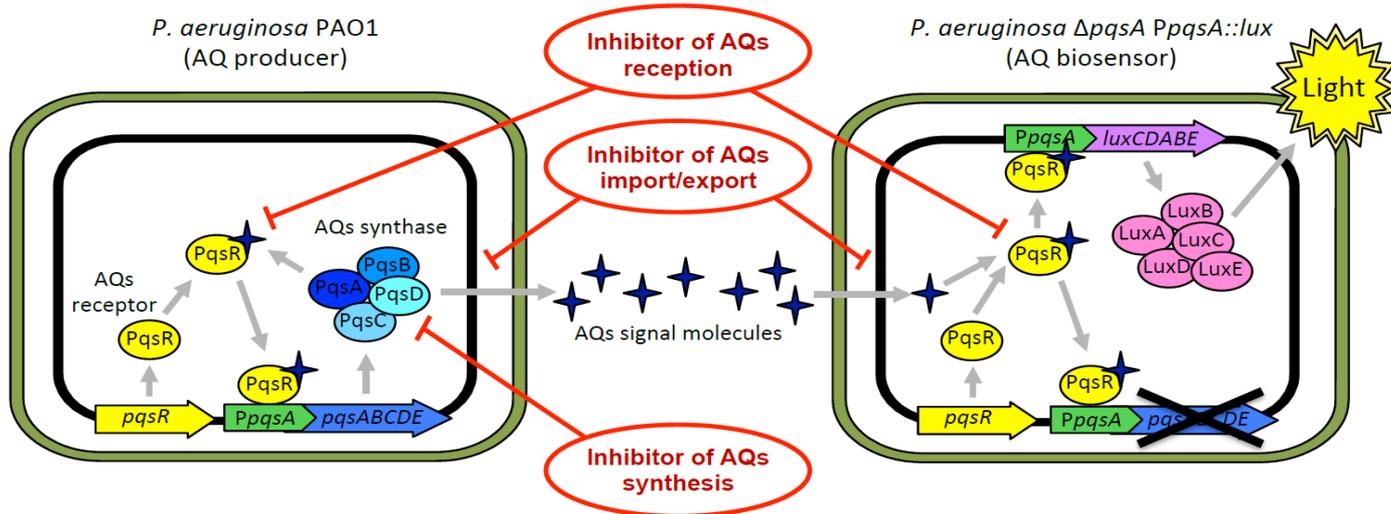
Finora sono stati pubblicati più di 1100 lavori inerenti l'inibizione del QS (100/anno in media dal 2013)



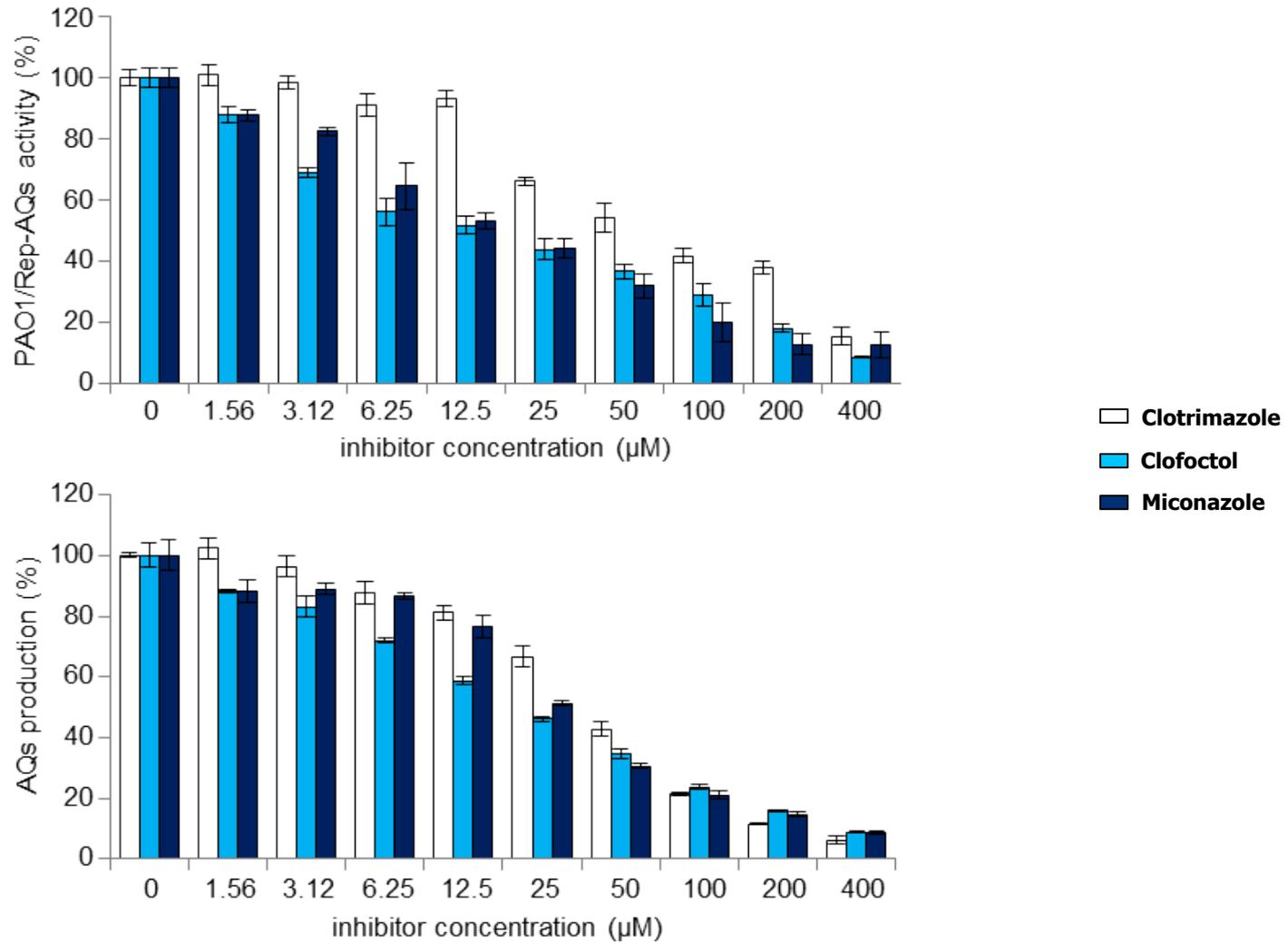
Identificazione di nuovi inibitori del sistema di QS *pqs* in *Pseudomonas aeruginosa*



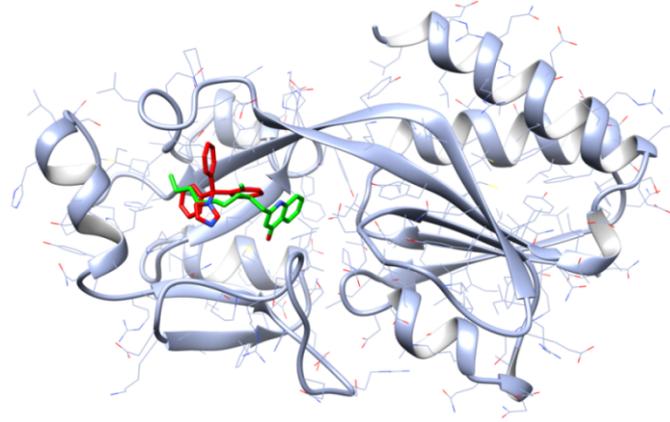
Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: screening



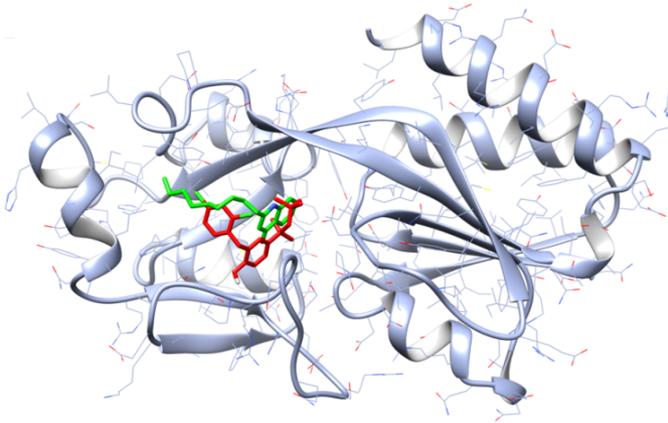
Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: screening



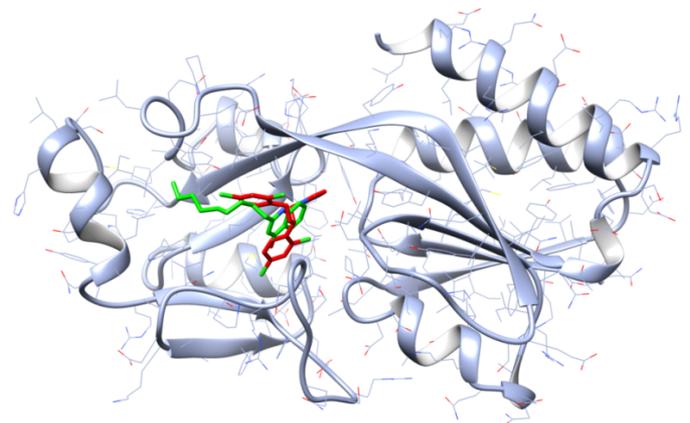
Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: screening



Clotrimazole

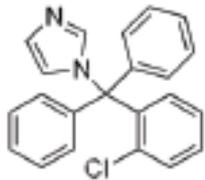
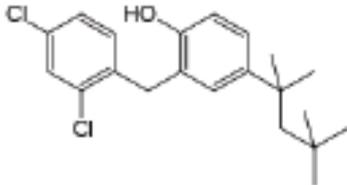
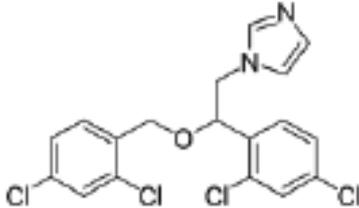


Clofctol

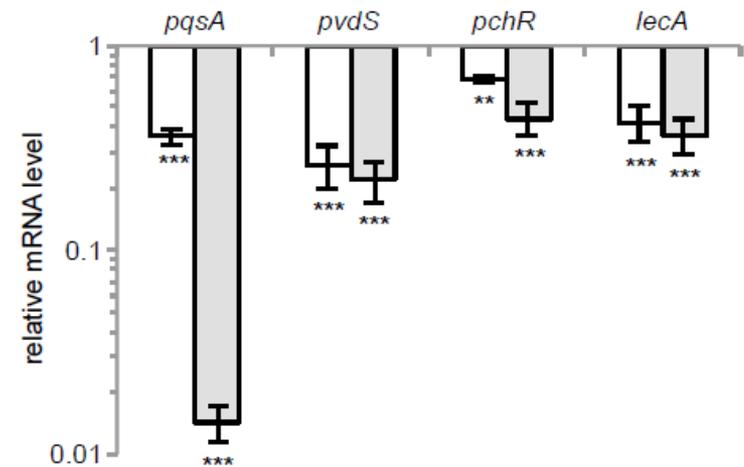
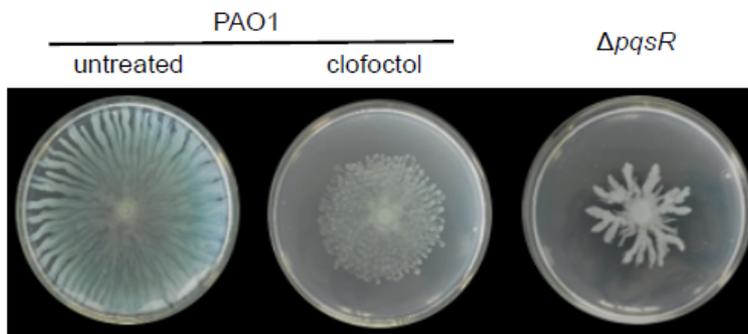
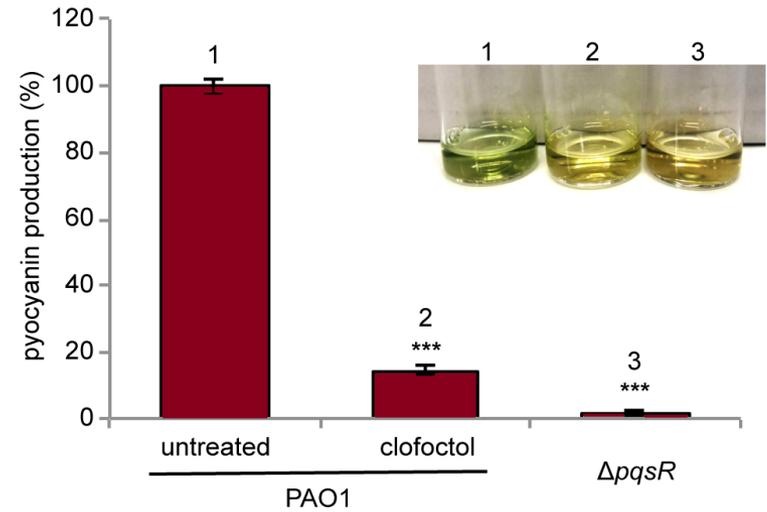
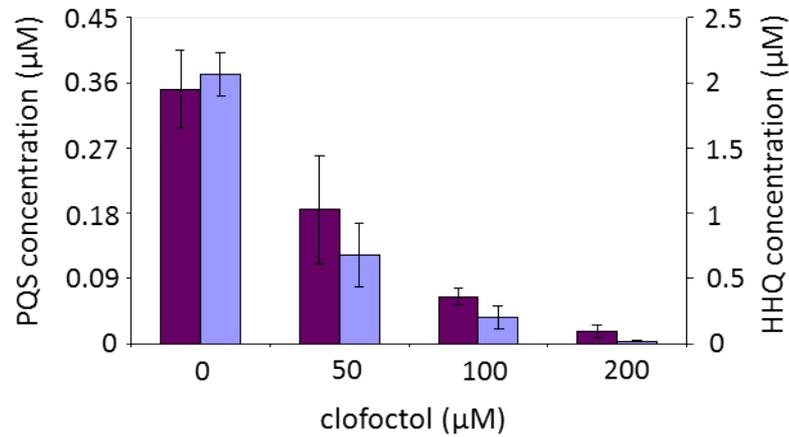


Miconazole

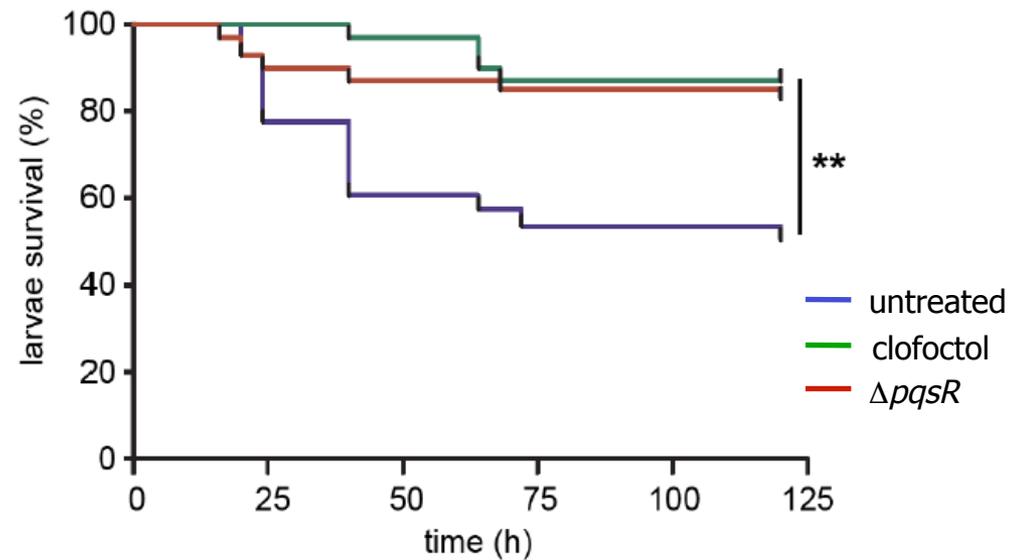
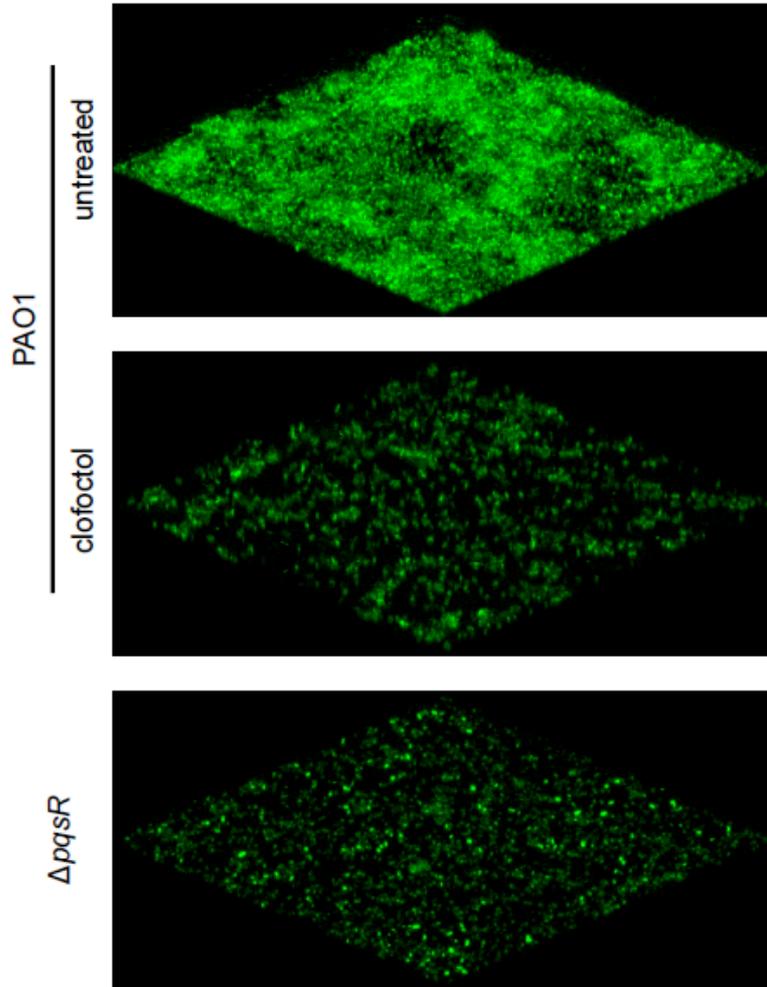
Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: screening

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

Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: screening

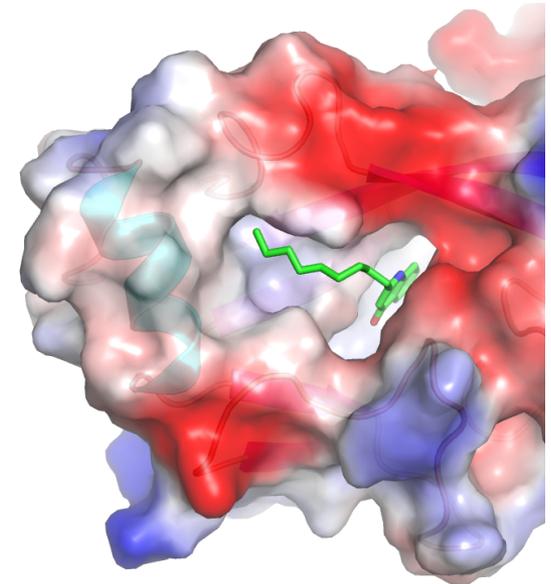
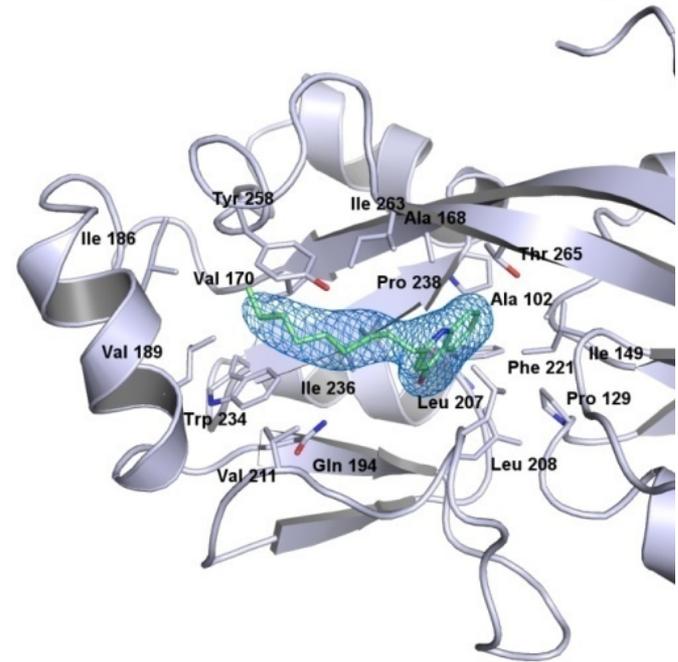
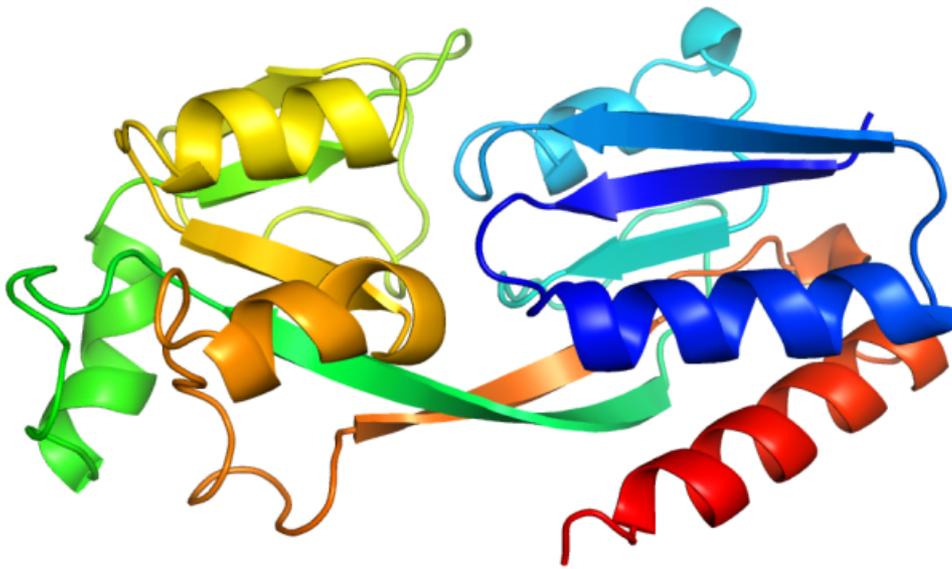


Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: screening



Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: *rational design*

La proteina PqsR è stata purificata e cristallizzata in assenza ed in presenza del ligando PQS.

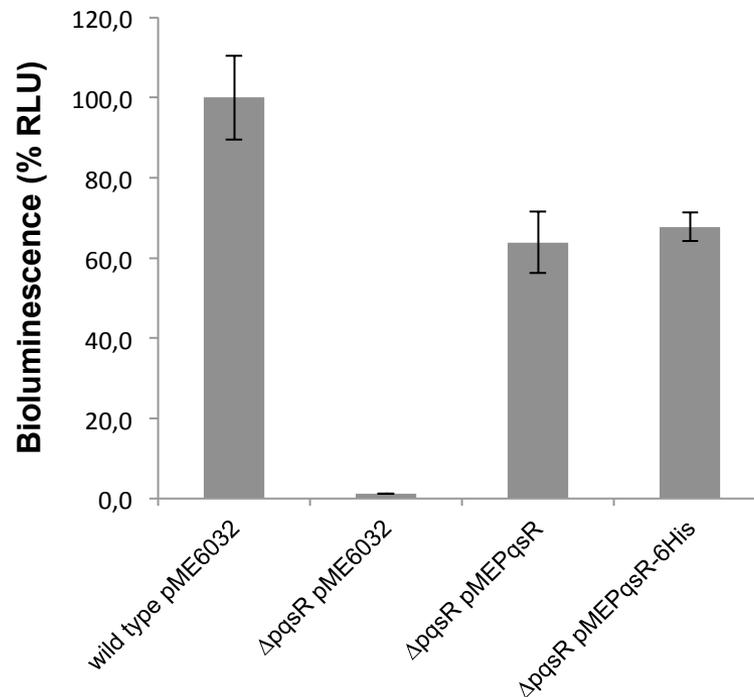


Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: *rational design*

La struttura è stata validata mediante saggi di complementazione con varianti mutate di PqsR.

In primo luogo è stato generato un mutante di *P. aeruginosa* $\Delta pqsR$ contenente una fusione trascrizionale tra il promotore del gene attivato da PqsR, *PpqsA*, e l'operone *luxCDABE*, per la produzione di luce.

L'emissione di luce è stata quindi misurata in *P. aeruginosa* $\Delta pqsR$ *PpqsA::luxCDABE* contenente il plasmide di espressione pME6032 vuoto o in cui erano clonati PqsR e PqsR—6His. Le 6His non alterano la capacità di PqsR di attivare la trascrizione di *PpqsA*.

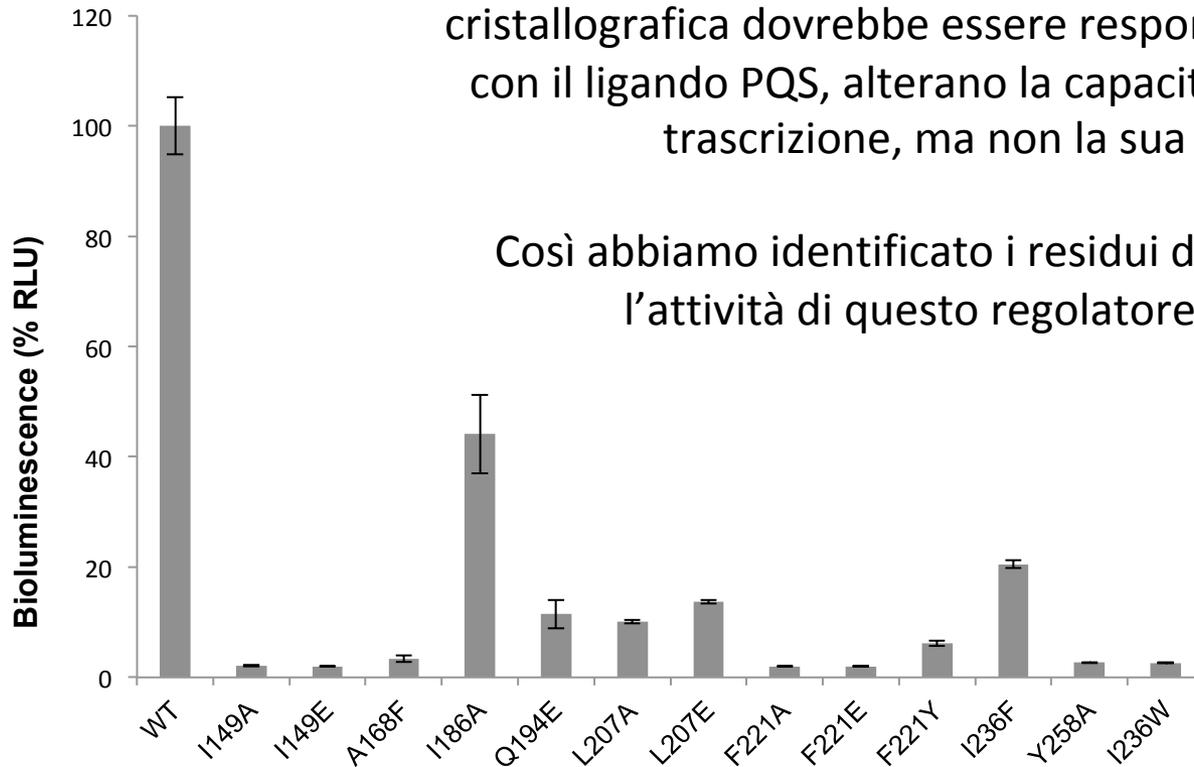


Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: rational design

L'emissione di luce è stata poi misurata in *P. aeruginosa* $\Delta pqsR$ *PpqsA::luxCDABE* contenente il plasmide di in cui sono state clonate le varianti mutate di PqsR—6His.

Le mutazioni introdotte nel sito che secondo la struttura cristallografica dovrebbe essere responsabile per l'interazione con il ligando PQS, alterano la capacità di PqsR di attivare la trascrizione, ma non la sua espressione.

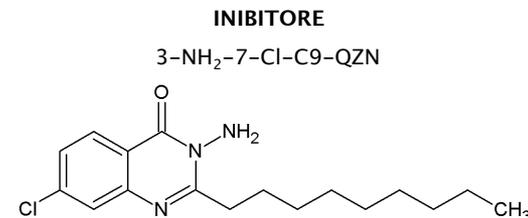
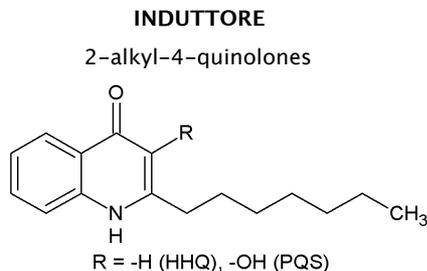
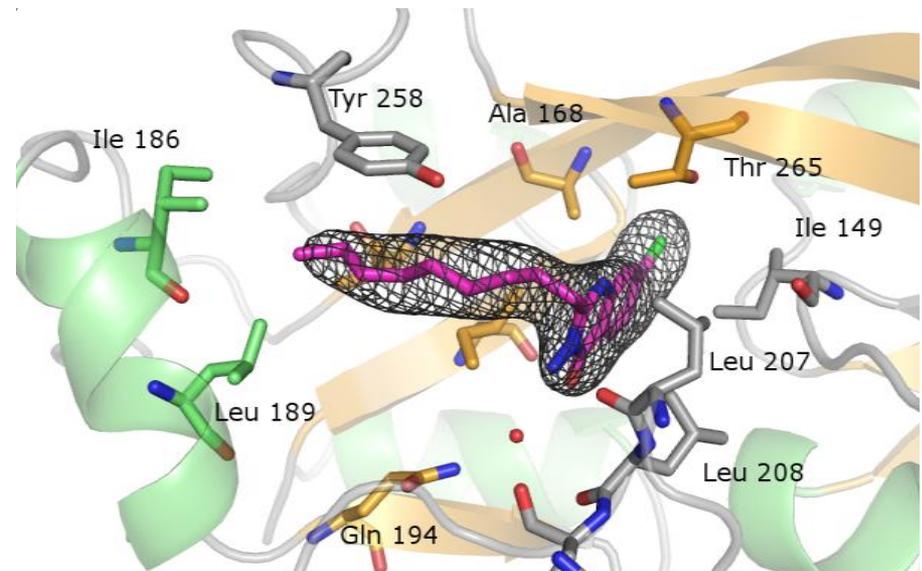
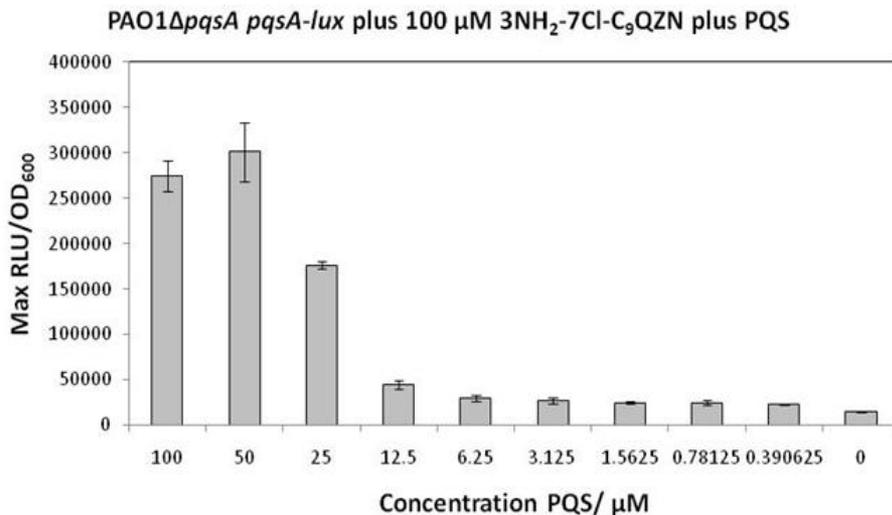
Così abbiamo identificato i residui di PqsR importanti per l'attività di questo regolatore trascrizionale.



Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: *rational design*

Sulla base di tali dati, sono stati sintetizzati degli analoghi dell'induttore che funzionassero come suoi inibitori competitivi: possono legarsi a PqsR, ma senza indurne l'attivazione.

La struttura di PqsR è stata risolta in presenza dell'inibitore.

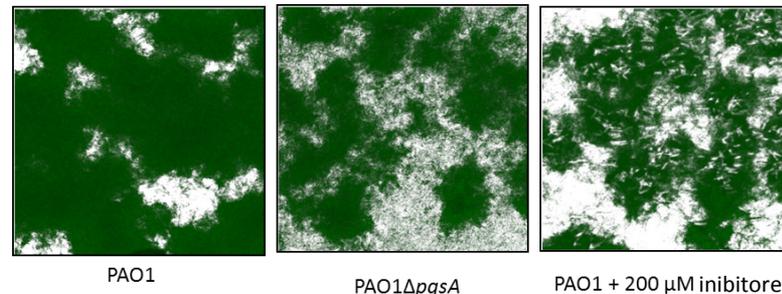
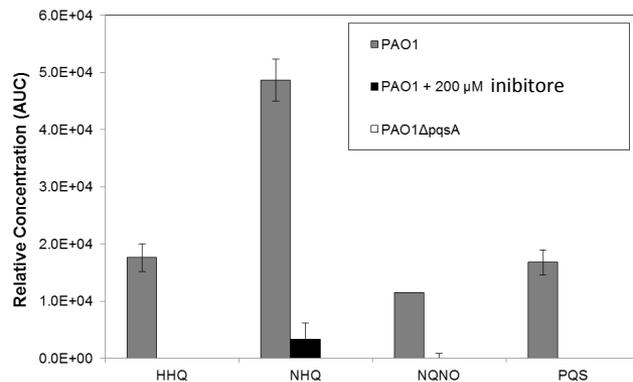
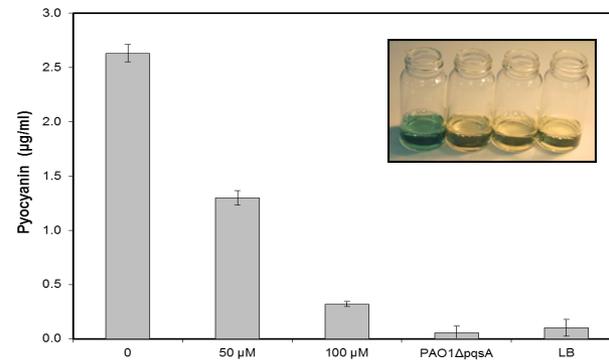
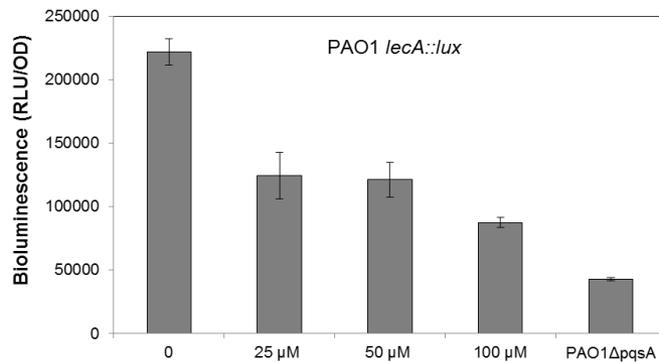


Nuovi inibitori del QS in *P. aeruginosa*: *rational design*

Sulla base di tali dati, sono stati sintetizzati degli analoghi dell'induttore che funzionassero come suoi inibitori competitivi: possono legarsi a PqsR, ma senza indurne l'attivazione.

La struttura di PqsR è stata risolta in presenza dell'inibitore.

L'inibitore riduce la produzione di fattori di virulenza e la formazione di biofilm.



Screening vs. rational design

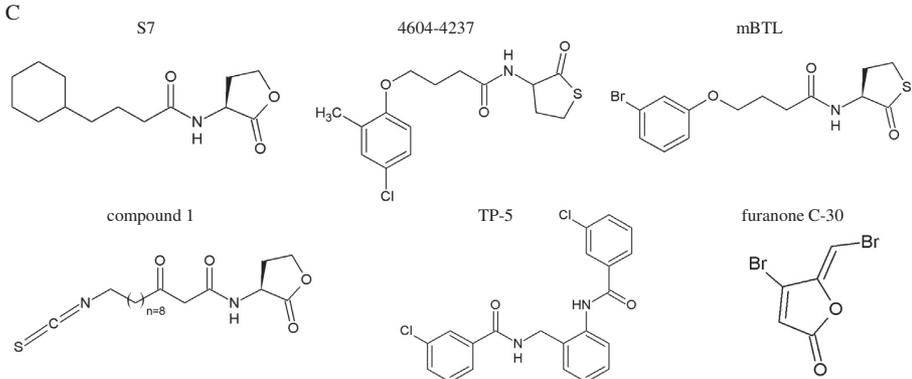
Entrambi gli approcci possono essere molto validi, ed hanno pregi e difetti.

Lo *screening* di composti è più rapido, ma richiede l'impiego di un sistema reporter appropriato. Se cercati in una *library* di composti *FDA-approved*, le molecole più interessanti possono essere rapidamente trasferite in campo clinico in quanto non sono tossiche per l'uomo. I problemi possono essere dovuti ai differenti metodi di somministrazione. Inoltre, per l'impiego del composto di interesse in terapia, si deve decifrarne il meccanismo d'azione. Questo può richiedere molto tempo e può essere complicato da una possibile azione pleiotropica del composto.

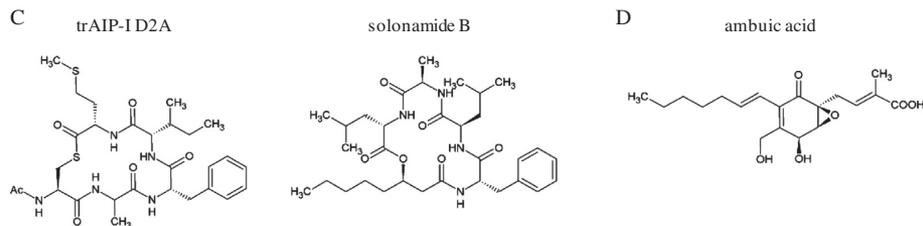
Il *rational design* richiede una conoscenza molto dettagliata dei meccanismi molecolari alla base del processo (anni di lavoro, tempi lunghi, costi alti). Inoltre, i composti identificati potrebbero essere tossici per l'uomo e quindi non utilizzabili in terapia. Tali composti potrebbero comunque essere utili come *scaffold* per l'ottimizzazione di nuove molecole con maggiore attività e minore tossicità. Un vantaggio è che il meccanismo d'azione del composto è noto.

Mediante vari approcci, negli anni, sono stati identificati molti enzimi che degradano le molecole del QS, e sono stati sviluppati moltissimi inibitori.

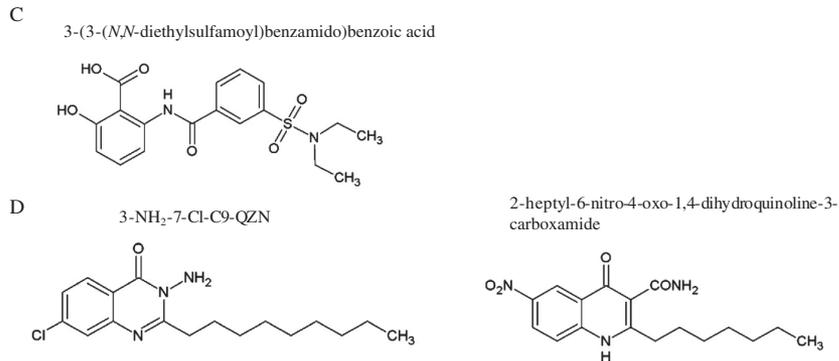
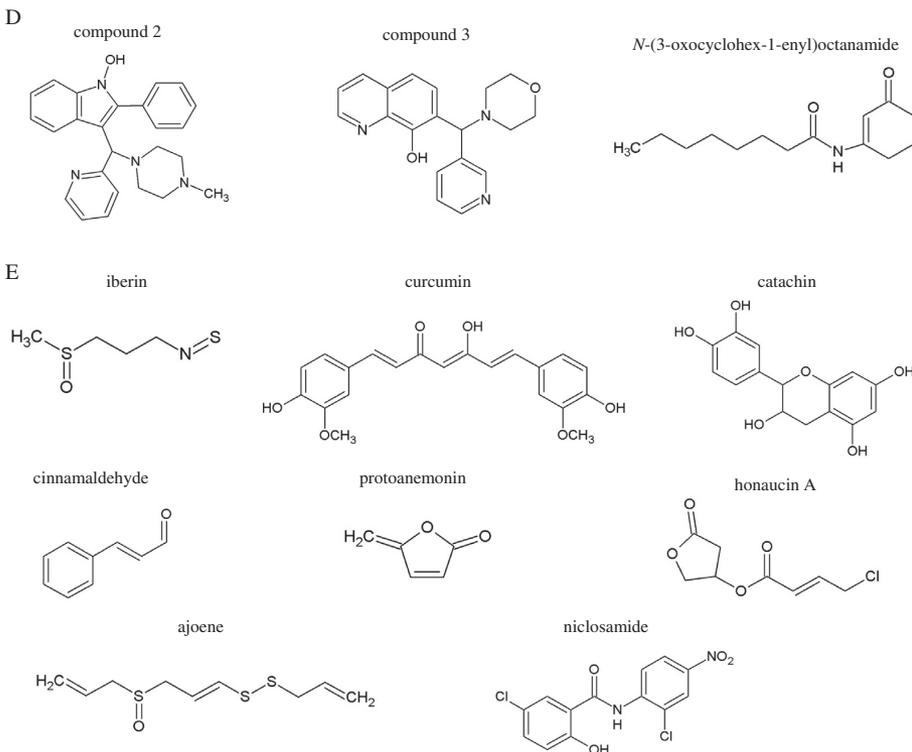
Inibitori di sistemi di QS basati su acil-omoserina lattori.



Inibitori di sistemi di QS basati su peptidi.



Inibitori di sistemi di QS basati su alchil-chinoloni.

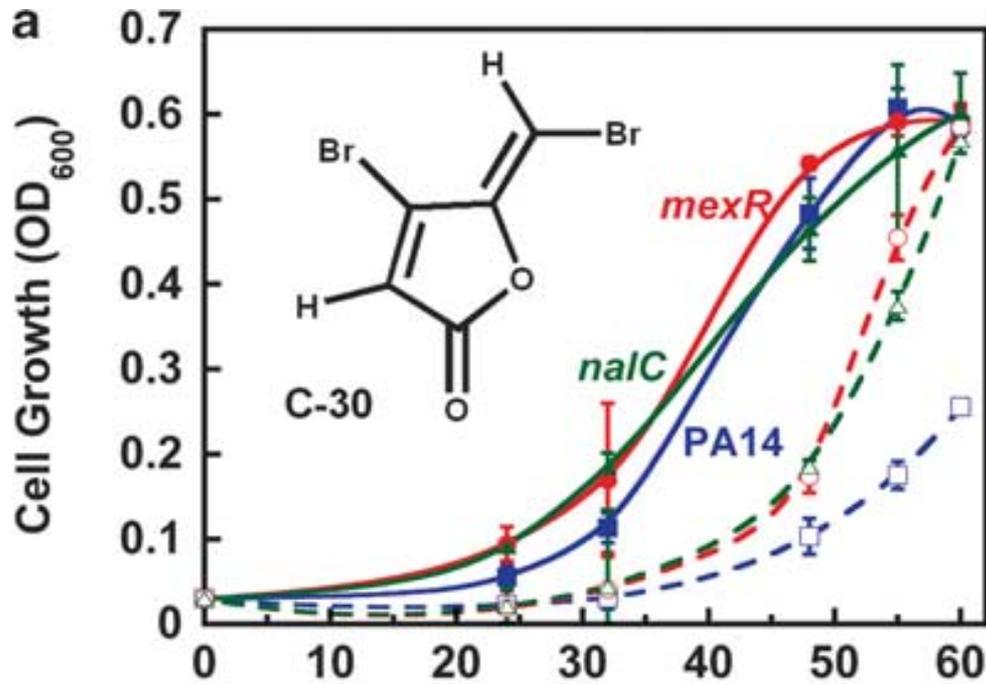


Ma davvero i batteri non sviluppano resistenze a tali inibitori?

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 intracellularmente, 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?

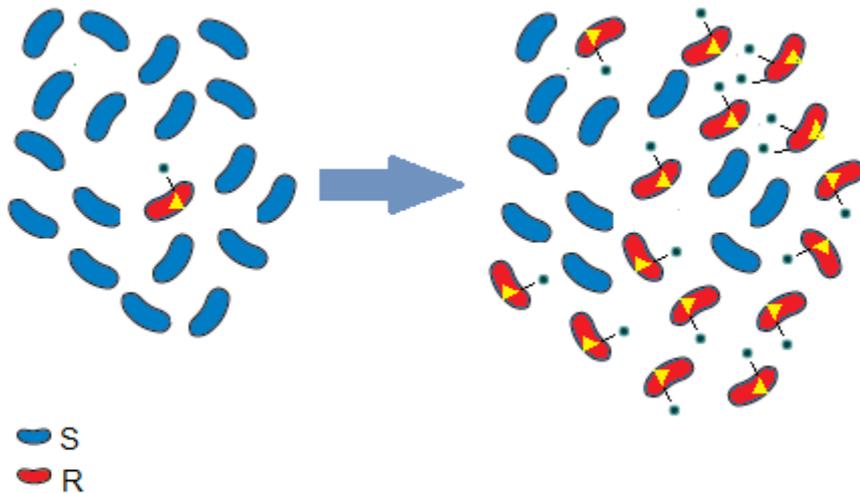
Resistenza agli inibitori del QS

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.

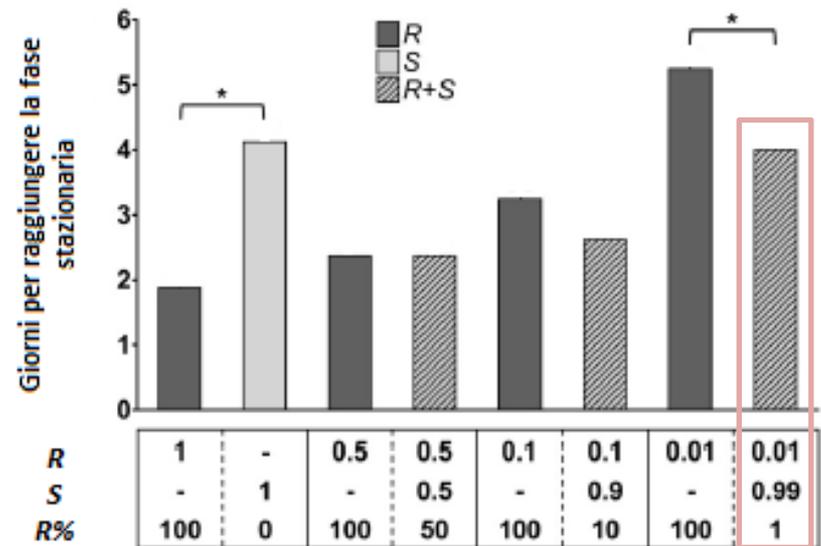


Immagine modificata da Mellbye e Schuster, (2011)

Resistenza agli inibitori del QS

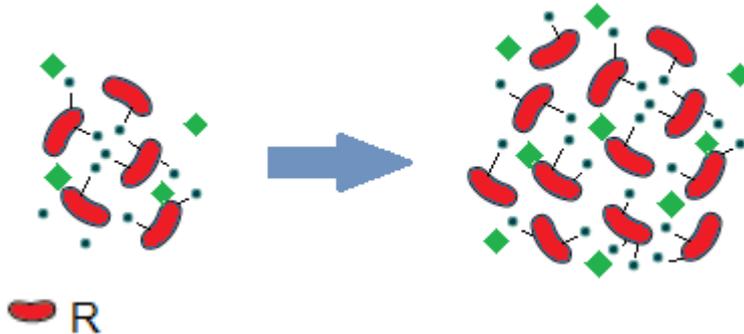
The Sociomicrobiology of Antivirulence Drug Resistance: a Proof of Concept

Brett Mellbye and Martin Schuster

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

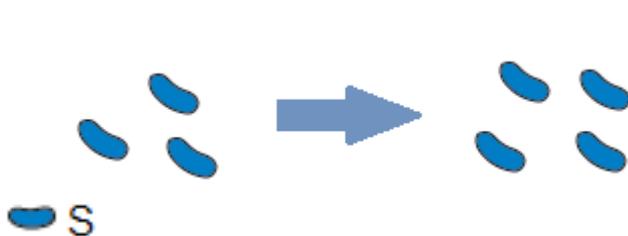
Monocoltura del ceppo resistente all'inibitore del QS.

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.

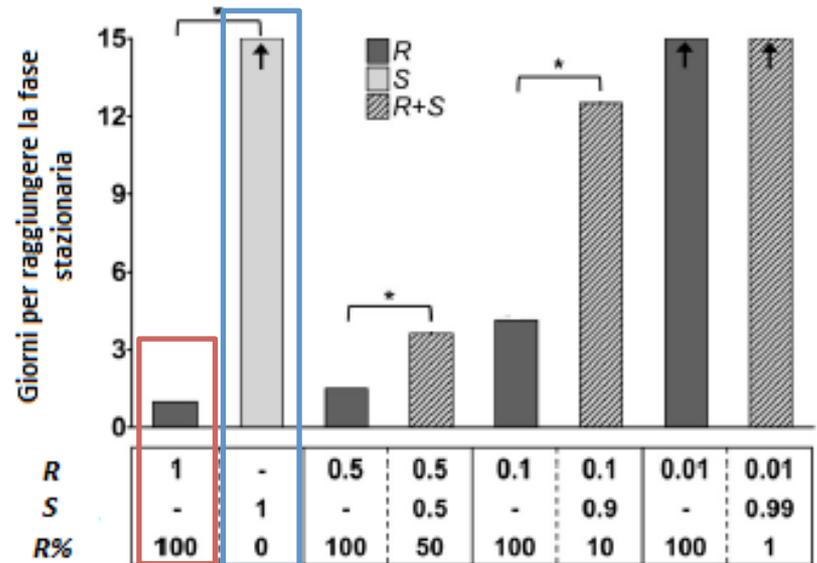


Immagine modificata da Mellbye e Schuster, (2011)

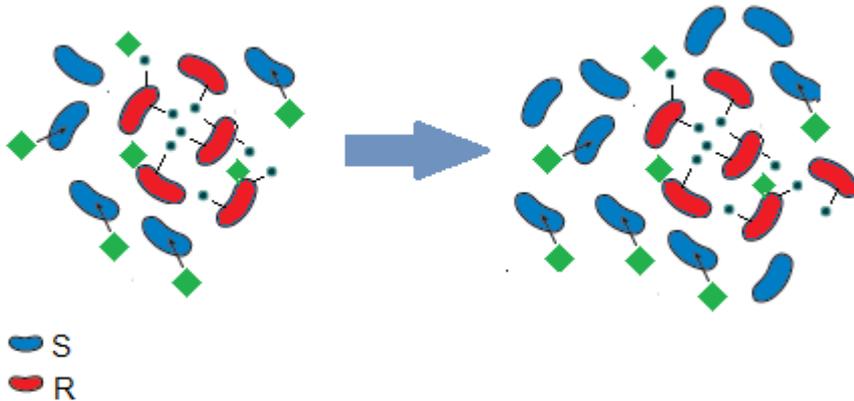
Resistenza agli inibitori del QS

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.

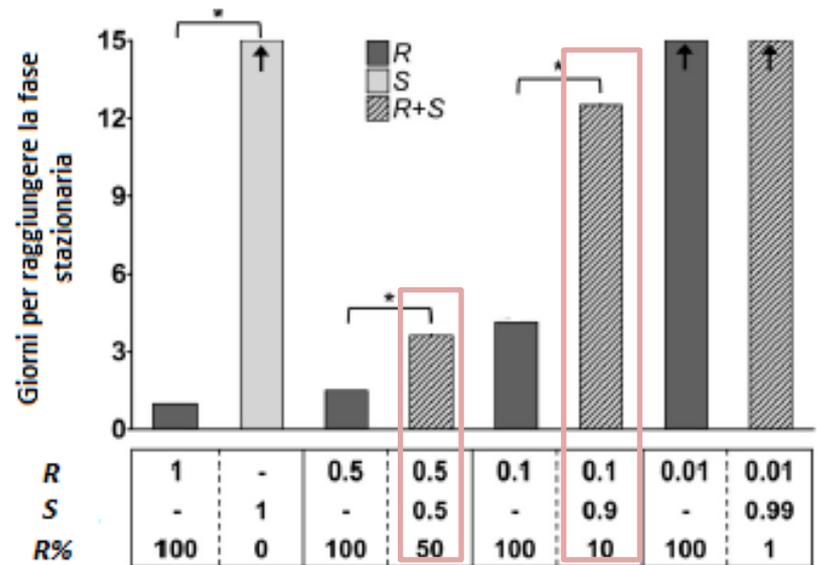


Immagine modificata da Mellbye e Schuster, (2011)

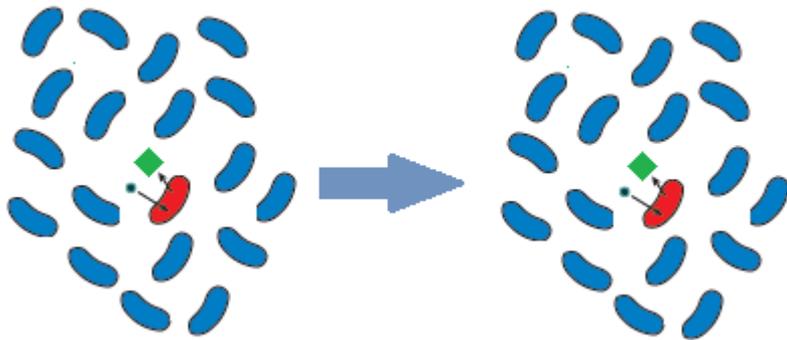
Resistenza agli inibitori del QS

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.

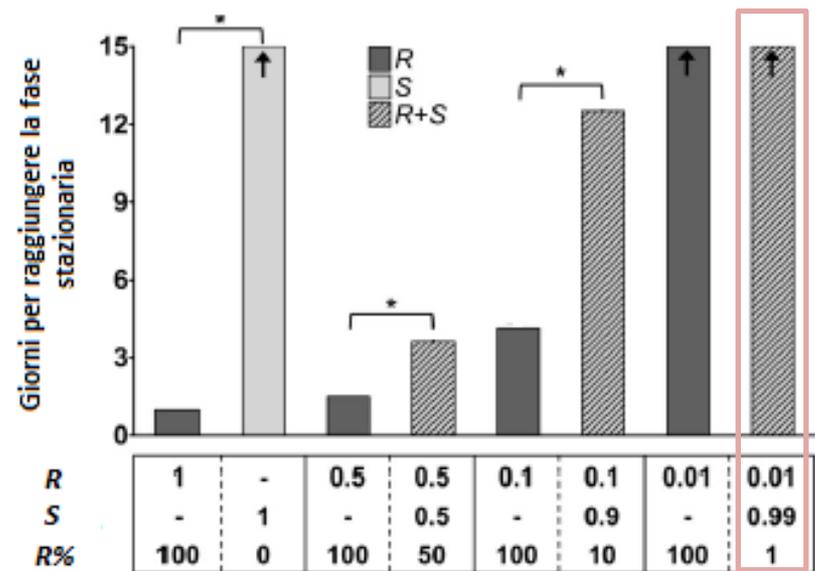


Immagine modificata da Mellbye e Schuster, (2011)

Resistenza agli inibitori del QS

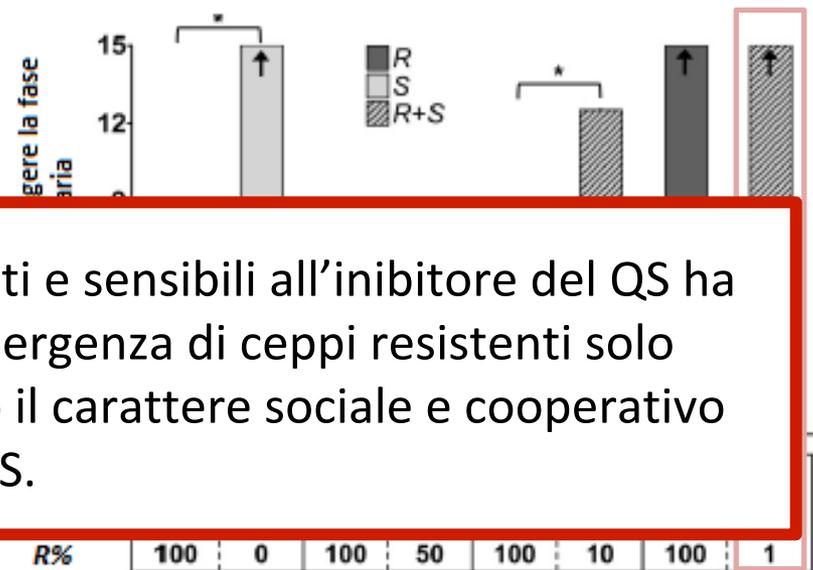
The Sociomicrobiology of Antivirulence Drug Resistance: a Proof of Concept

Brett Mellbye and Martin Schuster

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

Quando il ceppo resistente all'inibitore del QS è presente in percentuale ridotta all'interno della 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

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

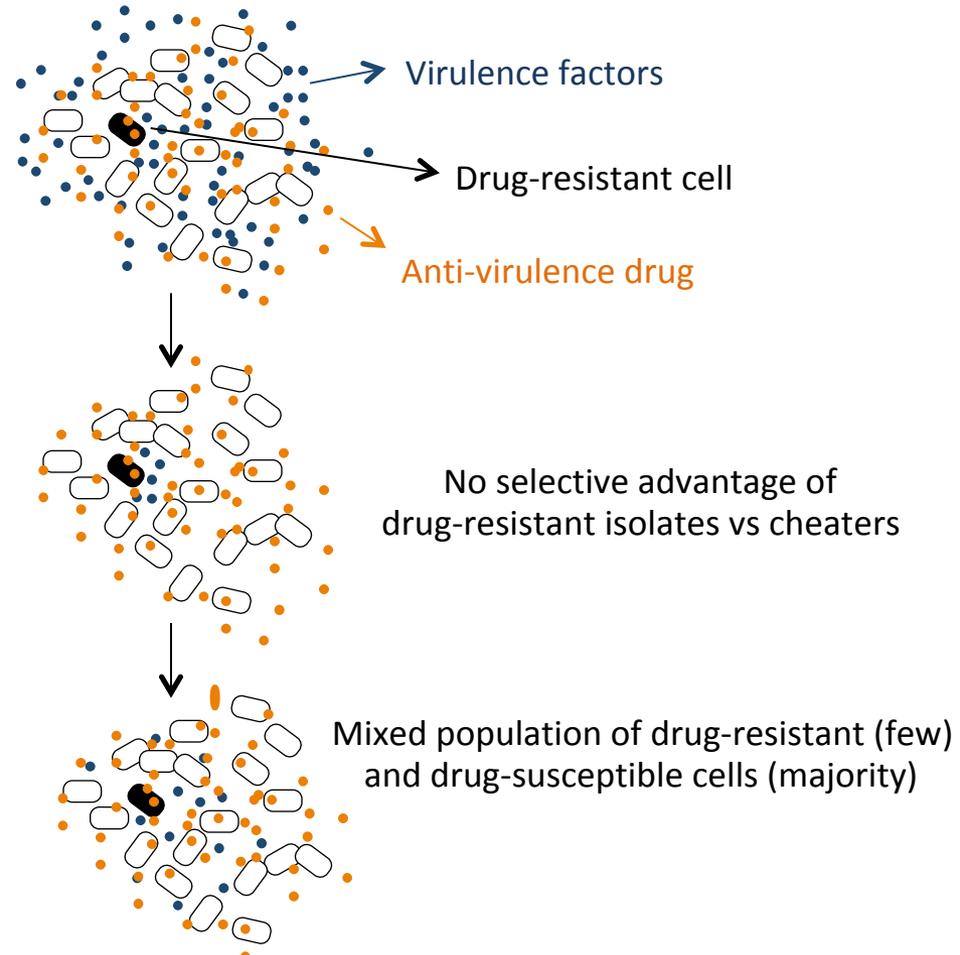
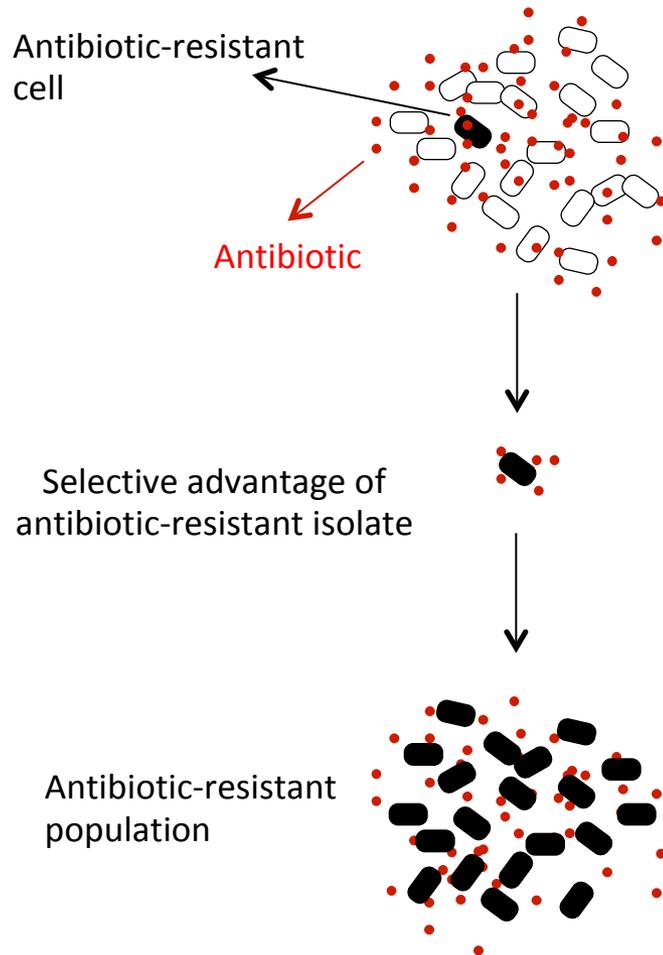


Immagine modificata da Mellbye e Schuster, (2011)

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.