



UNIVERSITA POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

Rivisitazione dei Meccanismi Molecolari Di Antibiotico-Resistenza

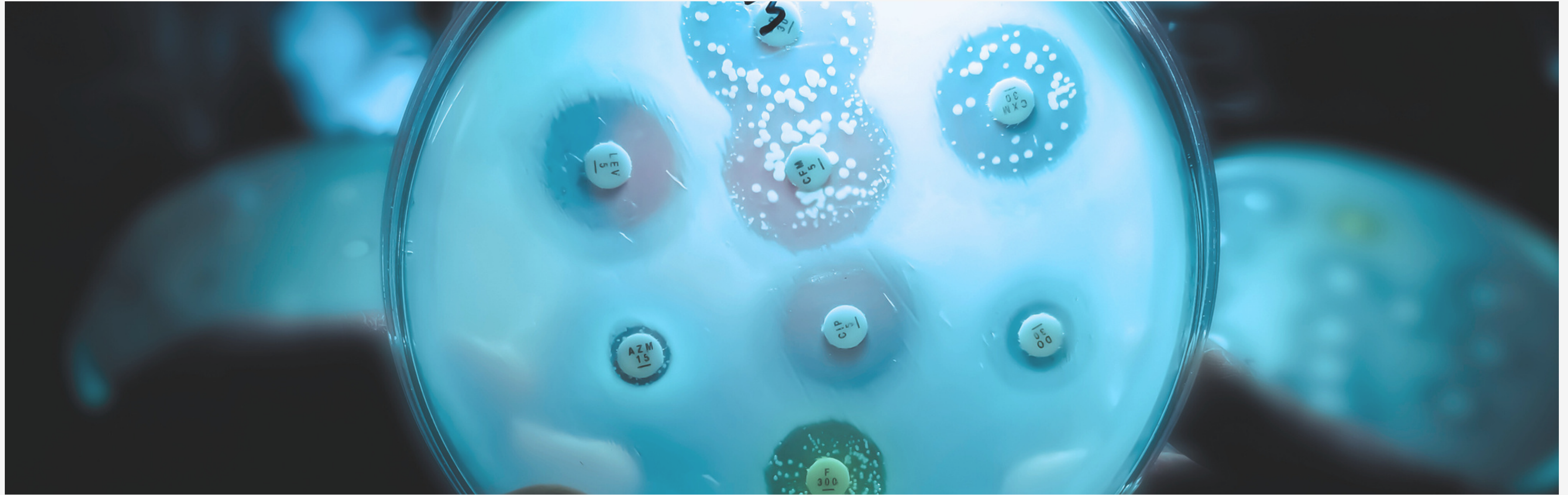
Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance Revisited

Tesi di Laurea di:
Giuseppe Mancinelli

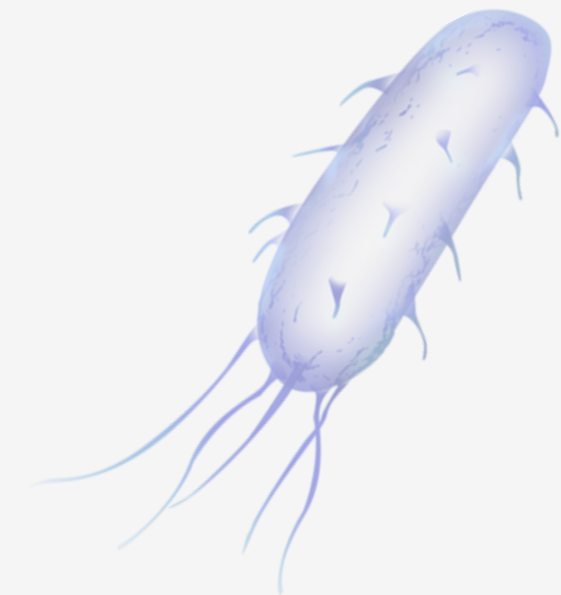
Sessione Straordinaria

Anno Accademico
2022/23

Docente Referente:
Prof.ssa Carla Vignaroli



RIVISITAZIONE DEI MECCANISMI MOLECOLARI DI ANTIBIOTICO RESISTENZA



Riassunto

01 Introduzione

L'utilizzo di molecole antibiotiche su larga scala ha permesso di abbattere la mortalità causata da infezioni e sepsi ed è considerata all'unanimità una delle più grandi scoperte della storia, tuttavia la comparsa di batteri resistenti agli antibiotici è ad oggi un'emergenza globale e una sfida senza precedenti per l'umanità.

02 Meccanismi di antibiotico resistenza

Sono 6 i principali meccanismi di antibiotico resistenza e rientrano in 3 categorie: Riduzione della concentrazione di antibiotico a livello citoplasmatico, alterazione del target dell'antibiotico e modificazione della molecola antibiotica.

03 Nuove frontiere lotta AMR

Nuovi e promettenti farmaci sono in sviluppo per contrastare i germi MDR e i fenomeni di antibiotico resistenza, tra questi si annoverano molecole in grado di mitigare specifici meccanismi di antibiotico resistenza per ripristinare la funzionalità dell'antibiotico.

04 Conclusioni

La comprensione dei meccanismi molecolari alla base della resistenza agli antibiotici permette di far chiarezza su questo fenomeno così preoccupante, e mentre i ricercatori di tutto il mondo cercano nuovi modi per fronteggiare il fenomeno, il rispetto di alcune semplici regole e norme può rallentare la comparsa di nuovi ceppi resistenti.



Introduzione

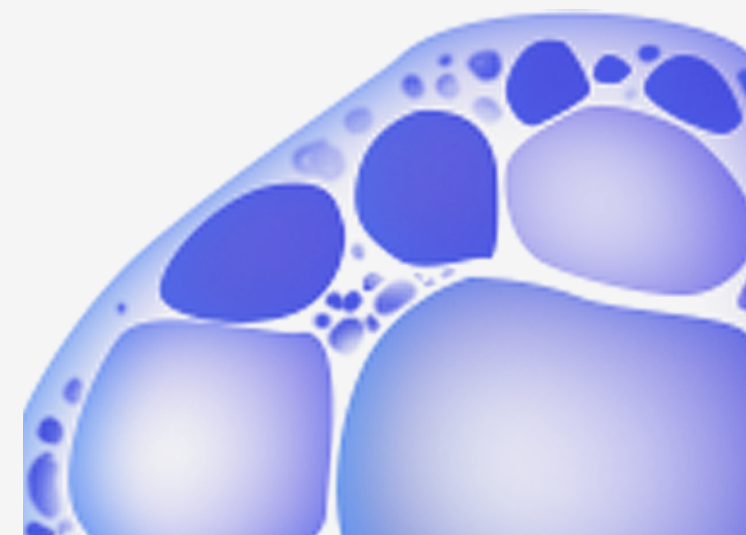
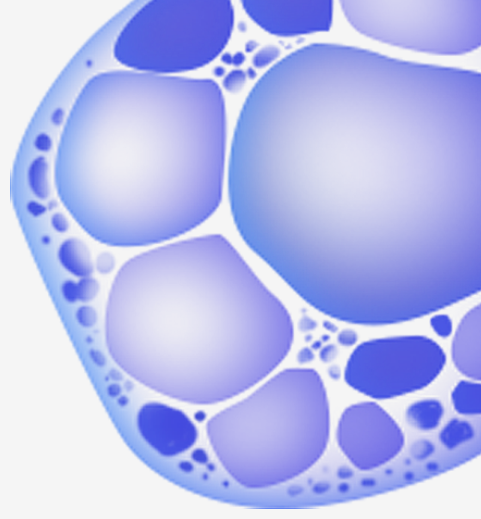
Fu Alexander Fleming, il medico scozzese che scoprì il lisozima e la penicillina e che grazie a quest'ultima ricevette il premio Nobel per la medicina nel 1945, ad intuire per primo il pericolo derivante dai batteri che sviluppano resistenze a determinati antibiotici.

Nella sua "Nobel lecture" del 1945 Fleming riportò il rischio che avrebbe corso l'umanità in seguito all'utilizzo inappropriato della penicillina:



"The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then 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".

Alexander Fleming



Rischi Connessi alle AMR

01

Mortalità

Secondo la World Health Organization le infezioni dovute a microbi resistenti agli antibiotici provocano, in combinazione con stati patologici pregressi, 5 milioni di morti l'anno.

02

Costi

Le infezioni con AMR hanno come conseguenza ospedalizzazioni prolungate con lunghe terapie che spesso risultano inefficaci e che gravano sul sistema sanitario a livello organizzativo e economico, con un costo complessivo che si aggira intorno ai 9 miliardi di euro per quanto riguarda il solo continente europeo.

03

Batteri MDR

Ad oggi sono state scoperte resistenze a ogni tipo di antibiotico e questo limita pesantemente l'arsenale che l'umanità ha a disposizione per combattere le infezioni e sepsi; sono inoltre diventati comuni microrganismi che possiedono molteplici resistenze a diversi tipi di molecole antibiotiche o MDR (Multi-Drug Resistance) come per esempio lo Staphilococcus aureus resistente alla meticillina.

04

Ritardo Nello Sviluppo Nuovi Farmaci

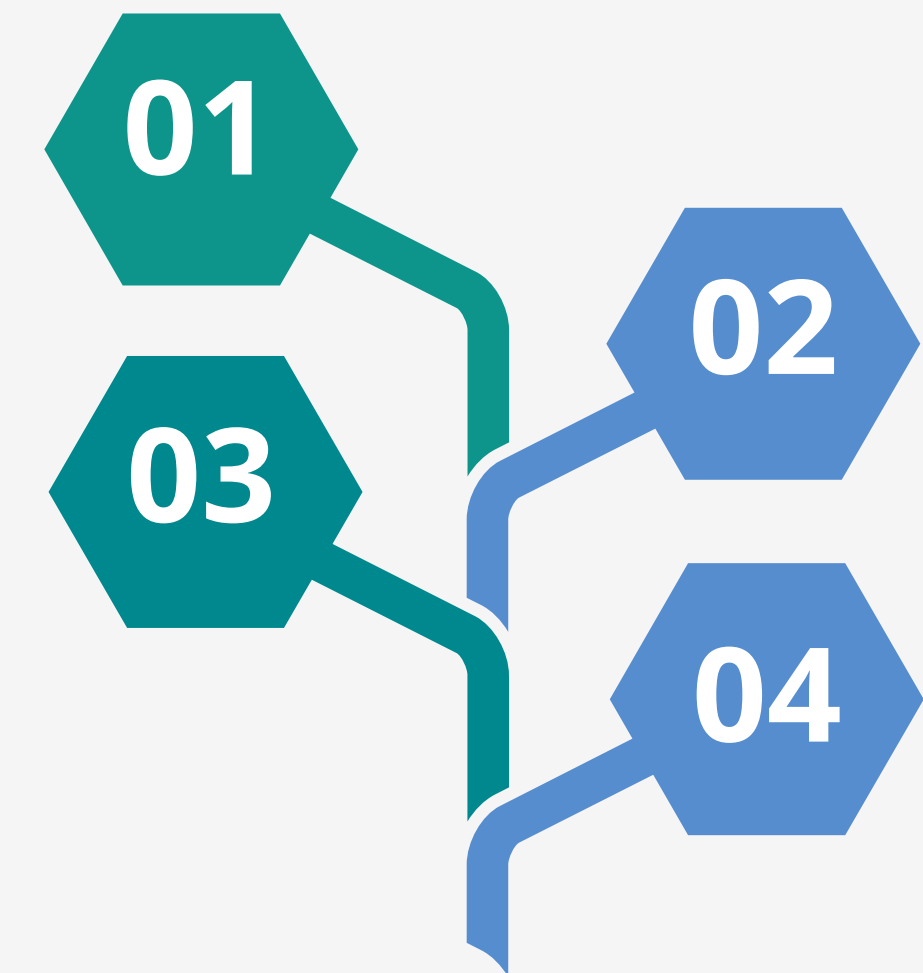
Lo sviluppo di nuovi farmaci antibiotici è un processo lungo e costoso che può richiedere in media un periodo di 7.2 anni con enormi difficoltà per quanto riguarda la ricerca di nuovi sponsor e le fasi di testing e che quindi non riesce a reggere il passo con la frequenza con cui i nuovi ceppi resistenti agli antibiotici si manifestano.

01

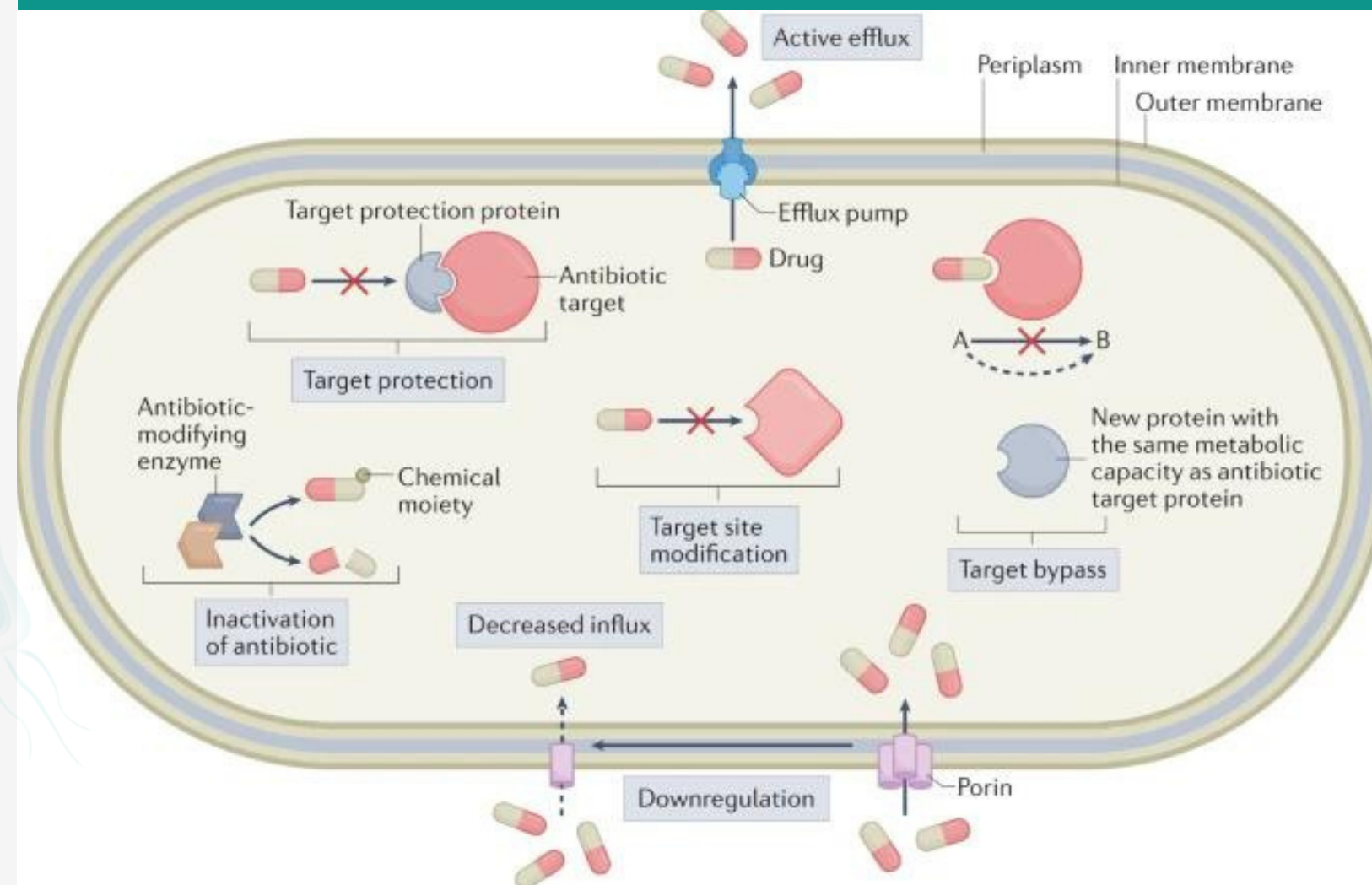
03

02

04



Meccanismi molecolari di antibiotico resistenza



Riduzione della concentrazione di antibiotico a livello citoplasmatico

- Permeabilità di membrana ridotta;
- Meccanismi di Efflusso Attivo.

Alterazione Del Target dell'Antibiotico

- Modifica, Alterazione e Protezione Del Target;
- Bypass Del Target.

Modificazione Della Molecola Antibiotica

- Inattivazione Dell'Antibiotico;
- Modifica Della Molecola Antibiotica.

Permeabilità Di Membrana Ridotta

La doppia membrana dei batteri gram-negativi impedisce l'ingresso di molecole polari nello spazio intracellulare, tuttavia piccole molecole polari possono passare attraverso canali di membrana chiamati porine.

Le porine sono proteine di membrana a β -barrel classificate in base alla loro forma e funzione in 3 famiglie, modifiche nel numero e nella struttura delle porine di membrana può portare a fenomeni di antibiotico resistenza.

Resistenza ai carbapenemi in *Klebsiella pneumoniae*

Resistenza mediata dalla modificazione delle porine non selettive OmpK35 e OmpK36.

Questo provoca un restringimento nel canale di OmpK36, diminuendo il tasso di ingresso di carbapenemi nella cellula.

Escherichia coli Multiresistente

Mutazioni multiple all'interno di OmpC, una porina non selettiva, alterano la carica elettrica all'interno del poro.

Come conseguenza il transito di antibiotici come cefotaxime, gentamicina o imipenem è impedito.

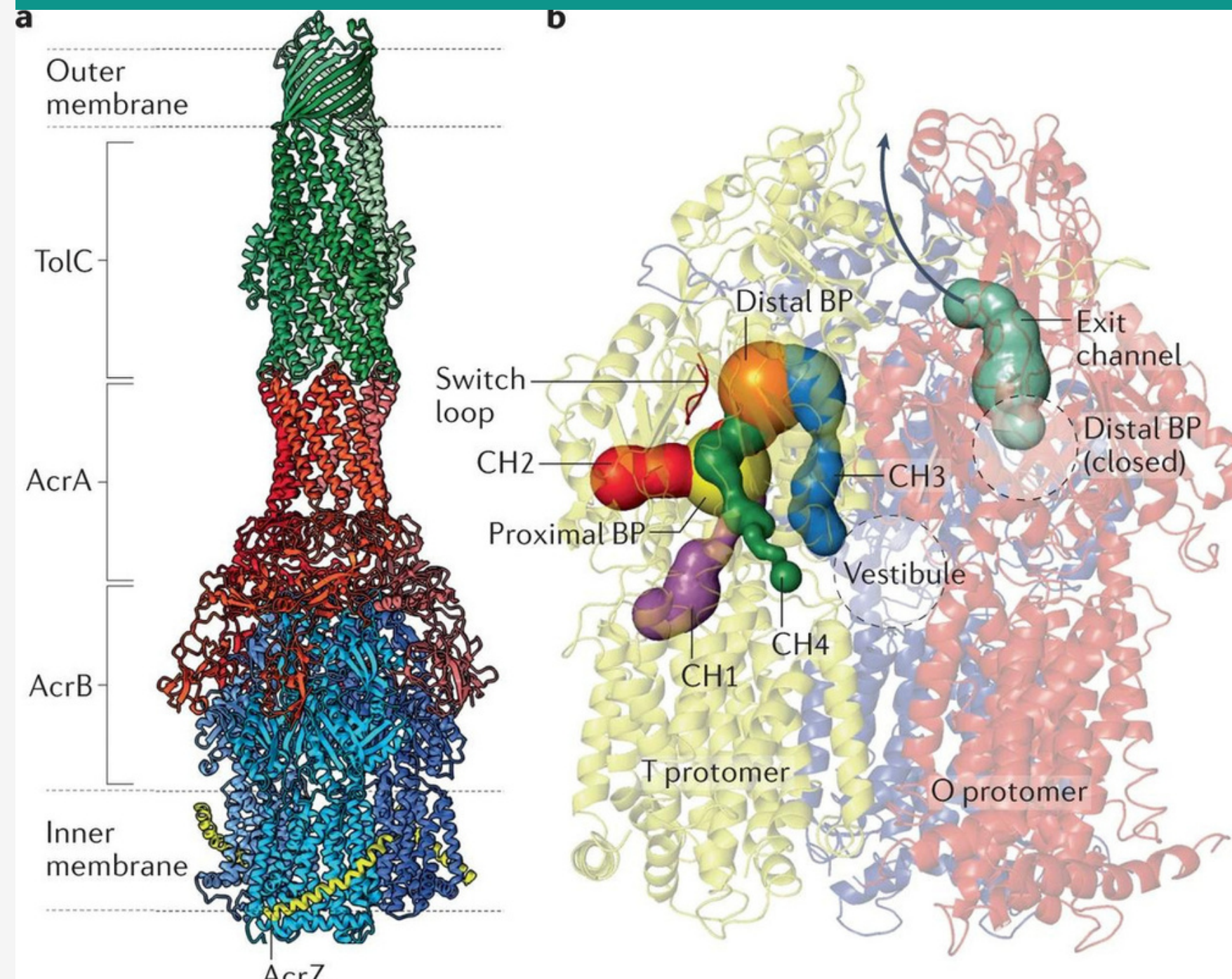
Resistenza ai carbapenemi in *Pseudomonas aeruginosa*

La perdita di porine OprD conferisce una significativa resistenza ai carbapenemi.

La perdita di tutte le porine tuttavia non impedisce l'ingresso di molecole antibiotiche all'interno della cellula, suggerendo quindi l'interazione con altri meccanismi.

Meccanismi Di Efflusso Attivo

- I batteri hanno la capacità di espellere molecole tossiche (tra cui gli antibiotici) tramite le pompe di efflusso, particolari complessi proteici di membrana presenti indistintamente sia nei batteri gram positivi che gram negativi e che proprio in questi ultimi mediano importanti fenomeni di antibiotico resistenza.
- Esistono 6 classi di pompe di efflusso, ma i membri della classe RND (Resistance-Nodulation-Division) sono quelli che conferiscono i livelli di resistenza più rilevanti clinicamente.
- Le pompe RND sono proteine di membrana interna che si associano con le PAPs (proteine adattatrici periplasmatiche) e con le OMF (Outer Membrane Factor, proteine della membrana esterna) per formare un complesso trimerico che attraversa tutta la membrana.
- Alterazioni nel numero e nella struttura delle pompe di efflusso provocano fenomeni di resistenza ad antibiotici.



STRUTTURA DEL COMPLESSO DI EFFLUSSO RND DI *E. coli*

Alterazione Del Target dell'Antibiotico

- La selettività con cui gli antibiotici limitano la crescita batterica e mediano la morte cellulare dipende dalla specificità per il proprio target.
- I target degli antibiotici sono di solito molecole o enzimi necessari per determinate funzioni cellulari essenziali alla sopravvivenza della cellula.
- Se la struttura del bersaglio primario viene alterata o protetta dall'aggiunta di gruppi chimici, il legame con l'antibiotico può diventare inefficiente, conferendo resistenza all'antibiotico.

Resistenza ai chinoloni

I chinoloni inibiscono gli enzimi topoismerasi, essenziali per la sopravvivenza cellulare.

Modifiche nella sequenza amminoacidica si traducono in una minore specificità di legame ai chinoloni permettendo così all'enzima di funzionare.

Resistenza ai β -lattamici

Resistenza conferita da mutazioni nei geni che codificano le proteine leganti la penicillina (PBP).

In *E. coli* le PBP mutate hanno scarsa affinità per gli antibiotici β -lattamici.

Resistenza alla colistina

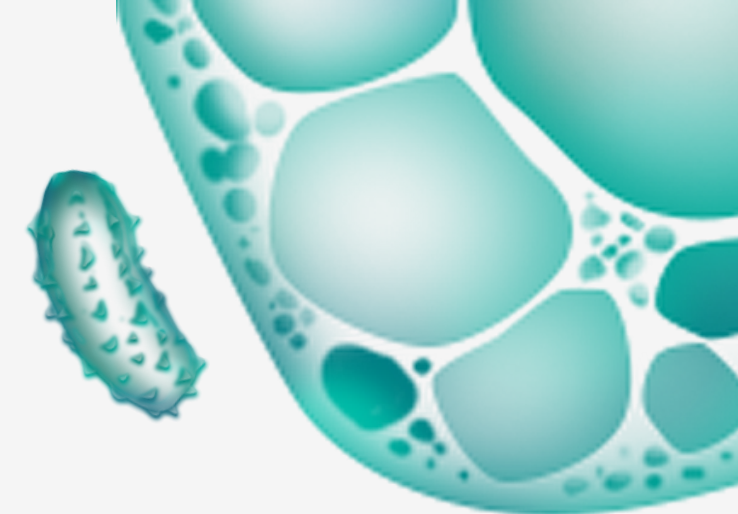
Il target della colistina è uno dei componenti della membrana esterna dei gram negativi, il Lipopolisaccaride.

L'aggiunta di molecole accessorie altera la carica della molecola, impedendo il legame con l'antibiotico.



BYPASS DEL TARGET

La cellula batterica può sviluppare nuovi pathway metabolici che vanno ad escludere il target dell'antibiotico, la molecola quindi diventa inefficace.



S. aureus meticillino-resistente (MRSA)

La meticillina è un antibiotico β -lattamico.

Alcuni elementi genici mobili come SCCmec possono conferire a *S. aureus* la capacità di produrre una PBP aggiuntiva (PBP2a), omologa al bersaglio originale ma con minore affinità per gli antibiotici β -lattamici.

Enterococchi resistenti alla vancomicina

La vancomicina inibisce la sintesi del peptidoglicano legando la porzione D-Ala D-Ala.

L'espressione dei geni *van* sul trasposone Tn1546 provocano una produzione massiva di precursori modificati del peptidoglicano contenenti D-Alanina-D-lattato o D-Alanina-D-serina. Questa sostituzione causa la perdita di affinità totale o parziale dell'antibiotico nei confronti del target.

E. coli resistente ai β -lattamici

E.coli riesce ad aggirare l'effetto degli antibiotici β -lattamici.

Questo avviene grazie alla produzione di un meccanismo alternativo per la formazione della parete che coinvolge l'enzima L,D-transpeptidase YcbB, bypassando quindi l'attività degli enzimi PBP, i target dei β -lattamici.

Modifiche alla molecola antibiotica

Le molecole antibiotiche possono divenire inefficaci grazie all'aggiunta di determinati gruppi chimici. Recentemente nuovi enzimi sono stati identificati quali:

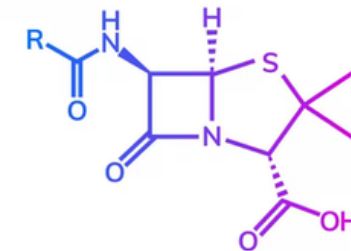
- ApmA** → Enzima della classe delle acetiltransferasi, è in grado di inattivare l'apramicina.
- CAT** → Enzima della classe acetiltrasferasi, che trasferisce un gruppo acetile al coenzima A, impedendo al cloramfenicolo di legarsi al suo bersaglio sul ribosoma.
- VATs** → Acetiltransferasi della virginiamicina, modificano le streptogramine alterandone la struttura.
- Rox enzymes** → Rifamicina-monoossigenasi inattivano la rifamicina mediante ossidazione seguita da linearizzazione.

Inattivazione dell'antibiotico

I batteri resistenti producono enzimi specializzati che possono distruggere o alterare pesantemente la molecola antibiotica.

Tra gli enzimi più comunemente associati ad antibiotico resistenza troviamo:

- **β-lattamasi**



Le β-lattamasi sono una classe di enzimi in grado di idrolizzare l'anello β-lattamico, conferendo resistenze verso penicilline, cefalosporine, carbapenemi, monobattami.

- **Enzimi della famiglia TetX**

Enzimi in grado di conferire resistenza alle tetracicline.

- **TetX3/X4/X5**

Conferiscono resistenza alla tigeciclina.

- **Carbapenemasi (KPC,NDM,OXA)**

Enzimi in grado di idrolizzare penicilline, cefalosporine e carbapenemi
Continua scoperta di nuove varianti.

Nuove Frontiere Lotta AMR

Lo studio dei meccanismi molecolari di antibiotico resistenza ci ha permesso di elaborare nuove strategie che possano interferire o inibire uno specifico meccanismo ripristinando la sensibilità a quel determinato antibiotico.

Alcuni esempi:

Nuovi Inibitori delle β -lattamasi

Nuove Molecole come avibactam, relebactam e durlobactam o l'acido boronico sono state sviluppate come inibitori delle β -lattamasi

Combinazioni di farmaci

Molecole in grado di danneggiare la membrana, come le polimixine, possono essere usati in combinazione con altri antibiotici per aumentarne l'efficacia

Meccanismi in grado di inibire le pompe di efflusso

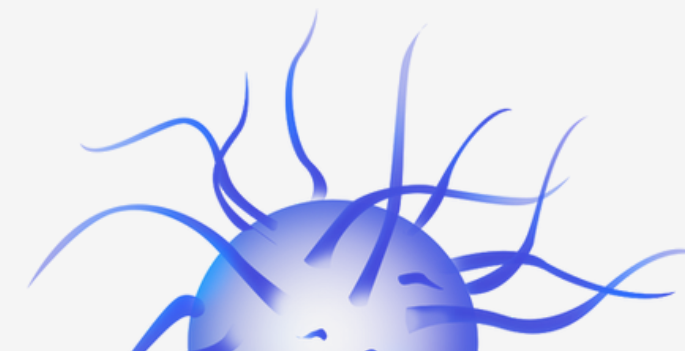
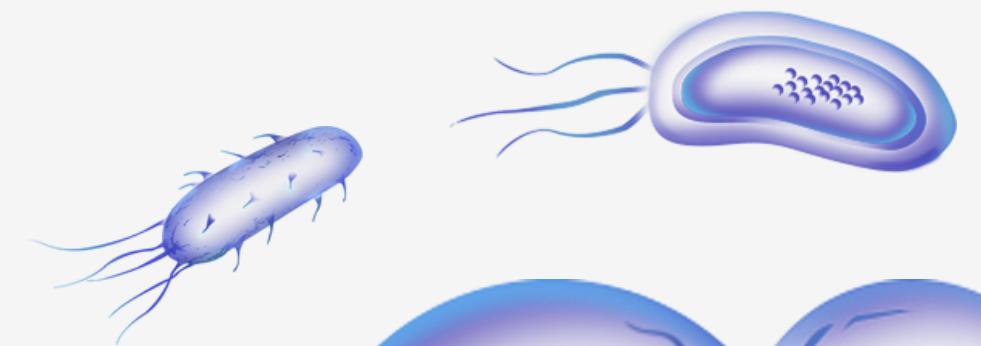
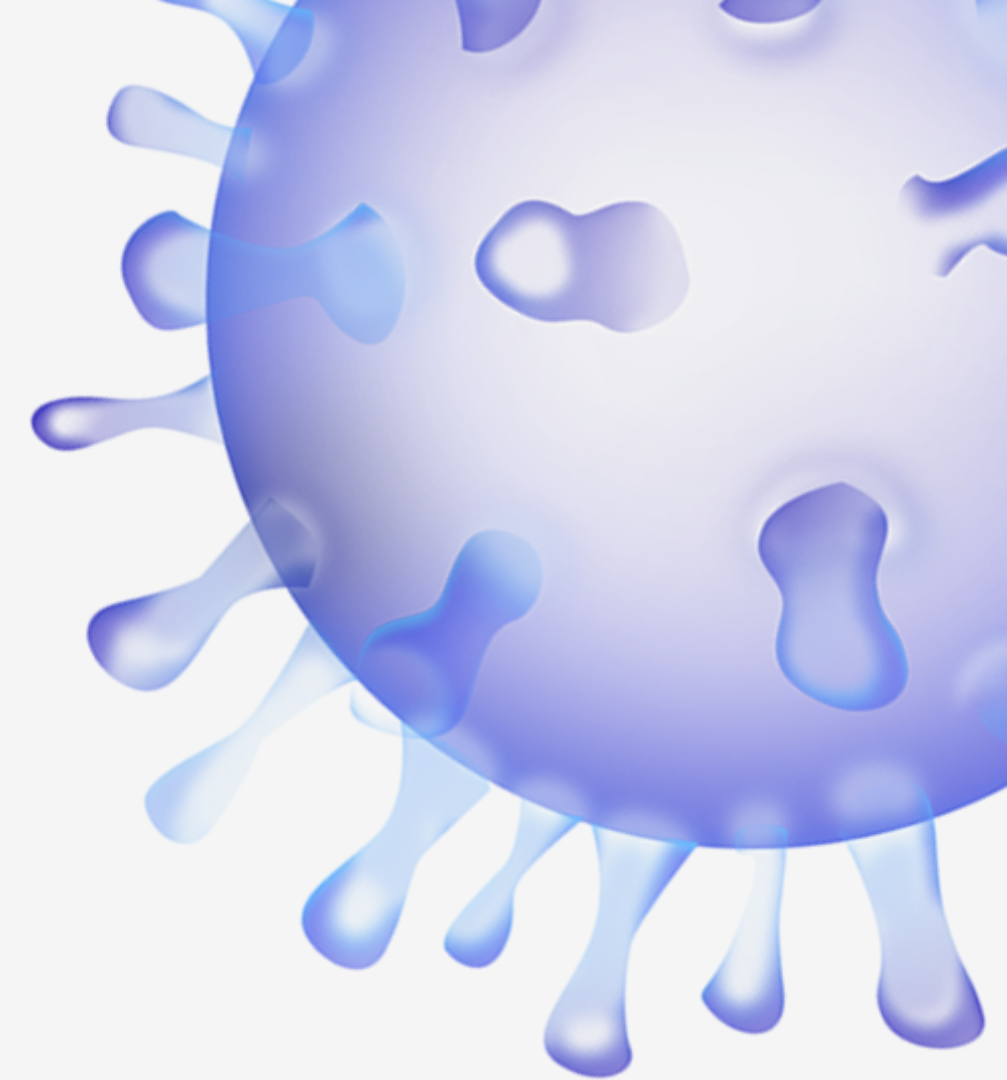
I ricercatori stanno sperimentando nuovi modi per impedire alle pompe di efflusso di espletare la propria funzione

CONCLUSIONI

La comprensione dei meccanismi d'azione degli antibiotici e dei corrispondenti meccanismi di resistenza, sono fondamentali per:

- Definire il regime di dosaggio di nuovi antibiotici, per limitare l'insorgere di resistenze
- Sviluppare rapidi test diagnostici che possano guidare nella scelta dell'antibiotico più efficace
- La ricerca di nuove combinazioni terapeutiche sinergiche o nuovi antibiotici

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!



Bibliografia Immagini e figure:

Immagine 1 - <https://www.canva.com/>

Immagine 2 - <https://www.canva.com/>

Immagine 3 - https://www.storicang.it/a/alexander-fleming-il-padre-della-penicillina_15292

Immagine 4 - <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/penicillina.html>

Figura 1 - Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol* 21, 280–295 (2023).
<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>

Figura 2 - Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol* 21, 280–295 (2023).
<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>