



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in

BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

**Ricerca di inibitori della pompa di efflusso NorA di
Staphylococcus aureus: dimostrazione dell'efficacia di
nuovi derivati della chinolina**

**Search of inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux
pump: evidence for efficacy of new quinoline derivatives**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Valentina Schiavoni

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Francesca Biavasco

Correlatore:

Dott. Nicholas Cedraro

Sessione Estiva (Luglio 2021)

Anno accademico 2020/2021

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Antibiotico resistenza	4
1.1.2 <i>Overview</i>	7
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.2.1 Caratteristiche generali	12
1.2.2 Fattori di virulenza	13
1.2.3 Meccanismi di antibiotico resistenza	15
1.3 Pompa di efflusso NorA di <i>Staphylococcus aureus</i>	19
1.4 Inibizione della pompa di efflusso NorA	22
2. SCOPO DELLA TESI	24
3. MATERIALI E METODI	26
3.1 Ceppi batterici, terreni e reagenti	26
3.1.1 Ceppi batterici	26
3.1.2 Terreni di coltura	27
3.1.3 Reagenti	28
3.2 Determinazione della MIC	31

3.3 Determinazione della MIC dell'associazione ciprofloxacina - inibitori di NorA	34
3.4 Test dell'efflusso di bromuro di etidio	36
3.5 Test a "scacchiera" (Checkerboard assay)	40
3.6 Saggio di citotossicità	43
3.7 Curve di battericidia (<i>time-kill curve assay</i>)	44
4. RISULTATI	46
4.1 Determinazione della MIC dei derivati della chinolina	46
4.2 Determinazione della MIC dell'associazione ciprofloxacina - derivati della chinolina	47
4.3 Test dell'efflusso del bromuro di etidio (EtBr)	49
4.4 Test di Checkerboard	51
4.5 Saggi di citotossicità	53
4.6 Determinazione dell'attività dell'associazione ciprofloxacina - derivati della chinolina mediante curve di battericidia	55
5. DISCUSSIONE	58
6. BIBLIOGRAFIA	67
7. FONTI DELLE IMMAGINI	78

1. INTRODUZIONE

1.1 Antibiotico resistenza

La resistenza antimicrobica nei batteri patogeni è una sfida mondiale associata ad alta morbilità e mortalità in contesti clinici. Batteri Gram-negativi e Gram-positivi multi-resistenti possono provocare infezioni difficili da trattare, o addirittura non curabili con terapie antibiotiche convenzionali (2).

L'uso massiccio e spesso inappropriato di antibiotici, anche in ambito non clinico, ha creato una pressione selettiva responsabile di un rapido sviluppo di antibiotico-resistenze, che rappresentano un grave problema di sanità pubblica, in particolare se presenti in microrganismi patogeni (20).

L'emergenza e la diffusione della resistenza agli antibiotici hanno portato a riconoscere che non solo i geni di resistenza agli antibiotici (ARG) incontrati nei patogeni clinici sono di rilievo, ma piuttosto in tutti i batteri commensali e ambientali. Anche gli elementi genetici mobili e i batteriofagi formano un serbatoio di ARG dai quali i batteri patogeni possono acquisire resistenza tramite trasferimento genetico orizzontale (HGT) (58).

I batteri hanno una notevole plasticità genetica che consente loro di rispondere a un'ampia gamma di minacce ambientali, compresa la presenza di molecole antibiotiche che possono mettere a repentaglio la loro esistenza (38).

L'antibiotico resistenza è definita come la capacità dei microorganismi di sopravvivere e moltiplicarsi in presenza di concentrazioni di antibiotico utilizzate in terapia e può essere distinta in resistenza naturale e resistenza acquisita (20).

La prima è l'insensibilità costitutiva di un microorganismo ad un determinato antibiotico che può dipendere sia dalle caratteristiche dell'organismo, che dall'antibiotico stesso. La resistenza acquisita, invece, si verifica quando un microorganismo, che prima era sensibile ad un determinato antibiotico, diventa resistente.

Da una prospettiva evolutiva, i batteri riescono a sopravvivere all'azione dell'antibiotico utilizzando due principali strategie genetiche:

- acquisizione di DNA esterno codificante per determinanti di resistenza, attraverso il trasferimento genico orizzontale (HGT);
- mutazioni che insorgono in tre tipi di geni: quelli che codificano il bersaglio dell'antibiotico, quelli che codificano i trasportatori dell'antibiotico, o quelli che codificano i regolatori che reprimono l'espressione dei trasportatori (35).

I batteri acquisiscono materiale genetico esterno attraverso tre strategie principali: la trasformazione, che implica l'incorporazione di DNA nudo; la

trasduzione, fago-mediata; e la coniugazione, che implica un contatto diretto donatore-ricevente.

L'acquisizione di DNA esogeno tramite HGT è uno dei meccanismi più importanti dell'evoluzione batterica ed è spesso responsabile dello sviluppo della resistenza agli antibiotici (38).

La diffusione di antibiotico resistenze nell'ambiente ospedaliero è spesso mediata da eventi di coniugazione: una modalità molto efficiente di trasferimento genico che richiede il contatto cellula-cellula ed è probabilmente molto frequente nel tratto gastrointestinale umano, specialmente in corso di trattamento antibiotico (25).

La coniugazione utilizza elementi genetici mobili (MGE) come veicoli per condividere informazioni genetiche, tra cui plasmidi, trasposoni e integroni (38). Questi elementi genetici guidano il rapido adattamento nei batteri, conferendo plasticità genomica al loro ospite e facilitando risposte rapide a pressioni selettive diverse (21).

1.1.2 Overview

Esistono diversi meccanismi di antibiotico-resistenza che comprendono modifiche della molecola antimicrobica, riduzione della permeabilità all'antibiotico, aumento dell'efflusso dell'antibiotico e modifiche del target (38).

Il primo importante meccanismo è quello delle modificazioni chimiche riguardanti l'antibiotico e quindi della produzione di enzimi, da parte del microorganismo, in grado di introdurre cambiamenti chimici all'interno della molecola antimicrobica, inattivandola (60). Un tipico esempio è costituito dagli enzimi beta-lattamasi che riconoscono e idrolizzano la classe antibiotica dei beta-lattamici (7).

Un altro meccanismo sviluppato dai batteri per impedire all'antibiotico di raggiungere il suo bersaglio intracellulare è quello di diminuire l'internalizzazione della molecola antimicrobica, molto comune nei Gram-negativi. Questo meccanismo è possibile grazie ad una specifica selezione di ciò che può entrare nella cellula batterica, in base alle dimensioni, da parte delle porine, le quali possono essere classificate in base alla loro struttura, alla loro selettività e alla regolazione della loro espressione. Questo tipo di resistenza intrinseca è evidente in *Pseudomonas aeruginosa* (11).

Un altro meccanismo di antibiotico resistenza è quello della modifica del bersaglio che può essere ottenuta per mutazione, come ad esempio la resistenza ai chinoloni, molto spesso causata da mutazioni nei geni codificanti le topoisomerasi batteriche (35). Utilizzando questa strategia, i batteri sono in grado di sviluppare nuovi sistemi che svolgono funzioni metaboliche simili al bersaglio originale, ma non sono inibiti dalla molecola antimicrobica. Gli esempi clinici più rilevanti includono la resistenza alla meticillina in *S. aureus* dovuta all'acquisizione di DNA esogeno che codifica per la proteina PBP2a e la resistenza alla vancomicina negli enterococchi attraverso modifiche della struttura del peptidoglicano mediata dai cluster del gene *van* (38).

Altro meccanismo di resistenza molto importante è mediato dall'estrusione delle molecole antibiotiche tramite complessi proteici superficiali che costituiscono le così dette pompe di efflusso, ovvero canali proteici attraverso i quali l'antibiotico penetrato all'interno della cellula ne viene fatto fuoriuscire (42).

Il loro ruolo fisiologico è stato correlato all'eliminazione di metaboliti endogeni nocivi per la cellula, alla secrezione di determinanti di virulenza e alle risposte allo stress cellulare, suggerendo che i farmaci sono "substrati accidentali" di questi trasportatori. I sistemi di efflusso possono essere specifici, estrudendo solo un antibiotico o una classe di antibiotici, oppure possono essere in grado

di estrudere diverse classi di composti antimicrobici, contribuendo al fenomeno della multi resistenza (MDR) (10) (30).

Le pompe di efflusso sono presenti e attive sia nei batteri sensibili agli antibiotici, che in quelli resistenti (45).

La resistenza è dovuta principalmente a due meccanismi: un'aumentata espressione del cluster genico codificante la pompa di efflusso, oppure la presenza di sostituzioni amminoacidiche nella sequenza proteica che aumentano l'affinità per il suo substrato e la rendono più efficiente nell'esportarlo. In entrambi i casi si ha una diminuzione della concentrazione intracellulare di antibiotico con conseguente diminuzione della sensibilità. (45).

I geni che codificano per le pompe di efflusso si possono trovare sul cromosoma o su elementi genetici mobili, come i plasmidi (30).

I sistemi di efflusso batterico rientrano generalmente in cinque famiglie: la superfamiglia “*major facilitator*” (MF), la famiglia “*ATP-binding cassette*” (ABC), la famiglia “*resistance-nodulation-division*” (RND), la famiglia “*small multidrug resistance*” (SMR) e la famiglia “*multidrug and toxic compound extrusion*” (MATE) (46).

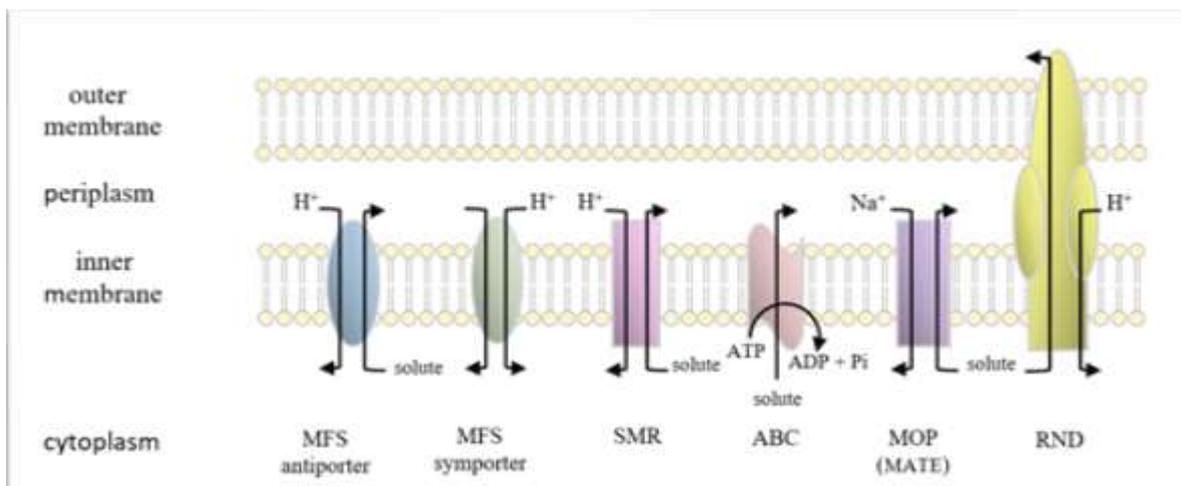


Fig. 1: rappresentazioni schematiche delle famiglie di trasportatori e loro localizzazione nell'involucro cellulare batterico.

Queste famiglie differiscono per la loro struttura conformazionale, la loro fonte di energia, il range di substrati che sono in grado di estrudere e il tipo di microorganismi in cui sono distribuite (44). Tutti questi sistemi utilizzano la forza proton-motrice come fonte di energia attraverso un sistema antiporto, a parte la famiglia ABC, che utilizza l'idrolisi dell'ATP per guidare l'esportazione dei substrati (59), e la famiglia MATE che utilizza sia protoni che ioni sodio (53). Per batteri Gram-negativi, quali *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, le pompe di efflusso associate ad una resistenza clinicamente significativa ai farmaci sono soprattutto appartenenti alla famiglia RND, mentre per i batteri Gram-positivi, come *Staphylococcus aureus*, sono le pompe di efflusso appartenenti alla famiglia MFS (32).

Le pompe RND utilizzano il gradiente protonico scambiando uno ione H^+ con una molecola di farmaco e sono sistemi multicomponente, ovvero formate da una proteina che attraversa il periplasma, nota come proteina di fusione della membrana, una proteina di efflusso della membrana esterna e un trasportatore situato nella membrana citoplasmatica (54). Assemblandosi, i tre componenti formano un canale interno nel quale transita il substrato.

Le pompe di efflusso MATE sono state descritte in vari batteri, tra cui *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Haemophilus influenzae* (45).

1.2 Staphylococcus aureus

1.2.1 Caratteristiche generali

Lo Staphylococcus aureus è un patogeno opportunista Gram-positivo che colonizza frequentemente e in modo asintomatico le cavità nasali dell'uomo (36) (55).

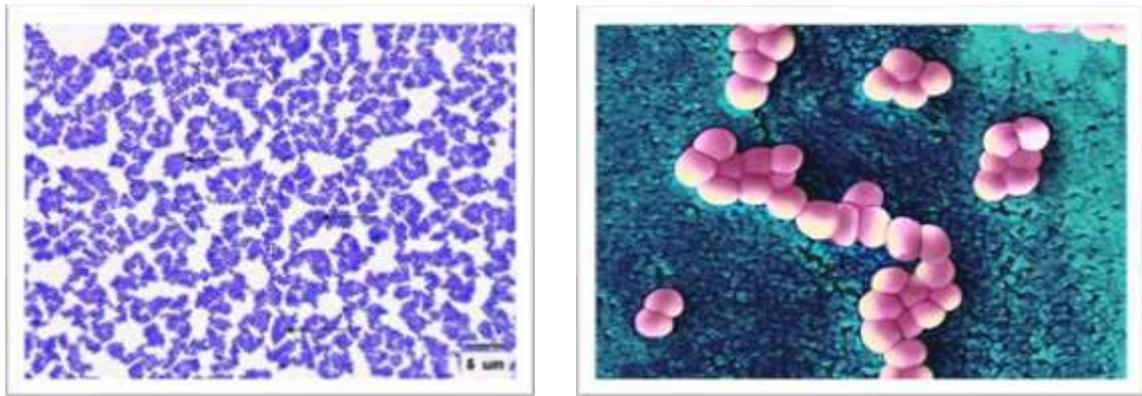


Fig. 2: a sinistra Staphylococcus aureus al microscopio dopo colorazione di Gram; a destra Staphylococcus aureus visto al SEM.

Staphylococcus aureus può provocare infezioni della pelle e delle vie respiratorie. Le infezioni della pelle sono generalmente acquisite in ambito comunitario, mentre in ambito ospedaliero si verificano soprattutto infezioni polmonari. Tra i patogeni nosocomiali risulta essere il più comune e associato ad alta morbilità e mortalità (42).

Può causare infezioni croniche persistenti come quelle che interessano le valvole cardiache (endocardite infettiva) o le vie respiratorie (specialmente in pazienti con fibrosi cistica) (15).

1.2.2 Fattori di virulenza

La capacità di causare malattie così diverse è dovuta principalmente ad un arsenale di fattori di virulenza codificati nel genoma di *S. aureus* (56).

Questo microorganismo è in grado di esprimere una grande varietà di proteine secrete e di superficie che promuovono la colonizzazione e l'evasione dalla risposta immunitaria. Le proteine di superficie promuovono l'adesione ai componenti dei tessuti e l'invasione nelle cellule ospiti. Le tossine citolitiche danneggiano le cellule epiteliali dell'ospite e i neutrofilo (27).

Speciali proteine leganti la fibronectina (FnBP-A e FnBP-B) conferiscono a *S. aureus* la capacità di legarsi alle integrine cellulari dell'ospite e di innescare l'internalizzazione (23). Inoltre, un'ampia varietà di esoproteine contribuisce alla sua capacità di colonizzare e causare malattie negli ospiti. Tra i fattori di virulenza secreti sono rilevanti anche una notevole varietà di citotossine, tra cui quattro emolisine (alfa, beta, gamma e delta) e di enzimi: nucleasi, proteasi, lipasi, ialuronidasi e collagenasi (12). Tra le tossine citolitiche, che formano pori nella membrana plasmatica e causano la lisi della cellula bersaglio (5) (42), di particolare importanza clinica è la leucocidina di Pantone-Valentine (PVL), che ha come bersaglio i leucociti ed è associata a infezioni cutanee primarie, come foruncolosi e polmonite necrotizzante grave (22) (17).

Staphylococcus aureus produce un gruppo aggiuntivo di esotossine, che includono la tossina della sindrome da shock tossico-1 (TSST-1), le enterotossine, appartenenti al gruppo di tossine che agiscono come superantigeni; e le tossine esfoliative, coinvolte nella sindrome della cute ustionata (33).

Un altro fattore di virulenza molto importante, oltre a quelli citati, è rappresentato dalla proteina A, che è in grado di legare il frammento cristallizzabile (Fc) degli anticorpi inibendo l'opsonizzazione e ostacolando la fagocitosi (34).

Questi fattori di virulenza sono proteine accessorie e pertanto prodotte in modo condizionale (41): in particolare, diversi segnali ambientali possono influenzarne l'espressione, tra cui la disponibilità di nutrienti, la temperatura, il pH, l'osmolarità e la tensione dell'ossigeno (56).

L'espressione coordinata di diversi fattori di virulenza in risposta a segnali ambientali durante le infezioni suggerisce l'esistenza di regolatori globali in cui un singolo sistema di regolazione controlla l'espressione di molti geni bersaglio non correlati. Questi regolatori aiutano i batteri a adattarsi ad un ambiente ostile, producendo fattori che consentono loro di sopravvivere e di causare infezione (5).

1.2.3 Meccanismi di antibiotico resistenza

Le infezioni da *S. aureus* acquisite in ospedale e in ambito comunitario rappresentano un peso notevole in termini di morbilità, mortalità e costi sanitari. L'introduzione di nuovi antibiotici per contrastare questo patogeno è generalmente seguita dall'emergere di ceppi resistenti (52).

Resistenza ai beta-lattamici: è dovuta principalmente alla produzione di β -lattamasi che inattivano gli antibiotici appartenenti alla classe dei beta-lattamici per idrolisi del loro anello beta-lattamico. Particolarmente preoccupante risulta l'emergere di ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina (MRSA), segnalati già poco dopo l'introduzione di questo antibiotico (61). La resistenza alla meticillina in *S. aureus* risulta dall'acquisizione di un gene dall'esterno, *mecA*, situato nella cassetta cromosomica *SCCmec*. *mecA* codifica per PBP2a, una *penicillin binding protein*, che ha una bassa affinità per tutti i β -lattamici, comprese le penicilline, le cefalosporine (ad eccezione dei composti di ultima generazione) e i carbapenemi. L'acquisizione di *mecA* rende la maggior parte dei β -lattamici inefficienti contro l'MRSA (38).

Resistenza ai glicopeptidi: in seguito alla diffusione di ceppi resistenti alla meticillina i glicopeptidi sono diventati il cardine di trattamento delle infezioni da MRSA. La vancomicina è stata introdotta nel 1958, ma i primi isolati clinici di *S. aureus* VRSA (completamente resistenti alla vancomicina) sono stati

isolati nel 2002. I ceppi VRSA acquisiscono resistenza mediante l'acquisizione di un plasmide contenente l'operone *vanA*, che è causa dell'alterazione del peptide terminale D -alanil- D -alanina della parete cellulare a D -alanil- D -lattato, prevenendo l'inibizione della sintesi della parete cellulare da parte della vancomicina (52).

Resistenza agli aminoglicosidi: i primi casi di *Staphylococcus aureus* resistenti agli aminoglicosidi emersero già negli anni '50. La resistenza può essere derivata da tre possibili meccanismi: una mutazione cromosomica dei ribosomi che porta ad un alterato legame con l'aminoglicoside; una scarsa permeabilità di membrana (che produce una resistenza di basso livello) o, più comunemente, è dovuta ad una modifica enzimatica dell'antibiotico (34).

Due nuovi antibiotici sono stati autorizzati per il trattamento di infezioni da MRSA: linezolid e daptomicina. Sono stati però trovati meccanismi di resistenza anche nei loro confronti. Il linezolid è un antibiotico appartenente alla classe degli oxazolidinoni che inibisce la sintesi delle proteine e la resistenza è causata da una singola mutazione nel sito bersaglio, corrispondente al dominio V dell'RNA ribosomiale 23S della subunità 50S (37).

La daptomicina è un antibiotico lipopeptidico che coinvolge il legame e l'inserzione nella membrana citoplasmatica del batterio in presenza di fisiologiche concentrazioni di ioni calcio (43).

Il calcio è assolutamente necessario per l'attività antibatterica del farmaco e forma un complesso che si chiama Ca-DAP. Quest'ultimo si oligomerizza per formare micelle che penetrano nella parete cellulare e si inseriscono nella membrana citoplasmatica. Questo porta ad una depolarizzazione della membrana citoplasmatica, permeabilizzazione, fuoriuscita di ioni K^+ e infine morte cellulare. La resistenza alla daptomicina è il risultato di mutazioni di geni che attivano difese del batterio contro i danni dell'involucro cellulare (17).

Resistenza ai chinoloni: i bersagli dei chinoloni sono la DNA girasi batterica, senza la quale viene inibita la replicazione del DNA, e la topoisomerasi IV (38).

Il principale meccanismo di resistenza ai chinoloni è rappresentato proprio da mutazioni nei target, che li rendono immuni dall'azione del farmaco. Un altro importante meccanismo di resistenza è rappresentato da una riduzione della concentrazione intracellulare di antibiotico, che si ottiene mediante il trasporto attivo dei chinoloni fuori dalla cellula, un ridotto assorbimento dei chinoloni o una combinazione dei due. Nei batteri Gram-positivi i trasportatori di efflusso attivo sono il mezzo principale per ridurre le concentrazioni di farmaci citoplasmatici (24); in particolare, in *S. aureus* è stato dimostrato che la sovra-espressione delle pompe di efflusso NorA, NorB e NorC aumenta da quattro a otto volte la resistenza ai chinoloni. Tutte e tre le pompe sono membri della famiglia *Major Facilitator Superfamily* (MFS) e sono trasportatori secondari

attraverso la membrana citoplasmatica alimentati dal gradiente protonico. L'espressione di NorA e di NorB conferisce resistenza ai chinoloni idrofili, come la norfloxacin e la ciprofloxacina, mentre l'espressione di e NorC conferisce resistenza ai chinoloni idrofobi (17).

1.3 Pompa di efflusso NorA di Staphylococcus aureus

Le pompe di efflusso possedute da microorganismi Gram-positivi possono essere codificate da geni plasmidici o cromosomici (19).

La pompa di efflusso NorA è uno dei sistemi di efflusso più studiati in *Staphylococcus aureus* ed è codificata dal gene cromosomico *norA*. Appartiene alla famiglia MFS ed è in grado di espellere dalla cellula una serie di composti strutturalmente e chimicamente dissimili, come fluorochinoloni idrofili (norfloxacin e ciprofloxacina) e coloranti (bromuro di etidio) (29).

La pompa di efflusso NorA risulta essere uno dei principali sistemi di efflusso over-espressi negli isolati clinici. È una proteina di 388 amminoacidi costituita da una singola catena polipeptidica che presenta 12 alfa eliche transmembrana con due domini N- e C-terminali collegati da un lungo loop citoplasmatico. Presenta una tasca di legame idrofobica composta da amminoacidi non polari, tra cui: valina, fenilalanina, glutammina e isoleucina, che risultano essere conservati tra i vari componenti della famiglia MFS. Studi di docking molecolare hanno evidenziato che i chinoloni, come acido nalidixico, ciprofloxacina e levofloxacina, mostrano un'elevata energia di legame, in particolar modo per quanto riguarda la ciprofloxacina, che forma un legame idrogeno con il gruppo amminico della glutammina 51 situata all'interno della cavità idrofobica (4).

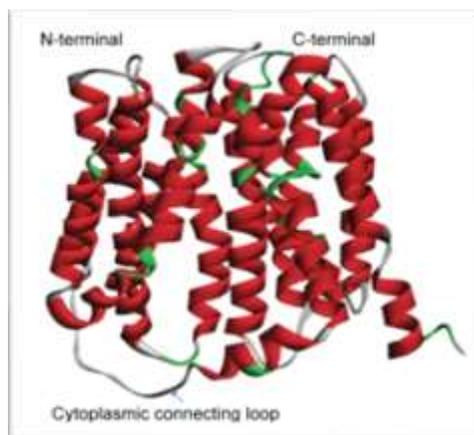


Fig. 3: modello acquisito per omologia della pompa di efflusso NorA con i domini N- e C-terminali collegati da un anello di connessione citoplasmatico.

NorA ha un livello di espressione basale, che causa una ridotta suscettibilità verso i composti antimicrobici. Una maggiore espressione del gene *norA* può essere sia costitutiva, per via di mutazioni nella regione del suo promotore, sia inducibile, attraverso l'azione di proteine regolatrici (19). Una mutazione individuata, che causa una sovra-espressione di NorA, si trova nella regione 5' UTR a monte di *norA*. Questa mutazione è associata ad un aumento dell'emivita dell'mRNA con conseguente incremento della quantità di farmaco espulsa e maggior livello di resistenza ai fluorochinoloni (40).

L'espressione di *norA* risulta influenzata un sistema di regolazione a due componenti, codificato a livello del locus *ArlR-ArlS*. In generale, i sistemi di regolazione a due componenti sono costituiti da un sensore transmembrana (una proteina-chinasi in grado di fosforilare l'istidina) e dal un regolatore della

risposta. La proteina transmembrana si lega ad un ligando specifico, che è rappresentato dal segnale, e si autofosforila a livello di un residuo di istidina conservato. Il sensore fosforilato trasmette successivamente il fosfato ai residui di aspartato del regolatore di risposta. La proteina ArlR appartiene al gruppo PhoB-OmpR; è noto che questi regolatori sono così in grado di modificare l'espressione genica tramite il legame con una regione a monte del promotore dei loro geni bersaglio (18), in questo caso *norA*.

La struttura cristallina di NorA non è stata ancora risolta. Chiarire le caratteristiche strutturali e il meccanismo di legame alla pompa di efflusso NorA sarebbe estremamente utile per progettare inibitori della pompa di efflusso (EPI) (4).

1.4 Inibizione della pompa di efflusso NorA

Dato il significativo ruolo di NorA nella resistenza ai fluorochinoloni in *Staphylococcus aureus*, la sua inibizione risulta essere una strategia molto promettente per migliorare l'attività di questa classe di antibiotici (1). Molto probabilmente, le pompe di efflusso svolgono un ruolo non specifico nelle prime fasi dell'esposizione agli antibiotici, dando così il tempo ai microrganismi di sviluppare meccanismi di resistenza più specifici ed efficaci (13). L'inibizione delle pompe di efflusso offre il vantaggio di contrastare la resistenza a tutti i farmaci che possono essere estrusi dallo stesso sistema. Gli inibitori della pompa di efflusso sono molecole prive di attività antimicrobica, ma che agiscono in modo sinergico con gli antibiotici che sono i substrati della pompa (8). La somministrazione di EPI insieme ad un antibiotico impedisce o abbassa la velocità di estrusione dell'antibiotico, portando a una concentrazione intracellulare del farmaco sufficientemente elevata, per il trattamento efficace delle infezioni batteriche (31).

La mancanza di informazioni strutturali su NorA, però, ha fortemente ostacolato l'identificazione di potenti EPI contro NorA (14). Da diversi studi, lo scaffold 2-fenilchinolina è stato identificato come il nucleo migliore per progettare e sintetizzare nuovi EPI di NorA (13).

In mancanza di informazioni di biologia strutturale per NorA è stato sviluppato un modello di farmacoforo tridimensionale per determinare i requisiti strutturali 3D essenziali necessari per l'interazione con NorA. Si sono evidenziate quattro caratteristiche principali: un accettore di legami idrogeno, una carica positiva e due anelli aromatici. Questo modello può essere utilizzato per migliorare EPI basati sullo scaffold della 2-fenilchinolina e per guidare la sintesi chimica di nuovi derivati. Inoltre, l'omologia di sequenza e la condivisione di diversi substrati con altre pompe MDR hanno portato all'ipotesi che NorA possa avere un sito di legame di natura idrofobica di grandi dimensioni. Questa particolarità strutturale potrebbe spiegare l'ampia specificità di substrato delle pompe MDR (49). Infatti, le proteine che riconoscono più farmaci, possiedono grandi siti di legame idrofobici e legano i loro substrati grazie a una combinazione di interazioni idrofobiche ed elettrostatiche, piuttosto che stabilendo una rete precisa di legami idrogeno e altre interazioni specifiche, caratteristiche di molti enzimi e recettori noti da tempo (39).

2. SCOPO DELLA TESI

La resistenza ai farmaci antimicrobici ha diminuito il repertorio di formulazioni efficaci nella lotta contro le infezioni batteriche, provocando un aumento della mortalità per infezioni causate da microrganismi multi-resistenti e dei costi per il loro trattamento. Considerando la capacità dei microrganismi di sviluppare una resistenza efficace contro nuovi farmaci in tempi relativamente brevi, l'uso di molecole adiuvanti, non antibiotiche, che mirano a contrastare meccanismi di resistenza, in co-somministrazione con antibatterici noti, è un valido approccio per ripristinare un fenotipo sensibile nei ceppi resistenti.

La pompa di efflusso NorA è il principale meccanismo di resistenza ai fluorochinoloni di *Staphylococcus aureus*. L'obiettivo di questa tesi è stato quello di verificare l'efficacia di nuovi inibitori di NorA da utilizzare in combinazione con la ciprofloxacina nel ristabilire la sensibilità a questo antibiotico in ceppi resistenti.

In particolare, sono stati analizzati alcuni derivati della chinolina (sintetizzati dal Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Perugia), che modelli sperimentali *in silico* indicavano come potenziali EPI, candidati ad essere utilizzati in associazione con la ciprofloxacina per ovviare al fallimento terapeutico dovuto al crescente dilagare dei ceppi resistenti.

Per indagare il meccanismo d'azione di questi composti e la loro efficacia ne è stata dapprima determinata la loro intrinseca capacità di inibire la crescita stafilococcica; successivamente, tramite saggi di valutazione dell'efficacia di combinazioni antimicrobiche, è stata valutata la sinergia della loro associazione con la ciprofloxacina. Infine, l'eventuale tossicità dei composti in esame verrà valutata tramite saggi di citotossicità su linee cellulari umane.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi batterici, terreni e reagenti

3.1.1 Ceppi batterici

I ceppi di *Staphylococcus aureus* utilizzati in questo lavoro di tesi sono stati coltivati in piastre di Mannitol Salt Agar e mantenuti in Triptone Soy Broth integrato con il 20% di glicerolo a -80° C. In particolare, i ceppi utilizzati sono i seguenti:

- **SA1199**: isolato clinico di *Staphylococcus aureus*, sensibile alla meticillina e ai fluorochinoloni, recuperato dal flusso sanguigno di un paziente negli anni '80 (47).
- **SA1199B**: ceppo di *Staphylococcus aureus* mutante di SA1199 e sovraesprime il gene *norA* (28); risultando di conseguenza resistente alla ciprofloxacina per via di un maggiore efflusso (47) e di una mutazione nel gene *grrA*, che codifica per la subunità A della topoisomerasi IV.
- **SAK1902**: ceppo di *Staphylococcus aureus* delecto della pompa di efflusso NorA (50). Quest'ultima è stata sostituita con una cassetta di resistenza all'eritromicina. Inoltre, presenta un vettore plasmidico, pCU1, che lo rende resistente al cloramfenicolo (3).

- **SAK2378**: ceppo di *Staphylococcus aureus* complementato con il gene *norA*, compreso del suo promotore sovraespresso, di SA1199B nel plasmide pCU1. Ha le stesse resistenze agli agenti antimicrobici di SAK1902, ma è anche efficiente nell'efflusso e quindi presenta una MIC elevata di ciprofloxacina e bromuro di etidio (3).

3.1.2 Terreni di coltura

Sono stati utilizzati due diversi tipi di terreni di coltura: il Mueller Hinton Broth II e il Mannitol Salt Agar (Oxoid).

Il Mueller Hinton Broth II è un terreno ricco, supplementato con cationi per gli ioni calcio e magnesio, usato per i test di sensibilità quantitativi di batteri aerobi Gram-negativi e Gram-positivi con svariati agenti antibiotici, infatti, in questo caso, è stato utilizzato per la determinazione della MIC.

Il Mannitol Salt Agar, noto anche come Chapman, è stato utilizzato per la conta batterica su piastra. È un terreno selettivo utilizzato per la crescita di batteri alofili, quindi che sopportano elevati livelli di salinità, come gli stafilococchi. Inoltre, è possibile la distinzione dei vari ceppi in base alla fermentazione del mannitolo: le colonie di *Staphylococcus aureus* presentano un colore giallo

intenso, poiché sono in grado di fermentare il mannitolo, provocando un viraggio del terreno dal rosa al giallo.

3.1.3 Reagenti

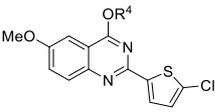
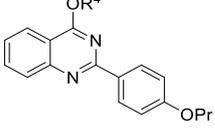
Nei saggi svolti in questo lavoro, come antibiotico, è stata utilizzata la ciprofloxacina, fornita dalla ditta Sigma-Aldrich (Saint Luis, Missouri, USA), in quanto substrato della pompa di efflusso NorA. Per l'esecuzione del test dell'efflusso sono stati utilizzati bromuro d'etidio (EtBr), in quanto anch'esso noto substrato della NorA, fornito dalla Merck (Darmstadt, Germania), e l'inibitore di efflusso aspecifico CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) (Sigma-Aldrich).

I test eseguiti hanno previsto l'utilizzo di composti chimici, sintetizzati dal Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Perugia, e sono stati testati come presunti EPI. Tra questi composti c'è il PQQ4O, il quale è già stato dimostrato essere un inibitore delle pompe di efflusso, quindi è stato usato, in particolare, come controllo positivo nel test dell'efflusso del bromuro di etidio. Tutti gli altri composti sono stati sintetizzati partendo da un gruppo centrale di chinolina, a cui poi sono state apportate modifiche, sia nel core che nelle catene laterali, per cercare di migliorarne l'efficacia.

I composti utilizzati sono riportati nella seguente tabella (Tab.1):

Tab. 1: Struttura chimica e nome dei composti utilizzati come presunti EPI della pompa di efflusso NorA. PQQ40 noto inibitore della pompa di efflusso utilizzato come controllo positivo nel test dell'efflusso del bromuro di etidio.

Composti		R ⁴
PQK40		$R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Et})_2$
PQK4P		$R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_4\text{H}_8)$
PQK4F		$R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_7\text{H}_{14})$
SH30		$R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Et})_2$
6mPQK4P		$R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_4\text{H}_8)$
6mPQK4F		$R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_7\text{H}_{14})$
Cl₂ThQK40		$R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_4\text{H}_8)$

Cl₂ThQK40		$R^4 = \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{N}(\text{Et})_2$
PQQ40		$R^4 = \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{N}(\text{Et})_2$

3.2 Determinazione della MIC

L'eventuale effetto tossico dei composti da soli è stato valutato con saggi di determinazione della MIC tramite metodo della microdiluzione in brodo in piastre microtiter a 96 pozzetti. I composti utilizzati sono quelli riportati nella *tab.1* (eccetto PQQ4O) in un range di concentrazione da 0 a 50 µg/ml. I composti sono stati testati per i ceppi di *Staphylococcus aureus* SA1199, SA1199B e SAK1902. I risultati, che saranno riportati successivamente, sono di almeno due test, in caso di valori discordanti, il test è stato ripetuto una terza volta e sono stati considerati i due valori corrispondenti.

Di seguito è mostrato come è stata allestita la piastra microtiter (*Fig.4*):

Concentrazioni di EPI (µg/ml)

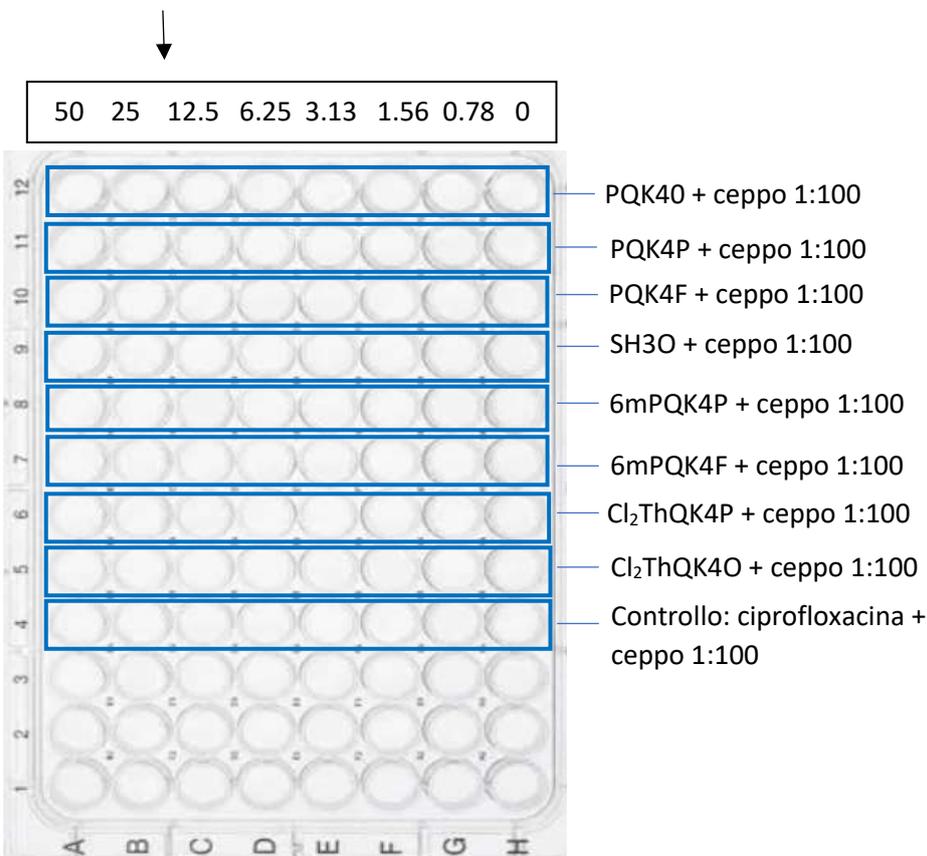


Fig. 4: Schema dell'impostazione della piastra microtiter per l'esecuzione della MIC

Standardizzazione del ceppo

La mattina precedente al saggio far crescere il ceppo batterico trasferendo con un'ansa sterile una colonia del ceppo dalla piastra ad una provetta con Mueller Hinton Broth cation adjusted (MHII brodo). Lasciar crescere overnight in termostato a 37°C. La mattina del saggio effettuare la standardizzazione del ceppo, quindi raggiungere una $O.D._{625nm} = 0.1$, equivalente, in *S. aureus*, a 1×10^8 CFU/ml. Successivamente l'inoculo viene ulteriormente diluito con un rapporto 1:100.

Allestimento della piastra

1. Preparare i composti ad una concentrazione doppia di quella che si vuole andare a testare (nel caso specifico ad una concentrazione pari a 100 µg/ml), facendo delle diluizioni con MHII a partire dalla soluzione iniziale di composto.
2. Inoculare 50 µl di ogni composto nei primi due pozzetti (A e B) di ogni riga (come mostrato nella *Fig.4*), tralasciando la riga numero 4.
3. Preparare l'antibiotico ad una concentrazione doppia di quella finale.
4. Inoculare 50 µl della soluzione con antibiotico nei primi due pozzetti della riga 4.

5. Inoculare 50 µl di brodo MHII con una multicanale in tutti i pozzetti, partendo dall'ultima colonna a destra e arrivando alla colonna B. Successivamente mescolare il contenuto dei pozzetti nella colonna B, prendere 50 µl e tornare indietro fino alla colonna G. A questo punto, scartare gli ultimi 50 µl di soluzione, poiché la colonna H deve essere priva di composti o di antibiotico per fornire un controllo sulla crescita batterica.
6. Per ultimo, inoculare in tutti i pozzetti il ceppo batterico diluito 1:100.
7. Incubare a 37°C per 24 ore.

La MIC corrisponderà alla più bassa concentrazione di EPI in cui si avrà il pozzetto limpido, quindi senza crescita visibile.

3.3 Determinazione della MIC dell'associazione ciprofloxacina - inibitori di *NorA*

Questo test è stato effettuato per tutti i composti elencati nella *Tab.1* (tranne PQQ40), su tutti i ceppi di *S. aureus* elencati precedentemente.

Far crescere il giorno precedente al saggio i ceppi batterici da utilizzare, prendendo dalla piastra una colonia batterica e inoculandola in una provetta con MHII. Incubare i ceppi in termostato a 37°C overnight.

Allestimento della piastra

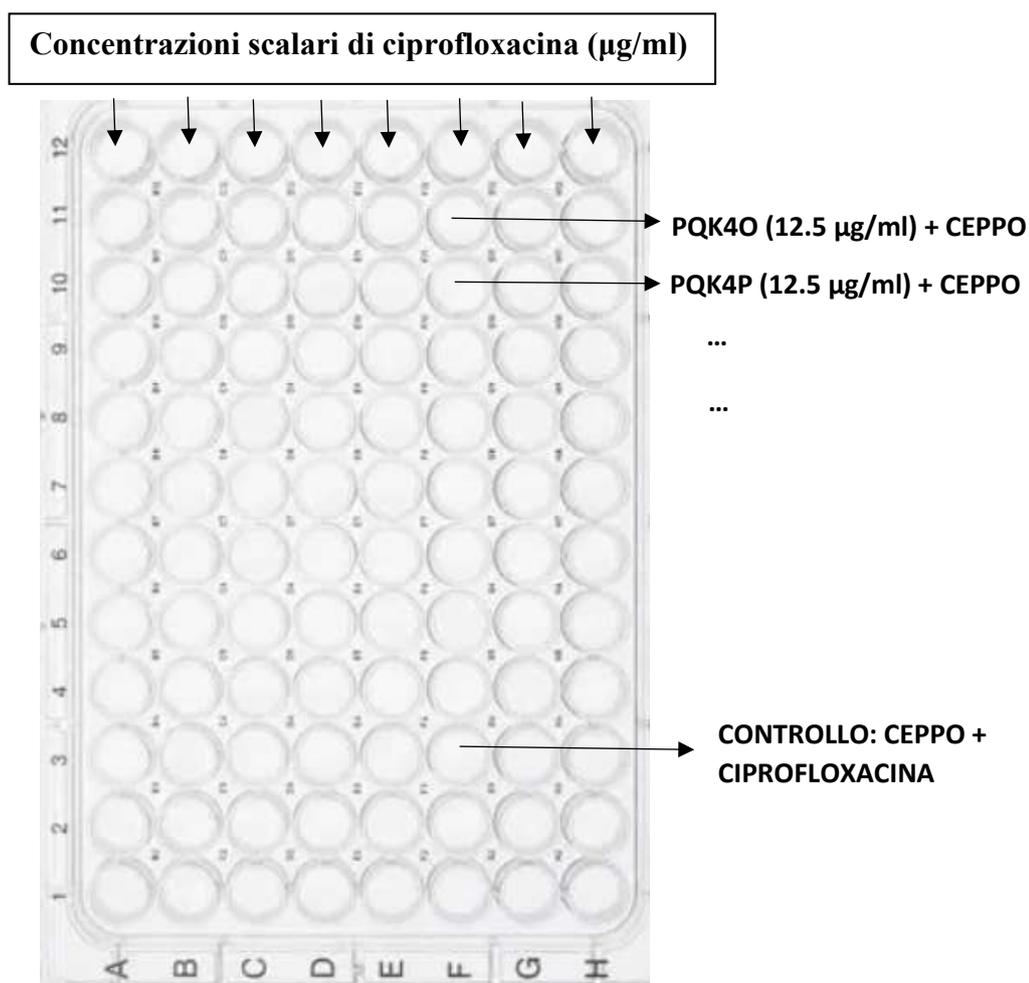


Fig. 5: impostazione della piastra per l'esecuzione della MIC in associazione.

1. Effettuare la standardizzazione del ceppo ottenendo una $O.D._{625nm} = 0.1$.
2. Preparare l'antibiotico a concentrazione doppia rispetto a quella che si vuole testare e inocularne 50 μ l nei primi due pozzetti di ogni riga.
3. A partire dalla colonna H, con una multicanale, inoculare 50 μ l di MHII brodo fino alla colonna B e da quest'ultima mescolare la soluzione, prelevare 50 μ l e tornare indietro fino alla colonna G. A questo punto, l'ultima pescata da 50 μ l va scartata.
4. Preparare una soluzione contenente MHII brodo + EPI 25 μ g/ml + inoculo allo 0.1. Per il controllo preparare una soluzione con MHII brodo + ceppo allo 0.1, in entrambi i casi la coltura batterica sar  diluita con un rapporto 1:100 nella provetta.
5. Inoculare in ogni riga la specifica soluzione, ognuna con un determinato EPI. Il controllo contiene solo il ceppo + ciprofloxacina per verificare la riuscita del saggio.
6. Incubare in termostato a 37 $^{\circ}$ c per 24 ore.

Il composto   stato considerato sinergico con la ciprofloxacina se in grado di ridurre il valore di MIC di almeno due diluizioni.

3.4 Test dell'efflusso di bromuro di etidio

Questo saggio è stato eseguito come test di screening per tutti i composti elencati precedentemente sul ceppo SA1199B, utilizzando il lettore di piastre Fluostar OMEGA (BMG LABTECH, Ortenberg, Germania), seguendo il seguente protocollo:

1. Due giorni prima del saggio, far crescere il ceppo (SA1199B) da glicerolo su terreno solido (Tryptone Soya Agar o Mannitol Salt Agar).
2. Il giorno prima del saggio, trasferire con l'ansa una colonia del ceppo dalla piastra ad una provetta con 4 ml di MHII brodo. Lasciar crescere overnight in termostato a 37°C.
3. La mattina del saggio, preparare un sub-inoculo del 4% in 4 ml di MHII brodo preriscaldato. Lasciar incubare in bagnetto agitato a 37°C fino ad ottenere una $O.D._{600nm} = 0.7/0.8$.
4. Allestire tante provette da 1.5 ml quante sono le condizioni testate (es: Epi1, Epi2, ..., No Epi) e aliquotare in ogni provetta 0.5 ml della coltura ad $O.D._{600nm} = 0.7/0.8$.
5. Centrifugare le provette a 16.300 x g per 7 minuti e rimuovere il sopranatante.

6. Per ogni provetta, risospendere il pellet in 0.5 ml di MHII brodo contenente 10 $\mu\text{g/ml}$ di EtBr e 100 μM di CCCP, precedentemente preparato. Vortexare per essere certi di aver risospeso le cellule.
7. Lasciar incubare a temperatura ambiente per 20 minuti al fine di caricare le cellule di bromuro di etidio. In questa fase il CCCP blocca le pompe di efflusso, in modo da massimizzare l'accumulo di EtBr ed evitare che venga espulso durante l'incubazione.
8. In attesa dell'incubazione, allestire la piastra microtiter 96-well nera. Per ogni condizione testata allestire tre pozzetti inserendo in ogni pozzetto 100 μl di soluzione con inibitore di pompa di efflusso a concentrazione doppia rispetto a quella che si intende testare. Per la condizione "NO EPI" (sono le cellule caricate con EtBr, senza EPI), inserire nei tre pozzetti 100 μl di MH di MHII brodo. Nei tre pozzetti dedicati al secondo bianco (solo brodo) inserire 200 μl di MHII brodo. Alla fine, la piastra sarà allestita nel seguente modo (*Tab.2*):

Tab.2: schema dimostrativo per allestimento della piastra per test dell'efflusso del bromuro di etidio.

PQK4O	A1	A2	A3	→ 100 µl EPI1 a concentrazione doppia
PQK4P	B1	B2	B3	→ 100 µl EPI2 a concentrazione doppia
SH3O	C1	C2	C3	→ 100 µl EPI3 a concentrazione doppia
Ecc..
NO EPI	B5	B6	B7	→ 100 µl MHII brodo
BIANCO (cellule)	C5	C6	C7	→ 100 µl MHII brodo + 100 µl coltura
BIANCO (brodo)	D5	D6	D7	→ 200 µl MHII brodo

9. Terminata l'incubazione, centrifugare nuovamente le provette a 16.300 x g per 7 minuti e rimuovere il sopranatante.

10. Configurare il lettore di piastre con le seguenti impostazioni:

- Excitation 485/12;
- Emission 620/10;
- Optics position = top;
- Gain = 1000

- Sensitivity = 50, 6 reads a 60 secondi l'una dall'altra (5 minuti in totale).

11. Impostato il lettore, tirare fuori dal ghiaccio le provette e lasciare riscaldare a temperatura ambiente per 5 minuti; dopodiché risospendere velocemente ogni pellet in 469 μ l di MHII brodo (le cellule saranno così ad una concentrazione pari a $O.D._{600nm} = 0.8$), vortexare e aggiungere 100 μ l in ogni pozzetto delle rispettive condizioni nella multi-well (nei pozzetti le cellule saranno ad una concentrazione pari a $O.D._{600nm} = 0.4$).
12. Leggere immediatamente.

Una volta ottenuti i valori della fluorescenza, i risultati vengono espressi come “percentuale di inibizione dell'efflusso”, come segue:

- **Variazione di fluorescenza** = fluorescenza al minuto 0 – fluorescenza al minuto 5
- **Percentuale di efflusso** = $\frac{\text{Variazione di fluorescenza} \times 100}{\text{Variazione di fluorescenza NO EPI}}$
- **Percentuale di inibizione di efflusso** = 100 – percentuale di efflusso

3.5 Test a “scacchiera” (Checkerboard assay)

Questo test è stato effettuato per verificare se l’antibiotico (ciprofloxacina) e l’EPI testato, utilizzati in combinazione, sono sinergici tra loro ed è stato effettuato inoculando in piastre microtiter a 96 pozzetti concentrazioni scalari sia di antibiotico che di EPI.

Tutti gli 8 composti elencati nella *Tab.1* (eccetto PQQ4O) sono stati testati in associazione con la ciprofloxacina sul ceppo SA1199B. Solo i quattro composti PQK4P, PQK4F, 6mPQK4F, Cl₂ThQK4P sono stati invece testati in associazione con la ciprofloxacina sul ceppo SAK2378. I composti sono sempre stati testati alle concentrazioni da 0 a 12.5 µg/ml, mentre la ciprofloxacina è stata testata da 0 a 10 µg/ml.

La piastra verrà allestita nel seguente modo:

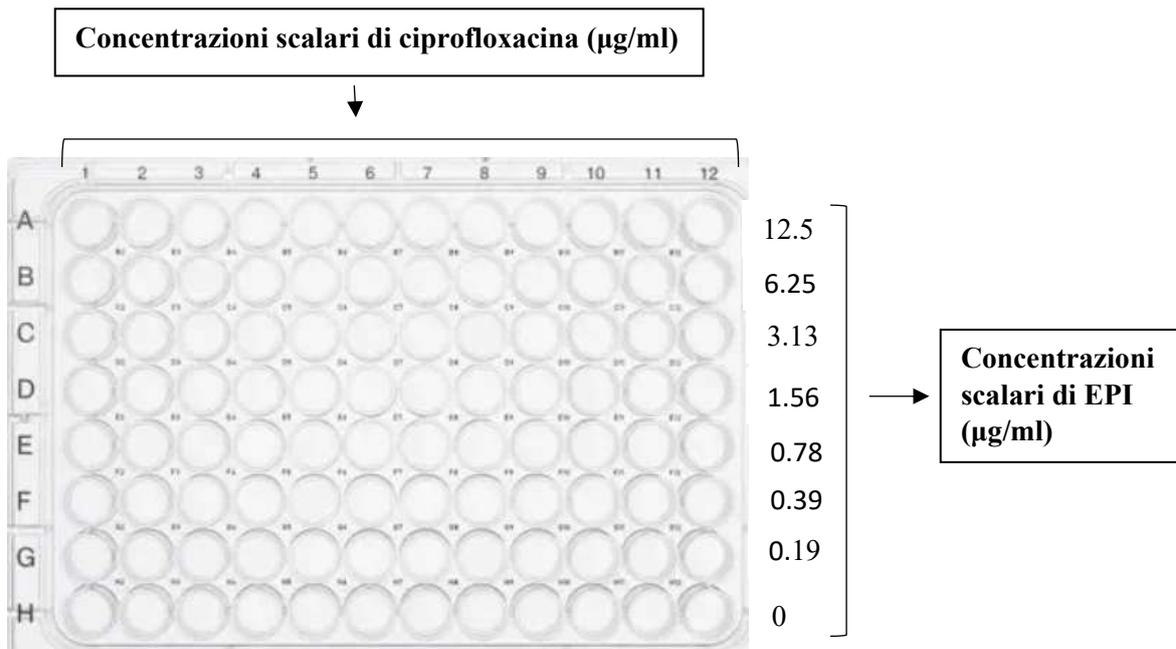


Fig. 6: Rappresentazione dell'allestimento della microtiter per eseguire il checkerboard. Il range di concentrazioni di ciprofloxacina da testare dipende dalla MIC dei singoli ceppi utilizzati.

1. Preparare una soluzione di ciprofloxacina ad una concentrazione quattro volte superiore a quella che si vuole andare a testare, diluita in MHII brodo (40 $\mu\text{g/ml}$ per ottenere poi la concentrazione finale di 10 $\mu\text{g/ml}$).
2. Allestire tante provette quanti sono i composti per preparare le soluzioni di EPI al quadruplo della concentrazione da testare (in questo caso preparare i composti ad una concentrazione di 50 $\mu\text{g/ml}$ per arrivare alla concentrazione finale voluta di 12.5 $\mu\text{g/ml}$).
3. Predisporre la piastra microtiter inoculando 50 μl della soluzione con l'antibiotico nei primi due pozzetti delle colonne 1 e 2.
4. Aggiungere, successivamente, 50 μl di MHII brodo, con la multicanale, partendo dalla colonna 12 fino alla colonna 2. Mescolare, pescare 50 μl dai pozzetti e tornare indietro fino alla colonna 11, in modo tale da lasciare l'ultima colonna senza antibiotico, così da poterla utilizzare come controllo di crescita batterica.
5. Aliquotare 50 μl della soluzione di EPI in ogni pozzetto della riga A. Mescolare con la multicanale, prendere 50 μl dalla prima riga e

aggiungerli ai pozzetti della riga successiva, e così fino alla riga G. Da quest'ultima, una volta prelevati i 50 µl, scartarli, così da avere la riga H come controllo, contenente solo l'antibiotico e il ceppo.

6. Aggiungere a tutti i pozzetti della riga H 50 µl di MHII, mescolare e rimuoverli.
7. Preparare la sospensione batterica. Standardizzare il ceppo, quindi con un tampone prelevare delle colonie dalla piastra e trasferirle in una provetta. Una volta ottenuta una $O.D._{625nm} = 0.1$, diluire 1:100.
8. Aggiungere 50 µl dell'inoculo 1:100 in tutti i pozzetti della microtiter.
9. Lasciare incubare la piastra in termostato a 37°C per 24 ore.

L'EPI viene considerato sinergico con la ciprofloxacina quando è in grado di ridurre il valore di MIC di almeno due diluizioni.

3.6 Saggio di citotossicità

L'effetto citotossico dei composti PQQ4P, PQQ4F, 6mPQQ4F e Cl₂ThQK4P è stato determinato mediante saggi MTT eseguiti su THP-1 (macrofagi) e A549 (cellule epiteliali polmonari) dopo 24 ore di esposizione, con l'aiuto del Dottor Salvatore Vaiasicca. Le cellule sono state seminate alla densità di 1x10⁴ cellule/pozzetto in piastra a 96 pozzetti con fondo piatto in 200 µl di terreno RPMI, e quindi esposte per 24 ore ai composti alle concentrazioni che risultavano sinergiche nei checkerboard. L'analisi colorimetrica MTT ha permesso di misurare i tassi di crescita cellulare attraverso la quantità di cristalli di formazano insolubili intracellulari accumulati, successivamente sciolti utilizzando DMSO e quantificati spettrofotometricamente (O.D.₅₄₀), utilizzando un lettore di micropiastre (Neo Biotech NB-12-0035). La percentuale di cellule vitali è stata calcolata nel seguente modo:

$$\bullet \text{ Percentuale di vitalità cellulare} = \frac{100 \times \text{assorbanza del pozzetto}}{\text{assorbanza del pozzetto di controllo non trattato}}$$

Tutti i test sono stati eseguiti in duplicato biologico e tecnico.

3.7 Curve di battericidia (time-kill curve assay)

Il saggio di battericidia è stato eseguito sul ceppo di *Staphylococcus aureus* SA1199B, utilizzando i composti PQK4F e 6mPQK4F. Sono state testate concentrazioni di ciprofloxacina comprese tra $\frac{1}{4}$ e 1 MIC, da sole e in combinazione con il composto ad una concentrazione pari a 0.78 $\mu\text{g/ml}$. L'attività battericida della combinazione ciprofloxacina + composto viene valutata mediante conteggio delle unità formanti colonia su piastra, dopo 2, 4, 6, 8 e 24 ore di incubazione in termostato a 37°C.

1. Il giorno prima del saggio far crescere il ceppo in MHII brodo, overnight, in termostato a 37°C.
2. Il giorno del saggio preparare un subinoculo del ceppo 1:20 in 5 ml di MHII brodo e far crescere in bagnetto agitato a 37°C fino al raggiungimento della fase esponenziale di crescita ($\text{O.D.}_{625\text{nm}} = 0.585$). Successivamente standardizzare a $\text{O.D.}_{625} = 0.1$ e diluire 1:100.
3. Preparare tante provette quante sono le condizioni come indicato nella seguente tabella:

Tab. 3: condizioni di crescita di *Staphylococcus aureus* SA1199B per il saggio di battericidia.

Controllo	Ceppo 1:100
Cipro ¼ MIC*	Ceppo 1:100 + cipro 1.25 µg/ml
Cipro ½ MIC	Ceppo 1:100 + cipro 2.5 µg/ml
Cipro 1 MIC	Ceppo 1:100 + cipro 5 µg/ml
Cipro ¼ MIC + EPI	Ceppo 1:100 + cipro 1.25 µg/ml + EPI 0.78 µg/ml
Cipro ½ MIC + EPI	Ceppo 1:100 + cipro 2.5 µg/ml + EPI 0.78 µg/ml
Cipro 1 MIC + EPI	Ceppo 1:100 + cipro 5 µg/ml + EPI 0.78 µg/ml

*MIC = 5 µg/ml

4. Mettere le provette in bagnetto agitato a 37°C per permettere la crescita dei microorganismi. A intervalli di 0, 2, 4, 6, 8 e 24 ore prelevare 100µl da ciascuna provetta per tutte le condizioni e allestire le provette necessarie per ottenere le diluizioni da piastrare.
5. Prelevare dalle specifiche provette 10 µl di brodocoltura e piastrare con la tecnica dello spot su piastre di Mannitol Salt Agar in duplicato.
6. Incubare le piastre a 37°C per 24 ore.
7. Contare le CFU/ml per ogni intervallo di tempo.
8. Calcolare la media e la deviazione standard.

4. RISULTATI

4.1 Determinazione della MIC dei derivati della chinolina

La minima concentrazione inibente è stata analizzata sugli 8 composti per i ceppi SA1199, SA1199B, e SAK1902. Per tutti i ceppi testati non è stato evidenziato alcun effetto inibente da parte dei composti fino a concentrazioni $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ (Tab.4).

Tab.4: valori di MIC relativi ai composti testati.

MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
COMPOSTO	SA1199	SA1199B	SAK1902
PQK4O	25	25	50
PQK4P	25	50	>50
SH3O	25	25	25
PQK4F	>50	>50	>50
6mPQK4P	>50	>50	>50
6mPQK4F	>50	>50	>50
Cl ₂ ThPQK4O	25	25	25
Cl ₂ ThPQK4P	>50	>50	>50

4.2 Determinazione della MIC dell'associazione ciprofloxacina – derivati della chinolina

La MIC in associazione è stata eseguita con concentrazione fissa di EPI (12.5 µg/ml) in combinazione a concentrazioni scalari di ciprofloxacina (CPX) sui ceppi SA1199, SA1199B e SAK1902. I composti PQK4O, PQK4P e PQK4F hanno abbassato la MIC della ciprofloxacina in SA1199B di quattro diluizioni (da 5 a 0.31 µg/ml); tutti gli altri hanno provocato un calo di tre diluizioni (fino a 0.62 µg/ml). Nei confronti del ceppo wild type di *S. aureus* SA1199, invece, non si ha mai una significativa diminuzione della MIC (> 1 diluizione) (Tab.5).

Tab.5: valori delle MIC eseguite con concentrazioni scalari di ciprofloxacina e EPI a concentrazione fissa (12.5 µg/ml) sui ceppi SA1199 e SA1199B. Sono evidenziati in giallo i 3 composti in grado di abbassare la MIC della CPX di quattro diluizioni.

MIC CPX (µg/ml) E CPX + EPI (12.5 µg/ml)		
COMPOSTO	SA1199	SA1199B
CPX	0,16	5
PQK4O	0,08	0,31
PQK4P	0,08	0,31
SH3O	0,16	0,62
PQK4F	0,16	0,31
6mPQK4P	0,16	0,62
6mPQK4F	0,16	0,62
Cl ₂ ThPQK4O	0,08	0,62
Cl ₂ ThPQK4P	0,08	0,62

Nel ceppo SAK1902 ($\Delta norA$) i composti non sono mai stati in grado di diminuire la MIC della ciprofloxacina (Tab.6). Per il composto Cl₂ThPQK4O si è notata assenza di crescita anche in assenza di ciprofloxacina.

Tab.6: risultati della MIC in associazione (CPX + composti a concentrazione fissa di 12.5 $\mu\text{g/ml}$) sul ceppo delecto della pompa di efflusso NorA, SAK1902. NC: nessuna crescita visibile in alcun pozzetto.

MIC CPX + EPI (12.5 $\mu\text{g/ml}$) CON CPX ($\mu\text{g/ml}$)	
COMPOSTO	SAK1902
CPX	0.078
PQK4O	0,15
PQK4P	0,078
SH3O	0,15
PQK4F	0,31
6mPQK4P	0,15
6mPQK4F	0,31
Cl ₂ ThPQK4O	NC
Cl ₂ ThPQK4P	0,15

4.3 Test dell'efflusso di bromuro di etidio (EtBr)

Il test dell'efflusso di bromuro di etidio è stato eseguito come test di screening con tutti i composti elencati precedentemente sul ceppo SA1199B. Mostrano tutti una percentuale di inibizione dell'efflusso $\geq 65\%$, a parte Cl₂ThPQK4P che mostra una percentuale del 58%; PQQ4O, in particolare ha mostrato la maggior percentuale di inibizione (94,53%) (Tab.7 e Fig.7).

Tab.7: composti testati come inibitori della pompa di efflusso NorA. Vengono riportati: lettura della fluorescenza a 0 e 5 minuti; differenza della fluorescenza; percentuale di efflusso; percentuale di inibizione di efflusso; deviazione standard.

Compound	Reading at:		Fluorescence difference	% efflux	% efflux inhibition	% efflux inhibition MEDIA	% efflux inhibition DEV.ST
	0 min	5 min					
PQQ4O (C+)	1248	1033	215	43,05741	56,9425901	62,2162884	13,51221
	1344	1105	239	47,86382	52,1361816		
	1348	1236	112	22,42991	77,5700935		
PQK4O	1070	1056	14	2,803738	97,1962617	94,5260347	2,312484
	956	922	34	6,809079	93,1909212		
	1059	1025	34	6,809079	93,1909212		
PQK4P	978	929	49	9,813084	90,1869159	78,3711615	10,29185
	1149	1017	132	26,43525	73,564753		
	1213	1070	143	28,63818	71,3618158		
SH3O	1125	1132	-7	-1,40187	101,401869	90,1201602	9,783066
	1220	1145	75	15,02003	84,9799733		
	1264	1184	80	16,02136	83,9786382		
PQK4F	1011	991	20	4,00534	95,9946595	79,4392523	16,139
	1126	1019	107	21,42857	78,5714286		
	1277	1096	181	36,24833	63,7516689		
6mPQK4P	957	891	66	13,21762	86,7823765	71,6955941	13,66569
	1078	919	159	31,84246	68,1575434		
	1219	1020	199	39,85314	60,1468625		

6mPQK4F	1053	928	125	25,03338	74,9666222	66,6889186	7,772666
	1034	832	202	40,45394	59,5460614		
	1086	914	172	34,44593	65,5540721		
Cl2ThPQK4O	1184	1066	118	23,63151	76,3684913	68,1575434	13,19485
	1350	1115	235	47,06275	52,9372497		
	1396	1272	124	24,83311	75,1668892		
Cl2ThPQK4P	1093	914	179	35,8478	64,1522029	58,811749	5,989067
	1221	1021	200	40,0534	59,9465955		
	1250	1012	238	47,66355	52,3364486		
Cells (NO EPI)	1390,667	891,33333	499,3333333	100	0	/	/

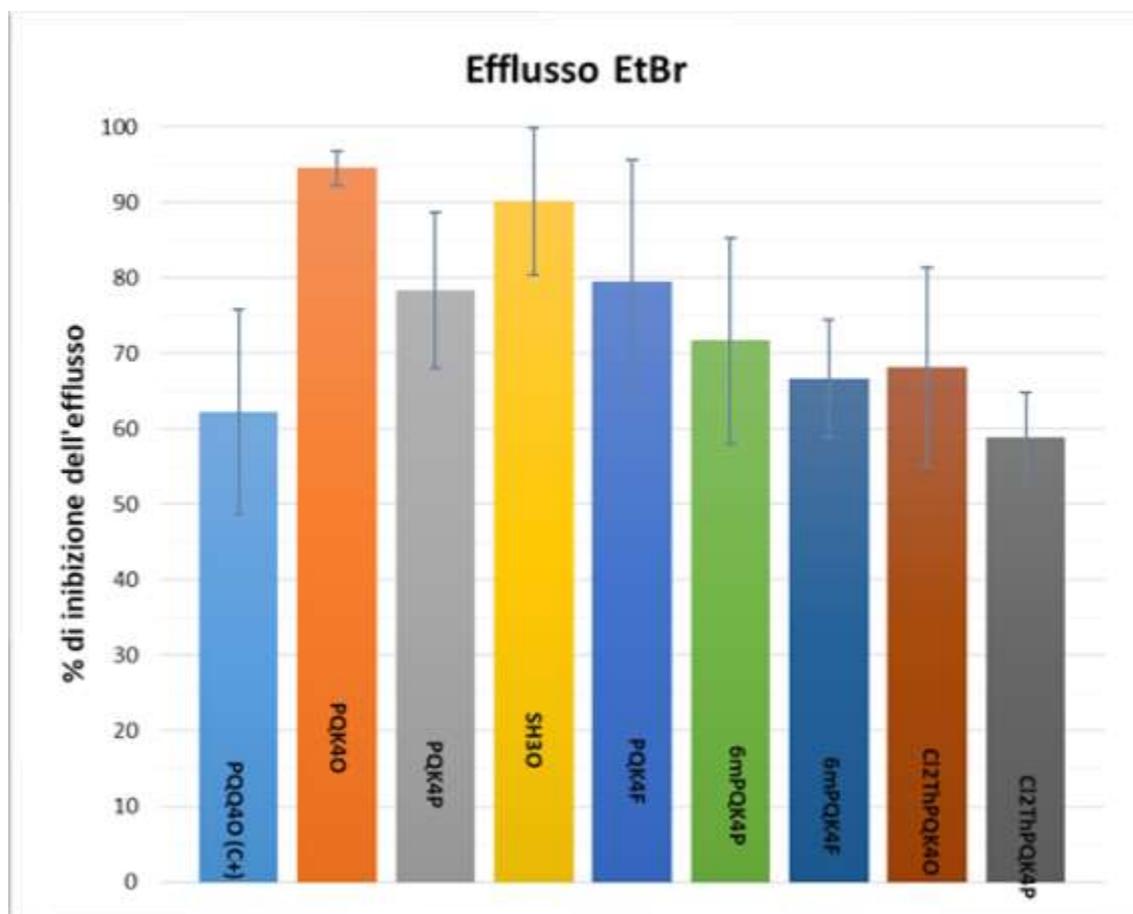


Fig. 7: percentuale di inibizione dell'efflusso di EtBr per ogni composto testato. Il composto PQQ4O è stato utilizzato come controllo positivo.

4.4 Test di Checkerboard

I checkerboard sono stati eseguiti per tutti i composti sul ceppo SA1199B. Successivamente i 4 composti risultati più attivi sono stati testati sul ceppo SAK2378. Tra i composti valutati su SA1199B, quelli più attivi, che hanno provocato un abbassamento della MIC della ciprofloxacina fino a quattro diluizioni, sono PQK4P e PQK4F; 6mPQK4F e Cl₂ThQK4O hanno portato ad una diminuzione della MIC di due diluizioni (Tab.8).

Tab.8: risultati dei checkerboard eseguiti sul ceppo SA1199B. In giallo sono evidenziati i composti che hanno causato un abbassamento della MIC fino a quattro diluizioni.

Concentrazione EPI (µg/ml)	MIC CPX (µg/ml)							
	PQK4O	PQK4P	PQK4F	SH3O	6mPQK4P	6mPQK4F	Cl ₂ ThQK4P	Cl ₂ ThQK4O
0	10	10	10	5	5	5	5	5
0,19	5	5	5	5	2,5	2,5	2,5	2,5
0,39	5	5	5	5	2,5	2,5	2,5	2,5
0,78	5	5	5	5	2,5	1,25	2,5	2,5
1,56	5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5
3,13	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5	1,25	2,5	1,25
6,25	2,5	1,25	0,6	2,5	2,5	1,25	2,5	1,25
12,5	2,5	1,25	0,6	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25

Testati su SAK2378, i composti PQK4F, PQK4P, Cl₂ThQK4O e 6mPQK4F, hanno mostrato a concentrazioni molto basse (3.13 µg/ml) una buona attività sinergica con la ciprofloxacina, abbassandone la MIC fino a 3 diluizioni, a parte

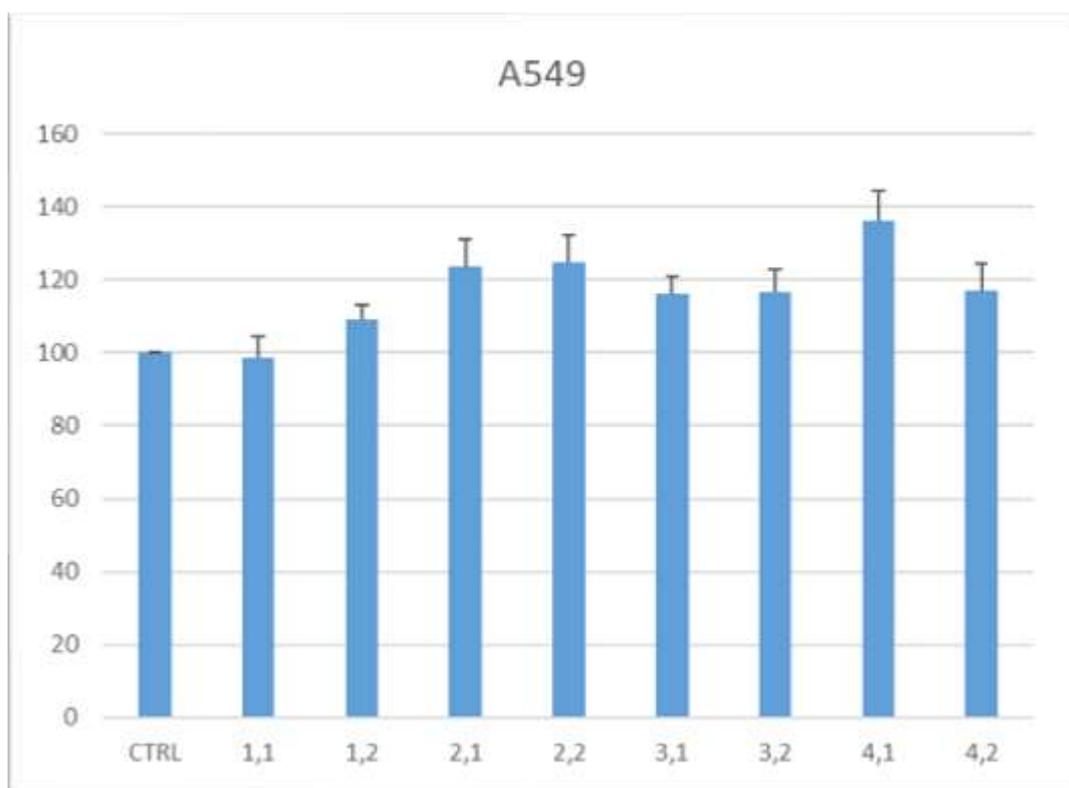
Cl₂ThQK4O che necessita di una concentrazione più elevata (6.25 µg/ml) per raggiungere lo stesso risultato degli altri tre (Tab.9).

Tab.9: risultati dei checkerboard eseguiti sul ceppo SAK2378. In giallo sono evidenziati i composti che alla concentrazione di 3.13 µg/ml hanno portato ad una diminuzione della MIC di tre diluizioni; in blu Cl₂ThQK4O che necessita di una concentrazione maggiore (6.25 µg/ml) per raggiungere lo stesso risultato.

Concentrazione EPI (µg/ml)	MIC CPX (µg/ml)			
	PQK4F	PQK4P	Cl ₂ ThQK4O	6mPQK4F
0	0,625	0,625	0,625	0,625
0,19	0,313	0,313	0,313	0,313
0,39	0,313	0,313	0,313	0,313
0,78	0,156	0,313	0,313	0,156
1,56	0,156	0,156	0,313	0,156
3,13	0,078	0,078	0,156	0,078
6,25	0,078	0,078	0,078	0,078
12,5	0,078	0,078	NC	0,078

4.5 Saggi di citotossicità

I saggi di citotossicità sono stati effettuati sui quattro composti PQQ4P, PQQ4F, 6mPQQ4F e Cl₂ThQK4P, risultati più attivi nei test di checkerboard, a due diverse concentrazioni: 6.25 e 0.78 µg/ml. Sulle cellule A549 non c'è alcun effetto tossico per nessuna delle due concentrazioni testate; sulle cellule THP-1 si nota un piccolo calo di vitalità, soprattutto per la concentrazione più alta (6.25 µg/ml), ma rimane sempre sopra l'80%.



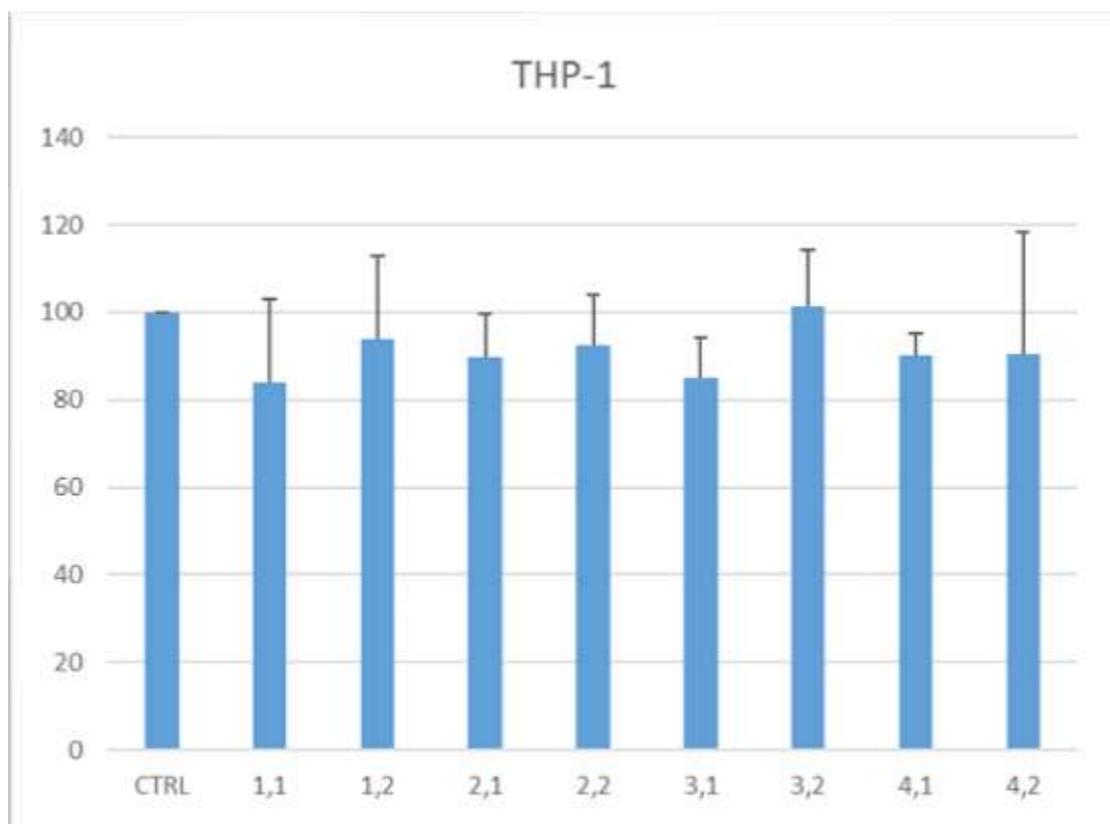


Fig.8: percentuale di vitalità sulla linea cellulare A549 (cellule epiteliali), sopra, e sulla linea cellulare THP-1 (macrofagi), sotto, dopo il trattamento con i composti a due diverse concentrazioni, rispetto al controllo non trattato. Sull'asse delle ascisse sono riportati i composti, sulle ordinate è riportata la percentuale di vitalità cellulare. 1.x = Cl₂ThQK4P, 2.x = PQK4F, 3.x = 6mPQK4F, 4.x = PQK4P. x.1 = composto a 6.25 µg/ml; x.2 = composto a 0.78 µg/ml.

4.6 Determinazione dell'attività dell'associazione ciprofloxacina – derivati della chinolina mediante curve di battericidia

I due composti testati sul ceppo SA1199B in saggi di battericidia in associazione con la ciprofloxacina sono PQK4F e 6mPQK4F, entrambi alla concentrazione di 0.78 µg/ml.

Il composto PQK4F in combinazione con la ciprofloxacina a $\frac{1}{4}$ x MIC è in grado di migliorare l'attività dell'antibiotico da 4 a 8 ore di trattamento, con una diminuzione dei sopravvissuti di 1-1.5 logaritmi rispetto all'antibiotico da solo. La combinazione composto + ciprofloxacina $\frac{1}{2}$ x MIC ha un effetto battericida paragonabile a quello della ciprofloxacina da sola a 1 x MIC. Infine, la combinazione composto + ciprofloxacina a 1 x MIC è stata in grado di potenziare ulteriormente l'attività a 24 ore di trattamento, rispetto all'antibiotico da solo (*Fig.9*).

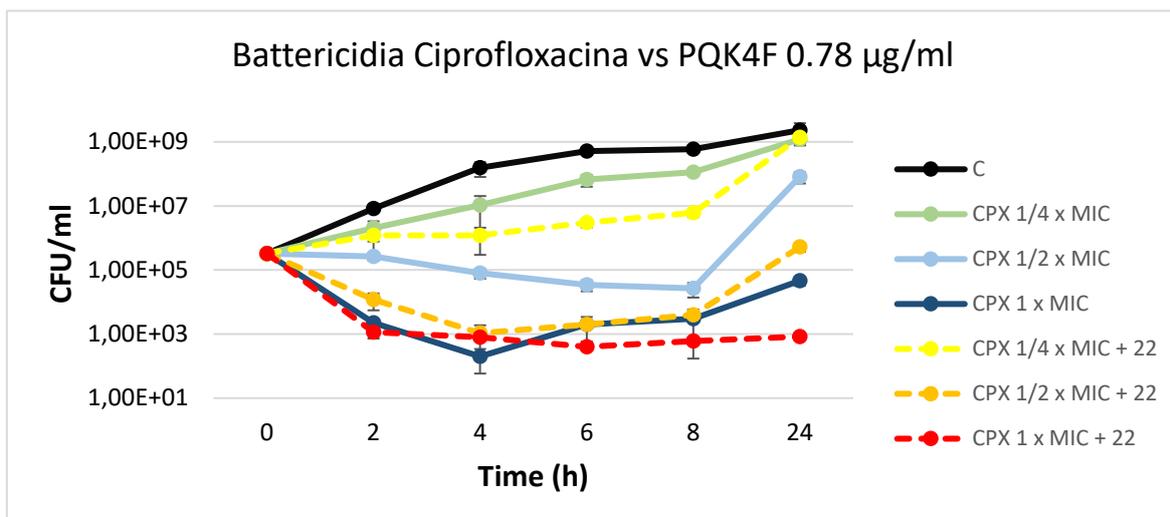


Fig.9: curve di battericidia di ciprofloxacina a $\frac{1}{2}$ x, $\frac{1}{4}$ x, 1 x MIC da sola e in associazione al composto PQQ4F alla concentrazione di 0.78 µg/ml sul ceppo SA1199B. Sull'asse delle ascisse sono riportati gli intervalli di tempo sui quali è stata effettuata l'analisi della crescita microbica; sull'asse delle ordinate è riportata in scala logaritmica la concentrazione microbica (CFU/ml).

Per quanto riguarda l'altro composto testato, 6mPQQ4F, l'attività battericida della ciprofloxacina nel tempo è potenziata ad una concentrazione corrispondente a $\frac{1}{2}$ x MIC, in cui si nota una diminuzione di crescita microbica di circa 1 log dopo le 6 ore di trattamento. La combinazione ciprofloxacina 1 x MIC + 6mPQQ4F ha aumentato l'attività battericida di circa 1 logaritmo a 24 ore. Non si nota alcuna differenza, invece, tra la presenza e l'assenza del

composto a una concentrazione di ciprofloxacina corrispondente a $\frac{1}{4}$ x MIC (Fig.10).

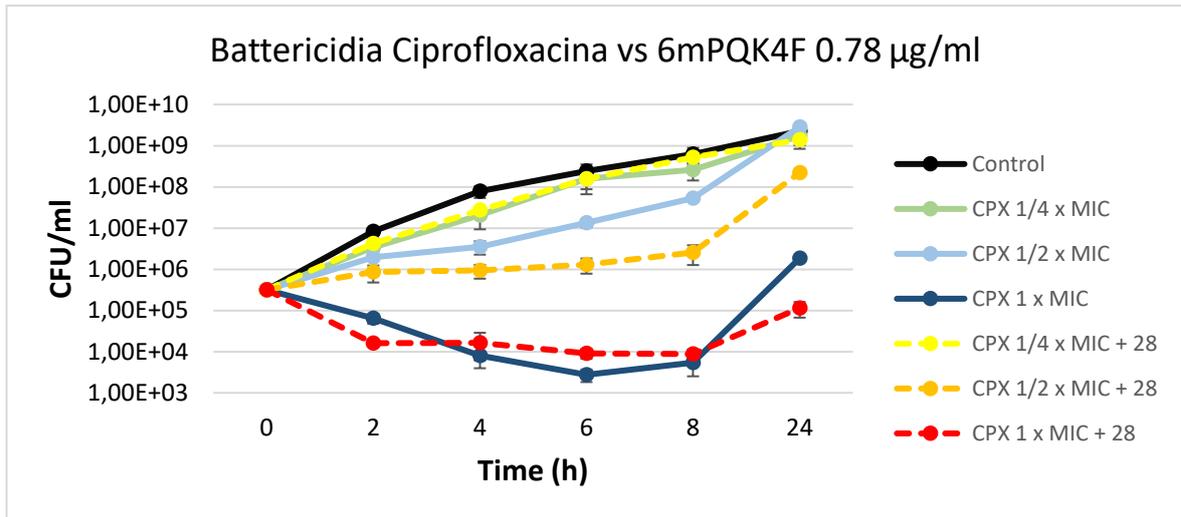


Fig.10: curve di battericidia di ciprofloxacina a $\frac{1}{2}$ x, $\frac{1}{4}$ x, 1 x MIC da sola e in associazione al composto 6mPQK4F alla concentrazione di 0.78 μ g/ml sul ceppo SA1199B. Sull'asse delle ascisse sono riportati gli intervalli di tempo sui quali è stata effettuata l'analisi della crescita microbica; sull'asse delle ordinate è riportata in scala logaritmica la concentrazione microbica (CFU/ml).

5. DISCUSSIONE

L'emergere delle antibiotico-resistenze tra i più importanti patogeni batterici è riconosciuta come una delle principali minacce per la salute pubblica (38).

La resistenza agli antibiotici può essere intrinseca, quindi la capacità di resistere all'azione di un determinato antibiotico come risultato di caratteristiche strutturali o funzionali intrinseche, o acquisita, tramite mutazioni nei geni cromosomici o per trasferimento orizzontale (HGT) (6).

I principali meccanismi di antibiotico-resistenza sono: limitazione dell'assorbimento di un farmaco, modificazione di un bersaglio farmacologico, inattivazione di una molecola antimicrobica ed efflusso attivo dell'antibiotico (48).

Recentemente, un gruppo selezionato di batteri è stato descritto con l'acronimo E.S.K.A.P.E. e causa la maggior parte delle infezioni nosocomiali. Il termine si riferisce alle specie *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (2).

Oltre ad un elevato rischio infettivo, queste specie sono caratterizzate soprattutto da una marcata propensione all'antibiotico resistenza, anche a diverse classi di antibiotici contemporaneamente. La multi-resistenza, causata

da un uso eccessivo di farmaci o da un uso inappropriato di antibiotici, è considerata una tra le principali minacce alla salute pubblica globale (51).

Tra questi, *Staphylococcus aureus* è uno dei patogeni più significativi, che vive come commensale e viene trasmesso sia in ambito sanitario che comunitario. È una delle principali cause di batteriemia, endocardite, infezione della pelle e dei tessuti molli, infezioni ossee, articolari e infezioni nosocomiali (57).

La capacità di *S. aureus* di causare tutti questi diversi tipi di infezione è legata all'espressione di un'ampia gamma di geni accessori che comprendono quelli codificanti proteine associate alla parete cellulare (26).

Il trattamento terapeutico di queste infezioni può essere complicato, poiché molti ceppi di *S. aureus* sono portatori di più geni di resistenza agli antibiotici, compresi quelli che codificano per proteine transmembrana, note come pompe di efflusso (9). Queste ultime sono in grado di estrarre antibiotici ed in particolare la pompa di efflusso NorA di *S. aureus* presenta come target principali i fluorochinoloni, ma anche coloranti, come EtBr (29).

L'inibizione di tali pompe è una strategia promettente per aggirare questo meccanismo di resistenza (50).

Lo scopo di questa tesi è stato, quindi, quello di testare composti chimici sintetizzati dal Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di

Perugia come potenziali inibitori della pompa di efflusso NorA. Questi composti sono stati sintetizzati partendo da un nucleo di 2-fenilchinazolina alla quale sono state apportate modifiche in diverse posizioni del core sfruttando le informazioni sulla relazione struttura-attività disponibili intorno alla relativa classe di chinolina (49).

Inizialmente tutti i composti sono stati sottoposti alla valutazione tramite MIC sui ceppi di *Staphylococcus aureus* SA1199 (wild type), SA1199B (*norA* ++)
e SAK1902 (Δ *norA*) per andare a verificarne l'eventuale attività battericida, poiché EPI ideali non dovrebbero possedere attività antibatterica a basse concentrazioni. La determinazione della MIC è una prova quantitativa che permette, solitamente, di definire con precisione qual è la concentrazione più bassa di antibiotico che è in grado di inibire la crescita visibile del ceppo testato. Tutti i composti hanno mostrato valori di MIC ≥ 25 μ g/ml, dimostrando quindi di non avere attività antimicrobica al di sotto di questa concentrazione. Per eseguire un primo screening sulla possibile sinergia tra le molecole e la ciprofloxacina su *S. aureus*, sono stati testati i composti alla concentrazione sub-inibitoria di 12.5 μ g/ml in combinazione con concentrazioni scalari di ciprofloxacina sui ceppi SA1199 e SA1199B. Composti in grado di diminuire la MIC della ciprofloxacina sul ceppo SA1199B, che sovra-esprime la pompa di efflusso NorA, possono essere considerati promettenti inibitori, tenendo

conto che però non devono abbassare la MIC della ciprofloxacina sul ceppo SA1199 per più di due diluizioni, in quanto ciò suggerirebbe che i composti non sono substrati della pompa di efflusso NorA e che l'effetto sinergico osservato non è dovuto alla competizione del substrato con la ciprofloxacina durante l'efflusso. I composti risultati più attivi sono PQK4O, PQK4P e PQK4F che su SA1199B hanno causato una diminuzione di quattro diluizioni della MIC della ciprofloxacina: dal valore iniziale di 5 µg/ml a 0.31 µg/ml.

Considerando il fatto che l'effetto sinergico con la ciprofloxacina potrebbe verificarsi in modi diversi, con meccanismi non specifici come l'alterazione della permeabilità o la depolarizzazione della membrana di *S. aureus*, è stata studiata la capacità dei composti di inibire l'efflusso di bromuro di etidio (EtBr) su SA1199B.

Il bromuro di etidio è un substrato della pompa NorA (29) ed essendo una molecola intercalante degli acidi nucleici, quando entra nella cellula emette fluorescenza, quindi cellule fluorescenti indicano una elevata concentrazione intracellulare di EtBr, dimostrando una inibizione della NorA. Da questa prova, valutando la variazione di fluorescenza per 5 minuti e poi calcolando la percentuale di efflusso inibita, si è visto che tutti i composti mostrano una inibizione di efflusso di EtBr $\geq 65\%$, mostrando una forte interferenza con il processo di efflusso dovuto alla pompa NorA, e paragonabile alla percentuale

di efflusso del composto PQQ4O utilizzato come controllo positivo, essendo stato già descritto come EPI.

Al fine di valutare in maniera più approfondita la sinergia tra i composti in esame a differenti concentrazioni e la ciprofloxacina, sono stati eseguiti saggi di checkerboard sui ceppi sovra-espressanti *norA* SA1199B e SAK2378: sul primo ceppo sono stati testati tutti i composti, sul secondo solo i quattro risultati più attivi dal primo test.

Dai saggi eseguiti sul ceppo SA1199B sono risultati più efficaci i composti PQK4P, PQK4F, 6mPQK4F e Cl₂ThQK4O, in particolar modo PQK4F ha mostrato una eccellente attività sinergica che riduce la MIC della ciprofloxacina fino ad un massimo di quattro diluizioni, a partire da una concentrazione pari a 1.56 µg/ml. Il composto PQK4P mostra un effetto sinergico simile al composto precedente, causando però una diminuzione della MIC fino a tre diluizioni. I composti 6mPQK4F e Cl₂ThQK4O causano un abbassamento della MIC fino ad un massimo di due diluizioni, ma il primo risulta più attivo a partire da una concentrazione molto bassa, uguale a 0.78 µg/ml. Gli altri composti, purtroppo, non hanno mostrato un significativo effetto sinergico per concentrazioni ≤ 6.25 µg/ml.

I checkerboard eseguiti sul ceppo SAK2378, che sovra-esprime la pompa di efflusso NorA, sono stati confrontati con la MIC in associazione di

ciprofloxacina del ceppo SAK1902 ($\Delta norA$): i composti in grado di ripristinare la MIC dell'antibiotico su SAK2378 allo stesso livello della MIC di SAK1902, probabilmente esercitano un'inibizione specifica dell'efflusso di NorA. I checkerboard eseguiti sui quattro composti risultati più attivi sul ceppo SA1199B hanno mostrato che alla concentrazione di 3.13 $\mu\text{g/ml}$ i composti sono in grado di ridurre la MIC dell'antibiotico di tre diluizioni. I composti PQK4P, PQK4F e 6mPQK4F hanno lo stesso grado di sinergismo a 0.78 $\mu\text{g/ml}$; il composto Cl₂ThQK4O presenta lo stesso livello di sinergismo degli altri ad una concentrazione di 6.25 $\mu\text{g/ml}$.

Considerando che, per quanto ad uno stadio ancora iniziale, questo studio sarà finalizzato all'introduzione nella pratica clinica di questi composti in associazione con antibiotici, è importante assicurarsi che le molecole in esame non abbiano evidenti effetti tossici nei confronti dell'organismo umano. Per questo motivo, in collaborazione con il Dr. Salvatore Vaiasicca, saggi di citotossicità sono stati effettuati sui quattro composti più attivi come inibitori, che sono PQK4P, PQK4F, 6mPQK4F e Cl₂ThQK4O. La valutazione è stata effettuata su due diversi tipi di linee cellulari umane: THP-1 (macrofagi) e A549 (cellule epiteliali del tessuto polmonare). Tutti i composti testati non hanno ridotto la sopravvivenza delle cellule della linea A549. Un effetto trascurabile si è visto sulla linea cellulare THP-1: alla concentrazione di 0.78

$\mu\text{g/ml}$, alla quale i composti hanno mostrato avere già un effetto sinergico con la ciprofloxacina dalle precedenti analisi, nessuno dei composti ha causato una diminuzione della sopravvivenza al di sotto del 10%. Sempre considerando la linea cellulare THP-1, queste cellule hanno mantenuto una elevata percentuale di sopravvivenza (84%) anche alla più alta concentrazione di composto testata, 6.25 $\mu\text{g/ml}$.

Infine, i composti PQK4F e 6mPQK4F che hanno mostrato un maggiore sinergismo con la ciprofloxacina e che quindi sono risultati migliori, sono stati sottoposti alla “time-kill curve”, o saggio di battericidia, per valutarne l’attività in associazione con la ciprofloxacina. Il ceppo utilizzato è SA1199B, utilizzato in associazione con la ciprofloxacina, e monitorando la crescita batterica entro 24 ore. Sebbene testato alla bassa concentrazione di 0.78 $\mu\text{g/ml}$, quando in combinazione con la ciprofloxacina a $\frac{1}{4}$ della MIC, il composto PQK4F è in grado di migliorare l’attività della ciprofloxacina da 4 a 8 ore di trattamento, e si nota una diminuzione di 1/1.5 logaritmi dei sopravvissuti rispetto all’antibiotico da solo. La combinazione del composto con la ciprofloxacina a $\frac{1}{2}$ x MIC ha esercitato un effetto battericida paragonabile a quello della sola ciprofloxacina a 1 x MIC, mentre la combinazione composto + ciprofloxacina a 1 x MIC è stata in grado di potenziare ulteriormente l’attività a 24 ore di trattamento, rispetto all’antibiotico da solo.

Il composto 6mPQK4F testato anch'esso alla concentrazione di 0.78 µg/ml in combinazione con la ciprofloxacina ha mostrato che l'attività battericida della ciprofloxacina nel tempo è potenziata ad una concentrazione corrispondente a $\frac{1}{2}$ x MIC, dove si ha circa 1 logaritmo di diminuzione di CFU/ml da 6 ore di trattamento. Questo composto è in grado di migliorare l'attività battericida a 24 ore di trattamento in associazione con la ciprofloxacina ad una concentrazione di 1 x MIC e rispetto all'antibiotico da solo alla stessa concentrazione, mostra una diminuzione di CFU/ml di circa 1 logaritmo. Non è stata evidenziata alcuna differenza tra la presenza e l'assenza del composto ad una concentrazione di ciprofloxacina pari a $\frac{1}{2}$ x MIC. Questi risultati mostrano i vantaggi di una combinazione tra ciprofloxacina e un EPI NorA, evidenziando come, in presenza di composti non antibiotici ad una concentrazione molto bassa, PQK4F e 6mPQK4F, l'uso di una concentrazione ridotta di ciprofloxacina può raggiungere lo stesso effetto battericida sul ceppo resistente di *Staphylococcus aureus* SA1199B entro 24 ore.

I composti analizzati hanno dato dei buoni risultati, in particolar modo, non mostrando una significativa tossicità nelle cellule umane, e potrebbero essere utilizzati per futuri studi sugli animali per poterne dimostrare l'efficacia *in vivo*. Inoltre, gli EPI utilizzati in combinazione con antibiotici possono aumentare la potenza antibatterica.

È stato anche dimostrato che gli EPI sono in grado di ridurre la produzione di biofilm e bloccano la tolleranza antibatterica dei biofilm batterici (49): bloccando le pompe di efflusso si potrebbe diminuire la produzione di biofilm.

Queste nuove scoperte possono essere utili per costruire nuovi modelli farmacoforici che saranno utilizzati per eseguire studi di riposizionamento dei farmaci e per test di screening virtuali per identificare nuovi EPI contro la pompa di efflusso NorA, o anche contro altre pompe di efflusso dello stesso *Staphylococcus aureus*, ma anche per altri batteri che presentano pompe di efflusso, le quali sono uno dei principali meccanismi dell'antibiotico-resistenza.

Le pompe di efflusso sono possibili bersagli antibatterici e l'identificazione e lo sviluppo di nuovi potenti EPI è una strategia promettente e valida nel trattamento di infezioni causate da patogeni antibiotico-resistenti.

BIBLIOGRAFIA

1. **Aeschlimann, J. R., Kaatz, G. W., & Rybak, M. J. 1999.** The effects of NorA inhibition on the activities of levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin against two genetically related strains of *Staphylococcus aureus* in an in-vitro infection model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(3), 343-349.
2. **Akova, Murat, 2016.** Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, 7(3), 252-266
3. **Augustin, j., rosenstein, r., wieland, b., schneider, u., schnell, n., engelke, g., ... & götz, f. 1992.** genetic analysis of epidermin biosynthetic genes and epidermin-negative mutants of *staphylococcus epidermidis*. *european journal of biochemistry*, 204(3), 1149-1154.
4. **Bhaskar, B. V., Babu, T. M. C., Reddy, N. V., & Rajendra, W. 2016.** Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. *Drug design, development and therapy*, 10, 3237.
5. **Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. 2011.** Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence

- factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *Journal of pathogens*, 2011.
6. **Blair**, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. **2015**. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), 42-51.
 7. **Bush** K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann N Y Acad Sci*. **2013** Jan; 1277:84-90.
 8. **Cannalire**, R., Mangiaterra, G., Felicetti, T., Astolfi, A., Cedraro, N., Massari, S., ... & Sabatini, S. **2020**. Structural Modifications of the Quinolin-4-yloxy Core to Obtain New Staphylococcus aureus NorA Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7037.
 9. **Costa**, L. M., de Macedo, E. V., Oliveira, F. A. A., Ferreira, J. H. L., Gutierrez, S. J. C., Peláez, W. J., ... & Barreto, H. M. **2016**. Inhibition of the NorA efflux pump of Staphylococcus aureus by synthetic riparins. *Journal of applied microbiology*, 121(5), 1312-1322.
 10. **Costa**, S. S., Viveiros, M., Amaral, L., & Couto, I. **2013**. Multidrug efflux pumps in Staphylococcus aureus: an update. *The open microbiology journal*, 7, 59.

11. **Cox, G., & Wright, G. D. 2013.** Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 287-292.
12. **Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM., 2000.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.*, vol.13, no.1:16-34
13. **Felicetti, T., Cannalire, R., Pietrella, D., Latacz, G., Lubelska, A., Manfroni, G., ... & Sabatini, S. 2018.** 2-Phenylquinoline *S. aureus* NorA efflux pump inhibitors: evaluation of the importance of methoxy group introduction. *Journal of medicinal chemistry*, 61(17), 7827-7848.
14. **Felicetti, T., Mangiaterra, G., Cannalire, R., Cedraro, N., Pietrella, D., Astolfi, A., ... & Sabatini, S. 2020.** C-2 phenyl replacements to obtain potent quinoline-based *Staphylococcus aureus* NorA inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 35(1), 584-597.
15. **Fitzgerald, J. R. 2014.** Evolution of *Staphylococcus aureus* during human colonization and infection. *Infection, genetics and evolution*, 21, 542-547.
16. **Foster, T. J. 2005.** Immune evasion by staphylococci. *Nature reviews microbiology*, 3(12), 948-958.

17. **Foster, TJ 2017.** Resistenza agli antibiotici in *Staphylococcus aureus*. Stato attuale e prospettive future. *Revisioni microbiologiche FEMS*, 41 (3), 430-449.
18. **Fournier, B., Aras, R., & Hooper, D. C. 2000.** Expression of the multidrug resistance transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. *Journal of Bacteriology*, 182(3), 664-671.
19. **Fournier, B., Truong-Bolduc, Q. C., Zhang, X., & Hooper, D. C. 2001.** A mutation in the 5' untranslated region increases stability of norA mRNA, encoding a multidrug resistance transporter of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 183(7), 2367-2371.
20. **Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. 2017.** Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369-378
21. **Ghaly, T. M., Geoghegan, J. L., Tetu, S. G., & Gillings, M. R. 2020.** The peril and promise of integrons: beyond antibiotic resistance. *Trends in microbiology*, 28(6), 455-464.
22. **Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J. C., Lina, G., Bes, M., ... & Etienne, J. 2002.** Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal

- necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *The Lancet*, 359(9308), 753-759
23. **Hauck, C. R., & Ohlsen, K. 2006.** Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Current opinion in microbiology*, 9(1), 5-11.
24. **Hooper DC, Jacoby GA. 2015.** Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci.*, articolo 1354:12-31.
25. **Huddleston, J. R. 2014.** Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and drug resistance*, 7, 167.
26. **Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., ... & Vandenesch, F. 2002.** Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and immunity*, 70(2), 631.
27. **Jenul, C., & Horswill, A. R. 2019.** Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Gram-Positive Pathogens*, 669-686.
28. **Kaatz, G. W., & Seo, S. M. 1997.** Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(12), 2733-2737.

29. **Kaatz, G. W., Seo, S. M., & Ruble, C. A. 1993.** Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(5), 1086-1094.
- Kumar, S., Lekshmi, M., Parvathi, A., Ojha, M., Wenzel, N., & Varela, M. F. (2020). Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. *Microorganisms*, 8(2), 266.
30. **Kumar, S., Lekshmi, M., Parvathi, A., Ojha, M., Wenzel, N., & Varela, M. F. 2020.** Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. *Microorganisms*, 8(2), 266.
31. **Lamut, A., Peterlin Mašič, L., Kikelj, D., & Tomašič, T. 2019.** Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Medicinal research reviews*, 39(6), 2460-2504.
32. **Li, X. Z., & Nikaido, H. 2004.** Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64(2), 159-204.
33. **Lina, G., Bohach, G. A., Nair, S. P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., & Mariuzza, R. 2004.** Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *The Journal of infectious diseases*, 189(12), 2334-2336.

34. **Maranan, M. C.,** Moreira, B., Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. **1997.** Antimicrobial resistance in staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. *Infectious disease clinics of North America, 11(4)*, 813-849.
35. **Martinez, J. L. 2014.** General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies, 11*, 33-39.
36. **Mehraj, J.,** Witte, W., Akmatov, M. K., Layer, F., Werner, G., & Krause, G. **2016.** Epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal carriage patterns in the community. *How to Overcome the Antibiotic Crisis*, 55-87.
37. **Morales, G.,** Picazo, J. J., Baos, E., Candel, F. J., Arribi, A., Peláez, B., ... & Sánchez-García, M. **2010.** Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases, 50(6)*, 821-825.
38. **Munita Jose M. and Arias Cesar A. 2016.** Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.*; vol. 4, no. 2: 10.1128.
39. **Neyfakh, A. A. 2002.** Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Molecular microbiology, 44(5)*, 1123-1130.
40. **Ng, E. Y.,** Trucksis, M., & Hooper, D. C. **1994.** Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*,

- a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(6), 1345-1355.
41. **Novick, R. P., & Jiang, D. 2003.** The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology*, 149(10), 2709-2717.
42. **Otto, M. 2014.** *Staphylococcus aureus* toxins. *Current opinion in microbiology*, 17, 32-37.
43. **Pantosti, A., Sanchini, A., & Monaco, M. 2007.** Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*.
44. **Piddock LJ. 2006.** Multidrug-resistance efflux pumps: not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:629–636.
45. **Piddock, L. J. 2006.** Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 382-402.
46. **Poole, K. 2005.** Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 20-51.
47. **Randhawa, H. K., Hundal, K. K., Ahirrao, P. N., Jachak, S. M., & Nandanwar, H. S. 2016.** Efflux pump inhibitory activity of flavonoids

- isolated from *Alpinia calcarata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biologia*, 71(5), 484-493.
48. **Reygaert, W. C. 2018.** An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482.
49. **Sabatini, S., Gosetto, F., Iraci, N., Barreca, M. L., Massari, S., Sancineto, L., ... & Cecchetti, V. 2013.** Re-evolution of the 2-phenylquinolines: ligand-based design, synthesis, and biological evaluation of a potent new class of *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors to combat antimicrobial resistance. *Journal of medicinal chemistry*, 56(12), 4975-4989.
50. **Sabatini, S., Kaatz, G. W., Rossolini, G. M., Brandini, D., & Fravolini, A. 2008.** From phenothiazine to 3-phenyl-1, 4-benzothiazine derivatives as inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA multidrug efflux pump. *Journal of medicinal chemistry*, 51(14), 4321-4330.
51. **Santajit, S., & Indrawattana, N. 2016.** Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed research international*, 2016.
52. **Schito, G. C. 2006.** The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection*, 12, 3-8.

53. **Stavri Michael, Piddock Laura J. V., Gibbons Simon. 2006.** Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 59, Issue 6, Pages 1247–1260.
54. **Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. 2014.** Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 254-267.
55. **Todar, K. 2015.** Staphylococcus.
56. **Torres, V. J., Attia, A. S., Mason, W. J., Hood, M. I., Corbin, B. D., Beasley, F. C., ... & Skaar, E. P. 2010.** Staphylococcus aureus fur regulates the expression of virulence factors that contribute to the pathogenesis of pneumonia. *Infection and immunity*, 78(4), 1618-1628.
57. **Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., ... & Fowler, V. G. 2019.** Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 203-218.
58. **Von Wintersdorff, C. J., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., ... & Wolffs, P. F. 2016.** Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in microbiology*, 7, 173

59. **Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. 2003.** The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 51(1), 9-11.
60. **Wilson, D. N. 2014.** Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35-48.
61. **Woodford, N. 2005.** Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 2-21.

FONTI DELLE IMMAGINI

1. **Kumar, S., Lekshmi, M., Parvathi, A., Ojha, M., Wenzel, N., & Varela, M. F. 2020.** Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. *Microorganisms*, 8(2), 266. (prima figura sulle pompe di efflusso)
2. **Taylor, T. A., & Unakal, C. G. 2017.** Staphylococcus aureus.
3. <https://www.gettyimages.ch/detail/nachrichtenfoto/staphylococcus-aureus-sem-nachrichtenfoto/179795962?language=it>
4. **Bhaskar, B. V., Babu, T. M. C., Reddy, N. V., & Rajendra, W. 2016.** Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of Staphylococcus aureus. *Drug design, development and therapy*, 10, 3237.