UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in

BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

Potenziamento dell'attività inibente la pompa di efflusso MexXY-OprM di *Pseudomonas aeruginosa* da parte di metil-derivati della berberina

Improvement of the inhibitory activity against *Pseudomonas aeruginosa* MexXY-OprM efflux pump by berberine methyl-derivatives

Tesi di Laurea Magistrale di:

Diletta Pigna

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Francesca Biavasco

Correlatore:

Dott. Gianmarco Mangiaterra

Sessione Autunnale (ottobre)

Anno Accademico 2020/2021

INDICE *Pagina*

1. INTRODUZIONE

1.1 ANTIBIOTICO RESISTENZA..……..…….....4

1.1.1 Aspetti generali dell'antibiotico resistenza……....4

1.1.2 Meccanismi di antibiotico resistenza…….....7

1.1.3 Pompe di efflusso…….....9

1.2 *PSEUDOMONAS*…….....……...….....….....11

1.2.1 Caratteristiche generali…….....11

1.2.2 Antibiotico resistenza di *Pseudomonas aeruginosa*…….....16

1.2.3 Pompe di efflusso di *Pseudomonas aeruginosa*..……...…..19

1.2.4 Caratteristiche della pompa di efflusso MexXY-OprM…….....21

1.2.5 Il ruolo degli inibitori…….....25

2. SCOPO DEL LAVORO…….....29

3. MATERIALI E METODI…….....30

3.1 Ceppi batterici, terreni di coltura e reagenti....…….....30

3.2 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) in assenza/ presenza di inibitori della pompa di efflusso…….....32

3.3 Determinazione dell'attività delle combinazioni tobramicina/inibitori di MexY mediante Checkerboard test……..….....34

3.4 Curve di battericidia…….....36

4. RISULTATI...……...….....38

4.1 SINERGIA TRA TOBRAMICINA E DERIVATI DELLA BERBERINA……....38

4.1.1 Incremento dell'attività inibente la crescita di *P. aeruginosa* ……....38

4.1.2 Incremento dell'attività battericida……..……42

4.1.3 Influenza dei poliformismi di MexY sulla risposta al trattamento con le combinazioni tobramicina/derivati della berberina……..……..... 44

5. DISCUSSIONE ……..…….……....47

6. BIBLIOGRAFIA…..……..…….....57

7. FONTE DELLE IMMAGINI…….....…...71

1. INTRODUZIONE

1.1 ANTIBIOTICO RESISTENZA

1.1.1 Aspetti generali dell'antibiotico resistenza

La resistenza batterica agli antibiotici è oggi considerata uno dei principali problemi di salute pubblica, che minaccia la prevenzione e il trattamento di una gamma sempre maggiore di infezioni data la perdita di efficacia anche degli ultimi farmaci immessi nel mercato (**47**). Un microorganismo è definito resistente ad un determinato antibiotico quando è in grado di crescere o sopravvivere in presenza di una concentrazione di farmaco solitamente sufficiente ad inibire la crescita o a uccidere ceppi appartenenti alla stessa specie (**51**). Tale capacità costituisce un vantaggio selettivo, che garantisce la sopravvivenza e la maggior diffusione di ceppi resistenti ai farmaci, riducendo così la suscettibilità dei microrganismi a varie opzioni terapeutiche (**47**). Lo sviluppo della resistenza batterica agli antibiotici può avvenire secondo varie modalità, a seconda delle quali è definita intrinseca o acquisita. Nel caso della resistenza intrinseca, l'insensibilità ai farmaci è dovuta a caratteri strutturali o fisiologici della cellula batterica stessa o alla presenza di determinanti specie-specifici, che impediscono l'azione del farmaco e caratterizzano tutti i ceppi

appartenenti ad una determinata specie batterica. La resistenza acquisita riguarda un certo numero di ceppi appartenenti ad una specie sensibile; può originare da eventi di mutazione genica o può derivare dall'acquisizione di materiale genetico esogeno (**16**). La modifica dell'informazione genica può portare alla perdita di sensibilità all'antibiotico, per esempio tramite la modifica del bersaglio del farmaco stesso, o la variazione dell'espressione di specifiche proteine; se, in condizioni normali, queste non determinano il fenotipo resistente, la loro over-produzione, o al contrario la loro assenza, può comportare variazioni fisiologiche della cellula, non più rispondente all'azione degli antibiotici. L'acquisizione di materiale genico esogeno, solitamente mediata da fenomeni di trasferimento genico orizzontale (HGT), prevede l'introduzione nella cellula batterica di sequenze geniche codificanti per specifici determinanti di resistenza, per lo più enzimi, e localizzate in elementi genetici extracromosomici e mobili, come plasmidi e trasposoni. Questi comprendono fenomeni di coniugazione, trasformazione e trasduzione (**3**). Il fenomeno di coniugazione comporta la trasmissione diretta di materiale genetico da un ceppo batterico ad un altro mediante il contatto cellula-cellula, in particolare, da una cellula batterica donatrice che possiede il plasmide coniugativo (F^+) a una cellula batterica ricevente che ne è priva (F^-). Il fenomeno di trasformazione consiste nell'acquisizione

da parte di una cellula batterica di DNA esogeno direttamente dall'ambiente extracellulare; infine, il fenomeno di trasduzione comporta il trasferimento di materiale genetico da un batterio donatore ad uno ricevente mediato dall'incorporazione dei geni batterici in batteriofagi, responsabili del trasferimento (**43**).

Sebbene lo sviluppo di resistenza agli antibiotici sia un fenomeno naturale, l'azione dell'uomo negli ultimi anni ha sicuramente contribuito ad aumentarne la frequenza, principalmente grazie all'abuso di antibiotici in ambito clinico e alla loro adozione come promotori della crescita in ambito agricolo (**1**, **30**). Se, in un primo tempo, la scoperta di nuove classi di farmaci, o la modifica chimica di molecole già in uso sono risultate efficaci contro il dilagare delle infezioni da parte di ceppi antibiotico-resistenti, oggi il processo di sviluppo di nuove molecole antimicrobiche risulta lungo e dispendioso, con conseguente attenzione verso nuove strategie contro l'antibiotico-resistenza (**13**). L'attenzione viene, infatti, rivolta verso molecole di origine naturale o alla "riconversione" di composti già noti in altri ambiti terapeutici come antimicrobici (**40**). Ad ogni modo, l'antibiotico resistenza risulta una grave minaccia per la salute pubblica, con la stima di circa 25.000 morti ogni anno in Europa per infezioni batteriche (**31**).

1.1.2 Meccanismi di antibiotico resistenza

A livello molecolare, i meccanismi di antibiotico-resistenza sono molteplici e possono risultare altamente specifici, cioè coinvolti nella resistenza ad una specifica molecola di antibiotico, o ad ampio spettro, contrastando l'azione anche di classi diverse di farmaci (**12**). L'identificazione di un determinato meccanismo di resistenza risulta fondamentale per lo sviluppo di nuove terapie antimicrobiche o di composti in grado di potenziare l'azione degli antibiotici e limitare la resistenza stessa (**69**).

I vari meccanismi noti di antibiotico resistenza possono essere riassunti in quattro strategie principali:

-Diminuzione della permeabilità di membrana: questa modalità, tipica principalmente dei batteri Gram-negativi come il patogeno opportunista *P. aeruginosa*, consiste nel rendere gli involucri batterici, principalmente la membrana esterna, ancora più impermeabili all'azione degli antibiotici, soprattutto attraverso l'alterazione della struttura e della produzione di porine di membrana, evitando così l'ingresso stesso degli antibiotici nella cellula microbica (**11**);

-Modifica del bersaglio: alterazione, soprattutto dovuta ad eventi di mutazione genica, delle molecole bersaglio degli antibiotici, escludendone così l'azione nella cellula

stessa (**24**). Esempi tipici di questa modalità comprendono l'alterazione strutturale delle proteine bersaglio (penicillin binding protein, PBP) coinvolte nella sintesi della parete cellulare (resistenza ai β-lattamici), l'alterazione della DNA-girasi e della topoisomerasi IV coinvolte nella topologia del DNA (resistenza ai fluorochinoloni), la modifica di sequenze specifiche dell' rRNA 16s (resistenza agli aminoglicosidi) o della subunità β della RNA polimerasi (resistenza alla rifampicina) (**17**);

-Modifica o degradazione dell'antibiotico: inattivazione del farmaco mediante modificazione enzimatica o degradazione della molecola stessa (**49**); esempi classici sono la produzione di β-lattamasi, specifiche o a spettro esteso, contro gli antibiotici β-lattamici (**2**), o di enzimi modificanti gli aminoglicosidi (AMEs), attivi in particolar modo nei confronti di gentamicina e tobramicina;

-Efflusso dell'antibiotico: trasporto attivo mediante "pompe di efflusso" atto ad espellere l'antibiotico dalla cellula microbica, impedendone il raggiungimento della concentrazione necessaria ad esibire attività antimicrobica (**11).**

1.1.3 Pompe di efflusso

Le pompe di efflusso sono proteine o complessi proteici deputati all'espulsione di sostanze tossiche, inclusi i farmaci, dalla cellula batterica, mediante un meccanismo di antiporto. Risultano generalmente componenti strutturali della cellula stessa, soprattutto nei batteri Gram-negativi, e presentano un ruolo fisiologico, come l'eliminazione di cataboliti o la secrezione di molecole segnale nell'ambiente extracellulare. In base alla loro struttura ed omologia di sequenza amminoacidica, le pompe di efflusso possono essere suddivise in cinque famiglie: Major Facilitator Superfamily (MFS), Small Multidrug Resistance (SMR), Resistance Nodulation Division (RND), Multidrug and toxic compound extrusion (MATE), ATP-Binding-Cassette (ABC) (**44**).

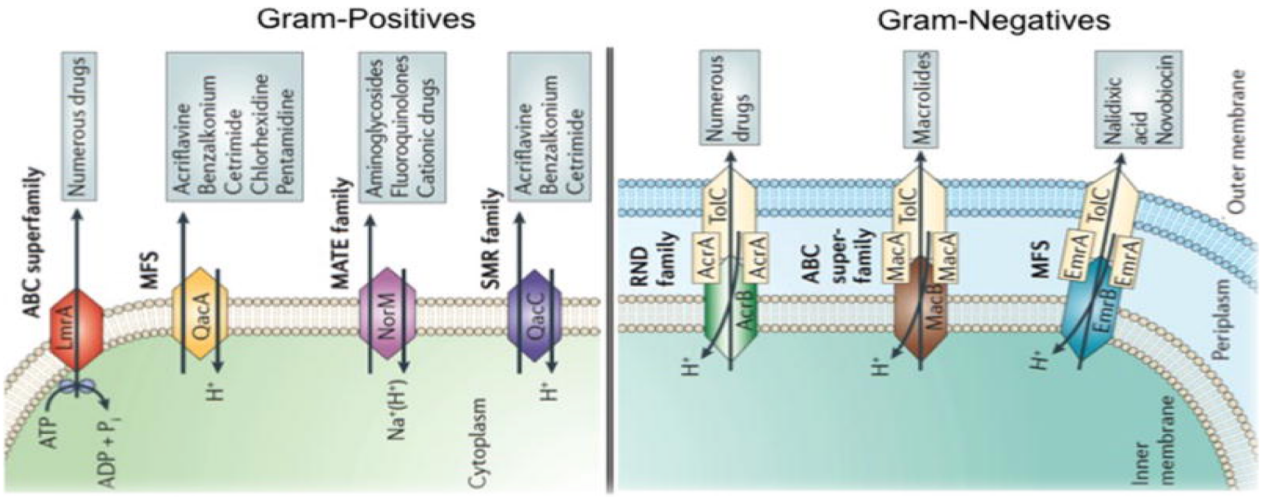


Figura 1. Rappresentazione delle pompe di efflusso in gram positivi e in Gram-negativi (Munita, Microbiology spectrum, 2016).

Nella maggior parte dei casi, l'efflusso nei batteri Gram-positivi è mediato da un

singolo trasportatore, localizzato nella membrana citoplasmatica, appartenente alle famiglie MF, SMR, MATE o ABC; al contrario, nei Gram-negativi la presenza della membrana esterna comporta sistemi più complessi, caratterizzati da un canale proteico tripartito, costituito da un trasportatore situato sulla membrana citoplasmatica (**56**), una proteina di fusione della membrana (MFP), e una proteina canale nella membrana esterna (OEP) (Figura 1). La sola presenza delle pompe di efflusso non implica il fenotipo di resistenza agli antibiotici, tuttavia il verificarsi di mutazioni nei sistemi di regolazione di tali complessi ne comportano un'espressione maggiore; di conseguenza, il ceppo mutante presenta una Concentrazione Minima Inibente (MIC) 2-8 volte più alta del corrispondente ceppo wild-type, nonché un tasso di sopravvivenza doppio. Inoltre, data la vasta gamma di substrati riconoscibili dai trasportatori, le pompe di efflusso sono spesso coinvolte nell'insorgenza di ceppi batterici multidrug-resistant (MDR). Tale fenomeno è stato segnalato per la prima volta nel caso della resistenza alla tetraciclina in *Escherichia coli,* dovuta ad una pompa a codificazione extracromosomica, trasferibile. La continua ricerca di determinanti di resistenza ha quindi permesso di identificare un numero sempre crescente di trasportatori in quasi tutte le specie batteriche (**56**), sottolineandone l'importanza come uno dei principali meccanismi di resistenza agli antibiotici.

1.2 PSEUDOMONAS

1.2.1 Caratteristiche generali

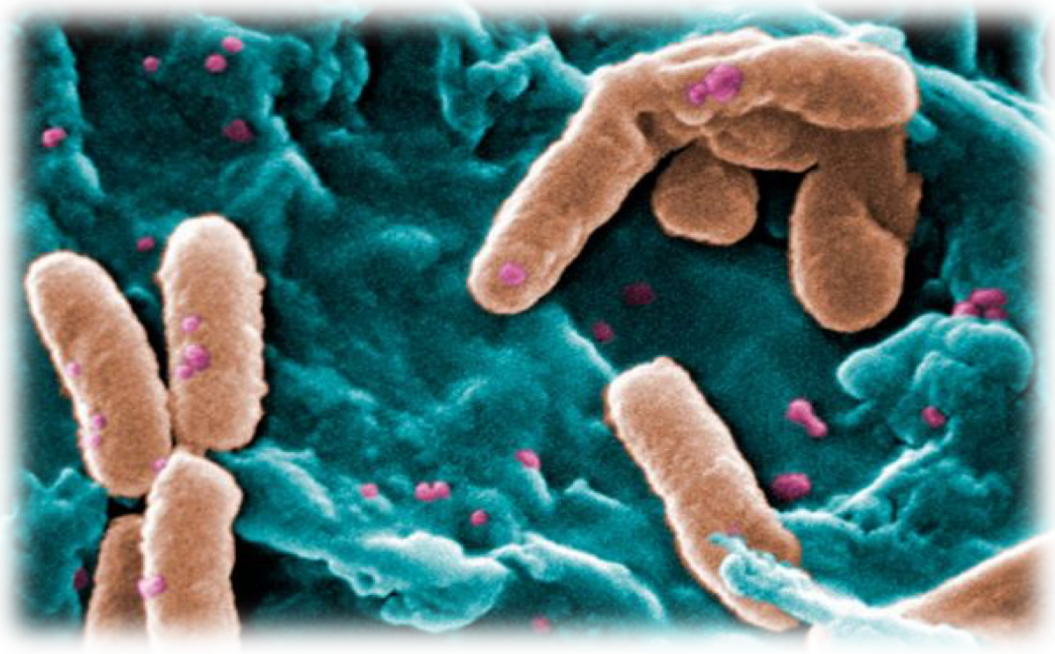


Figura 2. Immagine di P. aeruginosa al microscopio elettronico a scansione (Cournoyer, Les cahiers de la Recherche, 2013).

P. aeruginosa è un batterio Gram-negativo aerobio, di forma bastoncellare, mobile, in grado di crescere e sopravvivere in una vasta gamma di nicchie ecologiche, nonché di infettare organismi eucarioti superiori (**63**). Presenta come habitat naturale il suolo, con predilezione per zone caratterizzate da elevata umidità, come paludi e habitat marini costieri, ma può colonizzare stabilmente piante e animali, uomo compreso. Per quest'ultimo è un patogeno opportunista, capace cioè di infettare pazienti debilitati o immunocompromessi, in particolare i soggetti affetti da altre patologie, recanti ferite

profonde e ustioni, o cateterizzati. Risulta, infatti, uno dei principali patogeni in ambito ospedaliero (**6).** *P. aeruginosa* risulta responsabile di infezioni respiratorie, urinarie, del sistema circolatorio e viene frequentemente isolato da ferite ed ustioni; il trattamento delle infezioni risulta difficile e spesso inefficace, grazie alla marcata tendenza del microorganismo di sviluppare antibiotico resistenza, di persistere alla presenza di elevate concentrazioni di antibiotico, normalmente letali, e di produrre biofilm (**61**). Tale patogeno è considerato, inoltre, la principale causa di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da fibrosi cistica, in cui l'infezione è caratterizzata dalla colonizzazione persistente dell'epitelio polmonare, favorita dalla marcata produzione di muco da parte del tessuto stesso (**57**). Malgrado non risulti il primo colonizzatore polmonare, in quanto le infezioni acute sono più frequentemente sostenute da *Staphylococcus aureus* ed *Haemophylus influenzae*, *P. aeruginosa* costituisce il principale responsabile delle infezioni croniche, spesso caratterizzate dalla resistenza alla maggior parte delle classi antibiotiche attualmente in commercio. Tale versatilità a livello di patogenesi risulta diretta conseguenza di una vasta gamma di fattori di virulenza (**63**), tra cui un gran numero di esoenzimi e esotossine, spesso rilasciati dal patogeno all'interno del citoplasma delle cellule eucariotiche tramite un sistema di secrezione di tipo III.

Tra i principali fattori di virulenza troviamo (**7**):

- Esotossina A, con attività immunosoppressiva ed inibente della sintesi proteica con conseguente danno tissutale (soprattutto a livello di cute e cornea);
- Proteasi alcalina, con azione citotossica, che interferisce con il fattore di necrosi tumorale (TNF-α) e con l'interferone (IFN);
- Elastasi LasA e LasB, enzimi litici aventi come bersaglio Elastina e Collagene, attivi anche nei confronti di immunoglobuline e fattori del complemento;
- Emolisine;
- Ramnolipidi, glicolipidi batterici con azione di tensioattivi, importanti sia nella competizione con le altre specie microbiche sia nei processi infettivi dei tessuti epiteliali;
- Piocianina, pigmento con attività ossidoriduttiva, contribuisce a contrastare il sistema immunitario interferendo con il movimento ciliare e la fagocitosi;
- Pioverdina, pigmento con attività di sideroforo e regolatore trascrizionale di una vasta gamma di reguloni attivi in fase di infezione (**21**).

Altra peculiare caratteristica di *P. aeruginosa* risulta essere la produzione di biofilm, strategia che contraddistingue questo microorganismo sia nell'ambiente sia nel corso di infezione. Si definisce biofilm una comunità di microrganismi, appartenenti alla stessa o a più specie microbiche, adesa ad una superficie ed inglobata in una matrice autoprodotta, solitamente di natura esopolisaccaridica (**67**). Questo patogeno in particolare produce tre tipi diversi di esopolisaccaridi (Psl, Pel ed alginato), di cui l'alginato risulta essere il più conosciuto, in quanto la sua iper-produzione conferisce alle colonie batteriche il tipico fenotipo "mucoide" spesso riscontrato in fase di diagnosi di infezioni croniche (**14**). La formazione del biofilm è un processo ciclico e multifasico (costituito principalmente dalle tre fasi di adesione, maturazione e dispersione), che consente la colonizzazione di varie tipologie di superfici (**62**). Tale stile di vita, definito anche sessile, garantisce protezione contro danni di tipo fisico (variazioni dei parametri fisici ambientali), meccanico, chimico (presenza di sostanze tossiche ed antimicrobiche) e biologico (competizione con altre specie microbiche, infezione da fagi, fagocitosi da parte del sistema immunitario) e costituisce una strategia vincente nelle infezioni, che evolvono spesso in fase cronica (**25**). Lo sviluppo del biofilm risulta finemente regolato a livello genico, da sistemi di *quorum sensing* (**54**). Questi sono meccanismi di comunicazione intercellulare, basati

sull'azione di molecole segnale (principalmente lattoni dell'omoserina), prodotte dalle cellule stesse e capaci di regolare l'espressione di vari pathway genici coinvolti nel metabolismo, nella virulenza e nella resistenza agli antibiotici. In *P. aeruginosa* sono stati descritti tre differenti sistemi di *quorum sensing* (Las, Rhl e PQS), organizzati in maniera gerarchica e ciascuno attivato da varie tipologie di stimoli ambientali. Le cellule batteriche inglobate nella matrice del biofilm presentano caratteristiche diverse rispetto alle normali cellule vegetative in una coltura batterica (**34**): sono spesso caratterizzate da un metabolismo più lento, l'adozione di vie metaboliche e fonti di nutrienti alternative, un maggiore ispessimento degli involucri, l'espressione di geni normalmente silenti e una iper-espressione di fattori di resistenza, in particolare le pompe di efflusso. Tale eterogeneità deriva dalla formazione, all'interno della matrice stessa, di gradienti di nutrienti ed ossigeno, e conseguentemente di microambienti con condizioni di stress crescenti dall'esterno verso l'interno della matrice. Tutto ciò contribuisce allo sviluppo di varie sottopopolazioni batteriche, fra cui un ruolo particolare viene assunto dalle forme persistenti, in grado di tollerare concentrazioni di antibiotico da 10 a 1000 volte superiori alla MIC (**67**).

1.2.2 Antibiotico resistenza di Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa presenta una vasta gamma di meccanismi di resistenza, codificati a livello cromosomico o acquisiti, contro quasi tutte le classi note di agenti antimicrobici (**6**). Il principale fattore di resistenza è costituito dalla bassa permeabilità di membrana e di parete (**20**), favorita dalla scarsa produzione di porine, e dalla presenza di un canale di minori dimensioni. Ciò risulta particolarmente importante nel caso della resistenza ai carbapenemi, spesso veicolata dalla perdita o mancata espressione della porina OprD, osservata in differenti ceppi clinici caratterizzati da resistenza all'imipenem e, pur a basso livello, al meropenem (**35**). Si aggiungono, inoltre, meccanismi quali β-lattamasi cromosomiche (AmpC) costitutivamente presenti nella cellula batterica e conferenti resistenza una volta iper-espressi. AmpC, in particolare, risulta responsabile della resistenza alle cefalosporine (**20**), nello specifico al ceftazidime; sebbene questo venga considerato come farmaco di prima selezione nel trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa*, mutanti resistenti che mostrano una over-produzione di Amp C vengono selezionati, soprattutto in ambito nosocomiale, portando al fallimento terapeutico (**60**). *P. aeruginosa* risulta, inoltre, prono ad accumulare mutazioni geniche, capaci di conferire resistenza, in particolare nel caso dei fluorochinoloni. Questi antibiotici

interferiscono con la replicazione del DNA batterico agendo sugli enzimi DNA girasi e topoisomerasi IV e sono caratterizzati da azione battericida contro un ampio spettro di specie batteriche; la resistenza è principalmente attribuibile a modifiche della sequenza amminoacidica di questi due enzimi, che interferiscono con il riconoscimento da parte della molecola dell'antibiotico (**41**). Tra le mutazioni note, quelle che avvengono nelle cosiddette "regioni determinanti la resistenza ai chinoloni" (QRDR) sono le più note, in particolare quelle nelle subunità GyrA e GyrB della DNA girasi e nelle subunità ParC e ParE della topoisomerasi IV (**23**). Nel caso degli aminoglicosidi, la resistenza ad alto livello, caratterizzata da elevati valori di MIC, è dovuta alla modifica del farmaco da parte di enzimi specifici (AMEs), solitamente codificati da elementi genetici mobili, trasferibili da ceppo a ceppo. Molto più diffusa, e caratteristica soprattutto delle infezioni in pazienti affetti da fibrosi cistica, è la resistenza a basso livello a questa classe di farmaci, legata a meccanismi costitutivi della cellula batterica, quali l'efflusso, la modifica del bersaglio (**58**) o la produzione di glucani ciclici in grado di sequestrare le molecole di antibiotico in ambiente periplasmatico.

Il ruolo dell'efflusso nella resistenza di *P. aeruginosa* agli antibiotici risulta centrale, in quanto tale meccanismo media la sopravvivenza del patogeno a più classi di

farmaci, chimicamente differenti. La scarsa specificità di substrato delle pompe, unita alla loro presenza costitutiva nella cellula, costituisce, difatti, un fattore di successo di questo meccanismo, in quanto può portare facilmente allo sviluppo del fenotipo MDR, pur in assenza di informazione genica addizionale mediata da elementi genetici mobili. Si ritiene che, originariamente, la funzione delle pompe di efflusso si limitasse all'espulsione di cataboliti ed altre sostanze tossiche dall'ambiente intracellulare; la successiva e sempre più frequente esposizione ad agenti antimicrobici, sia in ambito nosocomiale, sia nell'ambiente (tramite la colonizzazione dello stesso habitat con organismi produttori di antibiotici), ha modulato adattamento all'espulsione anche di tali sostanze (**66**). In particolare, il bromuro d'etidio e i fluorochinoloni, i secondi ampiamente utilizzati contro varie famiglie di patogeni, risultano substrati ottimali (**65**).

1.2.3 Pompe di efflusso di Pseudomonas aeruginosa

Le principali pompe di efflusso note in *P. aeruginosa* sono le pompe Mex, appartenenti alla famiglia Resistenza-Nodulazione-Divisione (RND) (**26**), ampiamente diffusa tra i batteri Gram-negativi. Queste presentano una struttura tripartita, composta da (Figura 3):

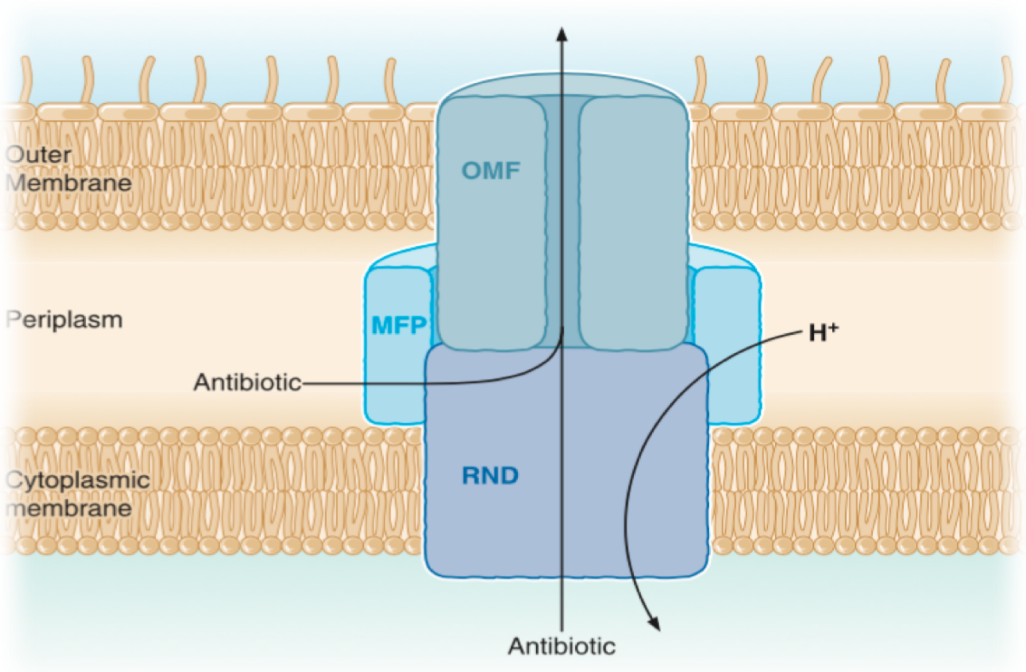


Figura 3. Rappresentazione di una pompa di efflusso RND (Poole, Microbe-American Society for Microbiology, 2008).

- Un trasportare localizzato a livello della membrana citoplasmatica, con il ruolo di riconoscimento-sequestro del farmaco e proteina motrice dell'intero complesso. Risulta un trasportatore attivo, che impiega come fonte di energia il gradiente protonico dato dall'ingresso di ioni H^+ in ambiente intracellulare;

- Una proteina canale, localizzata nella membrana esterna, con funzione di comunicazione con l'ambiente extracellulare;
- Una proteina periplasmatica con funzione di collegamento. A livello genico, le singole subunità sono generalmente codificate all'interno di operoni, controllati da specifici regolatori, la cui mutazione risulta spesso causa di over-espressione genica e resistenza.

I rappresentati principali di queste pompe in *P. aeruginosa* risultano MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM/A (**20**). In particolare, MexAB-OprM e MexXY-OprM sono coinvolte nell'insorgenza del fenotipo MDR.

MexAB-OprM è la più nota pompa di efflusso in *P. aeruginosa*, responsabile della resistenza a β-lattamici, inibitori delle β-lattamasi, chinoloni, macrolidi, tetracicline, cloramfenicolo, novobiocina e sulfamidici e riscontrata come iper-espressa in ceppi isolati da varie tipologie di infezioni (**59**). In particolare, sembra coinvolta nel fenomeno della resistenza alla combinazione ceftazidime/avibactam, recentemente in aumento sia nei casi di infezione correlata alla fibrosi cistica sia in pazienti ospedalizzati (**9**). Risulta il solo sistema di cui è disponibile il modello cristallizzato, che ha rivelato molte similitudini, sia strutturali che di funzionamento, con il sistema AcrAB-TolC di *E. coli*. Sembra, inoltre, essere coinvolta nel fenomeno del *quorum*

sensing, attraverso l'escrezione di molecole segnale, e, di conseguenza, nella formazione di biofilm (**33**).

1.2.4 Caratteristiche della pompa di efflusso MexXY-OprM

La pompa di efflusso MexXY-OprM risulta di primaria importanza in *P. aeruginosa*, in quanto capace di conferire resistenza agli aminoglicosidi, in particolar modo la tobramicina, ampiamente utilizzata per il trattamento delle infezioni sostenute da questo microrganismo.

Come le altre pompe della famiglia RND, è costituita da tre proteine (**38**):

- Un trasportatore di membrana, MexY organizzato come un omotrimero e distinto in un dominio transmembrana e uno periplasmatico; tale complesso proteico è responsabile del sequestro dell'antibiotico dall'ambiente intracellulare e della sua estrusione nell'ambiente extracellulare. In particolare, è stato indicato come responsabile del reclutamento degli aminoglicosidi un sito di legame presente nella porzione periplasmatica, denominato sito "Cleft", che veicola poi la molecola di antibiotico nelle restanti porzioni della proteina. Il

meccanismo di trasporto dei farmaci è costituito, anche in questo caso da un antiporto, con l'impiego della forza protomotrice ed è caratterizzato da cambiamenti conformazionali di ciascun monomero del complesso proteico, i quali si alternano in ciascuno dei tre stati: "loose, tight, open". Recentemente, è stata proposta l'ipotesi della presenza di più varianti polimorfiche di questa proteina, frutto di mutazioni nella sequenza nucleotidica del gene *mexY*, fattore che potrebbe influire sulla capacità della pompa di legare le molecole di antibiotico e, di conseguenza, sulla capacità dei diversi ceppi di estrudere i farmaci.

- Una proteina periplasmatica, MexX con funzione di legame delle altre subunità e che contribuisce alla formazione del complesso funzionale dell'intera pompa.
- Una proteina canale, OprM presente sulla membrana esterna necessaria per l'estrusione degli antibiotici; a differenza delle altre pompe di efflusso, in particolare MexAB-OprM, il gene per tale proteina non è compreso nell'operone *mexXY* ma viene "condiviso" con questa (**10**). Inoltre, sebbene più raramente è stata dimostrata la capacità di formazione di un complesso funzionale anche con la proteina OprA (**38**).

A livello genico, l'operone è sotto il diretto controllo del regolatore trascrizionale MexZ, il quale risulta un hot spot di mutazioni, che comportano l'iper-produzione della pompa stessa e quindi l'insorgenza del fenotipo resistente (**46**). Inoltre è stato dimostrato come, in particolare nei ceppi isolati da pazienti con fibrosi cistica, le particolari condizioni ambientali cui il patogeno è esposto selezionano specifiche mutazioni, similmente ad un fenomeno di evoluzione convergente; tra queste, quelle a carico del gene *mexZ* sono le più frequenti (**48**).

MexXY-OprM è anche coinvolta nel fenomeno della resistenza condizionale, che si manifesta cioè solo in conseguenza dell'esposizione ai substrati esportati dalla pompa stessa, in particolare gli aminoglicosidi (**32**,**45**). Tale meccanismo, che consiste nell'iper-espressione della pompa può risultare indipendente dall'azione del repressore MexZ (**4**); ad esempio, in condizioni di stress ossidativo e in presenza di danno ai ribosomi, viene stimolata l'espressione del gene PA5471, il quale poi media l'attivazione della pompa (**45**). Nel secondo caso, in particolare, il danno ai ribosomi compromette la traduzione in proteine del RNA messaggero, portando alla loro terminazione prematura con produzione di polipeptidi aberranti e potenzialmente tossici per la cellula batterica stessa, i quali a loro volta attivano il gene PA5471 (**45**) (figura 4).

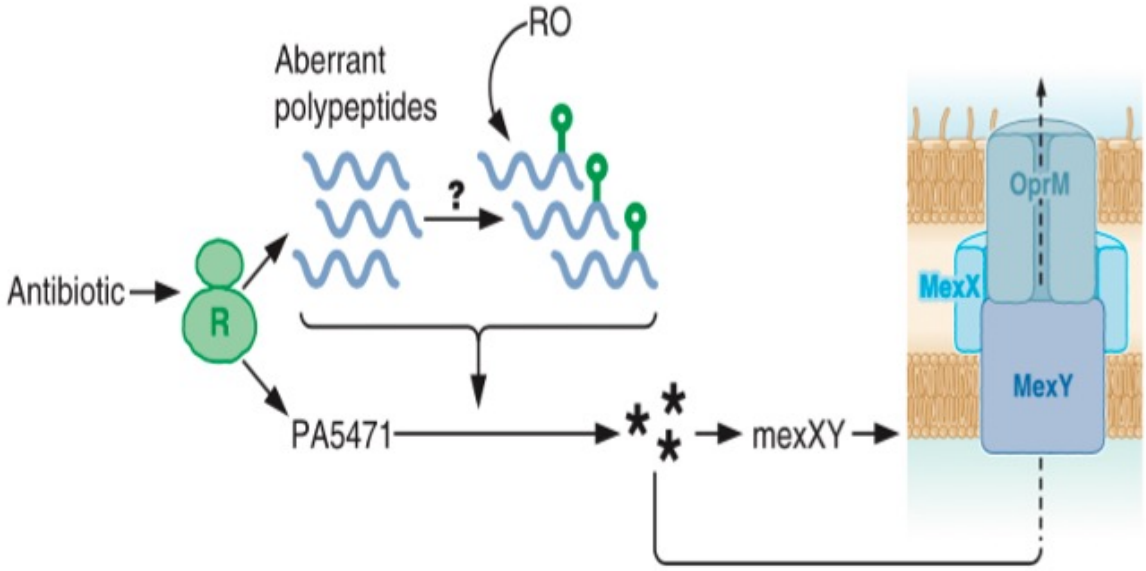


Figura 4. Induzione della pompa MexXY in seguito alla distruzione dei ribosomi da parte dell'antibiotico e all'espressione del gene PA5471 (Poole, Microbe-American Society for Microbiology, 2008).

In virtù di tutte queste caratteristiche, la pompa MexXY-OprM costituisce un potenziale bersaglio per lo sviluppo di nuove terapie antimicrobiche legate per lo più all'inibizione della pompa stessa e dell'efflusso degli aminoglicosidi (**27**).

1.2.5 Il ruolo degli inibitori

Considerato l'enorme peso in termini economici e di tempo legati allo sviluppo di nuovi farmaci, l'attuale tendenza nella ricerca di nuove terapie antimicrobiche consiste nell'adozione di composti di origine naturale o molecole già note in grado di esibire attività antimicrobica e di limitare lo sviluppo della resistenza da parte dei microrganismi (**50**). In quest'ottica l'inibizione delle pompe di efflusso risulta una strategia vincente e numerosi sforzi sono stati profusi nell'identificazione e sviluppo di potenziali inibitori (EPIs) (**52**). Viene definito EPI un composto dotato delle seguenti caratteristiche:

- Capacità di inibire le pompe di efflusso
- Assenza di attività antimicrobica intrinseca
- Assenza di interazione con altri target batterici

La seconda caratteristica in particolare risulta fondamentale in quanto l'assenza di un effetto tossico per i microrganismi limita la possibilità che questi possano sviluppare insensibilità al composto stesso. Il meccanismo di inibizione della pompa può risultare competitivo o meno; nel primo caso, l'inibitore lega lo stesso sito di legame che interessa l'antibiotico, permettendo così l'ingresso e l'accumulo del farmaco nell'ambiente intracellulare e la morte del patogeno; nel secondo, la natura

dell'inibizione è legata a fenomeni di ingombro sterico o del blocco di cambiamenti conformazionali coinvolti nella dinamica dell'efflusso stesso (**15**). Caso ulteriore, tipico degli inibitori definiti aspecifici, è l'eliminazione della fonte di energia dell'efflusso stesso, nella maggior parte dei casi la forza protomotrice, attraverso la modifica della polarizzazione della membrana batterica.

Il primo inibitore di pompe di efflusso identificato risulta essere il fenil-arginina-β-naftilamide (PAβN), specifico per la pompa di efflusso MexAB-OprM di *P. aeruginosa* e risultato sinergico con β-lattamici e fluorochinoloni. Tuttavia tale molecola risulta dotata di tossicità intrinseca anche per le cellule eucariotiche, fattore che non ne consente l'uso in pratica clinica e che è ancora in fase di studio per ottimizzare l'azione del composto (**19**).

Altra molecola nota è il cianuro di carbonile 3-clorofenilidrazone (CCCP), inibitore aspecifico in grado di depotenziare le membrane batteriche. Benchè tale molecola risulti spesso utilizzata come composto di riferimento per la valutazione dell'inibizione dell'efflusso, essa stessa presenta tossicità per le cellule eucariotiche; inoltre ne è stato dimostrato il ruolo nell'induzione di popolazioni batteriche persistenti capaci di tollerare anche alte dosi di antibiotici battericidi (**5**).

Altro inibitore aspecifico delle pompe di efflusso, in particolare, in batteri Gram-positivi è la reserpina, un alcaloide in grado di alterare la forza protomotrice necessaria al funzionamento delle pompe stesse e particolarmente attivo nei confronti dei sistemi di efflusso appartenenti alla famiglia ATP-Binding-Cassette (ABC). Queste risultano essenziali per la vitalità e la virulenza dei microrganismi e sono solitamente coinvolte nell'estrusione di tetraciclina. In ambito medico, la reserpina viene impiegata per il trattamento dell'ipertensione, ma seppur utilizzata a concentrazioni inferiori rispetto a quelle necessarie per esercitare l'effetto di EPI, è controindicata per la sua tossicità (**28**).

Recentemente è stata dimostrata l'attività di EPI dell'alcaloide naturale berberina (**39**) Tale molecola risulta presente nell'estratto di varie piante e viene utilizzata tradizionalmente nella medicina giapponese; ne sono note le proprietà antiaritmiche, ipocolesterolemizzanti e ipoglicemizzanti e, inoltre, è stata descritta come agente antimicrobico in particolare nei confronti dello *S. aureus* (**70**). Nel 2016 la berberina è stata indicata come inibitore della pompa MexXY-OprM di *P. aeruginosa,* con evidente e specifico effetto sinergico in associazione con antibiotici della classe degli aminoglicosidi (**39**). Precedenti osservazioni *in silico* hanno messo in luce, l'interazione di natura idrofobica di questo alcaloide con il sito cleft della proteina

MexY (Figura 5), in contrapposizione con l'interazione di tipo idrofilico dell'antibiotico al sito di legame. Tale interazione è risultata altamente stabile ed in grado di bloccare il cambiamento conformazionale alla base dell'estrusione dell'aminoglicoside. Queste osservazioni sono state verificate *in vitro* evidenziando il ruolo della berberina come EPI contro diversi ceppi clinici di *P. aeruginosa,* ad una concentrazione di composto (80 μg/ml) verificata come non tossica nei confronti di eritrociti umani (**22**). Inoltre, lo stesso alcaloide è stato dimostrato in grado di ridurre il numero di cellule persistenti (capaci di tollerare elevate concentrazioni di tobramicina) di *P. aeruginosa* sia in colture plantoniche che in biofilm (**29**).

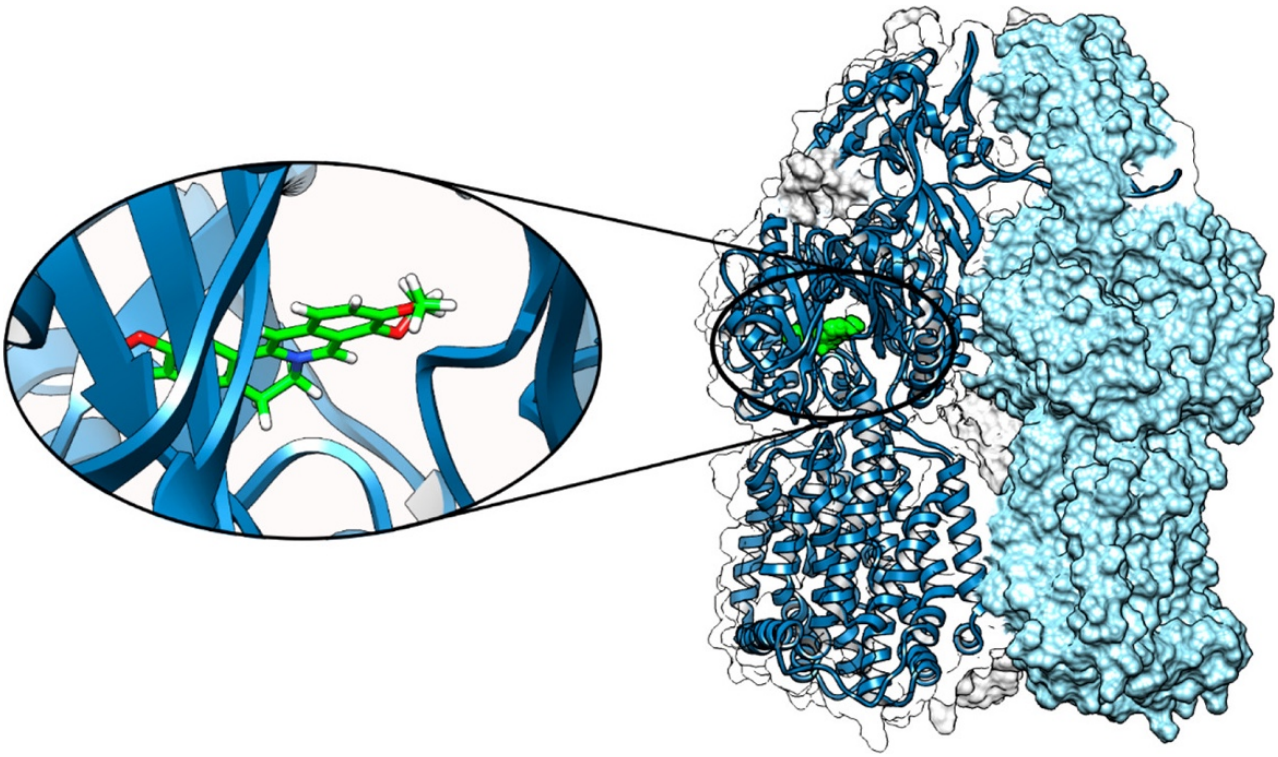


Figura 5. Interazione della Berberina (in verde) con il sito di legame del trimero MexY (Laudadio, Journal of Natural Products, 2019).

2. SCOPO DEL LAVORO

L'inibizione delle pompe di efflusso viene considerata come una valida strategia nel contrastare l'insorgenza e la diffusione dell'antibiotico resistenza. Considerato il comprovato ruolo della berberina come EPI, l'obbiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare l'efficacia, come inibitori della pompa MexXY-OprM, di tre derivati della berberina, utilizzando ceppi di collezione e ceppi clinici di *P. aeruginosa* caratterizzati da diversi poliformismi a livello della sequenza amminoacidica di MexY. Tale studio risulta fondamentale non solo per l'identificazione di potenziali nuove molecole utilizzabili come adiuvanti di antibiotici noti, ma anche per individuare specifiche strategie di modificazione chimica di molecole già note, al fine di ottenere composti in grado di contrastare il continuo sviluppo di resistenze microbiche.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi batterici, terreni di coltura e reagenti

Nello studio sono stati utilizzati sei ceppi di collezione di *P. aeruginosa* e 20 ceppi clinici isolati da espettorato di pazienti affetti da fibrosi cistica e da urinocolture, precedentemente caratterizzati per la resistenza alla tobramicina e per i relativi determinanti genici (**22**). I ceppi di collezione, appartenenti alla collezione della sezione di Microbiologia del dipartimento di Scienze della Vita dell'Ambiente, erano:

- ***P. aeruginosa* K767:** *P. aeruginosa* PAO1 wild type (**55**);
- ***P. aeruginosa* K1525:** *P. aeruginosa* K767 deleto dell'operone *mexXY* (**55**);
- ***P. aeruginosa* K1525 + pYM004:** *P. aeruginosa* K1525 complementato dell'operone *mexXY*, portato dal plasmide pYM004 (**37**).
- ***P. aeruginosa* PA14:** ceppo di *P. aeruginosa* di origine clinica (**36**);
- ***P. aeruginosa* PA7:** Ceppo di *P. aeruginosa* di origine clinica caratterizzato da resistenza ad alto livello alla tobramicina (**53**).
- ***P. aeruginosa* ATCC 27853:** ceppo di *P. aeruginosa* di controllo per i saggi di sensibilità agli antibiotici (**8**).

Tutti i ceppi sono stati coltivati in piastre di Luria Bertani (LB) o *Pseudomonas* agar, e conservati come stock in LB brodo supplementato con glicerolo al 20% a -80° C. Per il ceppo *P. aeruginosa* K1525 + pYM004 sono state usate piastre di LB agar supplementate con carbenicillina 200 μg/ml, per il mantenimento del plasmide stesso. Tutti i terreni di coltura sono stati forniti dalla ditta Oxoid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusettes, USA), la tobramicina dalla ditta Sigma-Aldrich (Saint Luis, Missouri, USA) e l'alcaloide Berberina dalla ditta SPECs (Cumberland, Maryland, USA). I tre composti derivati dalla berberina (o-CH_3-berberina, p-CH_3-berberina, p-CF_3-berberina) sono stati sintetizzati dal gruppo di *modeling* molecolare della Prof.ssa Galeazzi (Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, UNIVPM), e conservati come soluzioni stock in DMSO ad una concentrazione di 20 mg/ml.

3.2 Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) in assenza/presenza di inibitori della pompa di efflusso

La Minima Concentrazione Inibente (MIC) della tobramicina è stata determinata mediante la metodica della microdiluizione in brodo seguendo le linee guida del Clinical and Laboratory Standards Istitute (CLSI 2017) (**68**):

I ceppi batterici sono stati diluiti in Mueller Hinton (MH) II brodo fino ad ottenere una densità ottica (OD_{625nm}) di 0,1 corrispondente in *P. aeruginosa* a circa 10^7 CFU/ml e diluiti ulteriormente 1:10. La tobramicina è stata testata nel range di concentrazioni di 256-0,25 e 32-0,06 μg/ml a seconda del valore di MIC precedentemente esibito dai ceppi (**22)**. La soluzione di antibiotico è stata preparata in MHII brodo ad una concentrazione pari a 2X la concentrazione massima del range adottato ed aliquotata (50 μl) nelle prime due colonne di una piastra microtiter. Queste sono state quindi diluite serialmente di un fattore 2 tramite l'aggiunta di MHII brodo ottenendo così un range di concentrazioni pari a 2X l'intervallo desiderato. Le colture batteriche standardizzate sono state quindi inoculate (50 μl) ciascuna in una "lane" della piastra, dimezzando così la concentrazione di antibiotico ed ottenendo l'intervallo di valori desiderato. La piastra è stata incubata a 37°C per 24h, al termine delle quali è stata valutata la crescita batterica; la più bassa concentrazione di tobramicina capace di

inibire la crescita visibile è stata considerata come MIC. Il ceppo *P. aeruginosa* ATCC 27853 è stato utilizzato come ceppo di riferimento. La MIC della tobramicina è stata determinata in assenza/presenza della berberina e dei tre derivati alla concentrazione preliminarmente valutata come attiva.

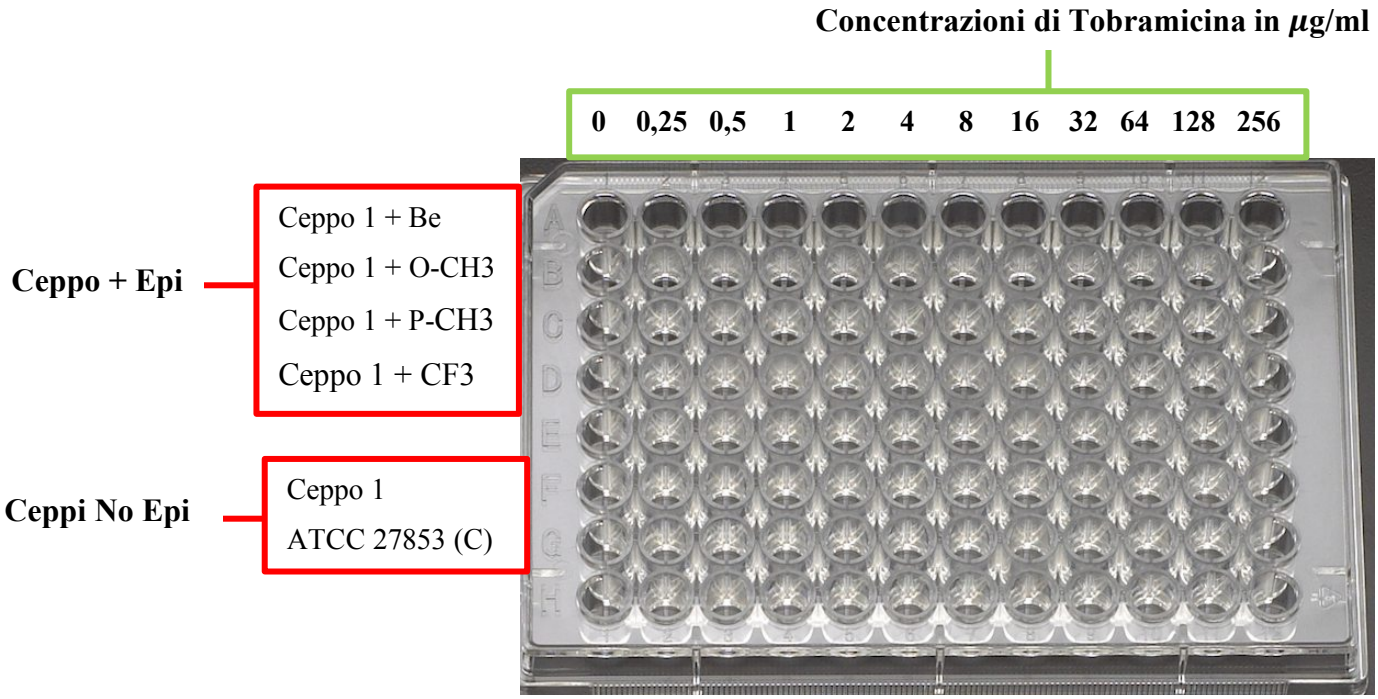


Figura 6. Esempio di come è stata allestita la piastra microtiter per ogni ceppo testato, sia in assenza che in presenza di EPI.

3.3 Test a scacchiera (Checkerboard)

Il test è stato eseguito con il seguente procedimento (**18**):

1) La tobramicina è stata utilizzata nel range di concentrazioni 256-0,25 μg/ml mentre i composti adottando il range di 320-10 μg/ml. Le soluzioni di antibiotico e composti sono state preparate ad una concentrazione pari a 4X il valore massimo del range e diluite serialmente in base 2 in MH II brodo in una piastra microtiter a 96 pozzetti (l'antibiotico in senso orizzontale e i composti in senso verticale). È stato inoltre valutato l'effetto del solvente dei composti (DMSO) alla concentrazione corrispondente al valore massimo del range di concentrazione (1,67 %).
2) I ceppi di *P. aeruginosa* sono stati diluiti in MHII brodo fino ad ottenere una densità ottica (OD_{625}) pari a 0,1 ed ulteriormente diluiti 10 volte. La sospensione è stata quindi inoculata (50 μl) in ogni pozzetto della piastra allestita.
3) La piastra è stata incubata per 24 h a 37° C, al termine delle quali è stata valutata la variazione dei valori di MIC del ceppo in corrispondenza di concentrazioni crescenti dei composti. La più bassa concentrazione di composto capace di

causare una riduzione della MIC di almeno 4 volte è stata considerata come concentrazione attiva.

I test sono stati eseguiti almeno due volte per ogni ceppo considerato.

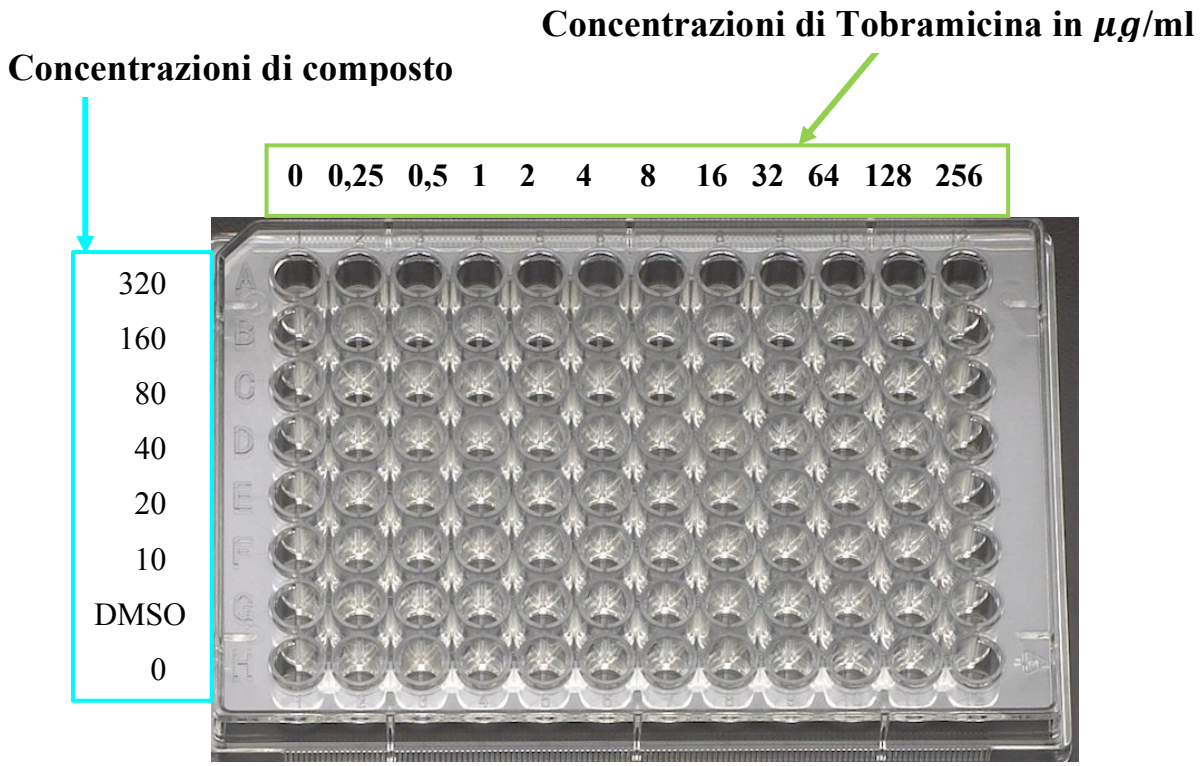


Figura 7. Rappresentazione grafica del saggio di checkerboard

3.4 Curve di battericidia

Le curve di battericidia sono state eseguite come precedentemente descritto utilizzando il ceppo di *P. aeruginosa* PA7 (**18**). Il ceppo è stato inoculato in MHII brodo e fatto crescere in fase esponenziale fino a raggiungere una OD_{625nm} pari a 0,5-0,6. La coltura è stata quindi diluita fino ad ottenere una concentrazione cellulare pari a circa 10^5 CFU/ml ed esposta a diverse concentrazioni (½ x, 1x, 2x MIC) di tobramicina in presenza/assenza dei tre derivati della berberina alla concentrazione verificata come attiva (i.e. berberina 80 μg/ml, o-ch3-berberina 40 μg/ml e p-ch3-berberina 320μg/ml) secondo il seguente schema:

Condizione 1: coltura esposta a tobramicina ½ MIC

Condizione 2: coltura esposta a tobramicina 1 MIC

Condizione 3: coltura esposta a tobramicina 2 MIC

Condizione 4: coltura esposta a tobramicina ½ MIC + EPI

Condizione 5: coltura esposta a tobramicina 1 MIC + EPI

Condizione 6: coltura esposta a tobramicina 2 MIC + EPI

Condizione 7: coltura priva di tobramicina e derivati della berberina (controllo della crescita).

Dal momento dell'esposizione all'antibiotico è stata determinata la carica microbica tramite saggi di conta su piastre di LB agar ogni due ore per le prime 8h e, successivamente a 24h. La concentrazione di antibiotico capace di causare una riduzione di carica di 3 log rispetto al controllo di crescita è stata definita come battericida. Un aumento dell'effetto battericida della tobramicina in presenza di EPI $\geq$2 log era considerato come indicativo di sinergia. Ogni condizione è stata testata in triplicato biologico e duplicato tecnico.

4. RISULTATI

4.1 SINERGIA TRA TOBRAMICINA E DERIVATI DELLA BERBERINA

4.1.1 Incremento dell'attività inibente la crescita di P. aeruginosa

L'eventuale effetto sinergico dei tre composti derivati dalla berberina con la tobramicina è stato dapprima testato mediante saggi di checkerboard contro il ceppo *P. aeruginosa* PA7, caratterizzato da resistenza ad alto livello al farmaco (MIC=256 µg/ml) dovuta principalmente all'iper-espressione della pompa MexXY-OprM (Figura 8).

Tobramicina

A o-CH_3-be

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	320	320 0.25	320 0.5	320 1	320 2	320 4	320 8	320 16	320 32	320 64	320 128	320 256
B	160	160 0.25	160 0.5	160 1	160 2	160 4	160 8	160 16	160 32	160 64	160 128	160 256
C	80	80 0.25	80 0.5	80 1	80 2	80 4	80 8	80 16	80 32	80 64	80 128	80 256
D	40	40 0.25	40 0.5	40 1	40 2	40 4	40 8	40 16	40 32	40 64	40 128	40 256
E	20	20 0.25	20 0.5	20 1	20 2	20 4	20 8	20 16	20 32	20 64	20 128	20 256
F	10	10 0.25	10 0.5	10 1	10 2	10 4	10 8	10 16	10 32	10 64	10 128	10 256
G	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256

B p-CH_3-be

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	320	320 0.25	320 0.5	320 1	320 2	320 4	320 8	320 16	320 32	320 64	320 128	320 256
B	160	160 0.25	160 0.5	160 1	160 2	160 4	160 8	160 16	160 32	160 64	160 128	160 256
C	80	80 0.25	80 0.5	80 1	80 2	80 4	80 8	80 16	80 32	80 64	80 128	80 256
D	40	40 0.25	40 0.5	40 1	40 2	40 4	40 8	40 16	40 32	40 64	40 128	40 256
E	20	20 0.25	20 0.5	20 1	20 2	20 4	20 8	20 16	20 32	20 64	20 128	20 256
F	10	10 0.25	10 0.5	10 1	10 2	10 4	10 8	10 16	10 32	10 64	10 128	10 256
G	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256

C p-CF_3-be

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	320	320 0.25	320 0.5	320 1	320 2	320 4	320 8	320 16	320 32	320 64	320 128	320 256
B	160	160 0.25	160 0.5	160 1	160 2	160 4	160 8	160 16	160 32	160 64	160 128	160 256
C	80	80 0.25	80 0.5	80 1	80 2	80 4	80 8	80 16	80 32	80 64	80 128	80 256
D	40	40 0.25	40 0.5	40 1	40 2	40 4	40 8	40 16	40 32	40 64	40 128	40 256
E	20	20 0.25	20 0.5	20 1	20 2	20 4	20 8	20 16	20 32	20 64	20 128	20 256
F	10	10 0.25	10 0.5	10 1	10 2	10 4	10 8	10 16	10 32	10 64	10 128	10 256
G	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256

D be

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	80	80 0.25	80 0.5	80 1	80 2	80 4	80 8	80 16	80 32	80 64	80 128	80 256

E DMSO

A	1,67%	1,67% 0.25	1,67% 0.5	1,67% 1	1,67% 2	1,67% 4	1,67% 8	1,67% 16	1,67% 32	1,67% 64	1,67% 128	1,67% 256

Figura 8. Test del checkerboard delle combinazioni derivati berberina/tobramicina. I tre composti derivati dalla berberina o-CH_3-berberina (A), p-CH_3-berberina (B), p-CF_3-berberina (C) sono stati testati nel range di concentrazioni 320-10 μg/ml in combinazione con l'antibiotico tobramicina, nel range di concentrazioni di 256-0,25μg/ml contro il ceppo P. aeruginosa PA7. La variazione della MIC della tobramicina è stata confrontata con il valore ottenuto in presenza di berberina alla concentrazione di 80 μg/ml (in arancione). È stato inoltre testato l'effetto del solvente dei composti (DMSO) alla concentrazione (%) presente alla più alta concentrazione di composto (1,67%). I pozzetti della piastra dove è stata osservata crescita batterica sono segnati in giallo.

Come mostrato nel grafico, il derivato o-CH_3-berberina già alla concentrazione 10 μg/ml ha comportato la diminuzione della MIC di *P. aeruginosa* PA7 da 256 a 32 μg/ml (figura 8A) producendo un effetto paragonabile alla berberina usata alla concentrazione 80 μg/ml (figura 8D); successivamente la MIC ha subito un ulteriore decremento fino a raggiungere il valore di 8 μg/ml alla concentrazione di composto pari a 40 μg/ml.

Nel caso del derivato p-CH_3-berberina (figura 8B) la MIC del ceppo ha mostrato un pattern di variazione paragonabile a quanto osservato con la berberina, con la sola eccezione della concentrazione massima di EPI (320 μg/ml) a cui la MIC è risultata 16 μg/ml. Infine, il composto p-CF_3-berberina ha comportato una variazione di MIC di 4 volte (da 256 a 64 μg/ml), risultata comunque inferiore all'effetto osservato con la berberina. Di conseguenza non è stato rilevato nessun potenziamento dell'attività dell'EPI e il composto è stato escluso dagli esperimenti successivi.

I due composti o-CH_3-berberina e p-CH_3-berberina sono stati quindi valutati in test di checkerboard contro altri due ceppi di collezione, *P. aeruginosa* K767 (PAO1) e PA14.

Tabella 1. Variazione della MIC (μg/ml) della tobramicina dei ceppi *P. aeruginosa* K767 e PA14 in corrispondenza di concentrazioni di concentrazioni crescenti dei derivati o-CH_3-berberina e p-CH_3-berberina.

	CONCENTRAZIONE DI COMPOSTO (μg/ml)								
CEPPO	**0**	**SOLVENTE***	**10**	**20**	**40**	**80**	**160**	**320**	**COMPOSTO**
K767	0,5	0,25	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	O-Ch3-Be
		0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	P-Ch3-Be
PA14	0,5	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	O-Ch3-Be
		0,5	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	P-Ch3-Be

*DMSO 1,67%

Inoltre i test sono stati replicati sui ceppi K1525 e K1525+pYM004, rispettivamente mutante deleto e complementato per *mexXY* del ceppo K767. I risultati relativi ai due ceppi wild type sono riportati in tabella 1.

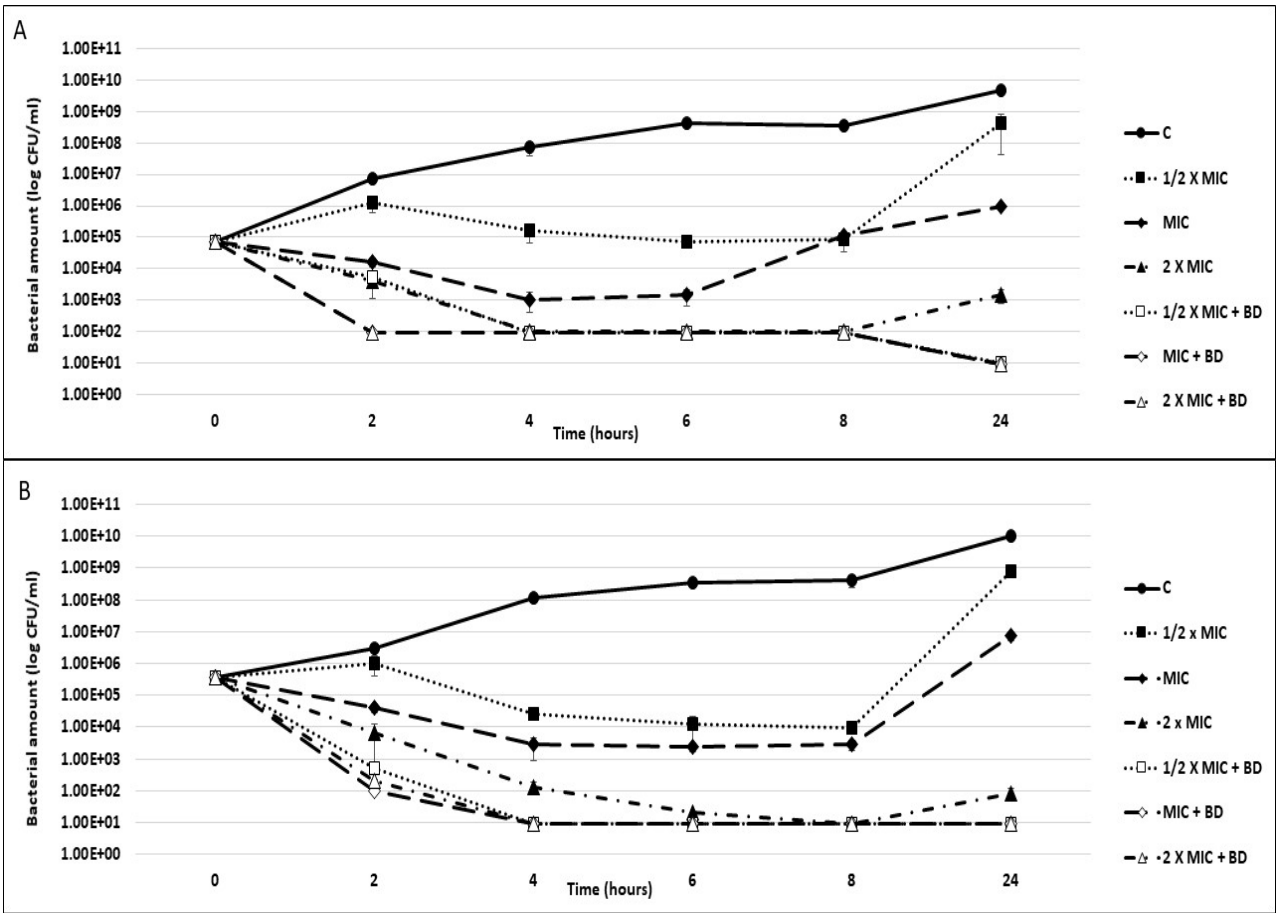
In entrambi i ceppi testati, il derivato o-CH_3-berberina ha esercitato alla concentrazione risultata attiva contro *P. aeruginosa* PA7 (i.e.40 μg/ml) un effetto sinergico con la tobramicina diminuendone la MIC nei confronti dei due ceppi di almeno 4 volte, cioè da 0,5 a 0,06 μg/ml per *P. aeruginosa* K767 e da 0,5 a 0,125 μg/ml per PA14.

Il derivato p-CH_3-berberina ha mostrato un effetto paragonabile quando aggiunto alla concentrazione di 320 μg/ml contro *P. aeruginosa* PA14, mentre ha ridotto la MIC di *P. aeruginosa* K767 di solo due volte (da 0,5 a 0,25 μg/ml).

Da sottolineare è il fatto che i test eseguiti contro *P. aeruginosa* K1525 non hanno evidenziato alcuna modifica della MIC della tobramicina, mantenuta costante ad un valore di 0,125 μg/ml per ogni concentrazione di composto testata; al contrario la variante complementata dei geni *mexXY* ha risentito della presenza dei composti in maniera paragonabile al ceppo wild type *P. aeruginosa* K767. Infatti, il composto o-CH_3-berberina ha ridotto la MIC della tobramicina da 0,25 a 0,06 μg/ml mentre il composto p-CH_3-berberina da 0,25 a 0,125 μg/ml.

4.1.2 Incremento dell'attività battericida

L'effetto sinergico delle combinazioni derivati della berberina/tobramicina è stato valutato anche in termini di battericidia, mediante l'allestimento di curve di killing contro il ceppo *P. aeruginosa* PA7. In questi test, l'antibiotico è stato aggiunto alle colture a concentrazioni corrispondenti a ½ x MIC (128µg/ml), 1 x MIC (256 µg/ml), 2x MIC (512 µg/ml), e i due derivati della berberina alle concentrazioni più basse risultate attive nei saggi di checkerboard, 40 µg/ml per o-CH3-berberina e 320 µg/ml per p-CH3-berberina (Figura 9).



*C, controllo della crescita

Figura 9. Curve di killing delle combinazioni derivati della berberina/tobramicina. Il ceppo P. aeruginosa PA7, in fase esponenziale e standardizzato ad una concentrazione iniziale di circa 10^5 CFU/ml, è stato esposto per 24h a concentrazioni diverse di tobramicina corrispondenti a ½ MIC, MIC e 2xMIC da sola o in combinazione con i derivati della berberina (BD) alle concentrazioni di 40 μg/ml per o-CH_3-berberina *(A) e 320 μg/ml per p-*CH_3-berberina *(B). Il numero di CFU è stato valutato ogni 2h per le prime 8h e successivamente a 24h. I test sono stati eseguiti in triplicato biologico e duplicato tecnico; i risultati sono riportati come media dei valori ottenuti ± deviazione standard.*

Mentre la tobramicina ½ MIC non riduceva mai, o di 1 log e transitoriamente, il numero di cellule iniziali, in presenza di entrambi i derivati si osservava la riduzione di circa 4 log, costante fino alla fine dell'esperimento. Entrambi i composti hanno potenziato l'attività di killing della tobramicina alla concentrazione pari alla MIC di 2 log dopo 2h di esposizione e di 5 log e 6 log dopo 24h. Utilizzando la tobramicina a concentrazioni pari a 2xMIC il potenziamento dell'attività battericida in presenza dei derivati della berberina risulta meno evidente, 2 log per o-CH_3-berberina e 1 log per p-CH_3-berberina a 24h.

Dopo 24h di esposizione all' antibiotico da solo si osservava un aumento del numero delle CFU rispetto ai valori ottenuti dopo 8h a tutte le concentrazioni (in particolare ½ MIC e MIC), indice di tolleranza batterica. Questo fenomeno non è stato mai rilevato in presenza dei derivati della berberina, neanche quando la tobramicina era utilizzata a ½ MIC.

4.1.3 Influenza dei poliformismi di MexY sulla risposta al trattamento con le combinazioni tobramicina/derivati della berberina

Dopo aver eseguito i test di sinergia sui ceppi di laboratorio di *P. aeruginosa*, l'efficacia delle combinazioni tobramicina/o-CH_3-berberina e tobramicina/p-CH_3-berberina, è stata testata su una collezione di ceppi clinici di *P. aeruginosa*, con diversi livelli di resistenza alla tobramicina e privi di determinanti di resistenza al farmaco differenti dalla pompa di efflusso MexXY-OprM. I valori di MIC delle combinazioni tobramicina/derivati della berberina nei confronti di quei ceppi sono riportati nella tabella 2 insieme a quelli ottenuti con la berberina.

Tabella 2. Variazione della MIC della tobramicina in assenza/presenza di berberina (80 μg/ml) e dei suoi derivati o-CH_3 (40 μg/ml) e p-CH_3 (320 μg/ml) nei confronti di ceppi clinici di *P. aeruginosa.*

	MIC (μg/ml)			
Ceppo di *P. aeruginosa*	**TOB**	**TOB+Be**	**TOB+O-CH3**	**TOB+P-CH3**
C6	2	0,5	0,5	0,25
C9	4	1	1	0,25
C15	8	8	8	0,125
C25	16	1	1	0,5
C30	16	8	4	4
C31	8	8	8	4
C54	32	16	8	4
C59	64	32	16	8
C61	64	16	8	4
C76	32	16	4	4
C84	0,5	0,125	0,125	0,125
C95	16	4	4	2
C104	32	8	8	8
AR48	32	8	16	1
AR51	16	8	8	4
NC01	16	8	8	4
NC02	32	16	16	2
NC04	1	1	0,5	0,25
NC06	16	2	1	0,25
NC10	4	1	0,5	0,125

TOB = tobramicina, O-CH3= o-CH_3-berberina, P-CH3=p-CH_3-berberina

Considerando l'alcaloide parentale, è stato osservato un effetto sinergico (i.e. riduzione della MIC di almeno 4 volte) nel 50% (10/20) dei ceppi testati, ossia *P. aeruginosa* C6, C9, C25, C61, C84, C95, C104, AR48, NC06, NC10; in particolare, negli isolati di *P. aeruginosa* C25, C95 e NC06 tale decremento ha comportato la conversione del fenotipo da resistente (MIC ≥ 16 μg/ml) a sensibile (MIC < 8 μg/ml).

Il derivato o-CH_3-berberina ha esercitato un effetto sinergico con la tobramicina nel 70% (13/20) dei ceppi diminuendo il valore di MIC di almeno 4 volte anche per i ceppi *P. aeruginosa* C30, C54, C59, C76; confrontando i risultati ottenuti in presenza della berberina e del suo derivato, quest'ultimo ha prodotto un ulteriore decremento della MIC di 2 volte nella maggior parte dei ceppi e nel ceppo *P. aeruginosa* C76 di 4 volte. Inoltre, negli isolati *P. aeruginosa* C25, C30, C76, C95, NC06 la presenza del composto ha revertato il fenotipo da resistente a sensibile.

Considerando il p-CH_3-berberina, esso è risultato attivo nel 90% (19/20) dei ceppi considerati, con la sola eccezione del ceppo di *P. aeruginosa* C31. Rispetto alla berberina si nota:

- un ulteriore diminuzione della MIC di tobramicina ≥ 4 volte in 11/19 ceppi (i.e *P. aeruginosa* C9, C15, C54, C59, C61, C76, AR48, NC02, NC04, NC06 e NC10);

- una diminuzione della MIC di tobramicina di 2 volte in 6/19 ceppi (i.e. *P. aeruginosa* C6, C25, C30, C95, AR51 e NC01);
- nessuna differenza in 2/19 ceppi (i.e. *P. aeruginosa* C84 e C104);

Anche questo composto ha comportato la reversione al fenotipo sensibile, osservata in 11/20 ceppi resistenti alla tobramicina (i.e. *P. aeruginosa* C25, C30, C54, C61, C76, C95, AR48, AR51, NC01, NC02 e NC06).

5. DISCUSSIONE

L'antibiotico resistenza e il continuo e crescente diffondersi di ceppi multiresistenti risulta oggi come non mai un problema di primaria importanza per la sanità pubblica, che limita le opzioni terapeutiche adottabili per molte infezioni e richiede lo sviluppo di strategie innovative. Questa tematica assume particolare rilevanza nel caso delle infezioni polmonari causate da *P. aeruginosa* nella fibrosi cistica, che tendono ad evolvere in croniche e risultano spesso sostenute da ceppi *extensively*- o anche pan-resistenti (**42).** Tra le strategie adottate da questo microrganismo per contrastare l'azione degli antibiotici, l'efflusso dei farmaci, mediato da specifiche pompe proteiche, risulta uno dei più frequenti. In particolare, i ceppi isolati in fase di infezione cronica sono caratterizzati da iper-espressione della pompa di efflusso MexXY-OprM, il principale determinante di resistenza contro la classe degli aminoglicosidi, nello specifico la tobramicina (**38**).

L'alcaloide naturale berberina è stato più volte riportato come inibitore di questa pompa di efflusso, capace di potenziare l'azione della tobramicina contro sia ceppi di laboratorio che ceppi clinici di *P. aeruginosa* (**39**,**22**,**29**). L'azione del composto è risultata efficace anche nei confronti dei biofilm del patogeno e delle varianti

persistenti (**29**). Tuttavia, la risposta batterica alla combinazione EPI/aminoglicoside è risultata ceppo-dipendente, e, nel caso di alcuni isolati clinici, inefficace. Pertanto, lo scopo di questo lavoro di tesi è stato la valutazione dell'efficacia di tre composti derivati dalla modificazione chimica della berberina, come nuovi EPI contro MexXY-OprM, nel tentativo di migliorare l'azione del composto parentale. Le tre nuove molecole o-CH_3-berberina, p-CH_3-berberina e p-CF_3-berberina sono state sintetizzate attraverso l'addizione di un anello aromatico variamente sostituito (CH_3 in posizione orto o para per i primi due derivati e CF_3 in posizione para per p-CF_3-berberina) allo scaffold della berberina stessa e valutate *in silico* per la loro interazione con la proteina MexY, il trasportatore presente nella membrana citoplasmatica dell'intera pompa di efflusso.

Tale interazione è stata verificata, *in vitro*, in saggi di sinergia con la tobramicina. Dapprima sono stati eseguiti saggi di checkerboard utilizzando il ceppo *P. aeruginosa PA7*, altamente resistente alla tobramicina a causa dell'elevata espressione della pompa MexXY-OprM. I risultati di questi saggi, hanno permesso di stabilire la concentrazione attiva dei derivati, intesa come concentrazione capace di ridurre la MIC della tobramicina di almeno 4 volte, e di evidenziarne la maggiore sinergia in combinazione con la tobramicina, rispetto al composto parentale. Dai dati ottenuti, è emerso che il

composto o-CH_3-berberina ha un'attività sinergica paragonabile a quella della berberina (i.e. riduzione della MIC da 256 a 32 μg/ml) ad una concentrazione nettamente inferiore (10 μg/ml vs 80 μg/ml), e utilizzata alla stessa concentrazione della berberina (80 μg/ml) determinava un effetto sinergico 4 volte maggiore. Anche il composto p-CH_3-berberina ha comportato una diminuzione della MIC della tobramicina (da 256 a 16 μg/ml) nei confronti di *P. aeruginosa* PA7; in questo caso però la minima concentrazione in grado di esercitare attività sinergica era piuttosto elevata (320μg/ml). I due composti presentano la stessa modificazione della molecola originale, ma inserita in posizioni diverse dell'anello aromatico. Questo è stato dimostrato, *in silico,* comportare una diversa affinità di legame con la proteina MexY, maggiore nel caso della sostituzione in orto rispetto a quella in para; inoltre nel secondo caso l'interazione con il sito di legame di MexY è risultata instabile, con continue rotazioni e riorientamenti della molecola nel sito stesso. Ciò giustifica la maggiore azione del composto o-CH_3-berberina, mentre il derivato p-CH_3-berberina risulta, in ultima analisi, esercitare un'azione comparabile alla berberina stessa, aspetto evidenziato dalle concentrazioni attive di ciascuno dei tre composti (i.e. berberina 80 μg/ml, o-ch3-berberina 40 μg/ml e p-ch3-berberina 320μg/ml).

Infine, l'ultimo composto testato, ovvero p-CF_3-berberina, ha comportato un decremento della MIC del ceppo di *P. aeruginosa* PA7 sempre minore rispetto all'alcaloide naturale, e non è stato pertanto considerato in ulteriori esperimenti.

Successivamente, i saggi di checkerboard sono stati ripetuti con i ceppi di laboratorio *P. aeruginosa* K767 e PA14, contro cui la berberina era risultata poco efficace (**22**) ed inoltre contro le versioni mutante e complementata per *mexXY* del ceppo K767 (rispettivamente *P. aeruginosa* K1525 e K1525+pYM004). Contro i due ceppi wild type, il composto o-CH_3-berberina, alla concentrazione 40 μg/ml, ha esercitato una riduzione di 4 volte della MIC della tobramicina. Lo stesso effetto è stato osservato utilizzando il composto p-CH_3-berberina alla concentrazione 320 μg/ml e il ceppo di *P. aeruginosa* PA14; al contrario, lo stesso composto è risultato poco efficace nei confronti del ceppo *P. aeruginosa* K767. Tali risultati confermano l'efficacia del composto o-CH_3-berberina, ed inoltre sottolineano la variabilità della risposta batterica nei confronti degli EPI, probabilmente dovuta a polimorfismi della proteina MexY, ipotesi già precedentemente avanzata (**29**). Infatti, dalle simulazioni *in silico*, emerge come tutti i composti, ed in particolar modo l'o-CH_3-berberina presentino un'affinità maggiore per la variante di MexY propria di *P. aeruginosa* PA7, mentre per gli altri ceppi di laboratorio tale affinità risulta meno spiccata.

Dato importante risulta l'assenza di attività dei due nuovi EPI testati nei confronti del ceppo deleto per *mexXY, P. aeruginosa K1525,* un risultato che evidenzia la mancanza in *P. aeruginosa* di altri bersagli dei due composti, oltre la pompa di efflusso stessa.

La mancanza di attività antimicrobica mostrata dai derivati della berberina saggiati in questo studio è una caratteristica favorevole al loro utilizzo come EPI in terapia combinatoria con antibiotici noti, al fine di evitare lo sviluppo di resistenza da parte delle cellule batteriche che potrebbe comprometterne l'efficacia (**64**). Ad ulteriore e definitiva conferma della specificità dell'azione dei derivati della berberina, i saggi eseguiti contro il ceppo complementato K1525 + pYM004, hanno evidenziato la stessa variazione della MIC della tobramicina osservata nel ceppo wild type K767 per entrambi i composti.

Per avere una visione più completa dell'attività sinergica nel tempo dell'associazione tobramicina/derivati della berberina, sono stati eseguiti saggi di battericidia del *P. aeruginosa* PA7, e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con il solo antibiotico. Entrambi gli EPI hanno incrementato il potere battericida del farmaco, già dopo 2h alla concentrazione pari alla MIC e dopo 4h alla concentrazione di ½ x MIC. In particolare, il composto o-CH_3-berberina ha mostrato un'attività più moderata, abbassando la carica microbica di un logaritmo rispetto all'azione svolta dalla sola

tobramicina, mentre con il composto p-CH_3-berberina la diminuzione era di 3 logaritmi. Tale effetto potrebbe essere spiegato dalla maggiore concentrazione del derivato p-CH_3-berberina. Inoltre le colture di *P. aeruginosa* PA7 esposte al solo antibiotico, hanno evidenziato tra le 8 e 24h di esposizione un aumento della carica microbica per tutte le concentrazioni testate. Ciò è probabilmente imputabile al fatto che, durante il trattamento con la tobramicina, si possono selezionare delle cellule batteriche in grado di tollerare la pressione antibiotica e, con il progressivo calo della concentrazione di tobramicina, di replicarsi e produrre un aumento della popolazione superstite. Trattando invece le colture con l'associazione di EPI e tobramicina, non è stato osservato tale effetto per nessuna concentrazione di antibiotico testata, indice dell'importanza dell'utilizzo di questi composti per evitare la formazione di sottopopolazioni batteriche persistenti e l'insorgenza di resistenze.

Infine, l'attività di o-CH_3-berberina e p-CH_3-berberina è stata valutata nei confronti di un pannello più ampio di ceppi clinici di *P. aeruginosa*, per la maggior parte isolati da infezioni in pazienti affetti da fibrosi cistica, esibenti un grado variabile di resistenza alla tobramicina e privi di determinanti di resistenza addizionali. Nel caso del composto o-CH_3-berberina è stata evidenziata una maggior efficacia della combinazione con la tobramicina rispetto a quella ottenuta con la berberina stessa; in particolare, nei

confronti dei ceppi *P. aeruginosa* C30, C54, C59, C76, risultati insensibili all'azione del composto parentale, la riduzione della MIC di tobramicina era di almeno 4 volte. Dato molto significativo, i ceppi *P. aeruginosa* C30 e C76, resistenti alla tobramicina, in presenza di questo composto hanno riportato valori di MIC riconducibili al fenotipo sensibile. La combinazione tobramicina/p-CH_3-berberina, si è dimostrata sinergica nei confronti di quasi tutti i ceppi. Bisogna considerare, tuttavia, la diversa concentrazione utilizzata dei diversi EPI, la metà di quella del composto parentale per o-CH_3-berberina e 4 volte tanto per p-CH_3-berberina.

Come nel caso dei ceppi di laboratorio, possiamo quindi interpretare questo dato come un effettivo potenziamento dell'azione della berberina nel caso del primo derivato, mentre per p-CH_3-berberina l'attività risulta similare a quello del composto originale. Ulteriori saggi e, soprattutto, prove di tossicità cellulare sono attualmente in corso per determinare l'applicabilità di questo composto, pur adottando una concentrazione così elevata. In ogni caso, la modificazione della berberina non ha annullato del tutto la variabilità della risposta batterica all'alcaloide, in quanto alcuni ceppi sono risultati comunque insensibili ai derivati, in particolare il ceppo *P. aeruginosa* C31, il cui livello di resistenza non è stato inficiato dalla presenza degli EPI. I dati *in silico* ottenuti con i ceppi di laboratorio inducono a pensare alla presenza di possibili varianti

polimorfiche della MexY, dotate di ridotta affinità per i composti testati. Osservazioni precedenti (**29**) hanno evidenziato la presenza di mutazioni nella sequenza amminoacidica della proteina nei ceppi insensibili alla berberina, modifiche concentrate principalmente in prossimità dei siti di legame del composto. Tuttavia, non sono state descritte particolari correlazioni tra tali mutazioni e il fenotipo dei ceppi analizzati, dato che richiede il sequenziamento dell'intera proteina per ottenere una visione più ad ampio raggio della sua variabilità.

In conclusione, i dati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno messo in luce il potenziamento dell'attività di EPI della modifica o-CH_3-berberina, il quale ha dimostrato un'efficacia maggiore rispetto al composto originale, nei confronti di un maggior numero di ceppi e, soprattutto, ad una concentrazione minore. Tale composto potrebbe rappresentare il punto di partenza per successive e più marcate modifiche della berberina stessa e il suo meccanismo di interazione con MexY, il modello di riferimento per la caratterizzazione di nuovi EPI. Prospettive future di questo studio risultano pertanto:

- L'analisi delle sequenze nucleotidica e amminoacidica della proteina MexY nei ceppi di *P. aeruginosa* risultati insensibili al composto o-CH_3-berberina, al fine

di evidenziare la presenza di specifiche mutazioni responsabili di tale comportamento e di sviluppare nuovi EPI in grado di contrastarne l'effetto;

- La valutazione dell'attività del composto o-CH_3-berberina nei confronti di biofilm di *P. aeruginosa*, modalità comune di crescita di questo microrganismo e particolarmente problematici da eradicare;
- Lo studio del composto stesso come anti-*persisters* e della sua capacità di inibire lo sviluppo di popolazioni resistenti alla tobramicina;
- La valutazione di tale derivato della berberina come possibile inibitore di altre pompe di efflusso, in particolare altri rappresentanti della famiglia RND come MexAB-OprM;
- L'uso dell'associazione o-CH_3-berberina/tobramicina, in modelli *in vivo* di infezione sperimentale da *P. aeruginosa*, in particolare nell'organismo modello *Galleria melonella,* al fine di ottenere una preliminare valutazione di una possibile applicazione clinica.

L'inibizione delle pompe di efflusso risulta, al momento, una delle strategie più promettenti nella lotta al diffondersi dell'antibiotico resistenza. Benchè siano stati proposti vari composti candidati come EPI, questi non trovano ancora applicazione nella pratica clinica, principalmente a causa di eventuali proprietà tossiche per le

cellule eucariotiche e della loro efficacia su un numero ristretto di ceppi batterici. Il presente lavoro di tesi rappresenta, pertanto, uno step preliminare, ma fondamentale, per lo sviluppo di derivati di composti naturali, già approvati per uso umano, come la berberina, da utilizzare in associazione con antibiotici noti per il trattamento delle infezioni sostenute da microrganismi multiresistenti.

6. BIBLIOGRAFIA

1. **Acar**, J., & Rostel, B. **2001**. Antimicrobial resistance: an overview. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, *20*(3), 797-810.
2. **Alanis**, A. J. **2005**. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. *Archives of medical research*, *36*(6), 697-705.
3. **Alekshun**, M. N., & Levy, S. B. **2007**. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, *128*(6), 1037-1050.
4. **Alguel**, Y., Lu, D., Quade, N., Sauter, S., & Zhang, X. **2010**. Crystal structure of MexZ, a key repressor responsible for antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of structural biology*, *172*(3), 305-310.
5. **Aparna**, V., Dineshkumar, K., Mohanalakshmi, N., Velmurugan, D., & Hopper, W. **2014**. Identification of natural compound inhibitors for multidrug efflux pumps of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa using in silico high-throughput virtual screening and in vitro validation. *PloS one*, *9*(7), e101840.
6. **Bassetti,** M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. **2018**. How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. *Drugs in context*, *7*.

7. **Ben Haj Khalifa** A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. Les facteurs de virulence de Pseudomonas aeruginosa : mécanismes et modes de régulations [Virulence factors in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and modes of regulation]. Ann Biol Clin (Paris). **2011** Jul-Aug;69(4):393-403.

8. **Cao**, H., Lai, Y., Bougouffa, S., Xu, Z., & Yan, A. **2017**. Comparative genome and transcriptome analysis reveals distinctive surface characteristics and unique physiological potentials of Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. *BMC genomics*, *18*(1), 1-17.

9. **Chalhoub** H, Sáenz Y, Nichols WW, Tulkens PM, Van Bambeke F. Loss of activity of ceftazidime-avibactam due to MexAB-OprM efflux and overproduction of AmpC cephalosporinase in Pseudomonas aeruginosa isolated from patients suffering from cystic fibrosis. Int J Antimicrob Agents. **2018** Nov;52(5):697-701.

10. **De Kievit**, T. R., Parkins, M. D., Gillis, R. J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., Iglewski, B. H., & Storey, D. G. **2001**. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *45*(6), 1761–1770.

11. **Delcour**, A. H. **2009**. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1794*(5), 808-816.

12. **Dugassa**, J., & Shukuri, N. **2017**. Review on antibiotic resistance and its mechanism of development. *Journal of Health, Medicine and Nursing*, *1*(3), 1-17.

13. **Gold**, H. S., & Moellering Jr, R. C. **1996**. Antimicrobial-drug resistance. *New England journal of medicine*, *335*(19), 1445-1453.

14. **Franklin**, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Howell, P. L. **2011**. Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in microbiology*, *2*, 167.

15. **Felicetti** T, Mangiaterra G, Cannalire R, Cedraro N, Pietrella D, Astolfi A, Massari S, Tabarrini O, Manfroni G, Barreca ML, Cecchetti V, Biavasco F, Sabatini S. C-2 phenyl replacements to obtain potent quinoline-based *Staphylococcus aureus* NorA inhibitors. J Enzyme Inhib Med Chem. **2020** Dec;35(1):584-597.

16. **Giedraitienė** A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (Kaunas). **2011**;47(3):137-46. English, Lithuanian. PMID: 21822035.

17. **Hooper**, D. C. **2002**. Target modification as a mechanism of antimicrobial resistance. *Bacterial resistance to antimicrobials*, 161-192.

18. **Isenberg**, H. D. **1992**. *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society of Microbiology

19. **Kotani**, K., Matsumura, M., Morita, Y., Tomida, J., Kutsuna, R., Nishino, K., ... & Kawamura, Y. **2019**. 13-(2-Methylbenzyl) berberine is a more potent inhibitor of MexXY-dependent aminoglycoside resistance than Berberine. *Antibiotics*, *8*(4), 212.

20. **Lambert**, P. A. **2002**. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of the royal society of medicine*, *95*(Suppl 41), 22.

21. **Lau**, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. **2004**. The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. *Trends in molecular medicine*, *10*(12), 599-606

22. **Laudadio** E, Cedraro N, Mangiaterra G, Citterio B, Mobbili G, Minnelli C, Bizzaro D, Biavasco F, Galeazzi R. Natural Alkaloid Berberine Activity against *Pseudomonas aeruginosa* MexXY-Mediated Aminoglycoside

Resistance: *In Silico* and *in Vitro* Studies. J Nat Prod. **2019** Jul 26;82(7):1935-1944.

23. **Lee, J. K.,** Lee, Y. S., Park, Y. K., & Kim, B. S. **2005**. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. *International journal of antimicrobial agents*, *25*(4), 290-295.

24. **Levy**, S. B., & Marshall, B. **2004**. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, *10*(12), S122-S129.

25. **Lima**, J. L. D. C., Alves, L. R., Jacomé, P. R. L. D. A., Bezerra, J. P., Maciel, M. A. V., & Morais, M. M. C. D. **2018**. Biofilm production by clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *22*, 129-136.

26. **Lomovskaya**, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H., & Lee, V. J. **2001**. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa: novel

agents for combination therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *45*(1), 105–116.

27. **Lomovskaya**, O., & Watkins, W. **2001**. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, *3*(2), 225-236.

28. **Mahamoud,** A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W. V., & Pagès, J. M. **2007**. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *59*(6), 1223-1229.

29. **Mangiaterra G**, Cedraro N, Laudadio E, Minnelli C, Citterio B, Andreoni F, Mobbili G, Galeazzi R, Biavasco F. The Natural Alkaloid Berberine Can Reduce the Number of *Pseudomonas aeruginosa* Tolerant Cells. J Nat Prod. **2021** Apr 23;84(4):993-1001.

30. **Marston**, H. D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N., & Fauci, A. S. **2016**. Antimicrobial resistance. *Jama*, *316*(11), 1193-1204.

31. **Martens**, E., & Demain, A. L. **2017**. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *The Journal of antibiotics*, *70*(5), 520-526

32. **Martha**, B., Croisier, D., Durand, D., Hocquet, D., Plesiat, P., Piroth, L., ... & Chavanet, P. **2006**. In-vivo impact of the MexXY efflux system on aminoglycoside efficacy in an experimental model of Pseudomonas aeruginosa pneumonia treated with tobramycin. *Clinical microbiology and infection*, *12*(5), 426-432.

33. **Maseda**, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T., & Nomura, N. **2004**. Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the mexEF-oprN efflux pump operon in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*(4), 1320-1328.

34. **McCready,** A. R. **2019**. *Quorum-sensing Receptor-Ligand Interactions in Pseudomonas aeruginosa* (Doctoral dissertation, Princeton University).

35. **Meletis**, G., Exindari, M., Vavatsi, N., Sofianou, D., & Diza, E. **2012**. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Hippokratia*, *16*(4), 303.

36. **Mikkelsen,** H., McMullan, R., & Filloux, A. **2011**. The Pseudomonas aeruginosa reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in ladS. *PloS one*, *6*(12), e29113.

37. **Morita**, Y., Sobel, M. L., & Poole, K. **2006**. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. *Journal of bacteriology*, *188*(5), 1847–1855.

38. **Morita** Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa. Front Microbiol. **2012** Nov 28;3:408. doi: 10.3389/fmicb.2012.00408. PMID: 23233851; PMCID: PMC3516279.

39. **Morita**, Y., Nakashima, K. I., Nishino, K., Kotani, K., Tomida, J., Inoue, M., & Kawamura, Y. **2016**. Berberine is a novel type efflux inhibitor which attenuates the MexXY-mediated aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1223.

40. **Munita**, J. M., & Arias, C. A. **2016**. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, *4*(2), 4-2.

41. **Nakajima**, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H., & Nakae, T. **2002**. High-level fluoroquinolone resistance in Pseudomonas aeruginosa due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiology and immunology*, *46*(6), 391-395.

42. **Nasirmoghadas**, P., Yadegari, S., Moghim, S., Esfahani, B. N., Fazeli, H., Poursina, F., ... & Safaei, H. G. **2018**. Evaluation of biofilm formation and frequency of multidrug-resistant and extended drug-resistant strain in Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in Isfahan. *Advanced biomedical research*, *7*.

43. **O'Connel**, M. P. **1984.** 1.1 Genetic Transfer in Prokaryotes: Transformation, Transduction, and Conjugation. *Advanced molecular genetics*, 1.

44. **Piddock,** L. J. **2006**. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews*, *19*(2), 382-402.

45. **Poole**, K. **2008**. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *American Society for Microbiology*, *3*(4), 179.

46. **Poole**, K. **2011**. Pseudomonas aeruginosa: resistance to the max. *Frontiers in microbiology*, *2*, 65.

47. **Prestinaci**, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. **2015**. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and global health*, *109*(7), 309-318.

48. **Prickett,** M. H., Hauser, A. R., McColley, S. A., Cullina, J., Potter, E., Powers, C., & Jain, M. **2017**. Aminoglycoside resistance of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis results from convergent evolution in the mexZ gene. *Thorax*, *72*(1), 40-47.

49. **Ramirez**, M. S., & Tolmasky, M. E. **2010.** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates*, *13*(6), 151-171.

50. **Rao**, M., Padyana, S., Dipin, K. M., Kumar, S., Nayak, B., & Varela, M. F. **2018**. Antimicrobial compounds of plant origin as efflux pump inhibitors: new avenues for controlling multidrug resistant pathogens. *J. Antimicrob. Agents*, *4*, 1-6.

51. **Sabtu,** N., Enoch, D. A., & Brown, N. M. **2015**. Antibiotic resistance: what, why, where, when and how?. *British medical bulletin*, *116*(1).

52. **Seukep**, A. J., Kuete, V., Nahar, L., Sarker, S. D., & Guo, M. **2020**. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *10*(4), 277-290.

53. **Siriyong**, T., Srimanote, P., Chusri, S., Yingyongnarongkul, B. E., Suaisom, C., Tipmanee, V., & Voravuthikunchai, S. P. **2017**. Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in Pseudomonas aeruginosa. *BMC complementary and alternative medicine*, *17*(1), 1-7.

54. **Skariyachan**, S., Sridhar, V. S., Packirisamy, S., Kumargowda, S. T., & Challapilli, S. B. **2018**. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia microbiologica*, *63*(4), 413-432.

55. **Sobel**, M. L., McKay, G. A., & Poole, K. **2003**. Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(10), 3202-3207.

56. **Stavri**, M., Piddock, L. J., & Gibbons, S. **2007**. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *59*(6), 1247-1260.

57. **Stover**, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., ... & Olson, M. V. **2000**. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, *406*(6799), 959-964.

58. **Strateva**, T., & Yordanov, D. **2009**. Pseudomonas aeruginosa–a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*, *58*(9), 1133-1148.

59. **Tafti**, F. A., Eslami, G., Zandi, H., & Barzegar, K. **2020**. Mutations in nalc gene of Mex AB-OprM efflux pump in carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wounds in Yazd, Iran. *Iranian journal of microbiology*, *12*(1), 32.

60. **Takeda,** S., Nakai, T., Wakai, Y., Ikeda, F., & Hatano, K. **2007**. In vitro and in vivo activities of a new cephalosporin, FR264205, against Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(3), 826-830.

61. **Tarafder,** A. K., von Kügelgen, A., Mellul, A. J., Schulze, U., Aarts, D. G., & Bharat, T. A. **2020**. Phage liquid crystalline droplets form occlusive sheaths that encapsulate and protect infectious rod-shaped bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(9), 4724-4731.

62. **Thi**, M., Wibowo, D., & Rehm, B. **2020**. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International journal of molecular sciences*, *21*(22), 8671.

63. **Van Delden**, C., & Iglewski, B. H. **1998**. Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. *Emerging infectious diseases*, *4*(4), 551–560.

64. **Venter**, H., Mowla, R., Ohene-Agyei, T., & Ma, S. **2015**. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Frontiers in microbiology*, *6*, 377.

65. **Verchère**, A., Dezi, M., Adrien, V., Broutin, I., & Picard, M. **2015**. In vitro transport activity of the fully assembled MexAB-OprM efflux pump from Pseudomonas aeruginosa. *Nature communications*, *6*(1), 1-6.

66. **Webber**, M resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *51*(1), 9-11.. A., & Piddock, L. J. V. **2003**. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic

67. **Werner**, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., Heydorn, A., Molin, S., ... & Stewart, P. S. **2004**. Stratified growth in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Applied and environmental microbiology*, *70*(10), 6188-6196.

68. **Wikler**, M. A. **2006**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. *CLSI (NCCLS)*, *26*, M7-A7.

69. **Wilson**, D. N., Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., & O'Neill, A. J. **2020**. Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(11), 637-648.

70. **Zhang**, X., Sun, X., Wu, J., Wu, Y., Wang, Y., Hu, X., & Wang, X. **2020**. Berberine Damages the Cell Surface of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, *11*, 621.

7. FONTI DELLE IMMAGINI

1. **Munita**, J. M., & Arias, C. A. **2016.** Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, *4*(2), 4-2.
2. **Cournoyer**, B. **2013**. Les habitats préférentiels et la dangerosité des bactéries pathogènes opportunistes de l'espèce Pseudomonas aeruginosa. *Les cahiers de la Recherche. Santé, Environnement, Travail*, (2), 30-31.
3. **Poole**, K. **2008**. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *Microbe-American Society for Microbiology*, *3*(4), 179.
4. **Poole**, K. **2008.** Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *Microbe-American Society for Microbiology*, *3*(4), 179
5. **Laudadio** E, Cedraro N, Mangiaterra G, Citterio B, Mobbili G, Minnelli C, Bizzaro D, Biavasco F, Galeazzi R. Natural Alkaloid Berberine Activity against *Pseudomonas aeruginosa* MexXY-Mediated Aminoglycoside Resistance: *In Silico* and *in Vitro* Studies. J Nat Prod. **2019** Jul 26;82(7):1935-1944.