

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E  
TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

TESI DI LAUREA

**Inibizione del *Quorum Sensing* di *Stafilococcus aureus*  
tramite derivati del carnosolo.**

**Relatore:** Prof.ssa Paola Brun

**Laureando:** Federico Zambon

**Anno Accademico:** 2021/2022



## INDICE

- **CAPITOLO 1: SOMMARIO** pagina n. 5
- **CAPITOLO 2: INTRODUZIONE** pagina n. 7
  - 2.1 *Staphylococcus aureus*: pagina n. 7
  - 2.2 Antibiotico resistenza: pagina n. 7
  - 2.3 Modalità di trasmissione infezioni da *Staphylococcus aureus*: pagina n 13
  - 2.4 Patologie provocate da *Staphylococcus aureus* pagina: n 14
  - 2.5 Fattori di virulenza: pagina n.15
  - 2.6 Motilità *Staphylococcus aureus*: pagina n. 18
  - 2.7 Biofilm *Staphylococcus aureus*: pagina n. 21
  - 2.8 interazioni di condizioni statiche o dinamiche nella crescita di *Staphylococcus aureus*: pagina n. 29
  - 2.9 Quorum Sensing: pagina n. 31
  - 2.10 Quorum Quenching: pagina n. 36
  - 2.11 Carnosolo: pagina n. 39
- **CAPITOLO 3: SCOPO DEL LAVORO DI TESI:** pagina n. 45
- **CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI:** pagina n. 47
  - 4.1 Molecole testate: pagina n 47
  - 4.2 Valutazione della minima concentrazione inibente (MIC): pagina n. 47
  - 4.3 Conta vitale: pagina n. 49
  - 4.4 Curva di crescita: pagina n. 50
  - 4.5 *Alivibrio Harveyi*: pagina n. 50
  - 4.6 PCR quantitativa real time: pagina n. 51
  - 4.7 Biofilm: pagina n. 53
    - 4.7.1 biofilm in statico: pagina n. 53
    - 4.7.2 biofilm in dinamico: pagina n. 55
  - 4.8 MTT assay: pagina n. 57
  - 4.9 Saggio di fagocitosi dei batteri: pagina n. 58
- **CAPITOLO 5: RISULTATI** pagina n. 61
  - 5.1 Valutazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC): pagina n 61
  - 5.2 Risultati degli studi di docking: pagina n. 62
  - 5.3 Le molecole testate non riportano alterazione della conta vitale alla concentrazione 0,05 mg/mL: pagina n. 63

- 5.4 Le molecole testate alla concentrazione 0,05 mg/mL non riportano:  
alterazioni nella curva di crescita di MRSA: pagina n. 65
- 5.5 Le molecole C1, C2 e C4 diminuiscono la bioluminescenza di *Alivibrio harveyi*:  
pagina n. 66
- 5.6 C1 non altera l'espressione del gene *agrA*: pagina n.67
- 5.7 Le molecole C1-C4 non alterano il biofilm cresciuto in condizioni statiche:  
pagina n. 68
- 5.8 Le molecole C1-C4 non alterano il biofilm in MRSA cresciuto in condizioni  
dinamiche: pagina n. 70
- 5.9 Verifica della specificità di azione in Q.S.: pagina n. 71
- 5.10 Valutazione della tossicità in cellule eucariotiche: pagina n. 74
- 5.11 Fagocitosi: pagina n. 75
- **CAPITOLO 6 DISCUSSIONE pagina n. 77**
  - **CAPITOLO 7: BIBLIOGRAFIA pagina n. 83**

## CAPITOLO 1: SOMMARIO

Il Quorum Sensing è un processo che permette a batteri sia Gram positivi che Gram negativi di rilevare la presenza di altri batteri e interagire con essi mediante la produzione di particolari molecole denominate autoinduttori. Gli autoinduttori permettono la regolazione di geni implicati in diversi sistemi batterici, tra cui anche la virulenza e la formazione del biofilm. In modo particolare, il biofilm rappresenta un serio problema per la salute dell'individuo in quanto origina infezioni croniche e antibiotico resistenti. Infezioni basate sulla formazione del biofilm e caratterizzate da antibiotico resistenza rappresentano ogni anno un costo sempre maggiore per la sanità e il numero di decessi legati a tali infezioni è in aumento.

Lo scopo di questo studio di tesi è di individuare alcuni composti derivati del carnosolo capaci di attività di Quorum Quenching in *Staphylococcus aureus*, un batterio Gram positivo membro della famiglia delle Micrococcaceae. Il Quorum Sensing di *S. aureus* è coinvolto nella formazione di biofilm, produzione di fattori di virulenza e comparsa dell'antibiotico resistenza rendendo *S. aureus* la prima causa di batteriemia a livello ospedaliero. Bloccare il sistema di Quorum Sensing in *S. aureus* risulta fondamentale per diminuire la produzione di fattori di virulenza, riducendo quindi la pericolosità della sintomatologia dell'infezione. A differenza degli antibiotici tradizionali, l'azione di Quorum Quenching non ha implicazioni sulla crescita del batterio in quanto non risulta né battericida né batteriostatica e quindi non innesca il processo di resistenza.

In questo studio, molecole ottenute da *Rosmarinus officinalis* sono quindi state testate mediante saggi microbiologici su un ceppo standard di *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA). Studi di docking *in silico* ci hanno consentito di concentrare il lavoro di tesi su quattro molecole. Lo screening condotto mediante bioassay con *Alivibrio harveyi* ha consentito di indentificare le molecole C1, C3 e C4 come capaci di ridurre il sistema di Quorum Sensing in *S. aureus*. Tali molecole sono state successivamente valutate per la loro possibile interferenza nel biofilm di *S. aureus* e per la loro specificità su un'altra specie batterica quale *P. aeruginosa*.

I risultati ottenuti indicano che la molecola C1 non è specifica per *S. aureus* in quanto riesce ad inibire il segnale di Quorum Sensing anche in *P. aeruginosa*. La molecola C3 non ha effetto sulla formazione del biofilm di *S. aureus* oppure sulla dissoluzione del

biofilm maturo. La molecola C4 (acido carnosico) invece incrementa la formazione del biofilm ma facilita l'azione di fagocitosi e killing in cellule THP-1 differenziate.

In conclusione, i dati raccolti non consentono di arrivare a conclusioni certe ma indicano come l'incubazione con la molecola C4 riduca in *S. aureus* la produzione di autoinduttori, riducendo quindi l'entità di attivazione del sistema di Quorum Sensing. I nostri dati evidenziano che tale riduzione non coinvolge il sistema di AgrA ma potrebbe piuttosto ridurre la produzione di PSM, proteine ad azione surfattante. L'acido carnosico quindi non si dimostra efficace nel controllo dei fattori di virulenza di *S. aureus*. La sua azione potrebbe essere incrementata con formulazioni adatte a migliorare la penetrazione della molecola nel biofilm.

## CAPITOLO 2: INTRODUZIONE

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

Ogston (1) descrisse per primo nel 1880 e nel 1882 il batterio *Staphylococcus aureus* e il suo ruolo nella formazione di ascessi e sepsi. Al giorno d'oggi, nonostante il progresso della medicina, lo *Staphylococcus aureus* rimane un agente patogeno versatile e pericoloso per l'uomo. *S. aureus* è un batterio membro della famiglia delle Micrococcaceae, è un organismo definito aerobio-anaerobio facoltativo: utilizza il sistema citocromiale in presenza di ossigeno e la fermentazione in condizioni anaerobiche. All'esame microscopico le colonie di *S. aureus* appaiono come cocci Gram-positivi singoli. Come si può notare dalla figura 1 *S. aureus* si distingue dalle altre specie di stafilococco in base alla pigmentazione aurea delle colonie da cui prende il nome. Il suo genoma è composto da un plasmide contenente circa 2800 paia di basi (1).



Figura 1 Colonie di *Staphylococcus aureus* in piastra soy agar, coltivate per 24 ore in condizioni di aerobiosi a 37°C.

### 2.2 Antibiotico resistenza

Il 30%/50% degli adulti sani risulta essere colonizzato da *S. aureus*, il 10%/20% di essi addirittura in modo persistente; è un patogeno opportunisto che colonizza frequentemente e in modo asintomatico le narici anteriori, la cute e le mucose di mammiferi e uccelli (2).

L'accumulo a livello nasale costituisce il maggior serbatoio per infezioni autogene e la trasmissione incrociata dell'infezione ad altri individui. I tassi di colonizzazione stafilococcica sono elevati, (oltre tra chi risulta già colonizzato persistentemente dal batterio), tra pazienti affetti da particolari patologie: diabete di tipo 1, pazienti sottoposti a emodialisi o intervento chirurgico, pazienti affetti da sindrome da immunodeficienza acquisita o tossicodipendenti che assumono sostanze stupefacenti per via endovenosa. In tali casi inoltre l'infezione è più probabile che passi da asintomatica a sintomatica con pericolosità e sintomatologia variabile data la compromissione del sistema immunitario e/o alterazioni significative dell'omeostasi generale dell'organismo (2).

La terapia comune prevede la somministrazione di antibiotici e drenaggio dell'infezione (2). La frequenza delle infezioni provocate da *S. aureus*, soprattutto quelle in ambito ospedaliero, dove è la principale causa di batteriemia, sono aumentate costantemente nel corso degli anni con pochi miglioramenti nella mortalità complessiva (20%-30% delle batteriemie totali in Italia) (3). Inoltre, il trattamento di queste infezioni è diventato sempre più difficile a causa dell'emergere di ceppi multi-resistenti, quelli che preoccupano maggiormente le autorità sanitarie sono il ceppo resistente alla meticillina, vancomicina e daptomicina. (2)

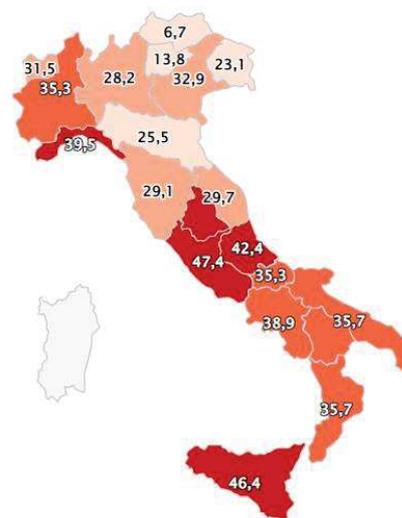
Nel febbraio 2017 *S. aureus* è stato inserito dal WHO (World Health Organisation) come patogeno ad alta priorità per la ricerca di nuovi trattamenti terapeutici.

Con il termine antibiotico resistenza si intende l'abilità di un microrganismo patogeno di sopravvivere ad un determinato trattamento farmacologico verso cui almeno in un primo momento risultava sensibile. Il problema dell'antibiotico resistenza non riguarda solamente *Staphylococcus aureus*, ma anche molti altri batteri patogeni che risultano sempre più spesso essere in grado di sopravvivere alle terapie farmacologiche tradizionali. Si stima che entro il 2050 infezioni causate da batteri resistenti alle terapie tradizionali colpiranno oltre 10 milioni di persone comportando anche costi molto elevati per le sanità nazionali. (4)

Classe di antibiotici	Antibiotico	Isolati (n)	R (%)	95% IC R (%)
Meticillina	Meticillina	Oxacillina/Cefoxitina	10.923	33,5
Macrolidi	Eritromicina	10.149	38,9	38,0-39,9
Lincosamidi	Clindamicina	9.627	34,4	33,5-35,4
Aminoglicosidi	Gentamicina	9.192	12,3	11,6-13,0
Fluorochinoloni	Levofloxacina	8.798	31,5	30,6-32,5
Glicopeptidi	Vancomicina	10.735	0,5	0,4-0,7
	Teicoplanina	10.190	2,7	2,4-3,1
Ossazolidinoni	Linezolid	10.118	0,4	0,3-0,6
Lipopeptidi	Daptomicina	10.203	0,8	0,7-1,0
Glicilciline	Tigeciclina	8.051	0,5	0,4-0,7
Rifamicine	Rifampicina	8.907	4,4	4,0-4,8
Tetracicline	Tetraciclina	9.034	6,0	5,5-6,5

**Tabella 1. Percentuale di resistenza di *Staphylococcus aureus* verso diverse tipologie di antibiotici usati comunemente per il suo trattamento. (2)**

La tabella in figura 2 rappresenta la percentuale di ceppi di *S. aureus* resistenti a ciascun antibiotico isolati a livello ospedaliero in Italia nel 2020. La terapia più comune nel trattare le infezioni da *S. aureus* prevede la meticillina, tuttavia, come si evince dalla tabella, i ceppi batterici isolati resistenti a tale antibiotico superano il 30%. L'uso della meticillina è stato quindi progressivamente sostituito nei protocolli terapeutici dalla somministrazione di vancomicina. Sfortunatamente stanno emergendo ceppi resistenti anche a tale antibiotico. Negli ultimi anni sono stati introdotti nuovi antibiotici nel trattamento di tali infezioni: linezolid e daptomicina, usati da soli o in combinazione



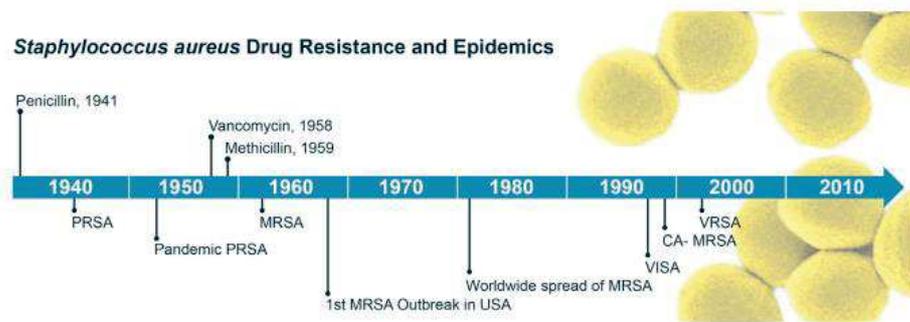
**Figura 2. Incidenza di infezioni causate da *S. aureus* meticillino resistente in Italia. (2)**

con la vancomicina; anche per questa terapia tuttavia sono emersi ceppi resistenti. (2)

Risulta pertanto evidente la necessità di ricercare nuove combinazioni di chemioterapici o nuove strategie terapeutiche. Si ricorda che le nuove strategie non devono innescare il meccanismo di antibiotico resistenza: l'idea è pertanto di utilizzare composti non battericidi che quindi non stimolano la formazione dell'antibiotico resistenza, ma che indeboliscano il batterio rendendolo più sensibile all'azione del sistema immunitario da solo o in combinazione con basse dosi di antibiotico.

### Modalità antibiotico resistenza

La resistenza di *S. aureus*, come di altri batteri, nei confronti degli antibiotici si basa sull'utilizzo di elementi genetici mobili che permette lo scambio orizzontale di materiale genetico, che una volta incorporato nel patrimonio genetico, permettono al batterio di adattarsi all'ambiente e agli stress provocati per esempio da antibiotici. Tra gli elementi genetici mobili si ricordano plasmidi, trasposoni, batteriofagi e *staphylococcal cassette chromosomes*. Quest'ultime assieme ai plasmidi sono per esempio la causa della resistenza verso gli antibiotici beta-lattamici come, per esempio, le penicilline e vancomicina.



**Figura 3. La linea cronologica indica la scoperta dei principali antibiotici utilizzati per il trattamento di *S. aureus* e il relativo periodo in cui è comparsa la forma resistente. Si evince come non ci sia nessun antibiotico che non abbia sviluppato la relativa resistenza (5)**

Come si evince dall'immagine a distanza di pochi anni dalla formulazione di un nuovo antibiotico compare la resistenza di *S. aureus* nei confronti del suddetto antibiotico: nel 1941 è stata isolata la penicillina, tuttavia metà della stessa decade è comparsa la rispettiva specie resistente, alla fine degli anni 50 sono state formulate meticillina e vancomicina e ad inizio anni 60 è comparso MRSA (*S. aureus* meticillino resistente), mentre le prime forme di VISA e VRSA (*S. aureus* a resistenza intermedia per la vancomicina e resistente alla vancomicina, rispettivamente) si sono riscontrate a cavallo del 2000 (5).

### Penicillina

La parete di *S. aureus* è costituita da peptidoglicani: una rete di N-acetilglucosamina (NAG) e N-acetilmuranico (NAM) cross linkate assieme da un ponte di cinque glicine. Le estremità del ponte sono legate alla 4Ala e 3Lys del segmento penta peptidico: (UDP-MurNAc-L-Ala-D-iso-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala) a sua volta legato al NAM. Ciascun

precursore della parete batterica viene sintetizzato nel citosol e poi trasportato fino al punto di accrescimento dove avviene la formazione della parete stessa (5).

Il target degli antibiotici  $\beta$ -lattamici è impedire la reazione che promuove l'allungamento della catena del peptidoglicano impedendo di fatto al batterio di formare la parete cellulare senza punti deboli che possano portare facilmente alla lisi della cellula. Il legame dell'antibiotico avviene in corrispondenza del dominio transpeptidasico (TP) dell'enzima transglicililase-transpeptidasi (PBP2) in quanto agisce da analogo della D-Ala4-D-Ala5 (ultima porzione del segmento peptidico di raccordo visto in precedenza). In questo modo viene inserito l'intermedio penicilloyl-O-serin al posto del segmento peptidico e si genera un punto di instabilità all'interno della rete del peptidoglicano (5).

La resistenza nei confronti della penicillina si basa sul gene blaZ che codifica per una serina  $\beta$ -lattamasi (BlaZ). BlaZ è in grado di legare il complesso TP-penicillina in modo da degradare la penicillina tramite la rottura dell'anello  $\beta$ -lattamico e rigenerare quindi il sito d'azione. In questo modo di fatto viene inibita l'azione dell'antibiotico. Il gene blaZ viene trasportato mediante il trasposone Tn552 che a sua volta risiede nel plasmide p1524 o viene direttamente integrato nel cromosoma batterico. La produzione di BlaZ è controllata da BlaR e BlaI (5).

### Meticillina

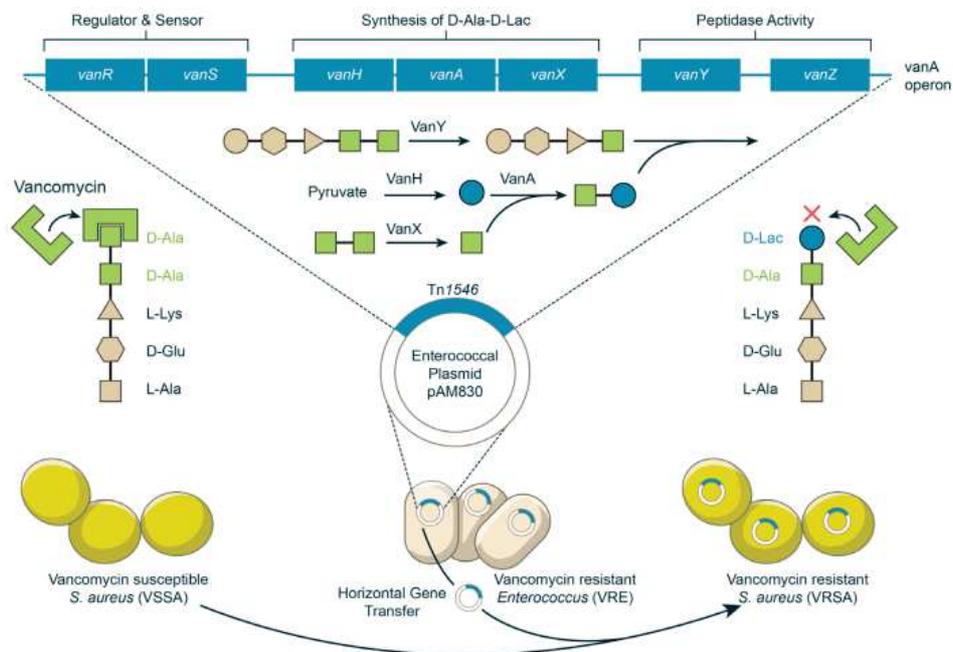
La meticillina è un antibiotico  $\beta$ -lattamico semisintetico la cui struttura riesce ad aggirare l'azione delle  $\beta$ -lattamasi e quindi viene utilizzato per il trattamento della PRSA (*Staphylococcus aureus* penicillino resistente). Tuttavia, dopo solo due anni dal suo utilizzo iniziarono a manifestarsi le prime forme di resistenza. La resistenza verso la meticillina si basa sul gene mecA che codifica per la proteina PBP2a o PBP2'. PBP2a presenta la serina catalitica (situata nella porzione TP di PBP2) a cui si lega l'antibiotico  $\beta$ -lattamico in una tasca più profonda dove l'antibiotico non riesce ad arrivare permettendo quindi al batterio di agganciare nuove unità di peptidoglicano e formare la parete (5).

### Vancomicina

La vancomicina ha attività simile alle penicilline: esplica la propria funzione nell'ultima fase di accrescimento della parete formando un legame non covalente (legame idrogeno) con la 4D-Ala. In questo modo viene alterata l'omogeneità della parete

cellulare con la conseguente comparsa di alcuni siti deboli dove avviene facilmente la lisi della cellula e quindi la morte del batterio (6).

Ceppi di VRSA (*Staphylococcus aureus vancomycin resistant*) sono apparsi circa venti anni fa: risale al 2002 la prima specie di VRSA isolata negli USA, da allora ne sono state individuate altre 14. La resistenza verso la vancomicina avviene tramite coniugazione plasmidica o tramite trasposizione del plasmidica. Il meccanismo di resistenza alla vancomicina si basa sull'operone *vanA* che permette l'idrolisi del dimero DAla-DAla e la sintesi al suo posto del dimero DAla-DLattato. La vancomicina non è più in grado di legarsi al segmento peptidico e quindi la formazione della parete batterica avviene senza punti deboli (6).



**Figura 4** schema del *pathway* cellulare che permette a *S. aureus* di sviluppare la resistenza nei confronti della vancomicina (6)

Dalla figura si evince che l'operone *vanA* sia composto dai geni *vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanS*, *vanR*, *vanY* e *vanZ*. A loro volta sono controllati dai regolatori *vanS* e *vanR*. VanS è in grado di percepire la presenza della vancomicina, mentre VanR è l'attivatore vero e proprio di *vanA*. VanA e VanH sintetizzano il dipeptide D-Ala-D-Lac: VanA è una ligasi che catalizza la formazione del legame estereo tra i due monomeri, mentre VanH è una deidrogenasi fondamentale per ottenere il D-lattato dalla riduzione del piruvato. VanX è una D,D-dipeptidasi che idrolizza il legame estereo D-Ala-D-Ala permettendo di formare il legame D-Ala-D-Lac, mentre VanY è una D,D-carboxipeptidasi che facilita l'azione di VanX. Infine, la funzione di VanZ non è ancora chiara (6).

## Daptomicina

La daptomicina è un peptide ciclico con catena laterale composta da acido grasso a 10C. Esso risulta attivo solamente verso i batteri Gram positivi ed è molto utilizzato per trattare batteriemie e endocarditi derivanti da *S. aureus*. La molecola nativa è anionica a cui si lega, tramite interazione elettrostatica, un atomo di calcio; la molecola risultante prende il nome di Ca-DAP. Il complesso Ca-DAP agisce come peptide cationico che, una volta dimerizzato, lega la testa polare del fosfatidilglicerolo presente nella parete batterica. In questo modo viene alterata la struttura della parete con conseguente depolarizzazione della membrana, perdita di ioni tra cui ione potassio e conseguente morte cellulare (5).

Anche in questo caso il batterio riesce ad adattarsi all'ambiente dove è presente daptomicina e generare resistenza verso di essa. Il meccanismo di resistenza si basa su alcune mutazioni che permettono di generare una molecola di difesa che previene i danni alla parete cellulare. Le mutazioni in questione avvengono più facilmente se la terapia risulta prolungata e se la densità cellulare è elevata. Alla base della resistenza vi è il gene *mprF* (*multiple peptide resistance factor*) che codifica per MprF, una proteina integrale di membrana che si lega al fosfatidilglicerolo neutralizzando la carica negativa grazie alla presenza di lisine (in ambiente fisiologico la lisina è carica positivamente). In questo modo si genera una struttura carica positivamente che respinge la daptomicina, anche lei positivamente caricata tramite lo ione calcio (5).

È importante sottolineare il fatto che la resistenza alla daptomicina comporta una maggior sensibilità verso gli antibiotici  $\beta$ -lattamici, pertanto, si possono utilizzare in combinazione per trattare le infezioni più severe di *S. aureus*. La maggior sensibilità è dovuta al fatto che l'incremento di lisil-fosfatidilglicerolo si deposita nella membrana a spese dello chaperone PrsA che risulta fondamentale per la stabilità di PBP2a. (5)

### **2.3 Modalità di trasmissione delle infezioni da *S. aureus***

Le persone già colonizzate da *S. aureus* hanno chiaramente maggiori probabilità di essere infettati dai loro ceppi batterici, tali infezioni possono essere poi trasmesse mediante contatto fisico in genere attraverso il contatto tra mani (1).

La via prediletta per dare origine all'infezione rimangono le cavità nasali poiché generalmente pelle e mucose rappresentano una barriera sufficiente ad ostacolare la penetrazione del batterio nell'organismo, ma eventuali danni fisici come ferite e abrasioni o stati di compromissione del sistema immunitario possono favorire la penetrazione del batterio nei tessuti profondi e nel sangue. La trasmissione di *S. aureus* dall'ambiente o da animali all'uomo è rara (1). Le autorità sanitarie affermano che il consumo di cibi provenienti da animali colonizzati da *S. aureus* è sicuro. (7)

#### **2.4 Patologie provocate da *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* causa infezioni a siti anatomici diversi; le infezioni più severe hanno alla base la formazione di biofilm. Molte di esse comportano un'elevata percentuale di decessi a causa dell'antibiotico resistenza e un gravoso impatto economico per la sanità nazionale.

Tra le infezioni vanno ricordate l'osteomielite che colpisce sia l'osso che il suo midollo. In tal caso è difficile che il batterio arrivi a contatto con le ossa in condizioni fisiologiche, spesso si serve di tessuti vicini o vi arriva direttamente a seguito di traumi o operazioni chirurgiche (8). Va anche ricordata la dermatite atopica, non direttamente causata da *S. aureus*, ma si è notato che oltre il 90% dei pazienti affetti da dermatite atopica risultano colonizzati da tale batterio. Essa provoca infiammazione della cute, edema, incrostazioni, prurito e desquamazione. Il peggioramento del quadro patologico è probabilmente dovuto all'azione del batterio, infatti trattando cavie, affette da dermatite atopica e colonizzate da *S. aureus*, con composti con azione di Quorum Quenching il quadro patologico migliorava (9). Un'altra tipologia di infezioni frequenti sono quelle originate da biofilm che si formano in dispositivi medici che sono permanentemente legati a pazienti: cateteri, pacemaker, protesi alle articolazioni, defibrillatore cardiaco, protesi di chirurgia estetica; in questi casi è necessaria la rimozione del dispositivo e il trattamento con antibiotici. Infine, si ricordano endocardite, piorrea alveolare e infezioni oculari (8).

## **2.5 Fattori di virulenza**

*Staphylococcus Aureus* è in grado di produrre 23 fattori di virulenza differenti. Con il termine fattore di virulenza si intende mediatori prodotti dal batterio o strutture proprie che gli permettono di colonizzare l'organismo, reperire sostanze nutritive, aggirare l'azione del sistema immunitario e sopraffare colonie batteriche che compongono fisiologicamente il microbiota dell'ospite. I fattori di virulenza più comuni per esempio sono funzionali a danneggiare le cellule e tessuti dell'ospite da cui ricavare sostanze nutritive provocando ascessi, infiammazione e sepsi.

Dato il crescente problema di debellare infezioni da *S. aureus* si ritiene che i fattori di virulenza possano fungere da nuovo target terapeutico; una loro inibizione infatti disarmerebbe il batterio che perderebbe la propria capacità di adattamento all'ambiente. Così facendo antibiotici e sistema immunitario avrebbero maggiori probabilità di combatterlo e superare l'infezione. Inoltre, molti fattori di virulenza sono alla base della sintomatologia dell'infezione da *S. aureus*: controllare i fattori di virulenza potrebbe significare ridurre la gravità della sintomatologia dell'infezione.

### **Produzione di fattori di virulenza di *S. aureus*: il complesso genico TCSTS**

TCSTS è un complesso genico adibito alla produzione di fattori di virulenza, la sua attività viene modulata da AIP prodotto dal *pathway agr*, dal sistema Sae attivato in caso di stress esterno: alterazione di pH, variazione di concentrazione di glucosio o di sali minerali o presenza di antibiotici e infine può essere attivato dal sistema Sar. Tra i fattori di virulenza prodotti da TCSTS vanno ricordati: enterotossina C3, lipasi, adesine e soprattutto una serie di enzimi funzionali al metabolismo cellulare che permette il passaggio dalla respirazione cellulare alla fermentazione. La sua regolazione tramite tre pathway cellulari è dovuta al fatto che *S. aureus* per sopravvivere necessita di attivare o disattivare TCSTS molto velocemente. Per esempio quando *S. aureus* colonizza ferite della cute, in un primo momento sfrutta il metabolismo aerobio data la presenza di ossigeno, mentre quando la ferita si rimargina il batterio necessita di modificare in brevissimo tempo il metabolismo a causa della riduzione della concentrazione di ossigeno (10).

Al fine di evidenziare l'importanza del sistema TCSTS nella virulenza di *S. aureus*, sono stati effettuati degli studi ceppi *wild-type* e mutati, questi ultimi recanti il sistema TCSTS inattivo. In condizioni aerobiche non si sono evidenziate differenze nella crescita dei due

ceppi, mentre in condizioni anaerobiche si è registrata una crescita cellulare ridotta di tre volte; la minore crescita è dovuta all'impossibilità di effettuare la fermentazione in condizioni anaerobiche che è gestita dal sistema TCSTS. Per confermare l'ipotesi è stato effettuato uno studio di elettroforesi 2D per evidenziare le differenti proteine prodotte dalla specie *wild-type* e mutati: in condizioni anaerobiche le due specie producono 19 proteine in quantità differenti: 7 sono down regolate mentre 12 upregolate. Tra le proteine che registrano un aumento della loro produzione vi sono succinil CoA, sintetasi, aconitasi, fumarasi; tutte proteine legate al TCA cycle: funzionale alla produzione di ATP che permette almeno in parte di arginare l'impossibilità di sfruttare la fermentazione. La diversa produzione di proteine in condizioni aerobiche invece è meno marcata (10).

Bloccare il sistema TCSTS non è solo importante per limitare la crescita cellulare, ma anche per ridurre notevolmente la capacità infettiva di *S. aureus* (10).

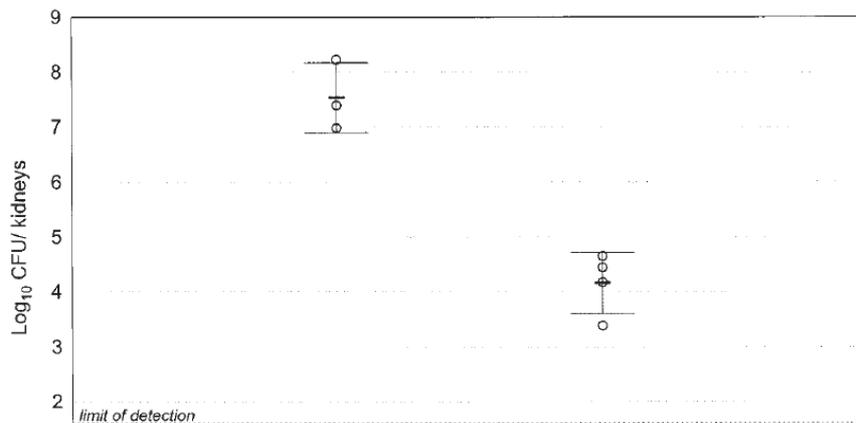


Figura 5 il grafico evidenzia la diversa capacità infettiva della specie *wild type* (sinistra) e mutata (destra) (10).

La figura 5 rappresenta uno studio in cui si sono infettate delle cavie murine con *S. aureus wild-type* o mutati. Dopo alcuni giorni sono state valutate il numero di C.F.U. presenti a livello renale. La specie *wild-type* presenta capacità infettiva estremamente superiori a quella mutata: il numero di CFU è di oltre tre ordini di grandezza superiore (10).

Il modo migliore per bloccare il sistema TCSTS sembrerebbe quello di bloccare il *pathway* agr e quindi evitare la produzione di AIP che, come detto in precedenza, è un fattore che regola l'attivazione di TCSTS. (10)

### Peptidoglicano

Tra gli altri fattori di virulenza propri del batterio si ricorda la parete cellulare che è costituita per il 50% in peso da peptidoglicano. Il peptidoglicano è un polimero formato da due unità polisaccaridiche alternate: N-acetilglucosamina e acido N-acetilmuramico legate assieme tramite legami  $\beta$  1,4 glicosidico. Il peptidoglicano ha attività simile ad un'endotossina con azione pro-infiammatoria in quanto stimola il rilascio di citochine da parte di macrofagi, l'attivazione del complemento e l'aggregazione piastrinica. (1)

### **Alfa emolisina**

Alfa emolisina è una proteina di 33 Kda, prodotta dal gene *hla*, che in forma matura polimerizza assumendo una struttura eptamerica in grado di legarsi alla membrana citoplasmatica e generare pori alterando l'integrità e la funzionalità della membrana stessa. Il danno provoca alterazioni nel flusso ionico del calcio, del potassio e dell'acqua compromettendo la pressione osmotica. Di particolare importanza è la variazione del flusso del calcio, in quanto un suo aumento a livello intracellulare comporta l'attivazione delle caspasi che inducono l'apoptosi della cellula (12).



Figura 6 struttura tridimensionale di alfa emolisina di *Staphylococcus aureus*. Fonte: protein data bank.

La funzione della tossina è quella di stimolare il rilascio di sostanze nutritive e funzionali alla crescita del batterio e rilascio di eDNA da cellule e tessuti propri dell'organismo tramite la loro lisi (11). La generazione dei pori è dipendente dal legame con il recettore ADAM 10: una zinco metalloproteasi, esso può rappresentare pertanto un target terapeutico per l'inibizione di uno dei fattori di virulenza principali di *S. aureus*. Alfa emolisina è anche un importante fattore pro-infiammatorio che esplica la sua funzione attivando l'inflammosoma NLRP3 quando raggiunge una concentrazione soglia; il legame con tale recettore è in grado di provocare la morte della cellula colpita tramite piroptosi (12). La produzione di alfatossina avviene tramite l'attivazione di RNA III, la cui trascrizione è attivata da AgrA, che induce la trascrizione di Hla. Ci sono diversi *pathway* cellulari paralleli che inibiscono o attivano la sua produzione. Il caso di stress: variazione di pH, alterata concentrazione salina o di glucosio, presenza di antibiotici, viene attivato il *sae loci* che incrementa la produzione di coagulasi e Hla in risposta allo stress. SrrAB

invece è un modulatore genico prodotto in condizioni anaerobiche che inibisce la produzione di RNA III e di conseguenza anche quella di Hla (11).

### **Mayorautolisina**

Mayorautolisina o Atla è la più importante peptidoglicano-idrolasi di *Staphylococcus aureus*. La sua funzione di adesione è determinante durante le prime fasi di formazione del biofilm in particolare durante l'attachment. Si è valutata infatti la differente capacità adesiva delle colonie batteriche *wild-type* o recanti mutazione del gene *atla*.

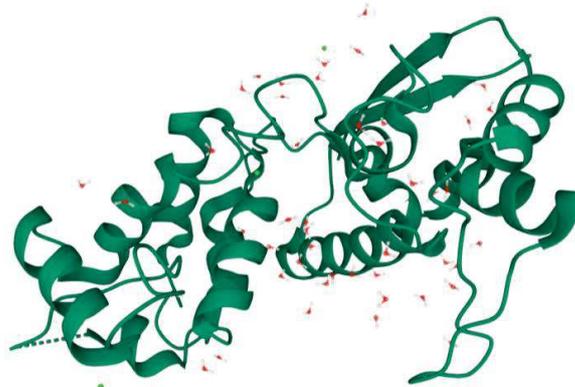


Figura 7 struttura tridimensionale della proteina Atla: mayorautolisina. Fonte: protein data bank.

Dopo 24 ore di crescita, le colonie batteriche con *atla* mutato venivano facilmente eluite con soluzioni saline, a differenza di quelle *wild-type* che rimanevano adese. Mayorutolisina costituisce pertanto un importante target terapeutico in quanto bloccare la formazione del biofilm significa non solo evitare la diffusione dell'infezione nell'organismo, ma anche diminuire drasticamente la produzione di fattori di virulenza (13).

### **2.6 Motilità *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* è da sempre considerato un batterio immobile in quanto non possiede flagelli o pili tipo IV, tuttavia è stata riscontrata la sua capacità di movimento mediante *gliding*: movimento attivo e *sliding*: movimento passivo. Il movimento è fondamentale durante la formazione del biofilm non solo per la fase di adesione, ma anche per quella di maturazione, in quanto è importante che i batteri si distribuiscano omogeneamente su tutta la superficie colonizzabile e per la fase di dispersione che consente la diffusione del patogeno nell'organismo (le diverse fasi del biofilm verranno approfondite in seguito). Alla base delle due tipologie di movimento vi sono molecole con attività surfactante che prevengono l'adesione cellulare riducendo la tensione all'interfaccia tra le membrane cellulari e il substrato su cui si muovono. (14)

## Sliding

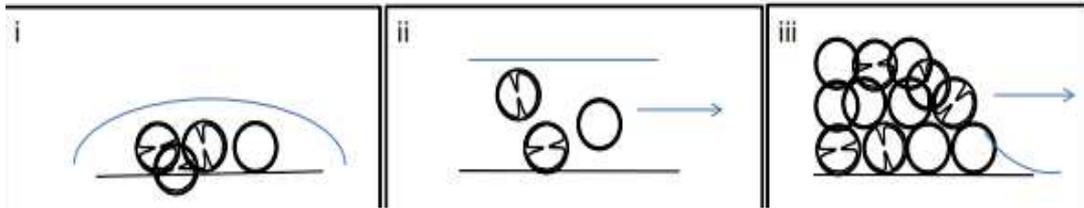


Figura 8. Dalla figura si può notare come lo sliding necessiti di tre fasi: la prima fase corrisponde ad una fase di crescita cellulare e produzione di PSM: molecole surfactanti (fase i) in seguito raggiunta una concentrazione sufficiente di cellule e PSM, queste richiamano acqua diminuendo la tensione interfaciale tra le cellule e quindi permettono l'inizio del movimento radiale (fase ii). Man mano che le cellule crescono sono fisicamente spinte verso l'esterno (fase iii) dalla crescita cellulare stessa. Dalle immagini non si nota ma la motilità tramite sliding permette solo una crescita radiale monostartificata. L'esperimento riportato nelle immagini è stato effettuato in una piastra agar (14).

Lo *sliding* permette la formazione di una struttura radiale e monostratificata, le sostanze con proprietà surfactanti in questione sono le PSM (*phenol soluble modulins*), sicuramente ci sono anche altre molecole coinvolte, ma la loro individuazione non è ancora stata effettuata. Sono stati effettuati studi in cui si valutava lo *sliding* di *S. aureus* mutato (produzione di PSM inibita), i risultati dimostrano che maggiore è l'inibizione di PSM maggiore è l'inibizione dello *sliding*. Ci sono diverse tipologie di PSM (le diverse tipologie verranno approfondite in seguito): PSM alfa, in particolare alfa 1 e 4, sono le più importanti per lo *sliding*, PSM beta hanno invece un ruolo secondario, infine delta-emolisina ha un ruolo ancora controverso. Oltre alle PSM sono importanti anche molecole funzionali all'adesione cellulare: acido teicoico e lipoteicoico legano il peptidoglicano garantendo l'adesione cellulare; se la loro produzione viene inibita lo *sliding* di *S. aureus* viene ridotta al minimo. Il motivo della riduzione della motilità è dovuto al fatto che alterando la produzione degli acidi teicoici viene alterata anche la divisione cellulare e quindi di conseguenza si hanno ripercussioni sullo *sliding*. Oltre agli acidi teicoici anche SortaseA risulta funzionale all'adesione cellulare; tuttavia una sua inibizione a differenza degli acidi teicoici incrementa il processo di *sliding*. FnbpA, FnbpB, ClfA e ClfB sono altre proteine funzionali all'adesione cellulare che se inibite si registra un incremento nello *sliding*. Un discorso analogo può essere fatto per il DNA, come vedremo in seguito è un importante fattore di adesione cellulare tramite la formazione di ponti elettrostatici tra strutture cariche positivamente; l'aggiunta di nucleasi infatti incrementa lo *sliding*. Tutti questi mediatori (tranne gli acidi teicoici) inibiscono la motilità cellulare in quanto incrementano l'adesione tra cellule e ostacolano quindi l'azione delle PSM (14).

## Gliding

*S. aureus* è anche in grado di compiere movimento attivo: *gliding*. Le cellule di *S. aureus*, quando compiono tale movimento vengono definite comete in quanto sono ricoperte di matrice extracellulare, durante lo spostamento lasciano una scia composta da batteri e matrice che comporta un fenomeno di fluorescenza visibile al microscopio che per l'appunto assomiglia alla scia delle comete. Le cellule batteriche a volte lasciano dei solchi nella piastra agar per cui si possono identificare facilmente i movimenti compiuti. Per compiere tale movimento si è visto essere necessario la presenza della matrice extracellulare, la presenza di un supporto e infine la produzione delle PSM. (14)

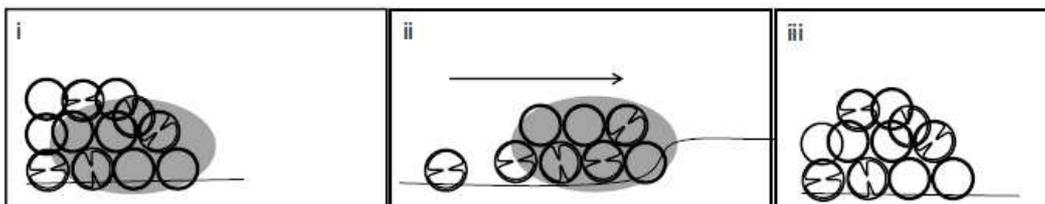


Figura 9 la figura descrive il meccanismo dello sliding. Nella fase i le cellule crescono, si aggregano e producono una particolare matrice extracellulare (denominata slime) che sarà fondamentale per lo spostamento. Fase ii: l'aggregato di cellule grazie alle PSM riduce il contatto con la piastra agr (il contatto deve restare in quanto essenziale) e si sposta depositando una scia di cellule e matrice extracellulare. Infine con la fase iii le cellule smettono di muoversi, la matrice scompare e le cellule riprendono a crescere normalmente. I meccanismi di quest'ultima fase sono totalmente sconosciuti. L'esperimento viene condotto in piastre agar (14).

Il *gliding* può essere lineare o circolare, la cellula può muoversi individualmente o a gruppi (*S. aureus* sembrerebbe in grado di muoversi solo a gruppi). I meccanismi alla base del *gliding* sono diversi e non si escludono a vicenda: si basano sulle adesioni focali della membrana cellulare, sulla matrice extracellulare che spinge e quindi sposta le cellule batteriche o infine su deformazioni della membrana cellulare che si traducono in una spinta per il batterio. Come già detto PSM sono una componente fondamentale della matrice extracellulare poiché permette il movimento del batterio in quanto, grazie alle loro proprietà surfactanti, diminuiscono l'aderenza di *S. aureus* per l'agar. Gli altri componenti della matrice extracellulare, il meccanismo preciso del *gliding*, la coordinazione delle cellule in testa alla cometa e la fase di arresto finale non sono ancora stati chiariti (14).

Inibire il movimento dello *Staphylococcus Aureus* significa inibire la sua capacità di colonizzazione dell'organismo e capacità di formare biofilm, esso pertanto rappresenta un importante target terapeutico. Il target principale per inibire entrambe le tipologie di movimento sembra essere l'inibizione del *pathway agr* e quindi delle PSM (14)

## 2.7 Biofilm *Staphylococcus aureus*

Il Quorum Sensing di *Staphylococcus Aureus* risulta essere fondamentale per la sua sopravvivenza e capacità di colonizzazione; probabilmente uno dei *pathway* cellulari più importanti è quello che permette la formazione del biofilm. Esso assicura sia la difesa del batterio da agenti meccanici, difese dell'organismo, agenti chemioterapici e altri microorganismi patogeni e non, sia la possibilità di diffondere l'infezione nell'organismo. Il processo di formazione del biofilm si divide in cinque differenti step: adesione, replicazione, esodo, maturazione, dispersione. (15)

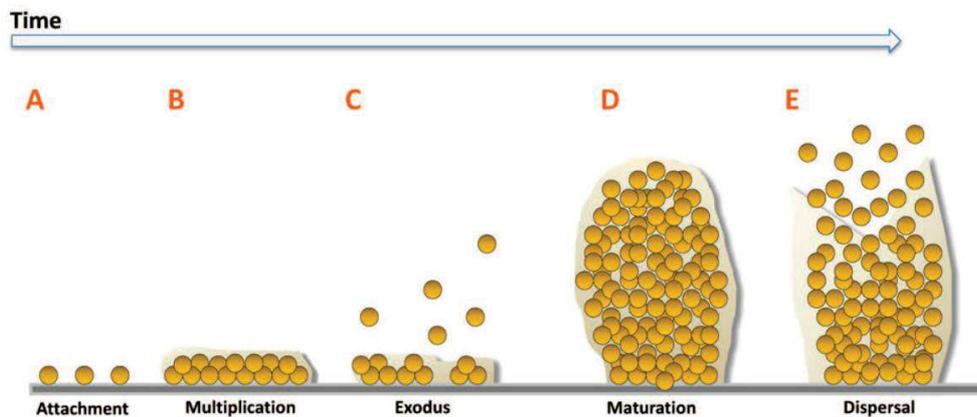


Figura 10. La figura rappresenta le diverse fasi di formazione e maturazione del biofilm fino alla fase di dispersione in cui le cellule batteriche vitali vengono disperse nell'organismo, possono attecchire in diversi distretti e dare origine ad infezioni di *S. aureus* croniche. (15)

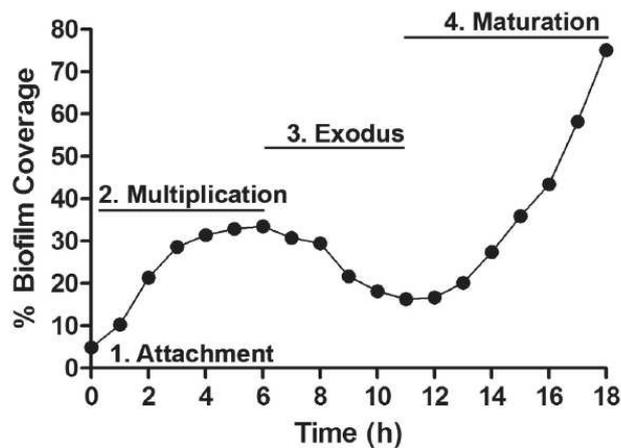


Figura 11. La figura rappresenta le tempistiche di ciascuna fase della formazione e maturazione del biofilm. Indica anche come varia la sua estensione durante le diverse fasi; fino alla fase di *multiplication* il biofilm cresce e aumenta la propria superficie grazie ai processi di crescita e adesione cellulare. Durante la fase di *exodus* la superficie che occupa diminuisce in quanto la struttura viene rimodellata e alcune cellule vengono rilasciate, infine la superficie occupata torna ad aumentare durante la fase di *maturation* (15).

## **Adesione**

La prima fase prende il nome di *attachment* o adesione durante la quale il batterio è in grado di riconoscere una superficie sui cui aderire e iniziare la formazione del biofilm. *Staphylococcus aureus* utilizza diverse modalità di adesione. Innanzitutto espone sulla superficie della propria membrana alcune proteine tra cui: fibronectina, fibrinogeno, collagene e citocheratina che sono in grado di legare strutture diverse presenti nell'organismo colonizzato. Nel corredo proteico è presente anche sortase A che è in grado di catalizzare la reazione tra il linker pentaglicidico, presente nel peptidoglicano della parete di *S. aureus*, e la superficie di legame dell'ospite dando origine ad un legame covalente. E' evidente che le proteine siano alla base dell'adesione, a prova di ciò sono stati eseguiti alcuni studi che prevedono l'aggiunta di alcune proteasi tra cui proteinasi K, i risultati evidenziano l'inibizione dell'*attachment*. Seppur tale fase sia primordiale nella formazione del biofilm si potrebbe pensare di sfruttare l'inibizione di particolari proteine per evitare la formazione del biofilm stesso. La fase di adesione avviene anche grazie a interazioni fisiche: le interazioni elettrostatiche, per esempio, sfruttano l'acido teicoico carico negativamente che può fungere da ponte elettrostatico tra strutture cariche positivamente, viene sfruttata anche la proteina majorautolisina che è in grado di formare interazioni di natura idrofobica (16).

Dal punto di vista temporale la fase di adesione risulta essere molto rapida, dalla figura numero 11 infatti si nota come duri pochi minuti (16).

A livello genomico sono stati valutati i geni che favoriscono e prevengono l'*attachment*: i geni *agr* tramite la produzione di PSMs prevengono l'*attachment* a causa delle loro proprietà surfactanti che prevengono l'aderenza: si è visto infatti che nella specie *S. aureus* con sistema *agr* silenziato la fase di *attachement* è favorita rispetto alla specie wild type. In contrasto a *agr* il gene *atlA*, che codifica per la majorautolisina, invece favorisce l'*attachement* (16).

## **Replicazione**

La seconda fase viene denominata: *multiplication* o replicazione ed ha la durata di circa 6 ore come evidenziato dalla figura numero 11 in tale fase i processi di divisione cellulare e di interazione cellula-cellula sono sovra regolati consentendo l'aumento delle dimensioni del biofilm. Durante la fase di replicazione viene generata la matrice extracellulare fondamentale per mantenere adese tra loro le cellule batteriche e

garantire quindi la stabilità del biofilm, ma anche per intrappolare e formare una riserva di sostanze nutritive (16).

La matrice extracellulare compone durante la fase di maturazione fino all'80% della massa totale del biofilm, una volta che tale matrice viene formata l'adesione del biofilm risulta irreversibile. I componenti della matrice extracellulare sono eDNA: DNA extracellulare ottenuto dalla lisi di altre cellule batteriche. Esso ha un effetto stabilizzante in quanto grazie alla sua carica negativa può fungere da ponte elettrostatico tra strutture cariche positivamente. Studi confermano che somministrando diverse tipologie di nucleasi, in particolare nucleasi di tipo I, durante le prime fasi di formazione del biofilm esse siano in grado di alterare la sua struttura che tende ad essere più lassa e disorganizzata. La mancanza di una struttura idonea non garantisce le proprietà di difesa meccanica sufficiente a far fronte agli stress esterni: flusso, all'azione del sistema immunitario e agli antibiotici (16).

La lisi di determinate cellule batteriche, da cui si ottiene eDNA, viene denominata "altruistic suicide", nel caso dello *S. aureus* avviene tramite la produzione di un'idrolasi che è controllata dagli operoni *cidABC* e *lrgAB*. Il sistema è regolato dalle proteine CidA e LrgAB che sono rispettivamente "holin" e "antiholin". Holin è una proteina che consente la lisi della cellula in quanto è funzionale al trasporto dell'idrolasi essenziale per la lisi della cellula, mentre antiholin è una proteina che impedisce la lisi cellulare. L'effettiva lisi della cellula batterica o il suo mantenimento in vita dipende pertanto dall'equilibrio CidA-LrgAB (16).

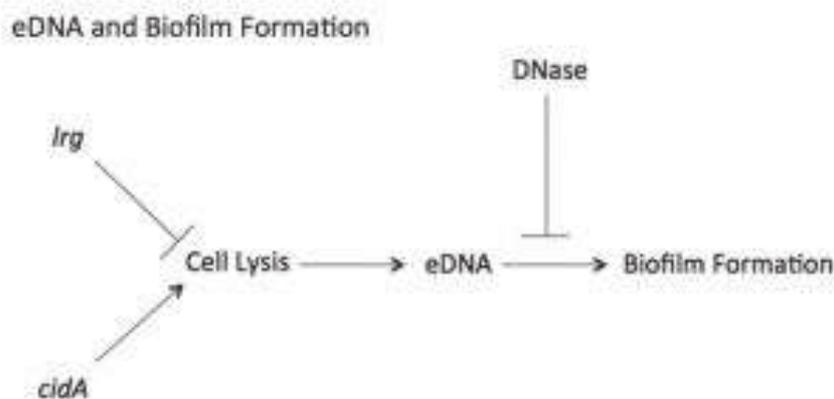


Figura 12 l'immagine schematizza i fattori che favoriscono il rilascio di eDNA e quindi promuovono la formazione del biofilm. Il gene *lrg* codifica per l'antiholin che promuove la sopravvivenza della cellula e diminuisce pertanto il rilascio di DNA tramite lisi cellulare. Il gene *cidA* invece codifica per l'holin che favorisce la lisi cellulare e quindi incrementa la fuoriuscita dalle cellule di DNA. Infine le nucleasi vanno ad intaccare la struttura della matrice extracellulare impedendo l'adesione cellulare. (16)

Oltre a eDNA la matrice extracellulare è formata anche da diverse proteine, fra le più importanti si ricorda PIA: “*polisaccaride intracellular adhesin*”. Analogamente a quanto visto per eDNA l’aggiunta di proteasi durante le prime fasi di formazione del biofilm comporta la formazione di una struttura lassa e disorganizzata. PIA viene prodotta in condizioni anaerobiche tramite il fattore SrrAB che lega e attiva il loco genico *icaADBC*. Ci sono inoltre fattori che down regolano l’attività di *icaADBC* e di conseguenza anche la produzione di PIA, fra questi si annoverano Spx un fattore regolatore dello stress che attiva il gene *icaR* che a sua volta down regola *icaADBC* e *tcaR*: regolatore trascrizionale “*teicoplanin associated locus*” che down regola direttamente l’attività di *icaADBC*. Rbf, proteina regolatrice della crescita del biofilm, riduce *icaR* e quindi incrementa la produzione di PIA. Infine si ricorda il *pathway* genico LuxS che ha come effetto finale quello di ridurre la formazione di PIA e quindi ridurre la formazione di biofilm. (16)

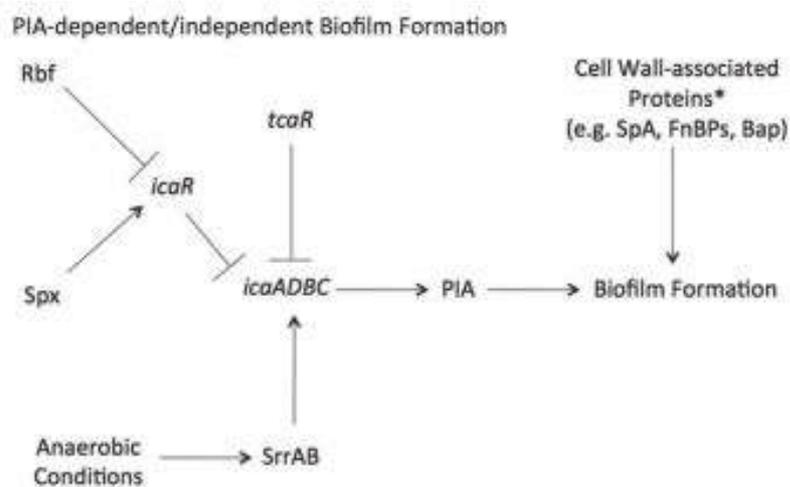


Figura 13 la figura schematizza i fattori che favoriscono la formazione del biofilm: SrrAB, SpA, FnBps, Bap, Rbf e quelli che lo sfavoriscono: *icaR*, Spx, *tcaR* e le proteasi in generale (16)

PIA nonostante sia importante per la “*multiplication*” del biofilm non è essenziale, è stato dimostrato infatti che colonie di *S. aureus* in cui manca il gene *icaADBC* e la produzione di PIA è nulla, sono comunque in grado di generare biofilm anche se diverso rispetto a quello della specie *wild-type*. Questo avviene grazie ad un *pathway* cellulare alternativo che comprende diverse proteine in grado di sopperire alla mancata attività di *icaADBC*: SpA, FnBPs: (*fibronectin binding protein*), Bap: (*biofilm associated protein*) (16).

Tra le molecole che regolano la struttura della matrice extracellulare vanno ricordate anche le PSM: *phenole soluble modulins*. Nonostante alcuni studi sostengano che la loro capacità di aggregarsi formando strutture polimeriche, simili alle fibrille amiloidi, comportino un fattore stabilizzante per la struttura del biofilm, la maggior parte degli studi affermano l'opposto. PSM, infatti, hanno una struttura con proprietà surfactanti che comportano la disaggregazione della matrice extracellulare e di conseguenza rappresentano ostacolo alla sua formazione. La formazione delle PSM si basa sull'*agr pathway*, osservando i grafici 14 e 15 si nota come la specie batterica con i geni *agr* silenziati produca un biofilm con estensione maggiore, rispetto alla specie *wild-type*, proprio perché non vengono prodotte le PSM (15).

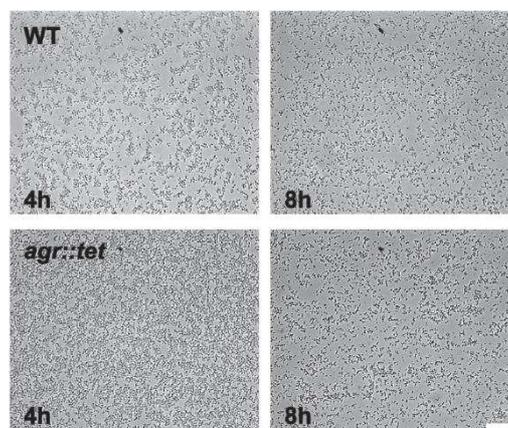
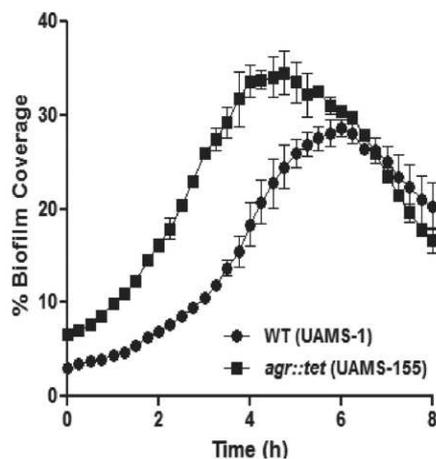


Figura 14 e 15 Le due figure evidenziano la diversa crescita del biofilm della specie *wild-type*: *agr pathway* attivo e la specie mutata (*agr tet*): *agr pathway* silenziato (15).

La matrice extracellulare è formata anche da polisaccaridi e altre sostanze proprie dell'ospite. La sua composizione, tuttavia, risulta essere molto diversificata in base all'ambiente in cui viene generato il biofilm

## Esodo

La terza fase di formazione del biofilm viene denominata esodo o *exodus*; si tratta di una fase in cui il biofilm viene rimodellato e vi è la liberazione di alcune cellule batteriche vitali. Il suo ruolo non è stato ancora ben definito, forse è funzionale al turnover cellulare e controllo della crescita cellulare. Si riteneva che il rimodellamento fosse dovuto alla produzione di proteasi tra cui la proteinasi K considerata la più importante. Tuttavia, studi più recenti evidenziano che *S. aureus* mutato in modo da non essere in grado di

produrre proteasi non presenta una fase di esodo diversa dalla specie *wild-type*. Si riteneva inoltre che tale fase fosse governata dal sistema *agr* similmente alla fase di *dispersal*. Si è valutata pertanto la fase di esodo in colture di *S. aureus* mutate in modo che *agr* fosse silenziato; sorprendentemente non si sono rilevate differenze tra le fasi di esodo delle colonie con *agr* silenziato e *wild-type*. Si è quindi investigato il ruolo delle nucleasi in quanto è ipotizzabile che tale fase si basi sulla alterazione del eDNA che forma la matrice extracellulare. Gli studi confermano tale teoria: il biofilm della specie mutata: incapace di produrre nucleasi presenta un biofilm più spesso della specie *wild-type* indice del fatto che non è avvenuta/ è avvenuta in maniera minima la fase di esodo. Si può pertanto affermare tale fase sia nucleasi dipendente, la loro produzione avviene circa 5 ore dopo l'inizio dell'attachment e coincide con l'inizio della fase di esodo che inizia circa 6 ore dopo. La produzione e regolazione delle nucleasi avviene tramite il sistema *saeQRS* (16).

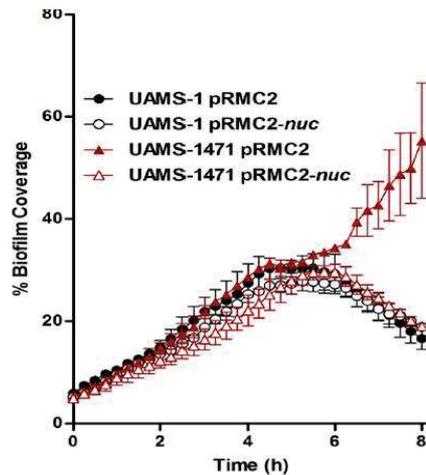


Figura 16 evidenzia la diversa copertura del biofilm della specie *wild-type*: UAMS-1 (pallini neri) e la specie mutata: UAMS-1471 (triangolino rossi). La seconda specie batterica forma un biofilm che risulta essere circa tre volte più esteso rispetto alla prima specie in quanto non avviene la fase di esodo. (16)

## Maturazione

La quarta fase è quella di maturazione funzionale allo scambio di nutrienti, eliminazione di sostanze di scarto, acquisizione dell'antibiotico resistenza e preparazione del biofilm alla fase di dispersione. Durante tale fase le cellule batteriche che compongono il biofilm acquisiscono fenotipi diversi funzionali a preparare il biofilm a resistere a stress esterni di diversa natura e a predisporre le cellule nelle migliori

condizioni possibili per la sopravvivenza. Un esempio è la capacità di cellule dello stesso biofilm di silenziare-attivare geni differenti in modo da differenziare il proprio metabolismo. Questa differenziazione è importante in quanto le cellule situate nelle zone più profonde del biofilm necessitano di metabolismo anaerobio data l'assenza di ossigeno, mentre quelle in superficie effettuano il metabolismo aerobio. Un altro esempio di diversa caratterizzazione fenotipica è la differenziazione di alcune cellule che diventano cellule persistenti e sono in grado di proteggersi dagli antibiotici (16).

Fondamentale è la regolazione della PDC: *programmed cell death/ altruistic suicide* funzionale a stimolare la morte solo di alcune cellule batteriche in modo da ottenere il rilascio di eDNA e sostanze nutritive, ma anche per la formazione di canali all'interno del biofilm essenziali per trasportare sostanze nutritive ed eliminare sostanze di scarto nelle porzioni più profonde della colonia. E' evidente infatti che ogni sistema biologico efficiente presenta diversità fenotipiche al suo interno che sono alla base della sua sopravvivenza. (16)

### **Dispersione**

La quinta e ultima fase prende il nome di dispersione "*dispersal*". Essa inizia quando la colonia batterica è sovrappopolata e si verifica quindi la situazione di *starvation*, le cellule batteriche pertanto sono portate a staccarsi dalla colonia per cercare altri distretti alla ricerca di nutrimenti. Man mano che le cellule si staccano dalla colonia diminuisce il sovraffollamento e di conseguenza anche i *signaling* cellulari che supportano la dispersione. Tale fase è regolata dal *pathway* cellulare *agr* che culmina con la produzione di PSM che, grazie alle loro proprietà surfactanti, sono in grado di alterare la struttura del biofilm e quindi consentire la dispersione di cellule batteriche vitali che possono attecchire in altri distretti dando origine ad un'infezione cronica e sistemica. Per esplicitare la loro funzione è fondamentale la struttura anfifilica di cui sono composte originata dalla presenza sia di amminoacidi idrofilici che idrofobici; tale struttura conferisce loro proprietà surfactanti che alterano i legami non covalenti che mantengono adese le cellule nella matrice extracellulare (16).

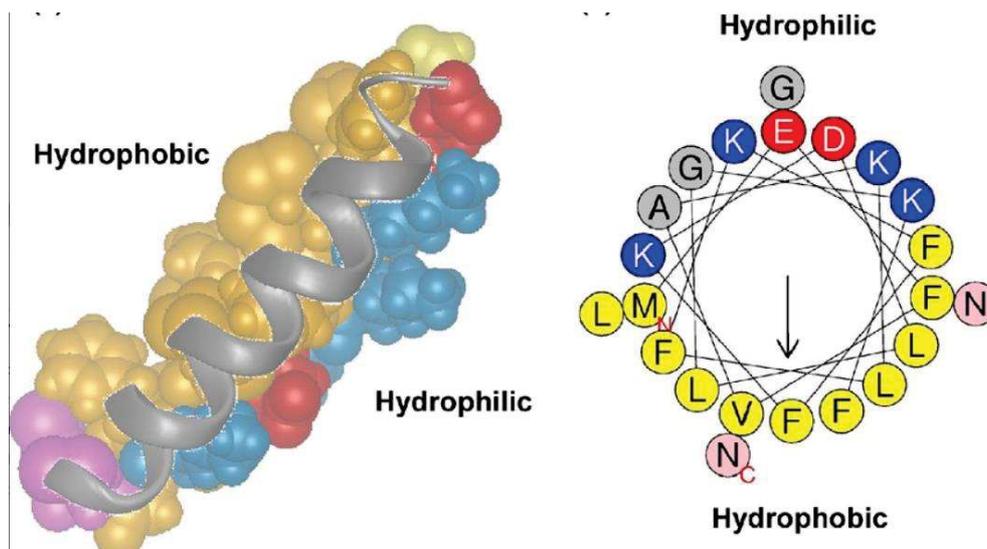


Figura 17 la figura rappresenta la struttura di PSM. E' riportata la struttura di PSM alfa3 come esempio. Nella parte sinistra viene evidenziata la sua struttura alfa-elica e la distinzione tra la porzione idrofobica in giallo e quella idrofilia in blu (amminoacidi carichi positivamente) e rosso (amminoacidi carichi negativamente). Nella parte destra vengono riportati gli amminoacidi che compongono PSM alfa3. Si nota come gli amminoacidi idrofobici e idrofilici siano ben separati e occupino porzioni opposte della molecola generando pertanto una molecola anfifilica.

Va ricordato che le PSM sono attive solamente se prodotte dalle cellule batteriche, non hanno pertanto effetto la somministrazione delle equivalenti sintetiche in quanto le cellule che occupano la porzione esterna del biofilm sono adese tra loro mediante legami covalenti che le PSM non sono in grado di alterare. Oltre alle *phenol soluble modulins* sono fondamentali per la *dispersal* anche nucleasi, proteasi e agenti meccanici come per esempio il flusso esterno. Chiaramente le prime vanno a rompere i ponti elettrostatici formati dall'eDNA, le seconde vanno a ledere le proteine che fungono da collante fra cellule mentre il flusso ha azione meccanica (16).

Sono state valutate le differenze tra biofilm formati dalla specie batterica *wild-type*: *pathway agr* attivo e la specie batterica con *agr* silenziato, nel primo caso avverrà la produzione di PSM, mentre nel secondo caso no. L'esperimento viene condotto prima in condizioni di flusso statico e poi in condizioni di flusso dinamico. Dai risultati in flusso statico si evince che la specie *wild-type* produce un biofilm caratterizzato da un minor volume e minor spessore. Tale specie presenta anche una minor formazione di canali e la superficie del biofilm risulta essere più ruvida. Lo stesso esperimento, effettuato in flusso dinamico, ha evidenziato anche che nella specie *wild-type* sono presenti le "waves of detachment" che caratterizzano la struttura del biofilm durante la fase di dispersione, tale fattore è confermato dal fatto che la specie *wild-type* è in grado di diffondere l'infezione dal catetere della cavia nel suo organismo, mentre la specie mutante non è in

grado. Tale studio sembra confermare la teoria secondo cui PSM vadano ad ostacolare la formazione del biofilm, mentre siano determinanti per fase di *dispersal* (17).

	SPECIE <i>WILD-TYPE</i>	SPECIE MUTATA
VOLUME BIOFILM	-	+
SPESSORE BIOFILM	-	+
CANALI	-	+
RUVIDITA' SUPERFICIALE	+	-
<i>WAVES OF DETACHMENT</i>	SI	NO

Tabella 2. Riassunto delle diverse caratteristiche del biofilm originato dalla specie *wild-type* (*pathway agr* attivo) e quello della specie mutata (*pathway agr* inattivo).

## 2.8 Interazioni di condizioni statiche o dinamiche nella crescita di *S. aureus*

Il flusso svolge un ruolo fondamentale per quanto riguarda: adesione, crescita, struttura, concentrazione cellulare e dispersione del biofilm. Il flusso infatti, rispetto all'ambiente statico, promuove un ambiente in cui è favorevole l'aggregazione cellulare, la comunicazione chemotattica e lo sviluppo del *Quorum Sensing*.

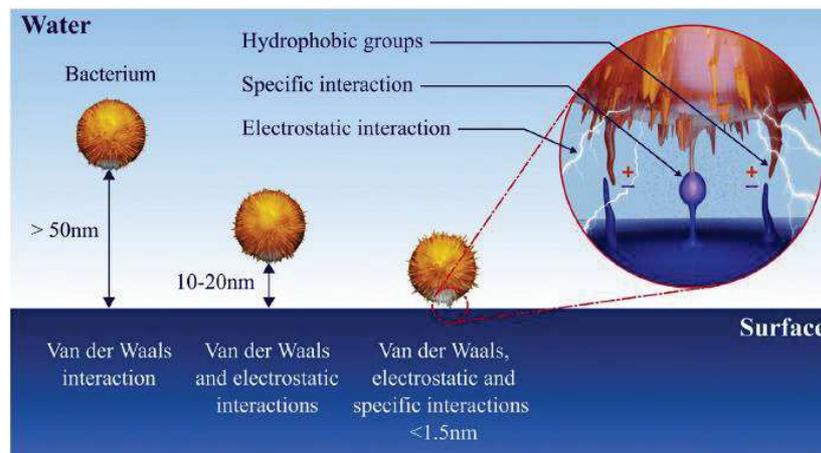


Figura 18. Rappresentazione della teoria DLVO: al variare della distanza tra batterio e tessuto host variano le interazioni attrattive e repulsive (18).

La teoria DLVO afferma che al variare della distanza tra batterio e superficie di contatto variano le interazioni attrattive-repulsive che determinano il passaggio da adesione

reversibile a irreversibile. Ad una distanza superiore a 50 nm vi sono unicamente interazioni basate su forze di Van der Waals che instaurano un legame batterio-host reversibile in quanto interazioni deboli. Diminuendo la distanza a 10-20 nm iniziano ad instaurarsi anche interazioni elettrostatiche generando quello che viene indicato come minimo secondario; in questa fase l'adesione è ancora reversibile in quanto il flusso, in particolare quello turbolento, è in grado di rimuovere la cellula batterica. Se la distanza diminuisce ancora si formano interazioni repulsive data l'elevata energia libera della membrana: repulsive layer, la repulsione continua finché il batterio non si avvicina fino a 1,5 nm dove le interazioni tornano attrattive e avviene il passaggio tra legame reversibile e irreversibile anche in caso di flusso elevato e turbolento, in questo stadio oltre alle interazioni deboli e elettrostatiche si instaurano anche interazioni specifiche. Oltre tale distanza non è possibile andare in quanto si instaurano repulsioni di natura sterica (18).

Il flusso è in grado di modulare e modificare le caratteristiche del biofilm: in caso di flusso con elevato sforzo di taglio tangenziale e con flusso laminare la struttura del biofilm risulterà più omogenea, più spessa e con una minor densità cellulare. Incrementando il flusso chiaramente aumenta anche lo stress per le cellule batteriche che lo sopportano incrementando la produzione di matrice extracellulare fino all'80% del volume totale del biofilm; dall'aumento della matrice deriva la minor concentrazione cellulare nominata in precedenza. Va inoltre considerato che l'elevato flusso incrementa l'attività metabolica della cellula, tale condizione non è sostenibile per lunghi periodi, raggiunto il limite vengono prodotti fattori che garantiscono la dispersione facilitata per l'appunto anche dall'elevato flusso (18).

Tra gli altri aspetti l'elevato flusso promuove anche la penetrazione di ossigeno e nutrimenti nelle porzioni più profonde del biofilm per diverse ragioni. Innanzitutto il flusso evita la formazione del *boundary layer* che sfavorisce la permeazione di nutrimenti e ossigeno in quanto sfavorisce l'apporto di nuovi nutrimenti sulla superficie esterna del biofilm. Il processo diffusivo, che fisiologicamente permette il passaggio di ossigeno e nutrimenti, non è sufficiente per garantire la vita della colonia batterica, sono necessari pertanto anche i canali che permettono il passaggio di ossigeno e nutrienti. La formazione dei canali in questione viene stimolata maggiormente in caso di flusso elevato (18).

Infine il flusso ha anche effetto sulla velocità di crescita del biofilm: aumentando il flusso infatti si registra un'accelerazione della crescita cellulare probabilmente perché l'alto flusso favorisce l'apporto maggiore di nutrienti. Tuttavia si è anche notato che la crescita veloce promuove la formazione di colonie con bassa adesività e quindi sarà di conseguenza facilitata la loro dispersione (18).

### **2.9 Quorum sensing**

Il *pathway* cellulare che regola la formazione di PSM, fattori di virulenza, tossine e enzimi litici si basa sui geni *agr* che costituiscono il corredo genico fondamentale per il *Quorum Sensing* di *S. aureus*, l'intero meccanismo e il ruolo di ciascun effettore, tuttavia, risulta non del tutto ancora chiarito.

Il fattore da cui inizia il *pathway agr* è AgrD che viene modificato da AgrB. AgrB è una proteina trans membrana (permeasi) che catalizza la reazione di formazione di un tiolattone chiuso ad anello tra la cisteina di AgrD e la sua porzione N-terminale; in seguito SpsB: *type I signal peptidase* effettua un taglio peptidico nella porzione N-terminale di AgrD formando così AIP. Tramite tale taglio si possono generare quattro differenti AIP che presentano tutti il tiolattone ciclico, ma differiscono nell'estremità N-terminale. Essi agiscono come attivatori del proprio AgrC e inibitori di quello degli altri AIP tramite un processo che prende il nome di *cross inhibition*. Attualmente per bloccare il *pathway agr* si pensa di modificare AIP in modo da usarlo come inibitore di tutti gli AgrC (19).

AIP lega la *spanning domain* di membrana AgrC situato nella porzione N-terminale; tale legame consente dimerizzazione e conseguente transautofosforilazione di AgrC che ora è in grado di attivare AgrA. La reazione di attivazione consiste nella fosforilazione di AgrA tramite AgrC che trasferisce un gruppo fosfato dalla sua istidina 239 all'aspartico 59 di AgrA. (19)

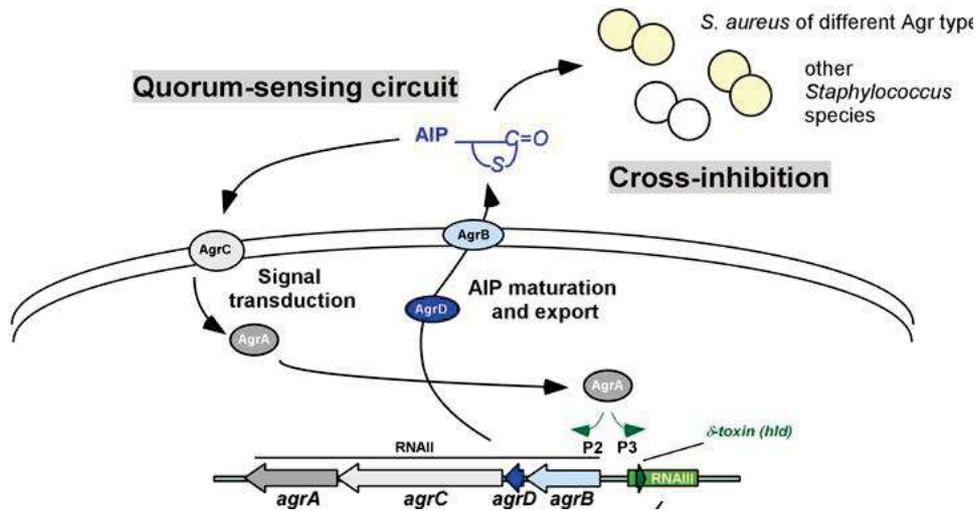


Figura 19 la figura schematizza il pathway agr(19).

AgrA dimerizza e può quindi spiegare la sua funzione di regolatore genico. Esso, infatti, presenta due domini: dominio N-terminale che è legato tramite un linker al secondo dominio: DNA binding domain. Il binding domain: LytTR è formato da 10 stranded elongated  $\beta$ - $\beta$ - $\beta$  fold inseriti in tre strutture beta foglietto antiparallele

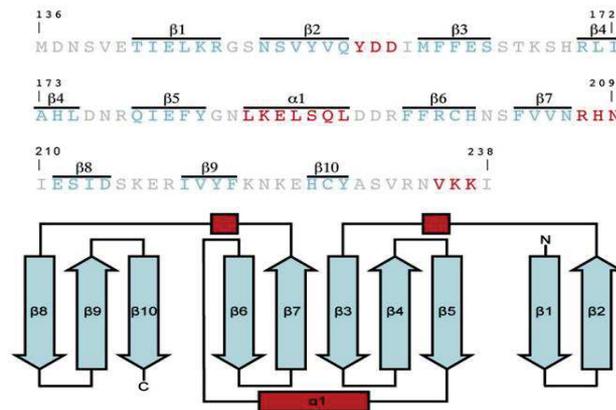


Figura 20 la figura schematizza la struttura e posizione dei beta fold e alfa elica (20)

e due brevi turn alfa eliche che non sono coinvolte nel legame con il DNA. I beta foglietti sono disposti parallelamente formando una sorta di beta-beta-beta sandwich. (20)

I 10 beta fold sono tenuti assieme da una buried isoleucina e da diversi ponti salini che connettono e stabilizzano tutti e i 10 segmenti beta, tutti i linker sono situati nei pressi di un turn nella porzione opposta del lytTr domain che lega il DNA. (20)

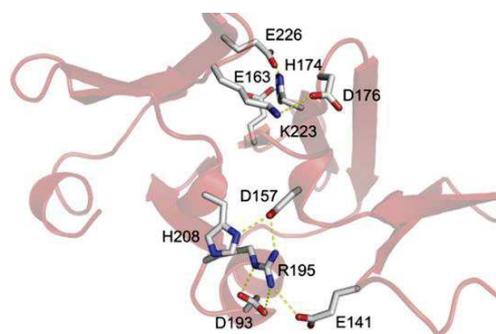


Figura 21 la figura schematizza i ponti salini che stabilizzano AgrA. Gli atomi di C sono in bianco, ossigeno in rosso e azoto in blu. (20)

Il *binding domain* di AgrA è in grado di legare *AgrA binding site 1* e *AgrA binding site 2*. AgrA si lega a sequenze imperfette dirette di consenso, separate da 12-13 paia di basi e situate a -35 paia di basi dal promotore che viene riconosciuto dalla RNA polimerasi *holoenzyme* che inizia la trascrizione. *AgrA binding site 1* è responsabile della trascrizione di AgrA tramite l'operone P1; pertanto, AgrA stimola la produzione di sé stesso tramite un sistema che prende il nome di *positive loop feedback* che assicura l'amplificazione dell'intero *pathway agr*. Sempre *AgrA binding site 1* è responsabile della trascrizione di AgrC, AgrD e AgrB tramite l'operone P2, essi sono i componenti che costituiscono il pattern enzimatico per la formazione di AgrD e attivazione di AgrC. *AgrA binding site 2* invece responsabile della trascrizione di RNAIII tramite l'operone P3; RNAIII attiva il gene *hdi* che codifica per la  $\delta$  tossina e controlla la produzione di una vasta gamma di fattori di virulenza (20).

Il ruolo di RNAIII non è ancora del tutto chiarito in quanto gli studi sono concordi nell'affermare che attivi la trascrizione di Hla denominata anche alfa emolisina e  $\delta$  tossina mentre non sono concordi se RNA III attivi o inibisca la produzione di tossine, proteine di adesione, lipasi e altri fattori di virulenza(19).

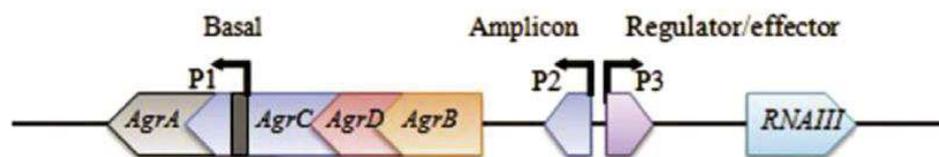


Figura 22 la figura schematizza i tre operoni P1, P2 e P3 e i relativi geni di cui ne controllano l'espressione (19).

Il legame del dominio LytTR di AgrA con il DNA avviene sia tramite interazioni specifiche che aspecifiche. È possibile modificare la struttura di AgrA per alterare il legame con il DNA, in particolare la mutazione che sembra compromettere maggiormente il legame è quella sulla His 200. Inoltre AgrA è sensibile allo stress ossidativo: se viene ossidato il ponte di solfuro presente nel dominio LytTR esso subisce una mutazione della propria struttura che impedisce il legame con il DNA. Sembra infine che anche alterando la fosforilazione di AgrA non solo vari l'affinità con il DNA, ma anche la probabilità di legarsi ai diversi siti di legame in quanto non è in grado di dimerizzare (19).

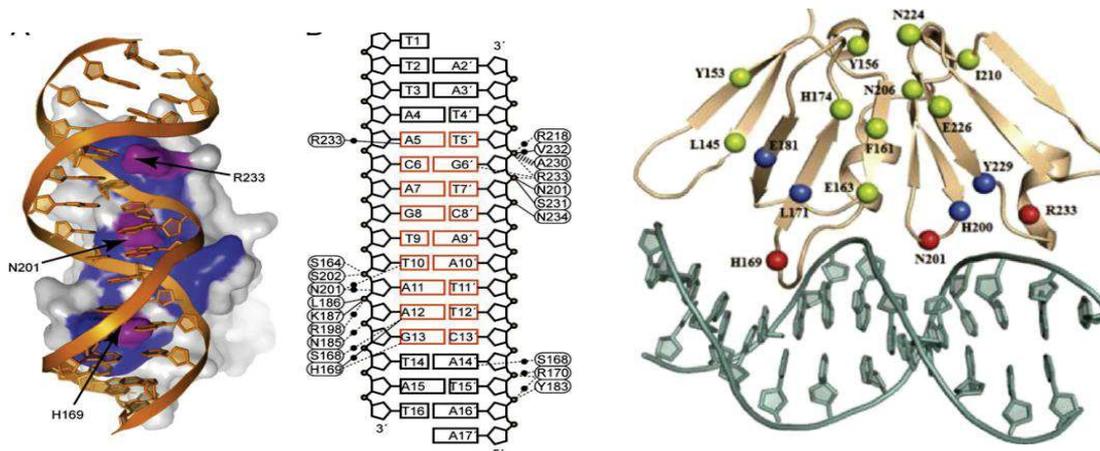


Figura 23 e 24 in figura 23 vengono schematizzate le interazioni tra gli amminoacidi di AgrA e DNA(18), in figura 24 vengono rappresentate le interazioni fondamentali (20).

La figura 23 evidenzia il legame del dominio *lytTR* di AgrA con il DNA. Tale legame avviene tramite tre interazioni specifiche tra amminoacidi presenti nei tre *loop* di *LytTR* e le basi azotate dei *AgrA binding site*. Gli amminoacidi responsabili di tali interazioni sono il residuo istidina H169, situata tra il *loop* 4 e 5, che interagisce tramite ponte idrogeno con guanina 13 e adenina 12. Il residuo arginina R233 situato tra il *loop* 10 e il segmento  $\alpha$ elica forma ponti idrogeno, tramite molecole di acqua, con adenina5 e guanina6'. Infine l'ultimo ponte idrogeno si forma tra asparagina 201 e timina 10. Inoltre vi sono anche interazioni aspecifiche tra gli amminoacidi del dominio *LytTR* e il *backbone* fosfodiesterico del DNA; la natura delle interazioni è elettrostatica in quanto è stato dimostrato che lungo la porzione di AgrA che lega il DNA sono situati la maggior parte degli amminoacidi basici (carichi positivamente a pH fisiologico) e che quindi possono interagire con il *backbone* fosfodiesterico del DNA carico negativamente. Le interazioni specifiche sono essenziali per ottenere una  $K_d$  tra dominio *LytTR* e il DNA pari a  $-80$  nmolare; se tali amminoacidi venissero modificati si assisterebbe ad una sensibile diminuzione di  $K_d$  o alla compromissione totale del legame (20).

Il legame *LytTR* di AgrA e il DNA avviene tra i tre *loop* e i due solchi maggiori del DNA consecutivi intramezzati dal solco minore inducendo una distorsione della struttura nucleotidica di 38 gradi; la distorsione è fondamentale perché permette una perfetta complementarietà geometrica ed elettrostatica. In totale il legame *LytTR*-DNA interessa 16 paia di basi considerando sia interazioni specifiche che aspecifiche per una lunghezza totale di 50 amstrong e un'area di 1516 amstrong quadrati. Nonostante il legame con il DNA avvenga nella porzione N-terminale si è visto che inducendo mutazioni nella porzione C-terminale di AgrA viene alterata la trascrizione di RNAIII probabilmente

perché viene compromessa la stabilità della proteina o perché anche la porzione C-terminale compie interazioni con il DNA non ancora chiarite. (20)

### **Attività PSM**

AgrA è in grado anche di legare *psm $\beta$*  e *psm $\alpha$* : i due promotori che originano PSM. Esistono diverse tipologie di PSM: 4 PSM $\alpha$ , 2 PSM $\beta$  e  $\delta$  tossina, rispettivamente codificate dall'operone alfa, beta e hdl.  $\alpha$ PSM e  $\delta$  tossina vengono denominate *short tipe* in quanto sono grandi circa la metà rispetto i PSM $\beta$ . L'attivazione di *hdl*, come visto in precedenza, non avviene tramite AgrA ma bensì tramite RNA III(21). PSM si possono trovare in forma fibrillare o monomeric.

PSM oltre ai ruoli già visti di destabilizzare la struttura del biofilm tramite le loro proprietà surfactanti sono anche in grado di ridurre la formazione delle *persister cell*. Le *persister cell* sono cellule insensibili agli antibiotici non tramite meccanismi di antibiotico resistenza, ma tramite down regolazione dell'attività cellulare entrando in uno stato di *dormancy*. In tale stato sono ridotti al minimo tutti i *pathway* colpiti dagli antibiotici che pertanto risultano inutili. Le *persister cells* si generano quando le cellule sono sottoposte a intenso stress come per esempio la presenza di antibiotici o mancanza di sostanze nutritive; nello stato di *dormancy*, infatti, il consumo di ATP è minimo. *Staphylococcus aureus* è in grado di diventare *persister cell* durante la fase di crescita esponenziale o stazionaria e, una volta che le condizioni ambientali tornano ottimali, la cellula batterica è in grado di riacquisire il fenotipo iniziale. Le PSM nella forma monomeric sono in grado di inibire la formazione di *persister cell*, in particolare si è visto che i composti più attivi sono PSM  $\alpha$ 2 o la combinazione di tutti i PSM  $\alpha$ : 1, 2, 3, 4. PSM in forma di fibrille invece non sembrano avere un ruolo nella loro formazione; tuttavia, si ipotizza che tali fibrille possano costituire una riserva importante in quanto possono essere convertite in PSM monomeric tramite meccanismo pH dipendente. Il meccanismo di azione delle PSM nell'incrementare la formazione di *persister cells* non è ancora accertato; un'ipotesi prevede che siano in grado di alterare il potenziale di membrana (22).

PSM  $\alpha$  presentano anche attività citotossica in quanto sono in grado di ledere la membrana cellulare di cellule eucariotiche e procariotiche; per PSM  $\beta$ , invece, al momento non è confermata attività citotossica. La differente attività litica sembrerebbe portare alla conclusione che PSM  $\beta$  abbiano un ruolo più importante di PSM  $\alpha$  nel processo di *dispersal*. (23)

Infine PMS sia  $\alpha$  che  $\beta$  che  $\delta$  *toxin* sono agenti pro infiammatori in quanto si legano al recettore: *formyl peptide receptor 2*: FPR2 che è presente nelle cellule immunitarie dell'ospite. Il legame a tale recettore scatena la risposta infiammatoria. Oltre a legare FPR2 sono pro-infiammatori anche per l'azione litica nei confronti di globuli bianchi e rossi, in danno infatti stimola il rilascio di mediatori pro-infiammatori (23).4

## 2.10 Quorum quenching

Con il termine *quorum quenching* si intende l'utilizzo di composti in grado di andare ad alterare-bloccare il *pathway* del *Quorum Sensing*. Come visto in precedenza il QS permette la difesa del microorganismo patogeno da stress ambientali, da antibiotici e dal sistema immunitario dell'ospite. I composti con azione *quorum quenching*, quindi, non sono battericidi o batteriostatici, ma permettono di abbassare le difese del patogeno e quindi permettono al sistema immunitario, da solo o in combinazione con basse dosi di antibiotico, di debellare l'infezione. Inoltre non avendo azione citotossica non stimolano la comparsa dell'antibiotico resistenza (24).

Come accennato in precedenza AgrB converte AgrD in AIP; tramite differenti reazioni si generano quattro classi di AIP che hanno azione cross inibitoria nei confronti degli AgrC delle altre classi. Pertanto si ritiene possibile modificare AIP col fine di ottenere un composto con attività inibitoria potenziata verso tutte le classi di AgrC. Inibire il *pathway agr* significa inibire l'attivazione di RNA III e degli operoni *psm*  $\alpha$  e  $\beta$  che sono i maggiori controllori della produzione di fattori di virulenza e formazione del biofilm (24).

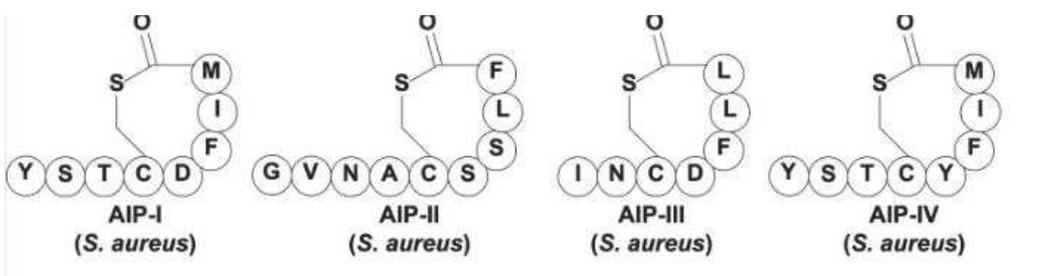


Figura 25 struttura dei quattro AIP dopo che è avvenuta la reazione di attivazione con la conseguente ciclizzazione e formazione del tiolattone ciclico (25)

### Classe AIP I

Una modifica effettuata nei confronti di AIP I è quella di sostituire l'aspartico in posizione 5 con un'alanina. Tale modificazione comporta la perdita dell'attività

attivatoria e conserva quella inibitoria nei confronti di AgrC. Il problema nell'utilizzo di tale peptide come antagonista di AgrC è la sua bassa emivita, il tiolattone infatti risulta essere una struttura chimica altamente instabile e AIP viene degradato velocemente dalle proteasi. (26).

### Classe AIP II

AIP II è una molecola che presenta alanina al posto dell'aspartico in posizione 3; AIP II ha bassa attività attivatoria nei confronti di AgrC, mentre presenta discrete proprietà inibitorie. Esiste un'altra versione di AIP II in cui viene troncata una porzione in N-term, in questo modo rimangono solo le proprietà inibitorie (26).

### Classe AIP III

AIP III Nf5 è una molecola in cui la fenilalanina viene trasferita nell'azoto in posizione 5, così facendo si ottiene un potente inibitore di AgrC IV, ma gli altri AgrC

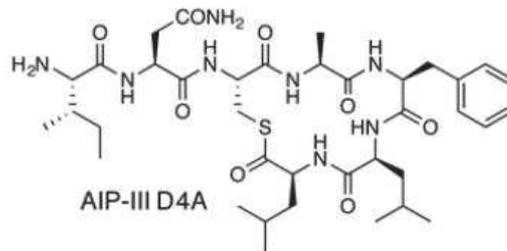


Figura 26 struttura AIP-III D4A (26)

sono debolmente inibiti. Tale AIP può essere ulteriormente modificato sostituendo l'aspartico in posizione 4 con una alanina ottenendo una molecola denominata AIP III D4A, essa risulta essere la versione più promettente tra gli AIP modificati in quanto in grado di inibire tutti gli AgrC. La sua attività inibitoria presenta IC 50 per AgrC I, II, III, IV rispettivamente di 0,49 0,43 0,051 e 0,035 nMol (26).

### Classe AIP IV

AIP IV modificato viene generato tramite rimozione della coda esaciclica ottenendo una molecola con discreta attività inibitoria per AgrC II e III, mentre attività inibitoria minima verso AgrC I e IV. Inoltre si è pensato di formulare un composto che sia una macromolecola formata da circa quaranta AIP IV con norleucina al posto della carbossimetionina; la macromolecola in questione presenta potente attività inibitoria verso tutti gli AgrC in quanto compete con i singoli AIP per il loro recettore. Quest'ultimo composto assieme a AIPD4A sono le molecole più promettenti per ideare una nuova modalità di prevenire infezioni croniche di *S. aureus* (26).

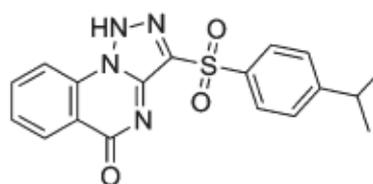
### AIP non di *Staphylococcus aureus*

Anche il batterio *Staphylococcus epidermidis* produce una classe di AIP I: la versione non modificata permette l'inibizione della  $\delta$ -tossina e di tutta la classe di AIP IV di *S. aureus*, la versione in cui è stato troncato l'aspartico in posizione N-terminale invece provoca l'inibizione della classe di AIP I di *S. aureus* (26).

*Pseudomonas aeruginosa* produce tramite il proprio Q.S. un homoserin lattone denominato 3-O-C12 HSL che a basse dosi è in grado di bloccare la produzione di AIP, mentre ad alte dosi inibisce la crescita batterica. Si ritiene che tali speci batteriche producano sostanze con funzione di *quorum quenching* nei confronti di *S. aureus* in quanto competono per le stesse nicchie biologiche (26).

### Molecole di sintesi

Savirina è una molecola di sintesi in grado di inibire il *pathway* di Q.S. di *S. Aureus* prevenendo il legame tra LytTR e il DNA in modo da bloccare la produzione di RNA III e PSM. Savirina presenta IC<sub>50</sub> inferiore a 1  $\mu$ mol e al momento non si evidenziano forme di resistenza verso tale molecola sia in vivo che in vitro. Tramite il suo utilizzo si è visto una riduzione delle infezioni di *S. aureus* nelle cavie. Il meccanismo d'azione, tuttavia, deve ancora essere chiarito (24).



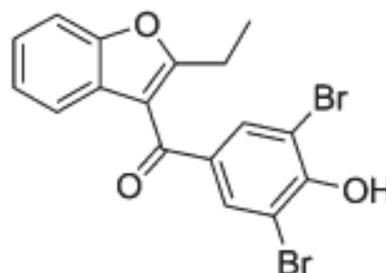
24

Savirin

AgrC-1 IC<sub>50</sub> < 1.0  $\mu$ M

Figura 27 struttura e IC<sub>50</sub> della savirina (24)

Benzbromarone è un principio attivo che tradizionalmente viene utilizzato per il trattamento della gotta; tuttavia, si è visto che è in grado di ridurre la formazione di ascessi in cavie murine infettate da *S. aureus*. Anche in questo caso come per la savirina il meccanismo d'azione non è stato completamente chiarito; si ritiene che il benzbromarone inibisca il legame di AIP con AgrC e la produzione di stafiloxantina: un pigmento carotenoide usato da *S. aureus* come protezione contro gli agenti ossidanti. A differenza della



25

Benzbromarone

AgrC-1 IC<sub>50</sub> 0.13  $\mu$ M

Figura 28 struttura e IC<sub>50</sub> della molecola benzbromarone (24)

savirina per il benzbromarone sono stati effettuati degli studi di SAR: *Structure-Activity Relationship* per potenziare la sua attività. In tali studi si modifica una o più porzioni del farmaco sostituendo porzioni della molecola con altri gruppi funzionali e si valuta come

cambia la sua attività. Il miglior risultato è quello indicato in figura 25 e presenta una IC50 pari a 0,13  $\mu\text{mol}$  (24).

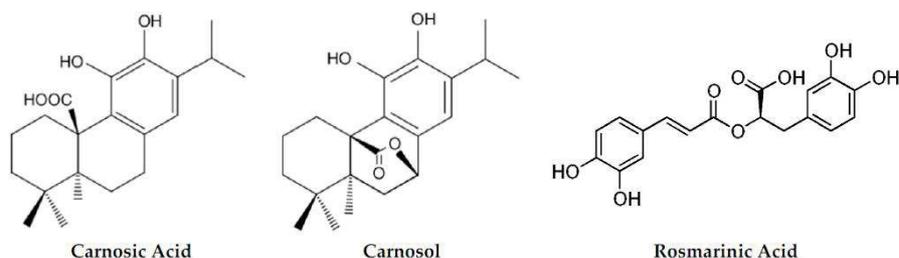
## 2.11 Carnosolo

In natura le piante presentano una grande abilità difensiva nei confronti di virus e batteri tramite la produzione di molecole difensive, il loro utilizzo nella medicina popolare è consueto e si stanno anche studiando diversi composti vegetali come possibili agenti antibatterici (9).

Tra i fitocomplessi più studiati vi è quello del rosmarino: *Rosmarinus officinalis*, esso contiene in particolare carnosolo e acido carnosico che hanno evidenziato importanti attività farmacologiche quali proprietà antimicrobiche nei confronti dei batteri Gram positivi: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, l'attività antimicrobica sembra essere legata alla presenza di composti fenolici. Tale fitocomplesso favorisce inoltre l'incremento delle funzionalità cognitive, presenta azione ossido protettiva nei confronti di danni al DNA nel fegato e testicoli e attività antitumorale. Per quanto riguarda l'azione antitumorale il carnosolo è in grado di attenuare le forme di resistenza dei tumori, è in fase di studio il suo utilizzo contro il tumore mammario GG918, in quanto riduce l'attività delle pompe di efflusso (glicoproteinaP) che estromettono il chemioterapico dalla cellula tumorale (27).

Infine carnosolo e acido carnosico presentano altre due importanti proprietà: il *rosmarinus officinalis* è una pianta economica e la loro estrazione non risulta complicata, inoltre presentano una struttura chimica che garantisce un corretto bilancio lipofilo-idrofilo che permette di attraversare le membrane biologiche agilmente e di ripartirsi nel citosol (27).

Uno studio si è focalizzato su acido carnosico, carnosolo e acido rosmarinico. Gli esperimenti evidenziano che i primi due composti hanno attività antibatterica, antiossidante e antiinfiammatoria, mentre l'acido rosmarinico non dimostra importanti proprietà farmacologiche. Per quanto concerne l'attività antibatterica si è notato la loro abilità nell'inibire il *pathway Quorum Sensing* di *S. aureus* inibendo *agr pathway* (9).



**Figura 29** struttura chimica di acido carnosico, carnosolo e acido rosmarinico. I primi due composti sono quelli più interessanti dal punto di vista farmacologico e appartengono alla classe dei diterpeni. Essi costituiscono il 5% in peso dell'estratto secco delle foglie di rosmarino officinalis (9).

La concentrazione a cui l'acido carnosico riesce ad inibire sia la produzione di RNAIII che di psm alfa è pari a 10  $\mu\text{mol}$ , mentre il carnosolo a 5  $\mu\text{mol}$ . L'acido rosmarinico invece non dimostra attività neppure a 100  $\mu\text{mol}$  pertanto è stato escluso. I due composti candidati non dimostrano attività sinergica se usati in combinazione e non sembrano stimolare la comparsa di forme di resistenza da parte di *S. aureus*, non si registrano inoltre significative variazioni se si usa il fitocomplesso o i principi attivi isolati. Entrambi i composti sono stati testati in vivo su carie murine affette da dermatite atopica causata da *S. aureus*: si è visto che un trattamento topico con pomate a base di acido carnosico o carnosolo migliora il quadro patologico (9).

Oltre ad avere attività di *Quorum Quenching* carnosolo, acido carnosico assieme ad altri diterpeni presenti nel fitocomplesso del *rosmarinus officinalis*, sono in grado di inibire la resistenza di *S. aureus* rendendo l'infezione batterica trattabile con antibiotici che prima risultavano inefficaci. Analogamente a quanto visto per le proprietà antitumorali i due diterpeni sono in grado di legare pompe di efflusso incrementando la quantità di antibatterico presente nel citosol e quindi potenziandone l'attività. Pertanto acido carnosico e carnosolo sono stati incubati con colture di *S. aureus* ed è stata monitorata l'attività delle pompe di efflusso tramite etidio bromuro (28).

Gli studi riportano attività nei confronti di XU212: linea di *S. Aureus* che esprime TetK: una pompa di efflusso che comporta resistenza verso le tetracicline. Trattando TetK con 10  $\mu\text{g/L}$  di carnosolo e acido carnosico l'attività antibatterica delle tetracicline aumenta dalle due alle quattro volte (28).

Trattando invece, con le stesse concentrazioni di carnosolo e acido carnosico, la linea batterica RN4220 che tramite la pompa di efflusso MsrA risulta essere resistente verso l'eritromicina, la sua attività aumenta di otto volte (28).

Infine i due diterpeni sono stati testati anche verso SA-1199B: una linea cellulare batterica resistente alla norfloxacina. I risultati sono molto promettenti anche comparati con la reserpina: un principio attivo antiipertensivo e antipsicotico utilizzato per diminuire la resistenza batterica dovuta alle pompe di efflusso (28).

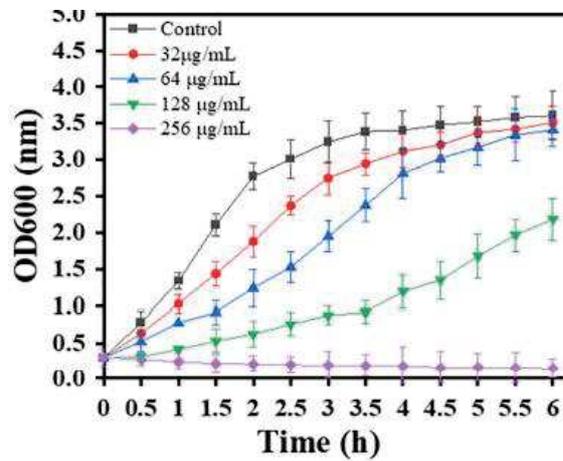


Figura 30 la figura rappresenta la riduzione dell'efflusso di etidio bromuro nella linea cellulare batterica SA-1199B. i pallini neri pieni rappresentano la reserpina, i triangoli vuoti l'acido carnosico (28).

#### Azione battericida verso cellule batteriche in forma planktonica

Dalla curva di crescita evidenzia l'azione del carnosolo sulla crescita in forma planktonica di *S. aureus* si nota come all'aumentare della concentrazione del carnosolo diminuisca la densità ottica del campione. Tale diminuzione rappresenta l'inibizione della replicazione batterica e testimonia l'attività antibatterica del carnosolo (29).

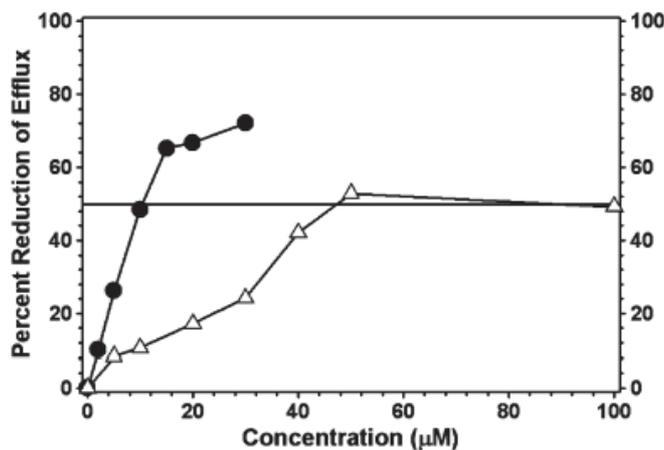


Figura 31 il grafico rappresenta la curva di crescita di *S. aureus* a concentrazioni differenti di carnosolo (29).

## Azione antibatterica verso la formazione di biofilm

Analogamente a quanto visto per l'inibizione della crescita in forma planktonica, il carnosolo è anche in grado di inibire la formazione del biofilm stesso. Nella figura 33 si nota come il biofilm sia molto ridotto alle concentrazioni più elevate di principio attivo rispetto al controllo. A conferma di tale dato anche la produzione di eDNA: costituente fondamentale per mantenere la struttura del biofilm è molto ridotta nei campioni trattati con carnosolo (29).

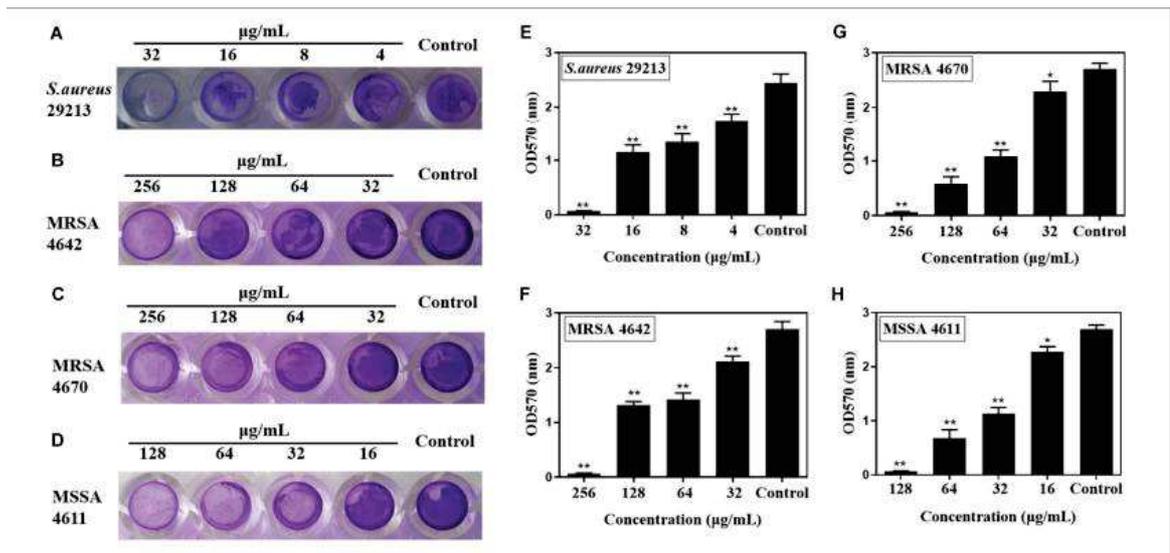
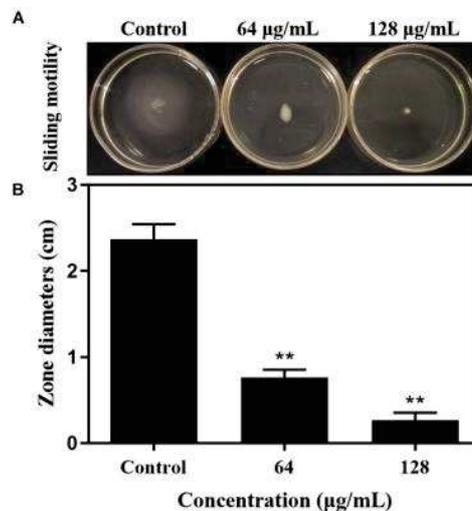


Figura 32 i grafici rappresentano l'alterazione della struttura del biofilm a diverse concentrazioni di carnosolo e la relativa quantità di eDNA presente (29).

## Inibizione della motilità

Carnosolo è anche in grado di inibire lo *sliding mobility* di *S. aureus* ovvero la principale modalità di movimento del batterio. Anche in tal caso l'immagine ben evidenzia come all'aumentare della concentrazione di carnosolo diminuisca la motilità del batterio (29).

Figura 33 il grafico rappresenta l'alterazione del movimento di *S. aureus* a differenti concentrazioni di carnosolo (29).



L'azione del carnosolo nel ridurre la motilità e formazione del biofilm di *S. aureus* può essere di fondamentale importanza per la formulazione di una terapia preventiva nei confronti di pazienti cateterizzati o recanti altri impianti permanenti su cui è frequente la crescita di biofilm di *S. aureus*. In tali casi, carnosolo immobilizzato sulla superficie dei *devices* medicali eviterebbe la formazione del biofilm e successiva dispersione nell'organismo di cellule batteriche.

### Azione carnosolo verso biofilm già formati

Aumentando ulteriormente la dose di carnosolo si evidenziano tramite saggio con cristal violetto 0,1% anche attività antibatterica nei confronti di biofilm già costituiti (29).

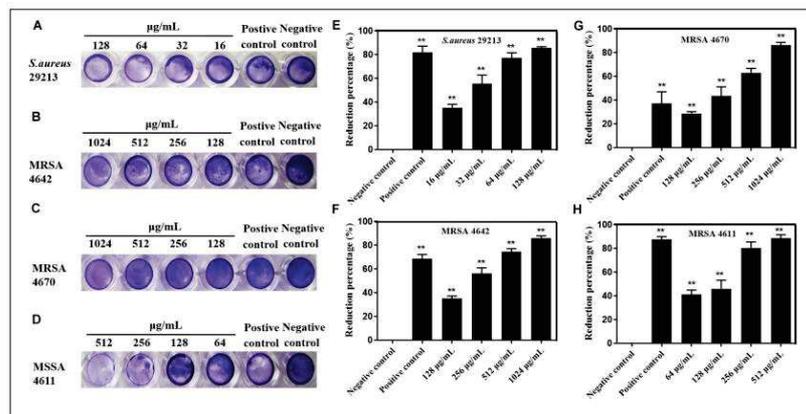


Figura 34 la figura illustra l'attività citotossica del carnosolo a diverse concentrazioni verso biofilm già formati (29).

### Azione del carnosolo sul metabolismo batterico

Per comprendere meglio l'attività del carnosolo è anche utile valutare il suo impatto nei confronti del metabolismo cellulare. È stato evidenziato che il principio attivo è in grado di alterare il metabolismo di glicina, serina, treonina, arginina, prolina, aspartato e glutammico. Una tale modifica del metabolismo di *S. aureus* è stata evidenziata anche con l'utilizzo di antibiotici quali ampicillina, kanamicina e norfloxacina. Questo suggerisce un'attività del carnosolo simile agli altri antibiotici; tuttavia la variazione del meccanismo della sintesi dell'arginina e dell'*aminoacyl-tRNA* fa intravedere un meccanismo differente dai comuni antibiotici e quindi la possibilità di nuovo protocollo terapeutico (29).

Le concentrazioni utilizzate di carnosolo per gli esperimenti condotti sono relativamente elevate tuttavia risultano essere ben tollerate dall'uomo (sono tutte al di sotto dell'assunzione massima giornaliera indicata dalle principali agenzie nazionali in materia

farmaceutica: per esempio EMA e FDA). Inoltre, test in vivo non hanno evidenziato alcuna variazione di peso o di comportamento nelle cavie testate (29).

### CAPITOLO 3: SCOPO DEL LAVORO DI TESI

Entro il 2050 le infezioni batteriche resistenti agli antibiotici attualmente in uso interesseranno oltre 10 milioni di persone causando un numero ingente di decessi e un impatto gravoso per i sistemi sanitari nazionali. In questo momento, *Staphylococcus aureus* meticillina resistente è annoverato tra gli agenti patogeni batterici più importanti dal punto di vista clinico per la salute dell'uomo. Il World Health Organisation, infatti, nel 2017 ha inserito questo patogeno all'interno di una lista di batteri ad alta priorità per la ricerca di nuovi trattamenti terapeutici.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è la ricerca di molecole capaci di interferire con il sistema del Quorum Sensing specifico di *S. aureus*, un meccanismo di comunicazione batterio-batterio che regola la sovraespressione di geni di virulenza legati al processo infettivo. L'inibizione del Quorum Sensing (Quorum Quenching) infatti rappresenta un nuovo approccio antibatterico che consente di disarmare il patogeno dei fattori di virulenza senza interferire con la sua vitalità, al fine di evitare l'insorgenza di resistenza. In questo studio, in particolare ci siamo concentrati sulle molecole del carnosolo e derivati che sono state valutate per la loro attività di Quorum Quenching mediante saggi microbiologici.



## CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI

### 4.1 Molecole testate

I saggi condotti in questo lavoro di tesi sono stati volti a testare 35 molecole isolate e purificate mediante protocolli diversi da *Rosmarinus officinalis*. Le molecole sono state preparate e caratterizzate presso i laboratori della professoressa A. Bisio, Dipartimento di Farmacia, Università di Genova. Le molecole sono state ottenute a partire da 50 g di droghe varie di *Rosmarinus officinalis* utilizzando solventi organici e USC600D Ultrasonic bath a 20 gradi per 10 minuti. Gli estratti ottenuti sono stati frazionati tramite gel di silice MPLC (Merck Kiesegel 60, 230-400 mesh, 200 g) (Merck, Darmstadt, Germania) eluendo con n-esano/CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH. Le successive frazioni sono state ulteriormente purificate mediante HPLC semi-preparativo in fase inversa. La caratterizzazione strutturale è stata effettuata mediante NMR e spettrometria di massa. Ulteriori dettagli della tecnica estrattiva sono in fase di brevettazione. Presso i laboratori della Prof. Bisio sono inoltre stati condotti studi di docking al fine di valutare l'affinità dei composti per il target putativo AgrA di QS in *S. aureus*. La struttura tridimensionale del dominio LytTR di AgrA di *S. aureus* (PDB: 4G4K) è stata ottenuta da *Protein Data Bank*. La struttura è stata ottimizzata utilizzando la procedura di preparazione delle proteine integrata in Schrödinger Suite 2020 e il pH è stato impostato a 6.0 +/- 1.0 ottimizzando gli stati di protonazione e la formazione di ponti disolfuro. Infine le molecole d'acqua sono state rimosse e la struttura energeticamente minimizzata utilizzando il campo di forza OPLSe3. Lo strumento Receptor Grid Generation nel modulo Glide è stato utilizzato per griglia che permetteva ai ligandi di legarsi nella tasca attiva del recettore. La grid box è stata centrata sul sito attivo (Ser231, Val232, Arg233, Asn234, Lys236, Lys237 e Ile238).

Le molecole purificate e caratterizzate sono state risospese in DMSO e diluite in PBS sterile per ottenere una concentrazione di principio attivo pari a 5 µg/L. I campioni sono stati conservati al buio a 4°C. Come descritto in seguito, gli esperimenti preliminari condotti presso i nostri laboratori hanno permesso di concentrare lo studio di questa tesi su 4 molecole: C1, carnosolo; C2, 7-metossi-rosmanolo; C3, 12-metossi acido carnosico; C4: acido carnosico.

### 4.2 Valutazione della minima concentrazione inibente (MIC)

Colture di *S. aureus* sono state fatte crescere per 16 ore a 37°C in terreno LB (1% NaCl, 0,5% bacto-yeast 1% bacto-triptone) La concentrazione della coltura batterica è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica e diluita in terreno LB. Ciascuna molecola è stata testata all'interno di piastre a 96 pozzetti. Nelle righe sono stati disposti partendo dall'alto: solo terreno di coltura, controllo positivo (DMSO), i composti e infine controllo negativo, *S. aureus* come indicato in tabella. Il primo passaggio è quello di riempire i pozzetti con 90 µL di terreno tramite pipetta multicanale, in seguito si aggiungono 10 µL di molecola nel primo pozzetto e tramite pipetta dopo aver mescolato si prelevano 10 µL della soluzione che verranno inoculati nel pozzetto successivo e così via per fino a completamento della riga. In tal modo ad ogni passaggio si diluisce il composto di dieci volte dato il volume iniziale di 100 microlitri. La concentrazione del composto nel primo pozzetto è pari a 0,5 mg/mL e viene diluita fino al dodicesimo pozzetto in cui la concentrazione è pari a 0,5 x10<sup>-12</sup> mg/mL. Le stesse diluizioni vengono effettuate anche per il DMSO in modo da valutarne l'eventuale tossicità per la coltura batterica. Infine con la pipetta multicanale si aggiungono 10 µL di coltura batterica alla concentrazione 1x10<sup>3</sup> C.F.U (colonie formati unità) per mL. Le piastre vengono quindi incubate 14 ore a 37°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TERRENO	TERRENO	TERRENO	TERRENO	TERRENO	TERRENO	TERRENO	TERRENO	TERRENO	TERRENO	TERRENO	TERRENO
B	10 µL DMSO	1/10 DMSO	1/10 DMSO	1/10 DMSO	1/10 DMSO	1/10 DMSO	1/10 DMSO	1/10 DMSO	1/10 DMSO	1/10 DMSO	1/10 DMSO	1/10 DMSO
C	90 µL LB 10 µL P.A. 10µL <i>S.aureus</i>	1/10 P.A.										
D	90 µL LB 10 µL P.A. 10µL <i>S.aureus</i>	1/10 P.A.										
E	90 µL LB 10 µL P.A. 10µL <i>S.aureus</i>	1/10 P.A.										
F	90 µL LB 10 µL P.A. 10µL <i>S.aureus</i>	1/10 P.A.										
G	90 µL LB 10 µL P.A. 10µL <i>S.aureus</i>	1/10 P.A.										
H	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO	<i>S.aureus</i> + TERRENO

**Tabella 1** la tabella rappresenta la simulazione di una piastra a 96 pozzetti utilizzata per calcolare la MIC di ciascun composto

Al termine dell'incubazione, la torbidità della coltura corrispondente alla presenza di cellule batteriche viene determinata mediante lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 600 nm. In particolare, la misura di densità ottica (OD) è determinata al tempo

T0 (inizio di incubazione) e al termine dell'incubazione, dopo 24 ore (T24). La differenza tra i valori di O.D. corrispondente ai due tempi per ogni campione viene calcolata; i risultati sono riportati come media e deviazione standard. Il confronto dell'OD delle colture batteriche incubate con le molecole in studio e l'OD delle colture batteriche incubate con solo DMSO consente di avere una indicazione della presenza di cellule batteriche in coltura. La valutazione della concentrazione più alta di molecole con valore di O.D. maggiore o uguale a quello di DMSO alla stessa concentrazione per mette di calcolare il valore di minima concentrazione di molecola in studio che inibisce la crescita batterica (MIC).

#### 4.3 Conta vitale

La valutazione del valore di MIC non tiene conto degli effetti battericidi o batteriostatici. Al fine di meglio valutare l'azione delle molecole in studio, le colture batteriche incubate sono state sottoposte a conta vitale delle colonie batteriche mediante piastramento su terreno agar e successiva incubazione. La conta delle colonie è possibile e realistica solo se il suo numero per piastra è compreso tra 30 e 300. È stato necessario quindi diluire la coltura batterica presente nel pozzetto che corrisponde alla MIC della precedente piastra (3.2) stimata intorno a  $10^9$  CFU per mL. Per fare ciò sono state necessarie 5 diluizioni

COMPOSTO	$10^7$ c.f.u.	$10^5$ c.f.u.	$10^3$ c.f.u.	$10^2$ c.f.u.	$10^1$ c.f.u.
	Diluizione 5	Diluizione 4	Diluizione 3	Diluizione 2	Diluizione 1
C1			C1 DIL 3	C1 DIL 2	C1 DIL 1
C2			C2 DIL 3	C2 DIL 2	C2 DIL 1
C3			C3 DIL 3	C3 DIL 2	C3 DIL 1
C4			C4 DIL 3	C4 DIL 2	C4 DIL 1
DMSO			DMSO DIL 3	DMSO DIL 2	DMSO DIL 1

**Tabella 2** la tabella rappresenta le diluizioni necessarie da eseguire in ciascun pozzetto della piastra a 96 pozzetti per eseguire la conta vitale.

Il volume in ogni endendorf in cui sono state effettuate le diluizioni è pari a 1 mL, da cui vengono prelevati 100 microlitri. È stato scelto di incubare le ultime tre diluizioni;

pertanto le colonie presenti in ciascuna piastra dovrebbero essere nell'ordine di  $10^2$  C.F.U. per la diluizione numero 3, 10 C.F.U. diluizione numero 2 e 1 C.F.U. diluizione numero 1. Si prendono 100 microlitri da ciascuna eppendorf, si pongono al centro della piastra e si distribuiscono omogeneamente su tutta la superficie tramite biglie metalliche, infine si lascia incubare a 37°C per 24 ore. Trascorse le 24 ore si contano le colonie batteriche nelle piastre la cui diluizione consente un numero consono di C.F.U. e le si confronta con quelle del controllo (DMSO).

#### 4.4 Curva di crescita

Si prepara una piastra da 96 pozzetti identica a quella dell'esperimento 3.2 con i composti C1, C2, C3, e C4. Si carica la piastra nel lettore di densità ottica (spectrofotometer Varioskan Lux) che ogni due ore registra l'OD di ciascun pozzetto. Prima di ogni lettura essa viene agitata per 5 secondi, con intensità media, in modo da omogeneizzare la coltura batterica. Sono state eseguite 9 letture a 600nm per un totale di 16h di monitoraggio della crescita (la prima lettura avviene a T0 e viene utilizzata come bianco da sottrarre alle letture successive).

#### 4.5 *Alivibrio harveyi*

Il batterio *Alivibrio harveyi* cresce nel terreno di coltura Marine broth (Sigma-Aldrich) a 30°C per 24 ore. Dopo omogeneizzazione dell'inoculo tramite vortex la coltura batterica viene diluita 1 a 5000 in Photobacterium broth (Sigma-Aldrich): il terreno di coltura utilizzato per l'esperimento. Vengono prelevati 90 microlitri di coltura e trasferiti in due differenti piastre a 96 pozzetti: una servirà per il normalizzare in risultato finale mediante lettura O.D. della crescita batterica, mentre l'altra per il calcolo della bioluminescenza.

Campioni di *S. aureus*  $10^3$  C.F.U. per mL contenenti le molecole C1, C2, C3 e C4 e il controllo DMSO alle concentrazioni di 0,05mg/mL sono stati incubati a 37°C per 16 ore. Trascorse le 16 ore i campioni vengono centrifugati a 13000 giri al minuto per 5 minuti (centrifuga: Biofuge Pico Heraeus) in modo tale da separare il pellet batterico dal terreno condizionato. In ciascun pozzetto vengono inseriti 10 microlitri di terreno di coltura così ottenuto assieme a 90 microl di *Alivibrio harveyi* diluito 1:5000.

	C1	C2	C3	C4	S. aureus	DMSO	LB
--	----	----	----	----	--------------	------	----

1	90 $\mu$ L A. harveyi +  10 $\mu$ L surnattante C1	90 $\mu$ L A. harveyi +  10 $\mu$ L surnattante C2	90 $\mu$ L A. harveyi +  10 $\mu$ L surnattante C3	90 $\mu$ L A. harveyi +  10 $\mu$ L surnattante C4	90 $\mu$ L A. harveyi +  10 $\mu$ L surnattante S.aureus	90 $\mu$ L A. harveyi +  10 $\mu$ L surnattante DMSO	90 $\mu$ L A. harveyi +  10 $\mu$ L surnattante LB
2	//	//	//	//	//	//	//
3	//	//	//	//	//	//	//
4	//	//	//	//	//	//	//
5	//	//	//	//	//	//	//
6	//	//	//	//	//	//	//
7	//	//	//	//	//	//	//
8	//	//	//	//	//	//	//

**Tabella 3** la tabella rappresenta la simulazione di una piastra a 96 pozzetti utilizzata per il bioassay di *Alivibrio harveyi*.

Poiché i risultati di tale saggio tendono ad essere molto variabili in ciascuna colonna viene analizzata una sola concentrazione di principio attivo in modo da ottenere per ciascuna di essa 8 dati sui quali verrà calcolata media e deviazione standard. Entrambe le piastre vengono lasciate in incubatore per 24 ore a 30 gradi C. Nella prima piastra viene calcolato l'OD a 0 e 24 ore con strumento settato a 600nm, mentre nell'altra viene valutata la bioluminescenza. Una volta ottenuto il valore delta di OD dato dalla sottrazione del dato ottenuto a T24 con quello a T0 si procede alla normalizzazione del valore di bioluminescenza con la differenza di OD in modo da normalizzare il risultato; quest'ultimo passaggio è fondamentale poiché trascorse le 24 ore in incubatore il numero di C.F.U. presente in ciascun pozzetto sarà differente.

#### 4.6 PCR quantitativa realtime

L'inoculo di *S. aureus* viene diluito fino ad ottenere una concentrazione di  $10^3$  C.F.U. per mL; in seguito viene lasciato in incubatore ulteriori 24 ore dopo aver inoculato C1 e DMSO come controllo positivo alla concentrazione di 0,05 mg/mL.

Il secondo passaggio è l'estrazione e purificazione dell'RNA. A causa della parete di *S. aureus* molto resistente, all'utilizzo del kit E.Z.N.A. total RNA kit I della Omega Biotek è

stata aggiunta una fase di omogeneizzazione tramite biglie metalliche che permettono la migliore rottura della parete cellulare batterica. La purificazione dell'RNA dal DNA è stata effettuata mediante DNase I. Infine l'RNA è stato raccolto mediante "Nuclease free water" e stoccato a -80 gradi.

Il terzo passaggio è quello di calcolare la concentrazione di RNA, valutarne la purezza e diluirlo in modo da ottenere una concentrazione finale di 50 ng/μL. Il calcolo della concentrazione e relativa purezza viene effettuato mediante lo strumento Nano Drop One della Thermo Scientific: si lava il sensore con acqua milliQ, si effettua il bianco con 2 μL di H2O milliQ, si quantifica l'RNA dei campioni mediante 2 μL di campione e infine si lava nuovamente il sensore. Per una quantificazione precisa del materiale genetico il campione va caricato perfettamente sopra il sensore.

Il quarto passaggio è la PCR quantitativa: amplificazione del materiale genetico e relativo confronto del quantitativo ottenuto rispetto a un gene house-keeping. Si effettua una miscela così composta:

COMPOSTO	QUANTITA' (μL)
TAQmix	5
iSCRIPT	0,25
Oligonucleotide senso	0,3
Oligonucleotide antisenso	0,3
ACQUA	4,15

**Tabella 5** la tabella rappresenta la miscela necessaria per effettuare la PCR quantitativa real time.

L'amplificazione viene effettuata mediante la sonda fluorescente intercalante TAQ. Essa si intercala nella doppia elica del DNA e, una volta legata ad esso, incrementa la propria luminescenza rispetto a quando si trova in forma libera. Per ottenere la sequenza di DNA partendo da quella di RNA, si utilizza iSCRIPT che è un enzima con attività retrotrascrittasi: converte l'RNA isolato e purificato in DNA a cui si può legare TAQ. L'enzima risulta attivo al raggiungimento di 95°.

Sono state utilizzate due coppie di oligonucleotidi: la prima specifica per il gene *housekeeping*, funzionale per valutare la quantità di materiale genetico presente nei campioni in quanto sicuramente diversa dato il numero iniziale diverso di cellule batteriche contenute in ciascun campione ed il tipo di trattamento del campione. Tutti i risultati ottenuti saranno normalizzati per il valore dato dal gene *housekeeping*. Sono inoltre stati utilizzati oligonucleotidi specifici per il gene *agrA*, gene implicato nel *Quorum Sensing* di *S. aureus*.

PRIMER UTILIZZATI	SEQUENZA NUCLEOTIDICA
SaAgrArv	ACACTGAATTACTGCCACGTTTTAAT
SaAgrAfw	GCACATACACGCTTACAATTGTTG

**Tabella 6** la tabella rappresenta gli oligonucleotidi specifici per il gene *agrA*.

Una volta preparata la miscela indicata nella precedente tabella si prelevano 10 microl della suddetta a cui vengono aggiunti 2 microl di RNA isolato da campioni batterici incubati con la molecola 1 o DMSO.

Lo strumento (Realtime PCR QuatStudio TM3) effettua diversi cicli di reazione e calcola la fluorescenza.

La prima fase è quella di amplificazione, essa è costituita da 40 cicli di amplificazione in cui ad ogni ciclo viene approssimativamente raddoppiato il segnale del DNA tramite la sonda intercalante. Tale fase è fondamentale perché permette di calcolare la differenza di tempo che il segnale di un determinato gene impiega per superare il segnale soglia rispetto al controllo. Maggiore è il tempo impiegato rispetto al gene maggiore è l'inibizione di quel particolare gene.

La seconda fase rappresenta la fase di *melting* e si caratterizza per un unico ciclo. Essa è funzionale a valutare se l'intercalante si è legato solo al DNA di interesse. Se ciò accade lo strumento restituisce un grafico caratterizzato da un singolo picco in quanto è presente una singola emissione di fluorescenza. Se tuttavia gli oligonucleotidi si legano tra loro mediante interazioni aspecifiche e in questo caso si registra un secondo picco d'intensità inferiore che dovrà essere sottratto al primo. Pertanto la reazione di *melting* dà un'indicazione della purezza della preparazione del campione.

#### 4.7 Biofilm

In quanto l'attività anti-biofilm delle molecole C1, C2, C4 verrà testata sia su *S. aureus* che su *P. aeruginosa* sono stati effettuati i test di curva di crescita e *bioassay Alivibrio harveyi* anche su *P. aeruginosa* seguendo le stesse modalità utilizzate per *S. aureus*. Per la curva di crescita l'inoculo di *P. aeruginosa*  $10^3$  C.F.U. viene messo in una piastra a 96 pozzetti e trattato con C1, C3 e C4 alla concentrazione 0,05mg/mL. La piastra viene inserita nel lettore di densità ottica (spectrofotometer Varioskan Lux) che ogni due ore registra l'OD di ciascun pozzetto. Vengono eseguite 9 letture di cui la prima viene utilizzata come bianco e sottratta a quelle successive. Per il *bioassay* di *A. harveyi* viene preparato un inoculo con il batterio e lasciato crescere nel terreno di coltura marine broth (Sigma-Aldrich), a 30 gradi per 24 ore. Dopo omogeneizzazione dell'inoculo tramite vortex la coltura batterica viene diluita 1 a 5000 in photobacterium broth (Sigma-Aldrich): il terreno di coltura utilizzato per l'esperimento. Vengono prelevati 90 microlitri di coltura e immessi in due differenti piastre a 96 pozzetti: una servirà per il normalizzare in risultato finale, mentre l'altra per il calcolo della bioluminescenza. Durante l'incubazione di *Alivibrio* sono lasciati in incubatore per 16 ore a 37 gradi campioni con *P. aeruginosa*  $10^3$  C.F.U. per mL contenenti le molecole C1, C3 e C4 e il controllo positivo DMSO alle concentrazioni di 0,05mg/mL. Trascorse le 16 ore i campioni i campioni vengono centrifugati a 13000 giri al minuto per 5 minuti (centrifuga: Biofuge Pico Heraeus) in modo tale da separare il pellet batterico dal surnattante. In ciascun pozzetto vengono inseriti 10 microlitri di surnattante assieme ai 90 microl di *Alivibrio harveyi* diluito 1:5000. Entrambe le piastre vengono lasciate in incubatore per 24 ore a 30 gradi. Nella prima piastra viene calcolato l'OD a 0 e 24 ore con strumento settato a 600nm, mentre nell'altra viene calcolata la bioluminescenza. Una volta ottenuto il valore delta di OD dato dalla sottrazione del dato ottenuto a T24 con quello a T0 si procede alla divisione del valore di bioluminescenza con la differenza di OD in modo da normalizzare il risultato; quest'ultimo passaggio è fondamentale poiché trascorse le 24 ore in incubatore il numero di C.F.U. presente in ciascun pozzetto sarà differente.

##### 4.7.1 Biofilm in statico

Un inoculo di *S. aureus*  $10^9$  C.F.U. per mL è stato diluito per ottenere una concentrazione batterica pari a  $10^3$  C.F.U. per mL. Sono stati inseriti in piastre da 6 pozzetti 6 vetrini precedentemente autoclavati. In ciascun pozzetto è stato inserito 1 mL

di soluzione batterica  $10^3$  C.F.U. per mL a cui sono stati aggiunti le molecole C1, C3, C4 o DMSO, come controllo, alla concentrazione di 0,05mg/mL. La piastra è stata in seguito incubata a 37°C per 16 ore in modo che si formasse il biofilm (è stato eseguito un esperimento preliminare per valutare il tempo più idoneo di crescita del biofilm, esso corrisponde a 16 ore). Per quantificare il biofilm si procede col rimuovere la coltura planctonica presente in ciascun pozzetto, si lavano i vetrini con 500 microlitri di PBS facendo attenzione a farlo scorrere lungo le pareti per non danneggiare il biofilm. Si aggiungono in seguito 300 microlitri di cristal violetto 0,1%, si aspettano 15 minuti in modo che il colorante si leghi al biofilm, si aspira il cristal violetto non legato e si attendono 15 minuti senza coperchio in modo che esso si asciughi. Viene effettuato un ulteriore lavaggio con 500 microl di PBS sempre avendo cura di non danneggiare il biofilm. Infine si aggiungono 250 microlitri di acido acetico glaciale 30% e si lascia agire finché tutto il cristal violetto adeso al vetrino si è sciolto. Si prelevano 100 microlitri di soluzione da ciascun pozzetto e si misura l'OD a 570 nm. Lo stesso esperimento è stato utilizzato anche per valutare la capacità delle molecole C1, C3 e C4 nel prevenire la formazione del biofilm; l'unica differenza tra le due procedure è la co-incubazione iniziale di *S. aureus* con i composti alla concentrazione di 0,05mg/mL anziché aggiungerli in seguito sul biofilm già formato.

#### 4.7.2 Biofilm in dinamico

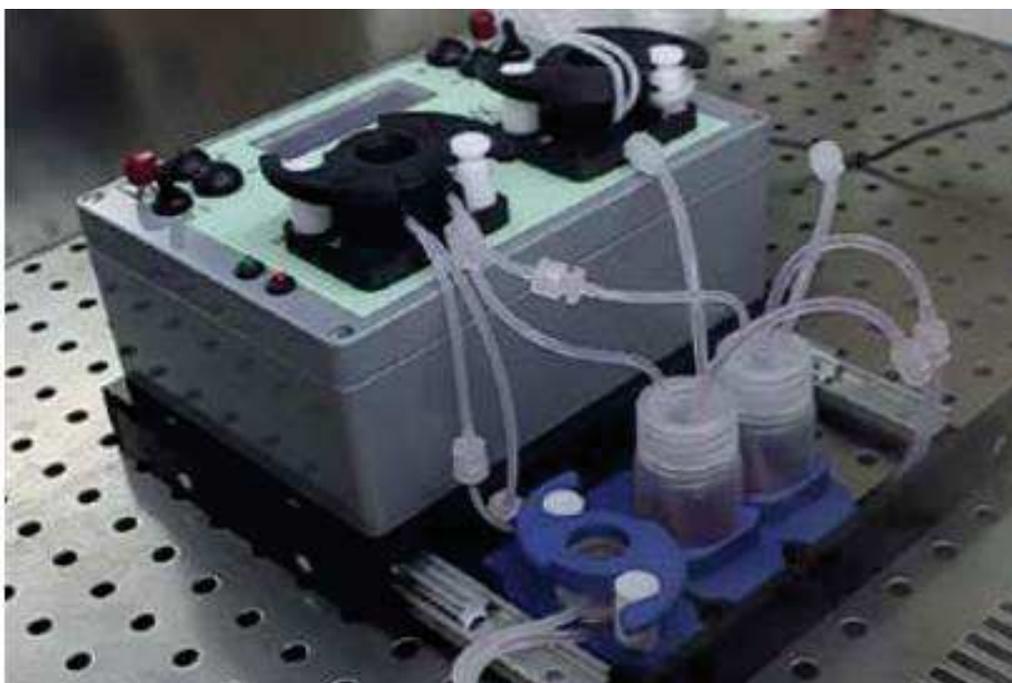
Come riportato nel capitolo Introduzione, le condizioni di biofilm in statico oppure in dinamico inducono l'attivazione di pathway cellulari diversi. Inoltre, il biofilm in dinamico simula meglio la realtà clinica dei biofilm batterici come ad esempio biofilm formati su cateteri. Per tale motivo in questo lavoro di tesi sono stati allestiti biofilm di *S. aureus* anche in dinamico. Inizialmente, per valutare la velocità del flusso a cui settare lo strumento sono stati posti in una piastra a 12 pozzetti 12 vetrini precedentemente autoclavati come indicato in figura. In ciascun pozzetto è stato inserito 1 mL di soluzione batterica  $10^3$  C.F.U. La piastra è stata in seguito incubata a 37°C per 16 ore in modo che si formasse il biofilm. Tali vetrini sono stati inseriti nella camera di coltura dello strumento Ivitech starter kit 2 (figuraxxx) e sono stati testati a tre differenti flussi: 500sp, 250 sp e 100sp rispettivamente un flusso elevato, intermedio e basso. Ciascun vetrino è stato incubato in tali condizioni per 10 minuti.

Vetrino 500sp	Vetrino 250sp	Vetrino 100sp	Vetrino CTR
Vetrino 500sp	Vetrino 250sp	Vetrino 100sp	Vetrino CTR
Vetrino 500sp	Vetrino 250sp	Vetrino 100sp	Vetrino CTR

**Tabella 4** la tabella rappresenta la disposizione dei vetrini nella piastra a 12 pozzetti utilizzati per testare il flusso di Ivitech starter kit 2.

Una volta terminato il periodo di test, i vetrini vengono riposizionati in una nuova piastra a 12 pozzetti dove viene eseguito il saggio del cristal violetto come indicato nell'esperienza 3.6.1.

Una volta valutata la velocità idonea del flusso sono stati testati i composti C1, C3, C4 e DMSO come controllo positivo. Le molecole sono state caricate nelle cisterne laterali alla concentrazione di 0,05 mg/mL (volume totale 40 mL) con flusso settato a 500sp. La crescita del biofilm avviene su vetrino sterile inserito nella camera e la sua quantificazione viene eseguita tramite saggio cristal violetto come indicato nell'esperienza 3.6.1. dopo 16 ore a 37°.



**Figura 2** la figura rappresenta una foto dello strumento ivitech starter kit 2 utilizzato per la crescita del biofilm in dinamico.

Partendo dal basso si nota la camera in cui viene fatto crescere il biofilm su vetrino, essa presenza due ulteriori vetrini nella parte superiore e inferiore in modo da isolare il vetrino su cui si forma il biofilm e garantire pertanto la sua sterilità, in seguito vi sono le due cisterne: rispettivamente per attingere a nuovo terreno e l'altra per lo scarico, esse si possono collegare tra di loro per avere un ricircolo continuo di terreno. Nel corpo dello strumento si distinguono le due pompe che vengono utilizzate rispettivamente per attingere terreno dalla prima cisterna immetterlo nella camera e da lì la seconda pompa lo aspira e lo immette nella cisterna dello scarto.

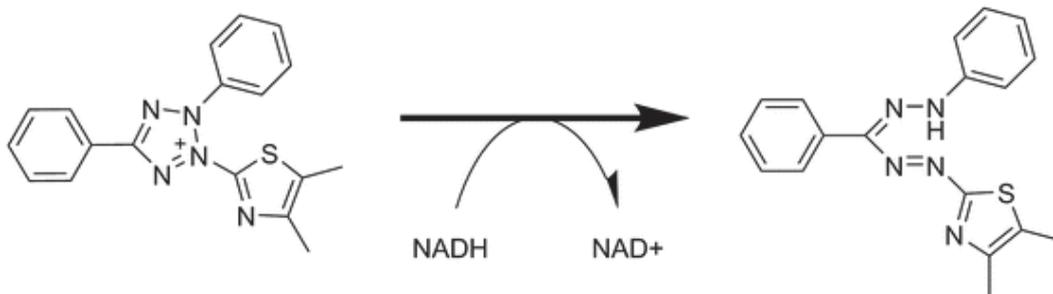
#### 4.8 MTT assay

Per il test MTT sono state utilizzate le linee cellulari A549 (linea cellulare epiteliale umana derivante da adenocarcinoma alveolare) e la linea cellulare THP1 (monociti umani da paziente con leucemia acuta). Dopo conta cellulare e appropriata diluizione in modo da avere  $10^4$  cellule per pozzetto di piastra da 96 pozzetti (100 microlitri/pozzetto) le cellule sono incubate per 24 ore a 37°C in incubatore umidificato contenente CO<sub>2</sub>. Le cellule THP1 sono state incubate in presenza di phorbol12-myristate 13-acetate (PMA; 200 ng/ml). Si inoculano i composti C1, C2, C3 e C4 alla concentrazione pari alla MIC: 0,05 mg/mL, oltre ad essi si inocula il DMSO come controllo e si lascia una riga senza nessun trattamento come controllo negativo come indicato in figura.

<i>LB</i>	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
<i>C1</i> 0,05 <i>mg/mL</i>	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
<i>C2</i> 0,05 <i>mg/mL</i>	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
<i>C3</i> 0,05 <i>mg/mL</i>	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
<i>C4</i> 0,05 <i>mg/mL</i>	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
<i>DMSO</i> 0,05 <i>mg/mL</i>	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//

**Tabella 7** la tabella rappresenta la simulazione di una piastra a 96 pozzetti utilizzata per test MTT.

Dopo 24 ore di incubazione, le colture cellulari sono aggiunte di una soluzione di MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro; 5 mg/ml in PBS). Le colture vengono incubate per 4 ore a 37°, tempo in cui MTT è ridotto da sale di tetrazolio giallo a cristalli di formazano di colore viola tramite l'enzima NADH.



**Figura 2** La figura rappresenta la riduzione del sale MTT a formazano.

Al termine dell'incubazione il terreno viene aspirato e sostituito con 100 microL di SDS 10% peso/vol e HCl 0,1%. Dopo 16 ore di incubazione a temperatura ambiente sotto agitazione e al buio, l'assorbanza dei campioni è registrata alla lunghezza d'onda di 570 nm. I risultati sono riportati come percentuale di vitalità delle cellule rispetto alle colture incubate con DMSO.

il saggio MTT: un test colorimetrico che si basa sulla riduzione di un o MTT) a cristalli di formazano viola da parte di cellule metabolicamente attive. Solo le cellule vitali infatti esprimono l'enzima necessario per la riduzione del sale come indicato in figura (34)

#### 4.9 Saggio di fagocitosi dei batteri

Le cellule THP-1 conservano capacità di fagocitosi e di produzione di citochine pro- e antinfiammatorie simili a quelle osservate in cellule primarie mononucleate isolate da sangue periferico umano. Per questo motivo in questo lavoro di tesi sono usate come modello in vitro per lo studio della fagocitosi.

Le cellule THP-1 sono state mantenute in coltura in fiasche T-75 (Corning®) in terreno RPMI aggiunto di 10% v/v di FBS. Per gli esperimenti,  $1 \times 10^4$  cellule/mL sono state differenziate mediante PMA come sopra riportato. Dopo 48 ore di incubazione a 37°C le cellule risultavano adese al fondo della piastra.

Nel frattempo sono stati preparati gli inoculi di *S. aureus*. Come indicato in tabella 8 l'esperimento è stato condotto in duplicato e sono stati testate le molecole C1, C2, C3 e C4; i controlli DMSO e *S. aureus* non incubato con DMSO.

C1	C1	C2	C2
C3	C3	C4	C4
DMSO	DMSO	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>

**Tabella 8** la tabella rappresenta la disposizione all'interno di una piastra a 12 pozzetti dei diversi trattamenti effettuati sulla linea cellulare THP1.

I saggi sono stati allestiti in piastre da 12 pozzetti in cui le cellule THP1 differenziate sono state incubate con  $1 \times 10^3$  CFU di coltura batterica (MOI 1:10). Le colture sono state incubate a 37°C per 2 ore ed in seguito lavate tre volte con LB sterile. Le colture sono quindi state aggiunte di gentamicina (0,1mg/mL) ed incubate a 37°C per 1 ora al fine di uccidere tutte le cellule batteriche non fagocitate. In seguito si lava nuovamente tre volte con LB. Le cellule THP1 sono staccate ed infine i campioni sono piastrati in piastre LB agar seguendo lo stesso procedimento effettuato per la conta vitale.



## CAPITOLO 5: RISULTATI

### 5.1 Valutazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)

In questo lavoro di tesi, le diverse molecole forniteci dal Dipartimento di Farmacia, Università di Genova, sono state testate nei confronti del ceppo batterico *S. aureus* meticillina resistente (MRSA), un ceppo batterico che a causa della elevata insorgenza di antibiotico resistenza sta suscitando notevoli problemi per la salute dell'ospite umano: è la prima causa di batteriemia in Italia con elevati livelli di mortalità: 20-30% (3).

CODICE	NOME COMPOSTO	MIC mg/mL	EC50 mg/mL
C1	Carnosolo	0,05	>0,5
C2	acido 7-metossi-carnosico	0,05	>0,5
C3	acido 12-metossi-carnosico	0,05	>0,5
C4	Acido carnosico	0,05	>0,5
C5			>0,5
C8			>0,5
C13			>0,5
C14			0,005
C15			0,5
C17			>0,5
C18			>0,5
C19			>0,5
C20			>0,5
C21			>0,5
C22			>0,5
C23			>0,5
C24			>0,5
C25			0,5

C26			>0,5
C27			>0,5
C28			>0,5
C29			>0,5
C30			>0,5
C31			>0,5
C32			>0,5
C33			>0,5
C34			>0,5
C35			>0,5
C36			>0,5
C37			>0,5
C38			>0,5
C39			>0,5
C40			>0,5
C41			>0,5
C42			>0,5

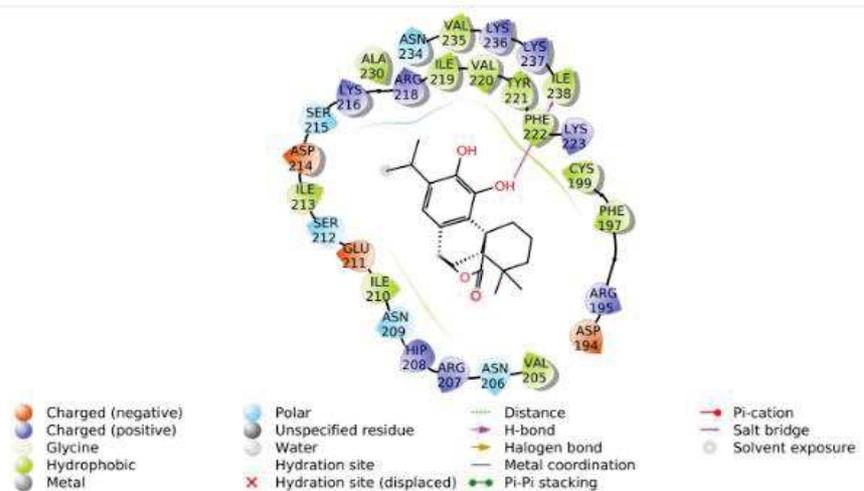
**Tabella n.1 La tabella indica i valori di MIC delle diverse molecole testate nei confronti di MRSA. L'esperimento è stato eseguito tre volte.**

Tutte le molecole testate tranne il C25 e C14 non hanno dimostrato attività tossica nei confronti di MRSA, neppure alla concentrazione più alta testata (0,5mg/mL). Tale dato risulta essere positivo per il nostro studio. Scopo di questo lavoro di tesi è infatti individuare molecole capaci di disarmare la virulenza batterica senza avere effetto battericida. L'azione battericida, infatti, è alla base dell'insorgenza di resistenza dei batteri nei confronti dell'azione degli antibiotici.

## 5.2 Risultati degli studi di docking

I saggi di docking sono stati condotti presso il laboratorio del Dipartimento di Farmacia, Università di Genova. Da tali studi è emerso che la molecola che potrebbe meglio inibire

il sistema QS in *S. aureus* è il carnosolo (C1). Secondo gli studi di docking infatti C1 presenta una energia di legame, all'interno del LytTR *domain* di AgrA, stimata di -24.269 kcal/mol. Tale risultato è frutto di un legame idrogeno che il composto effettua con isoleucina in posizione 238.



**Figura 3 Il carnosolo (C1) interagisce con il residuo Ile238 di AgrA mediante un legame idrogeno.**

L'acido carnosico (C4) ha fatto registrare un valore di docking pari a -17.299 kcal/mol. Altri score positivi sono stati ottenuti solo con le molecole C2 (acido 7-metossi-carnosico) e C3 (acido 12-metossi-carnosico) ma non con le altre molecole testate. Di conseguenza lo studio è proseguito con la valutazione delle molecole C1, C2, C3, e C4.

5.3 Le molecole testate non riportano alterazione della conta vitale alla concentrazione di 0,05 mg/mL

I risultati ottenuti dal calcolo della MIC per le molecole C1-C4 sono stati confermati mediante saggi di conta vitale. Infatti i valori di MIC derivano dalla determinazione della densità ottica, parametro che non discrimina detriti cellulari, cellule morte e cellule vive. Al fine di verificare l'assenza di effetto tossico su MRSA, le colture batteriche sono state incubate con le molecole di interesse e le cellule batteriche vitali determinate mediante conta su piastra. In seguito vengono riportate la media delle C.F.U. per ciascun composto testato alla concentrazione 0,5 mg/mL.

COMPOSTO	C.F.U. concentrazione 0,5 mg/mL

DMSO	118
C1	45
C2	53
C3	55
C4	2

Tabella 2 la tabella rappresenta la media delle C.F.U. cresciute nelle piastre LB+agar

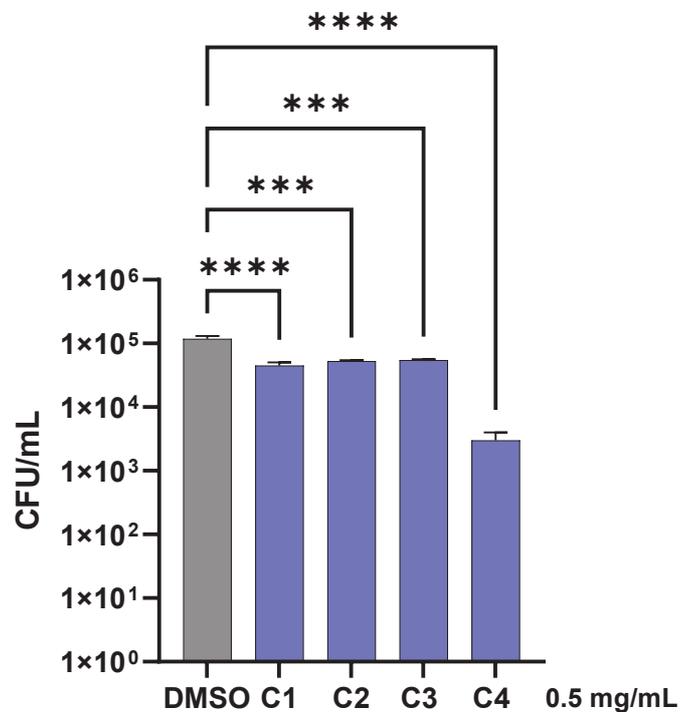


Figura 2 Il grafico riporta la conta su piastra delle colonie di *S. aureus* incubato con C1, C2, C3, C4 e controllo positivo (DMSO) alla concentrazione di 0,5 mg/mL. L'esperimento è stato eseguito due volte, ciascuna con due replicati. I dati sono riportati come media e errore standard \*\*\*\* indica  $p < 0.05$  vs DMSO.

Dal grafico si nota che la concentrazione di 0,5 mg/ml risulta essere battericida per tutte le molecole testate in quanto il numero di C.F.U. cresciute nelle piastre corrispondenti al trattamento è inferiore in modo statisticamente significativo rispetto al numero di C.F.U. cresciute in DMSO. Questo dato quindi è in disaccordo rispetto a quanto riportato dal calcolo della MIC.

E' risultato necessario pertanto eseguire la conta vitale anche per concentrazioni inferiori. Di seguito sono riportati i risultati relativi ai test eseguiti con molecole alla concentrazione 0,05 mg/ml.

COMPOSTO	C.F.U. DILUIZIONE 0,05 mg/mL
DMSO	213
C1	217
C2	198
C3	212
C4	196

Tabella 3 la tabella riporta la media delle C.F.U. cresciute nelle piastre LB+agar alla concentrazione delle molecole pari a 0,05 mg/mL.

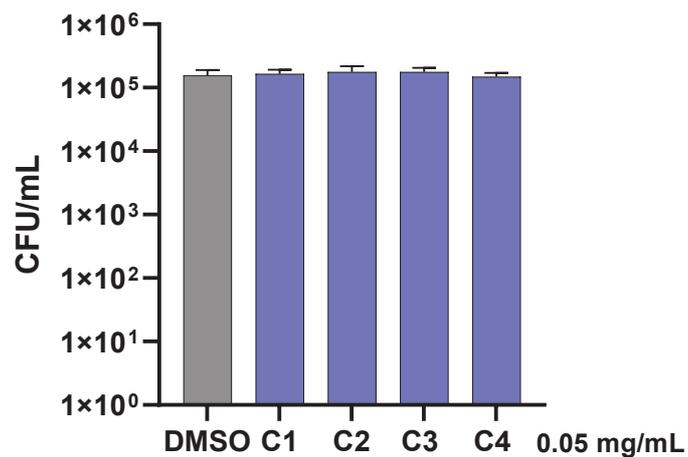


Figura 3. Il grafico riporta la conta su piastra delle colonie di *S. aureus* incubato con C1, C2, C3, C4 e controllo positivo (DMSO) alla concentrazione di 0,05 mg/mL. L'esperienza è stata eseguita due volte, ciascuna con due replicati. I dati sono riportati come media e errore standard.

Il grafico in Figura 3 evidenzia come alla concentrazione di 0,05 mg/ml nessuna delle molecole testate dimostri effetto battericida. Il numero di C.F.U. cresciute nelle piastre corrispondenti al trattamento infatti non è statisticamente diverso rispetto al numero di C.F.U. cresciute nella piastra di controllo (DMSO).

5.4 Le molecole testate alla concentrazione 0.05 mg/ml non riportano alterazioni nella curva di crescita di MRSA.

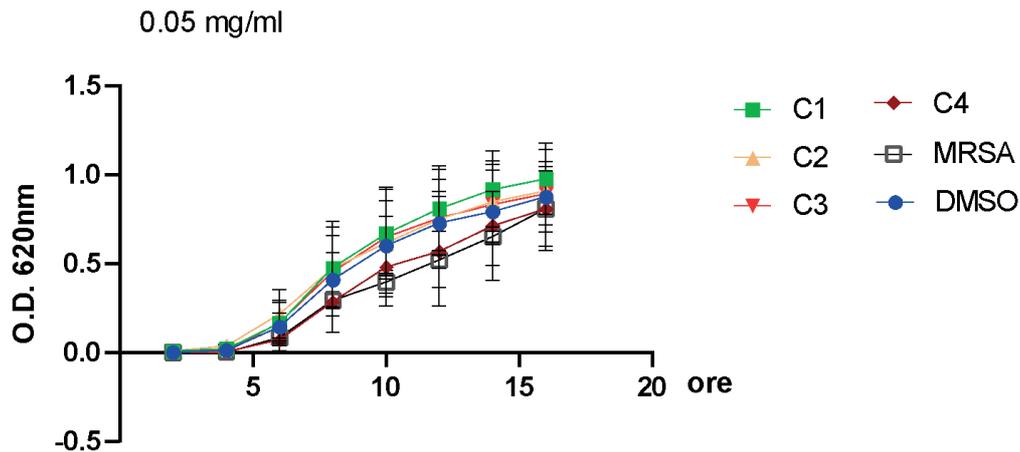


Figura 4 il grafico rappresenta la curva di crescita di *S. aureus* registrata per 16 ore a 37°C. L'OD è stata misurata ogni 2 ore. I dati sono riportati come media e errore standard, l'esperimento è stato eseguito tre volte, ciascuna in triplicato.

I batteri tendono a sviluppare la resistenza verso gli antibiotici non solo per composti battericidi, ma anche per quelli batteriostatici. Pertanto è stata effettuata la curva di crescita per valutare se le molecole C1, C2, C3 e C4 avessero attività batteriostatica nei confronti di *S. aureus*. Dal grafico si evince che le curve di crescita dei campioni trattati sono sovrapponibili a quella registrata con DMSO ad ogni rilevazione (le rilevazioni sono state effettuate ogni due ore) e pertanto nessuno di essi ha attività batteriostatica.

Grazie ai dati ottenuti dalla conta vitale e dalla curva di crescita, la concentrazione 0,05 mg/mL sarà utilizzata nei prossimi esperimenti.

#### 5.5 Le molecole C1, C3 e C4 diminuiscono la bioluminescenza di *Alivibrio harveyi*

Per confermare i dati dello studio docking è stato effettuato un saggio di *bioassay* utilizzando il batterio *Alivibrio harveyi*. *A. harveyi* è un batterio marino Gram negativo in grado di produrre bioluminescenza in seguito alla attivazione del suo sistema di QS. Tale sistema è tuttavia sensibile a segnali di QS quali omo-serina lattoni prodotti da batteri Gram negativi e autoinduttori prodotti da Gram positivi quali *S. aureus*. La presenza di tali segnali esterni riduce il sistema QS in *A. harveyi*, diminuendo il segnale di bioluminescenza. Tale sistema di *bioassay* quindi può essere usato come screening per valutare se le molecole in esame abbiano attività di *Quorum Quenching*.

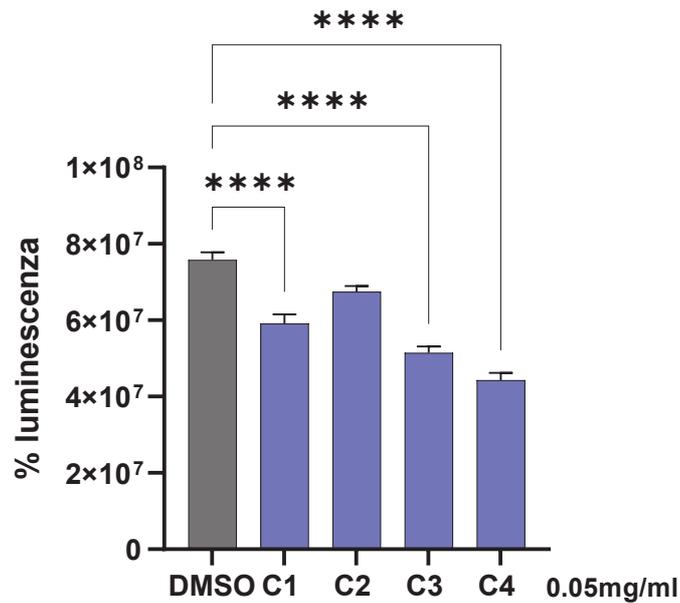


Figura 5 il grafico rappresenta la percentuale di bioluminescenza di *A. harveyi* nei diversi trattamenti. I dati sono riportati come media e errore standard di tre determinazioni, ciascuna condotta in triplicato. \*\*\*\* indica  $p < 0.05$  vs DMSO.

Dal grafico 5 si evince che le molecole C1, C3 e C4 diminuiscono in modo significativo la bioluminescenza di *A. harveyi* rispetto al controllo DMSO, portando ad ipotizzare una loro possibile attività di *Quorum Quenching*.

#### 5.6 C1 non altera l'espressione del gene *agrA*

Al fine di meglio indagare il meccanismo di *Quorum Quenching* evidenziato dai saggi di screening condotti con *A. harveyi*, colture di MRSA sono state incubate con la molecola C1 (molecola con il miglior score di docking) e quindi sottoposte ad estrazione di RNA e valutazione mediante PCR quantitativa dei livelli di espressione di *agrA*, gene chiave nell'attivazione del sistema di QS in MRSA.

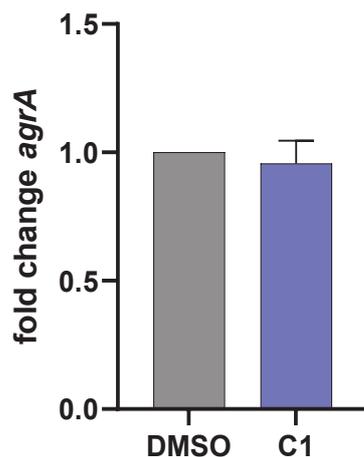


Figura 6 il grafico rappresenta l'espressione di *agrA* in colture di MRSA trattate con DMSO o C1. I dati sono riportati come media e errore standard di due determinazioni.

Come si evince dal grafico in figura 6 i livelli di espressione di *agrA* nelle colture di MRSA trattate con C1 non sono statisticamente differenti dall'espressione del gene nel campione di controllo (DMSO). Pertanto l'azione di Quorum Quenching registrata con gli esperimenti di *bioassay* in *A. harveyi* non sembra essere esplicitata mediante interferenza con il *pathway agrA*.

#### 5.7 Le molecole C1-C4 non alterano il biofilm in MRSA cresciuto in condizioni statiche

Il sistema del QS guida l'espressione dei fattori di virulenza come ad esempio la formazione del biofilm. Per tale motivo abbiamo indagato se le molecole oggetto di questo studio siano in grado di interferire con il biofilm di MRSA.

Prima di procedere a verificare l'attività di interferenza sul biofilm, abbiamo valutato mediante saggi in time-course le tempistiche migliori per ottenere un biofilm maturo di MRSA. Per tale motivo le colture batteriche sono stati piastrate per tempi diversi. La presenza del biofilm è stata valutata mediante colorazione delle cellule batteriche con cristal violetto, colorante basico che presenta affinità per gli acidi nucleici e le proteine, e successiva solubilizzazione in ambiente acido. La valutazione della densità ottica della soluzione (OD) consente di stimare la densità delle cellule batteriche nel biofilm.

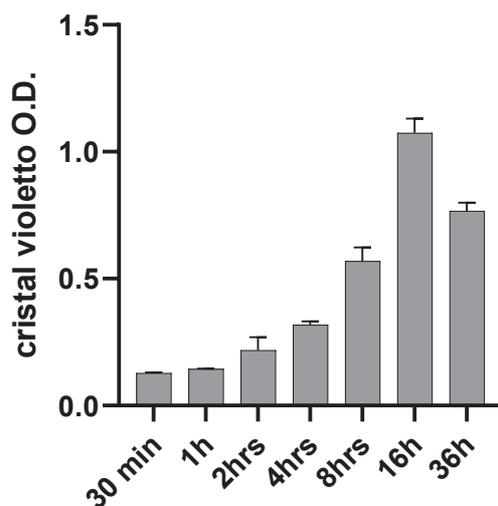


Figura 7. Il grafico riporta i valori di OD relativi a cristal violetto misurati in biofilm di *S. aureus* incubato ai tempi indicati. I dati sono riportati come media e errore standard di tre determinazioni, ciascuna condotta in duplicato.

Come si evince dal grafico in figura 7, i valori di OD relativi al cristal violetto aumentano fino a raggiungere un massimo dopo 16 ore di incubazione del biofilm. Dopo tale periodo di incubazione, la densità cellulare nel biofilm inizia a ridursi. Per tale motivo, l'effetto delle molecole sul biofilm è stato valutato a 16 ore di incubazione.

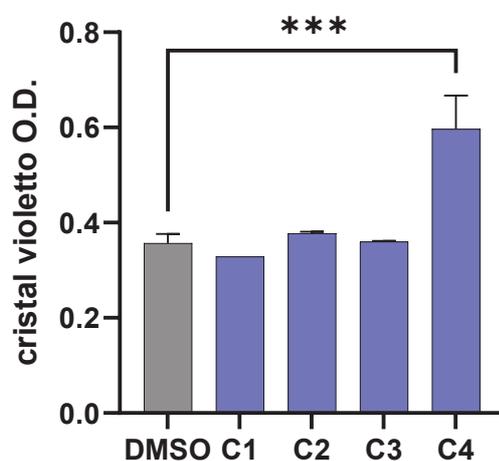
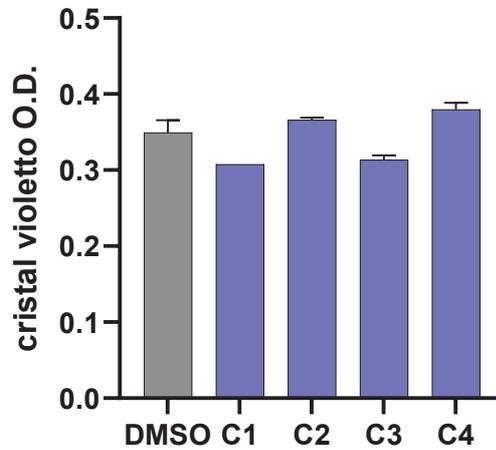


Figura 8 il grafico riporta i valori di OD relativi a cristal violetto misurati in biofilm di *S. aureus* co-trattato con le molecole. I dati sono riportati come media e errore standard di due determinazioni, ciascuna condotta in duplicato. \*\*\* indica  $p < 0.05$  vs DMSO.

In un primo tipo di esperimenti, *S. aureus* è seminato e contemporaneamente trattato con le molecole. Le colture sono state protratte per 16 ore. Dal grafico in figura 8 si evince che l'OD del cristal violetto ottenuto con le molecole C1, C2, C3 non è

statisticamente differente rispetto a quella del DMSO. La molecola C4 invece presenta OD significativamente superiore rispetto al controllo, riportando quindi la capacità di incrementare la produzione di biofilm in MRSA rispetto a DMSO.



**Figura 9** il grafico riporta i valori di OD relativi a cristal violetto misurati in biofilm di *S. aureus* aggiunti per le ultime 8 ore delle molecole in esame. I biofilm sono stati analizzati dopo 16 ore totali di incubazione. I dati sono riportati come media e errore standard di due determinazioni, ciascuna condotta in duplicato.

In un secondo tipo di esperimenti, la colture di MRSA sono state cresciute per 8 ore e quindi aggiunte delle molecole in esame nel momento in cui il biofilm si sta formando e verosimilmente i segnali di QS sono già attivi. I biofilm sono stati analizzati dopo 16 ore totali di incubazione. Il grafico in figura 9 evidenzia come i valori di OD di cristal violetto ottenuto con incubazione con le molecole C1-C4 non differiscono in maniera statisticamente significativa rispetto a biofilm incubati con DMSO. Pertanto nessuna delle molecole testate è in grado di alterare la struttura del biofilm già formato.

#### 5.8 Le molecole C1-C4 non alterano il biofilm in MRSA cresciuto in condizioni dinamiche

Poiché i biofilm di MRSA spesso si formano in distretti anatomici sottoposti a pressione (tratto respiratorio o tratto genito-urinario) oppure su dispositivi medici quali i cateteri in cui le colture batteriche sono sottoposte a flusso, in questo lavoro di tesi si è deciso valutare l'azione anti-biofilm delle molecole C1, C2, C3 e C4 anche in condizioni dinamiche. Il flusso di liquidi infatti è in grado di alterare la formazione e la struttura del biofilm.

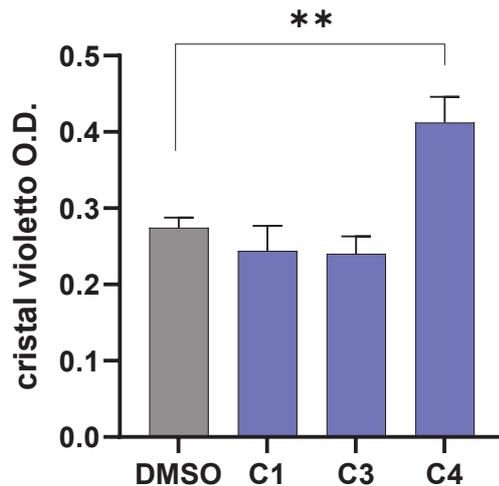


Figura 10. Il grafico riporta i valori di OD relativi a cristal violetto misurati in biofilm di *S. aureus* saggiati in dinamico con le molecole C1, C3 e C4. I dati sono riportati come media e errore standard di due determinazioni, ciascuna condotta in duplicato. \*\* indica  $p < 0.05$  vs DMSO

Il grafico in figura 10 rappresenta il co-trattamento del biofilm di *S. aureus* cresciuto in condizioni dinamiche. I risultati ottenuti sono speculari a quelli del co-trattamento in condizioni statiche: solo la molecola C4 aumenta l'OD del cristal violetto in modo significativo rispetto al controllo DMSO. Anche in condizioni dinamiche quindi la molecola C4 è in grado di incrementare la produzione del biofilm di *S. aureus*.

#### 5.9 Verifica della specificità di azione in QS

Molecole con azione di Quorum Quenching dovrebbero essere specie-specifiche ed interferire solo con il sistema QS di una determinata specie batterica. Al fine di accertare tale specificità per le molecole in esame, i saggi sono stati replicati anche in *Pseudomonas aeruginosa*, batterio Gram negativo che in associazione con *S. aureus* forma biofilm complessi ad esempio in corso di infezioni in soggetti con fibrosi cistica.

Come descritto per *S. aureus*, abbiamo innanzitutto valutato l'effetto delle molecole C1, C3, C4 (molecole con risultati positivi al bioassay in MRSA) nella curva di crescita di *P. aeruginosa* al fine di escludere attività battericida o batteriostatica.

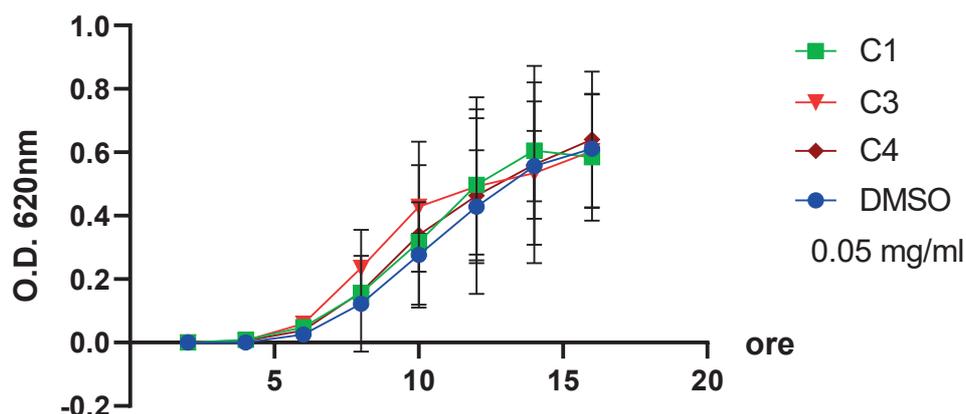


Figura 11 rappresenta la curva di *P. aeruginosa* trattata con i diversi composti alla concentrazione di 0,05mg/mL. I dati sono riportati come media e errore standard di tre determinazioni, ciascuna condotta in duplicato.

La curva di crescita dimostra che le molecole non hanno azione battericida o batteriostatica in quanto l'andamento della curva di crescita di *P. aeruginosa* incubato con le molecole è sovrapponibile a quella del batterio cresciuto con DMSO.

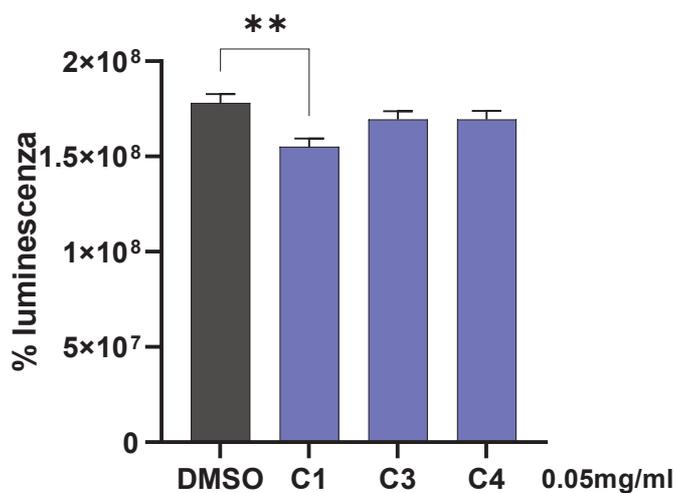


Figura 12 il grafico rappresenta la percentuale di bioluminescenza di *A. harveyi* incubato con il terreno di crescita di *P. aeruginosa* trattato con le diverse molecole. I dati sono riportati come media e errore standard di due determinazioni, ciascuna condotta in triplicato. \*\* indica  $p < 0.05$  vs DMSO.

Dal grafico in figura 12 si evince che la molecola C1 riduce in modo significativo la bioluminescenza di *A. harveyi* rispetto al DMSO. Dal confronto di tale grafico con quello riportato in figura 5, possiamo dedurre che le molecole C3 e C4 hanno azione di Quorum Quenching specifica per *S. aureus* mentre la molecola C1 non è dotata di specificità ed interferisce nel segnale di QS sia di *S. aureus* sia di *P. aeruginosa*.

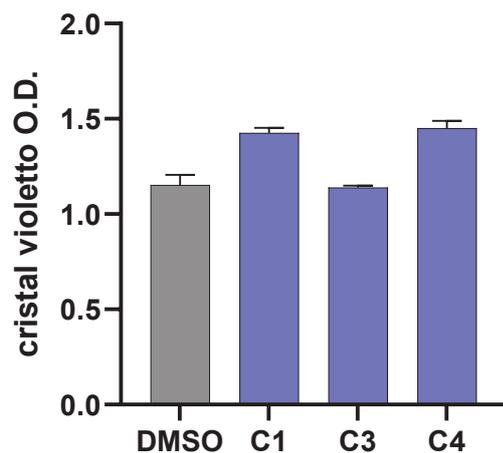


Figura 13 Il grafico rappresenta la crescita del biofilm di *P. aeruginosa* in modalità co-trattamento. I dati sono riportati come media e errore standard di due determinazioni, ciascuna condotta in triplicato. \*\* indica  $p < 0.05$  vs DMSO.

Procedendo nella valutazione dell'attività delle molecole, biofilm di *P. aeruginosa* sono stati co-trattati con le molecole. Il grafico riportato in figura 13 riporta come le molecole testate non alterino la formazione del biofilm di *P. aeruginosa* rispetto a colture incubate con DMSO.

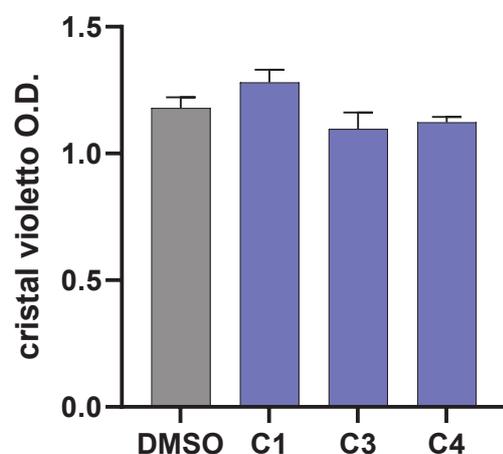
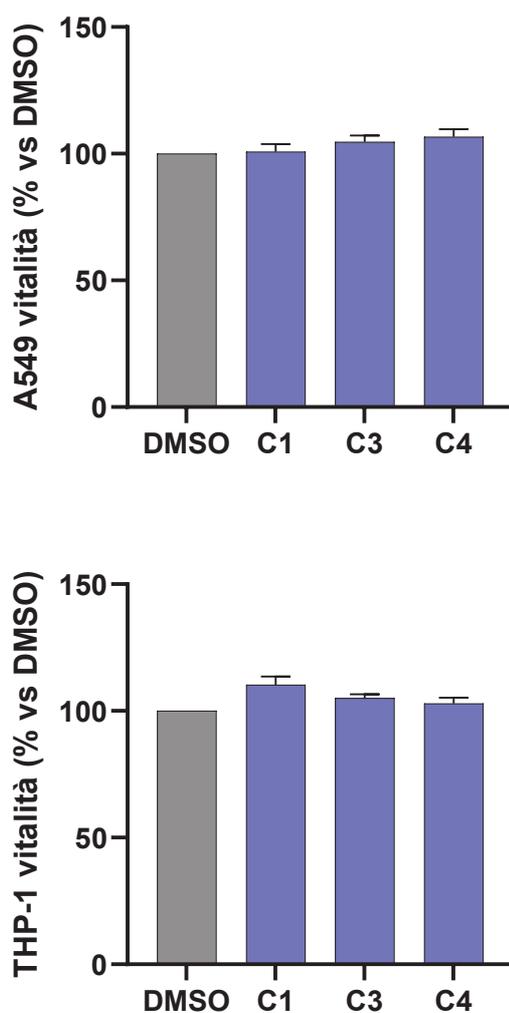


Figura 14 Il grafico rappresenta la crescita del biofilm di *P. aeruginosa* in modalità trattamento. I dati sono riportati come media e errore standard di due determinazioni, ciascuna condotta in triplicato.

Infine, analogamente a quanto riportato per MRSA (figura 9), l'aggiunta delle molecole al biofilm maturo di *P. aeruginosa* non determina alcun effetto significativo. Infatti, nessuna molecola riduce i valori di O.D. relativi a cristal violetto rispetto a quelli registrati per le colture incubate con DMSO.

## 5.10 Valutazione della tossicità in cellule eucariotiche

Le molecole in esame sono state valutate mediante saggio MTT al fine di escludere tossicità in cellule eucariotiche. In tali saggi sono state prese in considerazione due linee cellulari di uomo: la linea cellulare di adenocarcinoma A549 e la linea cellulare THP1 differenziata a macrofagi mediante incubazione con PMA.



**Figura 15** I grafici rappresentano la percentuale di vitalità in cellule A549 e THP1 dopo trattamento con le molecole. La percentuale è stata calcolata sui valori ottenuti dal trattamento con DMSO. I dati sono riportati come media e errore standard di due esperimenti condotti ciascuno in triplicato.

Dal grafico in figura 15 si evidenzia come le molecole C1, C3 e C4 non riportino riduzione della vitalità cellulare sia nella linea A549, sia nella linea THP1. La vitalità cellulare risulta paragonabile a cellule incubate con DMSO alla stessa concentrazione presente nelle molecole.

### 5.11 Fagocitosi

Un numero ristretto di studi riportano la capacità di estratti del rosmarino di incrementare la capacità di uccisione da parte di macrofagi di batteri quali *S. aureus* (35) (36). Al fine di valutare la capacità di acido carnosico (molecola C4) di influenzare la capacità di uccisione di *S. aureus* da parte dei macrofagi, cellule THP-1 sono state incubate con PMA. Colture di MRSA sono state incubate con la molecola C4 e quindi incubate con le colture cellulari di THP-1.

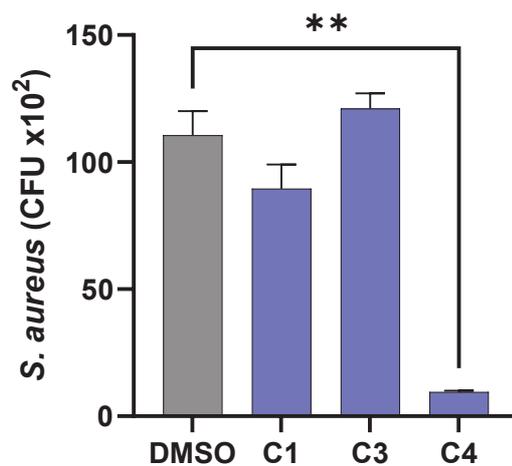


Figura 17. Il grafico riporta le CFU residue dopo incubazione di cellule THP-1 con colture di MRSA trattate con le molecole. I dati sono riportati come media e errore standard di due determinazioni, ciascuna condotta in duplicato. \*\* indica  $p < 0.05$  vs DMSO.

Come riportato nel grafico in figura 16, la molecola C4 incrementa la capacità di fagocitosi e di uccisione di MRSA da parte delle cellule THP-1 in quanto il numero di C.F.U. cresciute nelle piastre trattate con C4 è inferiore rispetto a quelle cresciute in colture di MRSA incubate con DMSO.



## CAPITOLO 6: DISCUSSIONE

Lo scopo dello studio di tesi è la ricerca di molecole con azione di *Quorum Quenching* e non battericida o batteriostatica che potrebbe innescare il fenomeno della resistenza batterica verso le molecole in esame come succede per gli antibiotici tradizionali. La prima fase dello studio, quindi, consiste nell'individuare la MIC (concentrazione minima inibente) di ciascuna molecola nei confronti di *Staphylococcus aureus*. Tutti gli esperimenti sono condotti con il ceppo batterico standard MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) in fase di crescita esponenziale poiché in questa fase è massima l'attività metabolica della cellula batterica e quindi è massima anche la produzione di mediatori prodotti *dal pathway del Quorum Sensing*. Dai primi risultati si evince come la maggior parte dei composti (tutti tranne C14 e C25), anche alla massima concentrazione testata (0,5 mg/mL), non alterano la crescita batterica in quanto il valore finale di O.D. del campione trattato è paragonabile con quello del riferimento (DMSO; Tabella 1 risultati).

Lo studio di docking è stato effettuato prendendo in considerazione il dominio LytTR, una regione della porzione N-terminale di AgrA altamente conservata il cui sito attivo comprende gli amminoacidi Ser231, Ile238, His200, Agr218 e Tyr229. Dallo studio di docking si evince che le molecole C1, C2, C3, C4 sono in grado di legare tale dominio potenzialmente inibendo la sua fosforilazione. Tale evento blocca la dimerizzazione di AgrA impedendo il legame con il DNA in corrispondenza di *agrA binding site 1* e *agrA binding site 2* (20). Bloccando il *pathway* del *Quorum Sensing* si ritiene pertanto possibile alterare la produzione di fattori di virulenza, tra cui PSM  $\alpha$  e  $\beta$ , la produzione di RNAIII e quindi anche la conseguente trascrizione di  $\delta$  tossina e Hla. I risultati dello studio di docking pertanto confermerebbero l'idea che tali molecole abbiano azione di *Quorum Quenching* nei confronti di *S. aureus*. Dal confronto con la letteratura, tuttavia, emerge che una efficace inibizione del legame AgrA-DNA richiede molteplici interazioni con il sito attivo (37). Studi precedenti condotti presso il nostro laboratorio ad esempio hanno permesso di evidenziare la necessità della presenza di molteplici legami idrogeno e contemporanee interazioni elettrostatiche tra il composto Azan-7 e la tasca attiva di AgrA (4).

Per escludere una effettiva azione battericida, in questo studio abbiamo eseguito la conta vitale delle colonie di *S. aureus* testando le prime quattro molecole in quanto avevano i migliori valori di docking. Oltre all'azione battericida si è indagata anche la

possibile azione batteriostatica che le molecole C1, C2, C3, C4 potrebbero avere nei confronti di MRSA. Le curve di crescita e la conta vitale evidenziano come tutti le quattro molecole testate non siano batteriostatiche e neppure battericide alla concentrazione di 0,05 mg/ml (grafici in figura 3 e 4 risultati).

Al fine di indagare una attività di Quorum Quenching per le molecole, in questo studio è stato utilizzato il ceppo batterico *Alivibrio harveyi*, batterio marino Gram negativo in grado di produrre bioluminescenza in seguito a attivazione del Quorum Sensing e l'espressione di alcune proteasi mediante un complesso di tre autoinduttori: HAI-1 (omoserin lattone), CAI-1 (3-hydroxytridecan-4-one) e AI-2 (furanosylborate diestere). In *A. harveyi*, la percezione dei tre autoinduttori regola la fosforilazione delle chinasi CqsS, LuxQ/LuxP e LuxN. Il gruppo fosfato, in seguito, viene trasferito al regolatore LuxO. Esso attiva la trascrizione di quattro RNA con funzione regolatoria, che assieme allo chaperone Hfq, regolano la trascrizione di luxR, proteina di tipo TetR che è in grado sia di attivare sia di reprimere diversi geni legati al *Quorum Sensing* di *A. harveyi*. Studi genetici hanno confermato che LuxO risulta essere fosforilato a bassa densità cellulare e questa condizione corrisponde al fenotipo buio (assenza di bioluminescenza). Quando invece si raggiunge una concentrazione adeguata di autoinduttori (densità cellulare elevata), LuxO è in forma defosforilata che corrisponde al fenotipo luminoso in cui è attiva la bioluminescenza (30).

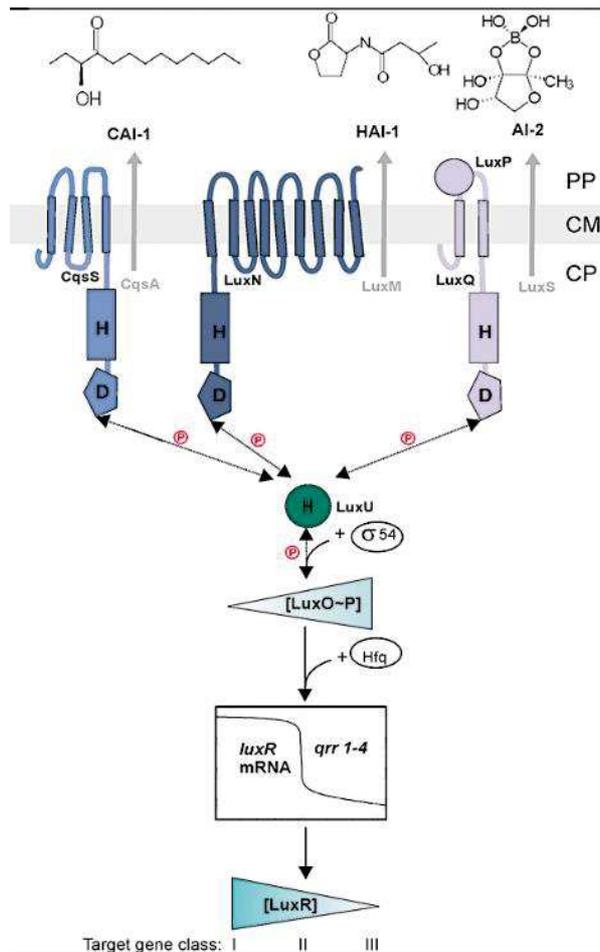


Figura 4: La figura schematizza una parte del Quorum Sensing in *A. harveyi*. Di particolare importanza è la parte del pathway regolata dal AI-2 che risulta essenziale per l'emissione di bioluminescenza da parte del batterio (30).

Dal momento che l'attivazione di Quorum Sensing in *A. harveyi* è determinata anche dall'autoinduttore AI-2 prodotto da *S. aureus* ed è modulata dalla sua concentrazione, il segnale di bioluminescenza viene utilizzato come sistema di screening anche per i batteri Gram positivi. Dagli esperimenti eseguiti, è stato quindi rilevato che le molecole C1, C3 e C4 sono in grado di alterare il pathway del Quorum Sensing di *S. aureus*, riducendo il segnale di bioluminescenza in *A. harveyi* rispetto al controllo (DMSO; grafico in figura 5 risultati). Tali dati quindi ci hanno indirizzato alla ricerca dei possibili meccanismi ed effetti delle molecole nella virulenza di *S. aureus*.

Per quanto riguarda l'indagine sui possibili meccanismi con cui le molecole potrebbero interferire nel sistema del Quorum Sensing di *S. aureus*, i dati ottenuti dalle indagini con qPCR realtime non hanno evidenziato una riduzione dei livelli di espressione del gene *agrA* in colture di *S. aureus* incubate con la molecola C1 (molecola con score di docking più elevato) o DMSO (grafico in figura 6 risultati). Tuttavia, come riportato in letteratura,

il Quorum Sensing di *S. aureus* è molto articolato. Oltre al sistema AgrA, in *S. aureus* è presente un *pathway* alternativo. Analogamente ad AgrA, componenti della famiglia SarA come MgrA e CodY sono in grado di interagire con gli operoni P1, P2 e P3 anche se il loro legame risulta essere di più debole entità. MgrA è un attivatore del sistema *agr*, mentre CodY ne è un silenziatore. L'espressione dei geni a valle degli operoni P1, P2 e P3 risulta ridotta in ceppi di *Staphylococcus aureus* con SarA silenziato rispetto a ceppi wild-type (31).

Dal momento che i dati ottenuti con *A. harveyi* indicano comunque una interferenza con il sistema di Quorum Sensing di *S. aureus*, in questo lavoro di tesi abbiamo valutato il possibile ruolo delle molecole nella riduzione dei fattori di virulenza del batterio, quale la produzione di biofilm. Il biofilm, infatti, è il risultato della attivazione del Quorum Sensing tramite la produzione di diversi fattori di virulenza, tra cui di PSM alfa, beta e  $\delta$ -tossina (19). I risultati ottenuti dimostrano che le molecole testate non interferiscono sulla formazione del biofilm e neppure sulla disgregazione di biofilm maturi (grafici in figura 8 e 9 risultati). Al contrario, la molecola C4 incrementa la formazione del biofilm negli esperimenti di co-trattamento (grafico figura 8 dei risultati). Studi condotti *in vitro* dimostrano che in seguito alla alterazione del segnale del Quorum Sensing, il batterio riduce la produzione di PSM (*phenol soluble modulins*). Tale fenomeno potrebbe accelerare la formazione del biofilm stesso, in una sorta di risposta allo stress subita dal patogeno. PSM  $\alpha$  e, in particolare,  $\beta$  sono proteine formate da amminoacidi idrofobici e idrofilici raggruppati in domini differenti e ben distinti tra loro formando strutture con proprietà surfattanti. Le PSM si dispongono all'interfaccia tra le cellule batteriche alterando i legami extracellulari che si formano tra esse e che sono alla base della fase di adesione e moltiplicazione del biofilm. Non a caso nelle primissime fasi di formazione del biofilm la loro produzione è inferiore rispetto alle fasi di maturazione e dispersione, nonostante il pathway del QS sia comunque attivo (16). Tuttavia, se da un lato la ridotta produzione di PSM accelera la formazione del biofilm, dall'altro consente di maturare un biofilm mancante delle *waves of detachment* ovvero della struttura ondulatoria sulla superficie del biofilm che induce la fase di dispersione (17). Di conseguenza, la molecola C4 pur inducendo la formazione di un biofilm più compatto potrebbe ridurre la dispersione delle cellule batteriche da questo, evento fondamentale per evitare la disseminazione dei batteri, ad esempio, dai devices medicali come dimostrato in studi già pubblicati (17). Ulteriori indagini sperimentali sono necessarie per provare tale attività per la molecola C4. L'assenza di attività delle molecole C1 e C3 verso biofilm

maturi (grafico in figura 9 risultati) può essere ricondotta alle caratteristiche e funzioni stesse del biofilm. Il biofilm è un sistema compatto di cellule la cui superficie esposta all'esterno è formata da cellule morte legate tra loro e alla matrice extracellulare mediante interazioni covalenti. Tale struttura forma una vera e propria barriera fisica che impedisce l'ingresso di farmaci, citochine e altri mediatori prodotti dall'attivazione dell'infezione (16). L'azione anti-biofilm di tali molecole potrebbe quindi essere incrementata da formulazioni contenenti surfattanti o tensioattivi in grado di permeare il biofilm.

Dati riportati in letteratura evidenziano come estratti ottenuti da *Rosmarinus officinalis* siano in grado di supportare e incrementare la fagocitosi nei confronti di alcuni batteri Gram positivi (35) (36). In questo studio, tale attività è stata valutata in cellule THP-1 differenziate a macrofagi. I risultati ottenuti dimostrano che la fagocitosi è aumentata nei confronti di *S. aureus* incubato con la molecola C4 (grafico in figura 17 risultati). Uno dei più importanti fattori di virulenza di *S. aureus* riguarda la sua capacità di sfuggire alla azione battericida dei macrofagi, sopravvivendo all'ambiente acido presente nei fagolisosomi (37). I dati relativi alla fagocitosi portando ad ipotizzare che la molecola C4 sia in grado di ridurre la capacità di *S. aureus* di resistere all'ambiente acido supportando in questo modo l'uccisione del patogeno da parte dei fagociti e favorendo l'attività del sistema immunitario dell'ospite.

Dal momento che ogni specie batterica presenta un suo proprio sistema di Quorum Sensing, uno dei vantaggi del Quorum Quenching è la possibilità di colpire in maniera selettiva la specie microbica responsabile dell'infezione. Al fine di indagare la specificità di azione delle molecole, in questo studio è stato preso in considerazione anche il patogeno *Pseudomonas aeruginosa*, batterio Gram negativo opportunisto capace di formare biofilm complessi con *S. aureus* nel corso di infezioni polmonari ricorrenti in pazienti con fibrosi cistica. Come per *S. aureus*, anche il trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa* nell'ultimo decennio sta diventando sempre più difficile a causa dell'insorgenza di antibiotico resistenza (32, 33). Nei soggetti con fibrosi cistica, la coesistenza di *S. aureus* e *P. aeruginosa* è molto frequente a livello polmonare e la riaccensione degli episodi infettivi è molto spesso determinata dalla sovracrescita di *S. aureus* (38). Di conseguenza, un trattamento specie-specifico capace di controllare la virulenza di *S. aureus* potrebbe rappresentare una valida alternativa all'uso degli antibiotici. I risultati ottenuti dai saggi condotti con *A. harveyi* riportano che la molecola C1 diminuisce significativamente il segnale di bioluminescenza (grafico in figura 12

risultati), comportando che la sua azione di Quorum Quenching non è specifica per *S. aureus* come invece riportato per le molecole C3 e C4. Nessuna delle molecole testate, tuttavia, interferisce con il biofilm di *P. aeruginosa*.

In conclusione, in questo studio di tesi abbiamo valutato l'azione di Quorum Quenching di alcune molecole ottenute da *Rosmarinus officinalis* nei confronti di *S. aureus* meticillina resistente. I dati raccolti non consentono di arrivare a conclusioni certe ma indicano come l'incubazione con la molecola di acido carnosico C4 riduca in *S. aureus* la produzione di autoinduttori, riducendo quindi l'entità di attivazione del sistema di Quorum Sensing. I nostri dati evidenziano che tale riduzione non coinvolge il sistema di AgrA ma potrebbe piuttosto ridurre la produzione di PSM, proteine ad azione surfattante. L'acido carnosico quindi non si dimostra efficace nel controllo dei fattori di virulenza di *S. aureus* e la sua azione potrebbe essere incrementata con formulazioni adatte a migliorarne la penetrazione nel biofilm.

## CAPITOLO 7: BIBLIOGRAFIA

- 1) Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med. 1998 Aug 20;339(8):520-32. doi: 10.1056/NEJM199808203390806. PMID: 9709046.
- 2) *Staphylococcus aureus*. Istituto superiore di sanità, 1 novembre 2019. In <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss-rapporto-staphylococcus-aureus>
- 3) *JAMA Internal Medicine* Batteriemia da S. aureus. Tre pratiche ospedaliere aumentano la sopravvivenza di Joan Stephenson
- 4) Bernabè G, Dal Pra M, Ronca V, Pauletto A, Marzaro G, Saluzzo F, Stefani A, Artusi I, De Filippis V, Ferlin MG, Brun P, Castagliuolo I. A Novel Aza-Derivative Inhibits agr Quorum Sensing Signaling and Synergizes Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus to Clindamycin. Front Microbiol. 2021 Feb 9;12:610859. doi: 10.3389/fmicb.2021.610859. PMID: 33633702; PMCID: PMC7899991.
- 5) Foster TJ. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects. FEMS Microbiol Rev. 2017 May 1;41(3):430-449. doi: 10.1093/femsre/fux007. PMID: 28419231.
- 6) McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus. Yale J Biol Med. 2017 Jun 23;90(2):269-281. PMID: 28656013; PMCID: PMC5482303.
- 7) Humanitas encyclopedia
- 8) Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. Staphylococcus aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. Int J Environ Res Public Health. 2021 Jul 16;18(14):7602. doi: 10.3390/ijerph18147602. PMID: 34300053; PMCID: PMC8304105.
- 9) Nakagawa S, Hillebrand GG, Nunez G. Rosmarinus officinalis L. (Rosemary) Extracts Containing Carnosic Acid and Carnosol are Potent Quorum Sensing Inhibitors of Staphylococcus aureus Virulence. Antibiotics (Basel). 2020 Mar 31;9(4):149. doi: 10.3390/antibiotics9040149. PMID: 32244277; PMCID: PMC7235817.
- 10) Throup JP, Zappacosta F, Lunsford RD, Annan RS, Carr SA, Lonsdale JT, Bryant AP, McDevitt D, Rosenberg M, Burnham MK. The srhSR gene pair from Staphylococcus aureus: genomic and proteomic approaches to the identification

and characterization of gene function. *Biochemistry*. 2001 Aug 28;40(34):10392-401. doi: 10.1021/bi0102959. PMID: 11513618.

- 11) Monecke S, Müller E, Büchler J, Stieber B, Ehricht R. Staphylococcus aureus in vitro secretion of alpha toxin (hla) correlates with the affiliation to clonal complexes. *PLoS One*. 2014 Jun 18;9(6):e100427. doi: 10.1371/journal.pone.0100427. PMID: 24940872; PMCID: PMC4062534.
- 12) Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):547-569. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688. PMID: 33522395; PMCID: PMC7872022.
- 13) Biswas R, Voggu L, Simon UK, Hentschel P, Thumm G, Götz F. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Jun;259(2):260-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x. PMID: 16734789.
- 14) Pollitt EJJ, Diggle SP. Defining motility in the Staphylococci. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Aug;74(16):2943-2958. doi: 10.1007/s00018-017-2507-z. Epub 2017 Apr 4. PMID: 28378043; PMCID: PMC5501909.
- 15) Moormeier DE, Bose JL, Horswill AR, Bayles KW. Temporal and stochastic control of Staphylococcus aureus biofilm development. *mBio*. 2014 Oct 14;5(5):e01341-14. doi: 10.1128/mBio.01341-14. PMID: 25316695; PMCID: PMC4205790.
- 16) Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011 Sep-Oct;2(5):445-59. doi: 10.4161/viru.2.5.17724. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21921685; PMCID: PMC3322633.
- 17) Periasamy S, Joo HS, Duong AC, Bach TH, Tan VY, Chatterjee SS, Cheung GY, Otto M. How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 24;109(4):1281-6. doi: 10.1073/pnas.1115006109. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22232686; PMCID: PMC3268330.
- 18) Krsmanovic M, Biswas D, Ali H, Kumar A, Ghosh R, Dickerson AK. Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. *Adv Colloid Interface Sci*. 2021 Feb;288:102336. doi: 10.1016/j.cis.2020.102336. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33421727.
- 19) Rajasree K, Fasim A, Gopal B. Conformational features of the Staphylococcus aureus AgrA-promoter interactions rationalize quorum-sensing triggered gene expression. *Biochem Biophys Rep*. 2016 Mar 23;6:124-134. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.03.012. PMID: 28955870; PMCID: PMC5600425.

- 20) Sidote DJ, Barbieri CM, Wu T, Stock AM. Structure of the *Staphylococcus aureus* AgrA LytTR domain bound to DNA reveals a beta fold with an unusual mode of binding. *Structure*. 2008 May;16(5):727-35. doi: 10.1016/j.str.2008.02.011. PMID: 18462677; PMCID: PMC2430735.
- 21) Periasamy S, Joo HS, Duong AC, Bach TH, Tan VY, Chatterjee SS, Cheung GY, Otto M. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 24;109(4):1281-6. doi: 10.1073/pnas.1115006109. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22232686; PMCID: PMC3268330.
- 22) Baldry M, Bojer MS, Najarzadeh Z, Vestergaard M, Meyer RL, Otzen DE, Ingmer H. Phenol-Soluble Modulins Modulate Persister Cell Formation in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*. 2020 Nov 9;11:573253. doi: 10.3389/fmicb.2020.573253. PMID: 33240231; PMCID: PMC7680730.
- 23) Le KY, Dastgheyb S, Ho TV, Otto M. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014 Nov 26;4:167. doi: 10.3389/fcimb.2014.00167. PMID: 25505739; PMCID: PMC4244807.
- 24) Gordon CP, Williams P, Chan WC. Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: a medicinal chemistry perspective. *J Med Chem*. 2013 Feb 28;56(4):1389-404. doi: 10.1021/jm3014635. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23294220; PMCID: PMC3585718.
- 25) Cyclic Peptides that Govern Signal Transduction Pathways: From Prokaryotes to Multi-Cellular Organisms. Mull RW<sup>1</sup>, Harrington A<sup>1</sup>, Sanchez LA<sup>1</sup>, Tal-Gan Y<sup>1</sup> 01 Jan 2018
- 26) Khan BA, Yeh AJ, Cheung GY, Otto M. Investigational therapies targeting quorum-sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015 May;24(5):689-704. doi: 10.1517/13543784.2015.1019062. Epub 2015 Feb 23. PMID: 25704585; PMCID: PMC6106785.
- 27) Jordán MJ, Lax V, Rota MC, Lorán S, Sotomayor JA. Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts. *J Agric Food Chem*. 2012 Sep 26;60(38):9603-8. doi: 10.1021/jf302881t. Epub 2012 Sep 18. PMID: 22957812.

- 28) Oluwatuyi M, Kaatz GW, Gibbons S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*. 2004 Dec;65(24):3249-54. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.10.009. PMID: 15561190.
- 29) Shen F, Ge C, Yuan P. Metabolomics Study Reveals Inhibition and Metabolic Dysregulation in *Staphylococcus aureus* Planktonic Cells and Biofilms Induced by Carnosol. *Front Microbiol*. 2020 Sep 18;11:538572. doi: 10.3389/fmicb.2020.538572. PMID: 33072009; PMCID: PMC7530940.
- 30) Anetzberger C, Pirch T, Jung K. Heterogeneity in quorum sensing-regulated bioluminescence of *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol*. 2009 Jul;73(2):267-77. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06768.x. Epub 2009 Jun 23. PMID: 19555459.
- 31) Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol Spectr*. 2019 Apr 5;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018. PMID: 30953424; PMCID: PMC6452892.
- 32) Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol*. 2017 Jun 28;27(6):1053-1064. doi: 10.4014/jmb.1611.11056. PMID: 28301918.
- 33) Endres TM, Konstan MW. What Is Cystic Fibrosis? *JAMA*. 2022 Jan 11;327(2):191. doi: 10.1001/jama.2021.23280. PMID: 35015036.
- 34) Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:1-17. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9\_1. PMID: 28470513.
- 35) Figueira LW, de Oliveira JR, Camargo SEA, de Oliveira LD. *Curcuma longa* L. (turmeric), *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary), and *Thymus vulgaris* L. (thyme) extracts aid murine macrophages (RAW 264.7) to fight *Streptococcus mutans* during in vitro infection. *Arch Microbiol*. 2020 Oct;202(8):2269-2277. doi: 10.1007/s00203-020-01945-5. Epub 2020 Jun 13. PMID: 32535791.
- 36) Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. 2013, *Food Control*; Moreno S, Ojeda A, Gaya M, Barni M, Castro O, Van Baren C. Rosemary Compounds as Nutraceutical Health Products February 2012 In book: *Food Additive*, DOI:10.5772/30883;
- 37) Leonard, P. G., Bezar, I. F., Sidote, D. J., and Stock, A. M. (2012). Identification of a hydrophobic cleft in the LytTR domain of AgrA as a locus for small molecule

interactions that inhibit DNA binding. *Biochemistry* 51, 10035–10043. doi: 10.1021/bi3011785

- 38) (Münzenmayer, L., Geiger, T., Daiber, E., Schulte, B., Autenrieth, S. E., Fraunholz, M., et al. (2016). Influence of Sae-regulated and Agr-regulated factors on the escape of *Staphylococcus aureus* from human macrophages. *Cell. Microbiol.* 18, 1172–1183. doi: 10.1111/cmi.12577
- 39) Quinn, R.A., Whiteson, K., Lim, Y.W. *et al.* Ecological networking of cystic fibrosis lung infections. *npj Biofilms Microbiomes* 2, 4 (2016). <https://doi.org/10.1038/s41522-016-0002-1>