

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Tesi di Laurea

**Saggio in tempo reale dell'attività ATP sintasica di batteri gram
positivi permeabilizzati.**

RELATORE

Prof.ssa Isabella Panfoli

CO-RELATORE

Prof.ssa Anna Maria Schito

CANDIDATA

Margherita Cavelli

Anno accademico 2021/2022

Indice

1 INTRODUZIONE	4
1.1 La respirazione aerobica	4
1.1.1 La catena di trasporto degli elettroni	4
1.1.2 Le specie reattive dell'ossigeno	9
1.1.3 La fosforilazione ossidativa	11
1.1.4 ATP sintasi	11
1.1.5 Inibizione della produzione di ATP	14
1.1.5.1 Oligomicina	17
1.2 I Batteri	18
1.2.1 Batteri Gram-negativi	18
1.2.2 Batteri Gram-positivi	19
1.2.2.1 Stafilococchi	19
1.2.2.1.1 Stafilococcus aureus	20
1.2.2.1.1.1 MRSA	20
1.2.2.1.2 Stafilococcus epidermidis	21
1.2.2.1.2.1 MRSE	21
1.2.3 Formazione del biofilm	22
1.2.4 Resistenza agli antibiotici	23
1.3 Polifenoli	25
1.3.1 Classificazione delle maggiori classi di fenoli antibatterici	27
1.3.1.1 Flavonoidi	27
1.3.1.1.1 Quercetina	28
1.4 Premesse alla tesi	31
2 METODI	33
2.1 Fotometria e spettrofotometria	33
2.1.1 Fotometro	34
2.1.2 Nefelometro	35
2.1.3 Misure di luminescenza	37
2.2 Condizioni di coltura batterica	41
2.3 Determinazione della concentrazione proteica	43
2.3.1 Metodo Bradford	43
2.4 Protocollo d'analisi della sintesi di ATP in continuo	45
3 RISULTATI	51
3.1 Messa a punto della metodica	51

3.2 Attività ATP sintasica dei ceppi MRSA ed MRSE	55
3.3 Inibizione da Oligomicina e Quercetina	58
4 DISCUSSIONE	62
5 CONCLUSIONI e SVILUPPI FUTURI	67
6 BIBLIOGRAFIA	68

1 INTRODUZIONE

1.1 La respirazione aerobica

La respirazione aerobica serve per ottenere energia e consiste in un processo esotermico in cui vengono demolite sostanze organiche complesse, ad esempio gli zuccheri. L'energia di legame delle fonti energetiche viene liberata tramite reazioni di ossidoriduzione ed immagazzinata come ATP per essere poi utilizzata nei processi cellulari (1).

1.1.1 La catena di trasporto degli elettroni

I quattro complessi della catena respiratoria sono complessi multienzimatici ciascuno dei quali ha la capacità di catalizzare le reazioni di una parte della catena di trasporto degli elettroni (1).

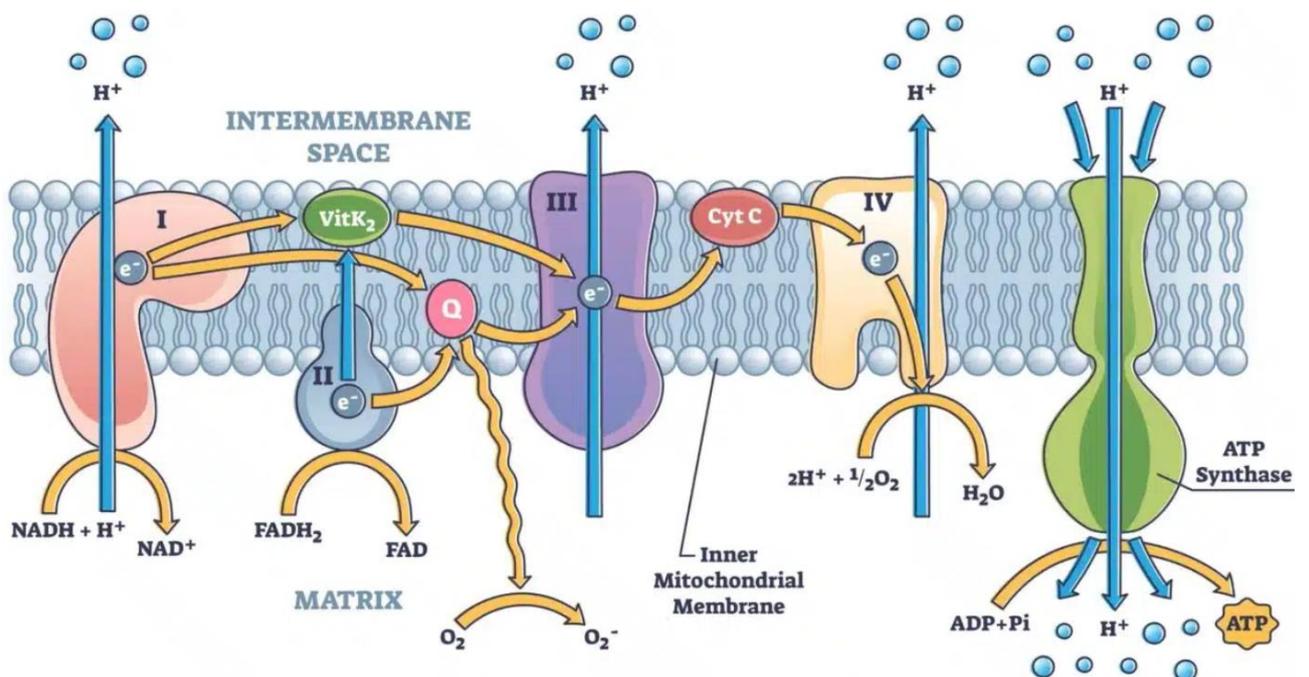


Figura 1. Schema della catena di trasporto degli elettroni.

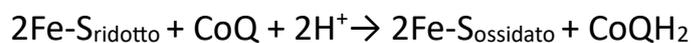
- 1) Complesso I : NADH-CoQ ossidoreduttasi catalizza il passaggio degli elettroni dal NADH al coenzima Q (CoQ). Esso si trova nella membrana interna mitocondriale ed include, tra le varie subunità, proteine contenenti centri ferro-zolfo e la

flavoproteina ossidante, NADH. Essa possiede un coenzima flavinico, flavin mononucleotide (FMN), che si differenzia dal FAD per la mancanza del nucleotide adenilico, e otto centri ferro-zolfo (1). La reazione è suddivisa in più tappe:

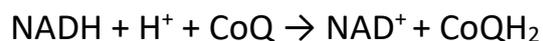
a) inizialmente si ha il passaggio di elettroni dal NADH alla flavoproteina.



b) qui si ha la riossidazione della flavoproteina precedentemente ridotta e la riduzione dei centri ferro-zolfo ossidati. I centri ferro-zolfo ridotti cedono elettroni al coenzima Q (o ubiquinone) che viene così ridotto a CoQH₂.

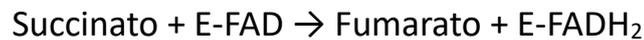


La reazione globale è:

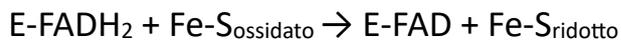


La reazione globale è una delle tre responsabili della creazione del gradiente di pH, poiché coinvolge il pompaggio di 4 protoni dalla matrice verso lo spazio intermembrana. Questa reazione è molto esoergonica, perciò, rilascia sufficiente energia da permettere la fosforilazione dell'ADP ad ATP (1). Esiste una direzionalità nel flusso di elettroni nei complessi, infatti il NADH ridotto cede elettroni al CoQ ma non accade l'inverso. Inoltre, è importante notare anche che alcuni trasportatori come ad esempio il NADH, trasportano elettroni ed idrogeni ridotti, mentre altri, come ad esempio le proteine ferro-zolfo, possono trasportare solamente elettroni. Ciò è alla base della formazione di ATP da parte della pompa protonica. Quando un trasportatore riduce, come ad esempio il NADH, la proteina ferro-zolfo, esso passa elettroni ma non gli ioni idrogeno (1). La conformazione della membrana mitocondriale interna e dei vari trasportatori di elettroni consente agli ioni idrogeno di passare dalla parte opposta della membrana. Il CoQ è il recettore finale degli elettroni del primo complesso, esso è mobile; perciò, può muoversi nella membrana e cedere gli elettroni acquistati al Complesso III, per l'ulteriore trasporto verso l'ossigeno (1).

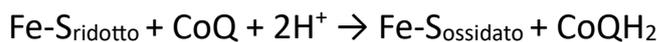
2) Complesso II: anche questo catalizza il passaggio di elettroni al CoQ e prende il nome di succinato-CoQ ossidoreduttasi. L'enzima succinato deidrogenasi consiste di una flavoproteina e di una proteina ferro-zolfo, tutto il complesso si trova nella membrana interna mitocondriale. La fonte di elettroni in questo caso è il succinato, facente parte del ciclo dell'acido citrico, che viene ossidato a fumarato da un enzima flavinico (1).



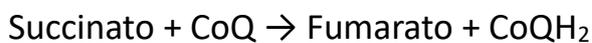
Il gruppo flavinico in seguito viene riossidato mentre un'altra proteina ferro-zolfo è ridotta.



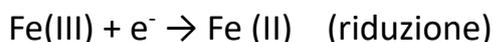
La proteina ferro-zolfo ridotta cede i suoi elettroni al CoQ ossidato così che il CoQ venga ridotto.



La reazione globale:

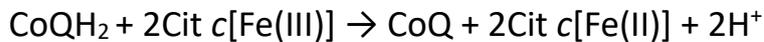


La reazione globale è esotermica (o esoergonica) ma non libera sufficiente energia per la produzione di ATP e inoltre gli ioni idrogeno non vengono pompati fuori dalla matrice in questa reazione. Nelle tappe seguenti della catena di trasporto degli elettroni, essi sono ceduti dal CoQ, che è quindi riossidato, alla prima di una serie di proteine simili chiamate citocromi (1). Ogni citocromo contiene un gruppo eme, che a sua volta contiene il ferro che è ciclicamente ridotto a Fe (II) e riossidato a Fe (III).



Ogni proteina differisce leggermente dall'altra strutturalmente e ciò dà ad ogni proteina proprietà leggermente differenti, compresa la tendenza o meno a partecipare alle reazioni redox. I diversi tipi di citocromi sono contraddistinti da lettere minuscole (*a,b,c*) e sono inoltre ulteriormente distinti con dei pedici (1).

3) Complesso III: CoQH₂-citocromo *c* ossidoreduttasi (anche chiamato citocromo *c* reduttasi) catalizza l'ossidazione del CoQ ridotto (CoQH₂). Gli elettroni prodotti da questa ossidazione sono ceduti al citocromo *c* in un processo a più tappe (1). La reazione globale è:



Per ogni molecola di CoQ sono necessarie due molecole di citocromo *c*. I componenti di questo complesso sono il citocromo *b*, il citocromo *c*₁ e molte proteine ferro-zolfo (1). I citocromi trasportano elettroni ma non ioni idrogeno. Quando CoQ ridotto viene ossidato, gli ioni idrogeno passano nello spazio intermembrana. Il terzo complesso si trova all'interno della membrana mitocondriale interna. Il CoQ e il citocromo *c* possono liberamente muoversi nella membrana, inquanto non fanno parte dei complessi della catena respiratoria. I complessi stessi si muovono all'interno della membrana e il passaggio degli elettroni si ha quando un complesso, spostandosi nella membrana, incontra quello successivo (1). Risulta sempre più evidente che un flusso ciclico elettronico coinvolga per due volte il CoQ. Infatti, esso è un chinone, che può esistere in tre forme, tra cui quella semichinonica, che è intermedia tra quella ossidata e ridotta (1). Questa parte della via, chiamata Ciclo Q, prevede che in una parte di tale ciclo, un elettrone trasportato da CoQ ridotto ai centri ferro-zolfo e poi al citocromo *c*₁, lascia il CoQ nella forma semichinonica.



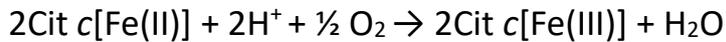
La serie di reazioni coinvolgenti il CoQ e il citocromo *c*₁, omettendo le proteine ferro-zolfo, può essere così descritta:



Il semichinone, insieme alle altre due forme di CoQ, prende parte ad un processo ciclico in cui i due citocromi *c* sono a turno ridotti ed ossidati. Vi è il coinvolgimento anche di una seconda molecola di CoQ che trasferisce un secondo elettrone al citocromo *c*₁ e inseguito al trasportatore citocromo *c*.

Il risultato finale delle reazioni del terzo complesso è il pompaggio di 4 protoni al quale viene accoppiata la formazione di ATP, grazie all'esistenza di un ΔE_0 che fornisce sufficiente energia per la produzione di ATP (1).

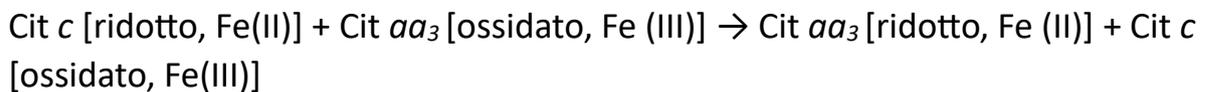
- 4) Complesso IV: o citocromo *c* ossidasi catalizza le reazioni finali della catena di trasporto degli elettroni, in cui gli elettroni passano dal citocromo *c* all'ossigeno (1).



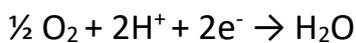
Associata alla reazione si ha il pompaggio di 2 protoni dalla matrice allo spazio intermembrana. La citocromo *c* ossidasi è un omodimero, immerso nella membrana mitocondriale interna e contiene i citocromi *a* ed *a*₃ oltre a due ioni di rame (Cu_A e Cu_B) che partecipano anch'essi al trasporto elettronico. I due ioni rame sono accettori intermedi di elettroni che si trovano tra i citocromi *a*.



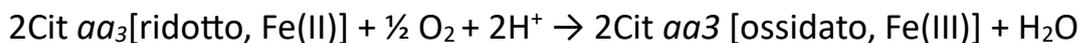
Le reazioni dei citocromi più esplicitamente sono:



I due citocromi *a* e *a*₃ formano il complesso citocromo ossidasi. La citocromo ossidasi ridotta viene poi ossidata dall'ossigeno che è poi ridotto ad acqua.



La reazione globale è:



In quest'ultima reazione si vede il collegamento con l'ossigeno molecolare del metabolismo aerobico (1).

1.1.2 Le specie reattive dell'ossigeno

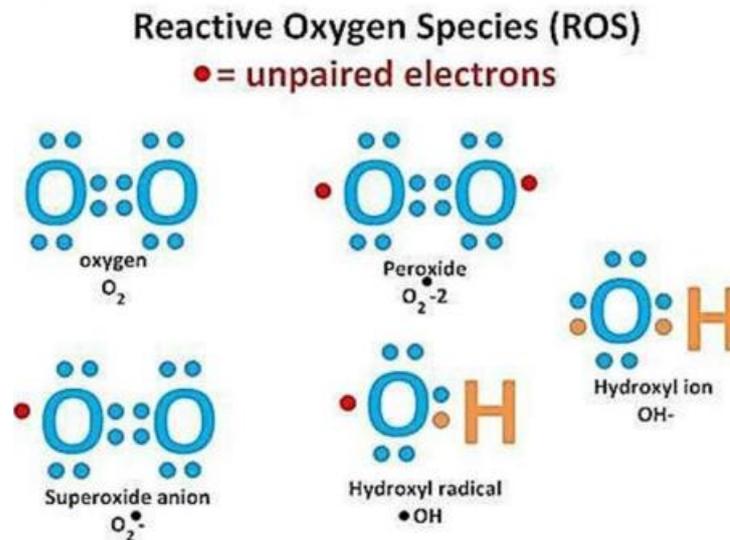


Figura 2. ROS più noti ed importanti.

Reagendo con gli elettroni, l'ossigeno è trasformato in specie reattive dell'ossigeno (ROS). È noto da tempo che i ROS possono distruggere cellule batteriche e animali e fra queste le cellule umane. Ci sono molte fonti di ROS, inclusi gli enzimi NADPH ossidasi e vi sono un grande numero di sistemi di degradazione dei ROS (2); tuttavia la principale fonte cellulare di specie reattive dell'ossigeno è la catena respiratoria mitocondriale. Si ritiene che negli organismi aerobici i ROS si formino principalmente durante il normale metabolismo ossidativo, come sottoprodotti della fosforilazione ossidativa durante la sintesi di ATP (3). Il meccanismo di autoprotezione cellulare contro tale potenziale danno da stress ossidativo rimane poco chiaro. In questo meccanismo di protezione paiono implicate determinate chinasi come Mst1 e Mst2 che rilevano i ROS e mantengono l'equilibrio redox cellulare modulando la stabilità del fattore di trascrizione antiossidante Nrf2 (4). Si pensa che un basso livello di ROS abbia effetti positivi, agendo come messaggeri intracellulari, mentre una maggiore produzione di ROS provochi l'invecchiamento e lo sviluppo di malattie degenerative(5). Lo squilibrio tra la generazione e l'eliminazione di ROS a favore della prima con determinate conseguenze sulla fisiologia cellulare, viene definito stress ossidativo (6). Malattie legate ai ROS possono essere dovute ad una mancanza di ROS (malattia granulomatosa cronica, alcune malattie autoimmuni) o a un'eccessiva presenza di ROS (malattie cardiovascolari e neurodegenerative). Per le malattie causate da un eccesso di ROS, un supplemento di antiossidanti è stato per lo più inefficace in

studi clinici, molto probabilmente perché per la loro azione ormai è troppo tardiva, troppo limitata e poco specifica. La specifica inibizione degli enzimi che producono i ROS è un approccio più promettente per l'efficienza clinica (2). I mitocondri sono la principale fonte di produzione di ATP da un lato e di produzione di ROS dall'altro (5).

1.1.3 La fosforilazione ossidativa

La fosforilazione ossidativa è il processo biochimico che produce ATP nei mitocondri e consta di due processi:

- 1) Il trasporto degli elettroni: gli elettroni trasportati da NADH e FADH₂ sono scambiati transmembrana dalla catena enzimatica che usa questo movimento per la produzione di un gradiente protonico.
- 2) La sintesi di ATP attraverso la fosforilazione dell'ADP da parte dell'enzima F₁F₀-ATP sintasi che è una nano-macchina che effettua una catalisi rotazionale (1).

Gli elettroni passano tramite trasportatori disposti asimmetricamente lungo la membrana interna. Il movimento degli elettroni lungo la membrana è accompagnato dal movimento di protoni tramite la membrana così che venga prodotto un gradiente elettrochimico. I protoni, per rientrare, devono passare tramite la subunità ϵ della porzione F₀ perché la membrana interna del mitocondrio è ad essi impermeabile. La forza motrice protonica spinge i protoni verso la matrice e così fornisce l'energia per la sintesi di ATP che è catalizzata dal complesso F₁ associato ad F₀ nella ATP sintasi (1).

1.1.4 ATP sintasi

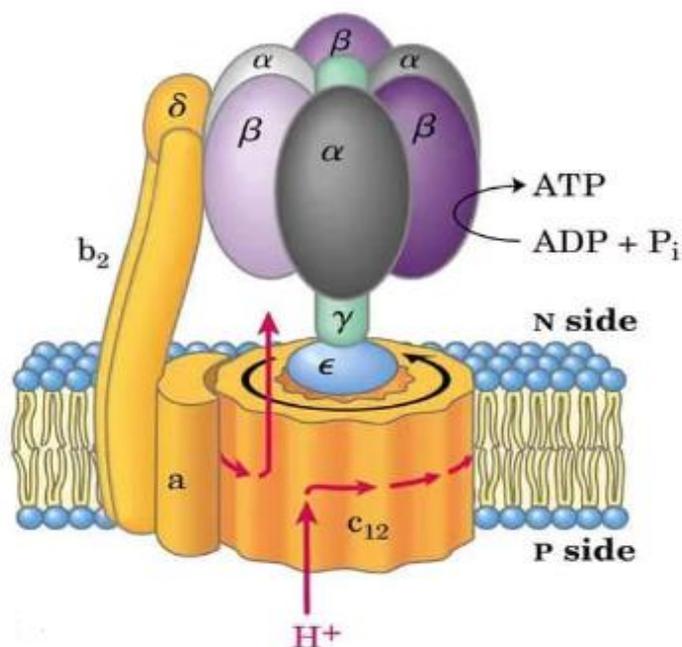


Figura 3. Un modello delle componenti F₁ ed F₀, un motore molecolare rotante.

Tra i due lati della membrana mitocondriale interna esiste un gradiente di pH dovuto al pompaggio di protoni generato dalle reazioni di ossidazione che liberano energia, inoltre vi è una differenza di voltaggio generata dalla differente concentrazione degli ioni all'interno e all'esterno della membrana (1). Tramite un processo di accoppiamento, la differenza di voltaggio è convertita nell'energia chimica dell'ATP. Per collegare l'ossidazione con la fosforilazione vi è la necessità di un fattore di accoppiamento, che è una proteina oligomerica complessa, la F_1F_0 -ATP sintasi (ATP sintasi) che attraversa la membrana interna per il suo spessore e protrude nella matrice. La porzione di proteina che protrude è formata da cinque catene polipeptidiche diverse e si chiama F_1 , la porzione transmembrana è formata da tre catene polipeptidiche diverse ed è chiamata F_0 (1). L'intero complesso catalizza sia la fosforilazione che l'inverso, ovvero l'idrolisi di ATP, in vivo esiste una proteina IF1 che inibisce la rotazione antioraria che comporterebbe tale idrolisi in condizione di ischemia e basso pH. Normalmente il NADH o il $FADH_2$ trasportano gli elettroni all'ossigeno così da generare ATP, in presenza di un disaccoppiante l'ossigeno è ancora ridotto ad H_2O , ma non viene prodotto ATP; se esso viene rimosso viene ripristinata la sintesi di ATP legata al trasporto degli elettroni (1). Sono state fatte varie ipotesi sui meccanismi di accoppiamento tra il trasporto degli elettroni e la produzione di ATP. L'ipotesi dell'accoppiamento chemiosmotico che è l'ipotesi più accreditata ha come punto chiave il gradiente protonico (ioni H^+) tra i due lati della membrana mitocondriale interna. Le proteine dei complessi facenti parte della catena respiratoria prendono H^+ dalla matrice per trasferirli nelle reazioni redox, i protoni vengono quindi successivamente rilasciati nello spazio intermembrana dove sono riossidati generando così il gradiente protonico (1). Il risultato quindi è che vi è una concentrazione più alta di protoni nello spazio intermembrana che nella matrice, infatti è noto che vi è un pH più basso nello spazio intermembrana. Il gradiente può guidare la produzione di ATP, che avviene quando i protoni rifluiscono nella matrice. La subunità α della porzione F_0 dell'ATP sintasi è il mezzo tramite cui i protoni rifluiscono verso la matrice. Il flusso di protoni è accoppiato alla sintesi di ATP nella porzione F_1 . Secondo la teoria dell'accoppiamento chemiosmotico vi è un legame diretto tra il gradiente di protoni e la reazione di fosforilazione (1).

La sintesi di ATP a livello della porzione F_1 avviene attraverso la variazione conformazionale delle subunità α e β causata dal movimento della subunità γ solidale con il movimento della porzione F_0 dell'ATP sintasi. L'asta rotante che coordina lo scambio energetico tra il flusso protonico in F_0 e la sintesi di ATP in F_1 è formata dalle subunità γ ed ϵ . Ciò significa che l'energia chimica del

gradiente di protoni è convertito in energia meccanica, per alimentare la rotazione della proteina. Questa energia meccanica infine viene convertita in energia chimica per formare legami fosforici altamente energetici dell'ATP (7,8).

Esistono tre siti sull'ATP sintasi per il substrato che sono rappresentate dalle subunità β che sono catalitiche (1).

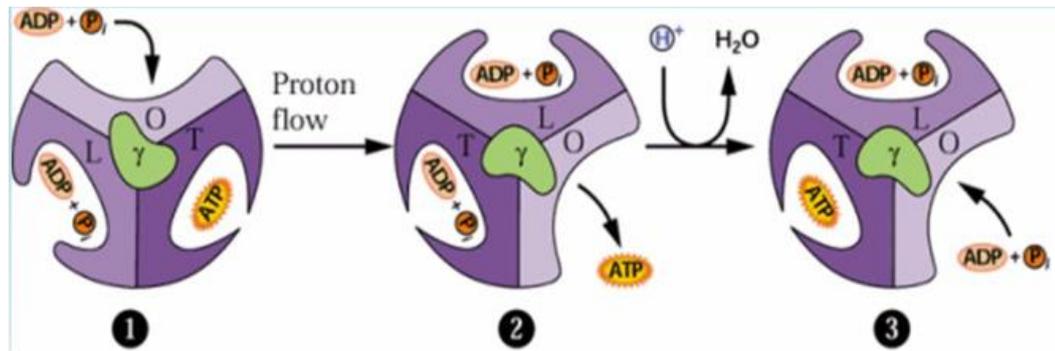


Figura 4. Schema dei tre siti esistenti sull'ATP sintasi per il substrato.

Esistono tre conformazioni possibili:

- 1) cataliticamente attivo e con alta affinità (T)
- 2) cataliticamente non attivo e con affinità debole (L)
- 3) aperto con bassa affinità per il substrato (O)

Questi stati si interconvertono a seconda del flusso protonico che attraversa la sintasi. L'ADP e il P_i si legano al sito nella conformazione L, l'ATP formato si lega al sito nella conformazione T. Un flusso protonico converte il sito dalla conformazione T alla conformazione O così da rilasciare ATP. Il sito in cui sono legati ADP e P_i assume la conformazione T e viene prodotta la molecola di ATP. La porzione F_1 della ATP sintasi agisce come un motore rotatorio, le subunità c, γ ed ϵ costituiscono il rotore girante dentro ad un cilindro costituito dalla subunità d associata ad $\alpha_3\text{-}\beta_3$ e con le subunità α e β (1).

1.1.5 Inibizione della produzione di ATP

Gli inibitori della sintesi dell'ATP possono agire in tre punti della catena di trasporto degli elettroni, che corrispondono ai siti di pompaggio dei protoni, ovvero i Complessi II, III e IV (1). Ad esempio, i barbiturati bloccano, nel primo sito, il passaggio degli elettroni dal NADH al coenzima Q; anche il rotenone agisce in questo punto (1).

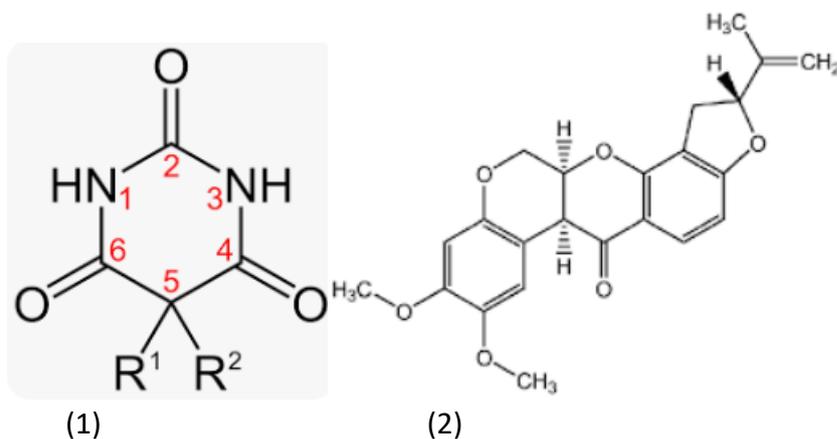
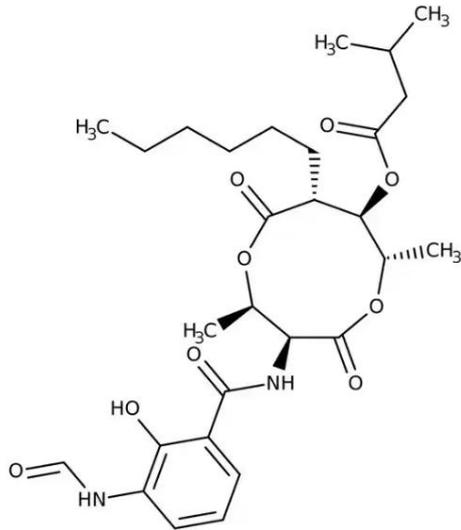
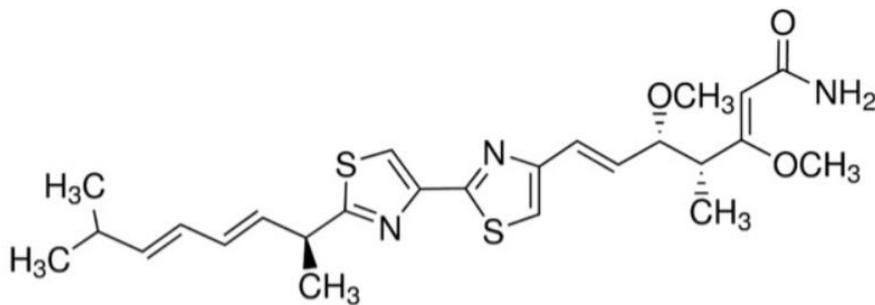


Figura 5. Struttura chimica dei barbiturici (1) e del rotenone (2).

Il secondo punto in cui si può avere il blocco è quello in cui sono coinvolti il citocromo *b*, il coenzima Q e il citocromo *c*₁, come inibitore si può usare il classico antibiotico antimicina A, oppure composti di più recente uso come il mixotiazolo, il 5-n-undecil-6-idrossi-4,7-diossobenzotiazolo (1).



(1)



(2)

Figura 6. Struttura dell'Antimicina A (1) e del Mixotiazolo (2).

Il terzo punto in cui si può bloccare il passaggio di elettroni dal complesso del citocromo α , all'ossigeno. Operano qui molti inibitori potenti come il CN^- , l'azide N_3^- e il monossido di carbonio CO . Ognuno dei punti di inibizione dove agiscono questi inibitori della respirazione corrisponde ad un complesso della catena respiratoria (1).

Oltre all'inibizione dei complessi, esistono inibitori capaci di agire sull'ATP sintasi, quali ad esempio la N,N-dicicloesilcarbodiimmide (DCCD) (9) o l'oligomicina che lega il canale di protoni sul componente F_0 di ATP sintasi (10) e che verrà trattata dettagliatamente nel paragrafo seguente 1.5.1.1.

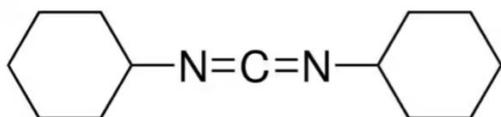


Figura 7. Struttura chimica di N,N-dicicloesilcarbodiimmide (DCCD).

DCCD è il classico inibitore di F_0F_1 -ATP sintasi che lega covalentemente l'altamente conservata subunità proteolipidica (subunità c) in F_0 tramite un

legame con l'acido carbolissico. Sebbene sia ben noto che la modificazione della subunità *c*, indotta da DCCD blocchi la traslocazione dei protoni in F_0 e l'attività di idrolisi dell'ATP accoppiata di F_1 , in che modo DCCD inibisca la rotazione dinamica di F_0F_1 rimane poco chiaro (9). Le strutture della ATP sintasi dai mitocondri del cuore bovino sono state inibite con il fitopolifenolo alimentare, resveratrolo e con i relativi polifenoli quercetina e piceatannolo (11). Il sito di legame è una tasca idrofobica tra la punta C-terminale della subunità γ e la subunità β , gli inibitori sono legati tramite legami H principalmente alle loro frazioni idrossiliche mediate da molecole d'acqua legate e da interazioni idrofobiche (11). Questa regione di F_1 -ATP sintasi forma un cuscinetto per consentire la rotazione della punta della subunità γ all'interno dell'anello durante la catalisi. Si pensa che gli inibitori impediscano sia l'attività sintetica che quella idrolitica dell'enzima bloccando entrambi i sensi di rotazione della subunità γ (11).

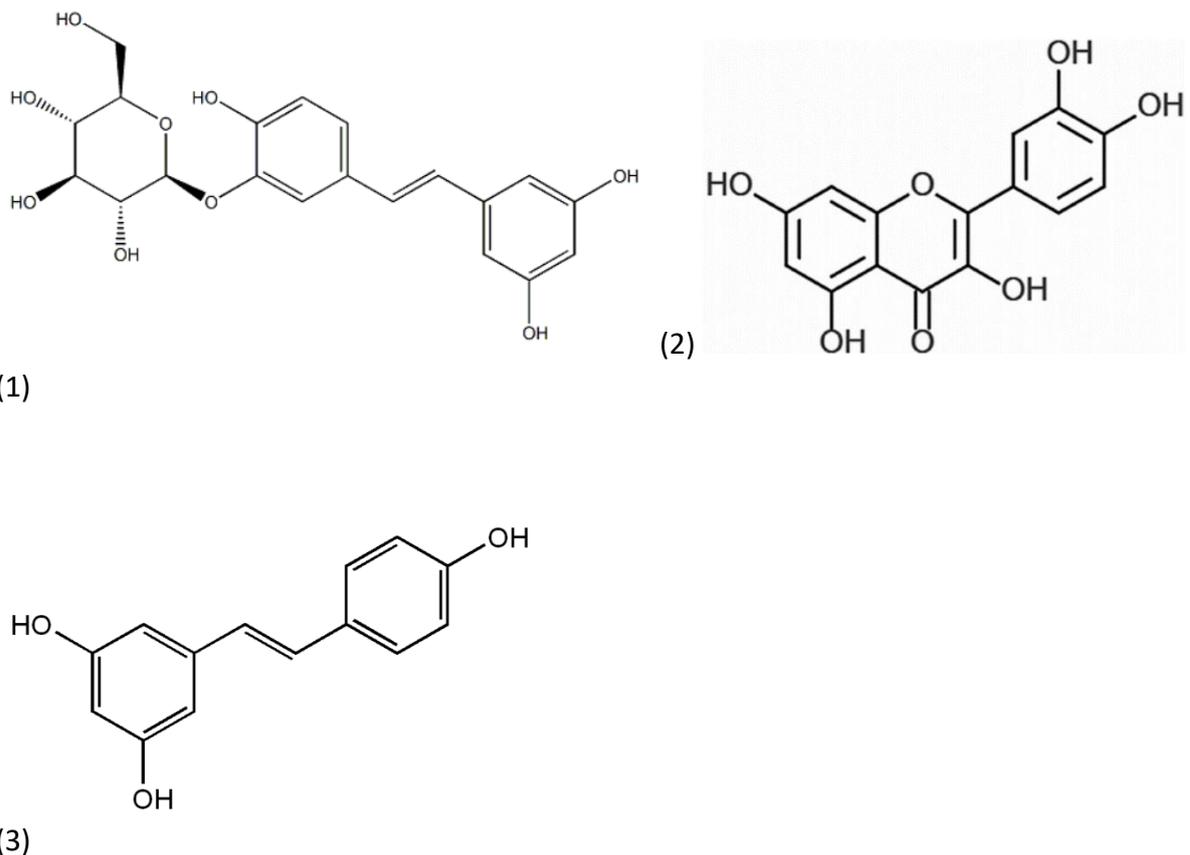


Figura 8. Struttura chimica del Piceatannolo (1), della Quercetina (2) e del Resveratrolo (3).

1.1.5.1 Oligomicina

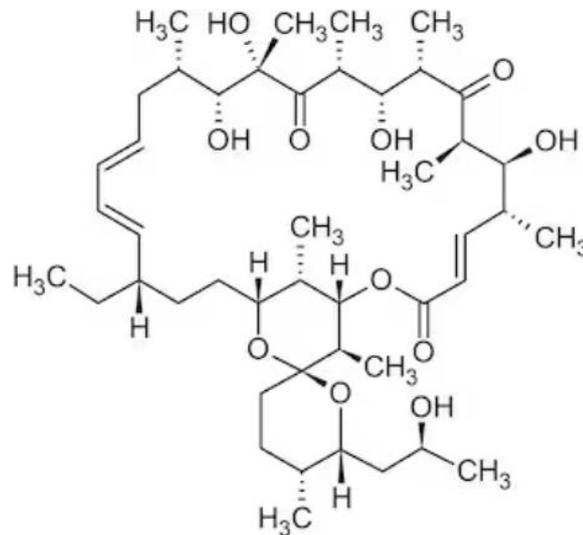


Figura 9. Struttura chimica dell'Oligomicina.

Oligomicina è un antibiotico macrolide tossico che lega il canale di protoni sul componente F_0 di ATP sintasi, bloccando la sintesi di ATP mitocondriale, la traslocazione dei protoni e l'utilizzo di ossigeno (12,13). L'oligomicina è stata riconosciuta come un potente inibitore dell'ATP sintasi mitocondriale dal 1958 (14). Studi degli anni '60 hanno dimostrato che l'ATP sintasi mitocondriale è separabile in due parti F_1 , che contiene il sito catalitico per la sintesi di ATP e F_0 che conferisce sensibilità all'oligomicina (15). Essa si lega alla subunità c della porzione F_0 dell'ATP sintasi. La subunità c dell'ATP sintasi è una proteina di membrana integrale costituita da due eliche, 1 e 2, che attraversano la membrana mitocondriale interna. La subunità c costituisce una componente essenziale della turbina protonica dell'ATP sintasi, che ruota accoppiata al movimento dei protoni lungo un gradiente potenziale. Il carbossile della catena laterale di Glu59 è quasi al centro dell'elica 2, posizionandolo nel doppio strato lipidico nella conformazione protonata "chiusa". Si ipotizza che la subunità a formi due semicanali acquosi che consentono ai protoni di accedere al carbossilato di Glu59 nella conformazione "aperta", consentendo la reazione di protonazione e deprotonazione. Sulla base di ciò, si pensa che oligomicina si leghi all'anello c posizionato sul canale protonico e blocchi la traslocazione protonica bloccando l'accesso al carbossile essenziale. Questo sito di legame costituisce una base importante per la futura scoperta di farmaci (10).

1.2 I Batteri

I batteri, organismi procarioti le cui dimensioni variano tra 1 e 3 μm , possono essere classificati in base alle loro dimensioni e morfologia. Le forme batteriche principali sono quattro: quadrata, sferica, a spirale e a bastoncino. Quelli di forma sferica si chiamano cocci e a seconda della loro organizzazione vengono identificati come: diplococchi se disposti a coppie, streptococchi se formano catene da 4 a 20 cellule, o stafilococchi se disposti in gruppi più numerosi a forma di grappolo (16).

Tutti i batteri, tranne poche eccezioni, vengono divisi in due tipi: Gram-positivi e Gram-negativi in base alla colorazione di Gram. Questa suddivisione si basa su differenze sostanziali di carattere chimico e fisico riguardante la parete cellulare. Un batterio viene definito Gram-positivo quando non viene decolorato dall'alcol inseguito all'applicazione del cristal-violetto, colorante primario, mentre è Gram-negativo quando è decolorato dall'alcol e perciò controcolorato dalla fuxina, colorante secondario (16). Entrambe le pareti cellulari batteriche contengono, in diverse quantità, peptidoglicano costituito da vari strati di catene polisaccaridiche, formate da acido N-acetilmuramico (NAM) e N-acetilglucosamina (NAG), unite o meno da corte catene peptidiche (16).

1.2.1 Batteri Gram-negativi

La parete cellulare dei Gram-negativi, al contrario di quella dei Gram-positivi, è composta da almeno 3 strati. All'esterno del peptidoglicano si trova la membrana esterna che è collegata per mezzo di molecole lipoproteiche ed ha una composizione piuttosto complessa. Essa è costituita da proteine per il 40-50%, da lipopolisaccaridi (LPS) per il 30% e da fosfolipidi per il 20-30%. I fosfolipidi facenti parte della membrana esterna hanno una disposizione a doppio strato simile a quella della membrana citoplasmatica (16). Nello strato fosfolipidico si trovano le porine, proteine canale, con funzione di trasporto; i nutrienti trasportati arrivano nello spazio periplasmatico compreso tra la membrana esterna e la membrana citoplasmatica ove sono contenute diverse molecole, tra cui enzimi in grado di trasformare le sostanze prima che queste entrino nel citoplasma ed una serie di proteine con funzione carrier simile a quella delle proteine di trasporto di nutrienti della membrana citoplasmatica (16). Sempre nello strato periplasmatico possono essere presenti diverse tipologie di enzimi capaci di inattivare vari farmaci antibiotici. La presenza di

questi enzimi rende quindi il batterio resistente all'antibiotico (16). La parte lipidica dei LPS della membrana è inserita all'interno del doppio strato fosfolipidico mentre la porzione polisaccaridica sporge esternamente rispetto alla superficie cellulare. Solo la parte lipidica dell'LPS, detta lipide A, è tossica, ma siccome le due molecole vengono rilasciate singolarmente, è l'intera struttura a prendere il nome di endotossina, molecola potenzialmente molto tossica per l'uomo (16).

1.2.2 Batteri Gram-positivi

La parete dei Gram-positivi è formata da molti strati di peptidoglicano ed è molto più spessa di quello dei Gram-negativi (16). Tale molecola rappresenta infatti circa il 50-60% del peso secco totale della parete dei Gram-positivi mentre il materiale rimanente è costituito per la maggior parte da particolari polisaccaridi, gli acidi teicoici che permeano il peptidoglicano e la sua superficie. La parete dei Gram-positivi ha quindi una consistenza molto rigida, anche dovuta ai numerosi legami crociati peptidici formati nel peptidoglicano (16)

1.2.2.1 Stafilococchi

I membri del genere *Staphylococcus*, appartenente alla famiglia delle *Micrococcaceae*, includono 23 specie di stafilococchi, 3 delle quali in particolare (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*) hanno notevole importanza clinica (16). *S. aureus*, stafilococco coagulasi positivo, è uno dei principali patogeni umani mentre la maggior parte delle altre specie, coagulasi negative, si comporta da patogeno opportunisto. Gli stafilococchi tendono ad aggregarsi in gruppi irregolari che ricordano grappoli d'uva, essi sono aerobi-anaerobi facoltativi, immobili e asporigeni (16). Sono catalasi-positivi, quindi se si aggiunge acqua ossigenata ad una colonia posta su un vetrino, si ha subito sviluppo di bolle di ossigeno. In particolare, lo *S. epidermidis* è uno tra i più importanti commensali naturali della cute nell'uomo: un grande numero è presente nelle narici anteriori, nelle ascelle, nel perineo. In numero minore sono anche presenti nel nasofaringe e occasionalmente, nella vagina (16).

1.2.2.1.1 *Stafilococcus aureus*

S. aureus può provocare molti tipi di infezioni umane. Le infezioni e le patologie ad esso associate comprendono foruncoli, favi, l'impertigine, la sindrome della cute ustionata, tossinfezioni alimentari, l'enterocolite stafilococcica, l'osteomielite e la sindrome da shock tossico (16). La patologia da stafilococco è multifattoriale ed è solitamente dovuta alla produzione di più fattori di patogenicità, solo in tre casi una particolare tossina è correlata a una determinata malattia: la tossina SST-1 e la sindrome da shock tossico, la tossina esfoliativa con la sindrome da cute ustionata e l'enterotossina con la tossinfezione alimentare. Altri fattori legati alla patogenicità di *S. aureus* comprendono la coagulasi, la leucocidina, le emolisine alfa e delta ed infine la proteina A (16).

1.2.2.1.1.1 MRSA

Dal 1960 è emersa la resistenza dello *S. aureus* alla meticillina (MRSA: methicillin resistant *S. aureus*) inizialmente descritta nel 1961 in Inghilterra, poco dopo l'introduzione della meticillina nella pratica clinica (17). Tale molecola fu inizialmente ampiamente usata; tuttavia a causa della sua tossicità, essa non è più commercializzata per uso umano ed è stata largamente rimpiazzata da molecole simili, penicilline più stabili, come l'oxacillina, flucloxacillina a dicloxacillina. Tuttavia, il termine MRSA continua ad essere usato (17). Negli anni successivi la resistenza agli antibiotici degli *S. aureus*, diffusasi globalmente, è diventata una delle prime cause di infezione batterica sia negli ospedali che fuori. Vi è però una marcata variazione geografica nel carico di MRSA a causa di diversi fattori, comprese le differenze nelle pratiche locali di controllo delle infezioni e le caratteristiche specifiche del patogeno dei cloni circolanti (17). Differenti cloni di MRSA sono il risultato dell'acquisizione indipendente della cassetta stafilococcica cromosomica mec (SCCmec), che contiene geni che codificano per proteine che rendono il batterio resistente alla maggior parte degli antibiotici beta lattamici (come appunto la meticillina) (17). Il successo degli MRSA è la conseguenza dell'esteso arsenale dei fattori di virulenza prodotti da *S. aureus* combinati con la resistenza ai beta lattamici e, per molti cloni, resistenza alle altre classi antibiotiche. Le manifestazioni cliniche degli MRSA vanno da infezioni da colonizzazioni asintomatiche della mucosa nasale e dei tessuti molli a malattie invasive e fulminanti con alta mortalità (17). Sebbene le opzioni di trattamento per MRSA siano limitate, si stanno

sviluppando nuovi potenti antibiotici. La comprensione delle dinamiche di colonizzazione, delle vie di trasmissione, dei fattori di rischio per la progressione verso l'infezione e delle condizioni che promuovono l'emergere della resistenza, consentirà l'ottimizzazione delle strategie per controllare efficacemente l'MRSA. Candidati vaccini sono anche essi in fase di sviluppo e potrebbero essere una efficiente misura di prevenzione (17).

1.2.2.1.2 *Stafilococcus epidermidis*

Gli stafilococchi coagulasi-negativi, in particolare *S.epidermidis*, sono la causa di molte infezioni associate con l'uso di cateteri, di corpi estranei come le protesi valvolari cardiache, le protesi dell'anca, i by-pass atrio-ventricolari (16). I biopolimeri usati come materiali per queste protesi sono solitamente idrofobici e fungono così da adesivi per molti patogeni le cui superfici cellulari sono idrofobiche (16). La patogenicità di *S. epidermidis* correlata ad oggetti esterni è causata dall'aderenza del batterio alla protesi ed alla produzione di uno strato mucoso inibente la risposta dei polimorfonucleati ai segnali chemiotattici e stimola queste cellule alla degranolazione riducendo la fagocitosi e la digestione dei batteri (16). Questi strati mucosi formano anche delle barriere ostacolanti la penetrazione degli antimicrobici. *S.epidermidis* è spesso causa di endocarditi, colonizzazione di protesi, infezione di ferite e, soprattutto negli uomini anziani ospedalizzati, di infezioni del tratto urinario (16).

1.2.2.1.2.1 MRSE

La minaccia della resistenza antimicrobica si sta inevitabilmente avvicinando a causa della scarsità di nuovi antibiotici (18). L'emergere di batteri resistenti a più farmaci, come ad esempio specie di stafilococchi resistenti alla meticillina, stanno causando gravi problemi di salute in tutto il mondo (18). *S epidermidis* è stato sempre più associato ad infezioni tramite dispositivi medici impiantati. Uno studio sulle infezioni degli impianti ortopedici ha mostrato che più dell'80% delle infezioni cliniche considerate sono dovute a *S.epidermidis* resistenti alla penicillina, ampicillina e cefazolina (18). Per di più, lo *S.epidermidis* meticillino resistente (MRSE) ha una grande abilità di scambiare i geni di resistenza ai farmaci, che porterà ad ampia diffusione di ceppi multifarmacoresistenti (18). Al giorno d'oggi, rimangono solo pochi antibiotici validi per il trattamento dell'MRSE che spinge disperatamente verso l'innovazione di nuove strategie

anti-infezione (18). Attualmente per trattare i ceppi ospedalieri antibiotico resistenti vengono usate soprattutto la vancomicina o la teicoplanina (16).

1.2.3 Formazione del biofilm

L'assemblaggio di microrganismi sopra le superfici e la loro capacità di sviluppare resistenza contro gli antibiotici sono di grande interesse (19–21). Per sopravvivere a dure condizioni ambientali inclusa la presenza degli antibiotici conosciuti, i microrganismi formano una struttura peculiare, chiamata biofilm. Per sviluppare una relazione con l'ospite, per mostrare resistenza verso condizioni esterne ostili e per far fronte ai noti antibiotici e ad altri segnali ambientali, i microrganismi si sono evoluti a formare una copertura protettiva attorno a sé stessi (19–21). Il meccanismo di formazione del biofilm è innescato e regolato dal quorum sensing, dalle condizioni ambientali ostili, dalla disponibilità dei nutrienti, dalle condizioni idrodinamiche, dalla comunicazione cellula-cellula, dalle cascate dei segnali e dai secondi messaggeri (19–21). La resistenza agli antibiotici, il non riconoscimento dei microbi da parte del sistema immunitario del corpo, le infezioni recidivanti, le morti associate ai biofilm e il deterioramento degli alimenti sono solo alcuni dei problemi associati al biofilm microbico che rappresentano una minaccia in campo medico sia umano che veterinario nonché in campo alimentare a causa della trasformazione dei cibi (19–21). I microrganismi possono vivere in forma libera o in consorzi di differenti o stesse specie, chiamate biofilm. I biofilm sono ordinati gruppi di microrganismi che vivono dentro una matrice prodotta da loro stessi formata da una sostanza polimerica extracellulare e aderiscono l'uno all'altro su superfici viventi o non viventi e mostrano variazioni in termini di tasso di crescita ed espressione genica (19–21). I biofilm sono associati a varie manifestazioni patologiche, si trovano un po' ovunque, come ad esempio nei dispositivi medici impiantati, sui tessuti vivi, tubi e pavimenti ospedalieri. Protesi mammarie, shunt ventricolari, filler tissutali, lenti a contatto, cateteri, protesi articolari, pacemaker, valvole cardiache meccaniche, defibrillatori, innesti vascolari, tubi endotracheali sono solo alcuni esempi di dispositivi impiantati spesso infettati da biofilm microbici (19–21). Alcune delle infezioni legate ai tessuti causate dai biofilm microbici includono parodontite, osteomielite, endocardite, placca dentale, tonsillite e laringite cronica, infezioni del tratto biliare ed urinario (19–21).

1.2.4 Resistenza agli antibiotici

L'emergenza della resistenza agli antibiotici da parte dei più importanti batteri patogeni è riconosciuta come una delle maggiori minacce per la salute pubblica umana in tutto il mondo (22). Gli organismi multifarmaco resistenti non sono emersi solo in ambiente ospedaliero, ma ora sono spesso identificati in contesti comunitari, suggerendo che i batteri resistenti agli antibiotici sono presenti anche al di fuori dell'ospedale(22). La risposta del batterio, in seguito all'azione da parte dell'antibiotico, è il primo esempio di adattamento batterico ed è l'apice dell'evoluzione (23). La sopravvivenza del "batterio più adatto" è una conseguenza di un'immensa plasticità genetica dei patogeni batterici che innescano risposte specifiche che si traducono in adattamenti mutazionali, acquisizione di materiale genetico o alterazione dell'espressione genica producendo resistenza a praticamente tutti gli antibiotici attualmente disponibili nella pratica clinica (23). Per questo motivo la comprensione delle basi biochimiche e genetiche della resistenza è di fondamentale importanza per progettare strategie per ridurre l'emergenza e la diffusione della resistenza e per l'ideazione di approcci terapeutici innovativi contro organismi multiresistenti (24). L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha definito la resistenza agli antibiotici una delle tre più importanti minacce per la salute pubblica del ventunesimo secolo (25). I meccanismi molecolari e biochimici tramite cui i batteri acquisiscono resistenza sono di vario genere e possono avvenire su base genetica o meccanicistica (26).

1) Basi genetiche della resistenza antimicrobica (26):

I batteri hanno una notevole plasticità genetica che consente loro di rispondere a un'ampia gamma di minacce ambientali, inclusa la presenza di molecole antibiotiche che potrebbero comprometterne la sopravvivenza (26). I batteri che condividono la stessa nicchia ecologica con organismi produttori di antimicrobici hanno sviluppato antichi meccanismi per resistere all'effetto della molecola dannosa antibiotica e, di conseguenza, la loro resistenza intrinseca consente loro di prosperare in sua presenza (26). Da una prospettiva evolutiva, i batteri utilizzano due principali strategie genetiche per adattarsi all'attacco antibiotico:

- a) Mutazioni nei geni spesso associati al meccanismo d'azione del composto (26).
 - b) L'acquisizione di DNA estraneo che codifica per la resistenza determinanti attraverso il trasferimento genico orizzontale (26).
- #### 2) Base meccanicistica della resistenza antimicrobica (26).

La resistenza ad una classe antimicrobica di solito può essere raggiunta attraverso più percorsi biochimici e una cellula batterica può essere in grado di utilizzare un quadro di meccanismi di resistenza per sopravvivere all'effetto di un antibiotico (26). Le specie batteriche sembrano aver sviluppato una preferenza per alcuni meccanismi di resistenza rispetto ad altri. Ad esempio, il meccanismo predominante di resistenza ai beta lattamici nei batteri Gram-negativi è la produzione di beta lattamasi, mentre la resistenza a questi composti negli organismi Gram-positivi si ottiene principalmente mediante modificazioni del loro sito bersaglio, le proteine leganti la penicillina (PBP) (26) ; questo fenomeno è probabilmente dovuto a grandi differenze nell'involucro cellulare tra organismi Gram negativi e positivi. La classificazione dei meccanismi di resistenza agli antibiotici sulla base della via biochimica coinvolta nella resistenza prevede:

- a) modificazioni della molecola antimicrobica (26).
- b) prevenzione della capacità dell'antibiotico di raggiungere il bersaglio (diminuendo penetrazione o estrusione attiva del composto antimicrobico) (26).
- c) modifiche e/o bypass dei siti bersaglio (26).
- d) resistenza dovuta a processi globali di adattamento cellulare(26)

1.3 Polifenoli

Numerosi studi hanno attribuito ai polifenoli una vasta gamma di attività biologiche incluse: attività antiinfiammatoria, immunomodulatoria, antiossidante, antibatterica, protettiva per l'apparato cardiovascolare ed anticancro(27). Molto attuale anche è l'uso di tali molecole nella cura della malattia COVID-19 (28). I polifenoli sono ubiquitariamente prodotti dalle piante (29) e sono ivi presenti come esteri glicosidici o come agliconi liberi. Esistono più di 8000 varianti di strutture della famiglia di polifenoli. Essi sono composti bioattivi che si trovano in frutta e verdura contribuendo al loro colore, gusto e attività farmacologica (30). I polifenoli sono classificati secondo la loro struttura chimica in flavonoidi come flavoni, flavonoli, isoflavoni, neoflavonoidi, calconi, antocianidine, proantocianidine e non flavonoidi come acidi fenolici, stilbenoidi, e ammidi fenoliche (31).

Le loro attività sono correlate con i gruppi chimici legati allo scheletro fenolico che ampliano la diversità e l'intensità delle attività biologiche mentre offrono anche l'opportunità per la sintesi di nuovi composti, ad esempio l'attività antiradicalica e la chelazione dei metalli sono dipendenti dalla struttura, dal numero dei gruppi idrossilici e la loro posizione rispetto al gruppo carbossilico influenza l'attività antiossidante (32). Il meccanismo antiossidante, come il trasferimento di atomi di idrogeno e il trasferimento di elettroni accoppiati a protoni, sono correlati con le proprietà termodinamiche dei radicali.

L'arrangiamento dei gruppi idrossilici sulla struttura ad anello influenza la stabilità dei radicali che sono formati dalla perdita di H ceduti ai radicali liberi. L'effetto elettromerico dice che la posizione orto dei gruppi idrossilici conferisce alta stabilità nei radicali. Per quanto riguarda i gruppi idrossilici, più è alto il loro numero, più forte è l'attività antiossidante e le altre proprietà (32).

Considerando l'attività antibatterica, i polifenoli delle piante possono agire contro le cellule batteriche tramite parecchi meccanismi, come l'interazione con le proteine e le cellule della parete batterica, l'alterazione delle funzioni citoplasmatiche e della permeabilità della membrana, inibizione dell'energia prodotta dal metabolismo e danni al DNA o inibizione della sintesi dell'acido nucleico da parte delle cellule del batterio (32). A livello del DNA, la planarità delle molecole e l'idrofobicità dello scheletro fanno sì che possano penetrare nell'elica del DNA durante la replicazione, la ricombinazione, la riparazione e la trascrizione. Inoltre, i gruppi idrossilici dei composti fenolici permettono alle molecole di formare legami ad idrogeno con le basi dell'acido nucleico (33). I fenoli interagiscono anche con vie sintetiche; ad esempio, inibiscono le topoisomerasi o l'attività delle DNA girasi. I polifenoli possono inoltre interagire

con metalli come rame e formare complessi che modificano la stabilità del DNA. Il meccanismo di inibizione differisce, dipendendo dalla struttura dei polifenoli e dalla specie batterica. Il carattere favorevole della molecola, idrofila o idrofoba, dipende dai siti di azione e quindi il carattere anfipatico dei composti fenolici gioca un ruolo molto importante nell'attività antibatterica (33).

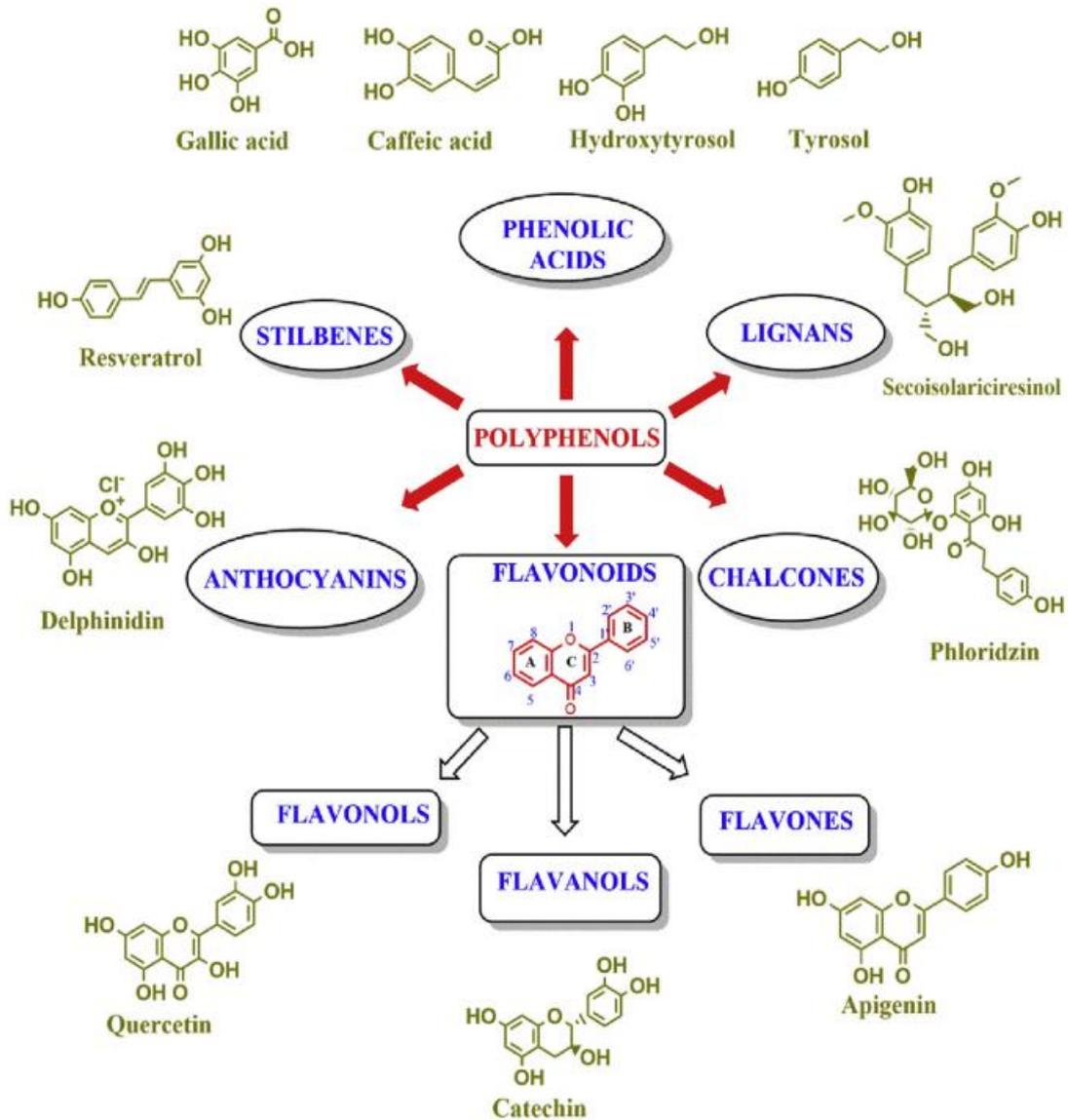


Figura 10. Rappresentazione schematica della suddivisione in base alla natura chimica dei polifenoli, con esempi delle più importanti molecole appartenenti a tali classi (34).

1.3.1 Classificazione delle maggiori classi di fenoli antibatterici

Chimicamente i polifenoli sono una classe con una ricca diversità di composti, vanno dalle semplici molecole con un anello aromatico e uno o più gruppi idrossilici, a composti polimerizzati. Essi possono anche essere classificati a seconda della loro fonte di origine, distribuzione naturale e attività biologica. Sulla base del numero di anelli aromatici e degli elementi strutturali, i polifenoli sono classificati come acidi fenolici, flavonoidi, lignani, stilbeni e tannini (30,35). Data l'alta diversità strutturale, i polifenoli agiscono su diversi siti d'azione delle cellule batteriche e la loro azione dipende dalle specifiche proprietà che sono date loro dai gruppi funzionali e dagli anelli aromatici. A livello della membrana, l'attività dei polifenoli delle piante è favorita dalla lipofilità delle molecole e quindi i composti fenolici possono modificare la permeabilità della membrana e legare enzimi che portano a cambiare le funzioni intracellulari(30,35).

1.3.1.1 Flavonoidi

I flavonoidi sono polifenoli naturali che abbondano nella verdura, nei frutti, nei cereali e nel tè (36).

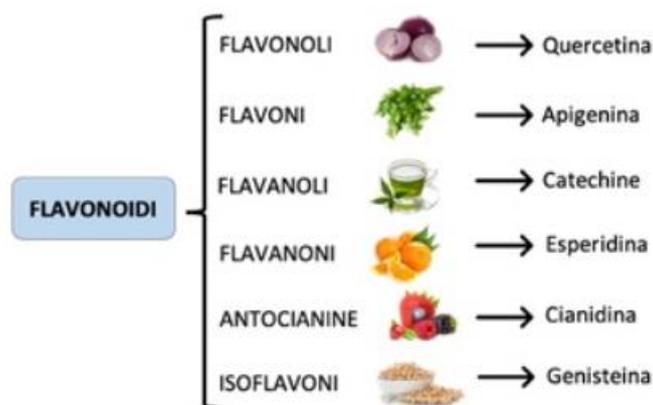


Figura 11. I Flavonoidi.

Essi sono metaboliti secondari della pianta ed hanno un ruolo essenziale in molti processi biologici e di risposta ai fattori ambientali(36). I flavonoidi sono comuni nella dieta umana, in particolar modo in quella che si ritiene una dieta salutistica, ed hanno effetti antiossidanti così come le citate bioattività (proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie) che riducono il rischio di

malattie. Gruppi di ricercatori hanno isolato ed identificato strutture di flavonoidi con azione antifungina, antivirale ed antibatterica (32,37,38). L'azione antinfiammatoria in vitro o nei modelli cellulari coinvolge l'inibizione della sintesi e dell'attività di differenti mediatori proinfiammatori come gli eicosanoidi, citochine, molecole di adesione e proteina c reattiva (39). Tuttavia, le prove in vitro potrebbero essere in qualche modo di impatto limitato a causa delle non fisiologiche concentrazioni utilizzate dovute al fatto che *in vivo* i flavonoidi sono in larga parte metabolizzati a molecole con differente struttura chimica(39). Gli studi sugli effetti dei flavonoidi sui marcatori dell'infiammazione sono insufficienti e sono focalizzati sui cibi ricchi di flavonoidi ma non sulle molecole pure. La maggior parte degli studi manca di una valutazione dell'assorbimento dei flavonoidi o non riesce ad associare un effetto sull'infiammazione con un cambiamento dei livelli circolanti di flavonoidi (39). Sono necessari studi clinici con placebo e molecole di flavonoidi puri per chiarire se i flavonoidi rappresentano ingredienti accessori o molecole chiave coinvolte nelle proprietà antinfiammatorie dei cibi vegetali(39). Inoltre, diversi gruppi hanno dimostrato sinergia tra flavonoidi attivi così come tra flavonoidi e chemioterapici esistenti (37). I rapporti sull'attività nel campo della ricerca sui flavonoidi antibatterici sono ampiamente contrastanti, probabilmente a causa della variazione inter- e intra- dosaggio nei test di sensibilità (37). Tuttavia, diverse ricerche hanno esaminato la relazione tra la struttura dei flavonoidi e l'attività antibatterica e queste sono in stretto accordo, inoltre numerosi gruppi di ricerca hanno cercato di chiarire i meccanismi d'azione antibatterica di flavonoidi selezionati; l'attività della Quercetina, ad esempio, è stata almeno parzialmente attribuita all'inibizione della DNA girasi (37).

1.3.1.1.1 Quercetina

La Quercetina (3,3,4,5,7-pentaidrossiflavone) è uno dei metaboliti secondari ampiamente presenti nel regno delle piante ed è un comune ingrediente nella dieta umana (33). Essa rientra nel gruppo dei flavonoli ed è considerata un polifenolo presente in abbondanza in natura; comunemente presente in forma glicosidica, si trova coniugata con residui zuccherini. La parola Quercetina deriva dal termine latino quercetum, che indica un composto dal colore giallo (33). La Quercetina si dissolve facilmente in lipidi ed alcol, è insolubile in acqua fredda e poco solubile nell'acqua calda. Questo composto si trova più comunemente in grandi quantità in diversi tipi di frutta e verdura che includono mele, bacche, ciliegie, lattuga rossa, cipolle, asparagi e in piccole quantità in peperoni,

broccoli, piselli e pomodori (33). Essa è nota anche per essere presente negli agrumi, nelle noci, nell'uva rossa in erbe come l'aneto ed in alcune varietà di tè e vino. La cipolla è nota per possedere la più alta quantità di Quercetina. La si trova inoltre in varie piante medicinali come Gingko, Sambuco americano ed Iperico (33).



Figura 12. Alimenti ricchi di Quercetina.

La struttura chimica è costituita dal comune nucleo flavonico cioè da due anelli benzenici collegati da un anello eterociclico pirone (33).

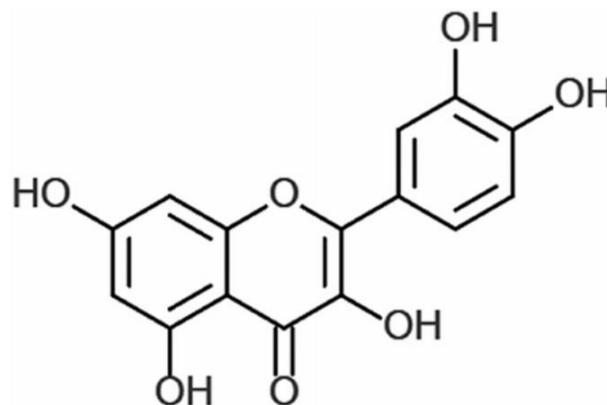


Figura 13. Struttura chimica della Quercetina.

Essa è una dei flavonoidi più studiati, deriva dall'aminoacido fenilalanina. Questo flavonoide è conosciuto per possedere proprietà antiossidanti e un'azione protettiva contro l'invecchiamento (33). Quercetina ha l'abilità di donare atomi di idrogeno e spegnere l'azione delle specie reattive dell'ossigeno,

interagisce con i segnali intracellulari che sono responsabili dell'azione antiossidante. Studi in vitro suggeriscono che essa inibisca la xantina ossidasi, riducendo la formazione di radicali liberi ed è quindi considerata un potenziale antiossidante (33). La biodisponibilità orale di Quercetina è molto scarsa e dipende dalle sue frazioni zuccherine: infatti nelle piante essa è maggiormente nella forma idrofila glicosidica che ne inibisce il diretto assorbimento. L'assorbimento della Quercetina diventa del 65-80% dopo che il glicoside viene idrolizzato (33). Essa può essere usata come supplemento nella dieta e per la dose giornaliera media di 1g al giorno, l'assorbimento, è di circa il 60%; è disponibile in entrambe le forme, libera o coniugata. La forma coniugata include il glicoside, la forma solfata ed esterificata (33). Le sue proprietà conosciute sono: antiossidante, antiinfiammatoria, antiproliferativa, antidiabetica, anticancerogena e antimicrobica. Quercetina è lipofila e perciò passa facilmente la membrana plasmatica, ha una solubilità molto bassa in acqua e la sua stabilità metabolica e chimica è molto scarsa, per cui ha una biodisponibilità orale molto bassa (33). In letteratura, inoltre, è presente il lavoro di John Walker, vincitore del premio Nobel, in cui sono stati identificati, tramite co-cristallografia a raggi X e analisi di inibizione multipla, nuovi siti di legame per alcuni inibitori polifenolici di ATP sintasi, tra cui quercetina, che competono per il sito di legame B (11).

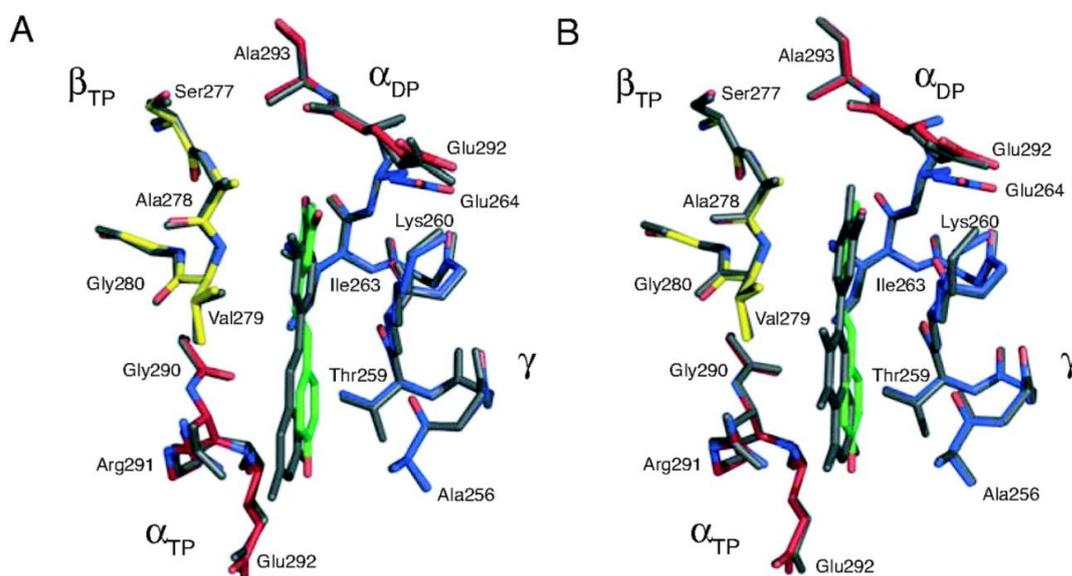


Figura 14. Confronto delle modalità di legame alla F₁-ATPasi bovina di piceatannolo e quercetina con quella del resveratrolo. (A) Principali modalità di legame del resveratrolo (verde) e del piceatannolo (grigio). (B) Principale modalità di legame del resveratrolo (verde) e cis-quercetina (grigio).

1.4 Premesse alla tesi

Gli spunti di partenza per il progetto di lavoro e la stesura della tesi sono stati molteplici. L'esame della letteratura ha consentito di verificare che dati sull'attività ATP sintasica di batteri saggiata in tempo reale sono virtualmente inesistenti ed è stato possibile trovare una sola pubblicazione che si basa su misure di attività sintetica dell'ATP sintasi in batteri Gram-negativi in particolare di *E. coli* K-12 ceppo BW25113 per mezzo dell'uso della bioluminescenza della reazione luciferina-luciferasi (40). Inoltre, in letteratura è noto che l'inibizione dell'ATP sintasi ha un'azione antibatterica, additiva a quella di antibiotici. In particolare, uno studio dimostra che l'inibizione di ATP sintasi elimina la resistenza alle polimixine (41): l'inibizione di ATP sintasi da parte di oligomicina in *S. aureus* o l'uso di un mutante di ATP sintasi, comporta la perdita della sua resistenza intrinseca nei confronti delle polimixine. Ciò dimostra che l'ATP sintasi contribuisce alla resistenza intrinseca di *S. aureus* nei confronti delle polimixine e che la sua inibizione sensibilizza tale specie batterica a questo gruppo di composti (41). D'altra parte, questo studio non saggiava l'ATP sintasi ma utilizzava un metodo correlativo tra l'osservazione di inibizione della crescita da oligomicina e/o mutazione dell'enzima. Pertanto, lo scopo della presente tesi è stato quello di mettere a punto un dosaggio in tempo reale della ATP sintasi. Inoltre, si è scelto di utilizzare batteri Gram-positivi quali *S. aureus* e *S. epidermidis* di interesse clinico (MRSA ed MRSE rispettivamente). Il presente lavoro di tesi ha considerato inoltre, il fenomeno già citato fenomeno dell'antibiotico resistenza (42). Il fatto che l'ATP sintasi abbia una struttura simile con pochissime differenze nei vari organismi viventi, procarioti ed eucarioti (43), e che sia stato dimostrato che i procarioti abbiano restrizioni bioenergetiche per il loro genoma e proteoma siccome essi hanno un metabolismo molto elevato e perciò qualsiasi restrizione della produzione di ATP è lesiva e insormontabile per la loro sopravvivenza (44), ci ha indotto a mettere a punto una metodica capace di valutare l'attività ATP sintasica in vivo, in tempo reale, quale possibile target di un'azione antibatterica di composti suoi inibitori. Inoltre, nel presente lavoro di tesi si è utilizzato il protocollo dell'unico lavoro reperibile in letteratura, adattandolo, come verrà inseguito descritto (40). D'altra parte, un importante punto da cui partire, che verrà discusso inseguito, è la disponibilità di un metodo efficiente per misurare quantitativamente l'attività cellulare della sintesi di ATP in tempo reale (40). La metodica utilizza una combinazione di shock osmotico e trattamento con detergente per rendere permeabili le cellule del batterio ad ATP ed ADP. L'ATP viene scaricato dalle cellule permeabilizzate e reagisce con la luciferasi aggiunta esternamente.

Come controlli positivi si sono utilizzati: oligomicina, inibitore specifico della porzione F_0 dell'ATP sintasi (10) e quercetina, la quale, come è stato detto nel blocco la rotazione della porzione F_1 dell'enzima, inibendolo. Infatti, i dati in letteratura dimostrano che i polifenoli ed altri composti ad essi correlati presentano un'attività antibatterica (45–47) dovuta ad un insieme di effetti su vari target molecolari, ed anche un'attività inibitoria specifica su ATP sintasi, suggerendo di verificare se l'effetto inibitorio sull'ATPsintasi abbia un ruolo rilevante nell'effetto globale dei composti polifenolici (48). Numerosi altri studi riguardanti flavonoidi e terpenoidi estratti dalla *Salvia Tingitana* e dalla *Salvia x jamensis* hanno evidenziato come essi siano in grado di inibire la produzione di ATP tramite l'inibizione di ATP sintasi (29,49,50). L'ulteriore ricerca in letteratura riguardante i polifenoli ha evidenziato numerosi altri studi effettuati sul polifenolo resveratrolo in cui esso potenzia l'effetto degli aminoglicosidi contro *S. aureus* (38,51). Infatti, la comprensione dell'attività di questi inibitori può consentire lo sviluppo razionale di agenti terapeutici che agiscano come nuovi antibiotici contro l'ATP sintasi batterica o per il trattamento di diversi disturbi legati alla regolazione dell'ATP sintasi, tra cui il danno da ischemia ed alcuni tumori (48).

2 METODI

2.1 Fotometria e spettrofotometria

Lo spettro visibile è costituito da radiazioni elettromagnetiche aventi lunghezza d'onda tra i 340 e i 760 nm. Esse sono in grado di eccitare i fotorecettori della retina e di generare così sensazioni di colore (16). La luce bianca, policromatica, è costituita dall'insieme delle radiazioni nel visibile. Quando la luce bianca attraversa un mezzo, che può essere una soluzione o un qualsiasi materiale trasparente, potrà emergere imm modificata se tutte le radiazioni visibili sono passate attraverso la soluzione senza essere assorbite, pertanto questa ci apparirà incolore (16). Se nel mezzo, che può essere una soluzione o altro materiale trasparente, sono presenti sostanze che assorbono una o più radiazioni visibili, esso verrà attraversato soltanto da quelle radiazioni che non vengono assorbite e apparirà con una colorazione che è il risultato di queste ultime. L'assorbimento della luce altro non è che un particolare caso del fenomeno generale di assorbimento delle radiazioni elettromagnetiche (16). La colorimetria è una metodica per l'analisi quantitativa che si basa sul valutare il colore di una soluzione di una sostanza colorata o che può dare un derivato colorato. La finalità di tale metodica è la determinazione della concentrazione di una soluzione. Questa metodica si basa su una determinazione visiva, dunque soggettiva di un colore, infatti, la colorimetria è stata soppiantata dalla fotometria basata sulla misurazione di quantità di luce tramite mezzi fisici obbiettivi che sfruttano l'effetto fotoelettrico (16).

La fotometria è anche essa una metodica di analisi quantitativa che si basa sulla colorazione di una soluzione ma, a differenza della colorimetria, qui si valuta la quantità di radiazioni assorbite (16). Il quantitativo di energia luminosa assorbita è proporzionale al numero di molecole che la radiazione incontra nel suo cammino, ciò è descritto tramite la legge di Lambert-Beer in cui l'Assorbanza, cioè la capacità di assorbire radiazioni è uguale a:

$$A = k * l * c$$

L'assorbanza può anche essere definita Densità Ottica, O.D. (16). La misura dell'assorbanza viene effettuata tramite fotometri, è implicito il fatto che vi sia una relazione inversa tra quantità di luce assorbita e non assorbita. In fotometria si arriva ad avere l'assorbanza risalendo tramite la misura della quantità di luce non assorbita (16). Viene indicato con I_0 l'intensità della radiazione incidente sul campione esaminato e con I l'intensità della luce che, siccome non viene assorbita, attraversa il campione. Si definisce trasmissione, T ,

il rapporto tra I ed I_0 cioè tra luce emergente e luce incidente ed è quindi una misura della proprietà del campione in esame di farsi attraversare dalla luce (16).

$T = I/I_0$. Perciò T è un numero puro compreso tra 0 ed 1, solitamente T è espresso in % e varia tra 0 e 100. Si avrà 0% di trasmissione quando un corpo opaco si trova sul cammino ottico per cui non giunge energia alla fotocellula. Si avrà invece 100% di trasmissione quando non vi è alcun assorbimento da parte del mezzo che si trova lungo il cammino ottico e quindi tutta l'energia incidente sul campione giunge alla fotocellula. Poiché come detto in precedenza, $A = k * I * c$ ne consegue che $A = -\log T$ ed è dunque possibile dalla misurazione di T risalire al valore di A (16).

2.1.1 Fotometro



Figura 15. Un fotometro digitale.

Esso è costituito da:

- L : ovvero una sorgente luminosa policromatica
- F : cioè un filtro avente lo scopo di selezionare una banda di lunghezze d'onda più o meno ristretta
- FM : una cellula fotoelettrica o un sistema fotomoltiplicatore
- un eventuale amplificatore
- G: un galvanometro avente una scala analogica graduata da 0 a 100 o con un sistema di rilevazione gestito da un microprocessore che dà risultati in forma digitale (16).

Per le analisi fotometriche ha molta importanza la scelta di una banda appropriata di lunghezza d'onda, più o meno ristretta, ottenuta tramite l'uso di filtri che non sono in grado di dare luce monocromatica. Si ha la massima sensibilità quando si utilizzano radiazioni ad una lunghezza d'onda tale che per la sostanza in esame si ha il massimo assorbimento e dunque massima variazione dell'assorbanza per unità di variazione della concentrazione (16). La concentrazione della soluzione esaminata, C_i , è determinata paragonandola con una soluzione standard a concentrazione nota, C_n , e si utilizza la relazione: $A_i : A_n = C_i : C_n$

Solitamente si costruisce la curva standard, lavorando in condizioni sperimentali uguali, determinando l'assorbanza di soluzioni a concentrazioni note. Si costruisce in questo modo una retta, determinando poi in seguito nelle stesse condizioni l'assorbanza di una soluzione da esaminare se ne ricava facilmente la concentrazione sulla curva standard (16).

2.1.2 Nefelometro



Figura 16. Un nefelometro.

Per la misurazione delle concentrazioni di sospensioni diluite, ovvero soluzioni torbide si può sfruttare un fenomeno cui vanno incontro le radiazioni luminose: la diffusione della luce. Essa è dovuta alla diffrazione, riflessione o rifrazione della luce, in modo irregolare da parte di una superficie (16). La diffusione, nel caso di particelle sospese in un liquido, dà luogo all'effetto Tyndall. Esso si ha quando una radiazione luminosa incontra particelle o macromolecole di

dimensioni sufficientemente grandi da venire da esse deviata in tutte le direzioni. L'intensità della diffusione dipende da vari fattori: grandezza e concentrazione delle particelle disciolte, lunghezza d'onda della radiazione, indice di rifrazione del solvente e della soluzione (16). La lunghezza d'onda della luce diffusa è la stessa della luce incidente. Nella nefelometria la diffusione della luce viene analizzata determinando direttamente la luce diffusa. Per la nefelometria si usano speciali fotometri detti nefelometri, in questi strumenti la luce diffusa è misurata a 90 gradi rispetto alla direzione della luce incidente sul campione (16). Esiste entro certi limiti una proporzionalità tra la diffusione o torbidità e concentrazione della sostanza in esame, causa del fenomeno (16).

2.1.3 Misure di luminescenza

La luminescenza si ha quando un atomo o una molecola, nel corso di una transizione da un livello elettronico di maggiore energia ad uno a minore energia, emette una radiazione luminosa (16). Se la transizione energetica dal livello fondamentale ad uno superiore è dovuta all'assorbimento di radiazioni luminose, l'emissione successiva di luce è detta fluorescenza o fotoluminescenza. Se, nel ritorno allo stato fondamentale, l'energia acquisita viene dispersa per collisione con altri atomi o molecole, si avrà solamente il fenomeno dell'assorbimento delle radiazioni luminose, senza altri affetti apprezzabili (16). Se invece, l'energia precedentemente acquisita è riemessa sottoforma di radiazione luminosa, si avrà il fenomeno della fluorescenza; quindi il ritorno di un elettrone dal suo stato eccitato a quello fondamentale è accompagnato dall'emissione di un fotone. A causa delle perdite energetiche che sempre accompagnano la transizione fluorescente, dovute a transizioni che avvengono senza radiazioni, l'energia del fotone assorbito è sempre maggiore dell'energia del fotone emesso cioè la lunghezza d'onda della luce eccitante è sempre minore della lunghezza d'onda della luce fluorescente (16). Se ci si limita a considerare radiazioni nel visibile e nell'UV, la fluorescenza consiste nell'emissione di radiazioni luminose da sostanze che hanno assorbito radiazioni della stessa natura. Le sostanze aventi tale capacità sono dette fluorescenti. Nonostante non siano tanti i composti fluorescenti, ce ne sono alcuni di grande interesse biologico come: vitamine, nucleotidi, ormoni, proteine, aminoacidi aromatici e clorofille (16). In seguito all'assorbimento delle radiazioni luminose, l'emissione di fotoni può avere luogo in un tempo più o meno lungo; parliamo di fluorescenza se il tempo tra eccitazione ed emissione è dell'ordine di $10^{-9}/10^{-3}$ secondi, mentre di fosforescenza se il tempo intercorso è maggiore di 10^{-3} secondi (16). Nella fluorescenza si ha una luce eccitante ed una emessa: per ogni sostanza fluorescente c'è sempre una radiazione caratteristica in grado di fare eccitare gli atomi o molecole ed una radiazione caratteristica emessa per ritornare allo stato fondamentale. Analizzando le radiazioni che eccitano la fluorescenza si ricava lo spettro di eccitazione, ovvero lo spettro di assorbimento di una data sostanza; lo spettro di emissione o di fluorescenza si ottiene analizzando la luce che viene emessa per fluorescenza (16). Allo stesso modo rispetto al fenomeno della dell'assorbimento, anche la fluorescenza può essere sfruttata per analisi quantitative e qualitative, come per fotometria e spettrofotometria si può parlare di fluorimetria e spettrofluorimetria (16).

La luminometria come detto in precedenza è la tecnica utilizzata per misurare la luminescenza. La luminescenza consiste nell'emissione di radiazioni luminose nel ritorno di un atomo o di una molecola da un livello energetico maggiore ad uno inferiore (16). La luminescenza è classificata sulla base dello stimolo che causa il passaggio dallo stato fondamentale a quello eccitato:

- a) fotoluminescenza: se dovuta a radiazioni luminose
- b) chemiluminescenza: se dovuta a radiazioni chimiche
- c) bioluminescenza: se da radiazioni di tipo enzimatico
- d) radioluminescenza: se dovuta a radiazioni ionizzanti
- e) elettroluminescenza: se causata da campi elettrici
- f) termoluminescenza: attivata in determinati materiali solidi in seguito a riscaldamento a temperatura maggiore rispetto a quella ambientale per attivazione di uno stimolo latente (16).

La luminescenza è un fenomeno che avviene senza variazioni apprezzabili della temperatura della sostanza.

Di particolare interesse nel campo biologico sono la chemiluminescenza e la bioluminescenza come metodiche di analisi quantitativa. Lo strumento necessario per rilevare la luminescenza, relativamente semplice, è il luminometro. Esso è un semplice fluorimetro nel quale manca la sorgente luminosa e che non necessita di un monocromatore. E' invece presente un fotomoltiplicatore specifico per la lunghezza d'onda emessa (562 nm), per registrare le letture (Unità relative di luminescenza, RLU) corrispondenti. La condizione essenziale nel luminometro è quella di allocare la provetta ed effettuare il mescolamento per avere l'attivazione della reazione in un comparto completamente al buio (16).

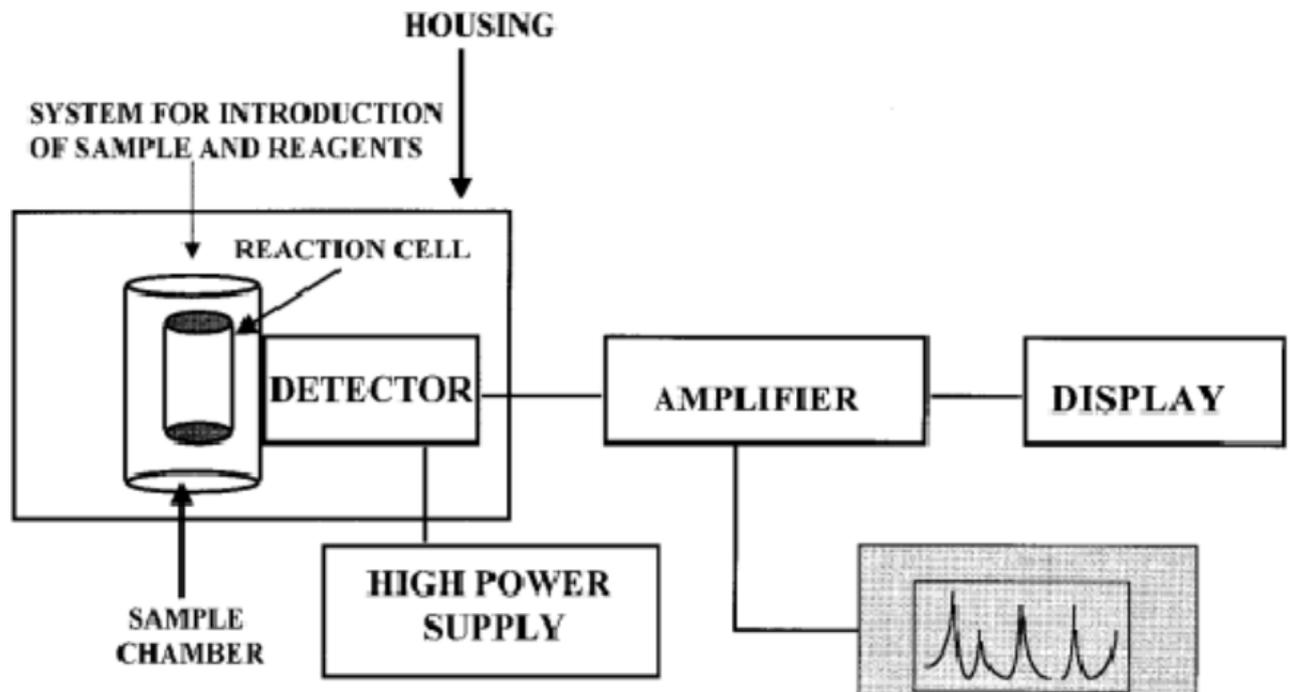


Figura 17. Schema di un luminometro.

Esistono anche luminometri portatili usati per esempio per determinare la concentrazione di ATP batterico mediante la reazione luciferina-luciferasi per il controllo della contaminazione batterica in vari campioni come liquidi, membrane filtranti e per effettuare il controllo di qualità nell'industria farmaceutica, alimentare e cosmetica (16). L'analisi quantitativa che si basa sulla luminescenza sfrutta una reazione chimica cui può andare incontro la sostanza esaminata, generando essa luminescenza o un prodotto che può reagire con una sostanza luminescente. Dunque, per capire il principio su cui si basa la luminometria possono essere fatti due esempi (16):

- 1) il classico esempio di chemiluminescenza: in varie reazioni di interesse in campo biologico, si ha la generazione di perossido di idrogeno che può essere dosato reagendo con il luminol, che è una molecola che quando viene ossidata dà emissione di luce bluastro di lunghezza d'onda intorno a 430 nm. Si fa avvenire la reazione di interesse nella cuvetta da inserire nel luminometro in presenza di una soluzione contenente luminol, così dalla quantità di luce misurata, rapportata a una soluzione standard di acqua ossigenata fatte reagire nelle stesse condizioni, si risale al quantitativo di acqua ossigenata generatasi (16).

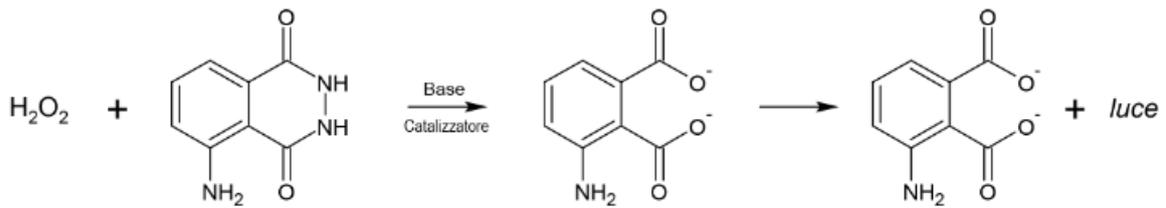


Figura 18. Reazione tra H_2O_2 e luminol.

- 2) In questo esempio ci si basa sul fenomeno di bioluminescenza: si sfrutta la luciferasi, un enzima responsabile della luminescenza in alcuni organismi viventi è ad esempio presente nelle lucciole da cui prende il nome. La luciferasi catalizza l'ossidazione della luciferina, che è un acido organico complesso presente anch'esso nelle lucciole, con emissione di luce fredda. Perché avvenga la reazione è necessaria la presenza di ATP: inizialmente si forma luciferina-adenilato che in presenza di O_2 dà ossiluciferina, AMP, CO_2 e produzione di luce. In seguito, dall'ossiluciferina viene rigenerata la luciferina. Quindi la luciferasi è l'enzima che catalizza la reazione che ossida la luciferina, il suo substrato naturale, ad ossiluciferina con l'emissione di una radiazione luminosa alla lunghezza d'onda di 562 nm (16).

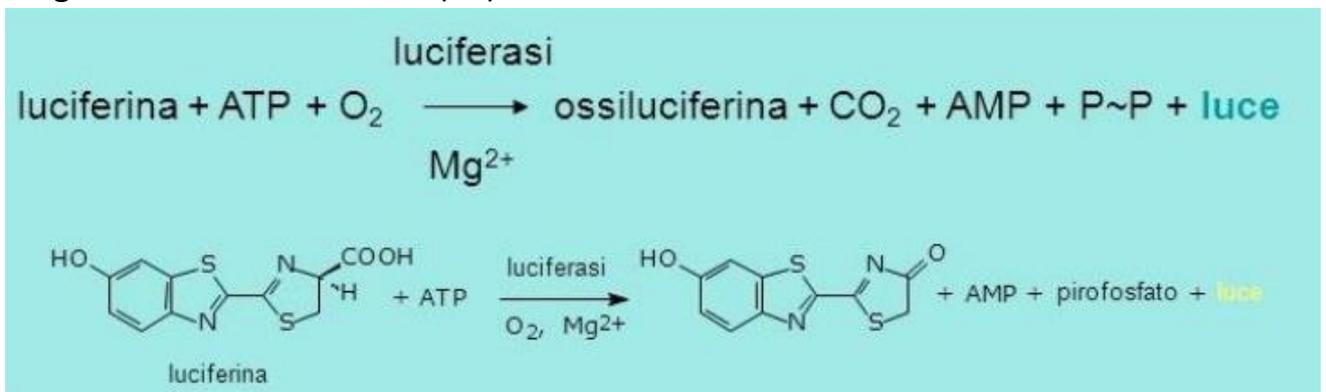


Figura 19. Schema della reazione tra luciferina/luciferasi in presenza di ATP.

La produzione di ossiluciferina è dipendente dalla concentrazione dei substrati e dell'enzima, quindi se si effettua la reazione in condizioni di eccesso di luciferina e di tutti gli altri reagenti, la produzione di ossiluciferina diventa dipendente solo dalla concentrazione di ATP che è quindi il substrato limitante. Usando come strumento di rilevazione il luminometro si effettuano letture a 562nm così da misurare l'intensità della radiazione emessa che risulterà direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente nel campione (16).



Figura 20. Un luminometro.

Questo ciclo è il responsabile della luminescenza nelle lucciole. Nell'ambito delle misure di laboratorio, la luciferina e la luciferasi clonata, sono presenti in commercio e vengono utilizzate per quantificare l'ATP. Questo è un metodo molto sensibile, tanto da potere determinare quantità di ATP nell'ordine delle femtomoli. Il sistema luciferina-luciferasi può essere utilizzato per determinare tutte le attività enzimatiche che coinvolgono ATP (16). Per concludere quindi, nel caso in esame, l'andamento della luminescenza rilevata nel tempo consentiva di valutare l'attività di ATP sintasi. Nel nostro caso, i campioni contengono batteri trattati nel modo che verrà inseguito illustrato, perciò l'ATP rilevato deriverà dalla sintesi di quest'ultimo da parte dell'ATP sintasi batterica. Per la sua determinazione è stato usato un luminometro (Lumi-Scint, Bioscan) e un apposito kit avente una soluzione standard di ATP per determinare la curva di taratura: ATP Bioluminescence Assay Kit (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN).

2.2 Condizioni di coltura batterica

Il terreno in cui vengono fatti crescere i batteri è: Mueller-Hinton II broth (52). Esso è un terreno per test di sensibilità antimicrobica, che può essere utilizzato in procedure standard riconosciute a livello internazionale. Il mezzo ha estremamente basse concentrazioni di timina e timidina nonché livelli adeguati di ioni calcio e magnesio (52).

Dehydrated media:

Code number:	500g: MHC20500, 5 kg: MHC25000
Colour:	Yellowish
Appearance:	Homogeneous hygroscopic powder
pH before autoclaving (25 °C)	7,2 – 7,6

Tabella 1. Caratteristiche del mezzo.

Direttive: Sospendere 21g in un litro di acqua distillata e agitare delicatamente per dissolvere completamente il medium. Distribuire nei contenitori finali e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Prepared media:

Bottled media:	100 mL: MHC30100, 500mL: MHC30500
Tubed media:	150 x 15 mm: MHC40010 (10mL)
Colour:	Yellowish
pH (25 °C)	7,3 – 7,5

Tabella 2. Preparazione per il mezzo

Direttive: dispensare i terreni in bottiglia in modo asettico in contenitori finali sterili. I terreni in provette sono pronti per l'uso.

Formula in g/L:

Peptones	19,5
Starch soluble	1,5

Tabella 3. Formulazione del mezzo g/L.

Condizioni di conservazione: i terreni disidratati sono conservati ben chiusi, in un luogo asciutto a temperatura ambiente. I terreni sciolti sono conservati in bottiglia o in provetta, protetti dalla luce, a temperatura ambiente (52). I batteri vengono incubati in questo terreno per 24h prima del loro utilizzo per avere una concentrazione pari a 10^8 CFU. Al termine delle 24h, essi vengono centrifugati, viene eliminato il soprannatante e risospesi in fisiologica, cioè in una soluzione sterile di cloruro di sodio allo 0,9%. I batteri da noi utilizzati sono 2 ceppi di MRSA e 2 ceppi di MRSE, tutti di origine clinica. In particolare: i ceppi A e 18 sono due ceppi di MRSA che derivano da emocolture da pazienti dell'ospedale San Martino di Genova mentre i ceppi 170 e 180 sono due MRSE, derivanti da cateteri impiantati in pazienti anche essi del San Martino di Genova.

2.3 Determinazione della concentrazione proteica

2.3.1 Metodo Bradford

Il colorante Coomassie Brilliant blue è rosso nella forma cationica, verde nella forma neutra e blu nella forma anionica (53). In condizioni acide, Coomassie Brilliant blue è per la maggior parte protonato e appare nella sua forma cationica rossa. Quando Coomassie Brilliant blue lega una proteina, esso passa alla sua forma stabile non protonata di colore blu. Il colore blu risultante può essere letto da uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 615-575nm (53). Ad entrambe le estremità dello spettro delle lunghezze d'onda (575 e 615 nm), avremo una riduzione del 10% dell'assorbimento della luce rispetto ai risultati ottenuti a 595 nm. Coomassie Brilliant blue nella sua forma anionica e mentre lega la proteina ha colore blu con il massimo di assorbimento della luce a 595nm, mentre nella forma non legata ha massimo assorbimento a 465nm. Il complesso colorato formato con la proteina è stabile per un'ora (53). Il numero di molecole di colorante attaccate a ciascuna proteina è approssimativamente proporzionale al numero di cariche positive trovate in quella proteina. La sensibilità del metodo del Bradford per misurare le proteine è di 0,2-2 µg per millilitro di proteine a seconda della qualità del colore. A determinate concentrazioni di proteine, il cambiamento di colore a 595 nm è direttamente proporzionale alla quantità di proteine del campione (53). A livelli proteici più elevati, i cambiamenti di colore non sono più commisurati alla quantità di proteine del campione. Dopo aver aggiunto un reagente alla soluzione proteica, per garantire la formazione del complesso, il picco di assorbimento viene misurato utilizzando uno spettrometro ultravioletto-visibile (UV-VIS). Il picco di assorbimento si ha quando il legame delle proteine con il colorante ha causato uno spostamento verso il rosso nell'assorbimento. L'assorbimento rappresenta la formazione di legami idrogeno tra Coomassie Brilliant blue e le molecole proteiche (53). A valori di pH bassi, il colorante libero ha massimi di assorbimento a 470 nm e 650 nm, quando è legato alla proteina ha un massimo di assorbimento a 595 nm (53).

Reattivo Bradford:

Comassie	0,005g
Etanolo	2,4 mL
Acido fosforico	5 mL
Volume finale	50 mL

Tabella 4. Composizione reattivo di Bradford.

Deve essere innanzitutto preparata una curva di calibrazione standard con l'uso dell'albumina di siero bovino (BSA, Bovine serum albumin), utilizzata in quanto essa è economica, pura e facilmente reperibile. Tuttavia, siccome gli amminoacidi che compongono la BSA saranno differenti da quelli presenti nel campione esaminato, qualsiasi valore venga ricavato potrà essere solamente approssimativo. La curva di riferimento è dunque basata sull'uso di concentrazioni note di BSA che ha una concentrazione di 100 μ g/mL.

Curva di taratura: si utilizzano sette concentrazioni di BSA, solitamente da 0 μ g a 6 μ g, inserite in una cuvetta e diluite in eguale volume (100 μ L di MilliQ), incubate con 0,9 mL di reagente per 5 minuti ed inseguito lette con lo spettrofotometro a 595 nm. La curva viene effettuata in doppio. I dati sono graficati con in ascissa i risultati delle densità ottiche e in ordinata le concentrazioni della BSA. Si otterrà una relazione lineare tra assorbanza e concentrazione della BSA e con l'utilizzo del foglio di calcolo di Microsoft Office Excel è possibile calcolare automaticamente l'equazione della retta e verificare l'attendibilità della misura indicata con R^2 . L'equazione verrà utilizzata per calcolare le concentrazioni di quei campioni che saranno sottoposti allo stesso trattamento, ovvero 5 μ L di campione portati a volume finale pari a 100 μ L con MilliQ e a cui sono aggiunti 0,9 mL di reagente.

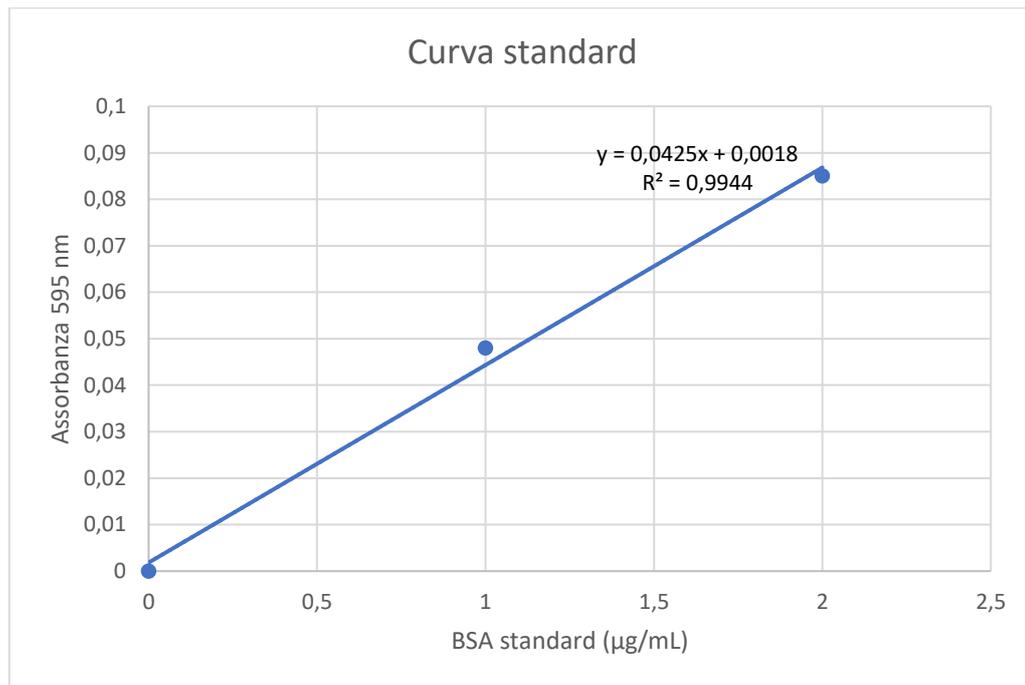


Figura 21. Curva standard del metodo Bradford.

2.4 Protocollo d'analisi della sintesi di ATP in continuo

L'attività ATP sintasica dei ceppi batterici da noi selezionati è stata saggiata secondo un protocollo modificato a partire dal lavoro di Hara e Mori (54), valutata tramite misurazioni effettuate con il luminometro. Il lavoro di riferimento (54), prevedeva che: la sospensione batterica utilizzata fosse raccolta mediante centrifugazione, lavata con tampone Tris-HCl 100mM a pH 7,4 ; risospesa nello stesso e miscelata con un egual volume di soluzione di pretrattamento (glucosio al 40% e varie concentrazioni di Triton X-100 per 20 minuti a T° ambiente, miscela A). La miscela B era formata da: 0,5 mM D-luciferina, 1,25 µg/mL, 1,25 µg/mL luciferasi, 5 mM MgSO₄, 100 mM acido etilendiaminotetraacetico, 1mM ditiotreitolo e 25 mM tampone Tricina a pH 7,8. La miscela B era preincubata per 15 min a T ambiente, Triton X-100 veniva aggiunto a tale soluzione alla concentrazione finale pari a quella della miscela A. La reazione era iniziata con l'aggiunzione di 10 µL della miscela A in 90 µL della miscela B, la luminescenza era misurata con un lettore opportuno. I ceppi erano coltivati in 1 mL di medium, a 30°C per 24h, in una piastra da 96 pozzetti. Le cellule erano raccolte tramite centrifugazione, lavate con soluzione tampone Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) e risospese nella stessa soluzione. La sospensione cellulare era poi miscelata con un egual volume di soluzione di pretrattamento

(40%[w/v] glucosio, 0,8%[v/v] Triton X-100) per 20 minuti a temperatura ambiente (miscela C). Dopo che la miscela B era preincubata per 15 minuti a temperatura ambiente, veniva aggiunto 1/20 di volume della soluzione detergente (8% Triton X-100, 300 mM fosfato di potassio a pH 7,2) si formava così la miscela D. La reazione era iniziata con l'aggiunta di 10 μ L della miscela C in 90 μ L della miscela D in una micropiastra nera a 96 pozzetti e la luminescenza era misurata per diversi minuti. Si stabilisce che importante per permeare le cellule, oltre che l'uso del detergente, è la creazione di uno shock osmotico (54).

In seguito ad una serie di esperimenti preliminari che saranno dettagliati nel paragrafo 3.1 il protocollo sopra descritto è stato modificato come segue. La sospensione di batteri alla concentrazione di 10^8 batt/mL trattati come descritto nel paragrafo 2.2, viene centrifugata e risospesa in NaCl allo 0,9% sterile. Si preferisce risospesare i batteri nella soluzione di NaCl piuttosto che in Mueller-Hinton II, perché i batteri in tale sospensione tendono a rimanere piuttosto costanti come numero e ciò è preferibile per avere sempre le stesse condizioni sperimentali, inoltre, il Mueller-Hinton II broth avrebbe dato problematiche allo strumento nella misurazione della luminescenza. Tale procedura è frutto di un'ottimizzazione rispetto al lavoro di riferimento (54), che prevedeva la risospensione Tris-HCl pH 7,4 (54). Successivamente si preleva 1 mL di tale sospensione a cui aggiungo 0,2 g di glucosio per avere un finale del 10% di glucosio nella sospensione. Dopo di che si diluisce tale sospensione aggiungendo 1 mL di PBS sterile, ottenendo così una concentrazione finale di 5×10^7 batt/mL. Si utilizza tale sospensione per un massimo di 1h e 30 minuti; per evitare che il numero di batteri possa cambiare durante l'esecuzione dell'esperimento, al termine dei 90 minuti la sospensione usata viene scartata e si prende una nuova aliquota dalla sospensione batterica come sopra descritto. Nei 90 minuti in cui l'aliquota viene usata, il numero di batteri non cambia, ciò è stato dimostrato misurando il quantitativo di proteina totale nella sospensione ad inizio dell'esperimento e dopo un'ora e mezza: tale quantitativo rimaneva pressochè invariato. Per ogni campione prelevo 35 μ L di tale sospensione batterica perché in seguito a varie prove effettuate, che saranno descritte in seguito al Paragrafo 3.1, questo volume con l'aggiunta di 15 μ L di H₂O MilliQ (shock osmotico) dà i migliori risultati.

	Madre	Controllo	Quercetina	Oligomicina
Sospensione batterica in NaCl allo 0,9%	/	35 μ L	35 μ L	35 μ L
Triton X-100 (20%)	20%	1,25 μ L	1,25 μ L	1,25 μ L
H2O MilliQ	/	15 μ L	15 μ L	15 μ L
DMSO	/	1 μ L	/	/
Quercetina (5mM)	5 mM	/	1 μ L (Mf 100 μ M)	/
Oligomicina (1mM)	1mM	/	/	2 μ L (Mf 50 μ M)
Kit Luciferina/Luciferasi	/	50 μ L	50 μ L	50 μ L
ADP (per ultimo)	5mM	1 μ L	1 μ L	1 MI

Tabella 5. Protocollo sperimentale.

Le sostanze utilizzate hanno diverse funzioni:

- il glucosio aggiunto inizialmente serve da nutrimento ai batteri del campione
- il Triton X-100 è un detergente ed ha come funzione quella di determinare dei fori nella parete batterica per permettere l'ingresso dei principi attivi solubili in acqua tra quelli in esame
- H₂O MilliQ nella quantità utilizzata serve per dare uno shock osmotico alla sospensione batterica
- il DMSO è un solvente usato nei controlli al posto del principio attivo, in quanto ne è il vettore
- il kit luciferina/luciferasi è necessario per eseguire la lettura al luminometro
- l'ADP è il substrato necessario per fare avvenire la reazione rilevata dallo strumento.

Nel nostro lavoro l'effetto di Quercetina ed Oligomicina sull'attività ATP sintasica è stato valutato in confronto ad un campione di controllo in assenza di tali principi attivi.

La procedura prevede che vengano prelevati 35 μ L di sospensione batterica, che vengano aggiunti Triton X-100 (o DMSO nei controlli) e nei campioni trattati quercetina o oligomicina, nelle quantità indicate in tabella 5, che si attendano 4 minuti nel caso della quercetina (8 nel caso dell'oligomicina) e poi si aggiungano 15 μ L di H₂O MilliQ, si attendano ulteriori 4 minuti, infine si aggiunga il Kit Luciferina/Luciferasi e l'ADP. A questo punto effettu le letture con il luminometro ogni 15'' per 1 minuto. I dati ottenuti sono indicati come RLU/pmoli.

Nel caso dell'oligomicina, in tutti i dati inseguito riportati, e per alcuni della quercetina, è stata eseguita una preincubazione di 30 minuti come inseguito riportato:

-per la preincubazione con oligomicina: si prelevano 120 μL di sospensione batterica a cui aggiungo 6 μL di oligomicina (1mM). Dopo 30 minuti questa soluzione viene trattata come precedentemente descritto, aggiungendo i reagenti nei tempi e nelle quantità descritte nella tabella 5.

-per la preincubazione con quercetina: si prelevano 120 μL di sospensione batterica a cui aggiungo 3,6 μL di quercetina (5mM). Dopo 30 minuti anche questa soluzione viene trattata secondo il protocollo in precedenza descritto, aggiungendo i reagenti nei tempi e nelle quantità descritte nella tabella 5.

-per quanto riguarda il controllo, quando si effettua la preincubazione, vengono prelevati 120 μL di soluzione batterica ed aggiunti 4 μL DMSO. Dopo 30 minuti, tale soluzione viene trattata secondo il protocollo descritto.

Riassumendo, protocollo di:

1) preincubazione con oligomicina:

- **6 μL di oligomicina (1mM)** in 120 μL di soluzione batterica → **soluzione 1**

attesa **30 minuti**

- prelevo **35 μL di soluzione 1**

- **2,5 μL di Triton X-100** al 20% (0,5% finale)

- **2 μL di oligomicina (1mM)**

attesa **8 minuti**

- **15 μL di H₂O MilliQ**

attesa **4 minuti**

- **50 μL kit luciferina/luciferasi**

- **1 μL di ADP 5 mM**

2) preincubazione con quercetina:

- **3,6 μL di quercetina (5mM)** in 120 μL di soluzione batterica → **soluzione 2**

attesa **30 minuti**

- prelevo **35 μL di soluzione 2**

- **2,5 μL di Triton X-100** al 20% (0,5% finale)

- **1 μL di quercetina (5mM)**

attesa **4 minuti**

- **15 µL** di **H₂O MilliQ**

attesa **4 minuti**

- **50 µL kit** luciferina/luciferasi

- **1 µL** di **ADP 5 mM**

3) controllo:

- **4 µL** di **DMSO** in 120 µL di soluzione batterica → **soluzione 3**

attesa **30 minuti**

- prelevo **35 µL** di **soluzione 3**

- **2,5 µL** di **Triton X-100** al 20% (0,5% finale)

- **1 µL** di **DMSO**

attesa **4 minuti**

- **15 µL** di **H₂O MilliQ**

attesa **4 minuti**

- **50 µL kit** luciferina/luciferasi

- **1 µL** di **ADP 5 mM**

La preincubazione, come dimostrano i dati in seguito descritti, migliora la permeabilità dei principi attivi non polari attraverso la parete batterica, essendo essa dipendente dal tempo di esposizione alla sostanza.

Precedentemente alle analisi viene realizzata una curva di taratura al luminometro tramite la preparazione di 5 soluzioni a concentrazioni differenti e note di ATP ultrapuro, fornito dal Kit commerciale (ATP Bioluminescence Assay Kit-Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Il range di concentrazione che viene definito deve rispecchiare il range di concentrazioni che saranno poi analizzate. Per la preparazione delle soluzioni standard aventi concentrazioni note, si parte da standard primari; perciò, considero i valori delle concentrazioni di tali soluzioni non affette da errore. Le letture sono effettuate in doppio. La retta sarà quindi priva di errore per quanto riguarda le x e omoscedastica per quanto concerne le y cioè l'errore che si compie sulle y è indipendente dalla variabile x. La curva di taratura usa soluzioni aventi cinque differenti concentrazioni di ATP, solitamente da 5 pmol a 100 pmol (5,10,25,50,100) inserite in provetta e diluite in egual volume di 50 µL, a questo punto si aggiungono 50 µL di kit Roche, si agita e si effettua immediatamente la lettura

al luminometro. Le provette da leggere al luminometro per la costruzione della curva di taratura contengono:

- Un tampone: TRIS 1M a pH 7,4
- Un chelante: EGTA 10 mM
- Acqua MilliQ ultrapura per portare a volume di 50 μ L
- ATP ultrapuro standard fornito dal kit Roche
- Luciferasi (in quantità costante)

I dati così ottenuti vengono quindi graficati con Microsoft Excel ponendo la concentrazione di ATP in ascissa e le RLU in ordinata. Si ha una relazione lineare tra le RLU e la concentrazione della luciferasi standard. Tramite l'uso del foglio di calcolo di Microsoft Office Excel è possibile calcolare automaticamente l'equazione della retta e valutare la bontà della misura, sulla base del valore di R^2 . Da tale retta, se si sostituisce y con il valore delle RLU del campione (avendo sottratto il valore del bianco) si ricava il valore della concentrazione di ATP del campione rispetto alla quantità utilizzata. Considerando le diluizioni operate durante il dosaggio è possibile risalire alla quantità totale di ATP prodotto durante il singolo esperimento, espressa in pmol.

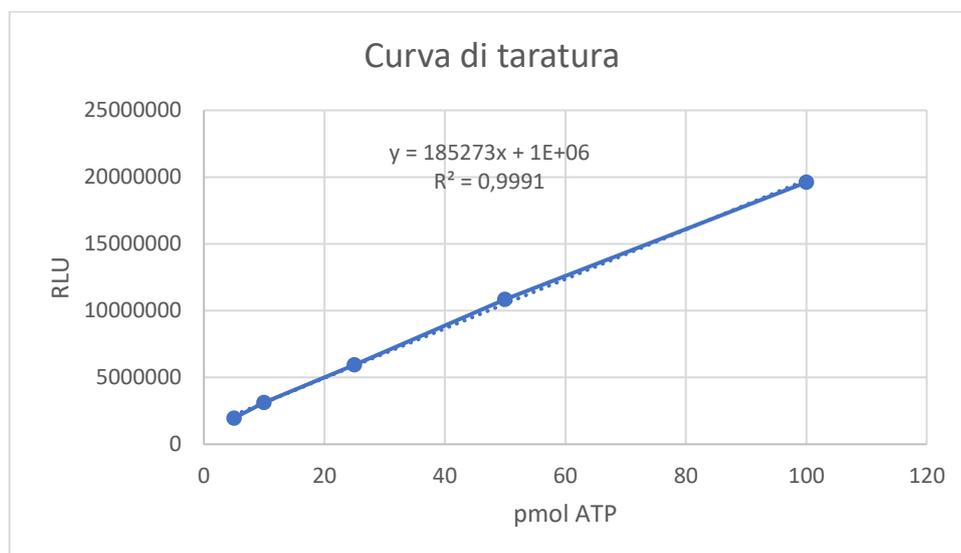


Figura 22. Curva di taratura del metodo.

3 RISULTATI

3.1 Messa a punto della metodica

Il punto di partenza per la messa a punto del metodo è stato il lavoro di letteratura in cui è descritto un metodo efficiente per la determinazione quantitativa real time dell'attività sintetica dell'ATP cellulare in batteri (54). In quel caso è stata usata una specie batterica Gram-negativa, in particolare *Escherichia coli* e al ceppo BW25113.

Il protocollo descritto nel paragrafo 2.4 della sezione Metodi (54) è stato da noi modificato in quanto avremmo trattato batteri Gram-positivi e quindi con caratteristiche strutturali diverse, in particolare per quanto concerne la parete. In particolare, abbiamo utilizzato la concentrazione ottimale di 0,5% di Triton. Pertanto, una parte importante del mio lavoro è stata mettere a punto il protocollo descritto nel paragrafo 2.4 dei Metodi, attraverso vari tentativi.

1) Primo tentativo:

50 mL di sospensione batterica di *S.aureus* MRSA da 0,5 Mc Farland (circa $1,5 \cdot 10^8$ batteri/mL) sono divisi in due aliquote da 22,5mL, che sono centrifugate, il sopranatante viene scartato. I pellet sono quindi risospesi in:

A in 22,5 mL di Mueller-Hinton II broth

B in 22,5 mL in Tris HCl 50 mM pH 7,4 + 20% glucosio

In seguito, la soluzione **A** è diluita 10 volte nel seguente modo:

50 μ L sospensione + 425 μ L di Mueller-Hinton II broth + 25 μ L Triton X-100 (10%) $\rightarrow 1,5 \cdot 10^8$ batt/mL

Sono prelevati 50 μ L $\rightarrow 15 \cdot 10^6$ batteri, aggiunti di 50 μ L di Kit (ATP Bioluminescence Assay Kit-Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) + 1 μ L di ADP 5 mM.

In queste condizioni non si osservava produzione di ATP, probabilmente perchè il Triton X-100 non aveva avuto il tempo di permeabilizzare la parete batterica, inoltre non era stato eseguito uno shock osmotico.

2) Secondo tentativo:

Si eseguono le stesse operazioni del tentativo precedente, con l'esecuzione anche dello shock osmotico.

25 μL di batteri + 25 μL di H_2O MilliQ (ipotonica) \rightarrow nel controllo, e i Δ a 15 secondi per 1 minuto ottenuti sono stati:

2848473
461442
91716
-9326

Tabella 6. Valori dei Δ a 15 secondi ottenuti da letture effettuate in 60 secondi.

Per i batteri trattati con principio attivo:

25 μL + 25 μL + 4 μL di Oligomicina 40 μM \rightarrow i valori ottenuti dalle letture in questo caso hanno dato valori di Δ a 15 secondi negativi.

Dai valori dei Δ a 15 secondi ottenuti nei controlli si evince che c'è stata una produzione di ATP iniziale che è andata esaurendosi in poco tempo, mentre in quelli trattati con oligomicina non si evince produzione di ATP. I risultati ottenuti sono dovuti a due problematiche, in primo luogo lo shock osmotico non sufficiente per la permeabilizzazione e in secondo luogo non si è atteso un tempo sufficiente perché le varie sostanze avessero il tempo di svolgere la loro funzione, compresa l'Oligomicina nei batteri trattati.

3) Terzo tentativo:

Nuova diluizione di 10 volte del campione **A**.

50 μL sospensione + 450 μL di Mueller-Hinton II broth \rightarrow $3 \cdot 10^8$ batt/mL

Si prende un'aliquota di questa diluizione da 30 μL :

+ 1 μL Triton X-100 (10%)

+ 20 μL di H_2O MilliQ

+ 50 μL di Kit Luciferina/Luciferasi

+ 1 μL ADP

+ 4 μL di Oligomicina 40 μM nel caso dei batteri trattati

Incubazione per 10 minuti, dopo di che si effettuano le letture al luminometro. In questo caso non si è riscontrata produzione di ATP probabilmente a causa dello shock osmotico non ottimale e per un tempo d'azione del Triton X-100 troppo elevato, che può avere disaccoppiato le membrane batteriche.

4) Quarto tentativo

- 400 μ L di Mueller-Hinton II broth + 100 di batteri della soluzione **A**
- 400 μ L PBS + 100 μ L di batteri della soluzione **B**

Di entrambe le soluzioni si prelevano 35 μ L della soluzione ed aggiungo in ciascuna:

+ 1 μ L di Triton X-100 (10%)

+ 15 μ L di H₂O MilliQ

+ 4 μ L di Oligomicina 40 μ M nel caso dei batteri trattati con principio attivo

Attesa di 4 minuti ed eseguo le letture di entrambe le soluzioni.

Le letture effettuate in 60 secondi della prima soluzione danno i seguenti Δ RLU in 15 secondi:

Controlli:

29941
5931
6192
6296

Tabella 7. Δ RLU 15 secondi nella soluzione di controllo.

Oligomicina:

20999
7245
4883
1951

Tabella 8. Δ RLU 15 secondi nella soluzione trattata con Oligomicina.

Le letture effettuate a 60 secondi della seconda soluzione danno i Δ RLU in 15 secondi seguenti :

Controlli:

78149
26651
26226
26477

Tabella 9. Δ RLU 15 secondi nella soluzione di controllo.

Oligomicina:

119878
30146
15742
14862

Tabella 10. Δ RLU 15 secondi nella soluzione trattata con Oligomicina.

Da questi dati si evince un aumento di ATP nei controlli e un'inibizione, seppur variabile, della produzione di ATP nelle soluzioni di batteri trattati con Oligomicina.

5) Quinto tentativo:

Dalla soluzione da 50 mL di sospensione batterica in NaCl allo 0,9% in cui sono presenti 10^8 batteri/mL, si prelevano 10 mL e si aggiungono 2g di glucosio, in questo modo si ha un finale di glucosio al 20%. Prelevo 1mL dai 10 mL di soluzione sin modo che la concentrazione batterica diventi $2 \cdot 10^7$ batteri/mL ed aggiungo 1 mL di PBS sterile, con questa diluizione la concentrazione batterica finale nel mio campione è di $5 \cdot 10^7$ batteri/mL. A questo punto prelevo 30 μ L di sospensione batterica e aggiungo:

- 1,25 μ L di Triton X-100
- 4 μ L di DMSO
- 20 μ L H₂O MilliQ
- 3 μ L di Oligomicina 40 μ M nel caso dei batteri trattati con il principio attivo

Attendo 10 minuti e aggiungo:

- 50 μ L di Kit luciferina/luciferasi
- 1 μ L di ADP

A questo punto effettuo la lettura al luminometro e quello che si ottiene a livello di inibizione rispetto al controllo è che si ottiene circa un 40% di inibizione di ATP nel campione trattato con Oligomicina.

In seguito a questi tentativi ed altri eseguiti in laboratorio ed allo studio dei dati ottenuti, il tentativo che maggiormente ci ha dato risultati positivi è quello che è stato usato come protocollo efficiente per l'esecuzione di un saggio in tempo reale dell'attività ATP sintasica in batteri gram positivi permeabilizzati. I tentativi sopra descritti sono stati eseguiti sul ceppo 18 di batteri MRSA.

3.2 Attività ATP sintasica dei ceppi MRSA ed MRSE

Il protocollo utilizzato è quello ottimizzato in seguito ai tentativi precedentemente dettagliati, come descritto nel paragrafo 2.4 nella sezione metodi (vedi tabella 5).

Le letture al luminometro vengono eseguite ogni 15 secondi per seguire l'andamento dell'ATP sintasi nel tempo, per un totale di 60 secondi. I grafici seguenti, esemplificativi di almeno quattro esperimenti identici illustrano i risultati di tali esperimenti per ogni specie e ceppo; L'attività è espressa come: pmol di ATP prodotte per mg di proteina, nel tempo.

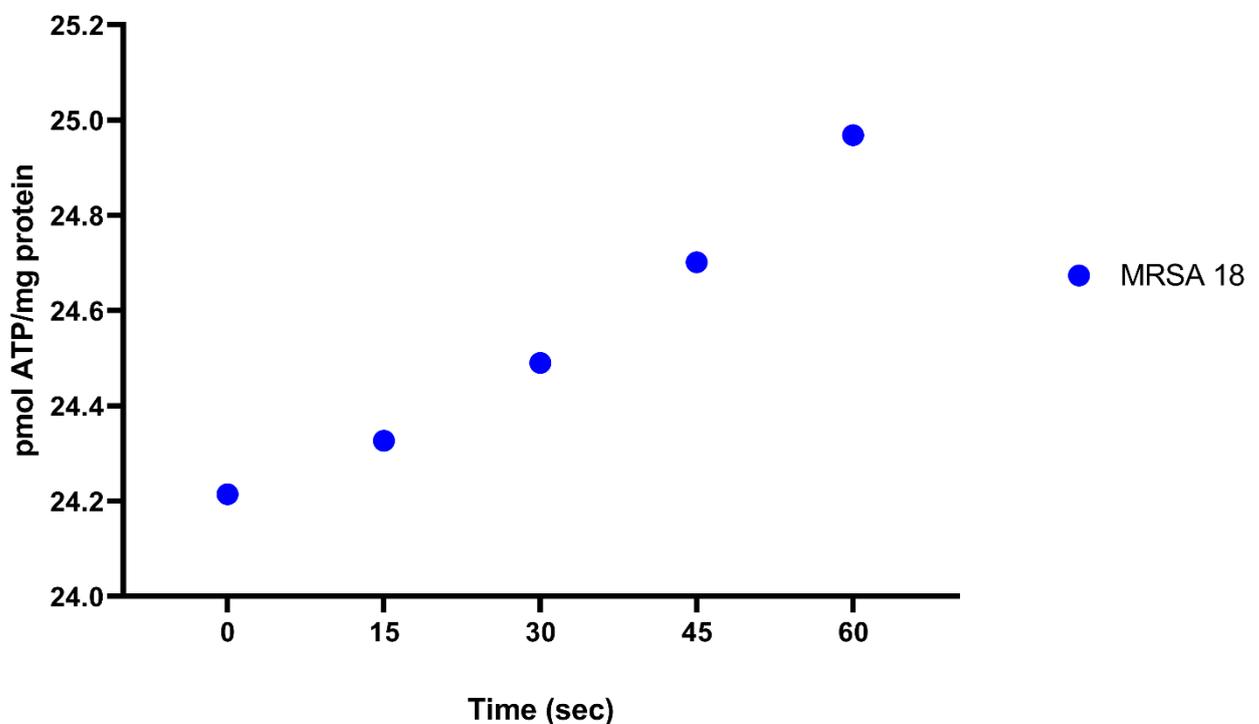


Figura 23. Andamento della crescita della concentrazione di ATP in 60 secondi nel ceppo 18 di batteri MRSA.

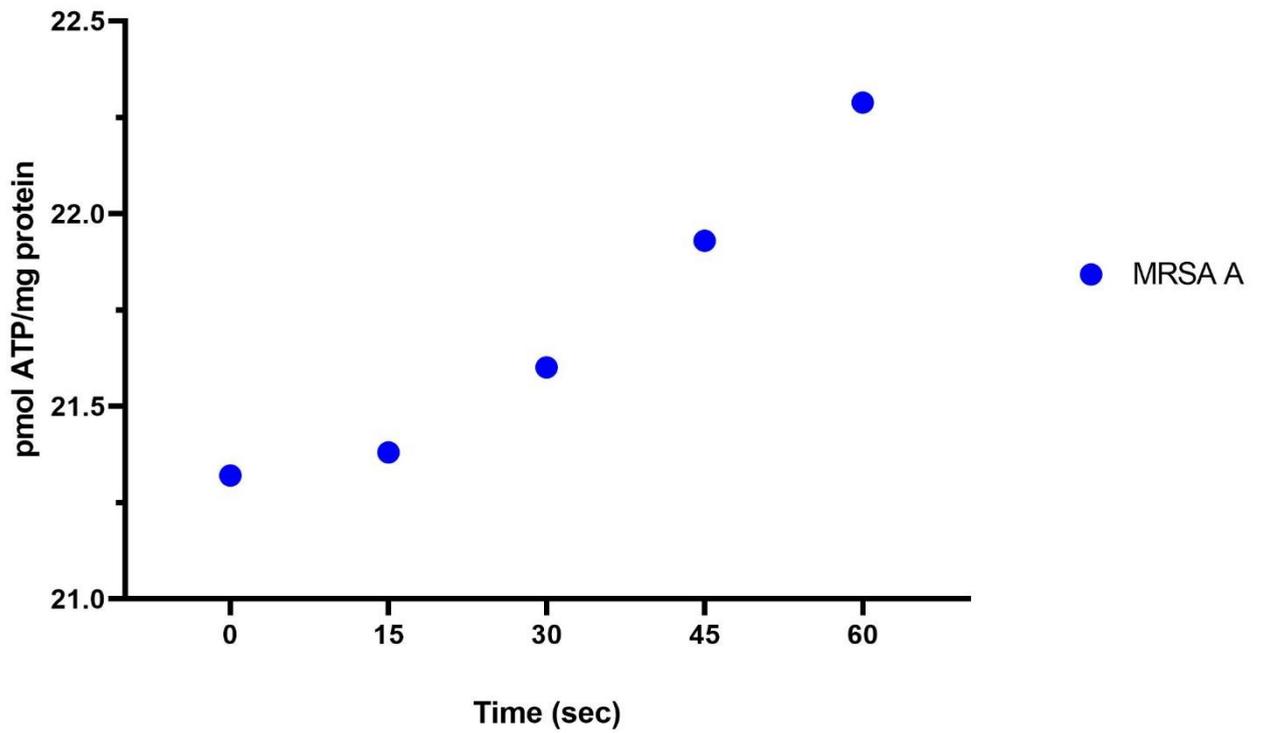


Figura 24. Andamento della crescita della concentrazione di ATP in 60 secondi nel ceppo A di batteri MRSA.

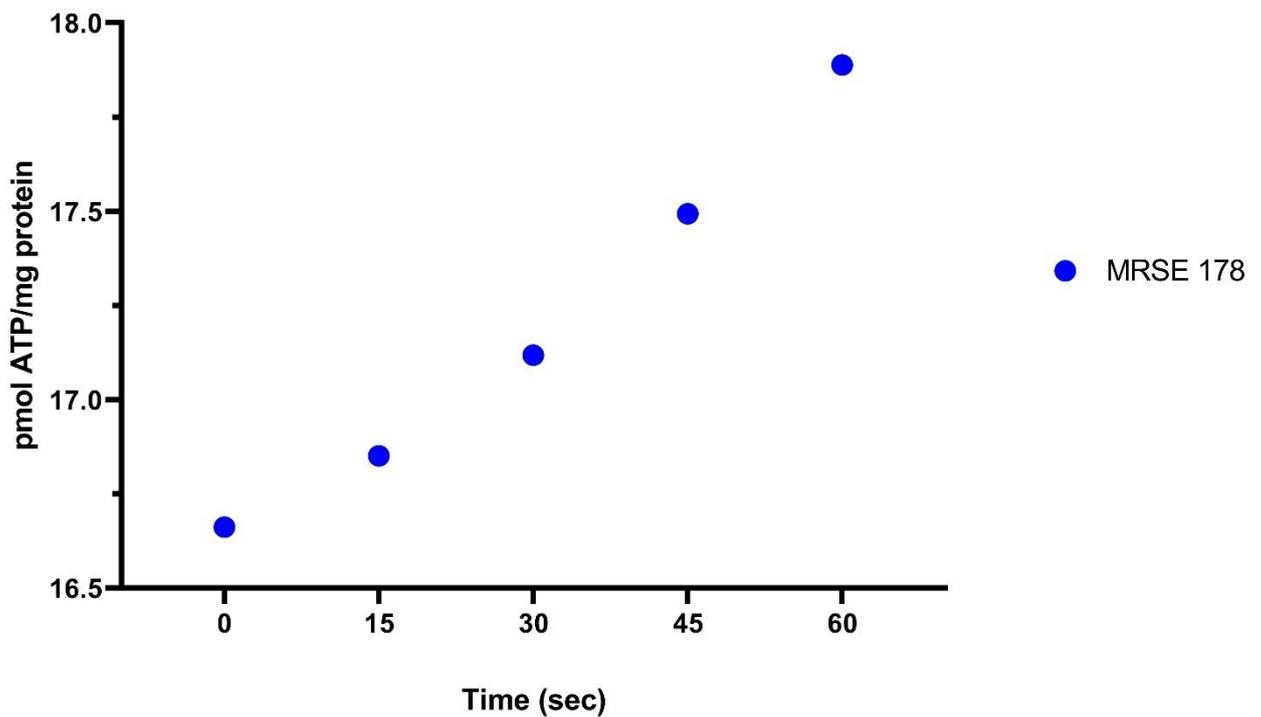


Figura 25. Andamento della crescita della concentrazione di ATP in 60 secondi nel ceppo 178 di batteri MRSE.

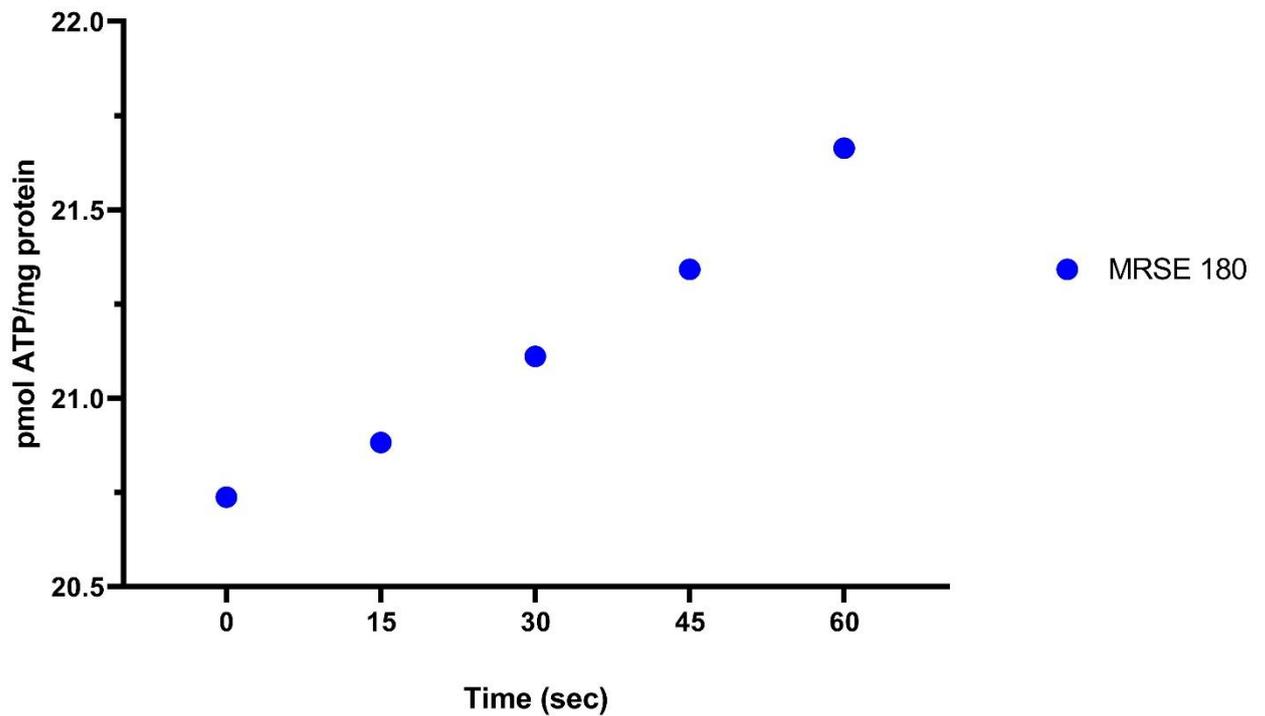


Figura 26. Andamento della crescita della concentrazione di ATP in 60 secondi nel cappo 180 di batteri MRSE.

Il grafico seguente, invece, illustra l'attività ATP sintasica dei 4 ceppi di MRSA ed MRSE, che appaiono molto simili (i valori delle mediane si situano in un range piuttosto ristretto). Essa è espressa come pmol di ATP al minuto per mg di proteina \pm S.D.

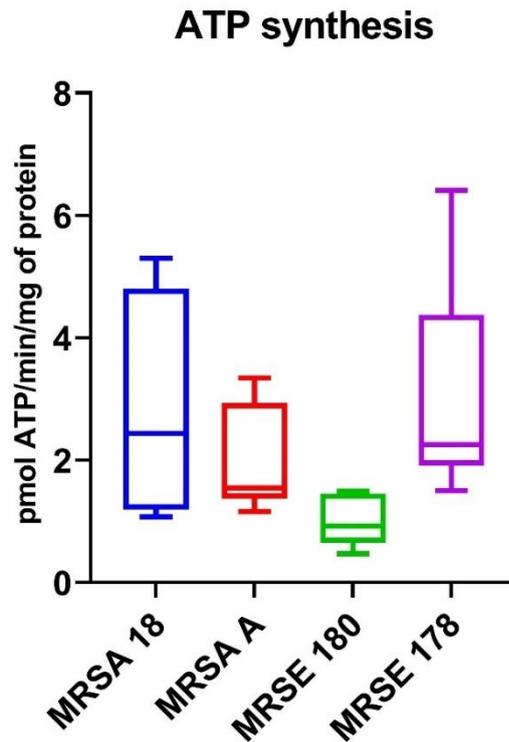


Figura 27. Grafico dell'attività ATP sintasica dei batteri MRSA ed MRSE, rispettivamente dei ceppi 18 e A per gli MRSA e dei ceppi 170 e 180 per gli MRSE.

3.3 Inibizione da Oligomicina e Quercetina

Gli inibitori dell'ATP sintasi utilizzati come controlli positivi sono stati Oligomicina e Quercetina. Come descritto in precedenza nel paragrafo 1.1.5.1. Oligomicina è un inibitore classico dell'ATP sintasi (10) mentre per la Quercetina è stato dimostrato tramite co-cristallografia che anche essa si lega ad ATP sintasi come accennato al paragrafo 1.3.1.1.1. (11). In particolare, il legame della Quercetina a tale complesso è stato dimostrato da John Walker, J.R. Gledhill et al. tramite co-cristallografia (11); essa si lega ad un sito nella superficie interna di un anello costituito da anse nelle tre subunità α e tre β sotto la "corona" dei filamenti β nei loro domini N-terminali (11). Questa regione di F_1 -ATP sintasi forma un cuscinetto per consentire la rotazione della punta della subunità γ all'interno dell'anello durante la catalisi. Il sito di legame è una tasca idrofobica tra la punta C-terminale della subunità γ e la subunità β , e la Quercetina viene legata tramite legami ad idrogeno principalmente alle sue frazioni idrossiliche mediate da molecole d'acqua legate e da interazioni idrofobiche (11). La

molecola probabilmente impedisce sia l'attività sintetica che quella idrolitica dell'enzima bloccando entrambi i sensi di rotazione della subunità γ . La Quercetina esiste come rotameri cis- e trans- prodotti dalla rotazione dell'anello esociclico di 180° attorno al legame che lo collega all'anello benzopiranonico (11).

L'inibizione della produzione di ATP da parte dei batteri MRSA e MRSE, trattati secondo il protocollo descritto al paragrafo 2.4 della sezione metodi, viene evidenziata con il grafico che segue, in cui viene descritta la % di inibizione della produzione di ATP trattando i batteri con oligomicina e quercetina, calcolata a partire dall'attività.

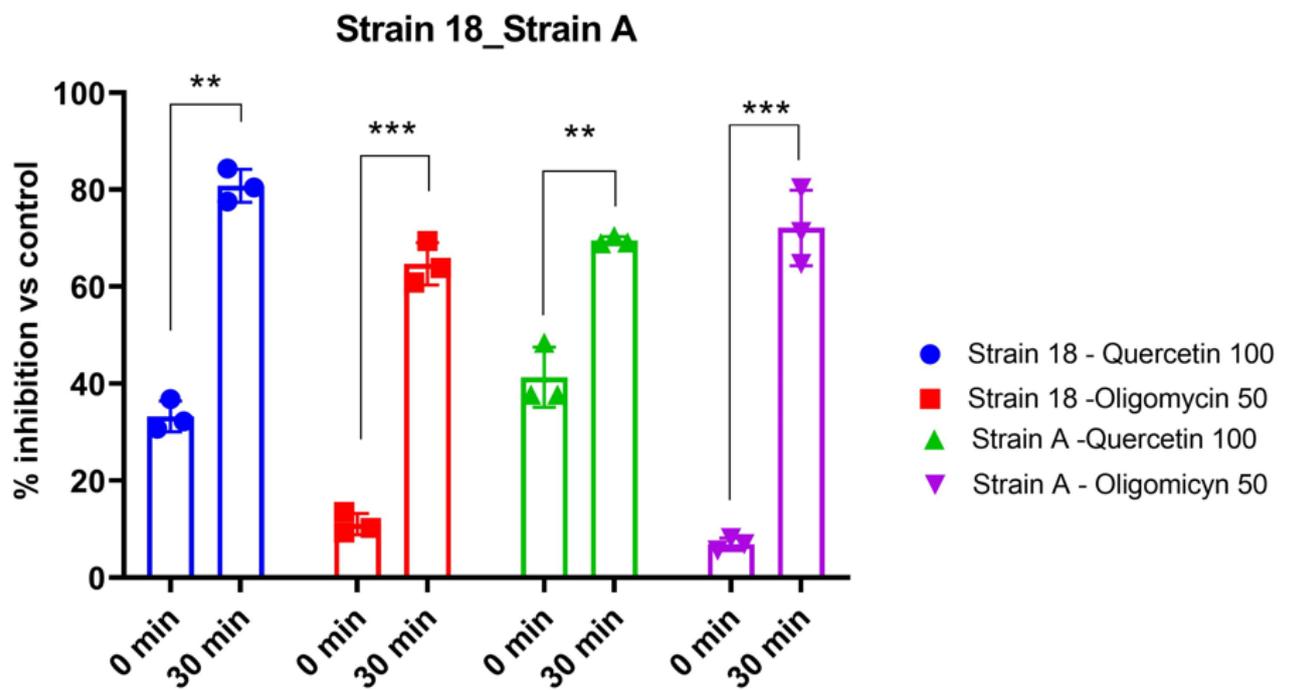


Figura 28. Grafico della percentuale di inibizione dell'attività ATP sintasica negli MRSA (ceppi 18 ed A) espressa come percentuale del controllo= 100%

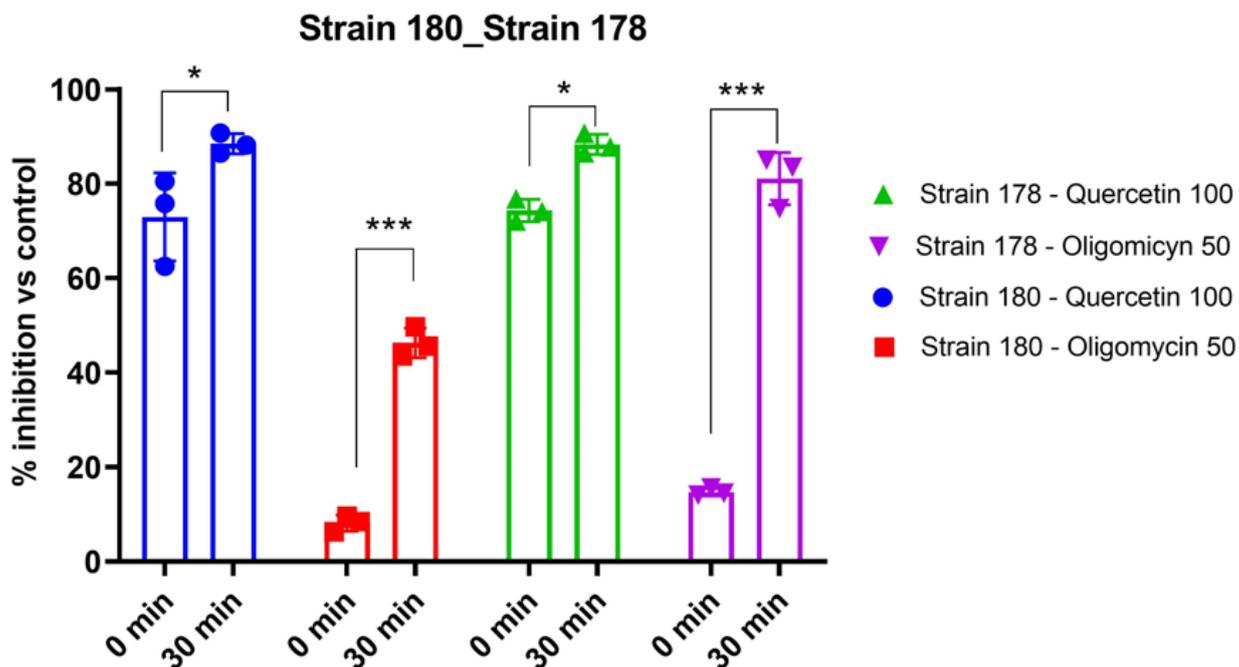


Figura 29. Grafico della percentuale di inibizione dell'attività ATP sintasica negli MRSE (ceppi 180 e 178) espressa come percentuale del controllo= 100%

Il protocollo utilizzato è quello descritto nella sezione metodi paragrafo 2.4 (vedi tabella 5). La maggior percentuale di inibizione di entrambe le sostanze inseguito a pre-incubazione di 30 minuti, è dovuta a una maggior capacità di permeazione dei principi attivi attraverso la parete batterica, infatti ciò è tempo dipendente. Maggiore è l'esposizione dei batteri in sospensione alle molecole, maggiore è la loro permeazione. La preincubazione è molto importante per quanto riguarda l'oligomicina, infatti come si evince dai grafici in figura 28 e 29, l'oligomicina non preincubata ha un'inibizione nella produzione di ATP, inferiore del 20% sia nei ceppi A e 18 dei batteri MRSA che nei ceppi 180 e 178 dei batteri MRSE. Invece, se essa viene preincubata per 30 minuti, si ottiene una inibizione maggiore del 65% nel ceppo 18 e di circa il 70% nel ceppo A dei batteri MRSA; mentre riguardo i batteri MRSE nel ceppo 180 oligomicina arriva ad un'inibizione maggiore del 50% e di circa l'80% nel ceppo 178. Per quanto riguarda la quercetina essa ha una percentuale di inibizione della produzione di ATP maggiore rispetto all'oligomicina anche senza preincubazione, ciò è probabilmente dovuto ad una migliore capacità di permeare la parete batterica. La quercetina non preincubata ha una percentuale di inibizione di circa il 40% nei ceppi 18 ed a dei batteri MRSA, mentre di quasi l'80% nei ceppi 178 e 180 dei batteri MRSE. Quando essa viene preincubata per 30 minuti, la percentuale di inibizione diventa dell'80% nel ceppo 18 e di circa il 75% nel ceppo A dei

batteri MRSA, mentre nei batteri MRSE supera l'80% nel ceppo 178 e diventa circa del 90% nel ceppo 180.

In ultimo, è stata fatta una modifica al normale protocollo utilizzato, non aggiungendo alla sospensione batterica inizialmente il glucosio al 20%, ma aggiungendo direttamente durante il dosaggio NADH e succinato, substrati specifici per la catena di trasporto degli elettroni. Questa è una prova pilota con l'intento di mirare più esplicitamente l'azione sulla catena respiratoria, evitando la variabilità dovuta al glucosio. Il risultato ottenuto, ovvero un'inibizione di circa il 60% data dall'oligomicina preincubata per 30 minuti e di circa il 75% per la quercetina non preincubata, è interessante in quanto dimostra che la sospensione batterica può restare nella miscela PBS/NaCl 0,9% per un'ora al massimo senza subire conseguenze negative sull'attività e che si può saggiare l'attività ATP sintasica utilizzando substrati che si scaricano direttamente sulla catena respiratoria.

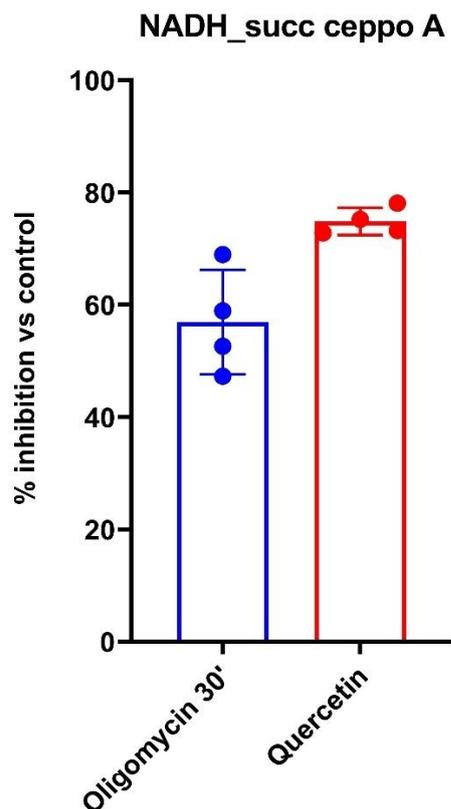


Figura 30. Illustra la percentuale di inibizione della produzione di ATP con oligomicina incubata 30 minuti e quercetina nei batteri MRSA del ceppo A.

4 DISCUSSIONE

Come è stato detto estesamente nel paragrafo 1.4, il problema che ci ha spinto a intraprendere il presente lavoro di Tesi è il fallimento nella clinica degli attuali antibiotici dovuto al fenomeno dell'antibiotico resistenza che ha un impatto notevole nel mondo, infatti, secondo l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ogni anno 700mila persone nel mondo muoiono a causa di infezioni dovute a batteri resistenti agli antibiotici (42). Considerando l'esigenza di individuare target alternativi per sviluppare futuri farmaci antibatterici, l'ATP sintasi appare promettente in quanto ha una struttura conservata nei vari organismi viventi, procarioti ed eucarioti (43), ma sono noti pochissimi mutanti vitali di tale enzima, pertanto, il batterio non può diventare resistente a molecole che agiscono inibendo tale complesso enzimatico. Infatti, esistono in letteratura alcuni studi che mostrano un'attività antibatterica di composti che hanno come target specifico ATP sintasi (38,51,57,58,59). Premessa essenziale in tale ottica è la disponibilità di un saggio enzimatico capace di individuare l'attività inibitoria di principi attivi seguendo in tempo reale l'attività dell'ATP sintasi. Esiste in letteratura al meglio delle nostre conoscenze un singolo lavoro (54) che riporta un protocollo di saggio di attività ATP sintasica di batteri Gram-negativi che è stato da noi opportunamente adattato come descritto al paragrafo 2.4 della sezione metodi. Nel presente lavoro di tesi è descritta per la prima volta la misurazione in tempo reale della produzione di ATP in batteri Gram-positivi che inoltre utilizza un kit commerciale estremamente sensibile e riproducibile che non era disponibile all'epoca del lavoro citato (54). I dati hanno mostrato l'efficacia del trattamento con detergente e con shock osmotico per rendere permeabili le cellule degli stafilococchi utilizzati, alle sostanze polari e in particolare l'ADP che ha potuto entrare nella cellula, trasformarsi in ATP ed essere scaricato ed ha reagito con la luciferasi aggiunta esternamente per effettuare le misure di luminescenza extracellulari. Il fatto che l'attività sintetica cellulare dinamica di produzione dell'ATP sia dovuta alla attività F_1F_0 -ATP sintasi della membrana plasmatica è dimostrato dalla sua inibizione da parte di oligomicina (13,55), inibitore specifico della porzione F_0 dell'enzima e di quercetina che dati di co-cristallografia hanno dimostrato inibire la rotazione della porzione F_1 (11). Nel nostro caso ci siamo interessati di specie batteriche Gram-positive quali *S.aureus* ed *S.epidermidis* divenute oggi estremamente resistenti a numerosi antibiotici e utilizzando, in particolare, ceppi clinici MRSA ed MRSE isolati da pazienti nosocomiali:

- il ceppo A e il ceppo 18, che sono i due ceppi di MRSA, derivano da emocultura da un paziente dell'ospedale San Martino di Genova

- il ceppo 170 e 180, che sono i due ceppi di MRSE, essi derivano da colture isolate da cateteri impiantati in pazienti anche essi del San Martino di Genova.

Nel lavoro di riferimento (54) la specie utilizzata era *E.coli*, ovvero un Gram-negativo e usavano come controllo positivo un mutante di ATP sintasi e non oligomicina. Per la differenza delle specie e la loro diversità strutturale, ovviamente abbiamo dovuto introdurre delle modifiche come è stato descritto nel paragrafo 3.1 della sezione risultati. In particolare, le modifiche più salienti sono state: la risospensione in una soluzione di PBS/NaCl 0,9%; l'aggiunta di glucosio ad una concentrazione finale del 10%; l'utilizzo di un kit per la rilevazione della luminescenza estremamente sensibile e diverso che probabilmente all'epoca del lavoro di riferimento (54) non era disponibile; l'uso di oligomicina come controllo positivo invece del mutante di ATP sintasi. Al fine di normalizzare le misurazioni ho utilizzato la sospensione batterica per 90 minuti passando in seguito ad una nuova aliquota. Infatti, come atteso in queste condizioni sperimentali si ha sempre lo stesso numero di batteri come confermato dalla misurazione del quantitativo di proteina presente nel campione all'inizio dell'esperimento e dopo 90 minuti, che ha mostrato che la concentrazione di proteina risultava invariato. Si è scelto di risospendere i batteri nella soluzione PBS/NaCl al 0,9% piuttosto che in Mueller-Hinton II broth, poiché nel terreno i batteri avrebbero avuto modo di replicarsi e dunque variare di numero durante lo svolgimento delle misurazioni, mentre col l'uso di tale soluzione i batteri si trovano in condizioni vitali buone ma statiche, inoltre, il Mueller-Hinton II broth avrebbe dato problematiche allo strumento nella lettura della luminescenza. Rispetto al lavoro di riferimento (54), i batteri nel mio caso erano in condizioni meno drastiche, infatti il Triton X-100 rimaneva a contatto con i batteri per 8 minuti (12 nel caso dell'oligomicina), invece che 30 minuti, tempo probabilmente necessario per permeabilizzare la parete più complessa dei batteri gram negativi (54). Infatti, durante la messa a punto del metodo si è verificato che un'esposizione prolungata al Triton-x100 (0,5%) provocava un disaccoppiamento delle membrane e pertanto l'impossibilità di testare l'ATP sintasi.

L'oligomicina in letteratura è considerata inibitore specifico dell'ATP sintasi e viene di norma utilizzata nei saggi in vitro su mitocondri e cellule alla concentrazione finale di 1 μ M. Essa è stata usata, inoltre, in alcuni lavori come inibitore di ATP sintasi su batteri in vivo, ma a concentrazioni elevatissime (90

μM) (41). Questo significa che la permeazione di questa grossa molecola idrofobica nella cellula batterica è problematica: infatti, lo studio dal quale siamo partiti non la utilizza come controllo positivo (40), inoltre nel nostro studio, pur utilizzando una concentrazione di oligomicina relativamente elevata ($50 \mu\text{M}$) non è stato possibile osservare un'adeguata permeazione se non dopo una preincubazione di 30 minuti. Questo dimostra che la metodica di permeabilizzazione serve unicamente a favorire il passaggio di sostanze polari. D'altra parte, il lavoro di Vestergaard et al. (41) è stato per noi un punto di partenza in quanto anche se oligomicina non potrà mai essere utilizzato come principio attivo in medicinali perché tossico per l'uomo (56), i risultati ci suggeriscono l'importanza di individuare di principi attivi con azione inibitoria su ATP sintasi da utilizzare in studi futuri quali additivi di antibiotici. La molecola di interesse per futuri sviluppi in questo senso è la quercetina da noi usata come controllo positivo, ma si è scelto di utilizzarla oltre che come controllo positivo come già discusso, anche perché essa appartiene alla classe dei polifenoli che in letteratura sono stati usati per le loro proprietà antimicrobiche. Quest'ultima infatti come dimostrano gli studi qui esposti, in accordo con gli studi di co-cristallografia (11), inibisce l'ATP sintasi. La quercetina ha una migliore capacità di permeabilizzare attraverso la parete batterica rispetto ad oligomicina, ciò probabilmente a causa della sua struttura chimica. Infatti, come si vede nei grafici delle figure 28 e 29 del paragrafo 3.1, causa una inibizione della produzione di ATP percentualmente maggiore rispetto ad oligomicina ed inoltre, quando preincubata con la sospensione batterica, la % di inibizione cresce, in quanto la capacità di permeazione è tempo dipendente, ma in misura minore rispetto alla % di inibizione di ATP sintasi dei batteri trattati e preincubati con oligomicina. La maggiore inibizione di cui risentono i batteri MRSE rispetto agli MRSA è probabilmente dovuta ad una loro maggiore sensibilità nell'inibizione del metabolismo aerobico, questo probabilmente per loro caratteristiche, infatti, gli stafilococchi sono organismi aerobi/anaerobi facoltativi ma gli MRSA sono maggiormente anaerobi perché vivono all'interno del corpo umano mentre gli MRSE potrebbero essere volti maggiormente ad un metabolismo aerobio in quanto vivono sulla superficie epidermica umana. Inoltre, i batteri MRSE sono più "fit", ovvero, sono metabolicamente più attivi, infatti, devono la loro virulenza solamente alla capacità di formazione del biofilm, mentre gli MRSA sono meno "fit" in quanto in vivo si arricchiscono di plasmidi a cui devono la loro elevata virulenza, più che al biofilm, e a causa del carico di plasmidi che possiedono, sono metabolicamente meno attivi e perciò

probabilmente risentono in misura minore rispetto agli MRSE dell'inibizione dell'ATP sintasi.

In letteratura si trovano diversi lavori in cui è stato usato il resveratrolo come antimicrobico, sia come singolo agente che in combinazione con antibiotici convenzionali. È stato osservato che a concentrazioni subinibitorie il resveratrolo può alterare l'espressione batterica dei tratti di virulenza che porta alla ridotta produzione di tossine, inibizione della formazione di biofilm, motilità ridotta e interferenza con il quorum sensing (38). Il resveratrolo potenzia l'attività degli aminoglicosidi contro *S.aureus*. Come per la quercetina, anche per il resveratrolo, tramite co-cristallizzazione è stato dimostrato che esso lega l'ATP sintasi in un sito di legame che si trova nel dominio F₁ in una tasca tra una subunità β e la subunità γ (11). L'attività antibatterica di resveratrolo è stata indagata mediante lo studio generale della MIC di questa molecola su varie specie batteriche tra cui *S.aureus* (38). Sempre riguardo lo studio della azione antibatterica del resveratrolo, è stato visto potenziare di 16 volte l'azione degli aminoglicosidi contro *S.aureus* e in misura minore anche contro altri batteri Gram-positivi (51). Il meccanismo con cui agisce come antibatterico è probabilmente dovuto all'inibizione di ATP sintasi e ciò è stato dedotto dal fatto che inattivando alcuni geni codificanti ATP sintasi nel patogeno, si ottengono i medesimi risultati per quanto riguarda la sensibilità agli aminoglicosidi (51). Anche nel caso del nostro studio è stato osservato un fenomeno globale che fa supporre che il target ATP sintasi sia rilevante per quanto riguarda un effetto sulla crescita dei batteri. I dati delle figure 28 e 29 (Paragrafo 3.1), infatti dimostrano che la sensibilità all'inibizione di ATP sintasi da parte di quercetina è piuttosto variabile nelle due specie, a differenza dell'inibizione da oligomicina che è molto più costante, questo significa che sia pur nel contesto di dosaggio enzimatico, ai 30 minuti di incubazione si osservano degli effetti che sono comunque dipendenti dal tipo di organismo, in base a ciò sarà interessante proseguire gli studi osservando l'effetto di una serie di altri polifenoli sulla crescita dei batteri per verificare se l'inibizione dell'ATP sintasi sia rilevante nell'azione globale di inibizione della crescita nelle 24 ore.

In un altro studio, questa volta riguardante i peptidi antimicrobici (AMP), che sono parte importante del sistema immunitario innato umano e che proteggono il corpo dalle infezioni batteriche, mostrano vari gradi di attività contro *S.aureus*. Si è notato come il mutante di ATP sintasi (*atpA*) è più suscettibile all'uccisione da parte degli AMP rispetto alle cellule wild type, allo stesso modo la somministrazione dell'inibitore dell'ATP sintasi, il resveratrolo,

sensibilizza *S.aureus* verso l'uccisione mediata dai peptidi antimicrobici (57). Anche in questo caso viene osservato un fenomeno generale determinando il quantitativo totale di ATP in seguito all'inibizione di ATP sintasi e non la sintesi di ATP in tempo reale, come fatto nel presente lavoro.

Uno studio, ha dimostrato che alcuni composti naturali tra i quali polifenoli, e in particolare due flavoni, sono in grado di inibire la formazione di biofilm da parte di batteri Gram-negativi *Pseudomonas aeruginosa* ed *E. coli*. Lo stesso studio ha individuato quercetina come flavone avente la migliore capacità inibitoria (58).

Infine un ultimo studio riguardante l'inibizione di ATP sintasi in batteri della specie *S.aureus*, descrive come i batteri vengano lisati in soluzione tampone di lisi (59). Gli agenti antimicrobici e chemioterapici venivano incubati a temperatura ambiente per 45 minuti sotto agitazione. Venivano invertite le vescicole di membrana utilizzando una french press preraffreddata. Le vescicole di membrana erano preincubate con composti sotto agitazione a temperatura ambiente per 10 minuti. Diccloesil-carbodiimmide (DCCD) e levofloxacin sono stati inclusi, rispettivamente come controlli positivi e negativi. L'attività di sintesi dell'ATP era determinata energizzando le membrane con NADH e quantificando la quantità di ATP prodotta utilizzando la luciferina/luciferasi, ATP bioluminescence assay kit, Roche Applied Science (59). In questo lavoro c'è lo stesso nostro fine, cioè quello di appurare l'inibizione di ATP sintasi da parte di principi attivi, l'uso di un controllo positivo che qui è la molecola DCCD mentre per noi è l'oligomicina, lo stesso kit luciferina/luciferasi per la quantificazione dell'ATP, ma alcune differenze come l'uso di NADH per energizzare le membrane mentre noi abbiamo usato il glucosio, con l'eccezione dell'esperimento in cui anche noi abbiamo usato NADH e succinato, ma la differenza maggiore è che in questo studio i batteri vengono lisati e poi viene effettuata la misurazione perciò qui si misura l'ATP totale presente, mentre noi misuriamo l'ATP in tempo reale in batteri vivi permeabilizzati. Quindi dall'esame di tutti i lavori citati si deduce che l'azione inibitoria sull'ATP sintasi delle varie molecole appartenenti alla classe dei polifenoli, sia rilevante per la loro azione antimicrobica anche se hanno molteplici targets. Inoltre, visti i risultati preliminari incoraggianti sull'utilizzo dei substrati specifici della catena respiratoria (NADH e succinato) una parte più enzimologica degli studi futuri continuerà in tal senso su tutti i ceppi batterici.

5 CONCLUSIONI e SVILUPPI FUTURI

Il dosaggio presentato in questo lavoro di tesi, che consente di seguire nel tempo l'andamento dell'attività ATP sintasica di batteri Gram-positivi in presenza di una serie di inibitori specifici, ad esempio i polifenoli, si presta ad essere utilizzato per studiare il ruolo della inibizione dell'ATP sintasi e pertanto di un deficit bioenergetico nell'effetto globale antibatterico di questi ed eventuali altri principi attivi. Peraltro, si può ipotizzare l'utilizzo del kit da noi impiegato nella metodica anche per i batteri Gram-negativi allo scopo di rendere il dosaggio maggiormente riproducibile (54). D'altra parte, i composti da noi utilizzati come controllo interno positivo (oligomicina e quercetina), richiedendo una pre-incubazione per evidenziarne l'attività hanno consentito di osservare un comportamento diverso delle due specie ai 30 minuti nei confronti di quercetina, suggerendo che questo dipenda da un'azione dipendente dal loro diverso metabolismo. Pertanto, in conclusione, si deduce che il flavone usato in questo studio possa in un futuro, a seguito di ulteriori approfondimenti, trovare applicazione come nuova molecola antibatterica. Quercetina o altri flavoni potrebbero anche essere utilizzati in combinazione a certi antibiotici, oggi ancora attivi sui ceppi MRSA e MRSE ma dotati di elevata tossicità (ad esempio Linezolid, che provoca con elevata frequenza una neuropatia periferica permanente alle dosi terapeutiche). Se idonei esperimenti confermassero l'eventuale effetto sinergico dei flavoni, essi permetterebbero quando usati in associazione con l'antibiotico, di abbassare la dose del principio attivo e diminuirne così gli effetti tossici; inoltre, tali composti sono noti componenti di una dieta salutistica.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Campbell MK, Farrell SO, McDougal OM. Biochemistry.
2. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* [Internet]. 2012 Aug [cited 2023 Mar 21];142. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22903797/>
3. Sarniak A, Lipińska J, Tytman K, Lipińska S. Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* [Internet]. 2016 [cited 2023 Apr 3];70(0):1150–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27892899/>
4. Wang P, Geng J, Gao J, Zhao H, Li J, Shi Y, et al. Macrophage achieves self-protection against oxidative stress-induced ageing through the Mst-Nrf2 axis. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Apr 3];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30765703/>
5. Ramzan R, Dolga AM, Michels S, Weber P, Culmsee C, Rastan AJ, et al. Cytochrome c Oxidase Inhibition by ATP Decreases Mitochondrial ROS Production. *Cells* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Mar 23];11(6). Available from: </pmc/articles/PMC8946758/>
6. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2014 Dec 5 [cited 2023 Apr 3];224:164–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25452175/>
7. Frasch WD, Bukhari ZA, Yanagisawa S. F1FO ATP synthase molecular motor mechanisms. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 Aug 23 [cited 2023 Mar 20];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36081786/>
8. Guo H, Rubinstein JL. Structure of ATP synthase under strain during catalysis. *Nature Communications* 2022 13:1 [Internet]. 2022 Apr 25 [cited 2023 Mar 17];13(1):1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-29893-2>
9. Toei M, Noji H. Single-molecule Analysis of F₀F₁-ATP Synthase Inhibited by N,N-Dicyclohexylcarbodiimide. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Sep 9 [cited 2023 Mar 22];288(36):25717. Available from: </pmc/articles/PMC3764779/>
10. Symersky J, Osowski D, Walters DE, Mueller DM. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Aug 28 [cited 2023 Apr 3];109(35):13961–5. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1207912109>
11. Gledhill JR, Montgomery MG, Leslie AGW, Walker JE. Mechanism of inhibition of bovine F₁F₀-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *PNAS* [Internet]. 2007 Aug 21 [cited 2023 Apr 3];104(34):13632–7. Available from: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2007PNAS..10413632G/abstract>
12. Pagliarani A, Nesci S, Ventrella V. Modifiers of the oligomycin sensitivity of the mitochondrial F₁F₀-ATPase. *Mitochondrion*. 2013 Jul 1;13(4):312–9.
13. Hearne A, Chen H, Monarchino A, Wiseman JS. Oligomycin-induced proton uncoupling. *Toxicol In Vitro* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Mar 19];67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32502624/>

14. Lardy HA, Johnson D, McMurray WC. Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1958 [cited 2023 Apr 3];78(2):587–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13618041/>
15. Racker E. A mitochondrial factor conferring oligomycin sensitivity on soluble mitochondrial ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1963 Mar 25 [cited 2023 Apr 3];10(6):435–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13972927/>
16. Jain A, Jain R, Jain S. *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*. 2020 [cited 2023 Apr 30]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9861-6>
17. Lee AS, De Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2018 May 31 [cited 2023 Mar 22];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29849094/>
18. Huang Z, Liu Y, Wang L, Ali A, Yao Q, Jiang X, et al. Supramolecular assemblies mimicking neutrophil extracellular traps for MRSE infection control. *Biomaterials*. 2020 Sep 1;253:120124.
19. Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Mar 24];52(4):1701–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34558029/>
20. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 24];18(1):96–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24657330/>
21. Tu C, Wang Y, Yi L, Wang Y, Liu B, Gong S. [Roles of signaling molecules in biofilm formation]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* [Internet]. 2019 Apr 25 [cited 2023 Mar 24];35(4):558–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31001942/>
22. Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2023 Mar 25];20(5):257–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34737424/>
23. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep* [Internet]. 2020 Dec 3 [cited 2023 Mar 25];21(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33400359/>
24. Wencewicz TA. Crossroads of Antibiotic Resistance and Biosynthesis. *J Mol Biol* [Internet]. 2019 Aug 23 [cited 2023 Apr 3];431(18):3370–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31288031/>
25. Antibiotic resistance [Internet]. [cited 2023 Apr 3]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
26. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Kudva IT, Zhang Q, editors. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016 Mar 25 [cited 2023 Mar 24];4(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
27. Panfoli I. Polyphenols in Anti-cancer Therapy and Prevention: Should we Add the FoF1-ATP Synthase Inhibition? *Curr Cancer Ther Rev*. 2022 Sep 29;18(4):227–9.

28. Panfoli I, Esposito A. Beneficial effect of polyphenols in COVID-19 and the ectopic F1 FO -ATP synthase: Is there a link? *J Cell Biochem* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2023 Apr 3];123(8):1281–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35838055/>
29. Carlini L, Tancreda G, Iobbi V, Caicci F, Bruno S, Esposito A, et al. The Flavone Cirsiliol from *Salvia x jamensis* Binds the F1 Moiety of ATP Synthase, Modulating Free Radical Production. *Cells* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2023 Mar 25];11(19). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36231131/>
30. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients* 2018, Vol 10, Page 1618 [Internet]. 2018 Nov 2 [cited 2023 Mar 16];10(11):1618. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1618/htm>
31. Zhang L, Han Z, Granato D. Polyphenols in foods: Classification, methods of identification, and nutritional aspects in human health. *Adv Food Nutr Res* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Apr 3];98:1–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34507639/>
32. Zorofchian Moghadamtousi S, Abdul Kadir H, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [cited 2023 Apr 11];2014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24877064/>
33. Lenard N, Henagan TM, Kumar Maurya P. Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 2498 [Internet]. 2022 Apr 13 [cited 2023 Mar 19];27(8):2498. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/8/2498/htm>
34. Losada-Barreiro S, Bravo-Díaz C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2017 [cited 2023 Apr 11];133:379–402. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28415050/>
35. Lobiuc A, Pavăl NE, Mangalagiu II, Gheorghiuță R, Teliban GC, Amăriucăi-Mantu D, et al. Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules* [Internet]. 2023 Jan 22 [cited 2023 Mar 17];28(3):1114. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36770780/>
36. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem*. 2022 Jul 30;383:132531.
37. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2005 Nov 1;26(5):343–56.
38. Vestergaard M, Ingmer H. Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2023 Mar 25];53(6):716–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30825504/>
39. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society* [Internet]. 2010 Aug [cited 2023 Mar 17];69(3):273–8. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/flavonoids-as-antiinflammatory-agents/22B54898AA99E73BE86DC4E589E6B1E4>
40. Hara KY, Mori H. An efficient method for quantitative determination of cellular ATP synthetic activity. *J Biomol Screen* [Internet]. 2006 Apr [cited 2023 Mar 25];11(3):310–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16490767/>
41. Vestergaard M, Nøhr-Meldgaard K, Bojer MS, Krosgård Nielsen C, Meyer RL, Slavetinsky C, et al. Inhibition of the ATP Synthase Eliminates the Intrinsic Resistance of *Staphylococcus aureus*

- towards Polymyxins. *mBio* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2023 Mar 25];8(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28874470/>
42. Antibiotico-resistenza nel settore umano [Internet]. [cited 2023 Apr 22]. Available from: <https://www.salute.gov.it/portale/antibioticoresistenza/dettaglioContenutiAntibioticoResistenza.jsp?lingua=italiano&id=5282&area=antibiotico-resistenza&menu=vuoto&tab=2>
 43. complesso dell'ATPsintasi-ATPasi in "Enciclopedia della Scienza e della Tecnica" [Internet]. [cited 2023 Mar 25]. Available from: https://www.treccani.it/enciclopedia/complesso-dell-atpsintasi-atpasi_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/
 44. Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature* [Internet]. 2010 Oct 21 [cited 2023 May 3];467(7318):929–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20962839/>
 45. Bisio A, Romussi G, Russo E, Cafaggi S, Schito AM, Repetto B, et al. Antimicrobial activity of the ornamental species *Salvia corrugata*, a potential new crop for extractive purposes. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2008 Nov 26 [cited 2023 May 3];56(22):10468–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18973336/>
 46. Bisio A, Schito AM, Ebrahimi SN, Hamburger M, Mele G, Piatti G, et al. Antibacterial compounds from *Salvia adenophora* Fernald (Lamiaceae). *Phytochemistry* [Internet]. 2015 [cited 2023 May 3];110:120–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25435172/>
 47. Bisio A, De Mieri M, Milella L, Schito AM, Parricchi A, Russo D, et al. Antibacterial and Hypoglycemic Diterpenoids from *Salvia chamaedryoides*. *J Nat Prod* [Internet]. 2017 Feb 24 [cited 2023 May 3];80(2):503–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28186413/>
 48. Gledhill JR, Walker JE. Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal* [Internet]. 2005 Mar 15 [cited 2023 Mar 27];386(3):591–8. Available from: </biochemj/article/386/3/591/78782/Inhibition-sites-in-F1-ATPase-from-bovine-heart>
 49. Ravera S, Esposito A, Degan P, Caicci F, Calzia D, Perrotta E, et al. Sclareol modulates free radical production in the retinal rod outer segment by inhibiting the ectopic f1fo-atp synthase. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2020 Nov 20 [cited 2023 Mar 25];160:368–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32853720/>
 50. Bisio A, Schito AM, Pedrelli F, Danton O, Reinhardt JK, Poli G, et al. Antibacterial and ATP Synthesis Modulating Compounds from *Salvia tingitana*. *J Nat Prod* [Internet]. 2020 Apr 24 [cited 2023 Mar 25];83(4):1027–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32182064/>
 51. Nøhr-Meldgaard K, Ovsepiyan A, Ingmer H, Vestergaard M. Resveratrol enhances the efficacy of aminoglycosides against *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2023 Mar 25];52(3):390–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29906565/>
 52. Mueller Hinton Broth biolab – Scheda Tecnica
 53. Karimi F, Hamidian Y, Behrouzifar F, Mostafazadeh R, Ghorbani-HasanSaraei A, Alizadeh M, et al. An applicable method for extraction of whole seeds protein and its determination through Bradford's method. *Food and Chemical Toxicology*. 2022 Jun 1;164:113053.
 54. Hara KY, Mori H. An efficient method for quantitative determination of cellular ATP synthetic activity. *J Biomol Screen* [Internet]. 2006 Apr [cited 2023 Apr 12];11(3):310–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16490767/>

55. Symersky J, Osowski D, Walters DE, Mueller DM. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Aug 28 [cited 2023 Apr 3];109(35):13961–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22869738/>
56. Hearne A, Chen H, Monarchino A, Wiseman JS. Oligomycin-induced proton uncoupling. *Toxicol In Vitro* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Apr 30];67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32502624/>
57. Liu L, Beck C, Nøhr-Meldgaard K, Peschel A, Kretschmer D, Ingmer H, et al. Inhibition of the ATP synthase sensitizes *Staphylococcus aureus* towards human antimicrobial peptides. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Apr 24];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32647350/>
58. Manner S, Fallarero A. Screening of Natural Product Derivatives Identifies Two Structurally Related Flavonoids as Potent Quorum Sensing Inhibitors against Gram-Negative Bacteria. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 May 3 [cited 2023 May 4];19(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29751512/>
59. Balemans W, Vranckx L, Lounis N, Pop O, Guillemont J, Vergauwen K, et al. Novel antibiotics targeting respiratory ATP synthesis in Gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2012 Aug [cited 2023 Apr 23];56(8):4131–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22615276/>