

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Tesi di laurea sperimentale

**Cirsiliolo e Quercetina come inibitori della sintesi di ATP in ceppi di *Staphylococcus*
meticillino-resistenti**

RELATORE

Prof.ssa Isabella Panfoli

CANDIDATA

Francesca Pesce

CO-RELATORE

Prof.ssa Anna Maria Schito

Anno accademico
2022/2023

INDICE

1.	INTRODUZIONE	4
1.1	I POLIFENOLI	4
1.1.1	I Flavonoidi	5
1.1.1.1	La Quercetina	7
1.1.1.2	Il Cirsiliolo	9
1.2	LA RESPIRAZIONE AEROBICA	11
1.2.1	La catena di trasporto degli elettroni	12
1.2.2	Le specie reattive dell'ossigeno	14
1.2.3	La fosforilazione ossidativa	15
1.2.3.1	Mitocondriale	15
1.2.3.2	Ectopica	16
1.2.4	ATPsintasi	17
1.2.5	Inibizione della produzione di ATP	19
1.2.6	L'Oligomicina	21
1.3	I BATTERI	22
1.3.1	Batteri Gram-negativi	23
1.3.2	Batteri Gram-positivi	24
1.3.2.1	Stafilococchi	25
1.3.2.1.1	Stafilococco aureus	26
1.3.2.1.1.1	MRSA	26
1.3.2.1.2	Staphilococcus Epidermidis	27
1.3.2.1.2.1	MRSE	27
1.4	GLI ANTIBIOTICI	28
1.4.1	Antibiotico resistenza	29
1.4.2	Fenoli antibatterici	30
1.5	PREMESSA ALLA TESI	32
2.	METODI	34
2.1	FOTOMETRIA	34
2.1.1	FOTOMETRO	35
2.1.2	Nefelometro	36
2.1.3	Luminometro	37
2.2	CONDIZIONI DI COLTURA BATTERICA	40
2.3	DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA	41
2.3.1	Metodo Bradford	41
2.4	PROTOCOLLO DI ANALISI DELLA SINTESI DI ATP IN CONTINUO	43
3.	RISULTATI	49
3.1	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ATP SINTASICA IN CEPPI MRSA ED MRSE	49
3.2	VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ INIBITORIA DI CIRSILIOLO E QUERCETINA	51
3.3	VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ INIBITORIA DI CIRSILIOLO E QUERCETINA DOPO 30MINUTI DI INCUBAZIONE	53
4.	DISCUSSIONE	55
5.	CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	60

1. INTRODUZIONE

1.1 I POLIFENOLI

I polifenoli costituiscono una vasta famiglia di sostanze organiche di origine naturale considerate componenti essenziali della nostra dieta. Presenti nel tè, nel cioccolato, nella frutta e nella verdura, influenzano positivamente la salute umana, migliorando i profili lipidici, la pressione sanguigna, l'insulino-resistenza e l'infiammazione sistemica¹. L'assunzione alimentare di polifenoli varia ampiamente fra gli individui e si stima che vada da poche centinaia di mg/die a oltre 1800 mg/die a seconda della regione e della popolazione target, oltre che alla metodologia utilizzata per la valutazione². In base al numero di anelli aromatici e agli elementi strutturali si dividono in quattro famiglie principali:

- Acidi fenolici
- Flavonoidi
- Stilbeni
- Lignani

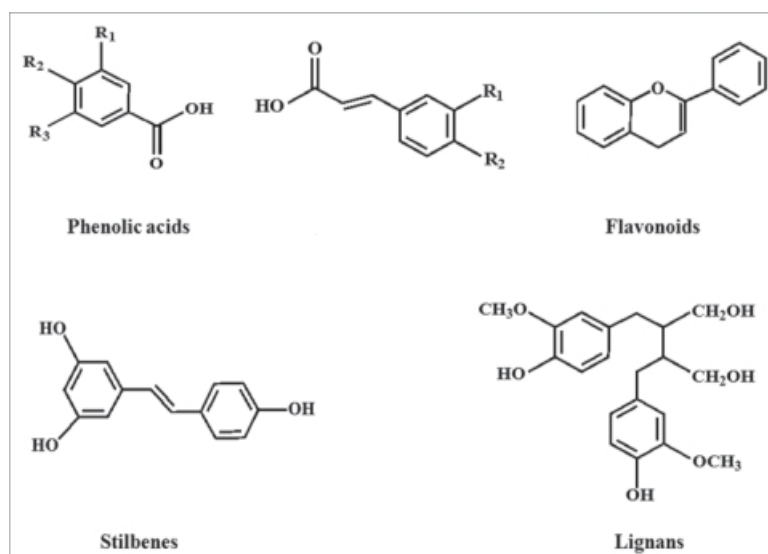


Figura 1. Struttura chimica di Acidi fenolici, Flavonoidi, Stilbeni e Lignani

Questi composti proteggono l'organismo dagli stimoli esterni, attraverso l'eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) causative di diverse malattie. Oltre all'azione antiossidante, sono state studiate sperimentalmente in vivo e in vitro anche quella citotossica, antinfiammatoria, antipertensiva e antidiabetica.¹ Queste attività sono strettamente correlate ai gruppi chimici innestati sul nucleo fenolico; ad esempio l'attività di scavenging radicale e chelante dei metalli dipende dalla struttura e in particolare dal numero di gruppi ossidrilici e dalla loro posizione rispetto al gruppo carbossilico.

Per quanto riguarda l'effetto antibatterico, i polifenoli possono agire attraverso diversi meccanismi come l'interazione con le proteine e le pareti cellulari batteriche, l'alterazione delle funzioni citoplasmatiche e della permeabilità della membrana, l'inibizione del metabolismo energetico e il danno al DNA o l'inibizione della sintesi degli acidi nucleici. La planarità delle molecole permette loro di penetrare nell'elica del DNA durante i meccanismi di replicazione, ricombinazione, riparazione e trascrizione e i gruppi ossidrilici permettono la formazione di legami a idrogeno con le basi dell'acido nucleico. Inibiscono inoltre l'attività delle topoisomerasi o della DNA girasi. Possono infine anche formare dei complessi col Cu^{2+} alterando la stabilità del DNA ³.

Sono considerati agenti promettenti per la prevenzione e la cura di COVID-19, grazie alla loro capacità di legare ed inibire la catalisi rotativa F_1F_0 -ATP sintasi, contrastando così il danno endoteliale e lo stress ossidativo che contribuiscono agli effetti infiammatorio e trombotico sistemici del virus ⁴. 15 Trials clinici sono attualmente in corso nel mondo, che utilizzano Quercetina nella cura del COVID-19 (fonte: <https://clinicaltrials.gov/>).

La maggioranza dei polifenoli ha una scarsa biodisponibilità e subisce una grande biotrasformazione nell'organismo, perciò è stato suggerito che gli effetti benefici in vivo potrebbero essere dovuti ad una loro azione come modulatori dell'espressione genica e delle cascate di segnalazione intracellulare coinvolte nella funzione e nella protezione cellulare oppure all'interazione fra i polifenoli e il microbiota intestinale. La maggior parte dei polifenoli assunti raggiunge l'intestino crasso, dove poi viene catabolizzata dalla microflora del colon in una varietà di metaboliti, alcuni dei quali possono essere biologicamente attivi e responsabili dell'attività associata ai loro polifenoli genitori. I polifenoli non assorbiti e alcuni metaboliti fenolici possono anche avere un impatto sulla composizione del microbiota intestinale, agendo come composti simili ai prebiotici ².

1.1.1 I Flavonoidi

I flavonoidi hanno come unità strutturale di base il 2-fenilcromone e vengono sintetizzati dalla via generale dei Fenilpropanoidi ⁵.

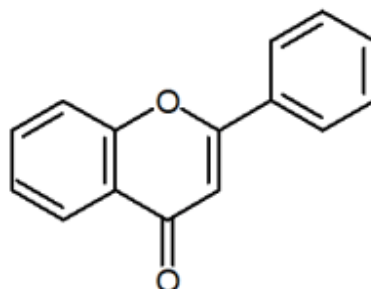


Figura 2. Struttura chimica del 2-fenilcromone

basso peso molecolare ⁶ Concentrati normalmente in fiori, frutti, foglie e semi, sono responsabili del loro colore, profumo e caratteristiche aromatiche e fungono da mediatori delle risposte delle piante a fattori ambientali biologici e non biologici ^{7,8}. I flavonoidi naturali esistono quasi tutti come forme O-glicosidiche o C-glicosidiche e questi glicosidi possono ampliare l'attività biologica dei flavonoidi, aumentando la solubilità in acqua, riducendo gli effetti collaterali e migliorando il targeting specifico ⁹.

Hanno attirato attenzione per la loro ampia applicazione farmacologica e biochimica associata a proprietà terapeutiche come quella antinfiammatoria, antiossidante, antivirale e antimicrobica ¹⁰.

La loro bioattività dipende dai modelli di sostituzione strutturale nei loro anelli ⁷.

L'attività biologica principale e ampiamente studiata è quella antiossidante, che riduce gli effetti negativi dello stress ossidativo che accompagna infiammazione, malattie cardiovascolari, malattie neurodegenerative e cancro, conferendogli una proprietà chemiopreventiva oltre a quella terapeutica ^{8,6}.

Grazie ai loro gruppi sostituenti e ai doppi legami coniugati, attraverso la risonanza, donano elettroni ai radicali liberi neutralizzandoli, agendo così come antiossidanti naturali.

I meccanismi con cui esercitano questa azione sono :

- scavenging diretto delle specie reattive dell'ossigeno ROS;
- attivazione enzimi antiossidanti;
- inibizione delle ossidasi come Xantina Ossidasi [XO] e proteina chinasi C [PKC] che catalizzano la produzione dell'anione superossido, la ciclossigenasi [COX], la NADH ossidasi, la Monossigenasi microsomiale e la Lipossigenasi ^{7,10} ;

- attività chelante dei metalli.

La Quercetina in particolare mostra un'attività antiossidante contro di Fe(III); possiede tre potenziali siti di legame bidentati (α -idrossi-carbonile, β -idrossi-carbonile e catecolo) che possono generare complessi metallici stabili;

- aumento del livello di radicali α -tocoferolo, ritardando l'ossidazione delle LDL attraverso l'interazione con i radicali α -tocoferolo ⁸.

Mostrano anche un'attività promettente contro i batteri Gram-positivi e Gram-negativi sensibili ai farmaci e multiresistenti, verso i quali possono agire come battericidi e batteriostatici danneggiando le membrane citoplasmatiche, inibendo il metabolismo energetico e la sintesi degli acidi nucleici contro diversi microrganismi ⁹.

La loro assunzione è inoltre correlata ad un miglioramento di parametri salutari comprese le funzioni cognitive e parametri biochimici nella sindrome metabolica.

Molto recentemente sono stati valutati anche i loro meccanismi d'azione su diversi modelli in vivo ed in vitro relativi all'AMD (degenerazione maculare legata all'età), un disturbo oculare comune che provoca cecità e perdita della vista includendo come principali processi patologici il danno ossidativo, l'infiammazione e la neovascolarizzazione ¹¹.

Vengono considerati come piccole molecole che fungono da struttura di partenza per sviluppo di farmaci e potenziatori di terapie convenzionali.

Tuttavia, la loro applicazione clinica è limitata a causa della loro scarsa idrosolubilità che li rende scarsamente biodisponibili. A fronte di tale problema sono state condotte recentemente ricerche riguardanti l'applicazione di nanomateriali di prodotti naturali di origine vegetale (PDNP), compresi nanomedicinali caricati con Flavonoidi e Polifenoli non flavonoidi, utili per uno sviluppo clinico futuro ¹².

In base alla loro struttura chimica, al grado di insaturazione e di ossidazione dell'anello di carbonio, sono classificati in Flavoni, Flavonoli, Isoflavoni, Flavanoni, Flavanoli e Antocianidine. Quelli più comuni presenti nei vegetali sono i Flavonoli fra cui si trova la Quercetina ⁸.

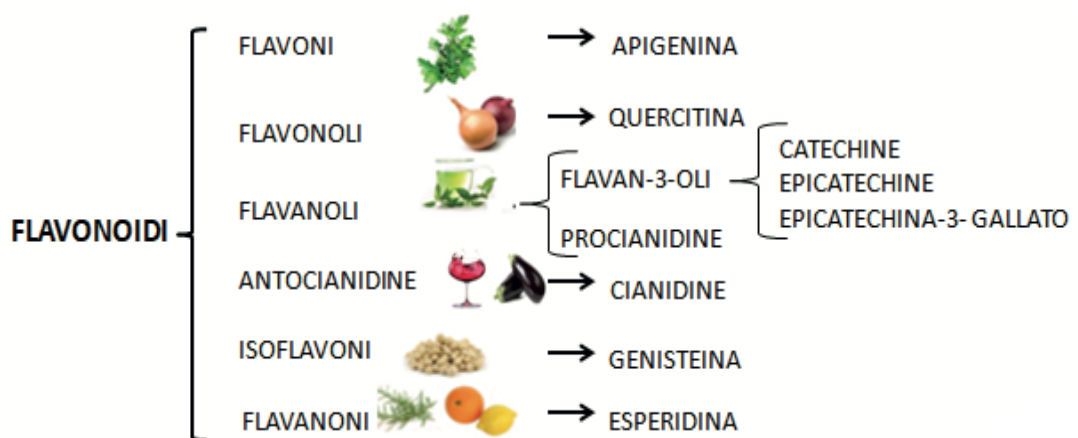


Figura 3. Classi dei Flavonoidi e principali alimenti che li contengono

1.1.1.1 La Quercetina

La Quercetina (3,3',4',5,7-pentaidrossiflavone) è uno dei principali flavonoidi presente nella dieta umana.

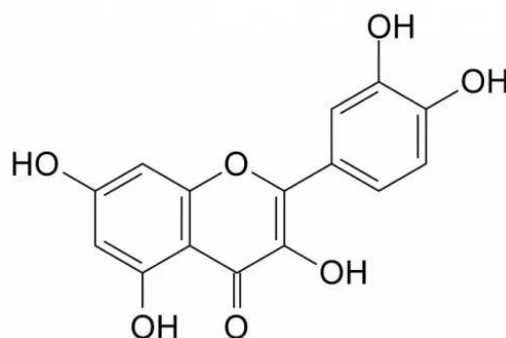


Figura 4. Struttura chimica della Quercetina

I livelli più alti di questo flavonoide si trovano soprattutto in mele, bacche, capperi, uva cipolle, cipollotti, tè, pomodori e verdure di brassica come broccoli, cavolfiori e cavolo cappuccio. Tuttavia, essa è contenuta anche in piante medicinali come *Ginkgo Biloba*, *Hypericum perforatum* e *Sambuco* ¹³.

Nelle piante Quercetina facilita vari processi fisiologici come la germinazione dei semi, la crescita del polline, i macchinari antiossidanti e la fotosintesi, oltre ad indurre una loro corretta crescita e sviluppo ¹⁴. È un composto di colore giallo solubile in alcool e lipidi, ma insolubile in acqua fredda e scarsamente solubile in acqua calda. Altamente utilizzato nella medicina botanica e nella medicina tradizionale cinese grazie alla sua potente azione antiossidante, molto studiata insieme alle proprietà antinfiammatorie, antiproliferative, anticancerogene, antidiabetiche e antivirali ¹⁵.



Figura 5. Alimenti ricchi di Quercetina

La forte capacità antiossidante della Quercetina è data dalla presenza di quattro gruppi ossidrilici sull'anello benzo-diidropiranoico ¹³. Svolge anche un ruolo importante nell'aggregazione piastrinica e nella perossidazione lipidica e migliora la biogenesi dei mitocondri.

Grazie alla sua lipofilia può facilmente attraversare la barriera emato-encefalica (BEE) e quindi proteggere dalle malattie neurodegenerative. Ha mostrato diversi effetti farmacologici sul sistema nervoso come agente protettivo da danni ai nervi causati da metalli pesanti come Piombo e Mercurio, ed è stata suggerita per il trattamento della malattia di Alzheimer (AD) ¹³¹⁵¹⁶. Grazie alle sue proprietà antinfiammatorie e antiossidanti offre anche effetti benefici sulle malattie cardiovascolari come ipertensione, aterosclerosi, danno ischemico da riperfusione o cardiotossicità; può

proteggere le cellule dallo stress del reticolo endoplasmatico e dall'apoptosi indotta dalle micotossine alleviando la loro tossicità¹³.

Attualmente il suo estratto viene usato anche come integratore alimentare e come ingrediente terapeutico per il diabete associato all'obesità e alla disfunzione circolatoria; è stato dimostrato che è in grado di inibire la produzione di grasso grazie al suo effetto pleiotropico che coinvolge l'inibizione dell'assorbimento intestinale del glucosio, la secrezione di insulina, l'attività di sensibilizzazione all'insulina e il miglioramento dell'utilizzo del glucosio nei tessuti periferici¹³.

Studi in vivo ed in vitro hanno scoperto che la quercetina ha anche attività antibatterica e riduce in modo molto efficace la formazione di biofilm, inibendo l'espressione dei geni correlati¹³.

È presente in letteratura un lavoro del vincitore premio Nobel Jhon Walker in cui si identificano, tramite studi di co-cristallografia a raggi X e analisi di inibizione multipla, nuovi siti di legame per la Quercetina ed altri inibitori polifenolici di ATP sintasi, che competono per il sito di legame B¹⁷.

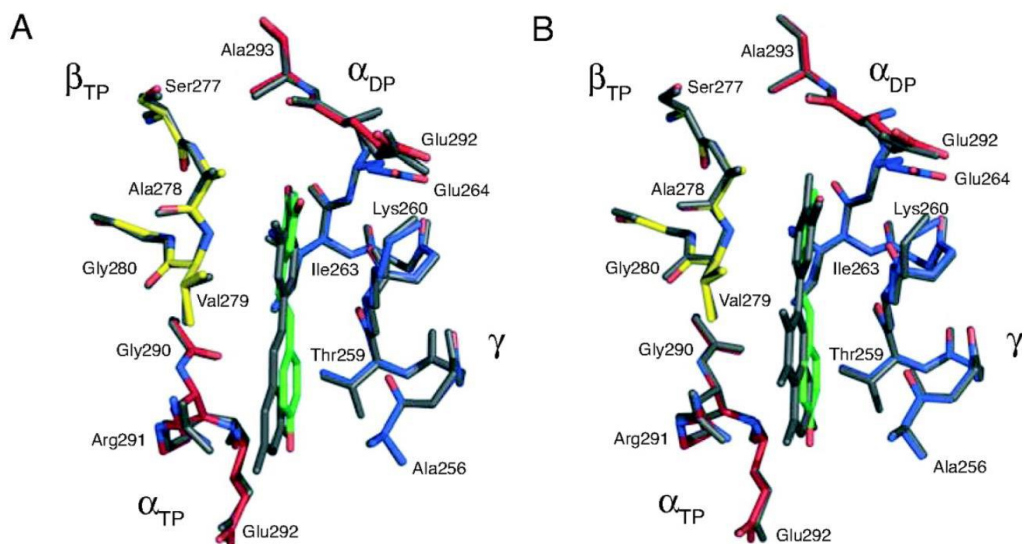


Figura 6. Confronto delle modalità di legame alla F₁ATPasi bovina di Picetannolo e Quercetina con quella del Resveratrolo. (A) principali modalità di legame del Resveratrolo (verde) e del Picetannolo (grigio). (B) principali modalità di legame del Resveratrolo (verde) e cis-quercetina (grigio)

1.1.1.2 Il Cirsiliolo

Il Cirsiliolo (triidrossi-6,7-dimetossi flavone) è un flavonoide presente ad esempio in *Salvia x Jamensis* che mostra effetti pleiotropici come quello antinfiammatorio e antiossidante.

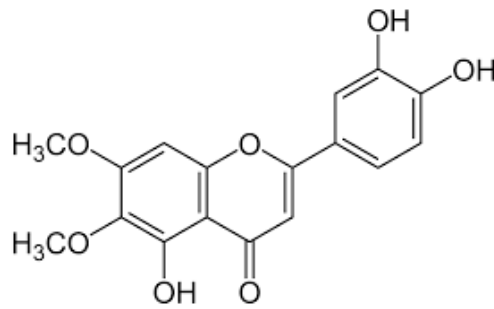


Figura 7. Struttura chimica del Cirsioliolo

Grazie all'utilizzo di segmenti esterni (OS) dei bastoncelli retinici dei mammiferi, che, privi di mitocondri, esprimono ectopicamente il macchinario molecolare per la fosforilazione ossidativa, il gruppo presso il quale ho svolto la mia Tesi di Laurea ha studiato la capacità del flavone di modulare la produzione di specie reattive all'ossigeno da parte della fosforilazione ossidativa. Inoltre è stato anche evidenziato un effetto protettivo da parte del cirsioliolo sulla stabilità della struttura del rodOS, che fa pensare ad un suo potenziale utilizzo contro lo stress ossidativo ¹⁸.

Sono state eseguite delle analisi di docking molecolare che hanno messo in evidenza i siti di legame del cirsioliolo all'interno della porzione F₁ della nanomacchina F₁F₀-ATP sintasi; i risultati hanno mostrato un'elevata inibizione dose-dipendente della produzione di ATP che va ad abbassare la produzione dei radicali liberi, limitando l'effetto dannoso dell'ossidazione alla struttura del bastoncello OS, potendo così proteggere l'intera retina dal danno ossidativo che innesca malattie neurodegenerative retiniche ¹⁸.

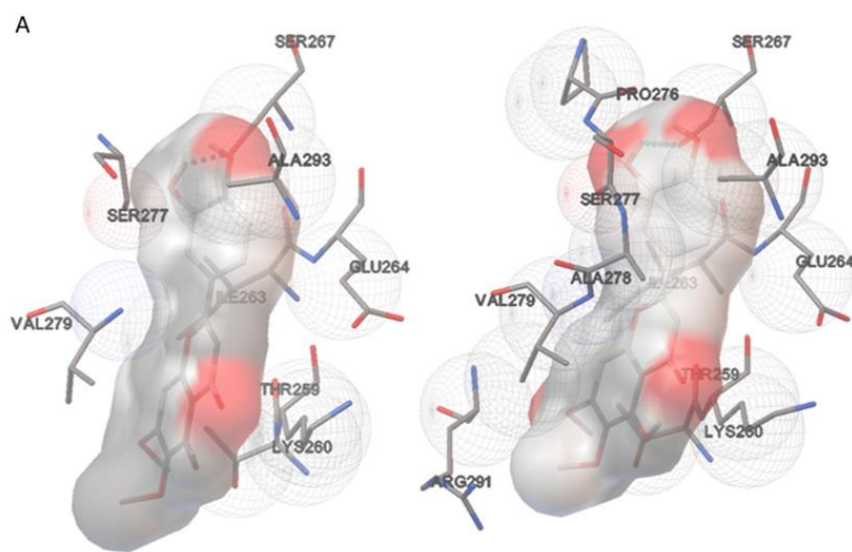


Figura 8. Analisi docking molecolare del Cirsioliolo sulla porzione F₁ della F₁F₀-ATP sintasi. A sinistra: conformazione 1 usando 2JJ2; a destra: conformazione 7 usando 2JIZ. Entrambe le conformazioni mostrano legami idrogeno evidenziati come punti verdi con Ser-267G

Cirsiliolo è presente in molte specie di Lamiaceae con elevata attività citotossica contro linee cellulari tumorali ma il suo potenziale farmacologico è limitato dalla sua bassa solubilità e biodisponibilità. A fronte di ciò è stata dimostrata, attraverso tecniche di microscopia elettronica a scansione, spettroscopia infrarossa, trasformata di Fourier (FTIR) e risonanza magnetica nucleare (NMR) la formazione di un complesso di inclusione cirsiliolo- β -ciclodestrina che porta ad un incremento della sua solubilità, verificato attraverso il metodo UV-Vis. Nello studio dell'attività antitumorale in topi portatori di sarcoma S-180, il complesso è stato ottenuto con il 71,45% aumentando di 2,1 volte la solubilità rispetto alla sua forma libera, e questo ha portato ad un potenziamento dell'inibizione della crescita tumorale di 1,5 volte. Questo studio ha anche mostrato che sia il cirsiliolo sia il suo complesso di inclusione vanno ad avere un forte potenziale antitumorale a basse dosi, senza promuovere effetti collaterali che si osservano comunemente per i farmaci convenzionali come la Doxorubicina¹⁹. Cirsiliolo può essere considerato un composto promettente contro la transizione mesenchimale epiteliale (EMT) nella gestione terapeutica del melanoma maligno in quanto ha mostrato di poter modulare il comportamento aggressivo delle cellule di melanoma metafasico B16F10 indotte da fibronectina, inibendo l'attività e l'espressione della metalloproteinasi-9 della matrice (MMP-9) e sopprimendo la via di segnalazione fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)/proteina chinasi B (nota anche come Akt)/fattore nucleare- κ B (NF- κ B)²⁰. Associato alla prevenzione del cancro anche per aver mostrato la capacità di indurre l'espressione dell'enzima CYP1 nelle cellule di adenocarcinoma mammario umano MCF7 e di venire successivamente convertito dal CYP1B1 o dal CYP1A1 in agente antiproliferativo²¹. È stato rilevato anche come ligando competitivo per i recettori centrali delle benzodiazepine insieme all'estere etilico dell'acido caffeico. Si è visto che estratti di Salvia Guarantica che hanno come principio attivo il cirsiliolo, somministrati per via intraperitoneale nei topi, hanno mostrato effetti sedativi e ipnotici misurati grazie a test del sonno indotti da Pentobarbital, senza dare effetti ansiolitici e miorilassanti^{22,23}.

1.2 LA RESPIRAZIONE AEROBICA

La respirazione è un processo vitale per la normale funzionalità ad ogni livello di organizzazione della vita, dalla cellula all'organismo. Distinguiamo operativamente una respirazione aerobica e la respirazione anaerobica; a differenza di quest'ultima la respirazione aerobica richiede la presenza di ossigeno. Il substrato respiratorio viene scomposto per rilasciare energia; il principale è il glucosio che viene metabolizzato attraverso la glicolisi, il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), la catena di trasporto degli elettroni (ETC) e la fosforilazione ossidativa. Attraverso questi cicli, le cellule sono in grado

di produrre ed immagazzinare ATP e anidride carbonica che si forma come sottoprodotto
24.

1.2.1 La catena di trasporto degli elettroni

La catena di trasporto degli elettroni opera il trasferimento degli elettroni dal NADH (Nicotinammide adenina dinucleotide) all'ossigeno, coinvolgendo quattro complessi proteici I, II, III e IV, che funzionano come enzimi ossidoriduttivi nella catena di trasporto ETC. I complessi I, II e IV pompano quattro protoni nello spazio intermembrana attraverso un meccanismo che porta a cambiamenti conformazionali del complesso. Il complesso V è l'ATP sintasi che, a differenza degli altri complessi, permette la generazione di ATP, piuttosto che il trasferimento degli elettroni ²⁵.

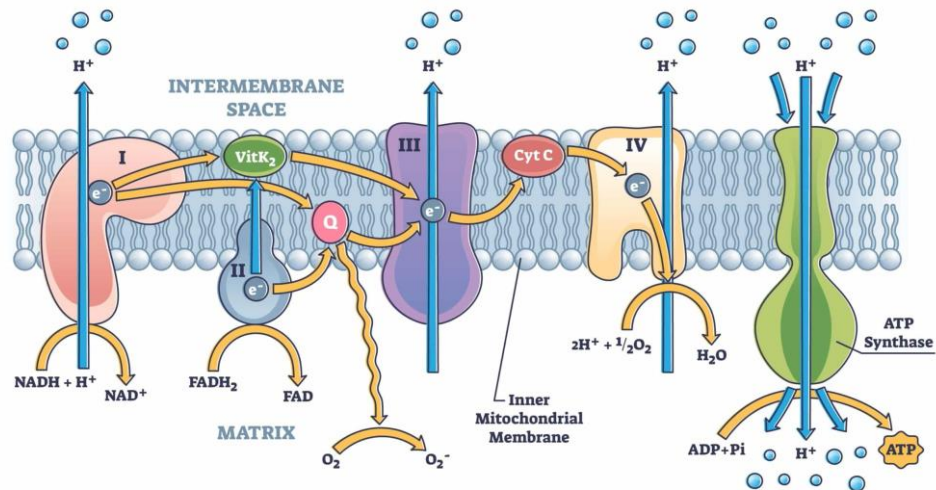


Figura 9. Schematizzazione della catena di trasporto degli elettroni

- **Complesso I : NADH deidrogenasi.**
Si occupa di trasferire una coppia di elettroni all'Ubichinone (Q), partendo dal NADH che viene ossidato a NAD⁺. In particolare, una prima coppia di elettroni viene prima trasportata nella NADH deidrogenasi da un gruppo protesico che è la Flavin mononucleotide (FMN) che deriva dalla Riboflavina (o vitamina B2). Nel complesso la coppia di elettroni viene trasferita in sequenza da un cluster ferro-zolfo (Fe-S) a quello successivo, fino a raggiungere l'Ubichinone che si riduce ad Ubichinolo e viaggia verso il complesso II. Nel mentre l'energia viene rilasciata e utilizzata dal complesso per pompare 4 ioni H⁺ nello spazio intermembrana. I prodotti che si formano consistono quindi in NAD⁺, Ubichinolo (forma ridotta di Co Q10) e 4 ioni H⁺.

- **Complesso II : Succinato deidrogenasi.**
Si occupa dell'ossidazione del succinato a fumarato nel ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA). Questo enzima trasferisce gli elettroni dal FADH₂ all'Ubichinone, grazie ai cluster Fe-S e un cofattore legato, il Flavina adenina dinucleotide (FAD). È un complesso di piccole dimensioni in cui non viene rilasciata abbastanza energia per cui nessuno ione H⁺ viene pompato nello spazio intermembrana. Il FADH₂ entra direttamente nel complesso II, non contribuendo alla formazione del gradiente protonico tanto quanto il NADH.
- **Coenzima Q10.**
È un trasportatore di elettroni idrofobico che può diffondere attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana interna. Ha una struttura benzochinone idrofobica che gli permette di diffondersi liberamente attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana interna. La forma ossidata è indicata come Q (Ubichinone), mentre la forma ridotta che trasporta la coppia di elettroni è indicata come QH₂ (Ubichinolo). Quando l'Ubichinolo arriva al complesso successivo si ossida nuovamente ad Ubichinone. Si occupa di trasportare gli elettroni del complesso I e del complesso II al complesso III.
- **Complesso III : Citocromo C riduttasi.**
Si occupa della riduzione del citocromo C ed è formato da diverse molecole fra cui il citocromo B e molti cluster Fe-S coinvolti nel trasferimento degli elettroni al citocromo C. Il trasferimento degli elettroni avviene dall'Ubichinolo al citocromo, seguito dal pompaggio di 4 ioni H⁺ nello spazio intermembrana. Nonostante l'Ubichinolo possa rilasciare due elettroni, il citocromo ne può accettare soltanto uno, è perciò presente in forma dimerica. Il processo di riduzione del citocromo C attraverso il complesso III è detto ciclo Q.
- **Complesso IV : Citocromo C ossidasi.**
Ossida il citocromo C, e contiene più gruppi eme, cofattori e subunità. Gli ioni metallici dei gruppi eme (Rame e Ferro) sequestrano un atomo di ossigeno all'interno del complesso. L'azione enzimatica permette il trasferimento di elettroni dalle molecole del citocromo C all'atomo di ossigeno che funge da ultimo accettore di elettroni. In particolare, due ioni H⁺ vengono estratti dalla matrice e trasferiti all'atomo di ossigeno ridotto, formando una molecola di acqua (H₂O). Contemporaneamente vengono pompati 4 ioni H⁺ nello spazio intermembrana.
- **Citocromo C.**
È una piccola proteina idrofila estrinseca della faccia esterna della membrana interna mitocondriale, che trasporta elettroni e viaggia liberamente attraverso lo spazio intermembrana spostandosi sul bilayer. È denominata citocromo per la struttura del gruppo eme; contiene un atomo di Ferro circondato da un anello di

Porfirina. La riduzione e l'ossidazione dell'atomo di ferro tra gli stati di ossidazione Fe^{2+} e Fe^{3+} consentono al citocromo di trasportare singoli elettroni.

- **Complesso V : ATP sintasi.**

Si occupa della sintesi di ATP attraverso la conversione dell'energia potenziale in energia meccanica ed energia chimica, grazie alla rotazione della subunità F_1 spinta dai protoni che tentano di rientrare nella matrice. È formata da diverse subunità proteiche, che si organizzano in due porzioni: F_0 ed F_1 . La porzione F_0 idrofobica è radicata nel doppio strato fosfolipidico e contiene un canale per gli ioni H^+ per passare attraverso la porzione idrofila F_1 che rappresenta il sito catalitico principale. È formata da una struttura anulare di tre dimeri di subunità α e β rotante che circonda la subunità γ . Gli ioni H^+ viaggiano quindi dalla porzione F_0 alla porzione F_1 e a loro volta forzano la rotazione della porzione F_1 che catalizza il legame di ADP e fosfato inorganico (Pi) per produrre ATP. Questo fenomeno è detto binding-change.

1.2.2 Le specie reattive dell'ossigeno

Attraverso le reazioni redox che avvengono all'interno dei complessi della catena di trasporto degli elettroni si formano, come sottoprodotti, le specie reattive dell'ossigeno indicate come ROS, che contribuiscono al danno della membrana cellulare e alla senescenza cellulare.²⁵ Esistono numerosi tipi di ROS fra cui l'anione superossido O_2^- , il perossido di idrogeno H_2O_2 , il radicale ossidrilico $HO\cdot$ e l'ossido nitrico NO che appartiene anche alle specie reattive dell'azoto (RNS). La loro generazione è causata principalmente dalla perdita di elettroni nella catena di trasporto ETC. In condizioni fisiologiche, lo 0,2-2% degli elettroni nell'ETC non può essere trasferito normalmente, ma fuoriesce dall'ETC e interagisce con l'ossigeno per formare O_2^- o H_2O_2 ²⁶.

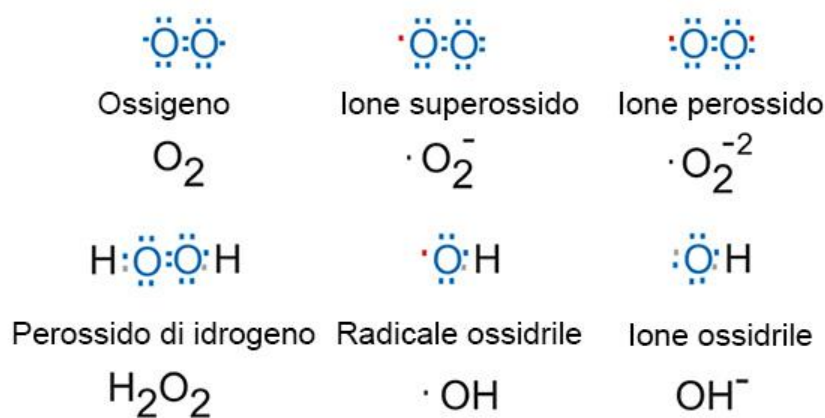
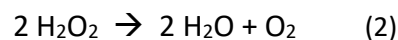
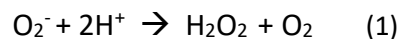


Figura 10. ROS più noti ed importanti

I ROS vengono generalmente considerati metaboliti tossici ed uno dei fattori trainanti di patologie come cancro, diabete e malattie cardiovascolari.²⁶ Tuttavia possiedono anche funzioni vitali nella normale fisiologia, come fattori coinvolti nella proliferazione e la differenziazione cellulare, l'espressione genica, la modificazione proteica post-traduzionale, l'omeostasi e l'adattamento all'ipossia e la stessa difesa antiossidante.²⁶ Nonostante ciò, la cellula possiede potenti mezzi per eliminarli²⁷. Esiste un sistema di controllo per mantenere l'equilibrio tra la produzione ed eliminazione dei ROS; si tratta del sistema di scavenging ROS che può ridurre il danno da stress ossidativo. La difesa antiossidante comprende sistemi endogeni ed esogeni, formata da una componente non enzimatica di cui fanno parte antiossidanti idrofili e lipofili come tocoferolo, acido ascorbico, coenzima Q10 riducente e il glutatione, e da una componente enzimatica che include principalmente la superossido dismutasi (SOD), la glutatione perossidasi (GPX), la perossiredossina (PRX) e la catalasi (CAT). Quando la concentrazione intracellulare di ROS è elevata interviene in primo luogo il sistema di difesa antiossidante; ad esempio O_2^- può essere dismutato in H_2O_2 dalla superossido dismutasi Mn^{2+} -dipendente (Mn-SOD, mitocondriale o dalla Cu-Zn-SOD citosolica) (1); H_2O_2 viene rimosso da PRX e GPX che possono essere rigenerati dal glutatione (GSH) e dalla tioredossina (TRX). La CAT, che esiste principalmente nel perossisoma cellulare, ha come ruolo principale quello di promuovere la decomposizione di H_2O_2 in O_2 e H_2O (2)²⁶.



1.2.3 La fosforilazione ossidativa

La fosforilazione ossidativa è un processo cellulare che genera legami fosfato ad alta energia sotto forma di adenosina trifosfato (ATP) attraverso la riduzione dell'ossigeno. Questo avviene grazie ad una serie di reazioni di ossido-riduzione che coinvolgono gli elettroni di trasferimento da NADH e $FADH_2$ all'ossigeno, attraverso complessi proteici, metallici e lipidici nei mitocondri che costituiscono la catena di trasporto degli elettroni (ETC). NADH e $FADH_2$ si generano da diversi processi cellulari catabolici. L'ossigeno elementare è utilizzato come agente ossidante finale e accettore di elettroni²⁵.

1.2.3.1 Fosforilazione ossidativa mitocondriale

La fosforilazione ossidativa mitocondriale coinvolge tre concetti fondamentali: l'elettronegatività, le fonti di riduzione di NADH e $FADH_2$ e l'anatomia del mitocondrio.

- Elettronegatività
L'ossigeno è altamente elettronegativo, ovvero ha un'elevata capacità di attrarre una coppia di elettroni leganti; data la sua alta disponibilità nell'atmosfera, l'ossigeno elementare viene utilizzato come accettore finale di elettroni nella fosforilazione ossidativa.
- NAD+ (nicotinammide adenina dinucleotide) e FAD+ (flavina adenina dinucleotide)
Sono i coenzimi portatori degli elettroni liberi (non legati a membrana) presenti nel citoplasma cellulare e nella matrice mitocondriale. Si riducono attraverso varie reazioni come glicolisi, ciclo dell'acido tricarbossilico (acido citrico) e la beta-ossidazione degli acidi grassi. Si generano NADH e FADH₂ ricchi di energia che vengono trasportati al mitocondrio, fornendo gli elettroni ad alta energia ai complessi proteici nella catena di trasporto degli elettroni.
- Anatomia del Mitocondrio
Formato da due membrane, interna ed esterna, entrambe sono costituite da doppi strati fosfolipidici e proteine integrali di membrana coinvolte nell'azione enzimatica e trasporto molecolare. La membrana interna ha dei ripiegamenti rivolti verso l'interno che ne aumentano notevolmente la superficie, così da massimizzare la quantità di produzione di energia. I complessi proteici coinvolti sono costellati su questa membrana. Lo spazio intermembrana, fra le due membrane, è il sito di accumulo di ioni idrogeno trasferiti dai complessi proteici della catena di trasporto degli elettroni. L'aumento della concentrazione di ioni idrogeno e la diminuzione del pH generano un potenziale di membrana attraverso la membrana mitocondriale interna, responsabile della sintesi di ATP ²⁵.

1.2.3.2 Fosforilazione ossidativa Ectopica

Attraverso delle proteomiche e biochimiche è stata scoperta l'espressione e l'attività di una F₀-F₁ ATP sintasi ectopica insieme alla catena di trasporto degli elettroni (ETC) e il citocromo c in dischi isolati OS, segmenti esterni dei bastoncelli della retina, in cui avviene la fototrasduzione ²⁸.

Rispetto agli altri tessuti, la retina possiede tassi metabolici più elevati dovuti ai fotorecettori che consumano circa 4 volte più ossigeno rispetto alle altre cellule retiniche o del SNC ²⁹.

Ci sono studi in cui è stata utilizzata l'applicazione della luce blu a lunghezza d'onda corta, come fattore di stress fisiologico in modo da identificare la principale fonte di ROS intracellulare e si è visto che i suoi effetti sono maggiormente esercitati sull'OS che sul segmento interno IS dei fotorecettori. Hanno mostrato un potenziale di membrana simile ai mitocondri attraverso l'uso di coloranti (JC-1 e TMRE) associati normalmente

esclusivamente ai mitocondri; hanno indicato una riduzione del potenziale di membrana in stati ipossici o situazioni di stress cellulare ³⁰.

Resveratrolo, Curcumina, Quercetina ed Epigallocatechinagallato hanno mostrato di inibire l'ATP sintasi ectopica espressa nell'OS, oltre ad inibire anche il suo consumo di ossigeno ²⁹.

1.2.4 ATP sintasi

F₁F_o-ATP sintasi/ATPasi è una macchina molecolare che accoppia la sintesi di ATP da ADP e fosfato inorganico (Pi) o l'idrolisi di ATP al consumo o alla produzione di un gradiente elettrochimico transmembrana di protoni, noto come forza motrice protonica (pmf) ³¹.



È un enzima ubiquitario che si trova incorporato nella membrana cellulare batterica, nelle membrane tilacoidali dei cloroplasti e nelle membrane interne mitocondriali negli eucarioti ³². Le F₁F_o-ATP sintasi appartengono ad una famiglia di proteine rotanti, formata da ATPasi di tipo F, V e A, le quali si classificano in base alla loro funzione e origine tassonomica, ma sono correlate fra loro sia nella struttura che nel meccanismo ³³.

- ATPasi di tipo F
Sintetizzano ATP, sfruttando il gradiente protonico generato durante la catena respiratoria con il pompaggio di ioni H⁺ fuori dalla matrice (mitocondri) o dalla fotosintesi (cloroplasti), ma sono anche capaci della reazione inversa di idrolisi dell'ATP.
- ATPasi di tipo V (o vacuolari)
Utilizzano energia che deriva dall'idrolisi di ATP per pompare protoni attraverso le membrane; sono localizzate nelle membrane intracellulari dove acidificano i compartimenti intracellulari come ad esempio i lisosomi; si trovano anche nella membrana plasmatica per il trasporto di protoni da cellule altamente specializzate, come cellule renali o osteoclasti.
- ATPasi di tipo A
Contenute negli Archea, eseguono sia la sintesi che l'idrolisi di ATP come le F-ATPasi ³³.

Mostra due domini funzionali: il settore F_1 , complesso catalitico globulare idrosolubile situato nella matrice mitocondriale e formato da 5 subunità ($\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta$ ed ϵ), con il sito catalitico situato sulla subunità β , e il sottocomplesso F_0 costituito da diverse proteine di membrana (a, b, c, d, F6 e A6L) legate alla membrana interna, che comprendono la proteina conferitrice di sensibilità all'Oligomicina (OSCP)³². Le subunità γ, δ ed ϵ costituiscono il gambo centrale del complesso V, mentre le subunità b, d, F6 e OSCP formano il gambo periferico che si trova su un lato del complesso. La struttura dettagliata della maggior parte di queste subunità del complesso mitocondriale bovino è stata risolta dagli studi cristallografici a raggi X condotti da John Waker e dal suo gruppo¹⁷.

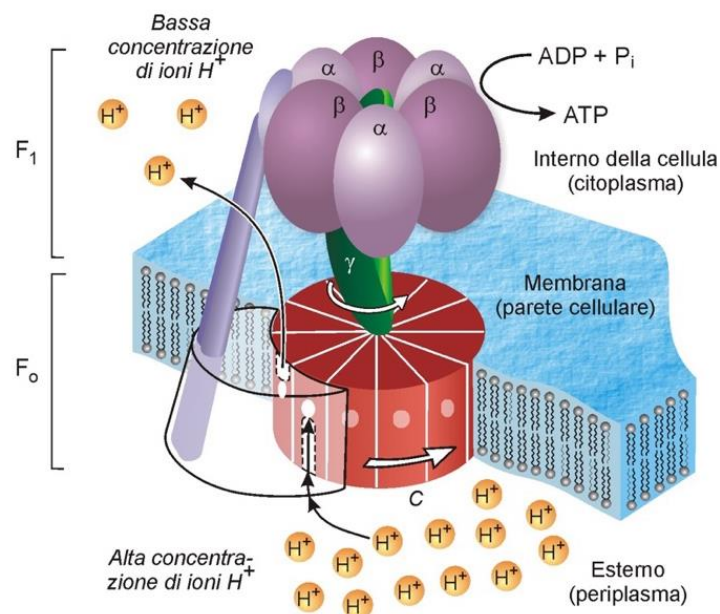


Figura 11. illustrazione schematica dell'enzima ATP sintasi

F_1F_0 sono motori molecolari che esercitano una coppia rotazionale l'uno contro l'altro; quando il gradiente protonico è sufficiente, l'enzima catalizza la sintesi di ATP, mentre quando il potenziale fosfato predomina, F_1 inverte la rotazione di F_0 per costruire un potenziale di membrana³⁴.

I protoni passano F_0 attraverso la subunità all'anello c; la rotazione della subunità γ fornisce l'energia per la sintesi di ATP. Questo è detto "catalisi rotante" e può essere spiegata con il meccanismo del "binding-change", proposto per la prima volta da Boyer.

Questo meccanismo descrive la sintesi di ATP e l'idrolisi nei siti catalitici, situati in ciascuna delle tre subunità β , all'interfaccia con una subunità α adiacente. Nel caso della sintesi, ogni sito cambia in modo cooperativo attraverso conformazioni in cui ADP

e Pi si legano, l'ATP si forma e quindi viene rilasciato. L'idrolisi usa la stessa via ma al contrario. L'esamero $\alpha_3\beta_3$ deve rimanere fisso rispetto alla subunità α durante la catalisi, questo avviene attraverso il gambo periferico. Il complesso V può quindi essere diviso meccanicamente in due componenti che sono il "rotore" (c-ring, γ , δ , ϵ) e lo "statore" ($\alpha_3\beta_3$, a, b, d, F6, OSCP) ³³.

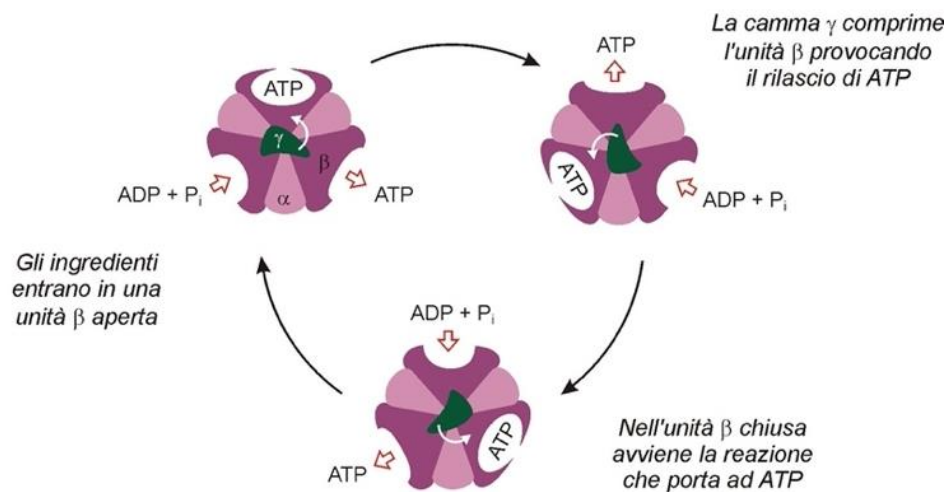


Figura 12. Illustrazione schematica della sintesi di ATP

Indipendentemente dal tipo di cellula in cui si trova, la testa F_1 contiene 3 subunità β catalitiche e di conseguenza, completa la sua rivoluzione in tre passi di 120° ; gli stati rotativi intermedi sono determinati dall'anello rotore F_0 , ovvero dal numero di subunità c che compongono l'anello. Ogni subunità c possiede un sito di legame per uno ione che attraversa la membrana e trasloca uno ione per giro o per ATP sintetizzato o idrolizzato. Nel mitocondrio il rapporto di accoppiamento ione-ATP è correlato al rapporto P/O, ovvero il numero di ATP sintetizzato per ogni coppia di elettroni ³⁵. Un modello di lavoro della nanomacchina accettato è quello a due semicanali in cui il percorso conduttore di H^+ di F_0 è formato da due emicanali nella subunità a e i siti di legame H^+ sull'anello c sono situati su ogni singola subunità c . La forza motrice protonica permette l'ingresso di H^+ dal semicanale che si affaccia sul periplasma e raggiunge il sito di legame della subunità c ; dopo una rivoluzione dell'anello c , H^+ legato viene trasferito all'altro semicanale rivolto verso il lato citoplasmatico e viene rilasciato nello spazio citoplasmatico ³⁶.

1.2.5 Inibizione della produzione di ATP

A causa della struttura complessa dell'ATP sintasi, esistono una serie di suoi inibitori naturali e sintetici. La disregolazione della sua espressione, della sua attività o localizzazione è legata a varie malattie umane fra cui cancro, diabete, morbo di Alzheimer e

Parkinson. È inoltre un nuovo e praticabile bersaglio farmacologico per lo sviluppo di antimicrobici, come è stato evidenziato dalla Bedaquilina approvata nel 2012 per il trattamento della Tuberculosis, ma anche ad esempio Resveratrolo, Picetannolo e Oligomicina³⁷.

Resveratrolo, inibitore polifenolico, si lega tra la subunità β e la regione c-terminale della subunità γ ³⁸.

Picetannolo, simile al Resveratrolo, interagisce sulla tasca creata dalle subunità α e β dello statore e della regione carbossilico-terminale della subunità γ (rotore).

Entrambi hanno mostrato inibizione sia dell'attività dell'ATP sintasi sia la sintesi di ATP³⁸.

Bedaquilina, colpisce l'ATP sintasi micobatterica legandosi a uno specifico sito di legame sulla subunità c, impedendo così il movimento rotatorio della subunità durante la catalisi, o in alternativa all'interfaccia tra la subunità oligomerica c e la subunità a. Inoltre è stato riportato che può legare anche la subunità ϵ . Ha un effetto selettivo, funziona soltanto contro i micobatteri, ha un effetto antibatterico limitato o addirittura nullo contro batteri patogeni come *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*, o *E. coli* (Gram-positivi) e *Helicobacter pylori* *Haemophilus influenzae* (Gram-negativi). Uno studio ha mostrato che può inibire anche l'ATP sintasi mitocondriale, per far fronte a questi effetti collaterali si suggerisce di produrre derivati con una maggiore specificità verso l'enzima del *Mycobacterium Tuberculosis* e ridurre l'effetto dannoso sulla salute umana³⁸.

Oligomicina si lega alla subunità c, ciò dimostra che l'OSCP è in grado di modulare la conduttanza protonica all'interno di F_0 . È stato dimostrato che anche il 17 β -estradiolo lega l'OSCP; questa interazione riduce l'efficienza della sintesi di ATP che potrebbe essere invertita dall'Oligomicina, ma non dal Resveratrolo ed è stata attribuita ad un aumento del disaccoppiamento intrinseco dell'enzima³⁴.

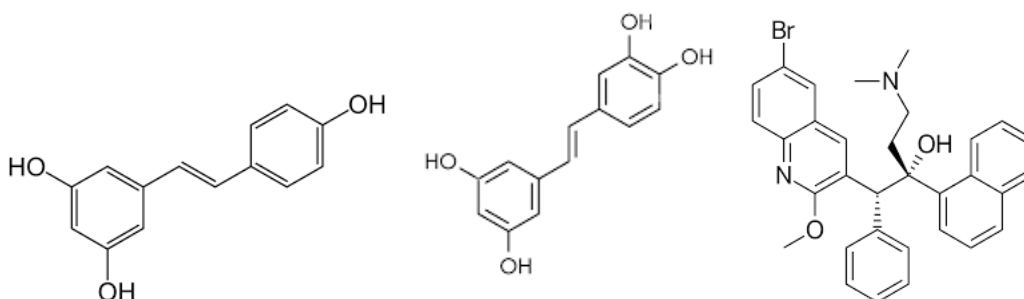


Figura 13. Struttura chimica di Resveratrolo (a), Picetannolo (b) e Bedaquilina (c)

L'Oligomicina è un potente agente antibiotico e antitumorale, tuttavia le sue applicazioni sono limitate dalla sua elevata tossicità e dalla sua bassa biodisponibilità. È un reagente mitocondriale che si lega al canale protonico sulla componente F_0 dell'ATP sintasi, bloccando la sintesi mitocondriale dell'ATP, la traslocazione protonica e l'assorbimento di O_2 . Il disaccoppiamento indotto in seguito all'inibizione della sintesi di ATP si osserva nelle cellule che metabolizzano il piruvato o il lattato ed è invertito dall'aggiunta di glucosio per ripristinare la sintesi di ATP⁴⁰. L'OSCP (o subunità δ nei procarioti) è la proteina che conferisce la sensibilità all'Oligomicina necessaria affinché il complesso enzimatico mostri sensibilità alla molecola che, interagendo, interrompe l'accoppiamento strutturale fra F_0 e F_1 ³⁴. Inibisce entrambe le modalità di funzionamento del motore a membrana. È stato suggerito come meccanismo che l'Oligomicina si diffonde lateralmente all'interfaccia membrana-acqua e, dopo aver incontrato l'anello c, si aggancia ai siti di legame protonico esposti all'interno del doppio strato lipidico. Una volta legato, l'inibitore conserva un microambiente anfipatico, formando interazioni specifiche con la proteina. Una di queste interazioni specifiche è mediata da una molecola di acqua che molto probabilmente origina dallo strato di idratazione dell'inibitore non legato e che fornisce un ponte di legame idrogeno tra Glu59 protonato e l'inibitore. L'Oligomicina diventa quindi un componente integrale della struttura di coordinamento protonico all'interno dei siti di legame dell'anello c. Mentre l'anello c ruota, il sito che trasporta Oligomicina alla fine incontra la subunità a e a questo punto interrompe un'ulteriore rotazione; se il sito con l'Oligomicina legata non può essere sistemato all'interfaccia a/c, l'inibitore compromette la rotazione dell'anello per ingombro sterico, se invece entra nell'interfaccia a/c, blocca il rilascio dei protoni perché il legame con l'Oligomicina richiede la protonazione del sito⁴¹.

1.3 I BATTERI

Tutti i batteri sono organismi unicellulari che si riproducono per fissione binaria. Le cellule batteriche sono estremamente piccole e le loro dimensioni vanno da 1-1,3 μ m x 3-10 μ m per le cellule grandi come il *Bacillus anthracis* a 0,2 μ m x 0,2-0,7 μ m per le cellule molto piccole come *Pasteurella tularensis*; esistono anche i micoplasmi (responsabili della polmonite atipica) che sono ancora più piccoli, misurando da 0,1 a 0,2 μ m di diametro. I batteri hanno quindi un rapporto superficie-volume molto elevato pari circa a 100.000⁴². Trovandosi in ambienti spesso imprevedibili e ostili, per sopravvivere hanno sviluppato un involucro cellulare complesso che li protegge ma allo stesso tempo permette il passaggio selettivo di nutrienti dall'esterno e di prodotti di scarto dall'interno. Nel 1884 Hans Christian Gram sviluppò una procedura di colorazione, ancora oggi utilizzata, con cui vengono classificati quasi tutti i batteri in due grandi gruppi: Gram-positivi e Gram-negativi. Questa tecnica colorimetrica consiste nell'utilizzo del cristal-violetto come colorante primario, iodio come fissante del colorante attraverso la formazione del complesso iodio-cristal violetto ed infine un solvente decolorante come etanolo o acetone. Il principio si basa sul fatto che la parete cellulare dei microrganismi Gram-positivi, avendo un contenuto

di peptidoglicano più elevato, trattiene il colorante durante la fase di decolorazione, in quanto il solvente, disidratando la parete, chiude i pori e impedisce la diffusione del complesso colorato; al contrario i Gram-negativi hanno nella parete cellulare un contenuto lipidico più elevato che viene dissolto dal solvente, perdendo così la colorazione primaria. Lo step finale è quello di utilizzare un colorante secondario, la fucsina, per dare ai batteri Gram-negativi, decolorati, una colorazione rosa per facilitarne l'identificazione al microscopio. I Gram-positivi, invece, appariranno al microscopio di una colorazione viola-marrone^{43 44 45}.

Altra informazione per differenziare i batteri è la forma: essa può essere a cocco come per il genere *Staphylococcus* (catalasi-positivo), che cresce grappoli, e *Streptococcus* (catalasi-negativo), che cresce in catene, o a bacillo (o bastoncino). Alcuni bastoncini hanno la capacità di produrre spore, che gli permettono loro di sopravvivere in ambienti ostili anche per molti anni come avviene per i generi *Bacillus* e *Clostridia*, altri, invece assumono una forma più filamentosa e ramificata come accade per i generi *Nocardia* e *Actinomyces*⁴³.

1.3.1 Batteri Gram-negativi

Possiedono tre strati principali : membrana esterna (OM) caratteristica distintiva dei Gram-negativi, parete cellulare del peptidoglicano e la membrana citoplasmatica o interna (IM); i due strati della membrana formano un compartimento cellulare acquoso che Peter Mitchell chiamò periplasma. È uno spazio ricco di proteine e più viscoso del citoplasma; permette ai batteri di sequestrare enzimi di degradazione potenzialmente dannosi come l'RNAsi o la fosfatasi alcalina; contiene anche proteine leganti che partecipano al trasporto di zuccheri e alla chemiotassi, più altre molecole simili agli chaperone che sono coinvolti nella biogenesi dell'involucro.

- OM (outer membrane):
contiene fosfolipidi, glicolipidi e principalmente lipopolisaccaride (LPS) (responsabile dello shock endotossico associato alla setticemia). LPS è un disaccaride della Glucosamina con sei o sette catene aciliche, un nucleo polisaccaridico e una catena polisaccaridica esterna estesa detta antigene O.
Formano un continuum non fluido che funge da barriera per le molecole idrofobiche; insieme alle porine limitano la diffusione di molecole idrofile di più grandi dimensioni, circa 700Da, rendendo l'OM una barriera di permeabilità molto efficace ma selettiva. È connessa al peptidoglicano dalla proteina Lpp (lipoproteina della mureina o lipoproteina di Braun)⁴⁴.

- Peptidoglicano:
è costituito da unità ripetute di due amminozuccheri acetilati che sono la N-acetilglucosammina (NAG) e l'acido N-acetilemuramico (NAM), che formano la porzione polisaccaridica del peptidoglicano, detta anche glicano, reticolate da catene laterali penta peptidiche.
Agenti come enzimi o antibiotici che danneggiano il peptidoglicano causano una lisi cellulare a causa della pressione di turgore del citoplasma; può essere prevenuta in mezzi ad elevata osmolarità. Senza il peptidoglicano la cellula perde la sua forma caratteristica e ciò che ne risulta è detto cellula sferoplastica.
- IM (inner membrane):
è un doppio strato fosfolipidico che si occupa di eseguire tutte quelle funzioni che nella cellula eucariota vengono svolte dai vari organelli intracellulari assenti nei batteri. Comprende proteine che funzionano nella produzione di energia, nella biosintesi lipidica, nella secrezione proteica e nel trasporto. È un doppio strato fosfolipidico ⁴⁴.

I batteri Gram-negativi mostrano una elevata resistenza agli antibiotici e, conseguentemente, assumono un significativo ruolo nella pratica clinica negli ospedali per gli alti livelli di morbilità e mortalità cui sono associati.

Possono raggiungere quasi tutti i distretti dell'organismo umano, come l'apparato digerente, il sistema nervoso, il sistema urinario e il flusso sanguigno causando gastroenterite diarroica fino alla meningite grave. Comprendono Enterobacteriaceae, i non fermentatori, *Neisseria*, *Helicobacter pylori* e *Chlamydia trachomatis*, tutti clinicamente preoccupanti ⁴⁶.

1.3.2 Batteri Gram-positivi

A differenza dei Gram-negativi, i microrganismi Gram-positivi non possiedono la membrana esterna, ma sono circondati da strati di peptidoglicano più spessi; su questi strati si trovano lunghi polimeri anionici detti acidi teicoici, composti in gran parte da glicerolo fosfato, glucosil fosfato o ribitolo fosfato ripetuti ⁴⁴.

Tutti questi polimeri possono rappresentare oltre il 60% della massa della parete cellulare, contribuendo principalmente alla struttura e funzione dell'involucro.

Possiedono inoltre una certa varietà di proteine analoghe a quelle presenti nel periplasma dei Gram-negativi che qui presentano elementi che le trattengono all'interno o vicino alla membrana. Studi condotti su *Staphylococcus aureus* hanno dimostrato che la composizione delle proteine espresse in superficie può cambiare drasticamente a seconda dei segnali ambientali o delle condizioni di crescita, riflettendo l'importante ruolo dell'involucro cellulare nell'adattamento all'ambiente locale ⁴⁴.

Spesso vivono in ambienti difficili proprio come i Gram-negativi e, per resistere alla pressione di turgore esercitata sulla membrana plasmatica, questi microrganismi sono

circondati più volte appunto da strati di peptidoglicano, più spessi di quelli che si trovano nei Gram-negativi.

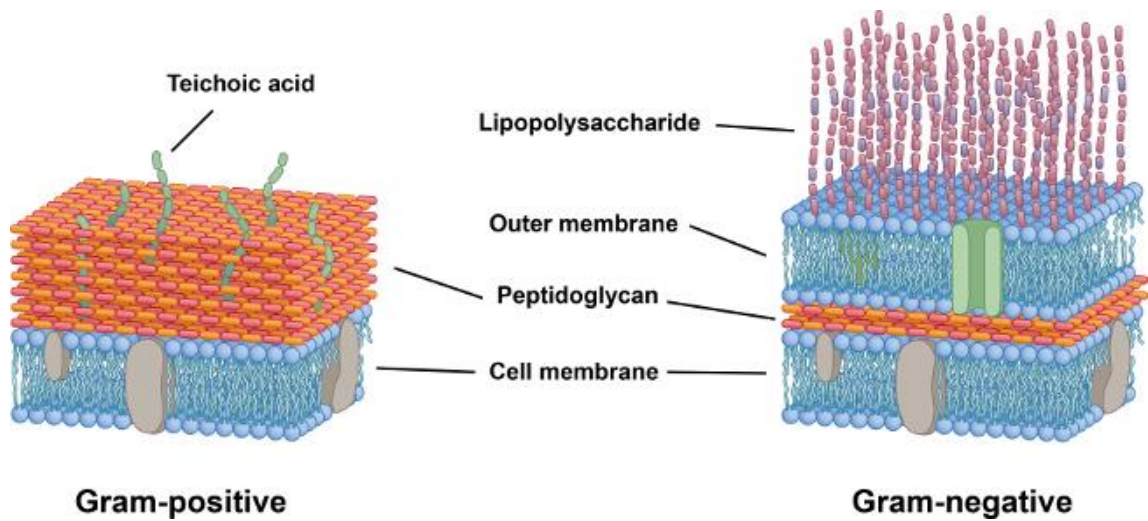


Figura 14. Schematizzazione degli involucri di Gram-positivi e Gram-negativi

1.3.2.1 Stafilococchi

I batteri del genere *Staphylococcus* includono un gruppo eterogeneo di organismi commensali Gram-positivi, non mobili che abitano la pelle e le mucose degli esseri umani e di altri mammiferi. Le sue specie vengono classificate clinicamente in base alla loro capacità di produrre l'enzima coagulasi (coagulasi negativi o positivi) che coagula il plasma legandosi alla protrombina, facilitando la conversione del fibrinogeno in fibrina ⁴⁷.

In genere sono membri benigni della flora naturale, ma molte specie hanno la capacità di essere patogeni opportunisti, infettando principalmente individui che hanno impianti di dispositivi medici o che sono immunocompromessi ⁴⁸.

Le principali infezioni acquisite in ospedale sono causate da *S. aureus* e da *Staphylococcus epidermidis*, principali cause di infezioni chirurgiche e del flusso sanguigno associate a dispositivi medici. La loro problematica principale è correlata alla capacità che hanno entrambe le specie di attaccarsi alle superfici e svilupparsi in strutture note come biofilm ⁴⁸. Rappresentano una comunità di cellule racchiuse all'interno di una matrice esopolimerica che fornisce loro protezione e adesione ad una superficie; questa loro capacità li rende altamente resistenti ai chemioterapici e porta allo sviluppo di malattie croniche. La matrice del biofilm contiene DNA extracellulare proveniente sia da batteri lisati che dalla potenziale morte delle cellule nutrofile dell'ospite ed è suscettibile alla dispersione da parte di DNAsi. Sono state identificate nella matrice del biofilm anche le Adesine, oltre che numerose proteine citoplasmatiche. Componente importante del biofilm stafilococcico è l'adesina

intercellulare polisaccaridica extracellulare (PIA). Essendo questa struttura a base proteica e polisaccaridica risulta suscettibile allo smontaggio da parte di enzimi come proteasi e agenti degradanti polisaccaridici. Secondo il National Institutes of Health (NIH) circa l'80% delle infezioni umane sono basate sulla formazione di biofilm; queste includono osteomielite, endocardite, infezioni da dispositivi medici e persistenza nel polmone della fibrosi cistica ⁴⁸.

1.3.2.1.1 *Stafilococco aureus*

È un batterio coccoide, Gram-positivo, non mobile, coagulasi-positivo del phylum di Firmicutes. Il genere *Staphylococcus* comprende 52 specie e 28 sottospecie, ma *S. aureus* è il più rilevante dal punto di vista clinico. Lo troviamo nel microbiota commensale umano della mucosa nasale nel 20-40% della popolazione. Quando le barriere cutanee e mucose vengono interrotte, ad esempio a causa di condizioni croniche della pelle, ferite o interventi chirurgici, il microrganismo può accedere ai tessuti sottostanti o alla circolazione sanguigna causando infezioni; sono particolarmente soggetti all'infezione persone con dispositivi medici invasivi come cateteri venosi periferici e centrali o con il sistema immunitario compromesso ⁴⁹. Può causare malattie infiammatorie, tra cui infezioni della pelle, polmonite, endocardite, artrite settica, osteomielite e ascessi; può anche causare sindrome da shock tossico, sindrome della pelle scottata e intossicazioni alimentari ⁴³.

1.3.2.1.1.1 MRSA

Lo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) è una delle principali cause di infezioni batteriche sia in ambito sanitario che comunitario. Esistono diversi cloni di *S. aureus* che si sono sviluppati in MRSA tramite trasferimento genico orizzontale del cromosoma contenente la cassetta mec (SCCmec) codificante per i geni mecA o mecC in grado di conferire la meticillino resistenza e di conseguenza anche alla maggior parte degli antibiotici β -lattamici ⁴⁹.

In combinazione alla resistenza β -lattamica e ad altri tipi di antibiotici, gli MRSA presentano spesso anche un ampio arsenale di fattori di virulenza.

Le manifestazioni cliniche vanno dalla colonizzazione asintomatica della mucosa nasale alle infezioni lievi della pelle e dei tessuti molli fino alla malattia invasiva fulminante con elevata mortalità ⁴⁹. Individui con colonizzazione o trasporto di MRSA hanno un aumentato rischio di infezione successiva e sono un'importante fonte di trasmissione da persona a persona.

Trimetoprim/sulfametossazolo, clindamicina e doxiciclina sono antibiotici orali utilizzati per le infezioni da MRSA da lievi a moderate. Vancomicina, linezolid, daptomicina e tigeciclina coprono infezioni da moderate a gravi. Linezolid è

un'opzione se un paziente è allergico alla vancomicina. Il CBC (esame emocromocitometrico) deve essere eseguito settimanalmente per controllare i valori delle cellule del sangue per evitare soppressione del midollo osseo, neutropenia, trombocitopenia e anemia ⁴³.

1.3.2.1.2 Staphylococcus epidermidis

Lo *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) è il membro più frequentemente riscontrato fra gli stafilococchi coagulasi-negativi sulle superfici epiteliali. Eccelle nella produzione del biofilm, che inibisce i principali meccanismi di difesa dell'ospite; produce polimeri superficiali protettivi ed esoenzimi; ha la capacità di secernere membri altamente citolitici della famiglia delle moduline solubili in fenolo (PMS) che però in questo caso partecipano principalmente alla formazione del biofilm; inoltre ci sono prove di una funzione di serbatoio del gene di virulenza del microrganismo, in quanto sembra aver trasferito importanti fattori di evasione immunitaria e resistenza agli antibiotici allo *S. aureus* ⁵⁰.

È una delle specie procariotiche più diffuse sulla pelle umana e sulle membrane mucose che costituiscono la flora commensale; è diventato una delle cause più comuni di batteremia primaria; le infezioni sono difficili da diagnosticare perché l'agente patogeno ha nicchie naturali sulla pelle umana e la capacità di aderire alle superfici inanimate tramite la formazione del biofilm ⁵¹.

È un microrganismo colonizzatore della pelle che non produce fattori di virulenza aggressivi, anzi i fattori che normalmente sostengono lo stile di vita commensale dello *S. epidermidis* sembrano dare origine ad ulteriori benefici durante l'infezione; ha un ruolo nel bilanciamento della microflora epiteliale e funziona da serbatoio di geni di resistenza ⁵².

È sempre più associato ad infezioni tramite dispositivi medici impiantati quali impianti protesici e cateteri che infetta comunemente producendo biofilm ⁴³⁵³.

I livelli di resistenza ai numerosi farmaci acquisiti da questa specie sono oggi allarmanti ⁵¹.

1.3.2.1.2.1 MRSE

Lo *S. epidermidis* meticillino-resistente (MRSE) nella maggior parte dei casi clinici isolati in Nord America ha mostrato resistenza all'attacco β -lattamico principalmente a causa della presenza di *mecA*, un gene che conferisce resistenza agli antibiotici β -lattamici in modo simile allo *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA). *MecA* codifica per l'espressione della proteina legante la penicillina 2a (PBP2a) che è assente nei ceppi sensibili ai β -lattamici di *S. epidermidis*.

Un'indagine sulle infezioni da impianti ortopedici ha mostrato che oltre l'80% dei 342 isolati clinici di *S. epidermidis* erano resistenti a penicillina, ampicillina,

cefazolina e cefamandole; inoltre l'MRSE ha una forte capacità di scambiare geni di resistenza ai farmaci, il che porta ad un'ampia diffusione di ceppi multiresistenti. Oggi pochi antibiotici rimangono validi per il trattamento di MRSE; questo fatto spinge disperatamente all'innovazione di nuove strategie antibatteriche.

1.4 GLI ANTIBIOTICI

Gli antibiotici sono farmaci utilizzati per il trattamento di infezioni batteriche e vengono classicamente raggruppati in due categorie in base al loro effetto in vitro: battericidi e batteriostatici.

Per definire correttamente queste due categorie è necessario comprendere il concetto di minima concentrazione inibente (MIC) che rappresenta la concentrazione più bassa che inibisce la crescita batterica nelle 24 ore e la concentrazione battericida minima (MBC) che rappresenta la concentrazione di un antibiotico che riduce la densità batterica di 1000 volte nelle 24 ore. Si parla di attività batteriostatica quando MBC/MIC è maggiore di 4 e di attività battericida quando MBC/MIC è inferiore o uguale a 4.

L'attività battericida può dipendere dalla concentrazione, come nel caso di fluorochinoloni o daptomicina la cui efficacia di uccisione batterica aumenta con l'aumentare della concentrazione della molecola, oppure dal tempo, come nel caso di penicilline e tetracicline, la cui attività battericida è determinata dalla durata della concentrazione efficace delle molecole ⁵⁴.

Importante per l'effetto terapeutico di un antibiotico è anche una valutazione del sito dell'infezione da trattare; ad esempio, nel trattamento della meningite è necessaria una molecola che sia in grado di penetrare la barriera emato-encefalica (BEE) e quindi che abbia un carattere lipofilo ⁵⁴.

Sono generalmente batteriostatici: tetracicline, macrolidi, clindamicina, trimetoprim/sulfametazolo, linezolid. Funzionano principalmente attraverso l'inibizione delle vie della sintesi proteica batterica. Il meccanismo primario delle Tetracicline ad esempio è l'inibizione reversibile della subunità ribosomiale batterica 30S che comporta l'arresto della produzione di proteine, inibisce le difese batteriche e permette alle cellule immunitarie di eliminare i batteri offensivi; l'efficace combinazione trimetoprim/sulfametazolo impedisce l'elaborazione di acido folico e dei suoi derivati nei batteri, mentre il linezolid possiede un meccanismo unico in quanto si lega al sito P del ribosoma 50S impedendo la formazione nel complesso fMet-tRNA ribosomiale batterico bloccando la sintesi proteica, senza dare resistenza crociata con altre classi di antimicrobici. Quest'ultimo è ben tollerato dalla maggior parte della popolazione, ma ha mostrato una correlazione con il rischio di sviluppo della sindrome serotoninergica e in alcuni casi una neuropatia periferica irreversibile ⁵⁵.

Tra gli antibiotici battericidi troviamo ad esempio la famiglia delle cefalosporine, strutturalmente correlate alle penicilline, che presentano un anello tiazolidinico e uno

β -lattamico e una catena laterale variabile. Si legano alle proteine leganti la penicillina sui batteri inibendo la sintesi della parete cellulare batterica e causandone lisi cellulare. Hanno una più ampia attività rispetto alle penicilline standard, ma sono anche sensibili alla β -lattamasi responsabile dell'antibiotico-resistenza ⁵⁶.

1.4.1 Antibiotico-resistenza

La maggior parte delle resistenze agli antibiotici è determinata geneticamente; i batteri, infatti, acquisiscono o evolvono geni che codificano per vari meccanismi biochimici che li proteggono dalle azioni lesive causate da queste molecole antibatteriche, generando così una resistenza stabile a uno o più antibiotici ⁵⁷.

I batteri hanno ampiamente dimostrato una straordinaria capacità di evolvere rapidamente questi meccanismi di resistenza e l'incidenza di ceppi multiresistenti (MDR), ampiamente resistenti (XDR) e pan-resistenti farmaci (PDR) è in continuo aumento ^{58, 9}.

La resistenza può essere acquisita tramite due principali strategie:

1. Mediante mutazioni specifiche e trasmissione alla prole dei geni di resistenza agli antibiotici (ABR), con trasferimento genico verticale
2. Mediante acquisizione di geni ABR esterni attraverso il trasferimento genico orizzontale (HGT) biofilm che è raggiunto essenzialmente da tre principali meccanismi genetici:

Trasformazione: include il trasferimento del DNA nudo a batteri riceventi competenti e la sua incorporazione nel cromosoma del ricevente mediante ricombinazione omologa; è stato indicato come il principale meccanismo HGT per il trasferimento dei geni di resistenza per *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Acetivobacter*.

Trasduzione: utilizza batteriofagi come veicoli per il trasferimento del DNA. Sembra essere il meccanismo HGT più comune per il trasferimento di geni ABR in *S. aureus*.

Coniugazione: richiede il contatto diretto tra batteri donatori e riceventi, che spesso avviene con l'aiuto di specifiche appendici cellulari o pili. Questo trasferimento di DNA coinvolge più frequentemente elementi genetici mobili come plasmidi, trasposoni e integroni; è probabilmente il meccanismo HGT più efficiente ⁴⁷.

Esiste inoltre un quarto meccanismo di trasferimento orizzontale di plasmidi attraverso vescicole extracellulari (EVs) liberate dalla membrana esterna che è stato descritto per *Acinetobacter baumannii* ed *E. coli* di cui però l'impatto per l'evoluzione dell'ABR non è ancora chiaro ⁵⁷.

I meccanismi principali con cui gli agenti patogeni batterici possono sviluppare resistenza sono:

- Acquisizione o sviluppo di geni che codificano per la produzione di enzimi che inattivano l'antibiotico all'interno della cellula.
Es. Enzimi β -lattamasi che scindono l'anello β -lattamico di Penicilline, Cefalosporine e Carbapenemi.
- Acquisizione o sviluppo di geni che codificano per la produzione di enzimi che inattivano l'antibiotico nell'ambiente extracellulare.
Es. Enzimi inattivanti gli Aminoglicosidi prodotti dai batteri Gram-negativi resistenti che inattivano o distruggono un antibiotico nello spazio extracellulare.
- Sovraespressione dei geni che codificano per la produzione delle pompe cellulari di efflusso che estrudono gli antibiotici dalla cellula.
Es. Gene *mef* in *S. pneumoniae* che regola una pompa di efflusso che estrude i Macrolidi dalla cellula batterica; è uno dei meccanismi più comuni di resistenza ai Macrolidi negli pneumococchi.
- Cambiamenti nell'involucro cellulare attraverso l'acquisizione di materiale genetico che codifica per vie metaboliche che alterano la parete cellulare modificando o eliminando il sito di legame per l'antibiotico.
- Downregulation delle porine di membrana che limita l'accesso del farmaco ai suoi bersagli intracellulari.
- Mutazioni nei geni che codificano per gli stessi bersagli batterici
Es. Batteri resistenti ai fluorochinoloni ^{58 9}.

La continua diffusione di batteri resistenti ai farmaci riduce drasticamente l'efficacia dell'arsenale antibiotico oggi a disposizione e di conseguenza aumenta la frequenza del fallimento terapeutico. È perciò particolarmente urgente la necessità di sviluppare nuovi farmaci terapeutici efficaci. I prodotti naturali continuano ad essere un'importante fonte di potenziali farmaci e candidati a causa della loro diversità strutturale e meccanicistica ⁹.

1.4.2 Fenoli antibatterici

I composti fenolici possiedono una potente attività antimicrobica che può essere significativamente migliorata attraverso una funzionalizzazione della loro struttura molecolare. Attraverso reazioni di esterificazione, fosforilazione, idrossilazione o coniugazione è possibile aumentarne l'attività antimicrobica e ridurre le concentrazioni minime necessarie.

Grazie all'elevata diversità strutturale hanno la capacità di colpire i batteri su più bersagli come la sintesi della parete cellulare, la replicazione del DNA o la produzione di enzimi, aumentando la sensibilità delle cellule patogene.³

A livello di membrana, l'attività dei polifenoli vegetali è favorita dal carattere lipofilo delle molecole, può quindi modificare la permeabilità della membrana legandosi agli enzimi, portando infine a un cambiamento delle funzioni intracellulari.

Quelli con gruppi Pirogallolo, piuttosto che Catecolo o Resorcinolo, hanno una più potente attività antibatterica ³.

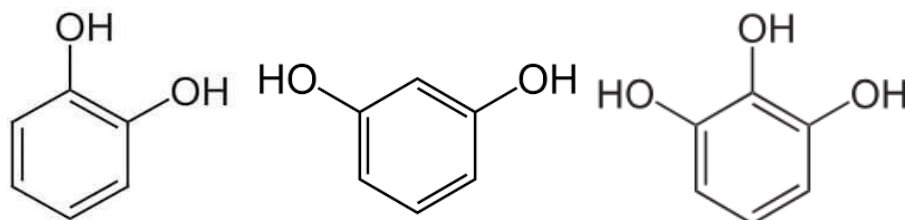


Figura 15. Struttura chimica di Catecolo (a), Resorcinolo (b) e di Pirogallolo (c)

La Quercetina, flavonoide isolato dalle parti aeree di *Tamarix balansae*, ha mostrato attività antibatterica ad ampio spettro contro *S. aureus*, MRSA, *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Escherichia coli*. Lo studio ha rivelato che potrebbe esercitare attività anti-MRSA attraverso la modulazione della proteina legante la penicillina 2a (PBP2a). La Quercetina isolata da *Trianthema decandra L.* ha mostrato una attività pari a quella del Cloramfenicolo contro *P. aeruginosa* e *V. colera*, probabilmente disturbando l'integrità della membrana batterica ⁹.

Il Resveratrolo, antiossidante polifenolico naturale, mostra attività antimicrobica contro una gamma molto ampia di specie batteriche, virali e fungine, sia come singolo che in associazione con antibiotici convenzionali.

A concentrazioni subinibitorie può alterare l'espressione batterica dei tratti di virulenza portando ad una riduzione della produzione di tossine, all'inibizione della formazione di biofilm, alla riduzione della motilità e all'interferenza con il quorum sensing ⁵⁹. Si è visto che in combinazione con gli antibiotici convenzionali aumenta l'attività degli aminoglicosidi contro lo *S. aureus*, mentre antagonizza l'attività letale dei fluorochinoloni contro *S. aureus* ed *E. coli* ⁵⁹.

In vivo, dopo un'applicazione topica ha mostrato la capacità di alleviare lesioni dell'acne causate dal batterio *Propionibacterium acnes* ⁵⁹.

Si lega in modo irreversibile all'ATP sintasi, inibendo parzialmente sia l'idrolisi sia la sintesi di ATP in *E. coli* e in *Mycobacterium smegmatis* ⁵⁹; induce frammentazione del DNA; influenza l'apparato di divisione cellulare sopprimendo l'espressione della proteina ftsZ, importante nella formazione del setto durante la divisione; danneggia la membrana causando perdita di potassio e l'aumento dell'assorbimento di ioduro di propidio (effetto non riscontrato però nello *S. aureus*) ⁵⁹.

1.5 PREMESSA ALLA TESI

Il principale spunto da cui siamo partiti per la progettazione e stesura di questa tesi è stato lo sviluppo di un metodo efficiente per la misurazione quantitativa dell'attività ATP sintasica cellulare dei batteri, attraverso tecniche di bioluminescenza (utilizzo della reazione luciferina-luciferasi). In particolare, il gruppo presso il quale ho svolto la mia Tesi di Laurea ha messo a punto un protocollo per effettuare misurazioni dinamiche della sintesi di ATP in cellule di batteri Gram positivi, a partire da un protocollo messo a punto in *E. coli*, che utilizza una combinazione di shock osmotico e detergenti in modo da rendere le cellule batteriche permeabili a molecole idrofile⁶⁰. Il protocollo che abbiamo utilizzato per la valutazione in tempo reale dell'ATP sintasi batterica è stato messo a punto sulla base dell'unico lavoro reperibile in letteratura del 2006 di Hara e Mori in cui il saggio dell'attività ATP sintasica è stato eseguito su ceppi di *E. coli* Gram-negativi⁶⁰.

Un'altra premessa è stata la nozione di letteratura secondo la quale l'inibizione dell'ATP sintasi è associata all'azione antibatterica, ed è utile per combattere la resistenza antibiotica. Esiste infatti uno studio⁶¹ in cui è stato osservato che, trattando *S. aureus* con un inibitore classico dell'ATP sintasi come Oligomicina A, si ha un incremento dell'effetto antibatterico dato dalla Polimixina B, dimostrando che l'ATP sintasi contribuisce alla resistenza intrinseca dello *S. aureus* verso le Polimixine, ma soprattutto che l'inibizione dell'ATP sintasi sensibilizza *S. aureus* a questo gruppo di molecole terapeutiche. Ciò offre uno spunto per lo studio di nuove applicazioni per antibiotici clinicamente già disponibili ma inapplicabili a causa del continuo aumento dell'insorgenza dell'antibiotico resistenza sviluppata dai batteri⁶¹.

Molecole che hanno attirato molta attenzione negli ultimi anni in questo ambito sono i Polifenoli grazie al loro noto effetto antiossidante dato anche dall'inibizione dell'ATP sintasi³⁷. In particolare, attraverso analisi di docking molecolare, sono stati evidenziati i siti con cui il Cirsiliolo interagisce con la porzione F₁ dell'ATP sintasi, mostrando inoltre un'elevata inibizione dose-dipendente della produzione di ATP che abbassa la produzione di radicali liberi¹⁸.

Essendo la struttura di questa nanomacchina pressoché identica in tutti gli organismi viventi, e considerando l'effetto antibatterico dei flavonoidi, si è ritenuto che l'effetto antimicrobico sia in parte associabile all'inibizione del macchinario enzimatico della ATP sintasi, dal momento che è stato dimostrato, dal lavoro di Martin e Lane del 2010, che i batteri hanno una restrizione bioenergetica del loro genoma e proteoma e, necessitando di una produzione costante di energia per mantenere la loro omeostasi, e avendo un metabolismo molto elevato, qualsiasi riduzione della produzione di ATP risulta essere per loro irreversibilmente dannosa⁶².

Lo scopo di questa tesi è stato pertanto di valutare l'effetto inibitorio dell'ATP sintasi batterica di due flavonoidi con note proprietà antiossidanti, Quercetina e Cirsiliolo, in un saggio enzimatico, che non è mai stato riportato in letteratura, messo a punto dal gruppo presso il quale ho svolto la presente Tesi di Laurea, utilizzando come controllo l'Oligomicina, specifico inibitore dell'enzima. In particolare abbiamo trattato un ceppo di *S.*

aureus meticillino-resistente (MRSA) e uno di *S. epidermidis* meticillino-resistente (MRSE), classi batteriche che mostrano una forte minaccia per la salute umana a livello mondiale. A differenza di questi ultimi, i ceppi da noi studiati, essendo Gram-positivi, presentano diversità strutturali di membrana, fra cui un più spesso strato di peptidoglicano,⁴⁴ che ha richiesto un particolare adattamento per il raggiungimento della permeabilità delle cellule batteriche ad ADP e ATP.

L'importanza dello studio enzimatico dell'attività di questi inibitori sulla ATP sintasi rappresenta una base per lo sviluppo di nuove molecole terapeutiche che agiscano come antibiotici contro l'ATP sintasi batterica o della associazione di tali molecole ad antibiotici già noti ma clinicamente inutilizzabili a causa dell'antibiotico-resistenza sviluppata dai patogeni, oltre che per il trattamento di altri disturbi legati alla regolazione dell'ATP sintasi, tra cui il danno da ischemia ed alcuni tumori⁶³.

2. METODI

2.1 FOTOMETRIA

La fotometria è un metodo di analisi quantitativa che comprende varie tecniche per misurare l'intensità luminosa a seguito di un'interazione fra la materia e una radiazione elettromagnetica. Il principio su cui si basa è l'assorbimento della luce da parte di atomi o molecole che, opportunamente eccitate dalla radiazione che le colpisce, passano a livelli energetici maggiori (fotometria di assorbimento) oppure l'emissione della radiazione luminosa da parte del campione eccitato nel momento in cui torna allo stato di più bassa energia o stato fondamentale (fotometria di emissione). Trattandosi di un'analisi quantitativa ha lo scopo di determinare la concentrazione di una soluzione, basandosi sulla misura della quantità di radiazione assorbita dal campione (o trasmessa) ⁶⁴.

Quando un fascio di luce bianca colpisce un oggetto o una sostanza, esso può essere riflesso, assorbito o trasmesso; il vetro ad esempio trasmette la maggioranza della luce che lo colpisce apparendo incolore, la neve appare bianca in quanto riflette tutta la luce a differenza di un oggetto nero che invece l'assorbe tutta. Le sostanze hanno la capacità intrinseca di assorbire la luce con un particolare colore o lunghezza d'onda. L'assorbimento nell'UV-visibile (200-780 nm) interessa, nelle transizioni energetiche, gli elettroni esterni della molecola che da assorbimento, impegnati o non impegnati in un legame. La parte della molecola coinvolta in queste transizioni è detta cromoforo e solitamente si tratta di anelli eterociclici aromatici, doppi legami coniugati, ponti disolfuro o gruppi chimici funzionali come COOH o NH₂.

L'intensità della radiazione incidente viene indicata con I_0 , mentre l'intensità della radiazione emessa viene indicata con I . La quantità dell'energia luminosa che viene assorbita dal campione sarà proporzionale al numero delle molecole che la radiazione incontra attraversando la soluzione. L'assorbanza può essere calcolata dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon_{\lambda} * C * l$$

Dove:

- A (numero adimensionale) indica l'assorbanza;
- ϵ_{λ} [L/(mol*cm)] indica la costante di proporzionalità, detto coefficiente di estinzione molare; è specifica per una determinata sostanza a temperatura e lunghezza d'onda costanti;
- C (mol/L) indica la concentrazione della sostanza;
- l (cm) indica il cammino ottico, ovvero la distanza che percorre il fascio di luce che attraversa il campione.

Conoscendo i fattori noti, la concentrazione C può essere calcolata partendo dall'assorbanza A della sostanza in relazione alla radiazione emessa I⁶⁴.

L'assorbanza, d'altra parte dipende non linearmente dalla trasmittanza indicata con T, uguale al rapporto fra l'intensità della radiazione luminosa trasmessa e quella incidente; T misura la capacità del campione di farsi attraversare dalla luce e può quindi assumere valori compresi fra 0 e 1, anche se è un valore che spesso viene espresso in percentuale, 0-100 %.

$$T = I/I_0$$

T = 0% quando si tratta di un corpo opaco che impedisce all'energia di raggiungere la fotocellula.

T = 100% quando l'assorbimento è nullo e perciò tutta l'energia incidente raggiunge la fotocellula.

Si può risalire al valore dell'assorbanza anche misurando la trasmittanza essendo:

$$A = -\log T$$

La legge di Lambert-Beer presenta però alcune limitazioni : la luce incidente deve essere monocromatica, l'assorbimento del solvente trascurabile, la concentrazione del campione entro certi limiti e non deve esserci alcuna interazione chimica fra le molecole del campione e del solvente⁶⁴.

Lo strumento che viene utilizzato per condurre un'analisi fotometrica è lo spettrofotometro che mostra il valore dell'assorbanza misurando la quantità di luce che non è stata assorbita dal campione.

2.1.1 Fotometro



Figura 16. Fotometro digitale

Per condurre analisi fotometriche viene utilizzato come strumento il fotometro che è formato da varie componenti:

- Sorgente luminosa policromatica;
- filtro di interferenza con lo scopo di selezionare una banda di lunghezza d'onda più o meno ristretta;
- rilevatore come cellula fotoelettrica o sistema fotomoltiplicatore che è posizionato in modo da non ricevere le radiazioni della sorgente eccitante che attraversano la soluzione;
- eventuale amplificatore;
- galvanometro o un misuratore dei segnali di uscita che vengono trasferiti su un display in forma.

La procedura per un'analisi fotometrica consiste inizialmente nella preparazione di soluzioni standard a concentrazione nota che vengono inserite nelle cuvette per la lettura, lavorando in condizioni sperimentali uguali⁶⁴. Si determina l'assorbanza delle soluzioni a concentrazione nota con cui si crea una retta di calibrazione dalla quale si ricava in seguito la concentrazione del campione da esaminare conoscendo la sua assorbanza letta con il fotometro. La banda di lunghezza d'onda selezionata per la lettura deve essere tale da dare il massimo assorbimento e quindi la massima variazione di assorbanza per variazione di concentrazione.

2.1.2 Nefelometro



Figura 17. Nefelometro

Il Nefelometro è un particolare tipo di Fotometro utilizzato per la misurazione della concentrazione di una sospensione diluita. Sfrutta il fenomeno della diffusione della luce generato dall'incontro fra la radiazione luminosa e la soluzione torbida del

campione. La diffusione in questo caso dà luogo all'Effetto Tyndall che si manifesta quando le particelle in sospensione hanno una dimensione tale da deviare la radiazione incidente in tutte le direzioni⁶⁴. L'intensità e la direzione di propagazione della luce diffusa è influenzata sia da variabili legate alla radiazione incidente come la sua lunghezza d'onda, sia da variabili legate al campione come la dimensione e la forma delle particelle sospese, l'indice di rifrazione e il colore; la lunghezza d'onda della radiazione luminosa diffusa sarà uguale a quella emessa dalla sorgente. Vengono solitamente utilizzati una lampada al Tungsteno come sorgente luminosa e due rilevatori: uno posto con angolazione di 90° rispetto alla luce emessa dalla sorgente per la rilevazione della luce diffusa e uno a 180° per la rilevazione della luce trasmessa. La valutazione della torbidità si basa sulla proporzionalità diretta che, entro certi limiti, esiste fra la diffusione e la concentrazione del campione sospeso⁶⁴.

2.1.3 Luminometro

Quando un atomo o una molecola eccitati, a seguito di un'interazione con una radiazione elettromagnetica, ritornano ad un livello energetico minore (stato fondamentale) emettendo una radiazione luminosa, si parla di Luminescenza. Il Luminometro è uno strumento di analisi quantitativa, progettato per saggi bioluminescenti e chemiluminescenti. Nella Chemiluminescenza la radiazione luminosa viene rilasciata a seguito di una reazione chimica esotermica, mentre ci si riferisce alla Bioluminescenza nel momento in cui la luce viene generata da un organismo vivente, per via enzimatica⁶⁴.

Esistono inoltre altri tipi di Luminescenza classificati in base allo stimolo che comporta la transizione allo stato energetico eccitato :

- Fotoluminescenza, dovuta a radiazioni luminose;
- Radioluminescenza, dovuta a radiazioni ionizzanti;
- Triboluminescenza, causata da azioni meccaniche;
- Elettroluminescenza, dovuta a campi elettrici;
- Termoluminescenza, causata da un riscaldamento a temperatura maggiore rispetto a quella ambientale per attivazione di uno stimolo latente in determinati materiali solidi.

In generale è un processo che non comporta variazioni apprezzabili di temperatura della sostanza.



Figura 18. Luminometro GLOMAX 20/20 (Promega)

Il luminometro è un tipo di fluorimetro in cui sono assenti sia la sorgente luminosa sia il monocromatore. È essenziale la presenza di un compartimento totalmente al buio in cui viene inserita la cuvetta contenente il campione da analizzare, precedentemente agitata per attivare la reazione ⁶⁴. È presente un fotomoltiplicatore specifico per la lunghezza d'onda emessa (562nm) per la registrazione delle letture che saranno in RLU (Unità relative di Luminescenza). L'intensità della luce rilevata sarà direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza di interesse, che può essere rilevata in un range abbastanza ampio compreso fra 10^{-7} a 10^{-10} M.

L'analisi quantitativa sfrutta quindi una reazione chimica a cui può andare incontro la sostanza in esame, generando lei stessa una luminescenza oppure un prodotto che da luminescenza in seguito a una reazione con una sostanza luminescente. In campo biologico sono la Chemiluminescenza e la Bioluminescenza ad essere principalmente utilizzate per le analisi quantitative ⁶⁴.

Un classico esempio di Chemiluminescenza è il dosaggio dell'acqua ossigenata attraverso una reazione con il Luminol (o idrazide dell'acido 3-aminoftalico) che, in seguito ad una reazione di ossidazione, emette una radiazione luminosa blu con lunghezza d'onda di circa 430nm. Questa luminescenza dura circa 30secondi, non ha bisogno di un luminometro e può essere effettuata per reazione diretta sul campione, ma per essere rilevata ha bisogno della quasi totale oscurità.

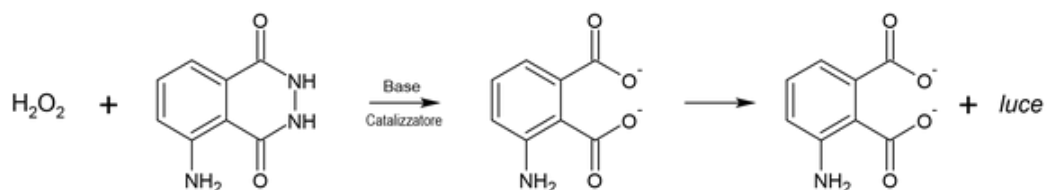


Figura 19. Reazione fra Luminol e H₂O₂

Un esempio di Bioluminescenza invece è quello che sfrutta una reazione catalizzata da una classe di enzimi chiamata Luciferasi, fra cui quella più importante è la Luciferasi di lucciola presente nella specie *Photinus pyralis*. Ha come substrato la Luciferina, un acido organico complesso presente anch'esso nelle lucciole. La Luciferasi catalizza l'ossidazione della Luciferina in presenza di ATP, emettendo una radiazione luminosa fredda che ci permette di risalire alla quantità di ATP presente nel campione, data la proporzionalità diretta fra intensità della radiazione emessa e la concentrazione di ATP nel campione ⁶⁴.

La reazione consiste nella formazione del complesso Luciferina-adenilato, che in presenza di ossigeno forma Ossiluciferina, CO₂, AMP e produce la luce. Dall'Ossiluciferina si rigenera poi Luciferina.

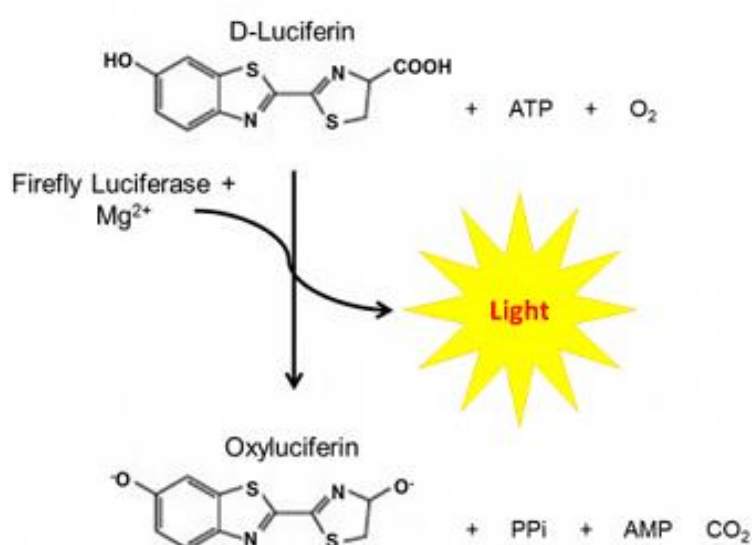


Figura 20. Reazione catalizzata dalla Luciferasi

Il sistema Luciferina-Luciferasi è stato utilizzato da noi in laboratorio per la determinazione in tempo reale della produzione di ATP prodotta dall'ATP sintasi batterica di ceppi MRSE ed MRSA. Per la determinazione di ATP abbiamo utilizzato un Luminometro GLOMAX 20/20 (Promega) e un kit apposito contenente dosi opportune di Luciferasi e Luciferina, in tampone adeguato, l'ATP Bioluminescence Assay Kit (Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, IN).

Questo è un metodo altamente sensibile, in quanto permette di rilevare la quantità di ATP nell'ordine delle femtomoli ed è un sistema che può essere utilizzato per la determinazione di tutte le attività enzimatiche che comportano la produzione di ATP.

2.2 CONDIZIONI DI COLTURA BATTERICA

I ceppi che abbiamo utilizzato sono stati fatti crescere nel terreno Mueller-Hinton II broth, un terreno liquido raccomandato per i comuni batteri aerobi ed anaerobi facoltativi a rapida crescita utilizzando procedure di diluizione in brodo come standardizzato dal CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). Mueller-Hinton II broth ha un basso contenuto di Timina e Timidina e concentrazioni di Ca^{2+} e Mg^{2+} come raccomandato nel documento M7 del CLSI ⁶⁵.

FORMULA TIPICA (*)	(g/L)
Estratto di manzo	3.0
Idrolizzato Acido di Caseina	17.5
Amido	1.5

pH finale 7.3 ± 0.1 a 25°C

*modificata e/o corretta con Sali appropriati per fornire 20-25 mg/l di Ca^{2+} e 10-12.5 mg/l di Mg^{2+}

Tabella 1. Formulazione del terreno Mueller-Hinton

In particolare, l'idrolizzato acido di caseina e l'estratto di manzo rappresentano fonti di amminoacidi, azoto, carbonio, vitamine, minerali ed altri nutrienti che supportano la crescita dei microrganismi; l'amido agisce da sostanza colloidale protettiva contro molecole tossiche eventualmente presenti nel terreno, inoltre, durante la sterilizzazione in autoclave l'amido subisce una reazione di idrolisi che produce una piccola quantità di glucosio usato come fonte di energia ⁶⁵.

Metodo di preparazione : sospendere 22g di polvere di terreno disidratato in 1L di acqua distillata o deionizzata sterile. Mescolare bene. Riscaldare agitando frequentemente e bollire fino a completa dissoluzione. Sterilizzare in autoclave a 121° per 10 minuti. Il terreno disidratato appare omogeneo, di fine granulometria e privo di materiali estranei, mentre il terreno preparato appare giallo chiaro, da limpido a leggermente velato.

Metodo di conservazione : la polvere altamente igroscopica, deve essere conservata a $10-30^{\circ}\text{C}$, in ambiente asciutto, nel suo contenitore originale ermeticamente chiuso. Il terreno pronto deve essere conservato a $10-25^{\circ}\text{C}$ e al riparo dalla luce. Il prodotto non deve essere utilizzato dopo la sua data di scadenza indicata in etichetta oppure se mostra segni di contaminazione o deterioramento ⁶⁵.

I batteri da noi studiati sono stati striati su piastre di agar Columbia e poi controllati per la loro purezza; 5-6 colonie di ogni ceppo sono state inoculate in terreno fresco Mueller-Hinton e incubate ad una temperatura di 37°C per un tempo di 24h prima di essere utilizzati in modo da raggiungere una concentrazione di 10^8 CFU (unità formati colonia).

Terminate queste ore sono state prelevate le aliquote necessarie, centrifugate e, dopo aver eliminato il soprannatante, risospese in soluzione PBS (Phosphate buffered saline o tampone fosfato salino) sterile fino ad ottenere una torbidità rilevata attraverso l'uso di un Nefelometro di 1 Mc Farland corrispondente a 5×10^8 CFU/mL. In particolare, i ceppi da noi utilizzati sono il ceppo A MRSA, ottenuto da emocolture di un paziente dell'Ospedale San Martino di Genova, e il ceppo 178 MRSE, derivante da catetere arterioso impiantato in un paziente dell'ospedale San Martino di Genova, entrambi conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

2.3 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA

La concentrazione proteica di un campione si determina generalmente misurando l'assorbanza UV a 280 nm o facendo reagire quantitativamente la proteina con coloranti e/o ioni metallici (saggi Bradford, Lowry o BCA).

Per le proteine purificate, l'assorbanza UV rimane il metodo più popolare in quanto veloce, conveniente e riproducibile, non consuma la proteina e non richiede reagenti, standard o incubazioni aggiuntivi ⁶⁶.

2.3.1 Metodo Bradford

Il Metodo Bradford viene utilizzato per un'analisi quantitativa del contenuto proteico in un campione, basandosi sulla modifica del massimo assorbimento luminoso del Brilliant Blue G-250 che va da 465 nm a 595 nm quando legato ad una proteina. In particolare, il Coomassie G-250 si lega ai gruppi amminici delle proteine. È un metodo semplice, accurato, veloce, riproducibile, poco costoso e non consuma la proteina. Spesso viene utilizzato in sostituzione al famoso metodo di Kjeldahl che presenta alcuni svantaggi come una lunga durata del procedimento, gravi condizioni di temperatura di reazione e uso di materiali altamente tossici, inoltre coinvolge una reazione di digestione del materiale organico da parte dell'acido fosforico con produzione di ammoniaca che può degradarsi rilasciando urea, indistinguibile dal contenuto proteico naturalmente presente nel campione analizzato ⁶⁷.

La BSA (Bovine Serum Albumin) o Albumina di siero bovino viene utilizzata come standard in quanto economica, di facile disponibilità e possiede un elevato grado di purezza. Il Coomassie Brilliant Blue (o Blu di Coomassie) è un colorante organico eterociclico sintetico che lega stechiometricamente le proteine che incontra, formando complessi con i gruppi amminici liberi e dando un massimo assorbimento a 595nm. La colorazione si sviluppa immediatamente e il complesso che si forma è altamente stabile per circa un'ora ⁶⁷.

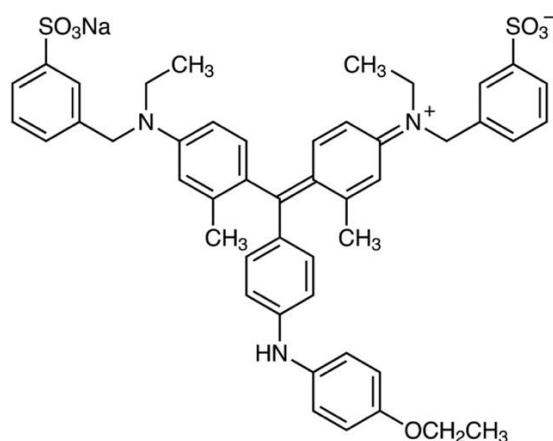


Figura 21. Coomassie Brilliant Blue G-250 $C_{47}H_{50}N_3O_7S_2^+$

La BSA viene utilizzata per la creazione della curva standard ed è fornita ad una concentrazione tarata di 0,1 mg/mL, da cui si preparano le seguenti concentrazioni finali: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$, diluite in un volume di 100 μL di H_2O Milli-Q. Per quanto riguarda i campioni incogniti viene fatta una diluizione 1:10 sempre con H_2O Milli-Q, in un volume finale di 100 μL da cui viene prelevata un'aliquota di 10 μL e aggiunta ad altri 90 μL di Milli-Q.

Sia le soluzioni standard di BSA che i singoli campioni diluiti vengono inseriti in una cuvetta da spettrofotometro a cui vengono aggiunti 900 μL di reattivo di Bradford; si lascia agire per 5 minuti a temperatura ambiente e si procede alla lettura allo spettrofotometro UV-visibile, alla lunghezza d'onda di 595 nm.

Reattivo di Bradford

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

Tabella 2. Composizione del reattivo di Bradford

Il picco di assorbimento si ha nel momento in cui il legame formante il complesso causa uno spostamento verso il rosso nell'assorbimento, rappresentando così la formazione dei legami a idrogeno tra Blu di Coomassie e molecola proteica. Vengono eseguite tre letture su altrettanti campioni (triplicato) e, dai valori medi ottenuti, si ricava, tramite l'utilizzo del foglio di calcolo di Microsoft Office Excel, la curva standard (o retta di regressione) come assorbimento in funzione della concentrazione di BSA. Con i valori medi delle letture riferite ai campioni è possibile, per interpolazione della retta, determinare la concentrazione proteica oppure

procedere con la sostituzione dei valori di y nell'equazione della retta calcolata automaticamente dal programma Excel e verificare l'attendibilità della misura con R^2 ⁶⁷.

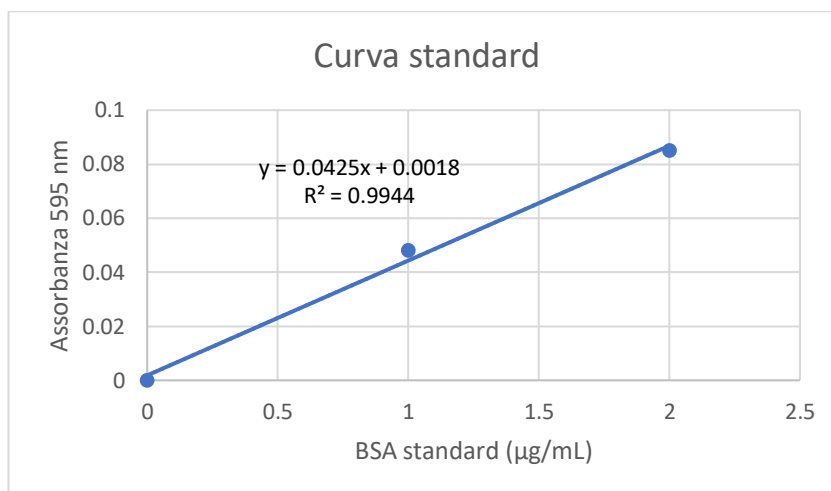


Figura 22. curva standard del Metodo Bradford

È un metodo di misurazione del contenuto proteico con una sensibilità di 0,2-2 µg per millilitro di proteina a seconda della qualità del colore. Il cambiamento di colore a 595 nm è direttamente proporzionale alla quantità delle proteine nel campione in cuvetta a determinate concentrazioni; a livelli elevati i cambiamenti di colorazione non possono più essere correlati alla quantità del materiale organico proteico ⁶⁷.

2.4 PROTOCOLLO DI ANALISI DELLA SINTESI DI ATP IN CONTINUO

Il saggio dell'attività dell'ATP sintasi sui ceppi studiati è stato eseguito seguendo un protocollo da noi stilato sulla base di un adattamento del metodo ad alto rendimento sviluppato da Hara e Mori ⁶⁰. In questo lavoro è stata utilizzata la Bioluminescenza della reazione Luciferina-Luciferasi per la misurazione quantitativa in tempo reale dell'ATP sintetizzato da cellule batteriche Gram-negative di *Escherichia Coli*, sfruttando una combinazione di shock osmotico e trattamento con detergente che ha reso le cellule patogene permeabili all'ATP e all'ADP. Nonostante le cellule permeabilizzate abbiano perso la capacità di crescere, l'attività enzimatica ATP sintasica è stata mantenuta.

L'ATP rilasciato dalle cellule reagiva con la Luciferasi aggiunta esternamente e, dal momento che le cellule utilizzano il glucosio per sintetizzare ed accumulare ATP senza duplicarsi, l'intensità della Bioluminescenza ha mostrato un aumento durante il consumo del glucosio da parte dei batteri. L'attività sintetica dell'ATP cellulare è stata calcolata dalla pendenza della Bioluminescenza crescente.

In particolare gli Autori hanno utilizzato il ceppo K-12 di *E. coli* BW25113 le cui cellule erano coltivate in 1 mL di terreno di Luria-Bertani (LB) contenete 2,8% di glucosio mantenuto a

30°C per 24h. Dopo la raccolta avvenuta per centrifugazione, le cellule erano lavate con una soluzione tampone di Tris-HCl da 100 mM (pH 7,4) e risospese nello stesso tampone. Questa sospensione batterica veniva pretrattata miscelandola con un egual volume di una soluzione contenente 40% [p/v] di glucosio e 0,8% [v/v] di Triton X-100 per 20 minuti a temperatura ambiente (miscela A).

La loro soluzione di dosaggio utilizzata era :

- 0,5 mM di D-Luciferina
- 1,25 g/mL di Luciferasi
- 5 mM di MgSO₄
- 100 mM di acido etilendiamminotetracetico (EDTA)
- 1 mM di ditionitrotolo (DTT)
- 25 mM di soluzione tampone di tricina a pH 7,8

Come si può osservare, il protocollo di cui sopra utilizza Luciferasi e Luciferina commerciali, infatti, all'epoca del lavoro non era ancora disponibile il Kit di dosaggio della Roche (ATP Bioluminescent Assay Kit-Roche Diagnostic Crop., Indianapolis, IN) che è stato da noi utilizzato, il quale contiene dosi opportune di Luciferasi e Luciferina, in tampone adeguato e consente di effettuare misure altamente riproducibili. Dopo una preincubazione di 15 minuti sempre a temperatura ambiente, è stato aggiunto 1/20 del volume di soluzione detergente (8% Triton X-100, 300 mM di fosfato di potassio pH 7,2) alla soluzione di analisi, formando la miscela B. La reazione è stata innescata con l'aggiunta di 10 µL della miscela A in 90 µL di miscela B e la luminescenza è stata misurata con un lettore di piastre multiscopio, Fusion-FP per diversi minuti. Le modifiche da noi apportate, in seguito ad una serie di protocolli tentativo, sono descritte di seguito.

I ceppi trattati come oggetto di questo studio, ceppo A MRSA e ceppo 178 MRSE, entrambi Gram-positivi, sono stati precedentemente coltivati come descritto nel paragrafo 2.2. Terminato il tempo di incubazione di 24 h che ha permesso di raggiungere una concentrazione di 10⁸ CFU (unità formate colonia), i batteri sono stati raccolti per centrifugazione e, dopo aver eliminato il soprannatante, risospesi in una soluzione sterile di PBS (Phosphate buffered saline o tampone fosfato salino) fino a raggiungere una concentrazione di 1 Mc Farland rilevato al Nefelometro, corrispondente a una concentrazione di 5x10⁸ CFU/mL. Per la sospensione non è stato utilizzato il terreno Mueller-Hinton II in cui sono stati fatti crescere, perchè in PBS tendono a mantenere una concentrazione più o meno costante, utile per lavorare sempre nelle stesse condizioni sperimentali; in più, il terreno di coltura darebbe problemi allo strumento utilizzato per la misura di bioluminescenza.

Si prosegue prelevando un'aliquota di 1 mL di sospensione batterica a cui si aggiungono 0,2 g di Glucosio e 1 mL di PBS filtrato, ottenendo così una concentrazione batterica finale di 5x10⁷ CFU/mL. Per evitare un'alterazione del numero dei batteri durante l'esecuzione dell'esperimento, la sospensione viene utilizzata per un tempo massimo di 1h e 30 minuti al termine del quale viene poi scartata e utilizzata una nuova aliquota preparata come descritto in precedenza. È stato dimostrato, grazie alla misurazione del quantitativo

proteico totale eseguito sia all'inizio dell'esperimento che dopo 1h e 30 minuti, che entro questi 90 minuti il numero di batteri in sospensione rimane pressoché invariato .

Dalla sospensione batterica sono state prelevate aliquote da 35 μ L a ognuna delle quali si aggiungono il detergente Triton X-100, DMSO nei controlli e Cirsiliolo, Quercetina o Oligomicina nei campioni, nelle quantità indicate in tabella 3, e infine 15 μ L di H₂O Milli-Q per ottenere uno shock osmotico che promuove, in associazione al detergente, la permeazione delle cellule batteriche. Si attendono 4 minuti per poi aggiungere il Kit Luciferina-Luciferasi e l'Adenosina Difosfato (ADP) come substrato; infine si eseguono le letture in RLU/ μ mol al Luminometro che vengono rilevate ogni 15 secondi per un totale di 1 minuto.

Protocollo:

- Prelevare 35 μ L di sospensione batterica
- Aggiungere 1,25 μ L di Triton X-100 al 20%
- Aggiungere l'inibitore o il controllo (Cirsiliolo/Quercetina/Oligomicina/DMSO)
- Attendere 4 minuti (8 minuti per l'Oligomicina)
- Aggiungere H₂O Milli-Q
- Attendere 4 minuti
- Aggiungere il kit Luciferina-Luciferasi in un volume uguale a quello della soluzione a cui viene aggiunto
- Aggiungere il substrato ADP
- Agitare la provetta e inserirla nello strumento per le letture (abbiamo eseguito una lettura ogni 15 secondi per un totale di 1 minuto)

	Madre	Controllo	Cirsiliolo 25µM	Cirsiliolo 100 µM	Quercetina 100 µM	Oligomicina 50 µM
Sospensione batterica in PBS	/	35 µL	35 µL	35 µL	35 µL	35 µL
Triton X-100 (20%)	20%	1,25 µL	1,25 µL	1,25 µL	1,25 µL	1,25µL
H₂O Milli-Q	/	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
DMSO	/	1 µL	/	/	/	/
Cirsiliolo (1,25 mM)	1,25 mM	/	1 µL	/	/	/
Cirsiliolo (2,5 mM)	2,5 mM	/	/	2 µL	/	/
Quercetina	5 mM	/	/	/	1 µL	/
Oligomicina	1 mM	/	/	/	/	2 µL
Kit Luciferina-Luciferasi	/	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
ADP	5 mM	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL

Tabella 3. Protocollo sperimentale

Funzioni delle sostanze utilizzate:

- Glucosio, nutrimento per i batteri
- Triton X-100 (detergente), è in grado di formare dei pori nella parete batterica permettendo l'ingresso dei principi attivi idrosolubili da noi utilizzati
- H₂O Milli-Q , crea uno shock osmotico alla sospensione batterica favorendo la permeabilizzazione delle cellule batteriche
- DMSO (Dimetilsolfossido), solvente utilizzato nei controlli al posto dei principi attivi, in quanto loro vettore
- Kit Luciferina-Luciferasi, necessario per la lettura di Bioluminescenza
- ADP, substrato necessario per la reazione rilevata dal Luminometro

L'esperimento è stato condotto anche pre-incubando per 30 minuti i ceppi batterici con solo gli inibitori dell'ATP sintasi da noi utilizzati. In questo caso sono state prelevate aliquote da 120 µL di sospensione batterica a cui sono stati aggiunti separatamente nei vari campioni:

- 4 µL di DMSO
- 3,6 µL di Quercetina (5 mM)
- 6 µL di Oligomicina (1 mM)
- 3,6 µL di Cirsiliolo (1,25 mM)
- 4,8 µL di Cirsiliolo (2,5 mM)

Al termine dell'incubazione si preleva da ogni campione un'aliquota da 35 μ L e si prosegue secondo il protocollo descritto precedentemente. I dati raccolti hanno dimostrato che la pre-incubazione con le molecole inibitorie migliora la loro permeabilità attraverso la parete batterica. In particolare è stata evidenziata l'inibizione ATP sintasica da parte di Oligomicina, non osservata nei dati raccolti senza pre-incubazione probabilmente a causa di una difficoltà della molecola ad entrare nella cellula, e un aumento dell'inibizione da parte di Cirsiliolo e Quercetina.

Prima dell'analisi di Bioluminescenza dei campioni è stata realizzata una curva di taratura graficando tramite Microsoft Excel la concentrazione di ATP in pmol sull'asse delle ascisse e, sull'asse delle ordinate, le letture al Luminometro in RLU di soluzioni a concentrazione nota e crescente di ATP. Le 5 soluzioni preparate utilizzando ATP ultrapuro, a diversa concentrazione, devono ricadere in un range che sia rappresentativo dell'intervallo delle concentrazioni analizzate. Le letture vengono eseguite in doppio. Vengono spesso utilizzate concentrazioni di 5, 10, 25, 50 e 100 pmol inserite in provetta e successivamente diluite in un volume totale di 50 μ L. Prima della lettura si aggiungono 50 μ L di Kit Luciferina-Luciferasi, si agita la provetta e si inserisce nello strumento. Ogni provetta contiene nello specifico un tampone (Tris HCl 1M a pH 7,4), un agente chelante (EGTA 10mM), H₂O Milli-Q ultrapura per portare a volume di 50 μ L, ATP ultrapuro standard e 50 μ L di kit Luciferina - Luciferasi. Ogni campione è stato preparato in triplicato.

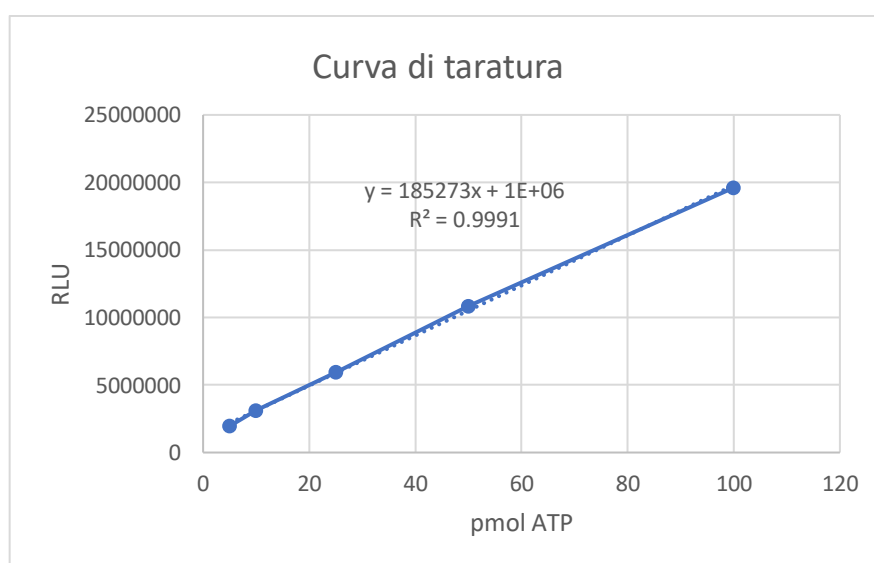


Figura 23. Curva di taratura del metodo

La curva di taratura mostra una relazione lineare fra la concentrazione di ATP espressa in pmol sull'asse delle ascisse e le RLU (Unità di Luce Relativa) rilevate dallo strumento sull'asse delle ordinate. Con il foglio di calcolo di Microsoft Office Excel si può calcolare in modo automatico l'equazione della retta dalla quale, sostituendo il valore delle RLU del campione rilevate dal luminometro alla y, si ricava il valore della x, ovvero la

concentrazione di ATP del campione. Si può poi risalire alla quantità totale di ATP prodotto nel singolo esperimento tenendo conto delle diluizioni eseguite durante il dosaggio.

3. RISULTATI

3.1 Valutazione dell'attività ATP sintasica in ceppi MRSA ed MRSE

Il protocollo seguito per la valutazione in tempo reale della sintesi di ATP batterica, sviluppato da noi sulla base del metodo utilizzato da Hara e Mori incentrato sullo studio di batteri Gram-negativi del genere *Escherichia coli* ceppo BW25113⁶⁰, è descritto in dettaglio nel paragrafo 2.4 della sezione Metodi.

L'adattamento è stato necessario in quanto la nostra valutazione ATP sintasica si riferisce ai ceppi A e 178 rispettivamente appartenenti alle specie *S. Aureus* e *S. epidermidis*, entrambi Gram-positivi, che presentano differenze strutturali rispetto a batteri Gram-negativi come la mancanza della parete esterna e uno strato più spesso di peptidoglicano⁴⁴ che ostacola maggiormente l'ingresso dei substrati idrofili e l'uscita dell'ATP neoformato.

In particolare, attraverso vari tentativi, siamo giunti ad una concentrazione di detergente Triton X-100 ottimale dello 0,5%, tale da permettere la formazione di pori idrofili sulla parete dei batteri da noi trattati.

Per il saggio della produzione di ATP abbiamo utilizzato il Luminometro GLOMAX 20/20 (Promega) e un kit apposito contenente dosi opportune di Luciferina-Luciferasi tali da effettuare misure altamente riproducibili, l'ATP Bioluminescence Assay Kit (Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, IN). I valori di lettura al Luminometro sono stati rilevati ogni 15 secondi per un totale di 2 minuti in modo da mettere in evidenza l'andamento temporale della sintesi.

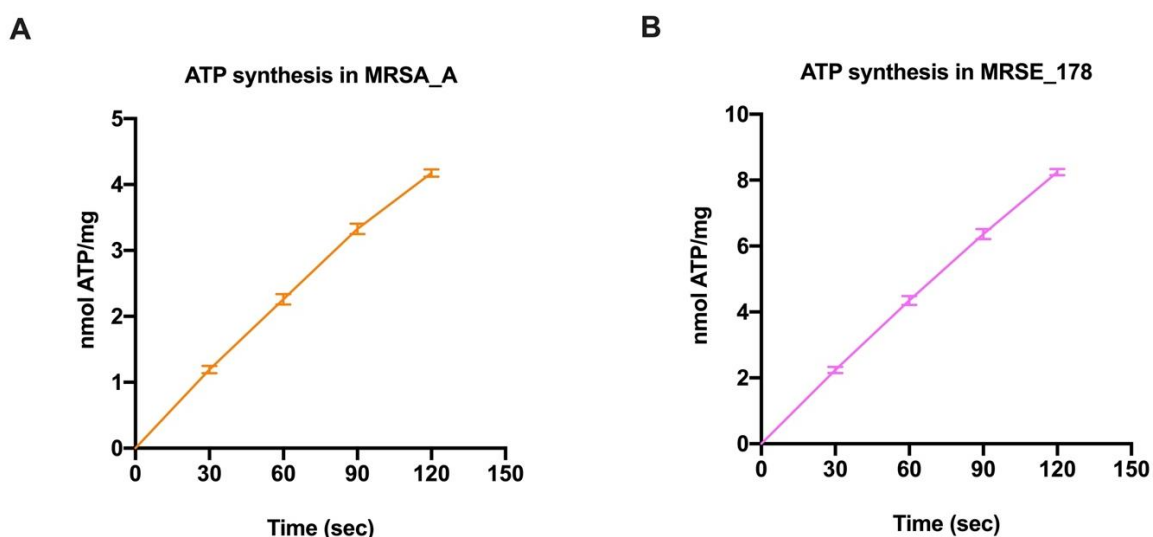


Figura 24. Andamento temporale della sintesi di ATP nei ceppi MRSA_A (A) ed MRSE_178 (B)

Le letture date dallo strumento in RLU (Unità di Luce Relativa) sono state trasformate in concentrazione di ATP, espressa in nmol, grazie all'utilizzo della curva di taratura creata utilizzando l'apposito kit sopraccitato; l'attività sintasica mostrata in figura 24 è pertanto espressa in nmol di ATP prodotte per mg di proteina, dosata con metodo Bradford, in funzione del tempo espresso in secondi. In particolare, la sintesi rilevata dal test mostra un andamento quasi del tutto lineare nel tempo. I due grafici ottenuti mostrano come la sintesi di ATP abbia un andamento molto simile nei due ceppi ma, confrontando la quantità prodotta nella stessa unità di tempo (120''), si nota che MRSE 178 mostra una produzione circa 2 volte superiore a quella di MRSA A.

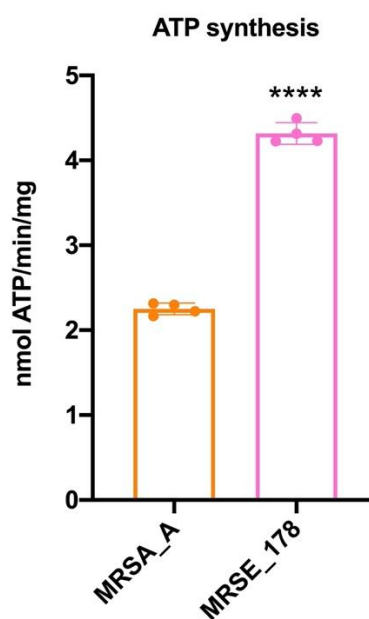


Figura 25. Confronto della sintesi di ATP nei ceppi MRSA_A ed MRSE_178

In questa rappresentazione grafica in ogni pannello i dati sono rappresentati come media \pm DS e sono rappresentativi di quattro esperimenti indipendenti. In particolare **** indica un $p < 0,0001$ tra MRSA_A ed MRSE_178, ottenuto per valutazione mediante test t-Student.

Gli Stafilococchi sono organismi aerobi o anaerobi facoltativi e la differenza della quantità di ATP prodotta nei due ceppi evidenziata dall'istogramma in figura 25 potrebbe essere dovuta al diverso metabolismo batterico dei due generi: i ceppi MRSE potrebbero utilizzare maggiormente la via aerobica per produrre energia rispetto agli MRSA. Questi ultimi si possono considerare maggiormente anaerobi tenendo conto del fatto che vivono all'interno del corpo umano a differenza dei ceppi MRSE che rappresentano uno dei colonizzatori più abbondanti della pelle

umana, per cui potrebbero essere volti maggiormente ad un metabolismo aerobio. Inoltre lo *S. aureus* rappresenta il membro più patogeno delle *Staphylococcaceae* in quanto possiede numerosi fattori di virulenza regolati in modo coordinato da una serie di fattori di trascrizione dedicati, risultando in questo modo più lento nel metabolismo, rispetto allo *S. epidermidis* che esercita la sua virulenza esclusivamente producendo una serie di molecole che forniscono protezione dalle difese dell'ospite come proteine ed esopolimeri che contribuiscono alla formazione del biofilm e inibiscono la fagocitosi e l'attività dei peptidi antimicrobici umani^{68, 50}.

3.2 Valutazione della capacità inibitoria di Cirsioliolo e Quercetina

Dopo aver rilevato la produzione di ATP nei due ceppi di *Staphylococcus* attraverso l'applicazione del nostro protocollo (Figura 24), siamo andati ad evidenziare la sensibilità dell'ATP sintasi batterica di MRSA A ed MRSE 178 ai due Flavonoidi Cirsioliolo e Quercetina, utilizzando come controllo positivo l'Oligomicina.

Come è noto dalla letteratura, diversi flavonoidi inibiscono la F_1 - F_0 ATP sintasi nelle cellule eucariotiche, rallentando la fosforilazione ossidativa e riducendo la produzione di ATP³⁸. Per quanto riguarda la Quercetina è stato dimostrato il suo legame all'ATP sintasi da John Walker attraverso studi di co-cristallografia a raggi X, in cui è stato messo in evidenza il legame che forma con la superficie interna di un anello nelle subunità 3α 3β sotto la "corona" di filamenti nei domini N-terminali; è una regione della porzione F_1 dell'ATP sintasi che forma un cuscinetto grazie a cui avviene la rotazione della punta della subunità γ all'interno dell'anello durante la catalisi. Questo sito di legame è una tasca idrofobica che si trova fra la punta C-terminale della subunità γ e la subunità β ; l'interazione avviene attraverso la formazione di legami H fra le porzioni idrossiliche della molecola, mediate da molecole di H_2O legate e da interazioni idrofobiche. Il suo effetto inibitorio è dato probabilmente dall'impedimento sia dell'attività sintetica che idrolitica dell'enzima, bloccando la rotazione della subunità γ in entrambi i sensi¹⁷.

Il sito di legame del Cirsioliolo all'interno della porzione F_1 della F_1F_0 -ATP sintasi, grazie al quale inibisce in modo dose-dipendente la sintesi di ATP abbassando anche la produzione dei radicali liberi, è invece stato evidenziato da analisi di docking molecolare¹⁸.

Dopo la rilevazione al Luminometro del rallentamento della sintesi di ATP batterica in seguito al trattamento con gli inibitori ATP sintasici, abbiamo graficato la diversa sensibilità dell'enzima alle molecole, rappresentandola come percentuale di inibizione nei due ceppi.

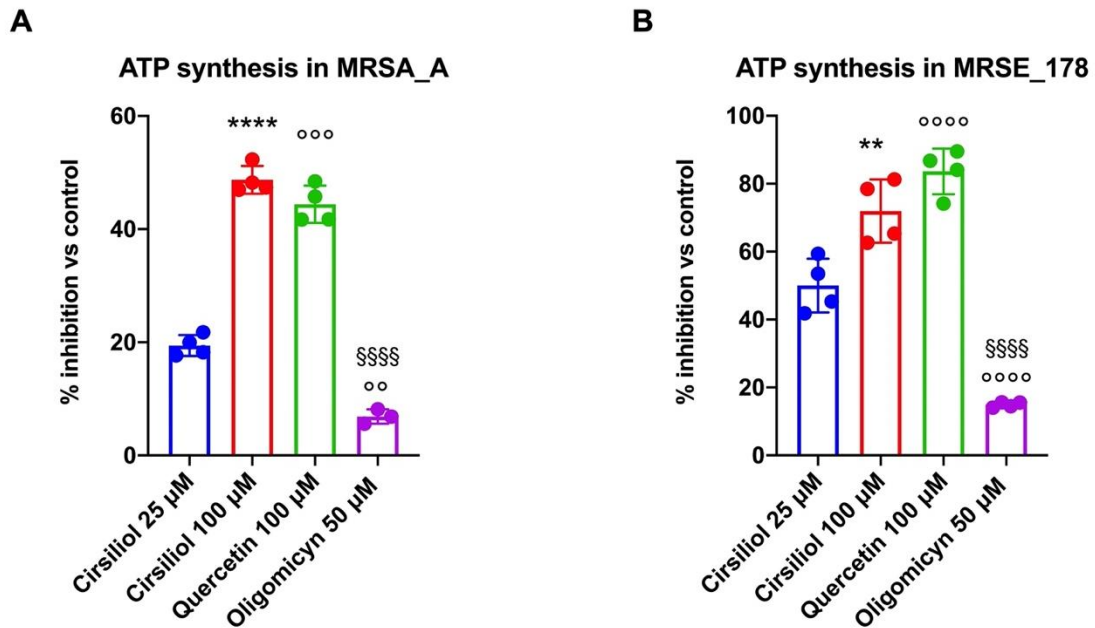


Figura 26. Effetto inibitorio di Cirsioliolo, Quercetina e Oligomicina sulla sintesi di ATP nei ceppi MRSA_A (A) ed MRSE_178 (B)

I dati ottenuti sono mostrati in ogni pannello come \pm SD media e si basano su quattro esperimenti indipendenti. La significatività dei risultati è stata testata da un test ANOVA unidirezionale seguito dal test di Tuckey. In particolare ** e *** indicano un $p < 0,01$ o $0,0001$ tra Cirsioliolo 25 μM e Cirsioliolo 100 μM ; °°° e °°°° indicano un $p < 0,001$ o $0,0001$ tra Cirsioliolo 25 μM e Quercetina o Oligomicina; §§§§ indicano un $p < 0,0001$ tra Cirsioliolo 100 μM e Quercetina o Oligomicina.

In questo caso le misure in RLU rilevate dal Luminometro sono state raccolte ogni 15'' per un totale di 60'' e la percentuale di inibizione indicata sull'asse delle ordinate nelle nostre rappresentazioni grafiche è stata calcolata basandosi sulle attività $\Delta 15''$.

$$\% \text{ inibizione} = 100 - [(\text{attività } \Delta 15'' \times 100) / \text{attività controllo}]$$

$$\text{Attività} = [(\text{RLU } \Delta 15'' \times 4) / 180000 \text{ RLU/pmol}] / \text{mg proteina}$$

Ciò che si osserva è un'inibizione istantanea dose-dipendente da parte del Cirsioliolo su entrambi i ceppi e la concentrazione più alta testata, 100 μM , ha mostrato un effetto molto simile a quello della Quercetina. Si nota anche che entrambi i flavonoidi hanno inibito maggiormente il ceppo 178 MRSE rispetto al ceppo A MRSA.

Per valutare ulteriormente l'effetto dose-dipendente del Cirsioliolo, abbiamo eseguito l'esperimento anche con una concentrazione di principio attivo più elevata, 200 μM .

Anziché osservare l'aumento dell'inibizione della produzione di ATP atteso, ciò che si è osservato è stata riduzione della percentuale di inibizione, dovuta probabilmente all'effetto di inner filter dato dalla soluzione del campione dimostrando che l'intensità della radiazione rilevata dallo strumento è proporzionale alla concentrazione del campione esclusivamente in un intervallo ristretto di concentrazione, soprattutto se si tratta di soluzioni colorate come nel caso dei nostri inibitori naturali.

L'IFE (effetto filtro interno) è un effetto che ostacola qualsiasi misura di fluorescenza, limitando la dipendenza lineare dei segnali di fluorescenza a basse concentrazioni di campione presente in cuvetta ⁶⁹.

L'intensità apparente della fluorescenza e la distribuzione dello spettro possono dipendere dalla densità ottica del campione alle lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione, riducendo l'intensità di eccitazione nel punto di osservazione o la fluorescenza osservata, assorbendo la fluorescenza emessa. Le intensità di fluorescenza risultano perciò proporzionali alla concentrazione solo in un intervallo limitato di densità ottiche e la dipendenza non lineare dell'intensità di fluorescenza della concentrazione della sostanza fluorescente altera la determinazione di parametri che derivano dai dati raccolti dall'analisi fluorimetrica ⁶⁹.

L'Oligomicina è un noto inibitore specifico della subunità F_o dell'ATP sintasi che si lega all'anello c del complesso enzimatico posizionato sul canale protonico e inibisce la traslocazione dei protoni a seguito del blocco dell'accesso degli H⁺ al gruppo carbossilico Glu59. Tuttavia, come si vede dai due grafici in figura 26, l'effetto inibitorio mostrato nell'immediato è molto leggero in entrambi i ceppi e ciò potrebbe essere dovuto a una difficoltà di ingresso nelle cellule a causa della sua struttura chimica e dimensione, in quanto si tratta di un macrolide ovvero un composto formato da lattoni in cui è presente un macrociclo di 26 termini.

Per chiarire questo suo mancato effetto inibitorio abbiamo eseguito ulteriori esperimenti in cui la valutazione dell'inibizione ATP sintasica è stata eseguita a seguito di un tempo di 30 minuti di incubazione dei ceppi batterici con le sostanze inibitorie seguendo sempre il protocollo indicato nel capitolo 2.4.

3.3 Valutazione della capacità inibitoria di Cirsiliolo e Quercetina dopo un'incubazione di 30 minuti

Una maggiore percentuale di inibizione si è osservata a seguito di una pre-incubazione batterica di 30 minuti con i nostri principi attivi, dimostrando che l'inibizione molto ridotta data dall'Oligomicina nei precedenti esperimenti è probabilmente dovuta ad una sua lenta internalizzazione nelle cellule batteriche attraverso la loro parete. A potenziare questa ipotesi è l'incremento della percentuale di inibizione mostrata anche da parte delle altre due molecole, Cirsiliolo e Quercetina; in particolare Cirsiliolo 100 µM e Quercetina arrivano ad una percentuale di inibizione enzimatica intorno al 75% in entrambi i ceppi.

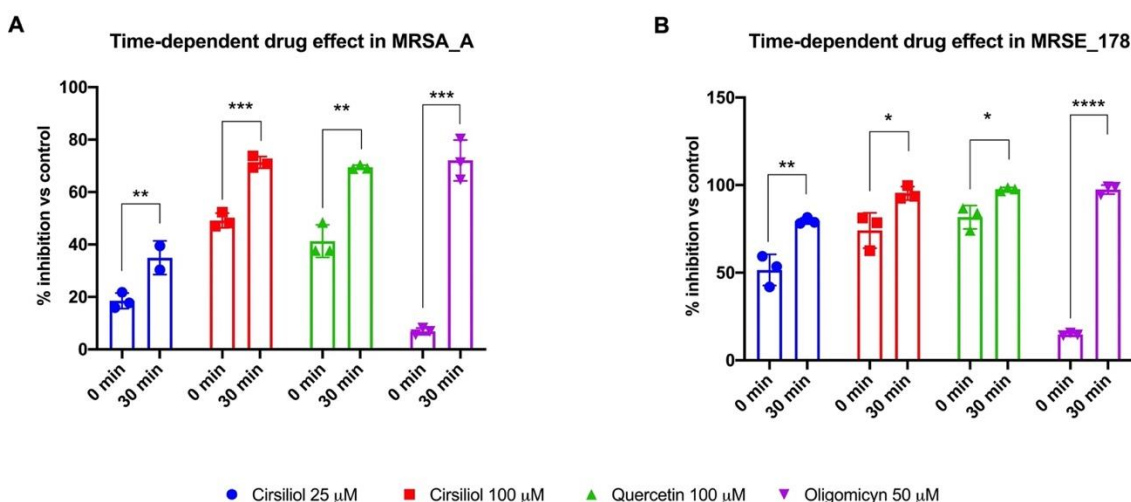


Figura 27. Effetto inibitorio di Cirsiliolo, Quercetina e Oligomicina sulla sintesi di ATP nei ceppi MRSA_A (A) ed MRSE_178 (B) dopo un'incubazione di 30 minuti

Anche in questo caso nei grafici in figura, i dati sono rappresentati come \pm SD media e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La significatività dei risultati è stata testata da un test ANOVA unidirezionale seguito dal test Tuckey. In particolare *, **, *** e **** indicano un $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 o 0.0001 tra i campioni incubati o meno con i farmaci per un tempo di 30 minuti.

Nello specifico, l'Oligomicina è l'inibitore enzimatico per il quale la pre-incubazione risulta essere più importante, in quanto permette di avere un incremento della percentuale di inibizione pari circa al 60-80%, passando da un'azione inibitoria enzimatica inferiore al 20% in entrambi i ceppi al tempo 0, ad un 75% e 90% circa di inibizione, osservata rispettivamente in MRSA_A ed MRSE_178 successivamente alla pre-incubazione. Per quanto riguarda Quercetina e Cirsiliolo, essi mostrano a loro volta un aumento dell'inibizione a seguito dei 30 minuti di incubazione, ma minore rispetto a quella vista per l'Oligomicina in quanto, a differenza di quest'ultima, i due Flavonoidi hanno una maggiore capacità di permeazione della parete batterica già attraverso i pori ottenuti tramite l'utilizzo della combinazione detergente e shock osmotico, che permette di vedere una buona percentuale di inibizione anche al tempo 0, in quanto molecole più piccole e idrofile.

4. DISCUSSIONE

Lo studio descritto in questa tesi è incentrato sulla valutazione in tempo reale dell'effetto inibitorio dell'ATP sintasi di due ceppi batterici Gram-positivi del genere *Staphylococcus*, da parte di due flavoni naturali, Cirsiliolo e Quercetina, analizzata come saggio produzione di ATP seguita in real-time. Cirsiliolo e Quercetina sono sostanze che rientrano nella dieta umana; in particolare mele, ciliegie, bacche, cipolle, asparagi e lattuga a foglia rossa sono alimenti ricchi di Quercetina, mentre il Cirsiliolo è presente in molte specie di *Lamiaceae* come salvia, menta, timo, lavanda, rosmarino e altri^{13,18}.

Fanno parte della grande famiglia dei Polifenoli noti per i loro effetti antiossidanti, citotossici, antinfiammatori, antiproliferativi, anticancerogeni, antivirali e antibatterici. Il continuo incremento del fallimento clinico di terapie antibiotiche convenzionali, dovuto allo sviluppo del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, ci ha portati a soffermarci particolarmente su quest'ultimo effetto che i Flavonoidi possono esercitare sia contro batteri Gram-positivi che Gram-negativi: essi possono agire tramite l'interazione con le proteine e con la parete cellulare, con conseguente alterazione delle funzioni citoplasmatiche o della permeabilità della membrana; attraverso l'alterazione della stabilità del DNA e l'inibizione della sintesi degli acidi nucleici, grazie alla loro struttura chimica planare che gli permette di penetrare nell'elica, o anche inibendo il metabolismo energetico^{1,3,9}. La nostra attenzione si è rivolta principalmente verso l'interazione di questi composti bioattivi con l'ATP sintasi che, oltre ad essere un enzima ubiquitariamente presente incorporato nelle membrane tilacoidali dei cloroplasti, nelle membrane cellulari batteriche e nelle membrane interne dei mitocondri negli eucarioti, sembra essere un promettente target batterico alternativo in quanto sono noti pochissimi mutanti vitali dell'enzima; ciò ridurrebbe la probabilità eventuale di sviluppare resistenza verso le molecole che interagiscono con il complesso enzimatico inibendo la sua funzionalità.³² Per quanto riguarda la Quercetina sono stati identificati i siti di legame con la porzione F₁ dell'ATP sintasi bovina attraverso studi di co-cristallografia a raggi X e analisi di inibizione multipla da parte del vincitore premio Nobel John Walker¹⁷. L'interazione da parte del Cirsiliolo con l'ATP sintasi è invece stata messa in evidenza attraverso analisi in silico, di docking molecolare che mostrano i siti di legame con cui la molecola si lega alla porzione F₁ della nanomacchina enzimatica; gli stessi studi condotti sull'ATP sintasi espressa ectopicamente sui segmenti esterni dei bastoncelli OS di retina bovina, hanno mostrato anche un'elevata inibizione dose-dipendente della produzione di ATP che abbassa la produzione dei radicali liberi, limitando l'effetto dannoso dell'ossidazione alla struttura del bastoncello OS, proteggendo così l'intera retina dal danno ossidativo che innesca malattie neurodegenerative retiniche¹⁸.

Nonostante i loro numerosi effetti pleiotropici, la maggior parte dei Polifenoli possiede una scarsa biodisponibilità a causa della loro ridotta idrosolubilità; i Flavonoidi naturali però esistono quasi tutti in forma O-glicosidica o C-glicosidica, le quali ampliano la loro attività biologica aumentando l'idrosolubilità, ma anche riducendo gli effetti collaterali e migliorando il targeting specifico^{2,9}.

Come controllo positivo nei nostri esperimenti è stato utilizzato un inibitore ATP sintasico classico che è l'Oligomicina, un macrolide a 26 termini. Nonostante il suo potente effetto antibiotico e antitumorale il suo utilizzo clinico è impedito da una bassa biodisponibilità, ma soprattutto da un elevato effetto tossico. Si lega al canale protonico sulla componente F_0 del complesso enzimatico, bloccando persistentemente la sintesi di ATP, la traslocazione protonica e l'assorbimento di O_2 ; interrompe l'accoppiamento strutturale fra F_0 e F_1 interagendo con la proteina OSCP (o subunità δ nei procarioti) ³⁴.

I ceppi batterici da noi analizzati sono stati isolati da pazienti ospedalieri: in particolare il ceppo A MRSA da emocolture di un paziente dell'Ospedale Policlinico San Martino e il ceppo 178 MRSE dal catetere arterioso impiantato in un paziente sempre del San Martino di Genova. Appartengono alle specie batteriche di *S. aureus* e *S. epidermidis*, in genere membri benigni della flora naturale che colonizzano pelle e mucose, ma in questo caso patogeni opportunisti che infettano principalmente individui con impianti di dispositivi medici o immunocompromessi. Rappresentano pertanto una delle cause principali di infezioni acquisite in ospedale a livello di siti chirurgici e di infezioni del flusso sanguigno associate a dispositivi medici. Entrambi hanno la capacità di aderire alle superfici e svilupparsi in strutture, chiamate biofilm, formate da una matrice esopolimerica, che li rende altamente resistenti ai chemioterapici, portando a malattie croniche.

MRSA ed MRSE mostrano in modo simile resistenza all'attacco β -lattamico, perciò non solo da parte della meticillina ma anche della maggior parte degli antibiotici β -lattamici, principalmente a causa della presenza di un gene (*mecA*), assente nei ceppi sensibili ai β -lattamici ^{48 49}.

In questo lavoro, inizialmente si è ottimizzato il metodo per permeabilizzare i batteri Gram-positivi per la valutazione in tempo reale della sintesi di ATP, partendo dal protocollo dell'unico lavoro presente in letteratura che riporta un protocollo di saggio dell'attività ATP sintasica di batteri Gram-negativi ⁶⁰. Gli opportuni adattamenti descritti nel paragrafo 2.4 della sezione Metodi, come l'utilizzo di basse dosi del detergente Triton X-100 e la creazione di uno shock osmotico ottenuto con l'aggiunta di H_2O MilliQ in quantità pari al 20% del volume finale di dosaggio, sono stati necessari per l'ottenimento di pori idrofili sulla parete batterica, tali da consentire l'ingresso nelle cellule dei composti bioattivi da noi studiati, del substrato ADP, fondamentale per la sintesi ATPasica e l'uscita dell'ATP neofornito, rilevato dal Luminometro attraverso un'analisi quantitativa di Bioluminescenza. Inoltre, a differenza del lavoro di partenza condotto su *E. coli*, per il dosaggio dinamico dell'ATP è stato utilizzato un kit commerciale di Luciferina-Luciferasi estremamente sensibile e riproducibile, non ancora disponibile nel 2006, anno di pubblicazione del lavoro di partenza. Un'altra differenza legata al protocollo di partenza riguarda l'uso da parte di Hara e Mori di un mutante enzimatico di ATP sintasi come controllo positivo ⁶⁰.

I dati dell'attività ATP sintasica batterica ottenuti hanno mostrato un andamento di produzione simile nei due ceppi ma una diversa quantità di ATP sintetizzato pari a 2 nmol/min/mg di proteina totale per il ceppo A MRSA e poco più di 4 nmol/min/mg di proteina totale per il ceppo 178 MRSE. Questa differenza suggerisce che le due diverse

specie di Stafilococchi possano possedere diversità nel tipo di metabolismo principalmente sfruttato, come una prevalenza della via aerobica da parte di *S. epidermidis*, principale colonizzatore della cute umana, e un maggiore metabolismo anaerobico di *S. aureus* che vive principalmente all'interno dell'organismo umano, ma anche diversità nella velocità di produzione energetica cellulare dovuta alla necessità di gestire una maggiore quantità di fattori di virulenza degli MRSA rispetto agli MRSE che invece basano il loro carattere virulento esclusivamente sulla formazione di biofilm^{68,50}.

Dagli esperimenti condotti in presenza degli inibitori è invece emersa un'inibizione enzimatica dose-dipendente da parte del Cirsiliolo e la riduzione di produzione di ATP da parte della dose più alta da noi utilizzata (100 μ M) risulta essere poco inferiore a quella della Quercetina nel ceppo 178 e poco superiore nel ceppo A.

Al contrario, l'Oligomicina ha mostrato una percentuale dell'effetto inibitorio molto bassa, nonostante sia una molecola che spesso viene utilizzata come classico inibitore ATP sintasico anche per studi in vivo come quello condotto da Vestergaard nel 2017 in cui è stata valutata una potenziale eliminazione della resistenza alle Polimixine da parte di ceppi di *S. aureus*, combinando l'Oligomicina all'antibiotico⁶¹.

Avendo utilizzato una moderata (50 μ M) dose di inibitore Oligomicina, il ridotto effetto che si osserva nei nostri grafici in figura 26, si riferisce probabilmente ad una difficoltà di permeazione del macrolide lipofilo attraverso i pori creati sulla parete, che favoriscono prevalentemente il passaggio a sostanze idrofile. Un miglioramento della permeabilità con conseguente aumento della percentuale di inibizione data, non solo dall'Oligomicina, ma anche dagli altri due Flavonoidi testati, si deve all'impiego di un periodo di 30 minuti in cui le sospensioni batteriche analizzate venivano preincubate con le singole molecole bioattive; ciò suggerisce che la capacità di permeazione delle molecole è tempo-dipendente e in misura maggiore per l'Oligomicina piuttosto che per Cirsiliolo e Quercetina. Pre-incubando i ceppi batterici si arriva ad una percentuale di inibizione intorno al 75-80% che mostra un effetto a lungo termine sulla quantità di ATP disponibile alla cellula batterica, suggerendo che i flavonoidi in questione, alterano lo stato bioenergetico, tenendo conto del fatto che i dati in letteratura mostrano come principale meccanismo antibatterico di queste sostanze naturali l'inibizione del metabolismo energetico. Dai dati sperimentali da noi raccolti risulta nello specifico una maggiore capacità inibitoria di Quercetina, dovuta probabilmente alla sua struttura chimica più idrofila rispetto a quella di Cirsiliolo, e che il ceppo batterico maggiormente sensibile all'effetto inibitorio appartiene agli MRSE probabilmente per il fatto che, come già detto in precedenza, sono Stafilococchi maggiormente aerobi rispetto agli MRSA.

In letteratura esistono altri lavori basati sullo studio dell'inibizione ATP sintasica su ceppi Gram-positivi di *S. aureus*, i quali evidenziano un promettente effetto terapeutico di sostanze polifenoliche. Un esempio è il Resveratrolo, antiossidante naturale polifenolico che oltre agli effetti anticancerogeno e antinvecchiamento, mostra anche un effetto antimicrobico; inoltre, come per la Quercetina sono stati condotti studi di co-cristallografia che dimostrano il legame del Resveratrolo con l'ATP sintasi in un sito della porzione F₁ in una tasca fra le subunità β e γ ¹⁷. La somministrazione di questo composto nutraceutico,

anch'esso inibitore ATP sintasico, ha mostrato la sensibilizzazione di *S. aureus* all'effetto battericida mediato da peptidi antimicrobici (AMP) che rappresentano un'importante componente del sistema immunitario innato per la protezione contro infezioni batteriche. Come per la dimostrazione che l'inattivazione ATP sintasica sensibilizza *S. aureus* alla classe antibiotica delle Polimixine, anche in questo caso, la suscettibilità cellulare batterica è stata mostrata attraverso l'utilizzo di un mutante ATP sintasico (atpA). Questo lavoro dimostra quindi che l'ATP sintasi aumenta la tolleranza di *S. aureus* verso alcuni AMP umani indicando perciò l'inibizione dell'enzima come possibile strategia terapeutica per sensibilizzare lo Stafilococco agli AMP naturali del sistema immunitario innato ⁷⁰. Il fenomeno inibitorio in questo studio è stato osservato in generale determinando il quantitativo totale di ATP e non la sintesi di ATP in tempo reale, come nei nostri esperimenti.

Un altro lavoro si è concentrato sulla valutazione dell'effetto antimicrobico del Resveratrolo sia come agente singolo sia in combinazione con antibiotici convenzionali. Vestegaard ha messo in evidenza che, ad una concentrazione subinibitoria, il polifenolo è in grado di alterare l'espressione batterica dei tratti virulenti riducendo la produzione di tossine, di inibire la formazione di biofilm, di ridurre la motilità e di interferire con il quorum sensing. In associazione con gli antibiotici ad uso comune ha invece mostrato un aumento dell'attività degli Aminoglicosidi contro *S. aureus* e un effetto antagonista dell'attività letale dei Fluorochinoloni contro *S. aureus* ed *E. coli*. Questi effetti sono stati prevalentemente studiati in vitro, ma a seguito di una sua applicazione topica si è verificato un alleviamento di lesioni acneiche causate da *Propionibacterium acnes* ⁵⁹. Pertanto, composti nutraceutici come il Resveratrolo possono essere dei candidati interessanti nella ricerca di soluzioni per il crescente problema della resistenza antimicrobica. Anche nel caso del nostro studio è stato osservato un fenomeno globale che fa supporre che il target enzimatico ATP sintasi sia rilevante per quanto riguarda un effetto sulla crescita dei batteri. Ai 30 minuti di incubazione si osservano degli effetti che sono comunque dipendenti dal tipo di organismo, in quanto appaiono diversi nei due ceppi; pertanto, una prosecuzione interessante del presente lavoro di Tesi potrebbe essere lo studio dell'effetto di questi Polifenoli sulla crescita batterica per verificare se l'inibizione dell'ATP sintasi sia rilevante nell'azione globale di inibizione della crescita microbica nelle 24 ore.

Gli antibiotici convenzionali risultano inefficienti anche nel trattamento di infezioni batteriche associate alla formazione di biofilm. Nella formazione di questa matrice protettiva, costituita da sostanze polimeriche extracellulari, svolge un ruolo fondamentale il processo di comunicazione cellula-cellula chiamato Quorum Sensing, tale da rappresentare anch'esso un target per nuove strategie terapeutiche che riescano a controllare il biofilm. Gli inibitori del quorum sensing (QSI) possono essere utilizzati per attenuare la virulenza batterica e rendere i biofilm più suscettibili agli antibiotici di uso comune e al sistema immunitario dell'ospite, inoltre non influenzando la crescita batterica, per cui ci si può aspettare che i QSI siano molto poco inclini allo sviluppo di resistenza.

È stata dimostrata una potente inibizione da parte di composti naturali, tra cui due derivati Flavonoidi, in grado di influenzare tutte le funzioni correlate al QS sulla maturazione del biofilm in *E. coli* e *P. aeruginosa* ⁷¹.

In uno studio del 2016 è stato dimostrato per la prima volta che la Quercetina è un efficace inibitore del quorum sensing, della formazione di biofilm e di fattori di virulenza fra cui piocianina, proteasi ed elastasi, in *P. aeruginosa* ⁷².

I risultati ottenuti dai nostri esperimenti, uniti a quelli presenti in letteratura suggeriscono quindi l'inibizione dell'ATP sintasi batterica come potenziale strategia terapeutica per la sensibilizzazione di ceppi batterici MRSA ed MRSE agli agenti terapeutici di uso comune, ostacolando sia l'apporto di ATP sia i molteplici processi metabolici ATP-dipendenti.

I composti polifenolici come Cirsiliolo, Quercetina, Resveratrolo, possono essere candidati interessanti per contrastare il crescente problema dell'antibiotico-resistenza, in quanto inibendo la sintesi di ATP possono esercitare un effetto nocivo sulle cellule batteriche che, a differenza delle cellule eucariotiche, sono soggette ad un vincolo bioenergetico assoluto che li rende suscettibili a questi inibitori.

4.3 CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

I dati ottenuti nel presente lavoro di tesi confermano che i due composti polifenolici, Cirsioliolo e Quercetina, agiscono come modulatori della produzione di ATP in ceppi batterici di *Staphylococcus* meticillino-resistenti e del contenuto di ATP totale, a seguito di una precinubazione di 30 minuti. La loro capacità di inibire l'ATP sintasi di organismi multiresistenti, quali MRSA ed MRSE, pone una notevole importanza sulla considerazione di questi due fitocomposti come promettenti candidati per lo sviluppo di nuove strategie clinico-terapeutiche atte a combattere il fenomeno, in continua crescita, dell'antibiotico resistenza.

Si pongono come possibili sviluppi futuri di utilizzo di flavoni quali Cirsioliolo e Quercetina:

- un utilizzo come nuove molecole antibatteriche andando a valutare la loro azione antimicrobica tramite studi con antibiogramma;
- una possibile formulazione in gel che potrebbe essere utilizzato per cateteri endovena in modo da limitare il più possibile la frequenza di infezioni batteriche da MRSE, sia per un'applicazione topica diretta a trattare ferite cutanee, prevenendo l'infezione batterica o riducendone l'entità;
- una valutazione della capacità di inibizione o rallentamento della formazione di biofilm, alla base della virulenza degli MRSE ma importante anche negli MRSA⁶⁸;
- una valutazione della crescita batterica nelle 24 ore a seguito di trattamento con queste sostanze. Dalla letteratura emerge l'ipotesi che inibiscano la rotazione enzimatica in entrambe le direzioni, bloccando sia la sintesi sia l'idrolisi di ATP. Ciò può far pensare ad un loro potenziale coinvolgimento sia nel metabolismo energetico aerobio, sia nella generazione della forza motrice protonica necessaria al funzionamento biologico batterico in anaerobiosi;
- un utilizzo quali coadiuvanti all'interno di una terapia antibiotica, tenuto conto della non tossicità delle molecole per l'organismo umano e dell'impossibilità per qualsiasi batterio di sviluppare resistenza all'inibizione ATP sintasica.

Un esempio potrebbe essere una combinazione con linezolid, un antibiotico ancora attivo su MRSA ed MRSE ma che possiede un'elevata tossicità come lo sviluppo, a dosi terapeutiche, di una permanente neuropatia periferica⁵⁵; in casi simili si potrebbe ridurre la dose di medicinale somministrata al paziente, mantenendo, con l'associazione antibiotico-polifenolo, l'effetto terapeutico ma riducendo l'effetto tossico.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Rana A, Samtiya M, Dhewa T, Mishra V, Aluko RE. Health benefits of polyphenols: A concise review. *J Food Biochem*. 2022;46(10):e14264. doi:10.1111/JFBC.14264
2. Santos-Buelga C, González-Manzano S, González-Paramás AM. Wine, Polyphenols, and Mediterranean Diets. What Else Is There to Say? *Molecules* 2021, Vol 26, Page 5537. 2021;26(18):5537. doi:10.3390/MOLECULES26185537
3. Lobiuc A, Pavăl NE, Mangalagiu II, et al. Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules* 2023, Vol 28, Page 1114. 2023;28(3):1114. doi:10.3390/MOLECULES28031114
4. Panfoli I, Esposito A. Beneficial effect of polyphenols in COVID-19 and the ectopic F1FO-ATP synthase: Is there a link? *J Cell Biochem*. 2022;123(8):1281-1284. doi:10.1002/JCB.30306
5. Wen K, Fang X, Yang J, et al. Recent Research on Flavonoids and their Biomedical Applications. *Curr Med Chem*. 2020;28(5):1042-1066. doi:10.2174/0929867327666200713184138
6. Golonko A, Olichwier AJ, Swislocka R, Szczerbinski L, Lewandowski W. Why Do Dietary Flavonoids Have a Promising Effect as Enhancers of Anthracyclines? Hydroxyl Substituents, Bioavailability and Biological Activity. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 391. 2022;24(1):391. doi:10.3390/IJMS24010391
7. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem*. 2022;383:132531. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2022.132531
8. Chen S, Wang X, Cheng Y, Gao H, Chen X. A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. *Molecules* 2023, Vol 28, Page 4982. 2023;28(13):4982. doi:10.3390/MOLECULES28134982
9. Tan Z, Deng J, Ye Q, Zhang Z. The Antibacterial Activity of Natural-derived Flavonoids. *Curr Top Med Chem*. 2022;22(12):1009-1019. doi:10.2174/1568026622666220221110506
10. Ramesh P, Jagadeesan R, Sekaran S, Dhanasekaran A, Vimalraj S. Flavonoids: Classification, Function, and Molecular Mechanisms Involved in Bone Remodelling. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:779638. doi:10.3389/FENDO.2021.779638/BIBTEX
11. Sun M, Yu T, Zhao J, et al. Role of flavonoids in age-related macular degeneration. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;159:114259. doi:10.1016/J.BIOPHA.2023.114259
12. Peng S, Wang Y, Sun Z, et al. Nanoparticles loaded with pharmacologically active plant-derived natural products: Biomedical applications and toxicity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2023;225:113214. doi:10.1016/J.COLSURFB.2023.113214
13. Yang D, Wang T, Long M, Li P. Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020. doi:10.1155/2020/8825387
14. Singh P, Arif Y, Bajguz A, Hayat S. The role of quercetin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021;166:10-19. doi:10.1016/J.PLAPHY.2021.05.023
15. Lenard N, Henagan TM, Kumar Maurya P. Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 2498. 2022;27(8):2498. doi:10.3390/MOLECULES27082498
16. Babaei F, Mirzababaei M, Nassiri-Asl M. Quercetin in Food: Possible Mechanisms of Its Effect on Memory. *J Food Sci*. 2018;83(9):2280-2287. doi:10.1111/1750-3841.14317

17. Gledhill JR, Montgomery MG, Leslie AGW, Walker JE. Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(34):13632-13637. doi:10.1073/PNAS.0706290104/SUPPL_FILE/06290FIG6.PDF
18. Carlini L, Tancreda G, Iobbi V, et al. The Flavone Cirsiolol from *Salvia x jamensis* Binds the F1 Moiety of ATP Synthase, Modulating Free Radical Production. *Cells*. 2022;11(19):3169. doi:10.3390/CELLS11193169/S1
19. Oliveira AP, Silva ALN, Viana LGFC, et al. β -Cyclodextrin complex improves the bioavailability and antitumor potential of cirsiolol, a flavone isolated from *Leonotis nepetifolia* (Lamiaceae). *Heliyon*. 2019;5(10). doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01692
20. Prasad P, Vasas A, Hohmann J, Bishayee A, Sinha D. Cirsiolol Suppressed Epithelial to Mesenchymal Transition in B16F10 Malignant Melanoma Cells through Alteration of the PI3K/Akt/NF- κ B Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol 20, Page 608. 2019;20(3):608. doi:10.3390/IJMS20030608
21. Androutsopoulos VP, Li N, Arroo RRJ. The methoxylated flavones eupatorin and cirsiolol induce CYP1 enzyme expression in MCF7 cells. *J Nat Prod*. 2009;72(8):1390-1394. doi:10.1021/NP900051S/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NP-2009-00051S_0007.GIF
22. Marder M, Viola H, Wasowski C, et al. Cirsiolol and caffeic acid ethyl ester, isolated from *Salvia guaranitica*, are competitive ligands for the central benzodiazepine receptors. *Phytomedicine*. 1996;3(1):29-31. doi:10.1016/S0944-7113(96)80006-7
23. Viola H, Wasowski C, Marder M, Wolfman C, Paladini AC, Medina JH. Sedative and hypnotic properties of *Salvia guaranitica* St. Hil. and of its active principle, Cirsiolol. *Phytomedicine*. 1997;4(1):47-52. doi:10.1016/S0944-7113(97)80027-X
24. Patel H, Kerndt CC, Bhardwaj A. Physiology, Respiratory Quotient. *StatPearls*. Published online February 13, 2023. Accessed August 28, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531494/>
25. Deshpande OA, Mohiuddin SS. Biochemistry, Oxidative Phosphorylation. *StatPearls*. Published online July 31, 2023. Accessed August 21, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553192/>
26. Zhang B, Pan C, Feng C, et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. <https://doi.org/10.1080/1351000220222046423>. 2022;27(1):45-52. doi:10.1080/13510002.2022.2046423
27. Voeikov VL. Reactive Oxygen Species—(ROS) Pathogens or Sources of Vital Energy? Part 1. ROS in Normal and Pathologic Physiology of Living Systems. <https://home.liebertpub.com/acm>. 2006;12(2):111-118. doi:10.1089/ACM.2006.12.111
28. Panfoli I, Musante L, Bachi A, et al. Proteomic analysis of the retinal rod outer segment disks. *J Proteome Res*. 2008;7(7):2654-2669. doi:10.1021/PR7006939/SUPPL_FILE/PR7006939-FILE012.PDF
29. Calzia D, Oneto M, Caicci F, et al. Effect of polyphenolic phytochemicals on ectopic oxidative phosphorylation in rod outer segments of bovine retina. *Br J Pharmacol*. 2015;172(15):3890-3903. doi:10.1111/BPH.13173
30. Roehlecke C, Schumann U, Ader M, et al. Stress Reaction in Outer Segments of Photoreceptors after Blue Light Irradiation. *PLoS One*. 2013;8(9):e71570. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0071570
31. Zharova T V., Grivennikova VG, Borisov VB. F1-Fo ATP Synthase/ATPase: Contemporary View on Unidirectional Catalysis. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 5417. 2023;24(6):5417. doi:10.3390/IJMS24065417

32. Vlasov A V., Osipov SD, Bondarev NA, et al. ATP synthase FOF1 structure, function, and structure-based drug design. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(3):1-27. doi:10.1007/S00018-022-04153-0/METRICS
33. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35(2):211-225. doi:10.1007/S10545-011-9382-9
34. Giorgio V, Fogolari F, Lippe G, Bernardi P. OSCP subunit of mitochondrial ATP synthase: role in regulation of enzyme function and of its transition to a pore. *Br J Pharmacol*. 2019;176(22):4247-4257. doi:10.1111/BPH.14513
35. Nirody JA, Budin I, Rangamani P. ATP synthase: Evolution, energetics, and membrane interactions. *Journal of General Physiology*. 2020;152(11). doi:10.1085/JGP.201912475/152111
36. Toei M, Noji H. Single-molecule analysis of FOF1-ATP synthase inhibited by N,N-Dicyclohexylcarbodiimide. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(36):25717-25726. doi:10.1074/jbc.M113.482455
37. Patel BA, D'Amico TL, Blagg BSJ. Natural products and other inhibitors of F1FO ATP synthase. *Eur J Med Chem*. 2020;207:112779. doi:10.1016/J.EJMECH.2020.112779
38. Mackieh R, Al-Bakkar N, Kfoury M, Roufayel R, Sabatier JM, Fajloun Z. Inhibitors of ATP Synthase as New Antibacterial Candidates. *Antibiotics 2023, Vol 12, Page 650*. 2023;12(4):650. doi:10.3390/ANTIBIOTICS12040650
39. Fedorov A, Lehto A, Klein J. Inhibition of mitochondrial respiration by general anesthetic drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2023;396(2):375-381. doi:10.1007/S00210-022-02338-9/FIGURES/6
40. Hearne A, Chen H, Monarchino A, Wiseman JS. Oligomycin-induced proton uncoupling. *Toxicology in Vitro*. 2020;67:104907. doi:10.1016/J.TIV.2020.104907
41. Zhou W, Faraldo-Gómez JD. Membrane plasticity facilitates recognition of the inhibitor oligomycin by the mitochondrial ATP synthase rotor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2018;1859(9):789-796. doi:10.1016/J.BBABIO.2018.03.019
42. Structure - Medical Microbiology - NCBI Bookshelf. Accessed September 13, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8477/>
43. Sizar O, Leslie SW, Unakal CG. Gram-Positive Bacteria. *Management of Antimicrobials in Infectious Diseases*. Published online May 30, 2023:29-41. doi:10.1385/1-59259-036-5:29
44. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(5):a000414. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A000414
45. Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. *StatPearls*. Published online August 14, 2023. Accessed September 13, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
46. Oliveira J, Reygaert WC. Gram-Negative Bacteria. *Infection Management for Geriatrics in Long-Term Care Facilities, Second Edition*. Published online August 8, 2023:427-443. doi:10.1385/1-59259-036-5:43
47. Burke TL, Rupp ME, Fey PD. Staphylococcus epidermidis. *Trends Microbiol*. 2023;31(7):763-764. doi:10.1016/j.tim.2023.01.001
48. Paharik AE, Horswill AR. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2). doi:10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0022-2015/ASSET/59CBA265-44E3-4CDB-8AA6-EF9A7F7D552A/ASSETS/GRAPHIC/VMBF-0022-2015-FIG4.GIF
49. Lee AS, De Lencastre H, Garau J, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Nature Reviews Disease Primers 2018 4:1*. 2018;4(1):1-23. doi:10.1038/nrdp.2018.33

50. Otto M. Staphylococcus epidermidis pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1106:17-31. doi:10.1007/978-1-62703-736-5_2/COVER
51. Lam AK, Hill MA, Moen EL, Pusavat J, Wouters CL, Rice C V. Cationic Branched Polyethylenimine (BPEI) Disables Antibiotic Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis (MRSE). *ChemMedChem*. 2018;13(20):2240-2248. doi:10.1002/CMDC.201800433
52. Otto M. Staphylococcus epidermidis — the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 2009 7:8. 2009;7(8):555-567. doi:10.1038/nrmicro2182
53. Huang Z, Liu Y, Wang L, et al. Supramolecular assemblies mimicking neutrophil extracellular traps for MRSE infection control. *Biomaterials*. 2020;253:120124. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.120124
54. Patel P, Wermuth HR, Calhoun C, Hall GA. Antibiotics. *Chronic Rhinosinusitis: the Mucosal Concept*. Published online May 26, 2023:341-353. doi:10.1007/978-981-16-0784-4_43
55. Loree J, Lappin SL. Bacteriostatic Antibiotics. *StatPearls*. Published online August 14, 2023. Accessed September 14, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547678/>
56. Cephalosporins. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Published online December 20, 2021. Accessed September 14, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548666/>
57. Eisenreich W, Rudel T, Heesemann J, Goebel W. Link Between Antibiotic Persistence and Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:900848. doi:10.3389/FCIMB.2022.900848/BIBTEX
58. Zinner SH. Antibiotic use: present and future. *NEW MICROBIOLOGICA*. 2007;30:321-325.
59. Vestergaard M, Ingmer H. Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53(6):716-723. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2019.02.015
60. Hara KY, Mori H. An Efficient Method for Quantitative Determination of Cellular ATP Synthetic Activity. Published online 2006. doi:10.1177/1087057105285112
61. Vestergaard M, Nøhr-Meldgaard K, Bojer MS, et al. Inhibition of the ATP synthase eliminates the intrinsic resistance of Staphylococcus aureus towards polymyxins. *mBio*. 2017;8(5). doi:10.1128/MBIO.01114-17/ASSET/3963F1C1-8A26-465C-B0DF-B994774D812C/ASSETS/GRAPHIC/MBO0041734720004.JPEG
62. Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature* 2010 467:7318. 2010;467(7318):929-934. doi:10.1038/nature09486
63. Gledhill JR, Walker JE. Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*. 2005;386(3):591-598. doi:10.1042/BJ20041513
64. Jain A, Jain R, Jain S. Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology. Published online 2020. doi:10.1007/978-1-4939-9861-6
65. Mueller Hinton II Broth. Accessed September 18, 2023. www.liofilchem.net
66. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Methods for Measuring the Concentrations of Proteins. *Cold Spring Harb Protoc*. 2020;2020(4):pdb.top102277. doi:10.1101/PDB.TOP102277
67. Karimi F, Hamidian Y, Behrouzifar F, et al. An applicable method for extraction of whole seeds protein and its determination through Bradford’s method. *Food and Chemical Toxicology*. 2022;164:113053. doi:10.1016/J.FCT.2022.113053
68. Richardson AR. Virulence and Metabolism. *Microbiol Spectr*. 2019;7(2). doi:10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0011-2018/ASSET/763154FF-F0D4-4C3D-923C-530AA15C1736/ASSETS/GRAPHIC/GPP3-0011-2018-FIG3.GIF
69. Weitner T, Friganović T, Šakić D. Inner Filter Effect Correction for Fluorescence Measurements in Microplates Using Variable Vertical Axis Focus. *Anal Chem*. 2022;94:38. doi:10.1021/ACS.ANALCHEM.2C01031/ASSET/IMAGES/LARGE/AC2C01031_0005.JPEG

70. Liu L, Beck C, Nøhr-Meldgaard K, et al. Inhibition of the ATP synthase sensitizes *Staphylococcus aureus* towards human antimicrobial peptides. *Scientific Reports* 2020 10:1. 2020;10(1):1-9. doi:10.1038/s41598-020-68146-4
71. Manner S, Fallarero A. Screening of Natural Product Derivatives Identifies Two Structurally Related Flavonoids as Potent Quorum Sensing Inhibitors against Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol 19, Page 1346. 2018;19(5):1346. doi:10.3390/IJMS19051346
72. Ouyang J, Sun F, Feng W, et al. Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* 2016;120(4):966-974. doi:10.1111/JAM.13073