

Abstract

The threat of bacterial resistance to antibiotics is a major concern, thus making the discovery of new molecules with antimicrobial activity a central goal of biomedical research. This PhD project aims to identify plant derived molecules with antimicrobial activity and elucidate their mechanisms of action. During the first year, the study of the labdane diterpenoid manool, a specialized metabolite of *Salvia* genus, Lamiaceae, was carried out. Firstly, the antimicrobial activity of manool was tested on different bacterial strains, both GRAM+ and GRAM-, and the most promising activity was observed towards *Streptococcus mutans*. Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) assay coupled with mass spectrometry was used as a reliable approach to identify the putative molecular target(s) of manool in *S. mutans*. DARTS was preliminary performed on protein extract (pe-DARTS) of *S. mutans* in presence or not of manool, and subsequently it was carried out on live bacteria. However, applying DARTS to bacterial systems presents intrinsic challenges due to the rapid replication and short generation times of prokaryotic cells. These fast dynamics can quickly trigger regulatory responses, such as transcriptional and translational changes, which can make it difficult to interpret DARTS results. Based on this evidence, experimental conditions were optimized to enable the effective application of DARTS in bacterial cells, to preserve the integrity of the protein/ligand interaction snapshot that DARTS aims to obtain. These approaches allowed the identification of manool interacting proteins belonging to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily. These proteins form a large family involved in the active transport of several molecules, using ATP to move substrates across cell membranes. During the second year of this PhD program, the putative targets of manool in *Streptococcus mutans* were validated. To confirm ABC transporters as potential targets of manool, amino acid and sugar uptake assays were performed using LC-MS and NMR analyses. Several studies have shown that ABC transporters are involved in the trafficking of various substrates across membranes, suggesting they may play a key role in bacterial susceptibility to antibiotics. Therefore, inhibition of ABC transporters by manool could enhance the efficacy of other antibacterial drugs. To test this hypothesis, LC-MS analysis of the supernatants of *S. mutans* incubated with and without manool in combination with

kanamycin was performed, along with experiments measuring the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) for manool and kanamycin. In order to elucidate the possible stress response and the principal pathway involved in manool treatment, *S. mutans* was subjected to differential proteomics studies. The results showed regulation of ABC transporters and several proteins involved in stress responses. Based on these results, the downstream effects of manool in *S. mutans* were investigated during the third year. Firstly, *S. mutans* was cultured in co-culture with human gingival fibroblasts (HGF-1). Incubating manool and *S. mutans* in co-culture with eukaryotic cells allowed studying the role of the diterpene in the adhesion and invasion of *S. mutans* in HGF-1. Subsequently, an evolution experiment was conducted to study *S. mutans*' response to a prolonged exposure to increasing concentrations of manool. After eight weeks, proteomics and genomics analyses were performed to investigate the possible mutations induced in bacteria by manool treatment. The experimental design used for investigation of manool's target on *S. mutans* was applied to ammoresinol, a sesquiterpenoid coumarin from *Ferula ammoniacum* (Apiaceae), that exhibited an interesting antimicrobial activity. As a starting point, the antibacterial activity of specialized metabolites from *F. ammoniacum* against bacteria was investigated. Ammoresinol was selected after antimicrobial screening as it showed promising activity against *Listeria monocytogenes*. Proteins involved in peptidoglycan synthesis and bacterial virulence were identified as putative ammoresinol targets by DARTS experiments on protein extracts (pe-DARTS) and bacterial cells (bc-DARTS). The two DARTS experiments led to the identification of *prfA* as a major putative target of ammoresinol in *L. monocytogenes*. Based on these results, a targeted proteomics assay was performed to confirm the interaction between ammoresinol and *prfA*.

Abstract

La resistenza batterica agli antibiotici rappresenta una grave minaccia globale, rendendo la scoperta di nuove molecole con attività antimicrobica un obiettivo centrale della ricerca biomedica. Questo progetto di dottorato mira a identificare molecole di origine vegetale con attività antimicrobica e a chiarirne i meccanismi d'azione. Durante il primo anno è stato condotto lo studio del diterpenoide labdanico manool, un metabolita specializzato del genere *Salvia* (Lamiaceae). In primo luogo, l'attività antimicrobica del manool è stata testata su diversi ceppi batterici, sia Gram-positivi che Gram-negativi, e l'attività più promettente è stata osservata nei confronti di *Streptococcus mutans*. Il saggio Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS), accoppiato alla spettrometria di massa, è stato utilizzato come approccio affidabile per identificare i potenziali bersagli molecolari del manool in *S. mutans*. La tecnica DARTS è stata inizialmente eseguita su estratti proteici (*pe*-DARTS) di *S. mutans* in presenza o assenza di manool, e successivamente applicata a batteri vivi. Tuttavia, l'applicazione della tecnica DARTS a sistemi batterici presenta sfide intrinseche dovute alla rapida replicazione e ai brevi tempi di generazione delle cellule procariotiche. Queste dinamiche rapide possono innescare risposte regolatorie veloci, come cambiamenti trascrizionali e traduzionali, rendendo difficile l'interpretazione dei risultati DARTS. Alla luce di queste evidenze, le condizioni sperimentali sono state ottimizzate per consentire un'applicazione efficace del protocollo DARTS nelle cellule batteriche, preservando l'integrità dell'istantanea interazione proteina/ligando che la tecnica DARTS mira a ottenere. Questi approcci hanno permesso l'identificazione di proteine interagenti con il manool appartenenti alla superfamiglia dei trasportatori ABC (ATP-binding cassette). Queste proteine costituiscono una grande famiglia coinvolta nel trasporto attivo di numerose molecole, utilizzando l'ATP per favorire il passaggio dei substrati attraverso le membrane cellulari. Durante il secondo anno del programma di dottorato, sono stati validati i potenziali bersagli del manool in *Streptococcus mutans*. Per confermare i trasportatori ABC come possibili bersagli del manool, sono stati eseguiti saggi di uptake di amminoacidi e zuccheri mediante analisi LC-MS e NMR. Numerosi studi hanno inoltre dimostrato che i trasportatori ABC sono coinvolti nel traffico di vari substrati attraverso le membrane, suggerendo che possano svolgere un ruolo

chiave nella suscettibilità batterica agli antibiotici. Pertanto, l'inibizione dei trasportatori ABC da parte del manool potrebbe potenziare l'efficacia di altri farmaci antibatterici. Per testare questa ipotesi, è stata effettuata un'analisi LC-MS dei surnatanti di *S. mutans* incubato con e senza manool in combinazione con kanamicina, insieme a esperimenti di determinazione dell'indice di concentrazione inibitoria frazionaria (FICI) per manool e kanamicina. Al fine di chiarire la possibile risposta allo stress e la principale via coinvolta nel trattamento con manool, *S. mutans* è stato sottoposto a studi di proteomica differenziale. I risultati hanno mostrato la regolazione dei trasportatori ABC e di diverse proteine coinvolte nelle risposte allo stress. Sulla base di questi risultati, durante il terzo anno sono stati indagati gli effetti a valle del manool in *S. mutans*. In primo luogo, *S. mutans* è stato coltivato in co-coltura con fibroblasti gengivali umani (HGF-1). L'incubazione di manool e *S. mutans* in co-coltura con cellule eucariotiche ha consentito di studiare il ruolo del diterpene nell'adesione e nell'invasione di *S. mutans* nelle cellule HGF-1. Successivamente, è stato condotto un esperimento di evoluzione per studiare la risposta di *S. mutans* a un'esposizione prolungata a concentrazioni crescenti di manool. Dopo otto settimane, sono state eseguite analisi proteomiche e genomiche per indagare le possibili mutazioni indotte nel batterio dal trattamento con manool. Il disegno sperimentale utilizzato per l'indagine del bersaglio del manool in *S. mutans* è stato applicato anche all'ammoresinolo, una cumarina sesquiterpenica isolata da *Ferula ammoniacum* (Apiaceae), che ha mostrato un'interessante attività antimicrobica. Come punto di partenza, è stata valutata l'attività antibatterica dei metaboliti specializzati di *F. ammoniacum* contro diversi batteri. L'ammoresinolo è stato selezionato dopo uno screening antimicrobico poiché ha mostrato un'attività promettente contro *Listeria monocytogenes*. Proteine coinvolte nella sintesi del peptidoglicano e nella virulenza batterica sono state identificate come potenziali bersagli dell'ammoresinolo mediante esperimenti DARTS su estratti proteici (*pe-DARTS*) e su cellule batteriche (*bc-DARTS*). I due esperimenti DARTS hanno portato all'identificazione di PrfA come principale potenziale bersaglio dell'ammoresinolo in *L. monocytogenes*. Sulla base di questi risultati, è stato eseguito un saggio di proteomica mirata per confermare l'interazione tra ammoresinolo e PrfA.