

Cellular Microbiology Emerging

P. Cossart, P. Boquet, S. Normark, R. Rappuoli

Nel 1996 emerge una nuova disciplina tra la biologia cellulare e la microbiologia: è la **MICROBIOLOGIA CELLULARE**



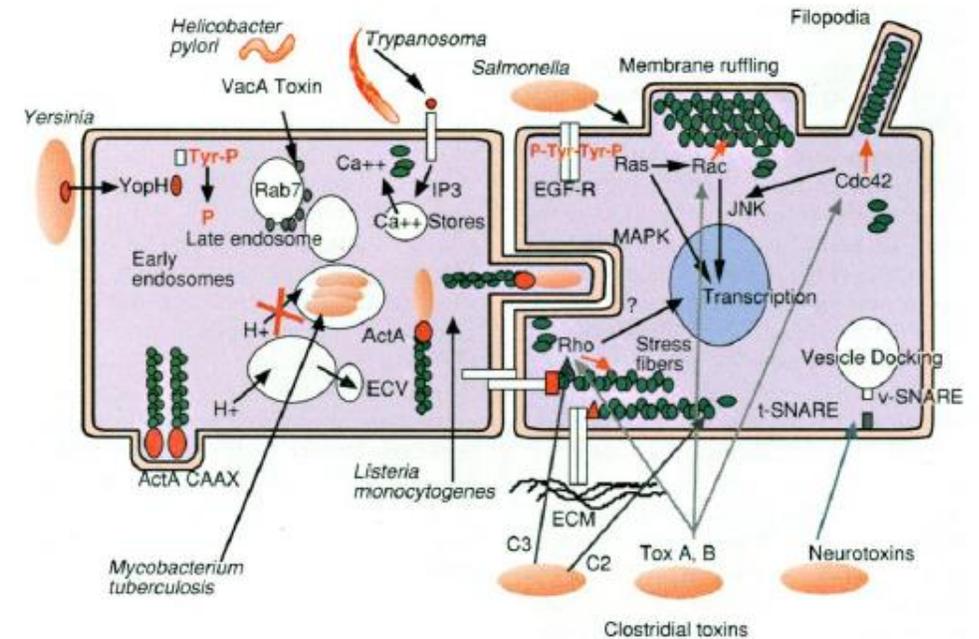
È una disciplina che studia i meccanismi di infezione utilizzati da batteri patogeni per rispondere ad importanti domande di microbiologia e biologia cellulare

A new discipline, cellular microbiology, is emerging at the interface between cell biology and microbiology. Traditional cell biological approaches are already widely used to unravel the tactics microbes utilize to infect their hosts, but the use of pathogens to tackle questions in cell biology is just now yielding promising approaches and elegant results. Two meetings, in 1989 and 1991 (1), laid the groundwork for the field, and a third meeting in 1995 highlighted recent progress (2).

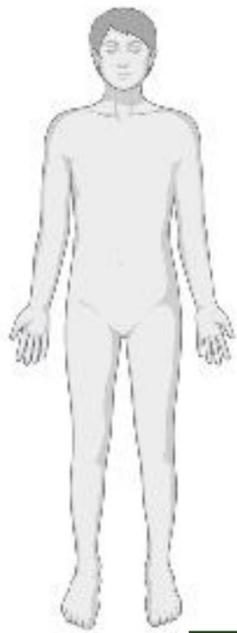
A major focus of this new field is the actin network, which together with intermediate filaments and microtubules constitute the cytoskeleton. The rapid assembly and disassembly of actin microfilaments is essential for phagocytosis, motility, cell division, and adhesion to a substratum or to another cell. Yet, the signaling pathways that control actin dynamics are poorly understood. Bacteria that can be genetically manipulated and parasites can provide tools to dissect these control pathways. When cer-

tain bacteria, such as *Salmonella* and *Shigella*, infect cells, they mimic the action of epidermal growth factor (EGF), inducing membrane ruffling and active actin polymerization (3-5) (see figure). The ruffling leads to internalization of the bacteria.

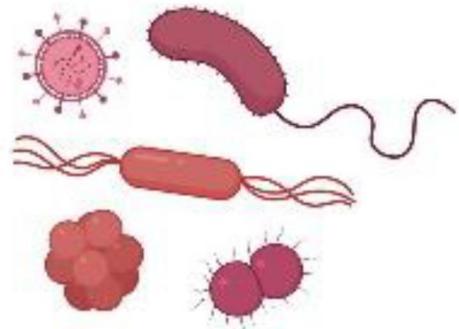
The internalization of other pathogens occurs without membrane ruffling or even actin polymerization. The parasite *Trypanosoma cruzi* enters cells by triggering a combination of events—a transient increase in cytosolic free calcium, rapid rearrangement of the cortical actin cytoskeleton, and lysosome recruitment and clustering at the invasion site (6, 7). Lysosomes contribute membrane for the formation of the parasitophorous vacuole. Disruption of cortical actin by the increase in local calcium allows lysosomes to migrate and fuse, a phenomenon also regulated by calcium. Phospholipase C



P. Cossart is with the Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Institut Pasteur, Paris, France. E-mail: pcosart@pasteur.fr. P. Boquet is with INSERM, U452, Faculté de Médecine, 06107 Nice, France. S. Normark is with Karolinska Institute, Microbiology and Tumor Biology Center, S-14181, Stockholm, Sweden. R.



Interazione
OSPITE - MICRORGANISMO



benefica

INFEZIONE
ovvero quando un
microrganismo si
stabilisce e cresce in
un ospite

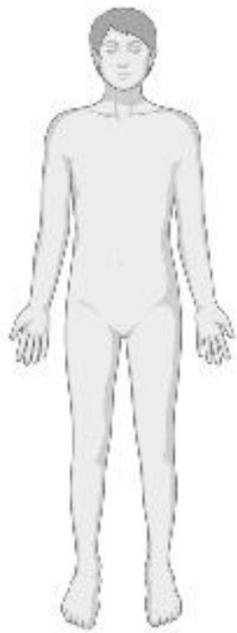
dannosa

Colonizzazione da parte di
microrganismi non patogeni o
commensali (**MICROBIOTA**) di
nicchie ecologiche all'interno
dell'ospite in condizioni normali

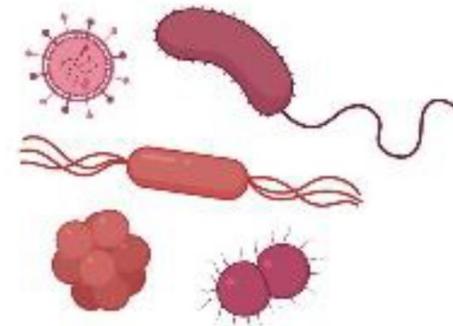
Interazione con
microrganismi
invasori può
danneggiare l'ospite

Interazione che non causa **MALATTIA**

Interazione che determina
l'insorgenza della **MALATTIA**



Interazione **OSPITE - MICRORGANISMO**



PATOGENI
microrganismi che vivono sulla superficie o all'interno di un organismo ospite provocando danni all'ospite stesso

PATOGENO PRIMARIO
se in grado di causare malattia in un individuo sano per interazione diretta

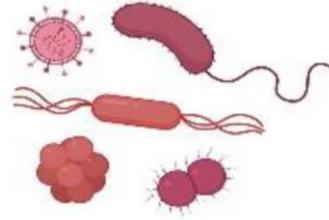
PATOGENO OPPORTUNISTA
se incapace di causare malattia in un individuo sano

dannosa

Interazione con microrganismi invasori può danneggiare l'ospite

Interazione che determina l'insorgenza della **MALATTIA**

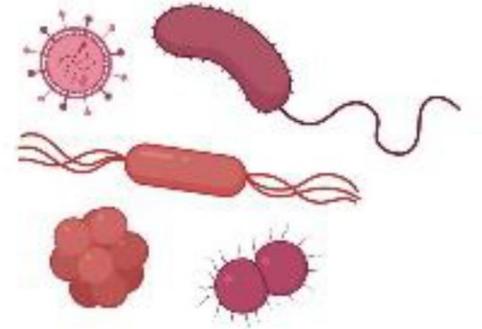
Classificazione dei patogeni



- **Patogeni extracellulari** → crescono al di fuori delle cellule dell'ospite.
- **Patogeni intracellulari facoltativi** → si replicano all'interno delle cellule dell'ospite in modo preferenziale od occasionale. Possono replicare anche al di fuori delle cellule dell'ospite.
- **Patogeni intracellulari obbligati** → si replicano esclusivamente all'interno delle cellule dell'ospite.
- **Patogeni tossigenici** → causano malattia attraverso la produzione di esotossine.



Interazione **OSPITE - PATOGENO**



L'esito dipende:

- Dalla **RESISTENZA** o **SUSCETTIBILITÀ** dell'ospite al parassita
- Dalla **PATOGENICITÀ** del batterio → capacità del microrganismo di infliggere un danno all'ospite



misura quantitativa è la **virulenza** ovvero il numero di cellule che suscitano una risposta patologica nell'ospite

Relazione dinamica in cui virulenza del patogeno e resistenza dell'ospite variano continuamente

Pathogenic Infection

Exposure

Adhesion

Invasion

Colonization

Key

- ▲ Toxin
- Pathogen
- Adhesin
- Receptor

Epithelial cell

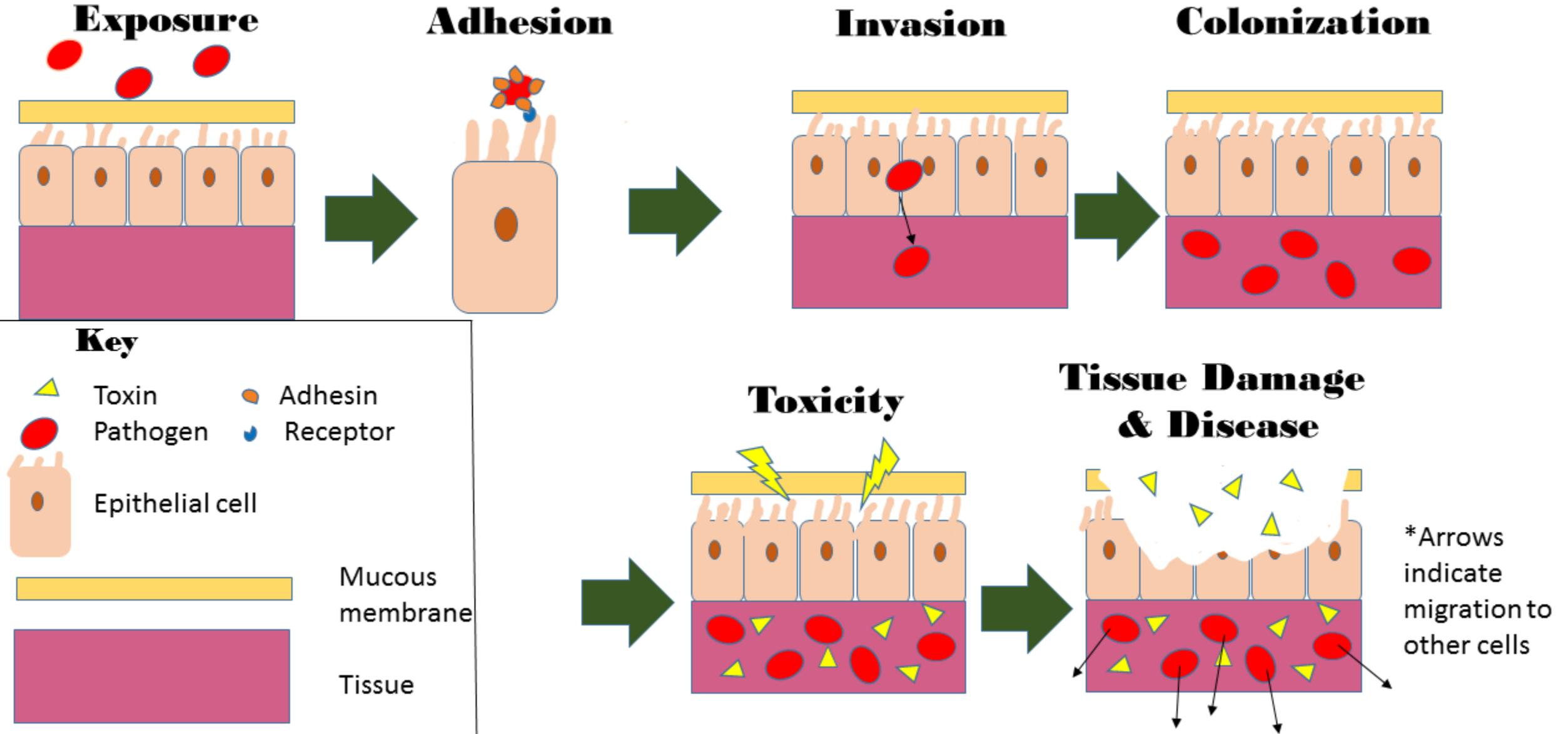
Mucous membrane

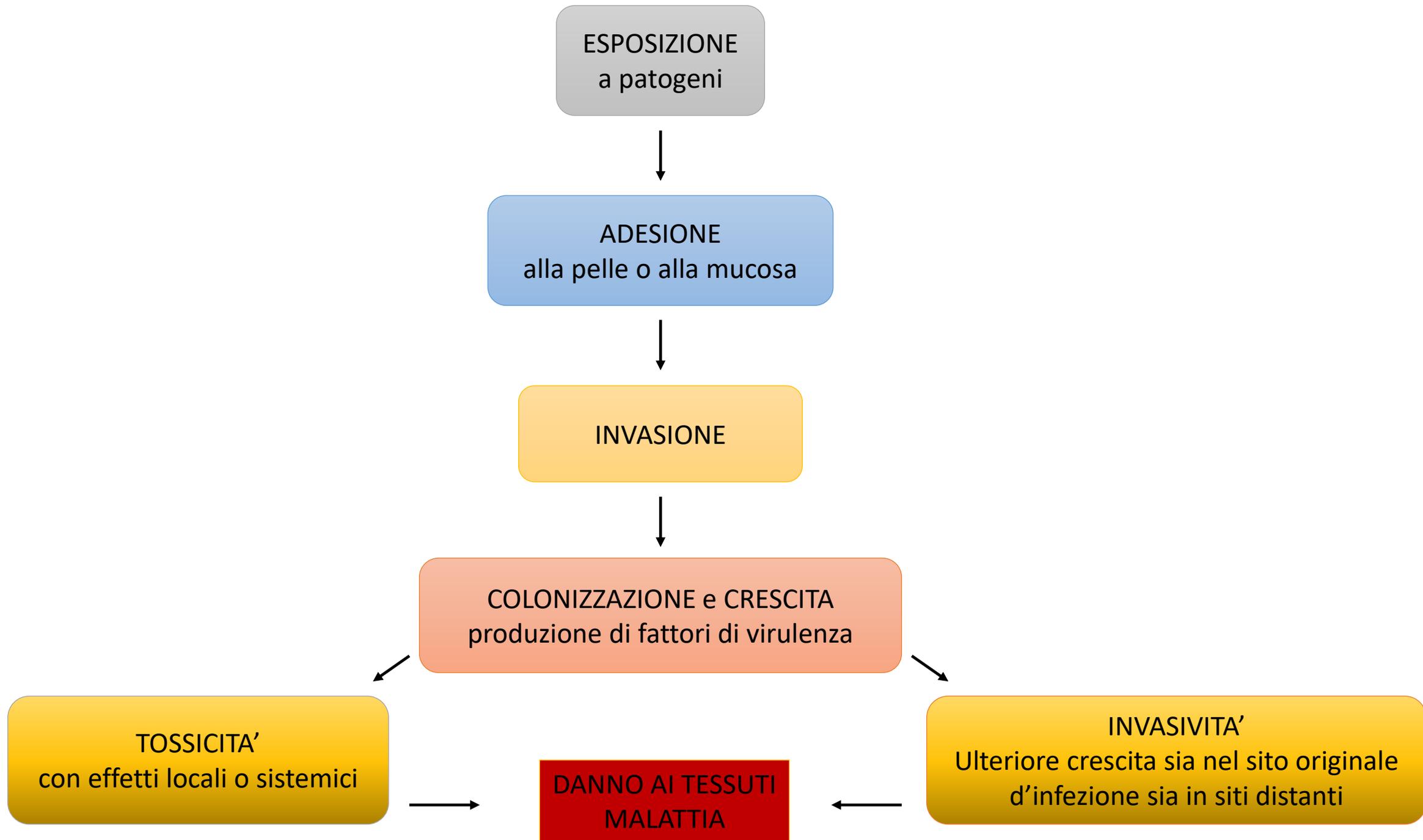
Tissue

Toxicity

Tissue Damage & Disease

*Arrows indicate migration to other cells





ESPOSIZIONE
a patogeni



ADESIONE
alla pelle o alla mucosa

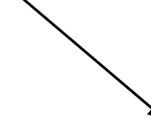
Le prime fasi del processo infettivo di un patogeno prevedono:

- **Penetrazione** del microrganismo nell'ospite attraverso uno dei numerosi punti di ingresso del corpo umano:
 - Mucose delle vie respiratorie
 - Mucose del tratto gastrointestinale
 - Mucose del tratto urogenitale
 - Cute nei punti dove sono presenti discontinuità come tagli, punture o ustioni
- **Elusione** delle difese aspecifiche dell'ospite come la fagocitosi, l'acidità dello stomaco o del tratto urogenitale, enzimi idrolitici e proteolitici presenti nella saliva, nello stomaco e nell'intestino tenue
- **Adesione** alle cellule dell'ospite (attuato da alcuni batteri)

ESPOSIZIONE
a patogeni



ADESIONE
alla pelle o alla mucosa



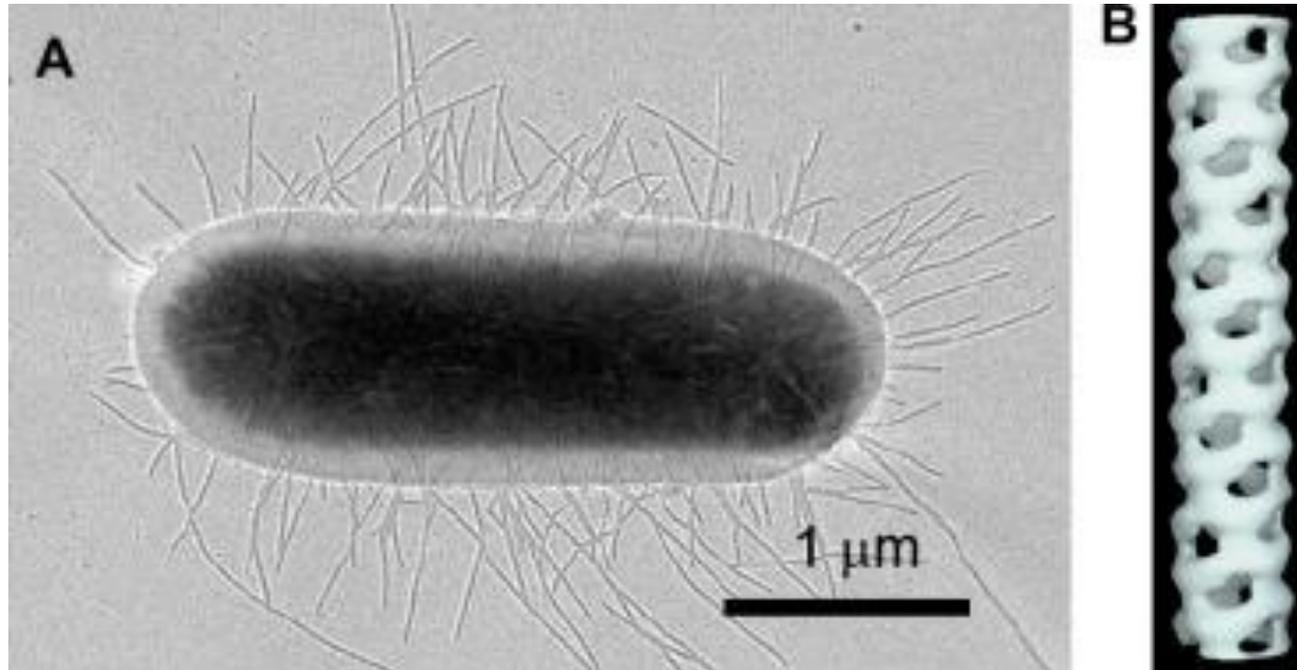
Può essere:

- Specie-specifica
- Cellula/tessuto-specifica

Adesione tra patogeno e cellula ospite avviene attraverso fattori specifici che permettono l'internalizzazione del patogeno e la sua diffusione:

- interazioni proteina-proteina
- macromolecole rappresentate da polisaccaridi sintetizzati e secreti dal batterio (capsula, glicocalice, strato mucillaginoso)
- Pili o fimbrie

Pili o fimbrie



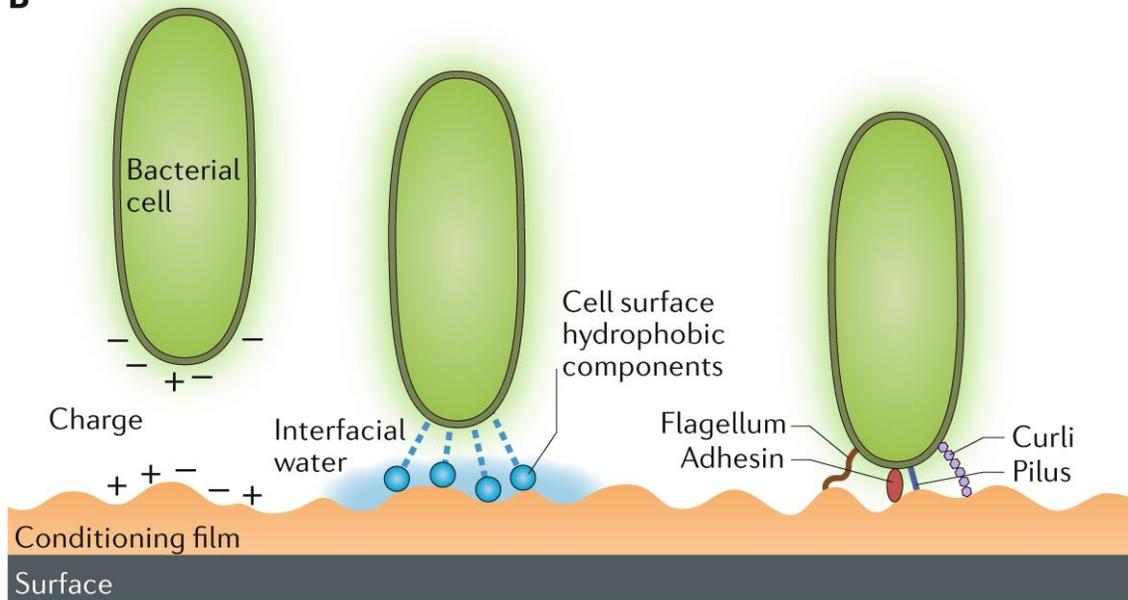
Capitani et al., 2006

- Sottili strutture proteiche filamentose (diametro tra 2 e 10 nm) che protrudono dalla superficie dei batteri con diverse importanti funzioni:
 - Pili sessuali o coniugativi
 - Pili conduttori di elettricità
 - Pili di tipo IV
 - Pili o fimbrie
- I pili di lunghezza ridotta che facilitano l'adesione al substrato sono comunemente chiamati **fimbrie**
- Consentono alle cellule batteriche di aderire alle superfici, inclusi i tessuti animali, o di formare biofilm sulla superficie di supporti solidi

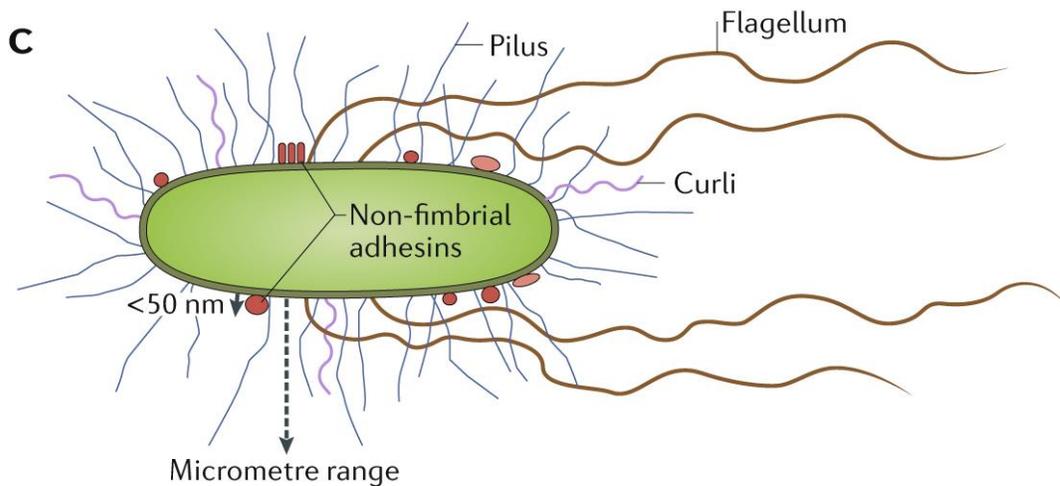
ADESIONE

Pili o fimbrie nel processo di adesione

B



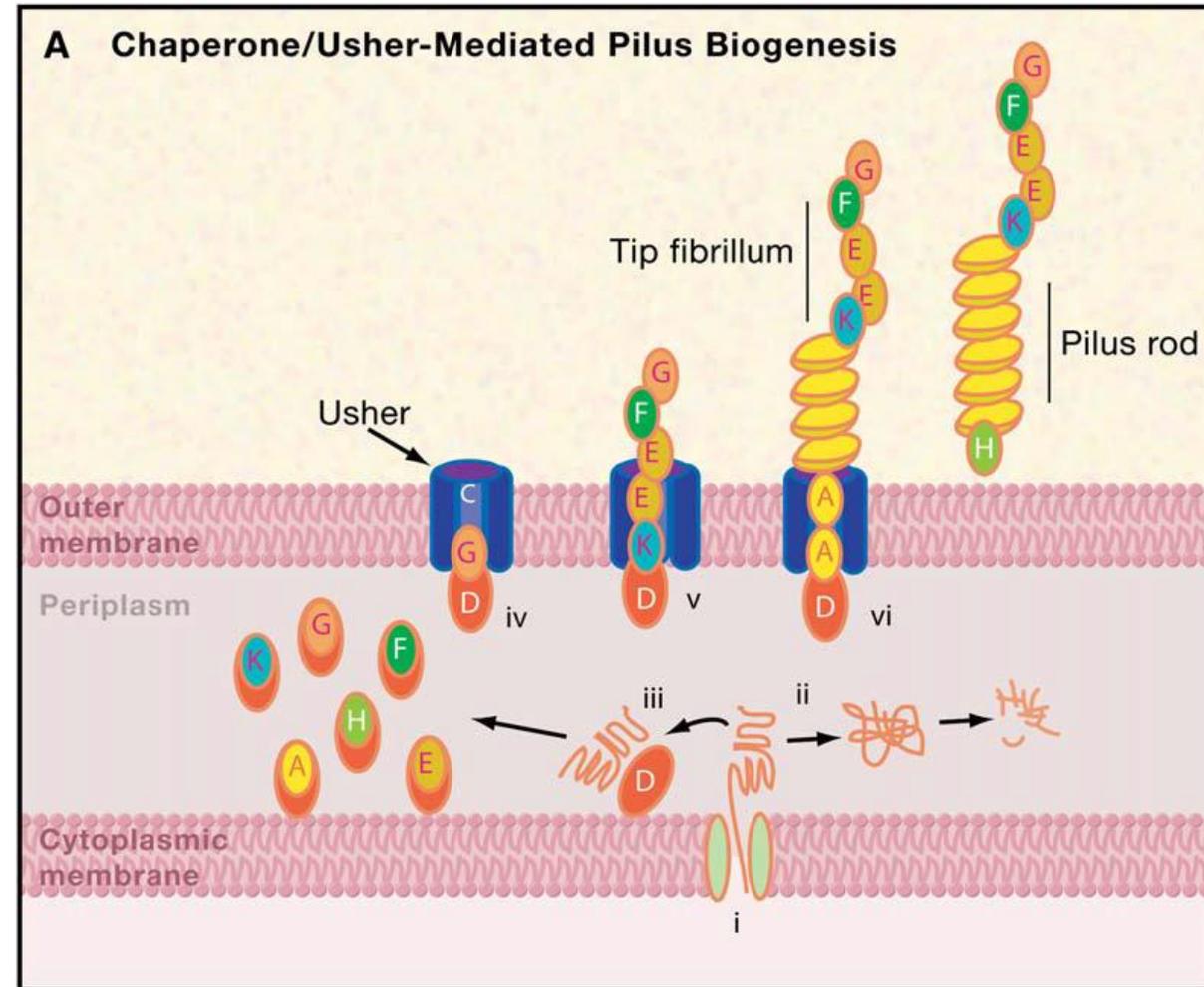
C



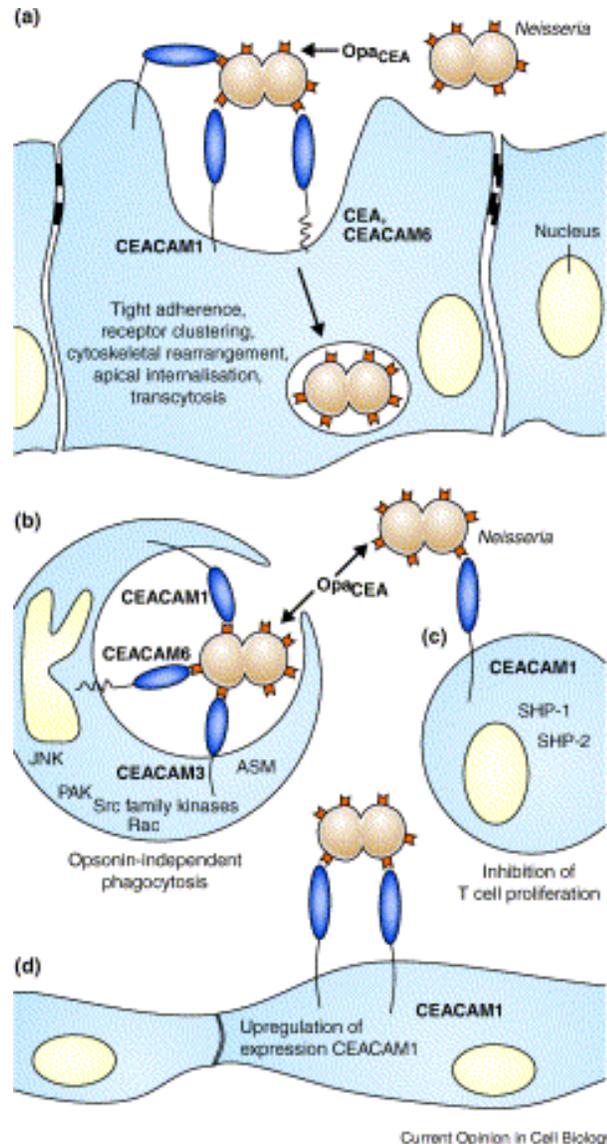
- Organelli adesivi che sporgono dalla superficie dei batteri
- Si legano alle glicoproteine delle cellule ospiti, iniziando il processo di adesione
- Sono importanti fattori di virulenza per diverse malattie, in particolare per le infezioni del tratto urinario, genitale e gastrointestinale
- I pili più sofisticati sono i pili retrattili, che dopo il contatto iniziale tra il batterio e la cellula ospite, si ritraggono per ridurre la distanza tra i due partner e favorire il crosstalk

Pili o fimbrie nel processo di adesione: P pilo in UPEC

- Pilo associato alla pielonefrite (P) espresso da ceppi di *E. coli* che colonizzano le vie urinarie e successivamente infettano il rene, noti anche come *E. coli* uropatogeni o UPEC.
- Codificato dal cluster genico *pap*
- La biogenesi è un esempio di pathway «chaperon/usher»
- Si legano attraverso l'adesina **PapG** all' α -D-galactopiranosil-(1-4)- β -D-galactopiranoside dei glicolipidi delle cellule del tratto urinario superiore. Le varianti di PapG riconoscono diversi ma correlati recettori Gala-(1-4)-Gal diversamente distribuiti all'interno dei tessuti e della popolazione dell'ospite, per cui l'espressione differenziale delle PapG determina la specificità del tessuto e dell'ospite.



Neisseria: un esempio di aderenza specifica



Hauck and Meyer, 2003

Neisseria gonorrhoeae e N. meningitidis:

- Batteri **patogeni** Gram-negativi;
- Altamente addattati a sopravvivere all'interno di un'unica popolazione ospite, **l'uomo**;
- L'adesione iniziale è mediata dai **pili**, e la retrazione dei pili consente poi un legame secondario stretto tra proteine Opa e le CEACAM espresse apicalmente.
- L'adesione e l'ingresso dei batteri nelle cellule dell'ospite è mediato dalle proteine **Opa**, una delle principali componenti di superficie di questi patogeni;
- Le proteine Opa si legano alla famiglia di recettori umani **CEACAM** espressi da diversi tipi di cellule tra cui cellule epiteliali delle superfici mucosali e varie cellule immunitarie.



I membri della famiglia CEACAM sono riconosciuti in modo diverso dalle varianti della proteina Opa → di conseguenza, la distribuzione di ciascuna CEACAM ha il potenziale per influenzare il tropismo cellulare di *Neisseria* che esprime diverse *proteine Opa in vivo*

ESPOSIZIONE
a patogeni



ADESIONE
alla pelle o alla mucosa



INVASIONE

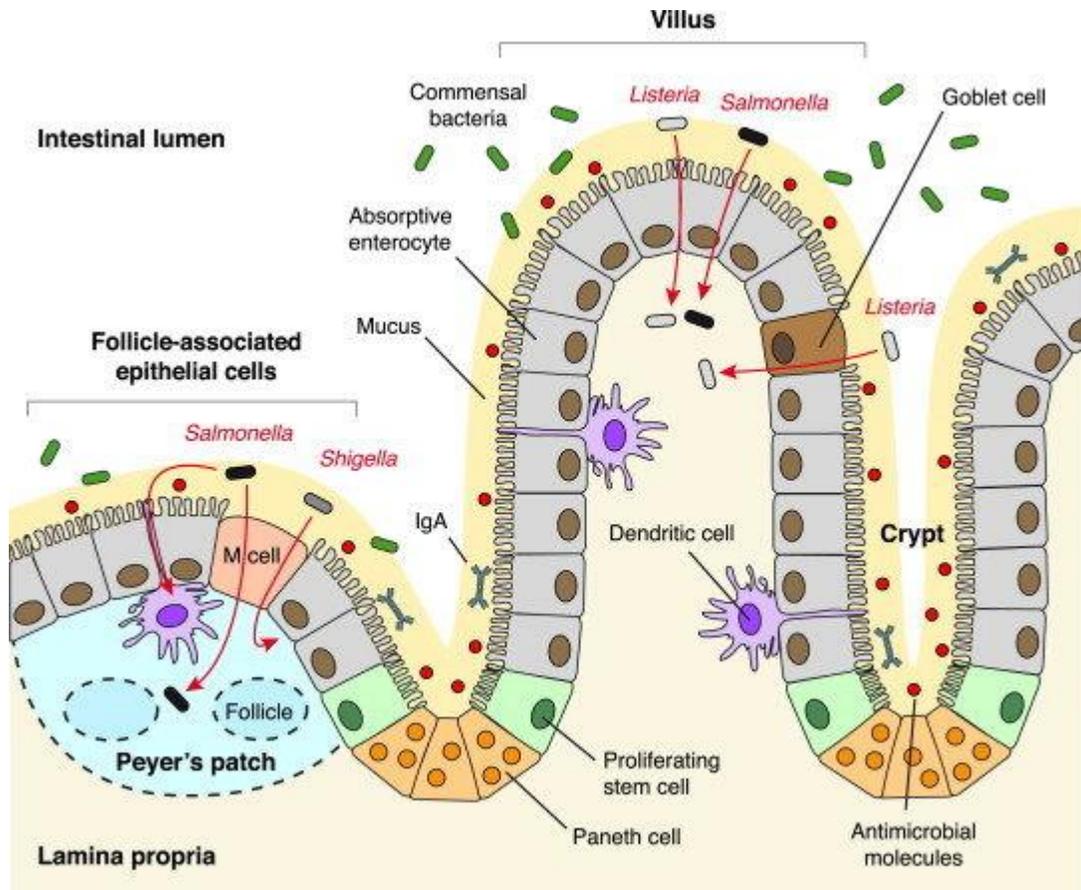


Per stabilire e mantenere un'infezione di successo, i patogeni microbici hanno evoluto una varietà di strategie per invadere l'ospite, evitare o resistere alla risposta immunitaria innata, danneggiare le cellule e moltiplicarsi in regioni specifiche.

È un meccanismo attivo indotto dal patogeno, da non confondere con la fagocitosi.

INVASIONE

Per invasività si intende la capacità dei batteri di entrare nelle cellule ospiti o penetrare le superfici della mucosa, propagandosi dal sito iniziale dell'infezione.



Ribert and Cossart, 2015

Una delle principali barriere del sistema immunitario dell'organismo è costituita dagli epitelii, strati di tessuti altamente organizzati che rivestono la maggior parte delle superfici dei tessuti e rappresentano le interfacce a contatto con l'ambiente esterno.

Molteplici fattori specifici dell'ospite e dell'agente patogeno giocano ruoli importanti nelle strategie di invasione utilizzate sia da agenti patogeni extracellulari sia da patogeni intracellulari per superare le barriere epiteliali e colonizzare e infettare l'ospite.

Numerosi enzimi batterici come collagenasi e ialuronidasi che degradano i componenti della matrice extracellulare permettono ai batteri un più facile accesso alla superficie della cellula e ai tessuti

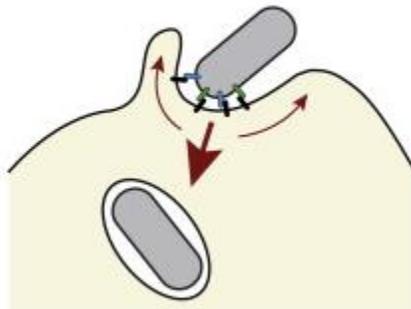
Meccanismi di invasione

Durante l'ingresso dei batteri, sono utilizzati due meccanismi distinti caratterizzati da due diversi tipi di riarrangiamento della membrana:

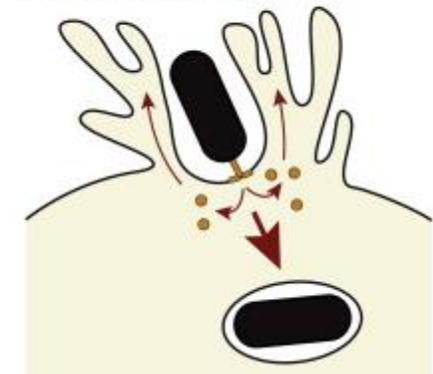
Zipper:
la membrana avvolge strettamente il batterio

Trigger:
caratterizzato dalla comparsa di grandi increspature della membrana nel sito di ingresso del batterio.

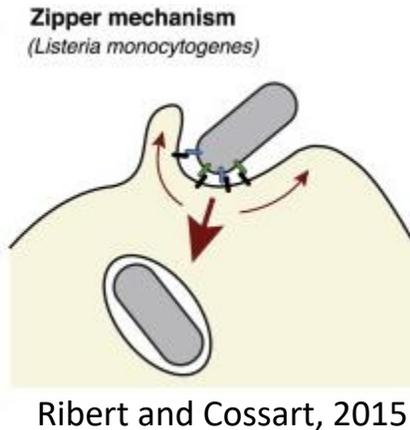
Zipper mechanism
(*Listeria monocytogenes*)



Trigger mechanism
(*Salmonella Typhimurium*)



Meccanismi di invasione: zipper



1. Contatto e adesione

Interazione iniziale tra una proteina di superficie batterica e il suo recettore sulla cellula ospite



2. Formazione della tasca fagocitaria

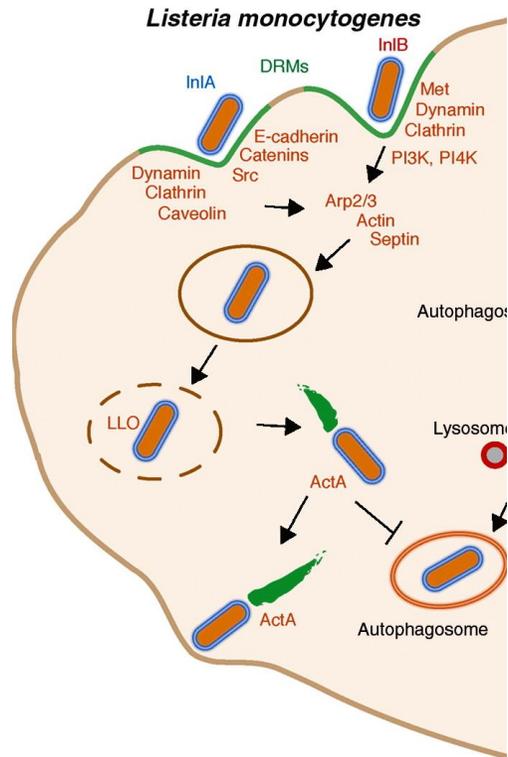
Dopo la formazione del complesso ligando-recettore, si innesca una cascata di segnali, tra cui la fosforilazione di proteine, ubiquitinazioni e modifiche dei fosfolipidi, che inducono la polimerizzazione dell'actina e l'estensione della membrana



3. Chiusura della tasca fagocitaria

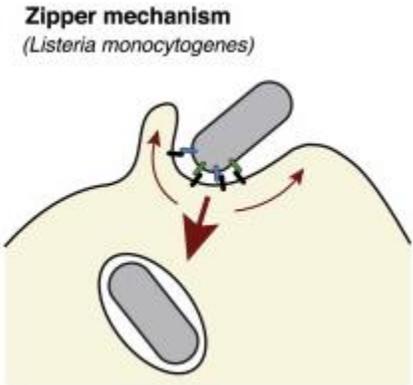
Si forma un vacuolo di internalizzazione e avviene la depolarizzazione dell'actina

Meccanismi di invasione: zipper



Esempi di batteri che utilizzano il meccanismo zipper per invadere:

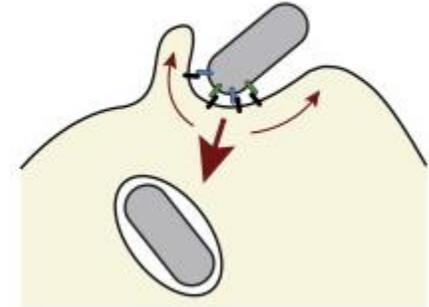
- **Listeria monocytogenes** → ha evoluto due principali proteine di invasione chiamate **internalina**, che interagisce con la molecola di adesione cellulare E-caderina, e **InlB**, che interagisce principalmente con Met, il recettore del fattore di crescita epatocitario.
- **Yersinia** → utilizza una molecola di superficie chiamata **invasina** per interagire con le integrine b1 sulla superficie delle cellule ospiti.



Ribert and Cossart, 2015

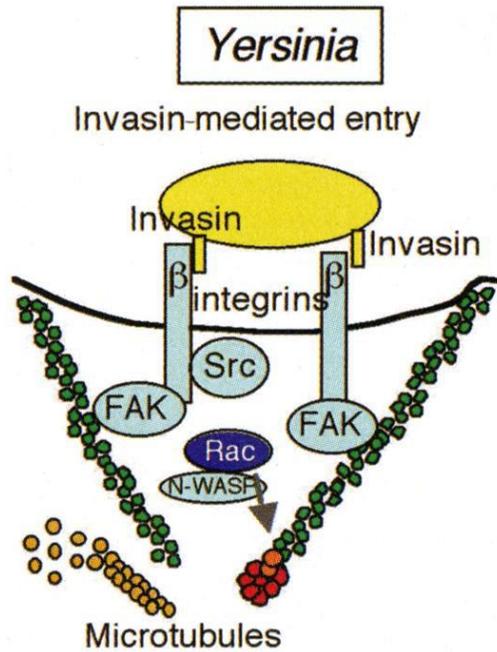
Meccanismi di invasione: zipper

Zipper mechanism
(*Listeria monocytogenes*)



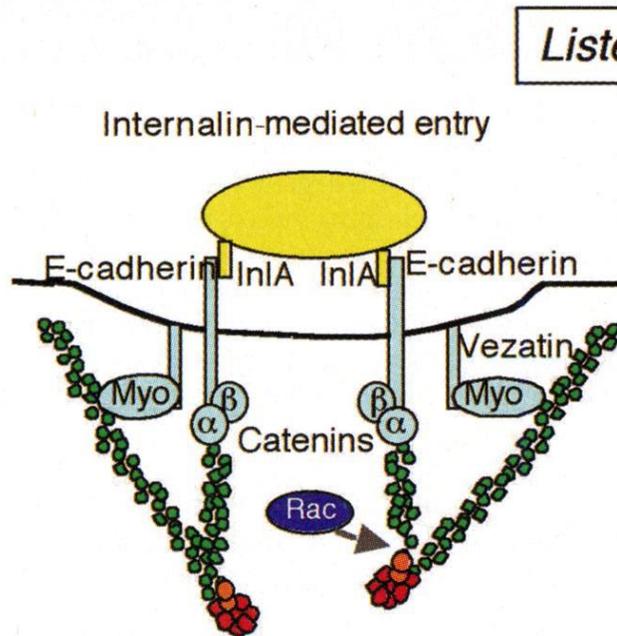
Ribert and Cossart, 2015

Esempi di batteri che utilizzano il meccanismo zipper per invadere:



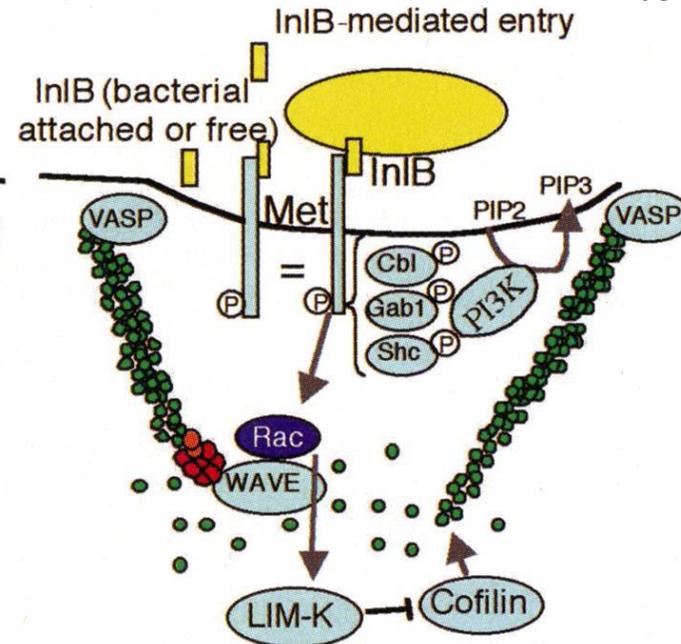
Yersinia

Invasin-mediated entry



Listeria

Internalin-mediated entry



InlB-mediated entry

InlB (bacterial attached or free)

Cossart and Sansonetti, 2004

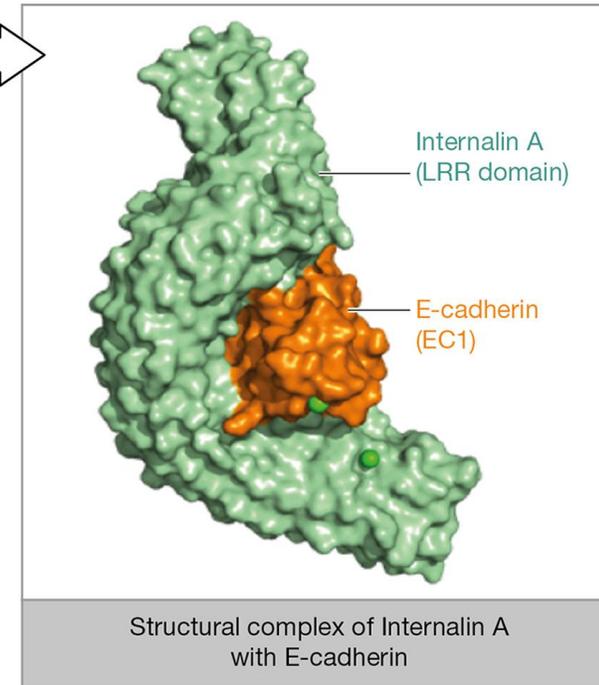
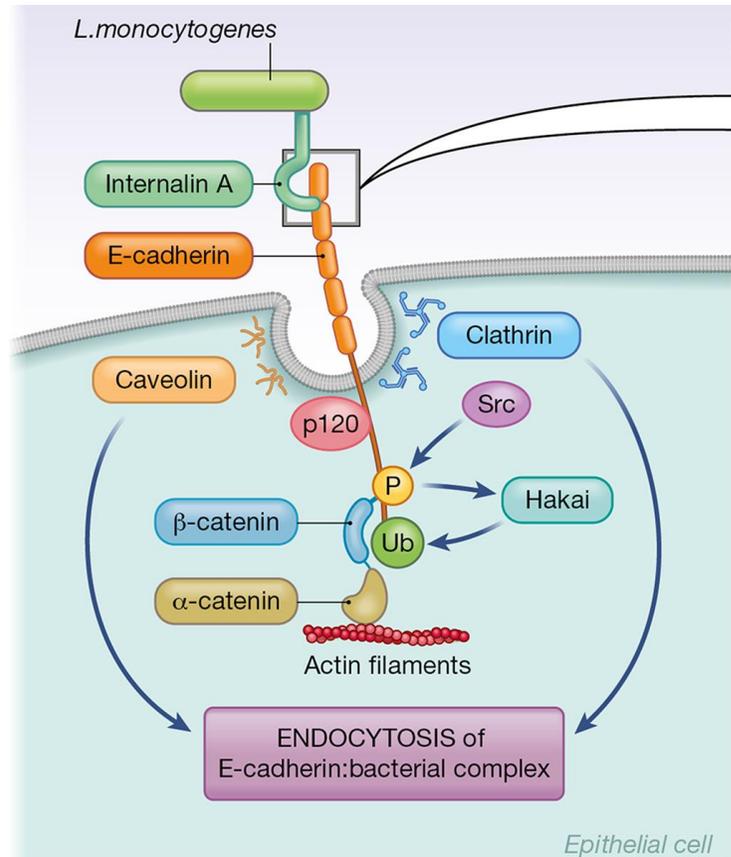
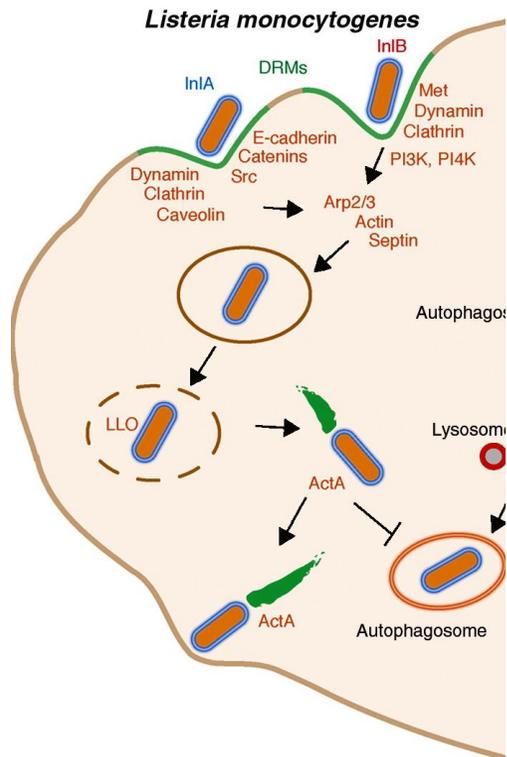
Invasina interagisce con le **integrine b1** sulla superficie delle cellule ospiti

Internalina interagisce con la molecola di adesione cellulare **E-caderina**

InlB interagisce principalmente con **Met**, il recettore del fattore di crescita degli epatociti (HGF)

INVASIONE

L. monocytogenes e il meccanismo di invasione zipper

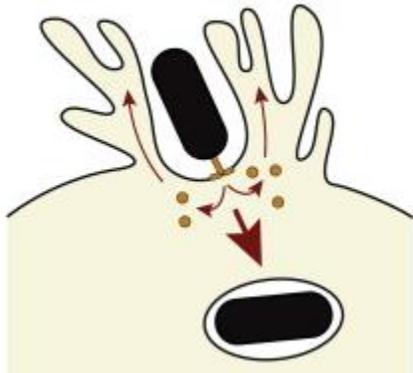


Il dominio **LRR** dell'Internalina circonda il primo ectodominio di **E-caderina**

Dash et al., 2021

Meccanismi di invasione: trigger

Trigger mechanism
(*Salmonella Typhimurium*)



Ribert and Cossart, 2015

I batteri attivano vie di segnalazione che portano a riarrangiamenti citoscheletrici su larga scala caratterizzati dalla formazione di protrusioni della membrana chiamate ruffles



Le increspature che si formano si ripiegano su stesse e si fondono con la superficie cellulare, intrappolando così i batteri nel sito di ingresso.



Questo meccanismo è indotto dal batterio:

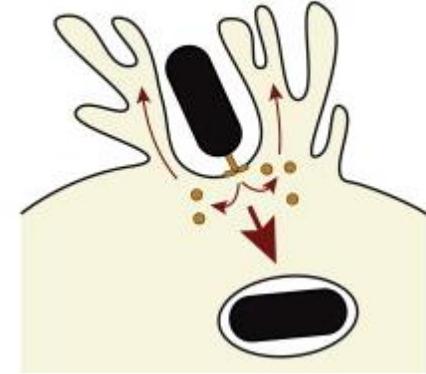
- I batteri iniettano direttamente nel citosol della cellula ospite, attraverso un TTSS, una serie di effettori che innescano diverse cascate di segnalazione intracellulare necessarie per l'ingresso
- In risposta a fattori di crescita solubili

Meccanismi di invasione: trigger

L'interazione dei batteri con le cellule epiteliali bersaglio avviene in 4 step:

1. Pre-interazione → gli effettori, immagazzinati nel citoplasma batterico, sono associati a chaperoni dedicati, il cui ruolo principale è quello di evitare l'associazione prematura e la loro degradazione proteolitica. Il TTSS è correttamente assemblato, ma la secrezione degli effettori è repressa fino a quando il batterio non stabilisce un contatto con il suo bersaglio cellulare.
2. Interazione → avviene il riconoscimento all'estremità del T3SS che attiva la secrezione degli effettori attraverso una segnalazione retroattiva.
3. Formazione di una tasca macropinocitaria → comporta riarrangiamenti localizzati ma massicci della superficie cellulare, caratterizzati da riarrangiamenti del citoscheletro di actina. Gli effettori inducono prima la depolimerizzazione locale dei microtubuli e poi la nucleazione e l'estensione dei filamenti di actina nel sito di ingresso del batterio.
4. Depolimerizzazione dell'actina e chiusura della tasca macropinocitaria

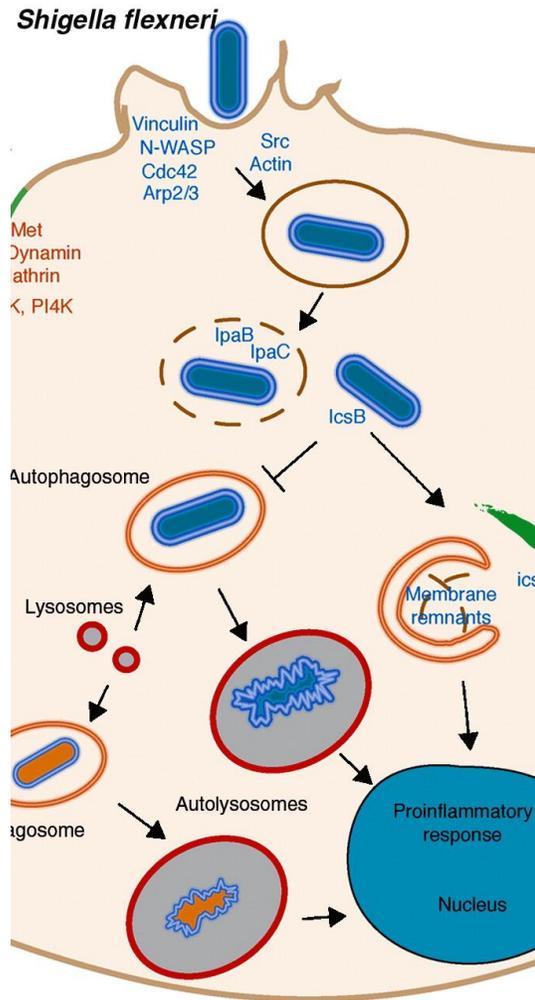
Trigger mechanism
(*Salmonella Typhimurium*)



Ribert and Cossart, 2015

INVASIONE

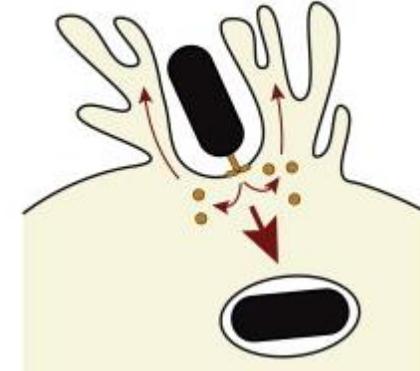
Meccanismi di invasione: trigger



Esempi di batteri che utilizzano il meccanismo trigger per invadere:

- ***Shigella*** → possono entrare in contatto con lo strato epiteliale tramite estensioni filopodiali prodotti dalle cellule dell'ospite. Al momento del contatto con i batteri, i filopodi si ritraggono e portano *Shigella* a contatto con la cellula, dove avviene l'invasione.
- ***Salmonella*** → mostra preferenze per il sito di ingresso in coltura tissutale. Questi loci vengono raggiunti grazie ad una motilità guidata dai flagelli.

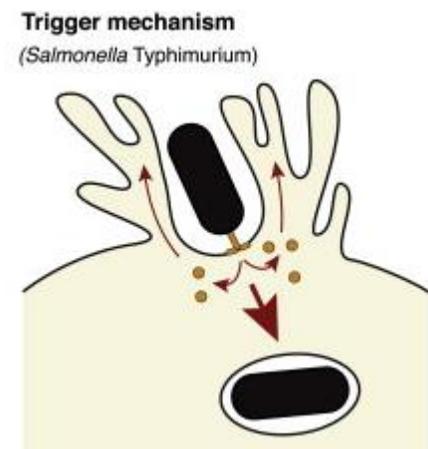
Trigger mechanism
(*Salmonella Typhimurium*)



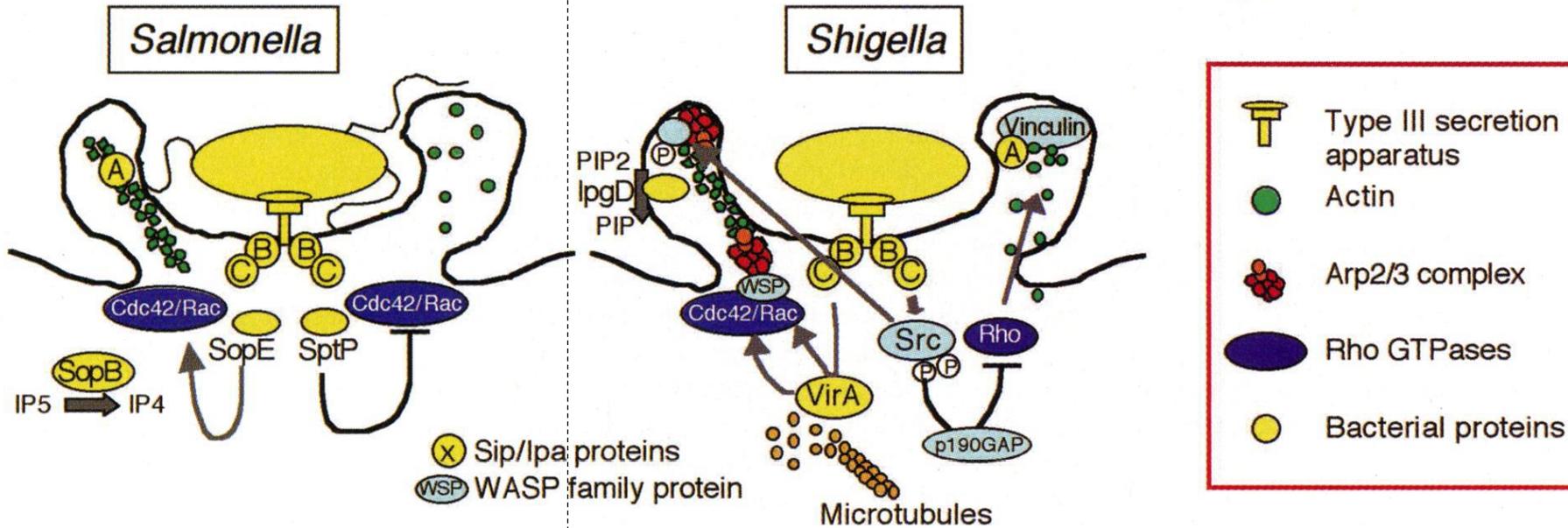
Ribert and Cossart, 2015

Meccanismi di invasione: trigger

Esempi di batteri che utilizzano il meccanismo trigger per invadere:



Ribert and Cossart, 2015

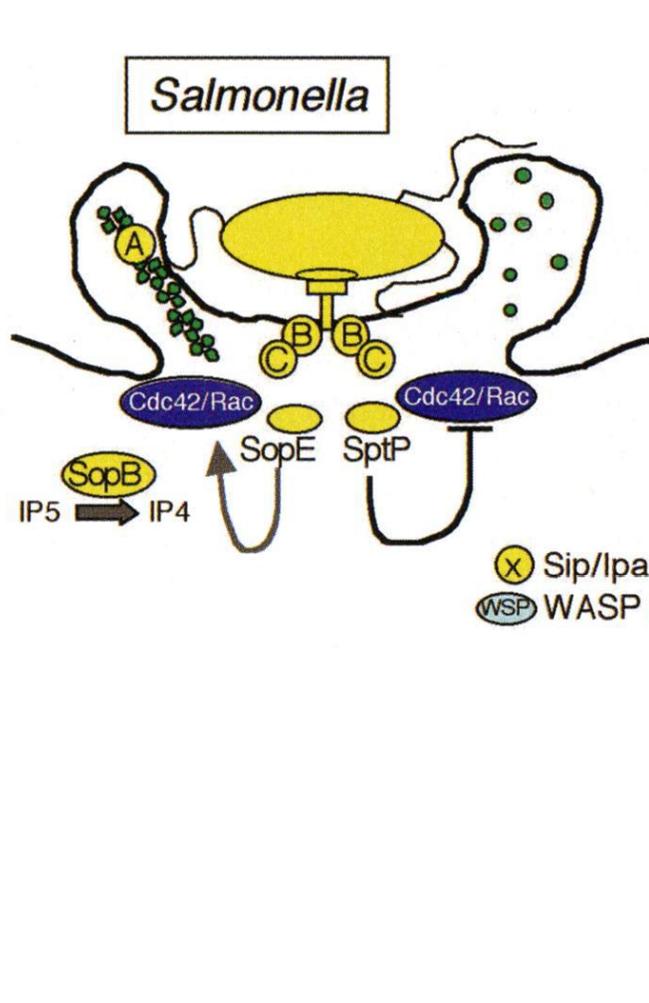


Cossart and Sansonetti, 2004

SipB e **SipC** formano il poro nella membrana della cellula ospite. **SipC** attraverso il dominio C-terminale citoplasmatico inizia la nucleazione dell'actina

IpaB interagisce con **CD44**, il recettore dell'acido ialuronico fortemente espresso sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali intestinali e sulla superficie di molti altri tipi di cellule. **IpaC** media la nucleazione dell'actina.

Meccanismo di invasione di *Salmonella*

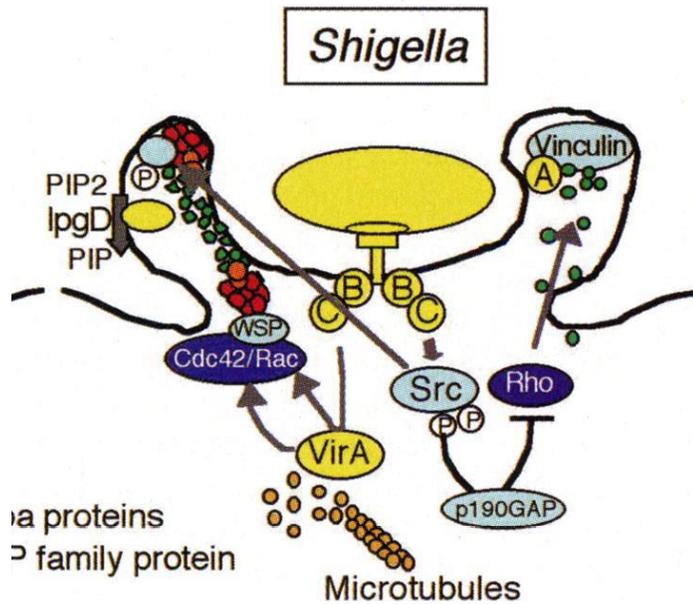


Effettori coinvolti nell'invasione di *Salmonella*:

- **SipB** e **SipC** formano il poro nella membrana della cellula ospite.
- **SipC** attraverso il dominio C-terminale citoplasmatico inizia la nucleazione dell'actina.
- **SopE** è un effettore che funziona come fattori di scambio delle GTPasi Cdc42 e Rac1 aumentando l'evento di nucleazione
- **SopB/SigD** stimola il riarrangiamento dell'actina.
- **SipA** lega e stabilizza i filamenti di actina
- **SptP** ha due attività: agisce come tirosin-fosfatasi per regolare l'attività delle MAPKinasi indotte dall'ingresso del batterio e agisce come GAP (GTPase-activating protein) su Cdc42 e Rac1 che antagonizza l'attività di SopE bloccando la polimerizzazione dell'actina

Meccanismo di invasione di *Shigella*

Effettori coinvolti nell'invasione di *Shigella*:

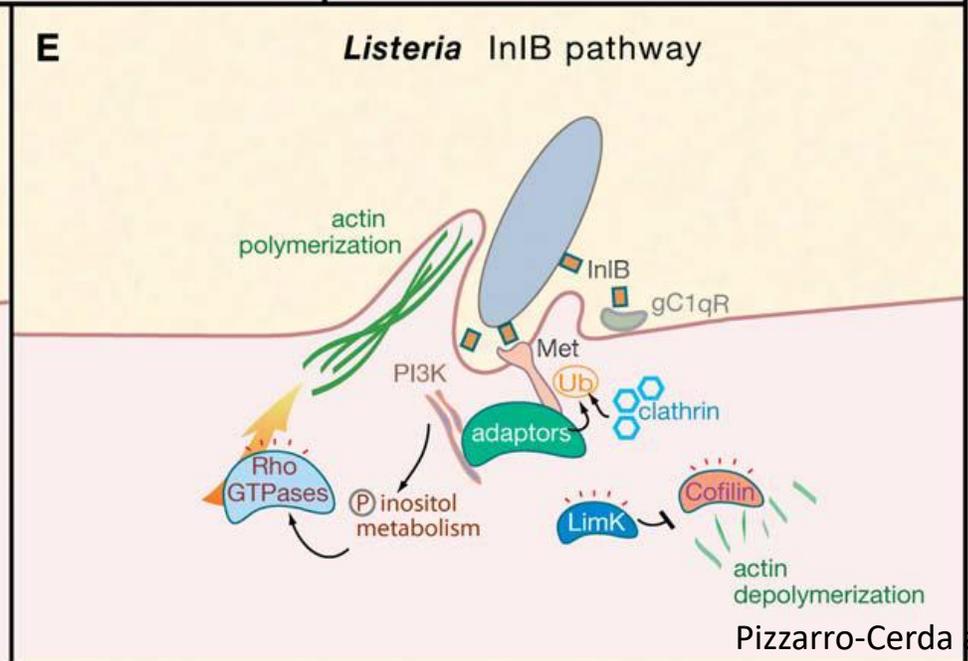
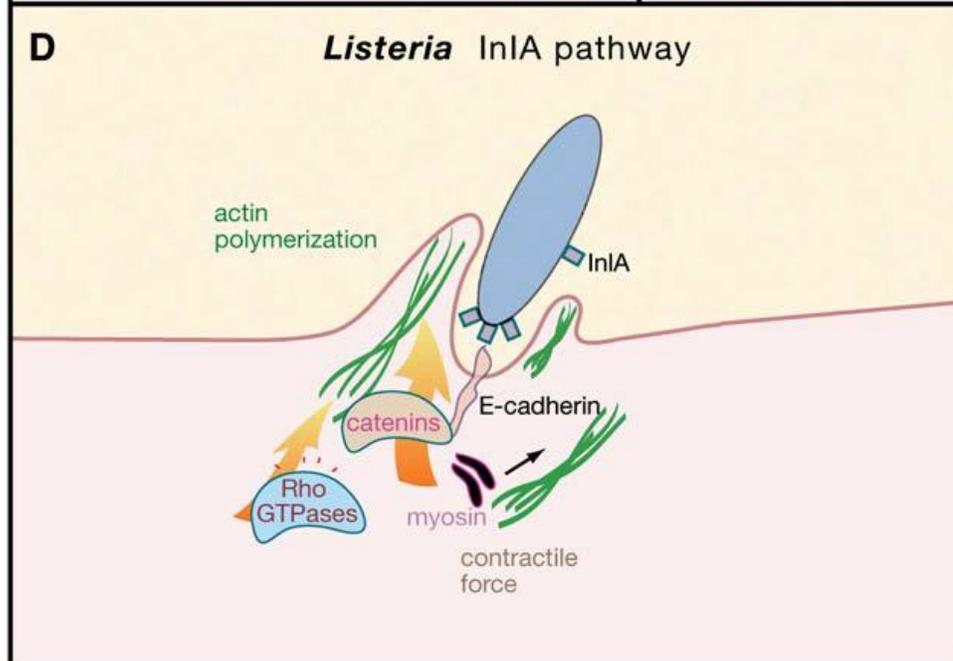
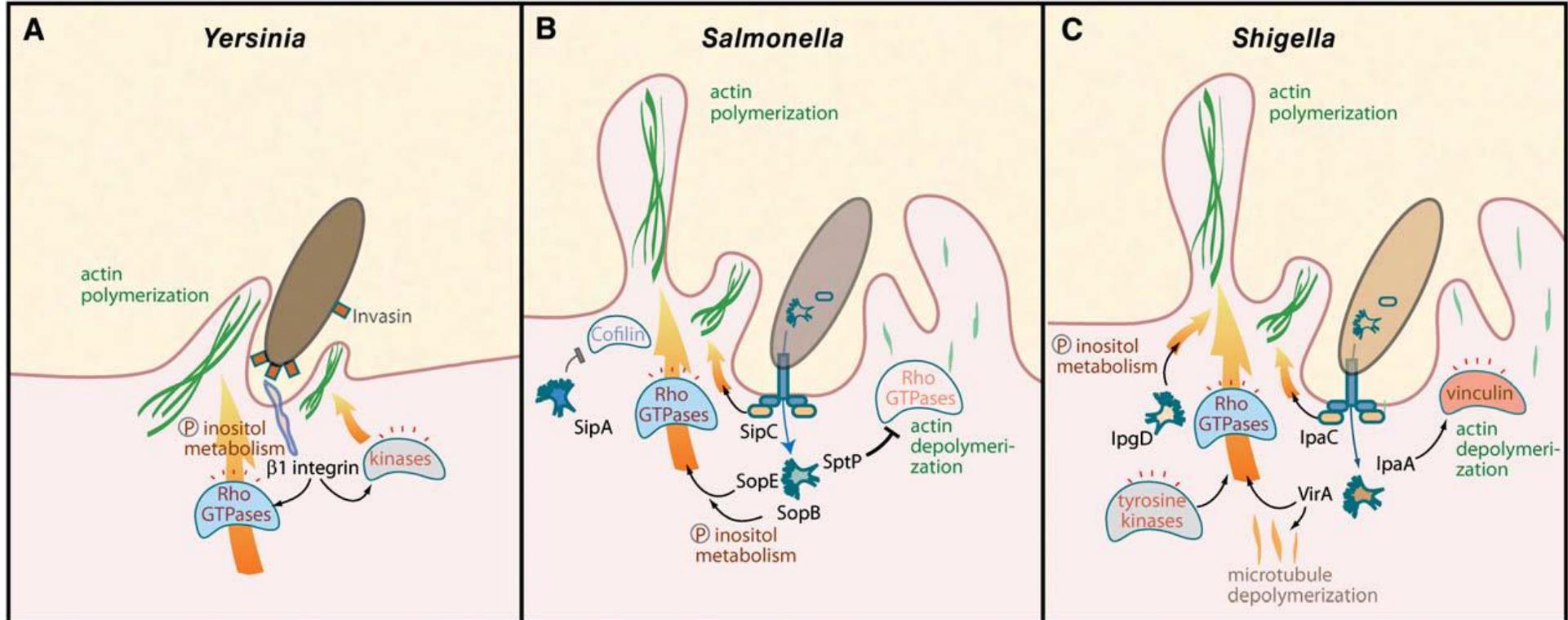


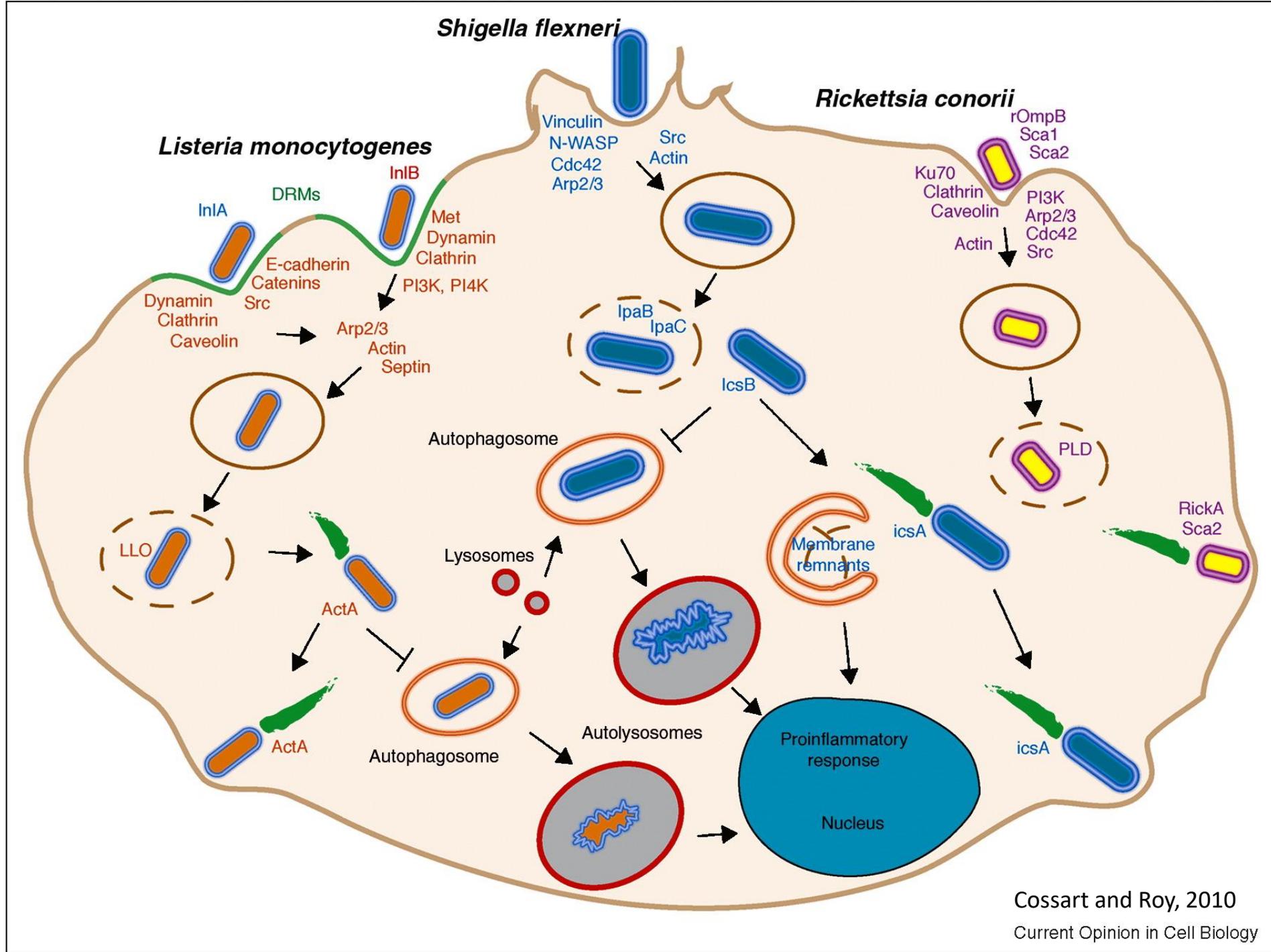
interazione

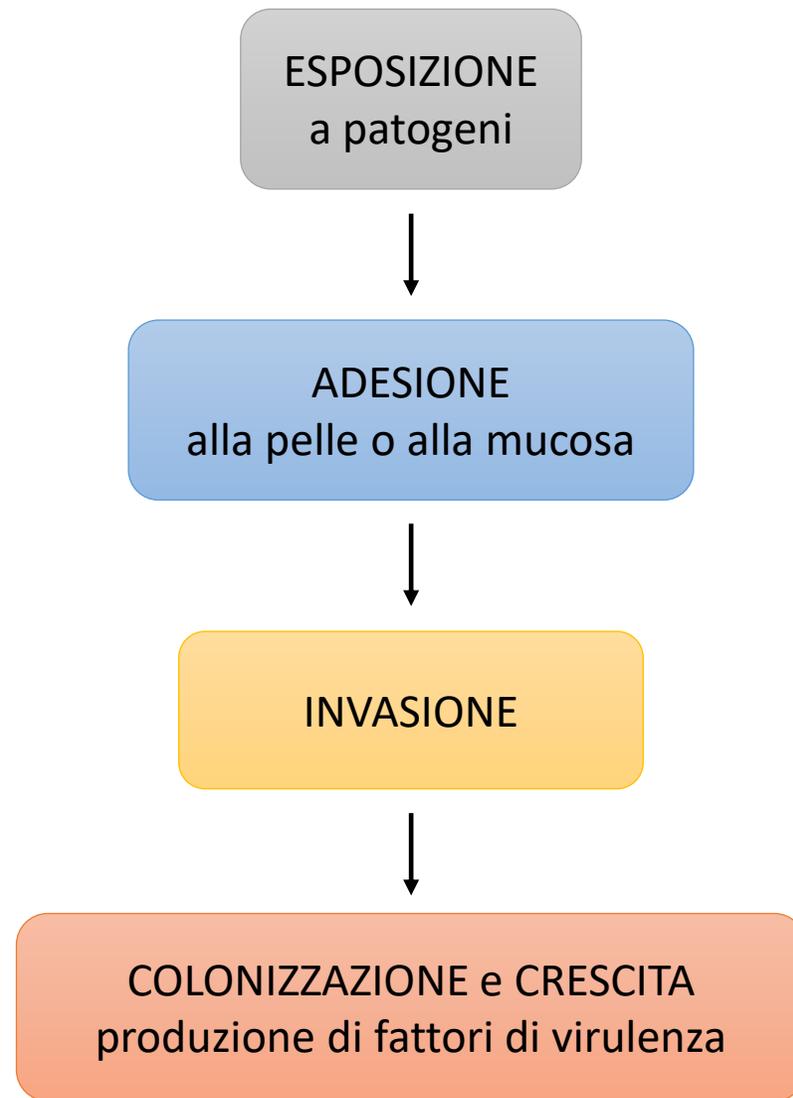
Formazione della tasca

Chiusura della tasca

- **IpaB** interagisce con CD44, il recettore dell'acido ialuronico fortemente espresso sulla membrana basolaterale dell'epitelio intestinale.
- **IpaB** e **IpaC** formano il poro nella membrana della cellula ospite.
- **VirA** induce la destabilizzazione locale dei microtubuli. Inizia il riarrangiamento dell'actina attraverso l'attivazione di Rac1 e la formazione del complesso Rac1-IRSp53-WAVE2 che recluta Arp2/3
- **IpaC** attraverso il dominio C-terminale citoplasmatico inizia la nucleazione dell'actina. Richiede l'attivazione di Cdc42 e Rac1. Promuove inoltre l'attivazione della tirosin chinasi Src.
- **IpgD**, omologo di SopB/SigD, destabilizza il citoscheletro di actina dalla membrana e favorisce il riarrangiamento dell'actina nel sito di ingresso.
- **IpaA** lega il dominio N-terminale della vinculina, una proteina chiave nella formazione delle placche di aderenza cellulare, e induce la depolimerizzazione dell'actina.







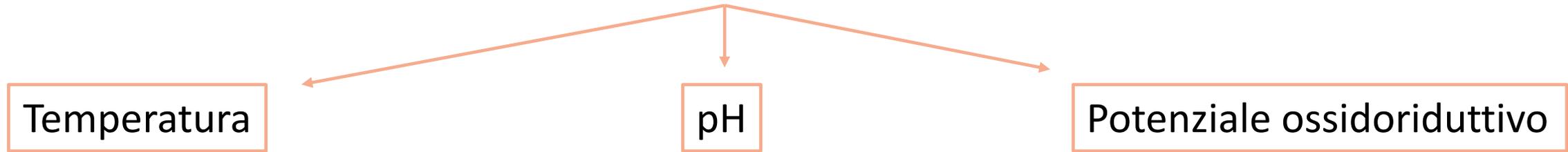
Per indurre la malattia il patogeno deve potersi riprodurre. Fattori che influenzano la crescita sono:

CONDIZIONI AMBIENTALI
appropriate

SOSTANZE NUTRITIVE
disponibili

Fattori ambientali che influenzano la crescita

Per colonizzare con successo l'ospite, i batteri patogeni monitorano continuamente molteplici caratteristiche dell'ambiente circostante tra cui:



In risposta a condizioni ambientali idonee nell'ospite, i patogeni regolano l'espressione genica di **fattori di virulenza** che permettono di attaccarsi alle superfici delle cellule dell'ospite, di eludere le difese immunitarie o di ottenere sostanze nutritive altrimenti inaccessibili.

L'espressione non regolata di questi fattori di virulenza può essere dannosa per i batteri, attraverso lo spreco di risorse metaboliche e l'induzione inappropriata di risposte infiammatorie e immunitarie.

Meccanismi di termo-sensibilità

A. topologia del DNA → entità del superavvolgimento e della curvatura può modulare l'espressione genica.

Esempi:

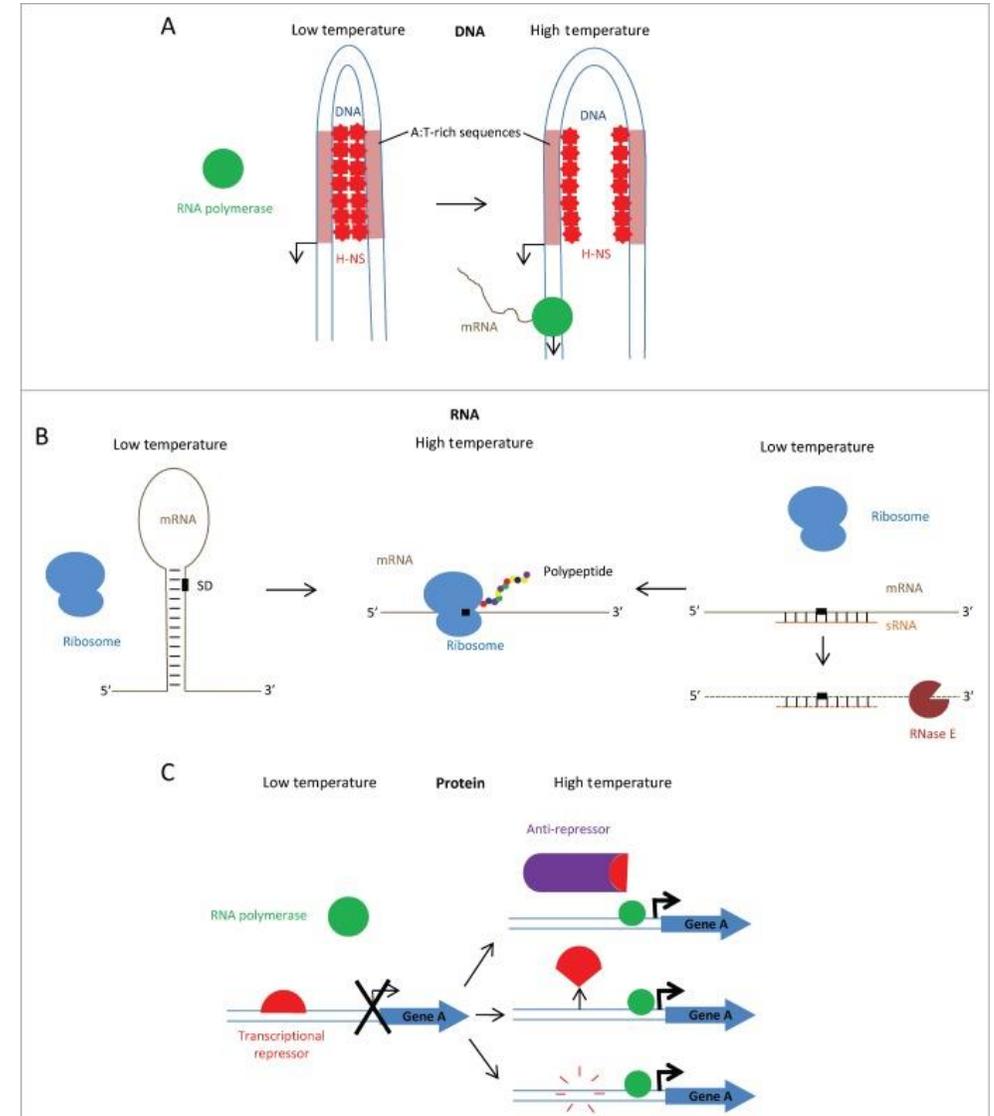
- ❖ T3SS in *Salmonella*
- ❖ *virF* in *Shigella*

B. struttura dell'RNA → strutture secondarie e terziarie dell'mRNA alterano il legame con i ribosomi con conseguenze sulla traduzione delle proteine.

Esempi:

- ❖ RNA termosensore (*cis-acting*): PrfA di *L. monocytogenes*
- ❖ sRNA regolatori (*trans-acting*): adesina AfaD di *E. coli* patogeni

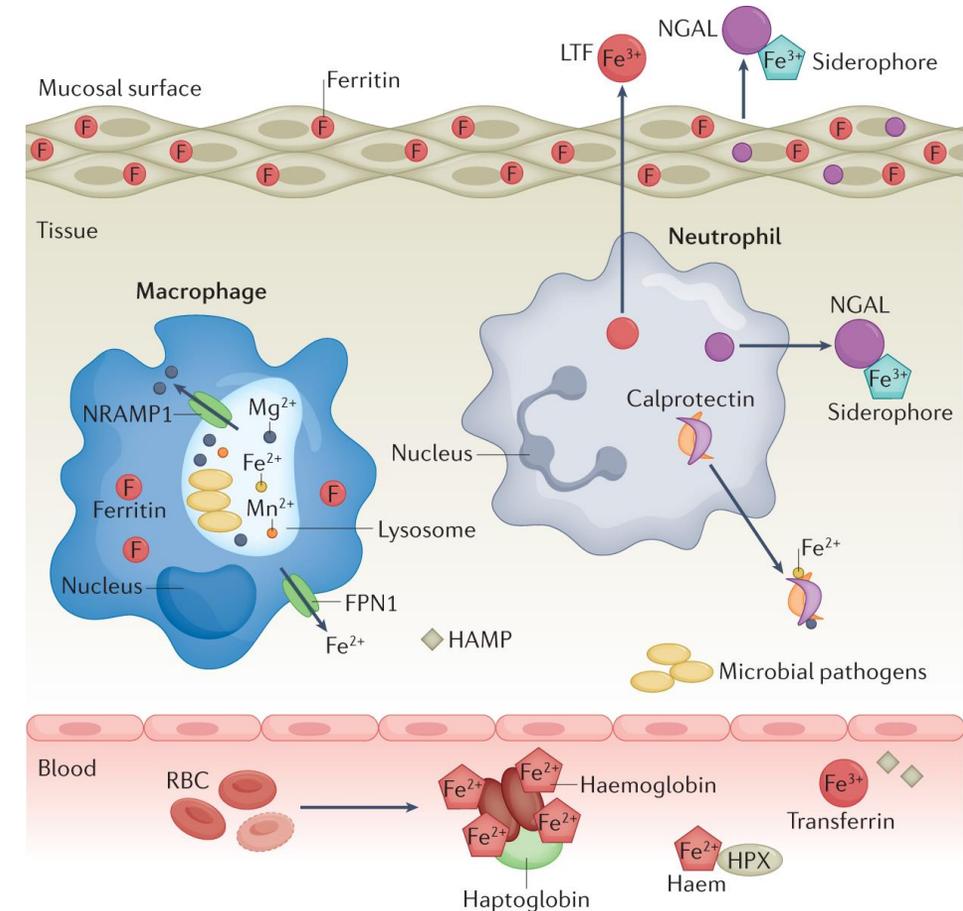
C. attività delle proteine → subiscono cambiamenti conformazionali a livello di domini termosensibili che ne modulano l'attività o che ne cambiano la suscettibilità alla degradazione.



Temperatura può influenzare:

- Motilità batterica
 - *L. monocytogenes* possiede meccanismo che assicura che la motilità sia limitata ad ambienti al di sotto delle temperatura fisiologica dell'ospite (< 37°C)
 - *Yersinia* non è mobile a 37°C. Il meccanismo non è noto, ma potrebbe essere legato a cambiamenti nel superavvolgimento del DNA
- Produzione di esotossine
 - Tossina Shiga-like (Stx-2) di *E. coli* enteroemorragico (EHEC) è soggetta a termoregolazione.
 - In *Bacillus anthracis*, la sintesi dell'attivatore della tossina dell'antrace (AtxA) è dipendente dalla temperatura.
- Adattamento tra diversi ospiti
- Assimilazione di nutrienti
 - In *Pseudomonas aeruginosa* i geni che codificano gli enzimi necessari alla biosintesi dei siderofori, sono regolati in modo differenziato a 22°C rispetto a 37°C. Geni coinvolti nella biosintesi della pioverdina sono up-regolati alle basse temperature, mentre quelli per la biosintesi della piochelina sono upregolati a 37°C.
- Meccanismi di evasione immunitaria

- **Nutrienti solubili** come zuccheri, amminoacidi e acidi organici sono spesso presenti in quantità limitate → sono facilitati i microrganismi in grado di utilizzare composti complessi quali glicogeno.
- **Vitamine** e altri fattori di crescita non sono sempre presenti in quantità sufficiente e in tutti i tessuti → *Brucella abortus* cresce lentamente nella maggior parte dei tessuti ma rapidamente nella placenta dove è presente eritritolo.
- **Oligoelementi** quali ferro, zinco, manganese, rame sono presenti in quantità limitata per impedire l'istaurarsi del patogeno



Dopo l'internalizzazione, i batteri intracellulari possono riprodursi in tre classi principali di compartimenti:

- I. Vacuoli simili a lisosomi, che hanno un pH acido e contengono enzimi idrolitici → es. *Coxiella burnetti*, l'agente della febbre Q, è un batterio intracellulare capace di sopravvivere in un compartimento lisosomiale, caratterizzato da pH acido, presenza di idrolasi e peptidi cationici. Nonostante queste condizioni ambientali difficili, *Coxiella* è in grado di replicare in modo efficiente in questo compartimento.
- II. Vacuoli intracellulari non acidi che non si fondono con i lisosomi e sono solitamente rimodellate dal patogeno creando così una nicchia meno ostile e permissiva per la loro sopravvivenza e crescita → es. *Salmonella* rimodella questi vacuoli (SCV) con effettori secreti dal T3SS. Alcuni effettori bloccano il reclutamento della NADPH ossidasi responsabile della produzione di composti battericidi.
- III. Citosol, nel quale alcuni patogeni risiedono dopo essere usciti dal loro vacuolo di internalizzazione → *Listeria* è in grado di sfuggire dal vacuolo di internalizzazione e di accedere al citosol delle cellule ospiti grazie a LLO, una tossina formante un poro secreta dal batterio, e da due fosfolipasi batteriche PC- e PI-PLC. Una volta nel citosol, *Listeria* è in grado di replicarsi e di muoversi all'interno delle cellule utilizzando una motilità basata sull'actina.

