

Interazione ospite-patogeno

- Luca Cavinato, PhD
- Ricercatore Postdoc presso il laboratorio Prof. Nelson
- cavinato@uchicago.edu



THE UNIVERSITY OF
CHICAGO

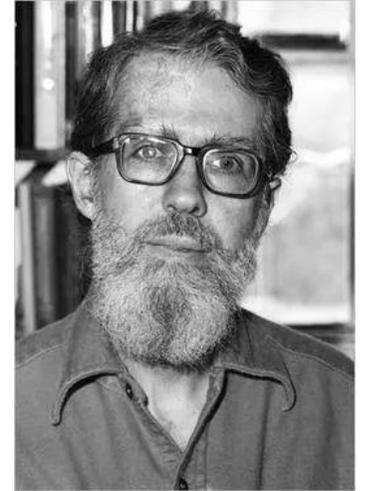


Interazione ospite patogeno



Ipotesi della regina rossa (1973)

Ora, in questo luogo, come puoi vedere, ci vuole tutta la velocità di cui si dispone se si vuole rimanere nello stesso posto; se si vuole andare da qualche altra parte, si deve correre almeno due volte più veloce di così!"



Biologo statunitense Van Valen

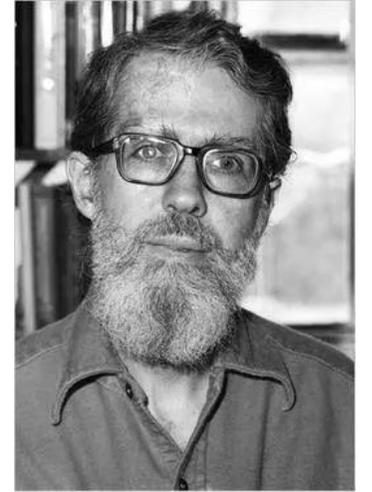
Interazione ospite patogeno



Ipotesi della regina rossa (1973)

Ora, in questo luogo, come puoi vedere, ci vuole tutta la velocità di cui si dispone se si vuole rimanere nello stesso posto; se si vuole andare da qualche altra parte, si deve correre almeno due volte più veloce di così!"

CORRI PER NON ESTINGUERTI!!



Biologo statunitense Van Valen

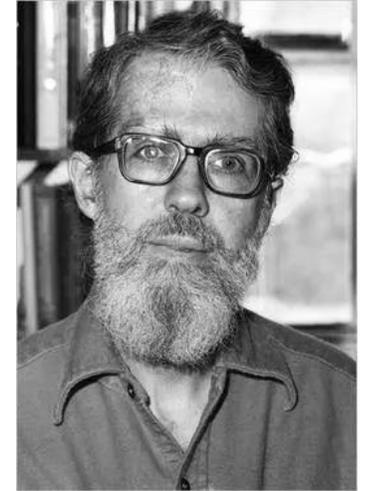
Interazione ospite patogeno



Ipotesi della regina rossa (1973)

Ora, in questo luogo, come puoi vedere, ci vuole tutta la velocità di cui si dispone se si vuole rimanere nello stesso posto; se si vuole andare da qualche altra parte, si deve correre almeno due volte più veloce di così!"

CORRI PER NON ESTINGUERTI!!



Biologo statunitense Van Valen

dinamica preda-predatore:

Differenti strategie di caccia



Mimetismo



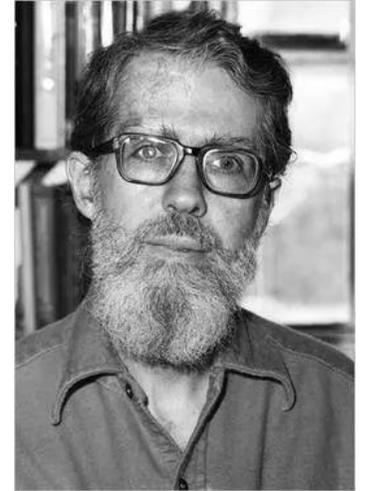
Interazione ospite patogeno



Ipotesi della regina rossa (1973)

Ora, in questo luogo, come puoi vedere, ci vuole tutta la velocità di cui si dispone se si vuole rimanere nello stesso posto; se si vuole andare da qualche altra parte, si deve correre almeno due volte più veloce di così!"

CORRI PER NON ESTINGUERTI!!



Biologo statunitense Van Valen

dinamica preda-predatore:

Differenti strategie di caccia

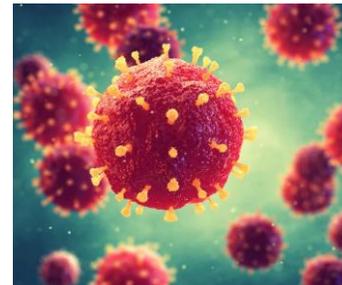


Mimetismo



Interazione ospite-patogeno

Virus



Batteri



Parassiti

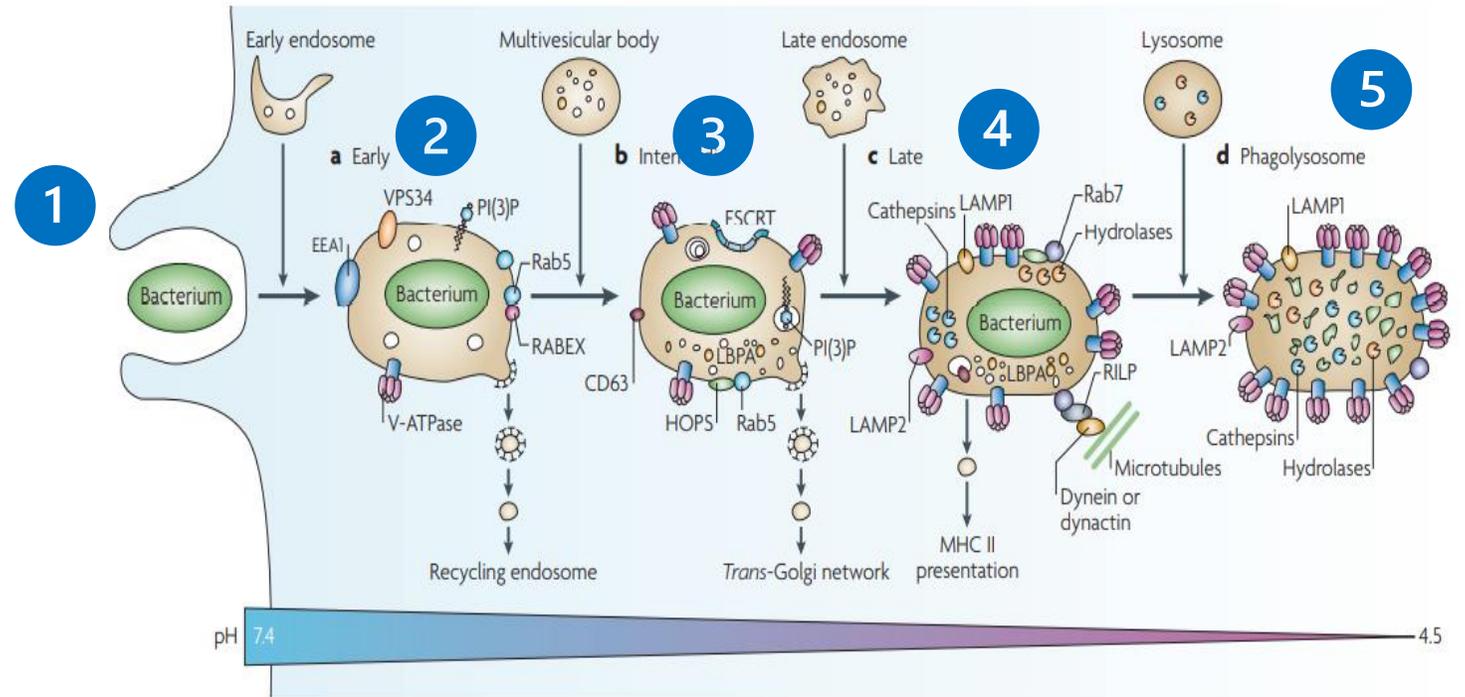


I fagociti e la maturazione del fagosoma

Fasi della maturazione del fagosoma

1. Fagocitosi
2. Fagosoma precoce
3. Fagosoma intermedio
4. Fagosoma tardivo
5. Fagolisosoma

Rappresentazione schematica degli eventi che portano alla maturazione del fagosoma

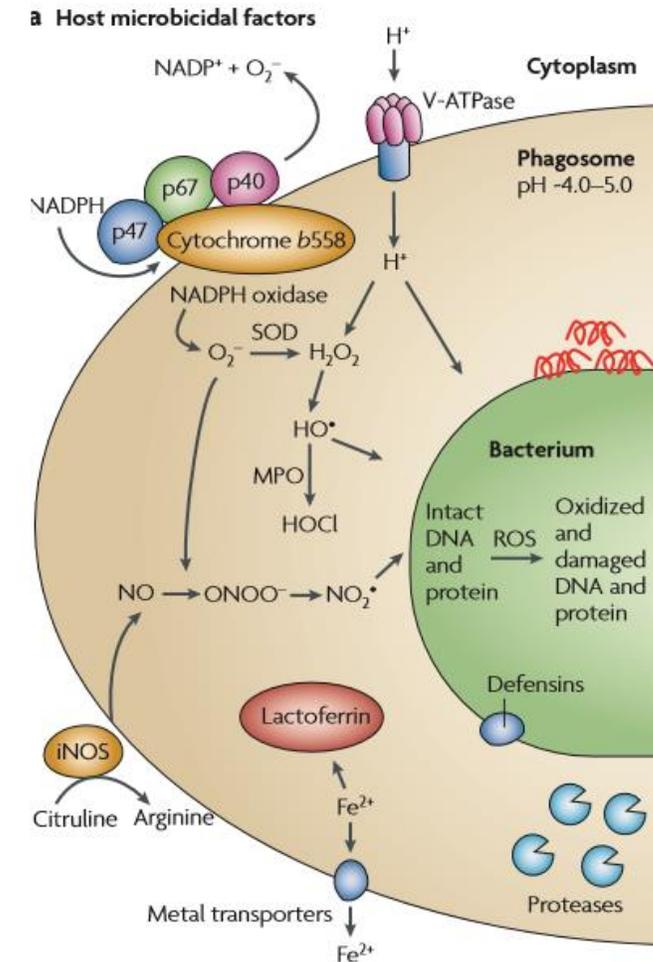


Flannagan *et al.*, 2009

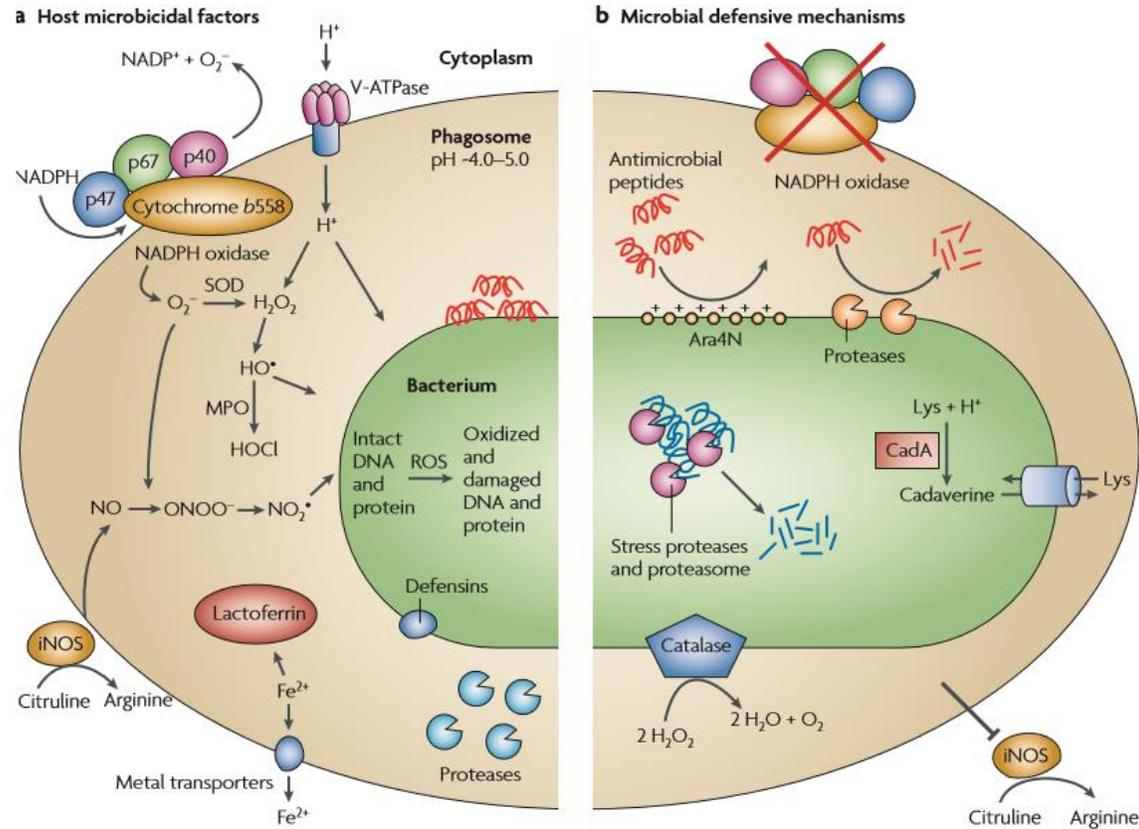
Meccanismi microbici dei fagociti

Meccanismi microbici

- Produzione di ROS (NADPH ossidasi)
- Produzione di RNS (iNOS)
- Acidificazione del pH intrafagosomale
- Peptidi antimicrobici
- Starvation
- Esposizione a metalli pesanti (es. zinco)
- Autofagia (LAP e xenofagia)



Meccanismi microbicidi dei fagociti e difese del batterio



Difesa microbica

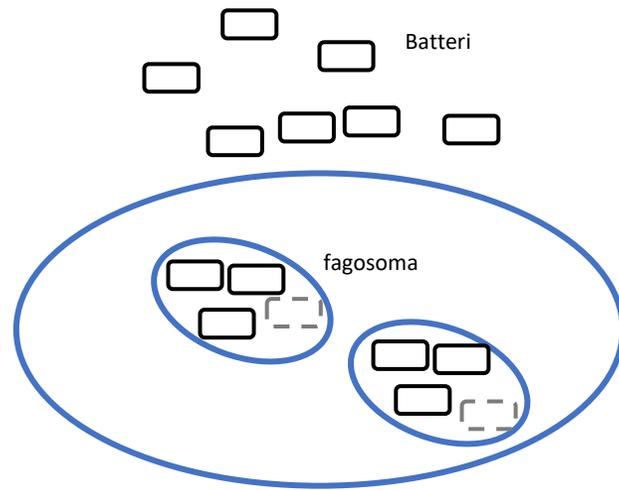
- Inibizione dell'assemblaggio di NADPH ossidasi e iNOS
- Enzimi di detossificazione dei ROS e degli RNS
- Alcalinizzazione del pH intrafagosomale
- Proteasi
- Trasportatori per ridurre l'accumulo di livelli tossici di metalli pesanti (i.e. zinco)
- Inibizione dell'autofagia

Flannagan *et al.*, 2009

Come si studia l'interazione ospite patogeno

Saggio di protezione antibiotica

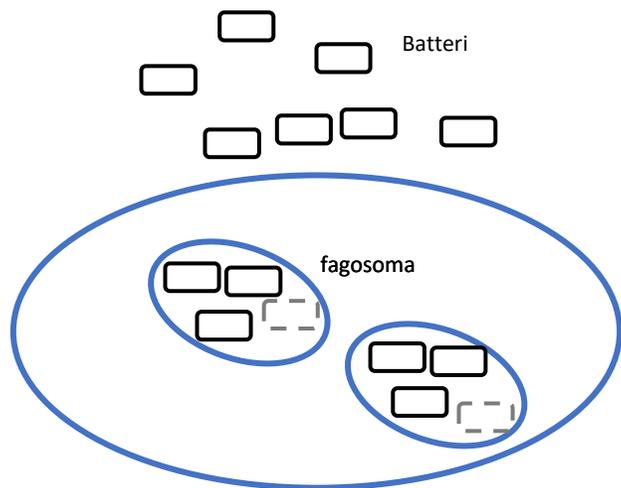
1. Infezione



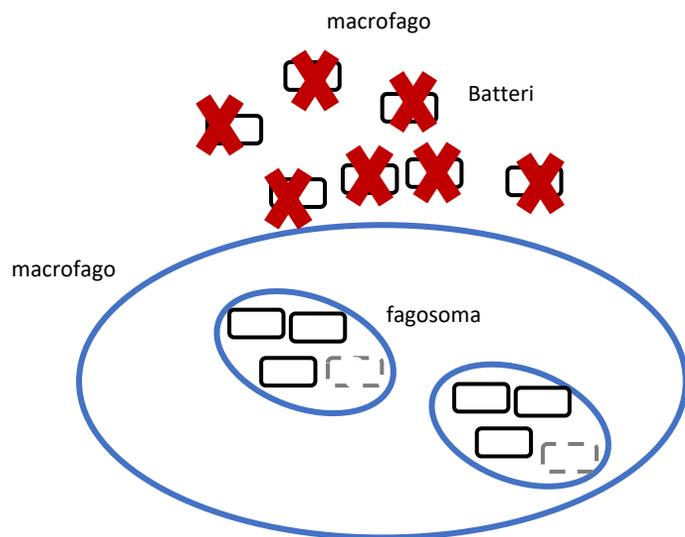
Come si studia l'interazione ospite patogeno

Saggio di protezione antibiotica

1. Infezione



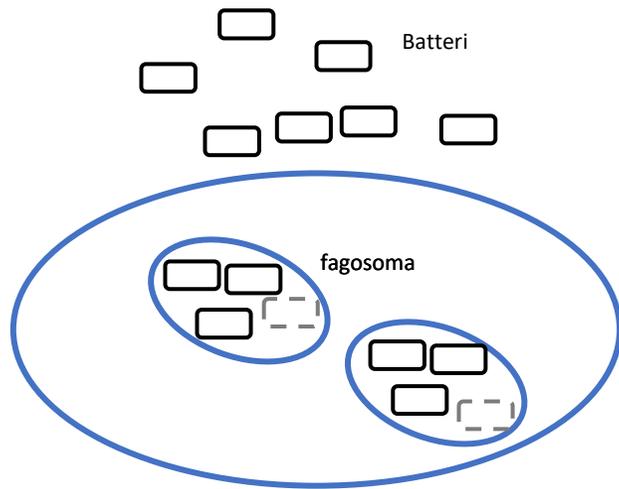
2. Trattamento antibiotico



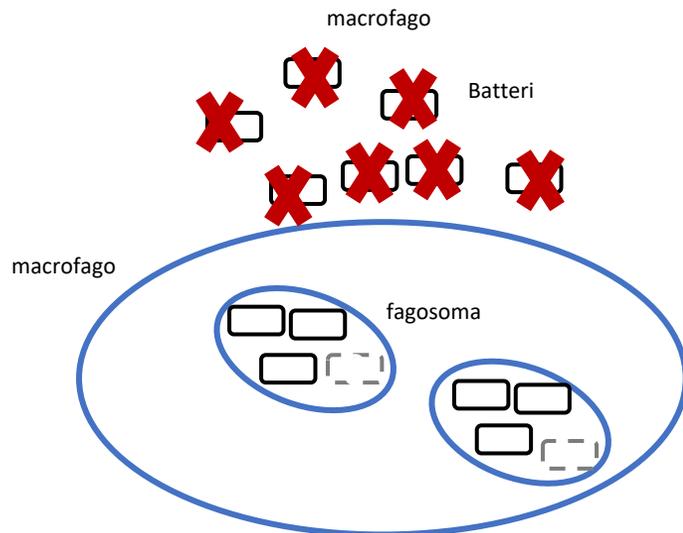
Come si studia l'interazione ospite patogeno

Saggio di protezione antibiotica

1. Infezione

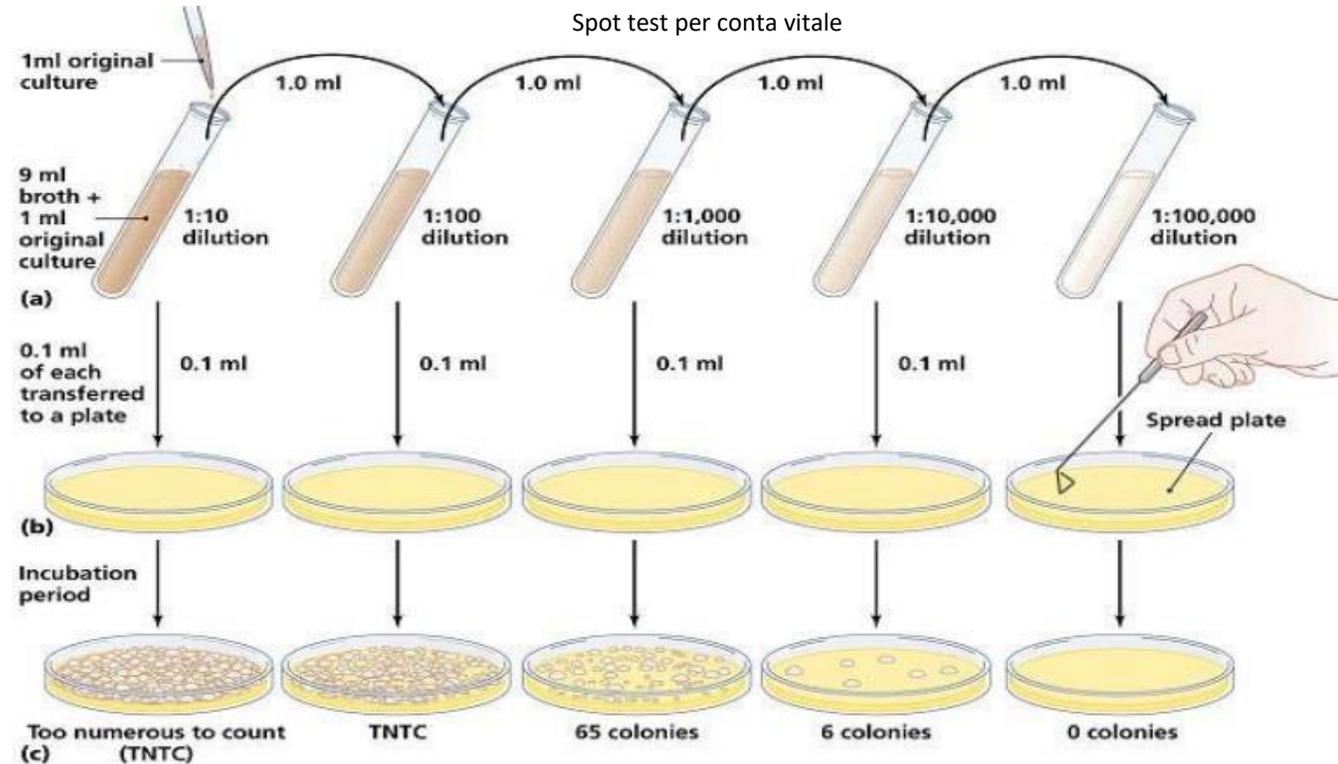
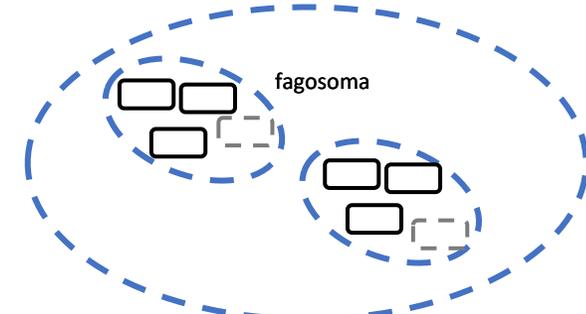


2. Trattamento antibiotico



3A Saggio delle CFU

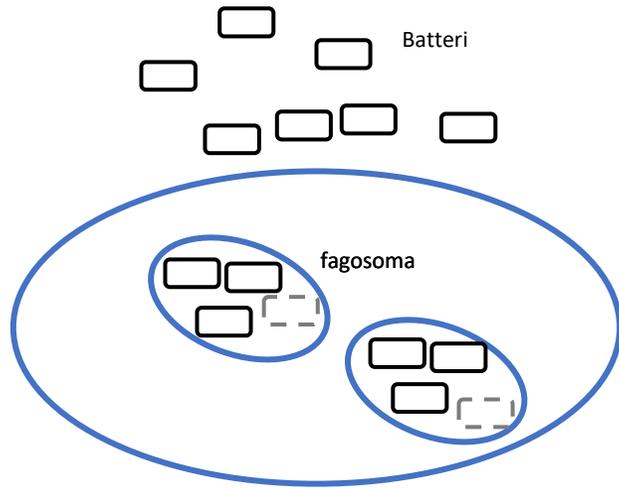
Lisi del macrofago tramite detergenti come triton X-100



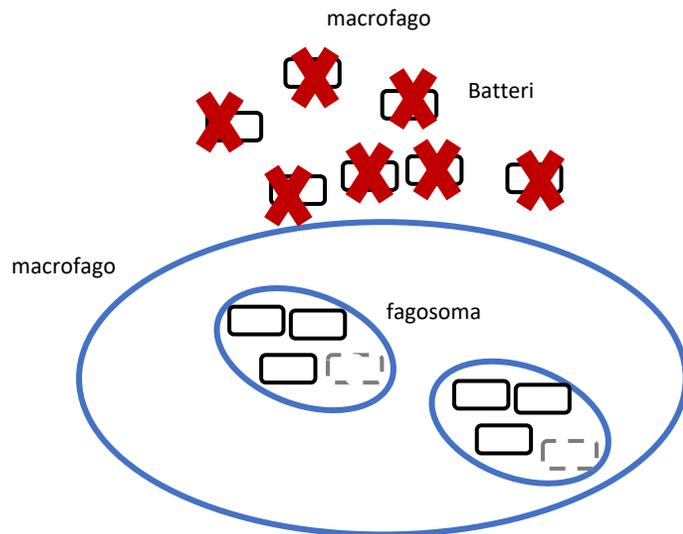
Come si studia l'interazione ospite patogeno

Saggio di protezione antibiotica

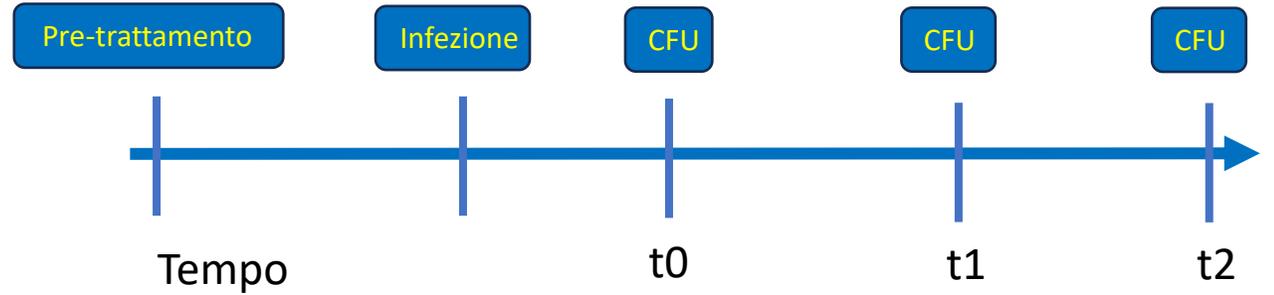
1. Infezione



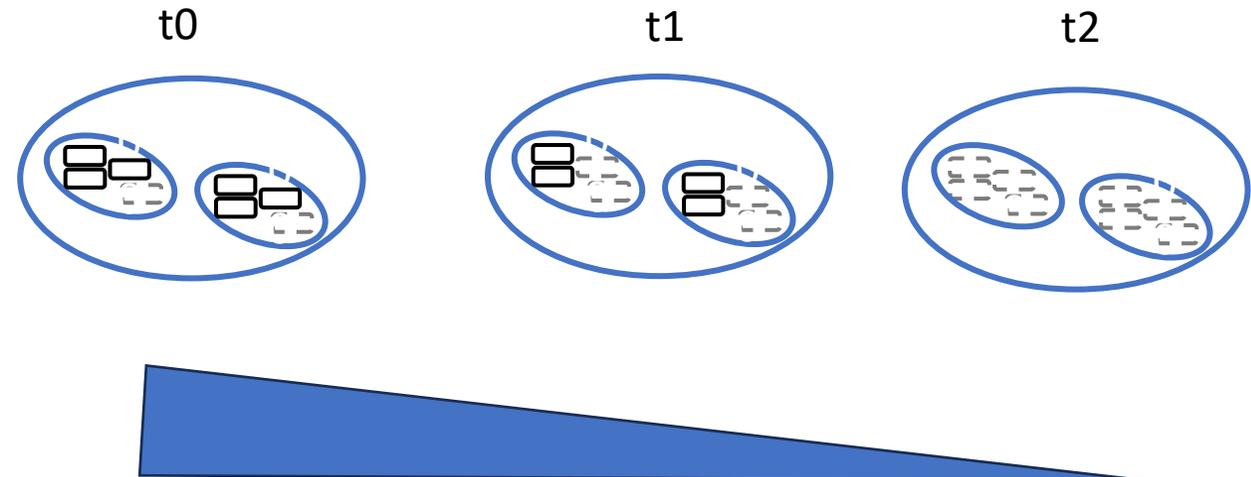
2. Trattamento antibiotico



3B. Incubazione post-infezione



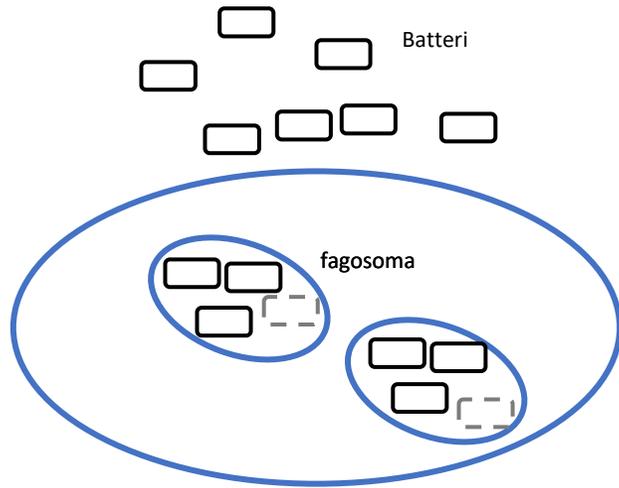
Analisi della sopravvivenza batterica nel tempo



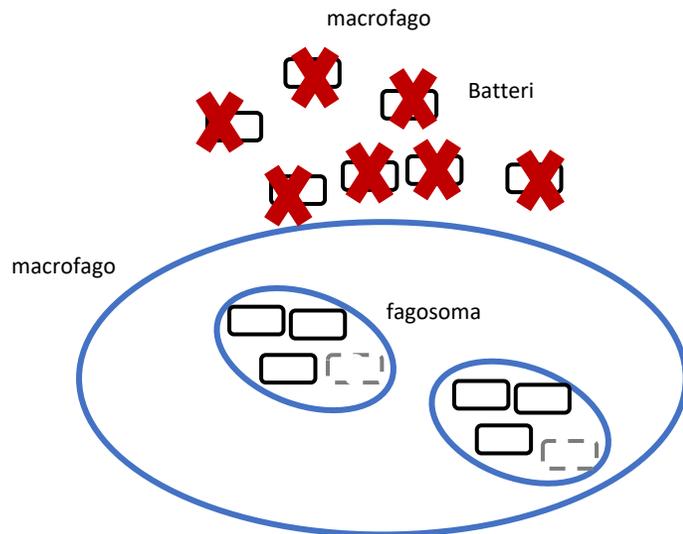
Come si studia l'interazione ospite patogeno

Saggio di protezione antibiotica

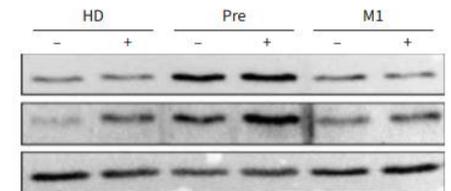
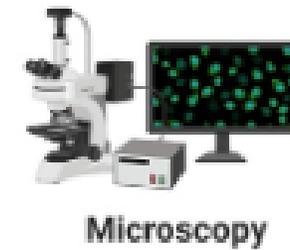
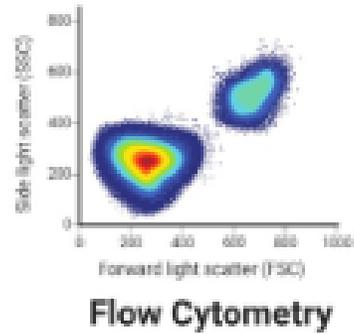
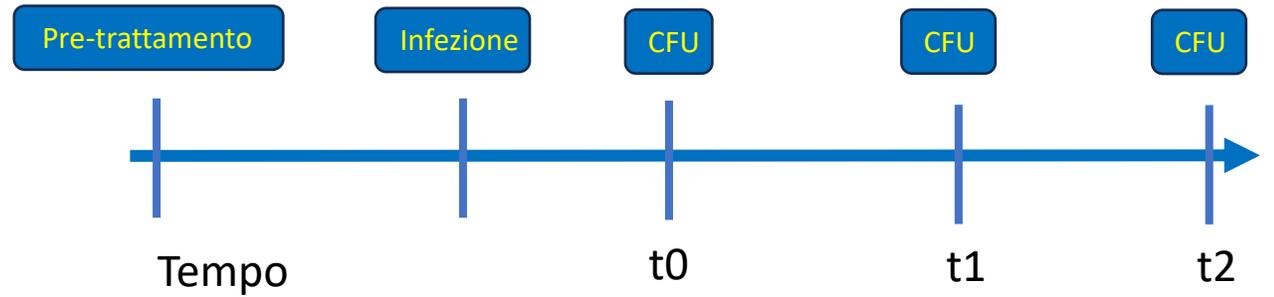
1. Infezione



2. Trattamento antibiotico



3B. Incubazione post-infezione



Quale meccanismo governa la maturazione del fagosoma?

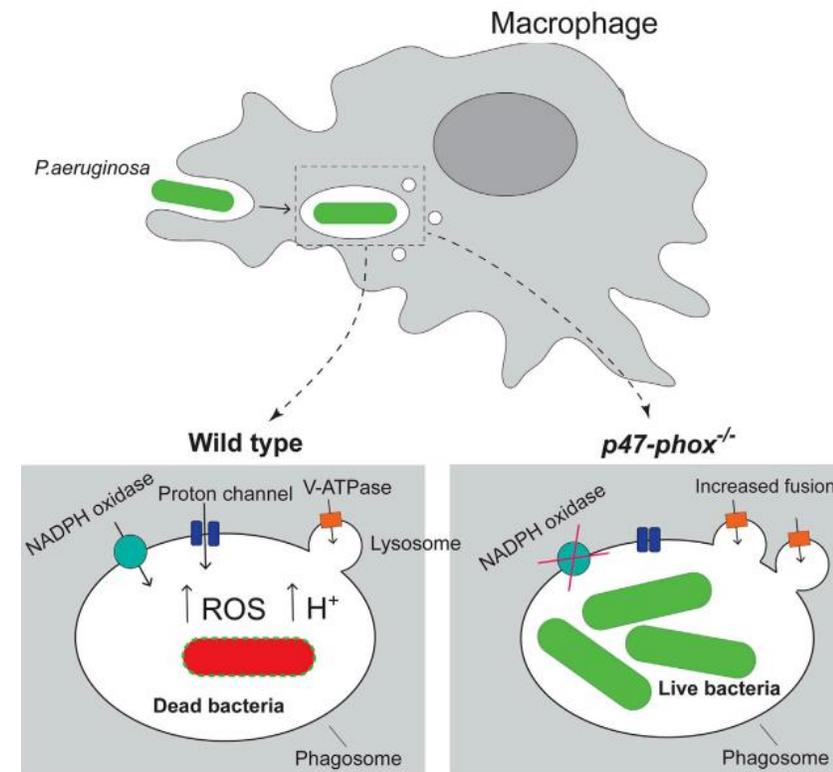
iScience

CellPress
OPEN ACCESS

Article

Kinetic Separation of Oxidative and Non-oxidative Metabolism in Single Phagosomes from Alveolar Macrophages: Impact on Bacterial Killing

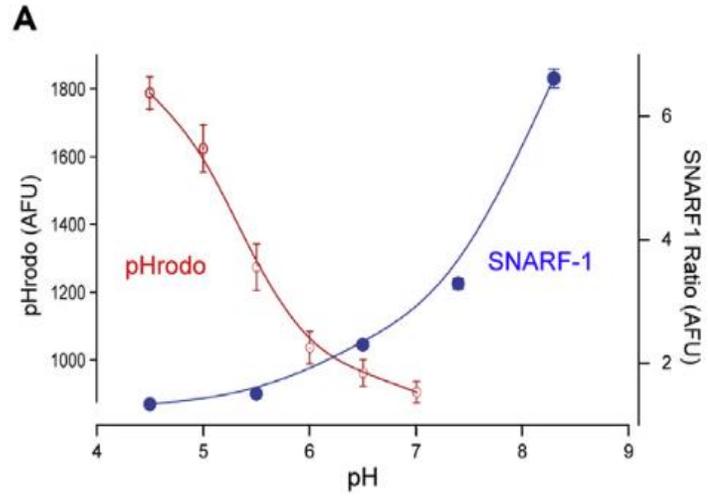
Analisi della maturazione del fagosoma tramite microscopia ad ultra risoluzione: analisi single phagosome



Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

pHrodo: pKa ~ 6.5 (range pH misurato 4-7)

SNARF-1: pKa ~ 7.5 (range pH misurato 7-8)

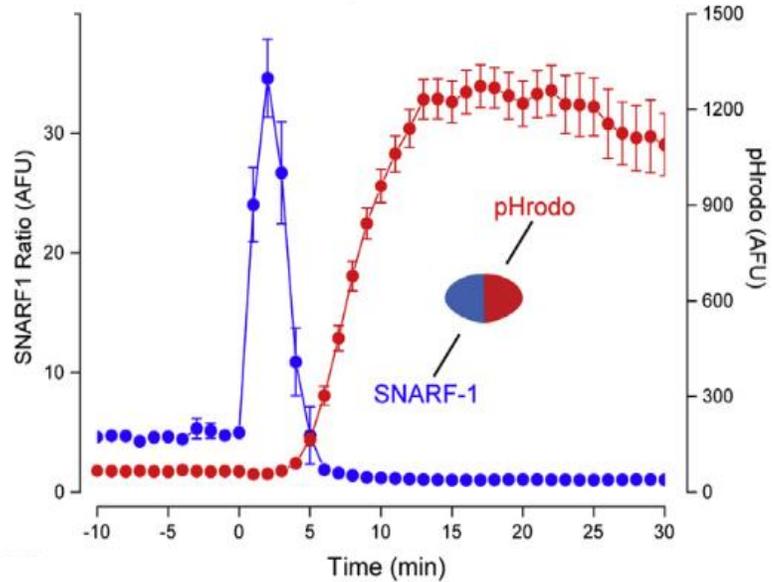
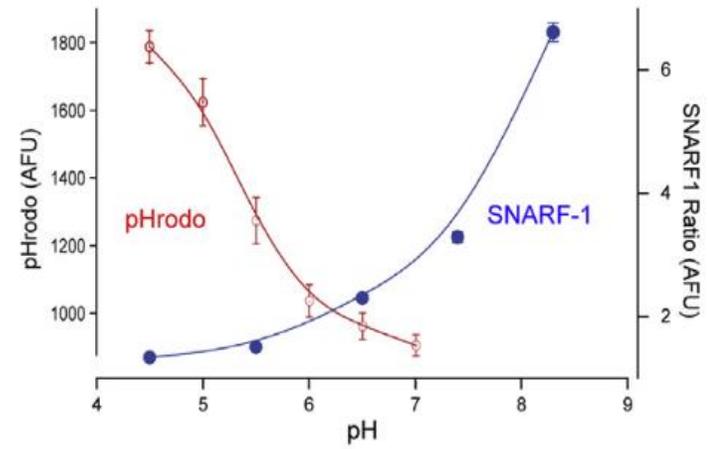


Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

pHrodo: pKa ~ 6.5 (range pH misurato 4-7)

SNARF-1: pKa ~ 7.5 (range pH misurato 7-8)

A

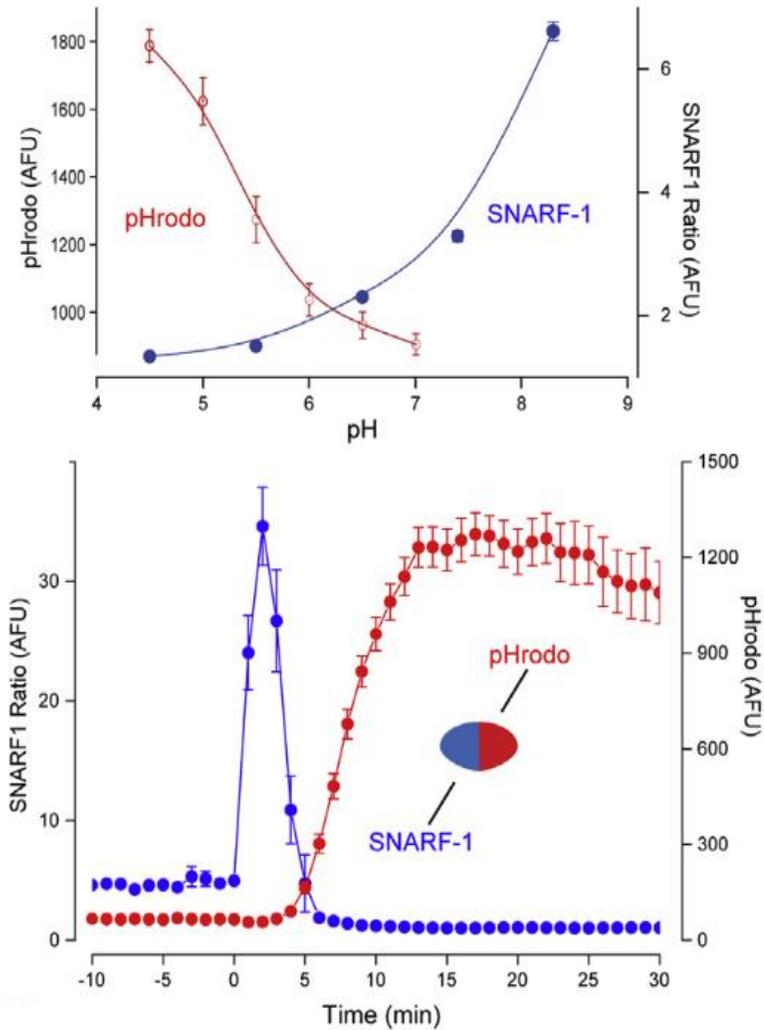


Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

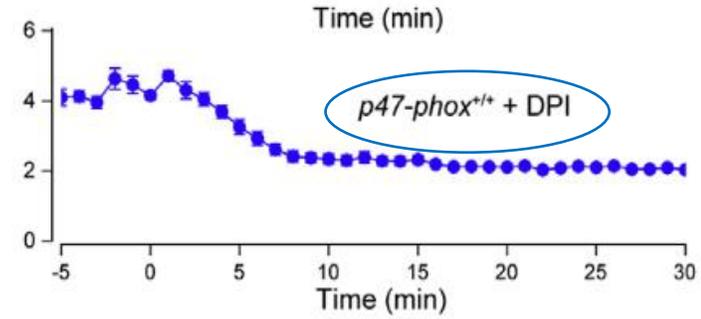
pHrodo: pKa ~ 6.5 (range pH misurato 4-7)

SNARF-1: pKa ~ 7.5 (range pH misurato 7-8)

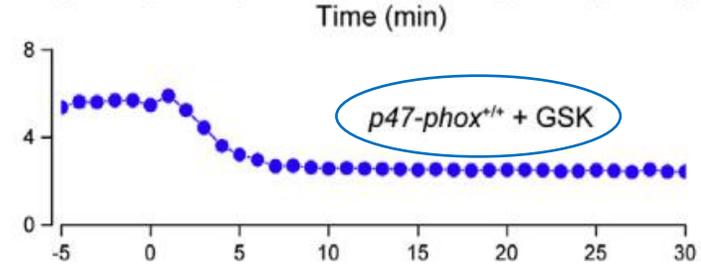
A



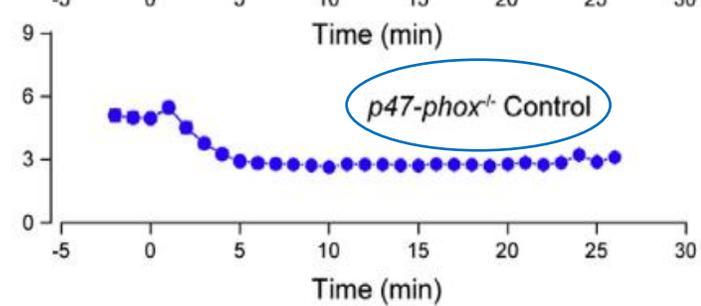
C2



C3

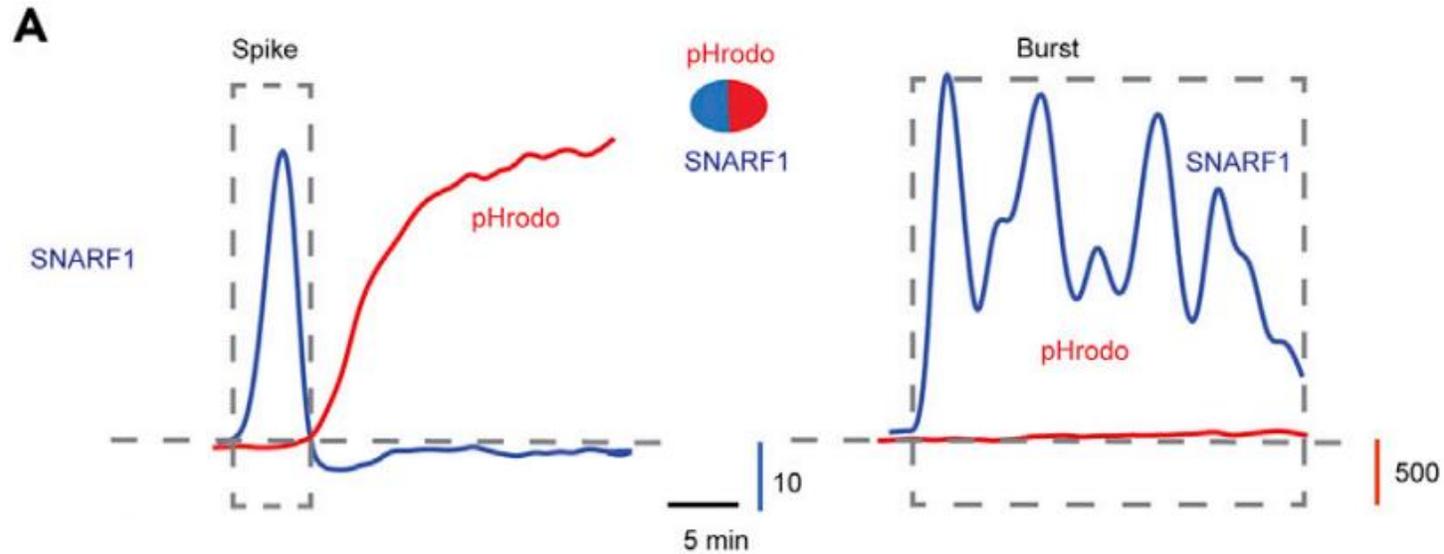


C4



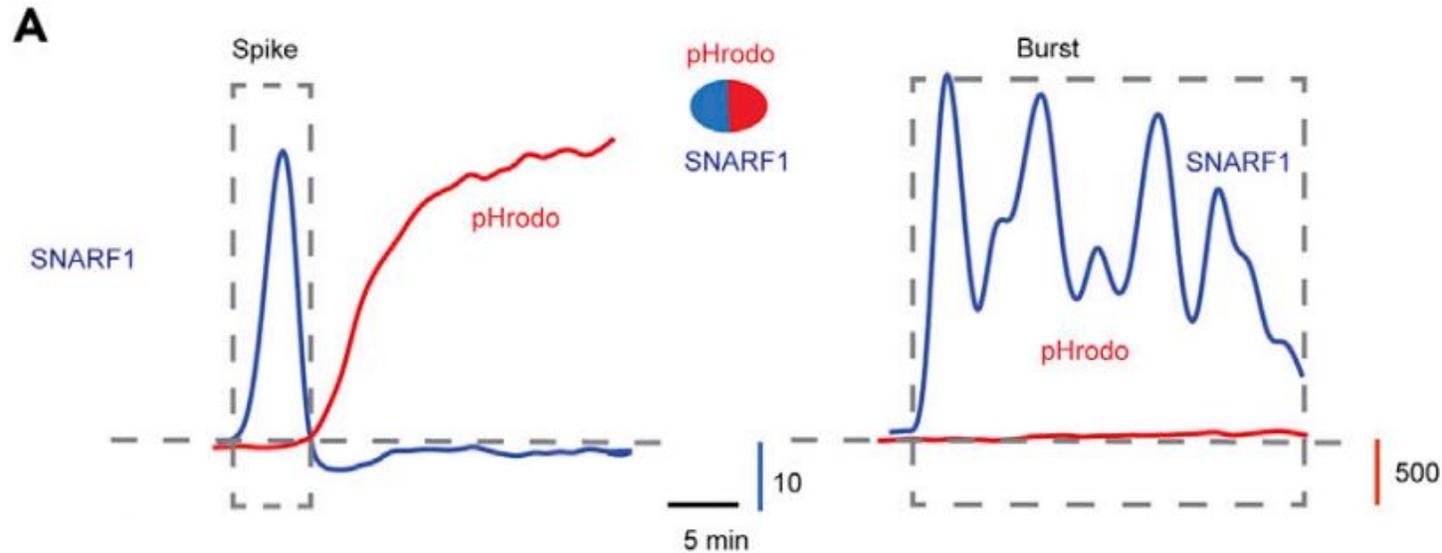
Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

Eterogeneità della risposta fagosomale, rilevata non solo in fagosomi generati in differenti macrofagi, ma anche in fagosomi all'interno dello stesso macrofago

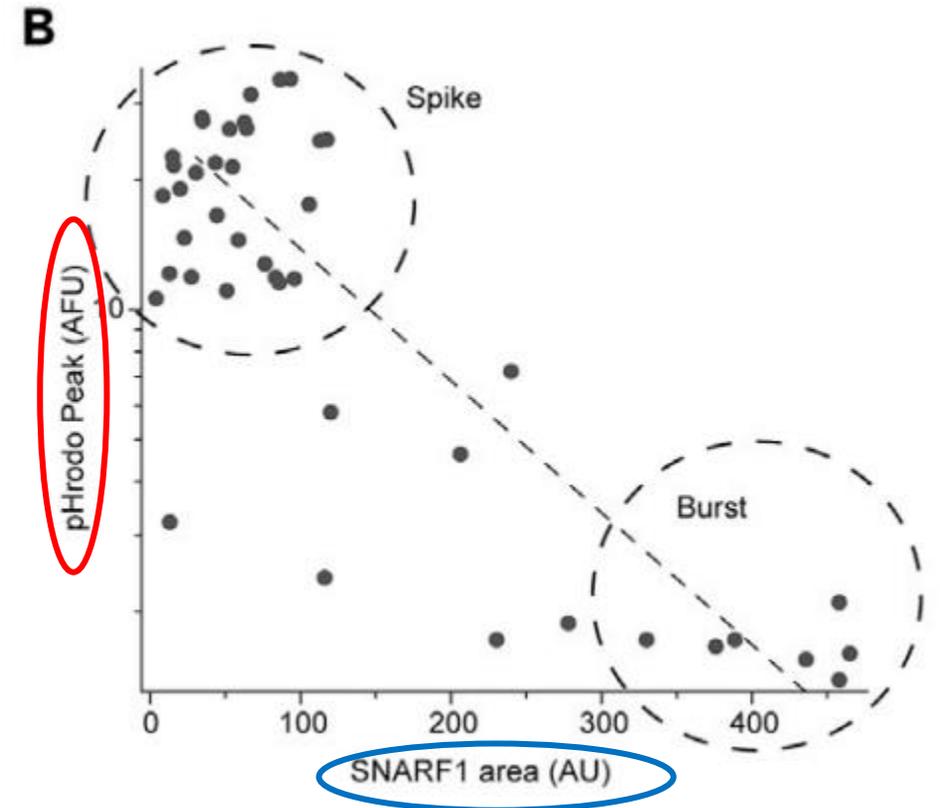


Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

Eterogeneità della risposta fagosomale, rilevata non solo in fagosomi generati in differenti macrofagi, ma anche in fagosomi all'interno dello stesso macrofago

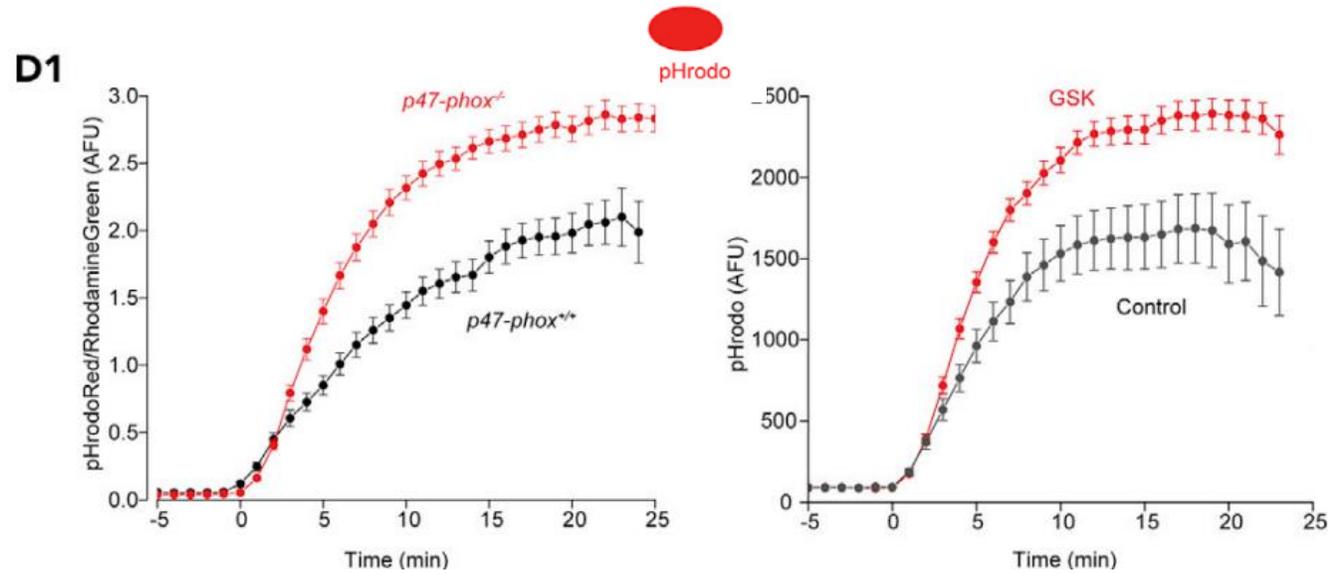


Analisi di correlazione tra le aree sottese alla curva (AUC) delle curve generate dal segnale SNARF-1 e il valore del picco di segnale fluorescente generato da pHrodo (AFU, active fluorescent unit)



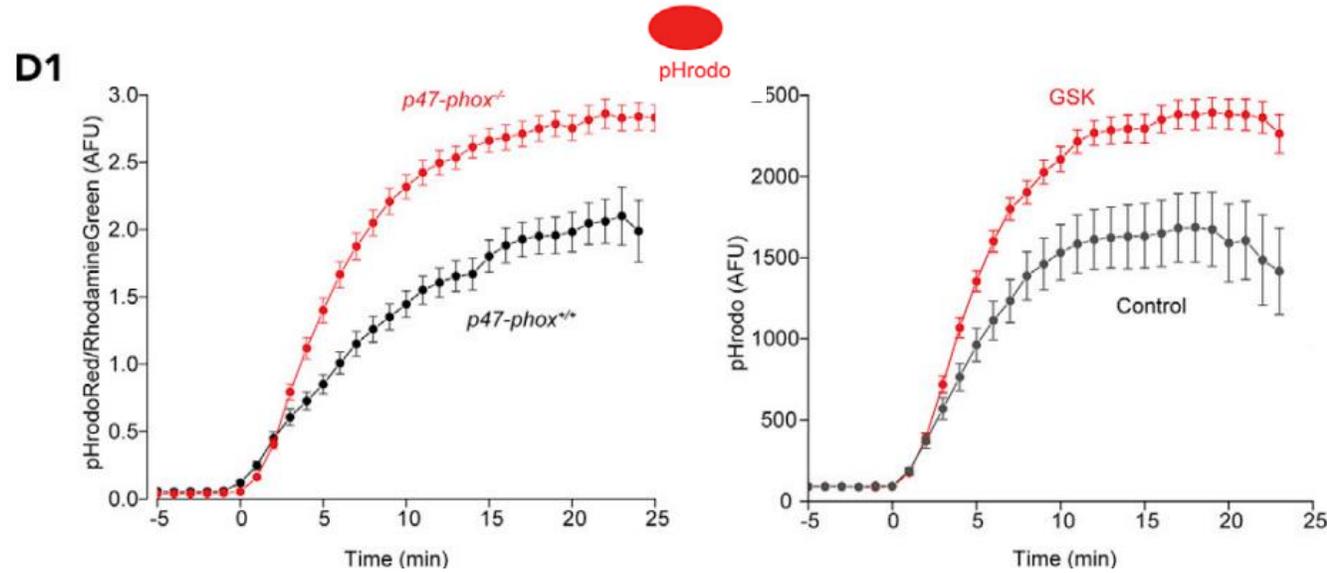
Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

Inibizione della NADPH

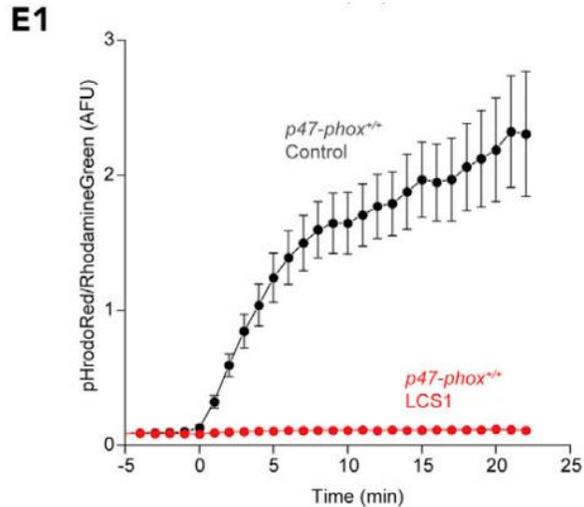


Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

Inibizione della NADPH

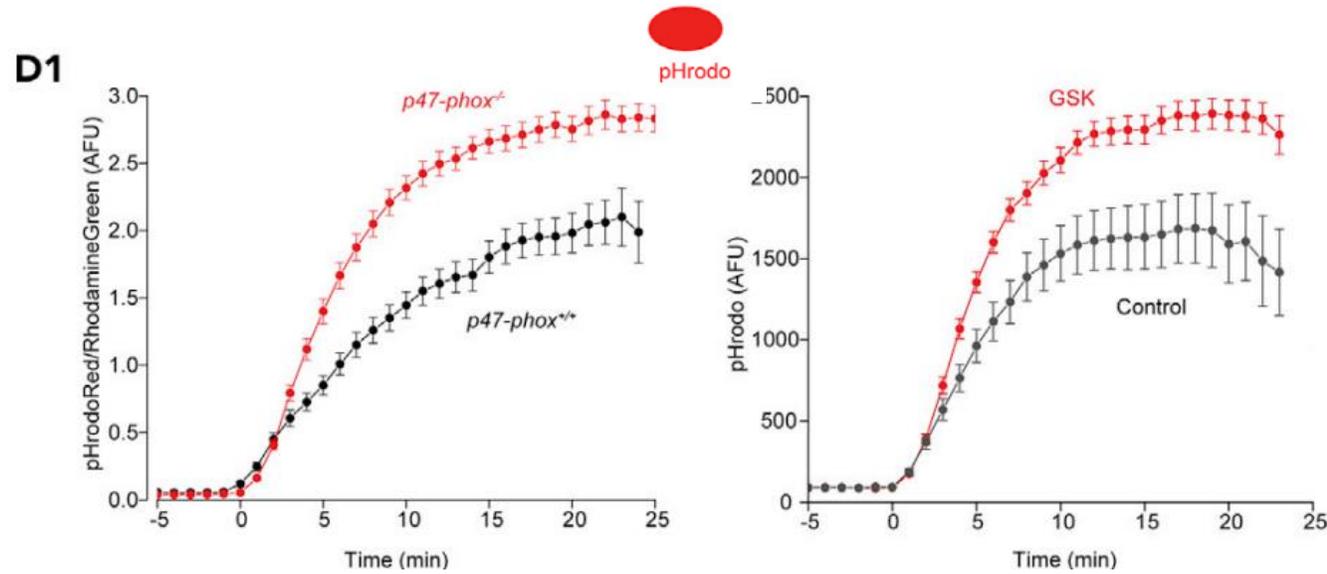


Inibizione della SOD

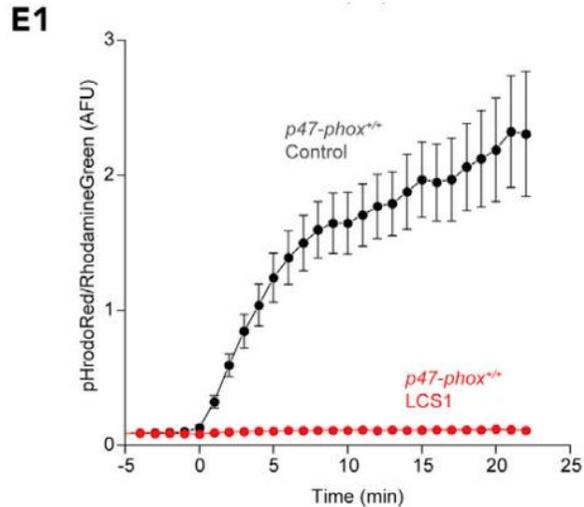


Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

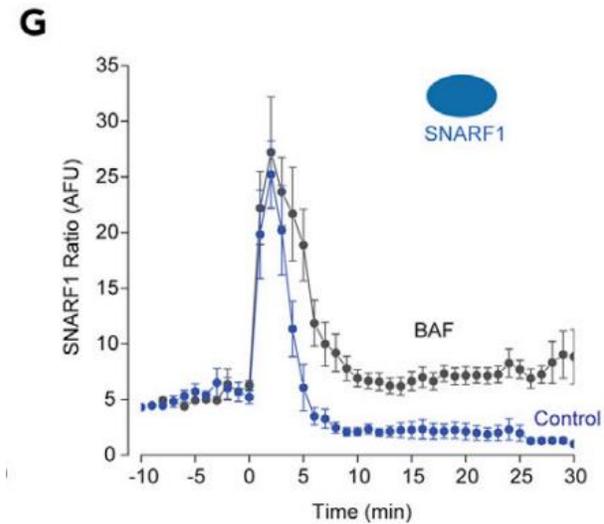
Inibizione della NADPH



Inibizione della SOD



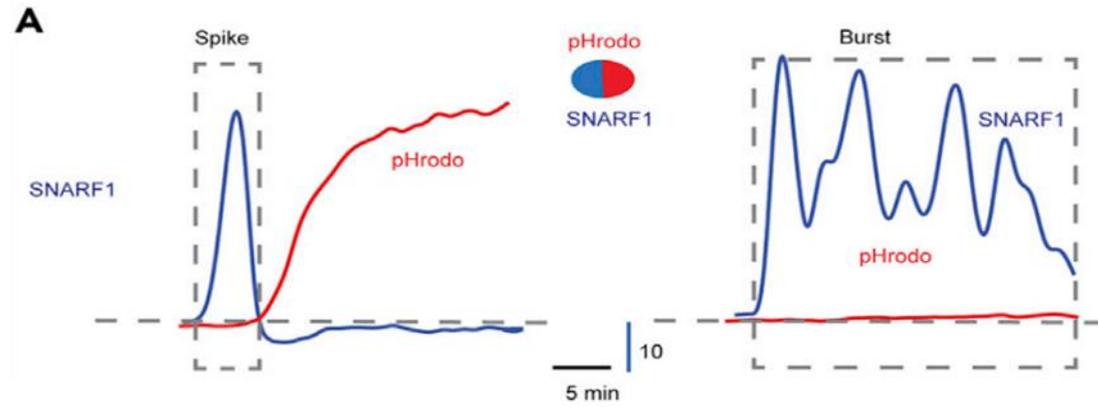
Inibizione V-ATPase



Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

Rodamina: sonda pH insensibile

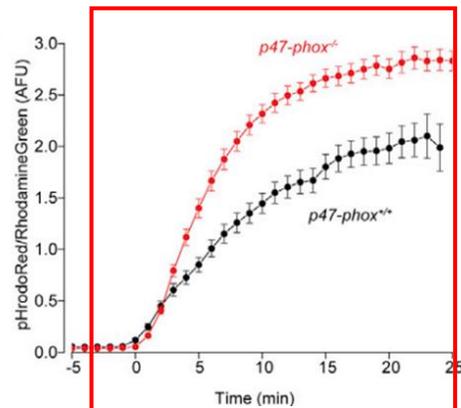
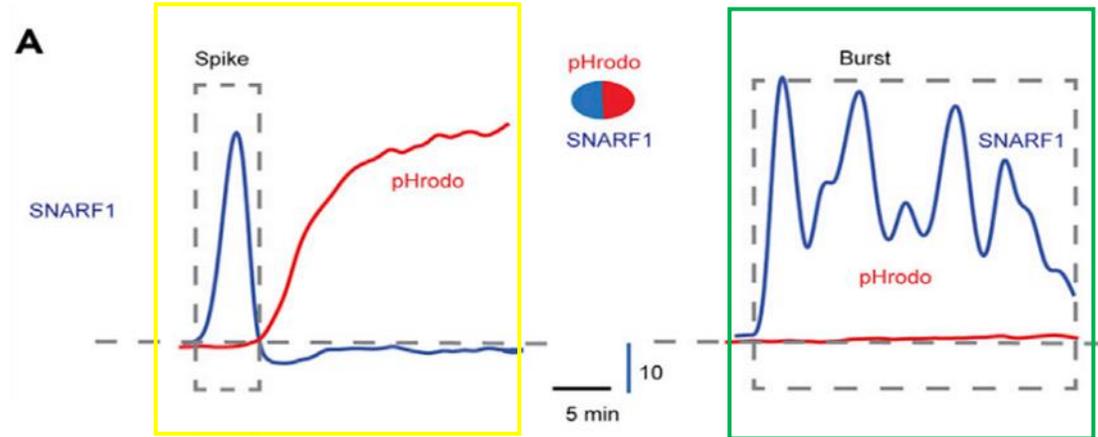
pHrodo: sonda pH sensibile



Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

Rodamina: sonda pH insensibile

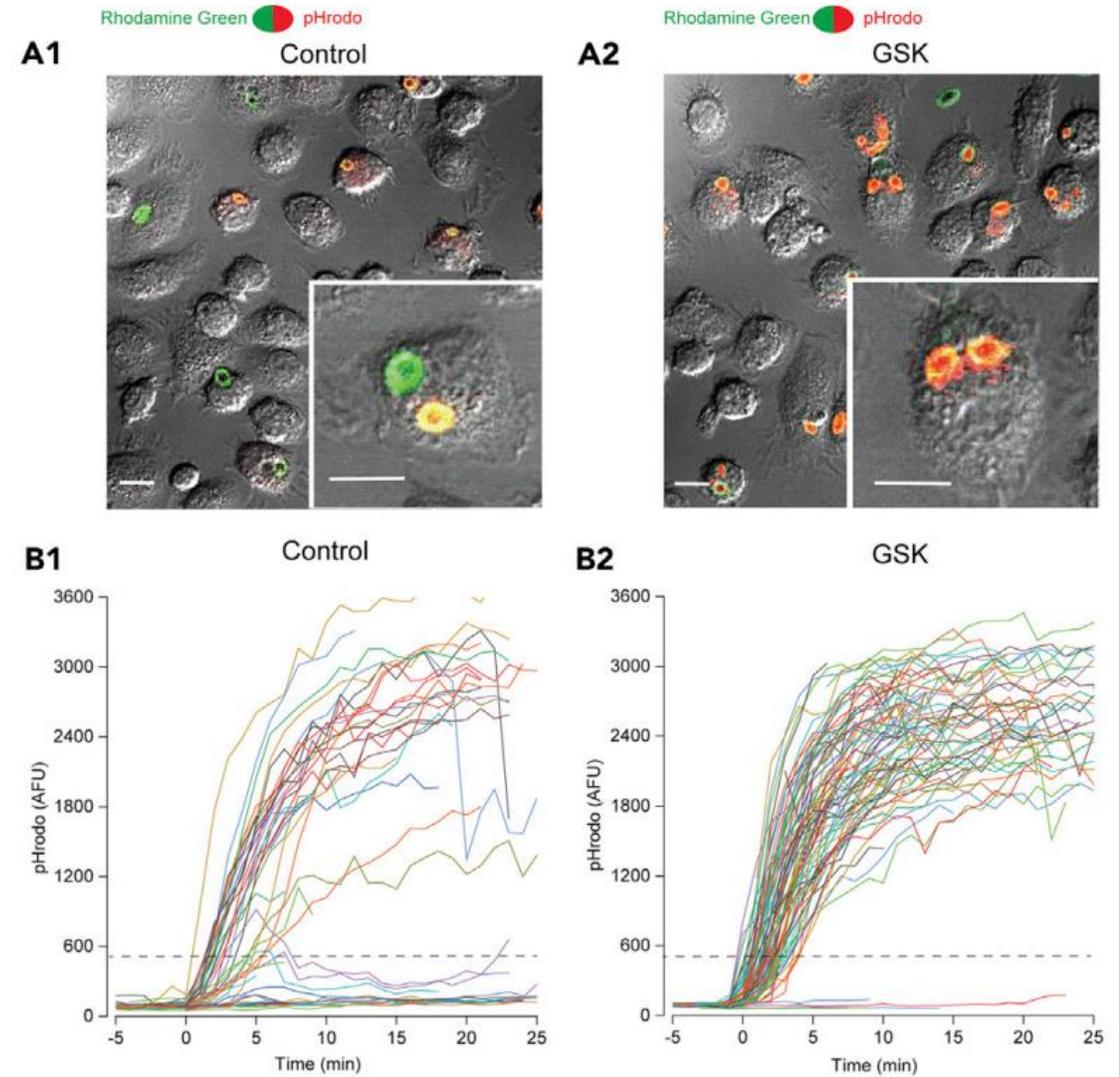
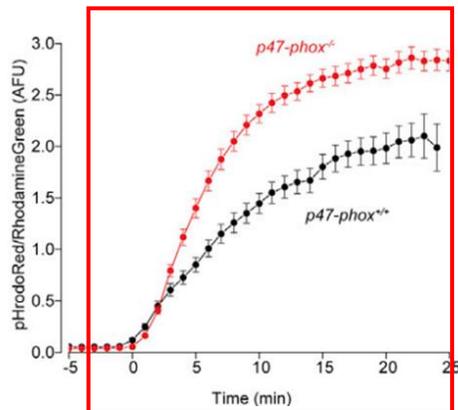
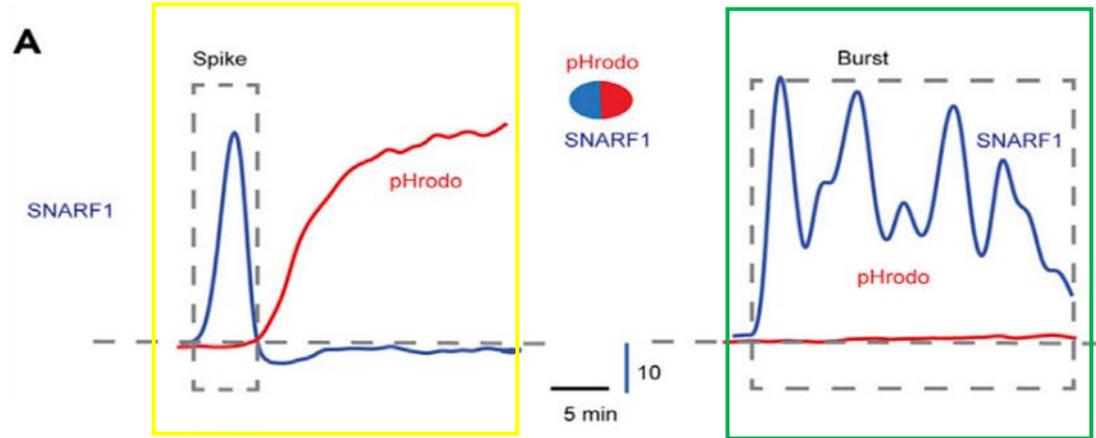
pHrodo: sonda pH sensibile



Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

Rodamina: sonda pH insensibile

pHrodo: sonda pH sensibile

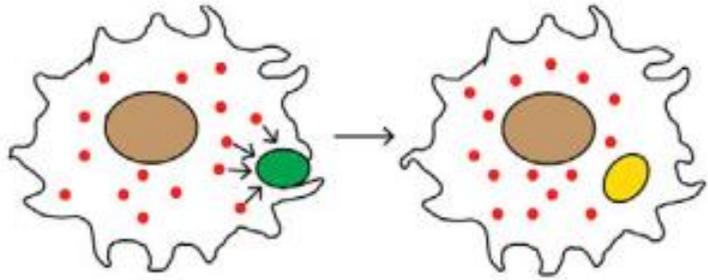


Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

Destrano: cargo del lisosoma

Rodamina: cargo (pH insensibile)

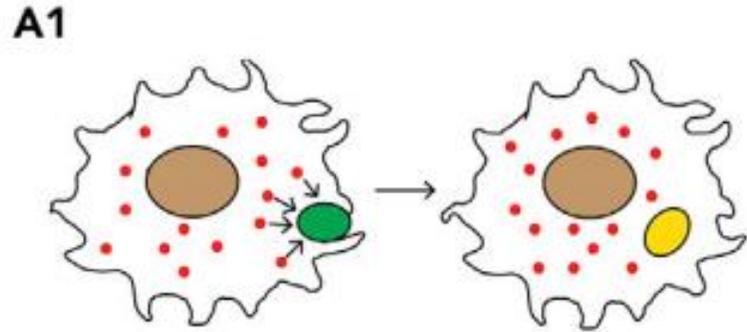
A1



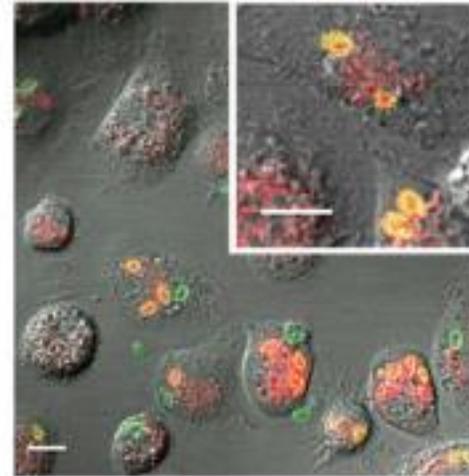
Analisi della cinetica di maturazione del fagosoma

Destrano: cargo del lisosoma

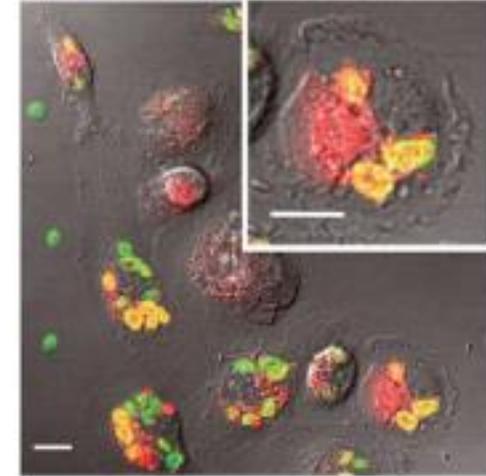
Rodamina: cargo (pH insensibile)



B2 *p47-phox^{+/+}* GSK



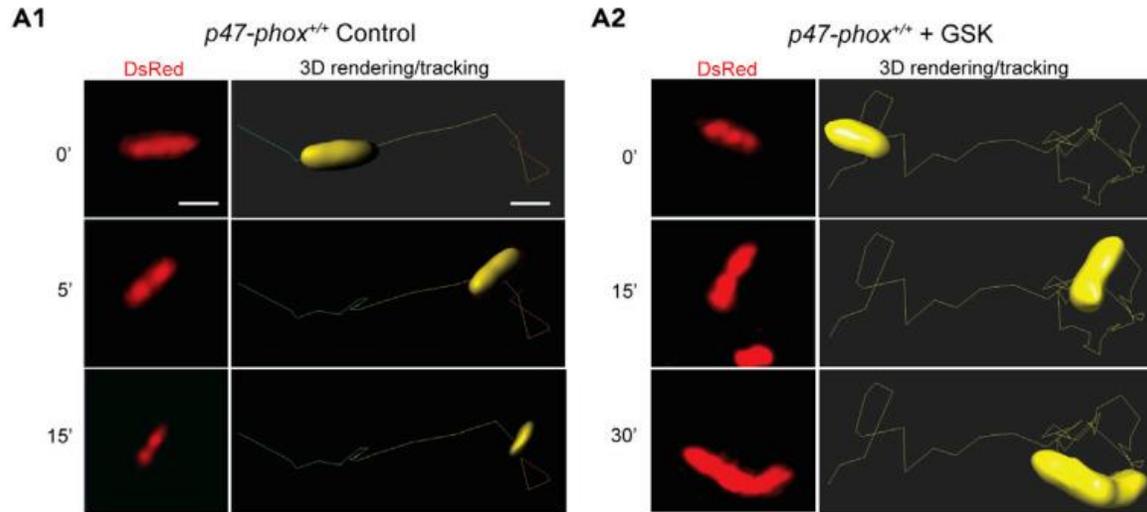
B3 *p47-phox^{-/-}* Control



Separazione della cinetica della maturazione del fagosoma

Attività microbica analizzata come
cambiamenti del volume del batterio

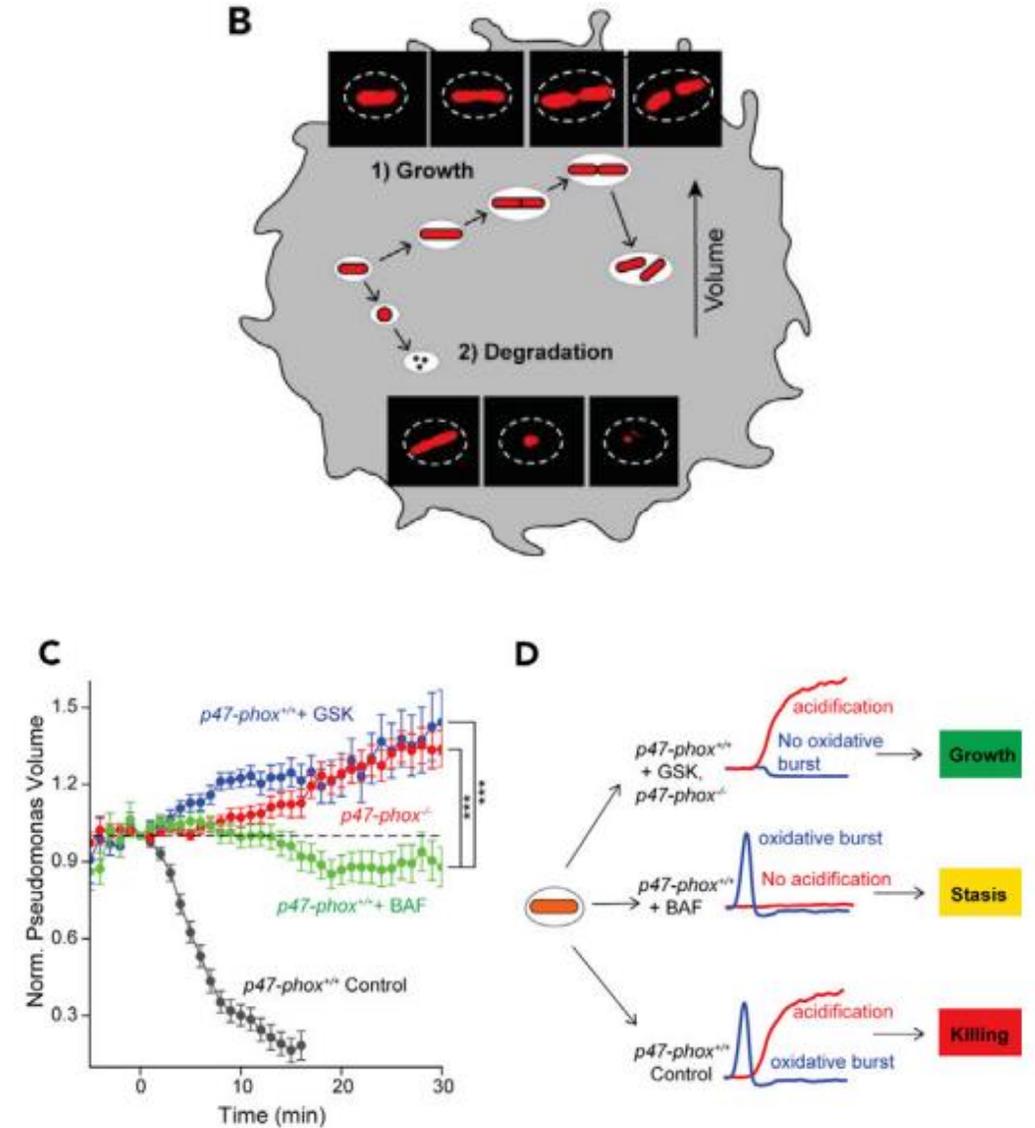
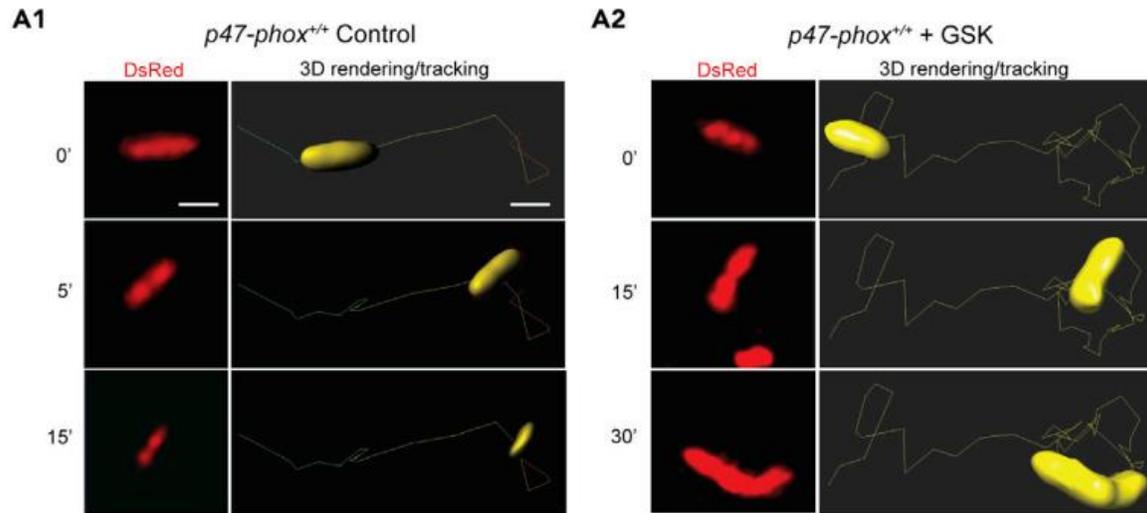
Combinazione del segnale fluorescente della proteina DsRed espressa
da *P. aeruginosa* e software di imaging per restituire immagini 3D di
aumento (crescita) o diminuzione (uccisione) del volume batterico



Separazione della cinetica della maturazione del fagosoma

Attività microbica analizzata come cambiamenti del volume del batterio

Combinazione del segnale fluorescente della proteina DsRed espressa da *P. aeruginosa* e software di imaging per restituire immagini 3D di aumento (crescita) o diminuzione (uccisione del batterio)



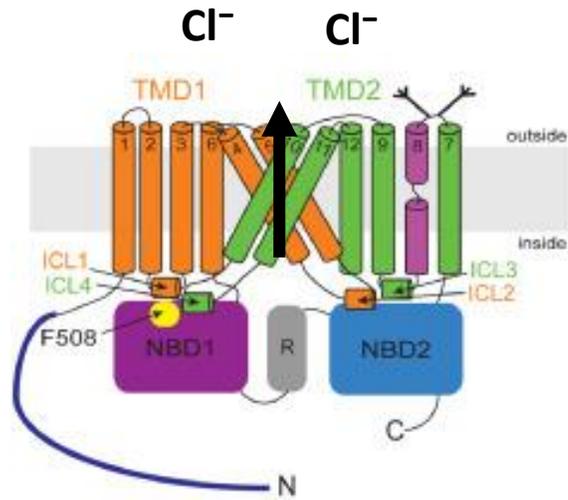
Dalla teoria alla pratica: fagociti Fibrosi Cistica e il caso di *Pseudomonas aeruginosa*

CFTR protein

TMD1/TMD2
Transmembrane domains
(channel pore)

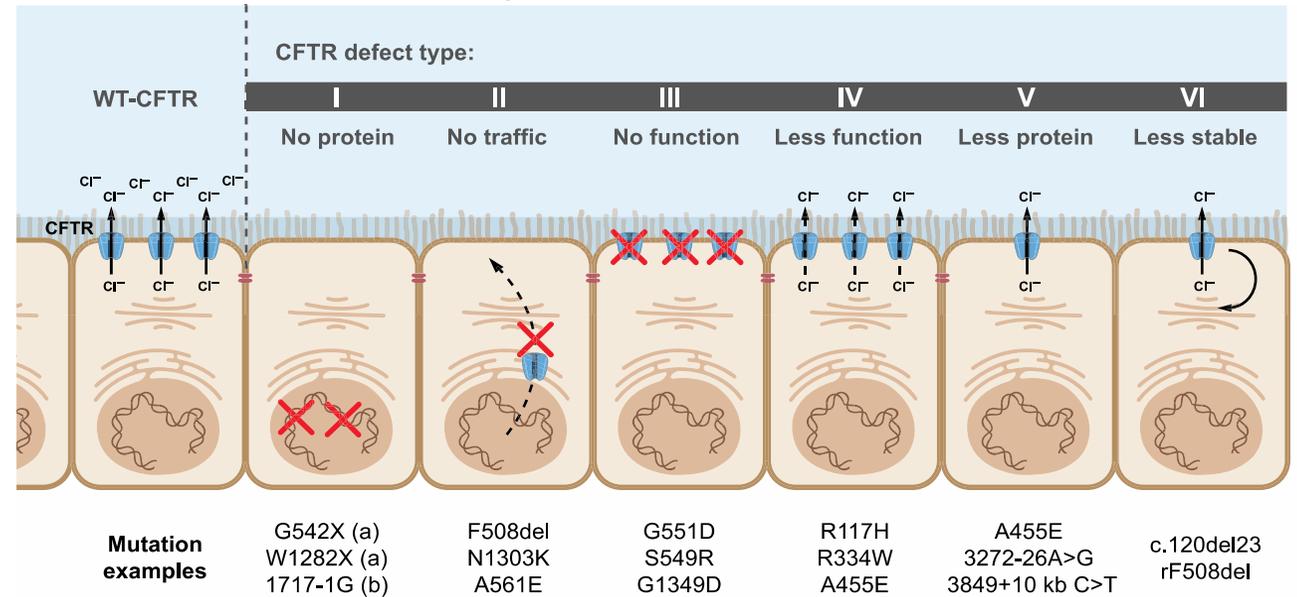
NBD1/NBD2
Nucleotide-binding domains
(ATP-binding domains)

R
Regulatory domain



From Kleizen *et al.*, 2020

Adapted from Milla and Moss 2015



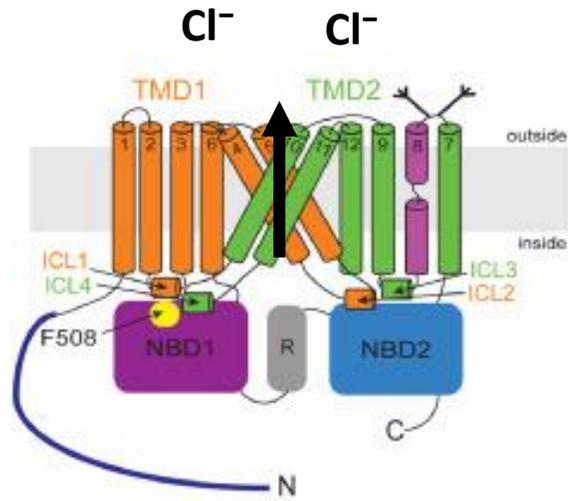
Dalla teoria alla pratica: fagociti Fibrosi Cistica e il caso di *Pseudomonas aeruginosa*

CFTR protein

TMD1/TMD2
Transmembrane domains
(channel pore)

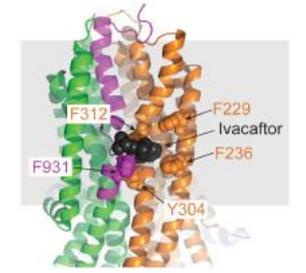
NBD1/NBD2
Nucleotide-binding domains
(ATP-binding domains)

R
Regulatory domain



Adapted from Kleizen *et al.*, 2020

Modulatori



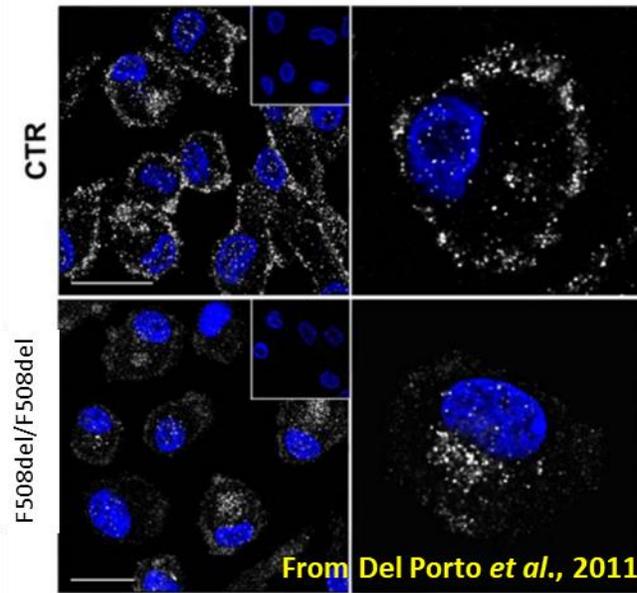
From Kleizen *et al.*, 2020

	CFTR defect type:						
	WT-CFTR	I	II	III	IV	V	VI
		No protein	No traffic	No function	Less function	Less protein	Less stable
Mutation examples		G542X (a) W1282X (a) 1717-1G (b)	F508del N1303K A561E	G551D S549R G1349D	R117H R334W A455E	A455E 3272-26A>G 3849+10 kb C>T	c.120del23 rF508del
Corrective therapy		Rescue synthesis	Rescue traffic	Restore channel activity	Restore channel activity	Correct splicing	Promote stability

Adapted from Milla and Moss 2015

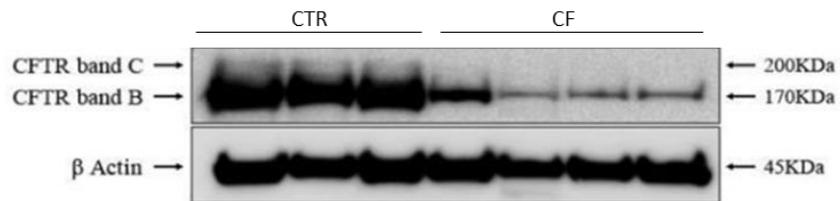
Dalla teoria alla pratica: fagociti Fibrosi Cistica e il caso di *Pseudomonas aeruginosa*

Macrofagi umani differenziati in vitro



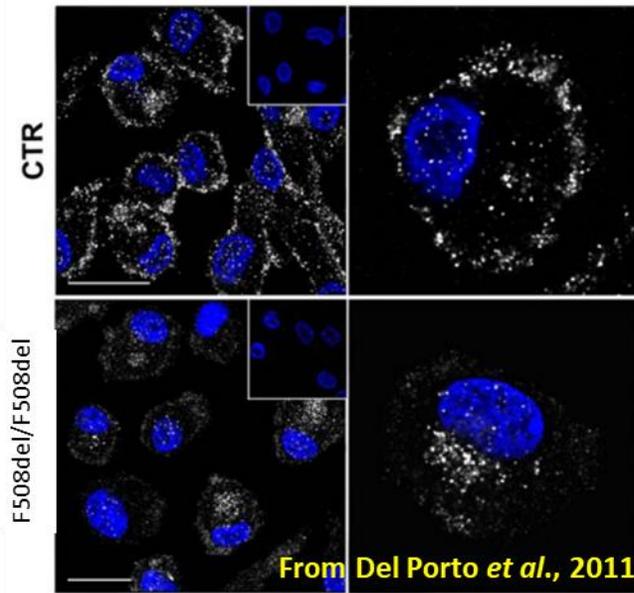
CFTR localization in macrophages from healthy donors (CTR) and CF (F508del/ F508del) subject.

Monociti isolati dal sangue periferico



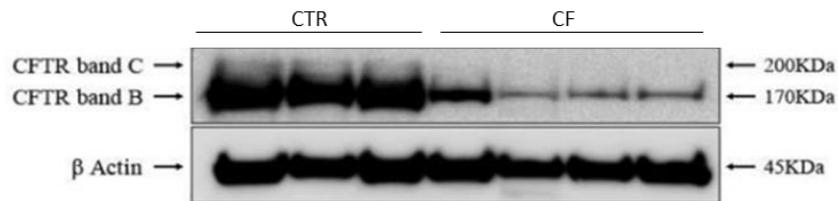
Dalla teoria alla pratica: fagociti Fibrosi Cistica e il caso di *Pseudomonas aeruginosa*

Macrofagi umani differenziati in vitro



CFTR localization in macrophages from healthy donors (CTR) and CF (F508del/ F508del) subject.

Monociti isolati dal sangue periferico



From Riquelme et al., 2017

Una CFTR disfunzionale determina una difettiva attività antimicrobica

I) Elevata risposta pro-infiammatoria

II) Attività antimicrobica:

- Fagocitosi
- Produzione dei ROS
- Acidificazione del fagosoma
- Autophagy

CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity

Anke Di¹, Mary E. Brown¹, Ludmila V. Deriy¹, Chunying Li², Frances L. Szeto¹, Yimei Chen¹, Ping Huang¹, Jiansun Tong⁴, Anjaparavanda P. Naren², Vytautas Bindokas⁴, H. Clive Palfrey⁴ and Deborah J. Nelson^{1,3}

Lumacaftor (VX-809) restores the ability of CF macrophages to phagocytose and kill *Pseudomonas aeruginosa*

Roxanna Barnaby¹, Katja Koeppen¹, Amanda Nyman^{1,2}, Thomas H. Hampton¹, Brent Berwin¹, Alix Ashare^{1,2}, and Bruce A. Stanton¹

Alterations in Ceramide Concentration and pH Determine the Release of Reactive Oxygen Species by *Cftr*-Deficient Macrophages on Infection

Yang Zhang,* Xiang Li,* Heike Grassmé,* Gerd Döring,[†] and Erich Gulbins*

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attaches tumor suppressor PTEN to the membrane and promotes anti *Pseudomonas aeruginosa* immunity

Sebastián A. Riquelme¹, Benjamin D. Hopkins², Andrew L. Wolfe³, Emily DiMango⁴, Kipyegon Kitur¹, Ramon Parsons³, and Alice Prince^{1,*,#}

Dysfunctional CFTR Alters the Bactericidal Activity of Human Macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*

Paola Del Porto^{1,*}, Noemi Cifani¹, Simone Guarnieri², Enea Gino Di Domenico¹, Maria A. Mariggio², Francesca Spadaro³, Silvia Guglietta¹, Marco Anile⁴, Federico Venuta⁴, Serena Quattrucci⁵, Fiorentina Ascenzi¹

Aspergillus-induced superoxide production by cystic fibrosis phagocytes is associated with disease severity

Shan F. Brunel¹, Janet A. Willment¹, Gordon D. Brown¹, Graham Devereux² and Adilia Warris¹

Human Cystic Fibrosis Macrophages Have Defective Calcium-Dependent PKC Activation of the NADPH Oxidase, an Effect Augmented by *Burkholderia cenocepacia*

Kaivon Assani¹, Chandra L. Shrestha¹, Frank Robledo-Avila¹, Murugesan V. Rajaram¹, Santiago Partida-Sanchez², Larry S. Schlesinger¹, and Benjamin T. Kopp^{1,*,#}

MiR-146a is over-expressed and controls IL-6 production in cystic fibrosis macrophages

Francesco R. Luly^{1,*}, Manuella Lévêque^{1,2,3,4}, Valerio Licursi¹, Giuseppe Cimino⁵, Corinne Martin-Chouly², Nathalie Thérêt⁴, Rodolfo Negri^{1,5}, Luca Cavinato⁶, Fiorentina Ascenzi¹ & Paola Del Porto^{1,*}

Obiettivo

Analisi degli effetti del combinazione di modulatori (Kaftrio) su monociti FC



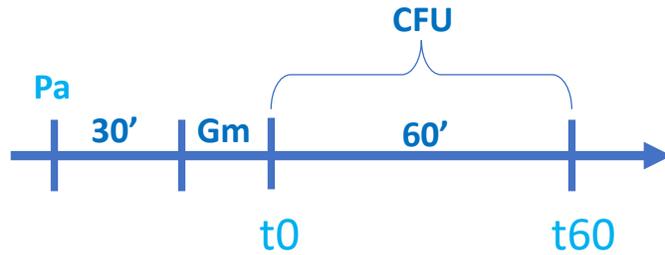
EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL
ORIGINAL RESEARCH ARTICLE
L. CAVINATO ET AL.

Elexacaftor–tezacaftor–ivacaftor corrects monocyte microbicidal deficiency in cystic fibrosis

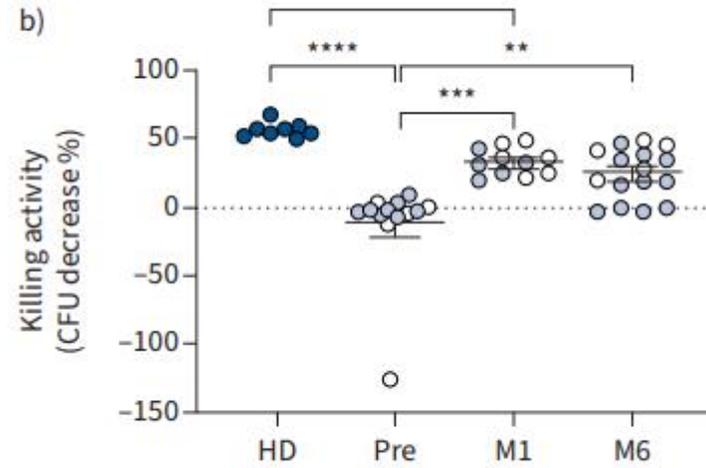
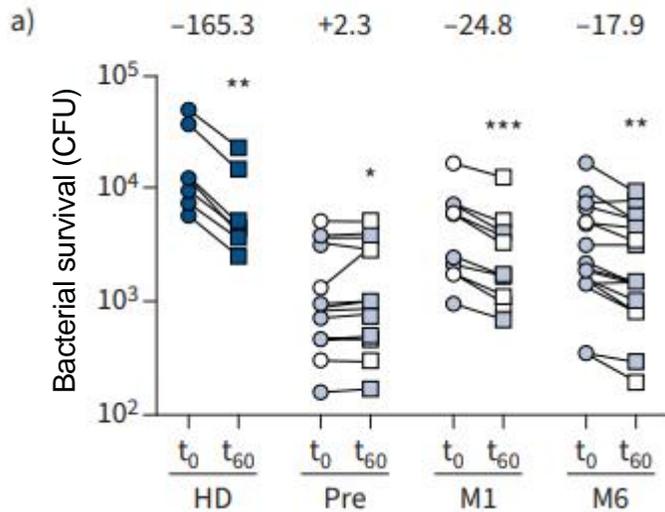
Luca Cavinato¹, Francesco R. Luly¹, Valentina Pastore¹, Daniele Chiappetta¹, Gloria Sangiorgi¹,
Eva Ferrara², Pia Baiocchi³, Giuseppe Mandarello⁴, Giuseppe Cimino², Paola Del Porto¹ and
Fiorentina Ascenzioni ¹

Dalla teoria alla pratica: fagociti Fibrosi Cistica e il caso di *Pseudomonas aeruginosa*

Disegno sperimentale

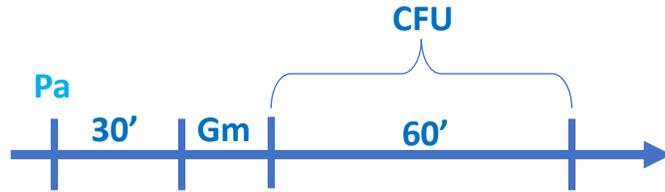


○ □ F508del/F508del ● ■ F508del/other



Dalla teoria alla pratica: fagociti Fibrosi Cistica e il caso di *Pseudomonas aeruginosa*

Disegno sperimentale

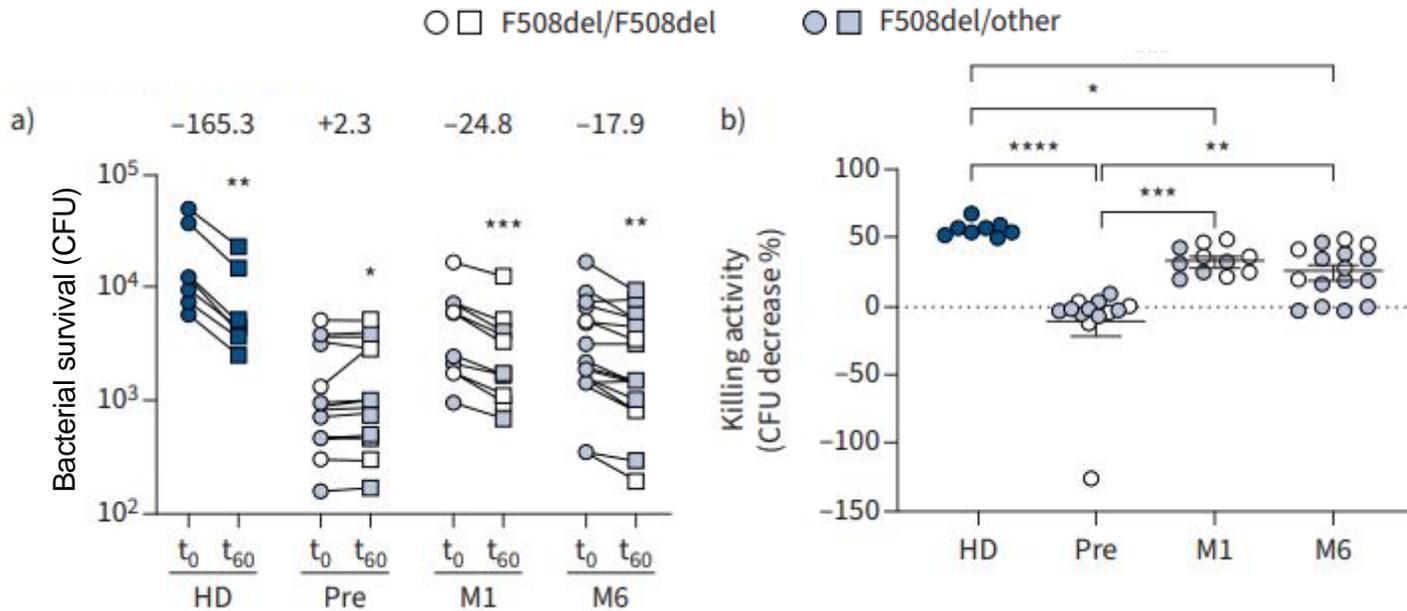


CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity

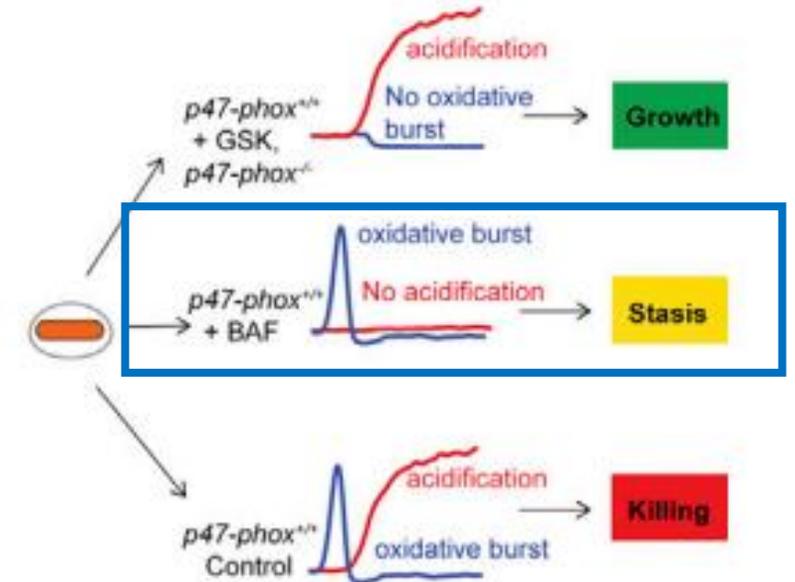
Anke Di¹, Mary E. Brown¹, Ludmila V. Deriy¹, Chunying Li², Frances L. Szeto¹, Yimei Chen¹, Ping Huang¹, Jiankun Tong³, Anjaparavanda P. Naren², Vytautas Bindokas¹, H. Clive Palfrey¹ and Deborah J. Nelson^{1,5}

Aspergillus-induced superoxide production by cystic fibrosis phagocytes is associated with disease severity

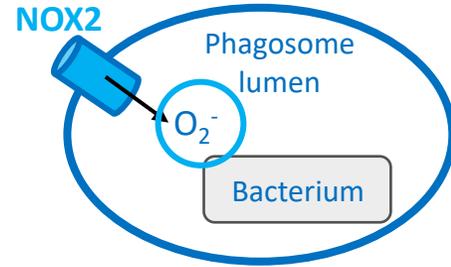
Shan F. Brunel¹, Janet A. Willment¹, Gordon D. Brown¹, Graham Devreux² and Adilia Warris¹



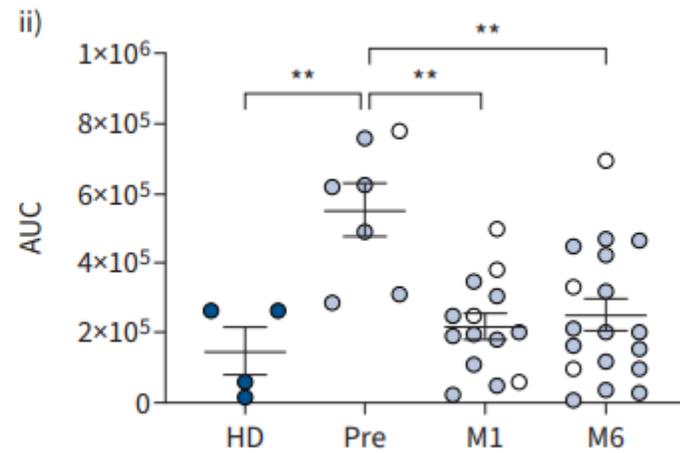
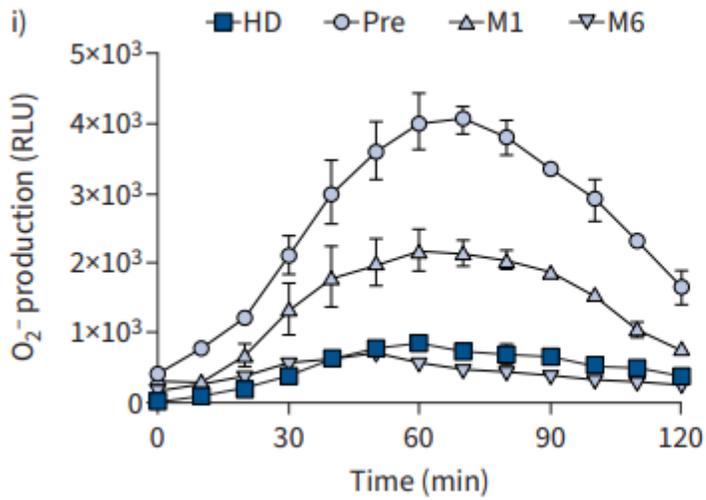
D



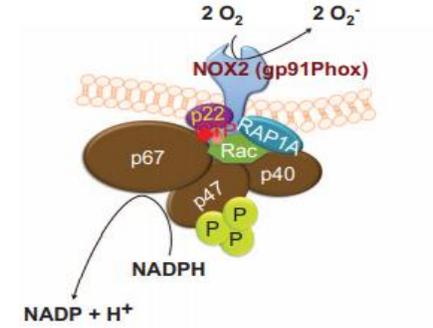
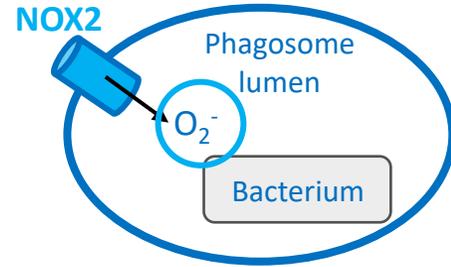
Dalla teoria alla pratica: fagociti Fibrosi Cistica e il caso di *Pseudomonas aeruginosa*



○ F508del/F508del ● F508del/other

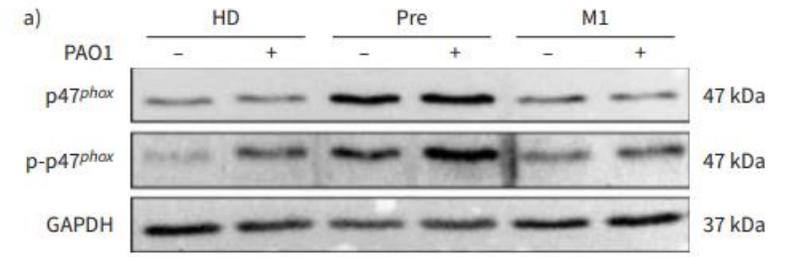
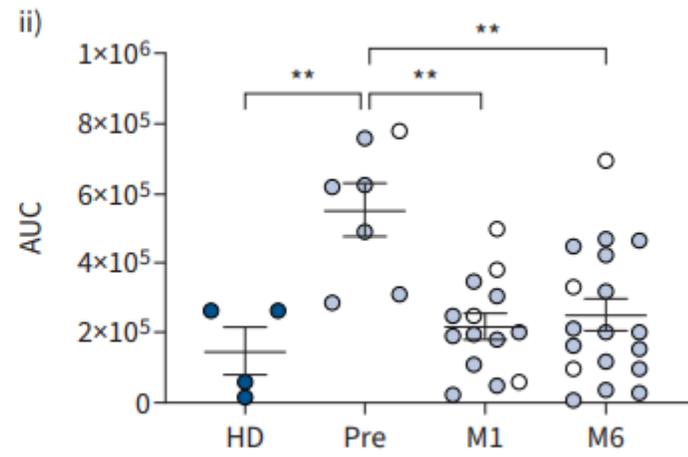
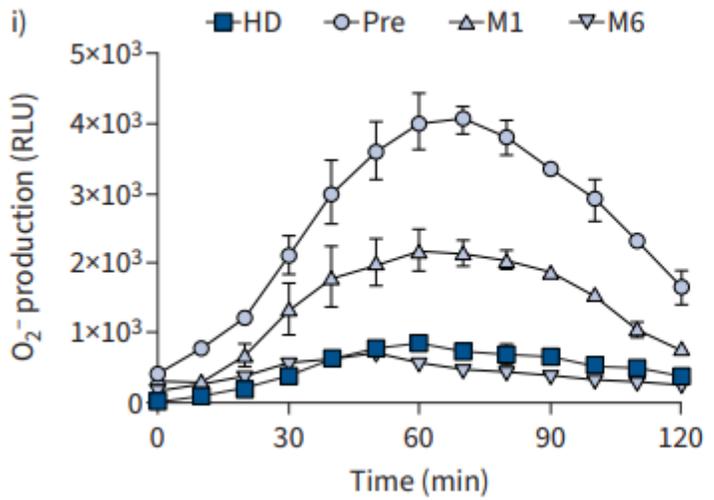


Dalla teoria alla pratica: fagociti Fibrosi Cistica e il caso di *Pseudomonas aeruginosa*

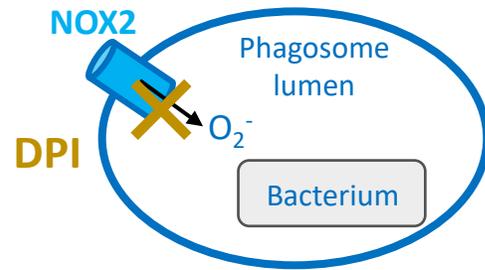


Adapted from Panday *et al.*, 2015

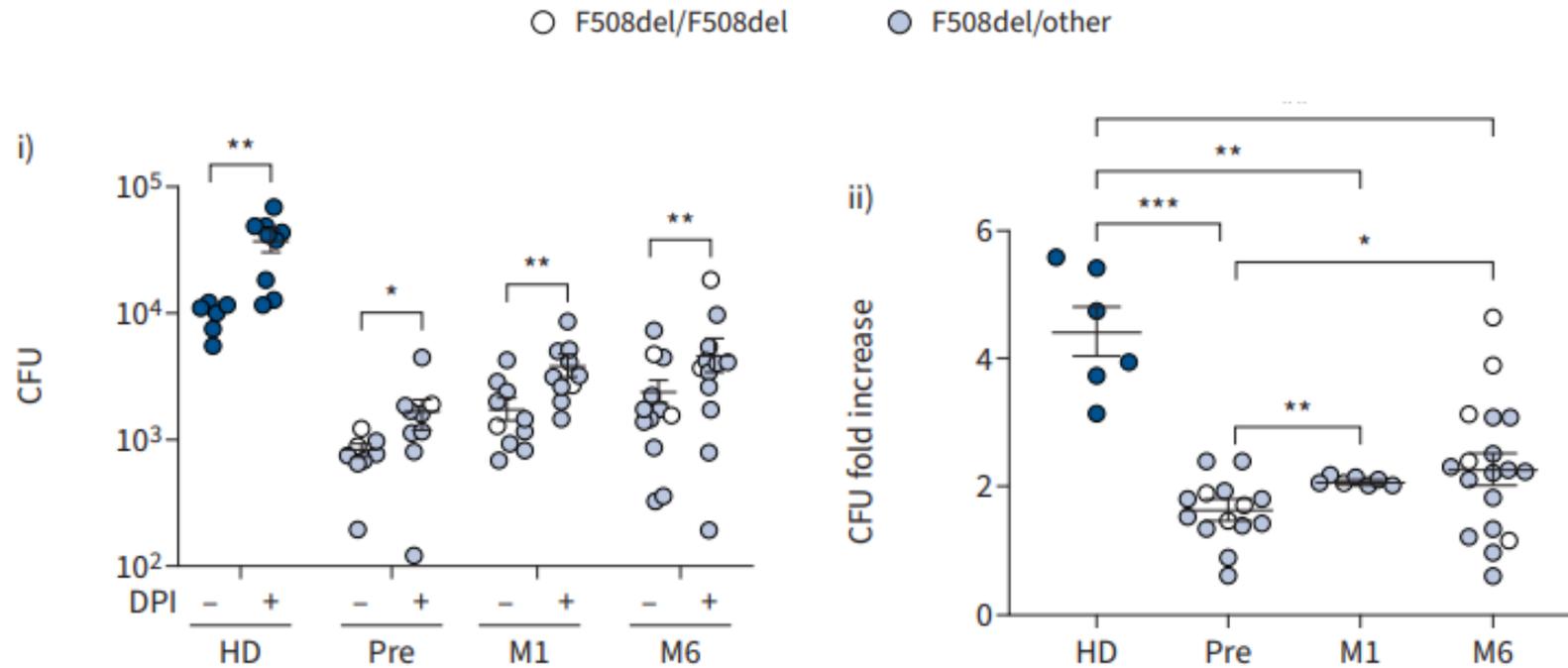
○ F508del/F508del ● F508del/other



Dalla teoria alla pratica: fagociti affetti da Fibrosi Cistica e il caso di *Pseudomonas aeruginosa*



Disegno sperimentale



Dalla teoria alla pratica: il caso di *Acinetobacter Baumannii*

Saggio di protezione antibiotica con *A. baumannii* fluorescente

L'isolato clinico di *A. baumannii* UPAB1 sono in grado di riprodursi all'interno di fagosomi (ACV, *Acinetobacter* containing vacuole)

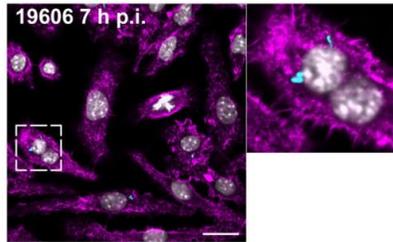
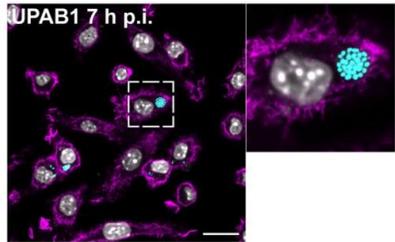
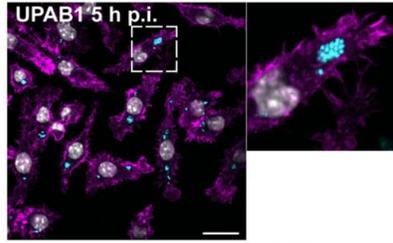
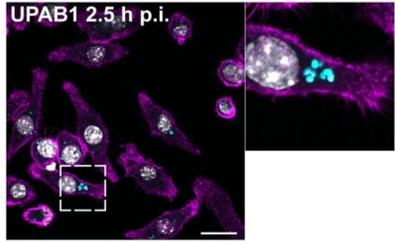
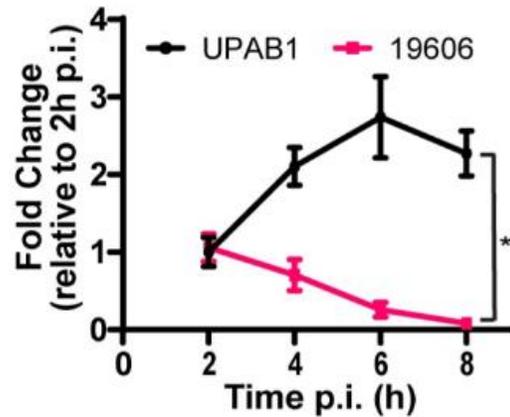


Immagine adattate da
Sycz et al 2021

Distel et al, 2023



Dalla teoria alla pratica: il caso di *Acinetobacter Baumannii*

Saggio di protezione antibiotica con *A. baumannii* fluorescente

L'isolato clinico di *A. baumannii* UPAB1 sono in grado di riprodursi all'interno di fagosomi (ACV, *Acinetobacter* containing vacuole)

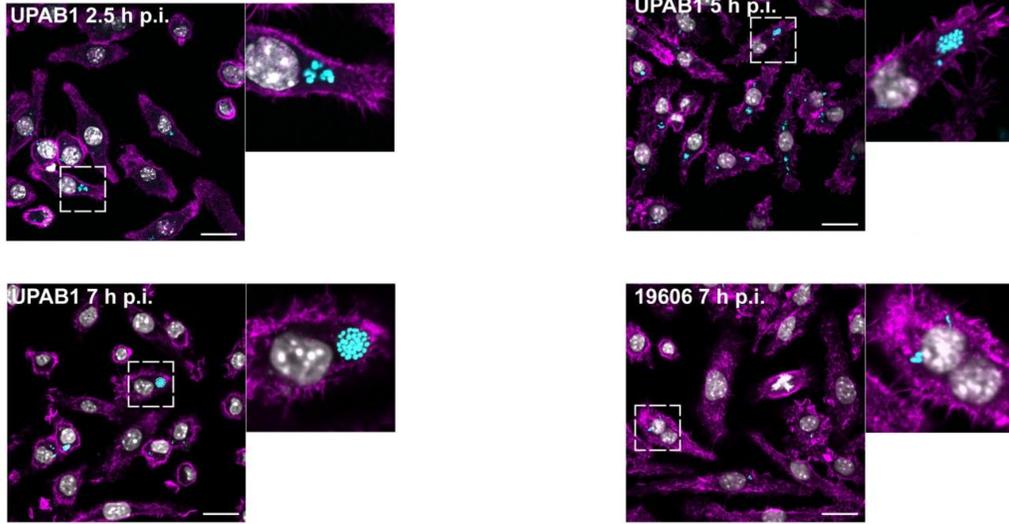
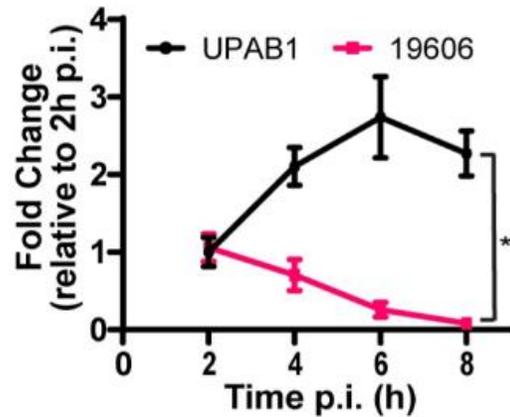
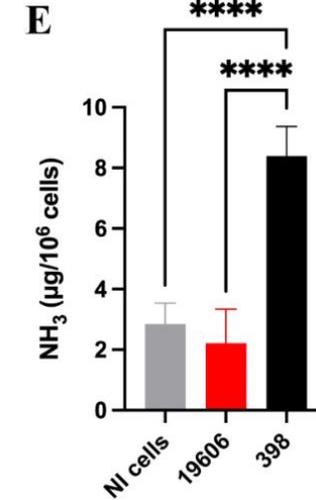
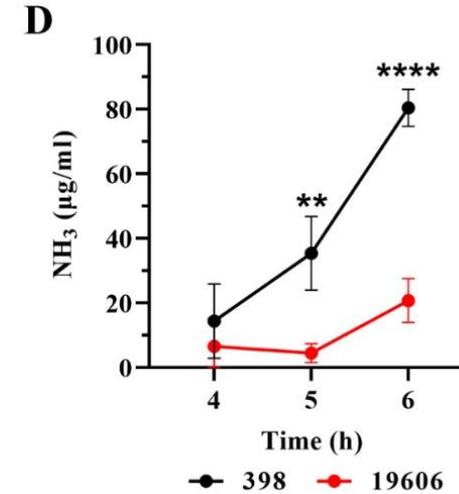


Immagine adattate da
Sycz et al 2021

Distel et al, 2023



Produzione di ammoniaca all'interno di ACVs



Dalla teoria alla pratica: il caso di *Acinetobacter Baumannii*

Saggio di protezione antibiotica con *A. baumannii* fluorescente

L'isolato clinico di *A. baumannii* UPAB1 sono in grado di riprodursi all'interno di fagosomi (ACV, *Acinetobacter* containing vacuole)

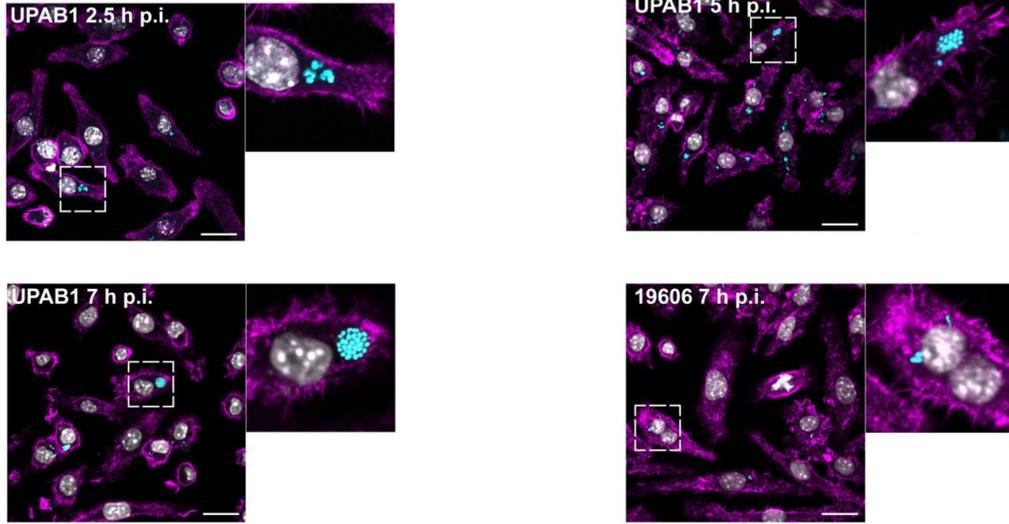
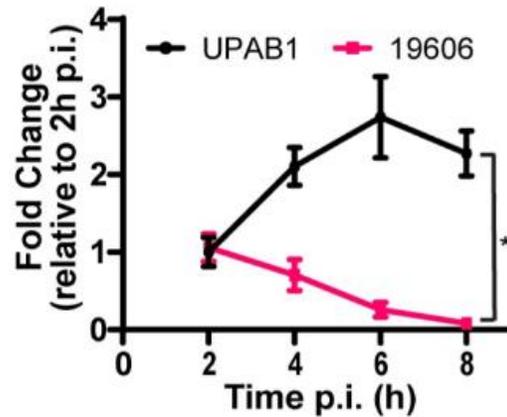
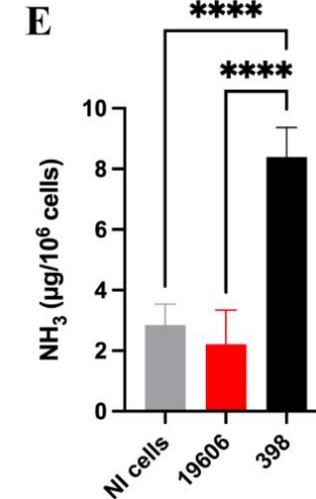
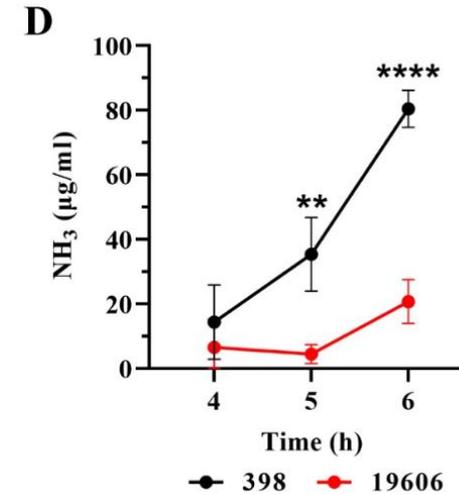


Immagine adattate da
Sycz et al 2021

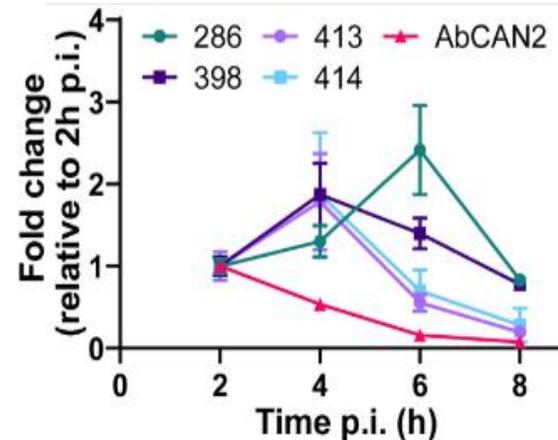
Distel et al, 2023



Produzione di ammoniaca all'interno di ACVs



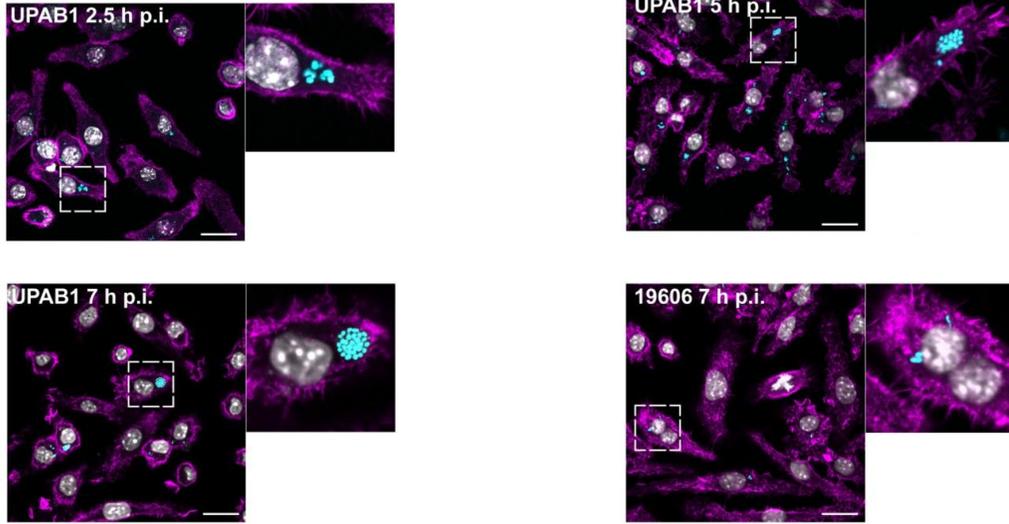
Altri isolati clinici di *A. baumannii* sono in grado di replicarsi all'interno di ACV



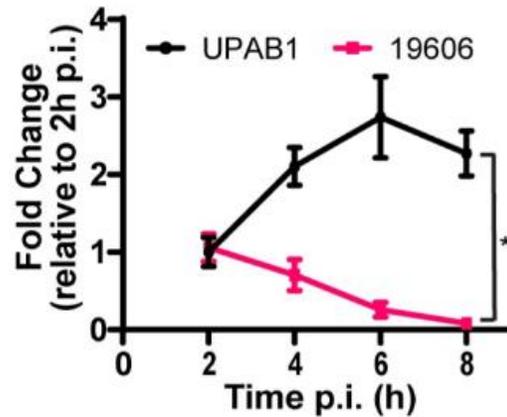
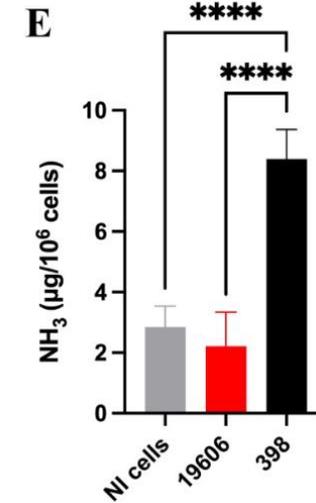
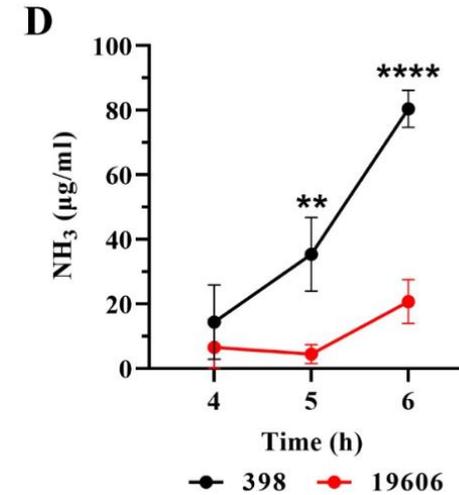
Dalla teoria alla pratica: il caso di *Acinetobacter Baumannii*

Saggio di protezione antibiotica con *A. baumannii* fluorescente

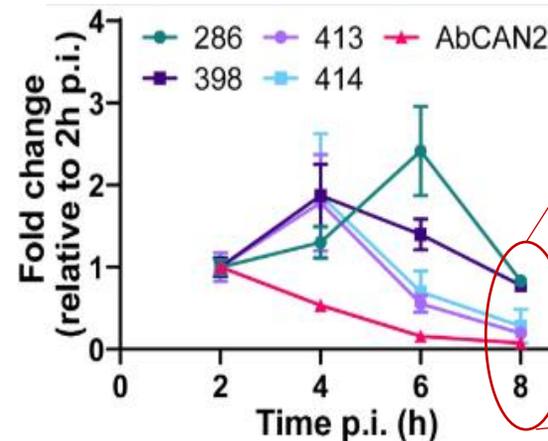
L'isolato clinico di *A. baumannii* UPAB1 sono in grado di riprodursi all'interno di fagosomi (ACV, *Acinetobacter* containing vacuole)



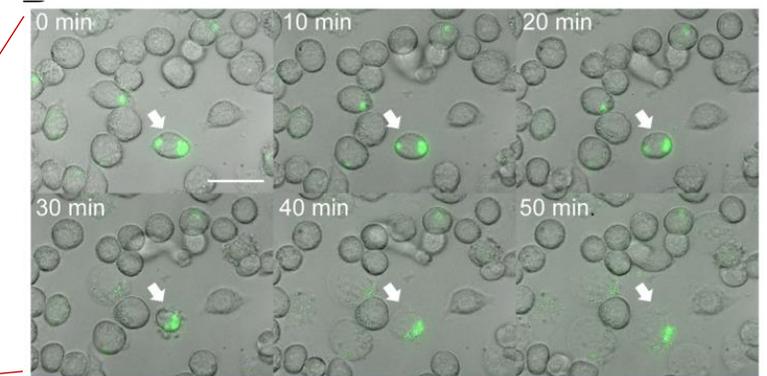
Produzione di ammoniaca all'interno di ACVs



Altri isolati clinici di *A. baumannii* sono in grado di replicarsi all'interno di ACV



Escape dal fagosoma e conseguente lisi del macrofago



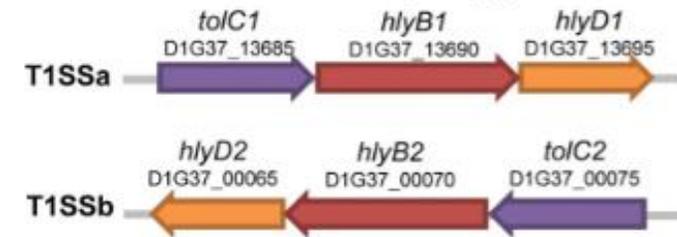
Immagini adattate da:
Sycz et al 2021

Distel et al, 2023

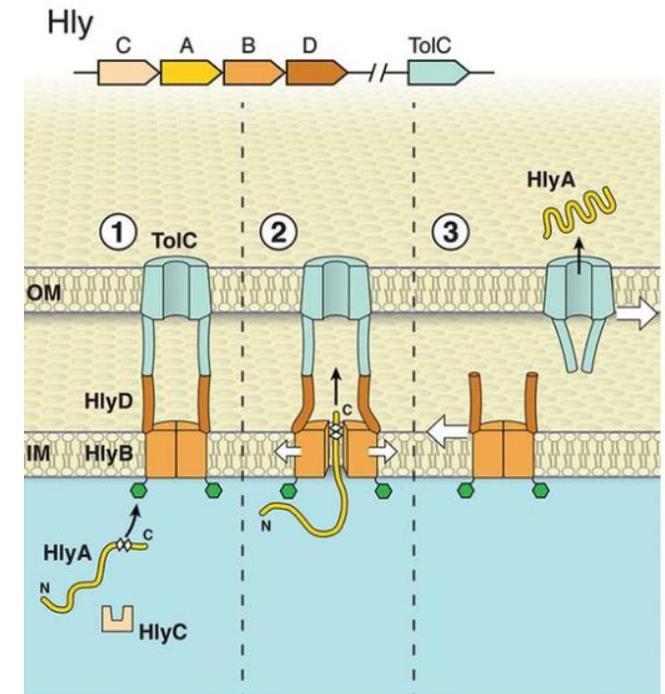
Dalla teoria alla pratica: il caso di *Acinetobacter Baumannii*

- T3SS, T4SS, T6SS, T7SS sono solitamente i sistemi di secrezione deputati alla sopravvivenza batterica all'interno dei macrofagi
- *A. baumannii* non possiede T3SS e T4SS
- Sembra che il T6SS in *A. baumannii* sia coinvolto solamente nella competizione interbatterica
- Il T1SS è utilizzato per es. da *Legionella pneumophila*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Francisella novicida* and *Orientia tsutsugamushi*
- UPAB1 possiede due loci per T1SS, T1SSa e T1SSb

Rappresentazione schematica dei due loci T1SS



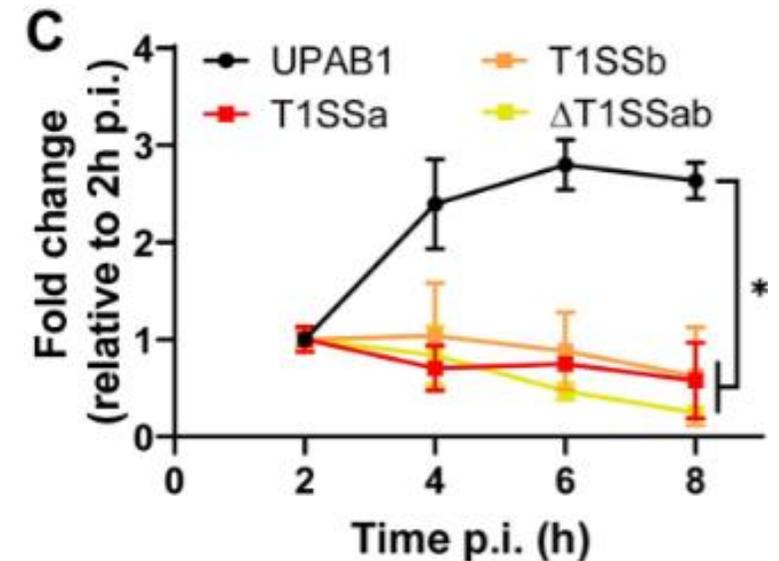
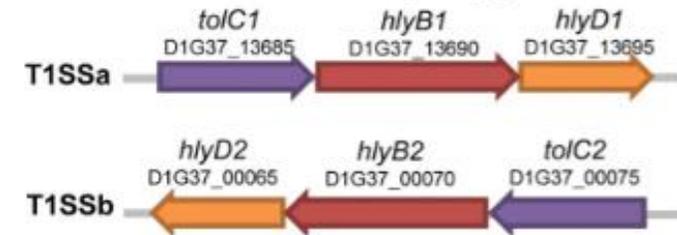
Rappresentazione schematica di T1SS (adapted from Smith *et al.*, 2018)



Dalla teoria alla pratica: il caso di *Acinetobacter Baumannii*

- T3SS, T4SS, T6SS, T7SS sono solitamente i sistemi di secrezione deputati alla sopravvivenza batterica all'interno dei macrofagi
- *A. baumannii* non possiede T3SS e T4SS
- Sembra che il T6SS in *A. baumannii* sia coinvolto solamente nella competizione interbatterica
- Il T1SS è utilizzato per es. da *Legionella pneumophila*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Francisella novicida* and *Orientia tsutsugamushi*
- UPAB1 possiede due loci per T1SS, T1SSa e T1SSb

Rappresentazione schematica dei due loci T1SS



***P. aeruginosa* è in grado di sfuggire al fagosoma**

MgtC

Si trova nella membrana interna dei
gram negativi

OprF

Porina della membrana
esterna

P. aeruginosa è in grado di sfuggire al fagosoma

MgtC

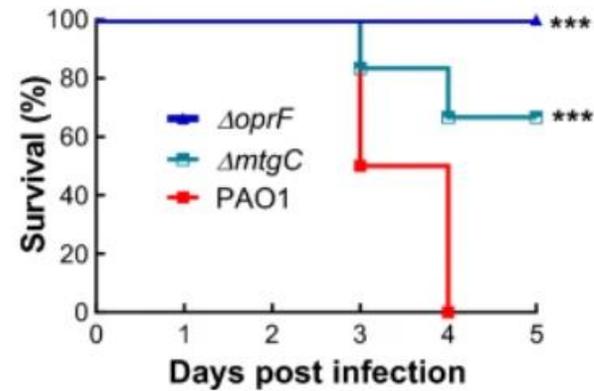
Si trova nella membrana interna dei gram negativi

OprF

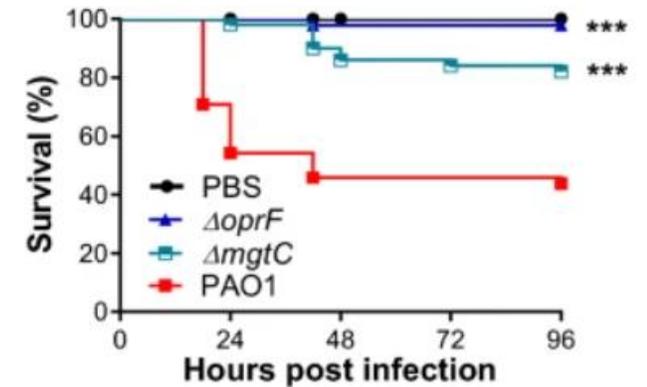
Porina della membrana esterna

Figure 1

A

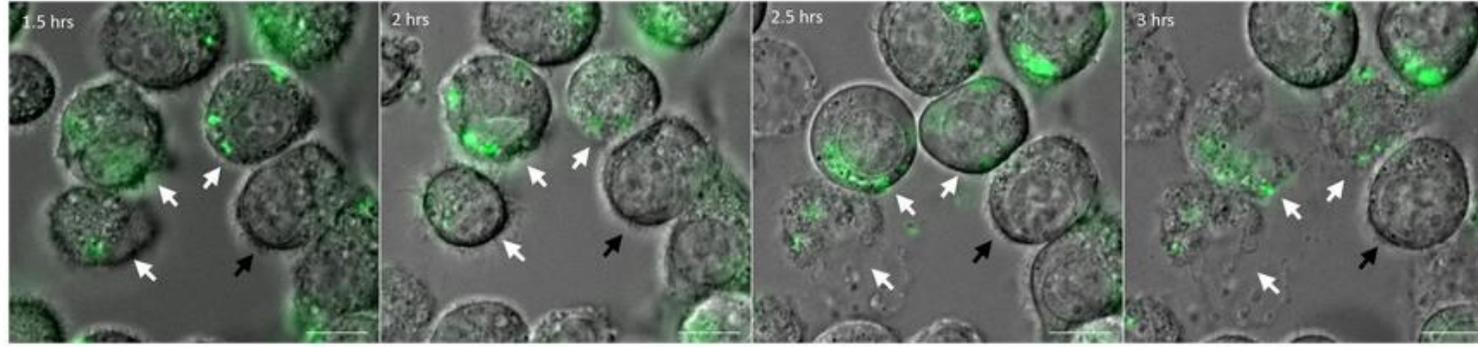


B



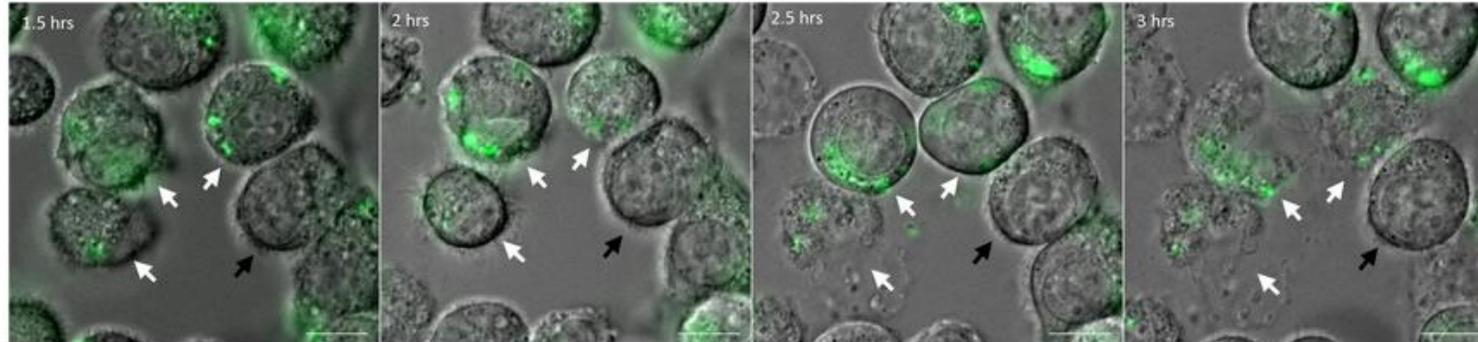
***P. aeruginosa* è in grado di sfuggire al fagosoma**

P. aeruginosa evade il fagosoma e riesce successivamente a lisare il macrofago

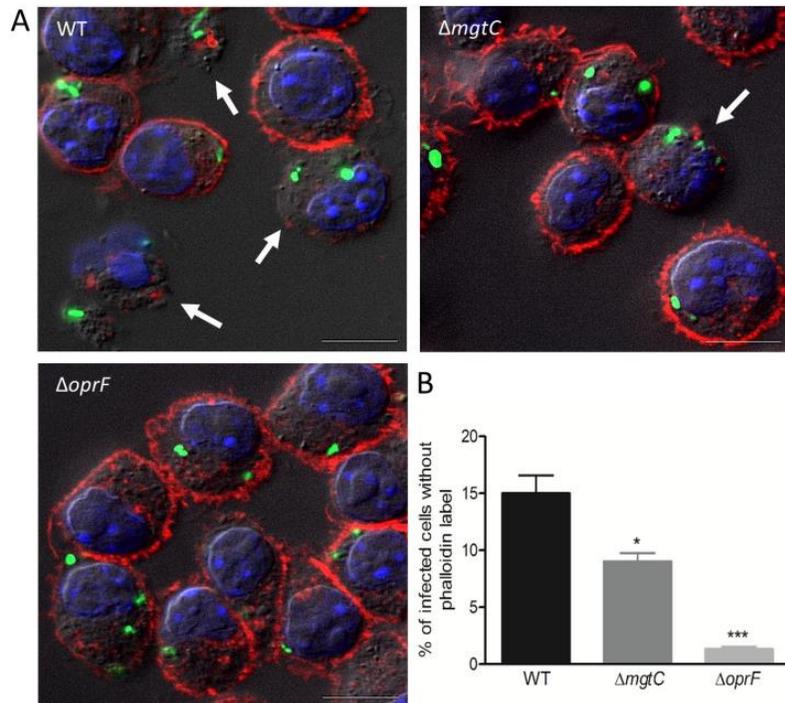


P. aeruginosa è in grado di sfuggire al fagosoma

P. aeruginosa evade il fagosoma e riesce successivamente a lisare il macrofago

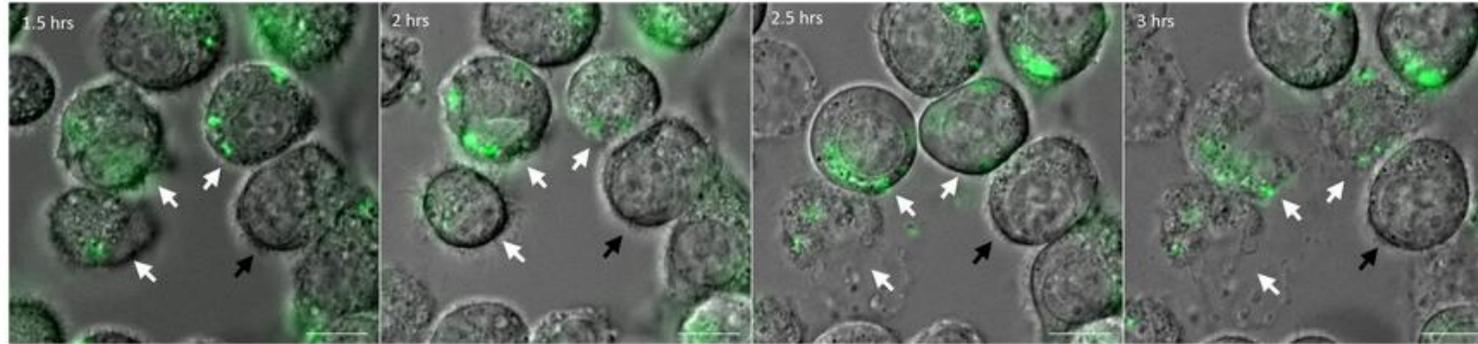


La lisi del macrofago è strettamente correlata all'attività di MgtC e OprF

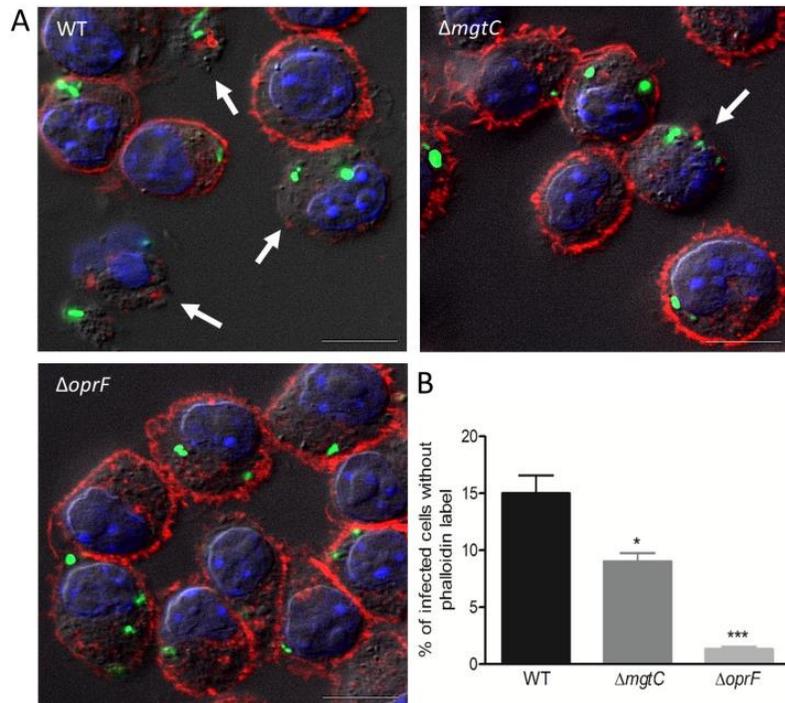


P. aeruginosa è in grado di sfuggire al fagosoma

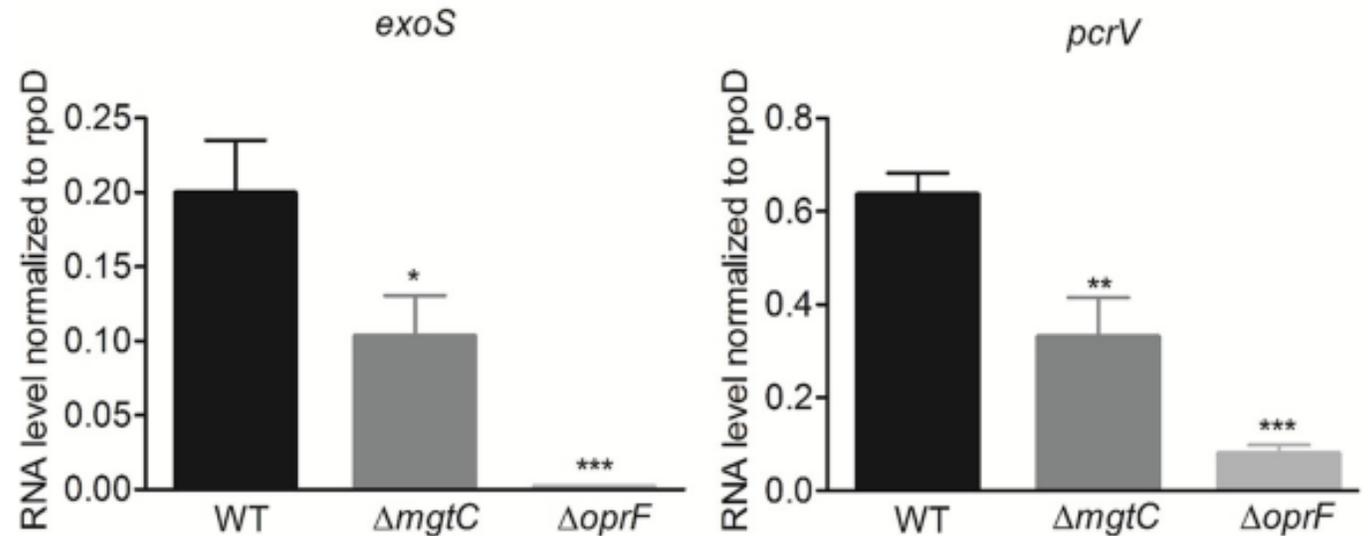
P. aeruginosa evade il fagosoma e riesce successivamente a lisare il macrofago



La lisi del macrofago è strettamente correlata all'attività di MgtC e OprF



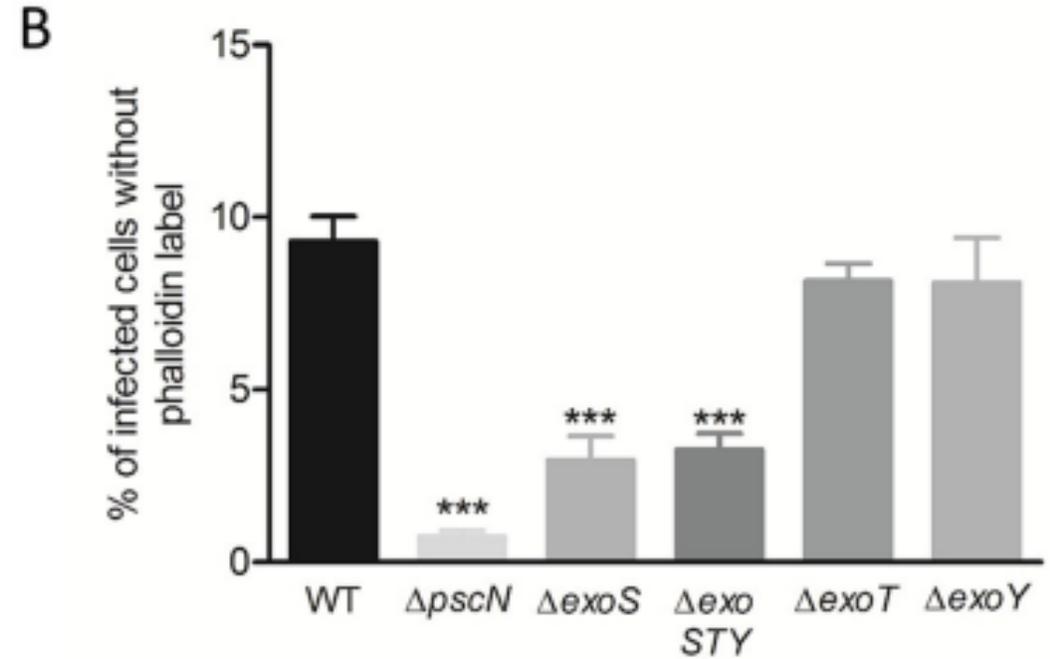
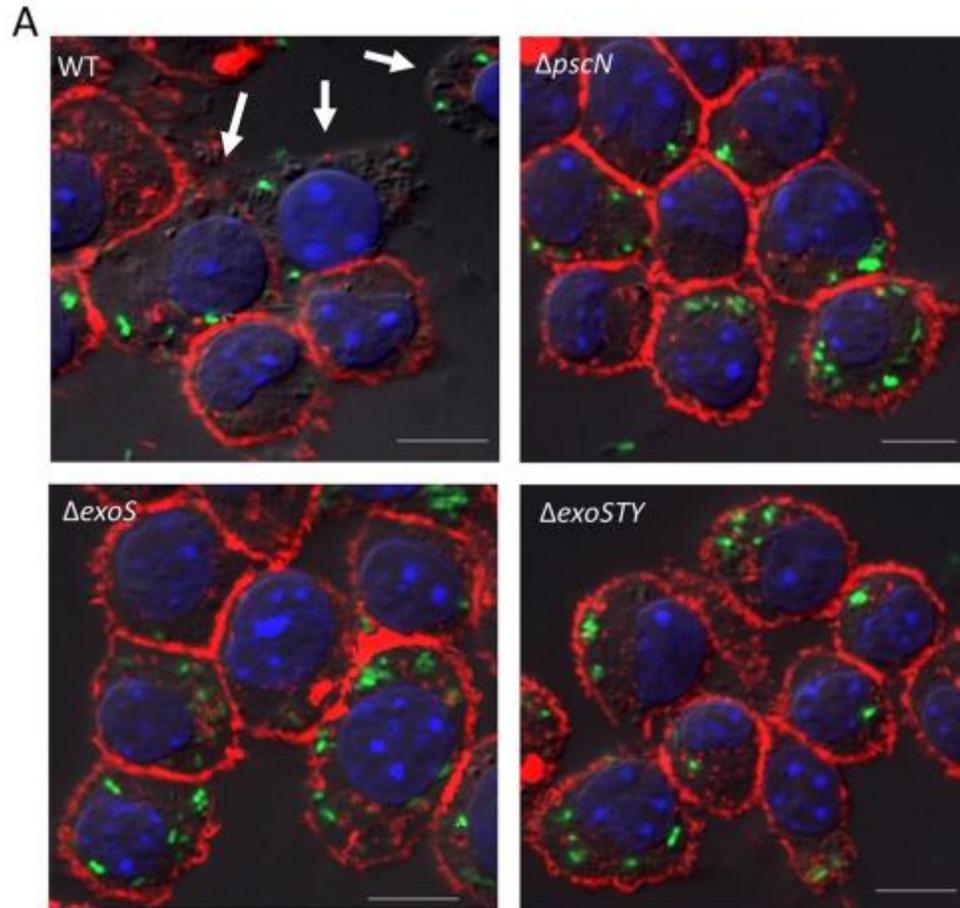
L'espressione di ExoS (effettore T3SS) e PcrV (ago del T3SS) è strettamente correlata con l'attività MgtC e OprF



(Garai *et al.*, 2019)

P. aeruginosa è in grado di sfuggire al fagosoma

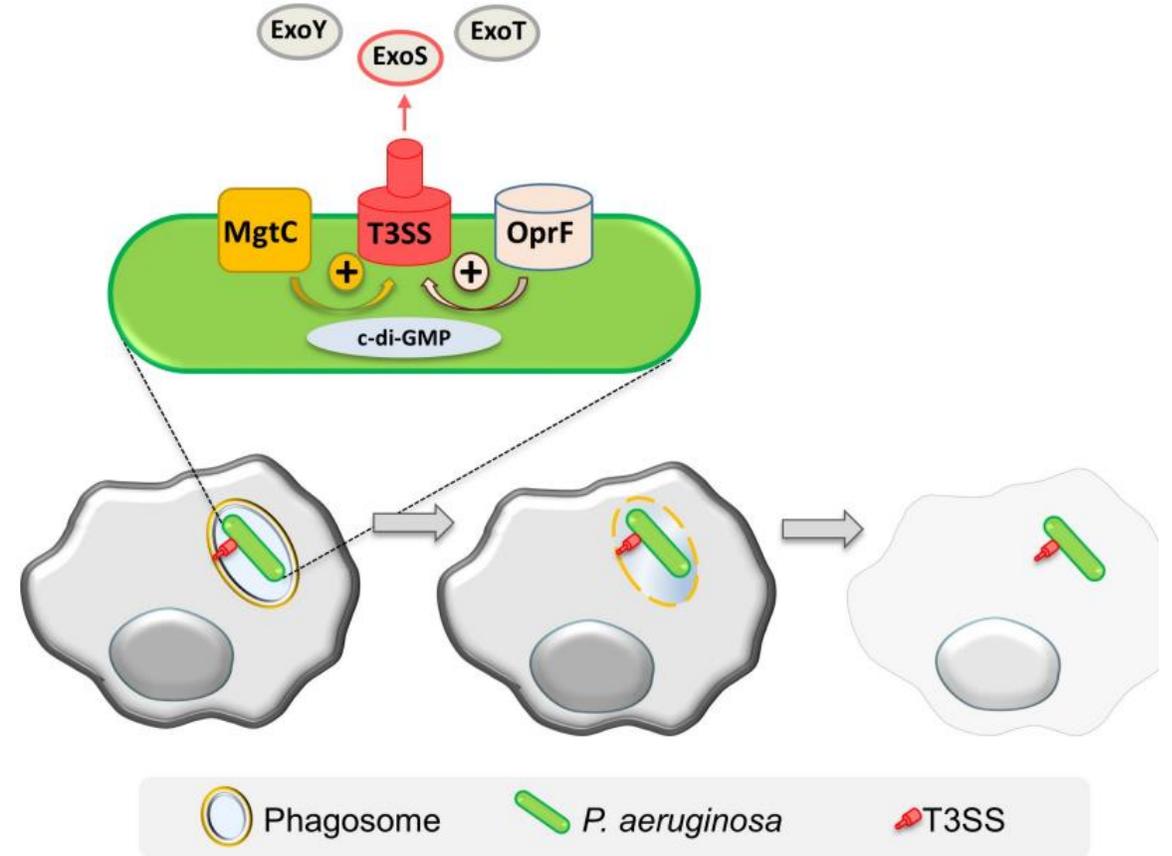
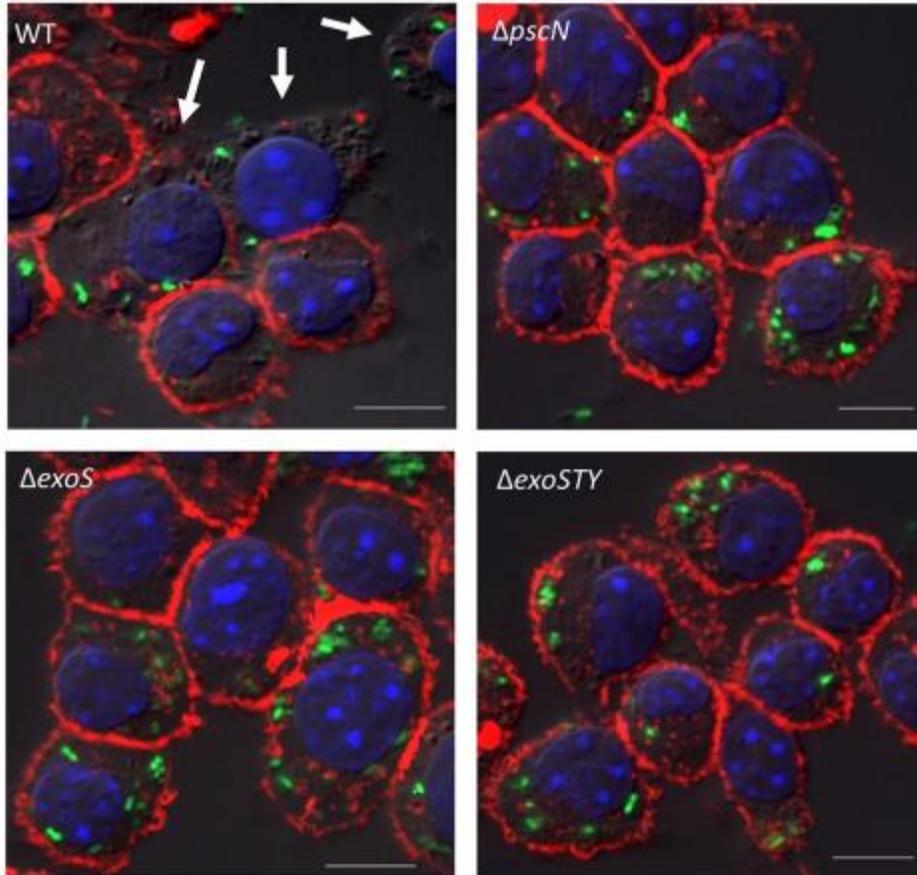
L'espressione di ExoS e PscN (ATPase necessaria all'attività di T3SS) ma non di ExoT ed ExoY sono necessari per permettere l'evasione di *P. aeruginosa* dal fagosoma e in ultima istanza della lisi del macrofago



P. aeruginosa è in grado di sfuggire al fagosoma

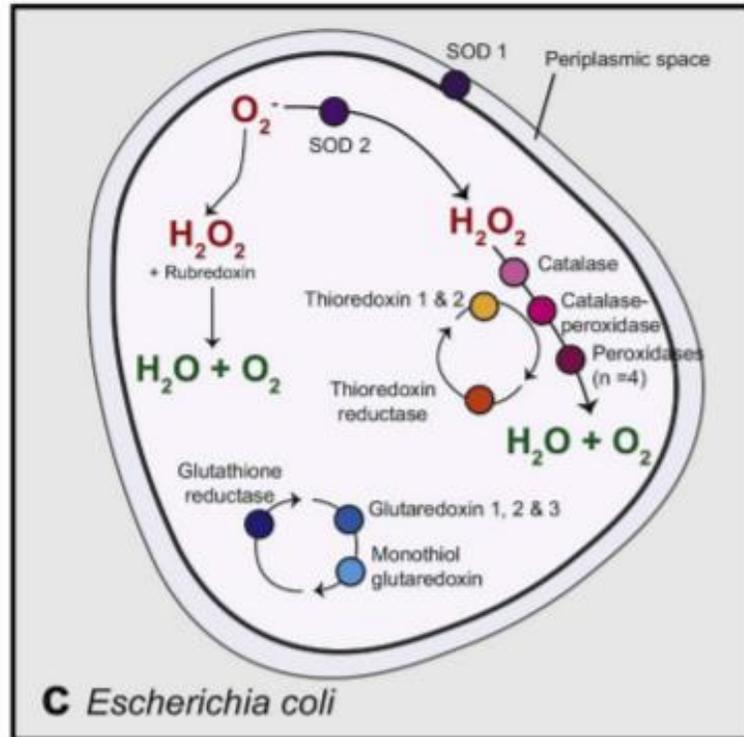
L'espressione di ExoS e PscN ma non di ExoT ed ExoY sono necessari per permettere l'evasione da *P. aeruginosa* del fagosoma e in ultima istanza della lisi del macrofago

A



(Garai *et al.*, 2019)

Enzimi batterici di detossificazione dei ROS

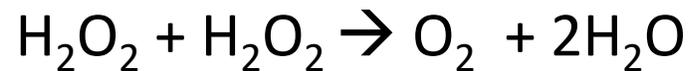


Adapted from
Johnson & Hug, 2019

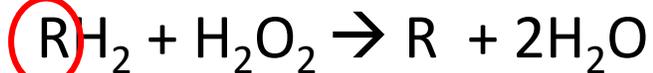
Superoxide dismutases (SOD)



Catalases (KAT)



Peroxidases

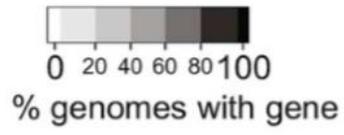
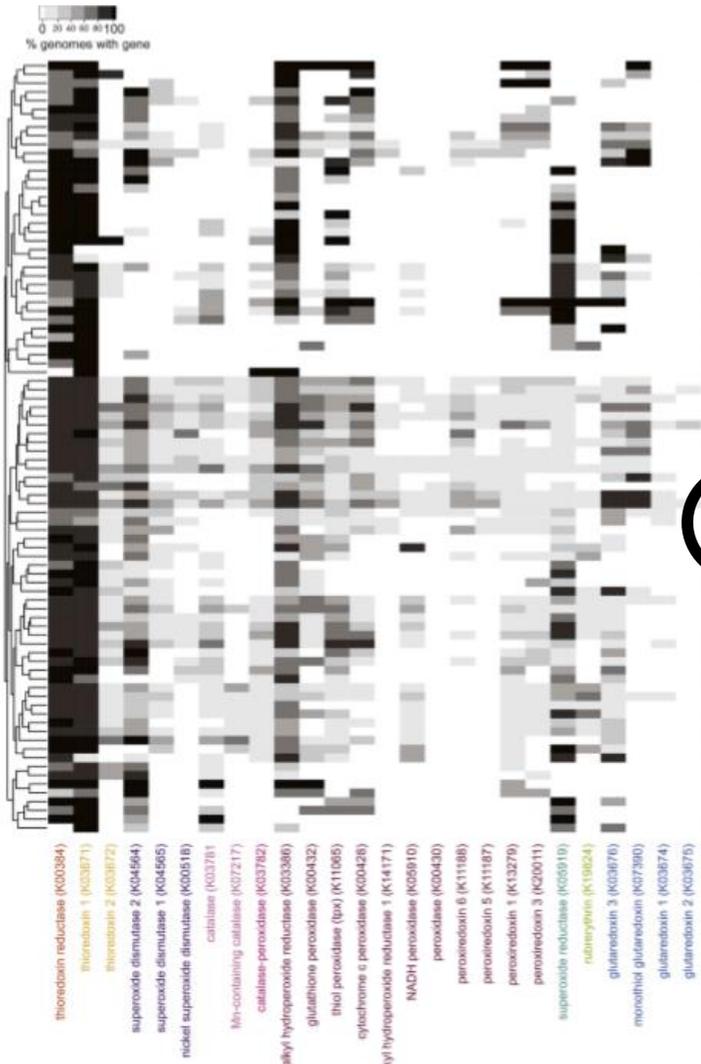


Le perossidasi si distinguono in base al loro fisiologico donatore di elettroni

SODs e KATs si distinguono in base al cofattore utilizzato

Distribuzione degli enzimi di detossificazione dei ROS

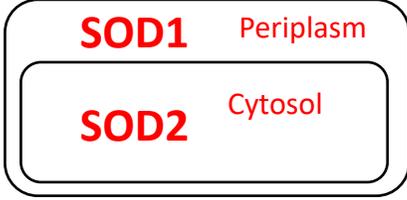
Predicted gene abundance of ROS scavenging enzymes



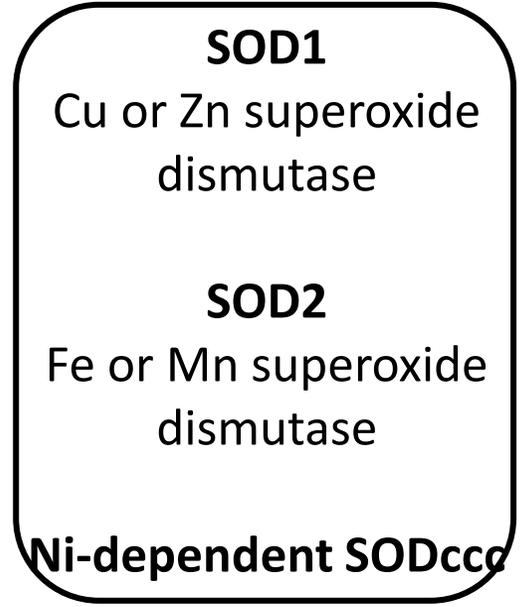
Proteobacteria:
Pseudomonas spp.
Salmonella spp.
Escherichia spp.
Acinetobacter spp.

- thioredoxin reductase (K00384)
- thioredoxin 1 (K03671)
- thioredoxin 2 (K03672)
- superoxide dismutase 2 (K04564)
- superoxide dismutase 1 (K04565)
- nickel superoxide dismutase (K00518)
- catalase (K03781)
- Mn-containing catalase (K07217)
- catalase-peroxidase (K03782)
- alkyl hydroperoxide reductase (K03386)
- glutathione peroxidase (K00432)
- thiol peroxidase (tpx) (K11065)
- cytochrome c peroxidase (K00428)
- alkyl hydroperoxide reductase 1 (K14171)
- NADH peroxidase (K05910)
- peroxidase (K00430)
- peroxiredoxin 6 (K11188)
- peroxiredoxin 5 (K11187)
- peroxiredoxin 1 (K13279)
- peroxiredoxin 3 (K20011)
- superoxide reductase (K05919)
- rubrerythrin (K19824)
- glutaredoxin 3 (K03676)
- monothiol glutaredoxin (K07390)
- glutaredoxin 1 (K03674)
- glutaredoxin 2 (K03675)

Gram- bacterium



Superoxide families



Adapted from Johnson & Hug, 2019

Il caso di *P. aeruginosa*

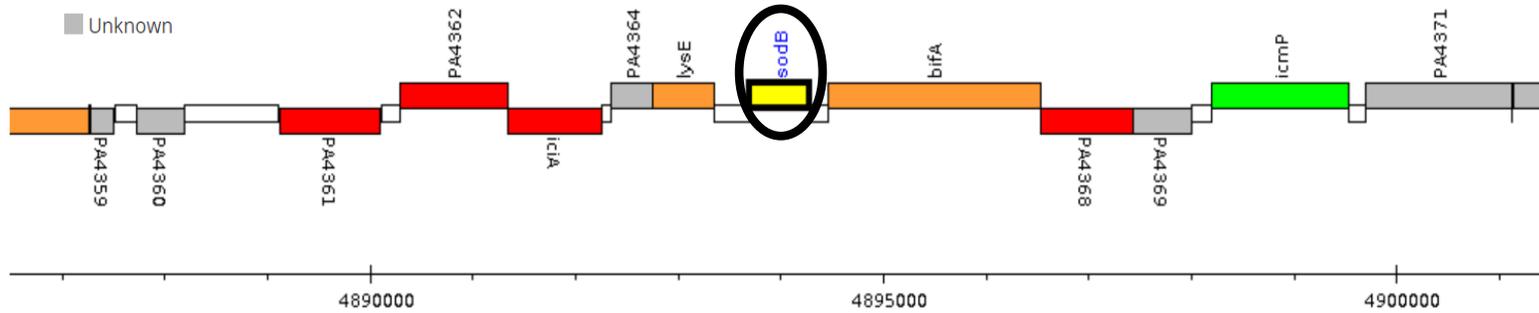


Pseudomonas
Genome DB

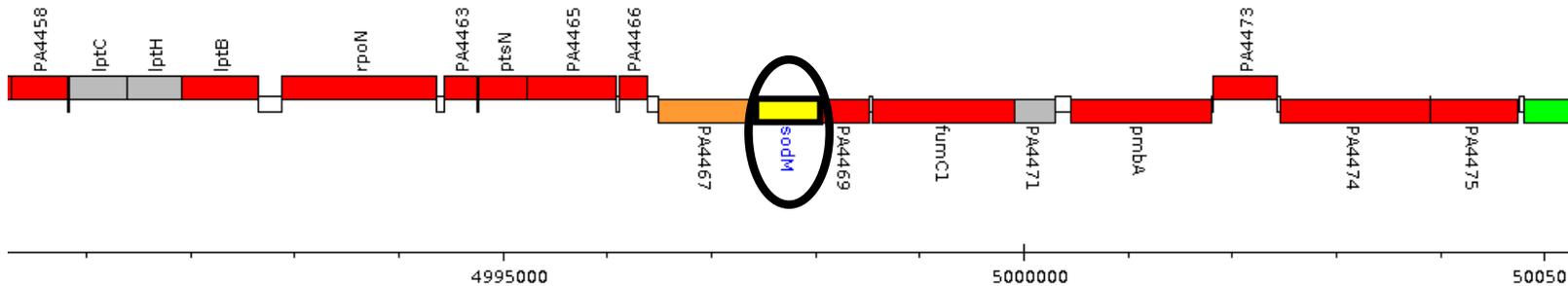


- Cytoplasmic
- Cytoplasmic Membrane
- Periplasmic
- Outer Membrane
- Extracellular
- Unknown

PA4366 (*sodB*): Fe-cofactored SOD

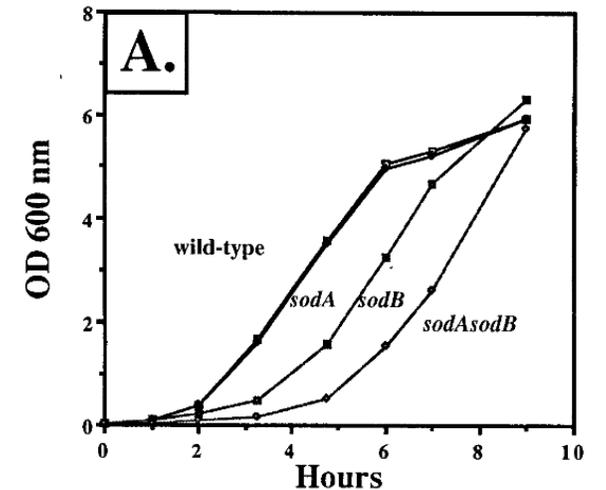


PA4468 (*sodM*): Mn-cofactored SOD



SOD (**SodB**) con Fe come co-fattore è maggiormente espressa. I mutanti *sodB* mostrano difetti di crescita

La SOD con co-fattore il manganese (**SodM**) è espressa solamente in condizioni di deprivazione di ferro e nei ceppi che producono alginato



Hassett *et al.*, 1995

Il caso di *P. aeruginosa*

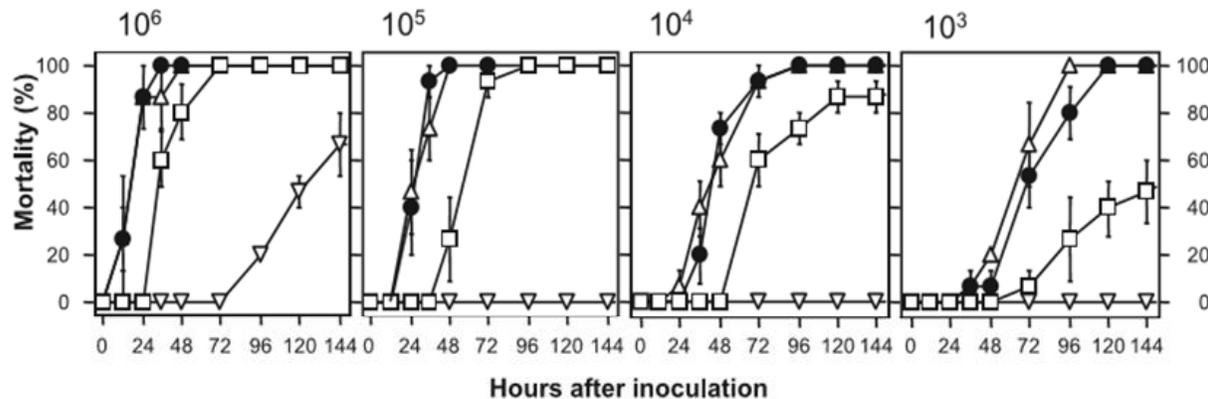
Effect of Superoxide Dismutase Gene Inactivation on Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the Silkworm, *Bombyx mori*[∇]

Kazuhiro Iiyama,^{1*} Yuuka Chieda,^{1,3} Jae Man Lee,² Takahiro Kusakabe,²
Chisa Yasunaga-Aoki,¹ and Susumu Shimizu¹



B. mori

● PAO1 □ PAO1*sodB* △ PAO1*sodM* ∇ PAO1*sodMB*



- Saggio di mortalità della larva *Bombyx mori*
- Il mutante *sodM* si comporta similmente al ceppo WT (PAO1)
- Le larve infettate con il mutante *sodB* mostrano ridotta mortalità
- Le larve infettate con il doppio mutante *sodMB* non mostrano alcuna mortalità quando le CFU inoculate erano inferiori a 10⁶

Adapted from Iiyama *et al.*, 2008

Obiettivo

- Definire il ruolo delle SOD di *P. aeruginosa* nel contrastare il burst ossidativo prodotto dai macrofagi

Escaping the Phagocytic Oxidative Burst: The Role of SODB in the Survival of *Pseudomonas aeruginosa* Within Macrophages

Luca Cavinato¹, Elena Genise¹, Francesco R. Luly¹, Enea G. Di Domenico², Paola Del Porto¹ and Fiorentina Ascenzioni^{1*}

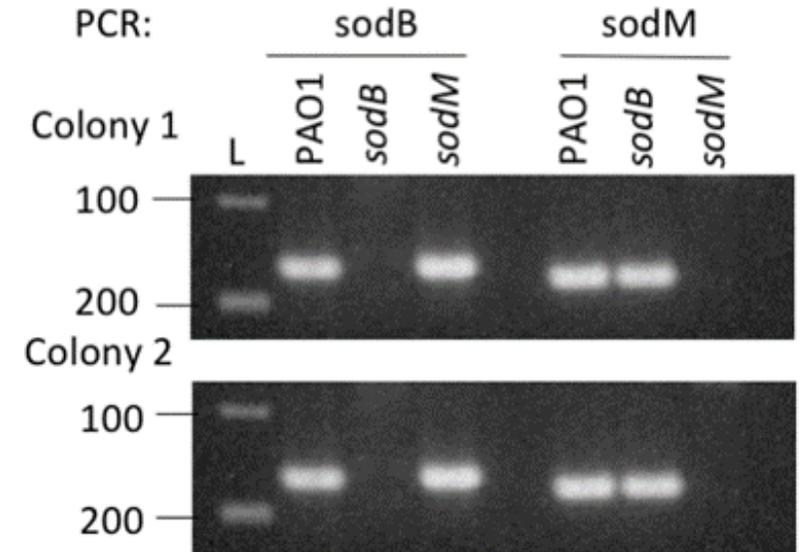
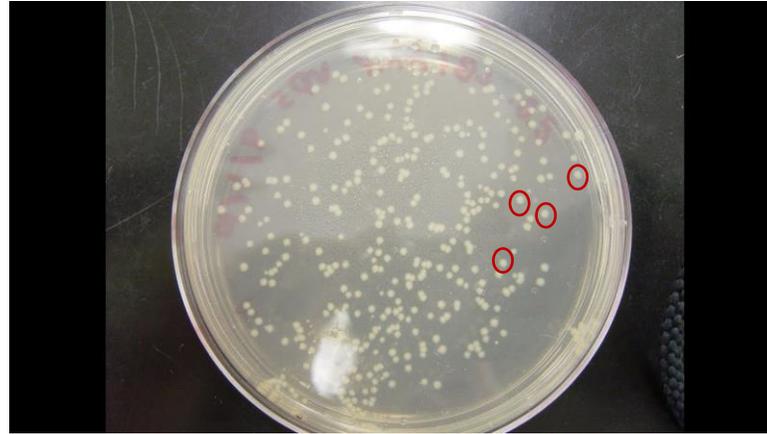
¹ Department of Biology and Biotechnology "Charles Darwin", Sapienza University of Rome, Rome, Italy, ² Microbiology and Virology, San Gallicano Dermatologic Institute, IRCCS, Rome, Italy

Materiali

P. aeruginosa strains:

- PAO1 wt
- PAO1 *sodB* mutant
- PAO1*sodM* mutant

Tipica piastra batterica

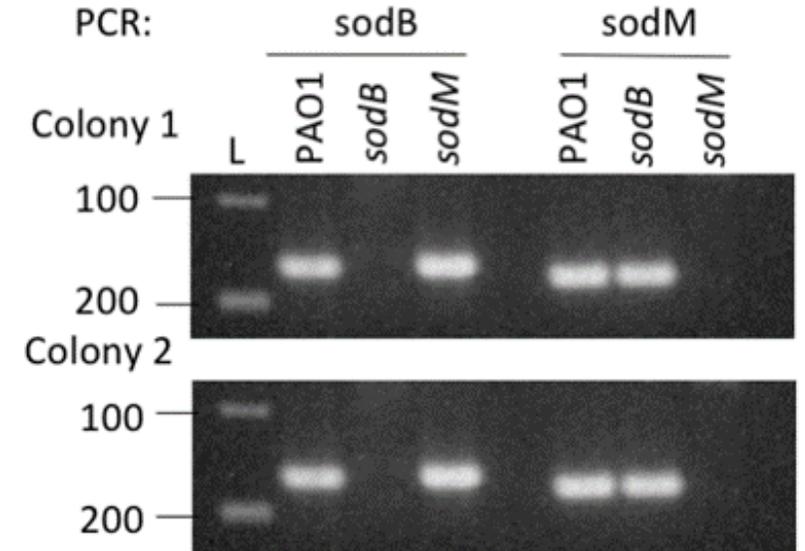
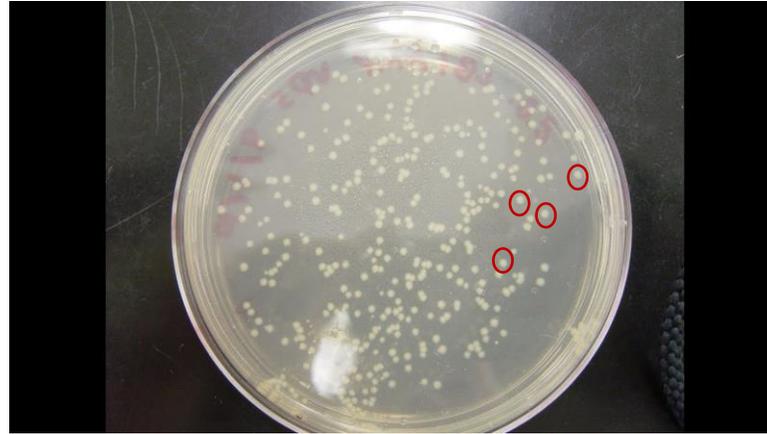


Materiali

P. aeruginosa strains:

- PAO1 wt
- PAO1 *sodB* mutant
- PAO1*sodM* mutant

Tipica piastra batterica



Macrophages:

- RAW264.7 

(linea cellulare immortalizzata di macrofagi murini)

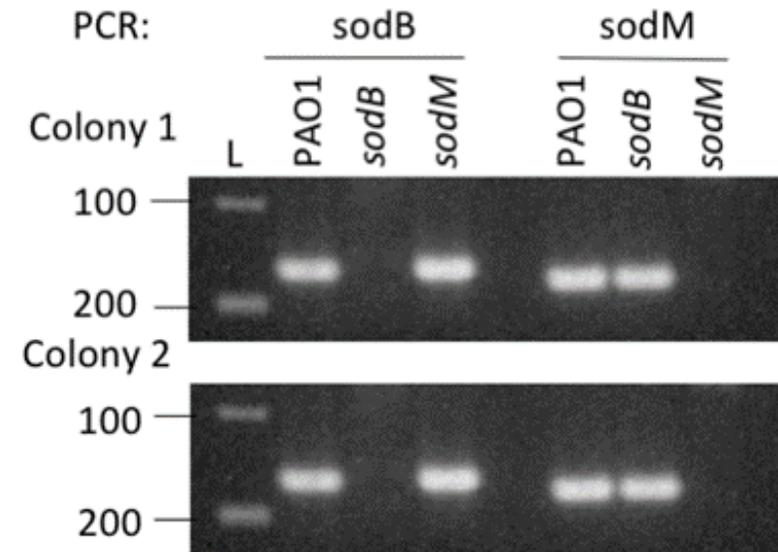
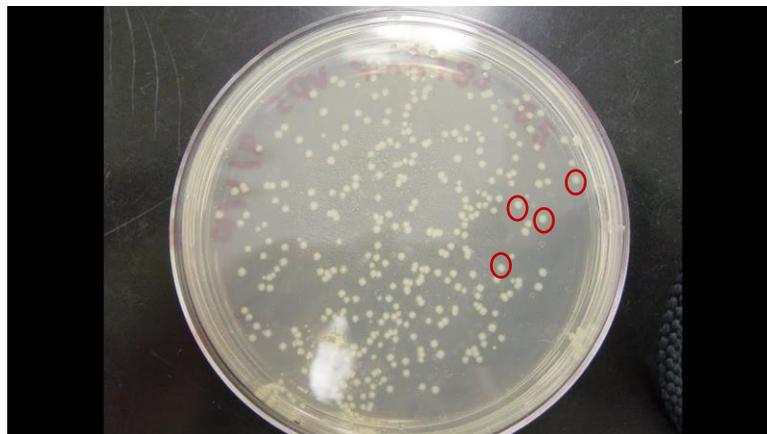
- Monocytes-derived macrophages (MDM) 
Macrofagi primari

Materiali

P. aeruginosa strains:

- PAO1 wt
- PAO1 *sodB* mutant
- PAO1*sodM* mutantc

Tipica piastra batterica



Macrophages:

- RAW264.7 
(linea cellulare immortalizzata di macrofagi murini)

- **Monocytes-derived macrophages (MDM)** 
Macrofagi primari

1

Isolamento dei PBMC dal sangue periferico



2

Differenziamento *in vitro* dei monociti in macrofagi

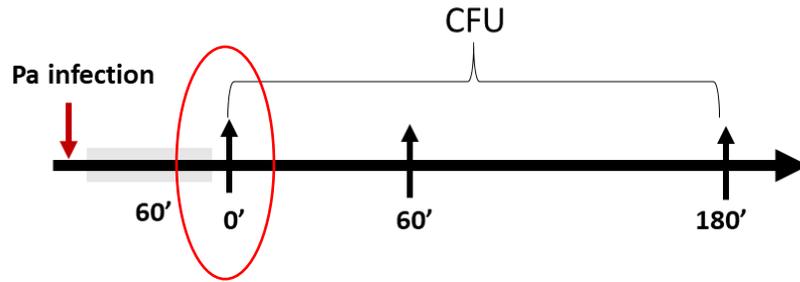


SODB contribuisce negativamente alla sopravvivenza precoce di *P. aeruginosa*

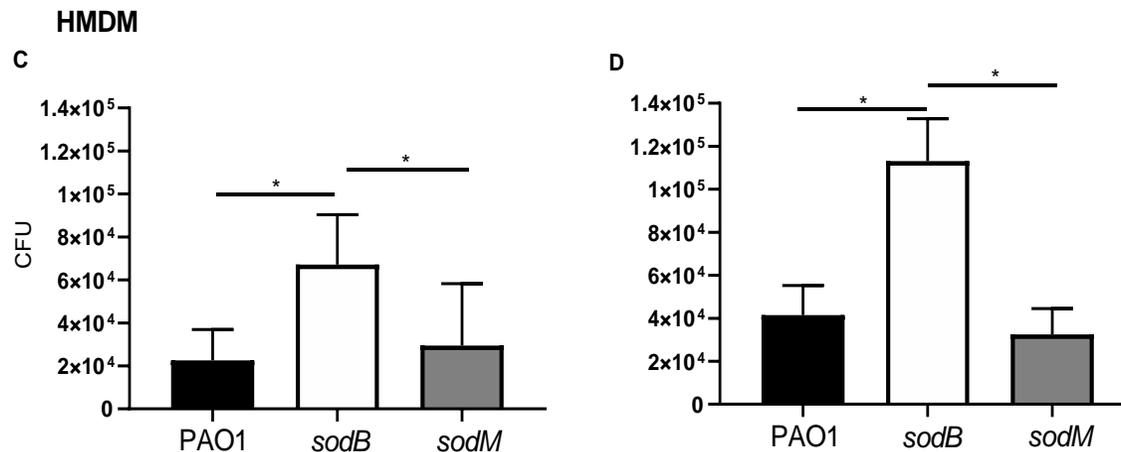
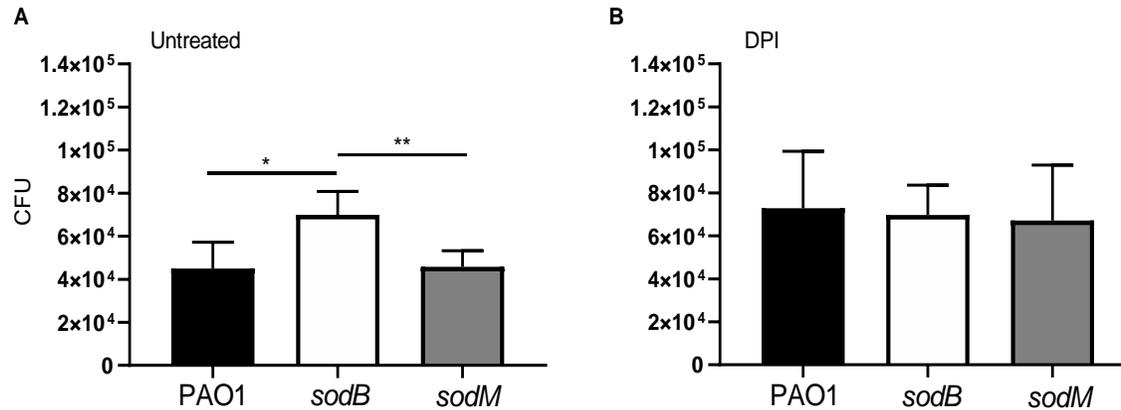


Fase precoce dell'infezione

- Il trattamento DPI aumenta la sopravvivenza di *P. aeruginosa* (eccezion fatta per il mutante *sodB* nei macrofagi murini).
- PAO1 wt e il mutante *sodM* si comportano in maniera del tutto simile
- Il mutante *sodB* sopravvive maggiormente rispetto al WT ed al mutante *sodM*



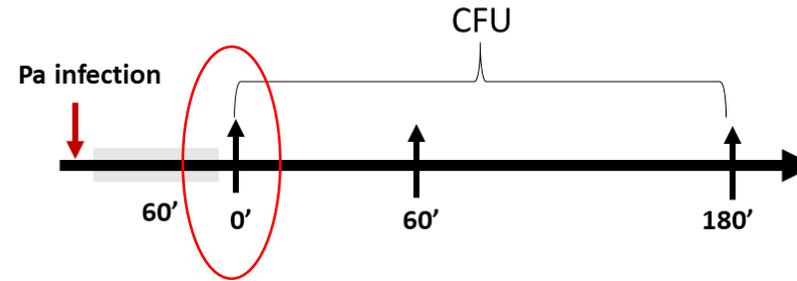
RAW264.7



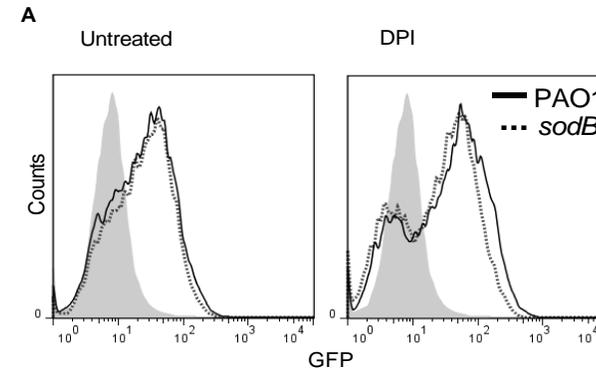
La fagocitosi di *P. aeruginosa* non è influenzata dall'attività di SODB

Analisi citofluorimetrica

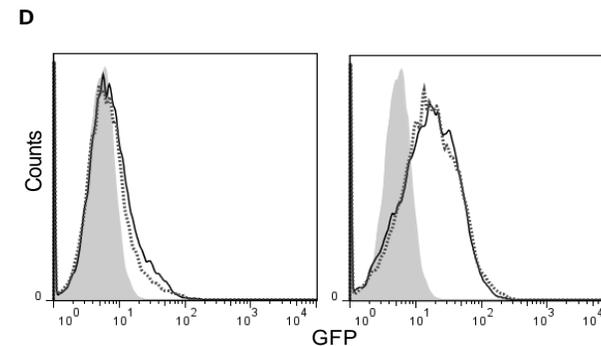
- La fagocitosi viene analizzata come percentuale di macrofagi GFP⁺
- Il trattamento con DPI non aumenta l'attività fagocitica, ma mette in evidenza il quenching ROS-dipendente della GFP



RAW264.7

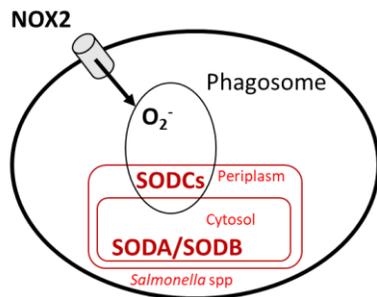


HMDM



Il caso di *Salmonella*

Ruolo della SOD periplasmatica di *Salmonella* nel contrastare il burst ossidativo



Myeloperoxidase targets oxidative host attacks to *Salmonella* and prevents collateral tissue damage

Nura Schürmann, Pascal Forrer, Olivier Casse, Jiagui Li, Boas Felmy, Anne-Valérie Burgener, Nikolaus Ehrenfeuchter, Wolf-Dietrich Hardt, Mike Recher, Christoph Hess, Astrid Tschan-Plessl, Nina Khanna & Dirk Bumann

Disparate Impact of Oxidative Host Defenses Determines the Fate of *Salmonella* during Systemic Infection in Mice

Neil A. Burton,^{1,2} Nura Schürmann,^{1,2} Olivier Casse,¹ Anne K. Steeb,¹ Beatrice Claudi,¹ Janine Zankl,² Alexander Schmidt,² and Dirk Bumann^{1*}

Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase

MARY ANN DE GROOTE¹, URS A. OCHSNER², MICHAEL U. SHILOH¹, CARL NATHAN¹, JOE M. MCCORD³, MARY C. DINAUER⁴, STEPHEN J. LIBBY⁵, ANDRÉS VAZQUEZ-TORRES⁶, YISHENG XU⁶, AND FERRIC C. FANG^{6#}

¹Departments of Medicine, Pathology, and Microbiology, University of Colorado Health Sciences Center, 4200 E. Ninth Avenue, Denver, CO 80262; ²Department of Medicine, Cornell University Medical College, 1300 York Avenue, New York, NY 10021; ³Department of Pediatrics, Indiana University Medical Center, Indianapolis, IN 46202; and ⁴Department of Medicine, University of California at San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093

***Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase**

Andrés Vazquez-Torres, Ferric C. Fang*

Role of *Salmonella typhimurium* Mn-Superoxide Dismutase (SodA) in Protection against Early Killing by J774 Macrophages

RENÉE M. TROMBLY, ANDRÉS VAZQUEZ-TORRES, BAÜMLER, AND FRED HEFFRON*

¹Department of Microbiology, Oregon Health and Immunology, Oregon Health Portland, Oregon 97201

Phagocytic Superoxide Specifically Damages an Extracytoplasmic Target to Inhibit or Kill *Salmonella*

Maureen Craig¹, James M. Schlauch^{1,2*}

¹Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, Illinois, United States of America, ²College of Medicine

***Salmonella* detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst**

so, Magali Hébrard, Aude-Agnès Guilhon, Julie P. M. Viala, Sandrine Henri, Sorvel, Frédéric Barras, Stéphane Mésère

Salmonella SODs

- SodCI/CII: periplasmic Cu/Zn-SOD
- SodA: cytoplasmic Mn-SOD
- SodB: cytoplasmic Fe-SOD

Salmonella periplasmic SODs

- **Sod CI**: Dimeric protein of 32kDa. It is tethered by some «noncovalent» interactions. It is required for fully virulence
- **Sod CII**: Dimeric protein of 16kDa. It is released in the periplasm by osmotic shock

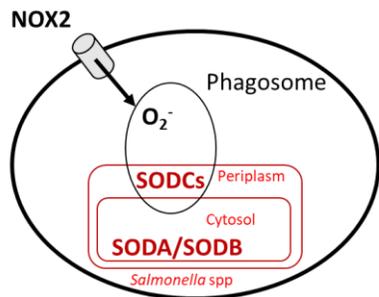
Phagocyte Roulette in *Salmonella* Killing

Luke A. Fenlon¹ and James M. Schlauch^{1,2*}

¹Department of Microbiology
²College of Medicine
University of Illinois, Urbana, IL 61801-3709, USA
*Correspondence: slauch@illinois.edu
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.001>

Il caso di *Salmonella*

Ruolo della SOD periplasmatica di *Salmonella* nel contrastare il burst ossidativo



Myeloperoxidase targets oxidative host attacks to *Salmonella* and prevents collateral tissue damage

Nura Schürmann, Pascal Forrer, Olivier Casse, Jiagui Li, Boas Felmy, Anne-Valérie Burgener, Nikolaus Ehrenfeuchter, Wolf-Dietrich Hardt, Mike Recher, Christoph Hess, Astrid Tschan-Plessl, Nina Khanna & Dirk Bumann

Disparate Impact of Oxidative Host Defenses Determines the Fate of *Salmonella* during Systemic Infection in Mice

Neil A. Burton,^{1,4} Nura Schürmann,^{1,4} Olivier Casse,¹ Anne K. Steeb,¹ Beatrice Claudi,¹ Janine Zankl,² Alexander Schmidt,³ and Dirk Bumann^{1,*}

Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase

MARY ANN DE GROOTE¹, URS A. OCHSNER², MICHAEL U. SHILOH¹, CARL NATHAN¹, JOE M. MCCORD³, MARY C. DINAUER⁴, STEPHEN J. LIBBY⁵, ANDRÉS VAZQUEZ-TORRES⁶, YISHENG XU⁷, AND FERRIC C. FANG⁸||

¹Departments of Medicine, Pathology, and Microbiology, University of Colorado Health Sciences Center, 4200 E. Ninth Avenue, Denver, CO 80262; ²Department of Medicine, Cornell University Medical College, 1300 York Avenue, New York, NY 10021; ³Department of Pediatrics, Indiana University Medical Center, Indianapolis, IN 46202; and ⁴Department of Medicine, University of California at San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093

Salmonella evasion of the NADPH phagocyte oxidase

Andrés Vazquez-Torres, Ferric C. Fang

Role of *Salmonella typhimurium* Mn-Superoxide Dismutase (SodA) in Protection against Early Killing by J774 Macrophages

RENÉE M. TROMP, ANDRÉS VAZQUEZ-TORRES, BAÜMLER, AND FRED HEFFRON¹
Journal of Immunology, Oregon Health Portland, Oregon 97201

Phagocytic Superoxide Specifically Damages an Extracytoplasmic Target to Inhibit or Kill *Salmonella*

Maureen Craig¹, James M. Slauch^{1,2*}

¹Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, Illinois, United States of America, ²College of Medicine

Salmonella detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst

so, Magali Hébrard, Aude-Agnès Guilhon, Julie P. M. Viala, Sandrine Henri, Sorvel, Frédéric Barras, Stéphane Mésesse

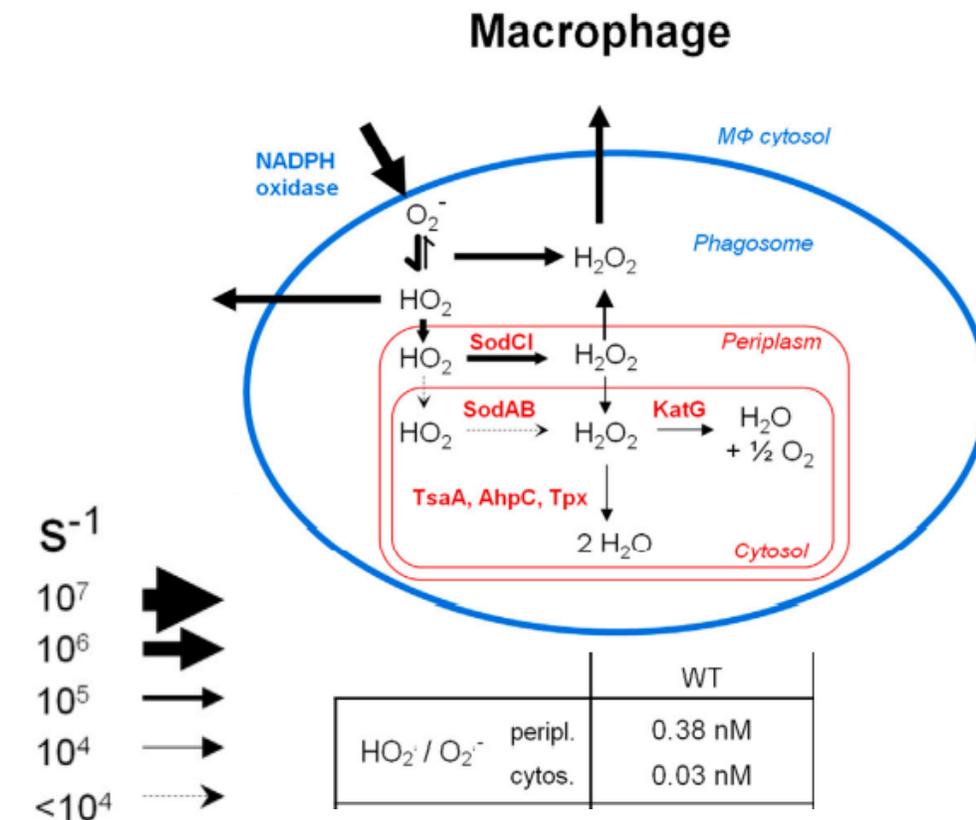
Phagocyte Roulette in *Salmonella* Killing

Luke A. Fenlon¹ and James M. Slauch^{1,2*}

¹Department of Microbiology
²College of Medicine
University of Illinois, Urbana, IL 61801-3709, USA
*Correspondence: slauch@illinois.edu
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.001>

Disparate Impact of Oxidative Host Defenses Determines the Fate of *Salmonella* during Systemic Infection in Mice

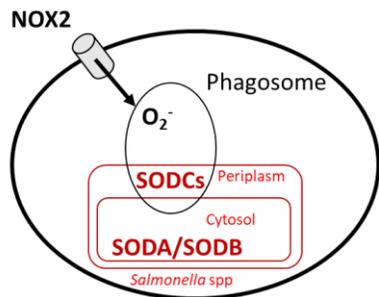
Neil A. Burton,^{1,4} Nura Schürmann,^{1,4} Olivier Casse,¹ Anne K. Steeb,¹ Beatrice Claudi,¹ Janine Zankl,² Alexander Schmidt,³ and Dirk Bumann^{1,*}



Adapted from Burton et al., 2014ccccc

Il caso di *Salmonella*

Ruolo della SOD periplasmatica di *Salmonella* nel contrastare il burst ossidativo



Myeloperoxidase targets oxidative host attacks to *Salmonella* and prevents collateral tissue damage

Nura Schürmann, Pascal Forrer, Olivier Casse, Jiagui Li, Boas Felmy, Anne-Valérie Burgener, Nikolaus Ehrenfeuchter, Wolf-Dietrich Hardt, Mike Recher, Christoph Hess, Astrid Tschan-Plessl, Nina Khanna & Dirk Bumann

Disparate Impact of Oxidative Host Defenses Determines the Fate of *Salmonella* during Systemic Infection in Mice

Neil A. Burton,^{1,4} Nura Schürmann,^{1,4} Olivier Casse,¹ Anne K. Steeb,¹ Beatrice Claudi,¹ Janine Zankl,² Alexander Schmidt,³ and Dirk Bumann^{1,*}

Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase

MARY ANN DE GROOTE¹, URS A. OCHSNER², MICHAEL U. SHILOH¹, CARL NATHAN¹, JOE M. MCCORD³, MARY C. DINAUER⁴, STEPHEN J. LIBBY⁵, ANDRÉS VAZQUEZ-TORRES⁶, YISHENG XU⁶, AND FERRIC C. FANG^{#1}

*Departments of Medicine, Pathology, and Microbiology, University of Colorado Health Sciences Center, 4200 E. Ninth Avenue, Denver, CO 80262; ¹Department of Medicine, Cornell University Medical College, 1300 York Avenue, New York, NY 10021; ²Department of Pediatrics, Indiana University Medical Center, Indianapolis, IN 46202; and ³Department of Medicine, University of California at San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093

Salmonella evasion of the NADPH phagocyte oxidase

Andrés Vazquez-Torres, Ferric C. Fang

Role of *Salmonella typhimurium* Mn-Superoxide Dismutase (SodA) in Protection against Early Killing by J774 Macrophages

RENÉE M. TROMP, ANDRÉAS VAZQUEZ-TORRES, BAÜMLER, AND FRED HEFFRON^{*}
ology and Immunology, Oregon Health Portland, Oregon 97201

Phagocytic Superoxide Specifically Damages an Extracytoplasmic Target to Inhibit or Kill *Salmonella*

Maureen Craig¹, James M. Slauch^{1,2*}

¹ Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, Illinois, United States of America, ² College of Medicine

Salmonella detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst

so, Magali Hébrard, Aude-Agnès Guilhon, Julie P. M. Viala, Sandrine Henri, Sorvel, Frédéric Barras, Stéphane Mèresse

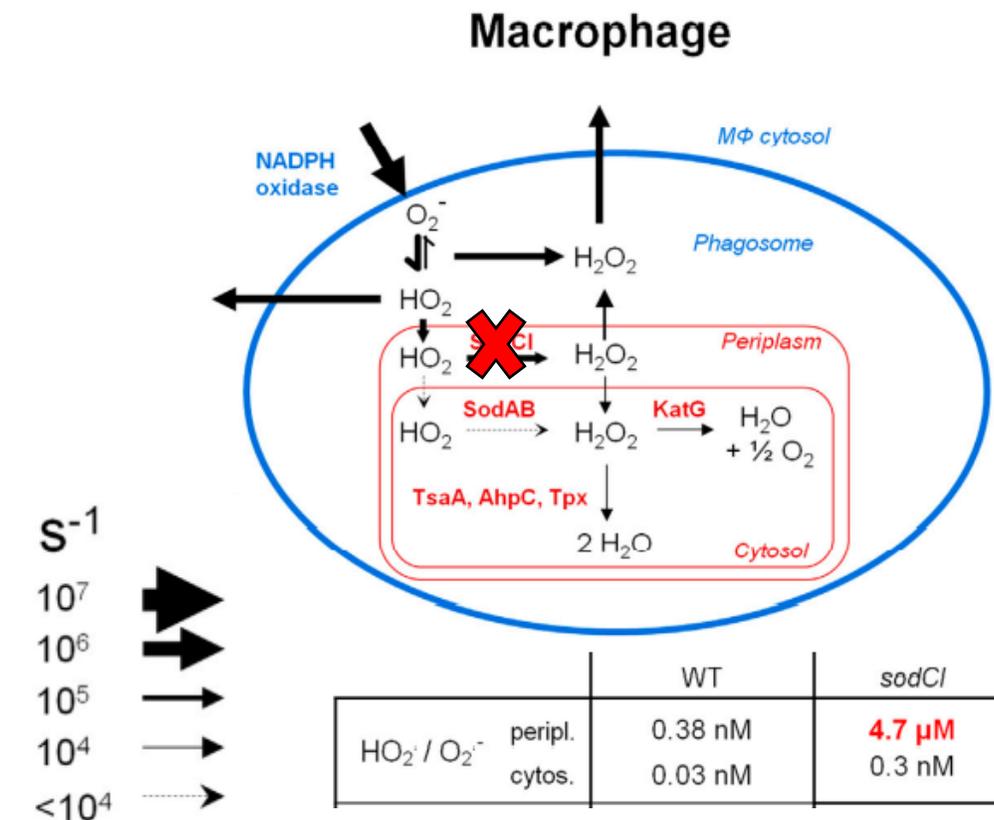
Phagocyte Roulette in *Salmonella* Killing

Luke A. Fenlon¹ and James M. Slauch^{1,2,*}

¹Department of Microbiology
²College of Medicine
University of Illinois, Urbana, IL 61801-3709, USA
*Correspondence: slauch@illinois.edu
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.001>

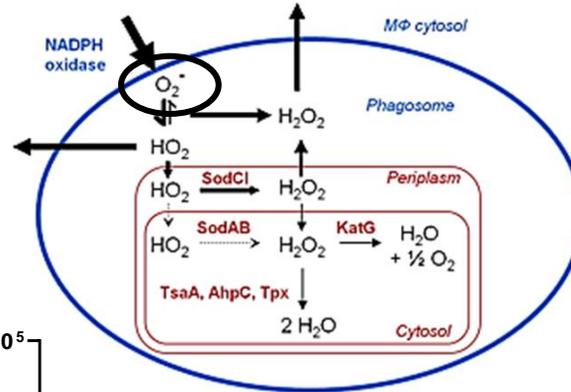
Disparate Impact of Oxidative Host Defenses Determines the Fate of *Salmonella* during Systemic Infection in Mice

Neil A. Burton,^{1,4} Nura Schürmann,^{1,4} Olivier Casse,¹ Anne K. Steeb,¹ Beatrice Claudi,¹ Janine Zankl,² Alexander Schmidt,³ and Dirk Bumann^{1,*}

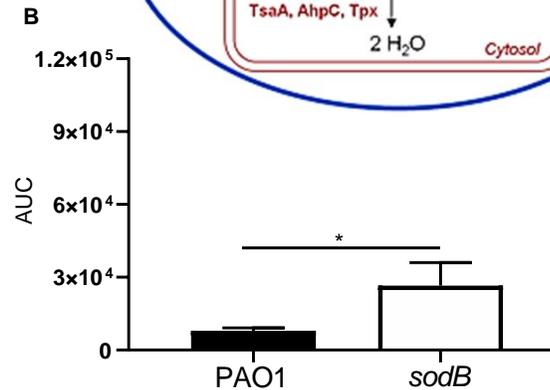
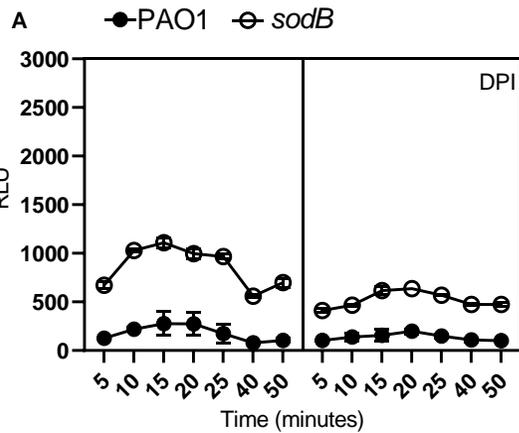


Adapted from Burton et al., 2014

P. aeruginosa SODB contribuisce ai livelli di O_2^- intrafagosomali

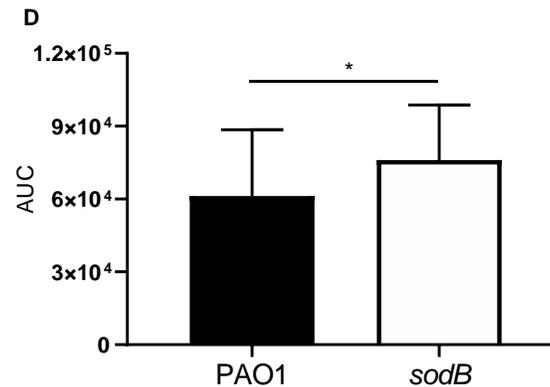
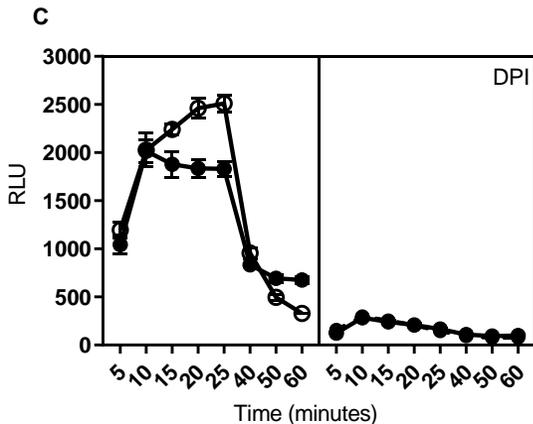


RAW264.7



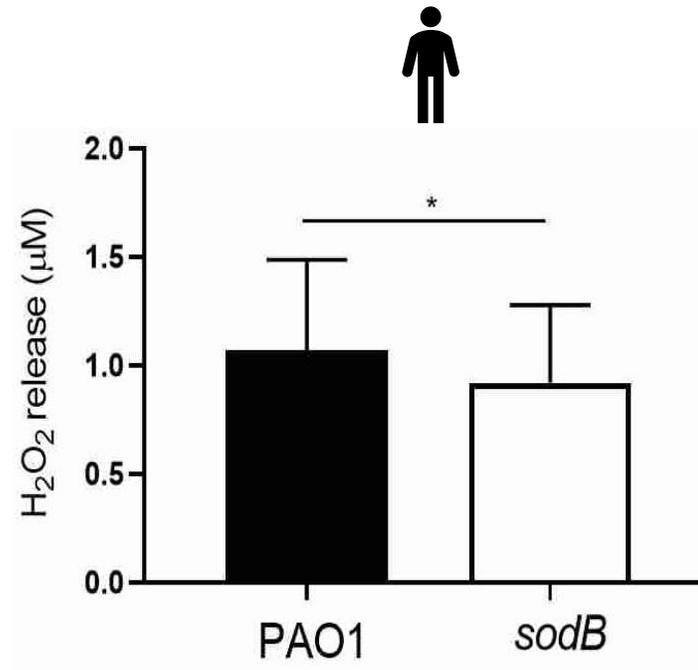
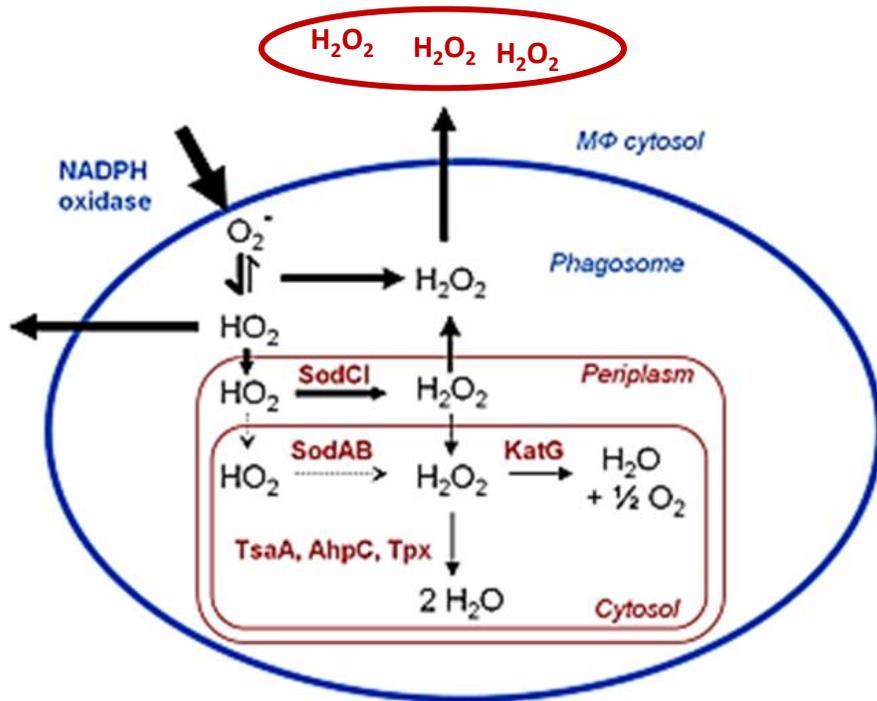
- La produzione dei ROS NADPH-dipendente aumenta rapidamente raggiungendo il picco intorno ai 15-20 min post-infezione
- I macrofagi umani producono più ROS rispetto ai macrofagi murini

HMDM



- I macrofagi infettati con il mutante *sodB* mostrano livelli più alti di O_2^- intrafagosomale

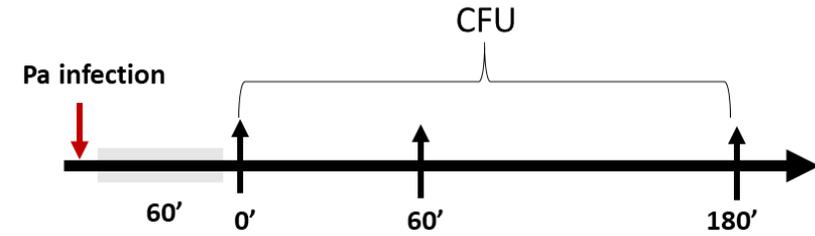
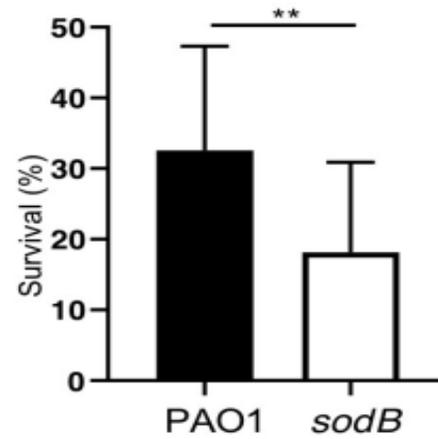
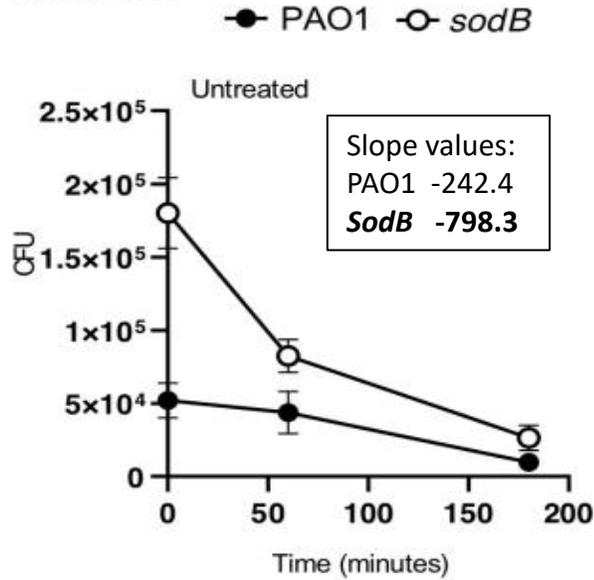
P. aeruginosa SODB contribuisce ai livelli di O_2^- intrafagosomali



- Misurazione di H_2O_2 rilasciato nel melieu extracellulare
- A conferma che i macrofagi murini producono meno ROS rispetto a quelli umani, il rilascio di H_2O_2 nel melieu extracellulare è stato undetectable

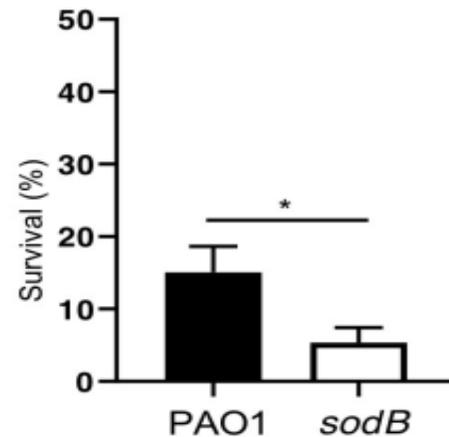
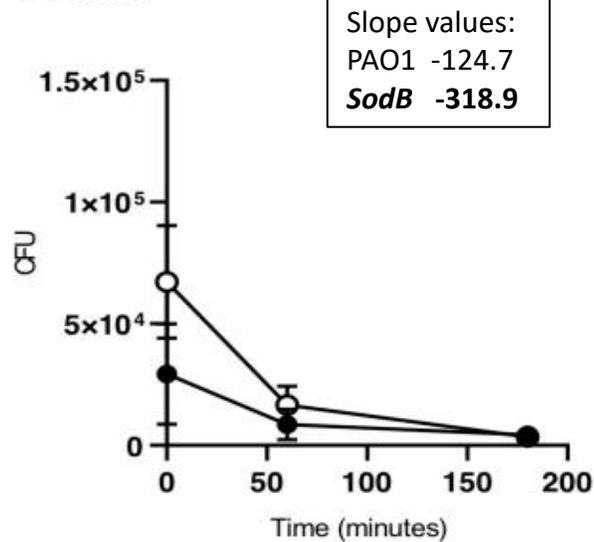
SODB promuove la sopravvivenza intramacroficagica di *P. aeruginosa*

RAW264.7



Saggio di protezione antibiotica

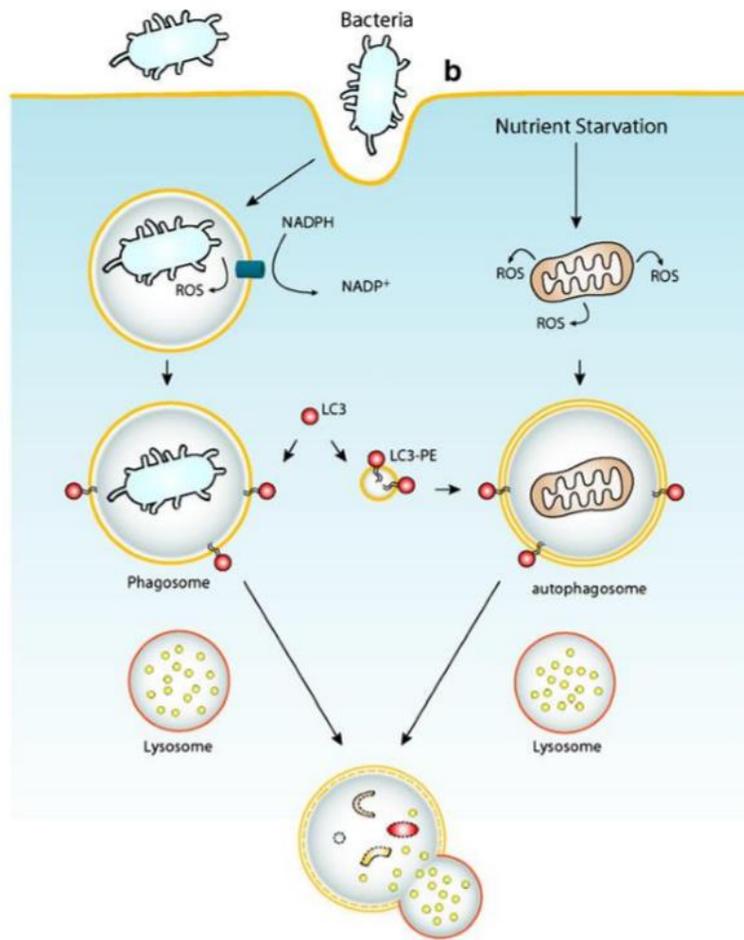
HMDM



- I valori di slope delle curve di killing rappresentano un indice dell'attività microbica dei macrofagi
- La percentuale di sopravvivenza è stata calcolata tra le CFU raccolte al t0 e quelle al t180
- % di sopravvivenza
- $100 - (CFU_{t0} - CFU_{t180}) / CFU_{t0} * 100$

P. aeruginosa SODB riduce l'attivazione dell'autofagia

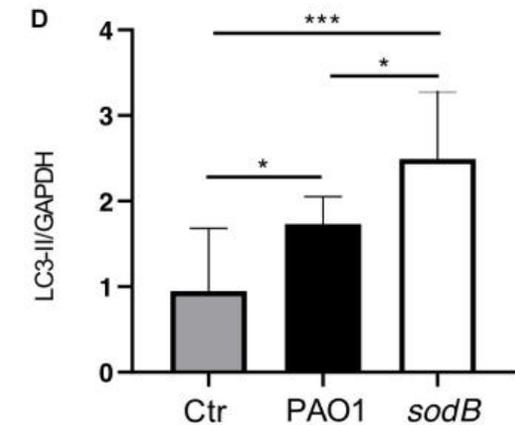
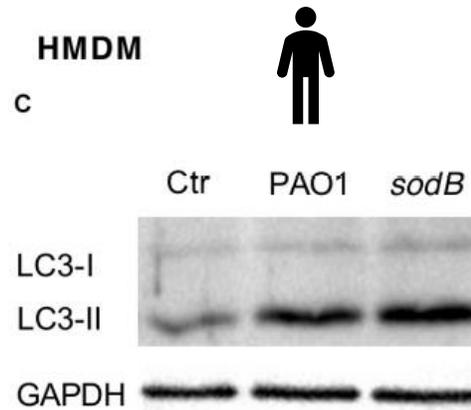
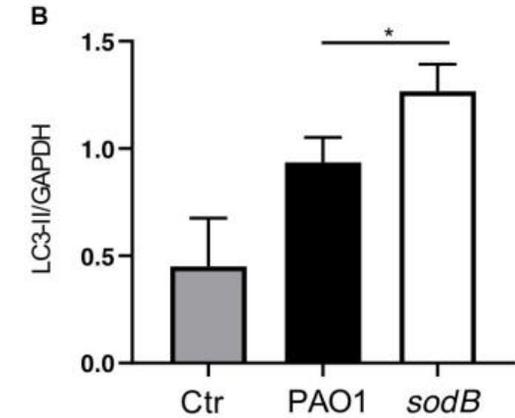
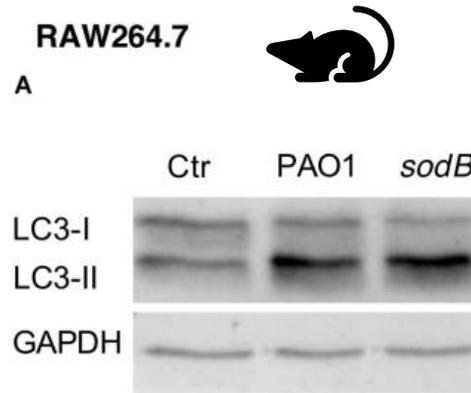
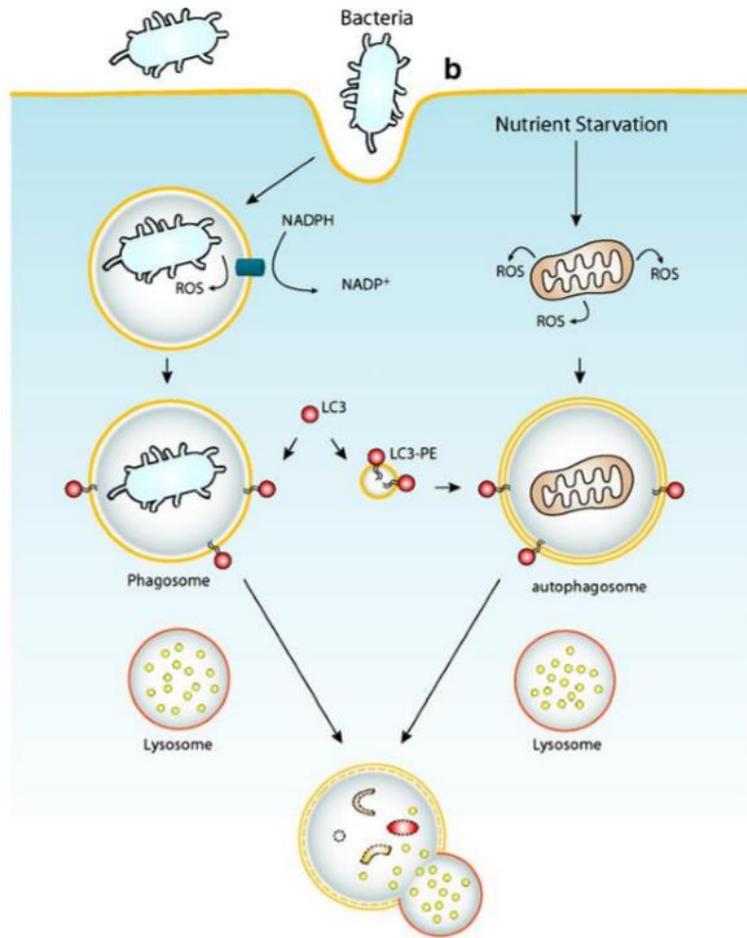
Autophagy activation



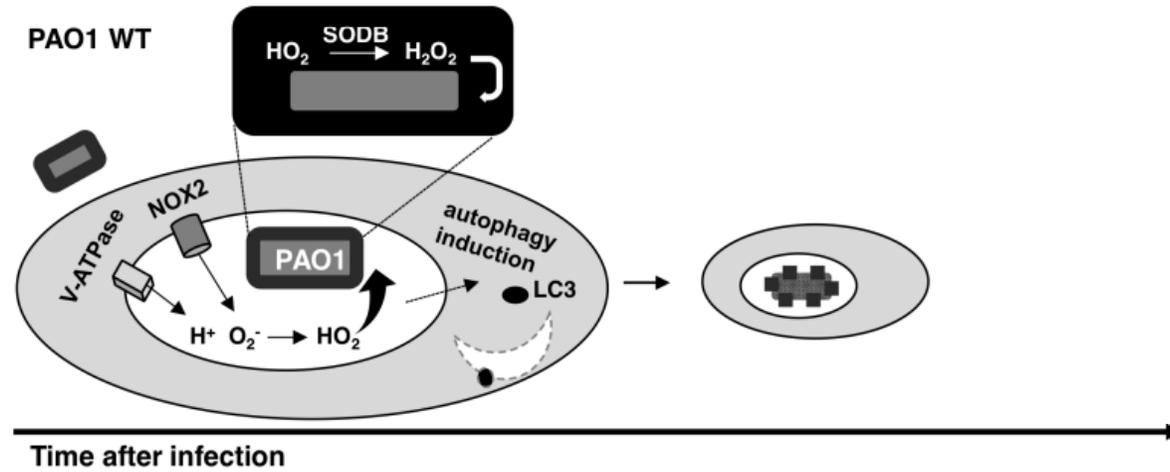
Adapted from Lam *et al.*, 2010

P. aeruginosa SODB riduce l'attivazione dell'autofagia

Autophagy activation

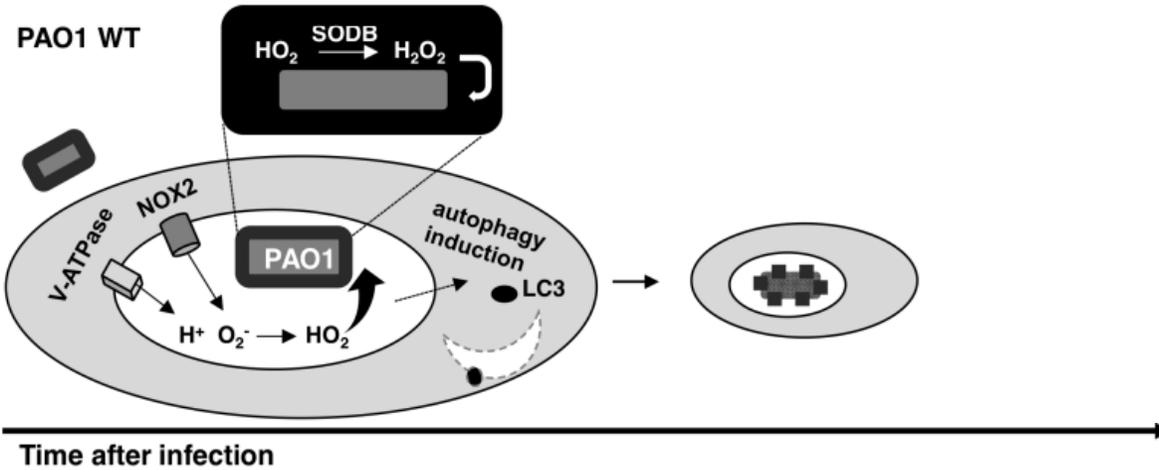


Conclusione

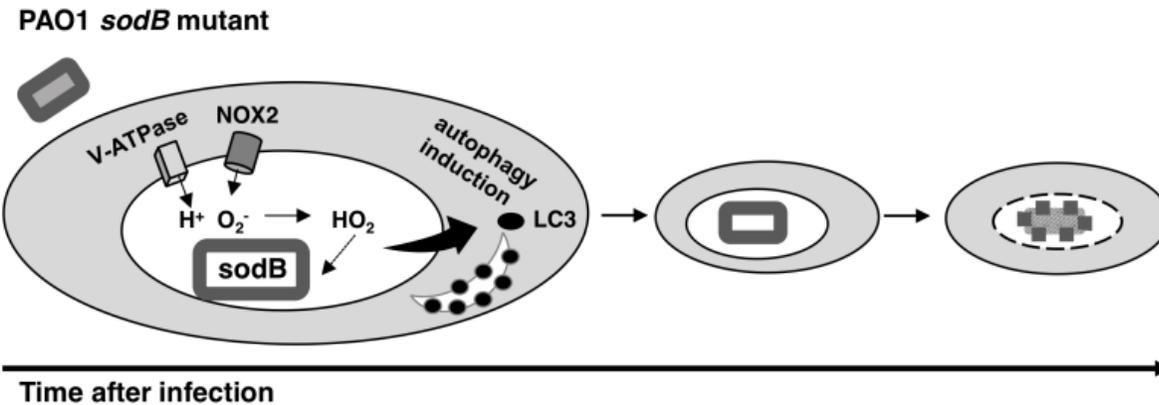


A tempi precoci dell'infezione, la SODB di *P. aeruginosa* contribuisce a trasformare l' O_2^- in H_2O_2 , diminuendone la sopravvivenza

Conclusione



A tempi precoci dell'infezione, la SODB di *P. aeruginosa* contribuisce a trasformare l'O₂⁻ in H₂O₂, diminuendone la sopravvivenza



A tempi tardivi, l'attività, della SODB promuove la sopravvivenza intracellulare, riducendo la risposta autofagica