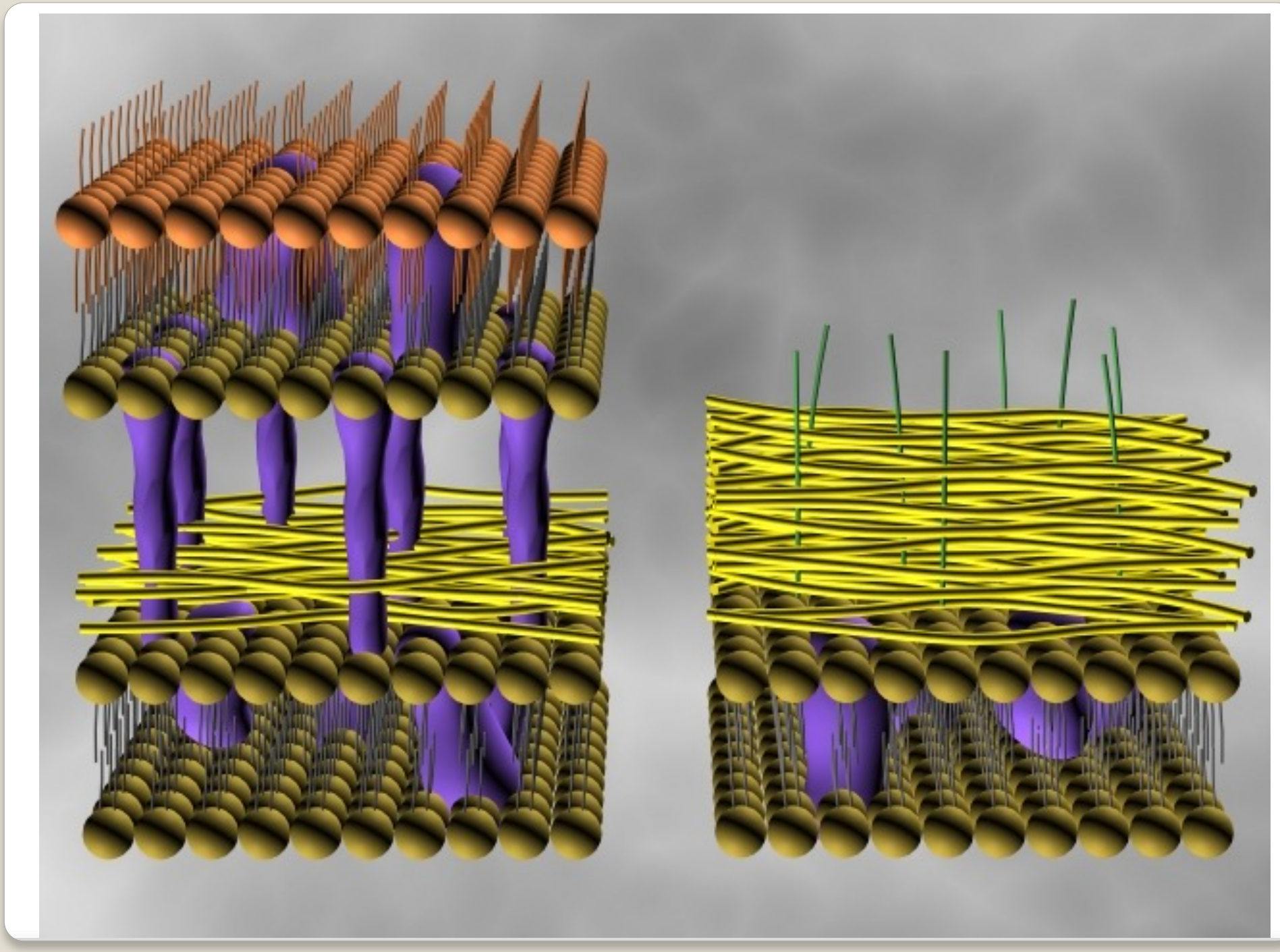
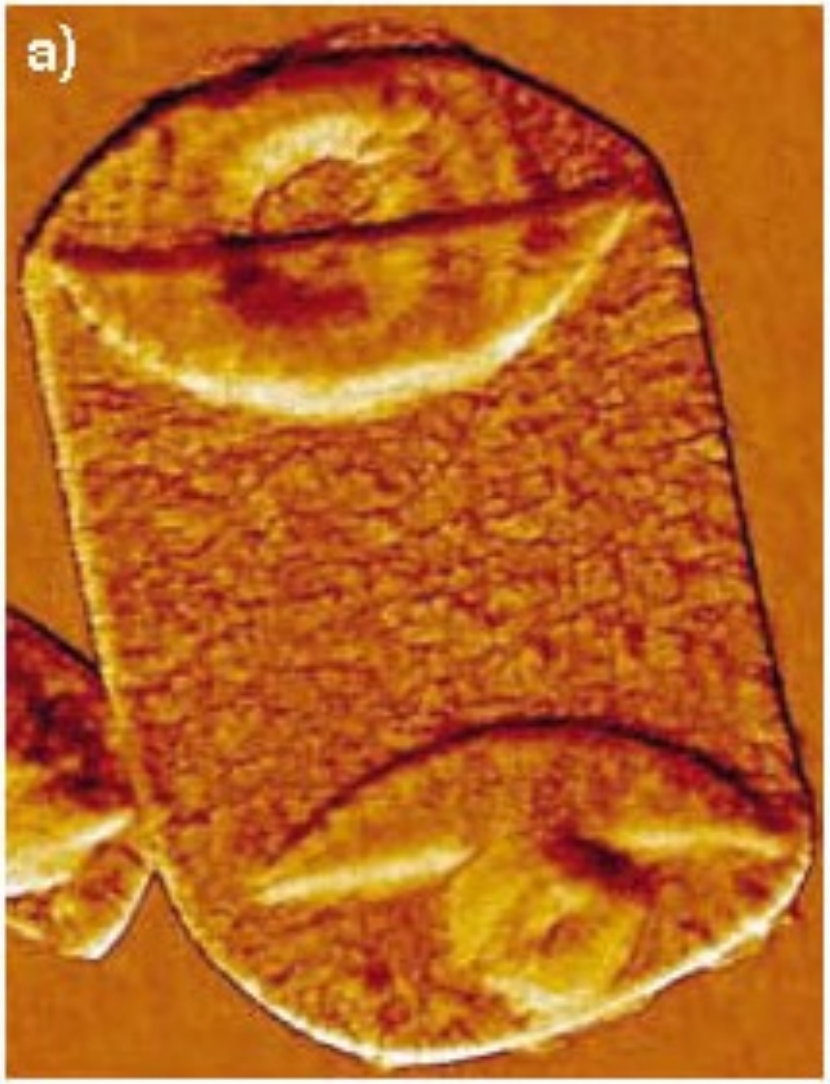
MICROBIOLOGIA
lezione 5
Le strutture (2)

Di che parliamo oggi??

Oggi parliamo di .....

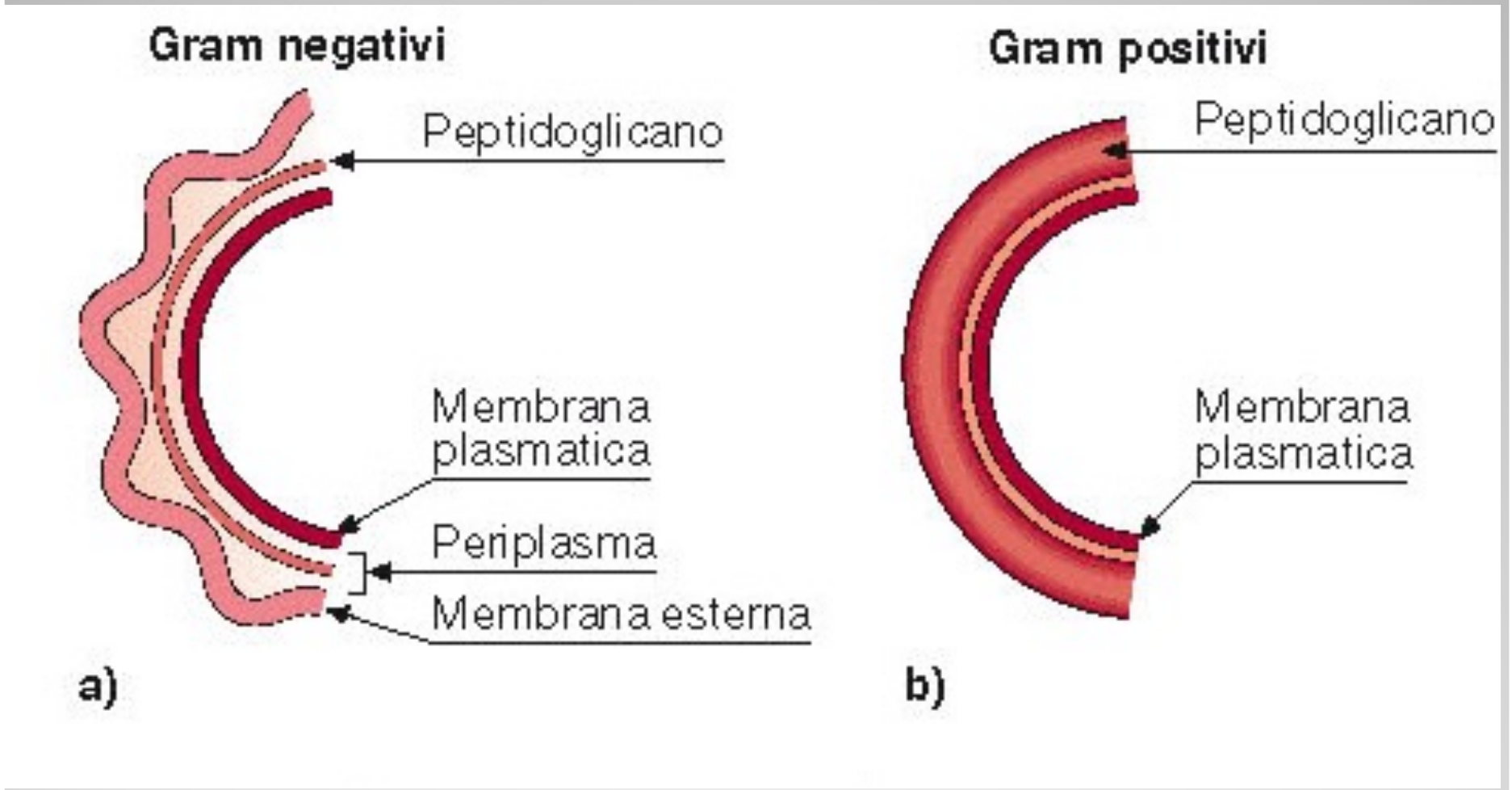


Il peptidoglicano o mureina: ovvero la parete dei batteri



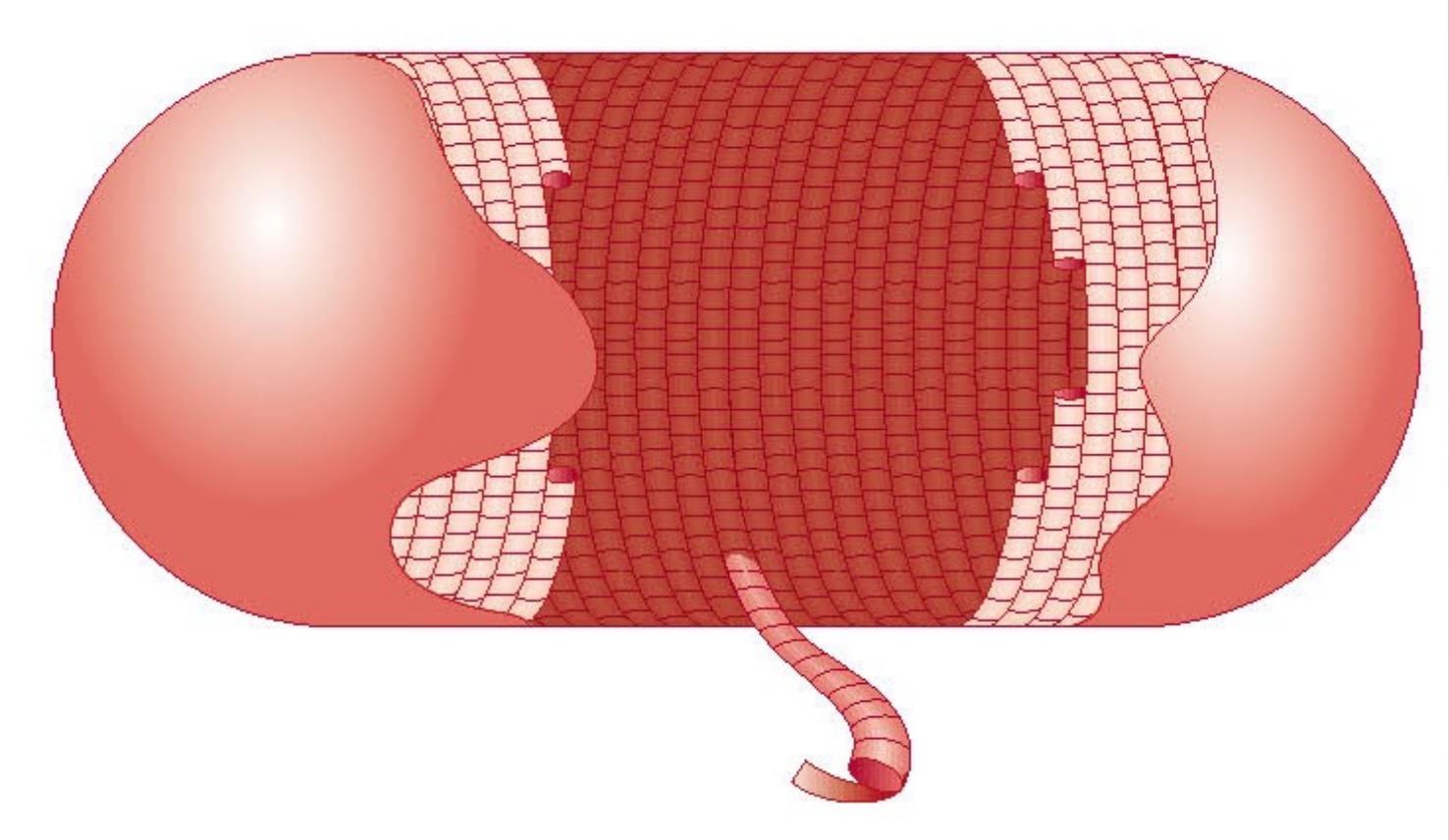
Escherichia coli

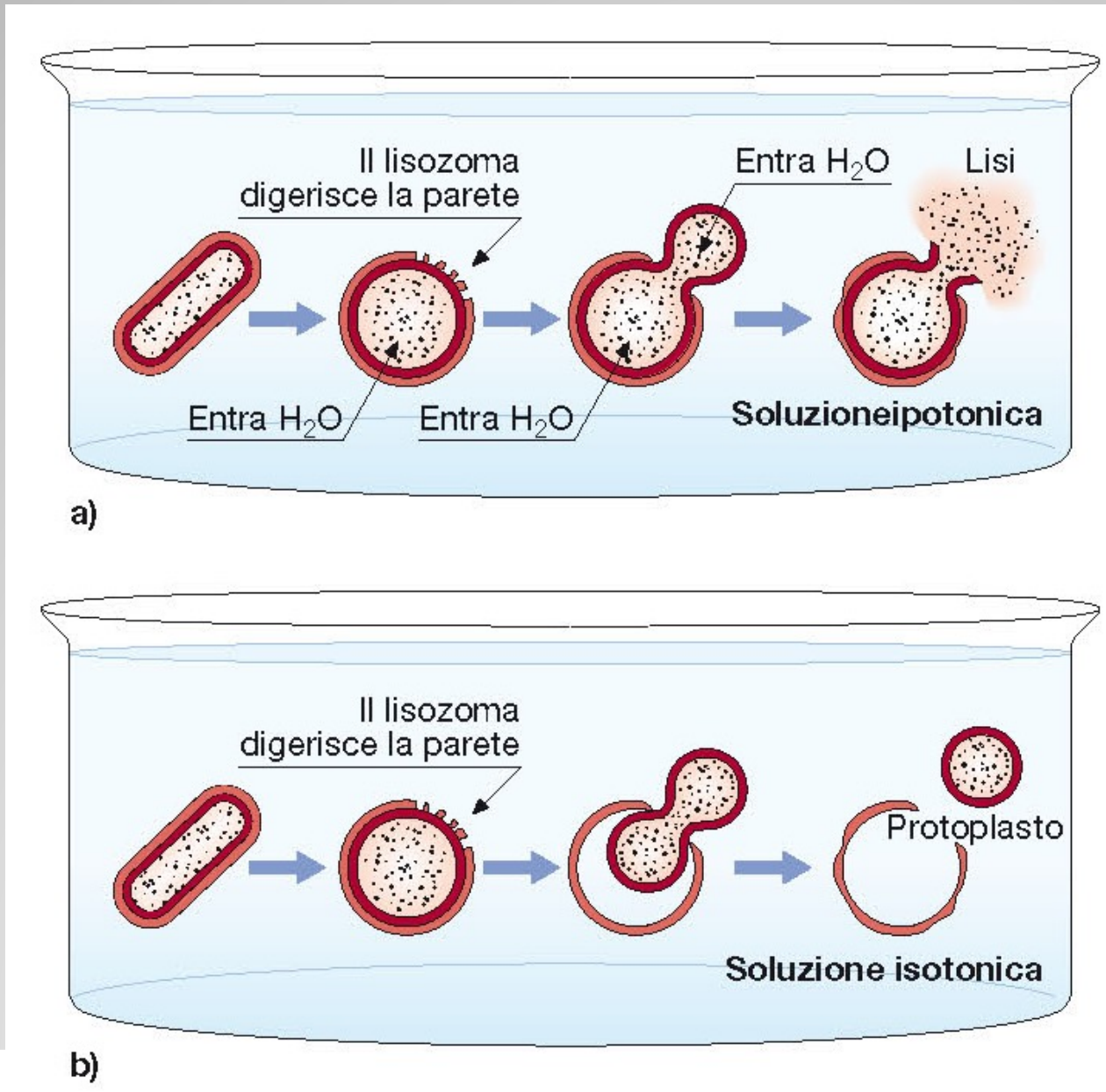
Thermus Thermophilus



Nei batteri Gram-positivi il peptidoglicano costituisce il 90% dell'involucro dei batteri mentre nei Gram-negativi c'è solo uno strato sottile

In tridimensionale……



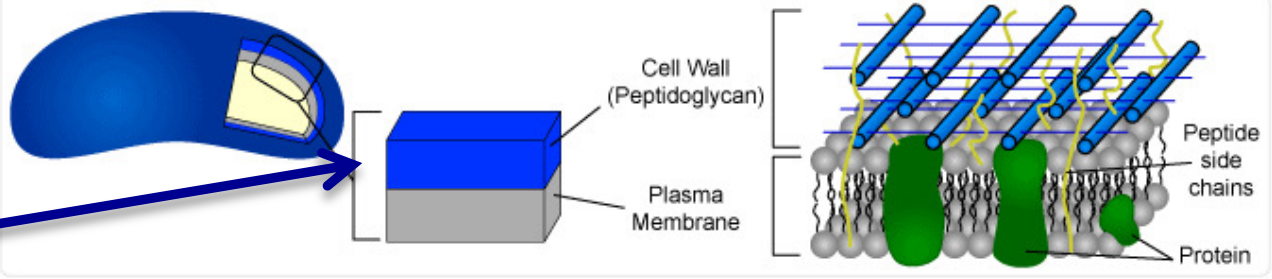


Il peptidoglicano può essere danneggiato o rimosso. Cosa succede quando c'è un danno a questa struttura??

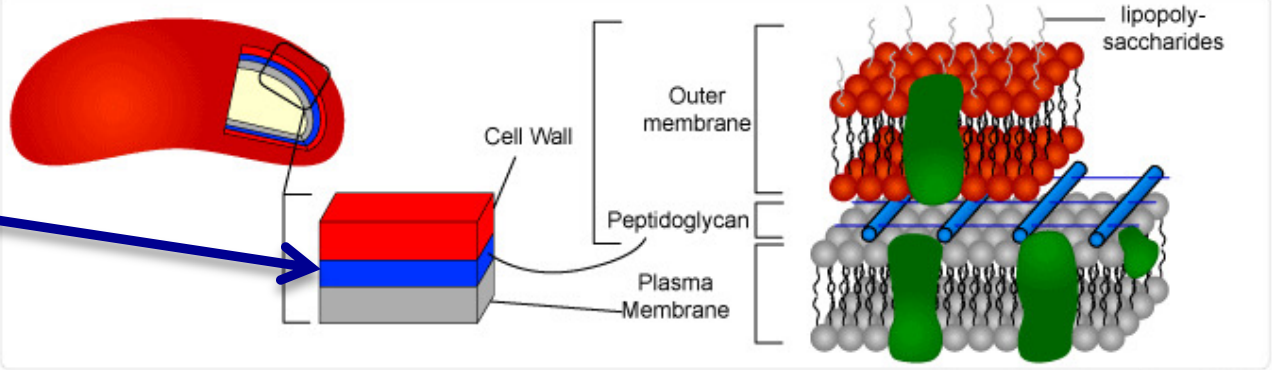
IL PEPTIDOGLICANO

- Unica grossa molecola-aminozucchero- nelle tre direzioni dello spazio
- Uno scheletro saccaridico unito a corte catene peptidiche
- **Legami beta-1,4** particolarmente forti fra le unità saccaridiche
- Presenza di **zuccheri non comuni** (MurNac): le catene peptidiche sono unite al residuo carbossilico dell'acido muramico mediante il residuo aminico.
- Alternanza di **aminoacidi D** e L risulta in una resistenza maggiore
- Sembra che tra i vari gruppi peptidici si stabiliscano numerosi legami idrogeno

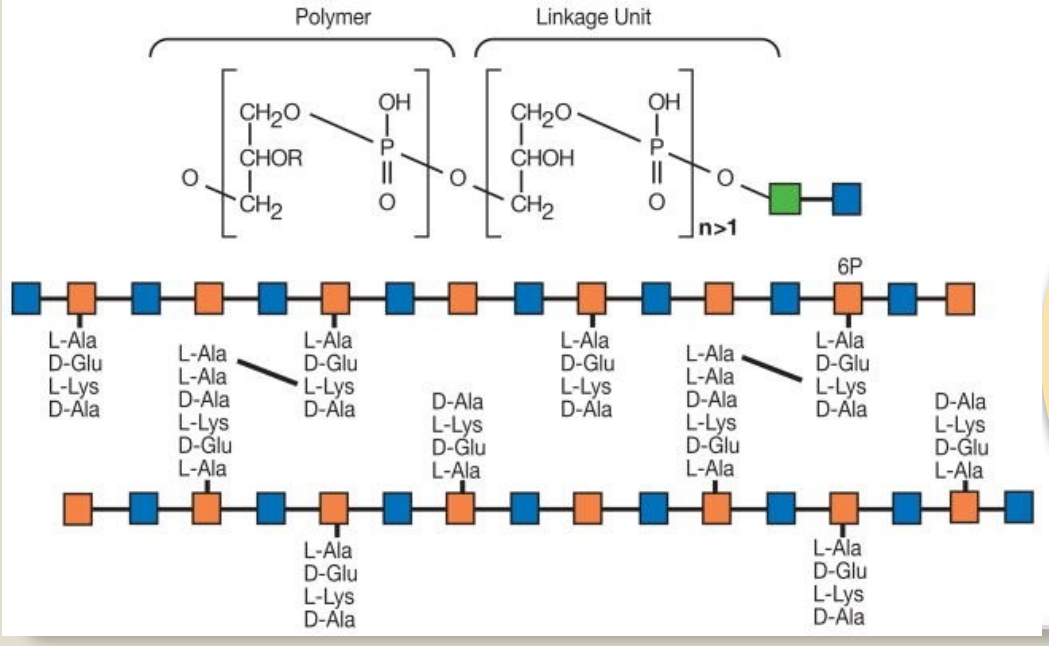
Gram⁺ Bacteria

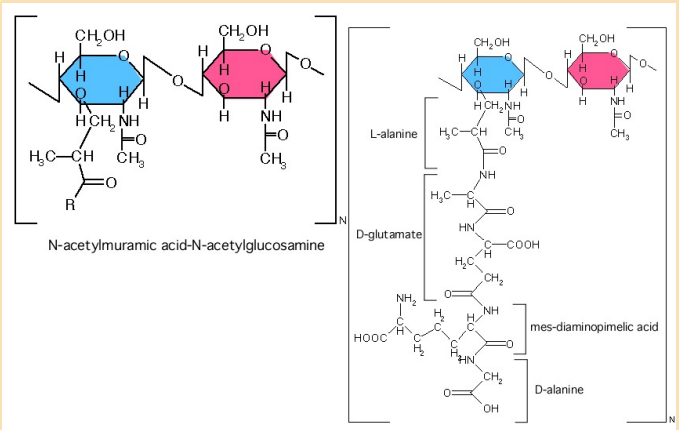


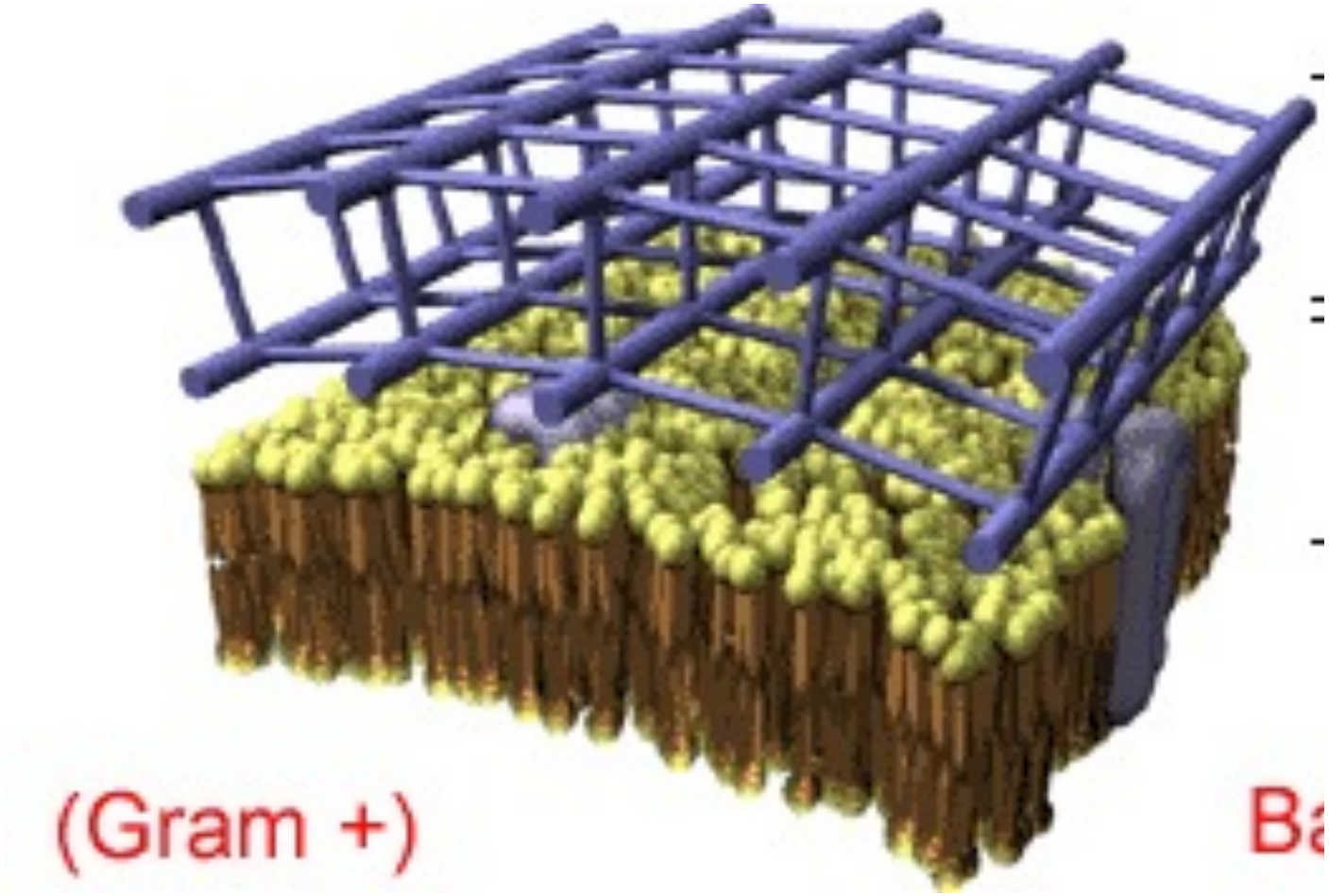
Gram⁻ Bacteria



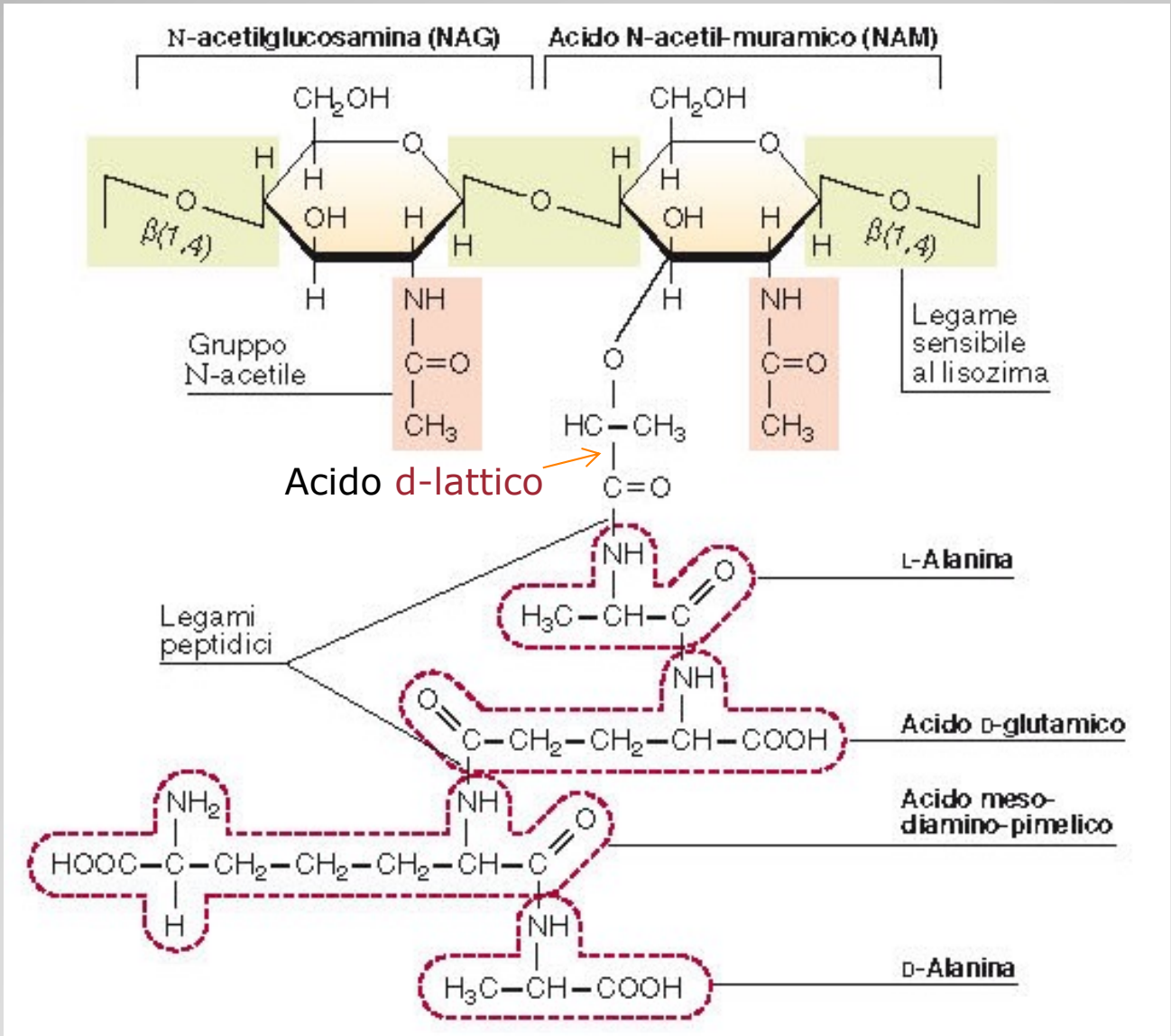
Dept. Biol. Penn State ©2002



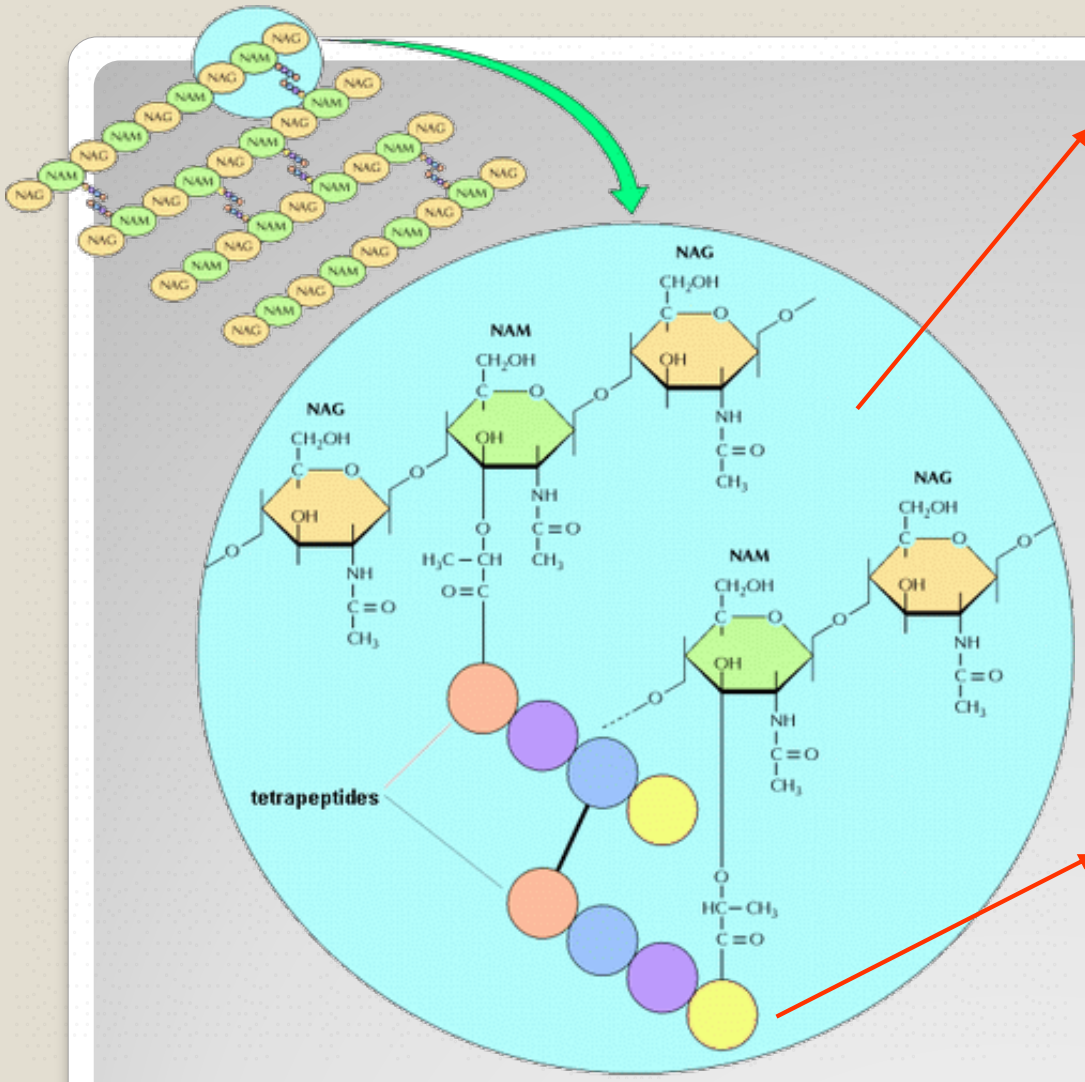


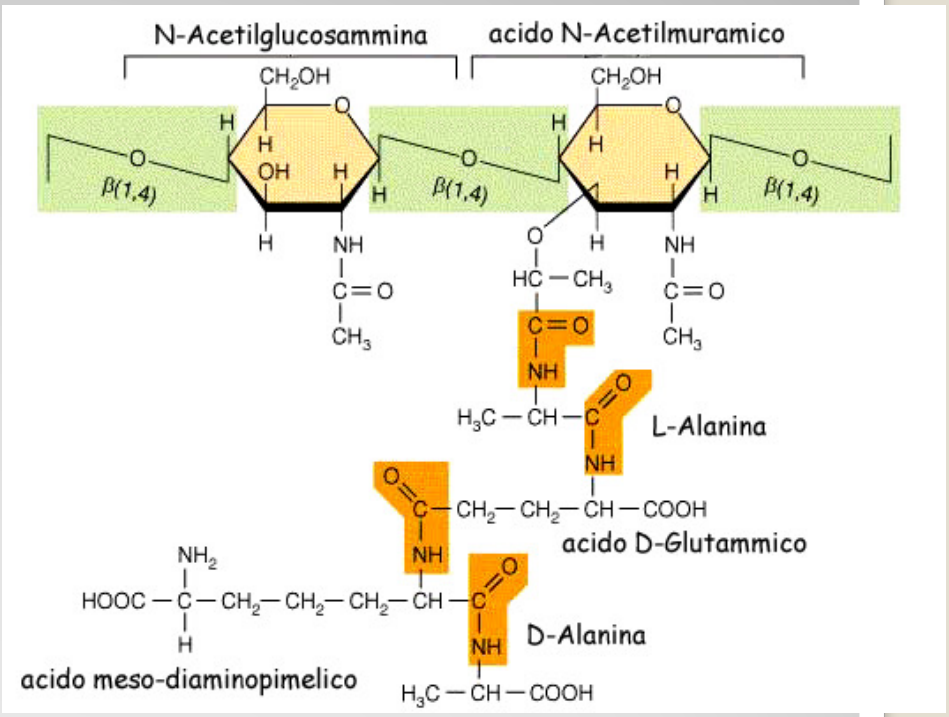

(Gram +)
Ba

La struttura del peptidoglicano



Il gruppo carbossilico del gruppo lattilico del NAM si lega al gruppo aminico del primo amminoacido del tetrapeptide mediante un legame carboaminico





COMPONENTE GLUCIDICA

Catene lineari di *n* unità di un disaccaride:

N-acetil-D-glucosammina (NAG)

Acido N-acetil-muramico (NAM)

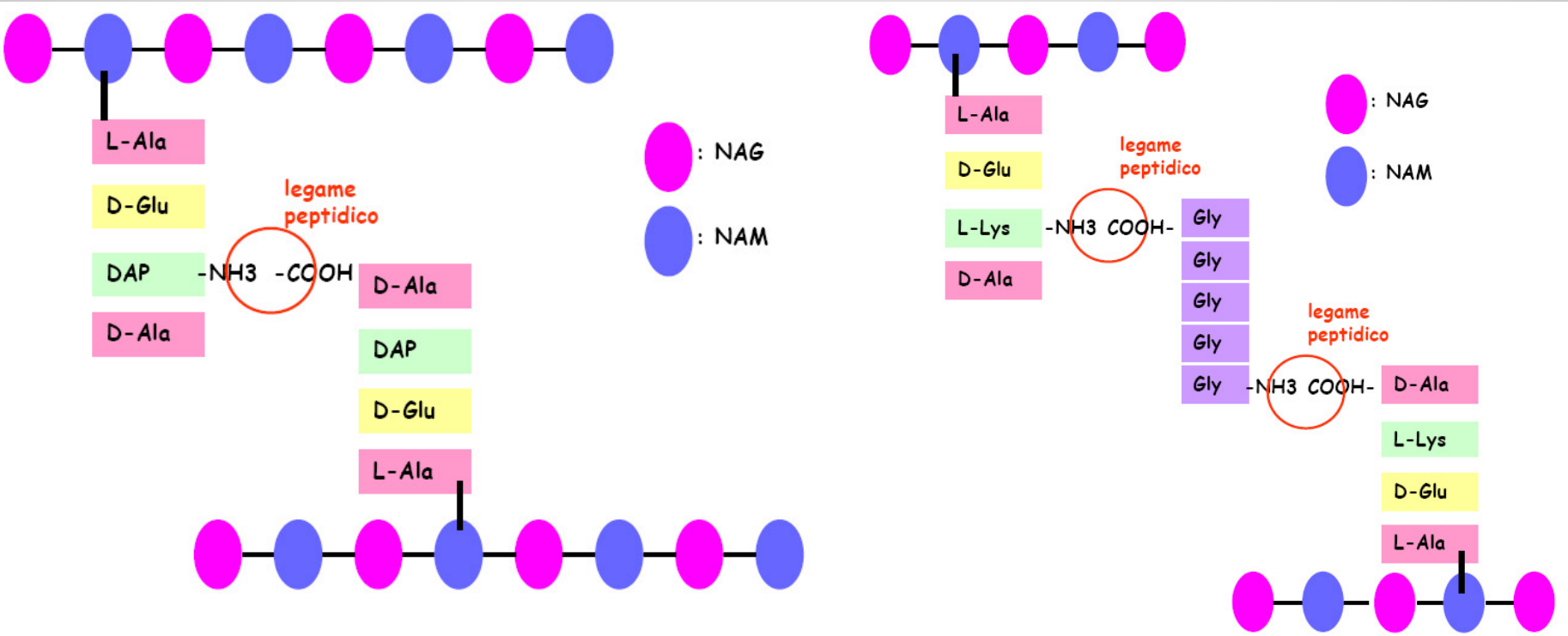
COMPONENTE PEPTIDICA

Corta catena di aminoacidi (TETRAPEPTIDE) alternati negli **stereoisomeri D e L**

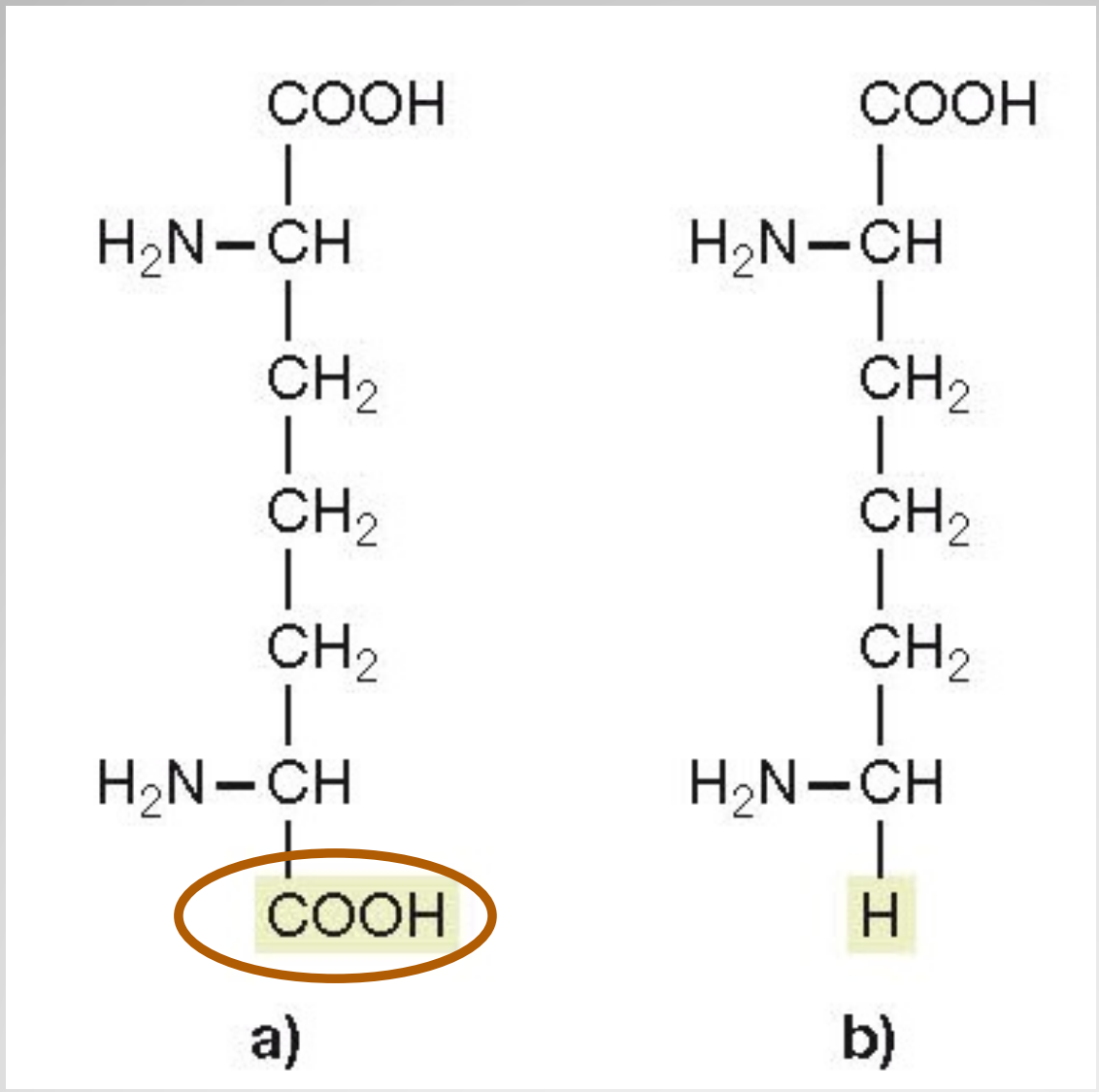
I tetrapeptidi

I tetrapeptidi si legano tra di loro con due modalità principali:

1) **DIRETTAMENTE** (nei Gram negativi)
2) **INDIRETTAMENTE** (solo in alcuni Gram positivi)



- Il legame peptidico coinvolge il il di-aminoacido in posizione 3 e la D-Alanina in posizione 4 di una catena adiacente.
- Questo è il "legame diretto" che è più diffuso sia nei batteri Gram-negativi che Gram-positivi.
- In alcuni Gram-positivi il legame interpeptidico si instaura fra la l'aa in posizione 3 (solitamente la L-Lys) e la D-Ala in 4 mediante l'interposizione di uno o più aa.
- Il tipo più frequente è rappresentato dal ponte di 5 Gly.



Acido *meso*-diaminopimelico

L-Lisina

L'acido *meso*-diaminopimelico è presente perevalentemente nei batteri Gram-negativi mentre la lisina si ritrova nei batteri Gram-positivi. Entrambi sono di-aminoacidi

Table 1. Amino acid variations in the peptide stem

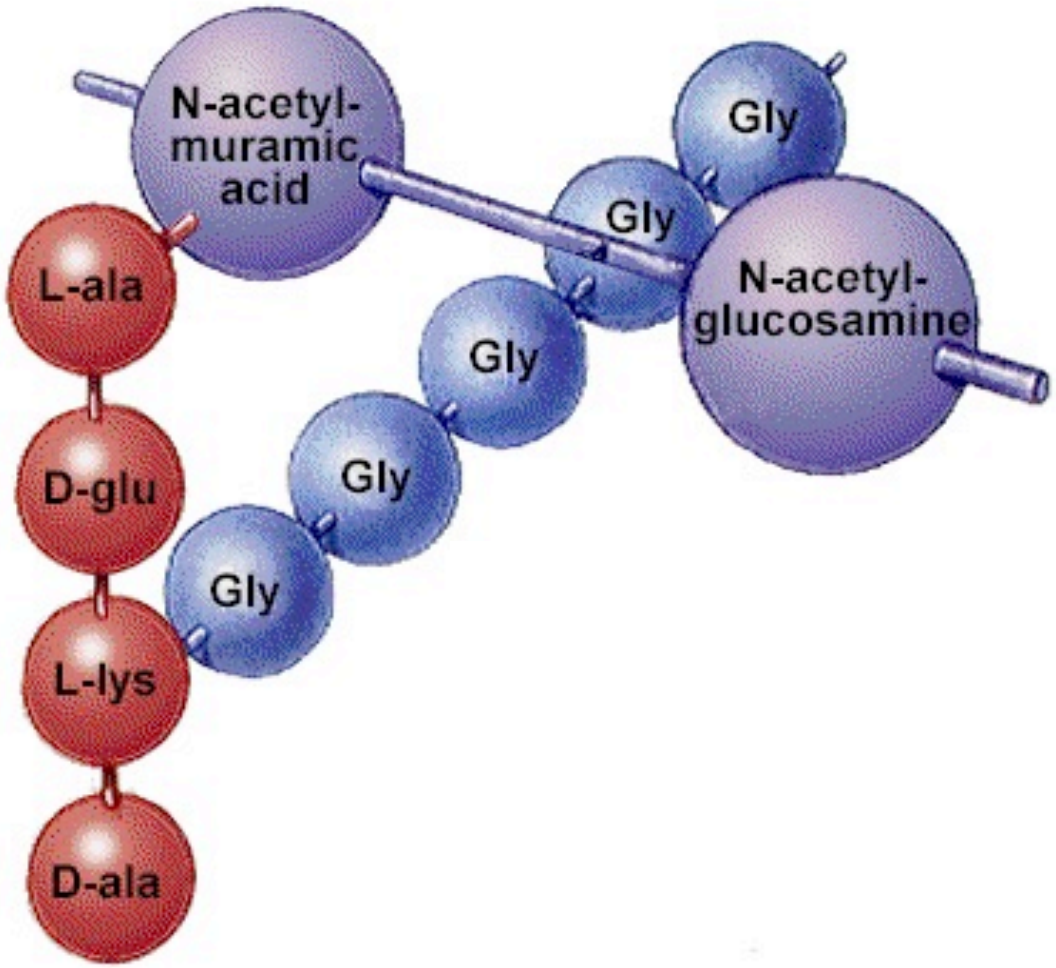
Position	Residue encountered	Examples
1	L-Ala	Most species
	Gly	*Mycobacterium leprae, Brevibacterium imperiale*
	L-Ser	*Butyribacterium rettgeri*
2	D-Isoglutamate	Most Gram-negative species
	D-Isoglutamine*	Most Gram-positive species, Mycobacteria
	threo-3-Hydroxyglutamate*	*Microbacterium lacticum*
3	*meso*-A_2pm	Most Gram-negative species, Bacilli, Mycobacteria
	L-Lys	Most Gram-positive species
	L-Orn	Spirochetes, *Thermus thermophilus*
	L-Lys/L-Orn	*Bifidobacterium globosum*
	L-Lys/D-Lys	*Thermotoga maritima*
	LL-A_2pm	*Streptomyces albus, Propionibacterium petersonii*
	meso-Lanthionine	*Fusobacterium nucleatum*
	L-2,4-Diaminobutyrate	*Corynebacterium aquaticum*
	L-Homoserine	*Corynebacterium poinsettiae*
	L-Ala	*Erysipelothrix rhusiopathiae*
	L-Glu	*Arthrobacter* J. 39
	Amidated *meso*-A_2pm*	*Bacillus subtilis*
	2,6-Diamino-3-hydroxypimelate†	*Ampuraliella regularis*
	L-5-Hydroxylysine†	*Streptococcus pyogenes*‡
	N^{γ}-Acetyl-L-2,4-diaminobutyrate*	*Corynebacterium insidiosum*
4	D-Ala	All bacteria
5	D-Ala	Most bacteria
	D-Ser	*Enterococcus gallinarum*
	D-Lac	*Lactobacillus casei*, Enterococci with acquired resistance to vancomycin

*These residues result from reactions occurring posterior to the action of Mur ligases.

†The process of formation of these residues (direct incorporation by MurE or subsequent hydroxylation of the nonhydroxylated residue) is unclear (Muñoz *et al.*, 1966; Perkins, 1969).

‡In this organism, a 10 : 1 ratio of lysine to hydroxylysine was found Muñoz *et al.* (1966).

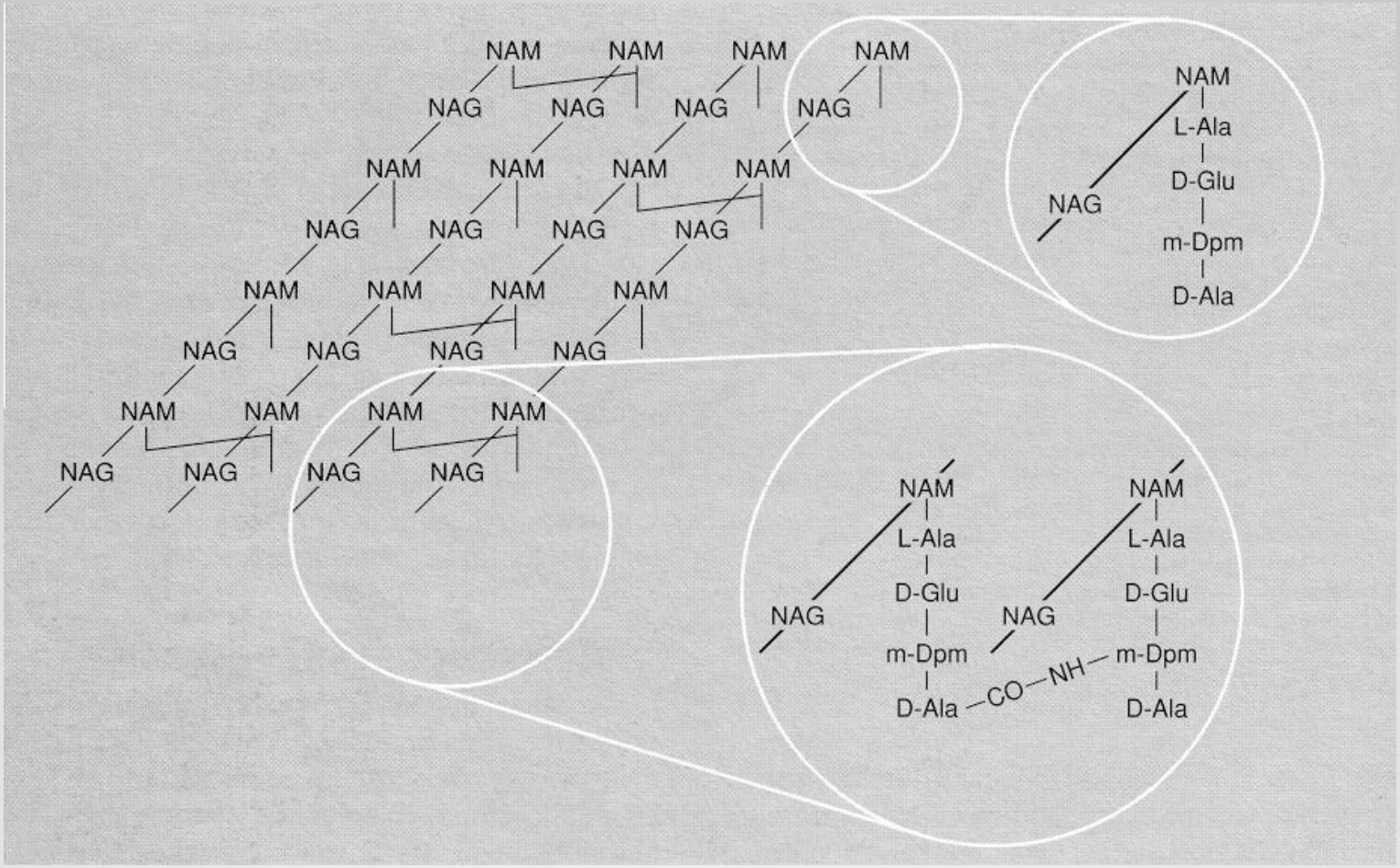
Negli stafilococchi…



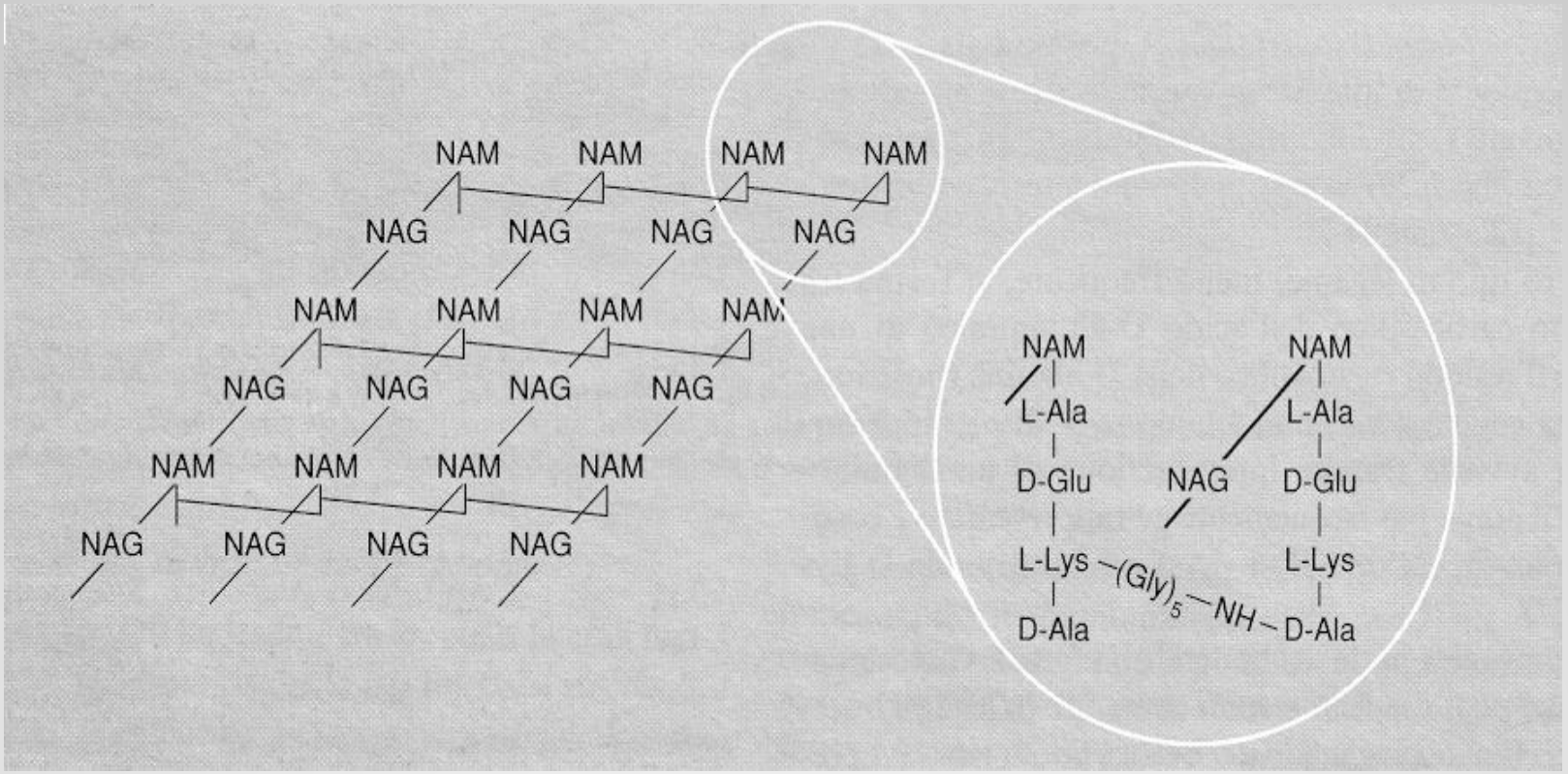
AA che sosstituiscono il ponte di pentaglicine

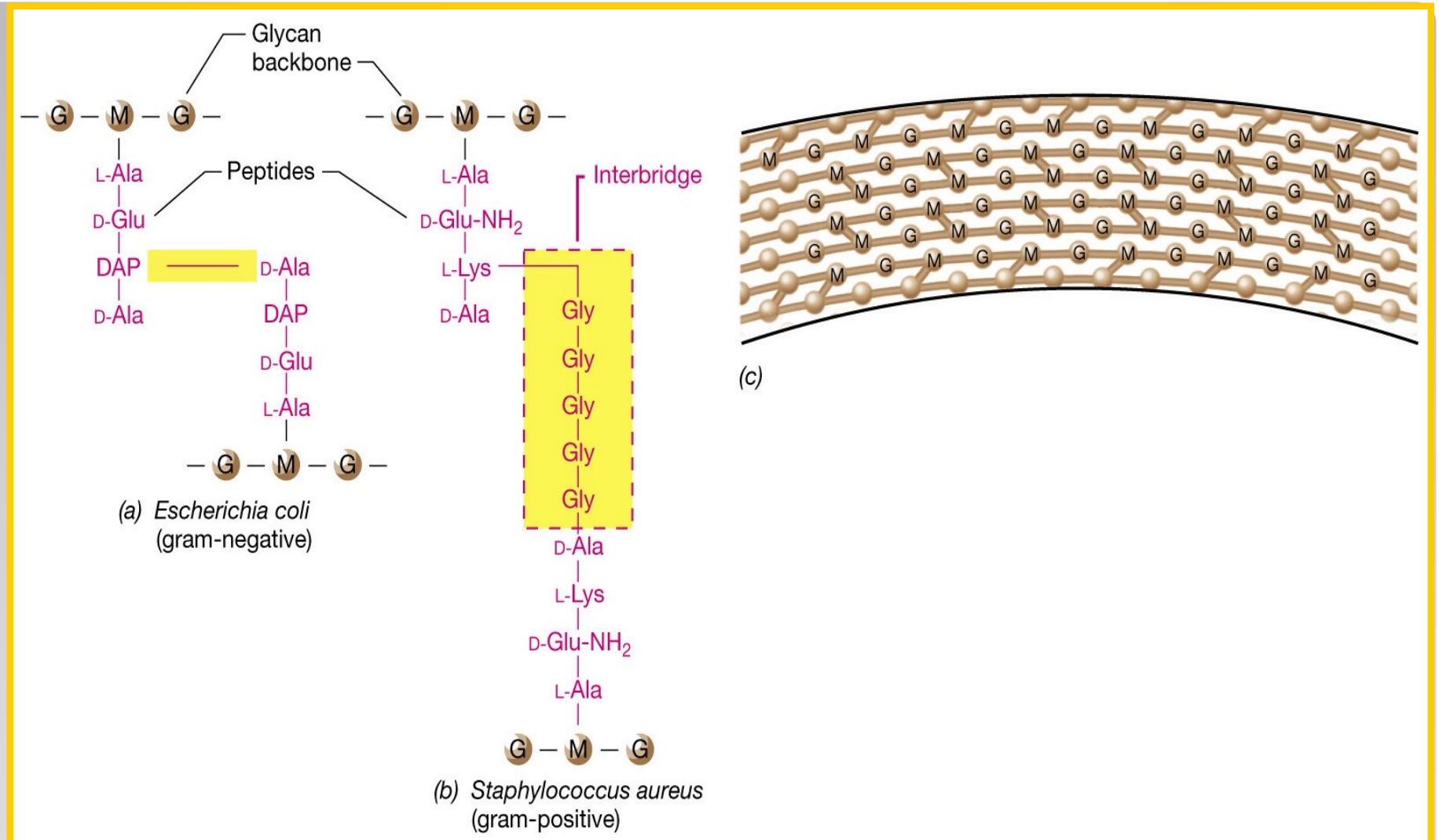
AA in posizione 3	Ponte interpeptidico	batterio
L-Lys	GLy-Gly-GLy-Gly-Gly	*Staphylococcus aureus*
L-Lys	L-Ala-L-Ala-L-Ala (L-Ala)	*Micrococcus roseus*
L-Lys	L-Thr-L-Ala-L-Ala-L-Ala	*Micrococcus roseus* (CM2131)
L-Lys	Gly	*Bifidobacterium infantis*
L-Lys	L-Ala-L-Ala-(L-Ala)	*Streptococcus faecalis*
L-Lys	D-Ala	*Lactobacillus buchneri*
L-Lys	L-Thr-L-Ala-(L-Ser)	*Streptococcus bovis*
M-Dpm	Assente(legame diretto)	*Lactobacillus plantarum, Bacillus subtilis*

Il Peptidoglicano (PGN): il legame delle catene peptidiche [1]

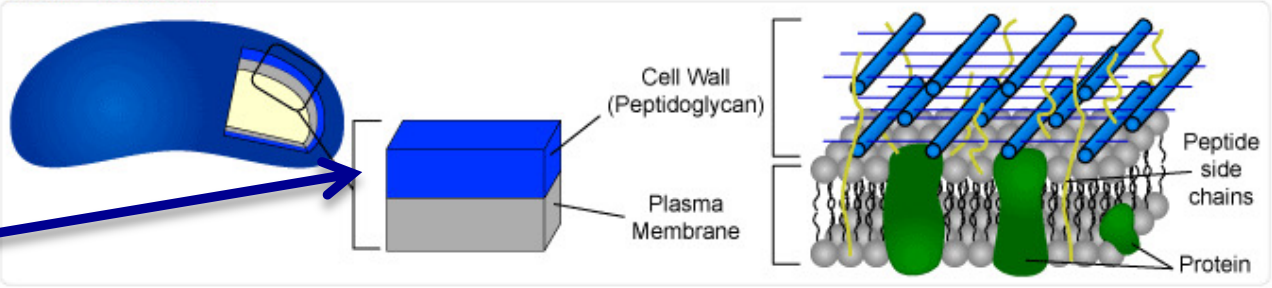


Il Peptidoglicano (PGN): il legame delle catene peptidiche [2]

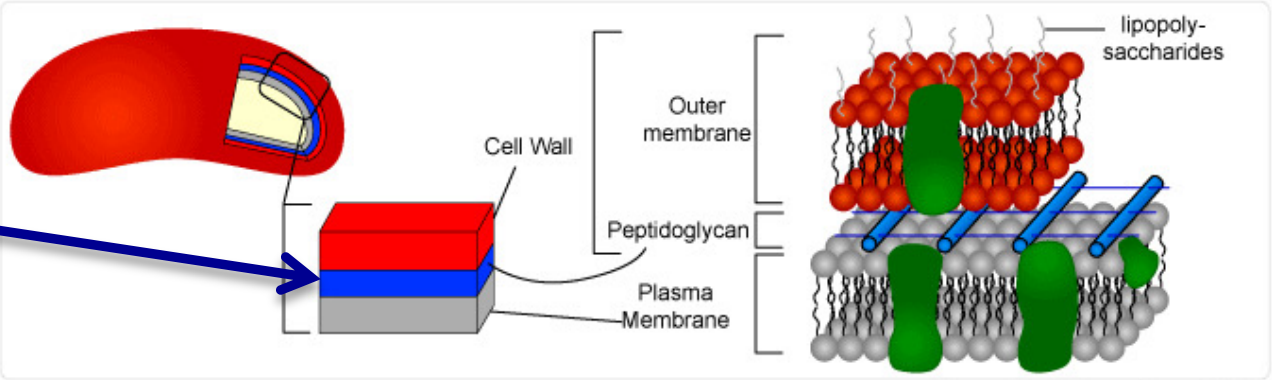



Glycan backbone
Peptides
Interbridge
L-Ala
D-Glu
DAP
D-Ala
D-Ala
DAP
D-Glu
L-Ala
D-Glu-NH2
L-Lys
D-Ala
Gly
Gly
Gly
Gly
Gly
D-Ala
L-Lys
D-Glu-NH2
L-Ala
(a) Escherichia coli (gram-negative)
(b) Staphylococcus aureus (gram-positive)
(c)

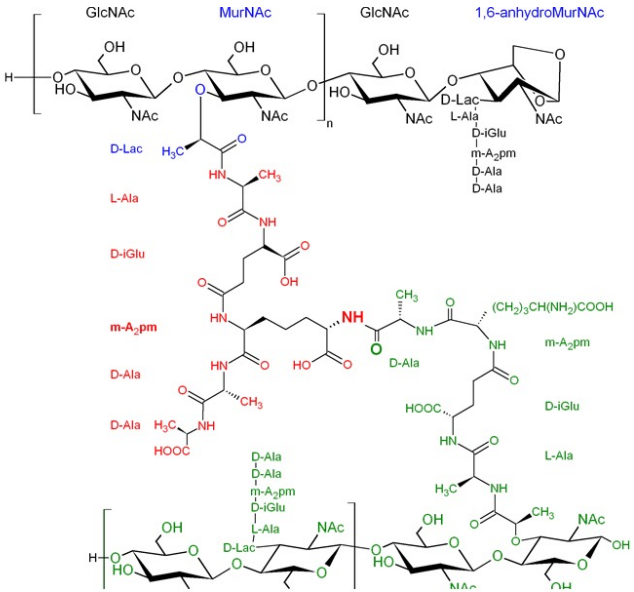
Gram⁺ Bacteria

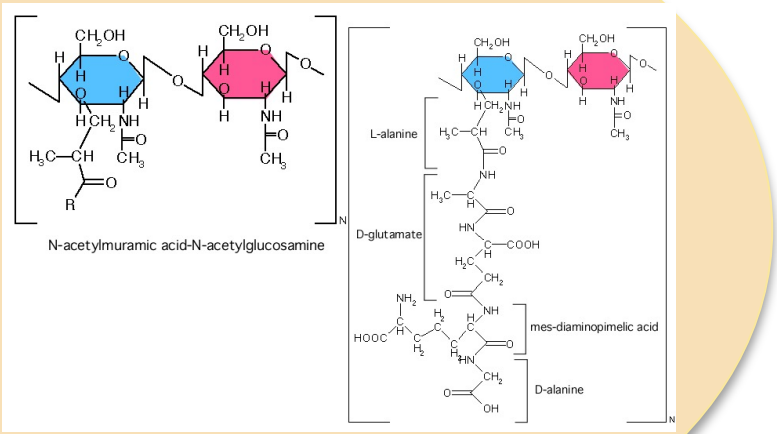


Gram⁻ Bacteria



Dept. Biol. Penn State ©2002





Biosintesi del PGN

- La sintesi del PGN ha luogo in tre diversi compartimenti

1. **Fase citoplasmatica**
2. **Fase di membrana**
3. **Fase periplasmatica**

Fase citoplasmatica

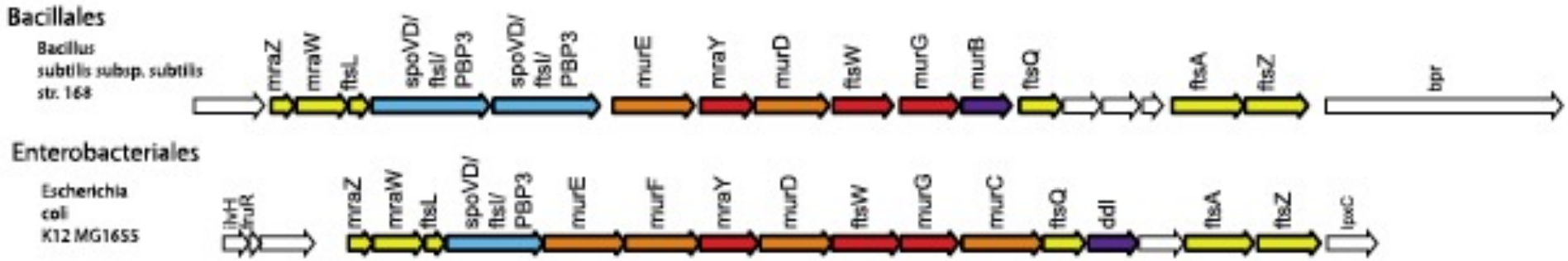
Sintesi dei precursori di natura saccaridica e proteica

Fase di membrana

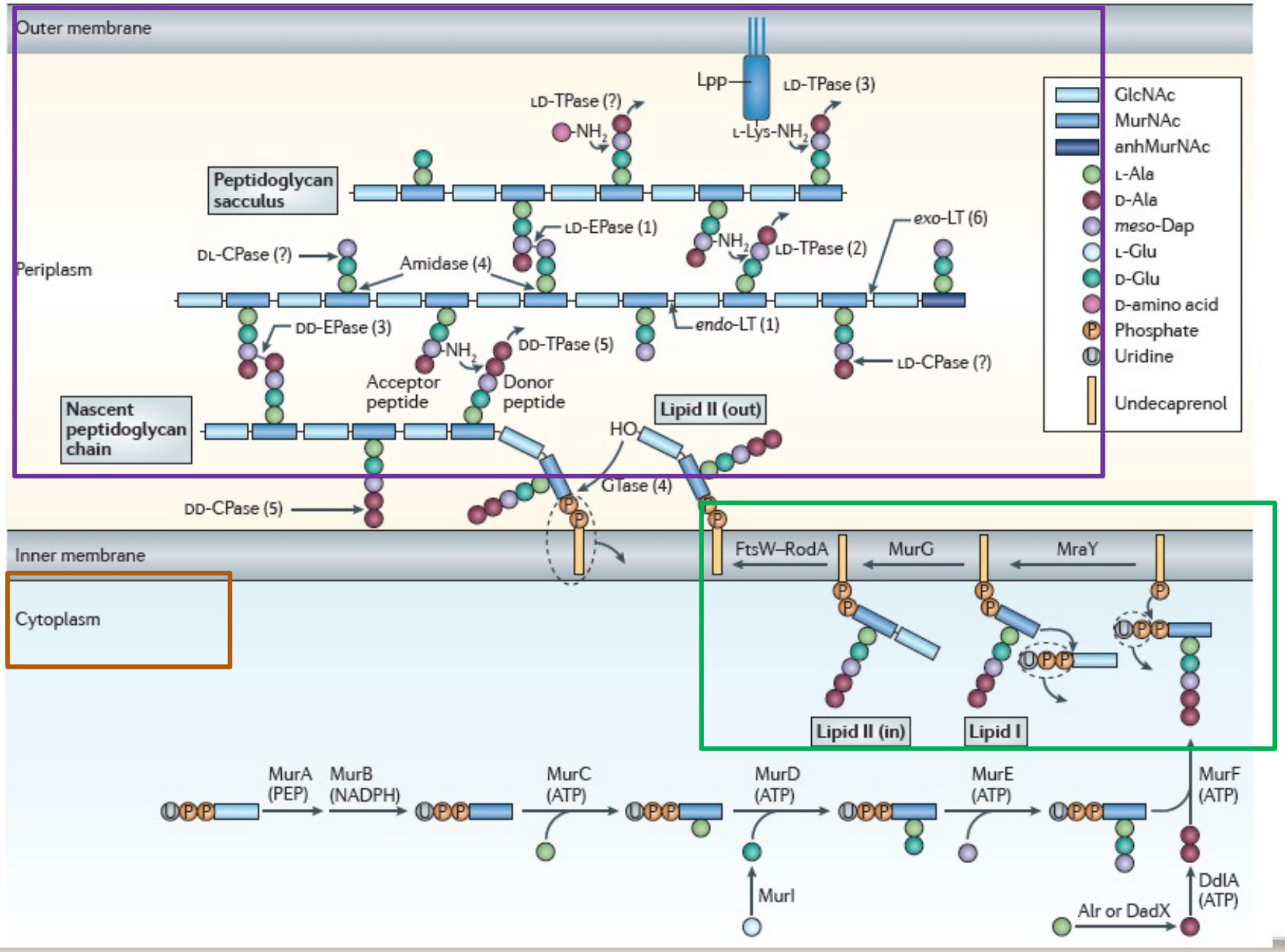
Assemblaggio del glican-pentapeptide e attraversamento della membrana citoplasmatica

Fase periplasmatica

Polimerizzazione del PGN (reazioni di **transglicosilazione**) e formazione dei legami crociati (reazioni di **transpeptidazione**)

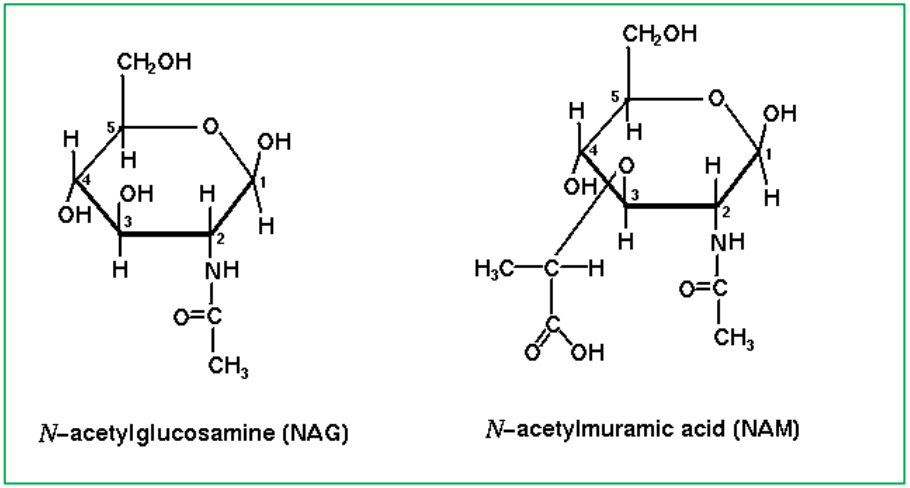

Bacillales
Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168
mraZ
mraW
ftsL
spoVD/ ftsI/ PBP3
spoVD/ ftsI/ PBP3
murE
mraY
murD
ftsW
murG
murB
ftsQ
ftsA
ftsZ
bpr
Enterobacteriales
Escherichia coli K12 MG1655
ihfA ihfB
mraZ
mraW
ftsL
spoVD/ ftsI/ PBP3
murE
murF
mraY
murD
ftsW
murG
murC
ftsQ
ddl
ftsA
ftsZ
lpxC

Biosintesi del PGN



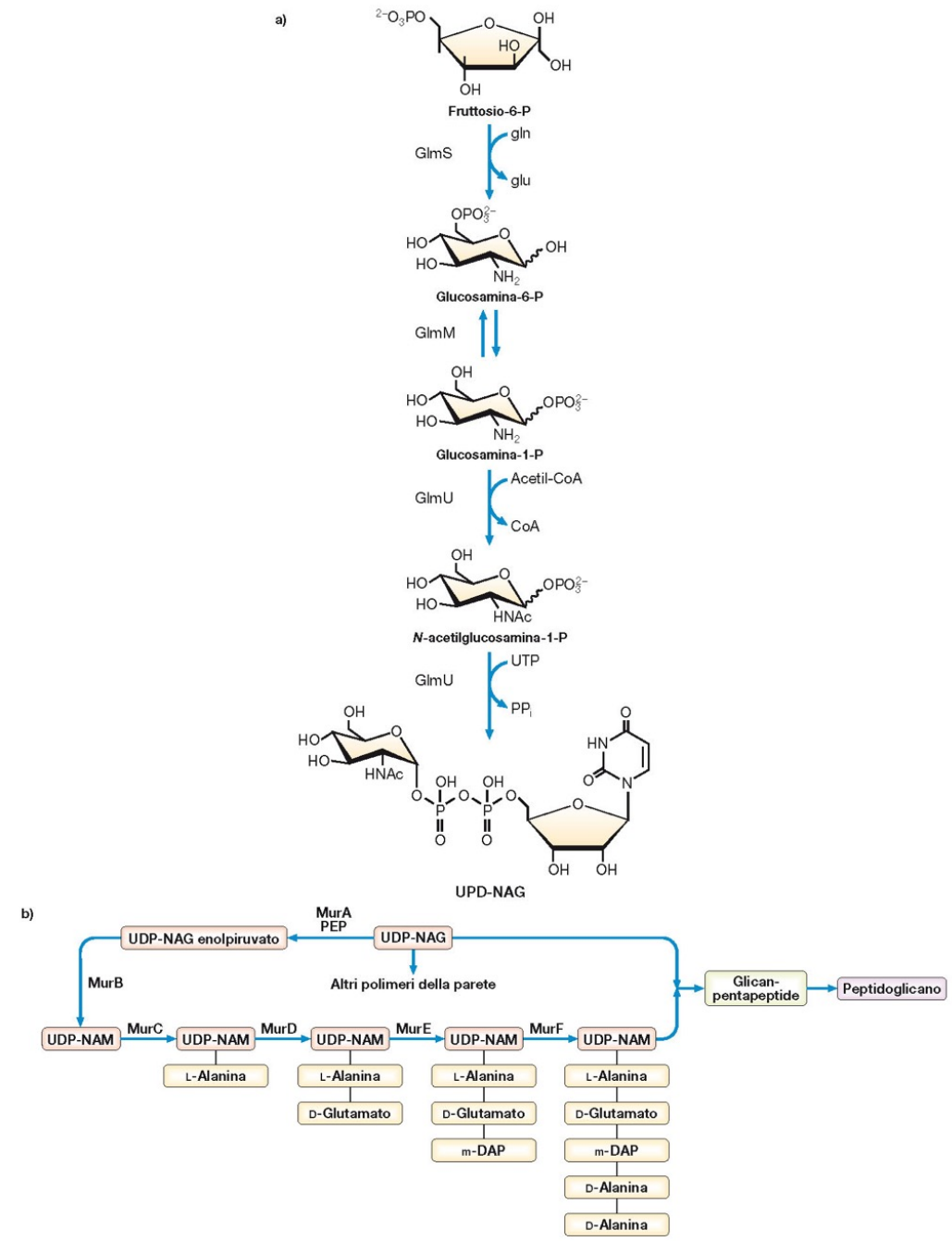
Fase citoplasmatica (step I)

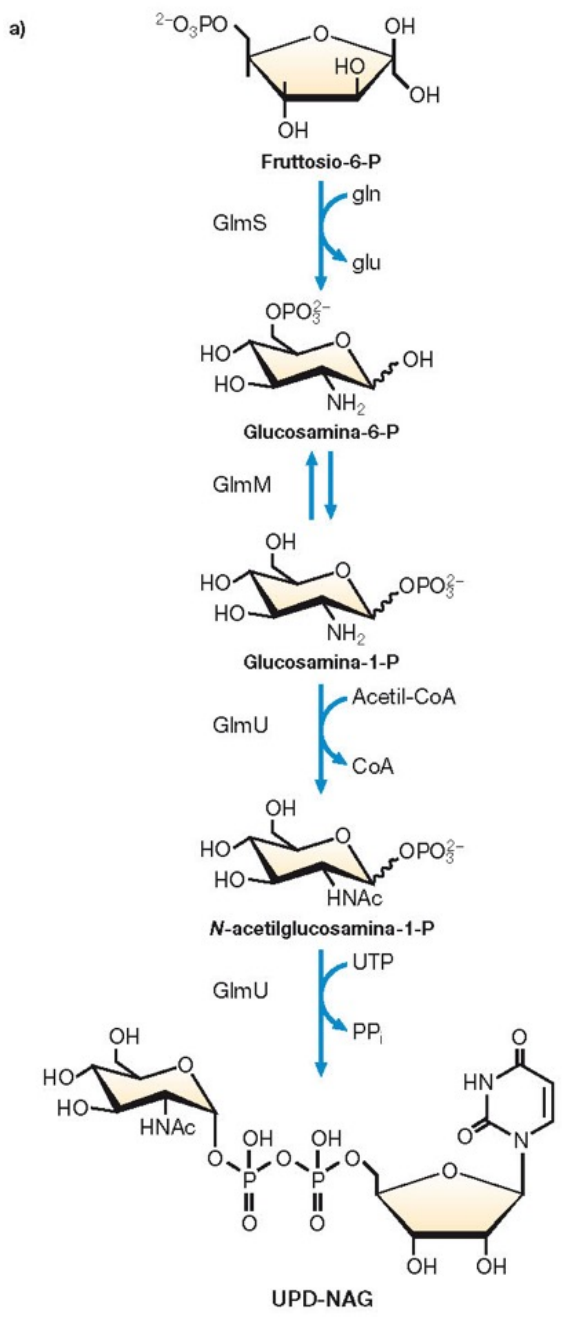
Sintesi dei precursori di natura **saccaridica** e **proteica**

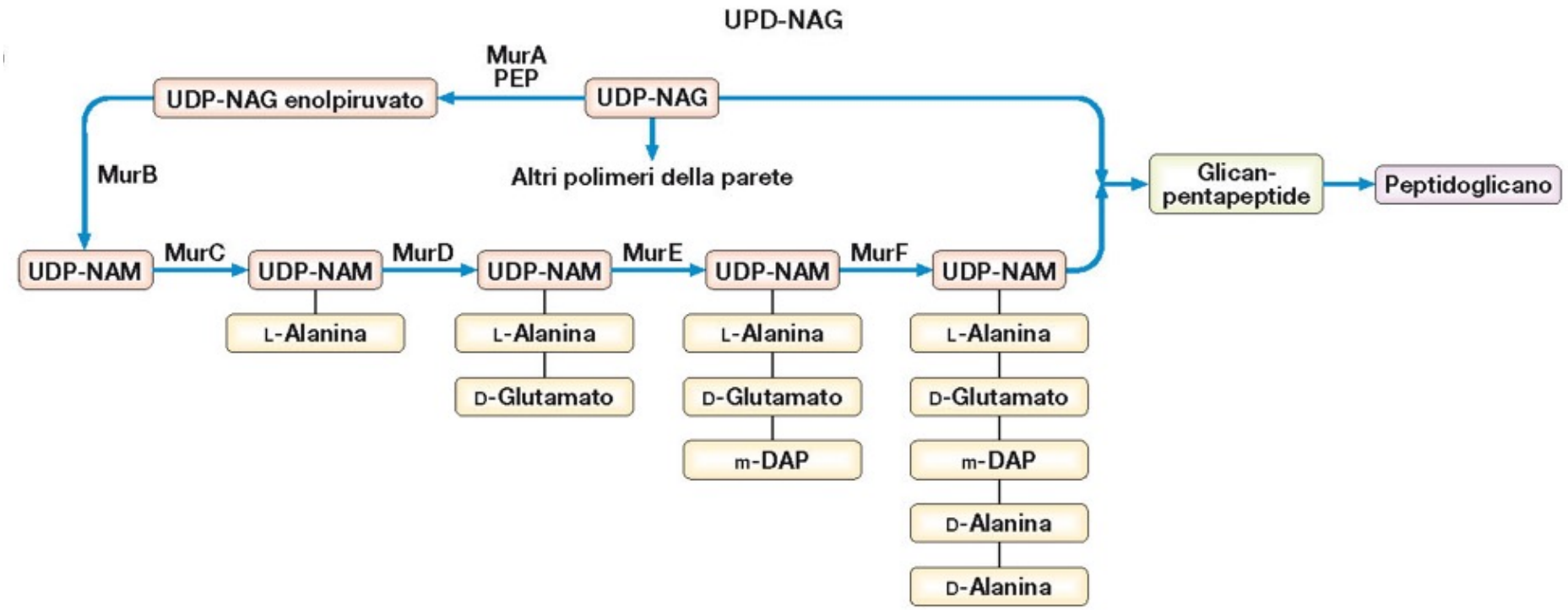


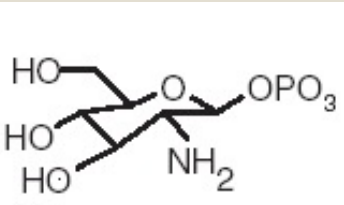
Sintesi del NAG

Si parte dal **fruttosio-6 fosfato** e attraverso l'azione coordinata di diversi enzimi si arriva alla formazione del primo substrato attivato del PGN: l'**UDP-NAG**



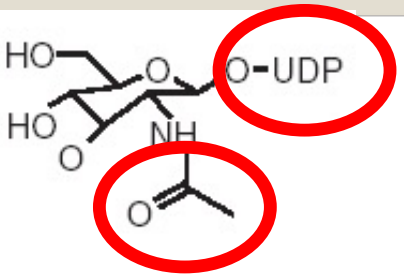

a)
Fruttosio-6-P
GlmS
gln
glu
Glucosamina-6-P
GlmM
Glucosamina-1-P
GlmU
Acetil-CoA
CoA
N-acetilglucosamina-1-P
GlmU
UTP
PPi
UPD-NAG


UPD-NAG
MurA
PEP
UDP-NAG enolpiruvato
UDP-NAG
MurB
Altri polimeri della parete
Glican-
pentapeptide
Peptidoglicano
UDP-NAM
MurC
UDP-NAM
MurD
UDP-NAM
MurE
UDP-NAM
MurF
UDP-NAM
L-Alanina
L-Alanina
D-Glutamato
L-Alanina
D-Glutamato
m-DAP
L-Alanina
D-Glutamato
m-DAP
D-Alanina
D-Alanina



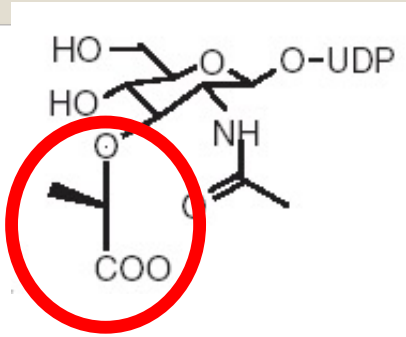
Glucosamina 1 P

GlmU



UDP-NAG

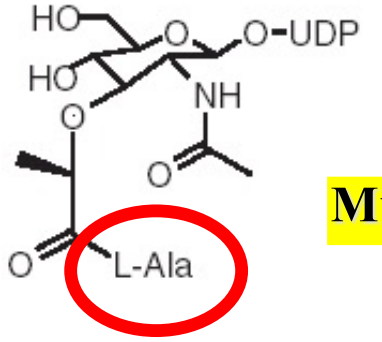
MurA
MurB



UDP-NAM

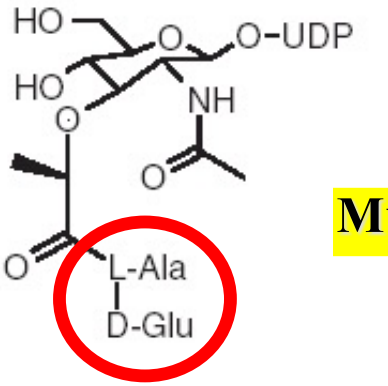
Tappe fondamentali della sintesi del UDP-NAM-pentapeptide

MurC



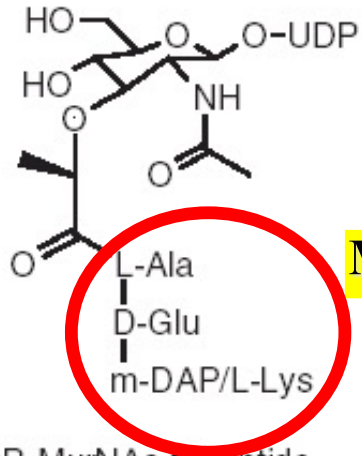
UDP-MurNAc-L-Ala

MurD



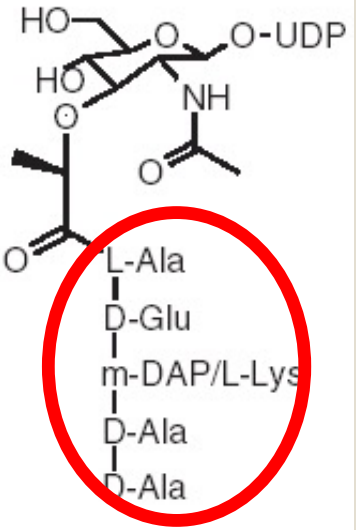
UDP-MurNAc-dipeptide

MurE



UDP-MurNAc-tripeptide

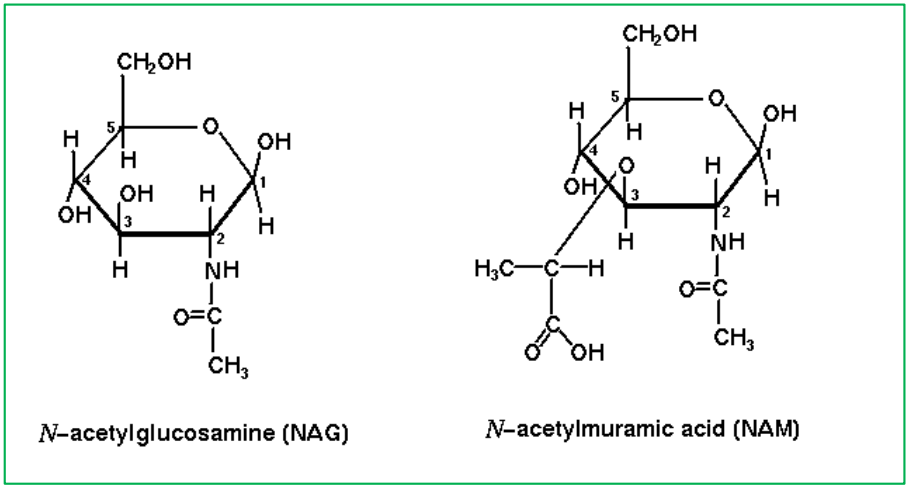
MurF



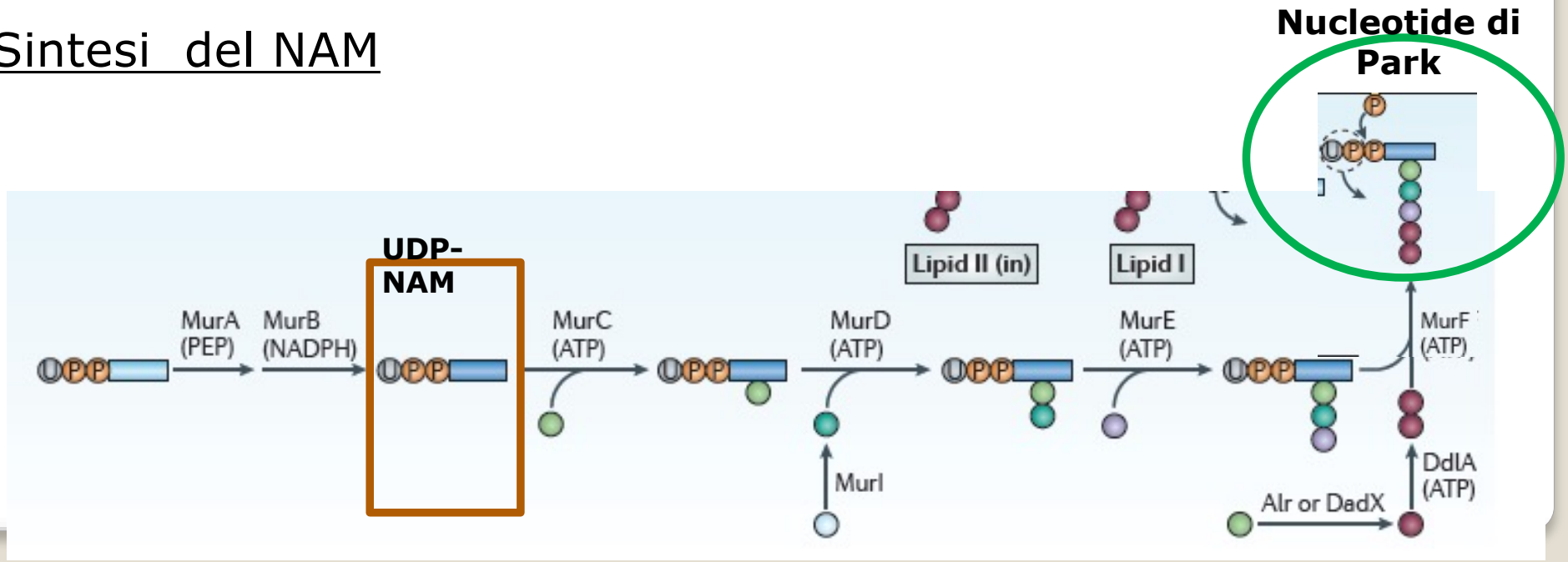
UDP-MurNAc-pentapeptide

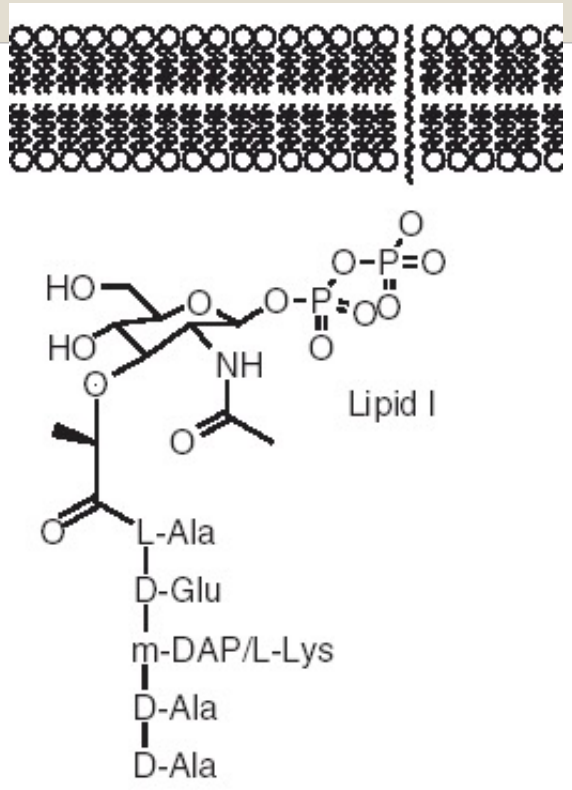
Fase citoplasmatica (stage I)

Sintesi dei precursori di natura **saccaridica** e **proteica**



Sintesi del NAM

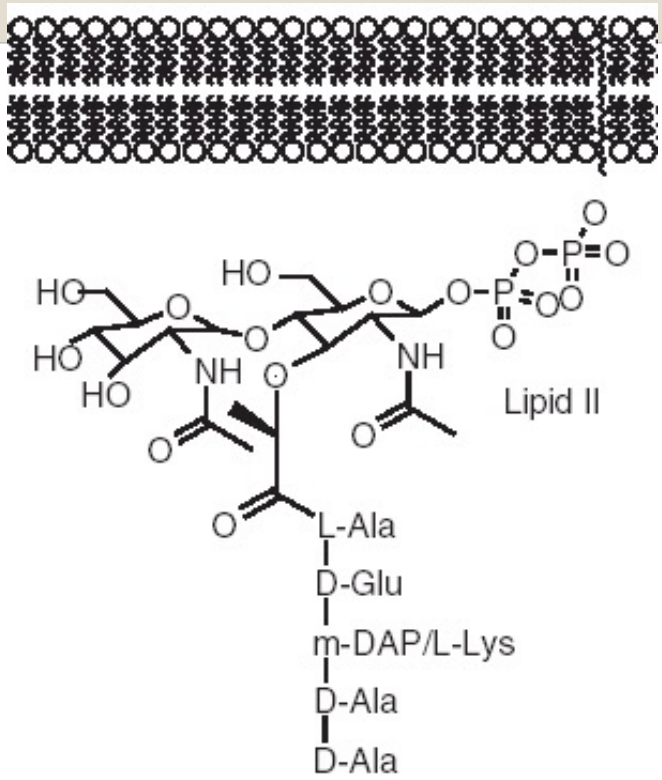




MurG

-UMP

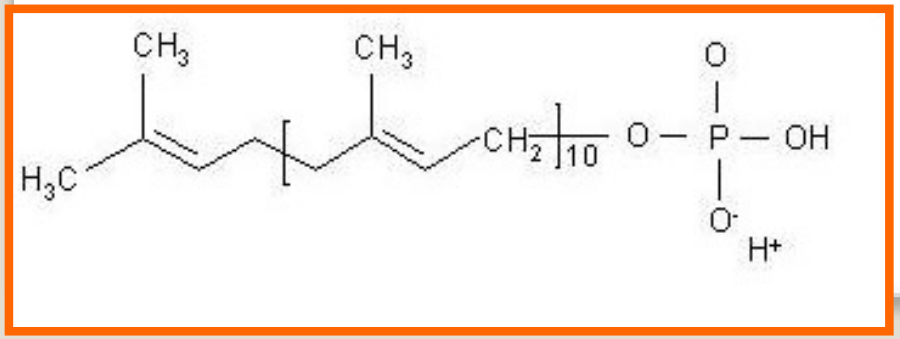
+UDP-NAG



LIPIDE I

Bactoprenolo

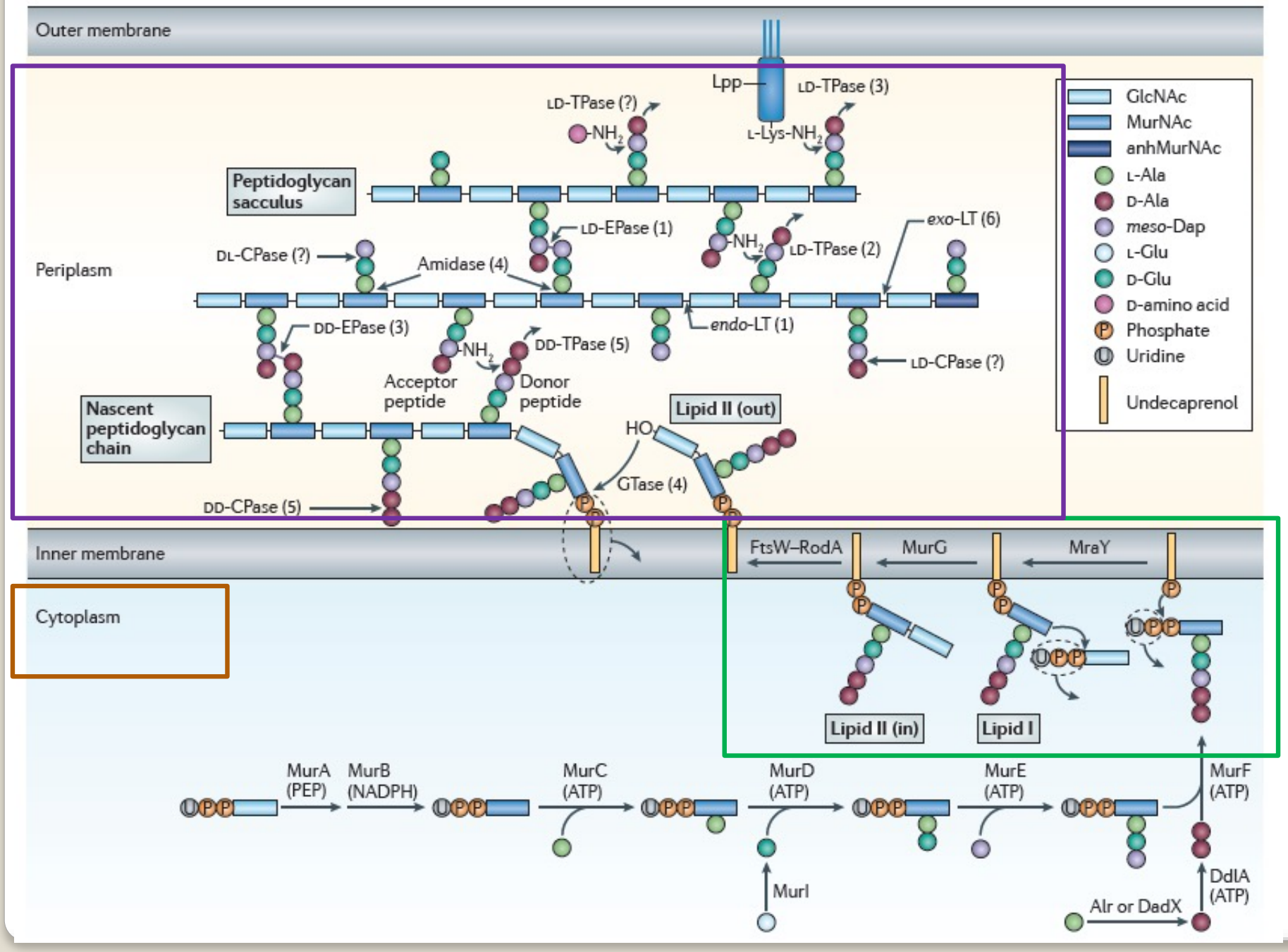
(undecaprenilfosfato)



LIPIDE II

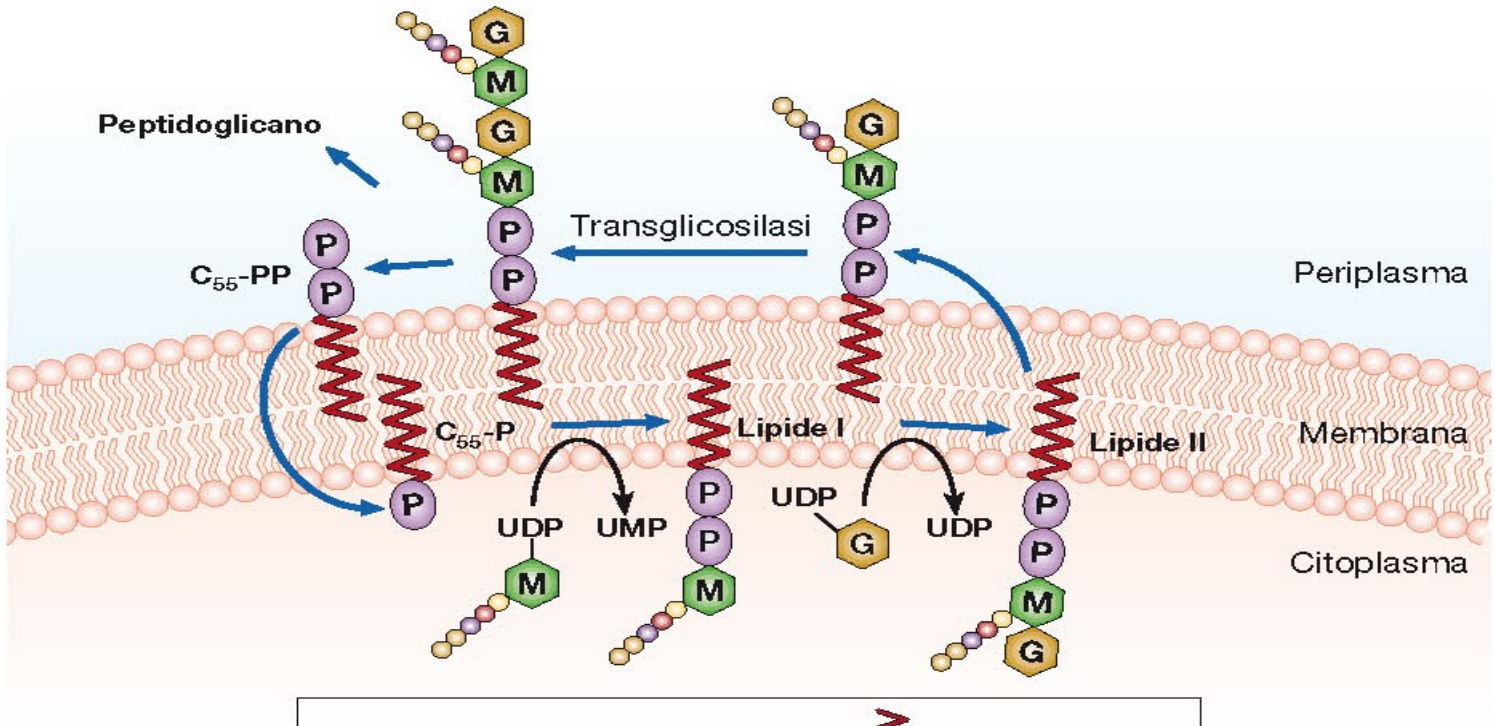
Viene definito Lipide I il complesso UDP+ NAM+pentapeptide che diventa Lipide II in seguito all'aggiunta del NAG

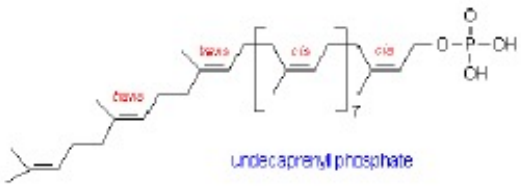
Biosintesi del PGN



Fase di membrana (stage II)

Formazione del glican-pentapeptide e **traslocazione nel periplasma**





undecaprenilfosfato

Bactoprenolo

Fase di membrana (stage III)

Polimerizzazione del PGN e formazione dei legami crociati

- **Sintasi mureiniche**

Enzimi presenti fino a circa 200 copie per cellula batterica

Possono essere

1. **monofunzionali** e quindi agire o come **transpeptidasi (TP)** o come **transglicosilasi (TG)**
2. **Bifunzionali:** hanno attività sia di TP che TG

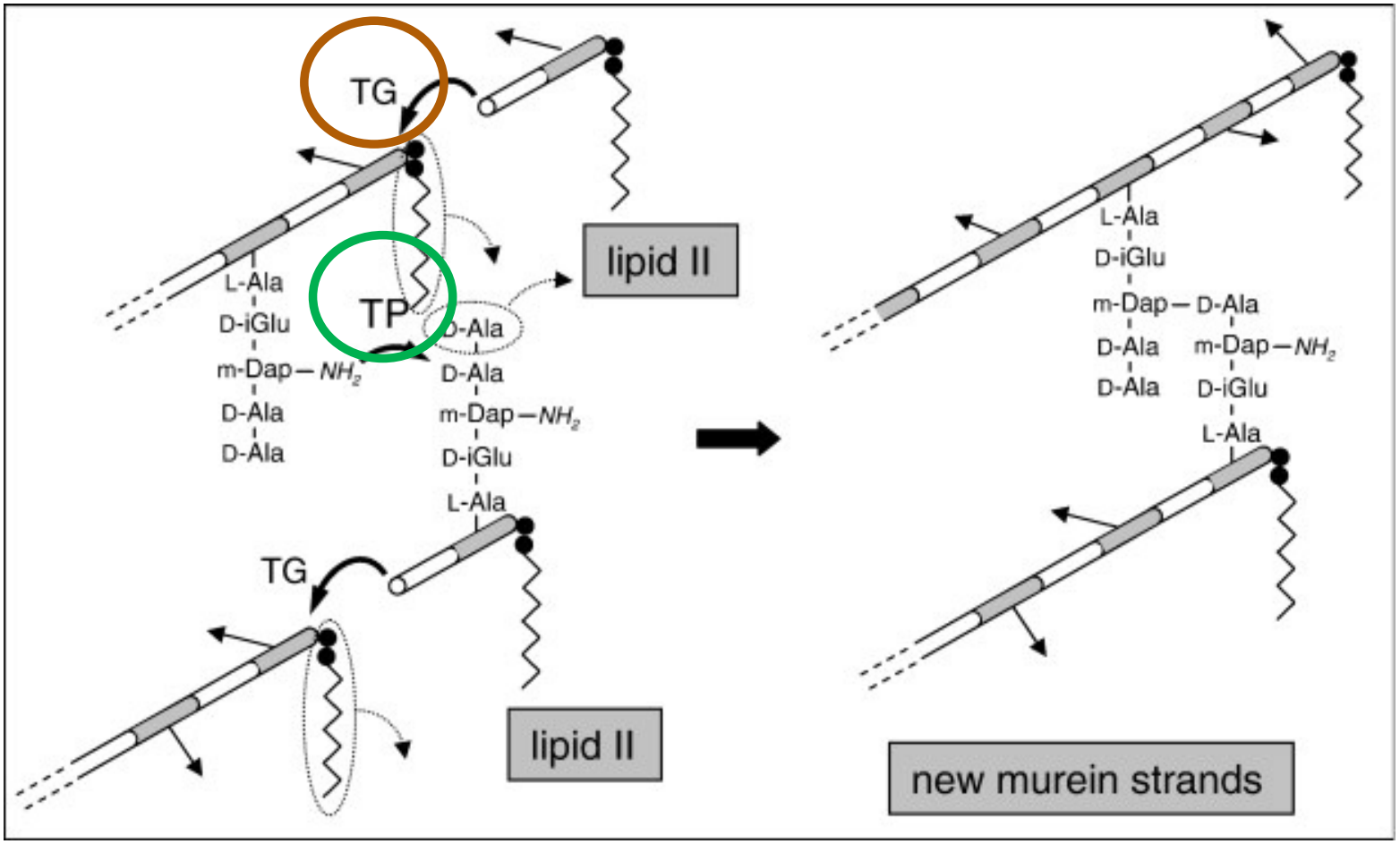
• Tutte le sintasi mureiniche sono ancorate alla membrana citoplasmatica grazie a un dominio transmembrana adiacente la regione N-terminale (citoplasma)

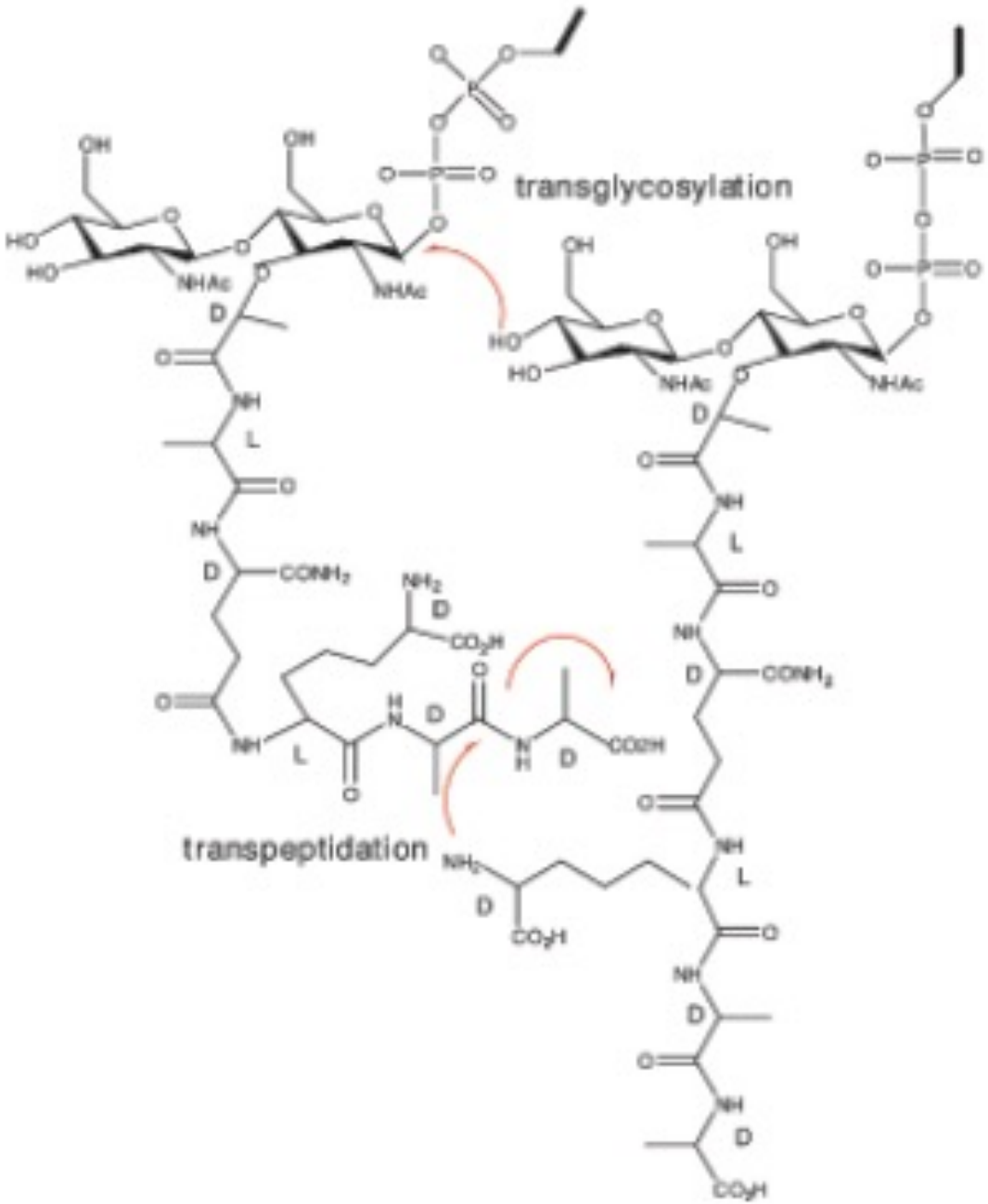
•Il dominio catalitico è presente all'estremità C-terminale

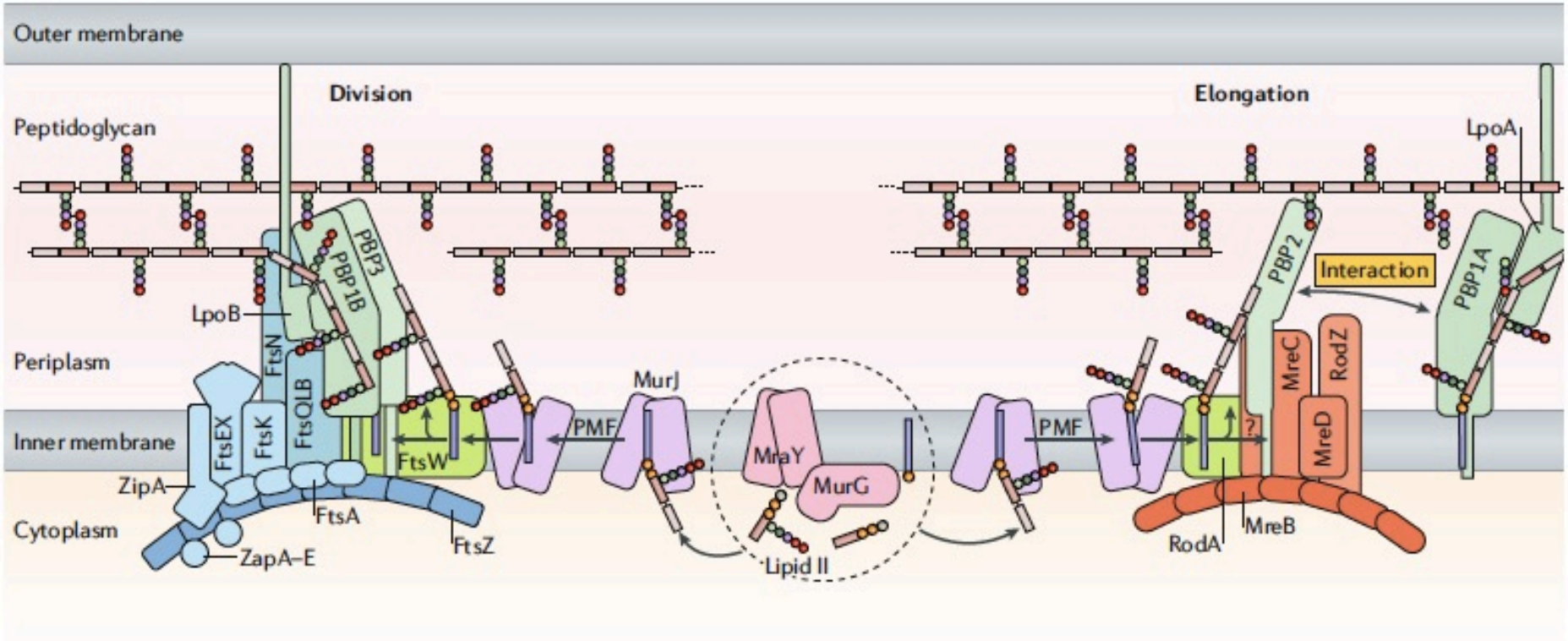
•Un gruppo specifico di sintasi con attività sono le **PBPs** (penicillin-binding proteins)

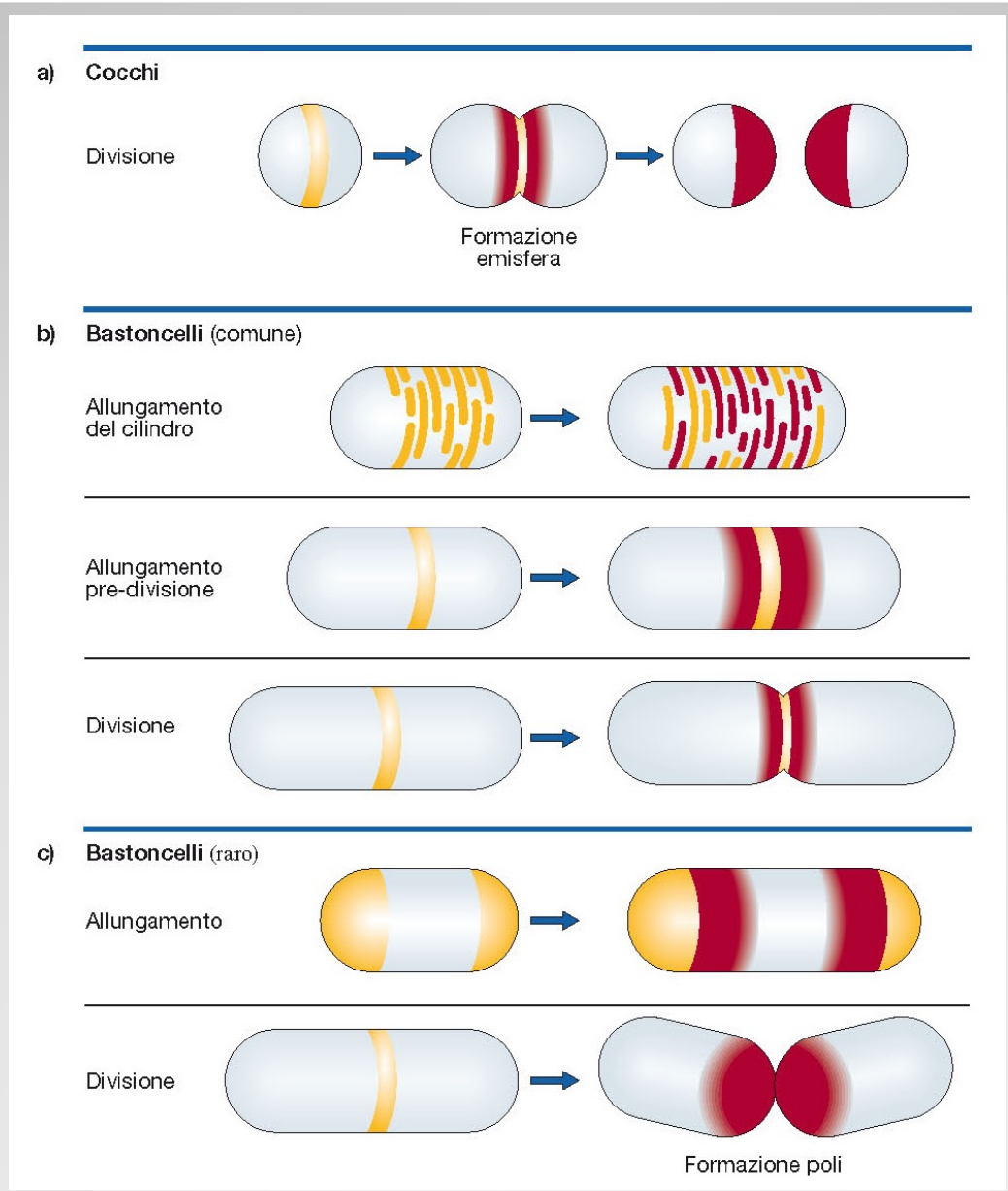
Fase di membrana (stage III)

Polimerizzazione del PGN e formazione dei legami crociati

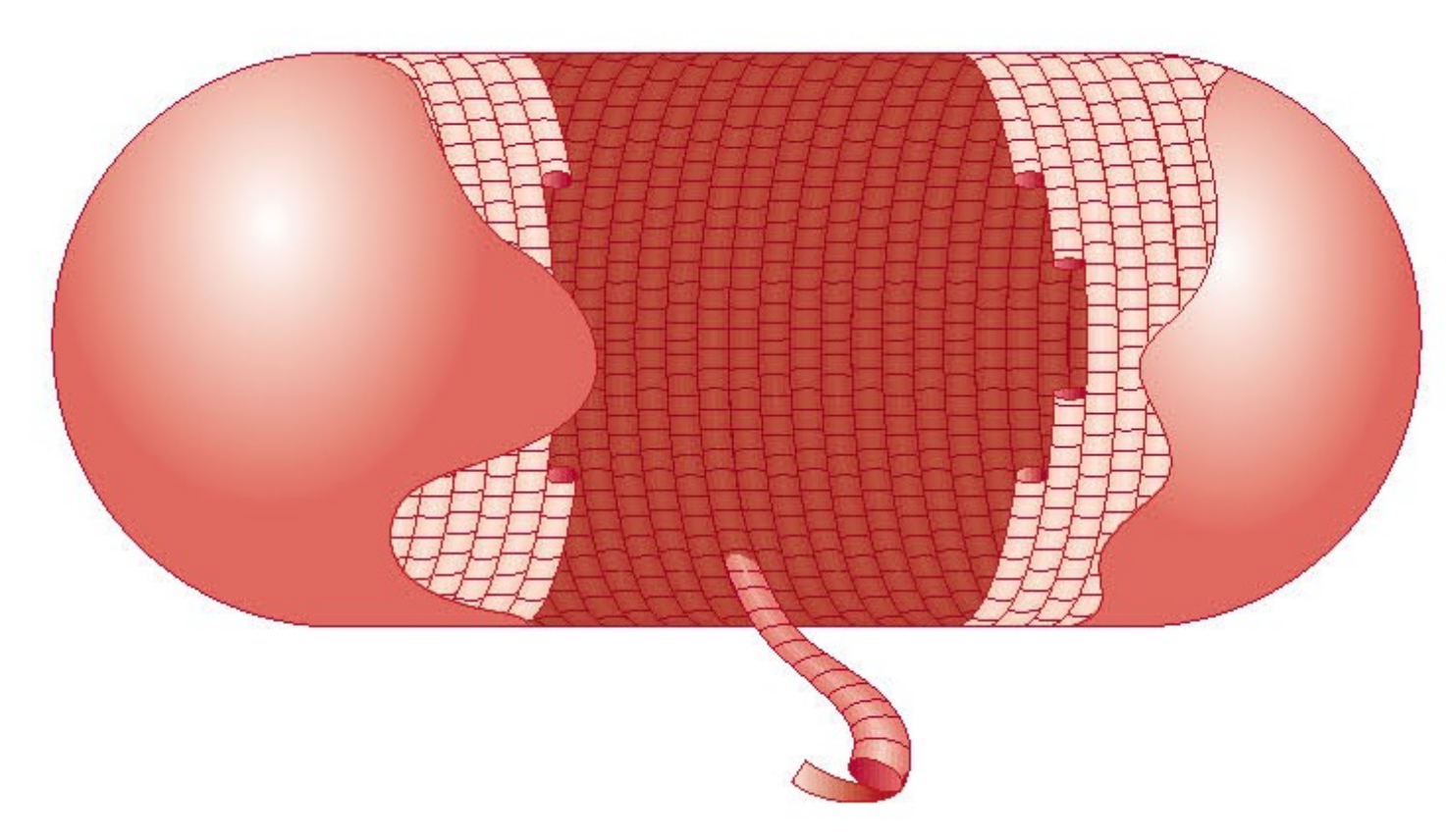


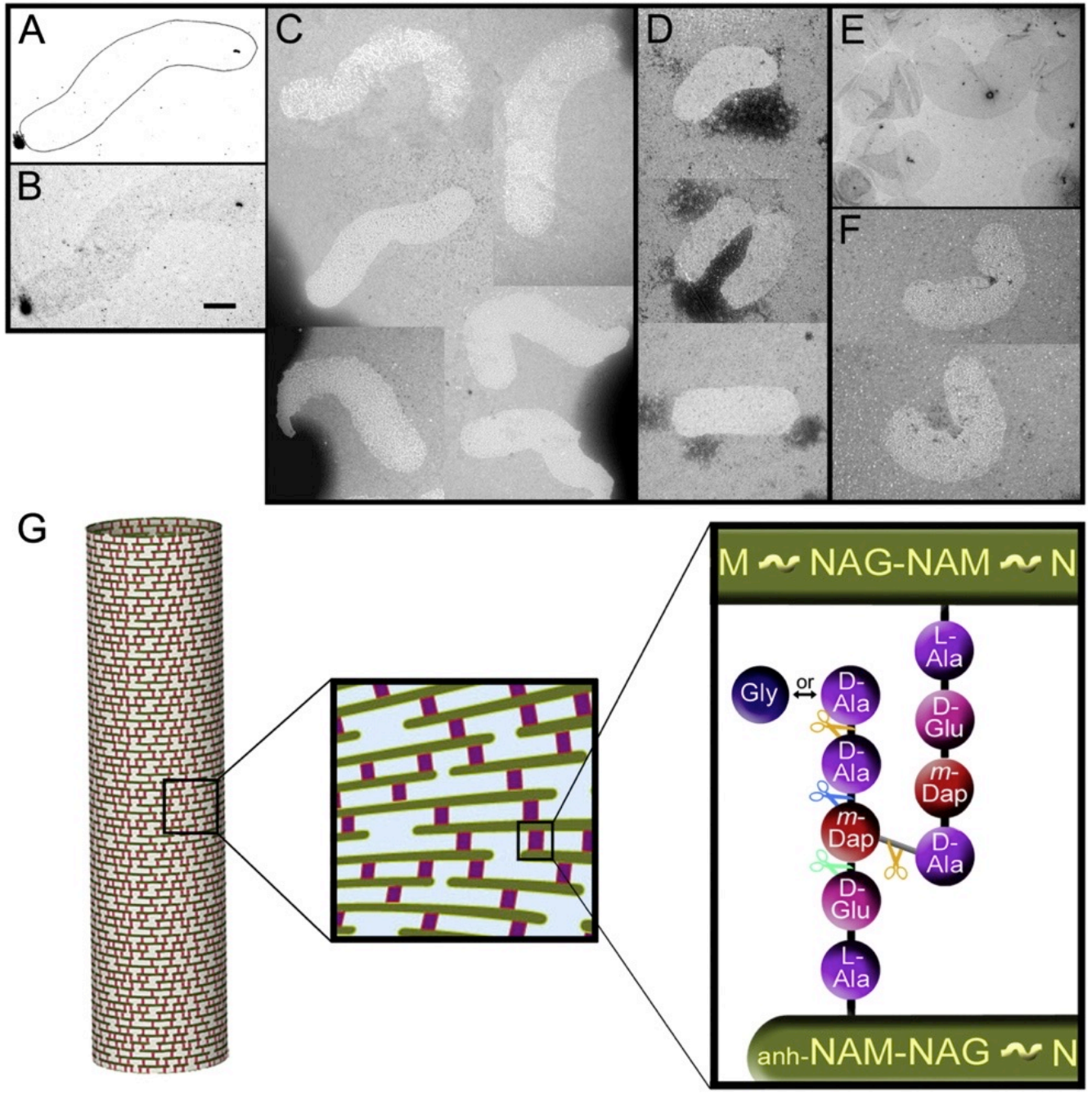

transglycosylation
transpeptidation


Outer membrane
Division
Elongation
Peptidoglycan
LpoA
PBP3
PBP1B
PBP2
Interaction
PBP1A
LpoB
FtsN
Periplasm
MurJ
MreC
RodZ
FtsQLB
FtsK
FtsEX
Inner membrane
PMF
MraY
MurG
PMF
?
MreD
FtsW
ZipA
FtsA
FtsZ
Cytoplasm
ZapA–E
Lipid II
RodA
MreB



In tridimensionale……




A
B
C
D
E
F
G
M NAG-NAM N
Gly
or
D-Ala
D-Ala
m-Dap
D-Ala
D-Glu
L-Ala
L-Ala
D-Glu
m-Dap
D-Ala
anh-NAM-NAG N

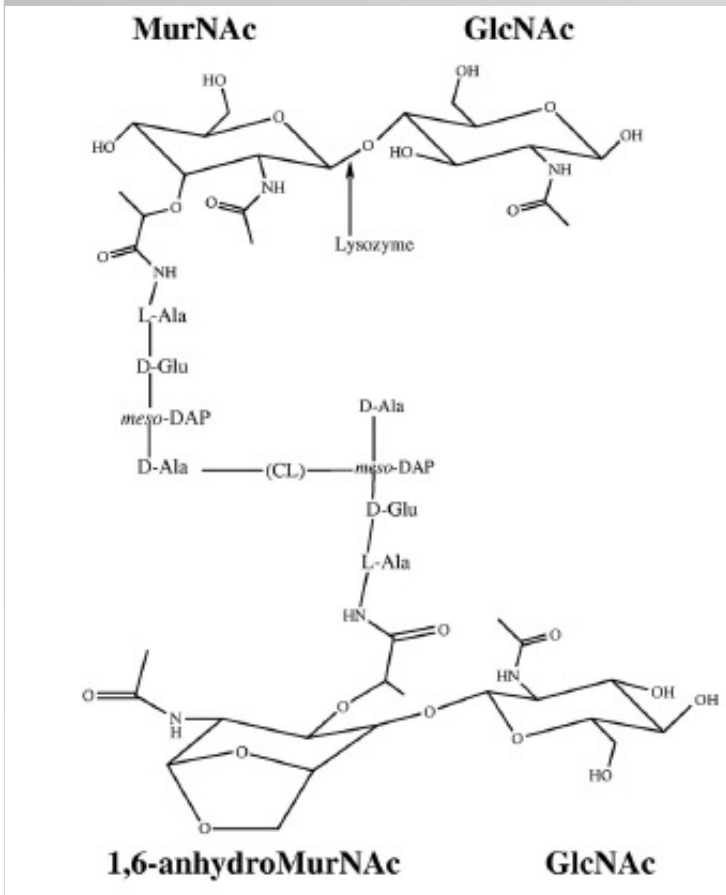
Il Peptidoglicano (PGN): le modificazioni

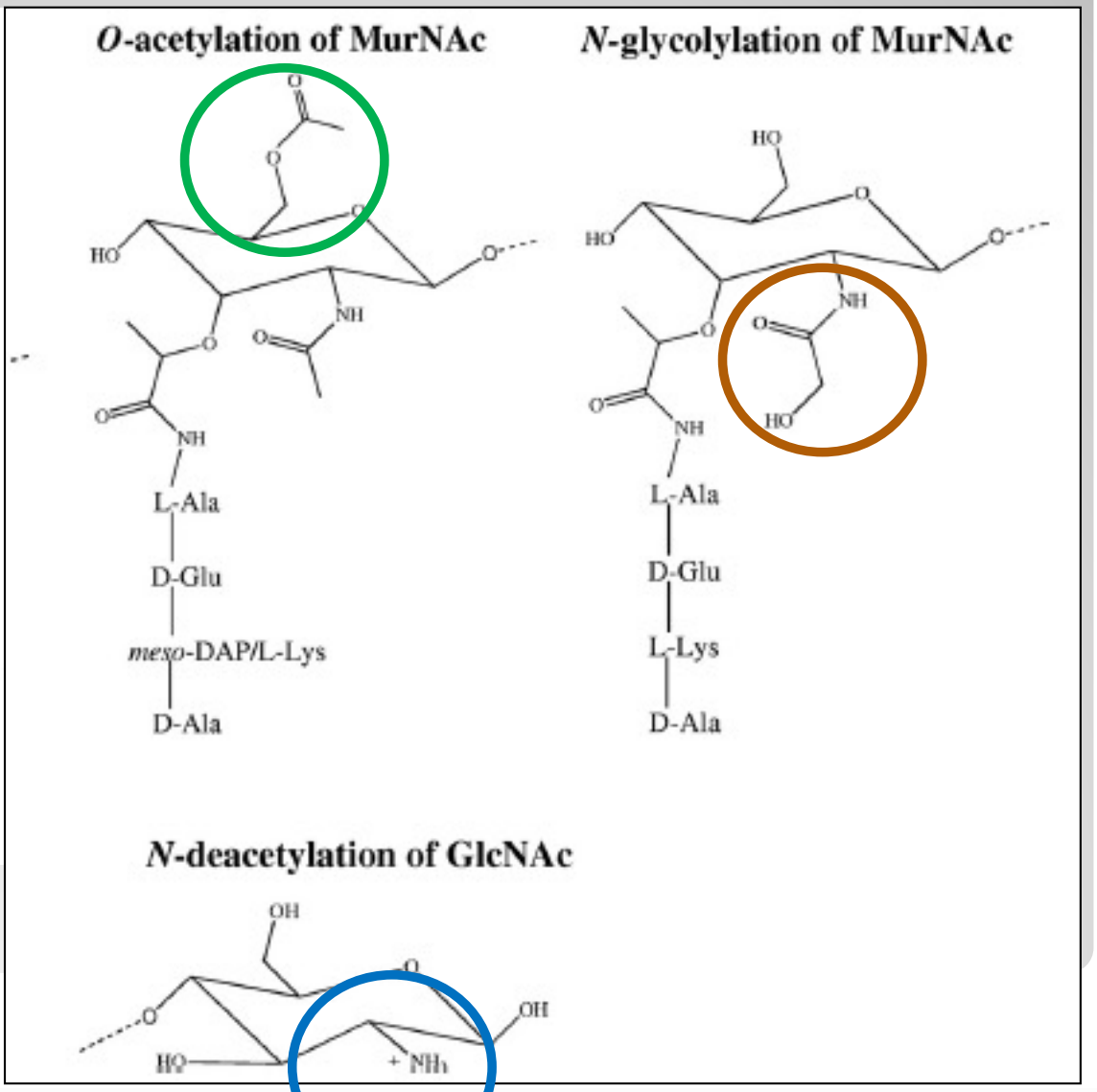
- Esistono numerose modificazioni del PGN, che si realizzano sia a carico dello scheletro glucidico, sia a livello della componente proteica.
  1. le modificazioni della componente saccaridica possono essere fatte rientrare nelle seguenti categorie: **deacetilazione**, **acetilazione**, **glicolilazione**

2. Le variazioni della **componente peptidica** (peptide stem) sono ascrivibili a due meccanismi:
   a) azione degli **enzimi Mur** (durante la biosintesi)
   b) fasi tardive della biosintesi: **amidazione**, **acetilazione**, **idrossilazione,** aggancio di **gruppi proteici**

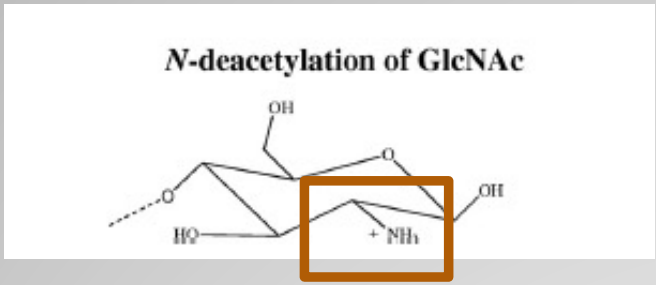
Le maggiori variazioni si osservano a livello dell'aminoacido in terza posizione!

Il Peptidoglicano (PGN): Modificazioni nella componente glicanica





Modificazioni nella componente glicanica [1]: la deacetilazione



- Osservata inizialmente in ceppi di *S. pneumoniae* **resistenti all'attività del lisozima**: una significativa proporzione dei residui di GlcNAC risulta deacetilata
- *B cereus, B. anthracis, L. monocytogenes, E. faecalis, H. pylori*
- In *S. pneuomniae* è stato identificato il gene responsabile di questa modifica: ***pgdA*** (peptidoglycan deacetilase A)
- PgdA appartiene a una superfamiglia di proteine: le esterasi saccardidiche di classe 4

Qual è il ruolo biologico della deacetilazione del PGN?

- La presenza di amminozuccheri deacetilati nella composizione del PGN riduce drasticamente l'attività del lisozima
- Lisozima: enzima con attività muramidasica ubiquitariamente presente nei liquidi corporei e nelle secrezioni, nei fagociti (granuli), cellule del Paneth