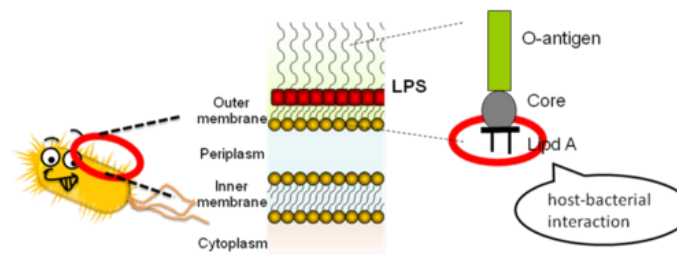
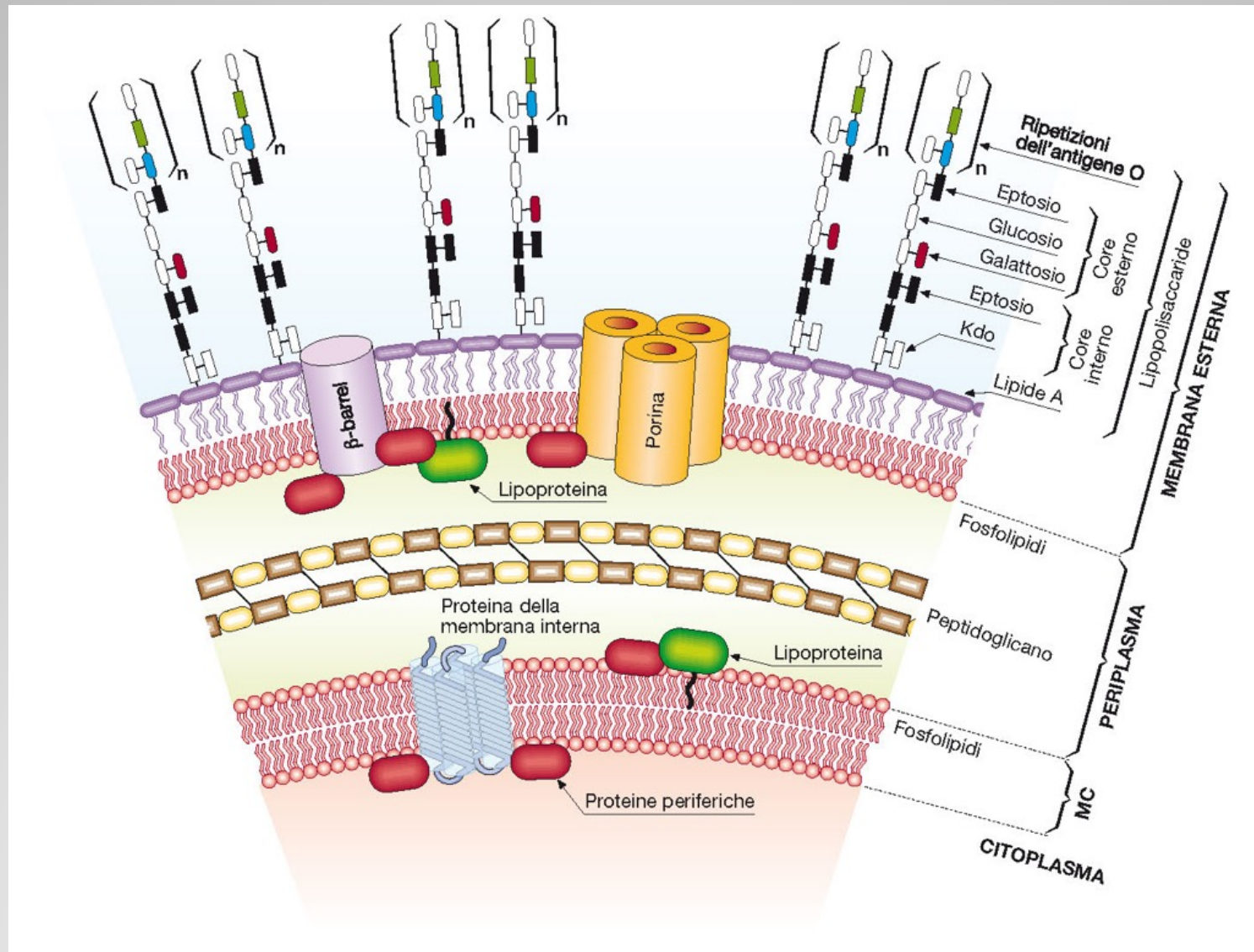


# Microbiologia e Virologia



lipopolisaccaride (LPS)



La membrana interna e quella esterna differiscono notevolmente per composizione e funzione.

(i) La componente lipidica della membrana interna (citoplasmatica) è composta esclusivamente da fosfolipidi, principalmente fosfatidiletanolamina (70-80%), fosfatidilglicerolo e cardiolipina, equamente distribuiti tra il lembo interno ed esterno. Al contrario, la membrana esterna è altamente asimmetrica, con il suo foglietto interno che mostra la stessa composizione lipidica della membrana citoplasmatica e il foglietto esterno costituito da lipopolisaccaridi (o lipooligosaccaridi nel caso di *Neisseria*).

(ii) Per quanto riguarda la funzione, la differenza principale è che la membrana esterna, è notevolmente più permeabile della membrana citoplasmatica per la presenza di proteine che formano dei pori (porine).

Le proteine costituiscono circa il 50% della membrana esterna e appartengono principalmente a 6 famiglie.

**Table 1.** Structural and functional features of prototype outer membrane proteins from *E. coli*.

Protein family	Small $\beta$ -barrel membrane anchors	Small $\beta$ -barrel membrane anchors	Membrane-integral enzymes	General (non-specific) porins	Substrate-specific porins	TonB-dependent receptors
Prototype protein	OmpA	OmpX	PldA (OMPLA)	OmpF	LamB	FhuA
Function	Physical linkage between OM and peptidoglycan	Neutralizing host defence mechanisms	Hydrolysis of phospholipids	Diffusion pore for ions and other small molecules	Maltose and maltodextrin uptake	Uptake of iron-siderophore complexes; signal transduction
Bacteriophages	K3, M1, O <sub>x</sub> 2, Tull*			K20	$\lambda$	T1, T5, $\phi$ 80, UC-1
Bacteriocins	Colicin K, colicin L			Colicin N		Colicin M, microcin 25
Oligomeric state	Monomer	Monomer	Monomer/dimer	Homotrimer	Homotrimer	Monomer
Domain structure	Two co-linear domains	One domain	One domain	One domain	One domain	Two interconnected domains
Size of the membrane domain	171 residues	148 residues	269 residues	340 residues	421 residues	714 residues
PDB code <sup>a</sup>	1BXW	1QJ8	1QD5	2OMF	1MAL	1BY3, 2FCP
Resolution	2.5 Å	1.9 Å	2.4 Å	2.4 Å	2.6 Å	2.5 Å
Number of transmembrane $\beta$ -strands, <i>n</i>	8	8	12	16	18	22
Shear number, <i>S</i>	10	8	16	20	22	24

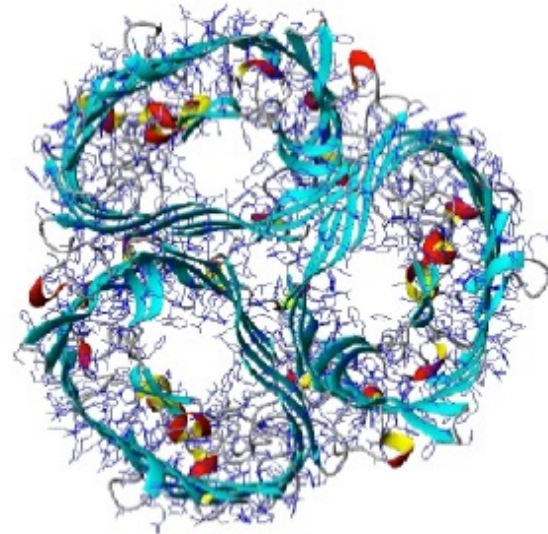
a. PDB code, Brookhaven Protein Data Bank accession code.

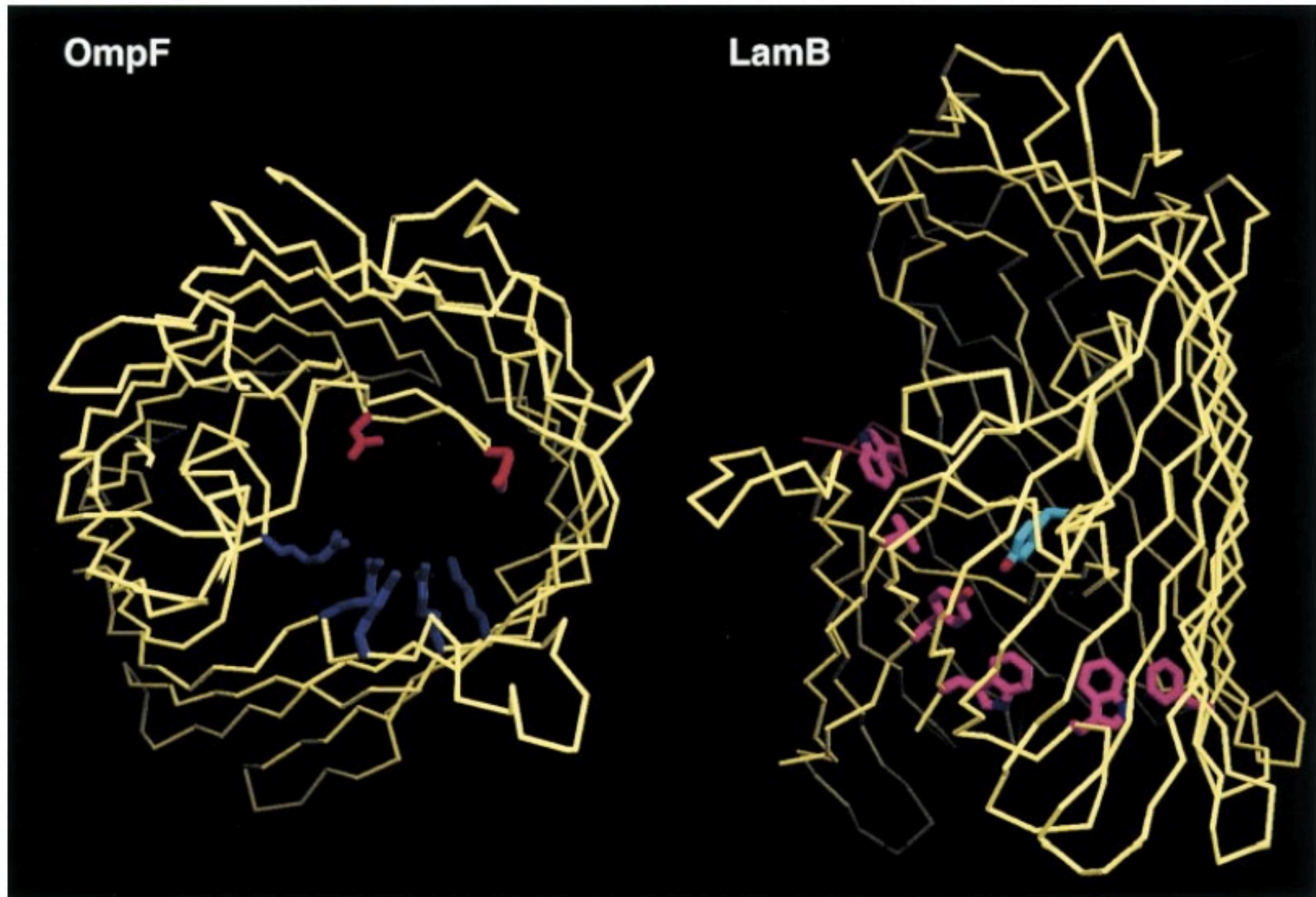


# LE PORINE-1

## PORINE:

- le più abbondanti c.a.  $10^5$ /cellula
- P.M. variabile (30-50 Kda);
- SONO ORAGANIZZATE A FORMARE DEI TRIMERI;
- SI OPPONGONO AL PASSAGGIO DELLE MOLECOLE IDROFOBICHE; SONO PERMEABILI ALLE MOLECOLE IDROFILICHE;
- Due TIPI:
  - **ASPECIFICHE**: selezionano solo in base alle dimensioni della molecola (piccole molecole idrofiliche < 600 Da) o, al massimo, per la carica - anioni o cationi-
  - **SPECIFICHE**: permettono il passaggio di 1 solo soluto o di pochi soluti strutturalmente simili (molecole idrofiliche più grosse: zuccheri, vitamine ecc.es: LamB di *E. coli*, specifica per le maltodestrine)

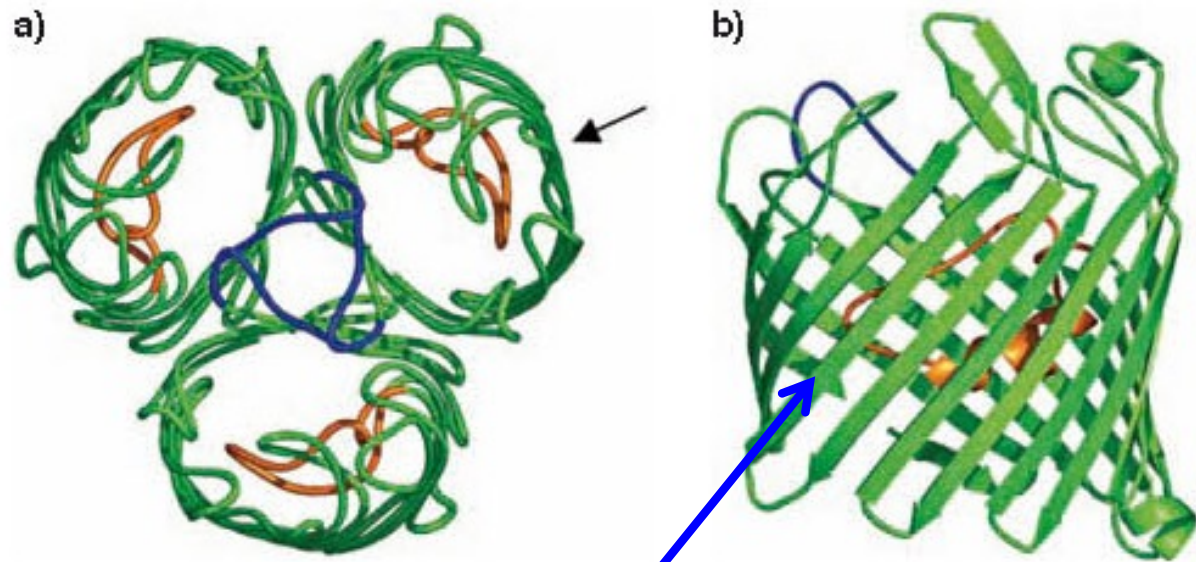




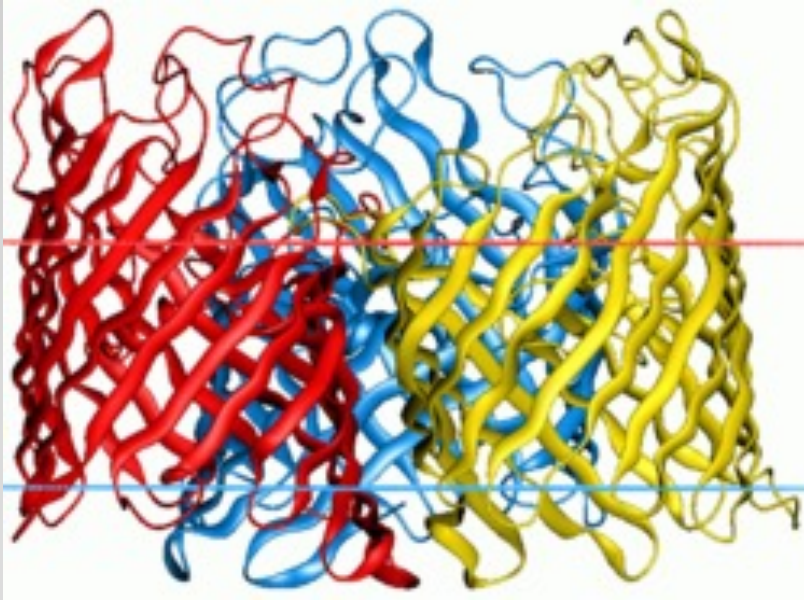
**Fig. 2.** Left: Constriction site of OmpF porin, as seen from the top of the outer membrane. The polypeptide backbone is shown in yellow. Side-chains of positively and negatively charged residues that are involved in the formation of a transverse electrostatic field are shown in blue (Lys-16, Arg-42, Arg-82, Arg-132) and red (Asp-113, Glu-117) respectively. Right: Side view of maltoporin. Aromatic residues that constitute the greasy slide (Trp-74 belonging to the adjacent monomer, Tyr-41, Tyr-6, Trp-420, Trp-358, Phe-227, from top to bottom) are shown in pink, and Tyr-118, which constricts the channel in LamB, is shown in blue.



La diffusione attraverso le porine avviene per gradiente di concentrazione in quanto non ci sono fonti di energia sulla ME.



Struttura a botte (beta barrel)

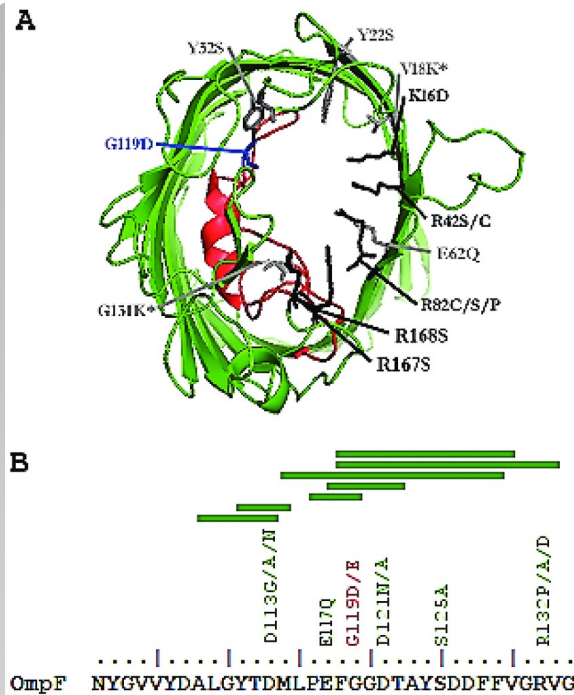


Le acquaporine che si trovano sulla MC non hanno una struttura a beta-barrel

- Due classiche porine aspecifiche di *Escherichia coli*- ma comuni alla maggioranza delle *Enterobacteriaceae*- sono **OmpC** ed **OmpF**.
- **OmpF** ha un canale con un diametro di circa 1.16 nm e consente il passaggio di molecole fino a 700 Da. Normalmente i soluti sono molecole prive di carica come monosaccaridi e disaccaridi.
- **OmpC** (60% di omologia con **OmpF**) ha un poro dal diametro leggermente più piccolo, circa 1.08 nm.

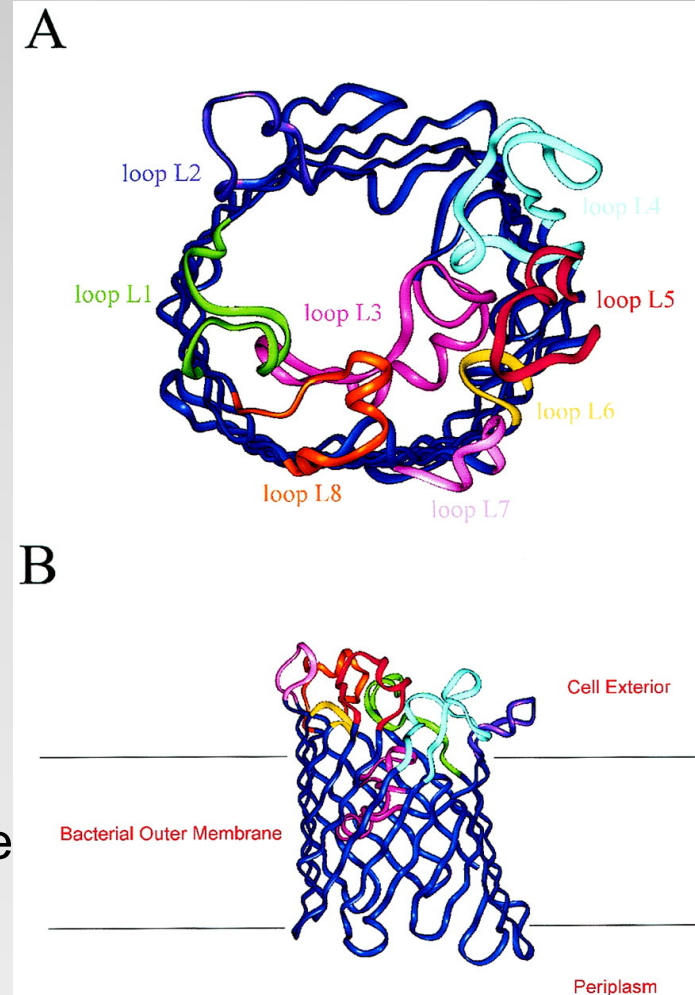


- **OmpC** e **OmpF** hanno una zona di costrizione vicino al centro del canale, formata dall'anello L3 ripiegato verso l'interno.
- In questa regione è presente un forte campo elettrico trasversale dovuto ai residui caricati negativamente sull'anello L3 e alle cariche positive sul lato opposto della parete che sono separate solo da una breve distanza.
- Le cariche principali in **OmpF** sono i residui caricati negativamente D113 ed E117 su L3, mentre quelli positivi sulla parete opposta del canale sono R42, R82 e R132. In **OmpC** quelli negativi sono D105 e E109, mentre i residui positivi sono R37, R74 e R124



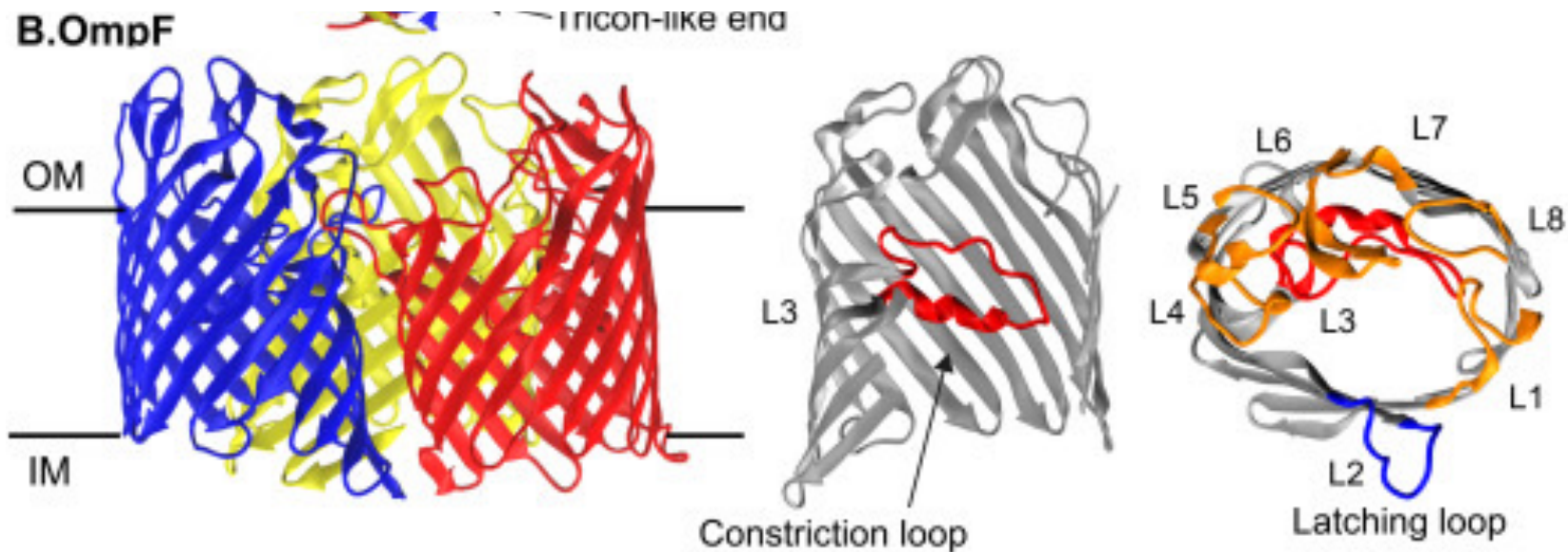
Un'altra differenza tra **OmpC** e **OmpF** risiede nei residui ionizzabili che determinano un diverso potenziale nella zona di costrizione del canali, il loop 3.

Differenze minori in questi residui hanno un forte impatto su proprietà cinetiche come la selettività e conduttanza del canale e sulla tensione e sul *gating* spontaneo che si genera.



- Un'altra differenza tra **OmpC** e **OmpF** risiede nei residui ionizzabili che determinano un diverso potenziale nella zona di costrizione del canali, il loop 3.
- Differenze minori in questi residui hanno un forte impatto su proprietà cinetiche come la selettività e conduttanza del canale e sulla tensione e sul *gating* spontaneo che si genera.

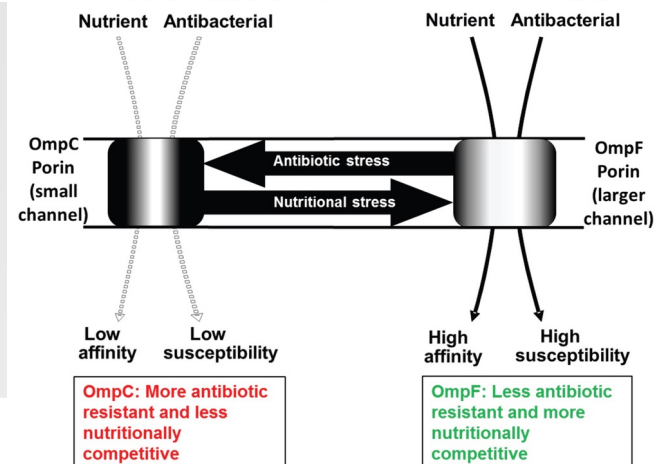
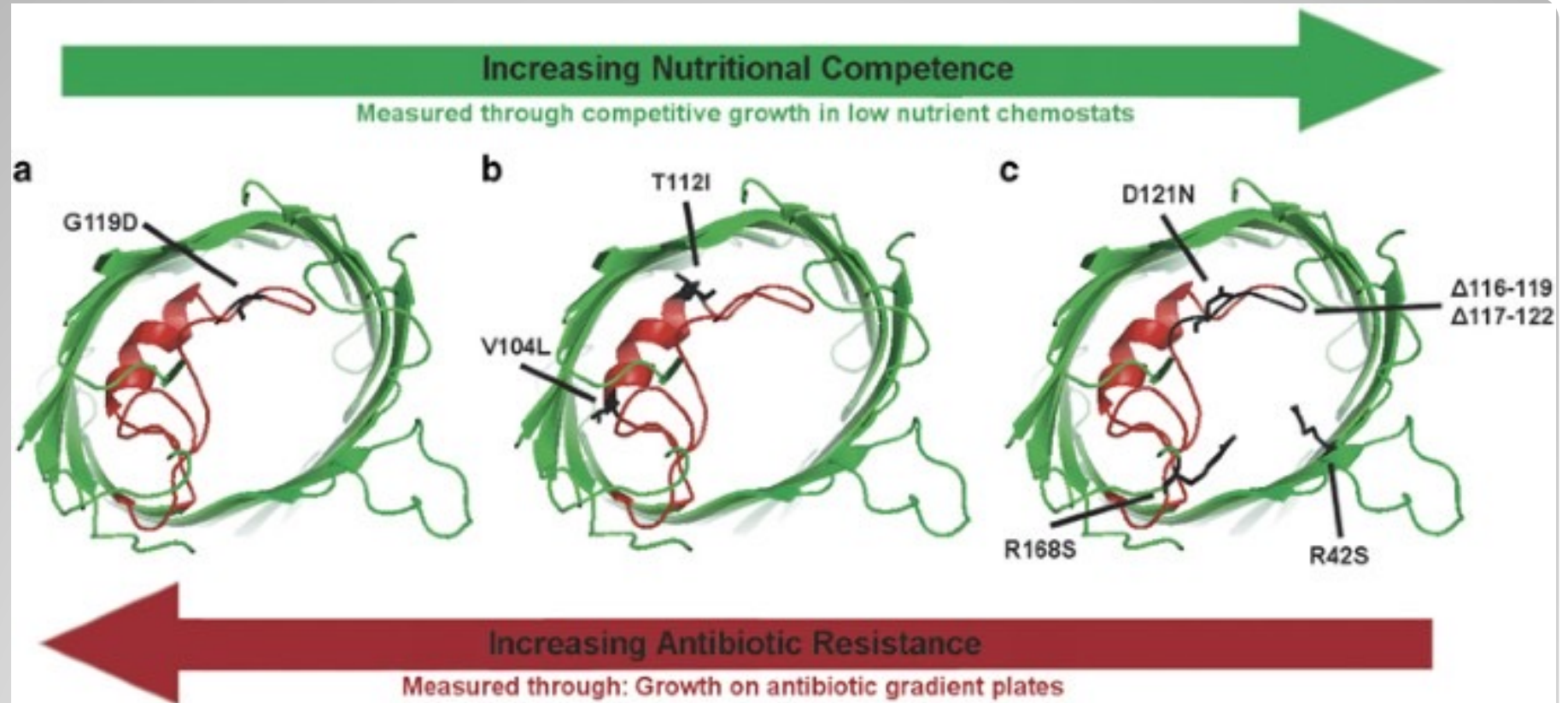




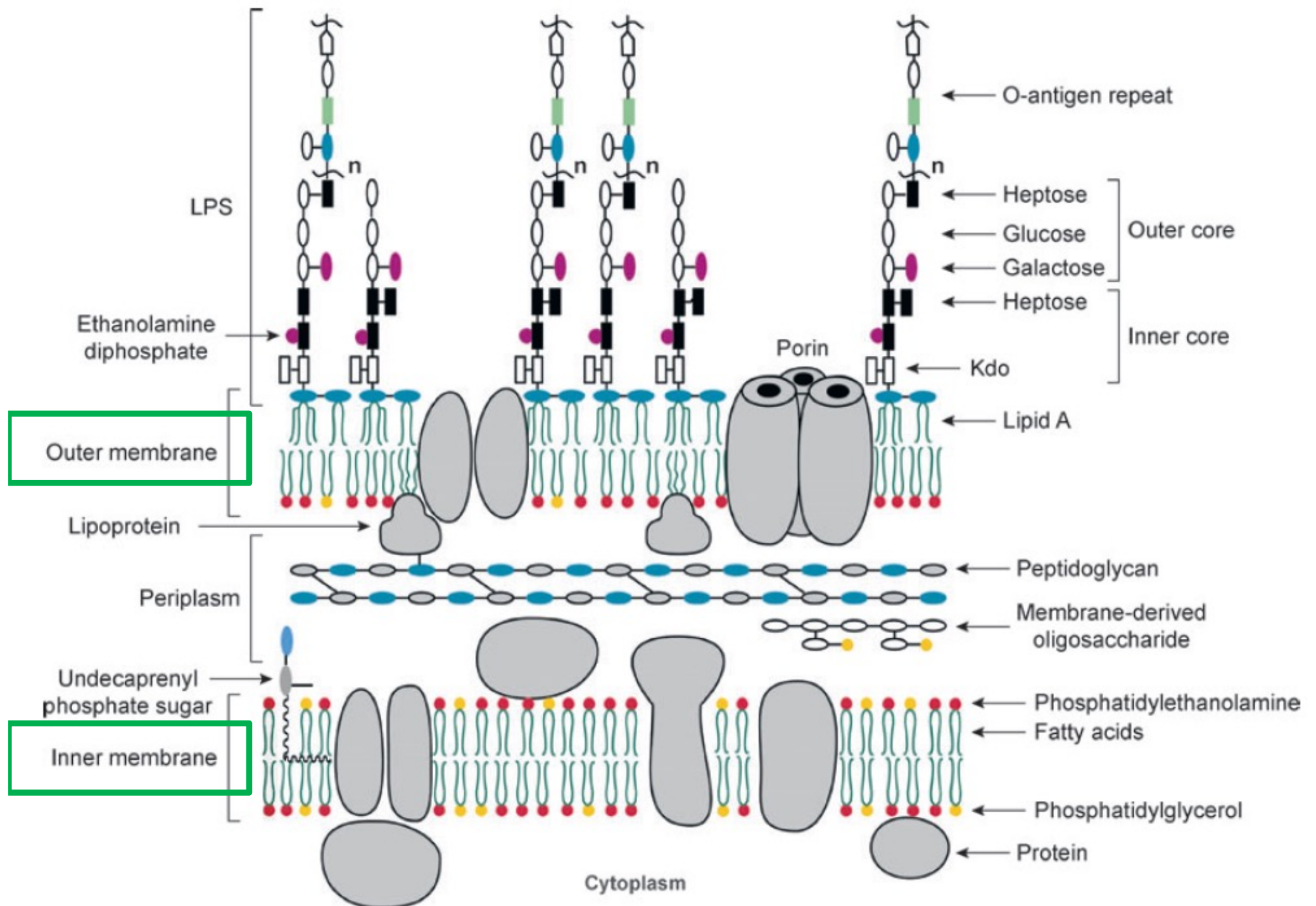
Un'altra differenza evidente risiede nella parete esterna dei pori che è formata dalle anse extracellulari in **OmpC** ma non in **OmpF**.

Gli anelli esterni (L1, L2, L4 – L8), che sono diversi nelle due porine, sono importanti rispetto al voltaggio o alla sensibilità al pH . La dimensione dei pori così come i siti di legame specifici giocano evidentemente un ruolo importante nella selettività e nell'assorbimento di antibiotici delle poliammine (blocco delle poliammine) o di altre molecole. La composizione dei lipidi circostanti, la plasticità della porina e il lipopolisaccaride potrebbero anche influenzare il comportamento della porina .

- E' noto che **OmpC** Inoltre favorisce maggiormente la diffusione di molecole leggermente cariche positivamente.
- La presenza delle 2 porine sulla membrana viene regolata dall'osmolarità.
- **PhoE** è invece una porina specifica che favorisce il passaggio degli anioni ed è specifica per il fosfato ed i suoi esteri dall'ambiente.







# L' LPS: un po' di storia [1]

## ✓ Klebs (1834-1913)

Postula l'esistenza di una **sostanza pirogena** in microrganismi da lui indicati come "*Microsporon septicum*" responsabili della maggior parte dei decessi dei militari.

## ✓ Panum (1820-1885)

Ipotizza l'esistenza di una **tossina pirogena**, nel materiale in putrefazione, non volatile, **resistente al calore** e solubile in acqua.

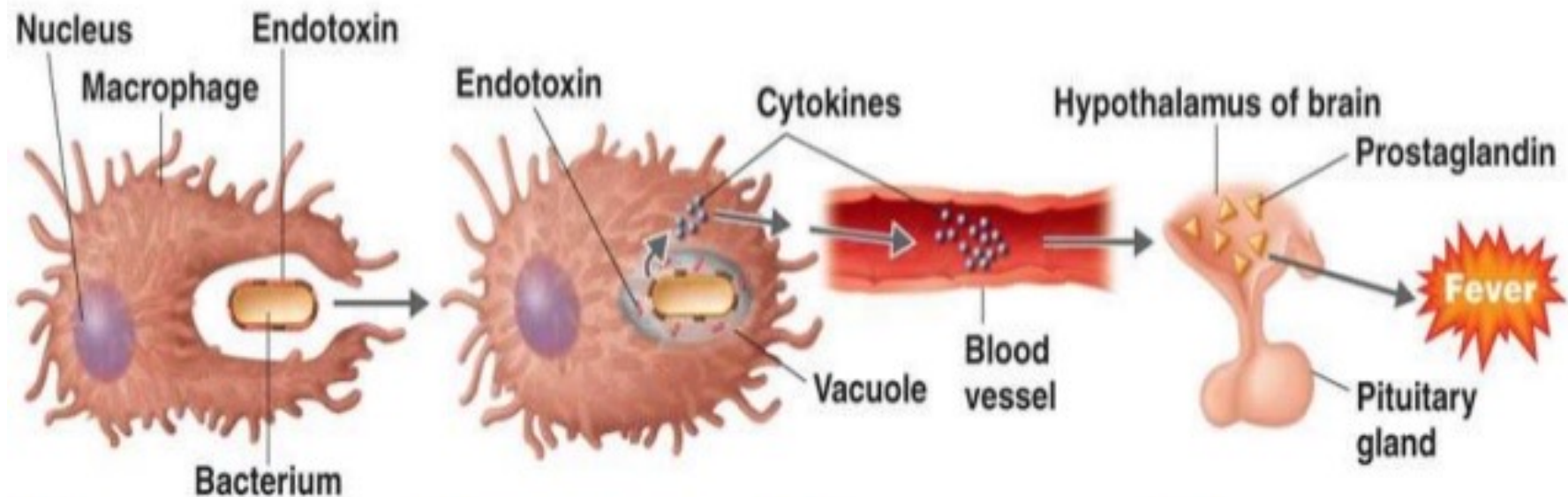
## L' LPS: un po' di storia [2]

✓ Richard Pfeiffer (1858–1910)

Lisati di batteri precedentemente uccisi al calore (*V. cholerae*) erano in grado di indurre una reazione di shock tossico quando somministrati nel modello del guinea pig.



# Mechanism of Endotoxin activity



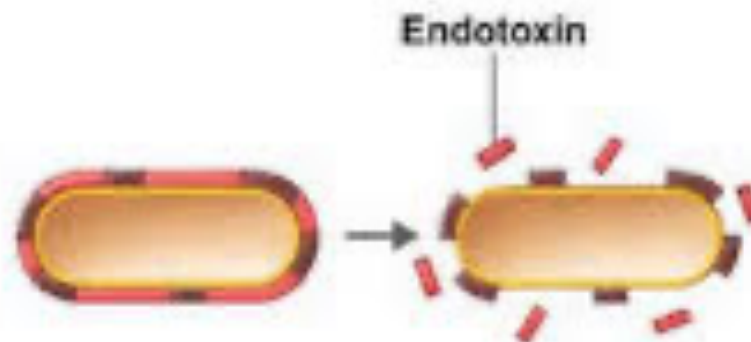
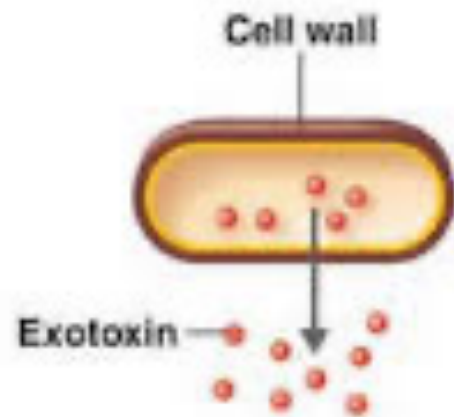
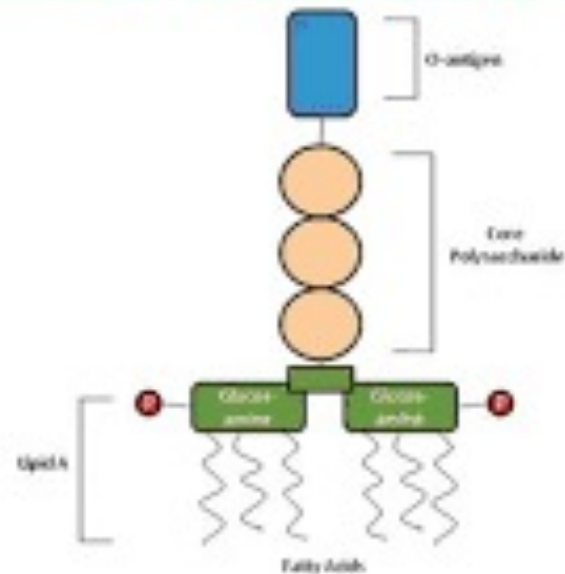
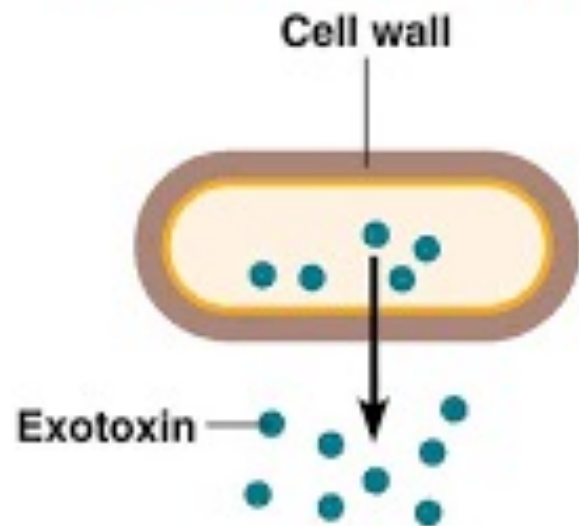
**1** A macrophage ingests a gram-negative bacterium.

**2** The bacterium is degraded in a vacuole, releasing endotoxins that induce the macrophage to produce cytokines IL-1 and TNF- $\alpha$ .

**3** The cytokines are released into the bloodstream by the macrophages, through which they travel to the hypothalamus of the brain.

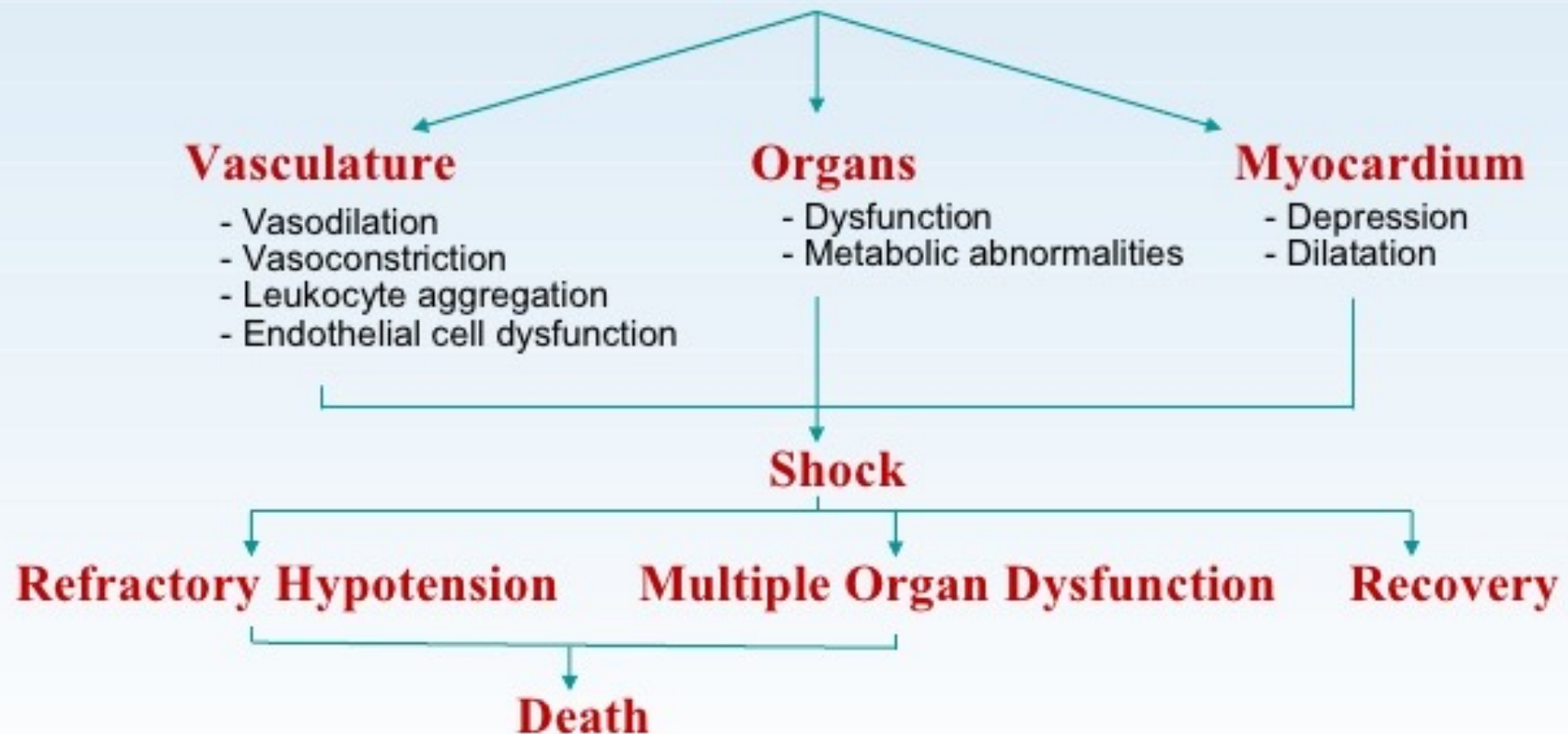
**4** The cytokines induce the hypothalamus to produce prostaglandins, which reset the body's "thermostat" to a higher temperature, producing fever.

# EXOTOXINS VS ENDOTOXINS



# Pathogenesis of Septic Shock

## Cellular Dysfunction





# MECCANISMI D' AZIONE DELLE ENDOTOSSINE

ENDOTOSSINA (LPS)

MACROFAGO (CD14)

## PROTEINE

fattore di necrosi tumorale

IL-1

IL-6

IL-8

## RADICALI LIBERI

Ossigeno ( $O_2$ )

Perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ )

Ossido di azoto (NO)

## LIPIDI

Prostaglandina  $E_2$

Trombassano  $A_2$

Fattore di attivazione  
delle piastrine

*Se i livelli di mediatore sono bassi*

*Se i mediatori sono prodotti in eccesso*

## EFFETTI BENEFICI

Febbre moderata

Stimolazione generale del sistema immunitario

Soppressione dei microrganismi patogeni

## EFFETTI DANNOSI

Febbre elevata

Ipotensione (abbassamento della pressione sanguigna)

Coagulazione ematica disseminata

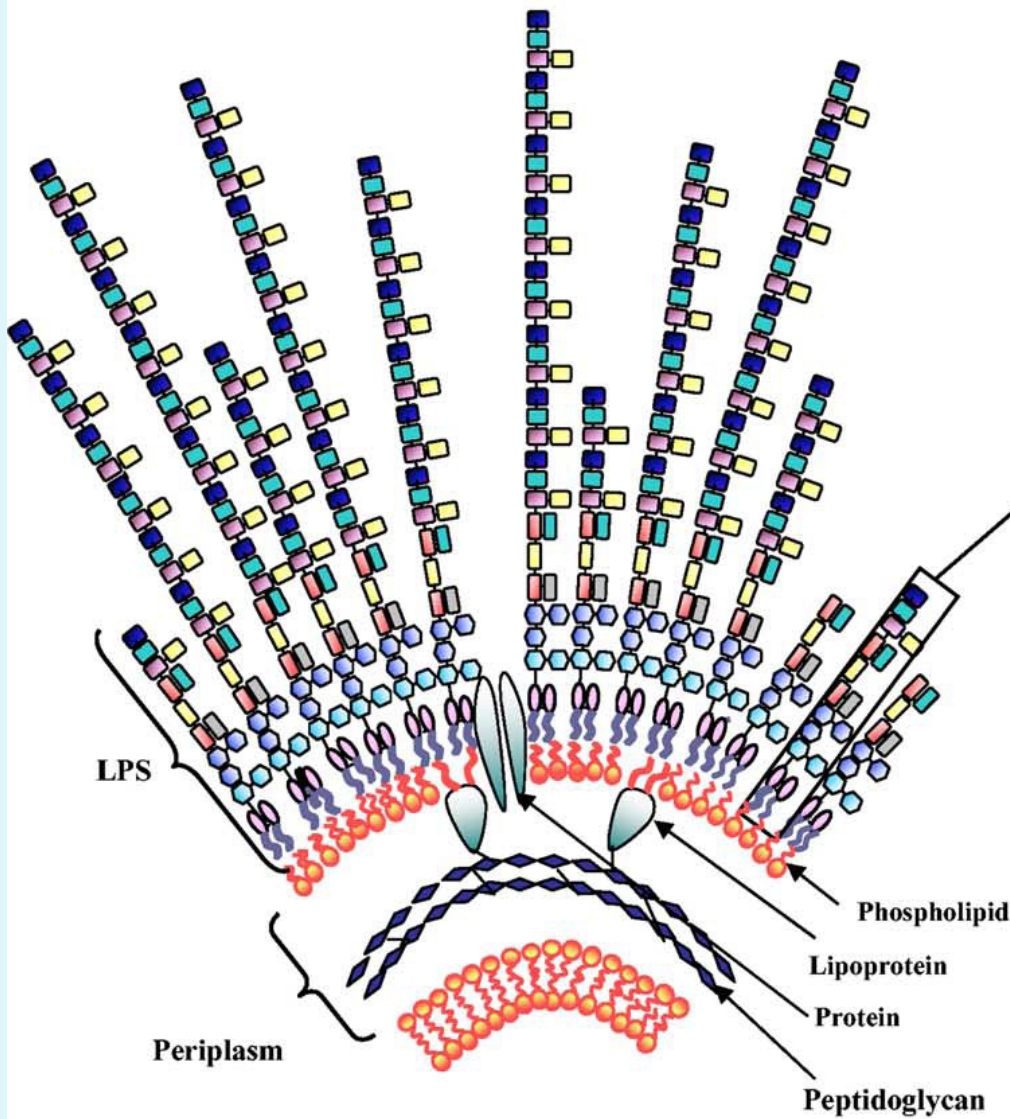
Shock letale

# L' LPS: generalità

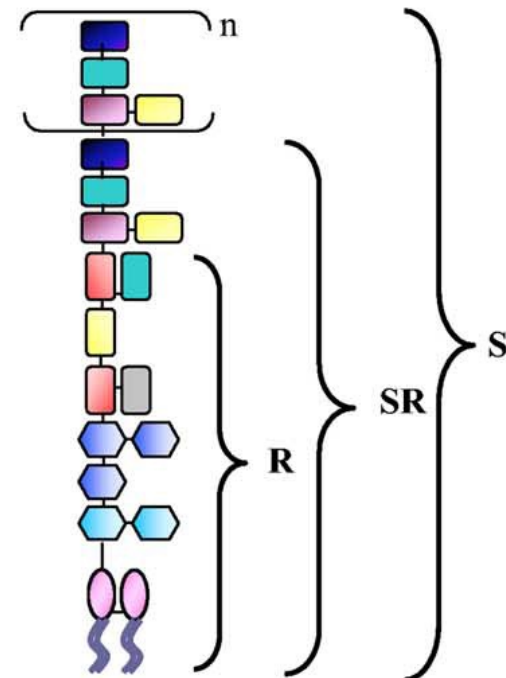
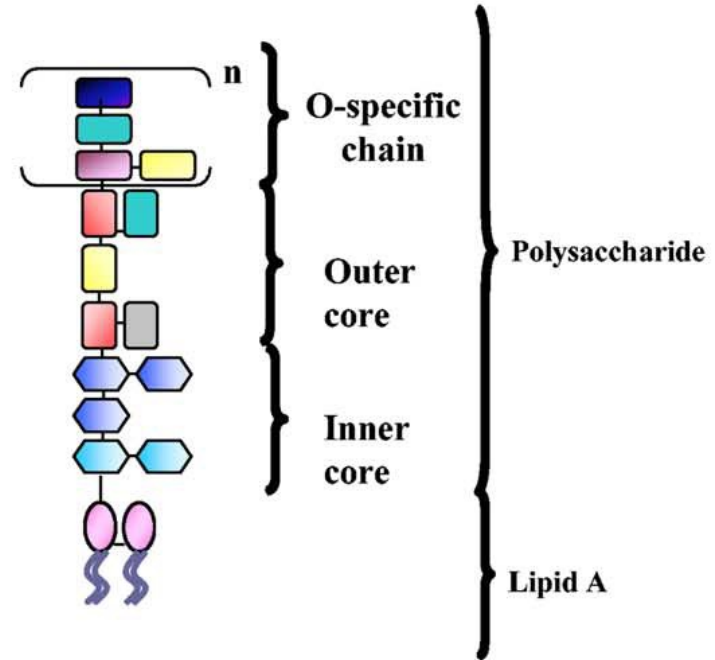
- ✓ **Endotossine** (per distinguerle dalle esotossine)
- ✓ Molecole anfifiliche stabili al calore (massa di 10 kDa)
- ✓ Componente essenziale della membrana esterna di batteri Gram-negativi, commensali e patogeni:

*E. coli*, *S. typhimurium*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *B. pertussis*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*, *K. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. trachomatis*

- ✓ **Diverse specie del genere *Sphingomonas* non possiedono LPS ma glicosfingolipidi (GSL)**



## Lipopolysaccharide

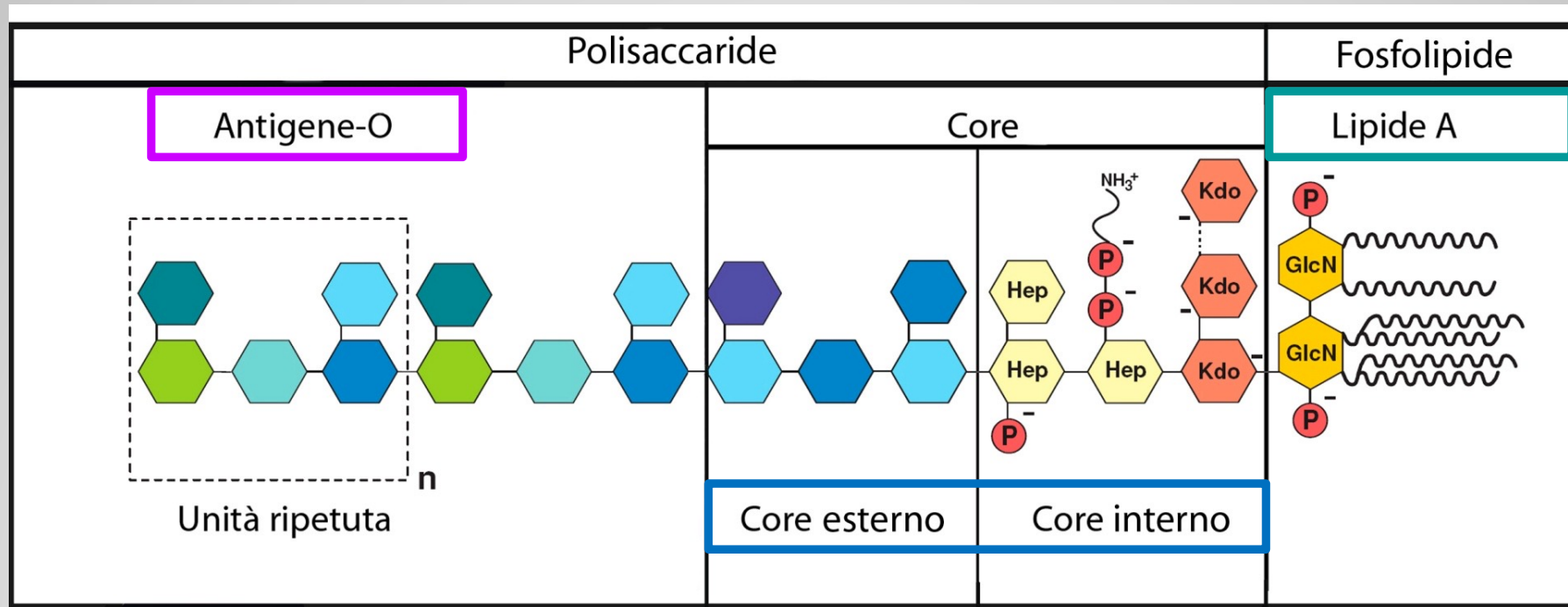


# L' LPS: la struttura [1]

- ✓ Regione lipofila, il Lipide A
- ✓ Regione oligo/polisaccaridica idrofila legata covalentemente

## Porzione oligo/polisaccaridica

## Lipide A



- ✓ Stabilizzazione delle molecole di LPS mediante il legame con cationi divalenti
  - ✓ Funzione di barriera impermeabile
- (Polimixine, poliamine, peptidi e proteine cationiche, agenti chelanti [EDTA])

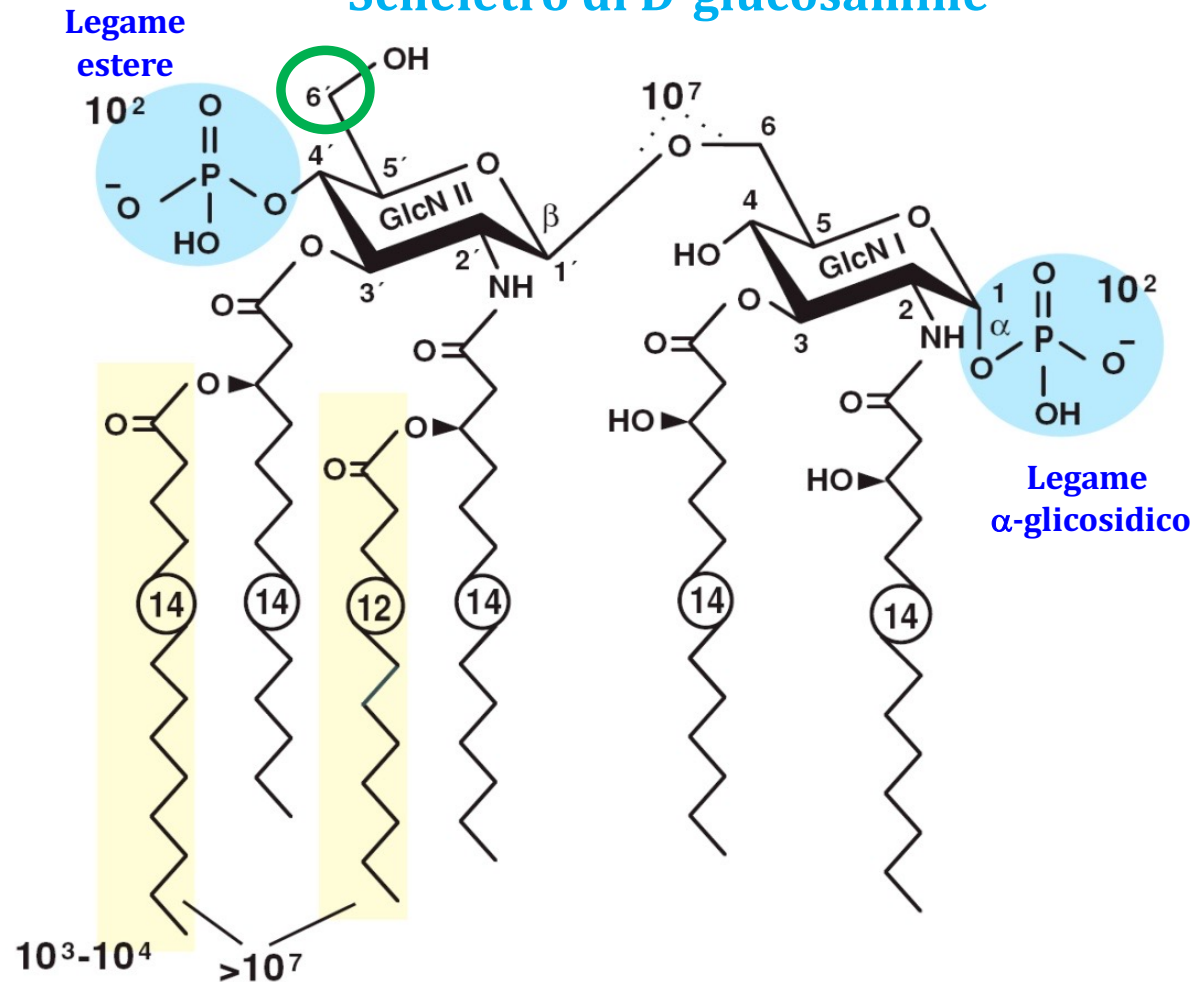


## L' LPS: la struttura [2]

- ✓ In *E. coli* sono presenti circa  $3 \times 10^6$  molecole di LPS (4,9 mm<sup>2</sup> vs 6,7 mm<sup>2</sup>)
- ✓ Principale componente della membrana (45 %); il 75 % della superficie della membrana esterna è occupato dall' LPS
- ✓ I lipopolisaccaridi tendono a formare aggregati
- ✓ L' architettura strutturale dell' LPS è molto conservata e comparabile nell' ambito delle *Enterobacteriaceae* (*Salmonella* spp., *E. coli*, *Shigella*)
- ✓ In questo modulo comune si ritrovano varianti strutturali:
  1. **Diversità nella composizione chimica della regione polisaccaridica**
  2. **Diversità nella struttura del Lipide A**

# Lipide A: struttura delle *Enterobacteriaceae*

## Scheletro di D-glucosamine



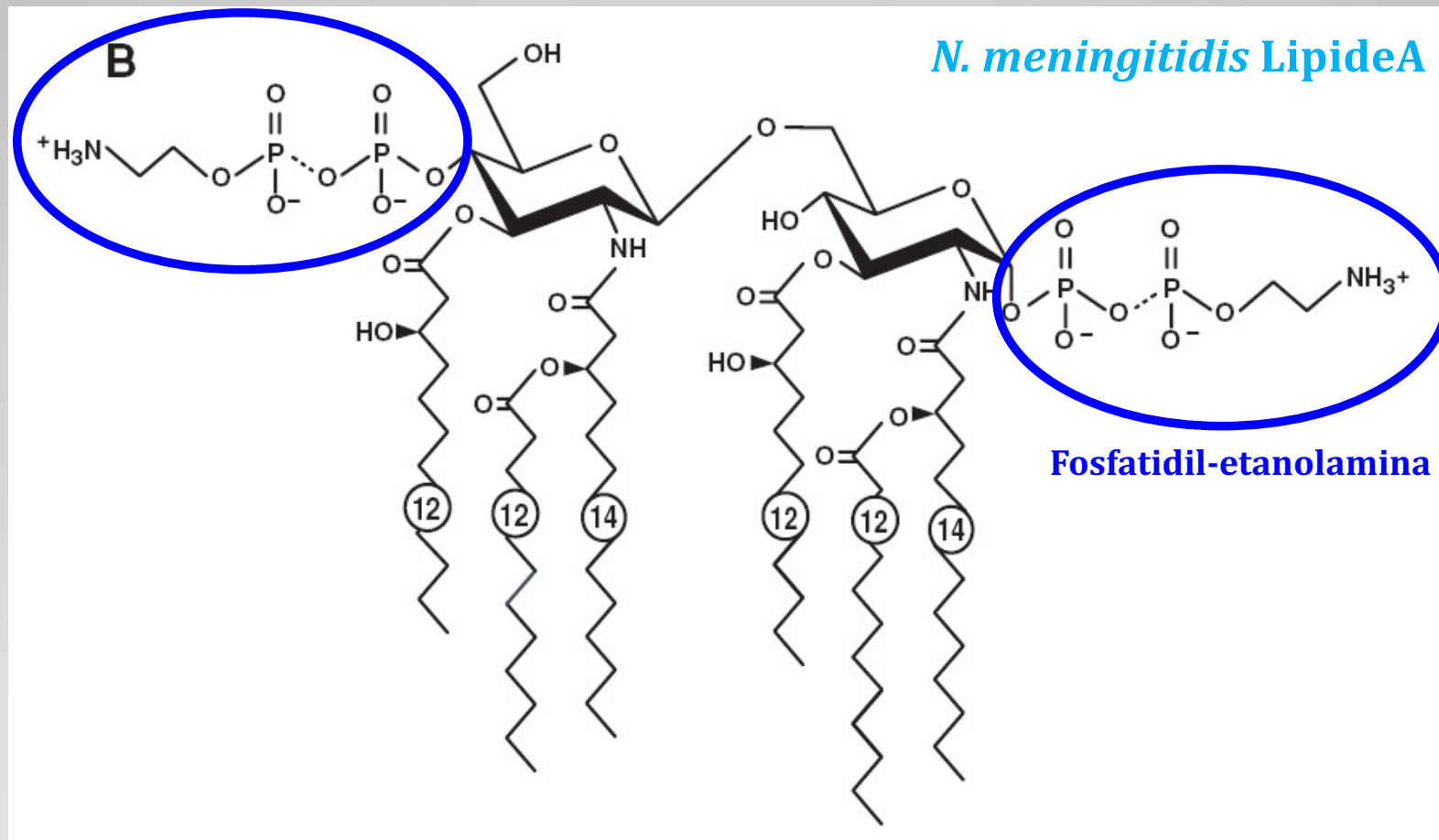
- lo scheletro è costituito da un disaccaride con legame β,1-6

- sono presenti due gruppi fosforici (solitamente il Lipide A è monofosforilato)

- sono presenti fino a 4 catene aciliche che a loro volta possono essere sostituite da ulteriori acidi grassi → **fino a 7 sostituenti acidi**

Posizione di attacco della regione polisaccaridica

# Lipide A: variazioni nei gruppi fosforici



Le principali sostituzioni presenti nel Lipide A nelle posizioni 1 e 4'i sono:

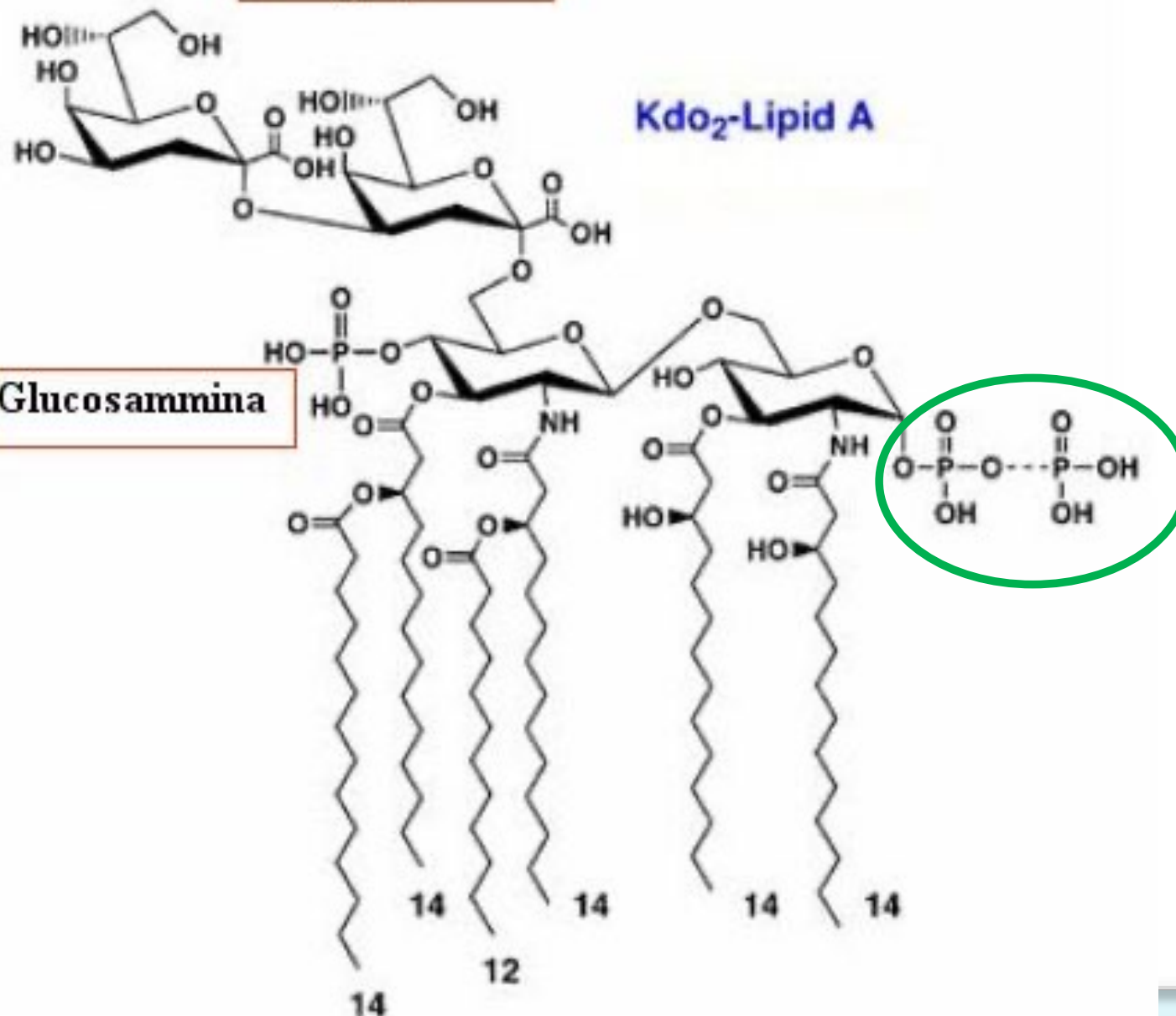
1. Gruppi **pirofosforici** (PP),
2. **etilamina, etanolamina, difosfoetanolamina**
3. **Residui saccaridici: L-arabinosio; L,D-glicero-D-manno-eptosio; acido D-galatturonico**

# L'endotossina (Lipide A) di *E. coli* K12

Kdo<sub>2</sub>-lipide A

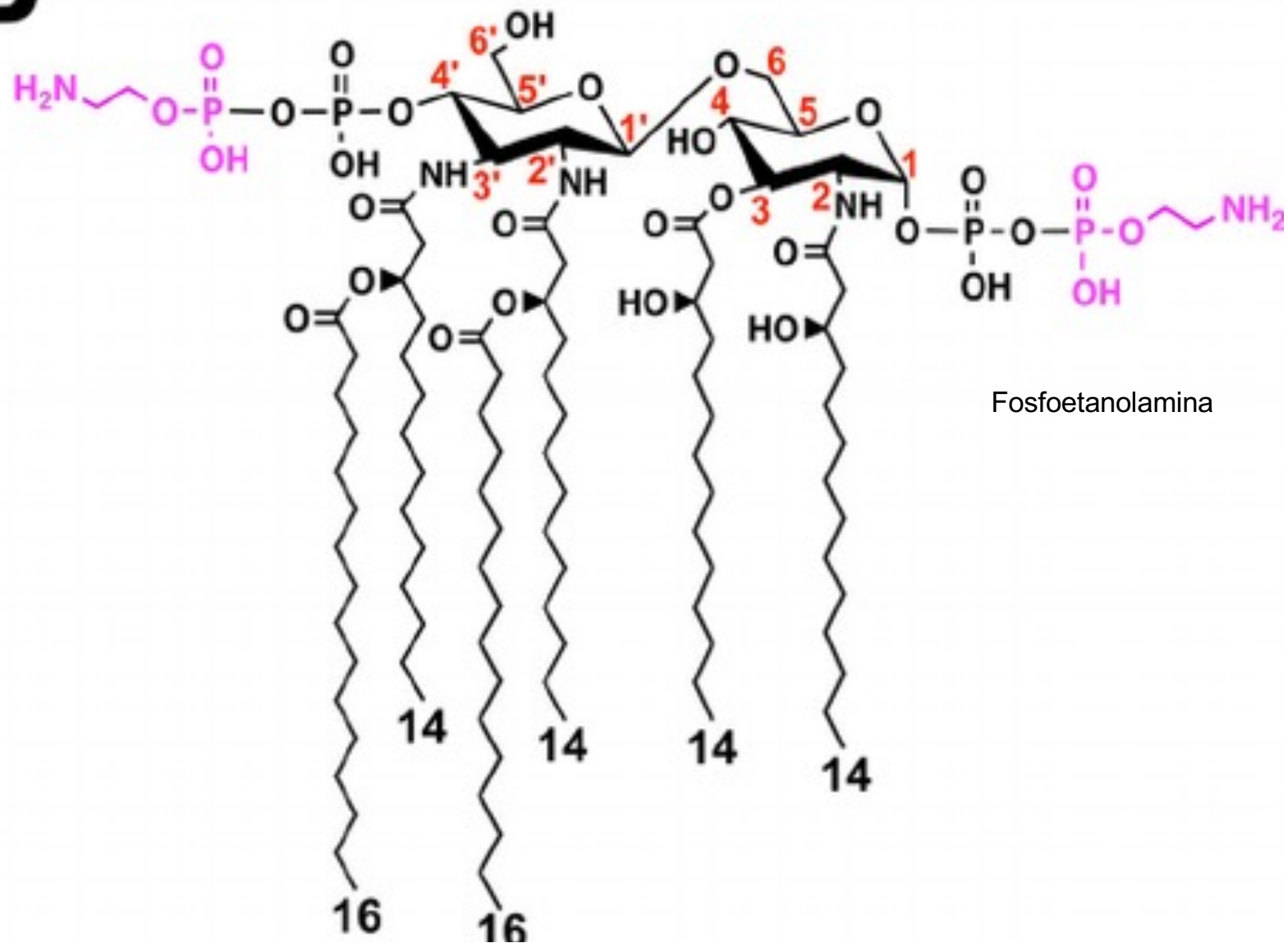
Kdo<sub>2</sub>-Lipid A

Glucosammina





**B**



*Campylobacter jejuni*

## Lipide A: acilazione

- ✓ Il lipide A di *E. coli* viene generalmente riportato come **esa-acilato**; in quantità più o meno variabili anche le specie **penta e tetracilate**.
- ✓ Gli acidi grassi principali hanno un numero di atomi di carbonio compresi tra C10 e C16  
**C18 e C21 in *H. pylori* e *C. trachomatis***
- ✓ Il numero di catene aciliche varia considerevolmente e ha un effetto diretto sulla tossicità dell' LPS
- ✓ Gli acidi grassi idrossilati sono legati allo scheletro glucidico mediante legami esterici o amidici in posizione 2 e 2' e 3 e 3'

# Lipide A: variazioni del *pattern* di acilazione

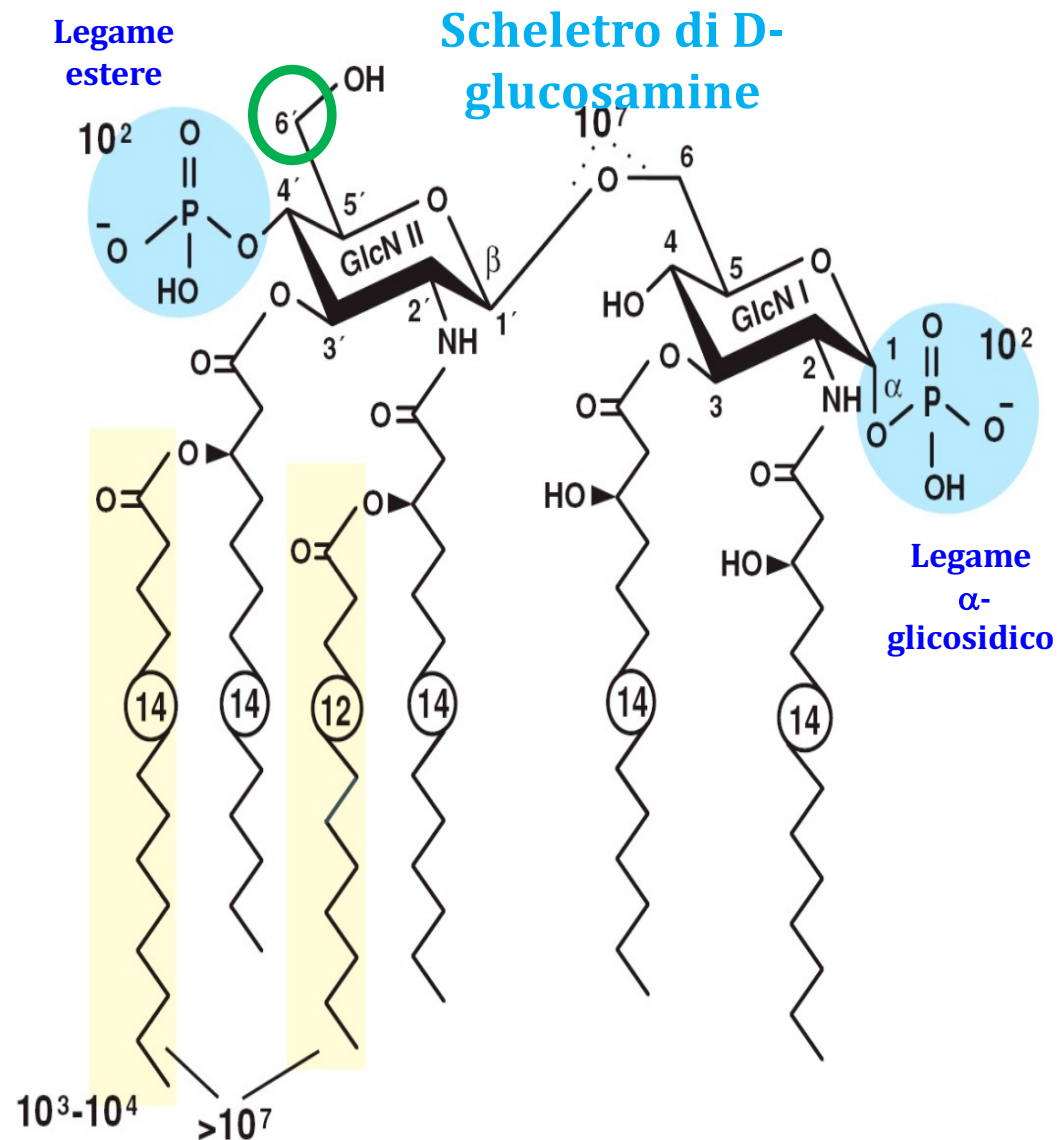
Le principali variazioni riguardano:

1. Il numero delle catene di acidi grassi

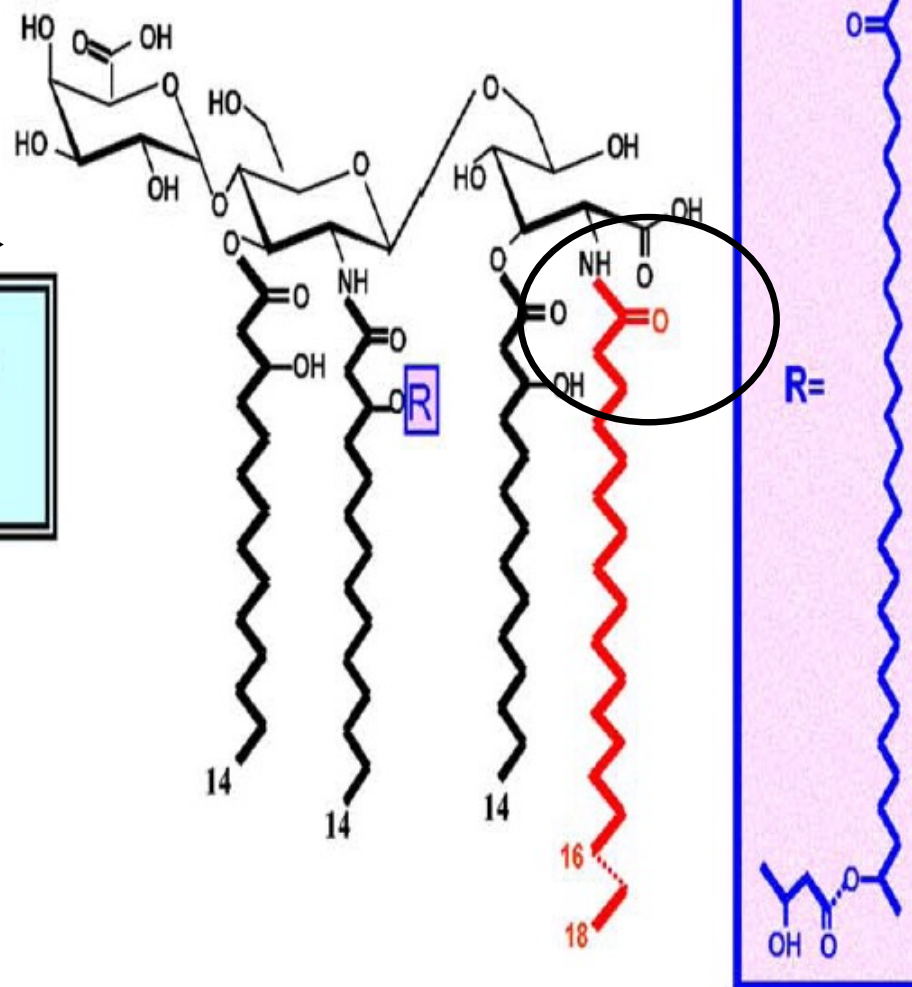
2. La posizione relativa delle catene di acidi grassi

1. La natura dei gruppi acilici

- acido miristico (C14)
- acido palmitico (C16)
- acido stearico (C18)
- acido laurico (C12)



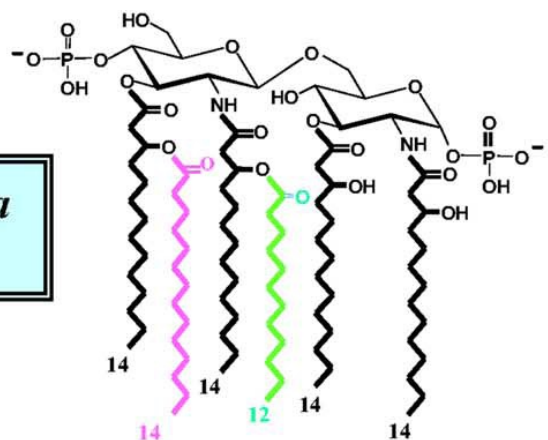
Acido galatturonico



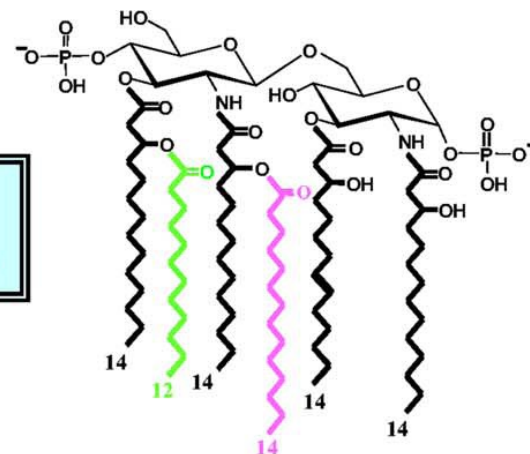
b-idrossibutirrato al  
C27



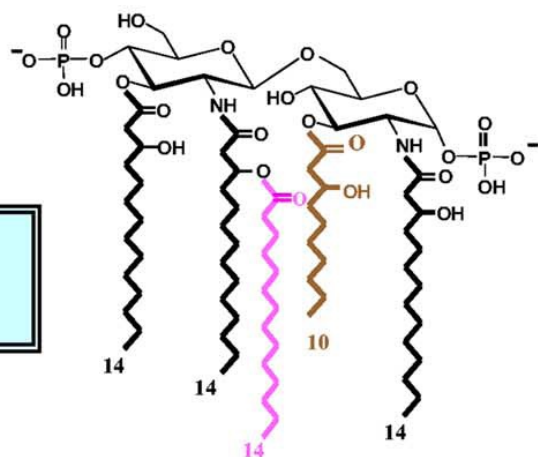
*Escherichia coli*



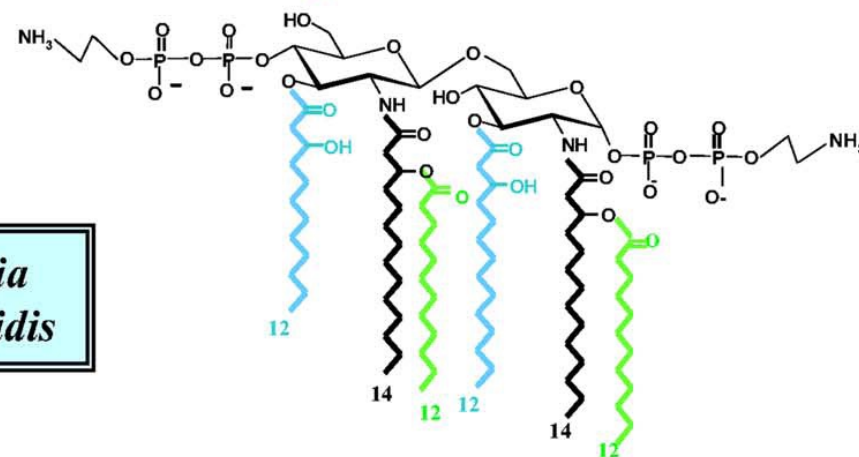
*Yersinia enterocolitica*



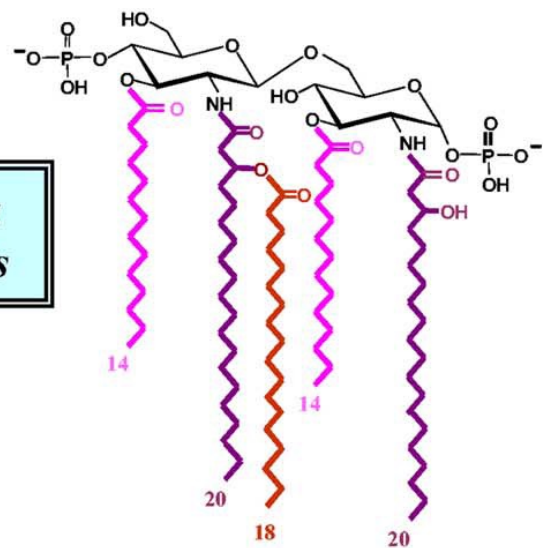
*Bordetella pertussis*



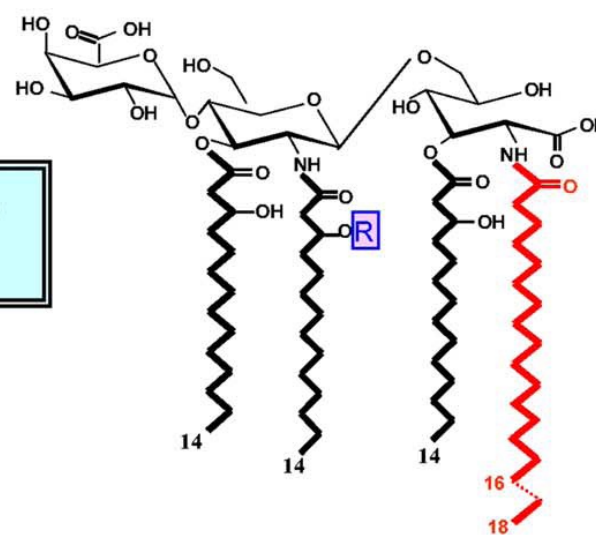
*Neisseria meningitidis*



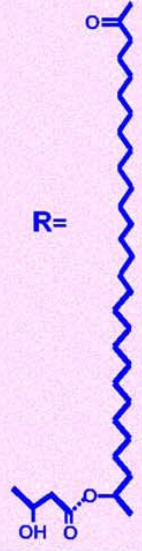
*Chlamydia trachomatis*



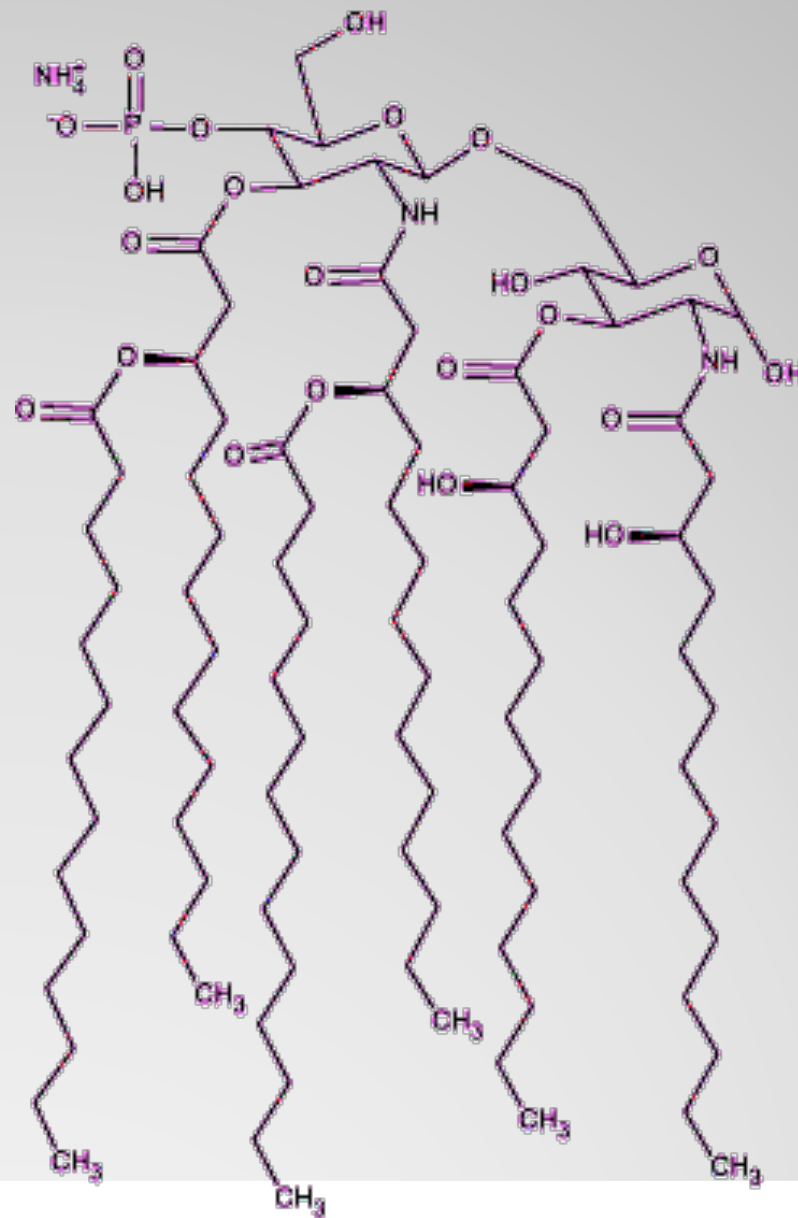
*Rhizobium etli*



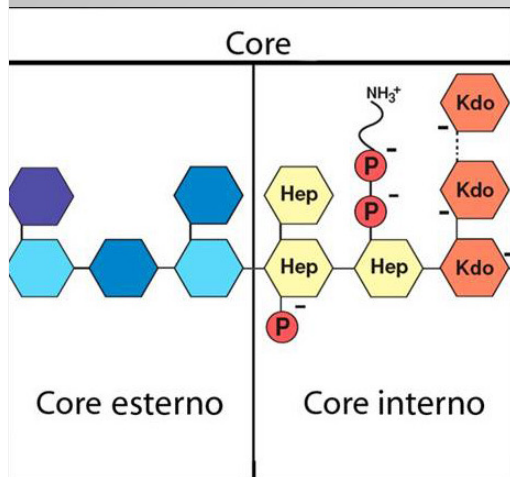
R=



# MONOFOSFORIL LIPIDE A (MPLA): UN ADIUVANTE PER VACCINI AD USO UMANO



# La regione del “Core” [1]



1. Sulla base della composizione in zuccheri (monosaccaridi) nelle *Enterobacteriaceae* si distinguono:

**CORE ESTERNO**

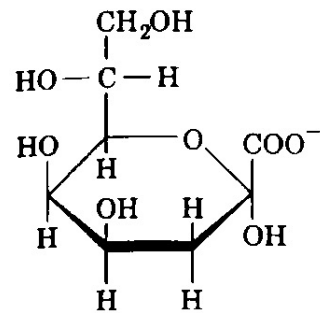
**CORE INTERNO**

2. **Core esterno:** consiste prevalentemente di **ESOSI** (D-glucosio, D-galattosio, D-glucosamina, N-acetilglucosamina, N-acetilgalattosamina)

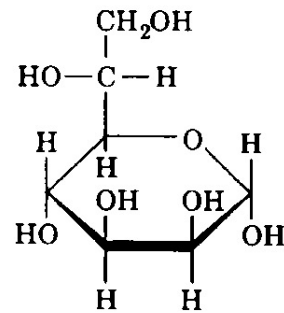
**Il numero delle unità può variare da 8 a 12**

3. **Core interno:** presenza di un caratteristico monosaccaride, il **Kdo** (acido 3-deossi-D-manno-octolussonico)

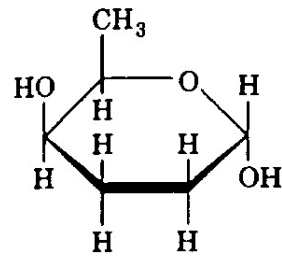
Gli eptosi del core interno possono essere sostituiti con gruppi fosforici, pirofosforici, e fosforiletanolamina (*Salmonella* spp., *Shigella*, *E. coli*)



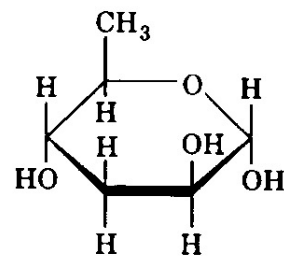
**2-Keto-3-deoxyoctanoate  
(KDO)**



**L-Glycero-D-manoheptose**



**Abequose  
(Abe)**



**Tyvelose**

The lipopolysaccharide core oligosaccharide frequently, but not always, contains unusual sugars such as heptose and KDO.



## Alcune eccezioni

- *Francisella tularensis*

Manca completamente degli eptosi del core interno; il solo residuo di Kdo presente è legato a un disaccaride di mannosio

- *Legionella pneumophila*

Come per *F. tularensis* non vi sono eptosi ma residui di mannosio

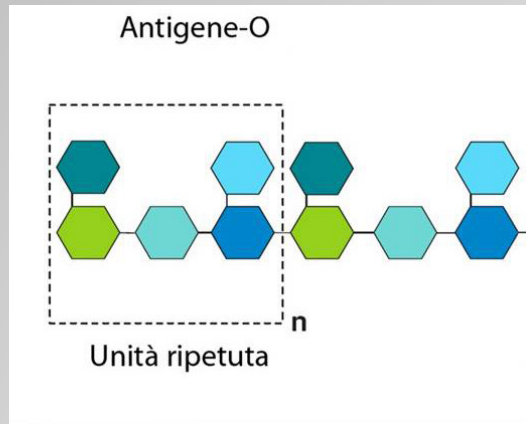
....e ancora *Acinetobacter*, *Chlamydia*, *Moraxella*, *Rhizobium*

**La regione minima dell' LPS richiesta è costituita dal lipide A e da due unità di Kdo**

## La regione del “Core”

La presenza del Kdo e dei residui di eptosio è stata (e tuttora è in uso) considerata un **marker** di identificazione dell' LPS. Nella clinica rappresenta un importante marker diagnostico per il rilevamento delle infezioni da parte di batteri Gram negativi.

## L' antigene somatico o Antigene-O [1]



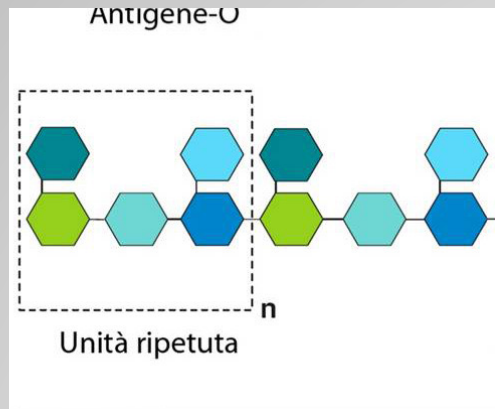
1. L' antigene somatico è la regione dell' LPS che entra a diretto contatto con le membrane dell' ospite
2. Regione fortemente antigenica; la caratterizzazione della composizione in zuccheri rappresenta la base per una classificazione sierologica dei diversi **sierotipi**
3. Rappresenta una sorta di **fingerprint** del batterio.
4. Queste catene saccaridiche aiutano il batterio a sfuggire all' azione litica da parte delle molecole del complemento, in un processo che viene definito “**shielding**”.
5. Proteggono la cellula batterica dall' azione di numerosi antibiotici
6. Possono funzionare anche come importanti sistemi di adesione (*Acinetobacillus pleuropneumoniae*).

<https://www.youtube.com/watch?v=WsCc5JVU98g>



# L' antigene somatico o Antigene-O [2]

➤ 50 unità oligosaccaridiche ripetute costituite da 2-8 monosaccaridi variabili



➤ Si conoscono almeno 20 residui saccaridici che possono entrare nella composizione dell' O-chain, molti dei quali presentano caratteristiche uniche (dideossi-esosi): colitosio, paratosio...

➤ Estrema variabilità nella composizione anche all'interno della stessa specie

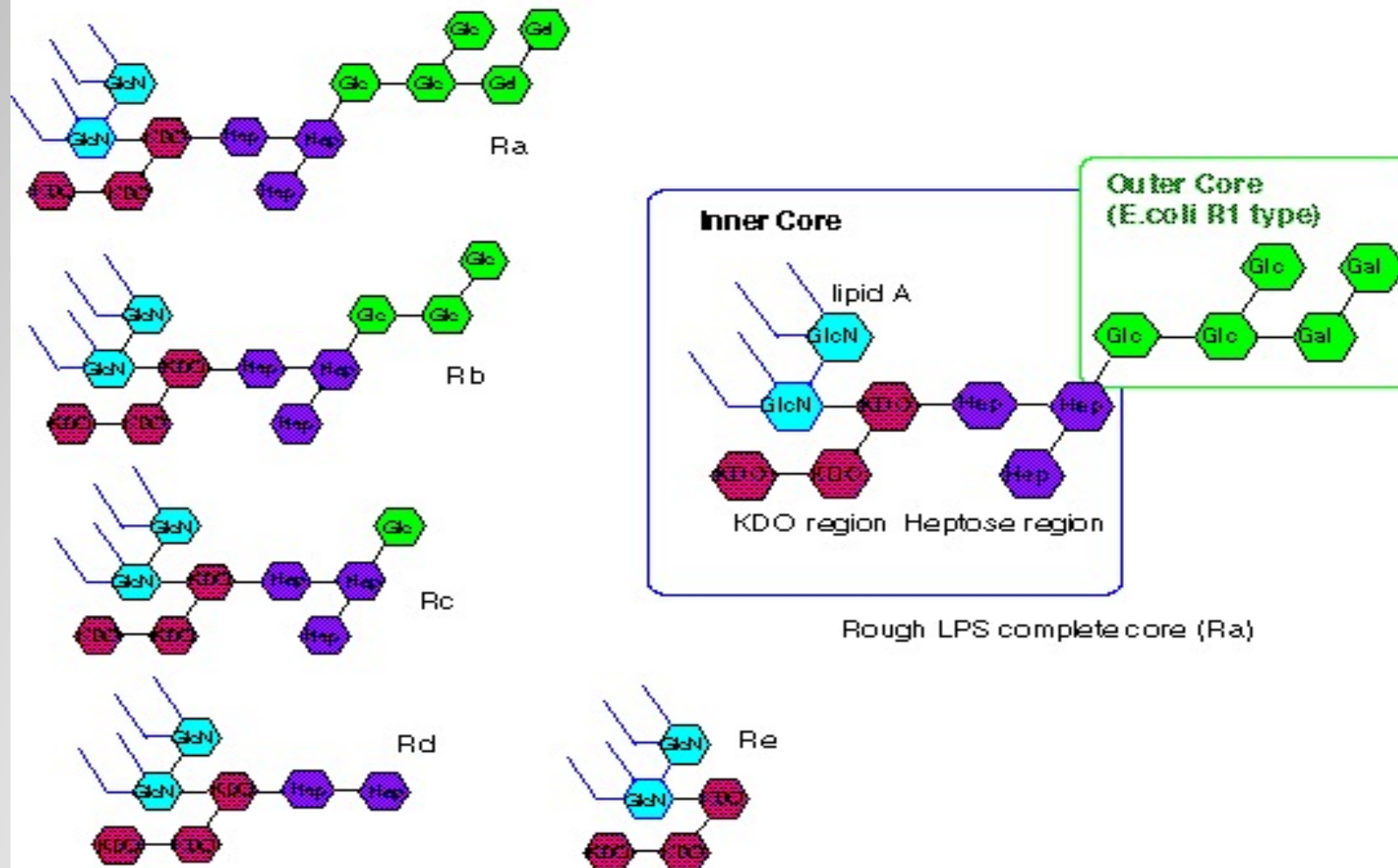
➤ La sintesi dell' antigene-O è determinata dal cluster genico *wb* (*rfb*)

➤ Mutanti difettivi nel cluster *wb* o mutanti di delezione  $\Delta wb$  presentano una morfologia diversa:

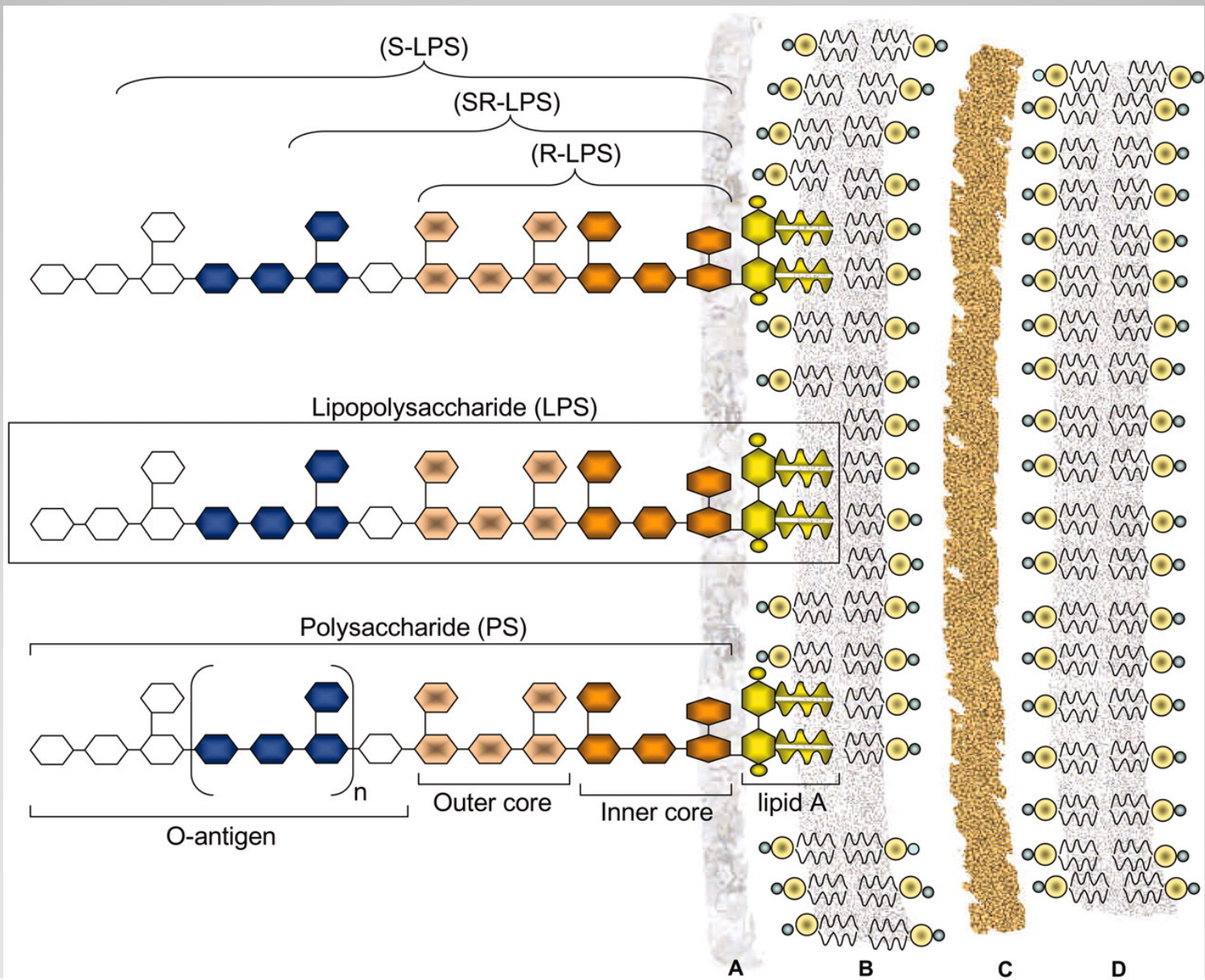
**R-mutants** (R: *rough*)

**batteri wild-type: S** (S: *smooth*)

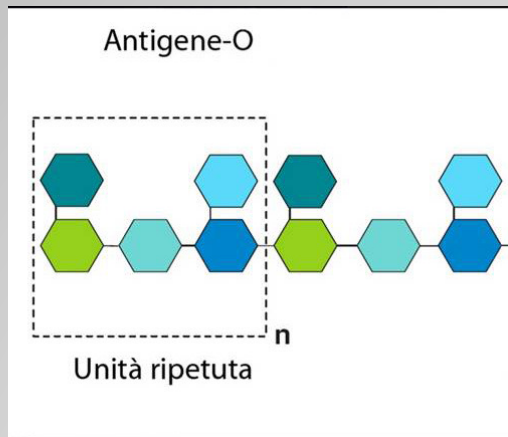
## Principali strutture del lipopolisaccaride 'rough' (R) dei batteri Gram-negativi



KDO=  
chetodeossiottonato



# L' antigene somatico o Antigene-O [3]

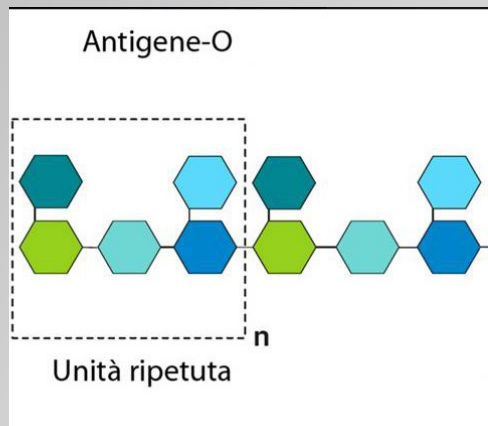


1. I mutanti R sono in grado di crescere in brodocoltura
2. La porzione dell ' antigene-O è dispensabile per la crescita batterica

➤ Patogeni batterici come *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *B. pertussis*, *H. influenzae*, e *C. trachomatis* mancano dell ' antigene-O (LPS a basso peso molecolare o lipooligosaccaridi [**LOS**])



## L' antigene somatico o Antigene-O [4]



➤ Lo scheletro dell' antigene somatico può presentarsi in forma lineare o ramificata, dipendente dalla presenza di gruppi sostituenti.

➤ I più comuni sostituenti sono: gruppi fosfato e fosforil-etanolammina; gruppi acetili. Meno frequenti: gruppi formilici, e acido glicerico.

➤ Durante il *pathway* biosintetico le singole unità saccaridiche vengono polimerizzate in blocchi e aggiunte alla regione del core.

➤ Le molecole di LPS sono dunque formate da catene saccaridiche di diverse lunghezza (elettrofresi SDS).