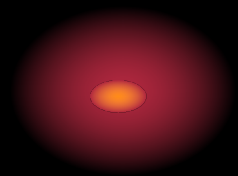


# Che cos' è il "Quorum Sensing"?

- E' un meccanismo mediante il quale i batteri possono comunicare all' interno di una singola popolazione o fra popolazioni differenti
- E' un processo mediante il quale i batteri possono esprimere risposte adattative in funzione della densità della popolazione.
  - Il QS implica la produzione il rilascio e il successivo riconoscimento di particolari molecole: gli autoinducers
  - Il QS permette la regolazione di comportamenti che risulterebbero inefficaci quando messi in atto dai singoli individui di una comunità.
  - Questi includono la secrezione di fattori di virulenza, la formazione di biofilms, la coniugazione, la sporulazione e la bioluminescenza.



# Esistono tre classi di QS

- La prima classe é tipica dei Gram-negativi e si basa sul sistema LuxI/R. L'autoinducer é l'omoserina lattone acilata (AHL). Fino ad ora sono stati identificate più di 100 specie batteriche dotate di un sistema LuxI/R.
- La seconda classe é tipica dei batteri Gram-positivi e coinvolge oligopeptidi modificati come autoinducer.
- La terza classe presenta degli elementi della prima e della seconda classe. I batteri appartenenti a questa classe producono due autoinducers: l'AI-1 é l'AHL mentre l'AI-2 é spesso una modificazione chimica di questo.



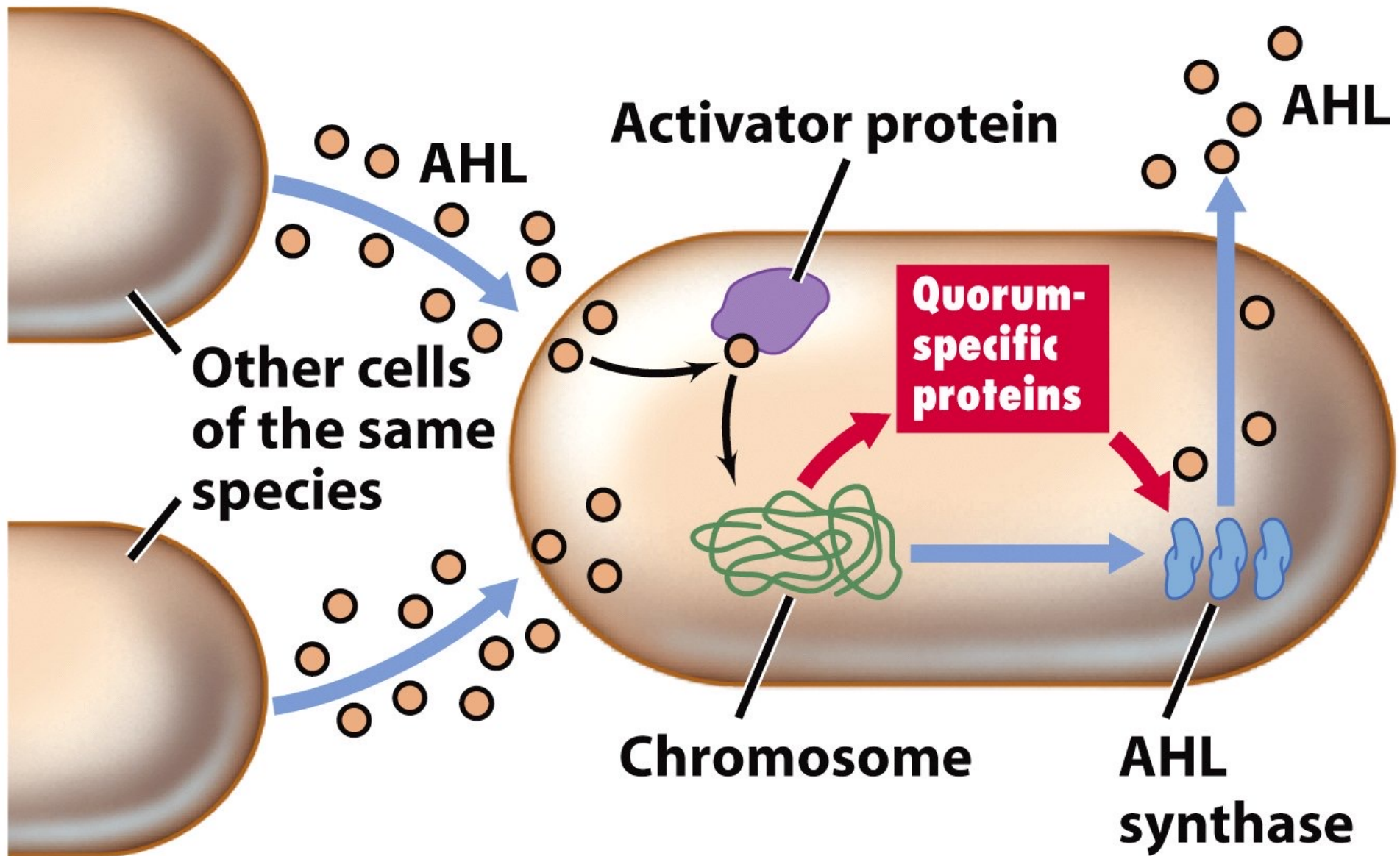
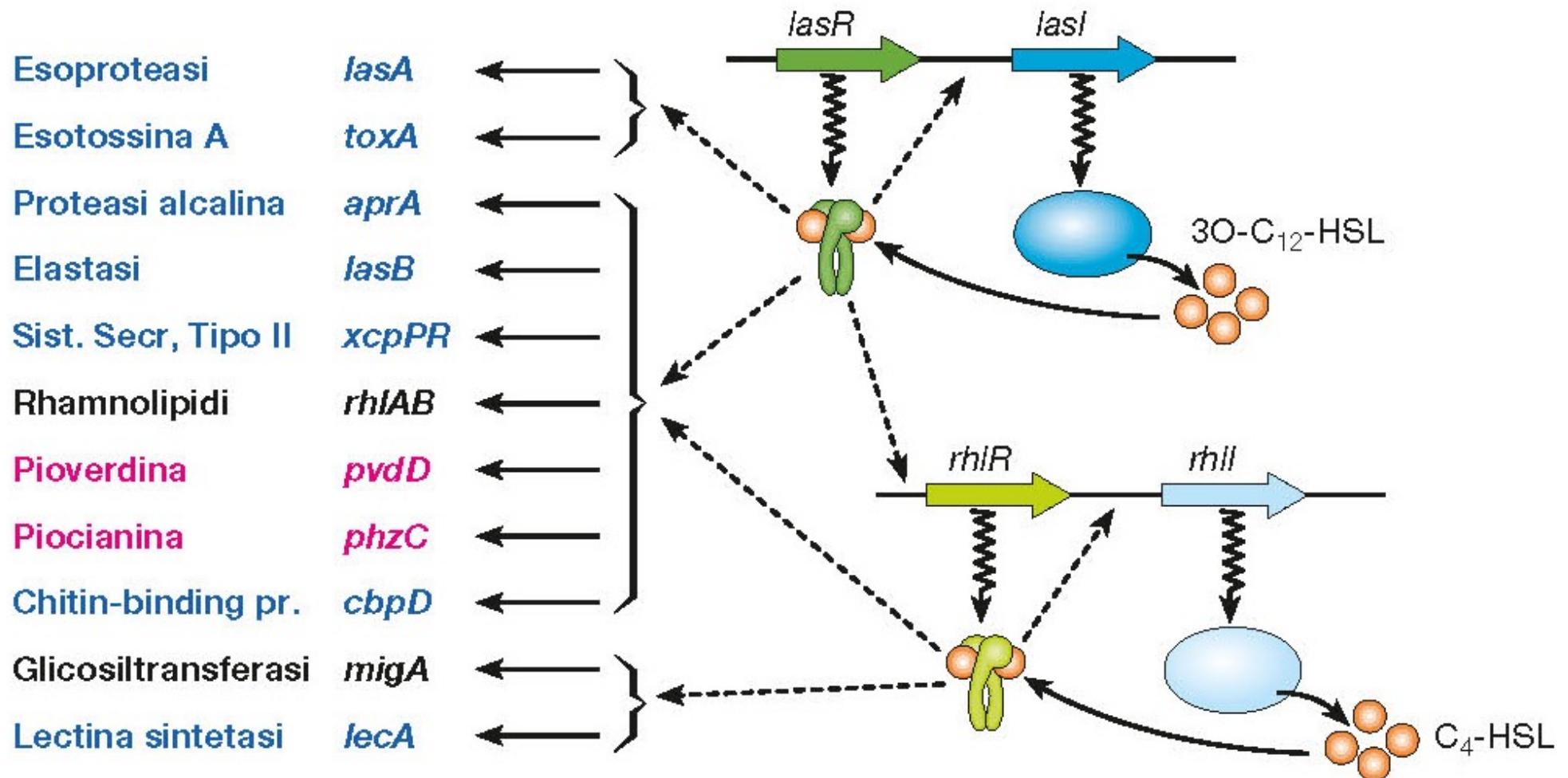
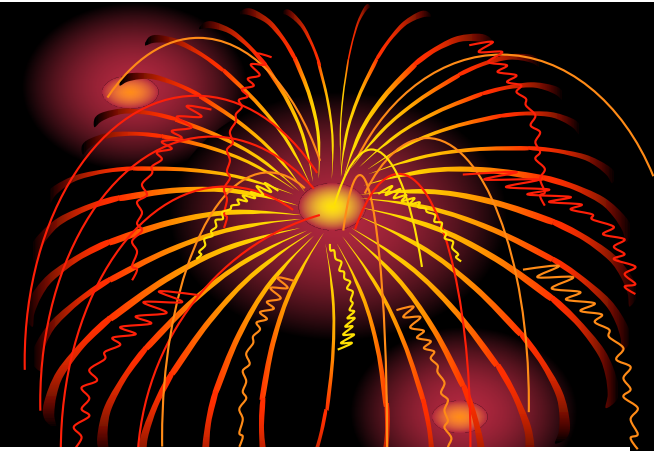
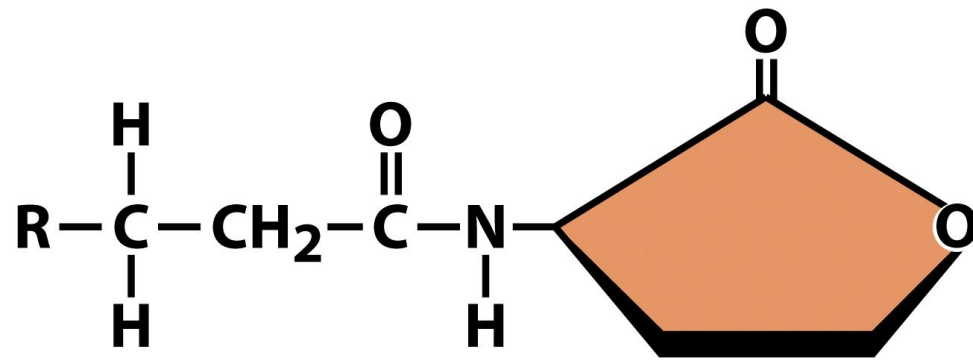
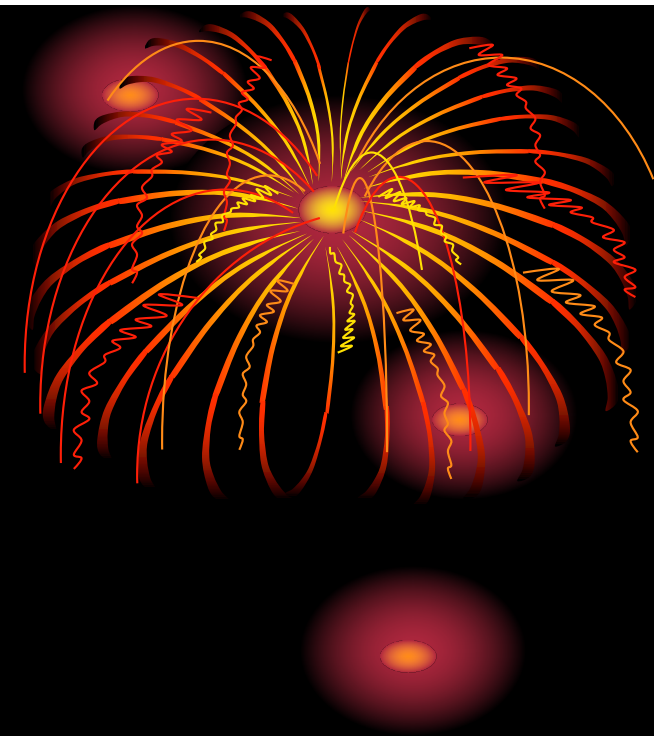


Figure 8-22b Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

I geni regolati dal QS possono rappresentare fino al 5% del genoma costituendo una grande rete di regolazione globale

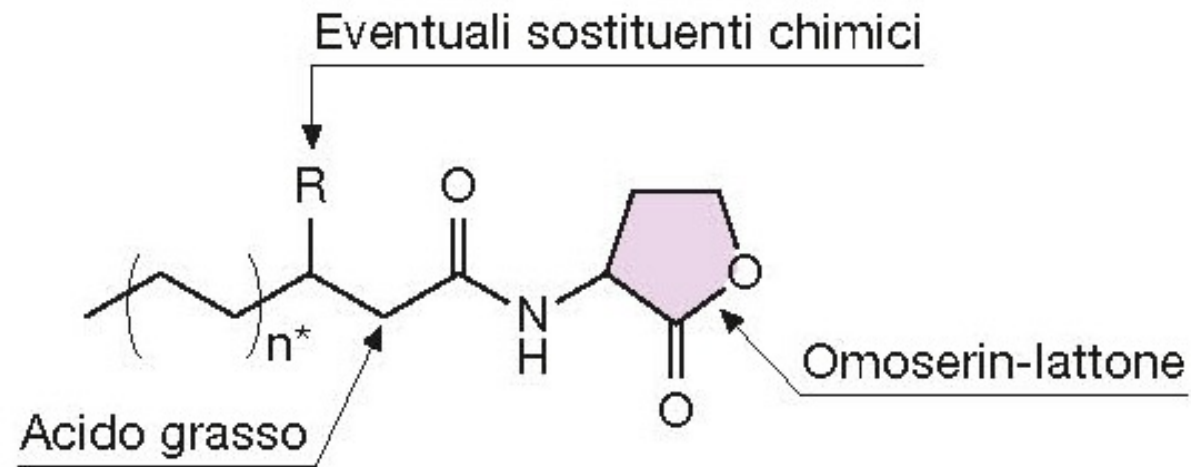




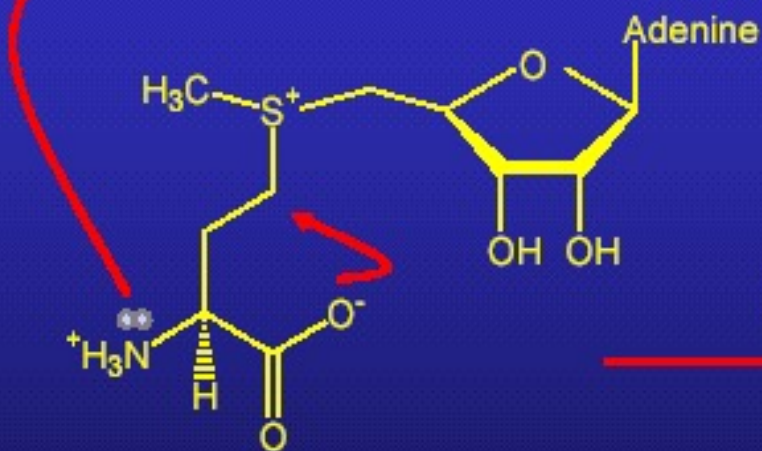
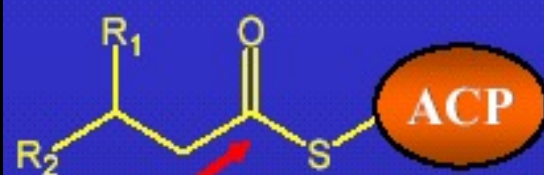


## Acyl homoserine lactone (AHL)

Figure 8-22a Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

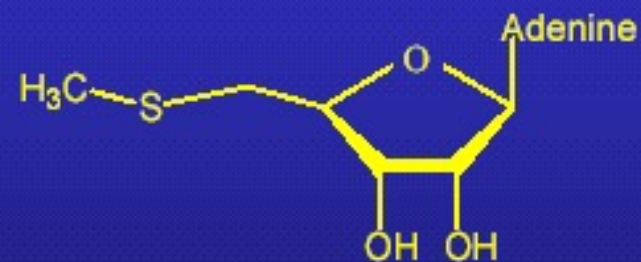


$n^*$  = tipicamente da 4 a 16 atomi di carbonio

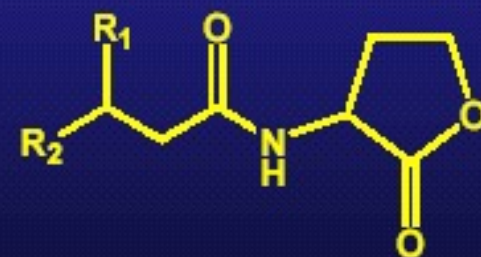


**S-adenosylmethionine  
(SAM)**

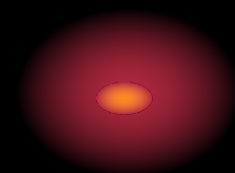
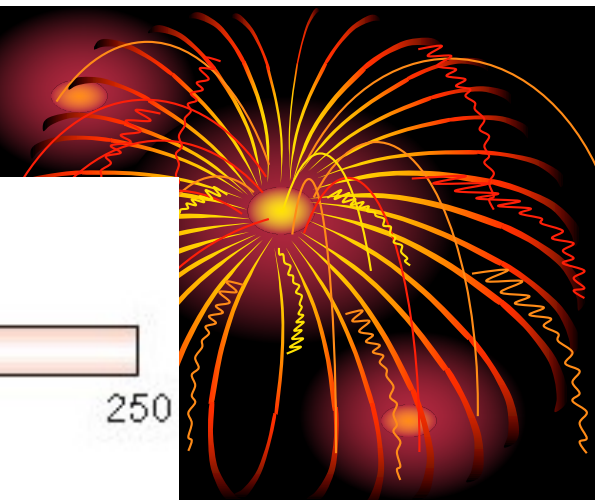
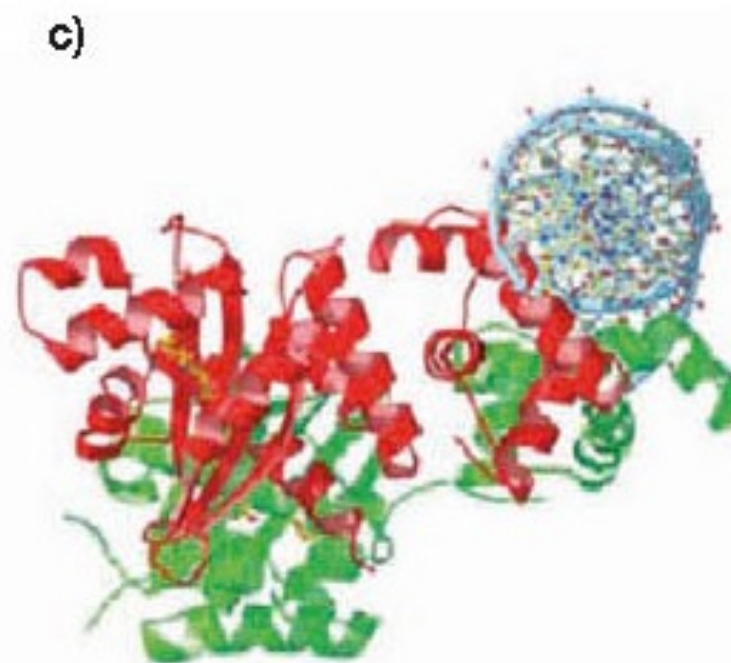
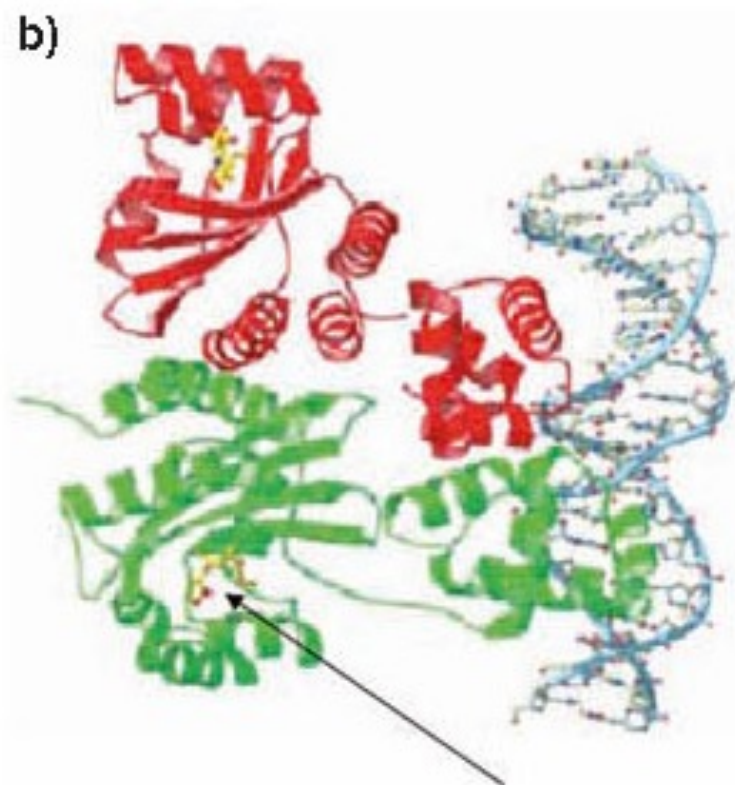
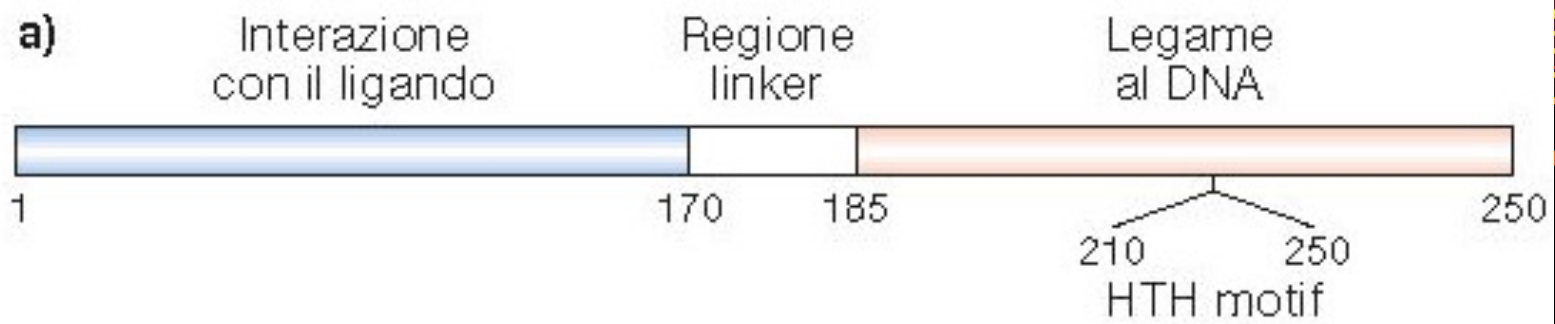
**LuxI**



**5'-methylthioadenosine**



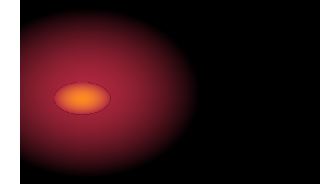
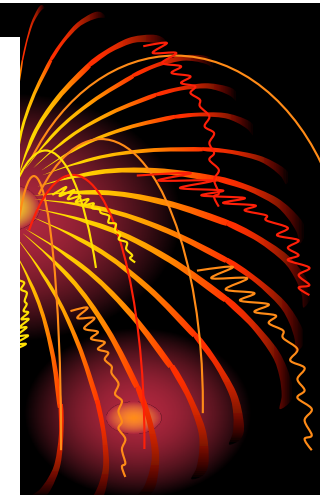
**N-acylhomoserine lactone**





**Table 1.** Some examples of AHL-dependent QS systems and the phenotypes controlled

Organism	AHLs	Phenotype
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C4-HSL, C6-HSL	Biofilms, exoproteases, virulence
<i>Aeromonas salmonicida</i>	C4-HSL, C6-HSL	Exoproteases
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3-Oxo-C8-HSL	Plasmid conjugation
<i>Agrobacterium vitiae</i>	C14:1-HSL, 3-oxo-C16:1-HSL	Virulence
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	3-Hydroxy-C8-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL, C12-HSL, 3-hydroxy-C12-HSL, C14-HSL, 3-oxo-C14-HSL, 3-hydroxy-C14-HSL, 3-hydroxy-C16-HSL	Not known
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	C6-HSL, C8-HSL	Exoenzymes, biofilm formation, swarming motility, siderophore, virulence
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	C8-HSL, C10-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL, 3-hydroxy-C14-HSL	Virulence, exoproteases
<i>Burkholderia mallei</i>	C8-HSL, C10-HSL	Virulence
<i>Chromobacterium violaceum</i>	C6-HSL	Exoenzymes, cyanide, pigment
<i>Erwinia carotovora</i>	3-Oxo-C6-HSL	Carbapenem, exoenzymes, virulence
<i>Pantoea (Erwinia) stewartii</i>	3-Oxo-C6-HSL	Exopolysaccharide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C4-HSL; C6-HSL, 3-oxo-C12-HSL	Exoenzymes, exotoxins, protein secretion, biofilms, swarming motility, secondary metabolites, 4-quinolone signalling, virulence
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	C6-HSL	Phenazines, protease, colony morphology, aggregation, root colonization
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	C6-HSL	Phenazine-1-carboxamide
<i>Pseudomonas putida</i>	3-Oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL	Biofilm development
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3-Oxo-C10-HSL	Mupirocin
<i>Pseudomonas syringae</i>	3-Oxo-C6-HSL	Exopolysaccharide, swimming motility, virulence
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	C14:1-HSL, C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL	Root nodulation/symbiosis, plasmid transfer, growth inhibition; stationary phase adaptation
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	7- <i>cis</i> -C14-HSL	Aggregation
<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006	C4-HSL, C6-HSL	Antibiotic, pigment, exoenzymes
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	C4-HSL, C6-HSL	Swarming motility, exoprotease, biofilm development, biosurfactant
<i>Serratia marcescens</i> SS-1	C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL	Sliding motility, biosurfactant, pigment, nuclease, transposition frequency
<i>Serratia proteamaculans</i> B5a	3-Oxo-C6-HSL	Exoenzymes
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	C8-HSL, C12-HSL, 3-oxo-C14-HSL, 3-oxo-C16: 1-HSL, C16:1-HSL, C18-HSL	Nodulation efficiency, symbiosis, exopolysaccharide
<i>Vibrio fischeri</i>	3-Oxo-C6-HSL	Bioluminescence
<i>Yersinia enterocolitica</i>	C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C14-HSL	Swimming and swarming motility
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C8-HSL	Motility, aggregation

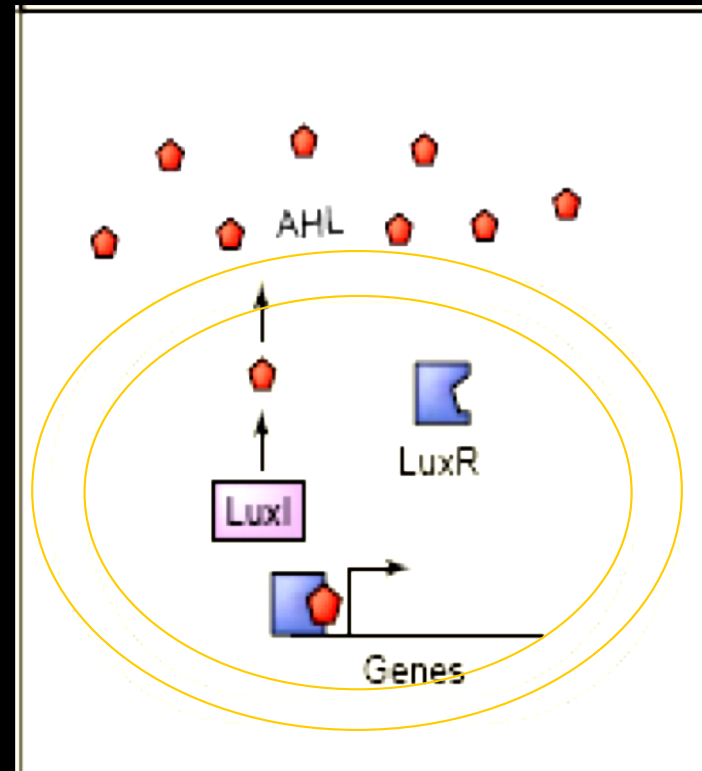




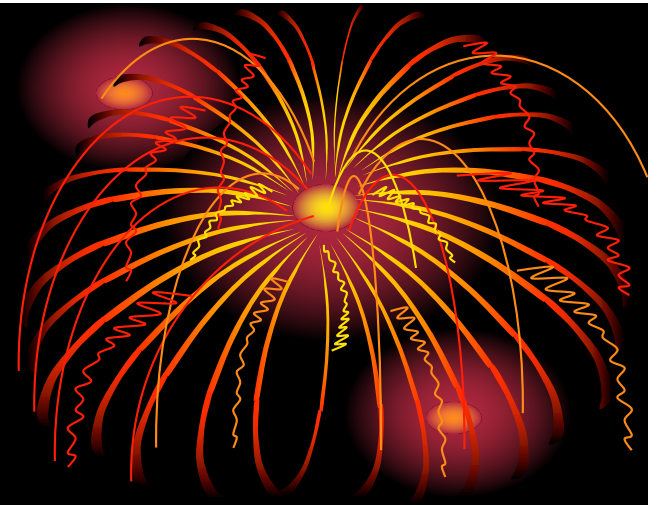
# La classe 1: il sistema LuxI/R



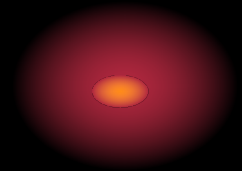
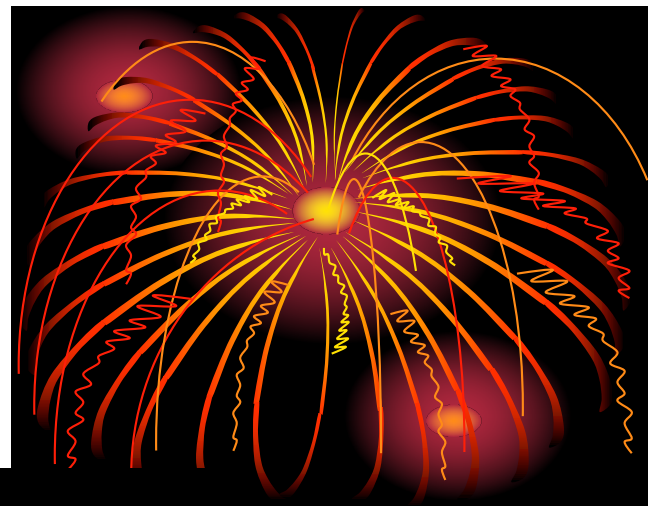
- *LuxI* sintetizza l'enzima necessario alla modifica (l'acilazione) del 5' adenosilmetionina (SAM) per la produzione dell'autoinducer AHL.
- Quando l'AHL raggiunge una concentrazione soglia questo viene intercettato da LuxR che si ritrova in una conformazione attiva per agire da regolatore positivo di una serie di geni.



## La "love story" fra il calamaro ed il batterio



*Eupryma scolopes*





# Euprymna scolopes

- Mollusco cefalopode
- Ordine Sepioidi
- Famiglia Sepiolidae
- Organo luminoso

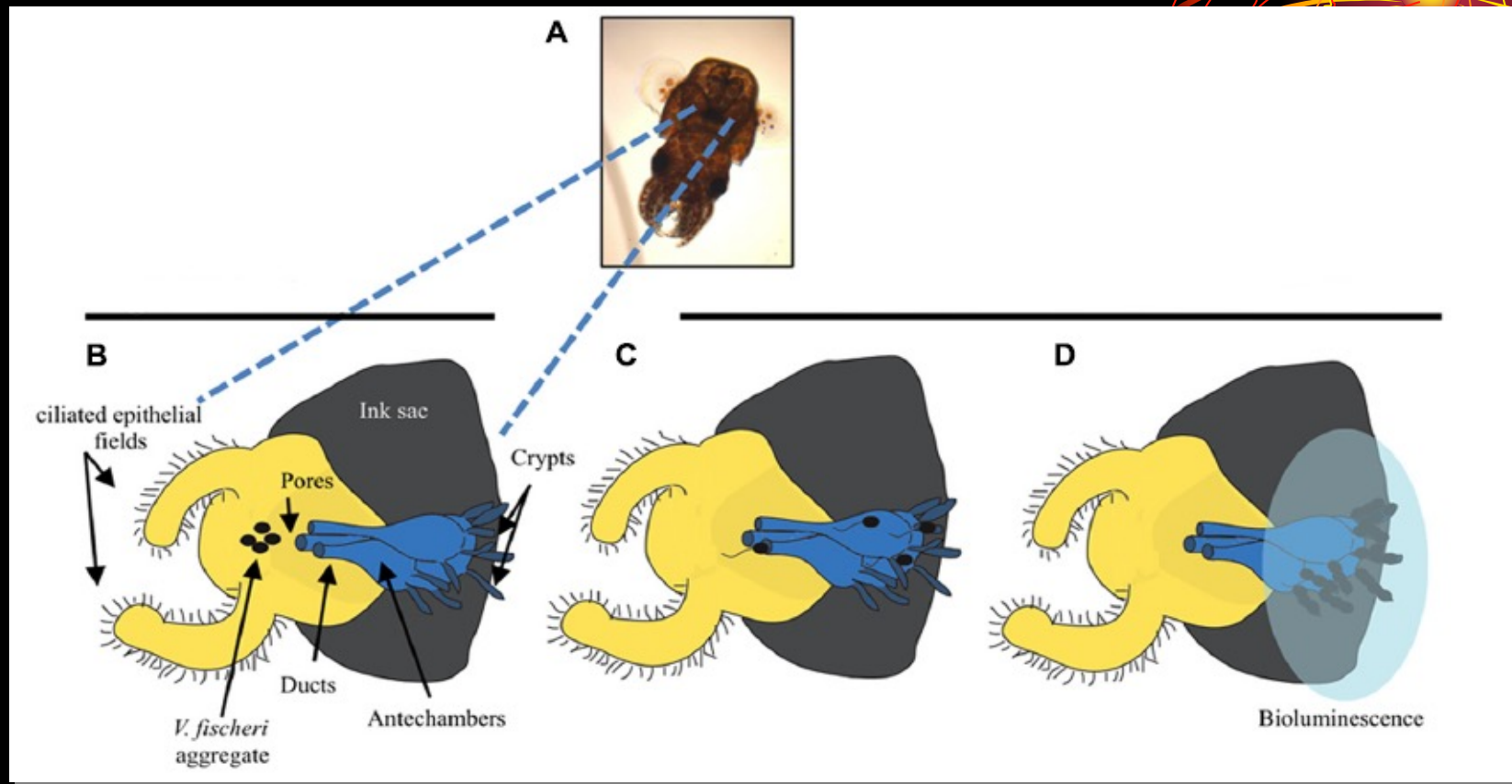


## Controilluminazione

- Grazie ai batteri luminescenti nell'organo luminoso, di notte quando risale verso la superficie per nutrirsi E.scolopes può attuare un processo mimetico chiamato controilluminazione.
- Emette luminescenza dal ventre per mimare la luce lunare proveniente dall'alto e nascondere quindi la propria ombra ai predatori.



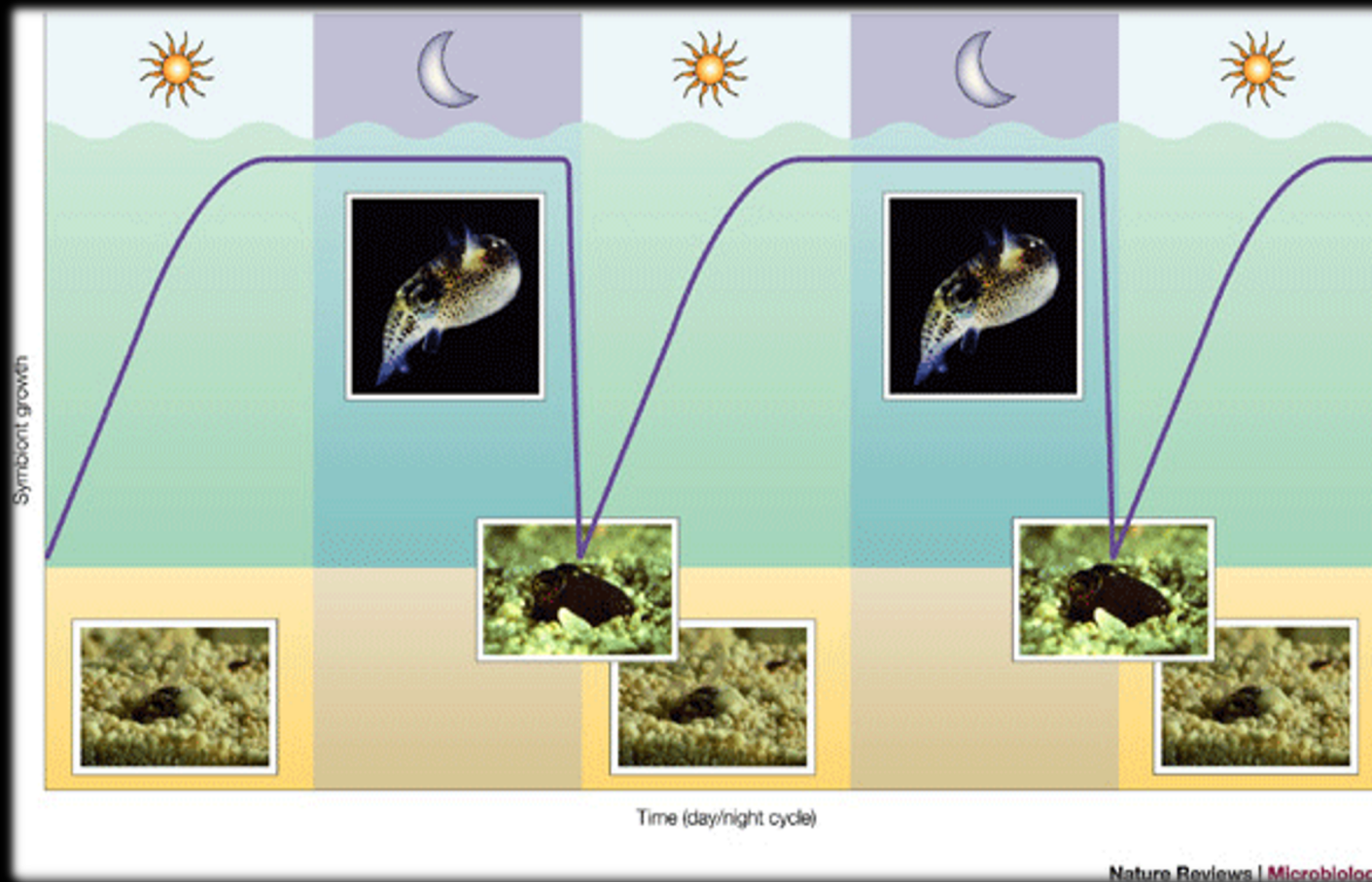
# Fasi della colonizzazione



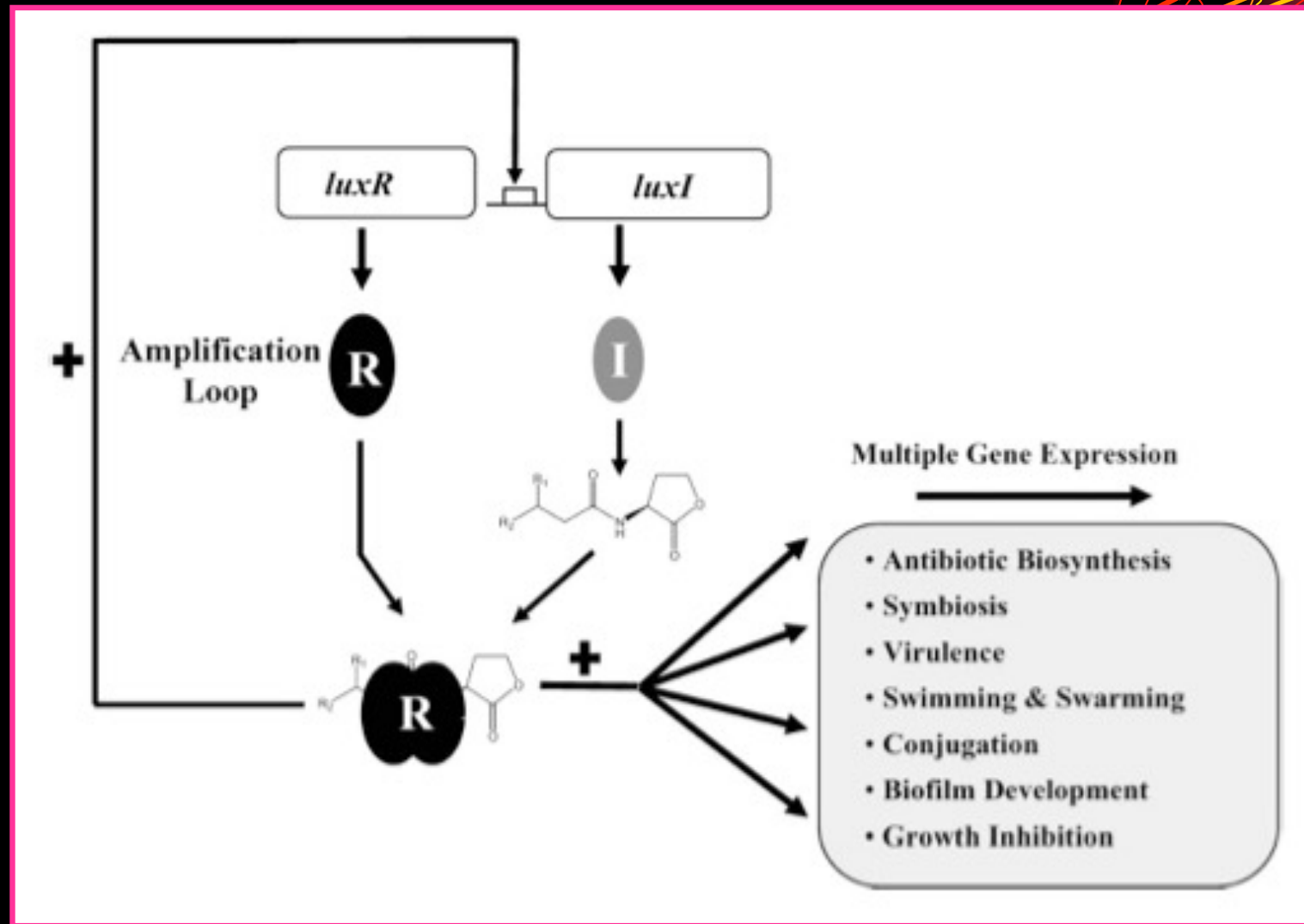
- Ingresso nella cavità del mantello
- Formazione del biofilm
- Migrazione
- Luminescenza

# Cicli giornalieri

- Prima dell'alba: scomparsa dei microvilli dell'epitelio delle cripte; formazione dei flagelli dei batteri, espulsione 95% dei batteri.
- Mezzogiorno: microvilli delle cripte ricostituiti, popolazione batterica nuovamente al massimo.



# La classe 1: il sistema LuxI/R



I geni *luxI* e *luxR* sono spesso identificati su elementi mobili e sono spesso associati fra di loro



<https://www.youtube.com/watch?v=mQ43fuJJW7M>



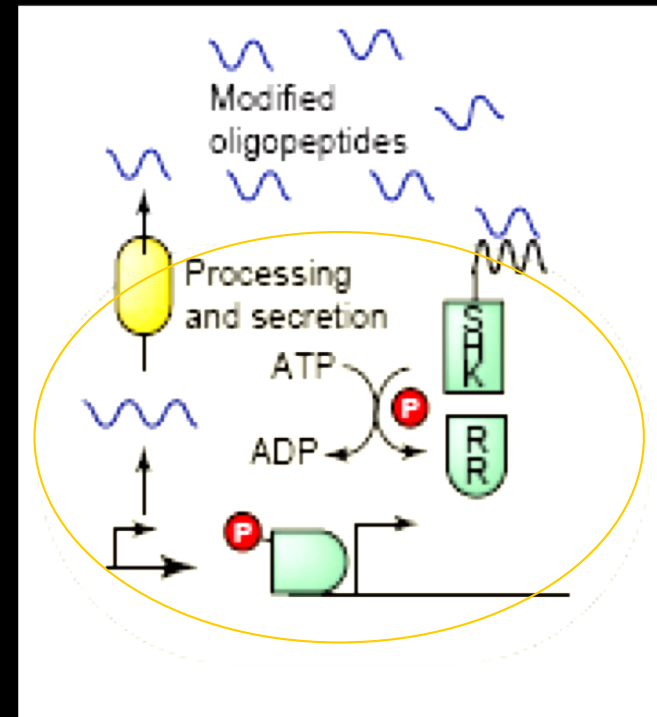
# La classe 1: il sistema LuxI/R

- Fino ad oggi non sono stati identificati ceppi di *E.coli* o *Salmonella* produttori AHL.
- Tuttavia entrambi questi batteri posseggono un recettore dell'AHL, SdiA, appartenente alla classe di LuxR.
- Questi batteri, infatti, rispondono alla produzione di AHL da parte di altre popolazioni.



# I sistemi di classe 2: gli oligopeptidi modificati

- In questa classe sono presenti oligopeptidi modificati come autoinducers. Una classe a parte è costituita da batteri che usano un altro tipo di autoinducer: i derivati del gamma-butirrolattone. Gli oligopeptidi- anche chiamati ferormoni- possono contenere gruppi isoprenili (*B.subtilis*) o anelli tio-lattonici (*Staphylococcus*).
- Questi sistemi implicano la presenza di sistemi a due componenti.
- L' oligopeptide si lega al sensore (l' istidin chinasi) SHK che fosforilerà il recettore di risposta (RR). L' RR si legherà ai promotori sensibili e regolerà la loro espressione



I gamma-butirrolattoni vengono prodotti dagli streptomiceti. Questi microrganismi hanno un metabolismo complesso caratterizzato dalla produzione di molecole antimicrobiche come metaboliti secondari.

Questi AI svolgono un ruolo chiave nella produzione di questi prodotti.

La mancanza di questo fattore non rende

Solo i batteri incapaci di produrre gli antibiotici, ma li rende sensibili

A questi stessi prodotti dai

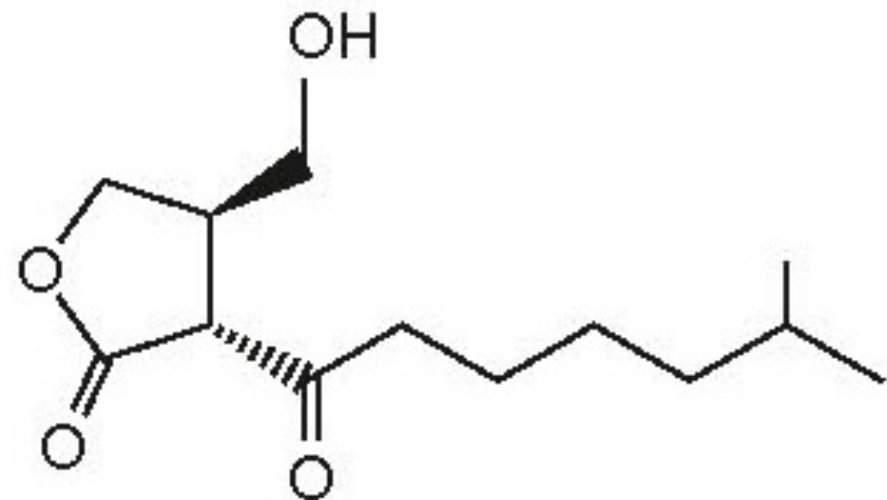
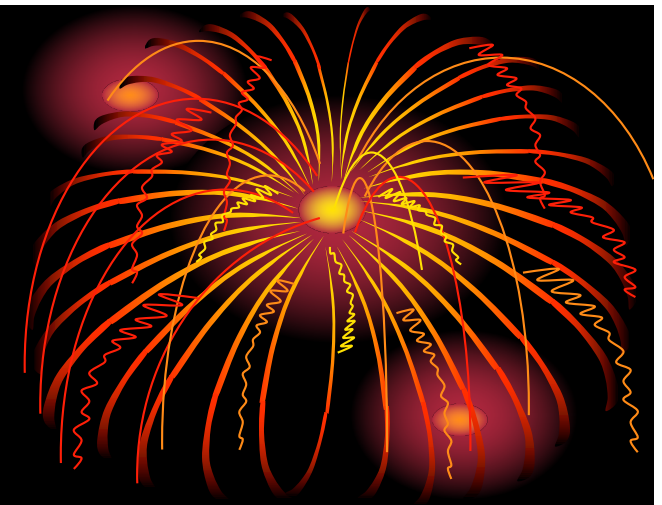
Membri della stessa popolazione

Ma produttori di AI.

Es. *Streptomyces griseus*,

Fattore A (AI)

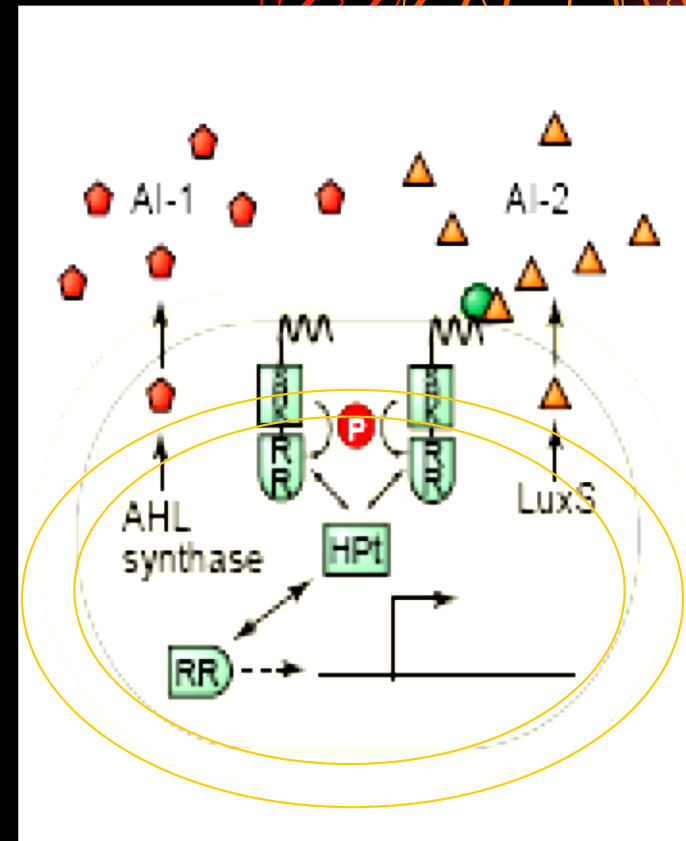
Streptomicina.



GBL

# I sistemi di classe 3: gli ibridi

- Anche questi sistemi sono stati identificati nei batteri Gram-negativi. Sono caratterizzati dalla presenza di due tipi di autoinducers. Il prototipo di questa classe é *Vibrio harveyi* che produce l' AHL come AI-1. l' AI-2 é il furanosil borato diestere prodotto da LuxS.
- Al pari dei sistemi QS di classe 2 quello di classe 3 comporta l' esistenza di un sistema a due componenti. Questo però é modificato dalla presenza di due HPT (istidin fosfotransferasi)



AI-1 → Comunicazione intraspecie

AI-2 → Comunicazione interspecie





I batteri possono possedere vari QS  
che agiscono in maniera parallela come  
*V.harvey* e *B. subtilis* o sequenziale  
come *Pseudomonas aeruginosa*.

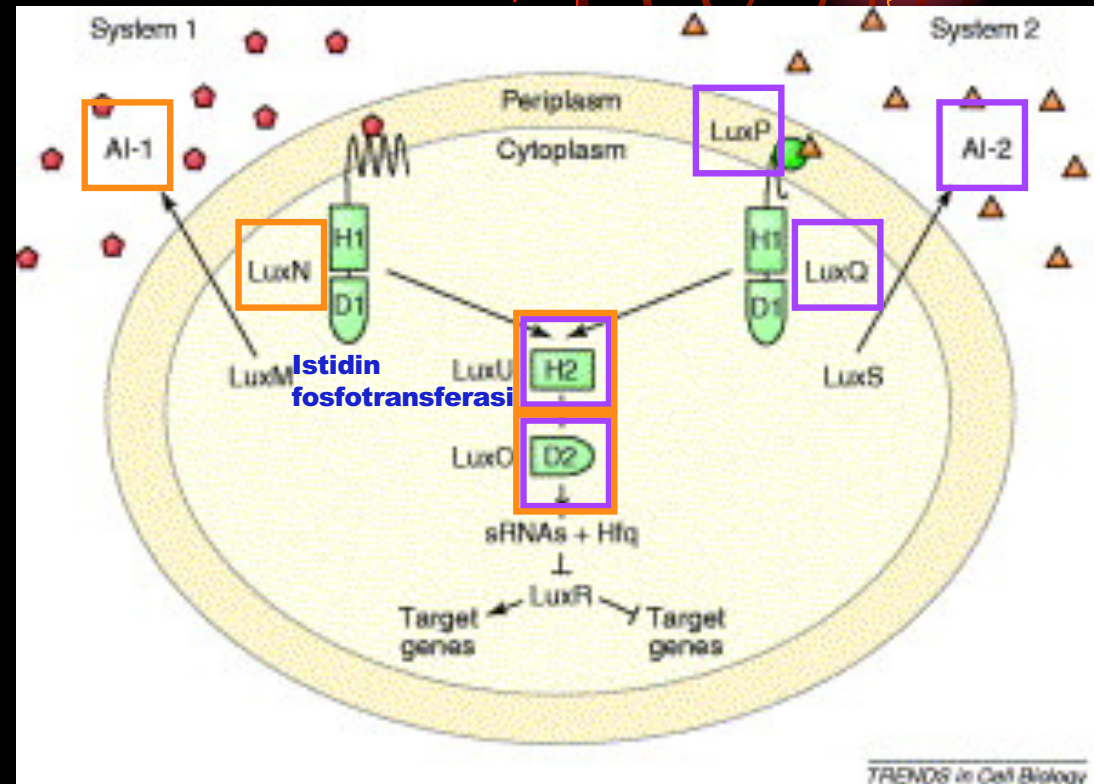
# *Vibrio harveyi* : il meccanismo del "coincidence detection"

In *V.harveyi* AI-1 viene riconosciuto dall'istidin chinasi LuxN, mentre AI-2 viene riconosciuto dall'istidin chinasi LuxQ.

LuxQ agisce insieme a LuxP, una proteina periplasmica.

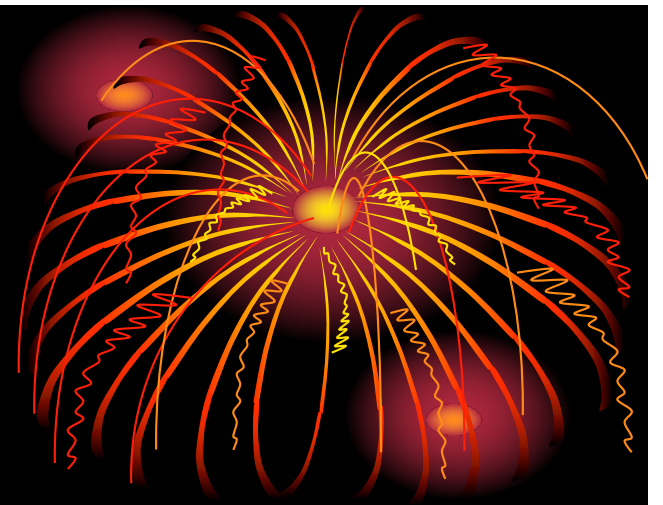
Entrambi, LuxN e LuxQ trasferiscono il fosfato su LuxU che trasferisce poi il fosfato sull' RR LuxO. LuxO poi attiva i geni target che sono quelli della bioluminescenza.

IL sistema è attivo solo quando entrambi gli autoinducers sono presenti.



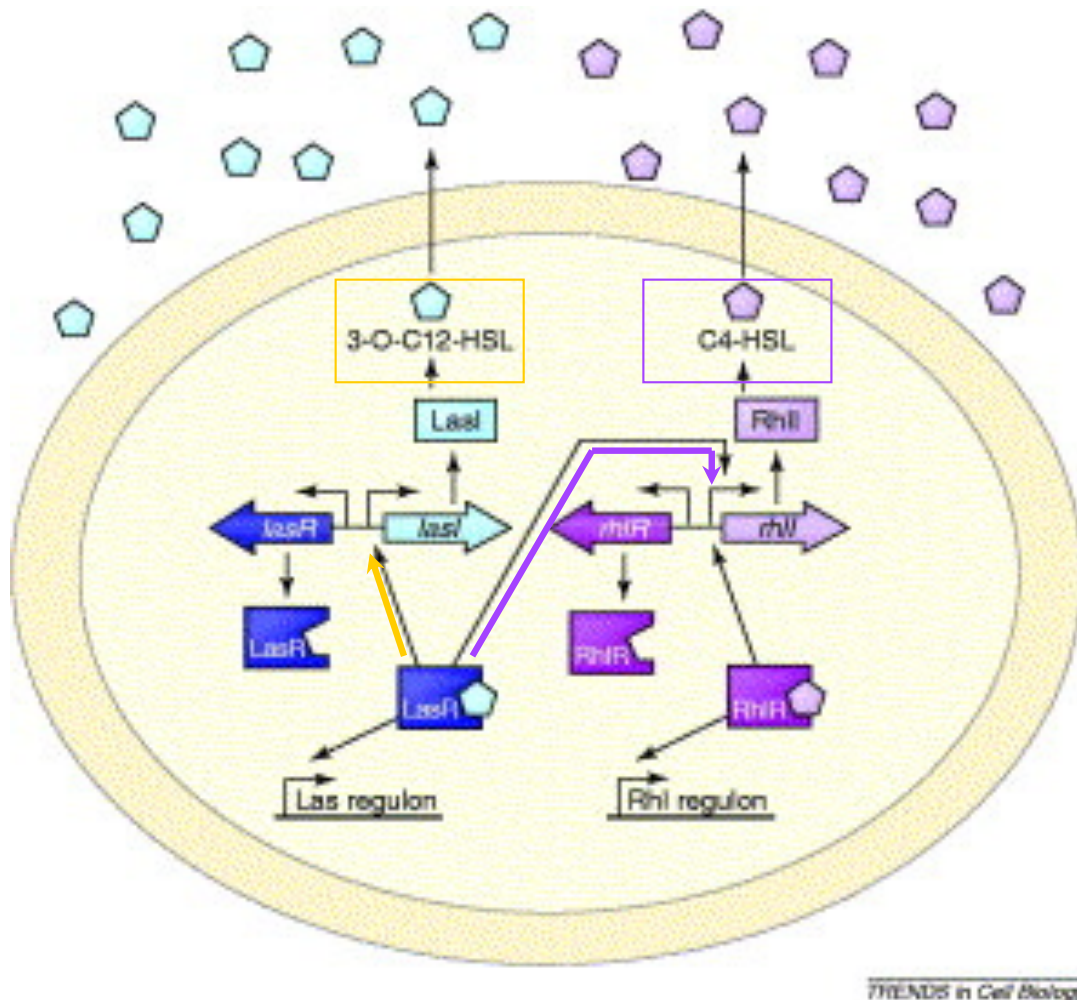
Questo effetto viene chiamato "coincidence detectors"

# *Pseudomonas aeruginosa* e la sequenza temporale delle risposte mediate dal QS



In *P. aeruginosa* due sistemi di QS agiscono in tandem per controllare una ampia varietà di processi legati alla virulenza.





In *P.aeruginosa* i due sistemi sono entrambi del tipo LuxI/R. Il sistema Las consiste di

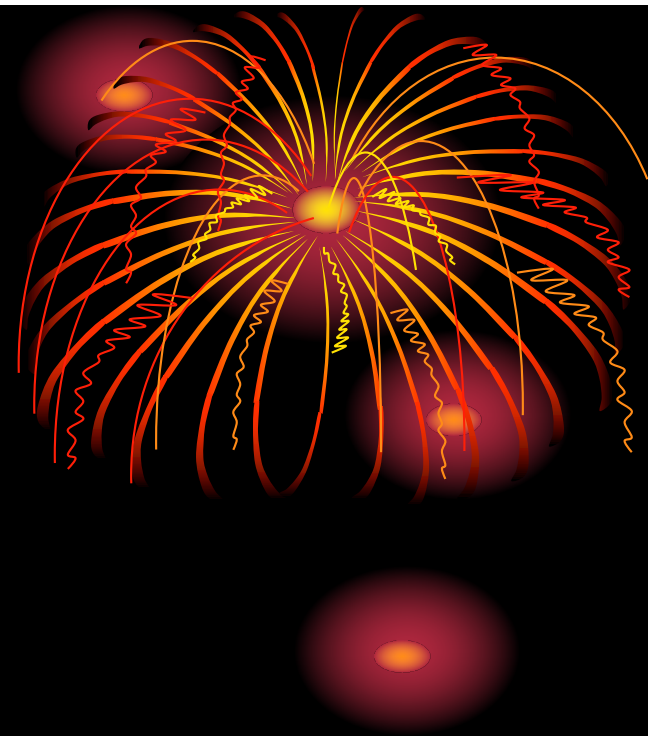
LasI che produce l'AI-1, 3-O-C12-HSL, (N-3-oxodocanoyl-) (omoserina lattone) ed il rispettivo attivatore trascrizionale LasR. L'altro sistema, Rhl, consiste di RhlI e RhlR e dell'AI-2, C4-HSL (N-butilirril-HLS). L'3-O-C12-HSL si accumula per primo ed induce l'attivazione di LasR.

LasR attiva i geni bersaglio fra cui *lasI* che a sua volta produce l'AI-1 3-O-C12-HSL e così via. Fra i geni bersaglio di LasR c'è anche *rhlI* che codifica per la C4-HSL sintetasi. C4-HSL si lega a RhlR che a sua volta attiva i propri geni bersaglio. Questa organizzazione genetica assicura che i geni sotto il controllo di LasI/R vengano sintetizzati per primi. Alcuni geni sono sotto il controllo trascrizionale di entrambi i sistemi. L'attivazione di questo set è necessario per lo sviluppo del biofilm.

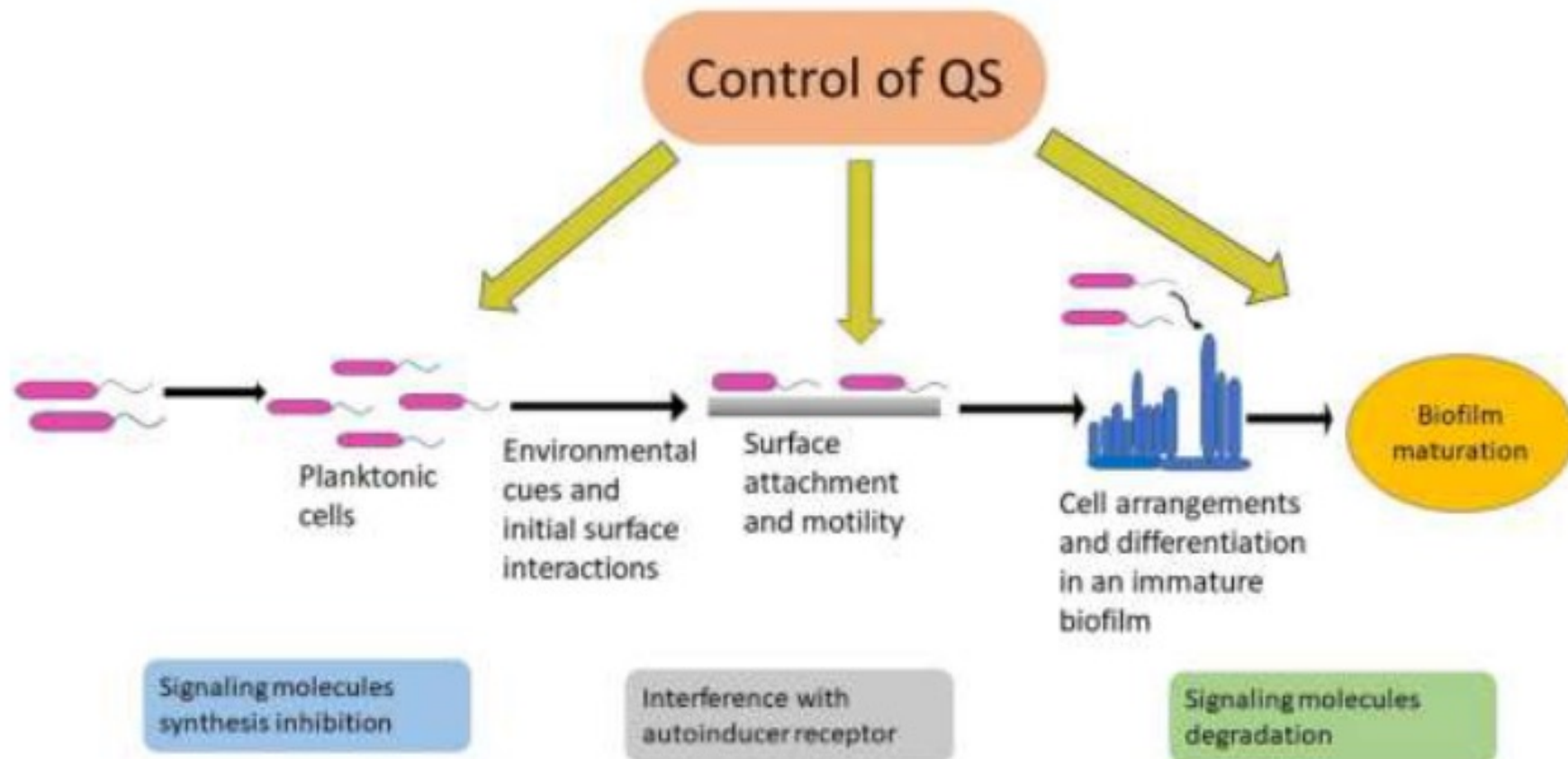
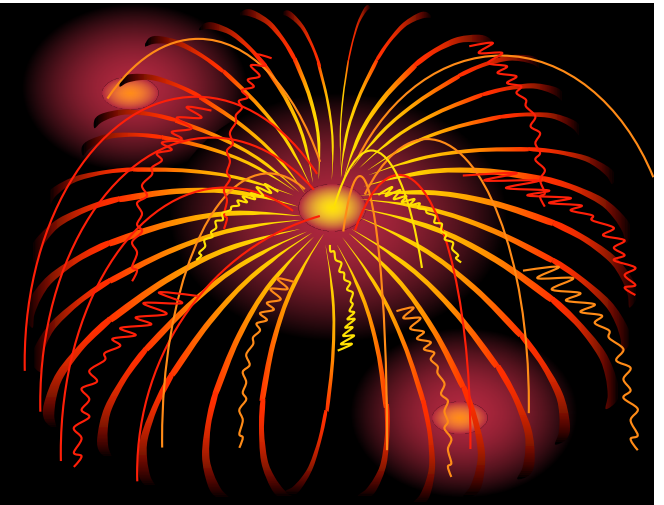
# Perché "coincidence detector"?

I geni targets sono attivati solo in presenza dei due autoinducers: questo significa che il sistema distingue primariamente la presenza o l'assenza di entrambi

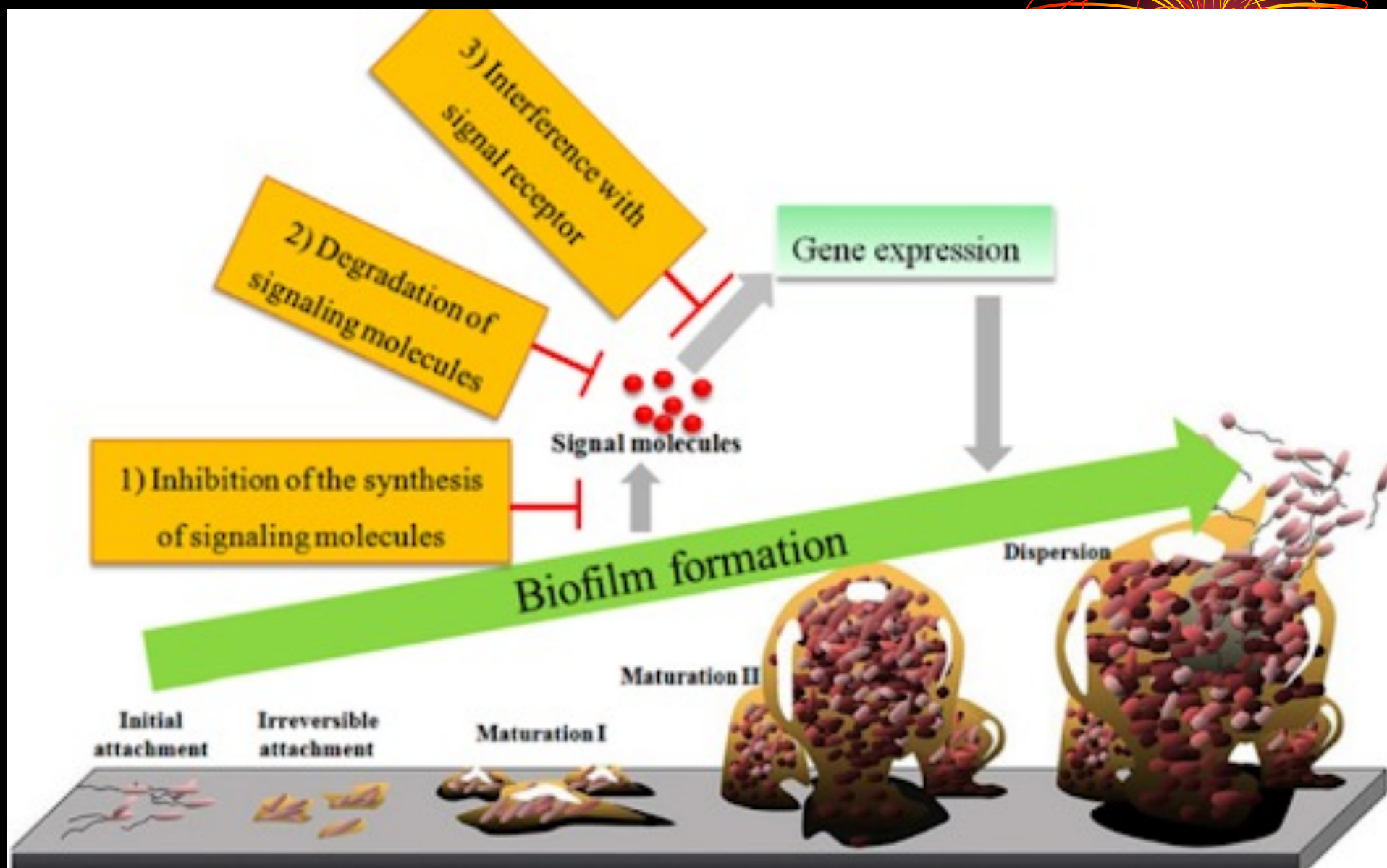
Il sistema è quindi organizzato in maniera tale da evitare gli sprechi o che per qualche "sbaglio" il sistema della bioluminescenza possa essere attivato in assenza di un opportuno numero di individui.



Perché c'è un legame fra il QS e la produzione dei biofilms?







# Importanza del QS nel colloquio fra popolazioni batteriche differenti



- *V. Harvey* risponde al riconoscimento di AI-2 prodotto da specie differenti.
- Nella formazione di biofilm misti la produzione di AI-2 di una specie é responsabile della messa in atto di risposte genetiche anche di altre specie batteriche presenti nel consorzio (es. *Porphyromonas gingivalis* e *S. gordonii*).
- Sorprendentemente *P. aeruginosa*, che non possiede il sistema LuxS, può rispondere alla produzione di AI-2 da parte di flora batterica endogena non patogena nella colonizzazione dei polmoni nei malati di fibrosi cistica.

# Importanza del QS nel colloquio fra popolazioni batteriche differenti



- Nelle culture miste del biofilm di *P.aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* nel modello di infezione cronica del topo *B.cepacia* è capace di rispondere al AHL prodotto da *P.aeruginosa*, ma non viceversa.
- Sebbene finora sia stato dimostrato che i batteri Gram-positivi non producano l'AHL, è stato dimostrato che *Staphylococcus aureus* è sensibile al 3-oxo-C12-HSL prodotto da *P.aeruginosa*. Il 3-oxo-C12-HSL interferisce con il sistema a due componenti AgrC/AgrA di *S.aureus*, sopprimendo l'attivazione di molti geni di virulenza.



# Importanza del QS nel colloquio fra popolazioni batteriche differenti



- Sia batteri Gram-positivi che Gram-negativi, produttori o meno l'AHL sono in grado di degradare questa molecola.
- Molti batteri producono enzimi quali lattonasi ed acilasi che idrolizzano l'anello lattonico e tagliano il legame amidico, inattivando così l'AHL.
- Altri batteri invece di degradare la molecola ne riducono l'affinità per il suo recettore.

# Importanza del QS nel colloquio fra popolazioni batteriche e cellule eucariotiche 1.



- Molti studi indicano come le molecole segnale del QS possono influenzare il comportamento di funghi, cellule vegetali e animali.
- Ad alte dosi il 3-oxo-C12-HSL sopprime la filamentazione di *Candida Albicans*.
- Ad alte dosi il 3-oxo-C12-HSL possiede un'attività apoptotica e influenza la contrazione delle cellule muscolari lisce nei vasi sanguigni.

# Importanza del QS nel colloquio fra popolazioni batteriche e cellule eucariotiche 3.

- Sia cellule vegetali che animali o cellule batteriche possono produrre enzimi in grado di interferire con l'attività biologica delle molecole segnale.
- I sistemi QS di *P.aeruginosa* AHL e AQ sono rispettivamente indotti dall'IFNgamma e dagli oppioidi.
- L'acido salicilico prodotto dalle cellule vegetali, invece, soprarregola l'espressione degli enzimi degradativi dell'AHL prodotto da *A.tumefaciens*.
- L'inattivazione dell'AHL nei tessuti eucariotici è stata associata alla presenza di un enzima la paraossonasi (PON), un' enzima che è presente nel siero e nell'epitelio respiratorio.
- Nell'epitelio respiratorio PON2 viene considerato un elemento di difesa contro il 3-oxo-C12-HSL prodotto da *P.aeruginosa*

