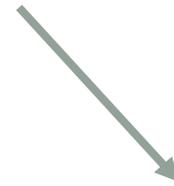
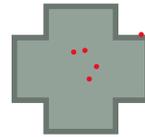


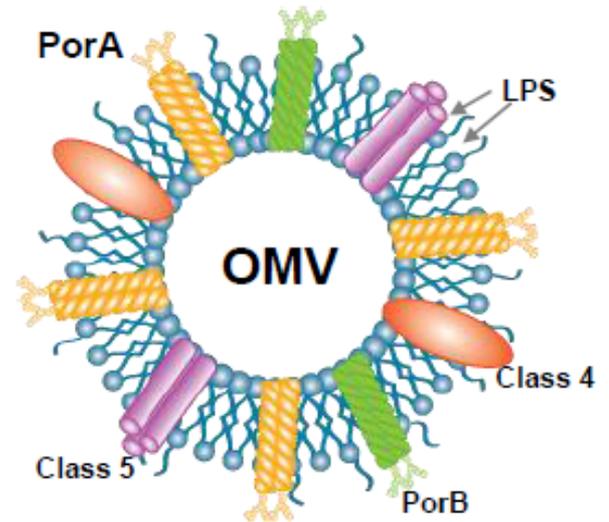
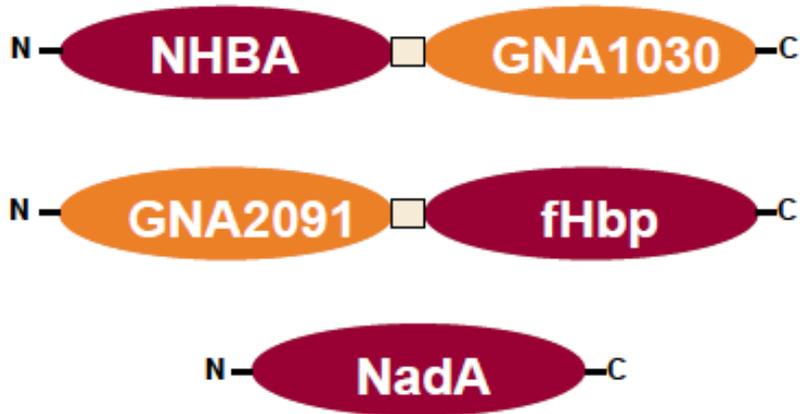
LA RIVOLUZIONE DELLE VESCICOLE



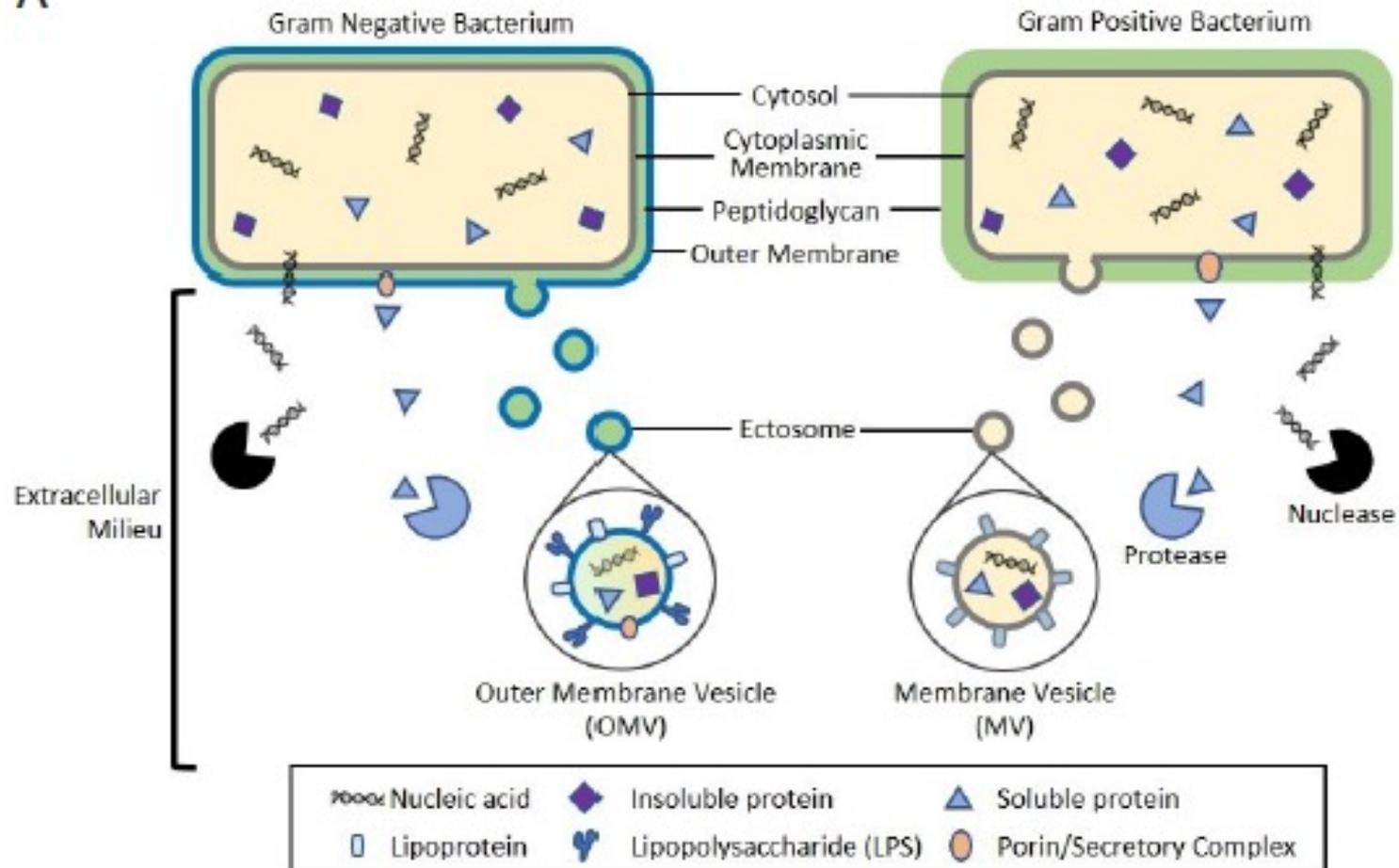
3 antigeni proteici di cui 2 di fusione

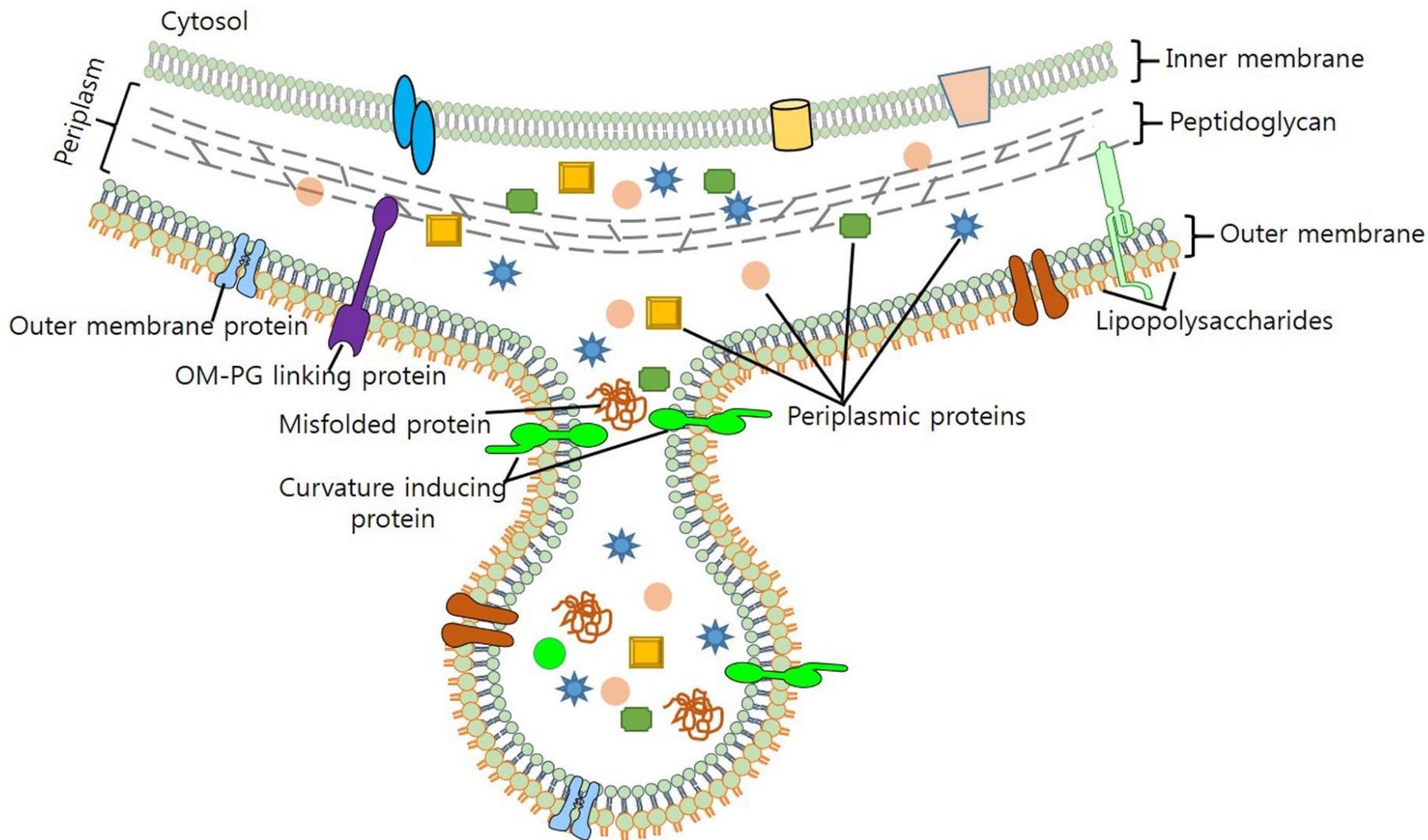


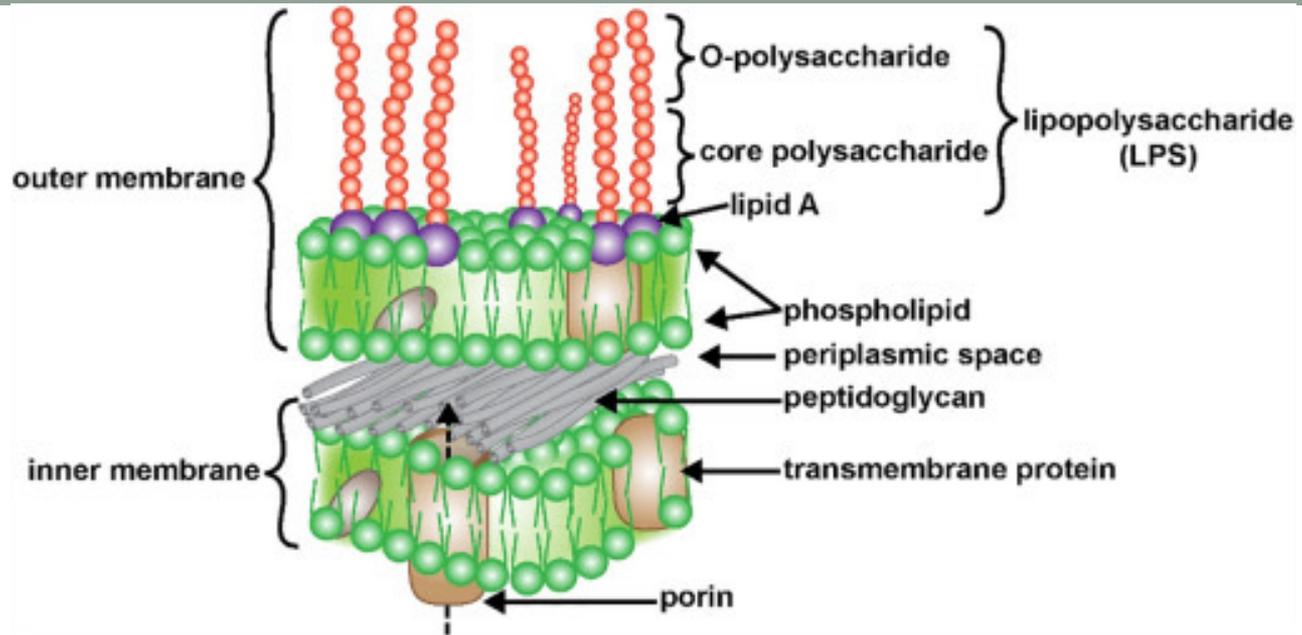
Le vescicole in cui PorA è il maggior antigene



A







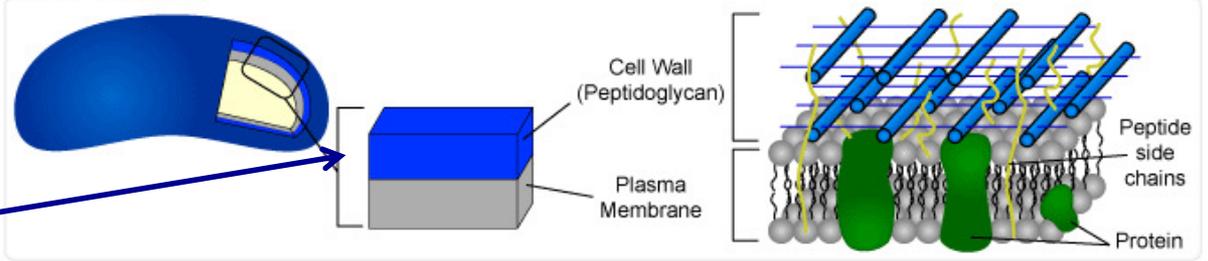
Porzione oligo/polisaccaridica

Lipide A

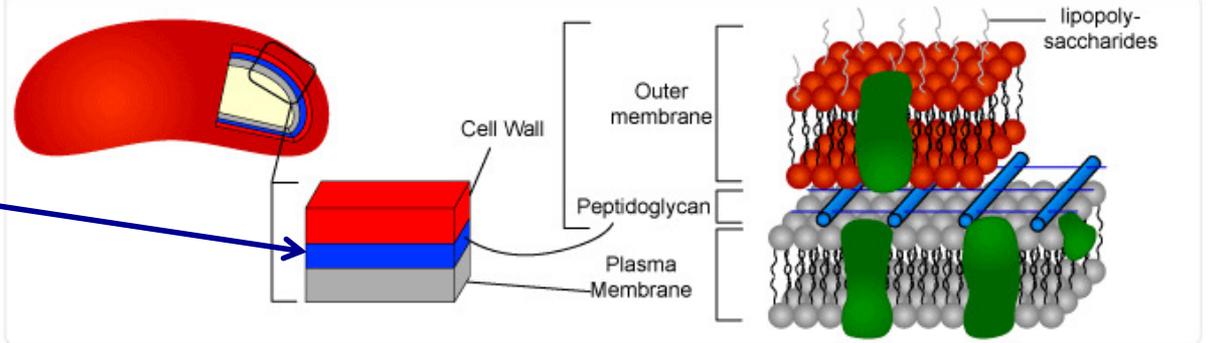
Polisaccaride			Fosfolipide
<p>Antigene-O</p> <p>Unità ripetuta</p>	<p>Core</p> <p>Core esterno</p> <p>Core interno</p>		<p>Lipide A</p>



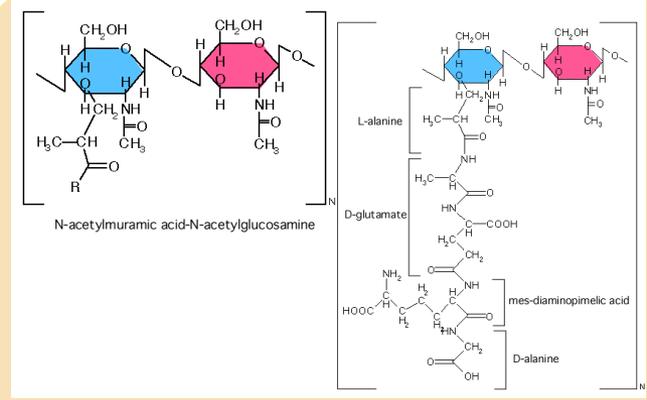
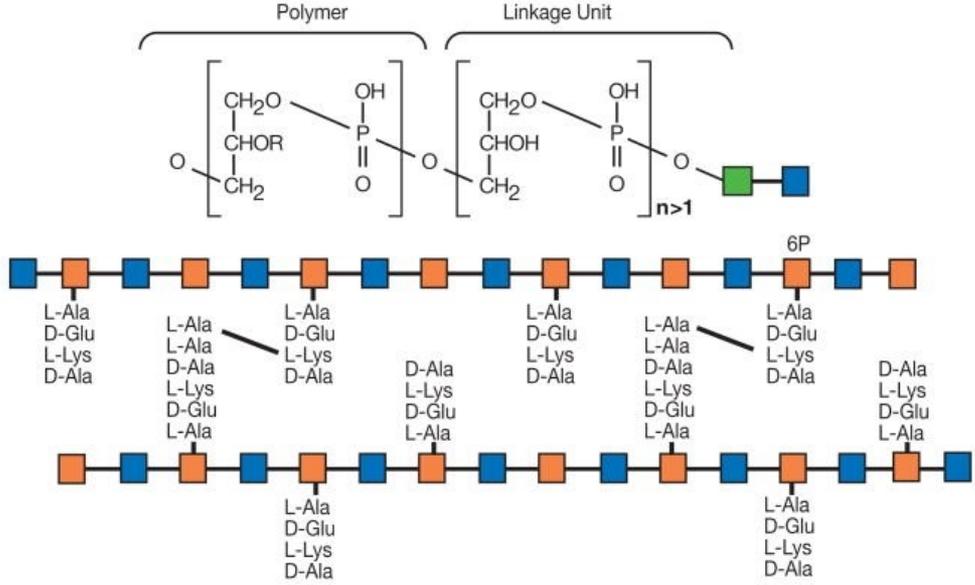
Gram⁺ Bacteria

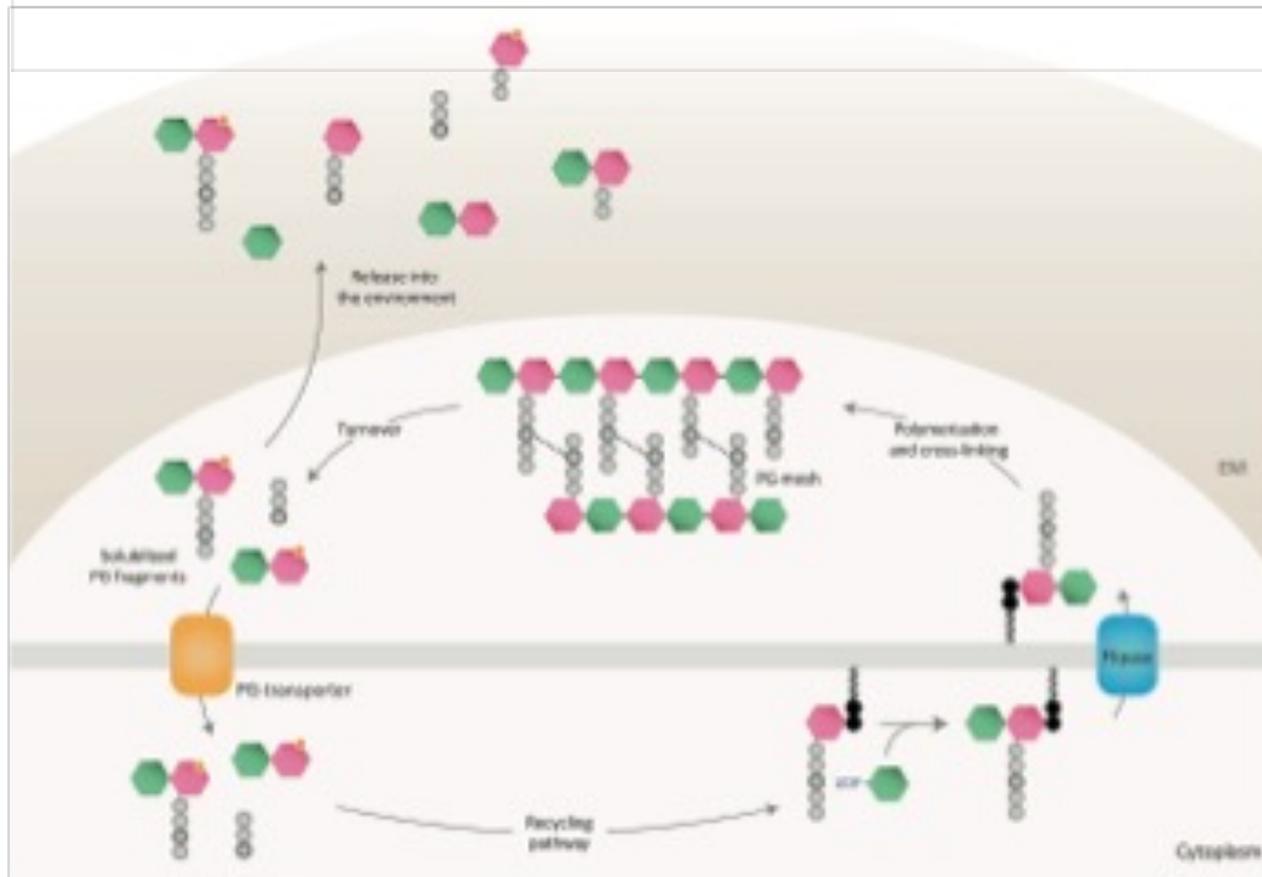
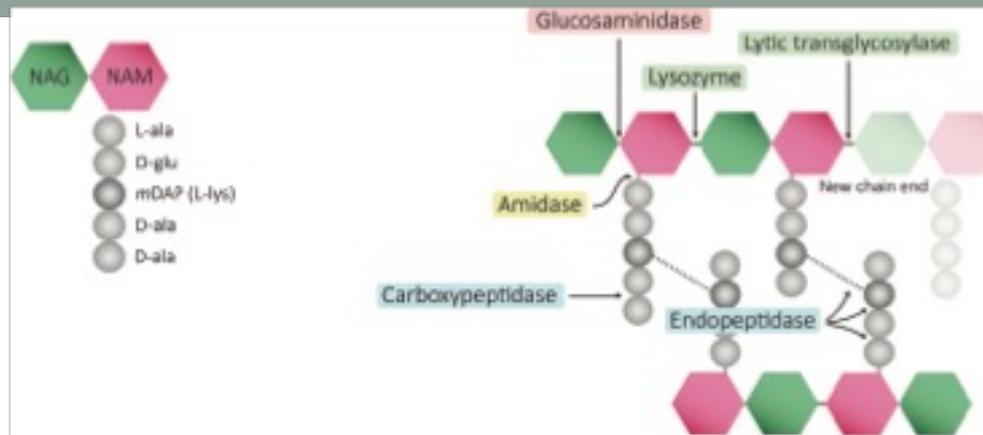


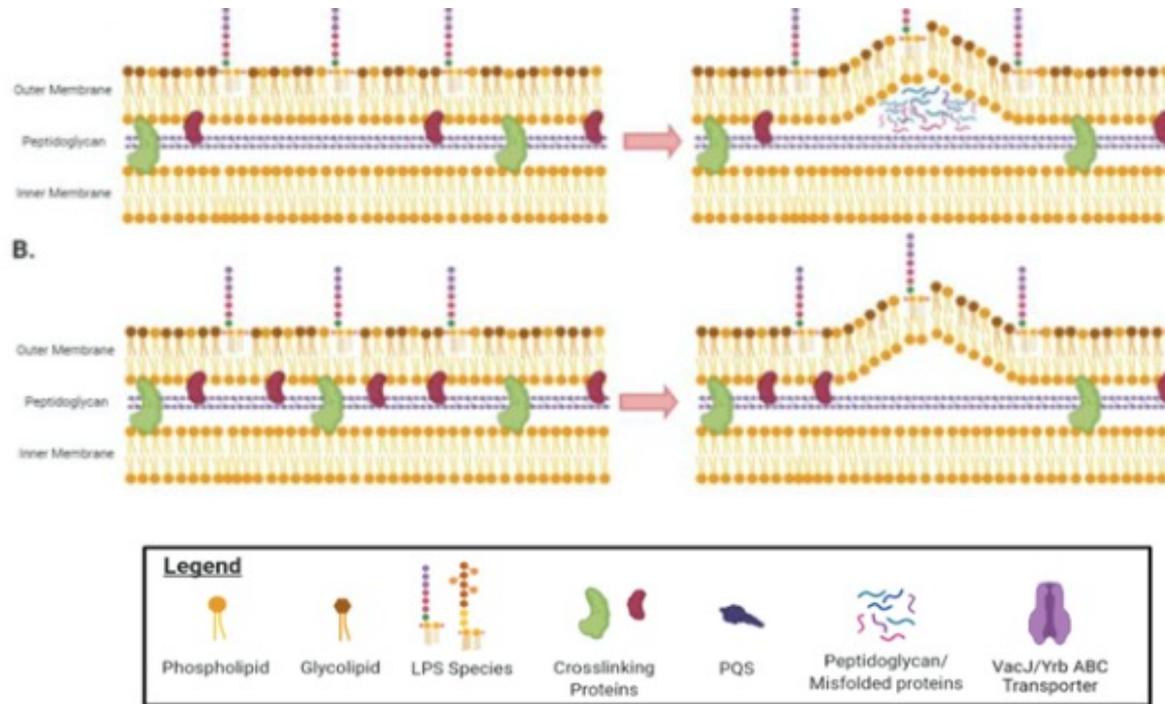
Gram⁻ Bacteria



Dept. Biol. Penn State ©2002

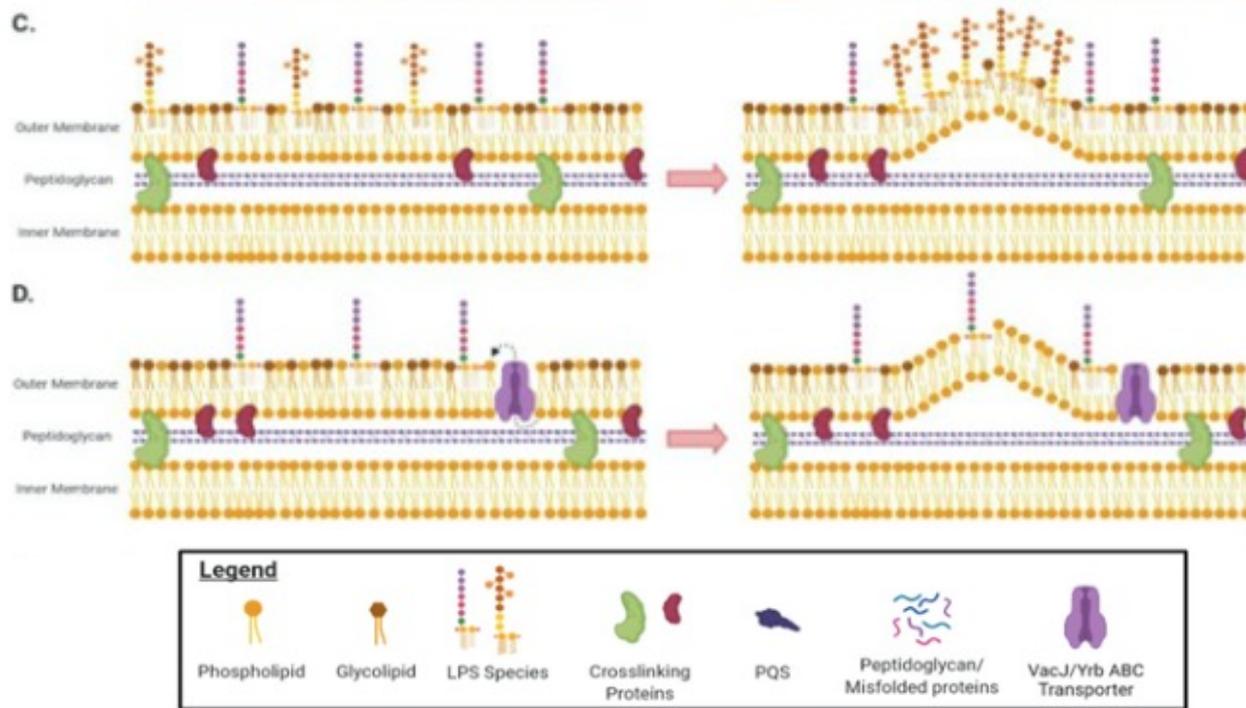






a) La curvatura dell'OM è indotta dall'accumulo locale di frammenti di peptidoglicano o proteine mal ripiegate nel periplasma.

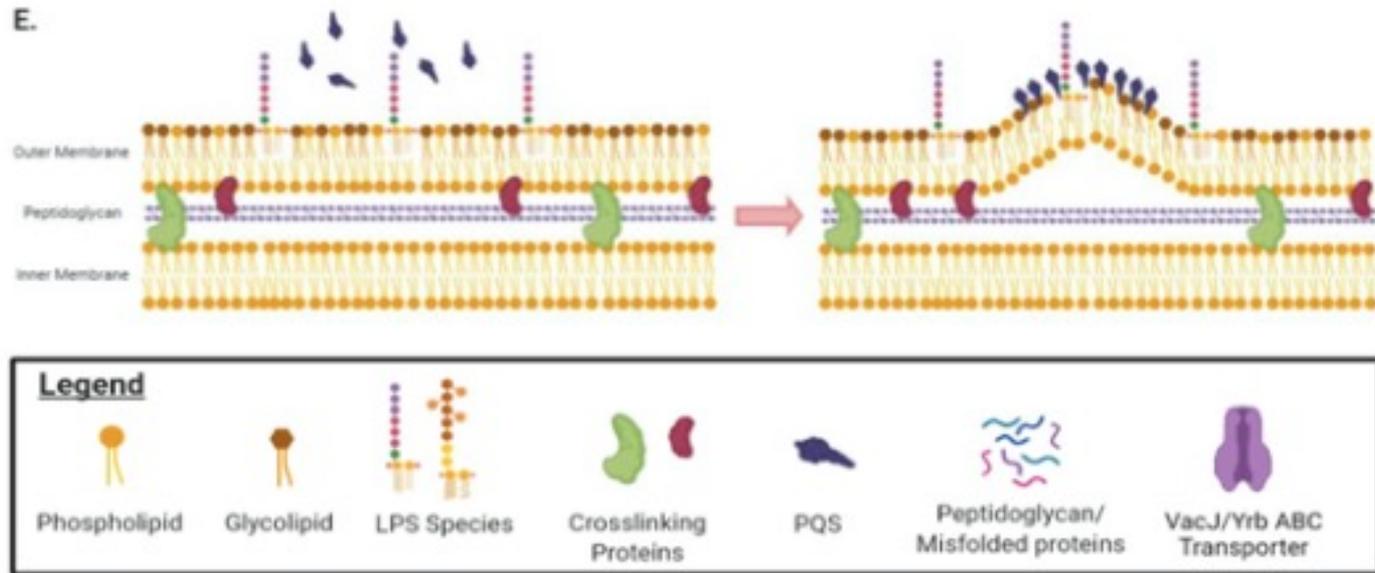
(b) La rimozione delle proteine che ancorano l'OM al peptidoglicano sottostante aumenta la fluidità dell'OM, consentendo alla membrana di piegarsi e formare vescicole.



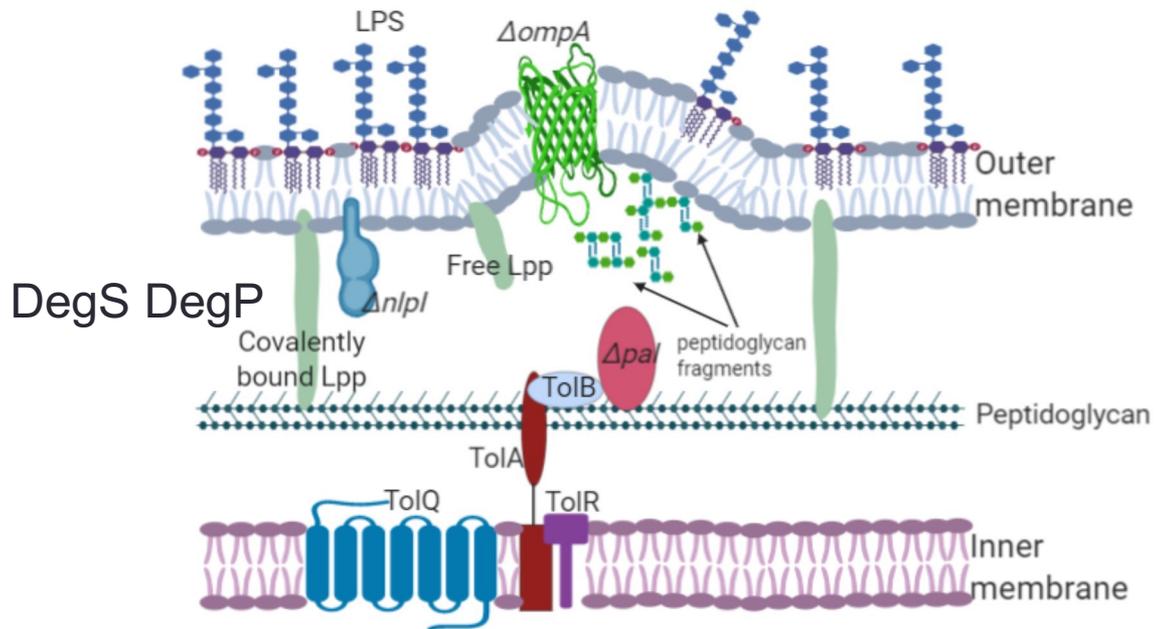
(c) A causa della repulsione di cariche, l'arricchimento locale degli LPS dotati di cariche anioniche induce la curvatura dell'OM e la successiva formazione delle vescicole.

L'arricchimento nelle specie LPS deacilate promuove anche la curvatura della membrana perché la deacilazione del lipide A cambia la forma di LPS da cilindro a cono rovesciato.

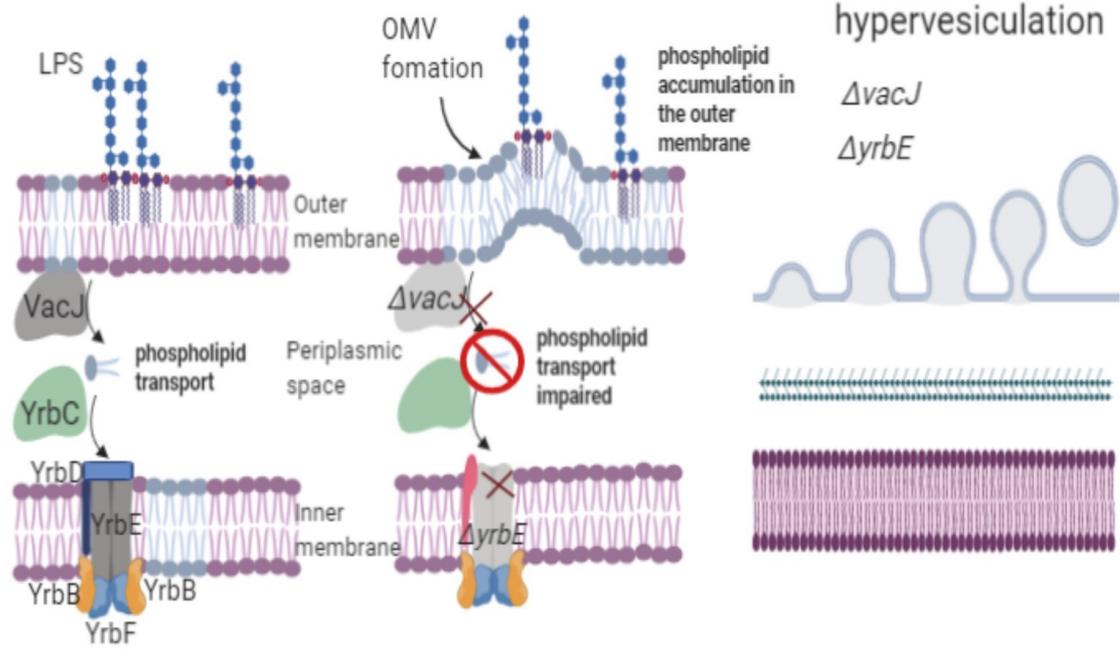
(d) Il trasportatore VacJ/Yrb ABC è coinvolto nel trasporto retrogrado dei fosfolipidi dall'OM. La "down-regulation" di questo trasportatore porta all'accumulo di fosfolipidi nel foglietto esterno dell'OM. Ciò fa sì che il foglietto esterno esterno si espanda rapidamente rispetto a quello interno. Il processo induce la curvatura della membrana e la formazione delle vescicole.

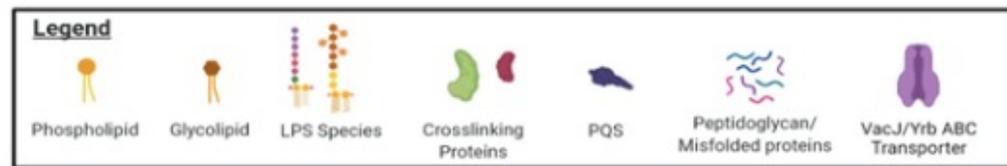
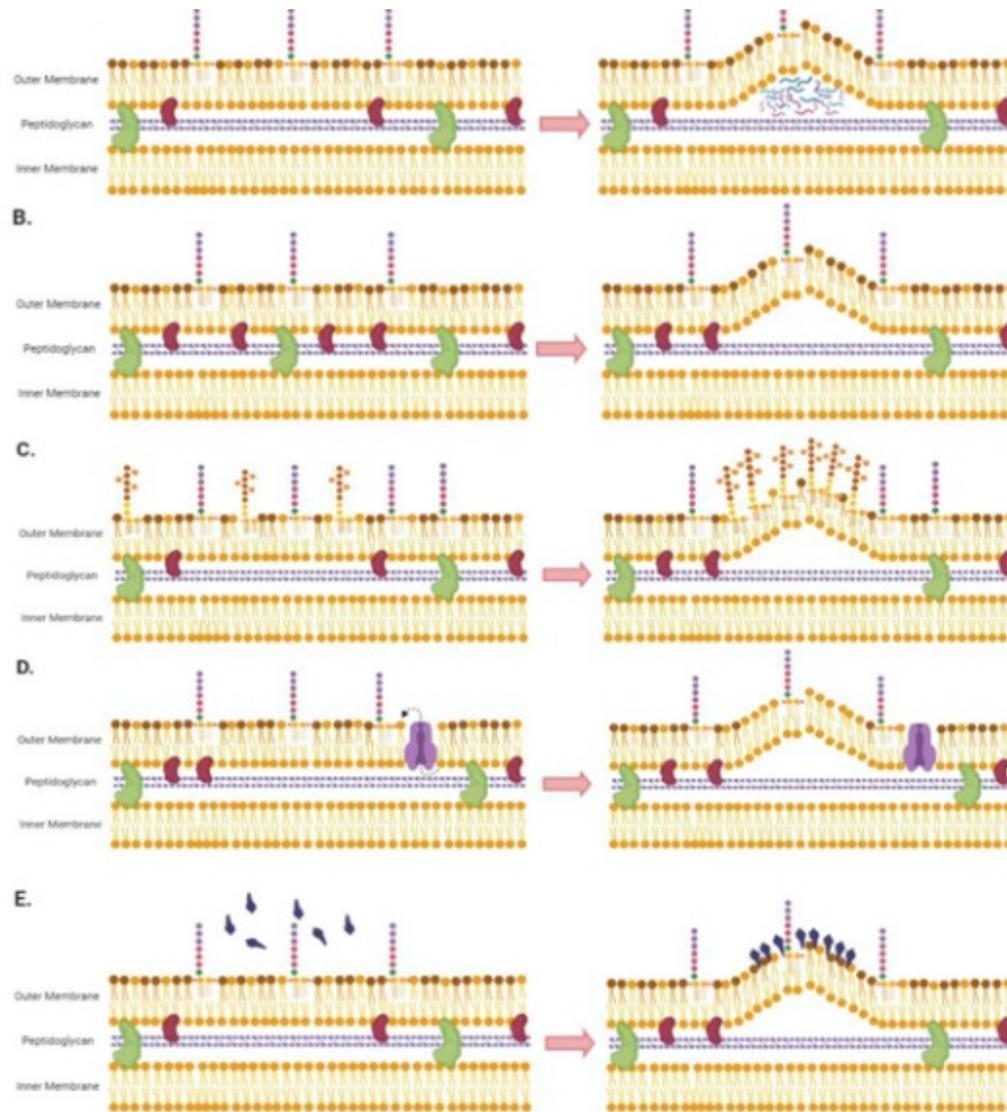


(e) Una volta prodotto, il PQS (*Pseudomonas* quinolone signal). viene secreto dalla cellula e successivamente intercalato nel foglietto esterno dell'OM a causa della sua interazione con gli LPS ed i fosfolipidi. L'inserimento di PQS nell'OM provoca l'espansione del foglio esterno che aumenta la produzione di OMV.



DegS DegP





a) La curvatura dell'OM è indotta dall'accumulo locale di frammenti di peptidoglicano o proteine mal ripiegate nel periplasma.

(b) La rimozione delle proteine che ancorano l'OM al peptidoglicano sottostante aumenta la fluidità dell'OM, consentendo alla membrana di piegarsi e formare vescicole.

(c) A causa della repulsione di cariche, l'arricchimento locale degli LPS dotati di cariche anioniche induce la curvatura dell'OM e la successiva formazione delle vescicole. L'arricchimento nelle specie LPS deacilate promuove anche la curvatura della membrana perché la deacilazione del lipide A cambia la forma di LPS da cilindro a cono rovesciato.

(d) Il trasportatore VacJ/Yrb ABC è coinvolto nel trasporto retrogrado dei fosfolipidi dall'OM. La “down-regulation” di questo trasportatore porta all'accumulo di fosfolipidi nel foglietto esterno dell'OM. Ciò fa sì che il foglietto esterno esterno si espanda rapidamente rispetto a quello interno. Il processo induce la curvatura della membrana e la formazione delle vescicole.

(e) Una volta prodotto, il PQS (*Pseudomonas* quinolone signal). viene secreto dalla cellula e successivamente intercalato nel foglietto esterno dell'OM a causa della sua interazione con gli LPS ed i fosfolipidi. L'inserimento di PQS nell'OM provoca l'espansione del foglio esterno che aumenta la produzione di OMV.

TABLE 1 | Bacterial species showing OMV production.

S. No	Bacterial species	Virulence factors as OMV component	Associated function	Reference
1	<i>Escherichia coli</i> [Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC), Shiga toxin producing <i>E. coli</i> (STEC), Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> (EHEC)]	Heat labile enterotoxin (LT), Shiga toxin, Cytolysin A (ClyA)	Pore forming ability, enterotoxic and vacuolating activity, cytotoxicity	Kolling and Matthews, 1999; Horstman and Kuehn, 2000; Yokoyama et al., 2000; Wai et al., 2003; Kuehn and Kesty, 2005; Kwon et al., 2009; Mendez et al., 2012; Jun et al., 2013
2	<i>Helicobacter pylori</i>	Vacuolating toxin (VacA), Lewis antigen LPS, Helicobacter cysteine rich proteins (Hcp), Sialic acid binding adhesion (SabA)	Adherence, cytotoxic and vacuolating activity, cell proliferation activity	Fiocca et al., 1999; Keenan et al., 2000; Mullaney et al., 2009; Olofsson et al., 2010; Jun et al., 2013
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alkaline phosphatase, Phospholipase C Protease, Hemolysin, Pseudomonas quinolone signal (PQS), Cif, hydrolases	<i>In vitro</i> enzyme activities, cytokine stimulation, bactericidal quinolones	Kadurugamuwa and Beveridge, 1995, 1996; Li et al., 1998; Mashburn and Whiteley, 2005; Mashburn-Warren et al., 2008; Bomberger et al., 2009; Ellis et al., 2010; Choi et al., 2011; Toyofuku et al., 2012
4	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Outer surface proteins (OspA, B, D)	Adherence to host cells	Dorward et al., 1991; Shoberg and Thomas, 1993, 1995
5	<i>Shigella flexneri</i>	Invasion plasmid antigens (IpaB, C,D)	Invasion of host tissue	Kadurugamuwa and Beveridge, 1998
6	<i>Shigella dysenteriae</i>	Shiga toxin (Stx)	Cytotoxicity, host cell apoptosis	Dutta et al., 2004
7	<i>Salmonella typhi</i>	Outer membrane protein (OmpC), ClyA	Pore forming activity	Bergman et al., 2005
8	<i>Treponema denticola</i>	Proteases, Dentilisin	Chymotryptic activity, disruption of tight junctions	Rosen et al., 1995; Chi et al., 2003
9	<i>Neisseria meningitidis</i>	NarE, NlpB, PorA, B	Cytokine production, fibrinolytic activity, adherence to host cells	Ferrari et al., 2006; Vipond et al., 2006; Massari et al., 2010; Van De Waterbeemd et al., 2013
10	<i>Bordetella pertussis</i>	Pertussis toxin (Ptx), Adenylate cyclase hemolysin	Cytotoxicity	Hozbor et al., 1999
11	<i>Burkholderia cepacia</i>	Phospholipase-N, Hemagglutinin	Enzyme activities	Allan et al., 2003
12	<i>Vibrio cholera</i>	Rtx toxin, LPS	Depolymerising actin, stimulatory response	Bishop et al., 2010; Altindis et al., 2014
13	<i>Xanthomonas campestris</i>	Type-3 secretion proteins, cellulase, xylosidase	Enzyme activity, insecticidal activity	Sidhu et al., 2008
14	<i>Legionella pneumophila</i>	Acid phosphatase (Map), Protease (Msp), Chitinase (ChiA), Hsp60	Adherence to ECM, enzyme activity	Fernandez-Moreira et al., 2006; Galka et al., 2008
15	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Ubiquitous surface protein (UspA1, A2)	Complement binding	Tan et al., 2007; Vidakovics et al., 2010
16	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Outer membrane protein (AbOmpA), PAMPS (LPS, flagellin), Proteases, Phospholipases, SOD, Catalase	Binding to host tissues, Immunomodulatory effect, enzyme activity	Kwon et al., 2009; Mendez et al., 2012; Moon et al., 2012; Jun et al., 2013
17	<i>Campylobacter jejuni</i>	Cytolethal distending toxin (CDT)	Adhesion and invasion, immunomodulatory effect	Elmi et al., 2012; Jang et al., 2014
18	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	CTD family proteins such as gingipains (RgpA, RgpB, Kgp)	Adherence, host tissue invasion, immune evasion	Veith et al., 2014
19	<i>Yersinia pestis</i>	Adhesin Ail, Protease Pla, F1 outer fimbrial antigen	Complement binding, enzyme activity	Eddy et al., 2014
20	<i>Cronobacter</i> sp. [<i>C. sakazakii</i> , <i>C. turicensis</i> , <i>C. malonicus</i>]	Outer membrane protein (OmpA and OmpX)	Binding to host cell receptors	Kothary et al., 2017

BACTERIAL MEMBRANE VESICLES (MVs)

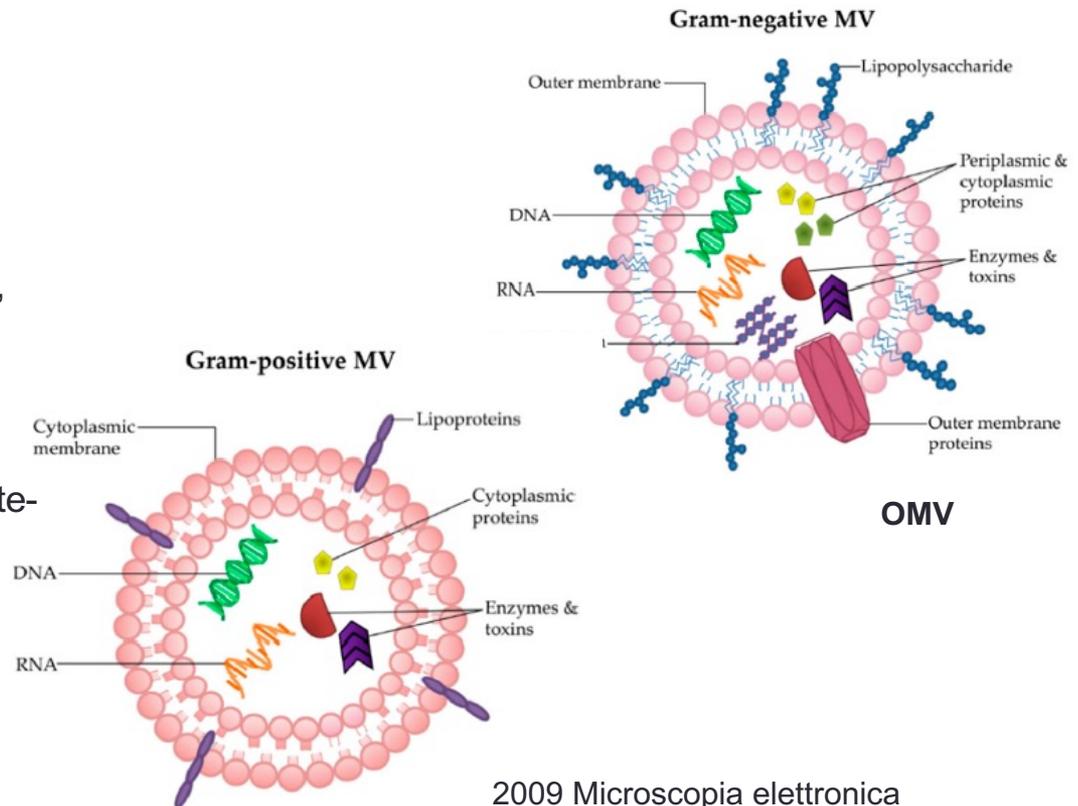
§ Carrier naturali di piccole molecole

§ Dimensioni eterogenee → 20-300 nm

§ Inclusione selettiva di cargo diversi: LPS, peptidoglicano, acidi nucleici, proteine citoplasmatiche e periplasmatiche

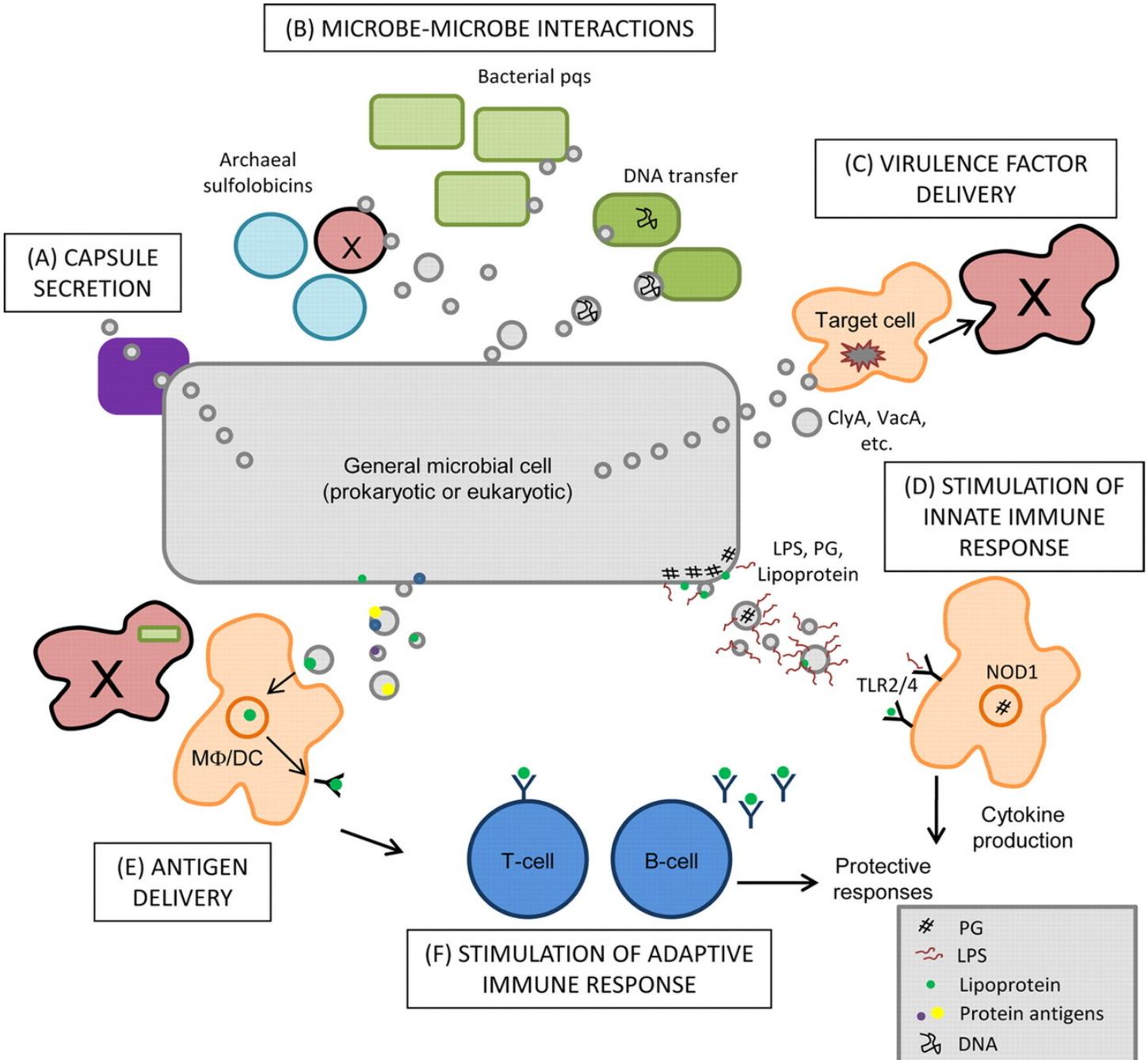
§ Comunicazione, competizione, sopravvivenza allo stress, interazione ospite-patogeno

§ Interazione con cellula ospite e rilascio contenuto in essa → endocitosi



2009 Microscopia elettronica
Staphylococcus aureus

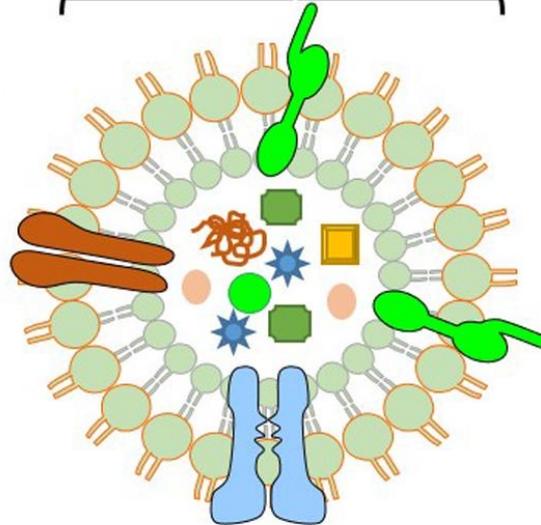
Bitto, N.J.; Kaparakis-Liaskos, M. [2017]. «The therapeutic benefit of bacterial membrane vesicles», *International Journal of Molecular Sciences*, 18, pp. 1287-1302.



Prospective applications

- ① As drug delivery vehicles
- ② As communication tool
- ③ As secretory system
- ④ As vaccines
- ⑤ As adjuvants

Defensive functions



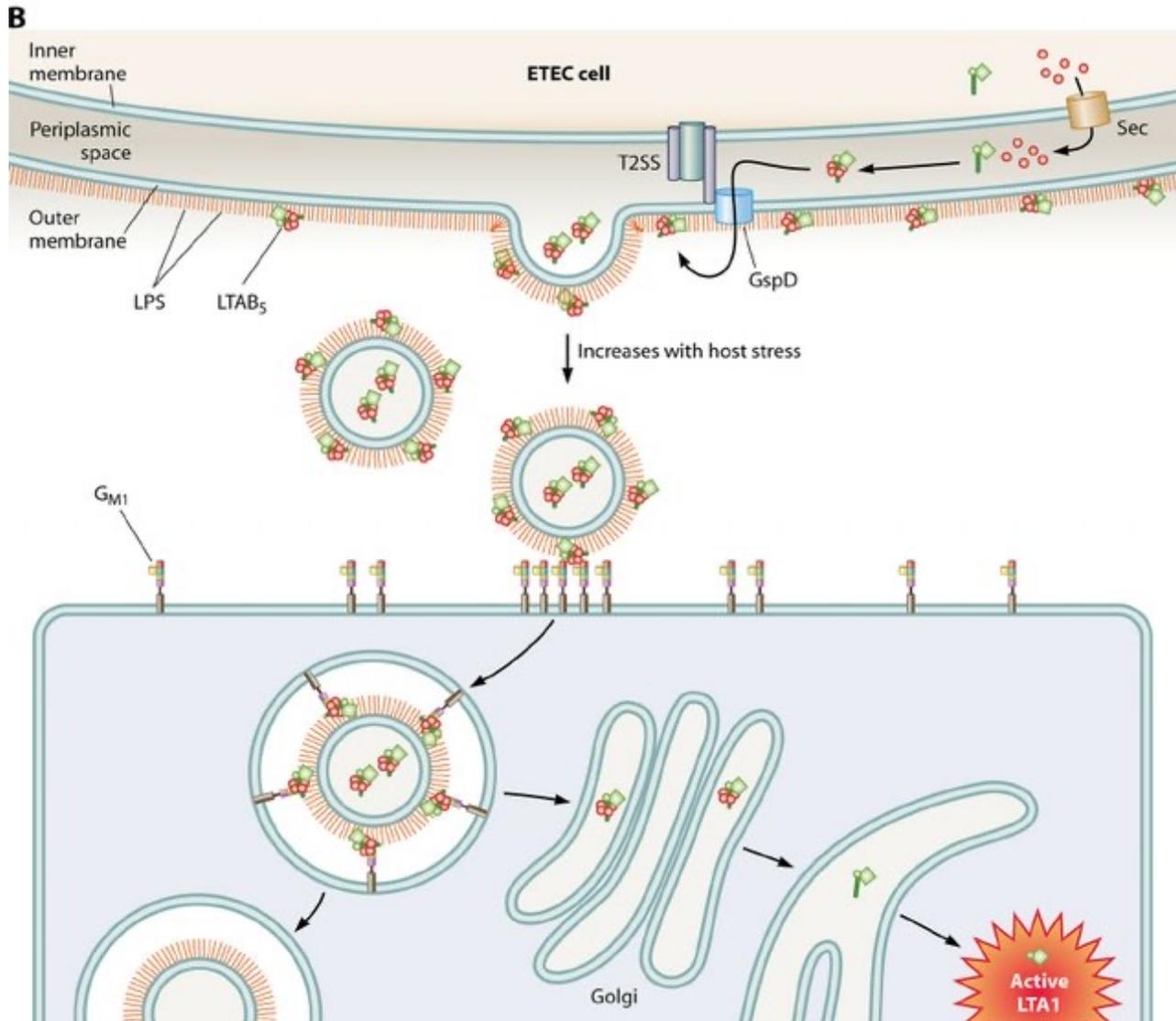
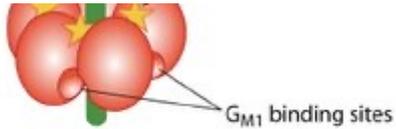
Offensive functions

Major ones

- ① Host immune suppression
- ② Sharing of resistance determinants
- ③ Enhanced biofilm formation
- ④ Relieving stress
- ⑤ Nutrient acquisition
- ⑥ Trapping AMPs

Major ones

- ① Bacterial killing
- ② Delivery of virulence factors
- ③ Elicit inflammatory response
- ④ Host-tissue disruption
- ⑤ Concentrate toxins

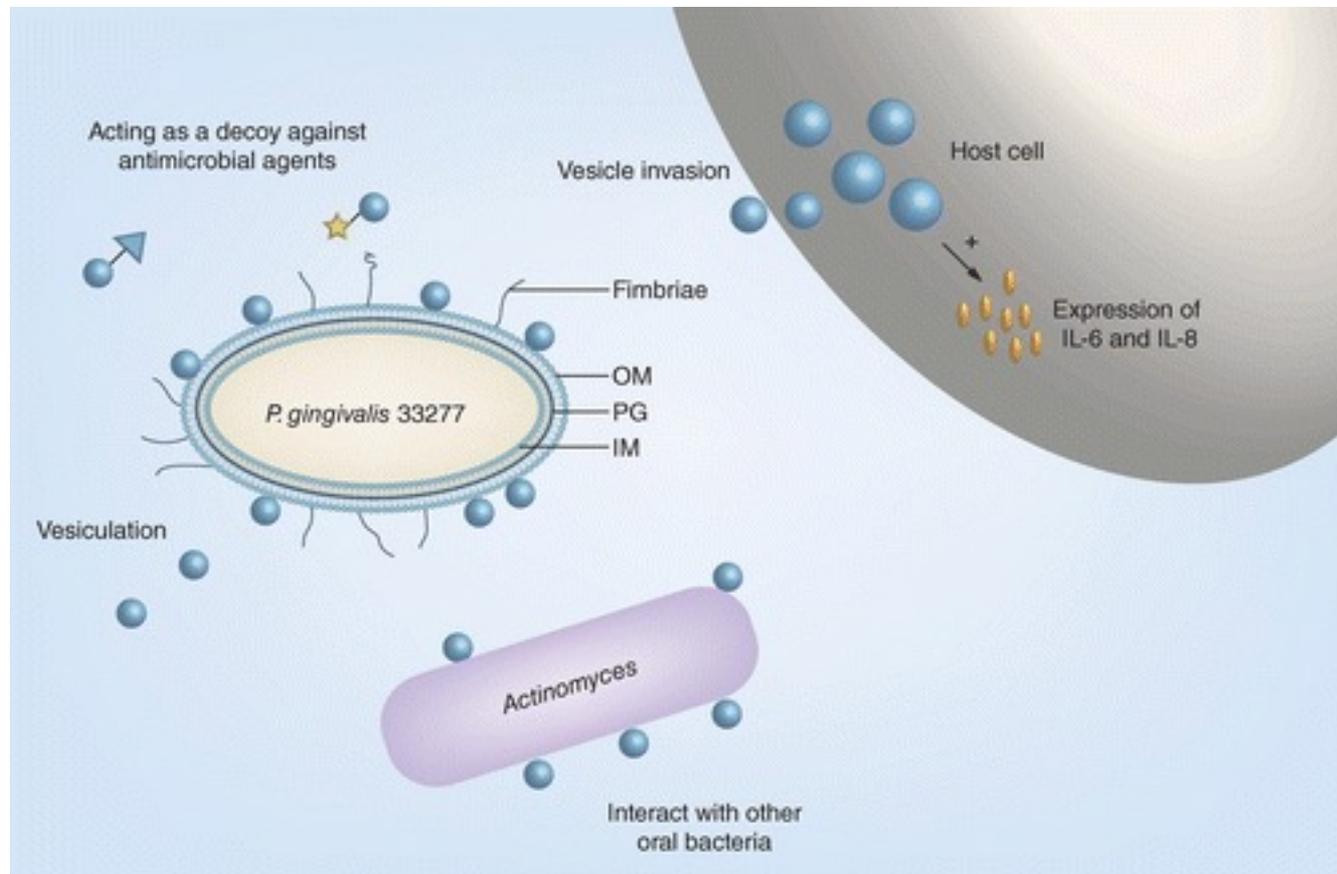


Heat-labile
enterotoxin (LT).

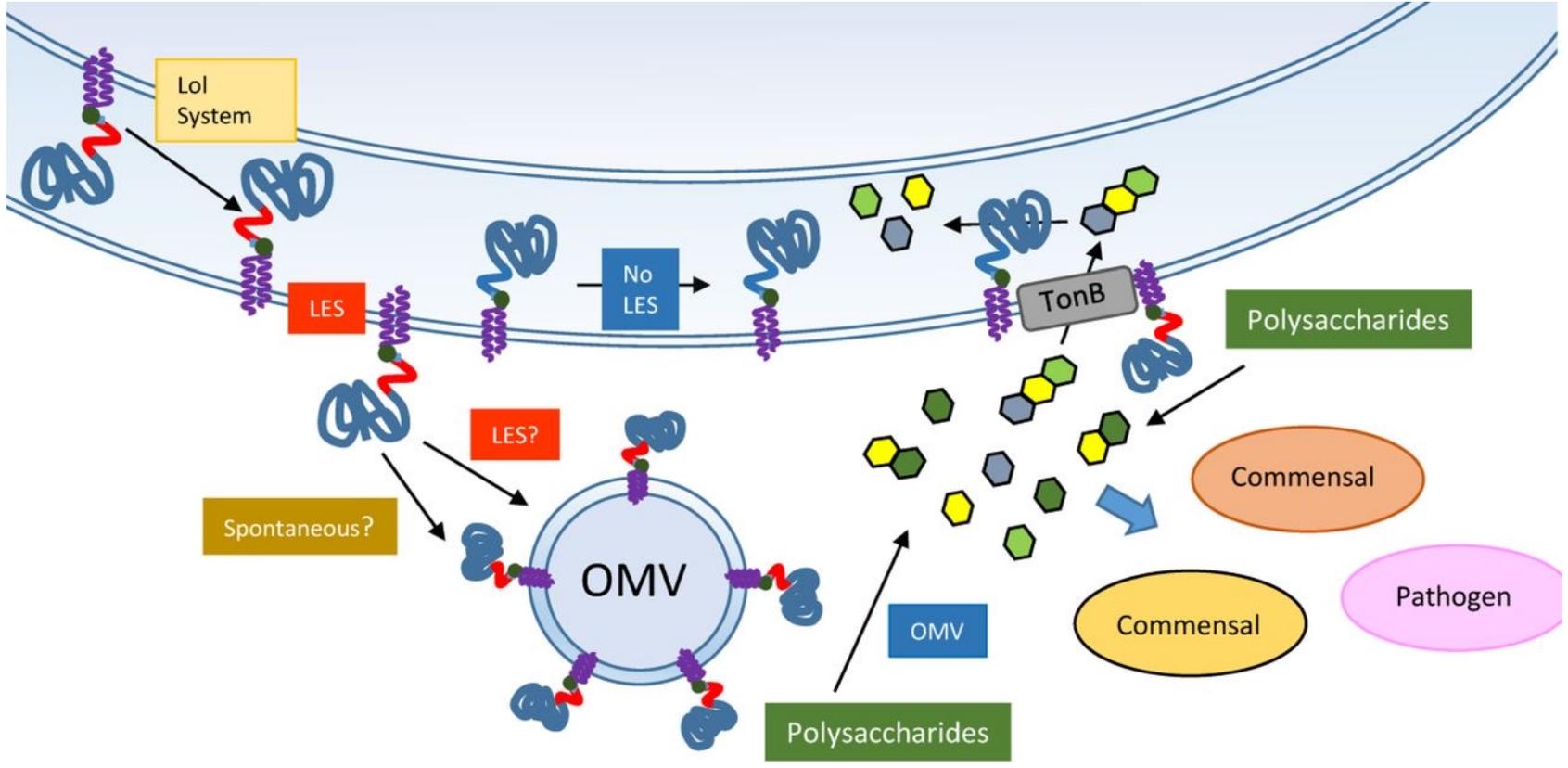
Pore-forming
cytotoxic protein
cytolysin A (ClyA)

Anche *S. typhimurium*, sfrutta gli OMV per trasportare i fattori di virulenza. S.t. è in grado di produrre OMV anche durante la sua vita intracellulare, secernendo all'interno delle cellule epiteliali infette OMV ricchi di tossina citoletale. La biogenesi di OMV in *S. typhimurium* all'interno di macrofagi infettati è innescata dal sistema a due componenti PhoPQ che controlla l'espressione degli altri fattori di virulenza.

I principali fattori di virulenza di *P. gingivalis*, i “gingipains”, sono arricchiti in OMV, che contribuisce alla compromissione della funzione della cellula ospite. Inoltre, le emoagglutinine e le proteine da shock termico, che sono principalmente coinvolte nell'adesione e l'invasione delle cellule ospiti, sono anch'essi secreti come cargo delle OMV. Di conseguenza, la produzione di OMV aumenta l'adesione batterica alle cellule ospiti, stimolando l'aggregazione batterica e portando alla formazione della placca dentale.



Bacteroides è noto per secernere grandi quantità di OMV e contribuire attivamente alla simbiosi intestinale. Questi batteri secernono glicosilasi e proteasi, che degradano polisaccaridi complessi e mucine. I prodotti di degradazione generati possono quindi essere utilizzati come fonti di nutrienti da qualsiasi altro membro del microbiota intestinale. Pertanto, gli OMV sono considerati beni pubblici: una volta che gli OMV vengono rilasciati, qualsiasi membro del microbiota intestinale può beneficiare della loro attività degradativa. Tuttavia, non tutto il carico delle OMV svolge questo ruolo altruistico. Recentemente, una famiglia di tossine peptidiche che ha un'attività ad ampio spettro contro *Bacteroides* è stata trovata come cargo delle OMV. I geni che codificano per queste tossine sono ampiamente distribuiti in tutto il microbiota intestinale umano



L'arricchimento di proteine specifiche nelle OMV non è casuale. Molte di queste sono capaci di interagire con la porzione dell'antigene O degli LPS.

Questa interazione può essere diretta, nel qual caso potrebbero avere le proteine specifiche dell'OMV un dominio per riconoscere e interagire con l'antigene O, promuovendo la compartimentazione dell'OM.

In alternativa, l'interazione potrebbe essere mediata da un fattore ancora sconosciuto che recluterebbe la proteina nella regione arricchita con antigene O nell'OMV.

Questo meccanismo proposto ricorda il ruolo della galectina nello smistamento delle proteine negli esosomi .

In accordo con il modello di «sorting», *B. fragilis* e *Bacteroides thetaiotaomicron* utilizzano sequenze proteiche conservate per indirizzare specificamente le proteine alle OMV.

Le OMV di questi organismi sono arricchite di in un ampio sottoinsieme di proteine uniche, che sono risultate essere lipoproteine acide (caricate negativamente), mentre la maggior parte delle proteine OM, proteine a β -barrel, sono caricate positivamente.

Nei *Bacteroidetes*, è stato scoperto che le lipoproteine arricchite in OMV contengono un motivo amminoacidico conservato e caricato negativamente noto come dominio LES (segnale di esportazione delle lipoproteine)

Come fanno le vescicole a essere internalizzate dalle cellule eucariotiche?

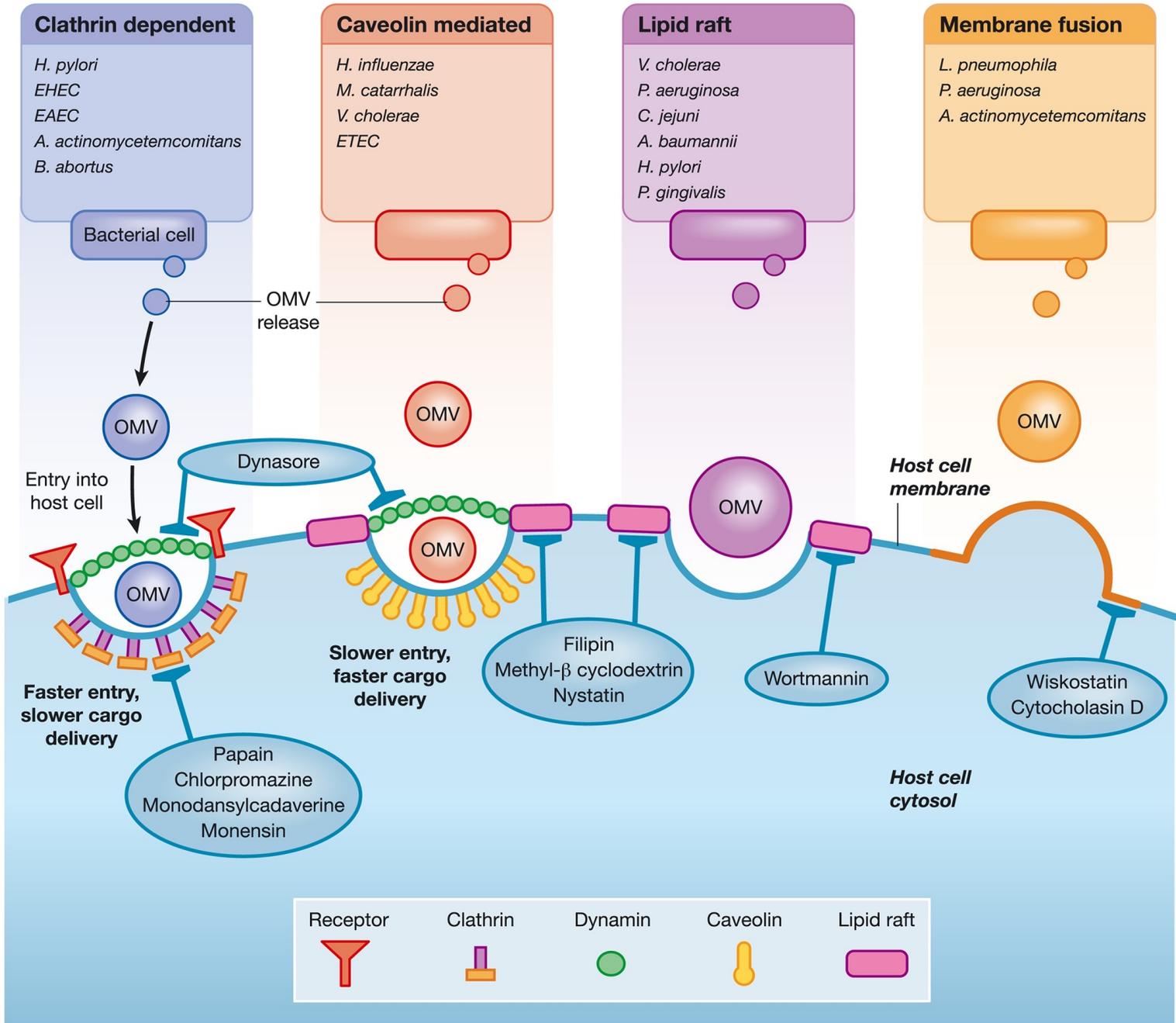
Sono stati proposti due pathways:

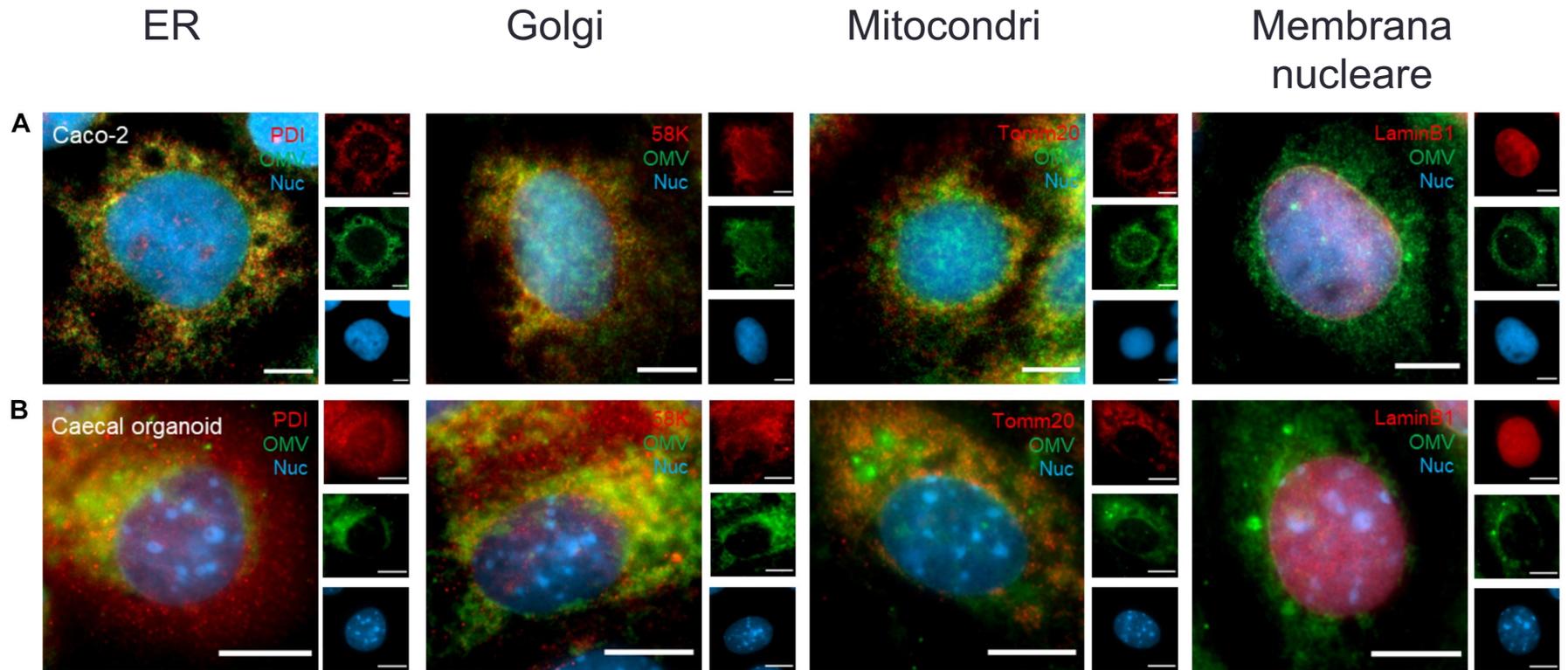
Il delivery diretta del cargo delle OMVs mediante fusione alle membrane delle cellule ospiti.

Seguendo questa ipotesi la fusione dell'OMV con i lipid rafts delle cellule ospiti induce il rimodellamento dell'actina per consentire al cargo solubile dell'OMV di diffondersi direttamente nel citoplasma delle cellule ospiti. Questo è il meccanismo proposto per le OMV di *P. aeruginosa*, *Legionella pneumophila* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

L' internalizzazione delle OMV mediante il pathway endocitico.

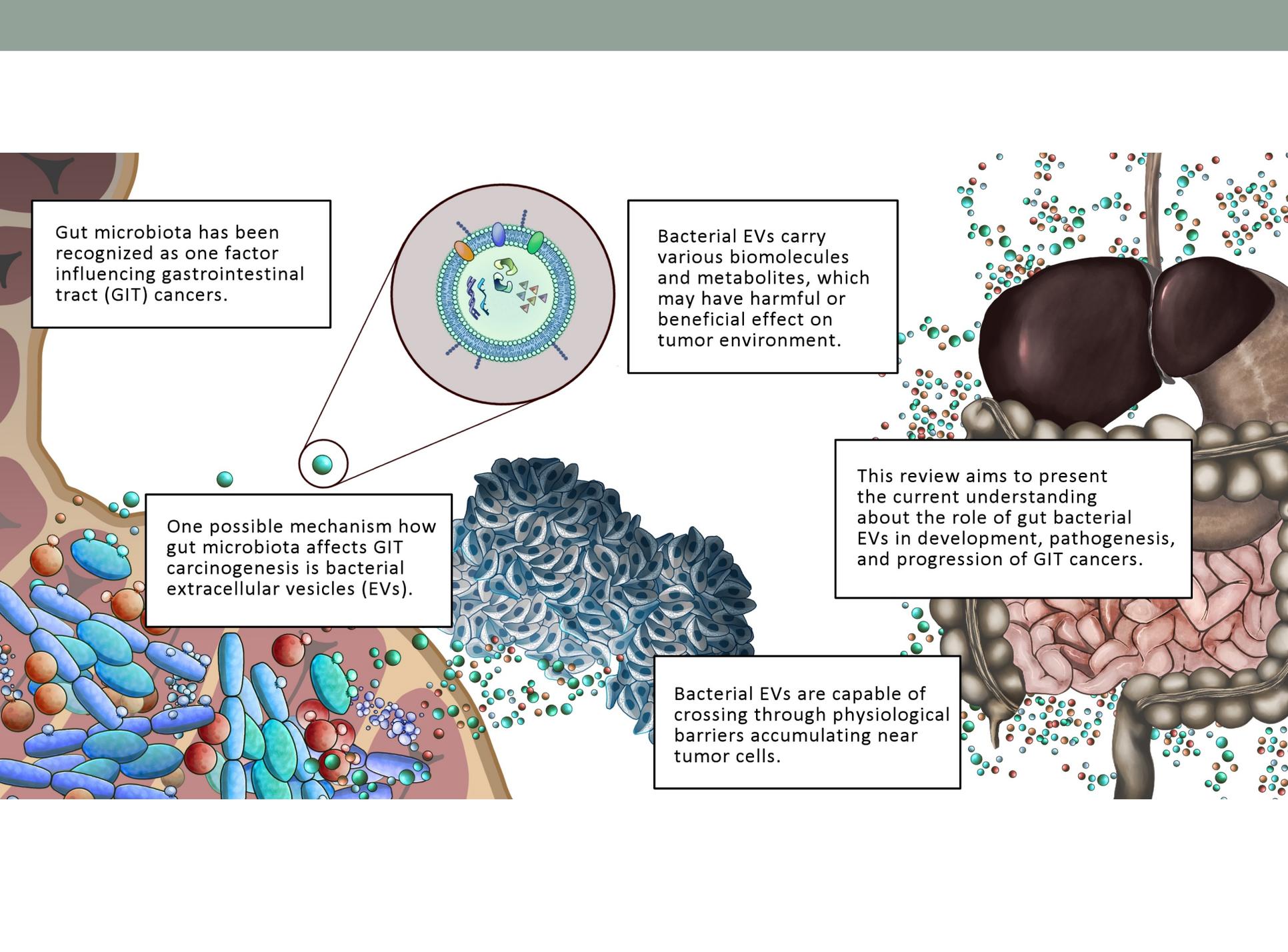
Il delivery delle OMVs potrebbe essere facilitata da diversi meccanismi di endocitosi, tra cui endocitosi mediata da clatrina, endocitosi mediata dalle caveoline ed endocitosi indipendente da clatrina e dalle caveoline. Dopo che gli OMV si sono legati ai raft lipidici, sono interiorizzati attraverso uno dei tanti percorsi endocitici





OMV di *Bacteroides thetaiotaomicron* esposte 24 h a cellule Caco-2 o organoidi dell'intestino cieco

Le dimensioni e il cargo dell'OMV possono determinare quale/i meccanismo/i di penetrazione nelle cellule ospiti è impiegato. le OMV da ceppi patogeni di *E. coli* sono interiorizzati circa il 30% più rapidamente ed efficientemente rispetto a quelli di ceppi di *E. coli* non patogeni. Allo stesso modo, le OMV prodotti e secreti da ceppi mutanti privi di un fattore di virulenza, come LT o gingipain, non possono fondersi o entrare nelle cellule ospiti.

The diagram illustrates the role of gut microbiota and bacterial extracellular vesicles (EVs) in gastrointestinal (GIT) cancer. It features several key components: 1. A cross-section of the gut wall on the left showing a layer of blue epithelial cells and a submucosal layer containing various bacteria (blue and red rod-like shapes). 2. A large, multi-layered cluster of blue epithelial cells in the center, representing a tumor. 3. A large, dark brown, lobulated mass on the right, representing a liver tumor. 4. Numerous small, multi-colored spheres (red, green, blue, orange) representing bacterial EVs, which are shown circulating in the gut lumen and accumulating near the tumor and liver. 5. A circular inset at the top center provides a detailed view of a bacterial cell, showing its internal organelles and a vesicle being released from its surface. 6. Five text boxes with black borders provide explanatory text for different parts of the diagram.

Gut microbiota has been recognized as one factor influencing gastrointestinal tract (GIT) cancers.

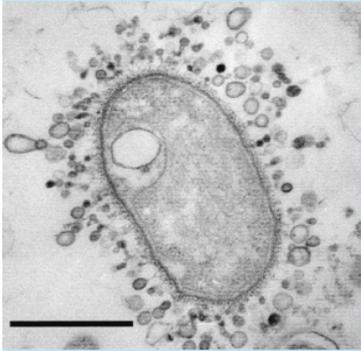
One possible mechanism how gut microbiota affects GIT carcinogenesis is bacterial extracellular vesicles (EVs).

Bacterial EVs carry various biomolecules and metabolites, which may have harmful or beneficial effect on tumor environment.

This review aims to present the current understanding about the role of gut bacterial EVs in development, pathogenesis, and progression of GIT cancers.

Bacterial EVs are capable of crossing through physiological barriers accumulating near tumor cells.

VANTAGGI DELLE MVs NELLE APPLICAZIONI TERAPEUTICHE



Gram-negative bacteria-shedding OMVs throughout its entire outer membrane, scale bar 1 μ m

Membrana MVs

- protezione cargo da nucleasi e proteasi
- Mantenimento attività antigenica per tutto il periodo di conservazione da 4°C fino a 37°C



Economiche



Stabili in ampio intervallo di temperatura



Sicurezza: sicure quando usate come vaccino umano

Bioreattori
Mutanti ipervescicolanti
Isolamento e purificazione delle MVs

Vaccino Meningococco B

- Economicamente sostenibile
- Efficace e sicuro su bambini di appena 2 anni

PTE in *E. coli*

Neisseria meningitidis

Bacterially produced carriers	Particle size	Material properties	Advantages	Disadvantages	References
Liposomes	10 nm–hundreds nm	Phospholipid vesicles	More extensive research; High biocompatibility; Low immunogenicity	Drug leakage; Incomplete loading function; Cumbersome quality control system	Carita et al., 2018
Bacterial ghosts	40–200 nm	Empty envelopes of Gram-negative bacteria	High security	Low efficiency; Complex production; Unclear effects of human application	Hu et al., 2019
Biologically synthesized polyester	100–500 nm	Polyester particles	Ensure antigen integrity; High biocompatibility; Non-toxic metabolism	Complex purification; Unstable production; Difficult to control the particle size of the host cell	Lee et al., 2019
Inclusion Bodies (IBs)	50 nm–hundreds nm	Inactive protein particles	Dense structure, hard to hydrolyze; Complete biocompatibility; Highly expressed protein	Purification is complex; Hard to produce large batches; Complex and Inconsistent production	Sánchez et al., 2020
OMVs	30–200 nm	Outer membrane of Gram-negative bacteria	Clinical use; High biocompatibility; Good biodegradability; Large-scale production; Simple purification steps; Unified production process; Convenient antigen presentation platform	Multiple antigen presentation efficiency is not high	Kesty and Kuehn, 2004; Ellis and Kuehn, 2010

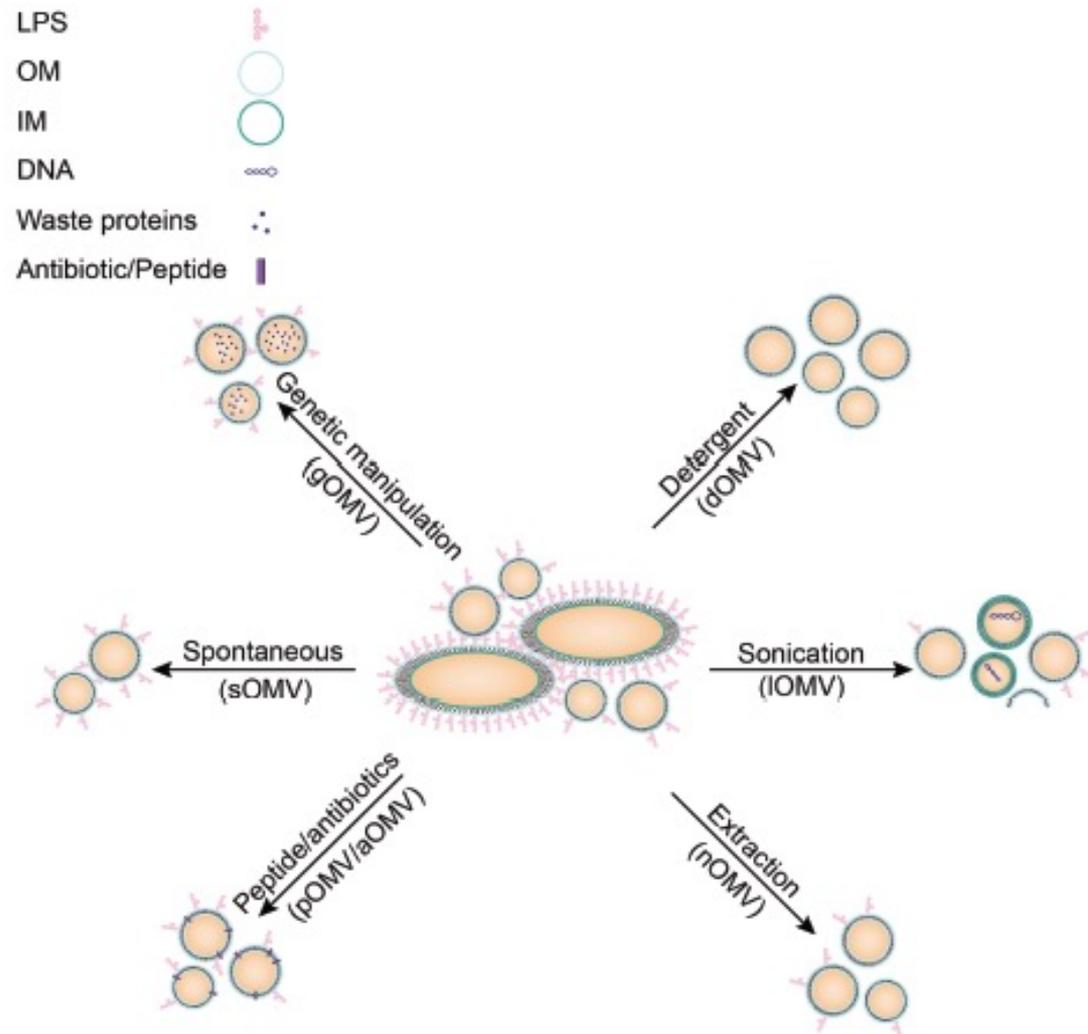


FIGURE 2 | Schematic overview of different induction methods for OMVs including characteristics of resulting OMVs. No stimulation: these vesicles are most similar to spontaneous vesicles released *in vivo* (sOMVs). Genetic manipulation may alter OMV cargo (gOMVs). Detergent isolation of OMVs results in OMVs lacking LPS (dOMVs), an important immunogenic molecule. Sonication of bacteria disrupts the entire membrane, resulting in impurities in the vesicles' fraction due to cell lysis (iOMVs). Extraction with membrane destabilizing molecules may alter vesicle composition (nOMVs), but they are more representative of the OM. OMV induction by peptides or antibiotics may alter membrane stability and may result in the peptide or antibiotic being present in the resulting OMV (pOMVs/aOMVs). A new technique researched to induce OMVs is heat-shock, resulting in hOMVs, but this technique is not yet established and therefore not included in this figure.

TABLE 1 | Summary of used abbreviations for OMVs based on their induction method, as described in the text.

Method	Abbreviation	Yield	Remarks
No induction	sOMV	Low	-
Genetically induced OMVs	gOMV	Variable	Possible change in cargo
Detergent induced OMVs	dOMV	High	Loss of LPS and lipoproteins
Sonication induced OMVs	IOMV	High	Contamination with IM
Extraction molecule induced OMVs	nOMV	High	Potential loss of membrane stability
Peptide induced OMVs	pOMV	Low	Potential loss of membrane stability
Antibiotic induced OMVs	aOMV	Variable	Antibiotic presence or resistance
Heat induced OMVs	hOMV	High	Possible change in lipid composition

MVs E RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA E ADATTATIVA

MVs
inducono



Riflettono la struttura della membrana batterica → antigeni in conformazione nativa → più efficace nella produzione di anticorpi neutralizzanti rispetto ai solo antigeni purificati



Risposta immunitaria innata → prima linea di difesa → citochine e chemochine

OMV → veicoli di trasporto dei MAMPs a lunga distanza

Risposta immunitaria adattativa

Studio *in vivo* con vaccino MV *Neisseria meningitidis*

Induzione cellule B e T durature in topi per 120 giorni

Profilo anticorpale: IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e siero con attività battericida

N. Meningitidis
MVs PorA vs. PorA purificata



VACCINI MVs

Grande richiesta sviluppo nuovi vaccini a causa di:

- ➔ Insorgenza antibiotico resistenze
- ➔ Aumento malattie nosocomiali
- ➔ Limitata disponibilità di adiuvanti sicuri per l'uomo

Bacillus pertussis →
Whole-cell vaccine vs
MVs vaccine

MVs usate come **adiuvanti** per vaccini vivi, inattivati e per antigeni purificati

Adiuvanti convenzionali

Allume
Tossina difterica
Tossina colerica

Effetti collaterali negativi

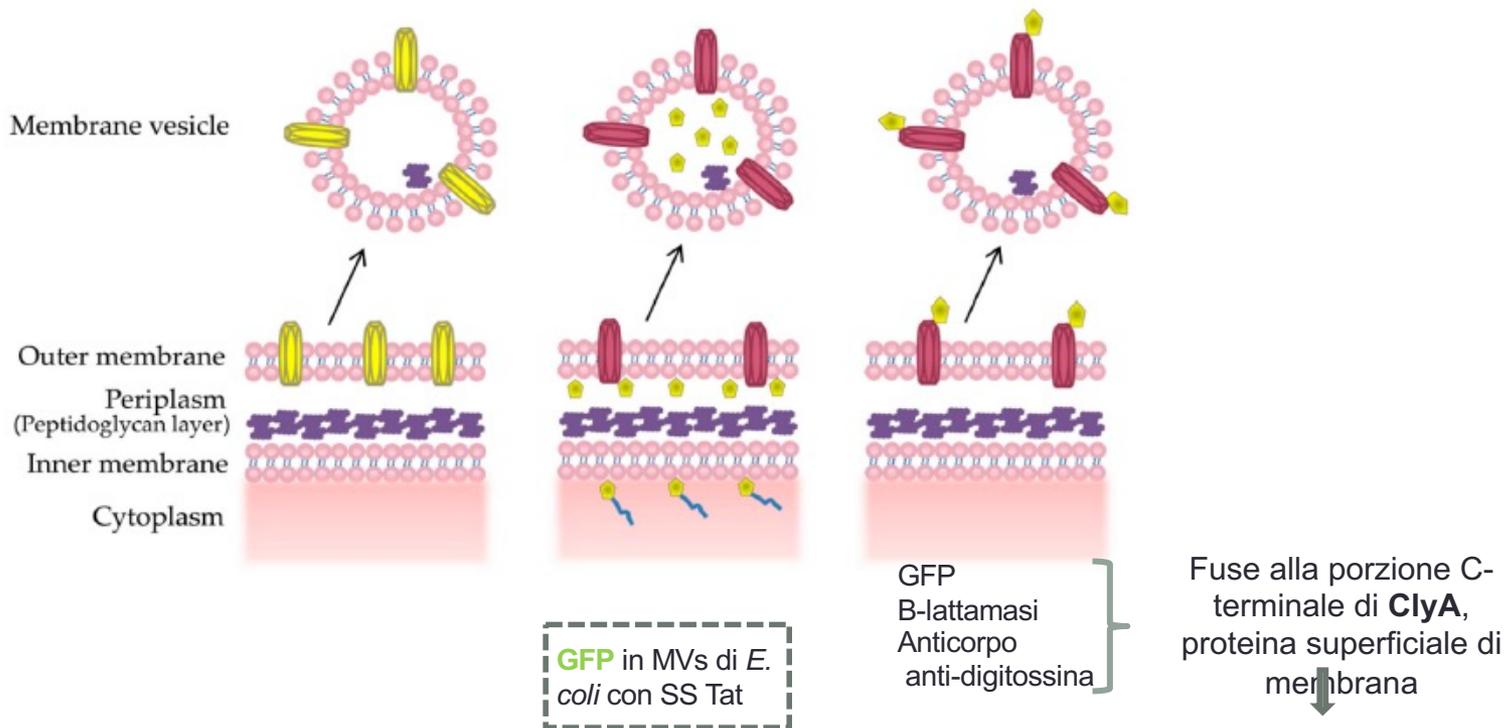
Infiammazione
Tossicità
Scarsa risposta immunitaria

Bitto, N.J.; Kaparakis-Liaskos, M. [2017]. «The therapeutic benefit of bacterial membrane vesicles», *International Journal of Molecular Sciences*, 18, pp. 1287-1302.

BIOINGEGNERIZZAZIONE DELLE MVs

Gram negativi
 Detossificazione
 LPS
 ↓
 Detergente
 Manipolazione
 genetica

Gram
 positivi
 ↓
 No LPS

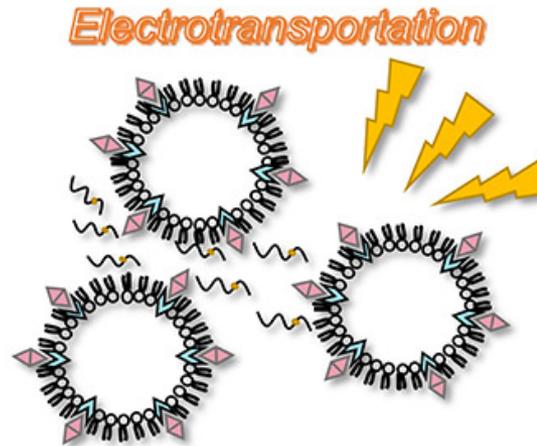


Bitto, N.J.; Kaparakis-Liaskos, M. [2017]. «The therapeutic benefit of bacterial membrane vesicles», *International Journal of Molecular Sciences*, 18, pp. 1287-1302.

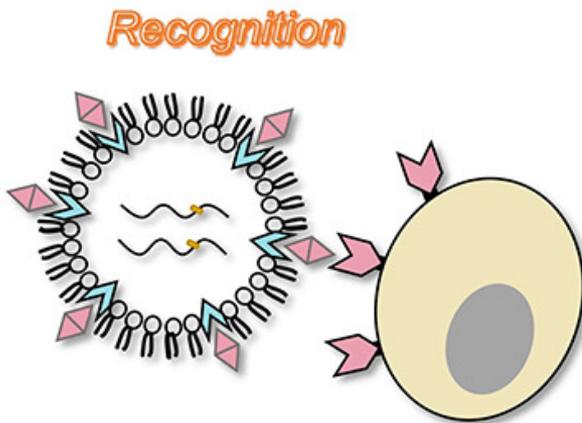
Cancer Targeted therapy



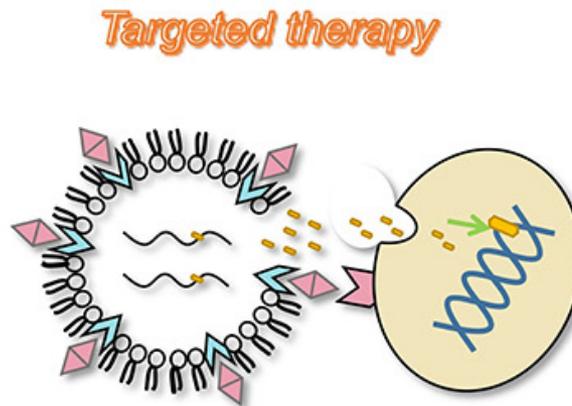
Expressing cancer specific antibody



Electrotransporting small molecule drugs



Specific recognition of cancer cells

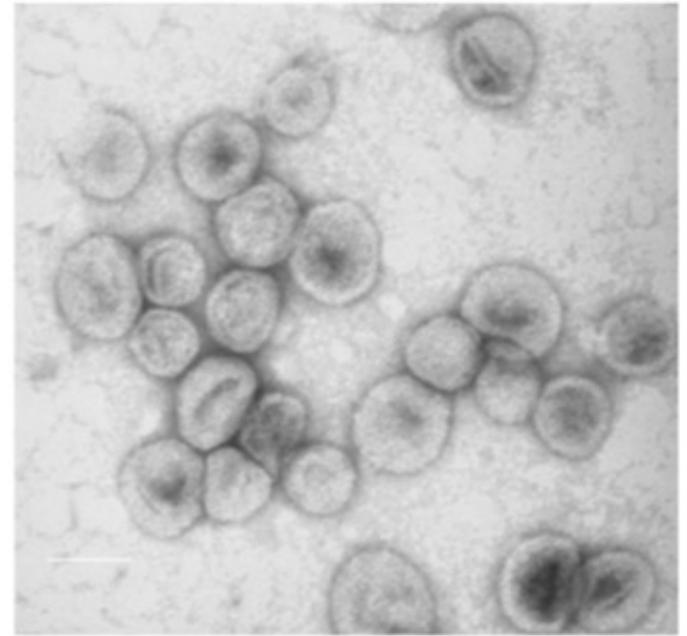
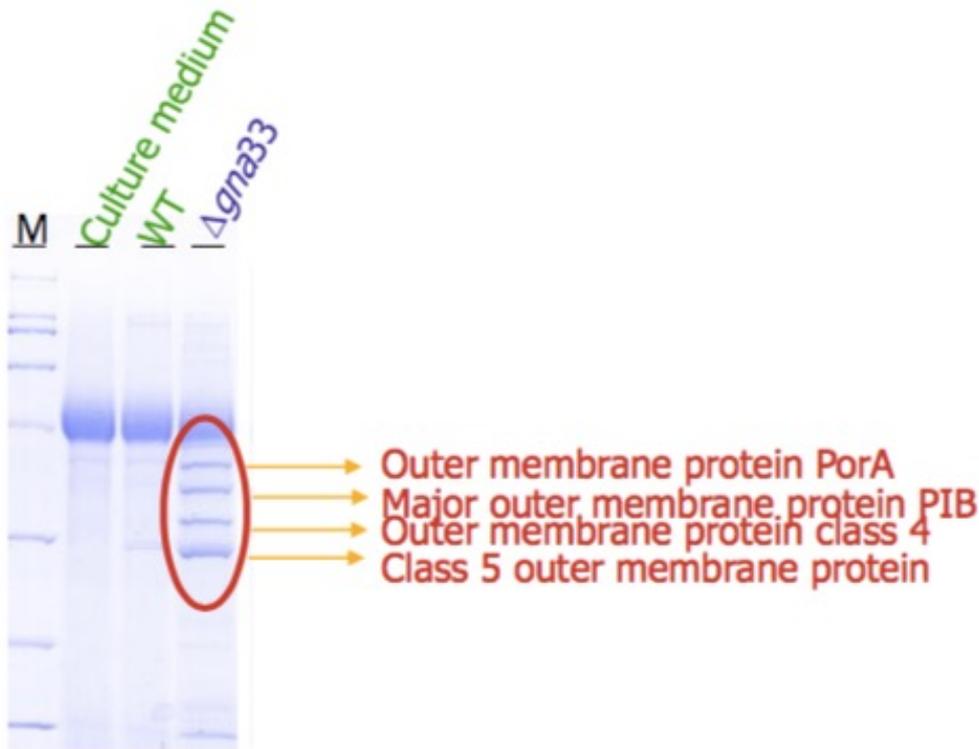


Drugs entering cancer cells
Silencing cancer-related genes

Terapia mirata per il recettore HER2. Gli OMV sono geneticamente progettati per trasportare siRNA che silenzia i geni del cancro e mira specificamente alle cellule tumorali che esprimono l'antigene HER2 per esercitare effetti anti-cancro.

Selection of MenB mutants releasing OMVs:

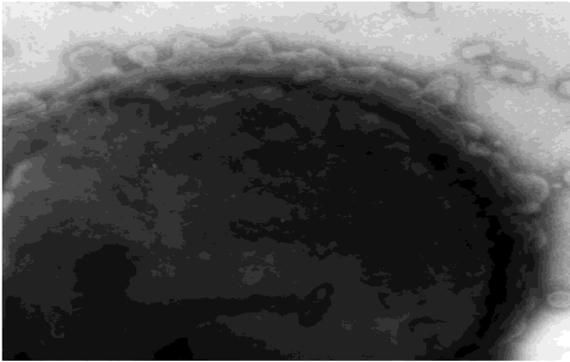
$\Delta gna33$ mutants release large quantities of OMVs
in the culture supernatants



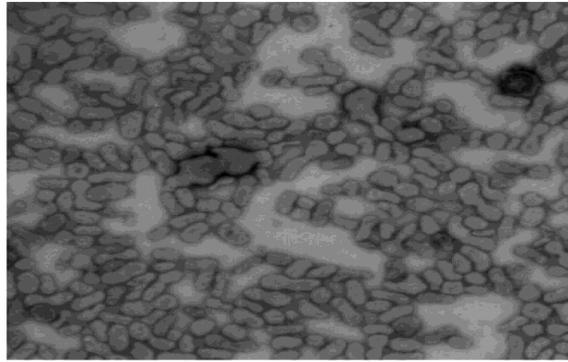
GNA33: a membrane-bound lytic transglycosylase

Adu-Bobie et al. Infect Immun. 2004

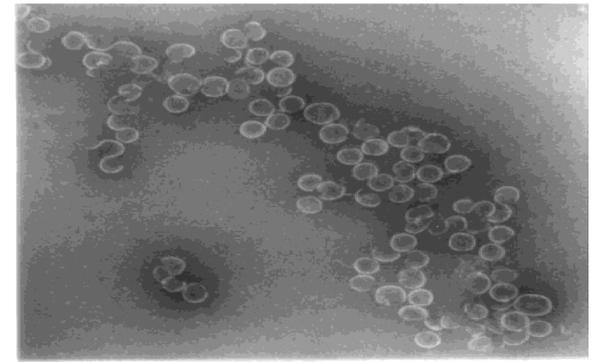
Vaccini OMVs



blebbing"meningococcus

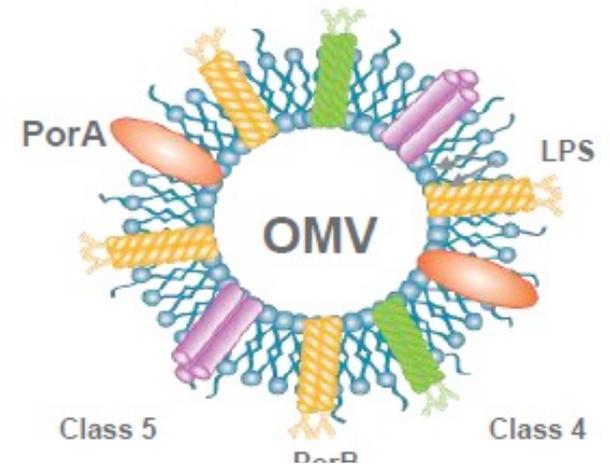


Extracted OMV vesicles

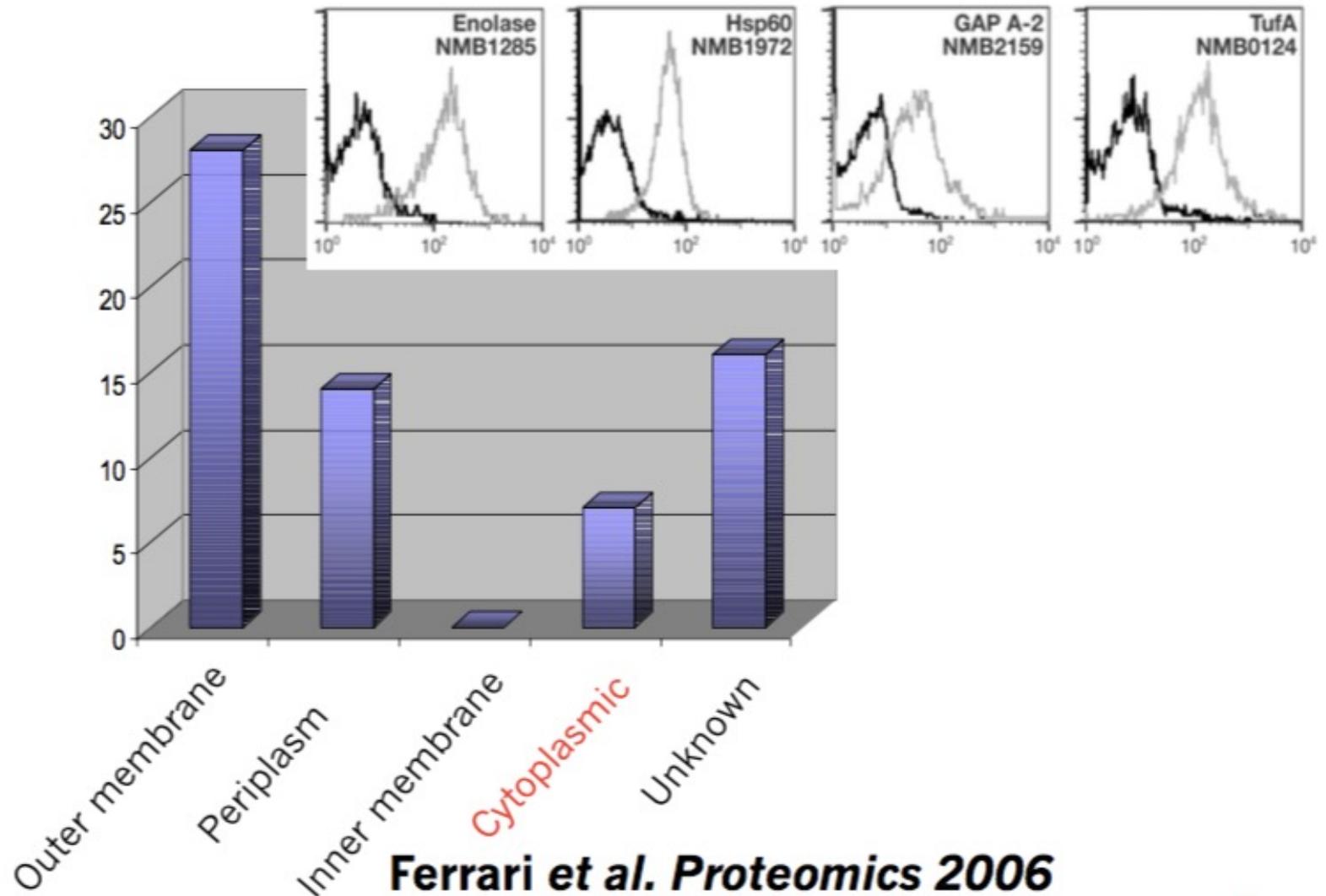


purifiedLPS-depletedOMV

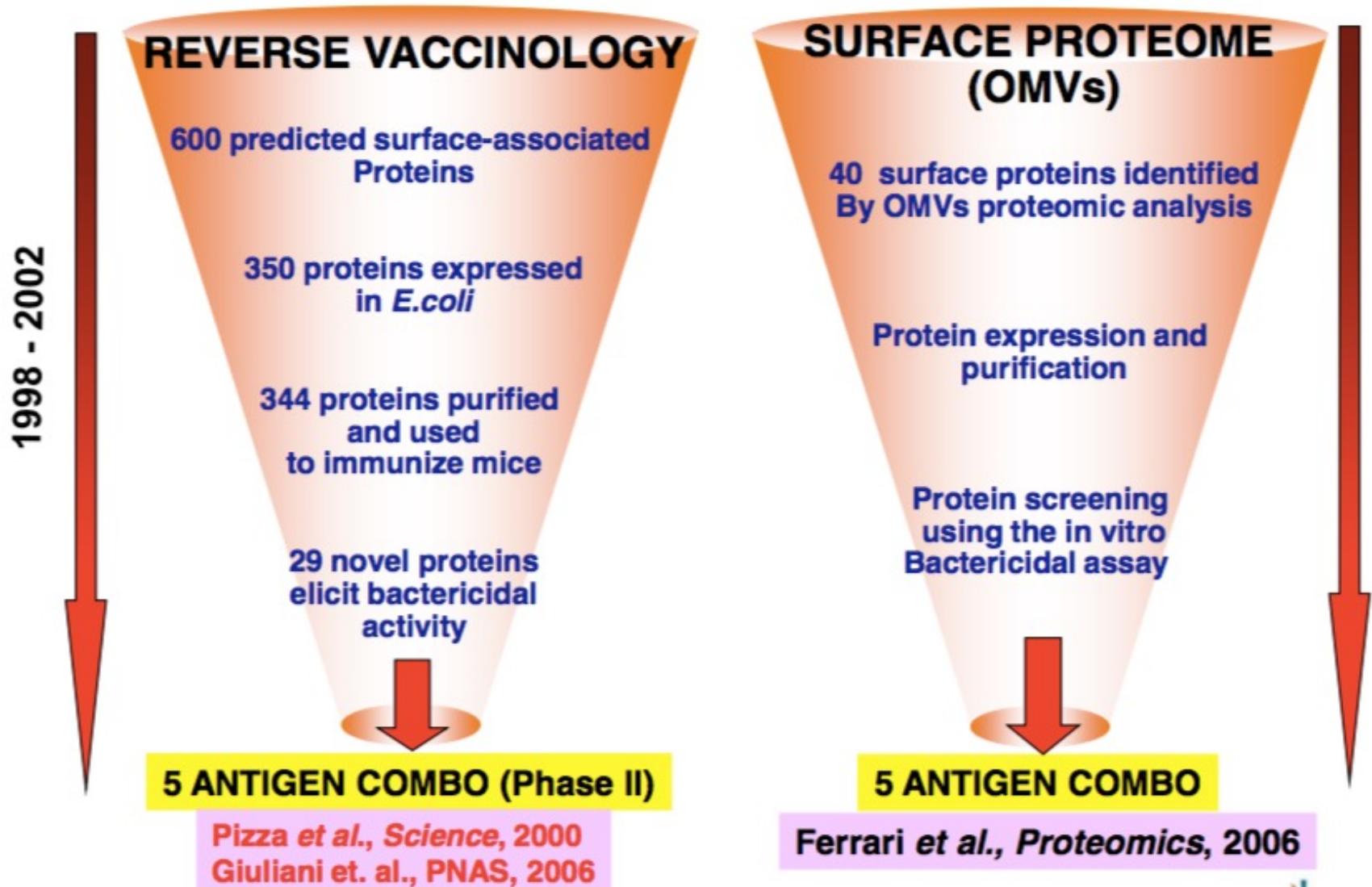
- Unici vaccini licenziati contro MenB
- Sono vaccini ceppo-specifici
- Non offrono protezione contro ceppi eterologhi
- PorA è il principale AG protettivo dei vaccini OMVs



Proteomic analysis of $\Delta gna33$ mutant-derived OMVs revealed the presence of 65 proteins



Surface Proteome as a fast-track to vaccine discovery: A retrospective analysis of *Menigococcus B* vaccine discovery



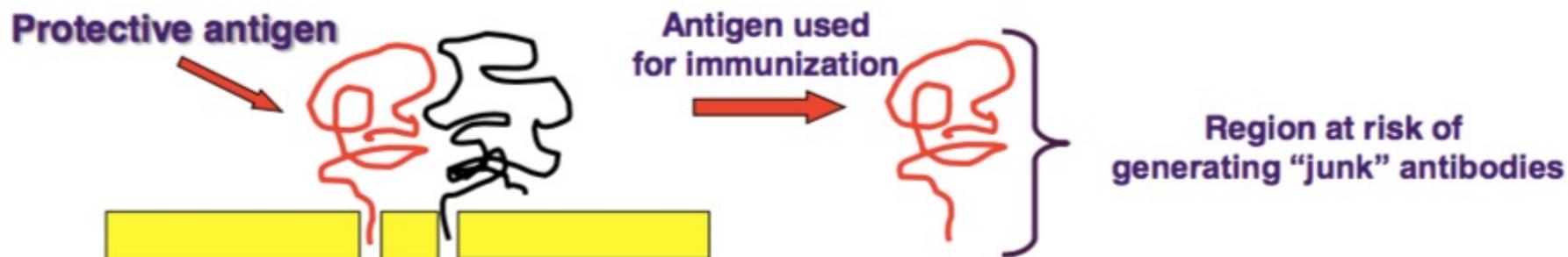
APPROCCI COMPLEMENTARI

BACTERIAL SURFACE PROTEIN INTERACTIONS

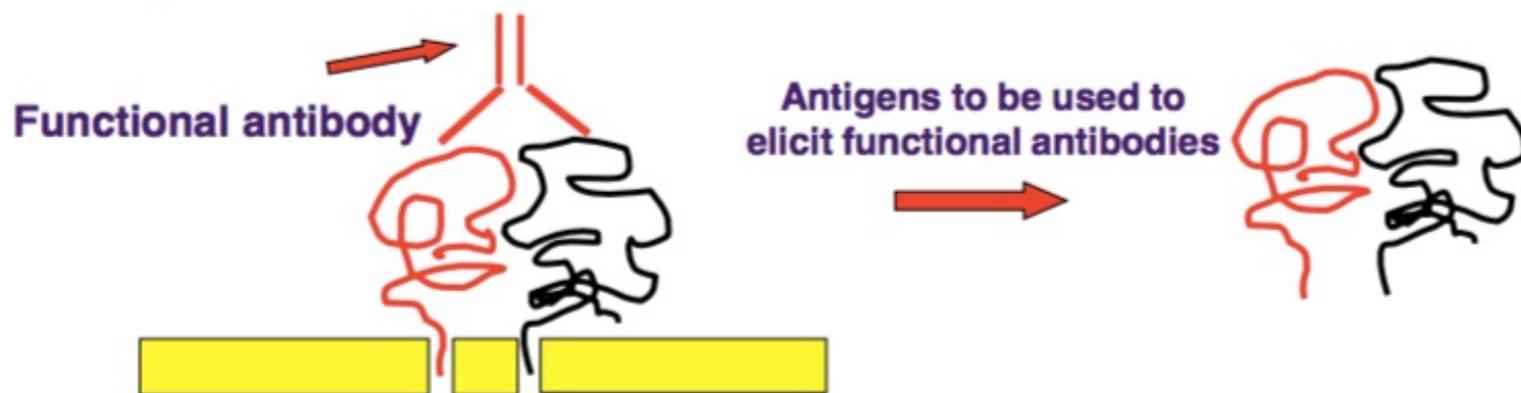
- **Protein-protein interactions and protein complexes occurring at the bacterial surface are expected to play important roles in bacterial physiology and in host-pathogen interaction**
- **Protein interactions occurring at the surface of bacteria are relatively poorly characterized**

Importance of elucidating the surface protein “interactome” in vaccine design

1. Avoid elicitation of “junk” antibodies

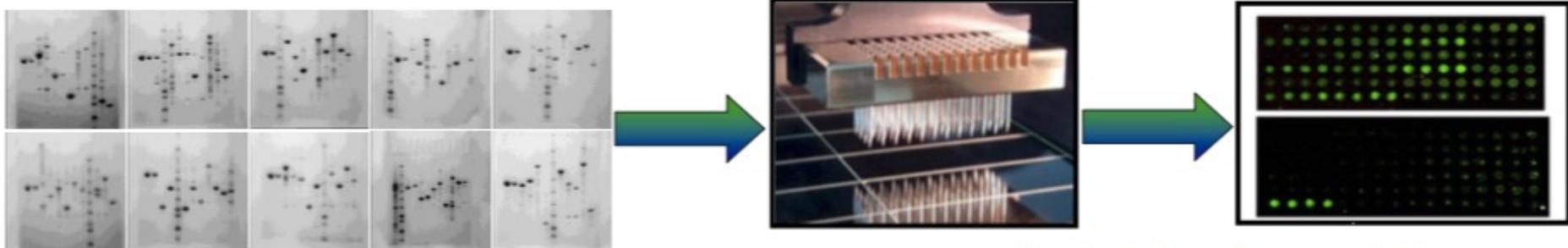


2. Use of antigens combos which naturally interact on the bacterial surface to elicit optimal protective antibody responses

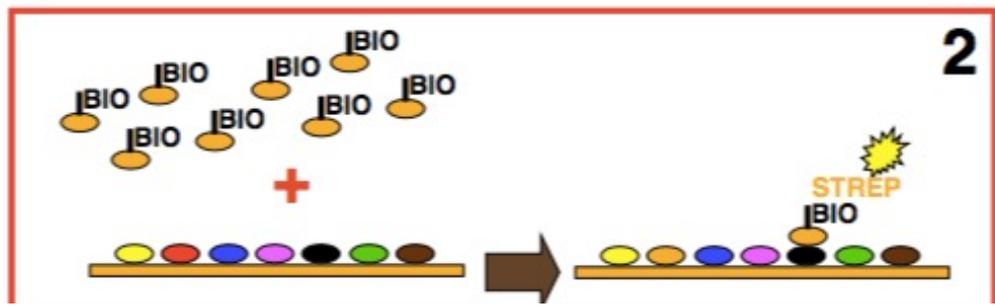


Protein microarrays to study bacterial surface protein "interactome"

➔ 100 GAS proteins identified by Proteomics were spotted on glass slides



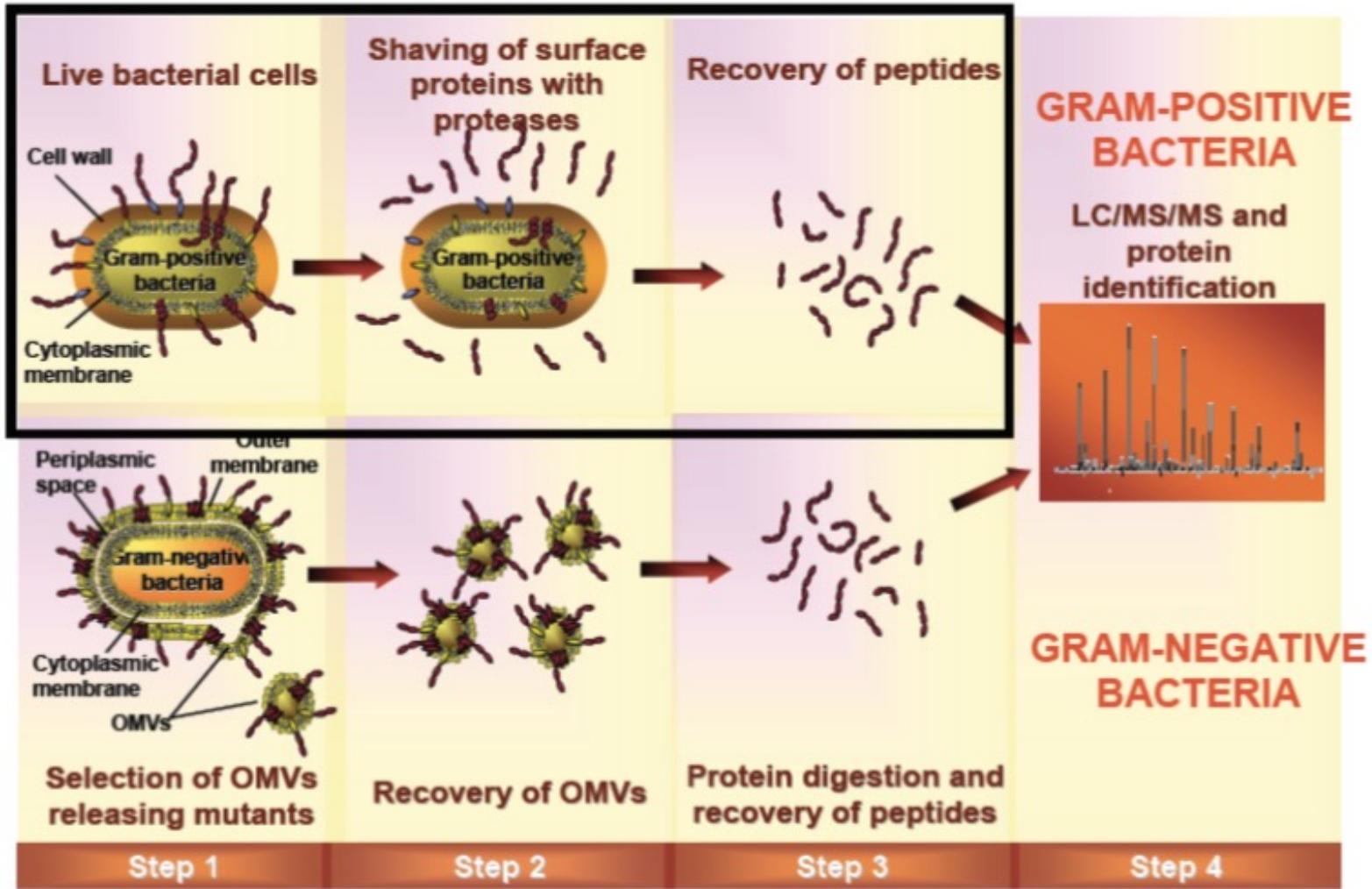
Bacterial surface proteins are spotted on glass slides and each protein is biotinylated and subsequently tested for its capacity to bind spotted proteins



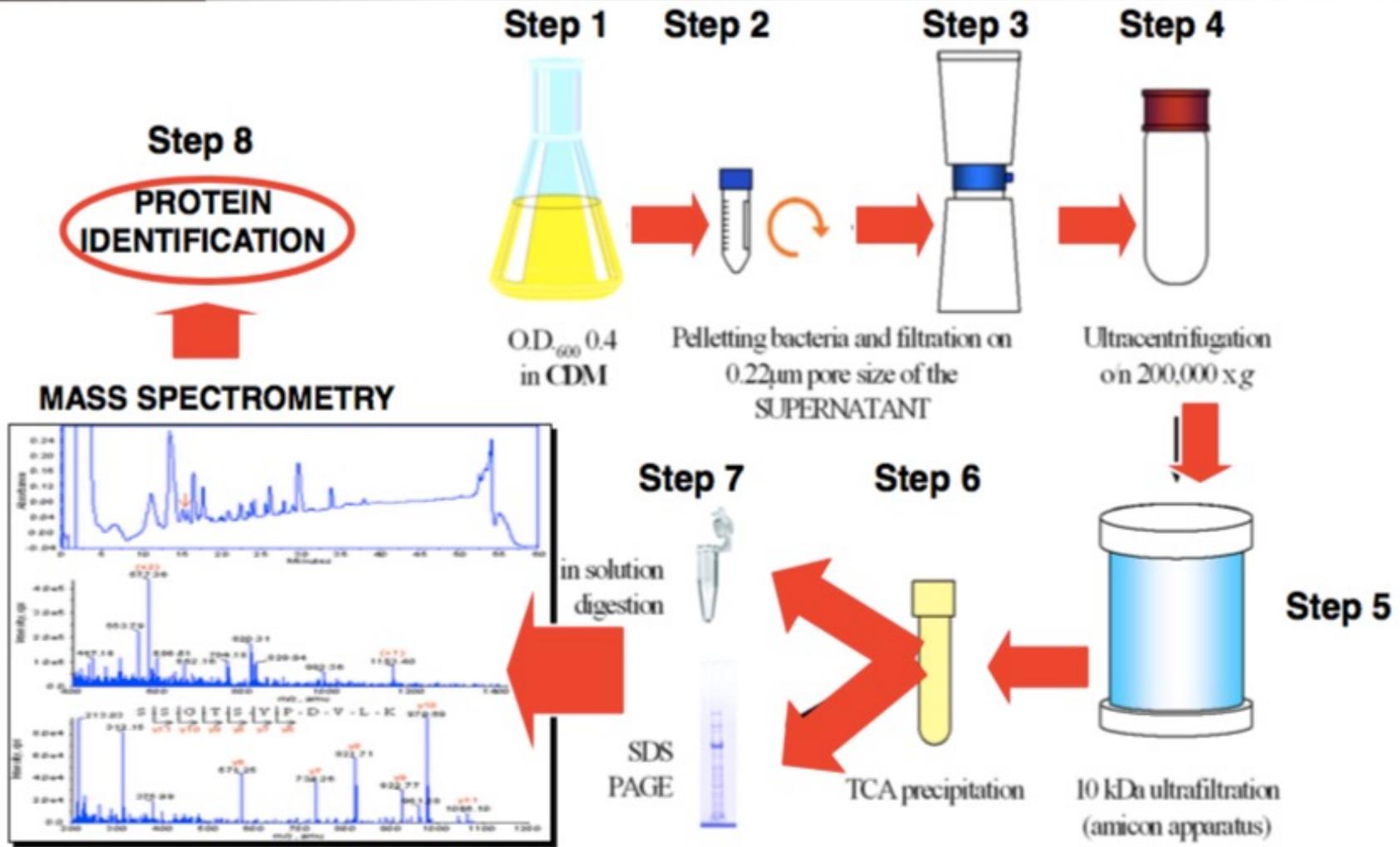
GAS: Streptococco di gruppo A

In alternativa (in aggiunta) alle vescicole

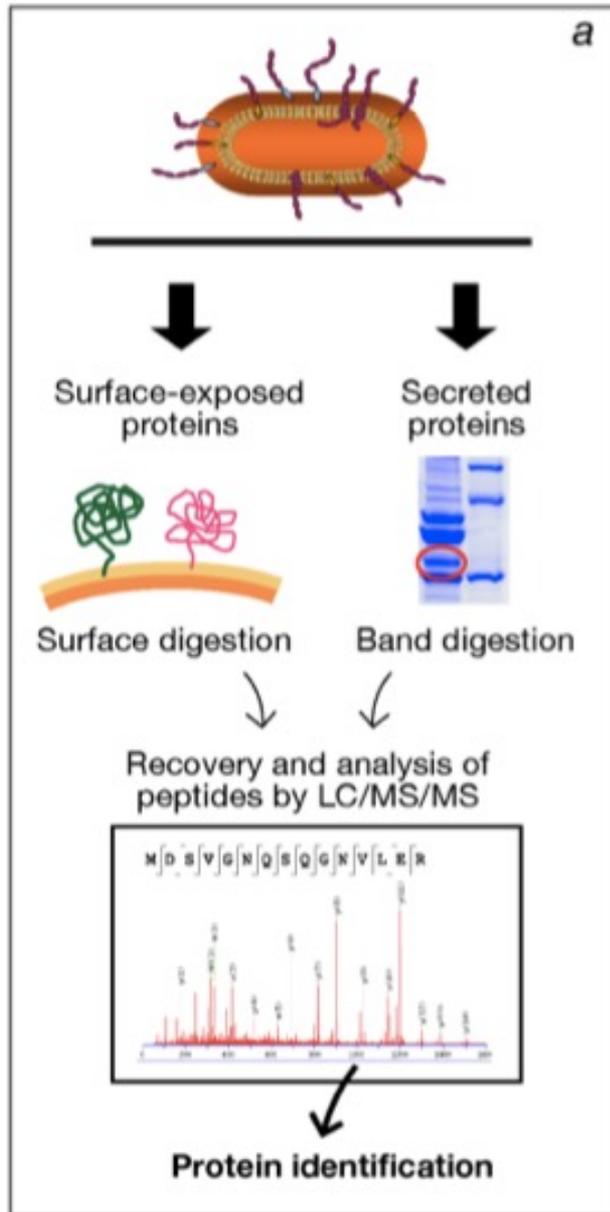
Analysis in Bacteria: Gram-positive Bacteria



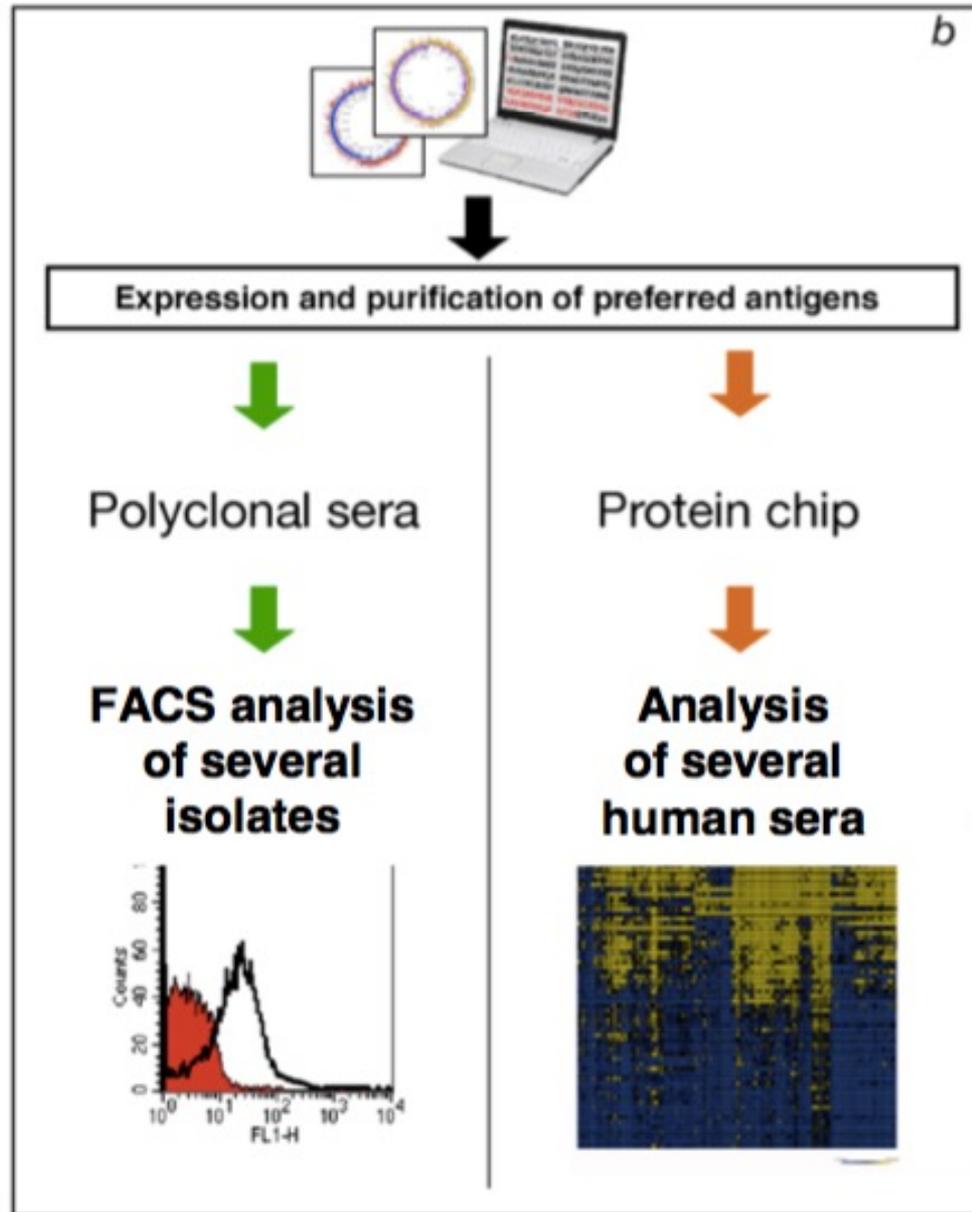
LE PROTEINE SECRETE

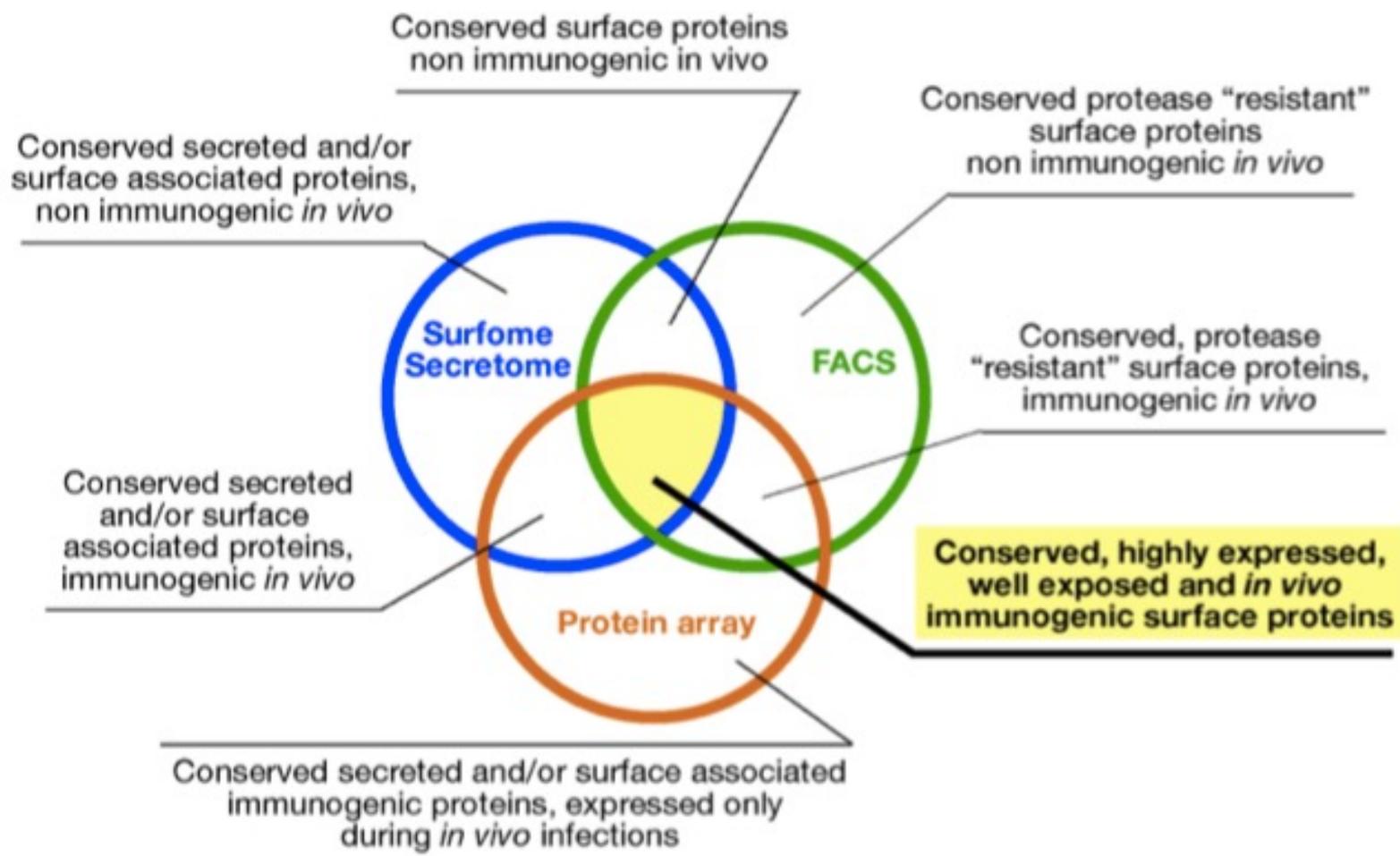


Proteomic analysis of several isolates

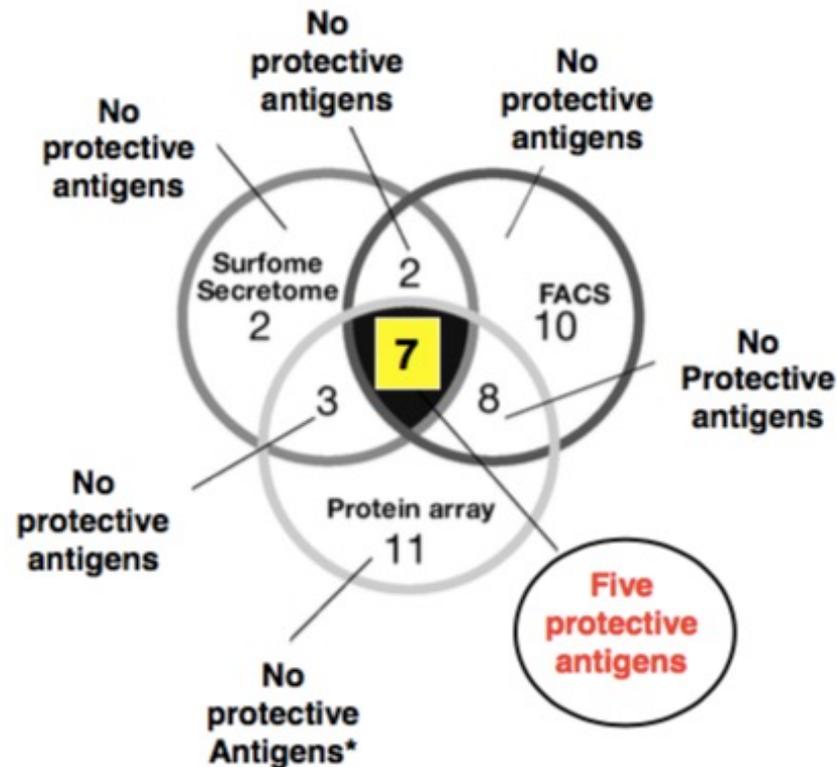


Bioinformatic analysis of several genome sequences



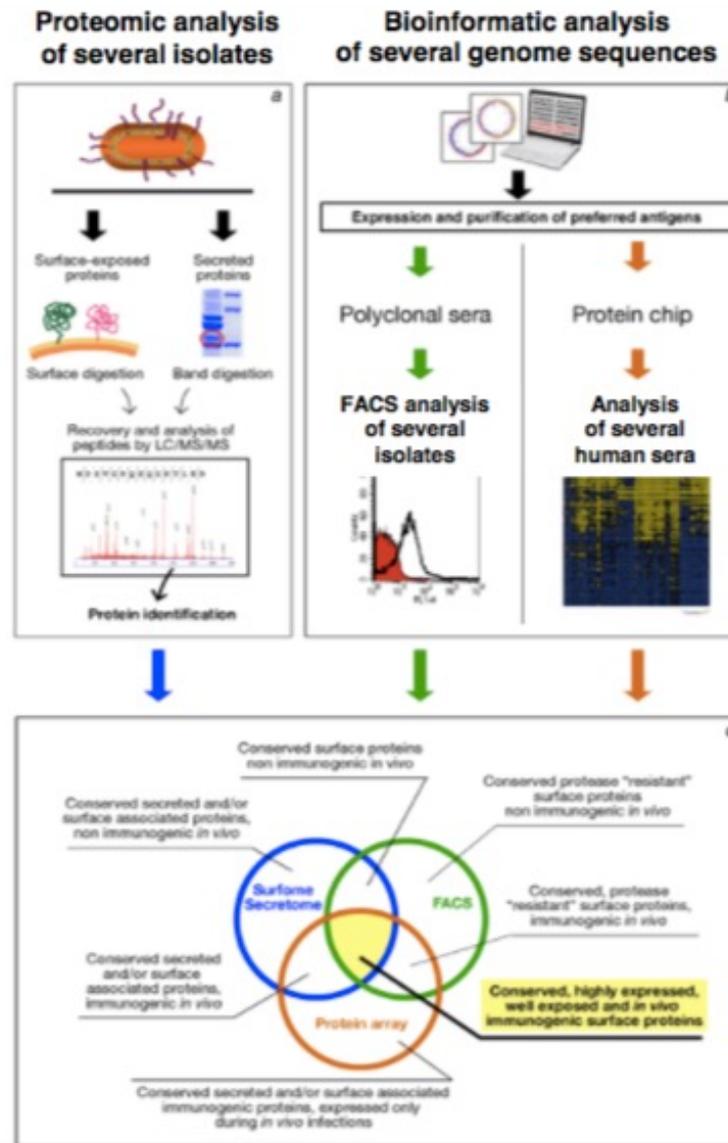


Conserved Protective Antigens Fall into the Central Area of the Venn Diagram: The *Group A Streptococcus (GAS)* example



*: One antigen found partially protective

A Three-approach Strategy for Accurate Selection of Protective Antigens



Bensi et al., *Mol.Cell.Proteom.* 2012

“3Tech” Vaccine Discovery Platform vs Classical (RV) Genomic Platform

