

## Il glicocalice

Molti microrganismi secernono sostanze mucose costituite generalmente da polisaccaridi e anche proteine.

Questo strato ricco in polisaccaridi viene definito

## GLICOCALICE

Il Glicocalice cambia di composizione chimica da specie a specie ed è tipico per ogni specie sia lo spessore che la rigidità.

**CAPSULA** è un glicocalice rigido organizzato in fitta matrice ben strutturato ed adeso alla parete che non permette passaggio di particelle (inchiostro di china) definito CPS (Capsular PolySaccaride)

**STRATO MUCOSO** è un glicocalice è di tipo deformabile più sottile, debolmente adeso alla parete. Vien definito anche SLIME o EPS ( Extracellular PolySaccarides).

## Funzione del glicocalice

Gli strati polisaccaridi esterni svolgono un ruolo importante nell'interazione del batterio con l'ambiente esterno. Batteri senza glicocalice sono vitali

### Glicocalice è un importante fattore di virulenza

In *Streptococcus pneumoniae* i batteri non capsulati non sono patogeni in quanto la capsula inibisce i processi di fagocitosi dei batteri da parte dei macrofagi

### Glicocalice è un importante fattore di aderenza

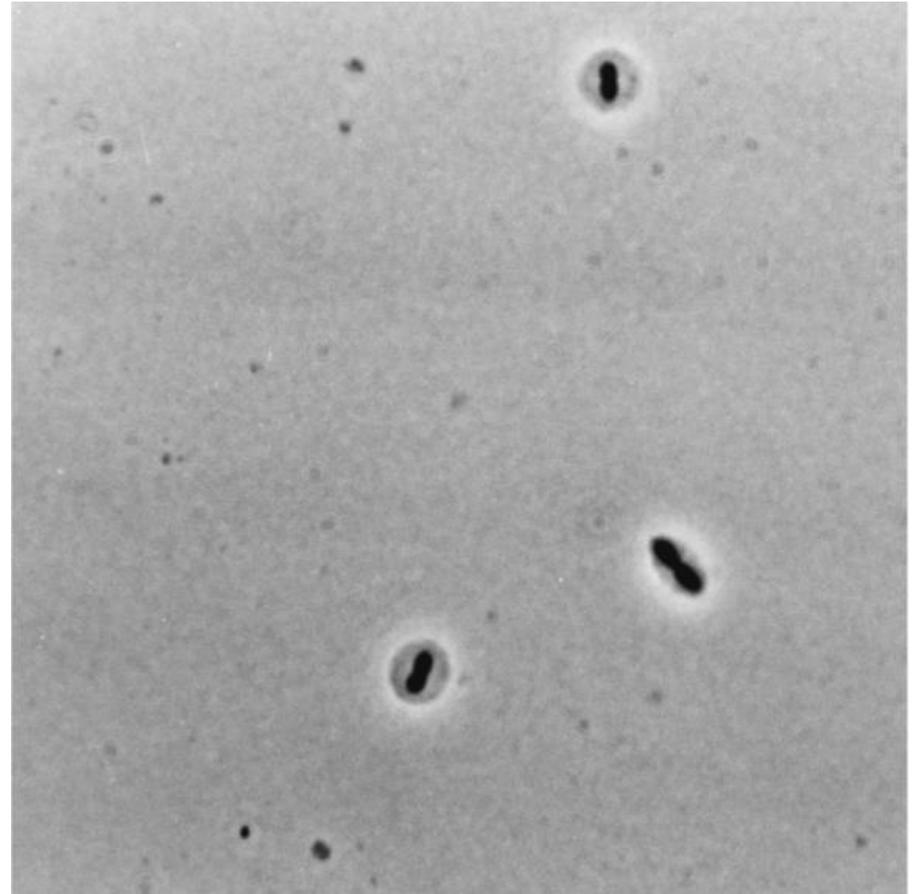
*Streptococcus mutans*, in presenza di destrosio produce una capsula polisaccaridica che consente l'attacco del batterio allo smalto dei denti. L'acido prodotto dalla fermentazione del saccarosio corrode lo smalto dentale

### Glicocalice svolge un ruolo nella resistenza

all'essiccamento in quanto è in grado di assorbire H<sub>2</sub>O .

## Colorazione tramite Quellung ( o rigonfiamento).

Capsula di *Streptococcus pneumoniae*, che costituisce un importante fattore di virulenza è difficilmente identificabile con tecniche classiche di contrasto. Con questa tecnica (quellung) possono essere identificate mediante anticorpi specifici per la capsula



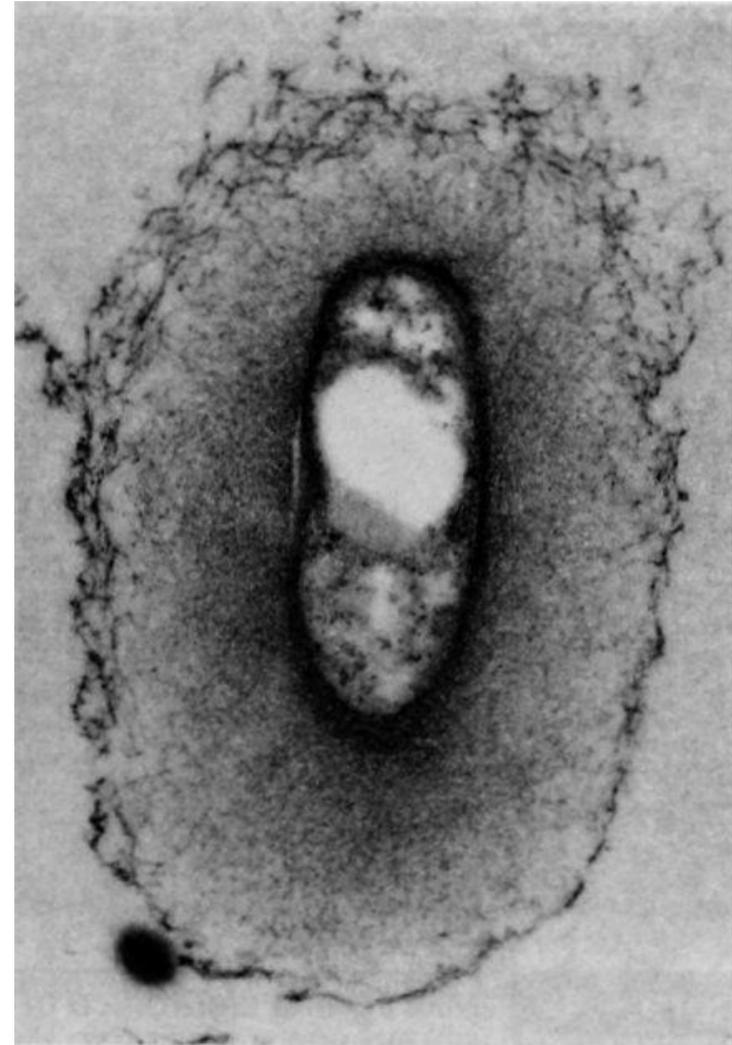
La gran parte delle capsule è di **natura polisaccaridica** : possono essere costituite da

- **OMOPOLIMERI** / composti da unità identiche di polisaccaridi come destrani ( polimeri del glucosio) o levani ( polimeri del fruttosio).

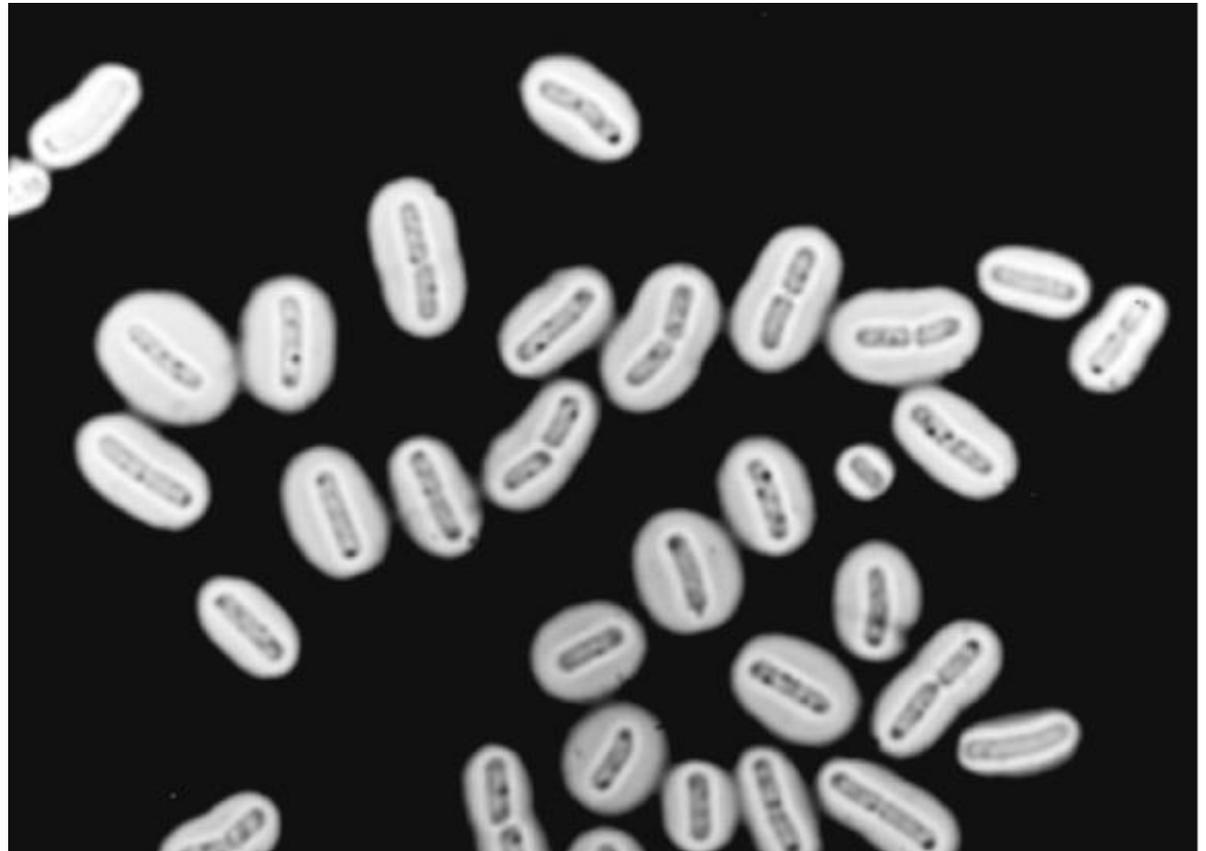
- **ETEROPOLIMERI** come acido ialuronico ( in *Streptococcus pyogenes* consiste di N-acetilglucosamina e acido glicuronico) 

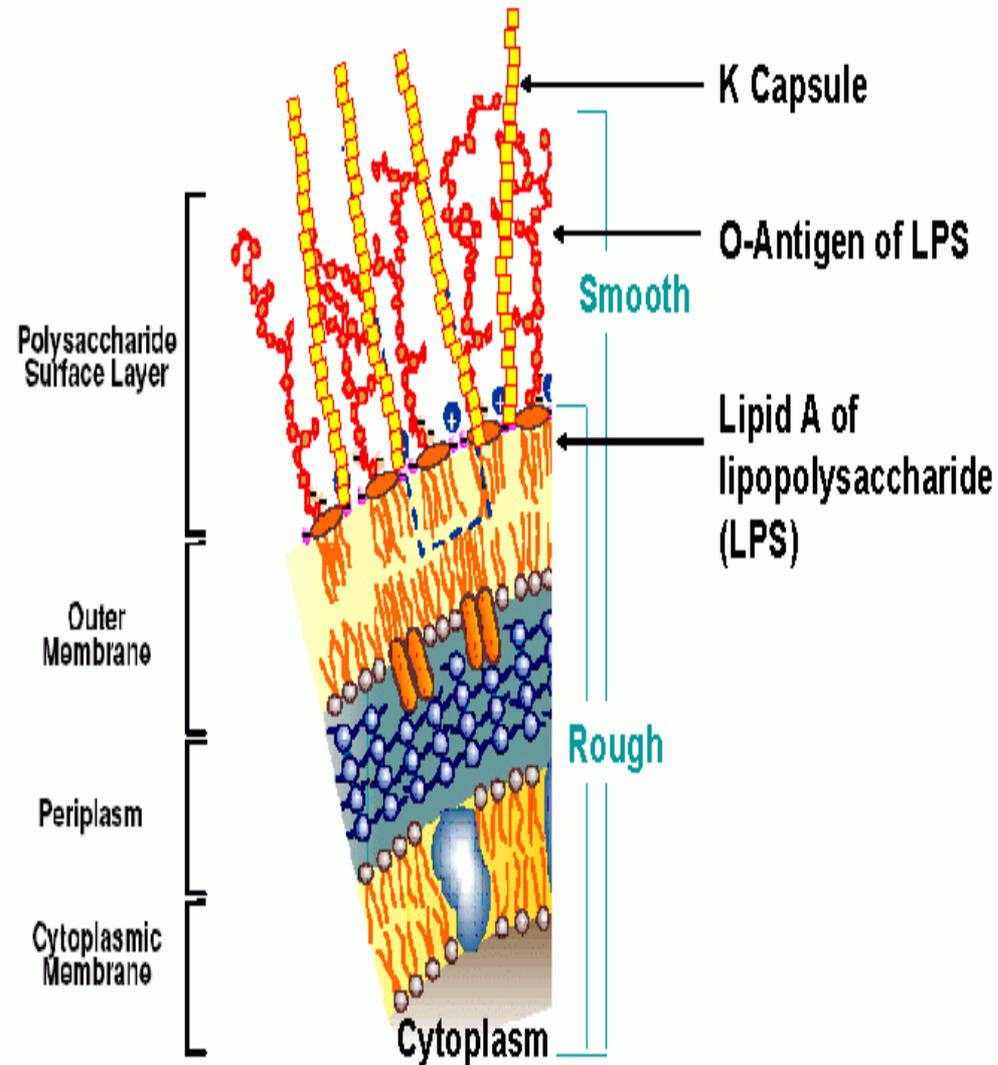
Vi sono capsule di **natura proteica**.

In *B. anthracis* solo acido D-glutammico con gli AA uniti tramite gruppo  $\gamma$ - carbossilico



**Colorazione con inchiostro di china che fa evidenziare la capsula definita colorazione negativa in quanto lo sfondo è colorato e la capsula non facendo penetrare il colorante appare**





*Journal of Endotoxin Research, Vol. 7, No. 3, 2001*

A differenza delle catene polisaccaridiche dell'antigene O del LPS che sono legate covalentemente all'LPS, le catene di zuccheri che costituiscono la capsula sono inseriti nella membrana esterna ma non sono legati all'LPS.

I carboidrati presenti nella membrana esterna dei Gram- che costituiscono l'antigene O e la capsula (K) sono delle lunghe catene di zuccheri con una composizione estremamente variabile.



La presenza della capsula conferisce alla colonia una morfologia liscia S (smooth).

I mutanti privi di capsula formano colonie rugose R (rough).

Nei batteri Gram- la capsula è costituita essenzialmente da polisaccardi

In *Escherichia coli* troviamo glucosio , galattosio, fucosio, acido glucuronico,acido sialico.

Le capsule sono altamente idratate (fino a 90% di acqua) e possono contribuire alla resistenza dall'essiccamento.

## La capsula K1 di *E. coli*

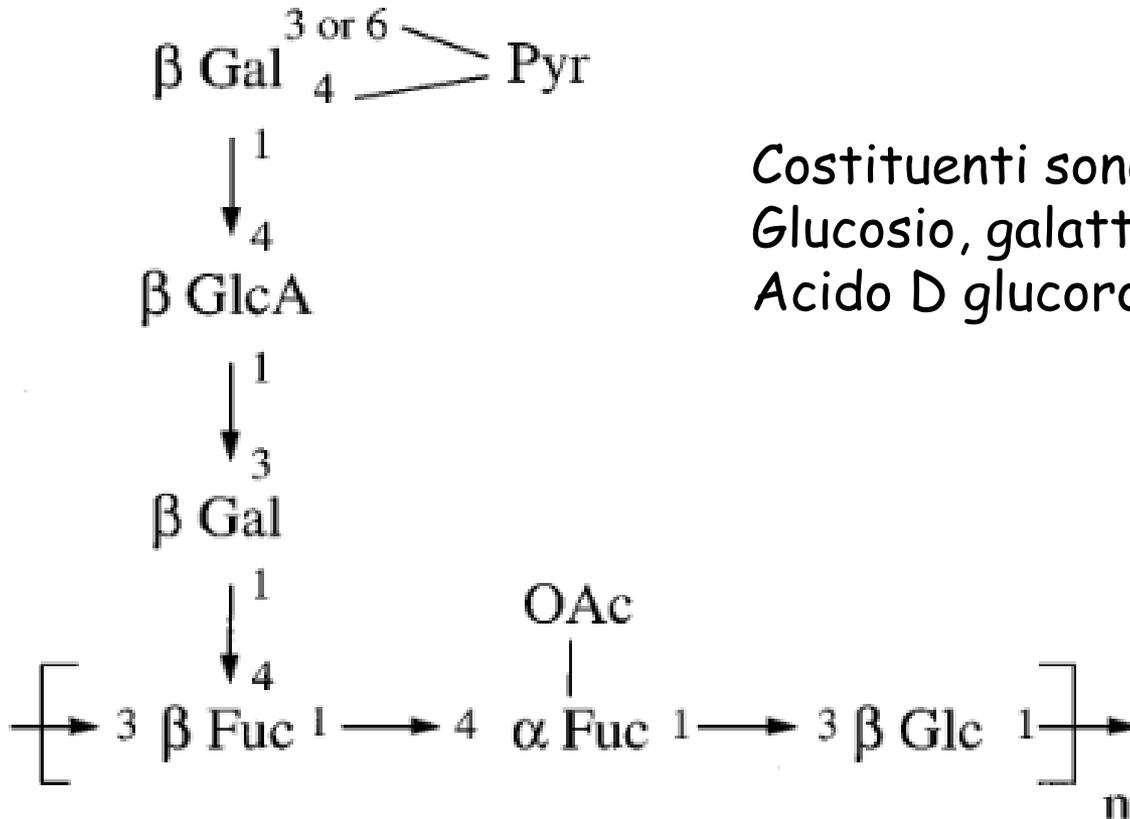
In *E. coli* vi sono infatti circa 150 varianti di Antigene O e circa 100 diversi capsule K. (*E. coli* K12)

Tutti i ceppi patogeni di *E. coli* hanno una capsula e quindi formano colonie di tipo S (Smooth).

La composizione degli zuccheri dell'antigene O e della capsula conferisce specificità per i diversi ospiti (uomo, uccelli, maiali) e per i diversi distretti da colonizzare (intestino, tratto urinario o il sangue).

Oltre il 90% dei casi di batteremia (infezione batterica nel sangue) da *E. coli* è causata da ceppi che hanno un tipo specifico di capsula :la capsula K1.

## K12 : ecco la struttura della capsula più famosa



Costituenti sono:  
 Glucosio, galattosio, fucosio,  
 Acido D glucuronico e piruvato

FIG. 1. Structure of CA of *E. coli* K-12 (3, 21, 28, 53). Fuc, L-fucose; Gal, D-galactose; GlcA, D-glucuronic acid; Glc, D-glucose; OAc, O-acetyl; Pyr, pyruvate linked acetalically to galactose.

# Capsula K1

La capsula K1 è costituita da lunghi polimeri di acido sialico che si estendono per oltre metà del diametro della cellula batterica.

Dal momento che l'acido sialico\* costituisce un rivestimento frequente delle cellule di mammifero, il sistema immune dell'uomo non riconosce come estranea la capsula K1.

Quindi i batteri con capsula K1 sono resistenti sia alla immunità innata che a quella adattiva. In genere la capsula di tipo K1 si trova associata a particolari antigeni O che ne permettono la giusta esposizione

\*Acido sialico è un monosaccaride a 9 atomi di Carbonio acido N-acetil neuroamminico

Regione genetica è distinta in tre gruppi

**kps**

**neu**

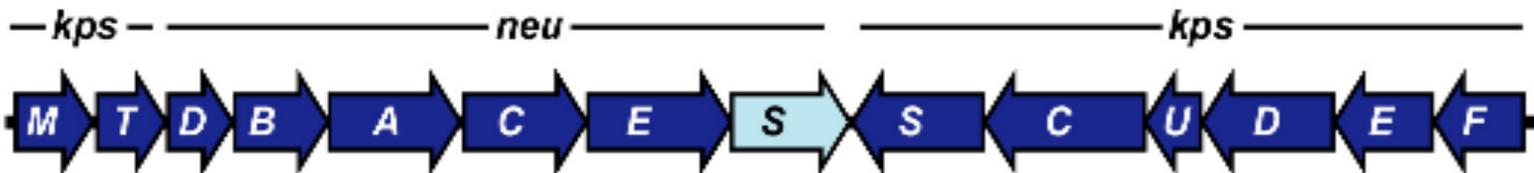
**kps**

Regione 3

Regione 2

Regione 1

K92 or K1 Gene Cluster



Le regioni 1 e 3 definite **kps** sono coinvolte nel trasporto dei componenti della capsula generalmente polisaccaridi

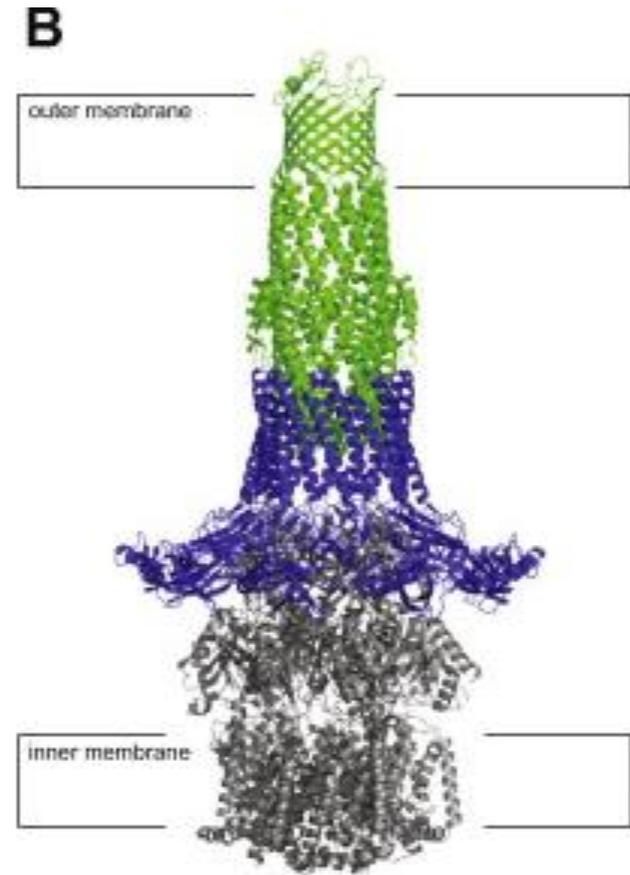
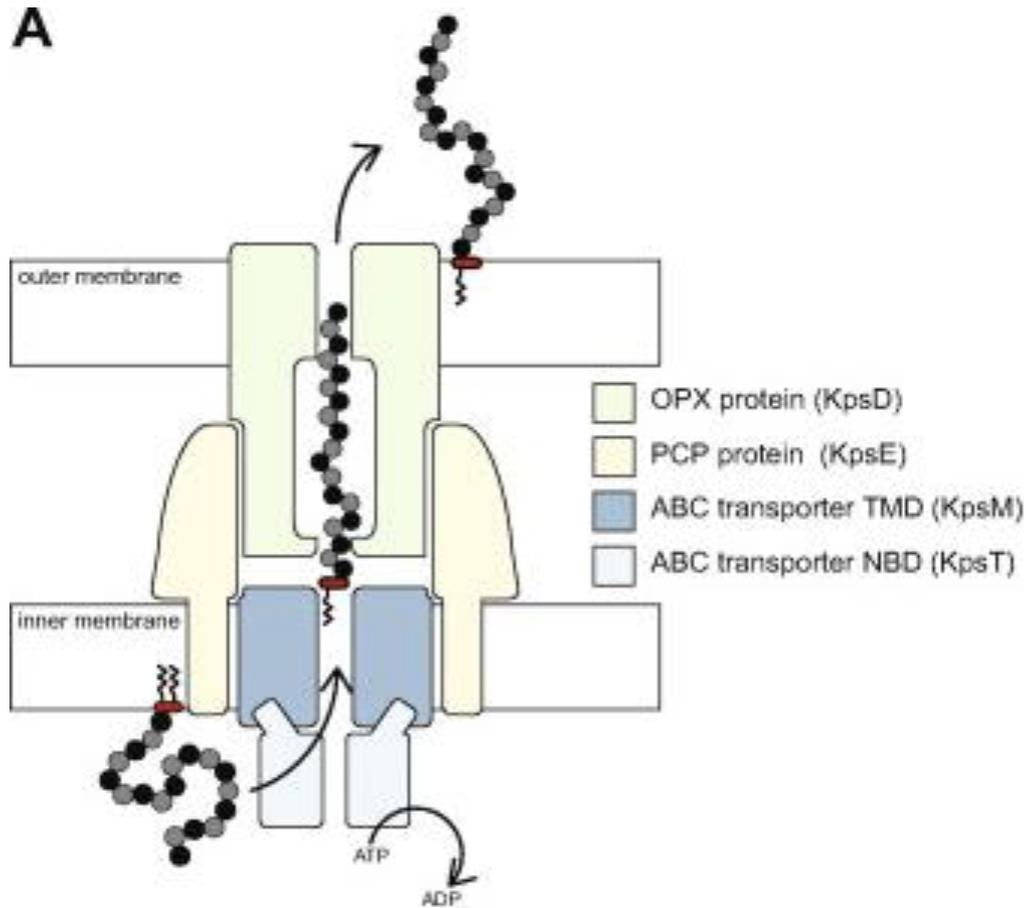
la regione 2 definita **neu** coinvolta nella biosintesi dei polisaccaridi ed è specifica per ogni sierotipo di E.coli

La biosintesi assomiglia come processo alla sintesi del peptidoglicano e avviene grazie a trasportatori di membrana. Le regioni 1 e 3 sono conservate in E.coli

La regione 1 costituita da 6 geni ed è coinvolta nell'attraversamento della membrana esterna. Mutazioni nella regione 1 provocano un accumulo di residui polisaccaridici nello spazio periplasmatico

La regione 3 è costituita da 2 geni sistema ABC

<b>kpsM</b>	<b>kpsT</b>
Proteine integrale della membrana	Proteina periferica legata alla membrana ABC transporter

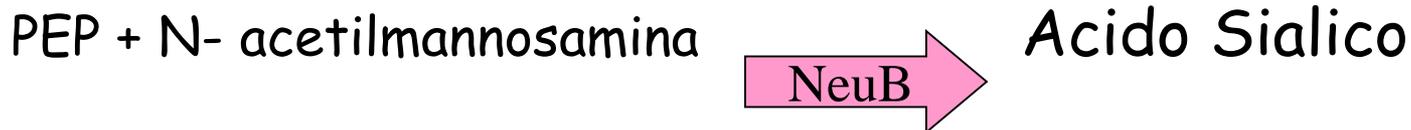


I geni *KpsM* e *KpsT* sono localizzati nella regione 1 e sono 2 proteine della membrana interna con dominio ABC.

Le proteine *KpsE* e *KpsD* coinvolte nel trasporto dei componenti della capsula sono codificate da geni della regione 3.

La regione 2 è una regione variabile a seconda della complessità del polisaccaride e contiene le informazioni necessarie per le funzioni di sintesi, attivazione e polimerizzazione. La capsula più studiata è quella di E.coli K1

Acido sialico è sintetizzato nel citoplasma in una reazione di condensazione



**Neu B** acido sialico sintetasi

**Neu C** sintetizza N acetil mannosamina

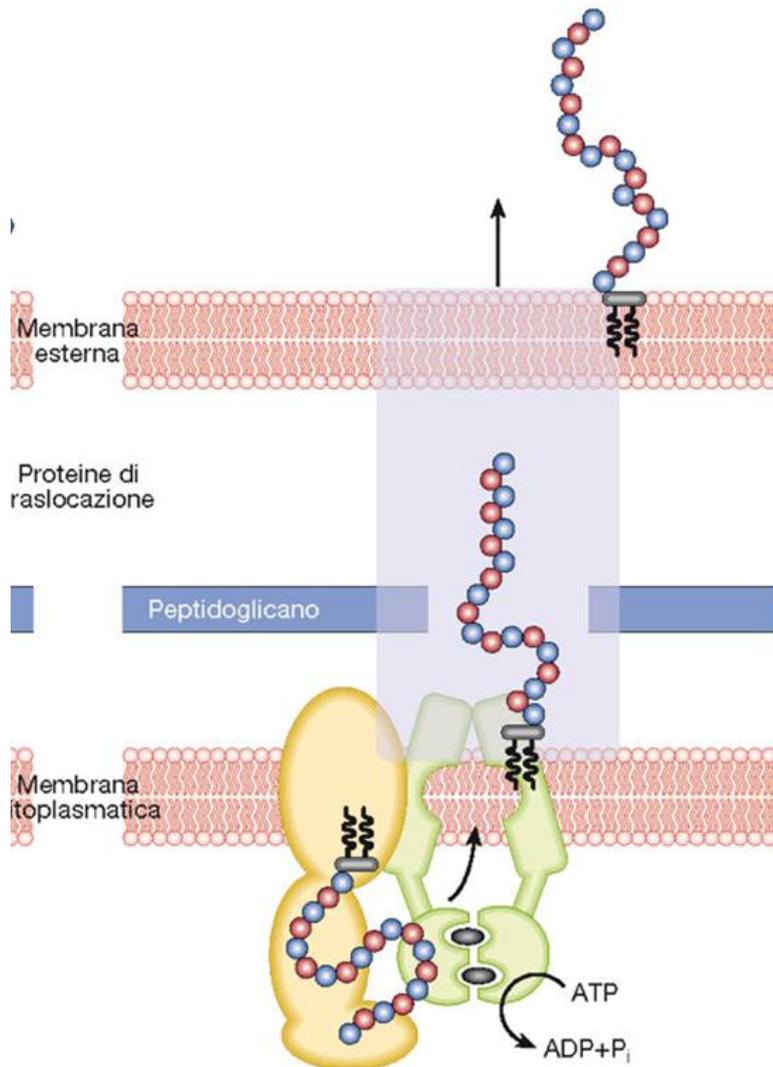
**Neu A** catalizza la sintesi di Acido Sialico a *CMP*  
( Citidin 5 acido monofosfosialico è la forma attivata dell'acido sialico richiesta per la biosintesi)

**Neu D** acetila il complesso Acido sialico-*CMP* Cytidine

**Neu S** coinvolto nella polimerizzazione

**Neu E** coinvolto nel trasporto

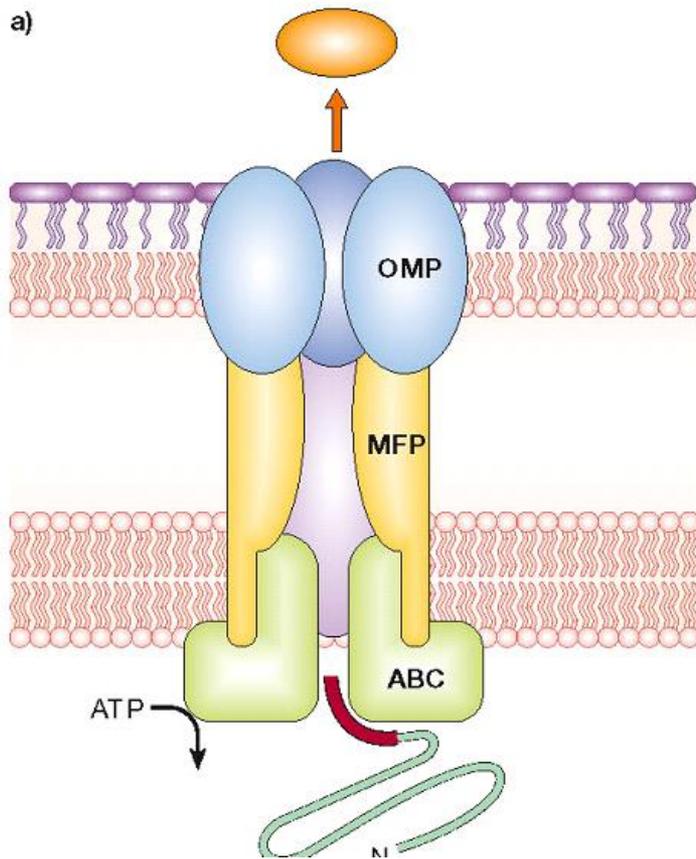
# Biosintesi con trasportatore ABC-dipendente



Il polimero viene sintetizzato sul lato interno della membrana interna per aggiunta di residui di glucosio alla catena nascente.

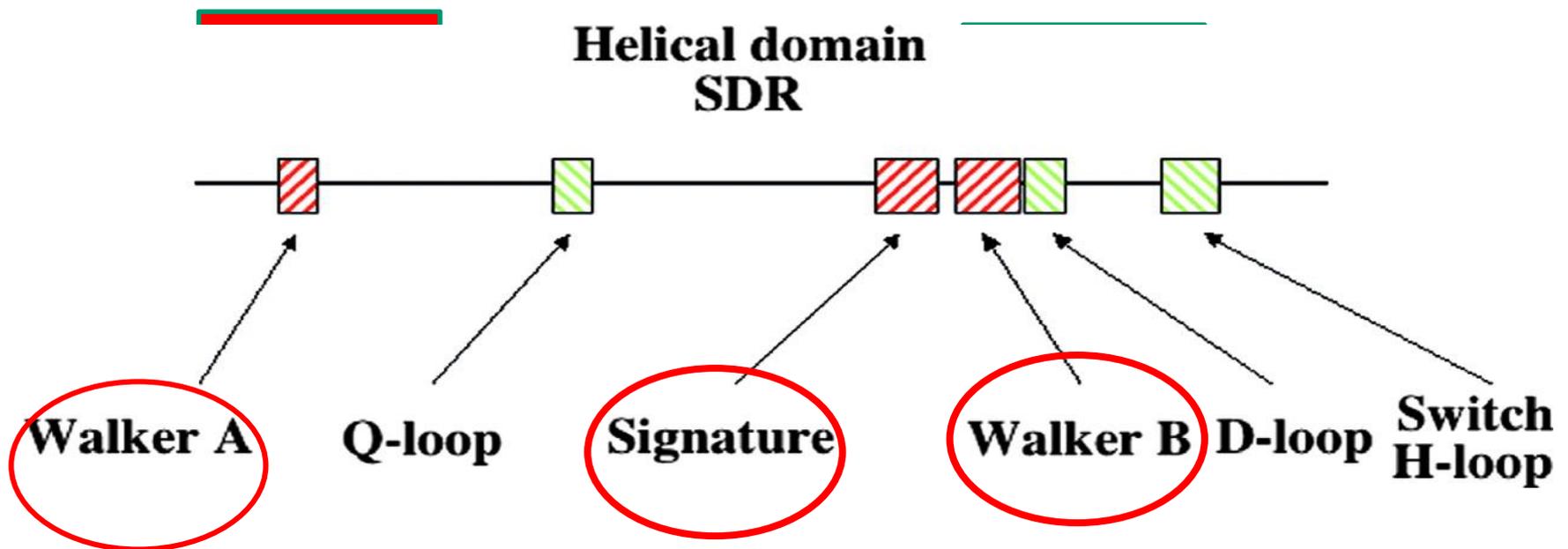
Il residuo viene poi trasportato da un trasportatore di tipo ABC

## I sistemi di tipo ABC



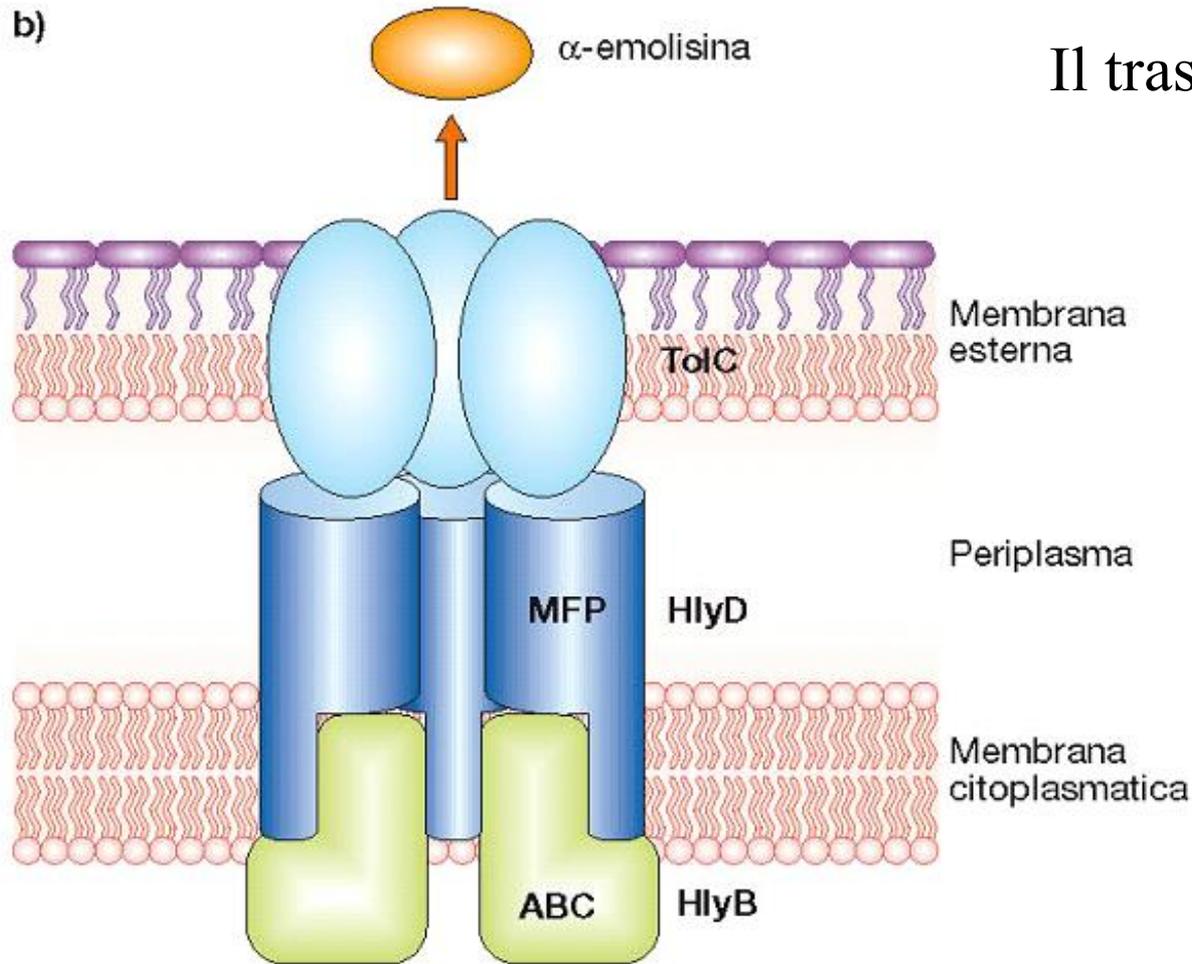
Presentano una proteina con un dominio ABC (ATP binding cassette) con attività ATPasica, in grado di legare ed idrolizzare ATP in modo da fornire l'energia necessaria al trasporto, una proteina di fusione MPF associata alla membrana interna ma che si estende nel periplasma ed una proteina della Membrana esterna (OMP).

Il dominio ABC si riconoscono 3 specifiche sequenze molte conservate ( in rosso):  
I dominio Walker A e Walker B che costituiscono rispettivamente il sito di legame dell'ATP e il sito di idrolisi.  
presenti in molte in molte ATPasi anche eucariotiche.  
Inoltre nelle proteine ABC vi è una sequenza detta "Peptide di unione" o caratterizzante (linker peptide o Signature ) localizzato a monte del motivo Walker B.



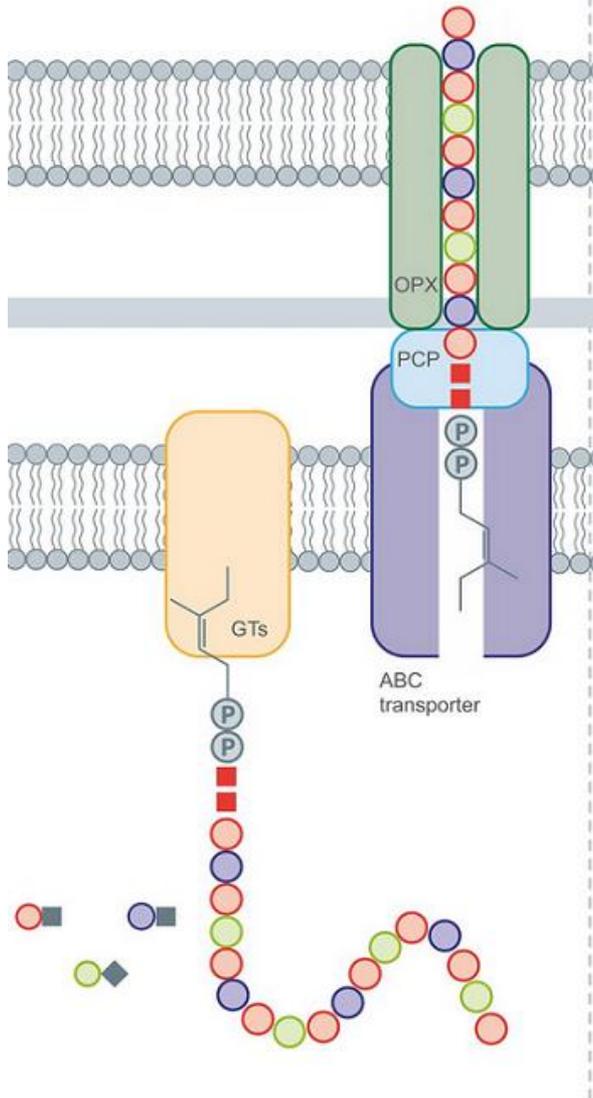
# Il sistema di tipo I come esempio di sistema ABC

b)



Il trasporto dell'emolisina

## II ABC transporter-dependent pathway



## Trasporto di tipo ABC dipendente

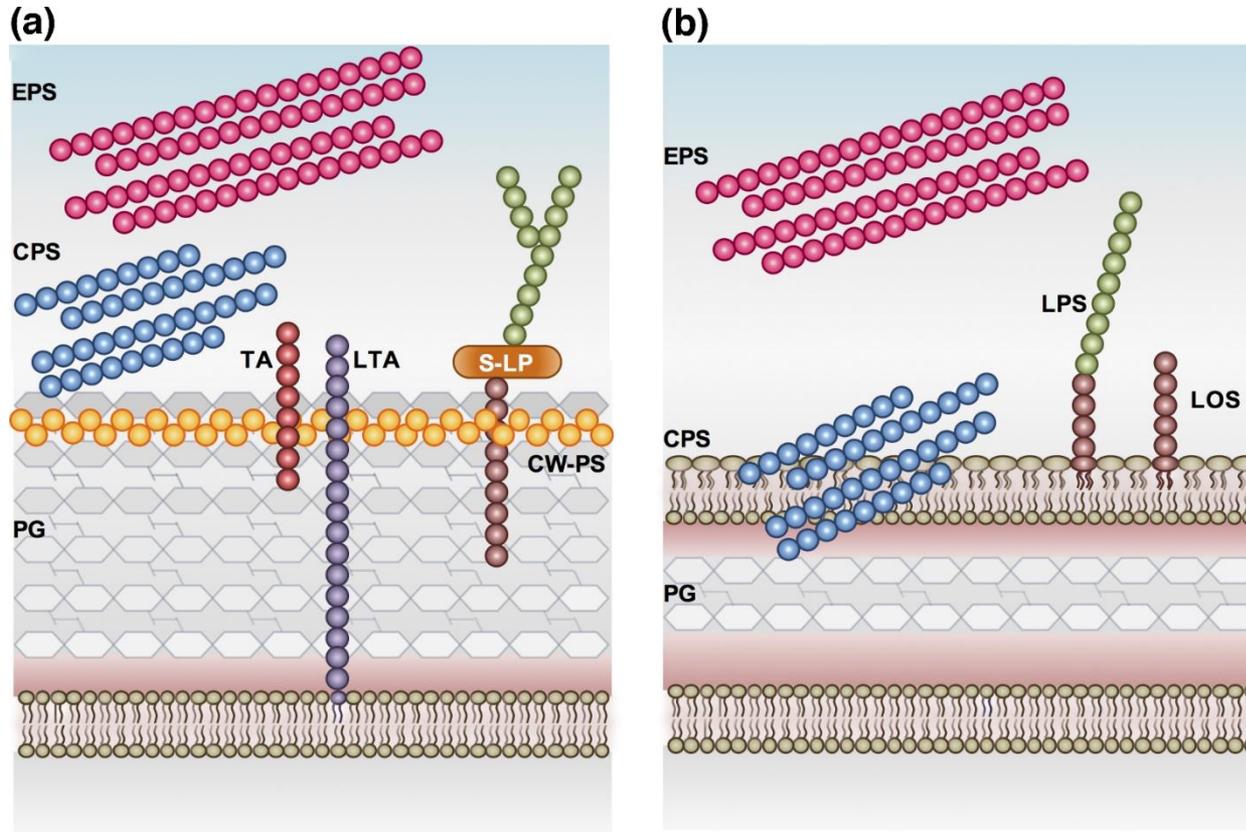
Il trasporto mediato da un sistema di tipo ABC è principalmente presente nella biosintesi della capsula (CPS) una struttura che a differenza degli esopolisaccaridi rimane ancorata alla parete cellulare.

I componenti della capsula sono sintetizzati per azione delle glicosiltransferasi (GT) sul lato citoplasmatico della membrana interna e sono degli omopolimeri nel caso vi sia un'unica proteina GT o degli eteropolimeri nel caso che più proteine GT siano coinvolte.

Il trasporto attraverso la membrana interna avviene tramite una pompa tripartita che rappresenta un classico sistema ABC.

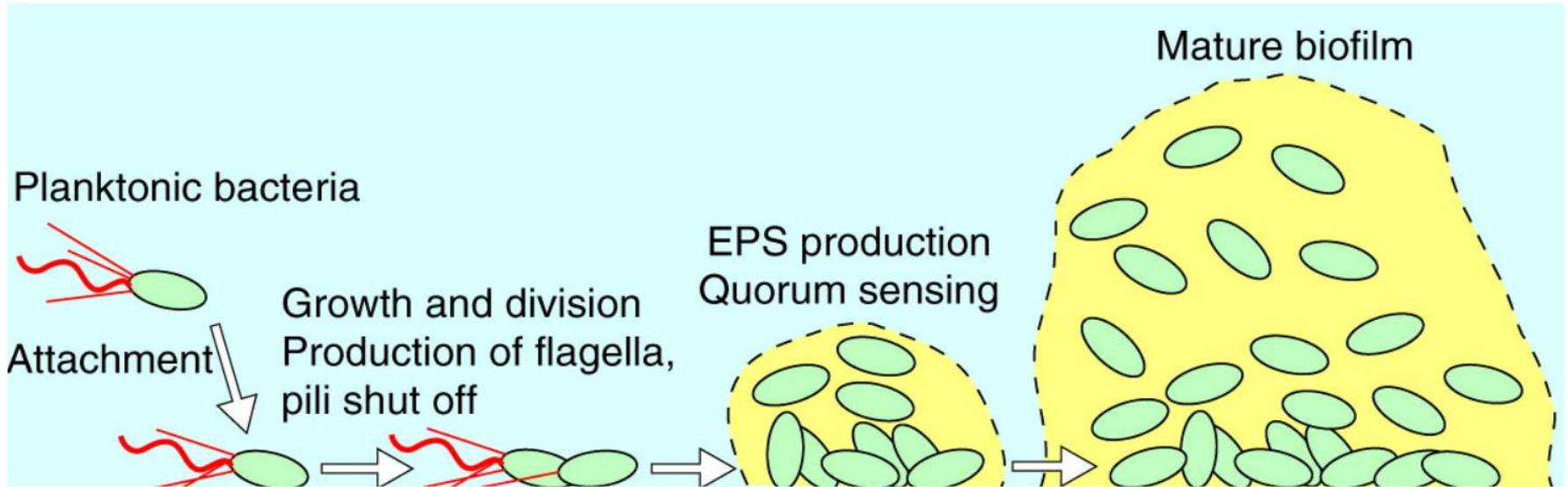
Nello spazio periplasmatico ritroviamo delle proteine di tipo PCP e OPX con una struttura simile a quelle del trasporto Wzy-Wzx dipendente. La capsula sintetizzata tramite questo processo contiene un glicolipe conservato tra i vari sistemi costituito da gliceroldifosfato e un acido ketodeossiottonato come linker

# Capsula ed EPS



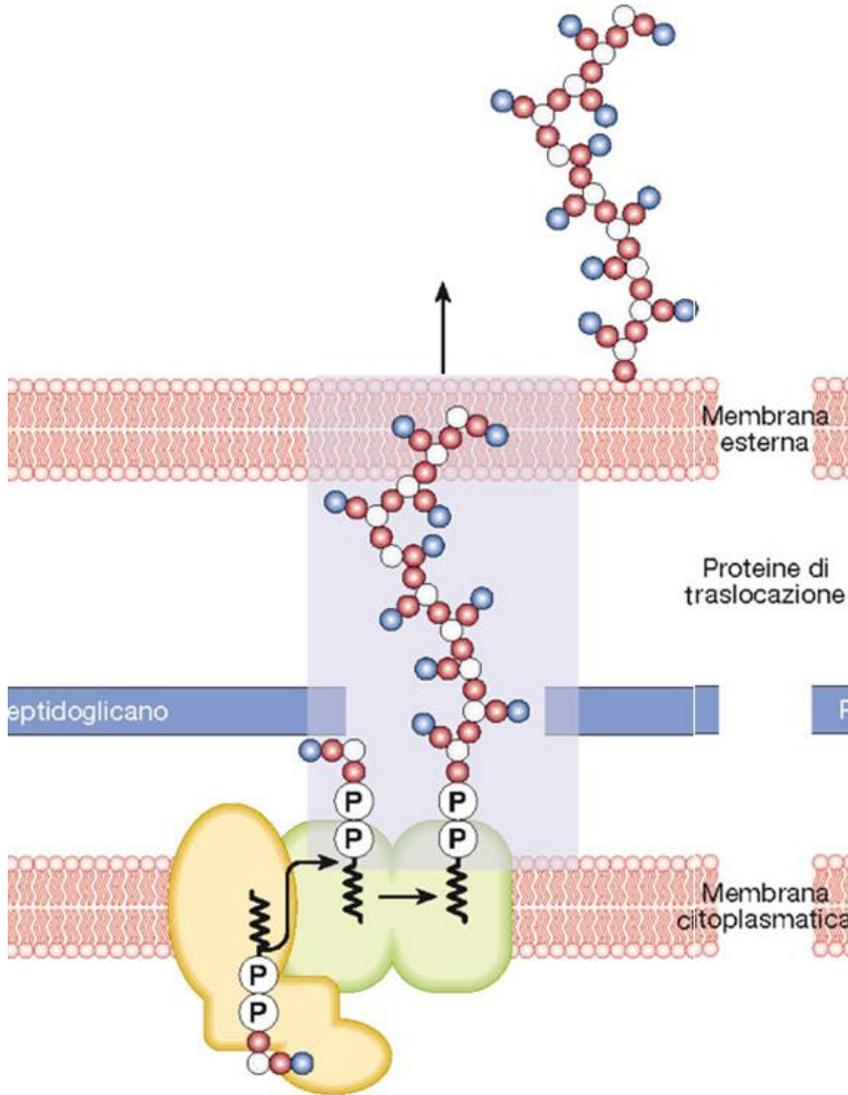
Cell surface-associated polysaccharides in bacteria. Capsular polysaccharides (CPS) and exopolysaccharides (EPS) are common to Gram-negative (a) and Gram-positive bacteria (b). Lipopolysaccharides (LPS) and lipooligosaccharides (LOS) are found only in Gram-negative bacteria, whereas Gram-positive bacteria synthesize cell wall polysaccharides (CW-PS) such as wall teichoic acids (TA), lipoteichoic acids (LTA) and pellicles. A peptidoglycan (PG) layer is present in the cell walls of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Closed circles, monosaccharides.

# EPS e BIOFILM



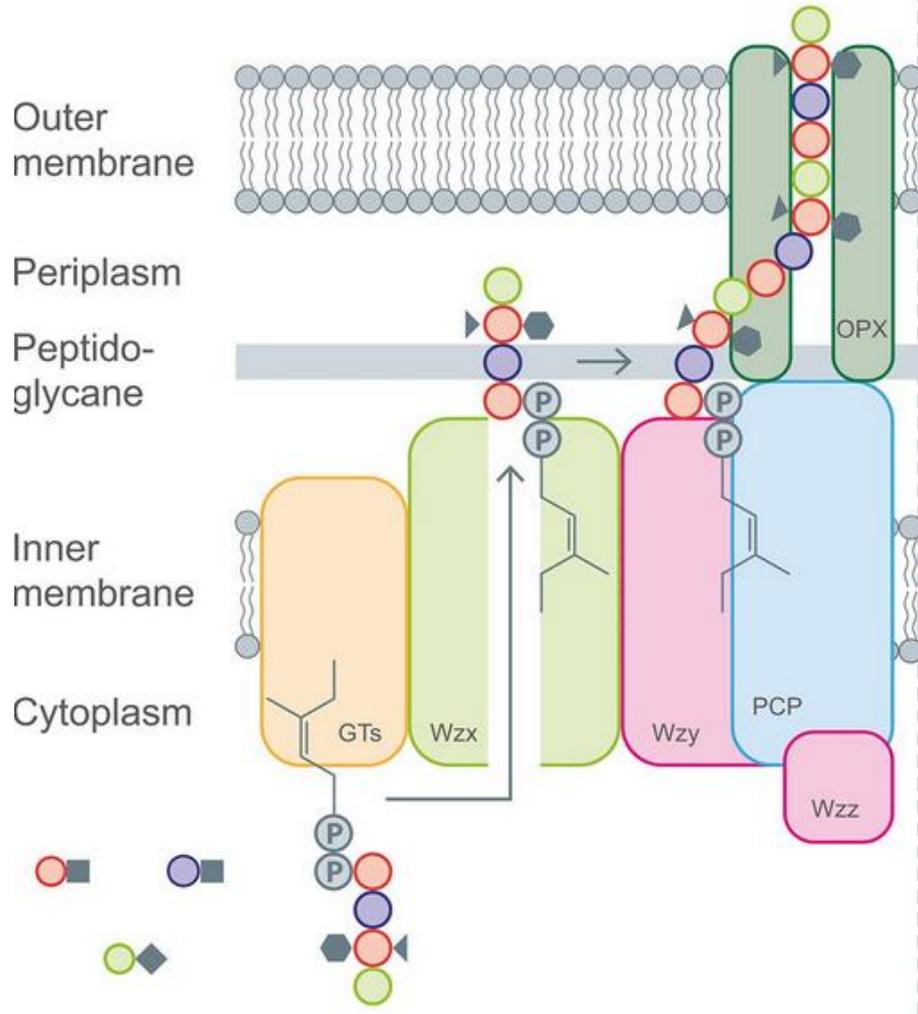
Nei biofilm le cellule batteriche sono inglobate in una matrice di EPS

# Biosintesi della capsula Wzy-dipendente.



Questo tipo di trasporto viene in genere utilizzato per il trasporto degli EPS. Alcuni polimeri vengono costruiti quando si trovano legati al bactoprenolo, grazie all'azione di una glicosiltransferasi localizzata nella membrana citoplasmatica. Sono poi trasportati attraverso la membrana dalla proteina citoplasmatica Wzy, polimerizzati nel periplasma e traslocati verso la membrana esterna da un complesso sistema di proteine di membrana.

# I Wzx/Wzy-dependent pathway



# La FLIPPASI e il trasporto degli EPS

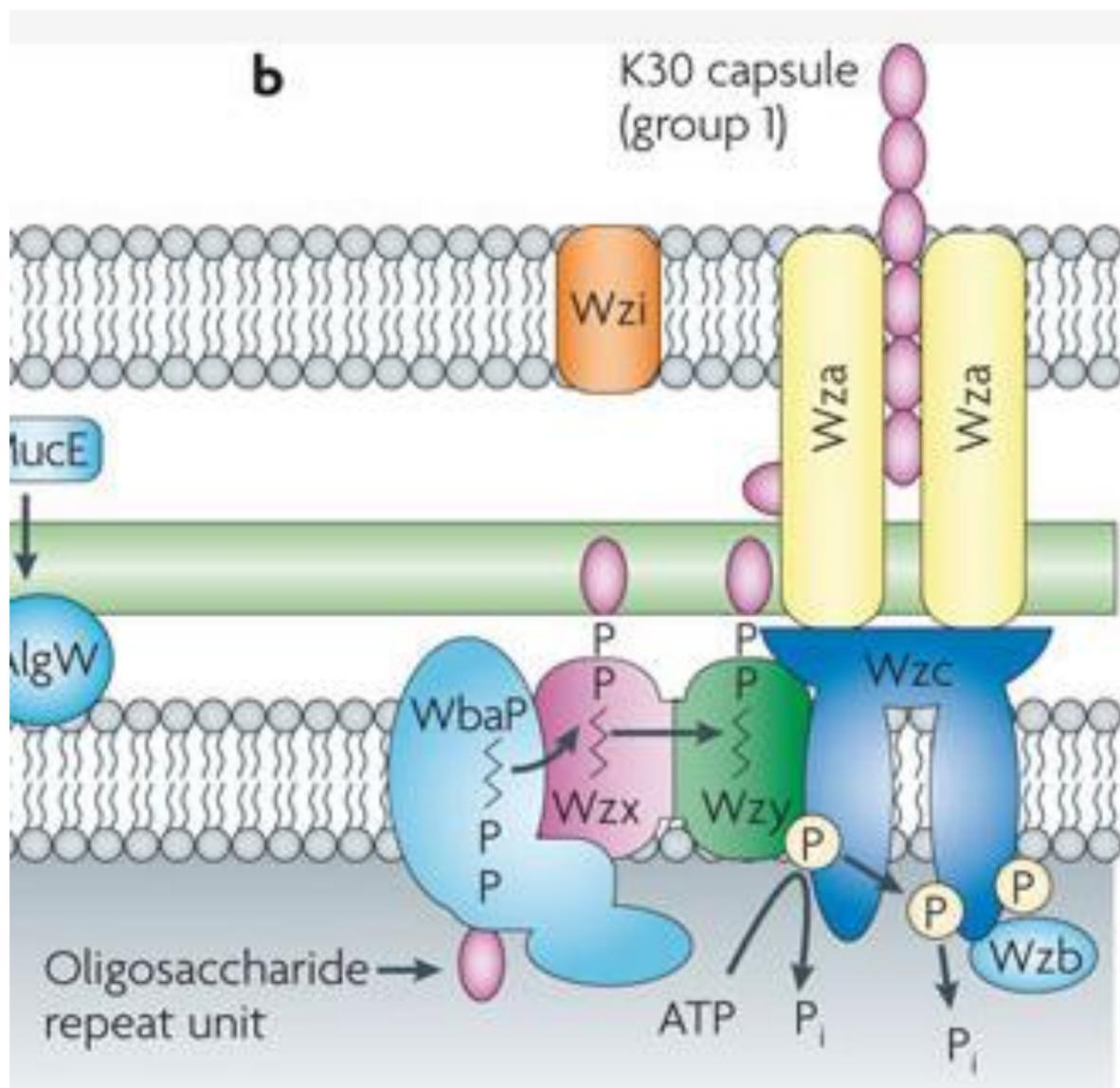
Nel sistema di secrezione Wzx/Wzy dipendente , le singole unità ripetute di zuccheri sono legate al bactoprenolo nella membrana interna, sono poi assemblate da alcune glycosil trasferasi (GT) e poi traslocate attraverso la membrana citoplasmatica dalla proteina Wzx detta anche FLIPPASI.

La polimerizzazione di queste subunità avviene nello spazio periplasmatico ad opera della proteina Wzy prima che siano esportati verso la superficie della cellula.

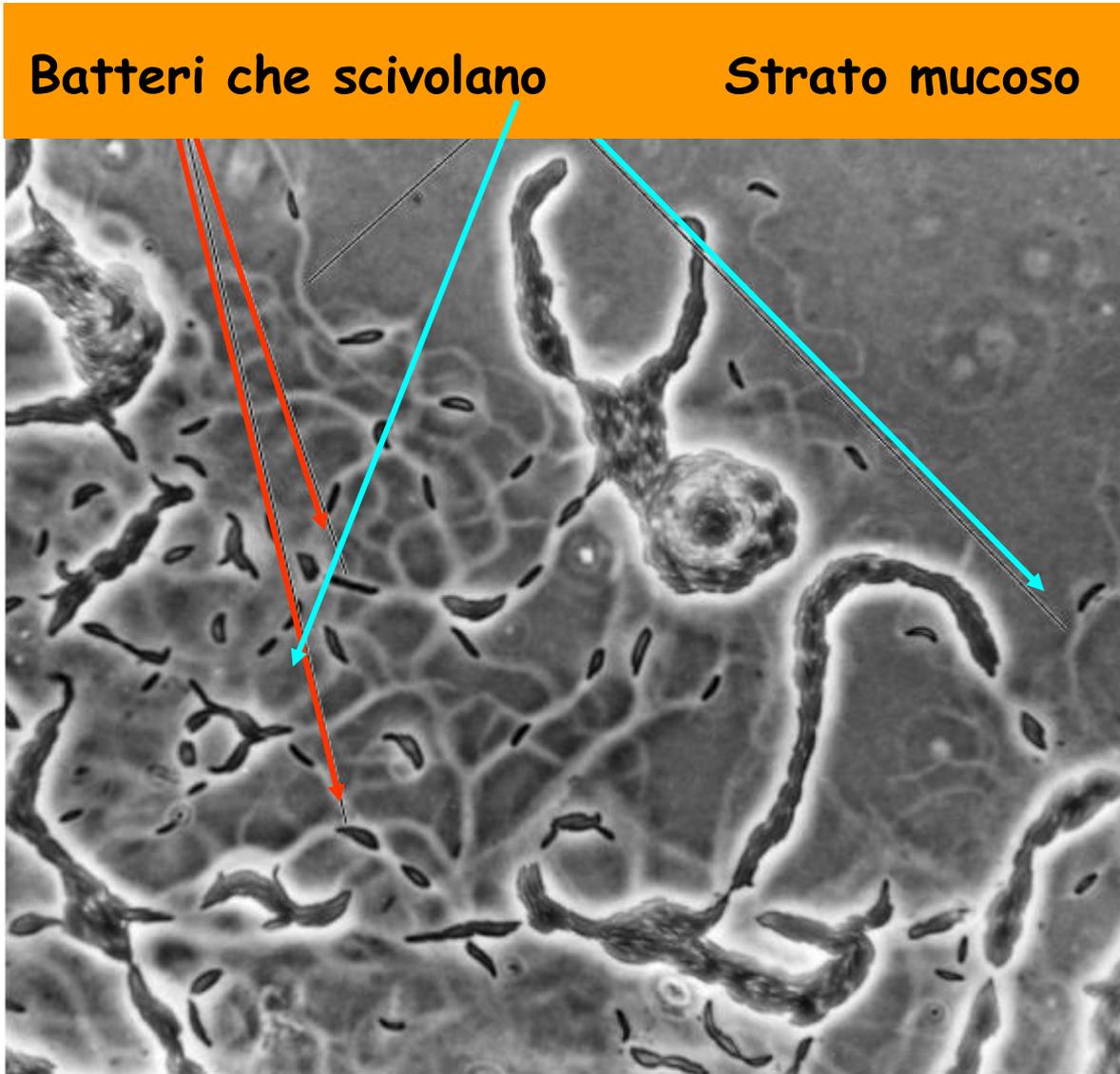
Il trasporto delle unità polimerizzate dallo spazio periplasmatico all'esterno avviene ad opera di altre proteine la polisaccaride copolimerasi ( localizzata nella membrana interna PCP) e una altra nella membrana esterna OPX ( Outer membrane polysaccaride export) OPX.

Tutti i polisaccaridi assemblati dal sistema WzyWzx sono eteropolimeri composti da zuccheri diversi . Tutti i geni che usano questo sistema contengono i geni per le flippasi Wzx e la proteina Wzy all'interno dell'operone dei polisaccaridi extracellulari

- UDP-Glucose
- UDP-Glucuronic acid
- ◆ dTDP-L-Rhamnose
- ◄ O-Acetate
- kdo-linker
- P Phosphate

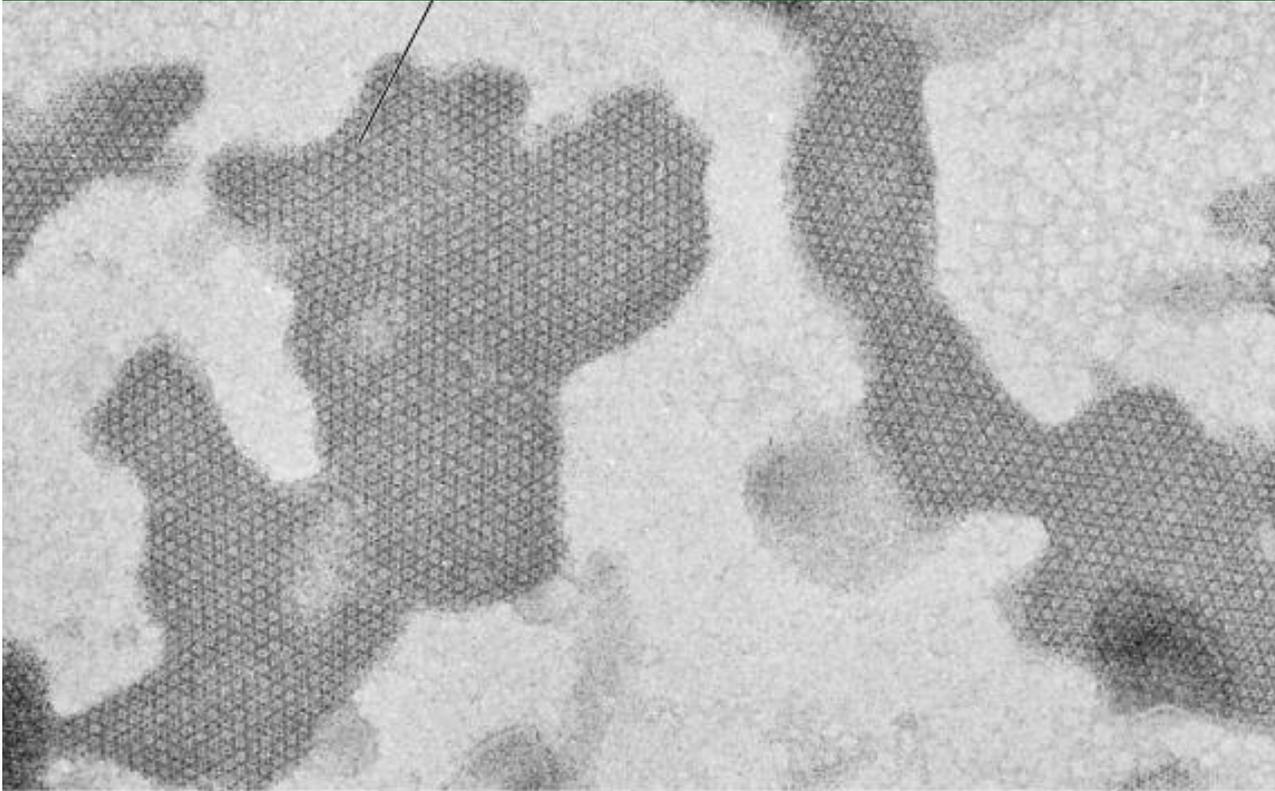


# Strato mucoso e lo scivolamento.



Alcuni batteri si spostano per scivolamento tramite la secrezione di una sostanza mucosa (slime) che forma la scia sulla quale scivolano. *Cytophaga* e *Flavobacterium* si muovono per scivolamento ed utilizzano chitina, cellulosa

## Strato S ( S-Layer)



Alcuni batteri sintetizzano degli strati esterni di natura proteica.

Negli Archea questi strati proteici possono costituire la parete cellulare.

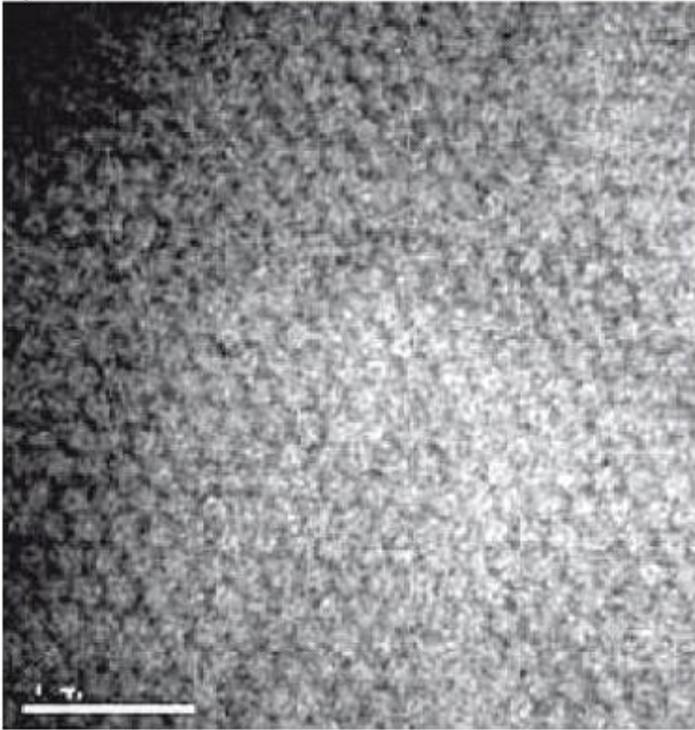
Possono costituire sito di attacco dei batteriofagi

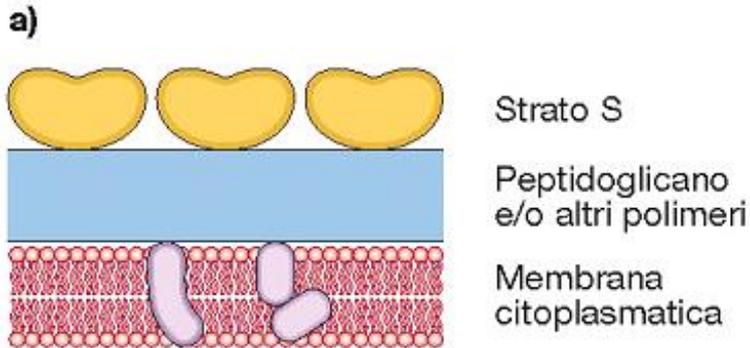
**Gli S layer si presentano come una struttura altamente organizzata, tipo una struttura cristallina , con varie simmetrie (esagonale, tetragonale,) a seconda del numero e della struttura delle subunità glicoproteiche che li compongono .**

Anche in molti Batteri Gram+ e negativi è presente uno strato di rivestimento esterno definito S layer.

S Layer si ritrova come costituente della parete in quasi tutti gli Archea.

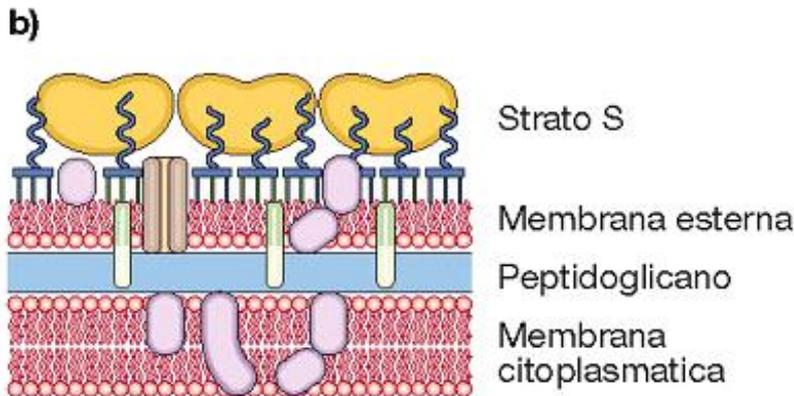
S layer si forma per autoassemblaggio di subunità proteiche con simmetria esagonale, quadrata o obliqua come teste fagiche. Durante l'assemblaggio si vengono a formare pori di dimensioni identiche





Gli strati S sono associati mediante legami non covalenti a diverse strutture cellulari.

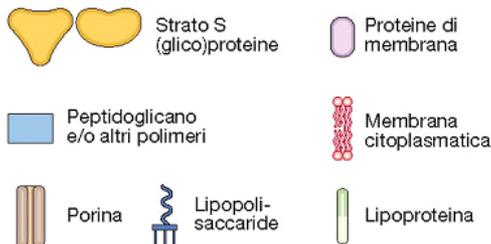
Nei batteri Gram+ le subunità dello strato S sono legate al peptidoglicano



Nei Batteri Gram- sono legati al LPS

Gli Strati S sono composti da proteine insolubili in acqua, debolmente acide con un alto contenuto di

- Acido glutammico
- Acido aspartico
- Lisina
- aminoacidi idrofobici.



Le proteine che costituiscono lo strato S sono secrete con il sistema Sec (ad eccezione di *Caulobacter* dove sono secrete con un sistema di tipo I).

Le proteine dello strato S sono frequentemente legate a catene di zuccheri costituiti da unità ripetute di vari tipi di zuccheri che sporgono nell'ambiente extracellulare (glicoproteine). Lo strato di glicosilazione varia dal 1 al 10%.

Il processo di sintesi è alquanto complesso e la glicosilazione viene regolata in modo coordinato con la sintesi della proteina.

### Qual è la funzione S layer?

Favorisce adesione e riconoscimento di superfici, conferisce rigidità e nei batteri patogeni protezione dalla difesa dell'ospite.