

# 5<sup>th</sup> International Conference on Polyamines

Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives

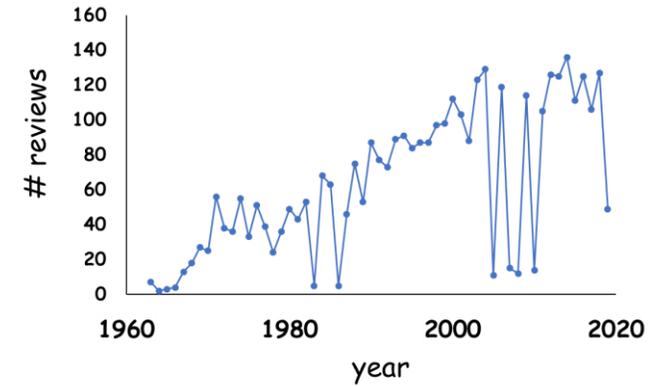
*We welcome you to visit Taiwan!*  
*Sep 2 - Sep 7, 2018 @ Taipei*



**Polyamines**  
Gordon Research Conference



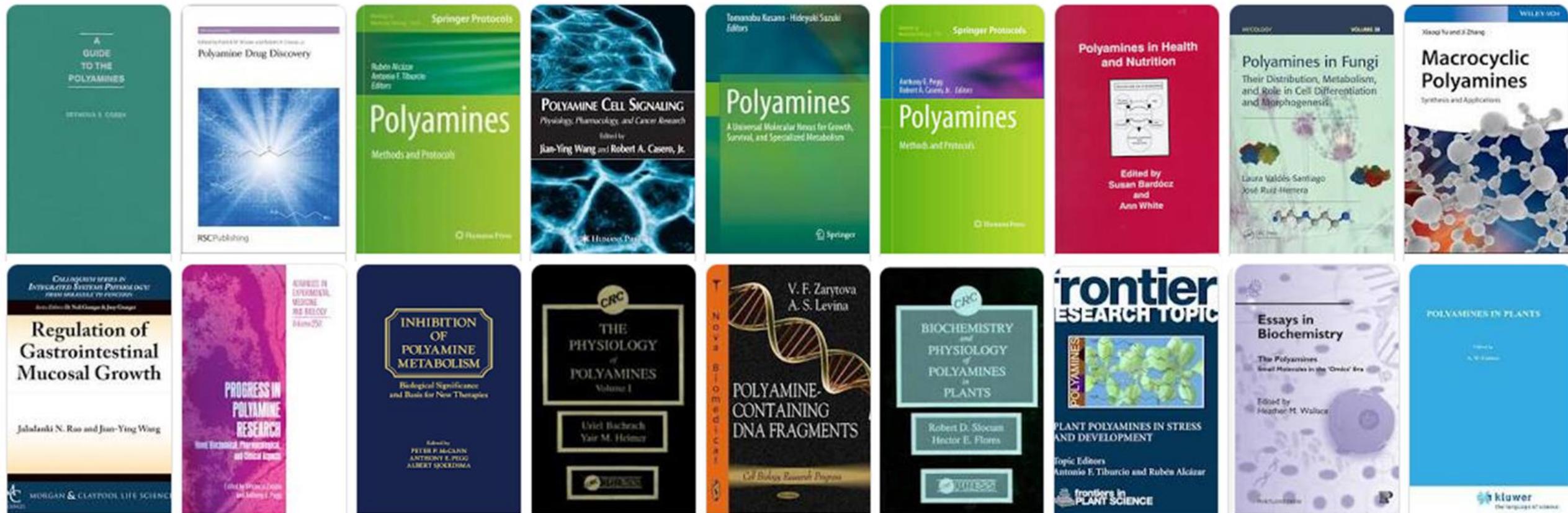
## Reviews on polyamines



## Polyamines in Cancer Biology, Inflammation, Microbiome, Plants and Pathogens

June 23 - 28, 2019

<https://www.polyaminesfoundation.org/>



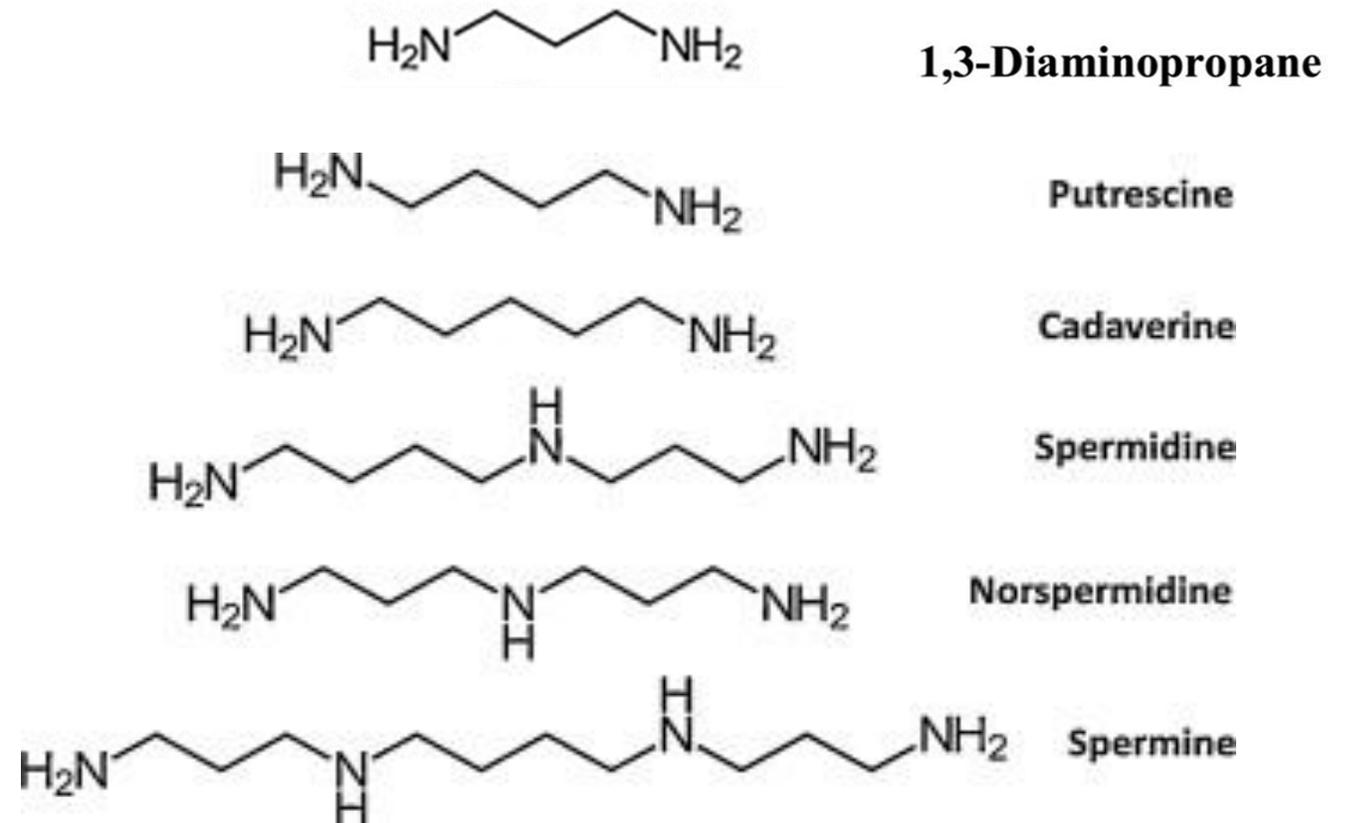
# Cosa sono le poliammine?

Catene alifatiche (lineari o ramificate) con almeno due gruppi amminici terminali...

Le poliammine più semplici e comuni sono:

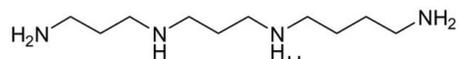


Antonie van Leeuwenhoek

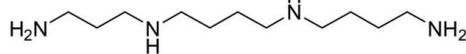


# Poliammine più complesse:

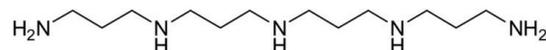
**Thermospermine (334)**



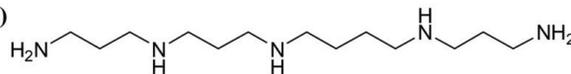
**Homospermine (344)**



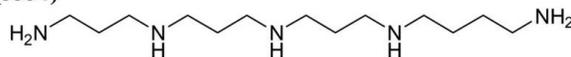
**Caldopentamine (3333)**



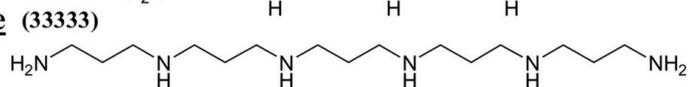
**Thermopentamine (3343)**



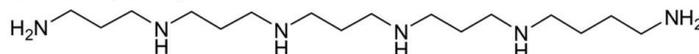
**Homocaldopentamine (3334)**



**Caldohexamine (33333)**

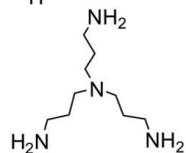


**Homocaldohexamine (33334)**

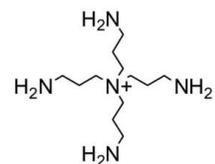


**Tris(3-aminopropyl)amine (3(3)3)**

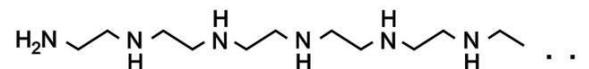
(Mitsubishine)



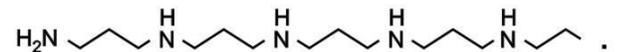
**Tetrakis(3-aminopropyl)ammonium (3(3)(3)3)**



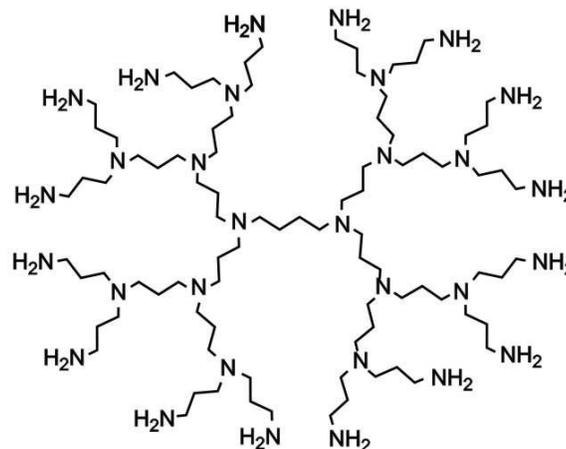
Linear poly(ethylene imine) (LPEI)



Linear poly(propylene imine) (LPEI)

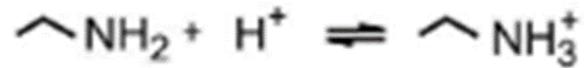


Dendritic poly(propylene imine) (DPEI)

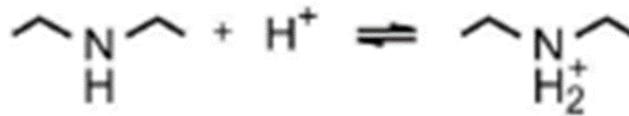


Sono ampiamente utilizzati nella produzione di carta, nel trattamento delle acque, nei detergenti, negli adesivi e nei cosmetici. Nella ricerca, sono ampiamente studiati come vettori non virali.

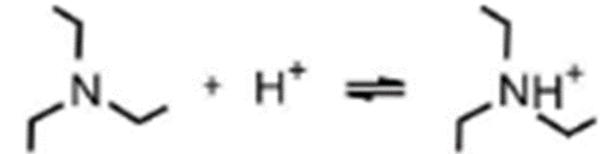
# Proprietà chimiche: protonazione a pH fisiologici



Primary Amines

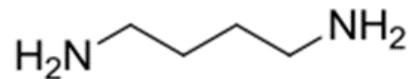


Secondary Amines



Tertiary Amines

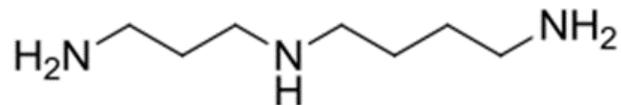
Put



$pK_{a1}$  11.15

$pK_{a2}$  9.71

Spd

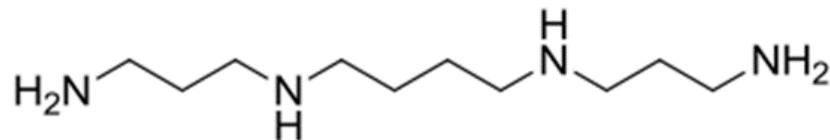


$pK_{a1}$  10.49

$pK_{a2}$  9.81

$pK_{a3}$  8.34

Spm



$pK_{a1}$  10.98

$pK_{a2}$  10.09

$pK_{a3}$  8.83

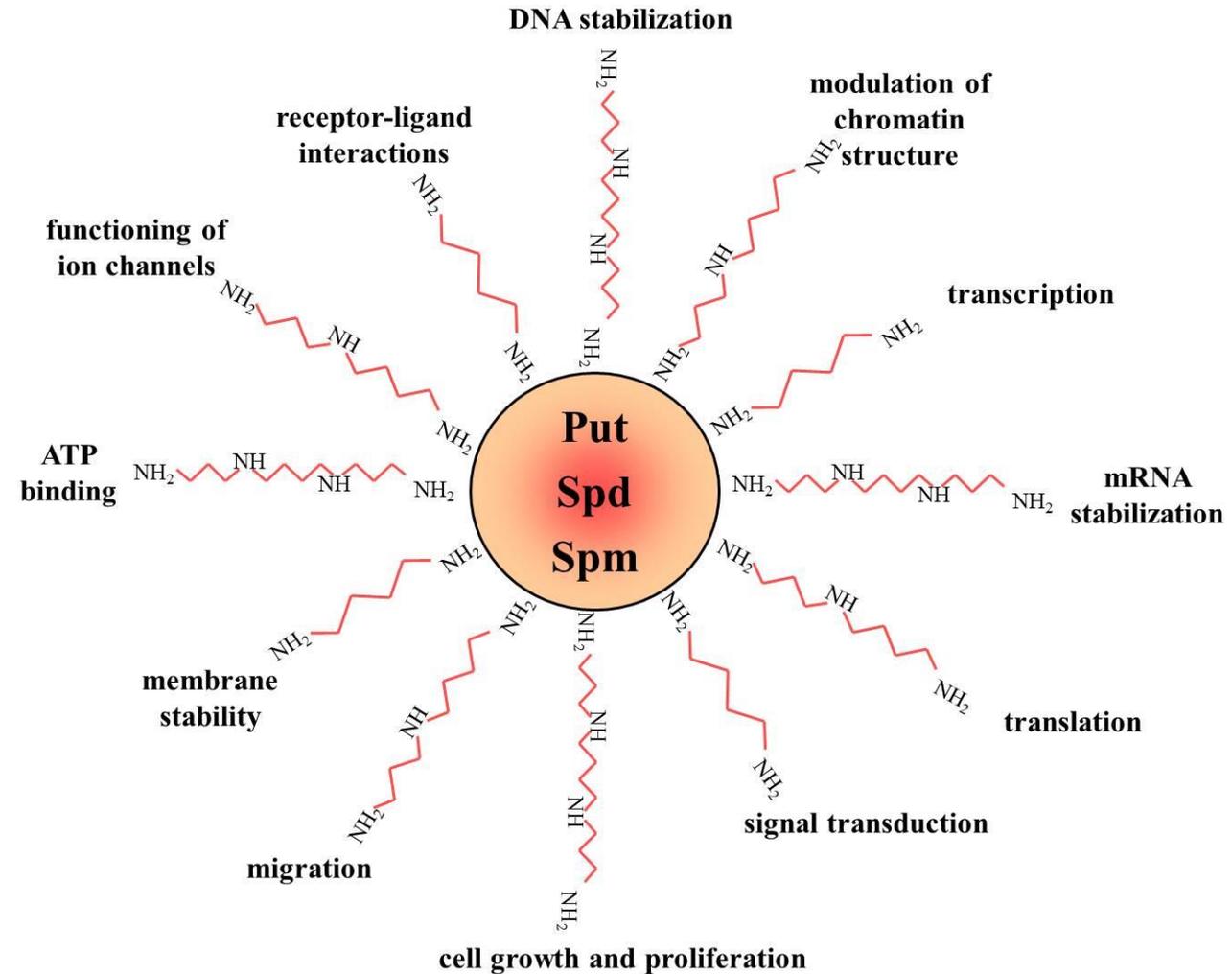
$pK_{a4}$  7.94

pH = 7.0-7.4

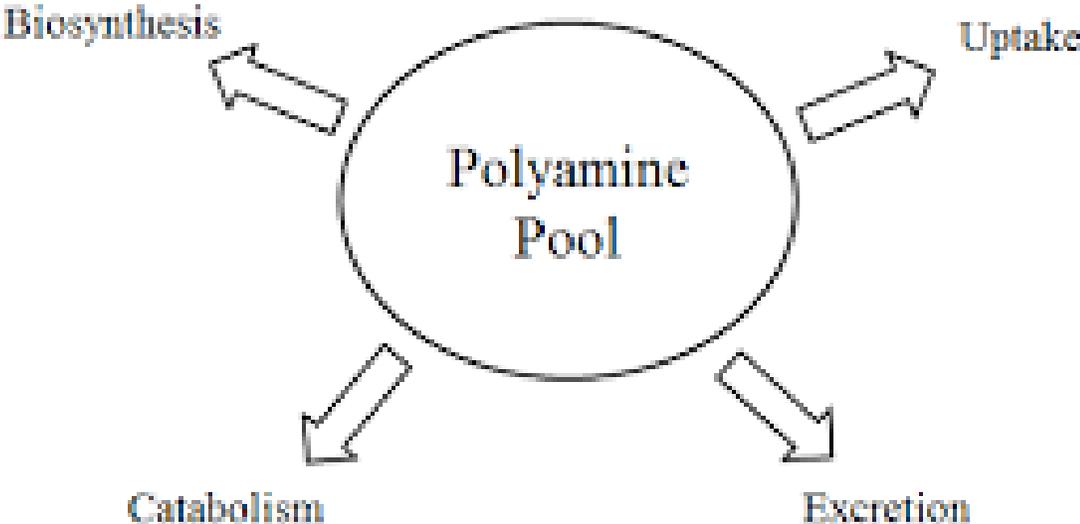
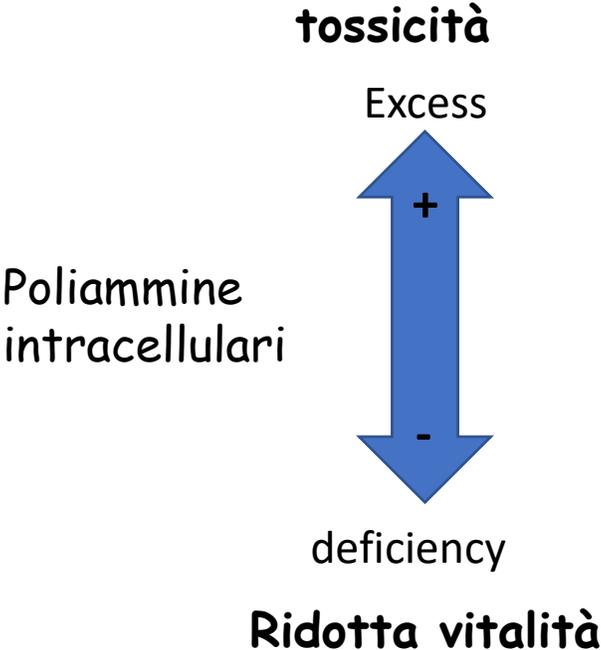
La carica positiva delle poliammine consente loro di interagire con i componenti della cellula con carica negativa, come il DNA, l'RNA, le proteine anioniche e i fosfolipidi.

Questo influenza un numero enorme di processi cellulari e biologici...

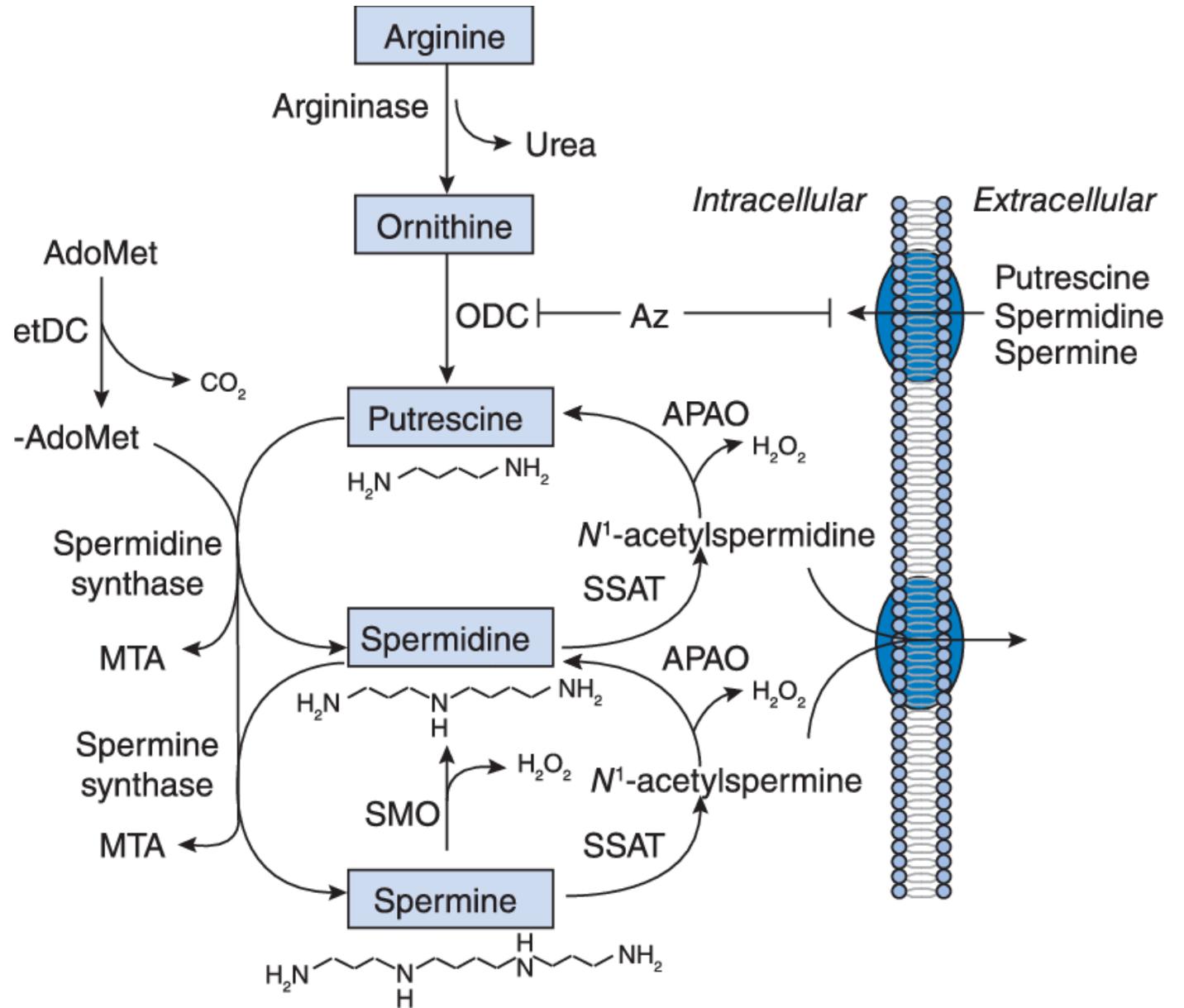
Le poliammine sono quindi essenziali e la loro concentrazione deve essere strettamente controllata...



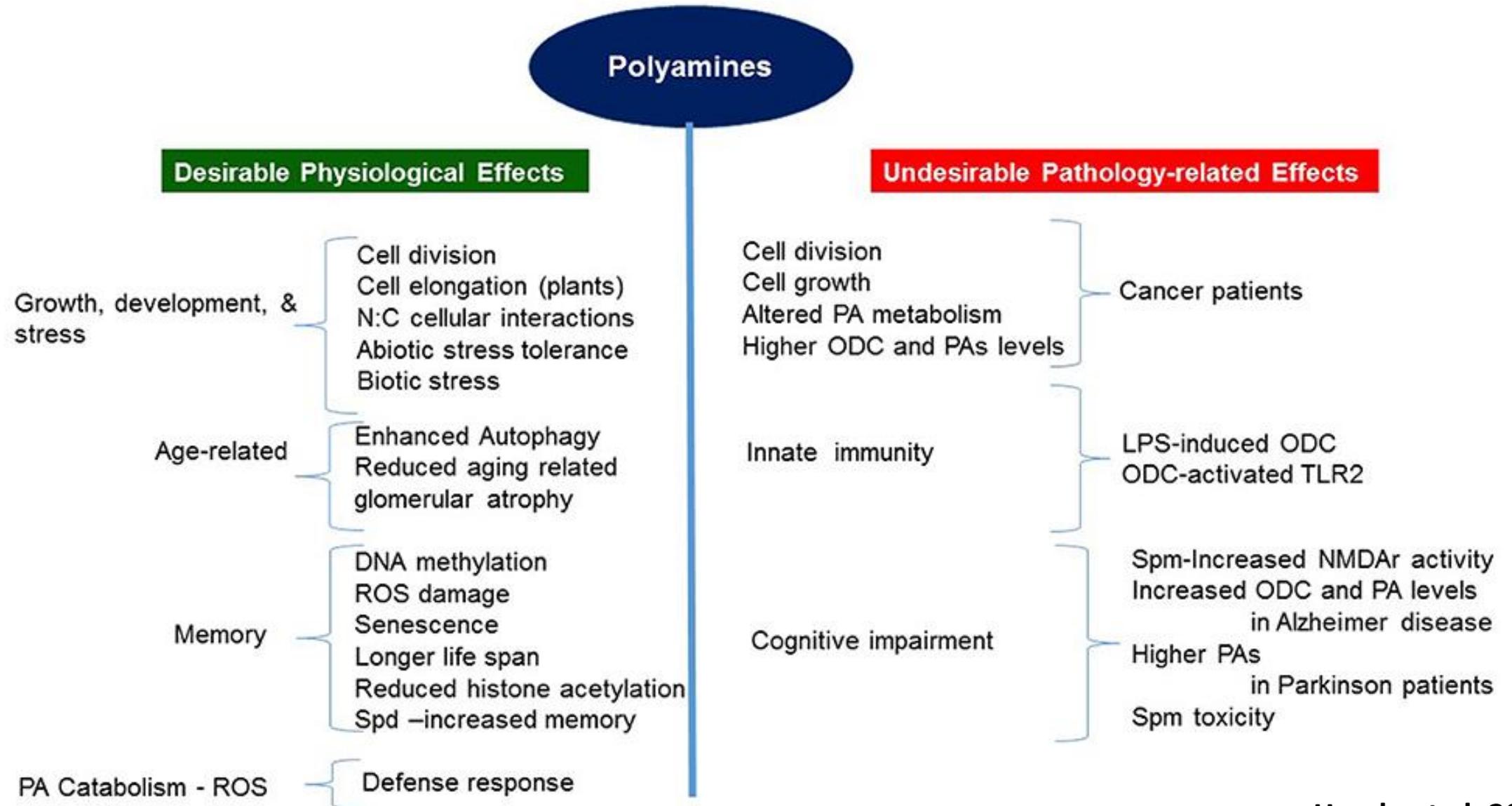
# Controllo cellulare del pool delle poliammine



# Metabolismo delle poliammine negli Eukarya



# Le poliammine influenzano la fisiologia animale e vegetale



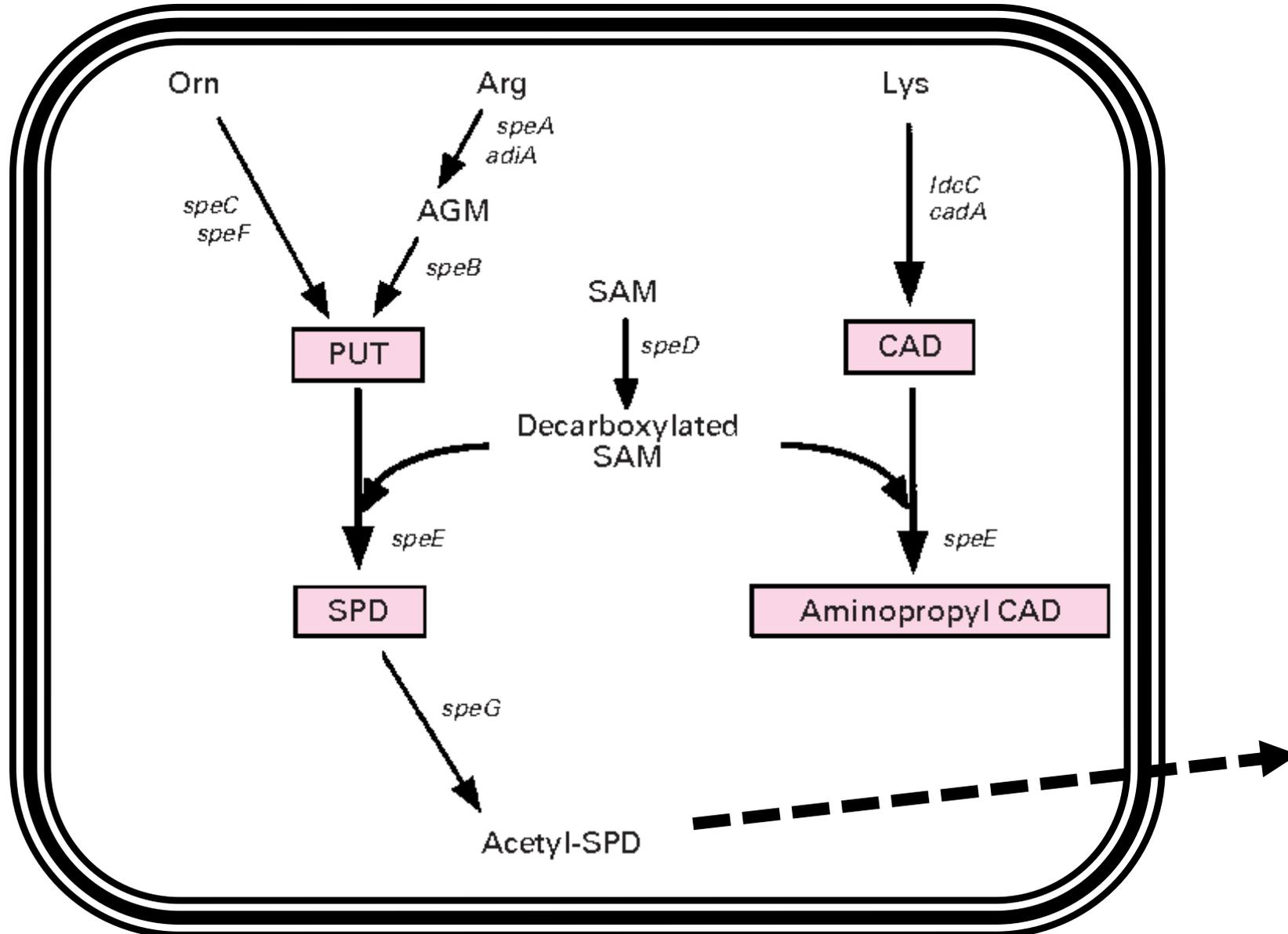
# Poliammine e piante

Le poliammine nelle piante sono implicate in:

- fioritura
- Sviluppo embrionale
- Senescenza delle piante
- Stress
  - Stress termico
  - Stress idrico
  - Stress salino
  - Stress ossidativo
  - Stress acido
  - Stress da radiazioni
  - Ferite e abrasioni
  - Metalli pesanti
  - Malattie e parassiti

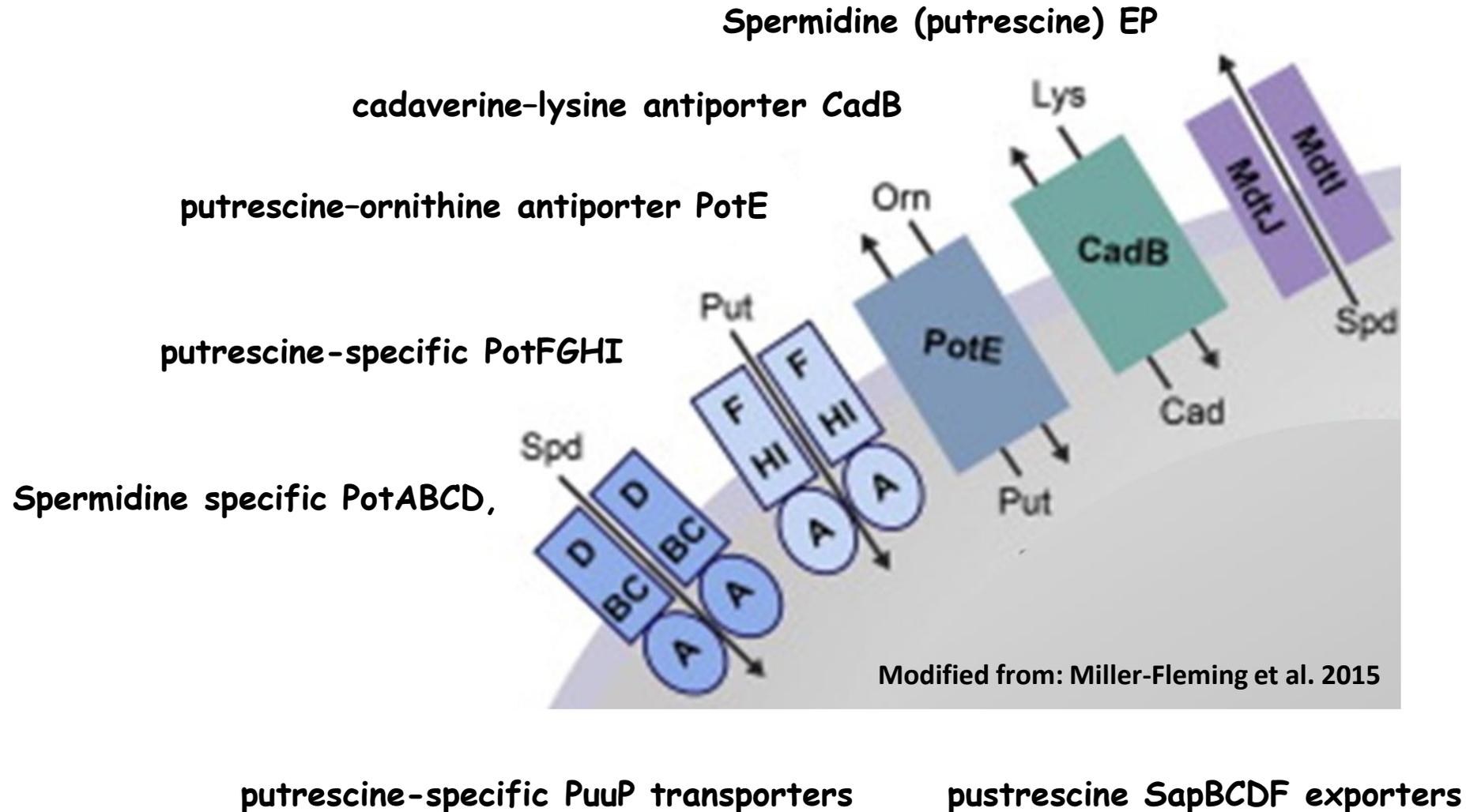


# Metabolismo delle poliammine in *E. coli*



Derivati acetilati della spermidina e spermina sono probabilmente secreti o conservati nel periplasma

# Trasporto delle poliammine in *E. coli*



# Principali problematiche nello studio delle poliammine...

i termini "enigmatico" e "misterioso" sono spesso utilizzati per descrivere il ruolo delle poliammine nelle funzioni biologiche e cellulari. Ciò dipende da....

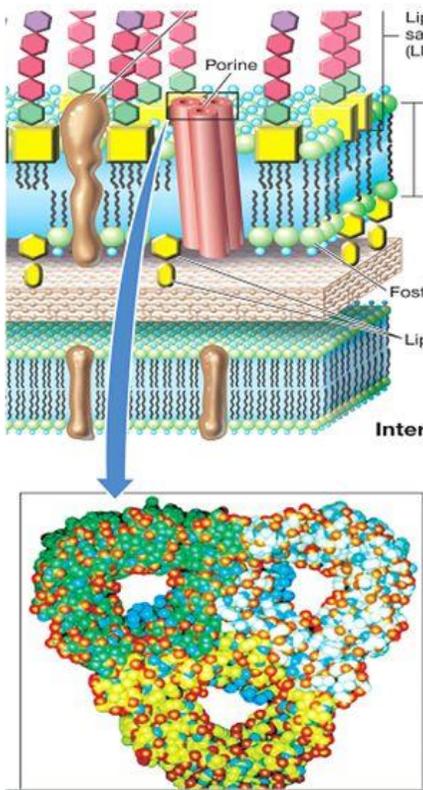
- la distribuzione filogenetica disomogenea di ogni specifica poliammina
- il problema del rilevamento e della quantificazione delle poliammine
- la scarsità di conoscenze sui meccanismi molecolari in cui le poliammine sono coinvolte nei batteri.

# Le poliammine e le loro funzioni funzioni nei batteri

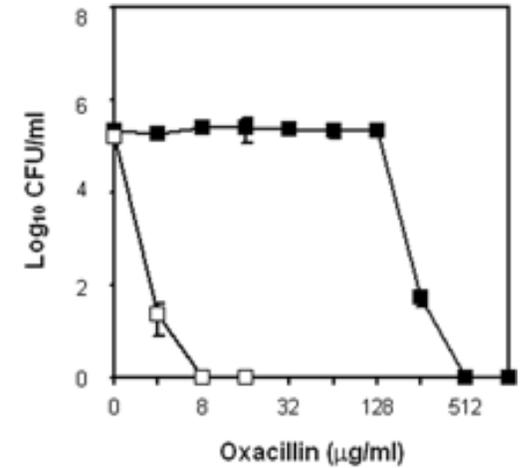
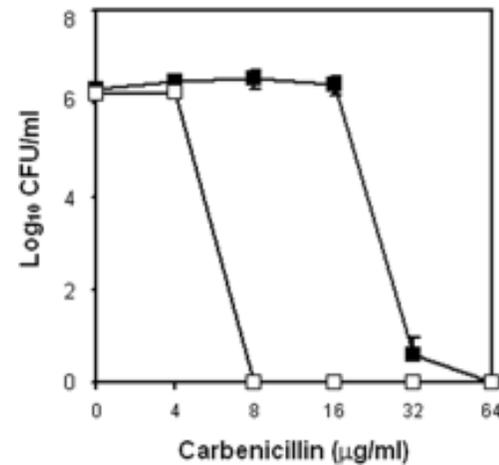
- Permeabilità di membrana
- Risposta allo stress acido e ossidativo
- Struttura e compattazione del DNA
- Espressione genica attraverso il controllo traduzionale

# Controllo della permeabilità cellulare da parte della spermina

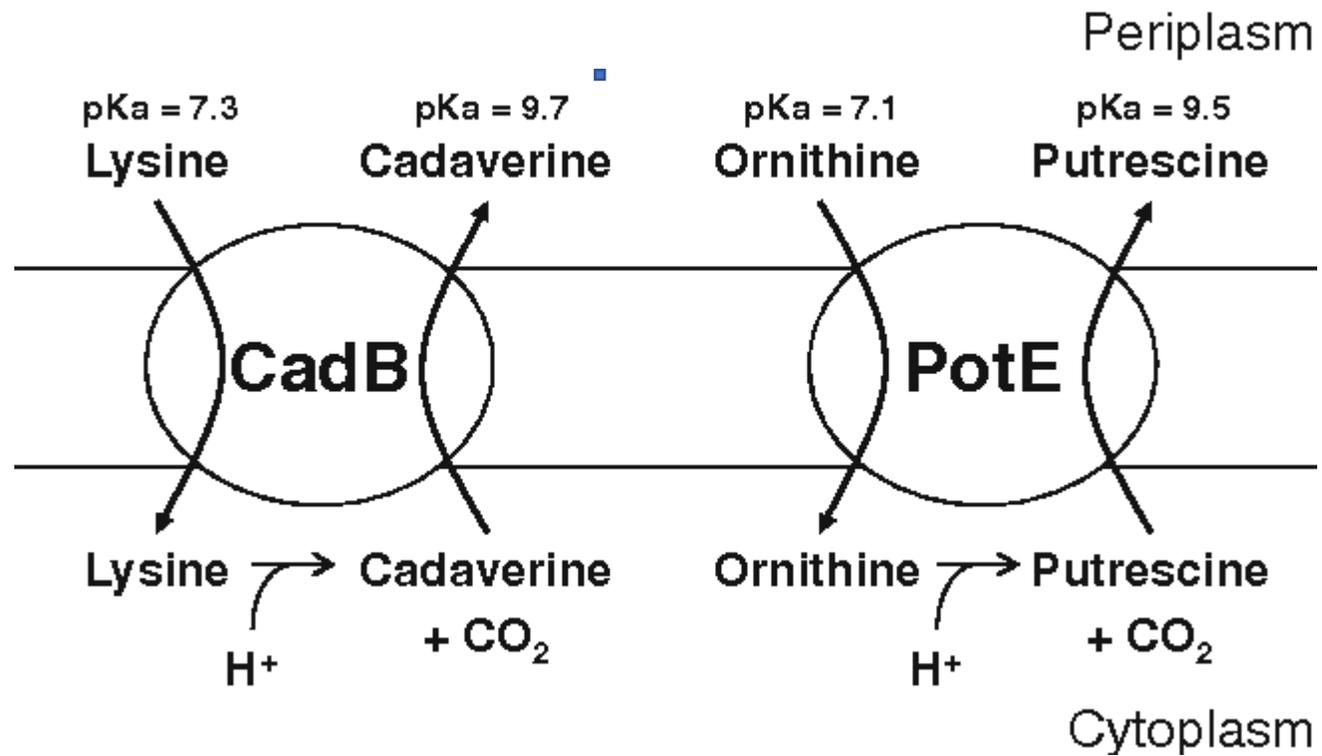
Attività della porina OmpF o OmpF-like in presenza di Spermina 10 mM



*Pseudomonas aeruginosa*

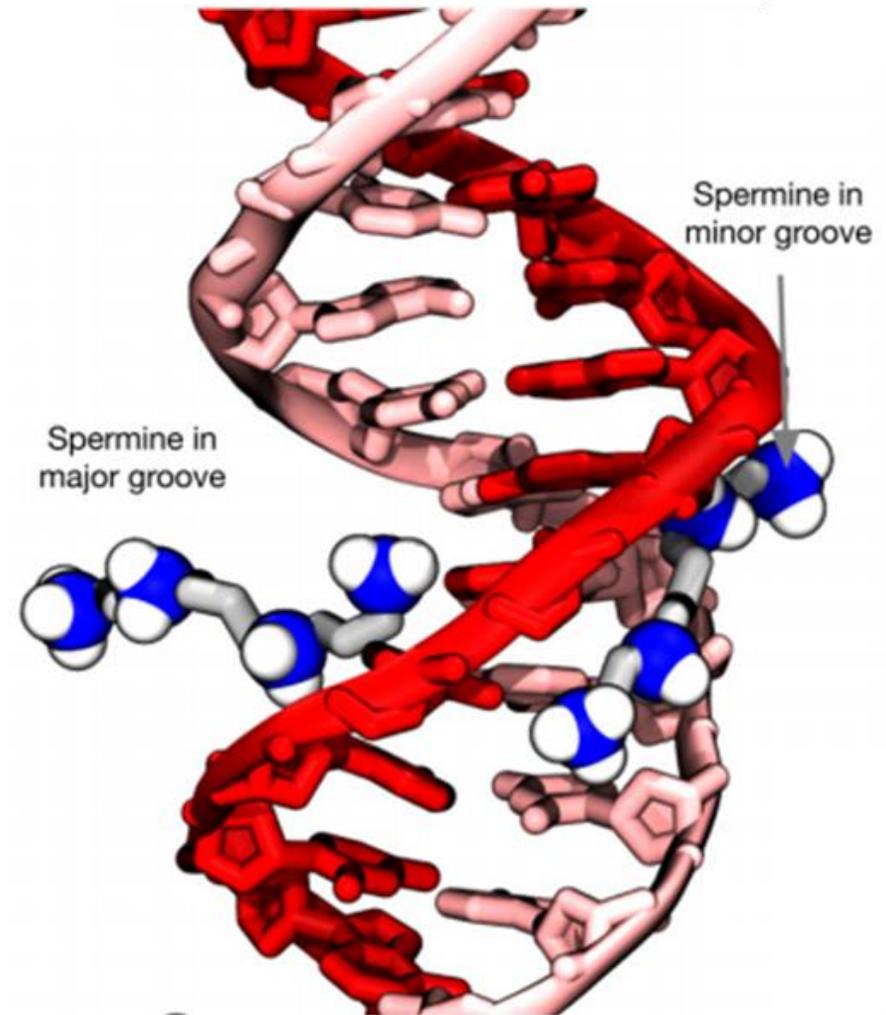


# Meccanismi di resistenza agli acidi in *E. coli*



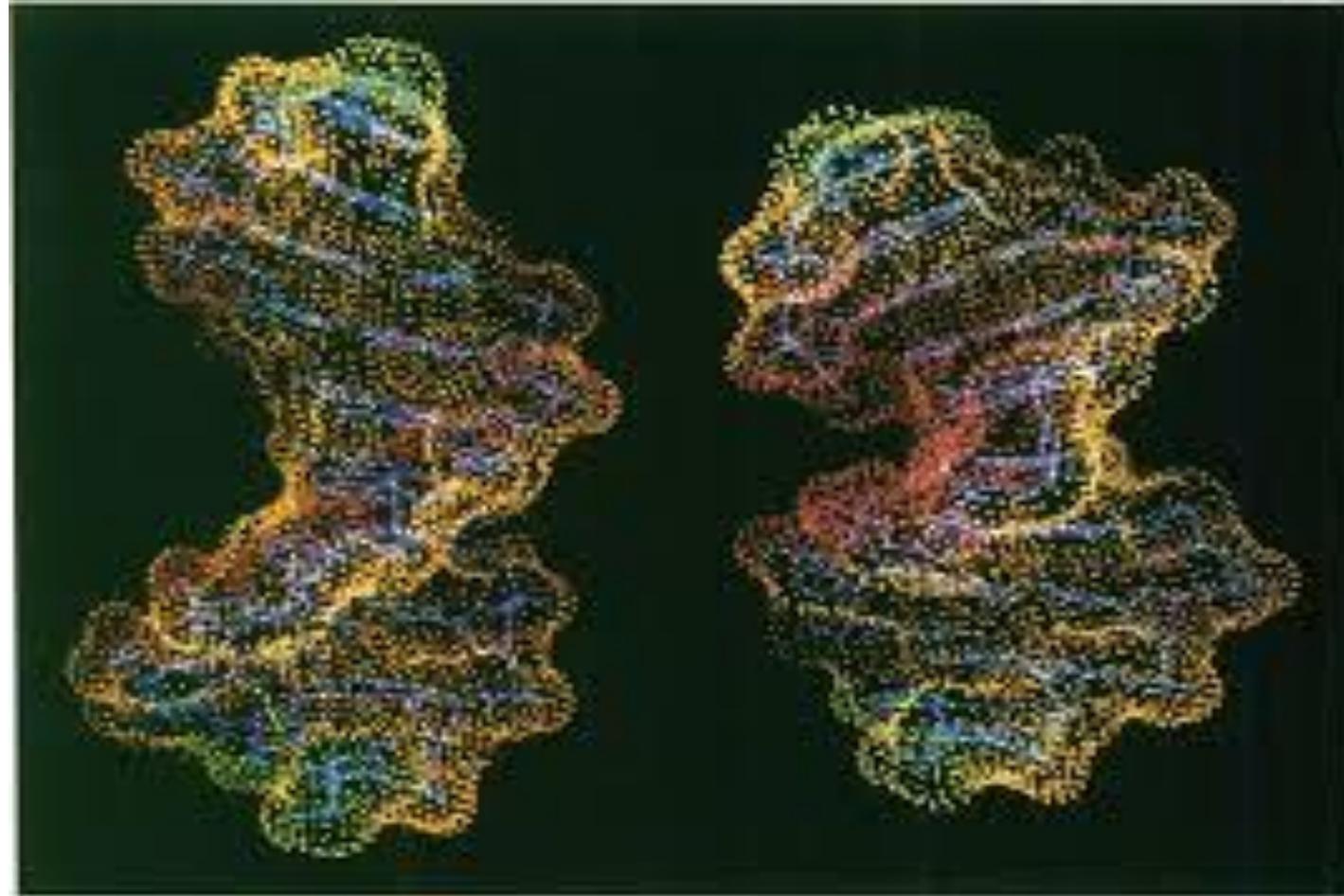
# Interazione con i poli-cationi all'interno delle cellule: acidi nucleici.

la distribuzione delle cariche della spermina lungo l'impalcatura fosfato del DNA, consente la corretta interazione preferenziale con questa molecola e la differenza da altri importanti cationi come  $Mg^{2+}$  o  $Zn^{2+}$



L'interazione della spermina con il DNA induce la transizione strutturale del DNA dalla conformazione B a Z o da B ad A

**Senza  
spermina**



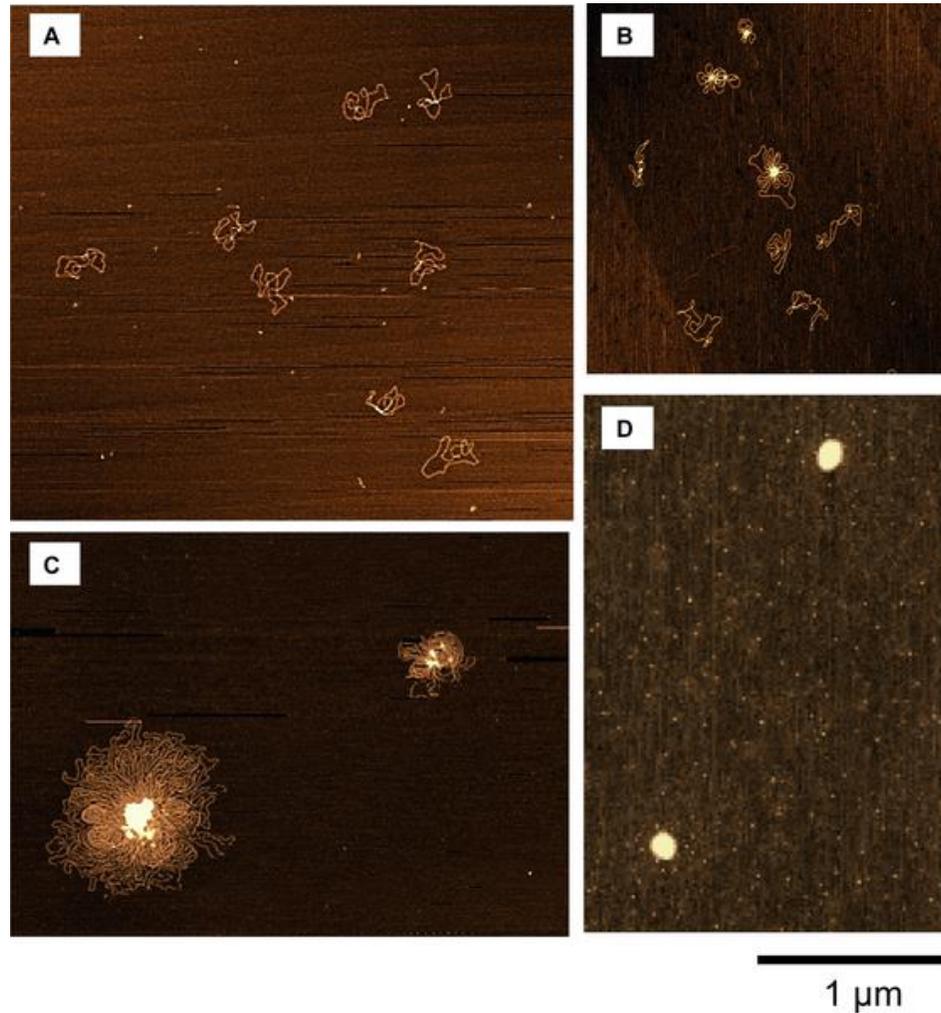
**Con  
spermina**

**Electrostatic Potential Surface Analysis**  
(for clarity, spermidine is not shown)

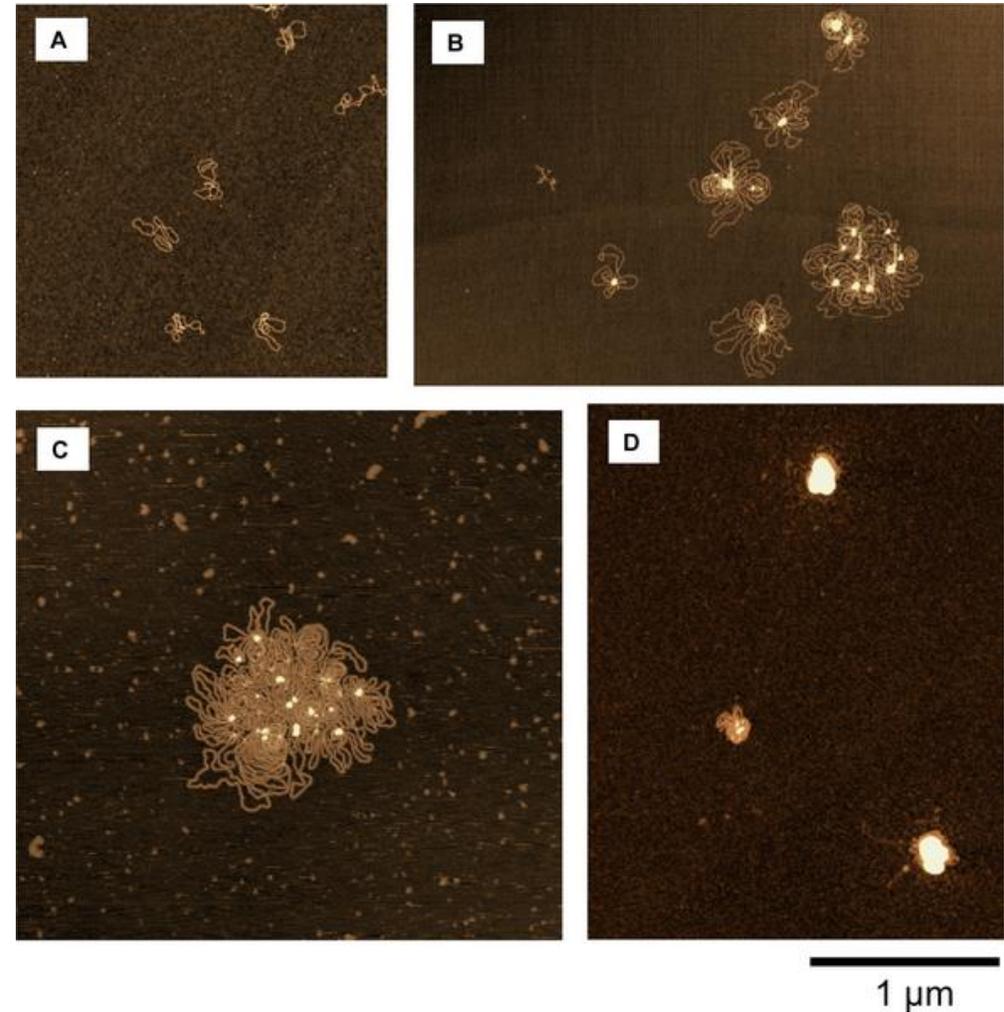
From Feuerstein aet al. 1985

# Effetti «Macroscopici» della spermina e spermidina sul DNA

SPD from 0,004 to 2 mM).

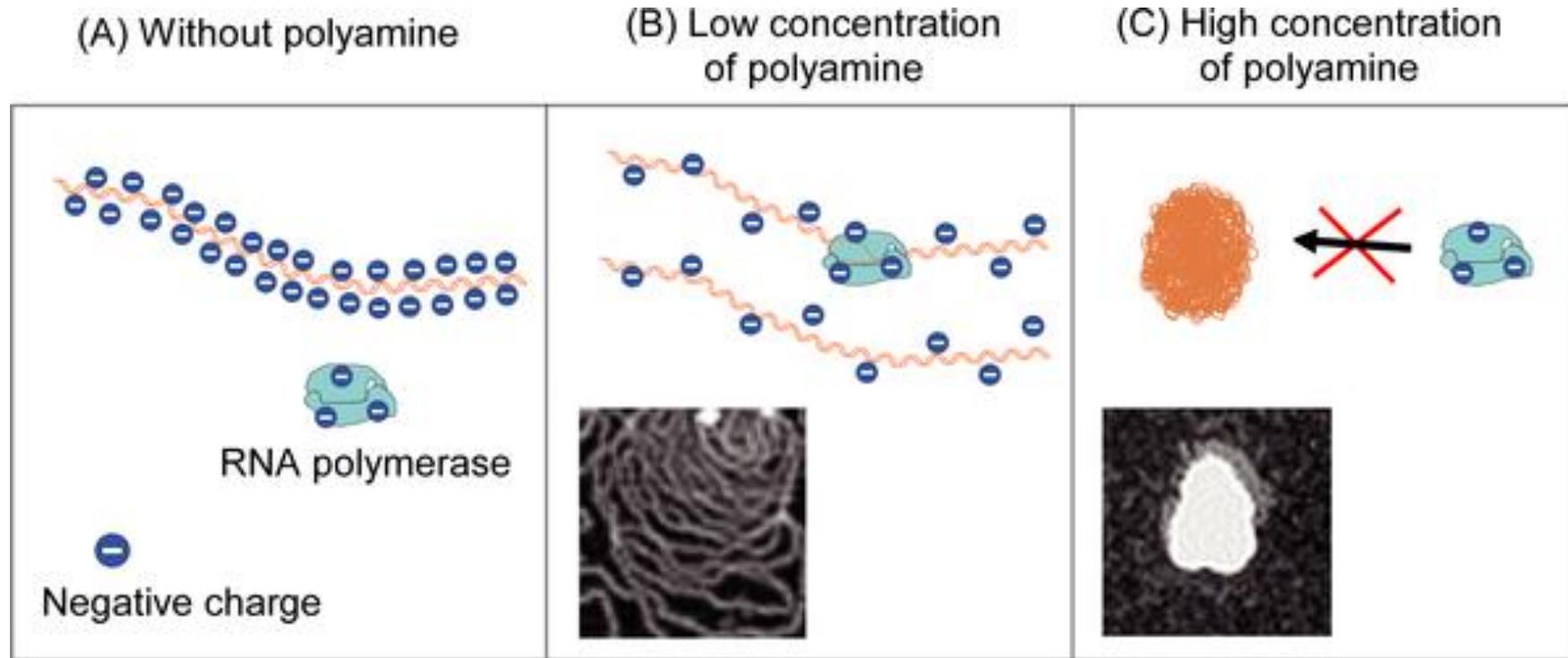


SPM from 0,004 to 0,6 mM).



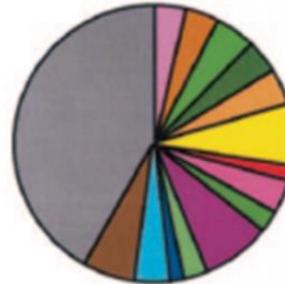
Adapted from Kanemura et al. (2018)

# Influenza sulla trascrizione del DNA...

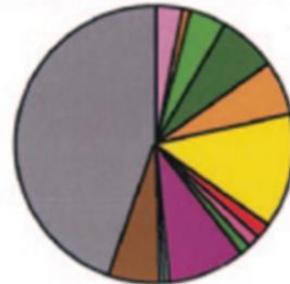


# Effetti delle polyamine sull profilo trascrizionale globale di *E. coli global*

Functional category of 2742 detected genes

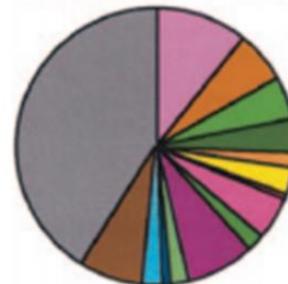


Genes up-regulated in the presence of PUT



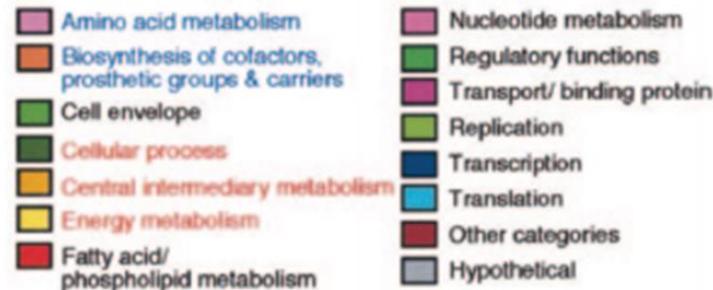
Total gene number : 309

Genes down-regulated in the presence of PUT



Total gene number : 319

Functional category

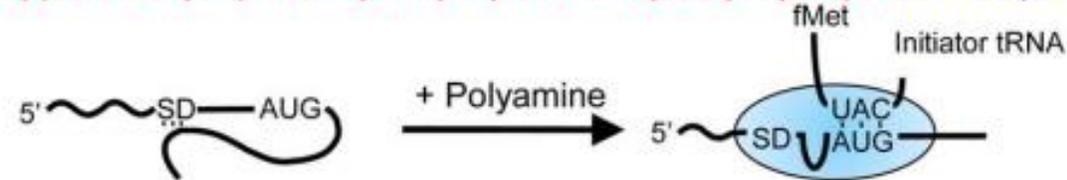


# Effetti delle poliammine sul controllo traduzionale e sull'espressione genica: il «modulone» delle poliammine in *E. coli*

## B. Three mechanisms of polyamine stimulation of protein synthesis

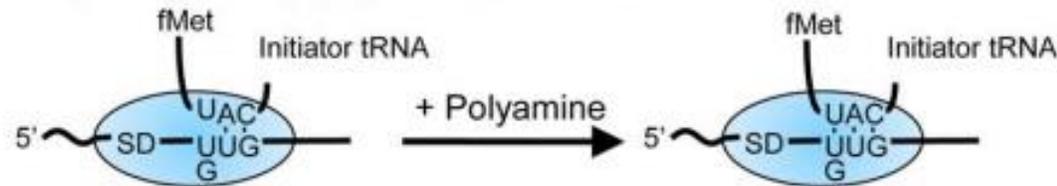
### 1. Long distance between SD sequence and initiation codon AUG

OppA, Fecl ( $\sigma^{18}$ ), Fis, RpoN ( $\sigma^{54}$ ), H-NS, RpoE ( $\sigma^{24}$ ), StpA, RMF, RpoZ ( $\omega$ ), CpxR



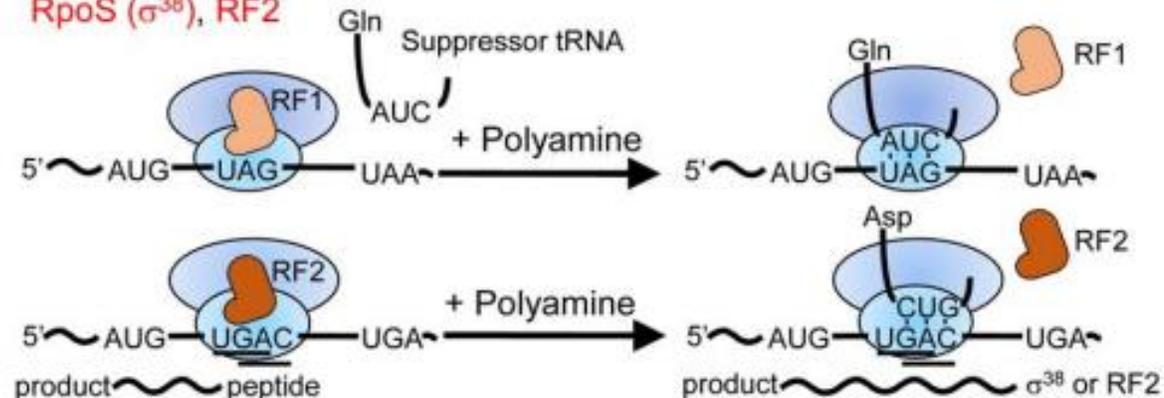
### 2. Initiation on inefficient initiation codon

Adenylate cyclase (Cya), Cra, SpoT, UvrY, RRF

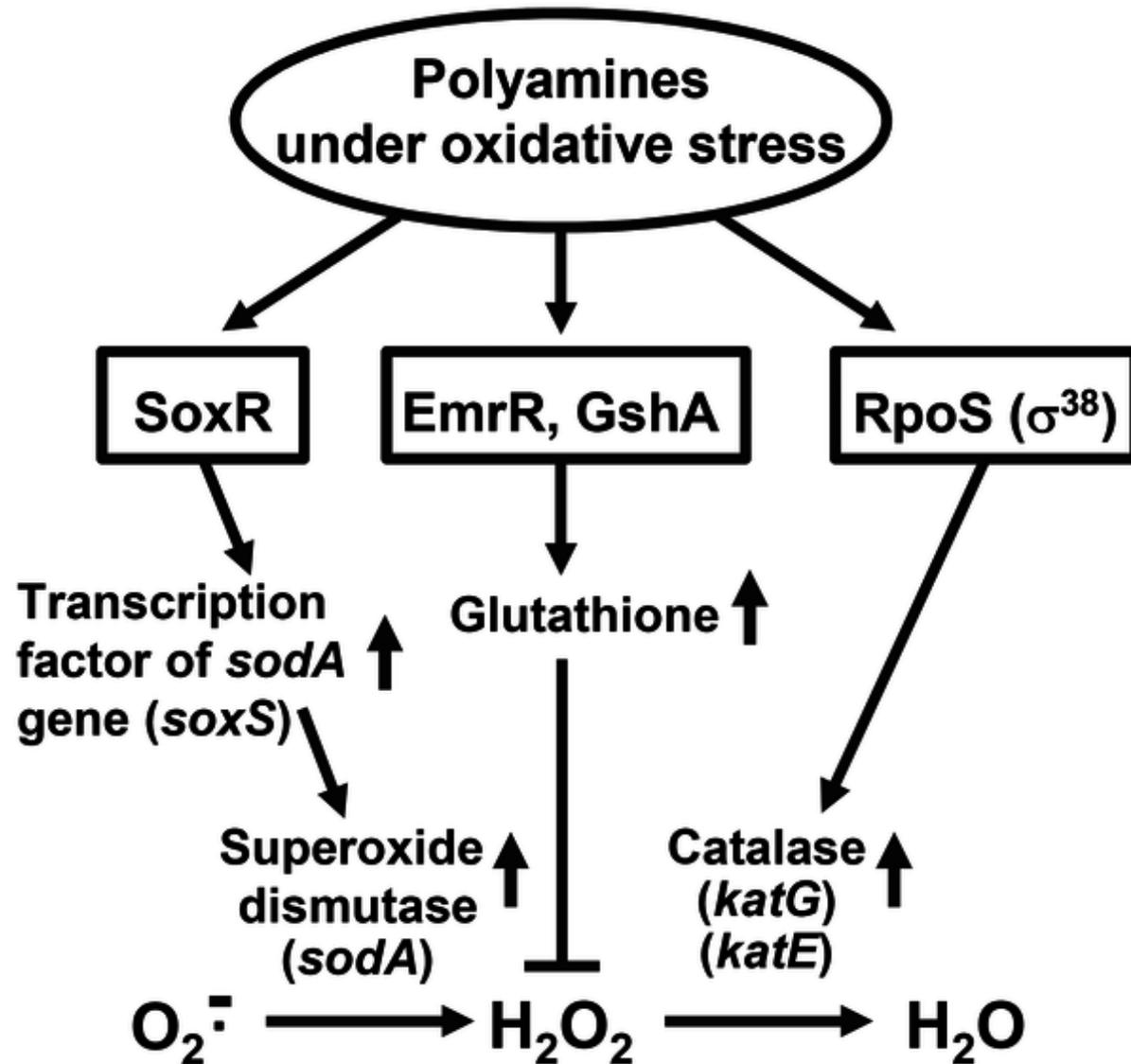


### 3. Suppression and +1 frameshifting on nonsense codon

RpoS ( $\sigma^{38}$ ), RF2



# Ruolo delle poliammine nella risposta allo stress nei batteri

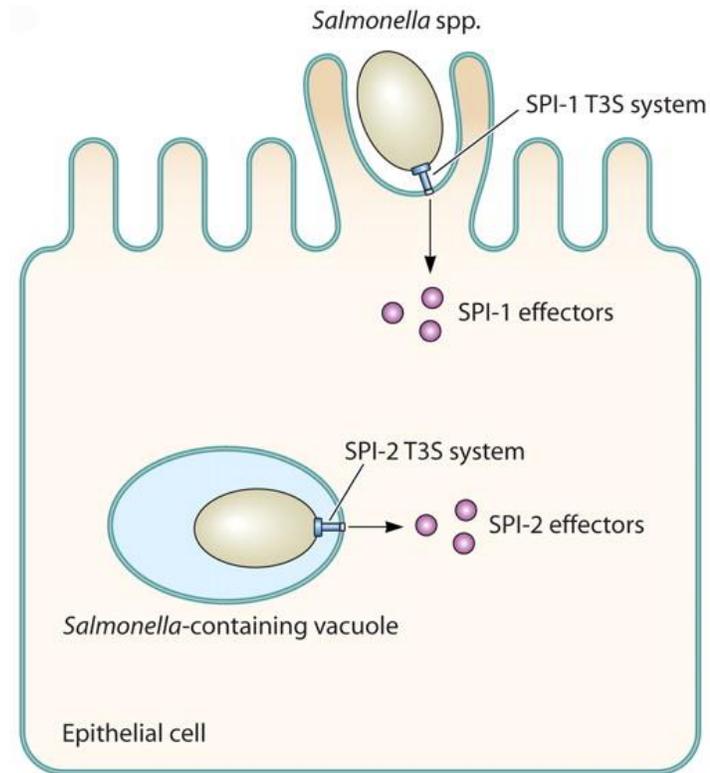
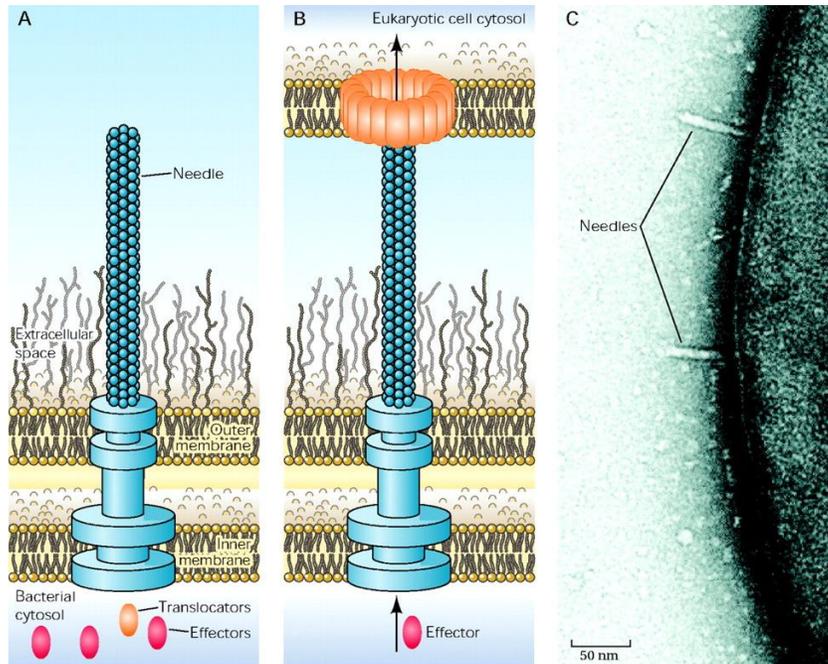


# Ruolo delle poliammine nella virulenza dei batteri patogeni e nella loro interazione con gli ospiti:

- *Salmonella Typhimurium*
- *Yersinia pestis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Vibrio cholerae*
- *Helicobacter pylori*
- *Shigella e EIEC (Enteroinvasive E. coli)*

# Salmonella Typhimurium e poliammine

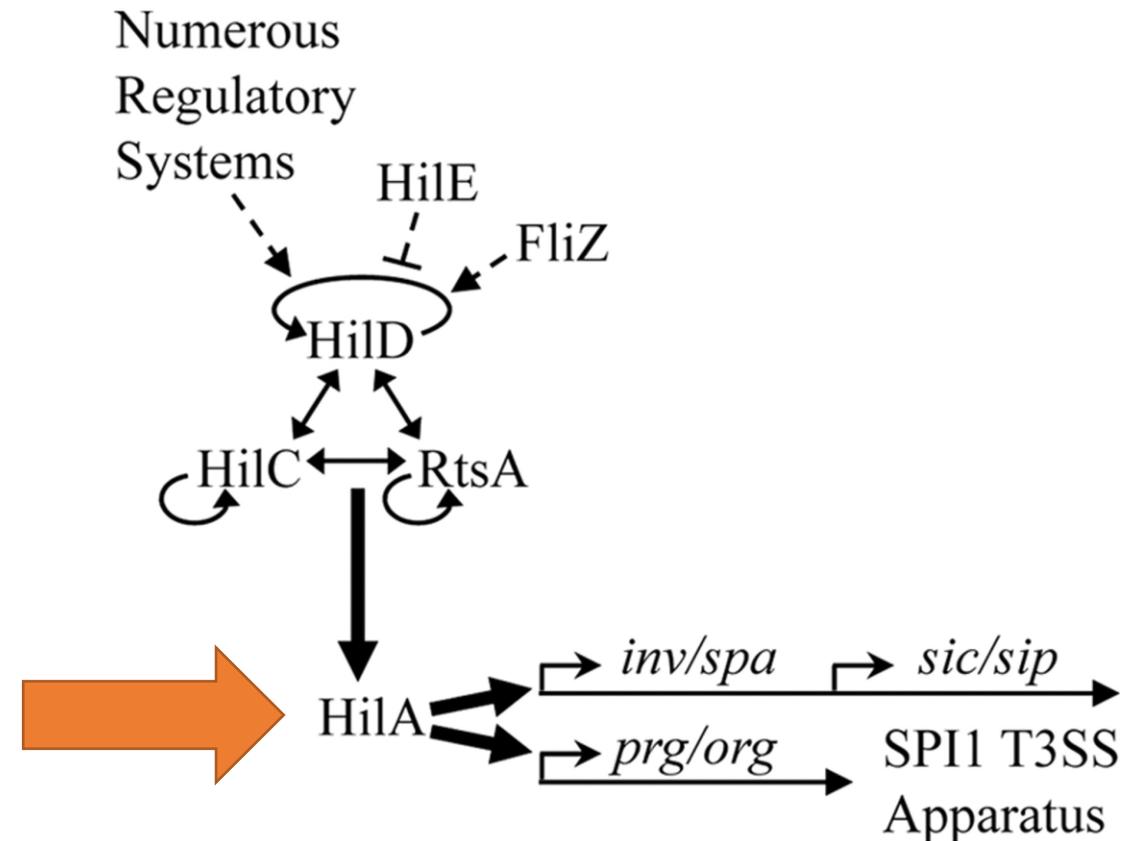
Salmonella Typhimurium è un patogeno intracellulare facoltativo in grado di causare da gastroenteriti autolimitanti a infezioni sistemiche e pericolose per la vita. La capacità di *S. Typhimurium* di causare malattie dipende in larga misura da due sistemi di secrezione di tipo III (T3SS1 e T3SS2), codificati da geni situati all'interno delle isole di patogenicità di *Salmonella* SPI1 e SPI2, rispettivamente (Ibarra e Steele-Mortimer, 2009).



# Salmonella Typhimurium e poliammine

I ceppi di *S. Typhimurium* difettosi nella biosintesi di putrescina e spermidina mostrano una ridotta invasione delle cellule epiteliali e una minore sopravvivenza intracellulare in un modello murino di febbre tifoidea.

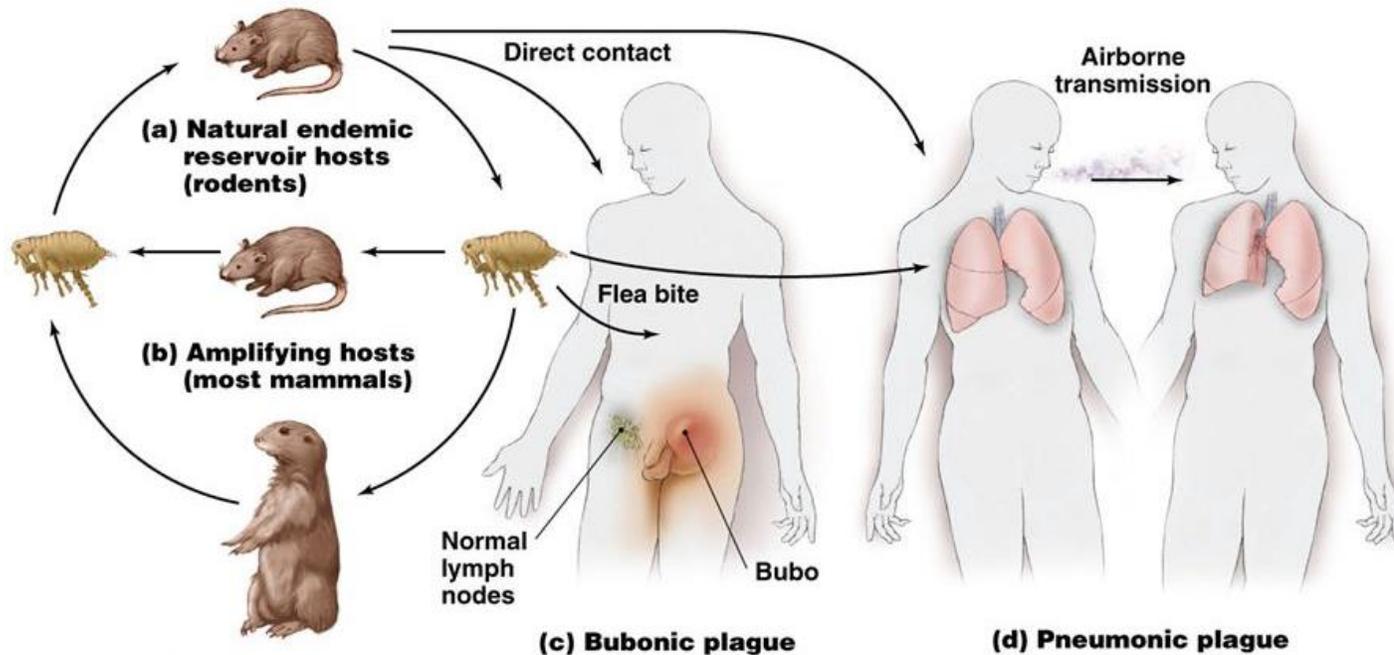
In questi ceppi, la ridotta espressione di SPI1, SPI2 e dei loro geni effettori dipende dalla bassa espressione del «master regulator» *hilA* e degli operoni *inv* e *sip*.



# *Yersinia pestis* e poliammine

*Yersinia pestis* è l'agente eziologico della peste bubbonica e polmonare, una malattia zoonotica trasmessa all'uomo dal morso delle pulci.

*Il biofilm di Y. pestis ostruisce il percorso tra l'intestino medio e l'intestino anteriore*



© 2012 Pearson Education, Inc.

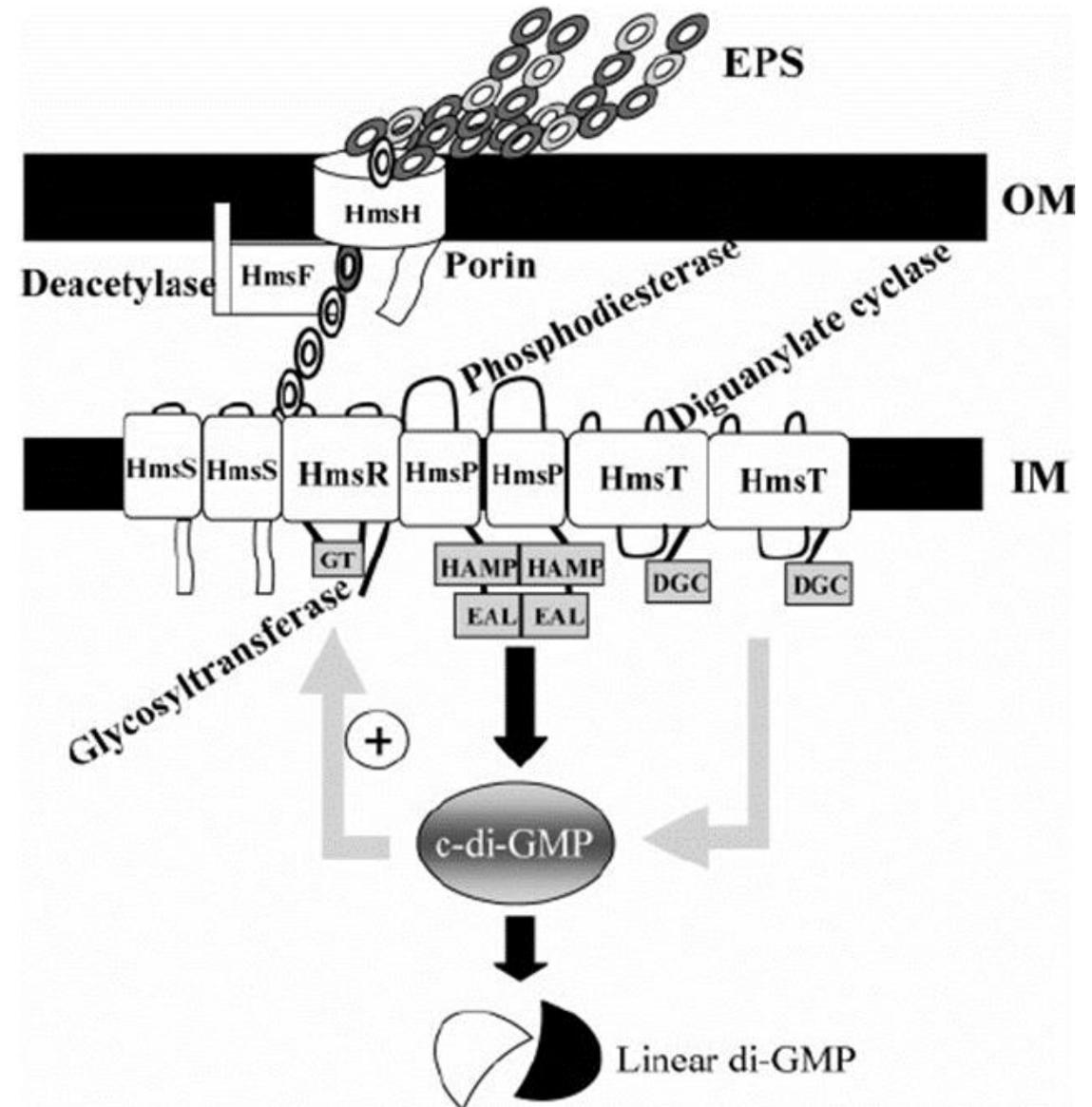
Poco prima del morso, la pulce rigurgita il biofilm sul derma dell'ospite causando l'infezione dopo il morso.

La carenza di poliammine, in particolare di putrescina, ha un impatto significativo sulla produzione di biofilm in *Y. pestis* senza influenzare la crescita batterica.

La formazione del biofilm nella pulce è controllata da sei prodotti genici del locus di immagazzinamento dell'emina (*hms*) (Hinnebusch et al., 1996).

Le poliammine sono necessarie per mantenere il livello di tre proteine Hms richieste per la produzione di biofilm: HmsR, HmsS e HmsT (Wortham et al., 2010).

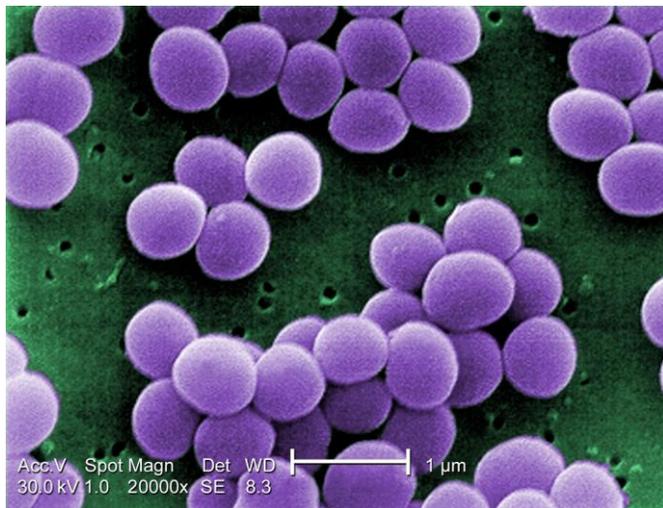
È noto che le poliammine promuovono la traduzione indipendentemente dalla presenza di una sequenza Shine Delgarno (SD) canonica (Yoshida et al., 2004) e, curiosamente, *hmsR* e *hmsT*, i due geni più colpiti dalla perdita di poliammine, mancano di una SD canonica.



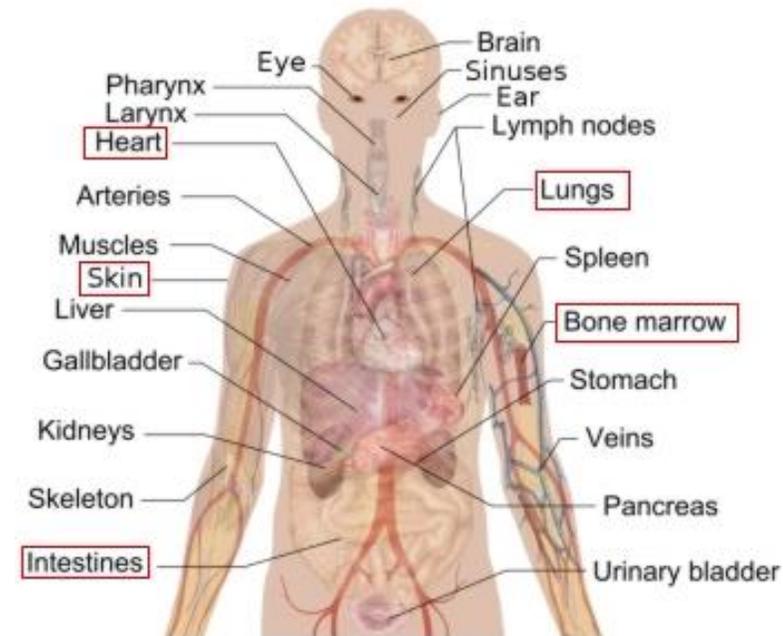
# Staphylococcus aureus e poliammine

Sebbene lo *S. aureus* sia considerato un commensale del microbiota umano, può anche agire come patogeno opportunistico (infezioni cutanee, respiratorie e intossicazioni alimentari) basando la sua virulenza sulla produzione di fattori di virulenza (tossine, anticorpi e proteine della superficie cellulare).

I ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina (MRSA), storicamente associati a infezioni nosocomiali, sono una causa diffusa di infezioni in comunità (CA-MRSA).



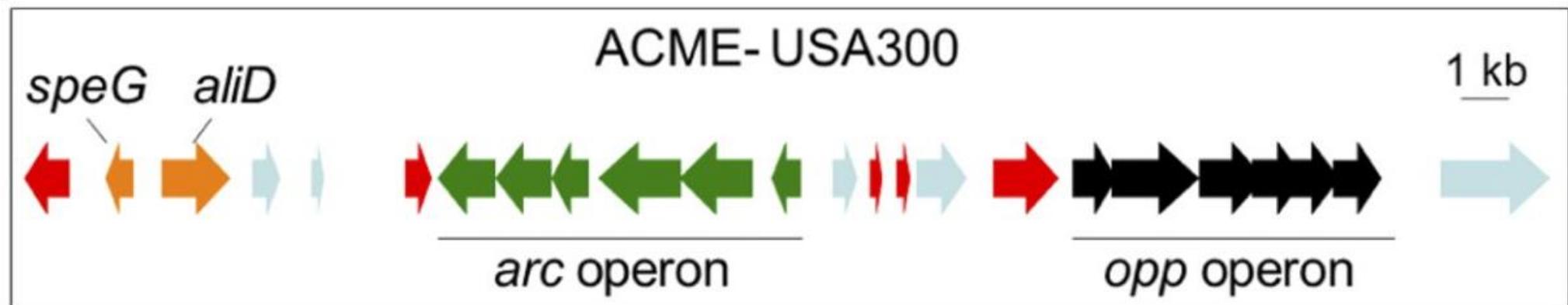
*Staphylococcus aureus*  
INFECTIONS



# *Staphylococcus aureus* e poliammine

Nel 2006 è stato caratterizzato un clone iper-virulento e iper-trasmissibile (appartenente al gruppo USA-300), le cui proprietà sono state associate alla presenza di un elemento genetico, l'"Arginine Catabolic Mobile Element" (ACME).

Questo elemento ospita anche due loci genetici coinvolti nel metabolismo delle poliammine, l'operone *arc* (che converte l'arginina in ornitina) e il gene *speG* (spermidina acetiltransferasi, coinvolto nella detossificazione delle poliammine). (Diep et al., 2008; Joshi et al., 2011).



# Staphylococcus aureus e poliammine

- È interessante notare che *S. aureus* è privo di geni biosintetici e quindi non produce poliammine.
- Le poliammine esogene inibiscono la crescita di *S. aureus* anziché potenziarla e possono essere battericide a concentrazioni note nell'ospite umano (Joshi et al., 2011).

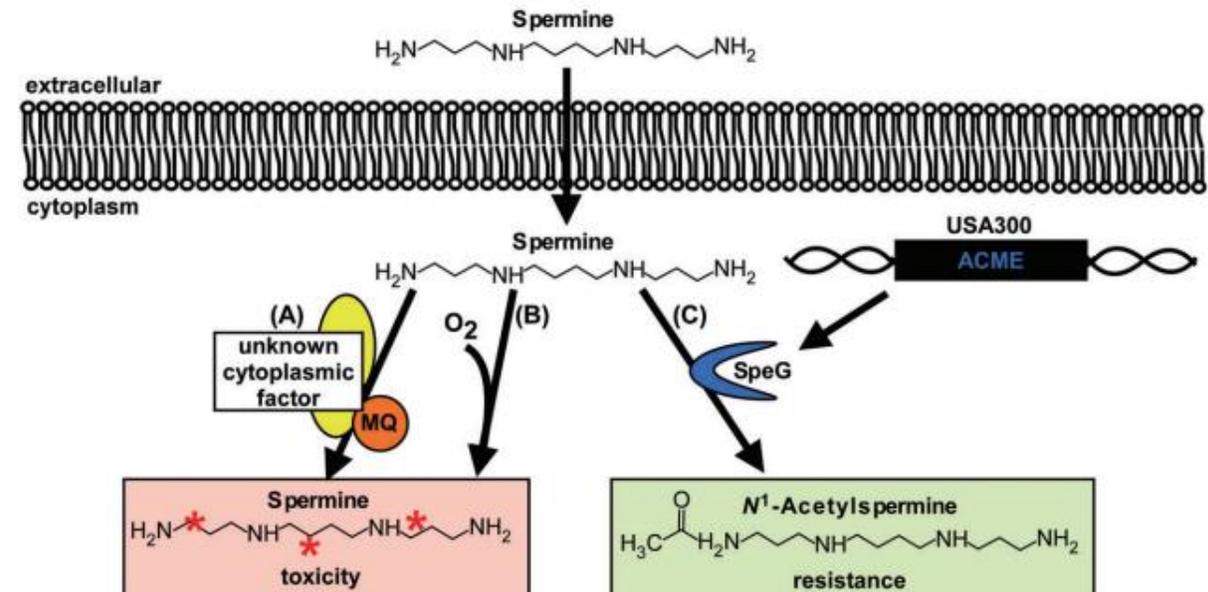
■ Molecular Microbiology [2011] 82(1), 1-3 ■

doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07808.x  
First published online 1 September 2011

## MicroCommentary

### The evolution of a superbug: how *Staphylococcus aureus* overcomes its unique susceptibility to polyamines

Laura L. Anzaldi and Eric P. Skaar\*  
Department of Pathology, Microbiology, and  
Immunology, Vanderbilt University Medical Center,  
Nashville, TN 37232-2363, USA.



la presenza del gene *speG* nell'elemento genetico ACME fornisce la resistenza alle poliammine

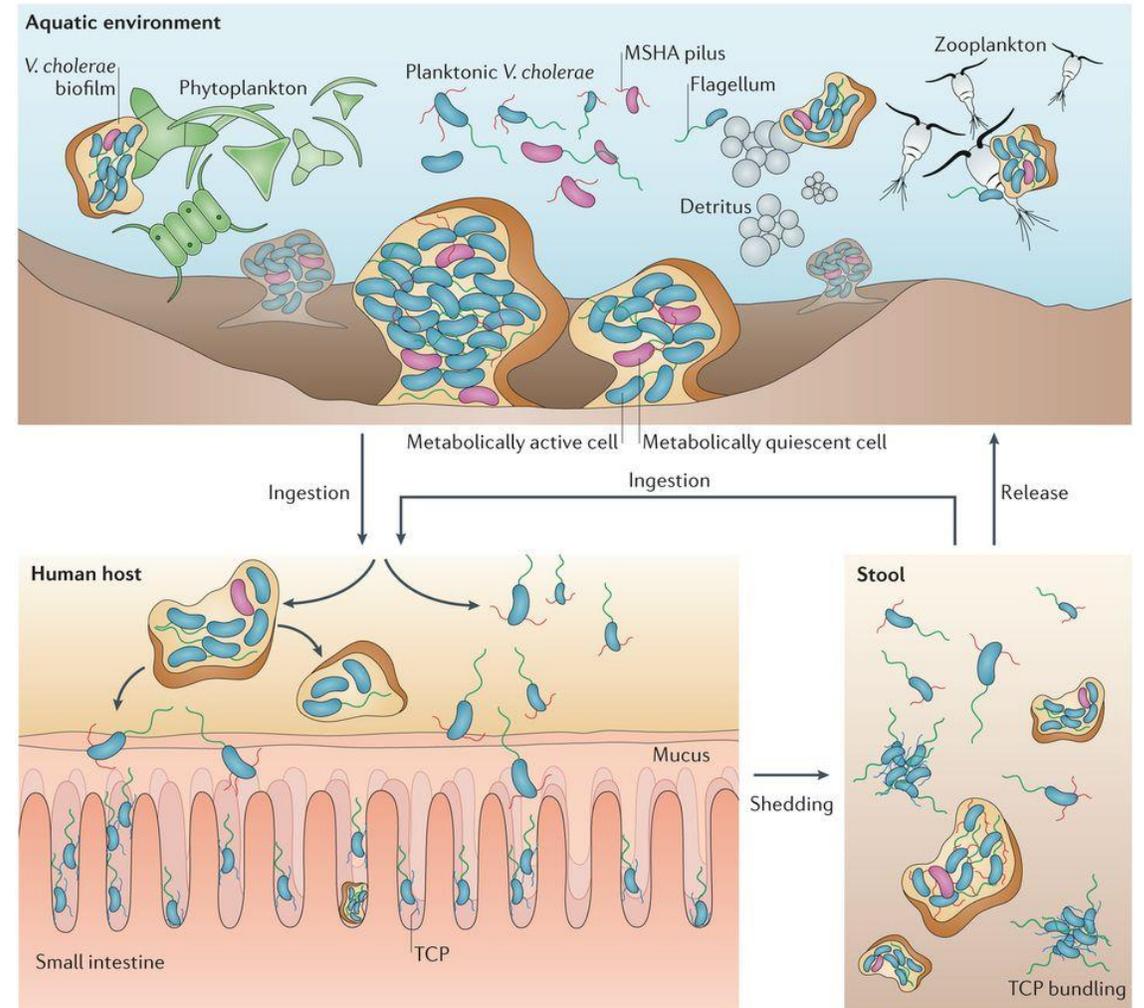
# *Vibrio cholerae* e poliammine

*V. cholerae* è l'agente causale del colera, una malattia infettiva che provoca una grave diarrea acquosa, che può portare alla disidratazione e persino alla morte se non trattata.

*V. cholerae* si trova negli ambienti acquatici prevalentemente come biofilm sulle superfici di molti organismi (crostacei, zooplancton e piante).

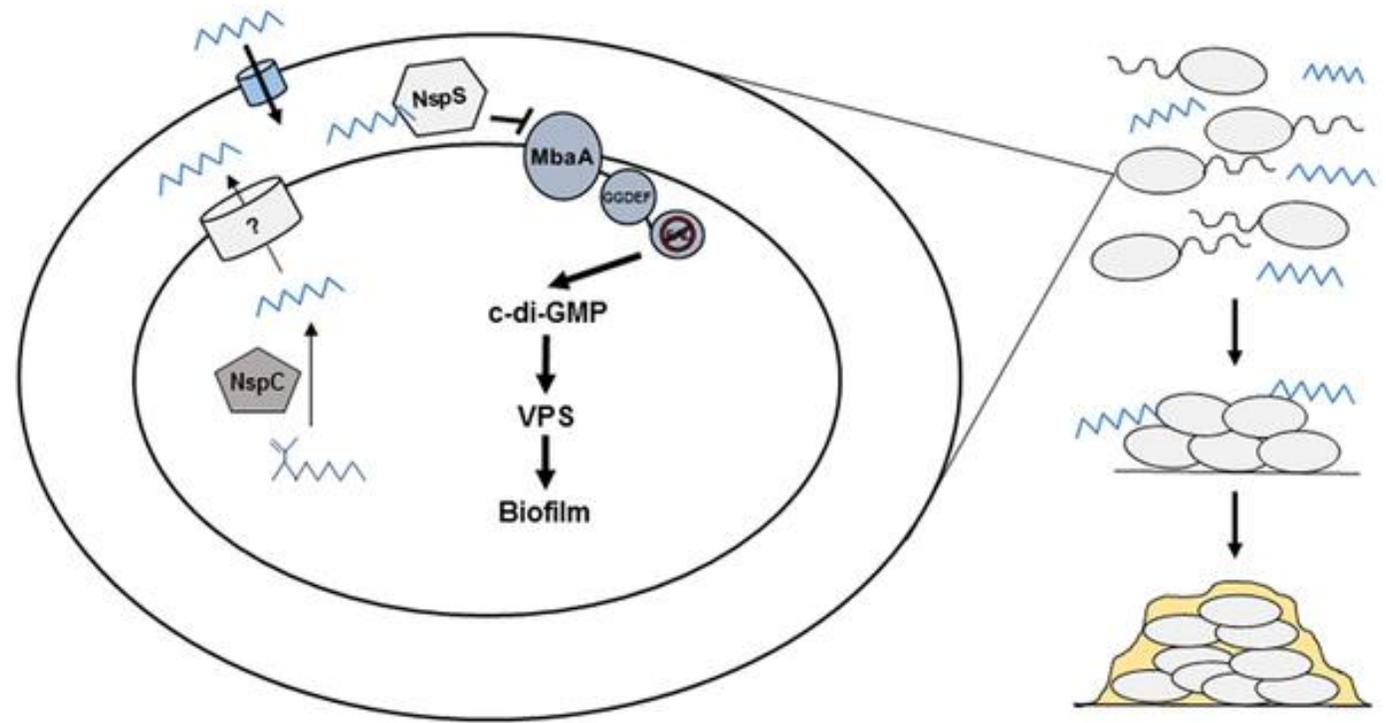
I biofilm contribuiscono a:

- alla persistenza del batterio nell'ospite umano
- ad una maggiore infettività (Faruque et al., 2006).



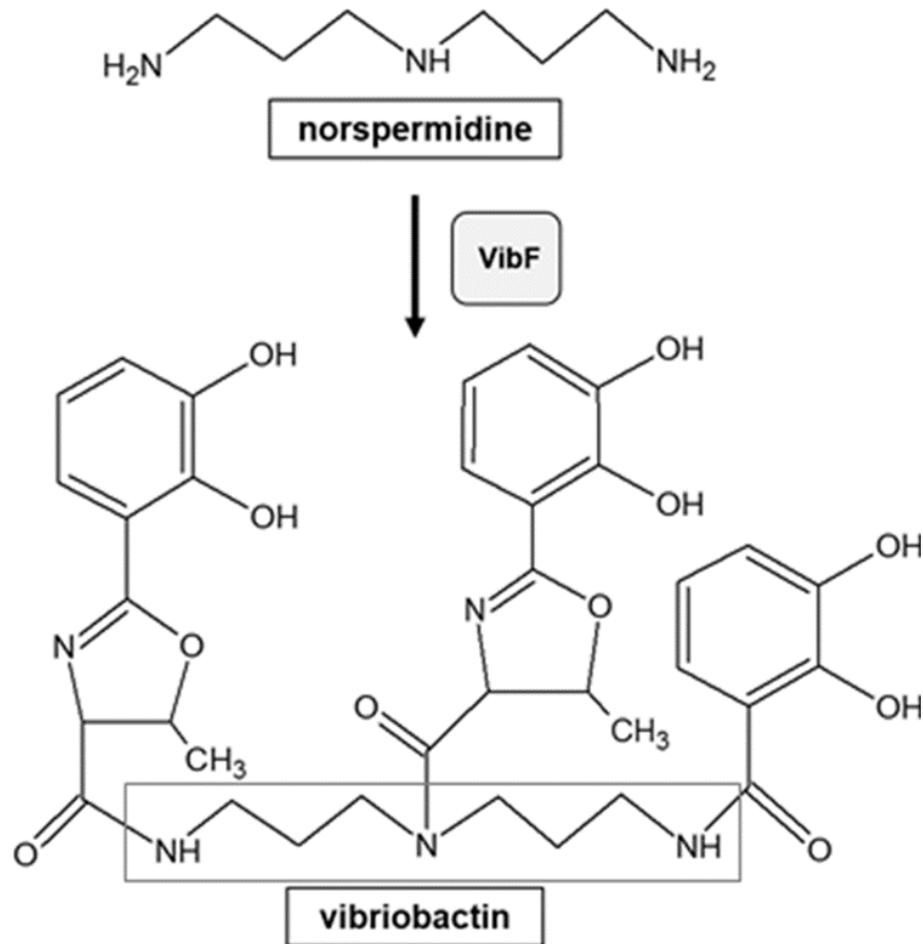
# Meccanismo di induzione dei biofilm da parte della norspermidina in *V. cholerae*

La norspermidina può essere sintetizzata da NspC e può anche essere importata dall'ambiente. La norspermidina esogena è percepita dal complesso di segnalazione NspS/MbaA, che porta a un aumento della produzione di VPS e alla formazione di biofilm, presumibilmente attraverso l'aumento dei livelli di c-di-GMP nella cellula

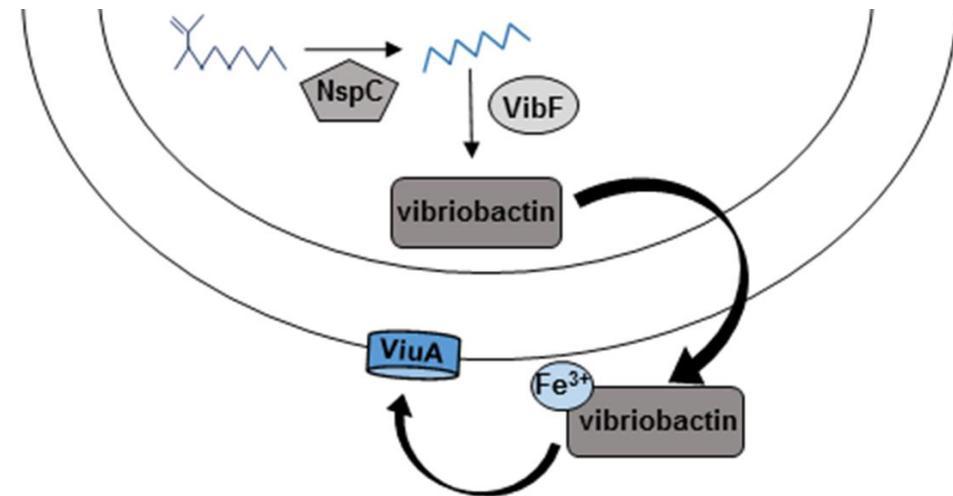


È interessante notare che la spermidina sembra competere con la norspermidina nel legarsi al sensore NspS ostacolando la formazione del biofilm.

Inoltre, la norspermidina agisce anche come impalcatura dorsale nella sintesi del sideroforo vibriobactina.

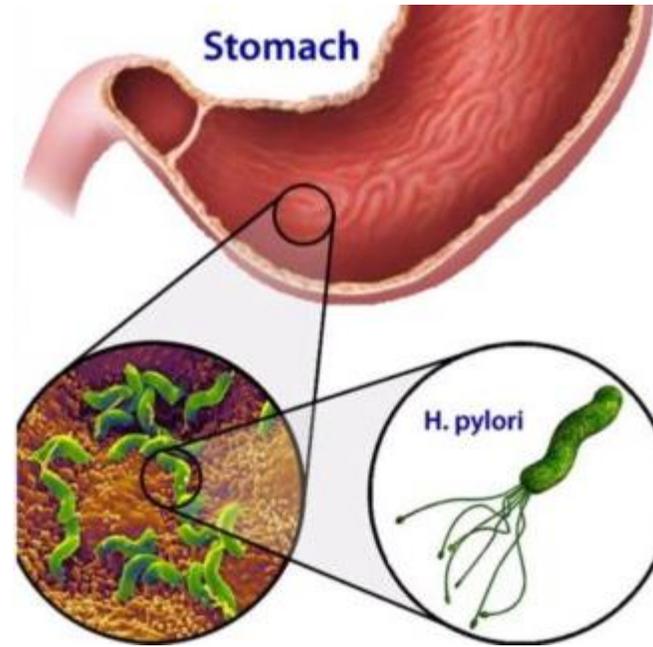


La vibriobactina, sintetizzata dalla norspermidina, viene secreta nell'ambiente e si lega al ferro. Questo complesso ferrico-vibriobactina viene riconosciuto dalla proteina di membrana esterna ViuA e trasportato nel periplasma, per poi essere importato nella cellula da un trasportatore di tipo ABC (non mostrato).



# *Helicobacter pylori* e poliammine

L'*Helicobacter pylori* colonizza lo stomaco dei mammiferi e causa gastrite, ulcera e cancro gastrico.

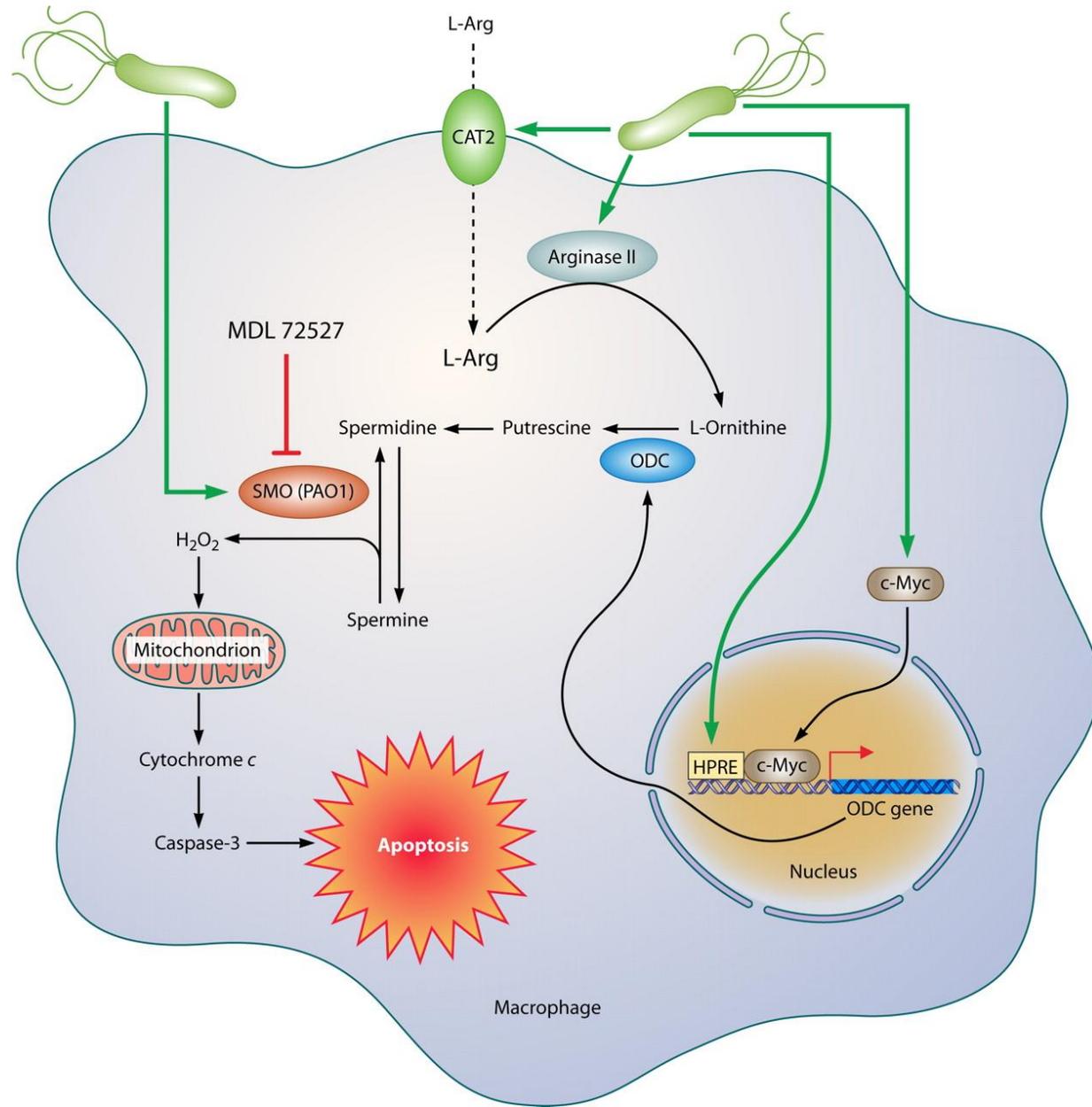


L'*H. pylori* è in grado di eludere la risposta immunitaria grazie a un'ingegnosa manipolazione del metabolismo delle poliammine delle cellule ospiti bersaglio (Chaturvedi et al., 2004, 2010, 2011).

# Helicobacter pylori e poliammine

L'*H. pylori* induce nei macrofagi l'attivazione del trasportatore di assorbimento dell'arginina CAT2, dell'arginasi II (Arg2), dell'ornitina decarbossilasi (ODC) e della spermina ossidasi (SMO).

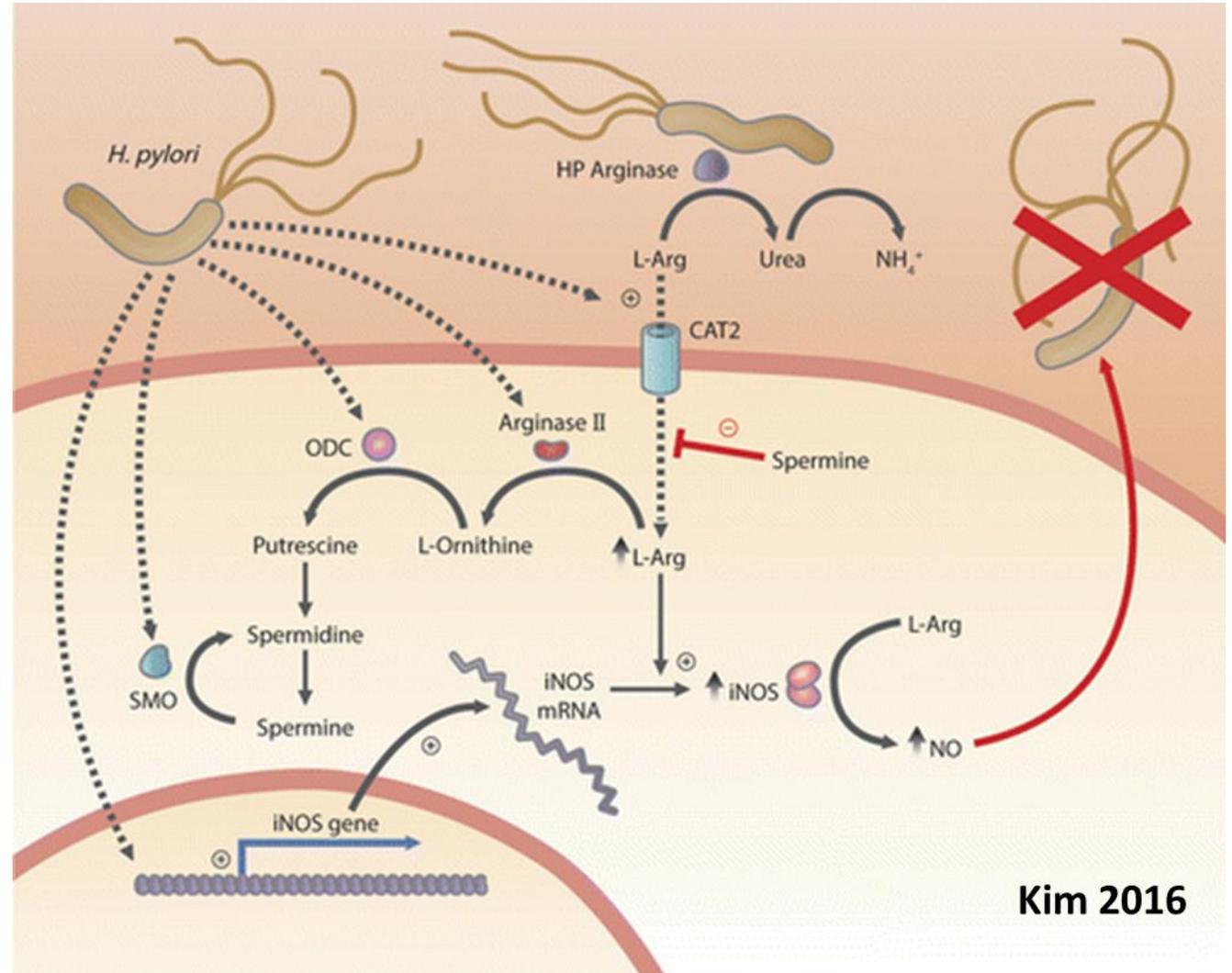
L'attività di SMO produce una quantità massiccia di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che induce il collasso dei mitocondri e l'apoptosi nei macrofagi.



# *Helicobacter pylori* e poliammine

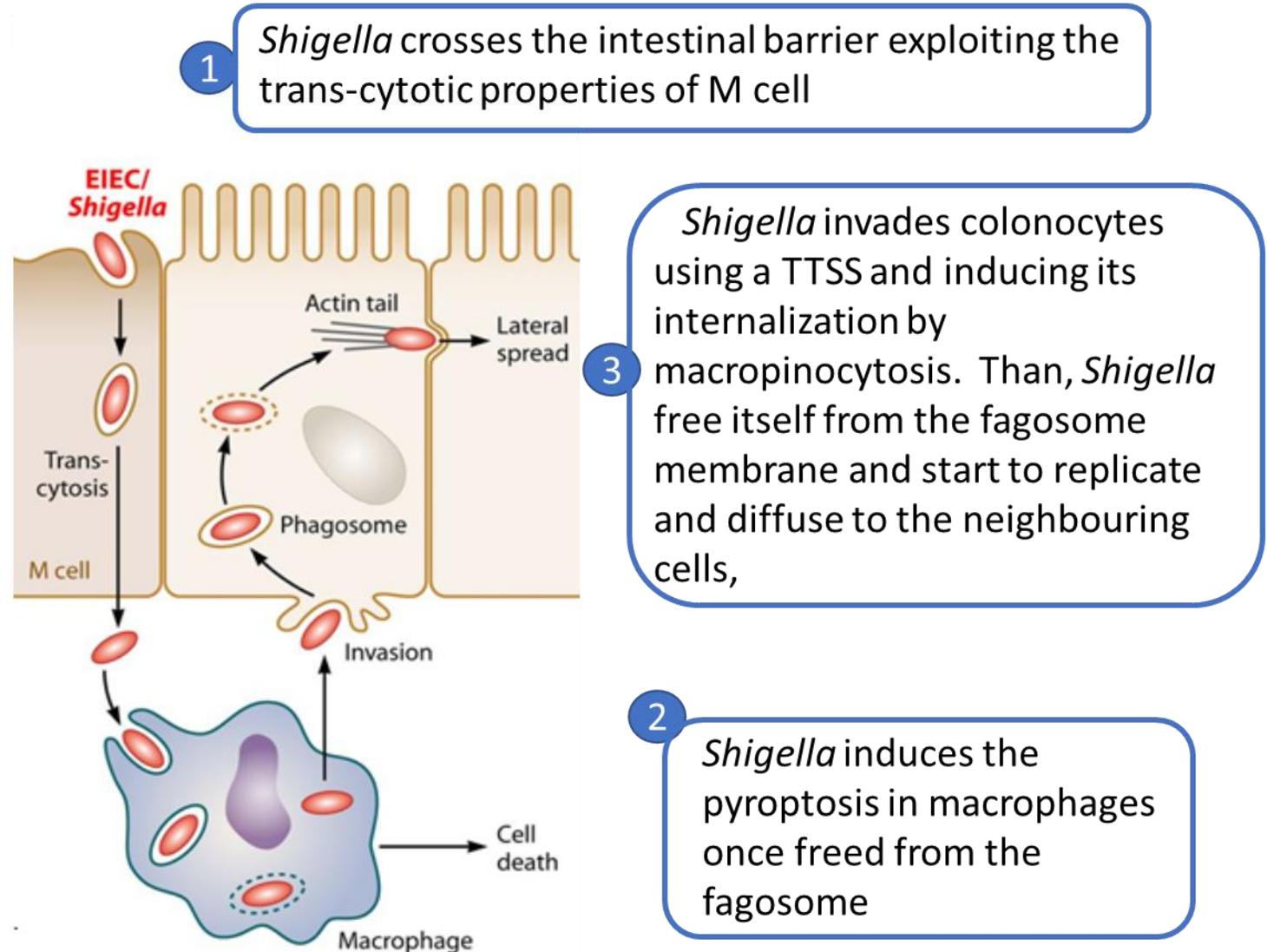
L'uso massiccio di arginina nella sintesi di ornitina sottrae substrati per la sintesi e l'attività dell'iNOS (arg), riducendo così la produzione di NO.

L'inibizione della sintesi di NO porta a una minore attività killing dei macrophagi su *H. pylori* nella sua nicchia gastrica

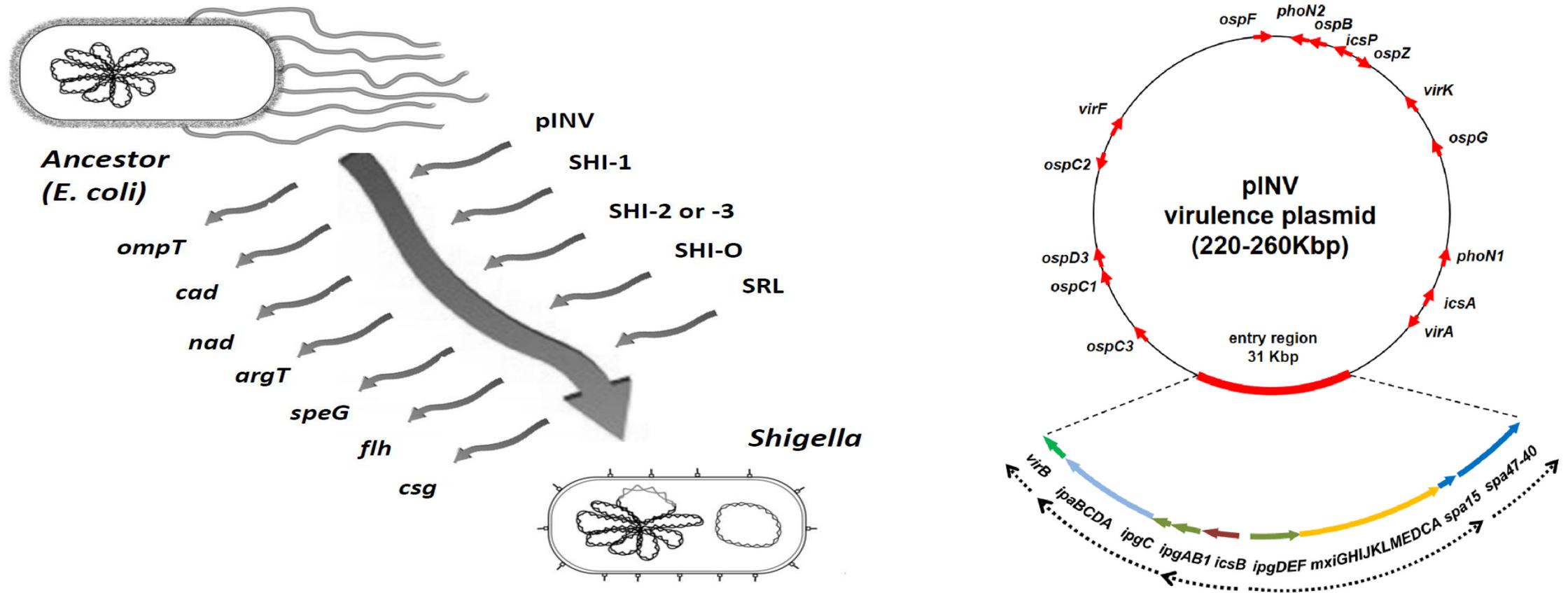


# Shigella (*E. coli* enetroinvasivi) e poliammine

- Shigella è un patogeno umano Gram negativo, intracellulare facoltativo.
- Shigella invade le cellule epiteliali, i macrofagi e le cellule dendritiche in un processo a più fasi
- Il programma invasivo di Shigella è regolato in risposta ai segnali ambientali (pH, temperatura, osmolarità, ferro).

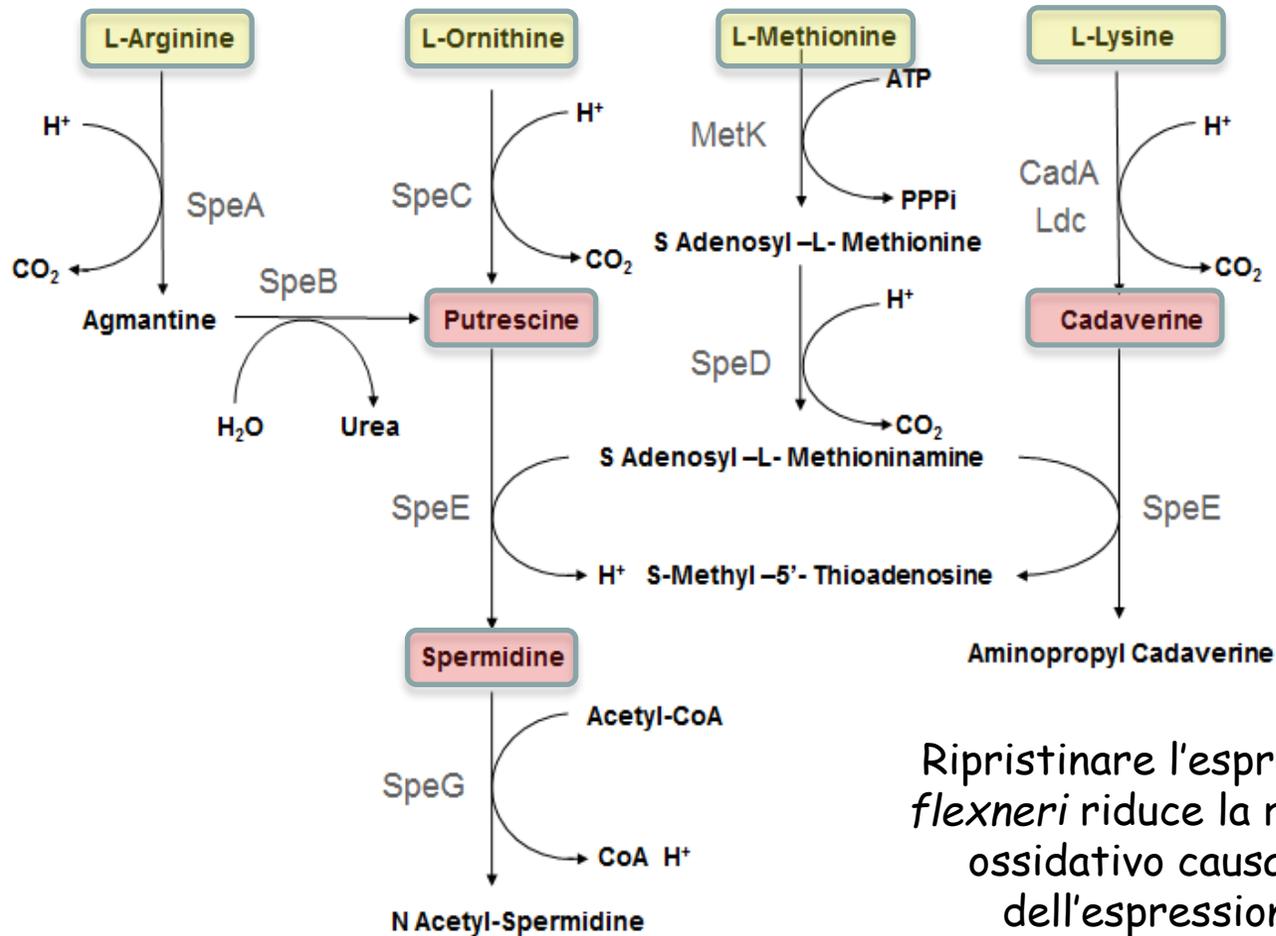


# Evoluzione da E.coli commensali ancestrali verso Shigella.

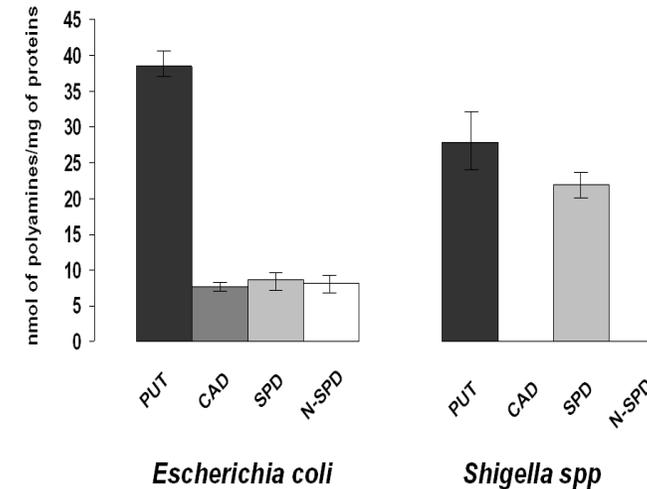


L'acquisizione del plasmide pINV di grandi dimensioni e di diverse isole di patogenicità di *Shigella* tramite trasferimento genico orizzontale è controbilanciata dalla perdita di geni nativi i cui prodotti sono dannosi per la piena espressione del fenotipo invasivo di *Shigella*.

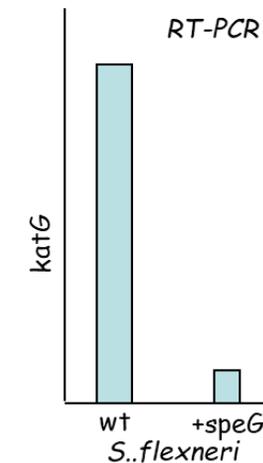
# The comparison of the polyamine biosynthesis pathways in *E. coli* and *Shigella* reveals strong differences



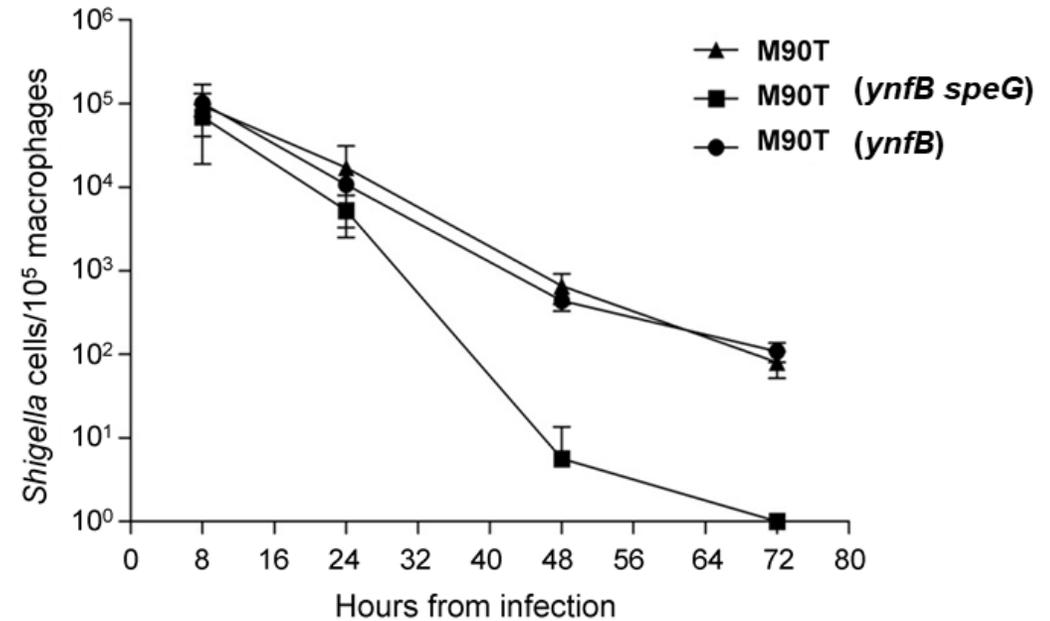
**Cadaverine and acetylspermidine are lost while spermidine accumulates**



Ripristinare l'espressione di *speG* in *S. flexneri* riduce la resistenza allo stress ossidativo causando una riduzione dell'espressione del gene *katG*  
Oxidative stress assay with  $H_2O_2$  (5mM, 30min) b

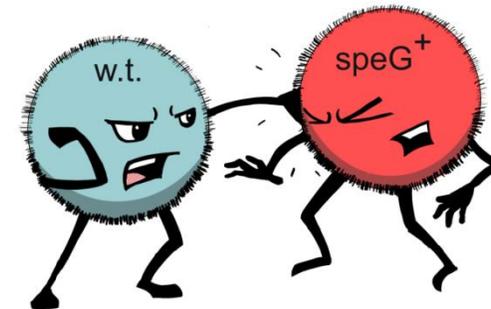


## Survival Assay in murine peritoneal macrophages

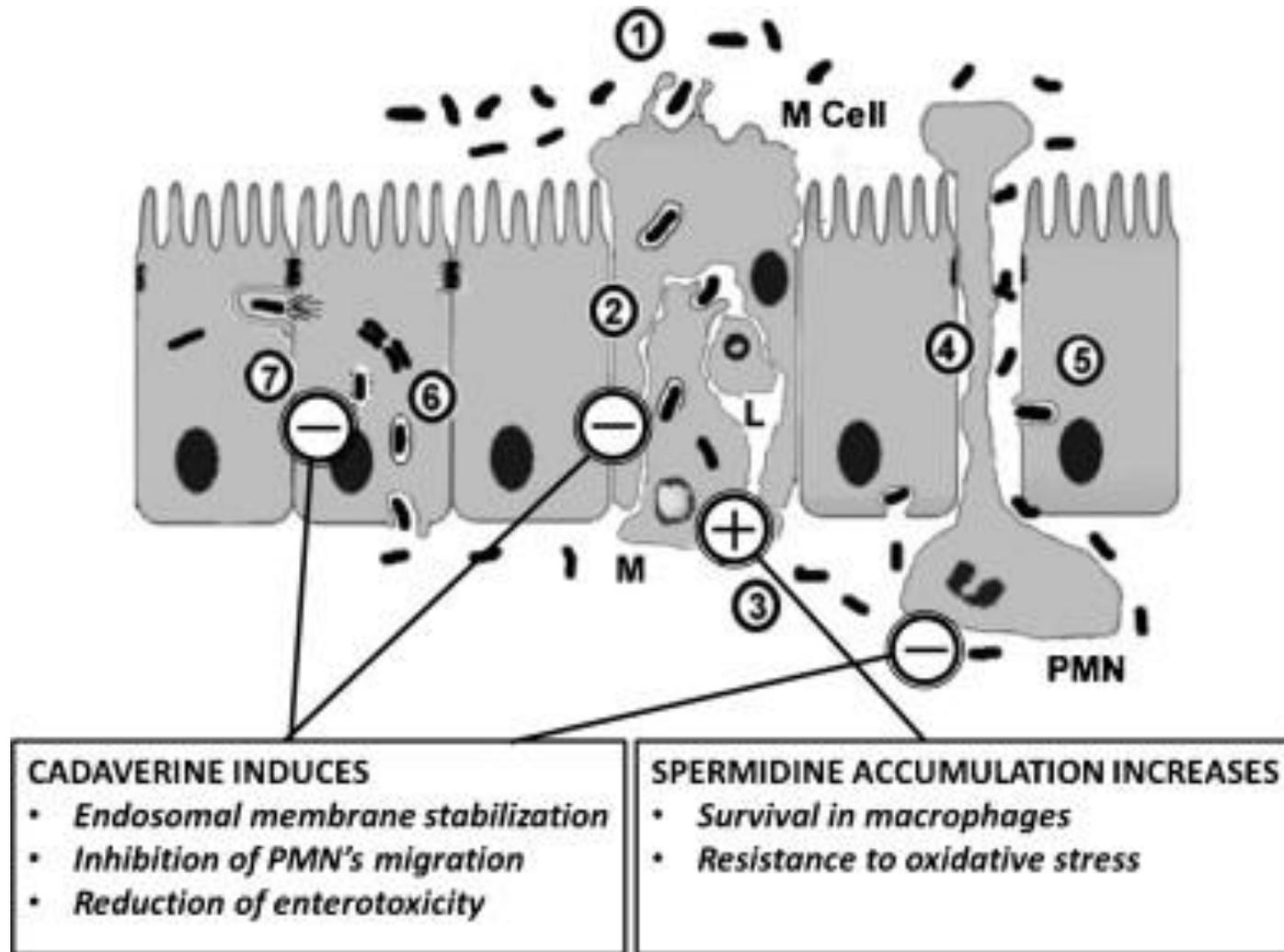


## Competitive infection assay on J774 murine macrophages

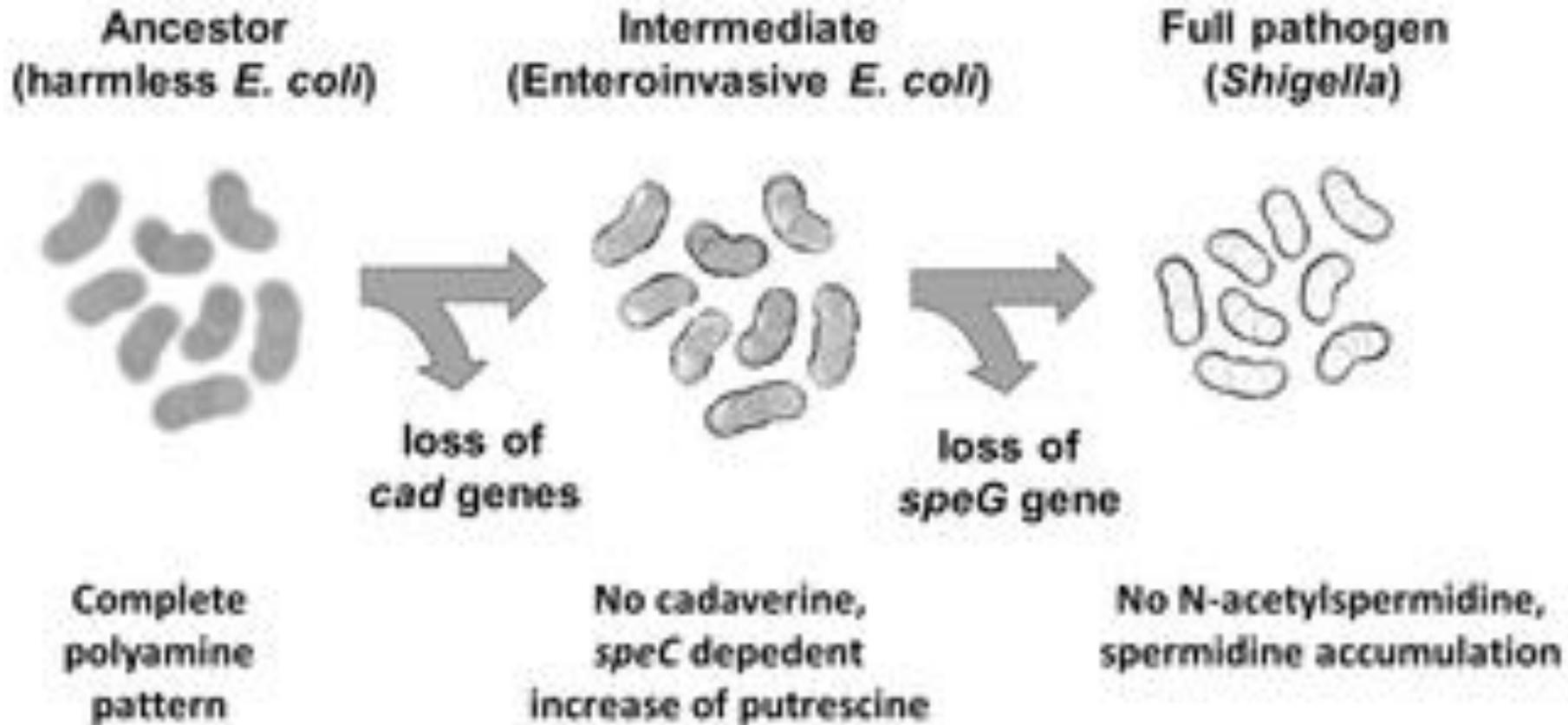
Strain vs M90T <sub>(wt)</sub>	Competitive Index (C.I.)	
	1h	2h
M90T pULS55 ( <i>ynfB</i> )	1,11 ± 0,22	1,05 ± 0,30
M90T pULS37 ( <i>ynfBspeG</i> )	0,73 ± 0,18	0,44 ± 0,12



# Sintesi del ruolo essenziale svolto dalle poliammine nella virulenza batterica di *Shigella*

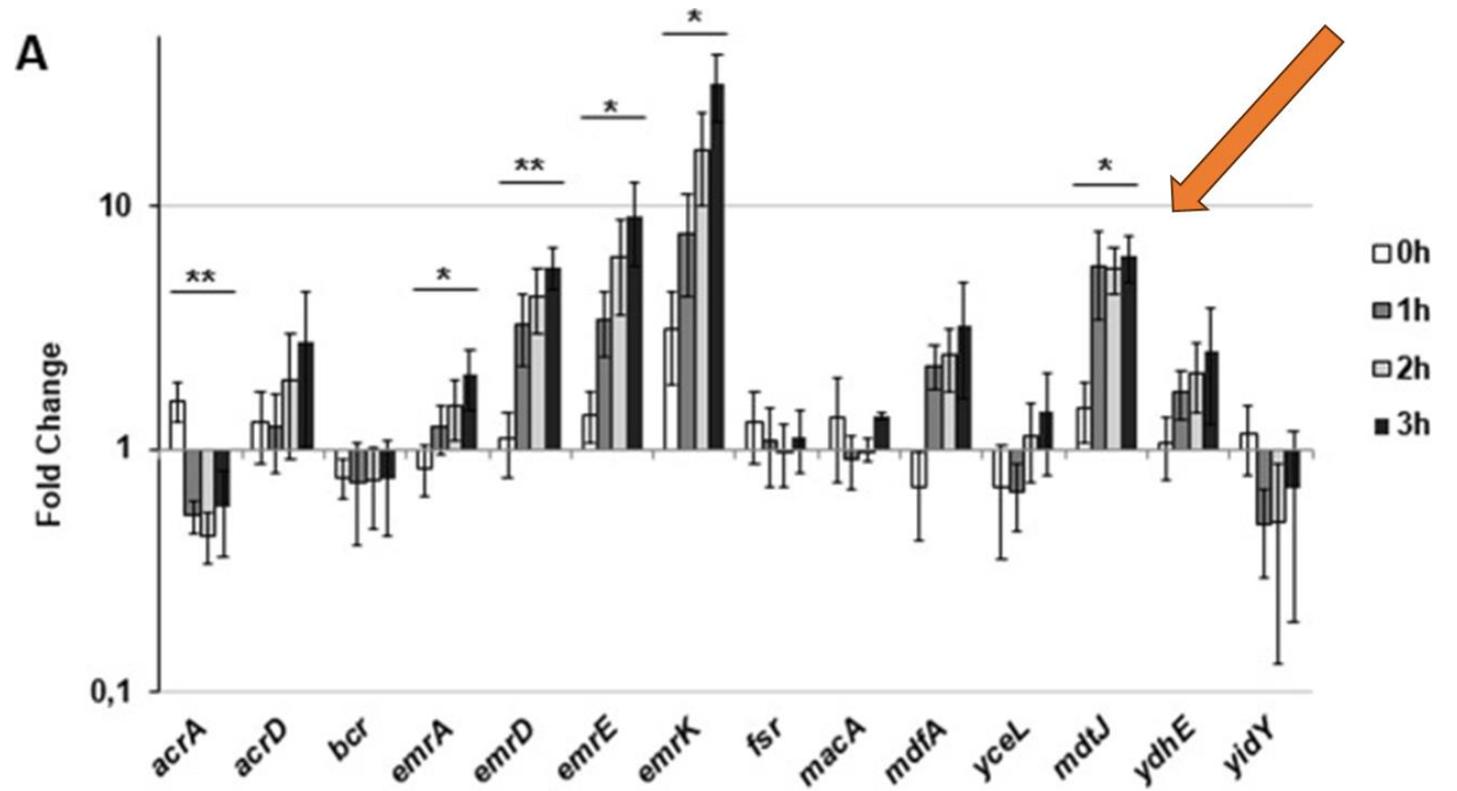
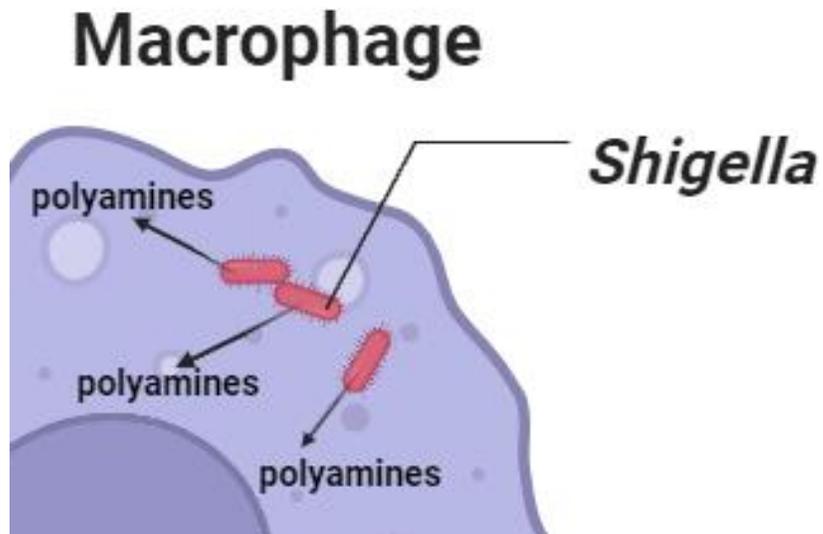


# Tappe dell'evoluzione del metabolismo delle poliammine da *E.coli* a *Shigella*

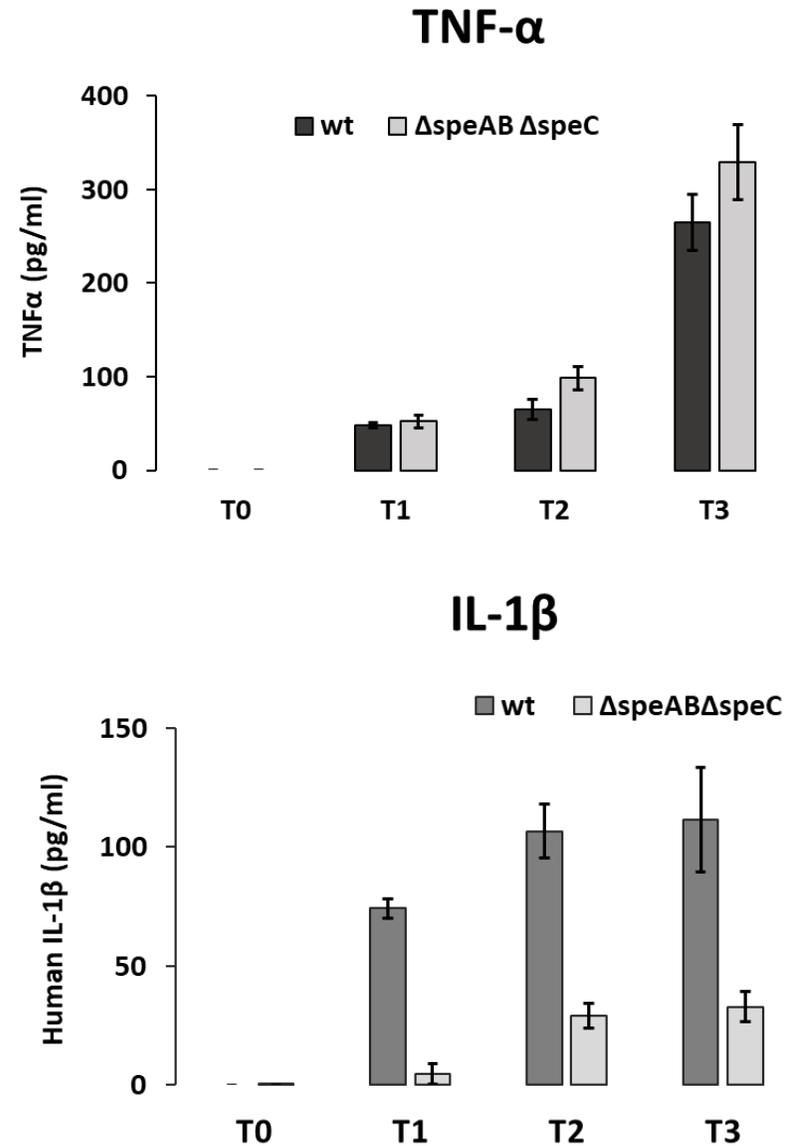
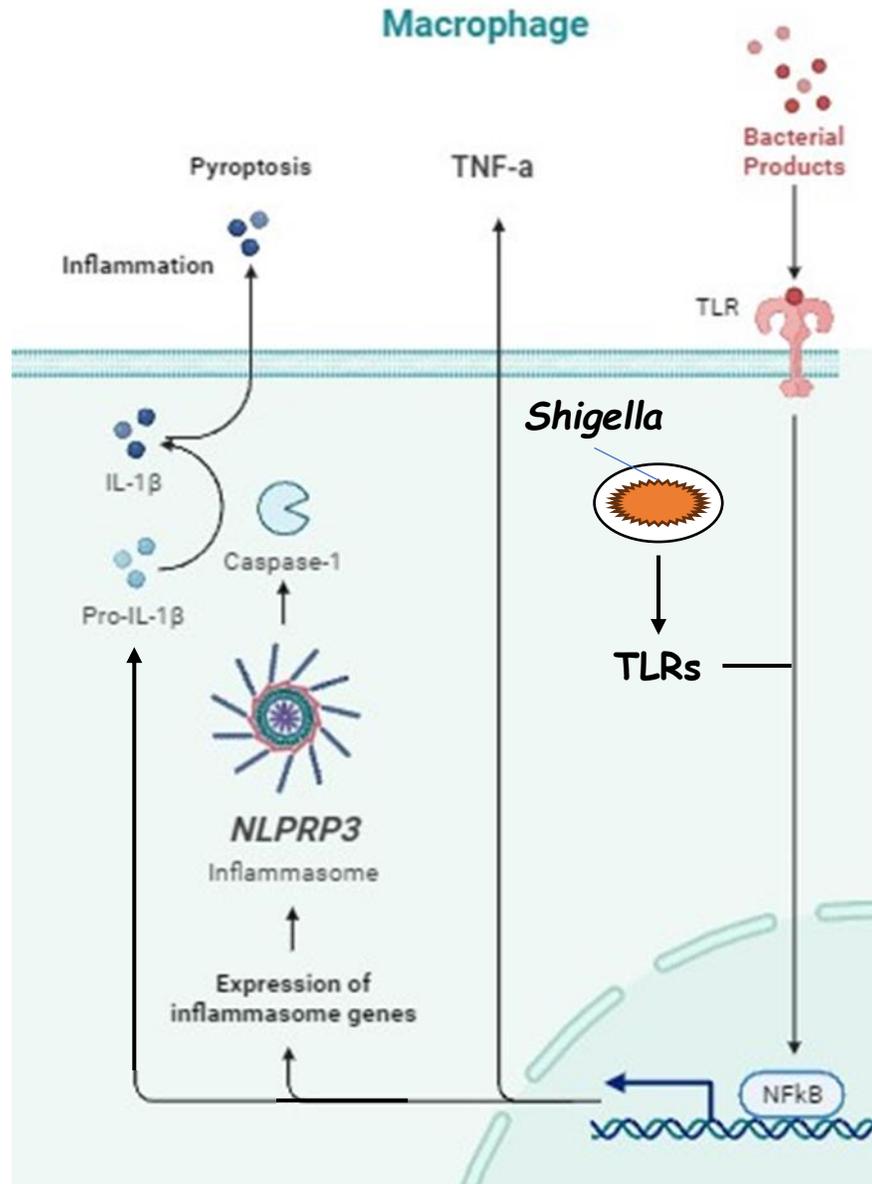


# The working model...

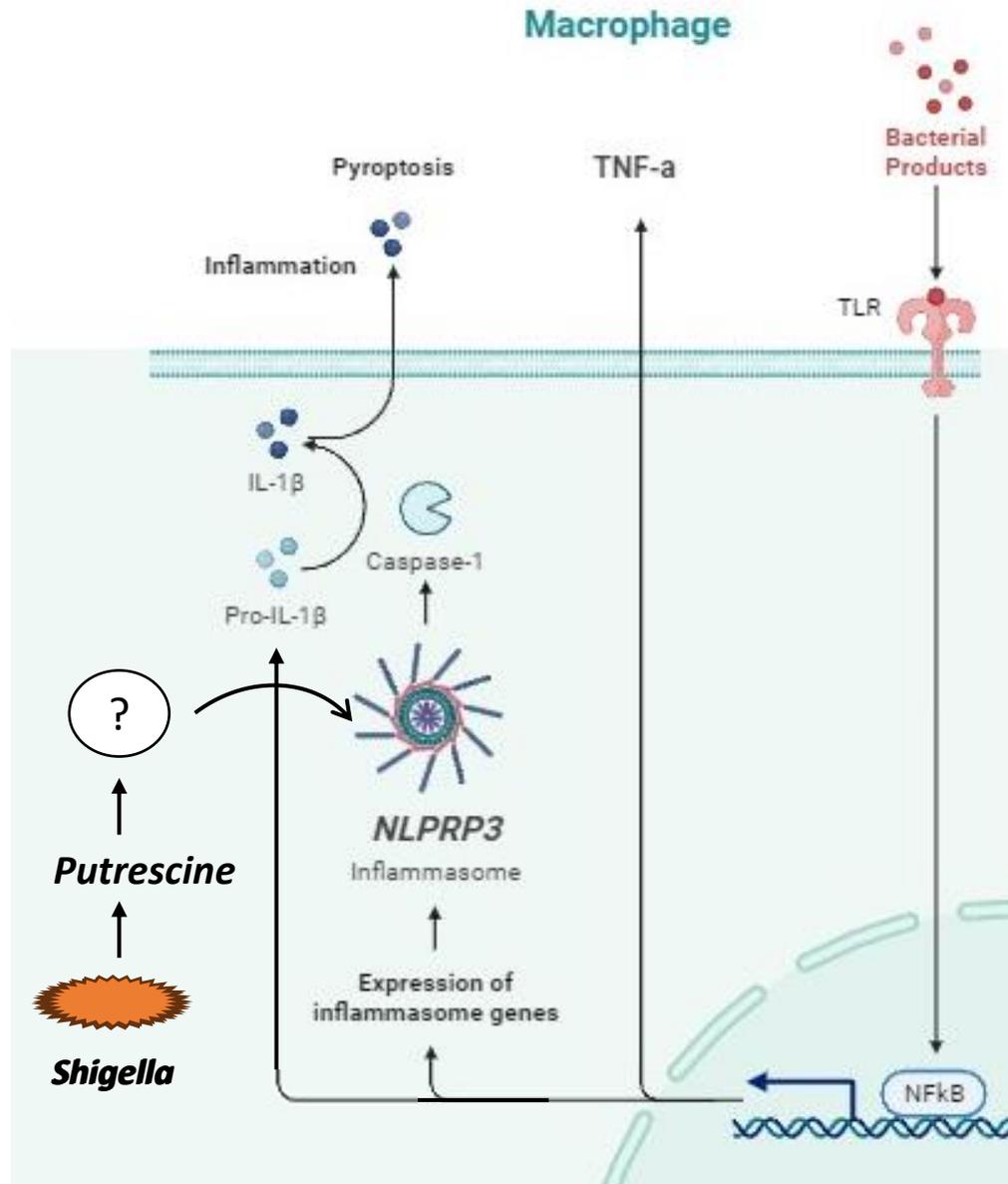
La pompa di efflusso MdtJI è stata caratterizzata in *E. coli* e *Shigella* per secernere rispettivamente spermidina e putrescina



# Qual è il ruolo della putrescina secreta nel macrofago infetto?



# Qual è il ruolo della putrescina secreta nel macrofago infetto?



## LDH da THP-1 infettati....

