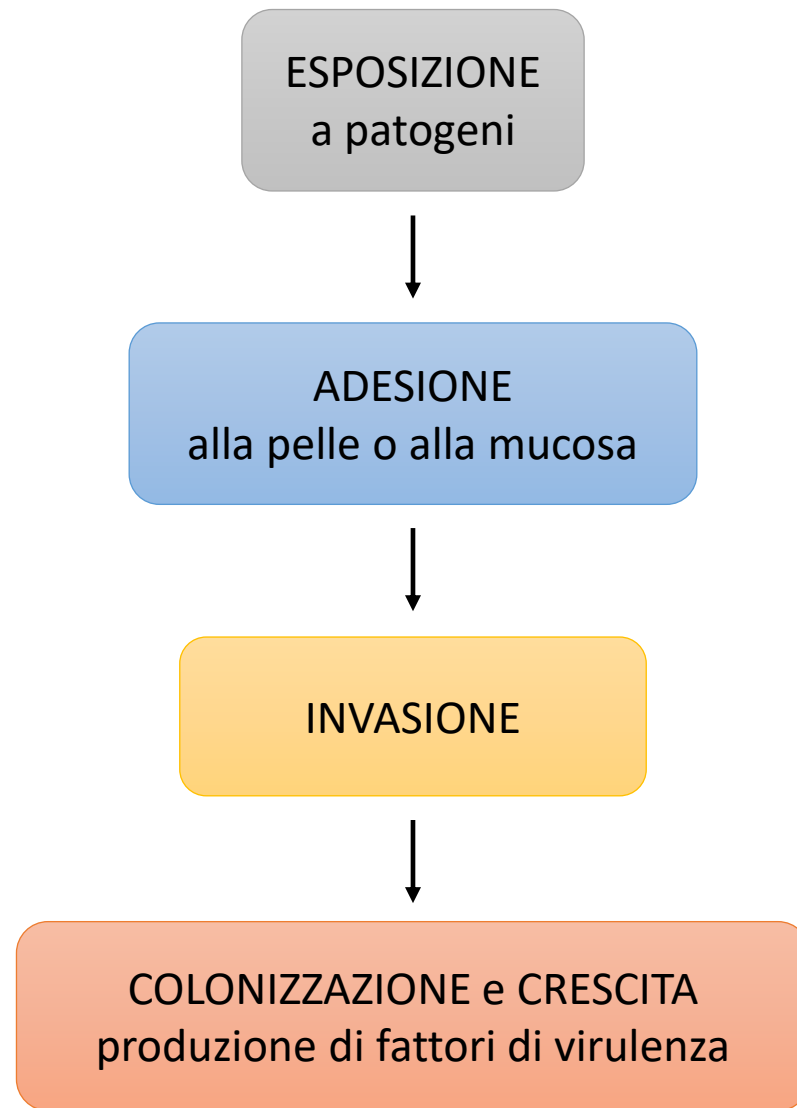




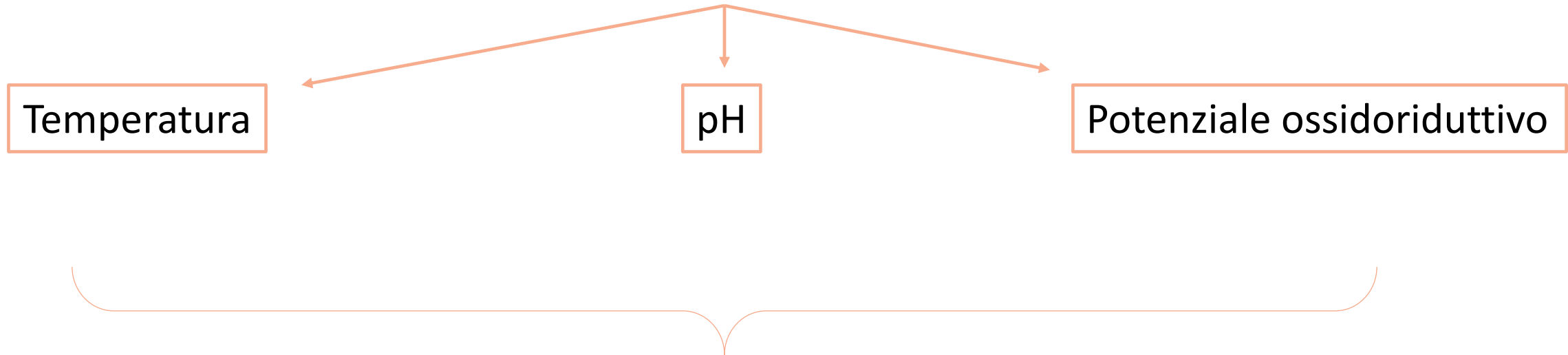
Per indurre la malattia il patogeno deve potersi riprodurre. Fattori che influenzano la crescita sono:

CONDIZIONI AMBIENTALI
appropriate

SOSTANZE NUTRITIVE
disponibili

Fattori ambientali che influenzano la crescita

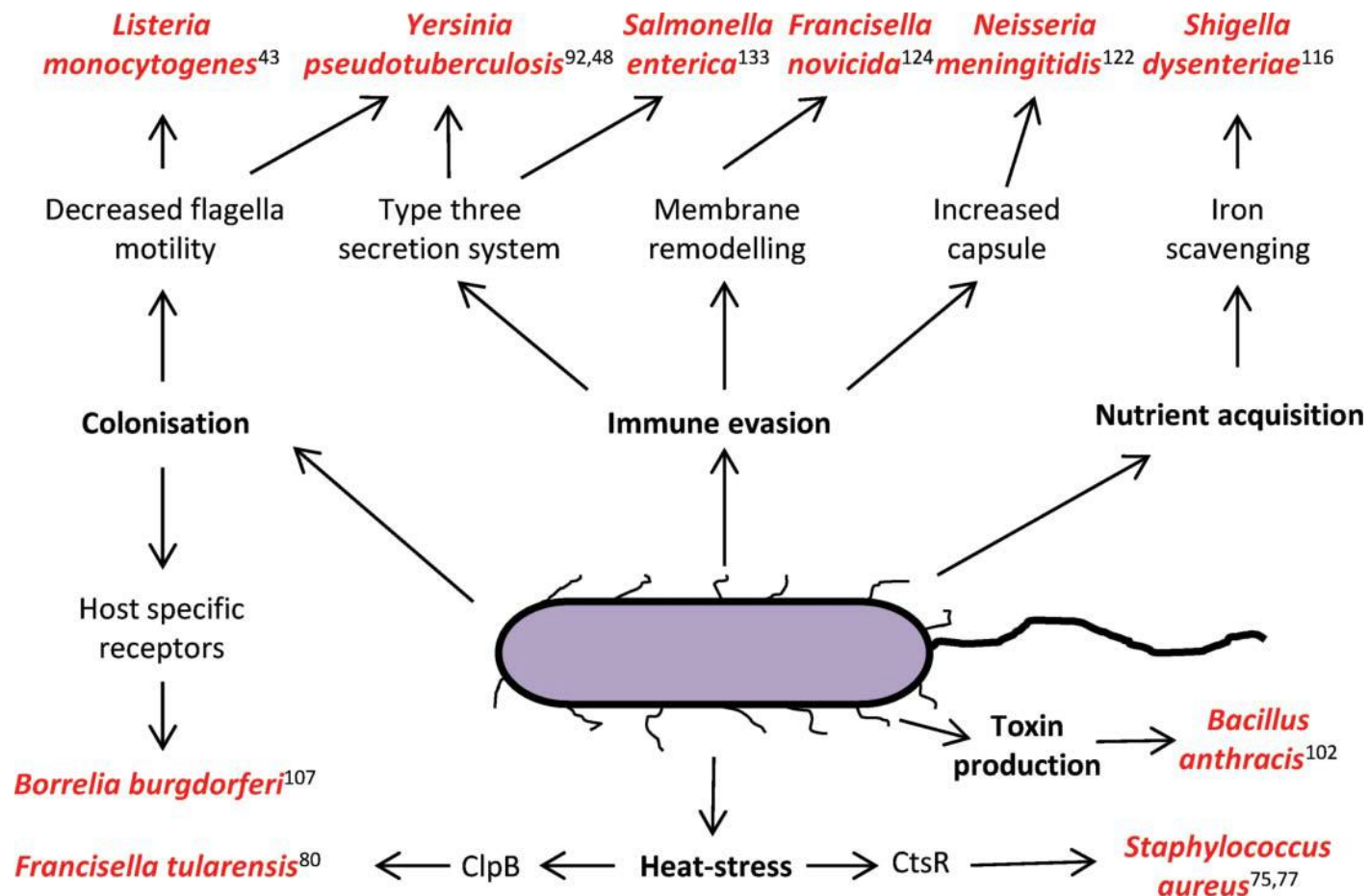
Per colonizzare con successo l'ospite, i batteri patogeni monitorano continuamente molteplici caratteristiche dell'ambiente circostante tra cui:



In risposta a condizioni ambientali idonee nell'ospite, i patogeni regolano l'espressione genica di **fattori di virulenza** che permettono di attaccarsi alle superfici delle cellule dell'ospite, di eludere le difese immunitarie o di ottenere sostanze nutritive altrimenti inaccessibili.

L'espressione non regolata di questi fattori di virulenza può essere dannosa per i batteri, attraverso lo spreco di risorse metaboliche e l'induzione inappropriata di risposte infiammatorie e immunitarie.

Termoregolazione di importanti fattori di virulenza nelle specie batteriche patogene → Un aumento a 37 °C (temperatura corporea dei mammiferi) è un segnale di invasione universale per i batteri e consente una regolazione fine dell'espressione dei fattori di virulenza, favorendo la sopravvivenza e la proliferazione nell'ospite.



A. topologia del DNA → entità del superavvolgimento e della curvatura può modulare l'espressione genica.

Esempi:

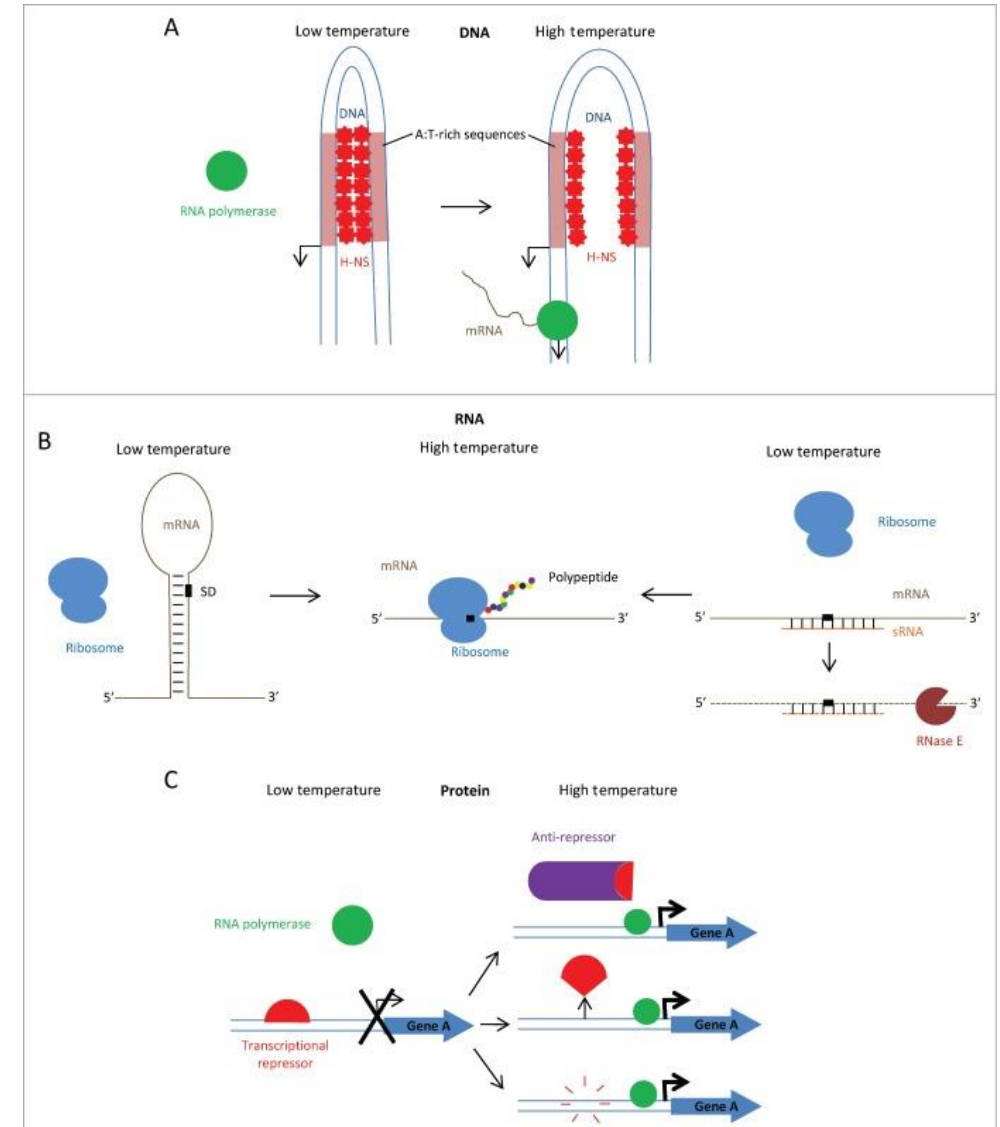
- ❖ T3SS in *Salmonella*
- ❖ *virF* in *Shigella*

B. struttura dell'RNA → strutture secondarie e terziarie dell'mRNA alterano il legame con i ribosomi con conseguenze sulla traduzione delle proteine.

Esempi:

- ❖ RNA termosensore (*cis*-acting): PrfA di *L. monocytogenes*
- ❖ sRNA regolatori (*trans*-acting): adesina AfaD di *E. coli* patogeni

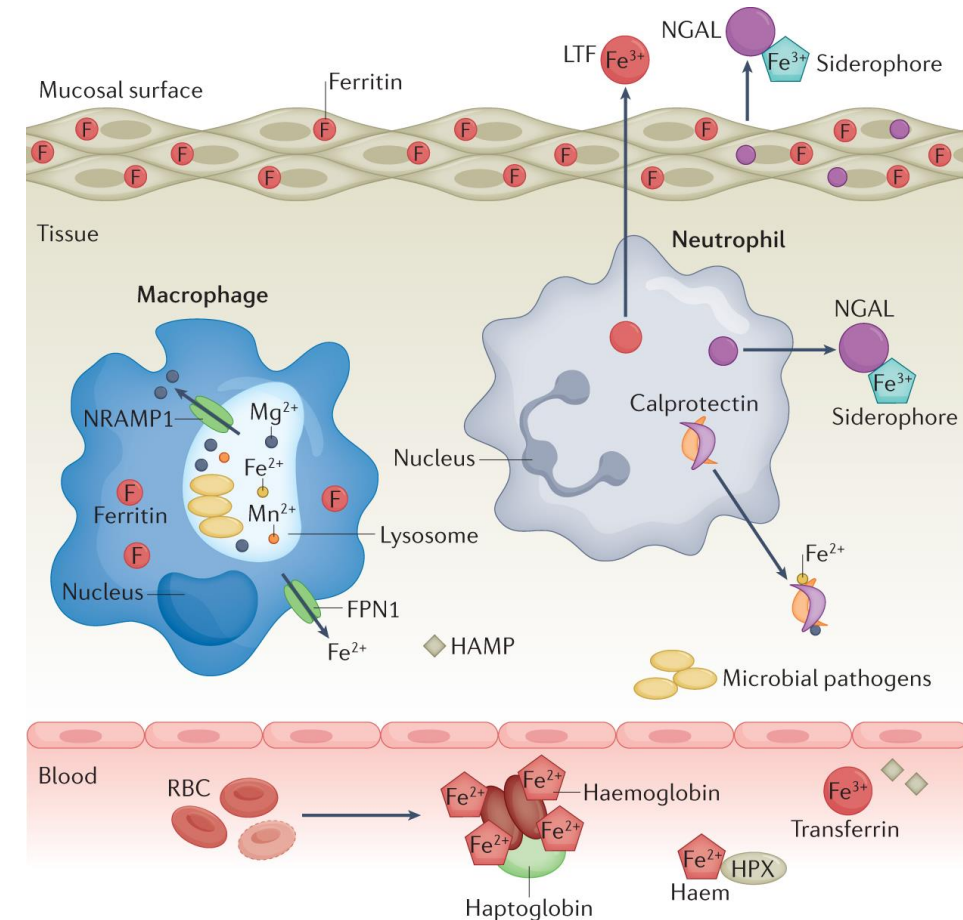
C. attività delle proteine → subiscono cambiamenti conformazionali a livello di domini termosensibili che ne modulano l'attività o che ne cambiano la suscettibilità alla degradazione.



Temperatura può influenzare:

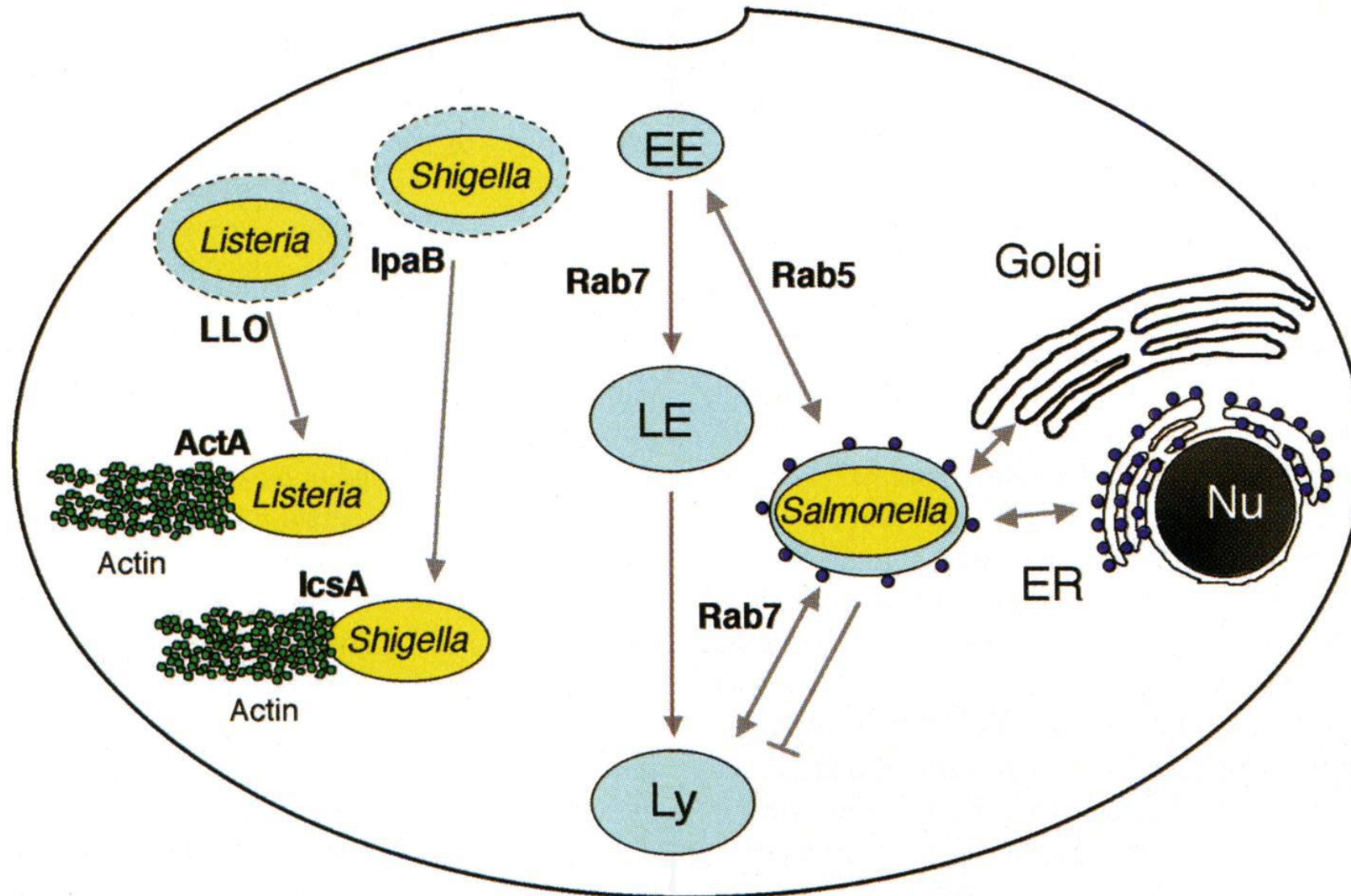
- Motilità batterica
 - *L. monocytogenes* possiede meccanismo che assicura che la motilità sia limitata ad ambienti al di sotto delle temperatura fisiologica dell'ospite ($< 37^{\circ}\text{C}$)
 - *Yersinia* non è mobile a 37°C . Il meccanismo non è noto, ma potrebbe essere legato a cambiamenti nel superavvolgimento del DNA
- Produzione di esotossine
 - Tossina Shiga-like (Stx-2) di *E. coli* enteroemorragico (EHEC) è soggetta a termoregolazione.
 - In *Bacillus anthracis*, la sintesi dell'attivatore della tossina dell'antrace (AtxA) è dipendente dalla temperatura.
- Adattamento tra diversi ospiti
- Assimilazione di nutrienti
 - In *Pseudomonas aeruginosa* i geni che codificano gli enzimi necessari alla biosintesi dei siderofori, sono regolati in modo differenziato a 22°C rispetto a 37°C . Geni coinvolti nella biosintesi della pioverdina sono up-regolati alle basse temperature, mentre quelli per la biosintesi della piochelina sono upregolati a 37°C .
- Meccanismi di evasione immunitaria

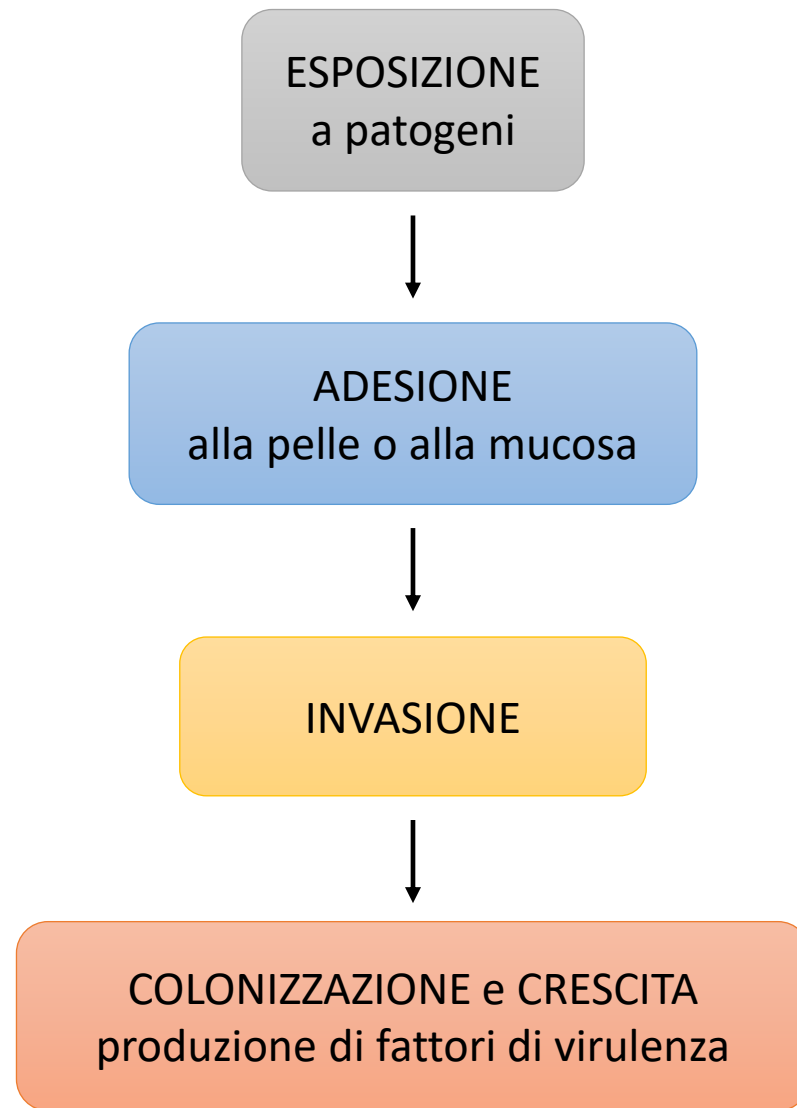
- **Nutrienti solubili** come zuccheri, amminoacidi e acidi organici sono spesso presenti in quantità limitate → sono facilitati i microrganismi in grado di utilizzare composti complessi quali glicogeno.
- **Vitamine** e altri fattori di crescita non sono sempre presenti in quantità sufficiente e in tutti i tessuti → *Brucella abortus* cresce lentamente nella maggior parte dei tessuti ma rapidamente nella placenta dove è presente eritritolo.
- **Oligoelementi** quali ferro, zinco, manganese, rame sono presenti in quantità limitata per impedire l'istaurarsi del patogeno



Dopo l'internalizzazione, i batteri intracellulari possono riprodursi in tre classi principali di compartimenti:

- I. Vacuoli simili a lisosomi, che hanno un pH acido e contengono enzimi idrolitici → es. *Coxiella burnetti*, l'agente della febbre Q, è un batterio intracellulare capace di sopravvivere in un compartimento lisosomiale, caratterizzato da pH acido, presenza di idrolasi e peptidi cationici. Nonostante queste condizioni ambientali difficili, *Coxiella* è in grado di replicare in modo efficiente in questo compartimento.
- II. Vacuoli intracellulari non acidi che non si fondono con i lisosomi e sono solitamente rimodelate dal patogeno creando così una nicchia meno ostile e permissiva per la loro sopravvivenza e crescita → es. *Salmonella* rimodella questi vacuoli (SCV) con effettori secreti dal T3SS. Alcuni effettori bloccano il reclutamento della NADPH ossidasi responsabile della produzione di composti battericidi.
- III. Citosol, nel quale alcuni patogeni risiedono dopo essere usciti dal loro vacuolo di internalizzazione → *Listeria* è in grado di sfuggire dal vacuolo di internalizzazione e di accedere al citosol delle cellule ospiti grazie a LLO, una tossina formante un poro secreta dal batterio, e da due fosfolipasi batteriche PC- e PI-PLC. Una volta nel citosol, *Listeria* è in grado di replicarsi e di muoversi all'interno delle cellule utilizzando una motilità basata sull'actina.





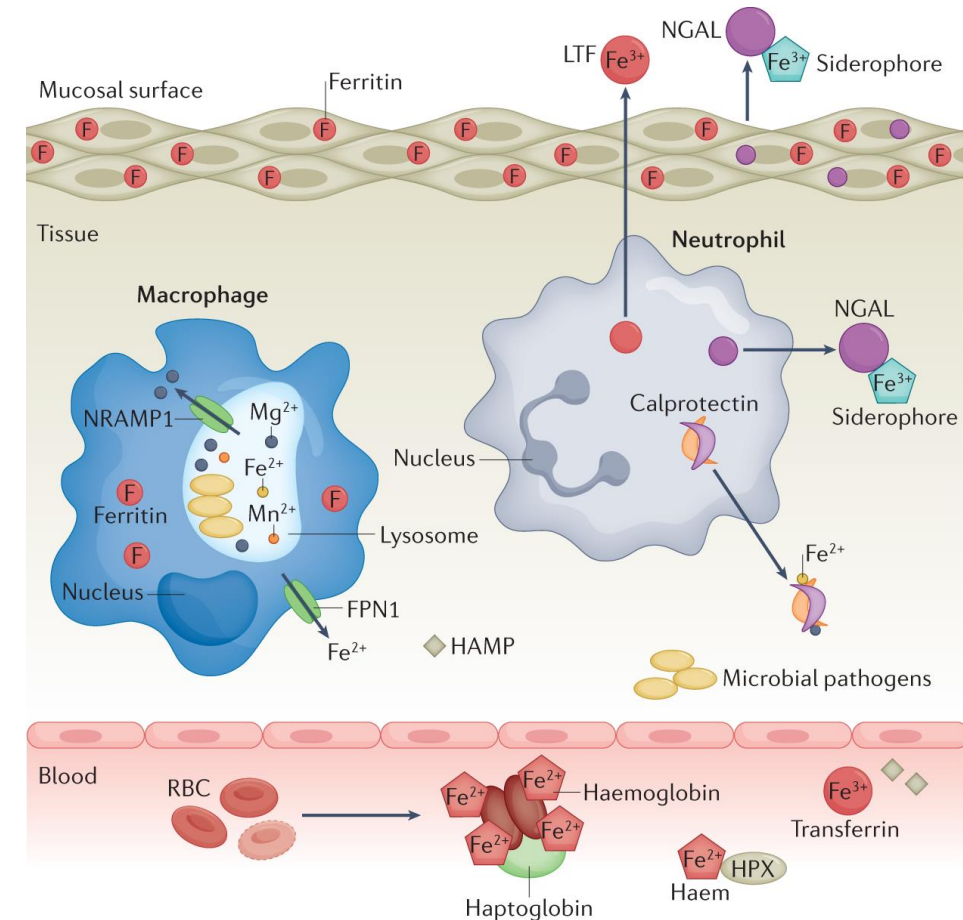
Per indurre la malattia il patogeno deve potersi riprodurre. Fattori che influenzano la crescita sono:

CONDIZIONI AMBIENTALI
appropriate

SOSTANZE NUTRITIVE
disponibili

La colonizzazione dell'ospite da parte di un patogeno richiede un'adeguata percezione e risposta ai segnali ambientali locali, per garantire l'adattamento e la sopravvivenza all'interno dell'ospite.

- Nutrienti solubili
- Vitamine e altri fattori di crescita
- Oligoelementi quali ferro, zinco, manganese, rame sono presenti in quantità limitata per impedire l'istaurarsi del patogeno



Ferro

```
graph TD; Ferro[Ferro] --> Box1[Esiste sottoforma di due stati di ossidazione: <br/>• forma ridotta, ferro ferroso (Fe<sup>2+</sup>) <br/>• forma ossidata, ferro ferrico (Fe<sup>3+</sup>)]; Ferro --> Box2[Grazie al suo potenziale redox, è un elemento versatile che lo rende adatto ad assumere il ruolo di cofattore di numerose proteine coinvolte in: <br/>• trasporto di elettroni <br/>• detossificazione dei ROS <br/>• sintesi di aminoacidi e nucleosidi <br/>• sintesi del DNA <br/>• fotosintesi]; Ferro --> Box3[È un elemento essenziale per quasi tutti gli organismi viventi, inclusi i batteri patogeni];
```

Esiste sottoforma di due stati di ossidazione:

- forma ridotta, ferro ferroso (Fe^{2+})
- forma ossidata, ferro ferrico (Fe^{3+})

Grazie al suo potenziale redox, è un elemento versatile che lo rende adatto ad assumere il ruolo di cofattore di numerose proteine coinvolte in:

- trasporto di elettroni
- detossificazione dei ROS
- sintesi di aminoacidi e nucleosidi
- sintesi del DNA
- fotosintesi

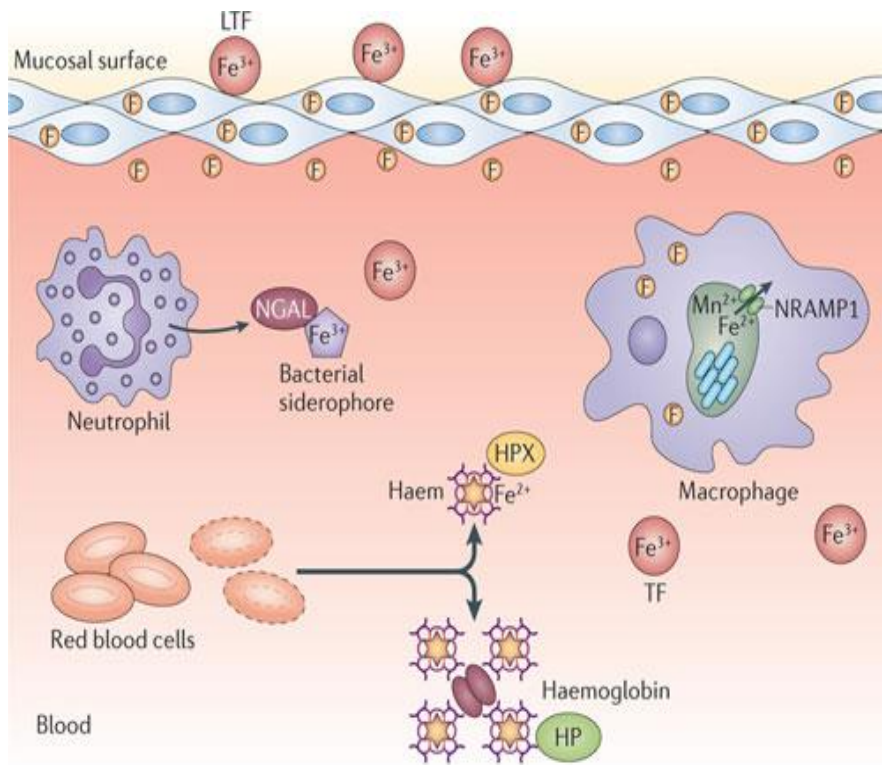
È un elemento essenziale per quasi tutti gli organismi viventi, inclusi i batteri patogeni

Biodisponibilità del ferro

Sebbene sia abbondante in natura, il ferro è difficilmente utilizzabile dalla maggior parte degli organismi viventi a causa della sua bassa solubilità in acqua in condizioni aerobiche.

Nell'ambiente il ferro è presente soprattutto nella forma ferrica (Fe^{3+}), che è molto poco solubile in presenza di ossigeno e a pH neutro $\rightarrow \text{Fe}^{3+} 10^{-9}\text{M}$

Nell'ospite il ferro è quasi completamente sequestrato da proteine che legano il ferro $\rightarrow \text{Fe}^{3+} 10^{-18}\text{M}$



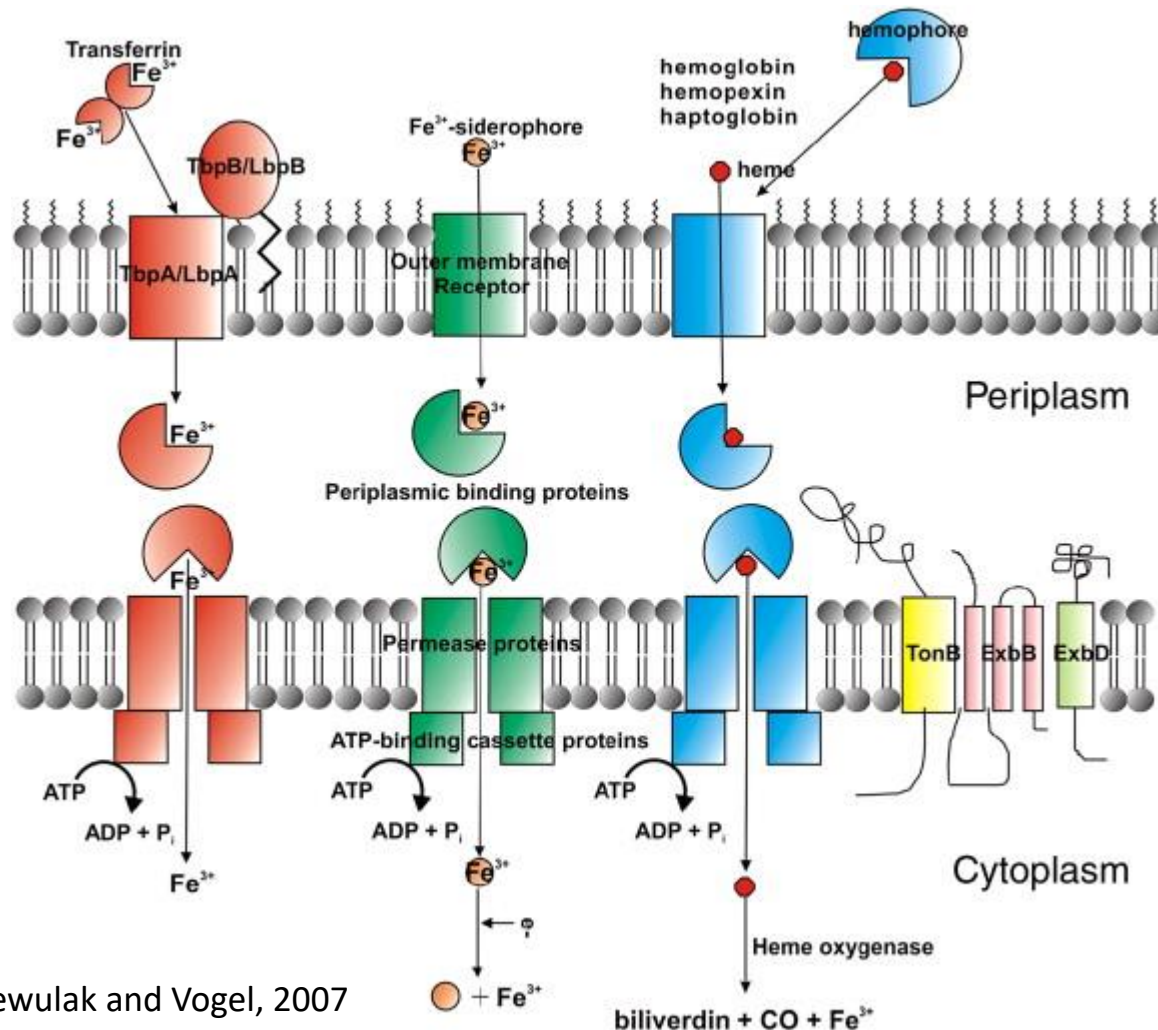
Mantengono il ferro in soluzione ma non lo rendono disponibile ai patogeni:

- Transferrina è il trasportatore del ferro nel sangue
- Lattoferrina trasporta il ferro nei fluidi secretori
- Ferritina sequestra e immagazzina il ferro all'interno delle cellule

Il ferro non è un nutriente facilmente disponibile

Meccanismi di uptake del ferro nei batteri

Al fine di colmare la differenza tra ferro biodisponibile e ferro richiesto per la crescita, i batteri hanno evoluto sistemi specializzati per l'assimilazione del ferro → strategie utilizzate:

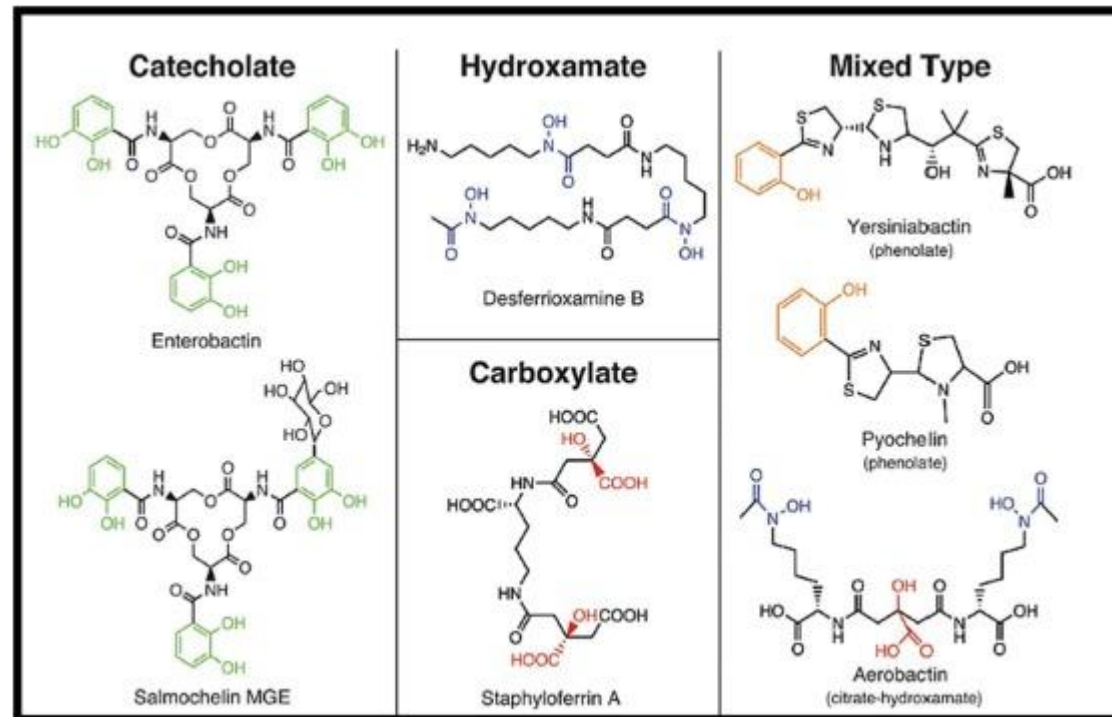


- Utilizzo di proteine dell'ospite quali transferrina, lattoferrina dalle quali il ferro viene estratto prima di poter essere trasportato nella cellula (es. *Neisseria*;
- Importo dell'eme all'interno della cellula come molecola intatta → per liberare l'eme legato alle proteine trasportatrici dell'ospite (es. emoglobina), i patogeni secernono esotossine es. emolisine, citolisine e proteasi;
- Produzione e secrezione di molecole a basso peso molecolare che chelano il ferro e che vengono importati come molecole intatte, i siderofori.

Tutte queste vie di assorbimento richiedono un recettore della membrana esterna, una PBP e un trasportatore ABC della membrana interna.

Siderofori

- Caratterizzati da una ridotta massa molecolare (< 1000 Da) e da un'elevata specificità ed affinità nei confronti del ferro ferrico;
- Sintetizzati e secreti dai batteri in risposta a livelli di ferro limitanti la crescita
- Una volta riconosciuto e legato il ferro nell'ambiente extracellulare, il complesso sideroforo-ferro viene legato da un recettore altamente specifico e trasportato nel citoplasma
- Classificati in base al gruppo funzionale che utilizzano per legare il ferro



Cattura del ferro siderofori-mediata nei batteri Gram- negativi e positivi

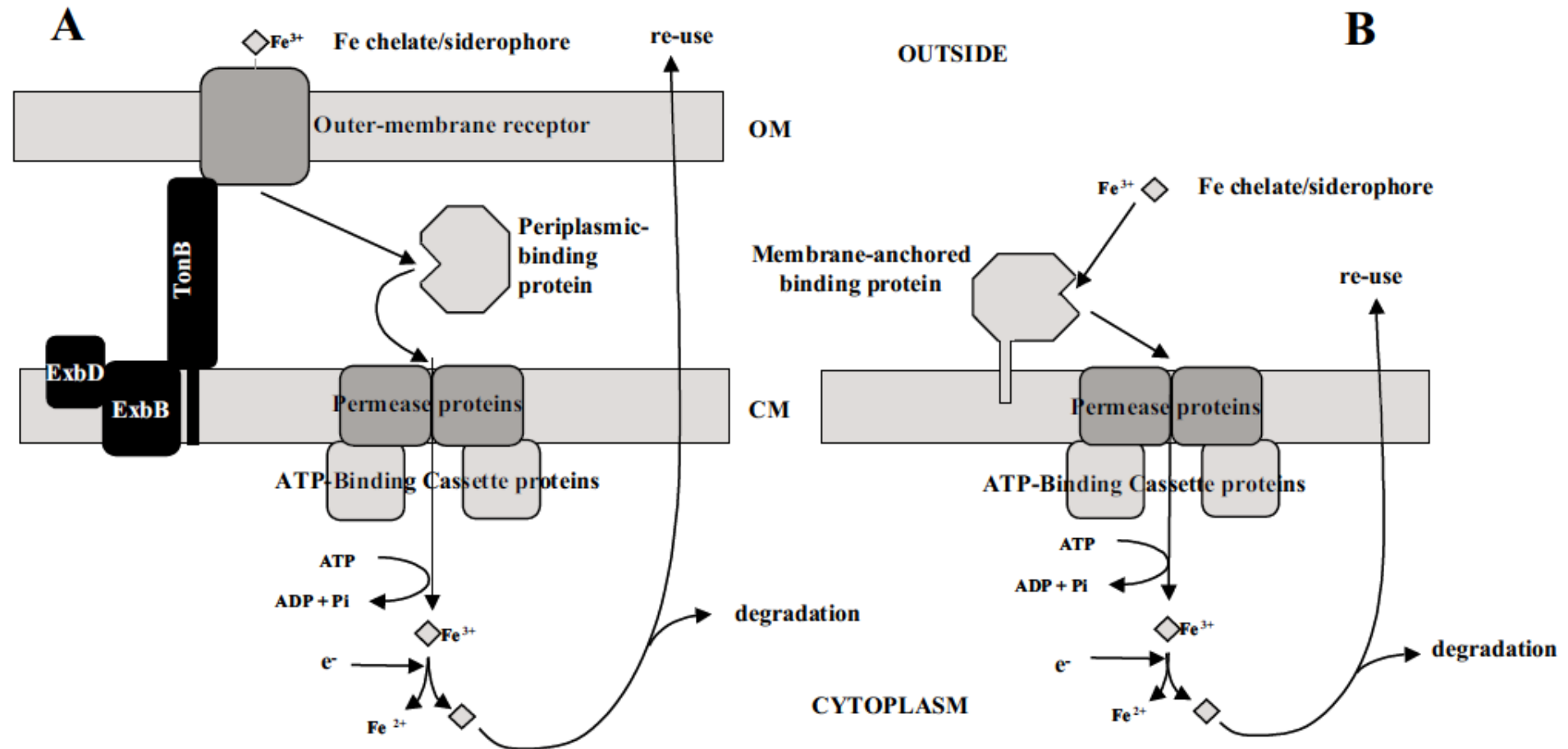
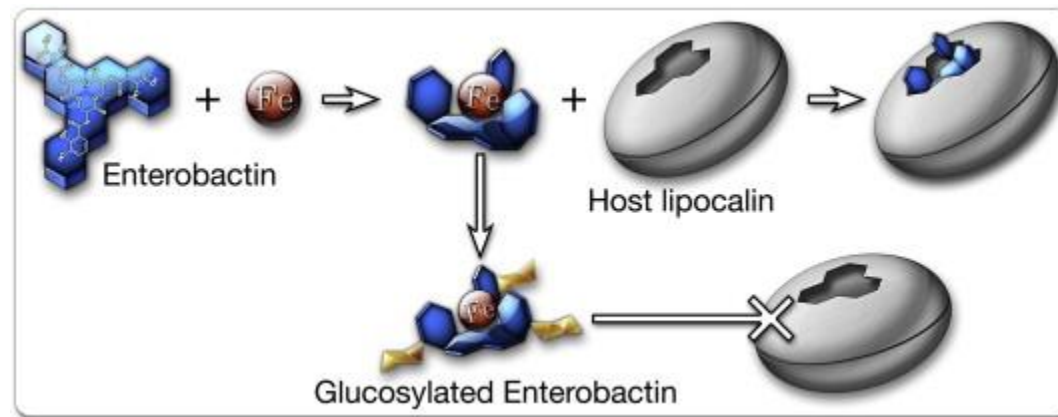


Fig. 1. Schematic representation of siderophore-mediated iron uptake in Gram-negative (A) and Gram-positive (B) bacteria.

Andrews et al., 2003

Come si difende l'ospite dalla cattura del ferro siderofori-mediata?

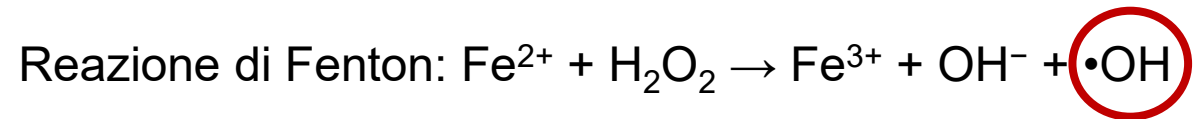
Per combattere la cattura di ione ferrico da parte dei siderofori, nei vertebrati viene prodotta dai macrofagi la lipocalina 2 o siderocalina ovvero una proteina che lega e sequestra i siderofori. La lipocalina 2 (che è anche un fattore di crescita) viene upregolata durante i processi infiammatori.



Alcuni batteri producono dei siderofori che sono in grado di eludere il legame con lipocalina grazie a specifiche modificazioni chimiche (es. glicosilazione nel caso dell'enterobactina)

Il doppio ruolo del ferro: essenziale ma tossico

In un ambiente riducente, come quello citoplasmatico, il ferro libero è presente come ione ferroso e, in presenza di perossido di idrogeno, può catalizzare la formazione di specie reattive dell'ossigeno



Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono danneggiare proteine, lipidi, acidi nucleici



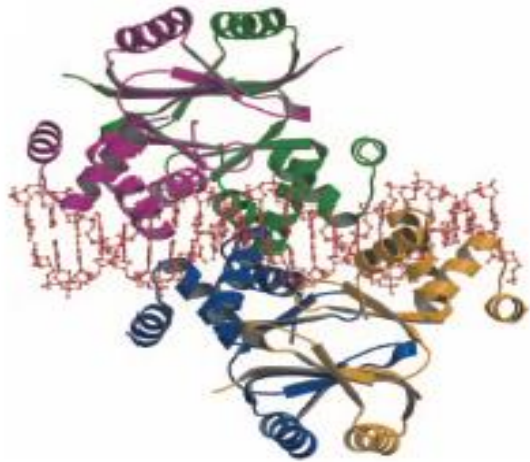
L'importo di ferro deve essere finemente regolato per mantenere una concentrazione intracellulare entro limiti «sicuri»



I batteri necessitano di meccanismi per percepire e controllare i livelli intracellulari di ferro

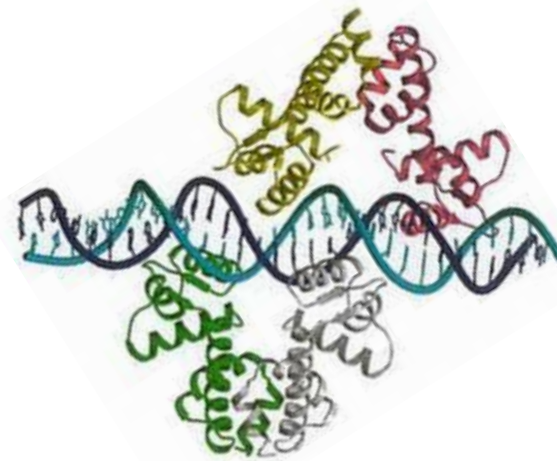
Regolazione dei sistemi di uptake del ferro

Fur (ferric uptake regulator)



Gram-negative bacteria

DtxR (Diphtheria toxin repressor)



Gram-positive bacteria

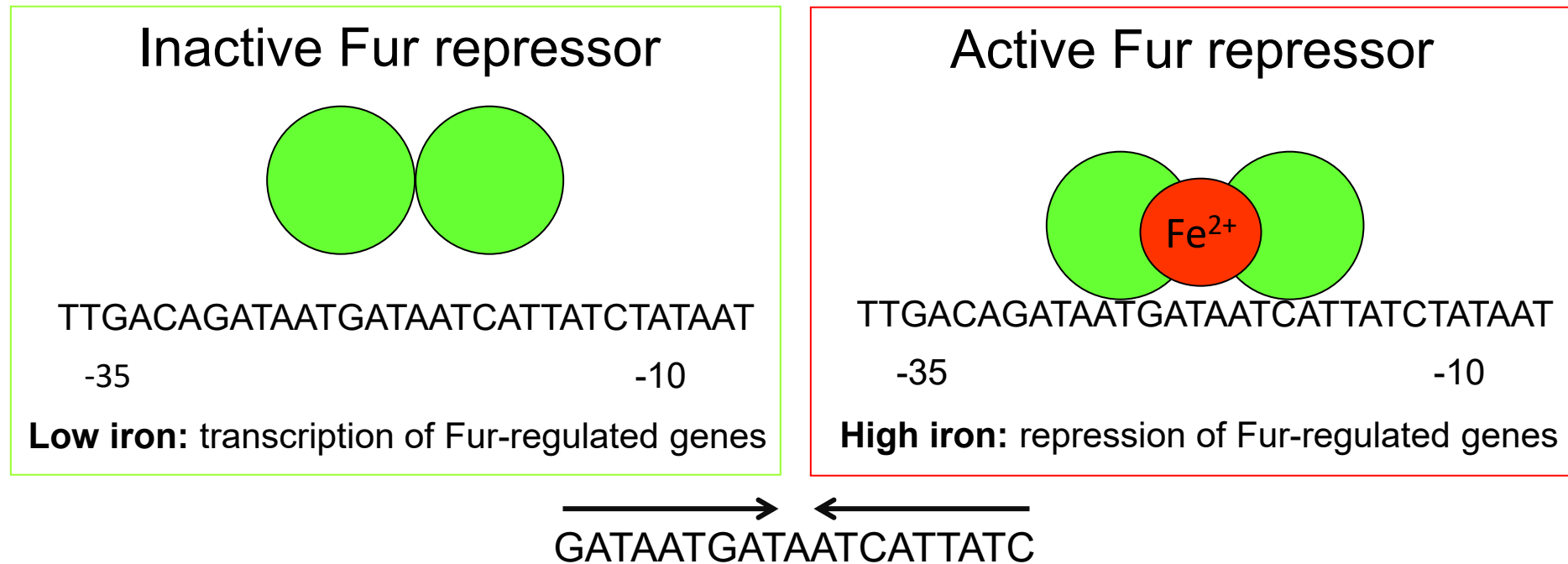
Fur e DtxR sono regolatori principali del metabolismo del ferro



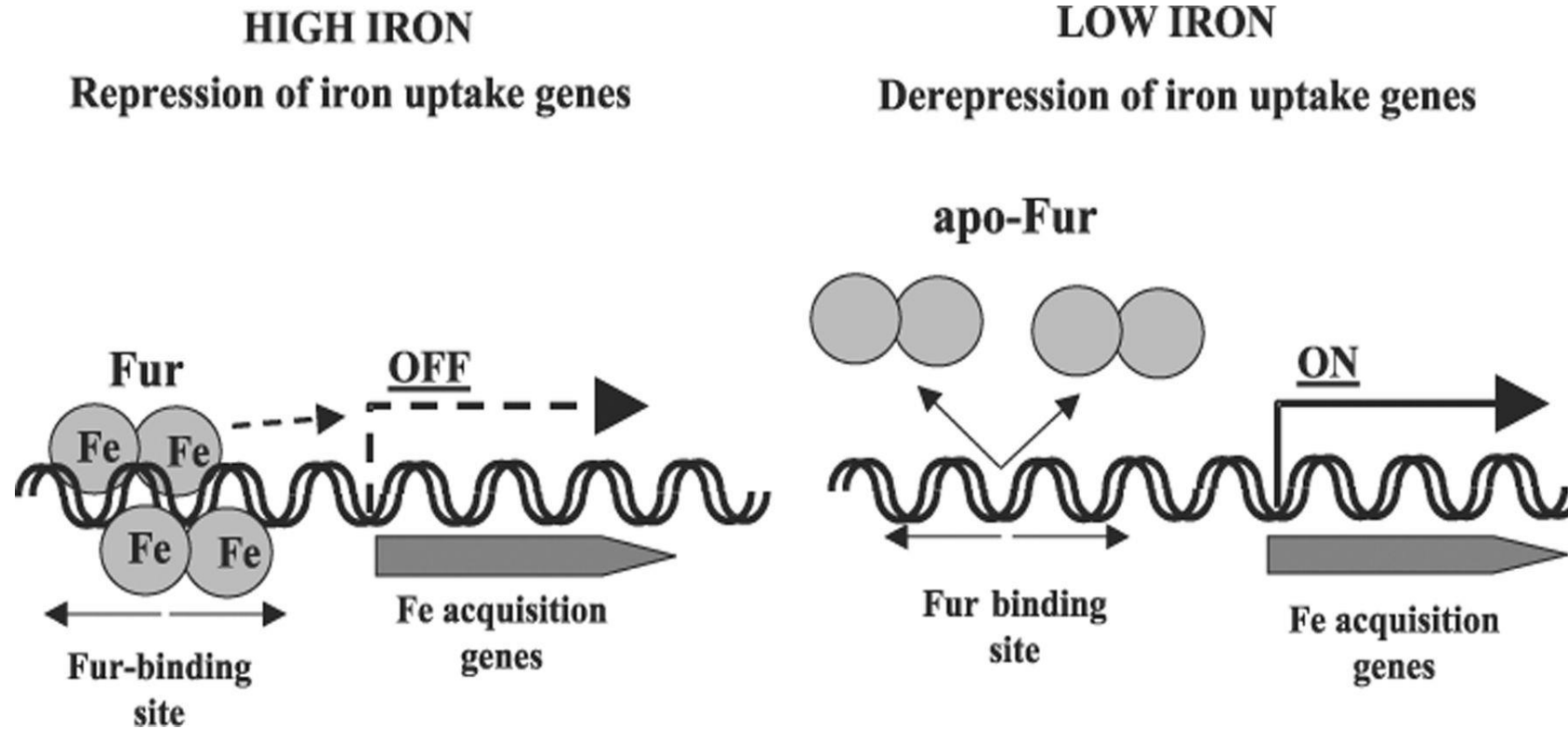
Agiscono come repressori trascrizionali

Fur e la regolazione del ferro

- Piccola proteina (15-17 KDa) presente in praticamente tutti i batteri Gram-negativi
- Regola un cospicuo numero di geni → in *E. coli* sono più di 90
- Necessita del co-repressore Fe^{2+} per dimerizzare, legare il DNA (affinità 1000 volte superiore rispetto alla forma apo) a livello della Fur box e reprimere la trascrizione dei geni bersaglio
- Rappresenta un sensore dei livelli intracellulari di ferro



Repressione genica mediata da Fur



Fur e la regolazione del ferro

I batteri hanno anche bisogno di esprimere proteine specifiche che utilizzano il ferro in risposta ad elevati livelli di ferro

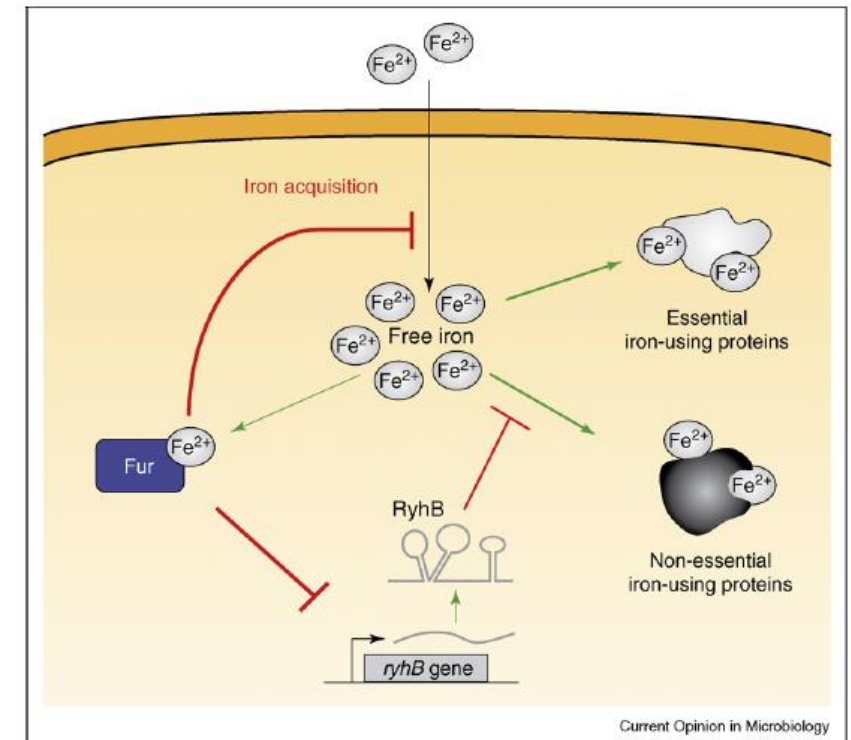
I geni indotti in presenza di ferro sono coinvolti in:

- immagazzinamento del ferro
- difesa dallo stress ossidativo
- metabolismo
- altri processi cellulari

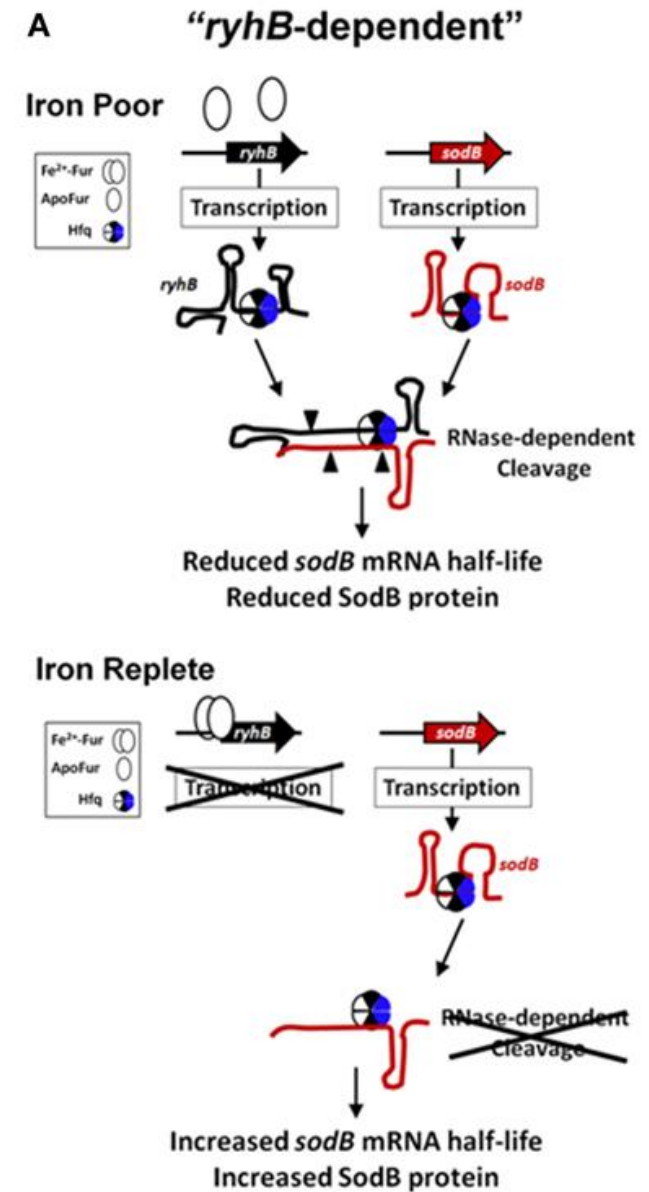
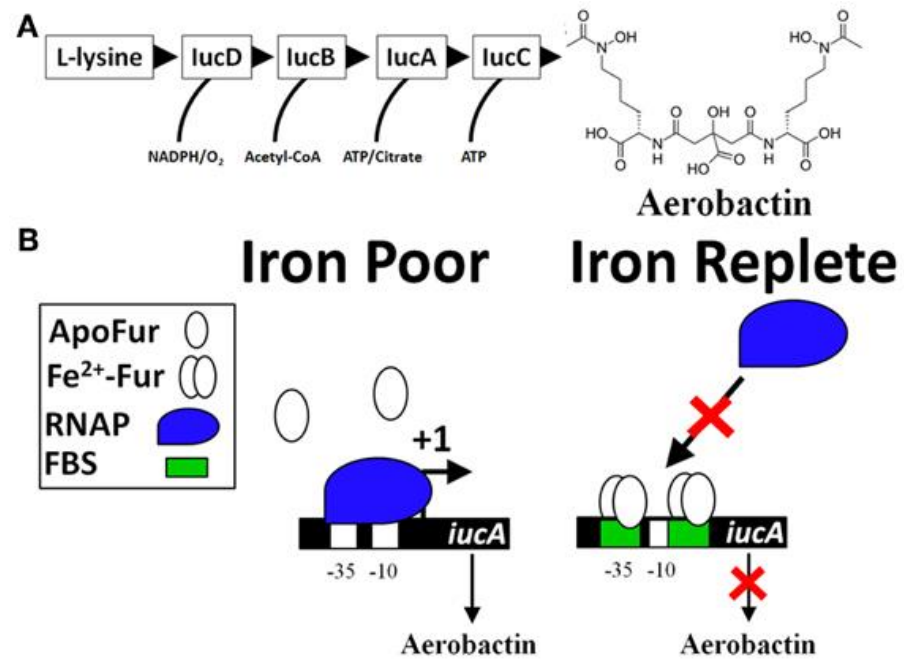
COME?

...accoppiando due sistemi di regolazione negativa

È il caso dello sRNA RyhB di *E. coli*

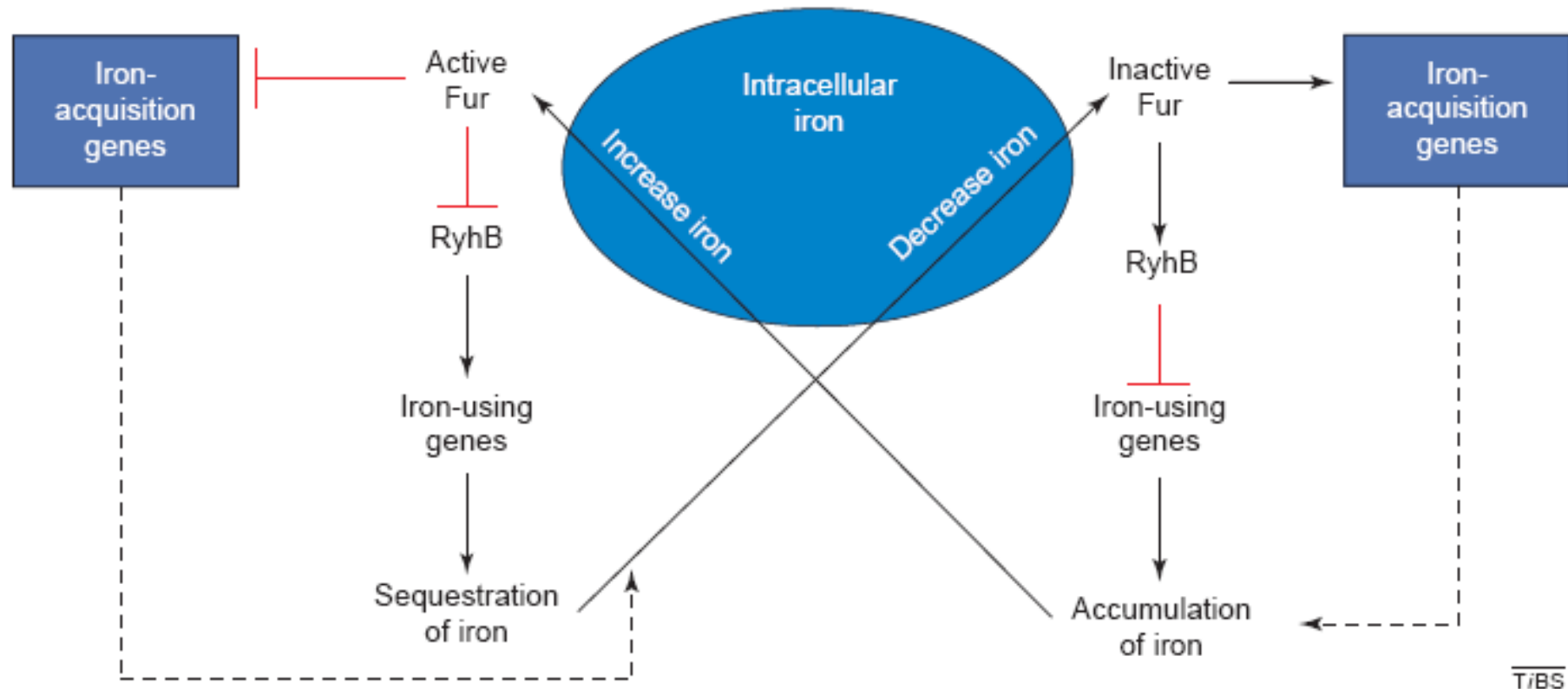


Geni regolati da Fur



Omeostasi del ferro

Un equilibrio ben regolato dell'attività di Fur permette ai batteri di mantenere l'omeostasi del ferro



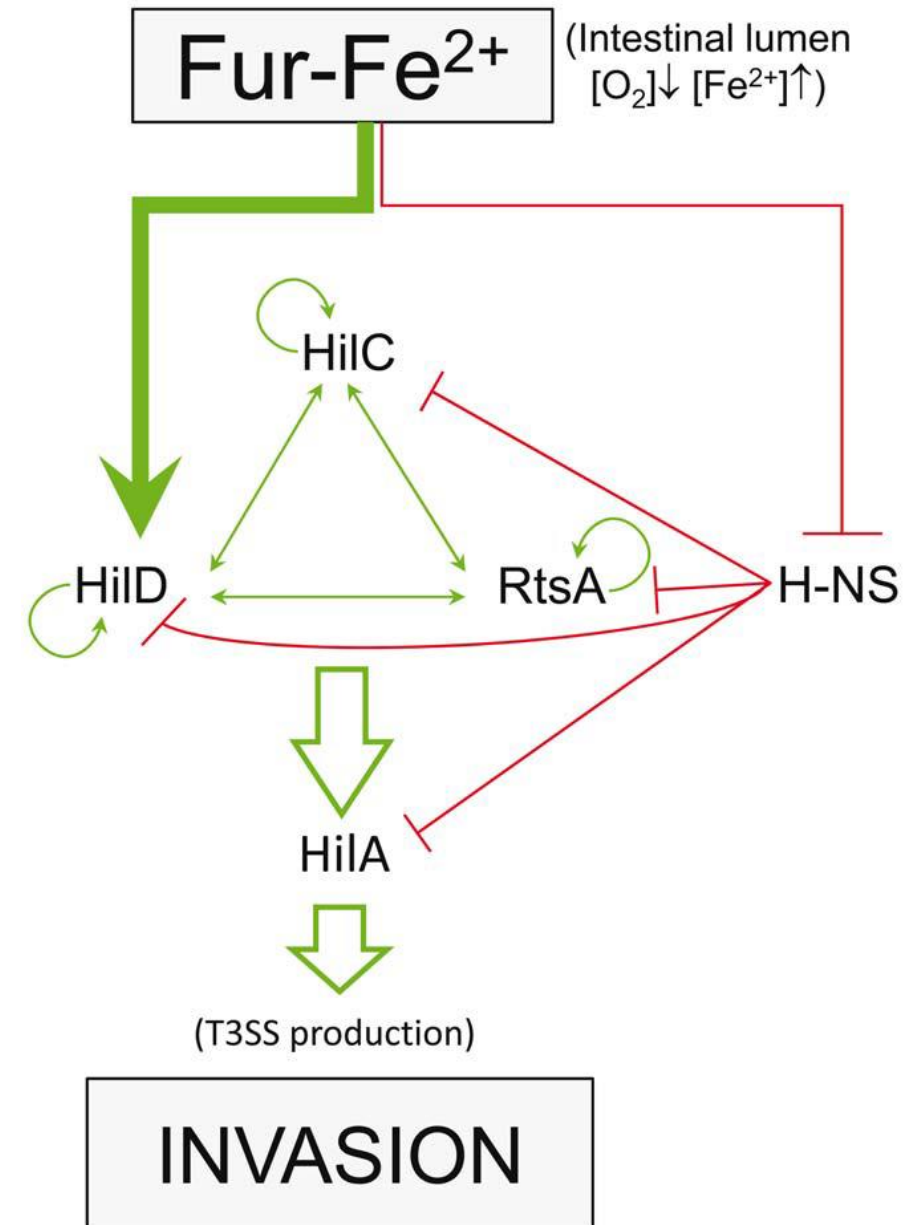
Fur in *Salmonella*

In *Salmonella enterica* la concentrazione del ferro è associata all'espressione del T3SS

Nel lumen dell'intestino tenue Fe^{2+} è abbondante

La concentrazione di Fe^{2+} rappresenta un segnale che permette al patogeno di percepire la propria posizione all'interno dell'ospite

molti dei geni di *Salmonella* rimangono silenti finché il batterio è confinato nel lumen intestinale mentre i geni per l'invasione vengono espressi
Es. HilD e SPI1



Fur in *Pseudomonas aeruginosa*



Esempio paradigmatico di microrganismo nel quale l'assimilazione e il metabolismo del ferro sono processi altamente regolati

La disponibilità di ferro ha una influenza considerevole sul profilo globale di espressione genica → i geni la cui espressione risulta influenzata, direttamente o indirettamente, da Fur rappresentano il 4% dell'intero genoma di *P. aeruginosa*. Tra questi:

- Metabolismo del ferro → sintesi di siderofori, recettori per l'importo di ferro, proteine per immagazzinare il ferro
- Risposta allo stress ossidativo
- Fattori di virulenza

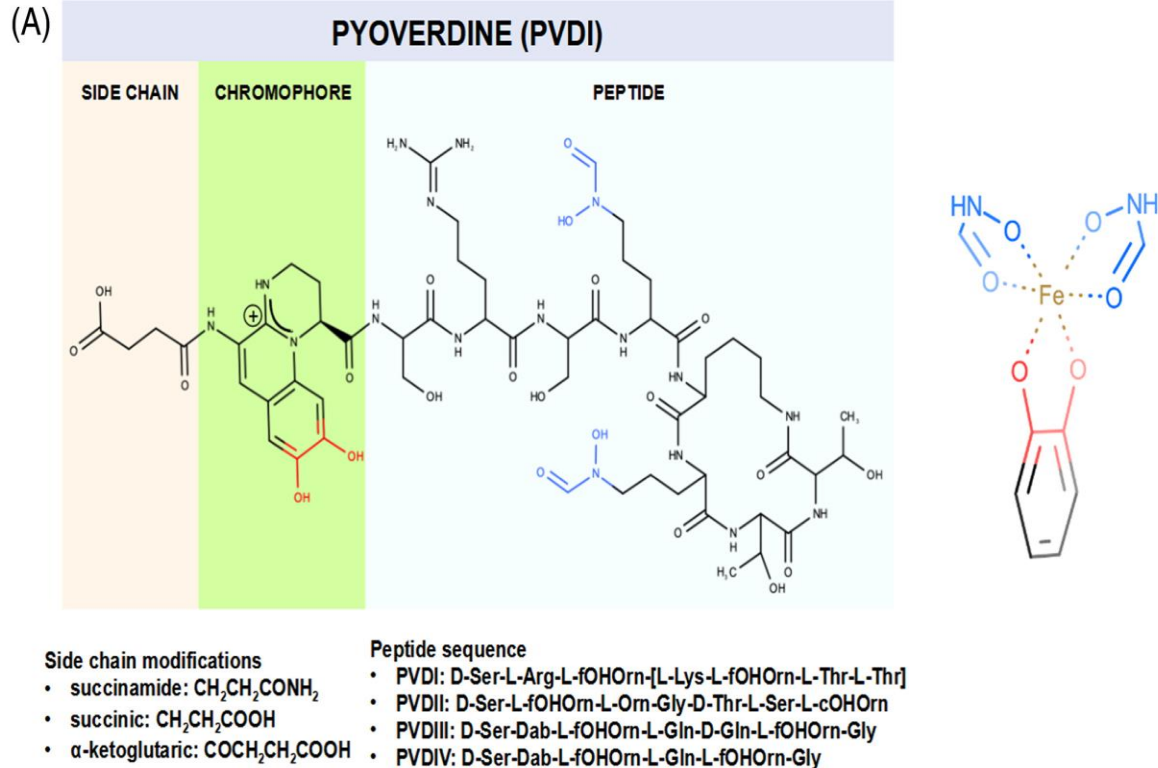
```
graph TD; A[Metabolismo del ferro] --> B[PIOVERDINA]; A --> C[PIOCHELINA]; B --- D[ ]; C --- D; D --- E[L'attività del regolatore Fur ha un ruolo chiave nella crescita e nella patogenesi di P. aeruginosa];
```

PIOVERDINA

PIOCHELINA

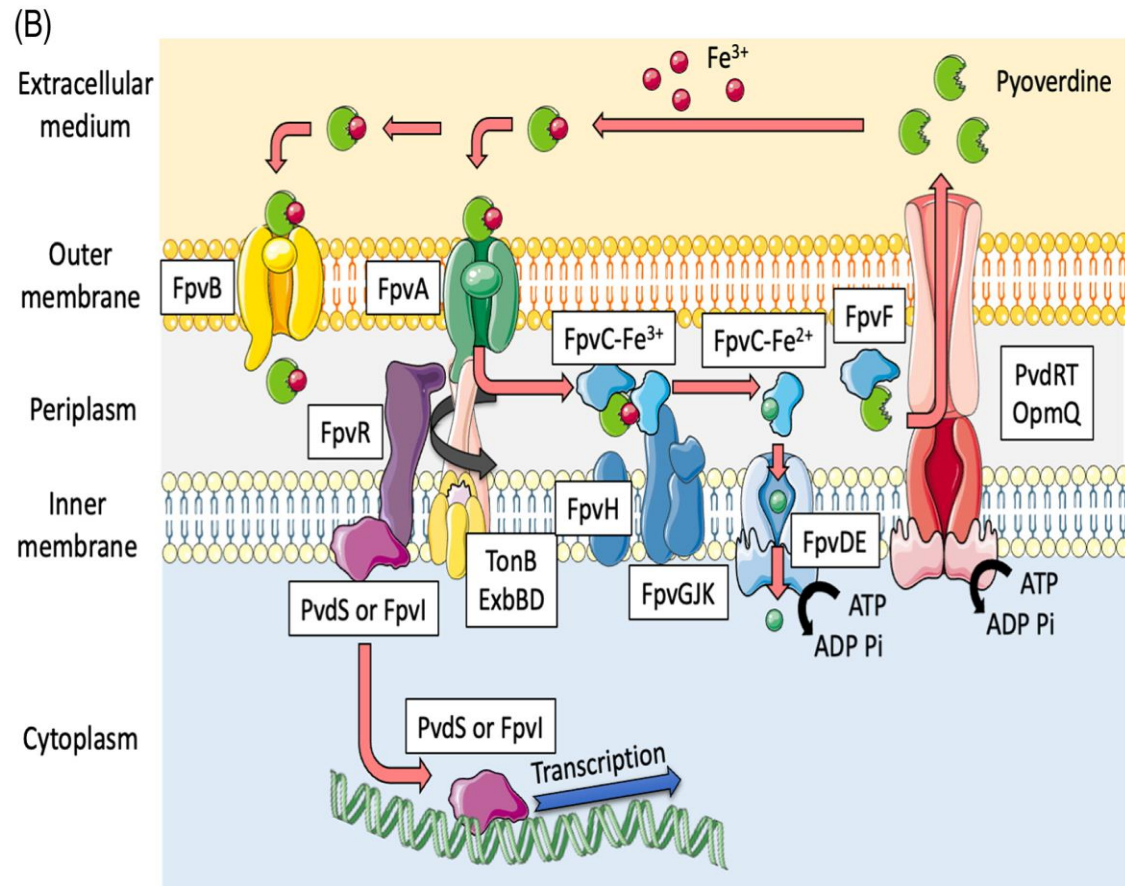
L'attività del regolatore Fur ha un ruolo chiave nella crescita e nella patogenesi di *P. aeruginosa*

Pioverdina in *Pseudomonas aeruginosa*



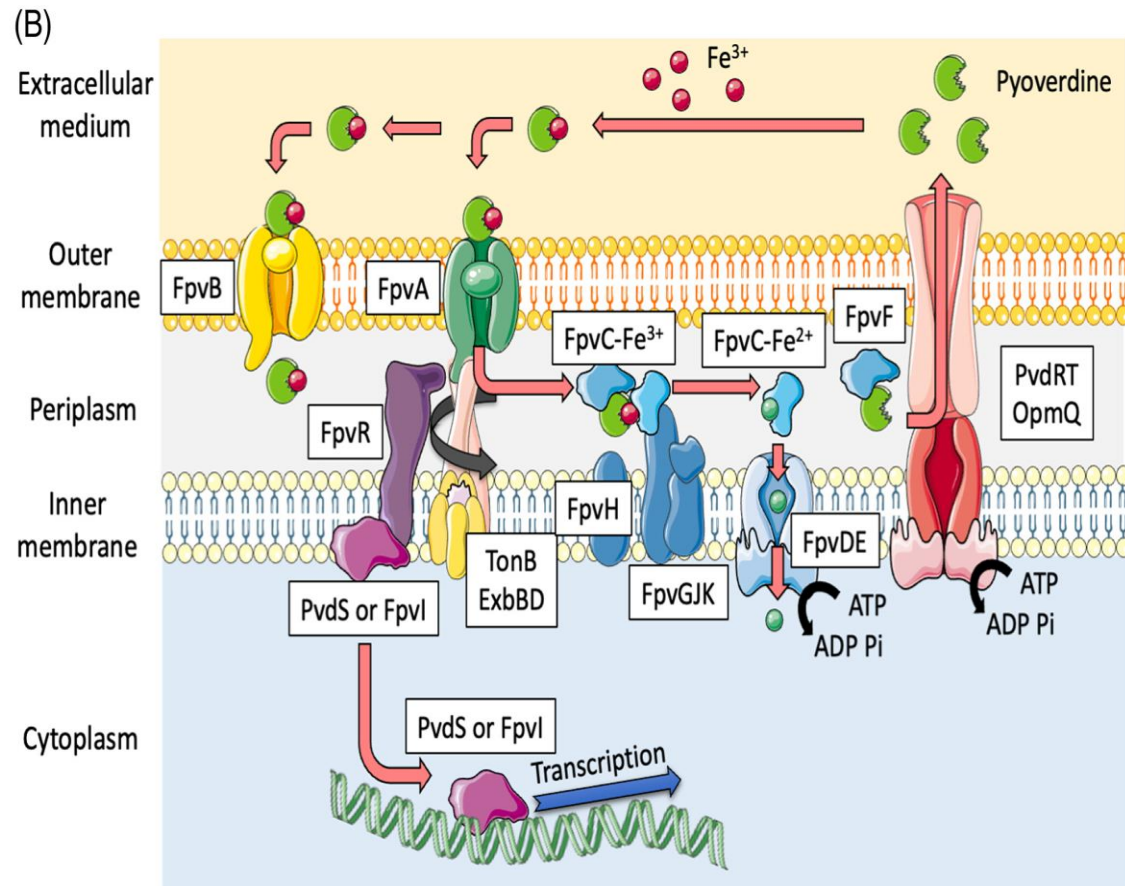
- È il principale sistema di acquisizione del ferro durante il processo infettivo
- Fa parte di un gruppo di siderofori verde-fluorescenti prodotti dalle diverse specie del genere *Pseudomonas*
- È composto da:
 - un cromoforo fluorescente, altamente conservato
 - catena peptidica variabile nelle diverse pioverdine
 - gruppi idrossammati altamente affini al legame con il Fe^{3+}

Sistema di uptake della pioverdina



- 2 trasportatori dipendenti da TonB (TBDT) sono responsabili dell'importo del complesso pioverdina-Fe³⁺ : **FpvA** e **FpvB**;
- Il complesso pioverdina-Fe³⁺ viene dissociato
- **FpvG**, proteina associata alla membrana interna, riduce Fe³⁺ a Fe²⁺ mentre la pioverdina non subisce nessuna modifica chimica
- Fe²⁺ viene legato dalla proteina periplasmatica **FpvC** che probabilmente porta il metallo al trasportatore ABC **FpvDE**, permettendo il passaggio di Fe²⁺ nel citoplasma
- FpvF si lega all'apo-pioverdina dopo il rilascio del ferro e la porta alla pompa di efflusso **PvdRT OpmQ** per il riciclo del sideroforo nel mezzo extracellulare.

Regolazione in risposta all'importo di pioverdina-Fe³⁺



Schalk and Perraud, 2022

Legame della pioverdina-Fe³⁺ al sito di legame di **FpvA**

interazione tra il dominio di segnalazione del trasportatore e la regione periplasmatica del fattore antisigma **FpvR**

FpvR rilascia quindi i due fattori sigma:

FpvI

attiva la trascrizione di *fpvA*

PvdS

attiva la trascrizione di tutti gli altri geni coinvolti nella biosintesi di pioverdina e nell'assorbimento del ferro tramite pioverdina

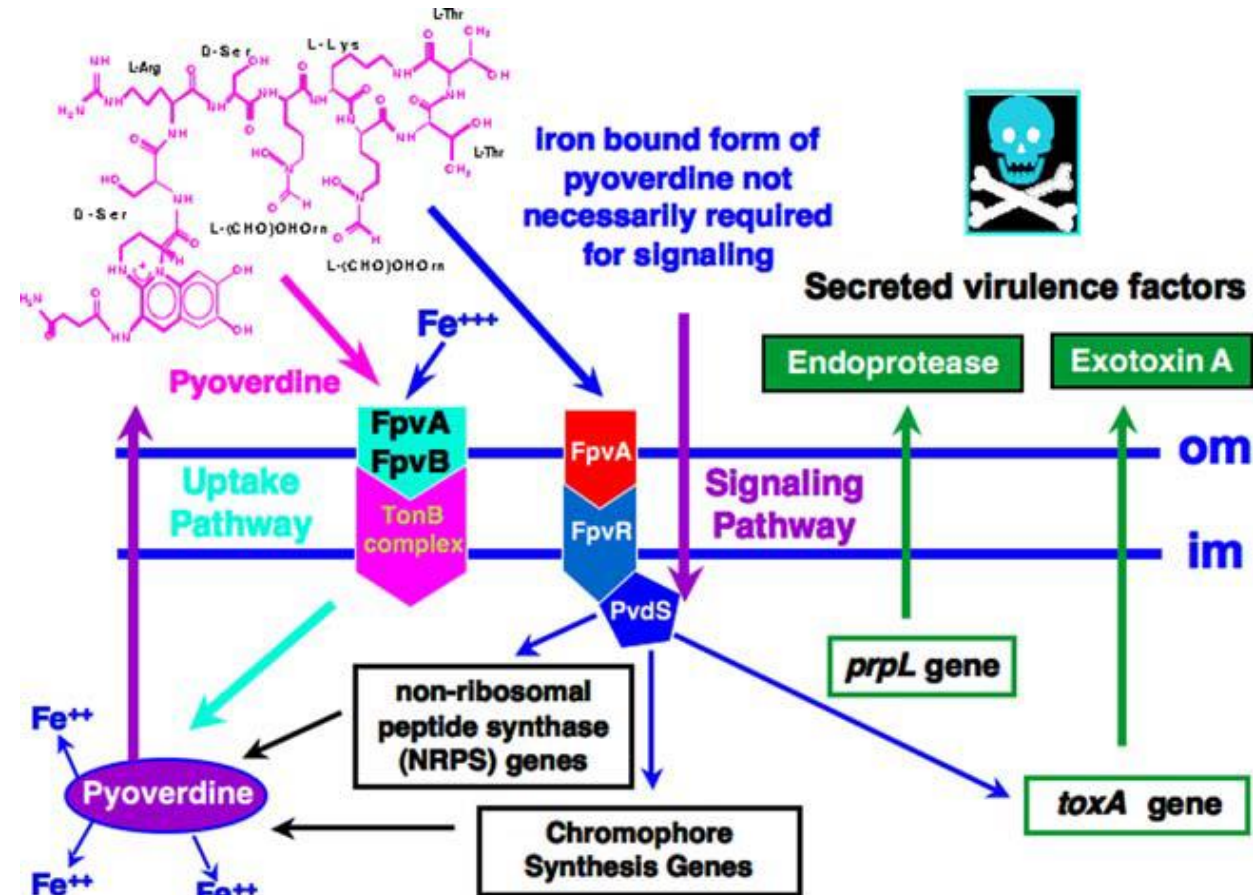
Ruolo della pioverdina nella patogenesi di *P. aeruginosa*

Esotossina A

Secreta nello spazio extracellulare sottoforma di singola catena polipeptidica di 71KDa formata da due frammenti A (active) e B (binding).

Frammento B si lega al recettore della cellula ospite e permette l'ingresso del frammento A nella cellula.

Frammento A è un'ADP-ribosil-transferasi e va ad inibire il fattore di allungamento EF-2 e quindi la sintesi proteica con conseguente morte della cellula ospite.



Proteasi PrpL

Agisce degradando le proteine dell'ospite tra cui lattoferrina e transferrina

Vasil, 2006