

## Batteri Gram positivi :

caratterizzati da una comune organizzazione della parete

Specie sporigene di Clostridium e di Bacillus

Specie di antibiotico-produttori di Streptomyces

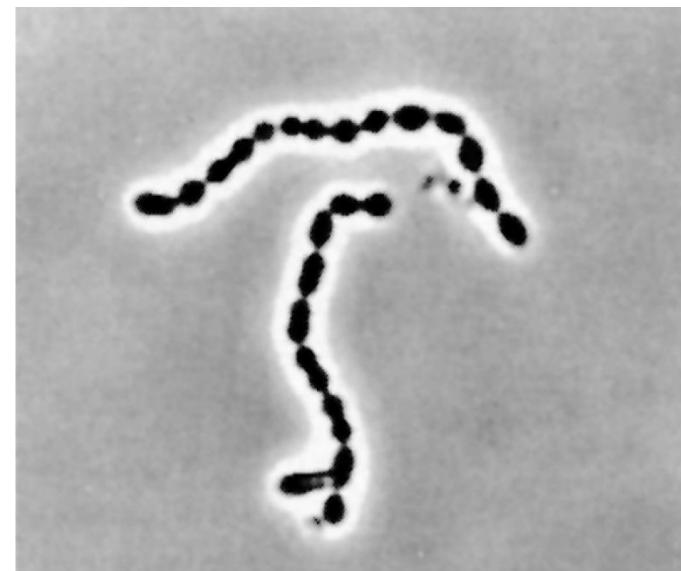
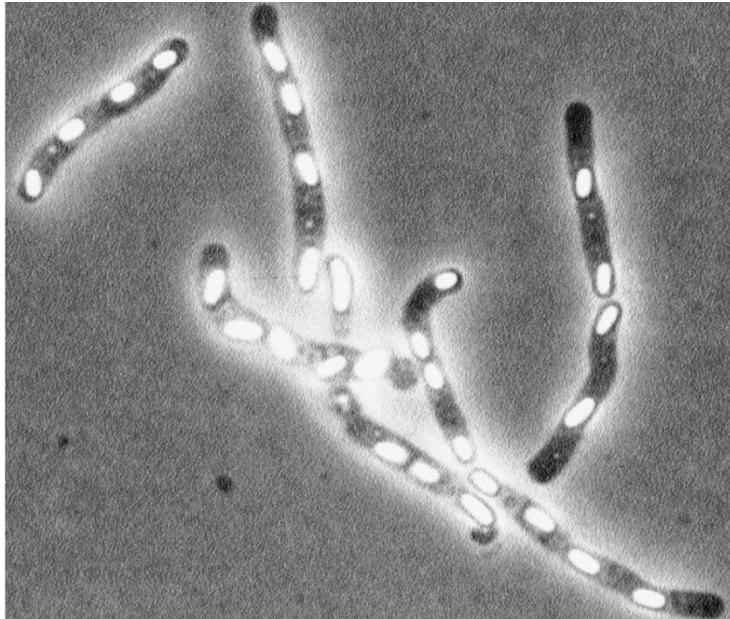
Produttori di acido lattico

Streptococcus

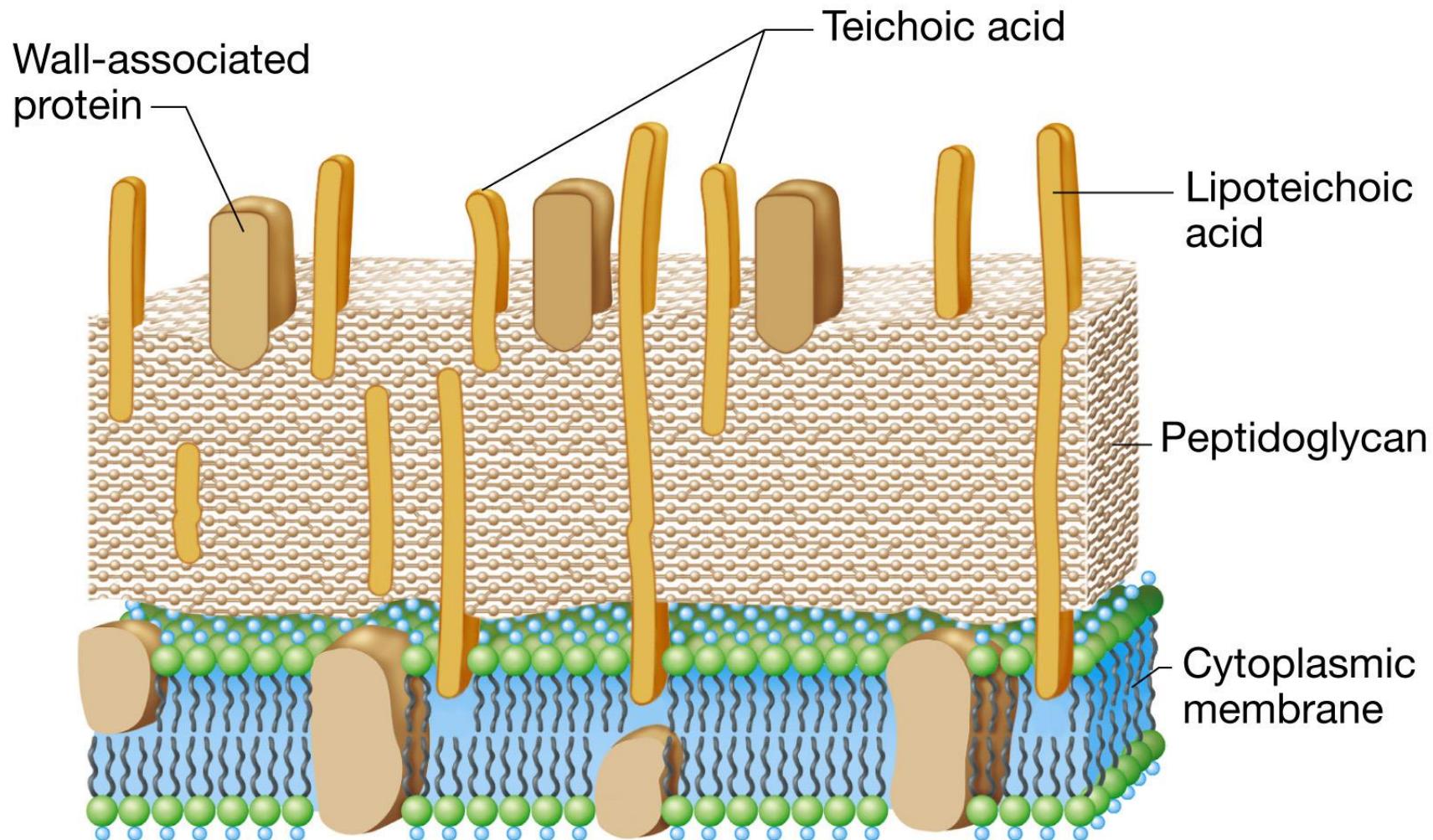
Lactobacillus

Bacillus: batterio Gram+ che può formare endospore forme di vita criptobiontica molto resistenti al calore

Streptococcus: batterio Gram+ di forma sferica che si aggrega a formare catene. Alcune specie. Diffusi nell'industria caseari e patogeni .

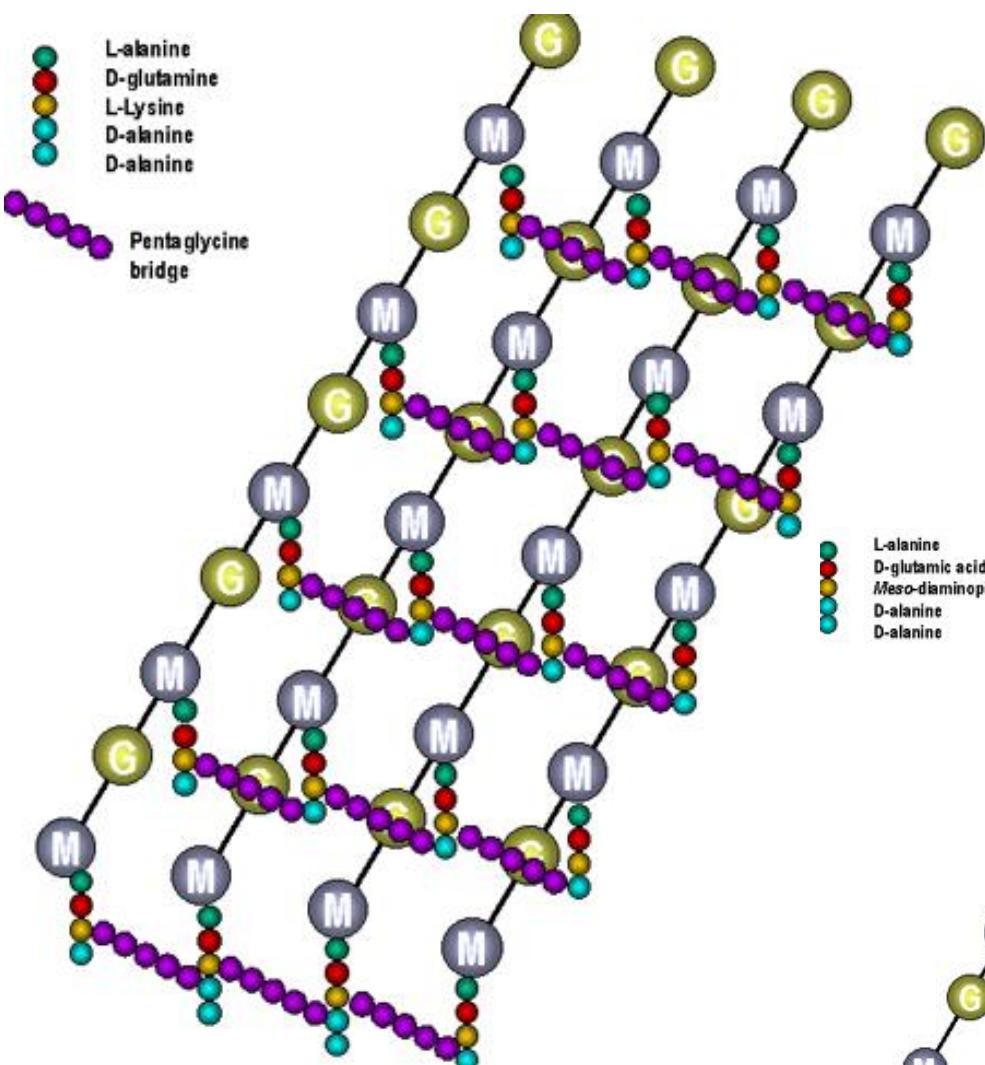


# La parete dei Gram+ possiede gli acidi teicoici



(b)

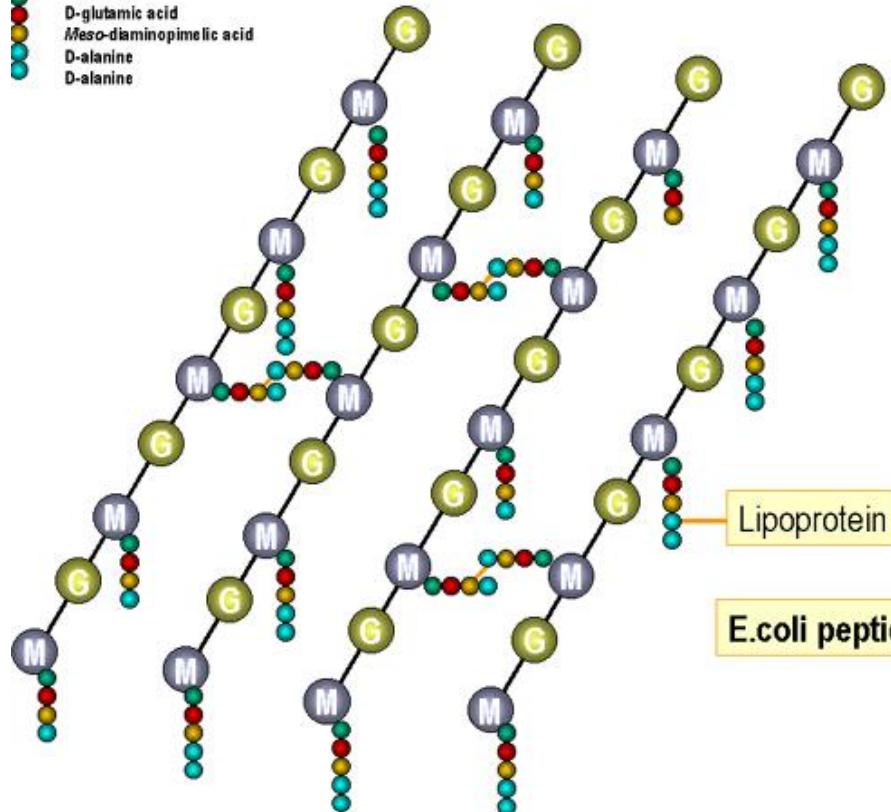
L-alanine  
D-glutamine  
L-Lysine  
D-alanine  
D-alanine



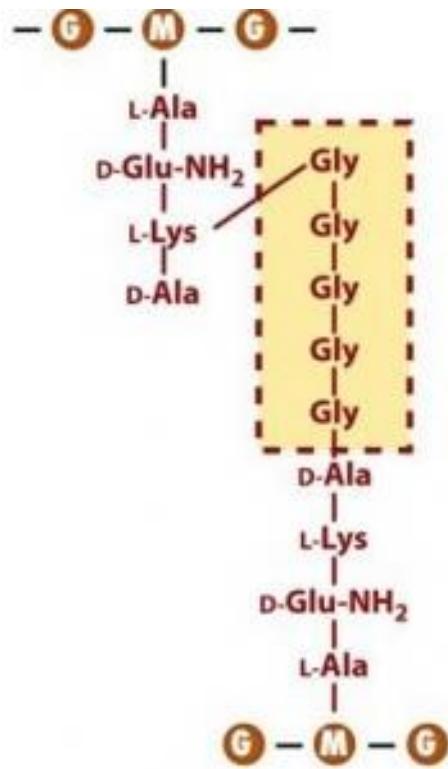
Peptidoglicano di  
*Staphylococcus aureus*  
Gram+ e

Escherichia coli  
Gram-

L-alanine  
D-glutamic acid  
Meso-diaminopimelic acid  
D-alanine  
D-alanine



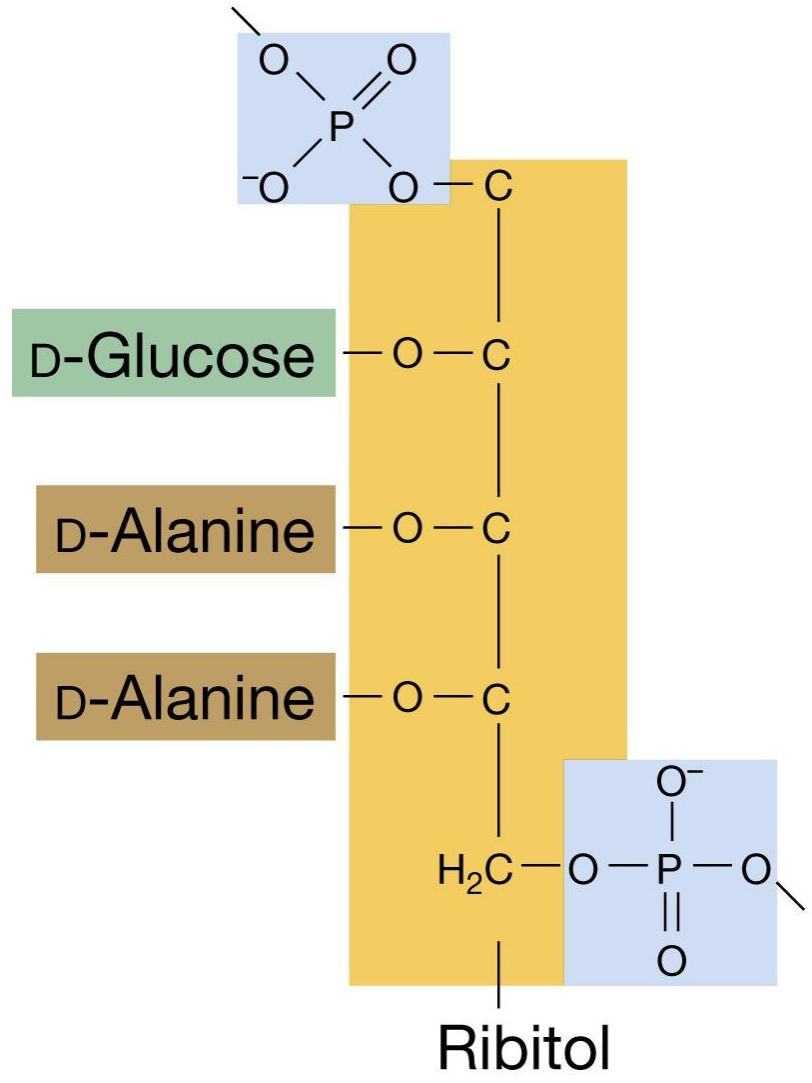
E.coli peptidoglycan



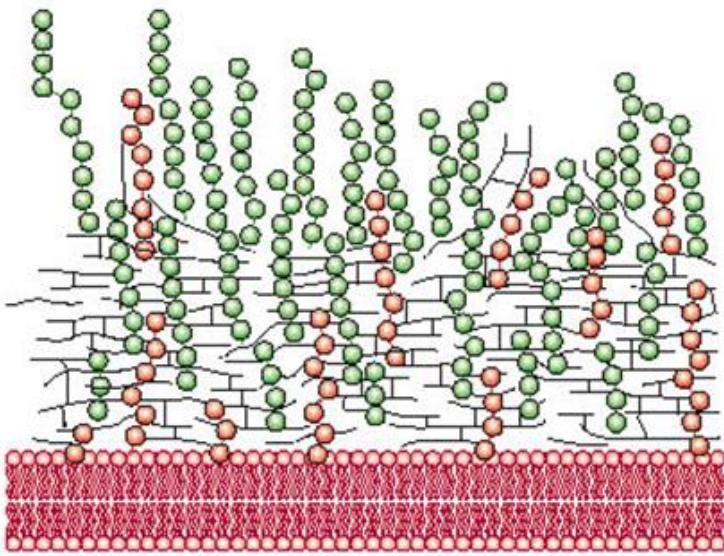
Ponte petidico costituito da AA quali glicina, treonina, serina, acido aspartico oltre a quelli tipici del tetrapeptide. Assenza di AA a catena ramificata, aromatici, AA con zolfo istidina, arginina prolina

Gli acidi teicoci sono polimeri derivati dalla polimerizzazione di unità di ribitolo generalmente associati ad altri zuccherie alla D-alanina.

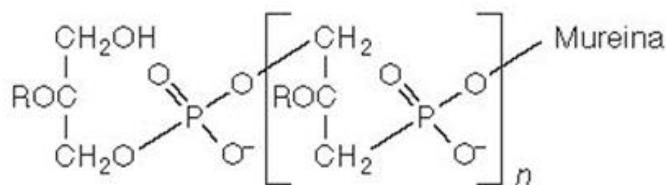
Alcuni acidi teicoici contenenti glicerolo sono strettamente legati ai lipidi della membrana e vengono detti lipoteicoci



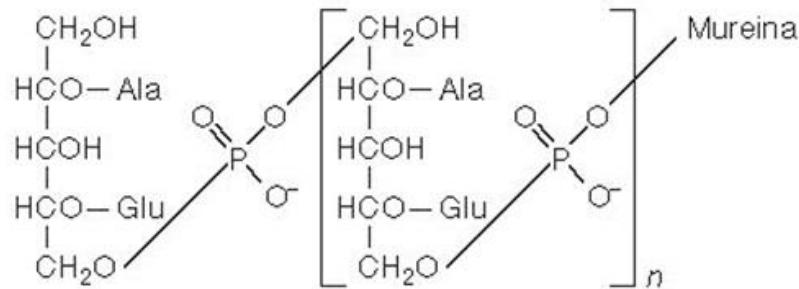
(a)



Acido glicerol-teicoico



Acido ribitol-teicoico



Gli acidi teicoici costituiscono fino al 60% della parete dei Gram+

-sono polimeri polianionici ricchi in fosfati, costituiti da unità ripetute di 1,3 glicerolfosfato (poli-glicerol fosfato) o da 1-5 D-ribitolfosfato (poliribitol fosfato) legate da legami fosfodiesterici

-Possono trovarsi legati covalentemente al peptidoglicano mediante il NAM o prendere contatto con la membrana citoplasmatica.  
 - carichi negativamente fonte di fosfato in carenza di P

- controllano il movimento degli ioni  
 assimilazione cationi metallici e l'attività delle autolisine.

**-Adesione dei batteriofagi**

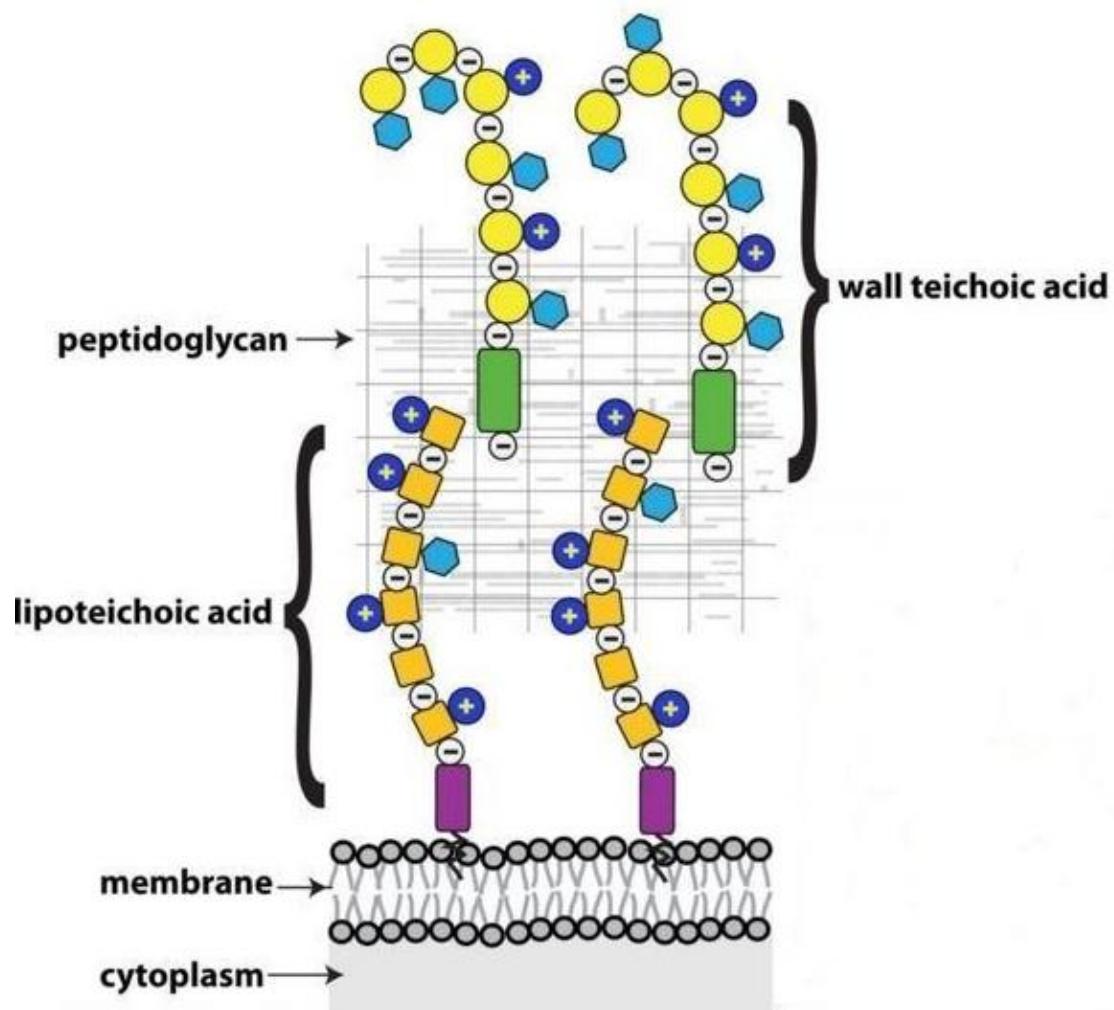
Oltre agli acidi teicoici nella parete troviamo gli acidi teicuronici che sono costituiti da N-acetil-galattosamina e acido D-glucoronico ripetute in egual proporzione.

In genere sono presenti acidi teicoici e acidi teicuronici in ugual proporzione sulla parete cellulare di Batteri Gram+ come *Bacillus subtilis*. In carenza di fosfato vengono sintetizzati sono gli acidi teicuronici

Gli acidi teicuronici non riescono però a sostituire funzionalmente in modo completo gli acidi teicoici.

Gli acidi teicoici sono associati

- o al peptidoglicano tramite un legame covalente con l'ossidrile in posizione 6 dell'acido N-acetilmuramico
- o ai lipidi di membrana citoplasmatica ( acido lipoteicocico) .



## Qual è il loro ruolo?

essendo carichi negativamente contribuiscono a conferire carica negativa alla cellula batterica ed essendo ricchi in fosfati possono rappresentare fonte di fosfato in carenza di fosfato.

Controllano il movimento degli ioni, l'assimilazione dei cationi metallici e l'attività delle autolisine

- Conferiscono porosità, elasticità e resistenza alla cellula

Oltre agli acidi teicoici nella parete troviamo gli acidi teicuronici che sono costituiti da N-acetil-galattosamina e acido D-glucoronico ripetute in ugual proporzione.

In genere sono presenti acidi teicoici e acidi teicuronici in ugual proporzione sulla parete cellulare di Batteri Gram+ come *Bacillus subtilis*. In carenza di fosfato vengono sintetizzati sono gli acidi teicuronici

Gli acidi teicuronici non riescono però a sostituire funzionalmente in modo completo gli acidi teicoici.

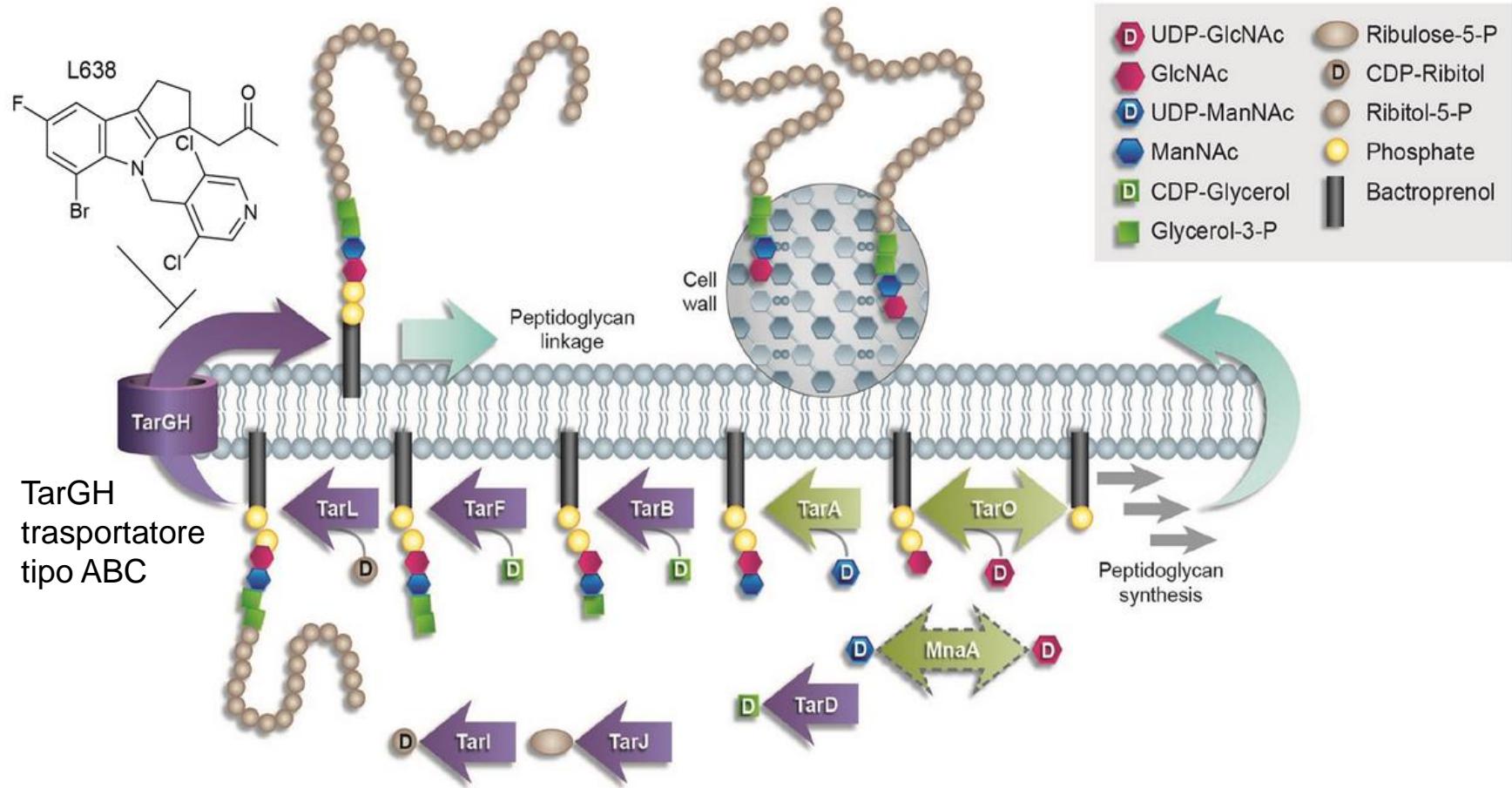
## Biosintesi degli acidi teicoici

Gli acidi teicoici (WTA) sono dei glicofosfati presenti nella parete dei Batteri Gram+ in quantità uguale al peptidoglicano.

In *Staphylococcus aureus* gli acidi teicoici svolgono un ruolo importante sia nella tolleranza alle penicilline sia nella formazione di biofilm.

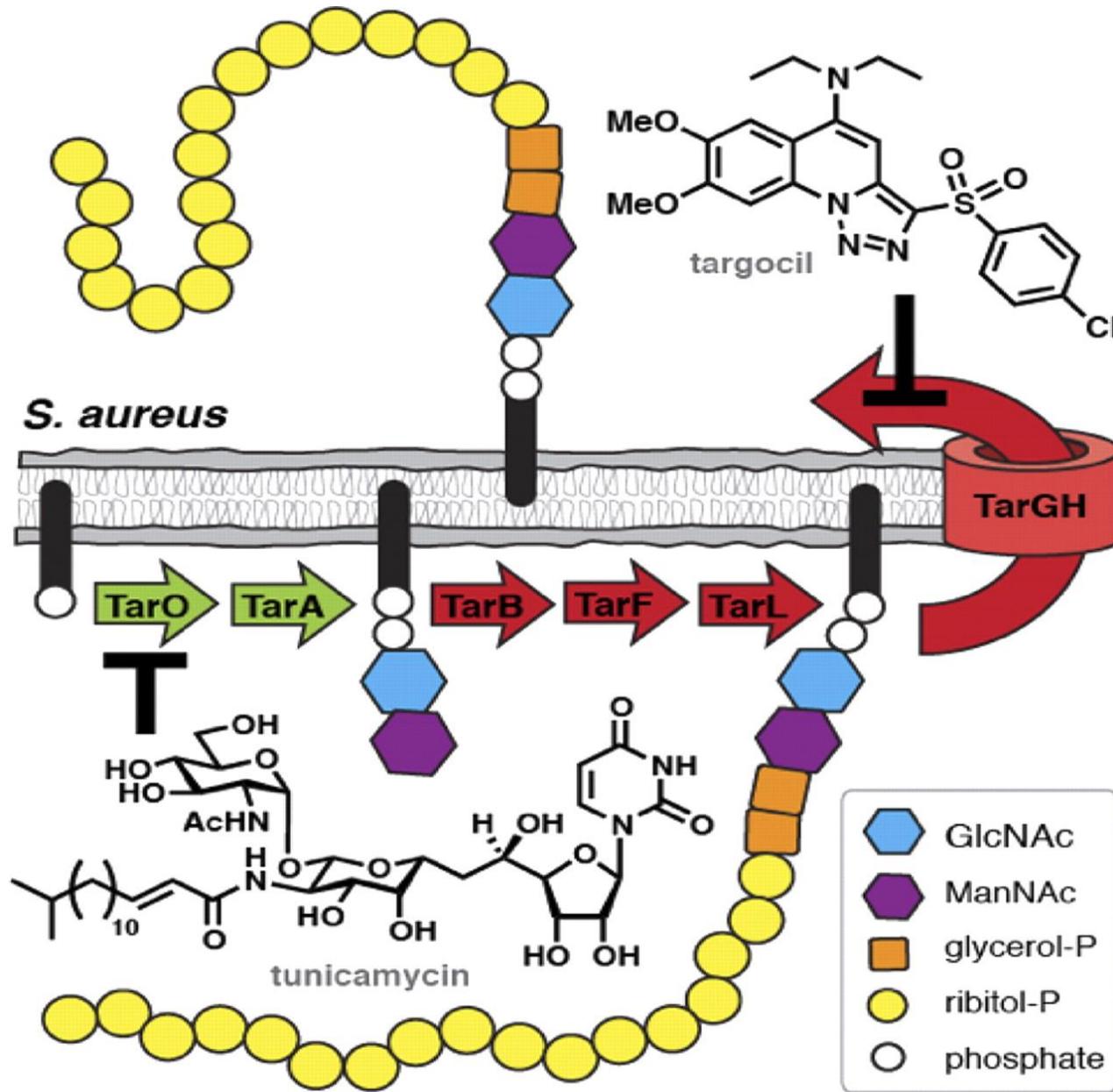
Gli acidi teicoci sono sintetizzati usando il carrier lipidico **bactoprenolo** e una serie di enzimi citoplasmatici associati alla membrana interna definiti Tar (Teicoic acid ribitol) che iniziano da TarO e TarA.

Il polimero viene successivamente traslocato attraverso la membrana interna da un trasportatore di tipo ABC costituito dalle proteine TarG e TarH ed infine legato al peptidoglicano della parete cellulare lasciando così libero il bactoprenolo che verrà riciclato.



Gli acidi teicoci sono sintetizzati usando il carrier lipidico **bactoprenolo** e una serie di enzimi citoplasmatici associati alla membrana interna definiti Tar (Teicoic acid ribitol) che iniziano da TarO e TarA. Il polimero viene successivamente traslocato attraverso la membrana interna da un trasportatore di tipo ABC costituito dalle proteine TarG e TarH ed infine legato al peptidoglicano della parete cellulare lasciando così libero il bactoprenolo che verrà riciclato

# Antibiotici che inibiscono la sintesi degli acidi teicoici ( WTA )



Simplified schematic of the *S. aureus* WTA biosynthetic pathway.

**Tunicamycin** inibisce TarO e **Targocil** inibisce la componente transmembrana TarG del trasportatore ABC (TarGH) responsabile del esportazione degli acidi teicoici Le frecce Verdi indicano che questi enzimi non sono essenziali per la vita della cellula. Le frecce rosse che sono essenziali

Un caratteristica particolare del pathway di biosintesi degli acidi teicoici è costituita dal fatto che non tutti i geni sono essenziali .

I primi due geni del pathway tarO e tarA non sono richiesti per la crescita in vitro ma i ceppi diventano non virulenti e hanno errori nella divisione cellulare. Quindi questi geni sono proposti come targets per farmaci di antivirulenza.

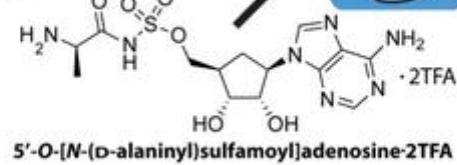
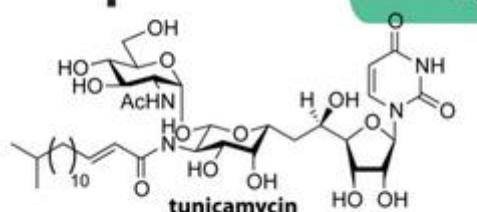
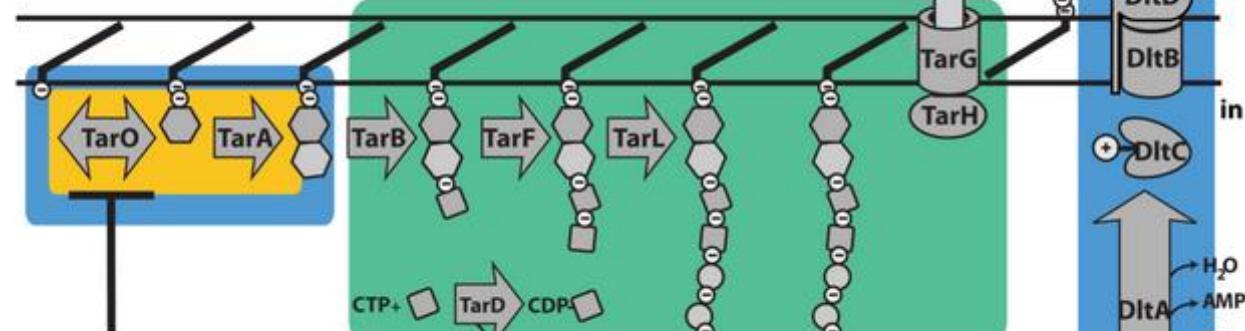
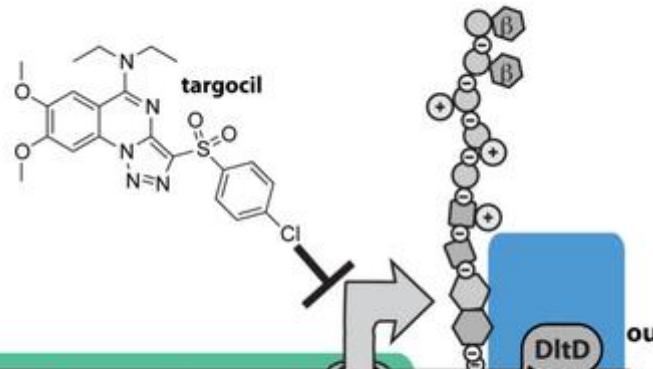
I geni finali del pathway sono invece essenzial in quanto la loro delezione provoca un accumulo di intermedi o il sequestro di molecole di bactoprenolo che dovrebbero servire anche per la sintesi ddel PG.

Pertanto tutti i geni coinvolti nelle fasi finali della biosintesi sono considerati nuovi target per gli antibiotici. Questi antibiotici determineranno la morte batterica a differenza di quelli di antivirulenza.

traditional antibiotic target  
(essential gene product)

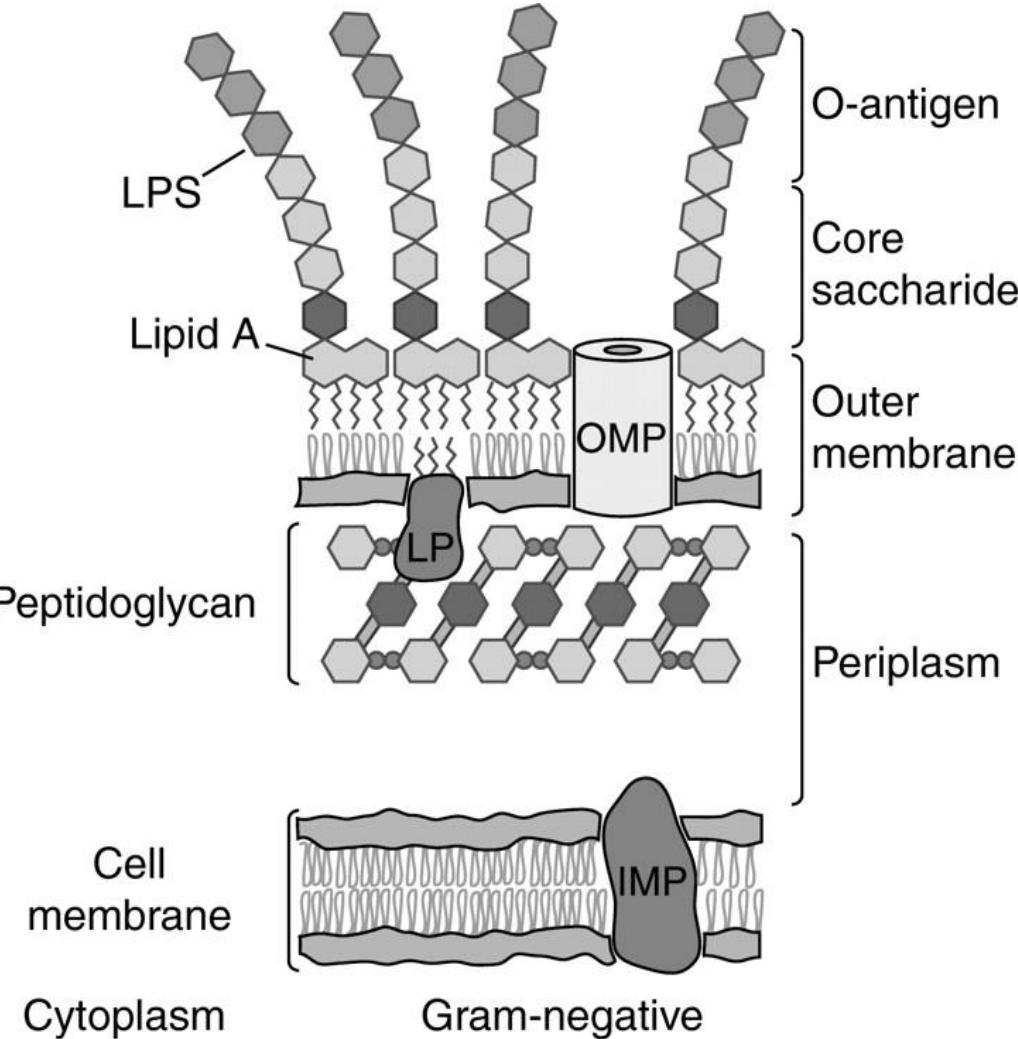
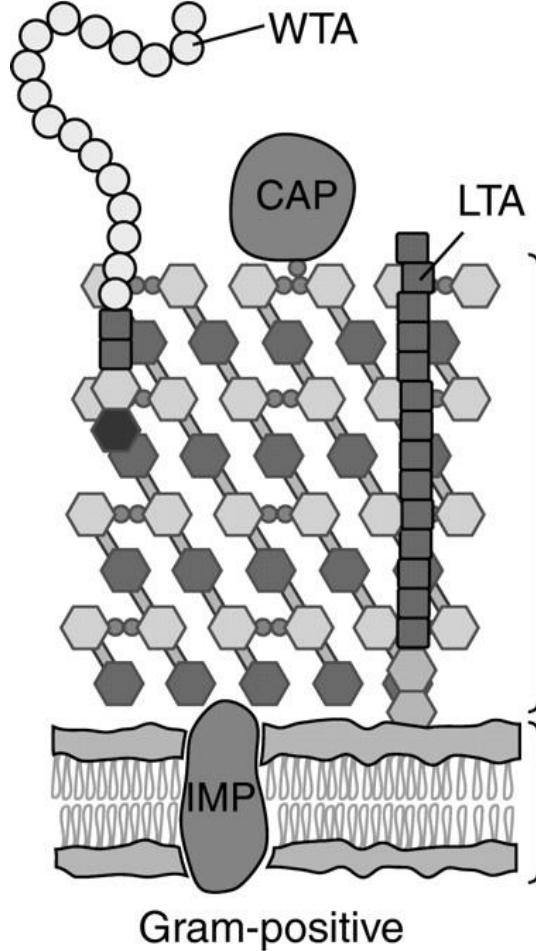
$\beta$ -lactam potentiator  
(non-essential gene product)

antivirulence target  
(non-essential gene product)



Undecaprenol  
⊖ Phosphate  
⊕ D-alanine  
GlcNAc  
ManNAc  
Glycerol  
Ribitol

**Depiction of Gram-positive and Gram-negative cell envelopes: CAP = covalently attached protein; IMP, integral membrane protein; LP, lipoprotein; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; OMP, outer membrane protein; WTA, wall teichoic acid.**



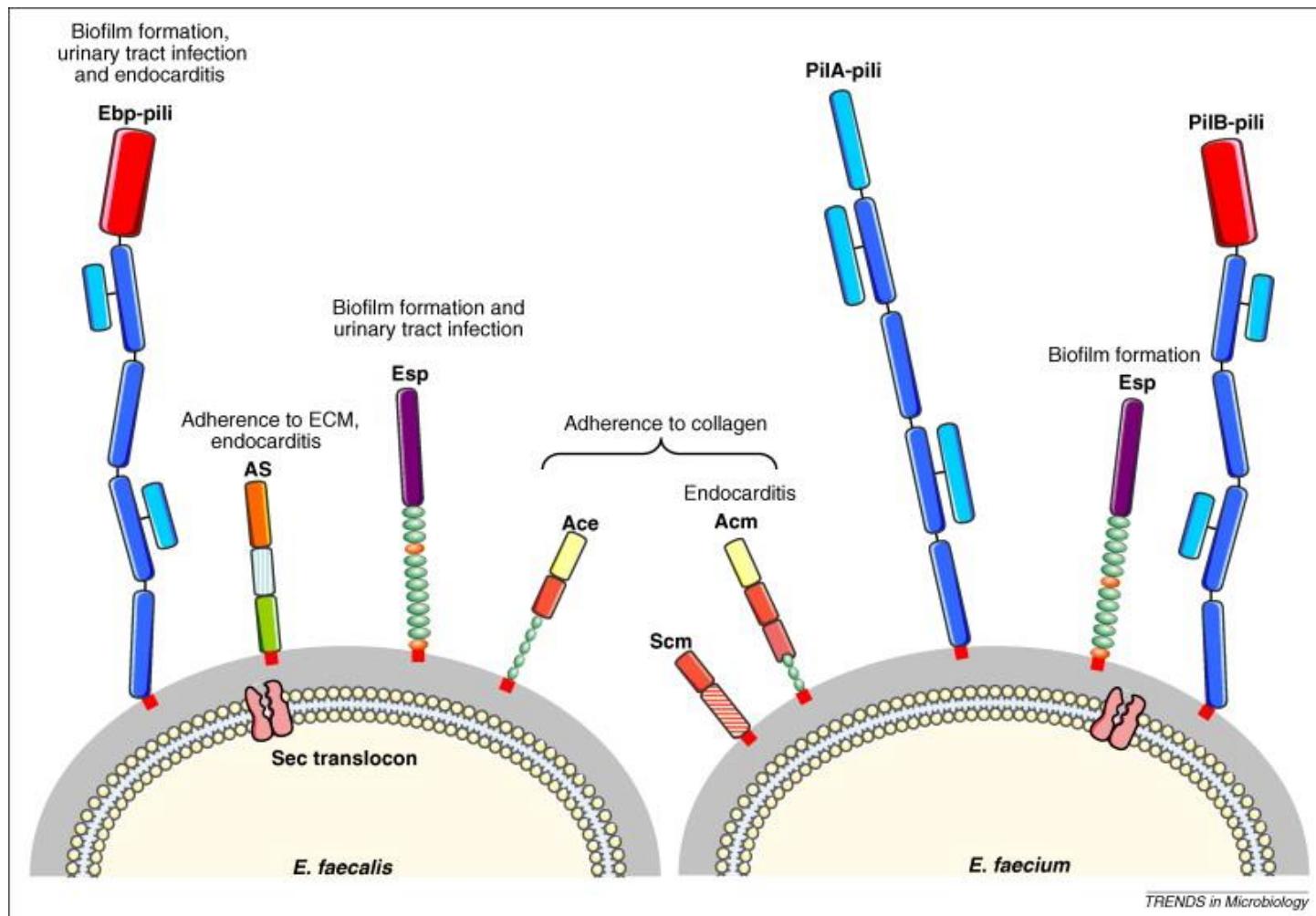
Nella parete dei Gram positivi sono presenti numerose proteine alcune delle quali hanno funzioni simili a quelle che si ritrovano nel periplasma dei Gram-.

Dal momento che non c'è la membrana esterna molte proteine contengono elementi che le mantengono dentro o a contatto con la IM.

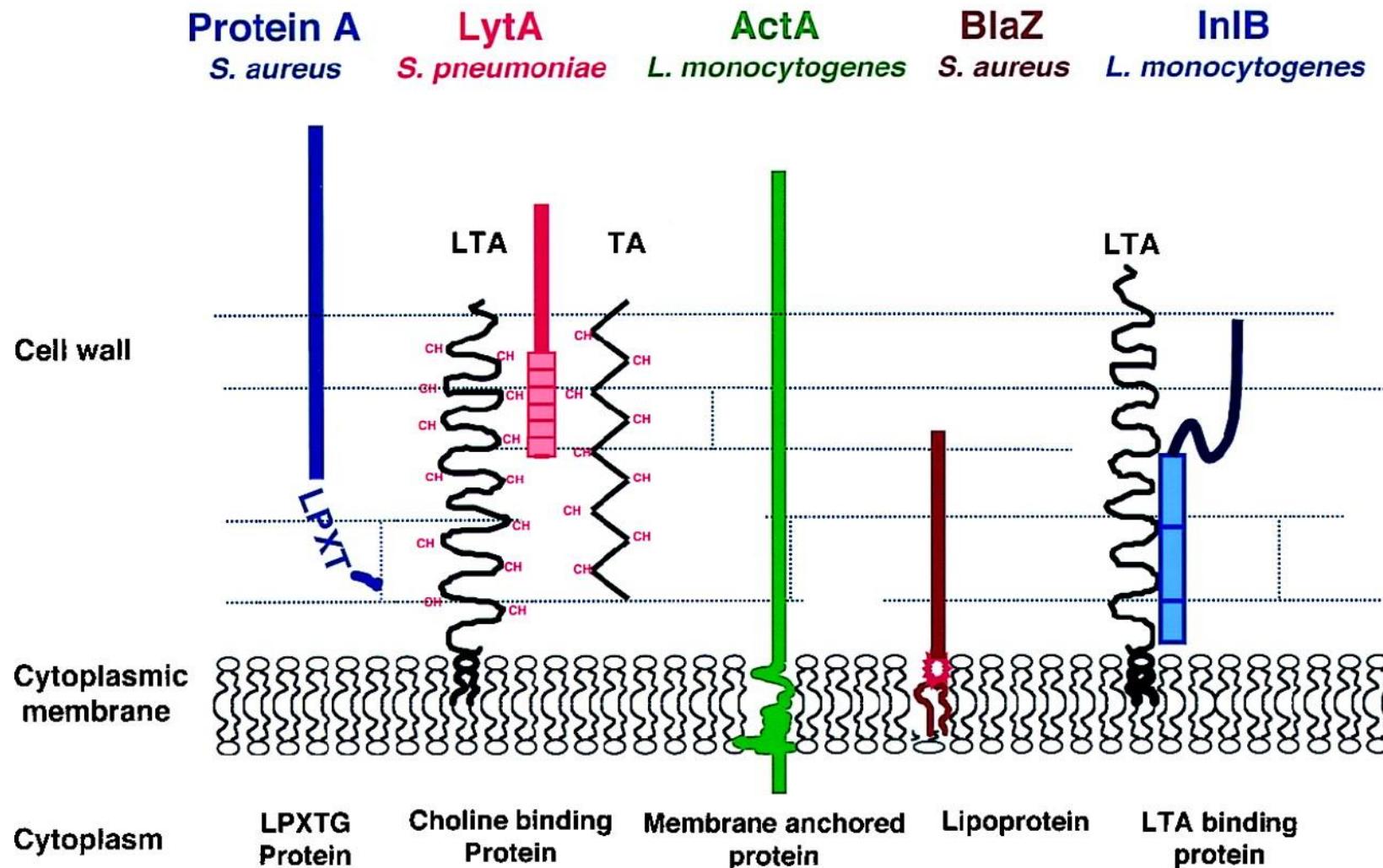
Altre proteine invece sono legate covalentemente al peptidoglicano. In alcuni casi vi sono proteine legate agli acidi teicoici

In *Streptococcus aureus* si è visto che circa 20 proteine sono il substrato della sortasi A quali adesine, recettori fagici, proteine coinvolte nei processi di evasione del sistema immunitario, nei processi di internalizzazione

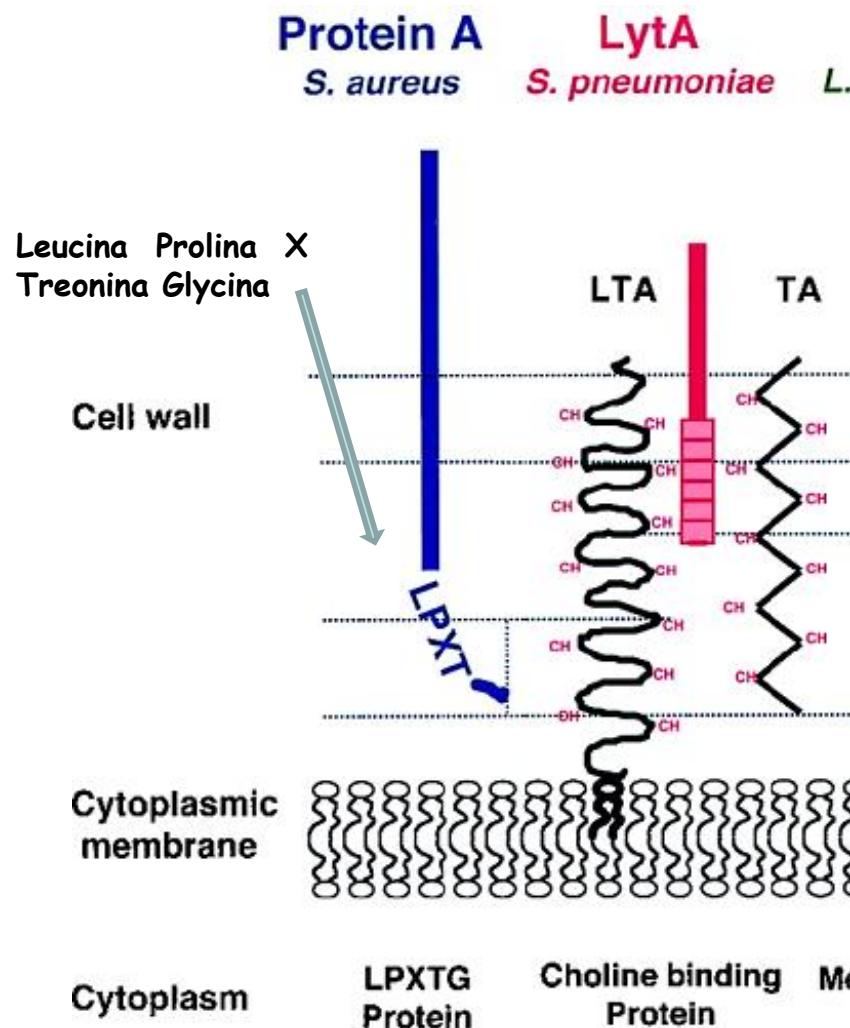
## Esempi delle funzioni svolte dalle proteine della parete dei batteri Gram+



## Vari tipi di proteine associate alla superficie dei Gram+



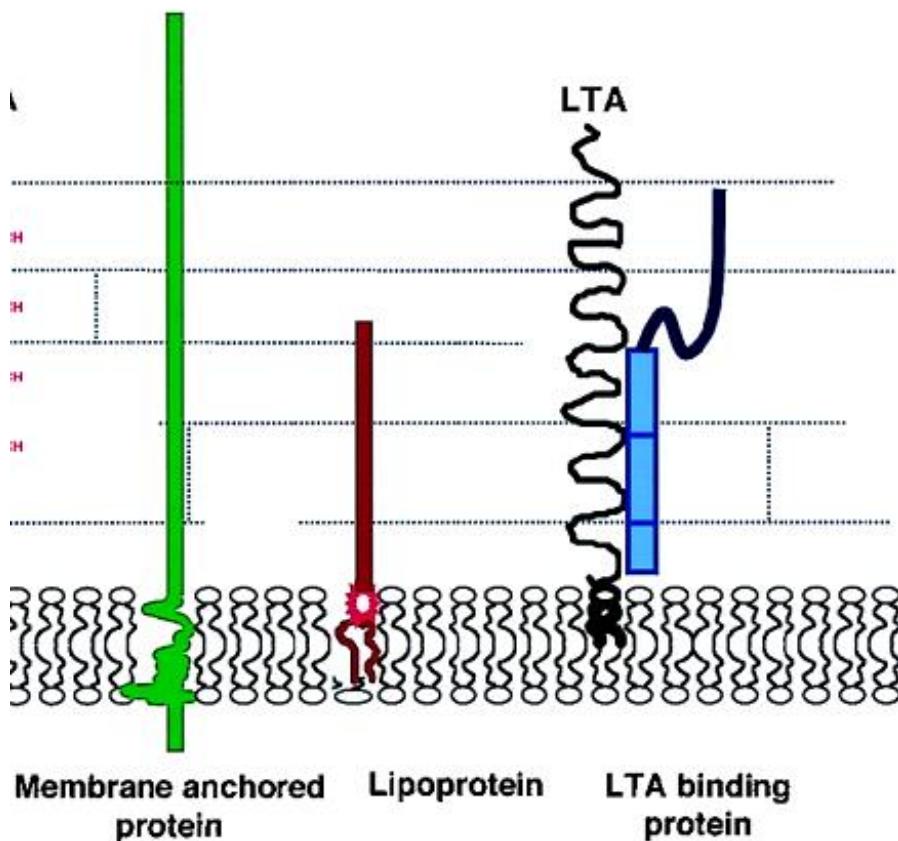
## Le proteine di superficie dei Gram+



1. Le proteine che contengono il motivo LPXTG come la proteina A di *Streptococcus aureus* sono le uniche proteine di superficie legate covalentemente alla parete cellulare ( definite anche CAP ( covalently associated proteins).

2. In altri casi la proteina può formare un legame diretto tramite ripetizioni di 20 AA con gli acidi teicoci (TA) o lipoteicoici (LTA) che contengono dei residui di colina come nel caso di *Streptococcus pneumoniae*

**ActA**      **BlaZ**      **InlB**  
*L. monocytogenes*    *S. aureus*    *L. monocytogenes*



3. la **proteina ActA** di *Listeria* è ancorata direttamente alla IM da una sequenza di AA idrofobici

4 .La **lipoproteina** in analogia alle lipoproteine dei Gram - è ancorata tramite una modificaione lipidica nella cisteina N -terminale ( dopo che è avvenuto il taglio da parte della Leader peptidasi).

3. Per la **proteina InlB** ed altre proteine di *Listeria* il legame agli acidi lipoteicoici (LTA) avviene direttamente tramite un motivo di 80 AA ripetuto in tandem nella porzione C-terminale della proteina.

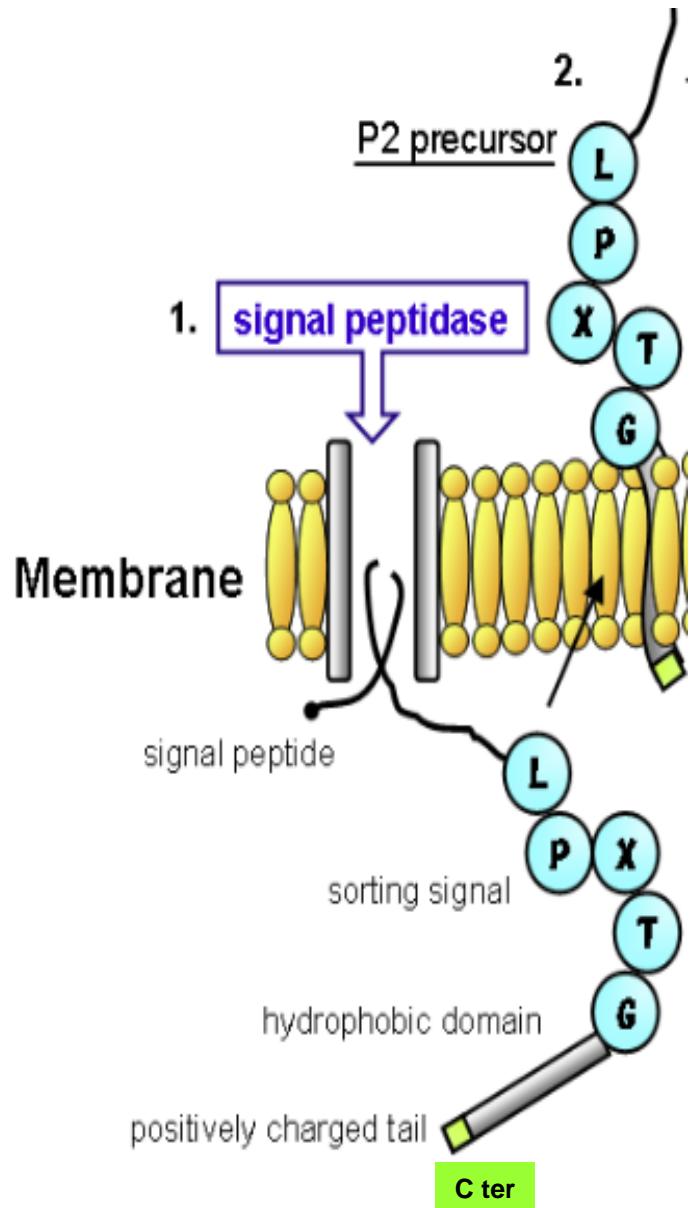
## La SORTASI nei Batteri Gram+

Sortasi è una proteina molto conservata nei batteri Gram+ è una proteina di 200 AA che contiene stabilmente un unico residuo cisteina nella porzione C terminale (C184).

Dotata di attività sia proteasica che transpeptidasica

Potrebbe essere un buon target visto che i mutanti difettivi nel gene per la sortasi risultano meno virulenti in *S. aureus* in quanto non riescono ad esportare correttamente proteine di virulenza.

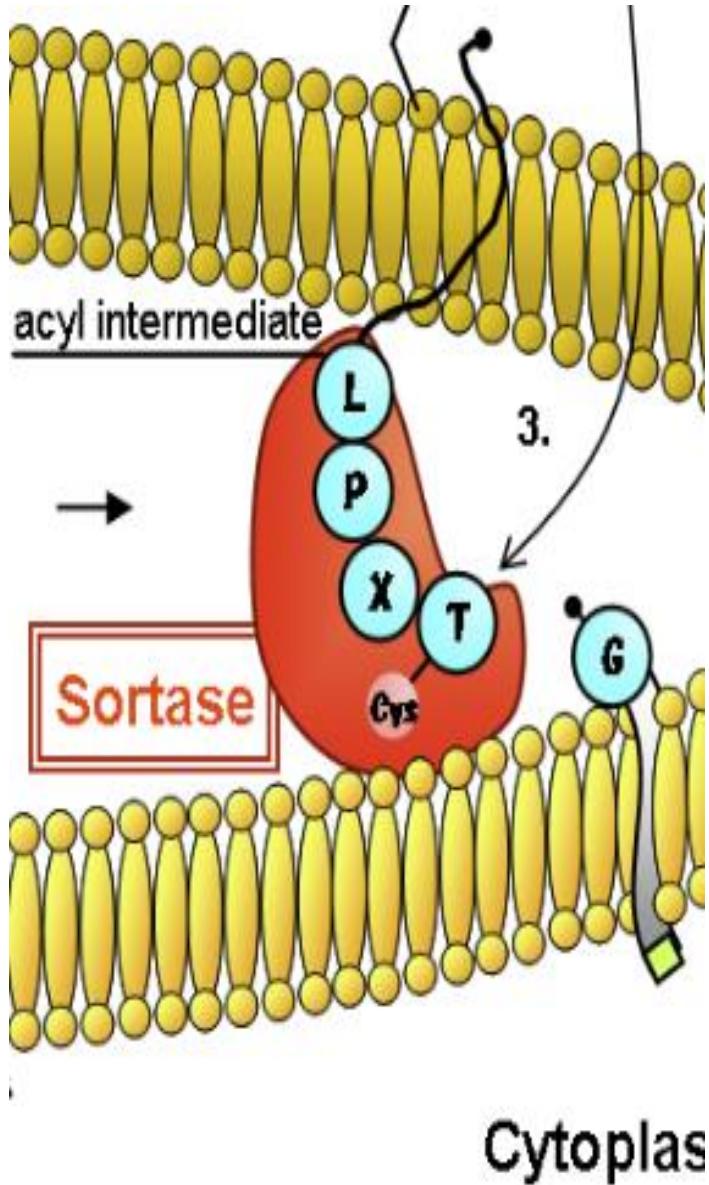
# Come vengono esportate le proteine nei Batteri Gram+?



La gran parte delle proteine esportate contiene la sequenza segnale ed è esportata dal citoplasma verso i compartimenti esterni grazie al sistema SEC

Le proteine contengono oltre alla sequenza segnale nella porzione N terminale anche un "sorting signal" costituito dalla sequenza **LPXTG** seguito da una regione idrofobica ed infine da una coda carica positivamente.

Una volta tagliata la sequenza segnale dalla Signal peptidasi (detta anche leader peptidasi) la proteina da esportare viene trattenuta nella IM dal dominio idrofobico e dalla coda carica positivamente.



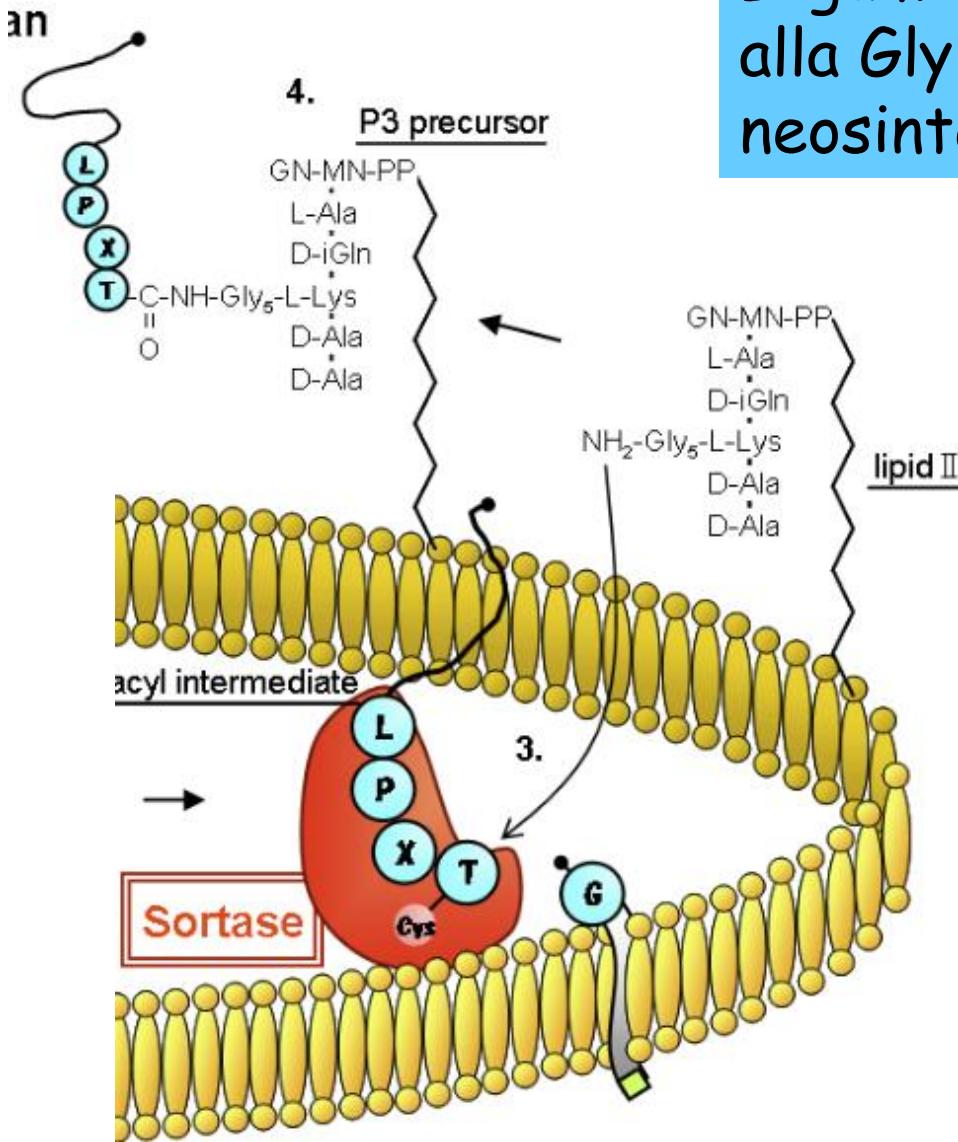
## Ruolo della SORTASI nell'esportazione delle proteine nei batteri Gram+

La proteina esportata subisce delle ulteriori modificazioni post traduzionali da parte della SORTASI, una transpeptidasi ancorata alla membrana interna contenente una cisteina nel proprio sito attivo.

La SORTASI riconosce il motivo LPXTG e taglia la proteina tra il residuo di treonina e quello di glicina (T G) e induce la formazione di un legame tioestere tra il proprio residuo di cisteina e la treonina carbossiterminale.

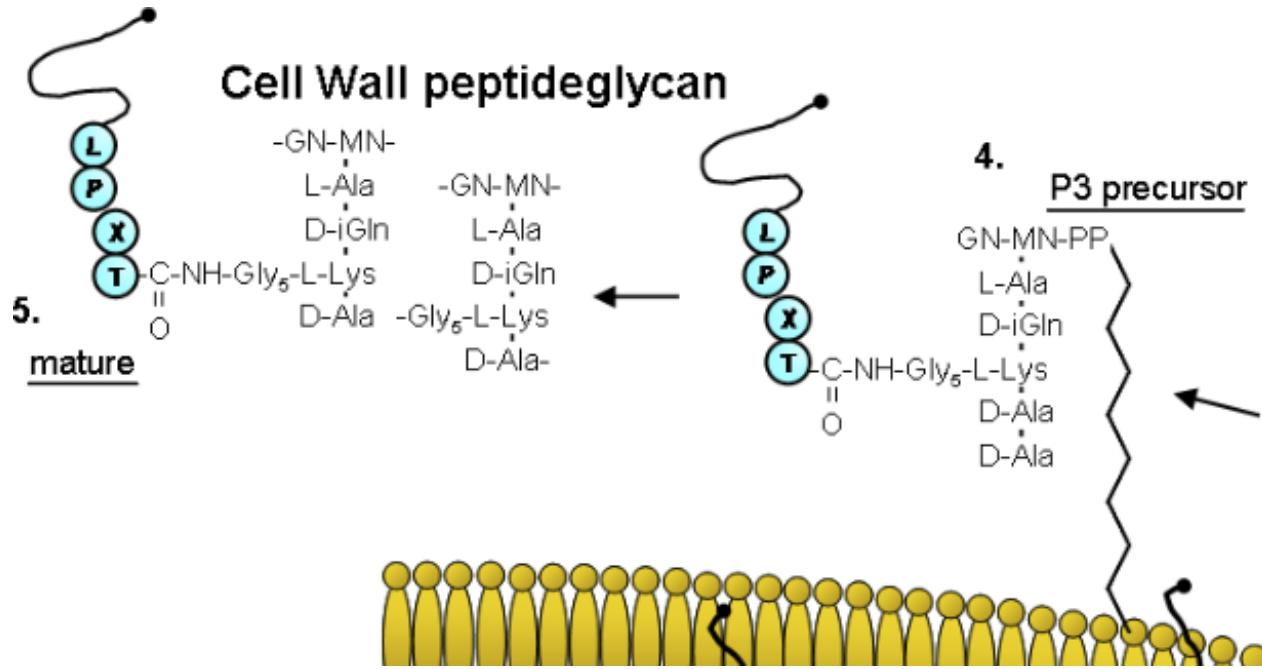
Leucina-Prolina-X-Treonina -Glicina

## Legame della proteina esportata alla Gly del peptidoglicano neosintetizzato

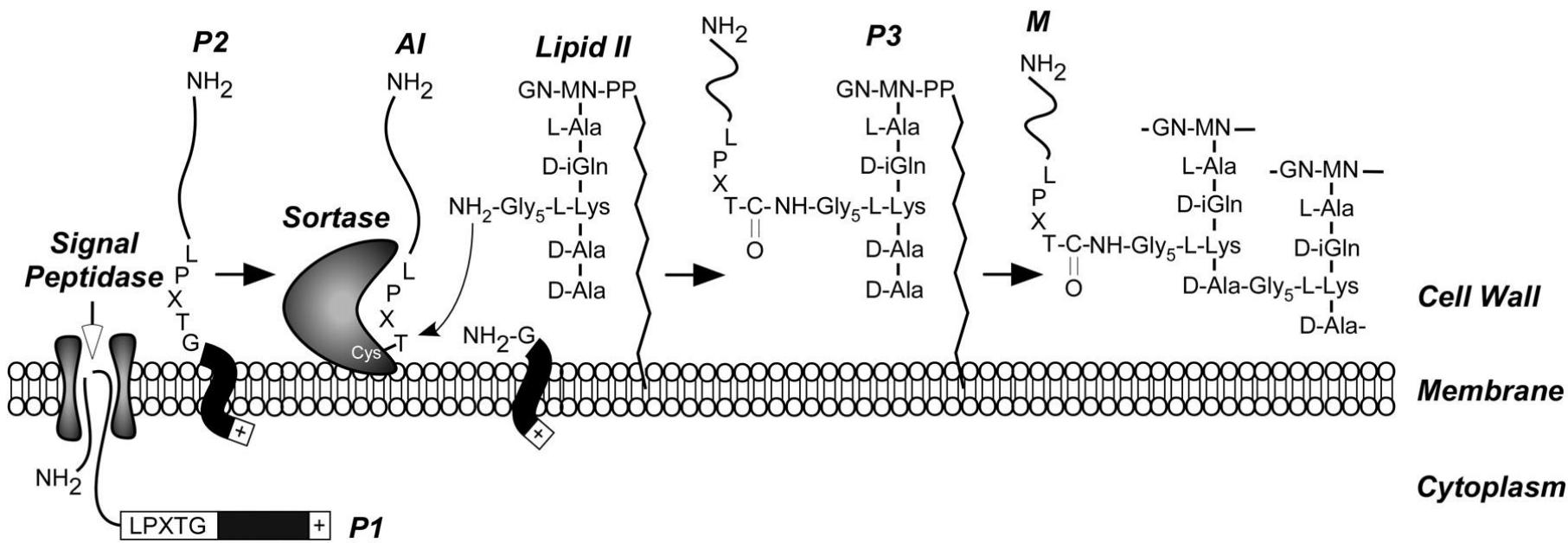


A questo punto la treonina posizionata al C terminale terminale forma un legame aminico con NH<sub>2</sub> terminale dell'ultimo residuo dell'interponte (costituito p.e. da 5 glicine) del Lipide II, l'intermedio della sintesi del peptidoglicano appena trasportato al di fuori della membrana.

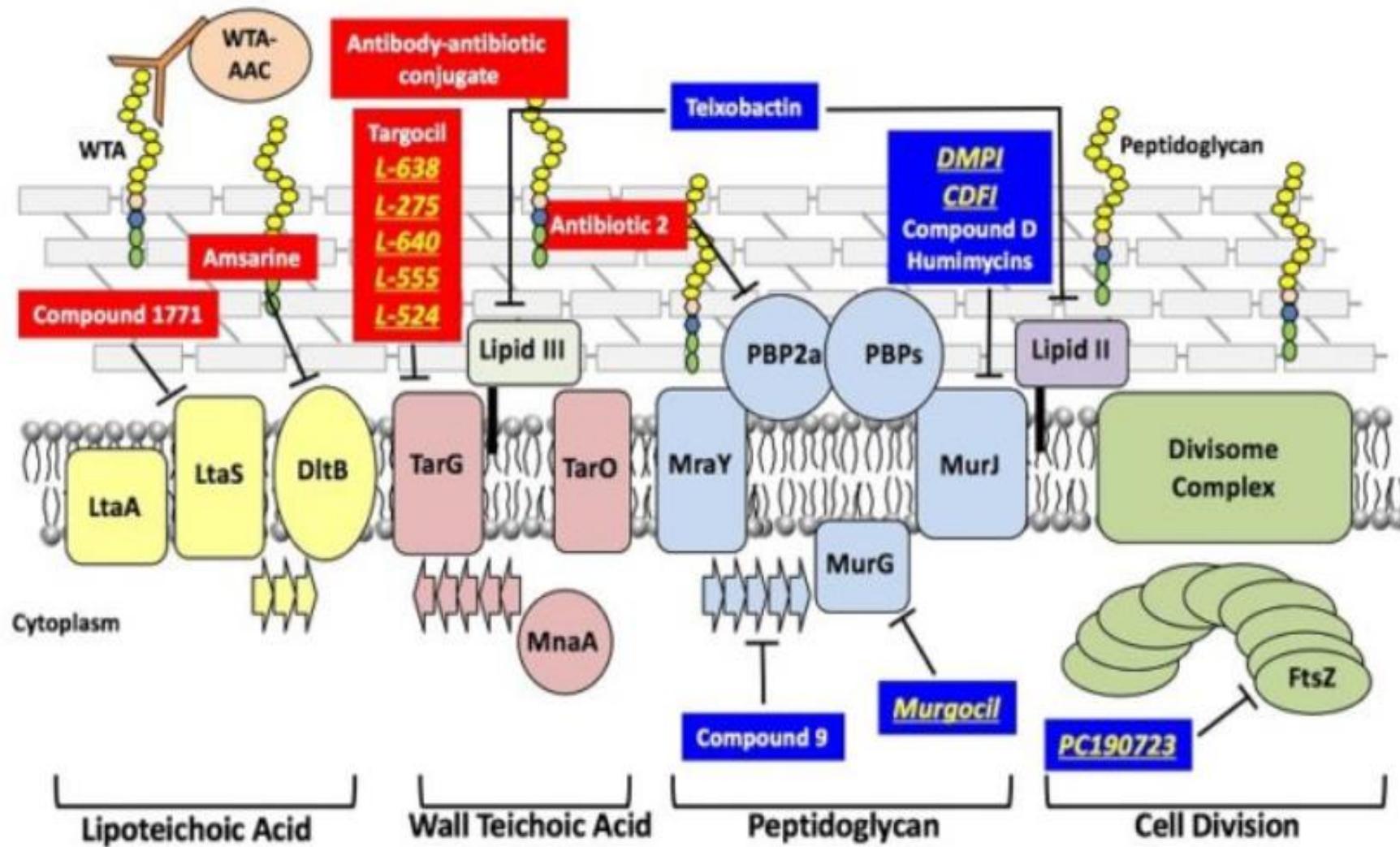
In questo modo si ristabilisce il legame **treonina - glicina** tagliato dalla SORTASI. La proteina si trova così ancorata al peptidoglicano tramite l'interponte.

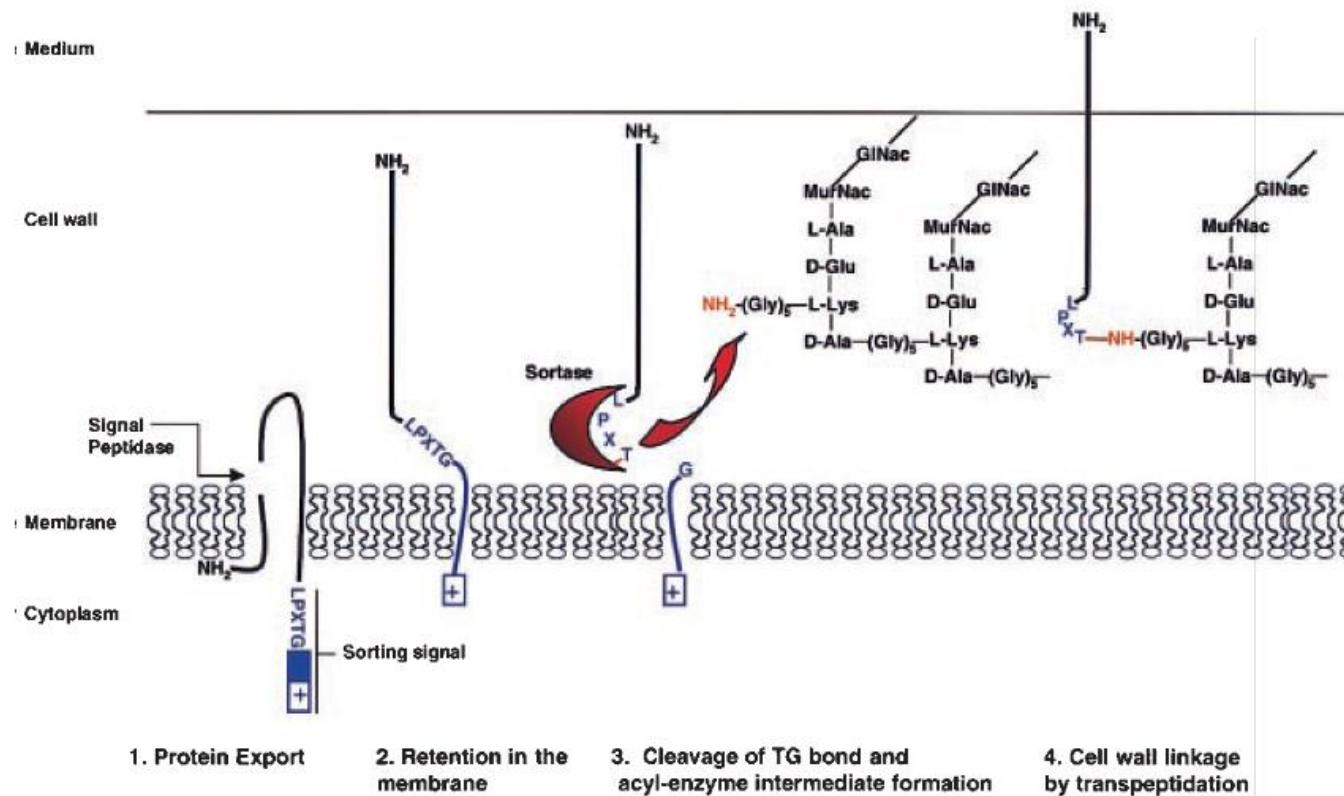


Le tappe finali sono costituite da una reazione di transglycosilazione che lega il precursore del peptidoglicano con la proteina già ancorata agli altri residui di NAM-NAG seguita poi dalla reazione di transpepididazione con perdita di alanina terminale.

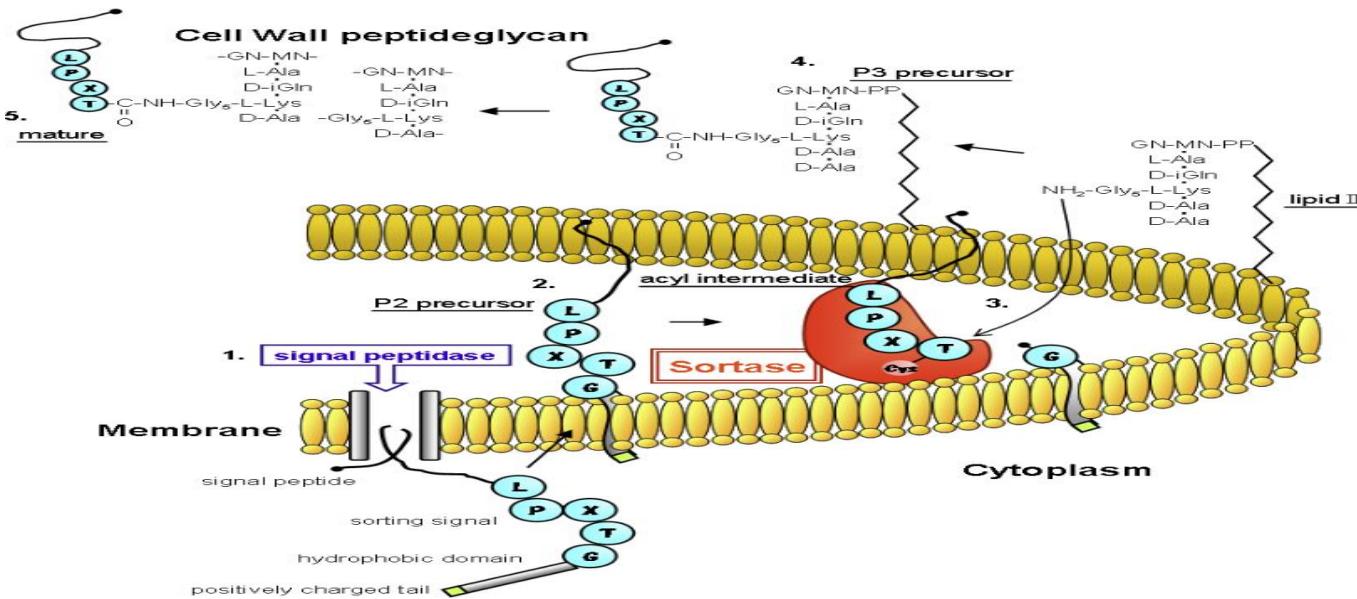


# Nuovi bersagli per gli antibiotici: gli enzimi coinvolti nella sintesi dei componenti della parete





**Fig. 1.** Surface protein anchoring in *Staphylococcus aureus*. (i) Export. Precursor proteins with an N-terminal signal peptide are initiated into the secretory (Sec) pathway, and the signal peptide is removed. (ii) Retention. The C-terminal sorting signal retains polypeptides within the secretory pathway. (iii) Cleavage. Sortase cleaves between the threonine and the glycine of the LPXTG motif, resulting in the formation of a thioester enzyme intermediate. (iv) Linkage. Nucleophilic attack of the free amino group of lipid II at the thioester bond resolves the acyl-enzyme intermediate, synthesizing the amide bond between surface proteins and the pentaglycine cross-bridge and regenerating the active-site sulphhydryl. (v) Cell wall incorporation. Lipid-linked surface protein is first incorporated into the cell wall via the transglycosylation reaction. The murein pentapeptide subunit with attached surface protein is then cross-linked to other cell wall peptides, generating the mature murein tetrapeptide.



Cell wall sorting pathway of surface proteins in gram-positive bacteria. Surface proteins are first synthesized in the bacterial cytoplasm as full-length precursors (P1) containing an N-terminal signal sequence and a C-terminal sorting signal. The signal sequence directs the cellular export of the polypeptide through the Sec system and, upon translocation, is cleaved by signal peptidase. The product of this reaction, the P2 precursor harboring only the C-terminal sorting signal, is retained within the secretory pathway via its C-terminal hydrophobic domain (black box) and positively charged tail (+). Sortase, a membrane-anchored transpeptidase with active-site cysteine, cleaves the peptide bond between the threonine (T) and the glycine (G) of the LPXTG motif, generating an acyl intermediate (AI). Lipid II, the peptidoglycan biosynthesis precursor, and its pentaglycine cross bridge ( $\text{Gly}_5$ ) amino group attack the acyl intermediate, linking the C-terminal threonine of the surface protein to lipid II (P3 precursor) and regenerating the active site of sortase. The P3 precursor functions as a substrate for penicillin binding proteins and is incorporated into the cell wall envelope to generate mature anchored surface protein (M), which is also displayed on the bacterial surface. This pathway is universal in many gram-positive bacteria, and the functional elements of cell wall cross bridges, LPXTG motif, sortase, and penicillin binding proteins are conserved.