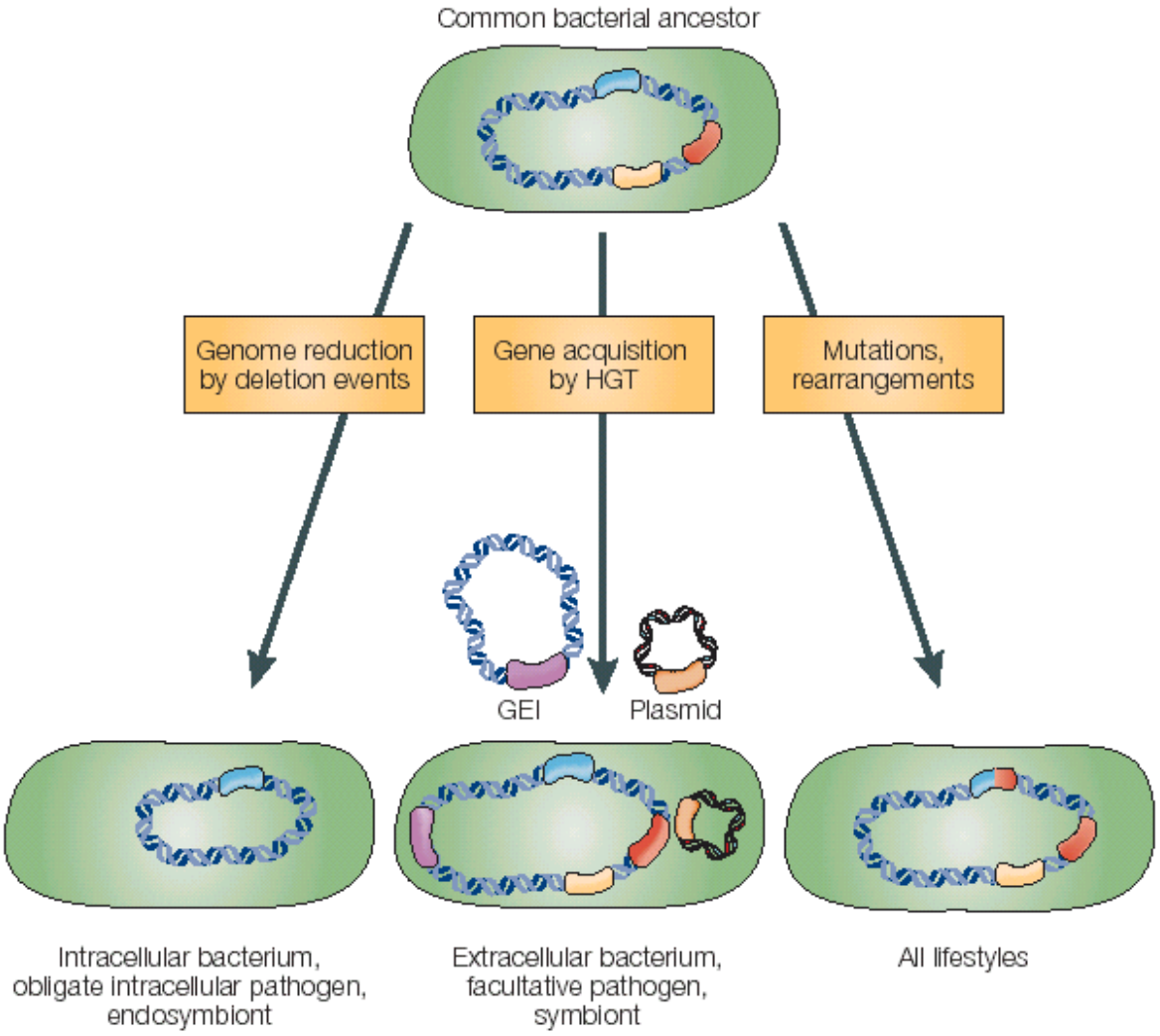
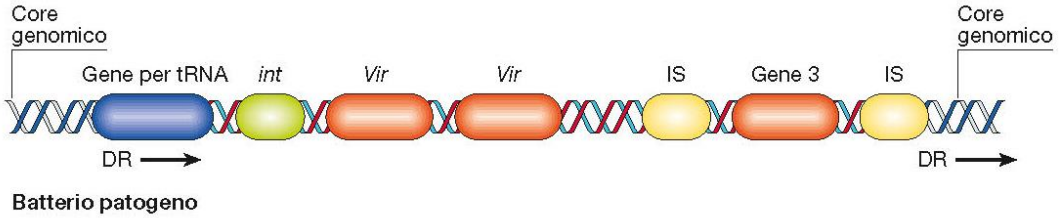
Come evolve un batterio verso la patogenicità



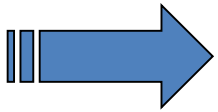
Le Isole di Patogenicità: né fagi, né trasposoni né plasmidi



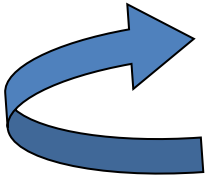
- Contengono uno o più geni di virulenza
- Sono presenti solo nei ceppi patogeni
- Sono di grandi dimensioni 10-200 kb
- Hanno un diverso contenuto in G+C (recente HTG)
- Sono spesso inserite in geni per tRNA
- Sono fiancheggiate da sequenze di DNA direttamente ripetute (DR)
- Sono associate a elementi genetici mobili

Evoluzione e dimensioni del genoma

Aumento del contenuto di DNA e selezione di funzioni geniche



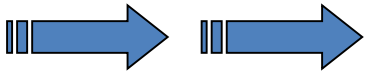
HGT
(trasferimento genico orizzontale)



Duplicazione genica

Rimozione di segmenti di DNA tramite riarrangiamenti genetici

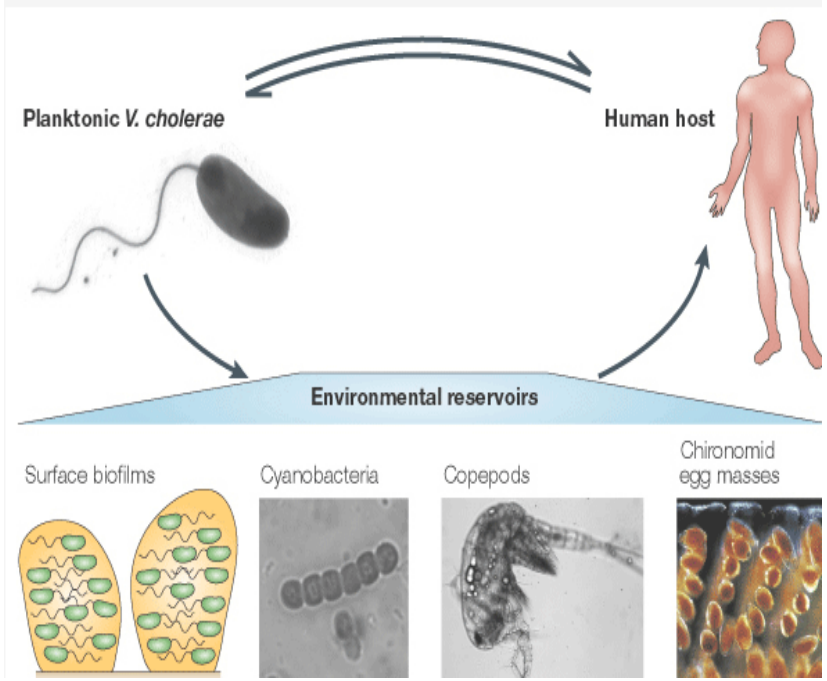
Perdita di geni tramite ampie delezioni



Inattivazione genica e successiva erosione genica o delezione

L'evoluzione di *Vibrio cholerae*: dall'ambiente all'uomo.

Dove vive il vibrione?



Dal 1817 si sono verificate 7 pandemie. Le prime sei determinate da *Vibrio cholerae* O1 sono durate ognuna da 5 a 25 anni.
nel 1961 è comparsa la 7° pandemia causata da una variante di *V. cholerae* 01 detta El Tor.

Epidemia attuale causata da un sierotipo non O1 ma O139

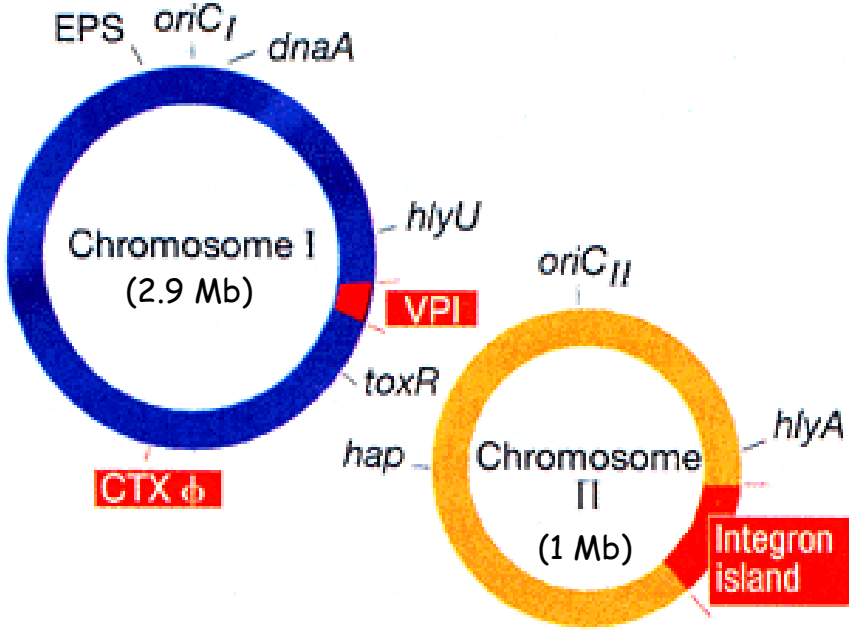
La comparsa di un nuovo sierotipo evidenza in modo chiaro la rapida evoluzione di *Vibrio cholerae* che grazie a questo nuovo sierotipo riesce ad evadere l'immunità presente nella popolazione.

La capacità di *Vibrio cholerae* di provocare la malattia dipende essenzialmente dall'espressione di due fattori di virulenza :

- la tossina CT una potente enterotossina localizzata sul fago CTX

- il pilo TCP definito "Toxin Coregulated Pilum" pilo coregolato con la tossina localizzati sull'PAI VP1

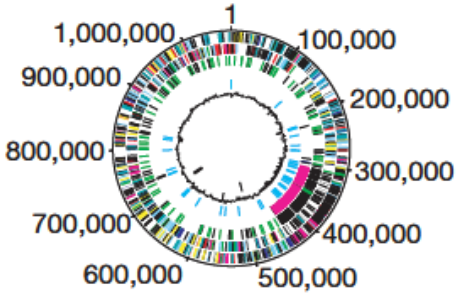
Vibrio cholerae: il genoma

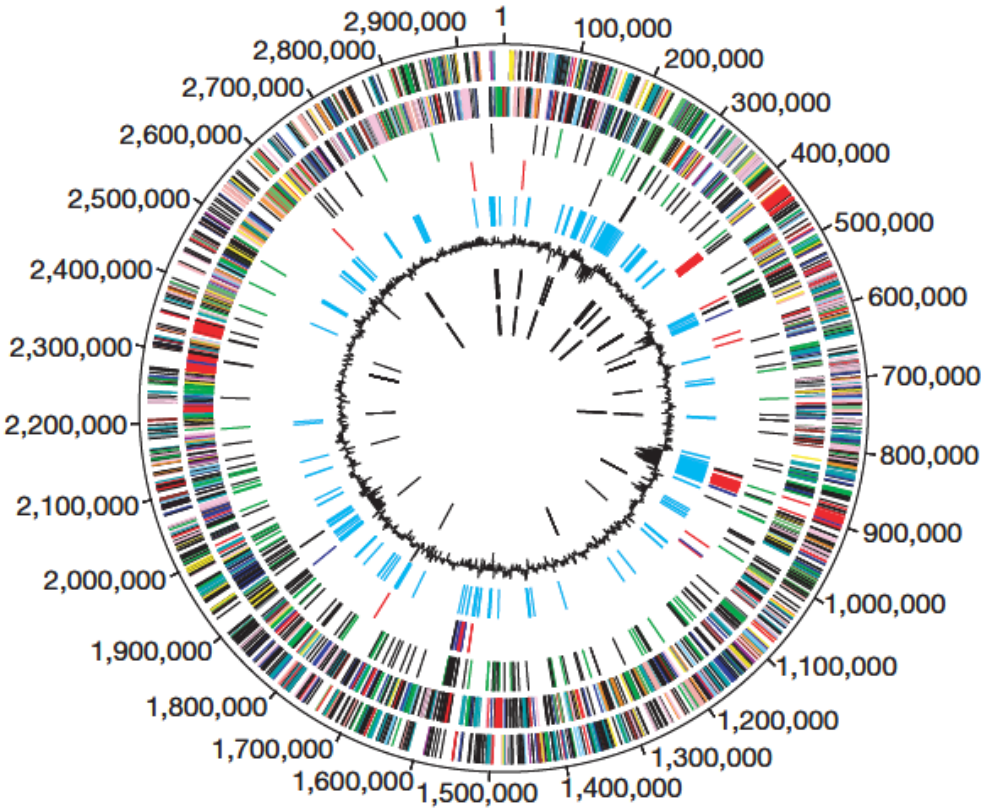


Isole di patogenicità, fagi ed integroni contribuiscono alla virulenza

1Mb = 1.000000 bp

Il genoma di Vibrio cholerae





2 cromosomi circolari di 2.961 kb e 1.072 kb con un contenuto simile in GC (47%).
Totale di 3880 ORF (2770 e 1110)

Sul 3° cerchio presenti duplicazioni geniche sul medesimo cromosoma (nero) o sull'altro cromosoma (verde)

Sul 4° cerchio elementi trasponibili (nero) geni di virulenza(rosso), in rosa la regione VCR.

Sul 6° cerchio % CG in rapporto alla media

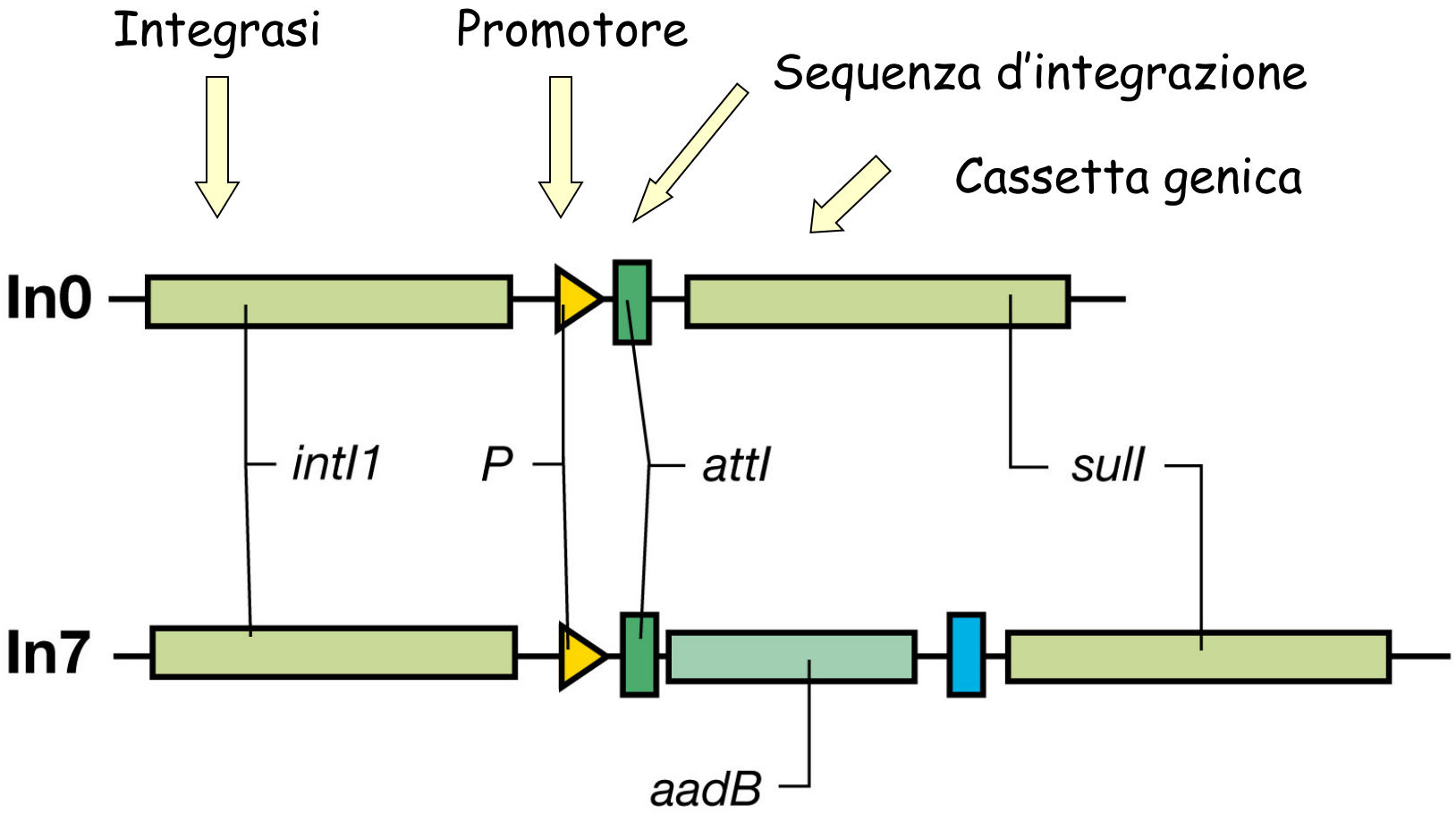
Sul Chr 1 sono localizzati la maggior parte dei geni essenziali per le funzioni cellulari - replicazione del DNA ,trascrizione , traduzione, biosintesi della parete e patogenicità (antigeni, adesine, tossine).

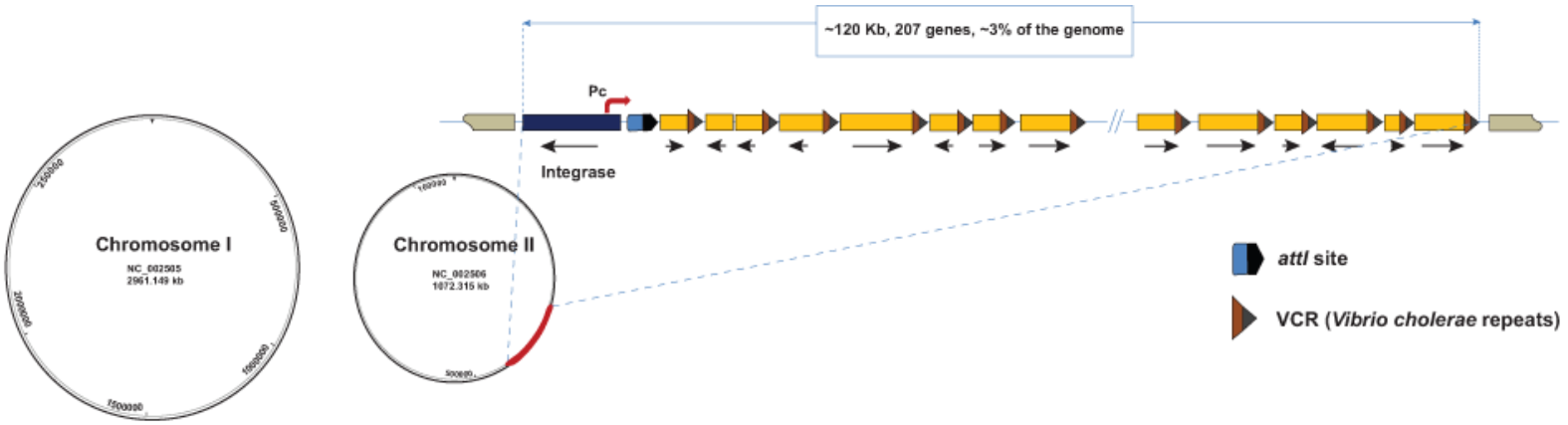
Sul Chr 2 sono presenti 59% geni a funzione sconosciuta rispetto a Chr1 (40%) e molti geni di recente acquisizione.

Sul Chr 2 è presente un'ampia regione con una struttura di tipo integrone di 125kb che contiene molte copie di sequenze ripetute ed una notevole quantità di ORF, molte non ancora identificate.

Molto alto è il numero di duplicazione geniche molte delle quali correlate a geni per il trasporto di sostanze o per la chemiotassi che indicano l'importanza che possano avere queste proteine nei diversi habitat che incontra *V. cholerae*. Anche il profago che contiene il gene per la tossina colerica può essere presente in più di una copia (talvolta anche presente sul Chr2)

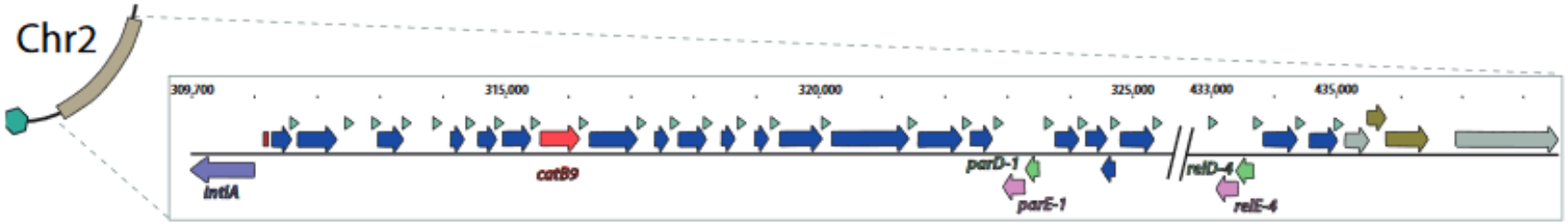
Struttura degli integroni





Vibrio cholerae repeats sono sequenze ripetute che fiancheggiano geni diversi organizzati in un grande integrone

Struttura della regione VCR sul cromosoma 2



Il Cromosoma 2 contiene un largo gruppo di Intergenic Repeated sequences(VCR) che fiancheggiano gruppi di geni estremamente variabili. Questa struttura viene definita superintegrone perché contine un integrasi , e la classica struttura di base di un integrone pur avendo dimensioni di oltre 100Kb.
All'interno si trovano geni di antibiotico resistenza, sistemi toxin/antitoxin, regolatori della trascrizione e molti geni a funzione ancora sconosciuta.

Gli integroni sono strutture genetiche mobili costituiti da una regione costante (Promotore, integrasi e sito di integrazione) e da una regione variabile in grado di codificare diverse funzioni tra le quali l'antibiotico-resistenza

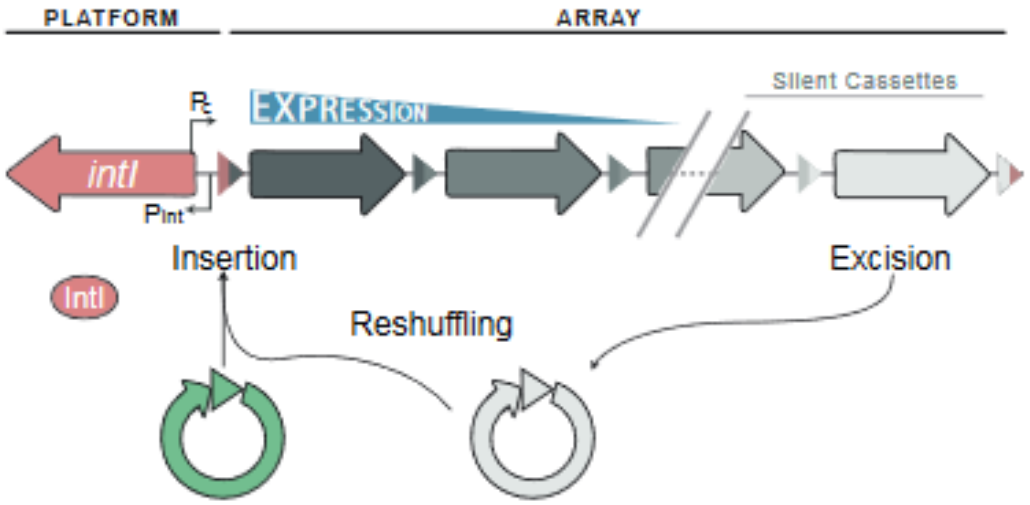


Fig. 3. Diagram of the integron. Genes are represented by arrows and recombination sites as triangles. The *intI* gene encodes the integrase that governs cassette insertion and excision. Coupling of both reactions reshuffles cassette order. Cassettes are expressed from the Pc promoter in the integron platform. Multiple insertion events lead to the stockpiling of cassettes, constituting a memory of adaptive functions. Expression of cassettes is weaker when located far from the PC. Integrases are expressed from the Pint when the SOS response is triggered and can reshuffle cassettes, changing their expression levels.

Gli integroni mantengono memoria di funzioni adattative e permettono al batterio di adattarsi rapidamente alle variazioni ambientali.

Come?

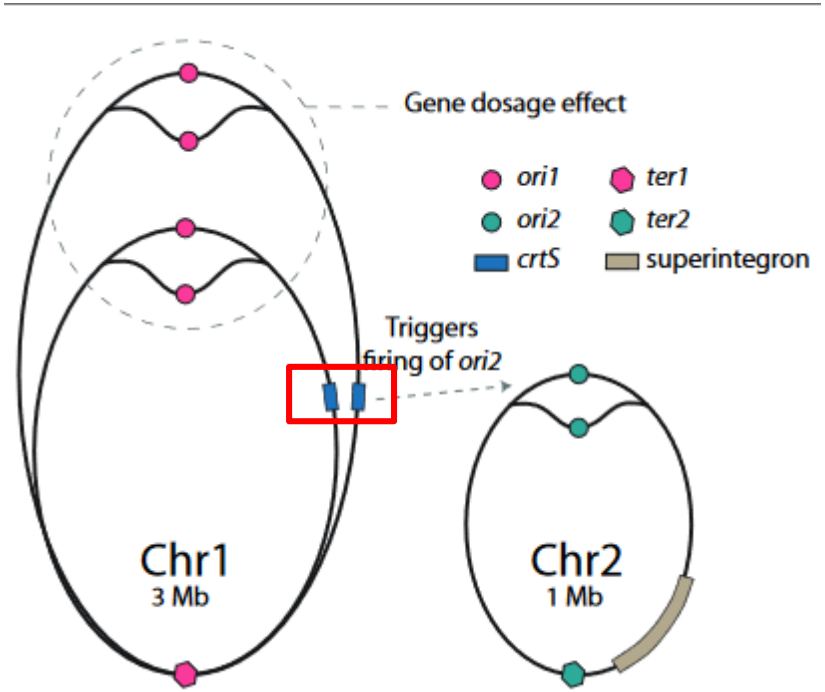
A partire dal Pc (promotore) si stabilisce un gradiente di espressione mettendo le funzioni che sono state acquisite inizialmente lontane dal promotore al punto da diventare silenti.
In condizioni di stress le cassette possono excidersi perché il promotore dell'integrasi è sotto controllo del sistema SOS e possono quindi reinserirsi in posizioni promotore prossimali ed essere espresse.

Coordinamento della replicazione dei 2 cromosomi in *Vibrio cholerae*

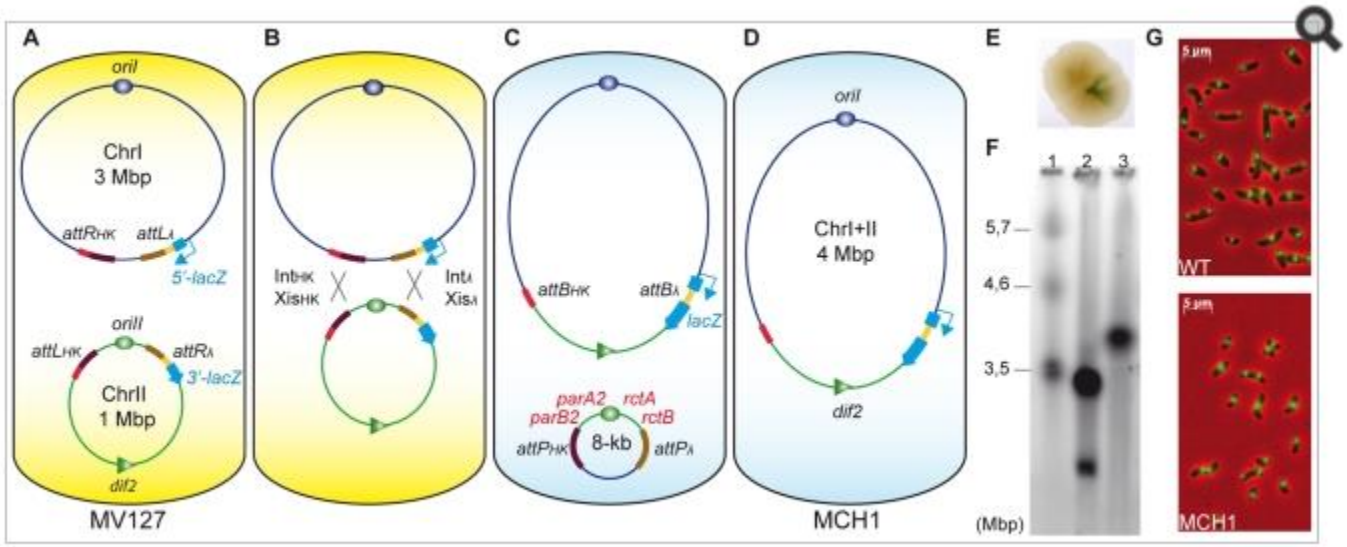
One of the important differences between plasmids and chromosomes is that the latter replicate during a defined period of the cell cycle, ensuring a single round of replication per cell.

Vibrio cholerae carries two circular chromosomes, Chr1 and Chr2, which are replicated in a well-orchestrated manner with the cell cycle and coordinated in such a way that replication termination occurs at the same time.

Initiation of Chr2 replication is triggered by the replication of a 150-bp locus positioned on Chr1, called **crtS**. This crtS replication-mediated Chr2 replication initiation mechanism explains how the two chromosomes communicate to coordinate their replication.



Un esempio Vibro cholerae



A mono-chromosomal *V. cholerae* model, MCH1.

A. *V. cholerae* MV127 strain with *attR/L* sites from λ and HK022 phages inserted at precise loci. Recombination sites [$attR_{HK}$ and $attL_{\lambda}$] replaced *dif1* on chrI and [$attL_{HK}$ and $attR_{\lambda}$] flanked [*parAB2-oriII-rctAB*] on chrII. B. Recombination [$attR_{\lambda}$×$attL_{\lambda}$] and [$attR_{HK}$×$attL_{HK}$] mediated by the expression of Int_{λ}+Xis_{λ} and Int_{HK}+Xis_{HK}. C. Recombination events [$attR_{\lambda}$×$attL_{\lambda}$] regenerate *lacZ*, allowing for phenotypic detection of rearranged chromosomes. D. Without selection, the 8 kb excised molecule (carrying a kanamycin resistance gene) was lost. E. Blue sector appearing within single conjugant on X-Gal supplemented LB-agar plates indicates recombination events between [$attR_{\lambda}$×$attL_{\lambda}$]. F. Ethidium bromide stained PFGE of genomic DNA: Lane 1, *S. pombe* marker (BioRad) ; Lane 2, WT (N16961) ; Lane 3, MCH1. G. Microscopic observation of WT (top panel) versus MCH1 (bottom panel). Nucleoids of exponentially growing cells stained with DAPI (green) merged with phase-contrast images (red).

Come altri batteri patogeni anche *V. cholerae* si pensa esista da prima della comparsa dell'uomo.

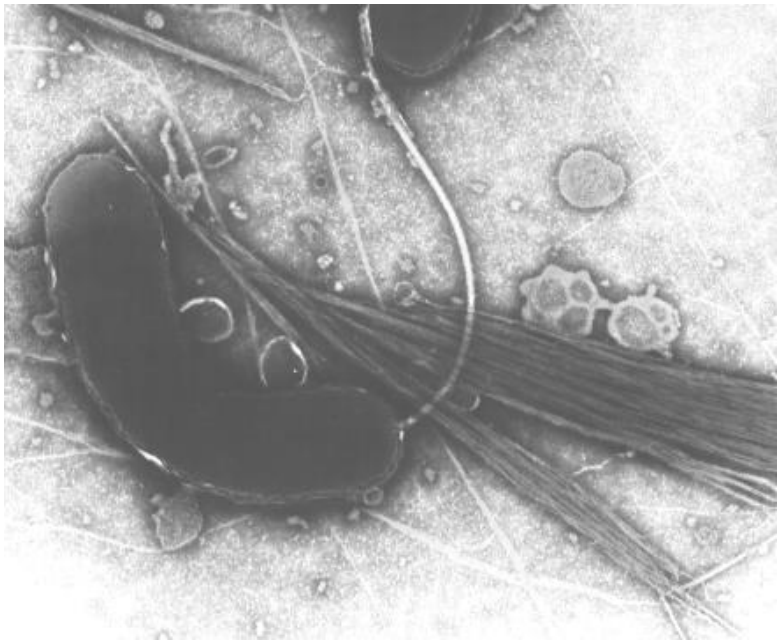
I cloni patogeni si sono quindi evoluti da forme acquatiche in seguito ad una progressiva acquisizione di informazione genetica

Questa ipotesi sostenuta dalla ampia presenza di specie di *Vibrio* nella flora acquatica mentre soltanto alcuni ceppi mostrano determinanti di virulenza.

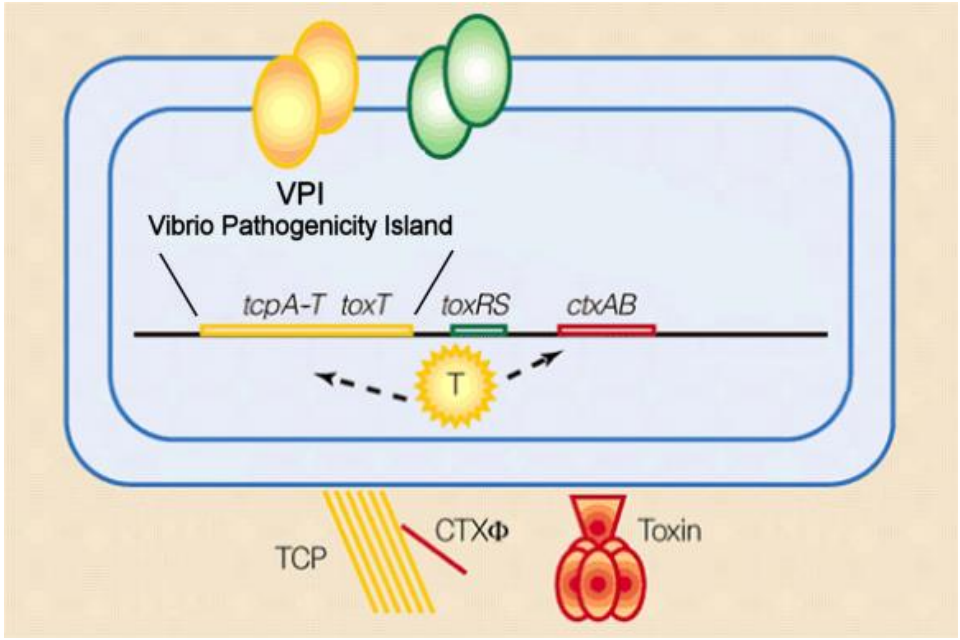
L'analisi comparativa tra ceppi virulenti e non virulenti ha messo in evidenza

un'ampia isola di patogenicità di 40 kb fiancheggiata da 2 siti att-like di 20 bp contenete i geni per l'integrasi ed una trasposasi.

Tutto inizia con l'acquisizione dell' Isola di Patogenicità VPI

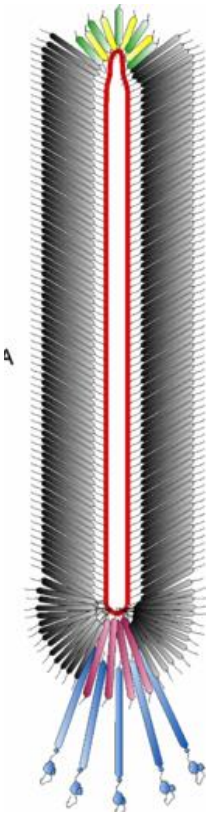


VPI (40 kb) contiene i geni per la sintesi del pilo TCP, struttura filamentosa importante nell'ambiente acquatico per ottimizzare l'adesione del batterio alla chitina dei copepodi …



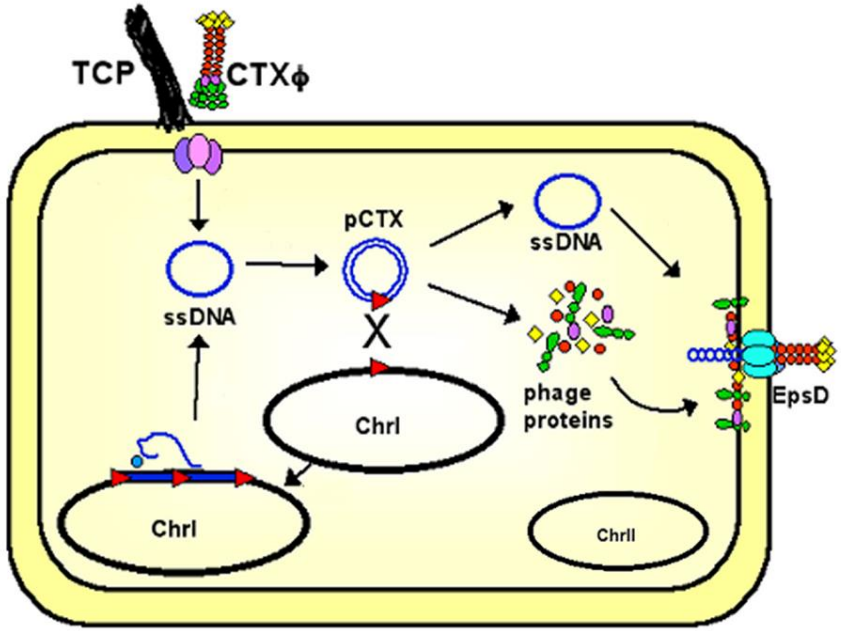
… ma …

…il pilo TCP è recettore del fago CTX

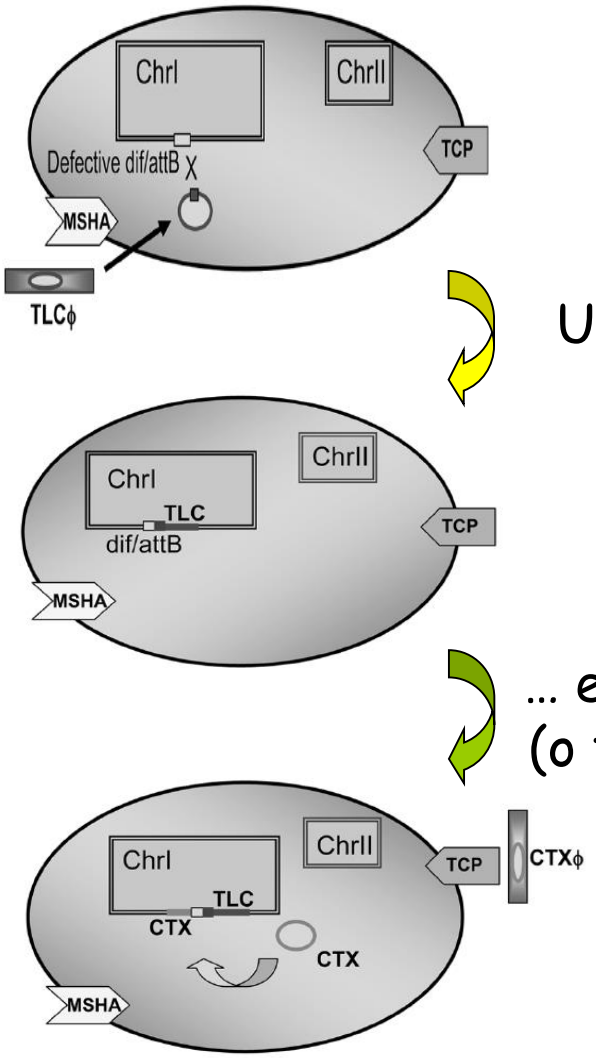


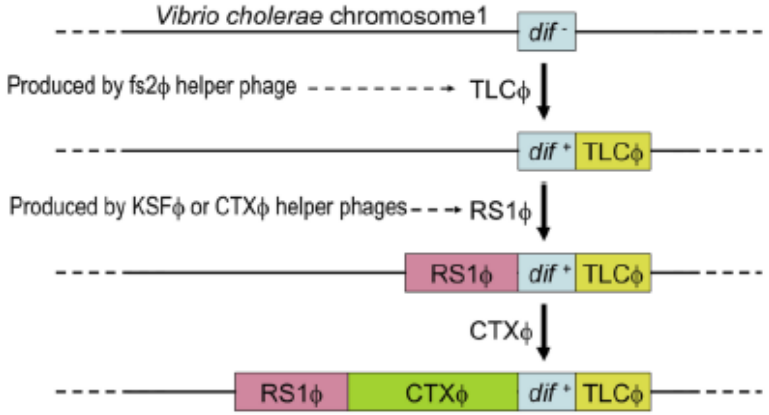
Ma chi è il fago CTX?

- è un fago filamentoso simile al fago M13 o F1 di *Escherichia coli*
- è un fago a DNA a singolo filamento di 7.000 basi capace di integrarsi nel cromosoma
- è un fago che codifica la tossina colerica (CtxAB) e altre tossine.



Un fago tira l'altro …

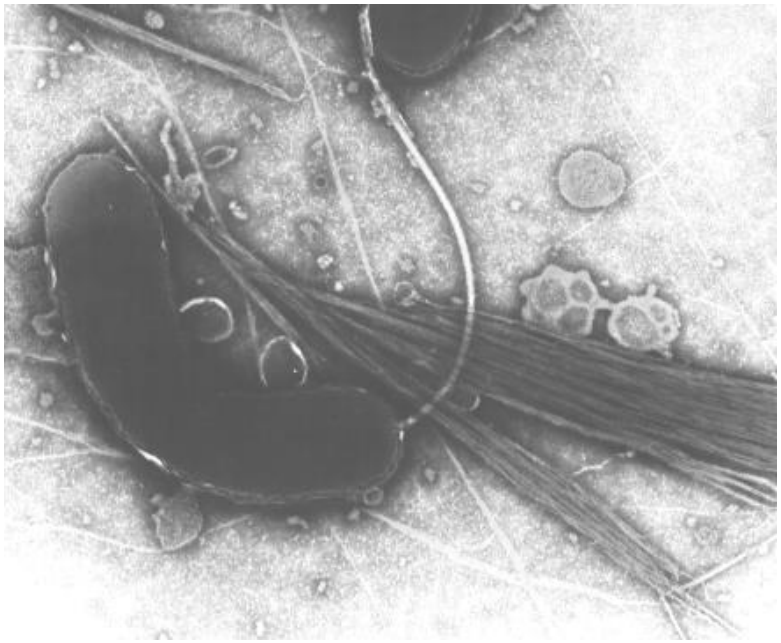




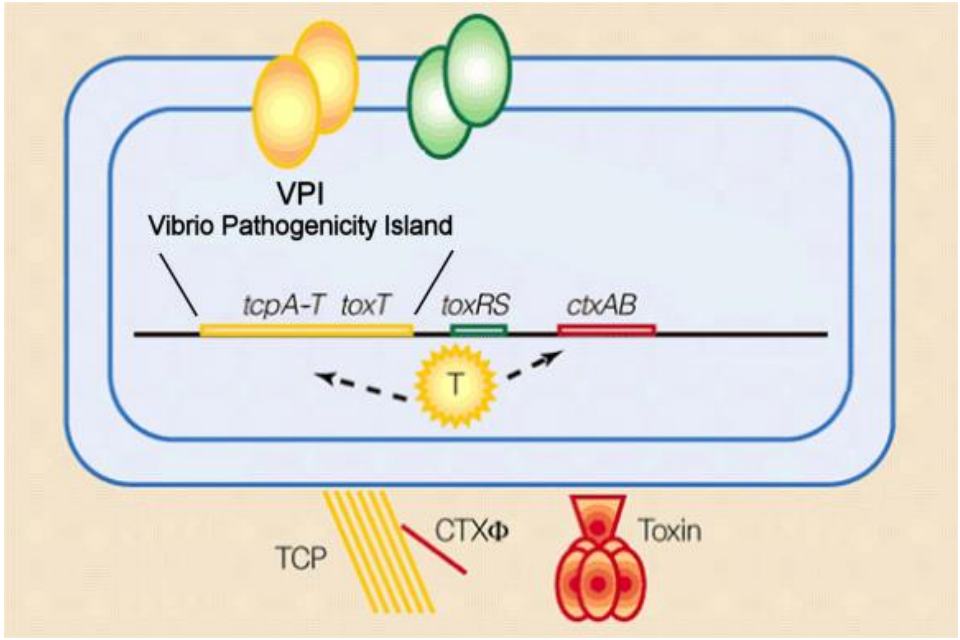
1. Il fago TLC infetta *V. cholerae* e si integra in un sito specifico del cromosoma I creando una perfetta sequenza *dif*, richiesta per la risoluzione dei cromosomi.

2. L'integrazione del fago TLC facilita l'integrazione del solo fago CTX (o dei fagi RS1 e CTX)

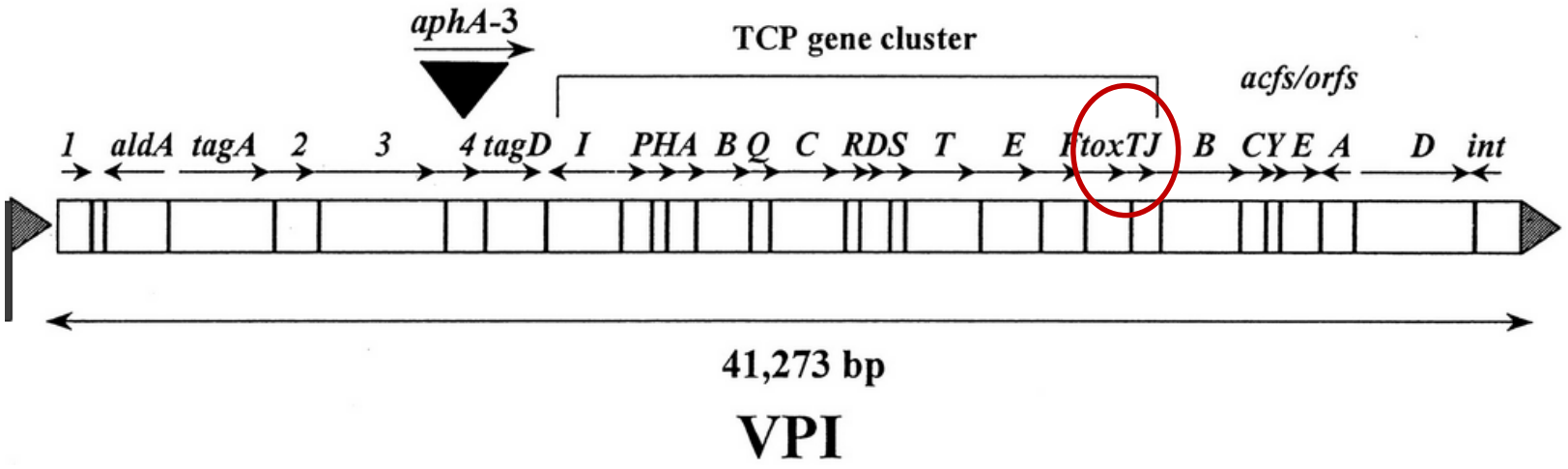
Tutto inizia con l'acquisizione dell' Isola di Patogenicità VPI



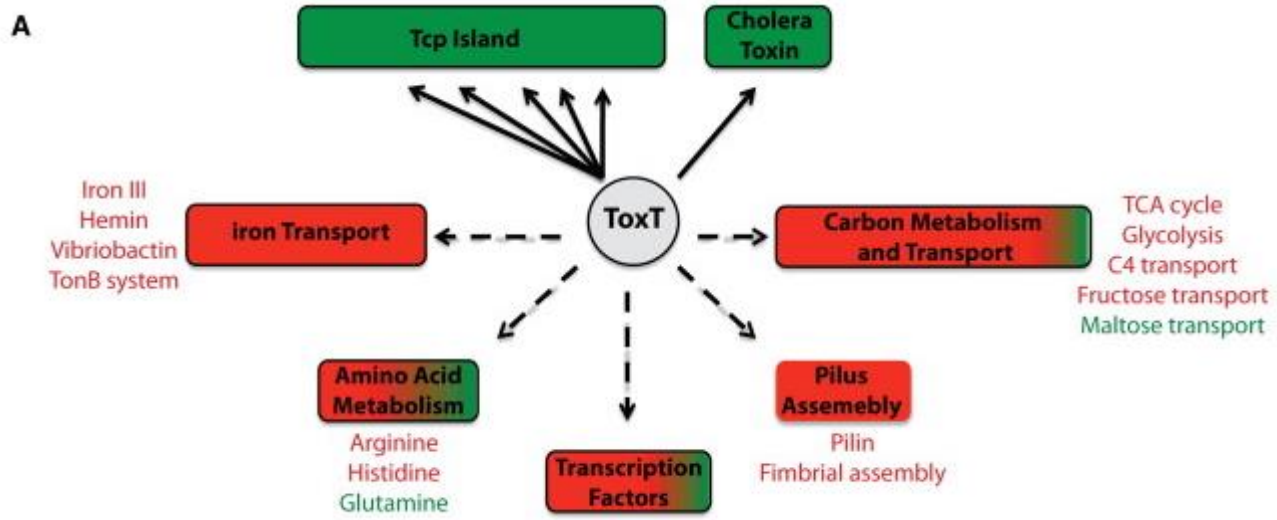
VPI (40 kb) contiene i geni per la sintesi del pilo TCP, struttura filamentosa importante nell'ambiente acquatico per ottimizzare l'adesione del batterio alla chitina dei copepodi …



… ma …



ToxT è un regolatore trascrizionale contenuto nella VP1



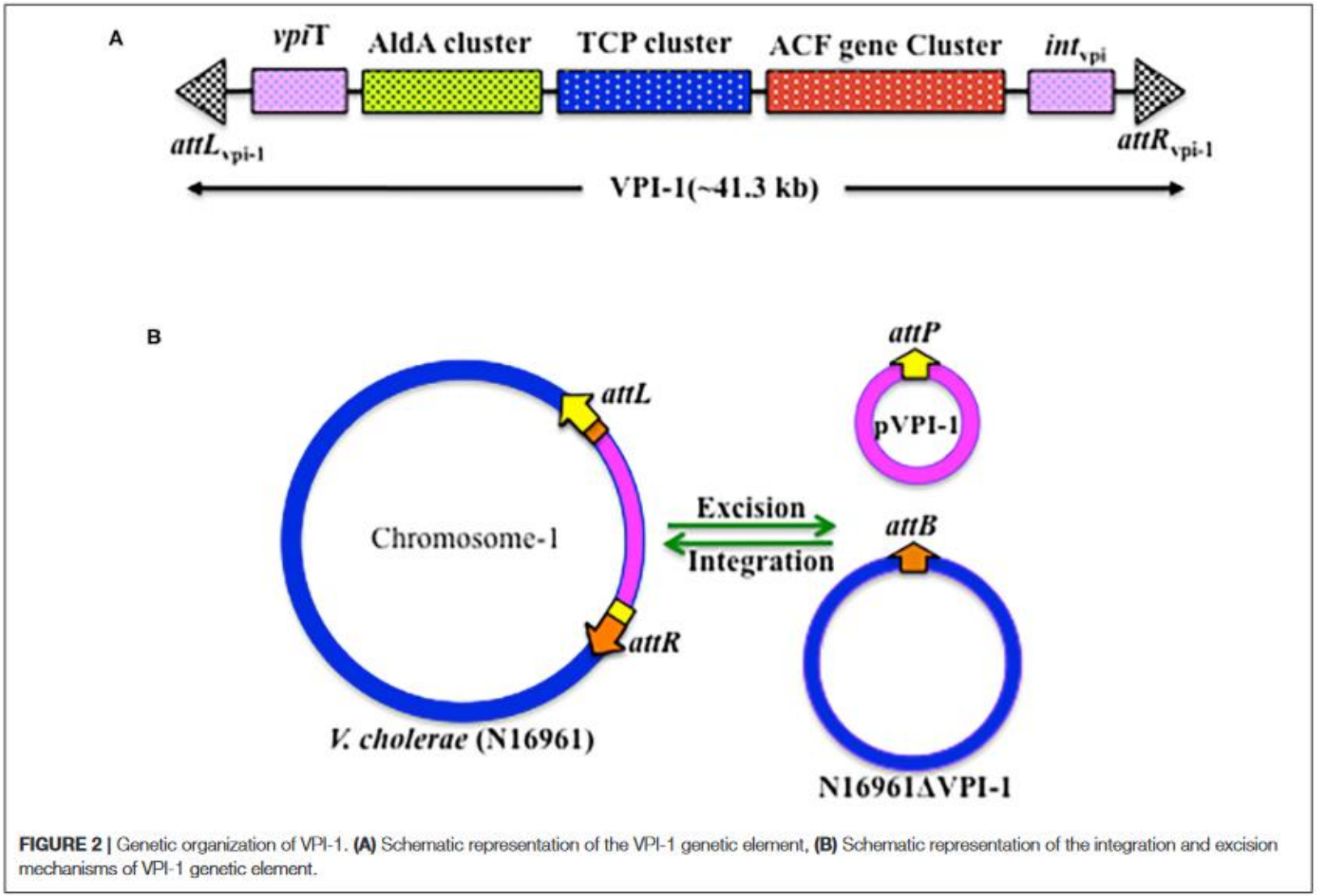


FIGURE 2 | Genetic organization of VPI-1. **(A)** Schematic representation of the VPI-1 genetic element, **(B)** Schematic representation of the integration and excision mechanisms of VPI-1 genetic element.

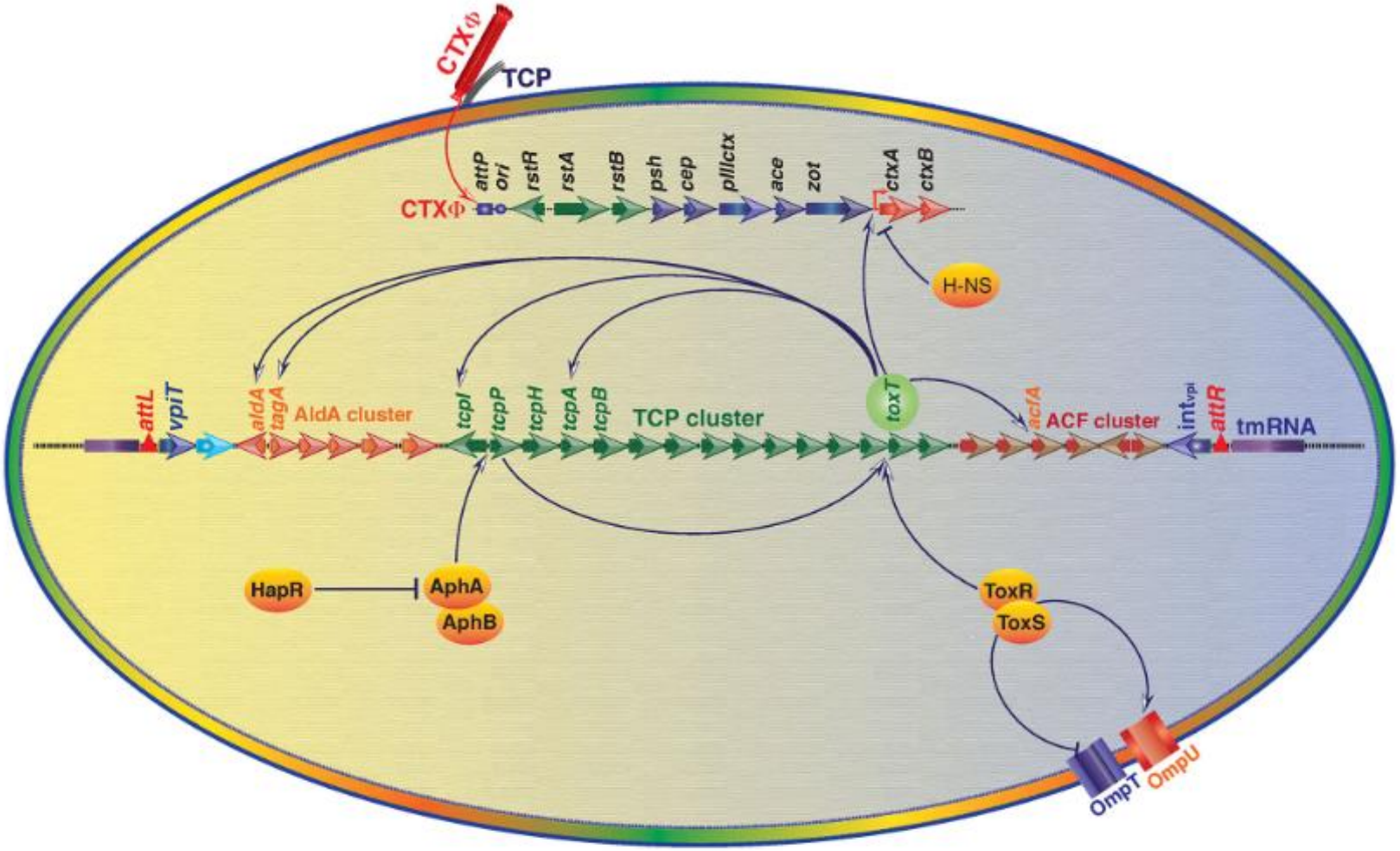
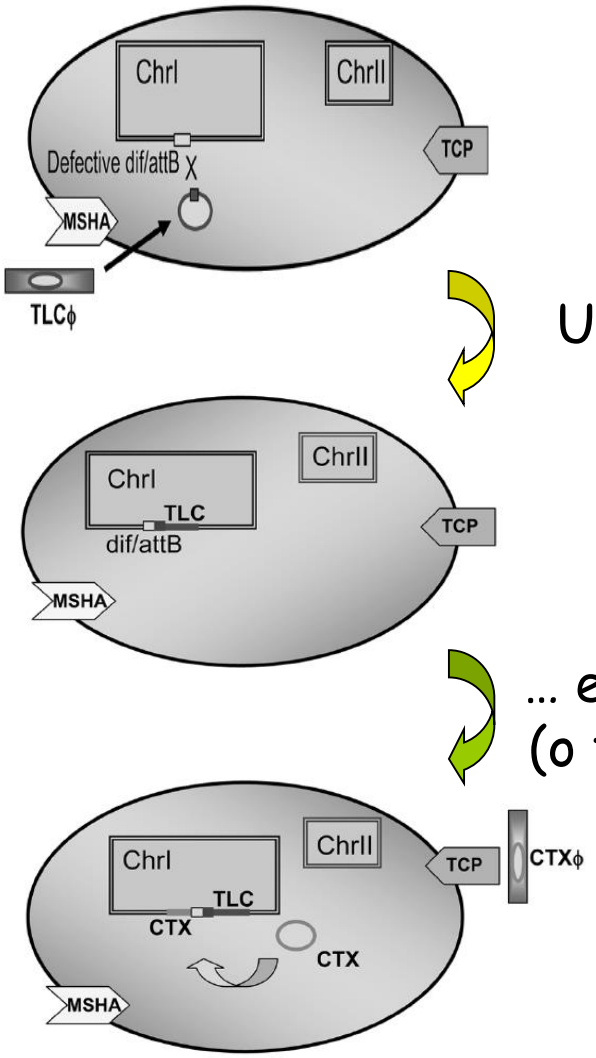
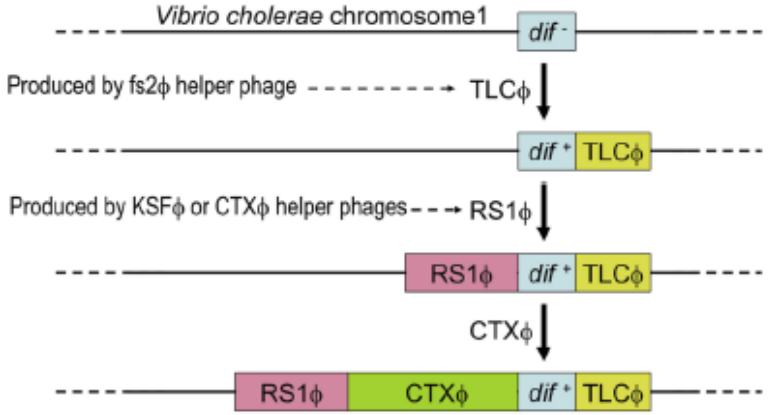


FIGURE 3 | An overview of regulation of *V. cholerae* virulence gene expression through Vibrio Pathogenicity Island 1 (VPI-1) and core genome encoded functions. Transcriptional factor ToxT is the key positive regulator of cholera toxin (CT) encoding genes *ctxA* and *ctxB*. ToxT also positively modulates expression of toxin co-regulated pilus (TCP) genes and several other genes located in the VPI-1. ToxR-ToxS and AphA-AphB proteins positively regulate expression of *toxT*. ToxR-ToxS proteins also modulate expression of outer membrane proteins OmpU and OmpT. Histone-like nucleoid-structuring (H-NS) protein negatively regulates expression of CT. Transcriptional regulator HapR negatively regulates expression of AphA and AphB encoding gene expression. Positive regulation is depicted by arrowhead and T head depicts negative regulation.

Un fago tira l'altro …

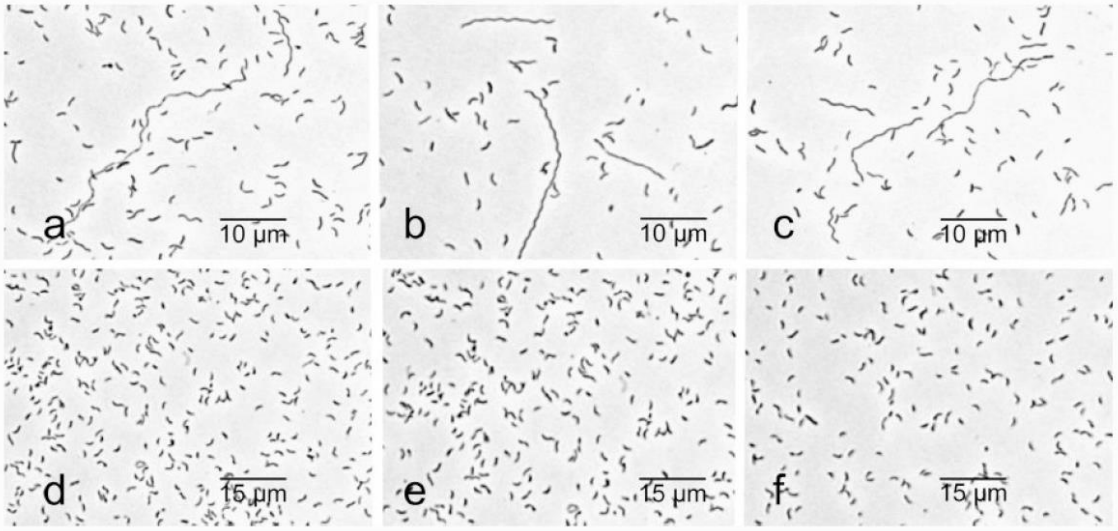




1. Il fago TLC infetta *V. cholerae* e si integra in un sito specifico del cromosoma I creando una perfetta sequenza *dif*, richiesta per la risoluzione dei cromosomi.

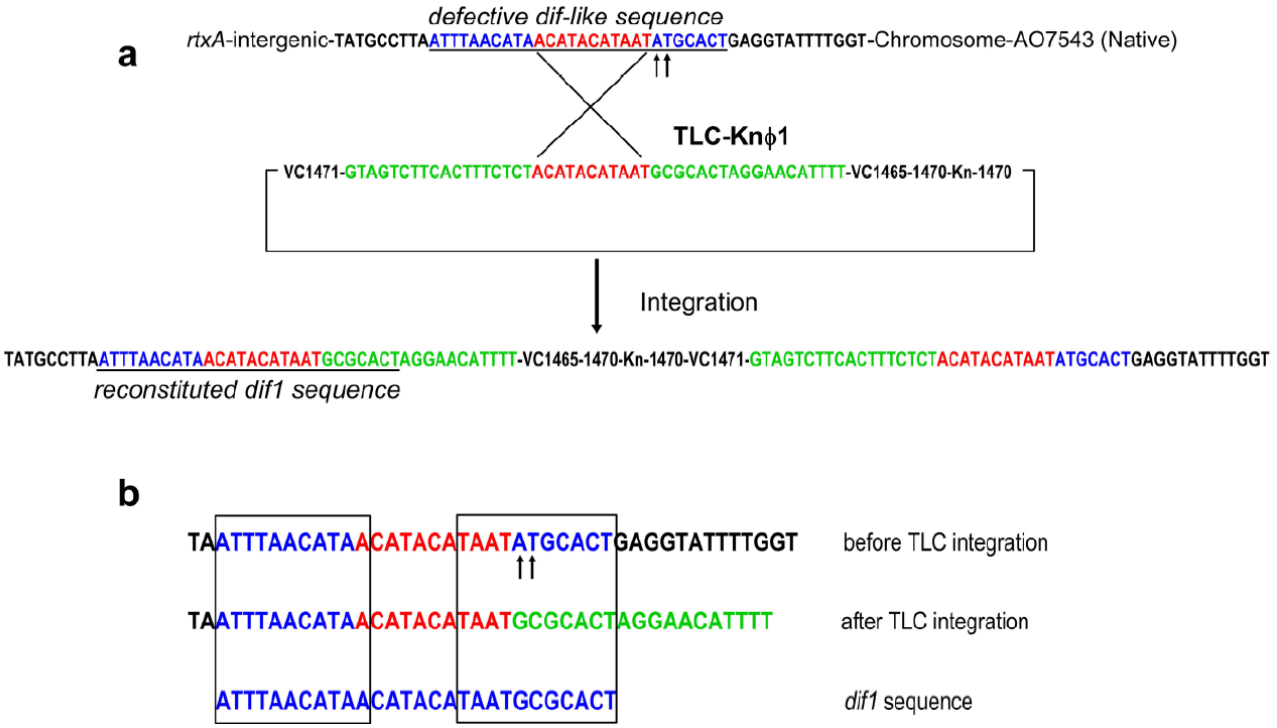
2. L'integrazione del fago TLC facilita l'integrazione del solo fago CTX (o dei fagi RS1 e CTX)

Qual è il vantaggio selettivo dell'inserzione del fago TLC in V.cholerae?



Trasduzione con il fago TLC evita la formazione di cellule filamentose derivati da una incorretta divisione delle cellule di Vibrio cholerae O1 che avevano difetti nella risoluzione dei cromosomi offrendo cosi un vantaggio selettivo

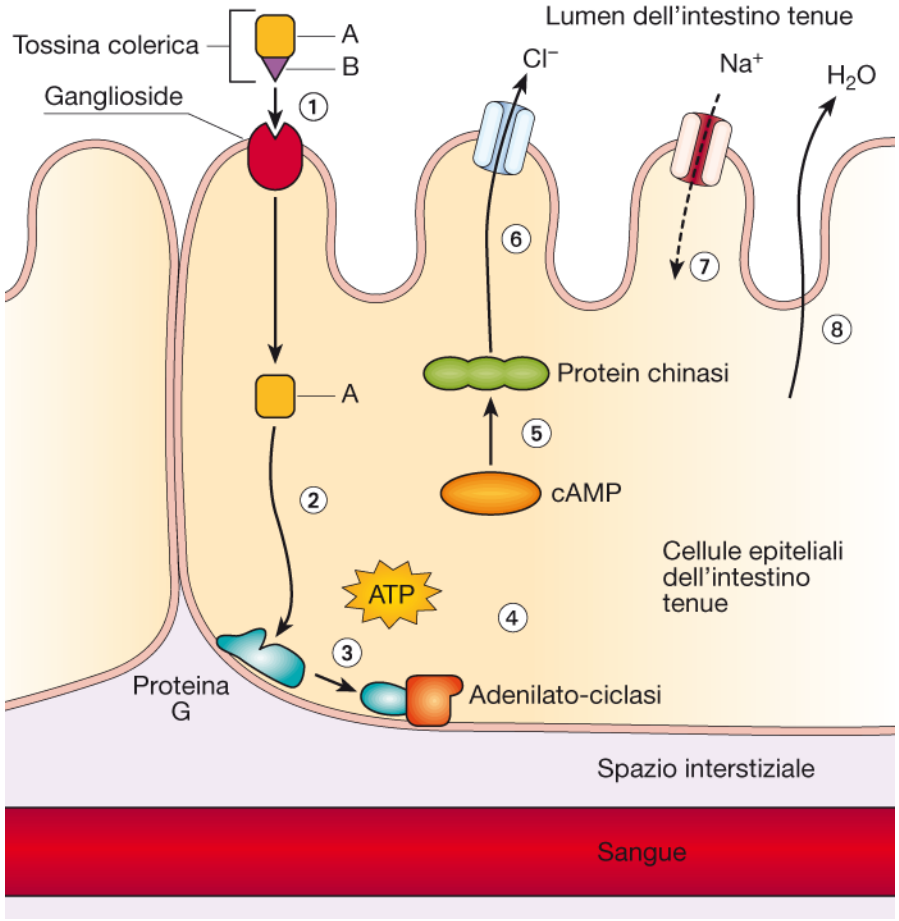
Grazie all'inserimento del profago nel sito "dif difettivo" si viene a creare un sito dif funzionale



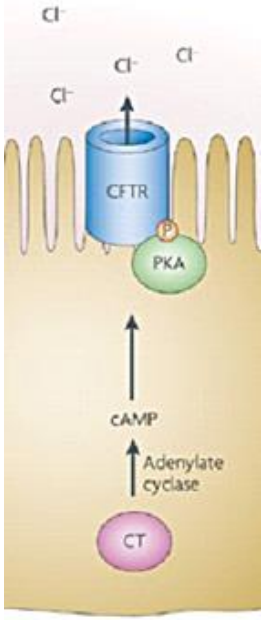
Schematic diagram showing site specific integration of TLC-Knϕ1 genome into the chromosome of strain AO7543. The region in the vicinity of the phage attachment site is shown in green and the region in the vicinity of the chromosome attachment site is shown in blue. The chromosomal attachment site corresponds to a defective dif-like sequence altered in an AT dinucleotide (arrows). Sequence analysis indicates that the recombination event that integrated the phage genome occurred in the central region of sequence identity (red) which also corresponds in part to the central region (CR) of a dif1 site (see Fig 2, Part b).

This recombination event is likely generated at least in part by action of the XerC and XerD on chromosomal and phage nucleic acid substrates in that the TLC-Kn1 genome did not chromosomally integrate in XerC-defective and XerD-defective strains

Ora Vibrio è pronto per provocare il colera

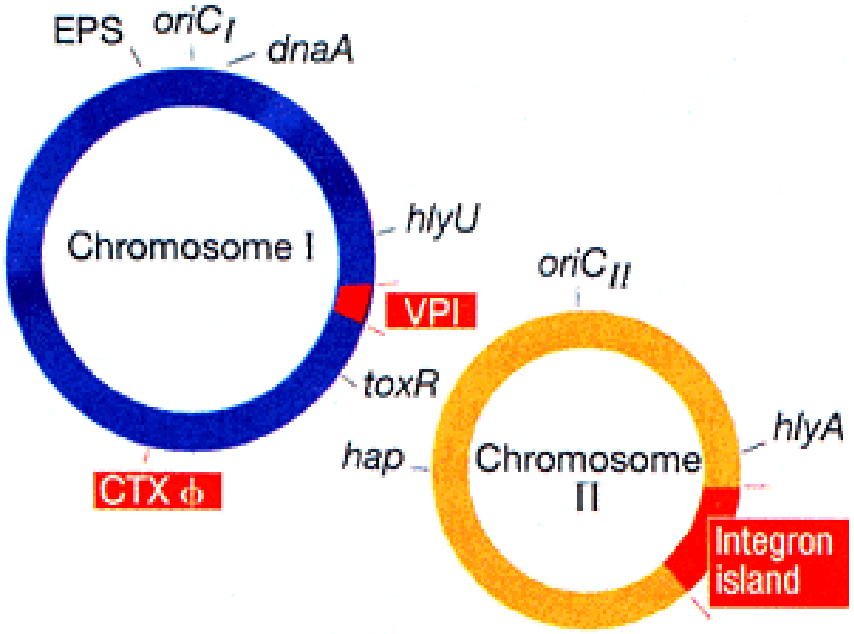


La tossina provoca l'attivazione dell'adenilato-ciclasi con conseguente formazione di alti livelli di una piccola molecola segnale (cAMP) che attiva una pompa del cloro, inducendo uno squilibrio elettrolitico che favorisce la fuoriuscita di acqua verso il lumen.



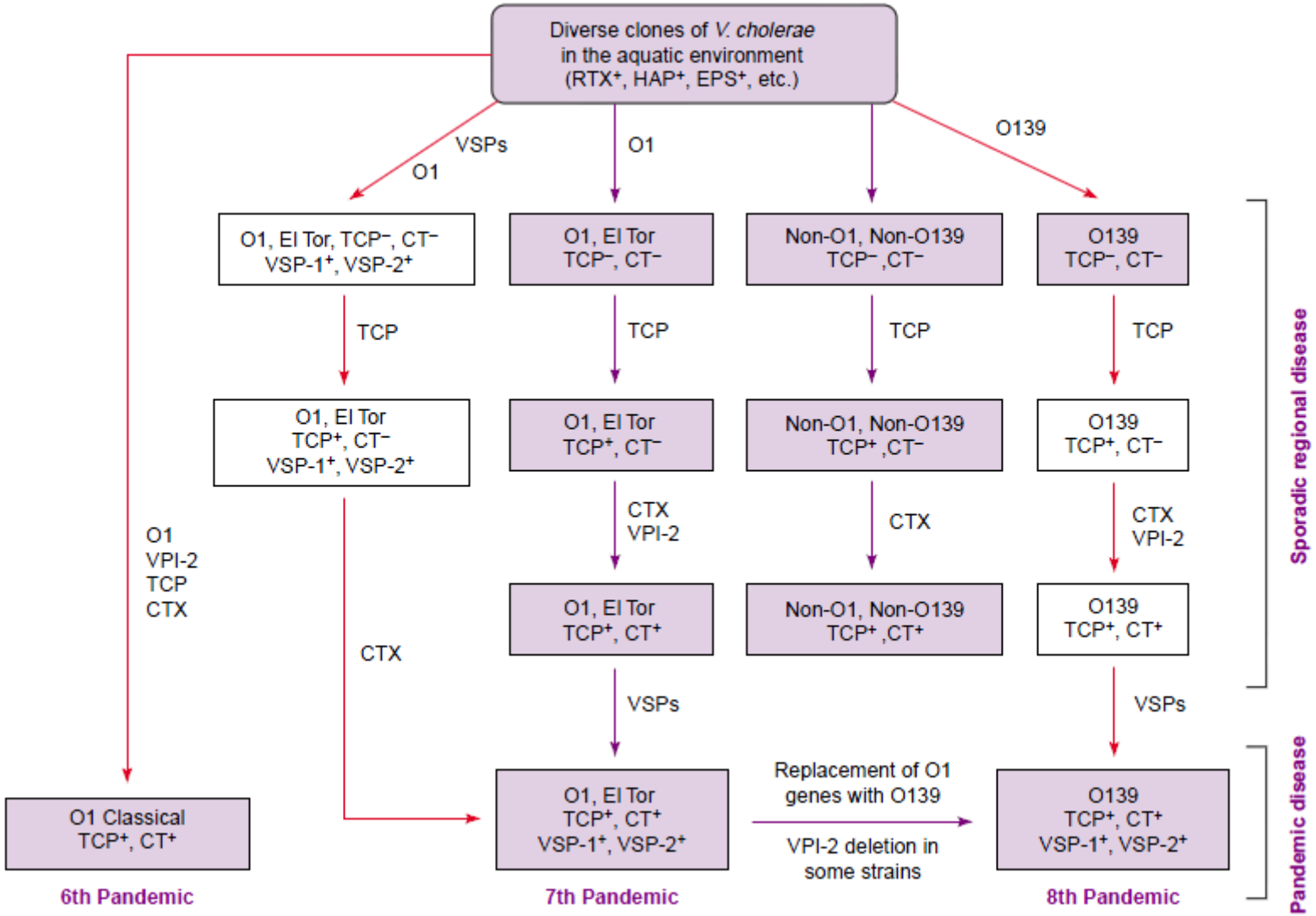
Il fago CTX contiene anche i geni per un'altra tossina (Zot) che favorisce la fuoriuscita di liquidi

L'evoluzione di *Vibrio cholerae*: il biotipo EL Tor



Responsabile della (7ª) pandemia è il V.*cholerae* O1 El Tor, mai comparso nelle precedenti pandemie.

V. cholerae El Tor ha acquisito due nuove isole di Patogencità, Vibrio 7th Pathogencity Island (VSP) 1 e 2, che contengono geni correlati ad una migliore colonizzazione dell'ospite.


Diverse clones of V. cholerae
in the aquatic environment
(RTX+, HAP+, EPS+, etc.)
VSPs
O1
O1
O139
O1, El Tor, TCP−, CT−
VSP-1+, VSP-2+
O1, El Tor
TCP−, CT−
Non-O1, Non-O139
TCP−,CT−
O139
TCP−, CT−
TCP
TCP
TCP
TCP
O1, El Tor
TCP+, CT−
VSP-1+, VSP-2+
O1, El Tor
TCP+, CT−
Non-O1, Non-O139
TCP+,CT−
O139
TCP+, CT−
CTX
VPI-2
CTX
CTX
VPI-2
O1
VPI-2
TCP
CTX
O1, El Tor
TCP+, CT+
Non-O1, Non-O139
TCP+,CT+
O139
TCP+, CT+
CTX
VSPs
VSPs
Sporadic regional disease
Pandemic disease
O1 Classical
TCP+, CT+
O1, El Tor
TCP+, CT+
VSP-1+, VSP-2+
Replacement of O1
genes with O139
VPI-2 deletion in
some strains
O139
TCP+, CT+
VSP-1+, VSP-2+
6th Pandemic
7th Pandemic
8th Pandemic

TCP=VP1

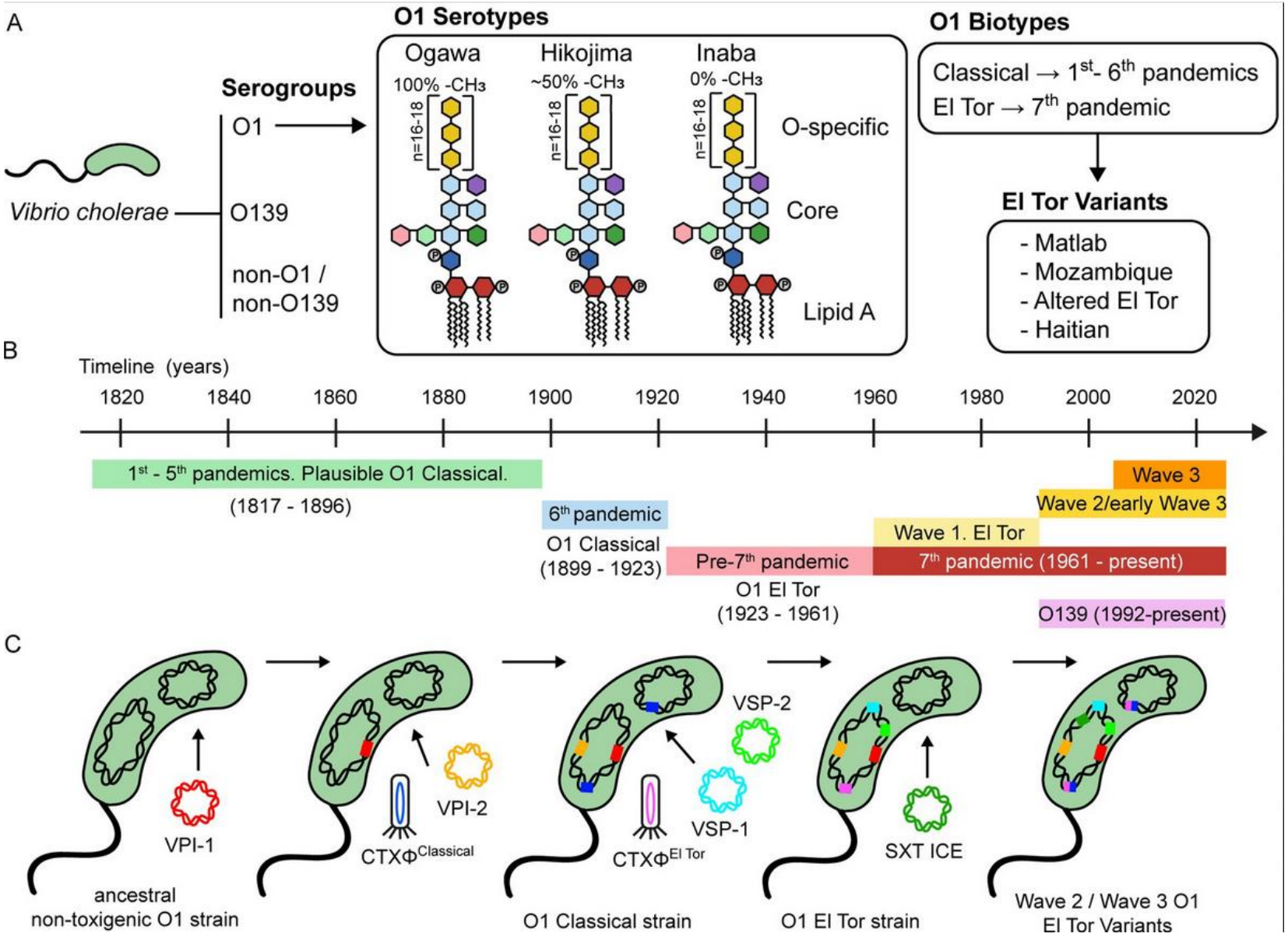

A
O1 Serotypes
Ogawa
Hikojima
Inaba
100% -CH3
~50% -CH3
0% -CH3
n=16-18
O-specific
Core
Lipid A
Serogroups
O1
O139
non-O1 / non-O139
Vibrio cholerae
O1 Biotypes
Classical → 1st- 6th pandemics
El Tor → 7th pandemic
El Tor Variants
- Matlab
- Mozambique
- Altered El Tor
- Haitian
B
Timeline (years)
1820
1840
1860
1880
1900
1920
1940
1960
1980
2000
2020
1st - 5th pandemics. Plausible O1 Classical.
(1817 - 1896)
6th pandemic
O1 Classical
(1899 - 1923)
Pre-7th pandemic
O1 El Tor
(1923 - 1961)
Wave 1. El Tor
7th pandemic (1961 - present)
Wave 3
Wave 2/early Wave 3
O139 (1992-present)
C
VPI-1
ancestral
non-toxigenic O1 strain
VPI-2
CTXΦClassical
O1 Classical strain
VSP-2
VSP-1
CTXΦEl Tor
O1 El Tor strain
SXT ICE
Wave 2 / Wave 3 O1
El Tor Variants

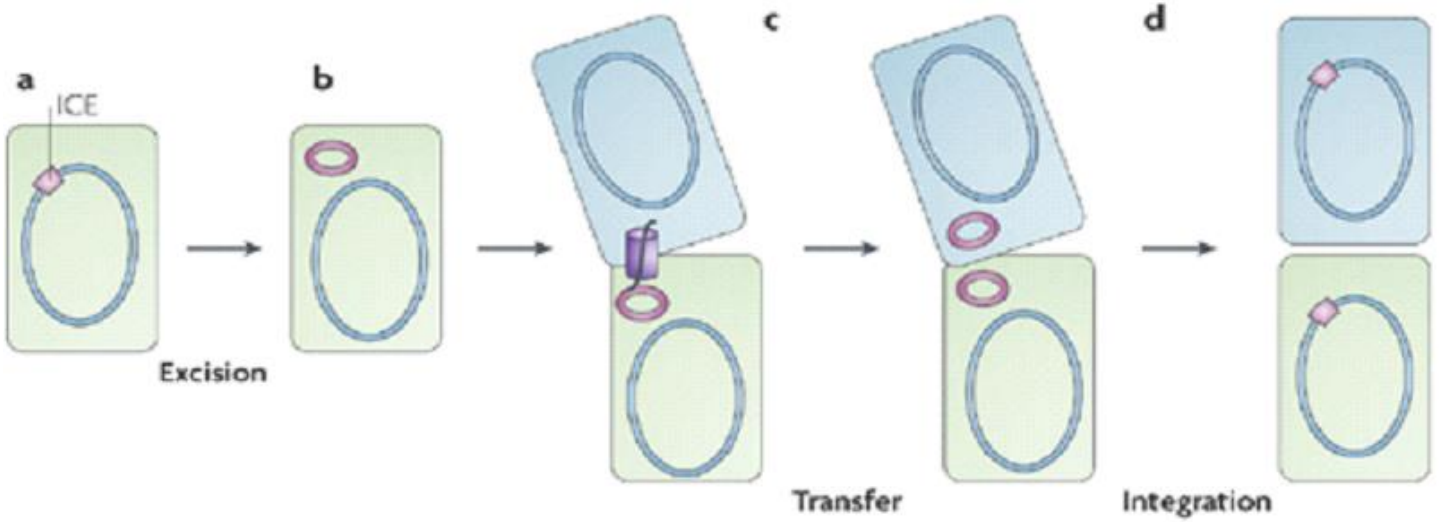
Figure 1. Classification and evolution of *V. cholerae*. **(A)** *V. cholerae* is classified into serogroups based on the composition of the O antigen of LPS. Strains belonging to the O1 serogroup are further divided into three serotypes, namely Ogawa, Hikojima, and Inaba. The LPS of these three serotypes is schematically represented, showing the approximate percentage of methylation of the terminal perosamine. Serogroup O1 is also classified into the Classical and El Tor biotypes, based on phenotypic and genetic markers. Over the past two decades, there has been a growing number of reports on *V. cholerae* strains that possess genetic features from both the Classical and El Tor biotypes, leading to the emergence of hybrid or variant strains. These strains have been linked to several cholera outbreaks worldwide and have contributed significantly to the global burden of this disease. **(B)** Timeline of the history of cholera pandemics. **(C)** A schematic representation of the evolutionary process underlying the development of virulence in serogroup O1. This process is mainly driven by the acquisition of mobile genetic elements, including bacteriophages, genomic islands, integrative and conjugative elements, among others.

L’epidemia attuale a differenza delle altre che sono state causate da V.Cholerae
Di sierotipo O1 è causata dal sierotipo O139

Figure 1. Schematic diagram of the possible evolutionary lineages for emergence of pandemic strains of *V. cholerae*. Lineages are based on the existence of intermediate strains carrying combinations of horizontally acquired gene clusters and other considerations. Shaded boxes describe strains that exist, whereas, non-shaded boxes designate strains that could hypothetically exist but have not yet been isolated. Purple arrows represent horizontal gene transfer events that are the most likely to have occurred based on the existence of intermediate strains that have similar polymorphic markers (for example, ribotypes and allelic types of variable genes such as *tcpA*, *rstR*, *toxT*, among others). Red arrows represent other transfer events that are hypothetically possible but for which critical intermediate strains have not been documented. Abbreviations: CTX, cholera toxin phage; EPS, extracellular protein secretion gene cluster; HAP, hemagglutinin protease gene; O1 and O139, various O antigen gene clusters; RTX, repeat in toxin gene cluster; TCP, toxin co-regulated pilus gene cluster also referred to as VPI; VPI, *Vibrio* pathogenicity island; VPI-2, the island that includes the nanH gene cluster; VSP, *Vibrio* seventh pandemic island; VSP-1 and VSP-2, the islands found in seventh pandemic El Tor strains and eighth pandemic O139 strains.

Metà plasmidi e metà fagi: gli ICE

Gli ICE sono elementi genetici mobili presenti in *Vibrio cholerae* in grado di trasferire efficientemente geni da una cellula all'altra.



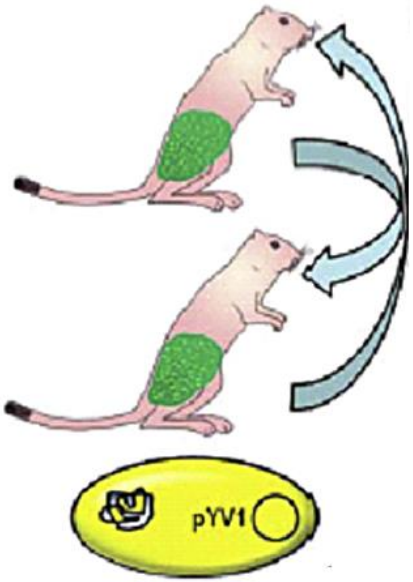
Gli ICE sono responsabil dell'alevata antibiotico-resistenza in Vibrio e in molti batteri

Mobile genetic elements	Description
Prophage CTXΦ	It is a filamentous bacteriophage of ~6.7 kb single-stranded DNA that contains the *ctxA* and *ctxB* genes encoding CTX, as well as the *zot and ace* genes encoding accessory toxins (50).
Prophage TLCΦ	It is a satellite bacteriophage of ~5.3 kb in size that facilitates stable integration of CTXΦ (51).
Vibrio pathogenicity island-1 (VPI-1)	Also known as TCP island, it is ~41.3 kb in size. It integrates into the Chr1 and contains genes encoding the toxin-coregulated pilus (TCP), the ToxR regulon, and the metalloprotease TagA (52).
Vibrio pathogenicity island-2 (VPI-2)	It is ~57 kb in size. It integrates into the Chr1 and contains several gene clusters, including genes required for the scavenging (Sialidase, *nanH*), transport (*dctPQM*), and catabolism (*nan-nag* region) of sialic acid (53).
Vibrio seventh pandemic island-1 (VSP-1)	It is ~16 kb in size. It integrates into the Chr1 and encodes the dinucleotide cyclase (DncV) enzyme, which is essential for producing intracellular signaling molecule cAMP- GMP. DncV is required for efficient intestinal colonization of the seventh-pandemic strains (54).
Vibrio seventh pandemic island-2 (VSP-2)	It is ~26.9 kb in size. It Integrates into the Chr1 and encodes RNase H1, DNA repair protein, methyl-accepting chemotaxis proteins, and type IV pilus. VSP-2 could be necessary for the evolutionary fitness and epidemic spread of the seventh pandemic strains (55).
SXT integrative and conjugative element (ICE)	It is ~100 kb in size. It carries multiple antibiotic-resistance genes that confer resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin (56).
Superintegron	Located in the Chr2, it is a large gene capture system of approximately 125 kb, predominantly comprising hypothetical genes, and is proposed as a source of genetic variation (57).

La peste: flagello antico e modello di evoluzione

Peste a Venezia (A. Zanchi 1631-1722)

Yersinia pestis si è evoluto in tempi recenti (1500-20000 anni fa) da un batterio patogeno intestinale dei roditori.



Da batterio presente nell'ambiente si è trasformato in patogeno a trasmissione ematica capace di causare infezioni sistemiche.

IDENTIFICAZIONE DELL'AGENTE DELLA PESTE

1894: Alexandre Yersin scopre il batterio ad Hong Kong

Yersin esamina molti ratti morti durante il suo soggiorno a Hong Kong ed è il primo a proporre una relazione causale tra la morte dei roditori e le epidemie nell'uomo

1897: Ogata propone la prima ipotesi riguardo un ruolo delle pulci nella trasmissione

1914: Bacot e Martin propongono un modello per spiegare la trasmissione attraverso l'insetto: modello del blocco proventricolare

2001: sequenziamento del genoma di *Y. pestis CO92*

Yersinia **appartiene alle Enterobacteriaceae e la classica nomenclatura si è basata su suddivisioni determinate da caratteristiche biochimiche e sistematica classica**

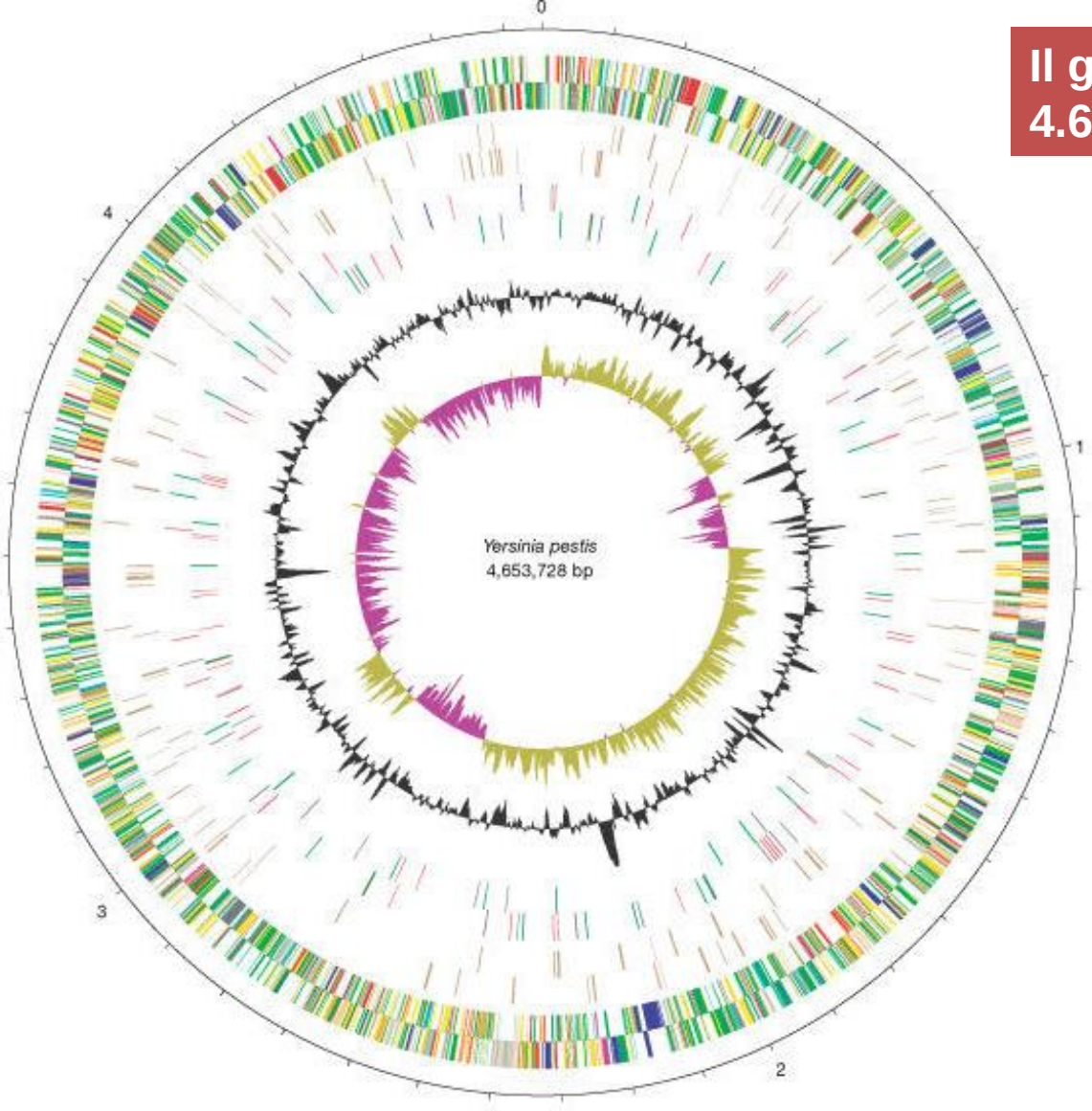
Suddivisione in 18 specie delle quali 3 sono patogene per i mammiferi incluso l'uomo:
Y. enterocolitica
Y. pseudotubercolosis
Y. pestis

Y. enterocolitica **e** ***Y. pseudotubercolosis*** **sono patogeni per gli animali nei quali causano una gastroenterite (anche nell'uomo)**

Y. pestis **è patogeno nei roditori e nelle pulci e occasionalmente viene trasmessa all'uomo dove provoca la PESTE .**

Le restanti 15 specie si trovano nel suolo o nell'acqua e sono generalmente non patogene.

Il genoma di *Yersinia pestis* 4.6 Mb



The outer scale is marked in megabases. Circles 1 and 2 (from the outside in), all genes colour coded by function, forward and reverse strand; **circles 3 and 4, pseudogenes; circles 5 and 6, insertion sequence elements (blue, IS*1661*; black, IS*285*; red, IS*1541*; green, IS*100***); circle 7, G + C content (higher values outward); circle 8, GC bias ((G - C/G + C), khaki indicates values >1, purple <1).

Colour coding for genes: **dark blue, pathogenicity or adaptation**; black, energy metabolism; red, information transfer; dark green, surface associated; cyan, degradation of large molecules; magenta, degradation of small molecules; yellow, central or intermediary metabolism; pale blue, regulators; orange, conserved hypothetical; brown, pseudogenes; pink, phage and insertion sequence elements; pale green, unknown; grey, miscellaneous.

Caratteristiche generali del genoma di Yersinia pestis

Table 1 General features of the *Yersinia pestis* genome

	Chromosome	pPst/pPCP1	pYV1/pCD1	pFra/pMT1
Estimated copy number*		186	4.3	1.8
Total size	4,653,728 bp	9,612 bp	70,305 bp	96,210 bp
G + C content	47.64%	45.27%	44.84%	50.23%
Coding sequences	4,012	9	97	103
… of which pseudogenes	149	0	8	3
Coding density	83.8%	57.2%	81.4%	86.8%
Average gene length	998 bp	611 bp	643 bp	835 bp
Ribosomal RNAs	6 × (16S–23S–5S)			
Transfer RNAs	70			
Other stable RNAs	6			

* The copy number of the plasmids was estimated on the number of reads per kilobase compared with the chromosome, and is likely to be affected by sampling bias in the shotgun.

Genoma costituito da **un cromosoma circolare** e

da **3 plasmidi** di diverse dimensioni ma nessuno con un apparato di coniugazione funzionale .

Il genoma presenta anomalie nella distribuzione della percentuale di GC ad indicare riarrangimaneti o la presenza di geni acquisiti per HGT

Molti geni appaiono acquisiti da batteri o virus includendo i geni per le adesine, per le tossine e per il sistema di secrezione T3SS

Il genoma contiene circa 150 pseudogeni molti dei quali legati a funzioni di un ancestrale batterio enteropatogeno

Frequenti riarrangimenti e ricombinazioni dovuti ad elementi IS: questi inversioni si ritrovano anche come popolazione mista delle colture ad indicare un genoma altamente dinamico

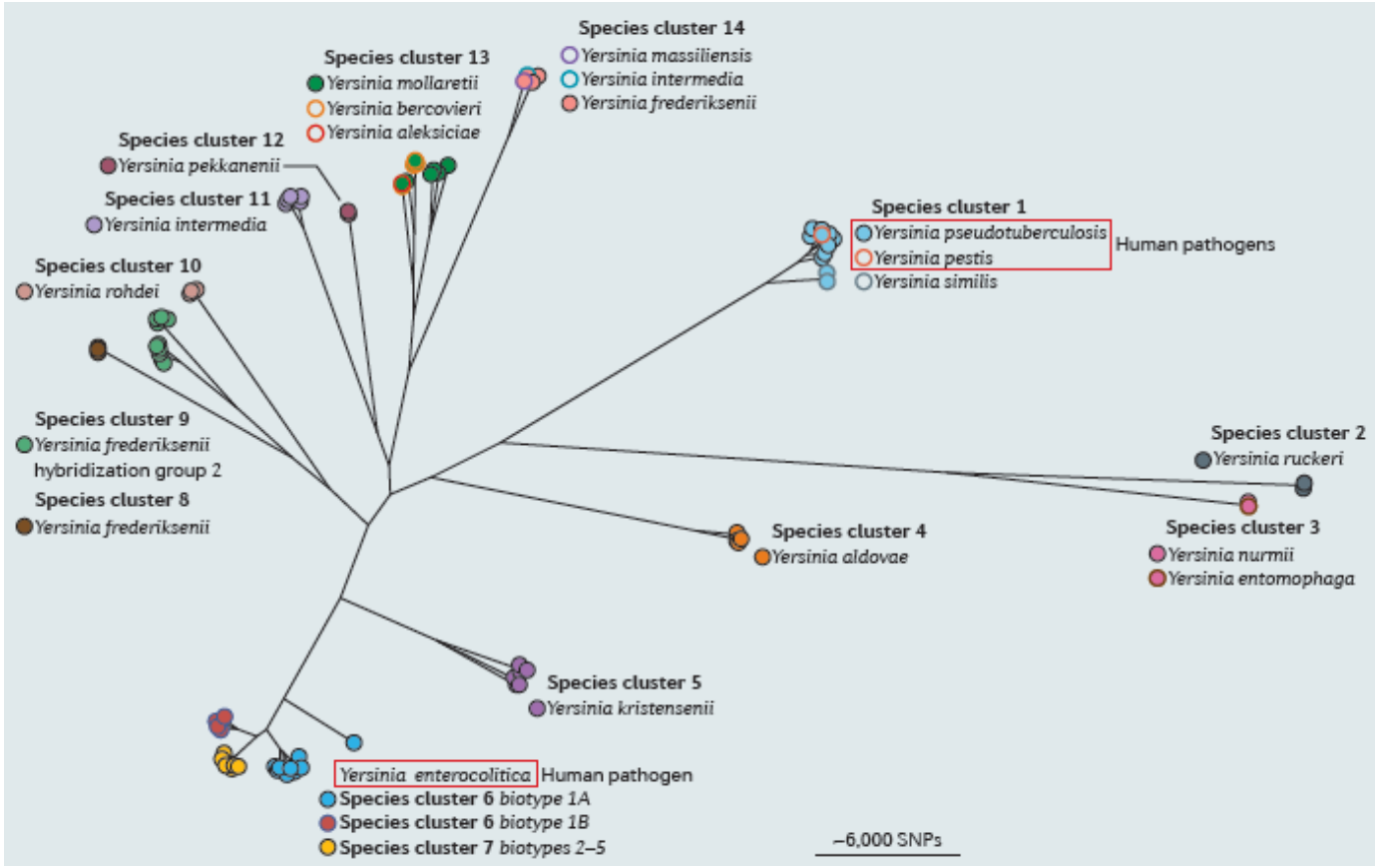
Plasmidi importanti per la virulenza di *Y. pestis*

La sequenza genomica del ceppo *CO92* di *Y. pestis*, rivela la presenza di un cromosoma di 4.65 Mb e di tre plasmidi: *pYV* di 70.3 kb, kb, *pMT1* di 96.2 kb e *pPla* di 9.6

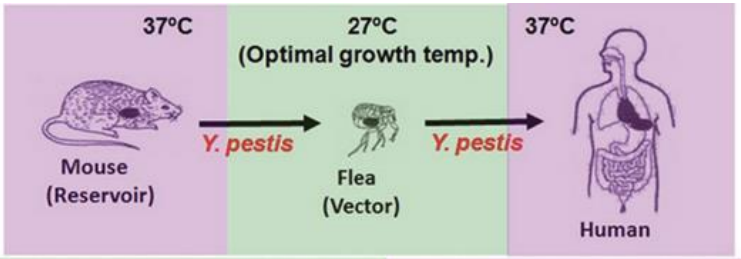
Nome del plasmide	Dimensioni (kb)	Fattori di virulenza	Ruolo nella malattia
Plasmide di virulenza Yersinia, pYV	70.3	Sistema di secrezione di tipo III, Yops	Evasione del sistema immunitario, tossicità
Plasmide con la tossina murina, pMT1	96.2	Tossina murina (PLD), capsula F1	Trasmissione batterica nelle pulci
Plasmide con l'attivatore del plasminogeno, pPla	9.6	Attivatore del plasminogeno	Diffusione dal sito di morso della pulce

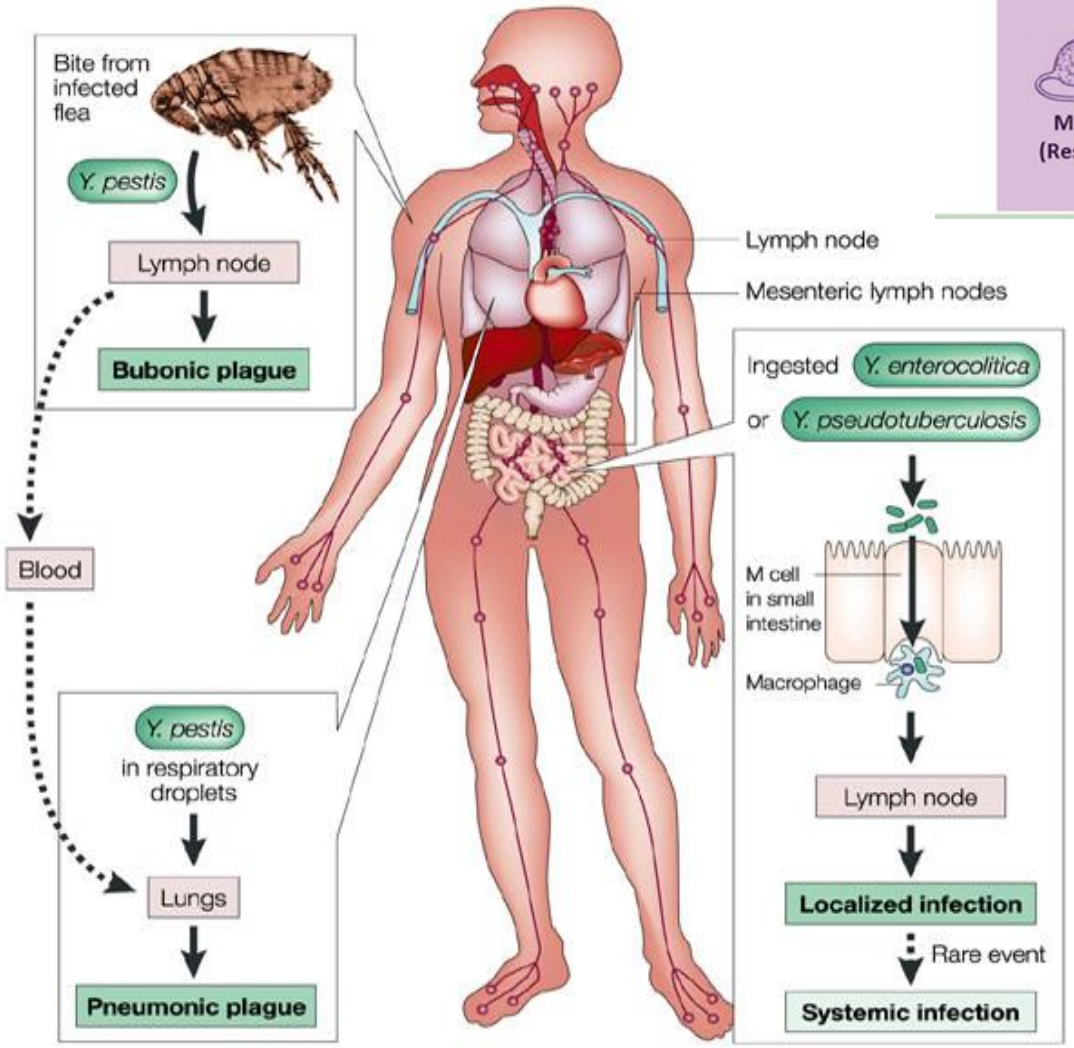
L'acquisizione di plasmidi è un elemento chiave dell'evoluzione di *Y. pestis*

Le specie patogene per l'uomo formano due rami separati agli opposti dell'albero evolutivo di *Yersinia*



Y. pestis, persa la capacità di vivere nell'ambiente esterno, prospera tra mammiferi e pulci

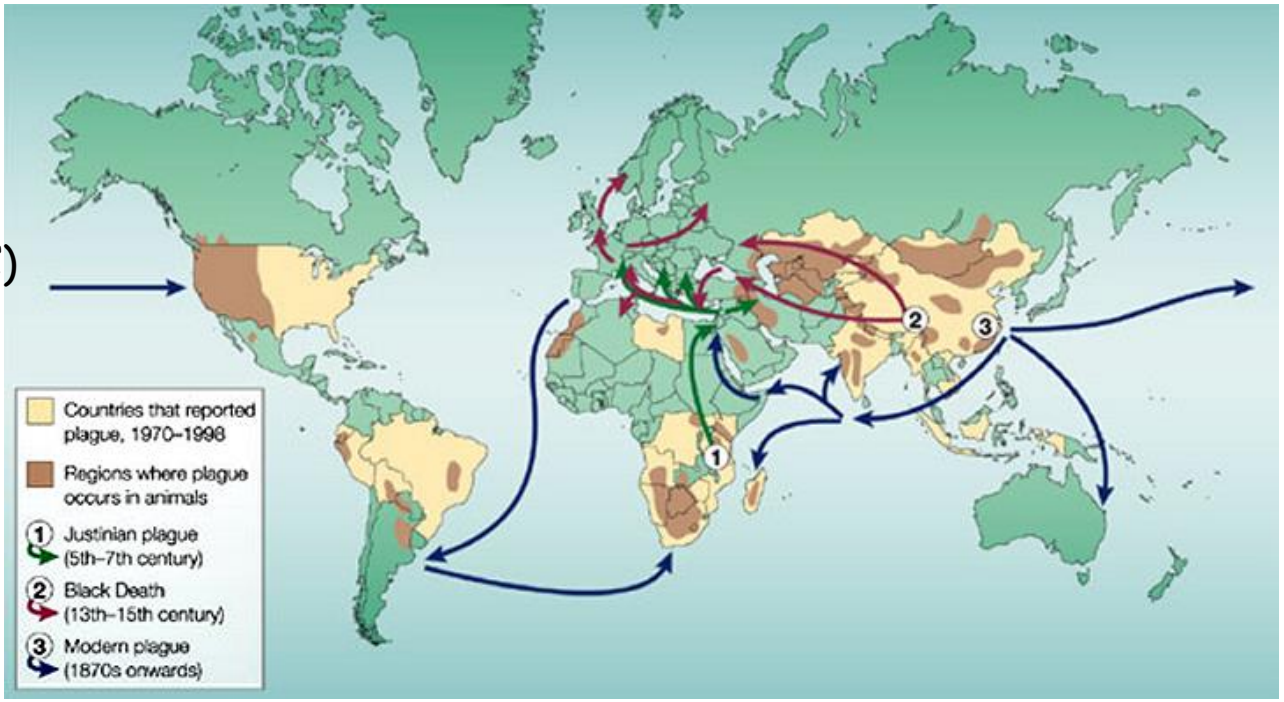




Il batterio si assicura la trasmissione formando aggregati che bloccano la parte iniziale dell'apparato digerente della pulce. Quando la pulce punge l'ospite rigurgita questo "tappo" di batteri che finiscono nella via linfatica e resistono ai macrofagi

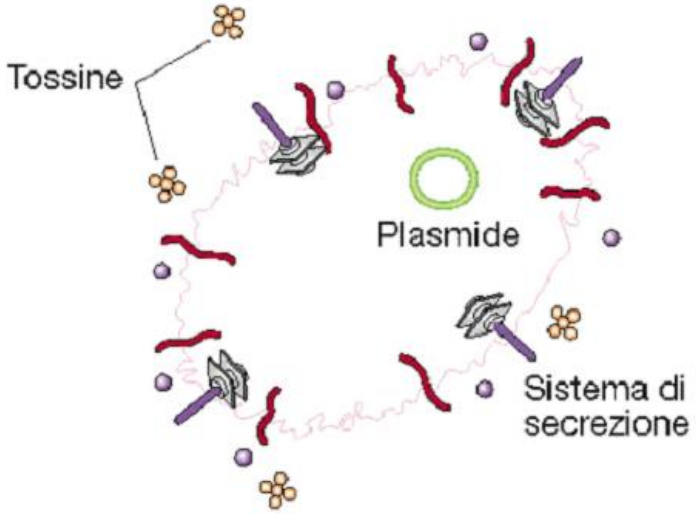
Le tre grandi pandemie di Peste

1. La Peste di Giustiniano (542 dC)
2. La Morte Nera (1347 dC)
3. La Terza Pandemia



Si conoscono tre grandi pandemie: la prima, di epoca giustiniana, diffusa nel bacino del Mediteraneo e in Medio Oriente; la seconda, iniziata nel tredicesimo secolo, che causò la morte di un terzo della popolazione europea; la terza, originatasi in Oriente nel 1870 e tuttora presente in molte regioni del mondo.

L'evoluzione di *Yersinia pestis*, un paradigma del ruolo dei plasmidi

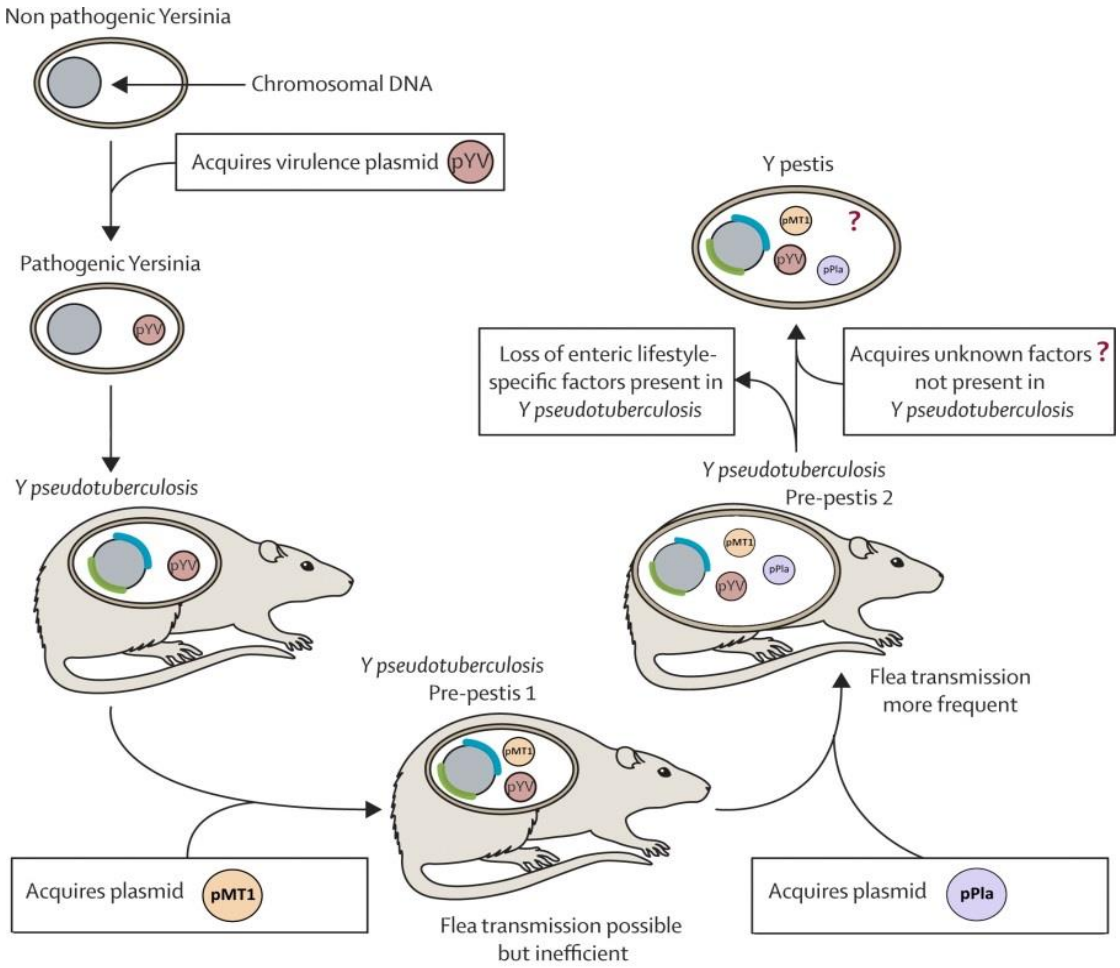


I plasmidi possono contenere geni per i sistemi di secrezione, per adesine, per tossine e in un sol colpo permettono al batterio di colonizzare una nuova nicchia.

Già i primi studi di genetica di popolazione suggerivano che *Y. pestis* fosse un clone di *Y. pseudotubercolosis* recentemente emerso sebbene abbia uno stile di vita che si differenzi nettamente e provochi una patologia molto più severa.
Da questi studi *Y. pestis* si era evoluta in un batter d'occhio tra 2.000 e 10.000 anni fa tramite acquisizione di materiale genetico, perdita e riarrangiamenti genomici.

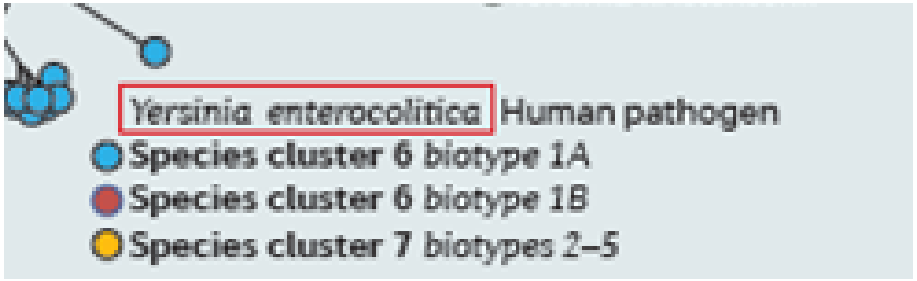
***Y. pestis* quindi è derivata da *Y. pseudotubercolosis* attraverso una serie di eventi quali acquisizione di plasmidi, batteriofagi ed integroni e isole genomiche ed eventi di perdita di determinanti genetici che hanno determinato una perdità di flessibilità ecologica determinando specializzazione nella nicchia in cui i batteri sopravvivono.**

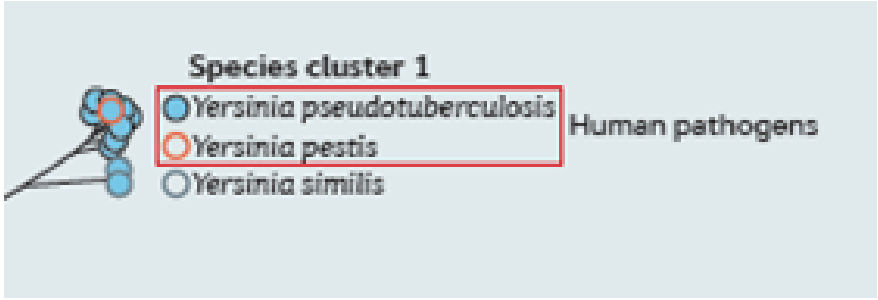
La storia evolutiva di *Y. pestis* dimostra come pochi cambiamenti genetici possano alterare le modalità di infezione e trasmissione, e come la perdita di geni sia critica tanto quanto l'acquisizione di materiale genico nel processo evolutivo



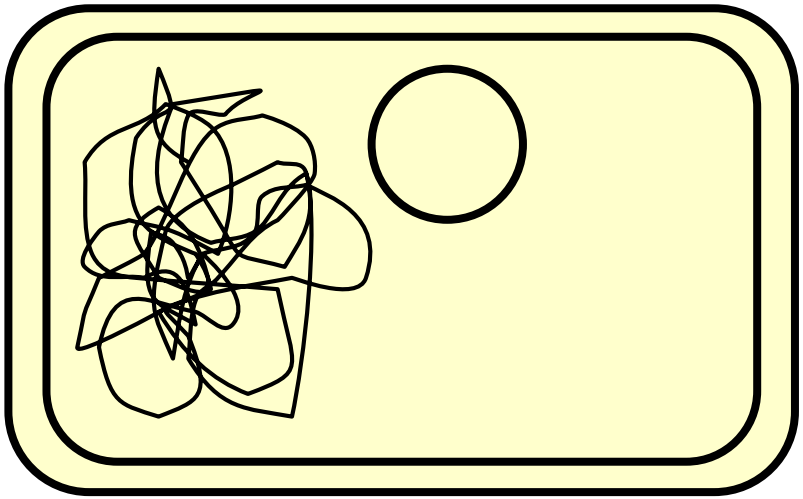
Le relazioni tra *Y. enterocolitica* e *Y. pestis-Y.pseudotubercolosis* sono state comprese solo recentemente.
Inizialmente infatti si pensava che la separazione tra *Y.enterocolitica* e *Y. pestis-Y. Pt* fosse avvenuta dopo l'acquisizione del plasmide pYV e che quindi esistesse un progenitore comune con il pYV per tutte e tre le specie

Invece uno studio filogenetico più accurato ha permesso di osservare che versioni simili del plasmide di virulenza pYV sono state acquisite indipendentemente almeno 3 volte : 2 volte nella linea di *Y. enterocolitica* che presenta più di un cluster ed una volta nella linea *Y.pestis/Y.pseudotubercolosis*

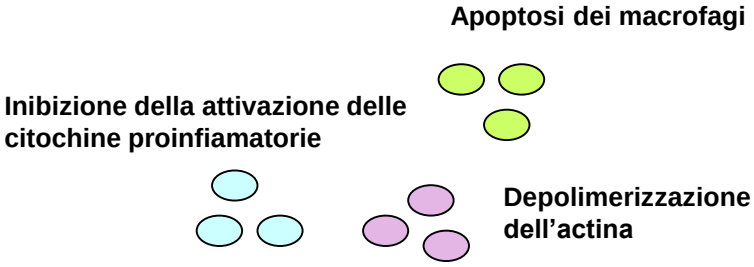


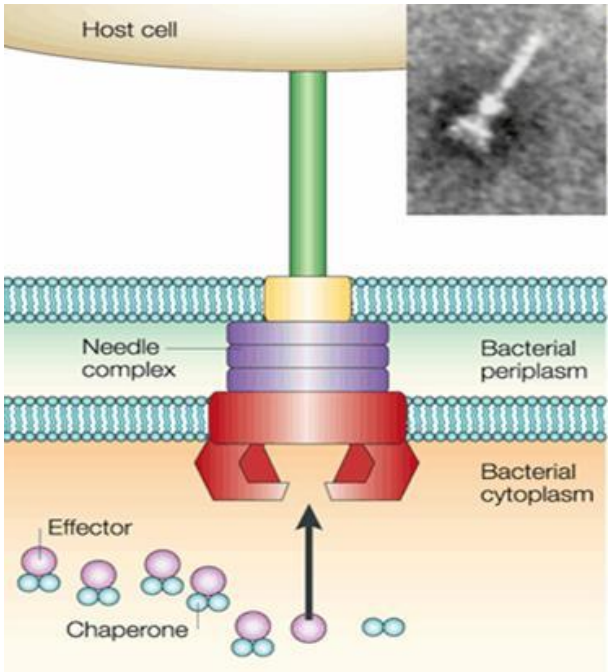


Arriva il primo plasmide …



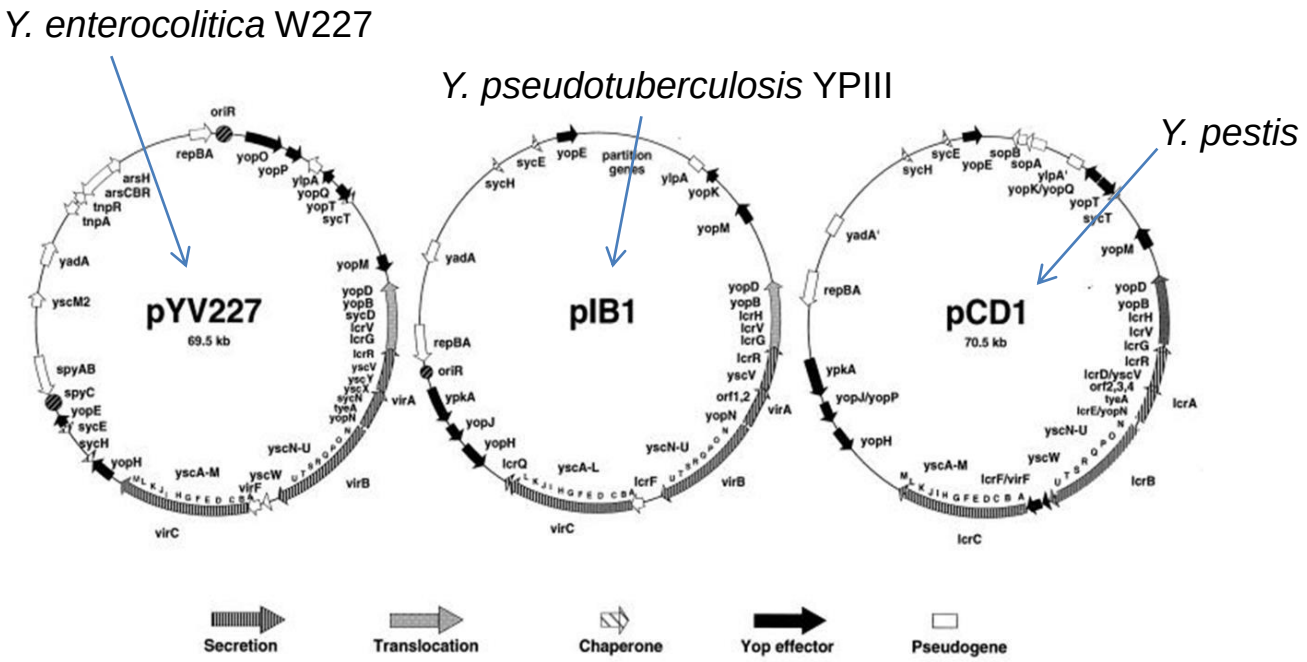
Il plasmide pYV è un grande plasmide (70 kb) che contiene i geni per la sintesi di una "siringa molecolare" in grado di iniettare proteine plasmidiche capaci di distruggere la funzionalità della cellula bersaglio





Il plasmide *pYV*

Il plasmide *pYV* (*Yersinia virulence*) è presente in tutti gli *Yersinia* patogeni e codifica
- un sistema di secrezione di tipo III e
- dei fattori proteici che interferiscono con la risposta immunitaria nell'ospite.

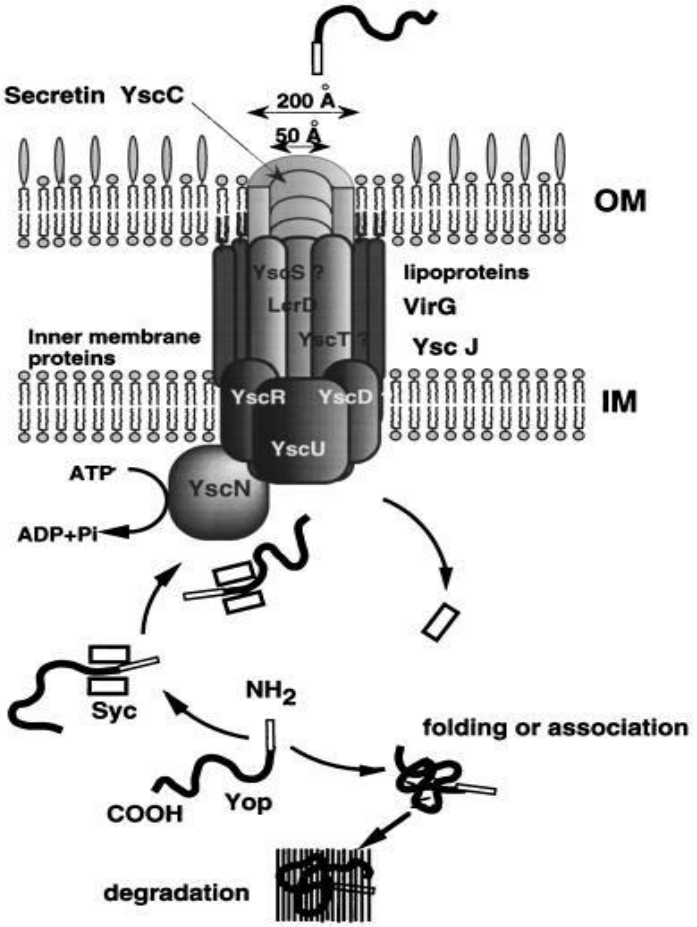


Codifica per delle proteine chiamate Yops (*Yersinia outer membrane proteins*). Il rilascio delle Yops nelle cellule del sistema immunitario inibisce la polimerizzazione dell'actina, prevenendo la fagocitosi delle cellule batteriche e sopprime la trascrizione dei geni per la risposta immune. La diminuita espressione delle citochine proinfiammatorie favorisce la proliferazione dell'infezione.

Esistono gruppi diversi di Yops:

- effettori che vengono trasportati all'interno della cellula eucariotica bersaglio
- chaperonine
- fattori di regolazione

Le varie componenti del sistema di secrezione di tipo III sono codificate dai geni *ysc* (*yop secretion*)



Tra gli effettori, YopE è un agente citotossico, che, attaccando i microfilamenti del citoscheletro, provoca il distacco della cellula eucariotica dalla matrice extracellulare.

Tutti gli effettori Yops hanno degli omologhi in altre specie di patogeni; ad esempio, YopE è omologo ad ExoS in *P. aeruginosa* e SptP/StpA in *Salmonella*

Evoluzione di Y. pestis da Y.pseudotubercolosis

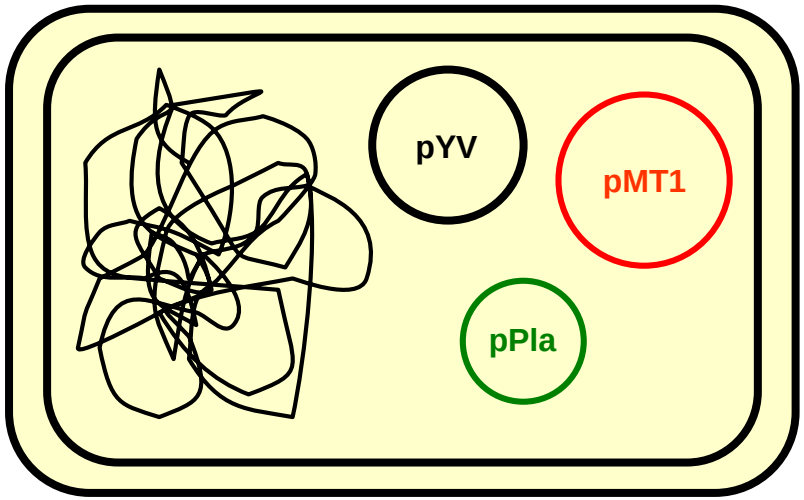
Il primo passo della transizione da *Y. pseudotubercolosis* a *Y. pestis* è stato l'acquisizione del gene *ymt,* presente sul plasmide *pMT1*

La trasformazione di *Y. pseudotuberculosis* con il gene *ymt* è sufficiente ad estendere l'infezione nella pulce

Per la trasmissione dal vettore insetto all'ospite mammifero è necessaria la formazione del biofilm nel proventriculus

I geni *hms* (*hmsHFRS, hmsT* e *hmsP)* sintetizzano una matrice extracellulare fondamentale per la formazione del biofilm

I geni *hms,* presenti sul cromosoma, sono funzionali sia in *Y. pseudotuberculosis* sia in *Y. pestis* ma hanno una diversa regolazione



Plasmide pMT1
contiene le informazioni necessarie per proteggere il batterio dall' azione batteriolitica di enzimi presenti nel tratto gastrointestinale della pulce.

Plasmide pPla
contiene le informazioni necessarie per l'attivazione del plasminogeno dell'ospite che degraderà
- alcuni fattori del complemento impedendo la chemiotassi dei fagociti
- la fibrina permettendo la disseminazione del batterio nell'ospite

Il plasmide *pMT1*

È un grande plasmide di circa 100 kb. Codifica per

- la **Yersinia Murine Toxin (Ymt)** , una fosfolipasi D (PLD) che aumenta le probabilità di sopravvivenza del batterio nell'intestino dell'insetto. Il gene *ymt* viene espresso a 26°C

- la capsula F1: importante per la resistenza alla fagocitosi; il gene *caf1* codifica per la proteina F1 (15.5 kDa), che forma una capsula esterna che riveste il batterio, e i geni *caf1M*, *caf1A* e *caf1R* codificano per regolatori e chaperonine.

I geni della capsula F1 hanno un contenuto in G+C del 39.2%, il locus *ymt* 38.2% e il resto del plasmide 50.1%; ciò suggerisce che il plasmide *pMT1* sia un mosaico genetico.

Il plasmide *pPla*

È un piccolo plasmide di 9.6 kb che codifica per:

- L'attivatore del plasminogeno (Pla): è una proteasi di 34.6 kDa che taglia il plasminogeno, precursore della plasmina, ed è fondamentale per l'infezione nell'ospite mammifero

- Si è recentemente osservato che Pla è associato con infezione polmonare fulminante.

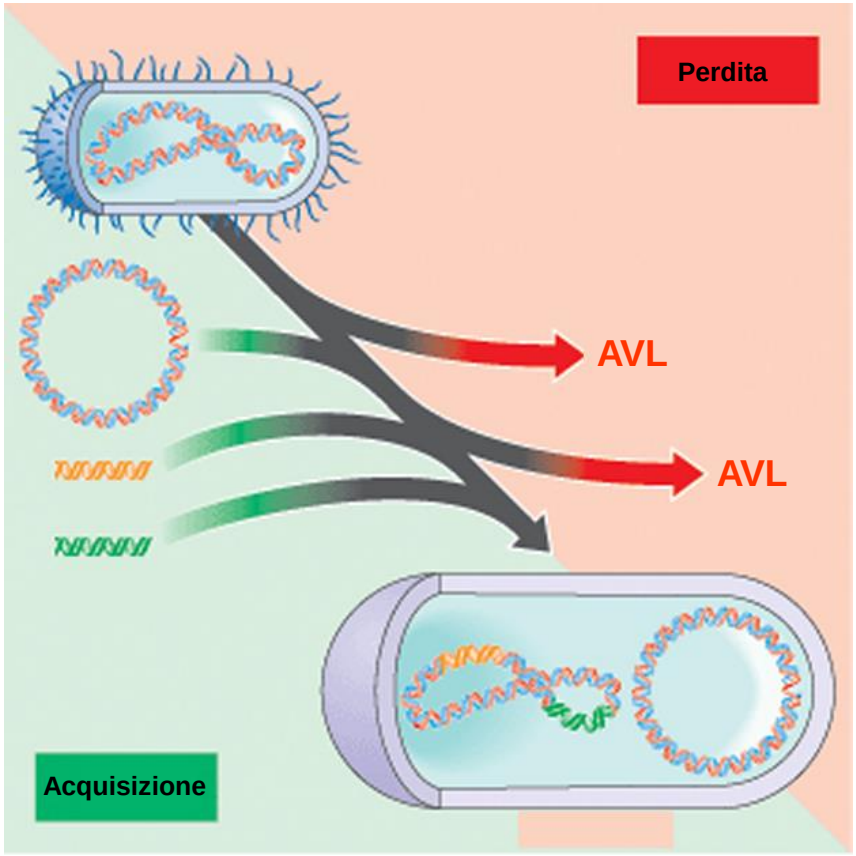
- La pesticina (Pst) è una tossina ed ha un'azione battericida. È simile al lisozima ed è in grado di degradare il peptidoglicano.

Oltre al pYV tutti i ceppi di Yersinia patogeni hanno acquisito il locus ail che svolge un ruolo nell'attachment e invasione delle cellule epiteliali e nella resistenza al killing da parte dei macrofagi.

Altri elementi specifici (*Y. pseudotubercolosis/Y. pestis*) che sono stati acquisiti includono l'isola di alta patogenicità (HP1) che è un ICE (Integrative Conjugative Element) che codifica yersiniabactina, un sideroforo che sequestra il Fe dall'ospite e importa lo zinco nelle cellule batteriche

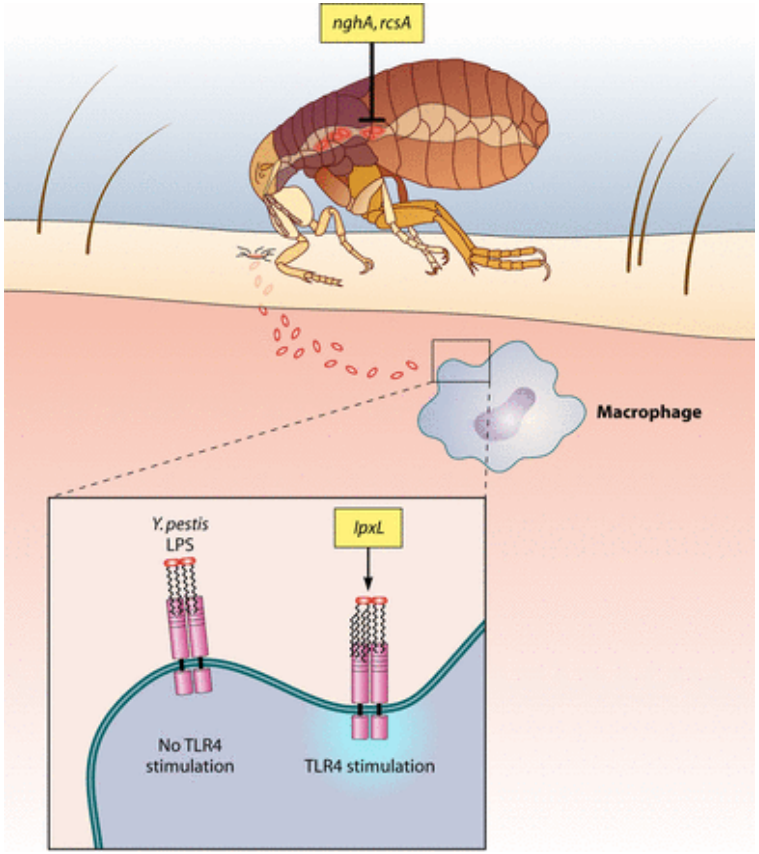
Gli altri geni essenziali nell'evoluzione di *Y. pestis* sono il locus *hms* localizzato sul cromosoma che codifica un sistema di stoccaggio dell'emina.Questo locus è un fattore importante ed è richiesto nella formazione dei biofilm che bloccano l'intestino della pulce con un riflusso di sangue dalla pulce infetta al punto di infezione facilitando la diffusione della malattia al mammifero ospite

Le mutazioni pato(genicità)-adattative



- Sono mutazioni in geni cromosomici funzionali nel batterio progenitore
- Aumentano il "benessere" del batterio nel nuovo ambiente all'interno dell'ospite
- Permettono al microrganimo di ottimizzare il nuovo stile di vita patogeno
- I geni che vengono persi sono definiti "geni di antivirulenza" (AVL); codificano funzioni diverse a seconda dei microrganimi

Il vantaggio selettivo di perdere funzioni



Rispetto al suo progenitore, *Y.pseudotuberculosis*, in *Y.pestis* si osserva la perdita di funzionalità del 13% dei geni. Sono eliminati:

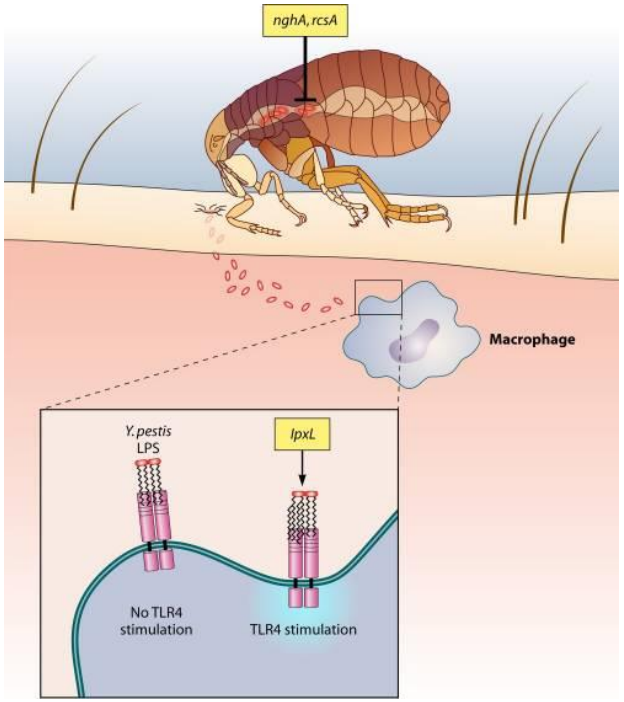
1. i geni che impediscono un efficiente formazione dei biofilm nella pulce

2. i geni che modificano la parete del batterio per renderla irriconoscibile ai recettori del sistema dell'immunità innata dell'ospite

Perdita di geni

Y. pestis si è evoluto circa 1.500-20.000 anni fa dal suo antenato *Y. pseudotuberculosis*, passando da un ciclo vitale a trasmissione oro-fecale dall'ambiente all'ospite ad un ciclo vitale di tipo vettore-ospite-vettore.

La perdita di geni è un passo importante nel processo di adattamento.



Gene	Ruolo	Localizzazione	Presente in:	
			Y. pestis	*Y. pseudotuberculosis*
rcsA	Regolatore trascrizionale	Cromosoma	pseudogene	+
nghA	Degradazione biofilm	Cromosoma	pseudogene	+
lpxL	Modifica il lipide A	Cromosoma	-	+
yadA	Adesione cellulare	*pYV*	pseudogene	+
ureD	Sintesi di ureasi	Cromosoma	pseudogene	+

Il 13% dei geni di *Y. pseudotuberculosis* non sono funzionali in *Y. pestis*

L oss-of-function mutations have also played a significant role in the evolution of Y. pestis from Y. pseudotuberculosis. Approximately 200 genes are inactivated in Y. pestis, according to a genome comparison with Y. pseudotuberculosis (7). Notably, Y. pestis lost genes whose products repress biofilm synthesis (*rcsA*) and enhance biofilm degradation (*nghA*), underscoring the importance of biofilm stability in this pathogen's lifestyle.

Le mutazioni patoadattative : la perdita di RcsA

RcsA è un regolatore negativo per la sintesi dei biofilm. RcsA è una proteina accessoria del sistema delle istidin chinasi Rcs che è in grado di aumentare l'effetto repressivo di RcsB, una DNA binding protein coinvolta nella regolazione negativa della formazione di biofilm.
La perdita di RcsA diminuisce la stabilità di legame e di conseguenza l'attività di repressore di RcsB che a questo punto è incapace di reprimere i geni coinvolti nella biosintesi del biofilm
Introduzione del gene *rcsA* wt di *Y.pseudotubercolosis provoca in Y.pestis:*
- Inibizione della formazione di biofilm
-diminuisce il blocco dell'apparato intestinale

Quando viene silenziato in *Y.pseudotubercolosis* il gene *rcsA* si osserva la formazione di biofilm in *C.elegans* (modello di infezione)

La mutazione più frequentemente osservata è una duplicazione di 30 bp nella sequenza codificante. Questa mutazione si ritrova in tutti le subspecie di *Y. pestis* suggerendo che possa essersi originata molto presto per promuovere una cospicua produzione di biofilm ,fase essenziale per la trasmissione dalla pulce all'ospite. In *Y. pestis* Antiqua si osserva un inserzione di un trasposone per l'inattivazione del gene.

Mutazioni patoadattative : la perdita di nghA

Oltre a mutazioni che favoriscono la formazione di biofilm , durante l'evoluzione si sono messi a punto sistemi per evitare la degradazione del biofilm.

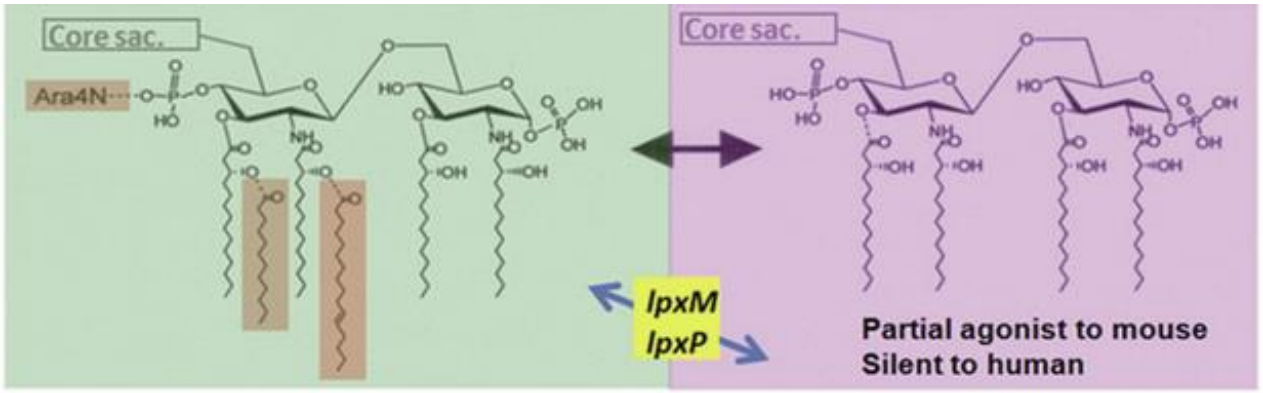
In *Y.pestis* la formazione della matrice extracellulare del biofilm nello stomaco della pulce dipende dall'espressione dei geni *hms* che permettono la sintesi di un biofilm ricco in una poly-glucosamina.

Il gene *nghA* codifica per una glicosil idrolasi e si è visto che questo gene in *Y. pestis* è sempre silenziato mentre è attivo in *Y. pseudotubercolosis.*
La mutazione è dovuta ad una delezione di 11 bp che determina l'insorgenza di un codone stop con conseguente formazione di una proteina tronca e inattiva.

Quando il gene *nghA* di *Y.pseudotubercolosis* viene introdotto in *Y.pestis* si osserva
-La degradazione dei biofilm per digestione dei residui di N acetil glucosamina.
Il ceppo riesce a colonizzare lo stomaco della pulce ma la formazione di biofilm è fortemente diminuita

La perdita di lpxL

La modificazione dell LPS.



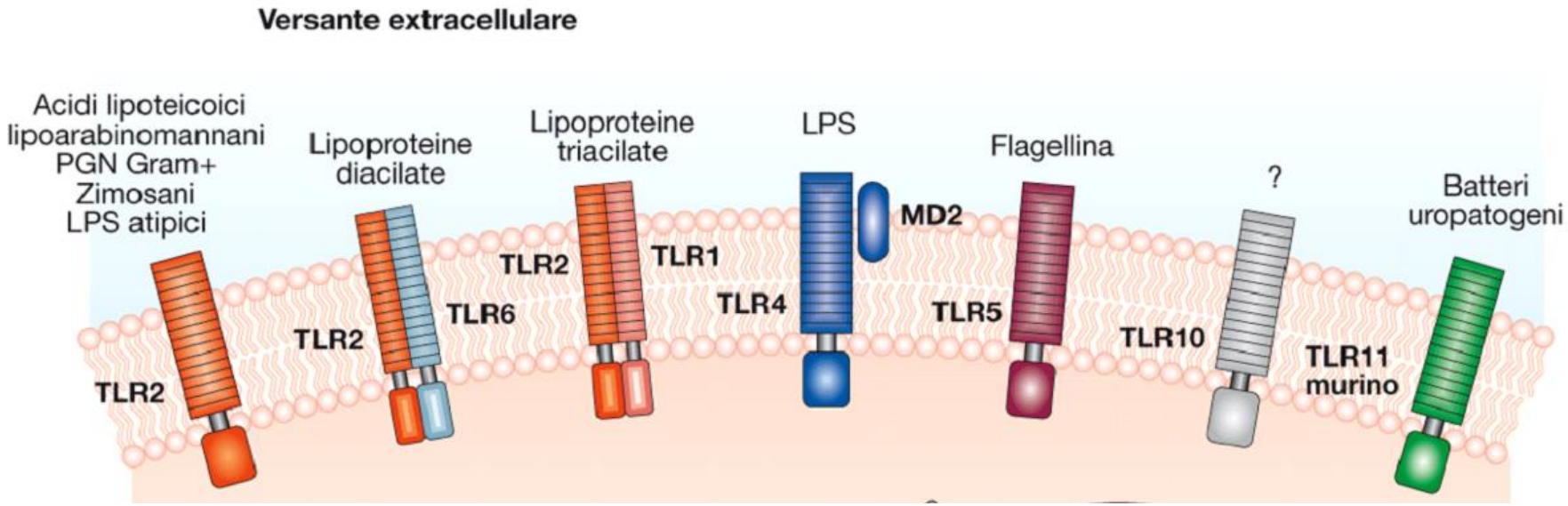
Un'altra importante mutazione patodattativa riguarda i gene lpx che sono in grado di modificare LPS, in particolare si osserva la perdita della capacità di convertire il lipide A dell LPS dalla forma tetra-acetilata in esa-acetilata.
Esa acetilazione è una modificazione post traduzionale del LPS che è cruciale nel provocare la risposta immune tramite l'interazione con il TLR4 sulla superficie della cellula.

Presentandosi in una forma non esacetilata Y.pestis induce solo una blanda risposta immune permettendo cosi al batterio di sopravvivere più facilmente nell'ospite.
Y.pseudotubercolosis invece possiede la capacità di esaacetilare Lipide A dell'LPS e induce una buona risposta immune.

Esa acetilazione è determinata da 2 proteine: LpxL e LpxP.
LpxL che è Lauril acetiltransferasi è in grado di attaccare delle catene lipidiche secondarie all'unità tetracetilata di lipide A.

Questo gene è assente in tutti i ceppi di Y.pestis.

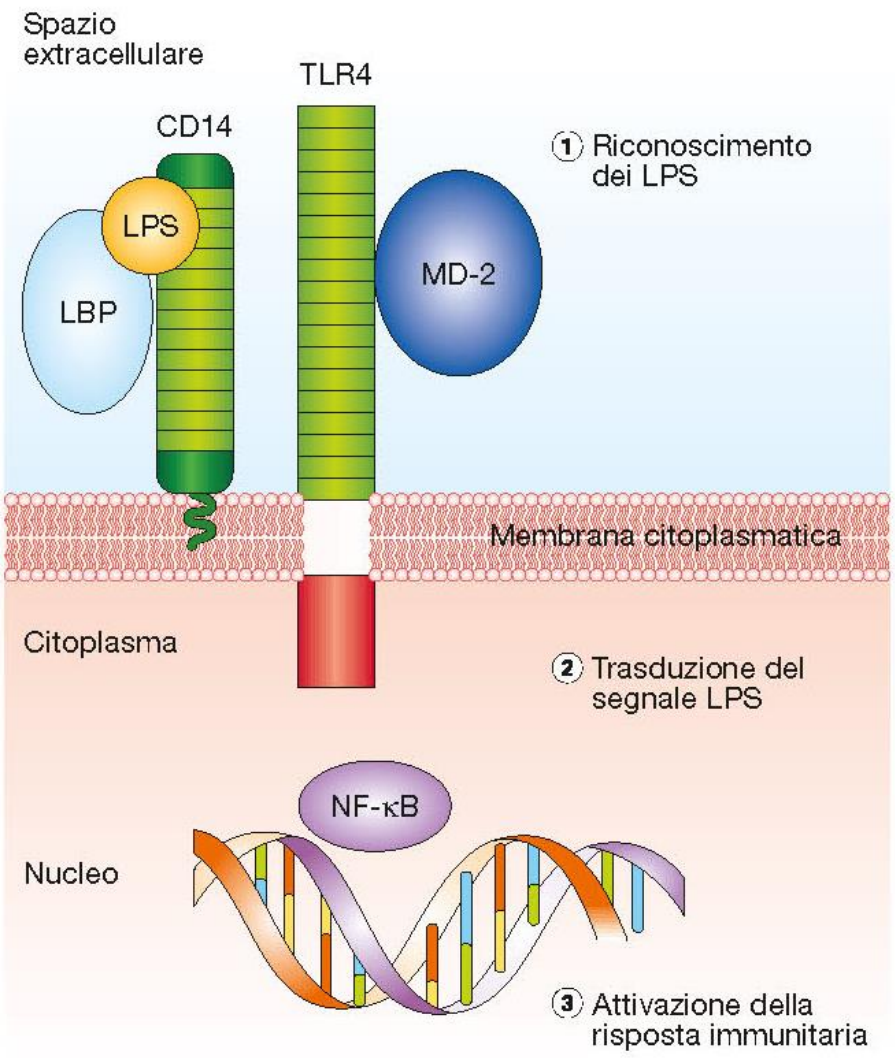
I Toll like receptor sono dei recettori presenti sulle cellule del sistema immunitario deputati al riconoscimento di varie strutture tra le quali alcune presenti nella parete batterica quali LPS, PG,acidi lipoteici



Sono glicoproteine integrali di membrana con un dominio N terminale esterno, un dominio centrale ed una regione citoplasmatica C terminale. Presenti nelle cellule immunocompetenti (macrofagi,neutrofili cellule dendriche).

vedi Cap.21

Come avviene il riconoscimento dell 'LPS da parte dei macrofagi?



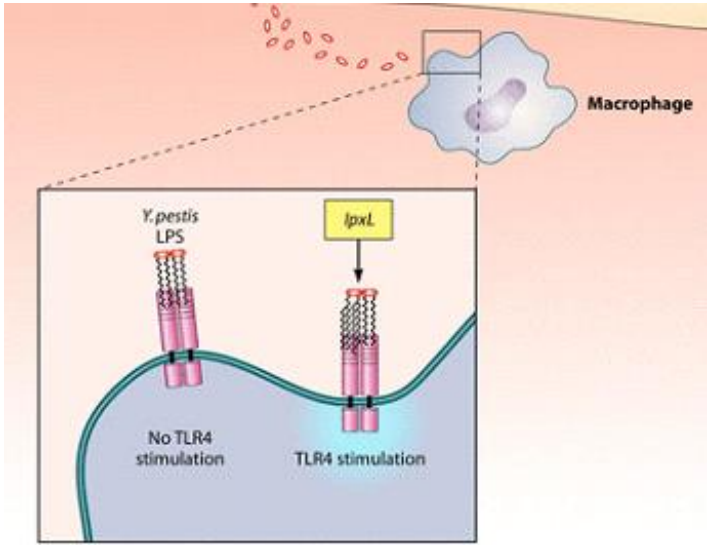
I toll like receptor (TLR) sono espressi principalmente nelle cellule immunocompetenti (macrofagi, cellule dendridiche)

Il legame dell'LPS all TLR4 provoca l'attivazione di una via di segnalazione che attiverà la trascrizione del fattore NFkB .e si avrà attivazione della risposta immunitaria.

Il processo richiede oltre al TLR4 altri fattori

- LBP proteina legante LPS presente nel siero.
- le molecole CD14 che si ritrovano sia in forma solubile che associate alla membrana (CD14s e CD14m)

La molecola MD2 che si associa al TLR.

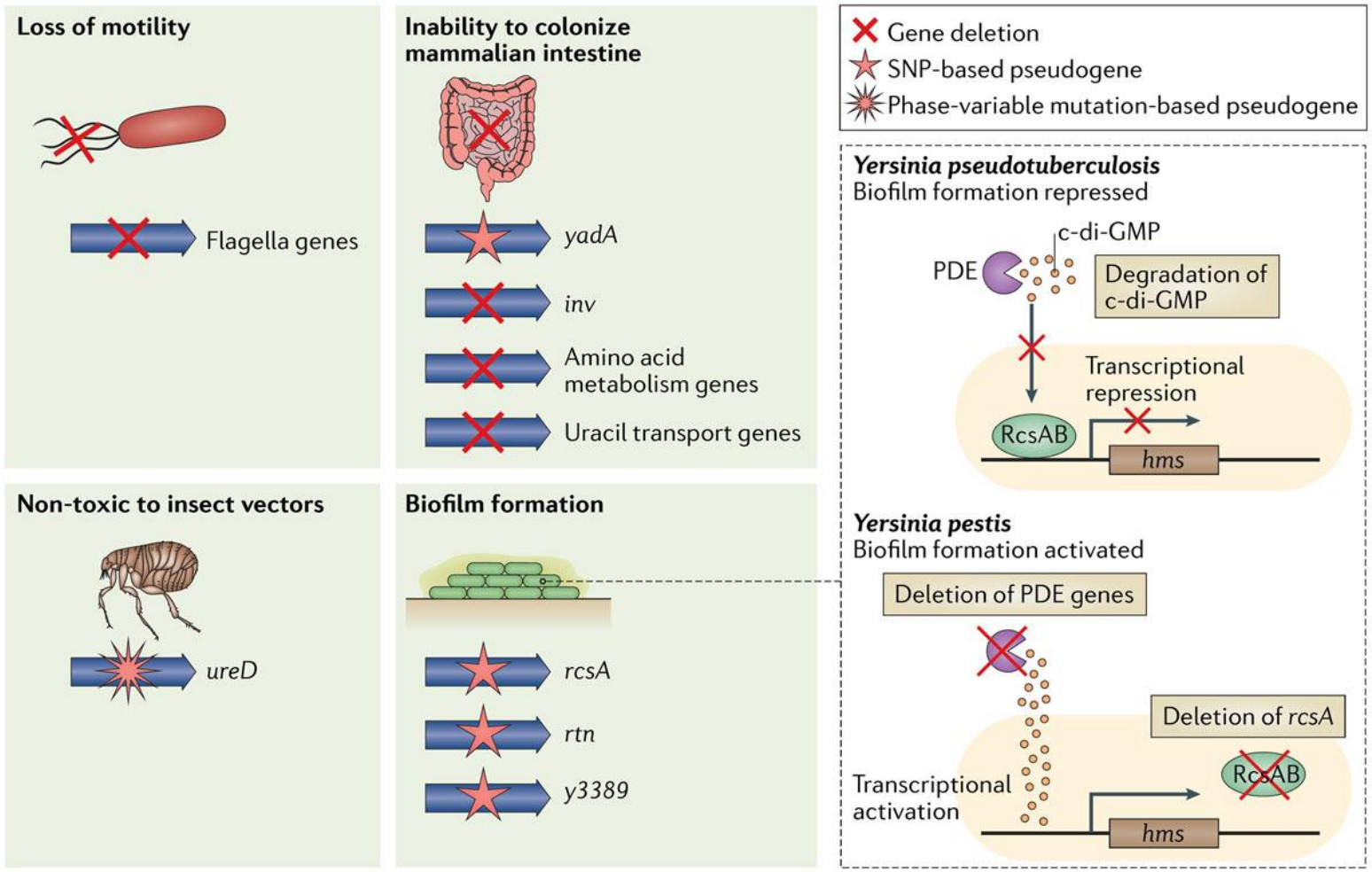


Quando il gene *lpxL* di E. coli viene espresso in Y. pestis si osserva attivazione della risposta immune con un aumento di sintesi diTNF, IL-6 e IL-8 da parte delle cellule.
In un modello murino , il ceppo wt provoca 100% di mortalità mentre il ceppo complementato con *lpxL* non è letale.
Quindi esacetilazione è una tappa essenziale per scatenere la risposta dell'ospite.
La perdita del gene lpxL è quindi essenziale per Y.pestis per eludere i sistemi di difesa dell'ospite.

Molti dei geni che sono stati funzionalmente persi nell'evoluzione da *Y. pseudotubercolosis* a *Y. pestis* codificano fattori di virulenza come le invasine e Yad A e loci metabolici che sono coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi dicarbossilici e nel trasporto di uracile o loci coinvolti nella motilità.

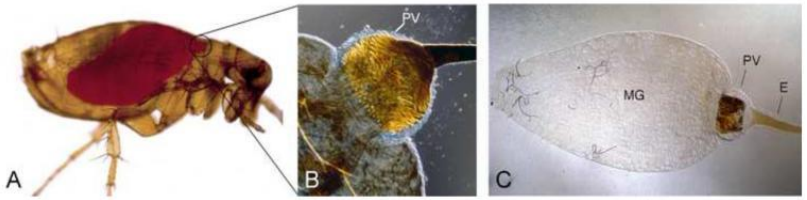
***Y.pseudo* richiede questi loci per un 'efficiente colonizzazione del tratto gastrointestinale che è una nicchia non più colonizzata da *Y. pestis* che deve invece colonizzare intestino della pulce e nei mammiferi per poi poteressere in grado di provocare un infezione sistemica.**

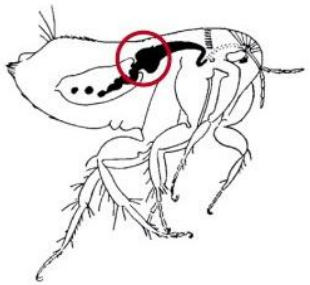
Ruolo della perdita dei geni nell'evoluzione di *Y. pestis* da *Y.pseudotubercolosis*

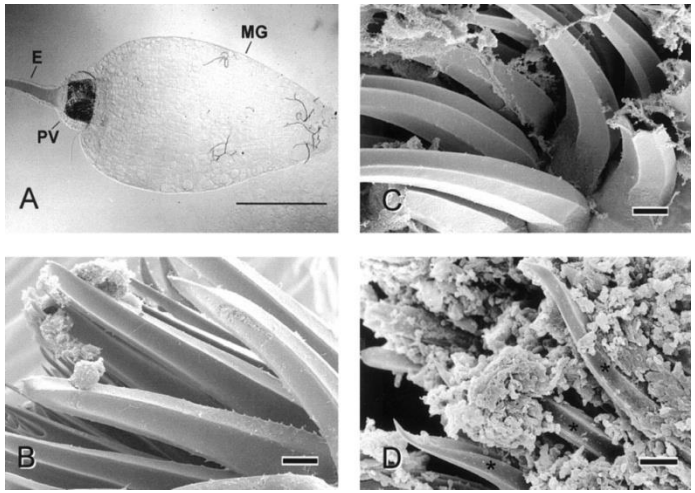


Nature Reviews | Microbiology

Analisi dell'importanza del passaggio nella pulce per la trasmissione







Tratto digerente della pulce: esofago, proventriculus, intestino medio e intestino posteriore

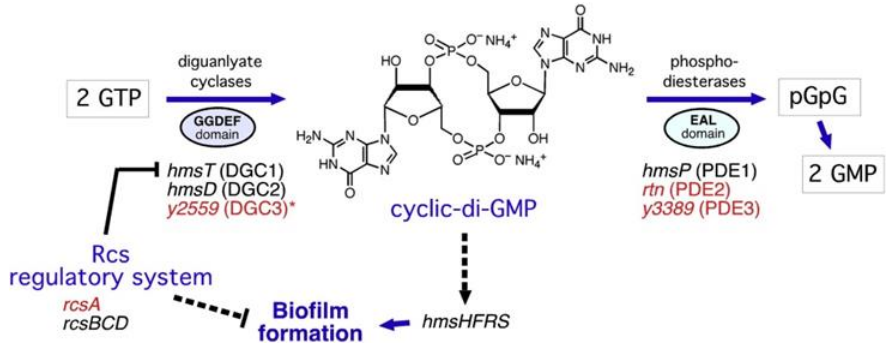
Modello del blocco proventricolare: si formano degli aggregati di *Y. pestis* prima all'interno dell'intestino medio e poi nel proventriculus.

Adattamento alla pulce

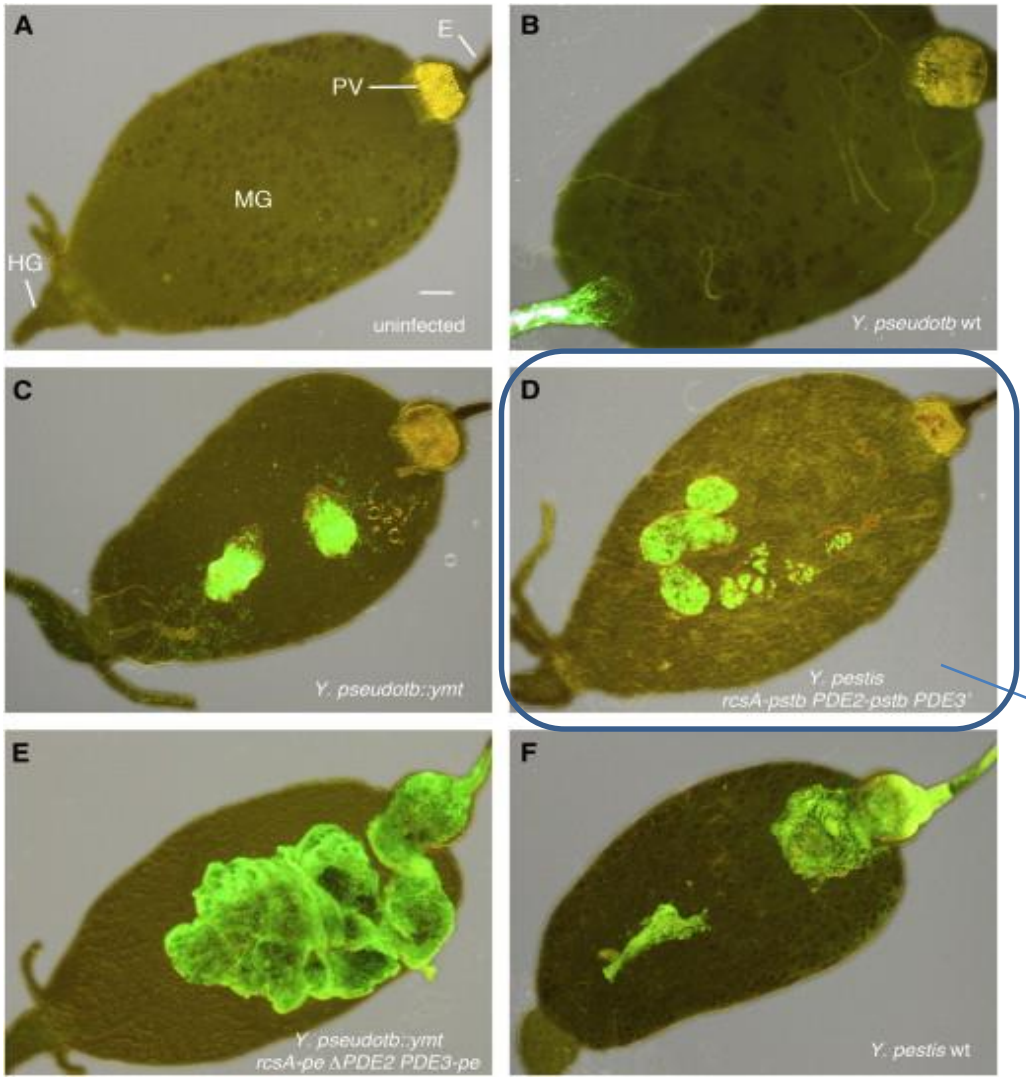
Mutazioni in *rcsA* alleviano la repressione trascrizionale sul operone dello stoccaggio dell'emina (hms) che codifica fattori necessari per la formazine dei biofilm.

Incremento dei livelli di formazione di biofilm di GMP-dependente.

Le mutazioni identificate sono localizzate in due geni che codificano fosfodiesterasi (rtn e y3389) che sono enzimi che degradano il cyclic –di-GMP),una molecola che agisce come attivatore di hms e quindi della formazione di biofilm



Cyclic-di-GMP: molecola segnale che induce la formazione del biofilm

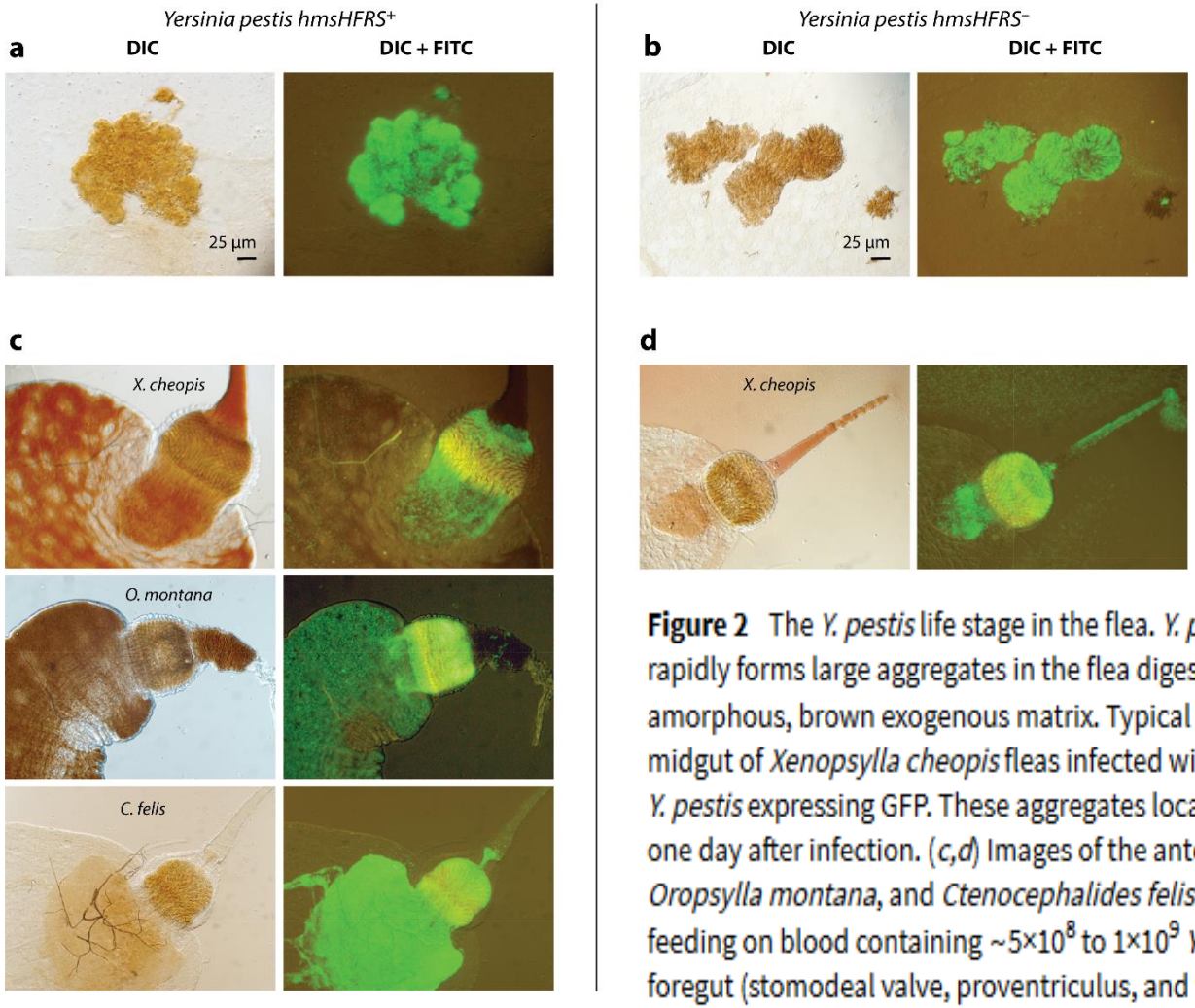


In *Y. pseudotuberculosis* ci sono tre diguanilato ciclasi (DCG) che sintetizzano cyclic-di-GMP e tre fosfodiesterasi (PDE) che la degradano.

In *Y. pestis* due dei tre PDE sono presenti come pseudogeni: la perdita di funzione di *rcsA* e dei due PDE ha l'effetto di aumentare la concentrazione intracellulare di cyclic-di-GMP, favorendo la sintesi del biofilm

La sostituzione dei tre pseudogeni con gli omologhi funzionali di *Y. pseudotuberculosis* elimina completamente la capacità di *Y. pestis* formare il biofilm

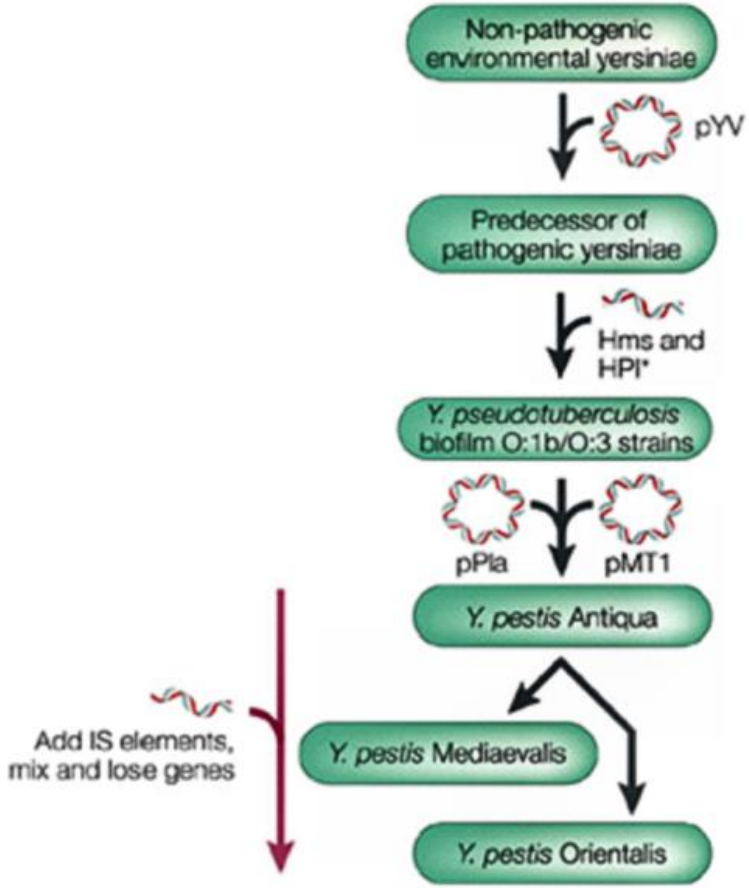
Difetto nella formazione di Biofilm nella pulce nei ceppi hms difettivi

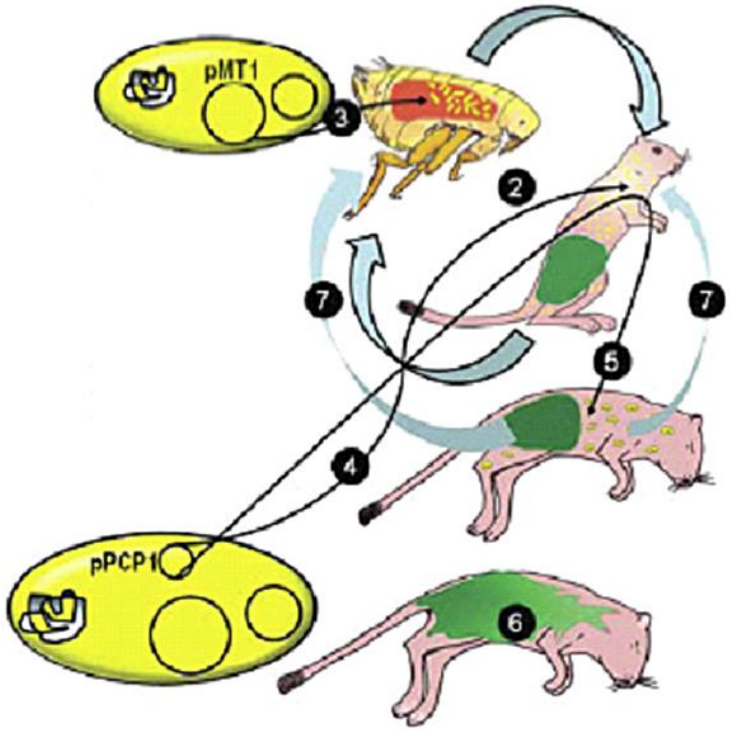


Hinnebusch BJ, et al. 2017. *Annu. Rev. Microbiol.* 71:215–32

Figure 2 The *Y. pestis* life stage in the flea. *Y. pestis* ingested in a blood meal rapidly forms large aggregates in the flea digestive tract, in association with an amorphous, brown exogenous matrix. Typical examples recovered from the midgut of *Xenopsylla cheopis* fleas infected with (*a*) *hmsHFRS*$^{+}$ or (*b*) *hmsHFRS*$^{-}$ *Y. pestis* expressing GFP. These aggregates localize in the proventriculus within one day after infection. (*c,d*) Images of the anterior digestive tract of *X. cheopis*, *Oropsylla montana*, and *Ctenocephalides felis*: Fleas were dissected one day after feeding on blood containing ~5×10^{8} to 1×10^{9} *Y. pestis* KIM6^{+} (pAcGFP1)/mL. The foregut (stomodeal valve, proventriculus, and the esophagus) as well as the midgut are colonized. Abbreviations: DIC, differential interference contrast; FITC, fluorescein isothiocyanate.

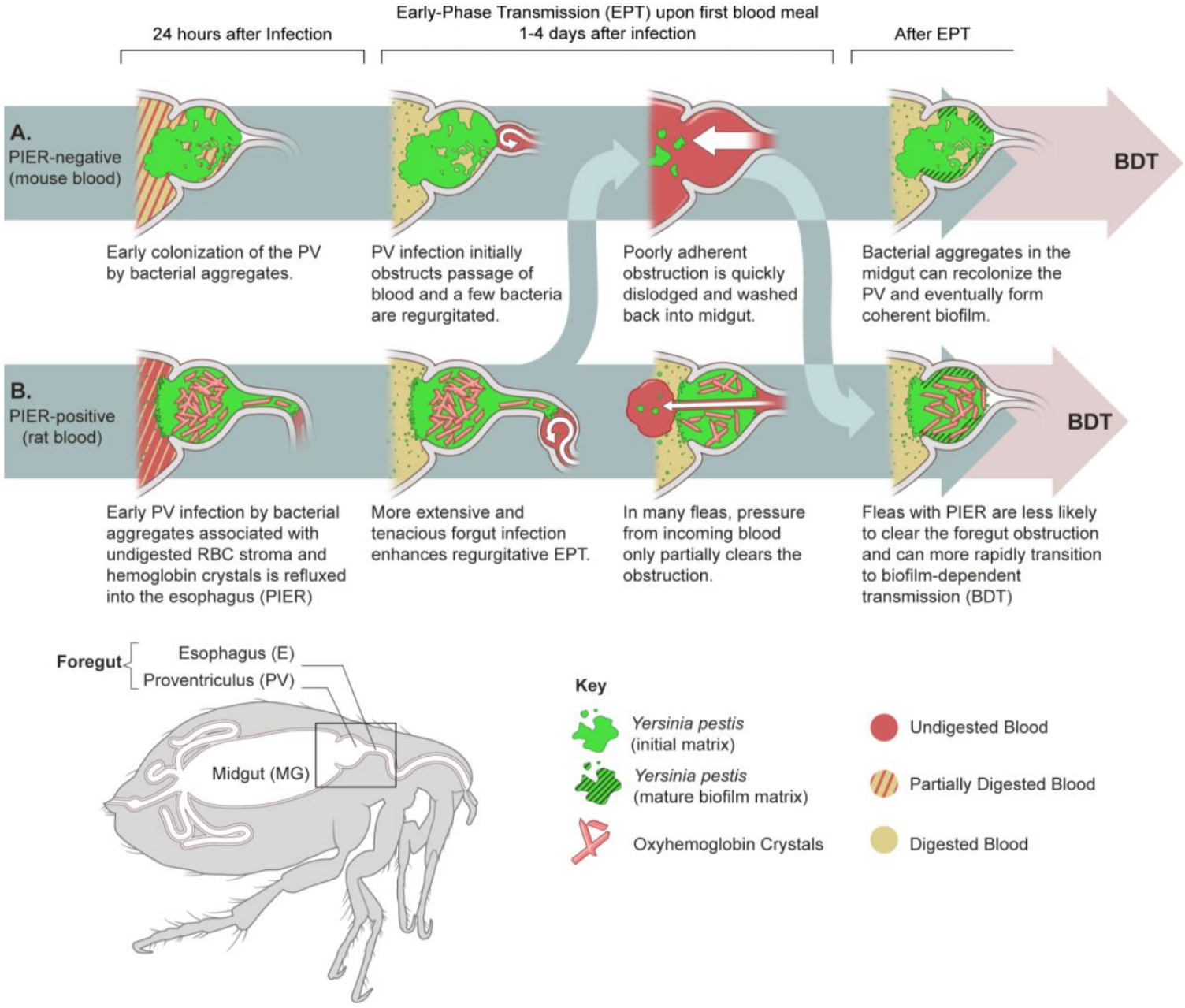
Un’evoluzione complessa, rapida ed inesorabile





Given the central importance of the biofilm life stage in the flea, much research has focused on identifying the *Y. pestis* genes required for this phenotype. The hallmark of a mature biofilm is the matrix or extracellular polymeric substance (EPS) in which the bacteria are embedded, which forms a cohesive scaffold and is essential for stable adherence to a surface. A major component of the *Y. pestis* EPS is poly-β-1,6-*N*-acetyl-d-glucosamine, which is synthesized and exported by the products of the *hmsHFRS* operon The PhoP-PhoQ gene regulatory system of *Y. pestis*, which acts to modify the bacterial outer membrane in response to certain environmental stresses, is induced in the flea and is required for a fully cohesive EPS .

Biofilm development is regulated by the second messenger c-di-GMP. Intracellular c-di-GMP levels are determined by the opposing activities of diguanylate cyclase enzymes, which synthesize c-di-GMP, and phosphodiesterase enzymes, which degrade it. *Y. pestis* encodes two diguanylate cyclases, *hmsT*, of primary importance in vitro, and *hmsD*, of primary importance in the flea; and one phosphodiesterase, *hmsP* . Several regulators that cumulatively control the relative expression of these enzymes, and therefore c-di-GMP flux, have been identified


24 hours after Infection
Early-Phase Transmission (EPT) upon first blood meal
1-4 days after infection
After EPT
A.
PIER-negative
(mouse blood)
BDT
Early colonization of the PV by bacterial aggregates.
PV infection initially obstructs passage of blood and a few bacteria are regurgitated.
Poorly adherent obstruction is quickly dislodged and washed back into midgut.
Bacterial aggregates in the midgut can recolonize the PV and eventually form coherent biofilm.
B.
PIER-positive
(rat blood)
BDT
Early PV infection by bacterial aggregates associated with undigested RBC stroma and hemoglobin crystals is refluxed into the esophagus (PIER)
More extensive and tenacious forgut infection enhances regurgitative EPT.
In many fleas, pressure from incoming blood only partially clears the obstruction.
Fleas with PIER are less likely to clear the foregut obstruction and can more rapidly transition to biofilm-dependent transmission (BDT)
Foregut
Esophagus (E)
Proventriculus (PV)
Midgut (MG)
Key
Yersinia pestis
(initial matrix)
Yersinia pestis
(mature biofilm matrix)
Oxyhemoglobin Crystals
Undigested Blood
Partially Digested Blood
Digested Blood

Model of early-phase regurgitative transmission of *Y*. *pestis* by PIER positive and PIER negative fleas.
Following an infectious blood meal, fleas rapidly lyse red blood cells (RBC) and hemoglobin is released. Within a few hours, *Y*. *pestis* coalesces into aggregates that are enveloped in an exogenous matrix that is derived from blood digestion products [8]. Depending on the blood source, incompletely digested RBCs and oxyhemoglobin crystals can associate with the bacterial aggregates in the midgut. Normal peristalsis and proventricular pulsations, which continue long after feeding, draw the aggregates into the proventriculus, and some of them lodge there. According to the model, when fleas with extensive proventricular colonization feed again 1–3 days after infection, the incoming blood flow is sufficiently impeded to result in regurgitation of bacteria. Early proventricular colonization and early-phase transmission do not require mature biofilm formation and the permanent proventricular colonization that is mediated by the *Y*. *pestis hmsHFRS* genes [8, 15]. (A) In PIER-negative fleas, RBCs are digested quickly and hemoglobin remains soluble. The bacterial aggregates in the proventriculus of heavily colonized fleas withstand the initial pulses of incoming blood, which can result in regurgitative transmission of a few bacteria. However, the obstruction is ephemeral and incoming blood quickly dislodges most or all of the poorly adherent bacterial aggregates back into the midgut. The proventriculus can later be recolonized permanently by an Hms-dependent biofilm. (B) In PIER-positive fleas, less rapid RBC digestion and formation of oxyhemoglobin crystals correlate with a more tenacious, expansive proventricular colonization and extrusion of infected blood into the esophagus (post-infection esophageal reflux; PIER). The obstruction in the PV is more resistant to dislodgement and bacteria are already present in the esophagus, both of which enhance regurgitative EPT. Incoming blood ultimately channels through the proventricular obstruction of most fleas and enters the midgut. However, because PIER tends to stabilize the initial proventricular colonization, the extrinsic incubation period for biofilm-dependent transmission (BDT) may be shortened, and the two phases of transmission may temporally overlap in populations of infected fleas. Figure adapted from reference [8].