

La parete cellulare è uno strato piuttosto rigido situato all'esterno della membrana citoplasmatica.

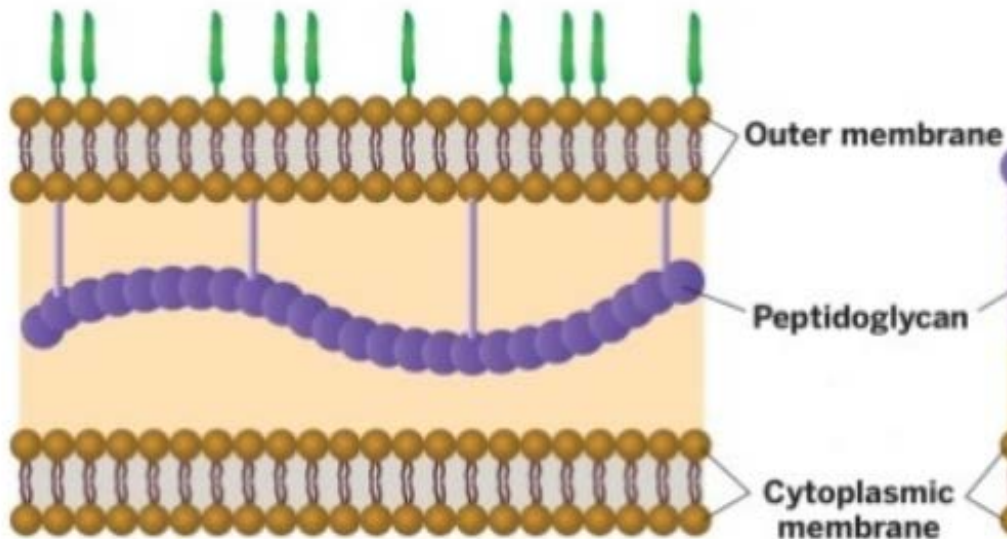
Presente in tutte le cellule procariotiche ad eccezione dei Micoplasmi le Chlamydiae e di alcuni Archea.

### **Funzioni:**

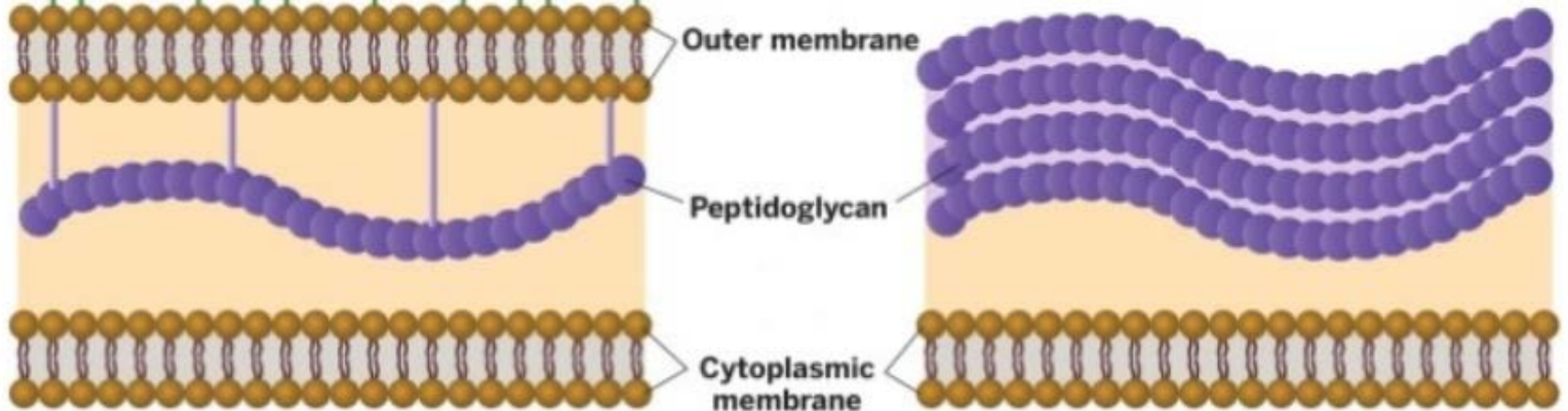
- **determina la forma del batterio**
- **protegge dalla lisi osmotica**
- **protegge la cellula da sostanze tossiche**
- **è il sito bersaglio di vari antibiotici**

# La parete nei Batteri

## GRAM-NEGATIVE



## GRAM-POSITIVE





*Google dedica un doodle allo scopritore della classificazione dei batteri.*

*Hans Christian Gram è stato il primo medico a distinguere le cellule batteriche in due categorie. Oggi 13 settembre Google ne ha ricordato la nascita.*

## La colorazione di GRAM

- messa a punto nel 1884 dal medico olandese Christian GRAM
- è una colorazione differenziale basata sull'uso di due coloranti

1° colorante **cristal violetto**

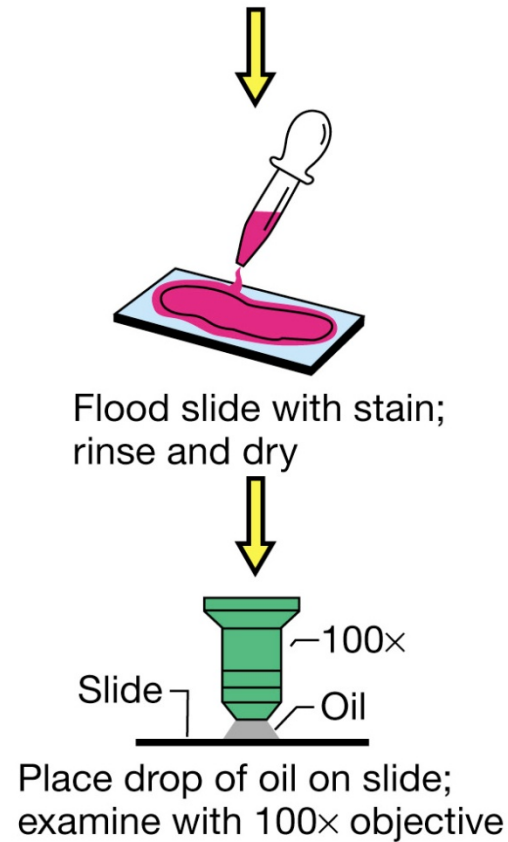
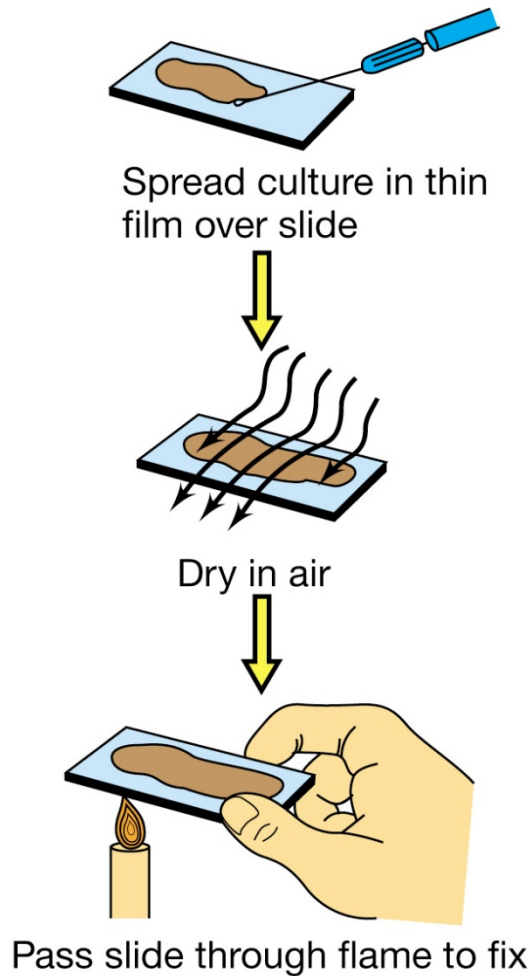
2° colorante **safranina**

Permette di suddividere i Batteri in

 **GRAM positivi**

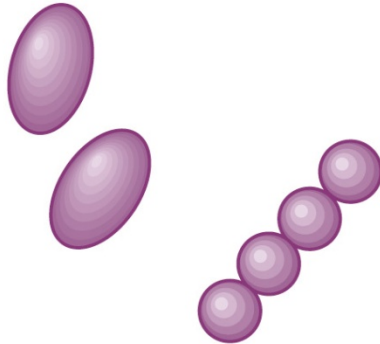
 **GRAM negativi**

# Metodi di colorazione semplice per l'osservazione di cellule batteriche al microscopio ottico



# Quali sono le fasi della colorazione di Gram?

## Step 1

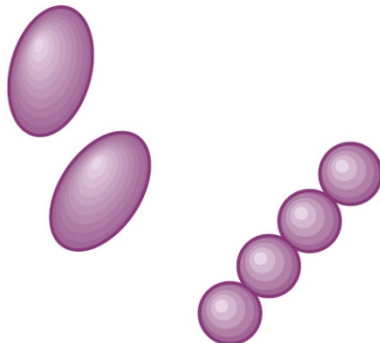


Flood the heat-fixed smear with crystal violet for 1 min

All cells purple

**Colorazione semplice con cristal violetto**

## Step 2



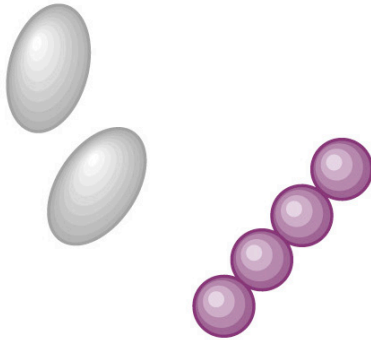
Add iodine solution for 3 min

All cells remain purple

Aggiunta della soluzione di Gram a base di iodo iodurato:  
**le cellule sono ancora violacee**

# Colorazione di Gram: la comparsa della differenza

## Step 3



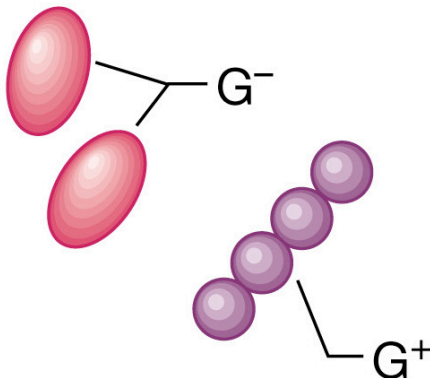
Decolorize with alcohol briefly — about 20 sec

Gram-positive cells are purple; gram-negative cells are colorless

La decolorazione con alcol decolora solo le cellule cosidette

**Gram negative**

## Step 4

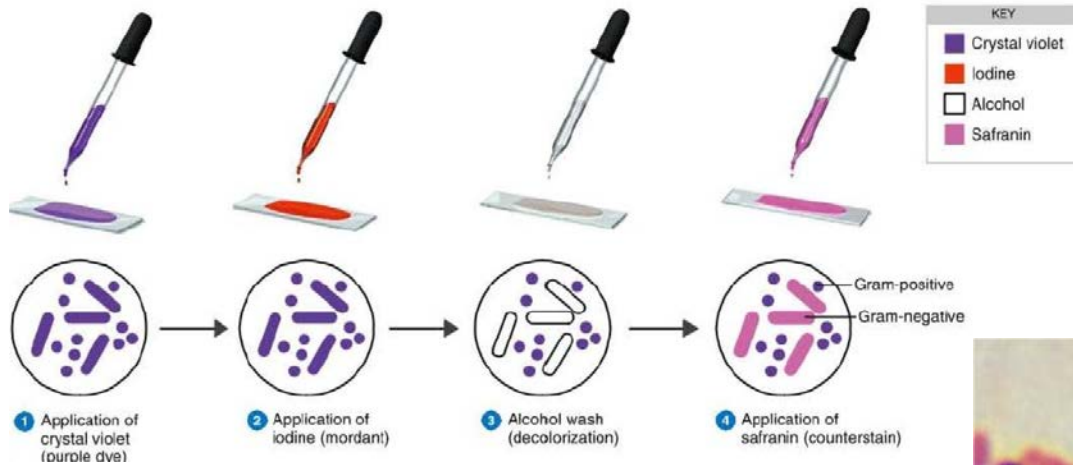


Counterstain with safranin for 1–2 min

Gram-positive ( $G^+$ ) cells are purple; gram-negative ( $G^-$ ) cells are pink to red

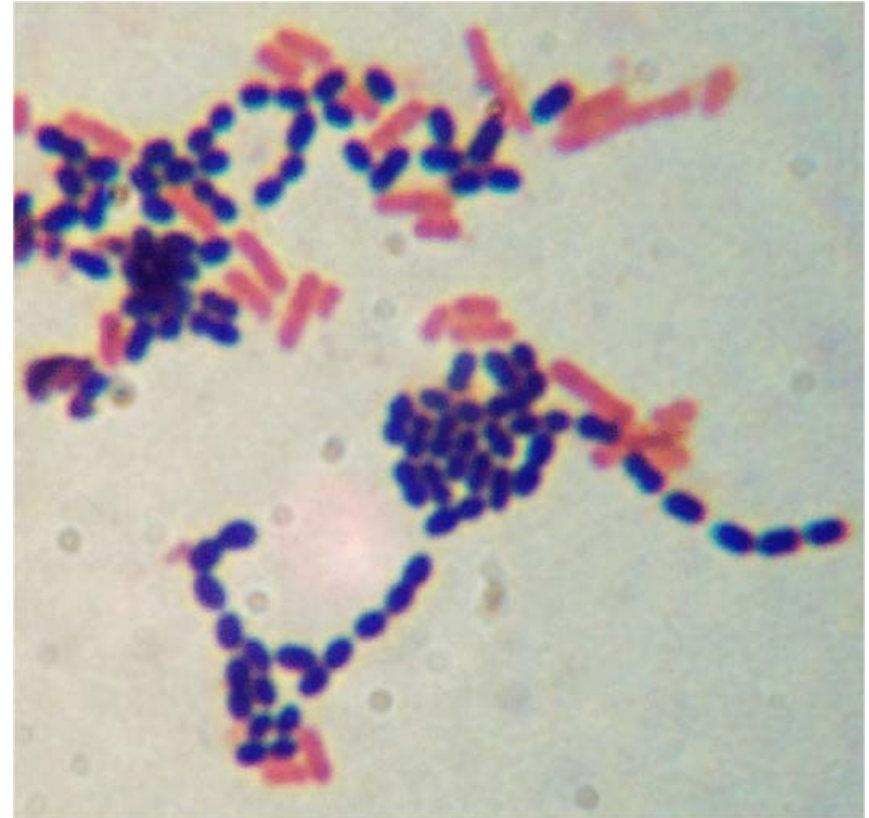
La colorazione di contrasto con **safranina** colora le cellule incolori (**Gram negative**) in **rosa-rosso**

# Le tappe della colorazione di Gram



La colorazione di Gram permette di suddividere i batteri sulla base della struttura della parete cellulare.

La diversità nella risposta dipende dallo spessore del peptidoglicano che riesce a trattenere il complesso ioduro-cristalvioletto nei Gram+



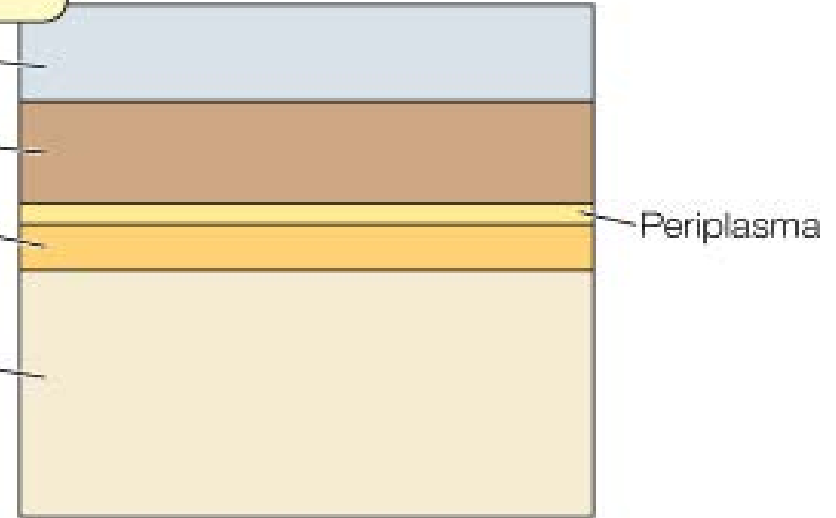


(A)

I batteri gram-positivi possiedono una parete cellulare monostrato, di densità uniforme formata soprattutto da peptidoglicano.



Esterno della cellula  
Parete cellulare  
Membrana cellulare  
Citoplasma



(B)

I batteri gram-negativi possiedono una parete cellulare a doppio strato formata da uno strato molto sottile di peptidoglicano e da una membrana esterna.



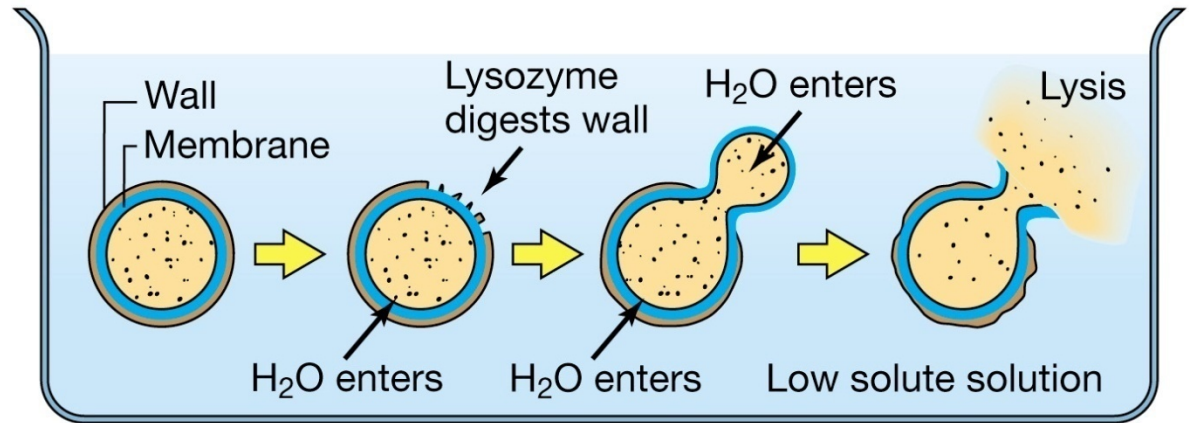
Membrana esterna  
Parete cellulare  
Peptidoglicano  
Membrana cellulare  
Citoplasma



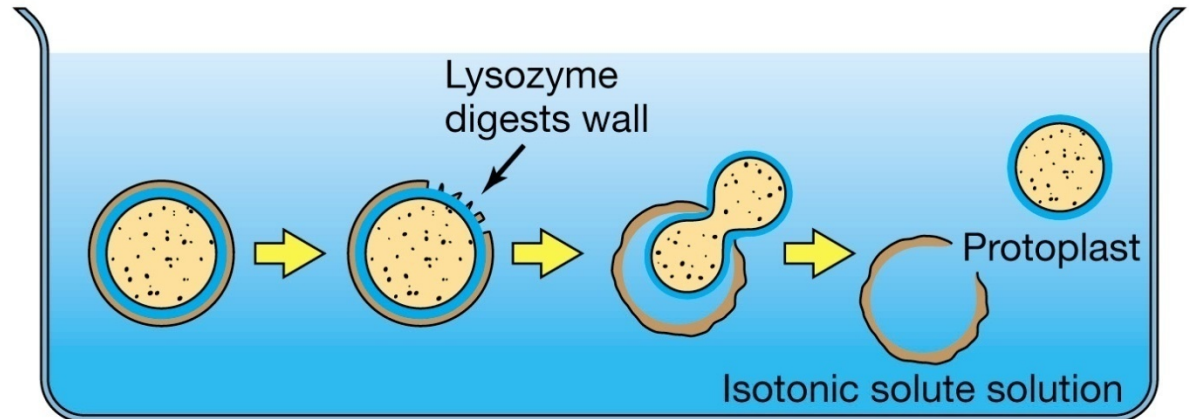
# La digestione della parete cellulare induce la morte della cellula

Il lisozima è un enzima presente in molte secrezioni naturali, lacrime, saliva etc capace di rompere il legame B-1,4 tra NAM e NAG

Formazione di protoplasti in mezzo isotonico



(a)



(b)

# Ma tutti i procarioti hanno la parete cellulare ?

Le eccezioni :

**Mycoplasma**

**Clamydie**

**Thermoplasma**

**Picrophilus**

**Batteri (Gram+)**

**Batteri (Gram-)**

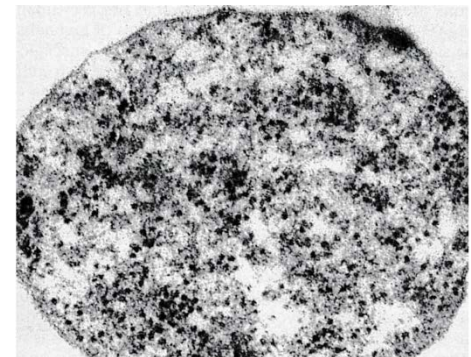
**Archea**

**Archea**

I micoplasmi ricordano i protoplasti ma sono più resistenti alla lisi osmotica

La maggiore resistenza è dovuta alla presenza di **steroli** nella membrana citoplasmatica

In alcuni micoplasmi sono presenti anche **Lipoglicani**, eteropolisaccaridi legati covalentemente ai lipidi di membrana.



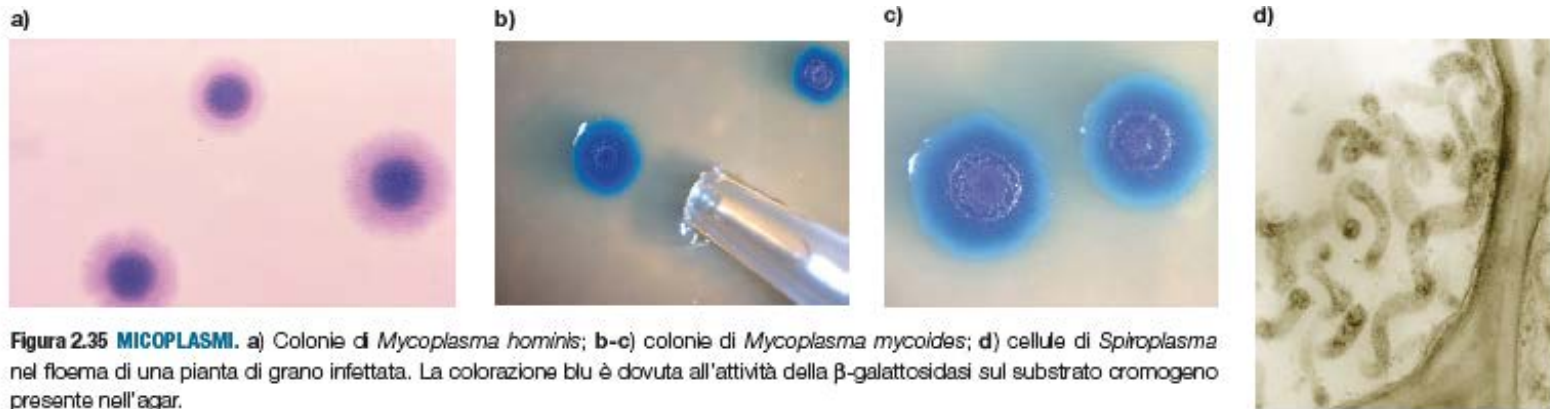


Figura 2.35 **MICOPLASMI**. a) Colonie di *Mycoplasma hominis*; b-c) colonie di *Mycoplasma mycoides*; d) cellule di *Spiroplasma* nel floema di una pianta di grano infettata. La colorazione blu è dovuta all'attività della  $\beta$ -galattosidasi sul substrato cromogeno presente nell'agar.

I micoplasmi batteri senza parete caratterizzati da un genoma molto piccolo (meno di 1 megabase), molte richieste nutrizionali.

Dal RNA16S appartengono ai Gram+, sono tutti commensali parassiti o patogeni, infezioni difficili da trattare con antibiotici

**Le Clamydie , sono Batteri Gram - senza parete.**

In base all'analisi dell'RNA16S sono una linea evolutiva nel dominio dei Batteri. Sono intracellulari parassiti e patogeni per l'uomo.

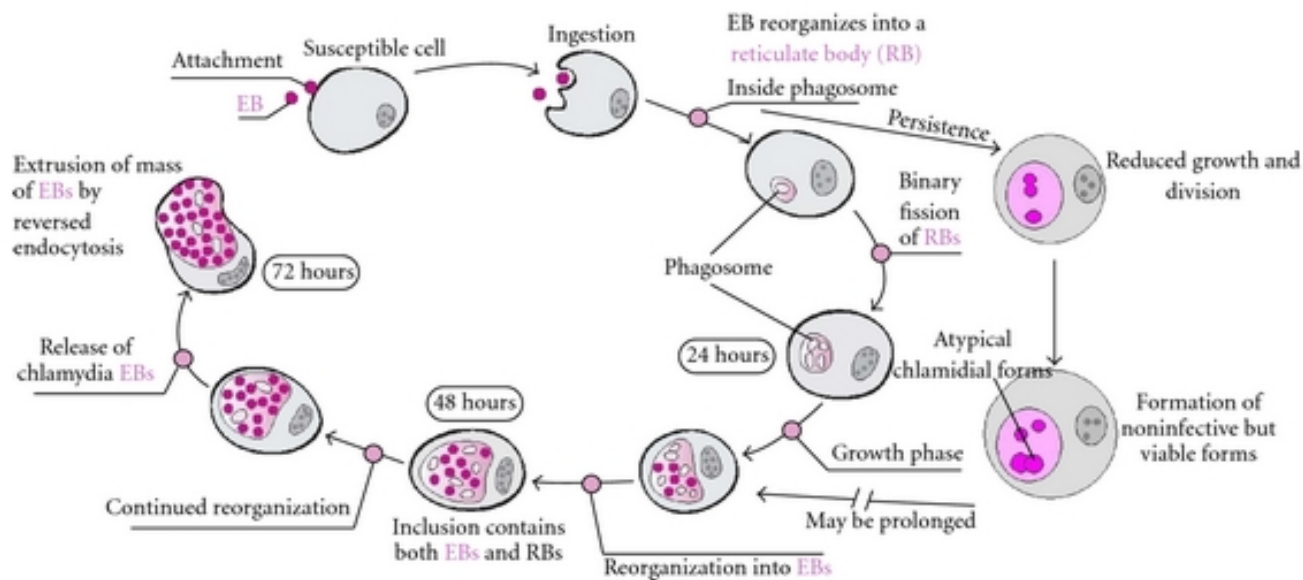
*Clamidia trachomatis* agente del tracoma

*Clamidia pneumoniae* agente della polmonite

Dotati di un genoma estremamente piccolo ( 1-1.3 Mb)  
Hanno un ciclo vitale molto particolare caratterizzato dalla presenza di due forme

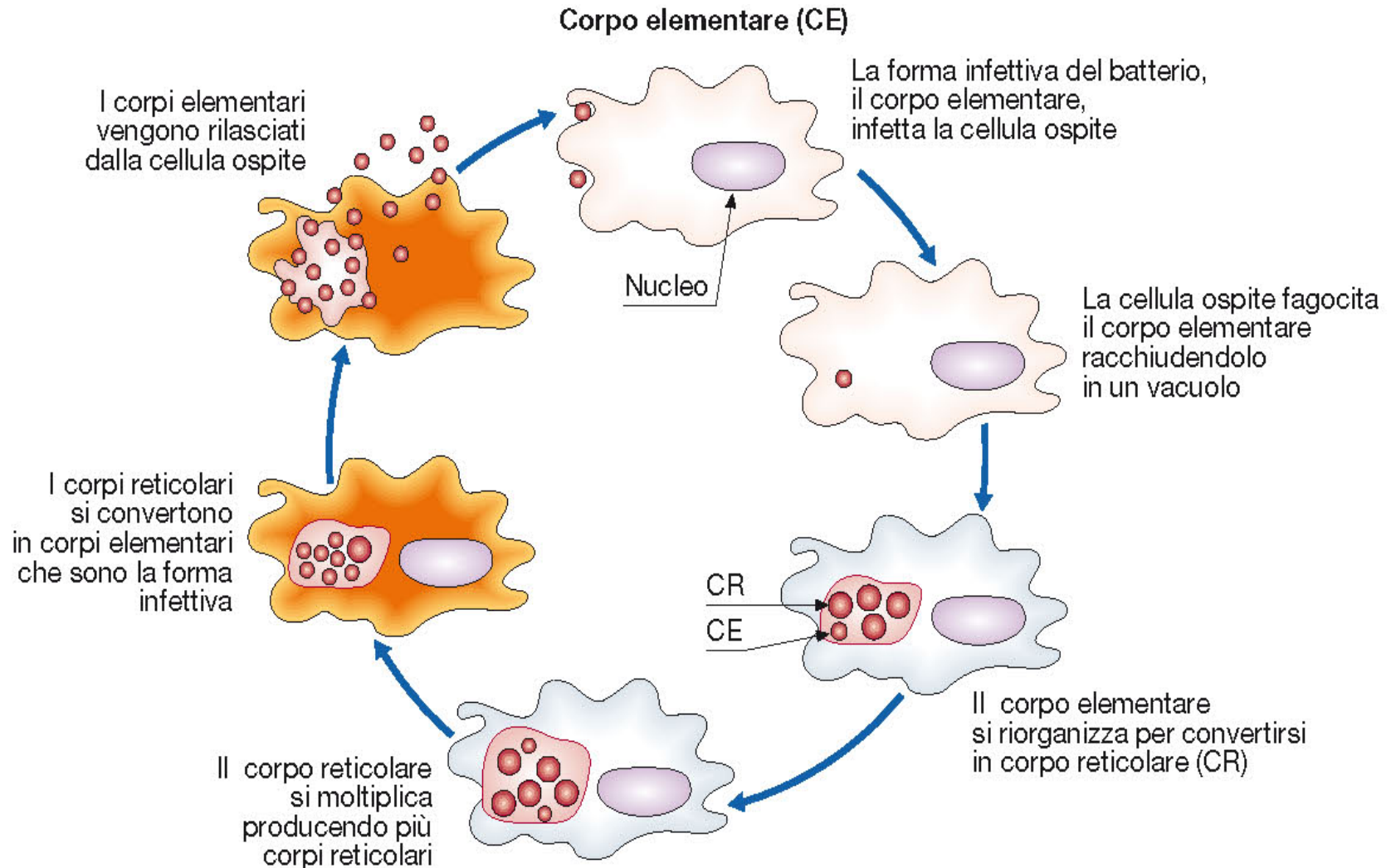
Elementary Body (EB) forma infettiva

Reticular Body (RB) forma replicativa



**Figure 2:** The life cycle of genital serovars of *C. trachomatis*. The chlamydial growth cycle involves transformation between distinct forms: the elementary body (EB) and the reticulate body (RB). The highly infectious EB attaches to nonciliated columnar or cuboidal epithelial cells and induces ingestion by the host cell. EB are metabolically inactive and represent the extracellular *C. trachomatis* growth form. Once ingested into a phagosome, fusion of the phagosome with the host lysosome is prevented, a highly unusual occurrence that ensures EB survival. The EB reorganizes within the phagosome into a metabolically active RB. RBs are noninfectious but can replicate and do so by binary fission. Several stimuli, including antibiotic and IFN $\gamma$  exposure, can drive chlamydia into a persistent state, which lasts in vitro until removal of the exogenous stressor. If persistence is avoided, or if infection is reactivated from persistence, the RB will ultimately reorganize back into EB, which will be released from the host cell to infect surrounding epithelial cells (reproduced with permission [17]).

# Ciclo vitale delle Clamidio, batteri senza parete parassiti obbligati intracellulari



# Peptidoglicano (o mureina)

Componente fondamentale della parete cellulare  
un enorme polimero composto da subunità identiche.

- due derivati polisaccaridici

**N-acetilglucosammina e l'acido N-acetilmuramico**

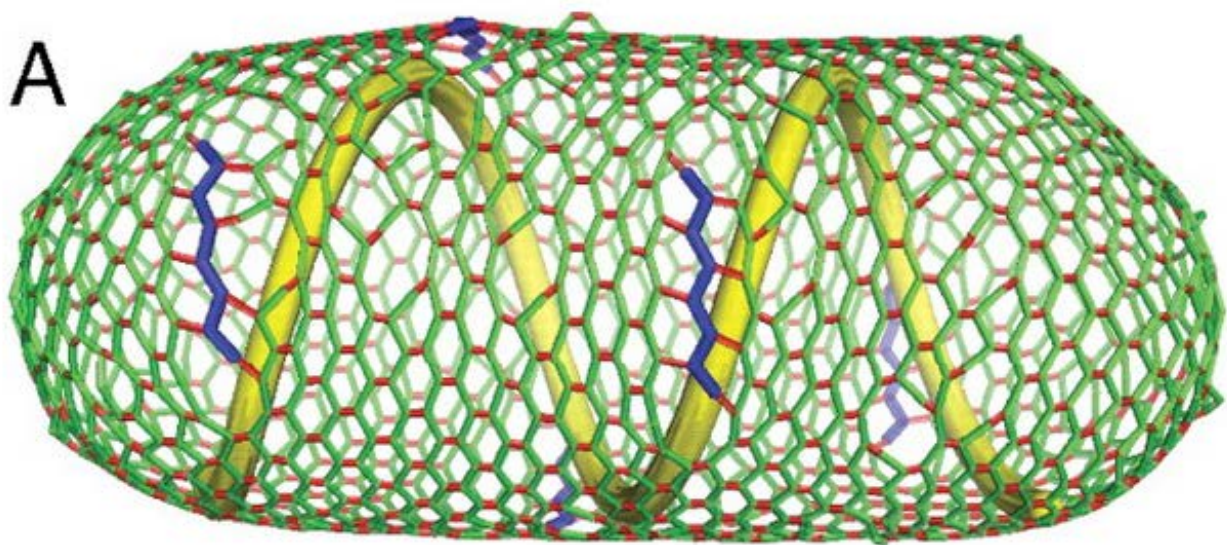
ed alcuni aminoacidi tra i quali

- **acido D-glutammico**
- **D-alanina**
- **acido meso -diamminopimelico**

che non si trovano mai nelle proteine.

I D-aminoacidi hanno un'azione protettiva contro l'attacco della maggior parte delle peptidasi

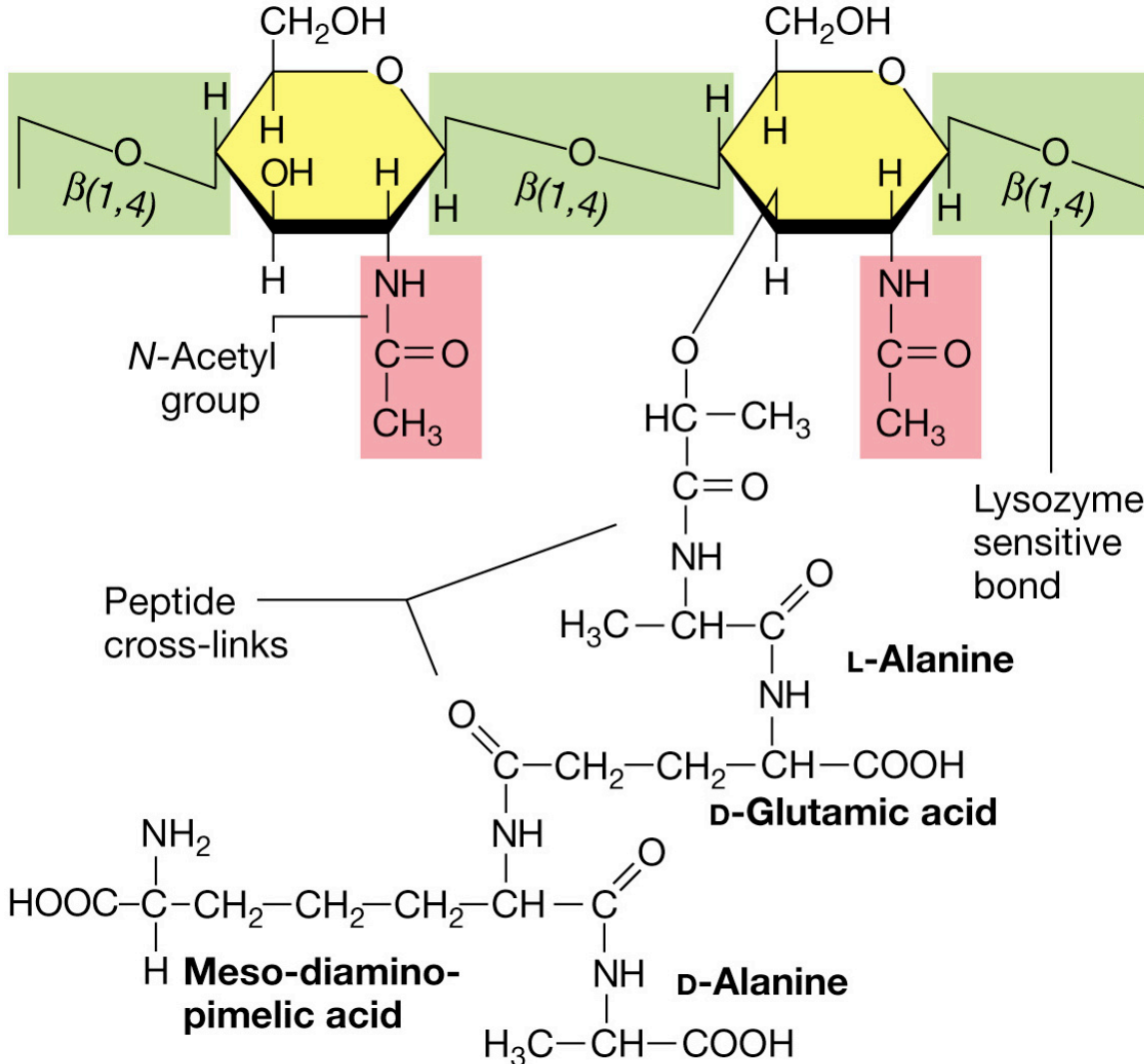




# I componenti fondamentali del peptidoglicano

**N-Acetylglucosamine (G)**

**N-Acetylmuramic acid (M)**



NAG

NAM

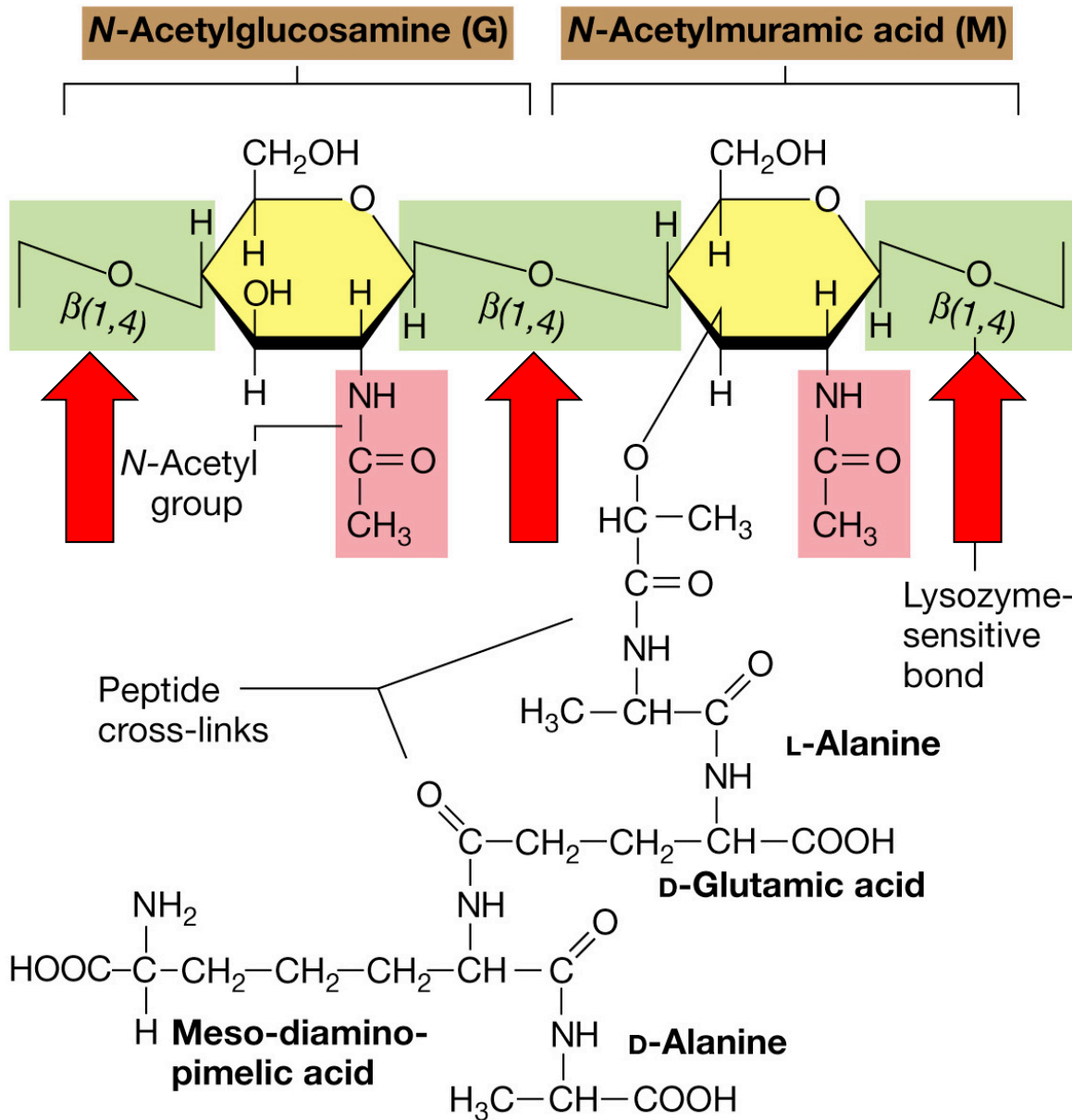
L-alanina

Acido D-glutamico

Acido diaminopimelico o L-Lisina

D-Alanina

# Il lisozima scinde il legame $\beta$ 1-4 tra il NAM ed il NAG



NAG

NAM

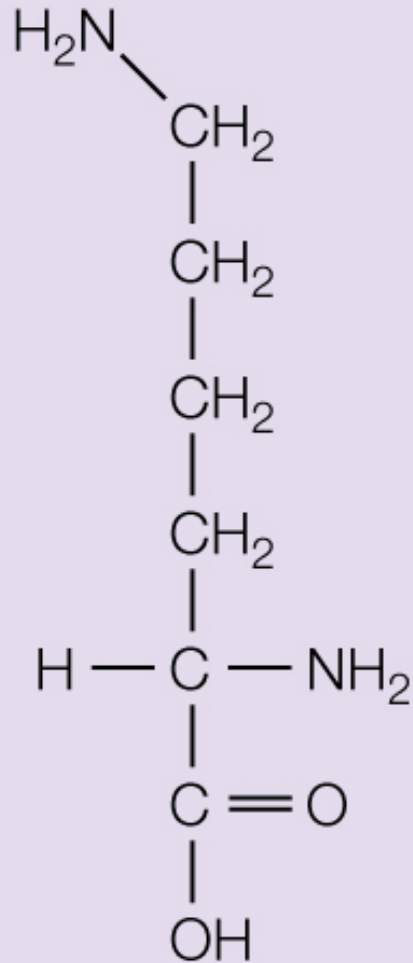
L-alanina

Acido D-glutamico

Acido diaminopimelico o L-Lisina

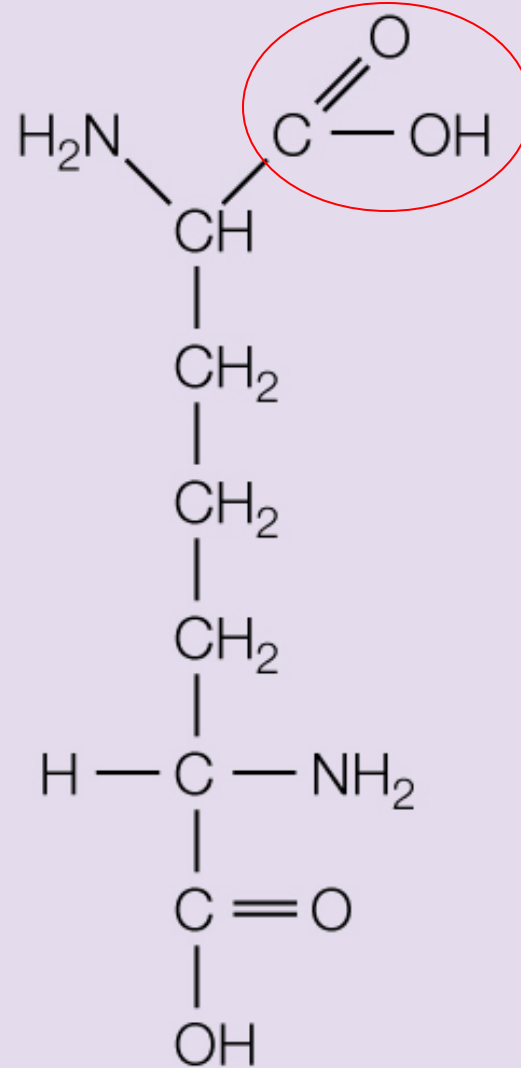
D-Alanina

**GRAM+**

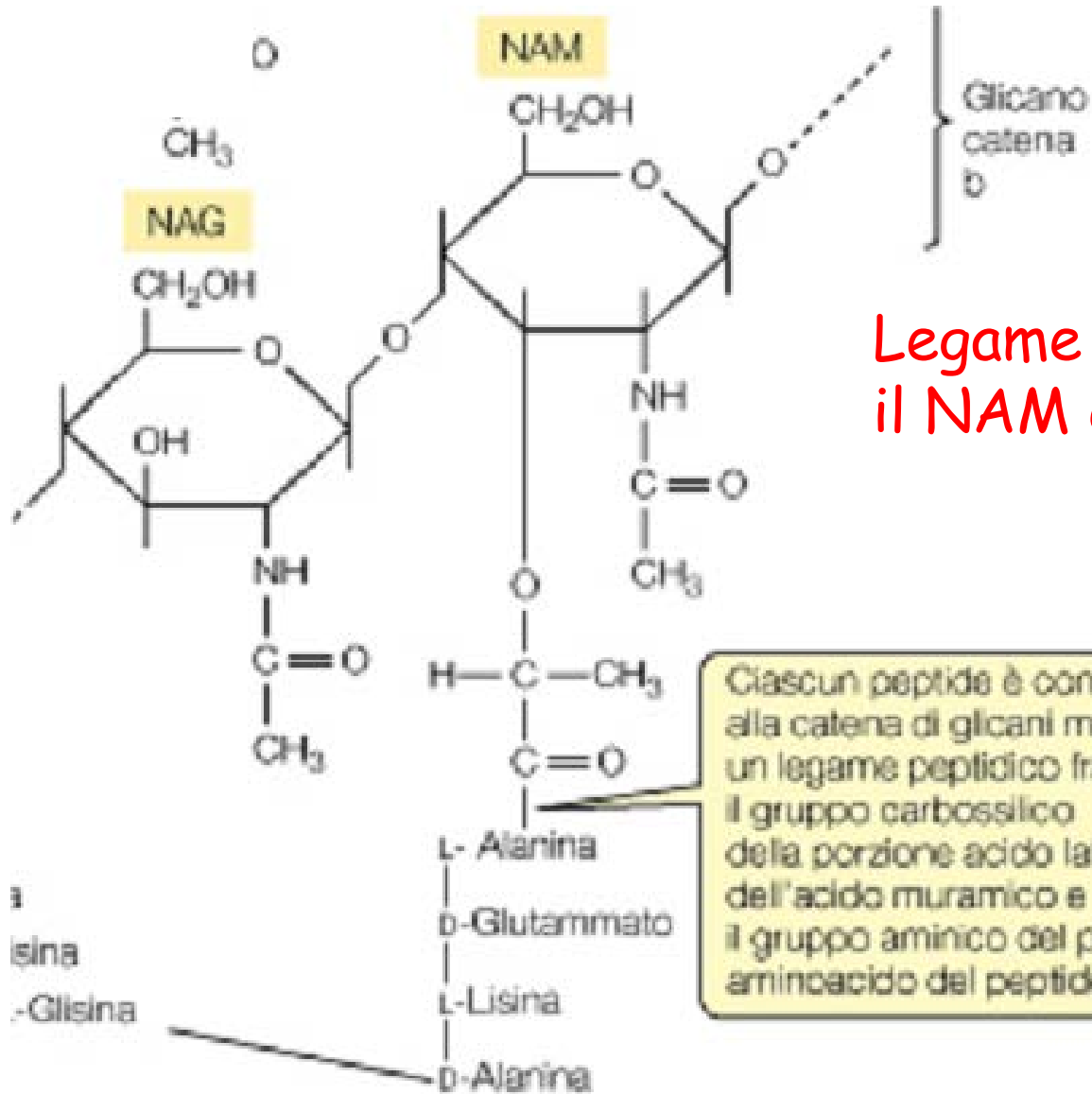


**Lisina**

**GRAM-**



**Acido diaminopimelico**



Legame peptidico tra il NAM e gli AA

Ciascun peptide è connesso alla catena di glicani mediante un legame peptidico fra il gruppo carbossilico della porzione acido lattico dell'acido muramico e il gruppo aminico del primo aminoacido del peptide.

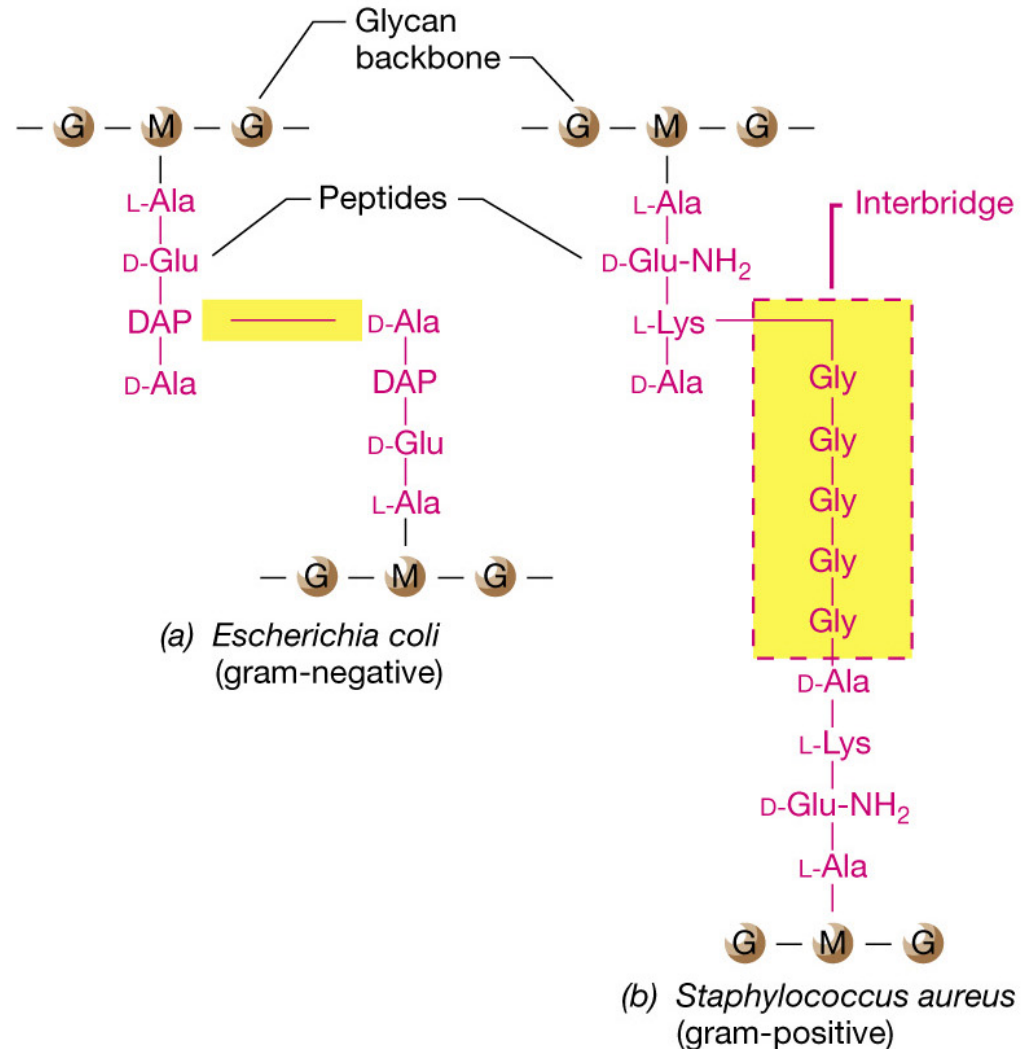
## Il peptidoglicano è presente solo nei Batteri:

l'acido N acetilmuramico e l'acido diaminopimelico (DAP) sono assenti negli Archea e negli Eucarioti

- DAP è presente in tutti i batteri Gram- e in alcuni Gram+
  - lisina sostituisce il DAP nei cocci Gram+
  - altri AA possono sostituire il DAP.
- La variabilità maggiore a livello del peptidoglicano si riscontra nel ponte peptidico .  
A livello del tetrapeptide possiamo trovare :
- Acido D-glutammico in posizione 2 può trovarsi in forma idrossilata
  - Sostituzione degli AA in posizione 1 e 3

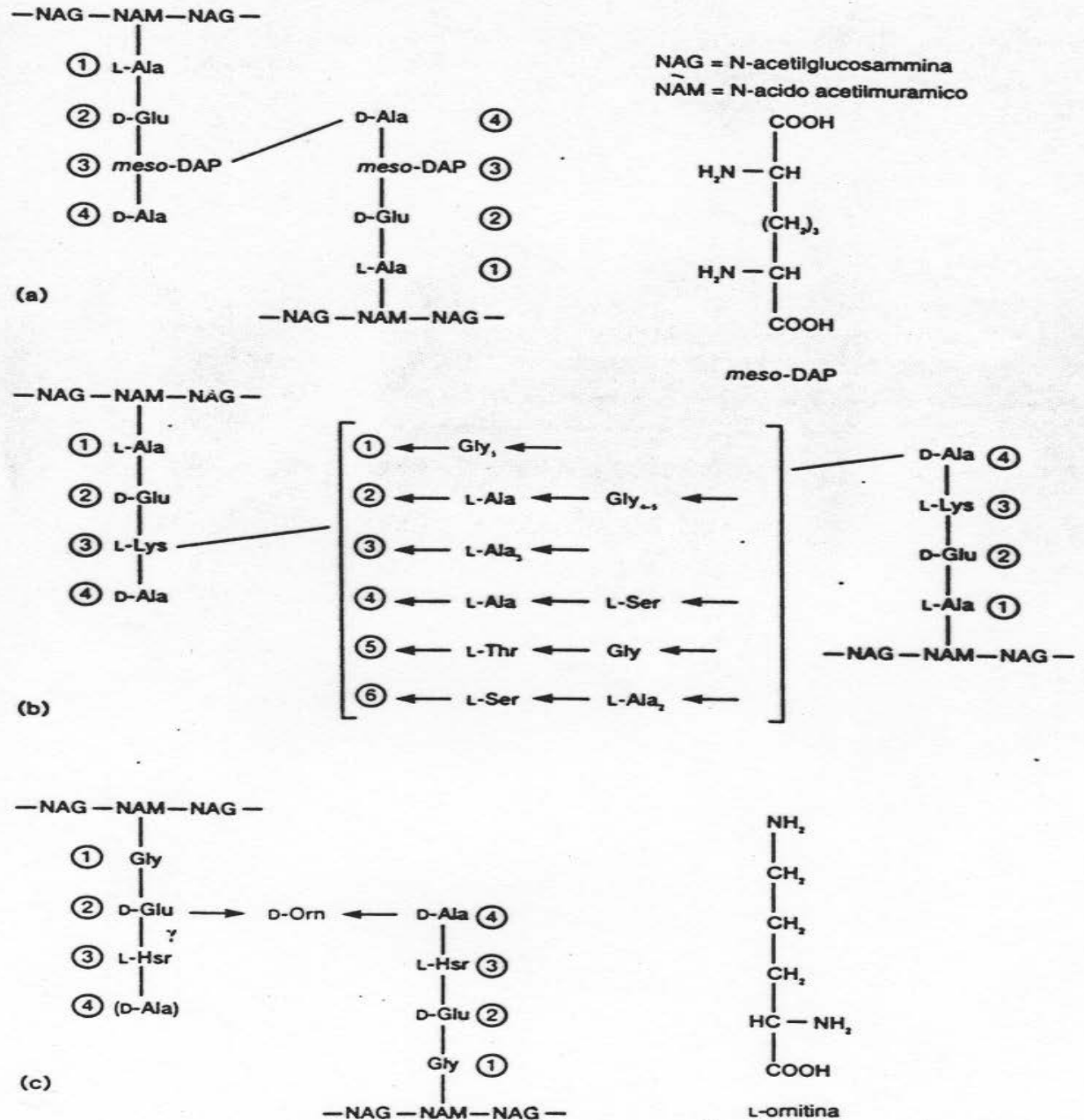
Il processo di transpeptidazione porta alla formazione di legami peptidico tra differenti AA presenti nelle catene laterali

Nei Gram- il legame crociato avviene tra il DAP ed un peptide e la D-alanina del peptide adiacente

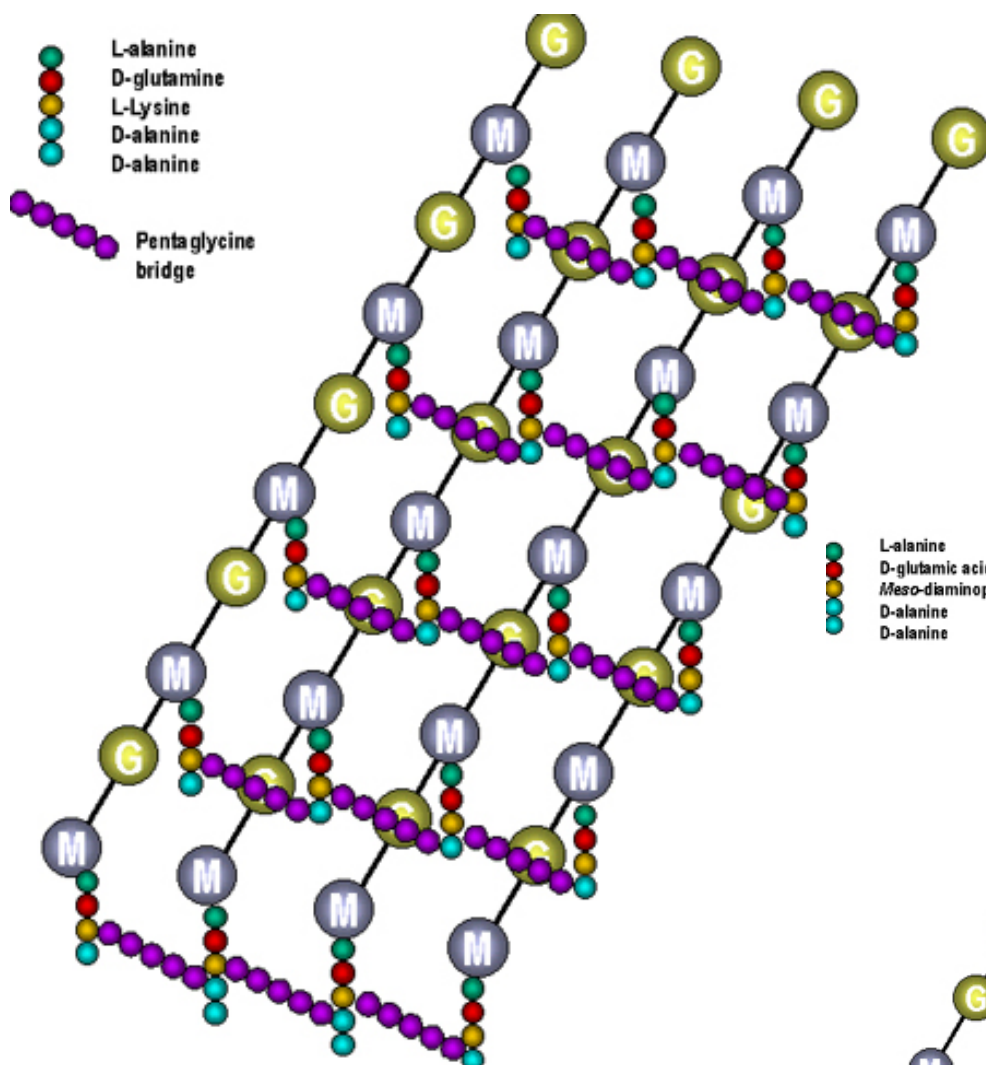


Nei Gram+ i legami avvengono attraverso i ponti penta glicinici tra la L-lisina di un peptide e la D-alanina di un altro

Nei batteri Gram+ è presente un ponte peptidico che collega le varie subunita di NAG-NAM.

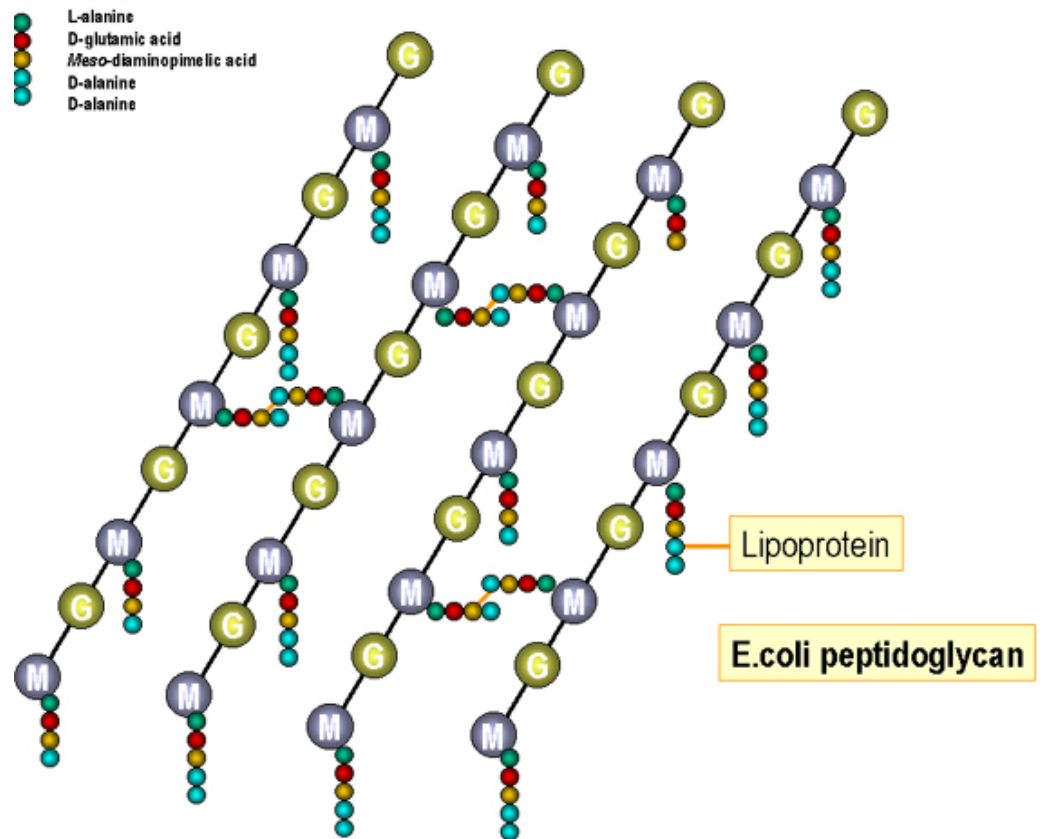




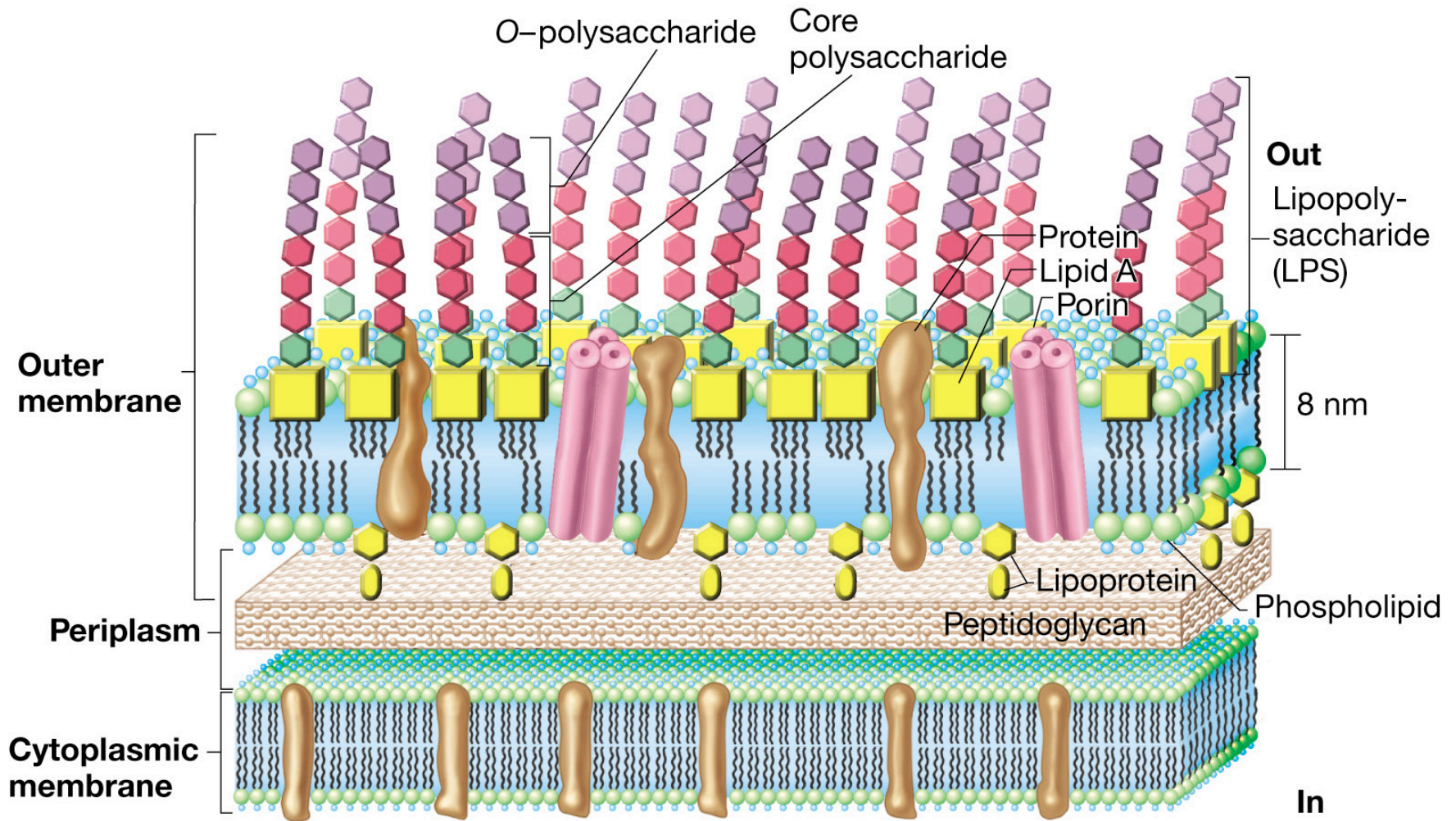


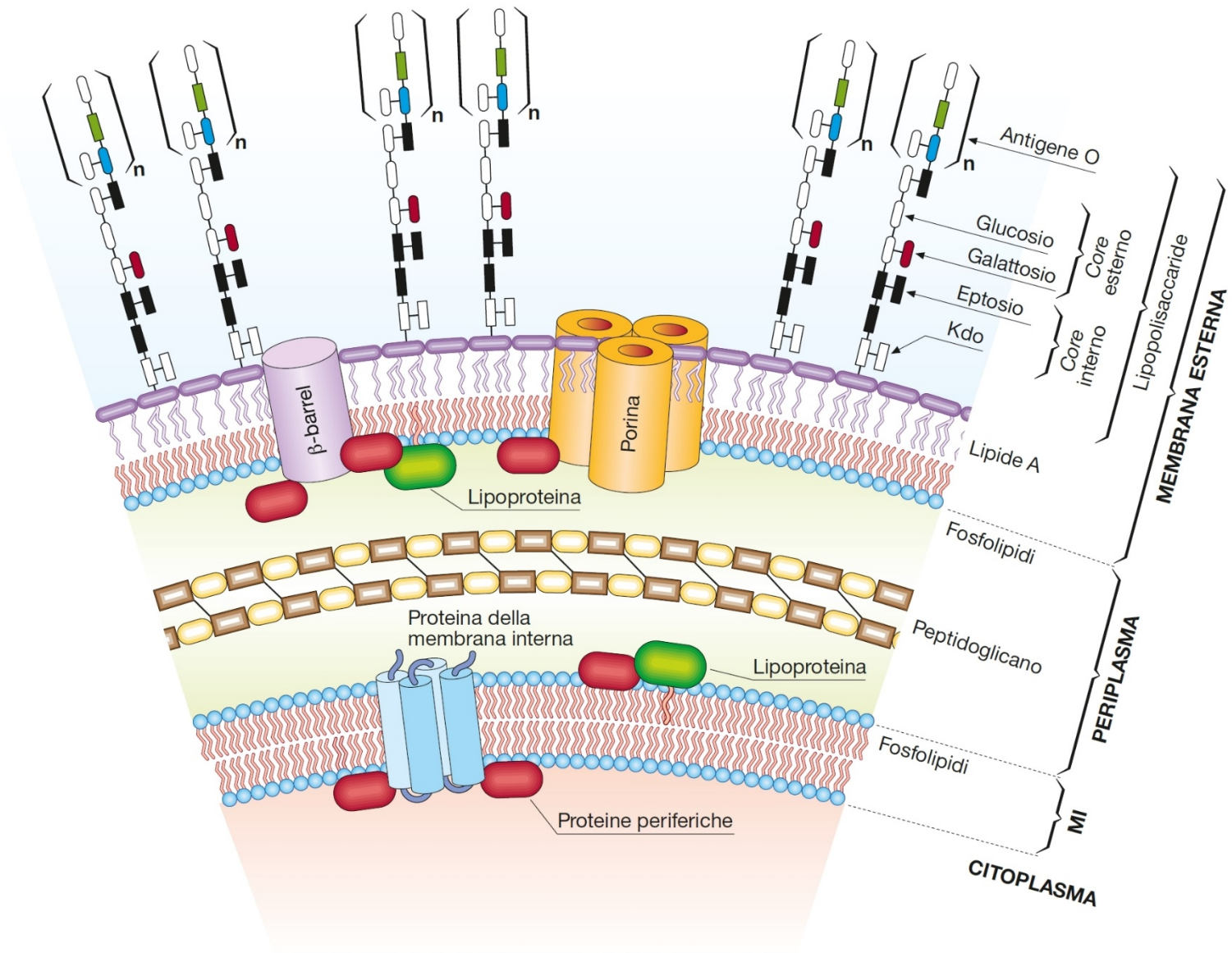
Peptidoglicano di  
**Staphylococcus aureus**  
 ← Gram+ e

**Escherichia coli**  
 Gram-



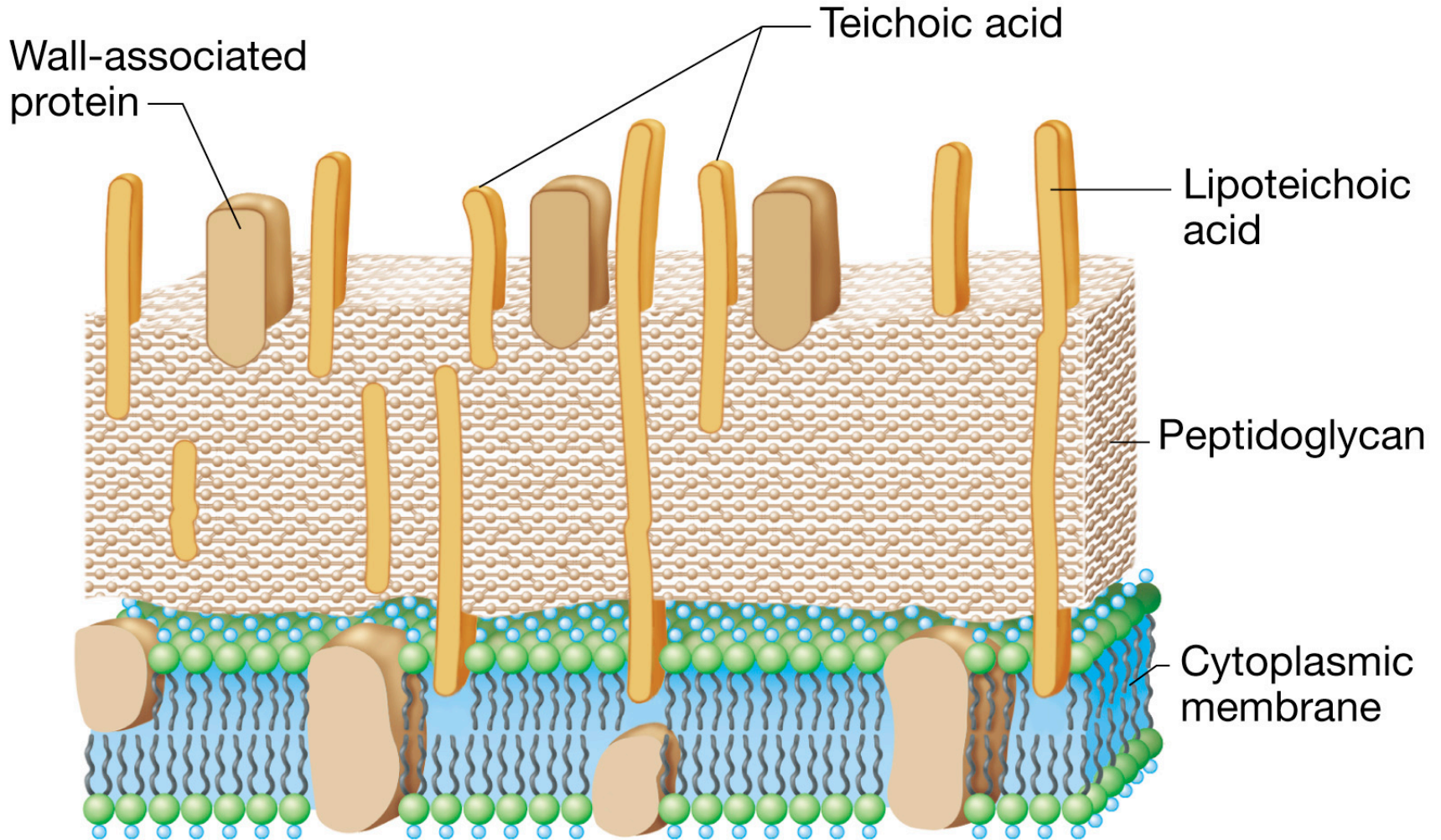
# Complessità della parete cellulare dei Gram - : presenza della membrana esterna o LPS





**Figura 2.25 SCHEMA GENERALE DELLA PARETE DEI BATTERI GRAM NEGATIVI.** La struttura dell'involucro cellulare del batterio Gram negativo *Escherichia coli*. I diversi monosaccaridi sono rappresentati da piccoli rettangoli e ovali di colori differenti. L'antigene O è costituito da un lungo polimero di una subunità tetra- o pentasaccaridica di cui è rappresentato un esempio. MI: membrana interna; Kdo: 2-cheto-3-deossiottonato.

# La parete dei Gram+ possiede gli acidi teicoici



(b)

## Batteri Gram positivi :

caratterizzati da una comune organizzazione della parete

Specie sporigene di *Clostridium* e di *Bacillus*

Specie di antibiotico-produttori di *Streptomyces*

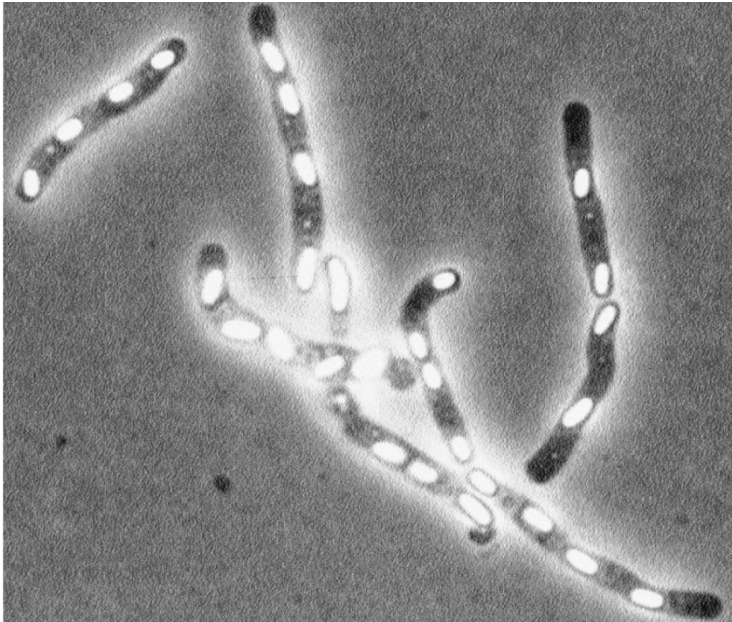
Produttori di acido lattico

*Streptococcus*

*Lactobacillus*

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

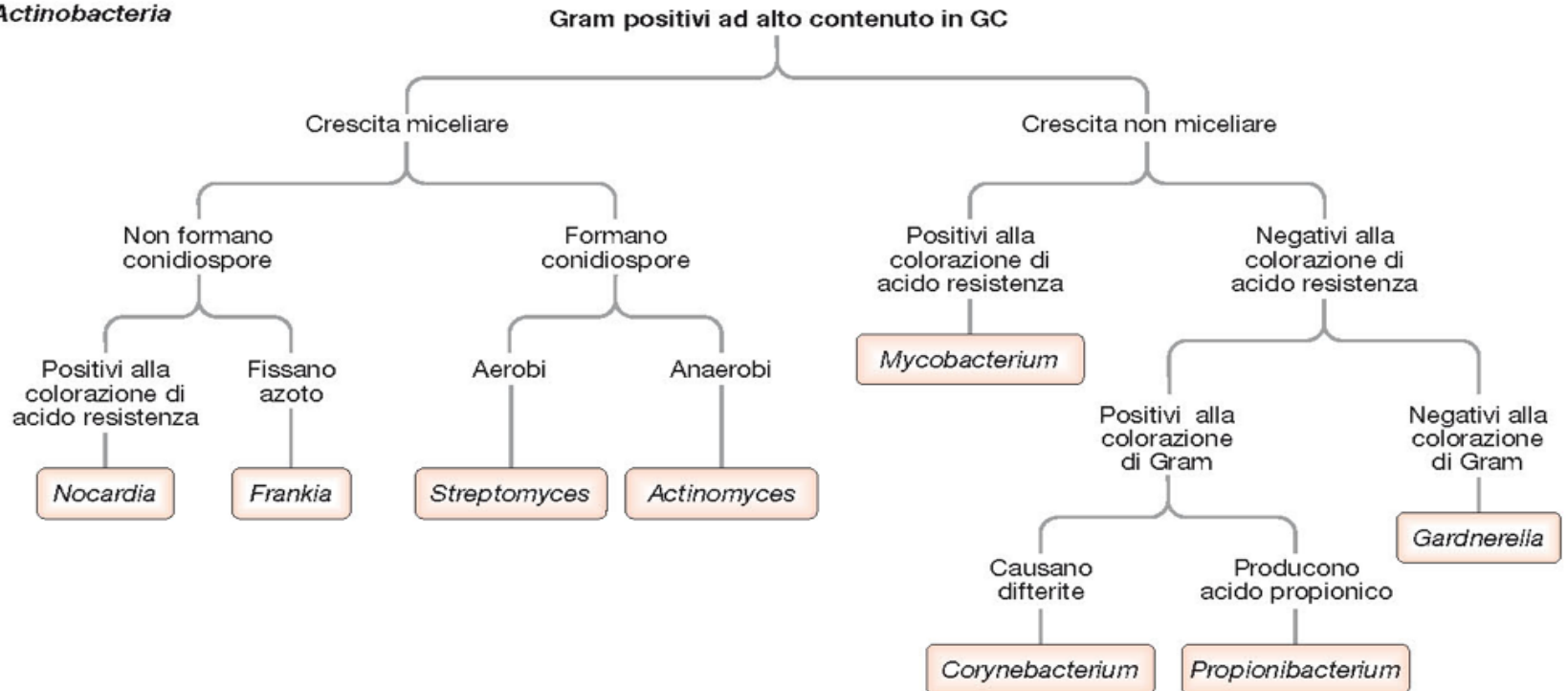
*Streptococcus*: batterio Gram+ di forma sferica che si aggrega a formare catene. Alcune specie. Diffusi nell'industria caseari e patogeni .



**Firmicutes**

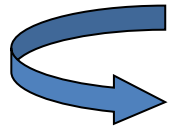


**Actinobacteria**

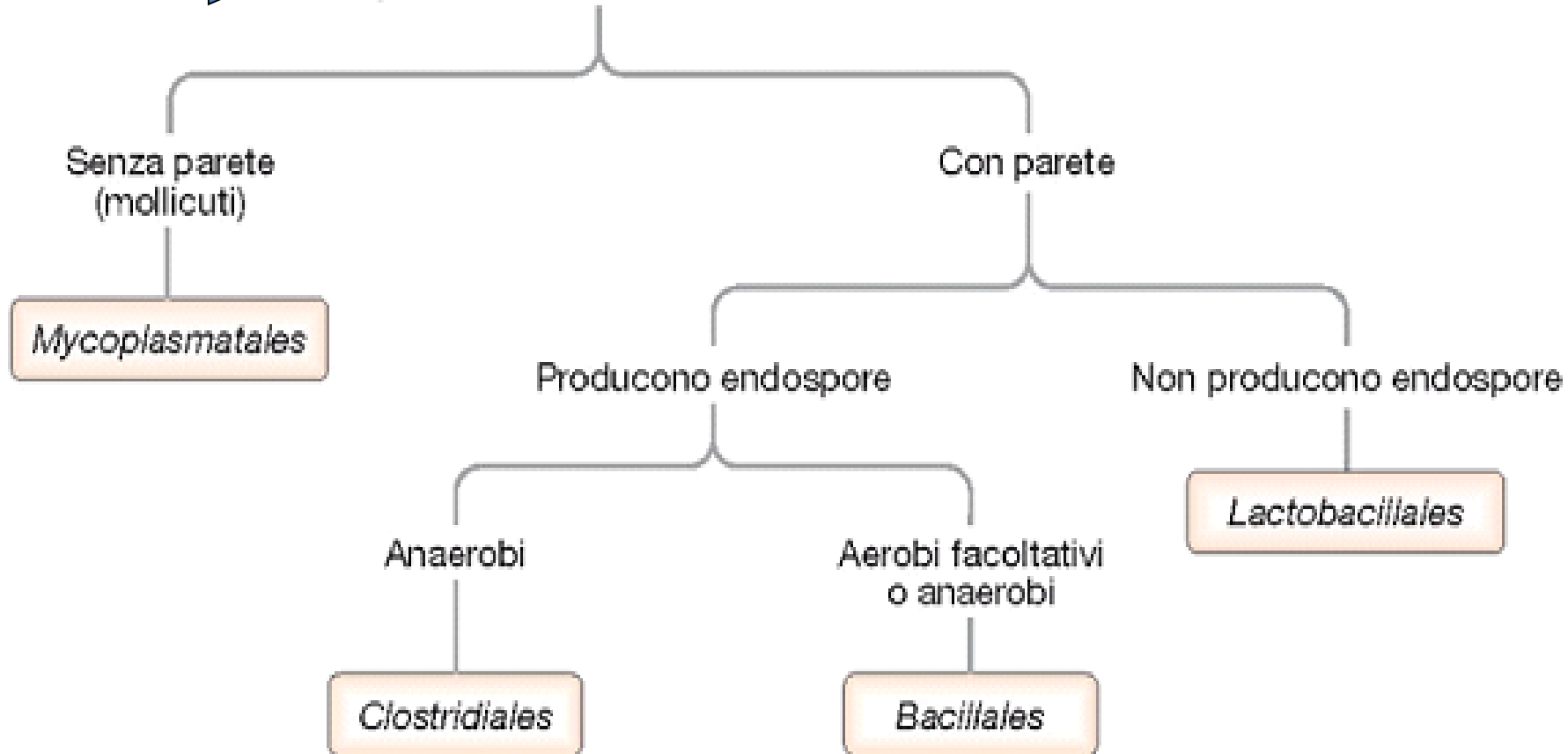


# I Batteri Gram positivi si suddividono in Firmicutes e Actinobacteria

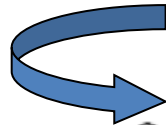
## Firmicutes



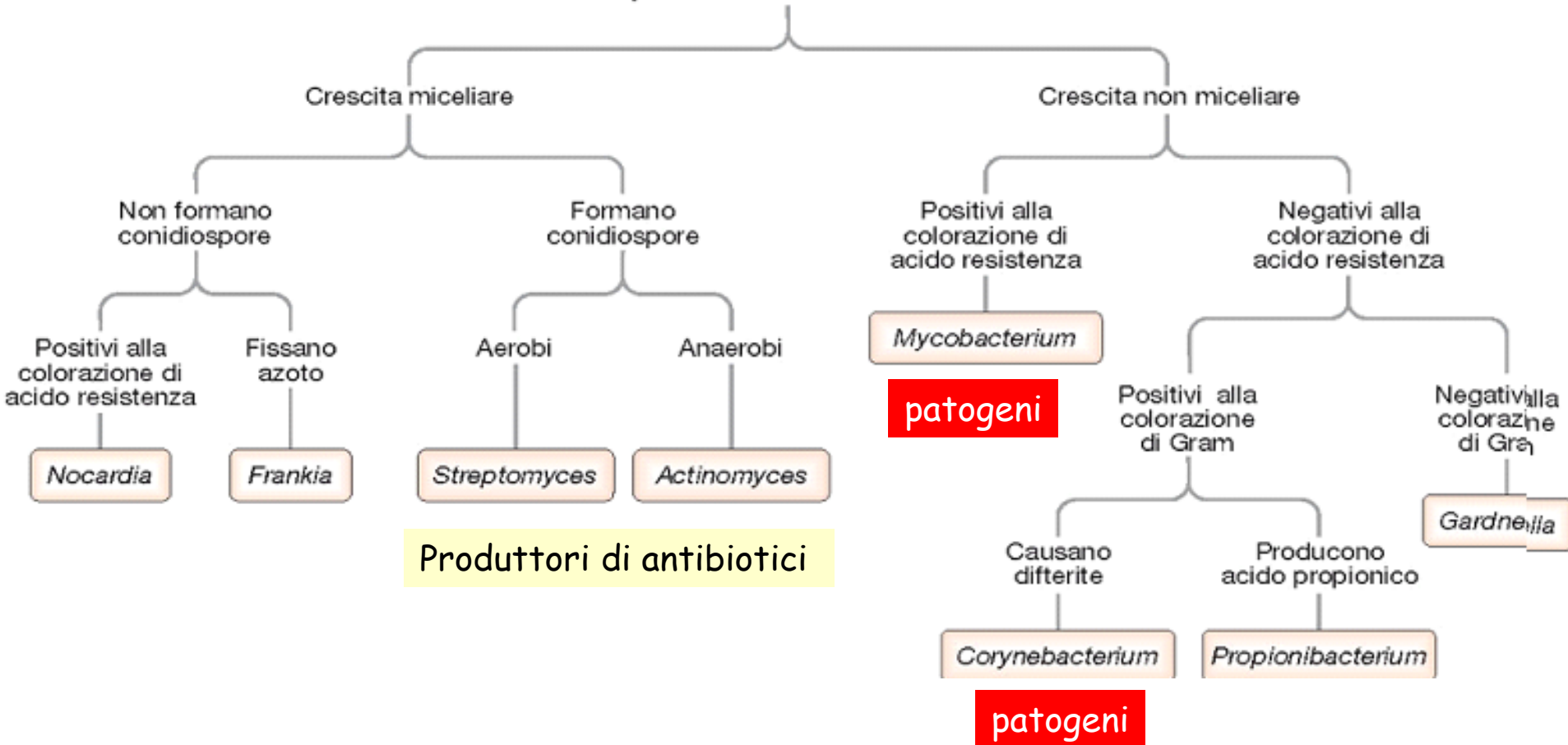
Gram positivi a basso contenuto in GC



# Actinobacteria

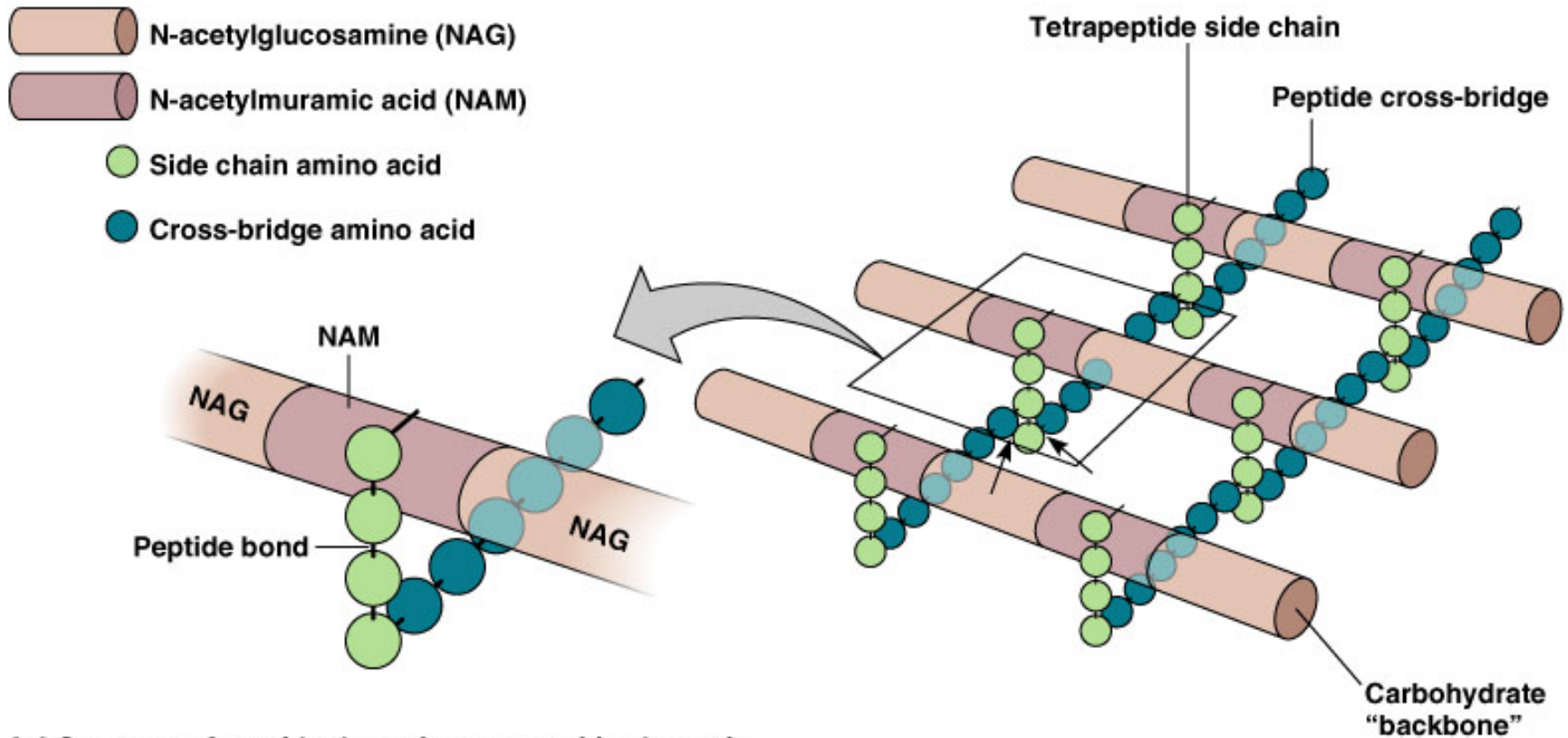


Gram positivi ad alto contenuto in GC





# Struttura del peptidoglicano nei Gram+ : presenza del ponte peptidico



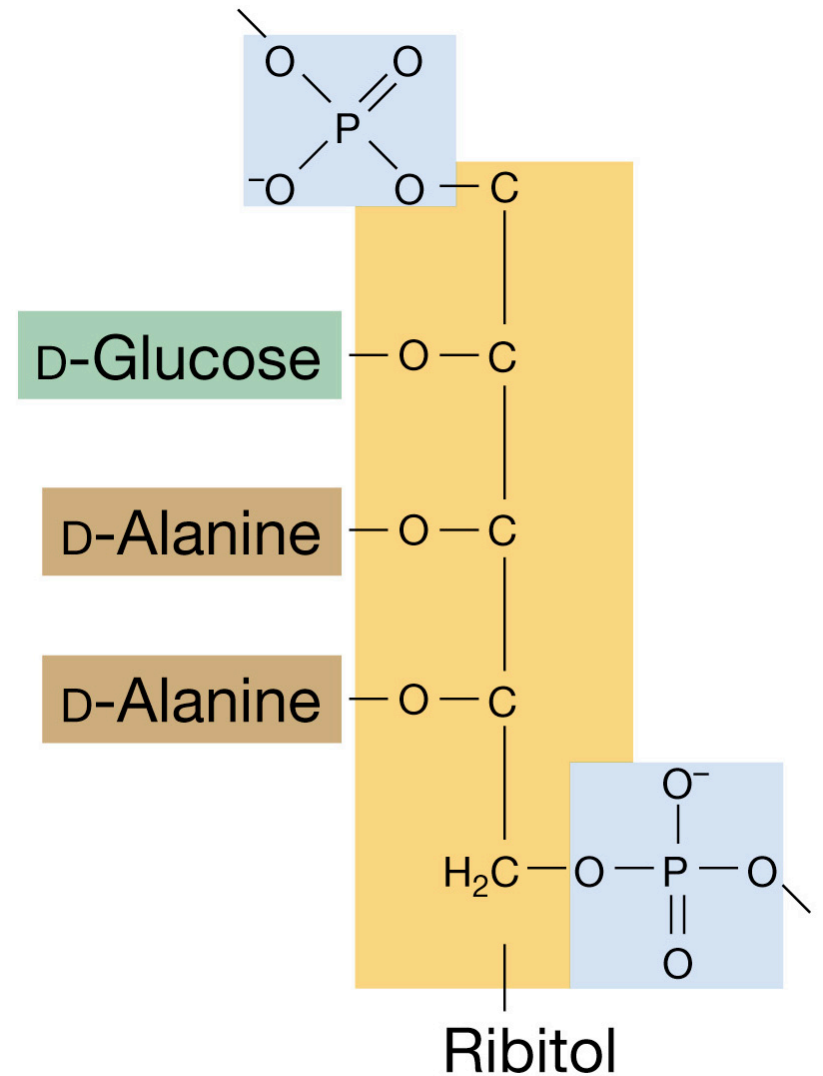
**(a) Structure of peptidoglycan in gram-positive bacteria**

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Ponte peptidico 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

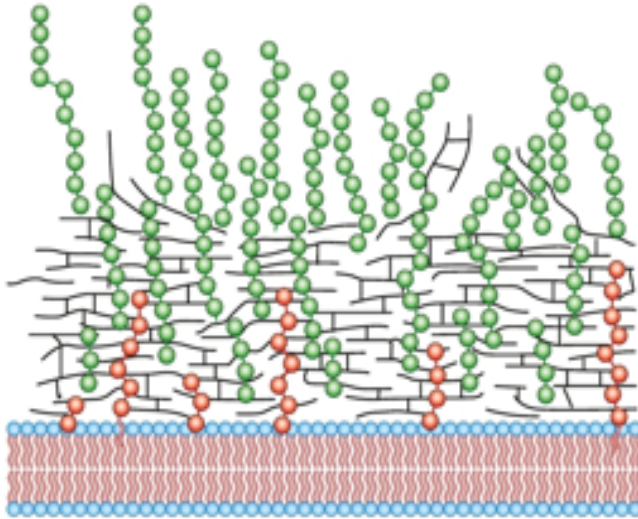
Gli acidi teicoci sono polimeri derivati dalla polimerizzazione di unità di ribitolo generalmente associati ad altri zuccherie alla D-alanina.

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



(a)

a)

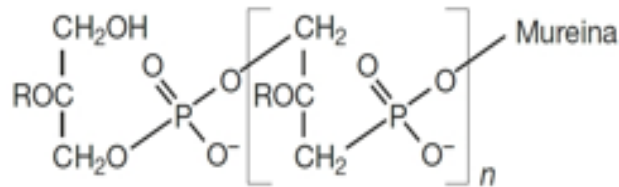


Gli acidi teicoici costituiscono fino al 60% della parete dei Gram+

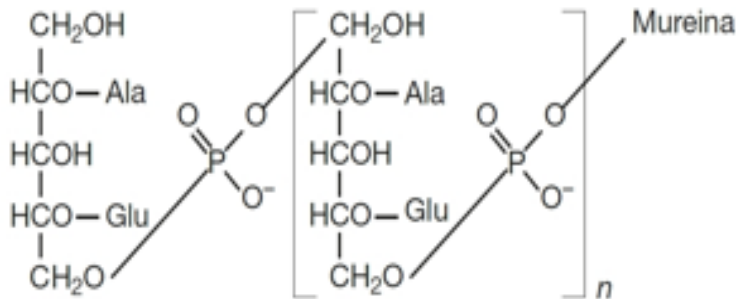
-sono polimeri polianionici ricchi in fosfati, carichi negativamente  
fonte di fosfato in carenza di P

b)

Acido glicerol-teicoico



Acido ribitol-teicoico



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

- Adesione dei batteriofagi

Gli acidi teicoici sono associati

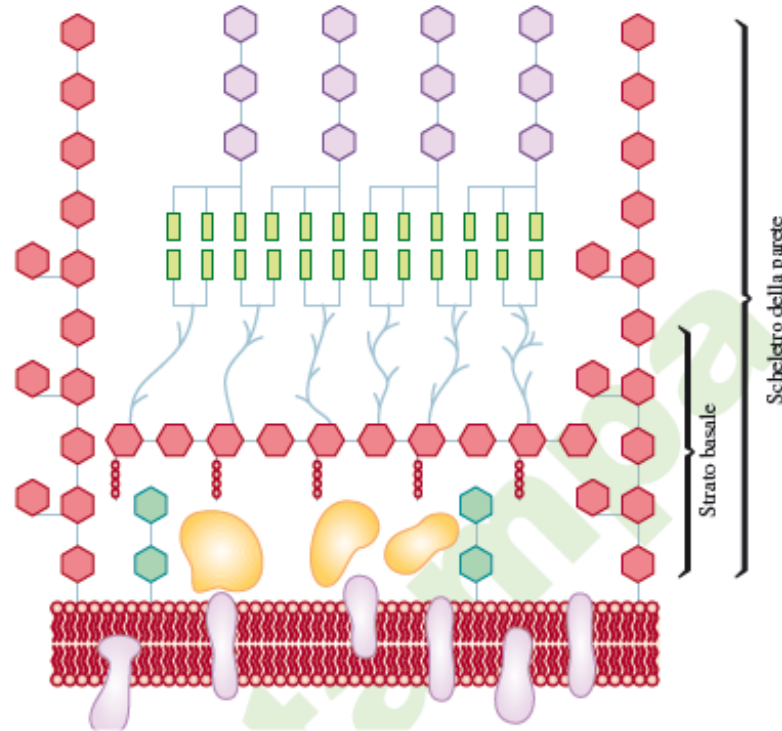
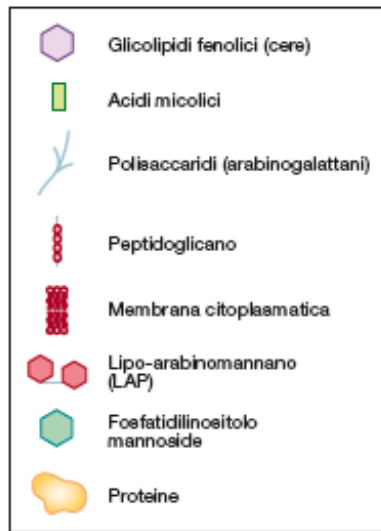
- o al peptidoglicano tramite un legame covalente con l'ossidrile in posizione 6 dell'acido N-acetilmuramico
- o ai lipidi di membrana citoplasmatica ( acido lipoteicoico) .

**Qual è il loro ruolo?**

Non ancora pienamente chiarito ma oltre alle attività descritte

- essendo carichi negativamente contribuiscono a conferire carica negativa alla cellula batterica
- porosità elasticità e resistenza

# Struttura della parete dei Micobatteri



40 L'INVOLUCRO CELLULARE IN MYCOBACTERIUM.

Caratterizzati da una parete particolare molto spessa ricca di sostanze cerosi che può essere suddivisa in

strato basale o core costituito da peptidoglicano, arabinogalattano e una struttura più esterna costituita da uno strato di acidi micolici e uno di cere glicolipidi fenolici.

La disposizione ricorda la M.E. dei Gram negativi ma la composizione è molto diversa

## Lo strato basale

è costituito da un copolimero di peptidoglicano e arabinogalattano, un polisaccaride ramificato complesso dove gli zuccheri (arabinoso e galattosio) sono presente in forma furanosica ( 5 atomi di C) anziche piranosica ( 6 atomi C):

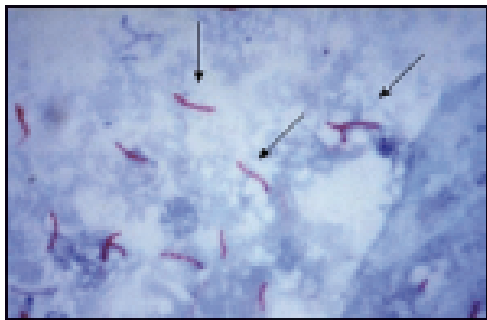
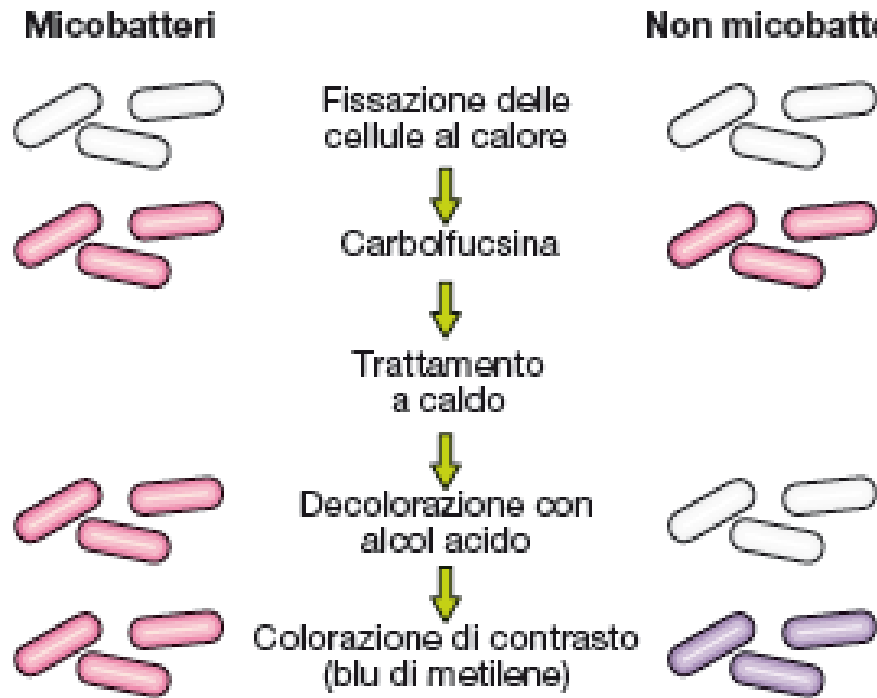
## Lo strato esterno

**Gli acidi micolici** sono acidi grassi complessi a lunga catena (C60-90) alchiliati e idrossilati e sono ancorati al core contribuendo alla scarsa fluidità del rivestimento esterno.

**le cere**, glicolipidi complessi caratterizzati da catene di carbonio molto lunghe e ramificate che si legano agli acidi micolici .

Barriera impermeabile che non permette l'accesso agli antibiotici.  
Recentemente trovati i benzotiazinoni che interagiscono con la sintesi degli arabinogalattani.

# Colorazione Ziehl-Neelsen (acido resistenza)



Questa colorazione differenziale prevede, in primo luogo, dopo la fissazione al calore del campione

su un vetrino da microscopio, un trattamento a caldo dei batteri con una soluzione di fucsina e fenolo in etanolo (detta anche carbolo-fucsina): a

temperatura elevata questo colorante è solubile nei lipidi di parete dei micobatteri e può così penetrare

nel citoplasma. Si procede poi con una decolorazione con alcol acido (al 3%).

Questo trattamento non ha effetto sui micobatteri, ma decolora tutti gli altri batteri presenti sul Vetrino

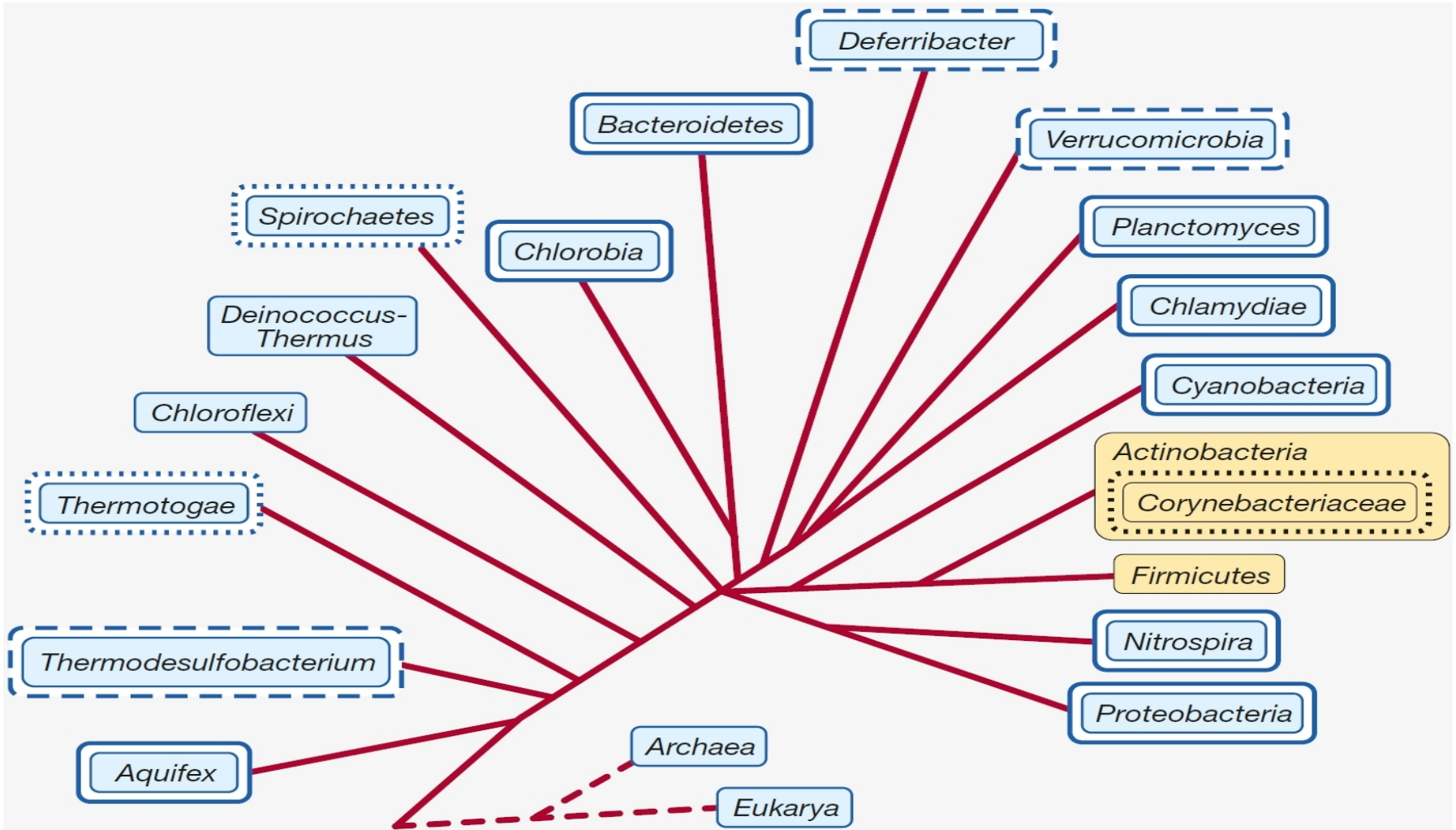
Classificazione più recente suddivide i Batteri in

MONODERMI

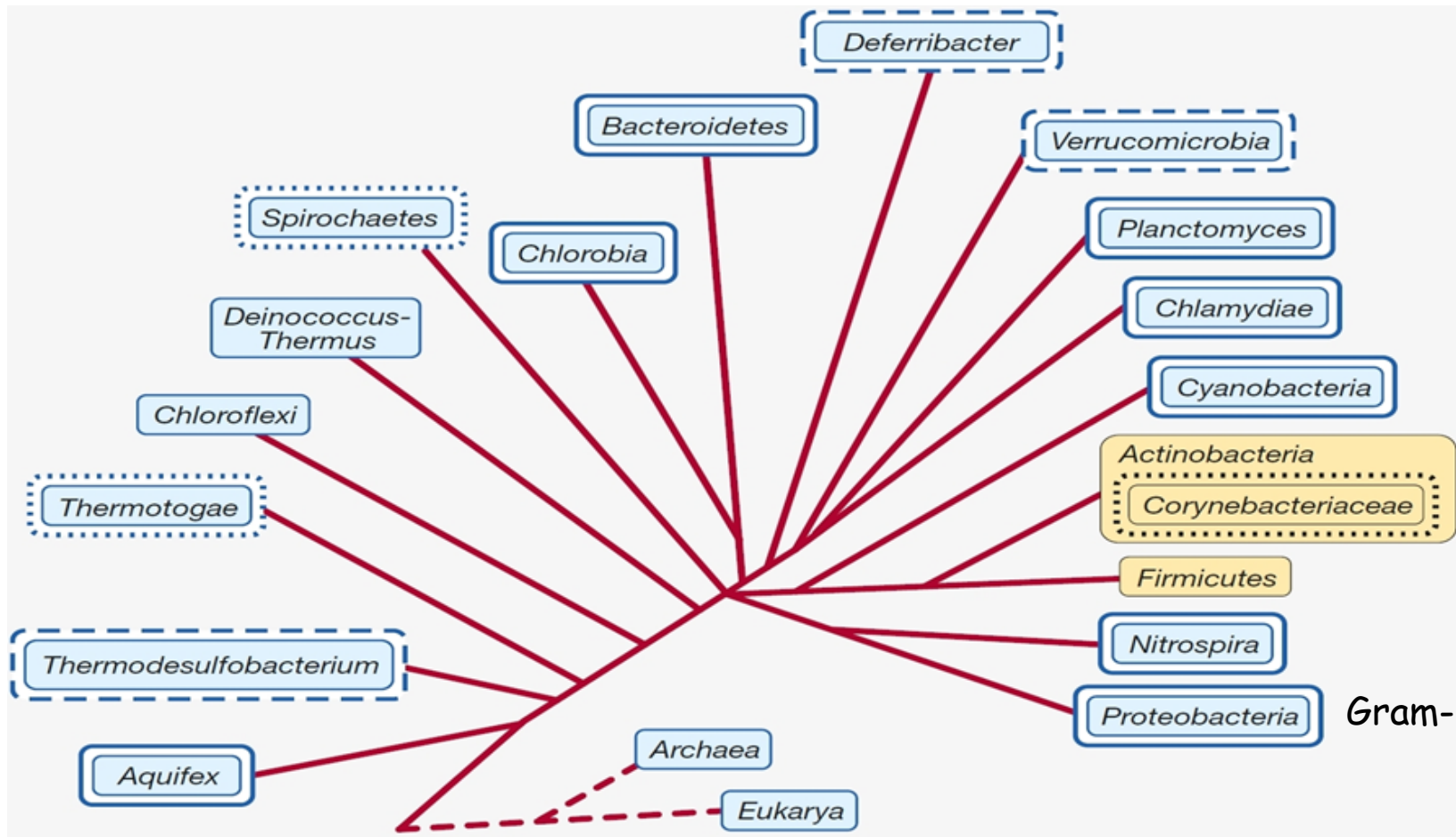
BIDERMI

Tenendo conto della presenza o meno di una membrana esterna al peptidoglicano che non sempre ha la struttura e composizione chimica del LPS ( ovvero della membrana esterna dei Gram negativi)





**Figura S2.9-1 DISTRIBUZIONE DI MONODERMI E DIDERMI NELL'ALBERO FILOGENETICO DEI BACTERIA.** Il dendrogramma illustra i principali phyla batterici. I gruppi dei batteri Gram positivi sono indicati da un riquadro giallo. I monodermi sono rappresentati circondati da una *linea continua*. I didermi sono rappresentati circondati da una *doppia linea*: la *linea continua spessa* indica la presenza di LPS nella membrana esterna; la *linea tratteggiata spessa* indica che gli organismi possiedono l'informazione per sintetizzare LPS ma non ci sono evidenze sperimentali che dimostrino la presenza di LPS associato alla membrana esterna; la *linea punteggiata* indica che la membrana esterna ha una composizione lipidica differente.



Giallo Gram +

Monodermi linea blu continua

Didermi doppia riga blu

Se continua contiene LPS \_\_\_\_\_

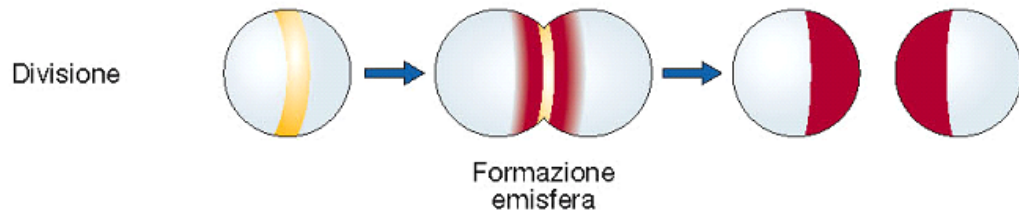
Se tratteggiata potrebbe sintetizzare LPS (dal'analisi genoma) ma non lo fa -----

Se punteggiata altra composizione della membrana esterna ( no LPS) .....

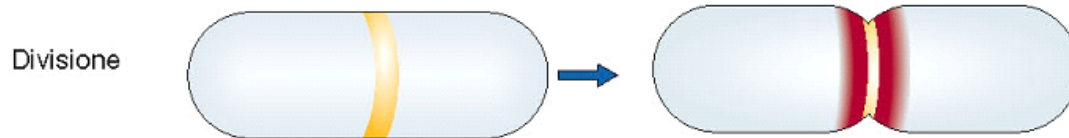
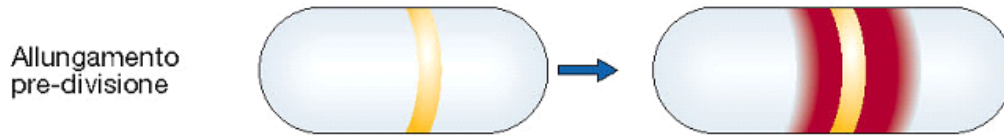
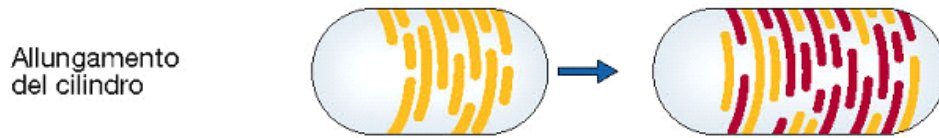
## Biosintesi del Peptidoglicano

- grande macromolecola
- I componenti sono sintetizzati nel citoplasma
- Non vi sintesi ex novo ma i componenti vengono aggiunti ad un peptidoglicano persistente
- le ultime reazioni avvengono nello spazio periplasmatico

a) Cocchi



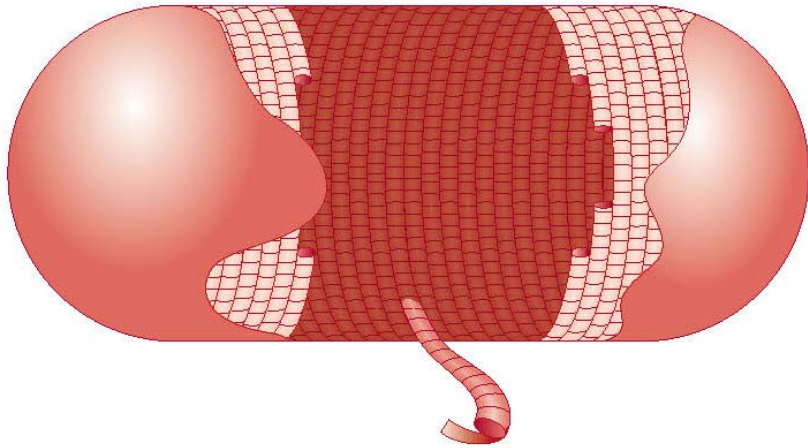
b) Bastoncelli (comune)



Quando avviene la sintesi della parete?

I batteri a forma coccoide sintetizzano la parete soltanto al momento della divisione. Ogni cellula figlia possiede un nuovo emisfero di peptidoglicano neosintetizzato durante la divisione.

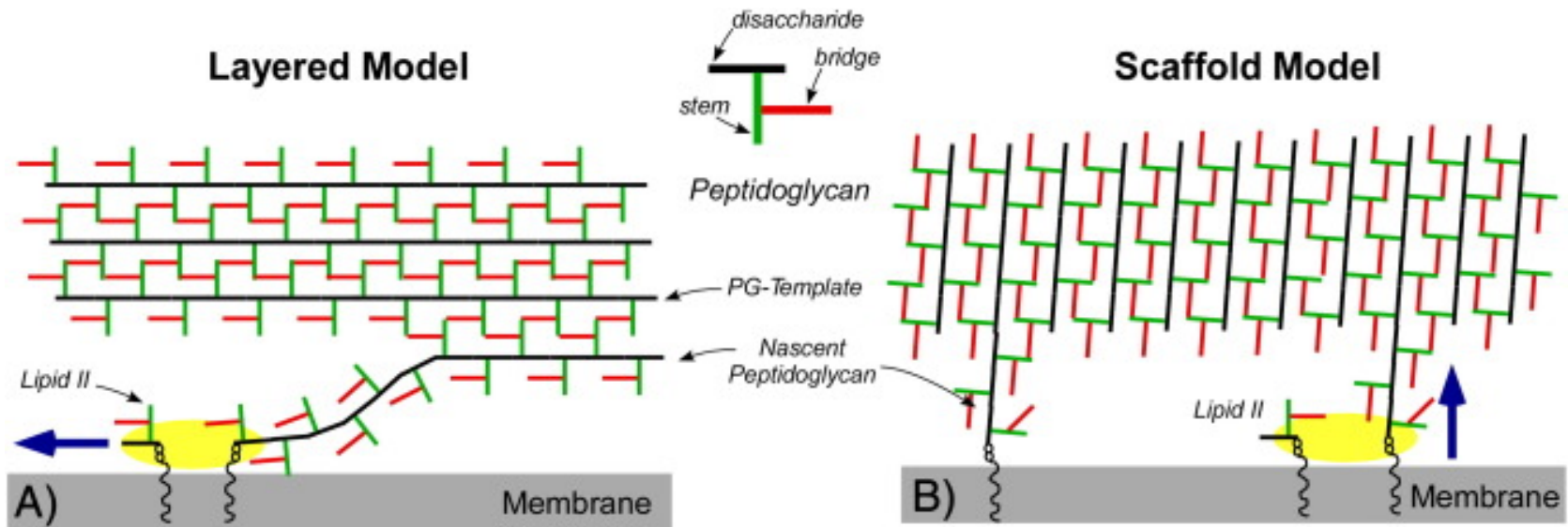
La maggior parte dei batteri bastoncellari può avere 2 fasi di allungamento. la prima è inserimento di monomeri di parete in modo sparso tra i due poli che rimangono inerti. La seconda al momento della divisione FtsZ dipendente intorno all'anello Ftz.



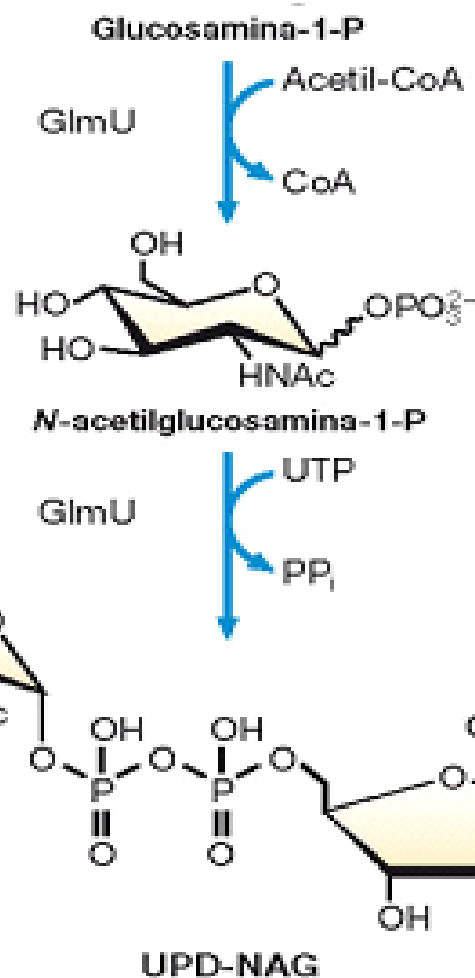
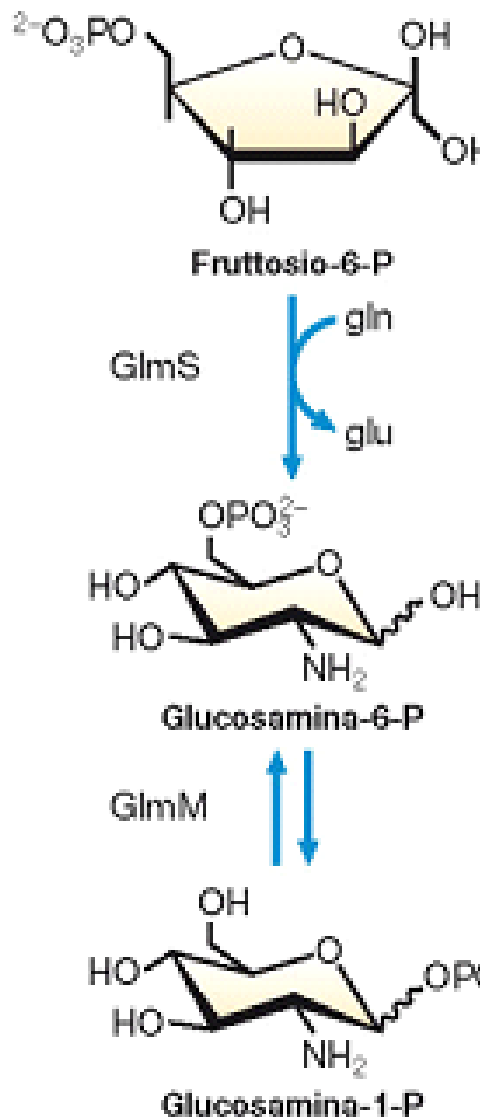
Come è organizzato il peptidoglicano intorno alla cellula:

Un modello recente propone che i filamenti di glicano siano associati in fibre

Avvolte ad elica formando dei cavi che avvolgono la cellula



Left) In the layered model PG chains elongate in a plane parallel to the membrane. The model shows that PG transglycosylation (highlighted in yellow) occurs along the direction of the membrane as shown by the arrow. Right) In scaffold model the PG chains are oriented perpendicularly to the membrane. Layered model (left) shows that the PG chains are oriented parallel to the bacterial cytoplasmic membrane. The arrows show the direction of PG chain elongation.



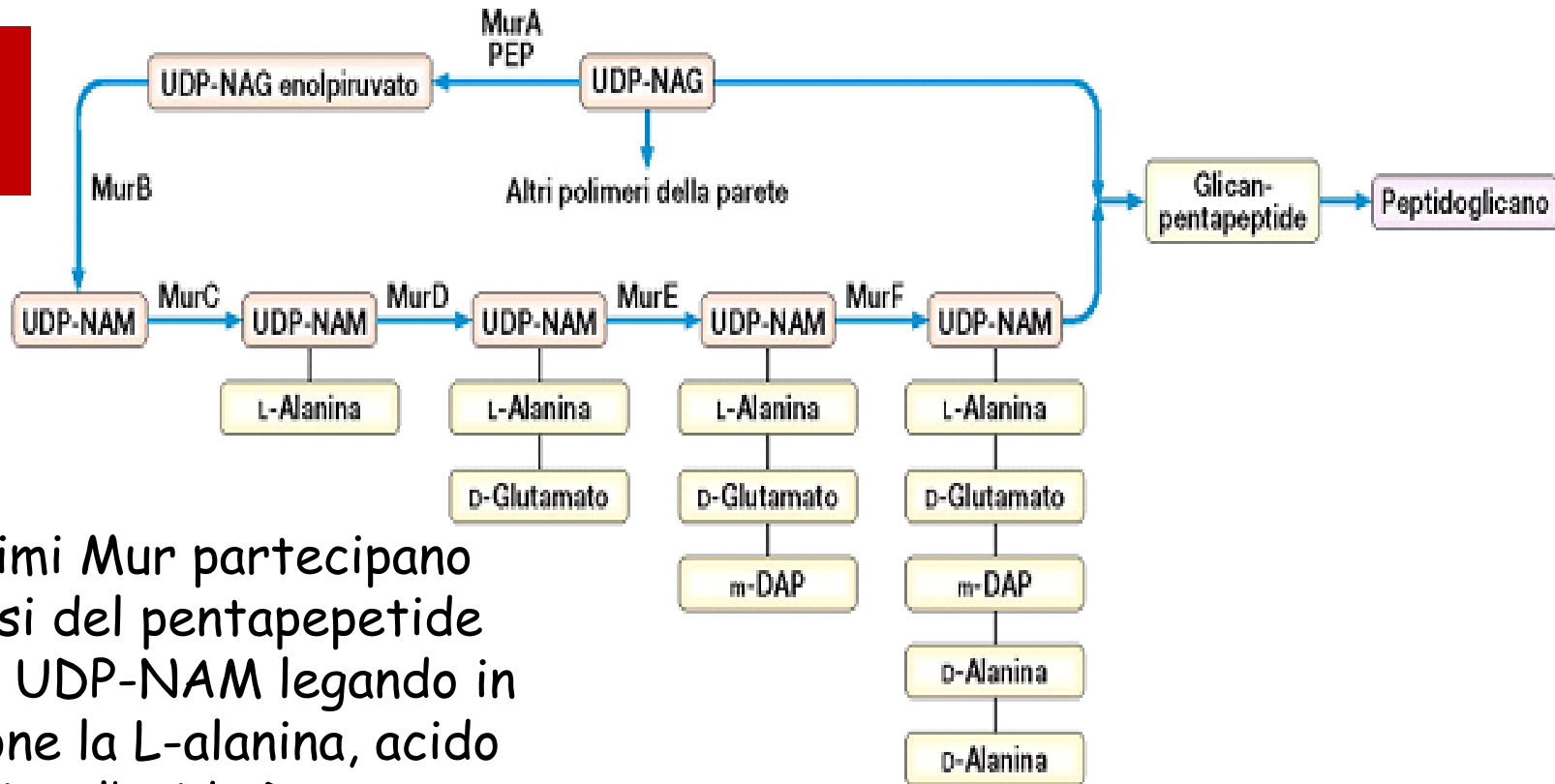
UDP-NAG

<sup>MurA</sup>  
 Nel citoplasma la sintesi di UDP-NAG avviene a partire dal fruttosio-6-P e UTP. Gli enzimi GlmS-GlmU catalizzano la sintesi di UDP-NAG a partire da fruttosio

La sintesi dell' UDP-NAM è catalizzata dagli enzimi MurA e MurB a partire dall'UDP-NAG in presenza di fosfoenol piruvato(PEP). Il PEP viene trasferito al UDP-NAG da MurA e successivamente MurB lo trasforma in UDP-NAM.

La fosfomicina inibisce MurA.

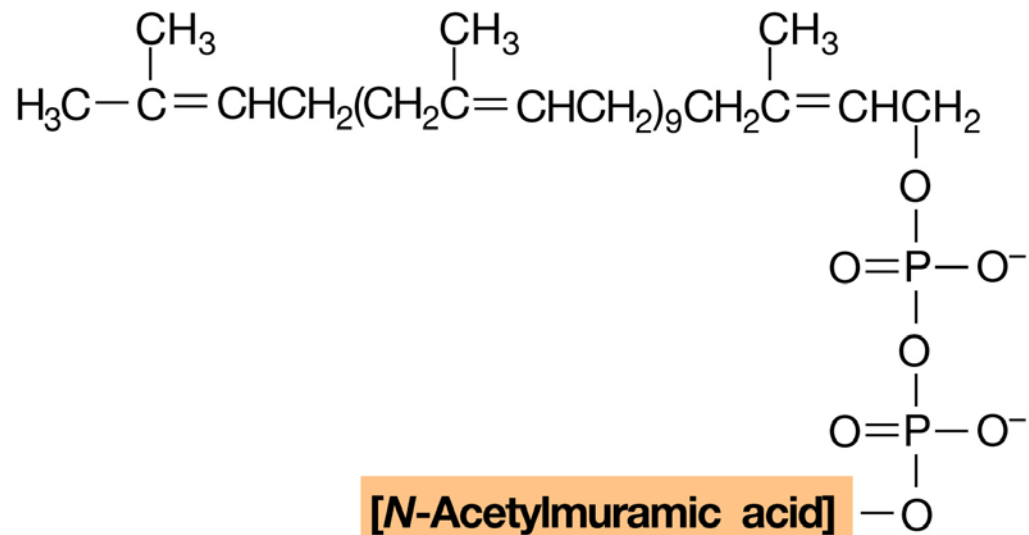
UDP-  
NAM



Altri enzimi Mur partecipano alla sintesi del pentapeptide. Legato al UDP-NAM legando in successione la L-alanina, acido D-glutamico, l'acido D-aminopimelico o lisina mentre le ultime 2 D-alanine vengono aggiunte insieme.

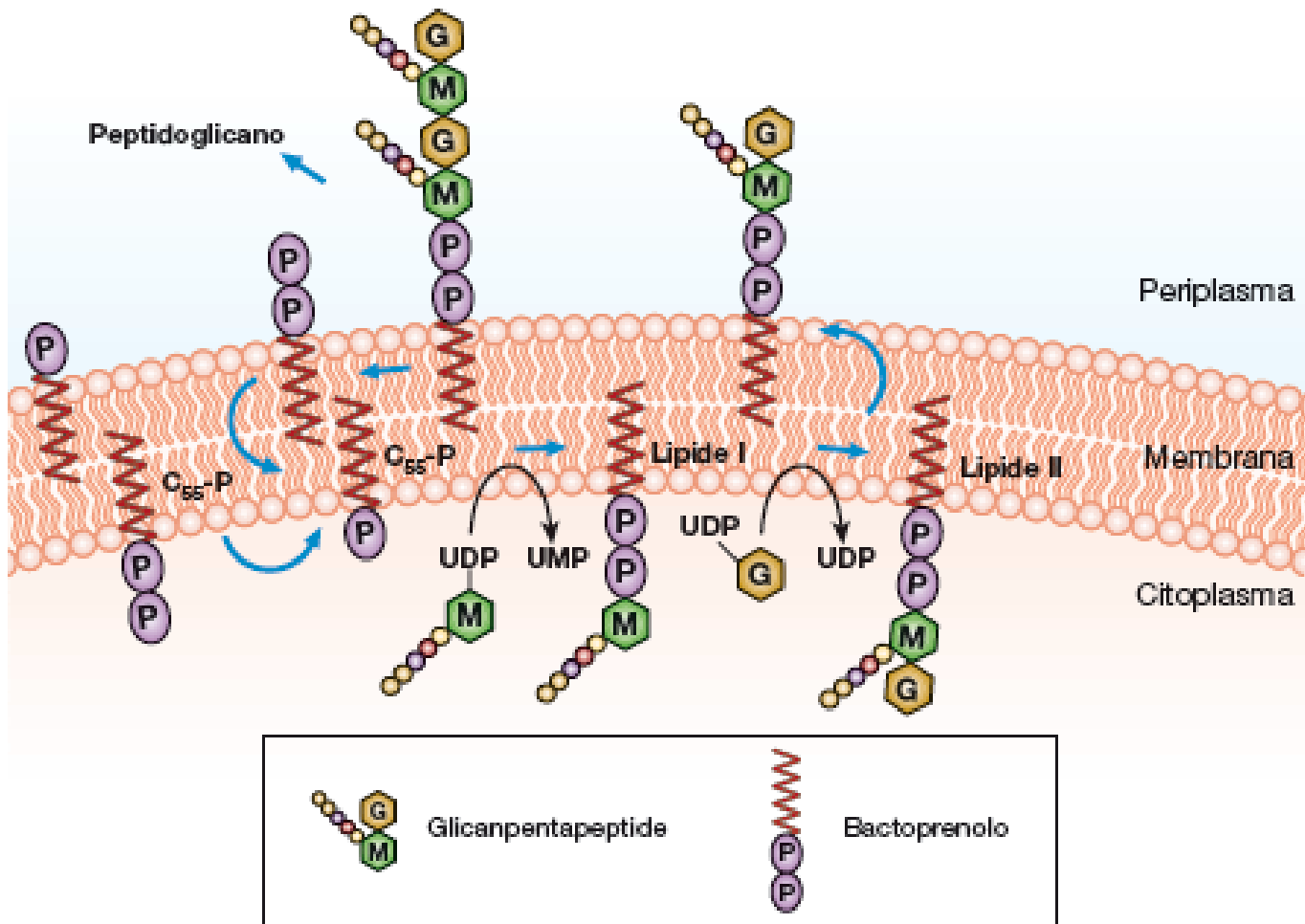


Il trasporto dei precursori del peptidoglicano attraverso la membrana citoplasmatica viene facilitato dal bactoprenolo (undacaproenoilfosfato)

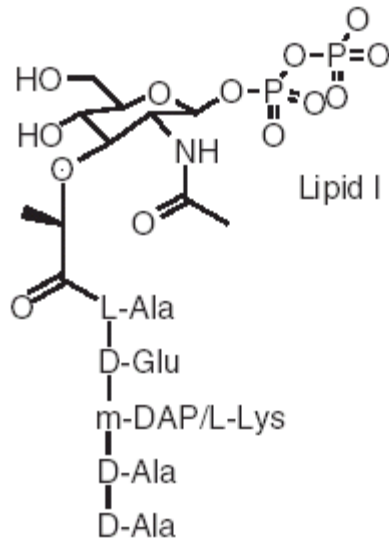
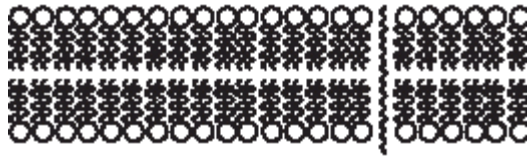


Bactoprenolo è un alcol a 55 atomi di C fortemente idrofobico che lega il precursore del peptidoglicano costituito da NAM-NAG e pentapetide.

# Fasi della biosintesi del peptidoglicano



• Il bactoprenolo raggiunto il periplasma interagisce con gli enzimi che intervengono nell'inserzione dei precursori nel punto di crescita e nella catalisi dei legami glicosidici

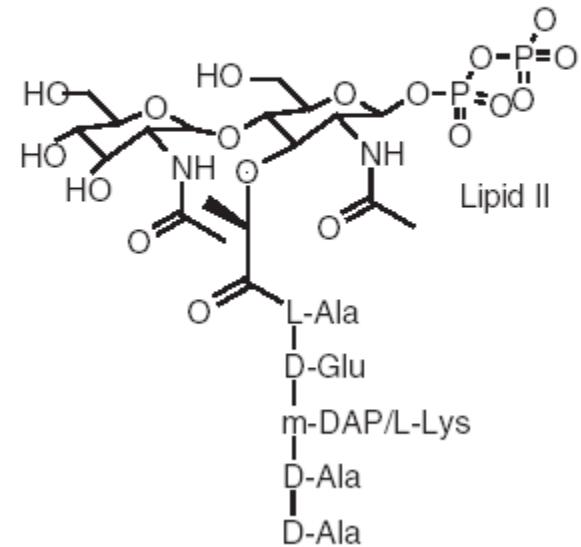
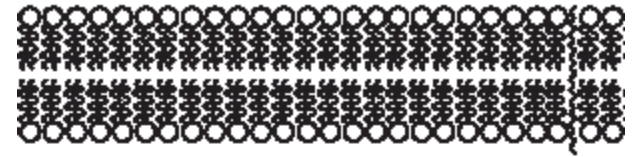


## LIPIDE I



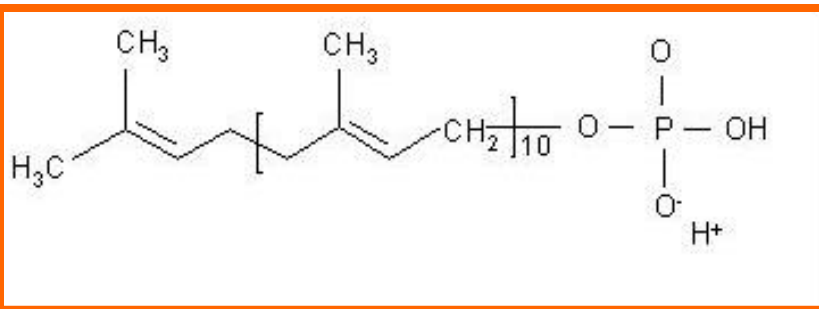
**-UMP**

**+UDP-NAG**



## LIPIDE II

## Bactoprenolo



Viene definito Lipide I il complesso UDP+ NAM+pentapeptide che diventa Lipide II in seguito all'aggiunta del NAG

## Lipide I

Il NAM-peptide si lega al bactoprenolo formando il cosiddetto Lipide I. Il lipide I viene legato da una molecola di NAG formando così il Lipide II (che è il monomero del peptidoglicano).

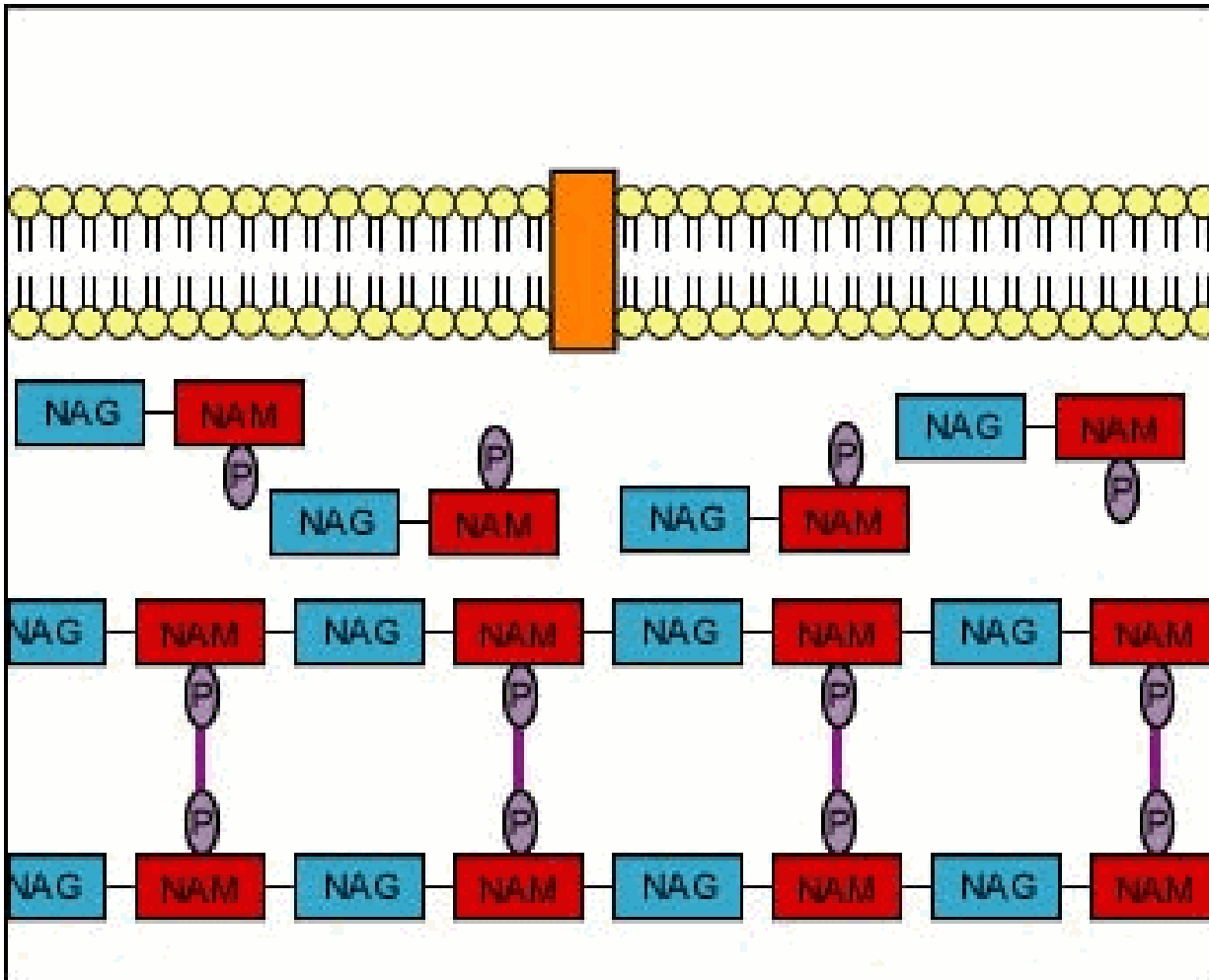
## Lipide II

Una volta attraversata la membrana citoplasmatica avviene la polimerizzazione dei monomeri (lipide II) ad opera delle transglicosilasi che catalizzano la formazione dei legami glicosidici tra il nuovo monomero e il glicano nascente.

Il bactoprenolo una volta donato il monomero di glicano viene defosforilato e ribaltato sulla faccia interna della membrana citoplasmatica per dare avvio ad un nuovo ciclo.

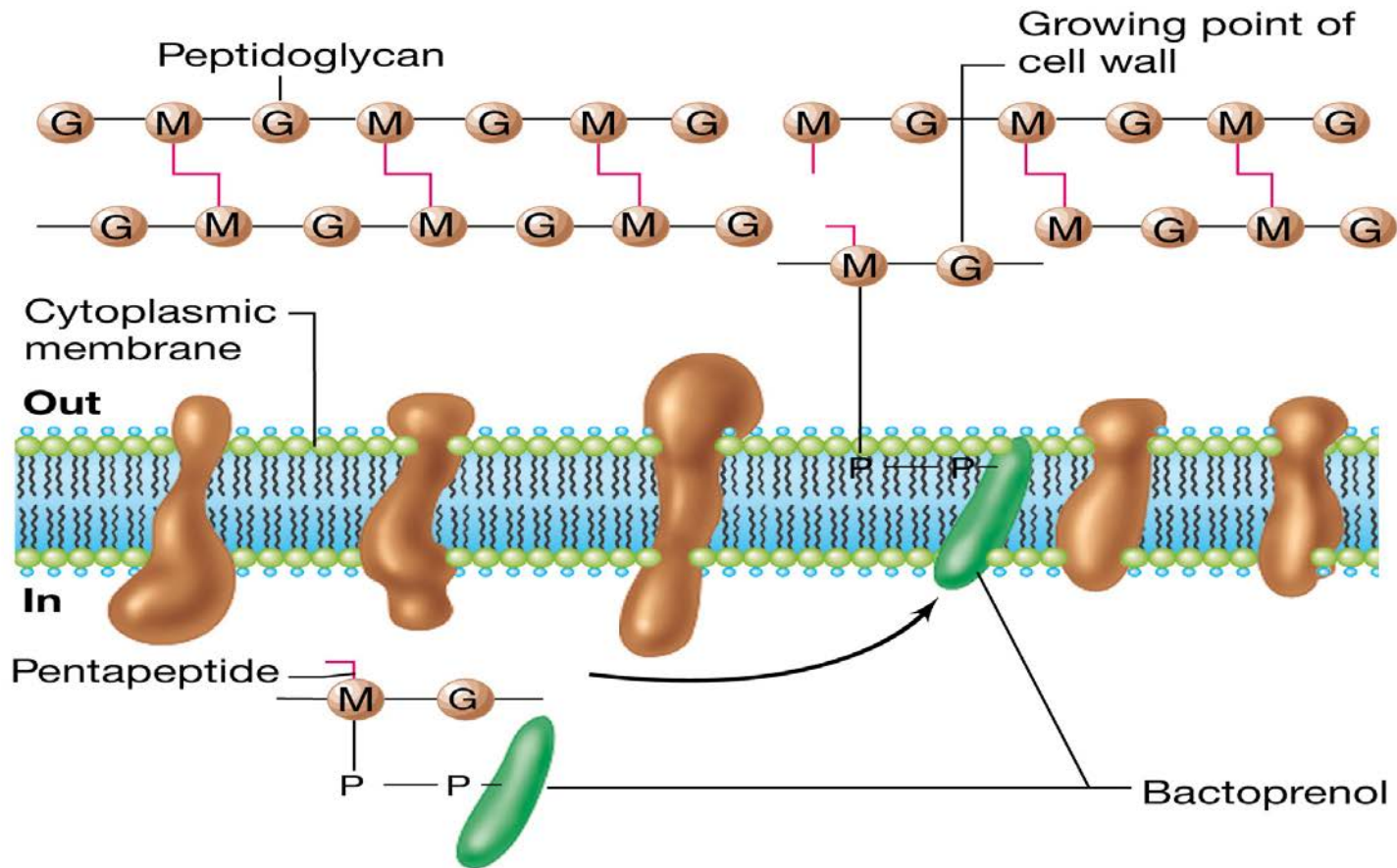
La bacitracina inibisce questa tappa impedendo la defosforilazione del bactoprenolo priorfosfato.

# Processo di incorporazione delle nuove unità nel peptidoglicano



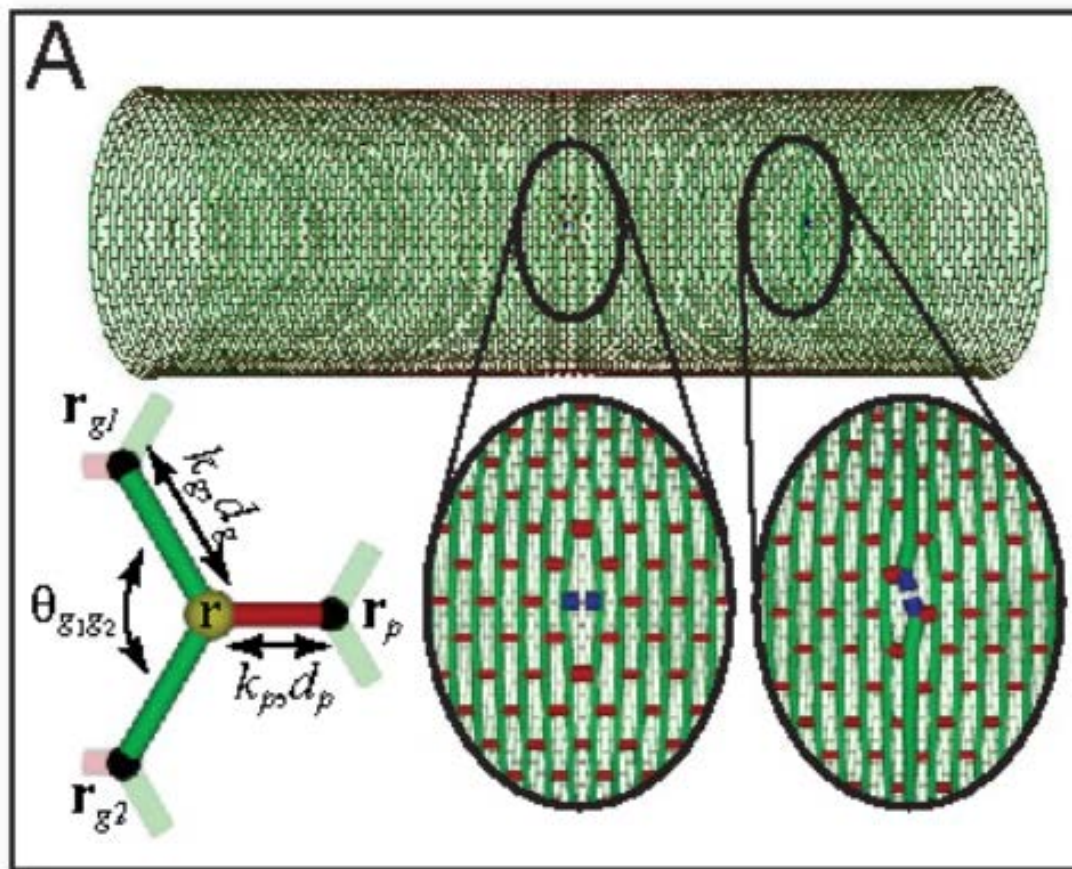
Gli enzimi che sono responsabili dell'assemblaggio del peptidoglicano sono:

- Autolisina
- PBPs



Durante la crescita cellulare la sintesi di peptidoglicano richiede rottura controllata del peptidoglicano persistente da parte delle **autolisine** e inserzione di nuovi precursori.

- Il bactoprenolo raggiunto il periplasma interagisce con gli enzimi che intervengono nell'inserzione dei precursori nel punto di crescita e nella catalisi dei legami glicosidici



## PBP (Penicillin Binding Protein)

Sono gli enzimi responsabili della reazione di trans-peptidazione tra i residui peptidici dei NAM.

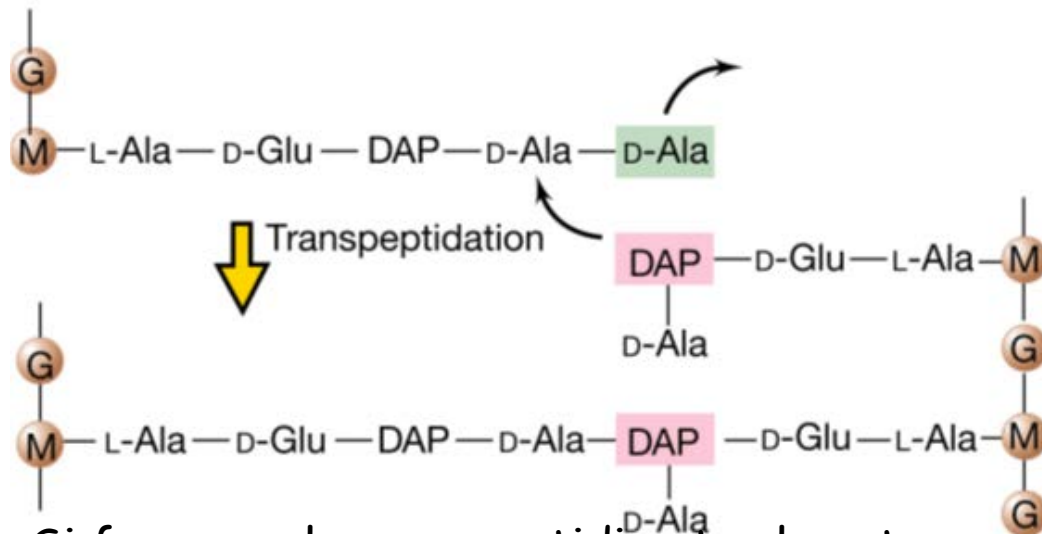
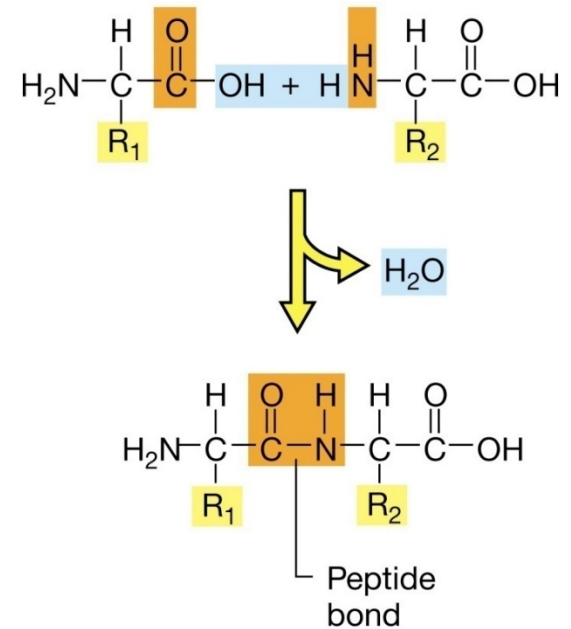
Molti microrganismi (in particolare patogeni) sono dotati di 4-8 PBP differenti.

In generale ne sono state identificate molte e sono state suddivise in due famiglie: HMWPBP (~ 80 kDa) e LMWPBP (~ 30 kDa) ...

Le HMWPBP sono spesso dotate anche dell'attività trans-glicosilasica responsabile del "legame" tra le unità esportate (NAM-NAG-NAM-NAG-etc)



L'ultima tappa della sintesi del peptidoglicano è la **transpeptidazione** ovvero la formazione di un legame peptidico tra due AA delle catene peptidiche



La reazione di transpeptidazione avviene ad opera delle transpeptidasi nello spazio periplasmatico.

Si forma un legame peptidico tra la catena pentapeptidica del nuovo monomero e il tetrapeptide di una catena di glicani adiacente. Il legame peptidico tra le due D-alanine terminali viene trasferito al gruppo aminico libero del DAP (o L-Lisina) creando un legame crociato e il rilascio della D-alanina terminale.

Tutte le PBP presentano attività transpeptidasi nel dominio C-terminale (dominio PB che lega la penicillina)

Alcune sono bifunzionali ed hanno un'attività transglicosilasi nel loro dominio N-terminale

## Penicillin-binding Proteins

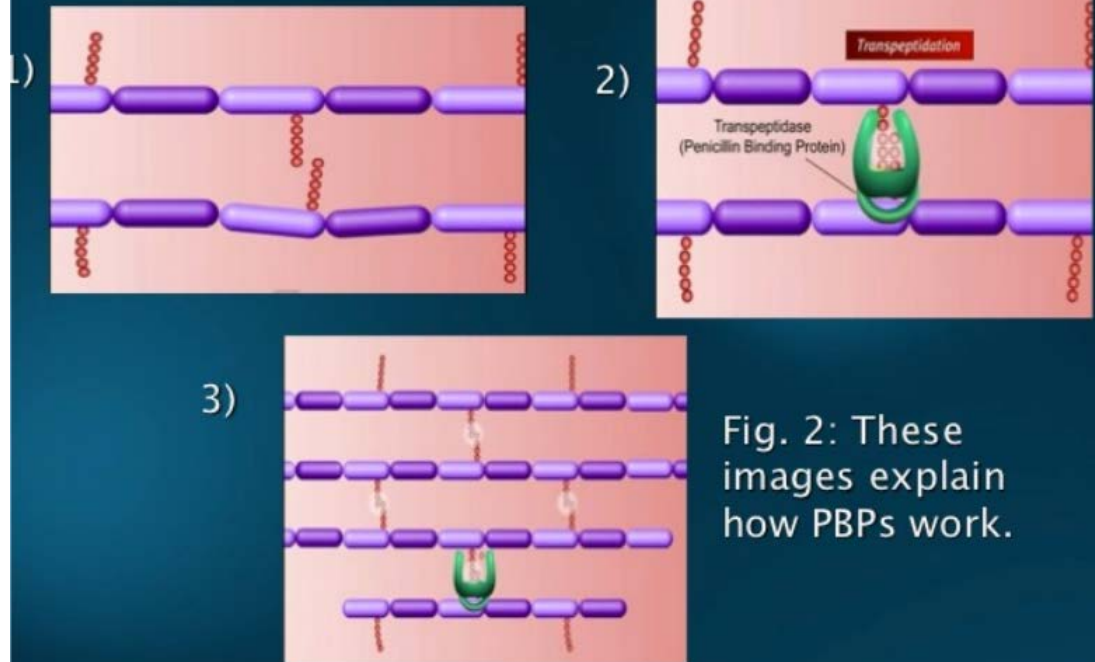
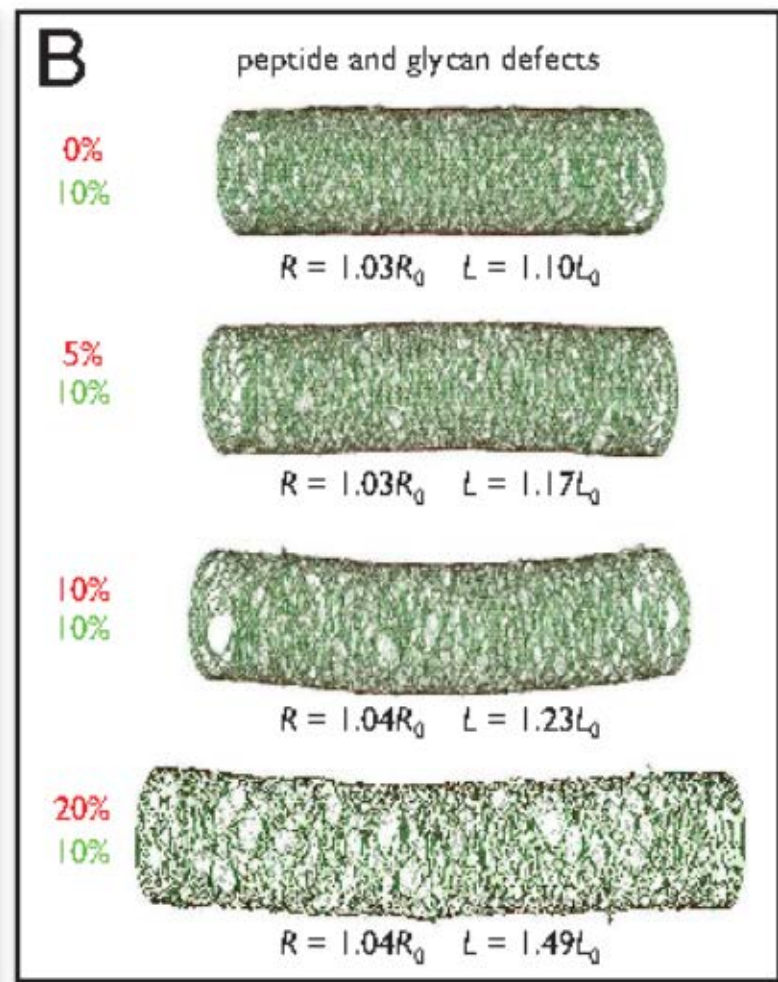
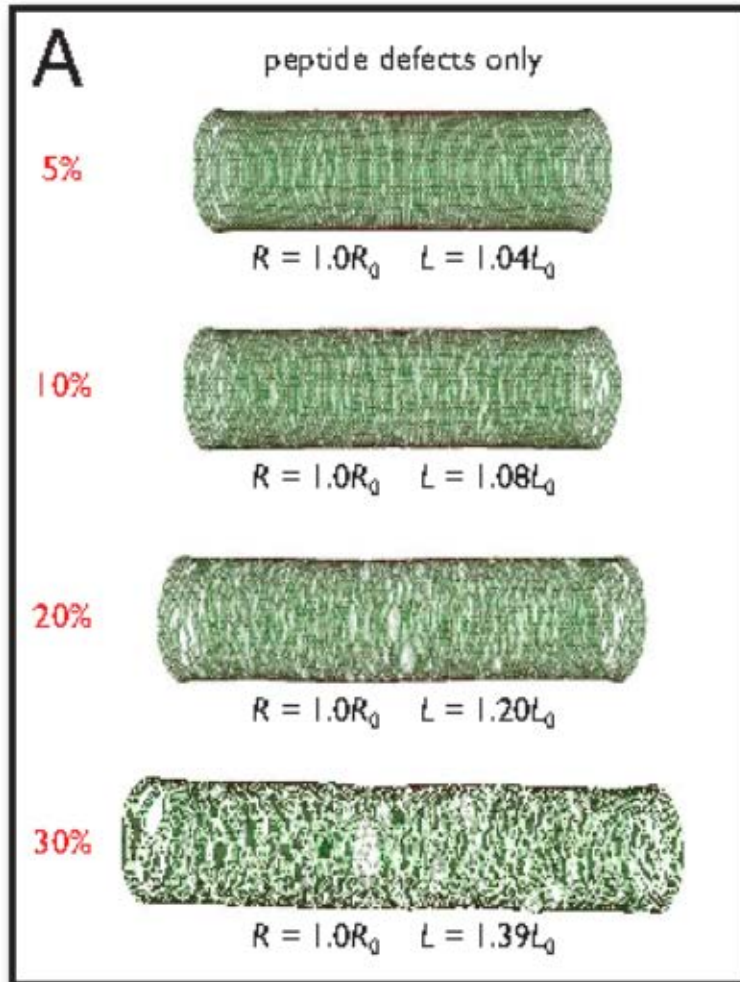


Fig. 2: These images explain how PBPs work.

<http://www.youtube.com/watch?v=qBdYnRhdWcQ>



Robustness of the shape of a model cell with peptidoglycan defects. (A and B) Upon removal of an increasing concentration of randomly chosen peptide bonds (A) or peptide and glycan bonds (B), the cell wall maintains an approximately cylindrical shape, with slightly increased dimensions as indicated. The peptide and glycan defect concentrations are shown as percentages in red and green, respectively. The glycan defects in B create large pores in the cell wall;

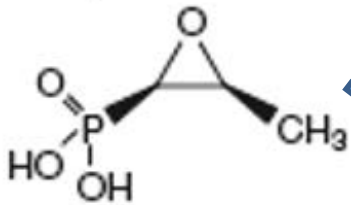
I principali antibiotici che agiscono a livello della biosintesi delle unità strutturali del peptidoglicano sono:

la fosfomicina inibisce l'enzima MurA responsabile della biosintesi del UDP-NAM ....

la cicloserina inibisce l'attività dell'enzima Isomerasi che determina la sintesi delle D-Ala

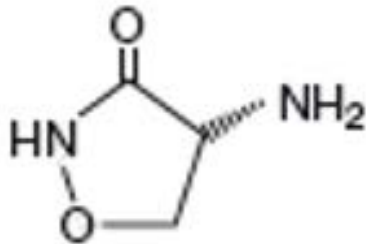
la bacitracina che impedisce il riciclaggio delle molecole di bactoprenolo necessario per il trasporto del LIPIDE II attraverso la membrana

a) Fosfomicina

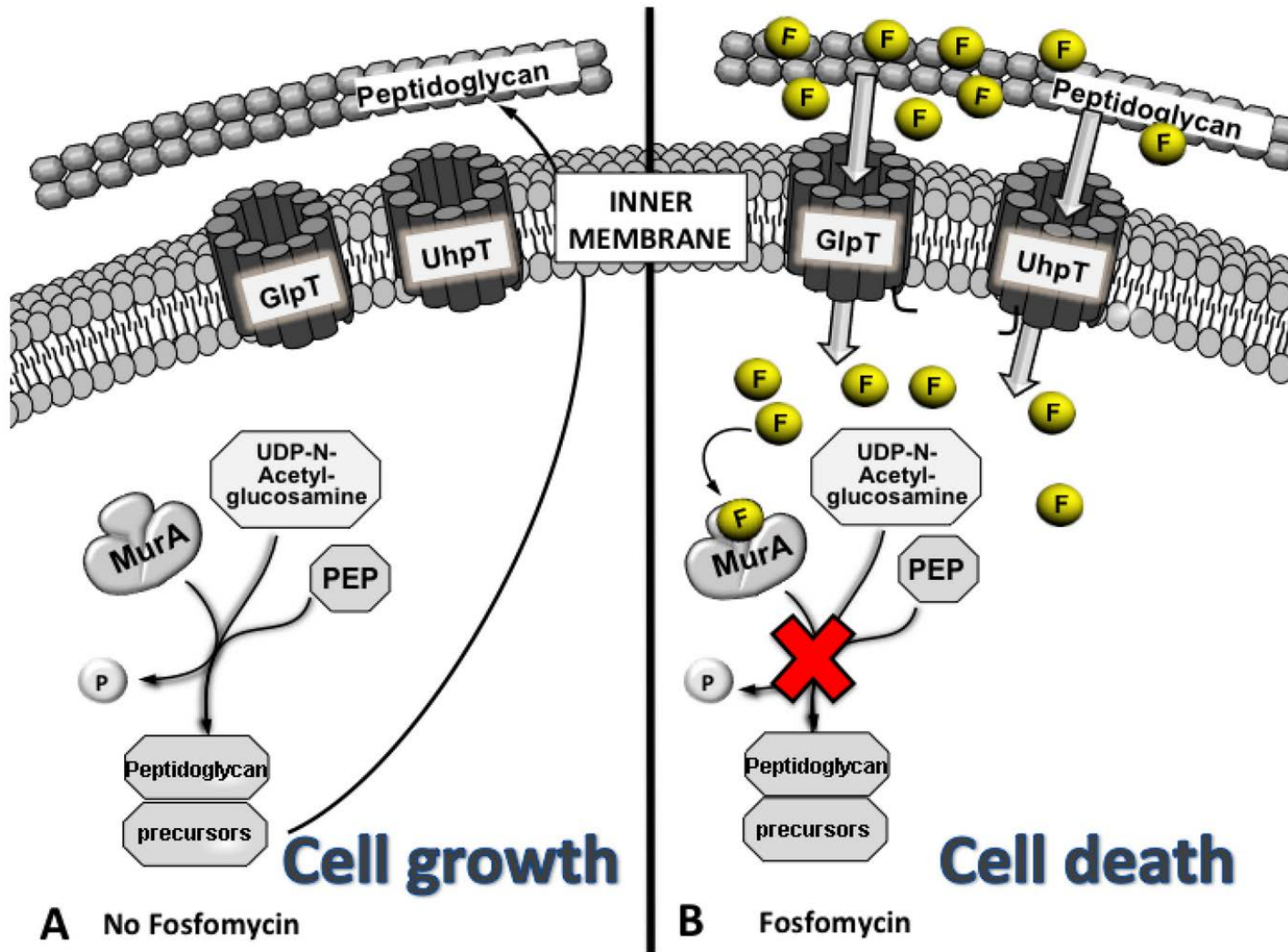


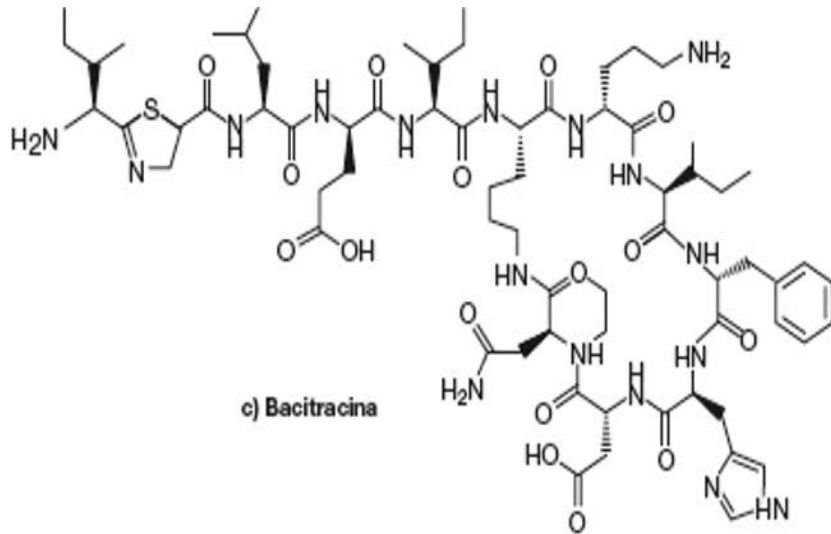
**Fosfomicina:** analogo strutturale del fosfoenolpiruvato e si lega all'enzima fosfoenolpiruvasi che catalizza la reazione di condensazione con UDP-N acetilglucosamina per formare enoilN-acetilglucosamina precursore

b) Cicloserina

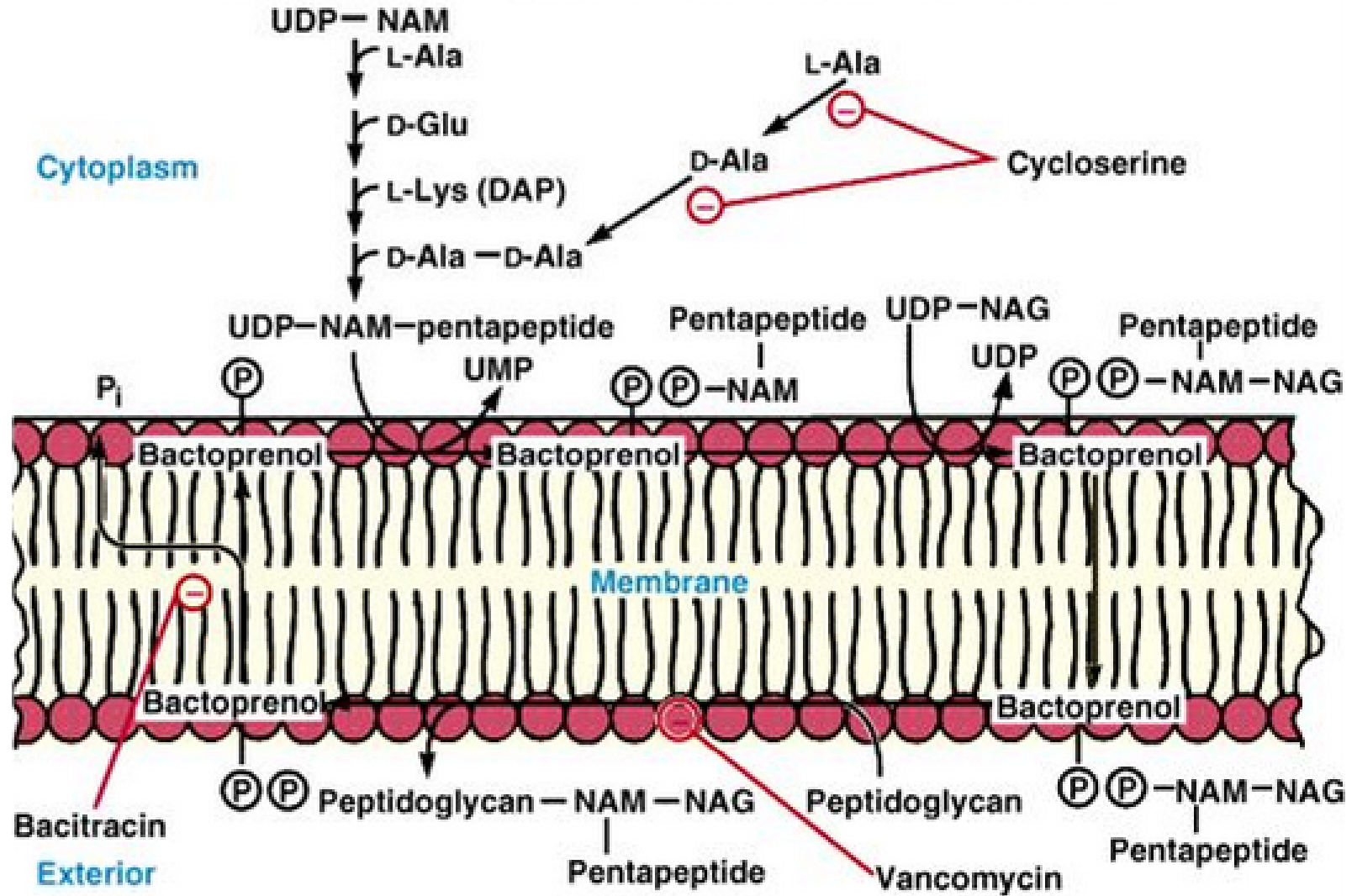


**Cicloserina:** analogo strutturale della D-alanina interferisce con la sintesi del dimero D-alanina-D-alanina inibendo l'enzima alanin racemasi che converte L-alanina in D alanina e l'enzima D-alanil.D-alanina sintetasi che catalizza la formazione del legame pepetidico tra le 2 D-alanine.



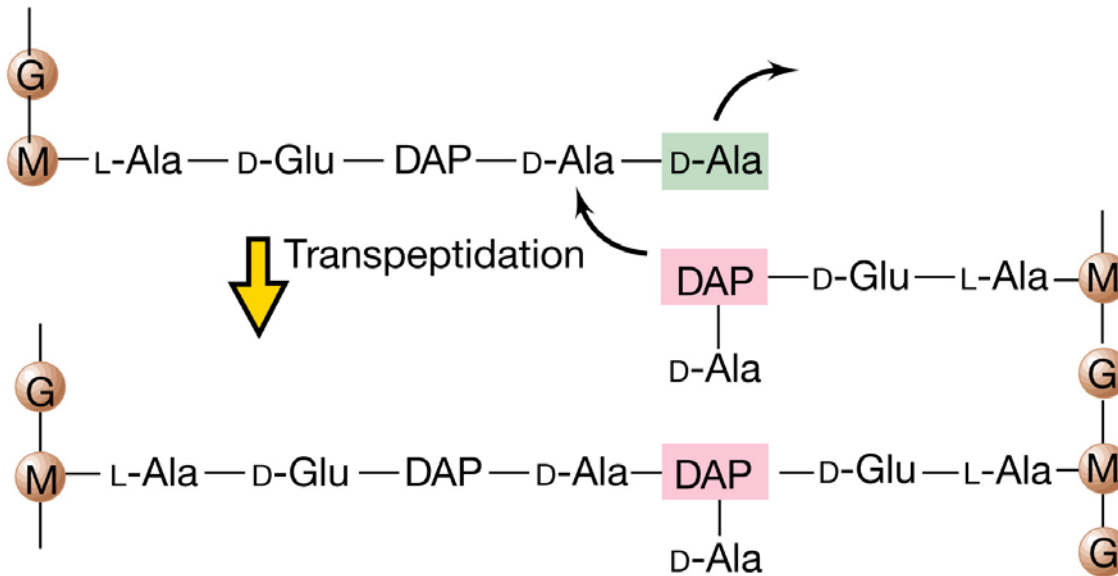
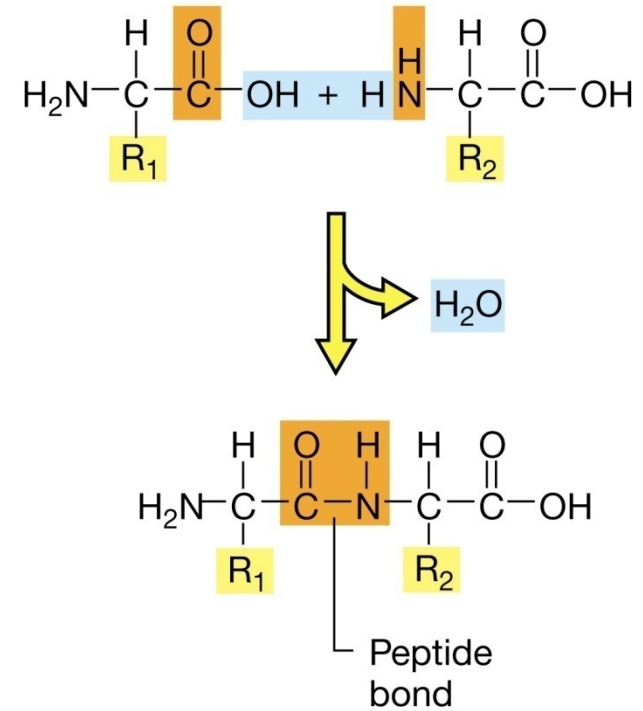


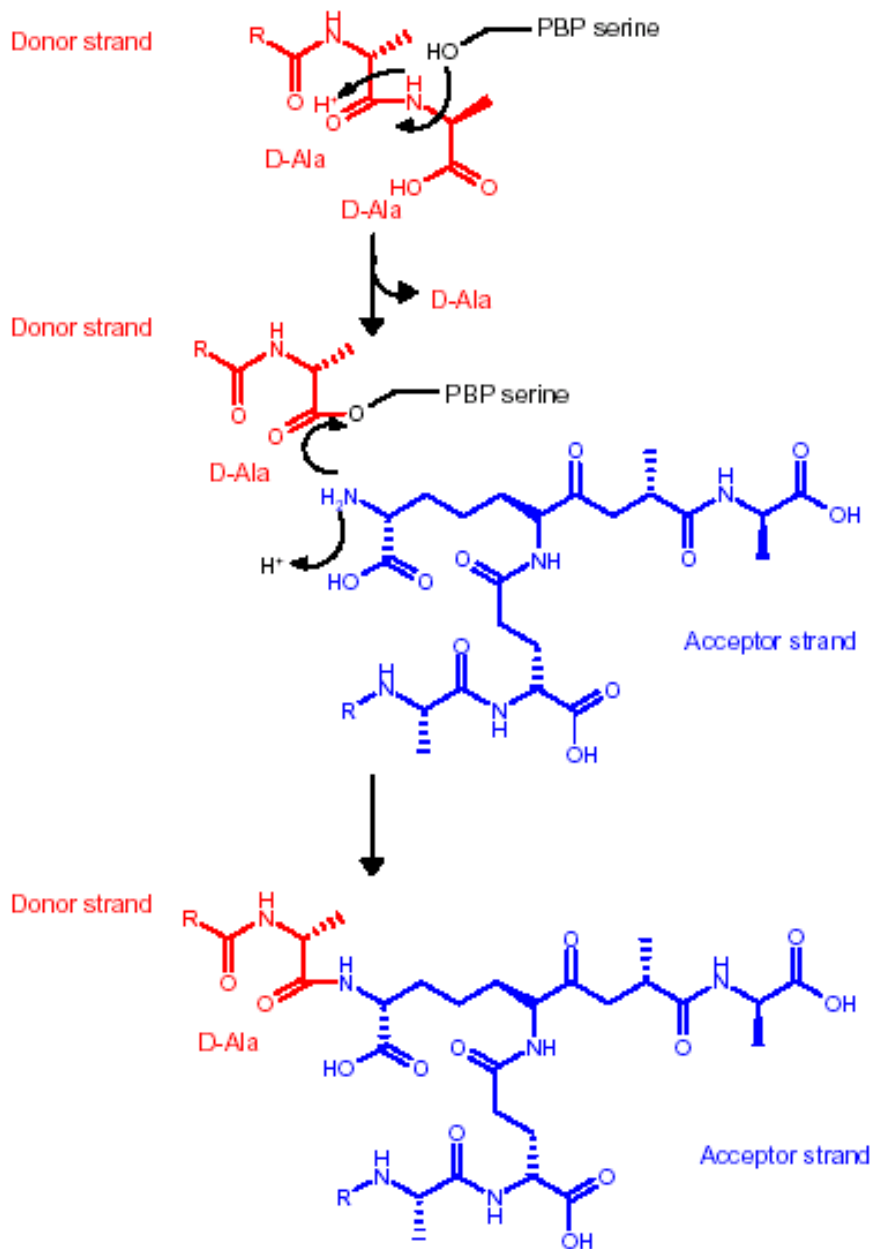
La bacitracina è un antibiotico polipeptidico che si lega al bactoprenolo interferendo con la defosforilazione del bactoprenolo pirofosfato, impedendo la traslocazione di unità di PG dal citoplasma all'esterno. Nella forma pirofosfato il bactoprenolo non è attivo (attivo solo se monofosfato)





L'ultima tappa della sintesi del peptidoglicano è la **transpeptidazione** ovvero la formazione di un legame peptidico tra due AA delle catene peptidiche





Le PBP sono in grado di effettuare la reazione di transpeptidazione riconoscendo il dimero di D-Ala terminale, eliminando l'ultimo residuo di D-Alanina e formando un intermedio covalente che trasferirà il legame al gruppo di DAP o L-Lys di un secondo penta peptide

....

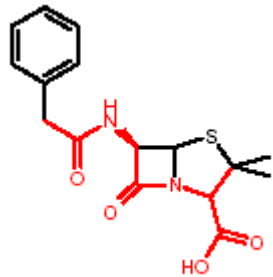
**Questa fase della sintesi del peptidoglicano prevede l'esistenza di almeno due classi di antibiotici in grado di inibire la reazione di transpeptidazione:**

- I  $\beta$ -lattamici (pennicilline)**
- I glicopeptidi (Vancomicina)**

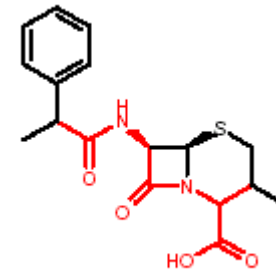
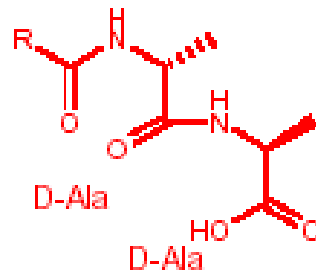
**Queste due classi di antibiotici agiscono in maniera differente....**

I  $\beta$ -lattamici sono dotati di una struttura che richiama quella presentata dal dimero di D-Ala..

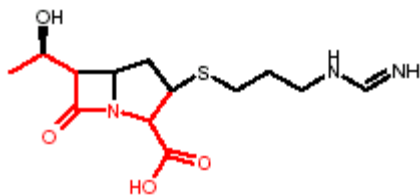
In questo modo essi possono legarsi al sito attivo delle PBP ed impedirne il funzionamento



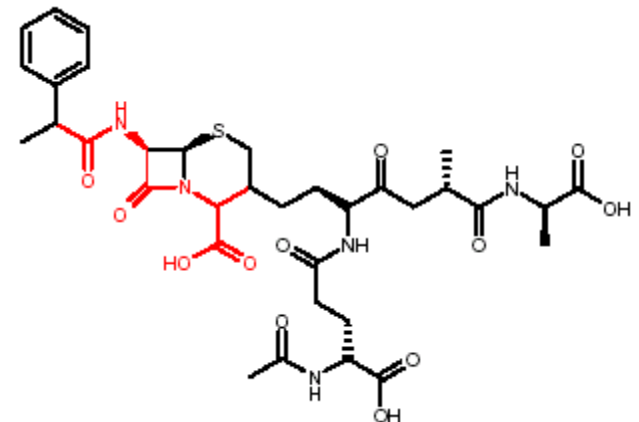
**Penicillina G**

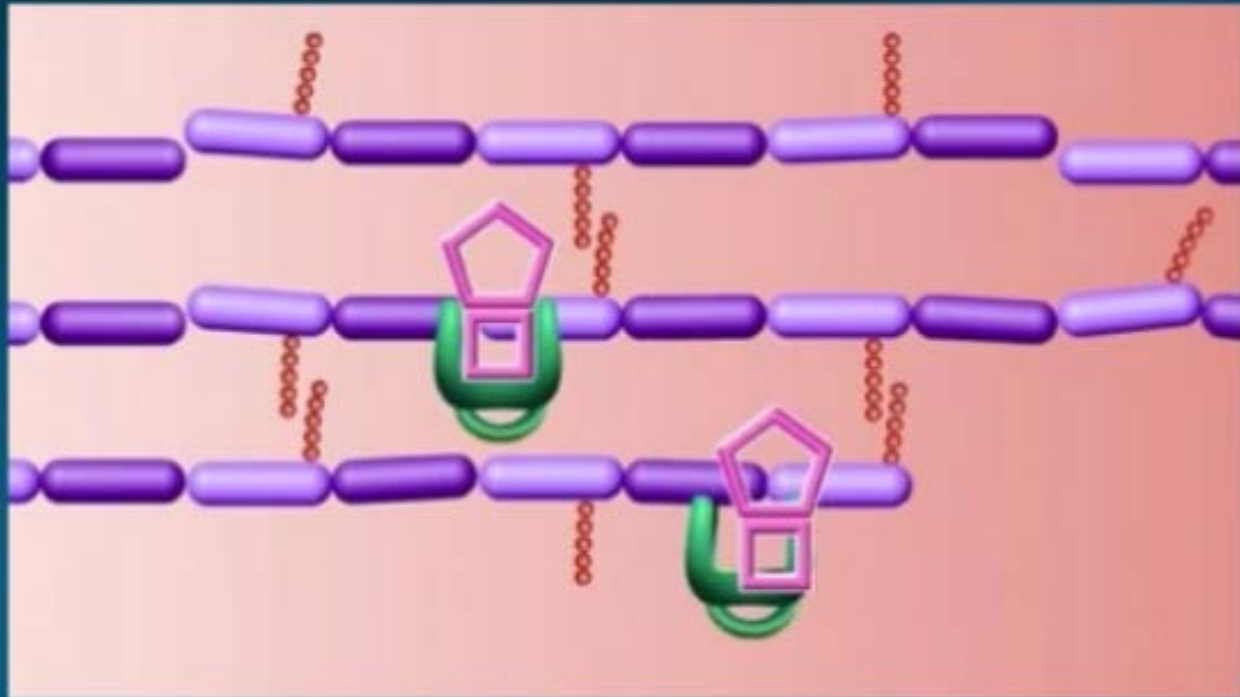


**Cefalosporine**



**Carbapenem Imipenem**



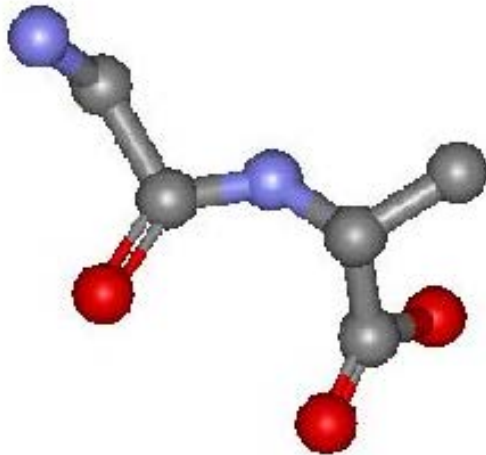


[http://www.youtube.com/  
watch?v=qBdYnRhWcQ](http://www.youtube.com/watch?v=qBdYnRhWcQ)

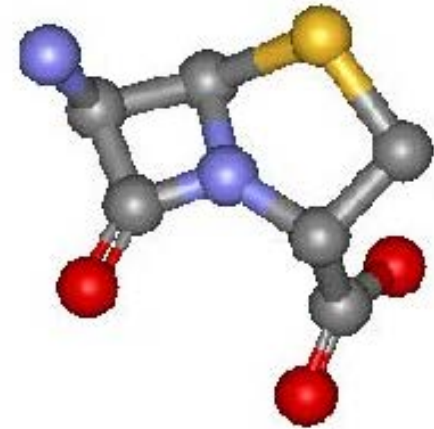
Fig. 4: Explains how  
beta-lactam antibiotics  
work

## Omologia strutturale tra

2 D-ALANINA

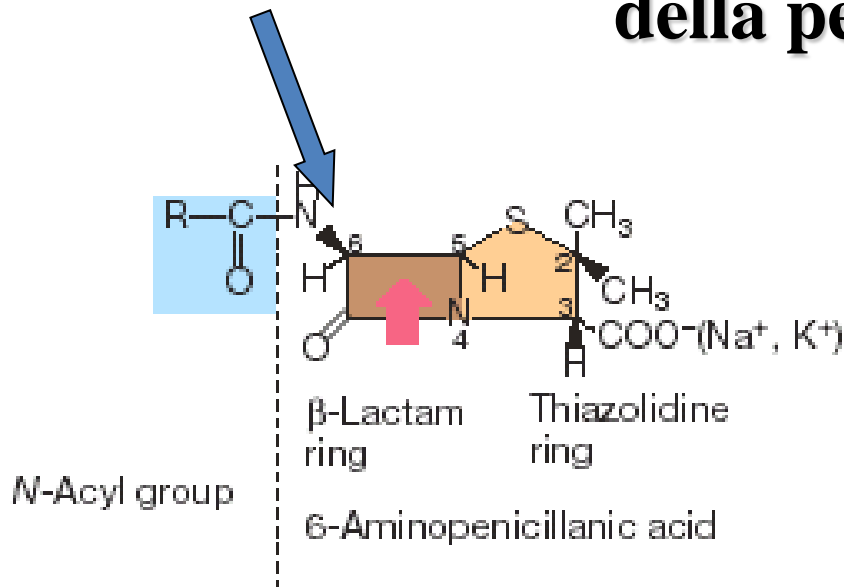


PENICILLINA



La reazione di transpeptidazione è il bersaglio della penicillina in quanto vi è omologia strutturale tra le 2 D-Alanina e la PENICILLINA

# I $\beta$ -lattamici più importanti sono i derivati della penicillina G



Le penicilline costituite da acido 6-aminopenicillanico legato a differenti catene laterali.

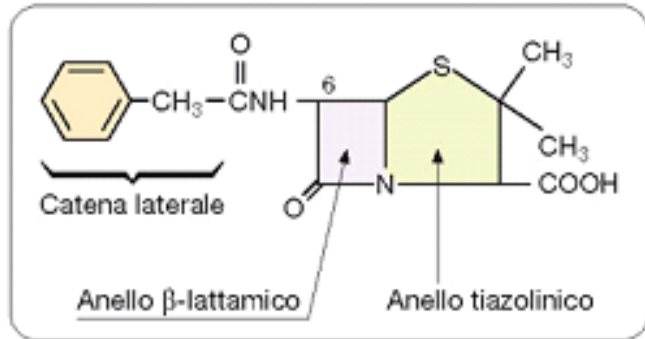
La penicillina G è prodotta da *Penicillium crysogenum* attiva su Gram+.

Sostituzione in posizione 6 hanno dato origine ad un'ampia gamma di composti

Designazione	Gruppo N-Acile
<b>PENICILLINA NATURALE</b> Benzilpenicillina (penicillina G) Attiva sui Gram-positivi, sensibile alle $\beta$ -lattamasi	
<b>PENICILLINE SEMISINTETICHE</b> Meticillina Stabile in ambiente acido, resistente alle $\beta$ -lattamasi	
Oxacillina Stabile in ambiente acido, resistente alle $\beta$ -lattamasi	
Ampicillina Ampio spettro di attività (specialmente contro i batteri Gram-negativi), stabile in ambiente acido, resistente alle $\beta$ -lattamasi	
Carbenicillina Ampio spettro di attività (specialmente contro <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ), stabile in ambiente acido ma inefficiente per via orale, sensibile alle $\beta$ -lattamasi	

# LE PENICILLINE

a)

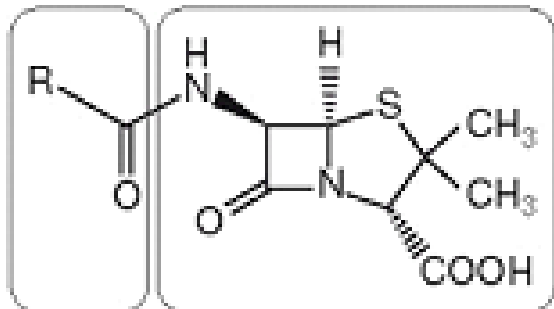


Penicillina

Le varie sostituzioni hanno permesso di ampliare lo spettro di azione variando l'affinità con le PBP e la permeabilità

b) Gruppo delle penicilline

Gruppo N-acile



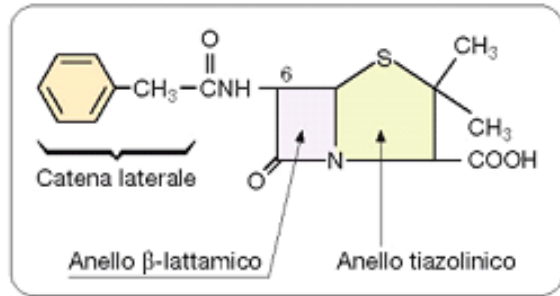
Acido 6-aminopenicillanico

Gruppo N-acile	Designazione
<chem>c1ccc(cc1)CC(=O)-</chem>	Penicillina G
<chem>COc1cc(C(=O)C)ccc1OC</chem>	Meticillina
<chem>c1ccc(cc1)C2=NC(=O)C(C)O2C(=O)-</chem>	Oxacillina
<chem>Nc1ccc(cc1)CC(=O)-</chem>	Ampicillina



# CEFALOSPORINA C simili alle Penicillina prodotte da un fungo *Cephalosporium acremonium*.

47

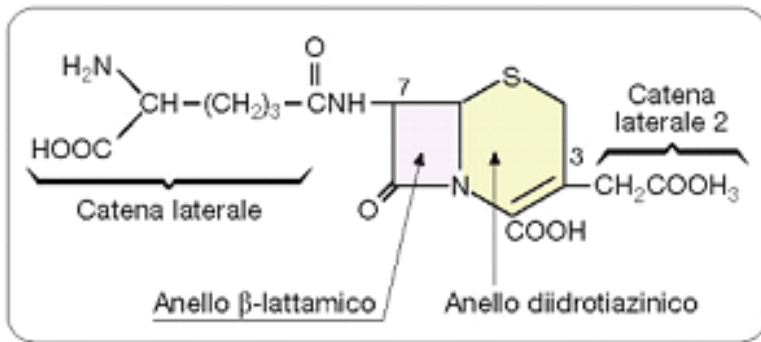


Penicillina

Dalla cefalosporina C derivano tutte le cefalosporine con spettro sempre più ampio.

Contengono acido 7-aminocefalosporanico costituito da

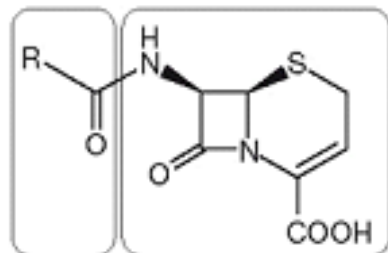
**anello B-lattamico**  
**anello diidrotiazinico**



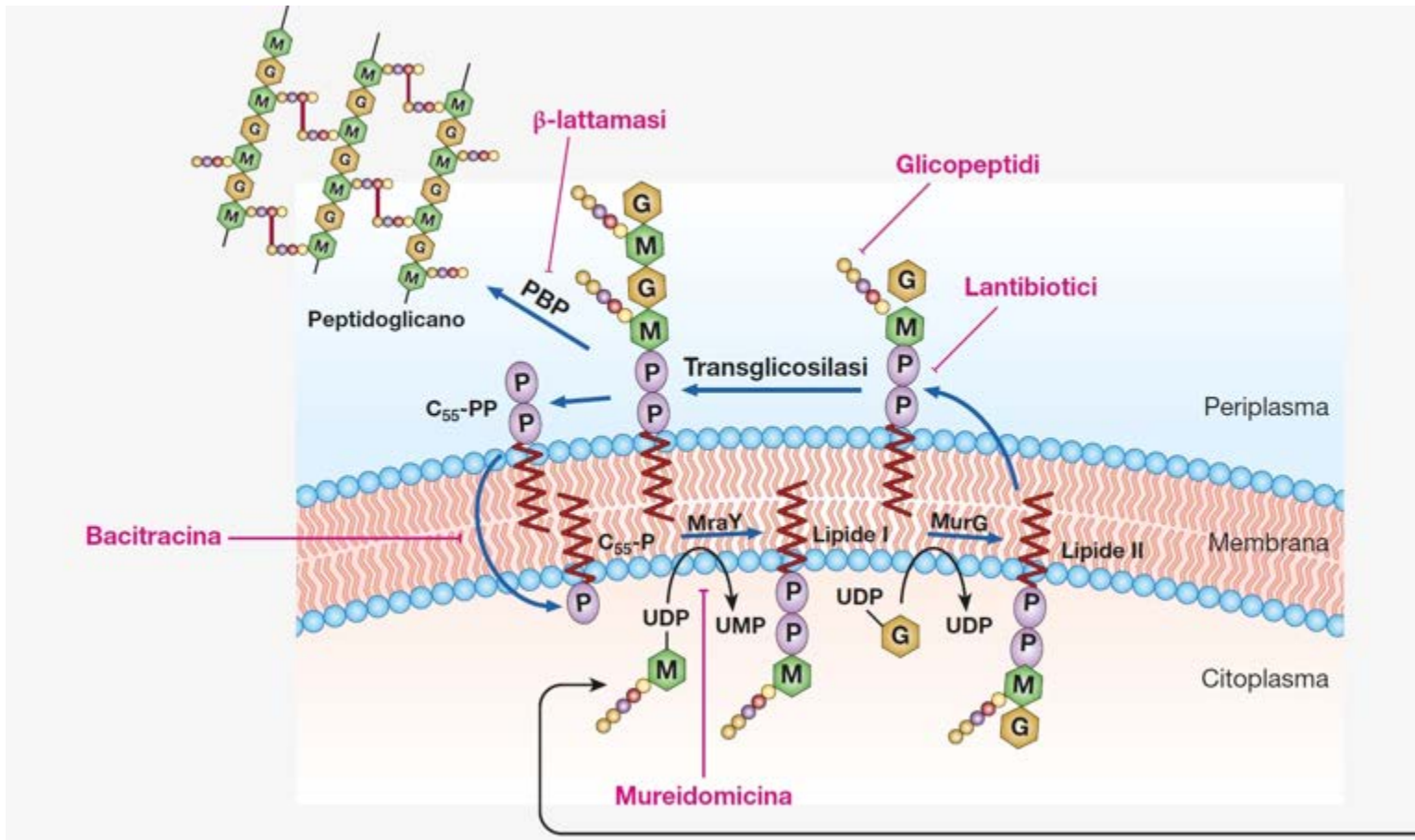
Cefalosporina

Lo sviluppo di questi antibiotici che contengono radicali laterali in posizione 3 e 7 ha portato all'ampliamento dello spettro di azione.

Si è passati quindi da uno spettro d'azione ristretto ad un numero limitato di patogeni ad ampio spettro d'azione che include microrganismi multi resistenti tra cui *P.aeruginosa*.



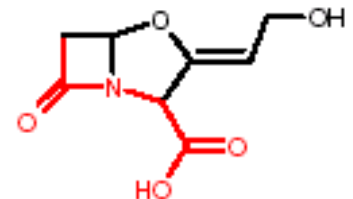
Acido 7-aminocefalosporanico



**I meccanismi di resistenza agli antibiotici  $\beta$ -lattamici sono di tre tipi:**

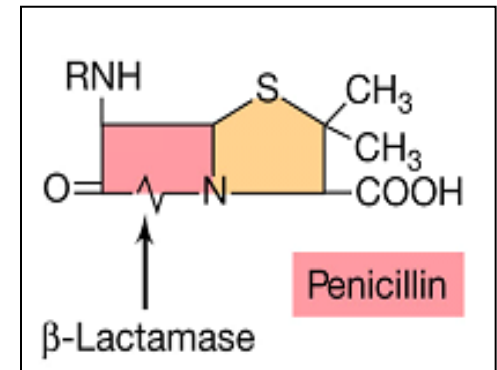
- **Modificazione della permeabilità**
- **Mutazione del sito attivo della PBP inibita**
- **Sintesi da parte del batterio di una  $\beta$ -lattamasi**

**Per contrastare il terzo caso (più frequente) si possono utilizzare delle molecole in grado di inibire l'attività delle  $\beta$ -lattamasi, come è in grado di fare l'acido clavulanico ....**

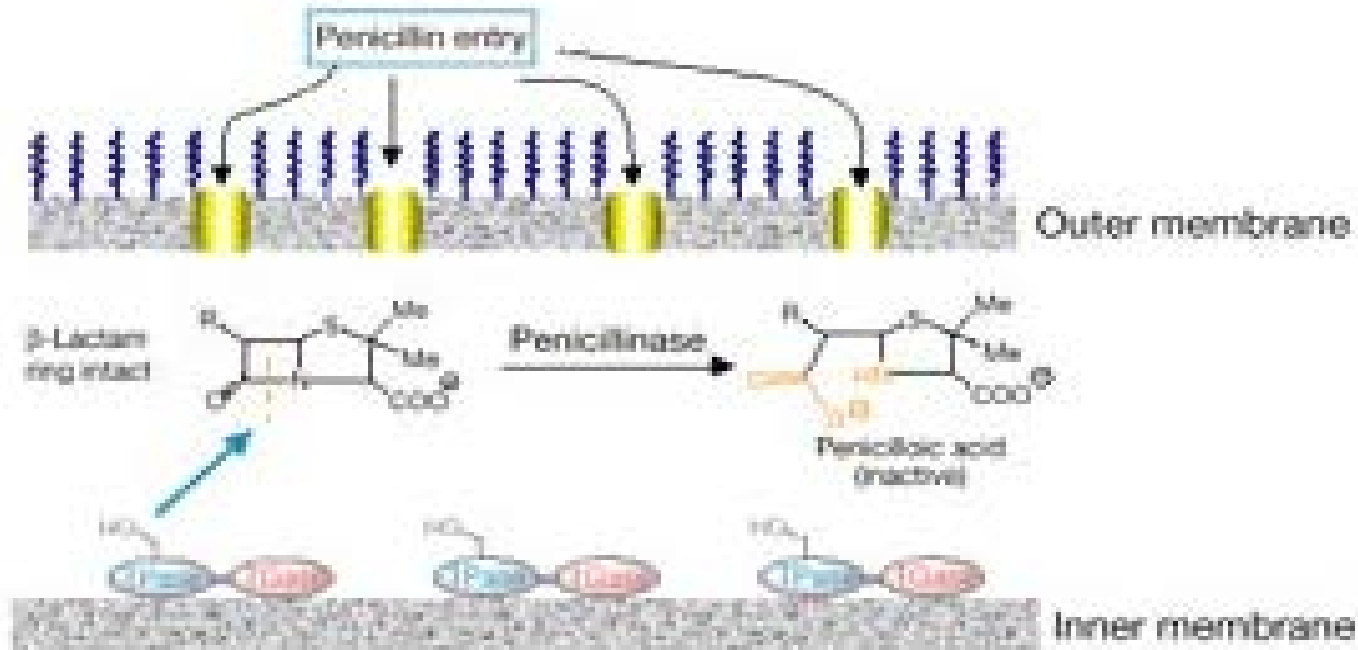


# 1. Modificazione dell'antibiotico che diviene inattivo

Le  $\beta$ -lattamasi o penicillinasi sono enzimi localizzati nello spazio periplasmatico in grado di tagliare l'anello  $\beta$ -lattamico della penicillina rendendola inattiva. I geni che codificano per questi enzimi sono localizzati su elementi mobili (spesso definita ampicillina-resistenza  $Ap^r$ )

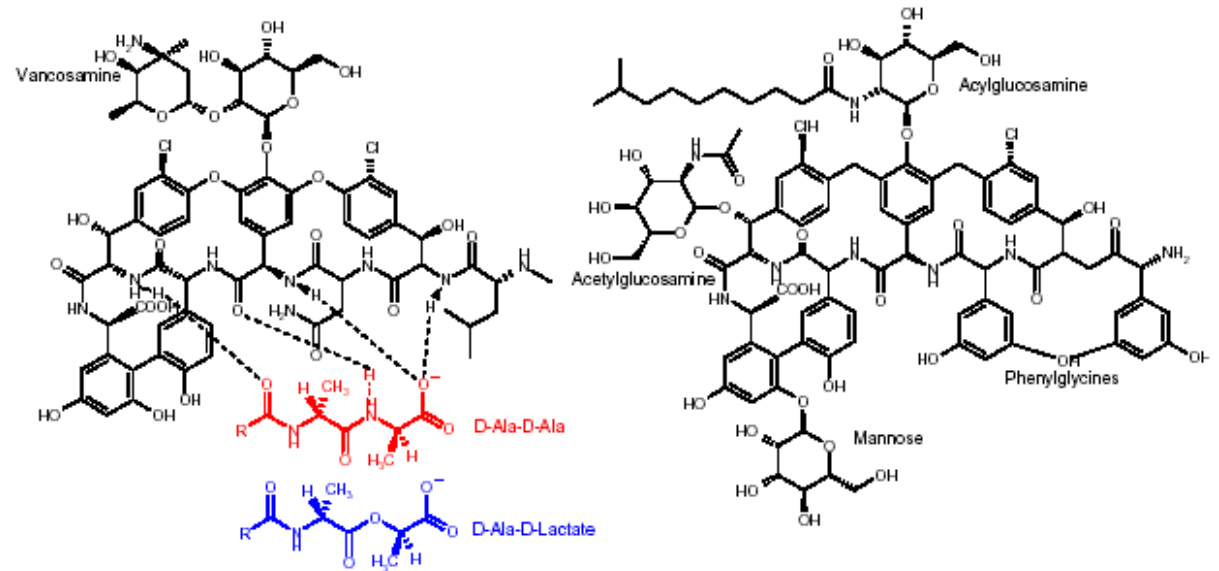


b

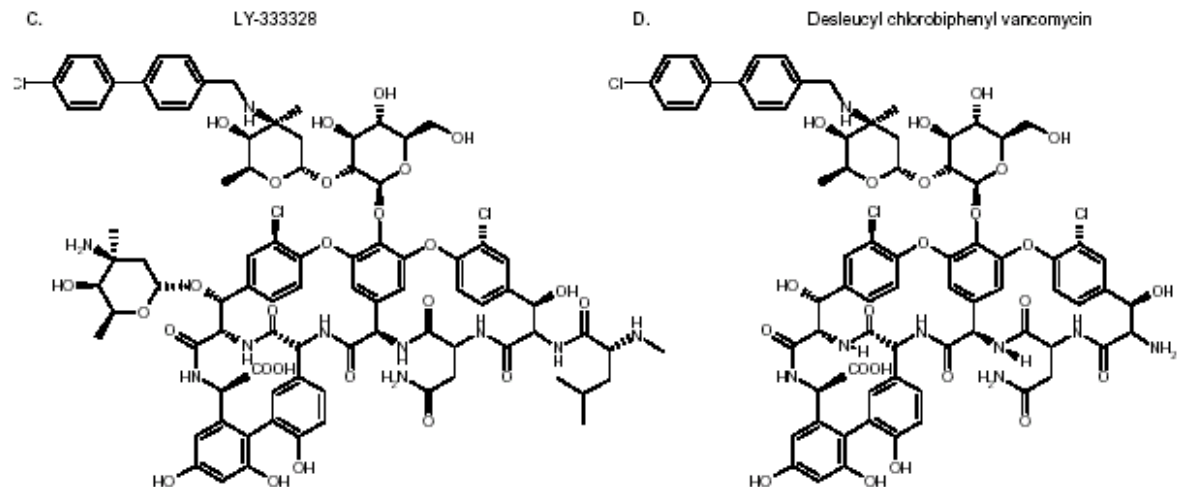


# I glicopeptidi come la Vancomicina hanno un meccanismo di azione differente....

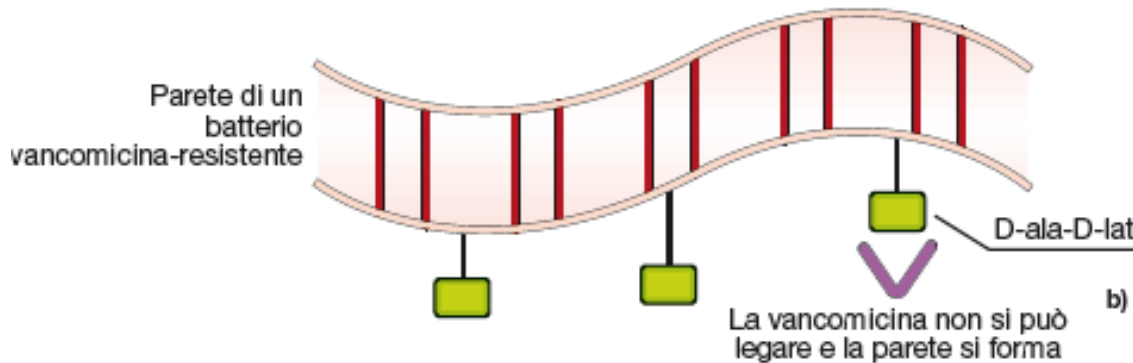
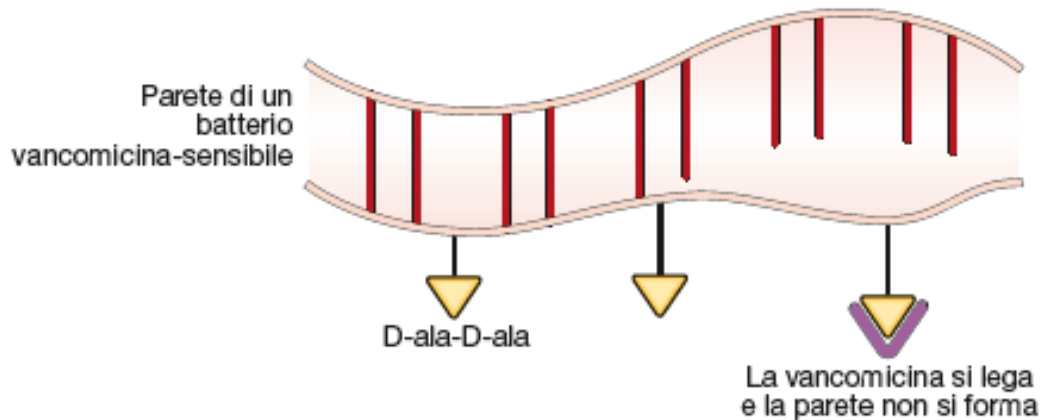
Essi, infatti si legano al dipeptide di D-Ala e non permettono alla PBP utilizzarlo per la transpeptidazione



I meccanismi di resistenza si basano sulla modificazione della prima D-Ala in D-Lattato ....



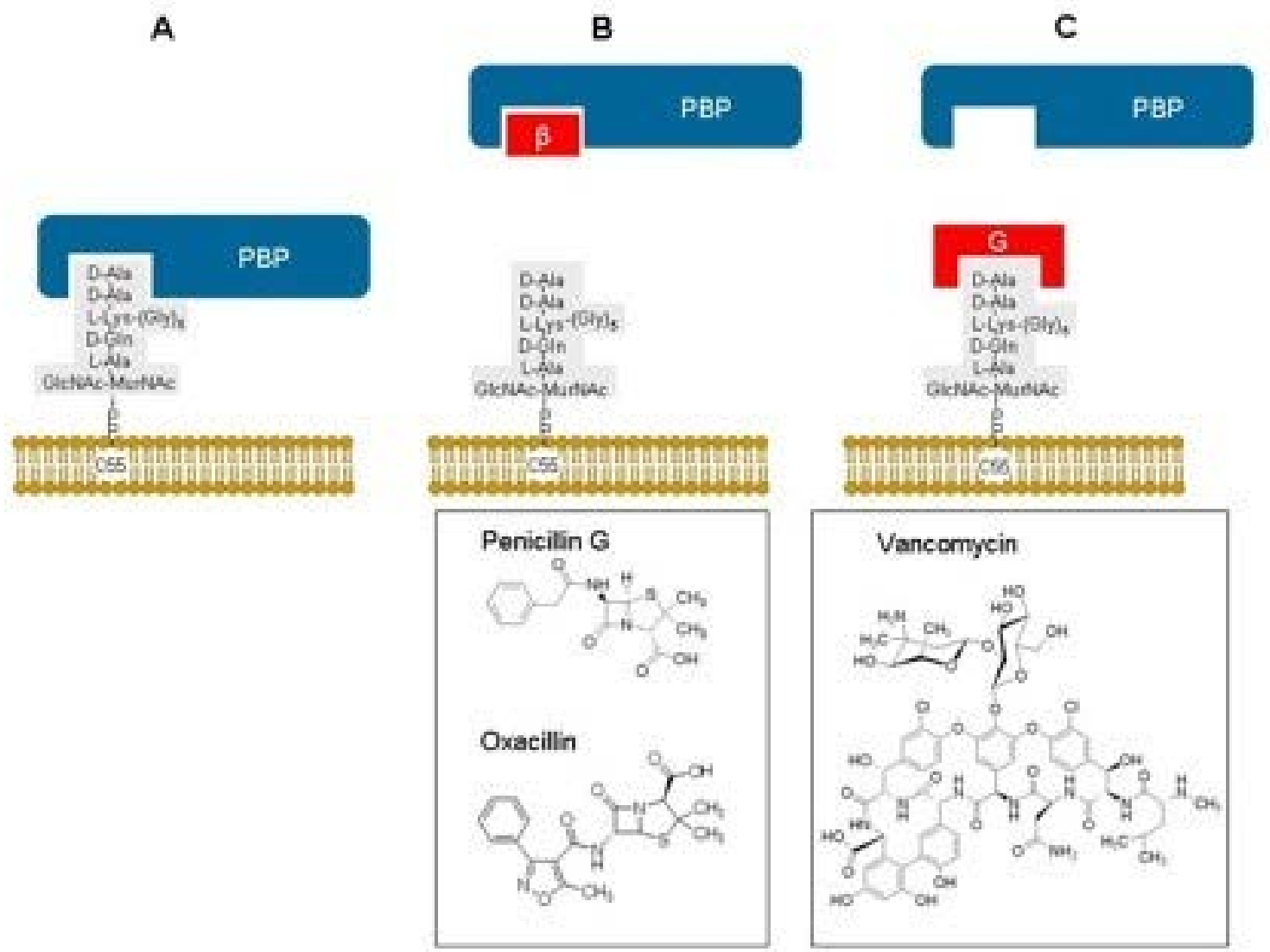
# Meccanismo di azione della vancomicina



Non agisce sugli enzimi ma interferisce con la polimerizzazione legandosi all'estremità C-terminale del dimero D-ala-D-ala dell' a) NAM-pentapeptide legato al bactoprenolo.

Impedisce quindi il riconoscimento da parte delle transpetidasi. Non passa la membrana esterna dei Gram- utilizzata nei Gram+ , importante negli *Staphylococcus aureus* MDRA

# Come gli antibiotici $\beta$ lattamici ( $\beta$ ) e la vancomicina (G) inibiscono le PBP



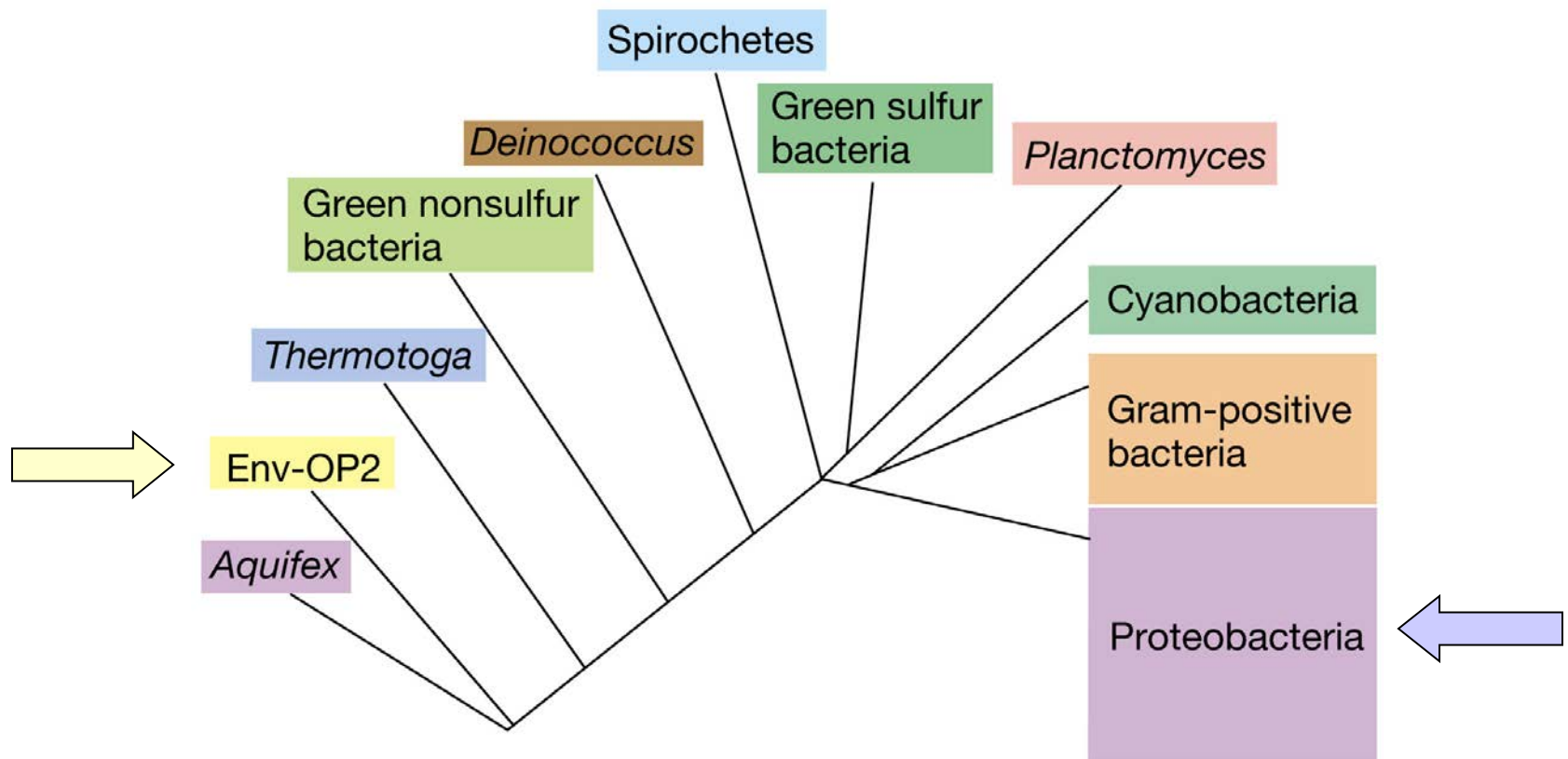


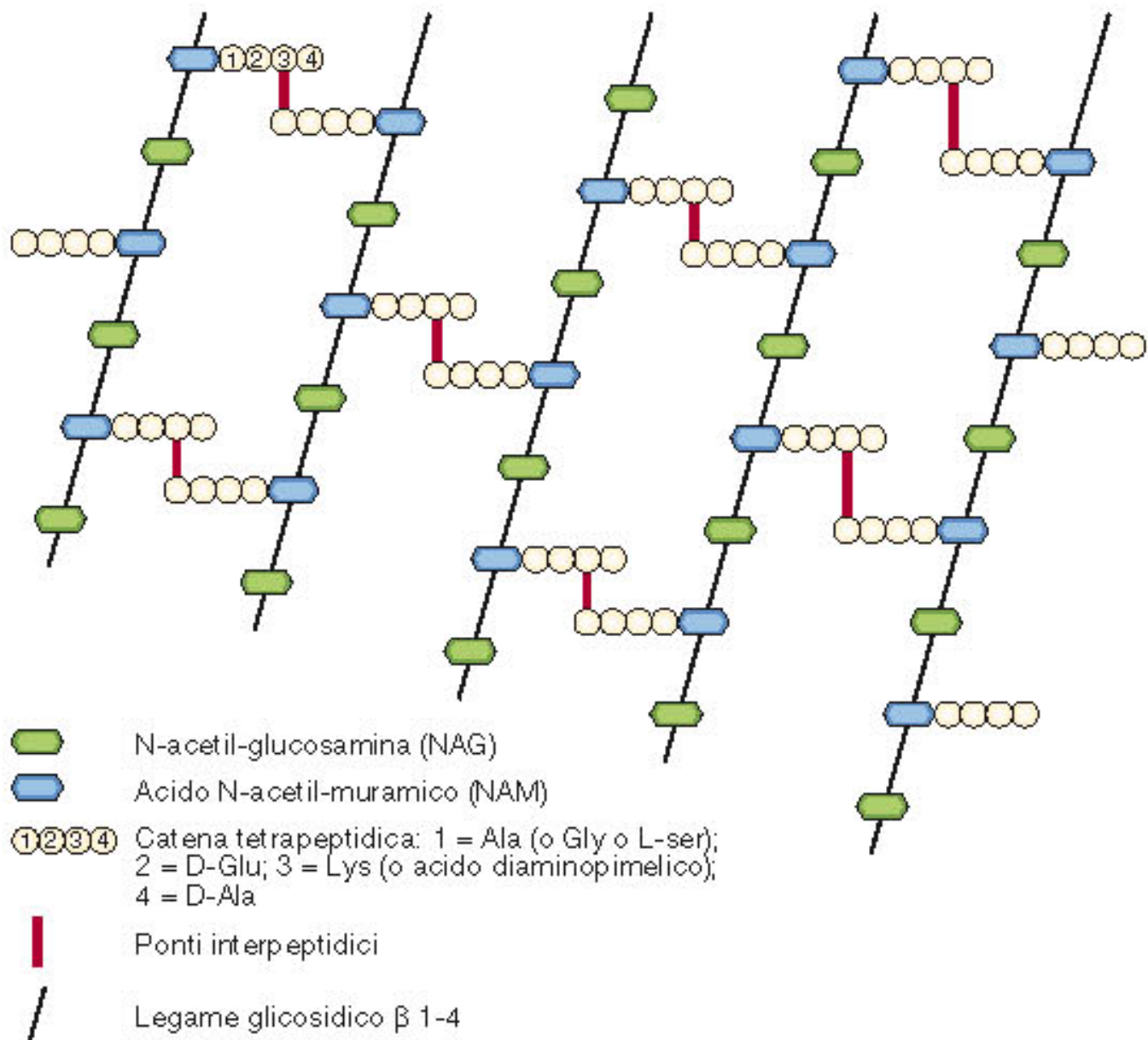


# Albero filogenetico dei Batteri costruito tramite sequenziamento dell'RNA 16 S

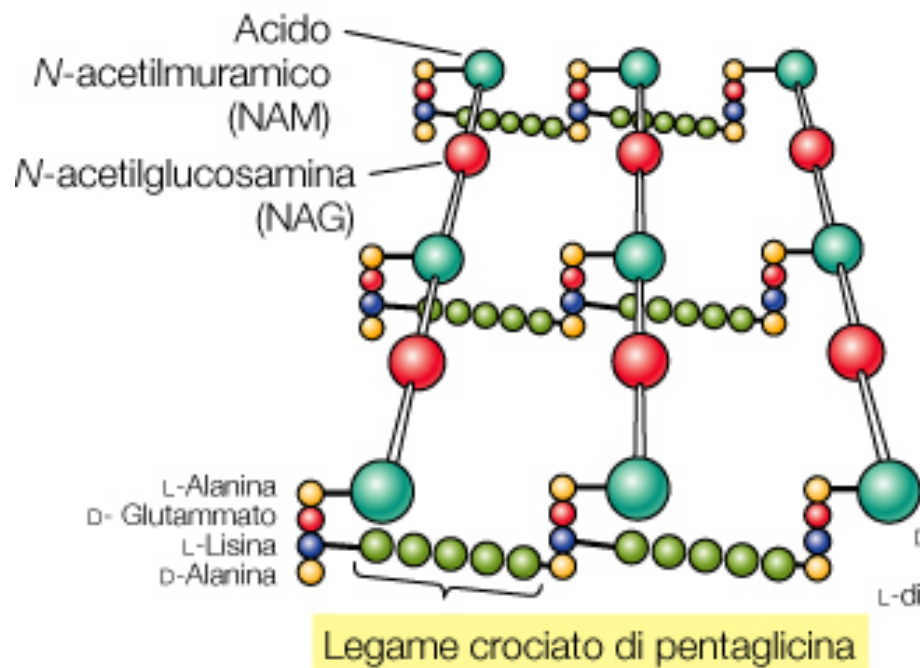
Proteobatteri( suddivisi in  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ ) sono finora il gruppo più rappresentato

Env sono batteri non coltivabili identificati solo per sequenza





(A) Peptidoglicano dei gram-positivi



(B) Peptidoglicano dei gram-negativi

