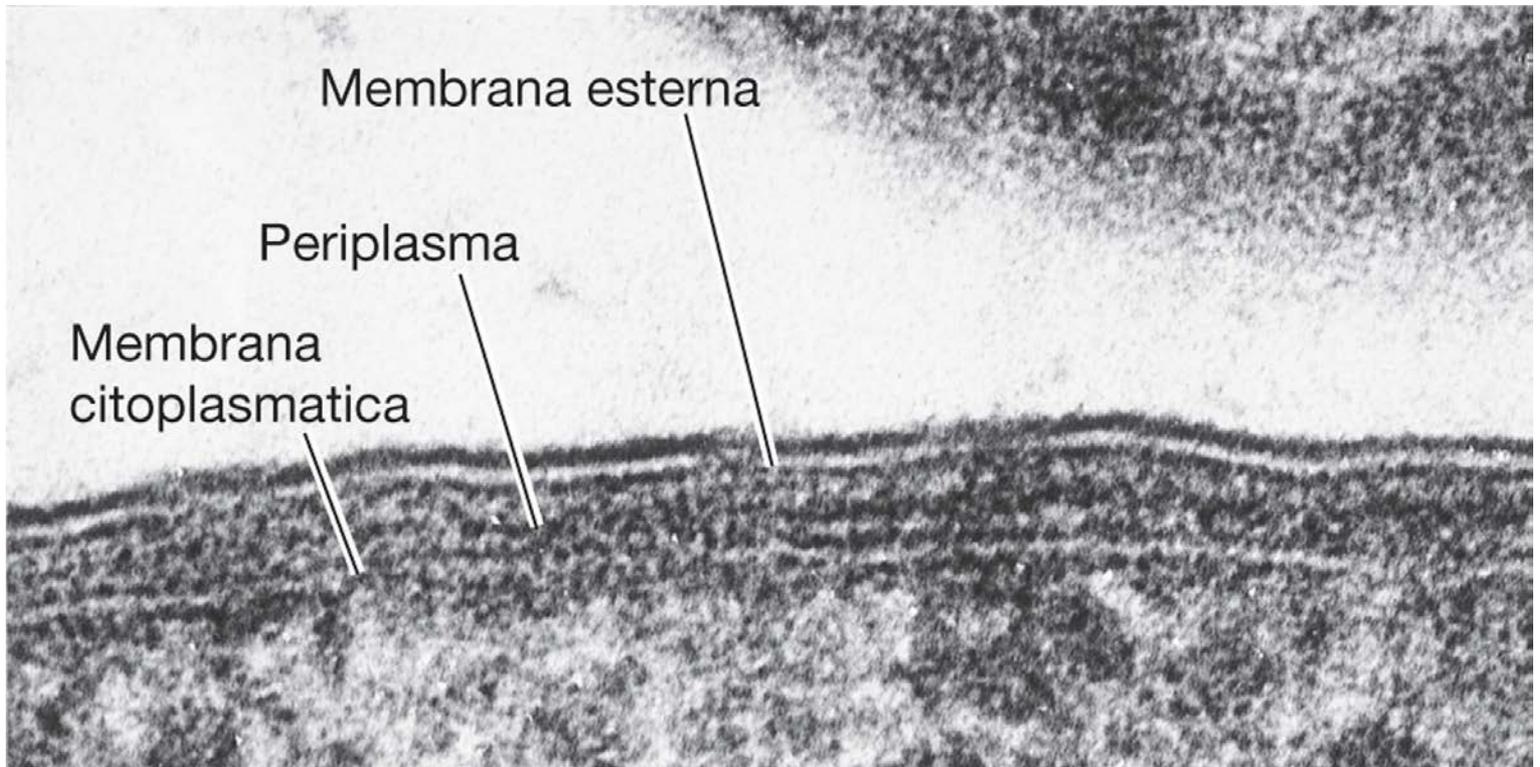
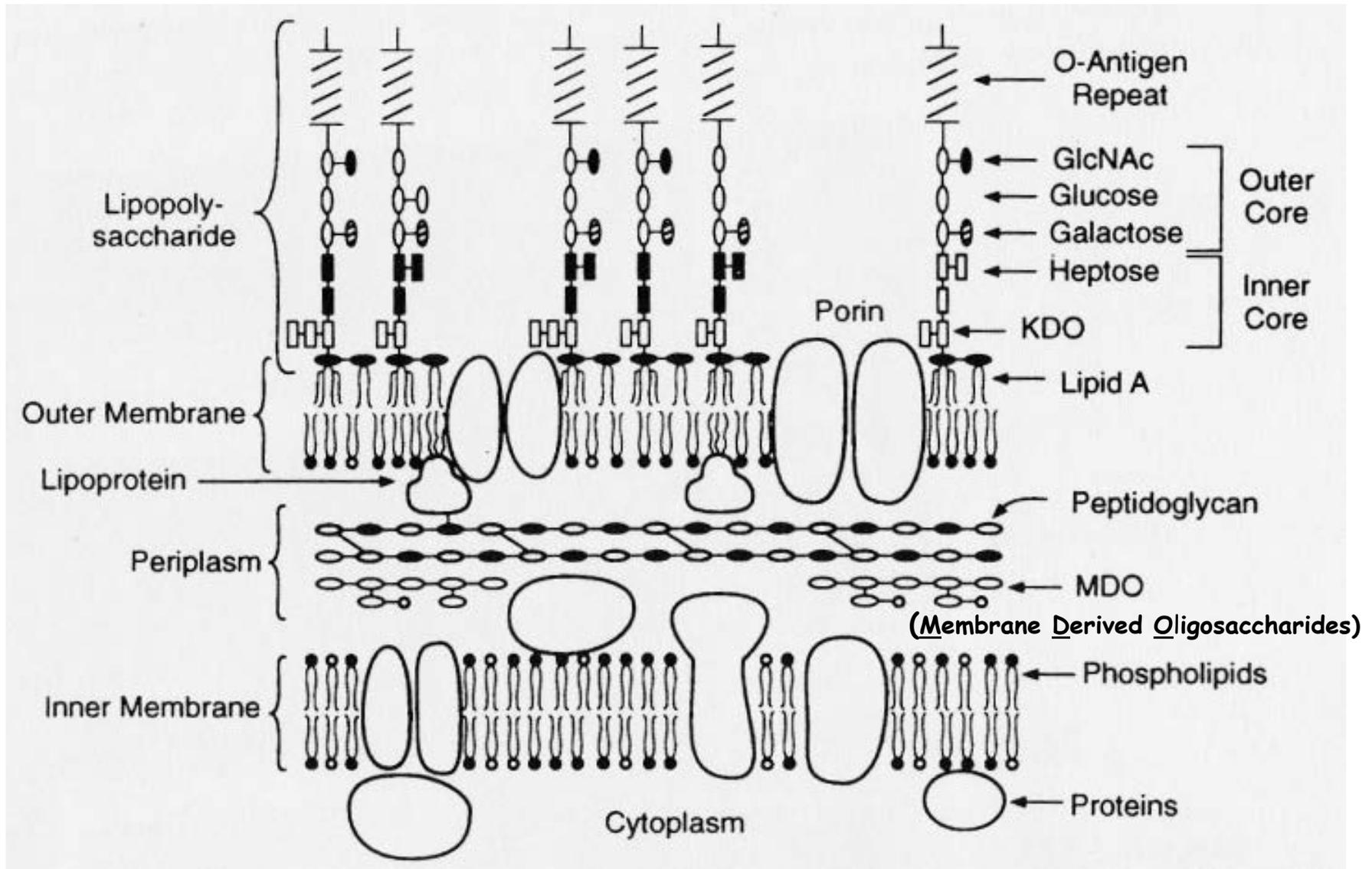


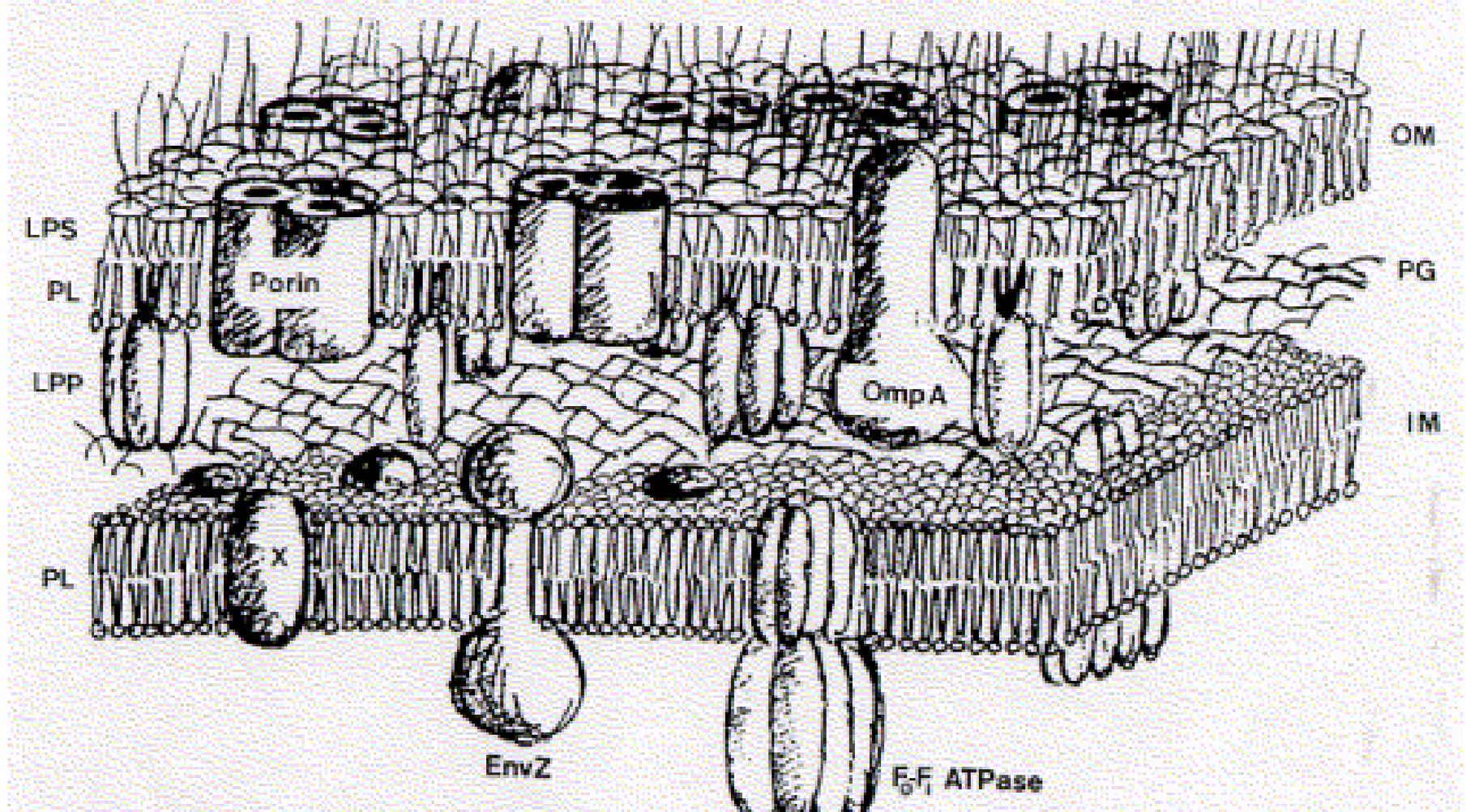
*La parete cellulare di un batterio Gram negativo :  
E.coli*



# Membrana interna e membrana esterna a confronto



# I costituenti fondamentali della membrana esterna



# Membrana Esterna (OM Outer membrane)

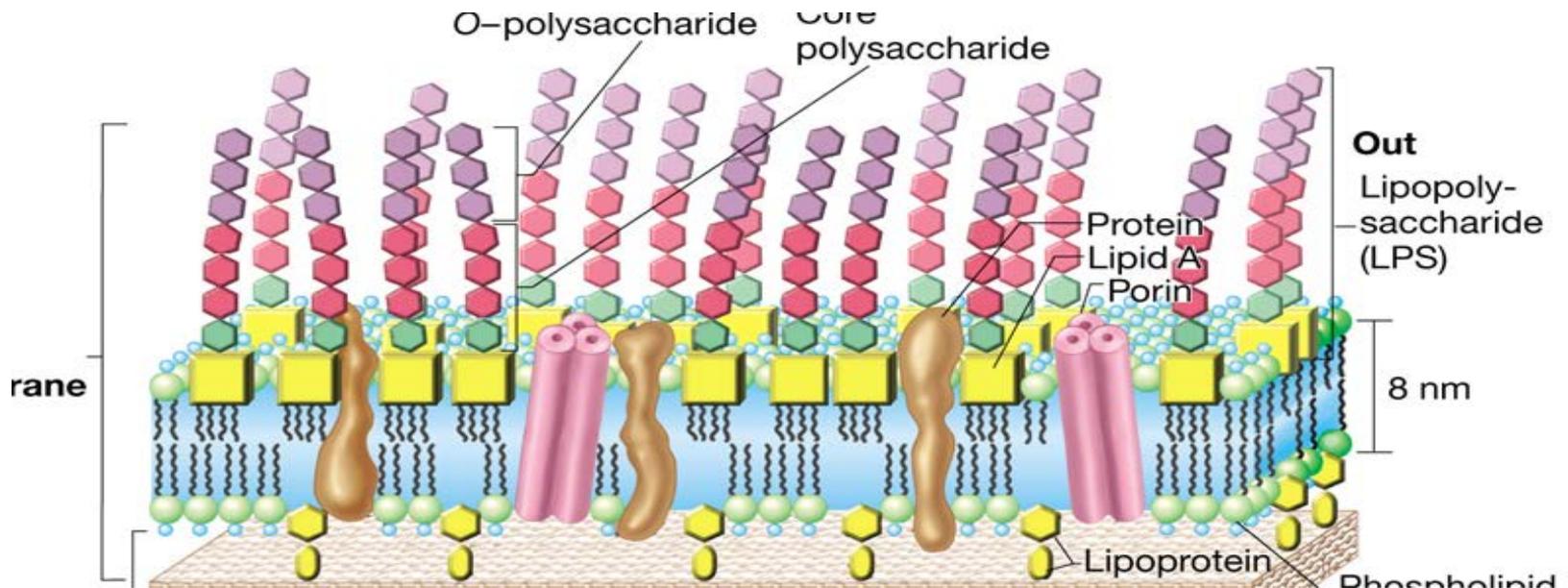
Doppio strato lipidico costituito da :

Fosfolipidi

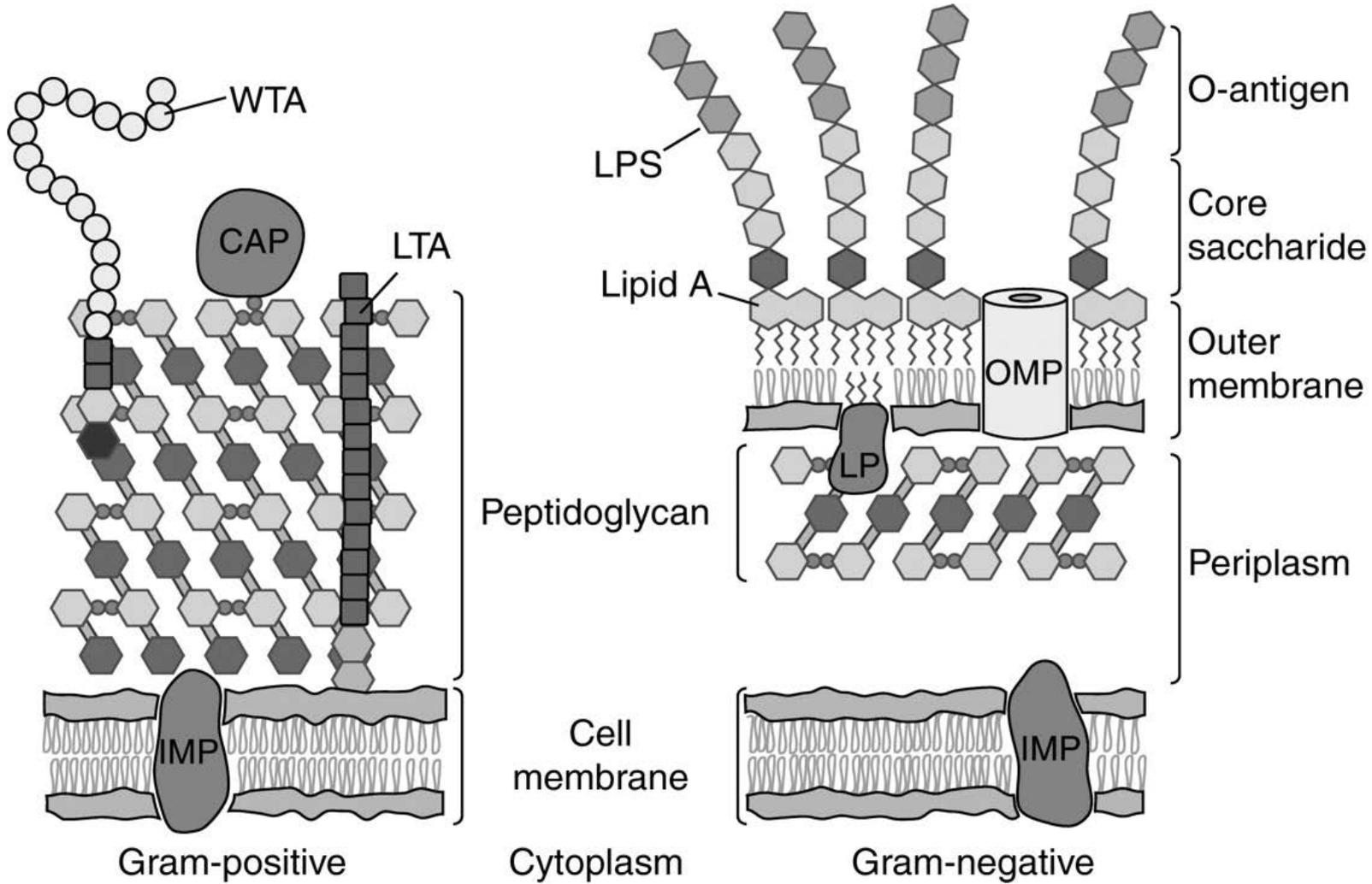
Proteine

Polisaccaridi

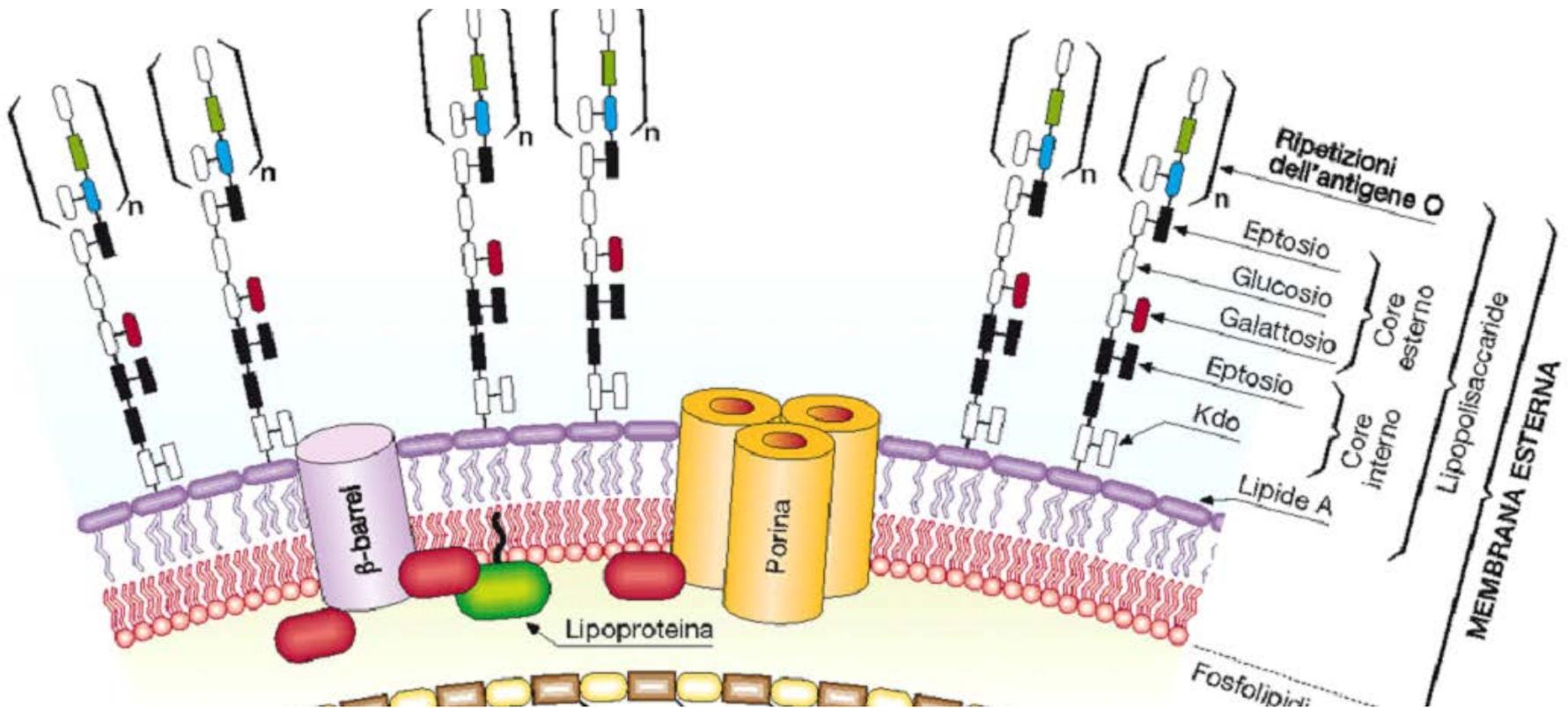
Lipidi e polisaccaridi legati tra loro a formare  
**COMPLESSO LIPOPOLISACCARIDICO o LPS**



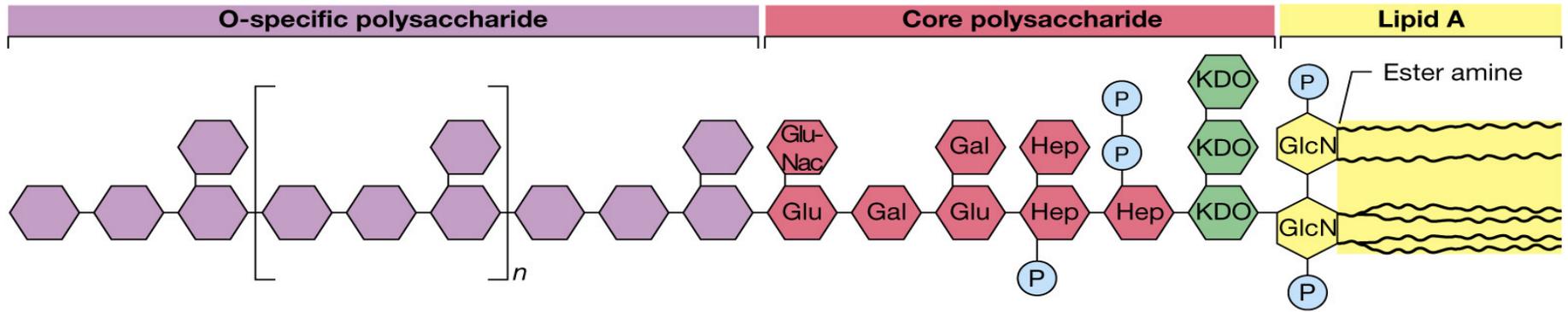
Depiction of Gram-positive and Gram-negative cell envelopes: CAP = covalently attached protein; IMP, integral membrane protein; LP, lipoprotein; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; OMP, outer membrane protein; WTA, wall teichoic acid.



La membrana esterna dei Gram - è **ASIMMETRICA**  
in quanto costituita :  
da **FOSFOLIPIDI** nel foglietto interno  
da **LIPOPOLISACCARIDE** nel foglietto esterno.



# LIPOPOLISSACCARIDE o LPS è una struttura anfipatica



costituita da

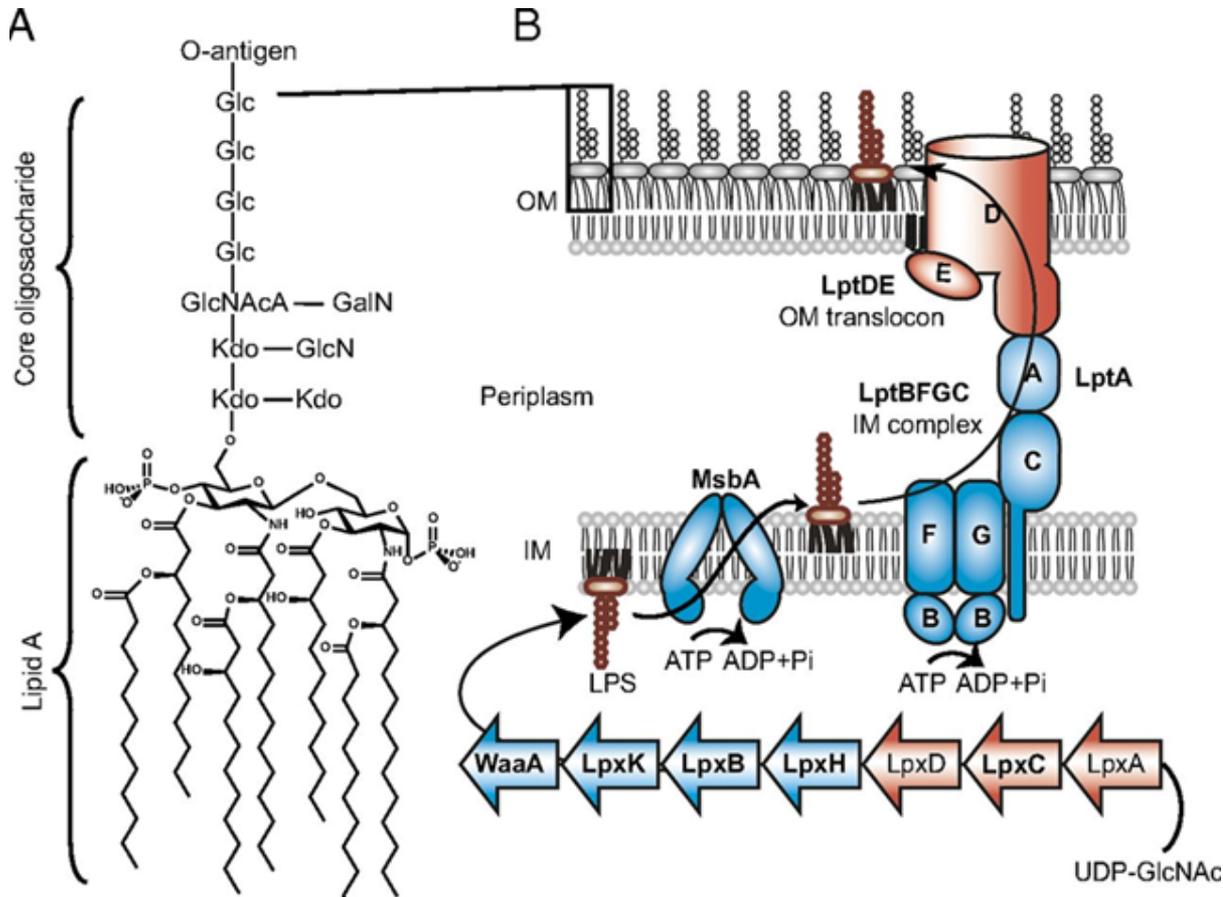
- una **porzione lipidica** caratterizzata da un fosfolipide speciale particolare il **LIPIDE A**

Lipide A non è costituito dai glicerolipidi ma da acidi grassi legati ad un disaccaride costituito da N-acetilglucosamina-fosfato

- una **porzione polisaccaridica**
- polisaccaride interno o core polisaccaridico
- polisaccaride esterno o polisaccaride O ( antigene O)

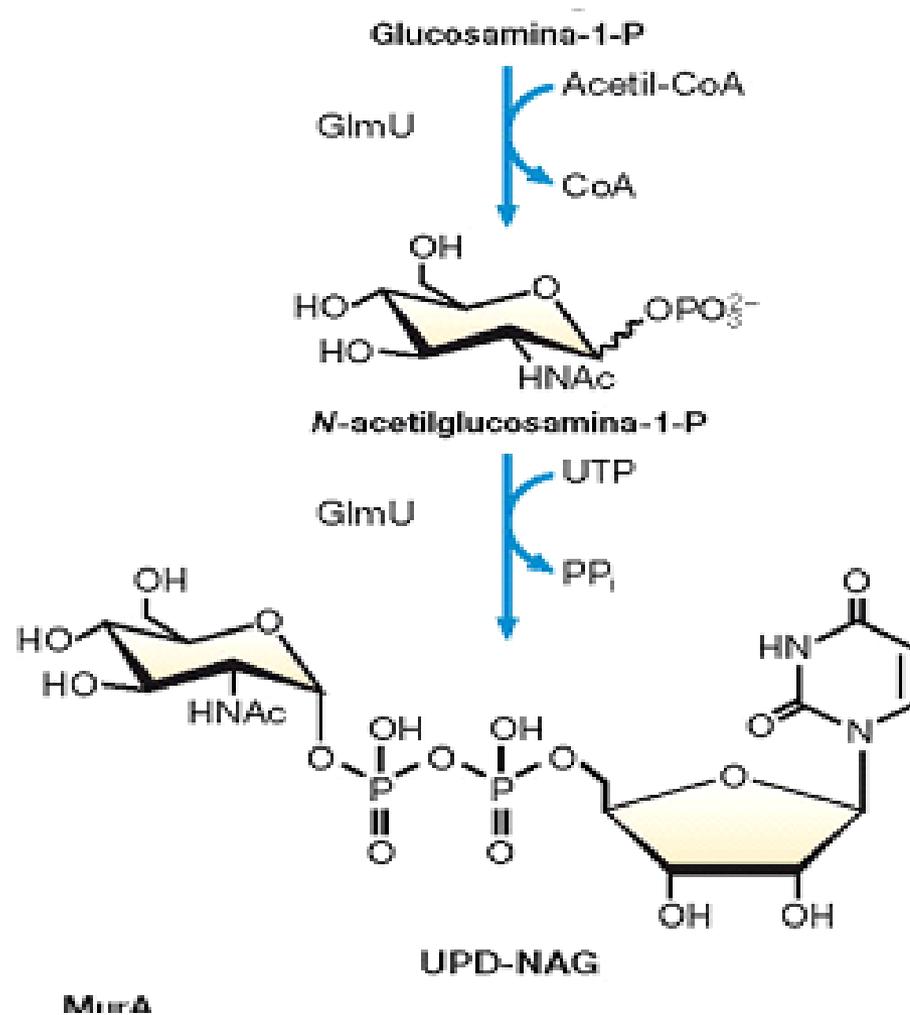
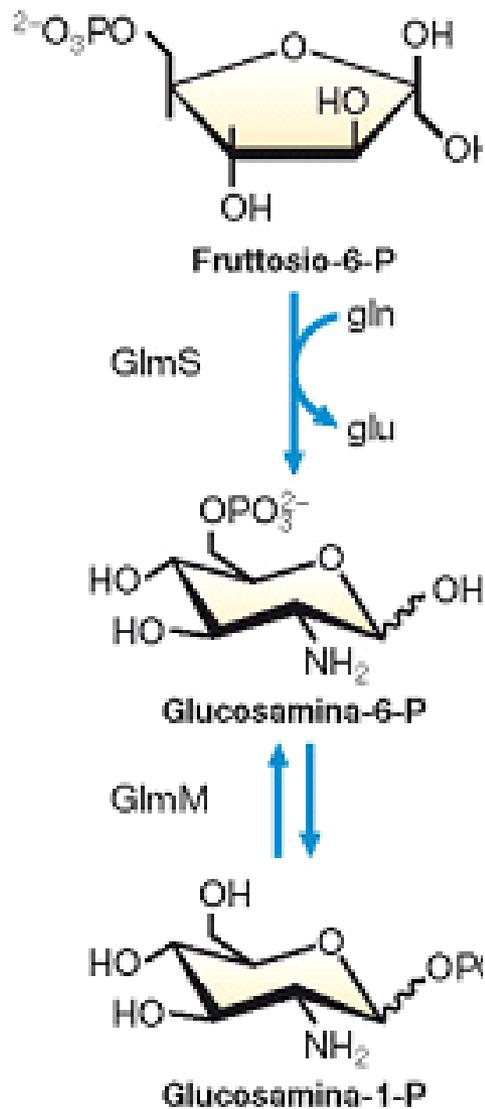
## Lipide A:

- costituito da acidi grassi legati tramite un legame **ESTERE-AMINICO** ad un **DISACCARIDE** costituito da **N-acetil glucosamina fosfato**.
- àncora LPS alla membrana esterna
- svolge un ruolo importante nei processi di difesa dell'ospite in quanto attiva l'immunità innata.



Numerosi geni sono coinvolti nella sintesi del lipide A

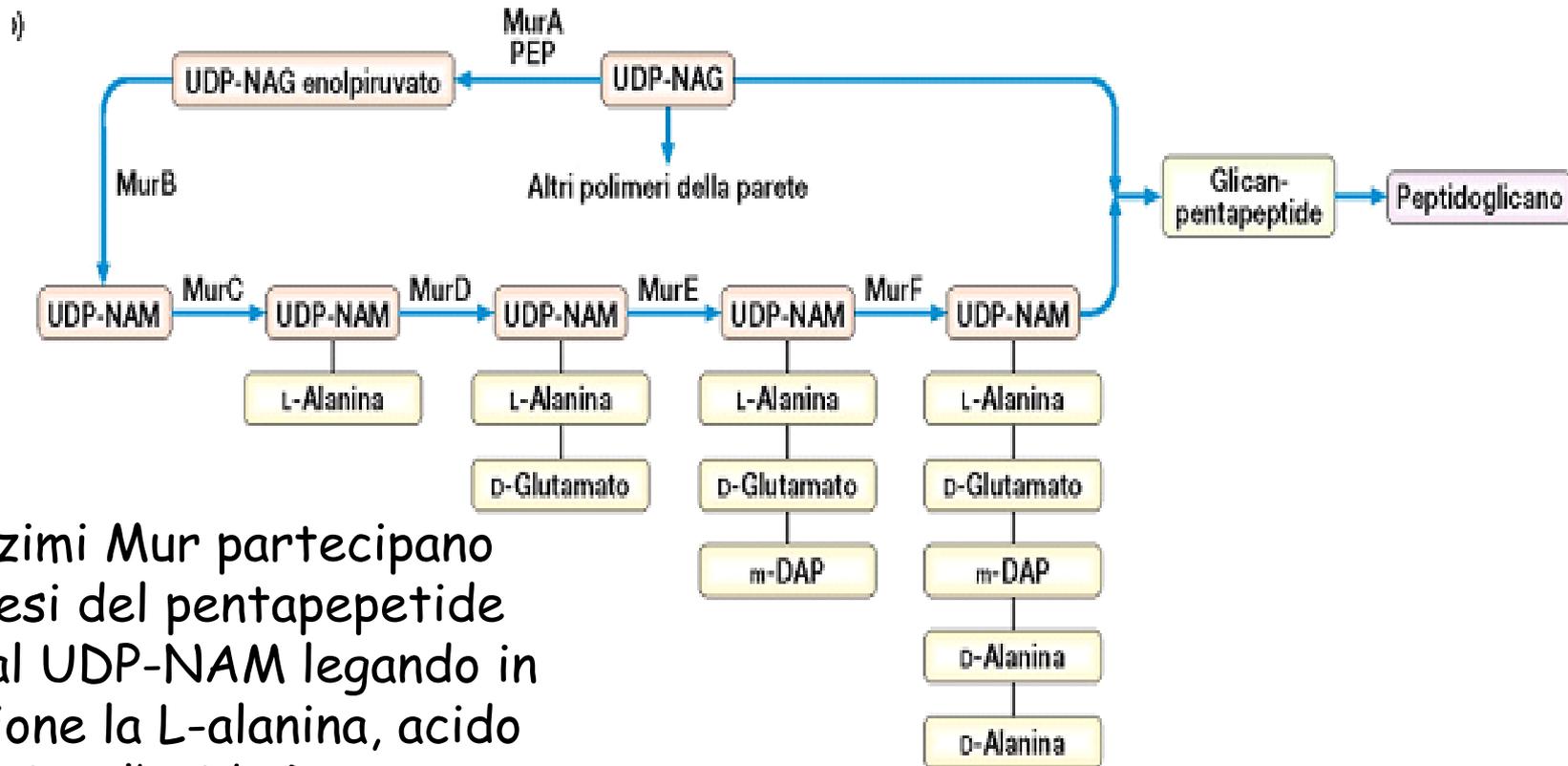
La biosintesi del lipide avviene per acilazione dell'UDP -NAG molecola che abbiamo già visto implicata nella biosintesi del PG



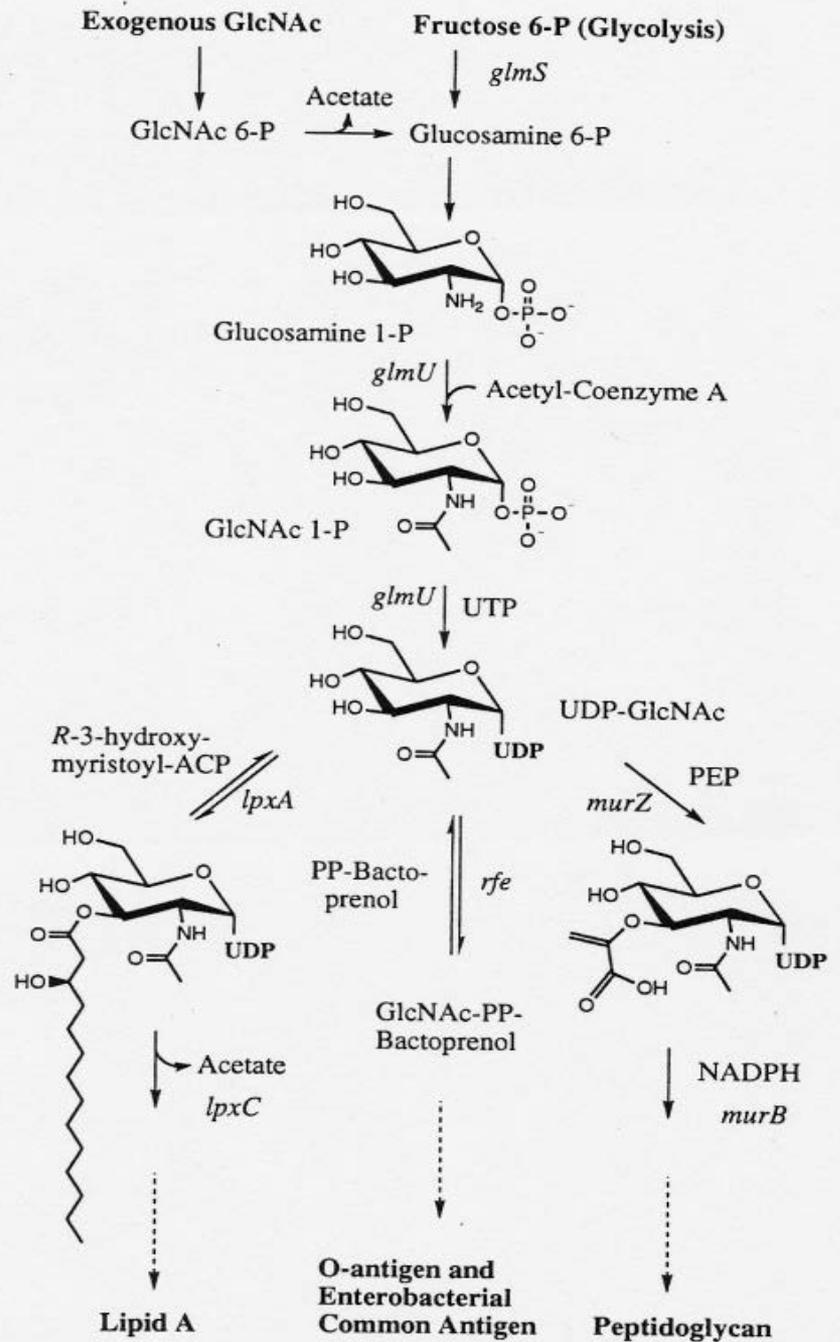
Nel citoplasma la sintesi di UDP- NAG avviene a partire dal fruttosio-6-P e UTP. Gli enzimi GlmS-GlmsU catalizzano la sintesi di UDP-NAG a partire da fruttosio

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.



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.



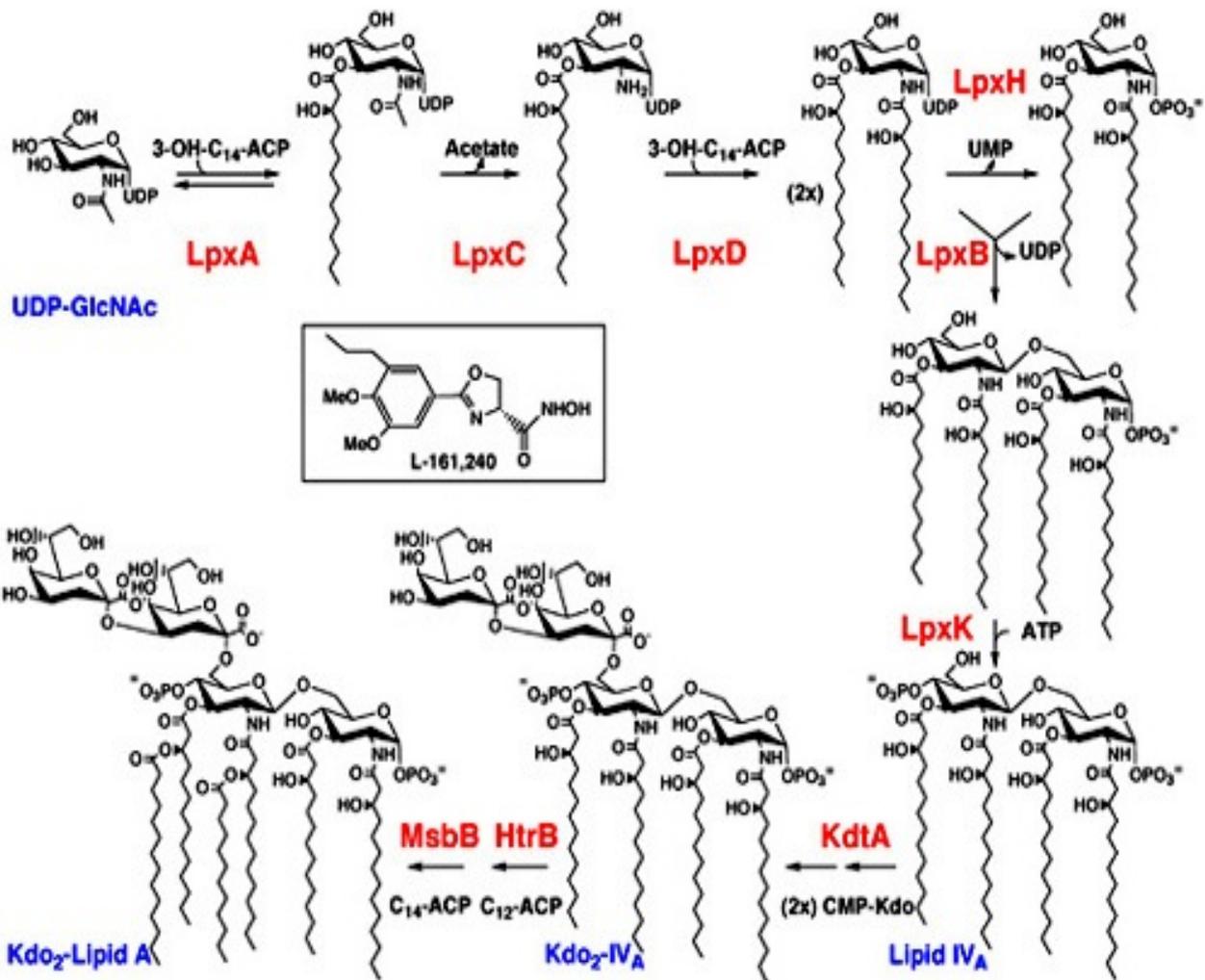
La biosintesi del UDP-NAG (N-acetilglucosamina) svolge un ruolo cruciale nella assemblaggio dei polimeri di superficie.

La formazione del UDP-NAG è catalizzata dall'enzima codificato dal gene *glmU*.

UDP-NAG è importante per la sintesi:

- del lipide A
- del peptidoglicano
- dell'antigene O

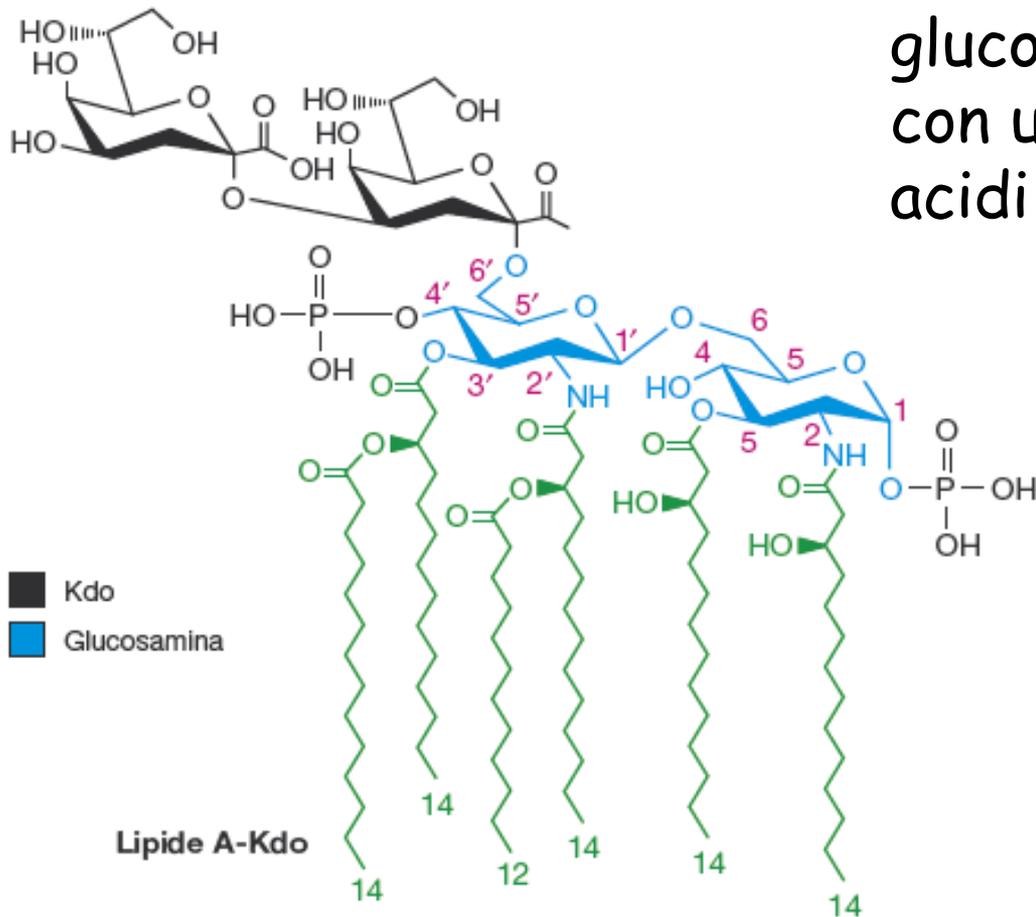
GlcNAc=NAG



La biosintesi del lipide avviene per acilazione dell'UDP - NAG molecola che abbiamo già visto implicata nella struttura del PG

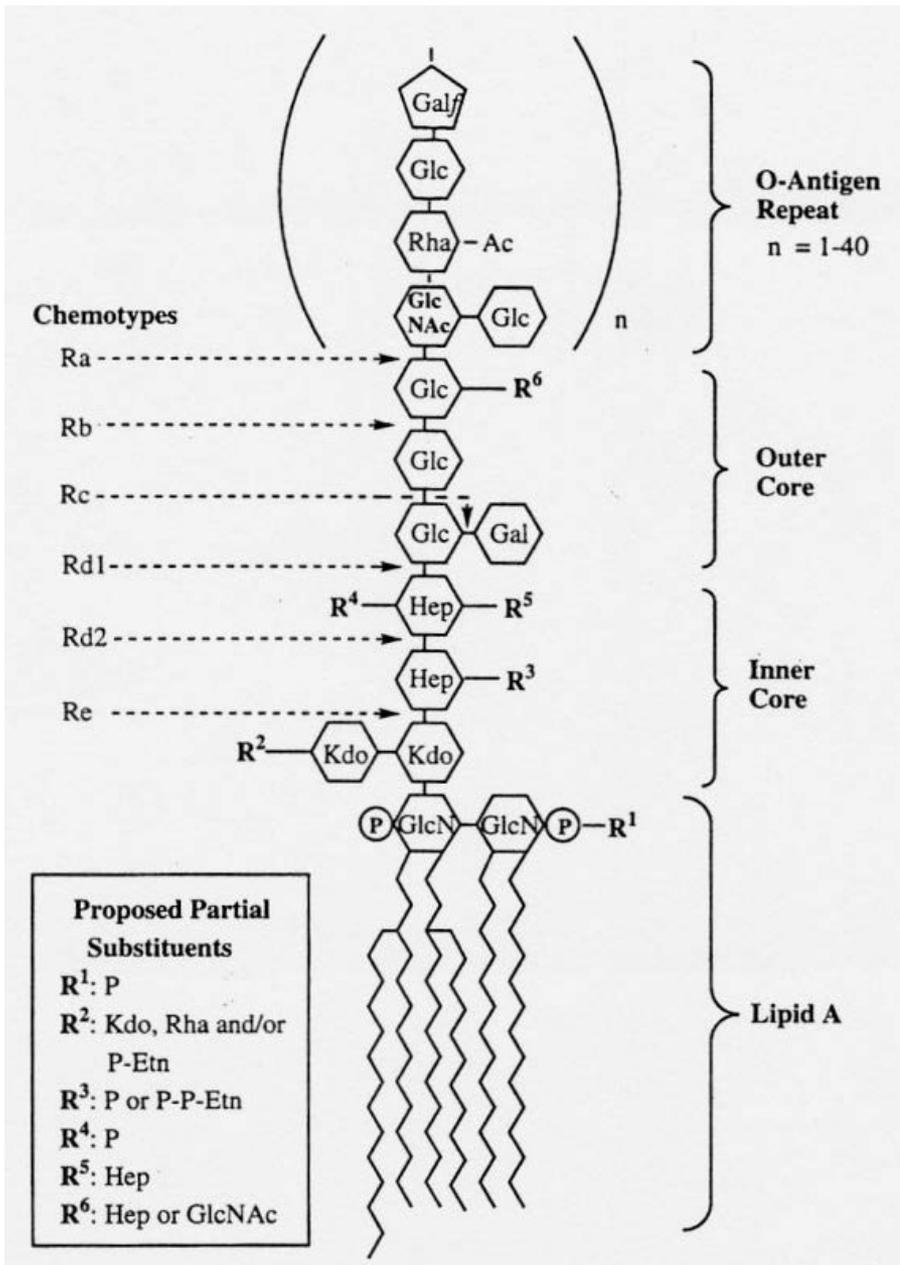
Fig. 4. Structure and biosynthesis of Kdo-lipid A in *E. coli* K-12. Only the Kdo and lipid A portions of LPS are required for cell growth. The red symbols indicate the relevant structural genes. A single enzyme catalyses each reaction (1, 2). In almost all sequenced bacteria, the genes encoding the enzymes of lipid A biosynthesis are present in single copy. LpxA and LpxC are the most highly conserved. The structure in the inset is a potent LpxC inhibitor with antibiotic activity comparable to ampicillin (79).

I due residui di N-acetil glucosamina sono esterificati con un numero variabile di acidi grassi ( da 4 a 7)



Gli **acidi grassi** che si trovano più comunemente nel lipide A comprendono:

acido caproico  
acido laurico  
acido miristico  
acido palmitico  
acido stearico.



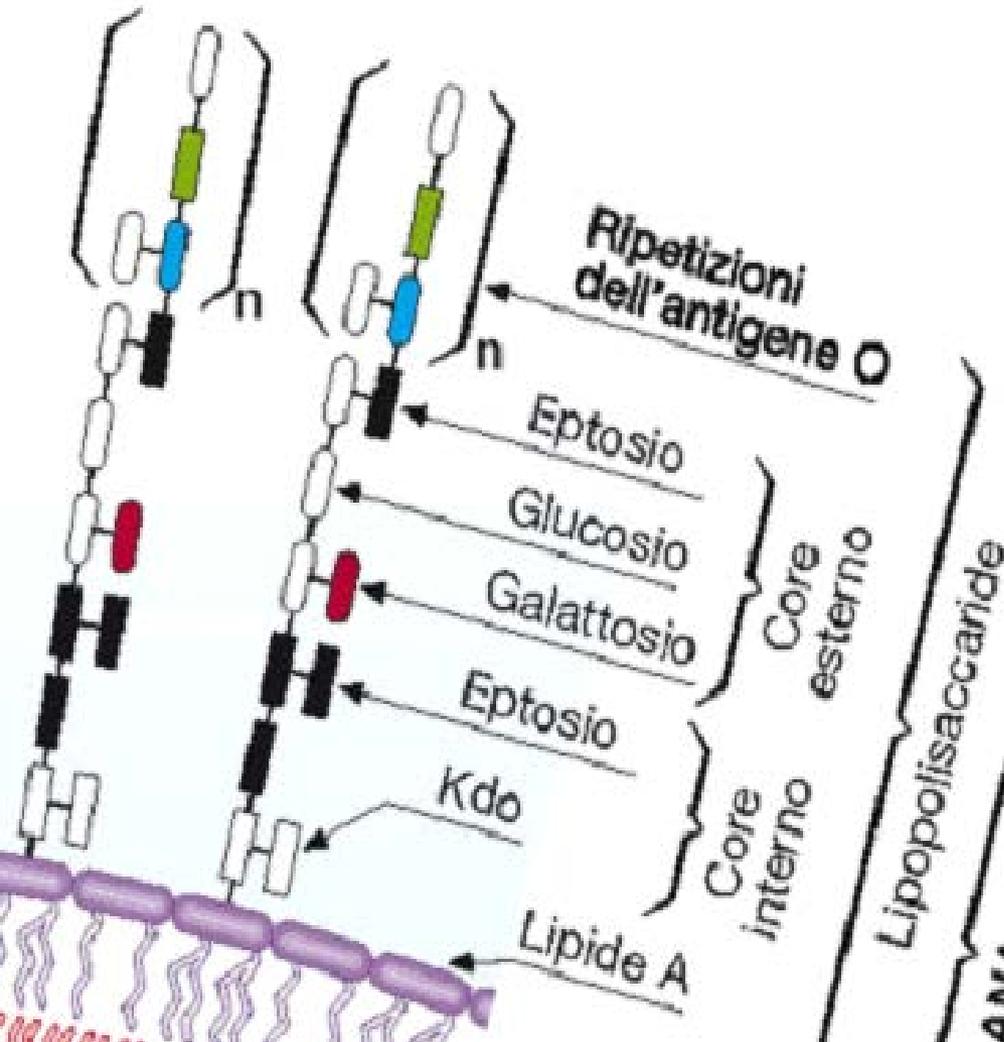
Il disaccaride di N-acetilglucosamina fosfato è attaccato al polisaccaride tramite

\* 2 o 3 residui di cheto-deossi-ottonato (KDO)

Seguono

\* 2-3 residui di Eptosi zuccheri a 7 atomi di C

**Core polissaccaridico può essere suddiviso in**



**Core Interno :**

- conservato nei vari tipi di LPS e costituito da **2-Cheto-3-deossiootonato KDO** (da 1 a 3 molecole) e da **un epitossio** (zucchero 7C)

**Core Esterno :**

- più variabile e contiene zuccheri a 6 o 7 C

La porzioni polisaccaridica consiste di due frazioni:

- il polisaccaride interno o **core polisaccaridico**
- 
- polisaccaride esterno o polisaccaride O.
- Il polisaccaride O ha una composizione molto variabile non solo tra generi diversi ma anche all'interno della stessa specie.
- viene anche definito antigene O in quanto induce la produzione di anticorpi nell'ospite.

## Polisaccaride esterno o polisaccaride O

costituito da **zuccheri a 6 atomi di carbonio**

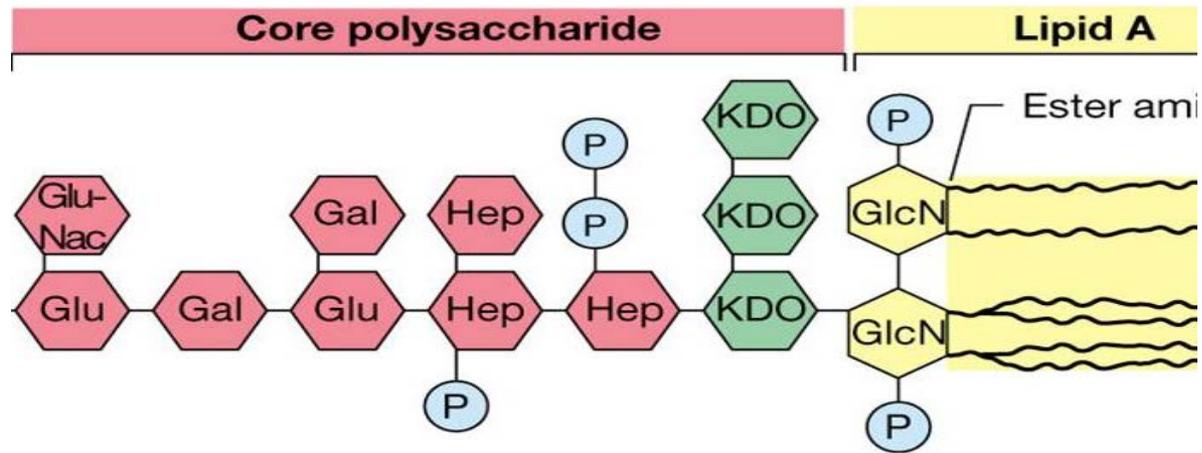
- galattosio,
- glucosio
- ramnosio
- mannosio

e da **dideossizuccheri**

- abequosio
- colitosio
- paratosio

Questi zuccheri sono legati a formare catene di 4-5 monomeri spesso ramificate. La ripetizione delle catene di zuccheri porta alla formazione di un lungo polisaccaride esterno

La superficie della cellula risulta carica negativamente grazie alla presenza di gruppo fosfato sia nel Lipide A (NAG-P) che negli zuccheri del core polissaccaridico. Cationi bivalenti quali  $Mg^{2+}$   $Ca^{2+}$  si possono associare all 'LPS.

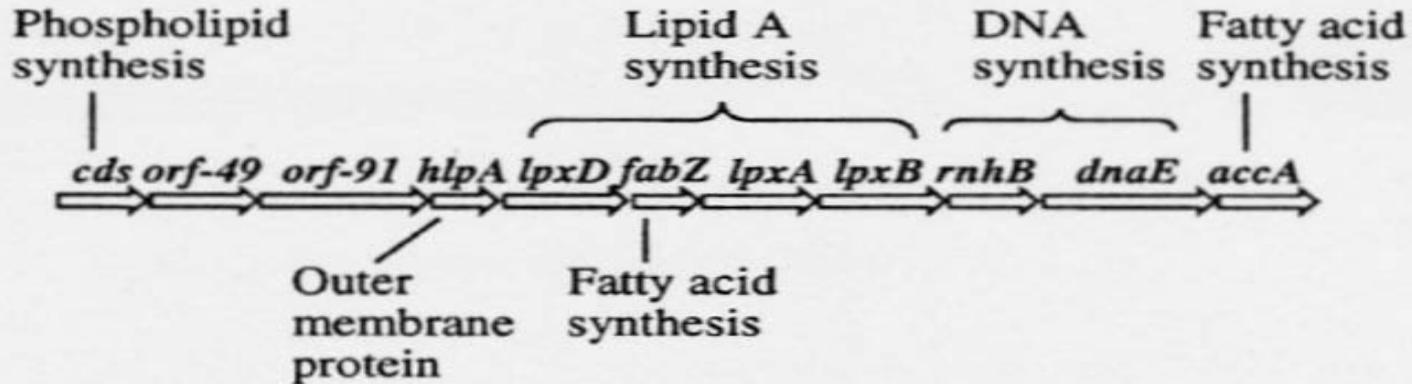


La membrana esterna grazie alla presenza dell'LPS rappresenta una struttura stabile ed un'efficace barriera di permeabilità in grado di impedire l'entrata di numerosi composti nocivi x il batterio (antibiotici, sali biliari).

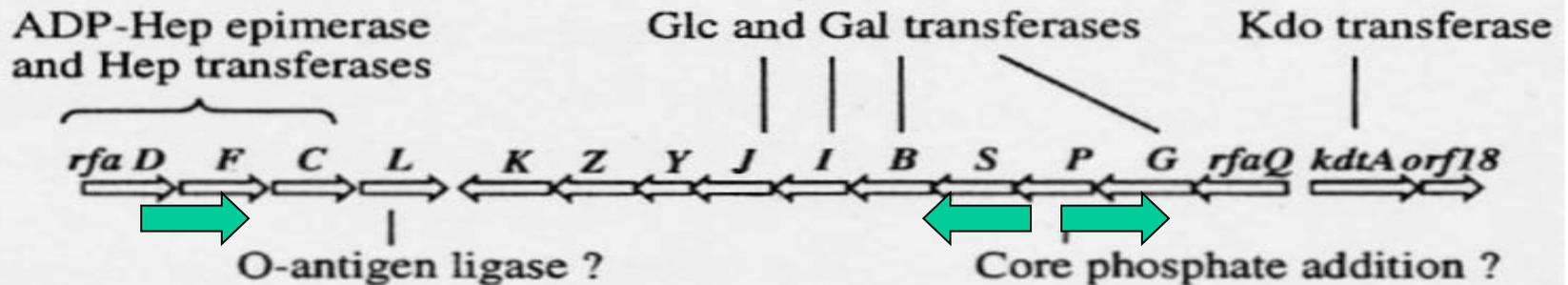


La regione *lpx* contenente i geni coinvolti nelle prime tappe della sintesi del lipide A possiede numerosi promotori

*Lpx/dnaE* gene cluster of *E. coli* K-12 (~14 kb near min 4)



*RfaD*, *rfaQ* and *kdtA* operons of *E. coli* K-12 (~15 kb near min 81)



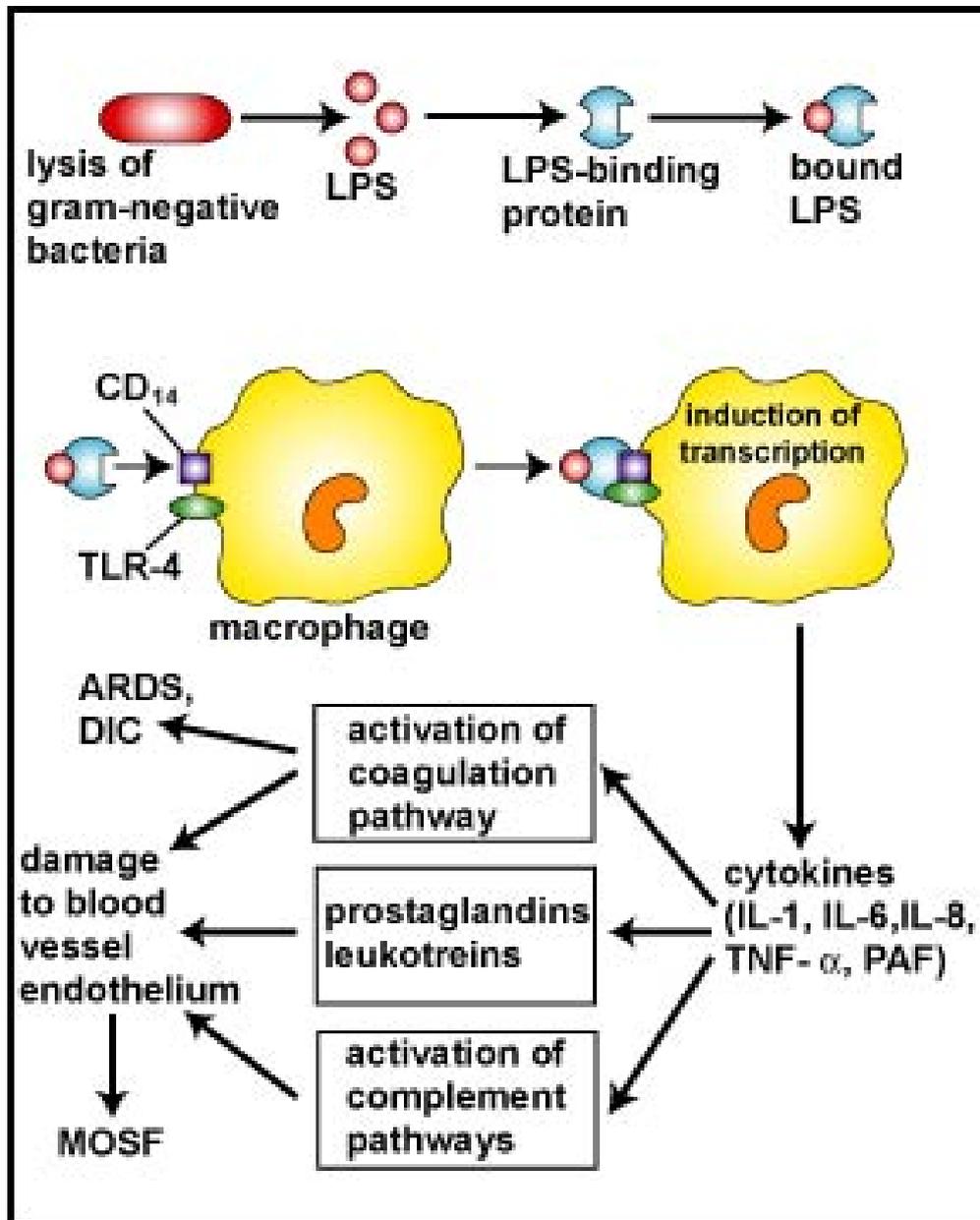
La regione *rfa* contenete i geni coinvolti nell'assemblaggio del core polisaccaridico è organizzata in due operoni convergenti

# LPS è l'endotossina dei batteri Gram-

## Endotossine

sono parte integrante della cellula batterica e vengono rilasciate in abbondanza quando la cellula va incontro a lisi.

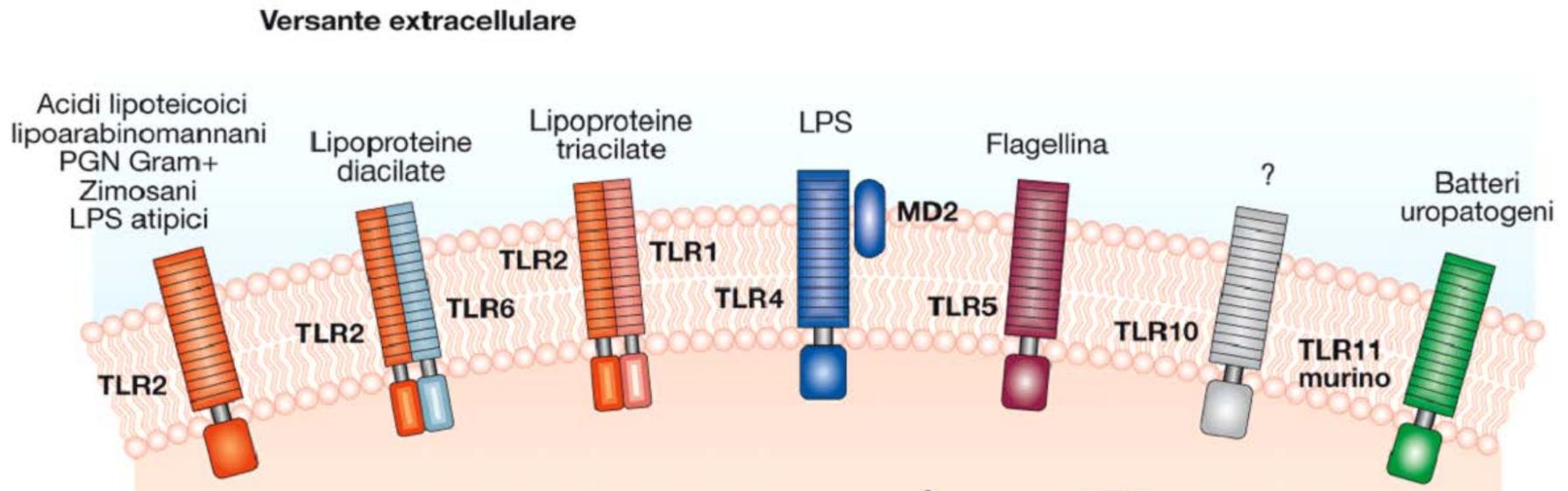
Provocano numerosi effetti fisiologici  
febbre è sintomo generale dovuto alla stimolazione del  
rilascio di particolari proteine definite PIROGENI  
ENDOGENI che colpiscono i centri nervosi deputati al  
controllo dell T corporea  
Inoltre inducono uno stato di infiammazione  
generalizzata che può provocare morte



La presenza di frammenti di LPS viene riconosciuta da specifici recettori presenti sulle cellule del sistema immunitario dell'ospite definiti TOLL like receptor.

La via biochimica per il riconoscimento dell'LPS è complessa e necessita di diverse molecole

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

# Riconoscimento dell'LPS da parte del sistema immunitario dell'ospite

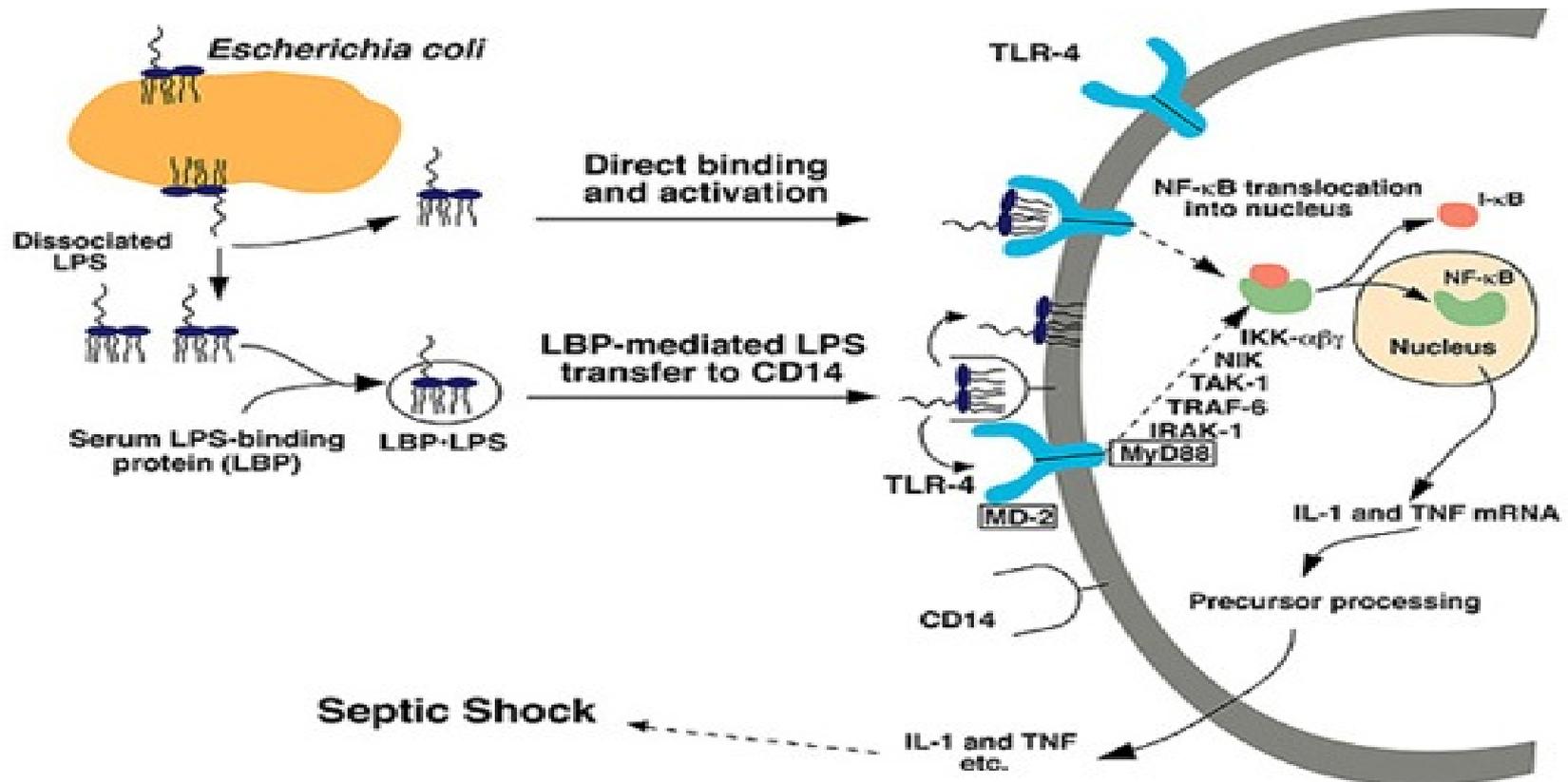
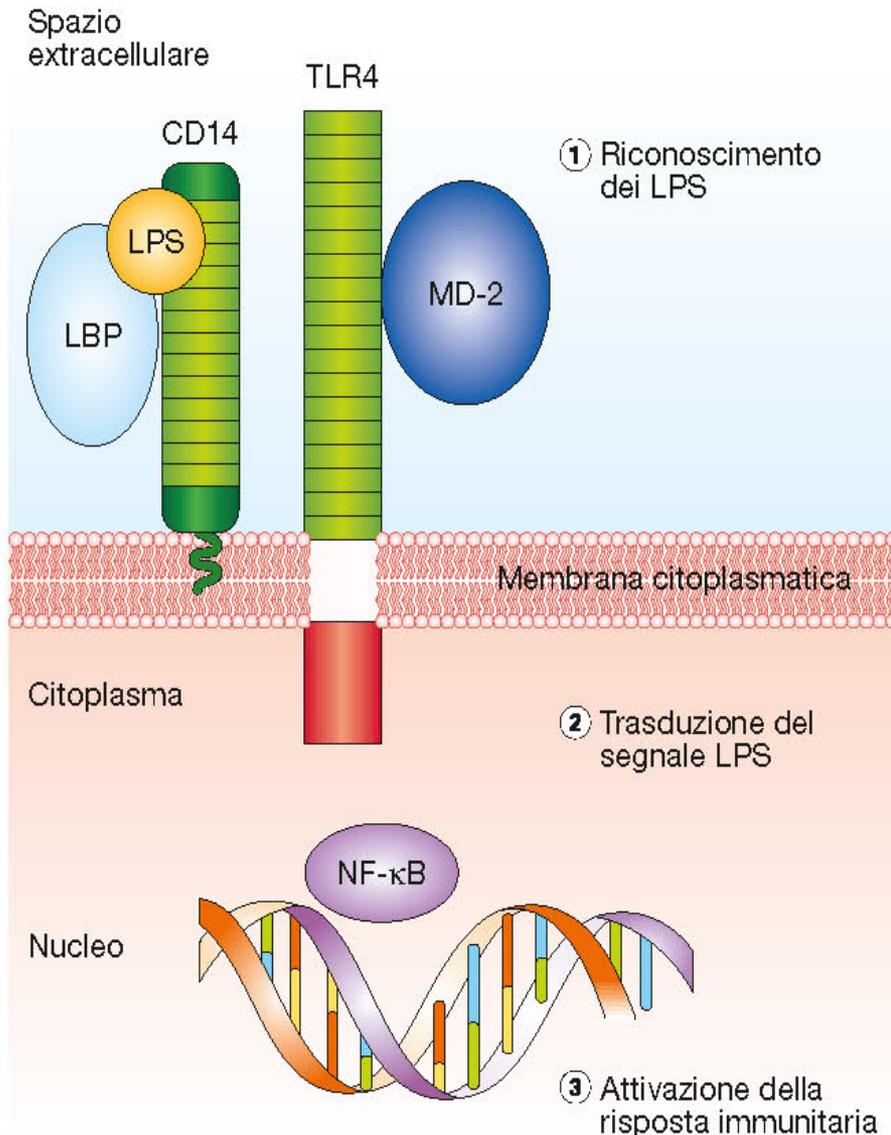


Fig. 3. Detection of lipid A endotoxin by animal cells and function of the signaling receptor TLR-4 in innate immunity. The above paradigm is based mainly upon studies of human, mouse and hamster cells (23-26). The TLR-4 receptor may be oligomerized upon binding of lipid A. As indicated by the upper arrow, cell activation can occur without CD14, but requires several orders of magnitude more lipid A. Overproduction of TNF- $\alpha$  and TLI- $\beta$  during a severe infection can damage small blood vessels, causing fluid leakage and shock. Synthetic lipid A analogues and certain precursors are potent endotoxin antagonists via TLR-4 (22,26,66,67).

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



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

Il legame dell'LPS al TLR4 provoca l'attivazione di una via di segnalazione che attiverà la trascrizione del fattore NF $\kappa$ B 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.

## Saggio del LIMULUS

Per evitare che vi siano contaminazioni di frazioni LPS in prodotti di derivazione batterica quali ANTIBIOTICI messo a punto un saggio molto sensibile utilizzando amebociti del granchio reale *Limulus polyphemus*

Il saggio consiste nel controllare se vi è coagulazione di estratti di amebociti con conseguente precipitazione. Allo spettrofotometro si può controllare la variazione di torbidità.

Saggio molto sensibile permette di verificare la presenza di endotossine nel siero, nel fluido cerebrospinale, nei solventi per le preparazioni farmaceutiche

**Studi di frazionamento del LPS hanno dimostrato che**

- la frazione lipidica è responsabile della tossicità**
- la frazione polisaccaridica rende il complesso idrosolubile ed immunogenico**

**Per ottenere un effetto tossico in vivo sono richieste tutte e due le componenti.**

# LIPOPOLISACCARIDE

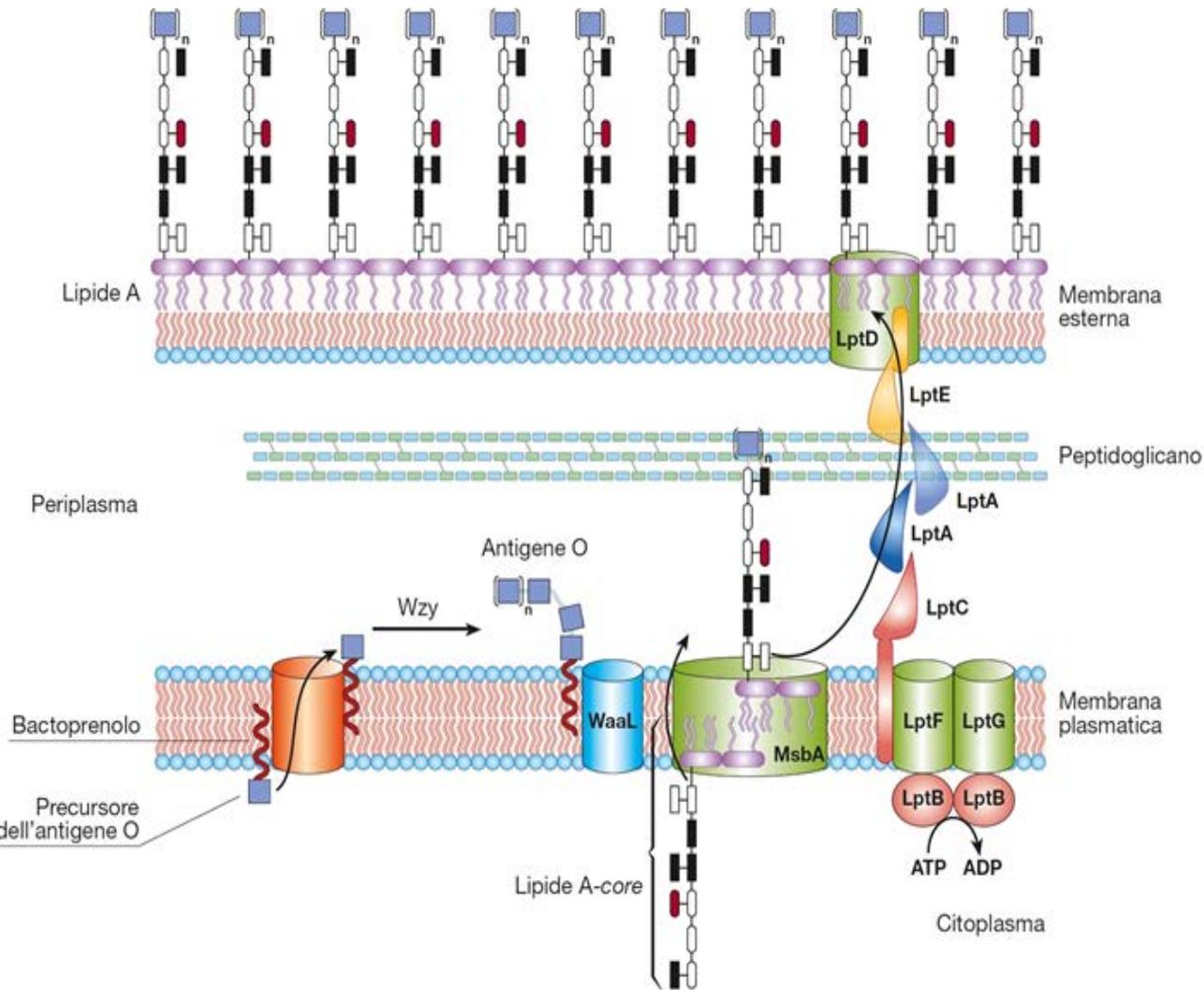
I diversi costituenti del LPS , lipide A, core oligosaccaridico e le eventuali estensioni polissaccaridiche (antigene O ) sono sintetizzate nel citoplasma a contatto con la IM

La traslocazione del lipide A e del core è mediata da MsbA, un trasportatore della IM di tipo ABC

- mutanti *msbA* accumulano LPS nella IM.

MsbA è presente anche nei Gram+ dove svolge un ruolo come trasportatore di antibiotici ( verso l'esterno)

# Biosintesi del LPS



Il trasporto del Lipide A-core avviene attraverso la proteina MsbA

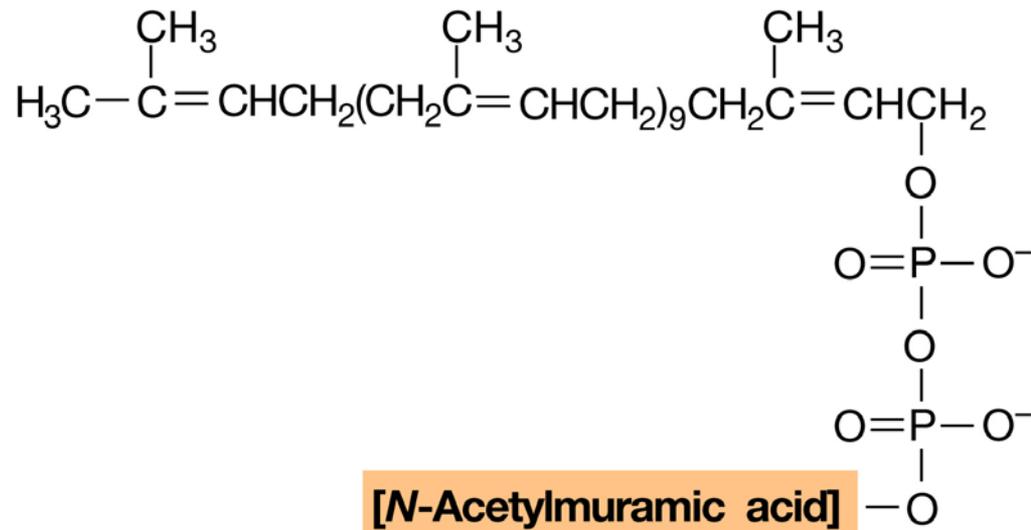
Gli zuccheri che compongono l'antigene O vengono trasportati attraverso la IM dal bactoprenolo

Nel periplasma le subunità di antigene O sono polimerizzate dalla polimerasi Wzy e poi unite al complesso LipideA-core dalla ligasi WaaL

L'antigene O , costituito da zuccheri è fortemente idrofilico e per attraversare la IM richiede come trasportatore il bactoprenolo, un alcol a 55 atomi di C che trasporta anche i componenti del peptidoglicano.

Nello spazio periplasmatico avviene la ligazione al complesso LipideA/core della porzione polisaccaridica che costituisce l'antigene O.

Struttura del bactoprenolo (undecaprenolfosfato), il lipide coinvolto nel trasporto degli elementi costitutivi del peptidoglicano attraverso la membrana cellulare.



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

## Come arriva LPS ormai polimerizzato dal periplasma alla OM?

Un complesso costituito da 7 proteine Lpt media il trasporto.

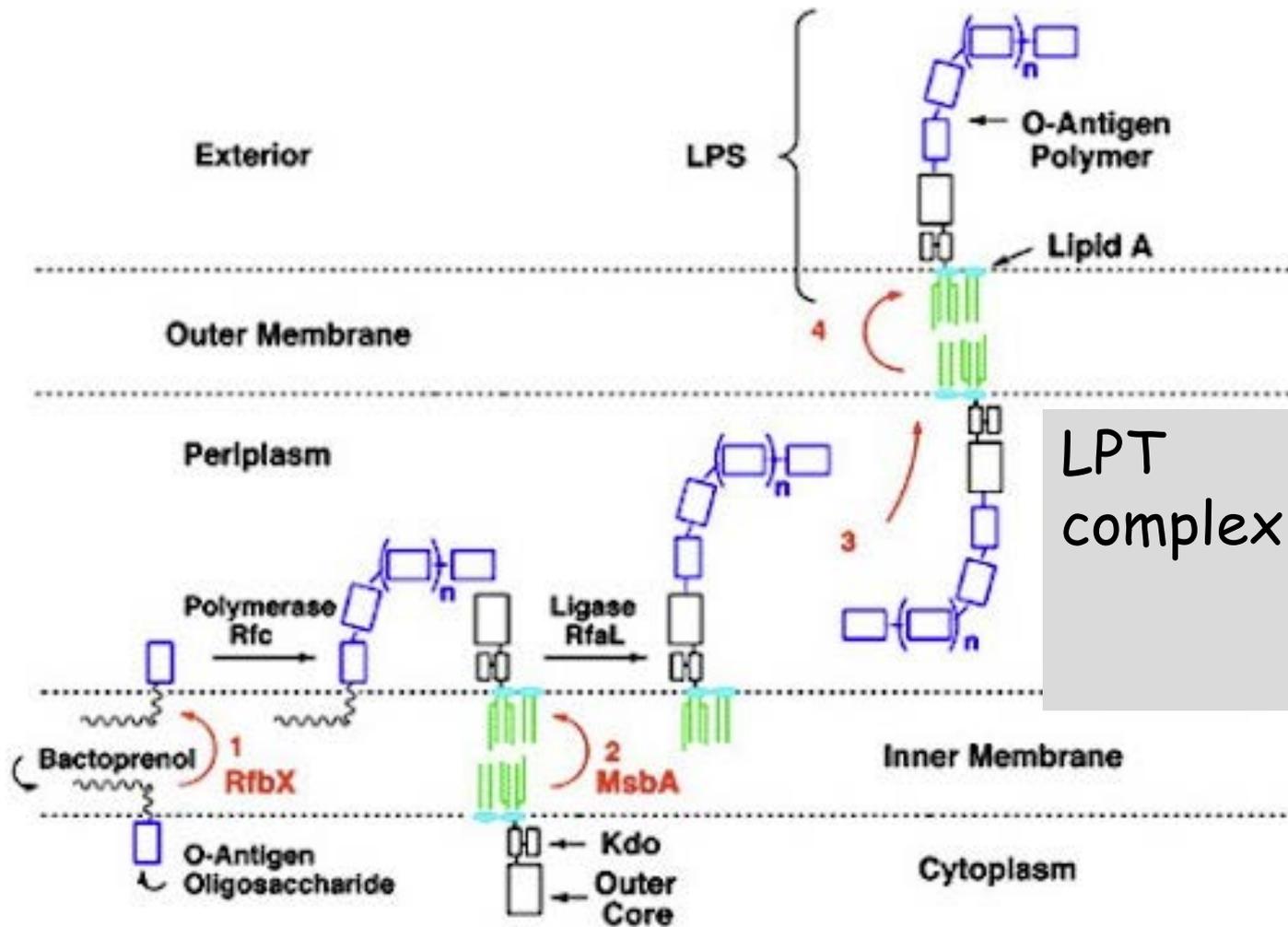
Le proteine Lpt ( LPS transport) sono localizzate sia nella IM che nel periplasma e nella OM.

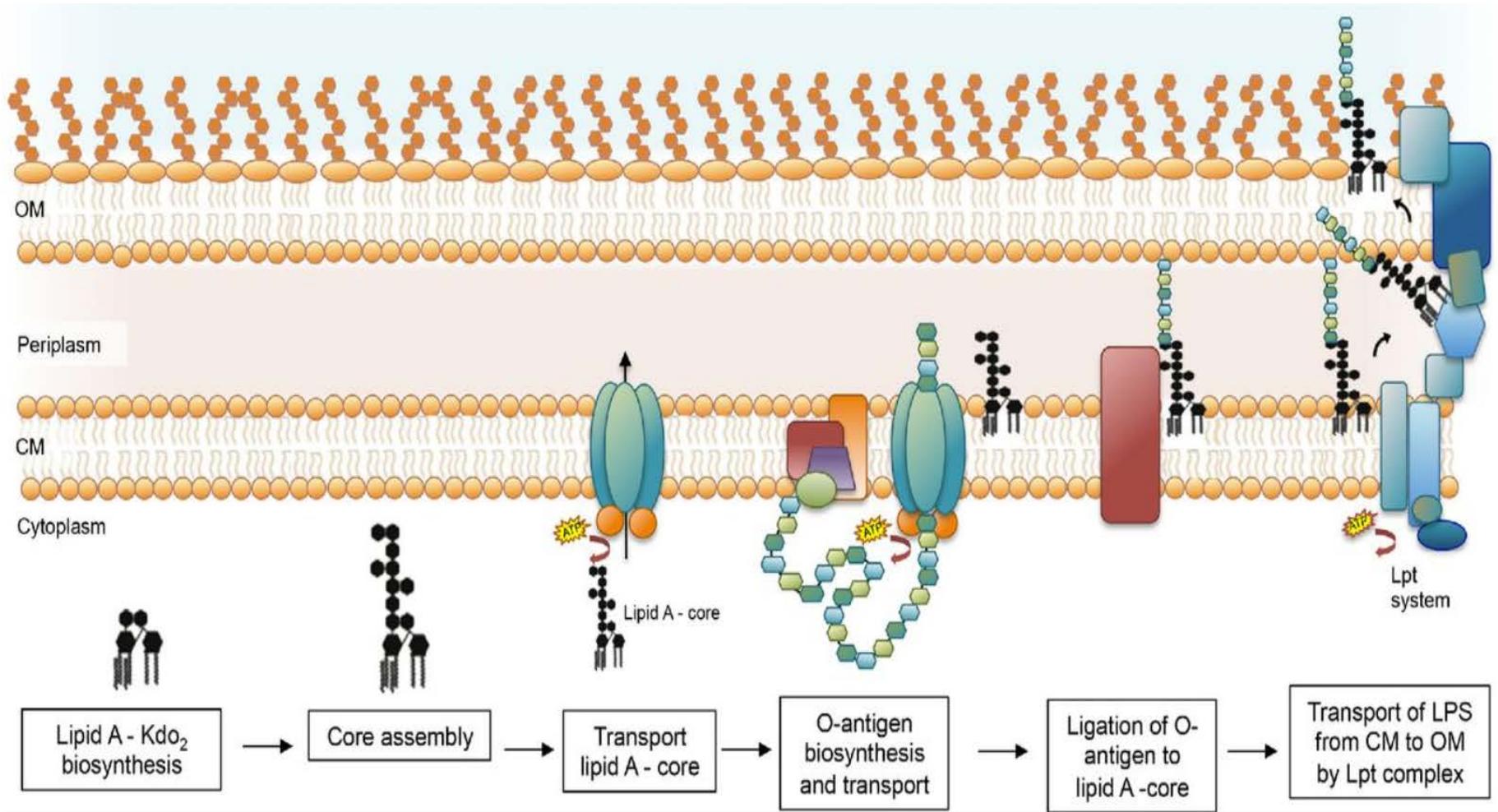
4 proteine sono localizzate nella IM delle quali 1 LptB è grado di idrolizzare ATP per fornire energia al processo

**LptA è il chaperon periplasmatico** che accompagna LPS alla OM.

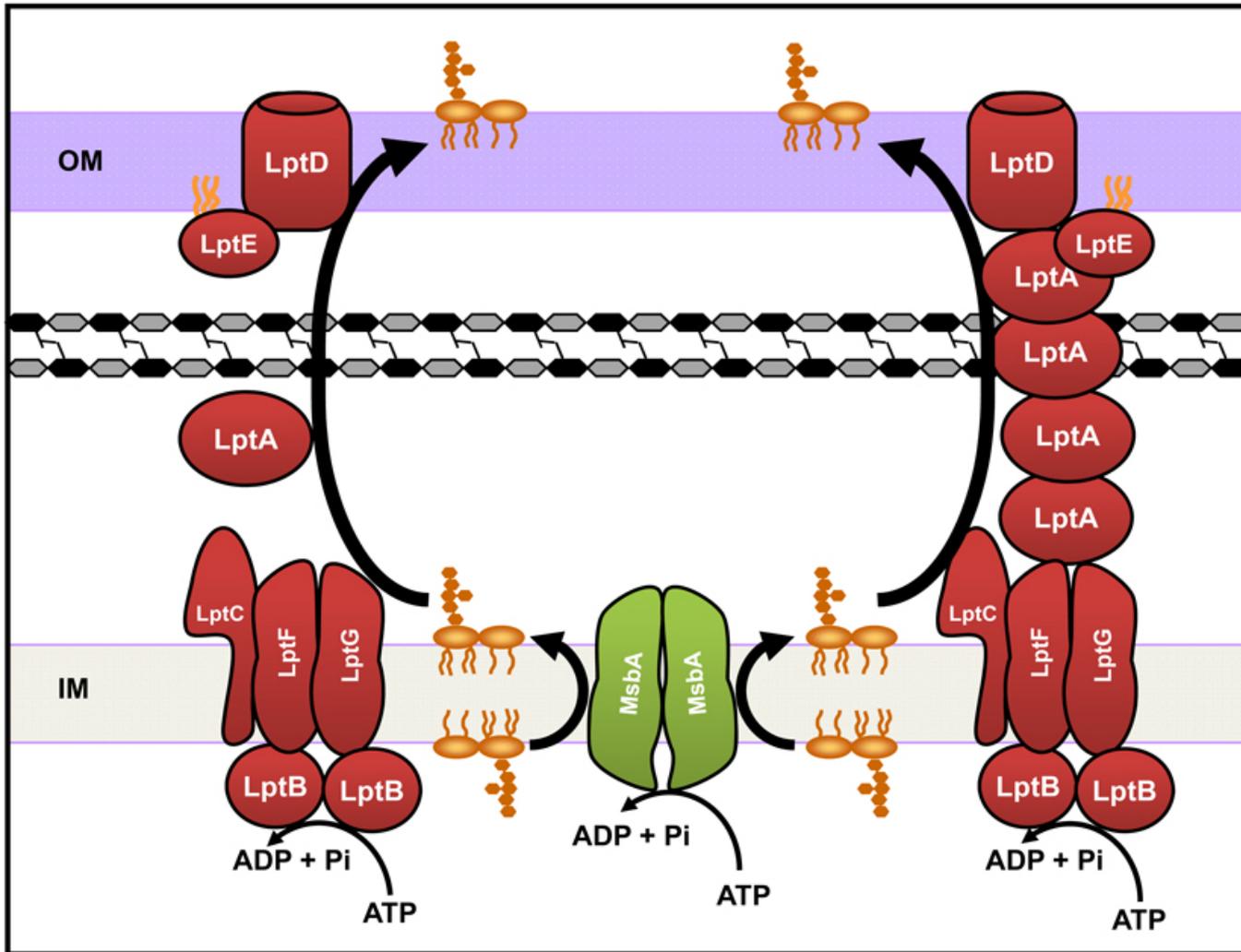
Altre 2 proteine sono localizzate sulla OM e sono necessarie per ultimare il processo di trasporto.

# Il legame del lipidaA/core polissaridico all'antigene O avviene nel periplasma

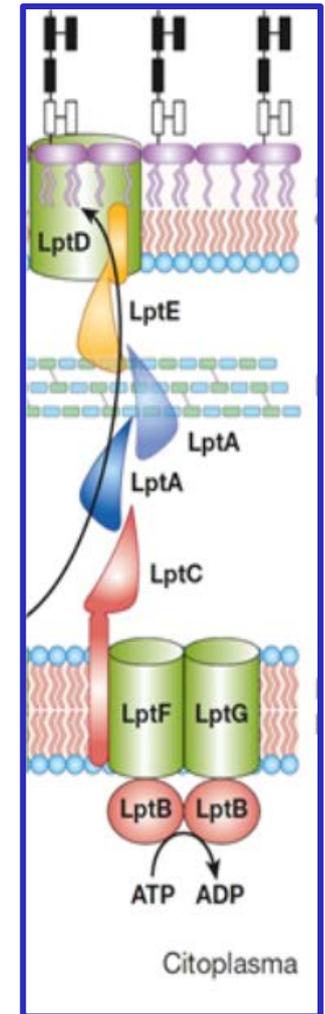




Simplified overview of the LPS biosynthesis. Lipid A-Kdo<sub>2</sub> is synthesized on the cytoplasmic surface of the cytoplasmic membrane. The rest of the core is assembled to the lipid A-Kdo<sub>2</sub> and MsbA flips the whole complex to the periplasmic side of the cytoplasmic membrane. The O antigen is synthesized by cytoplasmic membrane-associated enzyme complexes using C55 Und-P as an acceptor for chain assembly and is then flipped to the periplasmic face of the membrane by one of the three pathways: (1) Wzy dependent, (2) ABC transporter dependent or (3) synthase dependent. For simplicity, only the ABC-transporter pathway is represented. Once on the periplasmic side, the O antigen is linked to the lipid A-core by the WaaL ligase and the mature LPS molecule is then transported across the periplasm and inserted into the outer leaflet of the outer membrane by the Lpt (LPS transport) system, a complex that spans the Gram-negative cell envelope to deliver LPS to the outer membrane (E). OM, outer membrane; CM, cytoplasmic membrane.

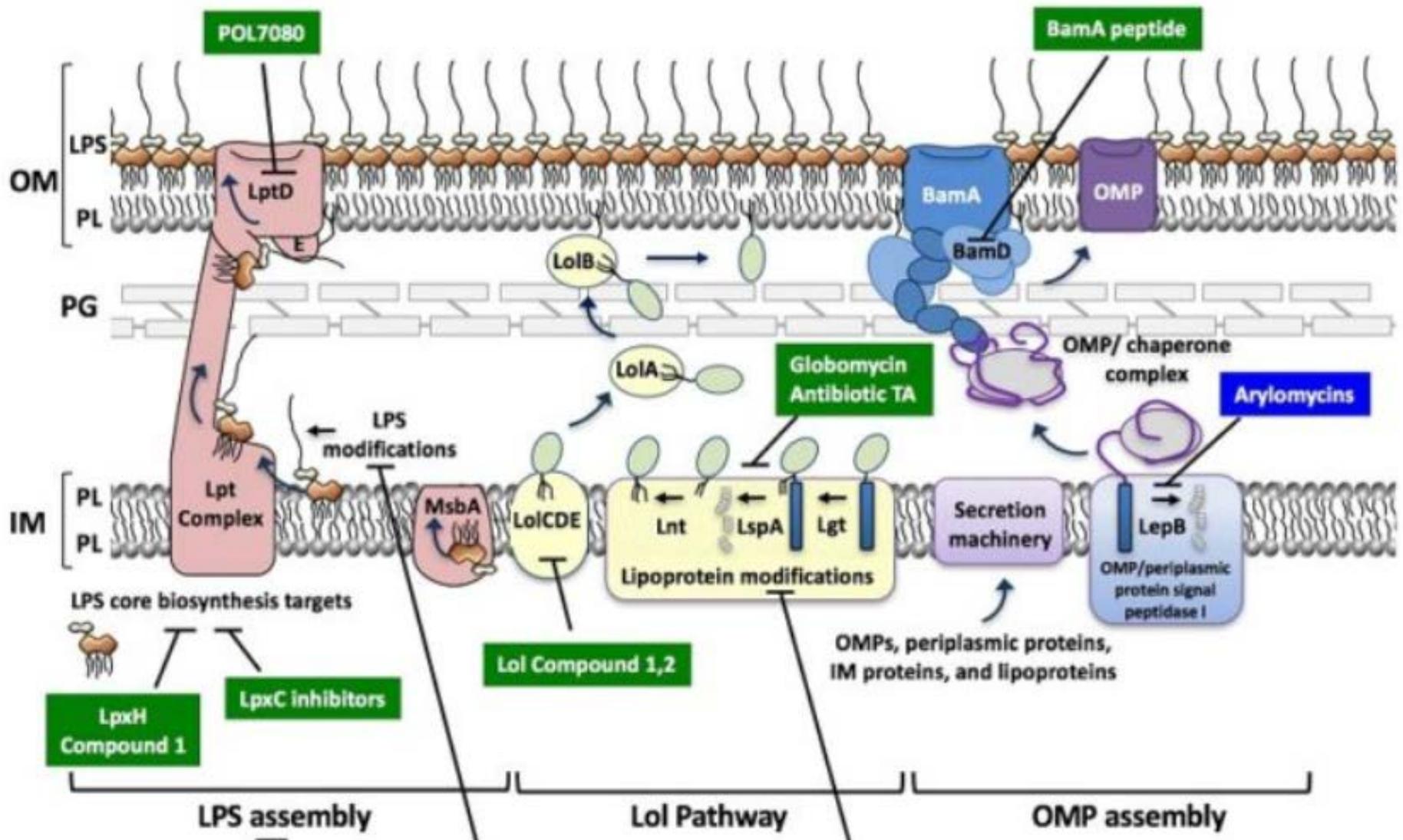


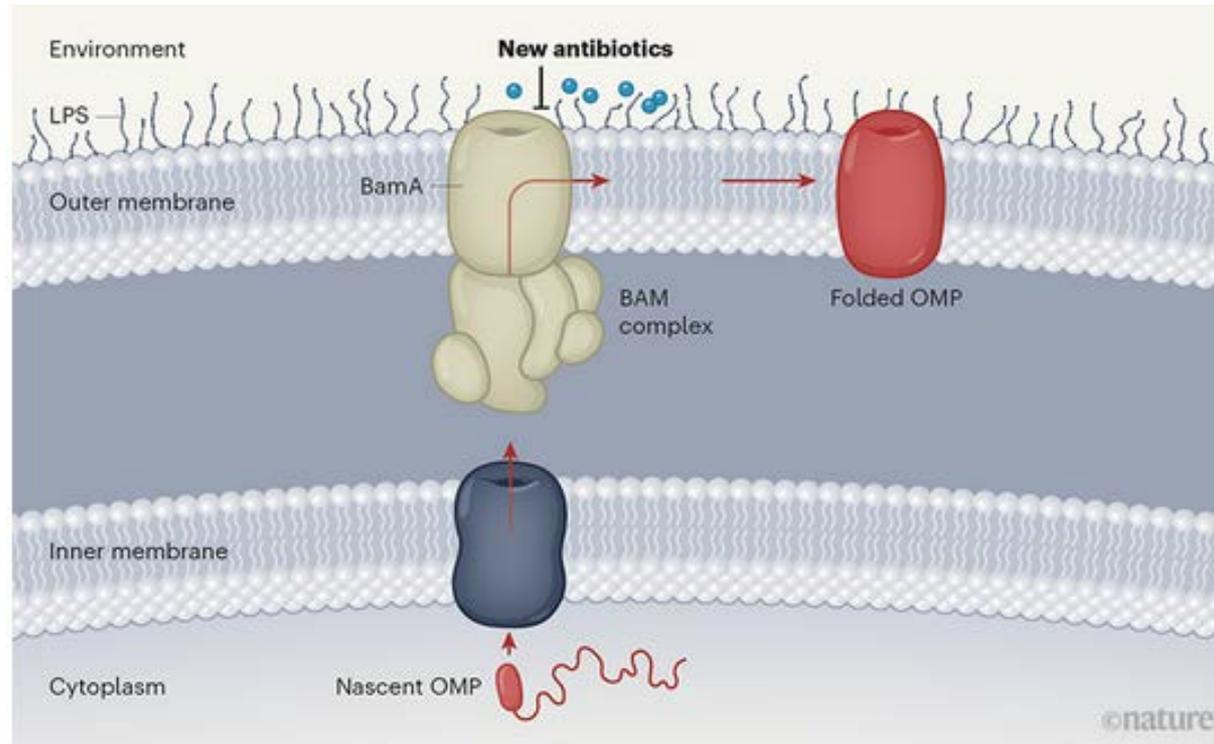
LptA si ritrova nello spazio periplasmatico libera (ipotesi a sinistra) e **non** forma una fibra continua che collega IM a OM come illustrato nell'ipotesi a destra



Modello aggiornato

Nuovi bersagli per gli antibiotici: enzimi coinvolti nel trasporto di LPS , proteine e lipoproteine.





Nuovi antibiotici diretti verso il complesso Bam

# Trasporto di LPS e proteine nella membrana esterna

