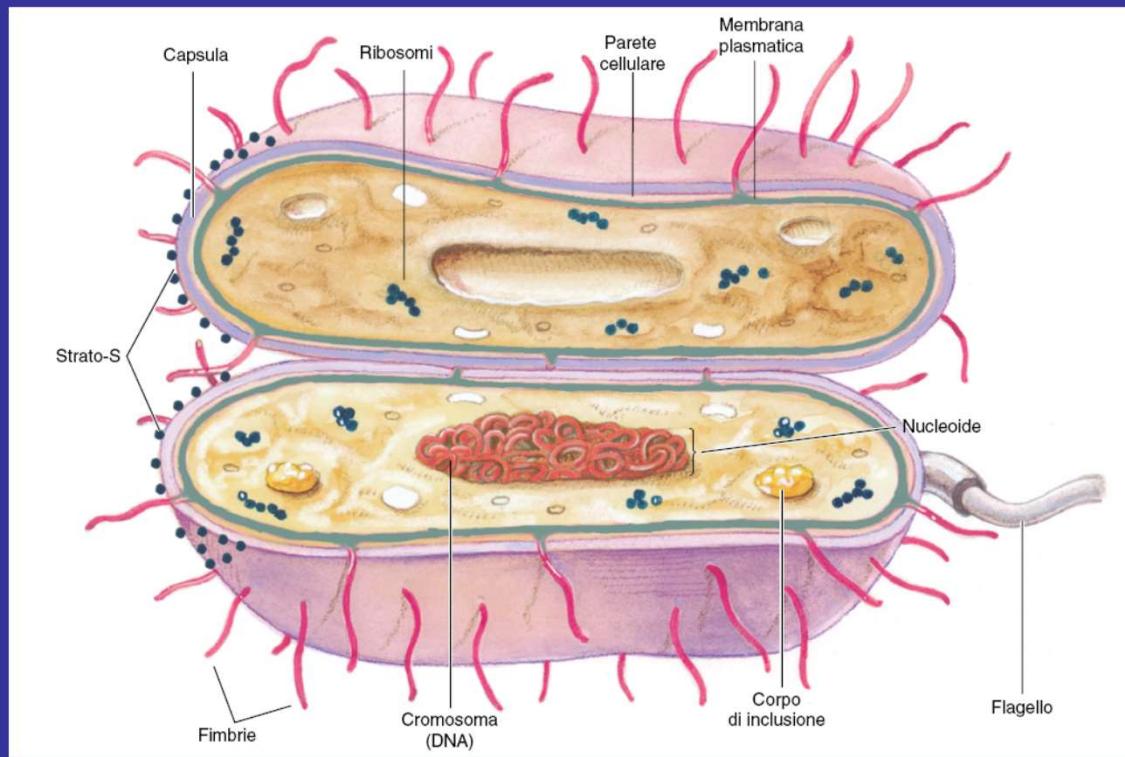


La cellula batterica: strutture di superficie ed inclusioni citoplamiche



Strutture opzionali delle cellule procariotiche

Capsula/glicocalice

Fimbrie

Pili

Strati S

Inclusioni cellulari

Vescicole gassose

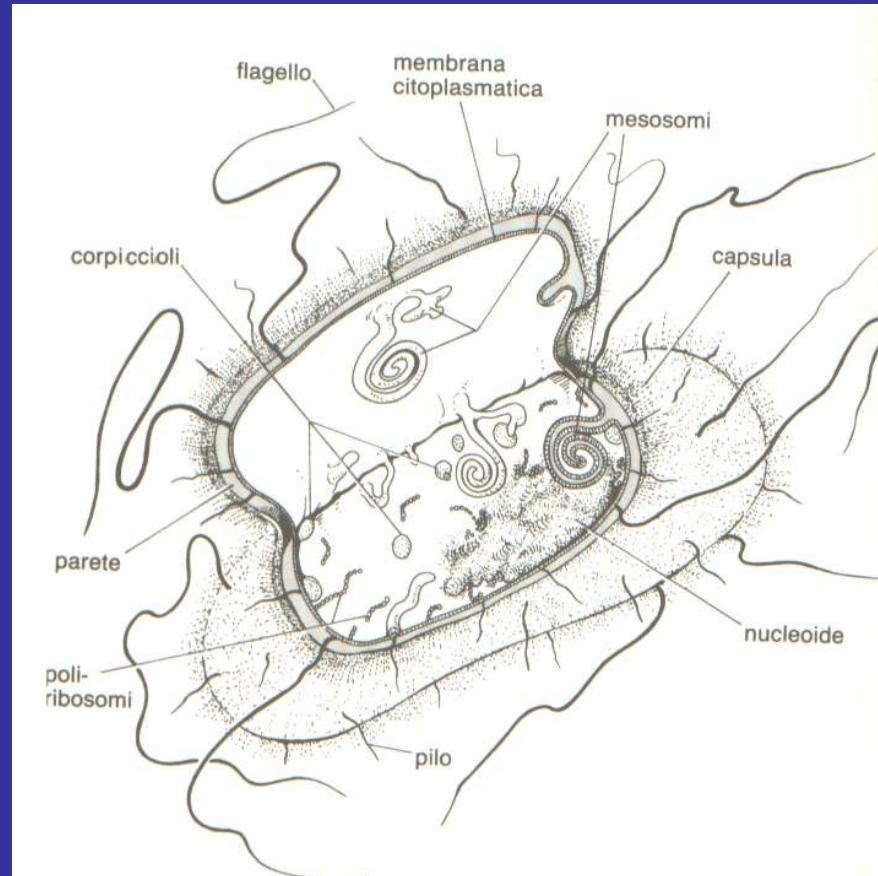


FIG. 4.2 • Schema di una cellula procariote parzialmente «scooperchiata» per mostrare il contenuto. Sotto il termine corpiccioli possono essere comprese strutture diverse, quali clorosomi, carbossisomi, magnetosomi, granuli di sostanze di riserva, gasvacuoli, ecc. Le dimensioni relative dei componenti non corrispondono a quelle reali.

SPE (Sostanze Polimeriche Extracellulari)

- Sono di varie dimensioni ed associate a numerose specie batteriche: capsula glicocalice, slime.
- **Capsula:** struttura rigida tenacemente aderente all'involtucro cellulare.
- **Glicocalice:** massa amorfa viscosa che circonda la cellula, facilmente rimovibile.
- **Slime:** materiale mucillaginoso distaccato dalla superficie cellulare

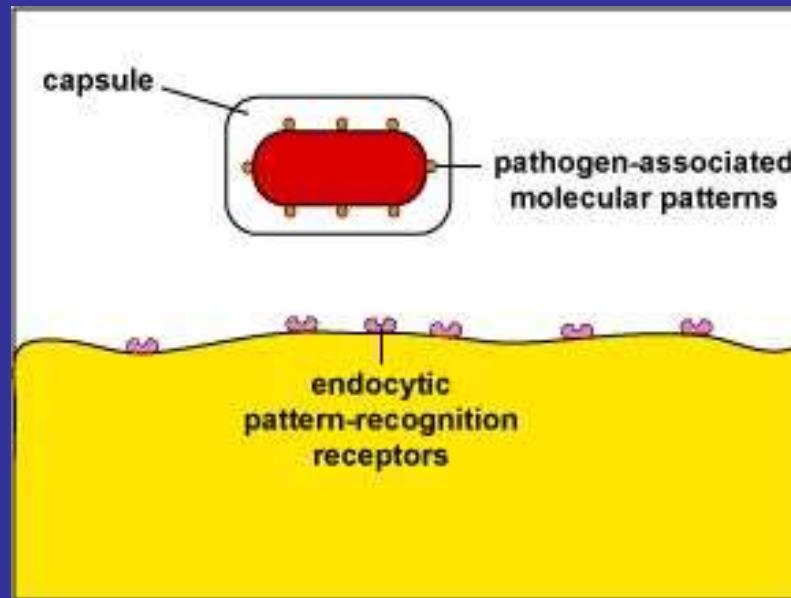
SPE (Sostanze Polimeriche Extracellulari)

- **Struttura:** omopolimeri o eteropolimeri di monosaccaridi, come esosi, acidi uronici ed aminozuccheri, acido sialico.
- **Funzioni:**
 - adesione alle cellule ospiti,
 - protezione (fagociti, anticorpi, farmaci)
 - motilità
 - Virulenza (nelle specie patogene)

Capsula (caratteri generali)

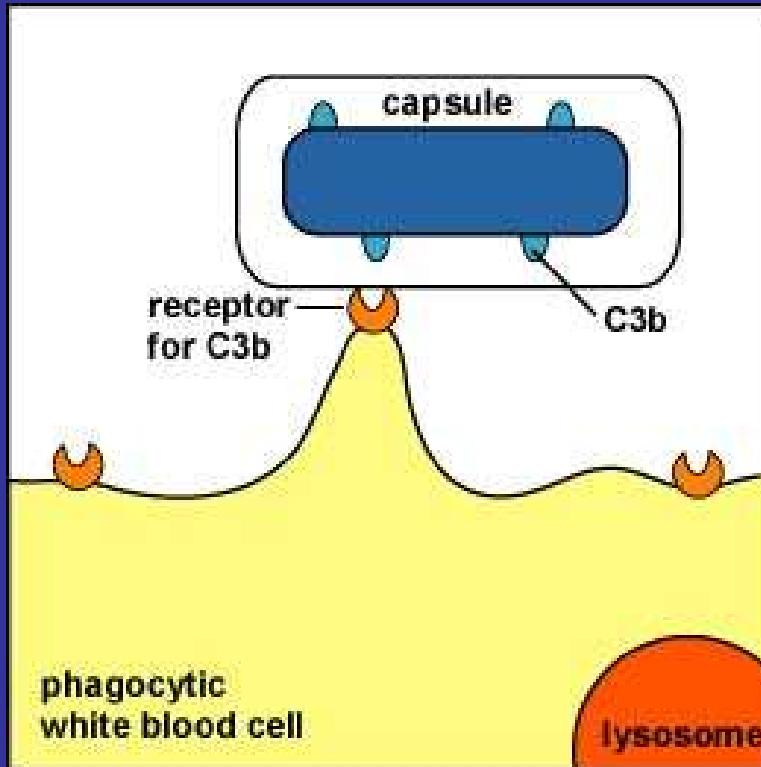
- Struttura amorfa gelatinosa (ad elevato contenuto di acqua) che presenta notevole variabilità in spessore in funzione di nutrienti, della temperatura o di mutazioni. (*fattori genetici ed ambientali ne influenzano la sintesi*)
- Sostanza viscosa che forma un involucro intorno alla cellula. Materiale escreto dalla cellula che per la sua viscosità non si allontana dalla cellula stessa, costituendo un rivestimento protettivo.
- Possiede una struttura polisaccaridica, (è costituita prevalentemente da polisaccaridi, come destrano, destrina, levano e cellulosa, e spesso da acidi uronici).
- Raramente proteica. In *B. anthracis* è formata da un peptide dell'acido D-glutammico.

Capsules Resisting Unenhanced Attachment of Pathogen-Associated Molecular Patterns by Endocytic Pattern-Recognition Receptors on Phagocytes



Glycoprotein molecules known as endocytic pattern-recognition receptors are found on the surface of phagocytes. They are so named because they recognize and bind to pathogen-associated molecular patterns - components of common molecules such as peptidoglycan, **teichoic acids**, **lipopolysaccharide**, mannans, and glucans - found in many microorganisms. Capsules can cover up these surface molecules preventing their attachment to the endocytic pattern-recognition sites on the phagocyte.

Bacterial Capsule Preventing C3b Receptors on Phagocytes from Binding to C3b Attached to a Bacterial Cell Wall



La capsula può prevenire l'opsonizzazione interferendo con l'attività del complemento.

In alcuni batteri la capsula batterica impedisce il legame tra il recettore (CR1) per C3b presente sui fagociti e l'opsonina C3b (proteina ad attività regolatoria che deriva dall'attivazione del complemento e che favorisce l'opsonizzazione) legata⁷ sulla superficie della cellula batterica.

Capsula

- Struttura protettiva e antigenica della cellula batterica.
- Presenta proprietà immunologiche utilizzate per la tipizzazione dei microrganismi (es. 13 sierogruppi di N.m).

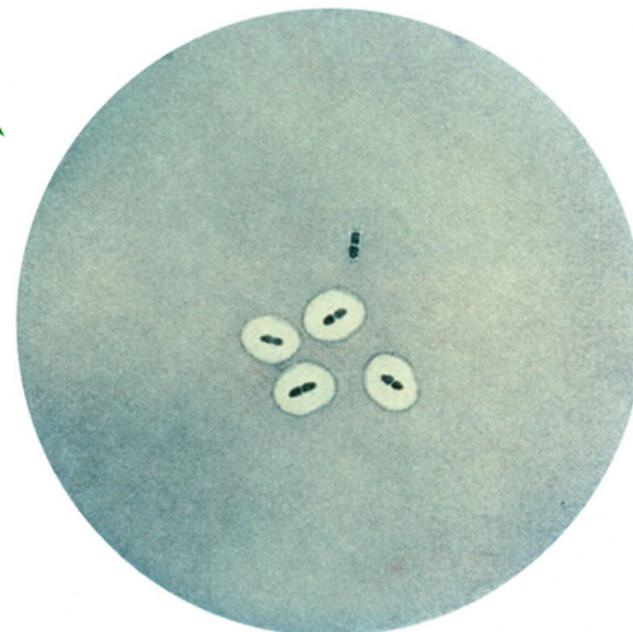
Metodi di visualizzazione:

- Reazione di Quellung (rigonfiamento capsulare): permette di evidenziare capsule antigenicamente distinte mediante anticorpi specifici.
- Colorazione negativa

Reazione di Quellung

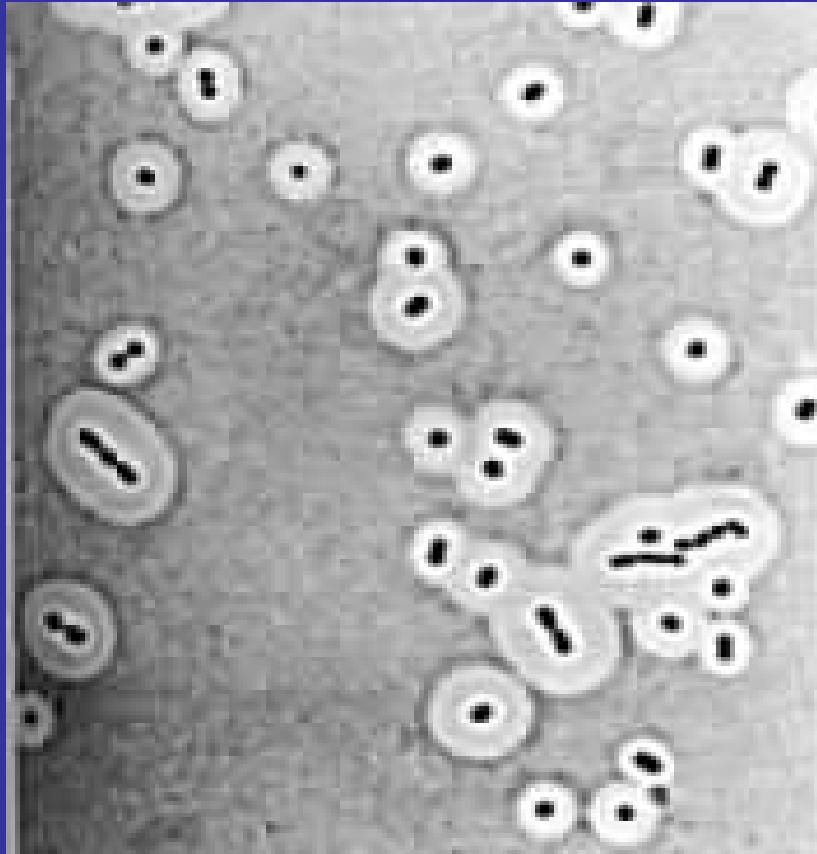
Reazioni immunologiche (anticorpi specifici-reazione di rigonfiamento capsulare-Neufeld)

Pneumococco



Bacterial Capsule

Colorazione negativa



**polysaccharide
protects against
phagocytosis
aids in attachment: biofilm**

Dimostrazione della presenza di capsula in *Acinetobacter sp.* mediante **contrasto negativo con inchiostro di china** ed osservazione al microscopio in contrasto di fase.

Capsules

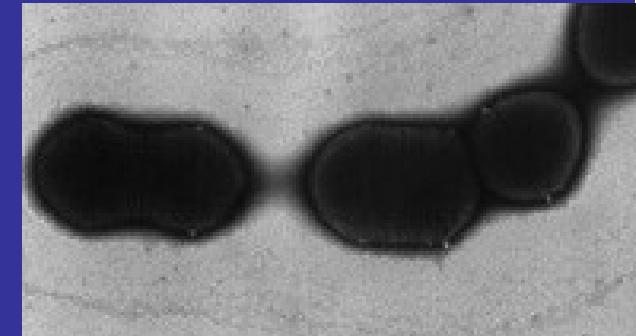
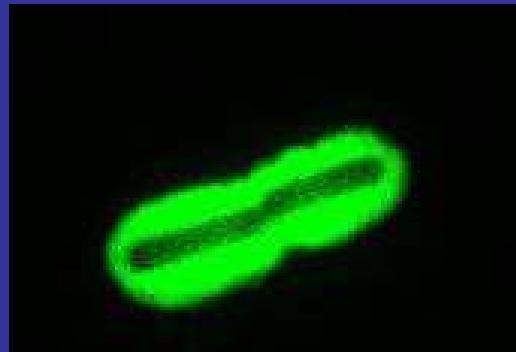
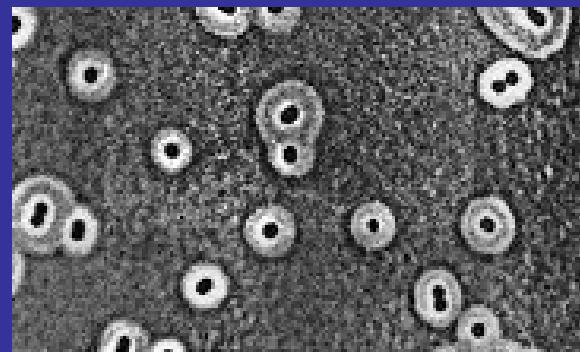
- outside cell envelope
- well defined: capsule
- not defined: glycocalyx
- usually polysaccharide
- protective *in vivo*: protects against phagocytosis
- aids in attachment

Capsula in *Klebsiella pneumoniae*



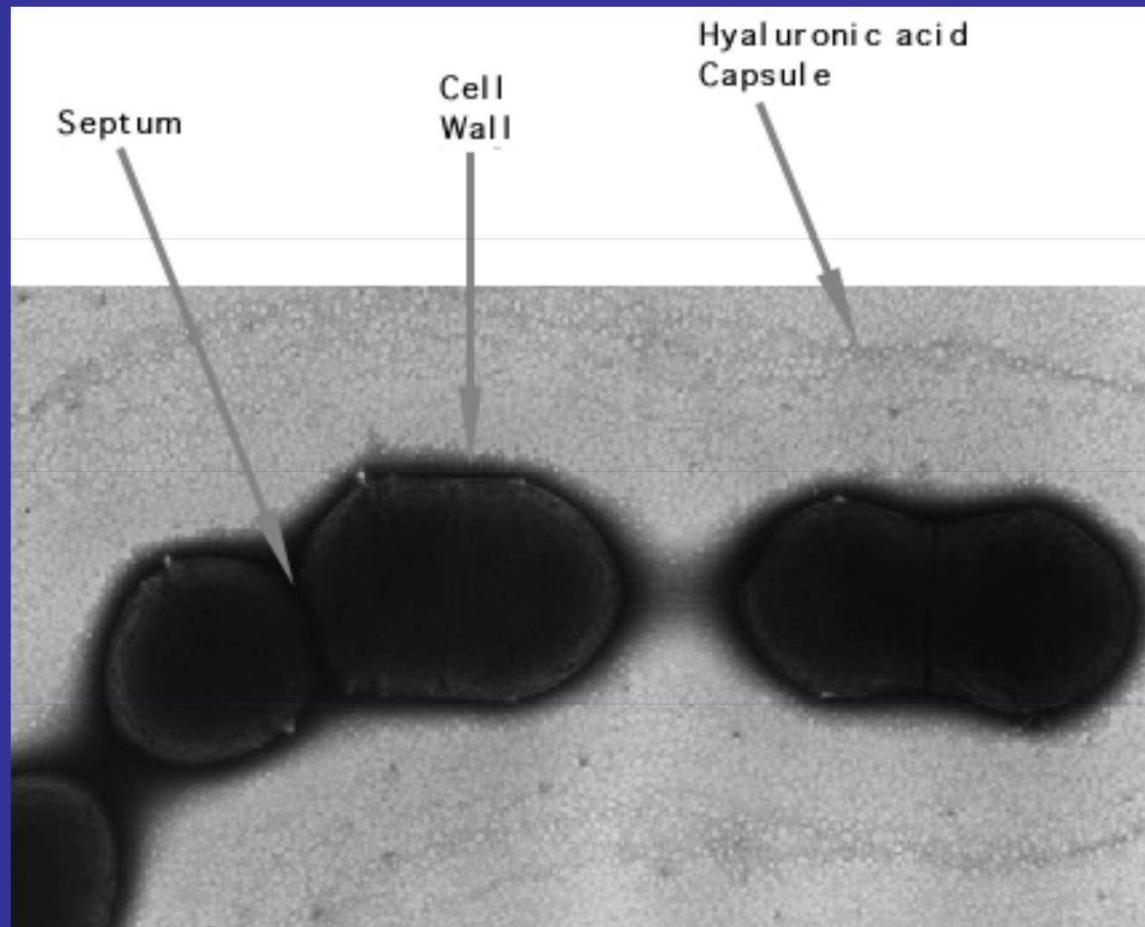
Microscopio ottico(x1500)

Bacterial capsules visualized by various techniques



Left. *Streptococcus pneumoniae* -India ink capsule outline ; *S. pneumoniae* capsular material is composed of polysaccharide. The capsule is the pathogen's most important determinant of virulence because it allows the bacterial cells to escape phagocytes in the lung. Middle. *Bacillus anthracis* -fluorescent-tagged antibody (CDC); the *B.anthracis* capsule is composed of poly-D-glutamic acid. Its capsule is antiphagocytic, and it protects the bacteria from complement- mediated lysis in serum or blood. Right. *Streptococcus pyogenes* -transmission electron micrograph. The capsule of *S. pyogenes* is composed of hyaluronic acid, the same polymer as found in human connective tissue. The capsule is an antigenic disguise that prevents recognition of the streptococci by phagocytes or the immune system.

Streptococcus pyogenes viewed by transmission electron microscopy (28,000X)



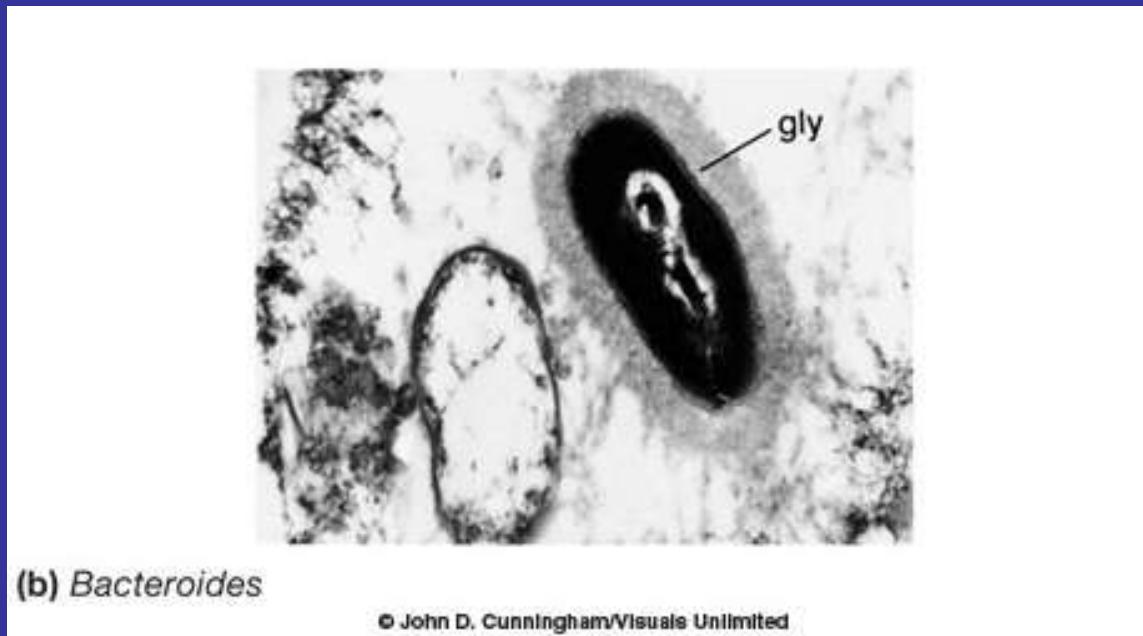
The halo around the chain of cells is the **hyaluronic acid capsule** that surrounds the exterior of the bacteria. The septa between dividing pairs of cells may also be seen.

Colonies of *Bacillus anthracis*



The slimy or mucoid appearance of a bacterial colony is usually evidence of capsule production. In the case of *B. anthracis*, the capsule is composed of poly-D-glutamate. The capsule is an essential determinant of virulence to the bacterium. In the early stages of colonization and infection the capsule protects the bacteria from assaults by the immune and phagocytic systems.

Glicocalice di Bacteroides

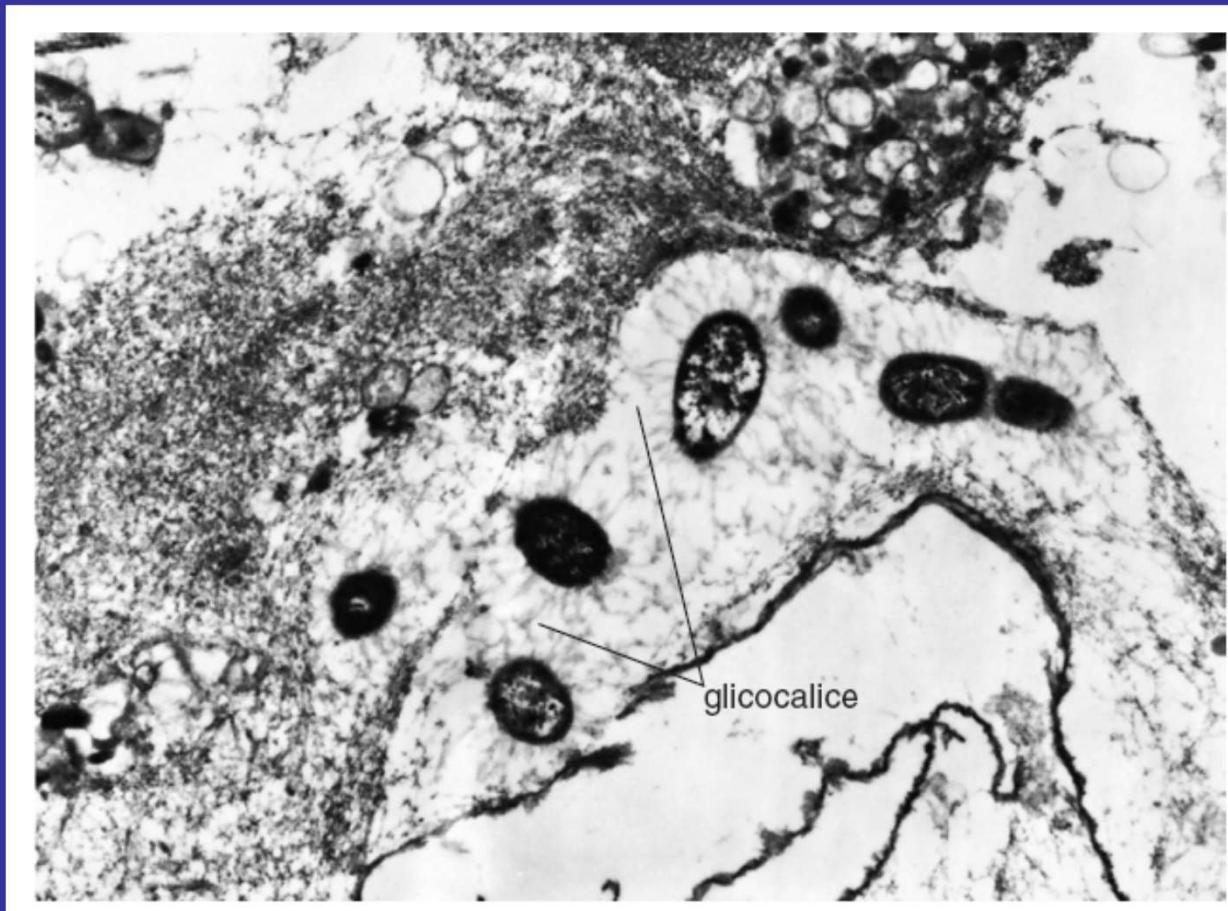


(b) *Bacteroides*

© John D. Cunningham/Visuals Unlimited

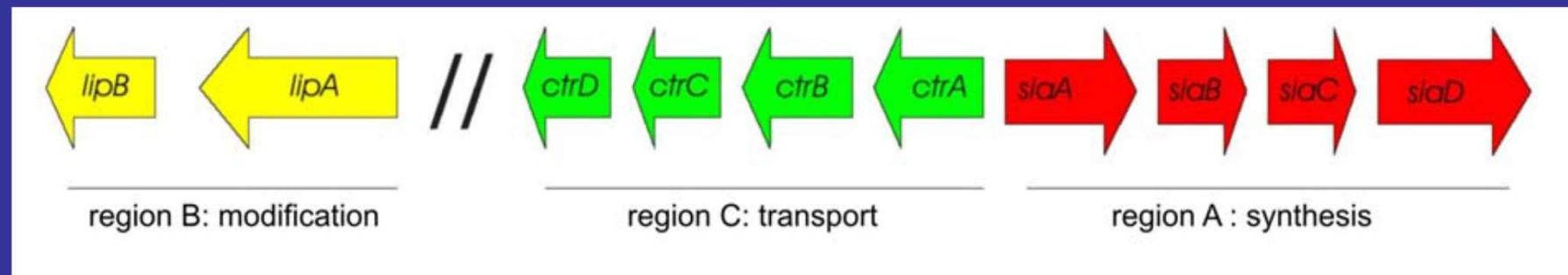
TEM x71250

Glicocalice batterico



Batteri connessi l'uno all'altro e con la parete intestinale per mezzo di glicocalici, le estese reti di fibre che si dipartono dalle cellule

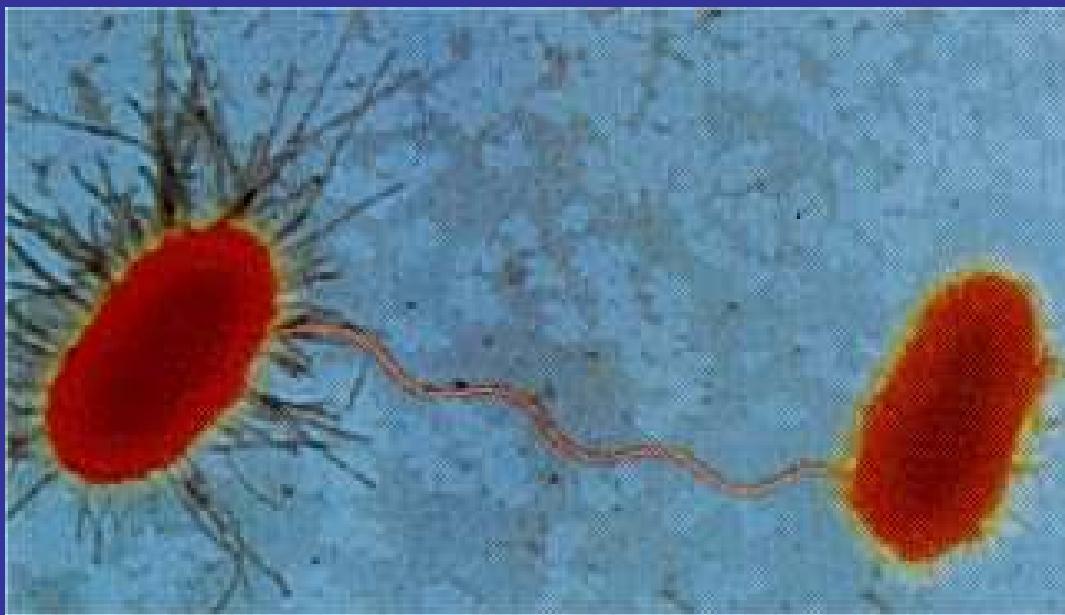
Schematic depiction of the capsule locus *cps* of *N. meningitidis*



The genes for capsule biosynthesis, modification, and transport are located in the regions A, B, and C, respectively of the *cps* locus of the meningococcal genome. The genes in region A determine the biochemical composition of the capsule. In meningococci expressing capsules containing sialic acid, the region A comprises the genes *siaA*, *siaB*, and *siaC*, which are necessary for the synthesis of activated sialic acid, and the serogroup-specific gene *siaD* encoding the polysialyltransferase.

Pili (fimbriae)

- hair-like projections of the cell
- sexual conjugation : pilus F of *E.coli*
- adhesion to host epithelium
- comuni nei Gram- ma presenti anche nei Gram+
- recettori per batterofagi
- Motilità
- trasporto

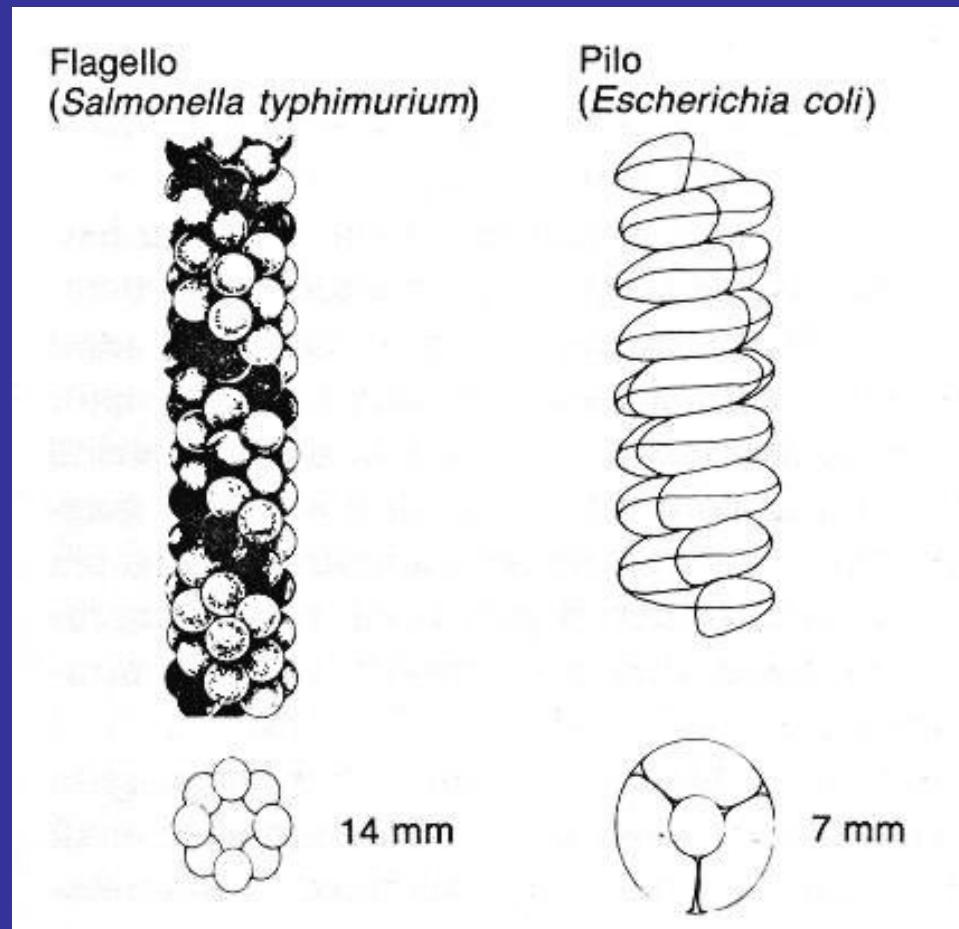


Coniugazione: modalità di trasmissione di informazioni genetiche, tramite plasmidi che avviene tra due cellule. Dopo che le due cellule si sono attaccate tra loro tramite un lungo pilo viene sfruttata la capacità di autoreplicazione dei plasmidi per trasmettere informazioni (resistenza agli antibiotici [plasmide R], presenza di pili sulla superficie [plasmide F]).

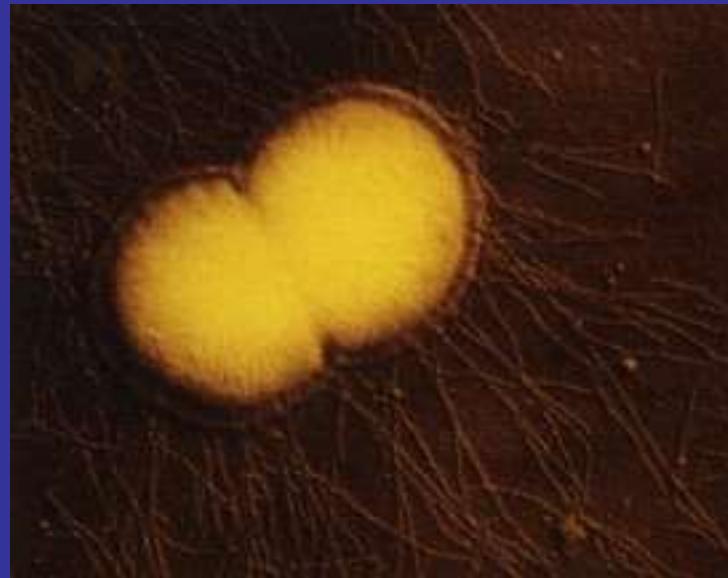
Fimbriae

- Singular “fimbria”; a.k.a. “pili” (singular “pilus”)
- Thread-like surface structures, 7 nm diameter, 0.5-2 μm long
- Repeating protein subunits (pilin), helical structure, central pore
- 500 fimbriae per cell, 1000 protein subunits
- Promote specific adhesion via protein adhesins
- Promote adhesion to target carbohydrate receptors

Modello della probabile disposizione elicoidale delle subunità proteiche di un flagello e di un pilo



Neisseria gonorrhoeae. Electron micrograph



This pathogen utilizes its fimbriae in order to initially colonize the urethral or cervical epithelium

E. coli - the major cause of UTI (Urinary Tract Infection)



- The uropathogenic *E. coli* frequently express filamentous appendages called P-fimbriae or Pap pili
- Uropathogenic *E. coli* cell has the potential to express many different fimbriae with different specificities for host cell carbohydrate receptors
- An individual bacterium will not express all fimbrial types at any given time - **antigenic variation**
- The ability to express different types of fimbriae allows bacteria to colonise different cell types as infection progresses

P-fimbriae of uropathogenic *E. coli*

- 9 different serotypes
- P pili consist of a rod built by more than thousand copies of PapA subunits in a helical conformation, and a flexible tip with an adhesin (PapG) at its distal end. Throughout the years, this adhesion system has been studied in some detail . For example, it has been shown that in pyelonephritic UPEC strains, the PapG adhesin binds to galabiose [α -D-Gal-(1–4)- β -D-Gal] containing glycolipid receptors on the kidney epithelium
- Receptor found on bladder, ureter and renal tissue
- Expressed by 90% of *E. coli* pyelonephritis isolates
- Mutants deficient in P-fimbriae expression show reduced virulence
- Maternal antibodies against P-fimbriae are protective

Variazione antigenica del pilo

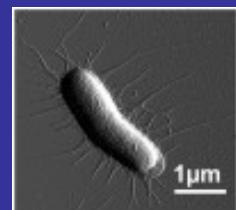
Capacità di elaborare versioni strutturalmente differenti di particolari determinanti di superficie

Per eludere la sorveglianza immunitaria dell'ospite molti patogeni hanno la capacità di introdurre varianti antigenicamente distinte a intervalli regolari. Di conseguenza una serie di meccanismi si sono evoluti che tendono a promuovere la variazione localizzata all'interno di geni che codificano per proteine di superficie immunodominanti.

Variazione di fase del pilo

Meccanismo regolatore genetico reversibile che permette al batterio di andare incontro rapidamente a cambiamenti per quanto riguarda la presenza (Fim+) o assenza di fimbrie (Fim-).

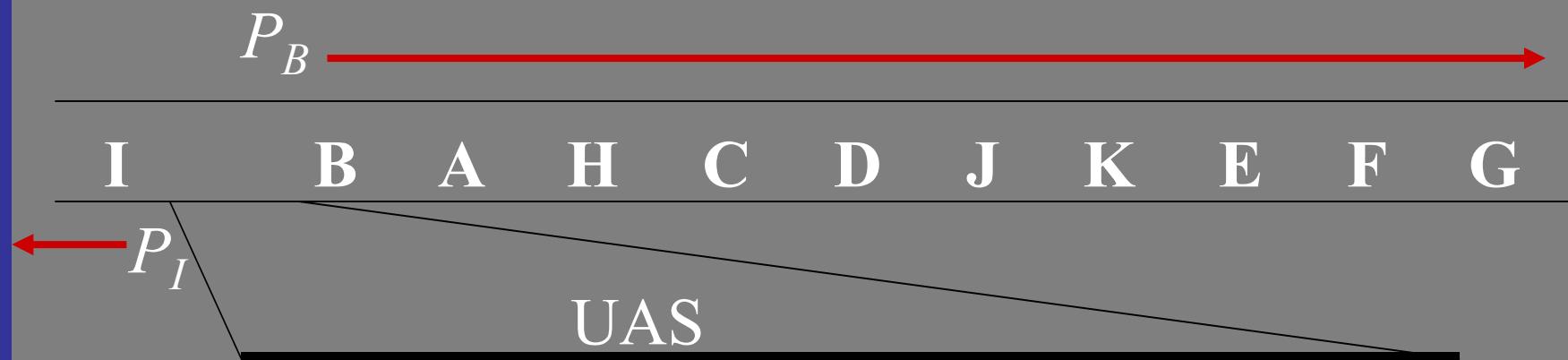
La prima condizione favorisce la colonizzazione iniziale ma accresce anche la suscettibilità alla fagocitosi; la perdita di tale condizione dopo la colonizzazione sembra favorire l'invasione dei tessuti.



AFM micrographs of cells expressing P pili.

Genetics of P-fimbriae

- Two transcription units separated by the Upstream Activator Sequence (UAS) or *pap* regulatory DNA



- Papl and PapB activators *pap* gene transcription

UAS contains promoters and binding sites for regulation by PapB/I and by catabolite repressor subunità maggiore del pilus, *papA*.

Pap operon

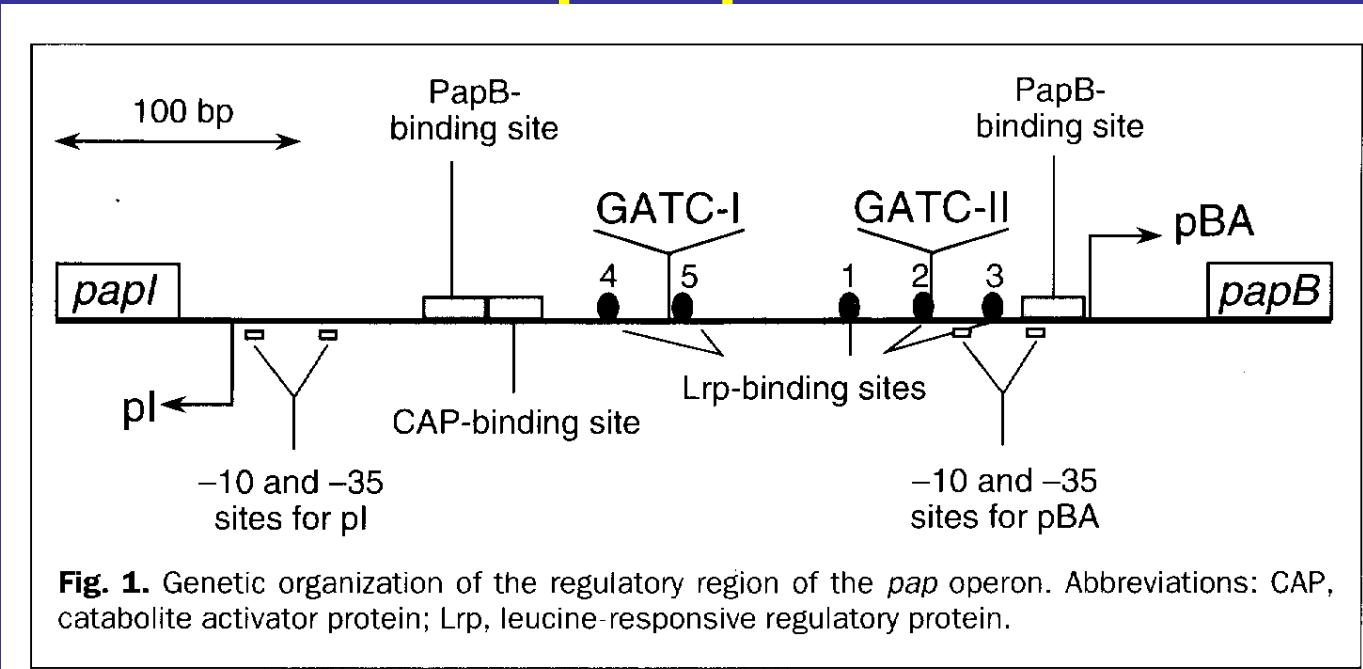


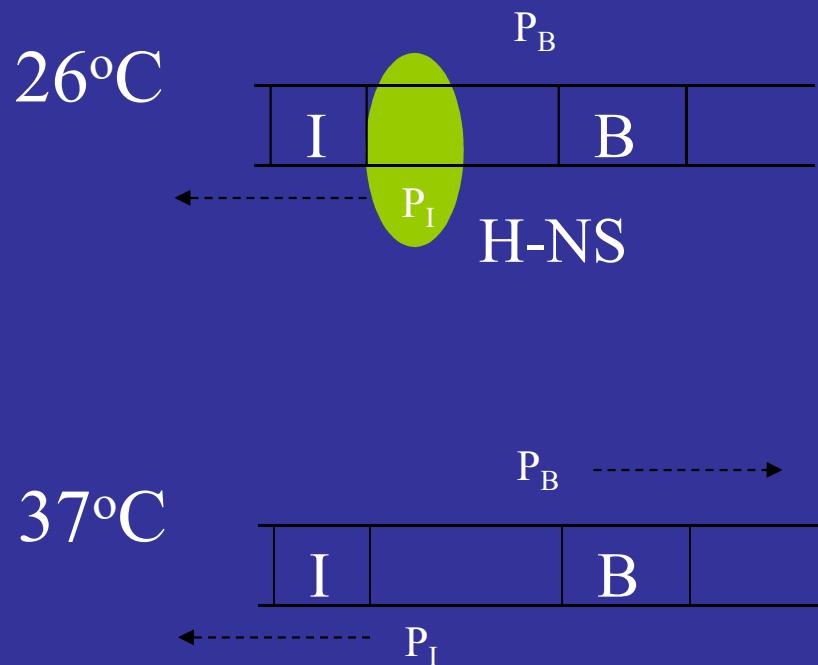
Fig. 1. Genetic organization of the regulatory region of the *pap* operon. Abbreviations: CAP, catabolite activator protein; Lrp, leucine-responsive regulatory protein.

- Two DNA GATC sites which are targets for Dam methylase are located within the *papI-papB* regulatory region
- The differential Dam methylation of two target sites is essential for the transition between active and inactive *pap* transcriptional states
- Phase ON cells have a methylation pattern that is the converse of phase OFF cells: GATC-I is protected from methylation whereas GATC-II is fully methylated
- Six Lrp (leucine-responsive regulatory protein) binding sites are located within the *papI-papB* regulatory region
- However, the *pap* operon is not responsive to leucine
- Lrp is a global regulator which activates some genes and represses others
- Lrp requires PapI as a cofactor to activate *pap* transcription
- Lrp and PapI are required for the protection of GATC-I from methylation: the binding of Lrp, in the presence of PapI, to the GATC-I region activates transcription about 8 fold over the basal transcription

Regulation of fimbrial expression

- *E. coli* is exposed to a various environmental conditions both within and outside the host
- A number of mechanisms have evolved to respond to environmental signals
- e.g. expression of *pap* is regulated by
 - temperature
 - catabolite repression: the presence of glucose seems to reduce expression of pili
- However, efficient expression of the *pap* operon also requires the PapB (autogenous regulation)

Temperature regulation by H-NS (histone-like nucleoid structuring protein)



- H-NS binding alters DNA supercoiling – weak transcription of *papI* – **no fimbriae**
- reduction in H-NS binding – more *papI* transcription activates *papB* transcription – **fimbriae produced**

Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*

Marjan van der Woude, Bruce Braaten and David Low

Box 1. Proteins involved in Pap phase variation

Lrp: Leucine-responsive regulatory protein, a global regulator that acts as a repressor when bound to *pap* DNA sites [1,2,3] and an activator when bound to *pap* DNA sites [4,5].

Papl: Regulatory protein that is essential for the translocation of Lrp from *pap* Lrp-binding sites [1,2,3] to Lrp-binding sites [4,5].

Dam: DNA-methylating enzyme that establishes differential phase ON and phase OFF *pap* DNA-methylation patterns in conjunction with Lrp. Essential for Pap phase variation.

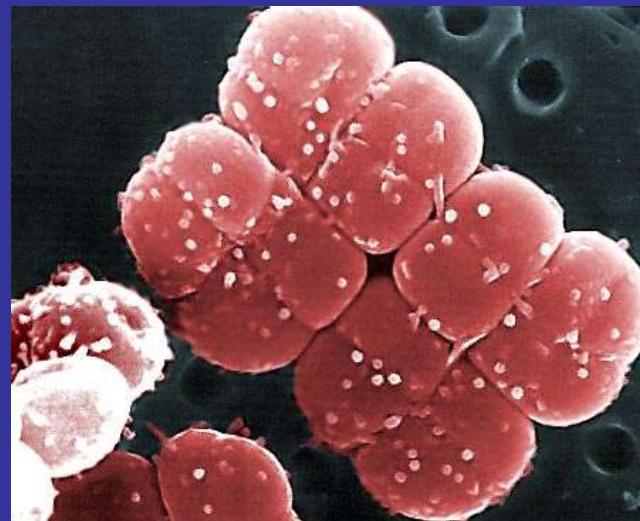
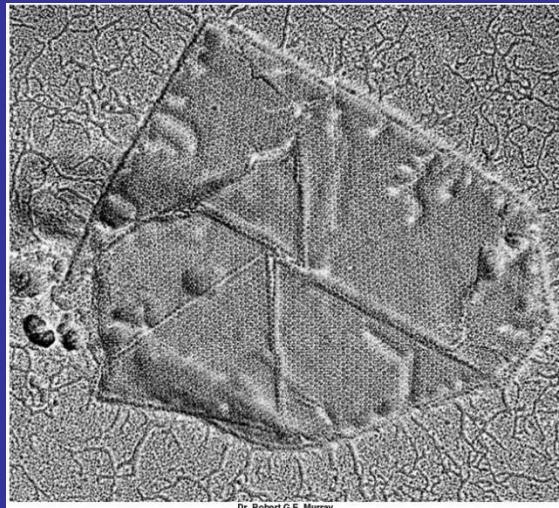
CAP: Catabolite activator protein, a global regulator essential for the activation of pBA and pl promoters.

PapB: Positive regulator for *papl* and an autorepressor for *papB*.

H-NS: Histone-like protein that can act as a repressor of the *pap* operon.

S-layer

- Diffusi sulla superficie degli ARCHEBATTERI ma presenti anche negli Eubatteri
- Hanno struttura cristallina con varia simmetria: esagonale, tetragonale, trimerica (a seconda del numero e della struttura delle subunità glicoproteiche)
- Formati da proteine strutturate bidimensionalmente



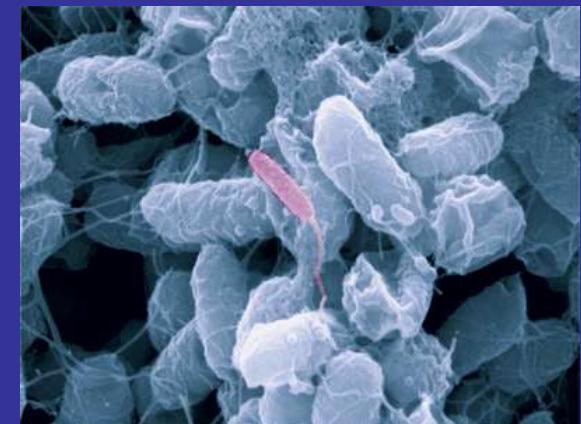
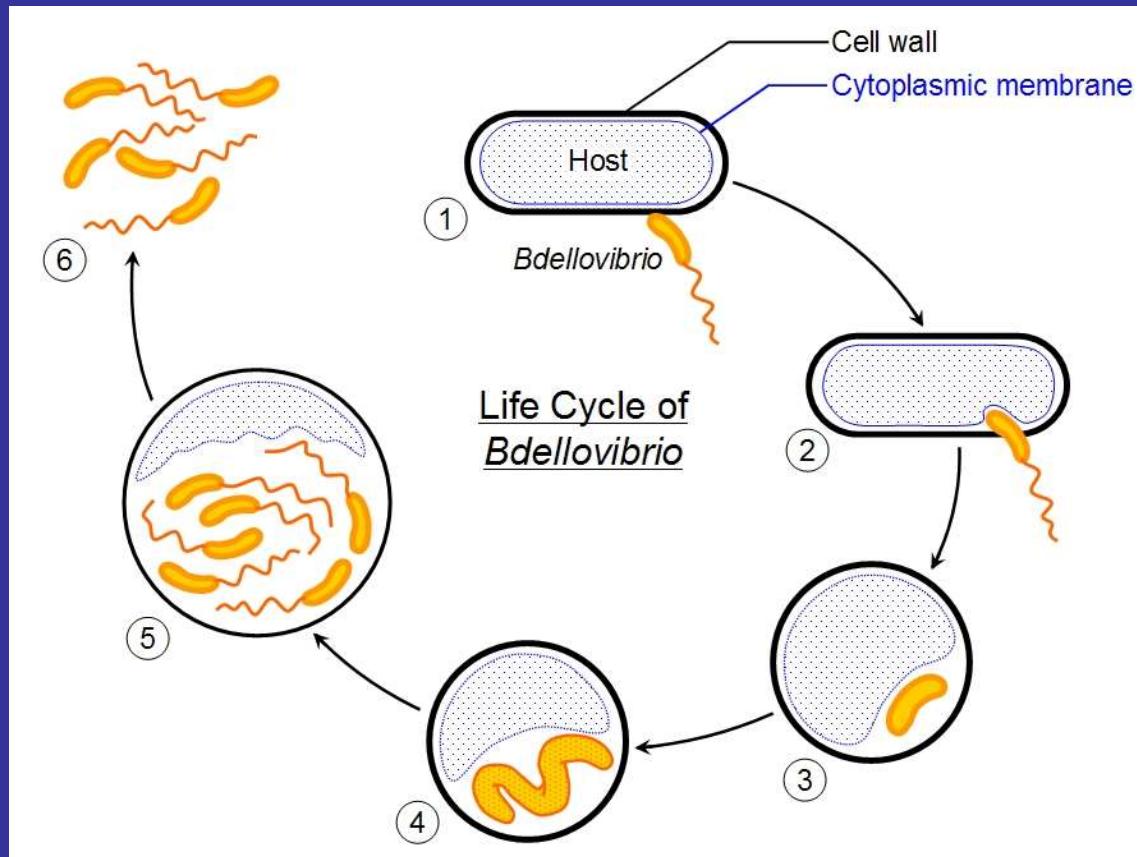
32

Strato S di Deinococcus radiodurans in una foto al m.e., dopo tecnica dell'ombreggiatura

Functions: The S-layer has been associated with a number of possible functions. These include the following:

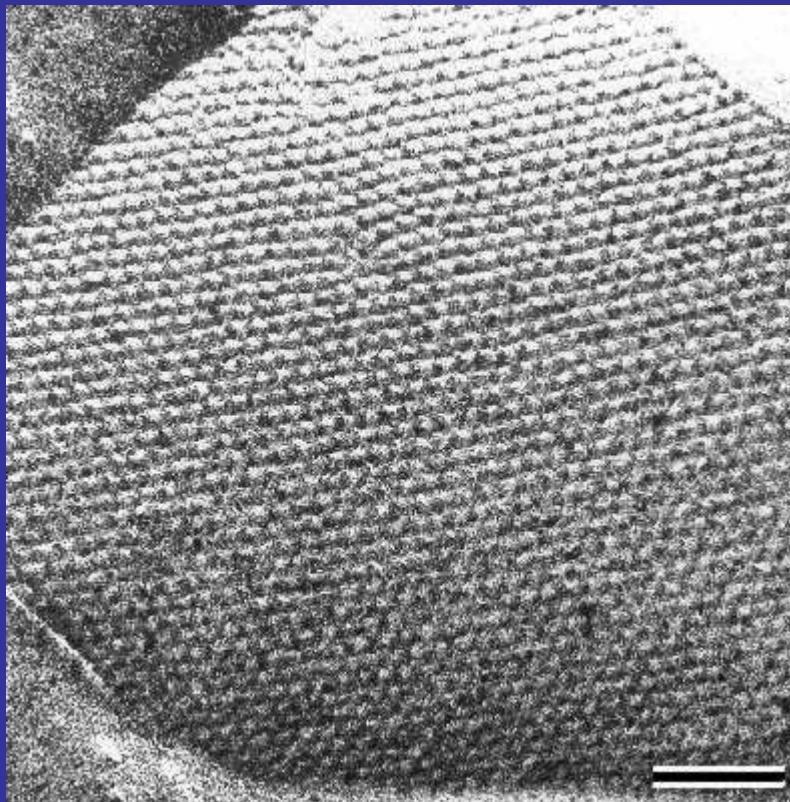
- a. The S-layer may protect bacteria from harmful enzymes, from changes in pH, and from the predatory bacterium *Bdellovibrio*, a parasitic bacterium that actually uses its motility to penetrate other bacteria and replicate within their cytoplasm.
- b. The S-layer can function as an adhesin, enabling the bacterium to adhere to host cells and environmental surfaces, colonize, and resist flushing.
- c. The S-layer may contribute to virulence by protecting the bacterium against complement attack and phagocytosis.

Bdellovibrio: il batterio predatore

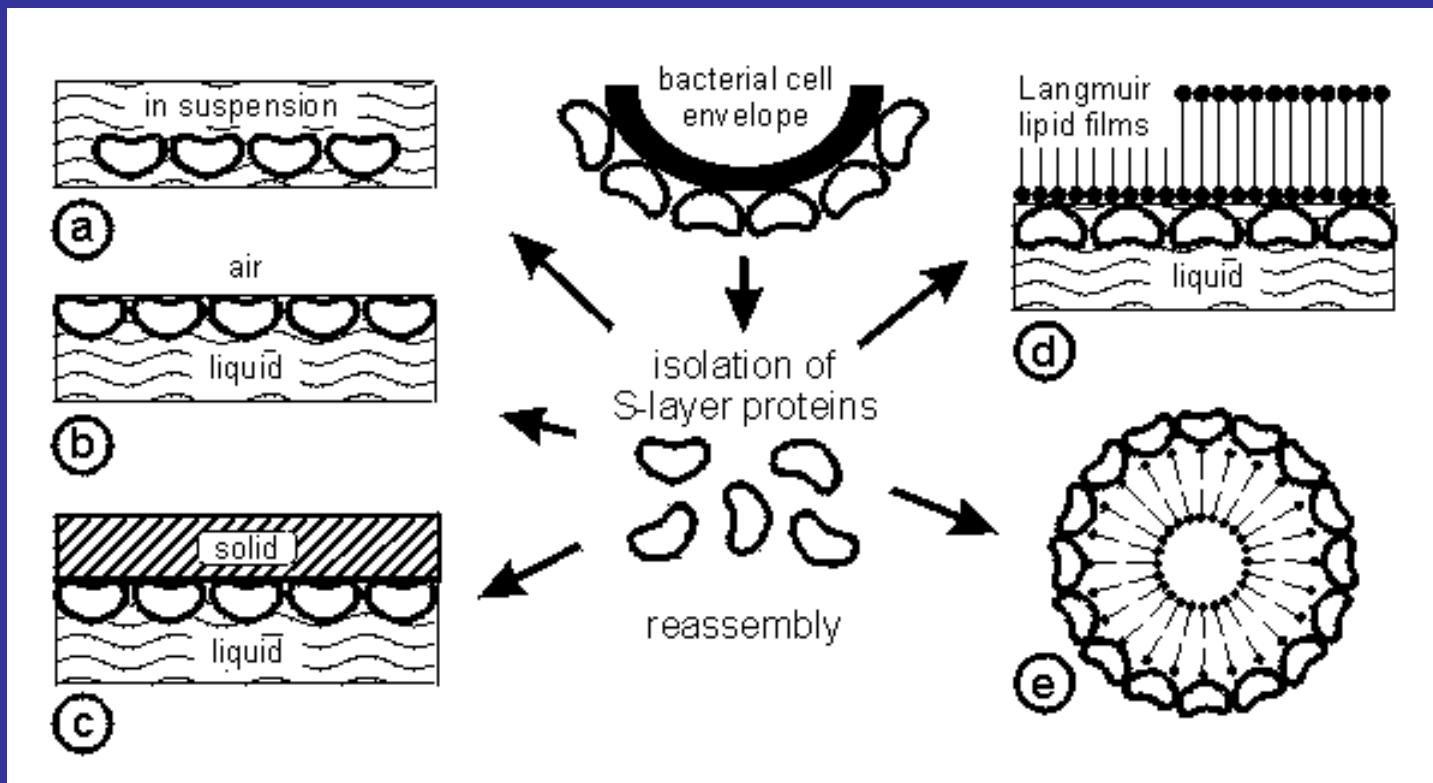


Alla ricerca della preda!!

S-layer



Transmission electron micrograph of a freeze-etched, metal shadowed preparation of a bacterial cell with an S-layer with hexagonal symmetry. Bar, 100nm



Disegno schematico dell'isolamento delle proteine dell'S-layer dalla superficie di una cellula batterica ed il loro riassemblaggio in una struttura cristallina in sospensione (a), nell'interfaccia aria-acqua (b), ad un supporto solido (c), in un film di lipidi (d) e in un liposoma (e). L'orientamento della struttura cristallina è determinato dalle proprietà chimico-fisiche della superficie.

Corpi d'inclusione nei batteri

Granuli di sostane organiche ed inorganiche
che sono stoccate come materiale di riserva

Alcuni sono racchiusi da una membrana a
singolo strato

- La composizione della membrana è variabile: alcune sono proteiche, altre contengono lipidi

Corpi d'inclusione nei batteri

- glicogeno
 - Polimeri di unità di glucosio
- poly- β -hydroxybutyrate (PHB)
 - Polimeri di β -hydroxybutyrate
- Granuli di cianoficina
 - Grandi polipeptidi contenenti arginina ed acido aspartico in quantità circa uguale
- Carbossisomi
 - Contengono il ribulose-1,5,-bisphosphate carboxylase (Rubisco), enzima usato per la fissazione di CO₂

- granuli di polifosfato

Chiamati anche granuli di volutina o granuli metacromatici

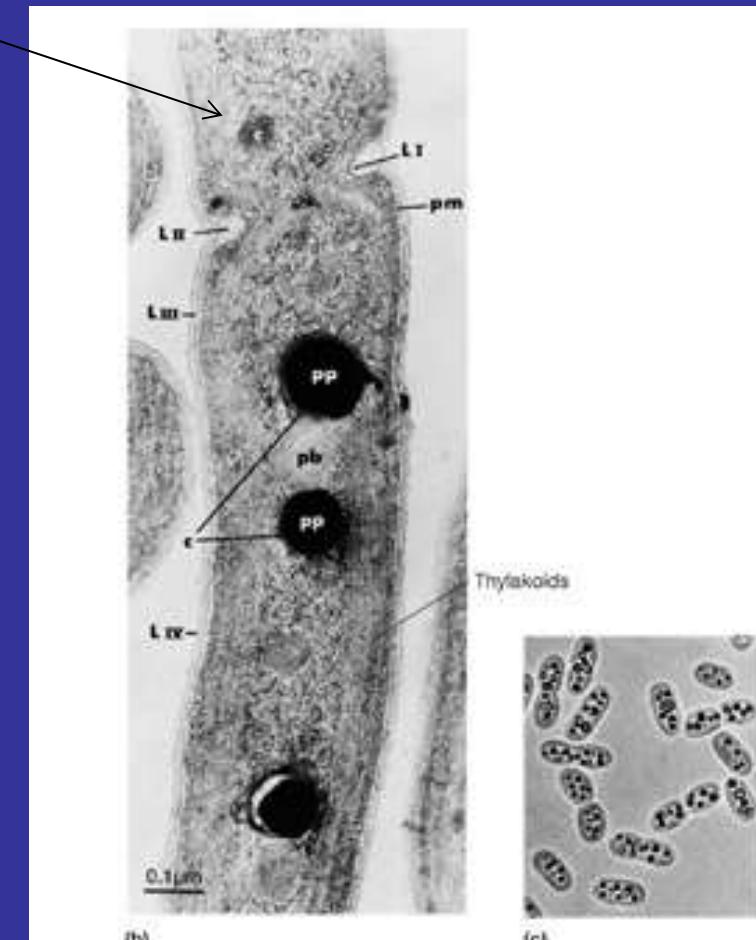
Polimeri lineari di fosfato

- granuli di zolfo
- magnetosomi

Contengono ferro in forma di magnetite

Servono per orientare le cellule nei campi magnetici

Corpi d'inclusione nei batteri



A sinistra. Ultrastruttura del cianobatterio *Anacystis nidulans*.

Pp: Granuli di polifosfato; C: depositi di cianoficina

A destra. *Chromatium vinosum*, un solforodobatterio

con granuli di zolfo nel citoplasma, al m.o

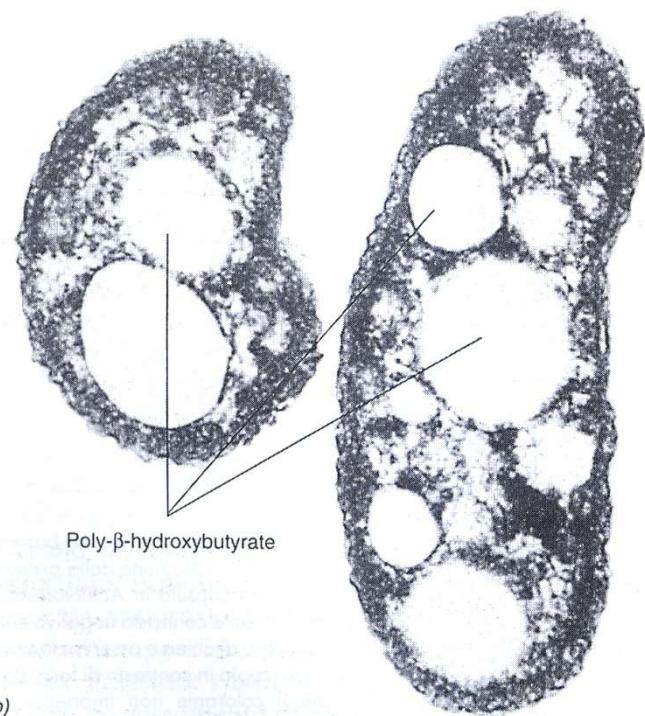
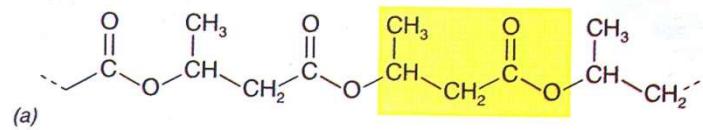
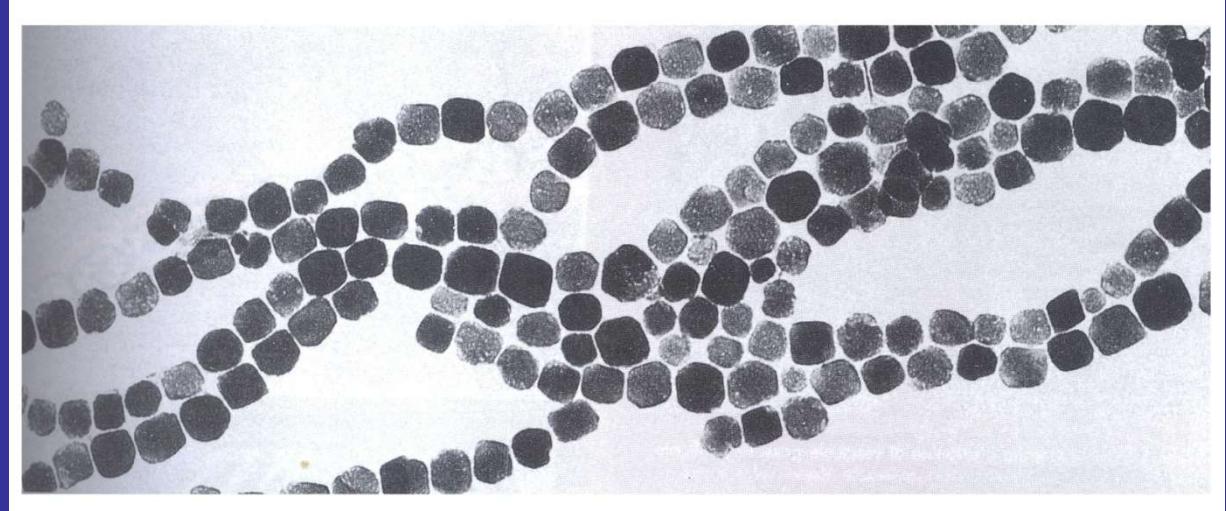
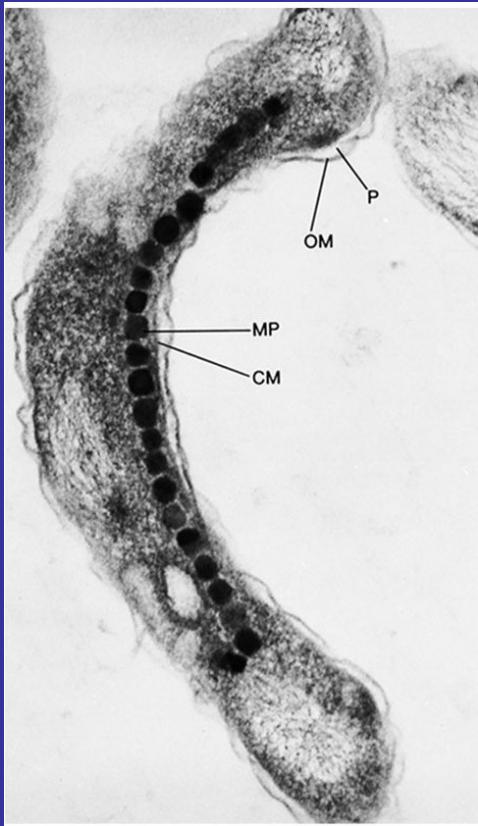


FIGURA 2.51 Poli- β -idrossibutirrato (PHB). (a) Struttura chimica del PHB, un poli- β -idrossialcanoato comune. La regione ombreggiata rappresenta l'unità monomerica. In altri polimeri analoghi il gruppo $-\text{CH}_3$ del carbonio in β è sostituito da catene di idrocarburi più lunghe. (b) Micrografia elettronica su sezioni sottili di cellule del batterio fototrofo *Rhodospirillum sodomense* contenenti granuli di PHB.

Inclusioni cellulari di poli- β -idrossibutirrato **PHB**

Polimero di natura lipidica, riserva di carbonio e di energia

Magnetosomi

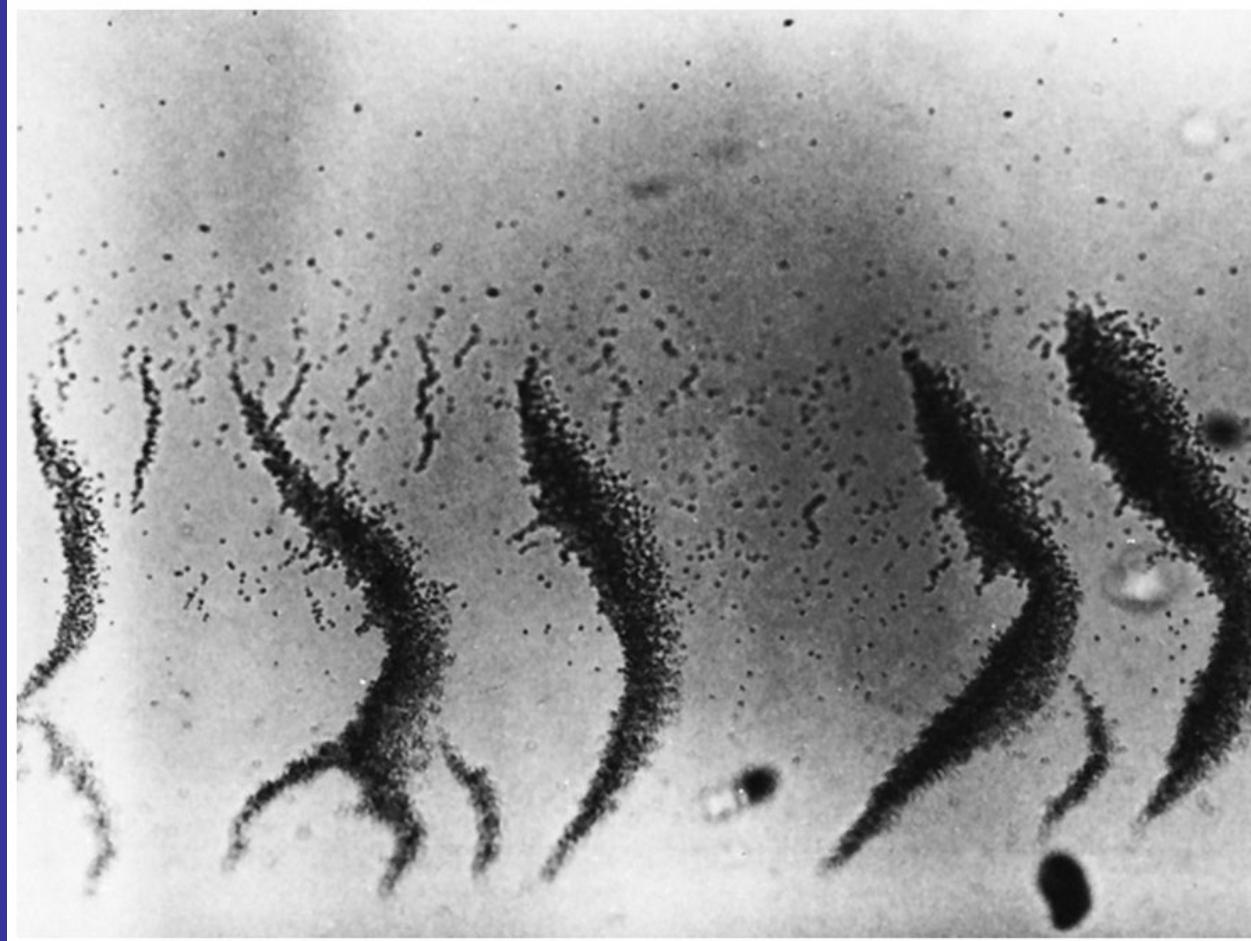


Magnetosomi isolati:
Particelle cristalline di ossido di ferro

Batterio magnetotattico
Aquaspirillum magnetotacticum

Magnetotassi: capacità di muoversi lungo campi geomagnetici

Magnetotassi



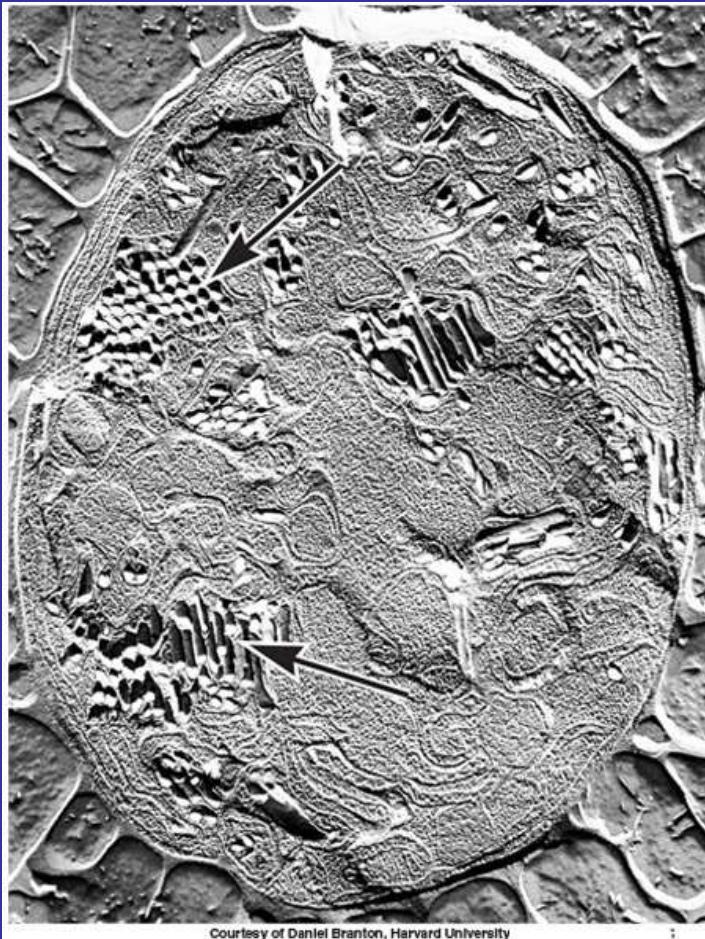
Batteri esposti a un campo magnetico si spostano formando onde



il batterio, 'Magnetospirillum magneticum', un microrganismo che vive in ambienti subacquei, e che utilizza questa sua proprietà naturale per nuotare su e giù per le linee del campo magnetico della Terra

Il Magnetospirillum è un Gram-negativo, microaerofilo isolato da acqua di stagno dal microbiologo R.P. Blakemore, nel 1975. La sua una morfologia è caratterizzata da spirilli elicoidali, dotati in ciascuna estremità di un flagello polare che gli consente una certa motilità verso condizioni favorevoli di concentrazione di ossigeno (aerotassi).

Vescicole e vacuoli gassosi



Preparato del cianobatterio Anabaena flos –aquae
Aggregati di vescicole a forma di sigaro formano i vacuoli gassosi.
Sono visibili sia vescicole gassose in sezione longitudinale che trasversale

Vescicole gassose

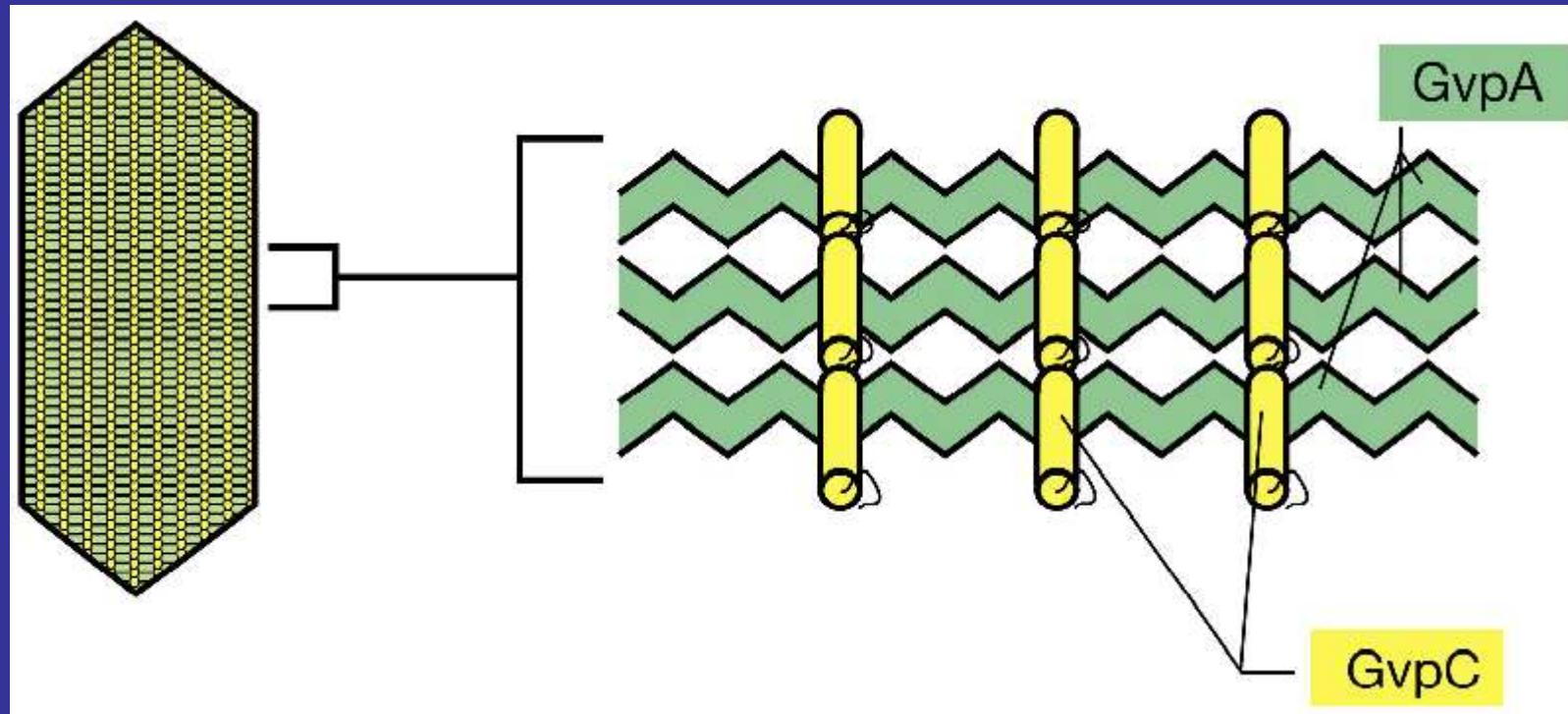


Brock

FIGURA 2.53 Massa di cianobatteri che, grazie alla presenza di vescicole gassose, galleggiano alla superficie di acque lacustri ricche di nutrimento.

Permettono alle cellule di muoversi in risposta a stimoli ambientali

Vescicole gassose



Membrana costituita da due proteine: GvpA e GvpC