

## “Quorum sensing”

*Regolazione della trascrizione in procarioti:  
da meccanismi semplici a eventi regolativi  
complessi*



# QUORUM SENSING

*Il quorum sensing fa parte dei sistemi di controllo globale: complessi sistemi di regolazione coinvolti nei meccanismi di patogenicità e virulenza che permettono a un organismo di rispondere efficientemente ai segnali dell'ambiente, come quello rappresentato, nel caso specifico, dalla presenza di altri microrganismi della stessa specie.*

## IL “QUORUM SENSING”

*“Un sistema di comunicazione tra batteri in grado di rispondere all’aumento della densità di popolazione modificandone l’espressione genica”*

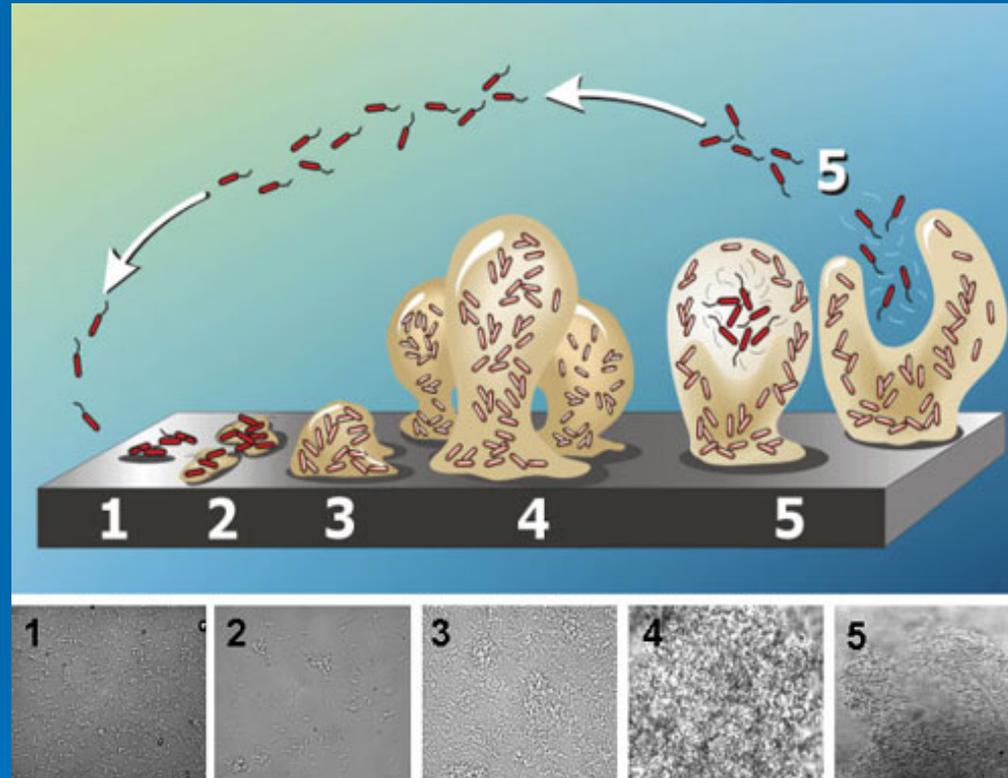
Nel processo chiamato quorum sensing i batteri rilevano la presenza di altri batteri nel loro intorno producendo e rispondendo con molecole segnale conosciute come **autoinduttori**.

# QUORUM SENSING

**La concentrazione di autoinduttore in un dato ambiente è proporzionale al numero di batteri presenti**

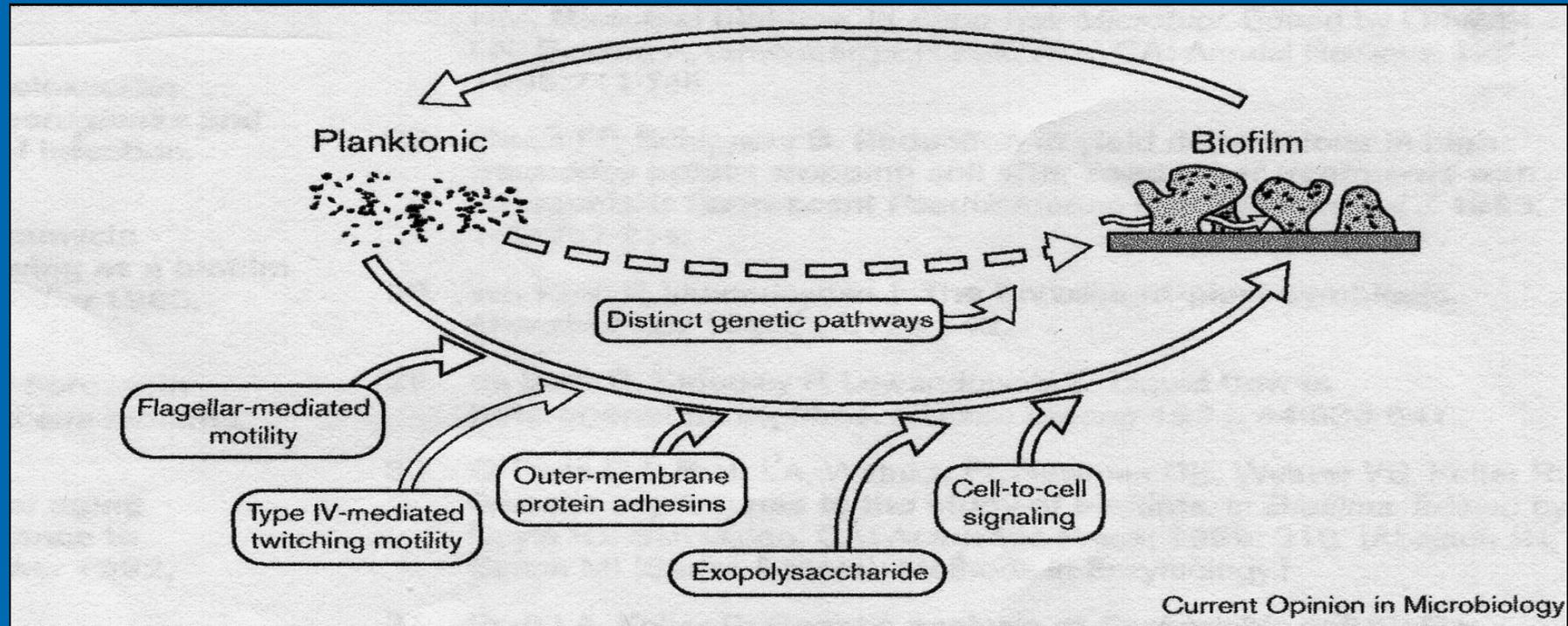
- Quindi, rilevare la concentrazione di autoinduttore consente ai batteri un meccanismo di conta reciproca.
- La maggior parte dei sistemi quorum sensing hanno efficacia soltanto quando *una popolazione batterica secerne sincronicamente l'autoinduttore di pertinenza.*

# Rappresentazione schematica del ciclo di formazione del biofilm



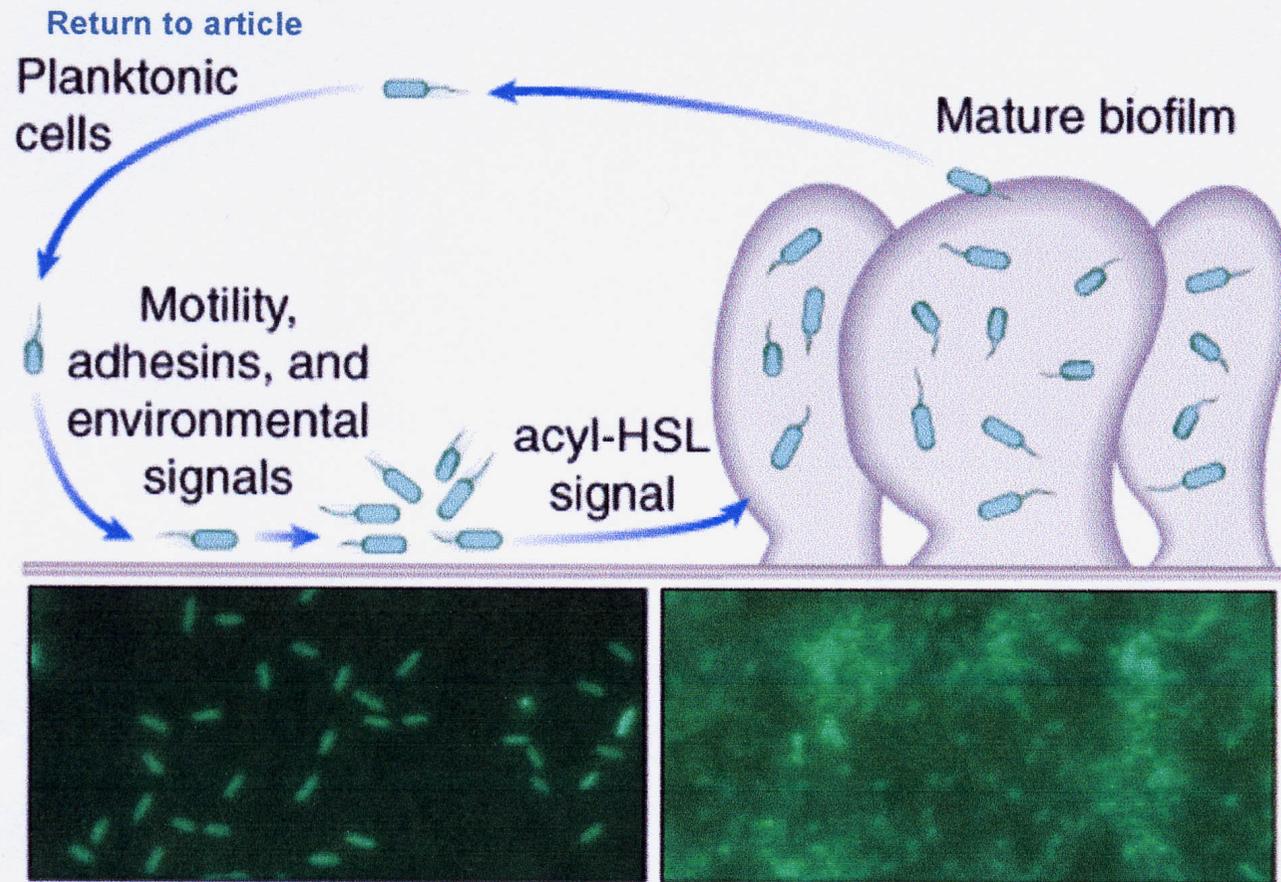
Formazione di biofilm microbico su una superficie organica  
1. Adesione dei batteri alla superficie organica; 2. Colonizzazione; 3. Produzione di esopolimeri; 4. Maturazione del biofilm; 5. Rilascio dei batteri dal biofilm.

# GENI COINVOLTI NELLA FORMAZIONE DEI BIOFILM



**Figure 4**

Summary of genetic components important in biofilm formation. Note that not all bacteria require all of these factors, and that distinct genetic pathways can be utilized by a single species to form a biofilm.

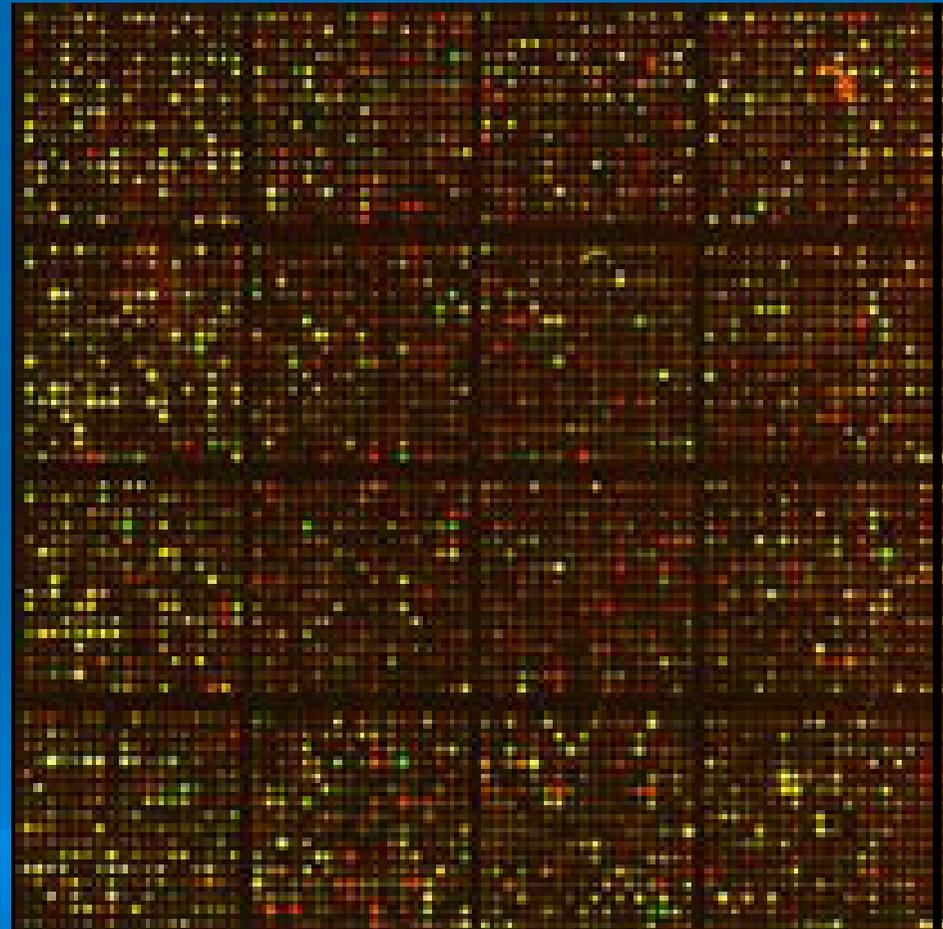


**Construction of a biofilm.** Free (planktonic) bacteria assemble on a surface (**left**). Cell-to-cell communication then induces the formation of multicellular pillars and columns (**right**).

*Genomic analysis of biofilm-dependent gene expression through microarray analysis*

**Biofilm**

Il numero di geni che si esprime in maniera diversa in singole cellule e nei biofilm comprende una % molto alta del genoma (10-30%).



**Single cells**

# QUORUM SENSING

Esempi di fenomeni regolati da sistemi di quorum sensing sono:

- **la bioluminescenza**
- **la produzione di fattori di virulenza**
- **la formazione di biofilm**
- **la sporulazione**
- **l'acquisizione dello stato di competenza per la trasformazione**
- **la coniugazione**
- **la produzione di pigmenti**

# QUORUM SENSING

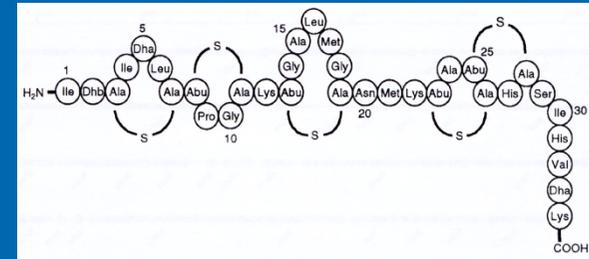
Ci sono due tipi di sistema quorum sensing batterici:

- quelli basati sull'azione delle proteine LuxI e LuxR, tipici dei **Gram-negativi**
- quelli basati sul rilascio di piccoli oligopeptidi, tipici dei **Gram positivi**

# Le molecole del quorum-sensing

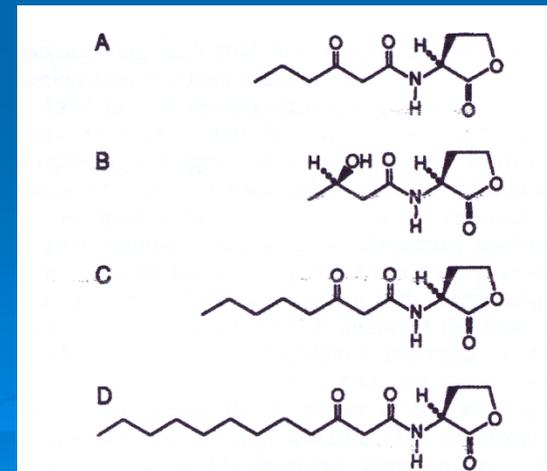
## Gram-positivi: piccoli peptidi modificati

Small Antimicrobial Peptides (AMPs):  
lantibiotici  
batteriocine



## Gram-negativi: derivati degli acidi grassi

Omoserina lattone acetilato (AHL)



# Peptidi Anti Microbici (AMPs)

## → Lantibiotici o AMPs di classe I

- *peptidi contenenti modificazioni post-traduzionali*
- *heat-stable*
- *attività antimicrobica e di molecole segnale*

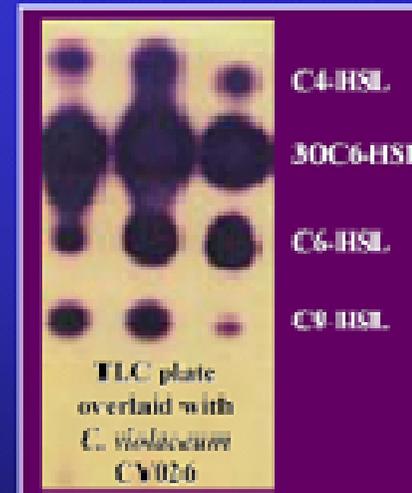
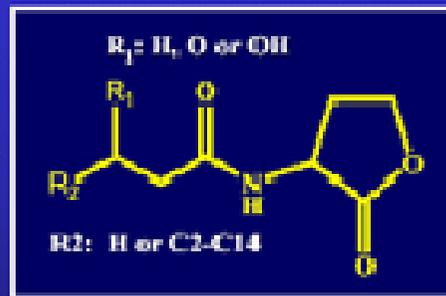
## → Batteriocine o AMPs di classe II

- *piccoli peptidi (40-70 aa) NON contenenti modificazioni post-trasduzionali*
- *sintetizzati come precursori contenenti una porzione all'estremità N-terminale che viene rimossa durante la secrezione*
- *contengono due residui di glicina (Gly-Gly motif) che precedono il sito di taglio*
- *attività antimicrobica e di molecole segnale*
- *oggetto di studio per la produzione di conservanti alimentari*

# La produzione di AMPs è regolata dalla densità cellulare: significato biologico

- 1. Garantisce livelli di AMPs nell'ambiente sufficienti ad uccidere i microrganismi competitori**
- 2. Il rapido incremento di AMPs previene lo sviluppo di meccanismi di difesa o resistenza nelle cellule bersaglio**
- 3. Evita una inutile produzione di AMPs quando le condizioni di crescita sarebbero tali da favorire una rapida dispersione nell'ambiente dei feromoni stessi**

## Diverse Gram-negative Bacteria Produce *N*-Acylhomoserine lactones (AHLs)

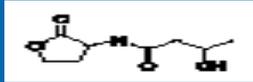


*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Burkholderia cepacia*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Enterobacter agglomerans*, *Chromobacterium violaceum*, *Hafnia alvei*, *Obesumbacterium proteus*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium aquatilis*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio metschnikovii*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*

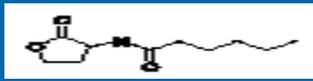
# Le molecole del quorum sensing: i più comuni acyl HSL



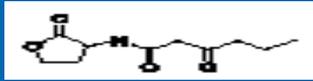
*N*-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL)



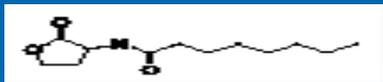
*N*-(3-hydroxybutanoyl)-L-homoserine lactone (HBHL)



*N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL)



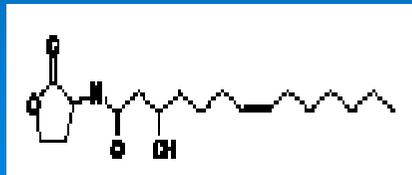
*N*-(oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL)



*N*-octanoyl-L-homoserine lactone (OHL)



*N*-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone (OOHL)



*N*-(3-hydroxy-*cis*-tetradecenoyl)-L-homoserine lactone (HtdeDHL)

# Caratteristiche:

→ Differiscono per composizione e dimensione delle catene aciliche

→ Le catene aciliche:

-possono avere da 4 a 14 atomi di carbonio

-possono contenere doppi legami

-spesso contengono un gruppo oxo ( $\text{-C-}$ ) o

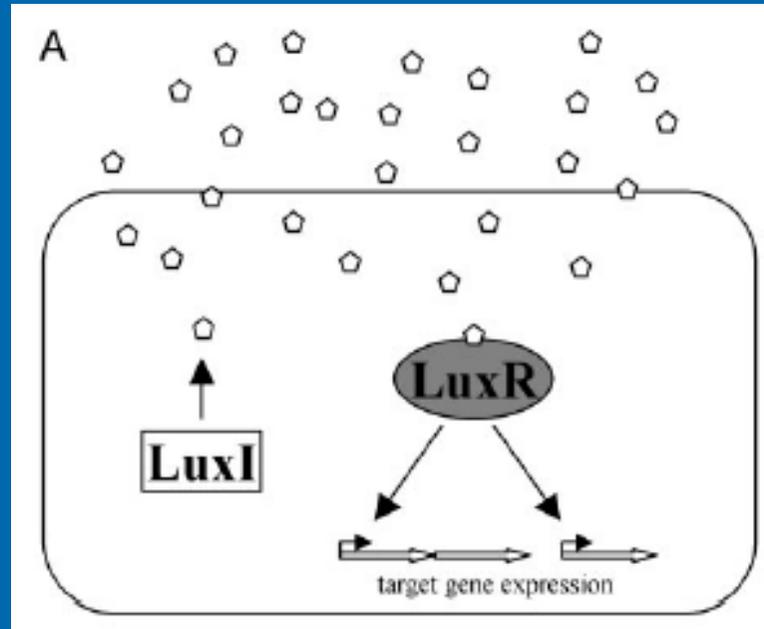
hydroxyl ( $\text{-C-}$ ) sul carbonio 3



→ Le molecole di acyl-HSL a catena corta possono diffondere attraverso le membrane batteriche, quelle a catena lunga attraversano le m. mediante un sistema di trasporto attivo

# Circuiti canonici del quorum sensing:

## Tipico circuito dei Gram-negativi LuxIR



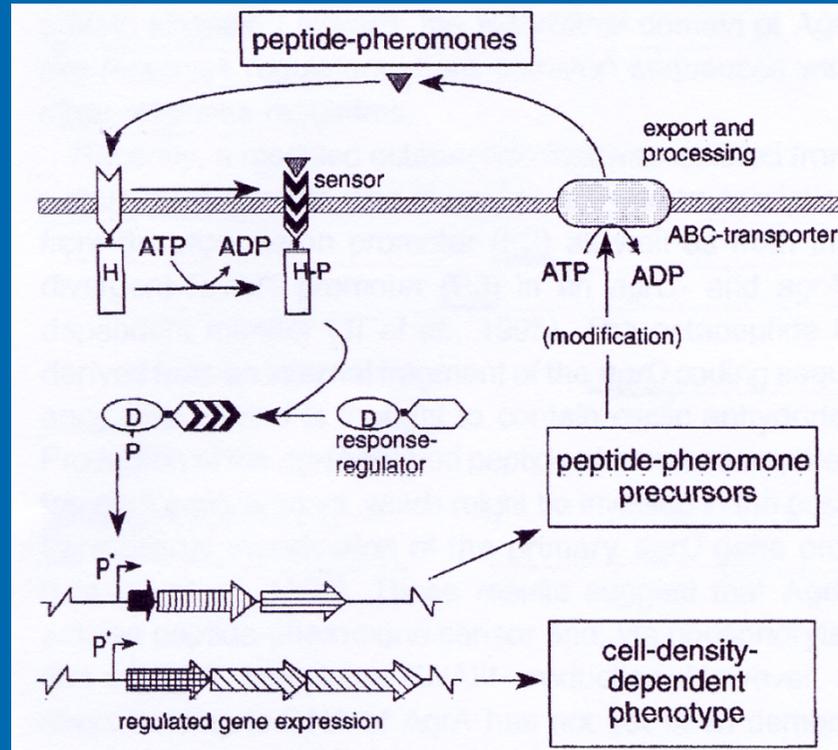
Nei batteri Gram-negativi le proteine **LuxI e LuxR**, inizialmente caratterizzate in *Vibrio fischeri* catalizzano rispettivamente la formazione di uno specifico autoinduttore acil omoserin lattone (AHL) e ne rilevano la presenza quando la concentrazione dell'autoinduttore raggiunge un livello di soglia nel mezzo circostante

**I complessi LuxR-AHL attivano la trascrizione dei geni target** riconoscendo specifici siti di legame sui promotori dei geni regolati dal quorum sensing

Attualmente sono conosciuti più di 70 sistemi quorum sensing di tipo LuxIR nei batteri Gram-negativi.

# Circuiti canonici del quorum sensing:

Tipico circuito a due componenti AIP dei Gram positivi



Nei batteri Gram-positivi le molecole autoinduttrici sono rappresentate da piccoli **oligopeptidi** (in genere lunghi 8 o 9 aminoacidi), chiamati **autoinduttori polipeptidici (AIPs)**.

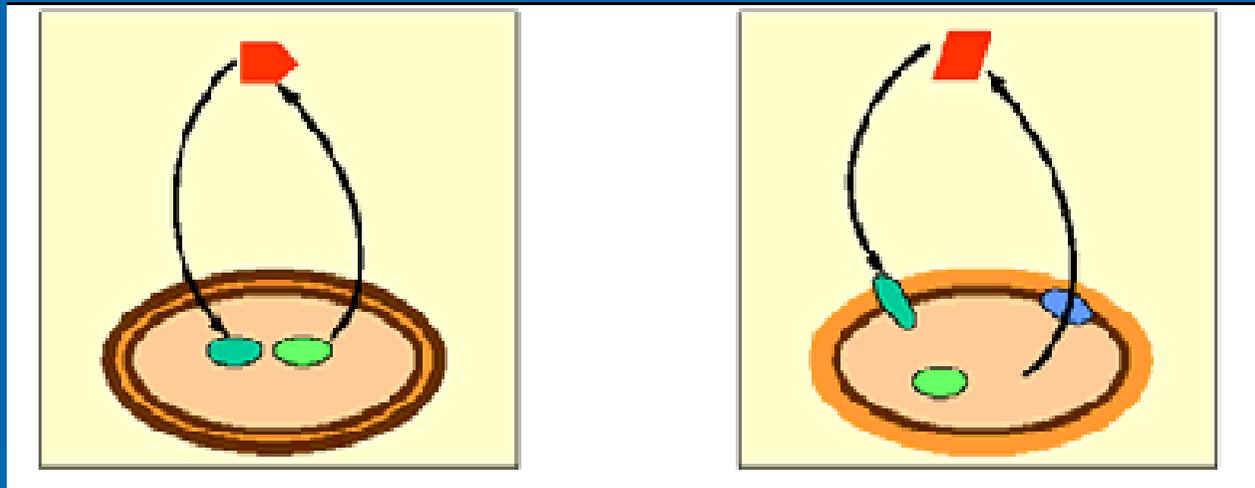
Gli AIPs sono prodotti nel citoplasma come precursori peptidici, successivamente subiscono modificazioni post-traduzionali e infine sono secreti.

Raggiunta una concentrazione soglia, gli AIPs interagiscono con i domini di **specifici recettori di membrana (istidina-chinasi) appartenenti ad un sistema a due componenti**.

***L'interazione dell'AIPs con lo specifico recettore ne stimola l'attività chinastica che fosforila una proteina regolatrice che lega il DNA e induce la trascrizione di alcuni geni***

# Confronto tra processi di QS in Gram - e Gram +

Molecole segnale o “feromoni”



**Feromoni: HSL**  
**Libera diffusione attraverso la membrana**  
**Sistemi a due componenti (entrambi citoplasmatici)**

**Feromoni: peptidi**  
**Secrezione attiva**  
**Sistemi a due componenti:**  
**Un sensore inserito nella membrana**  
**Un regolatore citoplasmatico**



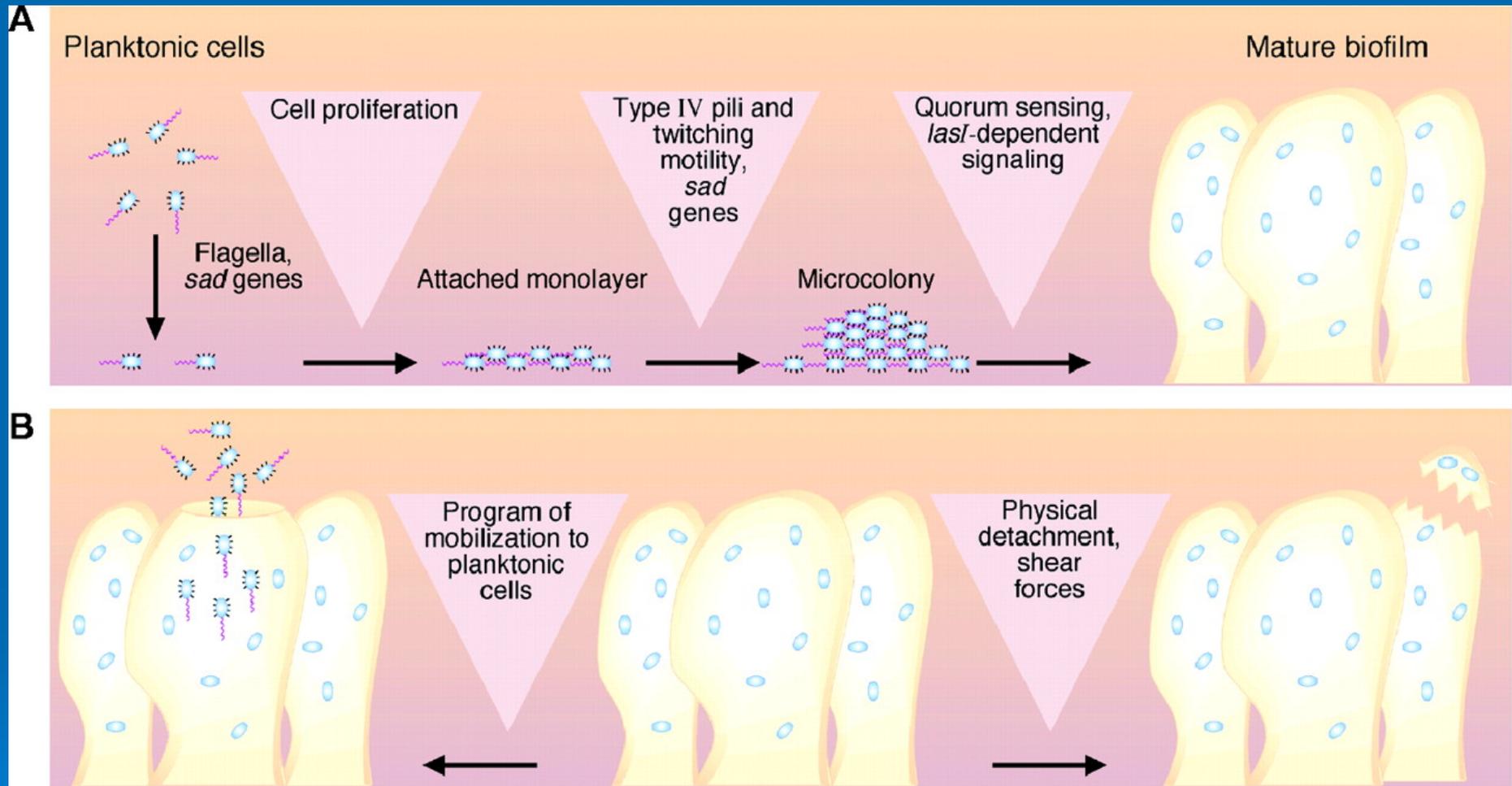
# The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm

David G. Davies, Matthew R. Parsek, James P. Pearson,  
Barbara H. Iglewski, J. W. Costerton, E. P. Greenberg\*

Bacteria in nature often exist as sessile communities called biofilms. These communities develop structures that are morphologically and physiologically differentiated from free-living bacteria. A cell-to-cell signal is involved in the development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. A specific signaling mutant, a *lasI* mutant, forms flat, undifferentiated biofilms that unlike wild-type biofilms are sensitive to the biocide sodium dodecyl sulfate. Mutant biofilms appeared normal when grown in the presence of a synthetic signal molecule. The involvement of an intercellular signal molecule in the development of *P. aeruginosa* biofilms suggests possible targets to control biofilm growth on catheters, in cystic fibrosis, and in other environments where *P. aeruginosa* biofilms are a persistent problem.

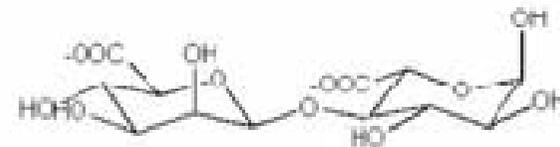
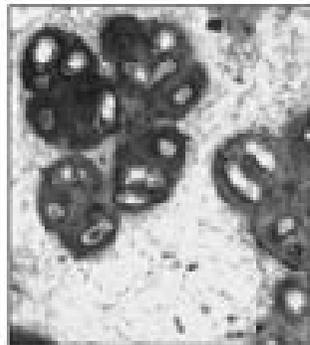
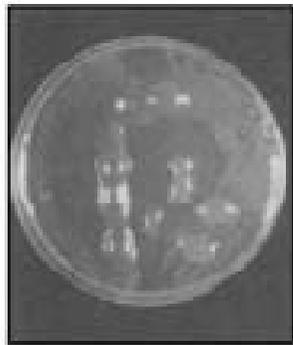
SCIENCE - VOL. 280 - 10 APRIL 1998 – [WWW.sciencemag.org](http://WWW.sciencemag.org)

# A. Sviluppo di un biofilm maturo in *Pseudomonas aeruginosa*

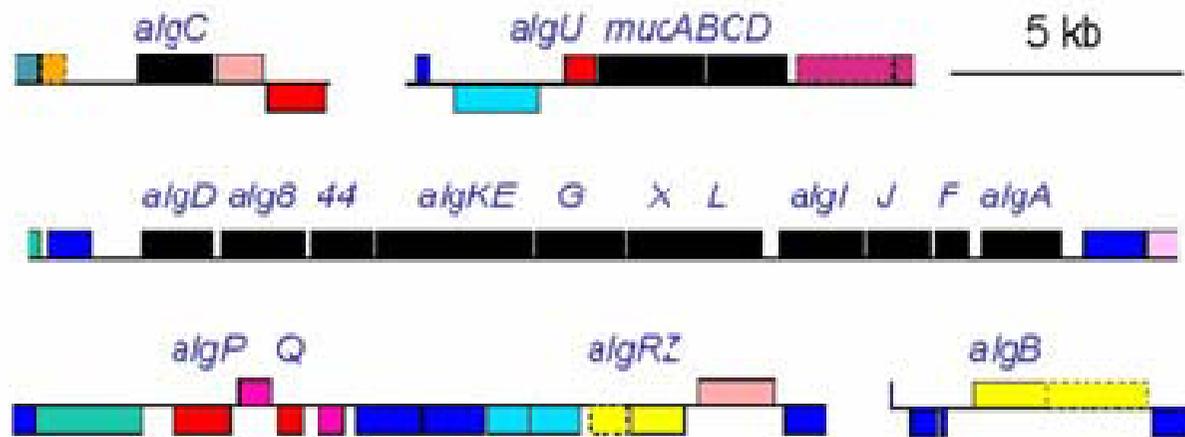


# B. Rilascio di cellule planctoniche dal biofilm

# Il polisaccaride alginato è coinvolto nella formazione della microcolonia in *Pseudomonas*



Acido β-D-mannuronico-α-L-glucuronico



# Cell-to-Cell signaling systems in *P. aeruginosa*

In *P. aeruginosa* la produzione dei biofilm è regolata da un sistema quorum sensing costituito da:

## ( I ) sistema *lasR-lasI* :

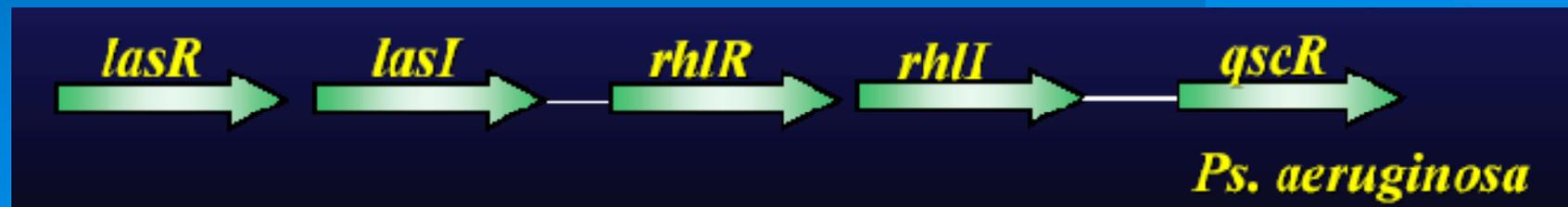
*lasI*: sintetasi dell'autoinduttore *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3OC<sub>12</sub>-HSL),

*lasR*: regolatore trascrizionale che richiede elevati livelli di 3OC<sub>12</sub>-HSL per attivare i geni della virulenza, *lasI* e il secondo sistema;

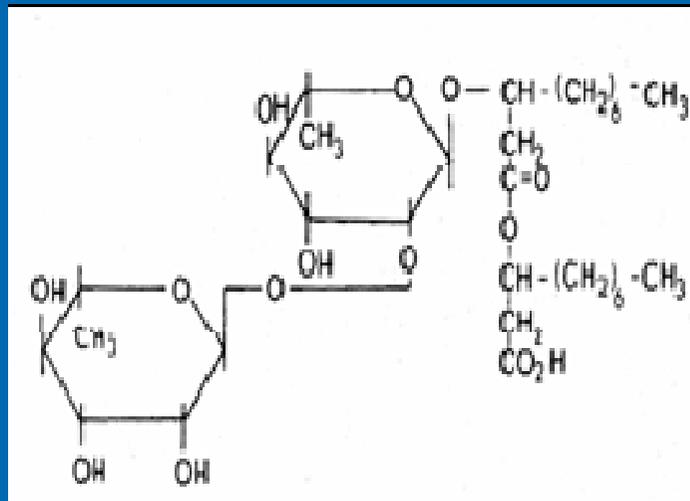
## ( II ) sistema *rhlR-rhlI* :

*rhlI*: sintetasi dell'autoinduttore *N*-butyryl-L-homoserine lactone (BHL),

*rhlR*: regolatore trascrizionale dei geni della virulenza e del fattore sigma di fase stazionaria (RpoS).



## Il cluster *rhIR/rhII* è così chiamato per il suo ruolo nella biosintesi dei rhamnolipidi

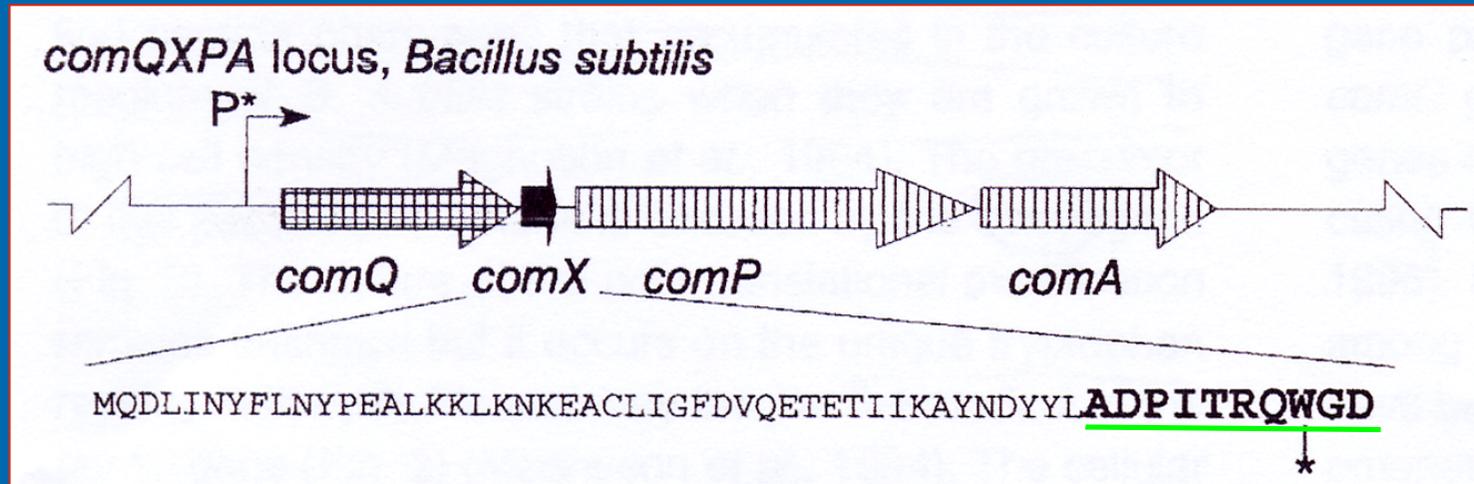


Rhamnolipidi: un esempio di biosurfattanti responsabili della “swarming motility”

# Processi regolati dal quorum sensing nei batteri Gram-positivi

- ➔ Sviluppo della competenza genetica in *Bacillus subtilis* e *Streptococcus pneumoniae*
- ➔ Espressione della virulenza in *Staphylococcus aureus*
- ➔ Produzione di peptidi antimicrobici (AMPs) da parte di diverse specie di batteri Gram-positivi

# Sviluppo della competenza in *B. subtilis*: locus *com*



*comP* = sensor

*comA* = respons regulator

*Two-component regulatory systems*

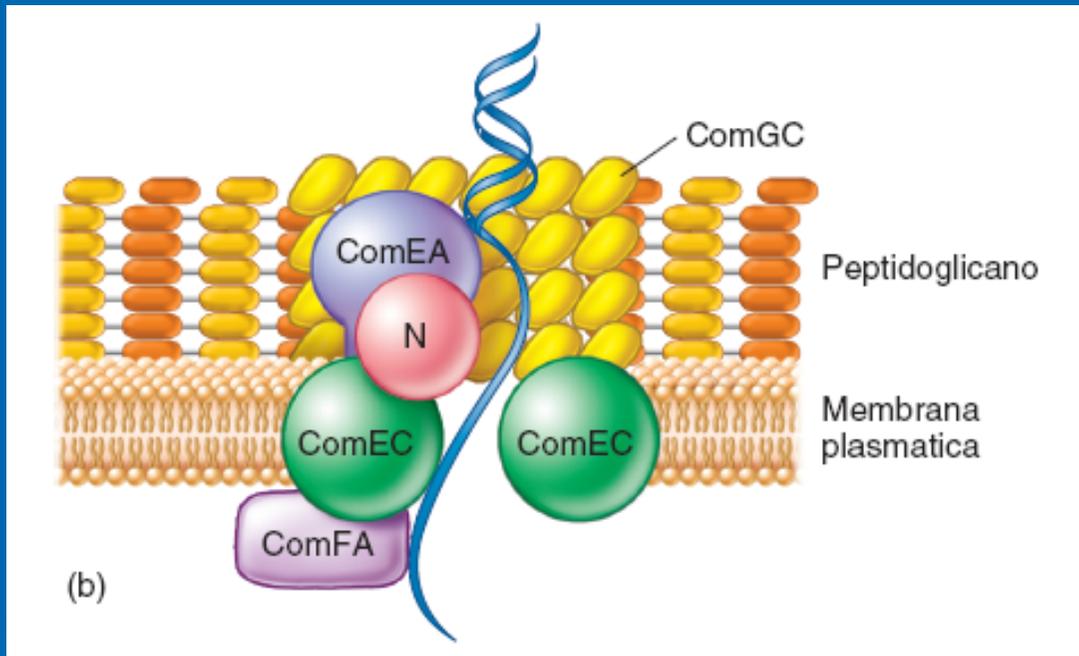
*comQ* = codifica una proteina coinvolta nella modificazione post-traduzionale del feromone peptidico

*comX* = precursore del feromone

Aumento della densità cellulare → Accumulo di feromone →

Attivazione trascrizionale di ComS → Blocca l'inibizione di ComK  
(*competence transcription factor*)

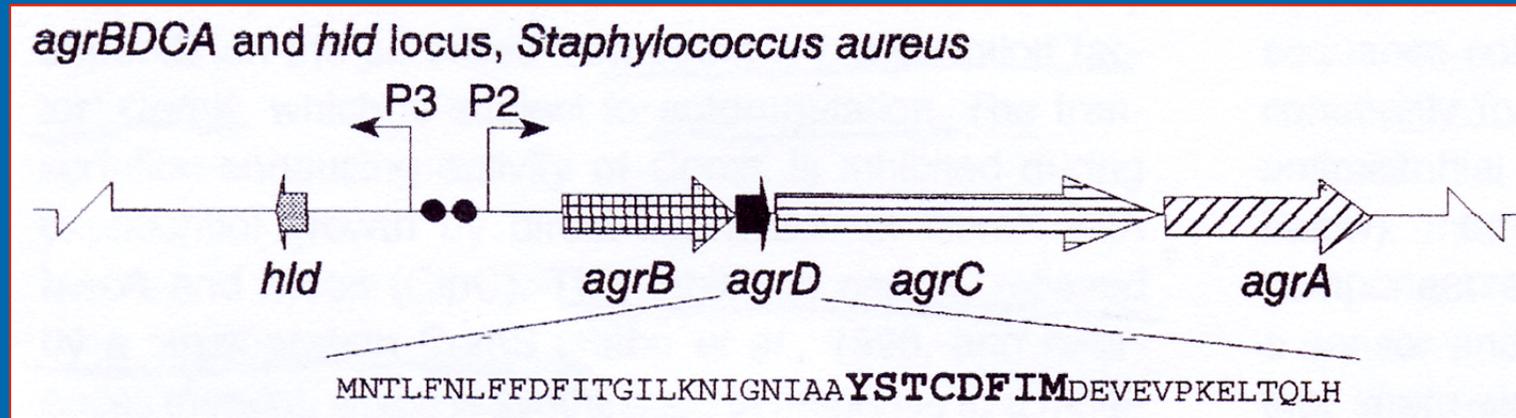
# Sviluppo della competenza in *B. subtilis*: sistema di captazione del DNA



Com GC: complesso pilinico  
ComEA: proteina di legame del DNA  
N: nucleasi  
ComEC: proteina canale  
ComFA: DNA traslocasi

*comK* is a positive autoregulatory gene occupying a central position in the competence-signal-transduction network. All regulatory routes identified in this network converge at the level of *comK* expression. The ComK protein is required for the transcriptional induction of *comK* and the late competence genes, which specify morphogenetic and structural proteins necessary for construction of the DNA-binding and uptake apparatus.

# Sviluppo della virulenza in *S. aureus*: locus *agr* (*accessory gene regulator*)



*agrC* = sensor

*agrA* = respons regulator

} *Two-component regulatory systems*

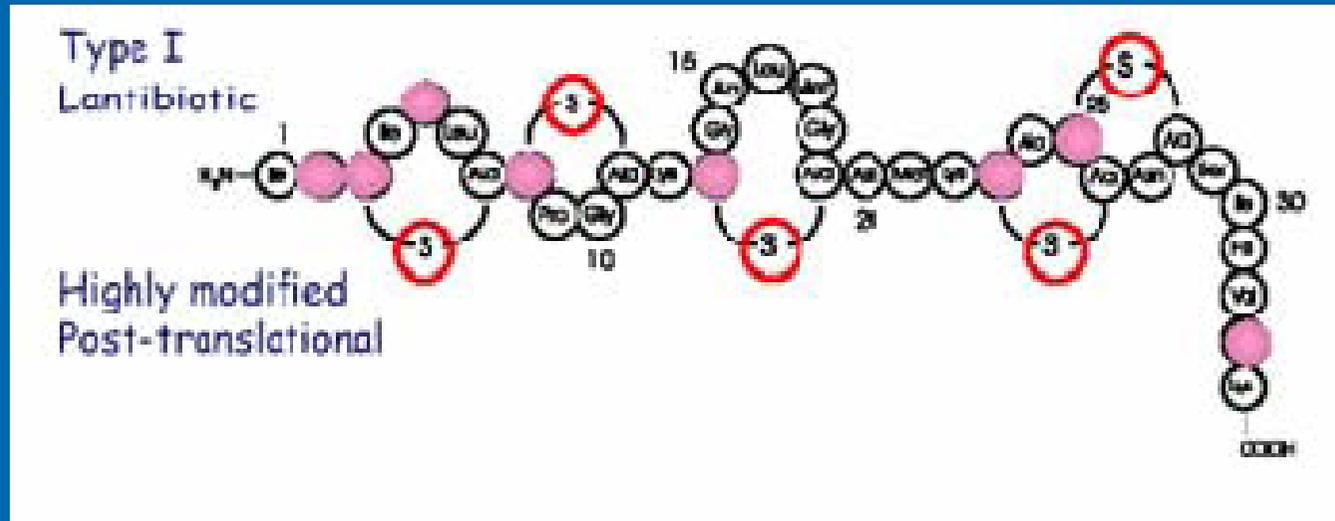
*agrB* = ? Codifica un'ipotetica proteina coinvolta nella  
modificazione post-traduzionale del prodotto di *agrD*

*agrD* = precursore dell'octapeptide

*hld* = RNAlII,  $\delta$ -lisina che regola l'espressione della virulenza



# Un peptide antimicrobico “utile”: la nisina

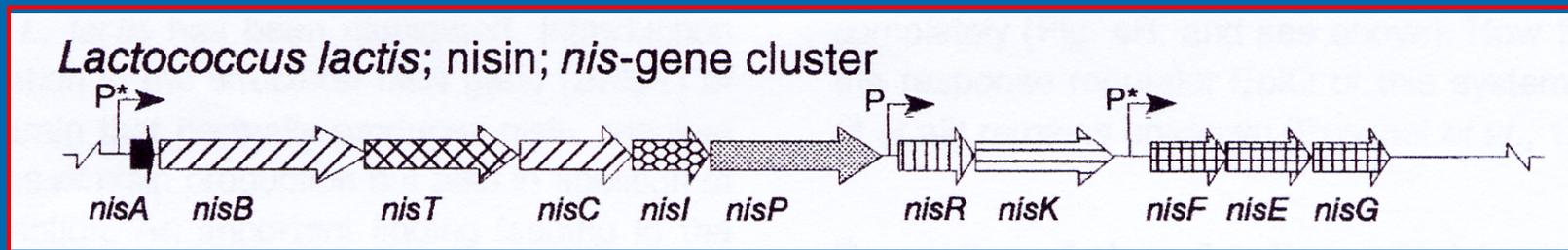


Dha: residuo di deidroalanina; Dhb: residuo di deidrobutilirina; Abu: residuo di deidrobutilirina che ha formato un ponte tioestere con un residuo di cisteina.

È un lantibiotico che contiene aminoacidi come la deidrobutilirina, deidroalanina, lantionina e beta-metil-lantionina; è ampiamente utilizzato nell'industria alimentare (Delves-Broughton et al., 1996) e possiede, dal 1969, la qualifica di composto GRAS, attribuita dall'American Food and Drug Administration.

- **Prodotta da lactobacilli; espressione richiede alta densità cellulare(QS) unitamente a fase stazionaria di crescita.**
- **Ampio spettro d'azione contro Gram + (a concentrazioni nM)**
- **Prodotta spontaneamente (o aggiunta) nella preparazione dei formaggi**

# Biosintesi e regolazione della nisina (AMPs) in *Lactococcus lactis*: Lantibiotic gene cluster



$P$  = promotore non regolato

$P^*$  = promotore regolato

*nisA* = precursore (57 aa)

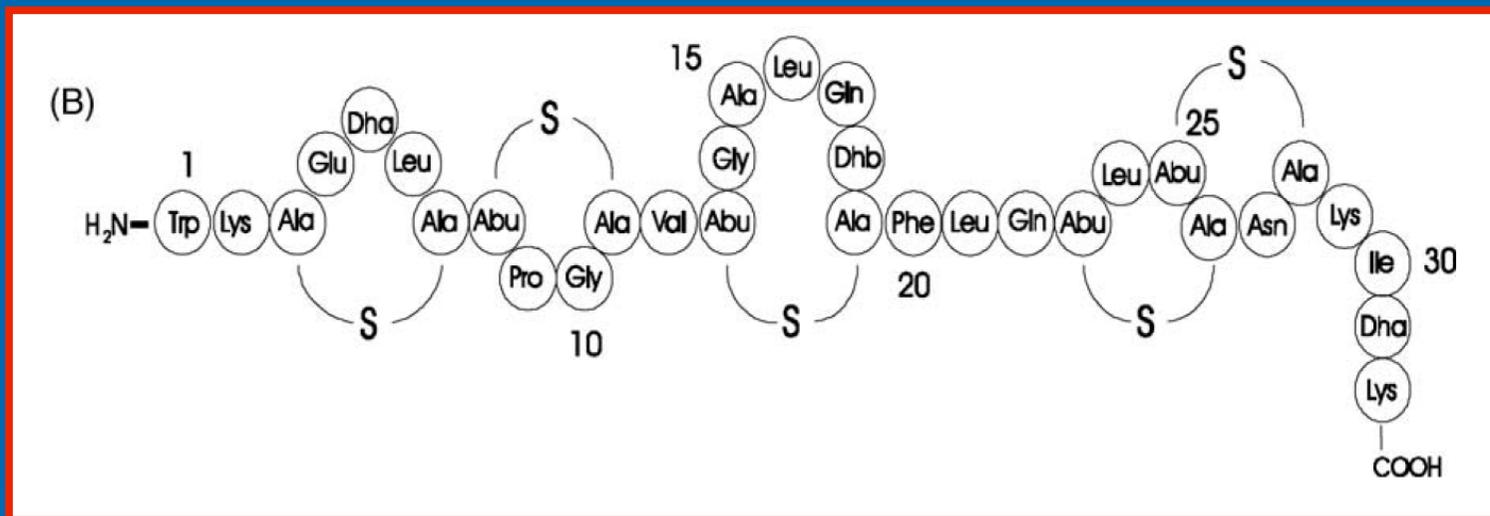
*nisK* = sensor

*nisR* = response regulator

} *Two-component regulatory systems*

*nis*.... = modificazione del precursore; trasporto; immunità.

# Struttura del peptide antimicrobico di *Bacillus subtilis*: la subtilina



Dha: residuo di deidroalanina;

Dhb: residuo di deidrobutilirina;

Abu: residuo di deidrobutilirina che ha formato un ponte tioestere con un residuo di cisteina.

# Organizzazione del cluster genico per la sintesi della subtilina

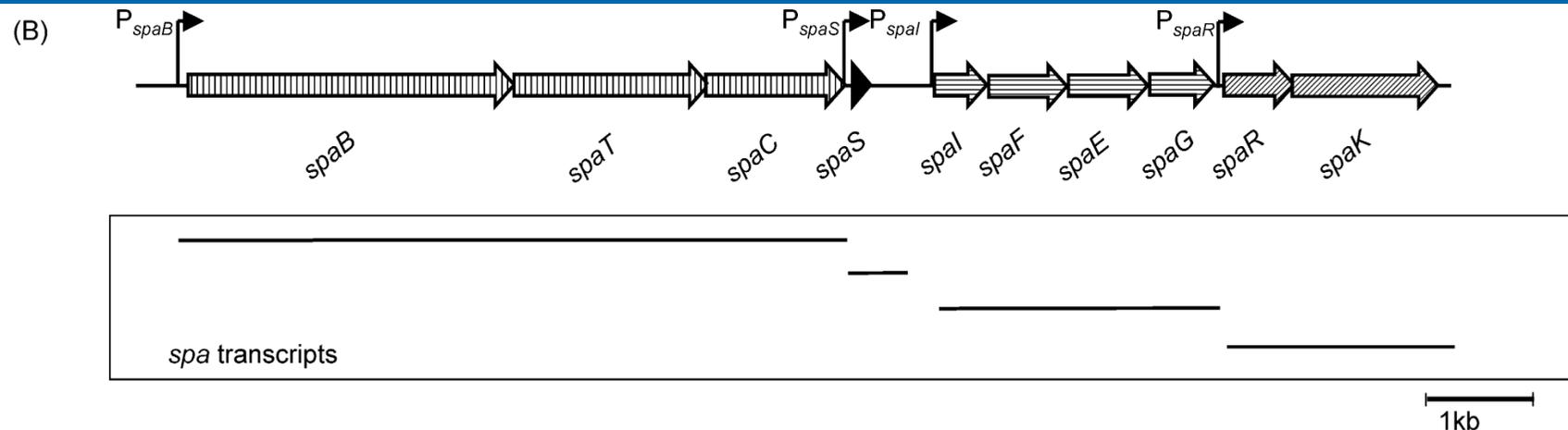


Fig. 2. Organization of nisin (A) and subtilin (B) biosynthetic gene clusters. The structural lantibiotic genes (filled black), the genes encoding proteins involved in precursor maturation and transport (vertical hatching), processing (backward tilted hatching; only present in the nisin gene cluster), producer immunity (horizontal hatching), and regulation (forward tilted hatching) are indicated. The positions of the promoters that have been identified within the nisin and subtilin gene clusters are indicated and in the transcripts derived from these promoters are indicated in the boxes below the gene representation. The organization of the gene clusters and individual functions of the gene products have recently been reviewed [34,59].

... promoter [55] (Fig. 2A). The subtilin structural gene, *spaS*, is transcribed as a monocistronic mRNA and has its own promoter ( $P_{spaS}$ ), while the subtilin biosynthetic machinery (*spaBCT*), the immunity genes (*spaIFEG*), and the regulatory components (*spaRK*) are all transcribed as individual, polycistronic mRNAs that depend on promoters upstream of *spaB* ( $P_{spaB}$ ), *spaI* ( $P_{spaI}$ ) and *spaR* ( $P_{spaR}$ ), respectively (Fig. 2B)