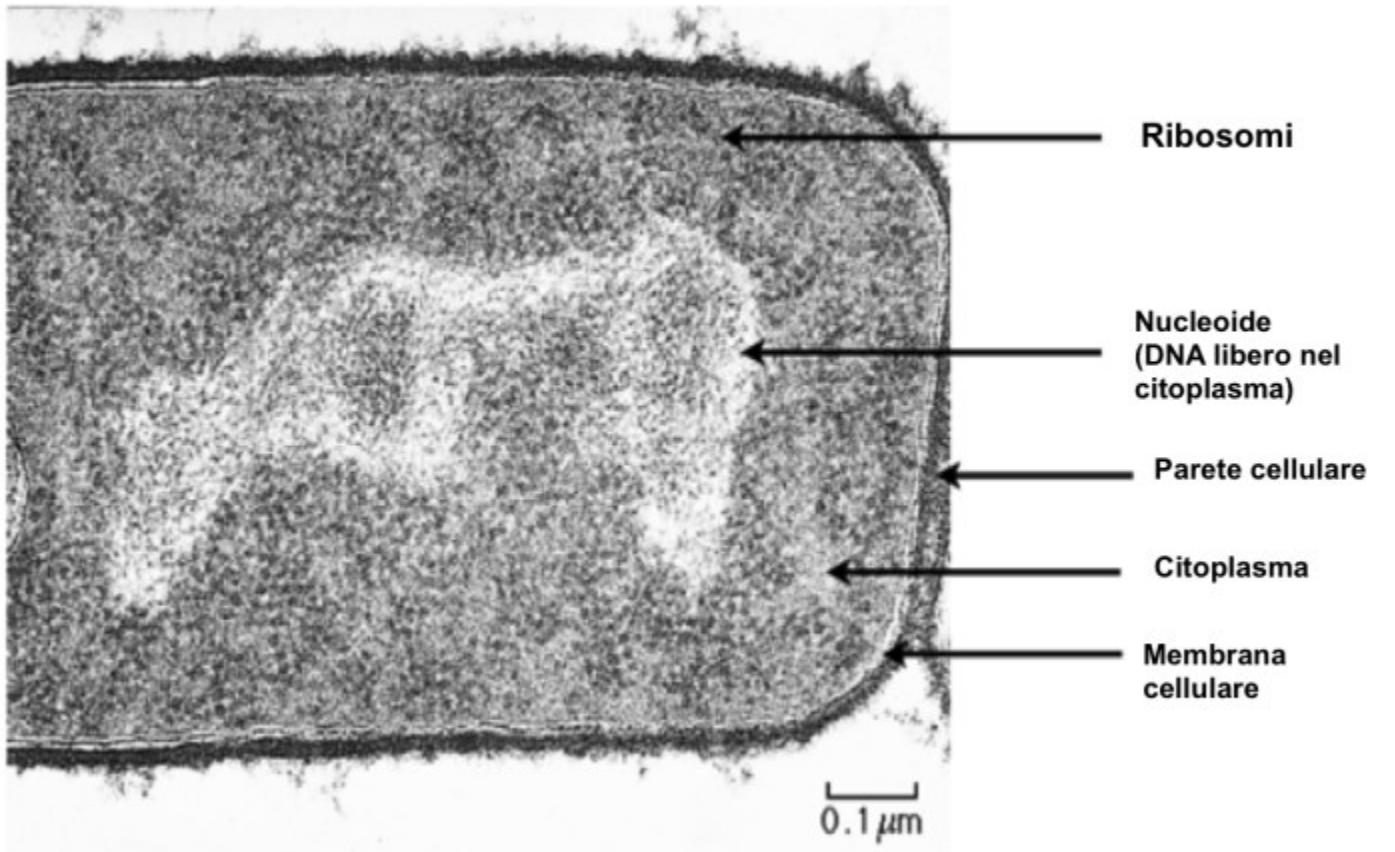


Funzione della membrana cellulare e sistemi di trasporto nelle cellule batteriche



Funzione della membrana cellulare

- È una barriera al passaggio di molecole polari e consente alla cellula di mantenere elevate concentrazioni di soluti nel citoplasma;
- È sede dei processi di trasporto delle molecole e di secrezione ed esporto;
- È coinvolta nei processi di crescita e divisione cellulare ed è la sede del complesso enzimatico per la replicazione del cromosoma batterico con la ripartizione delle due molecole di DNA alle cellule figlie;
- È sede dei processi di formazione e mantenimento dell'energia, come la catena di trasporto degli elettroni, la fotosintesi e il mantenimento della forza proton-motrice;
- È sede della sintesi del peptidoglicano (fasi finali);
- È sede della regolazione del flusso di acqua (in batteri alofili);
- È sede della comunicazione con altre cellule batteriche vicine;

Funzione della membrana cellulare

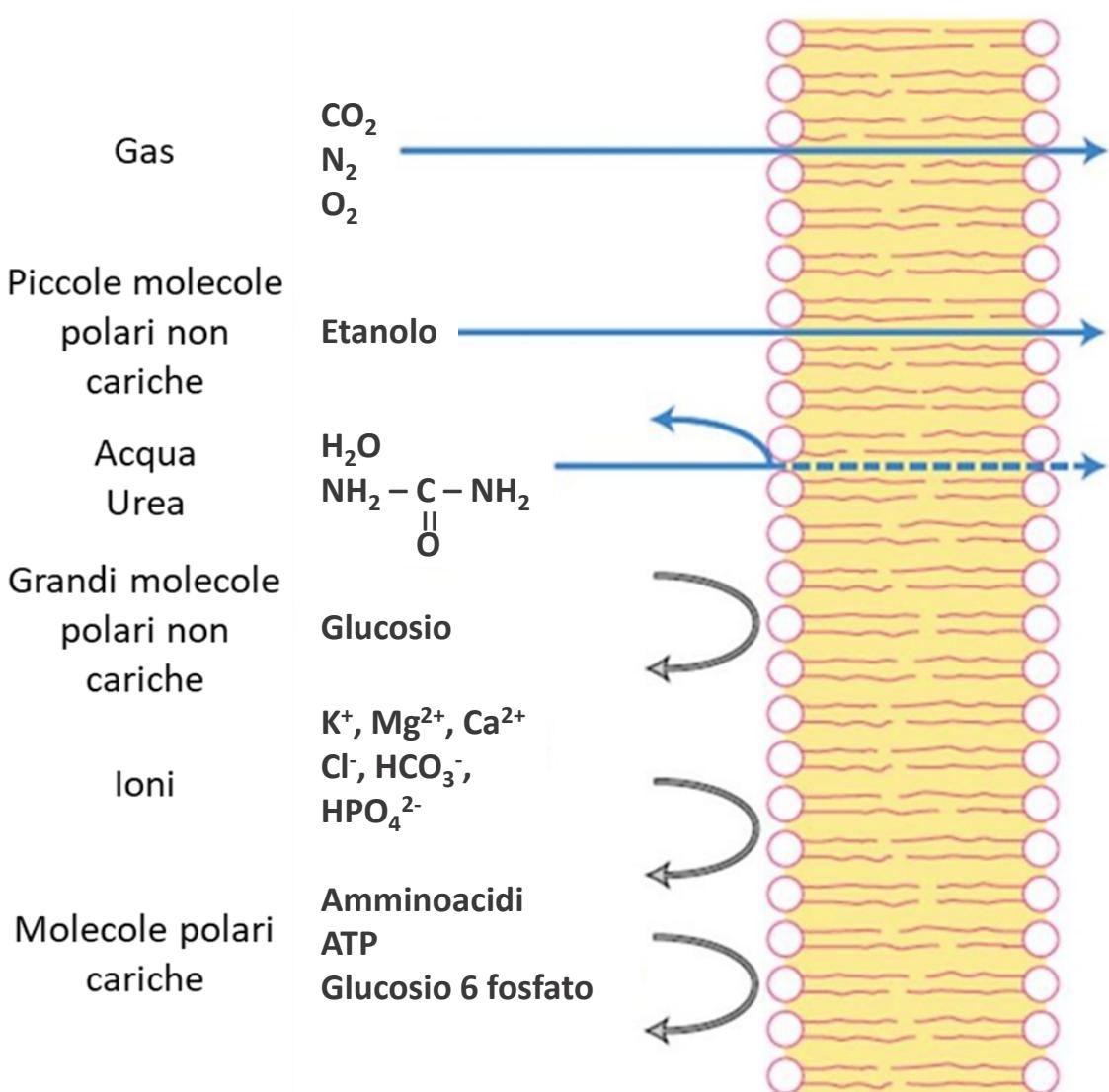
Le cellule batteriche possiedono proteine specifiche che facilitano il passaggio di sostanze attraverso il doppio strato lipidico della membrana. Queste proteine condividono alcune caratteristiche comuni:

Specificità: consentono il passaggio di molecole singole o di molecole con caratteristiche chimiche simili;

Struttura: sono spesso costituite da segmenti ad α -elica che attraversano la membrana, formando canali o trasportatori funzionali.

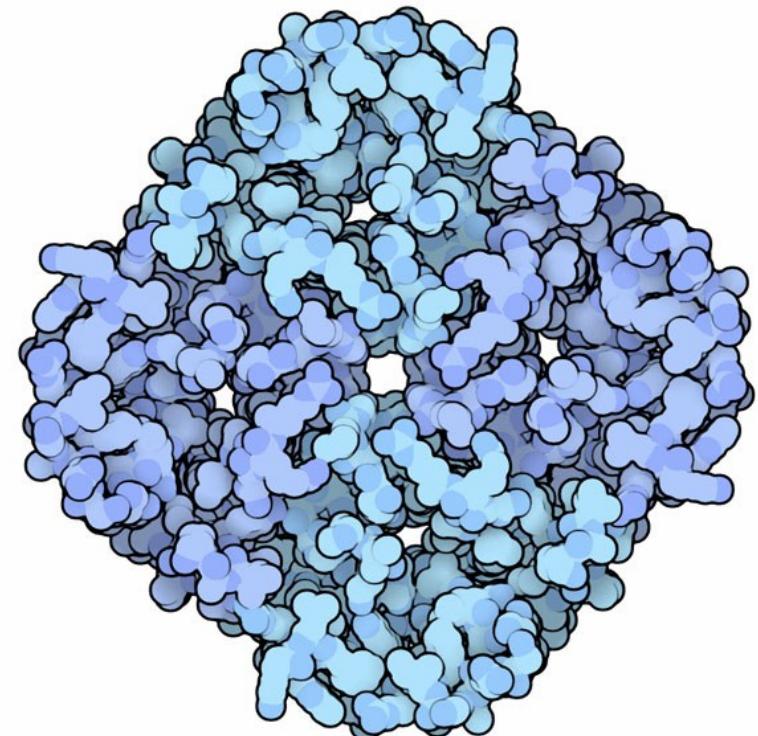
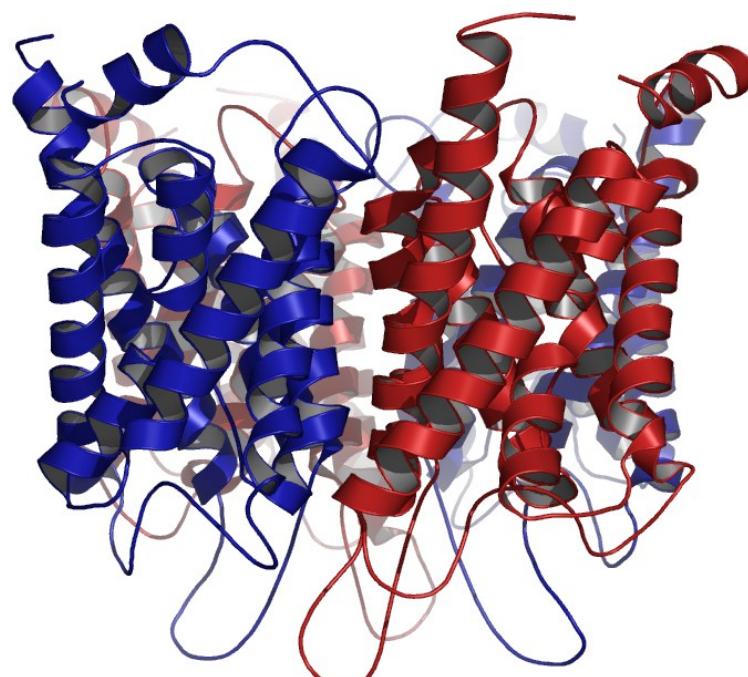
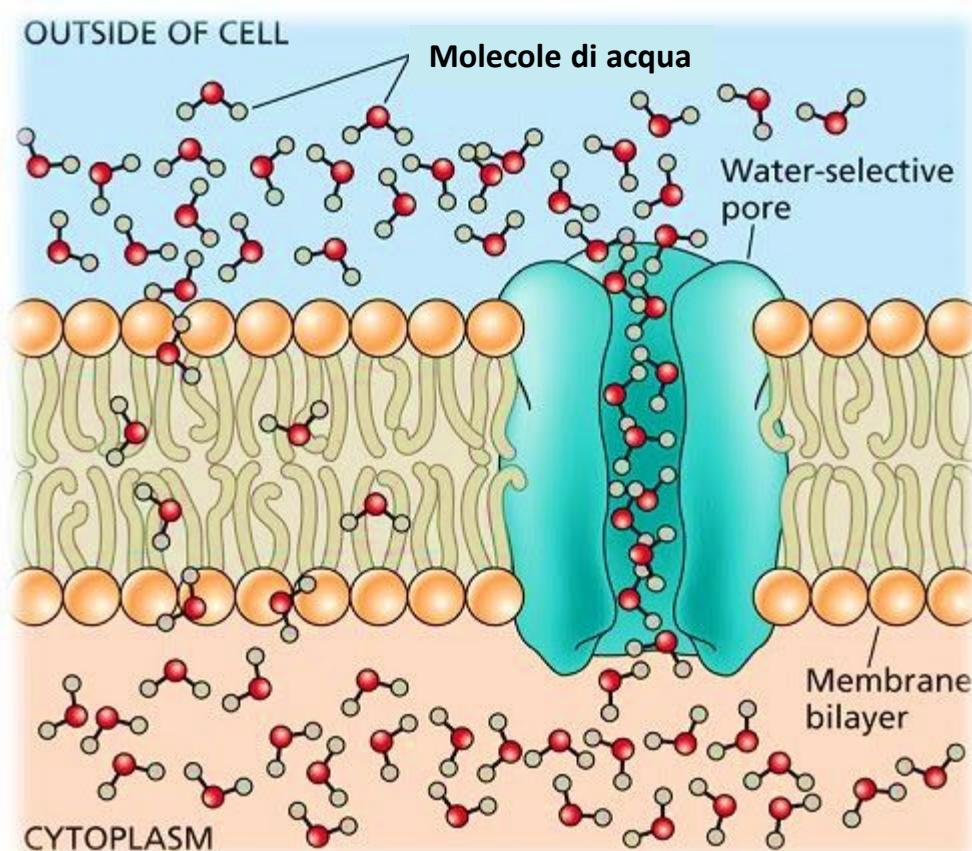
Il trasporto può essere:

- **Passivo o diffusione facilitata:** specifiche molecole attraversano la membrana secondo gradiente di concentrazione, senza consumo energetico da parte della cellula
- **Attivo:** specifici soluti sono trasportati contro gradiente di concentrazione, da bassa ad alta concentrazione, con consumo energetico da parte della cellula



Trasporto passivo:

Le acquaporine sono proteine di membrana che formano canali che consentono un rapido passaggio delle molecole di acqua attraverso la membrana. Presentano una struttura composta da più alfa eliche localizzate nel doppio strato lipidico. Questa struttura permette unicamente il passaggio selettivo delle molecole di acqua.



Trasporto attivo:

Può essere diviso in:

- **Trasporto attivo primario**, dove l'energia per il **trasporto contro gradiente** è fornita dall'idrolisi dell'ATP
- **Trasporto attivo secondario**, nel quale l'energia libera del gradiente elettrochimico di membrana è impiegata per trasportare un soluto attraverso la membrana **contro gradiente** di concentrazione
- **Traslocazione di gruppo**, che si basa sul trasferimento di un gruppo fosforico

Trasporto attivo primario:

Trasportatori di cassette leganti l'ATP
(*ATP binding cassette o ABC*)

Presente nei batteri, negli archaea e negli eucarioti.

Sono costituiti da:

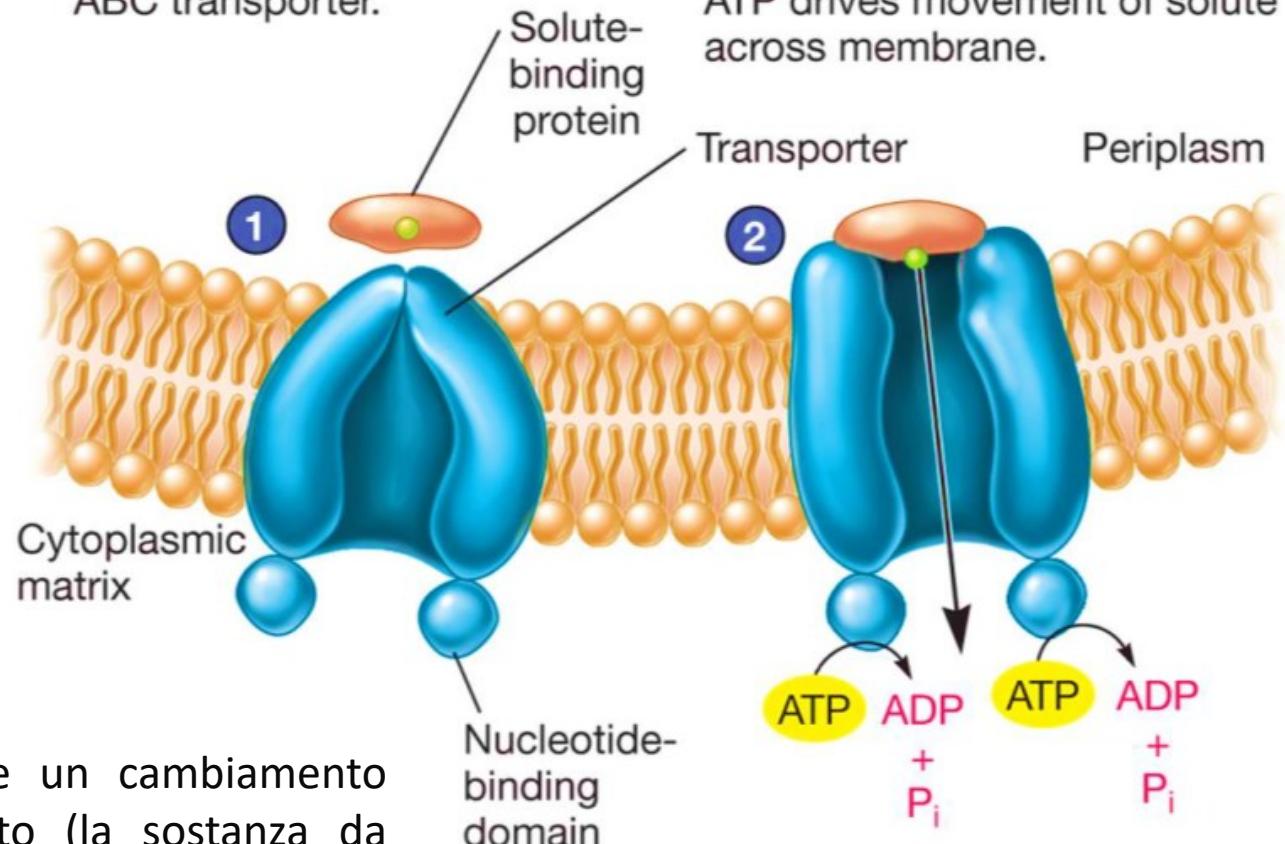
- 2 domini idrofobici di transmembrane
- 2 domini citoplasmatici che legano l'ATP chiamati nucleotide binding fold (NBF)

Funzione: il legame dell'ATP ai domini NBF induce un cambiamento conformazionale nella proteina, che sposta il soluto (la sostanza da trasportare) da un lato della membrana all'altro.

l'ATP viene idrolizzato a ADP e fosfato inorganico, e il trasportatore ritorna alla sua conformazione iniziale.

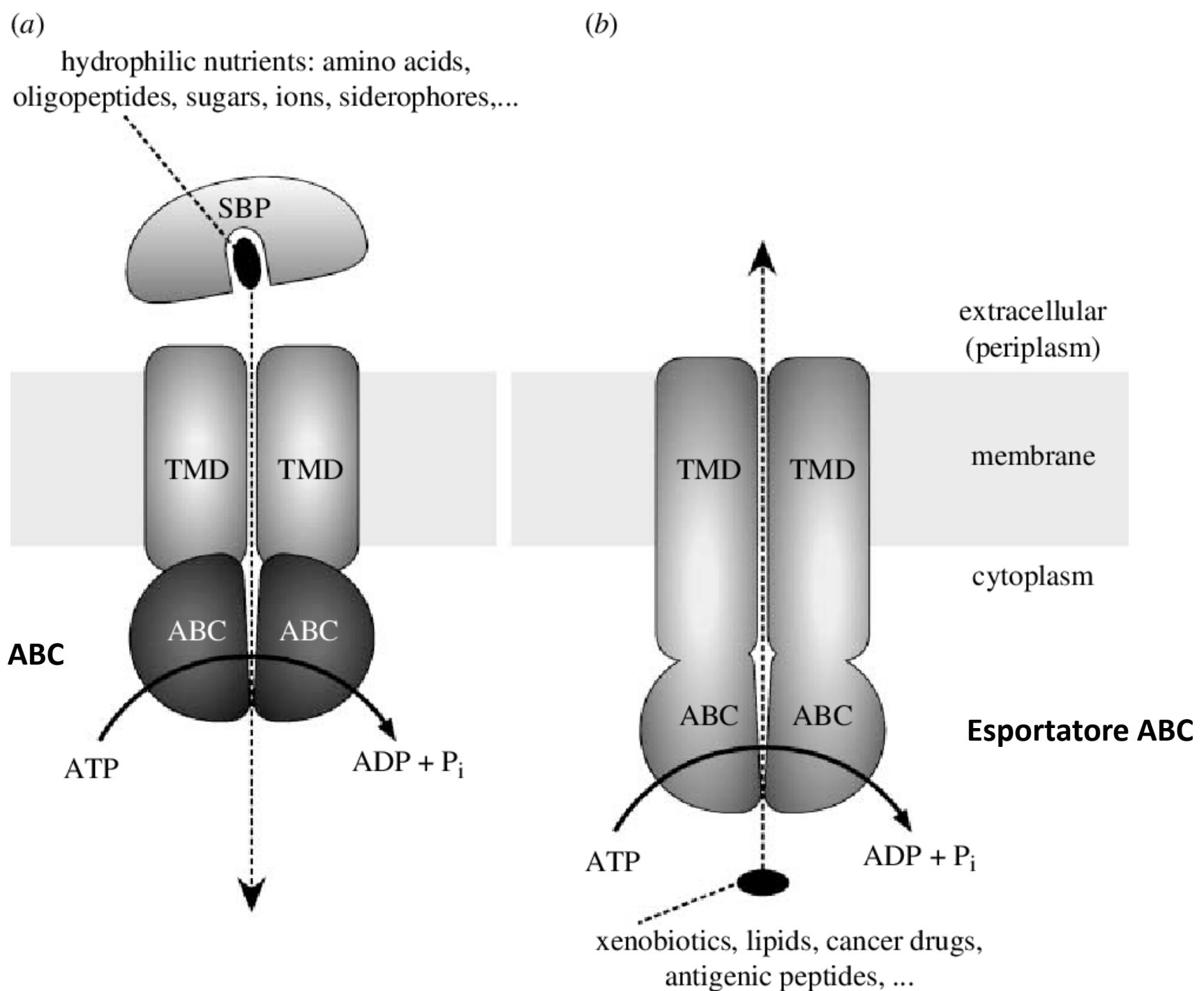
Trasportano una vasta gamma di molecole, inclusi aminoacidi, zuccheri, lipidi e ioni.

- 1 After binding solute, the solute-binding protein approaches ABC transporter.
- 2 Solute-binding protein attaches to transporter and releases solute.. Energy released by hydrolysis of ATP drives movement of solute across membrane.



Proteina legante il substrato (SBP):

Molti sistemi ABC, soprattutto nei batteri, necessitano di una proteina esterna per legare il substrato e trasportarlo ai domini di transmembrana (TMD).



Sistemi ABC in Batteri lattici

Batteri lattici come *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, possiedono numerosi sistemi ABC, per l'importazione di zuccheri.

Sebbene molti LAB usino la traslocazione di gruppo (PTS), molti zuccheri vengono importati anche tramite sistemi ABC, soprattutto nelle specie prive o povere di PTS (es. *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*).

L'importazione di peptidi avviene con l'impiego di alcuni trasportatori:

- Opp (Oligopeptide transporter)
- Dpp (Dipeptide transporter)

Questi sistemi ABC sono cruciali per la nutrizione azotata in ambienti poveri di aminoacidi. Possono trasportare anche aminoacidi liberi come la glutammina, il glutammato, l'arginina), altri trasportatori ABC sono specifici per NH_4^+ .

Sistemi ABC in Batteri acetici

Batteri acetici *Acetobacter*, *Gluconobacter* possiedono numerosi sistemi ABC, soprattutto perché molti nutrienti non vengono importati via PTS.

Per importare zuccheri e alcoli usano permeasi e trasportatori ABC.

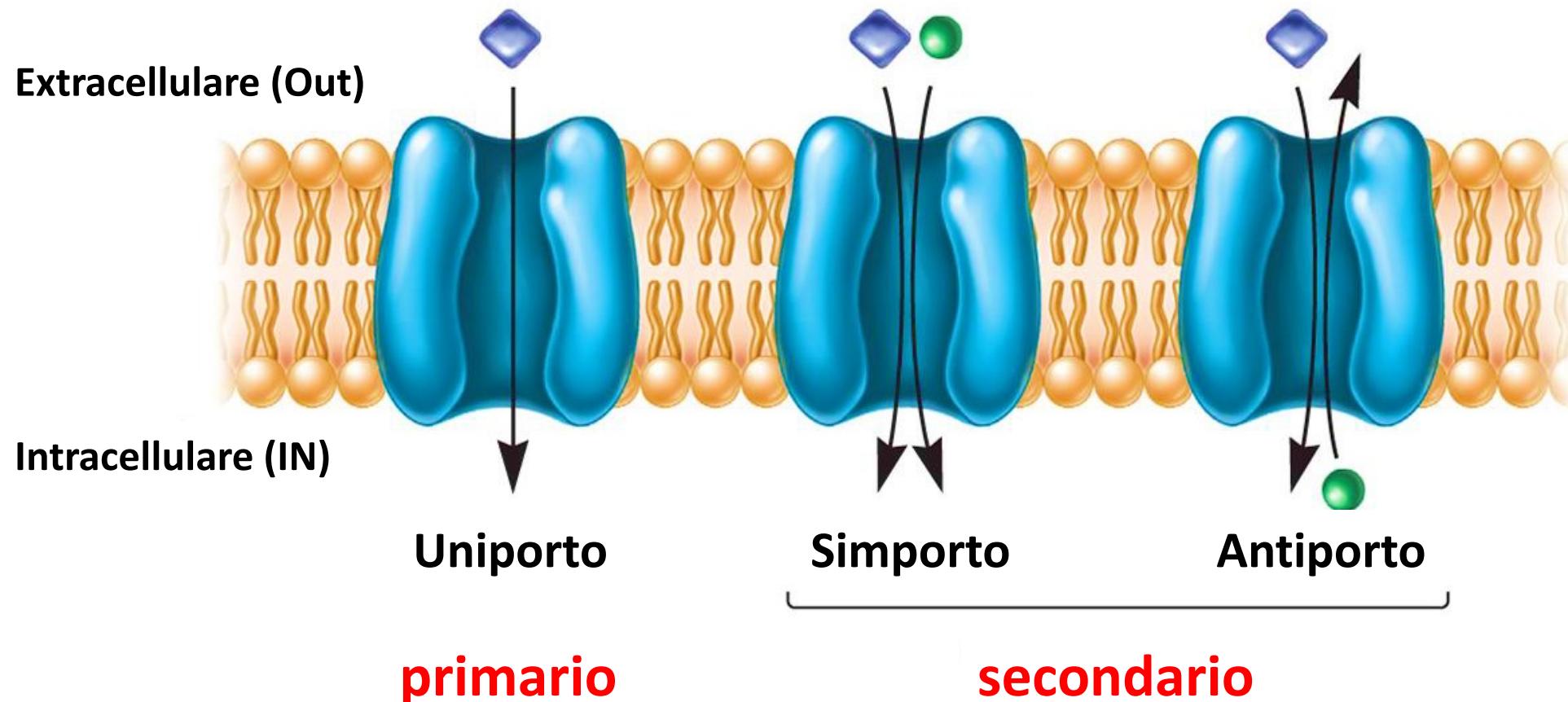
Per la resistenza allo stress:

Gli AAB vivono in ambienti con alte concentrazioni di acido acetico e alcol, quindi usano ABC per:

- espellere molecole tossiche
- pompate fuori acidi organici
- mantenere l'integrità cellulare

Nei **LAB**, l'uniporto è meno comune rispetto a sistemi come simporto (co-trasporto con H^+) o antiporto (scambio ioni), perché la maggior parte dei nutrienti (zuccheri, aminoacidi) entra tramite PTS o guidato dal gradiente protonico. L'uniporto serve soprattutto per piccole molecole neutrali o liposolubili. Alcune molecole piccole come il glicerolo o l'ossigeno possono attraversare la membrana tramite trasporto facilitato, spesso tramite acquaporine.

Negli **AAB**, che sono Gram-negativi, l'uniporto è più comune per piccole molecole che devono attraversare la membrana citoplasmatica, come l'ossigeno (importante per ossidazioni periplasmatiche) e piccoli nutrienti neutri. Per alcuni zuccheri e acidi organici, i sistemi preferenziali sono antiporto, simporto o trasporto periplasmatico.



Sistemi simporto/antiporto in Batteri lattici

Simporto:

I batteri lattici utilizzano numerosi simporti protonici (H^+) per importare nutrienti come:

- Il sistema LacS è un simporto che importa lattosio/ H^+ (in *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*)
- Le permeasi degli zuccheri della famiglia MFS importano glucosio/ H^+ , mannosio/ H^+ , galattosio/ H^+
- L' amino acid symporters è un simporto H^+ /aminoacidi (es. glutamato, istidina)

La funzione è di importare zuccheri in assenza di PTS, sfruttando il gradiente protonico come fonte energetica, inoltre serve a equilibrare pH interno/esterno.

Antiporto:

I batteri lattici hanno antiporti fondamentali per la regolazione del pH:

- L'antiporto lattosio/galattosio (LacS in modalità antiporto)
- L'antiporto Na^+/H^+ (Espelle Na^+ , importa H^+)
- L'antiporti amminoacido/protone (es. Glu^-/H^+)
- L'antiporto $Cl^-/lattato^-$ in alcuni lattobacilli

La funzione è mantenere il pH citoplasmatico stabile anche in presenza di un ambiente esterno molto acido, regolare l'osmolarità ed eliminare prodotti metabolici, come lo ione lattato $^-$.

Sistemi simporto/antiporto in Batteri acetici

Simporto:

I batteri dell'acido acetico hanno

- Simporto H^+ /zuccheri (meno frequente perché molte ossidazioni sono periplasmatiche)
- Simporto H^+ /aminoacidi
- Simporto H^+ /acidi organici (in alcune specie)

La funzione è di acquisire nutrienti minimizzando l'ingresso di protoni (visto l'ambiente acido).

Antiporto:

I batteri dell'acido acetico hanno fortissimi sistemi antiporto per resistere a livelli di pH 1,5–3.

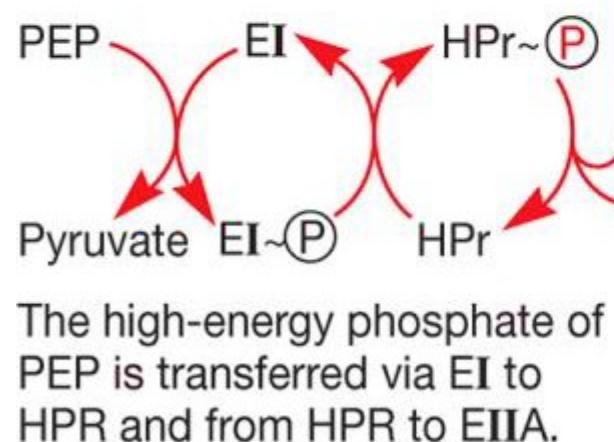
- Antiporto Na^+/H^+
- Antiporto K^+/H^+
- Antiporto acetato $^-/\text{H}^+$ o acido acetico/acetato
- Antiporto ossidativo guidato dal gradiente protonico e associato alle deidrogenasi periplasmatiche

La funzione è di ridurre l'accumulo di protoni nel citoplasma, sopravvivere in presenza di elevate concentrazioni di acido acetico e mantenere un gradiente protonico gestibile.

Traslocazione di gruppo (PTS)

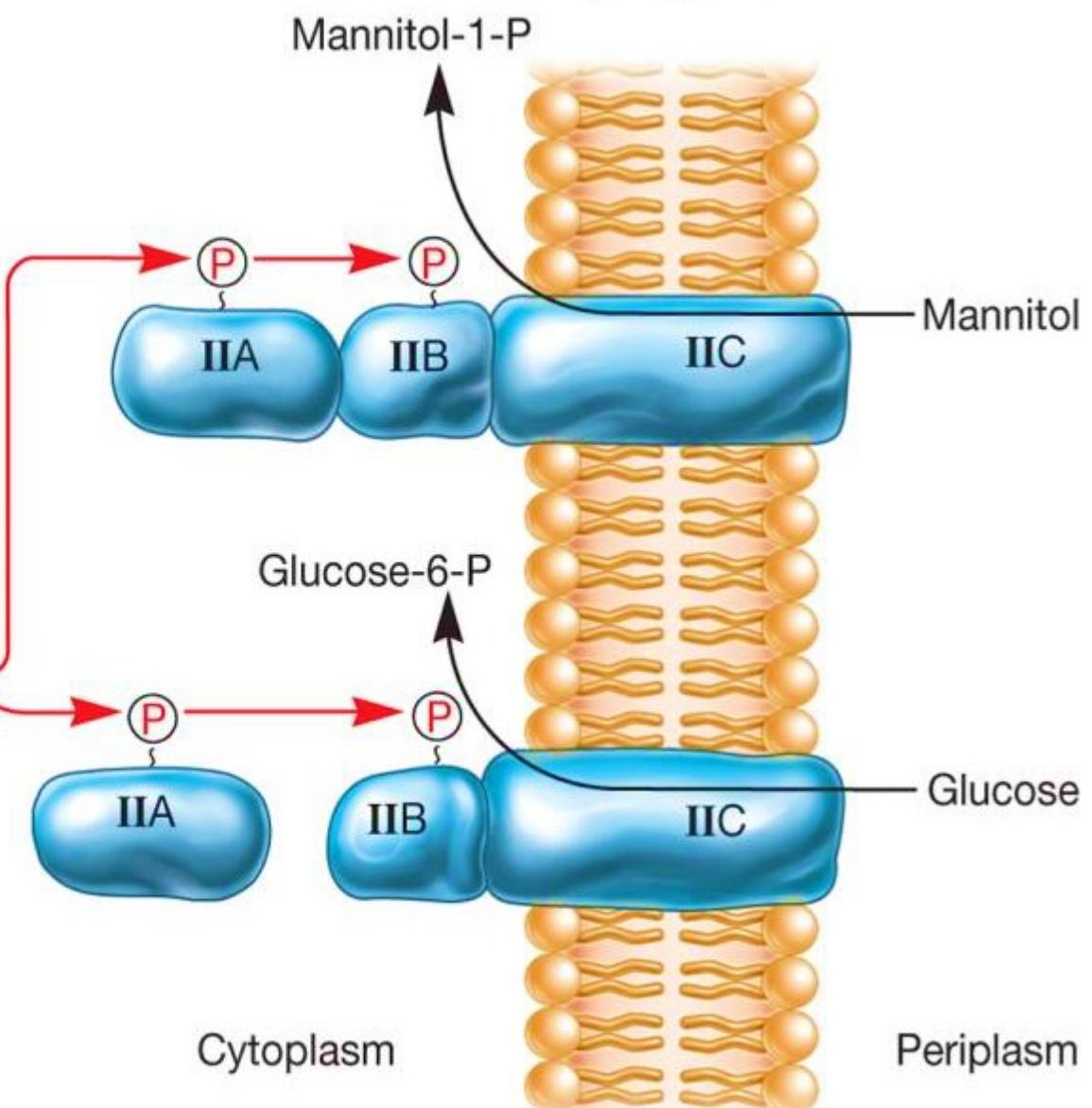
Trasporto dipendente dall'energia che modifica chimicamente la molecola quando viene portata nella cellula.

Il sistema di traslocazione più conosciuto è il fosfoenolpiruvato (PEP): sistema della fosfotransferasi dello zucchero (PTS).

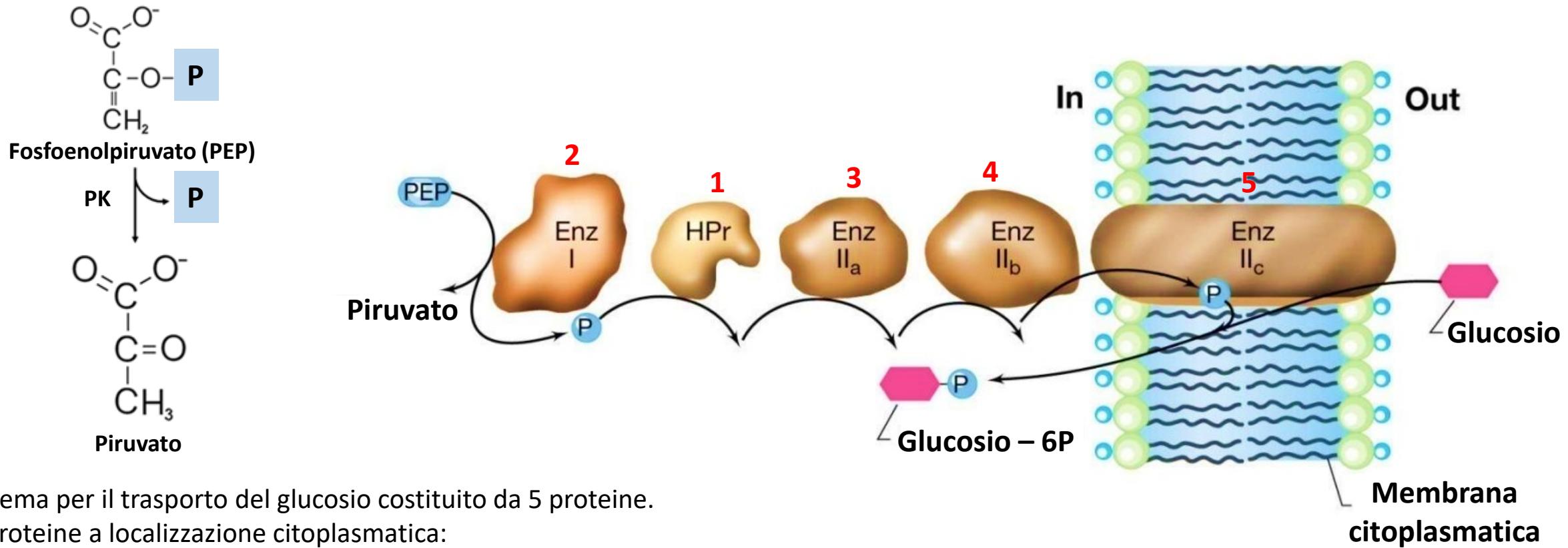


The high-energy phosphate of PEP is transferred via EI to HPr and from HPr to EI~P.

Phosphate is then transferred to incoming sugar via EIIB.



Il sistema più comune nei batteri di traslocazione di gruppo è il PEP-PTS (sistema delle fosfotransferasi) che non impiega ATP ma trasferisce il gruppo fosforico del PEP allo zucchero ottenendo il primo intermedio della via glicolitica.



Il sistema per il trasporto del glucosio costituito da 5 proteine.

Tre proteine a localizzazione citoplasmatica:

1. la proteina fosfocarrier HPr
2. l' Enzima I che fosforila HPr
3. l'Enzima II_a

Una proteina associata alla superficie interna della membrana:

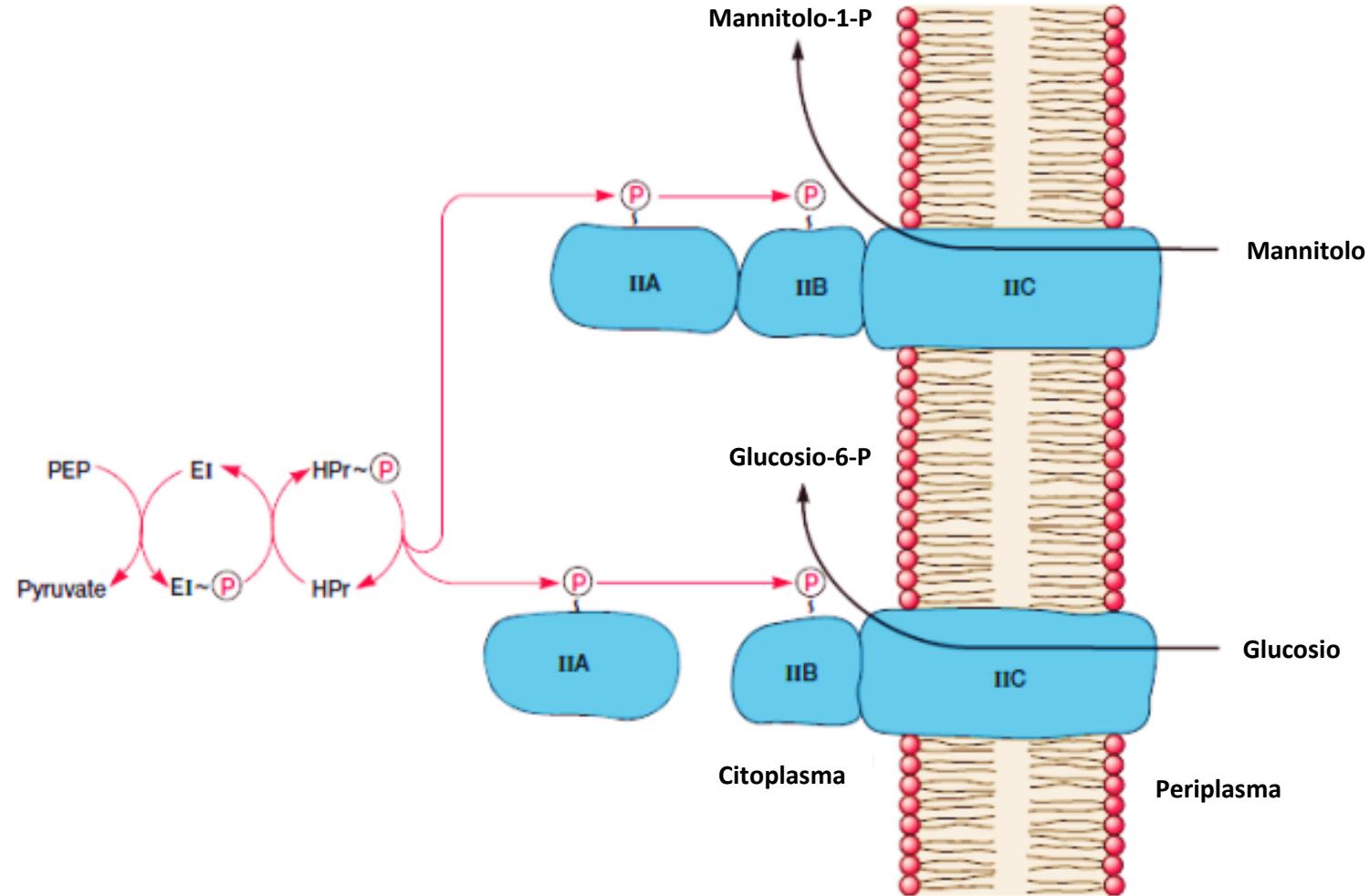
4. l'Enzima II_b

Una proteina integrale di membrana:

5. l'Enzima II_c

Il trasferimento del fosfato avviene a partire dal fosfoenolpiruvato (PEP) ed è sequenziale attraverso le proteine (enzimi) sino all'ultima (enzima II_c) che fosforila il glucosio.

Due esempi del sistema PTS per il trasporto specifico del glucosio e del mannitolo



Il sistema PTS in batteri lattici e acetici

Batteri dell'acido lattico: i *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e altri LAB spesso usano trasportatori di gruppo PTS per importare zuccheri come:

- glucosio
- fruttosio
- mannosio
- cellobiosio

Il sistema PTS consente di trasportare e fosforilare lo zucchero simultaneamente, risparmiando energia e facilitando la fermentazione lattica.

Batteri acetici: i generi come *Acetobacter* e *Gluconobacter* di solito non fanno grande affidamento sui trasportatori PTS.

Preferiscono sistemi di trasporto non-PTS, come permeasi e trasportatori di membrana secondari, (antiporti $H^+/Acetato^-$ e Na^+/H^+ , simporti H^+ per zuccheri, ecc.).

Utilizzano spesso deidrogenasi periplasmatiche che ossidano direttamente zuccheri e alcoli senza importarli completamente nel citoplasma.

Secrezione delle proteine:

Nei **batteri lattici (LAB)** e **acetici**, i sistemi di secrezione delle proteine sono in gran parte simili perché appartengono ai **Gram-positivi** (LAB) o ai **Gram-negativi** (*Acetobacter*, *Gluconobacter*).

Le differenze principali derivano dalla presenza o assenza della membrana esterna.

Batteri lattici: secernono proteasi e peptidasi per degradare proteine in peptidi e aminoacidi assimilabili.

Batteri acetici: possono secernere enzimi che ossidano zuccheri o alcoli complessi in metaboliti più semplici.

BATTERI LATTICI (LAB – Gram-positivi)

Hanno una *sola membrana* e una parete molto spessa di peptidoglicano.

Il Sistema Sec (Secretion) è il principale:

Trasporta proteine con **signal peptide N-terminale** attraverso la membrana citoplasmatica.

Due vie:

SecA–SecYEG (post-traduzionale)

SRP–FtsY (co-traduzionale)

Secrezione delle proteine:

I BATTERI ACETICI (Acetobacter, Gluconobacter – Gram-negativi) hanno due membrane e possono usare molti più sistemi.

Il **Sistema Sec**, come per i batteri lattici esporta proteine nel periplasma.

Sistemi di secrezione tipici dei Gram-negativi

T1SS – Type I Secretion System (Sec-indipendente).

T2SS – Type II (Dipendente da Sec)

T5SS – Autotrasportatori: le proteine passano attraverso la membrana esterna grazie a un dominio β-barrel.

T4SS – Type IV: è un complesso multi-proteico può trasferire DNA, proteine, o complessi proteina-DNA.

Sistema di secrezione delle proteine per traslocazione:

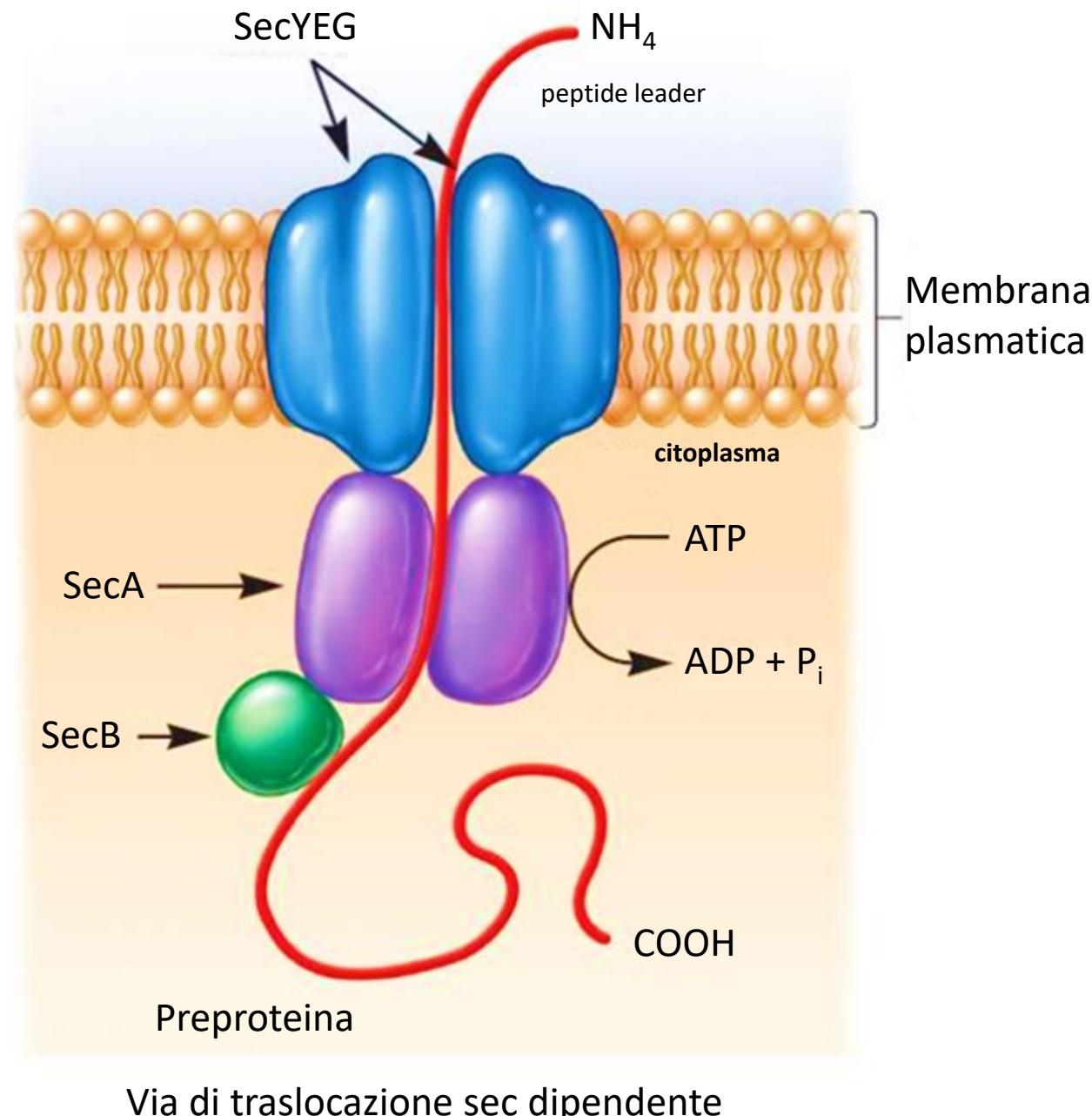
Il sistema SecYEG dei Gram-positivi

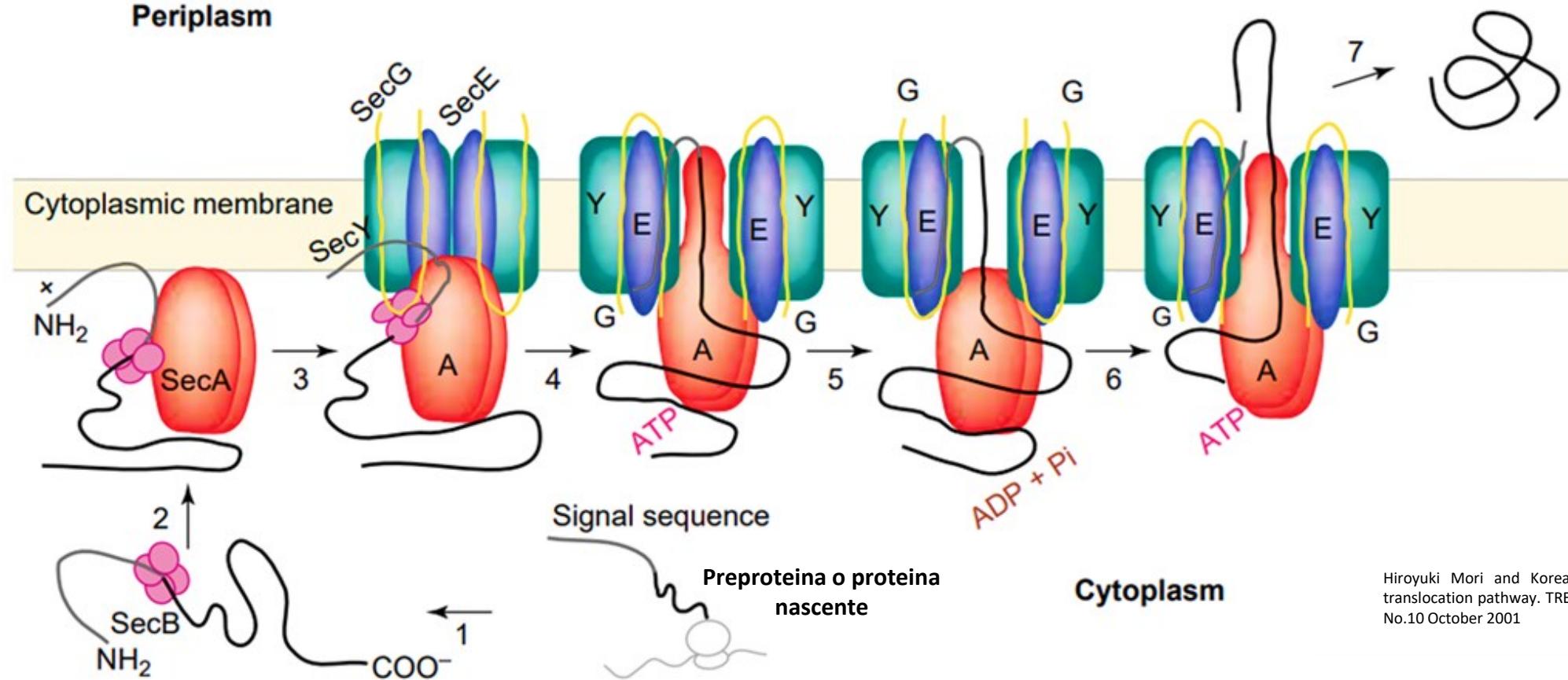
Il sistema **SecYEG** è una traslocasi associata alla membrana (un canale), sia in grado di esportare proteine all'esterno che di inserirle nella membrana nel giusto orientamento affinché svolgano correttamente la loro funzione.

Nella via **SEC dipendente** definita anche GSP (*General Secretory Pathway*) i polipeptidi che vengono trasportati hanno nella regione N-terminale una sequenza di circa 20-30 residui di aa, il peptide leader, che conferisce alla proteina il segnale di essere secreta dalla cellula. Il peptide segnale viene quindi rimosso e la proteina matura viene rilasciata, disponendosi nella conformazione nativa.

Questo sistema può esportare enzimi come amilasi, cellulasi che idrolizzano amido e cellulosa a glucosio.

Le proteine di secrezione svolgono importanti funzioni, come l'approvvigionamento di nutrienti, la comunicazione intracellulare, la detossificazione dell'ambiente.





Hiroyuki Mori and Koreaki Ito. The Sec protein-translocation pathway. TRENDS in Microbiology Vol.9 No.10 October 2001

Meccanismo:

La proteina destinata alla secrezione possiede un peptide segnale N-terminale. La proteina viene riconosciuta dal SecA e/o da chaperoni citoplasmatici, Sec B, (fasi da 1 a 3).

Le proteine SecY, SecE e SecG formano un complesso eterotrimericco (SecYEG) che costituisce un canale per il movimento dei polipeptidi. La SecA usa ATP per spingere la proteina attraverso il canale SecYEG. (fasi da 4 a 6). La traslocazione continua (fase da 5 a 6) richiede cicli di idrolisi dell'ATP.

La proteina attraversa la membrana ancora unfolded. Il peptide segnale viene tagliato dalla signal peptidase, (fase 7). La proteina è ora libera nel periplasma o legata alla parete peptidoglicana.

Secrezione delle proteine:

I meccanismi che permettono ai **Gram-negativi** di esportare proteine si dividono in:

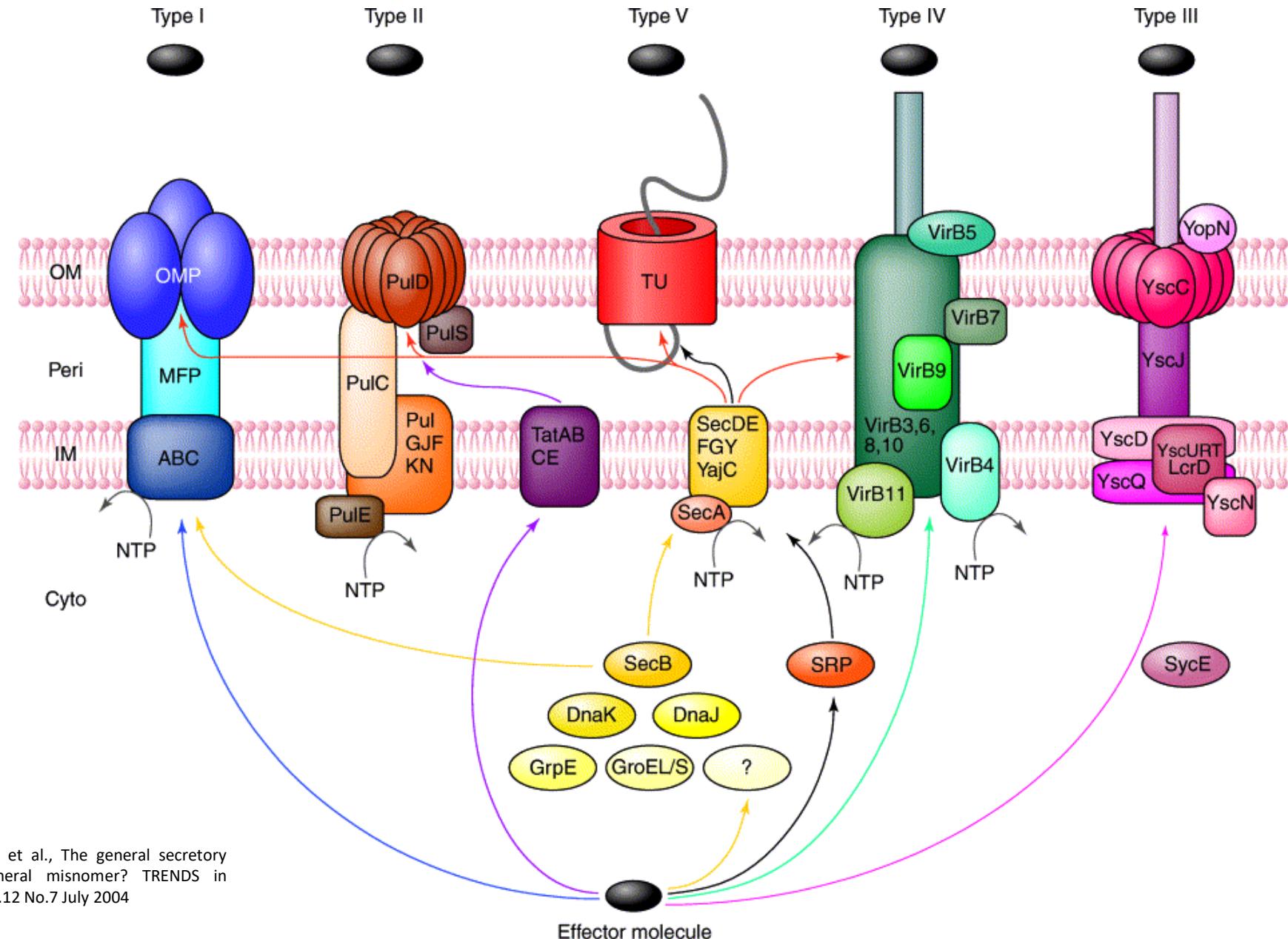
- **Sec-dipendenti**, utilizzano la Sec-traslocasi per il trasporto attraverso la membrana interna e si differenziano in base al meccanismo utilizzato per la membrana esterna.
- **Sec-indipendenti**, non dipende da SecA/SecYEG e spesso utilizza meccanismi alternativi o proteine di membrana specializzate che trasferiscono direttamente le proteine dal citoplasma allo spazio extracellulare, senza coinvolgere intermedi nello spazio periplasmico; includono sistema di secrezione di tipo1 (T1SS), sistema di secrezione di tipo3 (T3SS), sistema di secrezione di tipo4 (T4SS), trasportatori ATP-binding cassette (ABC). T4SS può agire sia in modo Sec-dipendente che in modo Sec-indipendente.

Molti fattori di virulenza, tossine incluse, sono proteine e vengono esportati con questi meccanismi.

SEC indipendenti

SEC dipendenti

SEC indipendenti



Mickael Desvaux et al., The general secretory pathway: a general misnomer? *TRENDS in Microbiology* Vol.12 No.7 July 2004

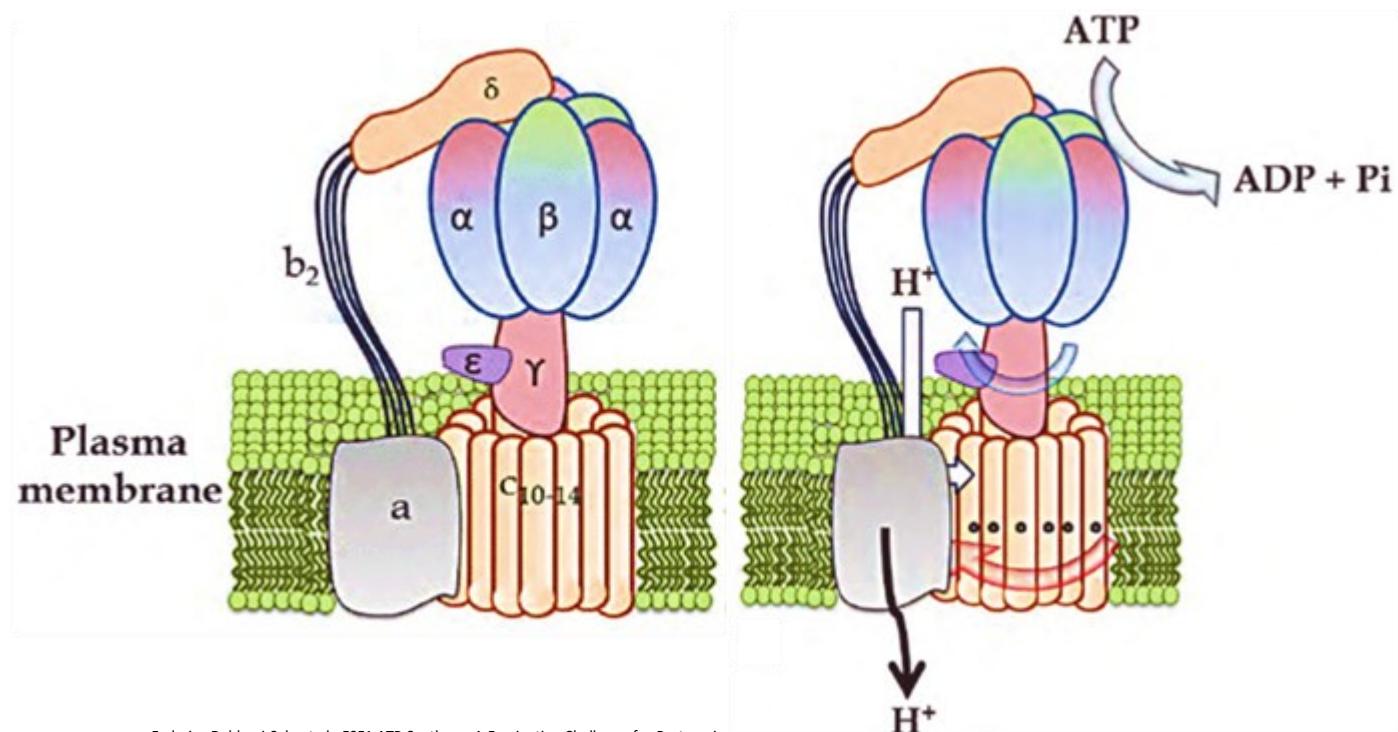
BATTERI LATTICI (LAB)

Non usano una catena di trasporto degli elettroni, come creano il gradiente protonico?

I LAB si trovano spesso in ambienti molto acidi come nelle fermentazioni. Per sopravvivere devono espellere protoni che entrano passivamente dall'esterno.

Nei batteri lattici la principale pompa protonica è la F₁F₀-ATPasi, che funziona consumando ATP per espellere H⁺ e mantenere il pH intracellulare. Questa azione genera un gradiente protonico (PMF) che serve a mantenimento il pH interno e il trasporto di nutrienti perché molti trasportatori usano la PMF (simporti H⁺/substrato).

La forza motrice protonica serve a mantenere il pH intracellulare stabile e sostenere la PMF.



BATTERI ACETICI (*Acetobacter* e *Gluconobacter*) sono aerobi e possiedono una catena di trasporto degli elettroni nella membrana. La reazione di sintesi dell'acido acetico:



Tale reazione avviene sulla membrana interna grazie a una alcol deidrogenasi di membrana (ADHm) e un'aldeide deidrogenasi di membrana (ALDHm). Questi enzimi trasferiscono elettroni alla pirrolochinolina chinone (PQQ) che entrano direttamente nella catena di trasporto degli elettroni, generando un gradiente elettrochimico che può essere utilizzato per la sintesi di ATP. In particolare, il trasferimento di protoni attraverso la proteina ubichinolo ossidasi (UOX) di membrana crea una forza proton-motrice che alimenta la produzione di ATP.

Il gradiente protonico viene usato per:

- Produzione di ATP
- importazione di sostanze (simporto H^+ /substrato)
- movimento flagellare

