

Danni da infezione batterica

1. Azione diretta del patogeno
2. Risposta dell'ospite all'infezione
3. Combinazione di entrambi i fattori

Tossine batteriche

- Diversi tipo di tossine:
 - Esotossine
 - Neurotossine
 - Endotossine
 - Esoenzimi
- Le tossine possono essere distribuite dal microrganismo perché non sono richieste per la crescita;
- I geni per le tossine sono normalmente sul plasmide.

Ruolo delle tossine nella patologia

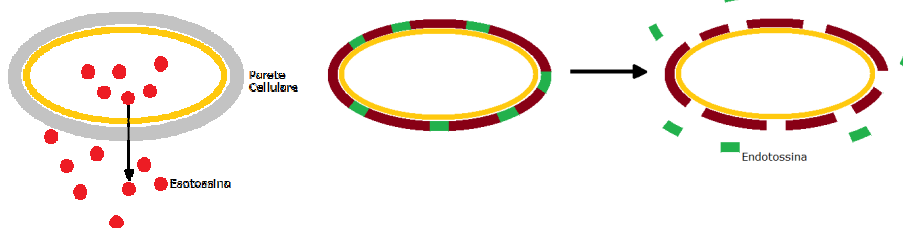
- I ruoli delle tossine possono essere molteplici
 - Tossicità diretta per l'ospite:
 - Generano la patologia
 - Interferiscono nell'acquisizione di nutrienti
 - Interferenza con le funzione del sistema immune durante l'infezione
- Spesso il contributo delle tossine è poco chiaro non completamente conosciuto

gs © 2001-2017 ver 0.2.3

R02 - Tossine batteriche - I

5

Esotossine e endotossine



- Le esotossine sono prodotte generalmente da batteri gram+ come intermedi o prodotti del metabolismo, quindi rilasciate nel mezzo.
- Le endotossine sono parte della parete cellulare di batteri gram-, vengono rilasciate alla morte della cellula.

gs © 2001-2017 ver 0.2.3

R02 - Tossine batteriche - I

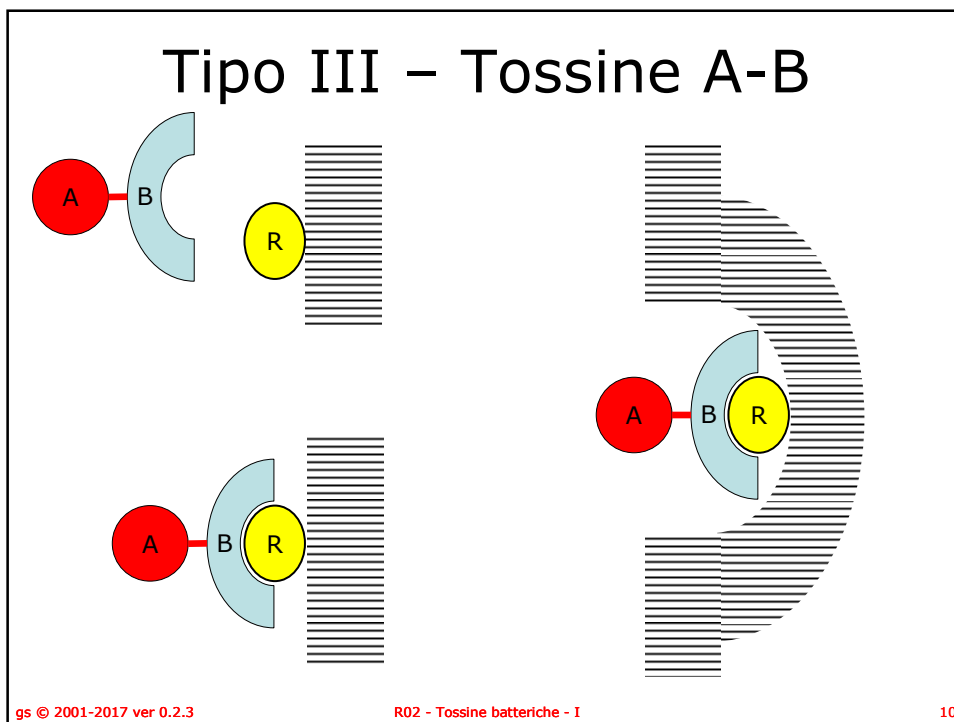
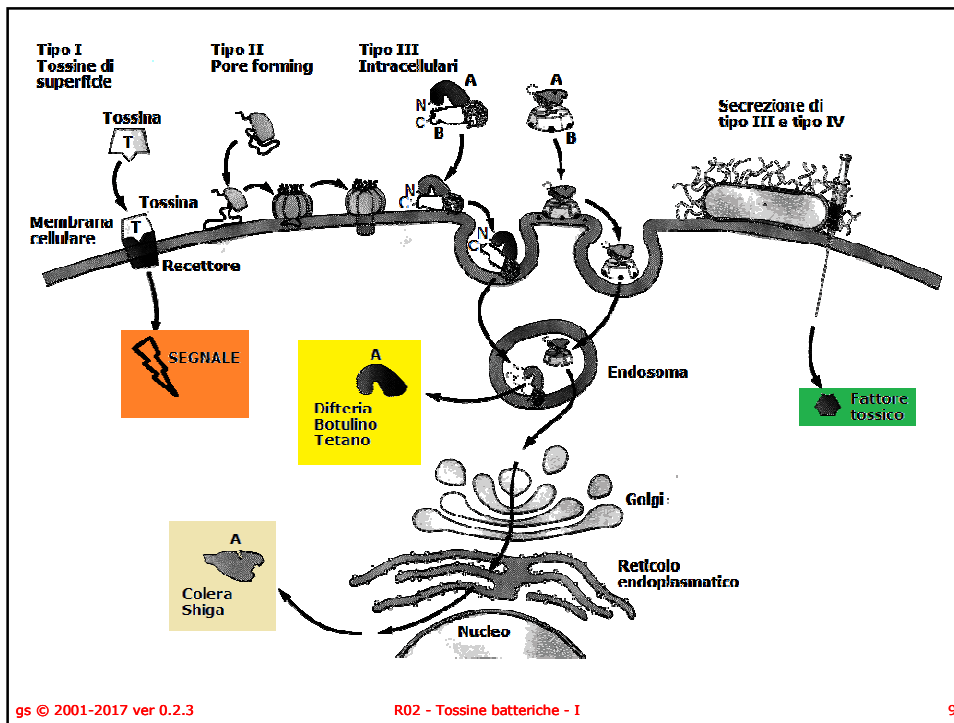
6

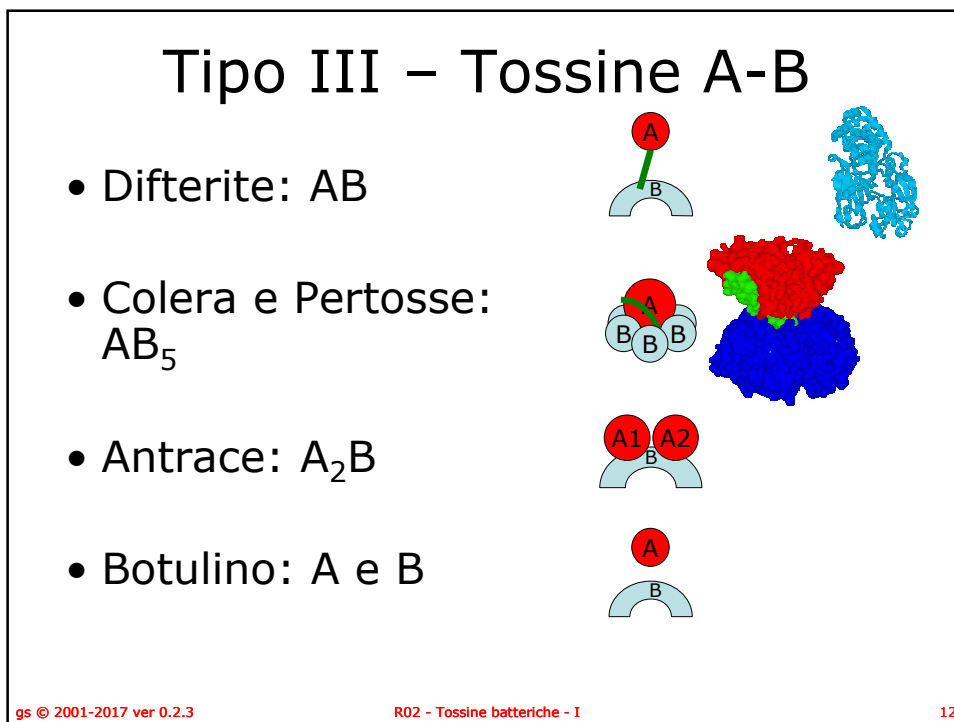
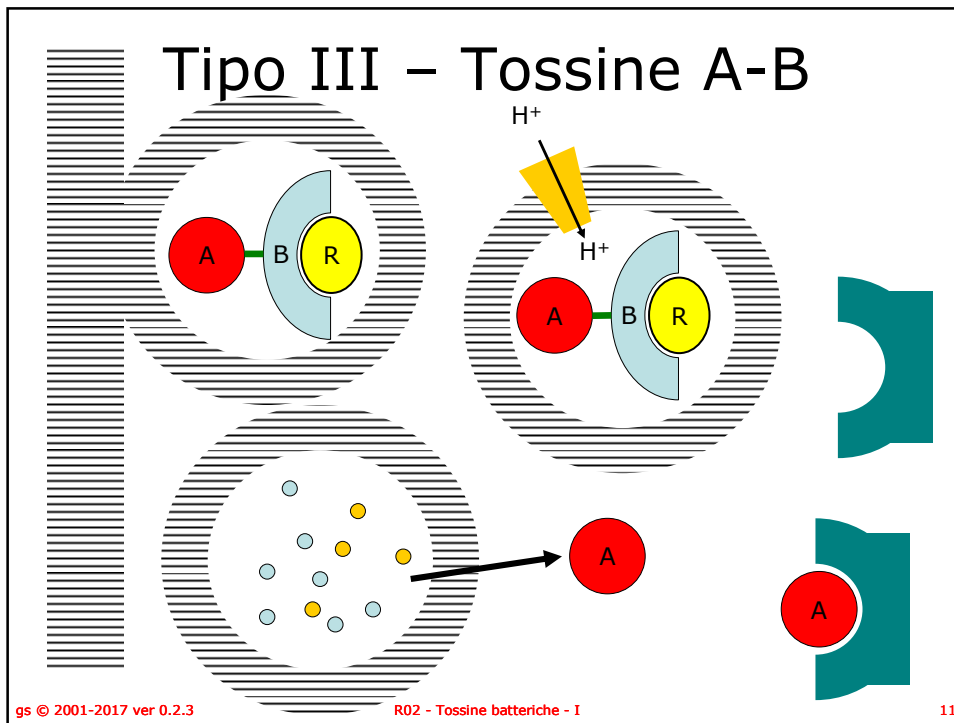
Esotossine

- **Tossina difterica:** prodotta da *Corynebacterium diphtheriae* infettato da fago che porta il gene *tox*. La tossina inibisce la sintesi proteica in cellule eucariote. Due peptidi: A (attivo) B (legame).
- **Tossina eritrogenica:** lo *Streptococcus pyogenes* produce tre tossine (SpeA, SpeB, SpeC) che danneggiano i capillari.
- **Tossina botulinica:** prodotta da *Clostridium botulinum*. È una neurotossina che inibisce il rilascio di acetilcolina e produce paralisi flaccida. Molto potente
- **Tossina tetanica:** prodotta da *Clostridium tetani*. Neurotossina che blocca il rilassamento della muscolatura scheletrica con spasmo muscolare e convulsioni
- **Tossina colerica:** prodotta da *Vibrio cholerae*. Due peptidi: A (attivo) B (legame). La subunità A causa una pesante perdita di liquidi ed elettroliti
- **Tossina stafilococcica:** lo *Staphylococcus aureus* produce una enterotossina simile alla tossina colerica
- **Tossina della pertosse:** prodotta da *Bordetella pertussis*
- **Tossina Shiga:** prodotta da *Shigella dysenteriae* (e da specifico ceppo di *E. Coli*)
- **Tossina letale dell'antrace:** prodotta da *Bacillus anthracis* provoca la morte bloccando la trasduzione del segnale MAPKK
- **Tossina edematosa dell'antrace:** provoca edemi diffusi a causa dell'aumento di cAMP nella cellula.

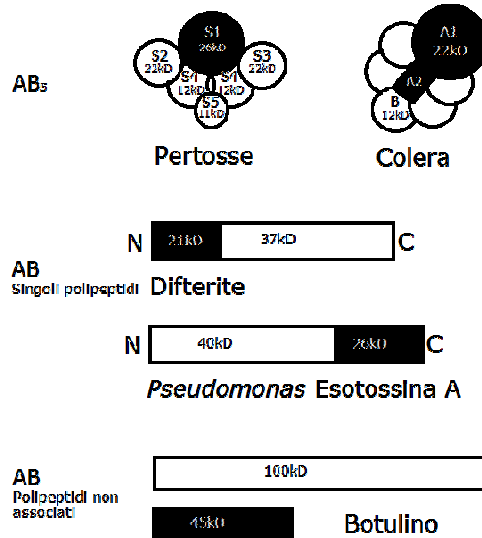
Tossine batteriche

- Tipo I: Tossine che agiscono dalla superficie cellulare
 - Superantigeni: modulano la risposta immune
- Tipo II: Tossine che danneggiano la membrana
 - Pore forming: lisi cellulare
- Tipo III: Tossine intracellulari
 - Tossine A-B; si legano alla cellula ospite ad uno specifico recettore e sono traslocate all'interno dove agiscono modificando il contenuto cellulare
- Proteine effettrici che vengono traslocate nella cellula ospite da sistemi di secrezione di tipo III e tipo IV
 - In molti batteri gram-
 - Nessun legame, iniezione diretta
- Tossine che danneggiano la matrice extra-cellulare





Tipo III – Tossine A-B



Organizzazione strutturale

- Dominio A:
 - dominio catalitico;
- Dominio B:
 - dominio di legame al recettore;

Organizzazione strutturale

- Tossine AB: una singola proteina.
 - Diphtheria ha un dominio catalitico (A) N-terminale e un dominio di legame (B) C-terminale.
- Tossine A e B: proteine non associate in soluzione, si associano dopo legame alla cellula
 - Antrace (edema e letale).
- Le tossine AB₅ consistono in sei peptidi non legati covalentemente;

Tossine AB

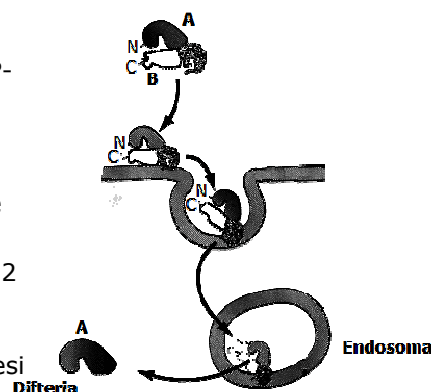
| Tossina | Struttura | Attività |
|----------------|------------------|---------------------------|
| Diphtheria | AB | ADP ribosilazione |
| Esotossina A | | |
| Botulino | | Proteasi Zn ⁺⁺ |
| Tetano | AB ₅ | ADP ribosilazione |
| Colera | | |
| Shiga | | Taglia 28S ribosoma |
| Antrace Letale | A ₂ B | Proteasi Zn ⁺⁺ |
| Antrace Edema | | Adenilato ciclasasi |

Difterite

- *Corynebacterium diphtheriae*
 - Gram +
 - produce un esotossina AB codificata dal gene tox presente in batteri infettati
 - causava mortalità fino agli anni '50, poi vaccinazione con toxoide
 - si diffonde per contatto attraverso le goccioline di saliva
 - Localizzata soprattutto nel tratto respiratorio superiore

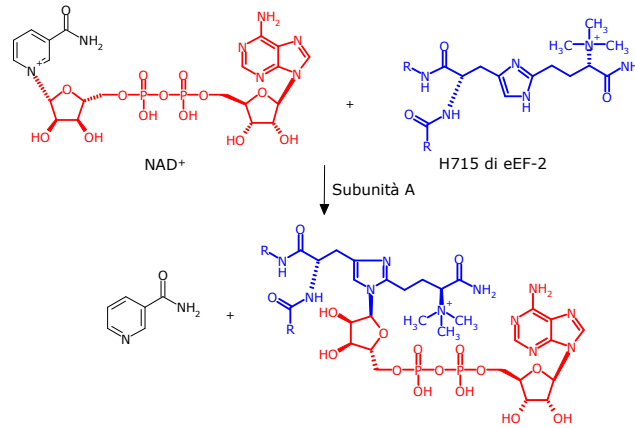
Meccanismo d'azione

- La subunità A
 - Ha un'attività NAD⁺-diftamide ADP-ribosiltransferasica (EC 2.4.2.36)
- Peptide-diftamide + NAD⁺ →
Peptide-ADP-riboside + Nicotinamide
- Provoca la ADP ribosilazione di EF-2 con conseguente inattivazione
 - EF-2 è il fattore ribosomiale di elongazione necessario per la sintesi proteica
 - Una sola molecola di tossina è sufficiente per inattivare tutto EF-2
 - Ferma la sintesi proteica e la cellula muore



Meccanismo d'azione

- La diftamide è presente come modificazione post-traduzionale dell'istidina nel fattore di elongazione 2 (eEF-2) negli eucarioti;
- L'istidina interessata è la H715 in mammiferi e la H699 in lievito.

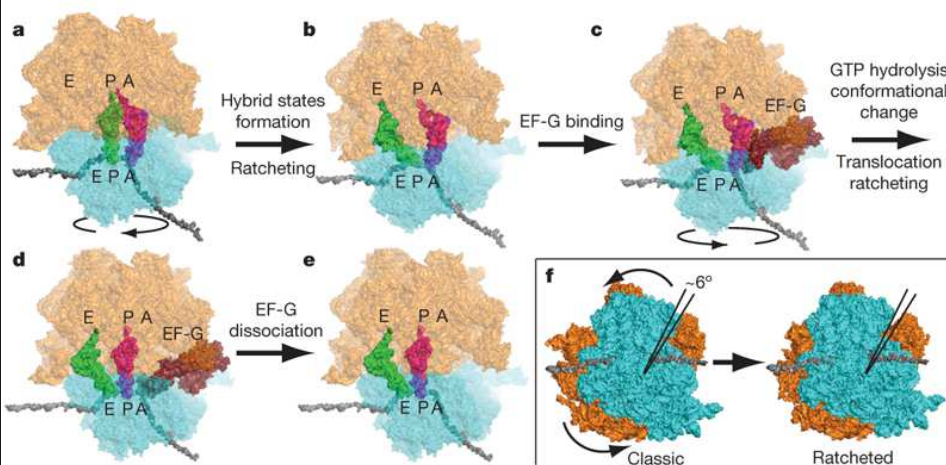


gs © 2001-2017 ver 0.2.3

R02 - Tossine batteriche - I

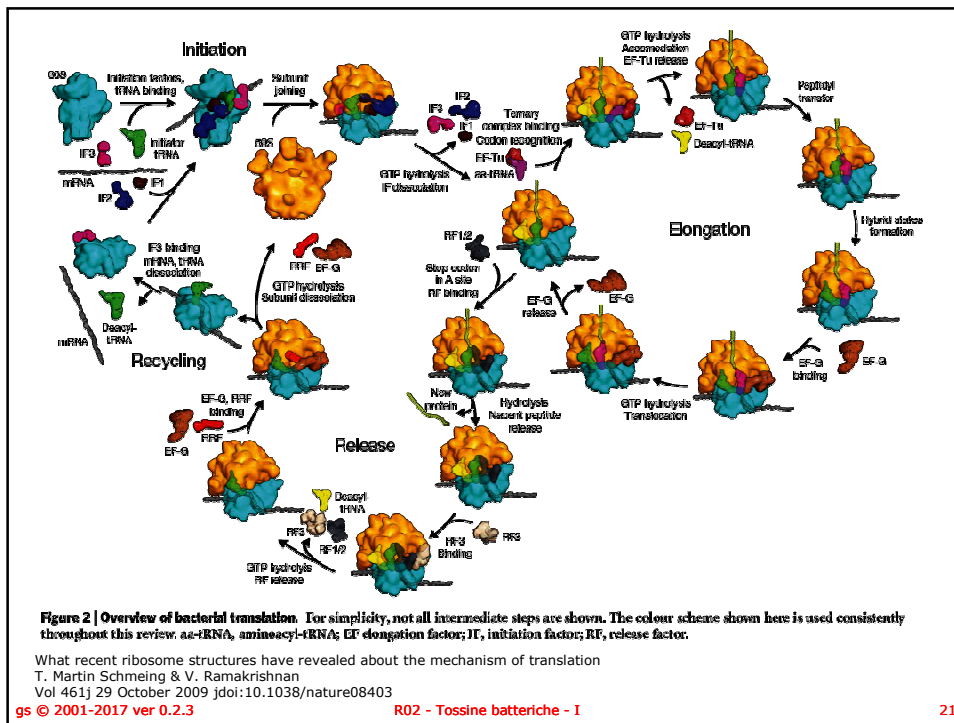
19

EF-G catalysed translocation.



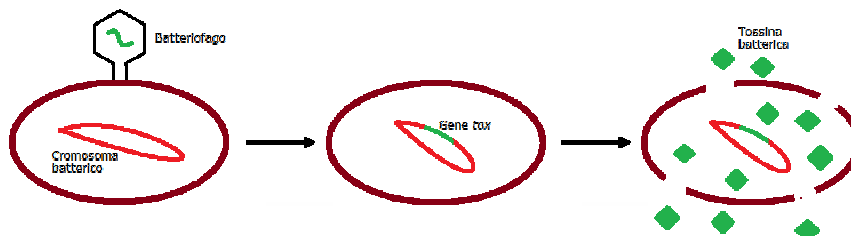
TM Schmeing & V Ramakrishnan *Nature* **000**, 1-9 (2009) doi:10.1038/nature08403

nature

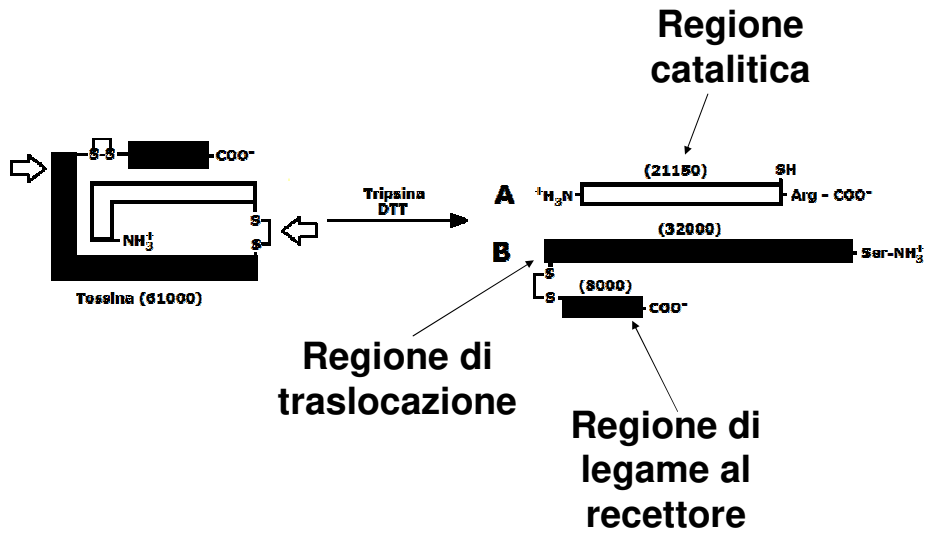


Gene tox

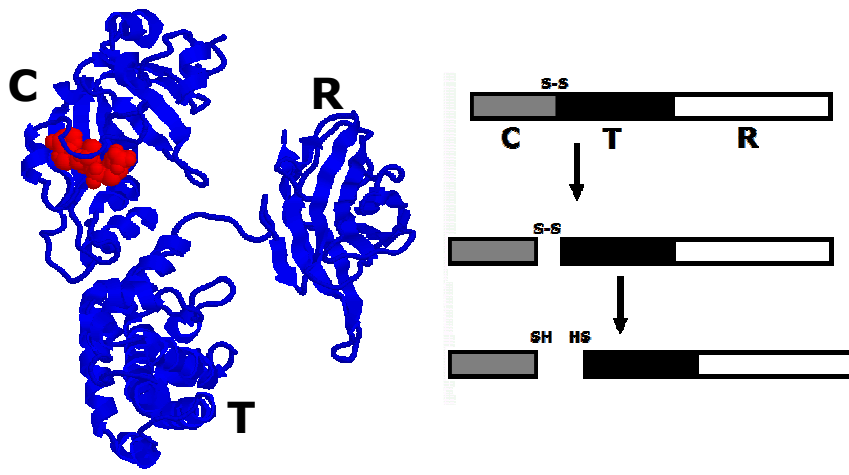
- Esistono ceppi di *Corynebacterium diphtheriae* con attività tossinogenica e non tossinogenica;
- Il gene che codifica per la tossina difterica è trasportato da un fago corynebacteriophage
- I ceppi di *Corynebacterium diphtheriae* sono lisati da questi fagi.



Struttura molecolare della tossina difterica

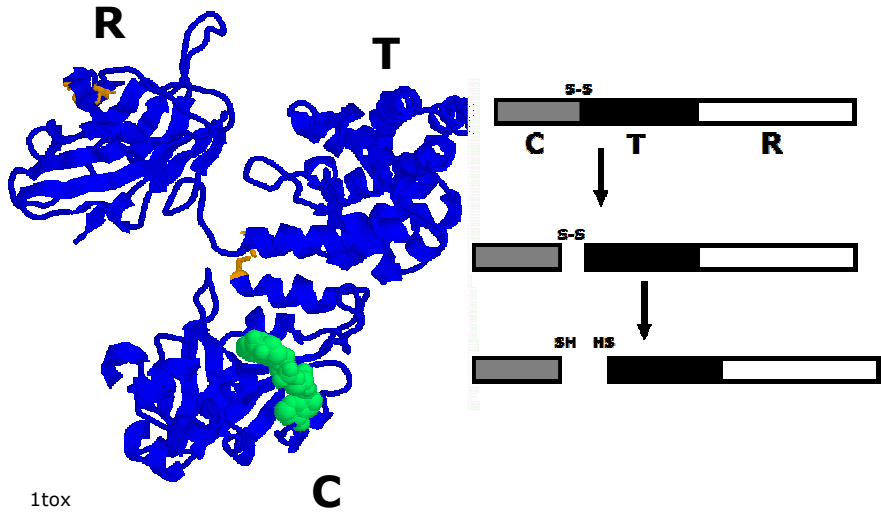


Struttura - Funzione

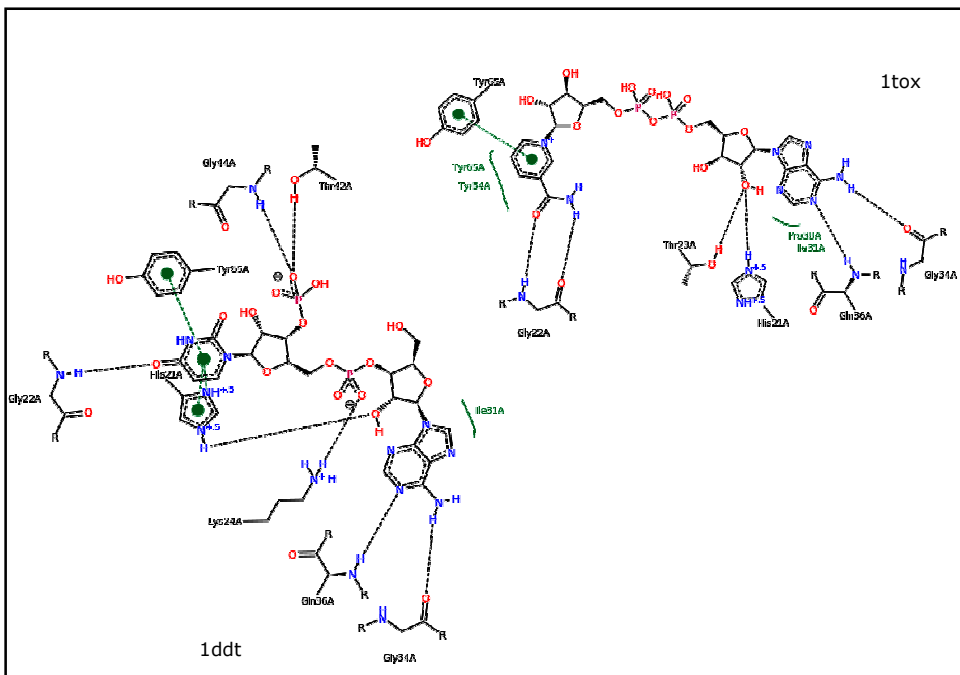


1ddt

Struttura - Funzione



1tox



1ddt

1tox

Domini

- Dominio R – recettoriale (C terminale):
 - si lega al recettore alla superficie della membrana permettendo alla tossina di entrare attraverso un meccanismo di endocitosi mediata dal recettore.
- Dominio C – catalitico (N-terminale):
 - Blocca la sintesi proteica attivando a ADP ribosilazione di EF2.
- Dominio T – traslocazione (Dominio centrale):
 - La variazione conformazionale indotta dal pH provoca l'inserzione nella membrana dell'endosoma e facilita il trasferimento del dominio catalitico nel citoplasma.

Legame al recettore

- Il dominio R si lega ad uno specifico recettore espresso sulla superficie della membrana
- La tossina difterica usa come recettore il recettore per l'eparina del epidermal growth-factor (HB-EGF)

Endocitosi e traslocazione

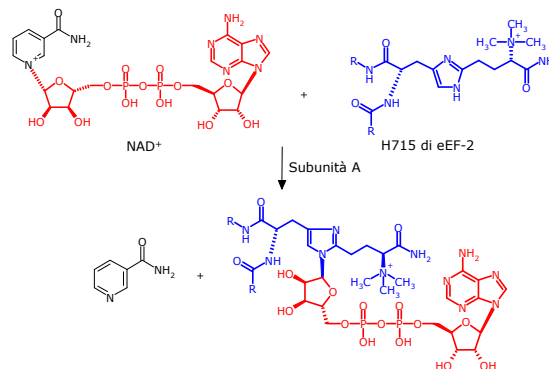
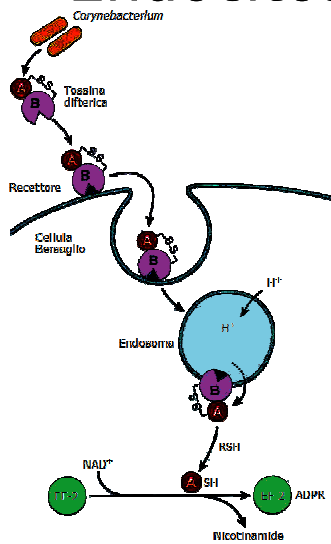
- Il pH acido dell'endosoma promuove la variazione conformazionale del dominio T che inserisce la tossina nella membrana
- La catena A è traslocata nel citoplasma
- La riduzione del ponte disolfuro rilascia la catena A

gs © 2001-2017 ver 0.2.3

R02 - Tossine batteriche - I

29

Endocitosi e traslocazione



gs © 2001-2017 ver 0.2.3

R02 - Tossine batteriche - I

30

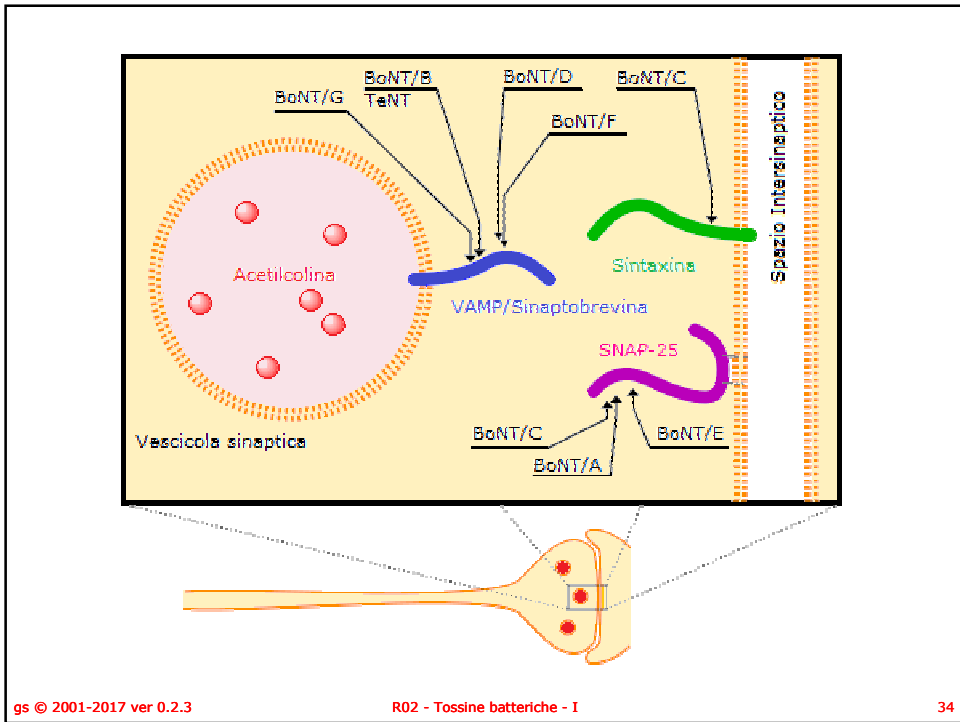
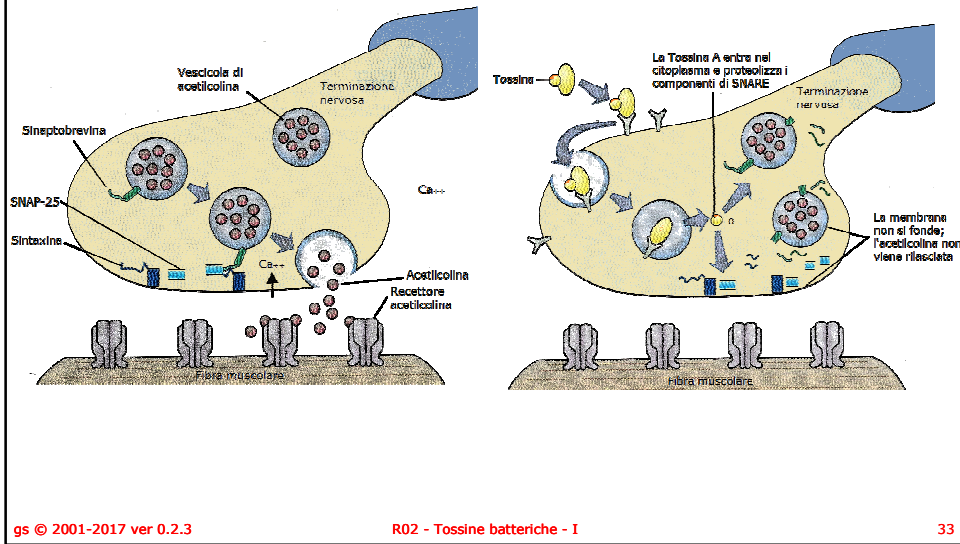
Vaccino

- Toxoide:
 - La tossina è resa non tossica attraverso modificazione chimica o trattamento termico
 - La tossina è ancora immunogenica
 - Trattamento chimico con formaldeide forma dei cross-link interni tra i gruppi NH_2 delle lisine: $[\text{prot}]-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-[\text{prot}]$

Botulino

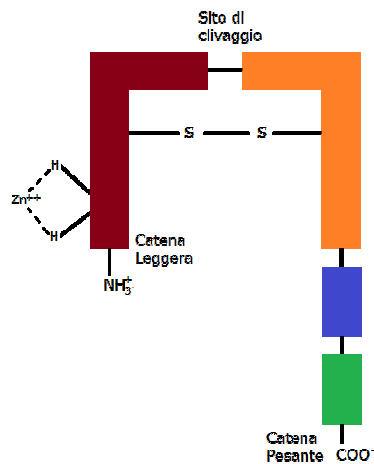
- *Clostridium botulium*
 - Anaerobico gram + a bastoncello
 - Produce una esotossina di tipo III (AB)
 - La tossina produce una paralisi flaccida attraverso il rilassamento muscolare irreversibile
 - I sintomi dipendono esclusivamente dalla tossina
 - Può essere presente in cibo contaminato
 - Contatto per ingestione
 - Non da' febbre o spesi
 - Morte per paralisi respiratoria

Meccanismo d'azione



Struttura

- È sintetizzata come singola catena polipeptidica con peso molecolare di circa 150kDa;
- In questa forma possiede una tossicità relativamente bassa;
- Quando lisata da proteasi (batteriche o gastriche) produce due catene;
 - Catena Leggera (A) con peso molecolare di 50kDa;
 - Catena Pesante (B) con peso molecolare di 100 kDa.

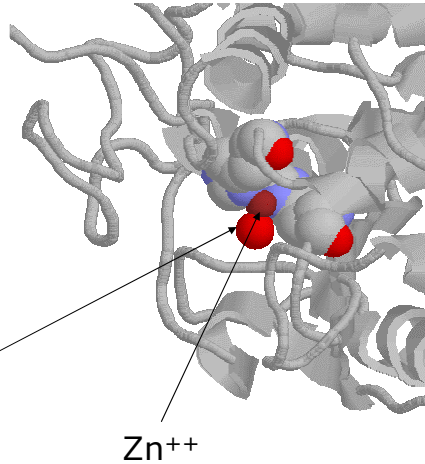


Enzimi proteolici: metallo proteasi

- Appartengono anche alla classe delle proteasi a Zinco (metalloproteasi):
 - La carbossipeptidasi (enzima digestivo).
 - Le metalloproteasi della matrice (collagenasi), coinvolte nella degradazione della matrice extra cellulare durante la crescita dei tessuti.
 - Una proteasi lisosomiale.
- Nel sito attivo è presente uno *zinc binding motif*, con due residui di istidina il cui imidazolo complessa lo ione Zn^{++} .
- Nella catalisi lo Zn^{++} interagisce con l'ossigeno del $C=O$ promuovendo l'attacco nucleofilo dell'ossigeno di una molecola di acqua nel sito attivo al carbonio del $C=O$.
- Nella carbossipeptidasi un residuo di glutamato facilita la reazione estraendo un H^+ dall'acqua.

Metallo (zinco) proteasi

- Uno ione Zn^{++} è coordinato con due atomi di azoto di due His, il carbonile del legame peptidico da idrolizzare e H_2O .
- Lo ione Zn^{++} promuove l'attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico da parte dell'atomo di ossigeno dell'acqua legata
- Il residuo di Glu agisce come base che facilita la reazione estraendo un H^+ dall' H_2O .



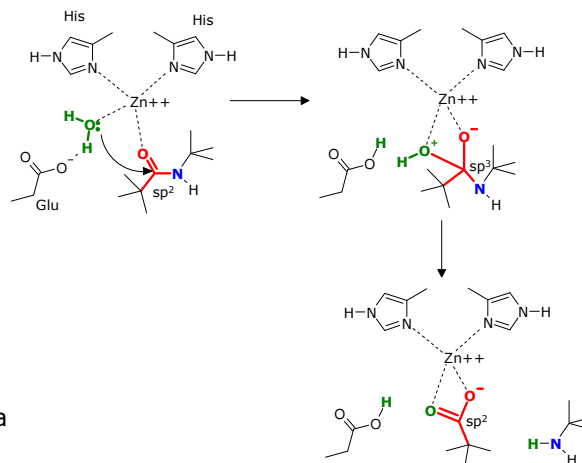
gs © 2001-2017 ver 0.2.3

R02 - Tossine batteriche - I

37

Metallo (zinco) proteasi

- Uno ione Zn^{++} è coordinato con due atomi di azoto di due His, il carbonile del legame peptidico da idrolizzare e H_2O .
- Lo ione Zn^{++} promuove l'attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico da parte dell'atomo di ossigeno dell'acqua legata
- Il residuo di Glu agisce come base che facilita la reazione estraendo un H^+ dall' H_2O .

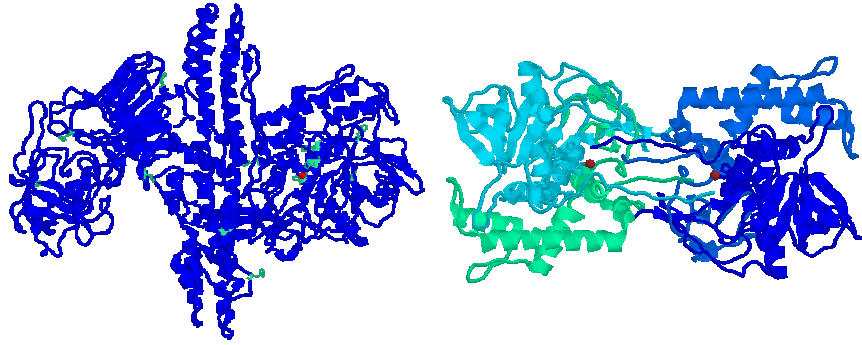


gs © 2001-2017 ver 0.2.3

R02 - Tossine batteriche - I

38

Struttura



3bta

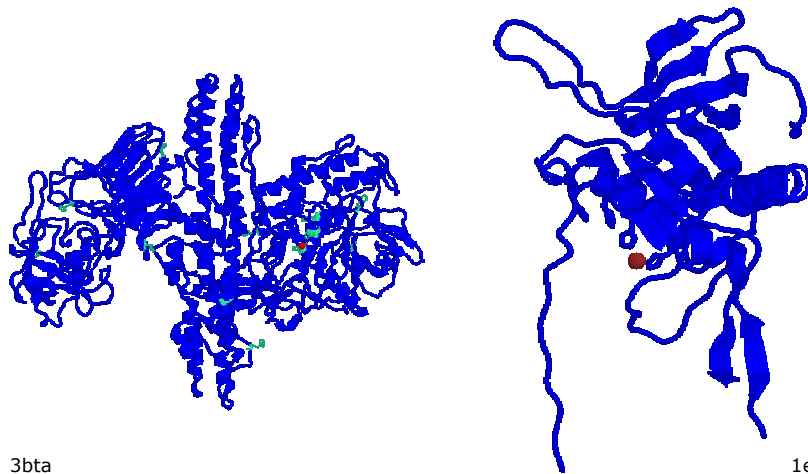
1e1h

gs © 2001-2017 ver 0.2.3

R02 - Tossine batteriche - I

39

Struttura



3bta

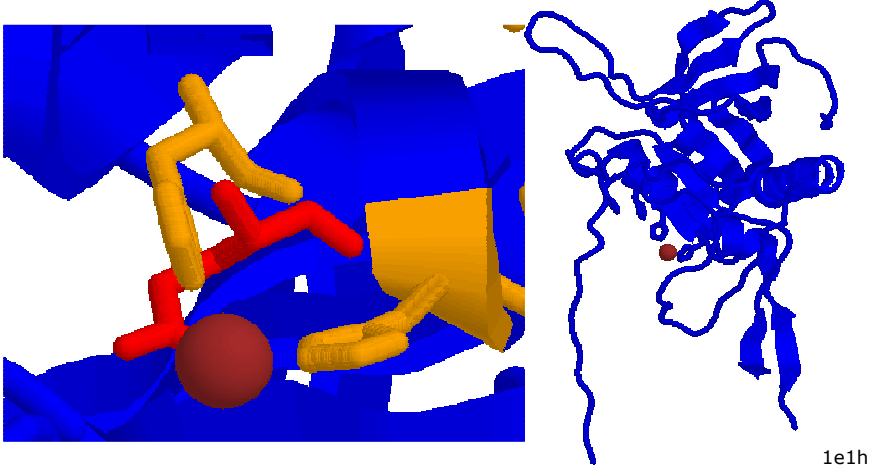
1e1h

gs © 2001-2017 ver 0.2.3

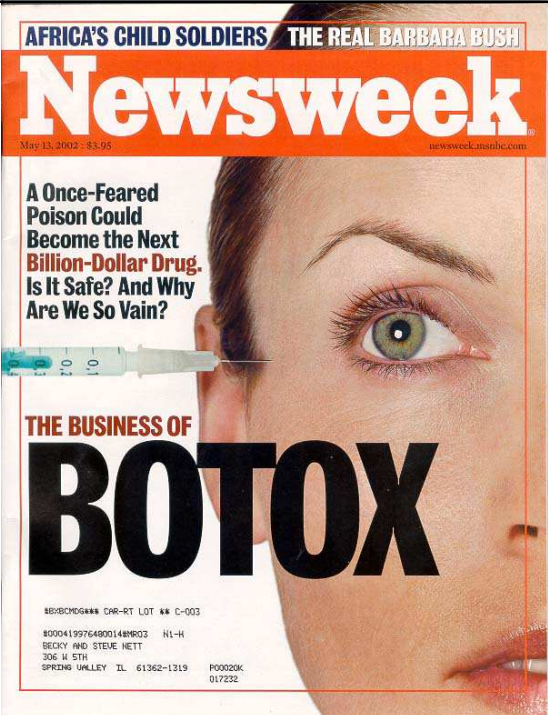
R02 - Tossine batteriche - I

40

Struttura



1e1h



Tetano

- *Clostridium tetani*

- Anaerobico, gram +, forma spore, a bastoncino;
- Produce un esotossina di tipo III (AB);
- Popola il suolo e si trova su ferri arrugginiti;
- Entra attraverso ferite o punture;
- Non diffonde dal punto di entrata;
- Produce contrazione muscolare irreversibile, paralisi spastica;
- I sintomi sono dovuti alla tossina e iniziano con irrigidimento della schiena e del collo;
- La morte sopravviene per paralisi respiratoria.

Meccanismo d'azione

- Blocca il rilascio di neurotrasmettitori inibitori (Acido γ -aminobutirrico GABA);
- Azione proteasica che previene il rilascio di vescicole sinaptiche;
- Agisce in un insieme di neuroni diverso da quello della tossina botulinica;
- Produce risultati opposti alla tossina botulinica.

Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin

Giampietro Schiavo^{*}, Fabio Benfenati[†], Bernard Poulain[‡], Ornella Rossetto^{*}, Patrizia Poverina de Laurentis[§], Bibhuti R. DasGupta^{||} & Cesare Montecucco^{*}

^{*} Dipartimento di Scienze Biomediche, Centro CNR, Biomembrane, and § CRIB, Università di Padova, 75 Via Trieste, 35121 Padova, Italy
[†] Istituto di Fisiologia Umana, Università di Modena, 41100 Modena, Italy
[‡] Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 91118 Gif-sur-Yvette, France
^{||} Food Research Institute, University of Wisconsin at Madison, Wisconsin 53706, USA

NATURE · VOL 359 · 29 OCTOBER 1992



Phil. Trans. R. Soc. Lond. B (1993) **334**, 259–268

Molecular Microbiology (1994) 13(1), 1–8

MicroReview

Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins

Cesare Montecucco^{*} and Giampietro Schiavo[†]
 Centro CNR Biomembrane and Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova, via Trieste 75, 35121 Padova, Italy.

Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses

Rossella Pellizzari¹, Ornella Rossetto¹, Giampietro Schiavo² and Cesare Montecucco^{1*}

¹ Centro CNR Biomembrane and Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova, Via G. Colombo 3, 35100 Padova, Italy
² Laboratory of Neurobiopathology, ICRF, Lincoln Inn's Field, London, UK

gs © 2001–2017 ver 0.2.3

R02 - Tossine batteriche - I

45

Meccanismo

2 C. Montecucco and G. Schiavo

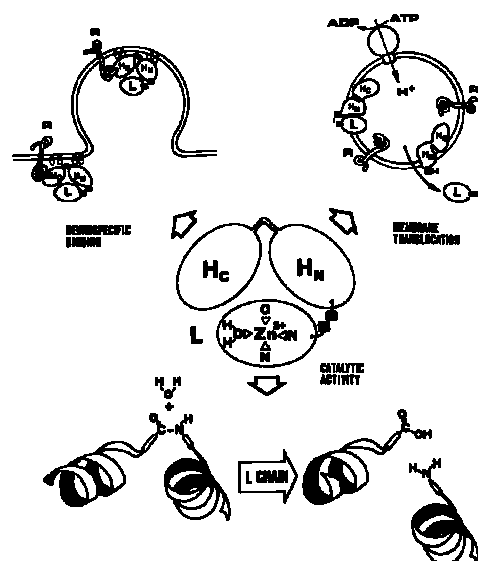


Fig. 1. Structure–function relationships of clostridial neurotoxins. The 50 kDa carboxy-terminal domain of the H chain (H_c) of clostridial neurotoxin is mainly responsible for neurospecific binding to their respective receptors localized on the surface of the presynaptic membrane (top-left panel). Productive binding is followed by the internalization of the toxin–receptor complex: inside vesicles that are different for tetanus and botulinum neurotoxins. BoNT-containing vesicles remain within the neuromuscular junction, while TeNT-containing vesicles move backwards along the motor neuron axon to the soma. The amino-terminal domain (H_n) is suggested to be involved in the membrane translocation of the L chain into the nerve-cell cytoplasm (top-right panel). This process is triggered by the acidification of the vesicle lumen by a proton-pumping ATPase which leads to a conformational change of the toxin. In its acid conformation, the toxin inserts into the lipid bilayer and H_n promotes the translocation of the L chain across the vesicular membrane. The L chain, set free in the cytosol by reduction of the interchain disulphide bond, can display its zinc-endopeptidase activity by the selective cleavage of proteins of the neuroexocytosis machinery (lower panel).

gs © 2001–2017 ver 0.2.3

R02 - Tossine batteriche - I

46

Meccanismo

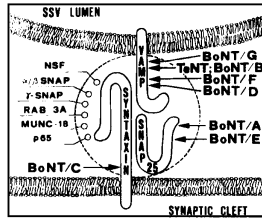


Fig. 3. Target and site of cleavage of tetanus and botulinum neurotoxins within the neuroexocytosis apparatus. The L chain is a zinc-endopeptidase specific for components of the 20S multi-subunit vesicle docking/fusion complex. Tetanus and botulinum B, D, F and G neurotoxins specifically cleave VAMP/syntaxobrevin, a protein of the neurotransmitter-containing vesicles. Botulinum neurotoxins serotypes A and E recognize and cleave SNAP-25, a presynaptic membrane component, while syntaxin, also localized on the plasma membrane, is specifically proteolyzed by serotype C. Arrows indicate the approximate positions of the cleavage sites. Empty circles refer to proteins that interact with the targets of clostridial neurotoxins: MUNC-18, NSF, α/β and γ -SNAP are components of the 20S docking/fusion complex, while rab 3A and synaptotagmin/p65 dissociate from syntaxin, VAMP and SNAP-25 before complex assembly. SSV indicates neurotransmitter-containing small synaptic vesicles, although VAMP is also present on the membrane of other exocytotic vesicles.



1z7h

Meccanismo

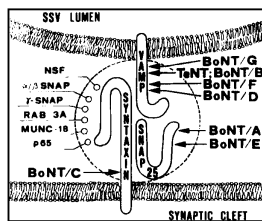
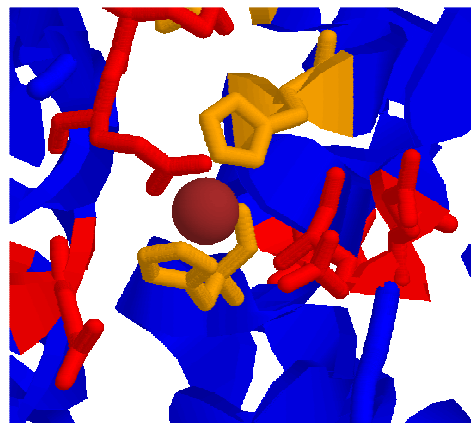


Fig. 3. Target and site of cleavage of tetanus and botulinum neurotoxins within the neuroexocytosis apparatus. The L chain is a zinc-endopeptidase specific for components of the 20S multi-subunit vesicle docking/fusion complex. Tetanus and botulinum B, D, F and G neurotoxins specifically cleave VAMP/syntaxobrevin, a protein of the neurotransmitter-containing vesicles. Botulinum neurotoxins serotypes A and E recognize and cleave SNAP-25, a presynaptic membrane component, while syntaxin, also localized on the plasma membrane, is specifically proteolyzed by serotype C. Arrows indicate the approximate positions of the cleavage sites. Empty circles refer to proteins that interact with the targets of clostridial neurotoxins: MUNC-18, NSF, α/β and γ -SNAP are components of the 20S docking/fusion complex, while rab 3A and synaptotagmin/p65 dissociate from syntaxin, VAMP and SNAP-25 before complex assembly. SSV indicates neurotransmitter-containing small synaptic vesicles, although VAMP is also present on the membrane of other exocytotic vesicles.



1z7h

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
 - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] - Zanichelli
 - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
 - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
 - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
 - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Rensselaer Polytechnic Institute: <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da: <http://www.gsartor.org/pro>

- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Università di Bologna

Giorgio Sartor
Ufficiale: giorgio.sartor@unibo.it
Personale: giorgio.sartor@gmail.com

Aggiornato il 28/03/2017 13:13:34