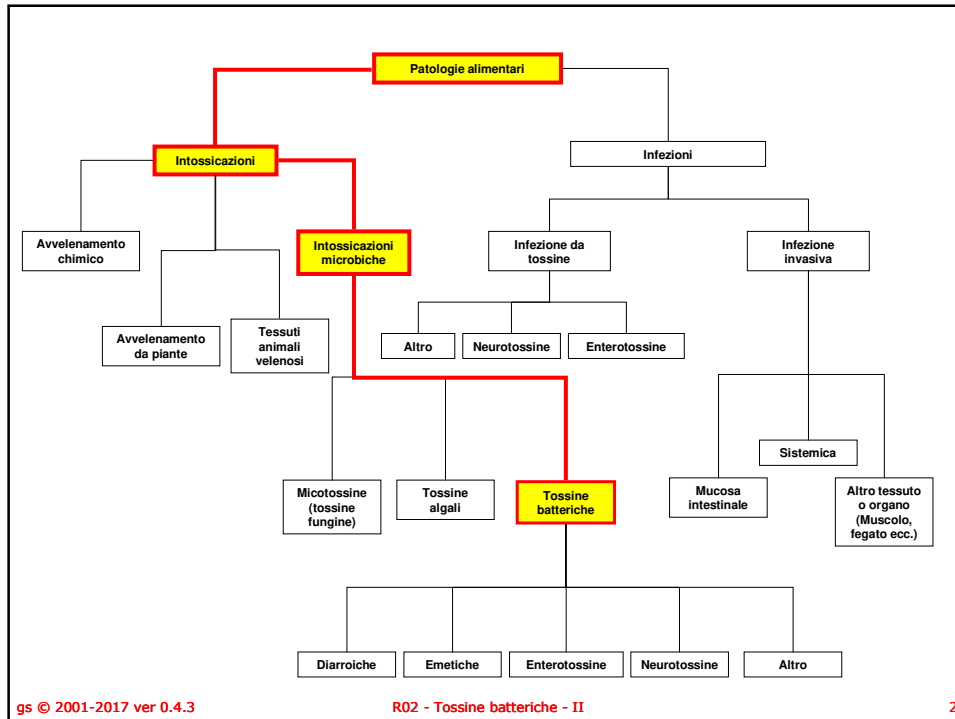


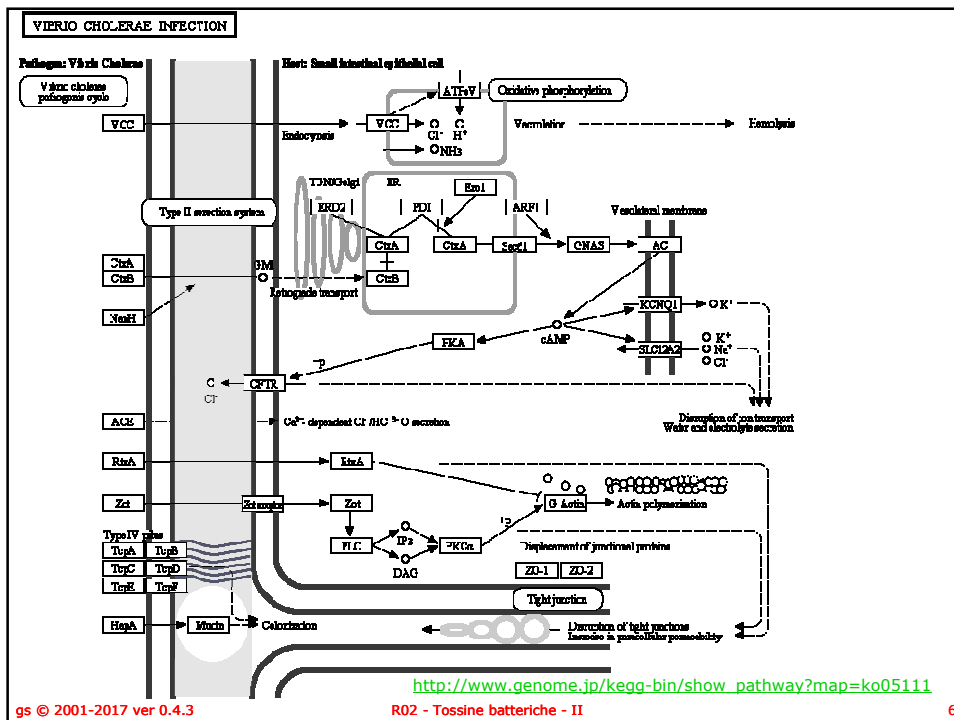
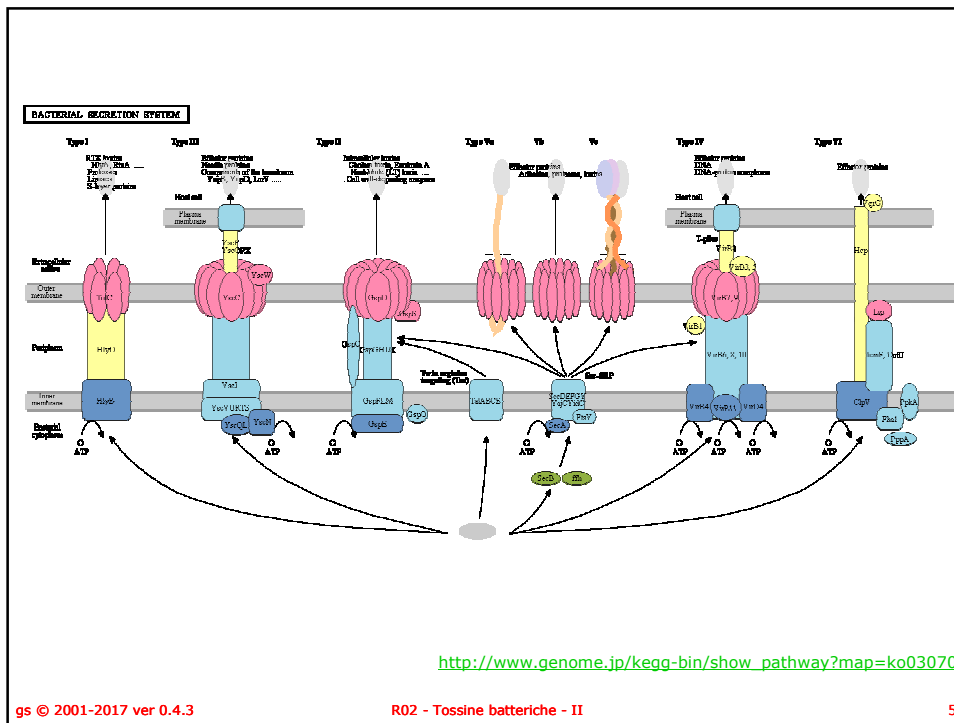
Prof. Giorgio Sartor

TOSSINE BATTERICHE II

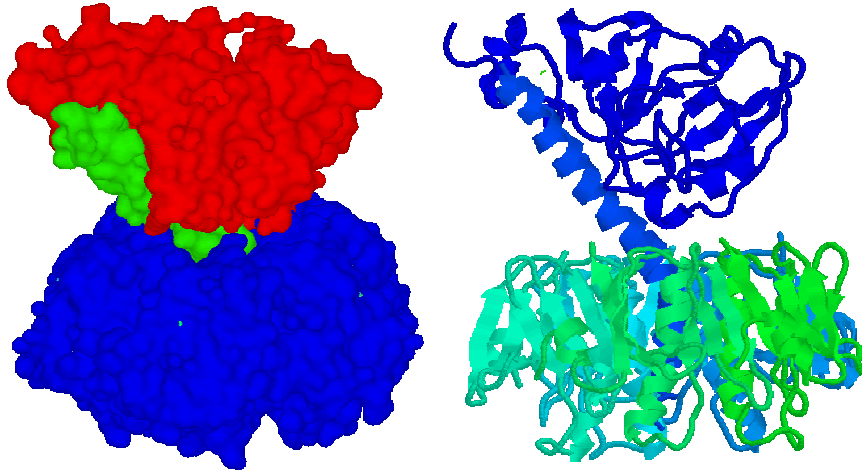
Copyright © 2001-2017 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 0.4.3 - Mar-17





Colera



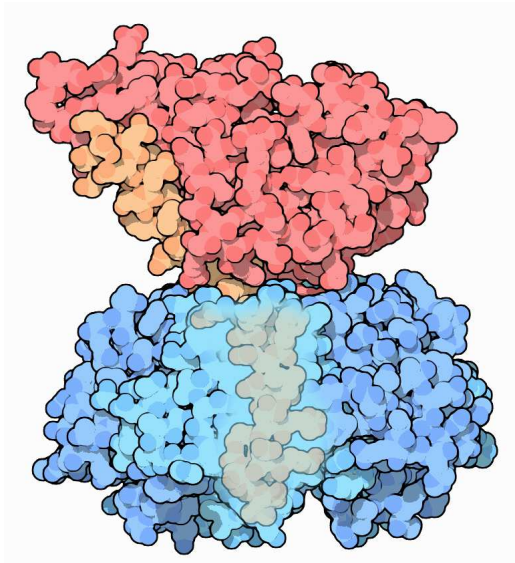
1xtc

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

7

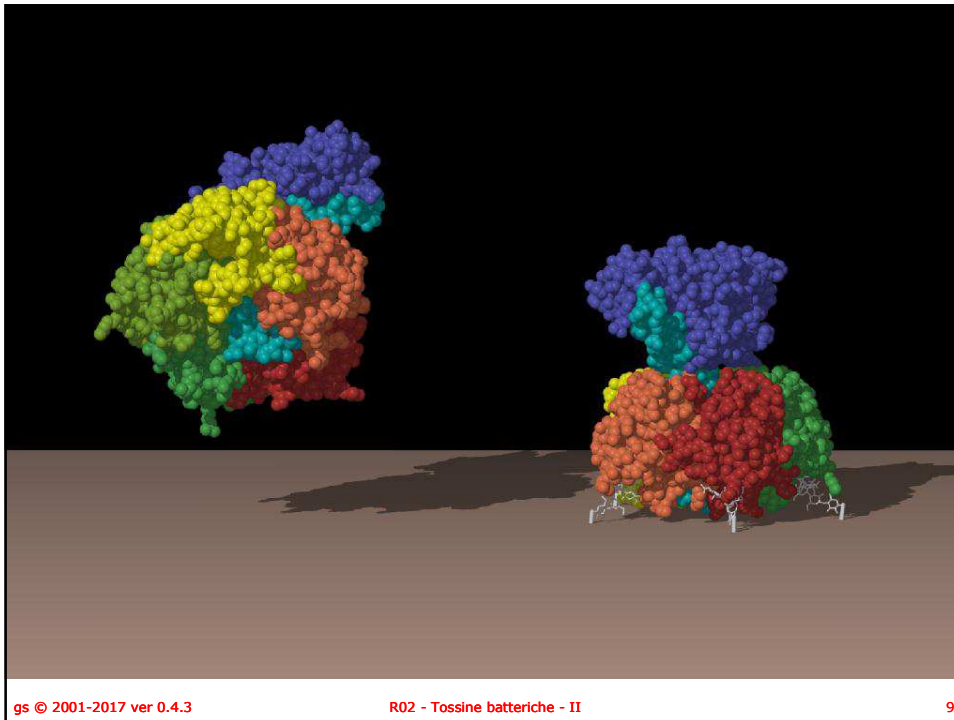
Tossina colerica



gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

8



Meccanismo d'azione

- Il bersaglio della tossina è il funzionamento della Adenilato ciclastasi presente nelle membrane basolaterali delle cellule epiteliali dell'intestino la cui attività viene regolata dai recettori accoppiati alle proteine G:
- La tossina si lega alla cellula attraverso il pentamero B che riconosce un recettore ganglioside inserito nella membrana plasmatica delle cellule bersaglio;
- La subunità A entra nella cellula, probabilmente attraverso endosomi, ed è tagliata da proteasi in due peptidi A1 e A2.

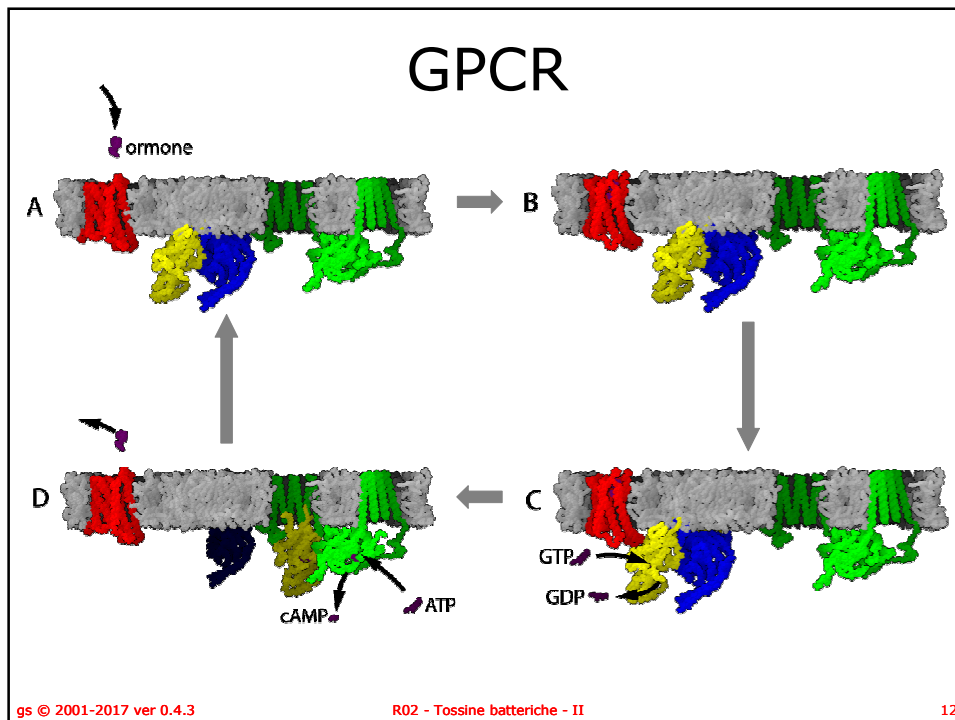
Meccanismo d'azione

- Il peptide A1 è attivato e trasferisce un ADP-ribosio (ADPR) alla subunità $G\alpha_s$ la quale si dissocia dall'eterotrimerico $G\alpha\beta\gamma$ e attiva la Adenilato ciclasi, aumentando la concentrazione di cAMP nella cellula.
- Sono stati ipotizzati tre possibili modi con i quali la tossina attiva la Adenilato ciclasi:
 1. Il peptide A1 trasloca attraverso la membrana apicale lasciando legato alla membrana il pentamero B;
 2. Il peptide A1 ADP-ribosila la $G\alpha_s$ nella membrana apicale e questa attraversa la cellula per agire sulla Adenilato ciclasi;
 3. L'intera tossina entra nella cellula attraverso l'endosoma e la subunità A è quindi traslocata attraverso la membrana, il peptide A1 ADP-ribosila la $G\alpha_s$ localizzata nella membrana basolaterale, probabilmente dopo fusione tra l'endosoma e la membrana plasmatica

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

11



gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

12

Famiglie di proteine G

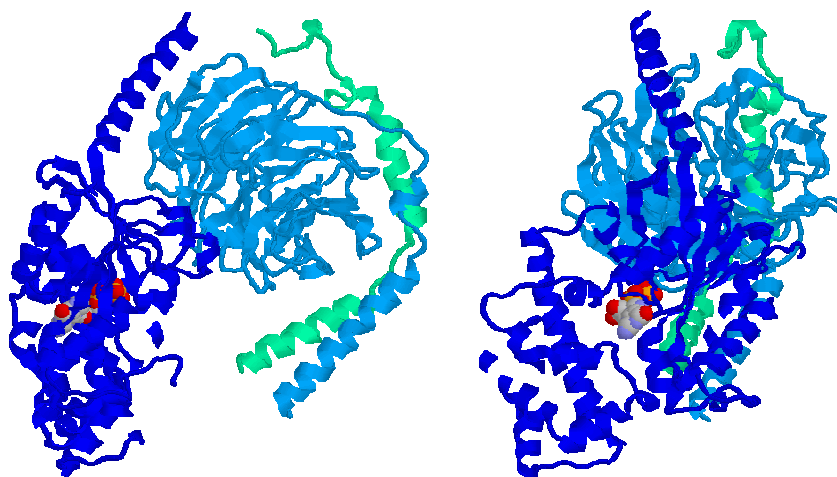
Classe G_{α}	Segnale	Effetto
$G_{\alpha s}$	Amine β -adrenergiche, glucagone, ecc.	Stimola Adenilato ciclasi
$G_{\alpha i}$	Acetilcolina, Amine α -adrenergiche, ecc.	Inibisce Adenilato ciclasi
$G_{\alpha t}$	Fotoni	Stimola cGMP diesterasi
$G_{\alpha q}$	Acetilcolina, Amine α -adrenergiche, ecc.	Aumenta sintesi IP_3 e Ca^{++} intracellulare
$G_{\alpha 13}$	Trombina ecc.	Stimola scambio Na^+/H^+

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

13

Proteine G

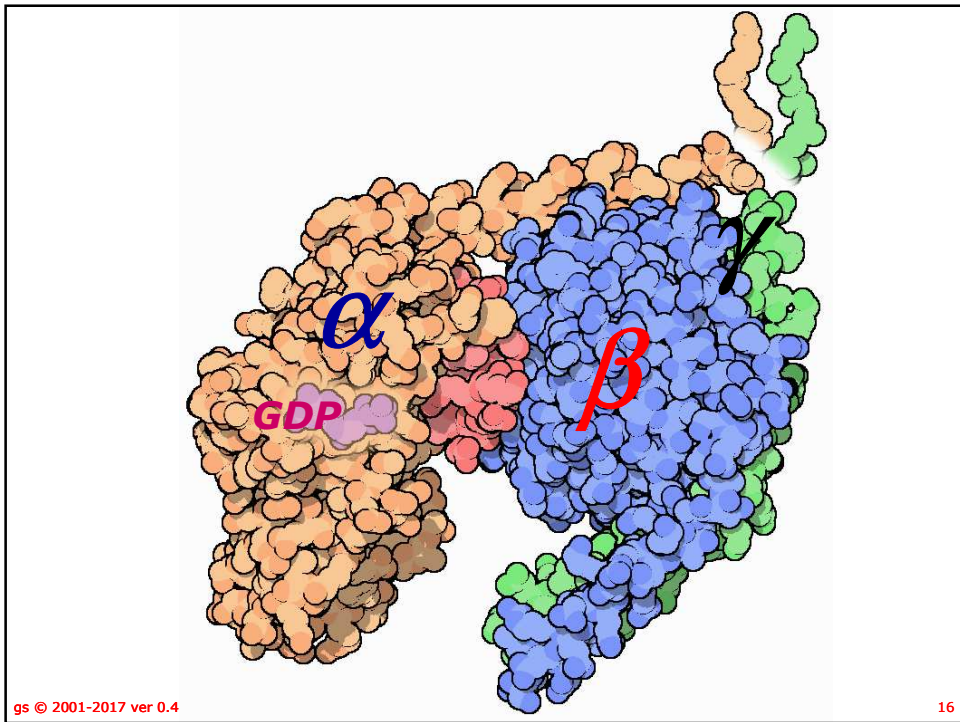
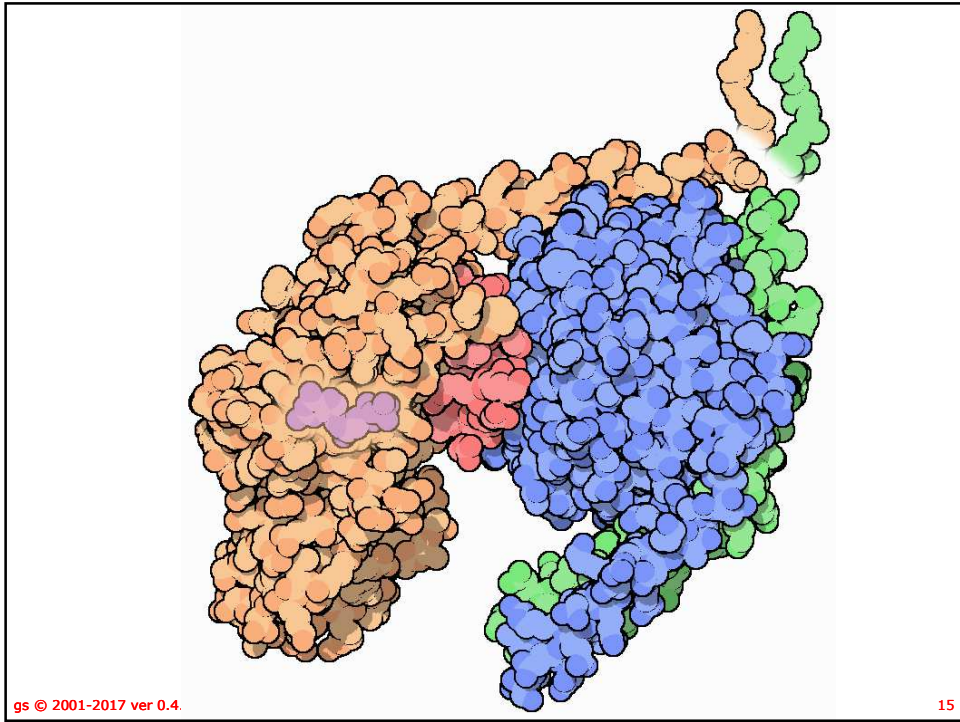


1got

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

14



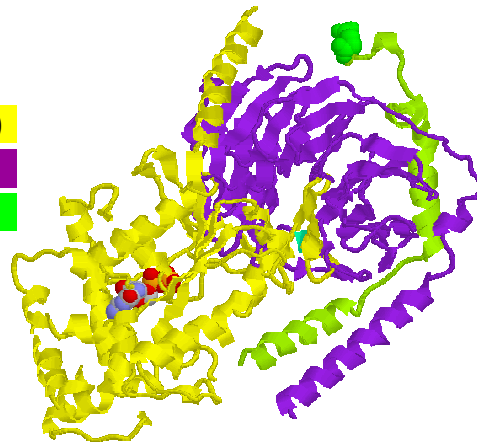
Proteine G

- Il tipico eterotrimerico delle proteine G consiste in:

- subunità α (45-47 kD)

- subunità β (35 kD)

- subunità γ (7-9 kD)



1GOT

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

17

Proteine G – subunità α

- La subunità α dell'eterotrimerico consiste in due domini:
- Il dominio GTPasico e il dominio α -elica, il dominio GTPasico è simile alla struttura di P21ras e agli altri membri della superfamiglia delle GTPasi:
 - Consiste in una struttura a cinque eliche che circondano un β -sheet con cinque strand paralleli e uno antiparallelo;
 - La seconda delle eliche è un elica 3_{10} .



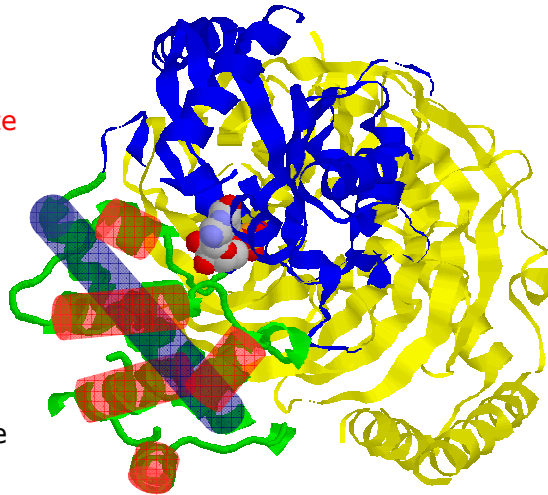
gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

18

Proteine G – subunità α

- Il dominio α -elica è costituito da una lunga elica centrale circondata da cinque eliche più corte
- Il dominio α -elica è connesso al dominio GTPasico attraverso due strands:
 - linker 1 (54-58)
 - linker 2 (173-179).
- Tra i due linker è posizionata la fenditura che accoglie il nucleotide (GTP o GDP).



gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

19

Proteina G

- La subunità α dell'eterotrimerico cambia conformazione quando il GDP è scambiato con il GTP
- Vi è la dissociazione dal complesso delle subunità β - γ e il complesso β - γ può agire da segnale legandosi a una proteina bersaglio attivandola o disattivandola.

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

20

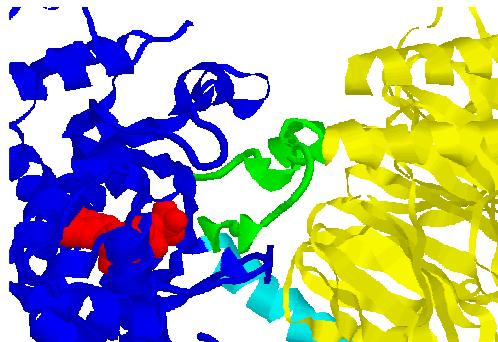
Proteina G

- I cambiamenti strutturali indotti dallo scambio del nucleotide sono localizzati alla superficie della subunità α a contatto con la β inclusa l' α -elica della subunità α e le tre regioni adiacenti
- Poiché la funzione segnale e l'attività GTPasica sono "accese" e "spente" da questo cambiamento conformazionale si parla di
 - **Switch I: residui 173-183;**
 - Switch II: residui 195-215;
 - Switch III: residui 227-238.



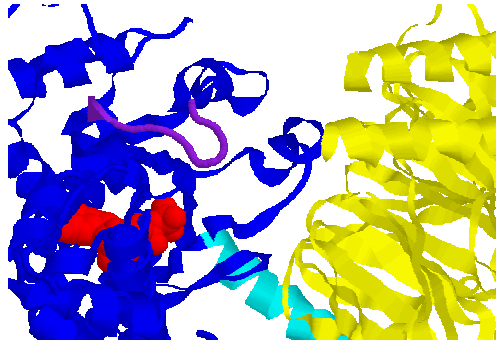
Proteina G

- I cambiamenti strutturali indotti dallo scambio del nucleotide sono localizzati alla superficie della subunità α a contatto con la β inclusa l' α -elica della subunità α e le tre regioni adiacenti
- Poiché la funzione segnale e l'attività GTPasica sono "accese" e "spente" da questo cambiamento conformazionale si parla di
 - Switch I: residui 173-183;
 - **Switch II: residui 195-215;**
 - Switch III: residui 227-238.



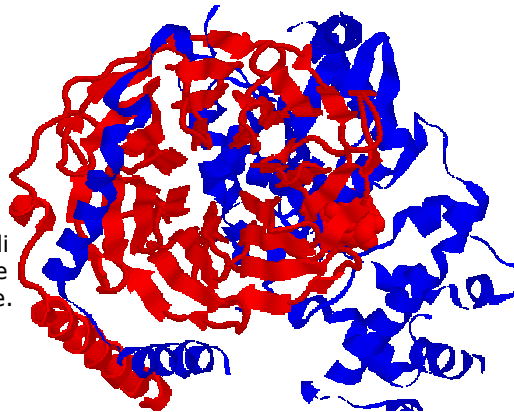
Proteina G

- I cambiamenti strutturali indotti dallo scambio del nucleotide sono localizzati alla superficie della subunità α a contatto con la β inclusa l' α -elica della subunità α e le tre regioni adiacenti
- Poiché la funzione segnale e l'attività GTPasica sono "accese" e "spente" da questo cambiamento conformazionale si parla di
 - Switch I: residui 173-183;
 - Switch II: residui 195-215;
 - **Switch III: residui 227-238.**



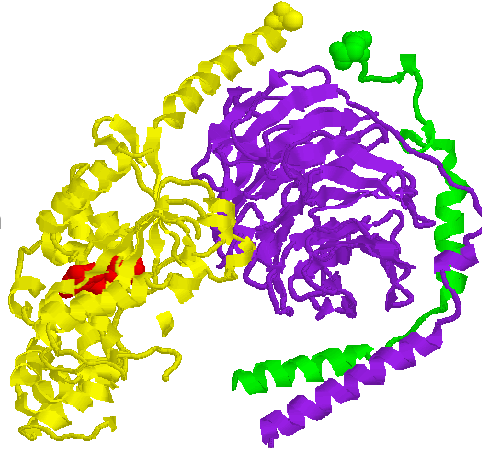
Proteine G – subunità β

- La struttura della **subunità β** dell'eterotrimerico è estremamente interessante.
- È un "β-propulsore" formato da sette domini β-sheet arrangiate come lame in un propulsore
- L'estremità N-terminale della subunità β contiene un α -elica di 25 residui (26-45) e un loop che connette l'elica con il propulsore.
- Le lame del propulsore sono fatte di un β-sheet antiparallelo avvolto su sé stesso.
- La presenza di questa struttura a sette lame sembra esser coinvolta nel legame con le proteine bersaglio.



Proteine G – Interazione con la membrana

- Sia la subunità α che la subunità γ sono ancorate ai lipidi della membrana.
- La subunità α può avere il suo N-terminale legato ad una catena miristoile o palmitoile mentre la subunità γ può essere legata a farnesile o geranylgeranile al C-terminale
- I due terminali sono giustapposti suggerendo una stretta interazione con il bilayer.



Attività GTPasica

- L'attività GTPasica della subunità $G\alpha$ determina la durata della permanenza del segnale nella forma attiva;
- l'idrolisi del GTP a GDP riporta la subunità $G\alpha$ nella forma inattiva che si lega al dimero $G\beta\gamma$.

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

27

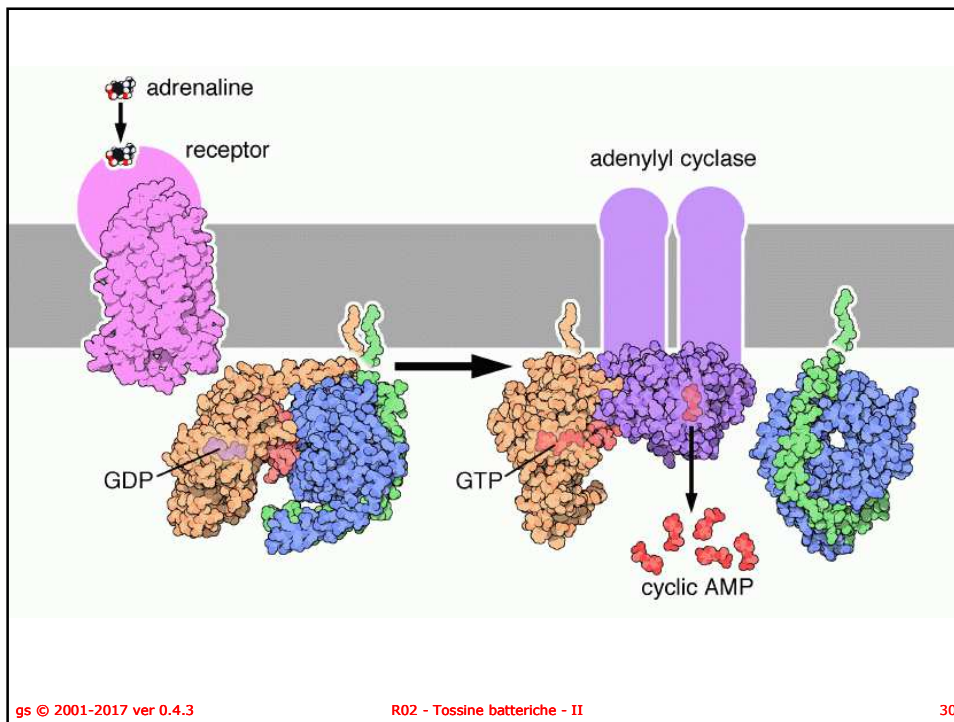
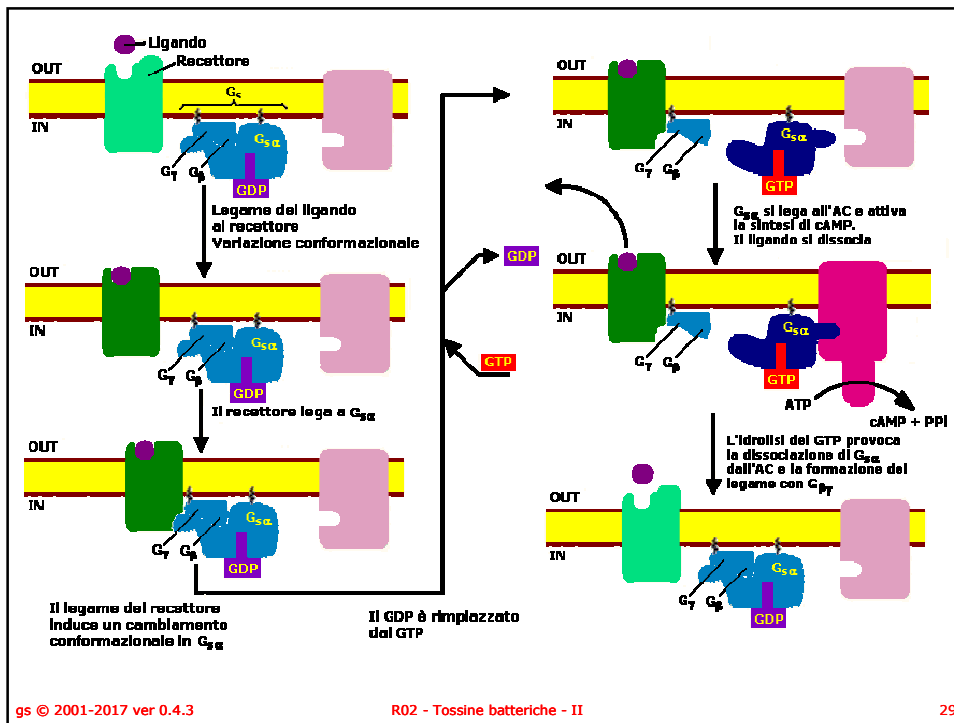
- Quasi tutti gli enzimi che idrolizzano nucleosidi fosfati trifosfati, compresi Ras e Gα, richiedono ioni Mg^{2+} per l'attività catalitica. Il Mg^{2+} è coordinato a un atomo di ossigeno del fosfato β e γ del GTP e alle catene laterali dei residui Ser 17 e Thr 35 di Ras.
- Due molecole di acqua completano la coordinazione del magnesio.

Attività GTPasica

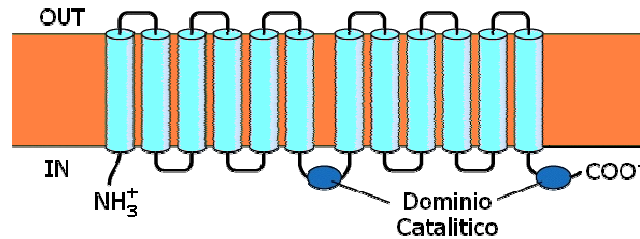
gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

28

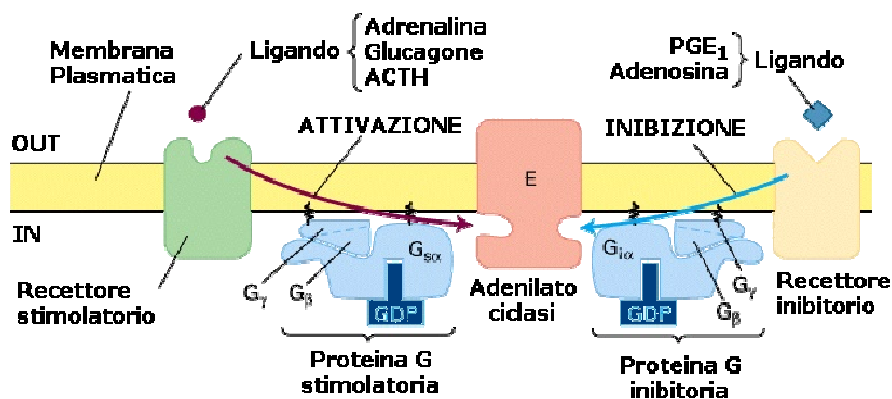


Struttura dell'adenilato ciclasi

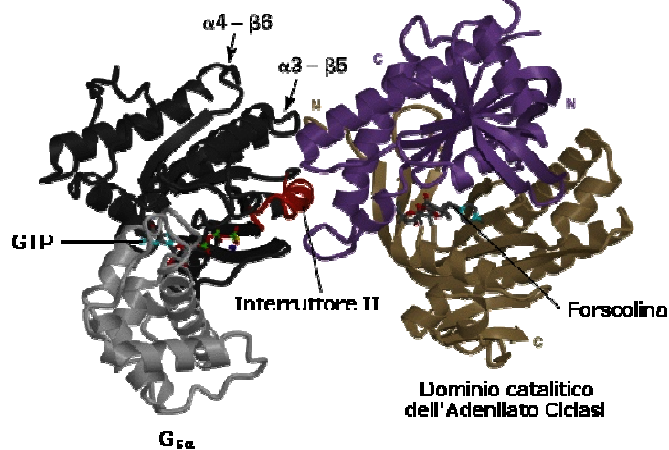


- L'enzima legato alla membrana possiede due domini catalitici simili che si affacciano sulla superficie citosolica della membrana e due domini integrali di membrana, ognuno dei quali si pensa essere formato da sei α -eliche transmembrana.
- Le sei isoforme di adenilato ciclasi, possono essere attivate o inibite dalle proteine G che trasducono i segnali.

Adenilato ciclasi



Adenilato ciclasi



- Sono due sono le regioni di G_{α} -GTP che interagiscono con l'adenilato ciclasi.
 - $G_{s\alpha}$ -GTP: l'elica dell'interruttore II e l'ansa $\alpha 3$ - $\beta 5$.
 - $G_{i\alpha}$ -GTP: l'elica dell'interruttore II e l'ansa $\alpha 4$ - $\beta 6$.

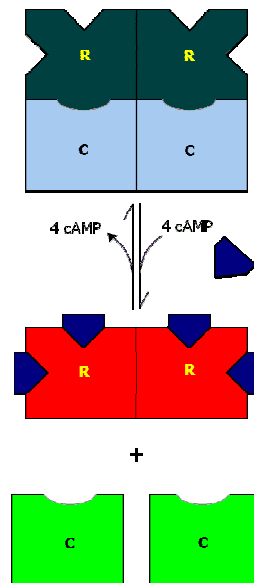
gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

33

Protein Kinasi A

- cAMP attiva la PKA.
- La PKA è costituita da due tipi di subunità:
 - una subunità regolatrice (R) di 49 kd, con alta affinità per cAMP e
 - una subunità catalitica (C) di 38 kd.
- In assenza di cAMP la subunità regolatrice e la subunità catalitica formano un complesso R_2C_2 enzimaticamente inattivo.
- Il legame di due molecole di cAMP a ciascuna delle due subunità regolatrici determina la dissociazione di R_2C_2 in una subunità R_2 e due subunità C.

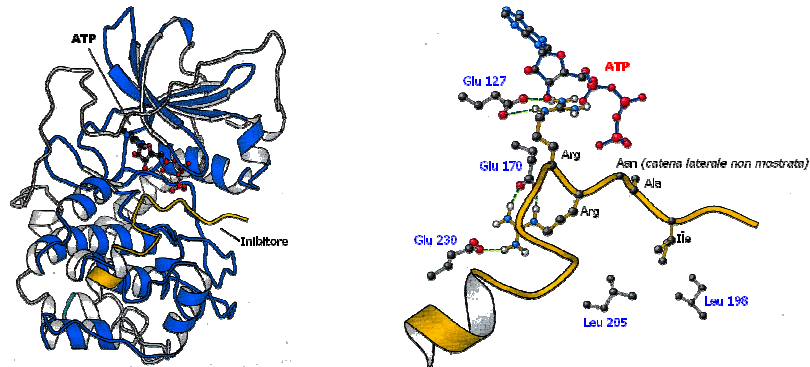


gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

34

Protein Kinasi A



- Ciascuna catena R contiene la sequenza Arg-Arg-Gly-Ala-Ile, uguale alla sequenza consenso per la fosforilazione se si eccettua la presenza di alanina al posto di una serina.
- Nel complesso R_2C_2 questa *sequenza pseudosubstrato* di R occupa il sito catalitico di C, impedendo l'entrata di altri substrati proteici.
- Il legame di cAMP alle catene R_2 estrae allostericamente le sequenze pseudosubstrato dai siti catalitici.
- Le catene C rilasciate sono libere di legare e fosforilare proteine bersaglio.

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

35

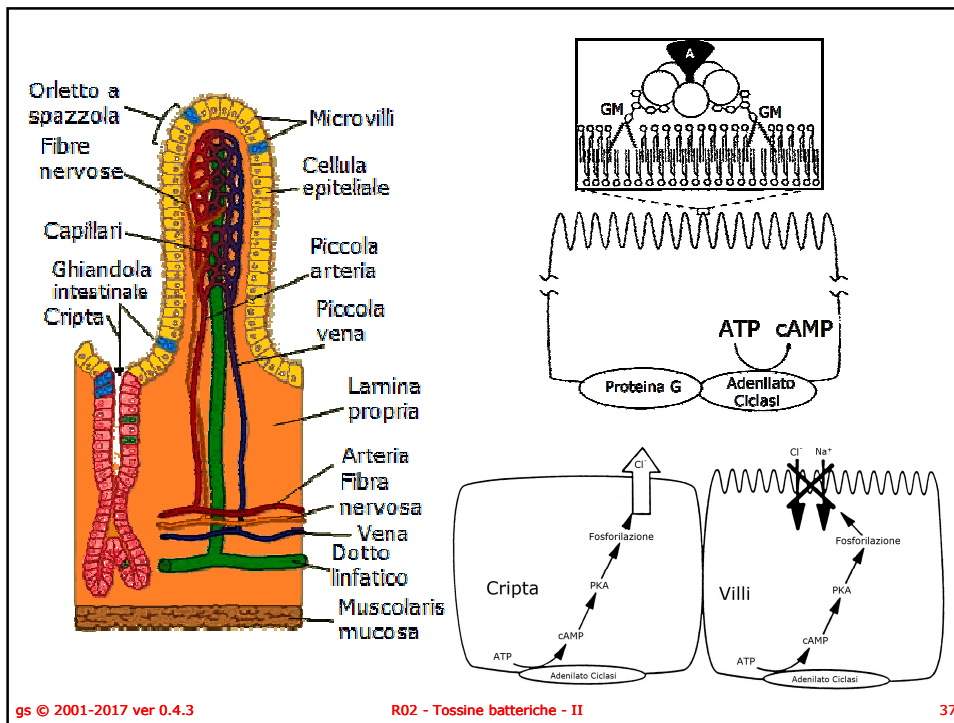
Meccanismo d'azione

- L'aumento di cAMP attiva la protein-kinasi A, che porta alla fosforilazione di proteine;
- La fosforilazione delle proteine porta ad una aumentata secrezione di Cl^- dalle cellule della Cripta e diminuito assorbimento di $NaCl$ da parte dei villi;
- Ciò produce un aumentato rilascio di acqua da parte delle cellule intestinali.

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

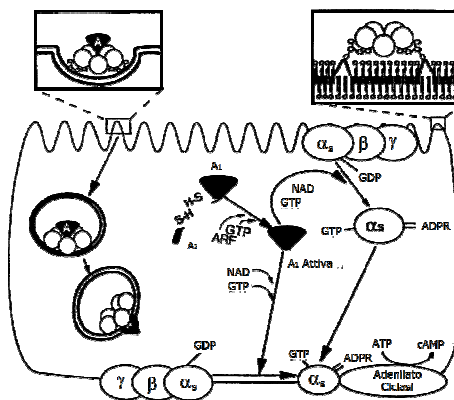
R02 - Tossine batteriche - II

36



Colera

- Normalmente:
 - Adenilato ciclas produce cAMP;
 - Le cellule epiteliali secernono HCO_3^- come fluido digestivo in risposta ad un piccolo aumento di cAMP
- In presenza di tossina colerica
 - Sovra attivazione dell'adenilato ciclas attraverso ADP-ribosilazione
 - Causa aumento di cAMP di circa 100 volte
 - Largo aumento di emissione di acqua e Cl^-



Antrace

- L'antrace, detta anche "carbonchio", è un'infezione acuta causata dal batterio *Bacillus anthracis*.
- Generalmente si manifesta come malattia endemica in animali erbivori selvatici o domestici: ovini, bovini, equini e suini.
- Può anche svilupparsi nell'uomo, per esposizione ad animali infetti, tessuti di animali infetti, inalazione di spore del batterio od ingestione di cibo contaminato da queste.
- Il batterio produce endospore che rimangono nel terreno, dove possono sopravvivere per decine di anni.
- Quando un erbivoro le ingerisce cominciano a moltiplicarsi all'interno dell'animale e possono ucciderlo. Nella carcassa il batterio continua a riprodursi fino a quando non ha esaurito le sostanze nutritive.
- Giunto a questo stadio il batterio produce nuove endospore.
- <http://www.youtube.com/watch?v=T1miakCvscM>

Antrace

- *Bacillus anthracis*
 - Produce una tossina di tipo III (2A + B)
 - A: Fattore letale (LF) 90 kDa
 - A: Fattore edematoso (EF) 89 kDa
 - B: Antigene protettivo (PA) 83 kDa
 - Batterio gram + forma spore
 - Presente nel suolo
 - L'antrace deriva dall'esposizione alle spore per:
 - Invasione in ferite - cutaneo (più frequente)
 - Inalazione - polmonare (raro)
 - Ingestione - gastrointestinale (rarissimo)
 - Non c'è trasmissione tra persone

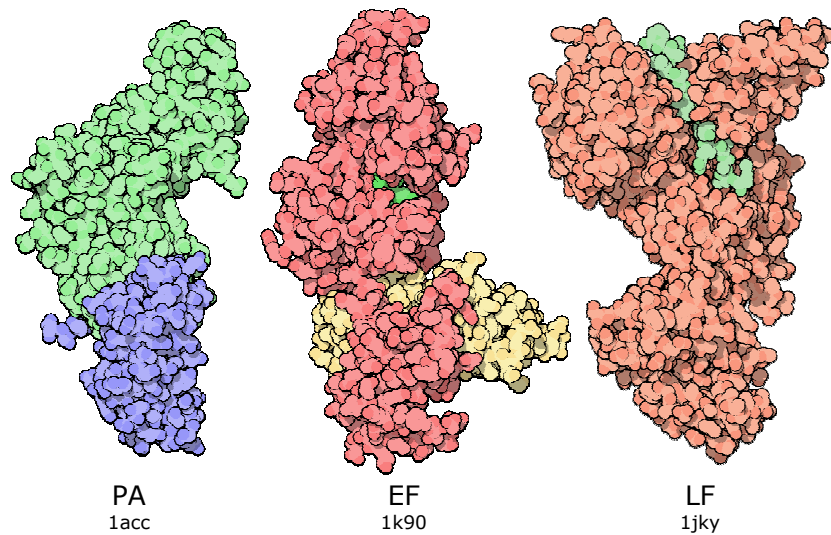
Sintomi dell'antrace

- Cutaneo
 - Le spore entrano attraverso un'abrasione o un taglio della pelle
 - La germinazione delle spore causa ulcerazioni locali con edema
 - Gli antibiotici prevengono la diffusione dell'infezione
- Polmonare
 - Ciclo di vita:
 - I macrofagi fagocitano le spore che raggiungono i linfonodi dove germinano
 - Le cellule sono rilasciate emettendo tossine e le cellule in riproduzione si diffondono
 - Sintomi
 - Febbre e brividi, respiro corto, tosse, massiccia effusione pleurica
 - Sepsi, shock e morte

Meccanismo d'azione

- Due tossine
 - Tossina Edematosa
 - Enzima adenili-ciclasico: Aumenta il livello di cAMP
 - Causa edema risposta pro infiammatoria
 - Tossina Letale
 - Metalloproteasi
 - Taglia le MAP kinasi richieste per la proliferazione e il signalling cellulare
 - Causa una soppressione generale del sistema immunitario
- L'entrata nella cellula è comune per entrambe le tossine e si avvale della presenza di B (antigene protettivo – PA) che viene processato dalla cellula e forma un sistema che trasloca le tossine dall'endosoma al citoplasma

Struttura e meccanismo d'azione



gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

43

Meccanismo d'azione

- I tre fattori vengono emessi da *Bacillus anthracis*;
- PA lega un recettore di membrana (*anthrax toxin receptor* - ATR) che lo immobilizza;
- Viene clivato da una endoproteasi a serina della superficie cellulare (furina) che libera un frammento da 20kDa da PA;
- Il frammento restante di 63kDa forma un eptamero legato alla membrana che lega LF o EF con alta affinità;
- Il complesso è internalizzato per endocitosi e trasloca le tossine nel citoplasma sfruttando il gradiente protonico ;
- EF possiede un'attività adenilato ciclasica Ca^{++} calmodulina dipendente;
- LF è una proteasi specifica per mitogen-activated protein kinase kinases 1 e 2 (MAPKK1 e 2) che vengono inattivate.

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

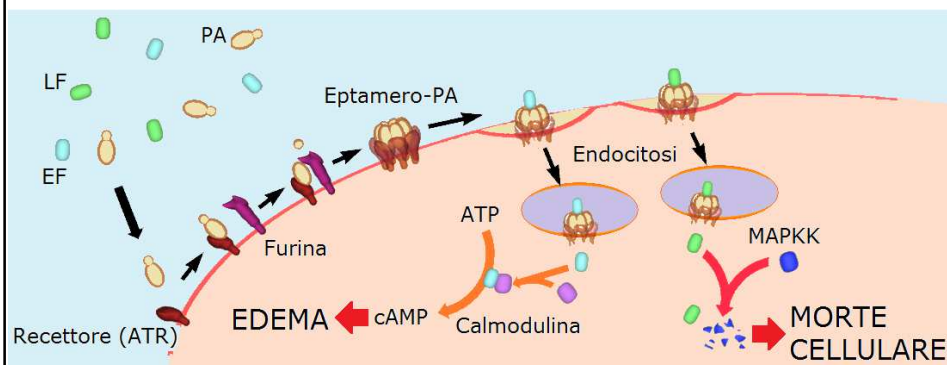
R02 - Tossine batteriche - II

44

Recettori di membrana

- Il recettore di membrana che riconosce PA può essere diversamente espresso in diverse linee cellulari incluse cellule del sistema immunitario :
 - receptors tumor endothelium marker (TEM)8
 - capillary morphogenesis protein (CMG)2
- Questi recettori di superficie sono associati con gli LDL-receptor-related protein (LRP)6, che sono essenziali per l'endocitosi di EF e LF.

Meccanismo d'azione



Antigene protettivo

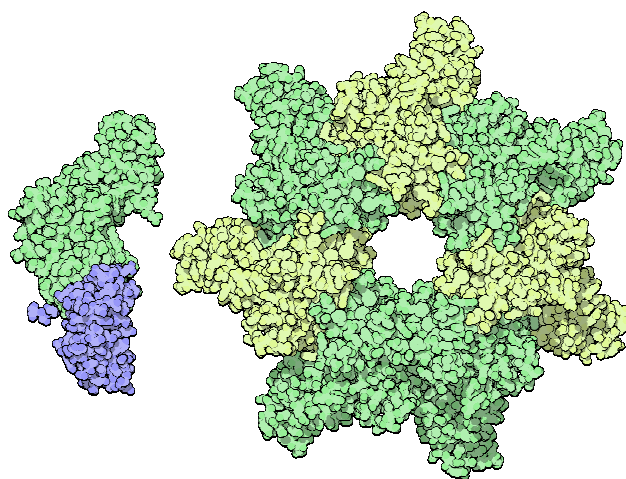
- È chiamato così per il suo uso come vaccino per l'antrace (uso controverso);
- Agisce come la porzione "B" nelle tossine AB;
- Interagisce sia con EF che con LF;
- Forma un canale nella membrana dell'ospite;
- È la meglio caratterizzata delle tre tossine dell'antrace
 - Deve essere clivata per diventare attiva;
 - Il precursore si lega alla membrana come struttura da 83 kDa ad un "receptors tumor endothelium marker (TEM)8" e a "capillary morphogenesis protein (CMG)2" che sono espressi in diverse isoforme da molte cellule comprese cellule del sistema immunitario
 - La proteasi dell'ospite (furina) taglia PA83 in due porzioni: PA20, che dissocia e PA63 che forma il poro sulla membrana.

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

47

Antigene protettivo



83 KdA
1acc

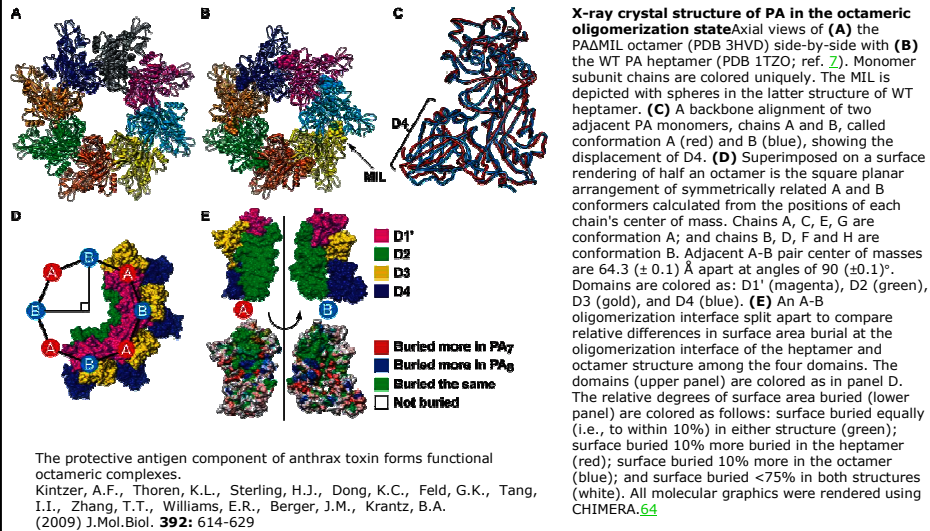
Eptamero
1tzo

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

48

Antigene protettivo: 7 o 8?

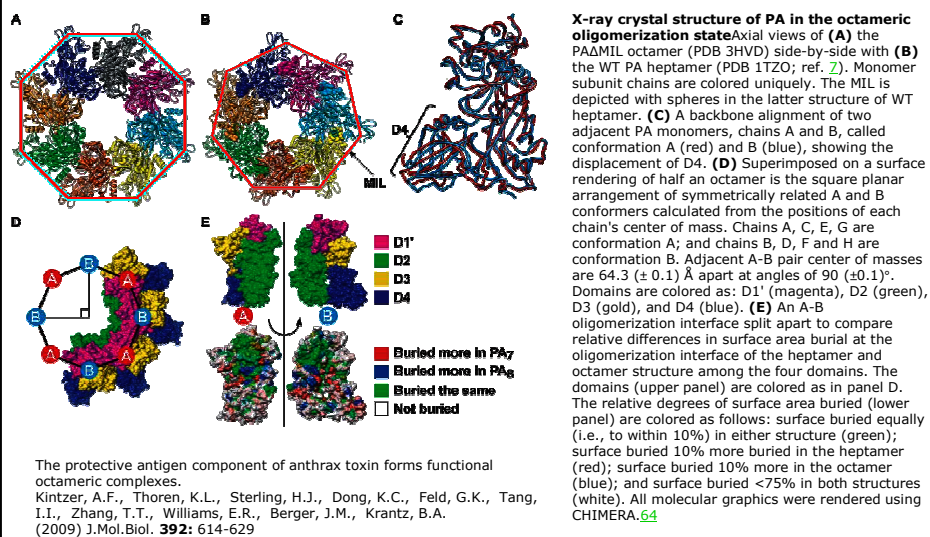


gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

49

Antigene protettivo: 7 o 8?

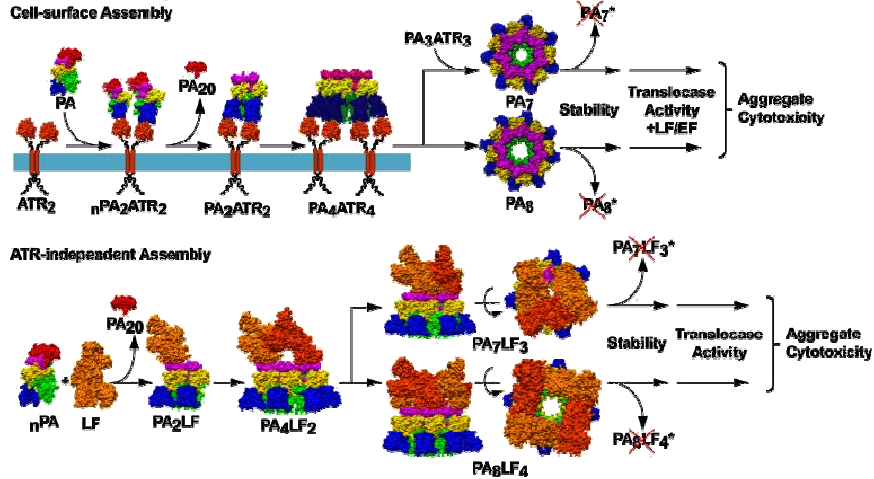


gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

50

Antigene protettivo: 7 o 8?



Heterogeneous assembly mechanism may modulate toxin activity(A) On cells, PA may encounter dimeric ATR sites and assemble into PA₂ and PA₄ intermediates. Intermediates can combine to form either PA₈ or PA₇, which can load with EF and/or LF. (In principle, LF and EF may be involved in the mechanism as well to produce similar outcomes.) During extracellular or ATR-independent assembly, PA may encounter LF or EF, making the intermediates, PA₂LFN and PA₄(LFN)₂, which then form either PA₈(LFN)₄ or PA₇(LFN)₃. Models of LF-PA complexes are derived from a theoretical model.²⁰ Toxin activity is a combination of the oligomer's stability and translocase activity; instability may lead to the formation of inactive oligomeric complexes (*).

Antigene protettivo: 7 o 8?

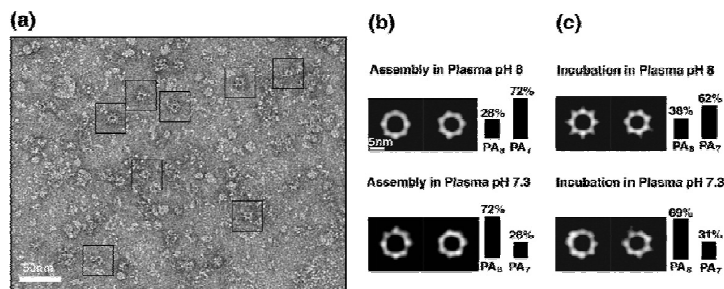
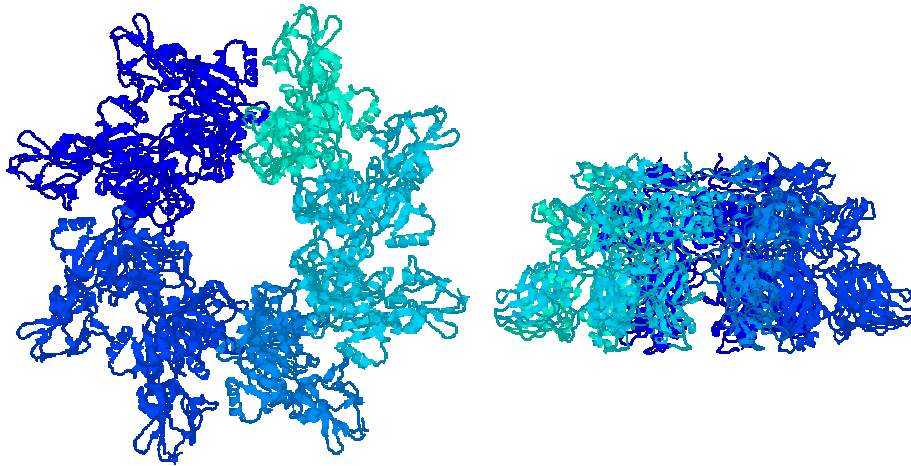


Fig. 1. PA₈ is the predominant oligomer that forms in bovine plasma. Negative stain EM analysis of His₆-PA-LFN₄ complexes either assembled in or incubated in defibrinated bovine plasma at 37 °C. Class-averaged images containing 10–100 particles of the resulting PA₇ and PA₈ oligomers. The total particle count *n* and the percentages of each oligomer are indicated (black bars next to the representative images). (a) An electron micrograph at a magnification of 49,000× shows affinity-purified His₆-PA-LFN₄ oligomers, resulting from assembly in bovine plasma at pH 8.0. Representative soluble complexes are outlined by black boxes. (b) Class-averaged images of affinity-purified complexes assembled in bovine plasma at pH 8.0 (top, *n* = 1132; 28% PA₈; 72% PA₇) and at pH 7.3 (bottom, *n* = 434; 72% PA₈; 28% PA₇). (c) Class-averaged images of the soluble complexes remaining after incubating pre-assembled PA complexes in bovine plasma for 5 min at 37 °C. The starting mixture of His₆-PA-LFN₄ oligomers contained 74% PA₇ and 26% PA₈ as determined by EM (*n* = 2572). Final class-averaged images are shown for incubation at pH 8 (top, *n* = 861; 38% octamer; 62% heptamer) and at pH 7.3 incubation (bottom, *n* = 300; 69% octamer; 31% heptamer).

Antigene protettivo



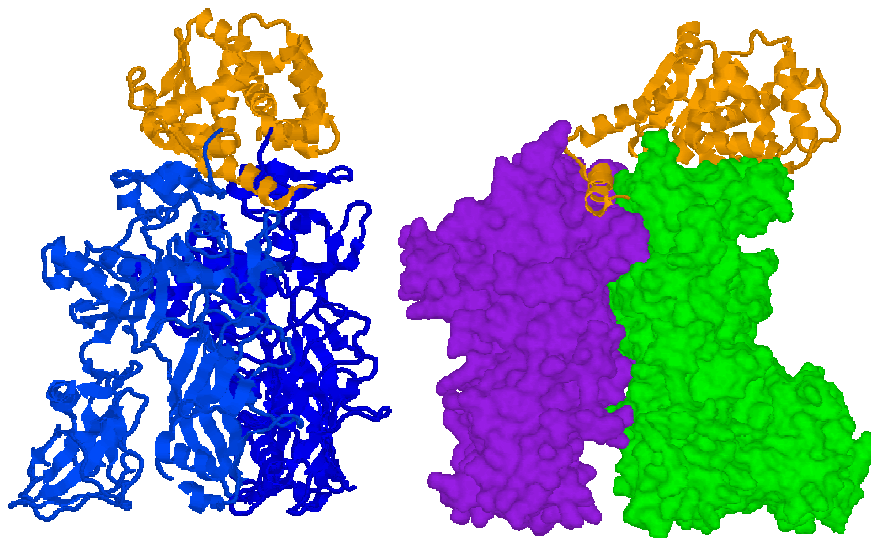
3hvd

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

53

Unfolding di LF da parte di PA

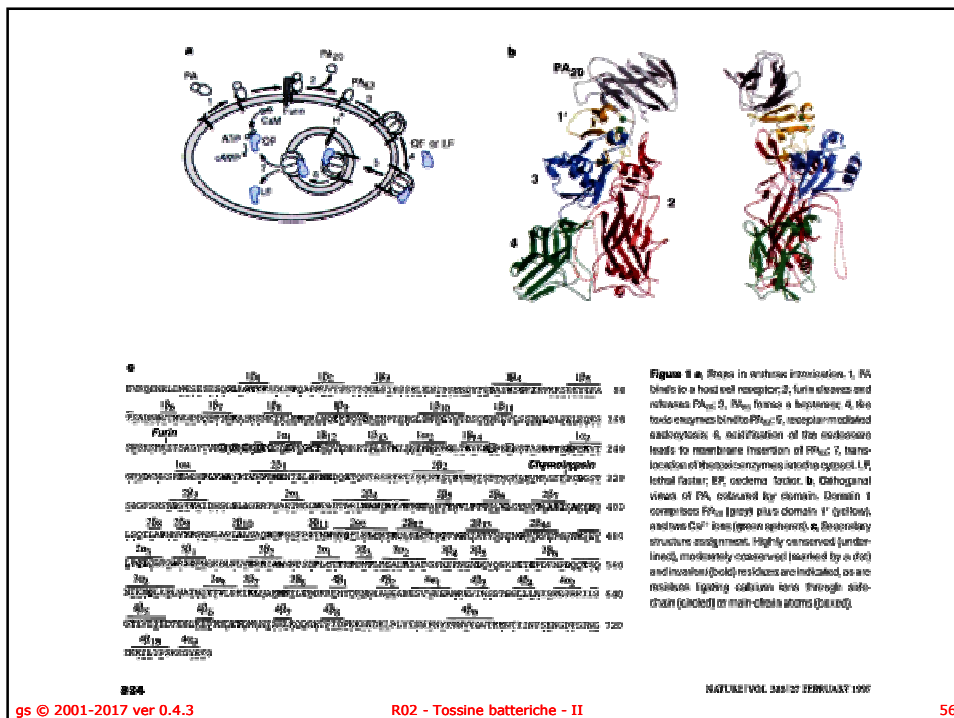
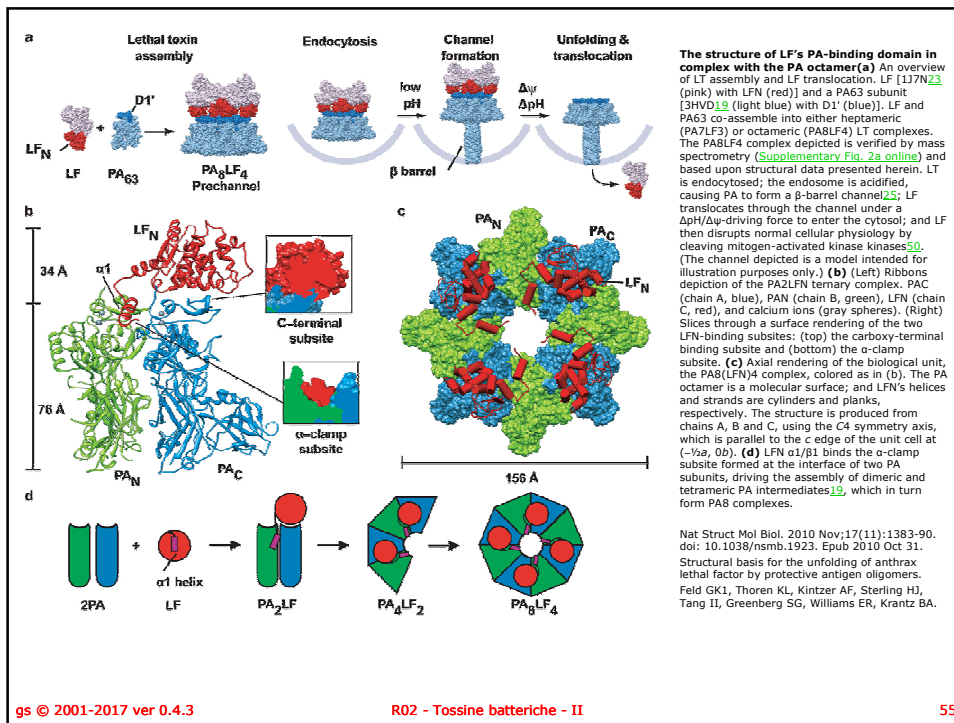


3kvw

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

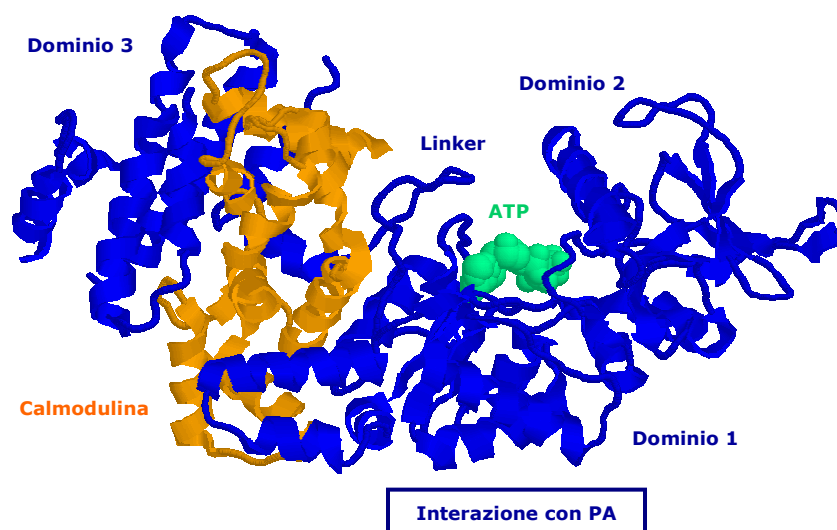
54



Fattore edematoso

- Peso molecolare 84 kDa
- È una adenilato-ciclastasi-calmodulina dipendente che provoca un aumento di cAMP;
- L'aumento di cAMP disturba l'omeostasi cellulare dell'acqua e questo provoca l'edema (vedi tossina colerica).

Fattore edematoso



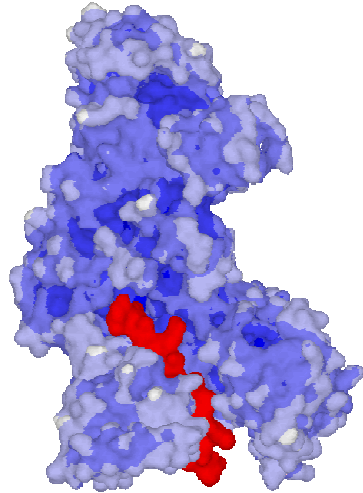
Fattore Letale

- Il Fattore Letale (Lethal factor: LF) è chiamato in questo modo poiché produce la morte rapida in animali al quale viene iniettato;
- È una proteina con PM di circa 90kDa;
- Inibisce la funzione dei neutrofili *in vitro*; la funzione dei neutrofili è anche inibita in pazienti con antrace cutaneo;
- Stimola i macrofagi a rilasciare TNF- α e IL-1 β , che possono portare a morte improvvisa;
- È una Zn²⁺ metalloproteasi altamente specifica che taglia membri della famiglia delle mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) alla porzione amino terminale producendo inibizione di uno o più vie di segnalazione;

Struttura del fattore letale

- LF (A1) è costituito da quattro domini:
 - Dominio I: lega il componente (B) che trasloca la tossina, l'antigene protettivo (PA);
 - Domini II, III e IV che insieme producono un lungo e profondo solco che alloggia la porzione dei sedici residui N-terminale di MAPKK-2 prima dell'idrolisi;
 - Il Dominio II assomiglia alla tossina ADP-ribosilante di *Bacillus cereus*, con il sito attivo mutato per aumentarne la selettività di substrato;
 - Il Dominio III è inserito nel dominio II e sembra essere derivato dalla duplicazione di un elemento strutturale del Dominio II;
 - Il Dominio IV è correlato alle zinco metallo proteasi e contiene il centro catalitico; assomiglia al Dominio I;
- La struttura di questa proteina si è evoluta attraverso una serie di processi duplicazione, mutazione e fusione genica fino ad produrre un enzima con una altissima e inusuale specificità.

Fattore Letale

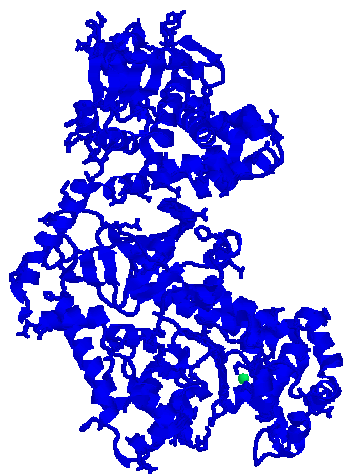


gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

61

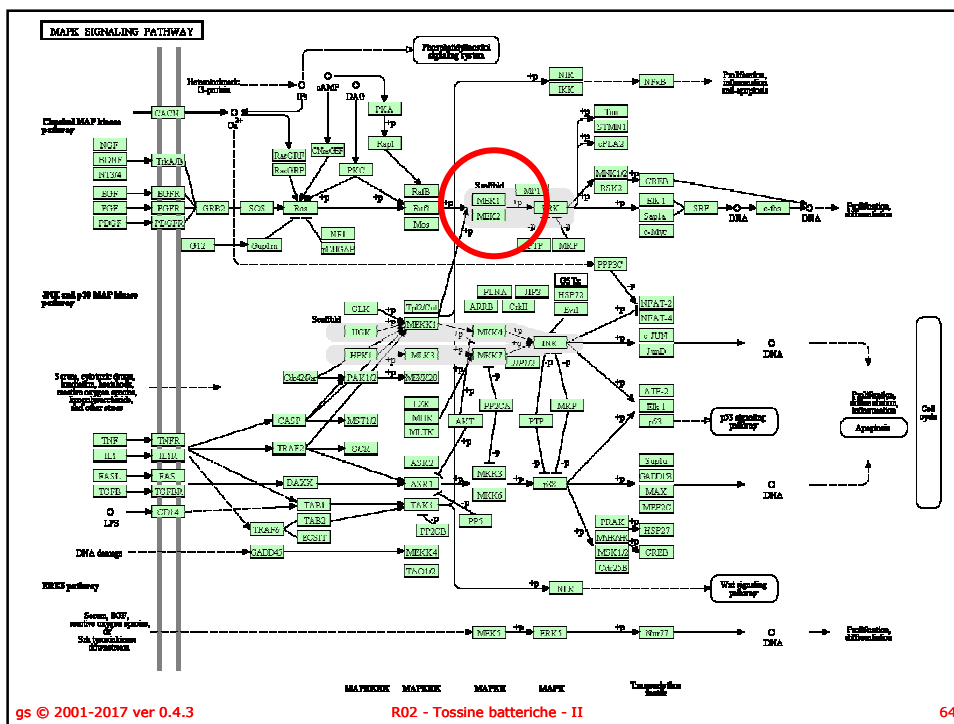
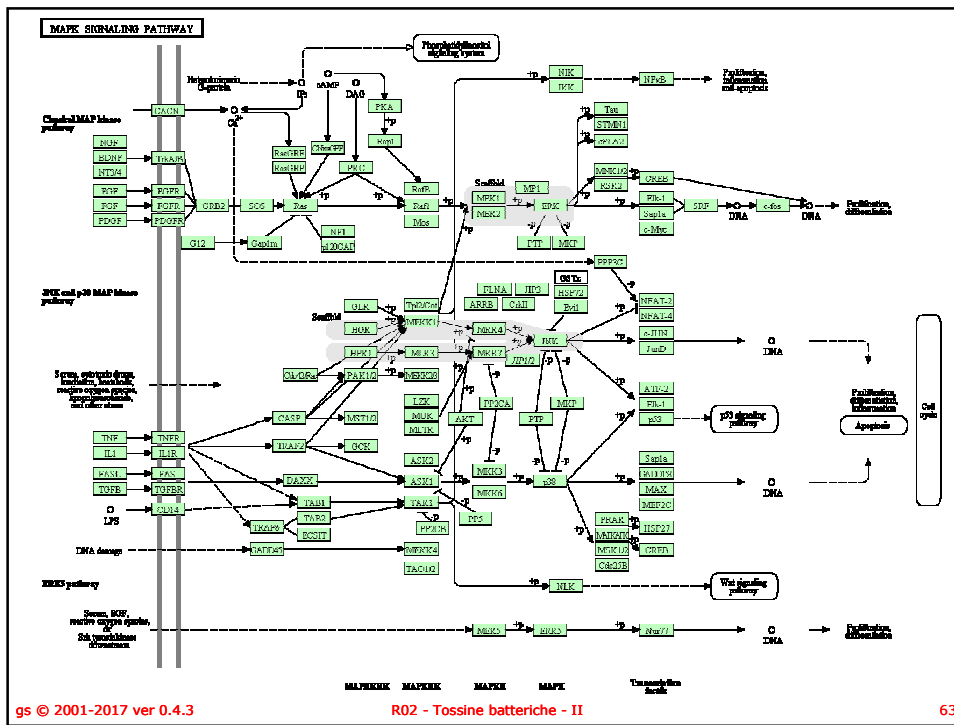
Fattore Letale



gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

62



Endotossine

Endotossine

- Definizione fuorviante
- Non sono internalizzate
- Sono presenti all'esterno dei microrganismi:
 - Lipopolisaccaridi da gram -
 - Acido Lipoteicoico da gram +
- Tossica solo ad alte concentrazioni;
- Attivazione del sistema immunitario;
- Hanno effetti diversi se presenti a concentrazioni alte o basse;
- Tutte producono la medesima sintomatologia:
 - A bassa concentrazione: brividi, febbre, debolezza, dolenzia generale;
 - Ad alta concentrazione: coagulazione e necrosi dei tessuti, shock, morte. Possono indurre l'aborto
 - La febbre è dovuto alla risposta pirogena.

Endotossine

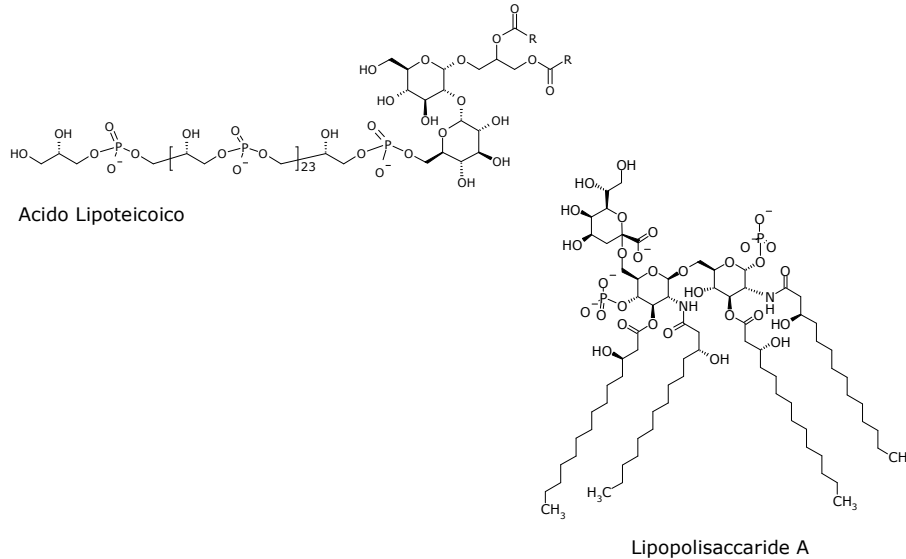
- Le endotossine non promuovono la formazione di anticorpi efficienti.
- Gli organismi che producono endotossine:
 - *Salmonella typhi*
 - *Proteus spp.*
 - *Pseudomonas spp.*
 - *Neisseria spp.*
- La sterilizzazione NON garantisce dall'eliminazione delle endotossine.

Rilevamento delle endotossine

- LAL test (LAL, Limulus Amebocyte Lysate)
- Utilizza il lisato di cellule del sangue, amebociti, del *Limulus polyphemus* per determinare e quantificare la presenza di endotossine prodotte da batteri gram-negativi.
- In natura gli amebociti del *Limulus polyphemus*, in presenza di endotossine batteriche, attivano una reazione enzimatica a catena che determina una coagulazione locale del sangue.



Endotossine



gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

69

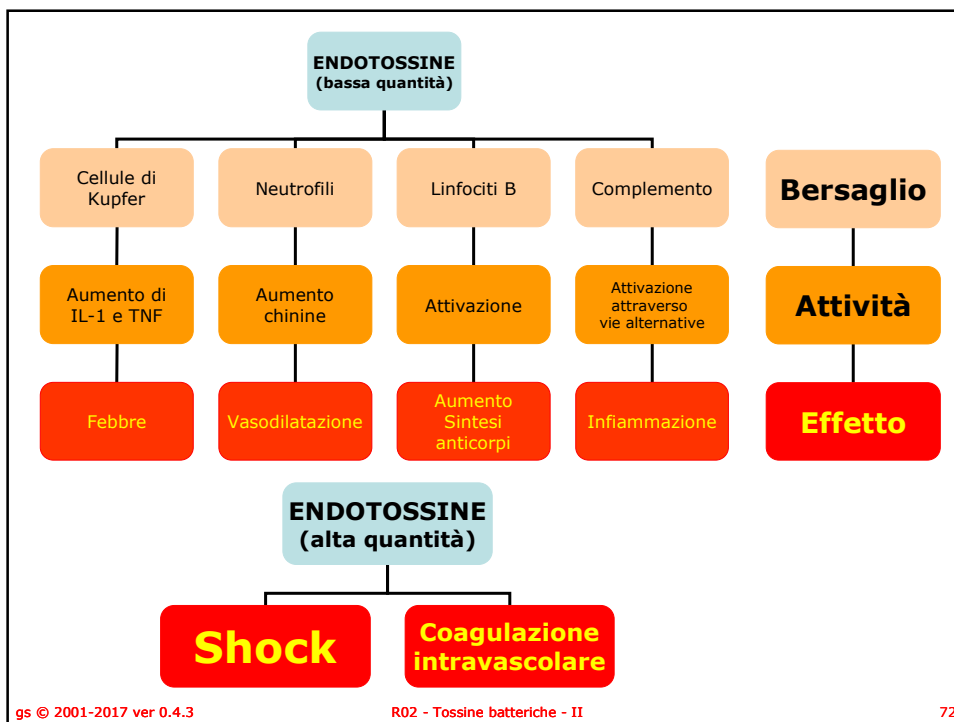
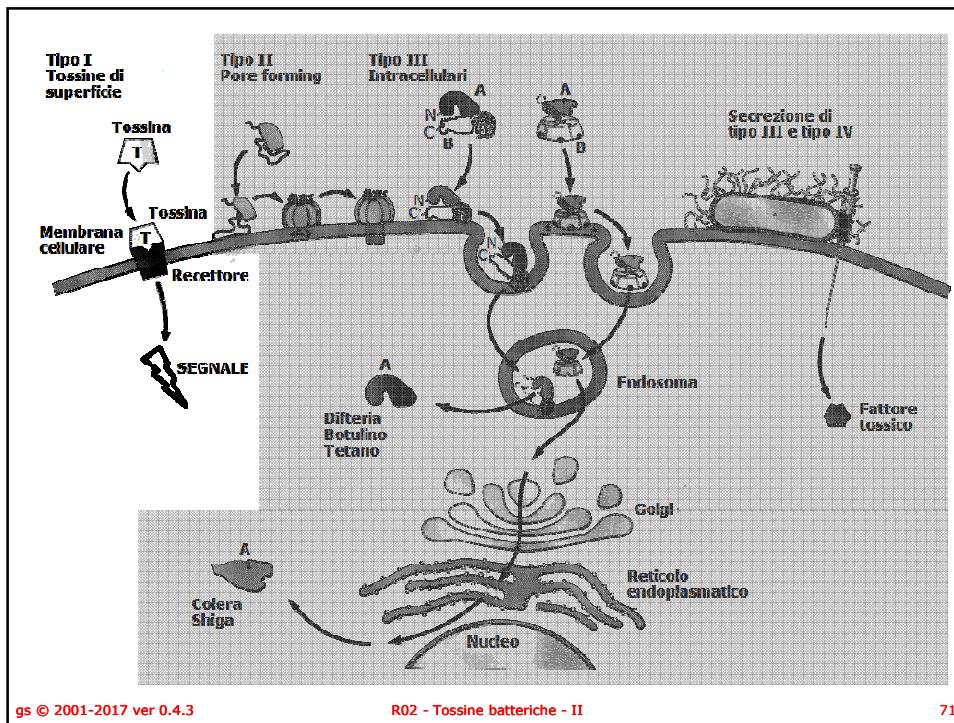
Meccanismo d'azione

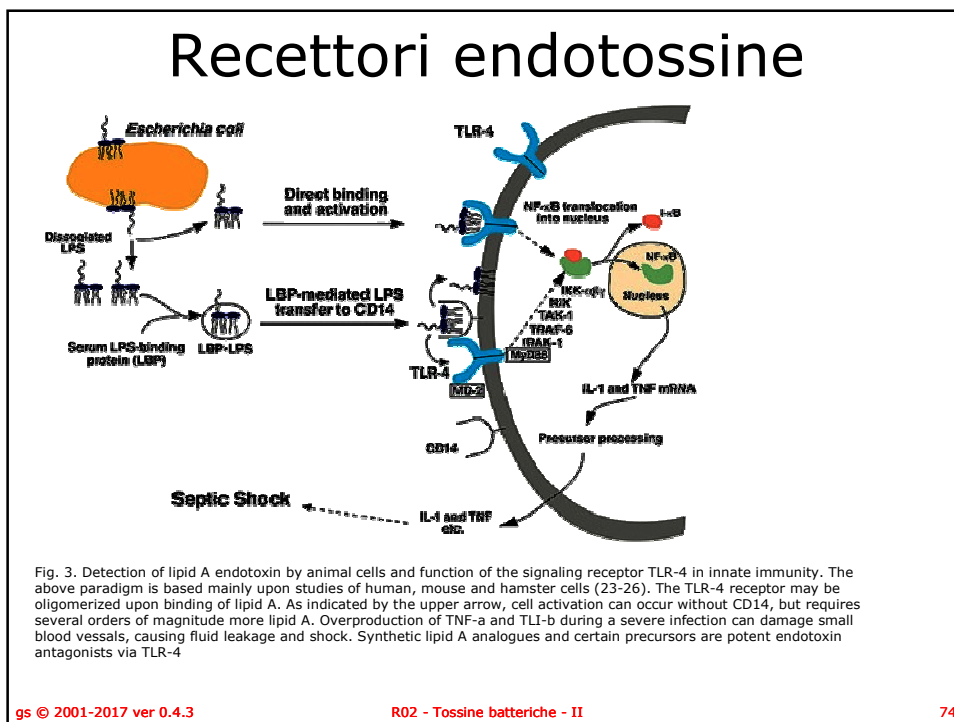
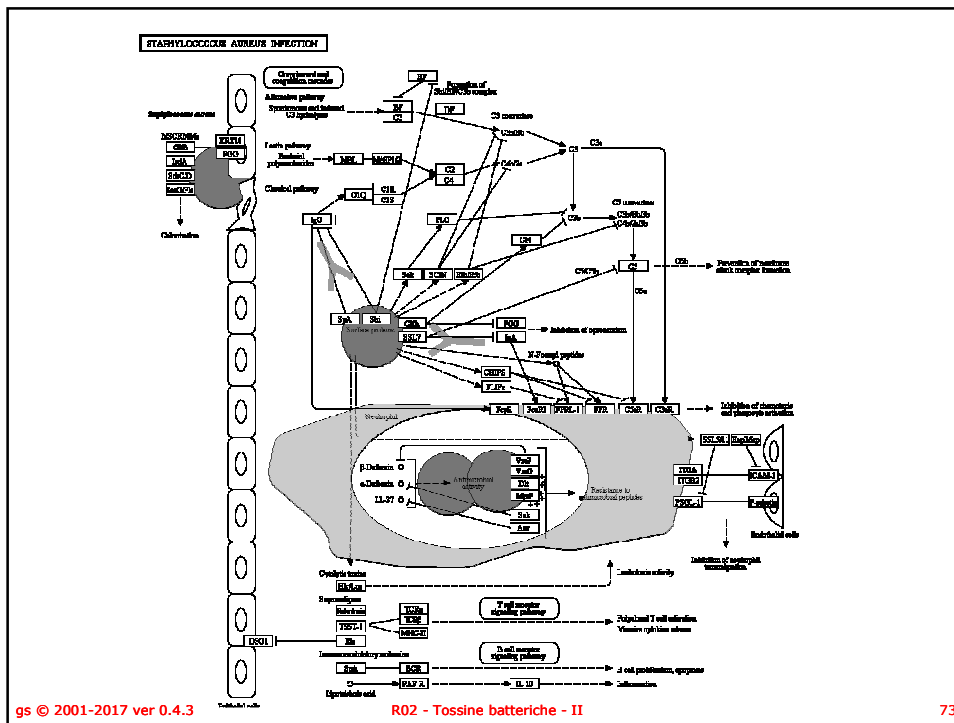
- Superantigeni (Tossine di tipo I)
 - Causano un'intensa risposta immunitaria
 - Le endotossine si legano a recettori su:
 - Macrofagi
 - Neutrofili
 - Linfociti
 - con rilascio di citochine.
 - Attivano il complemento
 - Infiammazione

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

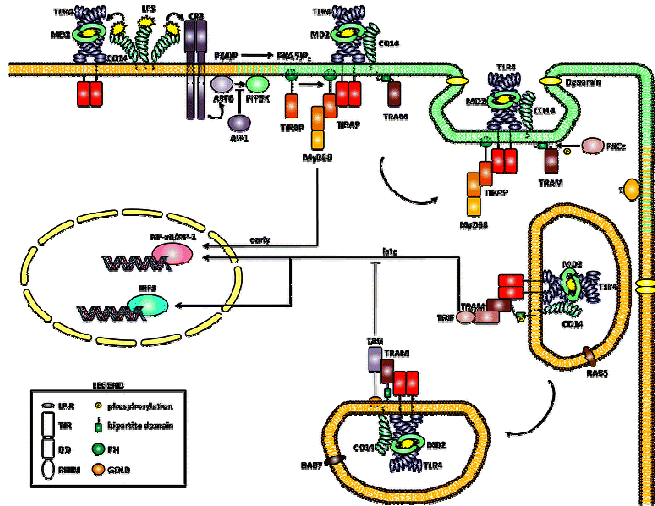
R02 - Tossine batteriche - II

70



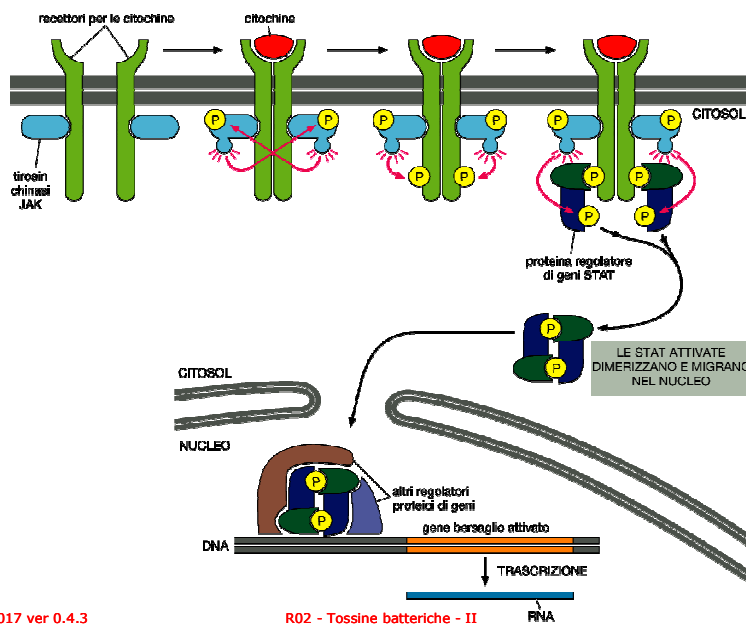


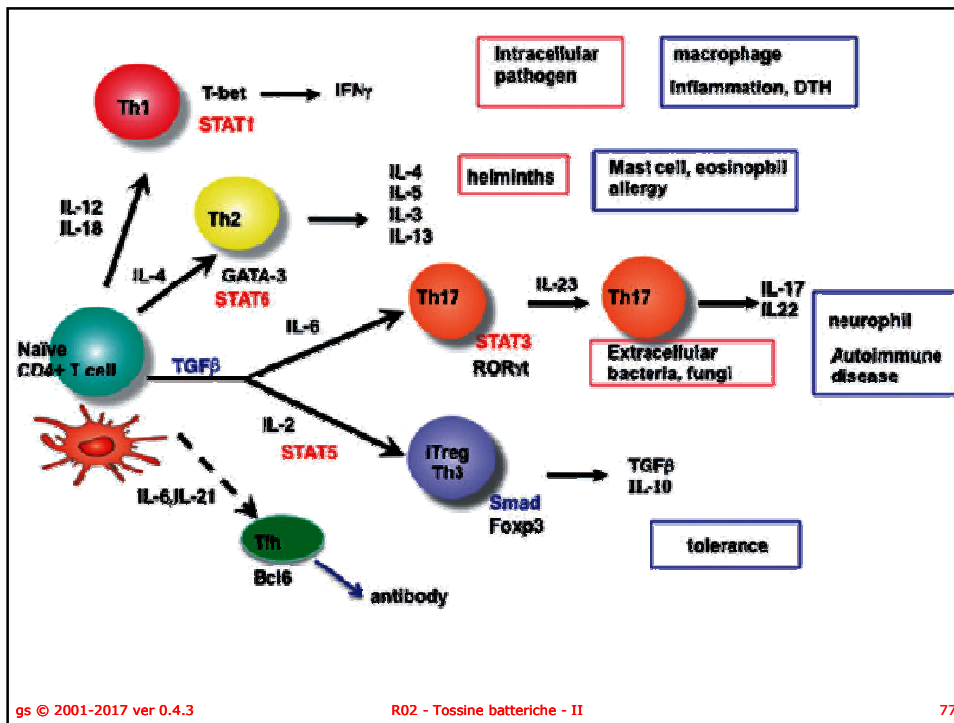
Recettori endotossine



Review
Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling
Renato Ostuni, Ivan Zanoni and Francesca Granucci
Cell. Mol. Life Sci. (2010) 67:4109–4134

Citochine





Via di segnalazione delle JAK/STAT

- **JAK** (Just Another Kinase): kinesi Janus, almeno quattro.
 - Il nome è dovuto alla presenza di due domini molto simili (bifronte).
- **STAT** (Signal Transducers and Activators of Transcription);
 - almeno sette.
 - Si ancorano al recettore fosforilato mediante il loro dominio SH2.
 - Fosforilati su Tyr da JAK si staccano dal recettore, formano dimeri (omo- o etero-) che migrano nel nucleo e regolano la trascrizione
 - Utilizzata da GH, prolattina, citochine (eritropoietina) e linfocine, interleuchine, interferone, e alcuni fattori di crescita (CNTF: fattore neurotrofico ciliare), leptina (prodotta dal tessuto adiposo)
 - Come la maggior parte delle tirosina kinesi regola la proliferazione cellulare.
 - Regola anche la maturazione degli eritrociti

JAK/STAT

- Il recettore è attivato dal segnale della citochina (interferone, interleuchina, fattore di crescita o altri messaggeri);
- Viene attivata la funzione kinasica di JAK che si autofosforila;
- STAT si lega al recettore fosforilato e transloca nel nucleo dove si lega al DNA e promuove la trascrizione dei geni che rispondono a STAT
- Nei mammiferi ci sono sette geni che codificano per STAT, ognuno dei quali lega una diversa sequenza di DNA
- STAT si lega alla sequenza promotore che controlla l'espressione di un'altra sequenza di DNA con conseguente controllo delle funzioni cellulari come:
 - Crescita
 - Differenziamento
 - Morte cellulare (Apoptosi)
- La via JAK/STAT è conservata dalle muffe ai vermi ai mammiferi (ma non nei funghi e nelle piante).
- L'alterazione o la mancata regolazione della via JAK/STAT può portare a sindromi immuno-deficienti o al cancro.

STAT

- Le proteine STAT (**Signal Transducer and Activator of Transcription**, o **Signal Transduction And Transcription**)
- Regolano la crescita, la sopravvivenza e il differenziamento.
- Sono attivate da JAK.
- Sono coinvolte nello sviluppo del sistema immune e giocano un ruolo essenziale nel mantenere il sistema immunitario e la sorveglianza dei tumori.

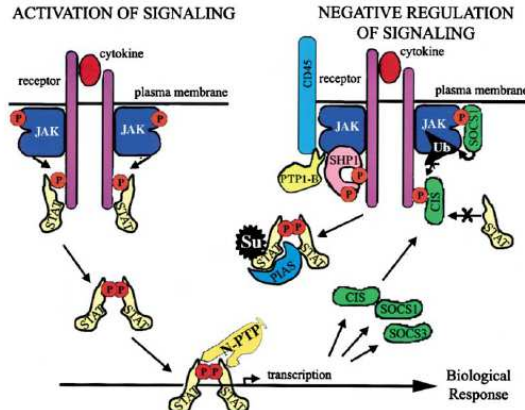
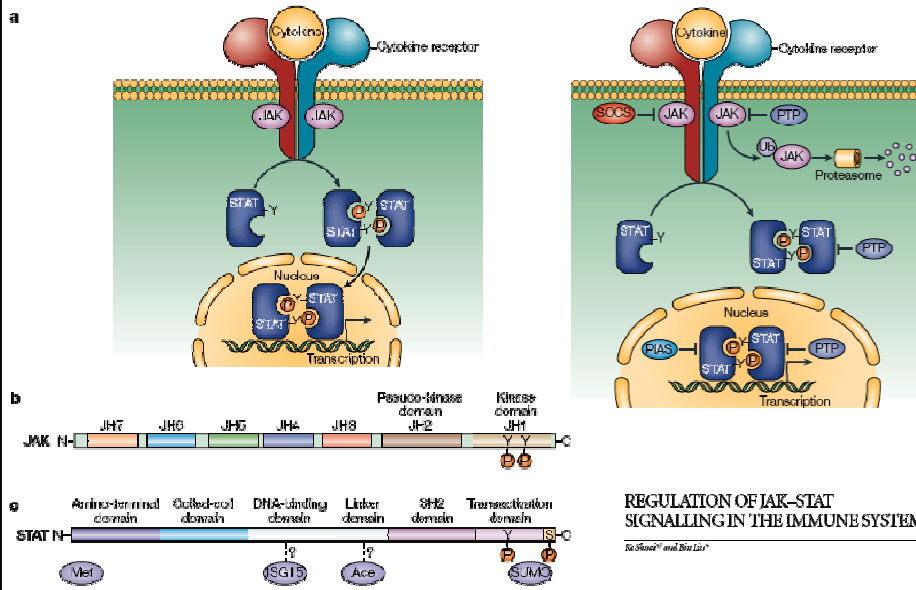


Figure 2. Overview of Cytokine Signaling: Positive and Negative Regulation

Cytokines bind to homodimeric or heterodimeric receptors, which bind Janus kinases (Jaks). Jaks are activated by transphosphorylation and they in turn phosphorylate cytokine receptors, allowing Stats to bind via SH2-phosphotyrosine interactions. Stats themselves are phosphorylated, permitting Stat dimerization and translocation to the nucleus where Stats bind DNA and regulate gene expression. This process is regulated at multiple steps, some of which are summarized here: tyrosine phosphatases such as SHP-1, CD45, and PTP1b may regulate phosphorylation of receptors and Jaks. Dimerized Stats can be bound by PIAS members, which have been found to be SUMO E3 ligases; the depicted sumoylation of Stats, however, is a speculative, albeit reasonable, possibility. Additionally, cytokine stimulation induces the transcription of a family of SH2 containing proteins known as SOCS proteins. SOCS proteins inhibit signaling by multiple means: (1) binding and inhibiting Jaks, (2) binding cytokine receptors and blocking Stat recruitment, and (3) promoting ubiquitination and degradation of the Jak/receptor complex. Stats are dephosphorylated in the nucleus, but the identity of the predominant nuclear Stat phosphatase (N-PTP) remains to be determined.

ment, and (3) promoting ubiquitination and degradation of the Jak/receptor complex. Stats are dephosphorylated in the nucleus, but the identity of the predominant nuclear Stat phosphatase (N-PTP) remains to be determined.

Regolazione di JAK/STAT





Esoenzimi batterici

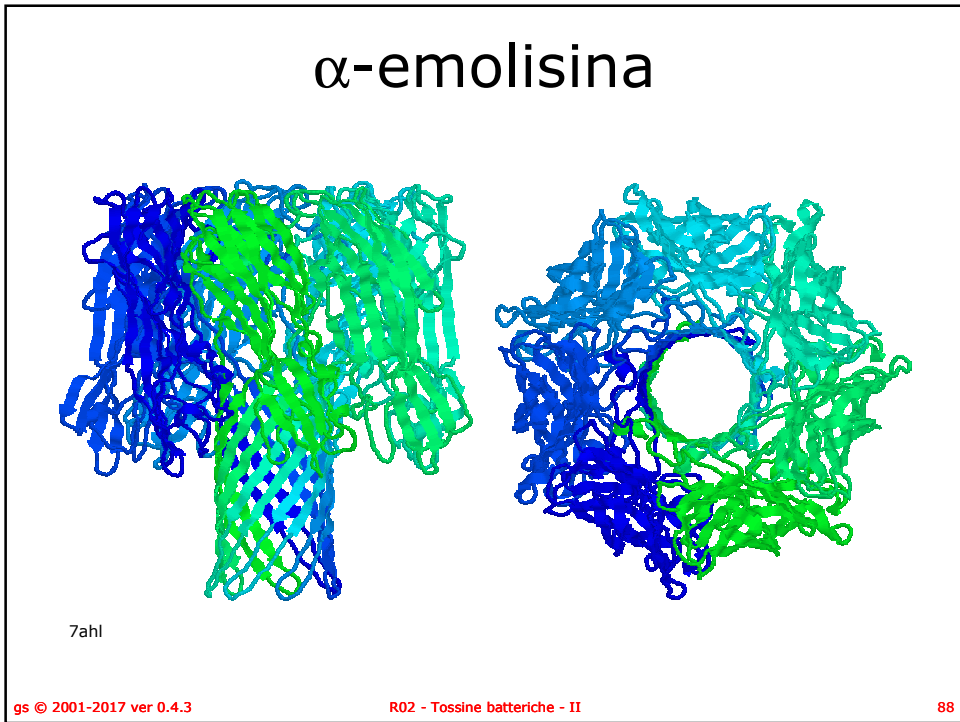
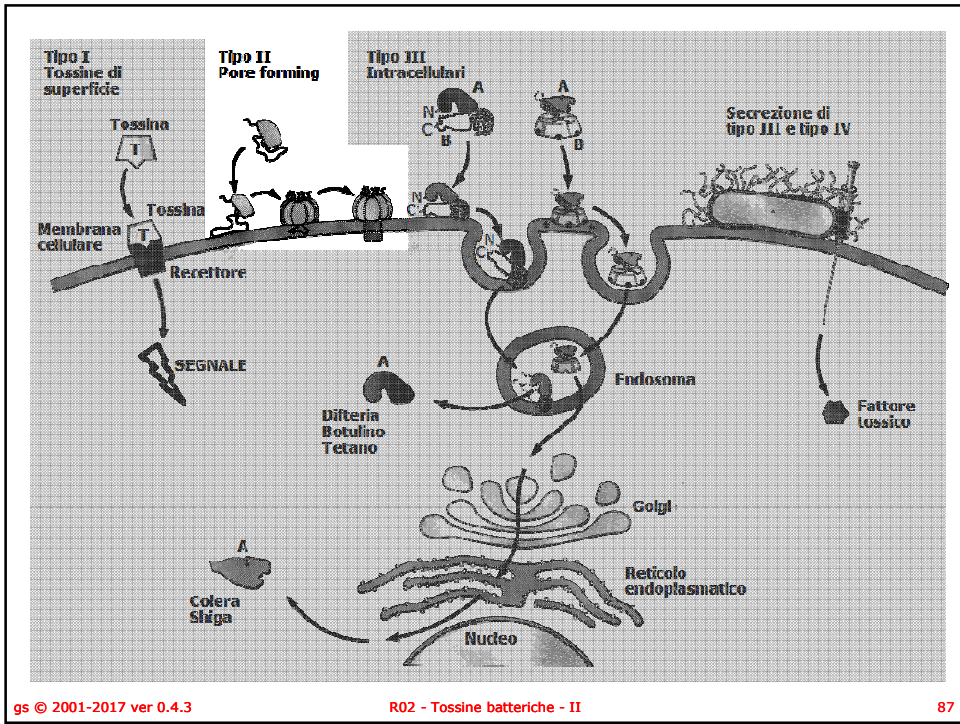
gs © 2001-2017 ver 0.4.3 R02 - Tossine batteriche - II 84

Esoenzimi batterici

- Enzimi secreti da cellule batteriche nella matrice cellulare dell'ospite
 - Enzimi che danneggiano la membrana:
 - Distruzione della membrana
 - Lisi dei globuli rossi
 - Pore forming complex
 - Enzimi che agiscono nella matrice extracellulare
 - Danneggiano il connettivo
 - Danneggiano i coaguli
 - Piccole sacche di pus contenenti DNA
 - Enzimi che agiscono su farmaci:
 - Penicillinasi

Esoenzimi batterici

- Emolisine
 - Pore forming
 - Distruggono i globuli rossi
 - *Staphylococcus aureus* (α -emolisina)
 - Streptolisine, gruppo di emolisine da *Streptococcus*
 - Streptolisina O è emoliticamente attiva solo nello stato ridotto mentre la streptolisina S è stabile in presenza di ossigeno
- Streptokinasi
 - Da *Streptococcus pyogenes*
 - Attaccano i coaguli, usata nella terapia dell'infarto
- Ialuronidasi
 - Scindono l'acido ialuronico nel tessuto connettivo
 - Funzione simile a
 - Collagenasi
 - Elastasi
- DNAasi
 - Piccole sacche di pus contenenti DNA e detriti rilasciati da leucociti



Streptococcus

- Streptococchi α -emolitici
 - Secernono emolisine che causano la lisi incompleta dei globuli rossi
- Streptococchi β -emolitici
 - Secernono emolisine che causano la lisi completa dei globuli rossi
- Streptococchi γ -emolitici
 - Non secernono emolisine.

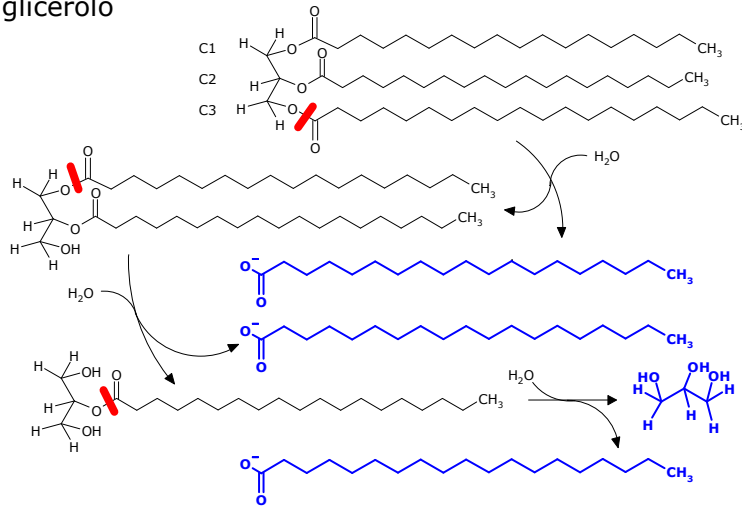


Clostridium perfringens

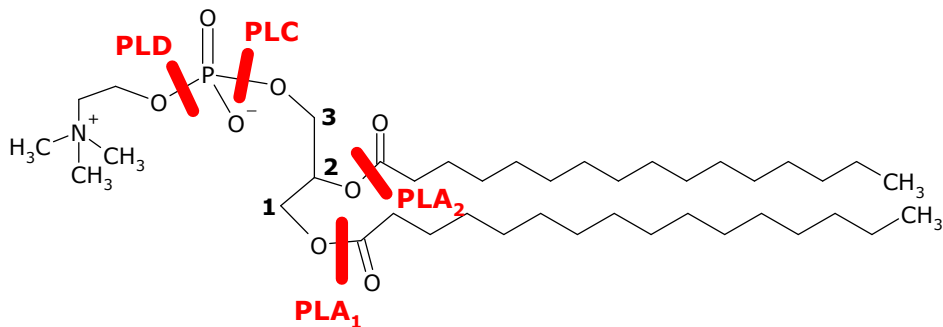
- Anaerobico gram +, forma spore
- Largamente diffuso in natura
- Necrosi muscolare
- Le spore entrano attraverso un trauma o una ferita
- Produce diversi esoenzimi necessari per la riproduzione batterica
 - Lecitinasi (lipasi c) – tossina principale che ha come substrato la fosfatidilcolina, lisi indiscriminata delle cellule
 - Collagenasi e ialuronidasi
 - DNAasi
- Gangrena Gassosa
 - Usata per facilitare la diffusione nel tessuto muscolare.

Lipasi

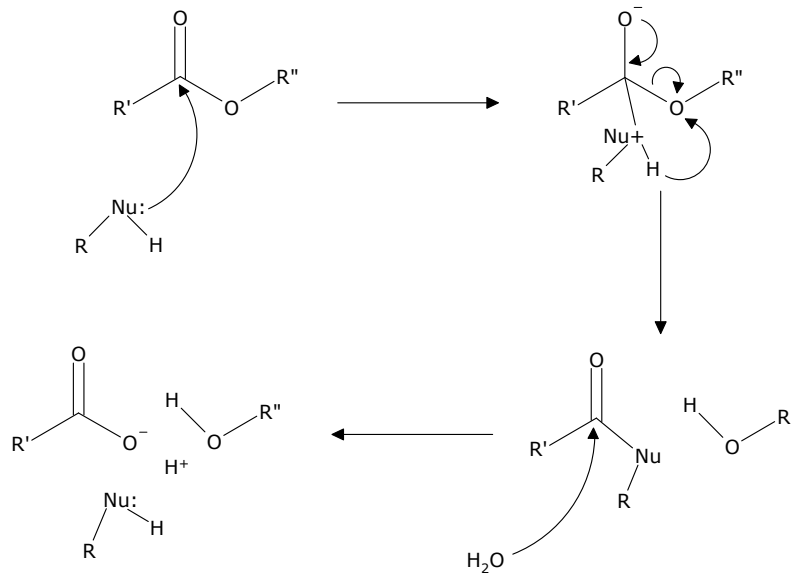
- Catalizza l'idrolisi dei triacilgliceroli in posizione 1 e 3 formando 1,2-diacilgliceroli, 2-acilglicerolo e quindi glicerolo



Fosfolipasi



Lipasi: meccanismo generale



gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

93

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

Riferimenti

- Handbook of Ecotoxicology -
- David J. Hoffman, Barnett A., Rattner G., Allen Burton, Jr., John Cairns, Jr. Eds. - LEWIS PUBLISHERS - 2003
- Environmental Toxicology - Biological and health effect of pollutants - II Edition
- Ming-Ho Yu - CRC Press - 2005
- Environmental Stressors in Health and Disease
- Jurgen Fuchs and Lester Packer Eds. - Marcel Dekker, Inc. - 2001

WEB

Vie metaboliche:
KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
Degradazione degli xenobiotici: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>

Struttura delle proteine:
Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
Hexpasy <http://us.expasy.org>
Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/sprot/>
Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
Enzyme (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>

Enzimi:
Nomenclatura - IUBMB: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
Proprietà - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
Expasy (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbd.ahc.umn.edu/>
Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
Metalloioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov>

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da: <http://www.qsartor.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 20/03/2017 10:31:40