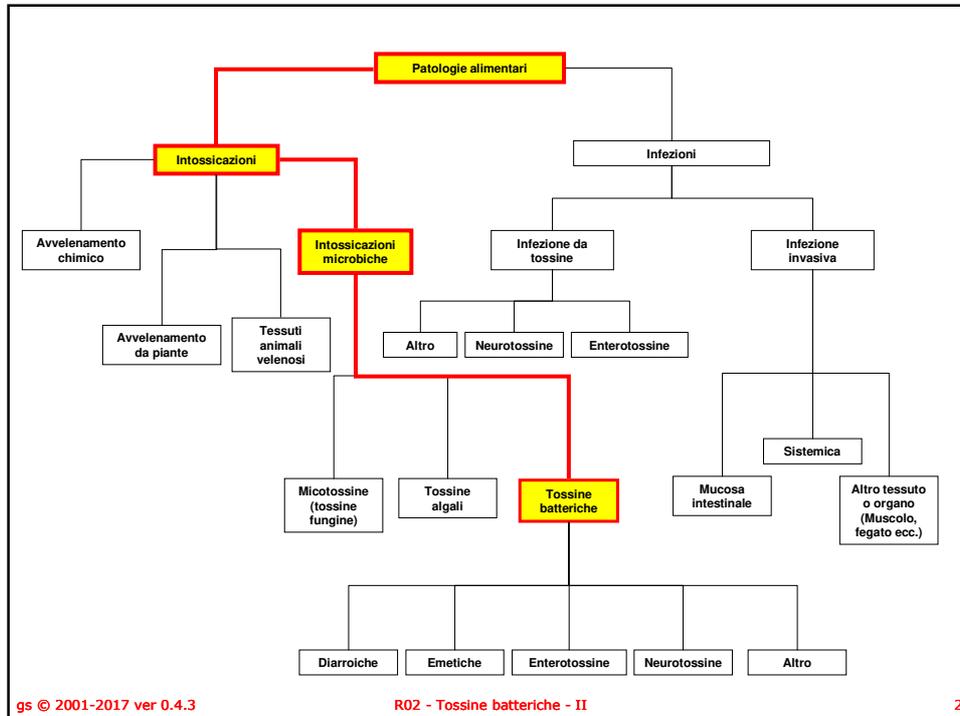


Prof. Giorgio Sartor

TOSSINE BATTERICHE II

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

Versione 0.4.3 - Mar-17



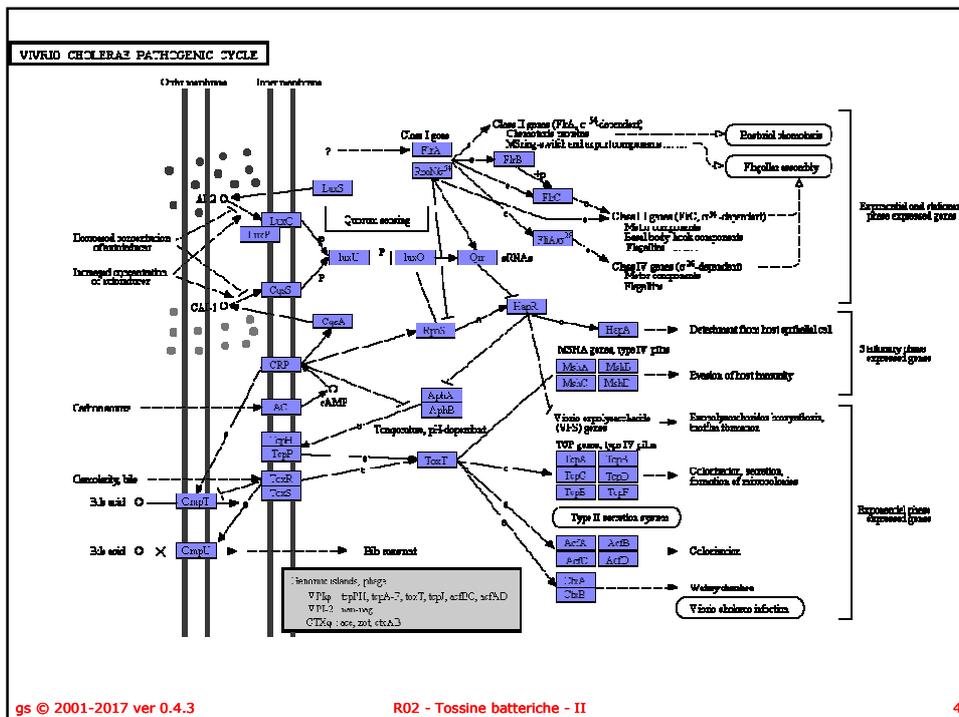
gs © 2001-2017 ver 0.4.3

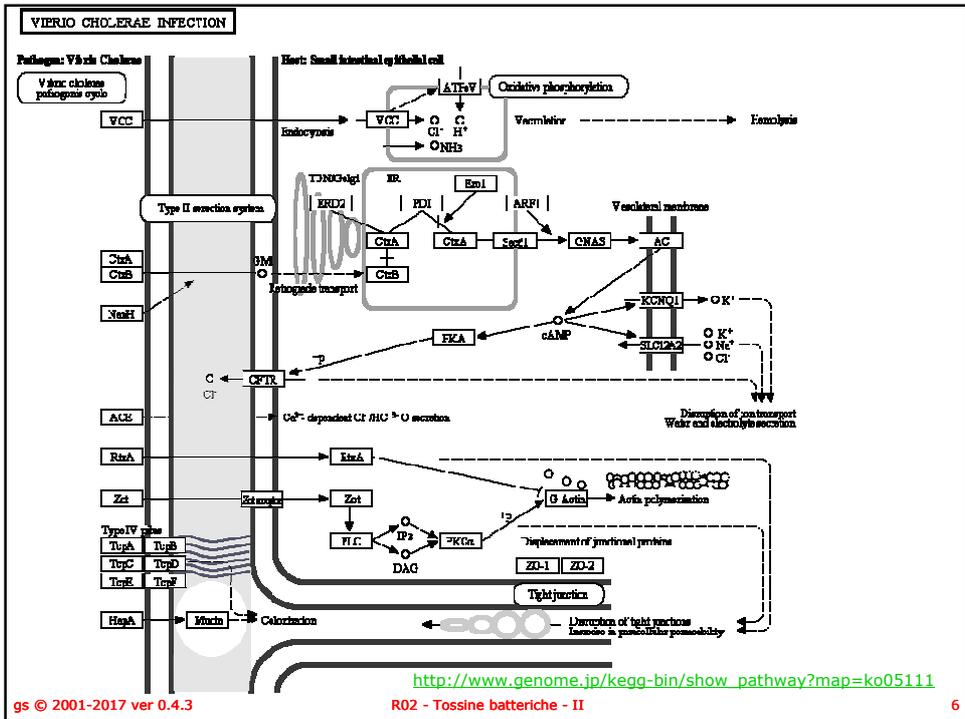
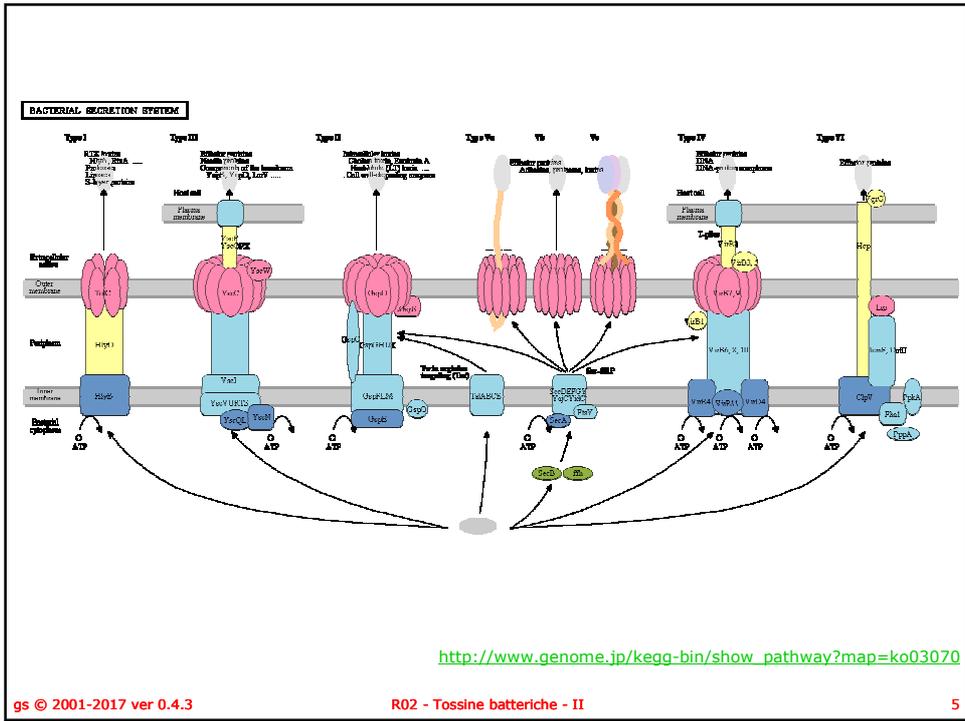
R02 - Tossine batteriche - II

2

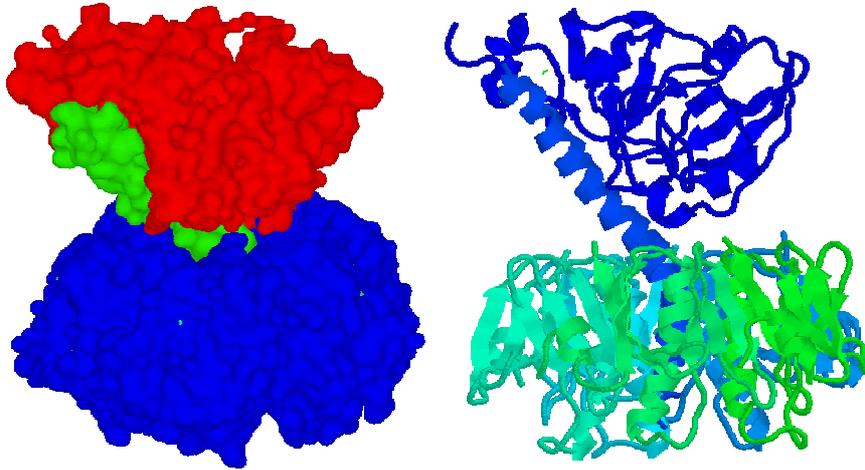
Colera

- *Vibrio cholerae*
 - Produce una esotossina di tipo III (A+5B);
- Vibrione gram -
 - Non invade né danneggia i tessuti
 - Vive nei copepodi;
 - L'uomo è infettato attraverso l'ingestione di cibo o acqua contaminati;
 - Provoca diarree violente e senza sangue (fino a 10 litri/giorno)
 - Perdita di fluidi ed elettroliti
 - Crampi muscolari
 - Diminuzione della pressione sanguigna
 - Aumento della frequenza cardiaca
 - Vomito
 - Trattamento: somministrazione di fluidi ed elettroliti.





Colera



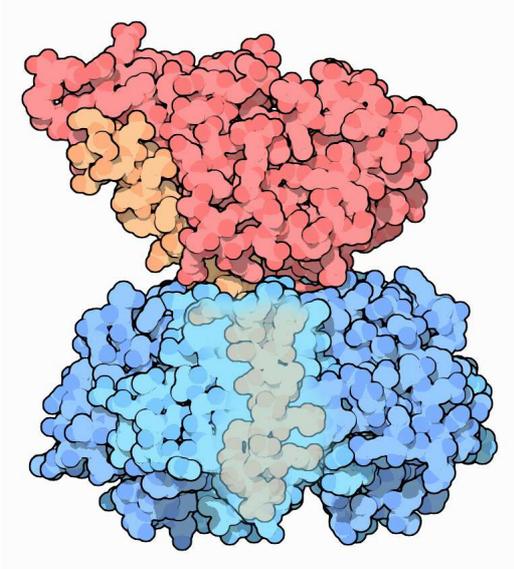
1xtc

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

7

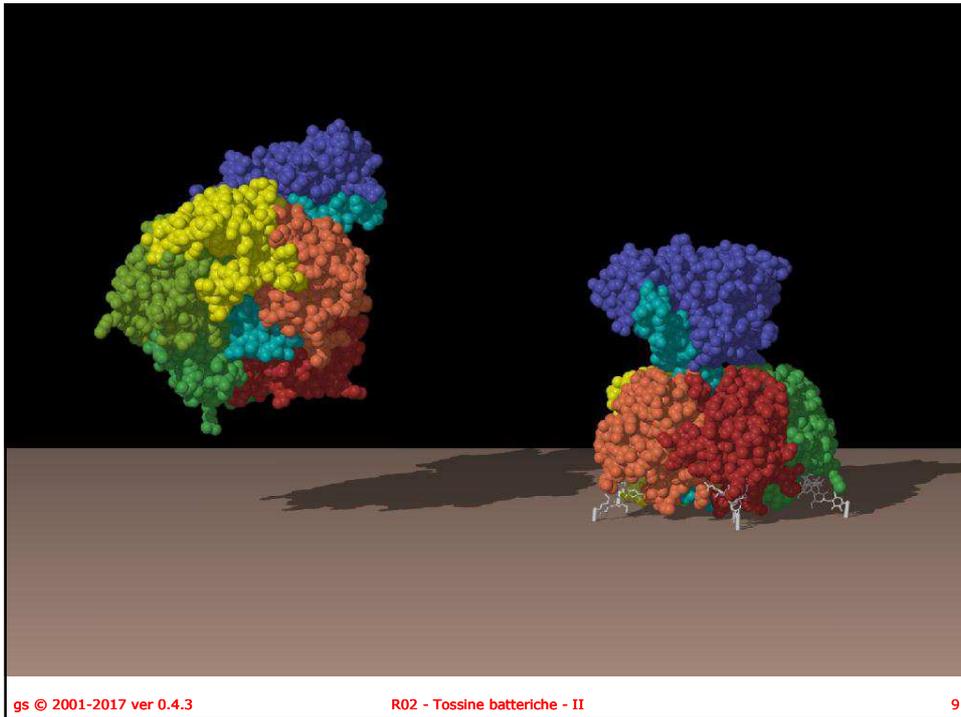
Tossina colerica



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.

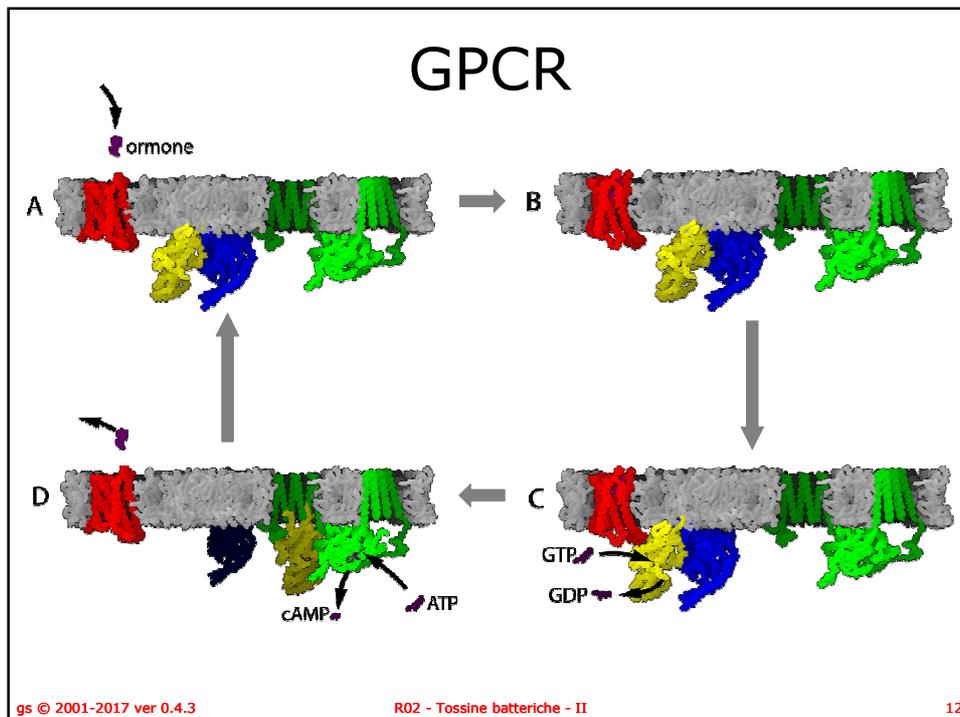
Meccanismo d'azione

- 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

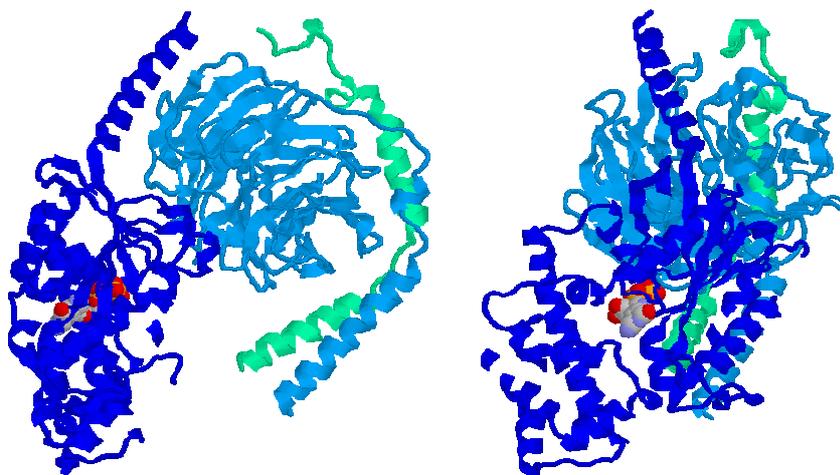
Classe G_{α}	Segnale	Effetto
$G_{\alpha s}$	Amine β -adrenergiche, glucagone, ecc.	Stimola Adenilato ciclasi
$G_{\alpha i}$	Acetilcolina, Amine α -adrenergiche, ecc.	Inibisce Adenilato ciclasi
$G_{\alpha t}$	Fotoni	Stimola cGMP diesterasi
$G_{\alpha q}$	Acetilcolina, Amine α -adrenergiche, ecc.	Aumenta 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

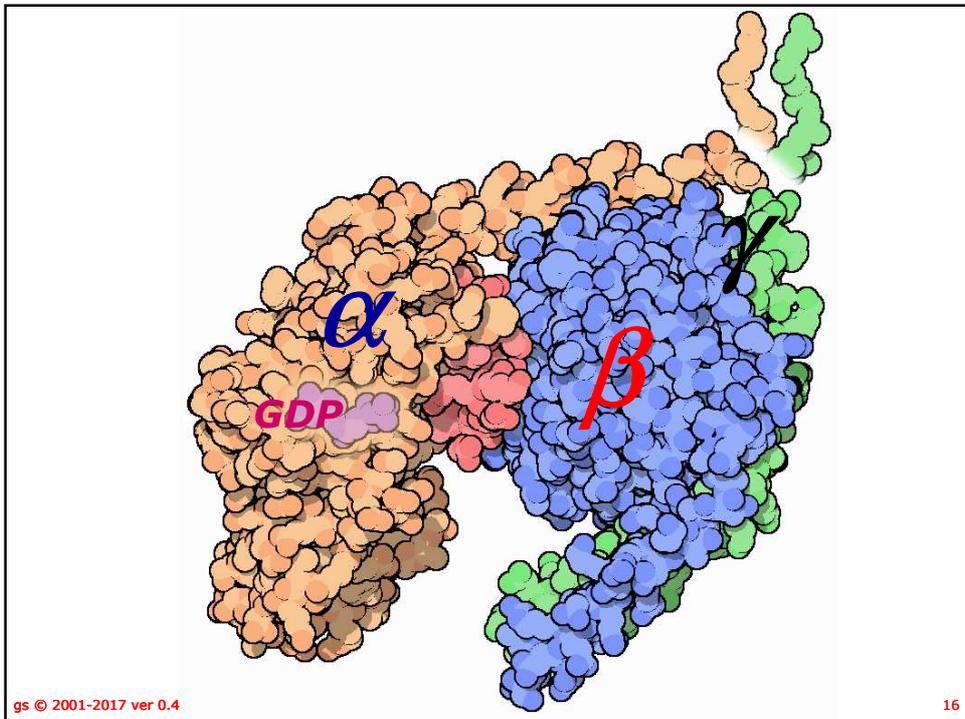
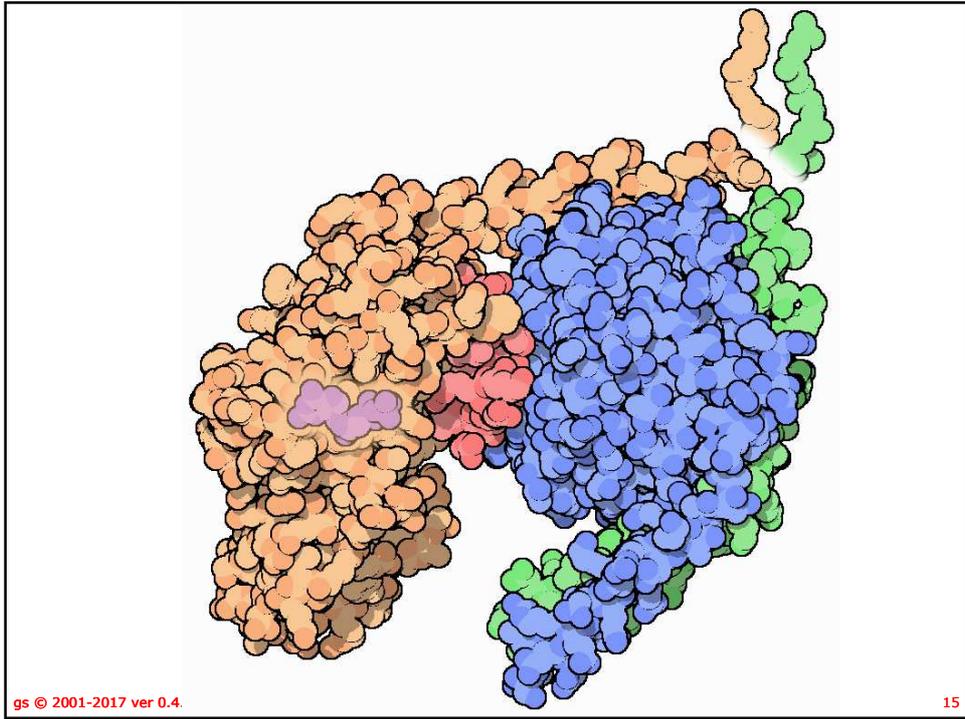


1got

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

14



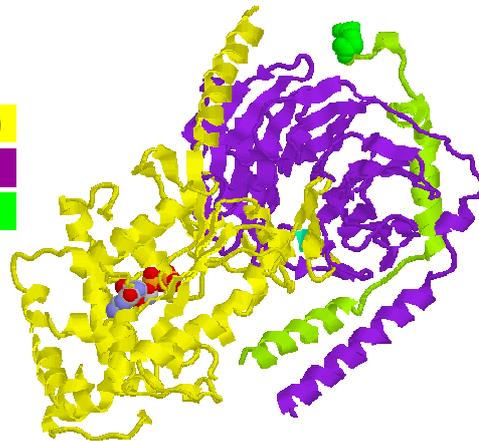
Proteine G

- Il tipico eterotrimerico delle proteine G consiste in:

- subunità α (45-47 kD)

- subunità β (35 kD)

- subunità γ (7-9 kD)



1GOT

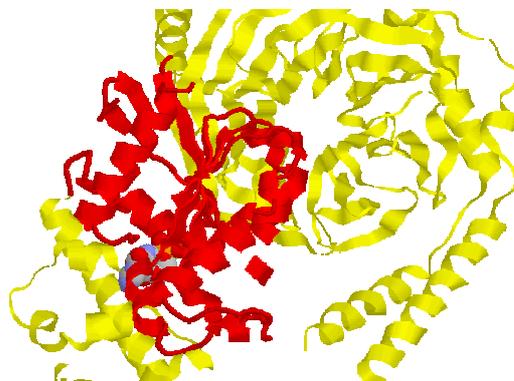
gs © 2001-2017 ver 0.4.3

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} .



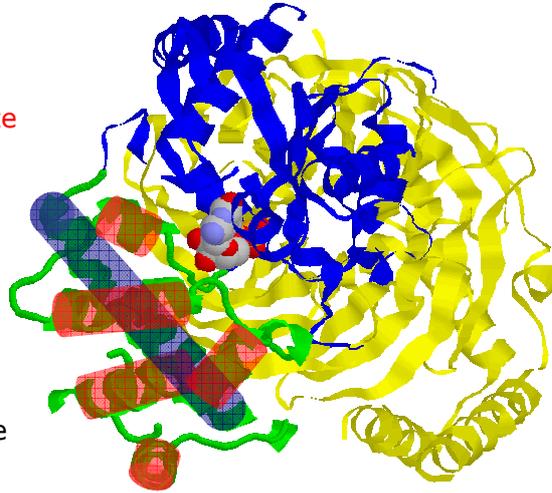
gs © 2001-2017 ver 0.4.3

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.

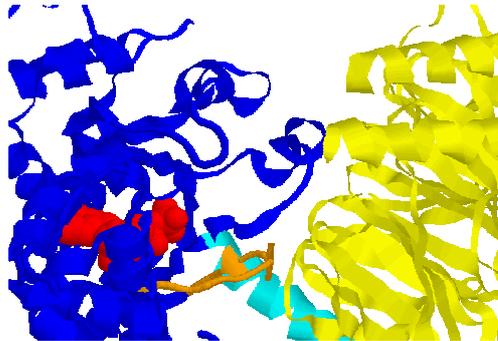
gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

20

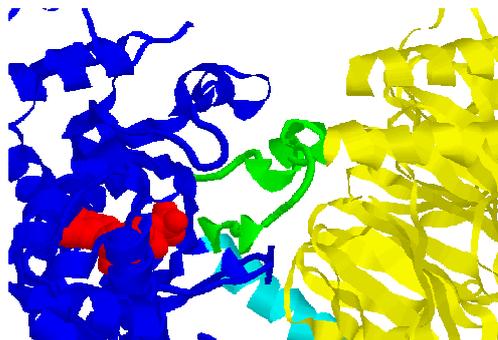
Proteina G

- 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.



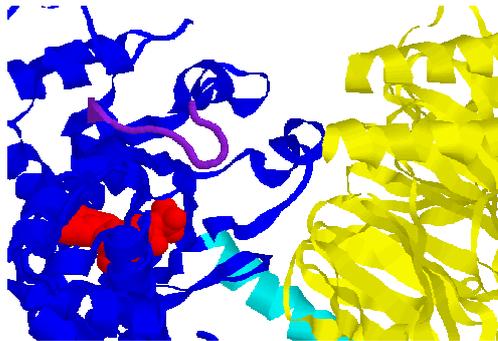
Proteina G

- 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.



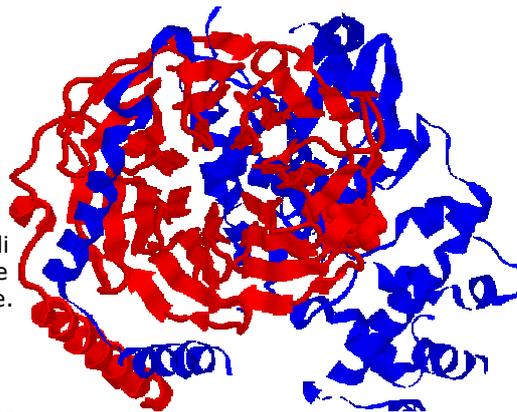
Proteina G

- 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.**



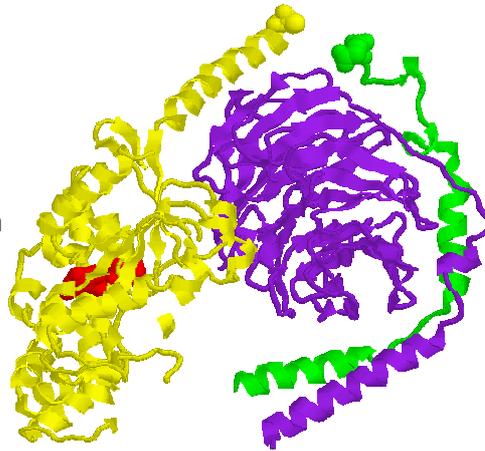
Proteine G – subunità β

- 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 $G\beta\gamma$.

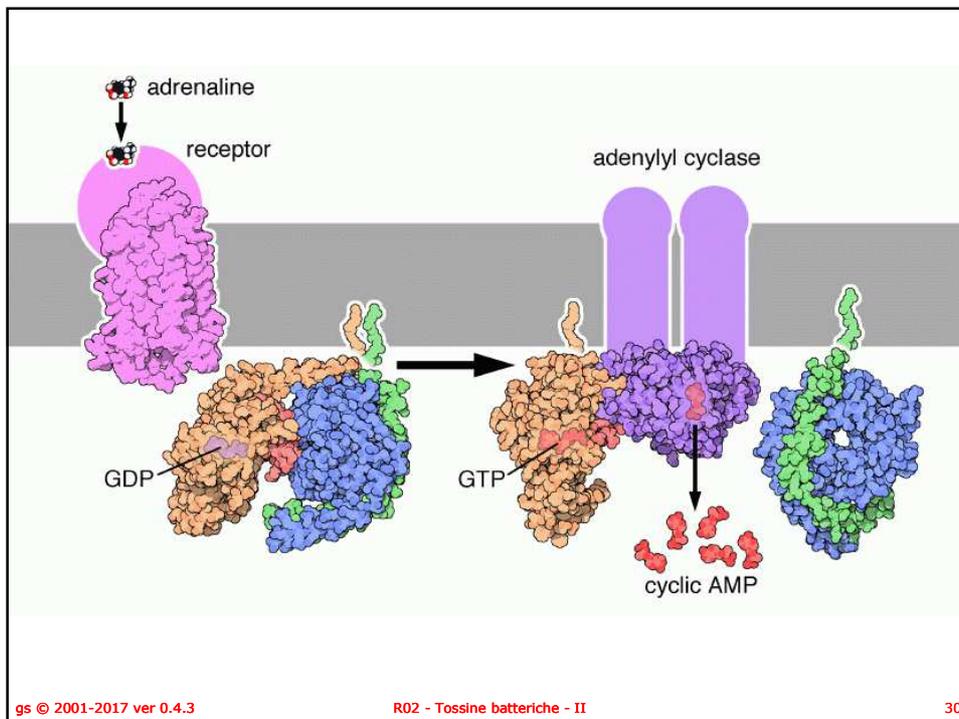
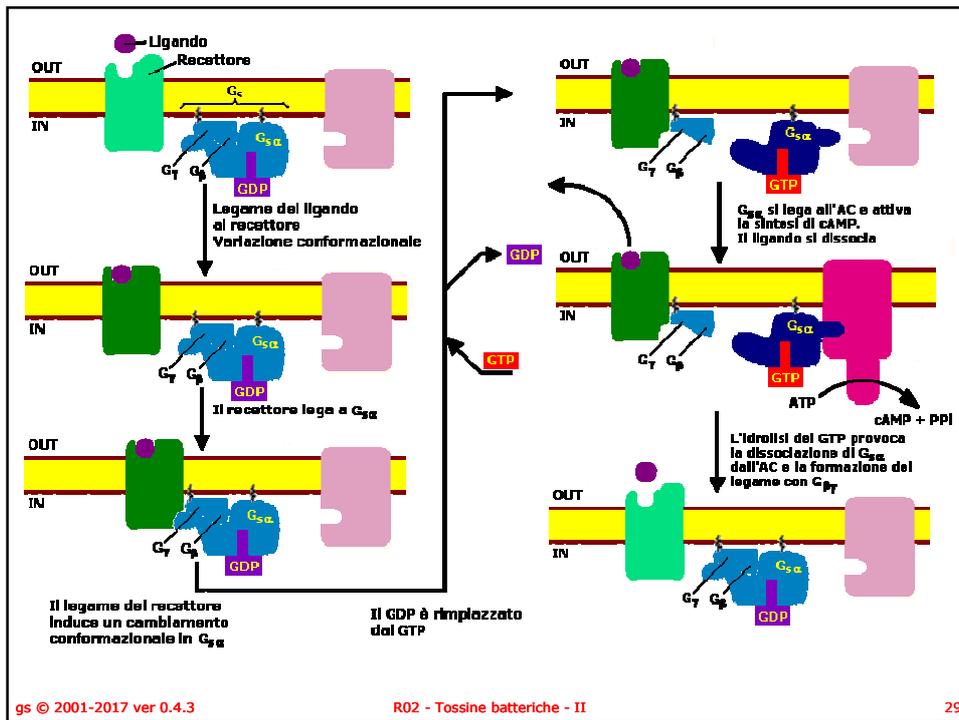
- Quasi tutti gli enzimi che idrolizzano nucleosidi fosfati trifosfati, compresi Ras e Gα, richiedono ioni Mg^{2+} per l'attività catalitica. Il Mg^{2+} è coordinato a un atomo di ossigeno del fosfato β e γ del GTP e alle catene laterali dei residui Ser 17 e Thr 35 di Ras.
- Due molecole di acqua completano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

gs © 2001-2017 ver 0.4.3 R02 - Tossine batteriche - II 27

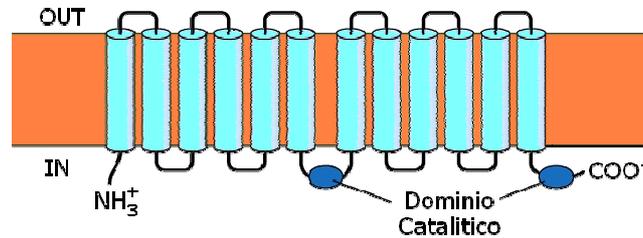
Attività GTPasica

$GDP \xrightarrow{GTP} GTP$

gs © 2001-2017 ver 0.4.3 R02 - Tossine batteriche - II 28

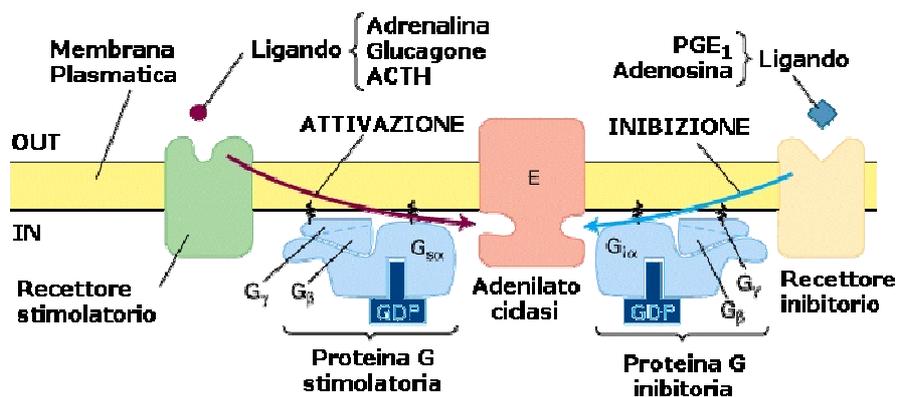


Struttura dell'adenilato ciclasi

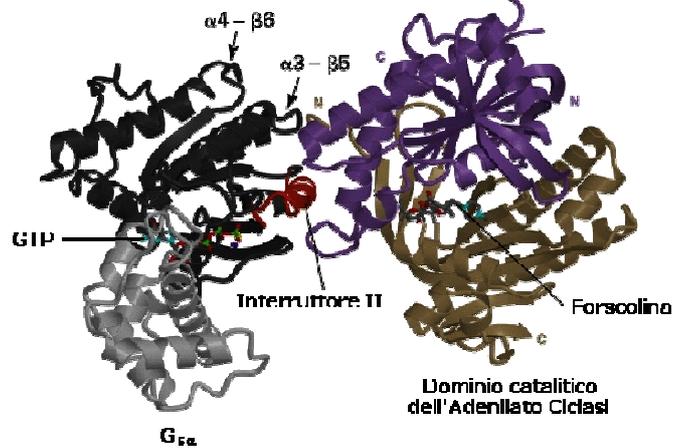


- L'enzima legato alla membrana possiede due domini catalitici simili che si affacciano sulla superficie citosolica della membrana e due domini integrali di membrana, ognuno dei quali si pensa essere formato da sei α -eliche transmembrana.
- Le sei isoforme di adenilato ciclasi, possono essere attivate 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 $\alpha 4$ - $\beta 6$.

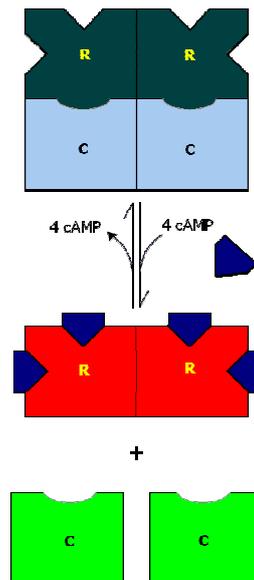
gs © 2001-2017 ver 0.4.3

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.

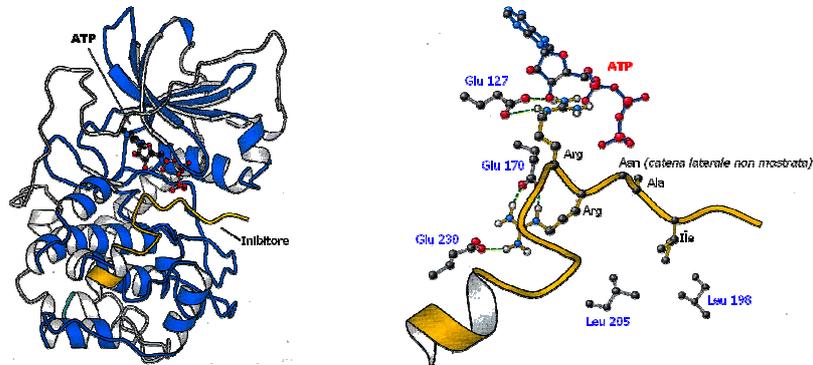


gs © 2001-2017 ver 0.4.3

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

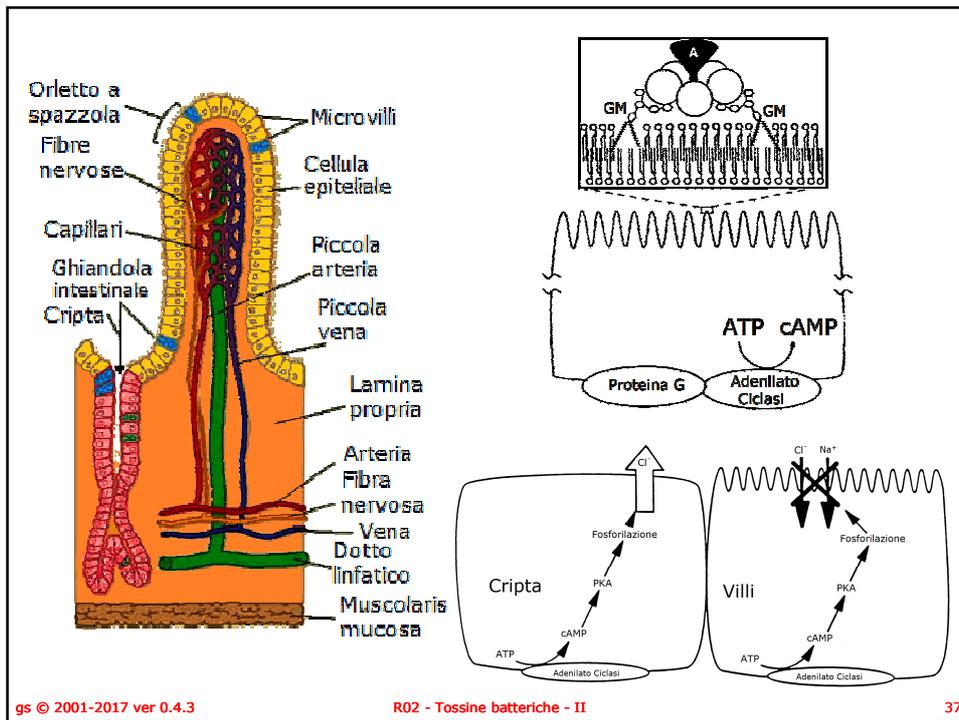
Meccanismo d'azione

- 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

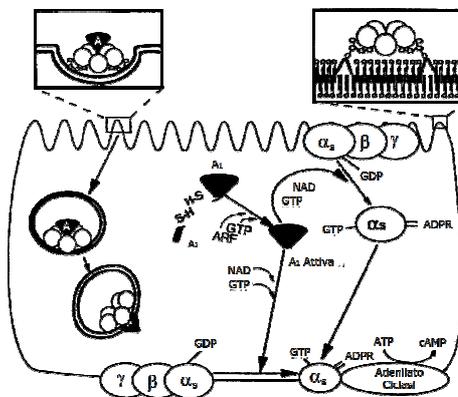
R02 - Tossine batteriche - II

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

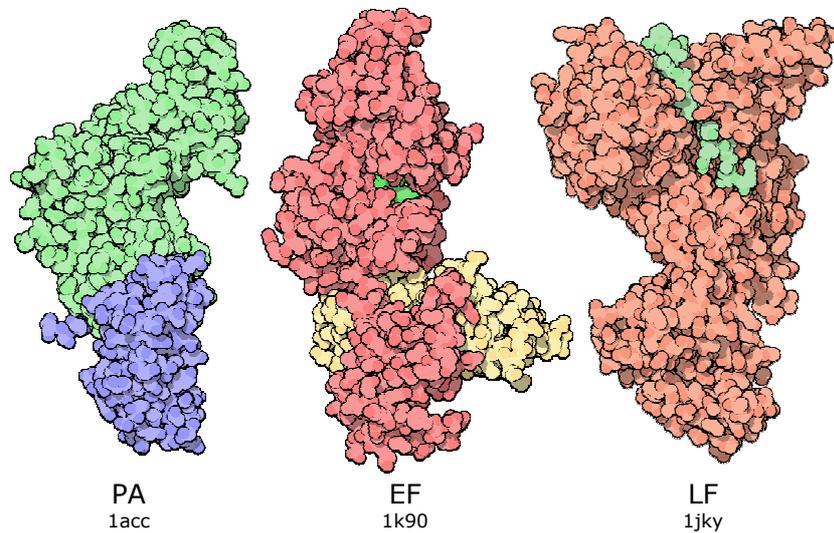
Sintomi dell'antrace

- 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
 - Sepsis, shock e morte

Meccanismo d'azione

- Due tossine
 - Tossina Edematosa
 - Enzima adenilil-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

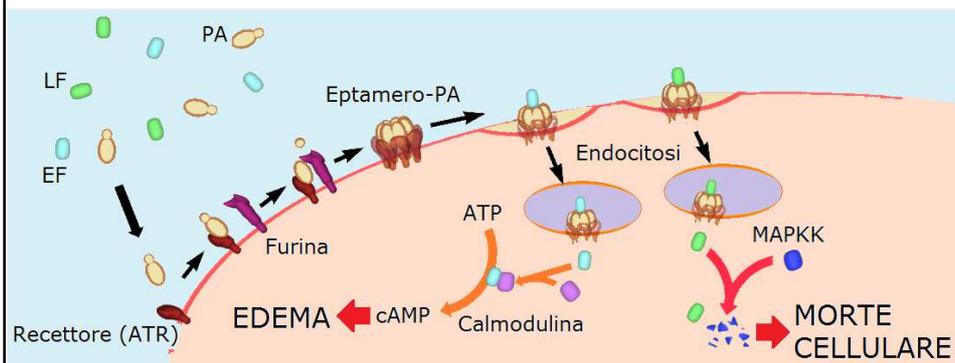
R02 - Tossine batteriche - II

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

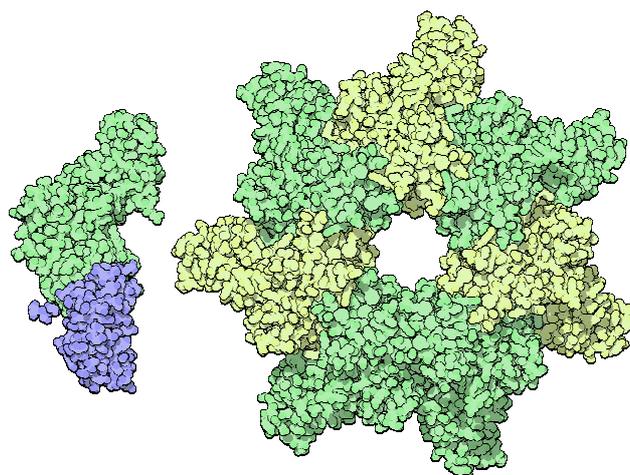
- È chiamato così per il suo uso come vaccino per l'antrace (uso controverso);
- Agisce come la porzione "B" nelle tossine AB;
- Interagisce sia con EF che con LF;
- Forma un canale nella membrana dell'ospite;
- È la meglio caratterizzata delle tre tossine dell'antrace
 - Deve essere clivata per diventare 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

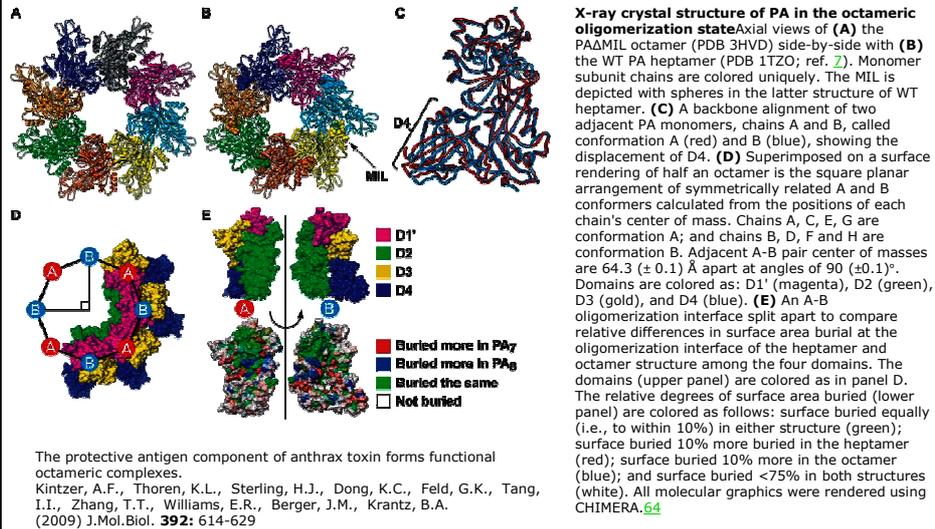
Eptamero
1tzo

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

48

Antigene protettivo: 7 o 8?

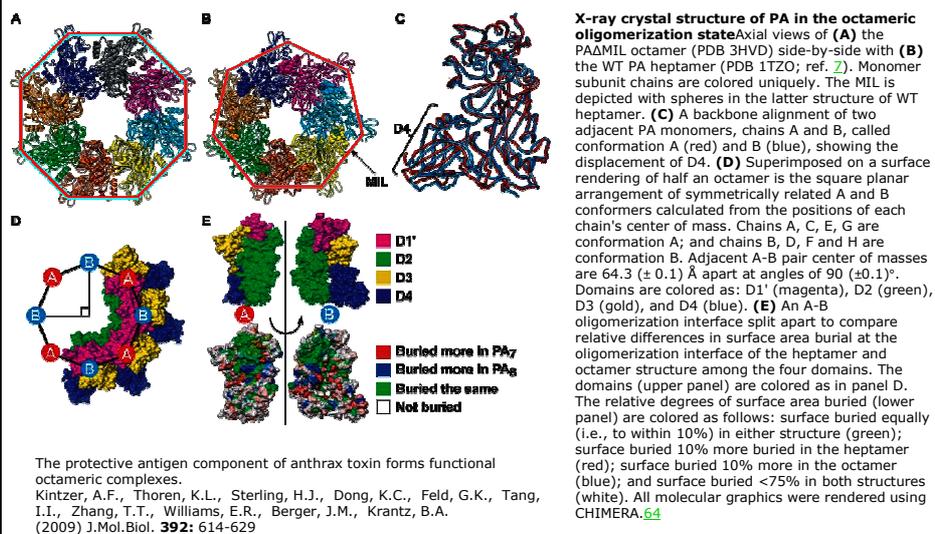


gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

49

Antigene protettivo: 7 o 8?

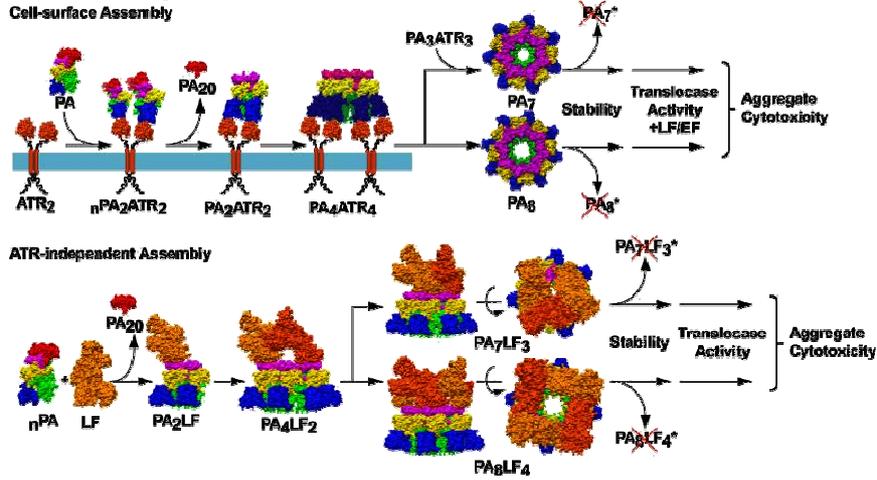


gs © 2001-2017 ver 0.4.3

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 (*).

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

51

Antigene protettivo: 7 o 8?

Lethal Toxin Stabilization by PA Octamer Formation

743

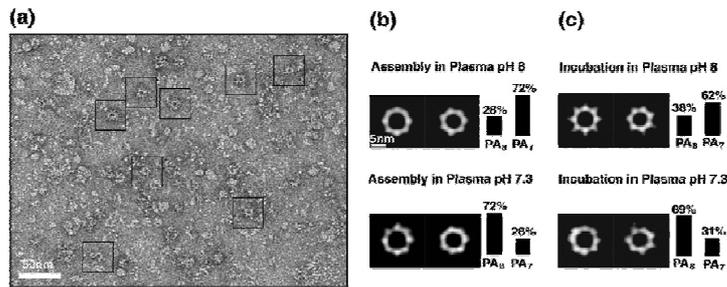


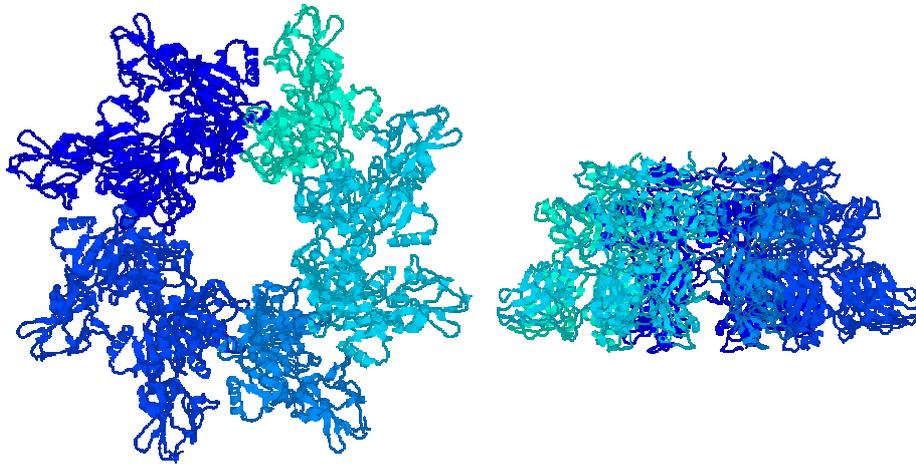
Fig. 1. PA₈ is the predominant oligomer that forms in bovine plasma. Negative stain EM analysis of His₆-PA-LFN₄ complexes either assembled in or incubated in defibrinated bovine plasma at 37 °C. Class-averaged images containing 10–100 particles of the resulting PA₇ and PA₈ oligomers. The total particle 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).

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

52

Antigene protettivo



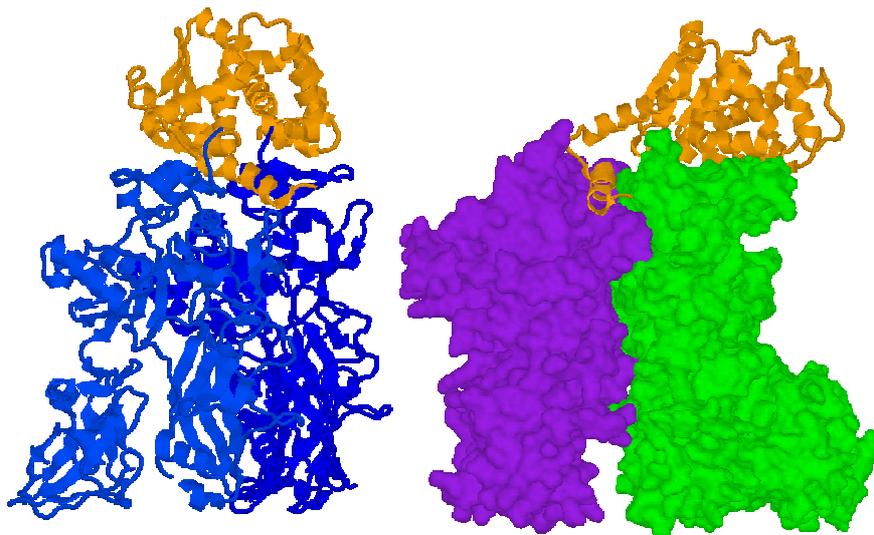
3hvd

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

53

Unfolding di LF da parte di PA

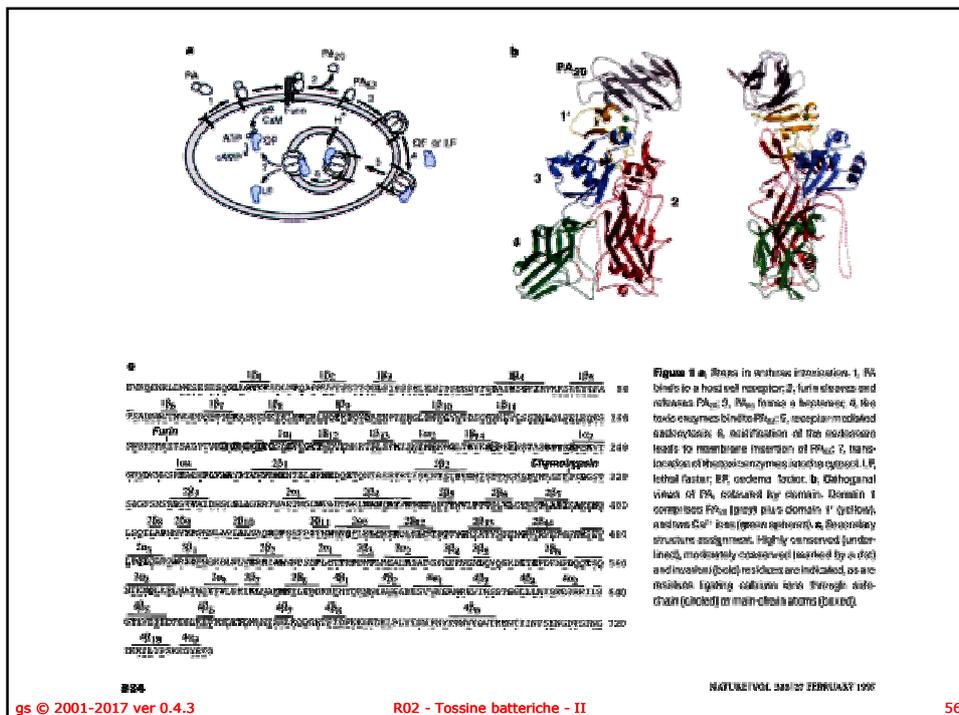
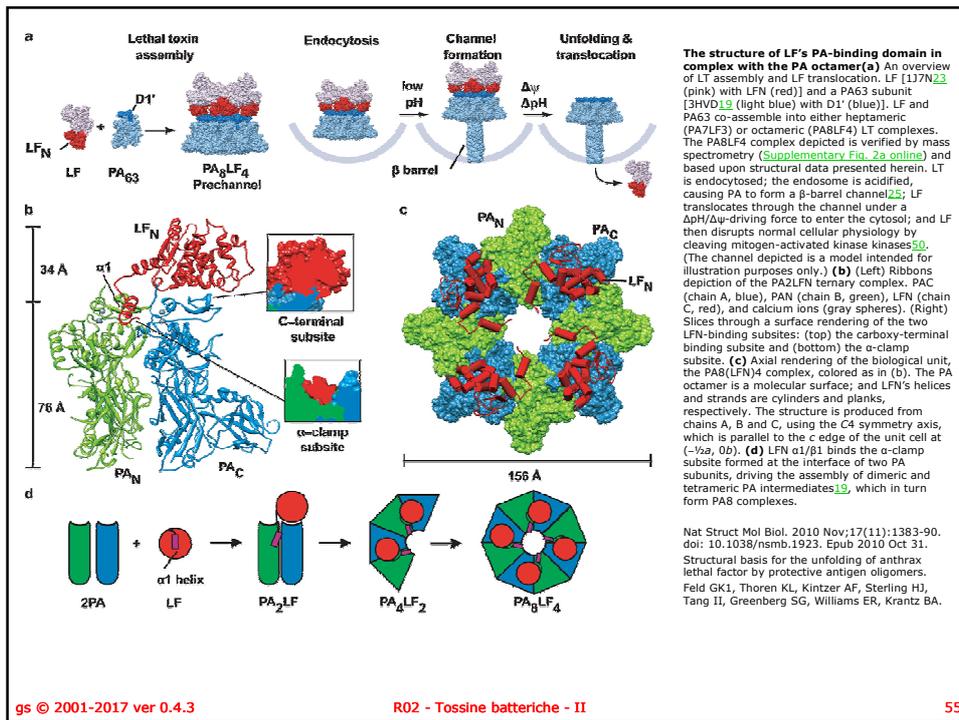


3kvw

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

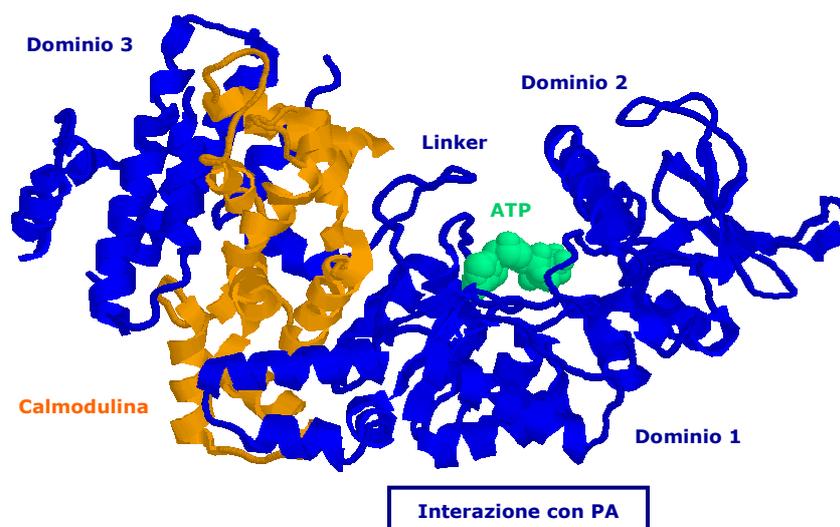
54



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



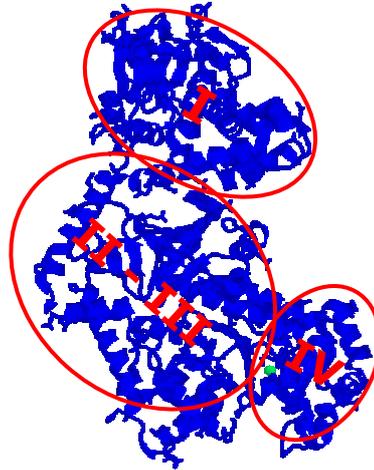
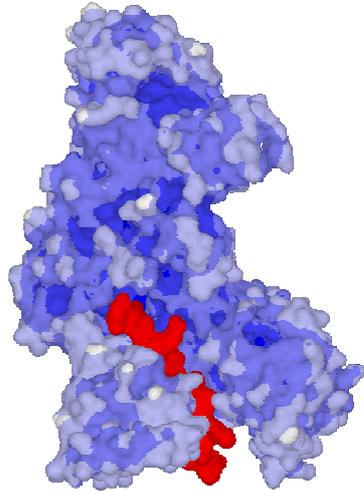
Fattore Letale

- 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

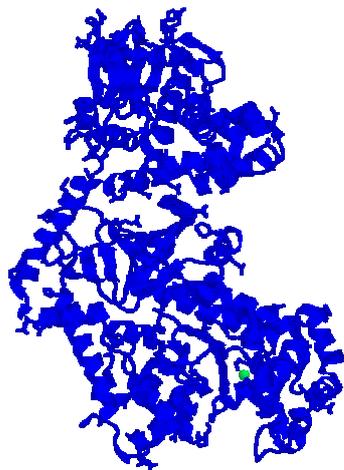


gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

61

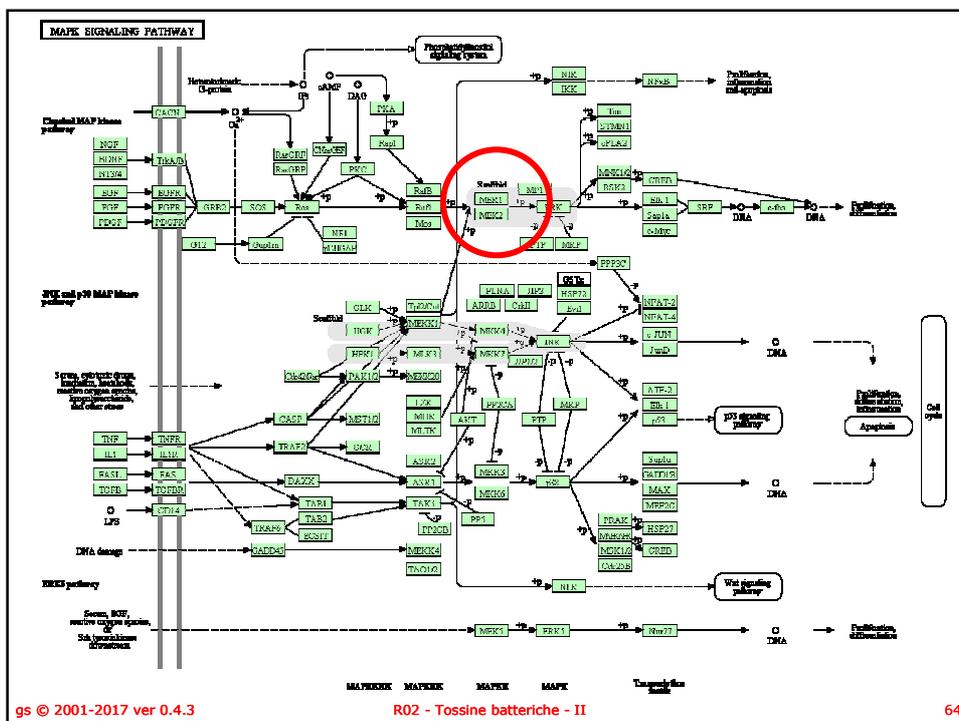
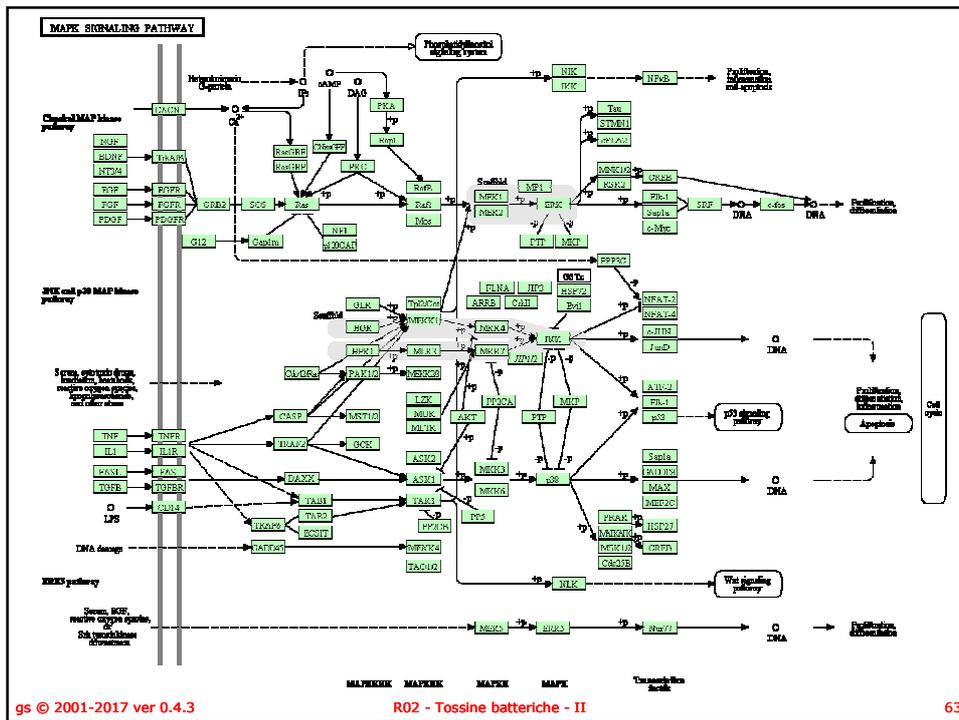
Fattore Letale



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

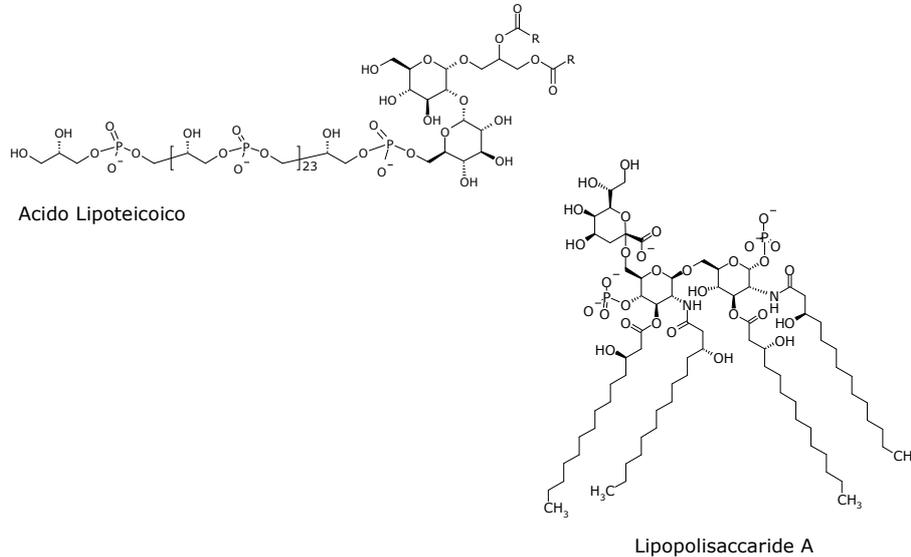
- Le endotossine non promuovono la formazione di anticorpi efficienti.
- Gli organismi che producono endotossine:
 - *Salmonella typhi*
 - *Proteus spp.*
 - *Pseudomonas spp.*
 - *Neisseria spp.*
- La sterilizzazione NON garantisce dall'eliminazione delle endotossine.

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

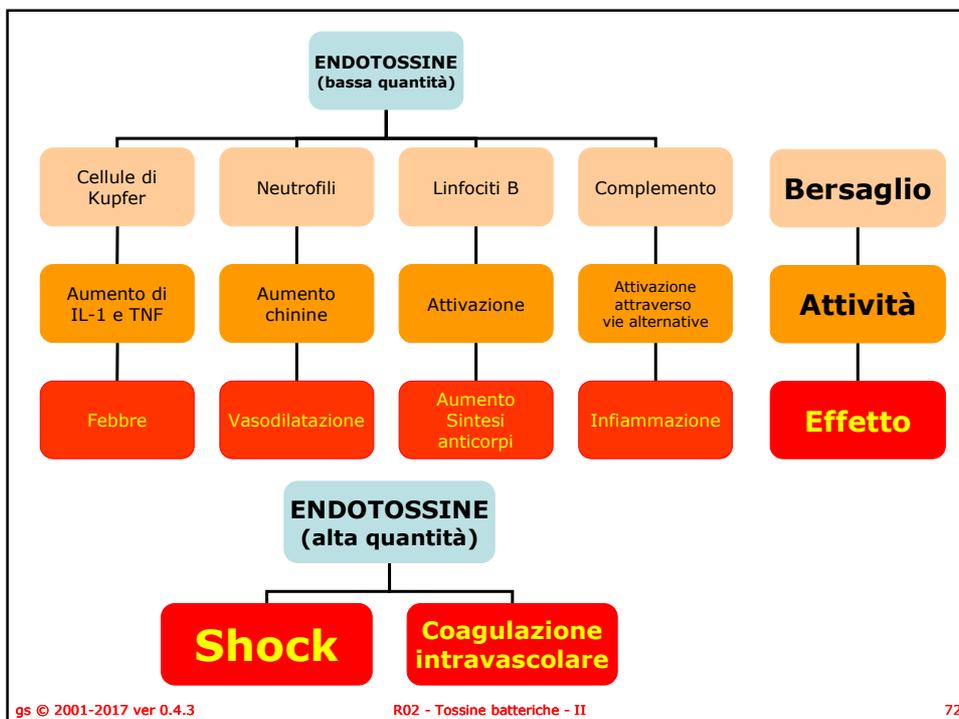
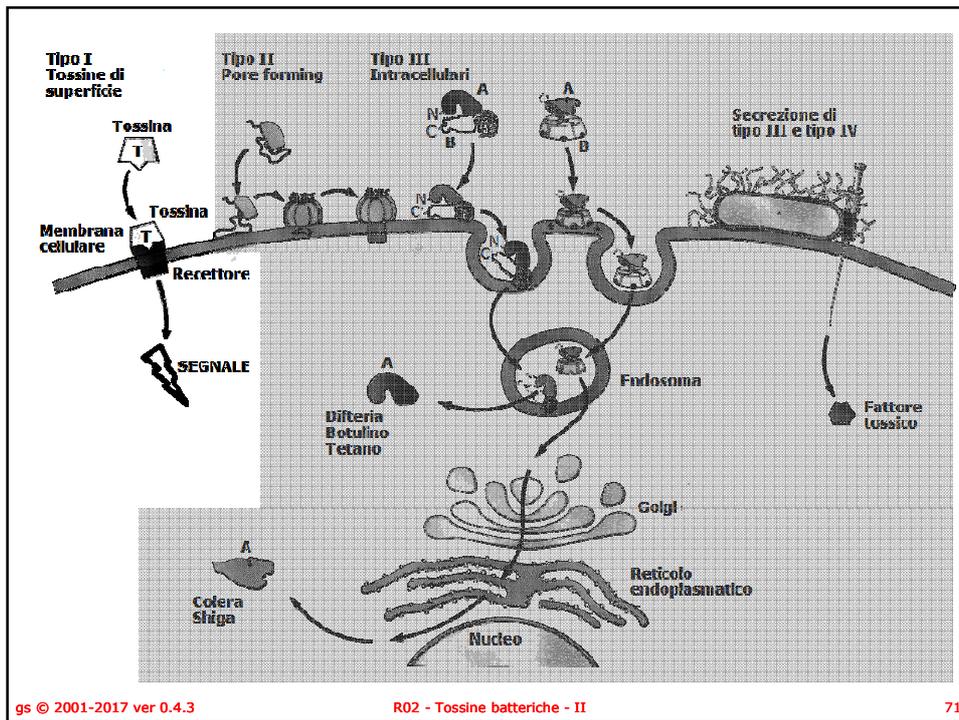
Meccanismo d'azione

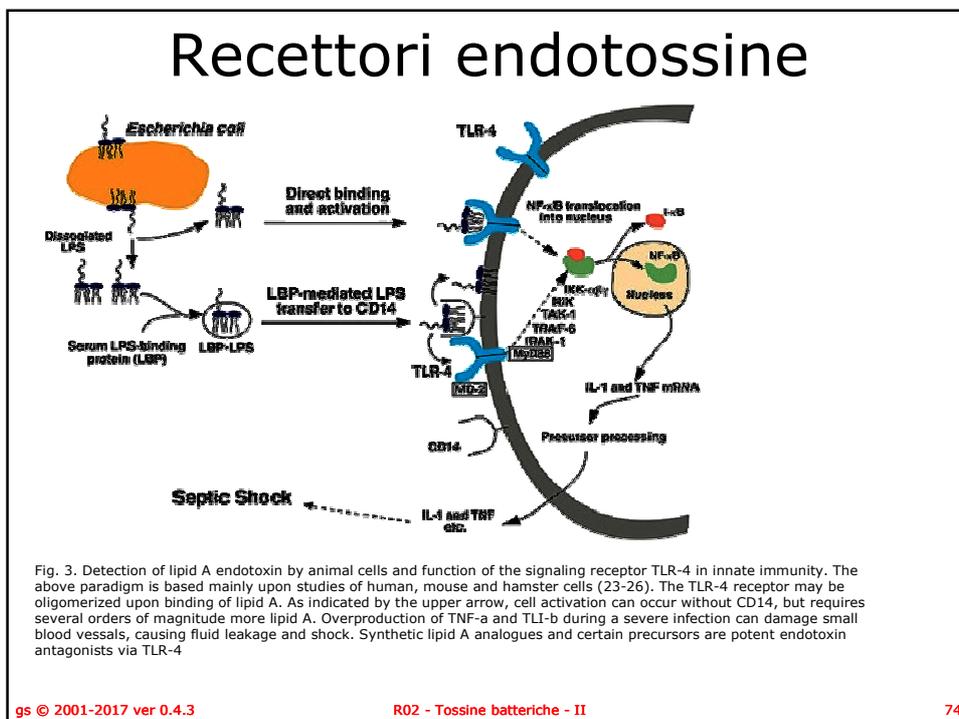
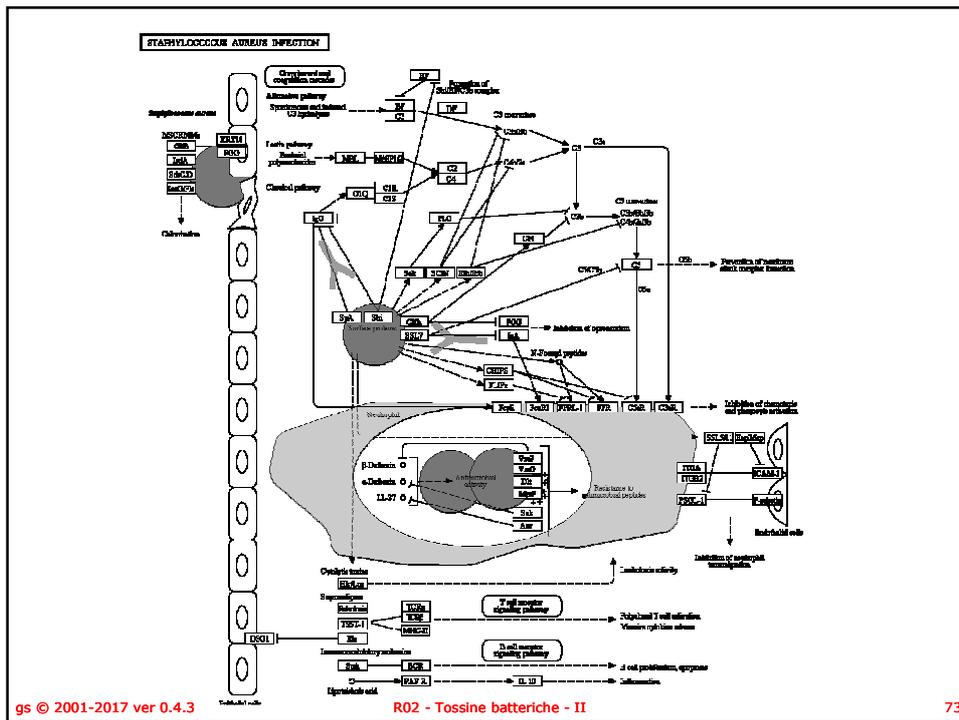
- Superantigeni (Tossine di tipo I)
 - Causano un'intensa risposta immunitaria
 - Le endotossine si legano a recettori su:
 - Macrofagi
 - Neutrofili
 - Linfociti
 - con rilascio di citochine.
 - Attivano il complemento
 - Infiammazione

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

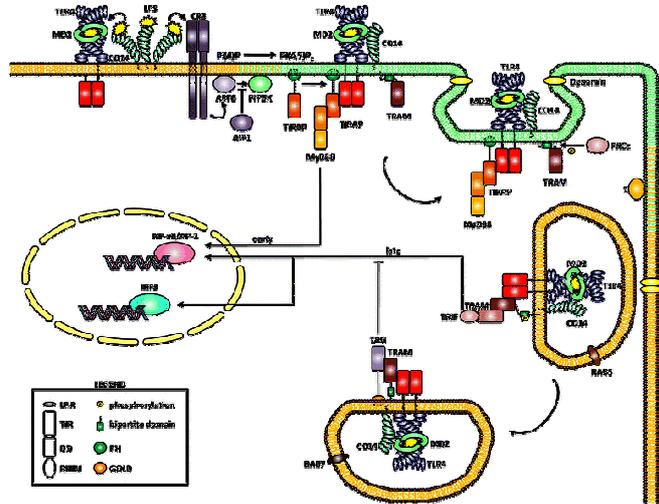
R02 - Tossine batteriche - II

70





Recettori endotossine



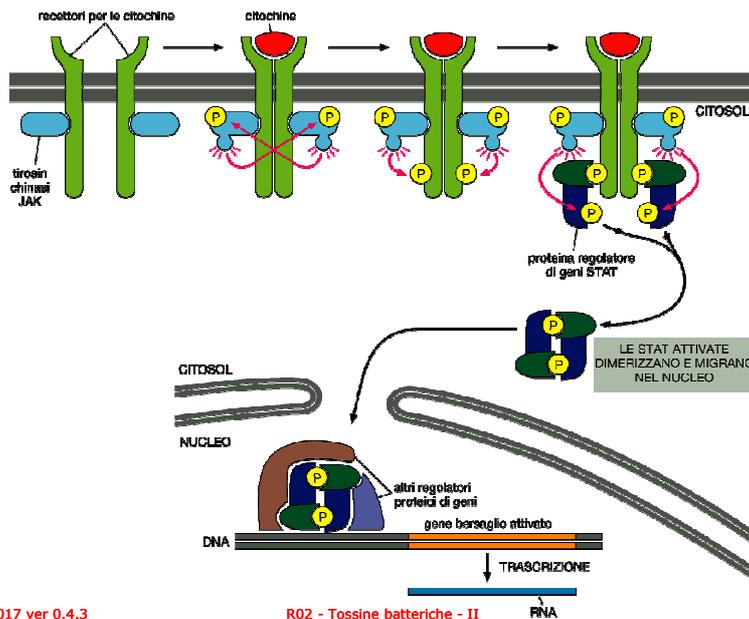
Review
Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling
Renato Ostuni, Ivan Zanoni and Francesca Granucci
Cell. Mol. Life Sci. (2010) 67:4109–4134

gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

75

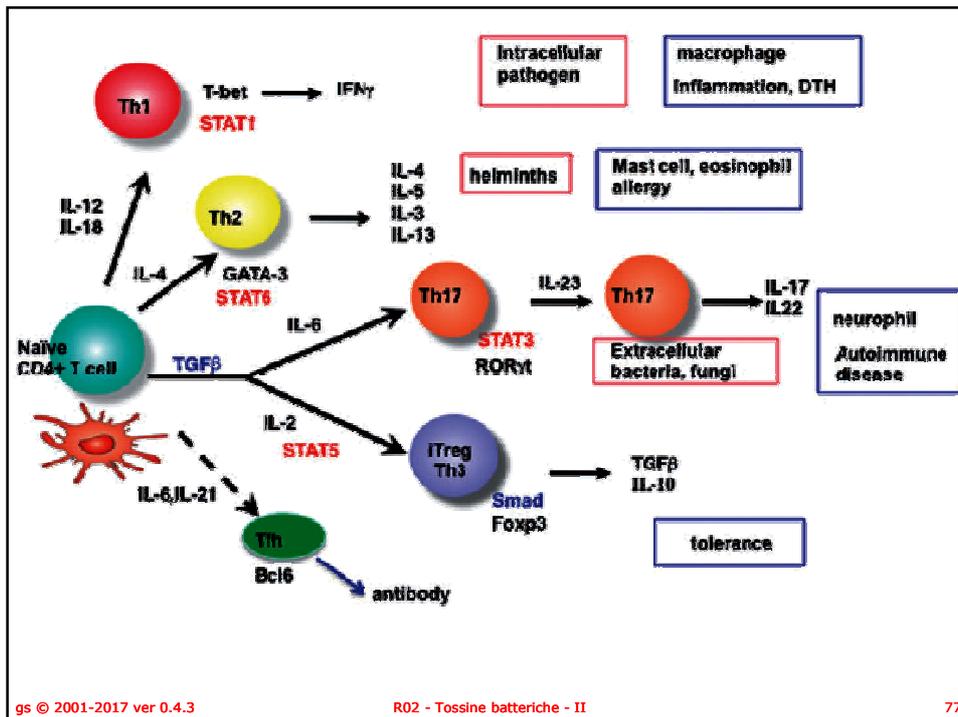
Citochine



gs © 2001-2017 ver 0.4.3

R02 - Tossine batteriche - II

76



Via di segnalazione delle JAK/STAT

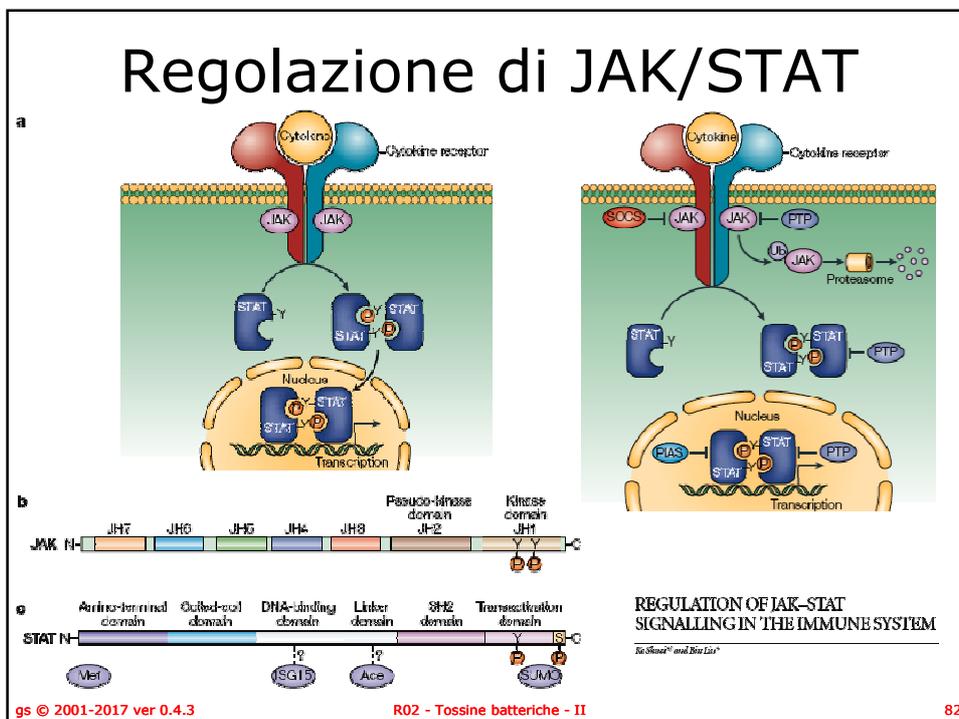
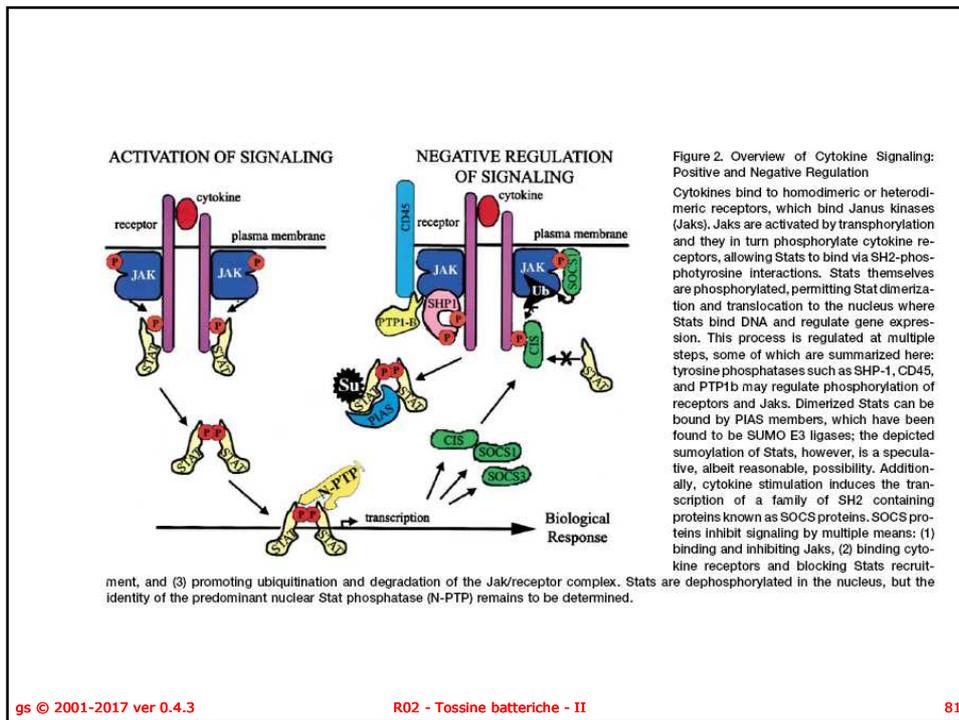
- **JAK** (Just Another Kinase): kinesi Janus, almeno quattro.
 - Il nome è dovuto alla presenza di due domini molto simili (bifronte).
- **STAT** (Signal Transducers and Activators of Transcription);
 - almeno sette.
 - Si ancorano al recettore fosforilato mediante il loro dominio SH2.
 - Fosforilati 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.





Esoenzimi batterici

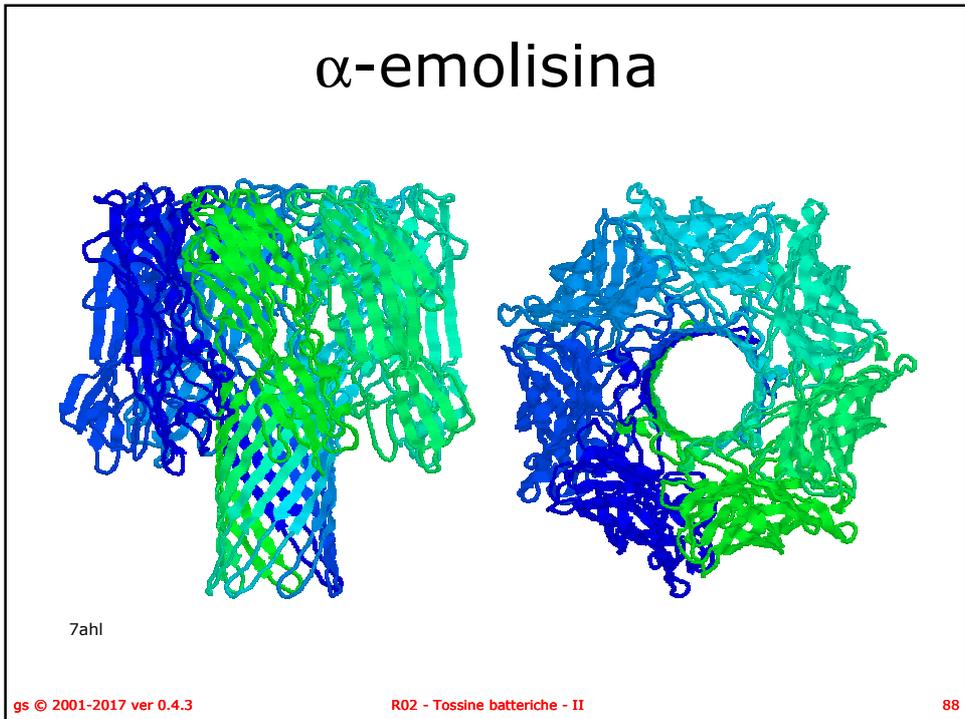
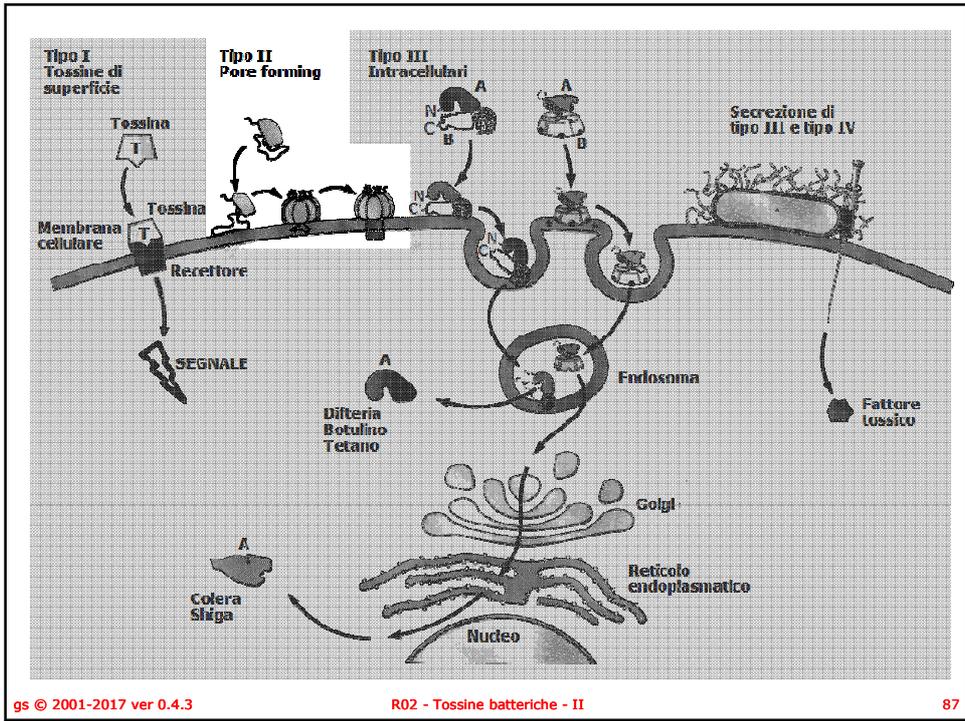
gs © 2001-2017 ver 0.4.3 R02 - Tossine batteriche - II 84

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.

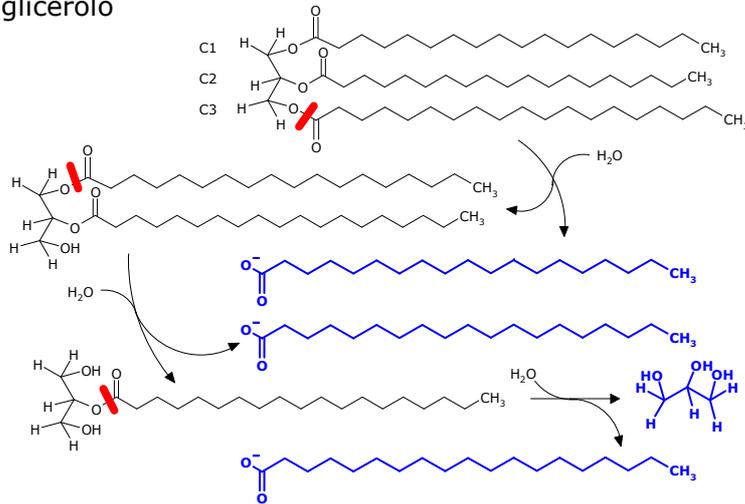


Clostridium perfringens

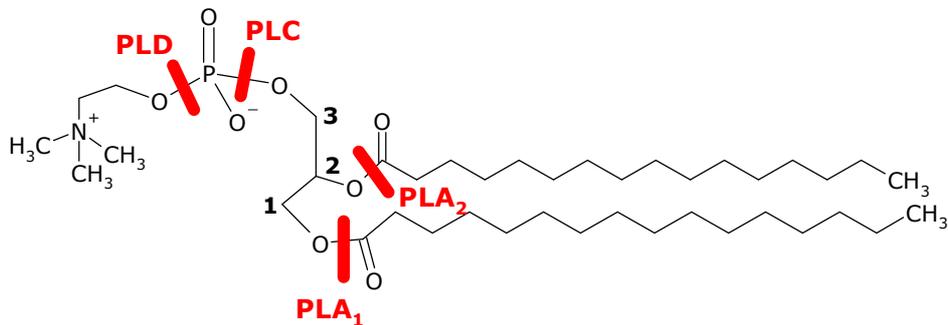
- Anaerobico gram +, forma spore
- Largamente diffuso in natura
- Necrosi muscolare
- Le spore entrano attraverso un trauma o una ferita
- Produce diversi esoenzimi necessari per la riproduzione batterica
 - Lecitinasi (lipasi c) – tossina principale che ha come substrato la fosfatidilcolina, lisi indiscriminata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

Lipasi

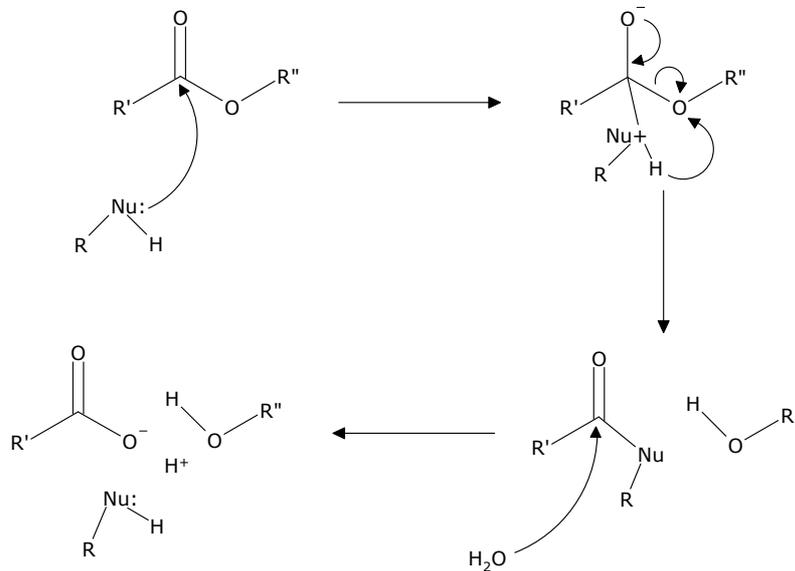
- Catalizza l'idrolisi dei triacilgliceroli in posizione 1 e 3 formando 1,2-diacilgliceroli, 2-acilglicerolo e quindi glicerolo



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