

Introduzione: *Shigella*

Scoperto dal batteriologo giapponese Kiyoshi Shiga nel 1897

- **Sintomatologia clinica**

Causa dissenteria bacillare → Da lieve diarrea a forte dissenteria accompagnata da febbre, crampi addominali, feci sanguinolente e mucose

- La trasmissione avviene per via oro-fecale

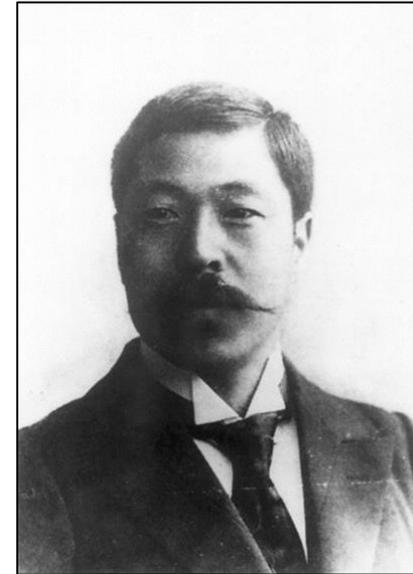
- Trasmissione attraverso acqua e cibo contaminati
- L'unico serbatoio è l'uomo

- Bassa dose infettiva rendono questo batterio altamente patogeno
10-100 cellule batteriche per causare la malattia

- **Trattamento**

La terapia di supporto è il trattamento antibiotici (un fluorochinolone, azitromicina, ceftriaxone).

È comune la resistenza ad ampicillina, trimetoprim/sulfametossazolo, e tetraciclina



Kiyoshi Shiga

Introduzione: *Shigella*

- **Caratteristiche Morfologiche:**
 - Gram-negativi anaerobi facoltativi
 - Non mobili (Assenza di flagelli)
 - Non formante spore
 - Forma di bastoncello
 - 0.3 - 1µm di diametro and 1 - 6µm in lunghezza

- **Appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae***

Sottogruppo	Specie
A	<i>Shigella dysenteriae</i>
B	<i>Shigella flexneri</i>
C	<i>Shigella boydii</i>
D	<i>Shigella sonnei</i>

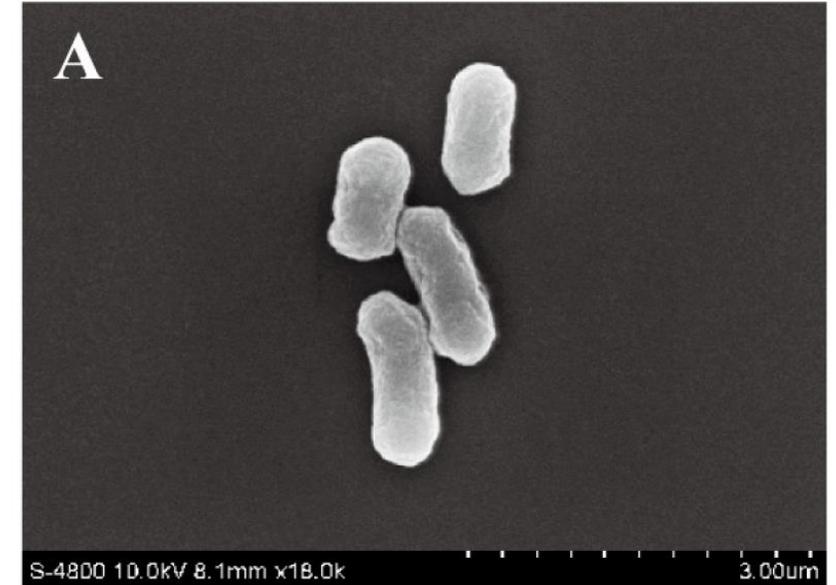
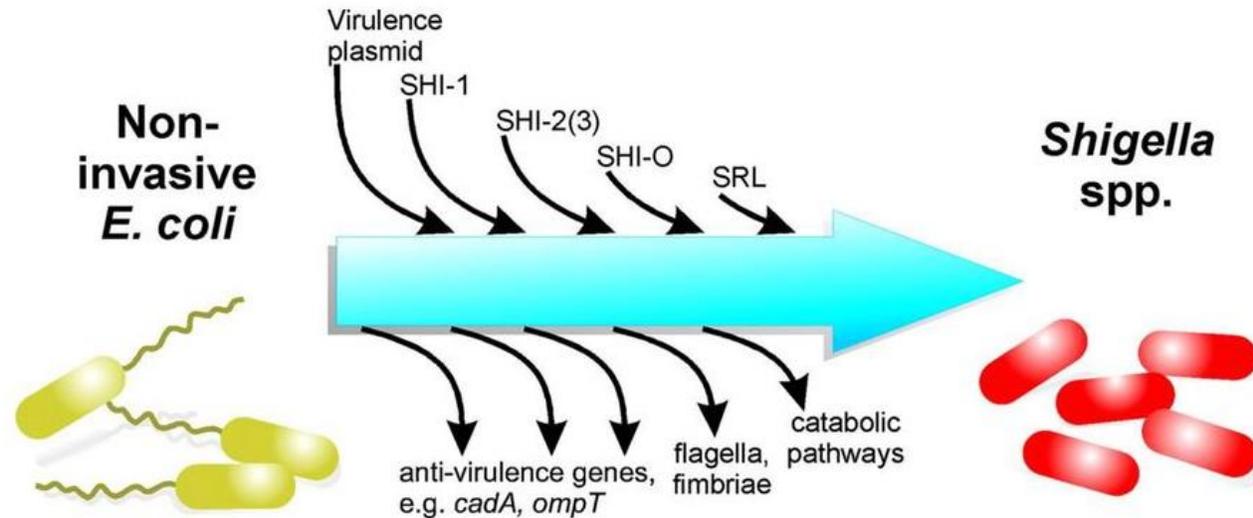


Immagine a microscopio elettronico a scansione a emissione di campo (FESEM) Bai et al 2022. ,

Le analisi della sequenza del DNA mostrano che le “specie” *Shigella* sierologicamente definite sono in realtà membri parafiletici della specie *Escherichia coli*

Evoluzione

Eventi genetici hanno contribuito all'evoluzione di *Shigella* spp. da *E. coli* non patogeno



➤ Guadagni di funzione

- Acquisizione del **plasmide di virulenza pINV** che trasporta i geni per l'infezione invasiva e del sistema di secrezione di tipo (T3SS)
- Delle isole genomiche SHI-1 e SHI-2, che codificano per i geni di evasione battericida e immunitaria.

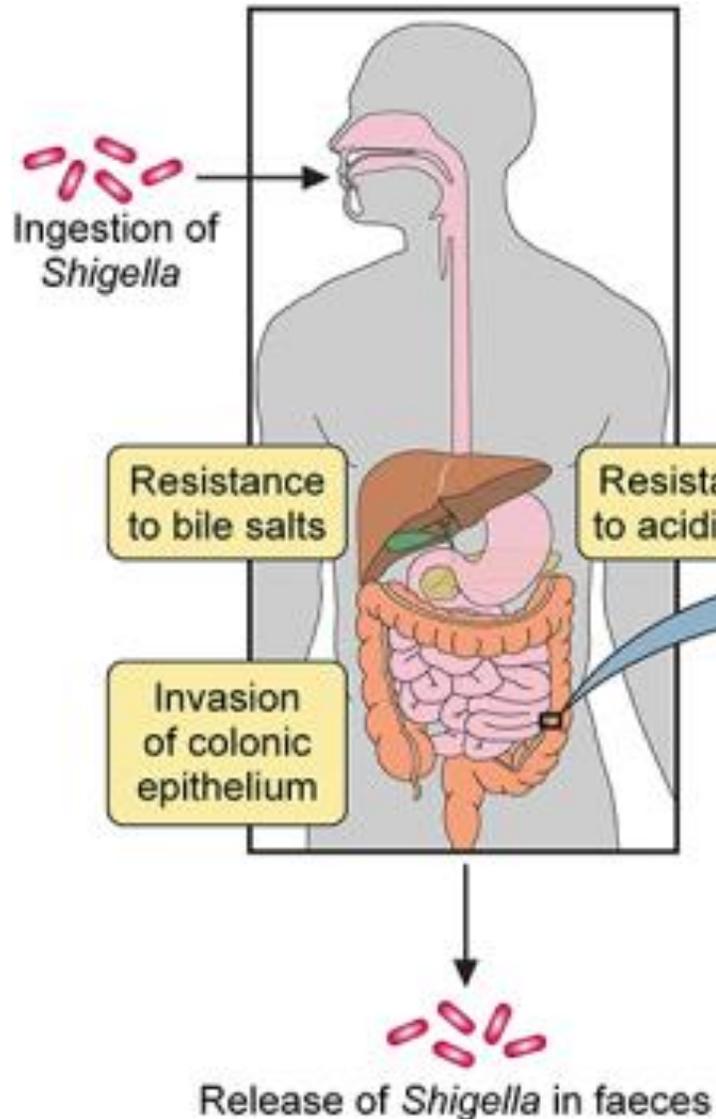
➤ Perdita di funzione

- Inattivazione dei flagelli e mancanza di adesine fimbriali
- Quattro vie metaboliche:
 - *nadA/nadB*, responsabili della via dell'acido nicotinico
 - *cadA*, che codifica per una lisina decarbossilasi
 - *speG* che converte la spermidina nell'acetilspermidina non reattiva
 - *ompT*, una proteasi della membrana esterna



Il ripristino della funzione di ciascuno di questi percorsi interferisce con la capacità di causare malattie negli esseri umani

Patogenesi: Transito lungo il tratto gastrointestinale



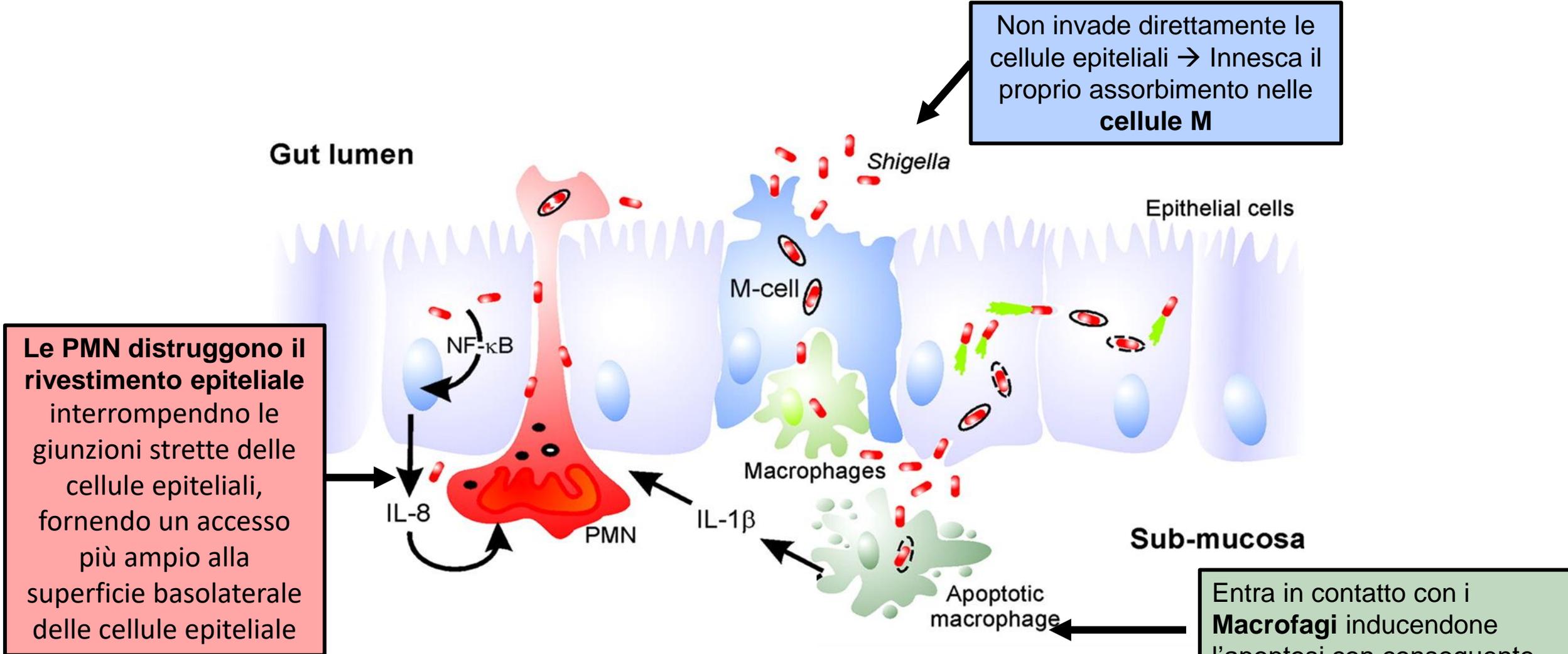
Entrando nel corpo umano, *Shigella* attraversa:

- Lo stomaco → incontra condizioni altamente acide con un pH compreso tra 1,5 e 2,8
- Intestino tenue → pH diventa più alcalino, intorno a 7,7
- Raggiunge il **suo sito preferito di infezione, il colon**, dove il pH diventa leggermente inferiore, intorno a 6,4

La resistenza agli acidi è fondamentale affinché una dose batterica così bassa possa causare malattie

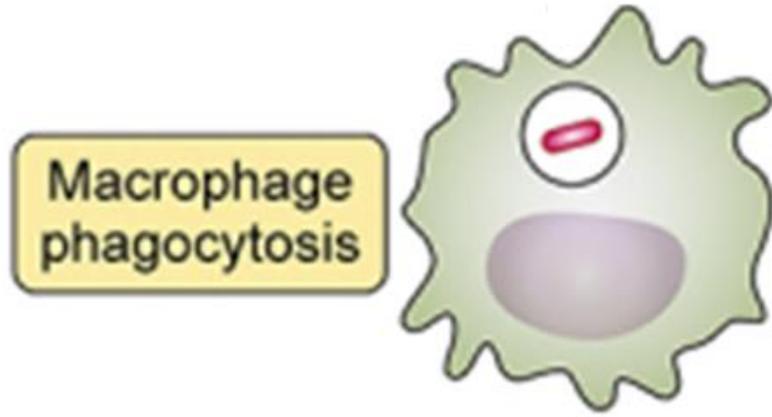
Inoltre, le condizioni acide e i metaboliti intestinali che incontra durante il transito come Colesterolo, Sali biliari, acidi grassi ne regolano la virulenza (Induce produzione di biofilm, induce reclutamento delle *ipa*...)

Patogenesi: Attraversamento dello strato epiteliale



Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion Gunnar N. Schroeder, Hubert Hilbi

Patogenesi: La fuga dai macrofagi



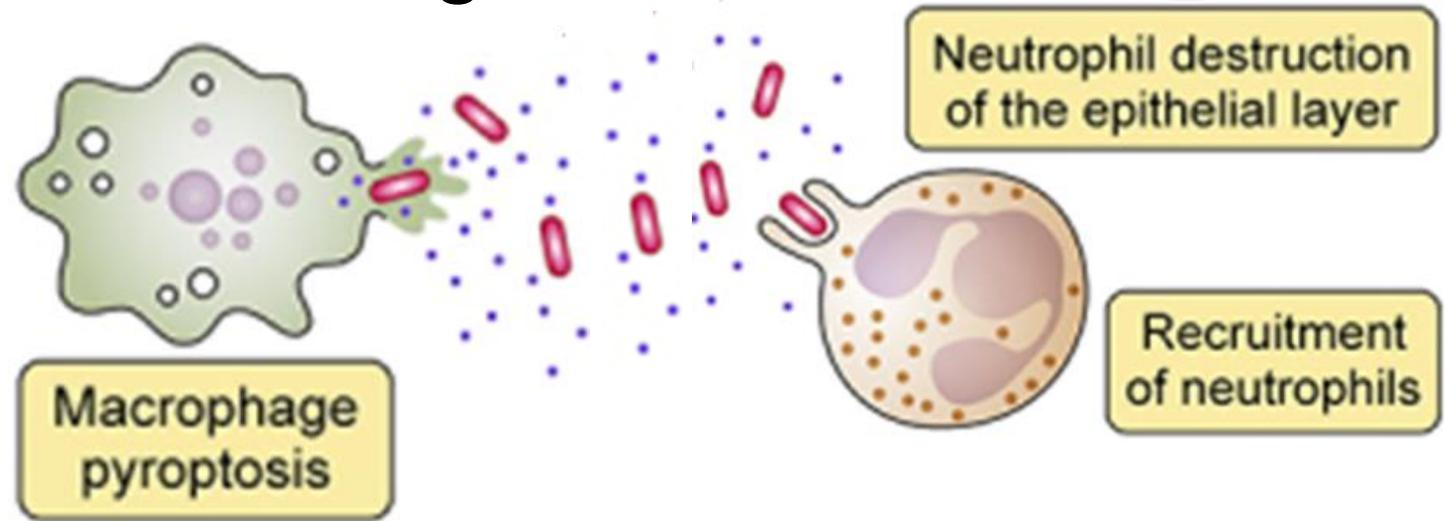
I macrofagi fagocitano i batteri che vengono sequestrati all'interno dei vacuoli



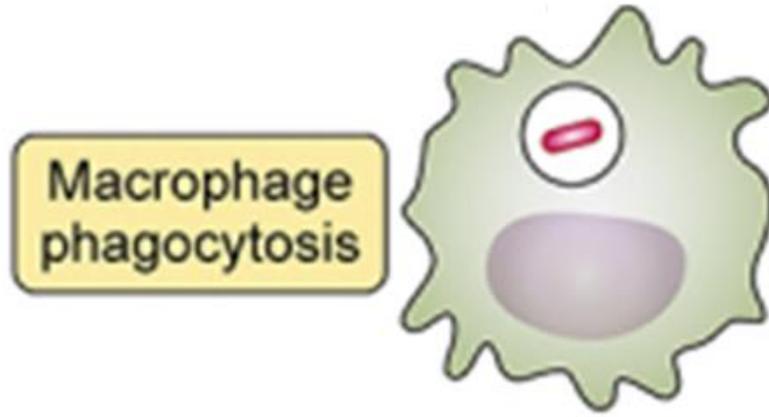
Shigella utilizza i fattori IpaB-ipaC del T3SS per sfuggire dal per sfuggire al vacuolo



IpaB forma dei pori e consente l'afflusso di potassio e conseguente rottura del fagosoma con rilascio del contenuto vacuolare nel citosol



Patogenesi: La fuga dai macrofagi



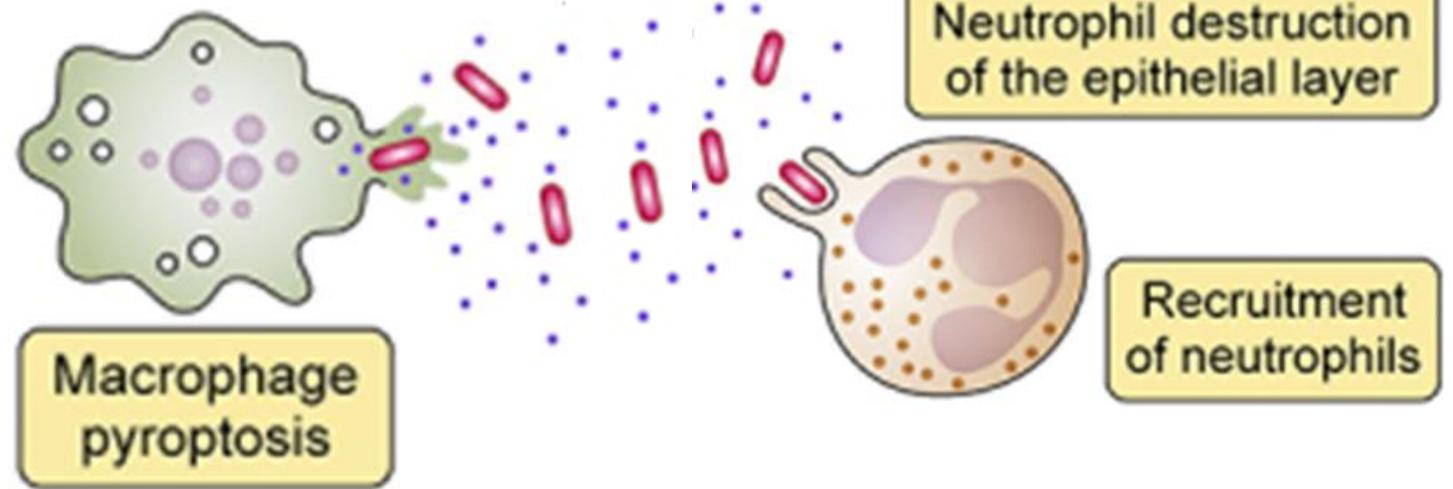
I macrofagi fagocitano i batteri che vengono sequestrati all'interno dei vacuoli



Shigella utilizza i fattori IpaB-ipaC del T3SS per sfuggire dal per sfuggire al vacuolo



IpaB forma dei pori e consente l'afflusso di potassio e conseguente rottura del fagosoma con rilascio del contenuto vacuolare nel citosol

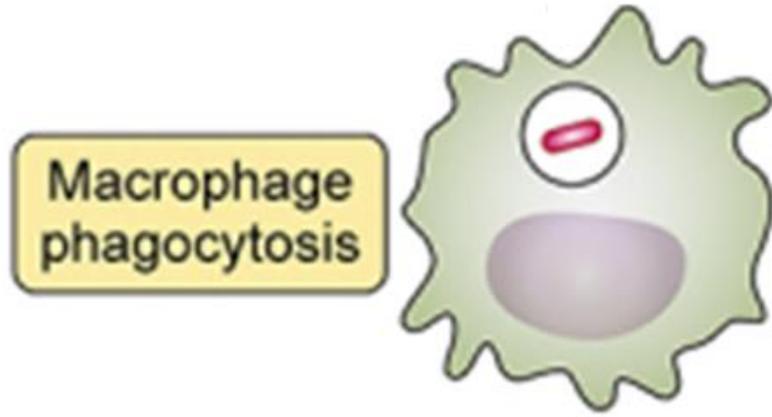


Nel citosol attraverso i fattori MxiH e MxiI del T3SS, *Shigella* promuove attivamente la morte piroptica



Comporta l'ingresso di liquidi in eccesso nella cellula con conseguente lisi osmotica e perdita di contenuto

Patogenesi: La fuga dai macrofagi



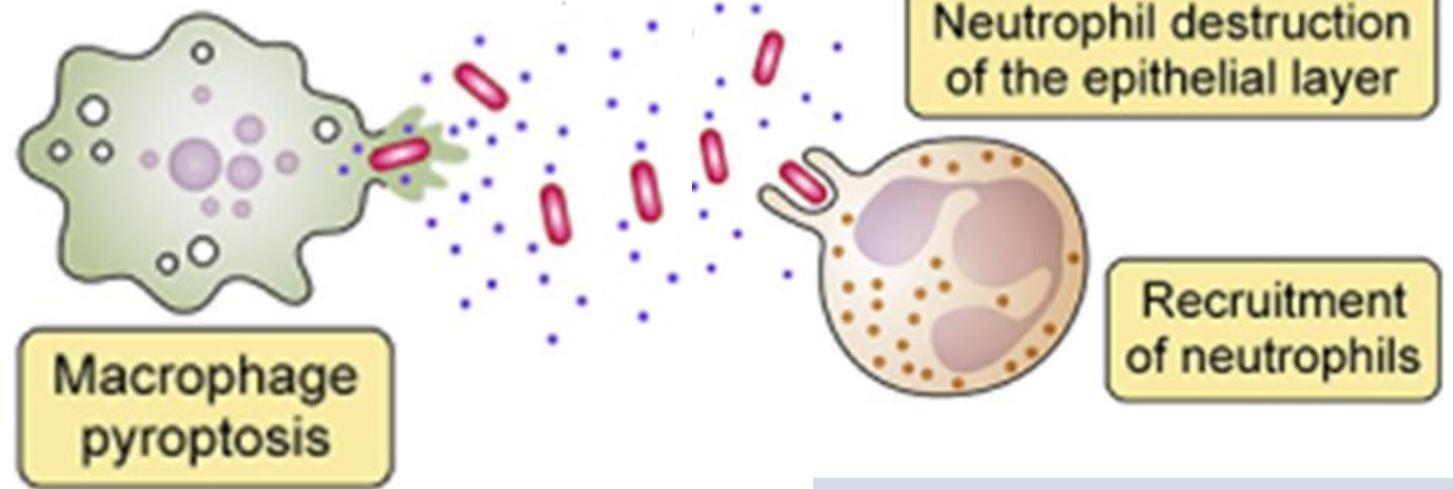
I macrofagi fagocitano i batteri che vengono sequestrati all'interno dei vacuoli



Shigella utilizza i fattori IpaB-ipaC del T3SS per sfuggire dal per sfuggire al vacuolo



IpaB forma dei pori e consente l'afflusso di potassio e conseguente rottura del fagosoma con rilascio del contenuto vacuolare nel citosol



Nel citosol attraverso i fattori MxiH e MxiI del T3SS, *Shigella* promuove attivamente la morte piroptotica



Comporta l'ingresso di liquidi in eccesso nella cellula con conseguente lisi osmotica e perdita di contenuto

Piroptosi dei macrofagi indotta da *Shigella* espone il batterio ad altri componenti e cellule immunitarie

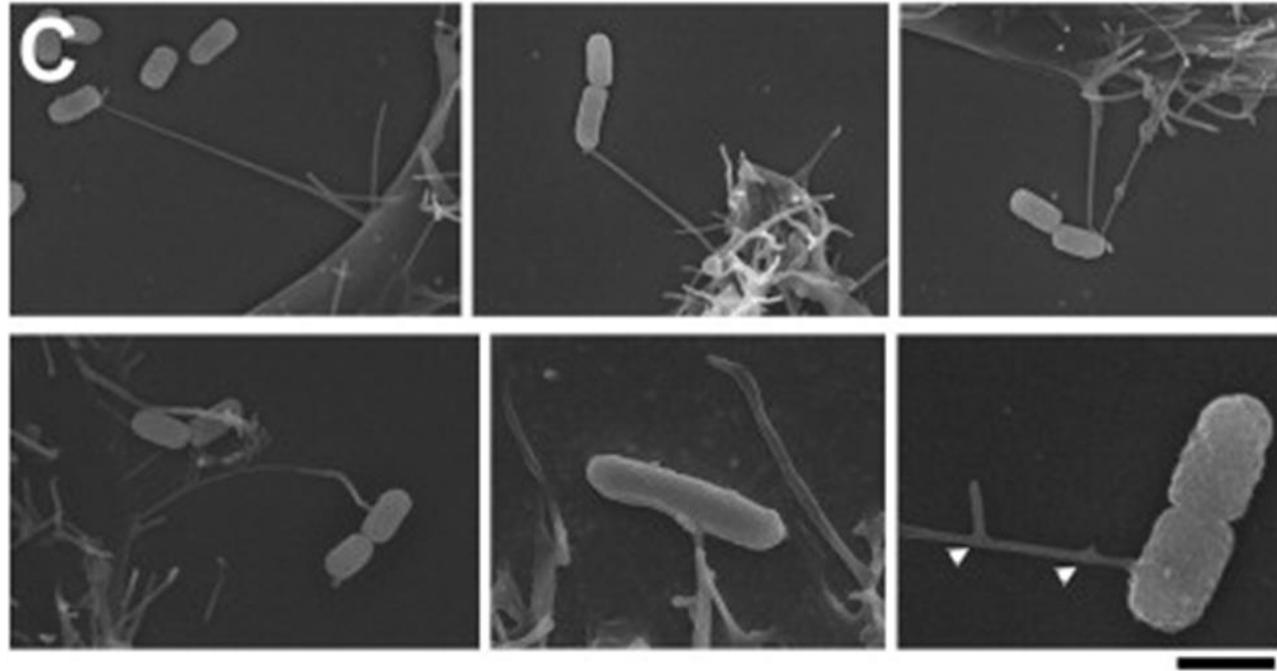


La loro migrazione verso il sito dell'infezione **distrukge lo strato intestinale** e favorisce l'ulteriore ingresso di *Shigella* nel lato basolaterale

Patogenesi: Invasione delle cellule epiteliali

La piroptosi dei macrofagi infetti rilascia *Shigella* vicino al lato basolaterale dell'epitelio

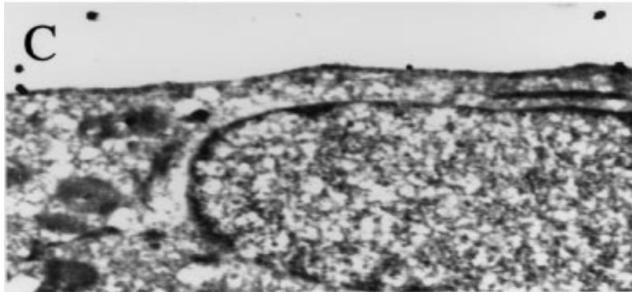
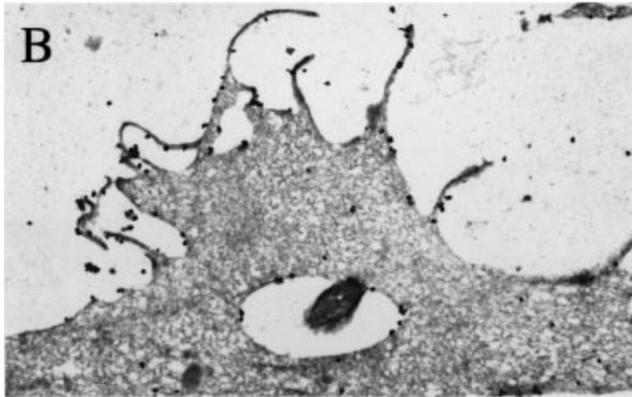
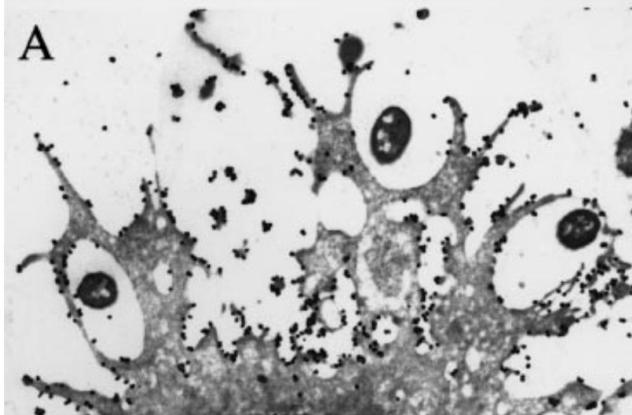
Shigella può essere catturata da estensioni micropodiali nanometrici (NME) simili ai filopodi che si estendono dal corpo cellulare epiteliale



ATP-Mediated Erk1/2 Activation Stimulates Bacterial Capture by Filopodia, which Precedes *Shigella* Invasion of Epithelial Cells. Stéphane R, Grompone G., Carayol N., Mounier J., Guadagnini S., Prevost M., Sansonetti P., Tran Van Nhieu G.,

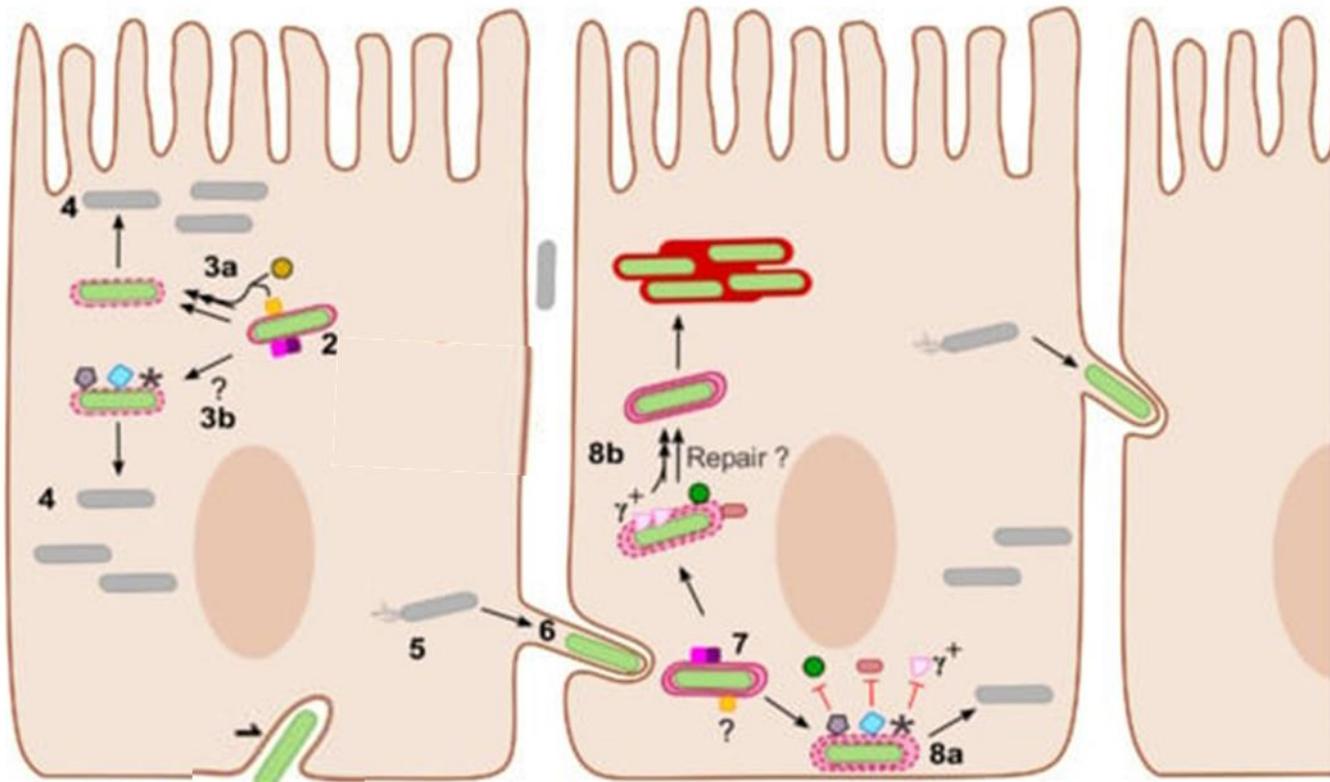
Shigella innesca la retrazione del filopodia, portando di fatto *Shigella* in prossimità del corpo cellulare

Patogenesi: Invasione delle cellule epiteliali

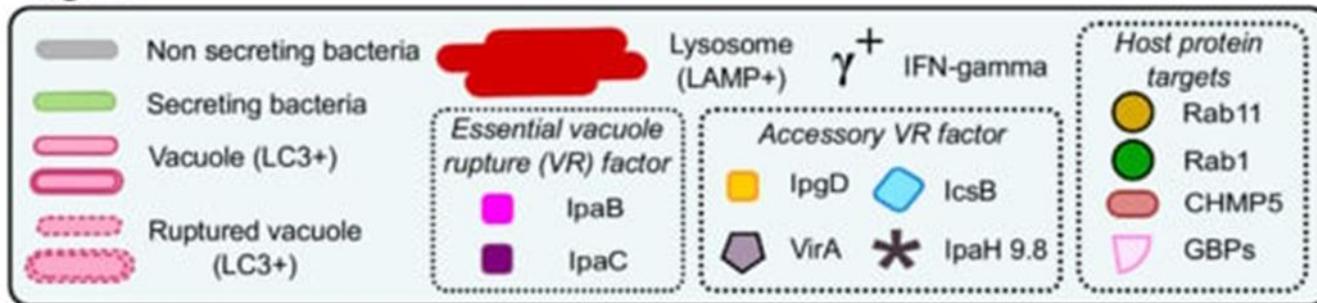


- ✓ L'ingresso della Shigella nelle cellule epiteliali è caratterizzato da una riorganizzazione transitoria del citoscheletro della cellula ospite nel sito di interazione batterica con la membrana cellulare, che porta al fagocimento batterico con un processo macropinocitico.
- ✓ Ad avviare il processo è l'interazione di IpaB con il recettore ialuronico CD44, distribuito lungo la membrana basolaterale delle cellule epiteliali.
- ✓ È probabile che quest'interazione induca una trasduzione del segnale che porta al riarrangiamento del citoscheletro cellulare

Patogenesi: Invasione delle cellule epiteliali



Legend



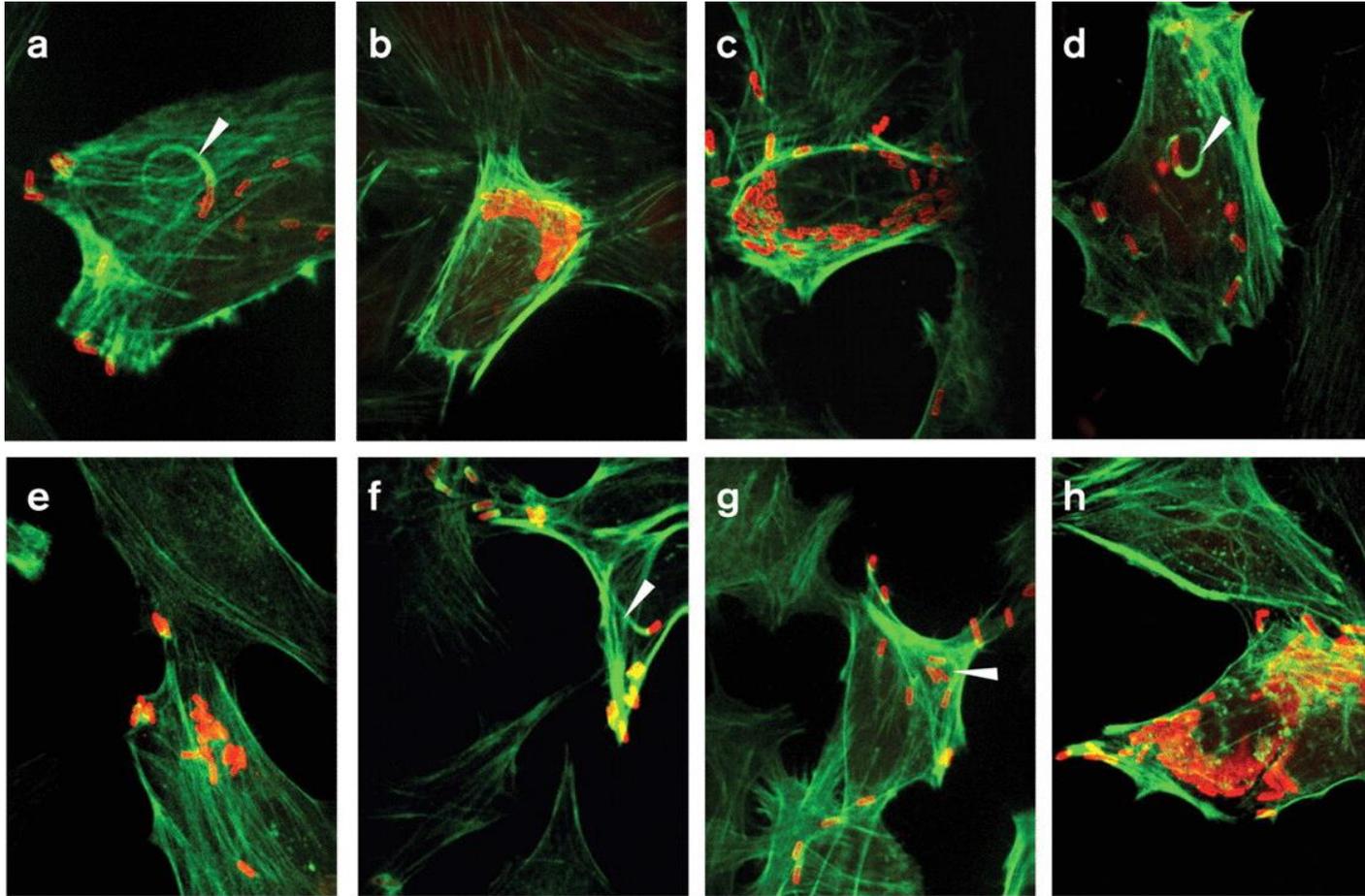
1. Il contatto con la cellula ospite comporta l'attivazione dei T3SS che induce il rimodellamento della membrana plasmatica

2. Il batterio intracellulare viene catturato in un vacuolo a singola membrana

3. I traslocatori IpaB, IpaC e IpgD (altri fattori sconosciuti) si accumulano in prossimità del vacuolo, e formano pori essenziali per la rottura

4-5. batteri citosolici proliferano e si muovono utilizzando le code di actina

Patogenesi: Movimento attraverso code di actina



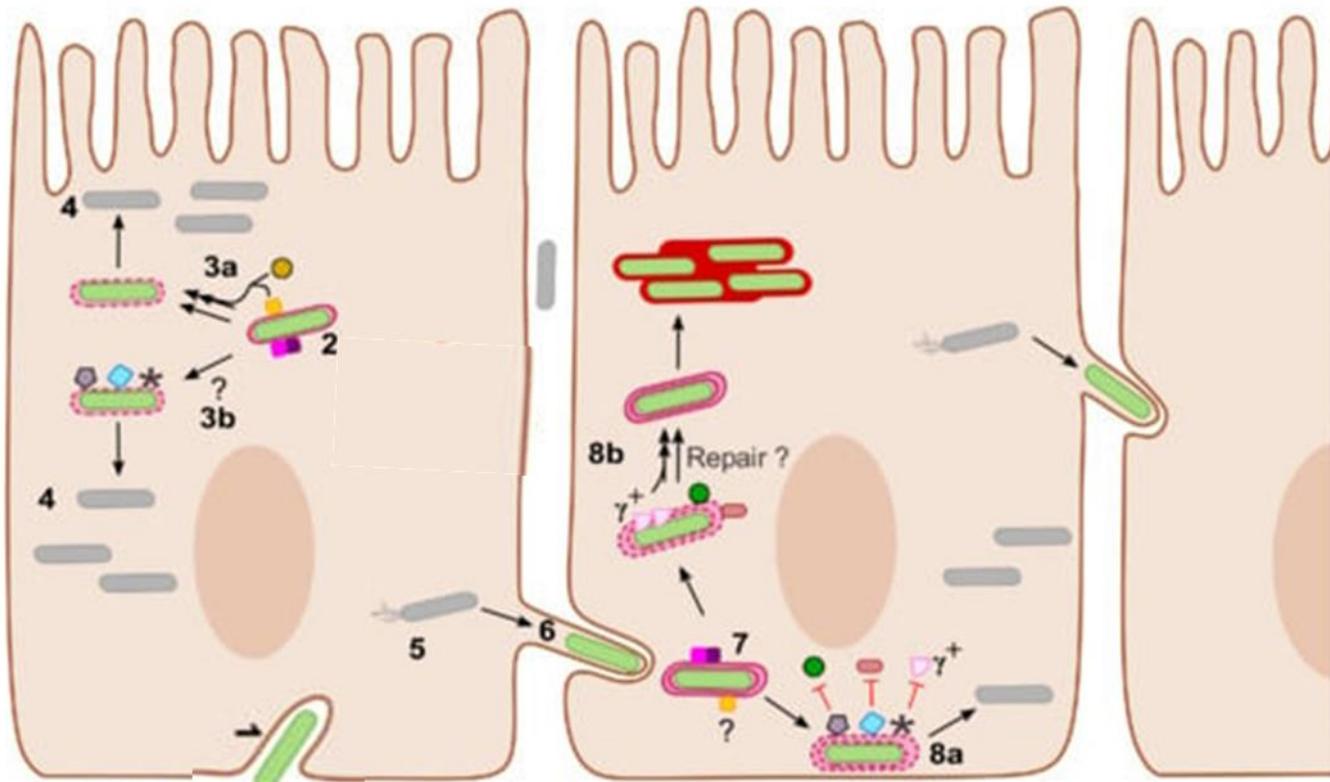
Rilevazione delle code di F-actina prodotte da *S. flexneri* che crescono all'interno delle cellule HeLa.

In condizioni fisiologiche, la proteina Cdc42 si lega alla proteina neurale della sindrome di Wiskott-Aldrich (N-WASP); quindi, N-WASP lega il complesso Arp2/3, formando così il complesso Cdc42-N-WASP-Arp2/3. Questi complessi mantengono sotto controllo la polimerizzazione dell'actina.

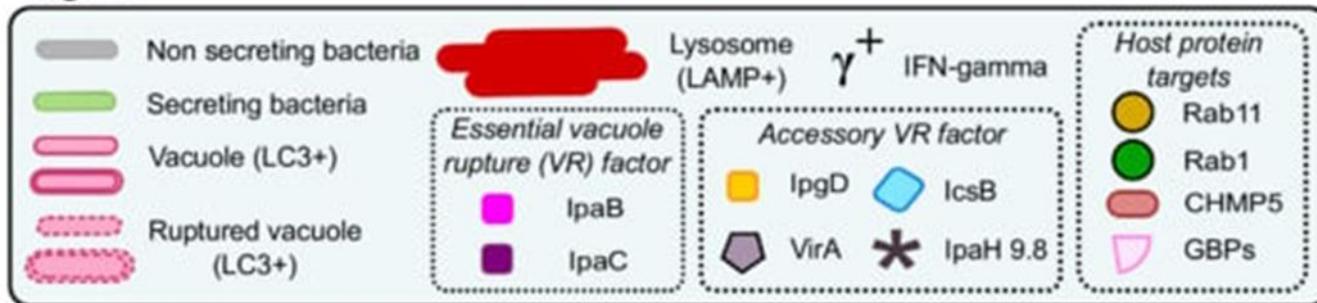
IcsA imita **Cdc42** e formando il complesso IcsA-N-WASP-Arp2/3 inducendo la polimerizzazione dell'actina...

La crescita dei filamenti forniscono la forza propulsiva affinché *Shigella* si muova nel citosol, a velocità fino a 26 $\mu\text{m}/\text{min}$

Patogenesi: Invasione delle cellule epiteliali



Legend



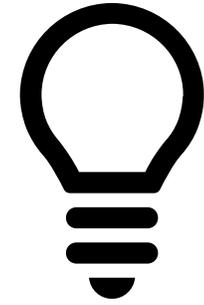
6. Il contatto con la cellula adiacente comporta nuovamente l'attivazione dei T3SS consentendo la formazione di una protrusione

7. Il batterio intracellulare viene catturato in un vacuolo a doppia membrana

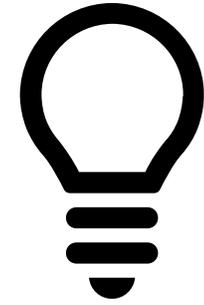
8. I traslocatori IpaB e IpaC e altri fattori come IcsB e VirA e probabilmente IpaH9.8 si accumulano in prossimità del vacuolo, formando pori essenziali per la rottura

Di nuovo... i batteri citosolici proliferano si muovono e sfruttano le code di actina per la diffusione tra cellule epiteliali adiacenti

8b. in assenza di questi traslocatori sono più spesso catturati nei lisosomi.



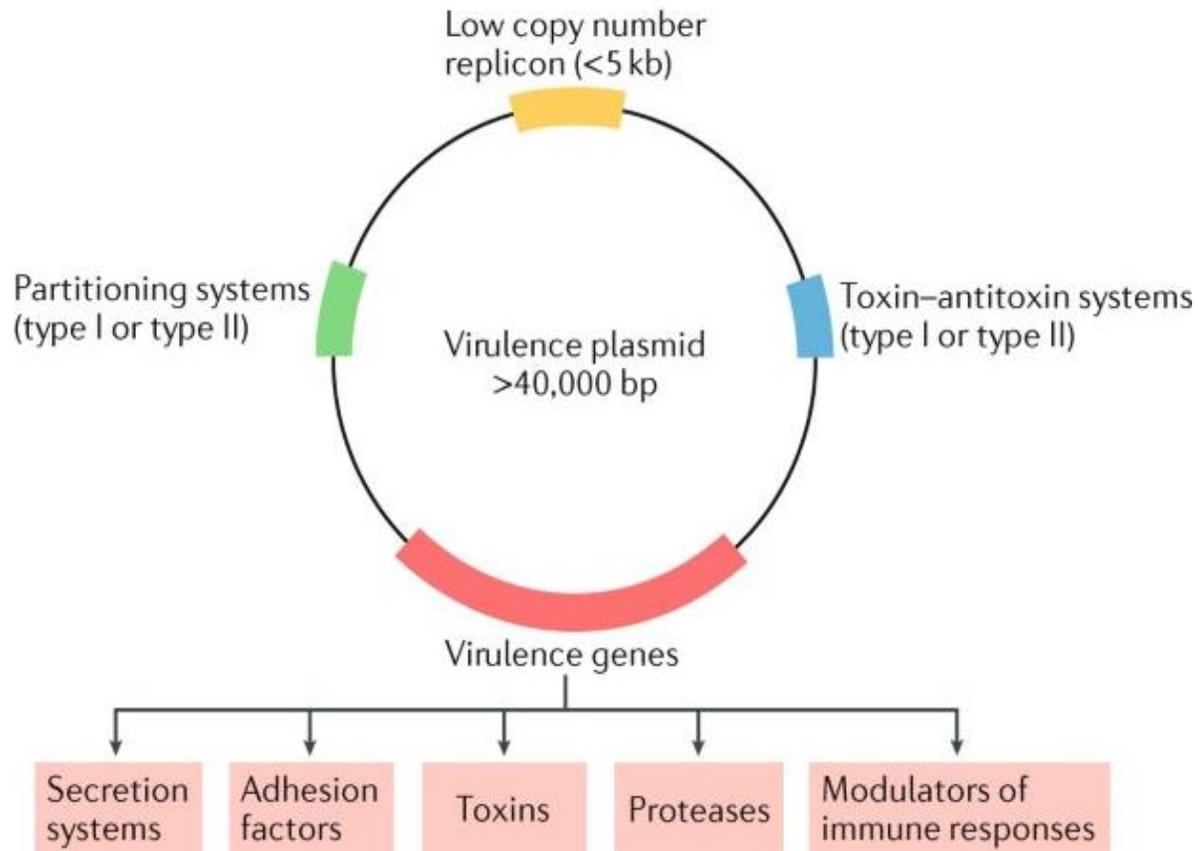
- ✓ **Dove sono localizzati i geni responsabili della virulenza di *Shigella spp.*?**
- ✓ **Come fa *Shigella spp.* a regolare la sua virulenza?**



- ✓ **Dove sono localizzati i geni responsabili della virulenza di *Shigella spp.*?**
- ✓ **Come fa *Shigella spp.* a regolare la sua virulenza?**

Plasmide di virulenza

Plasmidi a basso numero di copie di circa 200 kb, che conferiscono la capacità di invadere e manipolare l'ambiente nelle cellule ospiti



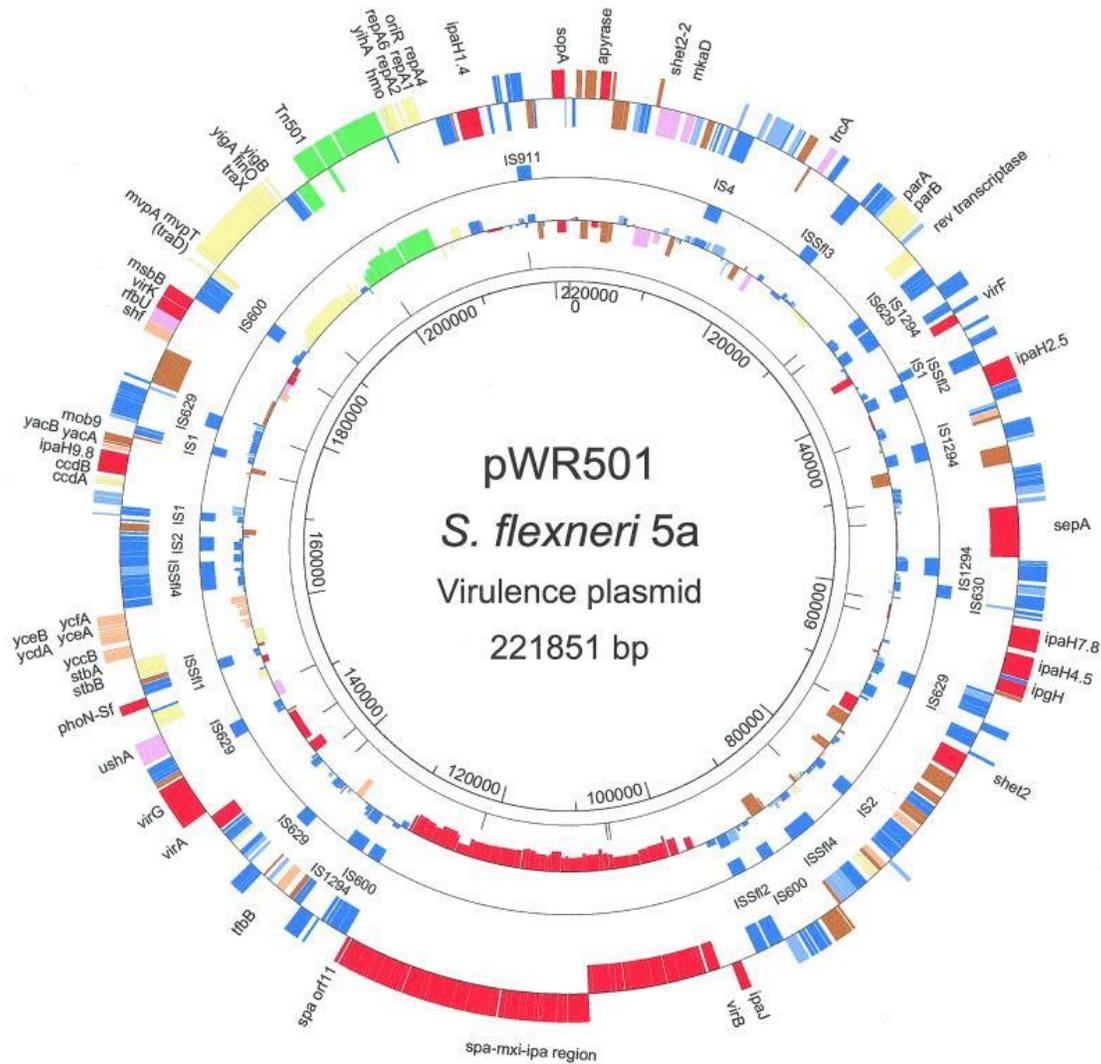
✓ Geni che ne hanno assicurato la continua persistenza

- **sistemi di partizionamento** che distribuiscono i plasmidi tra le cellule figlie prima della divisione
- **sistemi di dipendenza**, mediando l'uccisione post-segregativa di batteri privi di plasmidi (PSK)

✓ Geni di virulenza

- **Invadere** le cellule epiteliali intestinali
- **Fuggire** nel citosol della cellula ospite
- **Diffondersi** da cellula a cellula e di indurre piroptosi nei macrofagi

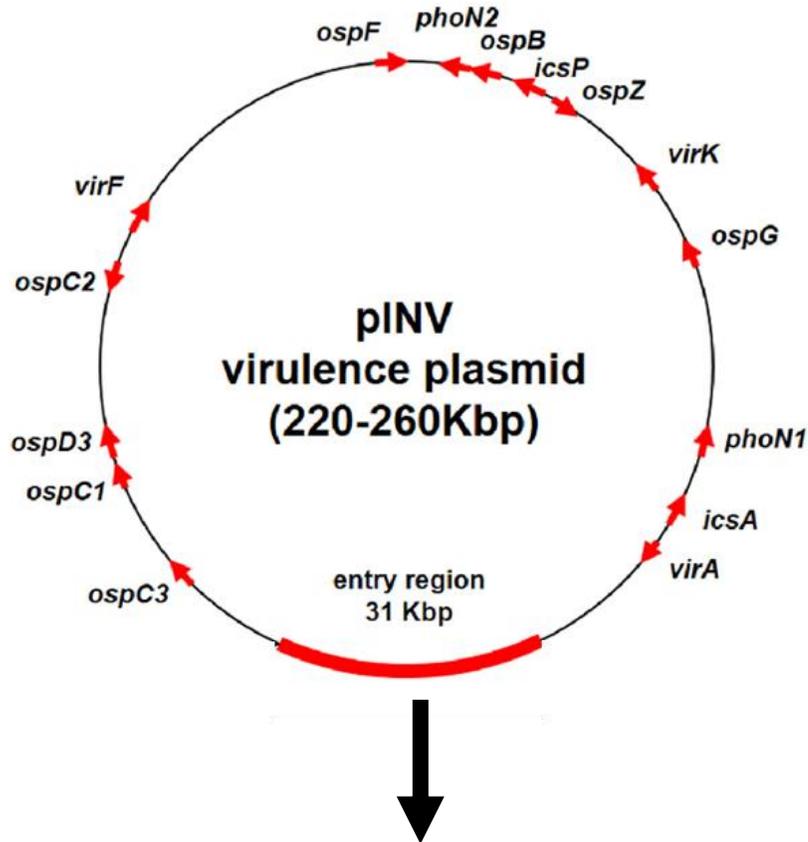
Plasmide di virulenza



I plasmidi di virulenza impongono costi di fitness

Particolarità
Presenza delle sequenze di inserzione (IS) fanno sì che si verifichino spontaneamente e frequentemente eventi di ricombinazione intramolecolare che comportano o la perdita o l'integrazione cromosoma → Espressione di sistemi di virulenza sottoregolate → Minor carico metabolico
L'escissione di plasmide dal cromosoma ripristina la funzione

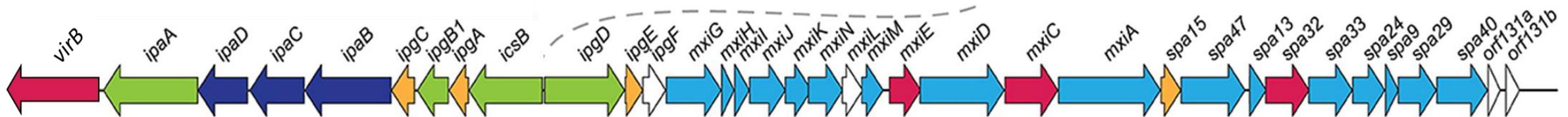
Plasmide di virulenza in *Shigella* - **pINV**



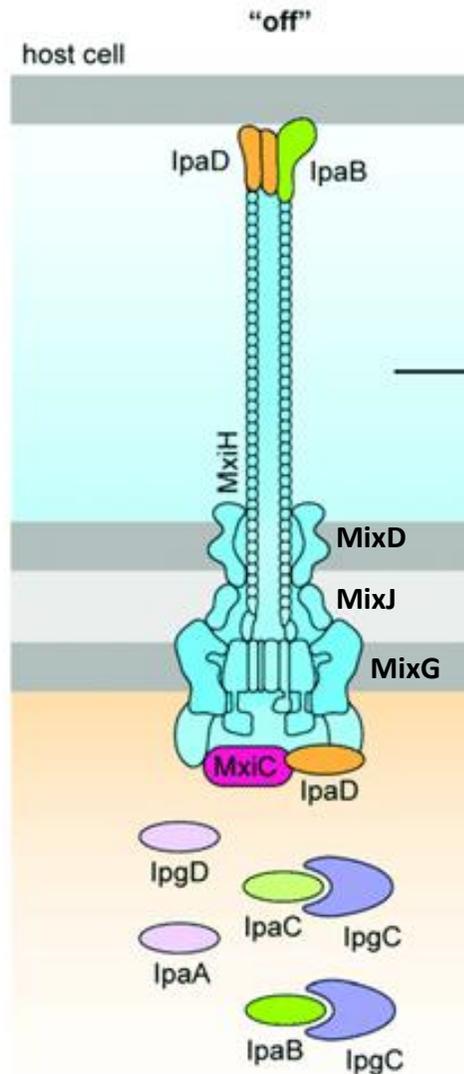
La regione principale è la cosiddetta «**entry region**» nota anche come locus *ipa-mxi-spa* → 34 geni organizzati in due metà, la cui trascrizione avviene in direzione opposta.

Questi geni possono essere divisi in 4 gruppi:

1. **Proteine effettrici** → proteine secrete dal **Sistema di secrezione di tipo 3 (T3SS)** che permettono l'invasione e sopravvivenza nelle cellule ospiti
2. **Proteine necessarie per la secrezione delle proteine effettrici** → locus *mxi-spa*
3. **Attivatori trascrizionali** → *virB* e *mxiE*
4. **Chaperoni** → *IpgA*, *IpgC*, *IpgE*, e *spa15*



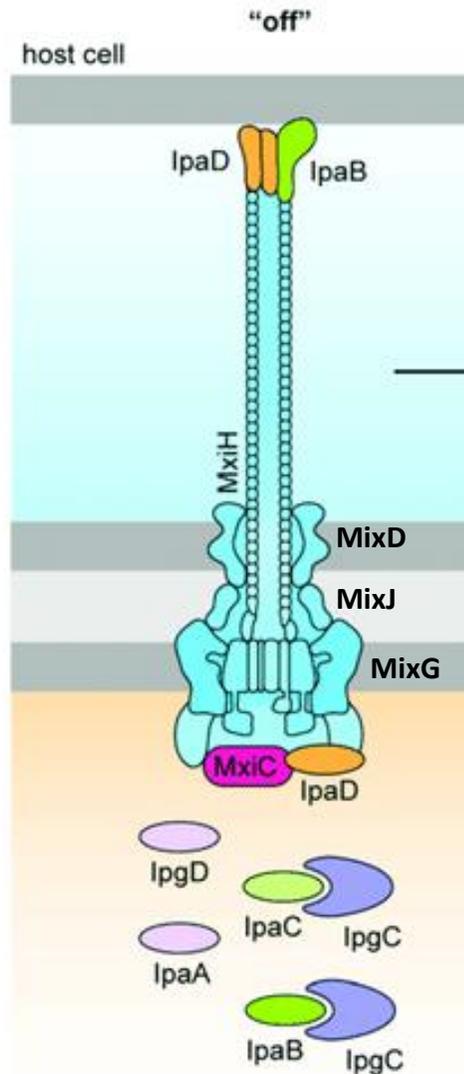
Il sistema di secrezione di tipo 3



Struttura multiproteica costituito da una basa a più anelli e da un sottile ago che attraversa la parete batterica fino ad arrivare alla cellula ospite

- ✓ MixD (secretina) è il costituente maggiore dell'anello associato alla membrana esterna
- ✓ MixG è il costituente maggiore dell'anello associato alla membrana interna
- ✓ MixJ è il costituente maggiore dell'anello associato nello spazio periplasmatico
- ✓ MxiI e MxiH formano l'asta interna e l'ago
- ✓ L'anello C è costituito da proteine **Spa33** che estroflette l'ago e **Spa32** che determina la lunghezza dell'ago.
- ✓ L'energia necessaria per l'assemblaggio e il funzionamento del T3SS derivano dall'attività **ATPasica** di **Spa47**

Il sistema di secrezione di tipo 3

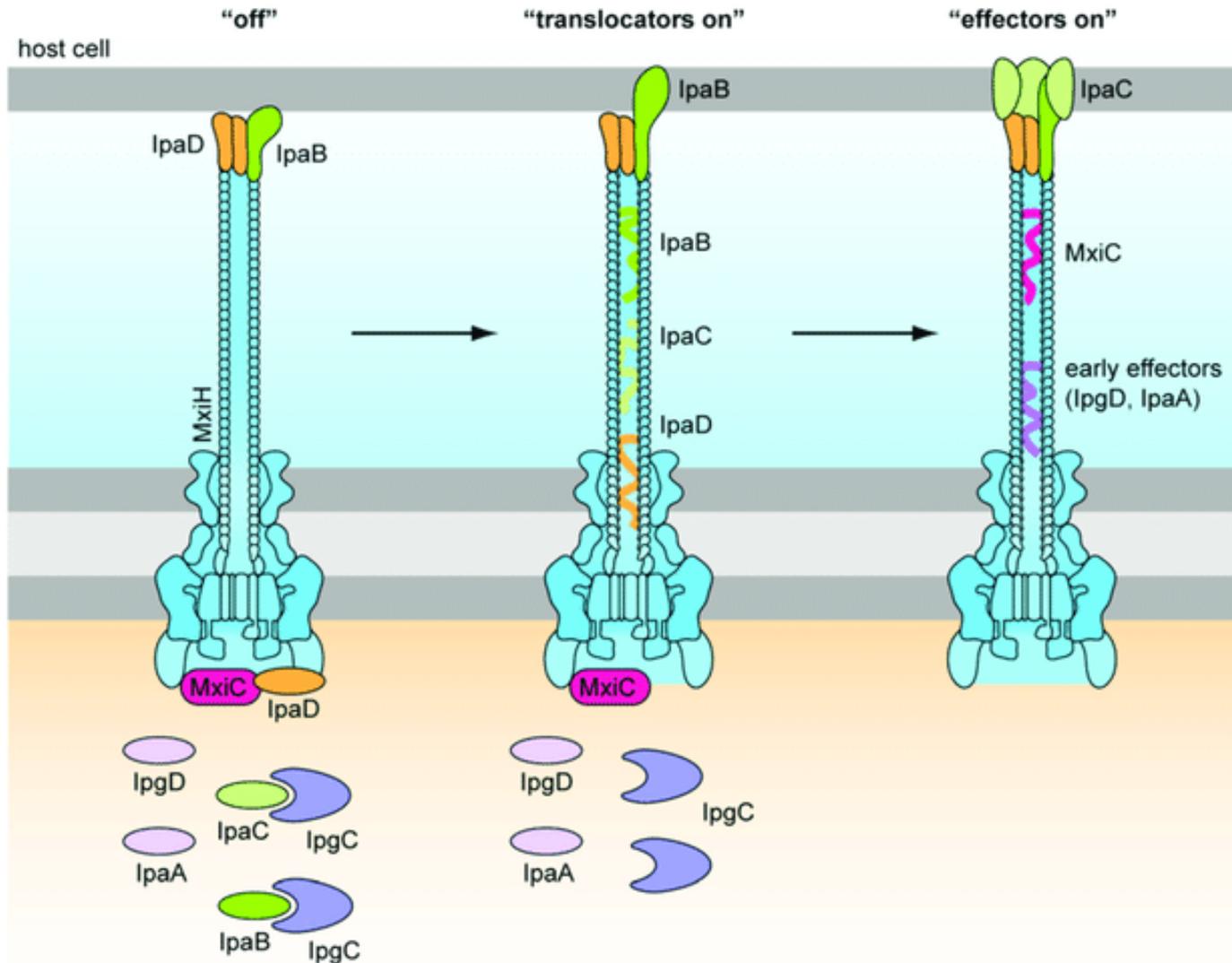


In assenza della cellula ospite, la proteina idrofilica **IpaD** interagisce con la proteina idrofobica **IpaB**, bloccandola all'interno del canale dell'ago e impedendo la secrezione delle proteine effettrici

IpaB e IpaC sono mantenuti nel citoplasma di *Shigella* come un complesso con il suo chaperone affine IpgC. Il complesso traslocatore-chaperone svolge molteplici ruoli:

- Previene la degradazione di IpaB o IpaC prima dell'esportazione
- Protegge il batterio dal potenziale autodanno della membrana
- sequestra IpgC che, una volta libero è in grado di per interagire con il regolatore della trascrizione della famiglia AraC MxiE e indurre l'attivazione degli effettori secondari

Il sistema di secrezione di tipo 3

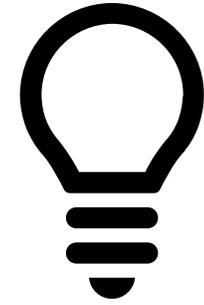


Il contatto con la cellula ospite determina un cambiamento conformazionale di IpaD che a sua volta permette la **localizzazione di IpaB sulla membrana cellulare eucariotica**

IpaB e IpaC formano un poro multimerico di traslocazione

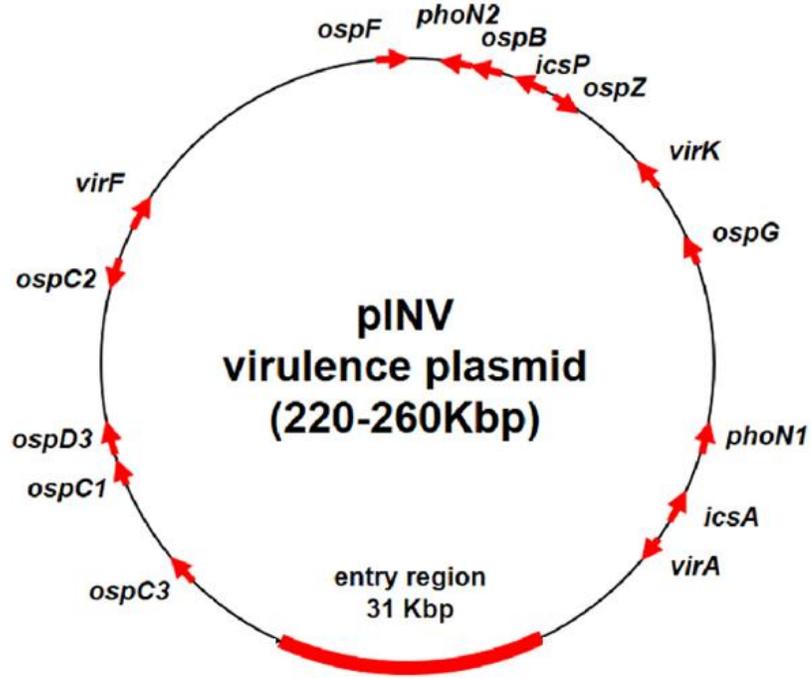
E una volta che il T3SS è in questa conformazione aperta, altre Ipa e altri effettori proteici possono raggiungere direttamente i propri bersagli nella cellula ospite

IpaB, IpaC e IpaD vengono rilasciati e vengono secrete come effettori



- ✓ Dove sono localizzati i geni responsabili della virulenza di *Shigella spp.*?
- ✓ Come fa *Shigella spp.* a regolare la sua virulenza?

Plasmide di virulenza in *Shigella* - **pINV**



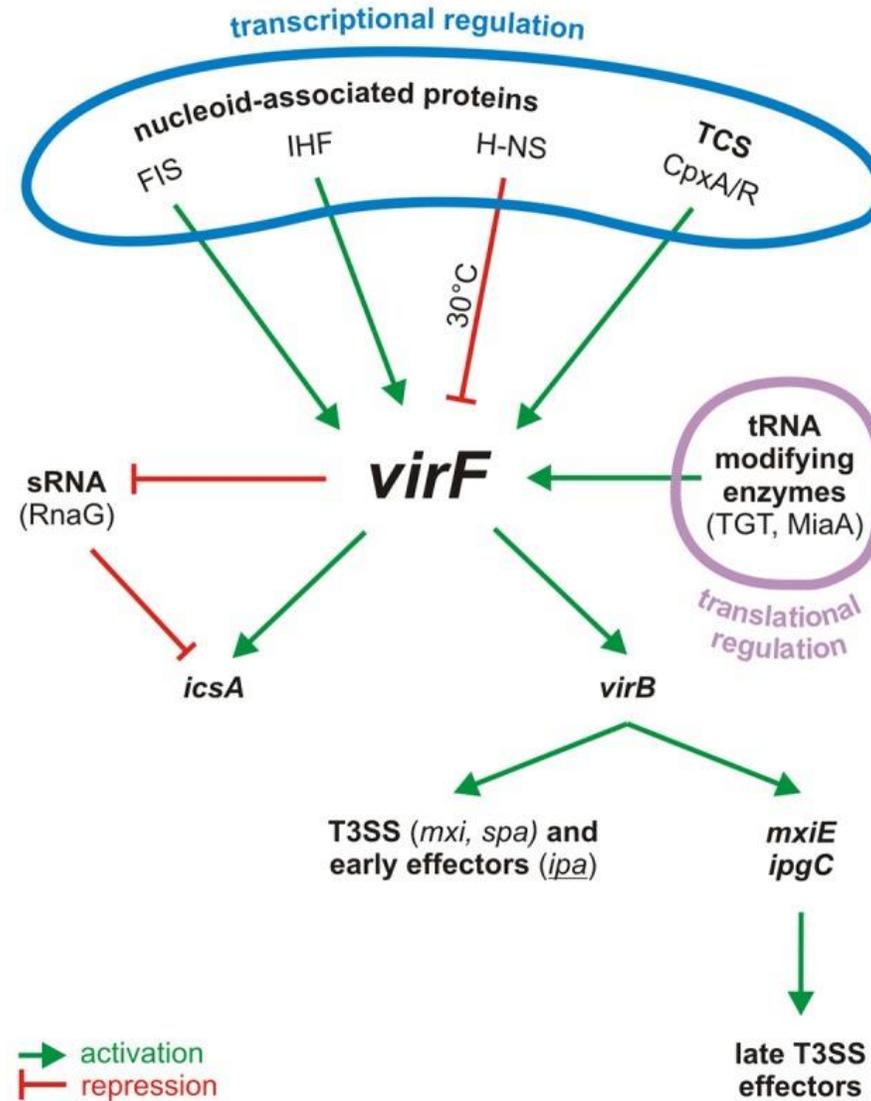
Il regolatore principale dei geni di virulenza di *Shigella* è il gene ***virF***

Localizzato al di fuori della entry region e circondato da un mosaico di sequenze IS → suggerisce che potrebbe essere stato acquisito dal genoma del plasmide indipendentemente dalla "regione di ingresso"

L'attivazione di *virF* avviene in risposta a **segnali ambientali**

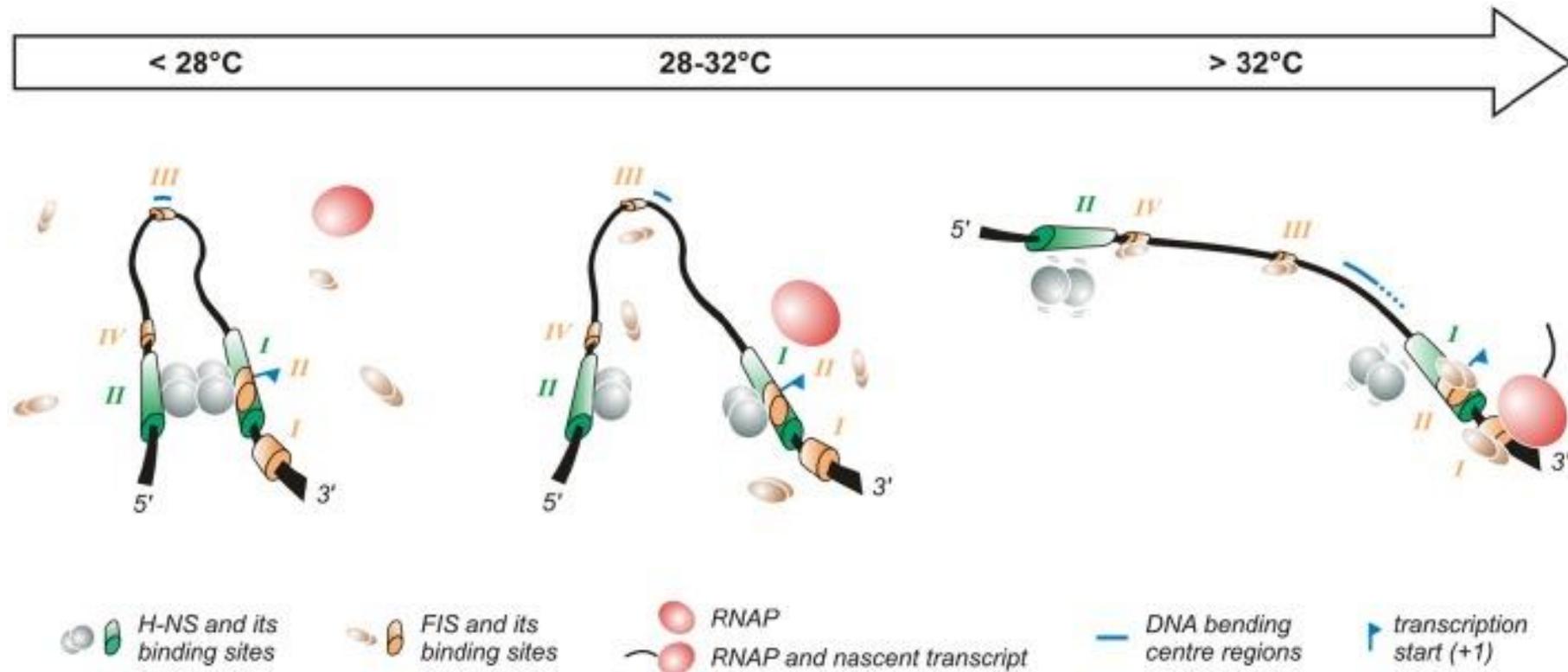
- Temperatura
- pH
- Osmolarità
- sRNA
- tRNA modificati

Il regolatore principale → VirF attiva una cascata di virulenza



Il regolatore principale → VirF

Regolazione dovuta dalla temperatura dipende dalla **curvatura del promotore del gene *virF***



<28°C

Struttura compatta in cui H-NS reprime *virF* interagendo con i siti di legame H-NS I e II. Ripiegando in DNA, impedisce l'accesso all'RNA polimerasi impedendo la trascrizione

28-32°C

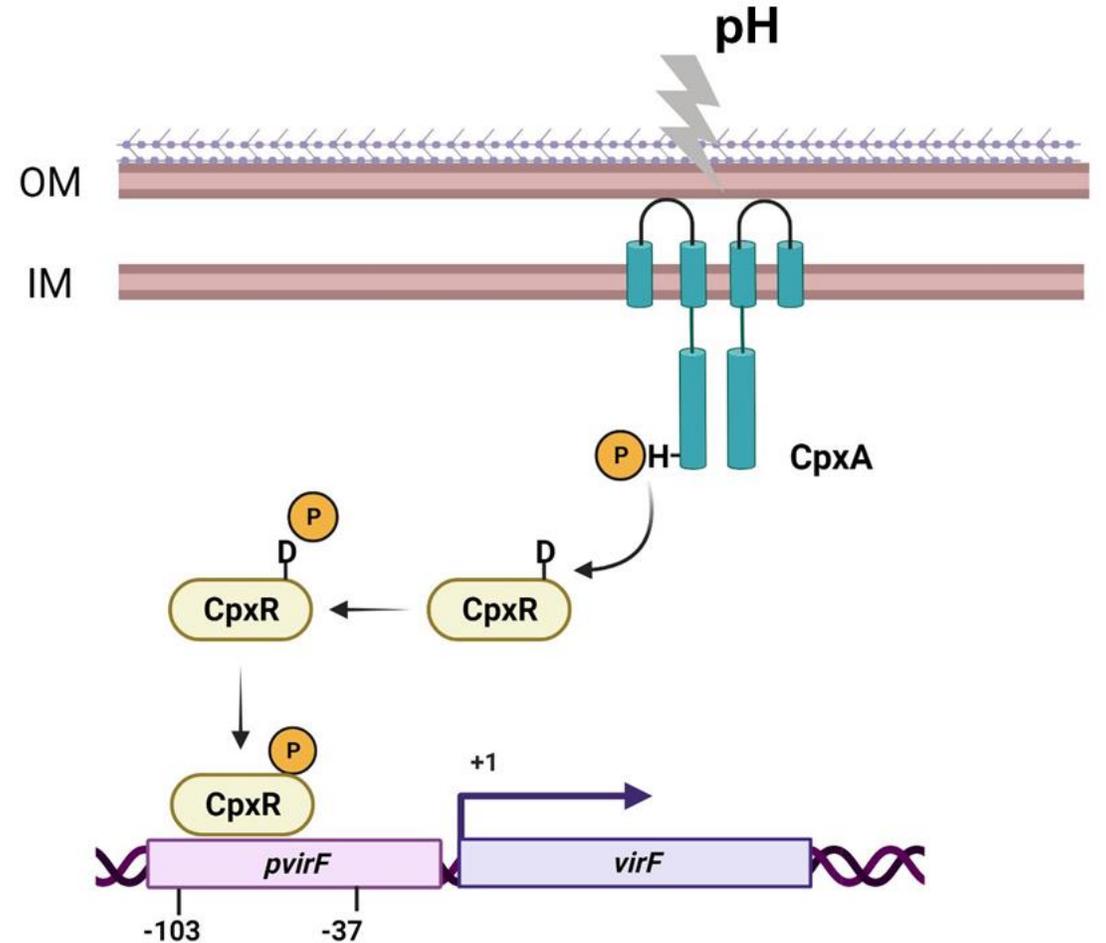
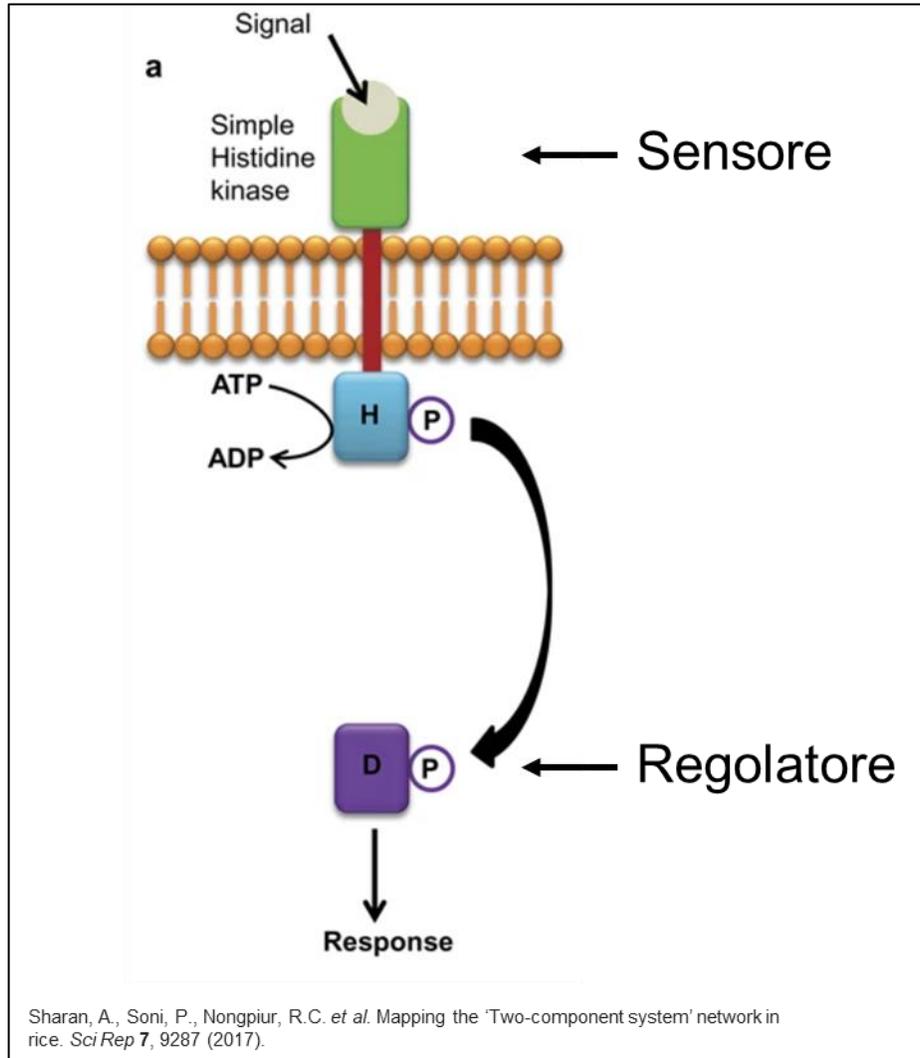
La curvatura situata tra i due siti di legame H-NS si scioglie intorno ai 32°C smascherando i siti di legame per FIS

>32°C

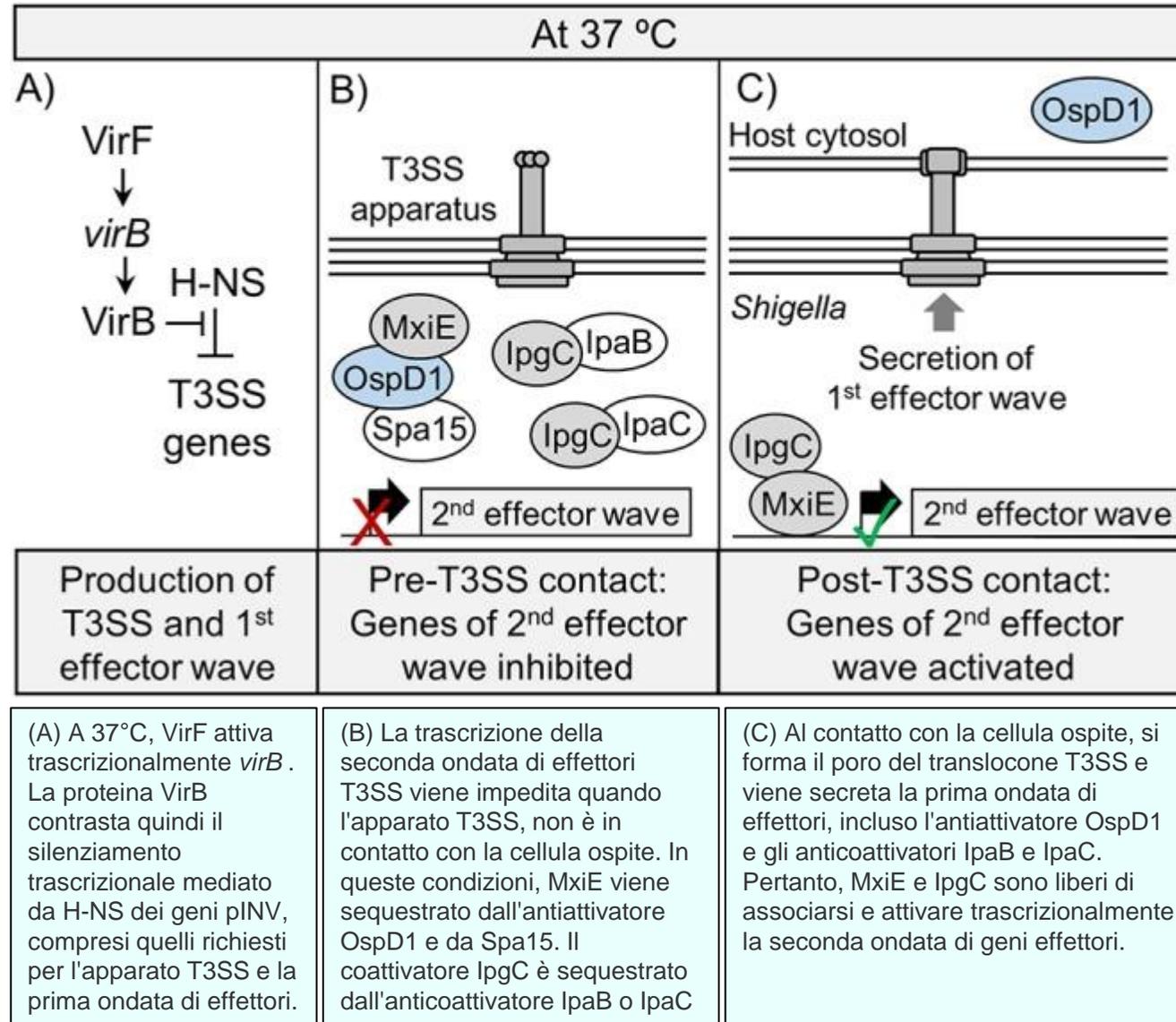
La curvatura del DNA si rilassa le interazioni H-NS con i siti di legame si indeboliscono e FIS ottiene un accesso più facile alle sue box di legame. Complessivamente questi eventi portano alla formazione di un complesso di trascrizione attivo.

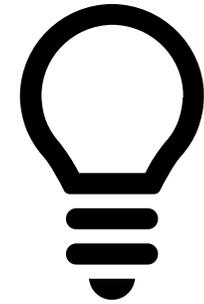
Il regolatore principale → VirF

Regolazione dovuta al pH dipende dal **sistema a due componenti CpxA/CpxR**



Il regolatore principale → VirF attiva una cascata di virulenza



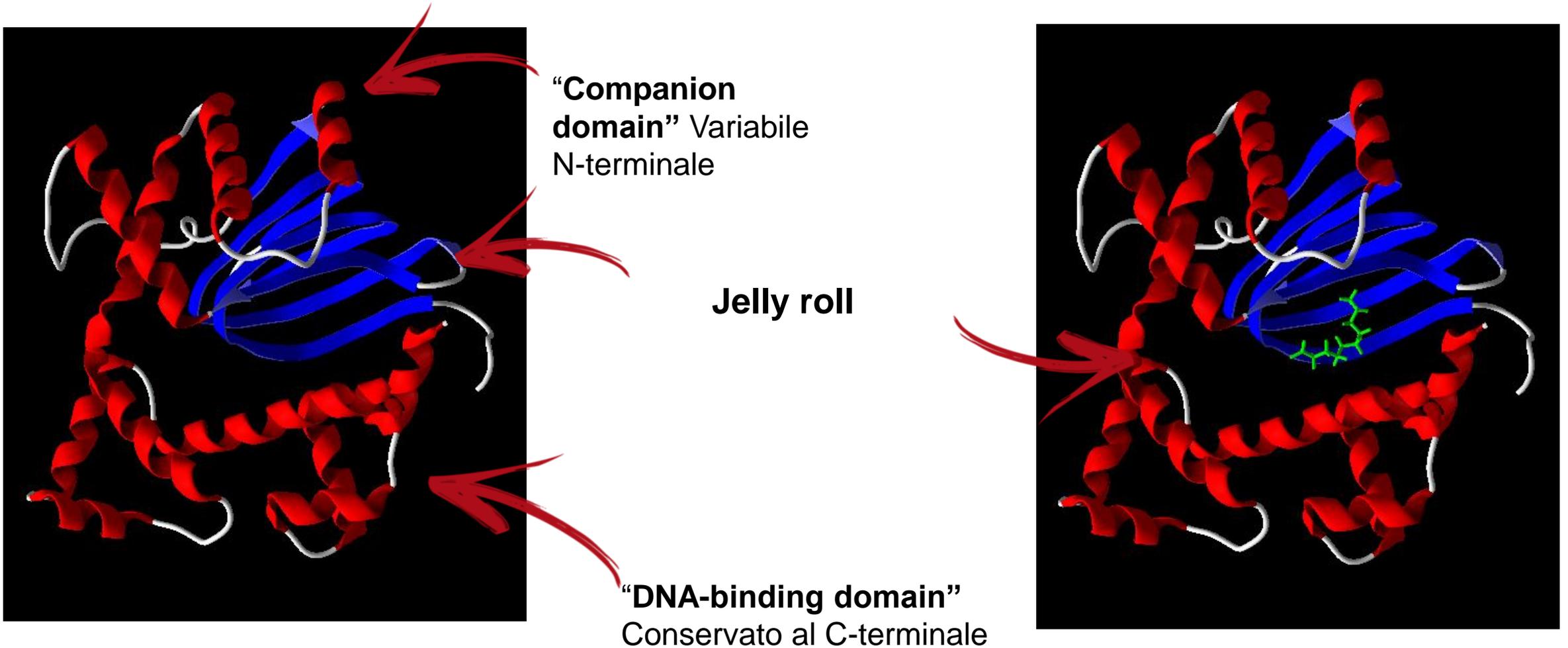


Meccanismo di regolazione della virulenza della *Shigella* da parte di fattori intestinali

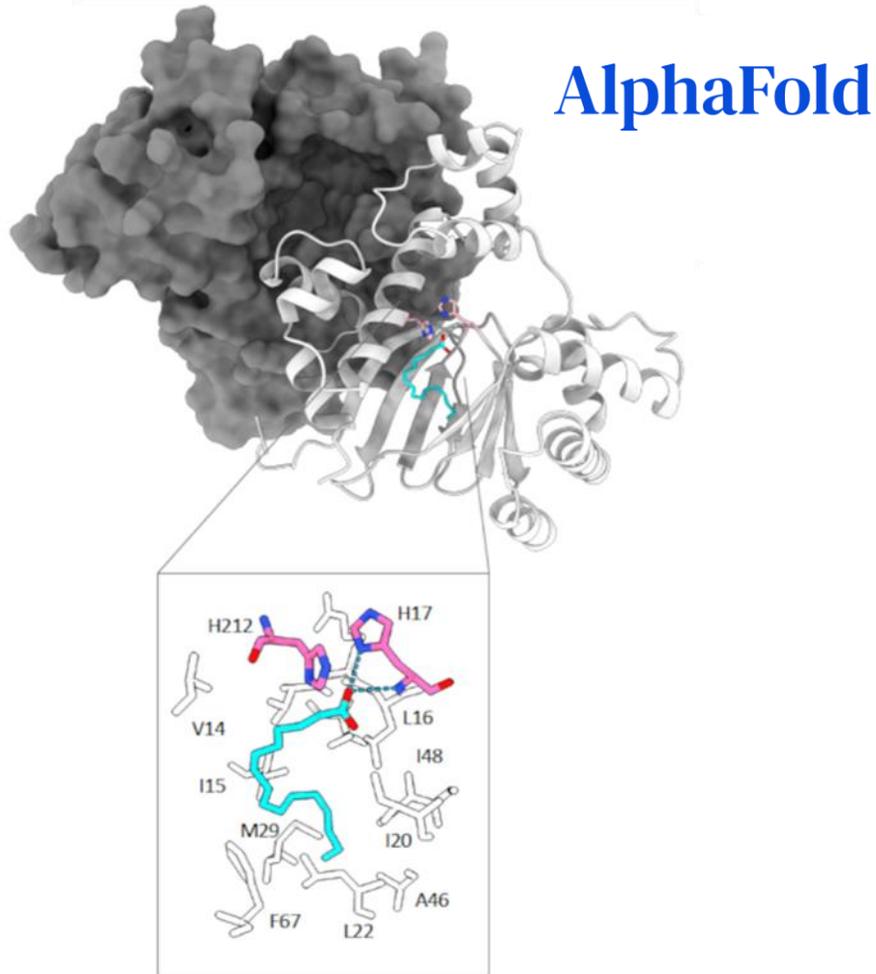
Ruolo chiave della proteina VirF

VirF Proteina: un AraC-XyIS

La proteina VirF è un membro della famiglia di attivatori trascrizionali AraC-XyIS.



- ✓ Dati bioinformatici suggeriscono che diversi acidi grassi possono interagire con VirF



MC- and
LC-SFAs

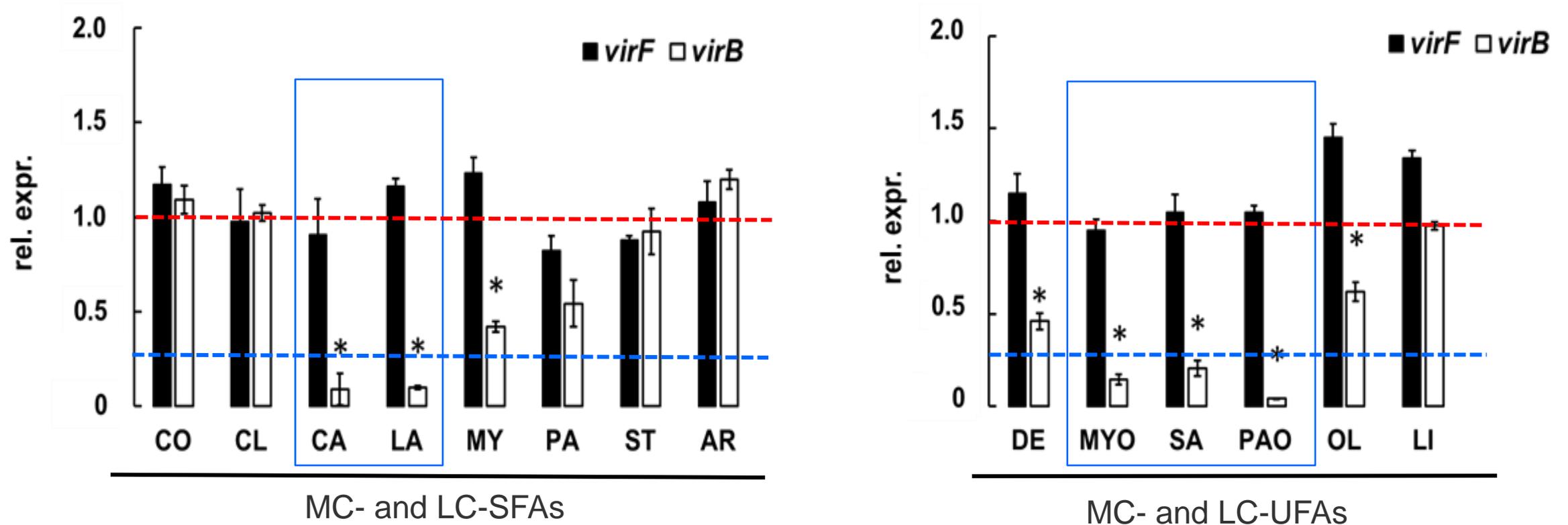
MC- and
LC-UFAs

Estimated energy of interaction (Rerank Score) by docking of FAs in VirF

Common Name	Structure	C:D	Energy
Capric acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	10:0	- 63.9
Lauric Acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0	- 70.2
Myristic Acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14:0	- 81.8
Palmitic Acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0	- 97.0
Stearic Acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0	- 75.9
Arachidic Acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	20:0	- 49.1
Decenoic acid	$\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	10:1	- 67.3
Myristoleic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	14:1	- 112.3
Palmitoleic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	16:1	- 116.8
Oleic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1	- 100.2
Sapienic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	16:1	- 119.4

Espressione dei geni della virulenza di *S. flexneri* in seguito a trattamento con acidi grassi

Che succede a livello trascrizionale?

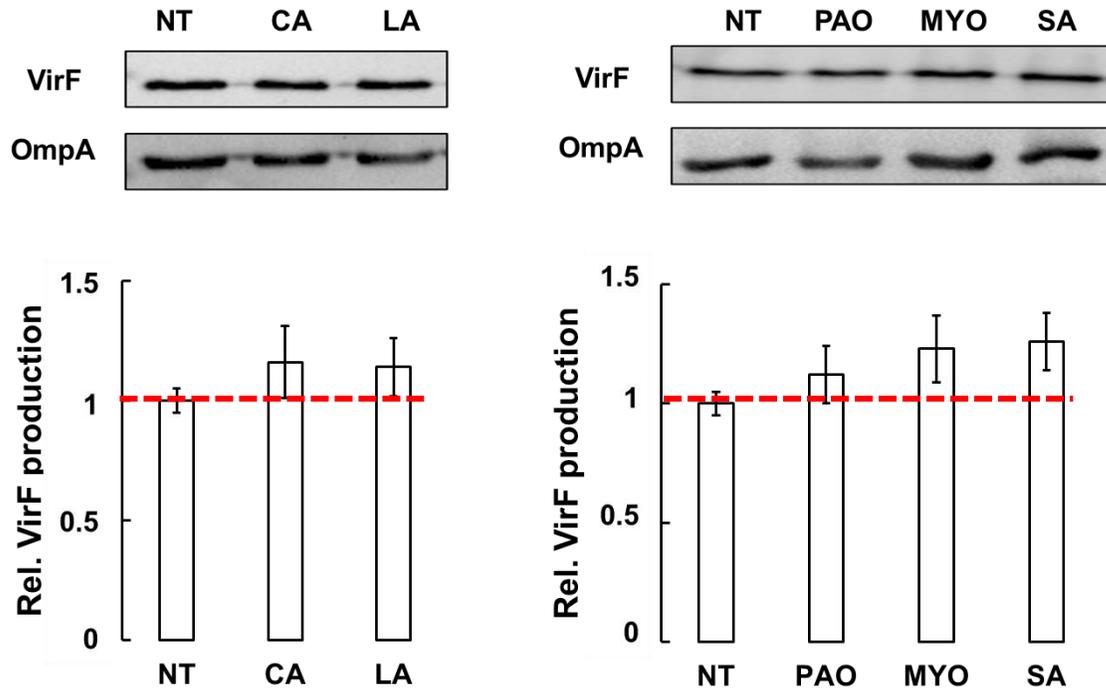


✓ *La trascrizione VirF non è influenzata in modo significativo dagli acidi grassi testati*

✓ *La trascrizione di virB è significativamente ridotta dalla presenza di MC-SFA CA e LA e di LC-UFA MYO, SA e PAO*

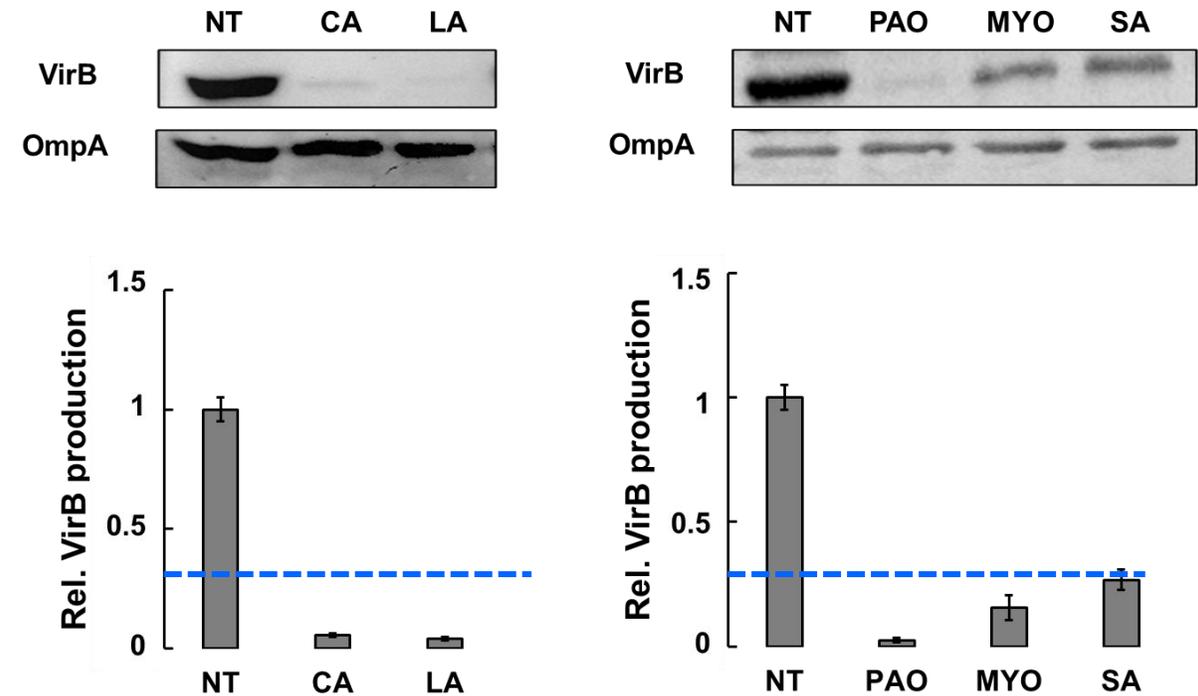
Espressione dei geni della virulenza di *S. flexneri* in seguito a trattamento con
acidi grassi

Produzione di VirF



Gli Acidi grassi selezionati non hanno effetti rilevanti sulla proteina VirF

Produzione di VirB

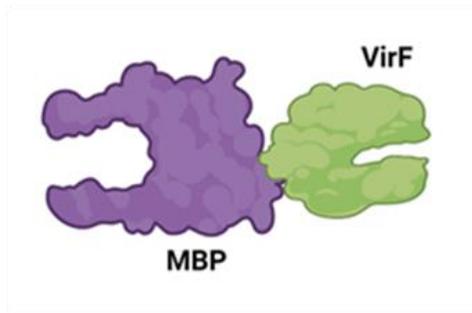


Gli Acidi grassi selezionati hanno ridotto significativamente la quantità di proteina VirB

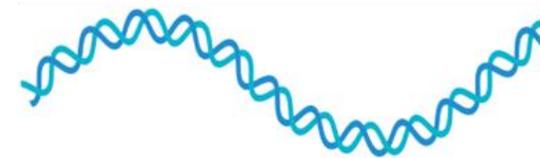
Ipotesi: Gli Acidi grassi si legano alla proteina VirF e influenzano la sua interazione con il promotore virB

- Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)
- Un nuovo test: DNA-Protein Interaction Plate assay (DPIPA)

Purified MalE-VirF fusion protein

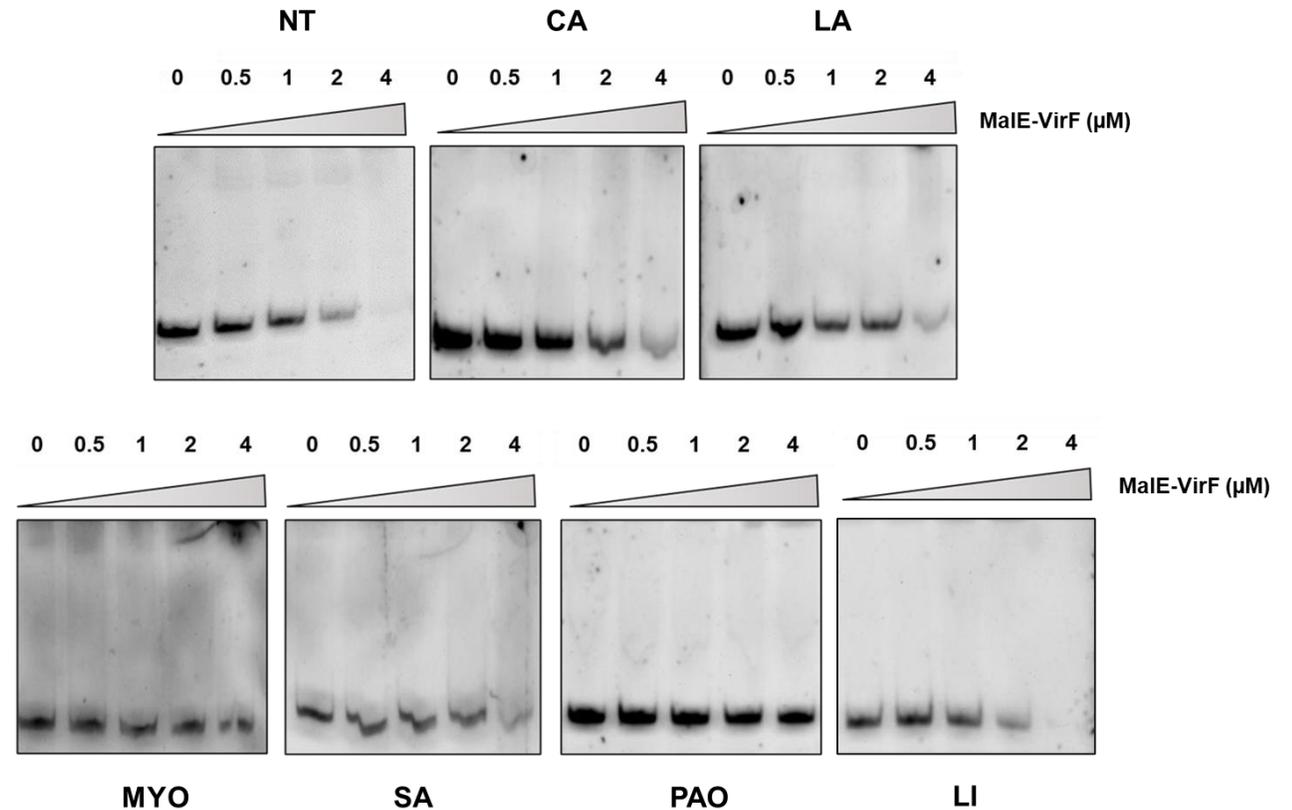
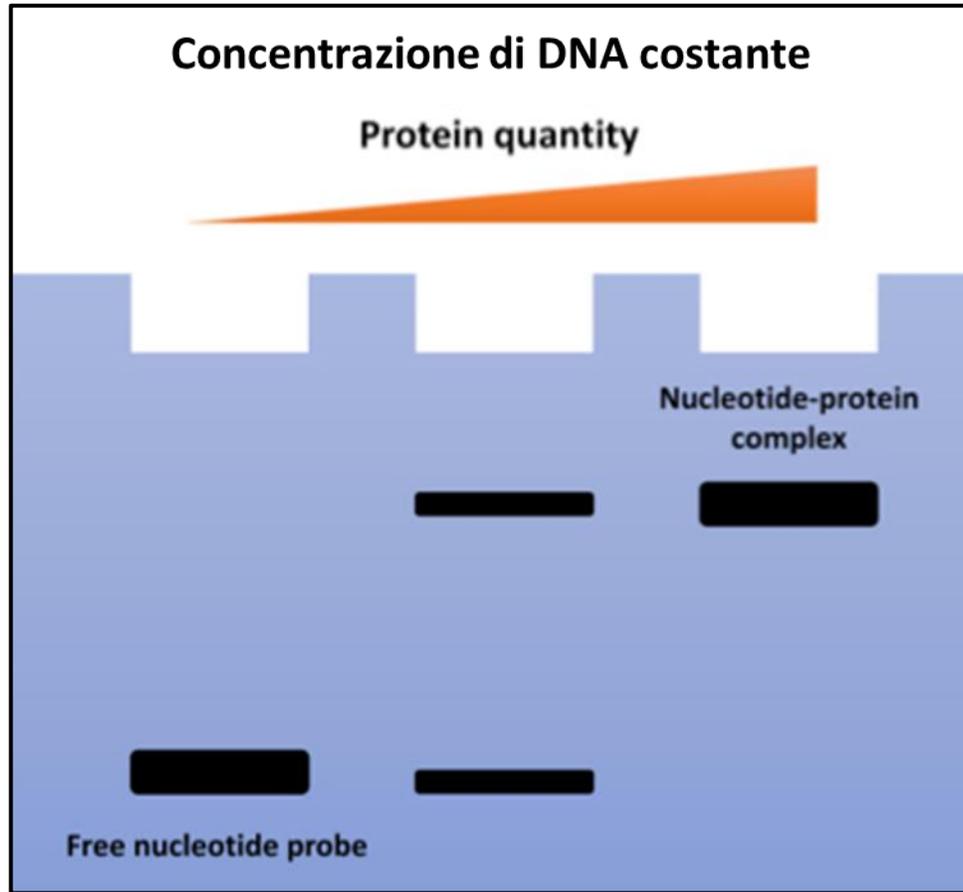


194bp PCR fragment covering the *virB* promoter



Ipotesi: Gli Acidi grassi si legano alla proteina VirF e influenzano la sua interazione con il promotore virB

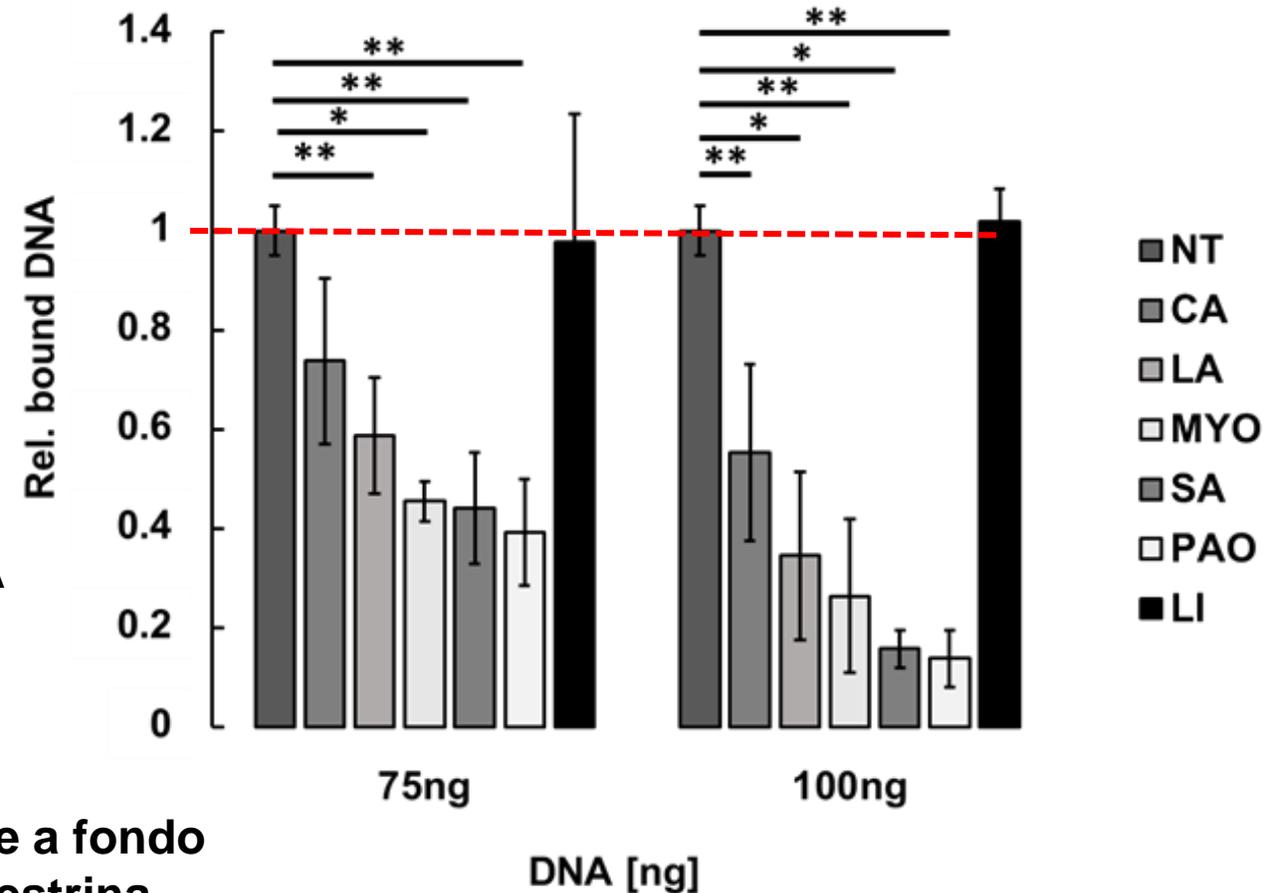
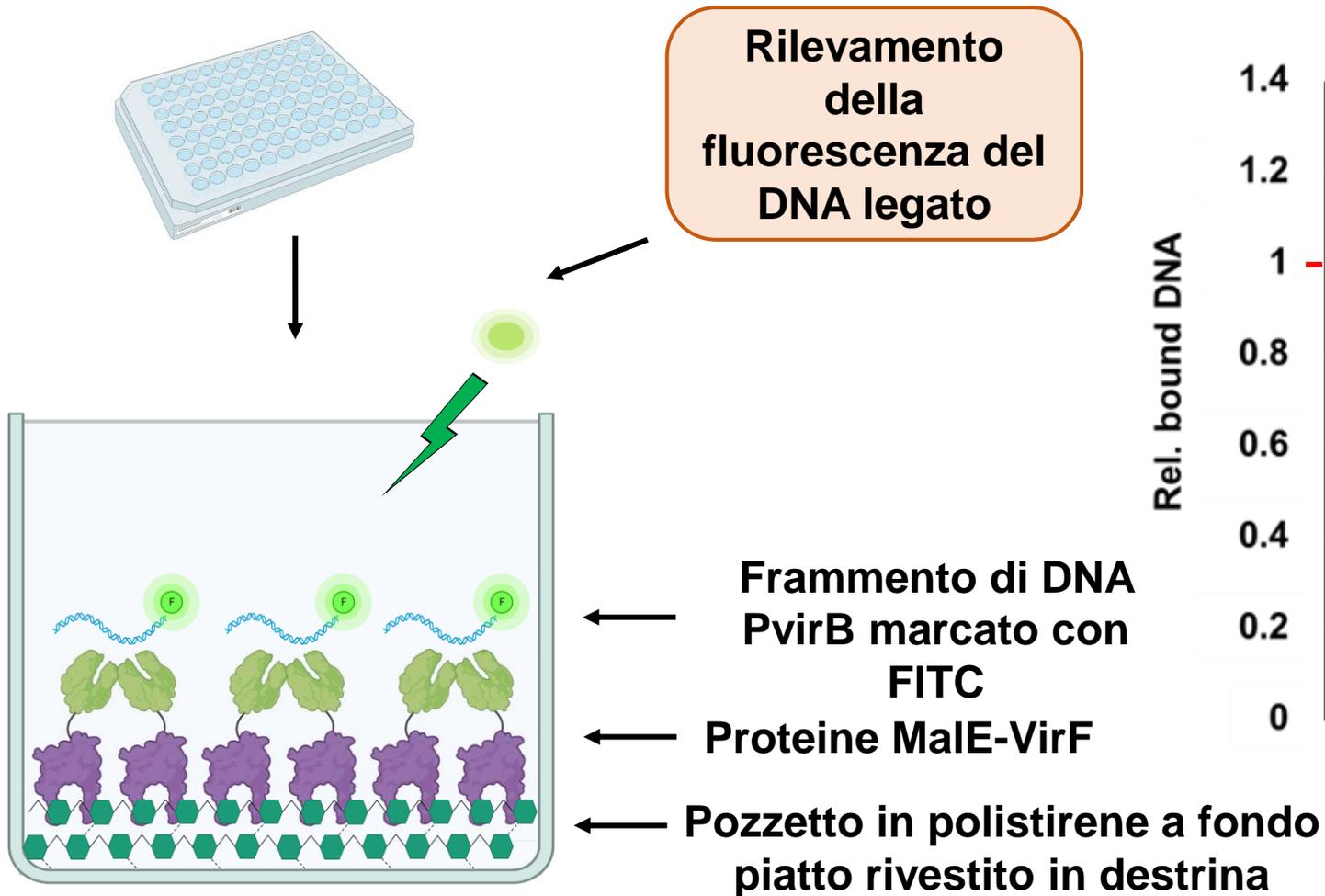
- Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)



La presenza degli acidi grassi aumenta la quantità di **DNA non legato** rispetto ai campioni non trattati

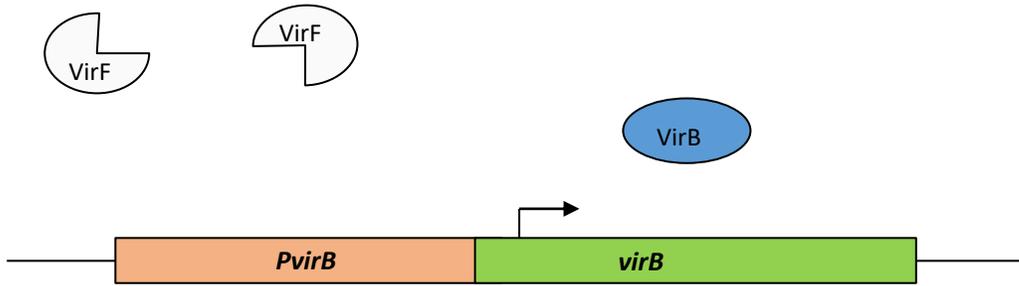
Ipotesi: Gli Acidi grassi si legano alla proteina VirF e influenzano la sua interazione con il promotore virB

Un nuovo test: DNA-Protein Interaction Plate assay (DPIPA)



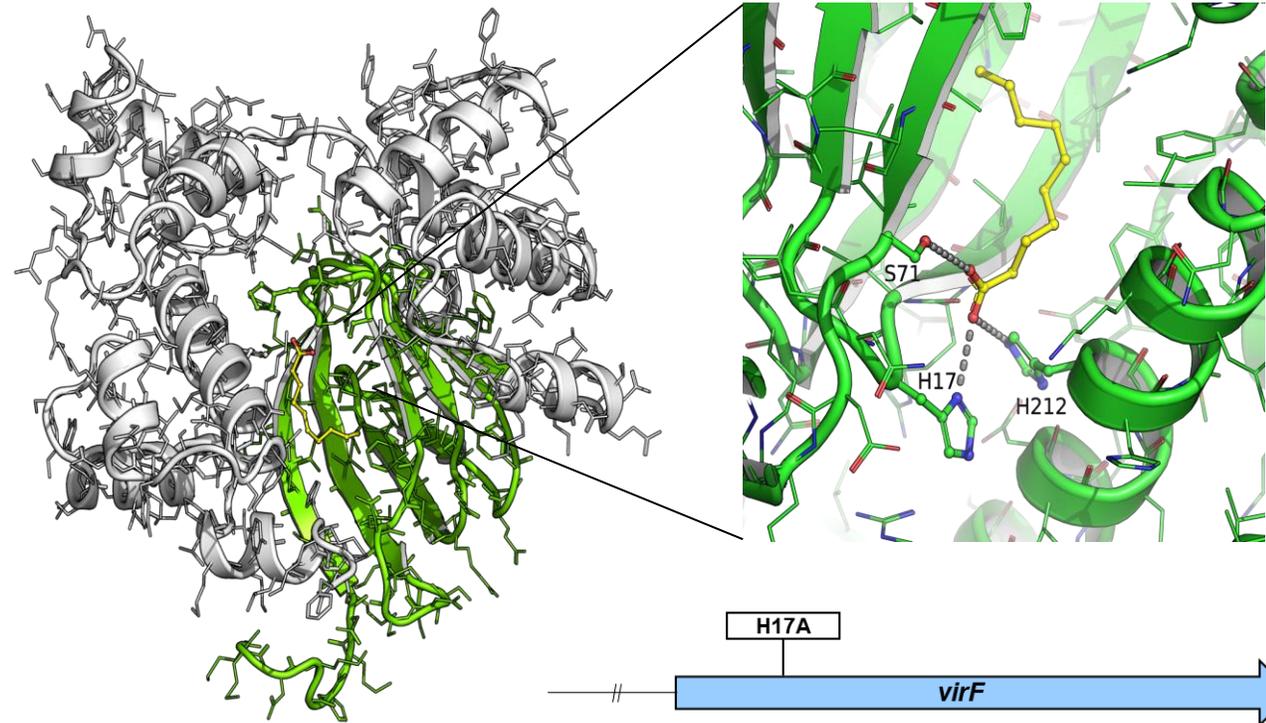
Ipotesi: Gli Acidi grassi si legano alla proteina VirF e influenzano la sua interazione con il promotore virB

Modello per la regolazione della trascrizione VirB

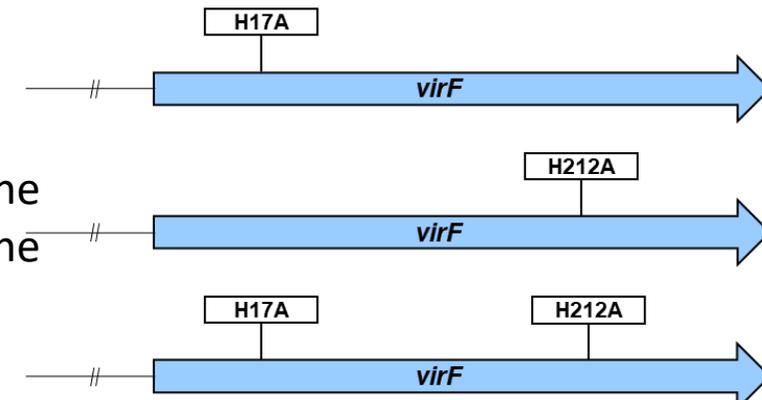


Modello per la regolazione della trascrizione di VirB da parte degli acidi grassi

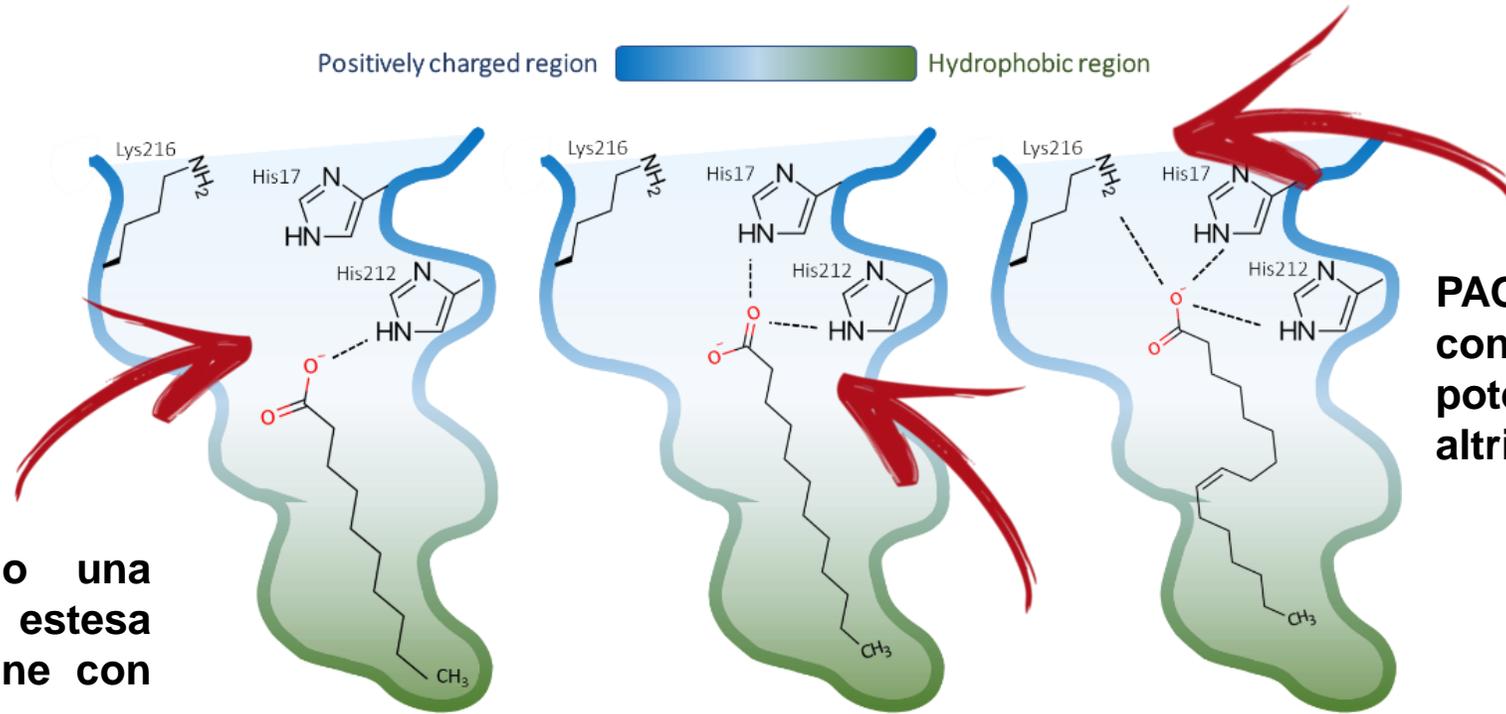
L'analisi bioinformatica suggerisce la presenza di residui amminoacidici su VirF responsabili del legame con gli acidi grassi



- Histidine 17 → Alanine
- Histidine 212 → Alanine



In che modo le FA interagiscono con la proteina VirF?

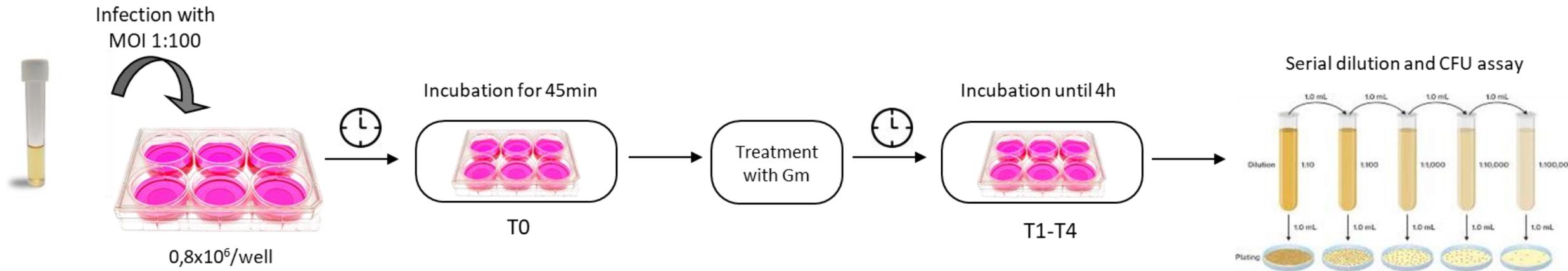


CA e MYO adottano una conformazione estesa prediligendo l'interazione con His212

PAO può adottare conformazioni alternative, potendo raggiungere anche altri residui polari (es. K216)

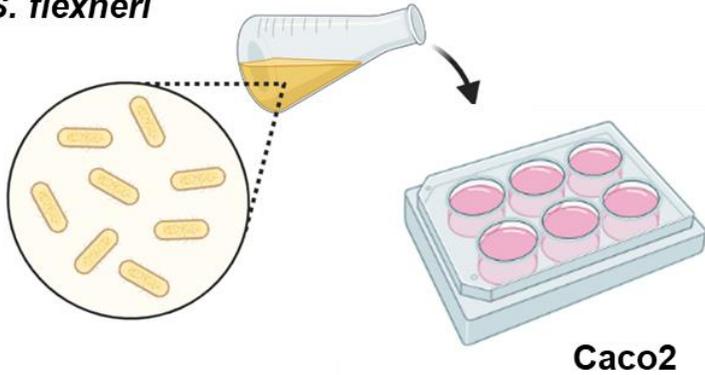
La presenza di entrambi i residui di His212 e His17 è essenziale per l'interazione con LA e SA

Gli acidi grassi riducono fortemente l'infettività di *S. flexneri* sulle cellule epiteliali

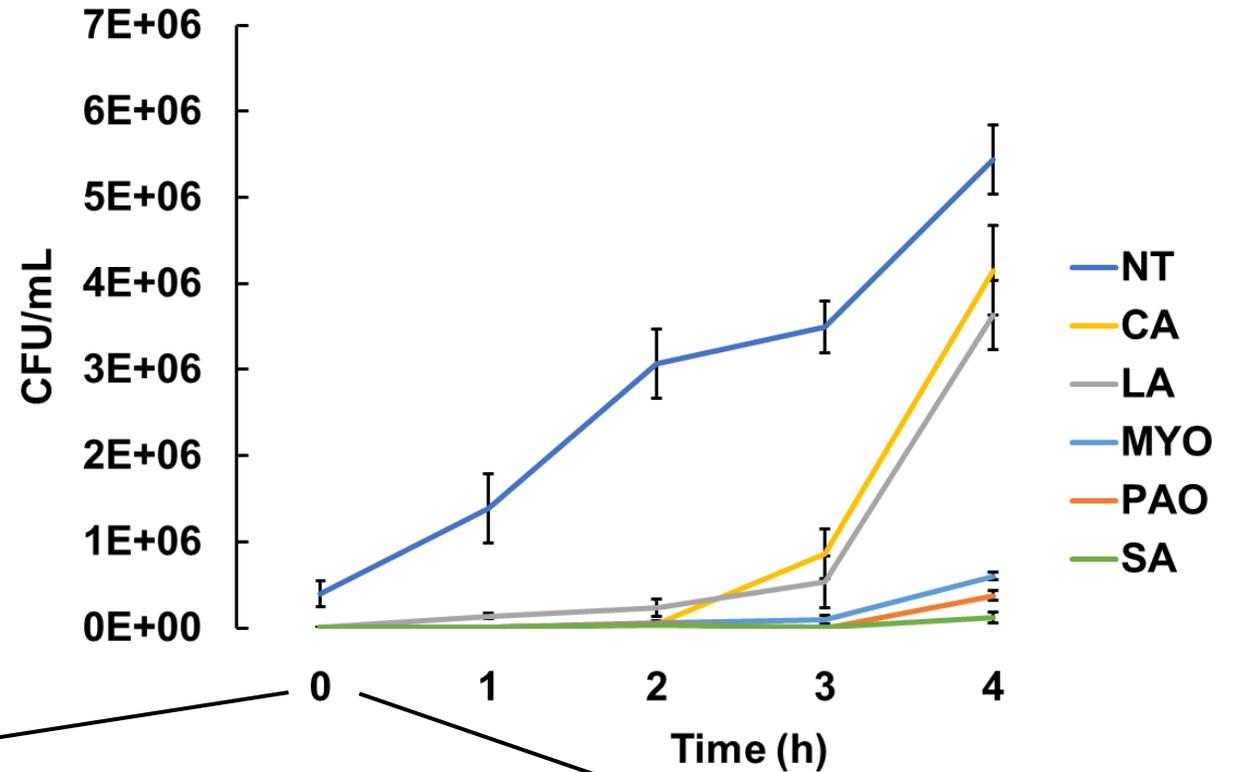


Gli acidi grassi riducono fortemente l'infettività di *S. flexneri* sulle cellule epiteliali

FAs-treated
S. flexneri

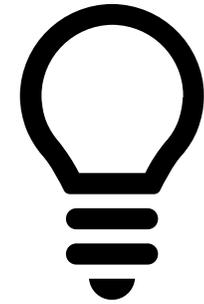


cellule epiteliali

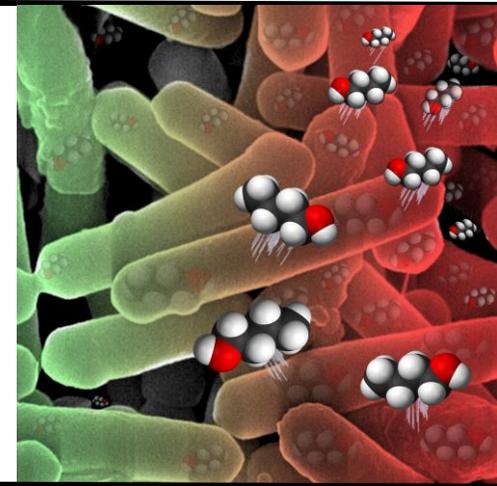


A seconda della diversa stabilità dell'interazione tra CA-LA e MYO-SA-PAO e proteina VirF

	NT	CA	LA	MYO	PAO	SA
Rel. Infection efficiency (%)	100	2.78	3.20	3.44	2.59	2.71
	± 4.044	± 0.011	± 0.073	± 0.010	± 0.028	± 0.034



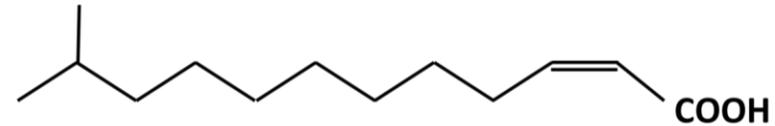
*Shigella sfrutta le molecole intestinali come
molecole di riconoscimento spazio-
temporale per regolare la sua virulenza*



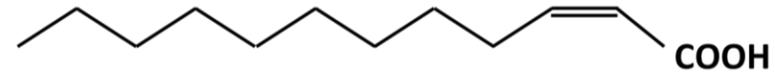
Diffusible Signal Factors (DSFs)

I DSFs sono membri di una rara classe di
Acidi grassi

Questi composti fungono da molecole segnale
nel sistema di rilevamento del quorum batterico
(QS)



XcDSF

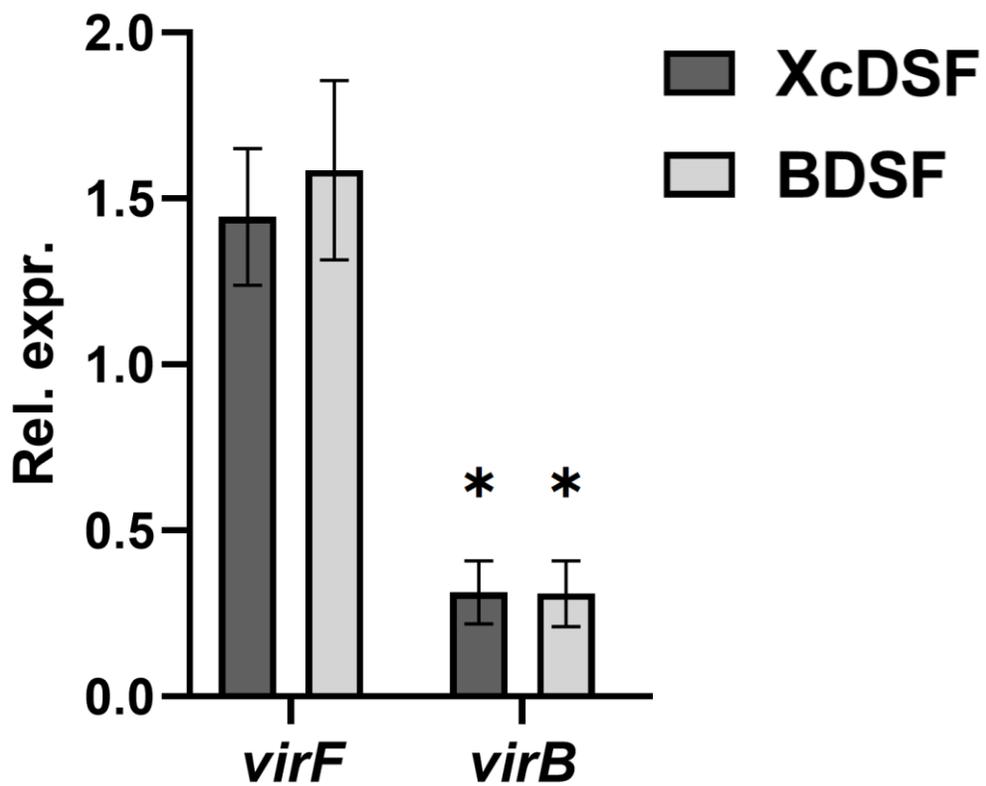


BDSF

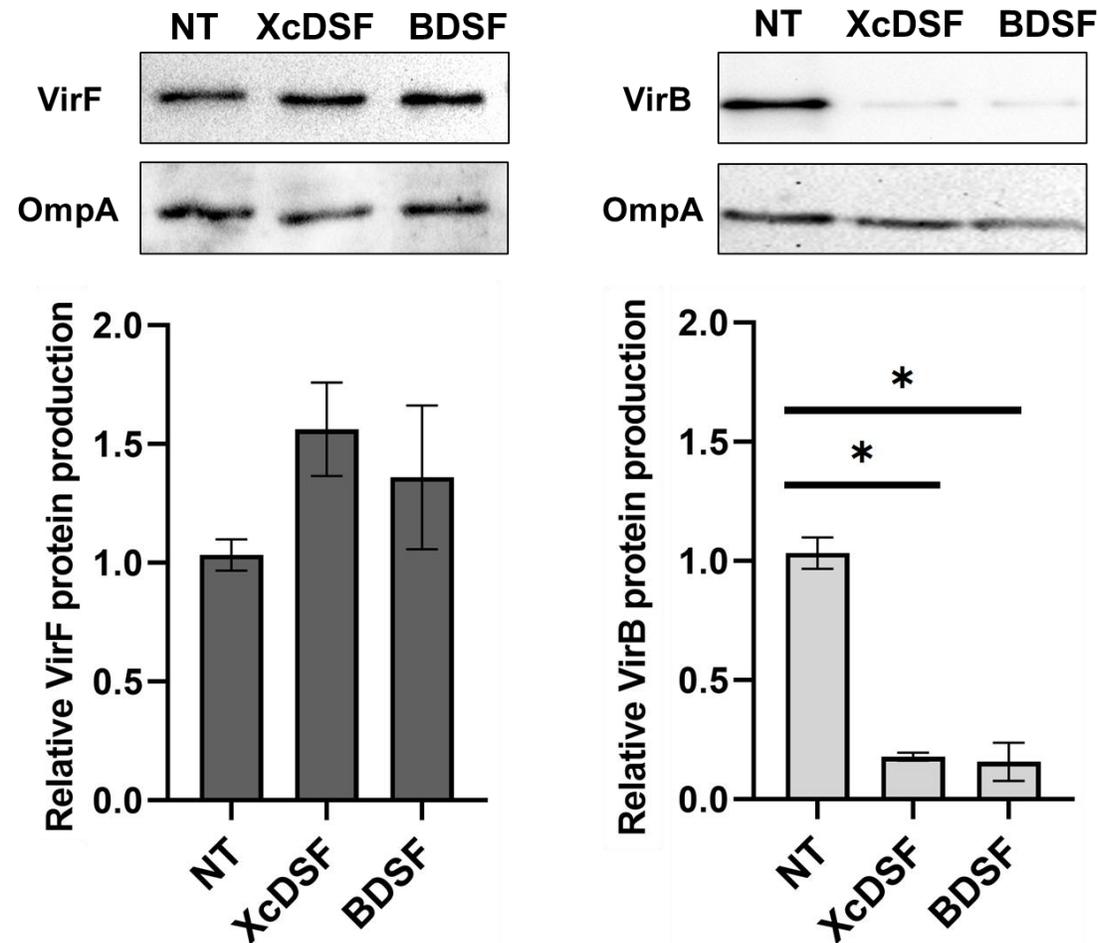
Queste due molecole DSF possono
ostacolare la virulenza della *Shigella*?

XcDSF e BDSF inibiscono l'attività di VirF reprimendo così la trascrizione del gene virB

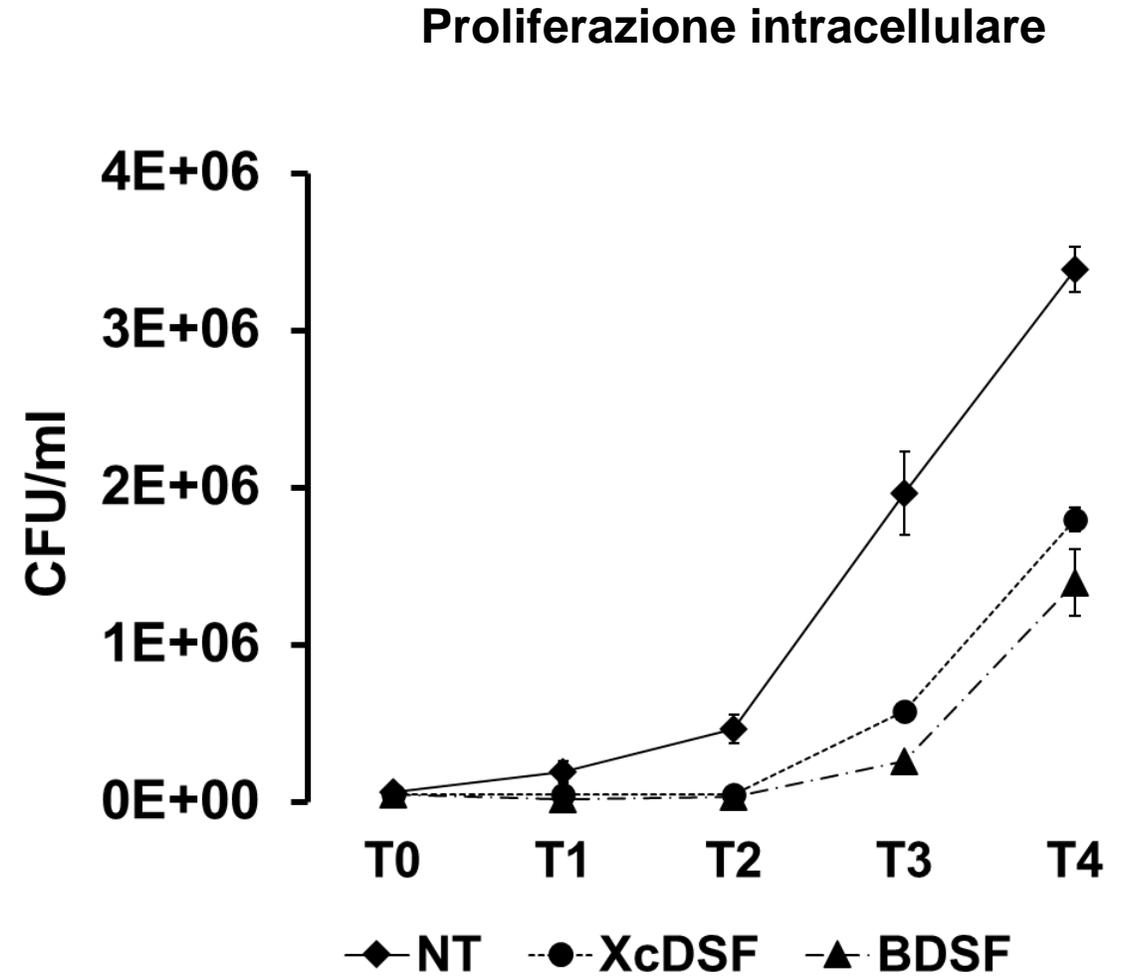
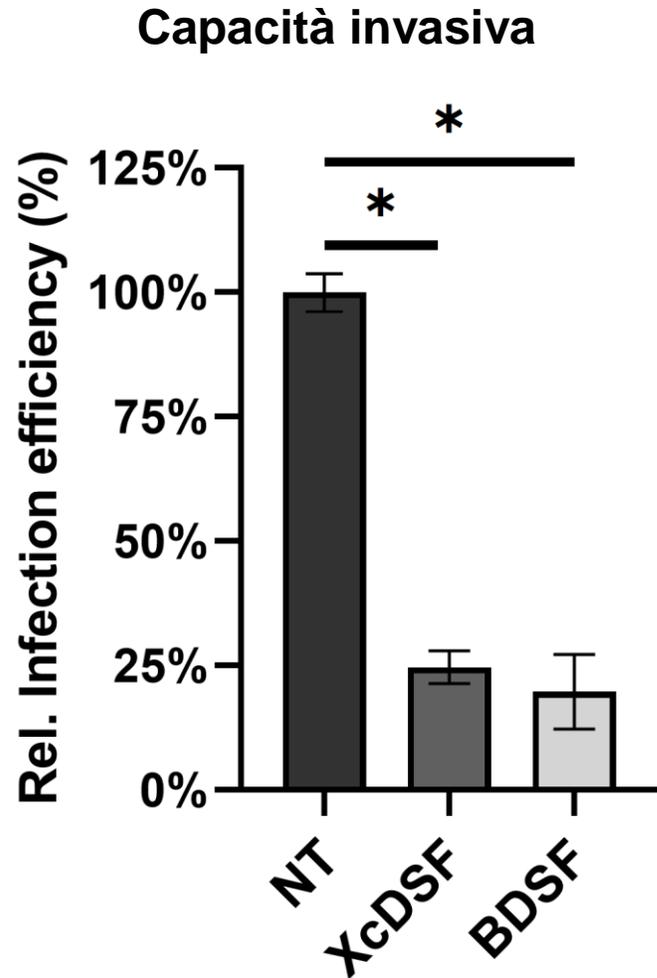
Livello trascrizionale



Livello traduzionale

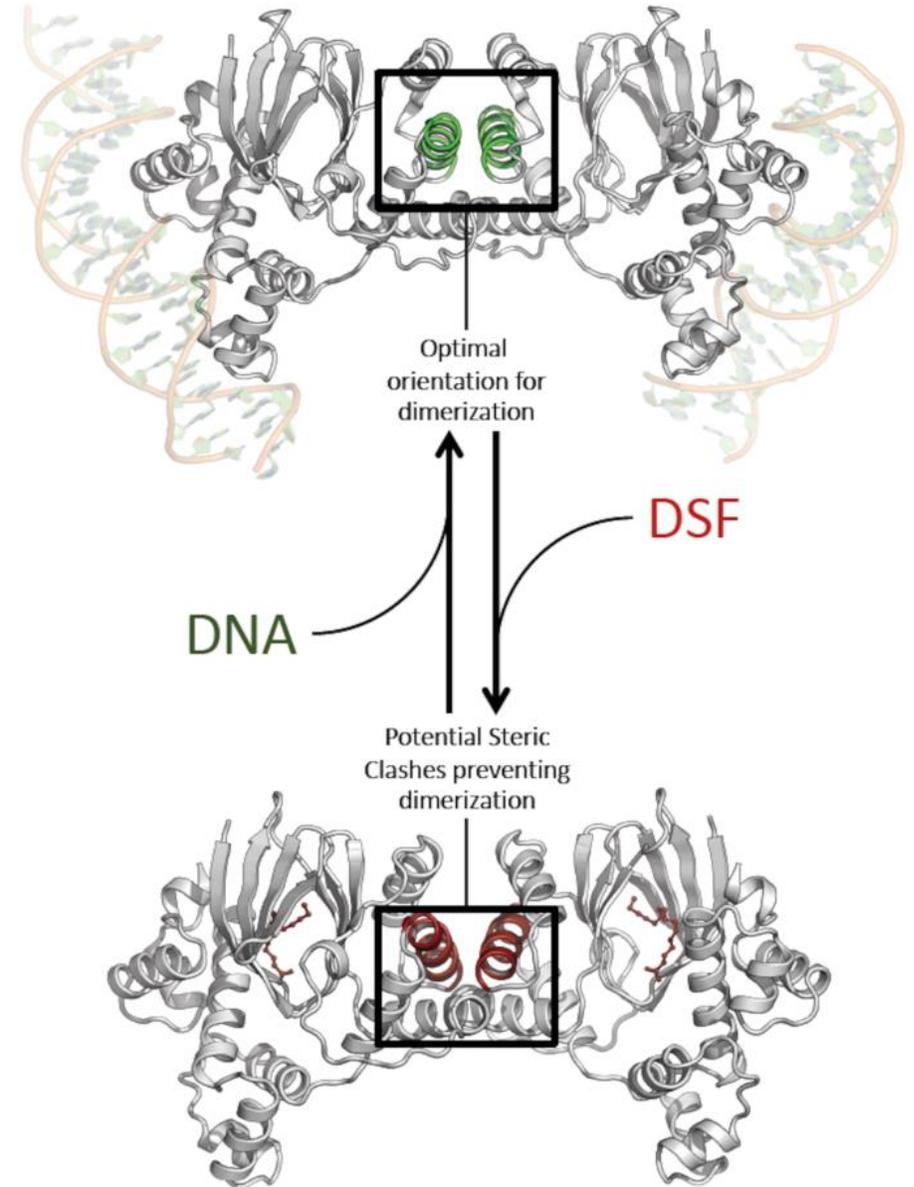
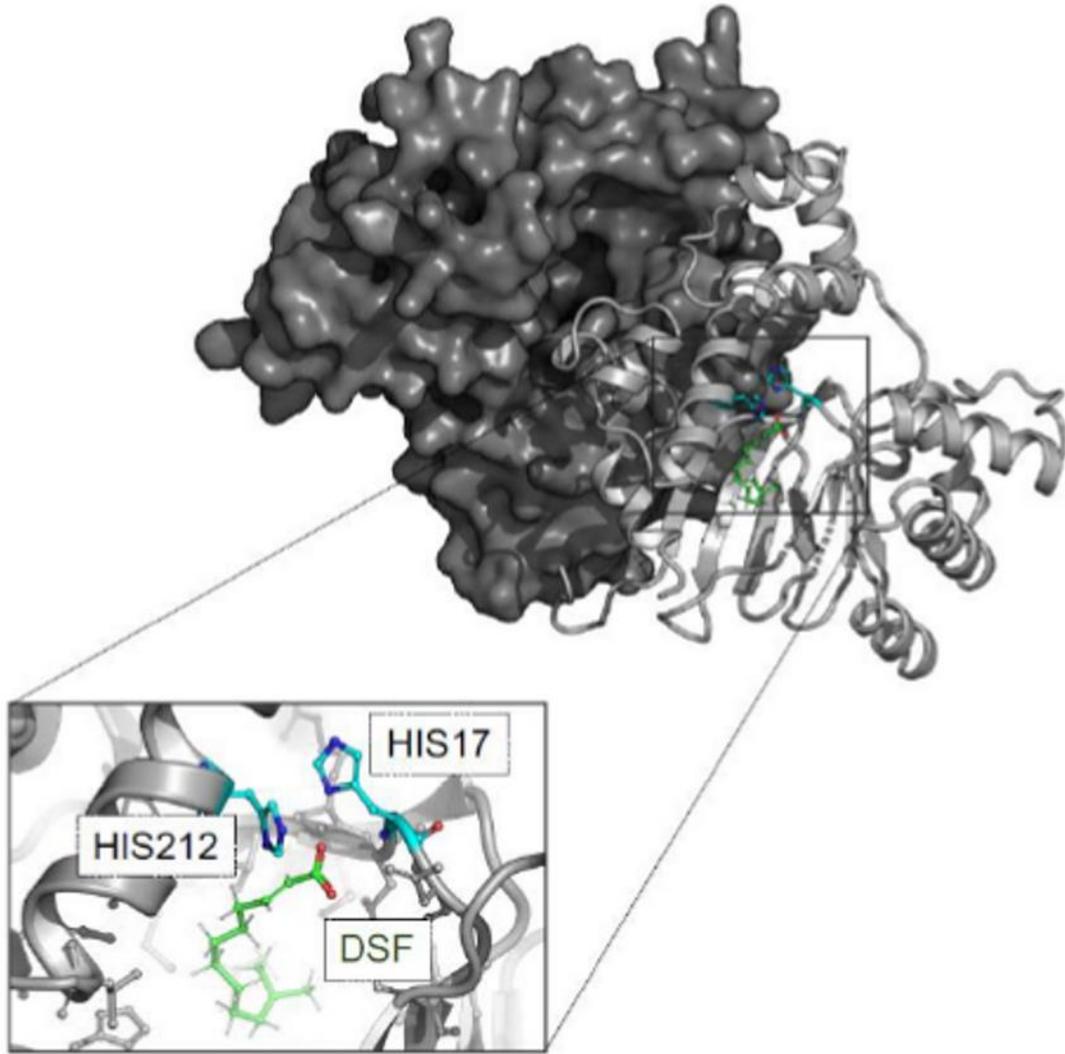


Il trattamento delle cellule di *S. flexneri* con XcDSF o BDSF ha ridotto la loro invasione e proliferazione all'interno delle cellule epiteliali

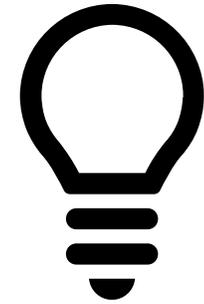


In che modo i DSFs interagiscono con la proteina VirF?

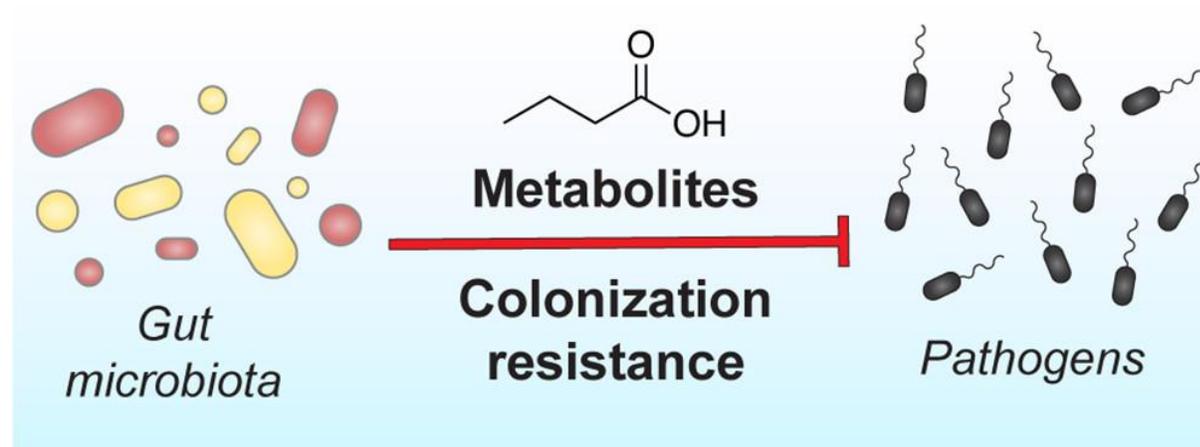
A



I residui di VirF H17 e H212 sono essenziali per l'azione repressiva di XcDSF e BDSF



Sulla base di questi risultati ipotizziamo che i DSF possano contribuire alla "resistenza alla colonizzazione"



Data l'assenza di un vaccino efficace contro la shigellosi e l'aumento delle resistenze ai farmaci nei ceppi isolati di *Shigella* negli ultimi anni...

... È importante definire il meccanismo attraverso il quale i composti intestinali influenzano l'espressione di virulenza di *Shigella*...

... potrebbe aprire la strada alla progettazione di nuovi composti in grado di agire come farmaci anti-virulenza...
