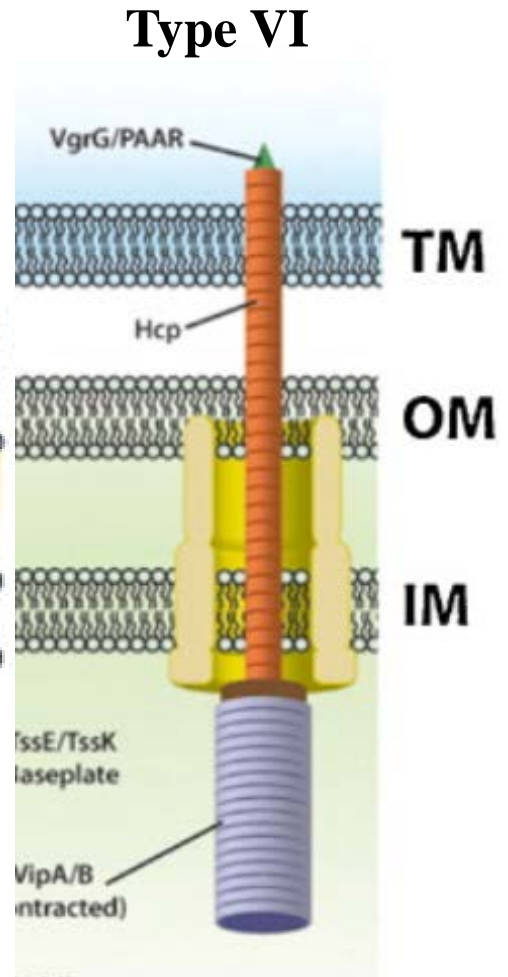
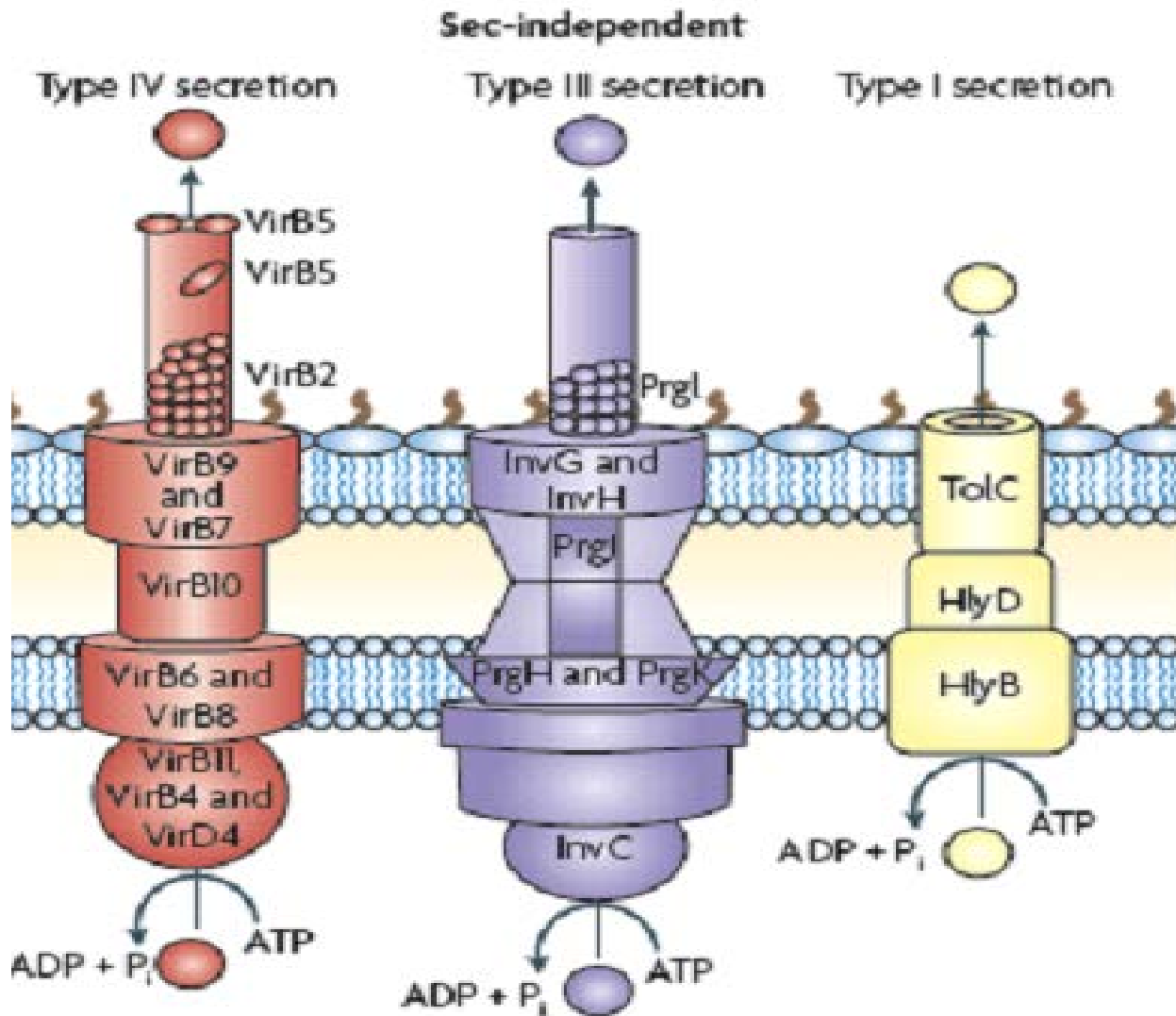


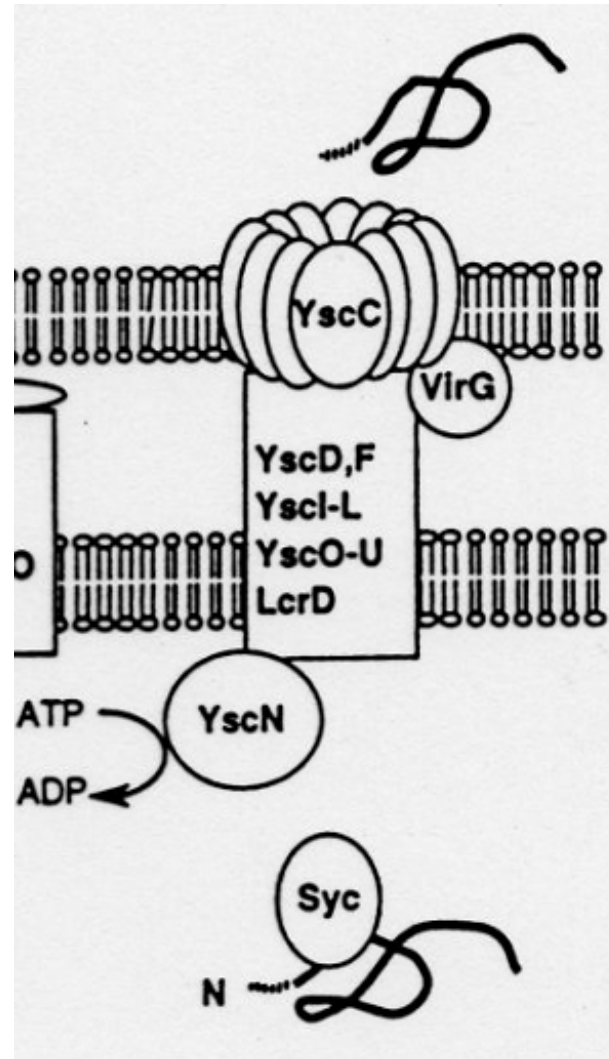
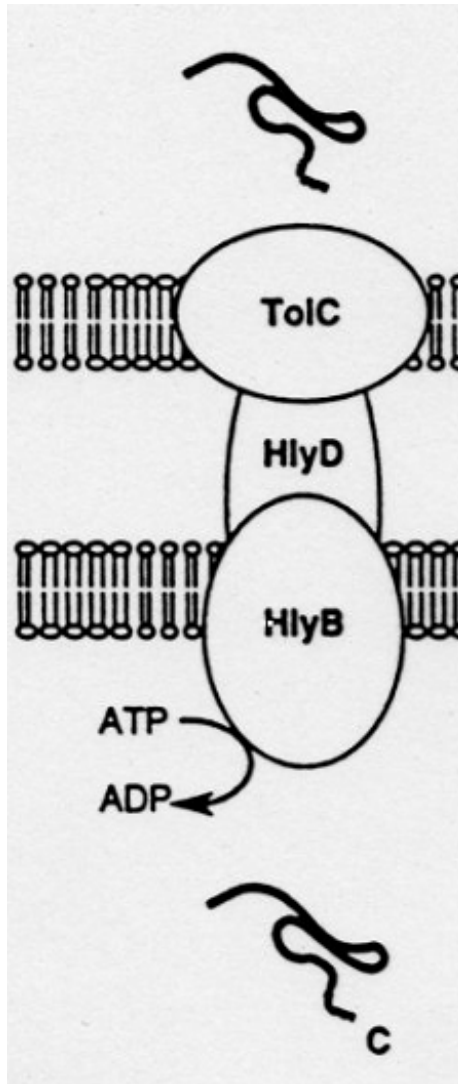
# I sistemi Sec Indipendenti



## Tipo I o via di secrezione ABC

- è ubiquitaria nei procarioti è presente nei batteri Gram+, Gram- ed Archea
- **Non coinvolge il sistema SEC**
- è coinvolta nella secrezione di tossine ( $\alpha$  emolisina), di proteasi e peptidi specifici
- Le proteine contengono segnali di secrezioni C-terminali
- nei Gram- compiono la traslocazione attraverso le 2 membrane in una sola fase
- nei Gram+ vi è una versione modificata del sistema di tipo I dei Gram- (70 sistemi in Bacillus)

## Sistema di Tipo I e Sistema di Tipo III: due sistemi Sec indipendenti.



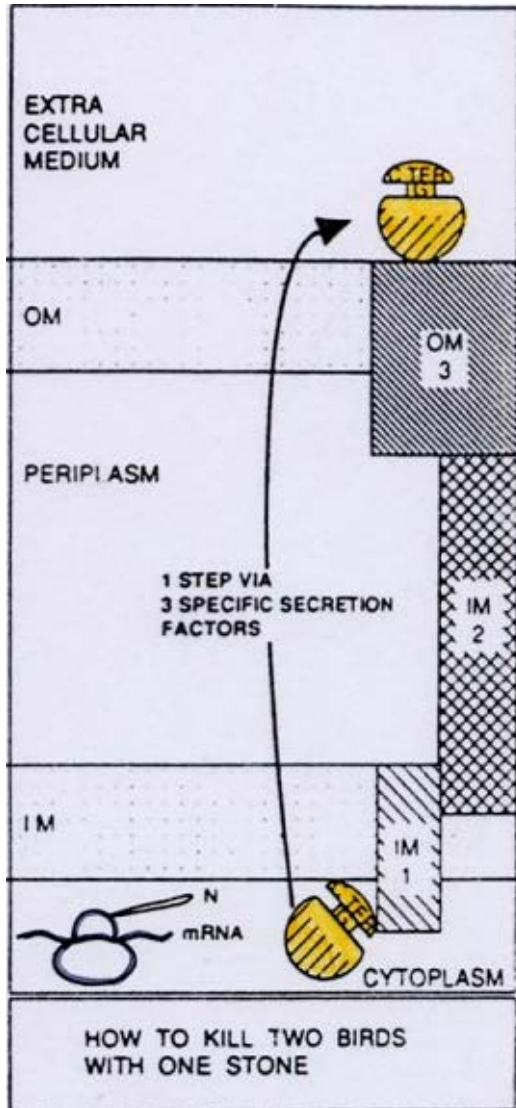
La proteina da esportare :

- non ha la classica sequenza segnale,

- non utilizza il sistema Sec

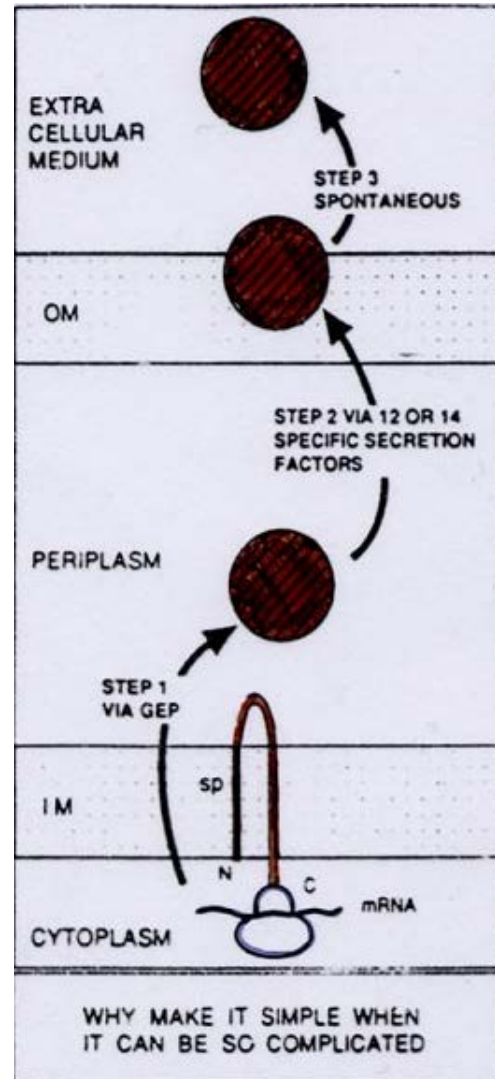
- non passa nello spazio periplasmatico

# Tipo I Sec Ind.

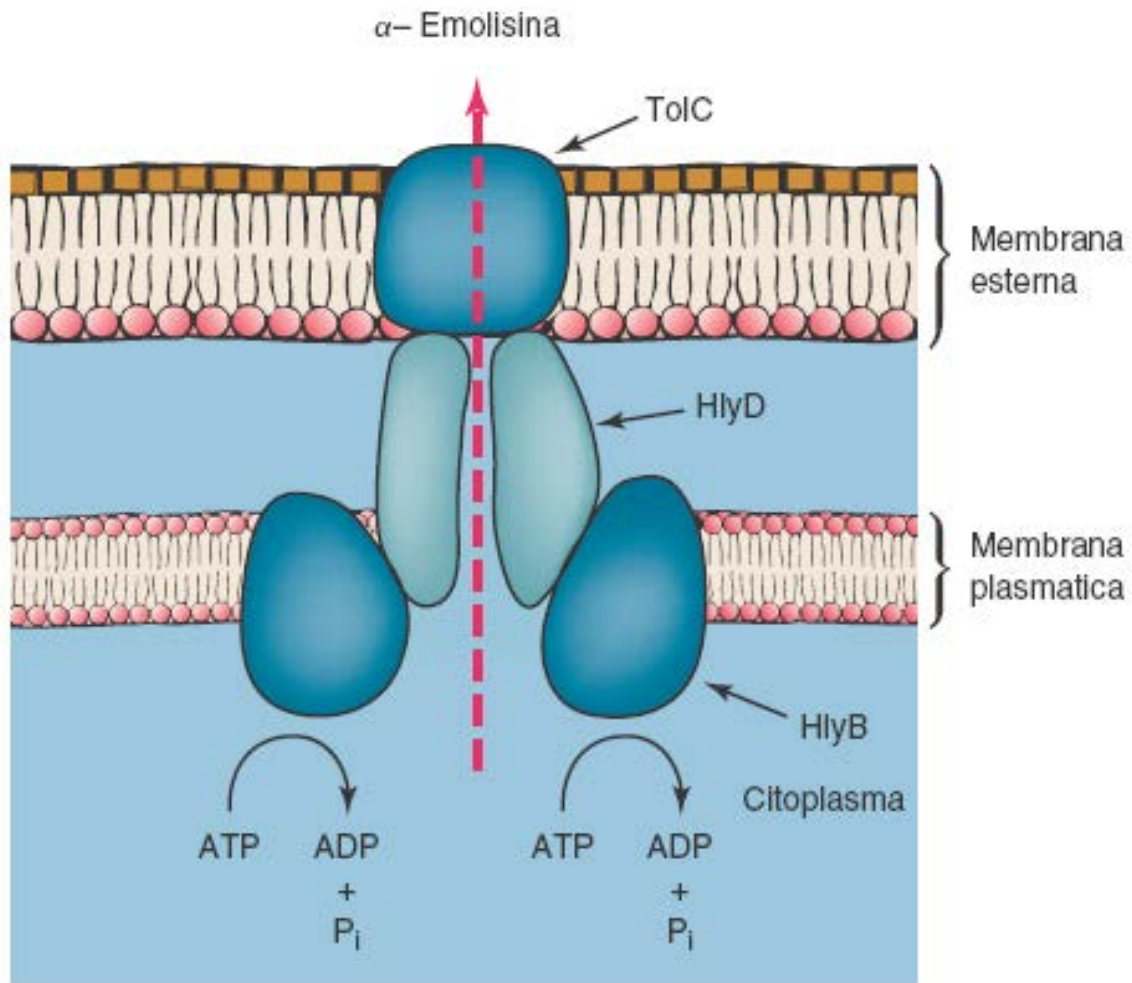


# Tipo II Sec Dip.

a confronto

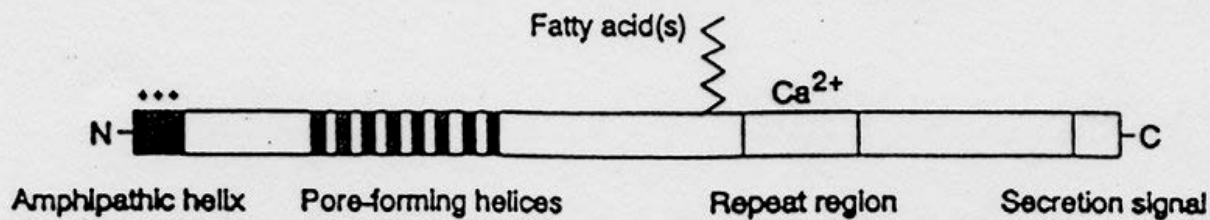
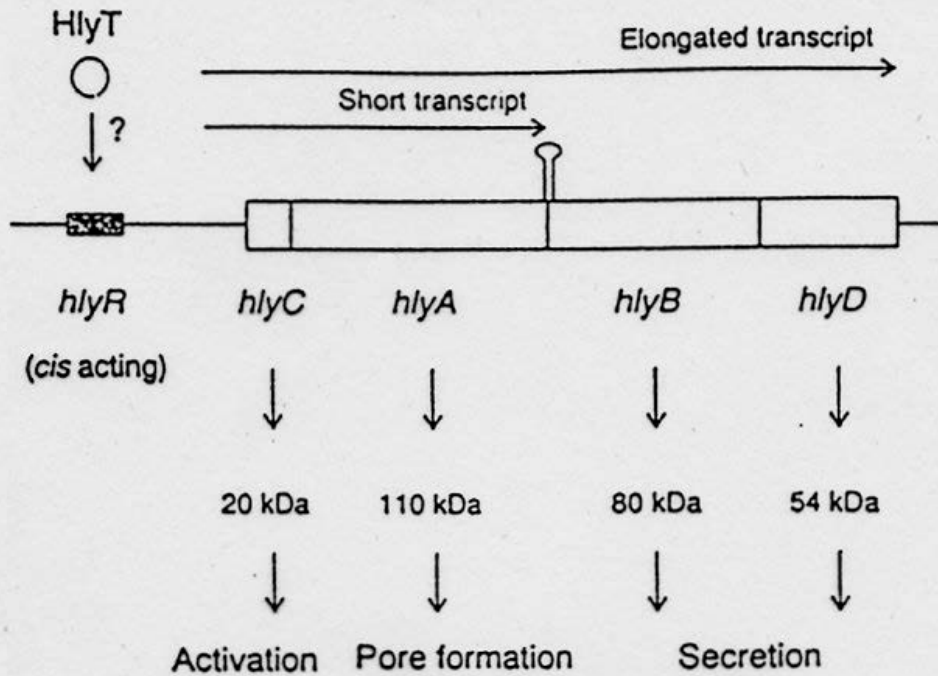


# Sistema di esportazione di Tipo I

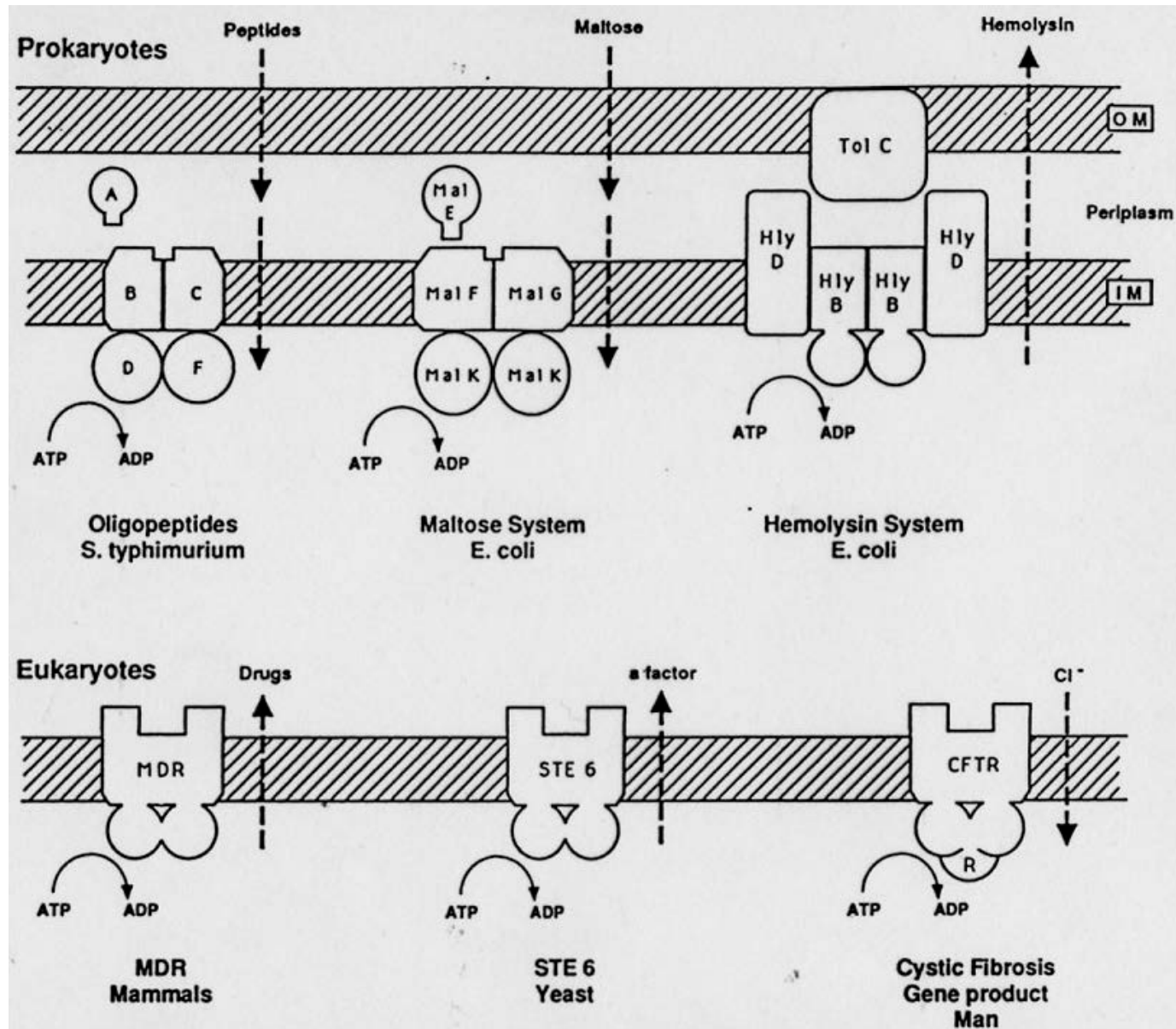


(b)

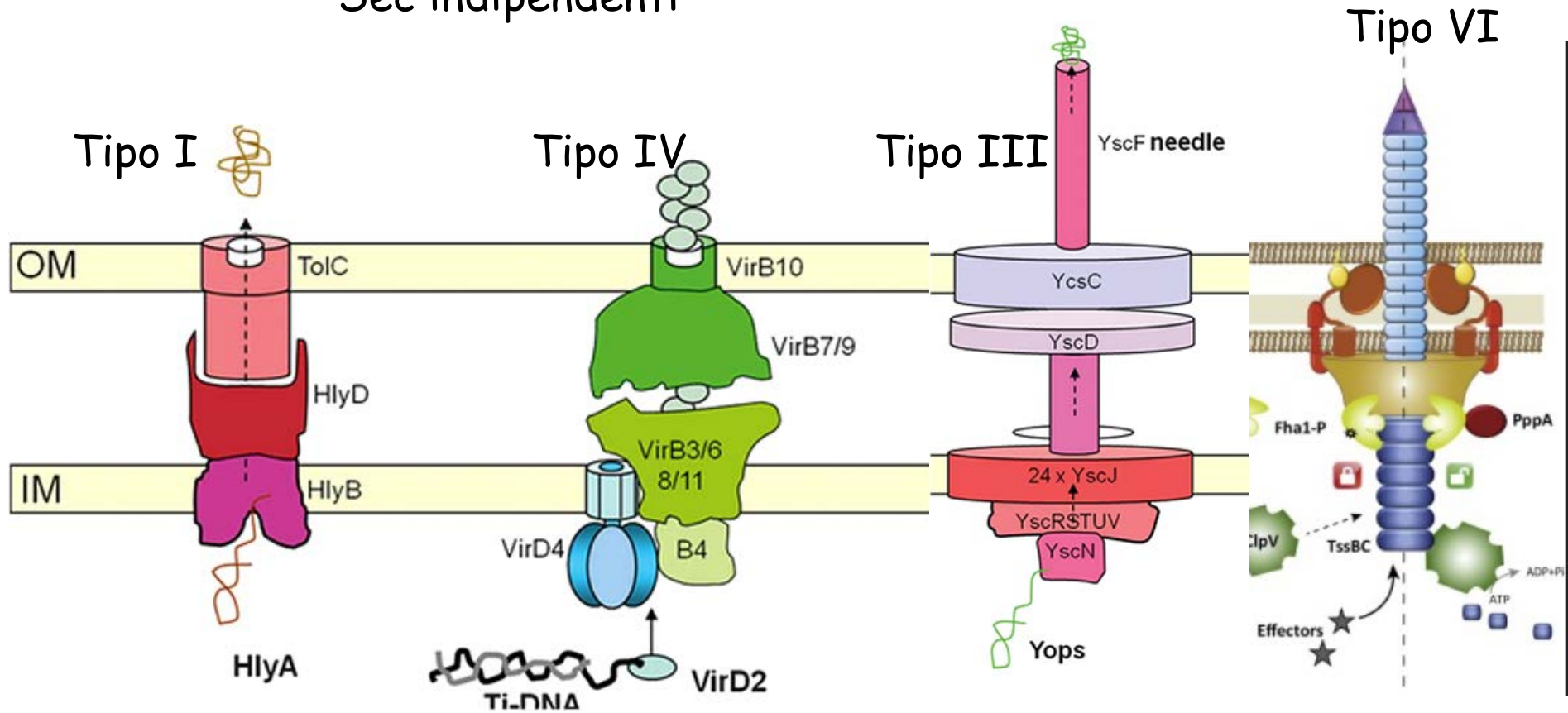
# Tipo I: il sistema emolisina



# Presenza di ABC protein in ogni sistema



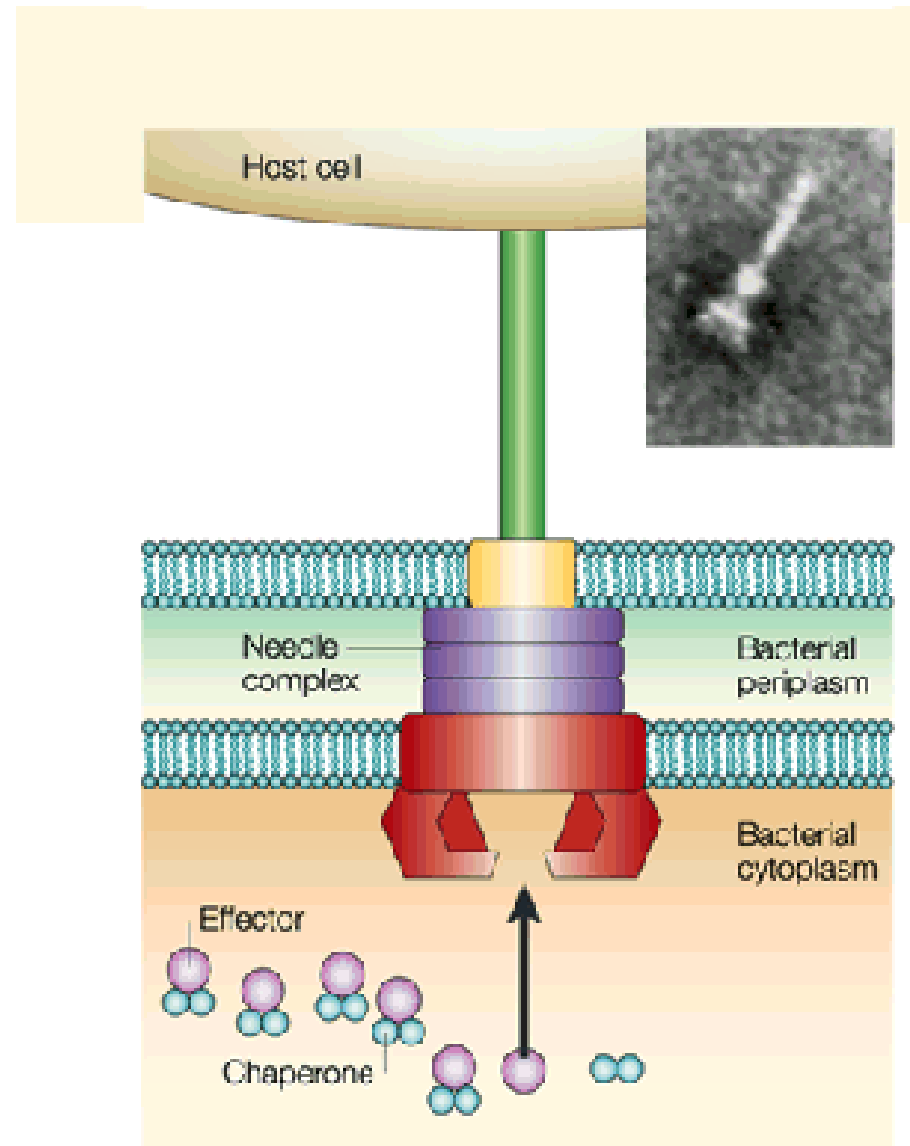
# Secrezione delle proteine in una singola tappa Sec indipendenti



Protein secretion by the 1-step mechanism. The hemolysin system, a Type 1 secretion system, consists of the ABC transporter HlyB, the adaptor protein HlyD, and the outer membrane component TolC (left). The Ti-plasmid is a Type 4 secretion system of *Agrobacterium tumefaciens* (middle). Type 3 Secretion System adopted by many pathogenic bacteria and Type VI.



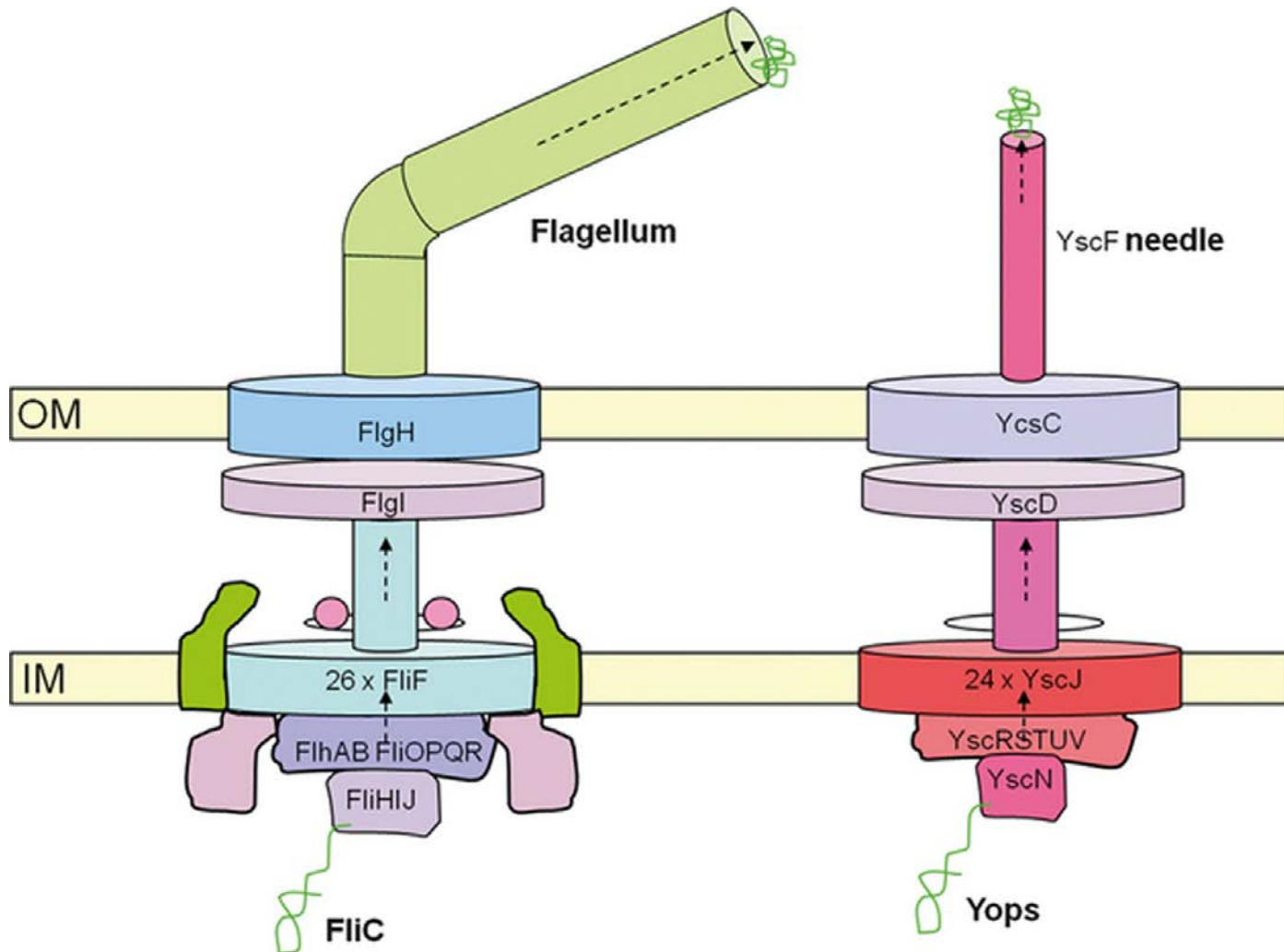
Organizzazione  
sistema di secrezione  
di Tipo III:  
un sistema in grado  
di iniettare proteine  
dal batterio  
direttamente nella  
cellula bersaglio



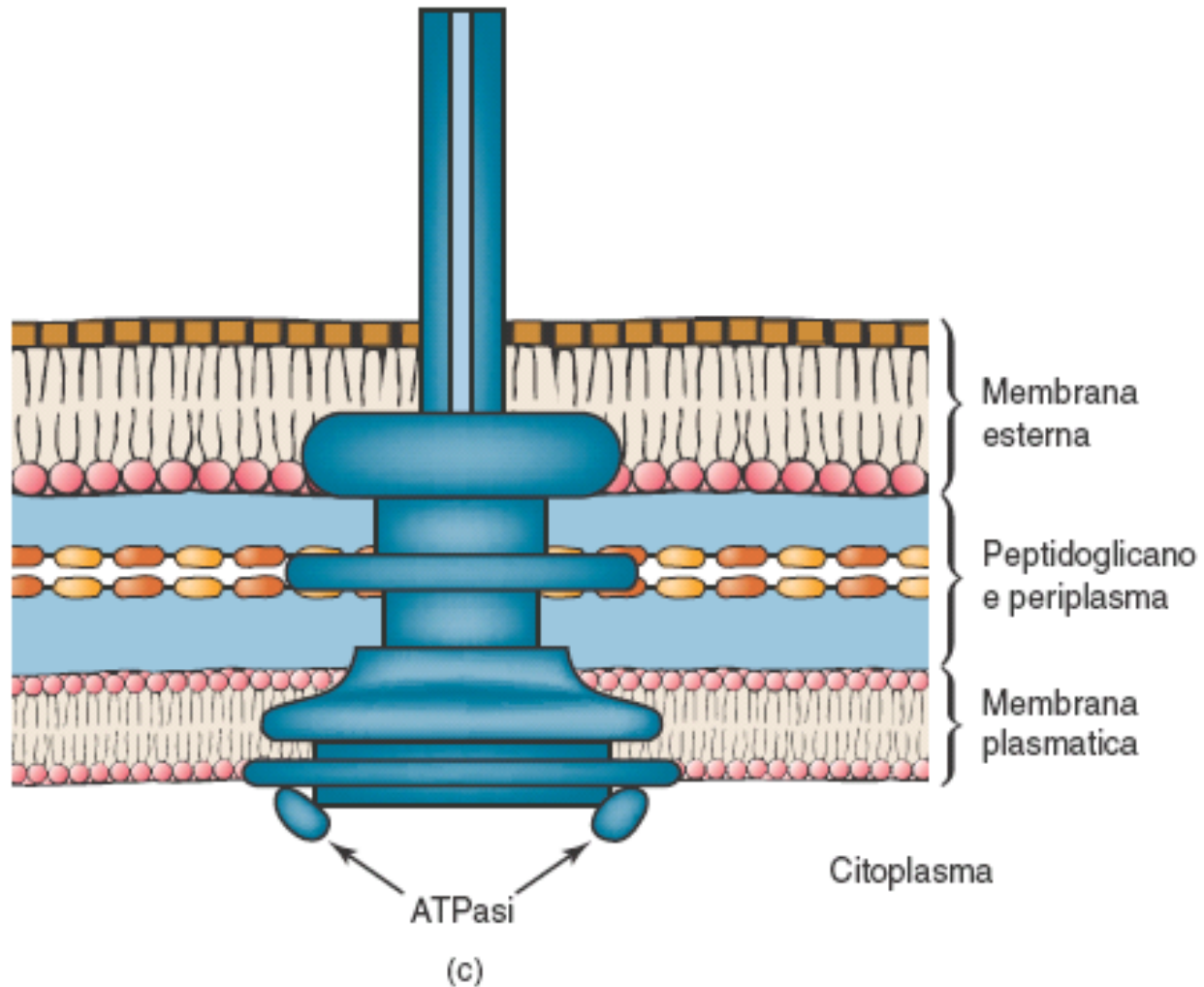
## Sistema di secrezione di Tipo III

- Non coinvolge il sistema Sec per attraversare I.M.
- Permette di inoculare fattori di virulenza direttamente in cellule animali o vegetali
- Dotati di una struttura complessa a siringa
- Hanno omologia strutturale con alcuni componenti del flagello
- Trasportano proteine che costituiscono l'apparato stesso e proteine di regolazione del processo di secrezione stesso
- Presenti in batteri patogeni quali Shigella, Salmonella, Yersinia

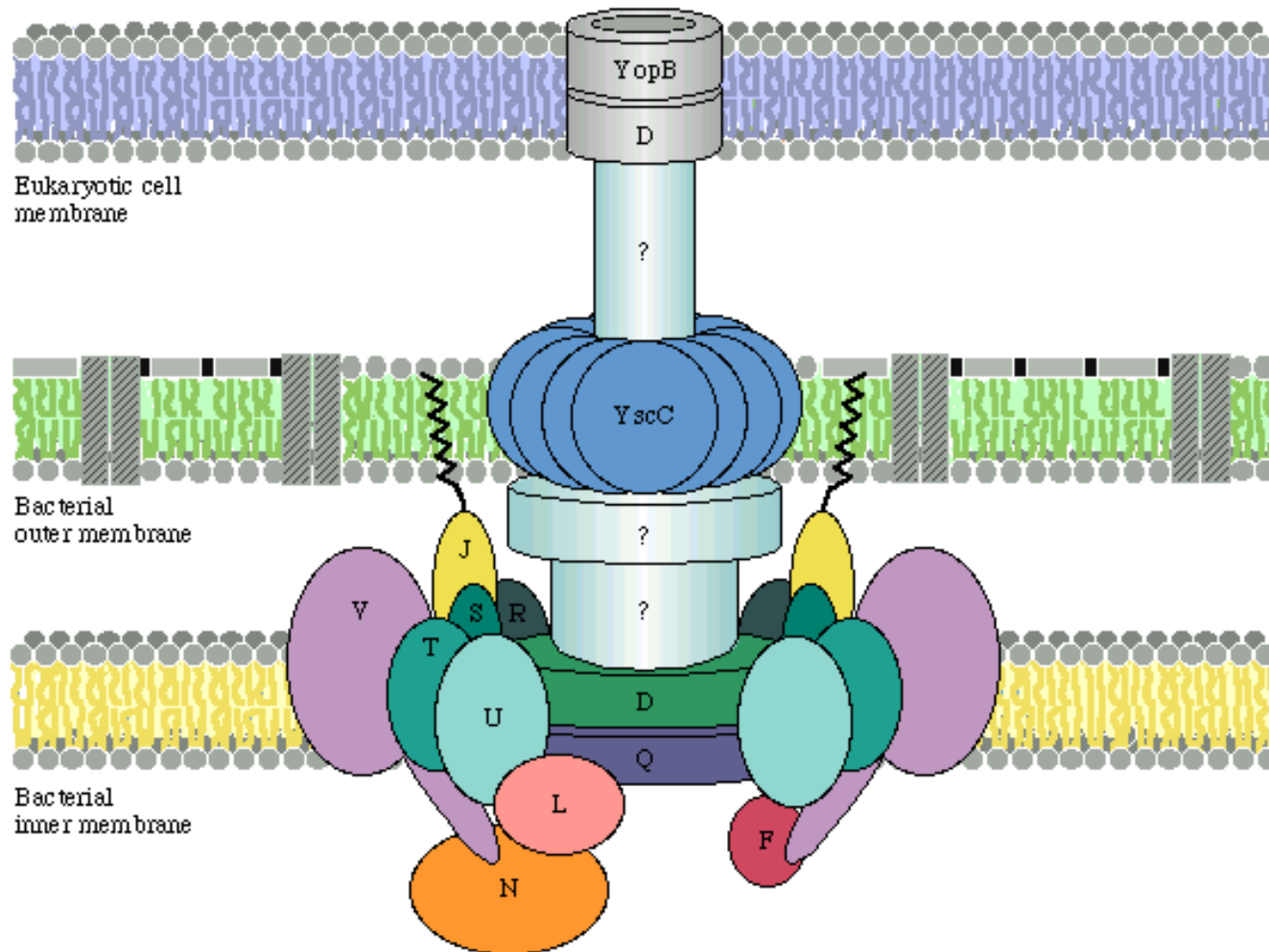
Da un punto di vista strutturale il sistema di secrezione di tipo III mostra delle omologie con il flagello

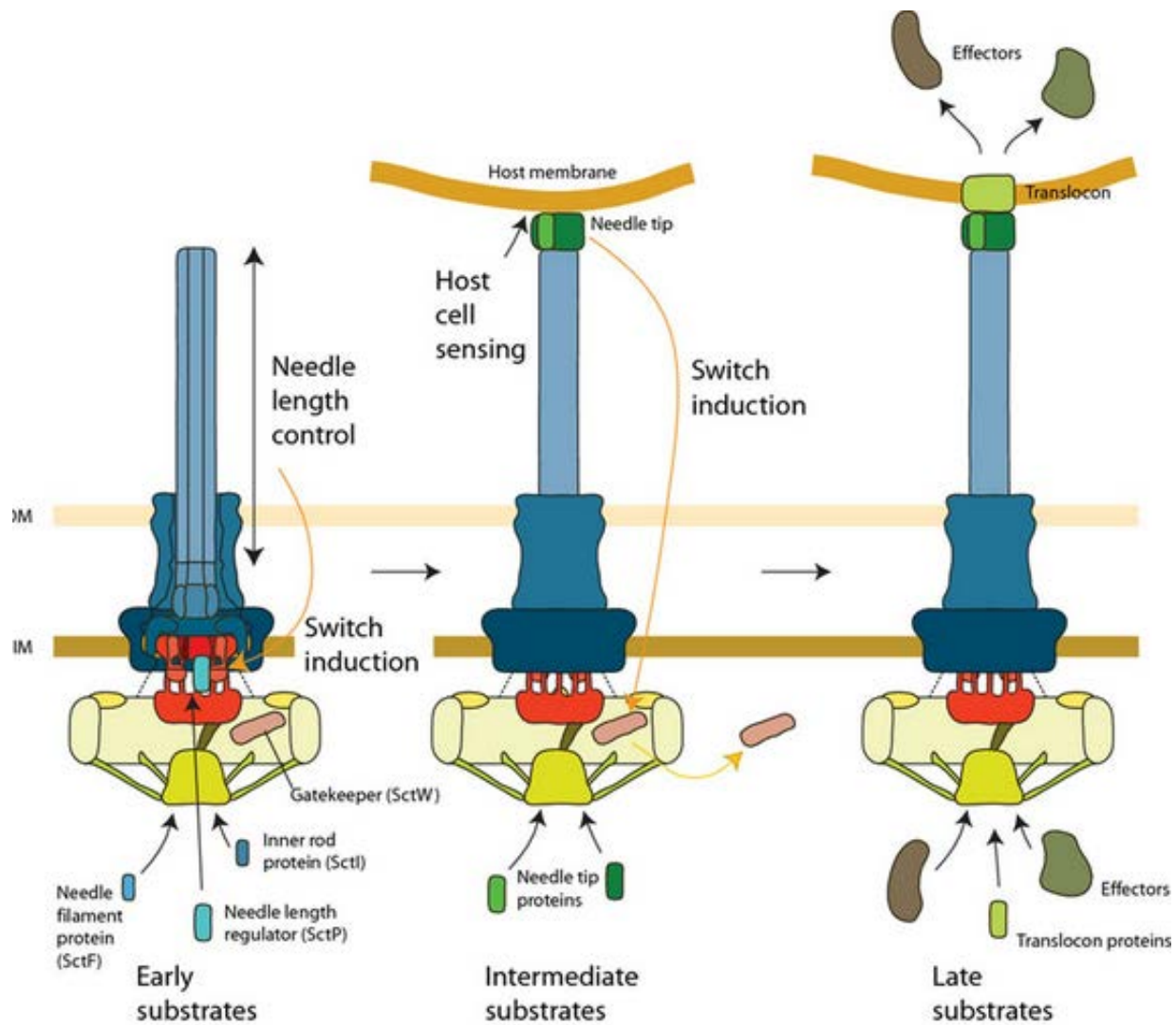


# Il sistema di esportazione di tipo III



# Il sistema di esportazione di Tipo III di *Yersinia* : elevata omologia con il TSS di *Shigella*



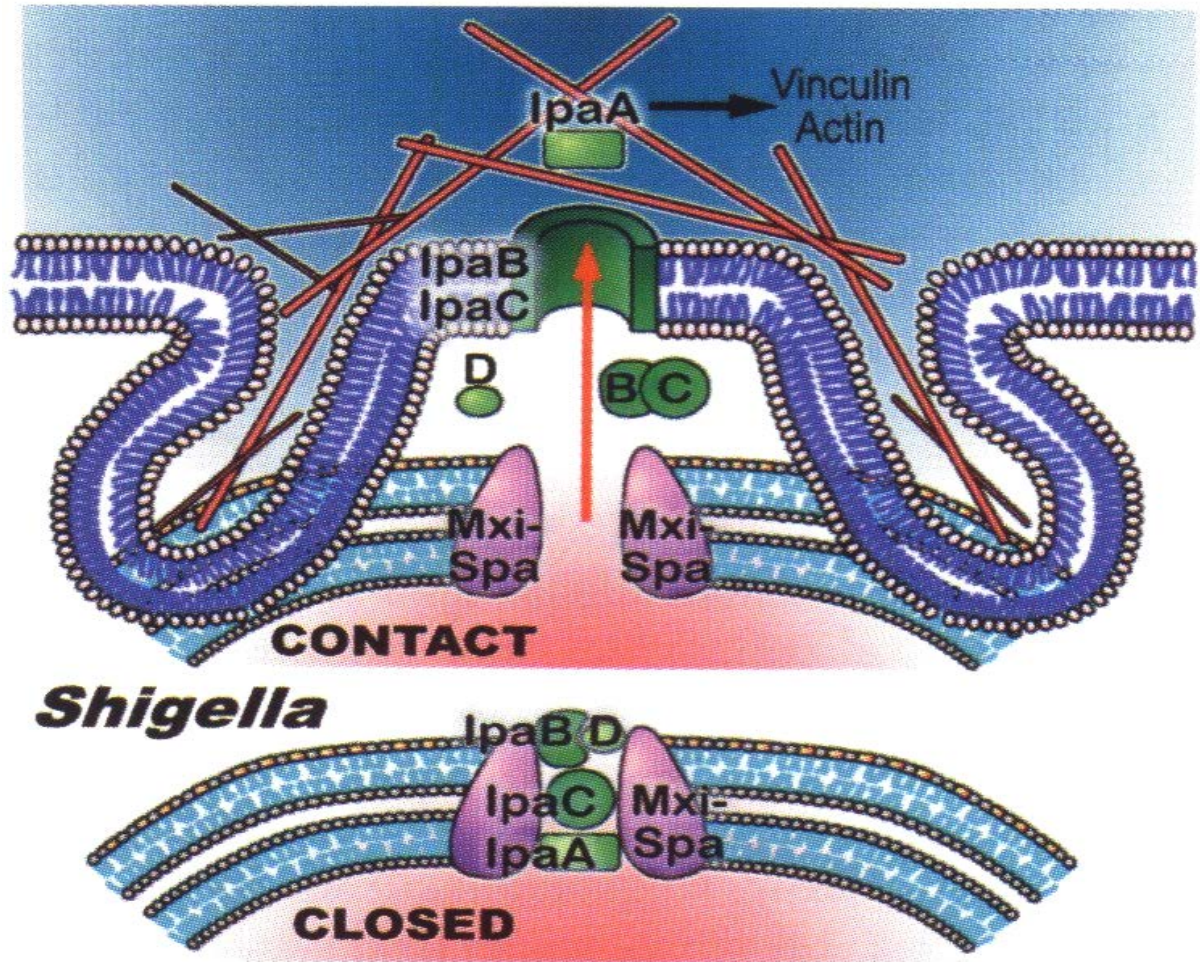


Sintesi del T3SS e formazione del poro con la membrana eucariotica per il rilascio degli effettori nel citoplasma della cellula ospite

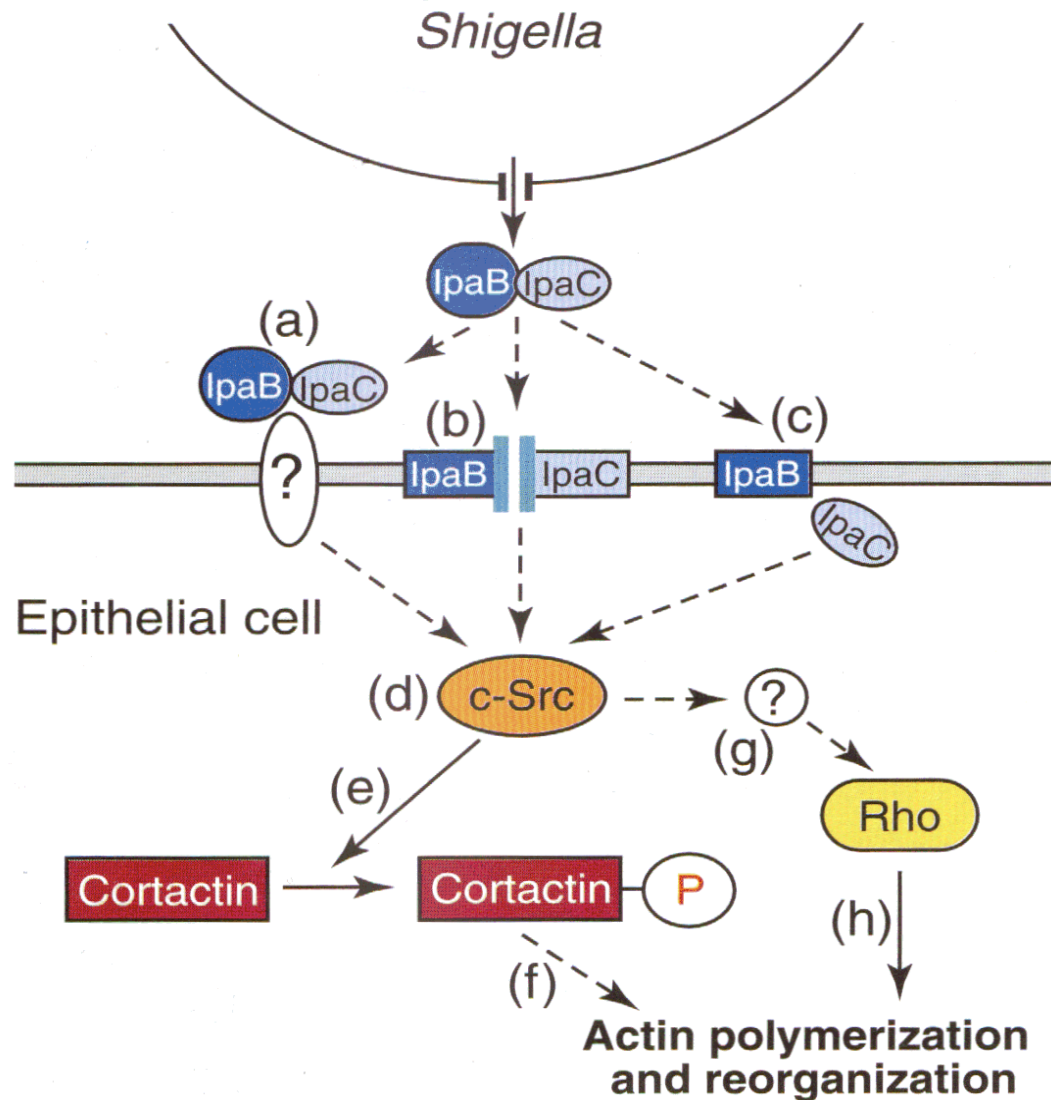
Il sistema di esportazione di tipo III viene attivato dal contatto della cellula batterica con la cellula bersaglio

Le proteine Mxi e Spa formano la struttura transmembranaria del sistema di esportazione

IpaB ed IpaC si inseriscono nella membrana della cellula bersaglio

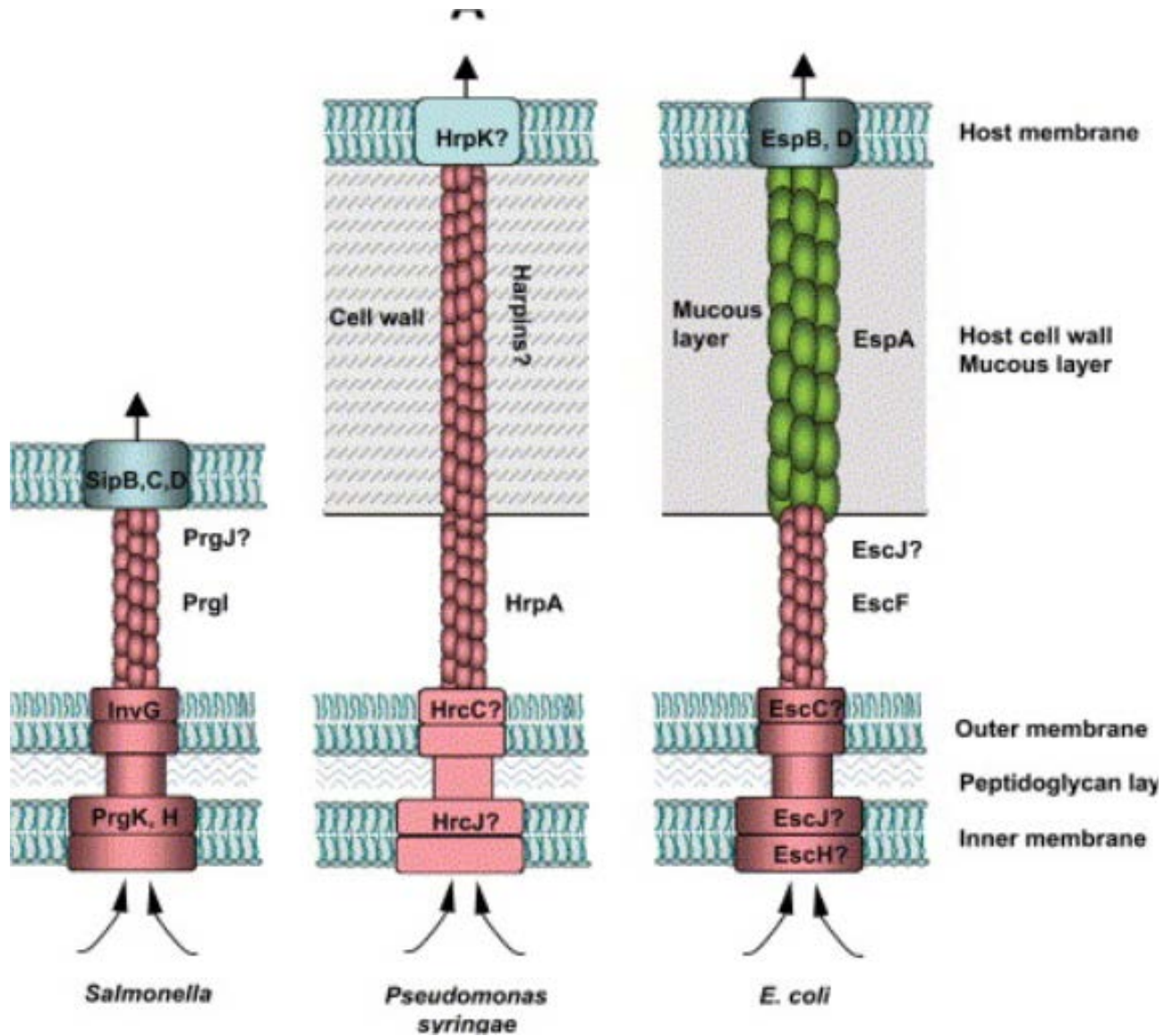


L'iniezione di IpaA nel citoplasma della cellula ospite altera profondamente il citoschelestro della cellula ospite



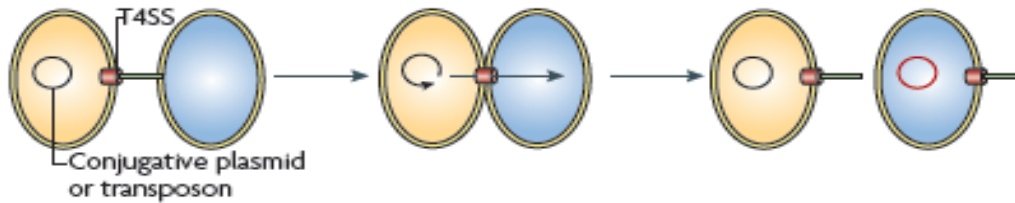


# Diffusione del sistema di tipo III in batteri patogeni per piante o animali



# Ruolo del sistema di esportazione di Tipo IV in vari processi cellulari

## a Conjugation



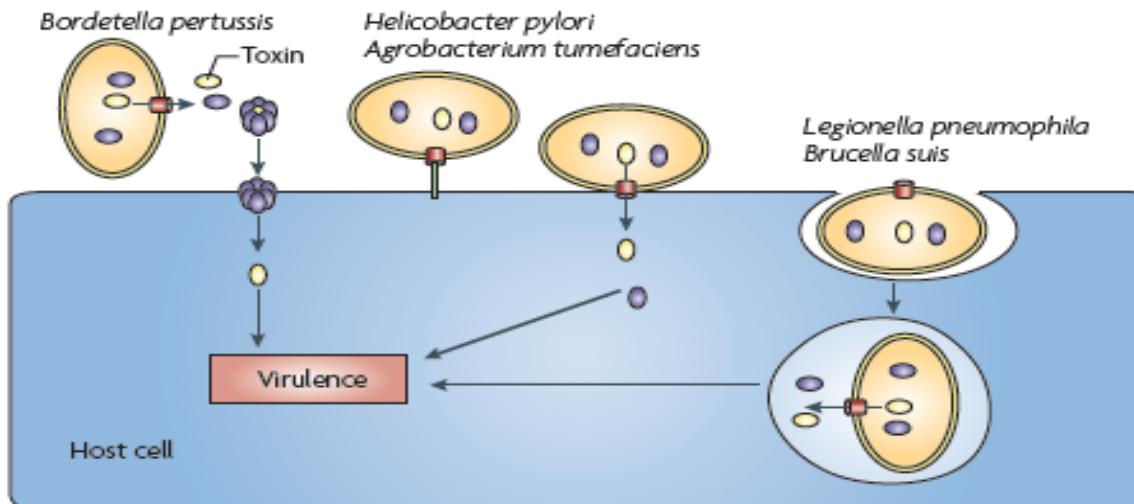
Coniugazione

## b DNA uptake (transformation) and release



Trasformazione

## c Effector translocation



Traslocazione di proteine in cellule eucariotiche

# Il sistema di esportazione di tipo IV

Evolutivamente legato al sistema di coniugazione

Costituito da un canale di traslocazione e da un adesina ( o filamento) di superficie

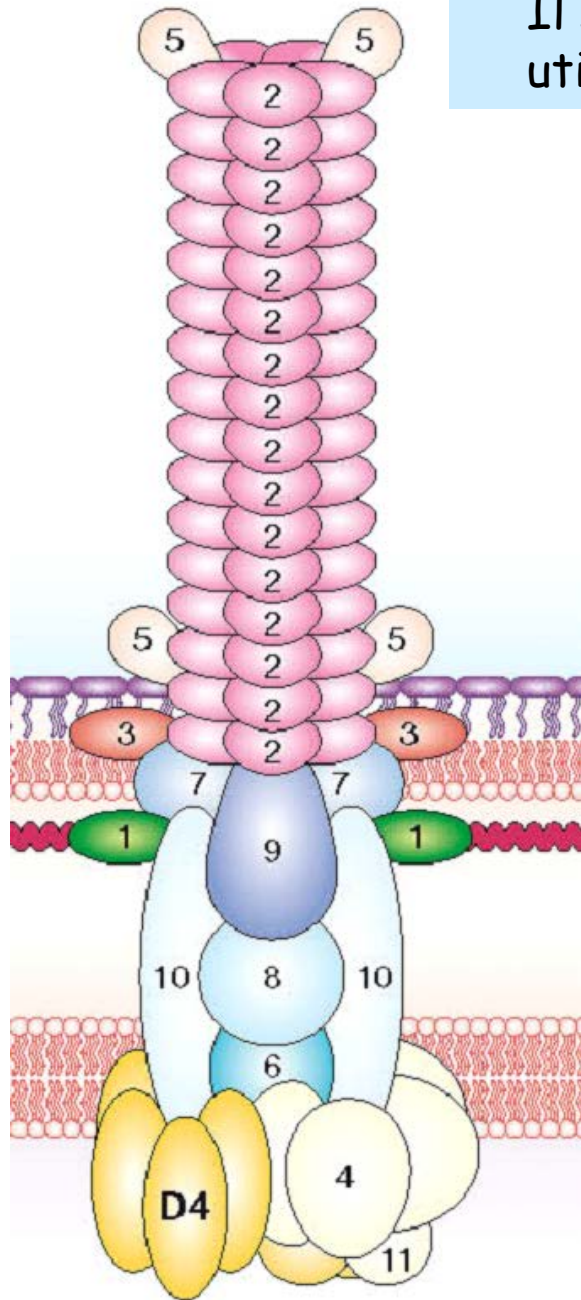
Mediano il trasferimento di DNA o proteine tra cellule batteriche o a cellule di funghi, piante o animali

Considerando che durante la coniugazione assieme al trasferimento di DNA vengono trasferite proteine quali la relaxasi si può pensare che il sistema di T4S sia ancestralmente un sistema di traslocazione di fattori proteici e che incidentalmente il DNA venga trasportato all'interno di un complesso nucleoproteico.

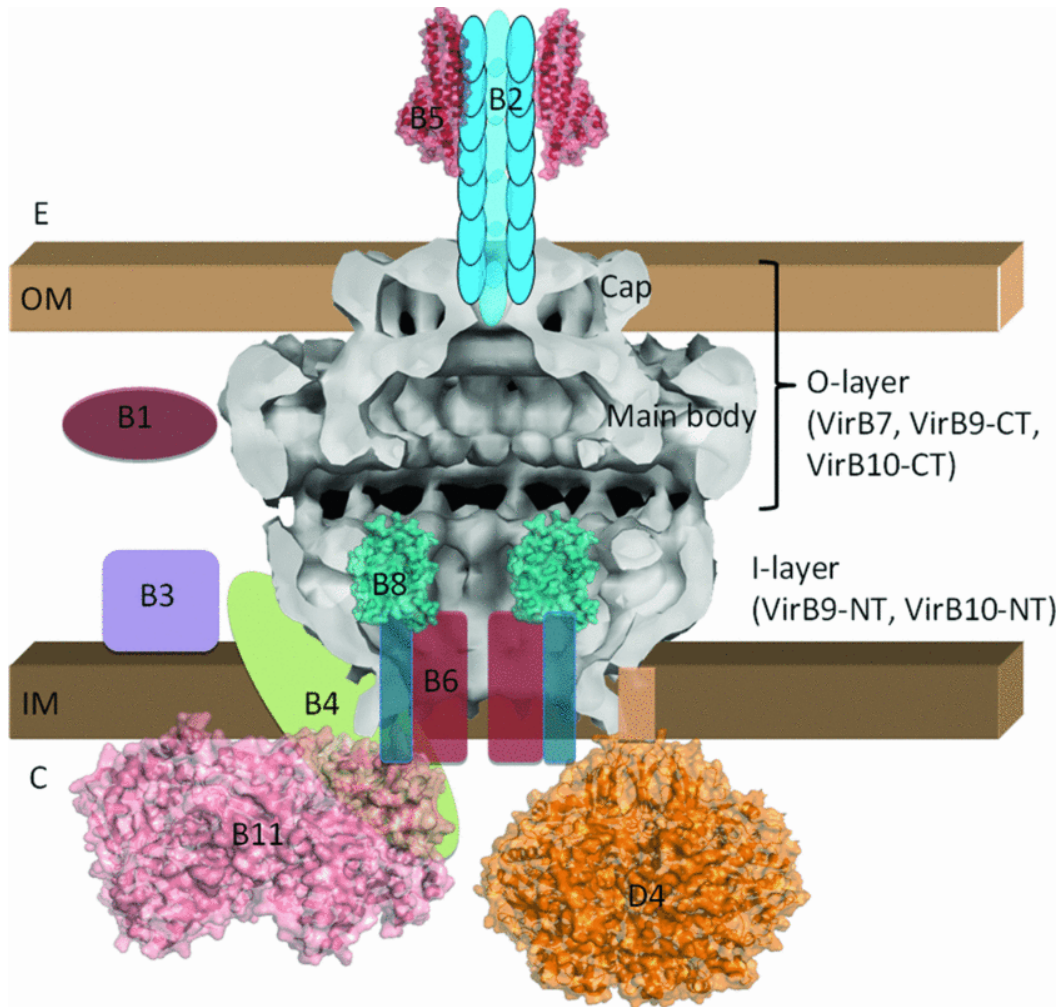
Vi sono quindi T4S che trasportano

- DNA e proteine
- solo proteine

Il sistema di tipo IV di *Agrobacterium tumefaciens* utilizzato come modello (11 proteine VirB e VirD4) :

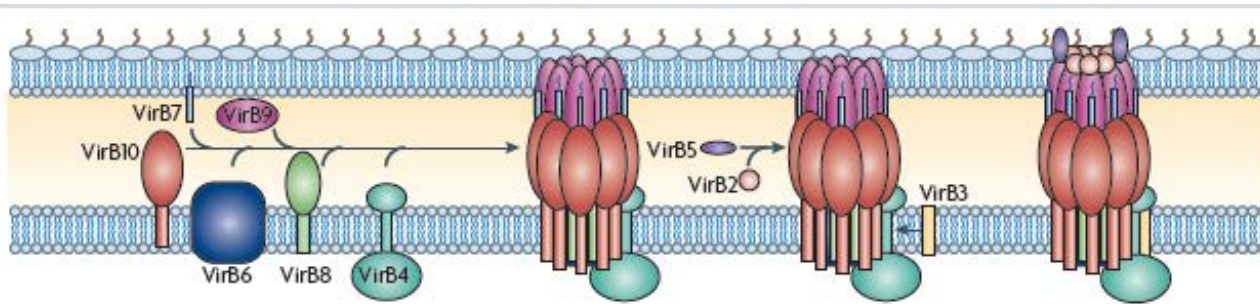


- da 3 ATPasi citoplasmatiche forniscono l'energia (B11-B4 -D4)
- da 2 proteine della IM che partecipano alla biosintesi dell'apparato (B6-B8)
- da un canale di secrezione (B10-B9-B7) che attraversa le 2 membrane ( IM+OM nei Gram-) attraverso il quale passano i substrati
- da un sottile pilo o adesina che serve per il contatto con la cellula bersaglio costituito da una pilina maggiore e una minore
- da transglicosilasi responsabili dell'inserimento nel peptidoglicano

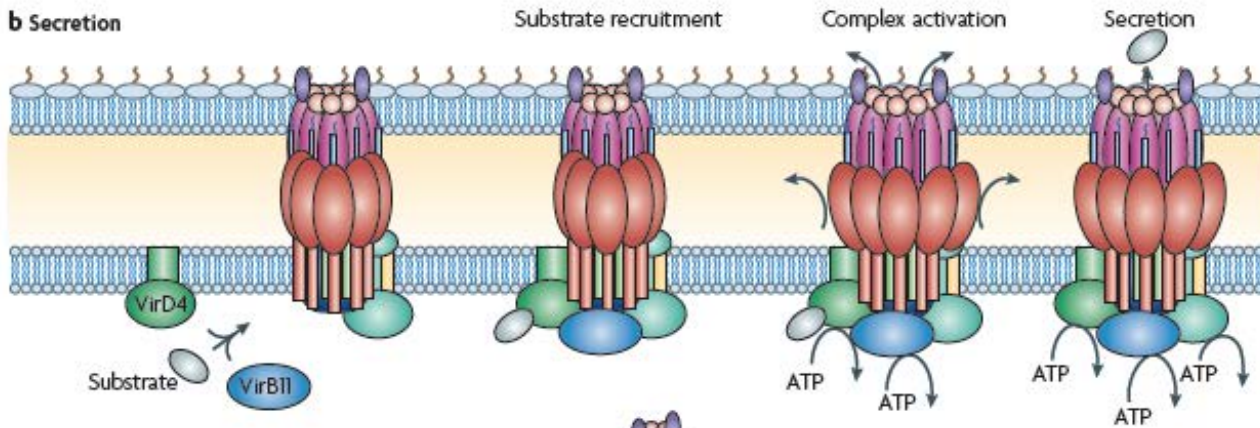


# Biosintesi del sistema di tipo IV

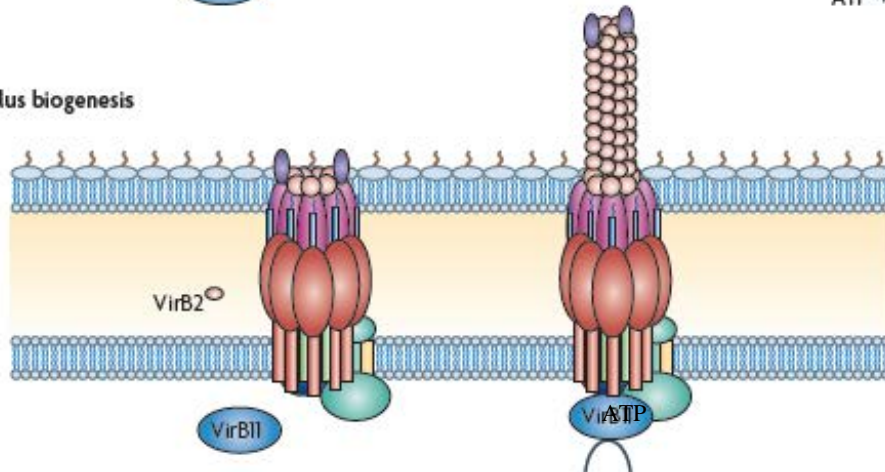
a. Assemblaggio del poro

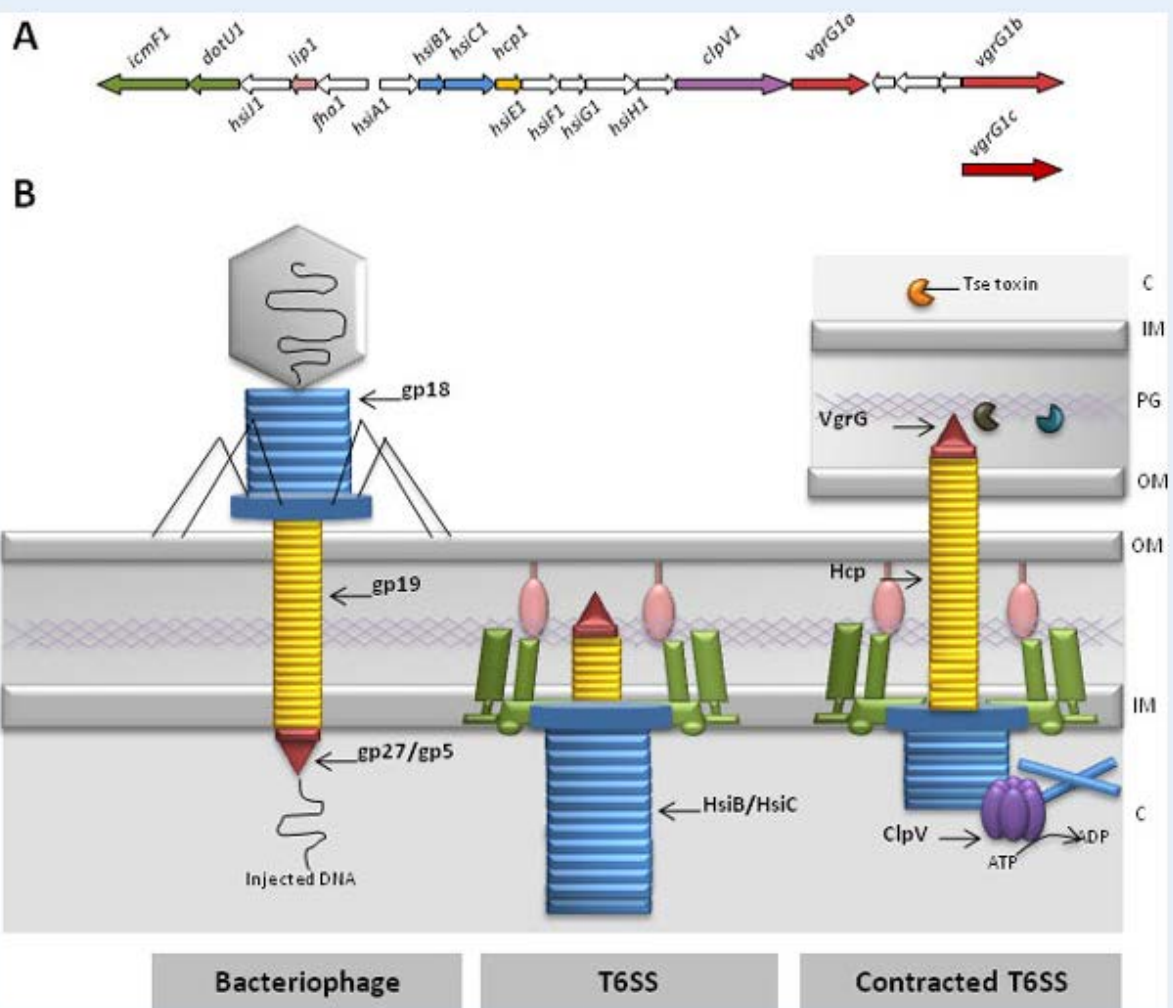


**b Secretion**



**c Pilus biogenesis**



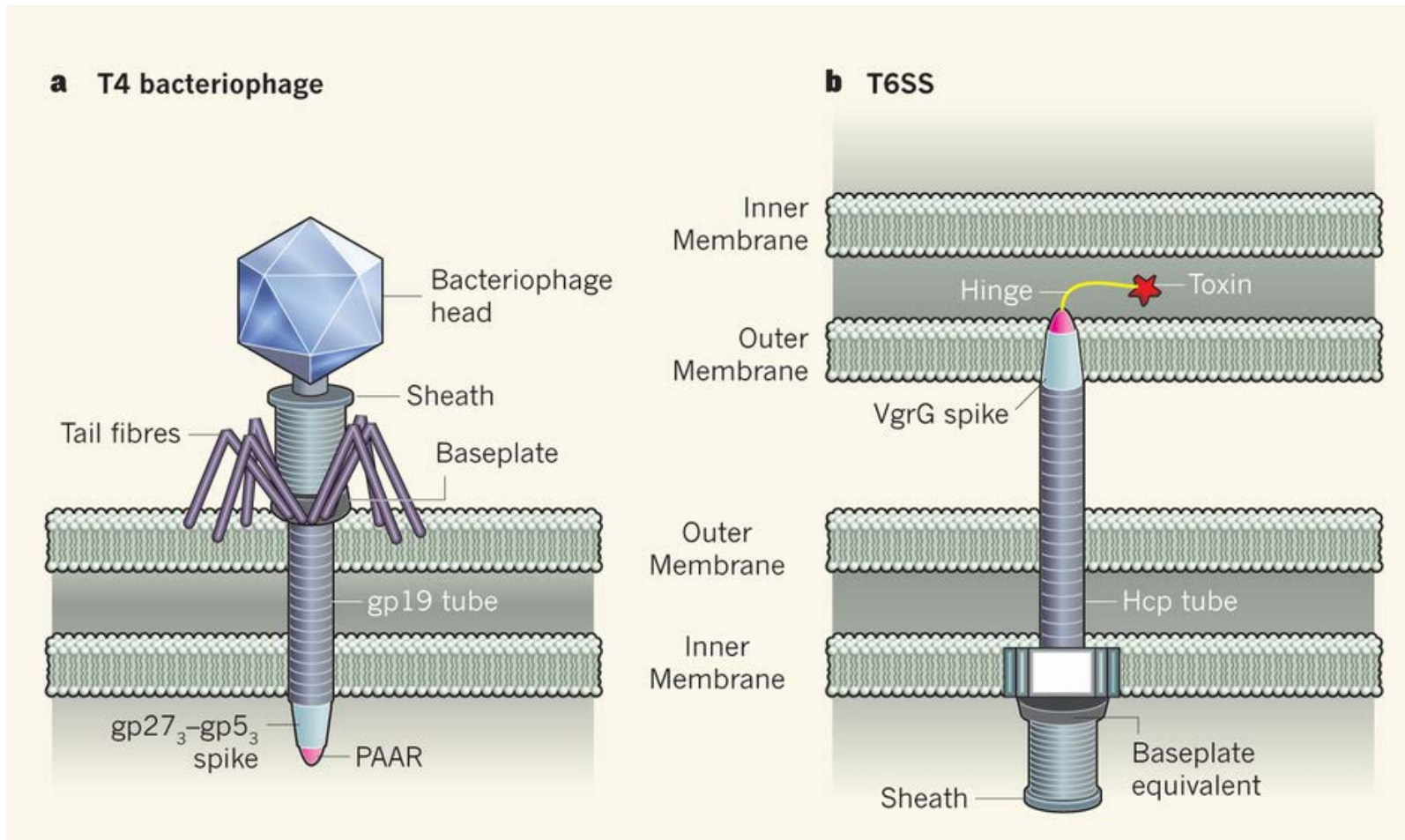


Il sistema di tipo VI nasce dall'osservazione che in diversi batteri sono presenti dei gruppi di 15 geni, due dei quali codificano funzioni simili a quelli presenti nel T4SS mentre altri geni VgrG e Hcp sono stati riconosciuti come omologhi delle proteine fagiche gp27/gp5 e gp19. Le proteine gp sono dei componenti centrali della coda batteriofagica nel fago T4. La proteina Gp19 è il componente fondamentale della coda del fago e mostra omologia strutturale con la proteina Hcp.



# Un Nuovo sistema di secrezione sec indipendente: Il sistema di Tipo VI

Utilizzato prevalentemente nelle interazioni tra batteri antagonismo competitivo  
.....ovvero come eliminare i vicini



# Il plasmide TI e la formazione di tumori nelle piante

Alcuni microrganismi sono patogeni per le piante ed inducono la formazione di tumori

*Agrobacterium tumefaciens* induce la formazione di tumori a cresta di gallo

*Agrobacterium rizogenes* induce tumori alle radici

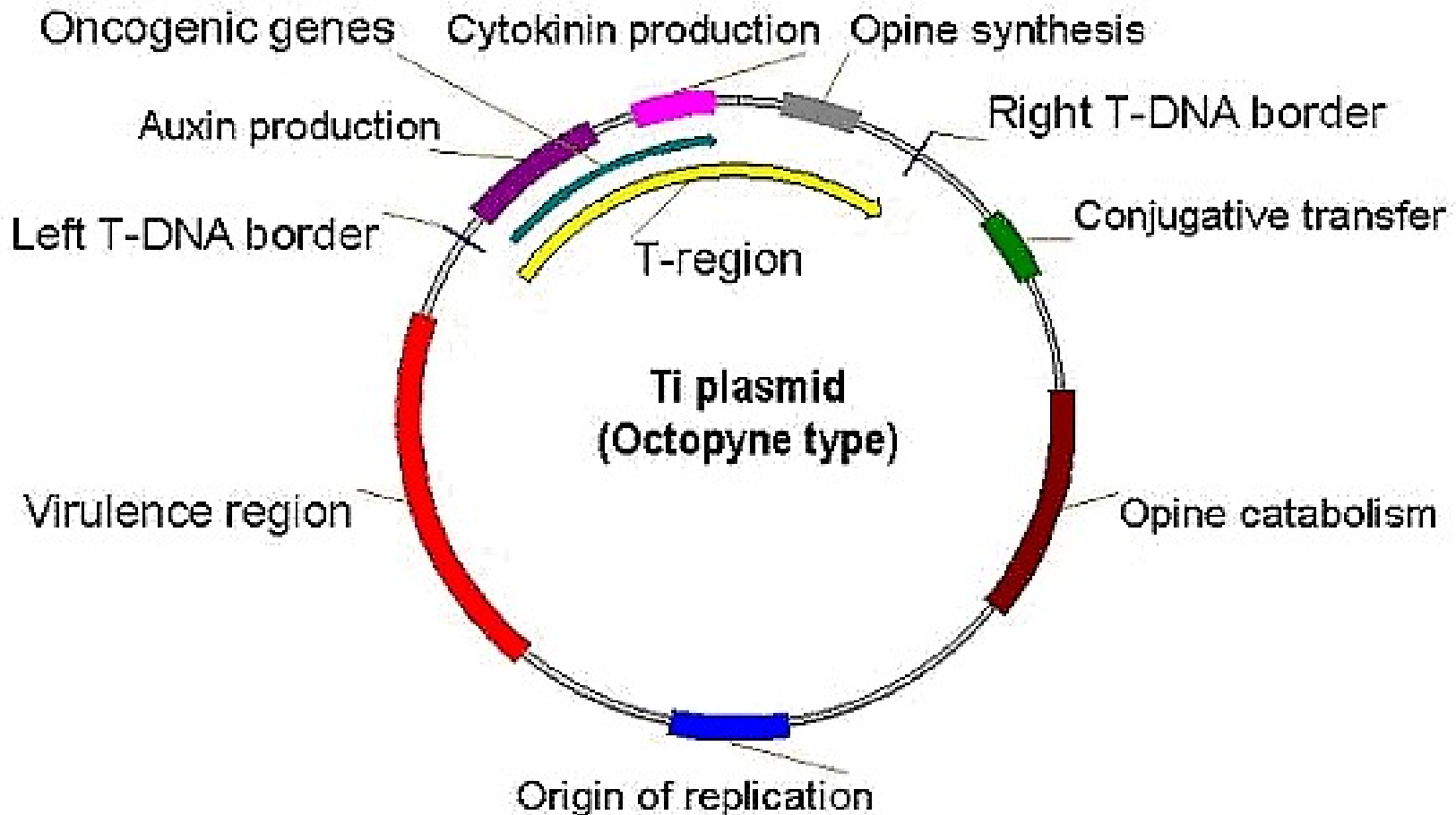


La rimozione del microrganismo dalla pianta non elimina il tumore

Il tumore viene indotto dal plasmide Ti (Tumor induction) in *A. tumefaciens* e dal plasmide Ri in *A. rizogenes*

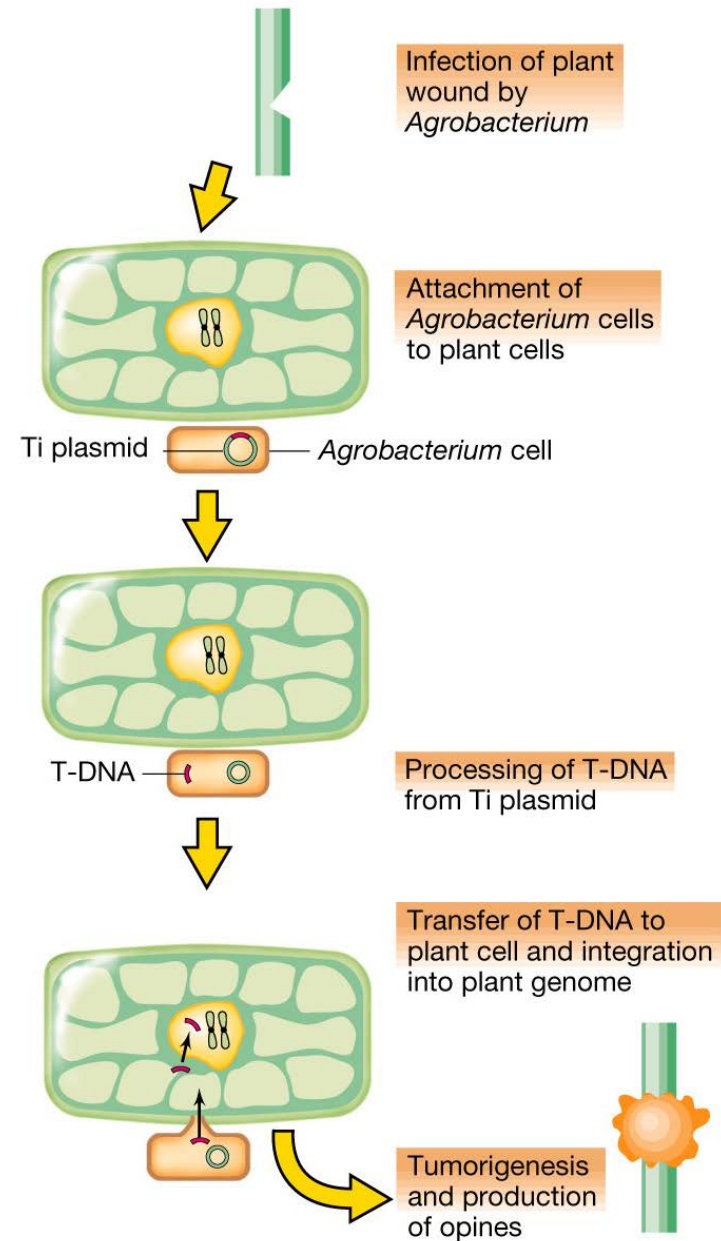
# Struttura del plasmide TI di *Agrobacterium*

La regione T (Transfer DNA) viene trasferita dal microrganismo al genoma della pianta.



Il processo di infezione prevede il riconoscimento da parte del batterio di molecole recettore presenti sulla superficie del batterio e sulla cellula vegetale.

Il recettore della pianta è costituito da una pectina (polisaccaride complesso) e quello del batterio costituito da glucani del lipopolisaccaride



Subito dopo l'attaccamento si osserva da parte del batterio la sintesi di microfibre di cellulosa che ancorano ulteriormente il batterio al sito d'infezione avvolgendolo in forma di aggregati sulla superficie della pianta.

A questo punto il microrganismo trasferisce il DNA alla pianta tramite un sistema di secrezione di tipo IV .

Nonostante molti geni del plasmide siano necessari per il trasferimento del T-DNA **solo la regione T viene trasferita.**

La sintesi dei geni **vir** necessari al trasferimento del T-DNA è indotta da segnali provenienti dal tessuto della pianta ferita.

**La regione T** del plasmide Ti contiene i geni necessari per

- **la formazione del tumore**
- **per la produzione di alcuni aminoacidi modificati definiti OPINE**

**Octopina** (N<sup>2</sup>-1,3 dicarboxyethyl)-L-arginina

**Nopalina** (N<sup>2</sup>-1,3- dicarboxypropyl)-L-arginina

sono prodotte dalla pianta in seguito a trasformazione da parte del T-DNA e sono una fonte di carbonio ed azoto per le cellule di *Agrobacterium*

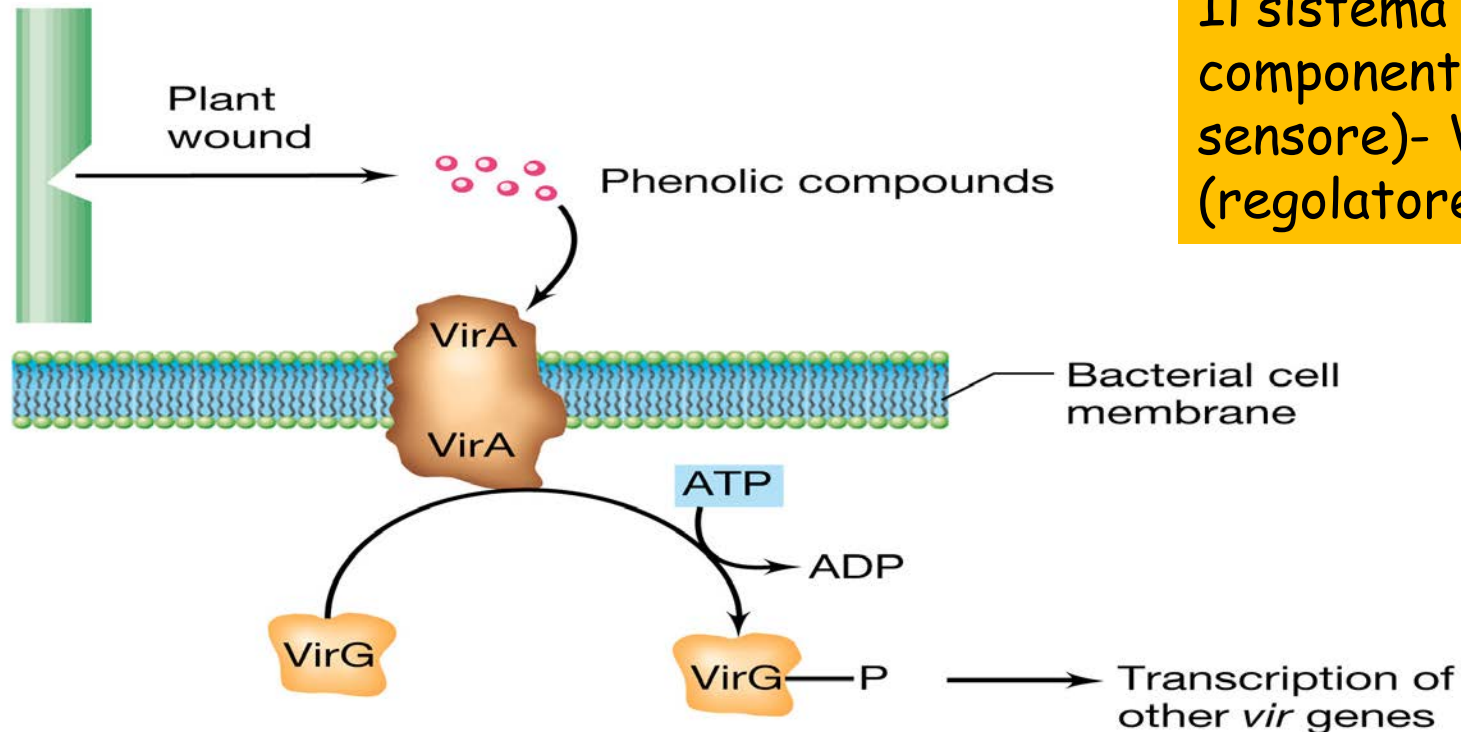
I geni vir sono essenziali per il processo di trasferimento del T-DNA

VirG fosforilata attiva gli altri geni vir.

VirD è una endonucleasi che taglia il DNA del plasmide Ti

## Il sistema *VirA* -*VirG* costituisce un sistema di trasduzione del segnale a 2 componenti

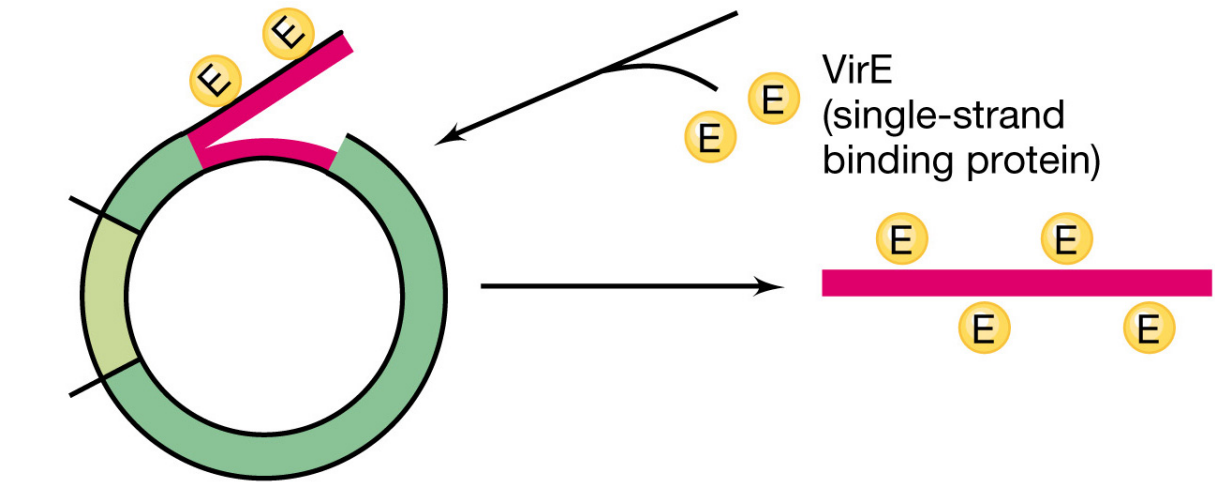
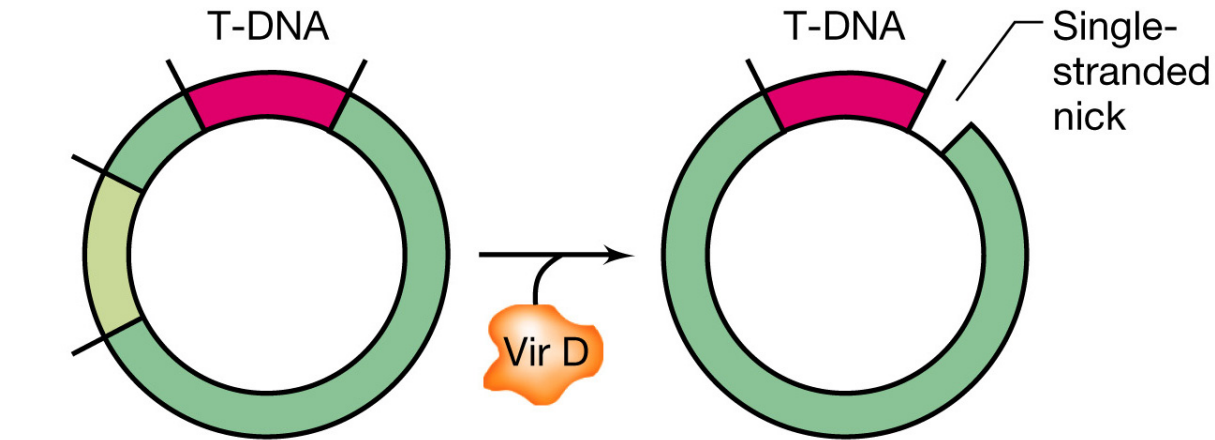
*VirA* è una protein chinasi che interagisce con alcuni induttori prodotti dalla pianta (composti fenolici acetosiringone, acido para idrossi-benzoico, vanillina) e fosforila la proteina *VirG*.



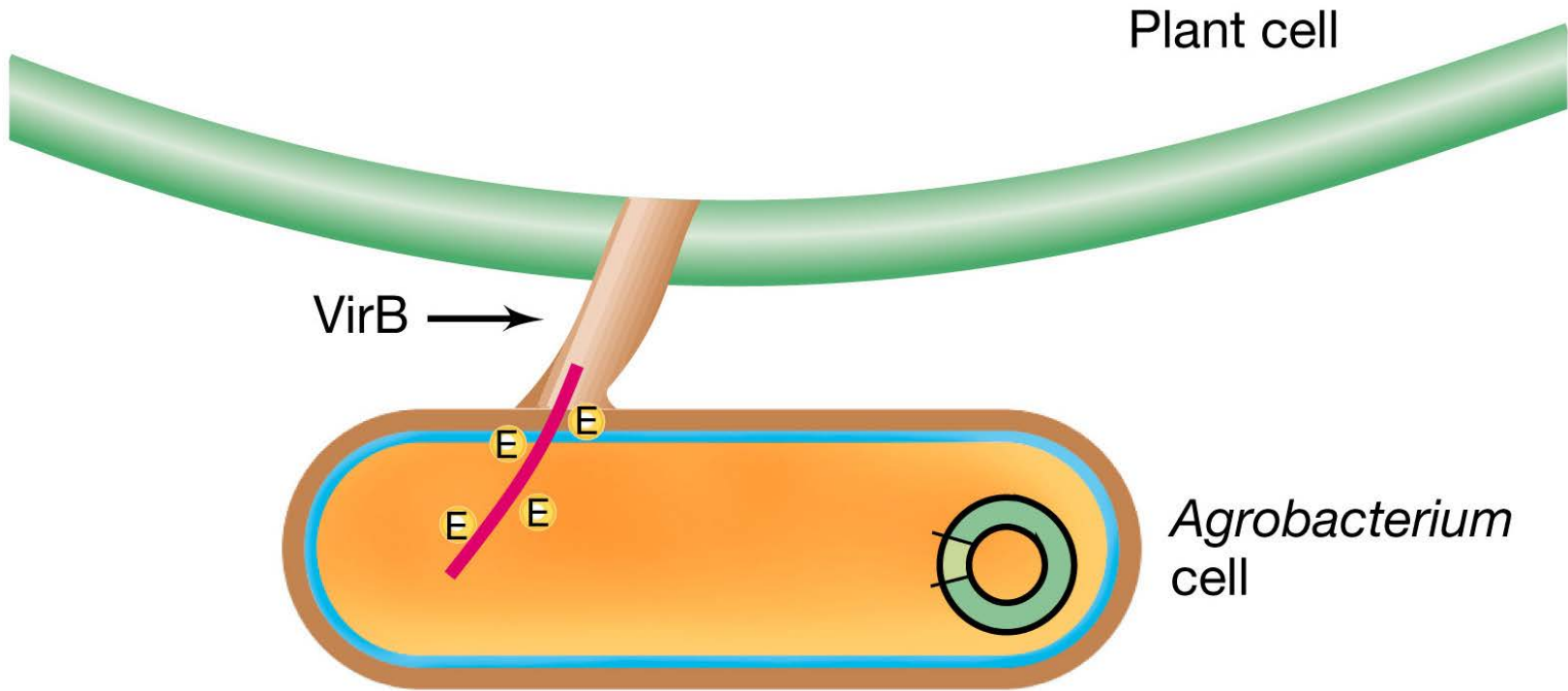
Il sistema a due componenti *VirA* (sensore)- *VirG* (regolatore)

(a)



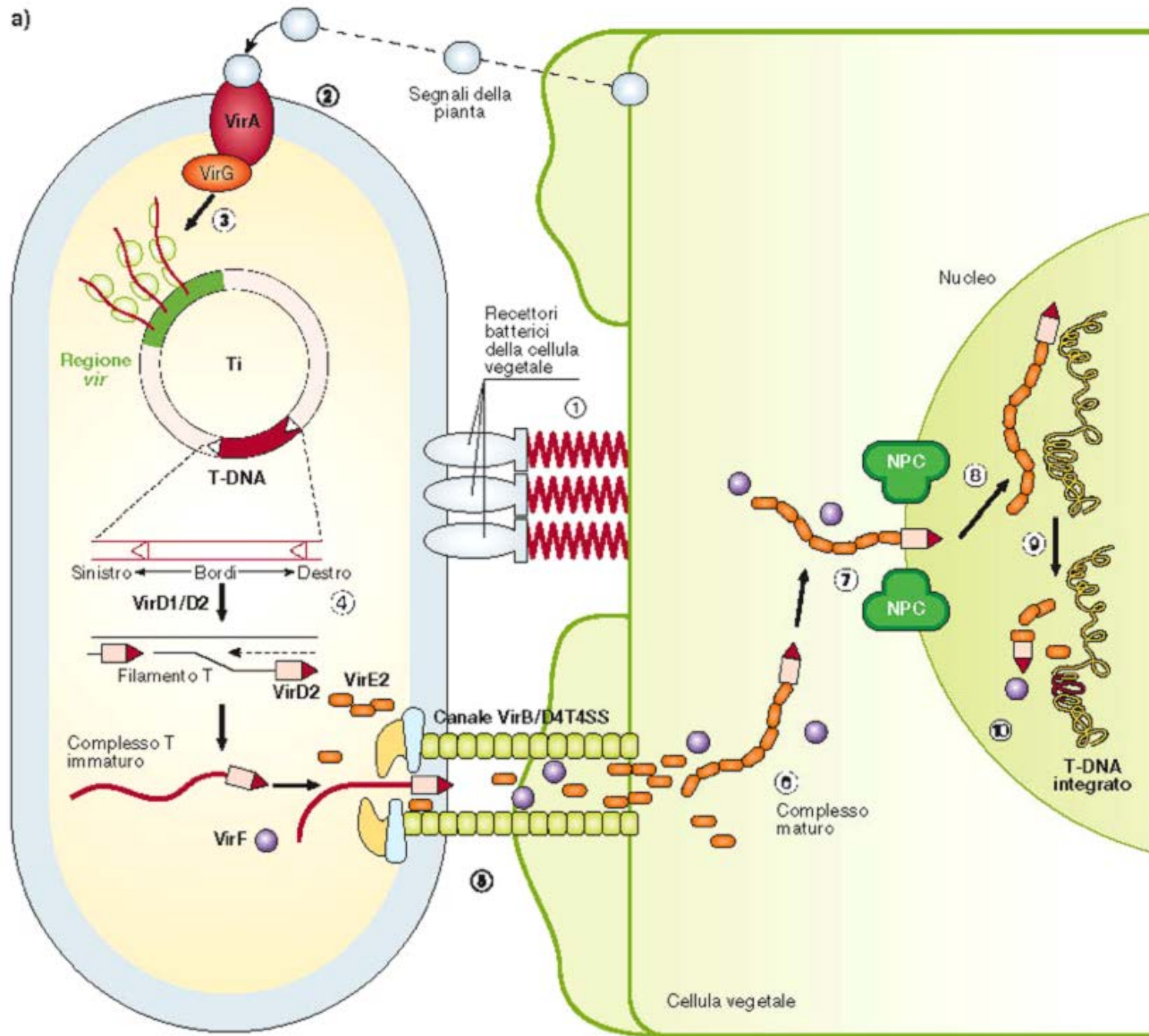


**Vir E** è la proteina che lega il DNA SS generato dal taglio della endonucleasi **VirD** e lo trasporta nella cellula vegetale



(d)

**VirB** agisce come ponte tra il batterio e la pianta.

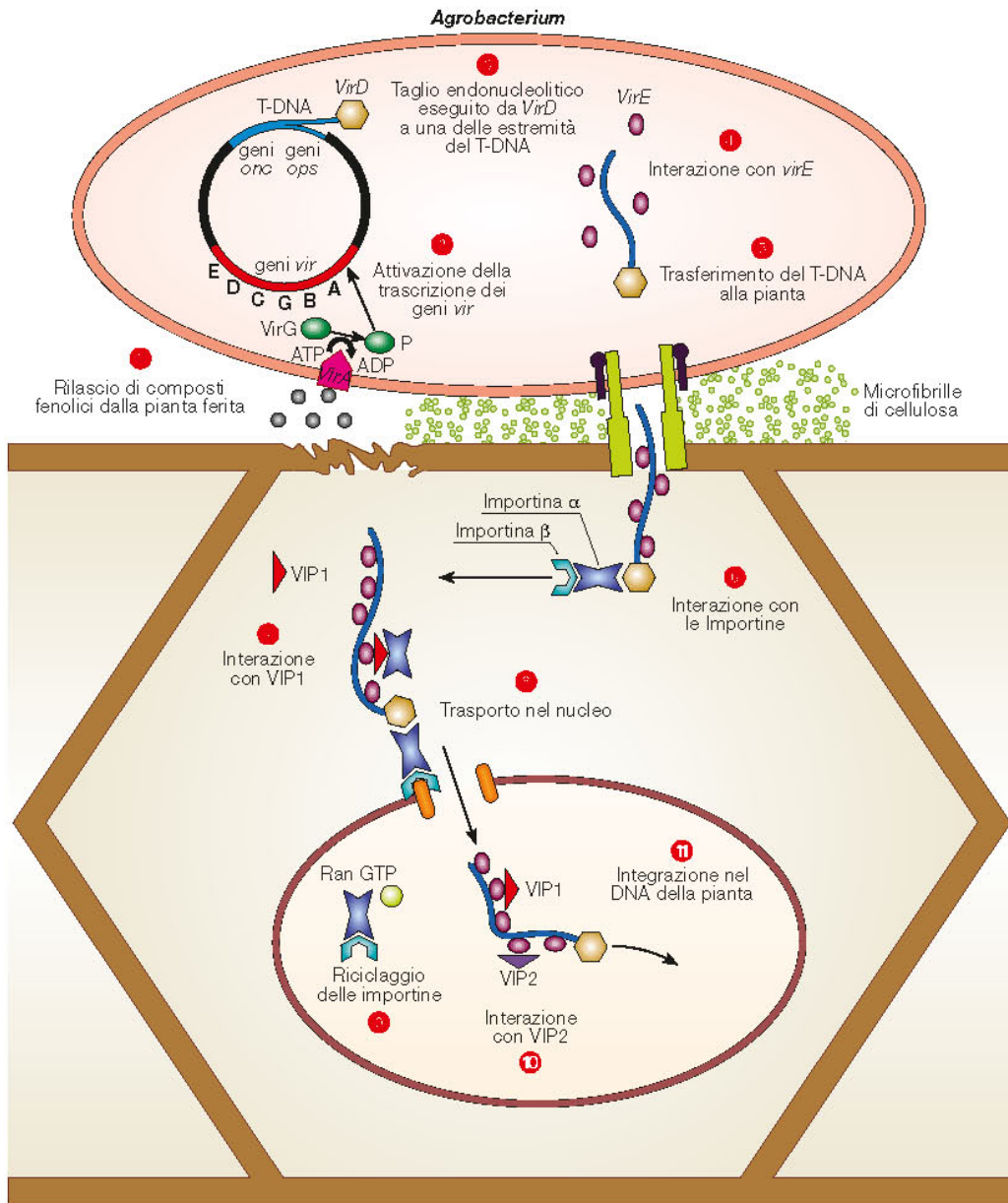


Modello recente del trasferimento di DNA da *Agrobacterium* alla piante. Ruolo del sistema T4 Secretion system

Il T DNA si integra in numerosi siti del genoma della pianta dove sono presenti sequenze ripetute in orientamento diretto o inverso.

I geni tumorigenici (onc) del plasmide codificano geni coinvolti nella sintesi di ormoni da parte della pianta oltre ad enzimi coinvolti nella sintesi di ponte.

Il plasmide Ti grazie alla regione T può essere un segmento importante per la generazione di piante transgeniche



Il processo di trasferimento del frammento T è mediato dalla proteina VirB. Nel citoplasma il complesso T-DNA VirD-VirE si associa alle importine alfa e beta e alla proteina VIP1 che lo trasportano nel nucleo. A questo punto le importine vengono staccate dalla GTPasi Ran e il T-DNA viene riconosciuto da VP2

### Type I secretion

Type I secretion systems (T1SSs), exemplified by the haemolysin secretion system in *Escherichia coli* (see the figure), are simple, tripartite systems facilitating the passage of proteins of various sizes across the cell envelope of Gram-negative bacteria. They consist of an ATP-binding cassette (ABC) transporter or a proton-antiporter, an adaptor protein that bridges the inner membrane (IM) and outer membrane (OM), and an outer membrane pore. They secrete substrates in a single step without a stable periplasmic intermediate<sup>115</sup>. T1SSs are involved in the secretion of cytotoxins belonging to the RTX (repeats-in-toxin) protein family, cell surface layer proteins, proteases, lipases, bacteriocins and haem-acquisition proteins (reviewed in REF. 116).

### Type II secretion

Type II secretion systems (T2SSs) are multicomponent machines that use a two-step mechanism for translocation. During the first step, the precursor effector protein is translocated through the inner membrane by the Sec translocon<sup>117</sup> or the Tat pathway<sup>118</sup>. Once in the periplasm, the effector protein is translocated by the T2SS through the outer membrane. The T2SS translocon consists of 12–16 protein components<sup>114</sup> that are found in both bacterial membranes, the cytoplasm and the periplasm. As an example, the general secretion pathway (Gsp) system is shown (see the figure). The T2SS shows an evolutionary relationship with the type IV pilus assembly machinery<sup>119,120</sup>.

### Type III secretion

Type III secretion systems (T3SSs), also called injectisomes, mediate a single-step secretion mechanism and are used by many plant and animal pathogens, including *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The T3SS is illustrated by the *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* system, which uses the invasion (Inv) and Prg proteins (see the figure). T3SSs deliver effector proteins into the eukaryotic host cell cytoplasm in a Sec-independent manner<sup>121</sup>. T3SSs are genetically, structurally and functionally related to bacterial flagella<sup>121</sup>. They are composed of more than 20 different proteins, which form a large supramolecular structure crossing the bacterial cell envelope<sup>121,122</sup>.

### Type IV secretion

Type IV secretion systems are versatile systems that are found in Gram-negative and Gram-positive bacteria and that secrete a wide range of substrates, from single proteins to protein–protein and protein–DNA complexes. These systems are exemplified by the *Agrobacterium tumefaciens* VirB/D system (see the figure). See main text for further details.

### Type V secretion

Type V secretion systems (T5SSs) include autotransporters and two-partner secretion systems. T5SSs translocate substrates in two steps<sup>123</sup>. Autotransporter proteins, such as NalP from *Neisseria meningitidis* (see the figure), are multidomain proteins that are secreted as precursor proteins across the inner membrane in a Sec-dependent process. Subsequently, the translocator domain of the protein inserts into the outer membrane and facilitates surface localization of the passenger domain. In two-partner secretion systems, a separate translocator protein (TpsB; see the figure) mediates the secretion of the effector protein (TpsA) through the outer membrane. Over 700 proteins with functions that include auto-aggregation, adherence, invasion, cytotoxicity, serum resistance, cell-to-cell spread and proteolysis use these two secretion systems to cross both inner and outer membranes during a simple two-step process<sup>124,125</sup>.