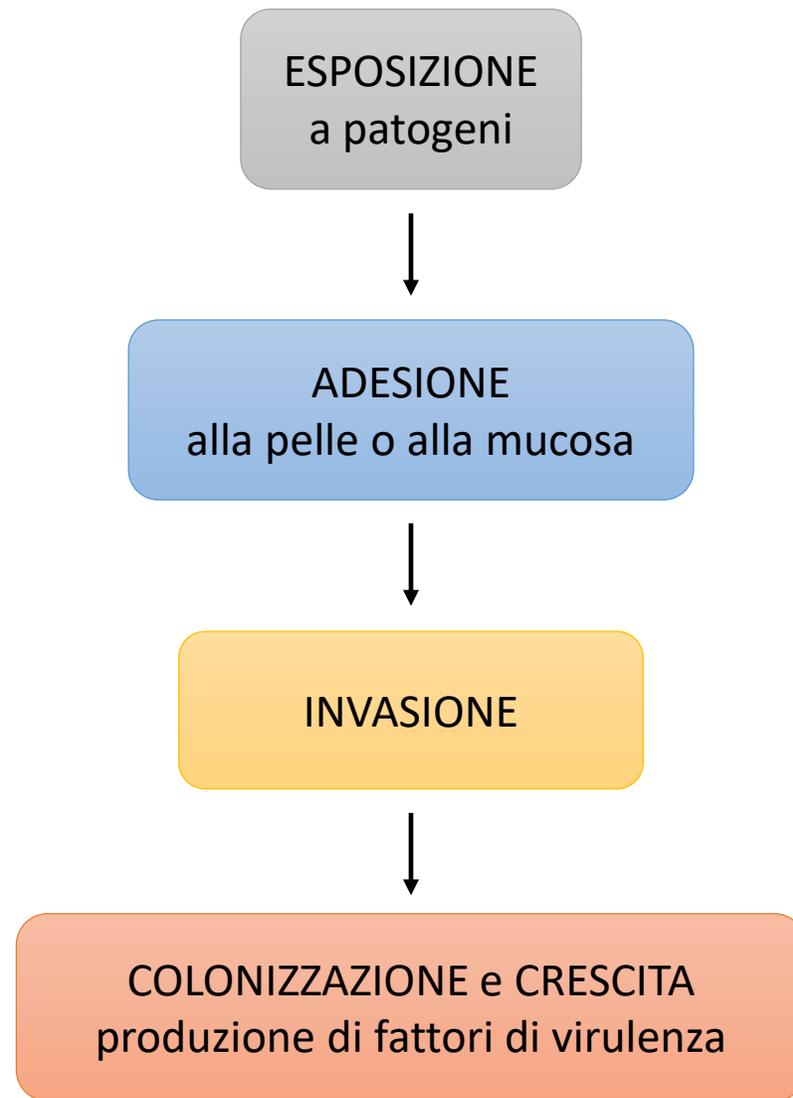


Quando e come attaccano i
microorganismi:
i fattori di virulenza e le tossine



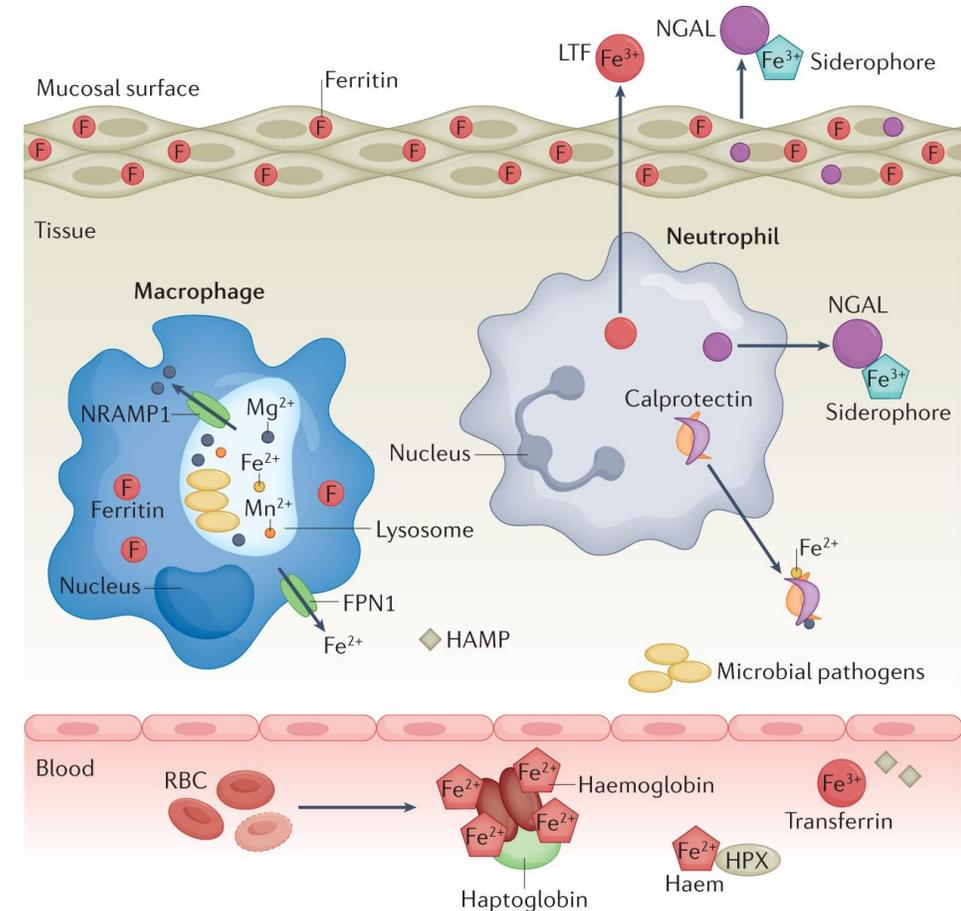
Per indurre la malattia il patogeno deve potersi riprodurre. Fattori che influenzano la crescita sono:

CONDIZIONI AMBIENTALI
appropriate

SOSTANZE NUTRITIVE
disponibili

La colonizzazione dell'ospite da parte di un patogeno richiede un'adeguata percezione e risposta ai segnali ambientali locali, per garantire l'adattamento e la sopravvivenza all'interno dell'ospite.

- Nutrienti solubili
- Vitamine e altri fattori di crescita
- Oligoelementi quali ferro, zinco, manganese, rame sono presenti in quantità limitata per impedire l'istaurarsi del patogeno



Ferro

```
graph TD; A[Ferro] --> B[Esiste sottoforma di due stati di ossidazione: <br/>• forma ridotta, ferro ferroso (Fe2+) <br/>• forma ossidata, ferro ferrico (Fe3+)]; A --> C[Grazie al suo potenziale redox, è un elemento versatile che lo rende adatto ad assumere il ruolo di cofattore di numerose proteine coinvolte in: <br/>• trasporto di elettroni <br/>• detossificazione dei ROS <br/>• sintesi di aminoacidi e nucleosidi <br/>• sintesi del DNA <br/>• fotosintesi]; A --> D[È un elemento essenziale per quasi tutti gli organismi viventi, inclusi i batteri patogeni];
```

Esiste sottoforma di due stati di ossidazione:

- forma ridotta, ferro ferroso (Fe^{2+})
- forma ossidata, ferro ferrico (Fe^{3+})

Grazie al suo potenziale redox, è un elemento versatile che lo rende adatto ad assumere il ruolo di cofattore di numerose proteine coinvolte in:

- trasporto di elettroni
- detossificazione dei ROS
- sintesi di aminoacidi e nucleosidi
- sintesi del DNA
- fotosintesi

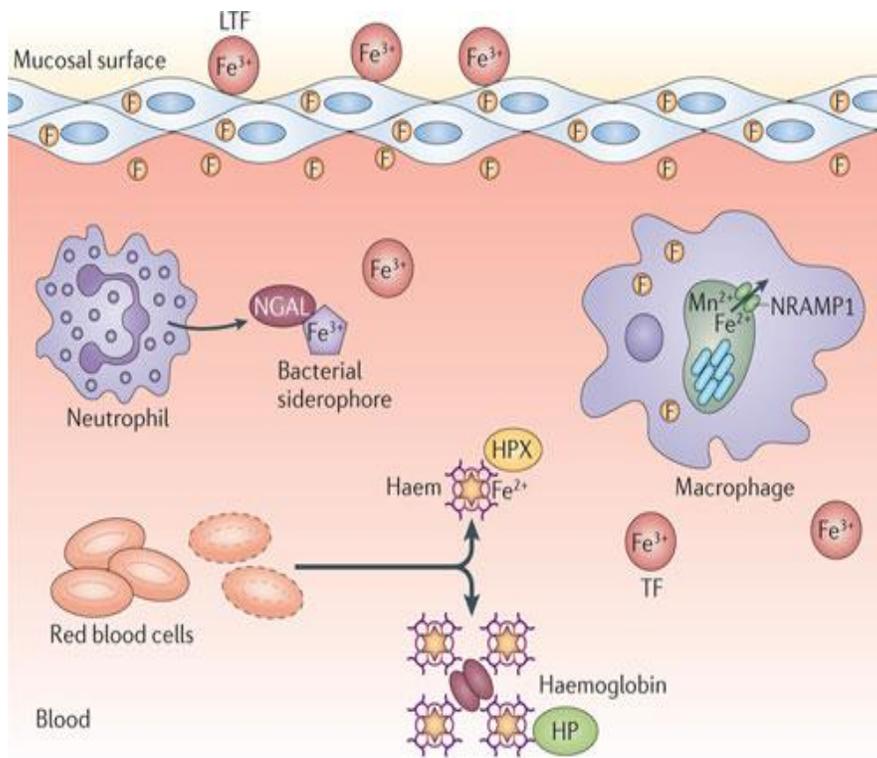
È un elemento essenziale per quasi tutti gli organismi viventi, inclusi i batteri patogeni

Biodisponibilità del ferro

Sebbene sia abbondante in natura, il ferro è difficilmente utilizzabile dalla maggior parte degli organismi viventi a causa della sua bassa solubilità in acqua in condizioni aerobiche.

Nell'ambiente il ferro è presente soprattutto nella forma ferrica (Fe^{3+}), che è molto poco solubile in presenza di ossigeno e a pH neutro $\rightarrow \text{Fe}^{3+} 10^{-9}\text{M}$

Nell'ospite il ferro è quasi completamente sequestrato da proteine che legano il ferro $\rightarrow \text{Fe}^{3+} 10^{-18}\text{M}$



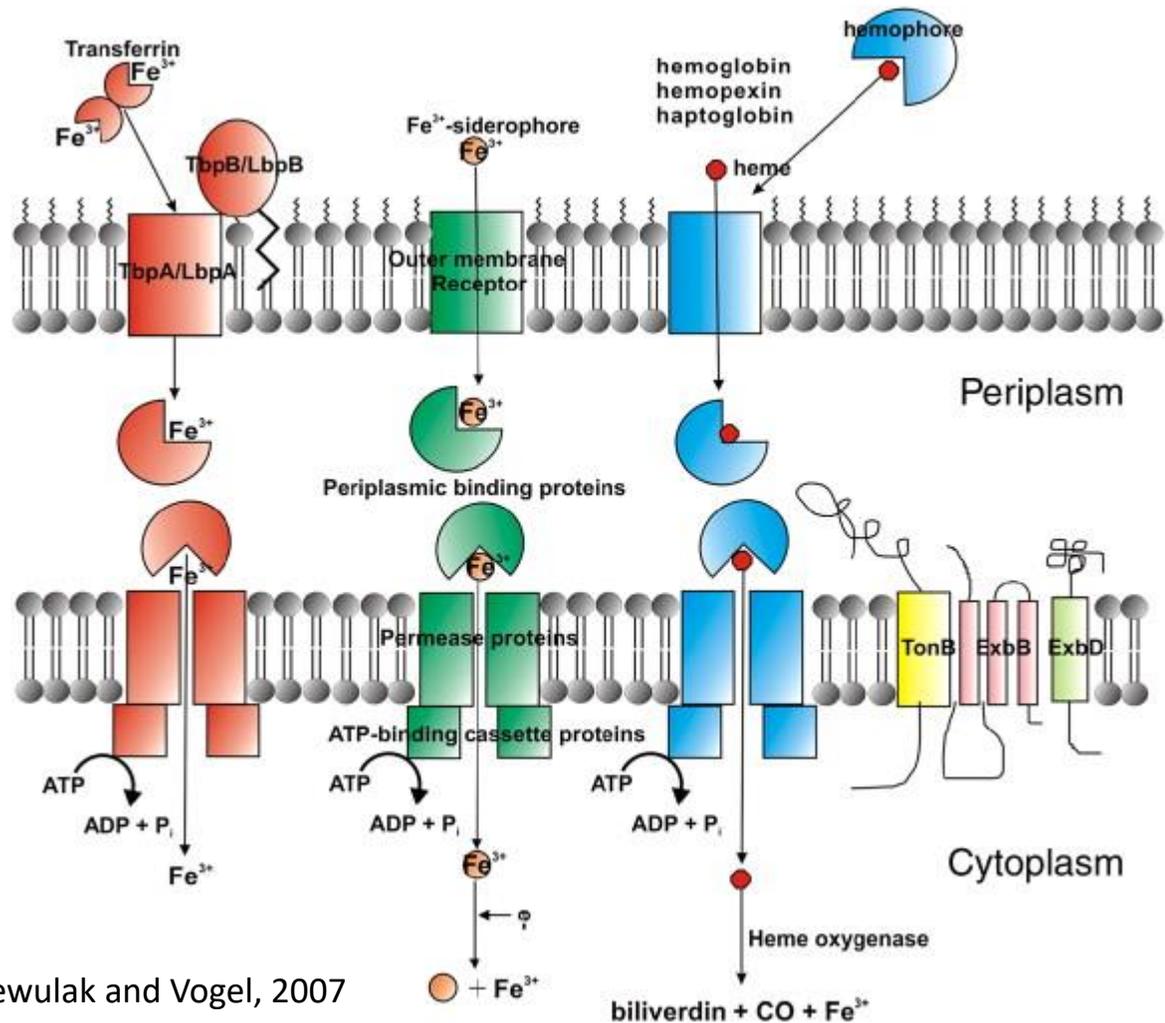
Mantengono il ferro in soluzione ma non lo rendono disponibile ai patogeni:

- Transferrina è il trasportatore del ferro nel sangue
- Lattoferrina trasporta il ferro nei fluidi secretori
- Ferritina sequestra e immagazzina il ferro all'interno delle cellule

Il ferro non è un nutriente facilmente disponibile

Meccanismi di uptake del ferro nei batteri

Al fine di colmare la differenza tra ferro biodisponibile e ferro richiesto per la crescita, i batteri hanno evoluto sistemi specializzati per l'assimilazione del ferro → strategie utilizzate:



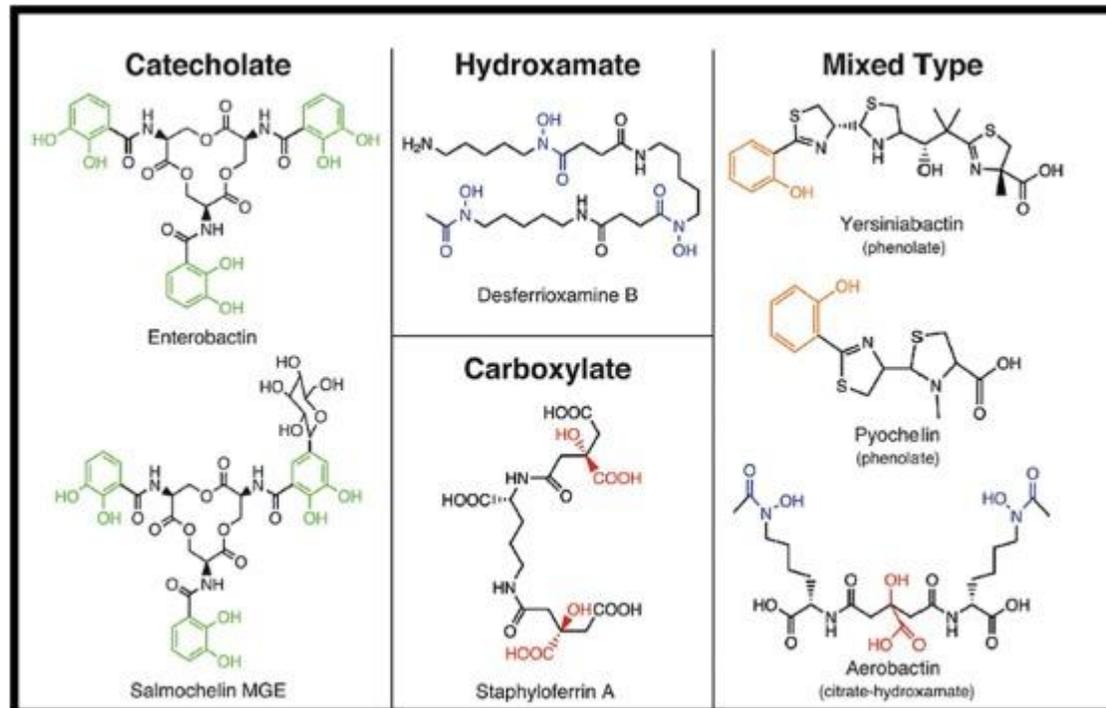
Krewulak and Vogel, 2007

- Utilizzo di proteine dell'ospite quali transferrina, lattoferrina dalle quali il ferro viene estratto prima di poter essere trasportato nella cellula (es. Neisseria;
- Importo dell'eme all'interno della cellula come molecola intatta → per liberare l'eme legato alle proteine trasportatrici dell'ospite (es. emoglobina), i patogeni secernono esotossine es. emolisine, citolisine e proteasi;
- Produzione e secrezione di molecole a basso peso molecolare che chelano il ferro e che vengono importati come molecole intatte, i siderofori.

Tutte queste vie di assorbimento richiedono un recettore della membrana esterna, una PBP e un trasportatore ABC della membrana interna.

Siderofori

- Caratterizzati da una ridotta massa molecolare (< 1000 Da) e da un'elevata specificità ed affinità nei confronti del ferro ferrico;
- Sintetizzati e secreti dai batteri in risposta a livelli di ferro limitanti la crescita
- Una volta riconosciuto e legato il ferro nell'ambiente extracellulare, il complesso sideroforo-ferro viene legato da un recettore altamente specifico e trasportato nel citoplasma
- Classificati in base al gruppo funzionale che utilizzano per legare il ferro



Cattura del ferro siderofori-mediata nei batteri Gram- negativi e positivi

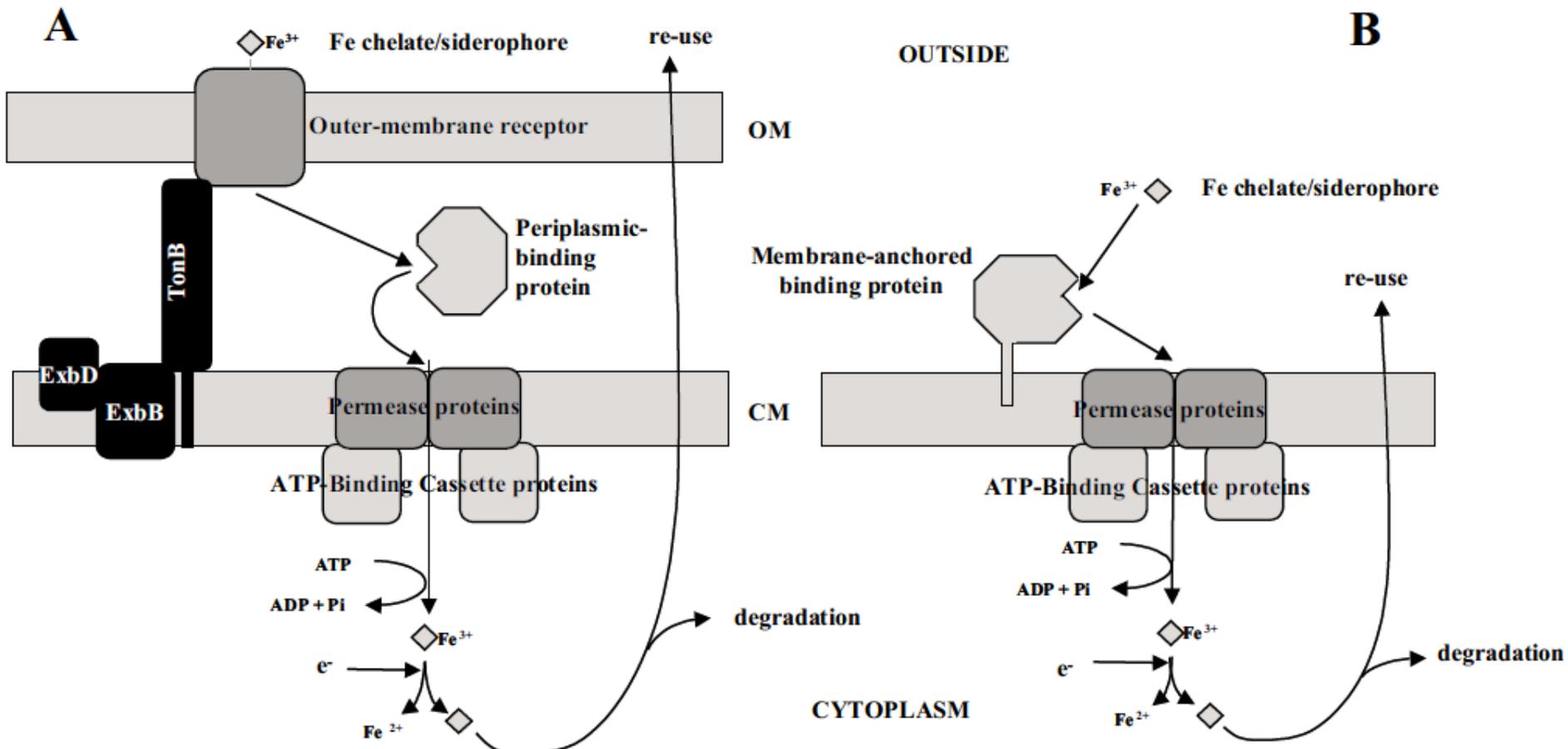
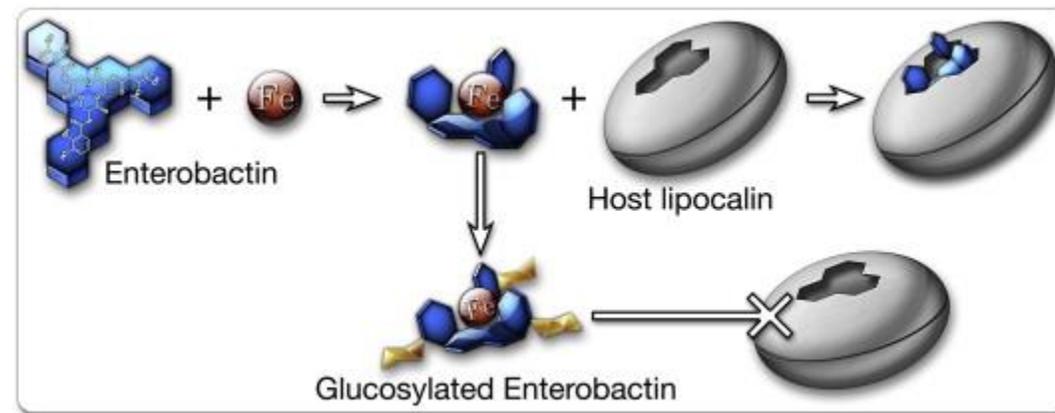


Fig. 1. Schematic representation of siderophore-mediated iron uptake in Gram-negative (A) and Gram-positive (B) bacteria.

Andrews et al., 2003

Come si difende l'ospite dalla cattura del ferro siderofori-mediata?

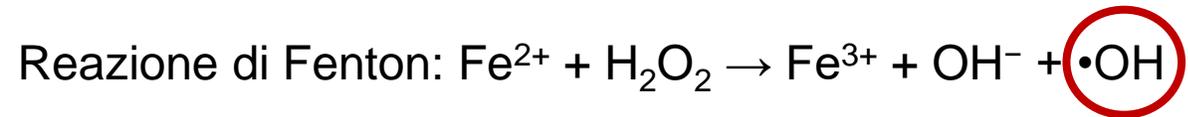
Per combattere la cattura di ione ferrico da parte dei siderofori, nei vertebrati viene prodotta dai macrofagi la lipocalina 2 o siderocalina ovvero una proteina che lega e sequestra i siderofori. La lipocalina 2 (che è anche un fattore di crescita) viene upregolata durante i processi infiammatori.



Alcuni batteri producono dei siderofori che sono in grado di eludere il legame con lipocalina grazie a specifiche modificazioni chimiche (es. glicosilazione nel caso dell'enterobactina)

Il doppio ruolo del ferro: essenziale ma tossico

In un ambiente riducente, come quello citoplasmatico, il ferro libero è presente come ione ferroso e, in presenza di perossido di idrogeno, può catalizzare la formazione di specie reattive dell'ossigeno



Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono danneggiare proteine, lipidi, acidi nucleici



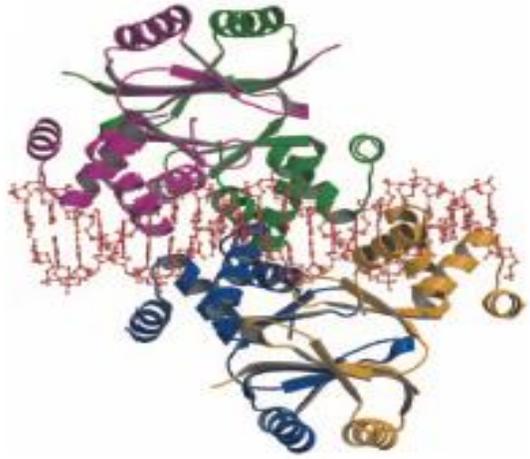
L'importo di ferro deve essere finemente regolato per mantenere una concentrazione intracellulare entro limiti «sicuri»



I batteri necessitano di meccanismi per percepire e controllare i livelli intracellulari di ferro

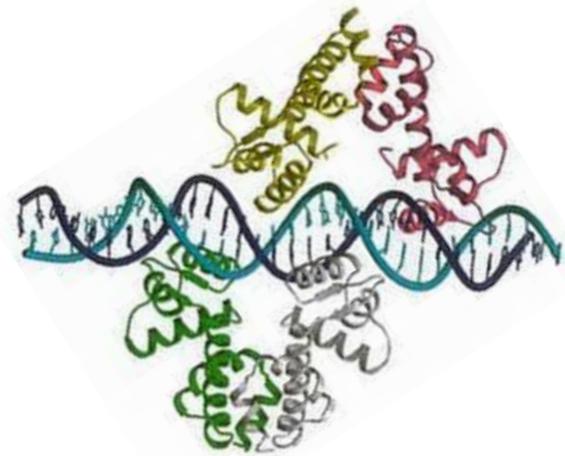
Regolazione dei sistemi di uptake del ferro

Fur (ferric uptake regulator)



Gram-negative bacteria

DtxR (Diphtheria toxin repressor)



Gram-positive bacteria

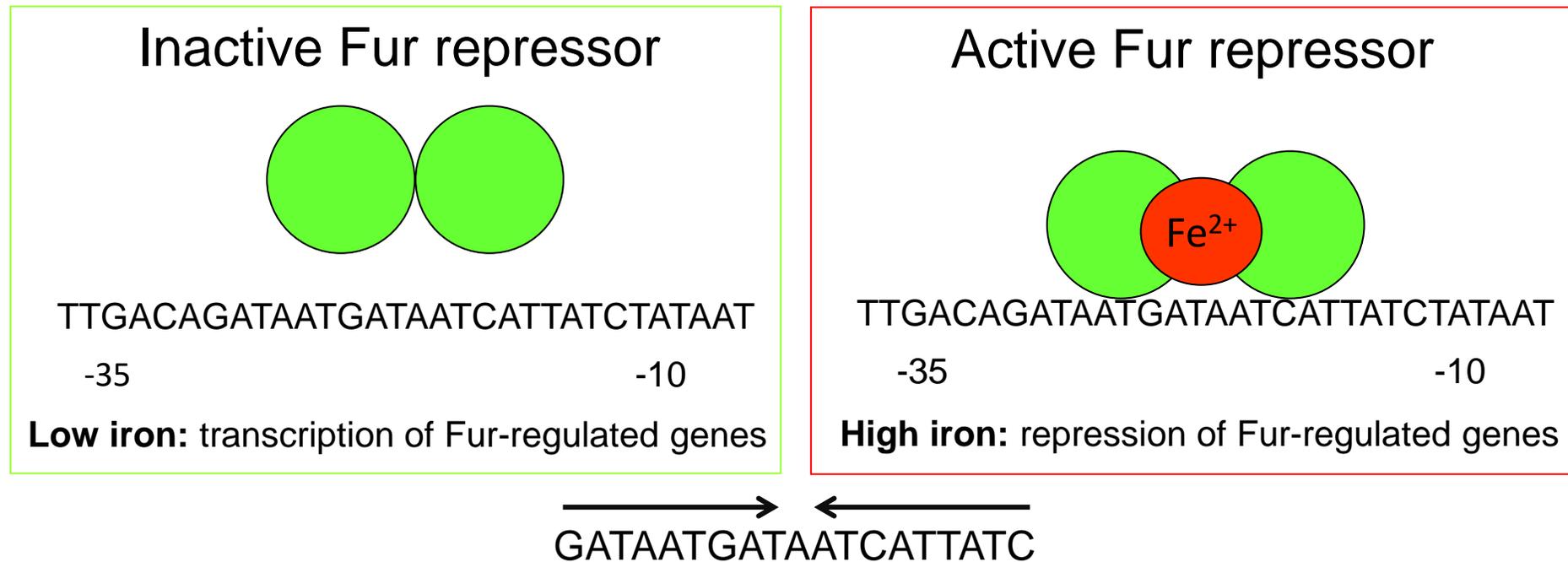
Fur e DtxR sono regolatori principali del metabolismo del ferro



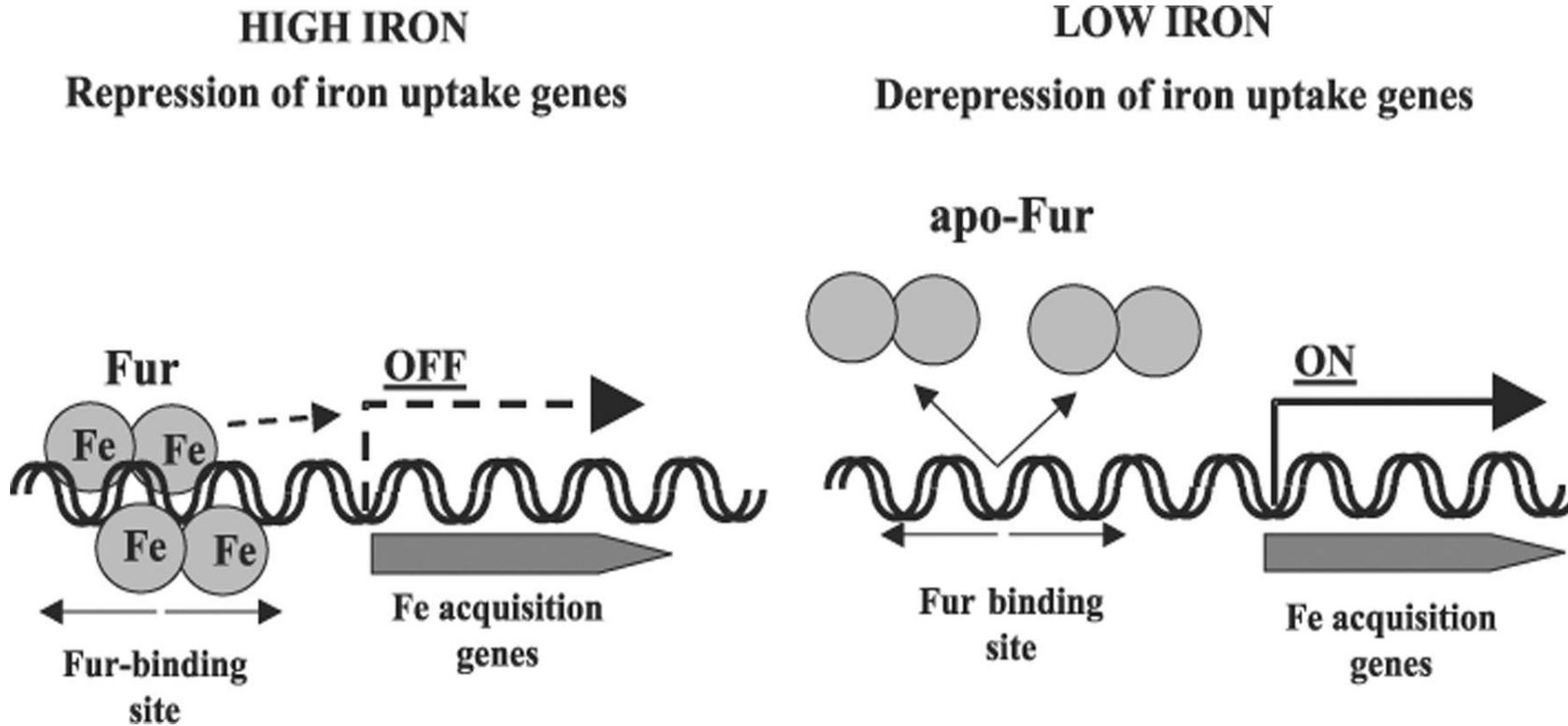
Agiscono come repressori trascrizionali

Fur e la regolazione del ferro

- Piccola proteina (15-17 KDa) presente in praticamente tutti i batteri Gram-negativi
- Regola un cospicuo numero di geni → in *E. coli* sono più di 90
- Necessita del co-repressore Fe^{2+} per dimerizzare, legare il DNA (affinità 1000 volte superiore rispetto alla forma apo) a livello della Fur box e reprimere la trascrizione dei geni bersaglio
- Rappresenta un sensore dei livelli intracellulari di ferro



Repressione genica mediata da Fur



Fur e la regolazione del ferro

I batteri hanno anche bisogno di esprimere proteine specifiche che utilizzano il ferro in risposta ad elevati livelli di ferro

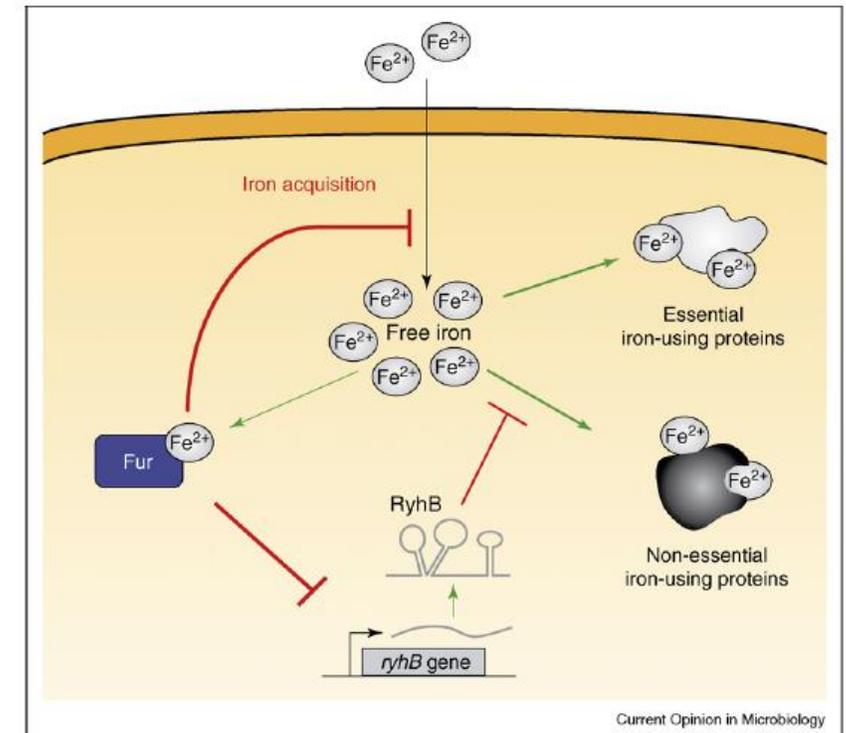
I geni indotti in presenza di ferro sono coinvolti in:

- immagazzinamento del ferro
- difesa dallo stress ossidativo
- metabolismo
- altri processi cellulari

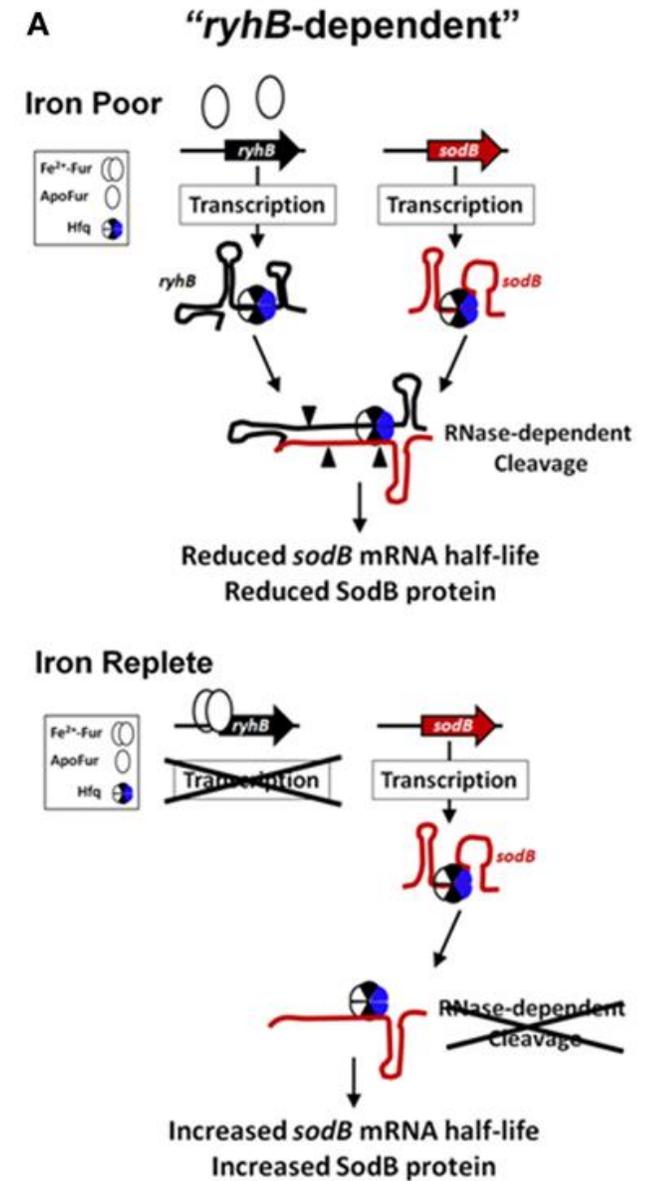
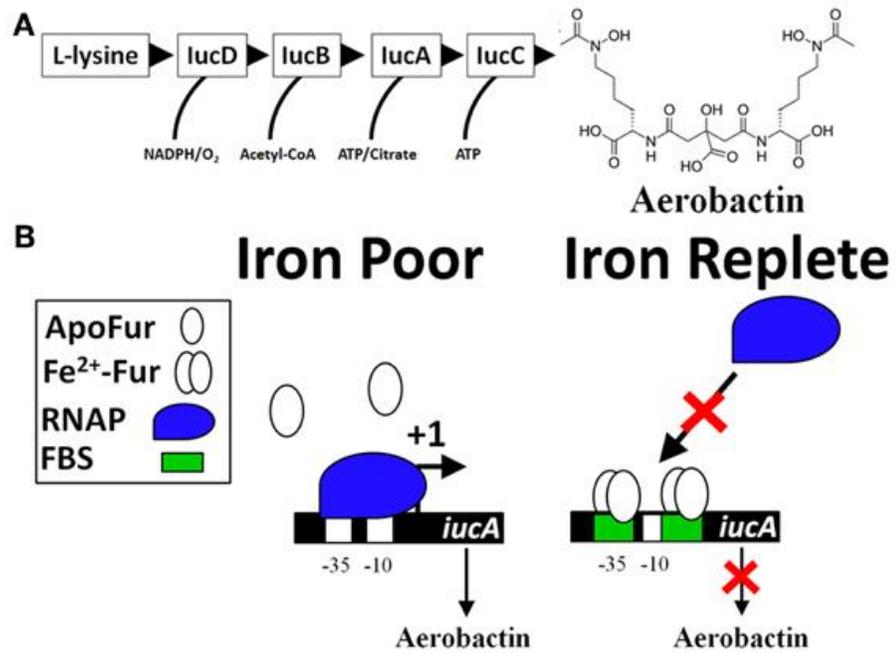
COME?

...accoppiando due sistemi di regolazione negativa

È il caso dello sRNA RyhB di *E. coli*

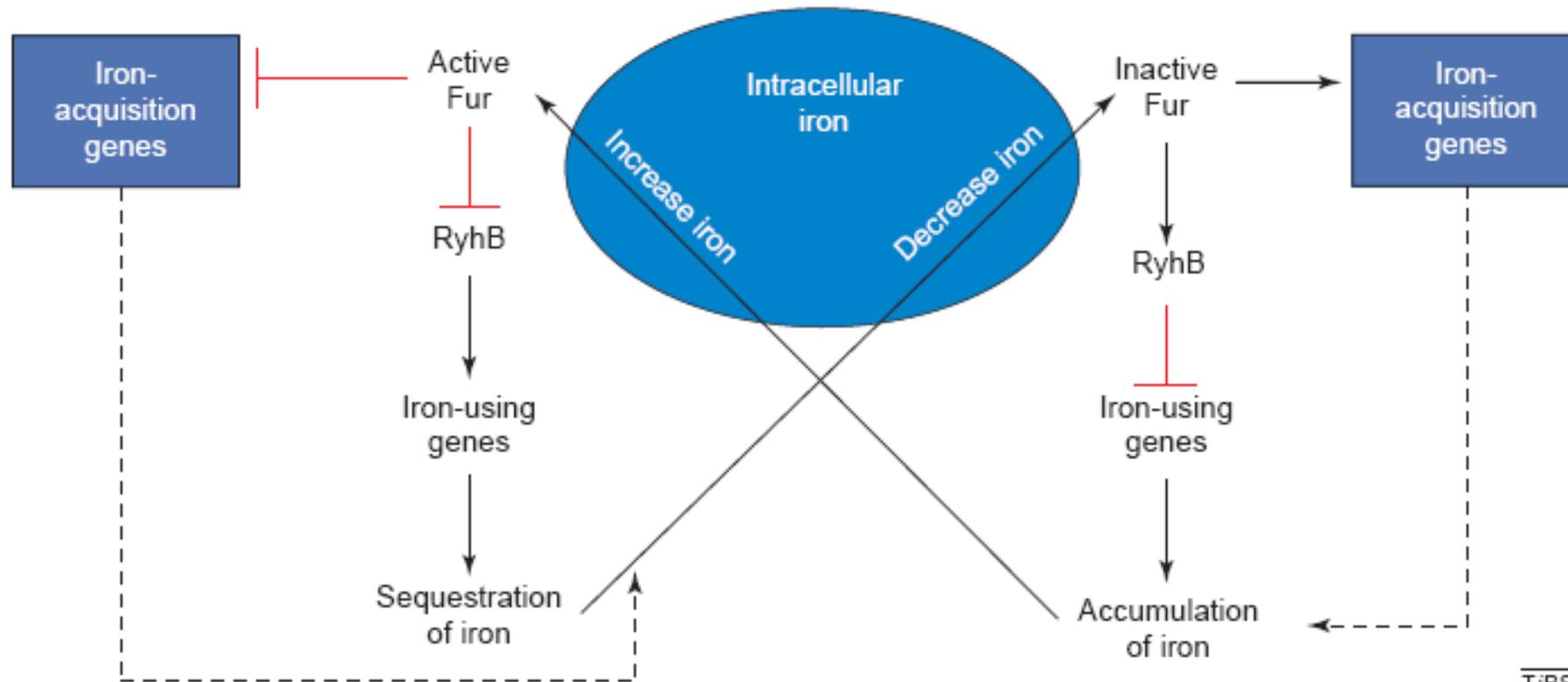


Geni regolati da Fur



Omeostasi del ferro

Un equilibrio ben regolato dell'attività di Fur permette ai batteri di mantenere l'omeostasi del ferro



Fur in *Salmonella*

In *Salmonella enterica* la concentrazione del ferro è associata all'espressione del T3SS

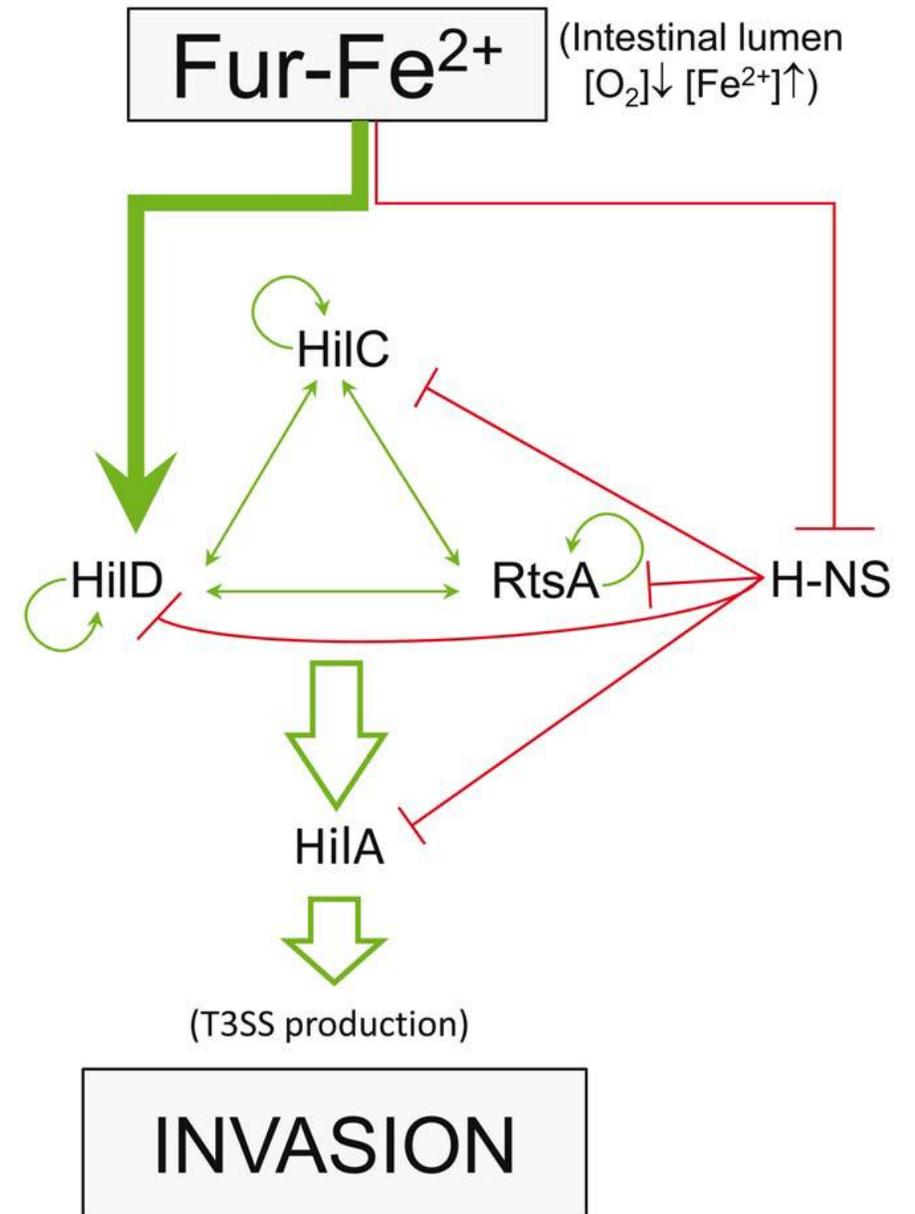
Nel lumen dell'intestino tenue Fe^{2+} è abbondante



La concentrazione di Fe^{2+} rappresenta un segnale che permette al patogeno di percepire la propria posizione all'interno dell'ospite



molti dei geni di *Salmonella* rimangono silenti finché il batterio è confinato nel lumen intestinale mentre i geni per l'invasione vengono espressi
Es. HilD e SPI1



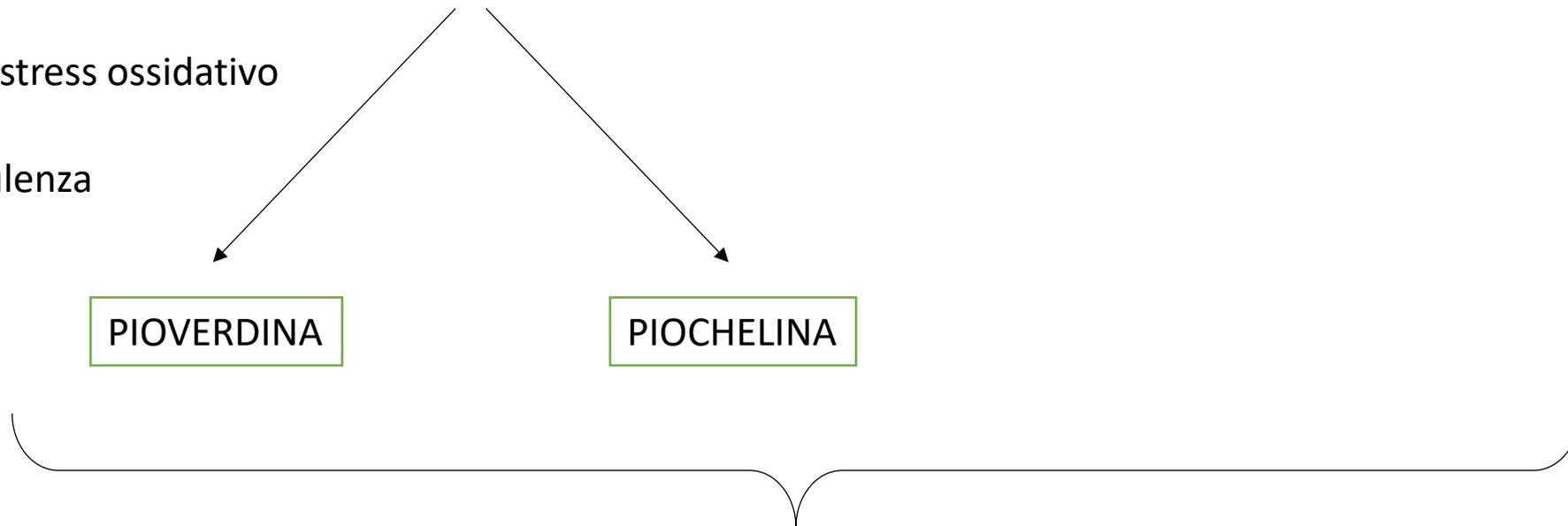
Fur in *Pseudomonas aeruginosa*



Esempio paradigmatico di microrganismo nel quale l'assimilazione e il metabolismo del ferro sono processi altamente regolati

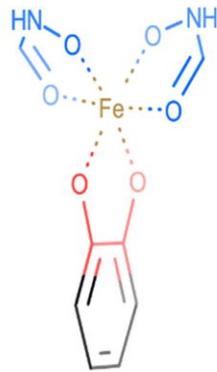
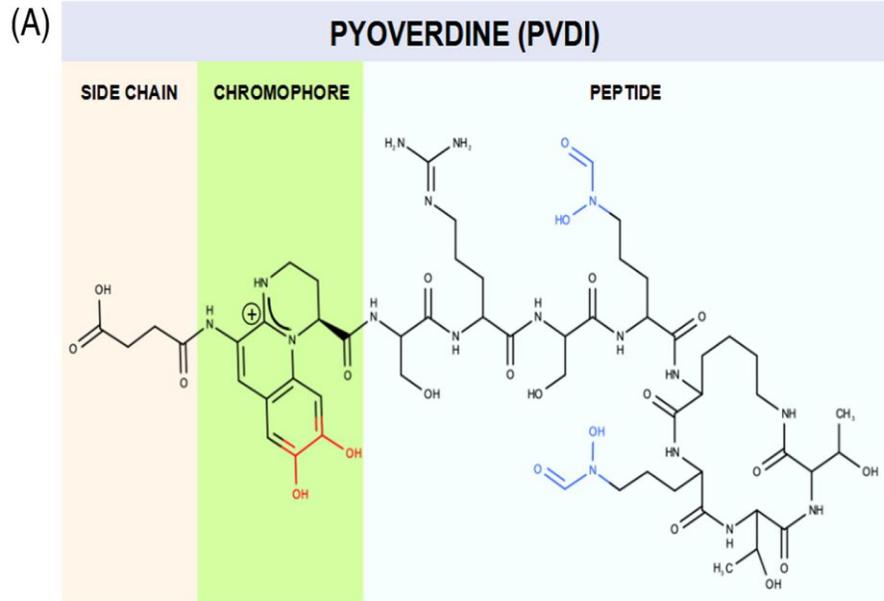
La disponibilità di ferro ha una influenza considerevole sul profilo globale di espressione genica → i geni la cui espressione risulta influenzata, direttamente o indirettamente, da Fur rappresentano il 4% dell'intero genoma di *P. aeruginosa*. Tra questi:

- Metabolismo del ferro → sintesi di siderofori, recettori per l'importo di ferro, proteine per immagazzinare il ferro
- Risposta allo stress ossidativo
- Fattori di virulenza



L'attività del regolatore Fur ha un ruolo chiave nella crescita e nella patogenesi di *P. aeruginosa*

Pioverdina in *Pseudomonas aeruginosa*



Side chain modifications

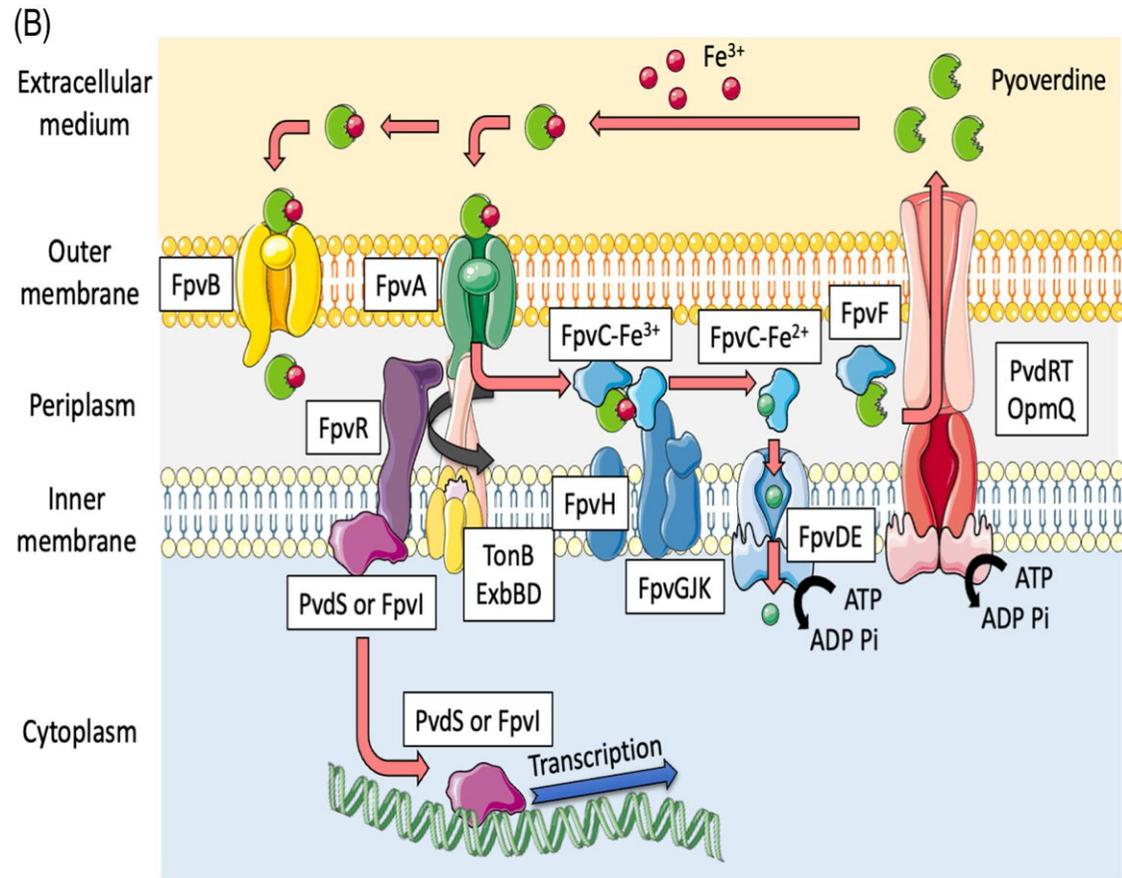
- succinamide: $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$
- succinic: $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
- α -ketoglutaric: $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

Peptide sequence

- PVDI: D-Ser-L-Arg-L-fOHOrn-[L-Lys-L-fOHOrn-L-Thr-L-Thr]
- PVDII: D-Ser-L-fOHOrn-L-Orn-Gly-D-Thr-L-Ser-L-cOHOrn
- PVDIII: D-Ser-Dab-L-fOHOrn-L-Gln-D-Gln-L-fOHOrn-Gly
- PVDIV: D-Ser-Dab-L-fOHOrn-L-Gln-L-fOHOrn-Gly

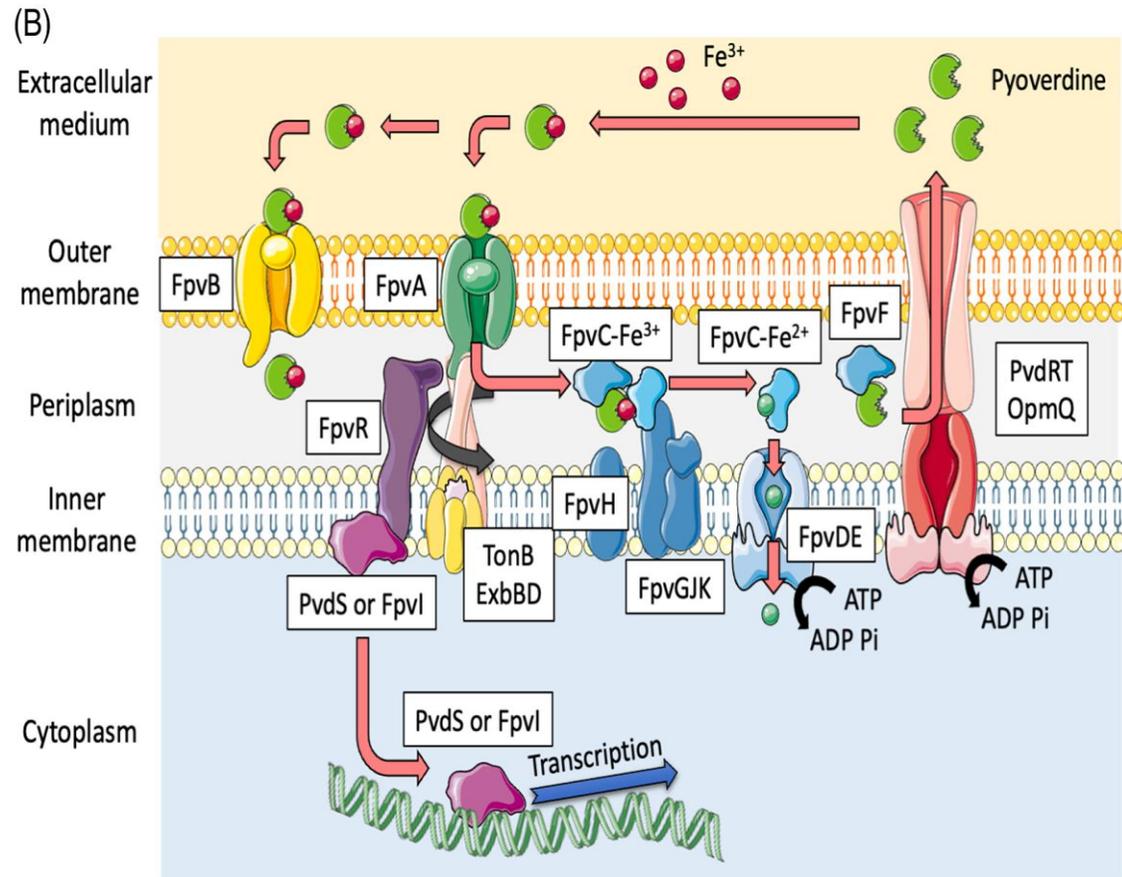
- È il principale sistema di acquisizione del ferro durante il processo infettivo
- Fa parte di un gruppo di siderofori verde-fluorescenti prodotti dalle diverse specie del genere *Pseudomonas*
- È composto da:
 - un cromoforo fluorescente, altamente conservato
 - catena peptidica variabile nelle diverse pioverdine
 - gruppi idrossammati altamente affini al legame con il Fe^{3+}

Sistema di uptake della pioverdina



- 2 trasportatori dipendenti da TonB (TBDT) sono responsabili dell'importo del complesso pioverdina-Fe³⁺ : **FpvA** e **FpvB**;
- Il complesso pioverdina-Fe³⁺ viene dissociato
- **FpvG**, proteina associata alla membrana interna, riduce Fe³⁺ a Fe²⁺ mentre la pioverdina non subisce nessuna modifica chimica
- Fe²⁺ viene legato dalla proteina periplasmatica **FpvC** che probabilmente porta il metallo al trasportatore ABC **FpvDE**, permettendo il passaggio di Fe²⁺ nel citoplasma
- FpvF si lega all'apo-pioverdina dopo il rilascio del ferro e la porta alla pompa di efflusso **PvdRT OpmQ** per il riciclo del sideroforo nel mezzo extracellulare.

Regolazione in risposta all'importo di pioverdina-Fe³⁺



Schalk and Perraud, 2022

Legame della pioverdina-Fe³⁺ al sito di legame di **FpvA**

interazione tra il dominio di segnalazione del trasportatore e la regione periplasmica del fattore antisigma **FpvR**

FpvR rilascia quindi i due fattori sigma:

FpvI

attiva la trascrizione di *fpvA*

PvdS

attiva la trascrizione di tutti gli altri geni coinvolti nella biosintesi di pioverdina e nell'assorbimento del ferro tramite pioverdina

Pathogenic Infection

Exposure

Adhesion

Invasion

Colonization

Key

- ▲ Toxin
- Pathogen
- Adhesin
- Receptor

Epithelial cell

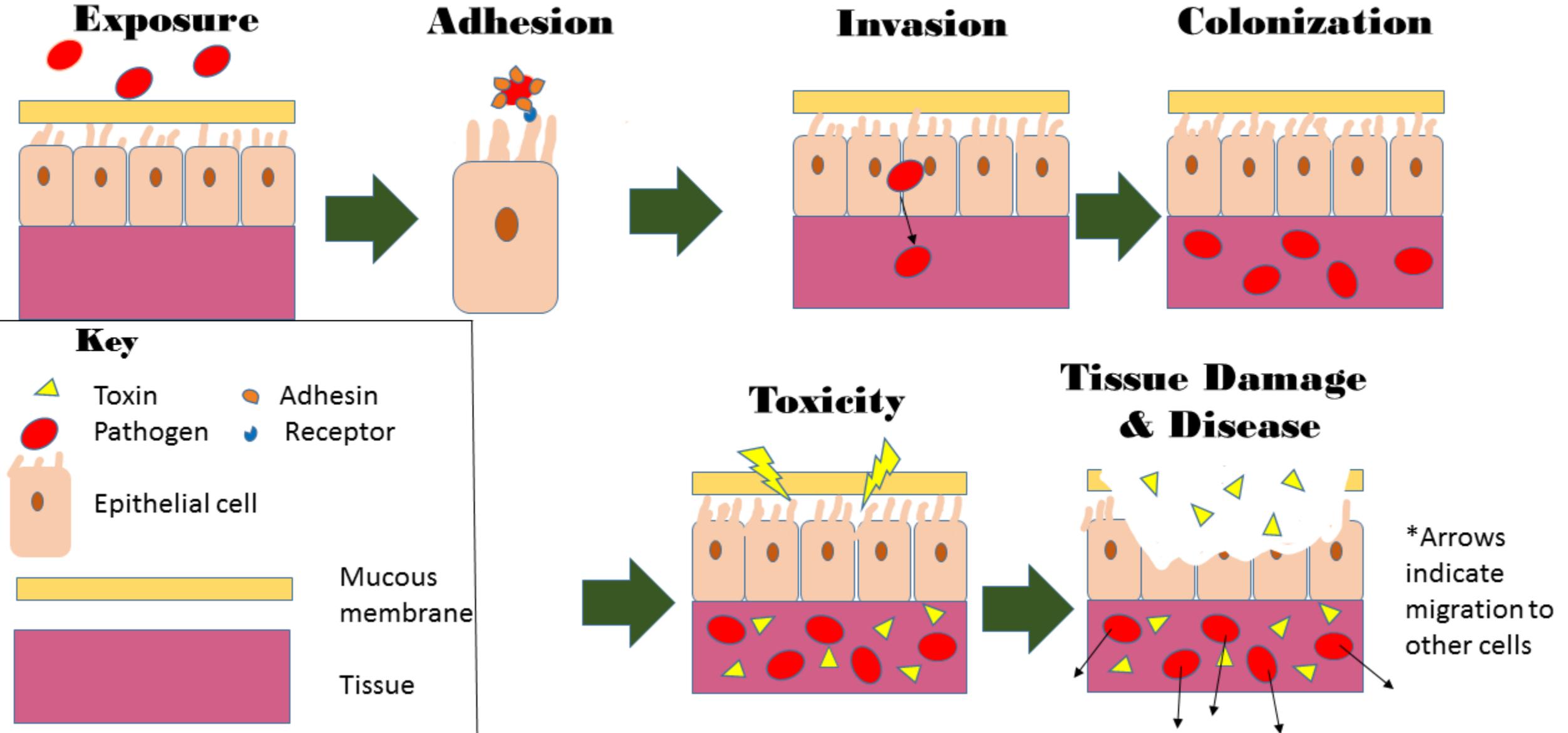
Mucous membrane

Tissue

Toxicity

Tissue Damage & Disease

*Arrows indicate migration to other cells



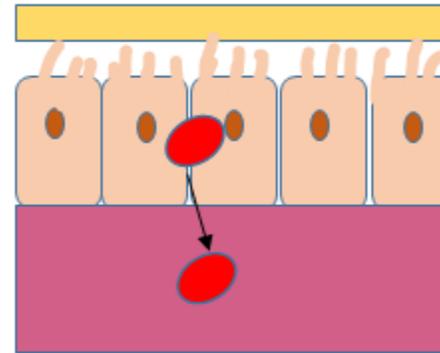
Pathogenic Infection

La patogenesi è promossa dalla produzione di:

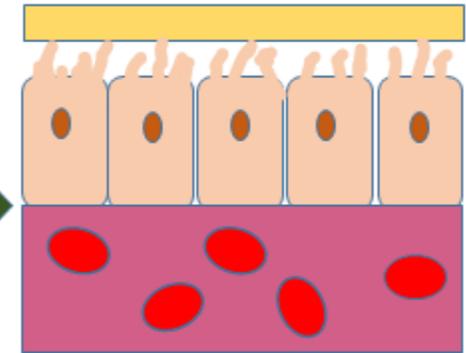
FATTORI DI VIRULENZA

TOSSINE

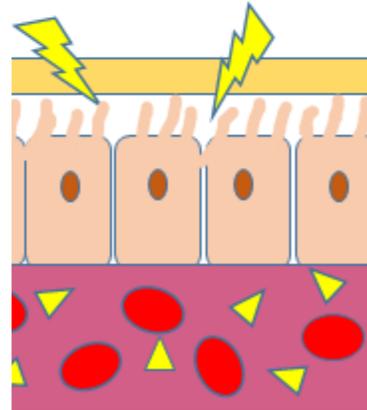
Invasion



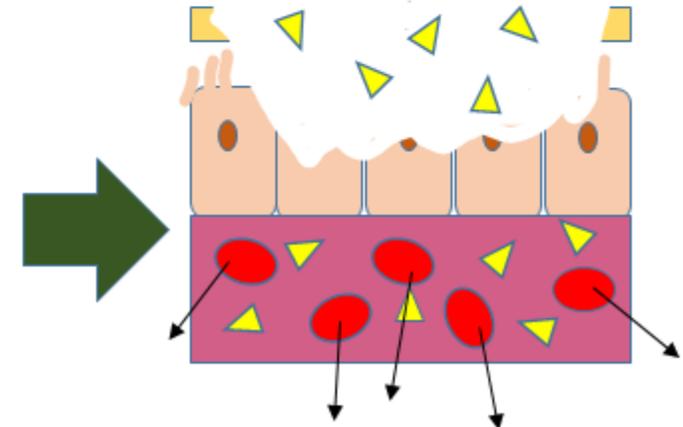
Colonization



Toxicity



Tissue Damage & Disease



*Arrows indicate migration to other cells

FATTORI DI VIRULENZA

Molecole che aiutano il batterio a colonizzare l'ospite

Fattori di virulenza citosolici
facilitano il batterio a subire un rapido
adattamento metabolico e rapidi
cambiamenti fisiologici e morfologici.

Fattori di virulenza
associati alla membrana
aiutano il batterio
nell'adesione e nell'evasione
della cellula ospite.

Fattori di virulenza secretori
aiutano il batterio a superare la
risposta immunitaria innata e
adattativa dell'ospite. In patogeni
extracellulari, i fattori di virulenza
secretori agiscono sinergicamente per
uccidere le cellule dell'ospite.

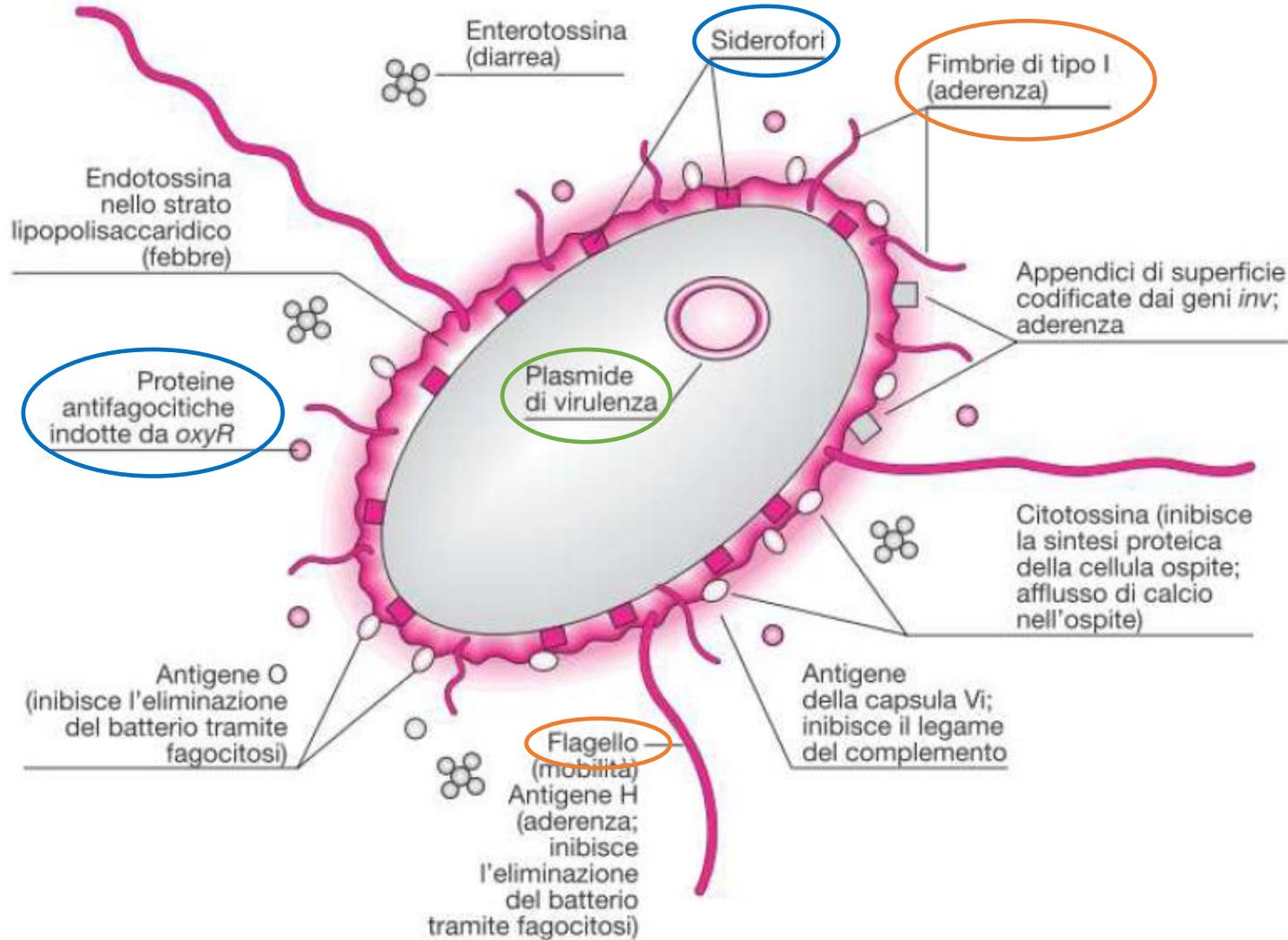
L'esito di un'infezione da *Salmonella* è determinato dallo stato dell'ospite e dallo stato del batterio. Mentre l'età, i fattori genetici e ambientali influenzano principalmente lo stato dell'ospite, lo stato del batterio è determinato dai cosiddetti fattori di virulenza.

Table 2 Main virulence factors, DNA location, and main functions

Virulence factor	Location	Function
SipA	SPI-1 ^a	Cytoskeleton rearrangement Chemotaxis
SipB	SPI-1	Translocation of effector proteins Macrophage apoptosis impairment
SipC	SPI-1	Chemotaxis Cytoskeleton rearrangement
SptP	SPI-1	Suppression of innate immunity
<i>irr</i> genes	SPI-2	Production of tetrathionate reductase
SpiC	SPI-2	Translocation of effector proteins Survival within SCV ^c
SseB	SPI-2	Formation of macromolecular structures which serves as a translocon
SseC	SPI-2	Formation of macromolecular structures which serves as a translocon
SseD	SPI-2	Formation of macromolecular structures which serves as a translocon
SseF	SPI-2	SCV perinuclear migration Microtubule aggregation SIF formation ^b
SseG	SPI-2	SCV perinuclear migration Microtubule aggregation SIF formation
MisL	SPI-3	Long-term persistence
MgtCB	SPI-3	Survival within macrophages
MarT	SPI-3	Activation of MisL expression
SiiE	SPI-4	Adhesion to the epithelium
SopB	SPI-5	Prevents apoptosis of epithelial cells
SigE	SPI-5	Chaperone
SpvR	pSLT	Regulation of <i>spv</i> genes
SpvB	pSLT	Prevents actin polymerization
SpvC	pSLT	Inhibits MAP kinase and immune signaling
Type 1 Fimbriae	Chromosome	Adhesion to the epithelium
SifA	Chromosome	SIF formation SCV maintenance
SseJ	Chromosome	SIF formation
SopE	Chromosome	Induce membrane ruffling in cell cultures
SopE2	Chromosome	Induce membrane ruffling in cell cultures

^aSPI *Salmonella* pathogenicity island

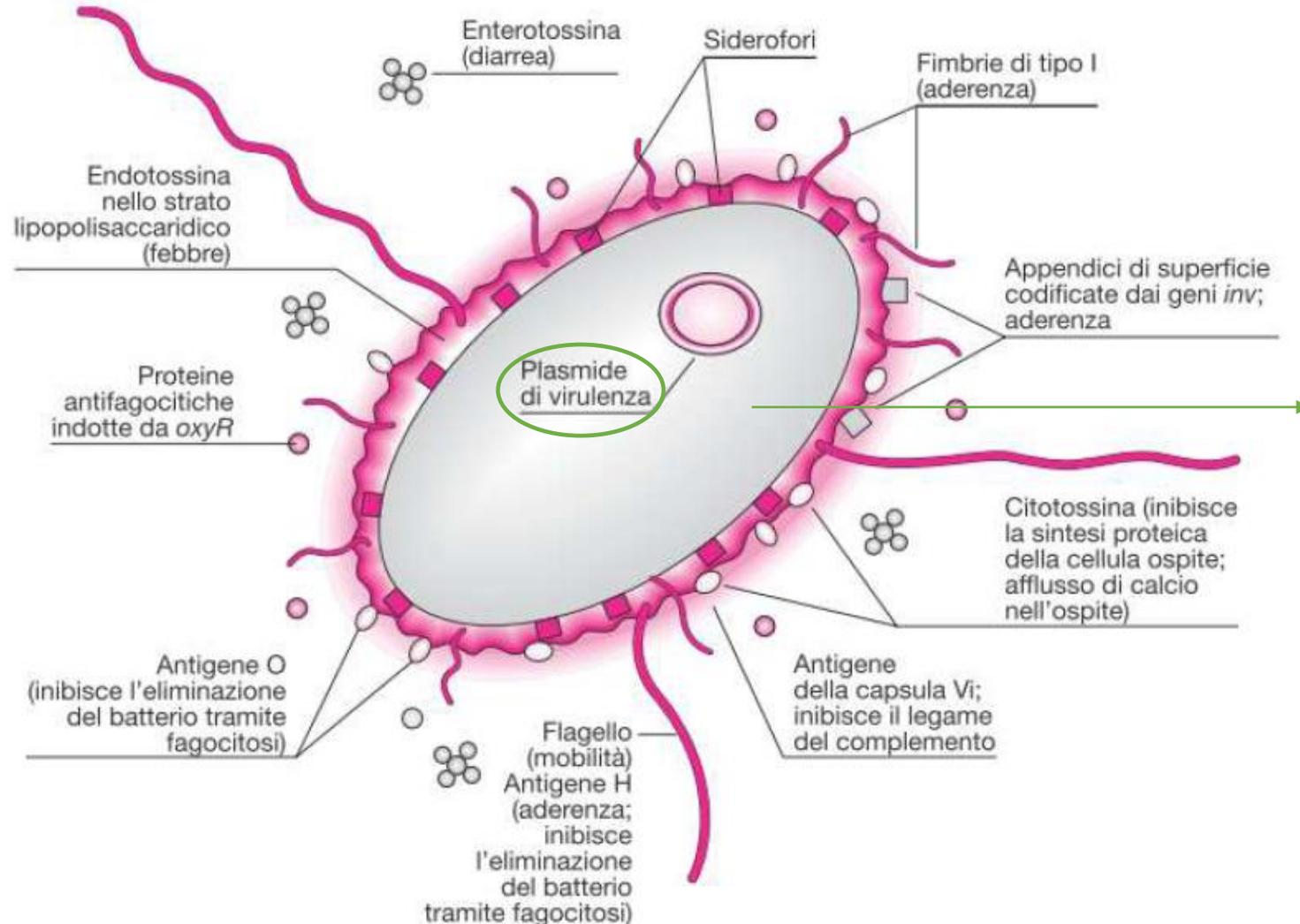
Salmonella



Fattori di virulenza citosolici

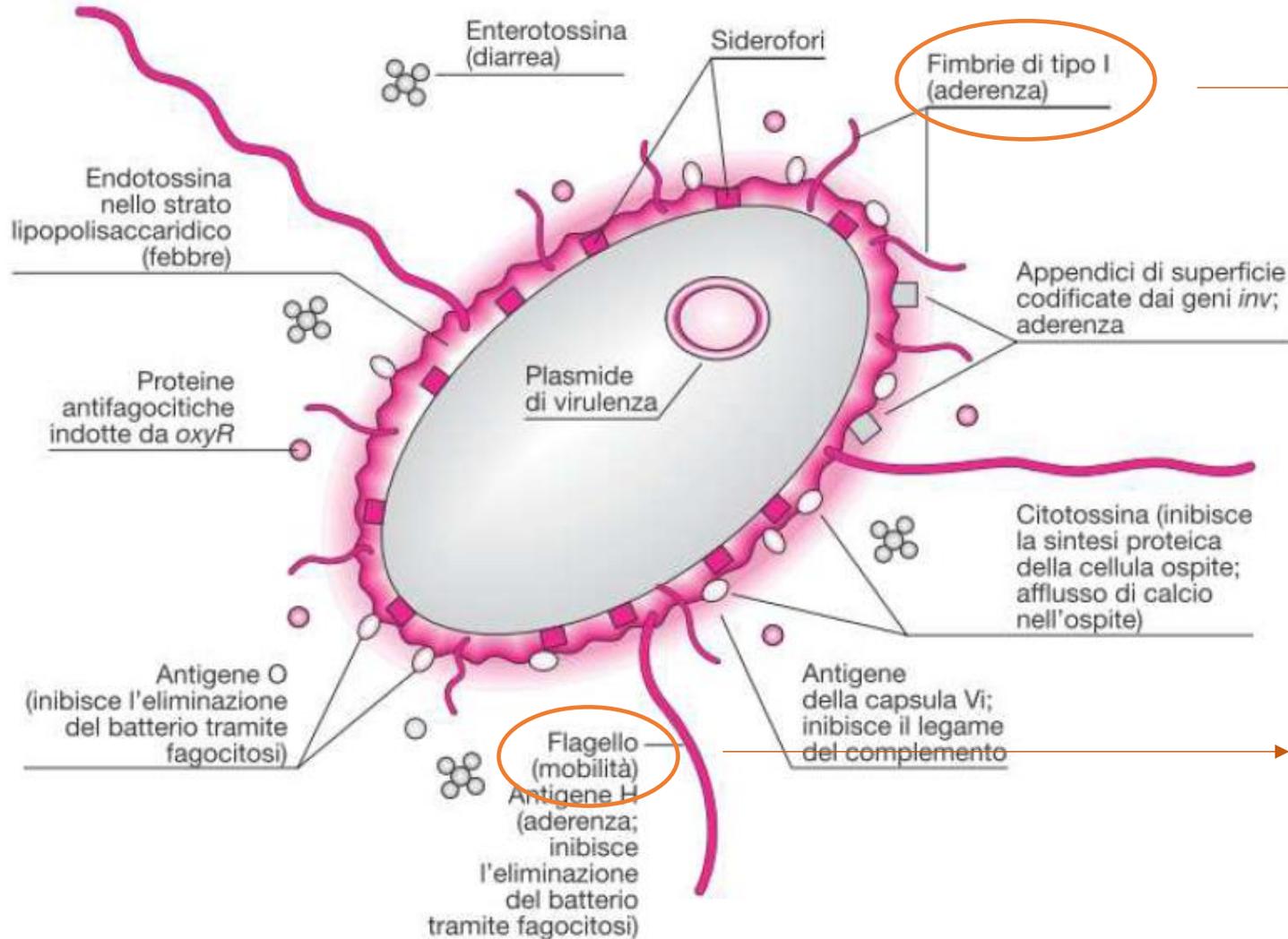
Fattori di virulenza associati alla membrana

Fattori di virulenza secretori

Salmonella

Plasmide di virulenza a basso numero di copie (1-2 copie per cellula) di dimensioni variabili a seconda del sierotipo (da 50 kb a 110 kb). Il plasmide di virulenza ospita i geni codificanti per i principali fattori di virulenza di *Salmonella*. Ad esempio, il locus *spv* (del plasmide di virulenza di *Salmonella*) di 7,8 kb che ospita 5 geni *spv* RABCD che hanno un ruolo nella moltiplicazione intracellulare di *Salmonella*.

Salmonella: fattori di virulenza associati alla membrana

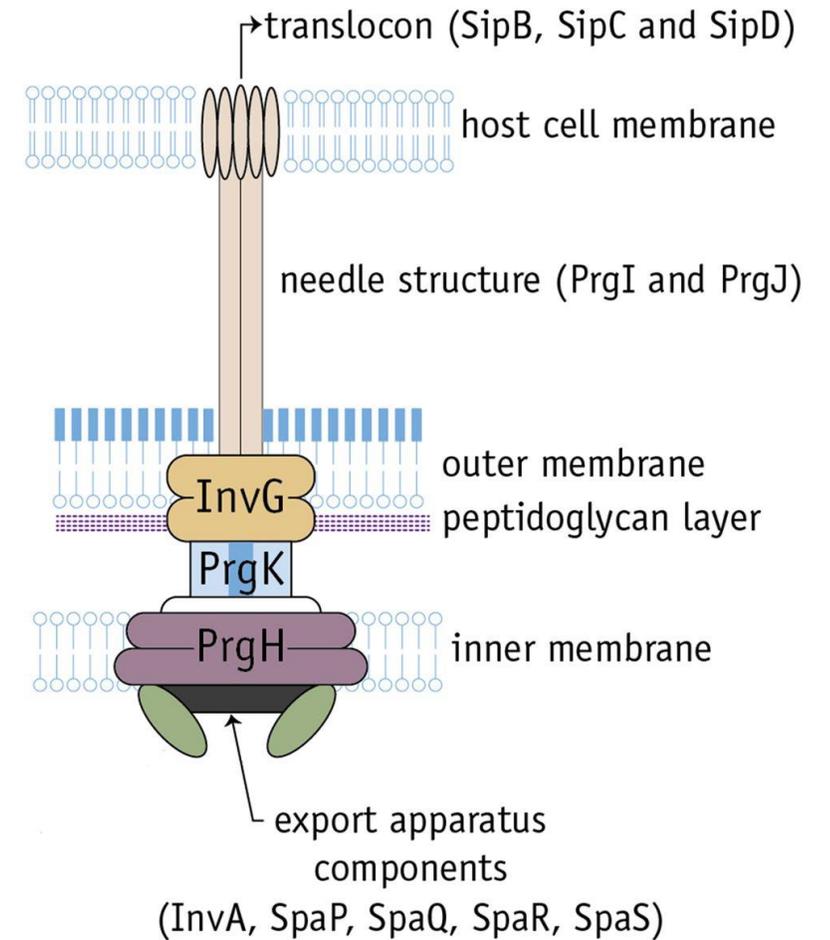
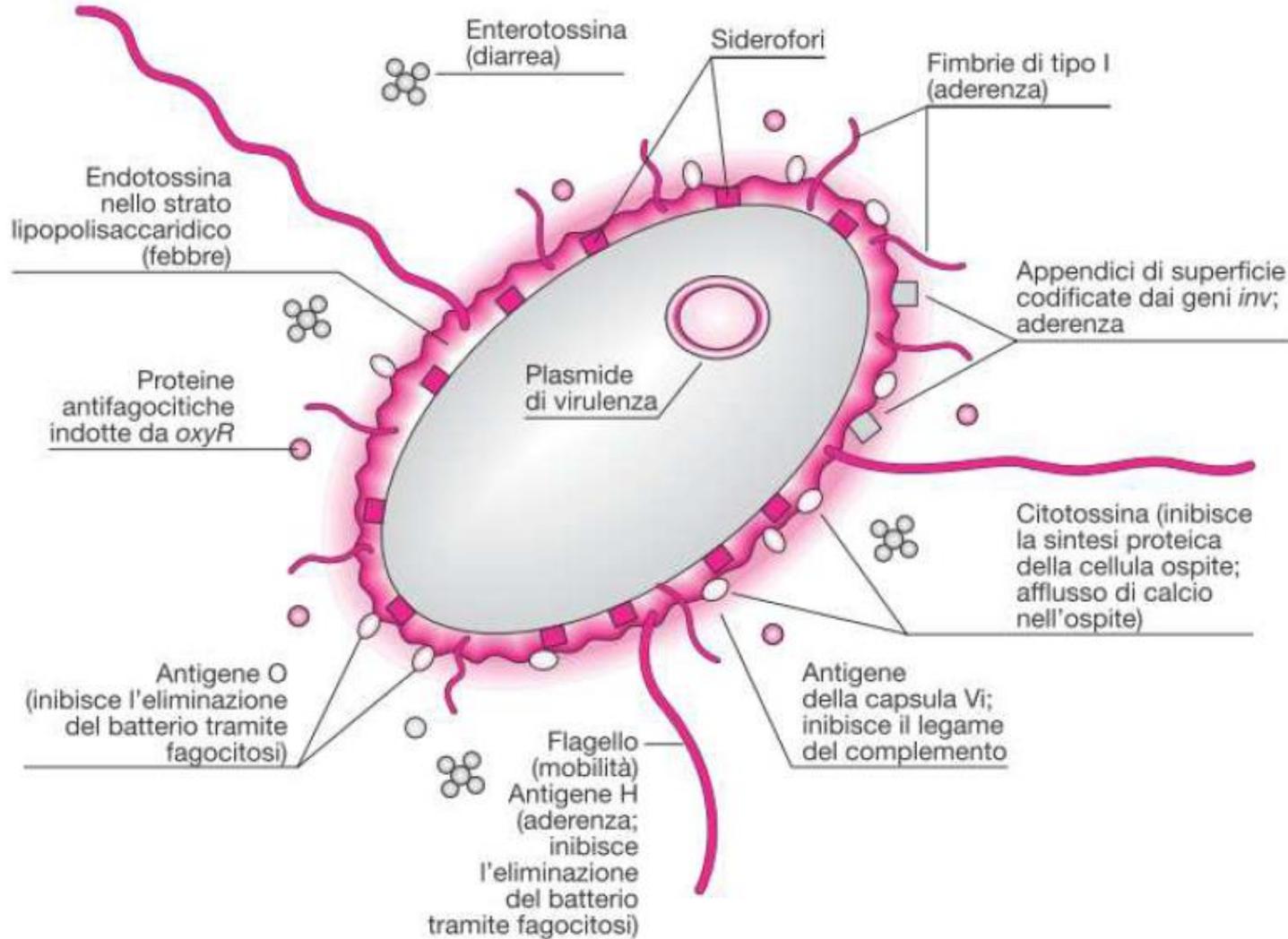


Salmonella ha 13 loci predetti per le fimbrie, molti dei quali sono indotti in vivo e sono necessari per:

- formazione del biofilm,
- adesione alle cellule dell'ospite,
- colonizzazione,
- non per la sopravvivenza intracellulare.

La motilità flagellare può aumentare l'invasività di *Salmonella*

Salmonella: fattori di virulenza secretori

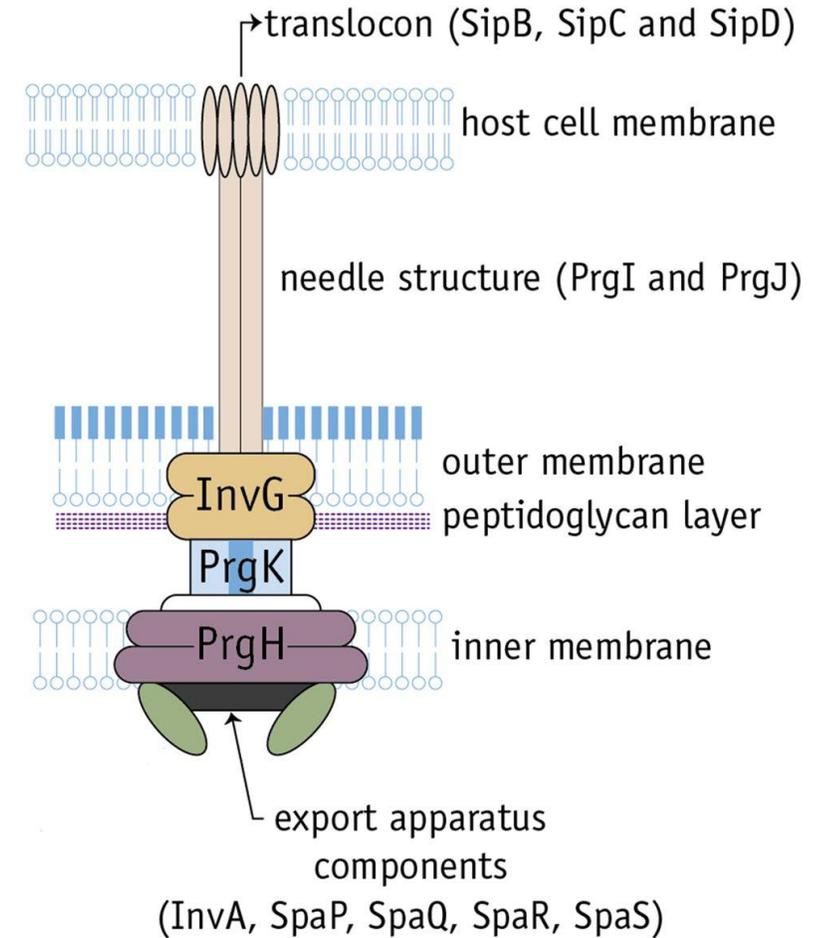


Salmonella: fattori di virulenza secretori

Salmonella possiede un apparato molecolare chiamato Sistema di secrezione di tipo III (T3SS) responsabile di iniettare proteine effettrici nel citosol delle cellule ospiti.

Gli effettori esportati alterano le funzioni cellulari come la struttura del citoscheletro, il trasporto di membrana, la trasduzione del segnale e l'espressione di citochine.

Questi cambiamenti permettono l'invasione e la permanenza del batterio nella cellula infettata.



TOSSINE

Contribuiscono al danno tissutale provocato dai batteri

ESOTOSSINE

Proteine extracellulari ad azione estremamente tossica secrete principalmente da batteri Gram-positivi e solo da alcuni batteri Gram-negativi.

ENTEROTOSSINE

Esotossine che agiscono sull'intestino tenue provocando un'abbondante secrezione di fluidi nel lumen intestinale, che porta a vomito e diarrea.

ENDOTOSSINE

Componenti lipopolisaccaridiche (LPS), termostabili, della membrana esterna dei batteri Gram-negativi, liberate nella circolazione dell'ospite a seguito della lisi della cellula batterica.

ESOTOSSINE

- Rilasciate nell'ambiente circostante da microrganismi in crescita, diffondendo quindi dal focolaio di infezione verso altre parti del corpo.
- Si dividono in 3 categorie:
 1. **Tossine citolitiche** → sono enzimi che attaccano i costituenti cellulari come la membrana esterna delle cellule animali, provocandone lisi e morte. Esempio: tossine che agiscono sui globuli rossi del sangue, *emolisine*; tossine che agiscono sui fosfolipidi della membrana citoplasmatica della cellula ospite, *fosfolipasi*.
 2. **Tossine A-B** → costituite da due subunità legate covalentemente: componente B si lega ad un recettore presente sulla superficie cellulare, in modo da permettere il trasferimento della subunità A attraverso la membrana della cellula bersaglio. Esempio: *tossina difterica, tetanica e botulinica*.
 3. **Tossine superantigeniche** → stimolano un elevato numero di cellule deputate alla risposta immunitaria, provocando così una estesa reazione infiammatoria.

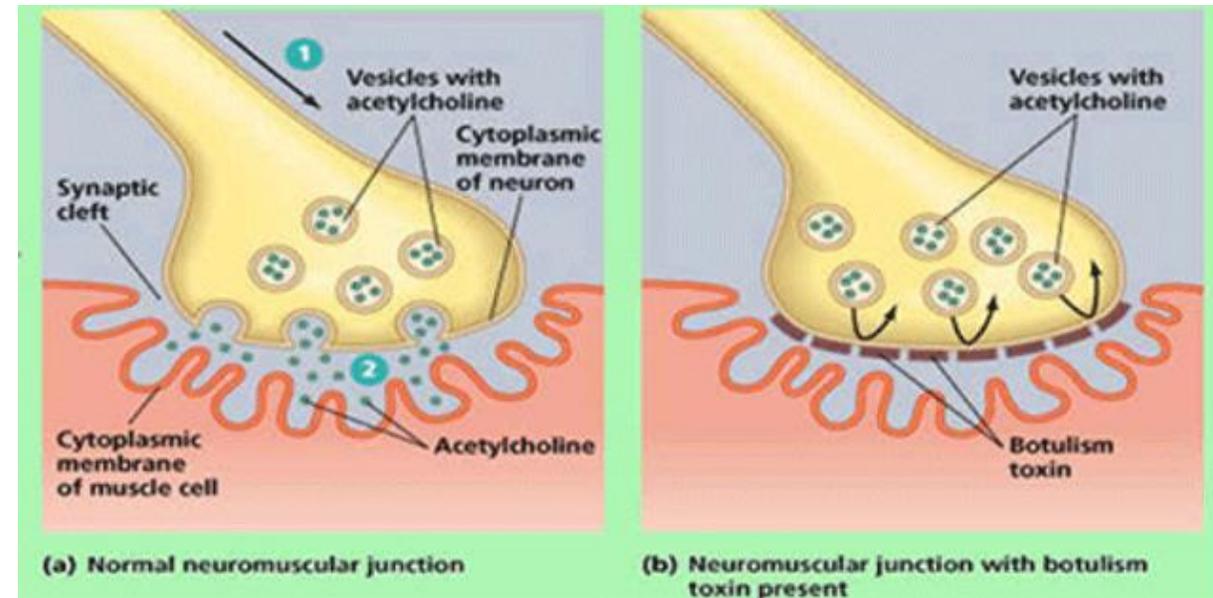
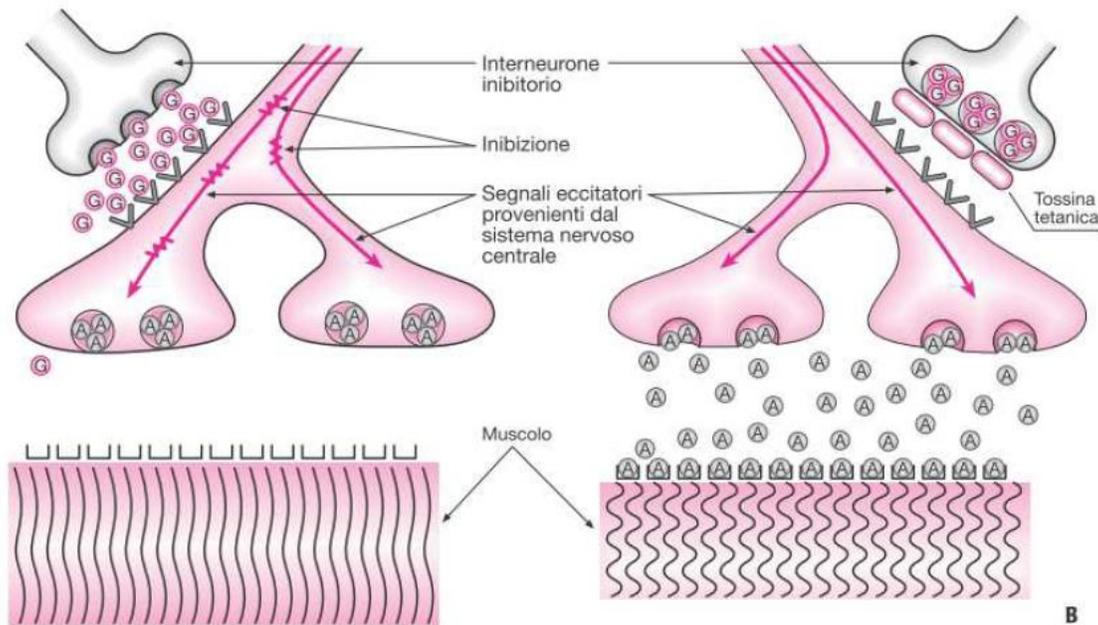
ESOTOSSINE

Tossine A-B: tetanica e botulinica

Clostridium tetani

- Neurotossine: bloccano il rilascio di neurotrasmettitori implicati nel controllo della contrazione muscolare → effetti diversi
- Batteri del suolo anaerobi obbligati

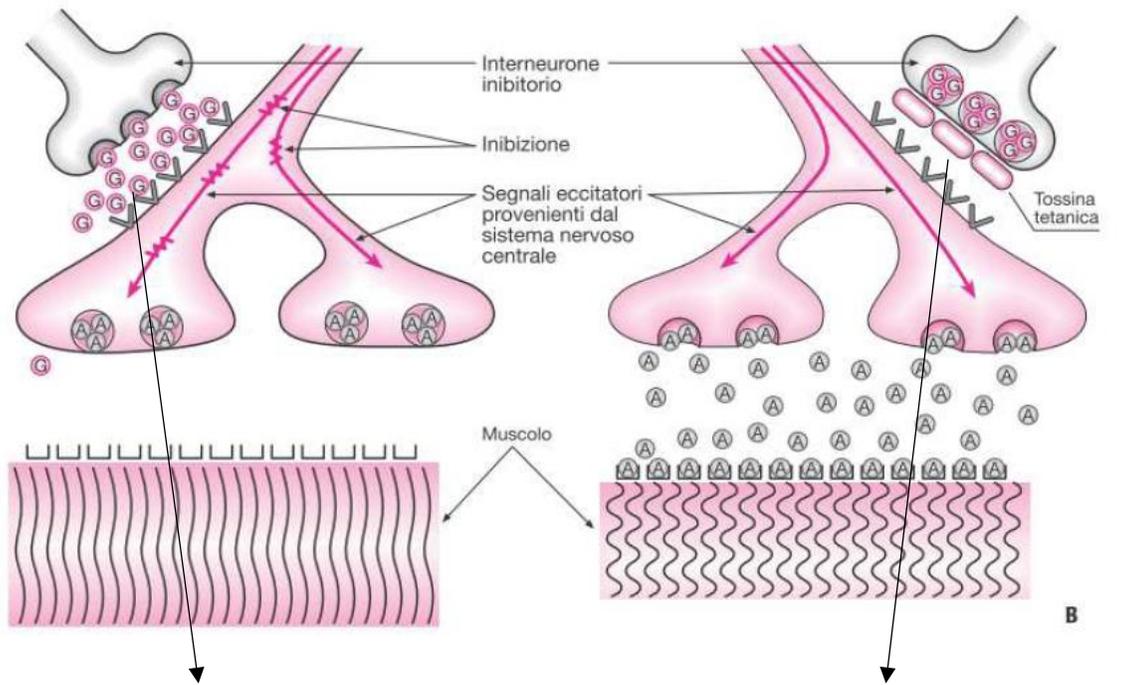
Clostridium botulinum



Tossine A-B: tetanica e botulinica

Clostridium tetani

- Neurotossine: bloccano il rilascio di neurotrasmettitori implicati nel controllo della contrazione muscolare → effetti diversi
- Batteri del suolo anaerobi obbligati



Rilascio di glicina blocca la liberazione di acetilcolina = rilassamento muscolare

Rilascio di glicina è bloccato e acetilcolina è liberata = contrazione muscolare incontrollata

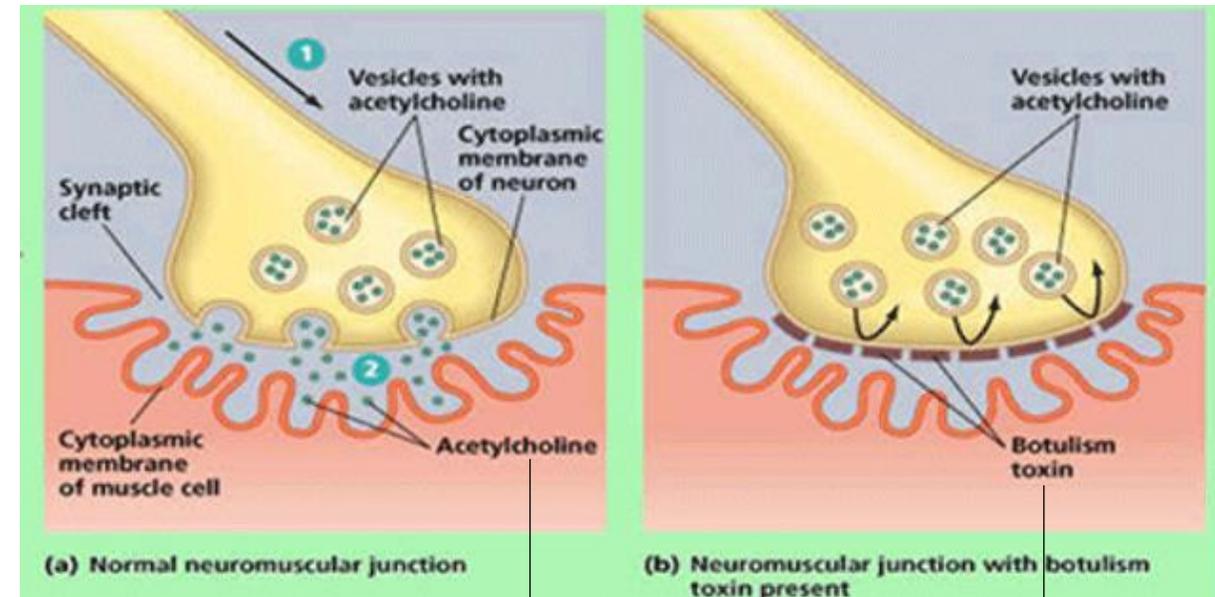
- Cresce in ferite profonde che ricreano un ambiente anaerobio;
- Produce una tossina che può diffondere attraverso le cellule nervose e causare paralisi spastica con muscolo colpito costantemente contratto;
- Lega i lipidi gangliosidici a livello delle terminazioni degli interneuroni inibitori bloccando il rilascio di glicina (neurotrasmettore inibitorio) → avviene il rilascio continuo di acetilcolina da parte dei neuroni motori che porta a sua volta ad una contrazione muscolare incontrollata

Tossine A-B: tetanica e botulinica

- Neurotossine: bloccano il rilascio di neurotrasmettitori implicati nel controllo della contrazione muscolare → effetti diversi
- Batteri del suolo anaerobi obbligati

Clostridium botulinum

- Raramente è in grado di crescere nell'organismo animale ma può crescere e produrre la tossina in alimenti conservati non correttamente;
- La tossina si lega alle membrane presinaptiche a livello delle terminazioni dei motoneuroni stimolatori, in corrispondenza delle giunzioni neuromuscolari, e inibisce il rilascio di acetilcolina (neurotrasmettitore) → il muscolo non riceve il segnale stimolatorio e l'inibizione che ne consegue porta alla paralisi flaccida.

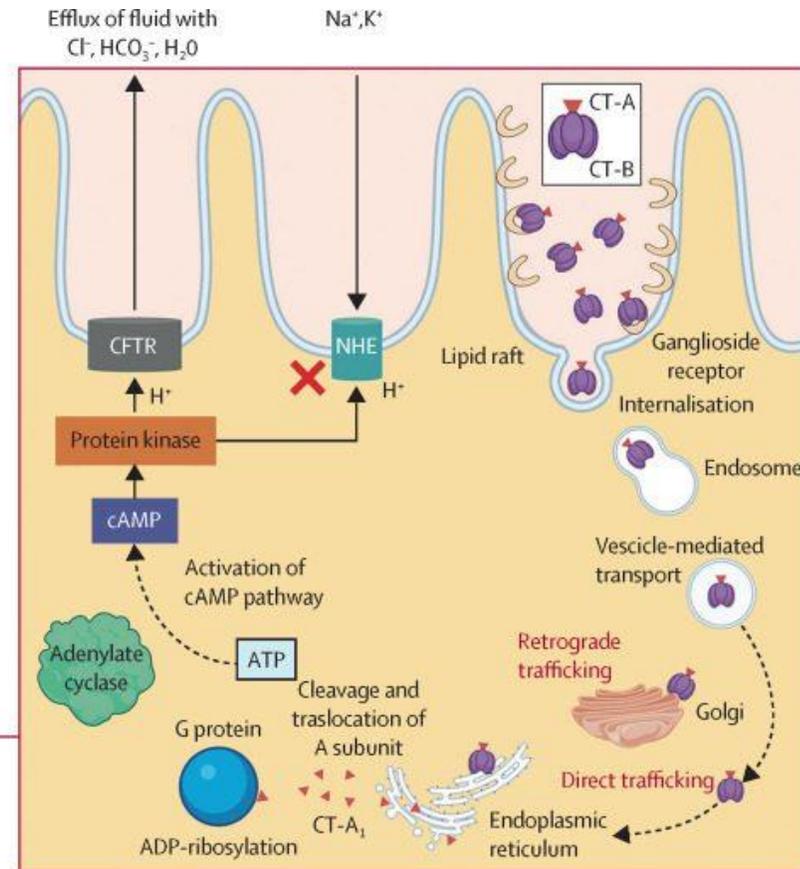
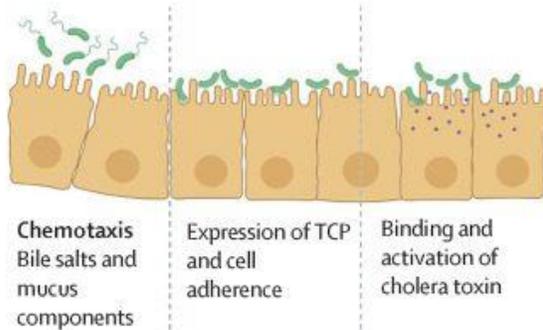
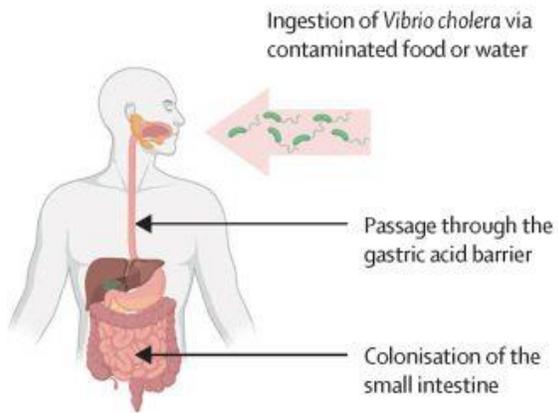


Induce la contrazione delle fibre muscolari

Blocca il rilascio di Acetilcolina inibendo la contrazione

ENTEROTOSSINE

La tossina colerica



- Prodotta da *Vibrio cholerae*, agente eziologico del colera
- Tossina A-B: subunità B lega il ganglioside GM1 presente sulla membrana delle cellule epiteliali; subunità A viene trasferita nel citoplasma della cellula bersaglio
- Subunità A attiva l'enzima cellulare adenilatociclastasi che converte l'ATP in AMP ciclico → l'aumento dei livelli di AMP ciclico provoca una secrezione attiva di ioni cloro e bicarbonato da parte delle cellule della mucosa nel lumen intestinale. → massiva perdita di liquidi, disidratazione e morte.

TOSSINE

Malattia alimentare da *Staphylococcus aureus*

S. aureus cresce negli alimenti; produce tossina



La tossina è ingerita; interagisce con le terminazioni nervose dello stomaco



Sintomi:
vomito, dolore addominale

Botulismo

Clostridium botulinum cresce negli alimenti; produce tossina



La tossina è ingerita; circola nel sangue verso i neuroni



Sintomi:
paralisi flaccida

Tetano

C. tetani cresce nelle ferite; produce tossina



La tossina penetra nel sangue; si dirige verso i neuroni



Sintomi:
paralisi spastica

Difterite

Corynebacterium diphtheriae cresce nel cavo orofaringeo; produce tossina



La tossina penetra nel sangue; si sposta ai vari organi (soprattutto cuore)



Sintomi:
insufficienza cardiaca

Shock settico da *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes cresce nelle ferite



I batteri penetrano nel sangue; producono tossine



Sintomi:
febbre, eruzione, shock