

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 sangunolente 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>

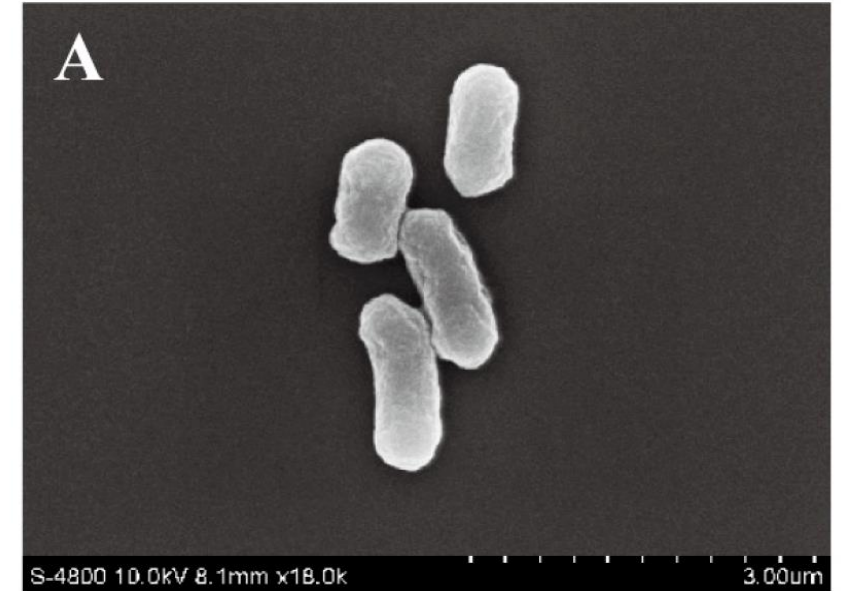
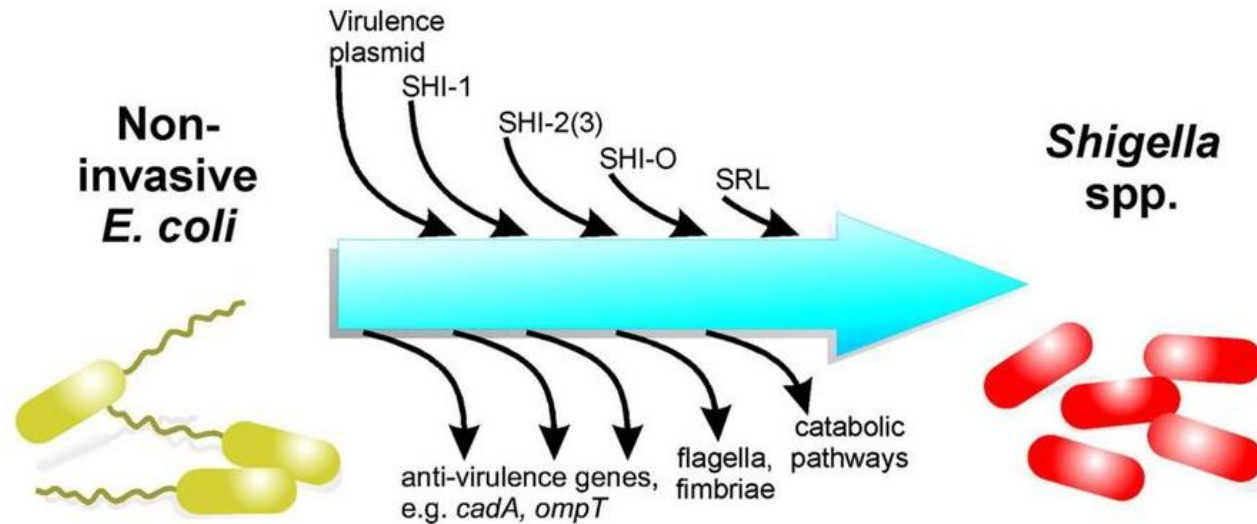


Immagine a microscopio elettronico a scansione a emissione di campo (FESEM) Bai et al 2022. ,

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.

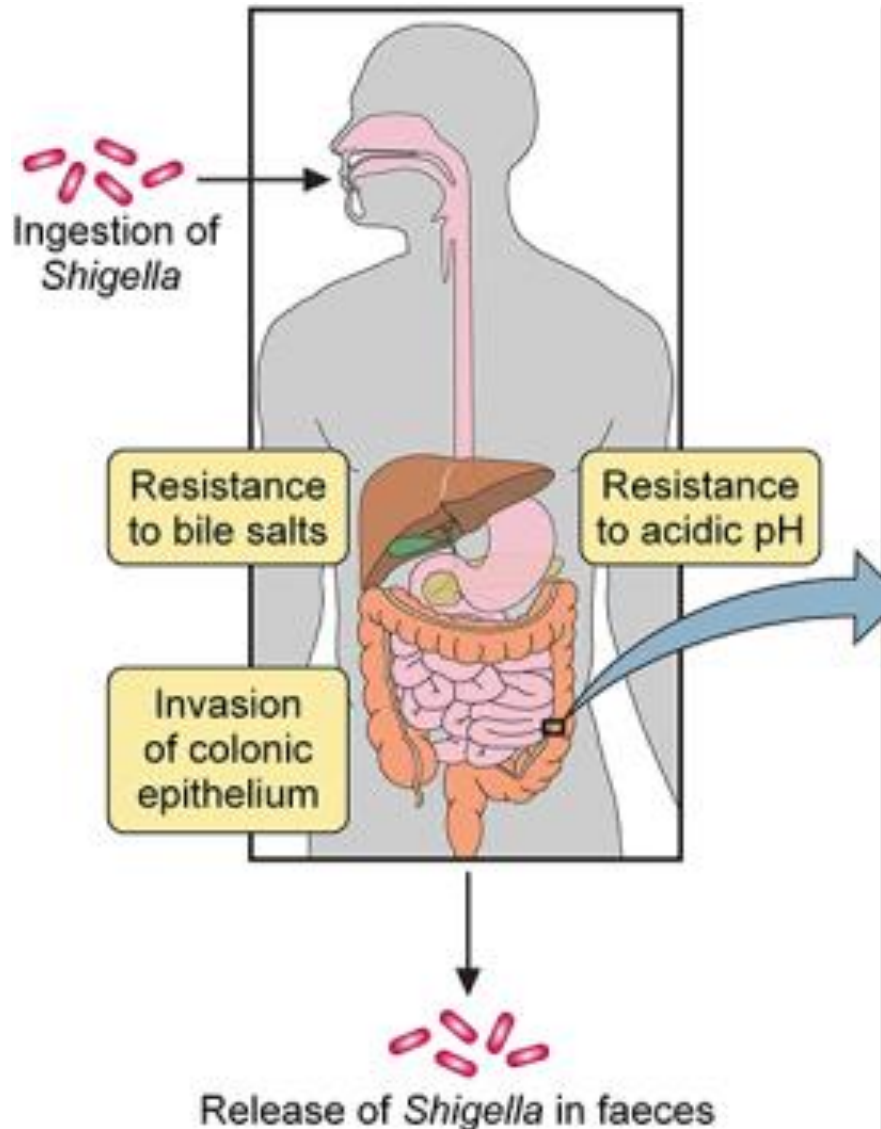
➤ Perdita di funzione

- 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 decarbossilas
 - *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



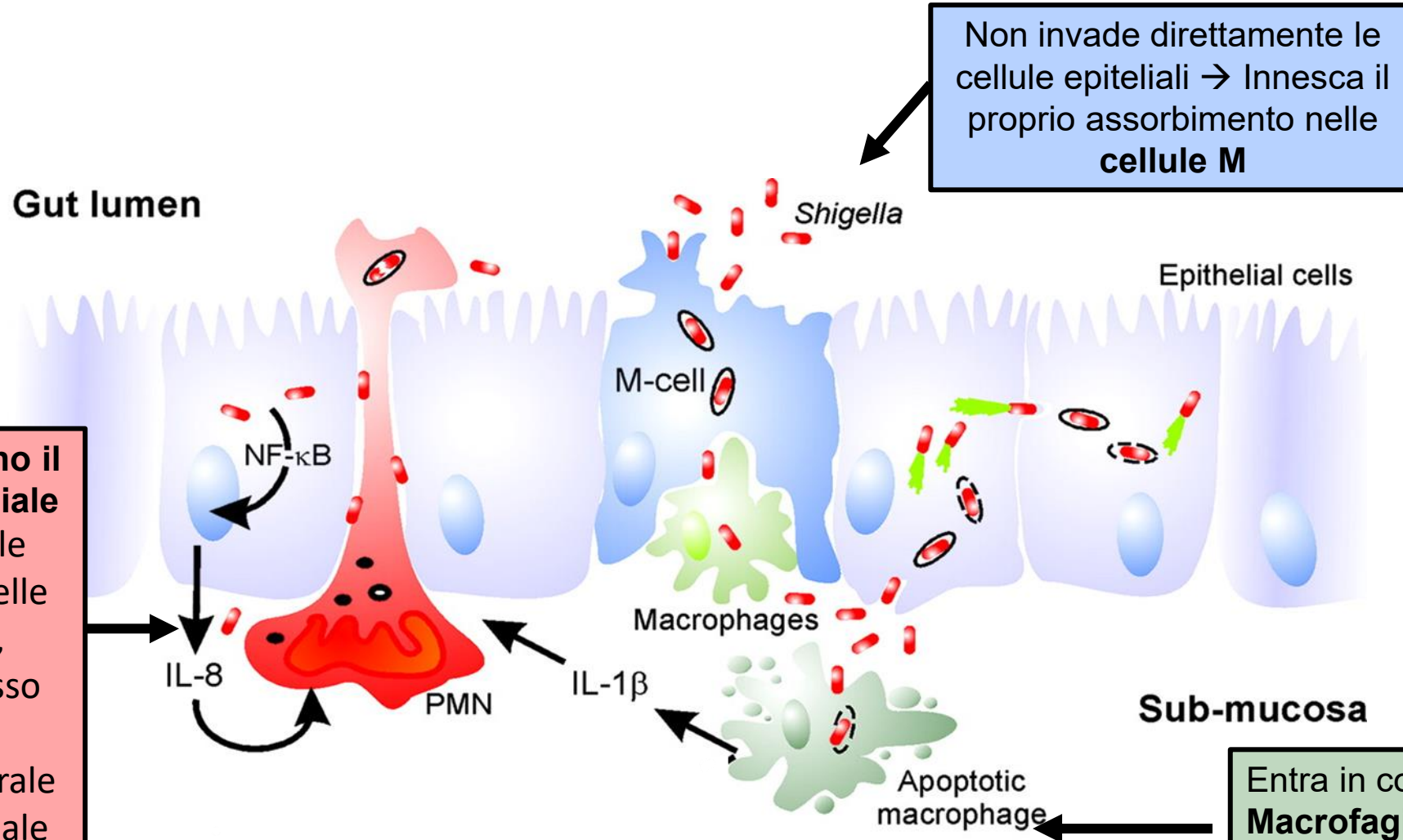
Entrando nel corpo umano, *Shigella* attraversa:

- 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*...)

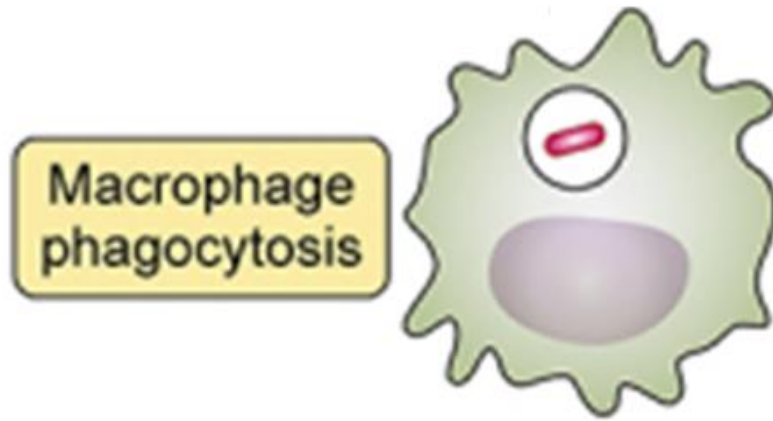
Patogenesi: Attraversamento dello strato epiteliale



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

Entra in contatto con i **Macrofagi** inducendone l'apoptosi con conseguente rilascio di **citochine proinfiammatorie** e richiamo di cellule polimorfonucleate (PMC)

Patogenesi: La fuga dai macrofagi



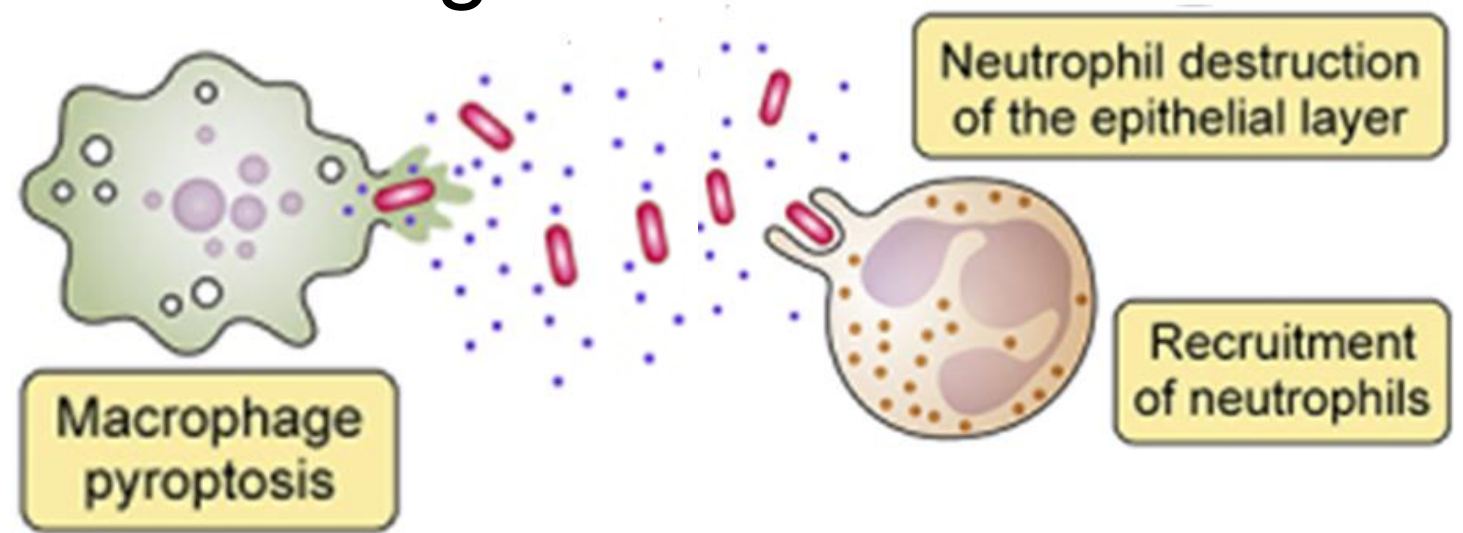
I macrofagi fagocitano i batteri che vengono sequestrati all'interno dei vacuoli



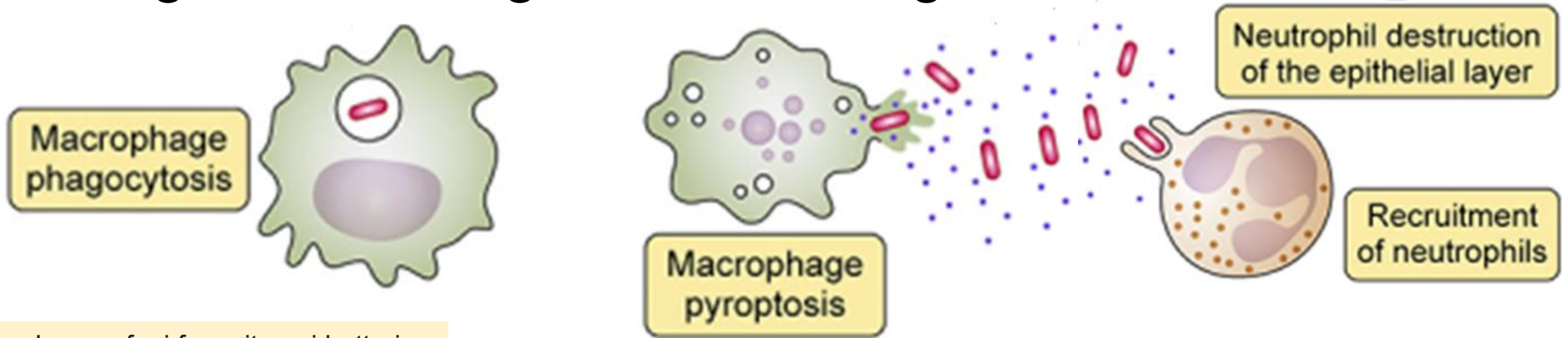
Shigella utilizza i fattori IpaB-ipaC del **T3SS** per **sfuggire dal** per **sfuggire al vacuolo**



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



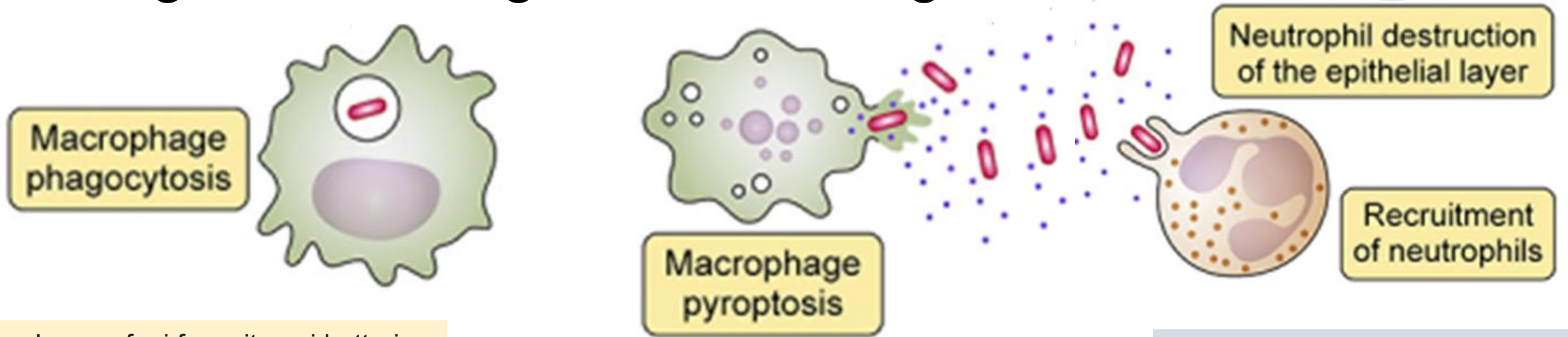
IpaB forma dei pori e consente l'afflusso di potassio e conseguente rottura del fagosoma con rilascio del contenuto vacuolare nel citosol

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



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**



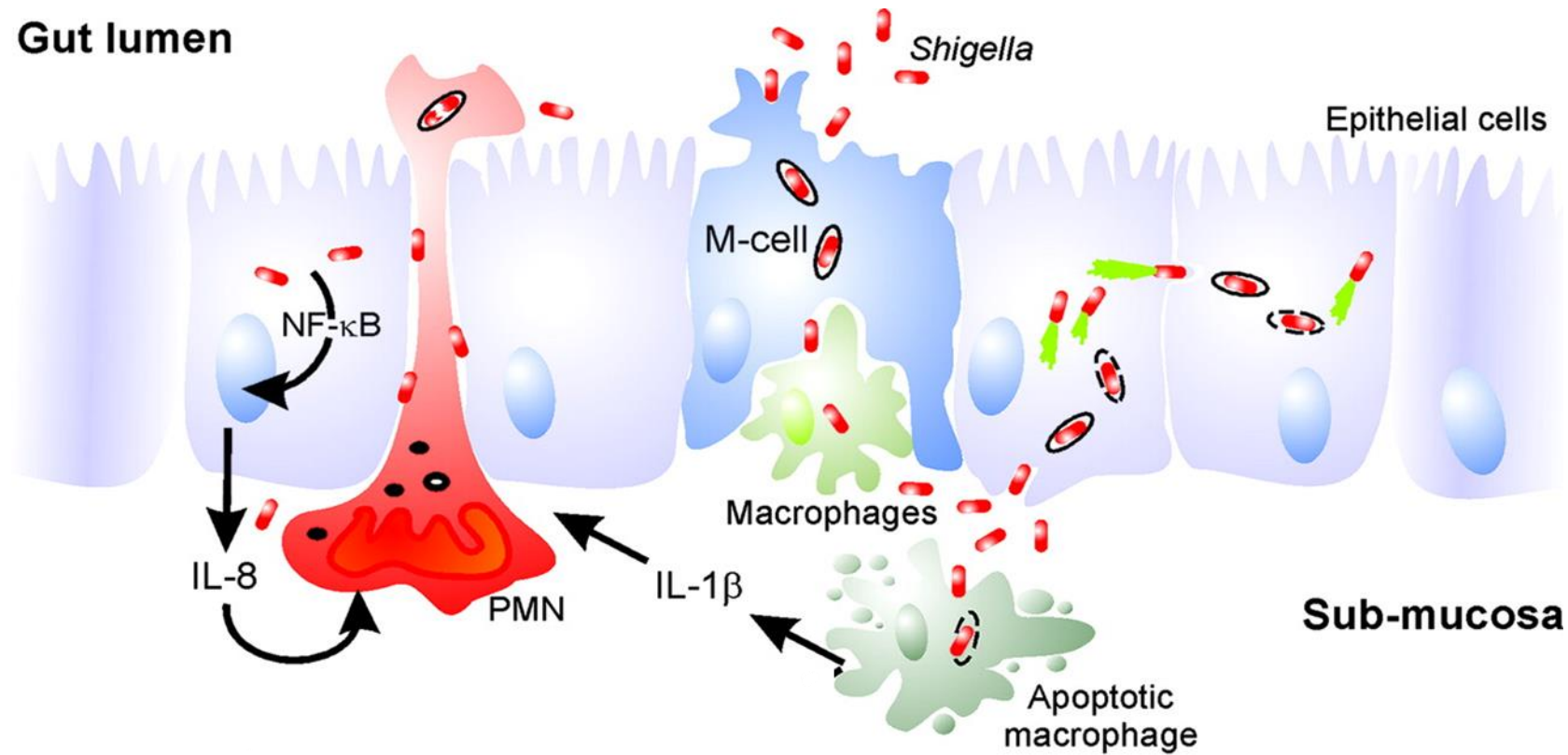
Comporta l'ingresso di liquidi in eccesso nella cellula con conseguente lisi osmotica e perdita di contenuto

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: Attraversamento dello strato epiteliale

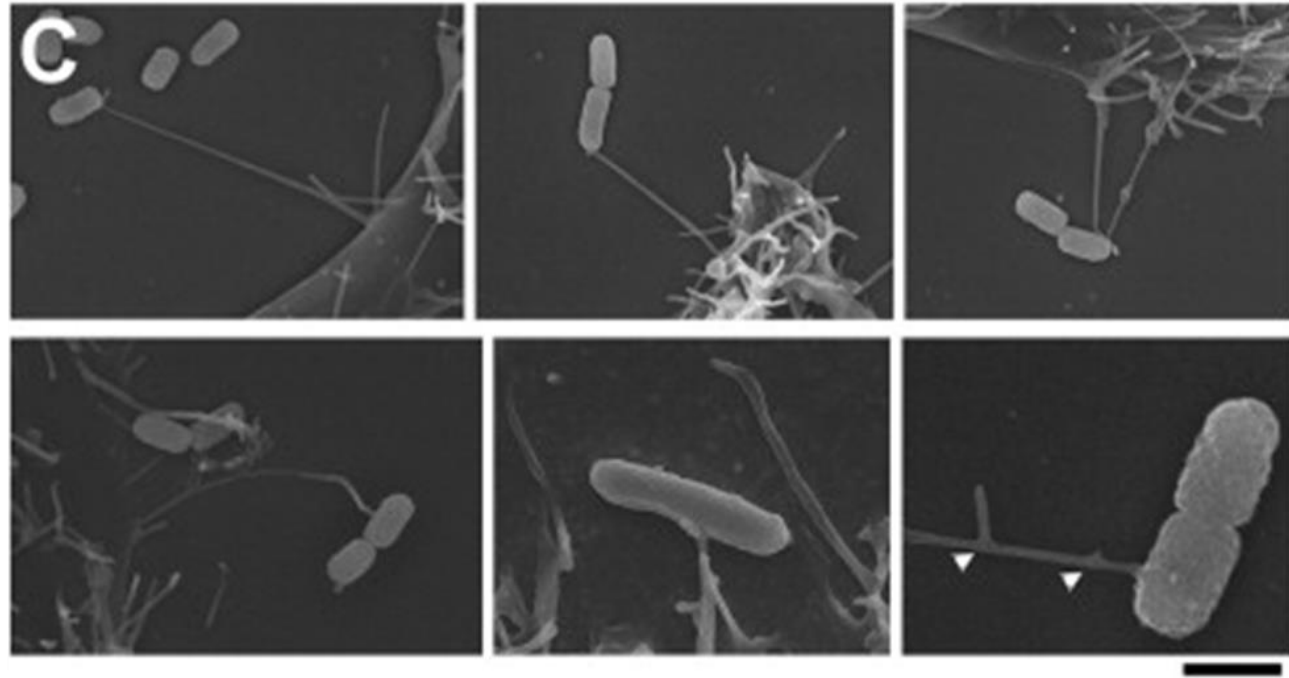


Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion Gunnar N. Schroeder, Hubert Hilbi

Patogenesi: Invasione delle cellule epiteliali

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

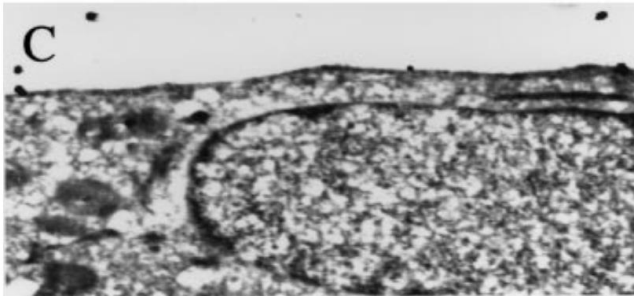
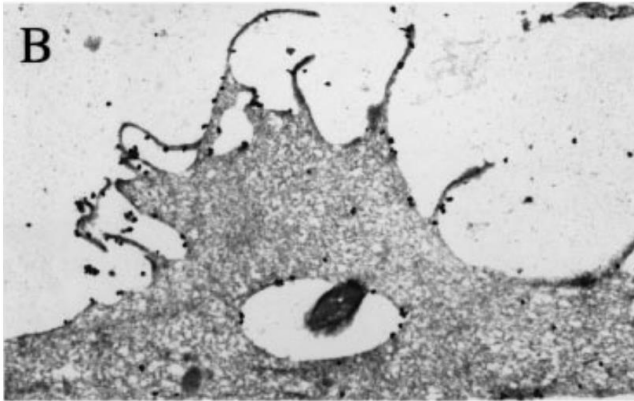
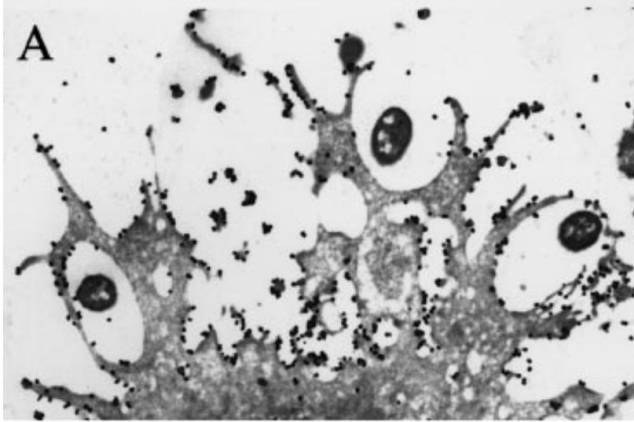
Shigella può essere catturata da estensioni micropodiali nanometrici (**NME**) simili ai filopodi che si estendono dal corpo cellulare epiteliale



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.,

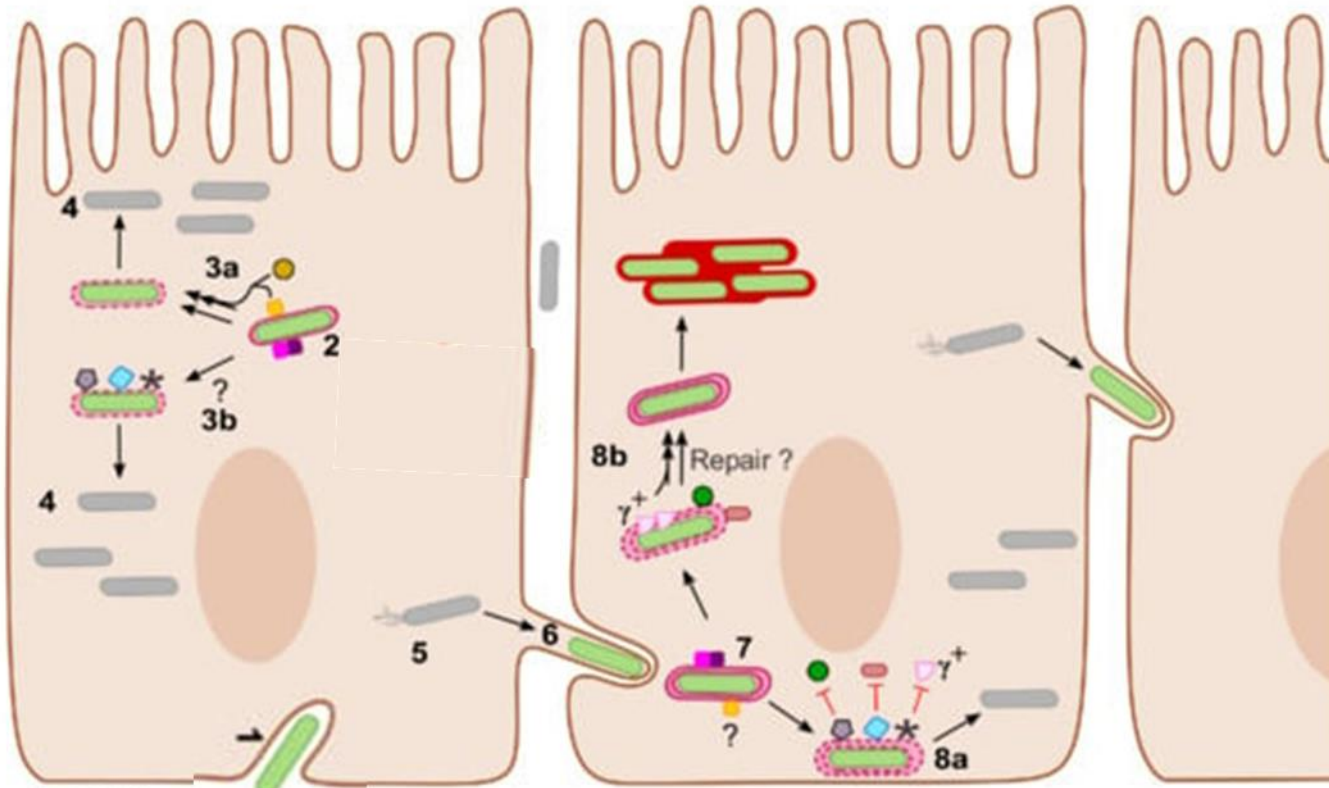
Shigella innesca la retrazione del filopodia, portando di fatto *Shigella* in prossimità del corpo cellulare

Patogenesi: Invasione delle cellule epiteliali

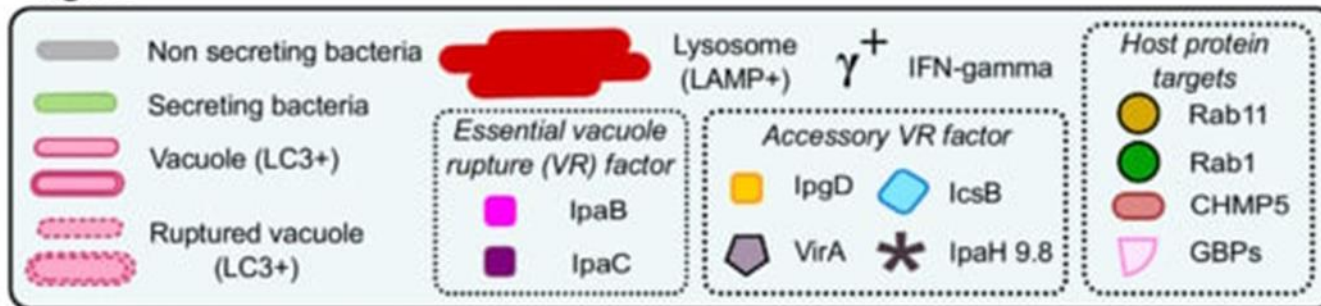


- ✓ L'ingresso della Shigella nelle cellule epiteliali è caratterizzato da una riorganizzazione transitoria del citoscheletro della cellula ospite nel sito di interazione batterica con la membrana cellulare, che porta al fagocimento batterico con un processo macropinocitico.
- ✓ Ad avviare il processo 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



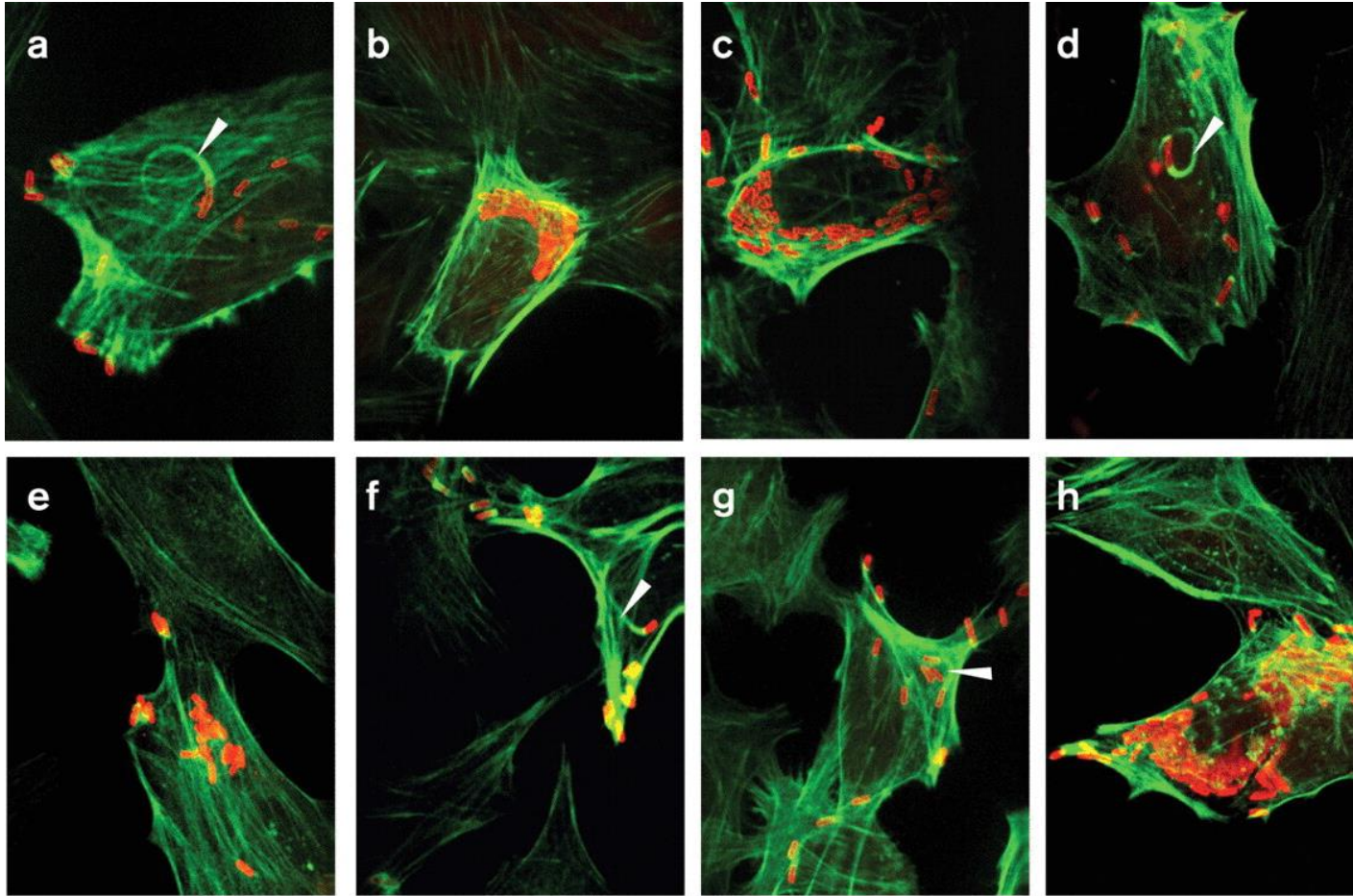
1. Il contatto con la cellula ospite comporta l'attivazione dei T3SS che induce il rimodellamento della membrana plasmatica

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



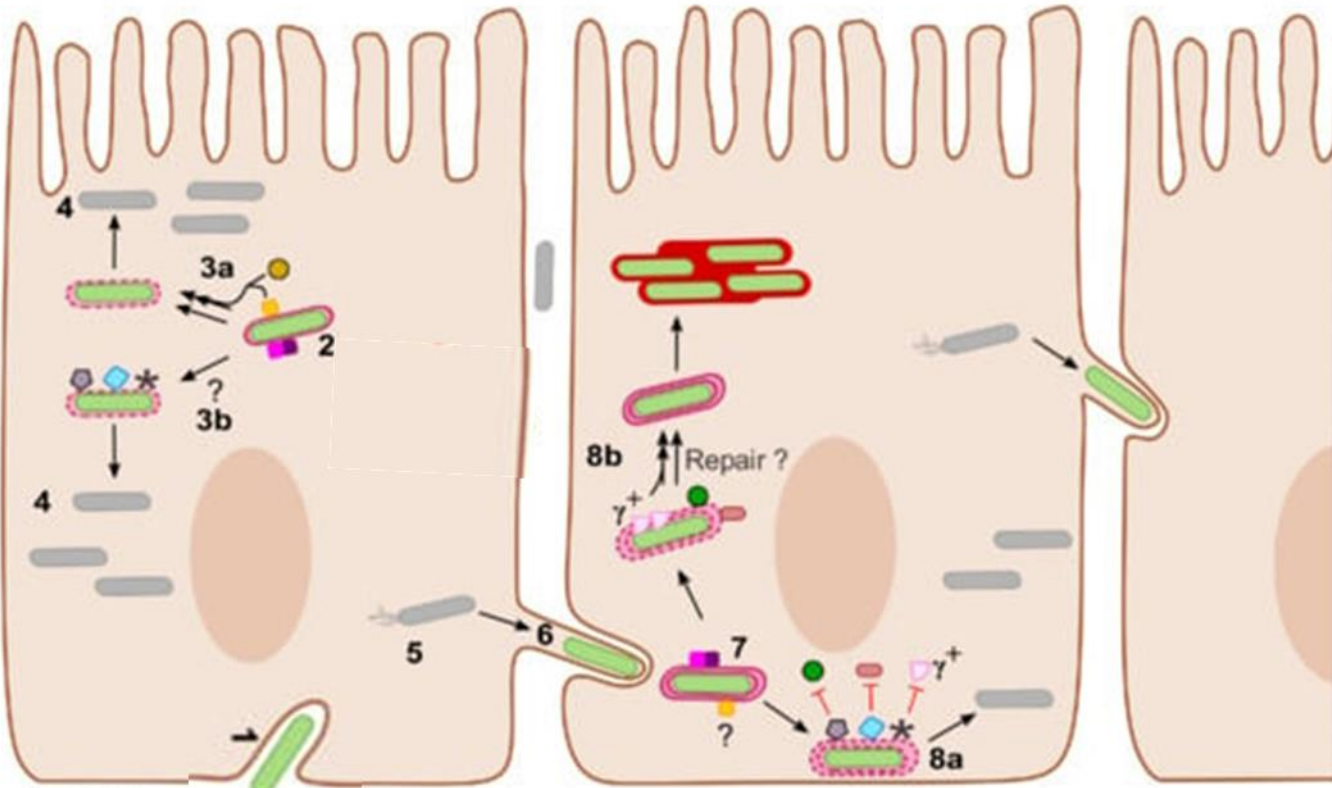
Rilevazione delle code di F-actina prodotte da *S. flexneri* che crescono all'interno delle cellule HeLa.

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.

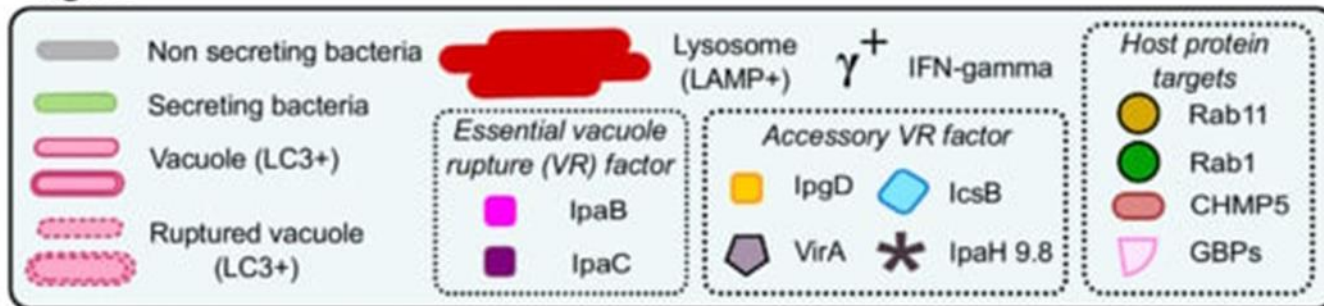
IcsA **imita Cdc42** e formando il complesso IcsA-N-WASP-Arp2/3 inducendo la polimerizzazione dell'actina...

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



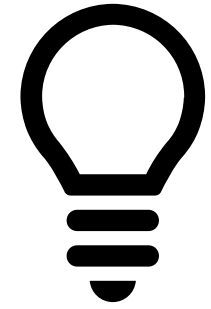
6. Il contatto con la cellula adiacente comporta nuovamente l'attivazione dei T3SS consentendo la formazione di una protrusione

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

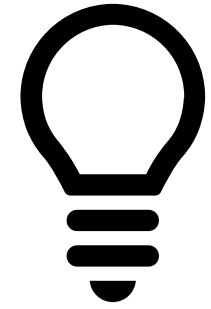
8. I traslocatori IpaB e IpaC e altri fattori come IcsB e VirA e probabilmente IpaH9.8 si accumulano in prossimità del vacuolo, formano pori essenziali per la rottura

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.



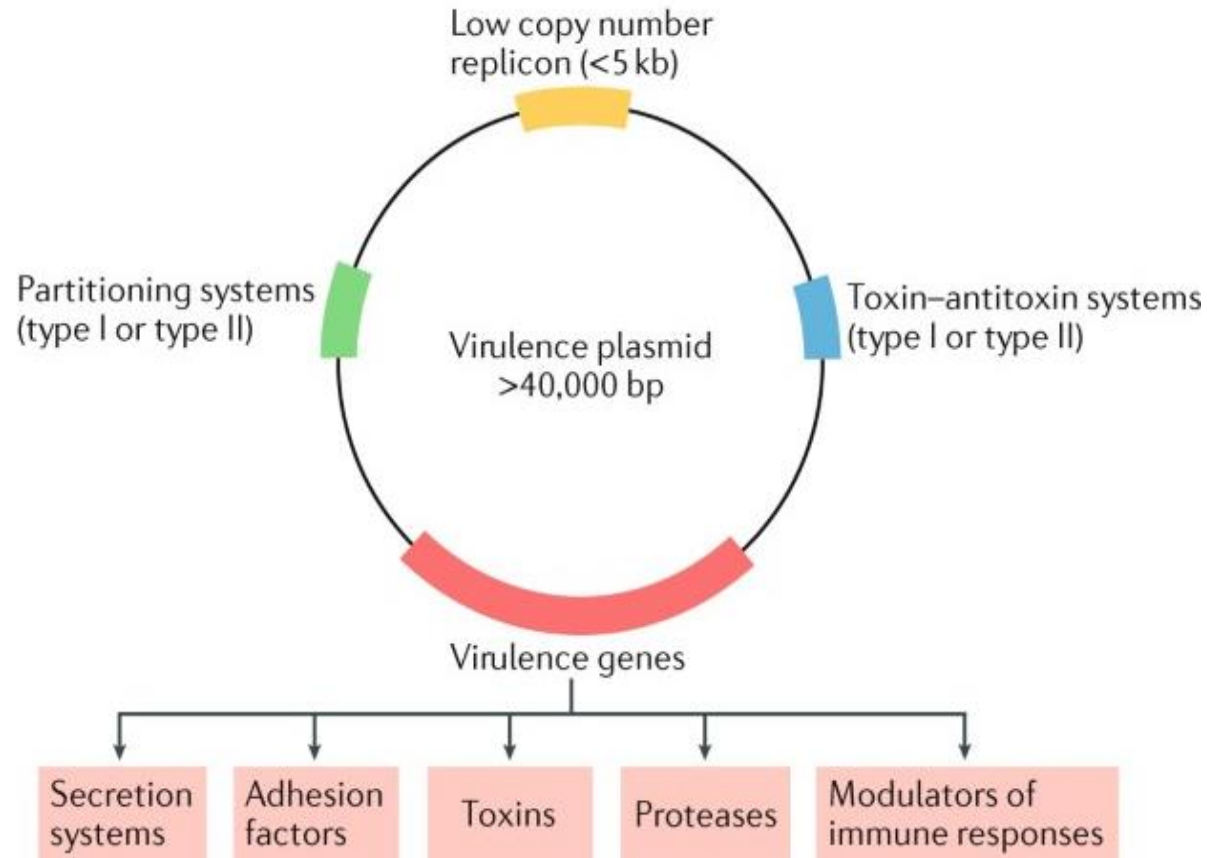
- ✓ Dove sono localizzati i geni responsabili della virulenza di *Shigella spp.*?
- ✓ Come fa *Shigella spp.* a regolare la sua virulenza?



- ✓ **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

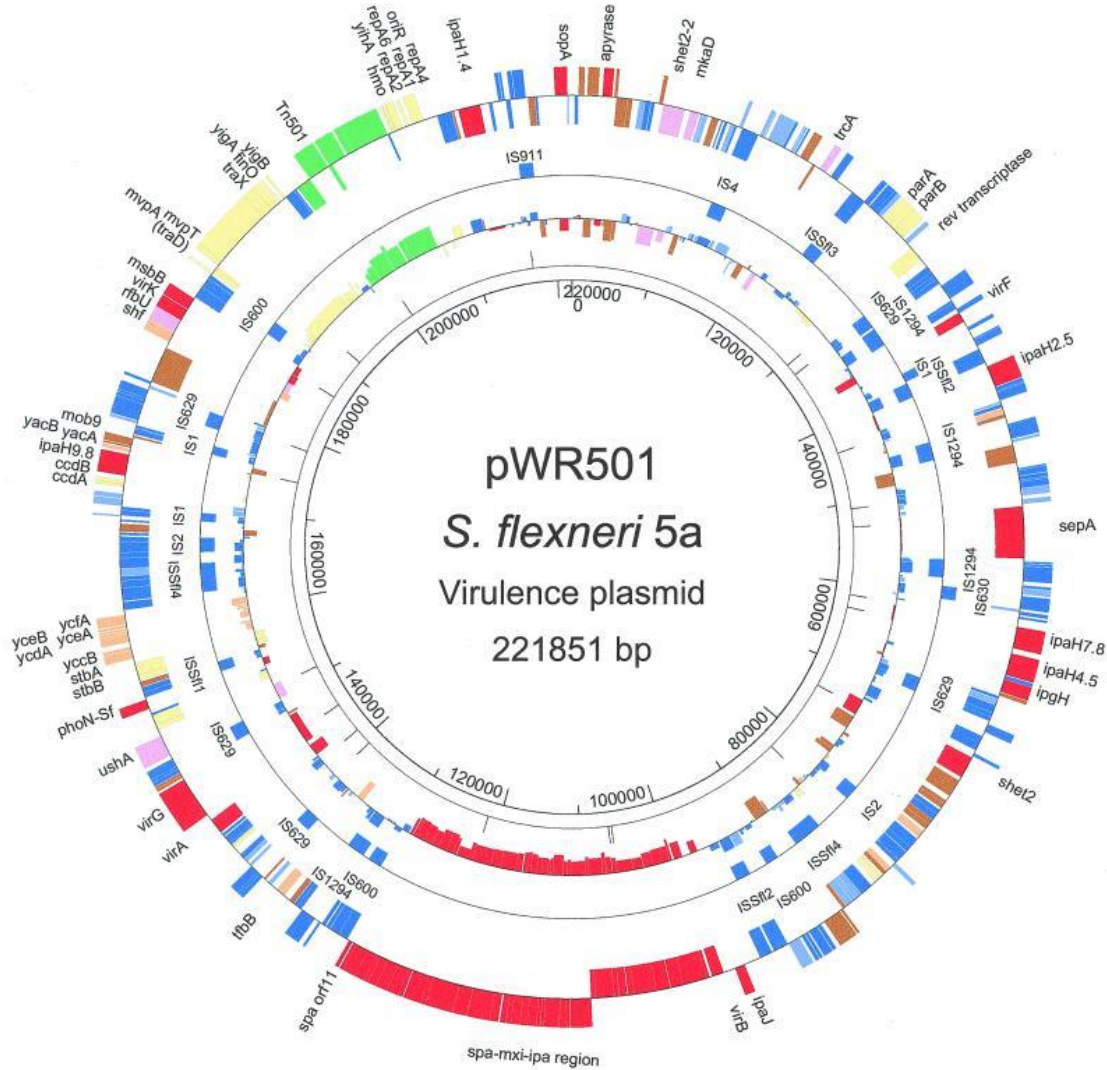
- **sistemi di partizionamento** che distribuiscono i plasmidi tra le cellule figlie prima della divisione
- **sistemi di dipendenza**, mediando l'uccisione post-segregativa di batteri privi di plasmidi (PSK)

✓ 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

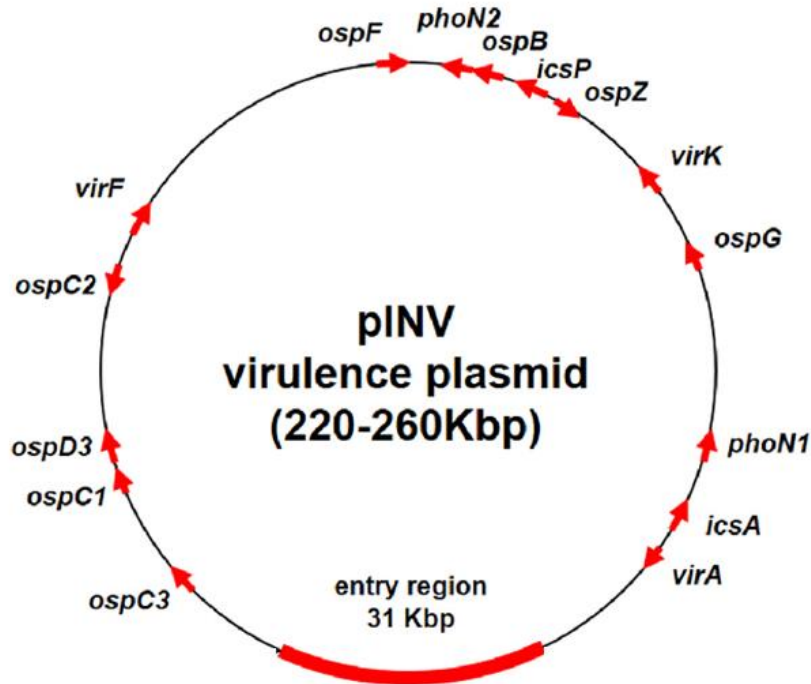
Plasmide di virulenza

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** → *lpgA*, *lpgC*, *lpgE*, e *spa15*

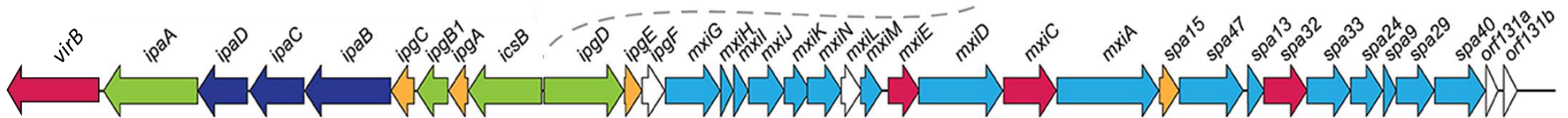
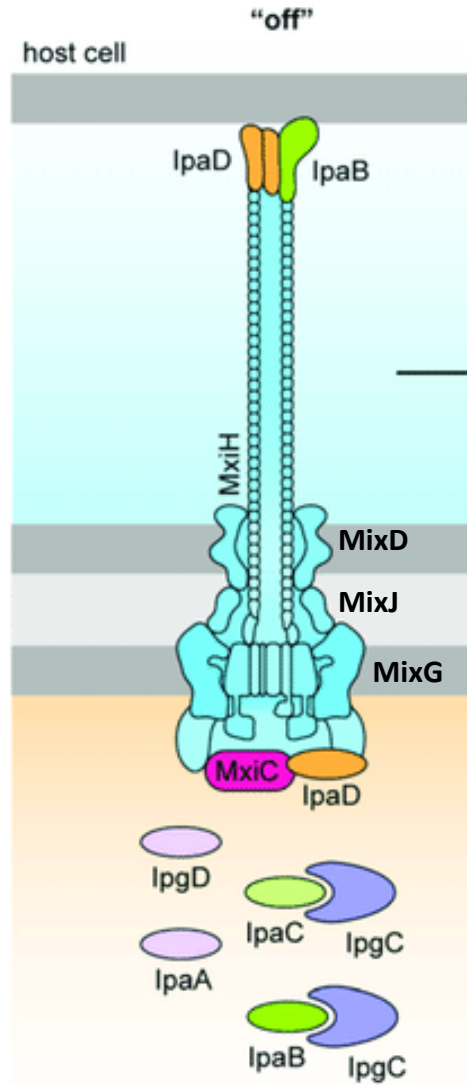


Diagram illustrating the flagellar motor in the "off" state. The motor is embedded in the host cell membrane. The stator is composed of MixG, MixJ, and MixD. The central shaft is MxiH. The hook is composed of LpaB and LpaD. The flagellum is composed of LpgC, LpaC, and LpgD. The motor is shown in the "off" state, with the flagellum retracted.

- ✓ 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

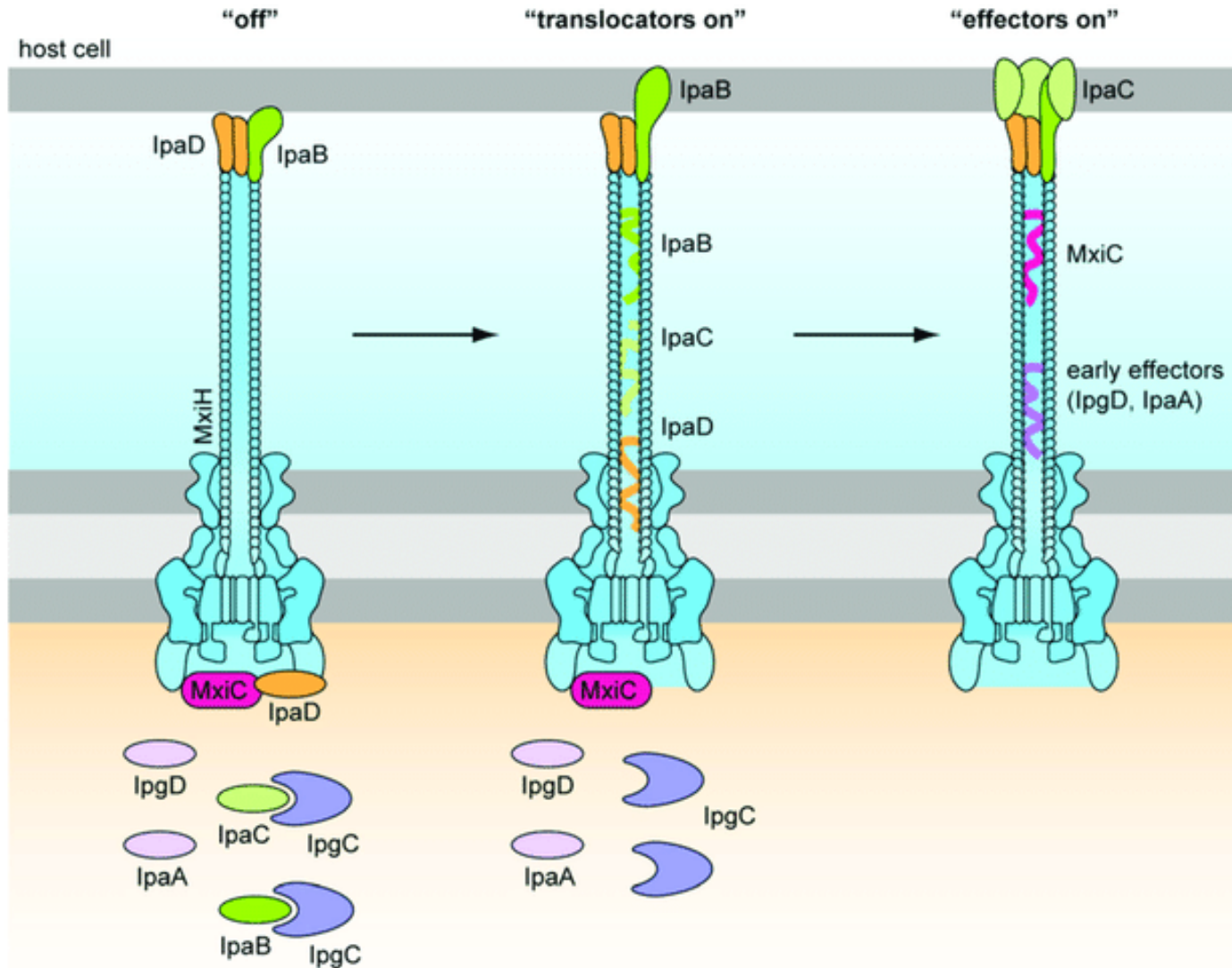


In assenza della cellula ospite, la proteina idrofilica **IpaD** interagisce con la proteina idrofobica **IpaB**, bloccandola all'interno del canale dell'ago e impedendo la secrezione delle proteine effettrici

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

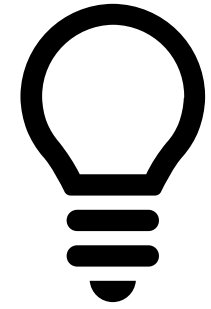


Il contatto con la cellula ospite determina un cambiamento conformazionale di IpaD che a sua volta permette la **localizzazione di IpaB sulla membrana cellulare eucariotica**

IpaB e IpaC formano un poro multimerico di traslocazione

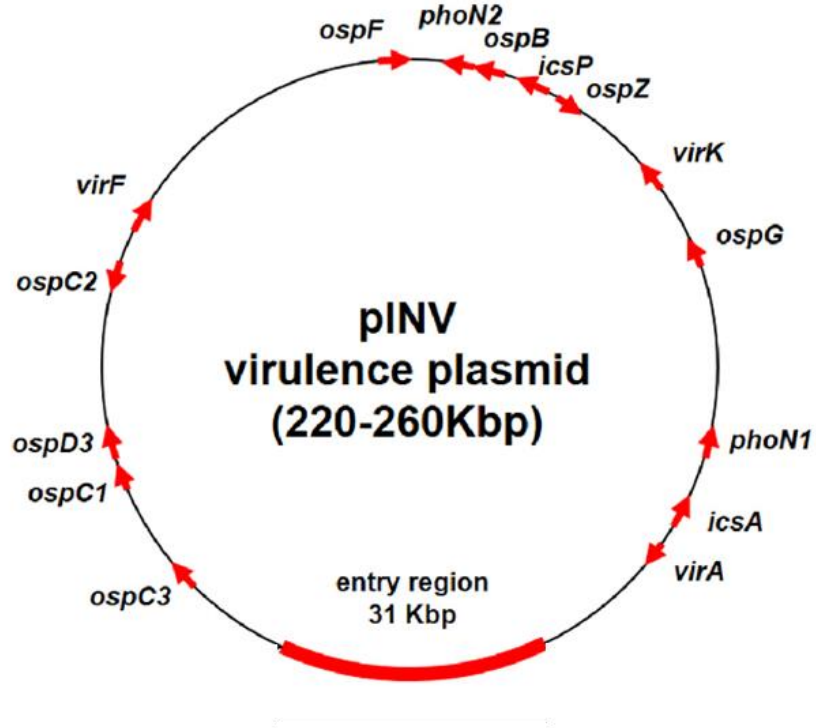
E una volta che il T3SS è in questa conformazione aperta, altre Ipa e altri effettori proteici possono raggiungere direttamente i propri bersagli nella cellula ospite

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**



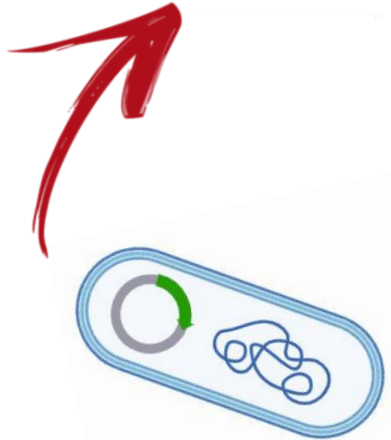
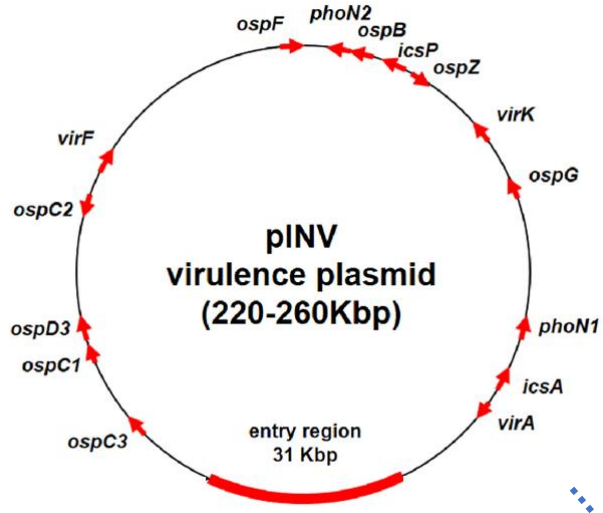
Il regolatore principale dei geni di virulenza di *Shigella* è il gene ***virF***

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"

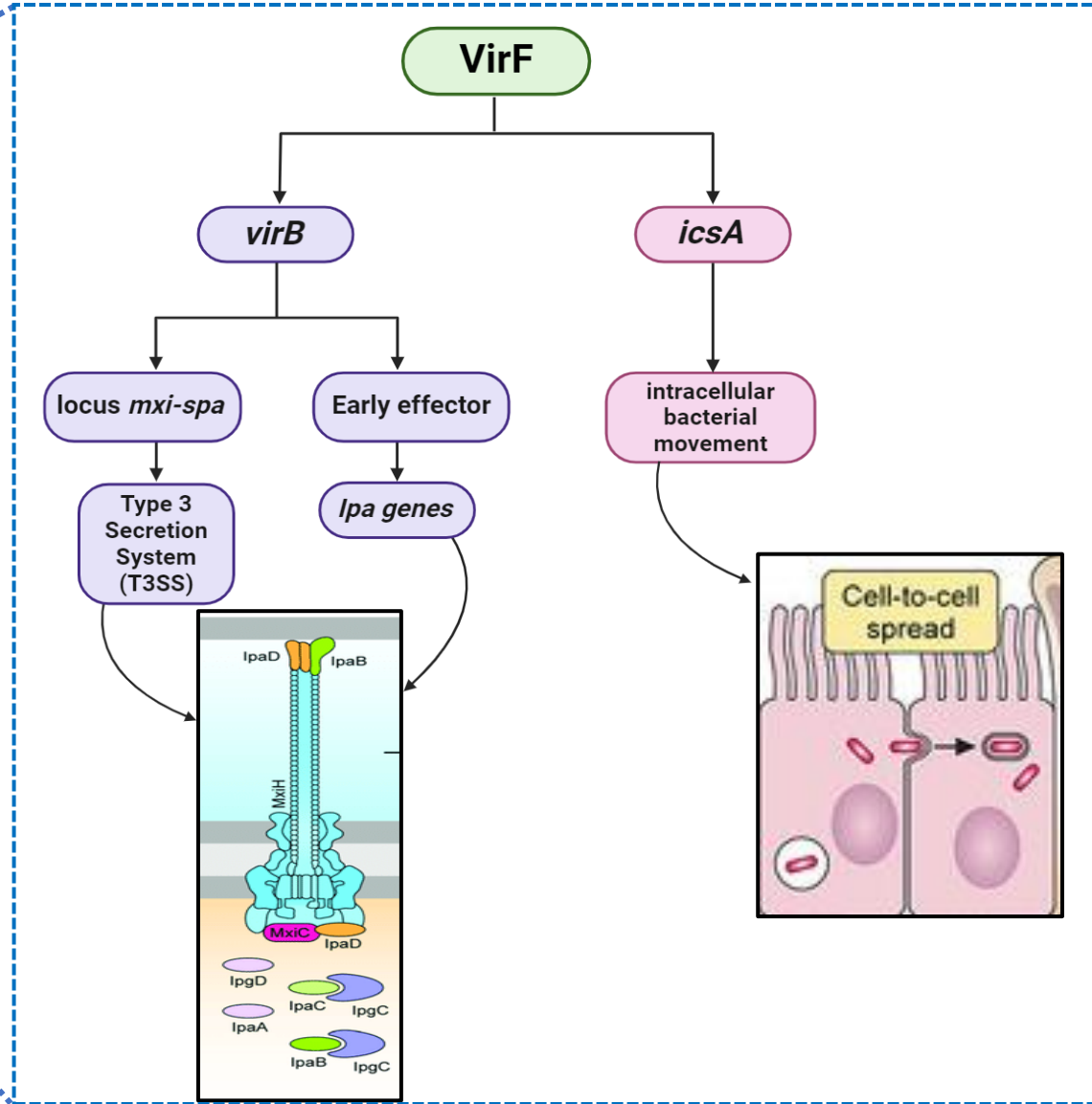
L'attivazione di *virF* avviene in risposta a **segnali ambientali**

- Temperatura
- pH
- Osmolarità
- sRNA
- tRNA modificati

Il regolatore principale → VirF attiva una cascata di virulenza

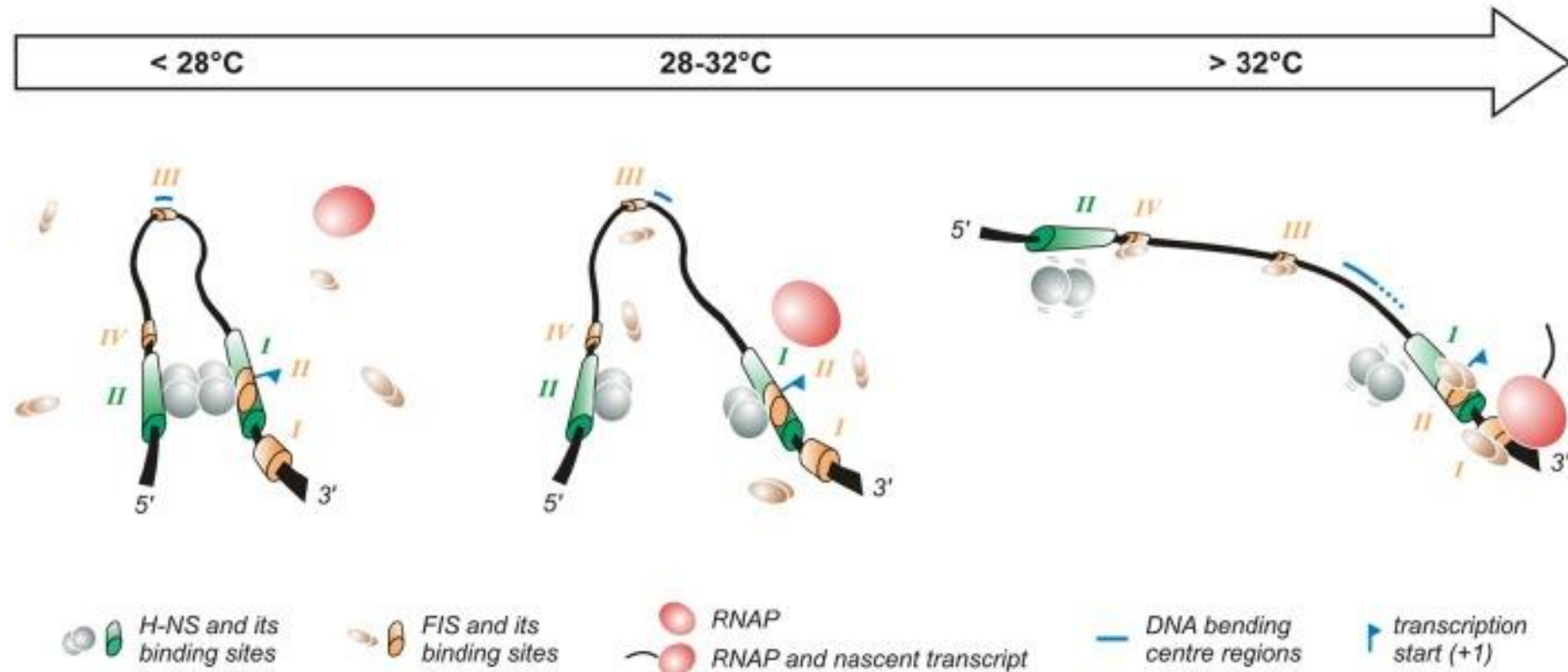


Shigella flexneri



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

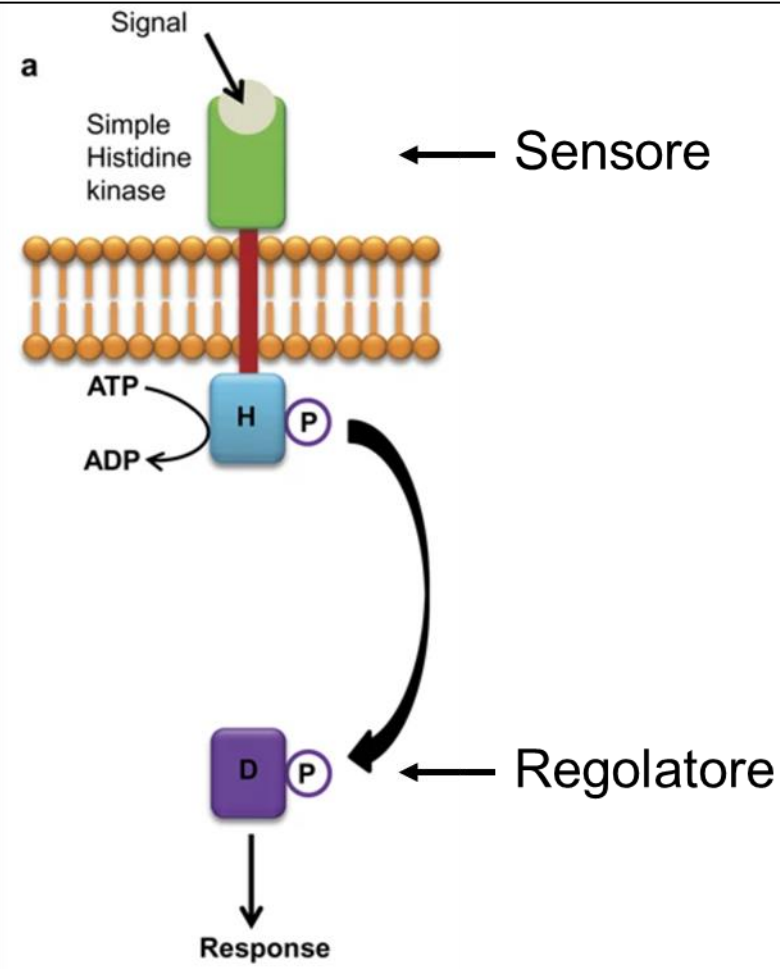
La curvatura situata tra i due siti di legame H-NS si scioglie intorno ai 32°C smascherando i siti di legame per FIS

>32°C

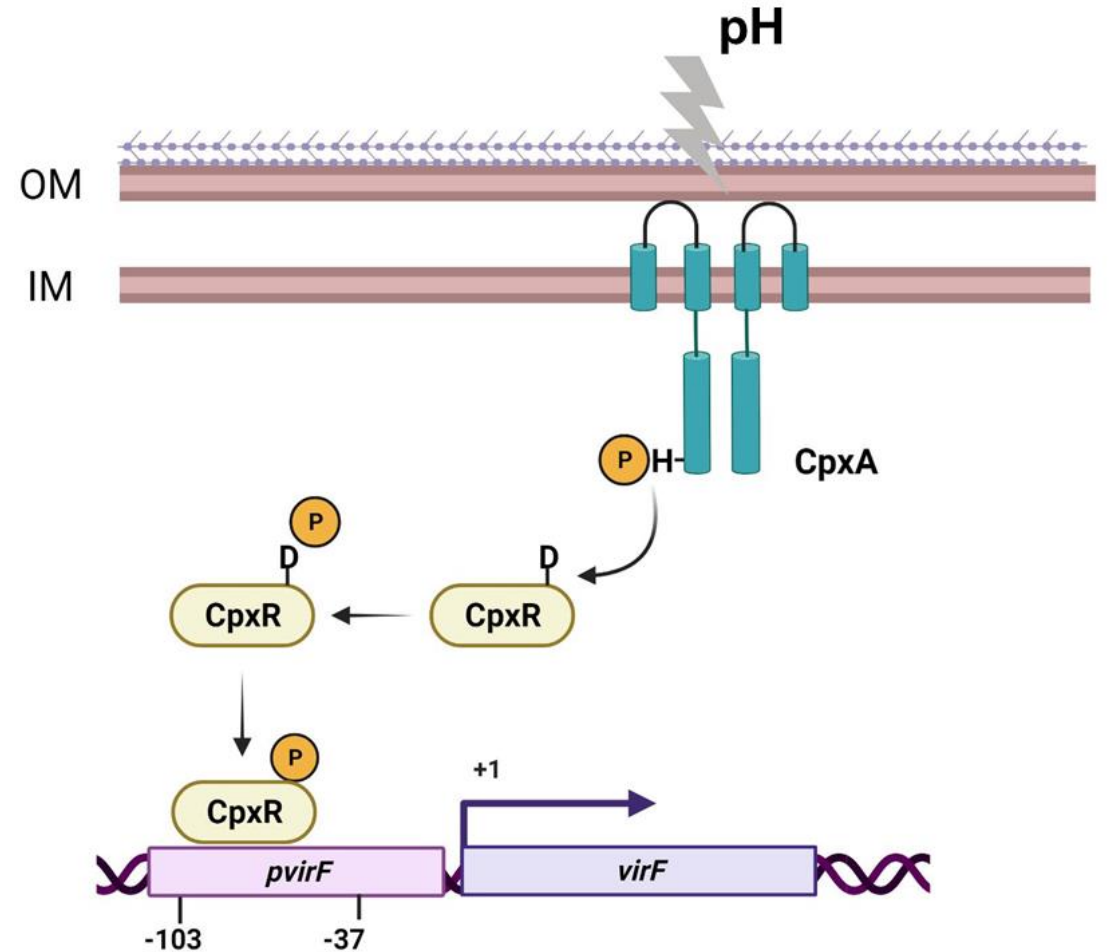
La curvatura del DNA si rilassa le interazioni H-NS con i siti di legame si indeboliscono e FIS ottiene un accesso più facile alle sue box di legame. Complessivamente questi eventi portano alla formazione di un complesso di trascrizione attivo.

Il regolatore principale → VirF

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



Sharan, A., Soni, P., Nongpiur, R.C. *et al.* Mapping the 'Two-component system' network in rice. *Sci Rep* 7, 9287 (2017).



Il regolatore principale → VirF attiva una cascata di virulenza

