

# Esotossine

Tossine sono proteine rilasciate nell'ambiente circostante da un microrganismo in crescita

Possono diffondere dal focolaio d'infezione verso altre parti del corpo e provocare danni lontano dal sito dove i microrganismi stanno proliferando.

TOSSINE CITOLITICHE

TOSSINE A-B

TOSSINE SUPERANTIGENICHE

I superantigeni stimolano un gran numero di linfociti, provocando reazioni infiammatorie sia intestinali che sistemiche

## Tossine

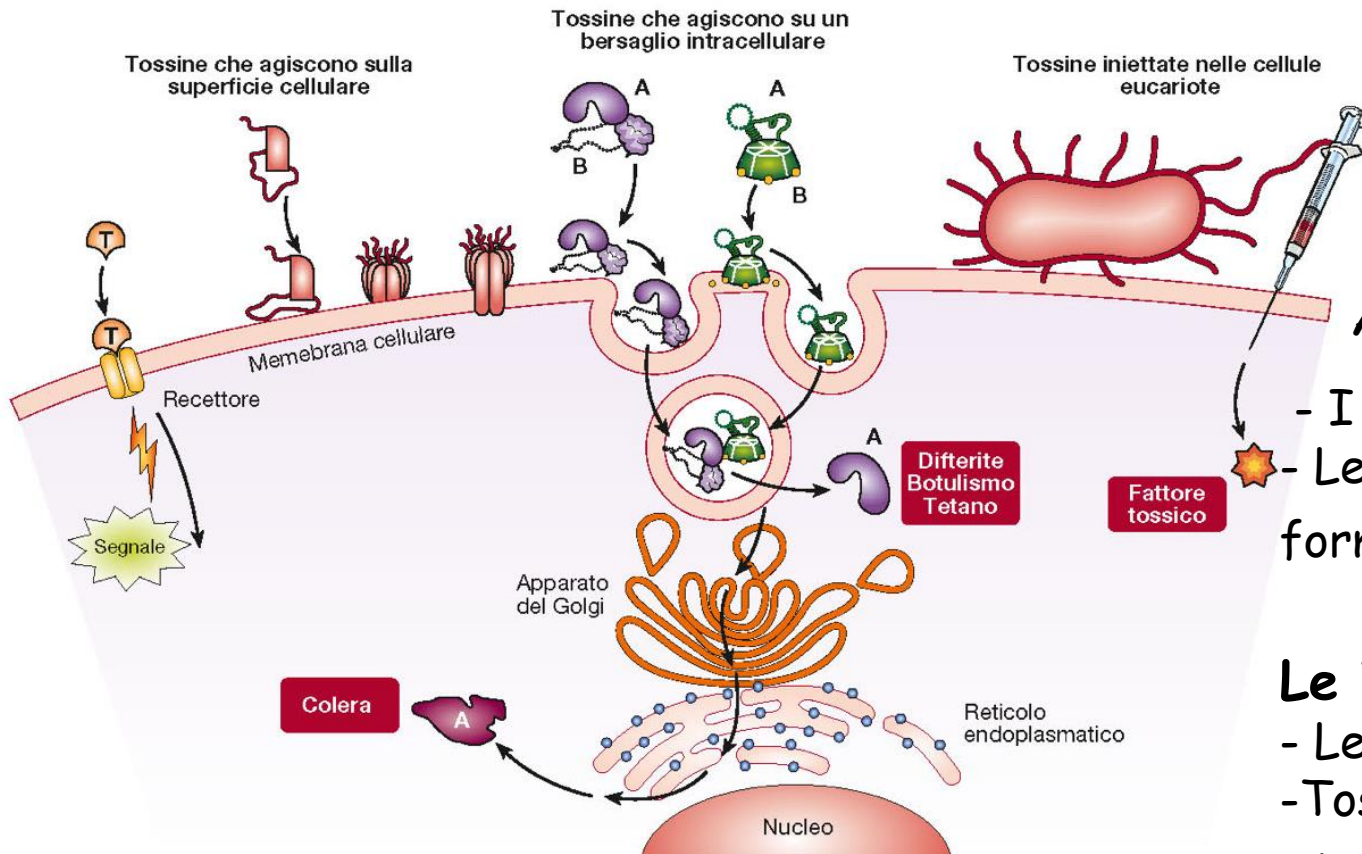
Con il termine tossine vengono indicate molecole solubili diverse che agiscono alterando completamente la fisiologia della cellula.

Nonostante possano essere prodotte da microrganismi completamente diversi alcune tossine possono avere bersagli in comune. Tra questi :

Piccole GTPasi della famiglia Rho, Rac e CDC42 che controllano processi fondamentali per la cellula.

Queste proteine possono essere modificate dalle tossine con strategie diverse (ADP ribosilazione, glicosilazione deaminazione)

# Le diverse strategie d'azione delle tossine



All'esterno della cellula

- I superantigeni
- Le tossine che formano pori

## Le Tossine solubili

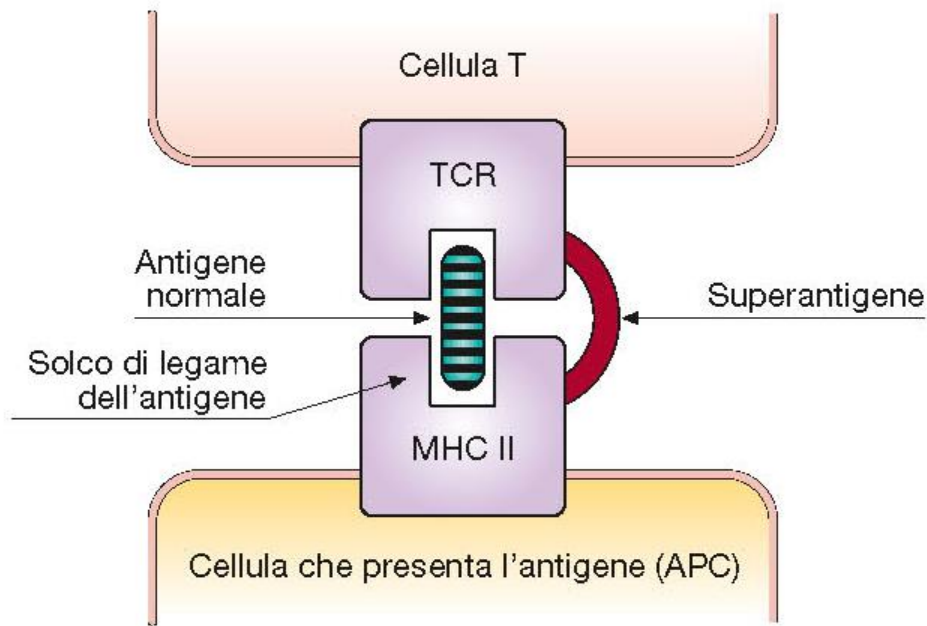
- Le tossine di tipo AB
- Tossine ad attività ADP ribosilante

## -Le Neurotossine

## Le tossine che agiscono dall'esterno della cellula: I SUPERANTIGENI

prodotte principalmente dai batteri Gram+ quali streptococchi e stafilococchi.

*Staphylococcus aureus* produce tossina 1 della Sindrome da Shock Tossico



Interagiscono direttamente con il recettore delle cellule T TCR dei linfociti T helper e con le molecole MHC II sulle cellule presentanti l'antigene (APC) (macrofagi), **AL DI FUORI DEL SITO CANONICO DI RICONOSCIMENTO** provocando un' attivazione aspecifica di un intero sottogruppo

In condizione fisiologiche la presenza dell'antigene presentato dalle cellule APC provoca l'attivazione uno o pochi cloni di linfociti T

## Le tossine che producono pori sulla superficie cellulare.

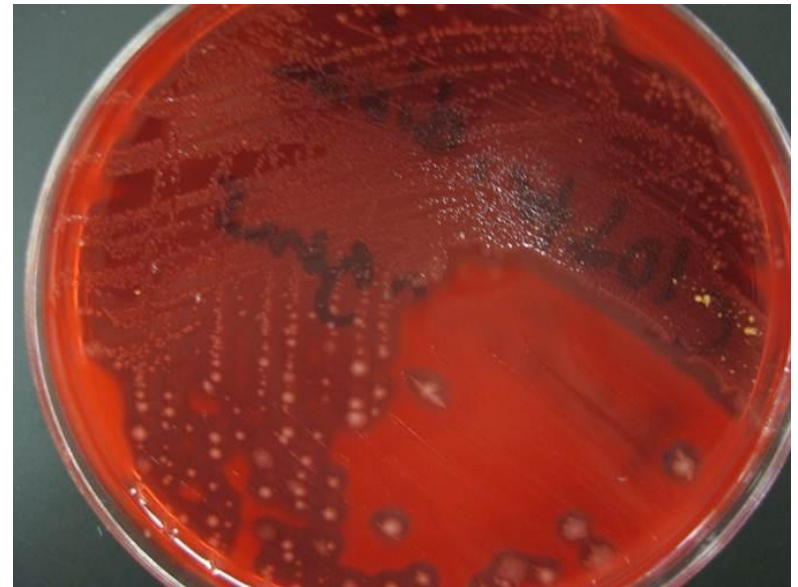
Provocano danno cellulare in quando causano lesione della membrana cellulare con efflusso/influsso di molecole ed acqua e distruzione del potenziale di membrana.

Esempi sono: alfa tossina di *Staphylococcus aureus*

Streptolisina O di

*Streptococcus pyogenes* .

Definite in modo generico emolisine per la loro capacità di lisare globuli rossi di montone ( o cavallo ) su piastre di terreno ricco con agar formano aloni di lisi



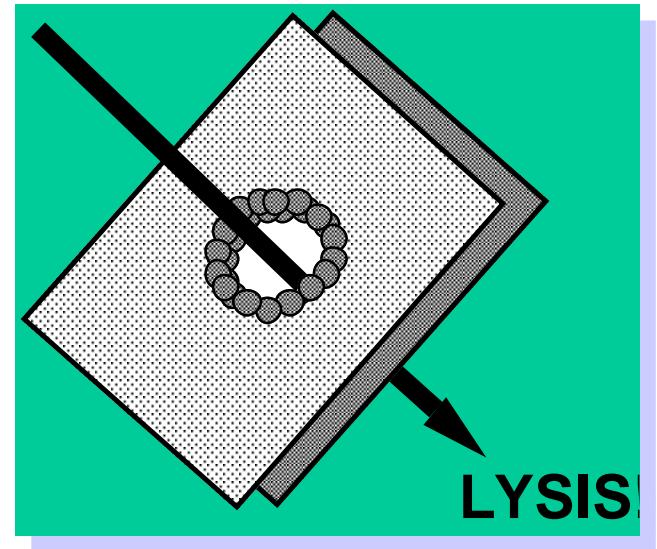
# Le esotossine che danneggiano la membrana

Molte tossine batteriche formano dei pori nelle membrane delle cellule eucariotiche inserendosi con una struttura ad anello

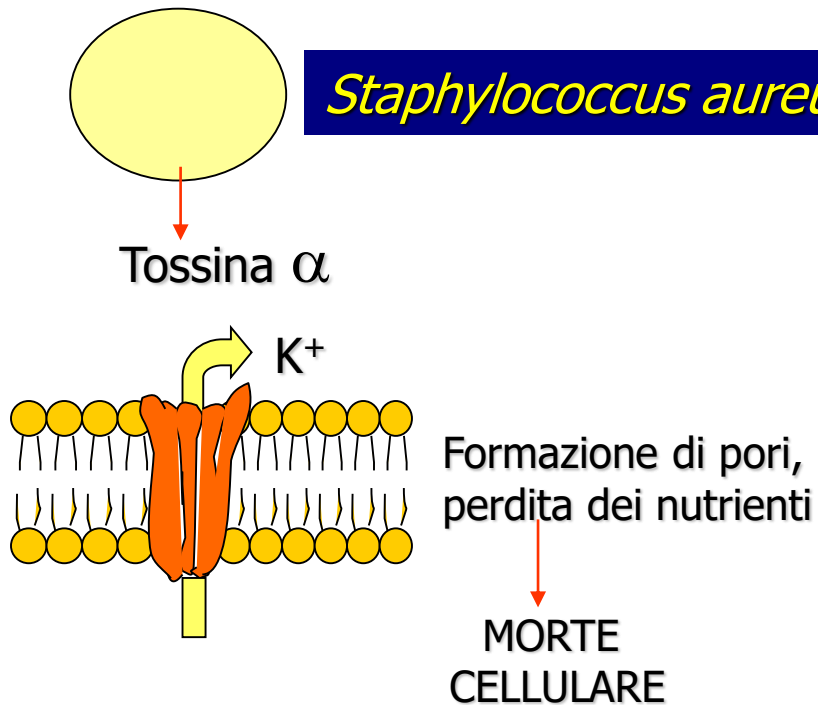
- Streptolisina O di *Streptococcus pyogenes*
- Alfa tossina di *Staphylococcus aureus*
- Lysteriolisina di *Lysteria monocytogenes*

Altre tossine come le fosfolipasi degradano componenti della membrana

- alfa tossina di *Clostridium perfringens*



# Tossine che formano pori piccoli



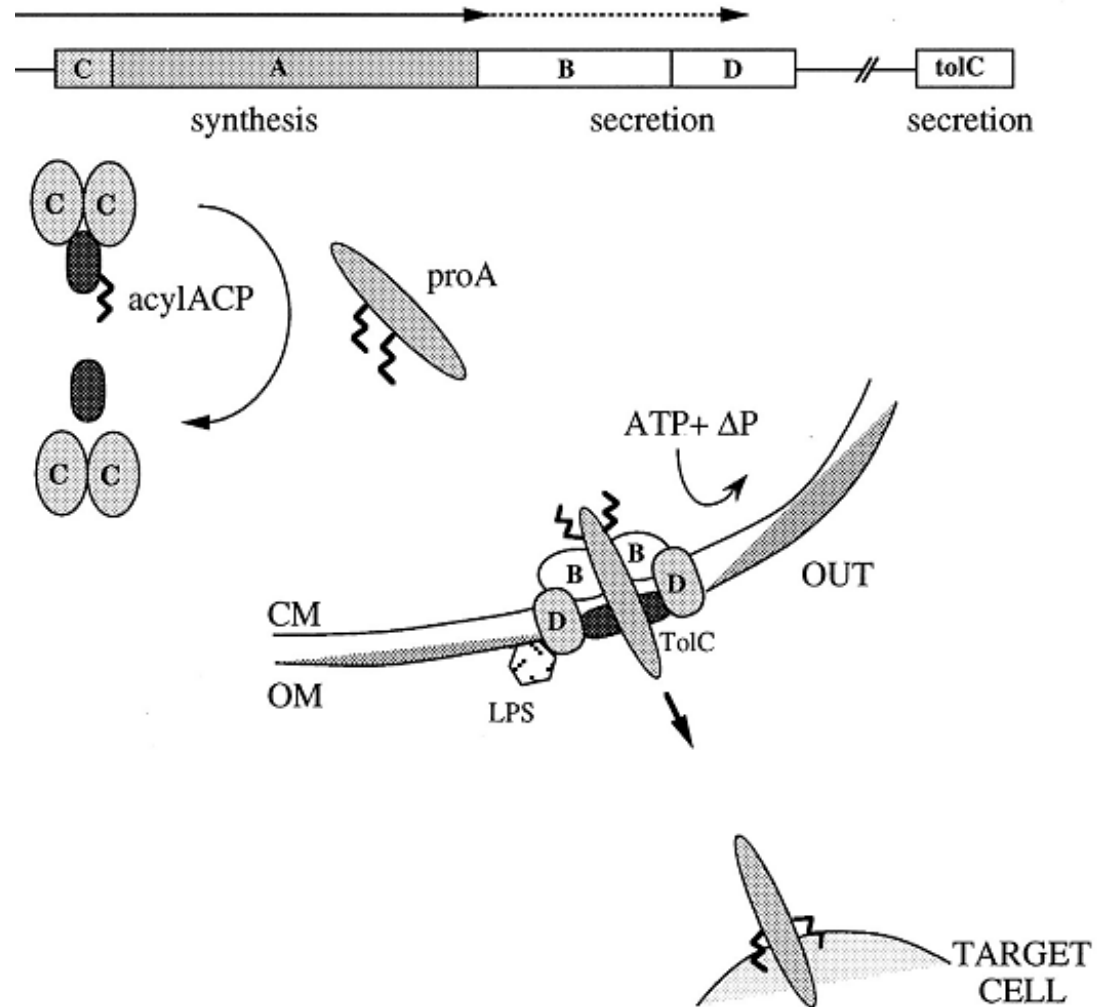
I pori formati da queste tossine hanno struttura eptamerica: i danni prodotti dipendono dalla quantità di tossina che ad alte concentrazioni può provocare la morte.

Permettono il rilascio di ioni ma non di grandi molecole. Vengono colpiti eritrociti, leucociti e piastrine

# ALFA EMOLISINA di E.coli

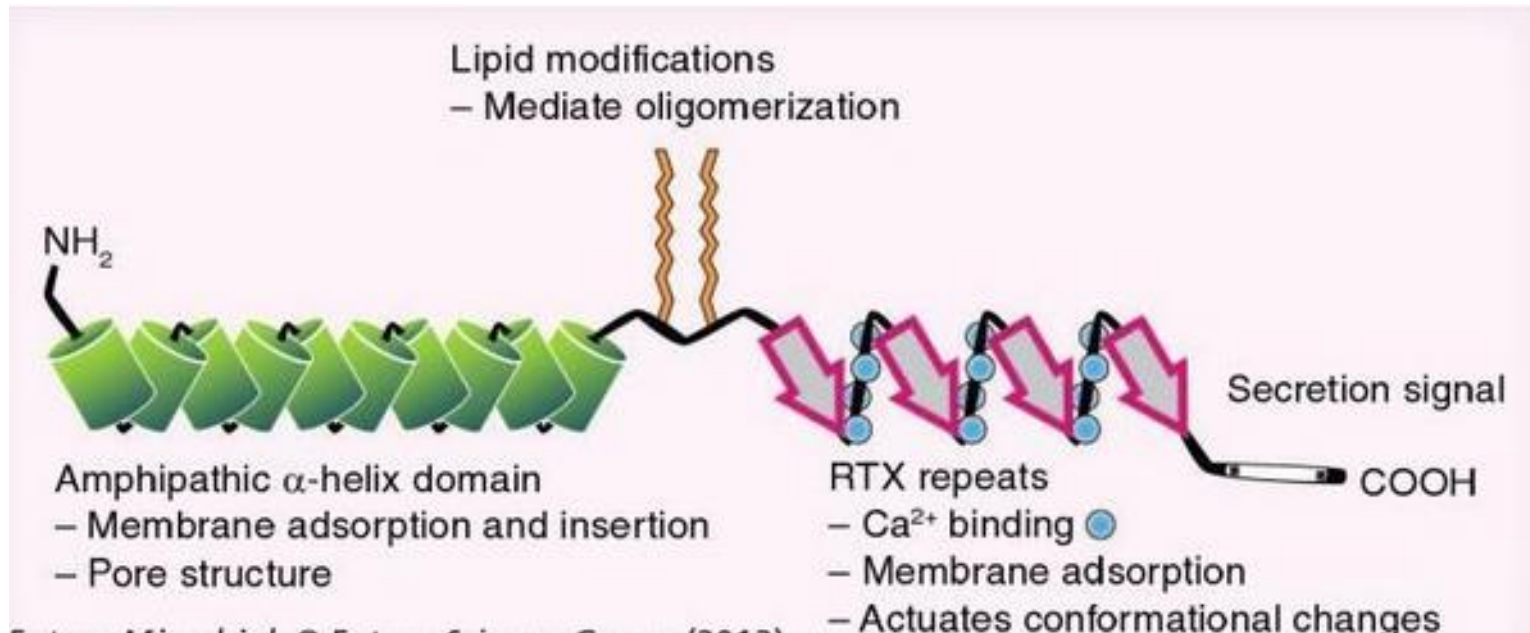
Secreta con il sistema di  
esportazione di tipo I .

Viene sintetizzata in una forma inattiva che verrà poi attivata per acilazione di un residuo di lisina ad opera della proteina HlyC codificata dallo stesso operone





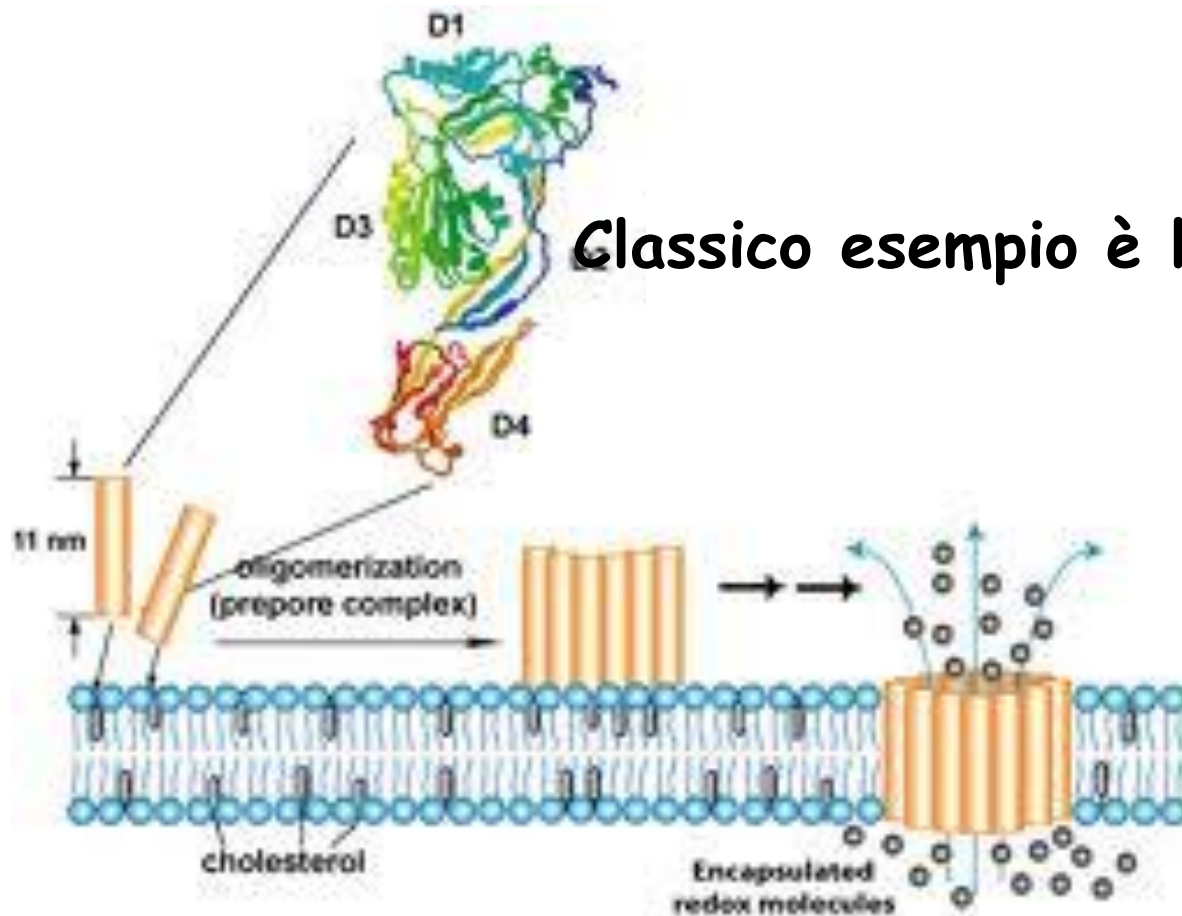
# Emolisina è una tossina RTX



E' un emolisina legante  $\text{Ca}^{2+}$

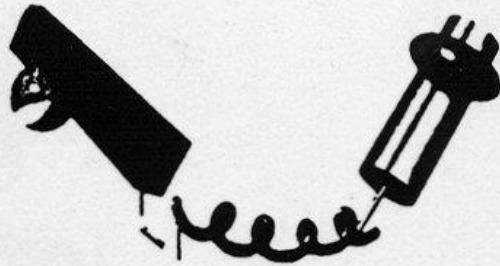
Dominio conservato di 9 aminoacidi dominio RTX

Le tossine che formano pori di grandi dimensioni si legano al colesterolo sulla membrana della cellula bersaglio. Si ha oligomerizzazione con formazione del poro



**Classico esempio è la Streptolisina O**

(a) AB-type diphtheria toxin



(b) AB<sup>x</sup>-type large clostridial cytotoxin



(c) AB<sub>5</sub>-type cholera toxin

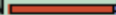























**Le tossine di tipo AB sono costituite**

**da una o più componenti B** costituita da un dominio o da proteine in grado di legarsi ad un recettore presente sulla superficie cellulare

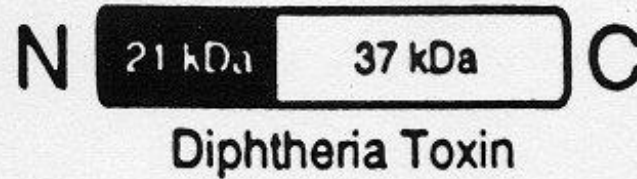
**da una subunità o proteina A** che costituisce la componente catalitica della tossina in grado di provocare danno.

## Representative A-B toxins

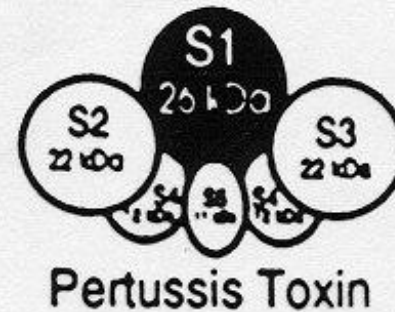
		<u>Domain organization</u>		<u>Activity</u>	<u>Target</u>	<u>Effects</u>	<u>Channels</u>
		A	B				
Single chain	Diphtheria	N 	 C	ADP-ribosylation	EF-2	Inhib prot synth	Y
	Ps. exotox A	C 	 N	ADP-ribosylation	EF-2	Inhib prot synth	?
	Botulinum			proteases	VAMP Syntaxin SNAP-25	Inhib neuro-transm release	Y
	Tetanus			protease	VAMP	Inhib neuro-transm release	Y
	<i>C. difficile</i>			glucosylation	Rho subfam GTPases	Block cyto-kinesis,	?
AB5	Cholera <i>E. coli</i> LT }			ADP-ribosylation	Gs	↑cAMP	N
	Shiga			N-glycohydrolase	rRNA	Inhib prot synth	N
	Pertussis			ADP-ribosylation	Gi	↑cAMP	N
Binary	<i>C. perf. iota</i>			ADP-ribosylation	actin	Inhib polymeriz	(Y)
	Anthrax Lethal Edema			protease adenylate cyclase	MAPKK ATP	Macrophage death ↑cAMP	Y
	<i>B. pertussis</i> AC			adenylate cyclase	ATP	↑cAMP	Y

# STRUTTURA DELLE TOSSINE AB

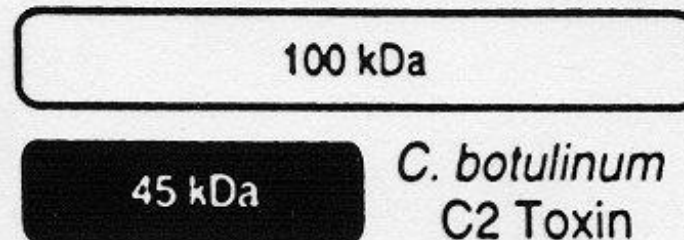
AB  
SINGLE  
POLYPEPTIDE



AB<sub>5</sub>  
NONCOVALENT  
MULTI-PROTEIN  
COMPLEX



AB  
NON-ASSOCIATED  
POLYPEPTIDES



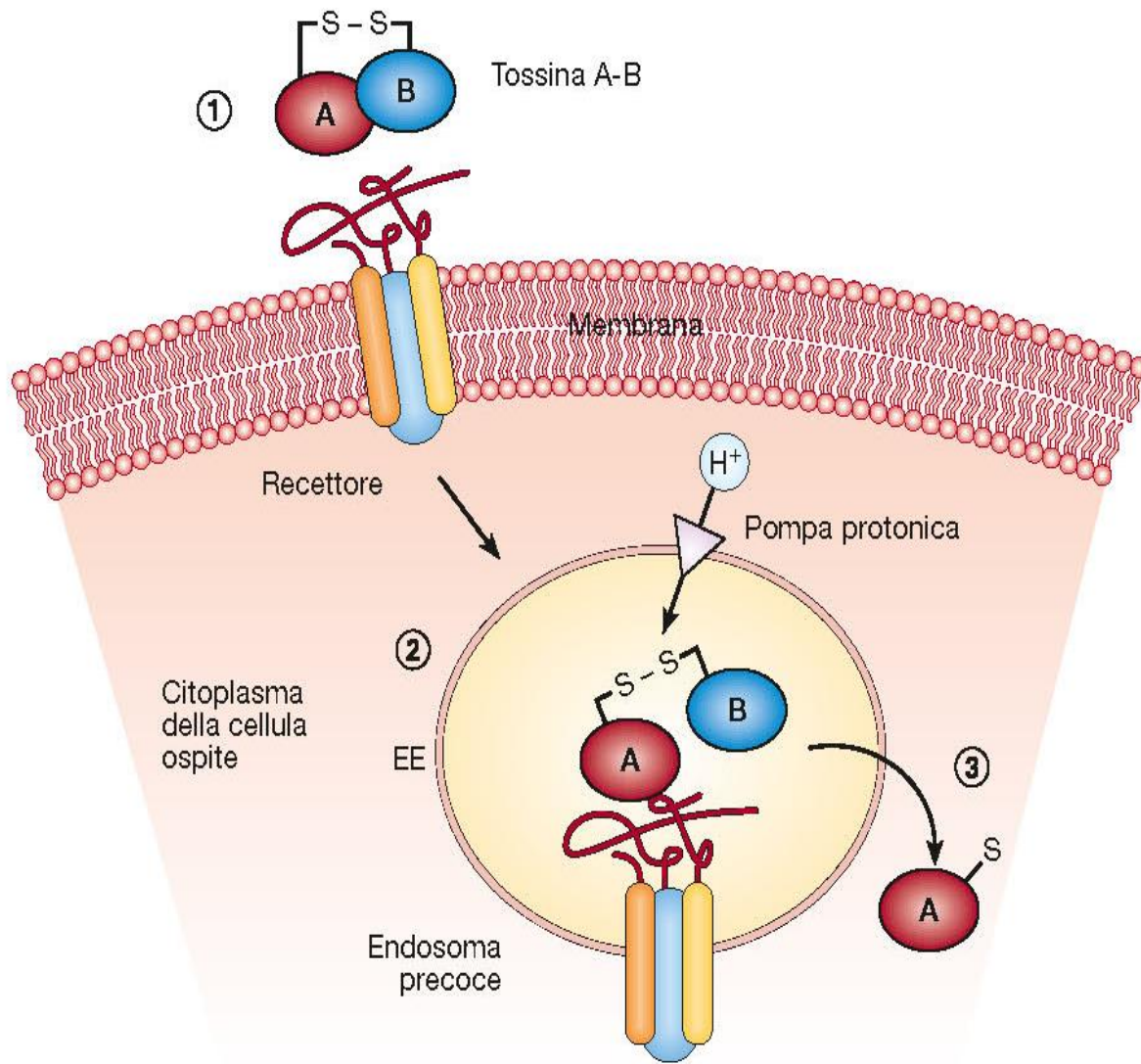
## La tossina difterica

La tossina difterica è una tossina di tipo AB secreta da *Corynebacterium diphtheriae*. I geni che codificano la tossina difterica sono localizzati su un batteriofago lambdoide (fago BETA ) che si ritrova allo stato di **profago** inserito nel genoma di *C. diphtheriae*.

La tossina è un polipeptide di 62.000 daltons costituita da una porzione B che promuove il legame specifico ad un recettore della cellula ospite .

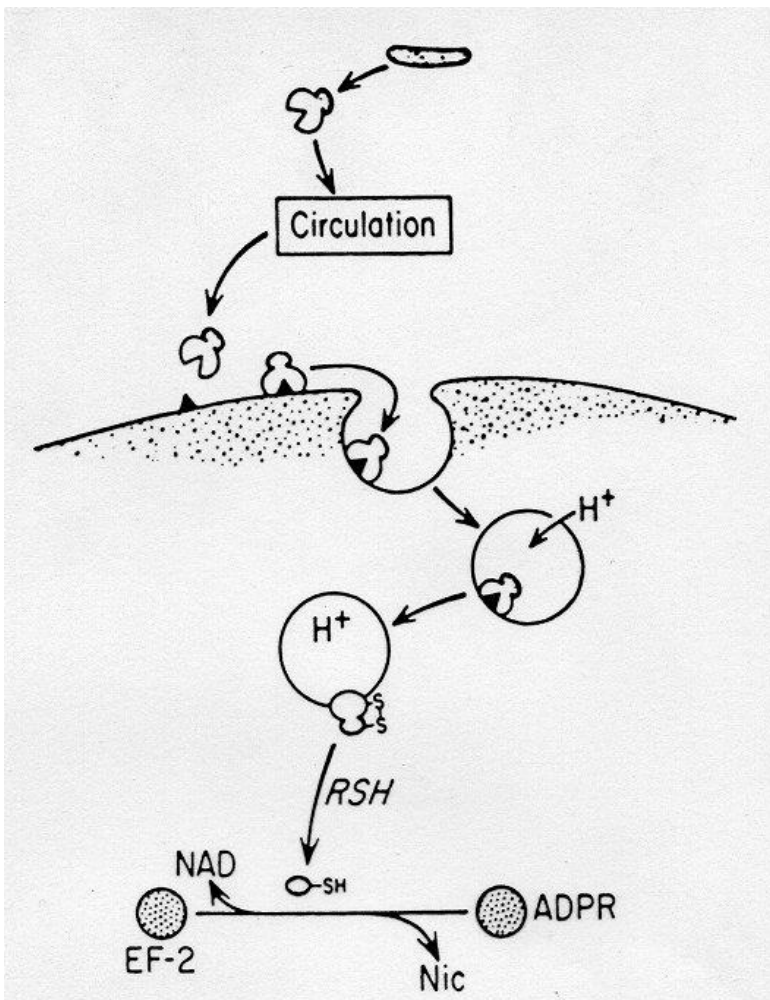
Dopo il legame al recettore la tossina AB viene tagliata e soltanto il frammento A ( p.m.21.000) entra nel citoplasma della cellula ospite.



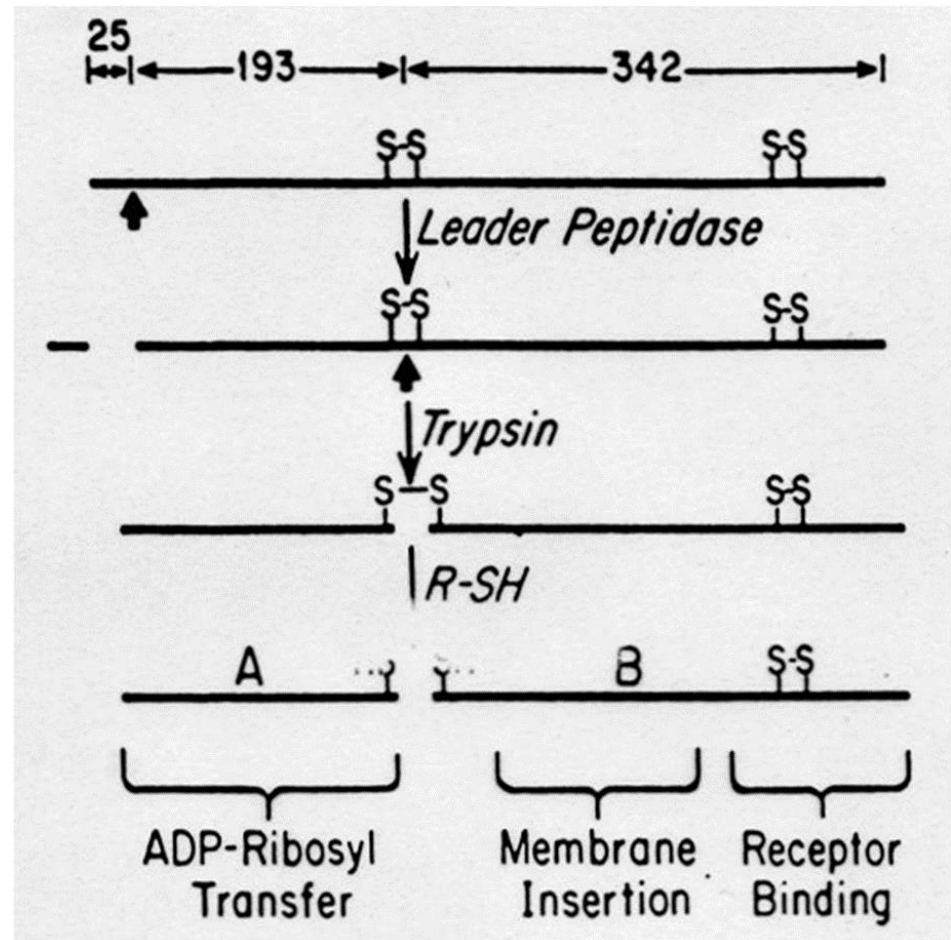


La tossina si lega alle cellule bersaglio grazie alla porzione **C-terminale (B)** e viene internalizzata per endocitosi.

Il basso pH all'interno del vacuolo determina la separazione della porzione A e B



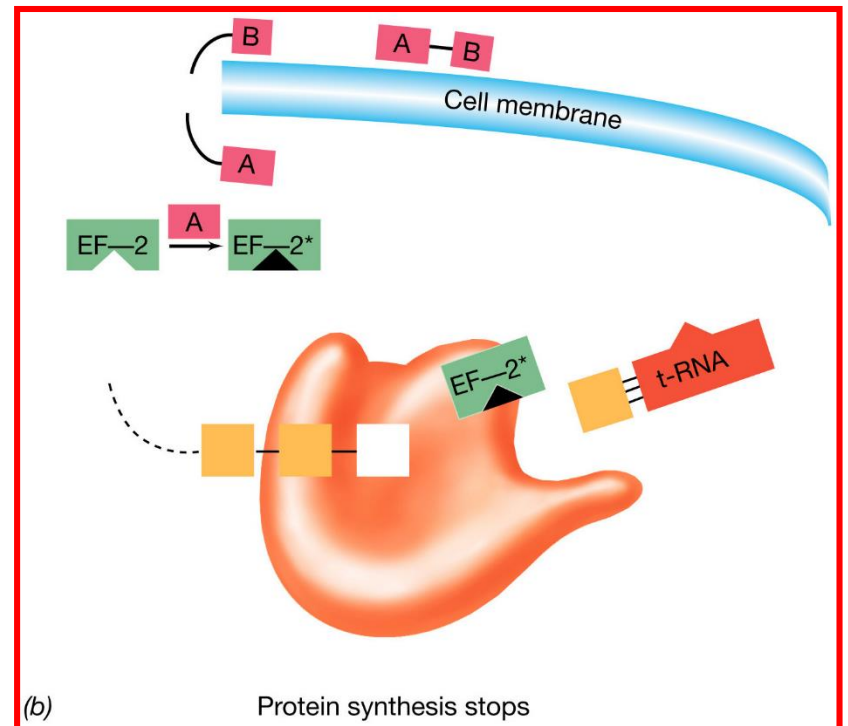
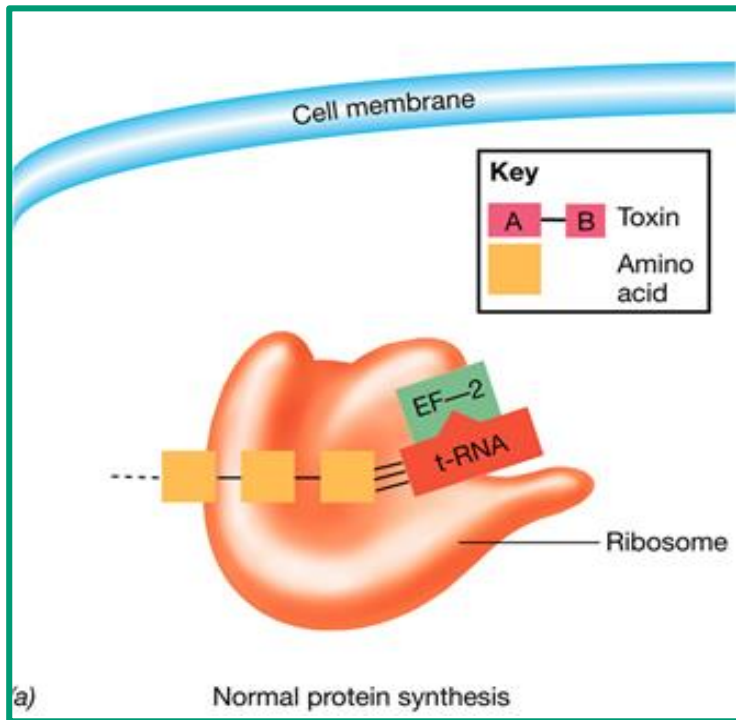
La tossina difterica viene scissa all'interno del vacuolo. La porzione N terminale catalizza l'ADP-ribosilazione del fattore EF-2



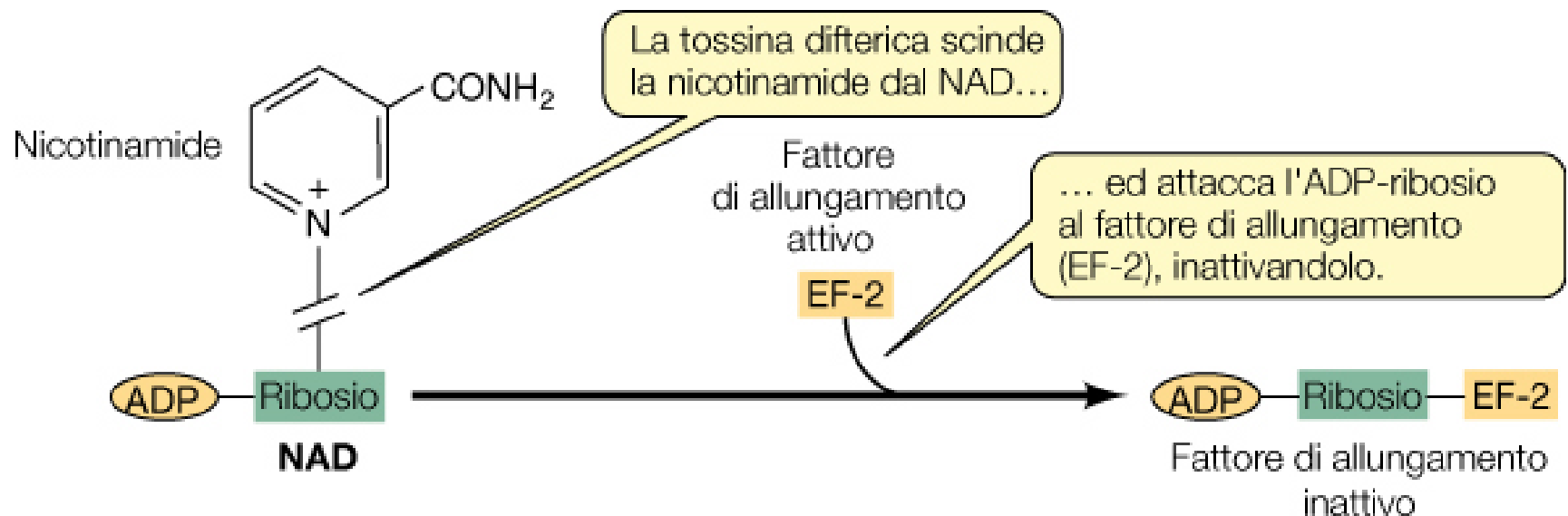


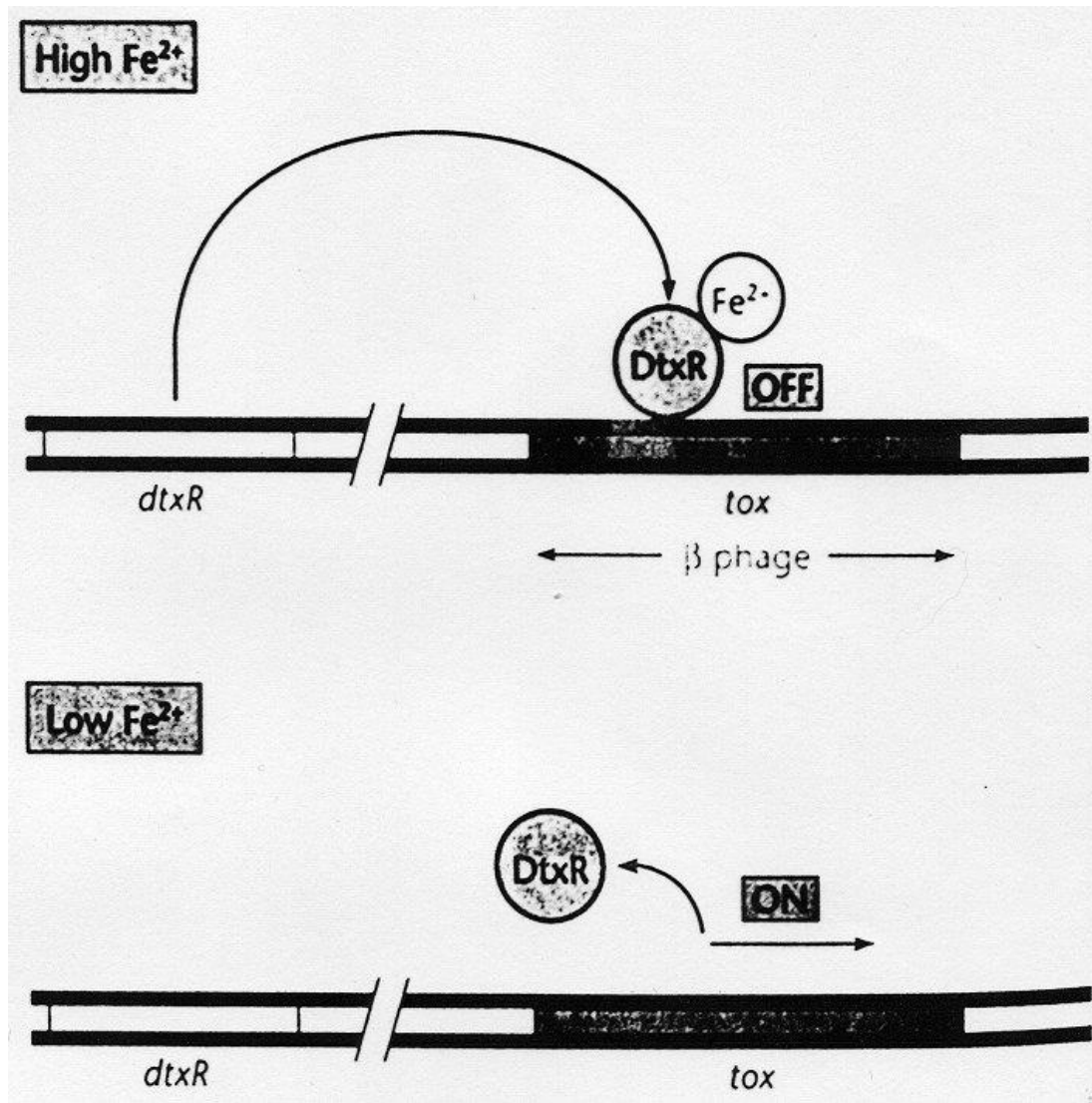
# La tossina difterica inibisce la sintesi proteica

Il peptide A della tossina difterica catalizza l'ADP ribosilazione del fattore EF-2 della traduzione (dal NAD<sup>+</sup>). Il fattore di allungamento modificato non promuove più il trasferimento di AA alla catena polipeptidica nascente con il conseguente blocco della sintesi proteica.



La tossina difterica è in grado di scindere la nicotinamide dal NAD e successivamente di legare l'ADP ribosio al fattore di elongazione della traduzione EF2 , inattivandolo





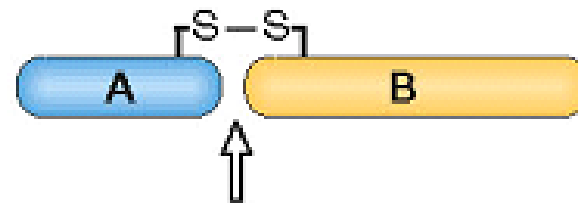
La sintesi della tossina difterica è sotto il controllo di ioni Fe. In presenza di ioni  $\text{Fe}^{2+}$  questo si lega al repressore agendo da corepressore della proteina DtxR reprimendo l'espressione dei geni per la tossina. In carenza di Fe il repressore non è attivo e si ha sintesi della tossina.

## Le neurotossine: la tossina botulinica e la tossina tetanica.

La tossina botulinica è prodotta da *Clostridium botulinum*, un batterio Gram positivo, ed è una tossina di tipo AB. Esistono 7 tipi diversi di tossina botulinica, correlati tra loro ed in almeno due casi la tossina è sintetizzata da batteriofagi temperati

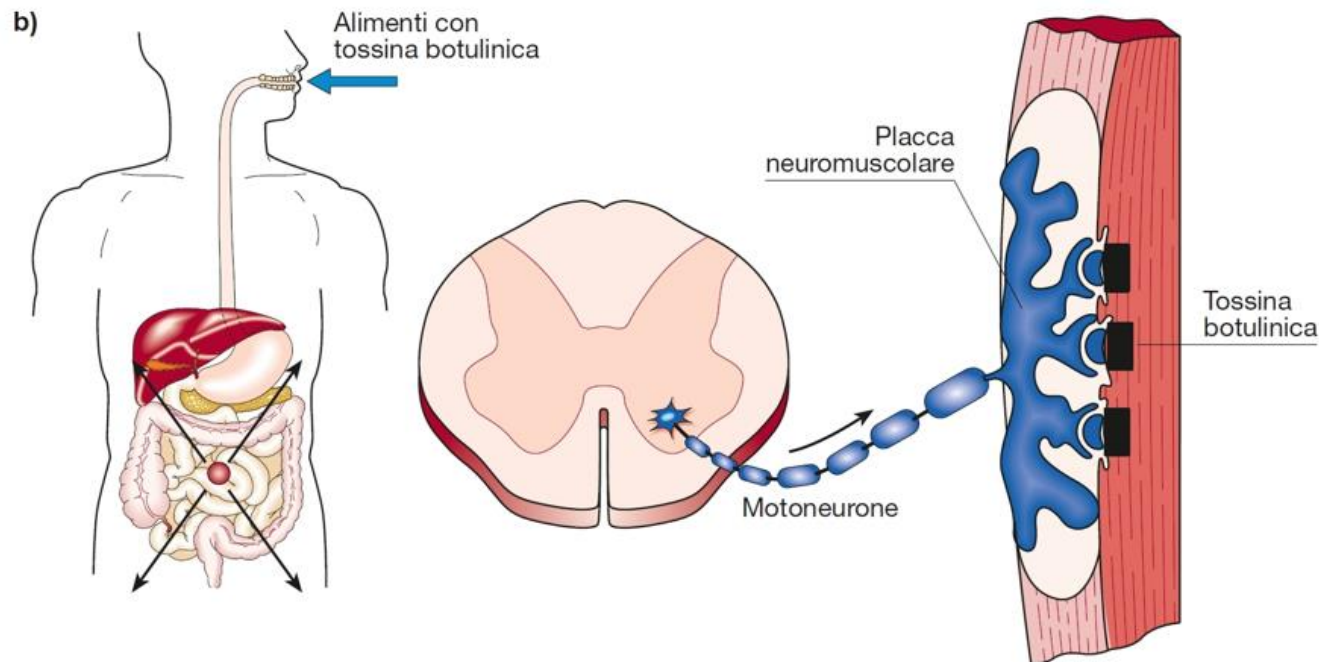
La tossina viene prodotta come singolo polipeptide di circa 150 KDa con due peptidi tenuti insieme da ponti disolfuro. Per proteolisi si generano due frammenti, uno definito catena pesante (B- 100 KDa) necessaria per il contatto con la cellula bersaglio ed un catena leggera (A- 50 KDa) con attività proteasica, responsabile dell' inibizione del rilascio di acetilcolina.

Neurotossina clostridica  
(tossine tetanica e botulinica)

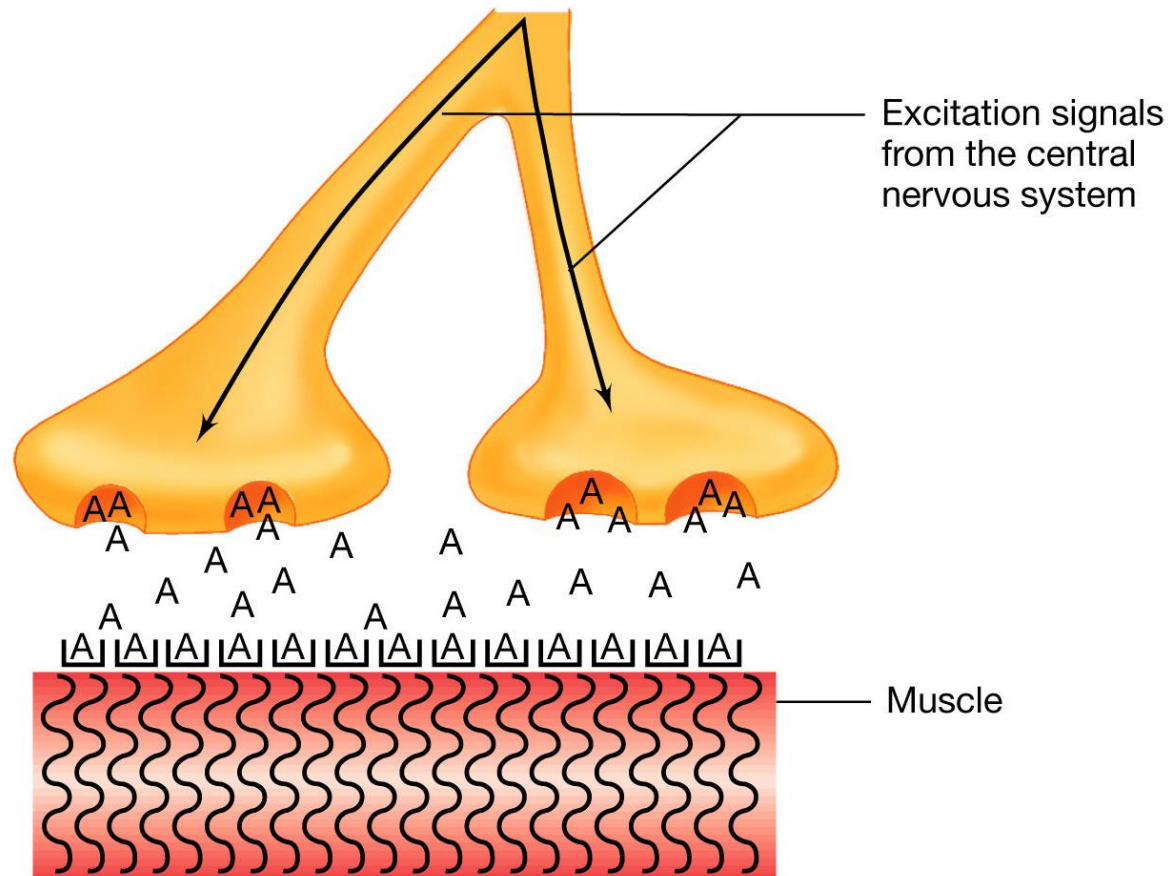


La tossina botulinica BoNT è tra i veleni più potenti esistenti in natura. Viene ingerita con gli alimenti contaminati e l'acidità dei succhi gastrici **non** riesce ad inattivarla.

Viene invece assorbita dalle cellule dell'epitelio gastrico, raggiunge le cellule dell'epitelio intestinale e tramite la circolazione raggiunge i motoneuroni associati al sistema nervoso periferico.



La tossina botulinica è prodotta da *Clostridium botulinum*.



**Normal**

Acetylcholine (A) induces contraction of muscle fibers

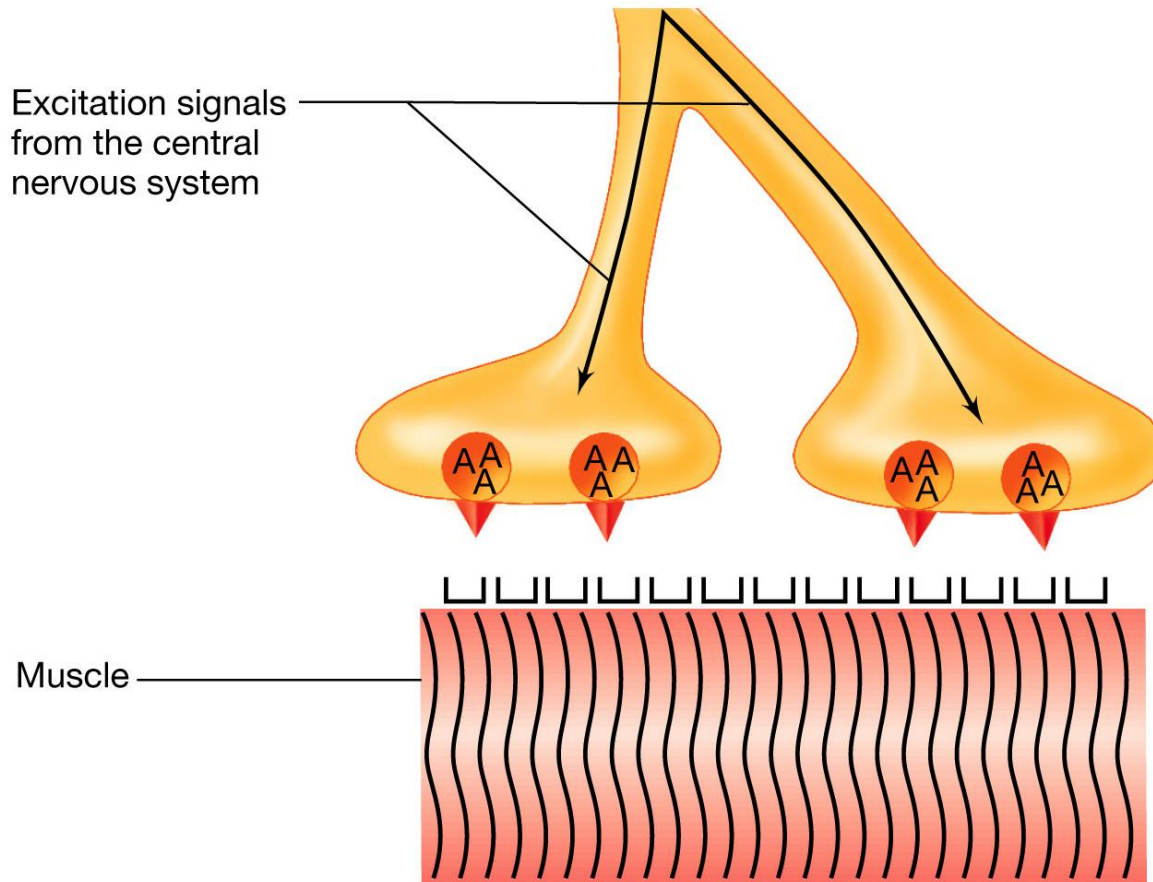
(a)

L'acetilcolina è rilasciata dalle terminazioni neuronali a livello della placca motoria in seguito a stimolazione da parte del Sistema Nervoso Centrale.

L'acetilcolina si lega a specifici recettori inducendo la contrazione



# La tossina botulinica previene il rilascio di acetilcolina dalle vescicole presinaptiche



Poiché la trasmissione dell'impulso nervoso al muscolo è mediata dall'interazione tra l'acetilcolina ed il recettore muscolare, in presenza di tossina botulinica il muscolo non può ricevere il messaggio e si ha paralisi flaccida

## Botulism

Botulinum toxin, ▲, blocks release of A, inhibiting contraction

(b)

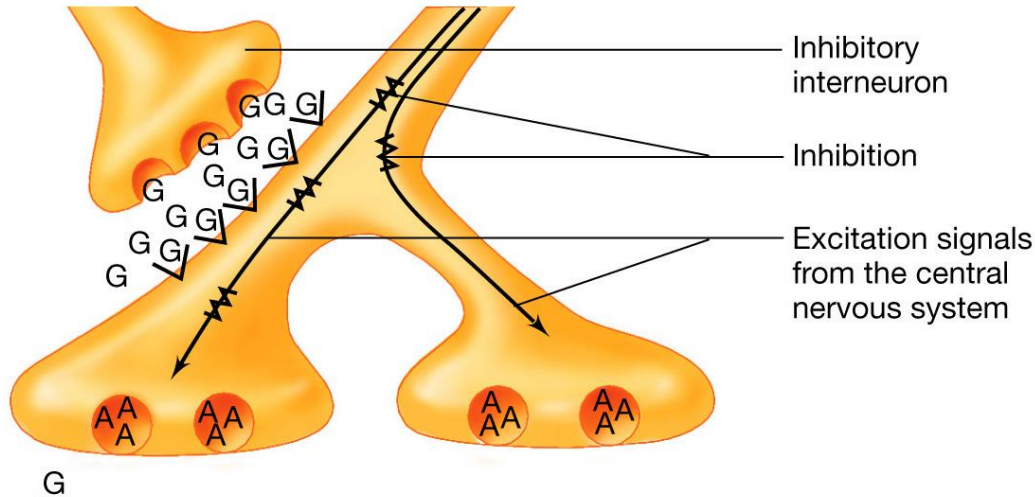
## TOSSINA TETANICA prodotta da *Clostridium tetani*

La tossina tetanica è una proteina di tipo A-B di pm.150.000

La presenza della tossina a livello delle terminazioni degli interneuroni inibitori blocca il rilascio di glicina dalle vescicole. In questo modo non vi sono più segnali inibitori diretti ai motoneuroni. Si ha quindi un continuo rilascio di acetilcolina da parte dei motoneuroni che porta ad una contrazione muscolare continua. L'esito è una paralisi spastica.

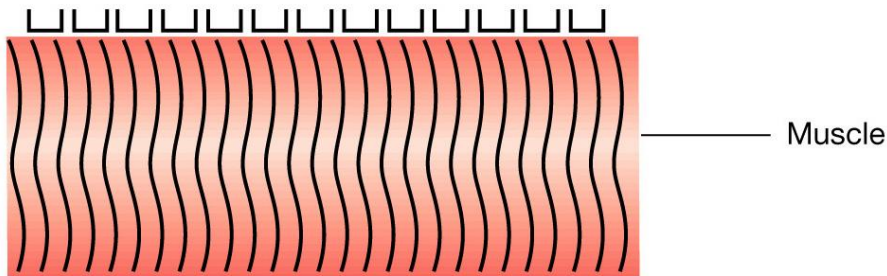


La tossina tetanica è prodotta da *Clostridium tetani*, un microrganismo Gram+ sporigeno ed anaerobio.



La tossina quando viene a contatto con il sistema nervoso è trasportata a ritroso nel midollo spinale dove si lega in modo specifico ai lipidi gangliosidici a livello delle terminazioni degli interneuroni inibitori.

Il rilassamento muscolare è normalmente indotto dalla glicina rilasciata dagli interneuroni inibitori. La glicina agisce sui neuroni motori bloccando l'impulso ed il rilascio di acetilcolina a livello della placca motoria .



**Normal**  
Glycine (G) release from inhibitory interneurons stops acetylcholine (A) release and allows relaxation of muscle

(a)

NH<sub>2</sub>

S-S

COOH



L

H<sub>N</sub>H<sub>C</sub>

Catena leggera (L)

Catena pesante (H)

Porzione enzimaticamente attiva

Zn-metalloproteasi

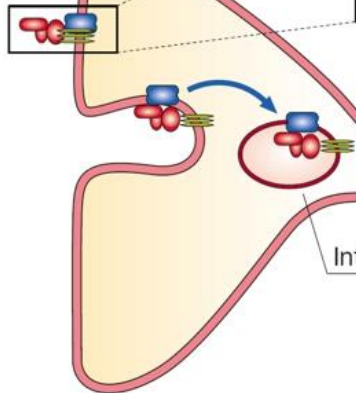
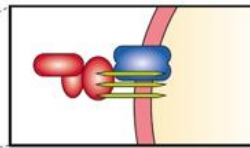
Taglio della proteina sinaptobrevina

Ponte disolfuro

Legame con i gangliosidi

Trasporto retrogrado lungo l'assone

Legame alla cellula



Internalizzazione

Nucleo

Taglio della sinaptobrevina



Tossina tetanica

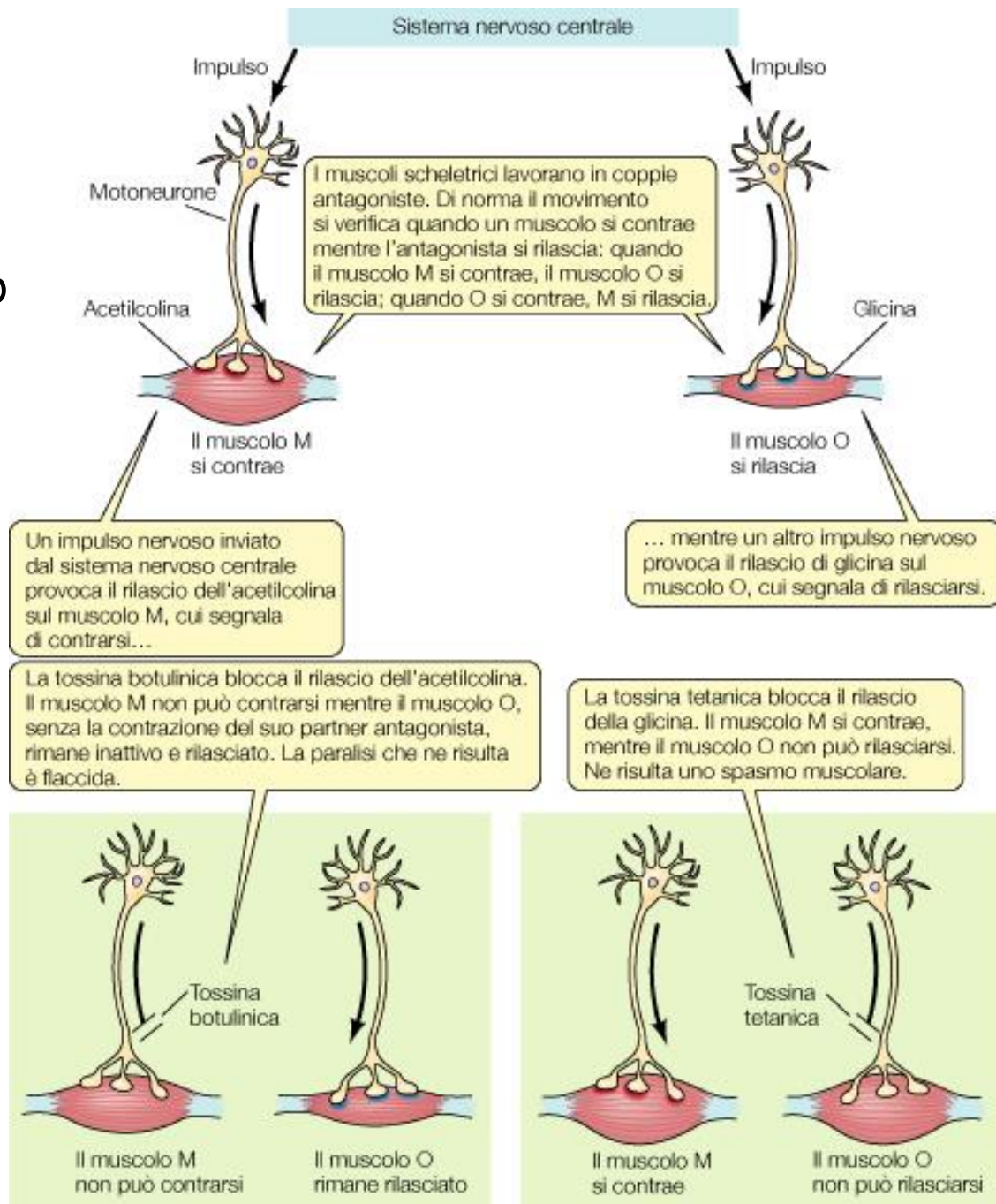


Proteina recettore



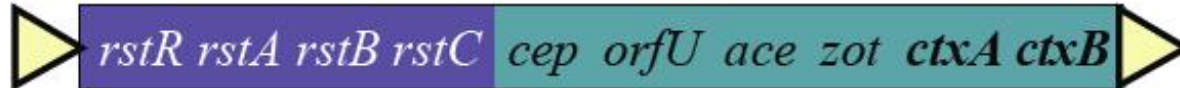
Ganglioside

# Tossina tetanica e tossina botulinica A confronto



*Vibrio cholerae*, l'agente eziologico del colera è un batterio Gram negativo. I ceppivirulenti appartengono al sierogruppo O1 e O139. I fattori di virulenza principali sono la tossina colerica CTX e il pilo coregolato con la tossina ( TCP) che tiene assieme le cellule batteriche in modo che possano resistere ai processi di dilavamento nell'intestino

Ceppi lisogeni per il fago filamentoso CTX $\Phi$  diventano tossigenici perché i geni per le subunità A e b della tossina sono localizzati sul fago.



La tossina colerica è sintetizzata da un fago di tipo M13 integrato nel genoma di *V.cholerae*.

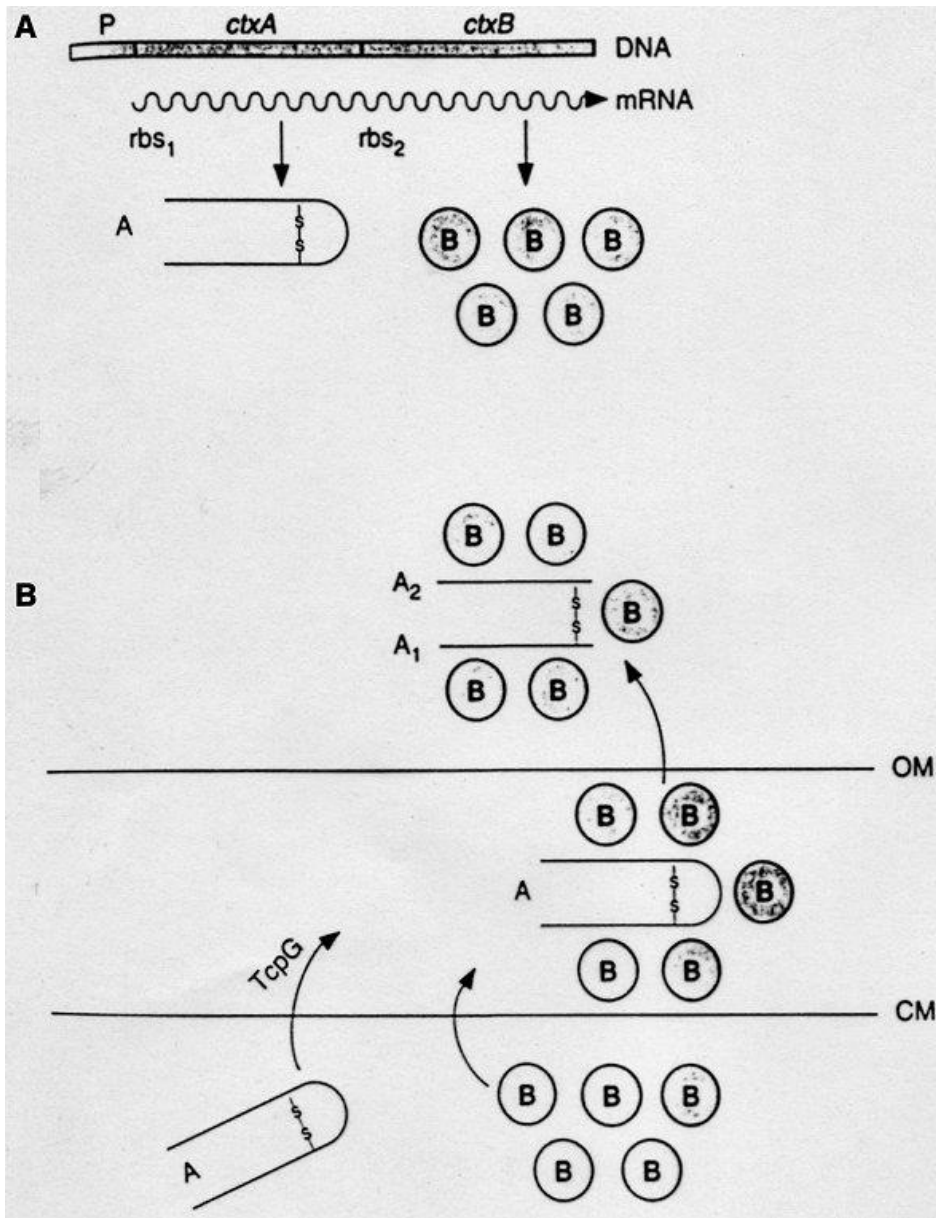
La tossina colerica ( p.m.82 200) è una tossina di tipo A-B costituita da 1 **subunità A** di p.m.27000 e 5 **subunità B** p.m.11.600.

**La subunità B** contiene il sito di legame attraverso il quale la tossina colerica si combina con il ganglioside GM1 , un glicolipide complesso, presente sulla membrana citoplasmatica delle cellule epiteliali .

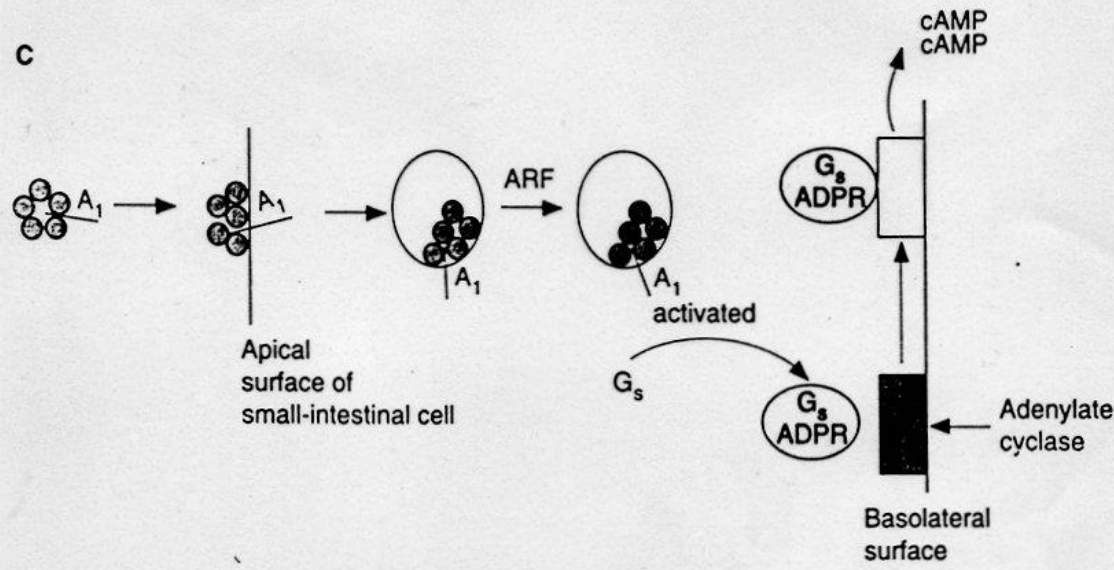
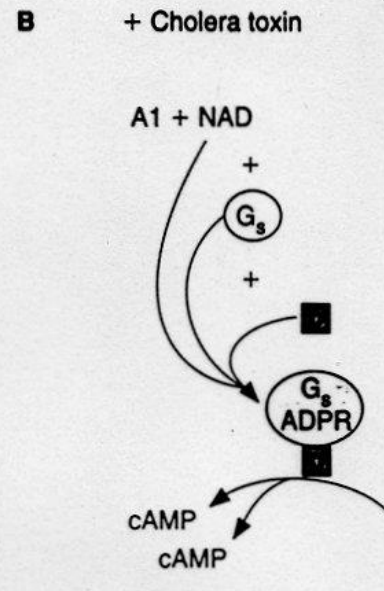
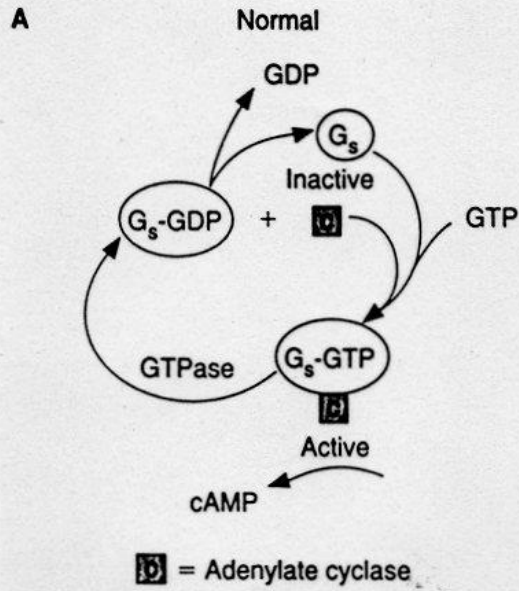
**La subunità A** è capace di attivare l'enzima ADENILATOCICLASI inducendo la conversione dell'ATP in AMPc. L'aumento dei livelli di cAMP provoca una secrezione attiva di ioni  $\text{Cl}^-$  nel lumen intestinale mentre si perde l normale afflusso di ioni  $\text{Na}^+$ .

Questa alterazione ionica porta all'immissione di grandi quantità di  $\text{H}_2\text{O}$  nel lumen, con conseguente massiva perdita di liquidi e morte per disidratazione



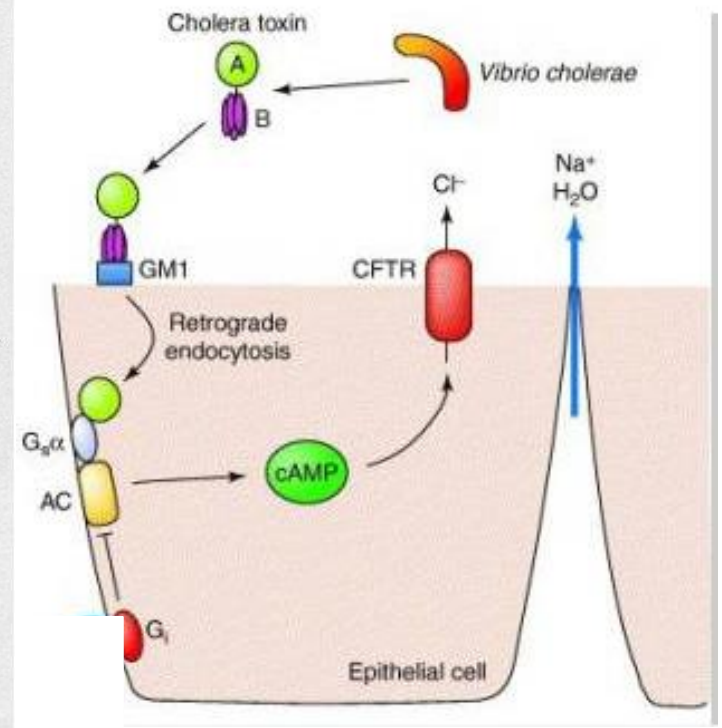


La tossina colerica è codificata da un operone presente sul genoma di un fago di tipo filamentoso (tipo M13)

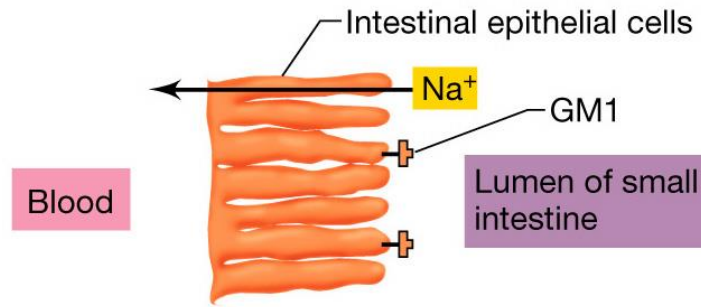


La tossina colerica provoca l'ADP ribosilazione della proteina G

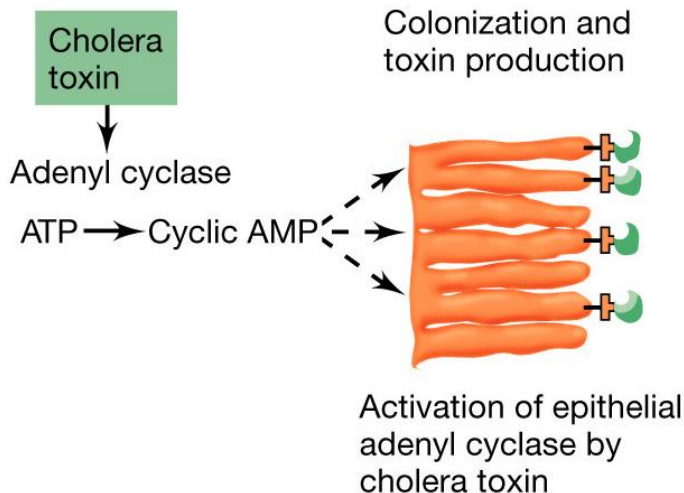
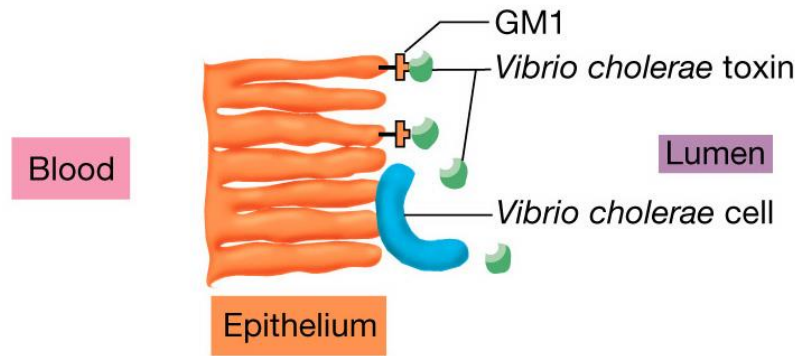
## Cholera Toxin



①



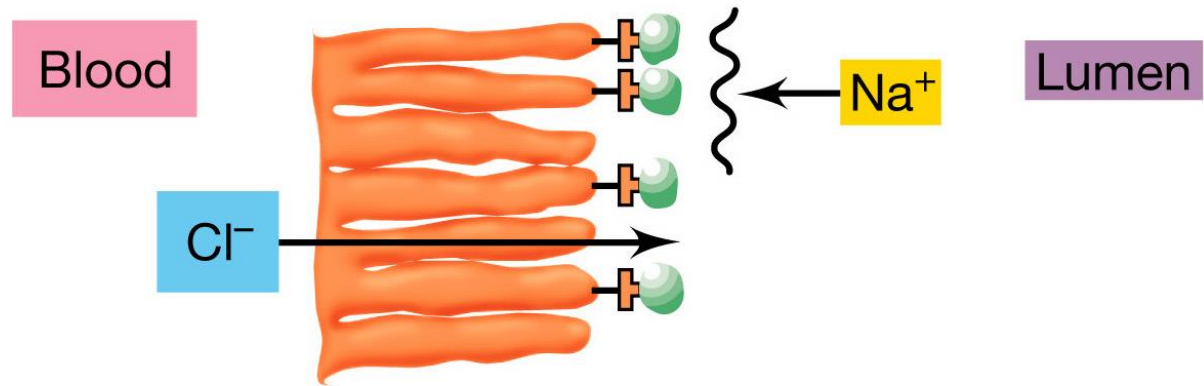
②



La tossina colerica interagisce con il ganglioside GM1 e provoca una continua attivazione dell'adenilatociclastasi. L'aumento intracellulare di AMPc determina uno scompenso nel flusso di ioni

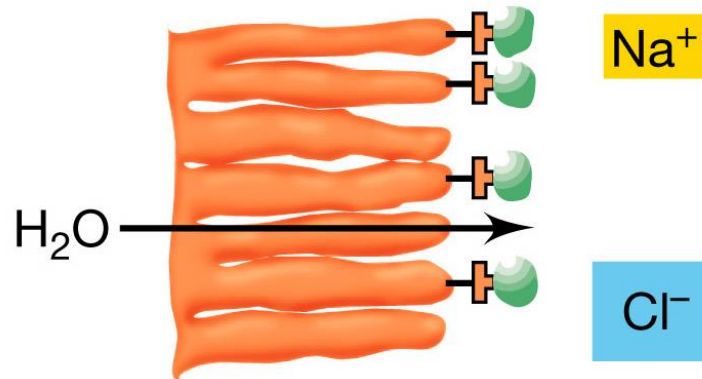


③



$\text{Na}^+$  movement blocked,  
net  $\text{Cl}^-$  movement to lumen

④



Massive water movement  
to the lumen

Sei interessato ai diversi aspetti della Microbiologia ??

I nostri corsi specialistici nelle LM

Genetica dei Microrganismi ( prof. F. Ascenzioni)

Microbiologia Cellulare e Vaccinologia (Dr.ssa Martina Pasqua)

Microbiologia molecolare e genomica microbica ( Prof. B. Colonna/Andreani - A. Carattoli )

Virologia Molecolare ( Prof.G.Matusali )

Microbiologia ambientale ( Prof. Colonna -Prof. A.Carattoli )

# **Microbiologia molecolare e genomica microbica**

## **B.Colonna A.Carattoli**

**Insegnamento del Corso di Laurea in Biotecnologie Genomiche, Industriali e Ambientali  
Selezionabile come esame a libera scelta per le LM in Biologia e Tecnologie cellulari (BTC),  
Genetica e Biologia Molecolare (GBM), Biotecnologie mediche e farmaceutiche**

### Programma del corso

#### *Genomica microbica*

- Genoma dei batteri e analisi dati di sequenza
- Genoma minimo e genoma sintetico: verso il batterio artificiale
- Origine ed evoluzione del genoma di batteri patogeni modello:
  - Microbioma intestinale: analisi genomica e metagenomica
  - Microbioma alimentare e salute dell'uomo
- Il resistoma: evoluzione delle antibiotiche resistenze

#### *Microbiologia molecolare*

- Controllo epigenetico nei batteri
- Differenziamento nei batteri: modelli e regolazione
- Piccoli RNA e regolazione genica nei batteri
- L'immunità nei batteri, le sequenze CRISPR e la resistenza ai batteriofagi
- Nuove strategie antibatteriche: farmaci mirati e terapia fagica
- Biologia sintetica: concetti di base e potenziali applicazioni