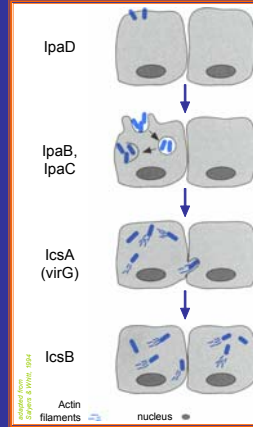


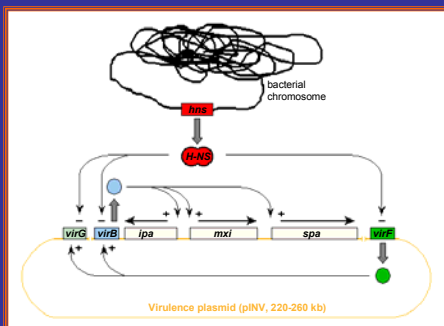
## Segnali per l'espressione di tossine e fattori di virulenza: risposta alla temperatura

- Uno dei principali segnali per "sentire" l'ospite e per la produzione di fattori di virulenza è il passaggio da temperature "basse" a 37°C.
- Quale può essere il "termometro" della cellula batterica?

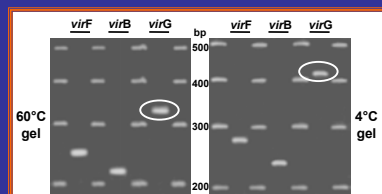


Un esempio specifico:  
Le proteine coinvolte  
Nell'invasione  
cellulare da parte di  
*Shigella* sono  
codificate da geni su  
un plasmide di  
virulenza (pINV) e  
sono espresse solo a  
37°C

## H-NS controlla i geni di virulenza in *Shigella* e in *E.coli* EIEC



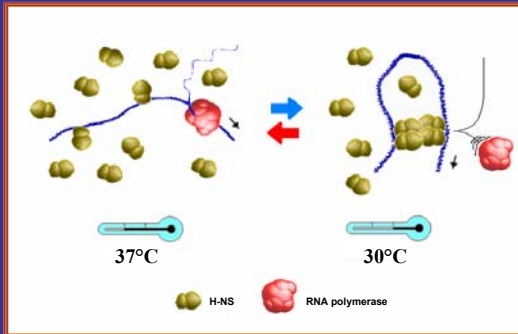
## L'espressione di tossine e fattori di virulenza in risposta alla temperatura è regolata dalla struttura locale del DNA



Le basse temperature favoriscono la  
formazione di una struttura terziaria "rigida"  
della regione dei promotori dei geni regolatori  
della virulenza. Tale struttura favorisce il  
legame cooperativo di repressori (es. H-NS)

## Temperature-dependent *virF* expression

Basic model



## Interazione tra microrganismi e cellule dell'organismo ospite

- Interazione "esterna": adesine (pili o fimbrie, OMPs); proteine che danneggiano la membrana citoplasmatica (tossine, proteasi)
- Interazione più stretta (internalizzazione): processi specifici di parassitismo intracellulare
- Entrambi i processi richiedono specifiche strutture o appendici extracellulari nel batterio

## I SISTEMI DI SECREZIONE determinano in gran parte le strategie utilizzate dai batteri patogeni per colonizzare e invadere le cellule eucariotiche

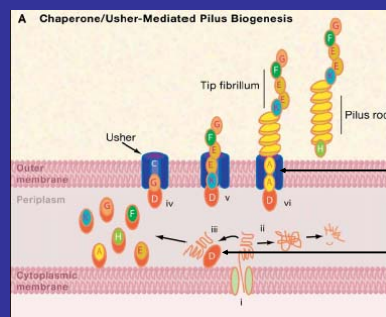
La secrezione di proteine rappresenta un processo di fondamentale importanza nella patogenesi batterica

La secrezione di tossine o l'iniezione di proteine direttamente nel citoplasma della cellula bersaglio rappresenta un meccanismo ampiamente usato dai batteri patogeni per modulare/sovrvertire le funzioni della cellula eucariotica.

Il processo di secrezione comporta il riconoscimento del substrato ed il suo trasporto attraverso uno (Gram positivi) o due (Gram negativi) sistemi di membrane.

I procarioti hanno evoluto una serie di meccanismi di trasporto composti da una serie di complessi multi-proteici

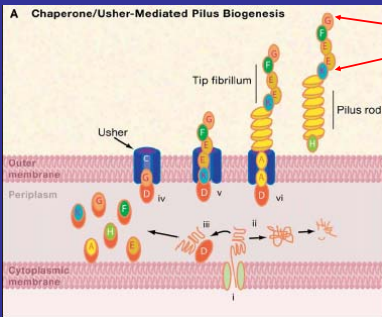
## "Ogni cosa al suo posto": l'assemblaggio corretto delle adesine batteriche (es. pili P)



La proteina PapC funge da sede di assemblaggio/esportazione corretta per le subunità funzionali delle fimbrie (sortasi)

La proteina PapD funge da chaperonina per le subunità funzionali delle fimbrie

## Sistemi di secrezione di tipo II: chaperone/usher pathway



Le strutture sulla parte terminale sono adesine specifiche per recettori eucariotici

“Bacterial Envelope”

## Esempi di interazione ed adesione specifica tra batteri e cellule eucariote

- Pili tipo P (PapG) >>>>> parte polisaccaridica di glicoproteine (tratto urinario)
- Fimbrie (FimH) >>>>> mannosio in glicoproteine (type I pilus)
- Adesine Afa/Dr (AfaE)>>>>> DAF (proteina del complemento) collagene integrine

La funzione delle adesine è di determinare un contatto stabile con la cellula bersaglio

## Sistemi di secrezione di tipo III

I sistemi di secrezione di Tipo III (T3SS) sono specializzati nella traslocazione di proteine prodotte dalla cellula batterica direttamente nel citoplasma delle cellule eucariotiche

Originariamente descritto e caratterizzato in *Yersinia* spp.

E' presente quasi esclusivamente in batteri Gram-negativi (pochi casi trovati in Gram +) che almeno per una parte del loro ciclo vitale si trovano in stretta associazione con cellule eucariotiche (animali o piante)

*Yersinia* spp.

*Yersinia pestis*

peste bubbonica

*Yersinia enterocolitica*

gastroenteriti

*Yersinia pseudotuberculosis*

I geni che codificano per l'apparato di secrezione e per le proteine effettrici sono localizzati su un plasmide (pCD1 in *Y. pestis* e pIB1 in *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*)

## Confronto dei T3SS in diversi organismi:

### Somiglianze

Le proteine che compongono l'apparato di secrezione hanno un elevato grado di omologia:

organizzazione genetica simile

geni localizzati su plasmidi o sul cromosoma in "isole di patogenicità"

acquisizione per trasferimento orizzontale

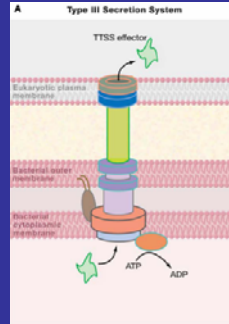
### Differenze

Le proteine traslocate non mostrano omologia nei diversi T3SS

I geni che codificano per le proteine effettrici (traslocate) sembrano essere stati acquisiti indipendentemente dai geni che codificano per l'apparato di secrezione

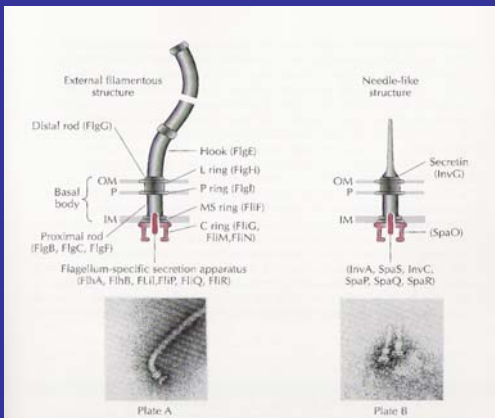
Risultato della co-evoluzione dei batteri con i rispettivi ospiti (?)

## Il meccanismo dei sistemi di secrezione di tipo III



La struttura di un tipico sistema di secrezione di tipo III costituisce una "siringa" in grado di iniettare macromolecole (tipicamente proteine) all'interno della cellula bersaglio (dell'ospite)

## L'APPARATO DI SECREZIONE DI TIPO III "ASSOMIGLIA" AL FLAGELLO

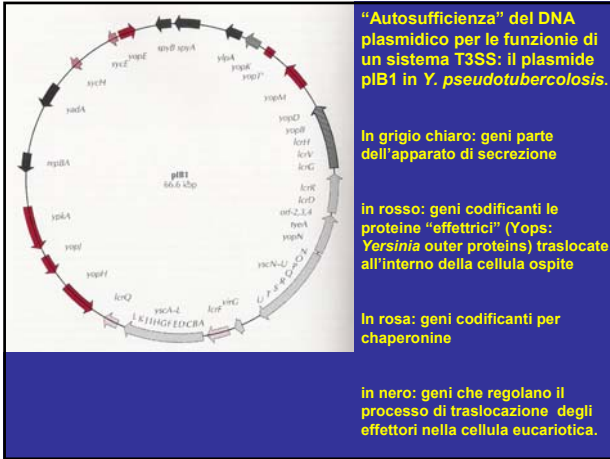


**Table 13.2** Proteins common to the flagellum-specific secretion apparatus and the *Salmonella* type III secretion system<sup>a</sup>

SPI-1	Flagellum	Location	Function and structure
InvC	FliI	Cytoplasm	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> proton-translocating ATPase; energizer of flagellar secretion and assembly
SpaO	FliN/Y <sup>b</sup>	Cytoplasmic face of the inner membrane	Probable component of the C ring
SpaP	FliP	Inner membrane	Secretion apparatus
SpaQ	FliQ	Inner membrane	Secretion apparatus
SpaR	FliR	Inner membrane	Secretion apparatus
SpaS	FliH	Inner membrane	Secretion apparatus; suppression of hook multimer formation
InvA	FliA	Inner membrane	Secretion apparatus; channel formation?

<sup>a</sup>While components of the SPI-1 type III secretion system of *Salmonella* are illustrated, all type III secretion systems encoded by animal- and plant-infecting bacteria contain proteins with extensive similarity to these components of the flagellum-specific secretion apparatus.

<sup>b</sup>FliN (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*); FliY (*Bacillus subtilis*).



### Ruolo delle proteine effettrici in *Yersinia* spp.

- Impedire la fagocitosi da parte di macrofagi
- Bloccare l'induzione delle citochine pro-infiammatorie

Il processo di fagocitosi richiede il riarrangiamento locale del citoscheletro della cellula fagocitica con il risultato di inglobare il batterio patogeno all'interno di un vacuolo circondato da membrana.

Le proteine effettrici YopE, YopH e YopT sono in grado di interferire in questo processo

YopH: tirosina fosfatasi (PTPase) simile alle PTPasi eucariotiche  
 YopE: GTPase activating protein  
 YopT: interferisce con il funzionamento di RhoA (non noto il meccanismo)

### Il segnale di attivazione dei T3SS è l'interazione stessa con la cellula ospite

Yersinia Blocks phagocytosis  
 Blocks induction of cytokine expression

Eukaryotic cell  $\beta$ 1-integrins

Invasin — Ysc — YopB/YopD

Closed — Open — Bacterium

**Il legame Invasina-  $\beta$ 1-integrina invia il segnale di apertura del canale per la secrezione/traslocazione di Yop**

$\beta$ 1-integrine: proteine transmembrana coinvolte nella adesione cellula-cellula e cellula-matrice (bersaglio "preferito" di molti patogeni è la  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrina)

### La regolazione dei geni di virulenza coinvolge tipici sensori di stimoli ambientali e TCRS

OmpC — OmpF — OM — PP — IM

Envelope stress? — Macrophage environment?

EnvZ — His-P — SsrA — Asp-P — SsrB

*spiC* — *ssrA* — *ssrB*

*sfh*, etc.

**Geni di virulenza in SPI 2 (T3SS)**

**Ruolo dei sistemi di secrezione di tipo III in altri batteri patogeni:  
Meccanismo d'azione comune per finalità diverse**

La modulazione del citoscheletro permette a microrganismi patogeni di invadere cellule non-fagocitiche

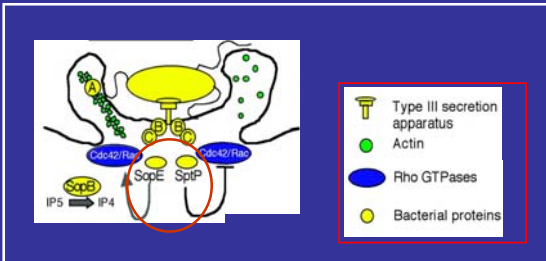
(Es. *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, etc.)

*Salmonella*: agente eziologico di febbre tifoide o gastroenteriti



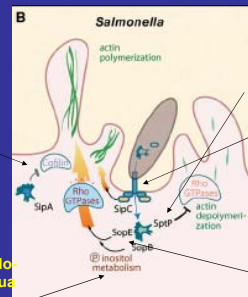
*Salmonella* SPI-1: importante per l'iniziale interazione con le cellule epiteliali intestinali. Le proteine effettrici causano riarrangiamenti locali del citoscheletro con conseguente "internalizzazione" del batterio patogeno. Le proteine effettrici hanno anche il ruolo di ripristinare l'iniziale architettura cellulare una volta che il batterio è stato "internalizzato"

**Meccanismo di entrata di *Salmonella* in cellule epiteliali:  
Modificazione del citoscheletro della cellula ospite**



**Il meccanismo di internalizzazione richiede una  
modificazione del citoscheletro della cellula ospite**

La proteina effettrice SipA blocca la cofilina, un fattore che innesca la depolimerizzazione dei filamenti di actina



La proteina effettrice SptP blocca l'attivazione delle GTPasi Rho innescando la depolimerizzazione dell'actina. Iniezione di proteine effettrici tramite T3SS

La proteina effettrice SopB attiva le inositolo-kinasi stimolando a sua volta la polimerizzazione di actina

La proteina effettrice SopE attiva le proteine Rho stimolando la polimerizzazione dell'actina

## Riassumendo.....

Le proteine effettrici codificate da SPI-1 di *Salmonella*

**SopE:** appartiene alla famiglia GEF (GTPase exchange factor) agisce sulle GTPasi eucariotiche della famiglia Rho, Cdc42 e Rac-1

**SopB:** fosfatidil-inositolo fosfatasi

**Azione di SopE e SopB:** provocare una massiccia e locale polimerizzazione di actina, formazione dei foci di adesione.  
**Risultato:** ingresso di *Salmonella* nella cellula eucariotica

**SptP:** appartiene alla famiglia GAP (GTPase activating protein) agisce sulle GTPasi eucariotiche Cdc42 e Rac-1 e antagonizza l'attività di SopE

**Azione di SptP:** ripristinare l'iniziale architettura cellulare una volta che il batterio è stato "internalizzato"

Le proteine effettrici SopE e SptP sono traslocate contemporaneamente e in uguale quantità; la loro attività è regolata in maniera "temporale" all'interno della cellula eucariotica.

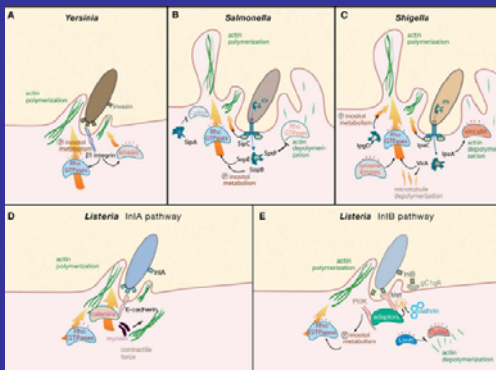
La velocità di degradazione delle due proteine nella cellula eucariotica è diversa: SopE (attivatore GTPasi Rho; stimola polimerizzazione) viene degradata 15' dopo la sua traslocazione  
 SptP (inibitore GTPasi Rho; inibisce polimerizzazione) è stabile fino a 120' dopo la sua traslocazione

Nelle cellule eucariotiche le proteine destinate alla degradazione vengono "marcate" con specifici segnali (es. ubiquitinazione) e quindi inviate al proteasoma per la distruzione.

I segnali per la degradazione di SopE e SptP risiedono nei primi 100 aa delle rispettive proteine



## I sistemi per l'internalizzazione batterica utilizzano bersagli e pathways diversi



## I SISTEMI DI SECREZIONE DI TIPO IV (T4SS)

EVOLVONO DAI SISTEMI DI CONIUGAZIONE MEDIATI DAI PILI SESSUALI

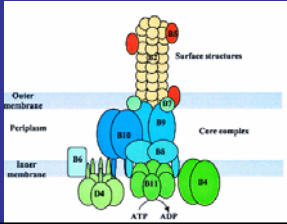
I SUBSTRATI SECRETI DA T4SS POSSONO ESSERE "RECLUTATI" NEL CITOPLASMA, NELLA MEMBRANA INTERNA O NEL PERIPLASMA

I SUBSTRATI POSSONO ESSERE SIA SECRETI NEL MEZZO EXTRACELLULARE SIA INIETTATI NEL CITOPLASMA DELLA CELLULA BERSAGLIO

L'ANALISI DELLE SEQUENZE GENOMICHE RIVELA LA PRESENZA DI T4SS IN MOLTI PATOGENI MA POCHE SONO I SUBSTRATI IDENTIFICATI

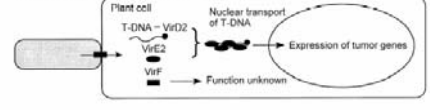
### Organizzazione e comparazione dei geni in diversi T4SS

<i>A. tumefaciens</i>	Vlr	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	#	D4
pKM101(N)	Tra	L	M	A	B	C	D	N	E	O	F	G		J
R388(W)	Trw	N	M	L	K	J	I	H	G	F	E	D		B
pSB102	Tra	A	C	D	E	F	H	I	J	K	L	M		N
<i>L. pneumophila</i>	Lvh	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11		D4
RP4(P)	Trb	N	C	D	E	F					I	B		TrnC
<i>B. pertussis</i>	Ptl	-	A	B	C		D	I	E	F	G	H		-
<i>H. pylori</i>	Cag	0523	0546	0548	0544			T	0530	0528	0527	0525		0524

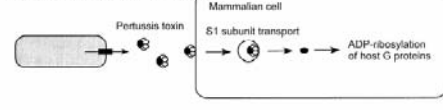


Yeo e Waksman J Bacteriol 2004

### A. *Agrobacterium tumefaciens* (virB system)



### B. *Bordetella pertussis* (ptl system)



Nagai and Roy Cell Microbiol 2003

Esotossina di tipo A-B responsabile della maggior parte dei sintomi  
 Ogni subunità possiede la sequenza segnale all'N-terminale: secrezione sec-dipendente nel periplasma e assemblaggio delle subunità.  
 La secrezione attraverso OM richiede i geni ptl del T4SS  
 S1: porzione catalitica pentamero B: riconoscimento cellula ospite

### D. *Legionella pneumophila* (dot/icm system)

