

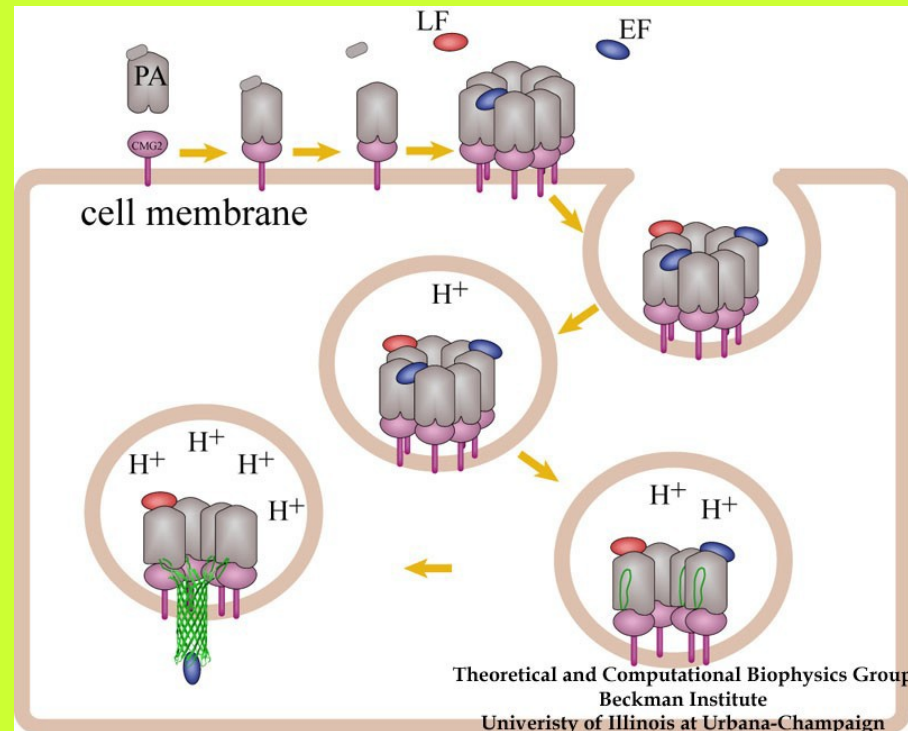
CYTOLOGIE A MORFOLOGIE PROKARYOT

5

Struktury vybraných
bakteriálních toxinů

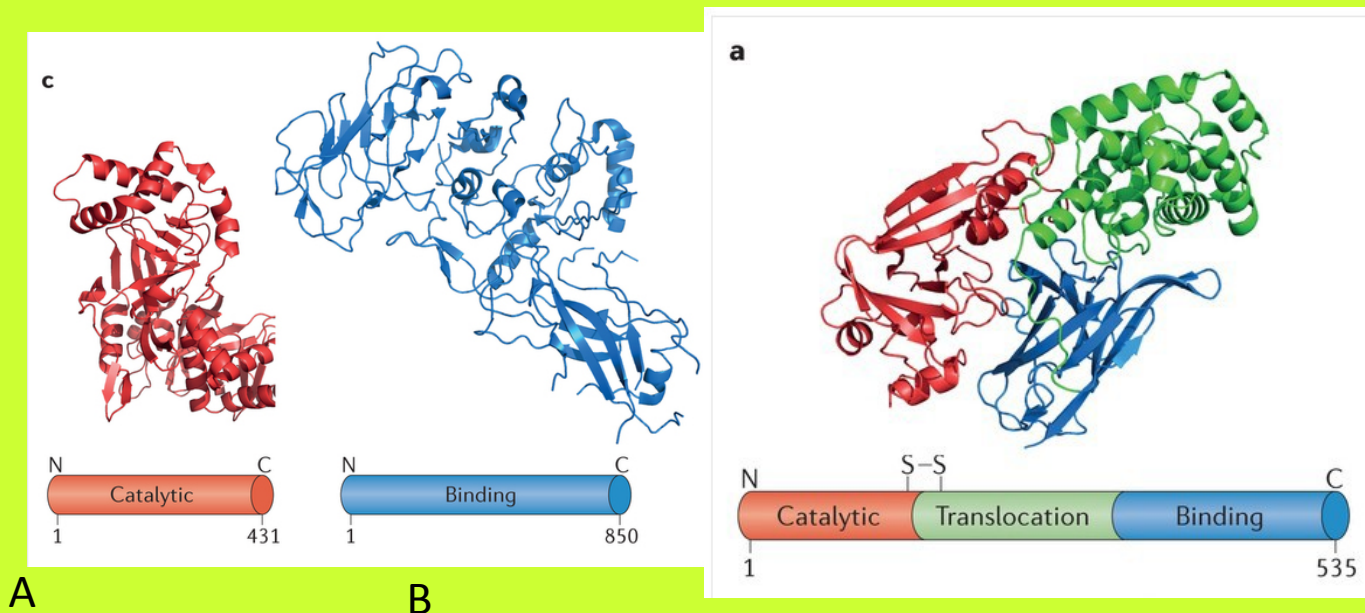
Toxiny

- zodpovědné za toxicitu a invazivitu
- enzymy - peptidy způsobující póry v membráně
- superantigeny
- toxiny jsou také virulentní faktory



Toxin je složen ze dvou domén

- A a B doména
- A..... katalytická fce (modifikace proteinů hostitele)
- např: glykosylace, proteolýza, nekovalentní modifikace
- B..... vazebná doména
- když domény oddělíme, samotná A doména je toxická, ale nedostane se do buňky
- B doména je schopná se do buňky dostat, ale není nijak toxická
- existuje zde také translokační doména - inzerce toxinu pomoci endozomu (= toxin díky tomu lépe proniká do cytoplasmy)



Vstup toxinů do cílové buňky

Dva mechanismy vstupu přes membránu:

1) přímý vstup po vazbě B jednotky na receptor a vytvoření póru v membráně pro transport A podjednotky do CPL

2) vazba A+B komplexu na receptor, ten zprostředkuje endocytózu

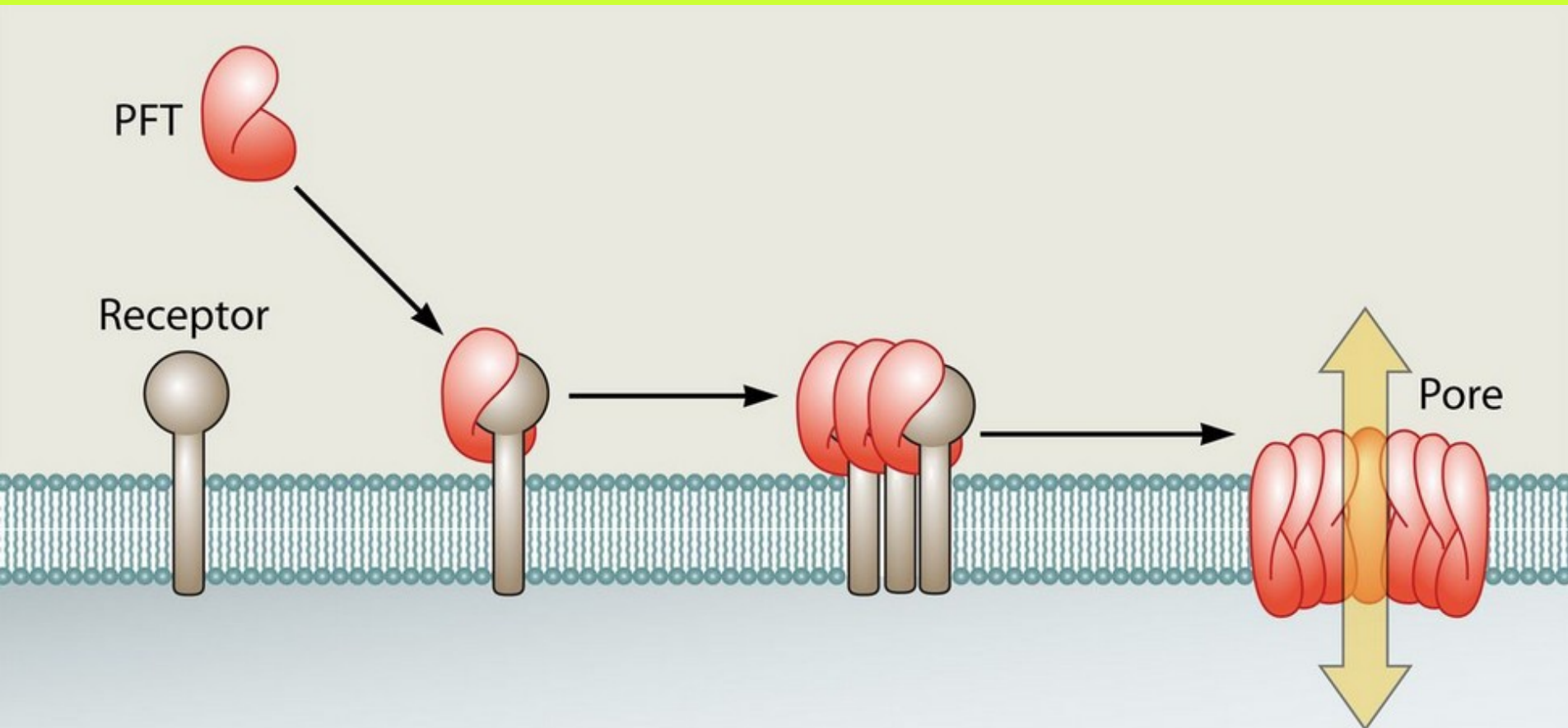
- uvnitř endozomu přibývá H⁺ iontů a okyseluje se, to vede k oddělení jednotek
- B podjednotka následně napomáhá průniku A jednotky

- některé toxiny vstupují oběma cestami
- podobná enzymatická fce nemusí znamenat stejnou cestu vstupu
- př. anthrax a adenylát cykláza *Bordetella pertusis* - obojí katalyzují produkci cAMP z rezerv ATP, ale anthrax vstupuje receptorem

Póry formující toxiny

- nejpočetnější skupina toxinů
- způsobují póry u rostlin, živočichů
- tím dojde k narušení membrány

- pór je tvořen podjednotkami přisedajícími na membránu
- tak vznikne komplex, dojde ke změně konformace proteinu a vznikne pór



- dominují dvě podskupiny proteinové konformace- alfa a beta (alfa helix, beta list)

alpha Helix

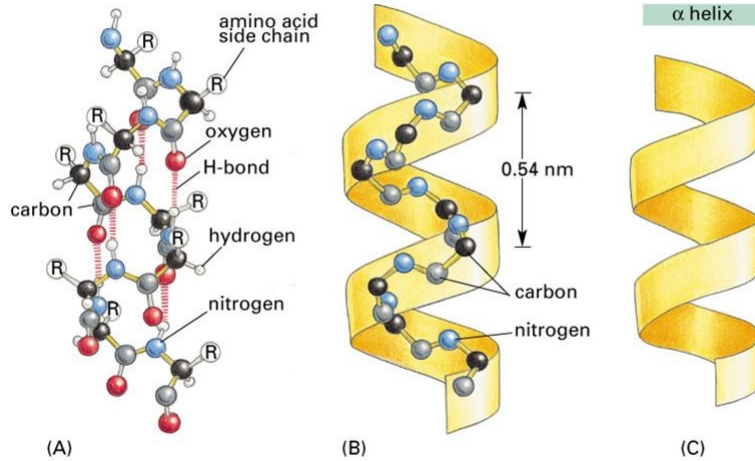
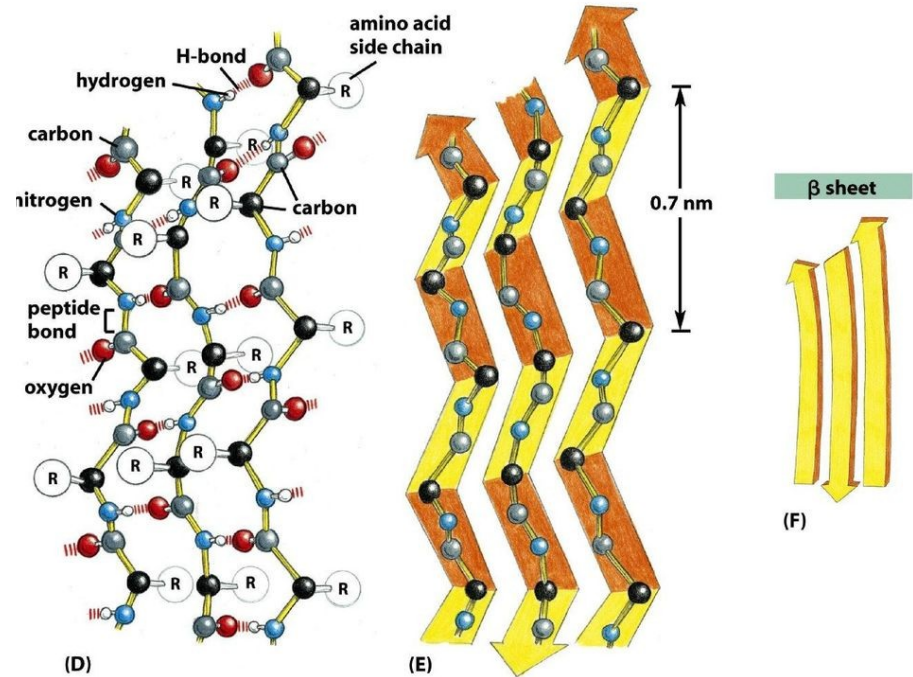


Figure 3-9 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

β-skládaný list



Póry formující toxiny

Toxin	species	prostup	nemoc
perfringiolysin O	<i>Clostridium perfringens</i>	cholesterol	gas gangrene
hemolysin	<i>Escherichia coli</i>	cell membrane	UTI
listeriolysin	<i>Listeria monocytogenes</i>	cholesterol	systemic; meningitis
anthrax EF	<i>Bacillus anthracis</i>	cell membrane	anthrax (edema)
alpha toxin	<i>Staphylococcus aureus</i>	cell membrane	abcesses
pneumolysin	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	cholesterol	pneumonia; otitis media
streptolysin O	<i>Streptococcus pyogenes</i>	cholesterol	strep throat
leukocidin	<i>Staphylococcus aureus</i>	phagocyte membrane	pyogenic infections

Superantigeny

- další skupina toxinů
- vyvolávají velkou systémovou odezvu, protože se važí na molekuly MHC druhé třídy
- modifikují pomocné T-lymfocyty
- to způsobí imunitní odpověď
- např. syndrom toxického šoku je způsobé superantigenem

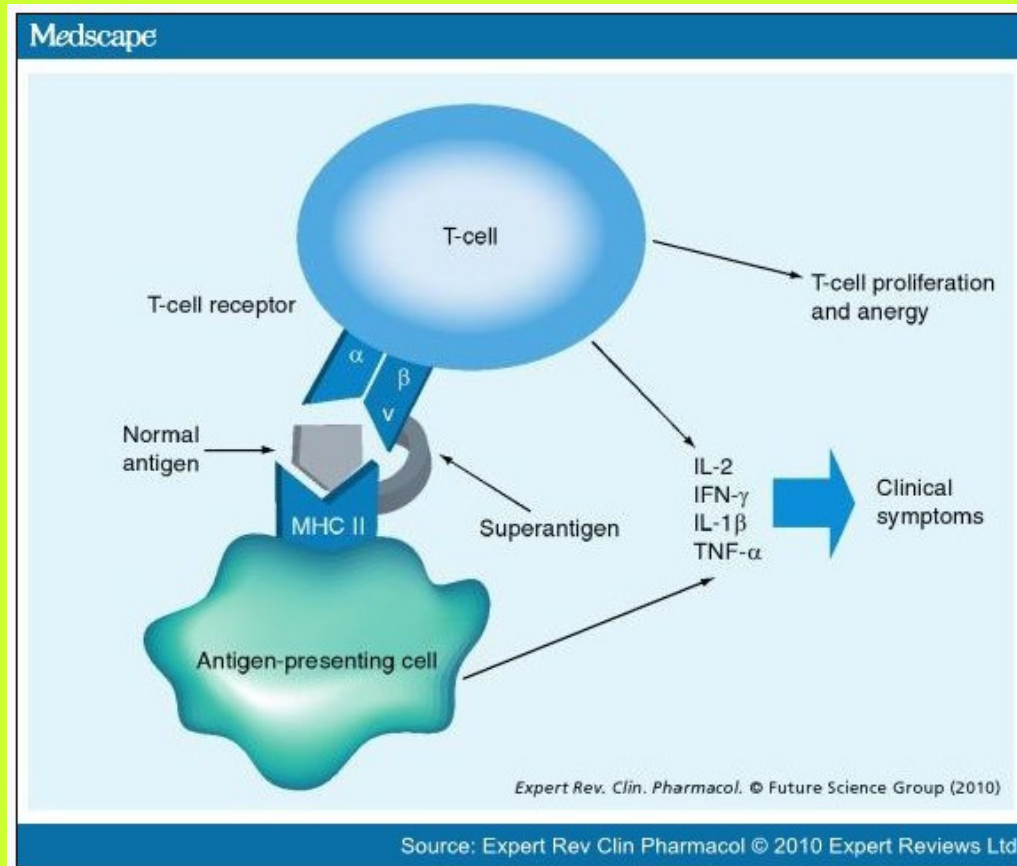
TSS - syndrom toxického šoku

- reakce těla na toxiny uvolňované bakteriemi *Staphylococcus*
- může způsobit nutné amputace i smrt způsobenou hypovolemickým šokem
- tj. náhlá porucha průtoku krve orgány a tkání
- přestanou fungovat srdce a plíce
- je rel. vzácný ale častou příčinou je nevhodné používání menstruačních tampónů
- příznaky - vysoká horečka se zvracením

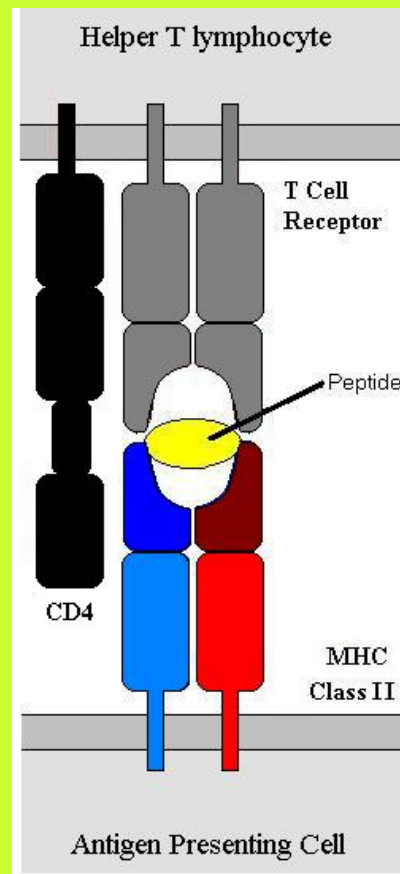


Superantigen - mechanismus

- napojí se na molekulu MHC buňky, která antigen má
- tj. makrofág a na T-buněčný receptor T-lymfocytů
- T-lymfocyty schopné účinně regulovat imunitní systém tím, že vylučují do krve cytokiny
- superantigen vede k masivnímu uvolnění cytokininů a chemokininů

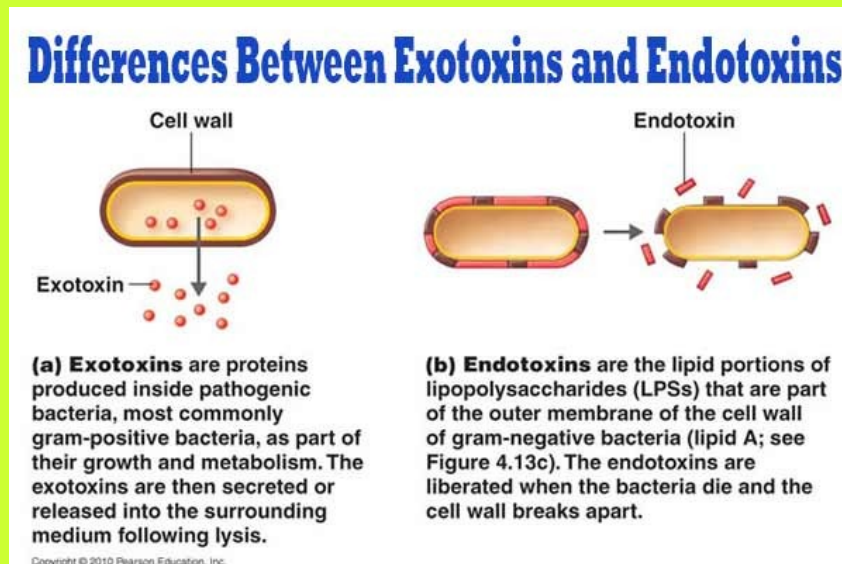


- superantigeny jsou rezistentní k proteázám a denaturaci teplem
- nescificky se vážou na molekuly MHC II aktivace T lymfocytů
- jejich proliferace a diferenciaci pak vede produkci zvýšeného množství prozánětlivých faktorů (TNF- α , IL-2, IFN- γ) a TSS



Bakteriální exotoxiny

- exotoxiny jsou vysoce toxické, působí v místě vzdálením od místa vstupu
- nezvyšují teplotu
- vylučovány živými buňkami v exp. fázi
- produkovány G+ i G- bakteriemi
- proteiny, málo polypeptidy (př: enzymy)
- vážou se obvykle na specifické receptory – GP, sialoglykosidy (G proteiny)
- kódovány geny plazmidů
- termolabilní; inaktivovány při 60 °C
- produkovány: *V. cholerae*, enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), některé kmeny *S. aureus*,



Bakteriální exotoxiny a makroorganismus

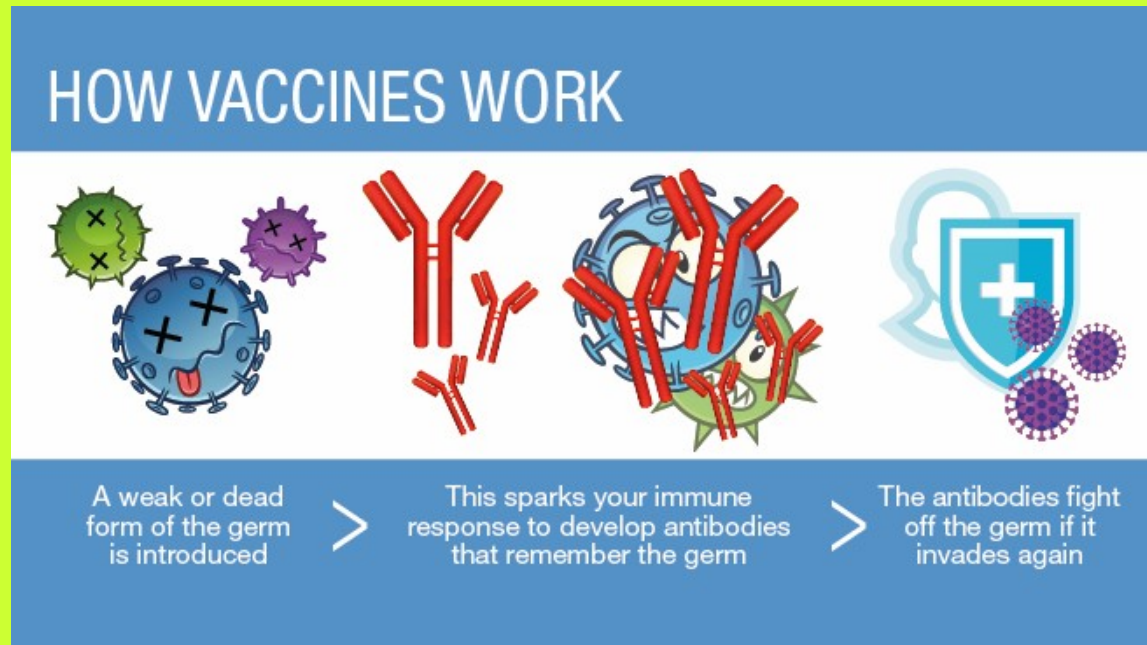
- vysoce toxické, pro zvířata letální i v malých dávkách
- vysoce antigení, stimulují vznik antitoxinu
- spojené s průjmovými onemocněními a otravami z potravin
- to je způsobené tím, že chlor jde z buňky ven, ale sodík nejde dovnitř
- tím dochází k poškození epitelu ve střevě=průjem
- většinou exotoxin působí v místě vzdáleném od vstupu
- tj. je invazivní - botulin, tetanospazmin

- specificky toxické – botulin, tetanospazmin – neurony

- nespecificky toxické - pro celou řadu cílových buněk, způsobují nekrózu (kolagenáza, hyaluronidáza, streptokináza, fosfolipáza, lecitináza, hemolyziny, leukocidiny)
- neindukují horečnaté stavy; zvyšují hladinu nitrobuněčného cAMP (choleratoxin stimuluje kinázu A)
- inhibují syntézu proteinů (difterický toxin), způsobuje záškrť
- mají afinitu k nervovým vláknům

Bakteriální exotoxiny jako vakcíny

- exotoxin lze konvertovat na toxoid –tj. modifikované toxiny
 - po konverzi na toxoidy jsou využity jako agens pro imunizaci - vakcíny
 - tj. můžou imunizovat organismus
 - endotoxiny nelze takto použít!!!
-
- nejsou toxické, pouze antigenní, použití ve vakcínách (př: difterický toxoid, tetanový o.)
 - konverze exotoxinů do toxoidů probíhá např. působením formalinu,iodinu, kys. askorbové, pepsinu, ketonů (směs: 37 °C, v rozmezí pH 6 – 9; několik dnů)

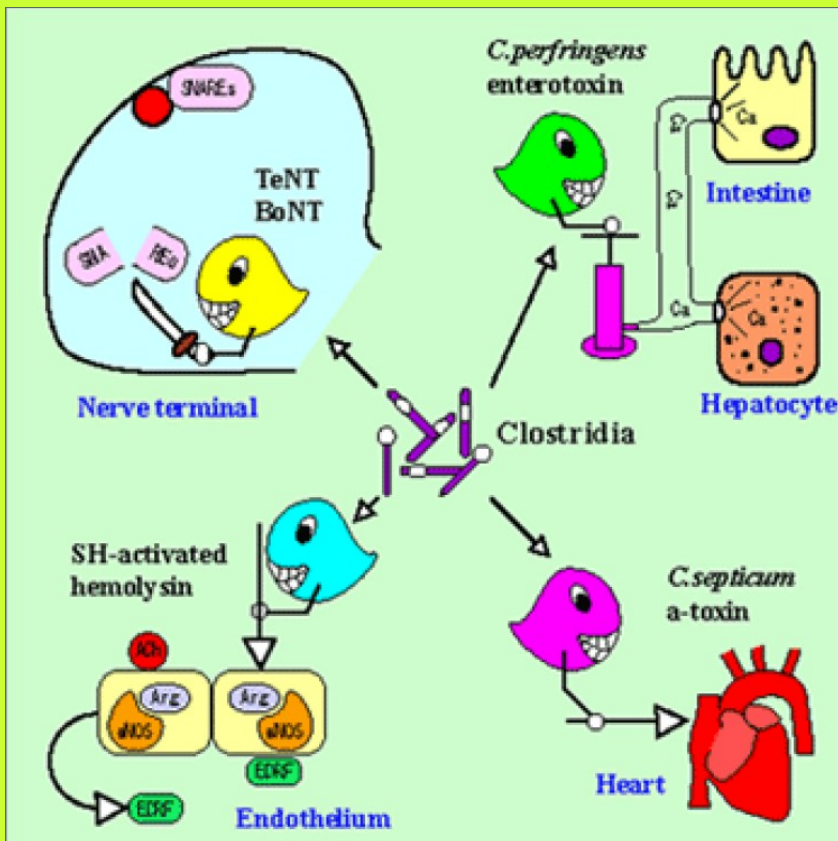


Letalita bakteriálních exotoxinů

Toxin	Toxic Dose (mg)	Host	Lethal toxicity	compared with:	
			Strychnine	Endotoxin (LPS)	Snake Venom
Botulinum toxin	0.8×10^{-8}	Mouse	3×10^6	3×10^7	3×10^5
Tetanus toxin	4×10^{-8}	Mouse	1×10^6	1×10^7	1×10^5
Shiga toxin	2.3×10^{-6}	Rabbit	1×10^6	1×10^7	1×10^5
Diphtheria toxin	6×10^{-5}	Guinea pig	2×10^3	2×10^4	2×10^2

Toxiny z Clostridií

- *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum* – SNARE proteiny (hrají zásadní roli ve splývání membránových váčků v buňkách)
- *Clostridium perfringens* - poškození epiteliální buněčné vrstvy
- *Clostridium septicum* - srdce



vstup Ca do buněk --> poškození buněk (pokud se tento toxin dostane do jater = smrt

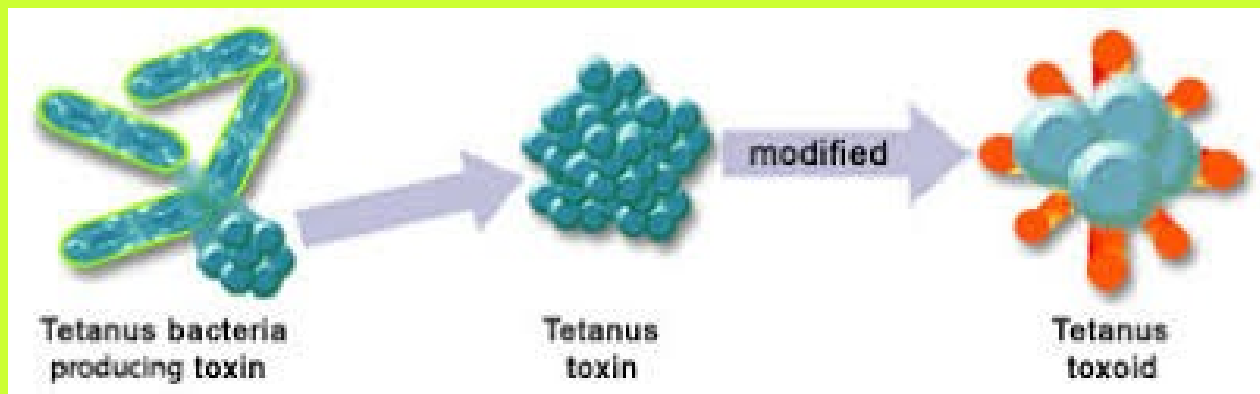


působí toxicky na srdce, pokud se dostane do krve... způsobuje ale taky nekrózu jiných svalů



Bakteriální endotoxiny

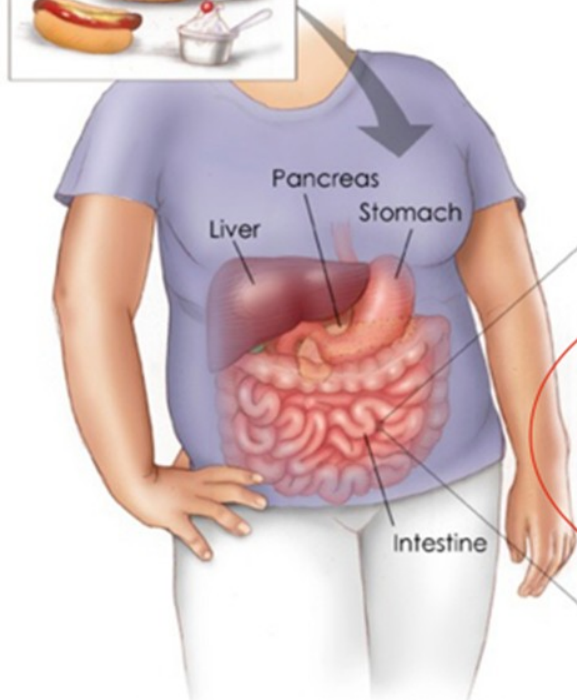
- endotoxiny – jsou součástí buněčné stěny G- bakterií
 - tvořeny lipopolysacharidem
 - součást bun.stěny G- bakterií
 - nelze je konvertovat na toxoid (NE vakcíny)
-
- uvolnitelné lyzí buňky
 - nemají specifický receptor
 - mírně toxické - ve větších dávkách letální pro zvířata
 - termostabilní- toxicita zachována často i při vícehodinovém působení 60 °C
 - slabě antigenní
 - nekonvertovatelné na toxoid
 - syntéza řízena geny nukleoidu



Bakteriální endotoxiny a makroorganismus

- účinky endotoxinů – shodují se u většiny G- bakterií
 - jsou pyrogenní - vyvolávají horečku
 - stimuluje odpověď imunitního systému – aktivace makrofágů, neutrofilů, lymfocytů B
 - vznik lokální zánětlivé reakce.
 - při vyšších koncentracích může dojít ke vzniku endotoxického šoku
-
- horečka – působí na makrofágy, uvolňuje se IL-1, působí na centrum termoregulace
 - leukopenie – může být následována leukocytózou
 - hypoglykémie – LPS způsobuje glykolýzu v buňkách různého typu
 - septický šok – při bakteriémii
 - koagulační kaskády, která vede ke konverzi fibrinogenu na fibrin
 - endotoxin způsobí adhezi destiček na endotelium cév
 - aktivuje přeměnu plazminogenu na plazmin
 - vznik diseminované intravaskulární koagulace (DIC) - vede k zvýšení krvácivosti
 - může způsobit smrt (septický šok)

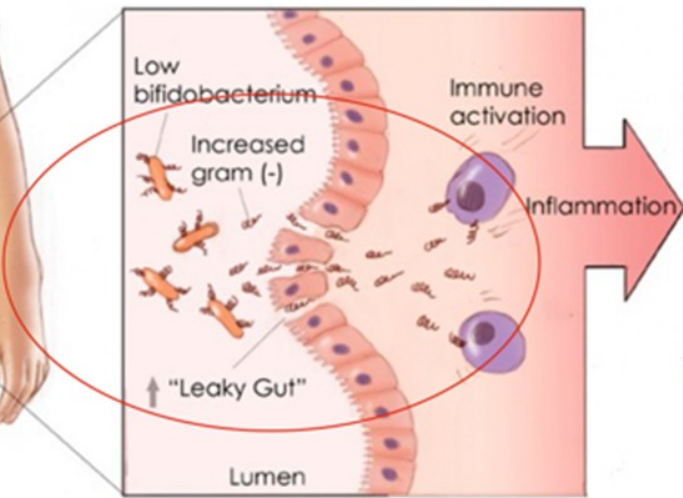
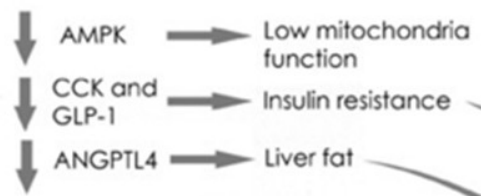
WHAT IS ENDOTOXIN?



Causes of Imbalanced Gut Flora

cesarean section birthing, formula feeding, excessive hygiene, acid suppressing medications (PPIs), anti-inflammatory medications (NSAIDs), environmental toxins, mindless eating, fructose, alcohol, low fiber diet

Gut Metabolic Signalling Molecules



Obesity and Diabetes

Reduced bacterial diversity, enhanced calorie extraction from food

BELLY FAT EFFECT

Enterotoxigenní *E. coli*

- dvě skupiny - LT1 a LT2, obě mají podjednotku A

a) Tepelně labilní enterotoxin

- dvě skupiny (LT-I, LT-II)
- jedna podjednotka A, pět podjednotek B

b) Tepelně stabilní enterotoxin

- malé monomery s mnoha cysteinovými zbytky
- pospojovaných disulfidickými můstky (stabilita)
- dvě skupiny STa a STb působí na cyklický guanosin-monofosfát
- inhibuje adsorpci Na -výsledek je průjem
- STb také poskozuje klky a vyvolává atrofii

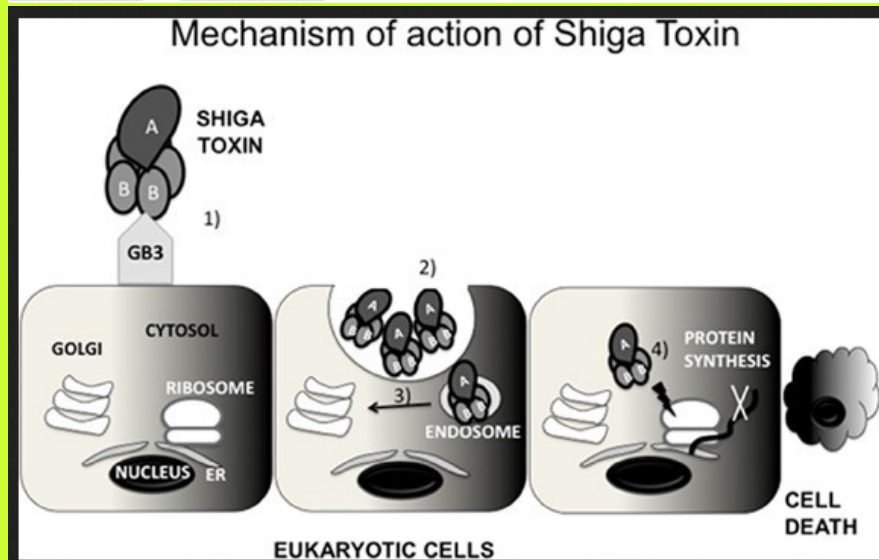


Enterohemoragická/Shigatoxigenní *E. coli*

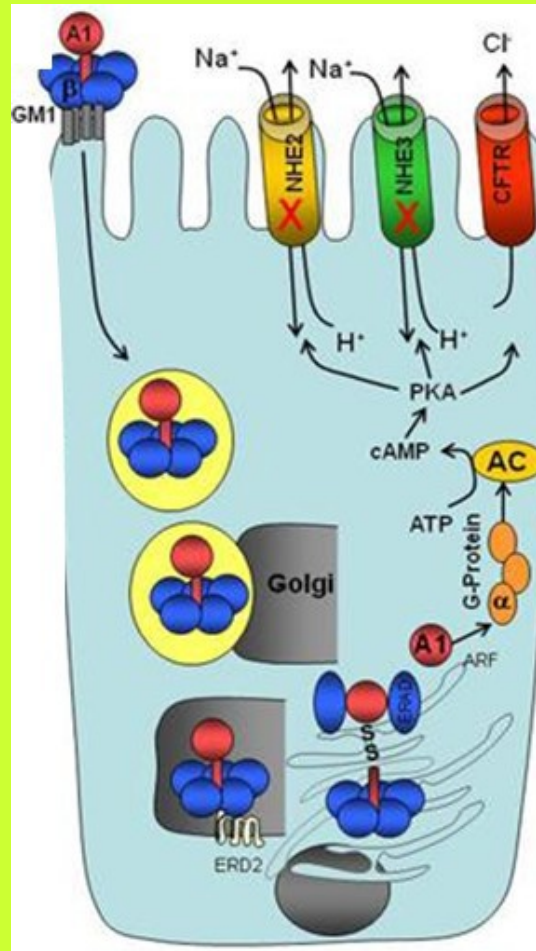
- způsobuje shigatoxin 1, shigatoxin 2
- hemoragická kolitida- krev ve stolici, silná bolest břicha, zvracení, horečky
- hemolyticko-uremický syndrom- krvavý průjem, neuropatie (poškození nervové soustavy), selhání ledvin, trombocytopenie (pokles destiček)
- trombotická trombocytopenická purpura
- shigatoxin --> do buněk endocytozou, přes GA jde až do ER

Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies

Alline R. Pacheco and Vanessa Sperandio*



- toxin cestuje přes Golgiho aparát a end.retikulum
- receptorem toxinu je GM1 receptor

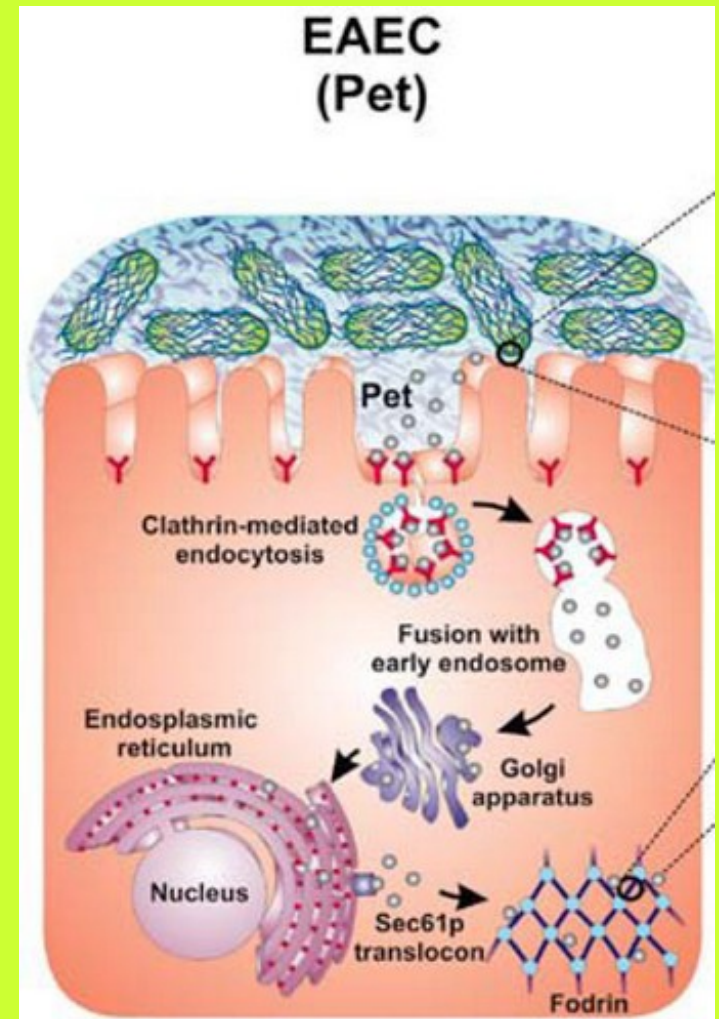


From *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to mammalian endogenous guanylin hormones

A.A.M. Lima¹, M.C. Fonteles^{1 2}

Enteroagregativní *E. coli*

- tepelně stabilní enterotoxin EAST1 a Pet toxin
- nutí buňky střevního epitelu vytvářet sliz
- vytváří se biofilm, produkuje dva toxiny
- **Pet** (pusobi na fodrin-protein potrebný k tomu, aby se aktinové vlákna napojily na PMembr.)
- a **EAST1** fce není úplně jasná
- ale je jasné, že dochází k průjmům :)



Toxiny u *Staphylococcus aureus*

a) Superantigeny – toxin syndromu toxického šoku (TSST-1) a stafylokokové enterotoxiny (SE)

Diagnostická kritéria syndromu toxického šoku:

- vysoká teplota (nad 38,9 oC)
- vyrážka
- pokles krevního tlaku
- 1-2 týdny po počátku onemocnění olupování pokožky na dlaních a ploskách
- zvracení
- průjem
- bolest svalů
- kombinace těchto příznaků mohou znesnadňovat určení správné diagnózy!

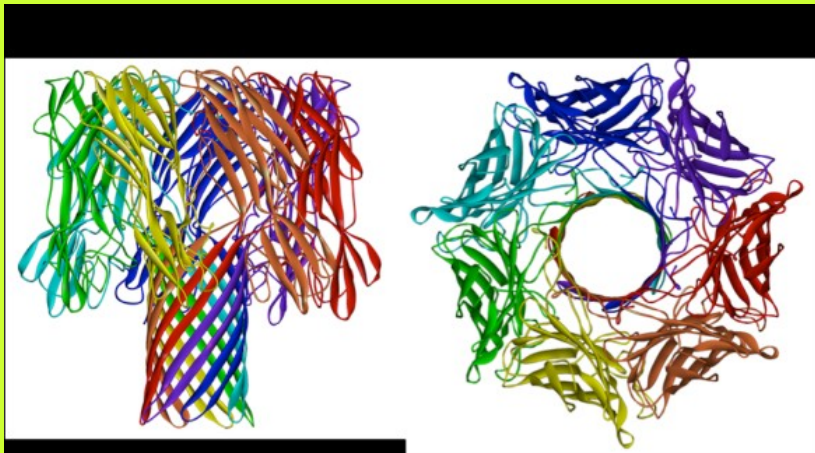
b) toxiny tvořící póry v buněčné stěně – dvě podskupiny:

- leukotoxiny a α -hemolyzin
- α -hemolyzin
- produkován téměř všemi kmeny *S.aurea*

- působí na fibroblasty, epitel, redukuje srážlivost krve
- existuje také Gamma hemolysin - působí na neutrofilů, makrofágy a č.kvinky

c) toxiny vyznačující se proteolytickou aktivitou – exfoliativní

- toxiny a toxiny způsobující epidermolytické infekce



α -hemolyzin



Cyanotoxiny

- **Cyanotoxin** je toxin produkovaný sinicemi
- mohou působit problémy zejména při přemnožení sinic („vodní květ“)
- vodní květ je často způsoben eutrofizací vody (obohacení živinami – např. splach z polí)

- účinky mohou být akutní nebo chronické
- záleží na síle a koncentraci toxinu...a taky na době vystavení tomuto toxinu
- toxiny sinic často vyvolávají alergické reakce



Proč sinice toxiny produkují?

- nejasná odpověď, několik možností...
- strukturní či metabolická funkce - tzn. že představují zásobní látky, chelatace železa
- mohou představovat signální molekuly ke komunikaci
- potlačení růstu konkurenčních fotoautotrofních organismů - alelopatie (cyanobakteriny či nostocyklamid)
- alelopatické účinky na lidi mají pravděpodobně mikrocytiny – neg. účinek hlavně na vyš. rostliny
- řada případů otrav dobytka a zvíře sinicemi *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena flos-aquae* a *Microcystis aeruginosa*
- v Evropě často úsobí problémy sinice *Microcystis* a *Planktothrix*
- zaznamenána i lidská úmrtí přičítaná cyanotoxinům
- teorie o vymření několika velkých savců v pleistocénu - na základě chemických rozborů fosílií přičítáno rovněž cyanotoxinům



Rozdělení cyanotoxinů:

1.) Podle chemické struktury se rozlišují cyanotoxiny na bázi alkaloidů, cyklické a lineární peptidy a lipopolysacharidy

2.) Podle biologické aktivity

- hepatotoxiny (toxické pro činnost jater),
 - neurotoxiny (toxický účinek na nervový systém),
 - imunotoxiny (negativně ovlivňují imunitní systém),
 - imunomodulanty (alergenní vliv, podnícení závažnějších autoimunitních chorob, a podobně),
 - mutageny a genotoxiny (způsobují mutace DNA, často schopné vyvolat rakovinu),
 - embryotoxiny (toxické pro embryo),
 - cytotoxiny (toxické pro buňky bakterií, řas či např. lidské buňky)
-
- nodularin, mikrocistin = hepatotoxiny (poškozují játra teplokrevných živočichů-strukturu i fci)
 - anatoxiny = neurotoxiny (neurotoxické efekty, narušení signalizace mezi neurony a svalstvem-pozor - i u dýchacích svalů - udušení)
 - dermatotoxiny (způsobují vyrážky)

DĚKUJI ZA POZORNOST

