

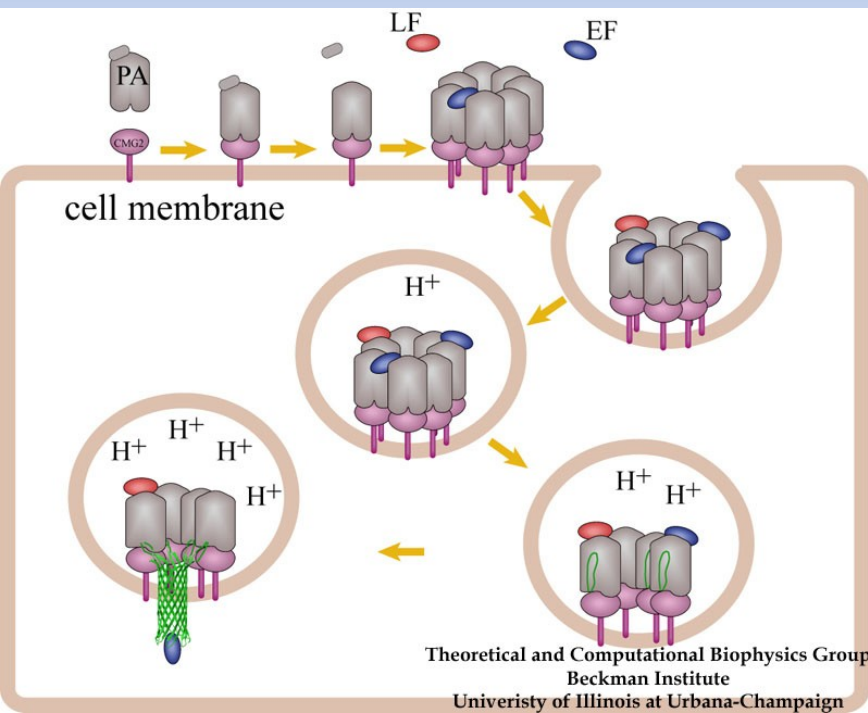
Struktury vybraných bakteriálních toxinů

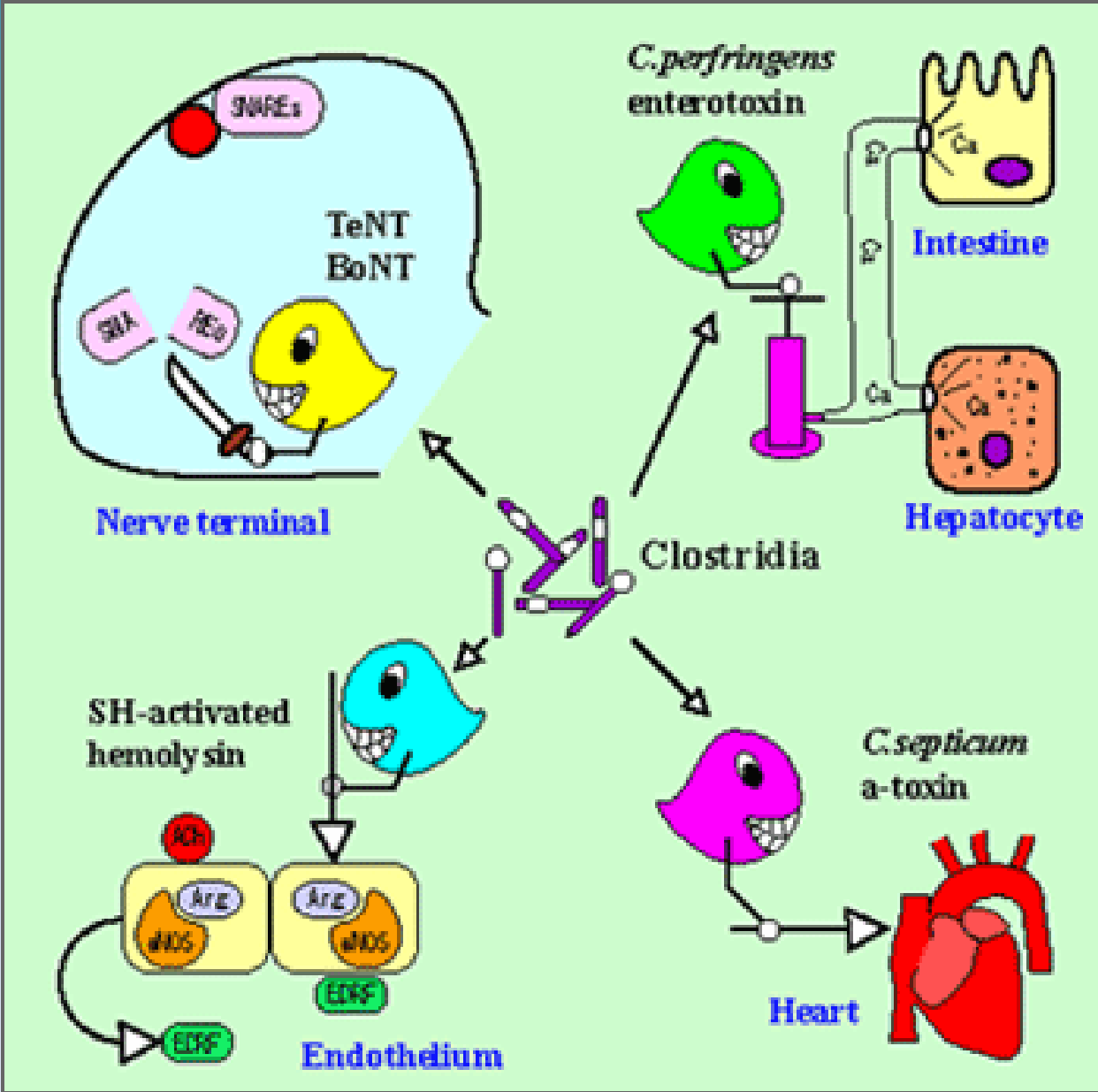
zodpovědné za toxicitu a invazivitu

Enzymy; peptidy způsobující póry v membráně; superantigeny

Kódovány geny nukleoidu, plazmidů či fágů

Lipopolysacharidy nebo proteiny





Bakteriální toxiny

I) Enzymatická struktura i funkce

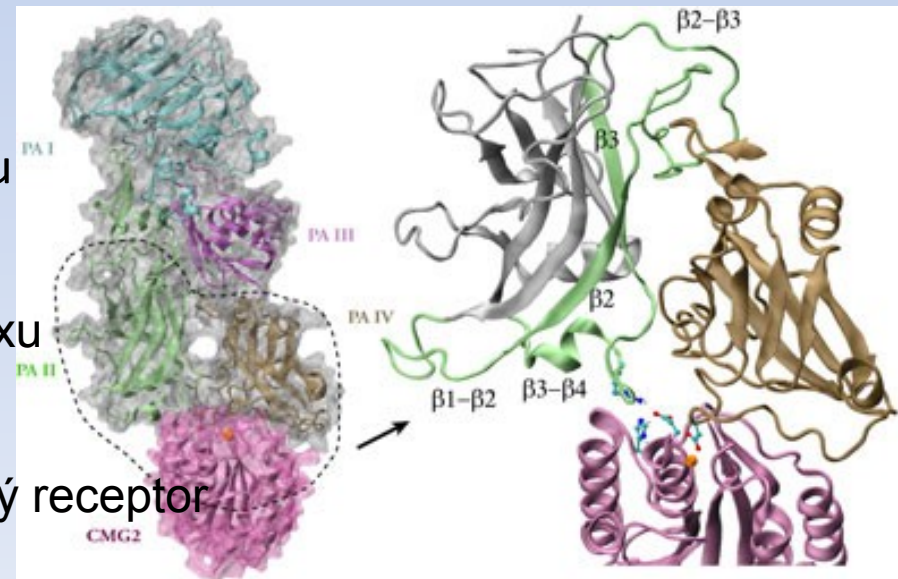
Substrát: komponenta tkáně, orgánu nebo tekutiny hostitele

Uspořádání: podjednotka A a B

- toxiny působící uvnitř buněk hostitele
- A podjednotka – enzymatická aktivita neaktivní, dokud ve spojení s B
- B jednotka – specifická vazba k receptoru a přenos enzymu přes membránu, netoxická

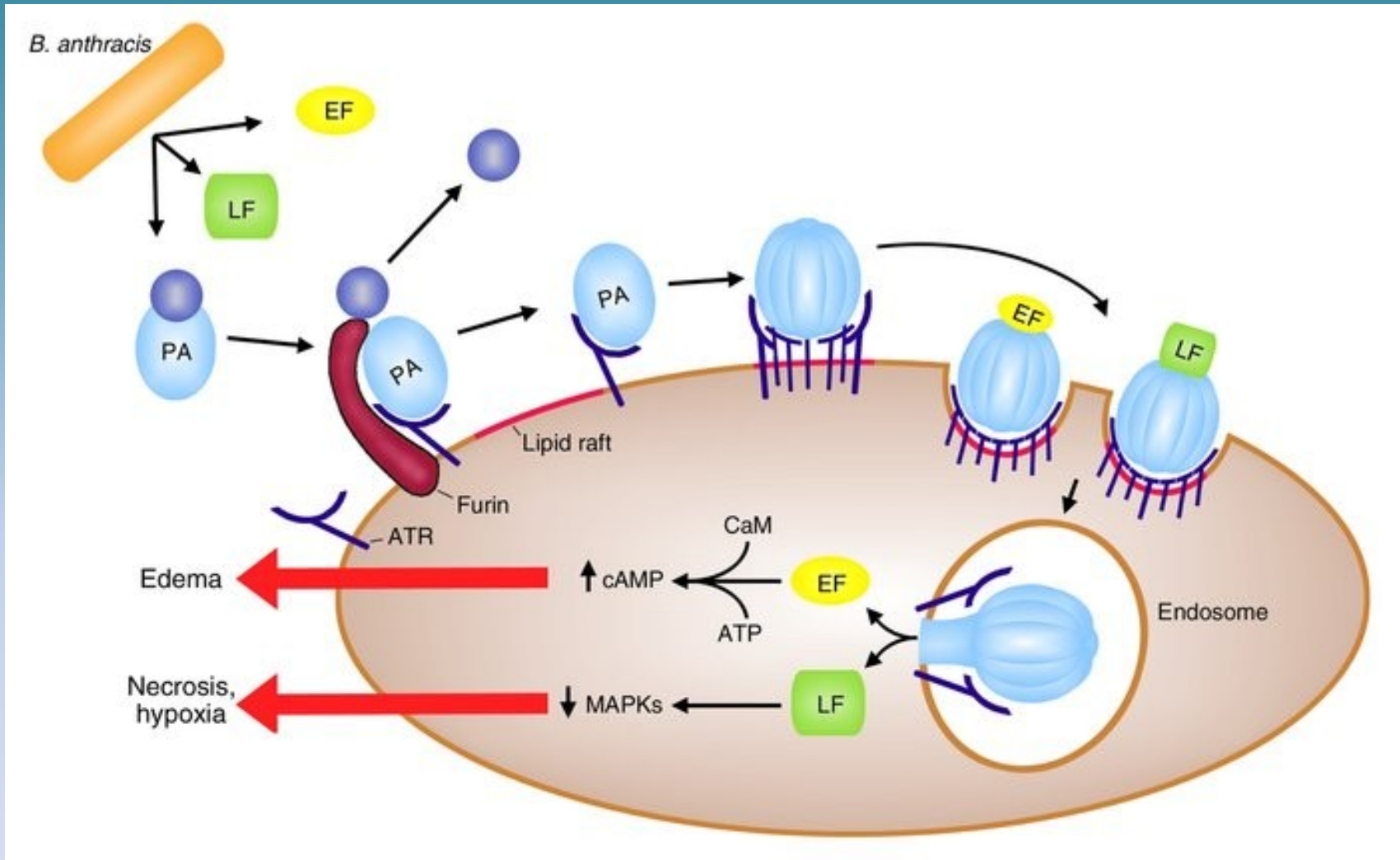
Toxin antraxu

Buněčný receptor



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
- Podjednotka B v obou případech schopnost inzerce do membrány. Obsahuje-li hydrofobní složku (AMK – jako difterotoxin) – je zodpovědná za translokaci.
- 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)



How anthrax toxins cause pathology. Fully virulent *B. anthracis* produce an antiphagocytic capsule as well as toxins. The protective antigen (PA) of the anthrax toxin binds to the ATR on the host cell surface. The 83-kDa form of PA is cleaved by the cell surface protease furin and produces a 63-kDa monomer. Heptamerization of PA induces clustering of the ATRs, association of the complex with lipid rafts, and exposure of binding domains to the edema factor (EF) or the lethal factor (LF). The heptamer, and bound EF or LF, are then endocytosed. EF, an adenylate cyclase, and LF, a Zn²⁺ metalloprotease, translocate to the cytosol through a pore created in the membrane and act on host cytosolic targets to induce edema, necrosis, and hypoxia. Modified with permission from Annual Reviews (4). CaM, calmodulin.

21.11.2014

Bakteriální toxiny

II) Způsobující vznik pórů v membráně

- blokuje selektivní influx a eflux iontů

Př: RTX toxiny G- bakterií, streptolysin *S. pyogenes*, alfa toxin *S. aureus*

- vznikají samouspořádáním oligomerů

Alfa-toxin – syntetizován jako 319 AMK prekurzor obsahující N-terminální konec z 29 AMK. Secenerovaný toxin je hydrofilní mlk 33 kDa. 7 protomer se uspořádává do houbovitého heptameru ze 3 domén, jedna z nich je iontový kanál

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

Bakteriální toxiny

III) Superantigeny

- toxiny stimulující IS (horečka, toxický šok)
- pyrogenní exotoxiny – stafylokoky enterotoxin serotyp A-E, G, H, exfoliatin, TSST-1), streptokoky (pyrogenní exotoxiny A-C)
 - 22 kDa - 30 kDa
 - vazba na MHC II spouští masivní proliferaci T buněk = uvolnění cytokinů z lymfocytů (IL-2, gamma interferon) a monocytů (TNF, IL-1-..)
 - tyto cytokiny jsou mediátory hypotenze horečky, šoku

Bakteriální exotoxiny

- 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 nebo fágů**
 - **Termolabilní**; inaktivovány při 60 °C
 - Nestabilní – toxicitu ztrácí (antigenitu nikoli)
-
- Produkovány: *V. cholerae*, enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), některé kmeny *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *Y. enterocolitica*, *Aeromonas* sp., *Cl. perfringens*

Bakteriální exotoxiny a makroorganismus

- **Vysoce toxické**, pro zvířata letální i v malých dávkách
- Vysoce **antigenní**, stimulují vznik antitoxinu
- Spojené s **průjmovými onemocněními a otravami z potravin**
- Většinou působí v místě vzdáleném bráně vstupu (**invazivní**)
 - botulin, tetanospazmin
- **Druhově specifické; ale pouze u virulentních kmenů**
- Specificky toxické – botulin, tetanospazmin – neurony
- Nespecificky toxické - pro celou řadu cílových buněk, nekróza
 - kolagenáza, hyaluronidáza, streptokináza, fosfolipáza, lecitináza, hemolyziny, leukocidiny
- Neindukují horečnaté stavy; zvyšují hladinu nitrobuněčného cAMP (choleratoxin stimuluje kinázu A); inhibují syntézu proteinů (**difterický toxin**), mají afinitu k nervovým vláknům

Bakteriální exotoxiny jako vakcíny

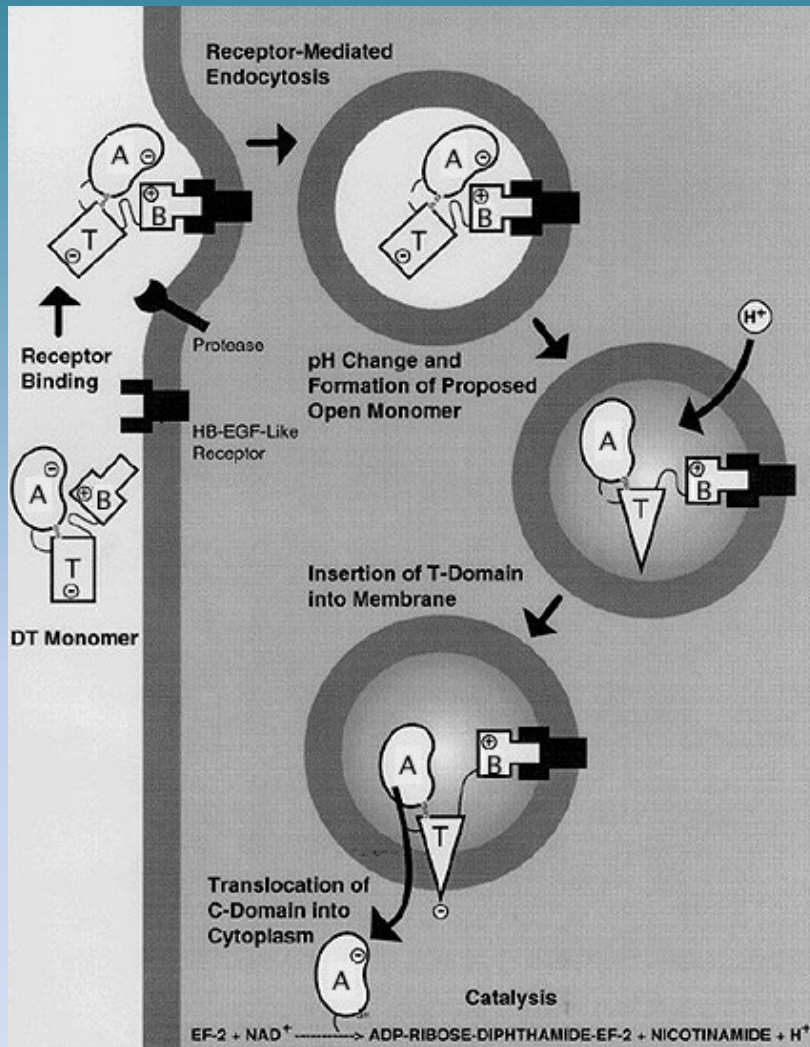
- **Konvertovatelné na toxoidy** – modifikované toxiny
 - Agens pro imunizaci
- nejsou toxické, pouze antigenní, použití ve vakcínách (př: difterický toxoid, tetanový o.)
- konverze exotoxinů do toxoidů např. působením formalinu, jodu, kys. askorbové, pepsinu, ketonů (směs: 37 °C, v rozmezí pH 6 – 9; několik dnů)

Příklady působení bakteriálních exotoxinů

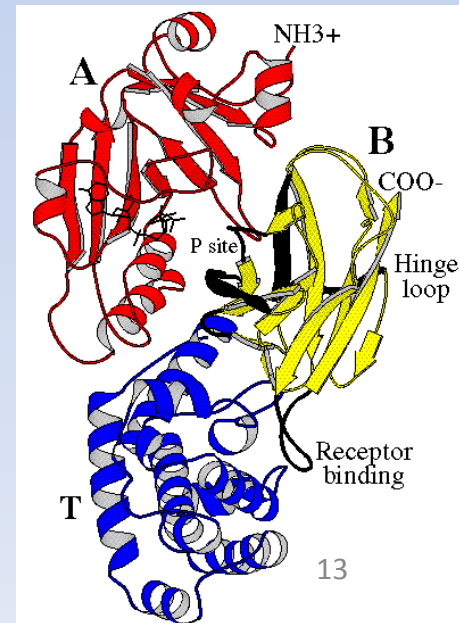
- *Corynebacterium diphtheriae* – toxigenní kmeny nesou temperovaného bakteriofága; difterotoxin inhibuje proteosyntézu – buněčná smrt
- *Clostridium tetani* – exotoxiny blokují relaxaci nervových buněk; tetanospazmin využívá receptor GT1 a/nebo GD1b
- *Clostridium perfringens* – alfatoxin (lecitináza) – buněčná smrt, enterotoxin – hypersekrece vody a elektrolytů (průjem)
- *Clostridium botulinum* – exotoxin paralyzuje svaly. Blokuje uvolnění acetylcholinu synapsí a nervosvalových spojů.

Difterický toxin: vstup do vnímavé buňky

- Vazba B doménou na receptor
- Receptor zprostředkuje endocytózu
- Okyselení vnitřku vezikuly (pH 5) dovolí rozvinutí A a B řetězců
- T doména (součástí B podjednotky) translokuje přes membránu A doménu
- A doména využívá NAD jako substrát, katalyzuje připojení ADP-ribózy z NAD na elongační faktor EF-2= inaktivace syntézy proteinů



60 000 Da



Vazebná doména k receptoru hostitelské buňky

Katalytická doména – inhibuje elognační faktor 2 – ADP ribosylací

T hydrofobní doména zodpovědná za inzerci do endosomu membrány k uvolnění jednotky A.

Příklady působení bakteriálních exotoxinů

- *Vibrio cholerae* 01 a 0139 – enterotoxin způsobuje hypersekreci vody a elektrolytů; cholera toxin využívá receptor gangliosid GM1
- *E. coli* – enterotoxin (LT – termolabilní) – hypersekrecie vody a elektrolytů
- *Shigella dysenteriae* type 1 – toxin akutního zánětu
- *Staphylococcus aureus* – toxického šoku; toxiny otravy z potravin, stimulace mozkového centra zvracení
- *Streptococcus pyogenes* – pyrogenní exotoxin; scarlet-fever a syndrom tox. šoku

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

Vero cell cytotoxiny produkované *E. coli*

- **Shiga-like toxiny SLTs**
 - SLT-I - identický shiga-toxinu
 - ostatní - SLT-II – podjednotka A (N-glykosidázová aktivita – inhibice syntézy proteinů) a B
 - vstřebávány do krevního oběhu, ovlivňují endotel cév v cílových orgánech
 - mohou být toxické pro enterocyty
- Průjem, hemolytická kolitida, hemolytickoureemický syndrom

Bakteriální endotoxiny

- **Endotoxiny** – součásti buněčné stěny G- bakterií
- uvolnitelné lyzí buňky; př: LPS = lipid A+PS, peptidoblykan (méně účinný než LPS), lipooligosacharid
- 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
 - 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 a vede k hypoglykémii
 - septický šok – při bakteriémii
 - aktivace komplementu
 - disseminovaná intravaskulární koagulace DIC – iniciováno aktivací koagulační kaskády, která vede ke konverzi fibrinogenu na fibrin; endotoxin způsobí adhezi destiček na endotelium cév, aktivuje přeměnu plazminogenu na plazmin
 - smrt (septický šok; DIC)

Regulace a syntéza bakteriálních toxinů

Kontrolováno působením signálů z vnějšího prostředí

- produkce difterotoxinu reprimována železem v mediu
- exprese cholerového toxinu – kontrolována osmolaritou prostředí

Signální sekvence:

- váže se do membrány při translaci, toxin uvolněn do periplazmy
- nebo syntéza v CPL, chaperony pomáhají prostupu
- vícesložkové – jako cholera toxin – podjednotky syntetizovány v CPL, spojení až po vyloučení do periplazmy
- u G- únik přes vnější membránu pomocí vezikul