

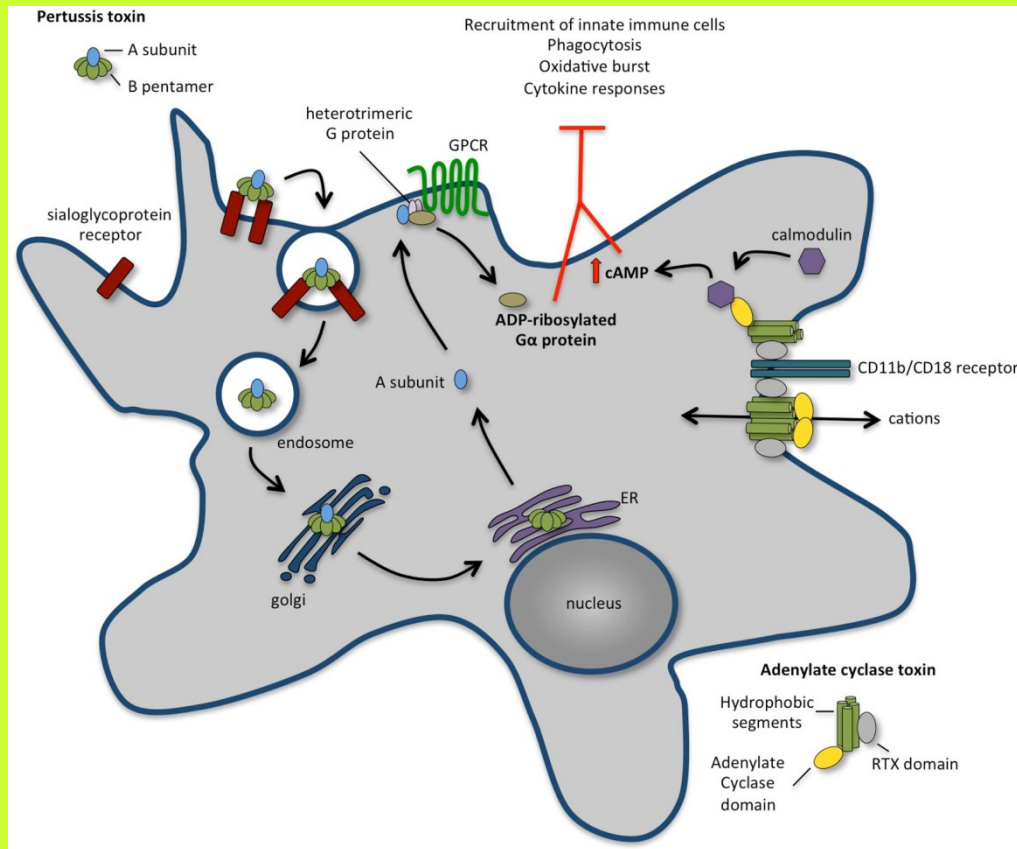
# CYTOLOGIE A MORFOLOGIE PROKARYOT

5

Struktury vybraných  
bakteriálních toxinů

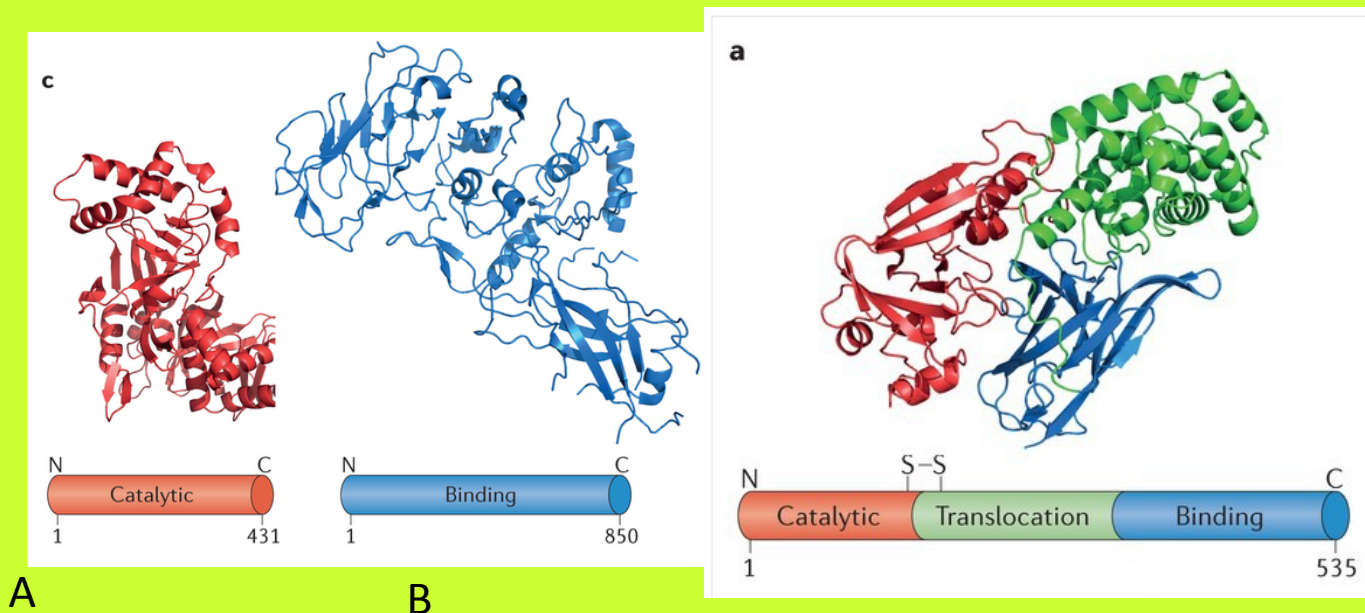
# Toxiny

- zodpovědné za toxicitu a invazivitu
- enzymy - peptidy způsobující póry v membráně
- nebo převážně proteiny (exotoxiny)
- 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)



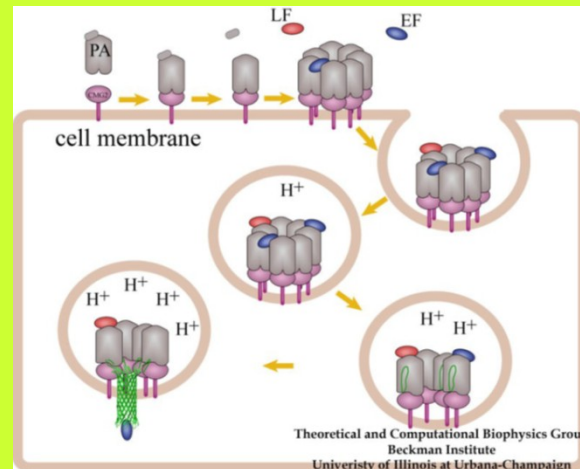
# Vstup toxinů do cílové buňky

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

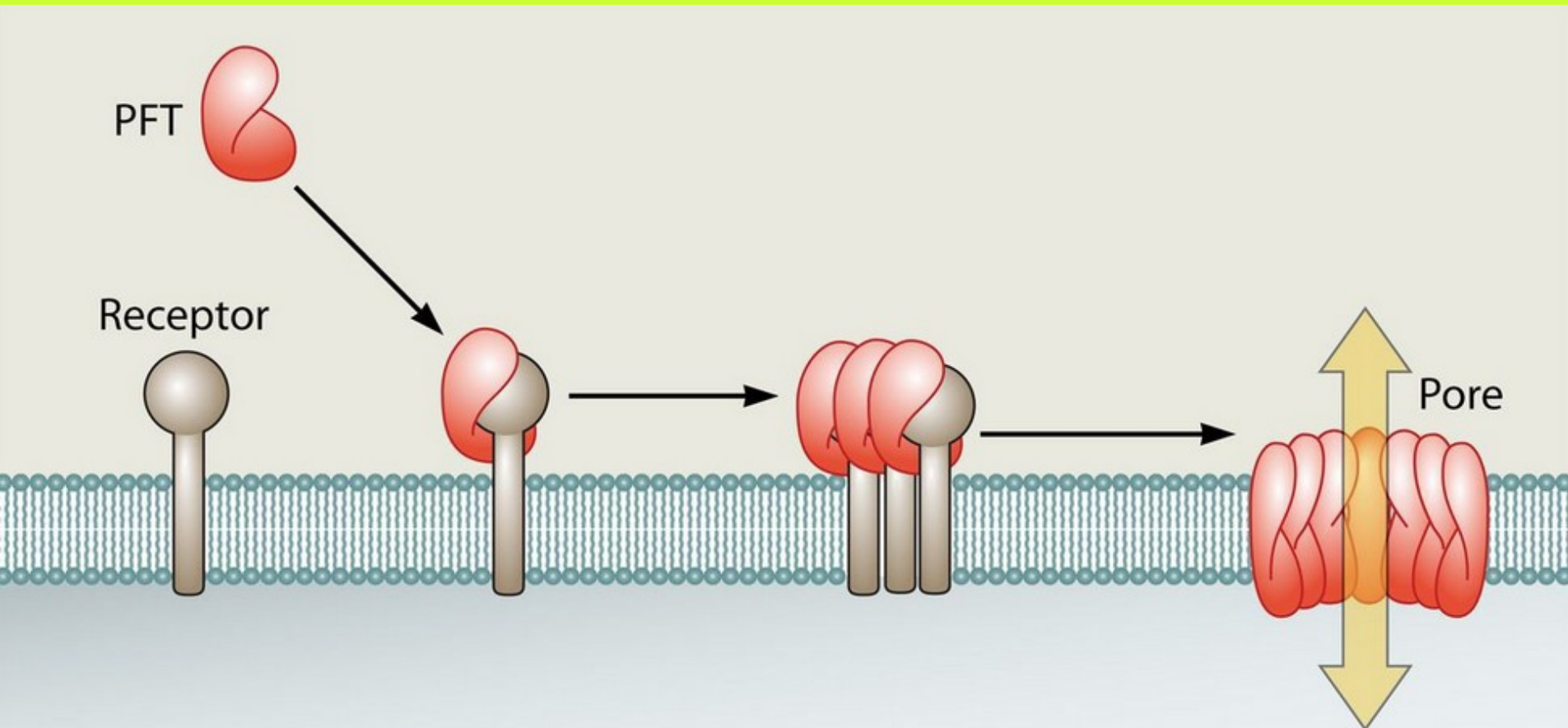
2) vazba A+B komplexu na receptor, ten zprostředkuje endocytózu

- 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

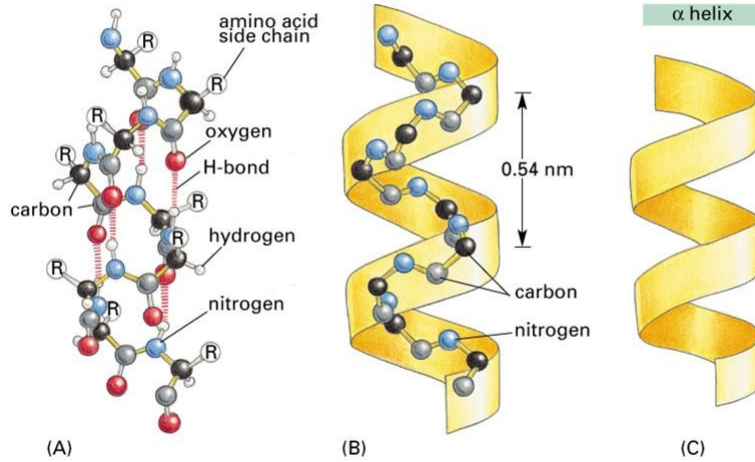
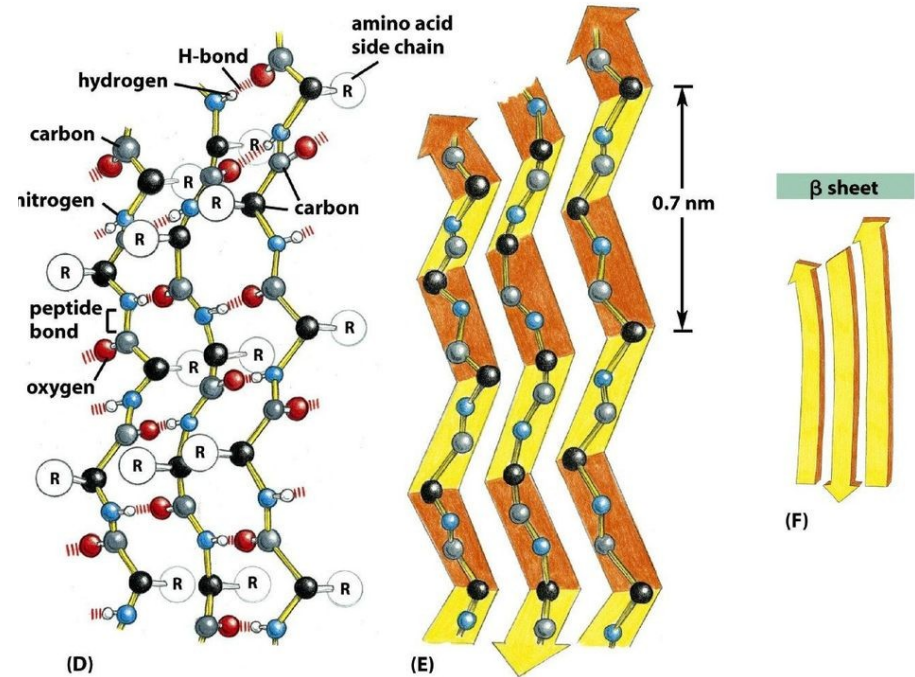


Figure 3-9 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## β-skládaný list





## Póry formující toxiny

| <b>Toxin</b>      | <b>species</b>                  | <b>prostup</b>        | <b>nemoc</b>               |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| perfringiolysin O | <i>Clostridium perfringens</i>  | cholesterol           | gas gangrene               |
| hemolysin         | <i>Escherichia coli</i>         | cell membrane         | UTI                        |
| listeriolysin     | <i>Listeria monocytogenes</i>   | cholesterol           | systemic;<br>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<br>media |
| streptolysin O    | <i>Streptococcus pyogenes</i>   | cholesterol           | strep throat               |
| leukocidin        | <i>Staphylococcus aureus</i>    | phagocyte<br>membrane | pyogenic<br>infections     |

## Superantigeny

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

### TSS - syndrom toxického šoku

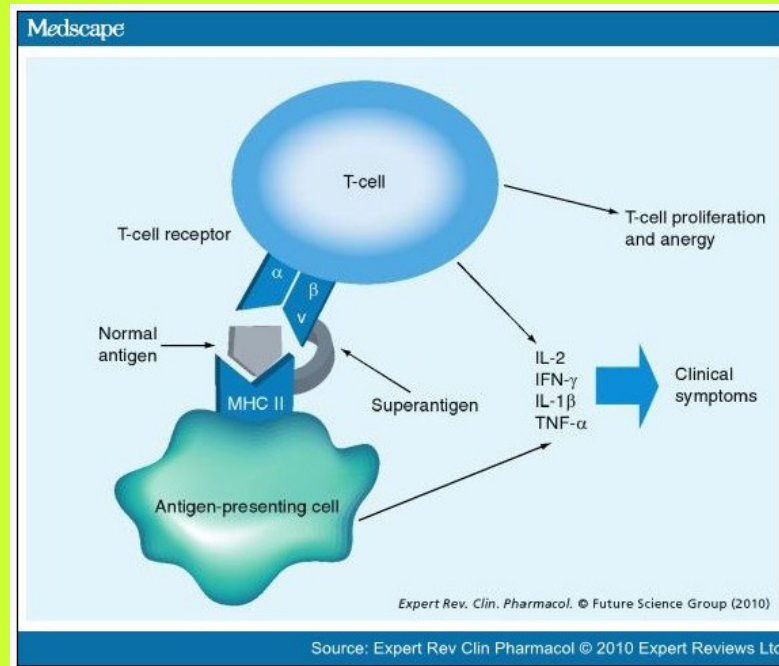
- reakce těla na toxiny uvolňované bakteriemi *Staphylococcus*
- může způsobit nutné amputace i smrt způsobenou hypovolemickým šokem
- tj. náhlá porucha průtoku krve orgány a tkání
- přestanou fungovat srdce a plíce
- je rel. vzácný ale častou příčinou je nevhodné používání menstruačních tampónů
- příznaky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





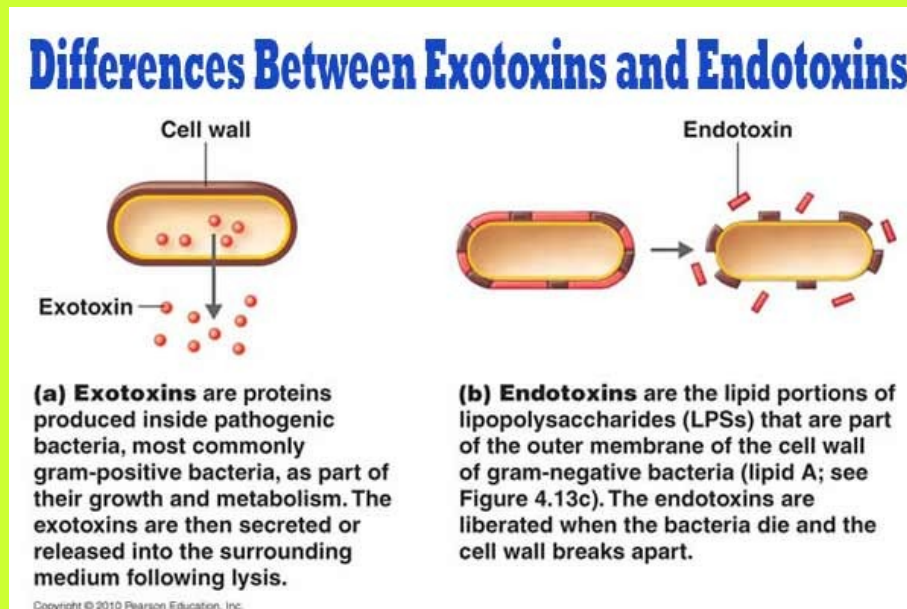
## Superantigen - mechanismus

- superantigen je virový nebo bakteriální protein, který se váže současně na V $\beta$  doménu T-buněčného receptoru a na řetězec  $\alpha$  molekuly MHC II
- tj. makrofág a na T-buněčný receptor T-lymfocytů
- T-lymfocyty schopné účinně regulovat imunitní systém tím, že vylučují do krve cytokiny
- když se v krvi objeví superantigeny, dochází k aktivaci 2–20 % všech T-lymfocytů
- superantigen vede k masivnímu uvolnění cytokininů a chemokininů
- superantigeny jsou rezistentní k proteázám a denaturaci teplem
- jejich proliferace a diferenciaci pak vede produkci zvýšeného množství prozánětlivých faktorů (TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ ) a TSS
- streptokoky a stafylokoky



# Bakteriální exotoxiny

- exotoxiny jsou vysoce toxické, působí v místě vzdáleném 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*

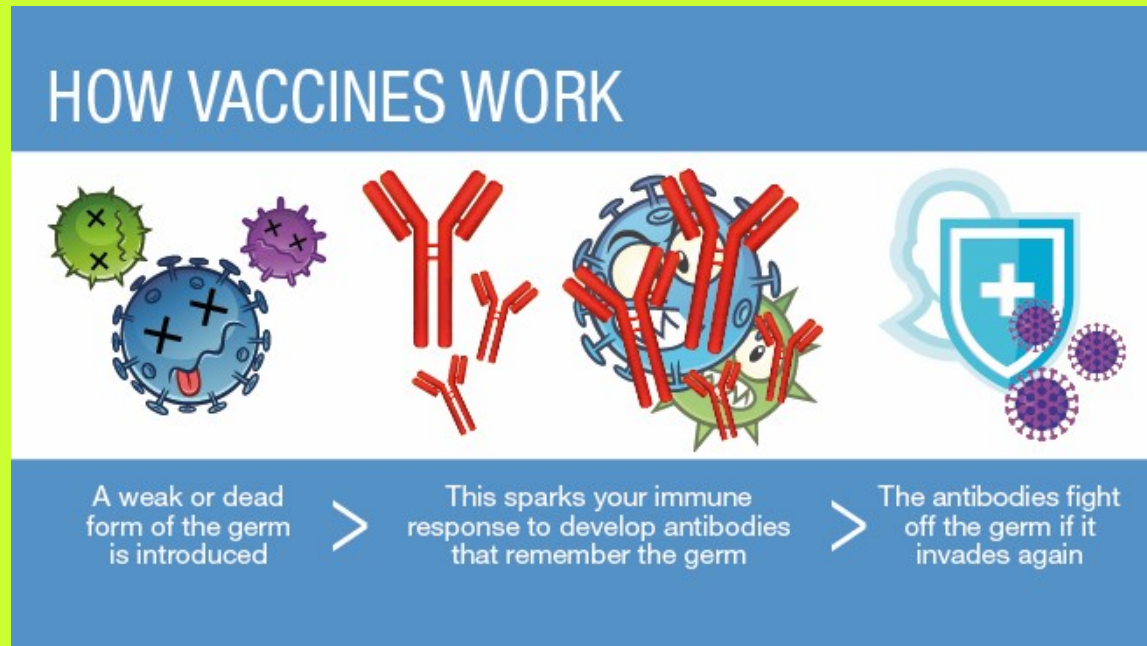


## Bakteriální exotoxiny a makroorganismus

- 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 - záškrť)
- mají afinitu k nervovým vláknům

## Bakteriální exotoxiny jako vakcíny

- exotoxin lze konvertovat na toxoid – tj. modifikované toxiny
  - toxicita byla snížena nebo odstraněna, imunogenicita zachována
  - 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 teploty nebo chemicky formalin, iodin, kys. askorbová, pepsin, keton (směs: 37 °C, v rozmezí pH 6 – 9; několik dnů)

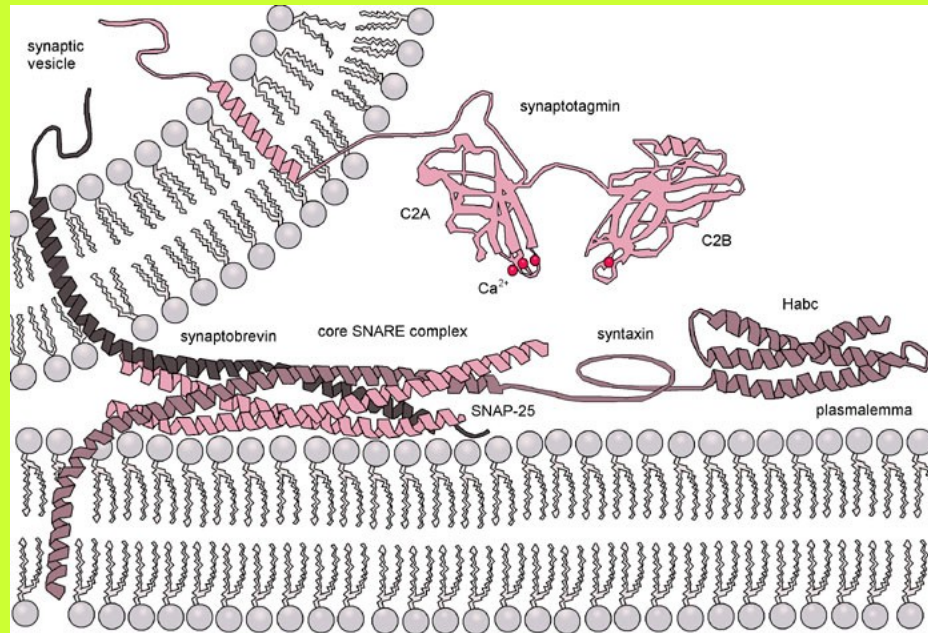


## Letalita bakteriálních exotoxinů

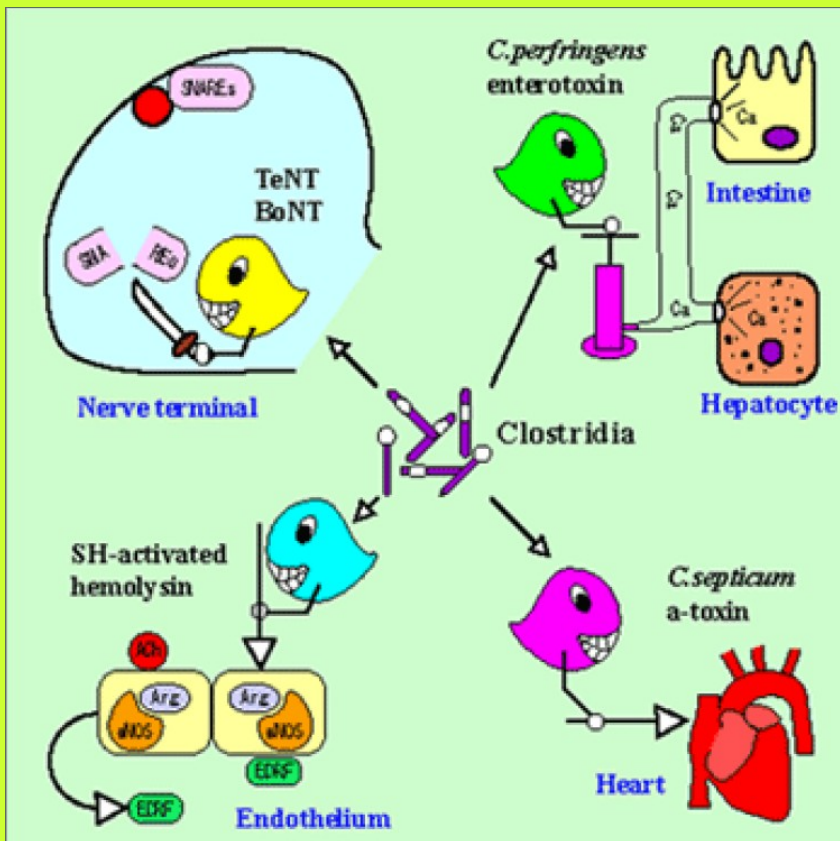
| Toxin            | Toxic Dose (mg)      | Host       | Lethal toxicity | compared with:  |                 |
|------------------|----------------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  |                      |            | Strychnine      | Endotoxin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

## Toxiny z Clostridií

- *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*
- toxiny rozkládají SNARE proteiny - umožňují část tzv. vezikulárního transportu uvnitř buňky - splývání membránových váčků v buňkách
- tím blokují přenos signálu na nervových synapsích
- SNARE proteiny se specializují na konkrétní membránové organely
- obvykle transmembránové proteiny a obsahují sadu alfa-helixů
- SNARE proteiny se na sebe vážou, přičemž helikální doména jednoho proteinu se omotá kolem helixu druhého - tzv. trans-SNARE komplex



- *Clostridium perfringens* - poškození epiteliální buněčné vrstvy
- *Clostridium septicum* - srdce



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



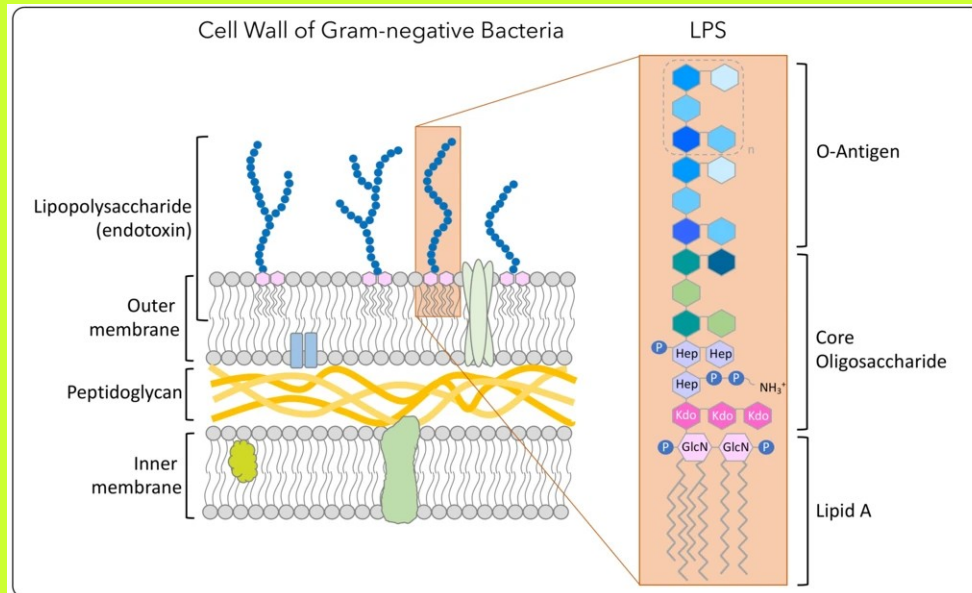
působí toxicky na srdce, pokud se dostane do krve... způsobuje ale taky nekrózu jiných svalů





# Bakteriální endotoxiny

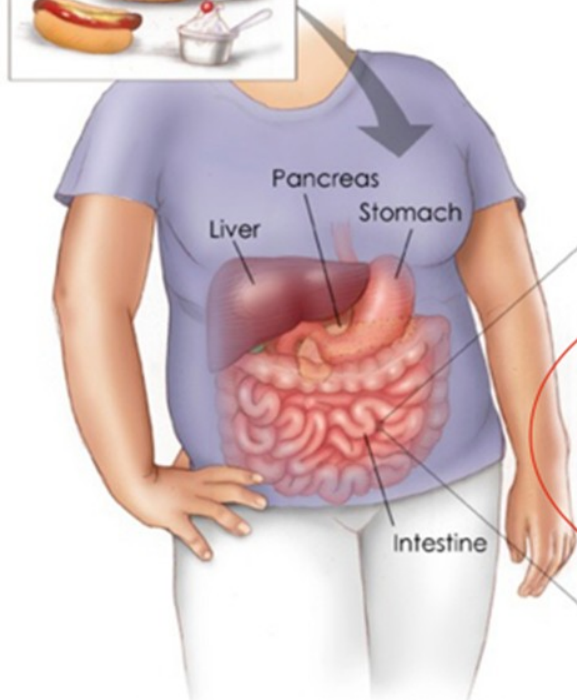
- endotoxiny –jsou součástí buněčné stěny G- bakterií
- tvořeny lipopolysacharidem
- nelze je konvertovat na toxoid (NE vakcíny)
  
- uvolnitelné lyzí buňky
- nemají specifický receptor
- mírně toxické - ve větších dávkách letální pro zvířata
- termostabilní- toxicita zachována často i při vícehodinovém působení 60 °C
- slabě antigenní
- 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 (srážení krve)
  - endotoxin způsobí adhezi destiček na endotelium cév
  - aktivuje přeměnu plazminogenu na plazmin (rozpuštění fibrinových vláken krevní sraženiny)
  - vznik diseminované intravaskulární koagulace (DIC) - vede k zvýšení krvácivosti
  - může způsobit smrt (septický šok)

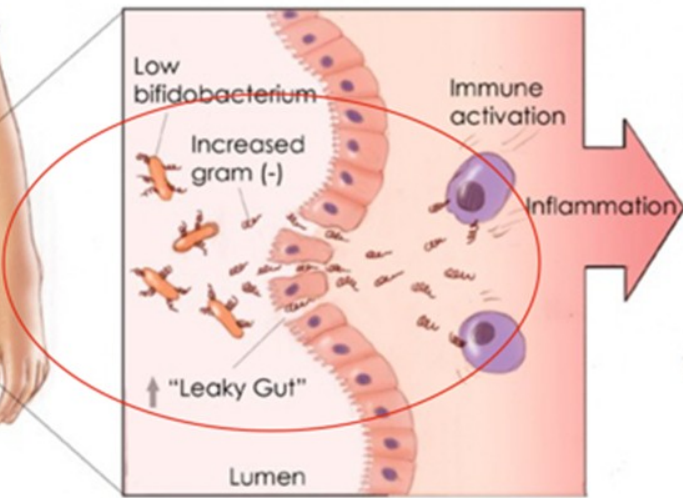
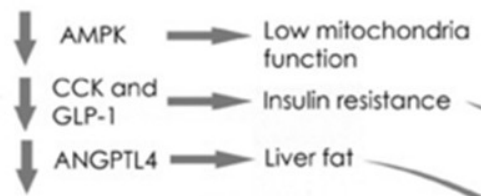
# WHAT IS ENDOTOXIN?



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

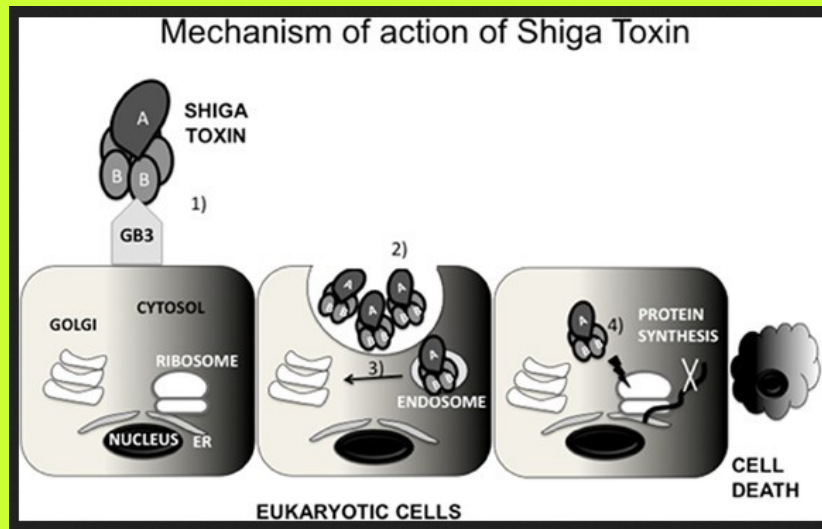
### b) Tepelně stabilní enterotoxin

- 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*

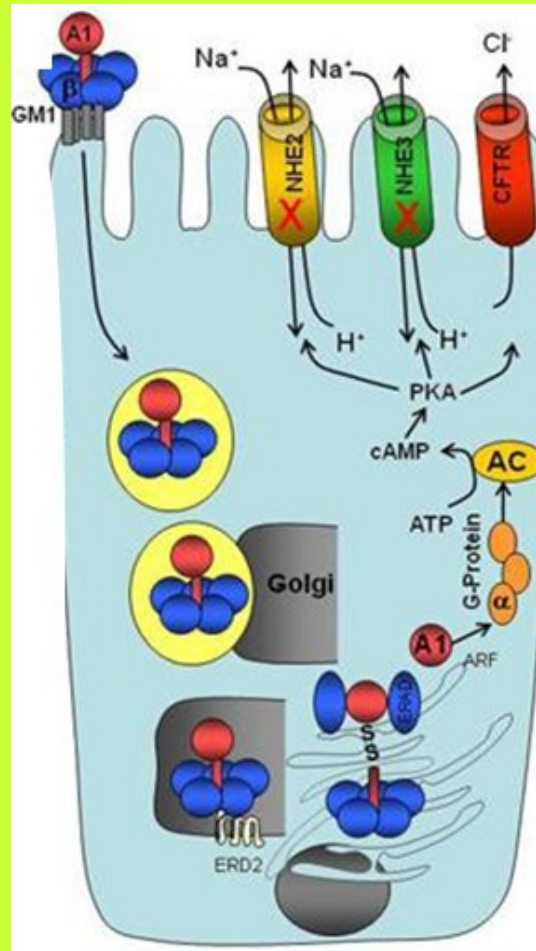
- způsobuje shigatoxin 1, shigatoxin 2
- Enterobacteriaceae, zejména původce úplavice (*Shigella dysenteriae*) a některými kmeny *Escherichia coli*
- toxin blokuje tvorbu bílkovin v střevních epitelálních buňkách tím, že poškozuje 23S rRNA nutnou pro správné fungování ribozomu
- hemoragická kolitida- 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
- shiga toxin --> do buněk endocytózou, 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



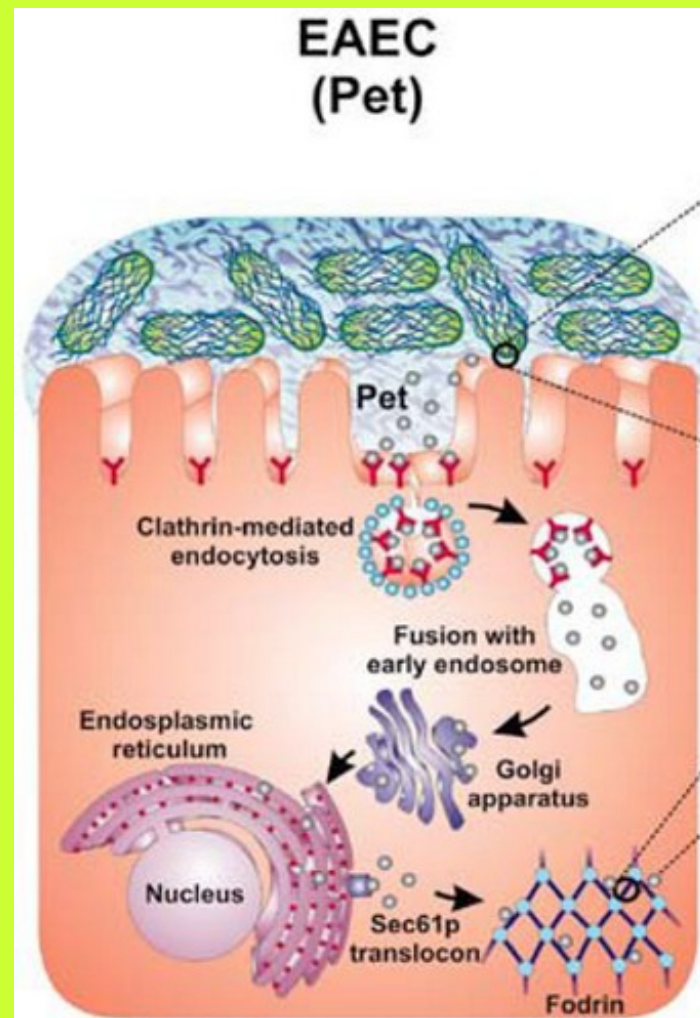
**From *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to mammalian endogenous guanylin hormones**

A.A.M. Lima<sup>1</sup>, M.C. Fonteles<sup>1 2</sup>



## Enteroagregativní *E. coli*

- tepelně stabilní enterotoxin EAST1 a Pet toxin
- nutí buňky střevního epitelu vytvářet biofilm
- produkuje dva toxiny
- **Pet** (působí na fodrin-protein potřebný k napojení aktinového vlákna na CM)
- a **EAST1** fce není úplně jasná, 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:

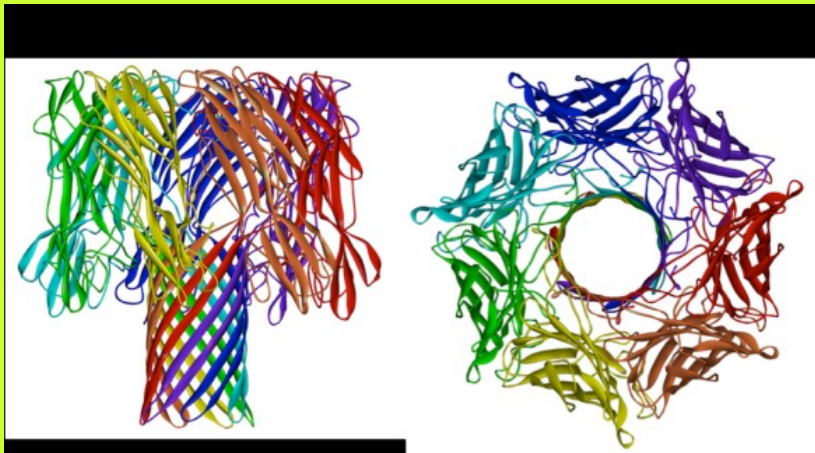
- vysoká teplota (nad 38,9 oC)
- vyrážka
- pokles krevního tlaku
- 1-2 týdny po počátku onemocnění olupování pokožky na dlaních a ploskách
- zvracení
- průjem
- bolest svalů
- kombinace těchto příznaků mohou znesnadňovat určení správné diagnózy!

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

- leukotoxiny a  $\alpha$ -hemolyzin
- $\alpha$ -hemolyzin
- produkované téměř všemi kmeny *S.aurea*
- působí na fibroblasty, epitel, redukuje srážlivost krve
- existuje taky Gama hemolysin - působí na neutrofilny, makrofágy a č.kvinky

c) toxiny vyznačující se proteolytickou aktivitou – exfoliativní

- toxiny a toxiny způsobující epidermolytické infekce



$\alpha$ -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 působí 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

