

ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова
Кафедра микробиологии и вирусологии

Факторы патогенности бактерий

Чаплин А.В. & К^o
Москва, 2016 г.

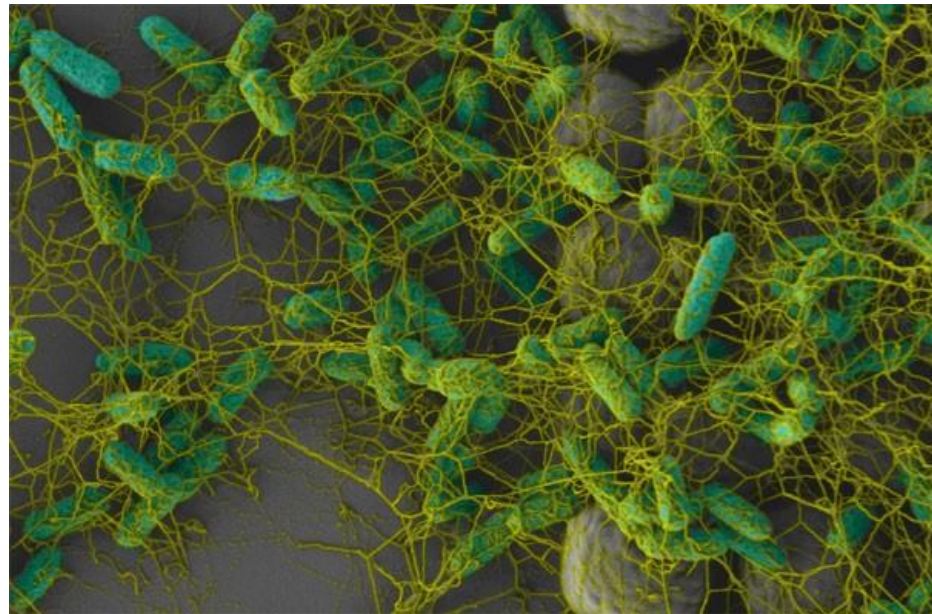
Факторы патогенности

- Факторы патогенности – это молекулы или структуры микроорганизмов, наличие которых обеспечивает протекание инфекционного процесса.
- Вирулентность конкретного штамма микроорганизмов обеспечивается набором присутствующих у него факторов патогенности.
- Синтез факторов патогенности может кодироваться как собственно геномом бактерий, так и присутствующими в клетках плазмидами или интегрированными бактериофагами.

Классификация

- Общепринятой классификации факторов патогенности бактерий не существует.
- Можно условно выделить следующие группы:
 - Факторы адгезии
 - Факторы инвазии, агрессии и добычи питательных веществ
 - Антифагоцитарные факторы
 - Токсины
 - Инъецируемые эффекторные белки

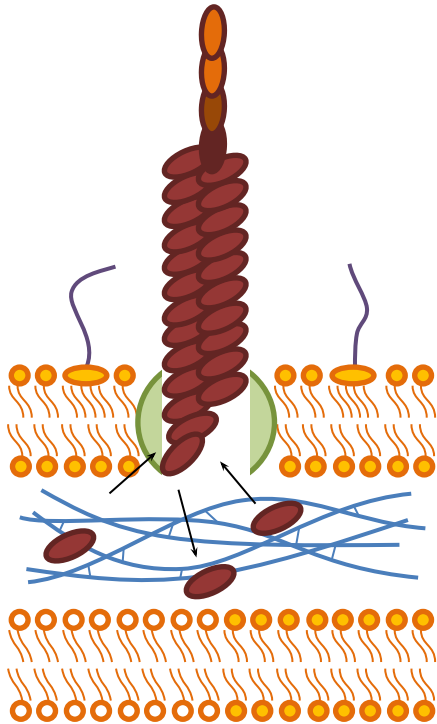
Часть I: Факторы адгезии



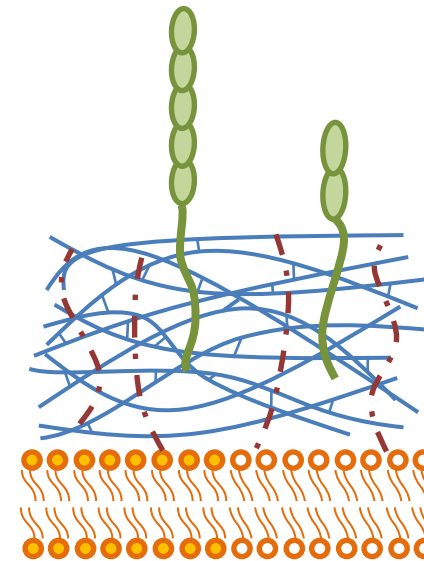
Бактериальная адгезия

- В большинстве случаев первым этапом взаимодействия бактериальных возбудителей с организмом человека является адгезия к эпителию слизистых оболочек.
- Адгезия позволяет противостоять смыванию бактерий со слизистых за счёт перистальтики кишечника, мукоцилиарного транспорта респираторного тракта и. т. д.
- Прочной специфической адгезии способствует наличие специализированных белков – **адгезинов**, которые связываются с белками или углеводными остатками на поверхностях слизистых оболочек.

Варианты адгезинов



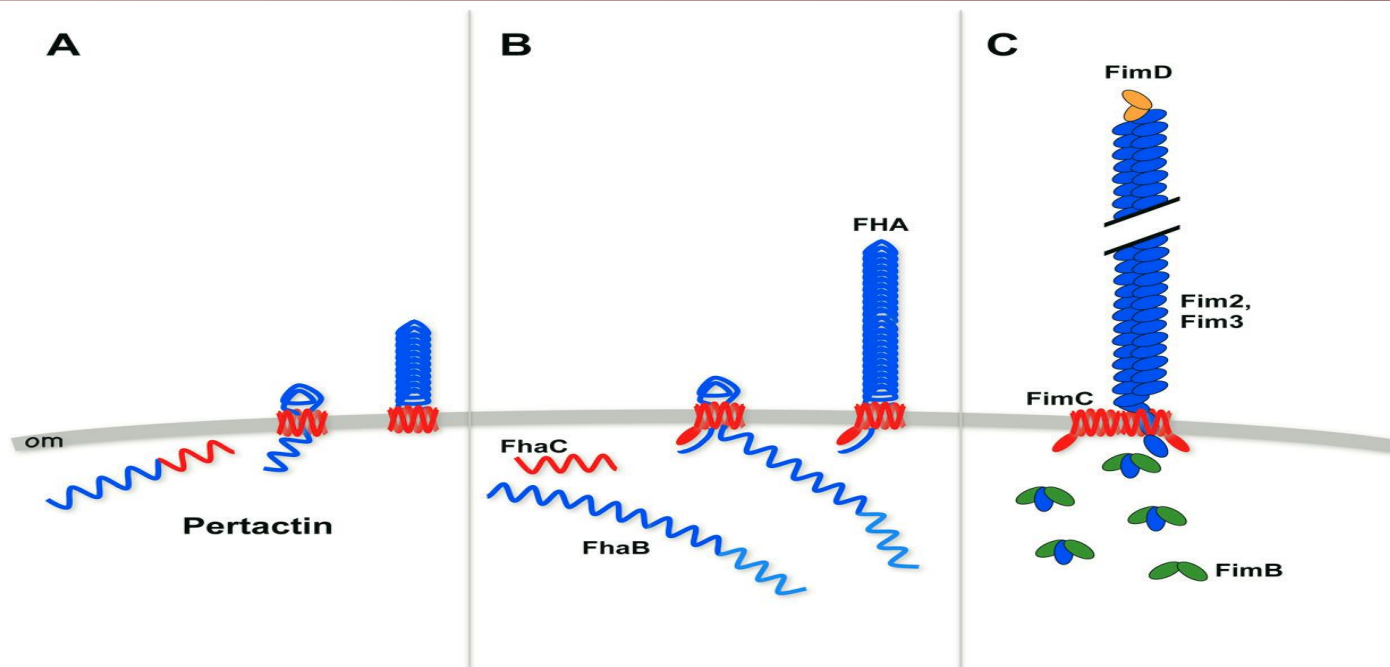
Фимбриальные адгезины
(на примере Fim-белков *E. coli*)



Афимбриальные адгезины
(на примере SpA и ClfA *S. aureus*)

- Необходимость связывания с определенными молекулами определяет видовой тропизм и тканевый тропизм бактерий

(ФГА), и фимбрии на поверхности клеток *Bordetella*

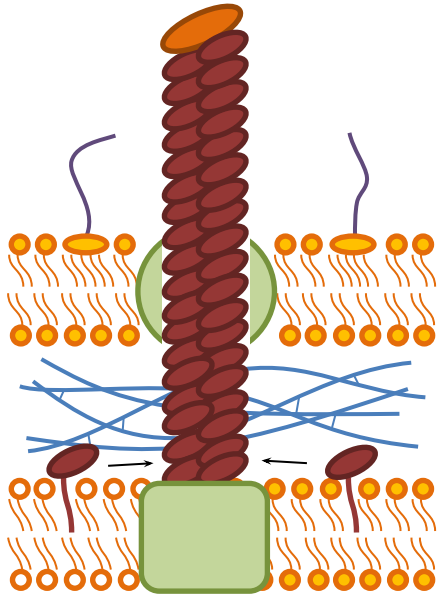


ФГА - экзопротеин (синий), секретируется через наружную мембрану посредством порообразующего белка (красный), FhaC. Эта транслокация происходит через двухкомпонентную систему секреции (TpsAB). ФГА является обязательным для присоединения к реснитчатым эпителиальным клеткам и для персистенции во время инфекции, возможно, прямо или косвенно, модулируя иммунную систему хозяина.

Фимбрии 1 типа. Белок-шаперон FimB, транспортирует субъединиц (FimD-верхушечная субъединица, Fim2 и Fim3) через мембранную пору FimC. Фимбрии необходимы для персистенции во время инфекции, прямо или косвенно, модулируют иммунную систему, необходимыми для адгезии к реснитчатому эпителию.

Пертактин - автотранспортер. С-концевой регион ~30 кДа (красное) образует канал в наружной мембраны (ом), необходимый для транслокации ~70 кДа β -спирального «пассажирского» домена

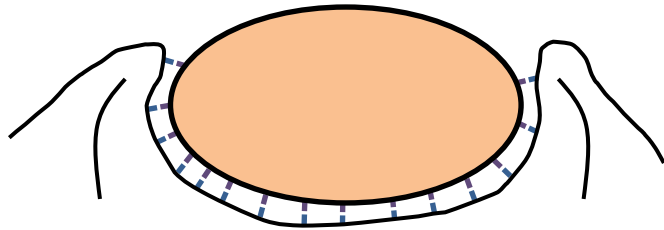
Пили IV типа



Пили IV типа
(на примере Pil-
белков
представителей рода
Neisseria)

- Пили IV типа способны сокращаться после прикрепления к субстрату, обеспечивая передвижение сквозь полужидкую среду на поверхностях слизистых оболочек.
- Также они участвуют в переносе ДНК из внешней среды сквозь капсулу и клеточную стенку в процессе трансформации.

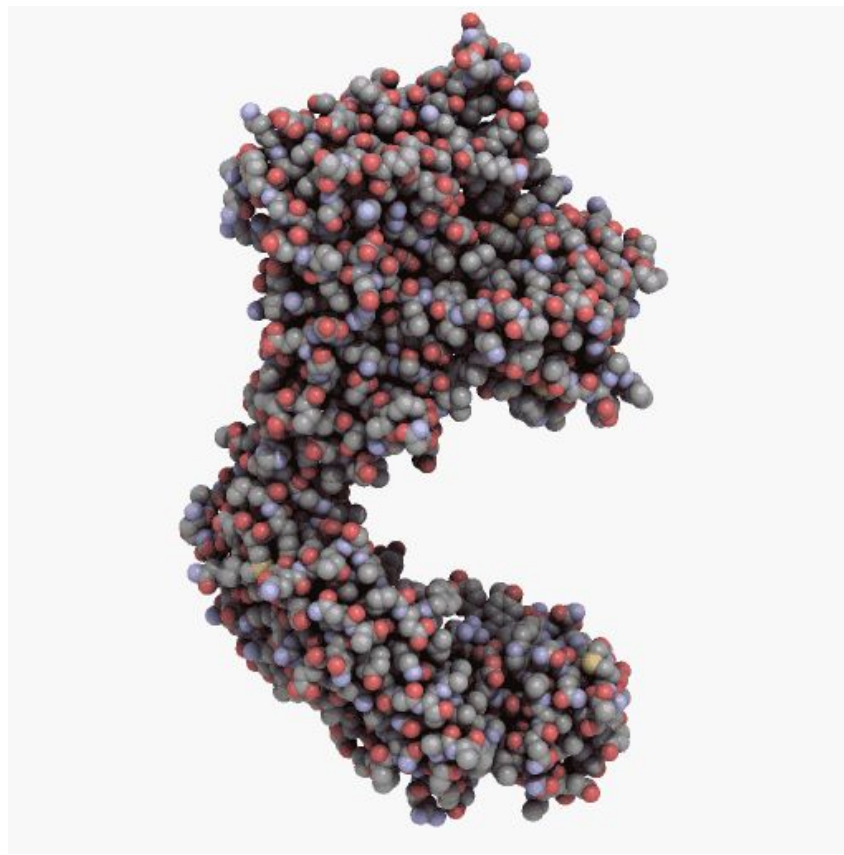
Адгезия как механизм инвазии



- Связывание бактерий с некоторыми поверхностными белками (интегрины, E-кадгерин) ведет к реорганизации цитоскелета и проникновению бактерии внутрь нефагоцитирующих клеток человека.
- Это называется “zipper mechanism”. Он характерен для представителей родов *Yersinia* и *Listeria*.
- Некоторые другие патогены вызывают свой захват клеткой путем прямого воздействия на внутриклеточные белки (“trigger mechanism”).

Часть II:

Факторы инвазии, агрессии и добычи питательных веществ



Факторы инвазии, агрессии и добычи питательных веществ

- Данная группа факторов преимущественно представлена набором ферментов, которые расщепляют компоненты тканей человеческого организма. Они выполняют следующие функции:
 - Распространение бактерий по тканям организма и прорыв в лимфатическую и кровеносную системы;
 - Подавление естественной резистентности и адаптивного иммунитета;
 - Обеспечение бактерий питательными веществами для роста и размножения.
- Наиболее широко данная группа факторов представлена у возбудителей раневых инфекций.

Ферменты инвазии

- **Коллагеназа** – расщепление коллагена – основного белкового компонента соединительной ткани.
- **Гиалуронидаза** – расщепление гиалуроновой кислоты – основного углеводного компонента соединительной ткани.
- **Нейраминидаза** – отщепление остатков сиаловых кислот от гликопротеидов и ганглиозидов.
- **ДНКаза** – расщепление ДНК, высвобождающейся из разрушенных клеток и служащей механическим барьером для распространения инфекции.

Ферменты инвазии

- **Фосфолипазы** – расщепление фосфолипидов мембран, приводящее к гибели клеток. Данные ферменты рассматриваются не только как факторы инвазии, но и как токсины.
- **Активаторы плазминогена** (стрептокиназа, стафилокиназа) – стимулируют расщепление фибрина, нейтрализуя участие системы свертывания крови в сдерживании инфекции.
- Активаторы плазминогена применяются в клинической практике для лечения инфаркта миокарда, тромбозов и тромбэмболий



Ферменты инвазии

- **Уреаза** – гидролизует мочевину до аммиака и углекислого газа.



- Это приводит к:
 - возможности использования аммиака как источника азота;
 - локальному защелачиванию среды. В частности, бактерии *Helicobacter pylori* используют уреазу для выживания в кислой среде желудка.

Железо как дефицитный ресурс

Неотъемлемым компонентом белков дыхательной цепи и многих ферментов являются ионы железа

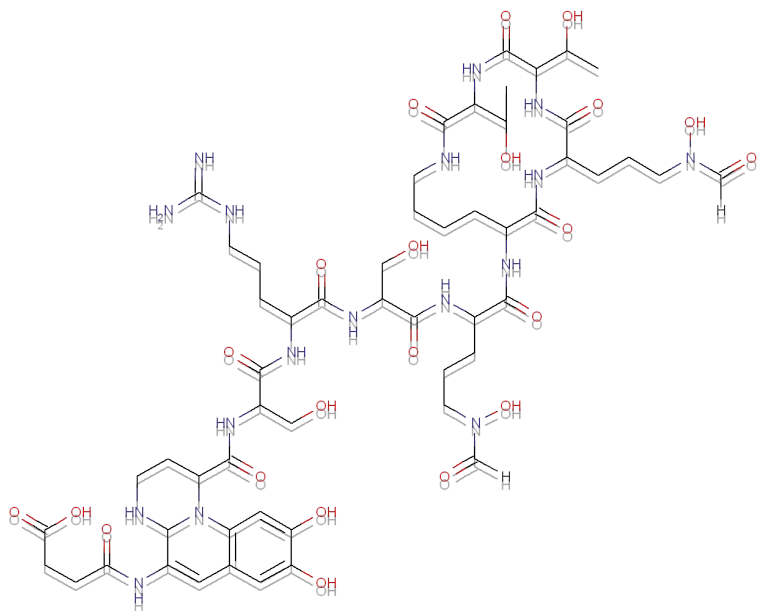
Большие количества железа часто являются необходимыми для размножения бактерий

Патогенные бактерии (особенно облигатно аэробные) должны обладать системами перехвата ионов железа с белков человека

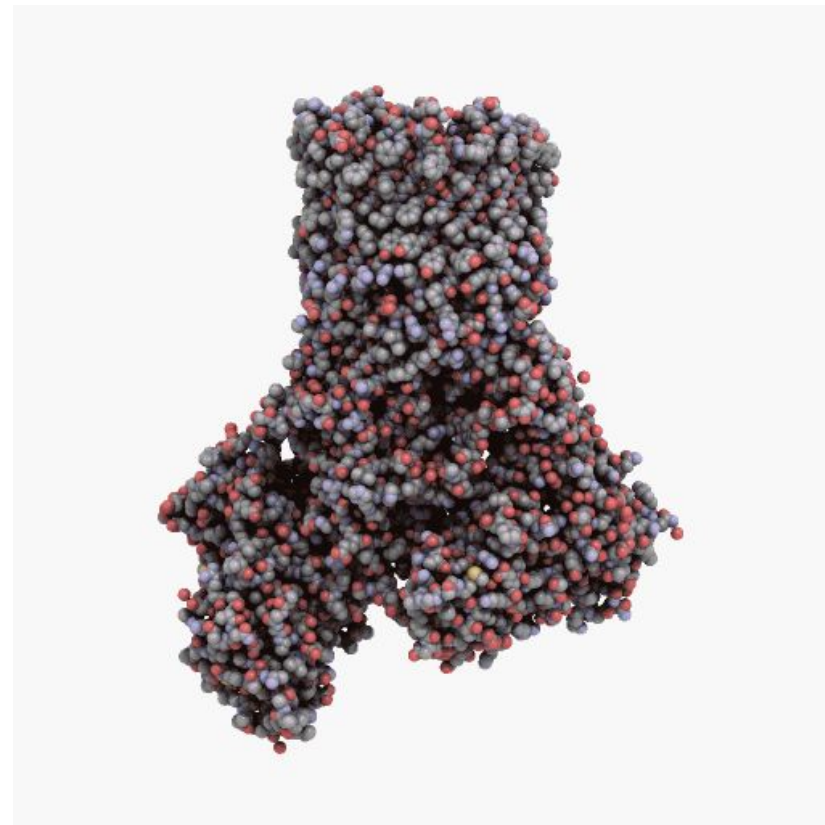
Свободные ионы железа могут катализировать реакции, приводящие к образованию свободных радикалов

В организме практически отсутствуют ионы железа, не связанные с белками

Системы перехвата железа



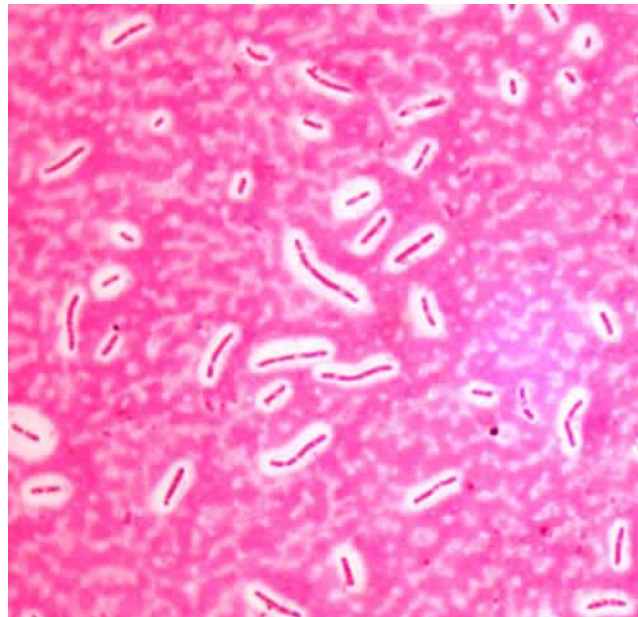
Сидерофоры
(пиовердин *Pseudomonas aeruginosa*)



Рецепторы к железосодержащим белкам человека
(трансферрин-связывающий белок)

Часть III:

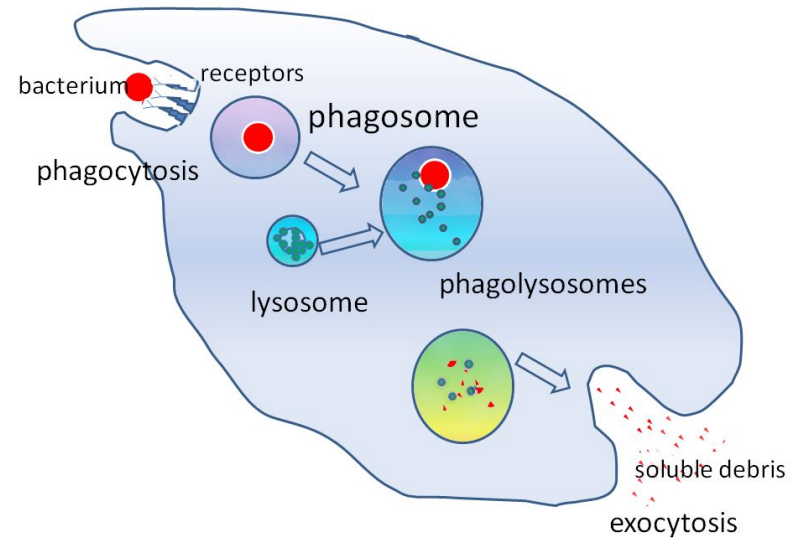
Антифагоцитарные факторы



Фагоцитоз

- Ключевую роль в инициации фагоцитоза играет распознавание – образование комплекса **бактериальная структура – опсонин – рецептор фагоцита.**

- Распространенным способом защиты от фагоцитоза является укрытие поверхности клетки от распознавания.



Капсулы

- **Капсулы** – наиболее распространенный защитный фактор бактерий. Для ряда патогенов (например, пневмококков) потеря способности синтезировать капсулу приводит к полной потере вирулентности.
- Основные функции капсулы:
 - *Маскировка поверхностных молекул;*
 - Защита от высыхания;
 - Депонирование питательных веществ
- Часто капсулы являются *иммуногенными* - против них вырабатываются антитела. Однако существуют и *неиммуногенные* капсулы, которые состоят из веществ, не чужеродных для человеческого организма.

Химическое строение капсул

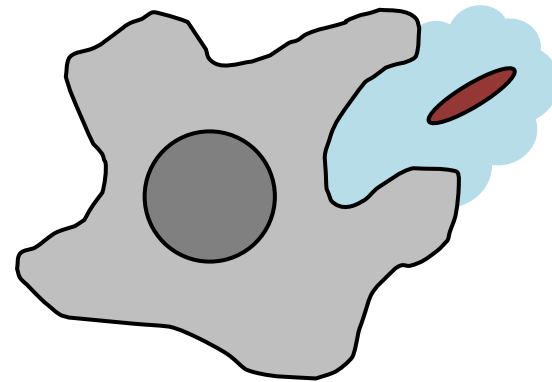
- Как правило, капсулы состоят из **полисахаридов** или, реже, **полипептидов**.

| Химический состав капсул некоторых бактерий | |
|---|--------------------------|
| Бактерия | Природа капсулы |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | Гиалуроновая кислота |
| <i>Neisseria meningitidis</i> группы В | Полимер сиаловой кислоты |
| <i>Bacillus anthracis</i> | Полимер D-глутамата |

- У многих бактерий капсулы имеют сложный состав, отличающийся у различных штаммов внутри вида (Например, полисахаридные капсулы *Streptococcus pneumoniae*).

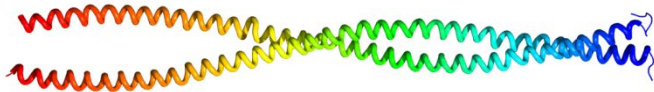
Слизистые чехлы

- Некоторые бактерии (например, *Pseudomonas aeruginosa*) образуют не плотные капсулы, а легко отделяющиеся от клетки слизистые чехлы.
- Это позволяет бактериям «выскальзывать» при попытке поглощения фагоцитом.



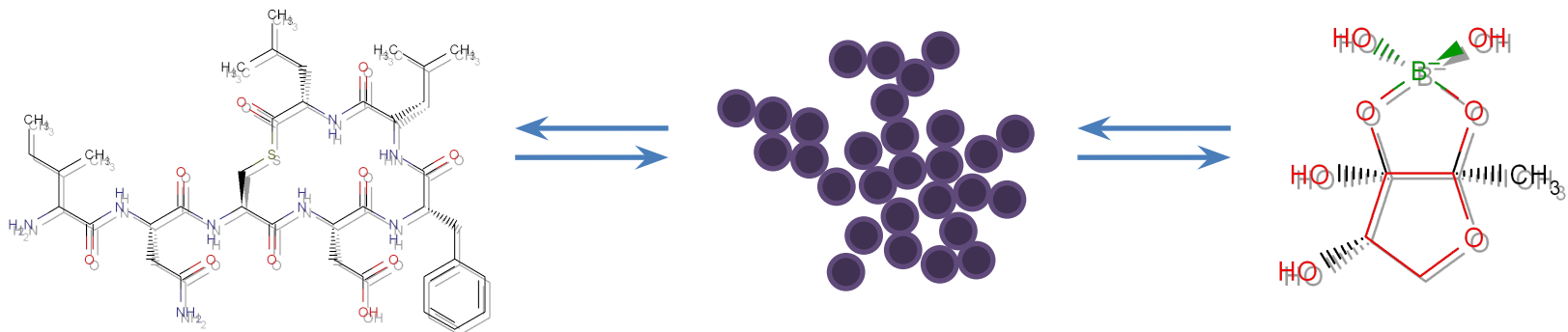
Укрытие белками организма

- **Плазмокоагулаза *Staphylococcus aureus*** – переводит фибриноген плазмы крови в нерастворимый фибрин, образуя подобие микротромба вокруг поверхности клетки.
- **Белок M *Streptococcus pyogenes*** – связывает фибриноген, фактор H, альбумин и другие белки человека образуя из них защитный слой вокруг бактериальной клетки.



Координированное поведение клеток

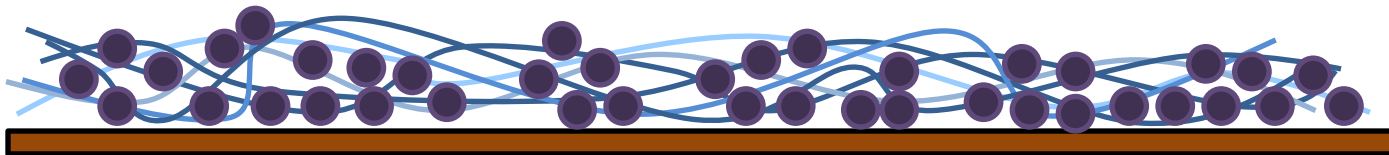
- Многие бактерии способны оценивать собственную численность в месте колонизации (феномен «чувства кворума», или «quorum sensing») и на основе этого проявлять координированное поведение.
- Одним из основных вариантов координированного поведения является образование **биоплёнок**.



Продукция и рецепция сигнальных молекул

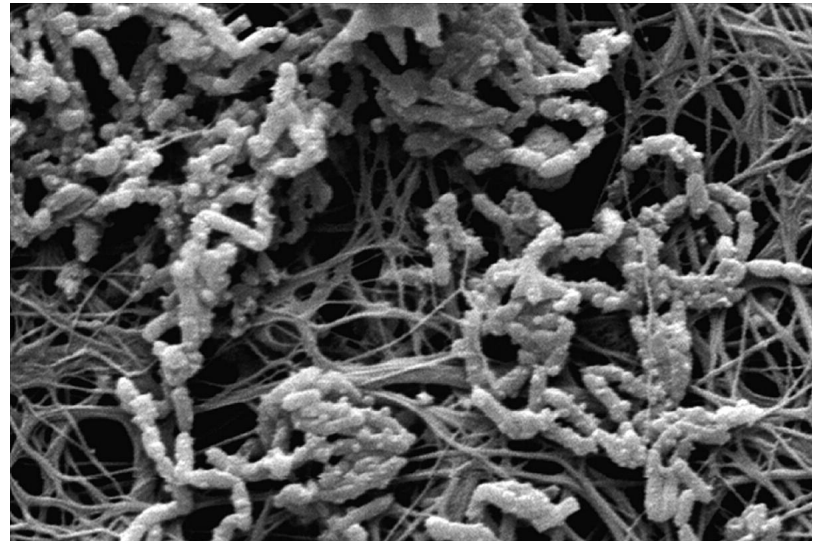
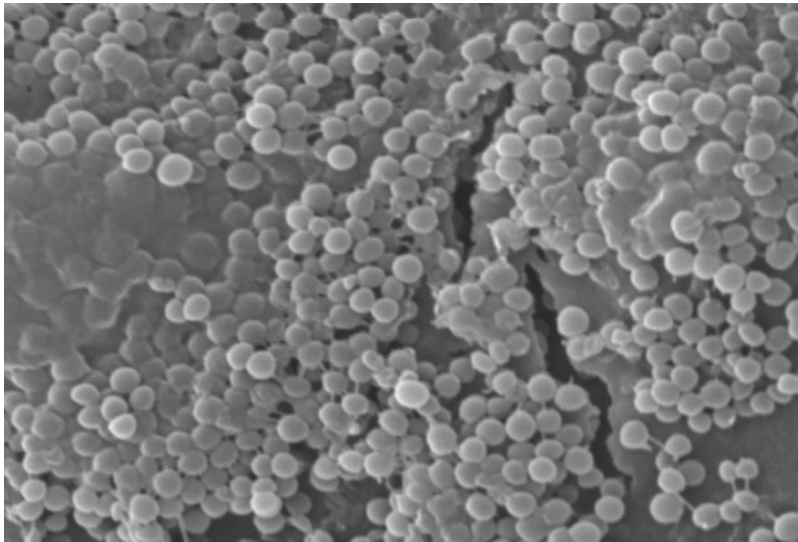
Биоплёнки

- Биопленки представляют собой сплошные слои из бактериальных клеток и скрепляющего из каркаса из полисахаридов, белков и ДНК.
- В норме биопленки в организме человека существуют на поверхности зубов и слизистой толстого кишечника.
- В ходе патологических процессов они могут образовываться на сердечных клапанах, инородных телах, в респираторном тракте.

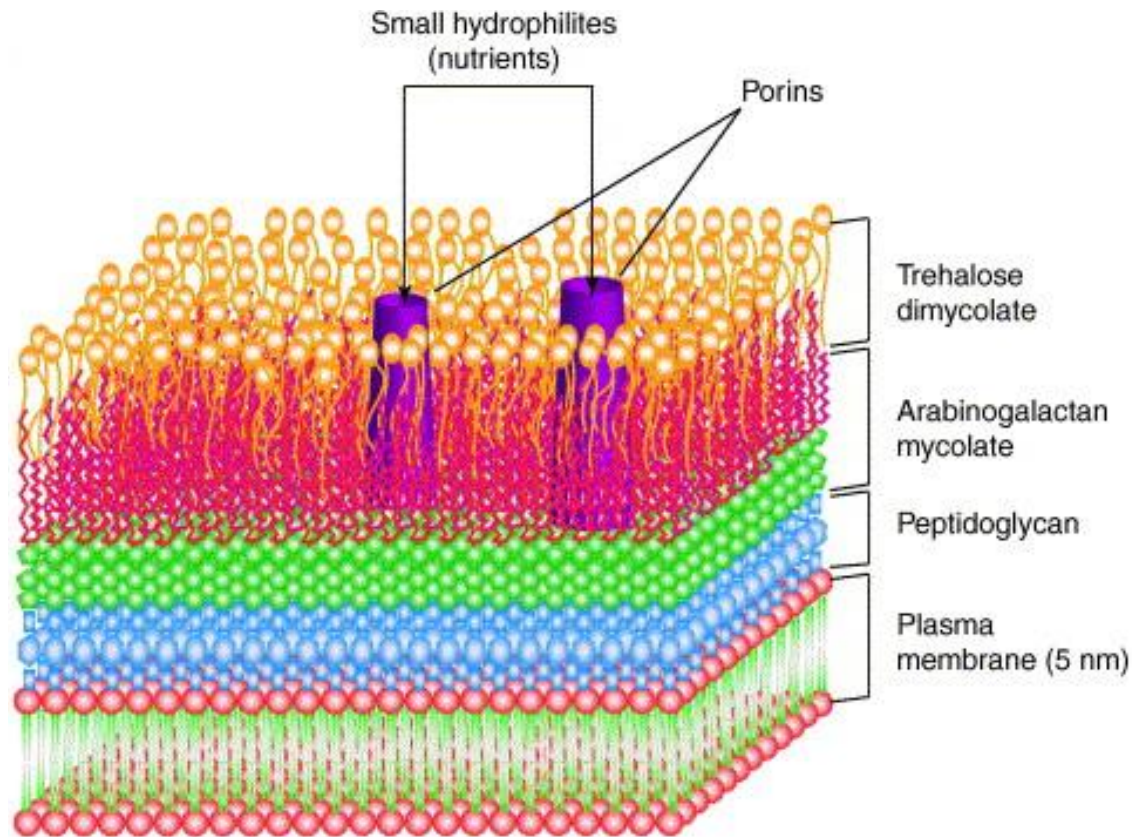


Биоплёнки как фактор патогенности

- Защита от фагоцитоза
- Устойчивость к антисептикам и дезинфектантам
- Устойчивость к антибиотикам
- Высокая частота горизонтального переноса генов.



Клеточная стенка кислотоустойчивых бактерий



- Димиколат трегалозы (также известный как **корд-фактор**) является основным фактором патогенности кислотоустойчивых бактерий (в том числе *Mycobacterium tuberculosis*)

Корд-фактор

- Толстый гидрофобный слой, создаваемый корд-фактором, обеспечивает защиту от многих антибактериальных веществ.
- Корд-фактор способен встраиваться в мембраны фагосом, блокируя их слияние с лизосомами – происходит **незавершенный фагоцитоз**, в результате которого бактерии могут выживать и размножаться внутри макрофагов.
- Также корд-фактор связывается со специфическим рецептором Mincle, что приводит к активации системы врожденного иммунитета и запуску специфического пролиферативного воспаления.

Часть IV: ТОКСИНЫ



Бактериальные токсины

- Токсины – это соединения, синтезируемые бактериями и способные вызывать патологические изменения в организме.

Бактериальные токсины

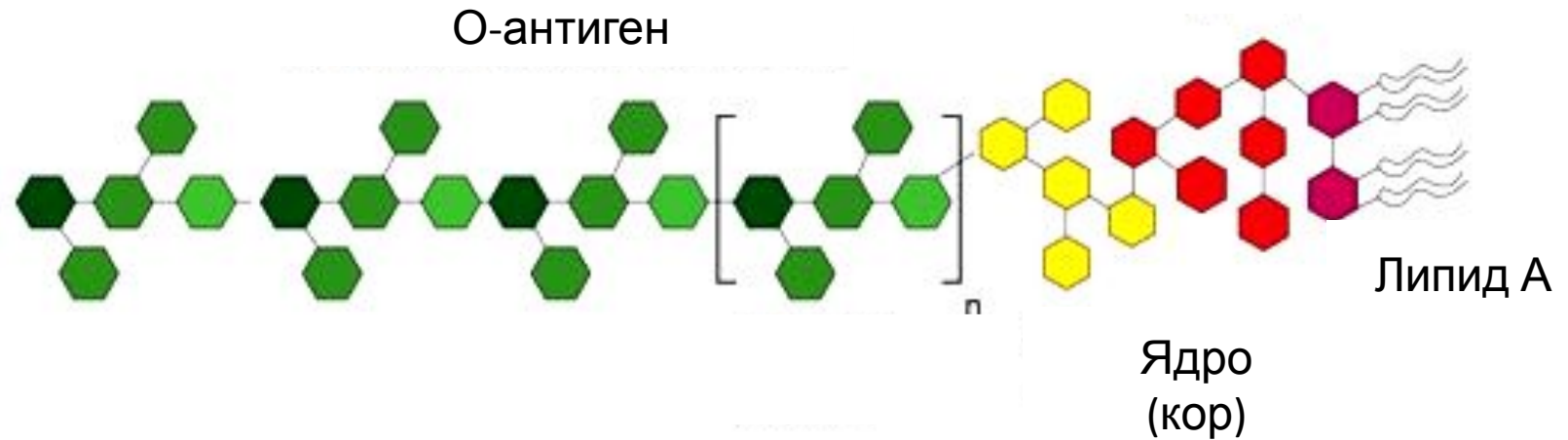
Эндотоксин

Липополисахарид.
Является структурным компонентом наружной мембраны грам- бактерий.

Экзотоксины

Белки и пептиды.
Секретируются в окружающую среду или накапливаются в цитоплазме бактерий.

Структура эндотоксина



- Присутствует почти у всех грамотрицательных бактерий, за исключением спирохет из родов *Treponema* и *Borrelia*.
- В ряде случаев в его составе отсутствует О-антиген (например, у представителей рода *Neisseria*).

Механизм действия эндотоксина

- Эндотоксин не является токсином в эволюционном смысле.
- Его действие обусловлено связыванием липида А с **Toll-like рецепторами**, что приводит к активации системы врожденного иммунитета и запуску воспалительной реакции.
- При системном действии эндотоксин приводит к повышению температуры, синтезу белков острой фазы и снижению артериального давления. Попадание большого количества экзотоксина в кровотоки может привести к смерти от дисрегуляции гемодинамики.

Экзотоксины

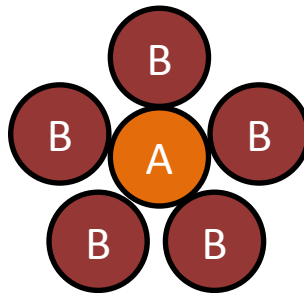
1. Действующие **снаружи** эукариотической клетки
2. Действующие **внутри** эукариотической клетки
 - Токсины, проникающие внутрь клетки, как правило, имеют бинарную (AB) структуру:
 - А-субъединицы (active) обладает токсической ферментативной активностью;
 - В-субъединицы (binding) обеспечивают связывание с клеткой и проникновение А-субъединиц внутрь.

ЭКЗОТОКСИНЫ

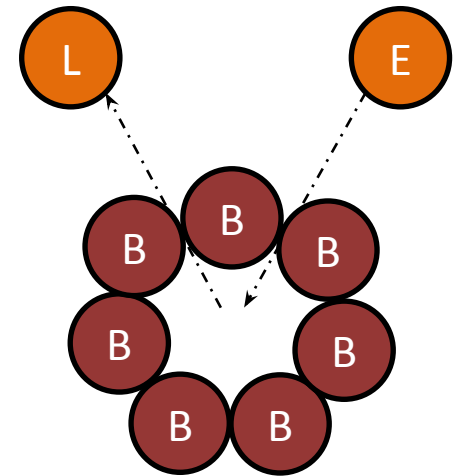
1. Действующие **снаружи** эукариотической клетки
2. Действующие **внутри** эукариотической клетки



Дифтерийный
ТОКСИН,
столбнячный токсин,
ботулинический
ТОКСИН



Холерный
ТОКСИН,
Шига-токсин



Летальный и
отеchnый
ТОКСИНЫ
B. anthracis

Виды экзотоксинов

- Большинство бактериальных токсинов можно отнести к одной из нескольких групп:
 - Мембранотоксины
 - Цитотоксины
 - Нейротоксины
 - Токсины, нарушающие внутриклеточную передачу сигнала
 - Суперантигены



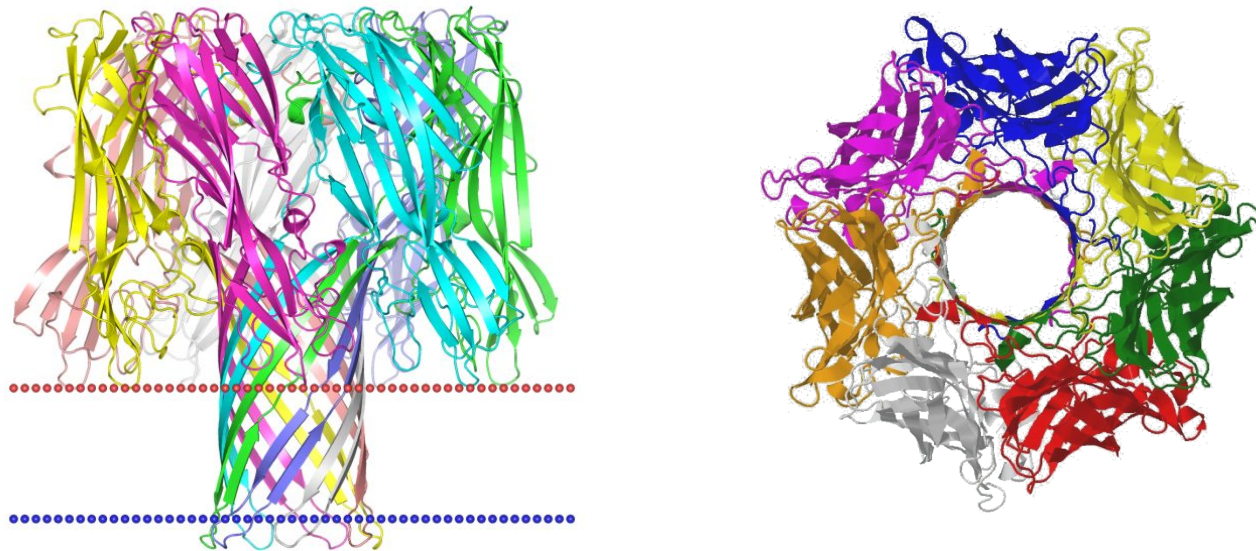
Мембранотоксины

- **Мембранотоксины** – это белки, нарушающие целостность мембран эукариотических клеток, что приводит к их гибели.
- Это самая широко распространенная группа токсинов.
- Мембранотоксины, способные разрушать эритроциты, образуют вокруг колонии бактерий на кровяном агаре зону β -гемолиза. Такие токсины называются **гемолизины**.



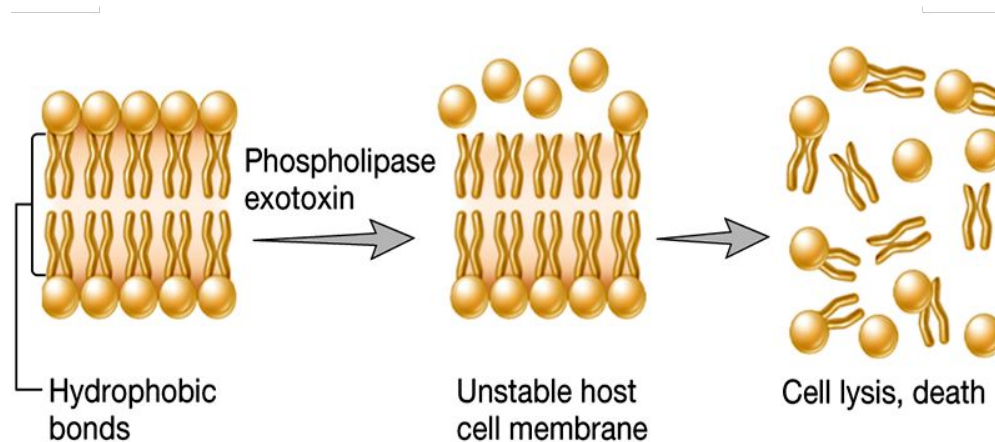
Мембранотоксины

- Мембранотоксины можно разделить на группы:
 - **Порообразующие токсины** – встраиваются в мембрану клетки и олигомеризуются, образуя пору, способную пропускать ионы.
Пример: α -токсин *Staphylococcus aureus*.



Мембранотоксины

- Мембранотоксины можно разделить на группы:
 - **Липазы** – ферментативно расщепляют фосфолипиды и сфинголипиды мембран, приводя к их разрушению. При этом продукты гидролиза могут запускать регуляторные каскады, приводящие к отёку и агрегации тромбоцитов.
Пример: α-токсин *Clostridium perfringens*.

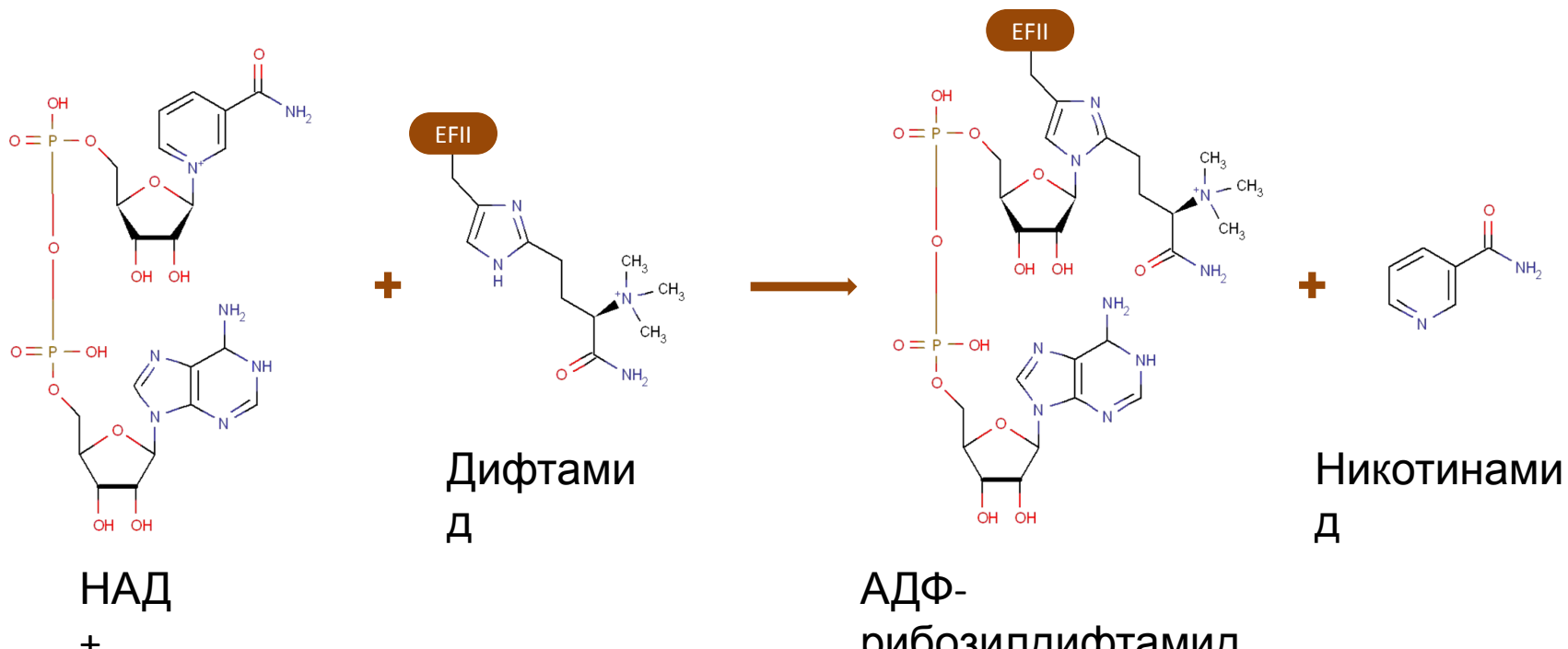


Цитотоксины

- **Цитотоксины** – это токсины, подавляющие жизненно важные процессы в клетках эукариот. Они приводят к нарушению выполнения клетками их функции, к некробиотическим процессам и в конечном счёте к их гибели.
- Примеры:
 - **Цитолетальный токсин** может продуцироваться *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter jejuni* и некоторыми другими бактериями. Данный токсин является ДНКазой: проникая в ядра эукариотических клеток, он ферментативно расщепляет молекулы ДНК (что ведет к остановке клеточного цикла и апоптозу).

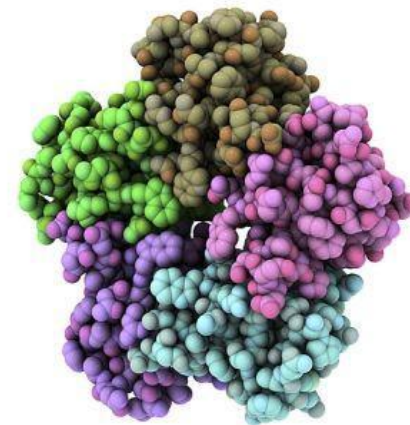
Цитотоксины

- **Дифтерийный токсин** вырабатывается штаммами *Corynebacterium diphtheriae*, содержащими *tox+* профаг. Данный токсин является АДФ-рибозилтрансферазой. Он специфически инактивирует фактор элонгации II – один из белков, вовлеченных в процесс синтеза белка.



ЦИТОТОКСИНЫ

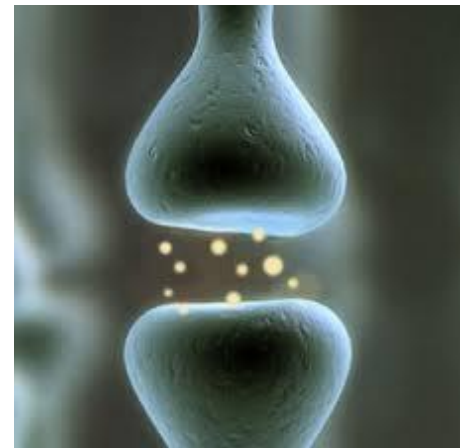
- **Шига-токсин** вырабатывается *Shigella dysenteriae*,
Шига-подобные токсины вырабатываются энтерогеморрагическими *Escherichia coli*.



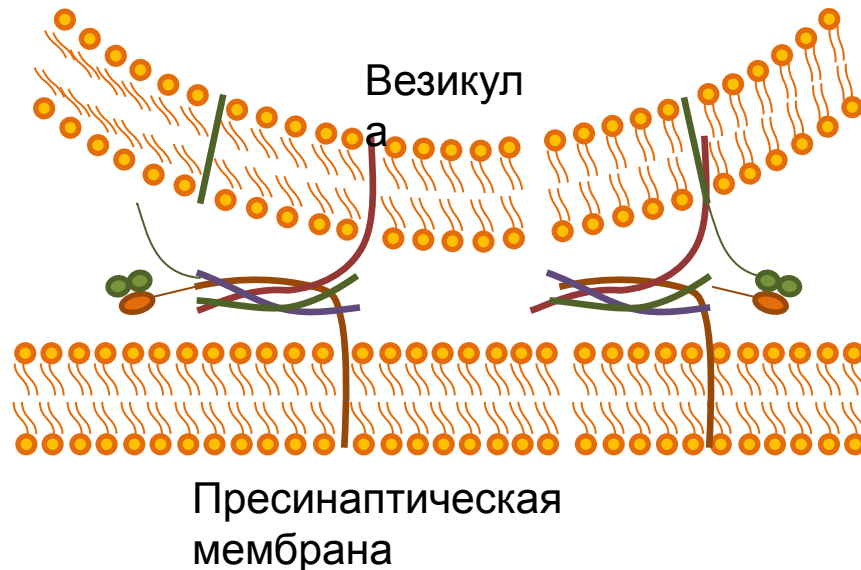
Данная группа токсинов является N-гликозидазами: они отщепляют остаток аденина в специфической позиции 28s рРНК (что приводит к остановке синтеза белка), а также могут отщеплять остатки аденина в молекулах ДНК (что ведет к остановке клеточного цикла и апоптозу).

Нейротоксины

- Группа бактериальных белковых нейротоксинов включает в себя всего два представителя:
 - Столбнячный токсин *Clostridium tetani*;
 - Ботулинический токсин *Clostridium botulinum*.
- Это сильнейшие из известных токсинов: летальная доза (LD50) ≈ 1 нг/кг веса.
- Механизм действия данных токсинов – блокирование выброса нейромедиаторов в синаптическую щель.



Нейротоксины



В слиянии мембран везикулы, содержащей нейромедиатор, и пресинаптической мембраны принимает участие четырехспиральный SNARE-комплекс, состоящий из белков синаптобревина, синтаксина и SNAP-25.

- Нейротоксины клостридий являются протеазами, специфически расщепляющими белки SNARE-комплекса, что приводит к невозможности выброса нейромедиатора в синаптическую щель.

Нейротоксины

- **Столбнячный токсин (тетаноспазмин)** нарушает высвобождение тормозных неромедиаторов (ГАМК и глицина) из вставочных нейронов спинного мозга. Это приводит к развитию спастических параличей.
- **Ботулинический токсин** нарушает высвобождение ацетилхолина из моторных нейронов. Это приводит к развитию вялых параличей.



Нейротоксины



спастических параличей.

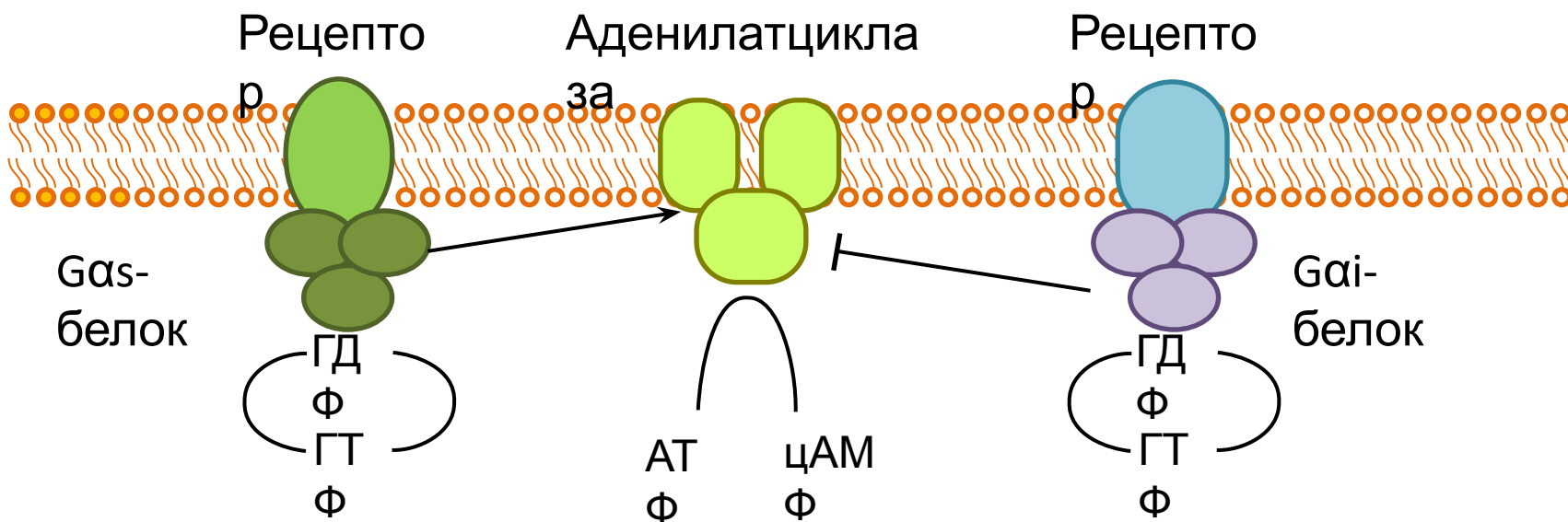
- **Ботулинический токсин** нарушает высвобождение ацетилхолина из моторных нейронов. Это приводит к развитию вялых параличей.



Использование
В
косметологических
и лечебных целях

Токсины, нарушающие внутриклеточную передачу сигнала

- Действуют на уровне **вторичных мессенджеров**.



Токсины, нарушающие внутриклеточную передачу сигнала

Холерный
ТОКСИН

Vibrio cholerae

АДФ

рибозилирование
Gas белка,
блокирующее его в
«активном» состоянии

Коклюшный
ТОКСИН

Bordetella pertussis

АДФ

рибозилирование
Gai белка,
блокирующее его в
«неактивном»

состоянии

Отечный
ТОКСИН

Bacillus anthracis

Прямая
аденилатциклазная
активность

Повышение уровня цАМФ в
клетке

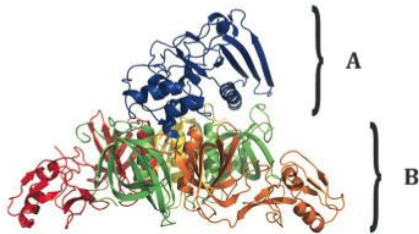
Повышенная
секреция ионов и
воды кишечным
эпителием –
водянистая диарея

Нарушение
хемотаксиса
лейкоцитов,
ингибирование
фагоцитоза

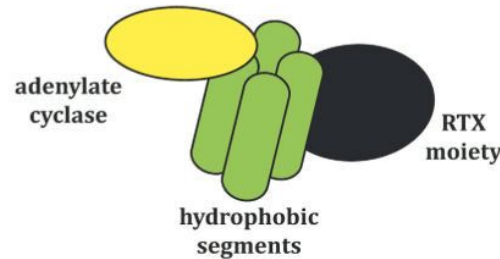
Отёк тканей,
ингибирование
фагоцитоза

Токсин-опосредованная вирулентность *Bordetella spp*

(a) pertussis toxin

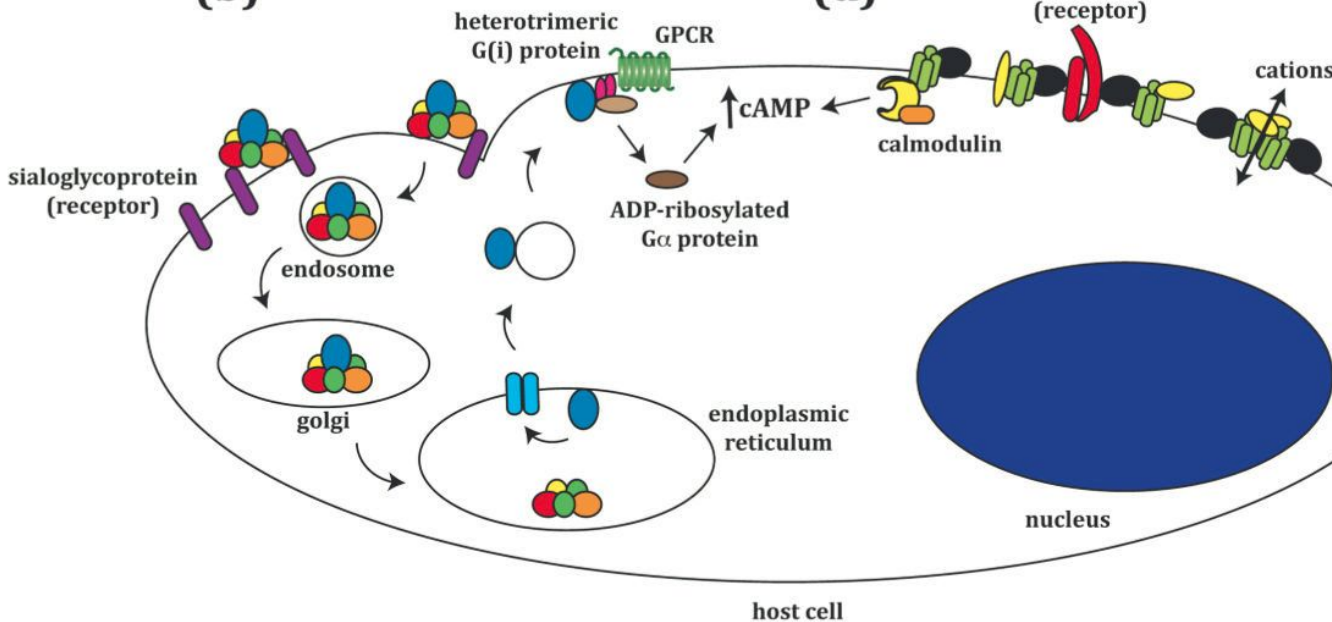


(c) adenylate cyclase toxin



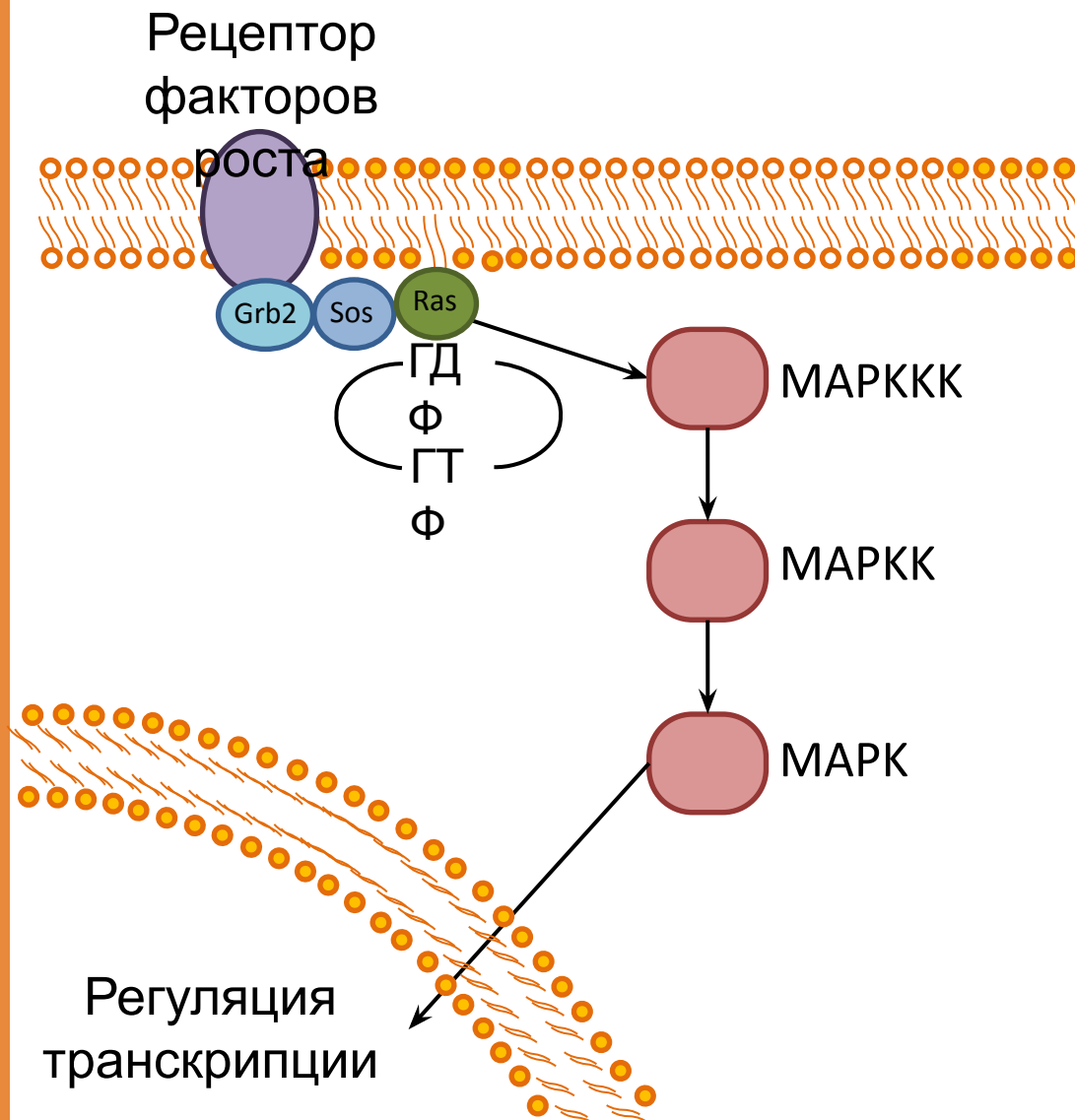
(b)

(d)



Комбинированное воздействие РТ и АСТ интоксикации и порообразования проявляется в ингибировании комплемент-зависимого фагоцитоза, индукции **противовоспалительных** цитокинов, подавлении **провоспалительных** цитокинов и ингибировании рекрутирования иммунных клеток к месту инфицирования.

Токсины, нарушающие внутриклеточную передачу сигнала



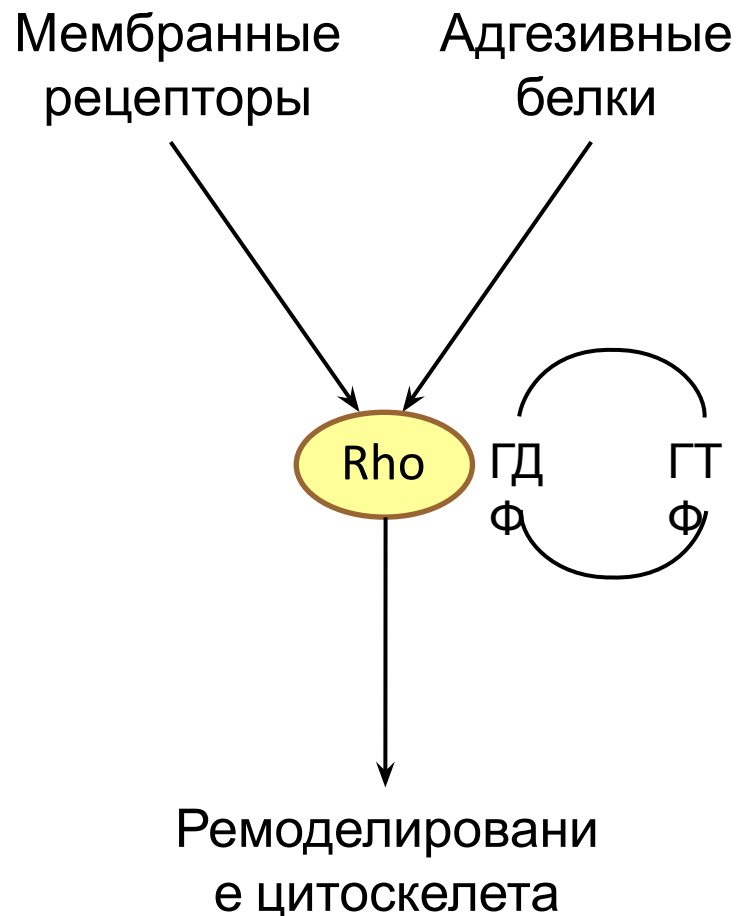
Летальный токсин

Bacillus anthracis – это протеаза, расщепляющая киназы киназ MAP (MAPKK), которые участвуют в передаче сигнала от рецепторов факторов роста.

Это приводит к запрограммированной клеточной гибели.

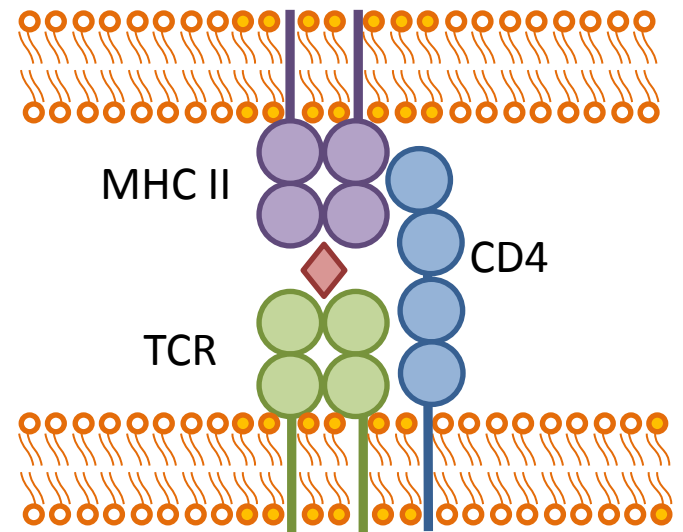
Токсины, нарушающие внутриклеточную передачу сигнала

- **Токсины α и β *Clostridium difficile*** – являются гликозилтрансферазами. Они гликозилируют белки Rho, блокируя их в «неактивном» состоянии. При их действии на кишечный эпителий теряются межклеточные контакты, нарушается адгезия, и в конечном счёте наступает апоптоз.



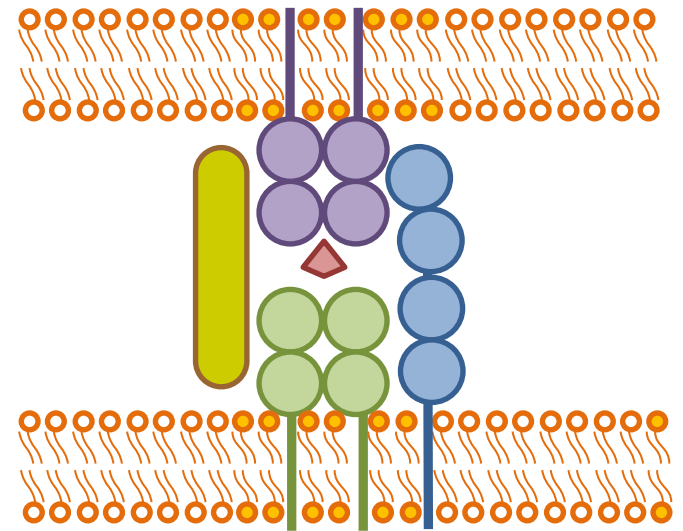
Суперантигены

- Активация Т-лимфоцитов не может происходить при простом контакте рецептора с антигеном.
- Короткий фрагмент антигена должен быть *презентирован* в составе молекулы главного комплекса гистосовместимости (**МНС**, или **HLA**).
- В норме Т-лимфоциты должны активироваться только тогда, когда наблюдается прочное связывание антигена с Т-клеточным рецептором (**TCR**)



Суперантигены

- Суперантигены – это токсины бактерий, которые перекрестно связывают TCR и MHC II класса независимо от силы связывания рецептор-антиген.
- Это приводит к *поликлональной* активации Т-хелперов и выраженной воспалительной реакции.
- Примеры: скарлатинозный токсин *Streptococcus pyogenes*, энтеротоксины *Staphylococcus aureus*.

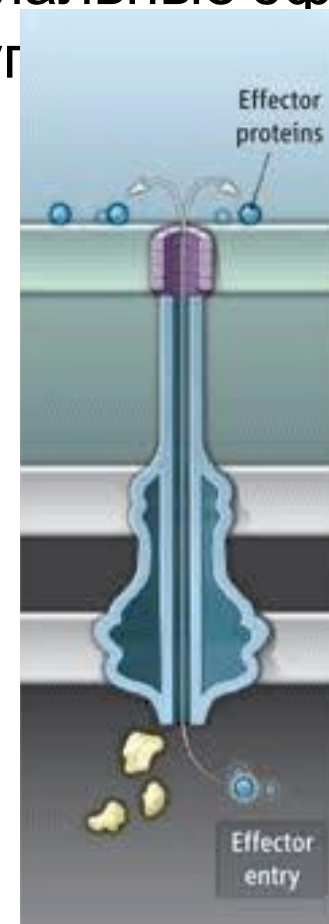


Часть V: Инъецируемые эффекторные белки

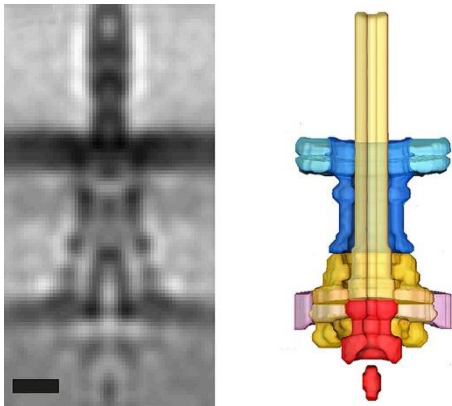


Механизмы инъекции

- Среди грамотрицательных патогенных бактерий широко распространены **системы секреции** белков, позволяющие инъектировать бактериальные эффекторы (bacterial effectors) *в цитоплазму* других клеток.
 - Система секреции III типа (T3SS)
 - Система секреции IV типа (T4SS)
 - Система секреции VI типа (T6SS)

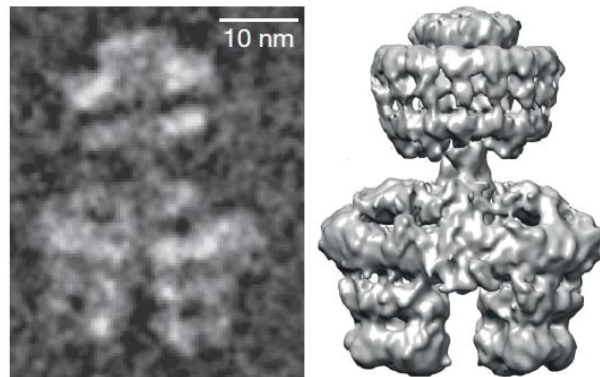


Строение и происхождение



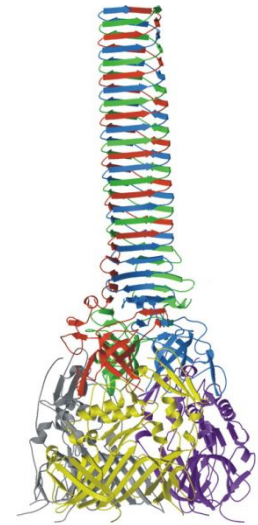
T3SS

Гомологичны
бактериальны
м
жгутикам



T4SS

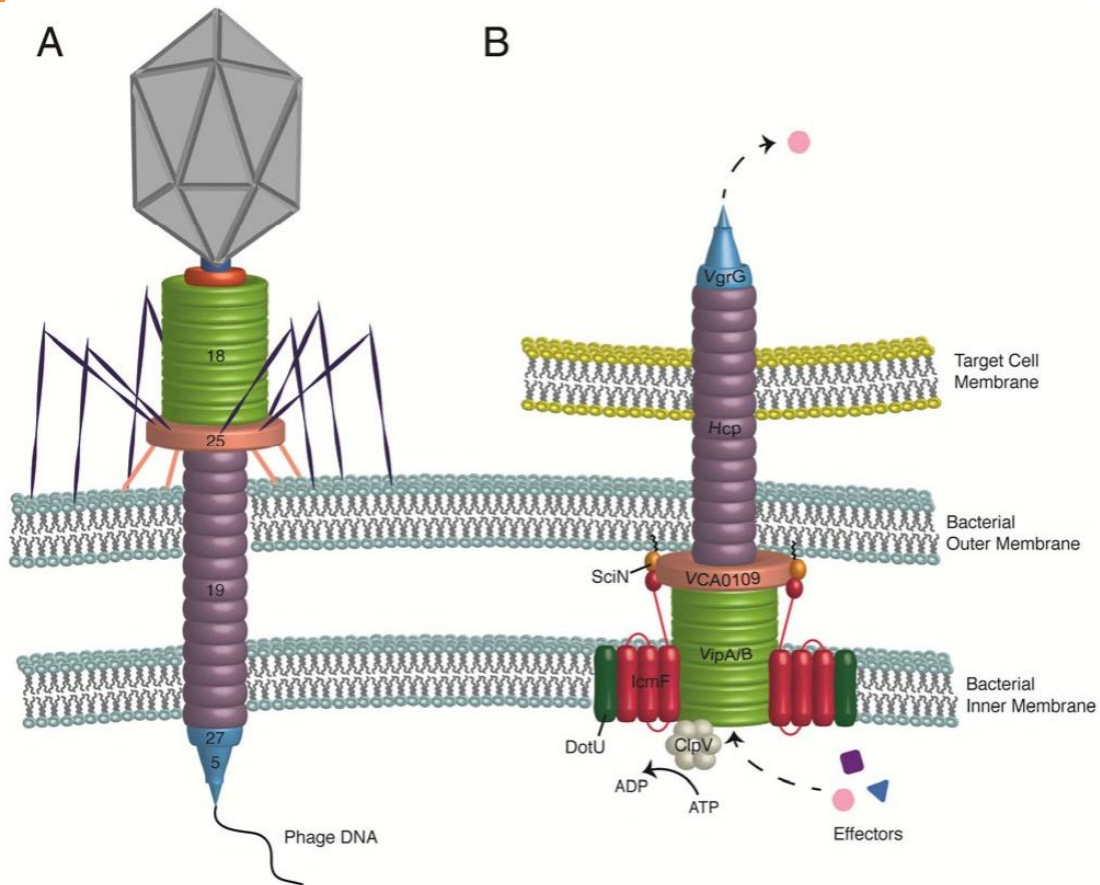
Гомологичны
конъюгативном
у
аппарату



T6SS

Гомологичны
хвосту
бактериофага
T4

Схематическое строение бактериофага Т4 и предполагаемой структуры впрыска у бактерий - системы секреции VI типа (Т6SS).



А. Молекулярная архитектура бактериофага Т4
Компоненты имеют маркировку с указанием числа генных продуктов.
Б. Модель Т6SS основана на предугадывании субклеточной локализации белков и на гомологии между Т6SS и фаговыми белковыми последовательностями. Т6SS белки с гомологией фаговым белкам окрашены такими же цветами, как их аналоги у фага Т4.

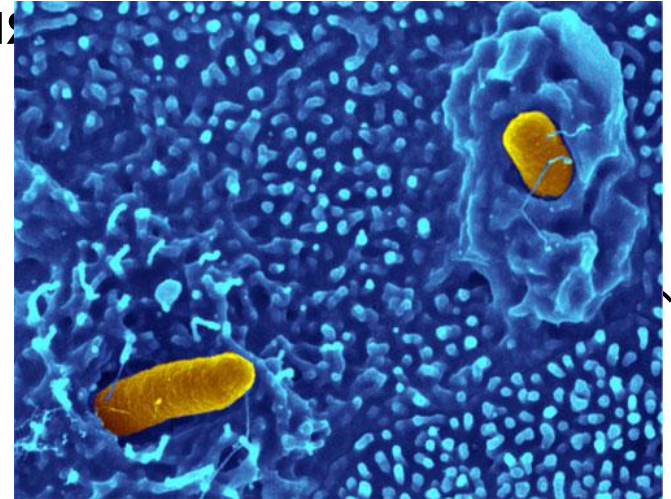
Бактериальные эффекторы

- Бактерии чаще всего невыгодно уничтожать клетку, на которой она адгезирована.
- Бактериальные эффекторы обычно действуют на уровне внутриклеточной передачи сигнала, *изменяя поведение клетки*. При этом они могут выступать как протеазы, киназы, фосфатазы, убиквитин-лигазы, АДФ-рибозилтрансферазы и. т. д.
- Как правило, одна бактериальная клетка инъецирует сразу десятки эффекторов, обеспечивая сложные эффекты.

Распространенные эффекты

- Самые распространенные действия бактериальных эффекторов:

- *Захват бактерий нефагоцитирующими клетками с использованием “trigger mechanism”.*



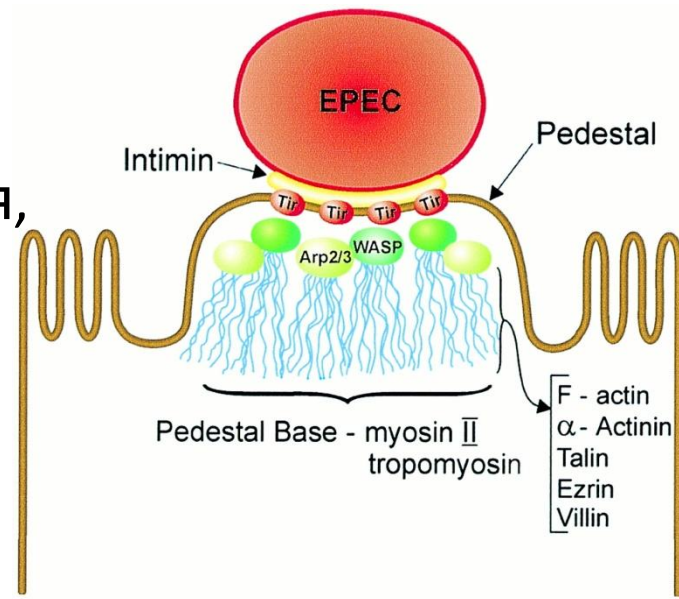
- *Ингибирование фагоцитоза на стадиях захвата бактерий или внутриклеточного переваривания.*

- *Ингибирование или стимулирование апоптоза в зависимости от необходимости остаться в клетке или покинуть её.*

- *Ингибирование синтеза провоспалительных*

Участие в адгезии: энтеропатогенные *Escherichia coli*

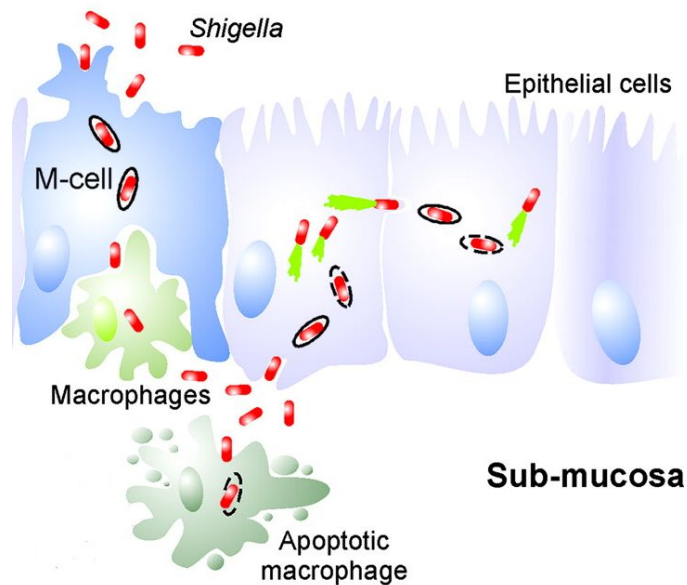
- Энтеропатогенные *E. coli* способны образовывать «пьедесталы» на поверхности кишечного эпителия, и прочно прикрепляться к ним. Это осуществляется с помощью системы секреции III типа.
- Самый важный эффектор в данном процессе – белок **Tir**, который после инъекции встраивается в мембрану и связывает ряд белков, запускающих полимеризацию актина. С наружной стороны с ним прочно связывается бактериальный адгезин **ИНТИМИН**.



Участие в инвазии:

энтероинвазивные *Escherichia coli* и *Shigella spp.*

- Вирулентность данных бактерий в первую очередь обеспечивается системами секреции III типа.
- У них присутствует около 25 эфффекторов, воздействующих на различные регуляторные механизмы клеток человека.

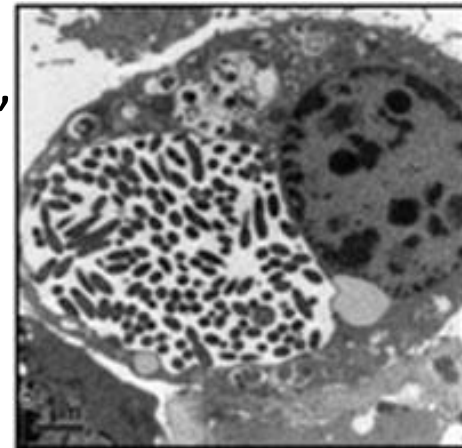


Эти бактерии через М-клетки проникают в подслизистый слой, вызывая апоптоз макрофагов. Оттуда они осуществляют инвазию клеток кишечного эпителия.

Участие в процессе выживания в макрофагах:

Legionella pneumophila

- Данные бактерии способны синтезировать около 300 эфффекторов, доставляемых в клетки с помощью системы секреции IV типа.
- После фагоцитоза легионелл не происходит слияния лизосомы с фагосомой. Вместо этого с фагосомой сливаются везикулы эндоплазматического ретикулума (образуется **легионелла-содержащая вакуоль, LCV**). Усиление протеолиза в клетке приводит к увеличению содержания свободных аминокислот, служащих питанием для легионелл. Ингибирование апоптоза позволяет бактериям длительное время размножаться в макрофагах.



Спасибо за внимание!