

17.Ottobre

## Identificato il meccanismo che consente ai patogeni di eludere la pirotosi

*Non si può asciugare l'acqua con l'acqua,  
non si può spegnere il fuoco con il fuoco,  
quindi non si può combattere il male con il male.  
Lev Tolstoj*

Eppure nel mondo delle cellule, caro Lev Nikolàevič Tolstòj, si può spegnere il fuoco con il fuoco: ce lo insegna la pirotosi.

La **pirotosi** è una forma altamente infiammatoria di "suicidio cellulare programmato" che si verifica più frequentemente in seguito a infezione da agenti patogeni intracellulari e fa parte della risposta antimicrobica.

E' un processo strategico in cui le cellule immunitarie riconoscono in se stesse i segnali di pericolo estraneo, *rilasciano citochine pro-infiammatorie*, si autosopprimono gonfiandosi ed esplodendo. Dall'esplosione viene rilasciata un'onda di *citochine chemiotattiche* che richiamano altre cellule immunitarie per combattere l'infezione .

Questo tipo di morte cellulare programmata intrinsecamente proinfiammatoria è stata nominata "pirotosi" nel 2001 da **Brad T. Cookson**, microbiologo dell'Istituto di microbiologia e medicina di laboratorio dell'Università di Washington.



Il "pyro" greco si riferisce al fuoco e "ptosi" significa cadere. Il significato apparente della parola combinata "**pirotosi**" è quindi "la caduta del fuoco", che qui si riferisce al processo di segnali chimici pro-infiammatori che esplodono da una cellula ospite.

La **pirotosi** ha una dinamica e meccanismo distinti rispetto ad altre forme di morte cellulare. Questa morte cellulare strategica, è considerata l'azimut della pressione evolutiva della infiammazione promuovendo una rapida eliminazione di varie infezioni batteriche e virali rimuovendo le nicchie di replicazione intracellulare e migliorando le risposte difensive dell'ospite.

La cinetica morfologica della pirosi porta alla formazione di pori nella membrana cellulare che consentono il rilascio di citochine infiammatorie e mediatori dell'infiammazione che derivano direttamente dalla scissione **dell' 'inflammasoma** e dall'attivazione della **gasdermin D (GSDMD)**.



Macrofago in pirosi con presenza di "fori" nella membrana. (archivio Tajana)

Tuttavia, nelle malattie croniche patogene, la risposta infiammatoria non sradica lo stimolo primario, come accadrebbe normalmente nella maggior parte dei casi di infezione o lesione, e quindi ne consegue una forma cronica di infiammazione che alla fine contribuisce al danno tissutale.

Sostanzialmente la **pirosi** agisce come un meccanismo di difesa contro l'infezione inducendo l'infiammazione patologica. La formazione di inflammasomi e l'attività della caspasi-1 determinano l'equilibrio tra risoluzione patogena e malattia.

Quando viene rilevato il segnale di "pericolo", le cellule quiescenti verranno attivate per sottoporsi a pirosi e produrre **citochine infiammatorie IL-16 e IL-18**.

In particolare **IL-18** stimolerà la produzione di **IFN $\gamma$**  e avvierà lo sviluppo di **risposte TH1**. (*Le risposte TH1 tendono a rilasciare citochine che dirigono un'immediata rimozione dell'agente patogeno*).

L'attivazione cellulare provoca un aumento sostanzioso dei livelli di citochine, che aumenterà le conseguenze dell'infiammazione e questo, a sua volta, contribuisce allo sviluppo della risposta adattativa con il progredire dell'infezione. La risoluzione definitiva eliminerà i patogeni in maniera radicale. Per i dettagli vedi allegato 1

Prove crescenti supportano un ruolo fondamentale per la **piroptosi** nel controllo delle infezioni , ma il modo in cui i patogeni sfuggono a questa risposta immunitaria rimane in gran parte inesplorato.

In particolare il ***Mycobacterium tuberculosis (Mtb)***, il patogeno che causa la tubercolosi (TB), ha sviluppato numerose strategie di sopravvivenza intracellulare per eludere l'immunità dell'ospite e per guidare l'insorgenza e lo sviluppo della tubercolosi.

Una caratteristica notevole ricavata da ***Mtb*** è un insieme di effettori simili a eucarioti, ma i loro bersagli ospiti e ruoli regolatori nelle interazioni patogeno-ospite rimangono in gran parte poco chiari.

In questo studio, abbiamo cercato di **identificare i principali regolatori patogeni delle vie infiammatorie-piroptosi da effettori simili a eucariotici *Mtb***, informazioni che potrebbero migliorare la nostra comprensione della patogenesi della tubercolosi e fornire potenziali bersagli per un nuovo trattamento anti-TB.

Il team del *CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology di Beijing (China)* coordinato da **Chai Q**



ha scoperto che la una **fosfatasi proteica(*PtpB*)** secreta dal ***Mycobacterium tuberculosis*** , agendo come una **fosfatasi fosfolipidica** defosforila i **fosfoinositidi** della membrana plasmatica dopo l'attivazione da parte dell'ubiquitina inibendo così la **piroptosi**.

In altre parole la strategia dei patogeni consiste nel sopprimere la **piroptosi** alterando la composizione della membrana dell'ospite, tuttavia in questo modo forniscono un potenziale trattamento della tubercolosi prendendo scoprendo una potenziale interfaccia PTB-ubiquitina Dsu cui possiamo farmacologicamente agire

**Chai Q et al A bacterial phospholipid phosphatase inhibits host pyroptosis by hijacking ubiquitin. Science. 2022 Oct 14;378(6616):eabq0132.**

Lo studio ha scandagliato l'intero genoma di *Mtb* per identificare le sue proteine secrete di *tipo eucariotico* che possiedono motivi o domini simili a quelli eucariotici che potrebbero colpire direttamente i fattori dell'ospite.

Queste proteine effettrici *Mtb* sono state quindi sottoposte ad ulteriori analisi sperimentali utilizzando un sistema di ricostituzione dell'inflammasoma per lo screening degli inibitori delle vie dell'inflammasoma-piroptosi.

Su 201 *proteine eucariotiche* secrete da *Mtb* previste, sei *proteine Mtb* (***Rv0153c***, ***Rv0561c***, ***Rv0824c***, ***Rv0861c***, ***Rv1515c*** e ***Rv1679***) hanno mostrato forti effetti inibitori sia sulla proteina 3 del recettore NOD-like (NLRP3) che assenti nel melanoma 2 (AIM2) vie infiammatorie.

Tra queste proteine, ***PtpB*** (cioè, ***Rv0153c***) è stata secreta più abbondantemente da *Mtb* durante l'infezione.

Il team si è concentrato su ***PtpB*** e abbiamo ulteriormente confermato il suo effetto inibitorio sulla secrezione di **interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )** mediata dall'inflammasoma AIM2 o NLRP3.

Esperimenti successivi hanno dimostrato che ***PtpB*** inibiva il rilascio di citochine dipendenti dalla ***gasdermina D (GSDMD)*** e la **piroptosi** per promuovere la sopravvivenza intracellulare di *Mtb* nei macrofagi.

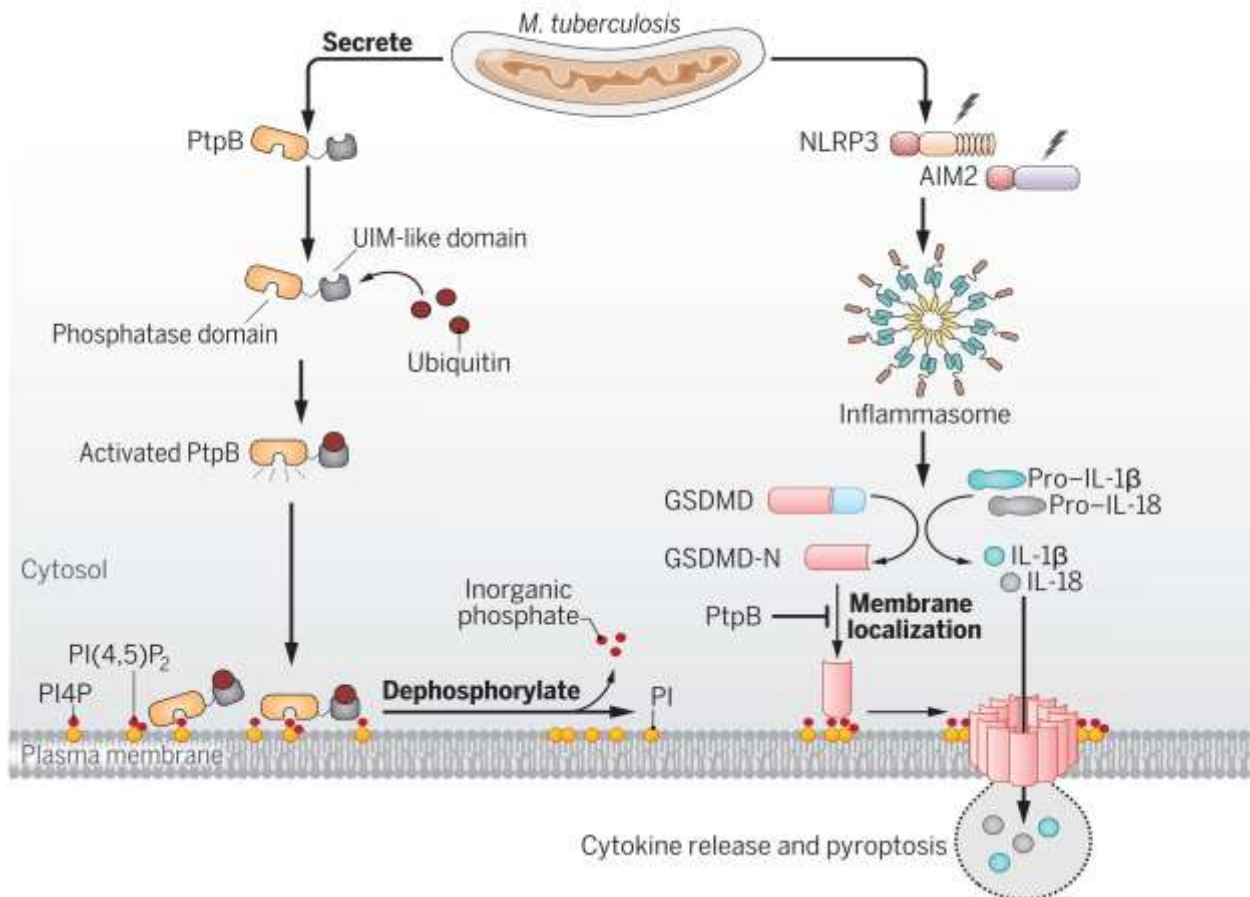
**In sintesi** il lavoro dimostra che la **piroptosi** mediata da ***GSDMD*** e il rilascio di ***citochine infiammatorie*** svolgono un ruolo fondamentale nell'immunità anti-infezione dell'ospite, che è contrastata dalla proteina effettrice ***Mtb PtpB***.

In particolare è evidente il ruolo della ***fosfatasi fosfolipidica*** derivata dal patogeno nella regolazione della **piroptosi *GSDMD*-dipendente** e dei rilasci di citochine, estendendo la nostra comprensione dell'elaborato meccanismo di regolazione delle vie di segnalazione dell'inflammasoma-piroptosi cellulare durante l'infezione da agenti patogeni.

In particolare svela la strategia mediante la quale **i patogeni dirottano l'ubiquitina per inibire la piroptosi dell'ospite alterando la composizione fosfolipidica della membrana ospite.** La scoperta di un dominio simile a UIM PtpB, che non è omologo a nessuna proteina umana, può fornire una potenziale selettività per lo sviluppo di terapie anti-TB.

*La tavola seguente sintetizza come M. tuberculosis PtpB dirotta l'ubiquitina dell'ospite per inibire la piroptosi alterando la composizione dei fosfolipidi della membrana dell'ospite.*

*La fosfatasi fosfolipidica PtpB secreta da M. tuberculosis viene attivata interagendo con l'ubiquitina dell'ospite attraverso un dominio simile a UIM, mediante il quale defosforila i fosfoinositidi della membrana plasmatica dell'ospite PI4P e PI(4,5)P 2 per inibire il targeting della membrana di GSDMD-N, interrompendo così il rilascio di citochine infiammatorie e la piroptosi all'attivazione dell'attivazione dell'inflammasoma innescata dall'infezione da M. tuberculosis nei macrofagi.*



## Allegato: L'inizio della pirotosi nei macrofagi

**L'inizio della pirotosi nei macrofagi** infetti è causato dal riconoscimento dei componenti flagellinici delle specie *Salmonella* e *Shigella* (e simili modelli molecolari associati ai patogeni (PAMP) in altri patogeni microbici) da parte di recettori simili a NOD (NLR). Questi recettori funzionano come recettori simili a pedaggi di membrana del plasma (TLR), ma riconoscono gli antigeni situati all'interno della cellula anziché all'esterno di essa.

Contrariamente all'apoptosi, la pirotosi richiede la funzione dell'enzima **caspari-1**.

La **caspari-1** viene attivata durante la pirotosi da un grande complesso supramolecolare chiamato **pirotosoma** (noto anche come inflammasoma). In ogni *macrofago* si forma un solo grande **pirotosoma**, a pochi minuti dall'infezione. L'analisi biochimica e spettroscopica di massa ha rivelato che questo **pirotosoma** è in gran parte composto da dimeri della proteina adattatrice ASC (proteina dello speck associata all'apoptosi contenente un dominio di attivazione e reclutamento CARD o Caspase).

A differenza dell'apoptosi, la morte cellulare per pirotosi provoca la rottura della membrana plasmatica e il rilascio di molecole di **pattern molecolari (DAMP)** associati al danno come oligomeri ATP, DNA e ASC (macchioline) nell'ambiente extracellulare, comprese le citochine che reclutano più cellule immunitarie e perpetuare ulteriormente la cascata infiammatoria nel tessuto.

Questi processi sono in netto contrasto con l'imballaggio dei contenuti cellulari e l'assorbimento fagocitico non infiammatorio di corpi apoptotici legati alla membrana che caratterizzano l'apoptosi.

Meccanismo molecolare e morfologia

L'infezione può avviare un sistema di "autodistruzione" e di allarme nella cellula ospite. Nella pirotosi sono presenti due tipi di recettori appartenenti a diverse famiglie di recettori per il riconoscimento di schemi (PRR) per rilevare segnali di "pericolo" intracellulari ed extracellulari.

Questi sono recettori **Nod-like (NLR)** e recettori **Toll-like (TLR)**.

I segnali di "pericolo" possono essere emessi da agenti patogeni invasivi o da una lesione a un tessuto, che possono essere tutti riconosciuti dai recettori delle cellule ospiti. Tale riconoscimento determinerà il destino della cellula ospite mediante un meccanismo distinto, ovvero indurrà la produzione di "citochine".

Le citochine comunemente trovate sono il fattore di necrosi tumorale (TNF), IL-6, IL-8, interferoni di tipo I (IFN) e fattore regolatorio dell'interferone (IRF). La risposta infiammatoria è indipendente dalla morte cellulare.

In termini di morte cellulare, sebbene la via di attivazione di caspasi-1 sia varia, la via di segnalazione a valle converge per provocare la morte cellulare pirototica. La lisi cellulare si verifica sulla **formazione di pori**, di un diametro stimato di 1,1-2,4 nm, nella membrana cellulare, che interrompe il gradiente ionico cellulare. Il conseguente aumento della pressione osmotica provoca un afflusso di acqua seguito da gonfiore e scoppio delle cellule. Allo stesso tempo, il contenuto citosolico viene rilasciato attraverso i canali dei pori. Il processo è molto simile a forature in un pallone d'acqua. Successivamente, le citochine pro-infiammatorie inattive vengono ulteriormente scisse dalla caspasi-1 e diventano attivate. Inoltre, si è scoperto che la scissione del DNA con integrità mantenuta e condensa nucleare è associata al processo.

I recettori a pedaggio (TLR) riconoscono i modelli molecolari associati ai patogeni (PAMP) che si trovano nella superficie cellulare o all'interno degli endosomi. Il riconoscimento risultante avvierà la via di segnalazione, inclusa l'attivazione dei fattori di trascrizione NF- $\kappa$ B e MAPK. Questo a sua volta sarà responsabile della produzione di citochine infiammatorie come IFN  $\alpha$  /  $\beta$ , TNF e IL-12. Inoltre, pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18 saranno rilasciati per essere elaborati dalla caspasi-1 mediata dalla cisteina.

I recettori simili a NOD (NLR) sono costituiti da più di 20 sottoinsiemi, inclusi NOD1 e NOD2, NLRP3 (noto anche come NALP3), NLRC4. Tutti riconoscono i prodotti estranei batterici, virali e tossici introdotti nel citosol delle cellule ospiti. Dopo il riconoscimento, NOD1 e NOD2 funzionano in modo simile ai TLR, producendo ed elaborando citochine infiammatorie. Alcuni di questi sottogruppi come NLRP3 potrebbero anche attivare la morte cellulare dipendente dalla caspasi-1, accompagnata da formazione di pori e ulteriormente stimolata dall'efflusso cellulare di potassio. NLRC4 è in grado di riconoscere in modo specifico la flagellina e quindi innescare la pirosi dipendente dalla caspasi-1. I NOD riconoscono i segnali di pericolo del modello molecolare e costruiscono l'inflammasoma.

### La formazione dell'inflammasoma

complesso multiproteico si ottiene attraverso il legame dei segnali di pericolo batterico, virale o ospite intracellulare al recettore NLR, il cui assemblaggio porta all'attivazione della caspasi-1 necessaria per l'elaborazione e la secrezione del pro- citochine infiammatorie. Il complesso di inflammasoma meglio caratterizzato, NLRP3, ha 3 domini distinti: diversi domini ripetuti ricchi di leucina (LRR), un dominio centrale nucleotidico e un dominio di oligomerizzazione (NBD) e un dominio N-terminale di pirina (PYD). L'interazione tra NLRP3 e caspasi-1 avviene tramite la proteina adattatore ASC. ASC contiene un dominio di attivazione e reclutamento caspasi (CARD) che lega e facilita l'attivazione di pro-caspasi-1 attraverso le interazioni CARD-CARD. In alcuni casi, NLRC4 può assumere direttamente caspasi-1 in quanto ha un dominio CARD.

### Caspasi-1

L'enzima cruciale richiesto nella stimolazione della via a valle è la caspasi-1, che si trova all'interno delle cellule. Caspasi-1 era noto come un enzima di conversione interleuchina-1 $\beta$ , poiché fu scoperto per la prima volta in associazione con la scissione di pro-IL-1 $\beta$ . Il pro-caspasi-1 con un dominio CARD 10-kDa sarà reclutato da vari inflammasome. Simile ad altre caspasi, caspasi-1 inizia come un precursore inattivo chiamato zimogeno. Gli enzimi caspasi-1 si attivano quando si oligomerizzano e formano tetrameri. Questo processo è spontaneo a causa del fatto che tutto nell'inflammasoma è molto vicino l'uno all'altro. L'enzima tagliato dalla cisteina non solo causerà la morte cellulare ma è anche responsabile della scissione delle citochine pro-infiammatorie IL-1 $\beta$  e IL-18. Le citochine, una volta elaborate, saranno nella loro forma biologicamente attiva pronte per essere rilasciate dalle cellule ospiti. Lo sviluppo di risposte immunitarie adattive efficienti dipende dal reclutamento e dall'attivazione delle cellule immunitarie da parte delle citochine infiammatorie.

## **Un anno fa... Baedeker/Replay del 17 ottobre**

*Alcune considerazioni per i "SI-VAX" sulla opportunità della terza dose*

Al contrario delle tribù dei "NO-VAX", il popolo dei "SI-VAX" entusiasti per i vaccini al punto da pretendere una terza dose senza tuttavia chiedersi a chi viene sottratta, dei costi, ed in particolare della reale necessità. Questo mi impone alcune riflessioni che vorrei condividere con chi legge, in particolare se è un "SI-VAX" convinto. Cosa sappiamo sulla terza dose o più generalmente sui cosiddetti "richiami"? Sono sicuri ed efficaci? Chi sono le persone che potrebbero averne veramente bisogno? E giusto programmare una "campagna di richiami" in questa fase della pandemia? In sintesi, caro "SI-VAX", sei sicuro di avere veramente bisogno di una terza dose di un vaccino se hai già ricevuto le tue prime due dosi? Io penso che ci sono tre ragioni per cui potresti avere necessità di una terza dose. La prima è se non hai risposto e se fai parte di una categoria di persone che non hanno reagito adeguatamente alle prime due dosi che hai ricevuto.

Molti dati ci dicono che per le persone immuno compromesse, potrebbe essere necessario ricevere una terza dose perché le prime due non stanno facendo quello che fanno normalmente in persone altrimenti normali e sane. Purtroppo non abbiamo parametri oggettivi per definire se hai questa necessità. Il secondo motivo per cui dovresti accedere ad una terza dose è se nel tempo l'immunità che hai ricevuto e ottenuto a seguito della vaccinazione è iniziata a diminuire, a deteriorarsi o a scomparire nel tempo. Anche per questa situazione, per te probabilmente asintomatica, non esistono evidenze robuste.

Al contrario, i dati in questo momento riportano che i vaccini "reggono" molto bene e ti proteggono da un Covid grave, da una possibile ospedalizzazione e persino morte. Quindi non vedo condizioni evidenti che portino alla necessità di somministrare una terza dose per le persone che sono già state rivaccinate. La terza ragione per cui potremmo voler somministrarti una terza dose è se le prestazioni dei vaccini si stanno dimostrando inferiori o inadeguate rispetto ad alcune delle "varianti di preoccupazione emerse". Tuttavia anche per questo scenario i dati sono pochi e incerti. Al contrario, i vaccini che abbiamo in questo momento contro le varianti e che stiamo osservando con molta attenzione, stanno reggendo molto bene contro l'estremità grave dello spettro della malattia. In generale, i vaccini nonostante alcuni impercettibili segnali di cedimento stanno funzionando. Purtroppo in questo momento, abbiamo dati che ci dicono che c'è una piccola percentuale di persone, quelle che hanno gravi condizioni di immuno compromissione e che non sembrano rispondere alle prime due dosi è che oggettivamente hanno bisogno di una terza dose, che per loro è equiparabile ad una risposta primaria. È perché non hanno risposto adeguatamente alle prime due dosi. Ma a parte la protezione teorica che una dose di richiamo potrebbe offrire alle persone, ci sono alcune altre considerazioni che dobbiamo sapere. La "domanda delle domande" è se dare una terza dose aumenta effettivamente la risposta immunitaria? Questo dato lo avremo solo alla fine della somministrazione della terza dose.

Tuttavia l'esperienza di Israele che ha cominciato a somministrare la terza dose a luglio (vedi Baedeker) non predispone ad entusiasmi immunitari. Personalmente non sono a conoscenza di prove conclusive che ci dicono che sia necessaria e indispensabile una dose di richiamo tra la maggior parte delle persone che sono già state vaccinate. Un aspetto di cui si parla poco o per niente è la sicurezza. La somministrazione di una terza dose andrebbe gestita e monitorata attraverso un database specifico. Caro "SI-VAX" in questo momento, siamo in una situazione in cui, come ho detto, le prove mostrano che i vaccini che le persone hanno ricevuto resistono molto bene per proteggerti da malattie gravi, dal ricovero in ospedale e dalla morte.

E questo è davvero l'intento primario dei vaccini. Quello che vediamo anche è che siamo in una posizione davvero "iniqua" in questo momento su chi ha già ricevuto la prima e la seconda dose per fornire protezione contro gli esiti gravi nei paesi a basso reddito e nei paesi a reddito medio basso che sono solo a circa un percento, due percento, cinque percento della popolazione che ha già ricevuto il vaccino. E questo è quanto avviene a molti vaccini che sono stati distribuiti nei paesi ad alto reddito e nei paesi a reddito medio-alto. Quindi l'obiettivo primario dovrebbe essere quello di proteggere quelle persone che non sono ancora affatto protette dai vaccini.

Molto probabilmente la terza dose ridurrà la trasmissione, ridurrà la probabilità che emergano più varianti e ci darà il tempo di vedere più prove sulla necessità o meno di dosi di richiamo. Nessuno di noi è al sicuro finché non abbiamo tutti l'opportunità di essere vaccinati, di essere protetti dal virus mentre la copertura vaccinale aumenta. E ciò che realmente significa è portare le dosi ora a quelle parti del mondo che non hanno avuto un'offerta adeguata finora. Mentre lo facciamo, è davvero importante continuare con le altre misure che riducono la trasmissione del virus. Ciò include indossare la maschera, lavarsi le mani, non riunirsi in grandi folle quando si è in casa, trovarsi in spazi ben ventilati. Queste sono le cose che, insieme ai vaccini, è importante assolutamente fare.