

6. Aprile

Siringhe biologiche

*Il Maestro apre la porta,
ma tu devi entrare da solo*
Provebio cinese

Premessa:

Per i batteri endosimbiotici, è spesso vantaggioso secernere fattori che modulano la biologia dell'ospite a favore dell'idoneità simbiote. Tuttavia, molti di questi fattori non possono facilmente passare attraverso le membrane cellulari; ciò ha portato allo sviluppo di sistemi complessi che trasportano attivamente le proteine del carico utile nelle cellule.

Un esempio sono i sistemi di **iniezione contrattile (CIS)** una classe di nanomacchine siringhe simili a code di batteriofagi.

Brackmann M et al. Using Force to Punch Holes: Mechanics of Contractile Nanomachines. Trends Cell Biol. 2017 Sep;27(9):623-632.

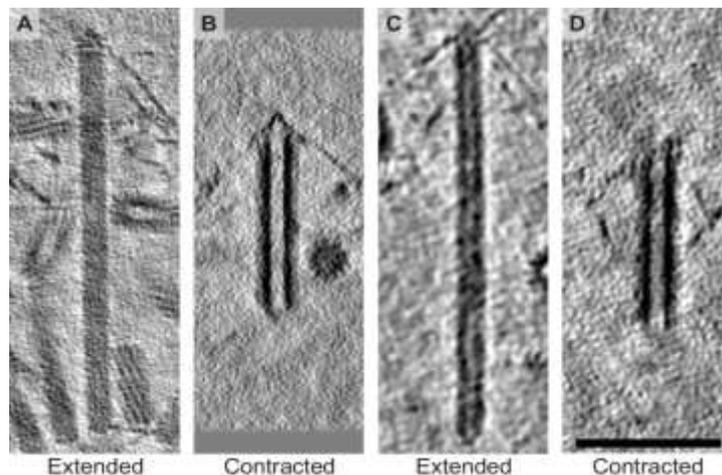
I **CIS** sono complessi macromolecolari contenenti una struttura tubolare rigida alloggiata in una guaina contrattile, che è ancorata a una piastra di base e affilata da una proteina spike

Jiang F et al. Structure and Assembly of an Extracellular Contractile Injection System. Cell. 2019 Apr 4;177(2):370-383.e15.

Si pensa che i carichi utili si carichino nel lume della camera d'aria dietro la punta, formino proteine di fusione con la punta o si associno alla punta stessa, che, dopo il riconoscimento della cellula bersaglio, viene forzata attraverso la membrana tramite la contrazione della guaina

Ma J et al. The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. Virulence. 2017 Oct 3;8(7):1189-1202.

Mechanics of Contractile Nanomachines



Questa strategia si è rivelata un notevole successo in tutta la biosfera, poiché è stato dimostrato che i **CIS** prendono di mira gli organismi di tutti e tre i domini della vita

Ge P et al. Action of a minimal contractile bactericidal nanomachine. Nature. 2020 Apr;580(7805):658-662.

I **CIS** possono essere ancorati alla membrana batterica, risultando in un sistema di rilascio dipendente dal contatto noto come sistema di secrezione di tipo VI (*T6SS*), oppure possono essere attaccati alla membrana tilacoide nei *cianobatteri* (*tCIS*) per essere attivati durante un *ciclo cellulare risposta allo stress*; infine, possono essere prodotti come complessi liberi (*eCIS*) e rilasciati a livello extracellulare per fornire carichi utili indipendenti dal produttore batterico
Chen L et al. Genome-wide Identification and Characterization of a Superfamily of Bacterial Extracellular Contractile Injection Systems. Cell Rep. 2019 Oct 8;29(2):511-521.e2.

Gli **eCIS** sono ampiamente distribuiti in batteri e archaea e hanno dimostrato di raggrupparsi in almeno sei sottofamiglie, di cui solo due contengono esempi caratterizzati .

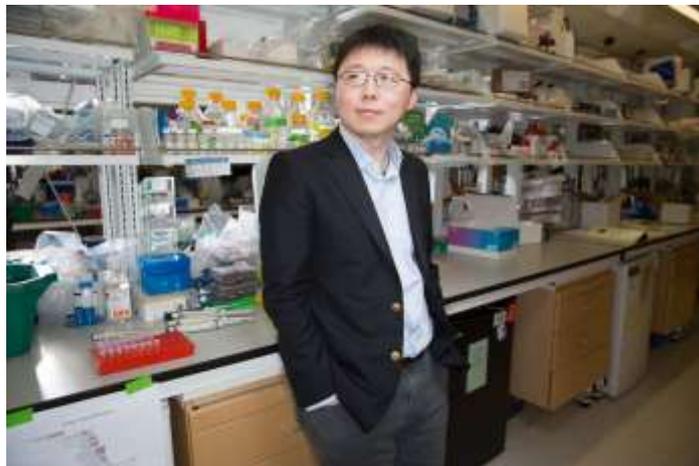
È stato dimostrato che i *payload eCIS* esibiscono una varietà di funzioni naturali, tra cui la modulazione del citoscheletro dell'ospite la scissione del DNA l'induzione della metamorfosi e la tossicità dell'ospite indicando che questi sistemi sono stati adattati per molteplici nicchie biologiche.

Geller AM et al. The extracellular contractile injection system is enriched in environmental microbes and associates with numerous toxins. Nat Commun. 2021 Jun 18;12(1):3743.

Recentemente, è stato scoperto che gli **eCIS** colpiscono le cellule di topo , aumentando la possibilità che questi sistemi possano essere sfruttati come strumenti di consegna delle proteine.
Jiang F et al. N-terminal signal peptides facilitate the engineering of PVC complex as a potent protein delivery system. Sci Adv. 2022 Apr 29;8(17):eabm2343.

Tuttavia, l'attività **eCIS** deve ancora essere dimostrata nelle cellule umane e il meccanismo mediante il quale gli **eCIS** riconoscono le cellule bersaglio, una necessità se questi sistemi devono essere sviluppati in dispositivi di consegna mirati, resta da chiarire.

Il team guidato da **Feng Zhang** del *Broad Institute di Cambridge (Massachusetts, USA)*



ha modificato una *nanosiringa batterica* in modo tale da indirizzare le sostanze attive a specifici tipi di cellule. Il gruppo scrive che questo potrebbe rendere possibili diverse terapie, con riferimento in particolare alle cure contro il cancro e alle terapie geniche.

Nella prova del concetto, il team di Zhang ha studiato il sistema di iniezione del batterio *Photobacterium asymbiotica*, che originariamente prende di mira le cellule degli insetti. La siringa molecolare, chiamata ***Photobacterium virulence cassette (PVC)***, è costituita da un tubo lungo circa 100 nanometri (milionesimi di millimetro). Alla sua estremità, una cosiddetta fibra di coda si lega a speciali recettori sulle cellule bersaglio in modo che il carico proteico possa essere guidato attraverso la membrana cellulare in queste cellule.

Photobacterium virulence cassette (PVC)



In test secondari sistematici, il team di Zhang ha modificato i dispositivi di iniezione in due modi principali: da un lato, sono stati in grado di iniettare inizialmente altre proteine che non provengono da *P. asymbiotica* nelle cellule degli insetti. In secondo luogo, ha riprogrammato le fibre della coda in modo tale che le *nanosiringhe* si attaccassero ad altre cellule, ad esempio quelle di topi o umani.



Ciò potrebbe potenzialmente rendere possibile in futuro in una fase finale, il team ha dimostrato l'uso della *nanosiringa* sugli organismi viventi. Iniettandoli nel cervello dei topi, hanno contrabbandato proteine nelle cellule nervose nell'area cerebrale dell'ippocampo. I ricercatori non hanno osservato né effetti dannosi per le cellule né una forte attivazione del sistema immunitario.

Inoltre, l'apparato di iniezione non era più rilevabile dopo una settimana. Questo suggerisce che il sistema è ideale per terapie destinate ad essere transitorie a breve termine o la modifica terapeutica del DNA nelle cellule nei bersagli desiderati.

Tuttavia, gli esperti indicano alcuni ostacoli: il carico proteico nel sistema è limitato. Inoltre, è importante che questa carica venga portata solo nelle destinazioni desiderate e non raggiunga altre celle.

La capacità di introdurre proteine specifiche in tipi cellulari specifici offrirebbe un enorme potenziale sia per la ricerca nelle scienze della vita che per il trattamento delle malattie e rappresentano un'entusiasmante cassetta degli attrezzi biotecnologica con applicazioni in diversi sistemi biologici.

Kreitz J et al. Programmable protein delivery with a bacterial contractile injection system. Nature. 2023 Mar 29.

Il leader dello studio Feng Zhang è una figura di spicco nelle scienze della vita. Per lo sviluppo delle forbici del gene Crispr-Cas9, ha combattuto un'aspra disputa sui brevetti con le due ricercatrici Emmanuelle Charpentier, ora direttrice fondatrice del Max Planck Research Center for the Science of Pathogens, e Jennifer Doudna dell'Università della California a Berkeley. Hanno presentato il loro lavoro sul metodo in rapida successione nel 2012 sulla rivista Science. Charpentier e Doudna hanno ricevuto il premio Nobel per la medicina nel 2020, Zhang è andato via a mani vuote.

Un anno fa... Baedeker/Replay del 6 aprile 2022

Potenziale impatto transgenerazionale delle infezioni virali in gravidanza:

Parte Seconda

Trasmissione transplacentare di SARS-CoV-2 e infezione fetale diretta

La trasmissione transplacentare di virus in grado di infettare il tessuto neurale può avere conseguenze durature e devastanti sullo sviluppo del cervello fetale. Un fattore chiave nella comprensione del potenziale rischio di infezione fetale è se SARS-CoV-2 acquisito dalla madre può trasmettere attraverso la placenta, la barriera fisiologica e immunologica primaria che impedisce la trasmissione virale dalla circolazione materna a quella fetale. La preponderanza delle prove fino ad oggi suggerisce che gli effetti negativi sullo sviluppo neurologico dell'infezione da SARS-CoV-2, almeno con il ceppo ancestrale e i ceppi che precedono la variante Delta, hanno maggiori probabilità di verificarsi tramite l'attivazione immunitaria materna e placentare e l'impatto a valle sul cervello fetale in via di sviluppo, piuttosto che tramite l'infezione fetale diretta con SARS-CoV-2 in utero (Shah PS 2020). I dati a livello di popolazione suggeriscono che i tassi di positività a SARS-CoV-2 tra i neonati nelle gravidanze esposte a SARS-CoV-2 vanno dall'1% al 3% con l'infezione placentare un evento relativamente raro.

Una meta-analisi della Sections of Reproductive Endocrinology and Infertility, Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences di Yale, ha stimato il tasso di infezione placentare al 7% (Kotlyar AM 2020) sebbene studi prospettici abbiano identificato tassi ancora più bassi di infezione placentare. I meccanismi protettivi contro l'infezione placentare includono bassi tassi di viremia SARS-CoV-2 materna, difese immunitarie conservate al confine del sinciziotrofoblasto e la mancanza di un'espressione coordinata delle molecole richieste per l'attaccamento e l'ingresso di SARS-CoV-2 (ACE2 e TMPRSS2) nel sinciziotrofoblasto. Le prove a supporto dell'infezione fetale., Daniel Schwartz e David Levitan del rispettivamente del Department of Pathology, Medical College of Georgia, del 2th Department of

Pathology, SUNY Downstate Medical Center di, New York (Levitan). ovvero particelle virali documentate nello spazio amniotico sterile o nel tessuto fetale, sono state limitate ai casi clinici (Schwartz DA 2021) Coerentemente con il basso tasso osservato di infezione placentare e trasmissione verticale, i dati sono ora disponibili da gravidanze completate esposte a SARS-CoV-2 durante tutte le finestre di sviluppo (dal primo al terzo trimestre). Ad oggi, nessuna sindrome congenita caratteristica è emersa dopo l'esposizione prenatale a SARS-CoV-2 che suggerirebbe un'infezione fetale diretta. Allo stesso modo, gli studi di neuroimaging prenatale del Department of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Sciences, Health Science Center di Houston in coorti in gravidanza non sono riusciti a identificare prove di patologia intracranica fetale grossolanamente visibile associata all'infezione materna da SARS-CoV-2, sebbene il piccolo numero di donne incluse con malattia grave o critica rispetto a malattia lieve possa limitare la generalizzabilità di questi risultati. (Soto-Torres 2021) Tutti questi dati indicano l'attivazione immunitaria materna e placentare e la conseguente attivazione neuroimmune fetale come fattori primari della morbilità dello sviluppo neurologico nella prole esposta a SARS-CoV-2, piuttosto che l'infezione cerebrale placentare e fetale diretta come è stato osservato con il virus Zika o l'infezione da citomegalovirus materno

Potenziale vulnerabilità del cervello fetale all'infezione da SARS-CoV-2

Nonostante i suddetti dati osservazionali contro l'infezione fetale diretta come un importante meccanismo di rischio per lo sviluppo del cervello fetale, modelli animali e cellulari hanno dimostrato il potenziale per SARS-CoV-2 di infettare direttamente il tessuto cerebrale fetale, se la barriera placentare viene violata. Un'analisi completa dei dati di sequenziamento del cervello fetale da set di dati pubblicamente disponibili ha identificato una bassa espressione degli interattori della proteina spike (S) canonica ACE2 e TMPRSS2, ma un'elevata espressione di nuovi interattori della proteina S durante la gestazione, con la massima espressione che si verifica nel secondo e terzo trimestre, indicativo di una maggiore vulnerabilità durante questa finestra di gestazione (Varma P 2021) Prove limitate da modelli umani e animali adulti suggeriscono che il virus SARS-CoV-2 può bypassare o distruggere la barriera emato-encefalica e ottenere l'accesso al tessuto neurologico. I modelli che utilizzano organoidi cerebrali con firme proteomiche simili al tessuto cerebrale fetale hanno fornito prove della capacità di neuroinvasione e neurotropismo SARS-CoV-2 per il plesso coroideo, i neuroni corticali e le cellule gliali. Presi insieme, questi dati sollevano la possibilità che il neurosviluppo a livello cellulare possa essere direttamente influenzato dall'infezione prenatale con SARS-CoV-2, se le particelle virali accedono alla circolazione fetale. Varianti di SARS-CoV-2 preoccupanti e potenziale rischio fetale. Un avvertimento chiave nell'interpretazione dei dati disponibili è che le osservazioni riflettono principalmente gli effetti dei ceppi virali ancestrali, mentre meno si sa sugli effetti placentari e fetali di recenti varianti di interesse, in particolare le varianti Delta e Omicron. È plausibile che le mutazioni associate a una maggiore fuga o trasmissibilità immunitaria possano avere un impatto sul rischio di infezione transplacentare. Sfortunatamente, il rilevamento di qualcosa di diverso da un aumento grande o improvviso della trasmissione verticale richiederà l'accumulo di dati nel tempo.

Esposizione alla variante prenatale SARS-CoV-2 e impatto placentare

Prove recenti che mostrano un rischio quasi raddoppiato di natimortalità associato all'infezione materna da SARS-CoV-2, con una maggiore entità dell'associazione durante il periodo predominante del Delta della pandemia di COVID-19 ha sollevato preoccupazioni sul fatto che il SARS-CoV-2 virus stesso potrebbe essere direttamente responsabile di esiti avversi della gravidanza. Di fondamentale importanza è se l'infezione da SARS-CoV-2 della variante Delta possa influenzare in modo differenziale (i) la funzione placentare o (ii) l'integrità della barriera placentare all'infezione e quindi la suscettibilità alla trasmissione verticale e/o effetti più diretti sullo sviluppo del cervello fetale. Come notato in precedenza, l'emergere di nuovi ceppi complica le generalizzazioni sui meccanismi di rischio SARS-CoV-2. Le infezioni della variante delta sono state collegate da Amanda Wang Division of Maternal-Fetal Medicine, the University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas. a cariche virali più elevate e ad un aumentato rischio di ospedalizzazioni in soggetti non gravidi rispetto alle varianti precedenti, nonché a una maggiore gravità della malattia materna in gravidanza (Wang AM, 2021) La mutazione delta spike P681R può anche influenzare la virulenza e il tropismo tissutale aumentando la scissione della proteina S da parte della furina, una proteasi della serina transmembrana ampiamente espressa sia dal sinciziotrofoblasto placentare e tessuto cerebrale fetale. Sebbene una caratteristica firma istopatologica associata all'infezione materna da

SARS-CoV-2 non sia stata chiaramente identificata con il ceppo ancestrale placentite SARS-CoV-2 - la triade di intervillosite istiocitica, fibrina perivillosa e villosi necrosi trofoblastica nel contesto dell'infezione da SARS-CoV-2 - è emersa come un'entità istopatologica osservata in associazione con infezioni materne SARS-CoV-2 della variante Alpha e Delta ed è stata collegata a scarsi risultati della gravidanza, incluso il parto morto nel caso rapporti in un mega studio che coinvolto 47 claboratori. Sebbene ad oggi manchino prove definitive che colleghino la placentite SARS-CoV-2 variante Delta all'aumento del rischio di infezione fetale, queste osservazioni suggeriscono la possibilità biologica che la SARS-CoV-2 variante Delta prenatale possa portare a disfunzione placentare globale e violazione di la barriera immunitaria placentare.

Parto pretermine associato a SARS-CoV-2 e rischio di sviluppo neurologico

L'esposizione prenatale a SARS-CoV-2 può anche avere un impatto sullo sviluppo neurologico della prole, contribuendo direttamente agli esiti avversi della gravidanza. Infatti, l'infezione da SARS-CoV-2 acquisita durante la gravidanza è associata ad un aumentato rischio di preeclampsia e parto pretermine esiti che sono stati indipendentemente associati al rischio di sviluppo neurologico della prole (Pierra V 2017). L'associazione tra SARS-CoV-2 e parto pretermine complica gli studi sul neurosviluppo, perché influisce sulla capacità di comprendere la specificità del rischio associato al virus. Se il meccanismo d'azione di SARS-CoV-2 è semplicemente quello di causare una malattia materna che, nei casi più gravi, contribuisce al parto pretermine, la prole a termine non dovrebbe sperimentare tassi elevati di sequele dello sviluppo neurologico e gli sforzi per indagare sugli effetti virali specifici è improbabile che siano necessari. Al contrario, se questo non è il caso, è di fondamentale importanza comprendere l'effetto additivo o moltiplicativo del virus stesso quando si verifica un parto pretermine nel contesto o in seguito all'infezione materna da SARS-CoV-2. Ad oggi, solo uno studio. (Edlow A.G., et al. Neurodevelopmental outcomes at one year in offspring of mothers who test positive for SARS-CoV-2 during pregnancy. medRxiv. 2021 doi: 10.1101/2021.12.15.21267849. Published online December 16, 2021.) ha affrontato questa domanda e ha scoperto che l'infezione materna era ancora associata a un rischio maggiore di esiti avversi dello sviluppo neurologico a 12 mesi dopo l'aggiustamento per il parto pretermine. Per quanto riguarda l'analisi dei parti a termine, l'entità del rischio era diminuita con un intervallo di confidenza al 95% che non includeva alcun effetto, ma il rischio in termini numerici rimaneva "significativo". Sebbene si tratta di dati preliminari, tuttavia ciò evidenzia l'importanza di studi di follow-up ben controllati che valutino l'impatto dell'età gestazionale al momento del parto.

Il ruolo dei modelli cellulari nella comprensione dei meccanismi di rischio per il cervello fetale

Ad oggi, gli sforzi per comprendere la MIA si sono in gran parte concentrati su studi epidemiologici umani su larga scala o su materiali biologici umani, che possono indicare rischi ma sono il più delle volte confondenti, e modelli animali di malattia, che consentono un controllo sperimentale più completo ma potrebbero non riprodurre le diverse fasi dello sviluppo cerebrale. I modelli cellulari possono collegare queste due forme investigative, in particolare a modelli che fanno uso di cellule umane primarie che possono conservare gli effetti epigenomici dell'ambiente e dell'infezione. Ad esempio, cellule simili a microglia derivate dal paziente differenziate a partire dai precursori dei monociti del sangue periferico hanno dimostrato una fagocitosi anomala dei residui sinaptici, fornendo un potenziale meccanismo di malattia per la schizofrenia o disturbi correlati. Più recentemente, questi protocolli sono stati adattati per generare cellule simili a microglia dal sangue del cordone ombelicale fornendo un sistema sperimentale più diretto per caratterizzare l'impatto delle esposizioni in utero. Un'altra strategia emergente utilizza le cellule di Hofbauer, che possono essere isolate dalla placenta dopo il parto e coltivate. Un vantaggio di queste cellule è che, come la microglia, sono derivate dal sacco vitellino e quindi possono imitare da vicino le esposizioni e i processi di sviluppo della microglia cerebrale.

Osservazioni conclusive

I dati disponibili dimostrano che l'infezione materna da SARS-CoV-2 può guidare l'attivazione immunitaria materna, placentare e fetale e quindi interferire con il neurosviluppo fetale. Gli studi futuri dovranno valutare se le risposte immunitarie fetoplacentari osservate nell'infezione materna da SARS-CoV-2 sono associate a una morbilità neuropsichiatrica a lungo termine nella prole. Sebbene la maggior parte dei dati disponibili riguardi le infezioni del terzo trimestre o l'infezione attiva al momento del parto, le implicazioni dell'infezione all'inizio della gestazione sugli esiti della prole saranno fondamentali per una comprensione olistica del rischio. Un'osservazione importante è che l'attivazione immunitaria non deve necessariamente avere un impatto solo sulle cellule completamente differenziate, anzi, potrebbe influenzare anche le cellule

della linea germinale migrate dal sacco vitellino. Pertanto, è fondamentale comprendere non solo gli effetti diretti/immediati sulle cellule, ma anche gli effetti persistenti, come presunti mediatori delle conseguenze dello sviluppo neurologico. Come i tempi dell'infezione, ceppo variante, sesso fetale, altre esposizioni prenatali (p. es., condizioni cardiometaboliche materne, uso di sostanze, stress, esposizioni ambientali o a farmaci, altre infezioni in gravidanza) ed esposizioni perinatali/postnatali (p. es., neonato o bambino successivo infezione da SARS-CoV-2, stato di allattamento al seno) si intersecano per avere un impatto sullo sviluppo neurologico della prole. Considerazioni Sebbene l'infezione placentare e la trasmissione verticale dopo l'infezione materna da SARS-CoV-2 siano entità rare fino ad oggi, gli studi preliminari suggeriscono che l'esposizione prenatale all'infezione da SARS-CoV-2 è associata a esiti avversi dello sviluppo neurologico nei bambini da 3 mesi a 1,5 anni di età. La valutazione degli esiti dello sviluppo neurologico nei bambini esposti all'infezione materna da SARS-CoV-2 in fase prenatale a 2 anni di età e oltre sarà fondamentale per acquisire una piena comprensione del rischio di sviluppo neurologico della prole. L'impatto di fattori di rischio materno additivi o sinergici come l'obesità materna, il diabete o l'ipertensione, il disturbo arrecato dall'uso di sostanze materna o altre infezioni batteriche o virali materne in gravidanza sugli esiti dello sviluppo neurologico della prole costituirà un'area importante per lo studio futuro.

Domande che attendono una risposta

Quali saranno gli esiti dello sviluppo neurologico nei bambini esposti all'infezione prenatale da SARS-CoV-2 all'età di 2 anni e oltre? Il trimestre di infezione materna ha un impatto sugli esiti dello sviluppo neurologico della prole? L'infezione prenatale da SARS-CoV-2, che si traduce in un'infezione placentare e/o nella trasmissione verticale, ha un impatto differenziale (p. es., più grave) sugli esiti dello sviluppo neurologico della prole? In che modo il ceppo variante e la gravità della malattia materna influiscono sul rischio di sviluppo neurologico della prole? Qual è l'impatto del sesso fetale sul rischio di sviluppo neurologico della prole? In che modo altre esposizioni prenatali e perinatali e l'ambiente postnatale interagiscono con l'infezione prenatale da SARS-CoV-2 per influire sul rischio di sviluppo neurologico della prole? Come si possono sfruttare i modelli cellulari per comprendere il rischio di sviluppo neurologico a livello individuale e guidare interventi di precisione e/o terapeutici?

Un anno fa... Baedeker/Replay del 6 aprile 2021

La definizione di un titolo protettivo anticorpale per un vaccino anti Sars-cov2