

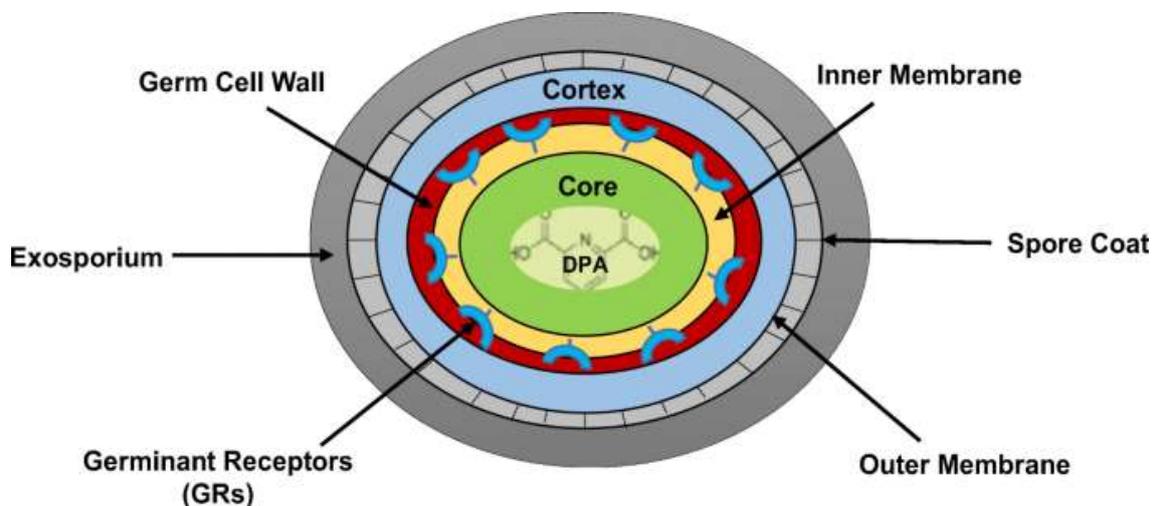
5. Maggio

## Come i batteri dormienti tornano in vita

*L'intero piano per il futuro ha la sua chiave nella risurrezione.*

Billy Graham

Le spore di varie specie di *Bacillus e Clostridium* sono tra le forme di vita più resistenti conosciute. Poiché le spore di alcune specie sono agenti causali di, intossicazione alimentare e malattie umane, ( le spore di *Bacillus anthracis* sono anche un'importante arma biologica) c'è molto interesse nei meccanismi di resistenza delle spore e su come queste spore possono essere neutralizzate



Un problema rilevante è dato dai fattori coinvolti e responsabili della **resistenza delle spore** ad agenti come calore umido e secco, essiccazione, radiazioni UV e  $\gamma$ , enzimi che idrolizzano le pareti cellulari batteriche e una varietà di sostanze chimiche tossiche, inclusi agenti genotossici, agenti ossidanti, aldeidi, acido e alcali.

Questi **fattori di resistenza** includono:

-**gli strati esterni della spora**, come lo spesso rivestimento proteico che disattiva e sostanze chimiche reattive;

-**la membrana interna delle spore** relativamente impermeabile che limita l'accesso di sostanze chimiche tossiche al nucleo delle spore contenente il DNA delle spore e la maggior parte degli enzimi;

-**il basso contenuto di acqua e l'alto livello di acido dipicolinico**

nel nucleo delle spore che proteggono le macromolecole del nucleo dagli effetti del calore e dell'essiccazione; -

-**la saturazione del DNA delle spore** con un nuovo gruppo di proteine che proteggono il DNA dal calore, dai prodotti chimici genotossici e dalle radiazioni;

-**la riparazione dei danni da radiazioni al DNA**

quando le spore germinano e tornano in vita.

La **memoria cellulare** è definita come una **risposta sostenuta a uno stimolo ambientale transitorio**,

Le spore batteriche, nonostante siano metabolicamente dormienti, possiedono la notevole capacità di rilevare nutrienti e altre molecole nel loro ambiente attraverso un *apparato sensoriale* che può innescare la germinazione, consentendo il ritorno alla crescita vegetativa entro pochi minuti dall'esposizione dei germinanti.

I ricercatori del **Dipartimento di Fisica, East Carolina University, Greenville, North Carolina, USA**. Hanno dimostrato che le spore batteriche di più specie *conservano la memoria* di esposizioni transitorie a stimoli germinativi che possono provocare risposte alterate alla successiva esposizione. L'entità e il decadimento di questi effetti di memoria dipendono dalla durata dell'impulso, nonché dal tempo di separazione, dalla temperatura di incubazione e dai valori di pH tra gli impulsi.

Wang S et al *Memory of Germinant Stimuli in Bacterial Spores*. *mBio*. 2015 Nov 24;6(6):e01859-15.

I ricercatori della **Harvard Medical School** hanno scoperto una nuova classe di **sensori cellulari** che consente alle spore di rilevare la presenza di sostanze nutritive nel loro ambiente e tornare rapidamente alla vita.

Si scopre che questi sensori *fungono anche da canali* di membrana e rimangono chiusi durante la dormienza ma si aprono rapidamente quando rilevano i nutrienti.

Una volta aperti, i canali consentono agli *ioni caricati elettricamente* di fluire attraverso la membrana cellulare, innescando lo spargimento degli strati protettivi e l'attivazione di processi metabolici dopo anni ( o addirittura secoli) di dormienza.

La scoperta di questi sensori pubblicata il *28 aprile su Science*, potrebbe aiutare a progettare modi per impedire che pericolose spore batteriche rimangano dormienti per mesi, persino anni, prima di svegliarsi di nuovo e causare epidemie. *Questa scoperta risolve un enigma che ha più di un secolo*", ha detto l'autore senior dello studio **David Rudner**, professore di microbiologia presso ***'Istituto Blavatnik dell'HMS***.



*“Per sopravvivere a condizioni ambientali avverse, alcuni batteri vanno in letargo e diventano spore, con processi biologici sospesi e strati di armatura protettiva attorno alla cellula. Queste mini fortezze biologicamente inerti consentono ai batteri di attendere i periodi di carestia e di proteggersi dalle devastazioni del caldo estremo, periodi di siccità, radiazioni UV, sostanze chimiche aggressive e antibiotici. Da più di un secolo, gli scienziati sanno che quando le spore rilevano i nutrienti nel loro ambiente, perdono rapidamente i loro strati protettivi e riaccendono i loro motori metabolici. Sebbene il sensore che consente loro di rilevare i nutrienti sia stato scoperto quasi 50 anni fa, i mezzi per fornire il segnale di risveglio e il modo in cui quel segnale innesca la*

*rinascita batterica è rimasto un mistero. Nella maggior parte dei casi, la segnalazione si basa sull'attività metabolica e spesso coinvolge i geni che codificano le proteine per produrre specifiche molecole di segnalazione. Tuttavia, questi processi sono tutti disattivati all'interno di un batterio dormiente, sollevando la questione di come il segnale induca i batteri dormienti a svegliarsi”*

Il team di **David Rudner** hanno scoperto che il sensore di nutrienti stesso si assembla in un condotto che apre la cella per il business. In risposta ai nutrienti, il condotto, un canale della membrana, si apre, consentendo agli ioni di fuoriuscire dall'interno delle spore. Ciò avvia una cascata di reazioni che consentono alla cellula dormiente di abbandonare la sua armatura protettiva e riprendere la crescita.

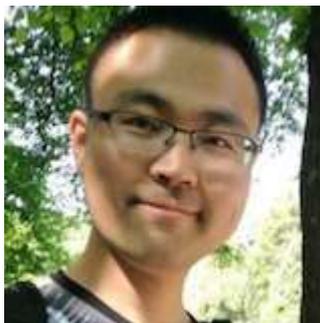
### **E' estremamente interessante ricostruire come si è arrivati a questa scoperta:**

Utilizzando strumenti di intelligenza artificiale per ricostruire la struttura del complesso di sensori ripiegato in modo intricato, una struttura composta da cinque copie della stessa proteina del sensore. Hanno applicato l'apprendimento automatico per identificare le interazioni tra le subunità che compongono il canale.

Sono state introdotte una serie di tecniche di modifica genetica innovative per produrre al computer sensori mutanti che agissero secondo modalità svolte nelle cellule viventi.

**Rudner** ha descritto il processo di scoperta in questo caso come una serie di osservazioni confuse che lentamente hanno preso forma, grazie a un team di ricercatori con diverse prospettive che hanno lavorato in perfetta sinergia nonostante durante la sperimentazione continuavano a fare osservazioni sorprendenti che li confondevano, suggerimenti che suggerivano risposte che non sembravano poter essere vere.

**Yongqiang Gao** un ricercatore HMS nel laboratorio Rudner,



stava conducendo una serie di esperimenti con il microbo *Bacillus subtilis*, che si trova comunemente nel suolo (un “cugino” del batterio che causa l'antrace).

**Gao** ha introdotto geni di altri batteri che formano spore in *B. subtilis* per verificare l'idea che le proteine non corrispondenti prodotte interferirebbero con la germinazione. Con sua grande sorpresa, **Gao** scoprì che in alcuni casi le spore batteriche si risvegliavano perfettamente con un insieme di proteine di un batterio lontanamente imparentato.

**Lior Artzi**, una borsista post-dottorato in laboratorio al momento di questa ricerca,



ha fornito una spiegazione per la scoperta di **Gao** dimostrando che il sensore fosse una specie di recettore che si comporta come un cancello chiuso finché non rileva un segnale, in questo caso un nutriente come uno zucchero o un amminoacido.

Una volta che il sensore si lega al nutriente, il cancello si apre, consentendo agli ioni di fuoriuscire dalla spora. In altre parole, le proteine di batteri lontanamente imparentati non avrebbero bisogno di interagire con proteine spore di *B. subtilis* non corrispondenti, ma semplicemente risponderebbero ai cambiamenti nello stato elettrico della spora quando gli ioni iniziano a fluire.

**Rudner** inizialmente manifestò scetticismo su questa ipotesi perché il recettore non si adattava al profilo. Non aveva quasi nessuna delle caratteristiche di un canale ionico. Ma **Artzi** obiettava sostava che il sensore poteva essere costituito da più copie della subunità che lavorano insieme in una struttura più complessa.

Un altro postdoc, **Jeremy Amon**,



uno dei primi utilizzatori di **Alpha Fold** uno strumento di intelligenza artificiale in grado di prevedere la struttura delle proteine e dei complessi proteici, stava anche studiando la germinazione delle spore e si dimostrò interessato e disponibile a studiare il sensore dei nutrienti.

**Alpha Fold** ha predetto che una particolare subunità del recettore si assembla in un anello di cinque unità noto come pentamero. La struttura prevista includeva un canale nel mezzo che poteva consentire agli ioni di passare attraverso la membrana della spora. La previsione dello strumento di intelligenza artificiale era proprio ciò che **Artzi** aveva sospettato.

Gao, Artzi e Amon si sono quindi concentrati per testare il modello generato dall'intelligenza artificiale.

Per questo hanno lavorato a stretto contatto con un terzo postdoc **Fernando Ramirez-Guadiana**

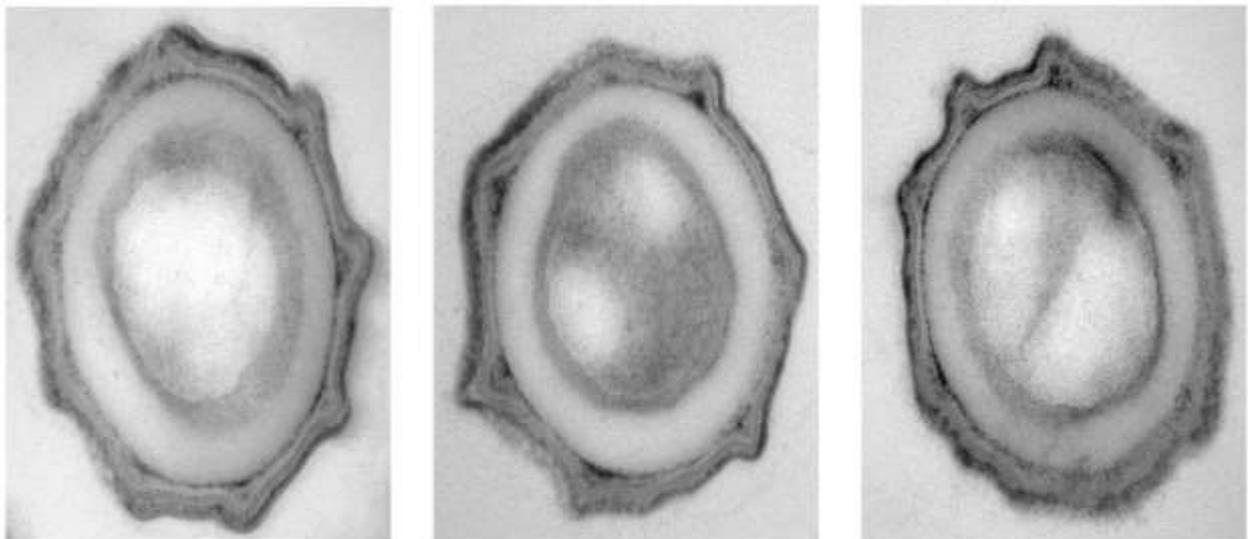


e i gruppi di **Andrei Kruse** professore di chimica biologica e farmacologia del HMS e la biologa computazionale **Debora Marks** professore associato di biologia dei sistemi sempre al HMS.

Pertanto hanno ingegnerizzato le spore con **subunità del recettore alterate** previste per allargare il canale della membrana e hanno scoperto che le spore si risvegliavano in assenza di segnali nutritivi. Contemporaneamente hanno generato subunità mutanti che, secondo loro, avrebbero ridotto l'apertura del canale.

Queste spore **non sono riuscite** ad aprire il cancello per rilasciare ioni e risvegliarsi dalla stasi in presenza di abbondanti nutrienti per convincerli a uscire dalla dormienza.

In altre parole, una leggera deviazione dalla configurazione prevista del complesso piegato potrebbe lasciare il cancello bloccato aperto o chiuso, rendendolo inutile come strumento per svegliare i batteri dormienti.



Da sinistra a destra: il risveglio di una spora dormiente

Capire come i batteri dormienti tornano in vita non è solo un enigma intellettualmente allettante, ma ha importanti implicazioni per la salute umana. Un certo numero di batteri che sono in grado di entrare in una profonda dormienza per lunghi periodi di tempo sono agenti patogeni pericolosi, persino mortali: la forma bianca polverosa dell'antrace armato composta da spore batteriche è una tragica e pericolosa evidenza

Un micidiale agente patogeno sporigeno è il *Clostridioides difficile*, che provoca diarrea e colite pericolose per la vita.



La malattia da *C. difficile* si verifica tipicamente dopo l'uso di antibiotici che uccidono molti batteri intestinali ma sono inutili contro le spore dormienti. Dopo il trattamento, *C. difficile* si risveglia dalla dormienza e può "fiorire", spesso con conseguenze catastrofiche.

L'eradicazione delle spore è anche una sfida centrale negli impianti di trasformazione alimentare perché i batteri dormienti possono resistere alla sterilizzazione grazie alla loro armatura protettiva e allo stato disidratato.

Se la sterilizzazione non ha successo, la germinazione e la crescita possono causare gravi malattie di origine alimentare e ingenti perdite finanziarie.

Comprendere come le spore percepiscono i nutrienti e escono rapidamente dalla dormienza può consentire ai ricercatori di sviluppare modi per innescare la germinazione in anticipo, rendendo possibile la sterilizzazione dei batteri o bloccando la germinazione, mantenendo i batteri intrappolati all'interno dei loro gusci protettivi, incapaci di crescere, riprodursi e rovinare il cibo o causare malattie.

La foto finale riporta gli attori di questa sperimentazione ritratti intorno al puzzle del sensore perfettamente ricostruito grazie alla sinergia sperimentale delle diverse competenze.

Complimenti !



In sintesi

I batteri inerti e dormienti - o spore - possono sopravvivere per anni, persino secoli, senza sostanze nutritive, resistendo al calore, alle radiazioni UV, agli antibiotici e ad altri prodotti chimici aggressivi. Il modo in cui le spore tornano in vita è stato un mistero lungo un secolo, Una nuova ricerca identifica in che modo le proteine del sensore fanno rivivere i batteri dormienti. La scoperta apre nuove strade per combattere la resistenza delle spore agli antibiotici e alla sterilizzazione. I risultati possono fornire nuove strategie per prevenire le infezioni e il deterioramento degli alimenti.

*Gao Y, Amon JD, Artzi L, Ramírez-Guadiana FH, Brock KP, Cofsky JC, Marks DS, Kruse AC, Rudner DZ. Bacterial spore germination receptors are nutrient-gated ion channels. Science. 2023 Apr 28;380(6643):387-391.*

### **Un anno fa... Baedeker/Replay del 5 Maggio 2022**

*Dal genoma di Gabriela preziose informazioni per il lupus e per COVID-19*

**I recettori toll-like (TLR) svolgono un ruolo importante nel riconoscimento di particelle virali e nell'attivazione del sistema immunitario innato.** La loro attivazione porta alla secrezione di citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina-1 (IL-1), IL-6 e il fattore di necrosi tumorale- $\alpha$ , l'interferone di tipo 1. Sono considerati i "regolatori chiave" del sistema immunitario innato. Diversi TLR, (TLR2, TLR3, TLR4, TLR6,

TLR7, TLR8, e TLR9) sono coinvolti nell'infezione da COVID19. ( Khanmohammadi S, 2021) Il TLR endosomiale, nelle versioni TLR3, TLR7, TLR8 e TLR4 associato alla membrana, ha un ruolo decisivo nello scatenare la "tempesta citochinica. In particolare TLR7/8 riconosce l'ssRNA SARS-COV-2 e quando si replica in dsRNA, guida la segnalazione infiammatoria mediata da NF- $\kappa$ B, MAPK. Tale segnalazione porta a una significativa trascrizione di geni pro-infiammatori, con il rilascio di molecole infiammatorie nella circolazione sistemica, causando uno "squilibrio di sistema" che porta ad un aumento dei mediatori pro-infiammatori nel sangue, comprese le citochine come l'interleuchina (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, interferone (IFN)- $\gamma$ , fattore di necrosi tumorale (TNF)-  $\alpha$ . IL-6 e IL-1 $\beta$  sono i fattori trainanti principali capaci di portare la tempesta citochinica nella circolazione sistemica, causando così insufficienze multiple d'organo che possono portare alla morte dell'individuo. ( Manik M 2021) Nella pandemia di COVID-19 i maschi sono 2,84 volte più spesso ricoverati in terapia intensiva con una mortalità di 1,39 volte superiore. Alcuni studi suggeriscono che la dose genica del Toll-Like Receptor (TLR)7 potrebbe contribuire alla gravità essendo uno dei recettori cruciali per il riconoscimento del pattern per SARS-CoV-2 ssRNA e perché l'effetto della dose genica è causato dalla fuga dall'inattivazione del cromosoma X (XCI). Le cellule immunitarie femminili con escape TLR7 XCI hanno un'espressione TLR7 biallelica e pertanto producono più interferone di tipo 1 (IFN) dopo la stimolazione mediata da TLR7. (Spiering AE 2021) Nel COVID-19, il TLR7 nelle cellule dendritiche plasmacitoidi è uno dei recettori di riconoscimento del pattern responsabile della produzione di IFN ritardata è stata associata all'immunopatogenesi e alla mortalità.

**Il team del Centre for Personalised Immunology, Department of Immunology and Infectious Disease University, Canberra, coordinato da Carola Vinuesa** ha pubblicato su Nature pochi giorni fa il report "TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus" in cui si dimostra che il gene TLR7 quando è quando è iperattivo, scatena il sistema immunitario sugli organi e sui tessuti del corpo inducendo un Lupus diffuso. Sebbene TLR7 non sia l'unico gene implicato nel lupus, è probabile che sia un hub centrale, la via di segnalazione centrale principale.

**Nel 2016, il team Vinuesa, si è imbattuto in una bambina spagnola di 7 anni di nome Gabriela** che presentava i LES, insoliti nei bambini di questa età. Il sequenziamento del genoma di Gabriela ha rivelato un cambiamento a base singola nel gene per TLR7, che codifica per toll-like 7 la proteina che, come abbiamo visto, è preposta al rilevamento dei patogeni presente sulla superficie di più tipi di cellule immunitarie, comprese le cellule B produttrici di anticorpi. Il dato interessante è che una mutazione TLR7 non era mai stata implicata nel lupus prima, ma solo successivamente i ricercatori hanno trovato molti altri pazienti affetti da lupus con mutazioni simili. Un ulteriore elemento di riflessione è che i topi modificati geneticamente per portare la mutazione TLR7 di Gabriela hanno sviluppato sintomi tipici del lupus come piastrine basse e danno renale consistente. Il compito della proteina TLR7 è individuare i virus a RNA. Quando il recettore viene attivato, le cellule che lo trasportano producono interferoni che impediscono al virus di replicarsi in altre cellule infette; TLR7 induce i linfociti B di produrre anticorpi contro il virus. Ma la mutazione TLR7 di Gabriela rende il recettore che codifica molto più sensibile. Gli studi sui topi geneticamente modificati hanno mostrato che la loro proteina TLR7 viene attivata semplicemente interagendo con la guanosina peraltro presente nel DNA e nell'RNA di cellule umane sane. La conseguente sovrapproduzione di interferone porta a un attacco immunitario alle cellule normali.

**Ma un effetto ancora più importante è che la proteina mutante TLR7 promuove la sopravvivenza dei linfociti B che riconoscono le proteine cellulari normali, portando alla produzione di anticorpi autoreattivi contro quelle proteine che danneggiano i tessuti umani.** Normalmente questi linfociti definiti "B traditori" vengono eliminati dal sistema immunitario. I risultati del "team Vinuesa" confermano definitivamente che il percorso TLR7 è spesso iperattivato nelle persone con lupus, anche se non sono presenti mutazioni nel gene. Ne scaturisce che utilizzare farmaci che prendono di mira il recettore o i segnali a valle, possa essere una strategia terapeutica ragionevole". Il reumatologo Amr Sawalha dell'Università di Pittsburgh suggerisce di utilizzare anifrolumab un farmaco bloccante l'interferone approvato lo scorso anno usato per trattare il lupus con un discreto successo. Le informazioni disponibili su TLR7 aiutano anche a spiegare perché la maggior parte delle persone con lupus siano donne: il gene si trova sul cromosoma X in una sezione in cui, a differenza della maggior parte dei geni, sono spesso espresse entrambe le copie di un gene. Gli uomini, con la loro coppia di cromosomi X e Y, ne hanno solo una copia, quindi producono meno del recettore

immunitario in generale, anche se portano la mutazione TLR7 . Gabriela, ora adolescente, assume un cocktail di immunosoppressori per controllare la sua malattia; i farmaci hanno avuto purtroppo l'effetto collaterale di rallentare la sua crescita. Ha dichiarato in un comunicato stampa che questa nuova ricerca porti a trattamenti migliori per così tanti guerrieri lupus che soffrono di questa malattia". Almeno 200.000 persone negli Stati Uniti hanno il lupus eritematoso sistemico (LES), la forma più comune della malattia autoimmune. I pazienti possono sviluppare eruzioni cutanee, dolori articolari, affaticamento, coaguli di sangue, insufficienza renale, malattie cardiache e problemi psichiatrici. Si pensa che il lupus coinvolga sia la genetica sia i fattori scatenanti ambientali. I pazienti di solito ricevono farmaci immunosoppressori, ma questi possono renderli vulnerabili alle infezioni. Ad oggi non esiste una cura per il lupus, ma i ricercatori sono ora più vicini a una spiegazione genetica per la condizione sconcertante, grazie al genoma di Gabriela portatrice di una rara forma ereditaria della malattia.

**Un anno fa... Baedeker/Replay del 5 Maggio 2021**

***COVI-VAC, Parte Seconda: la deottimizzazione***