

CONVERSAZIONI TRA BATTERI E OSPITE

ALESSIO FASANO

Divisione di Gastroenterologia e Nutrizione Pediatrica, University of Maryland, School of Medicine, Baltimora, Maryland (USA)

I microrganismi vanno considerati tra le forme più antiche di "intelligenza biologica"; i batteri sono senz'altro tra le prime forme di organismi viventi che hanno popolato il nostro pianeta e probabilmente continueranno a sopravvivere ben oltre l'estinzione della razza umana.

Le loro peculiarità biologiche (piccole dimensioni, materiale genetico limitato, capacità di sopravvivere in condizioni estreme e continuamente cangevoli) contribuiscono alle loro virtù di adattamento e apprendimento rapido necessarie per la loro sopravvivenza. Per questo motivo è mia opinione che i batteri debbano essere considerati degli eccellenti biochimici, biologi molecolari, farmacologi e fisiologi.

Per essere dei patogeni efficienti, i batteri devono essere degli ottimi colonizzatori, devono competere per l'approvvigionamento di nutrienti e, infine, devono essere capaci di comunicare con la loro cellula bersaglio. Il problema fondamentale è capire che lingua usano per parlare con la cellula bersaglio e che cosa si dicono.

Per quanto ne sappiamo, per adempiere alle loro funzioni vitali quotidiane, le nostre cellule parlano essenzialmente quattro "linguaggi":

1. il linguaggio dell'AMP ciclico;
2. il linguaggio del GMP ciclico;
3. il linguaggio del calcio (Ca^{++});
4. il linguaggio del citoscheletro.

Per questo motivo, i batteri patogeni (compresi i patogeni enterici, su cui mi soffermerò più a lungo, data la mia personale esperienza) hanno dovuto imparare almeno uno o più di questi quattro linguaggi per comunicare con la cellula bersaglio.

IL LINGUAGGIO DELL'AMP CICLICO

Di tutti i linguaggi usati dalle nostre cellule, questo è il primo che abbiamo "decifrato" e studiato nei minimi dettagli. Molti patogeni enterici hanno appreso il linguaggio dell'AMP ciclico e sono in grado di parlare con la cellula eucariota attraverso una famiglia di tossine chiamate termolabili. La tossina colerica (CT) elaborata da *Vibrio cholerae* rappresenta la capostipite di questa famiglia di tossine ed è certamente la meglio studiata. La CT possiede 5 subunità B che formano un pentamero simile a un modulo lunare che atterra sulla superficie dell'enterocita, ancorandosi a recettori specifici (GM1 gangliosidi). Una volta atterrata, la subunità attiva (A) della tossina presente al centro del pentamero viene letteralmente iniettata nella cellula bersaglio, per poi viaggiare dall'apice alla base dell'enterocita, dove attiva l'adenilato-ciclasi, l'enzima che produce l'AMP ciclico. Il risultato finale è la fosforilazione del recettore transmembrana della fibrosi cistica (CF-TR), il canale attraverso cui il cloro viene secreto nel lume intestinale, provocando la diarrea imponente tipica del colera. Altri patogeni enterici, compresi l'*Escherichia coli* enterotossigeno e, forse, la *Salmonella thyphimurium* e il *Campylobacter jejuni*, hanno appreso il linguaggio dell'AMP ciclico per comunicare con l'enterocita bersaglio.

IL LINGUAGGIO DEL GMP CICLICO

Oltre alla tossina termolabile, l'*Escherichia coli* enterotossigeno (ETEC) elabora una famiglia di tossine termo-

stabili (ST), di cui la meglio studiata è la STa, un piccolo peptide che stimola la guanilato-ciclasi, con conseguente incremento della concentrazione intracellulare del GMP ciclico. Una serie di altri patogeni enterici, compresi la *Yersinia enterocolitica*, la *Klebsiella pneumoniae*, e il *Vibrio cholerae* non-01, elaborano la STa. Il recettore di membrana della tossina STa non è altro che la stessa guanilato-ciclasi, l'enzima responsabile per la produzione di GMP ciclico.

Il ruolo fisiologico del recettore della STa era del tutto sconosciuto fino a 6 anni fa, quando Currie e collaboratori purificarono dall'intestino di ratto un peptide omologo alla STa. Questo peptide endogeno, chiamato guanilina, presenta una omologia con la STa di circa il 50% e si lega competitivamente alla guanilato-ciclasi, con successiva formazione di GMP ciclico.

Pochi mesi prima della scoperta della guanilina, il nostro gruppo aveva scoperto una nuova tossina termostabile elaborata da *Escherichia coli* enteroaggregante (che chiamammo EAST1) che risultò strutturalmente e funzionalmente molto simile alla guanilina. Utilizzando monostrati di T84, una linea di cellule intestinali umane che possiede attività guanilato-ciclasica, scoprimmo che la EAST1, come la guanilina e la STa, parla il linguaggio del GMP ciclico. Un'analisi accurata delle tre molecole ci consentì di capire quali sono le caratteristiche strutturali necessarie per parlare tale linguaggio. Ci era ben noto che la presenza di 6 residui di cisteina che partecipano alla formazione di tre ponti disolfuro risulta essenziale per l'attività enterotossigena della STa. Di contrasto,

la EAST1 e la guanilina possiedono solo 4 residui di cisteina che formano due dei tre ponti disolfuro presenti in STa. È interessante notare che il gene della EAST1 non è limitato al solo *Escherichia coli* enteroaggregante (dove si ritrova nel 40% dei ceppi analizzati), ma è presente anche in altri *Escherichia coli* patogeni, particolarmente in *Escherichia coli* enteroemorragico (EHEC). Un'analisi genetica dettagliata ci ha permesso di stabilire che il gene della EAST1 è localizzato sul cromosoma di EHEC, mentre è presente sul plasmide (elemento circolare mobile usato dai batteri per scambio di informazioni genetiche) degli altri *Escherichia coli* patogeni. Questi dati suggeriscono che il gene di EAST1 è stato acquisito inizialmente da EHEC e poi trasferito via plasmide ad altri coli patogeni.

Il linguaggio del GMP ciclico rappresenta un esempio tipico di come i batteri siano stati capaci di studiare la fisiologia intestinale di animali superiori, di ottenere informazioni sulla guanilina, la "chiave di lettura" del linguaggio del GMP ciclico, di sintetizzare un agonista (EAST1) capace di mimare la guanilina e infine, di condividere il nuovo "linguaggio" con altri microrganismi. Ancora più impressionante è l'osservazione che altri batteri (ETEC) hanno avuto l'intelligenza e la capacità di sintetizzare un "superagonista" della guanilina, in considerazione del fatto che il terzo ponte disolfuro presente nella STa (e non nella guanilina) conferisce alla tossina un effetto secretivo 40 volte più potente della guanilina. Considerando i tempi necessari agli organismi procarioti di assemblare nuovi geni, di mantenerli nel loro limitato genoma e di passare tali informazioni ad altri microrganismi, ne consegue che i batteri hanno appreso il linguaggio del GMP ciclico migliaia, se non milioni di anni prima di noi.

IL LINGUAGGIO DEL CALCIO (Ca⁺⁺)

Il Ca⁺⁺ intracellulare gioca un ruolo fondamentale nelle funzioni vitali delle nostre cellule, compresa la regolazione

del trasporto di elettroliti e acqua attraverso l'intestino. Piccoli spostamenti da un compartimento intracellulare all'altro possono causare variazioni drammatiche delle funzioni cellulari. L'importanza del linguaggio del calcio a livello intestinale è testimoniata dalla presenza di numerosi mediatori neuroumorali (acetilcolina, serotonina, sostanza P, neurotensina ecc.) normalmente presenti nella mucosa intestinale.

Anche per questo linguaggio, abbiamo un esempio di una tossina elaborata dal *Vibrio parahaemolyticus* chiamata *thermostable direct hemolysin* (TDH) che, come abbiamo recentemente dimostrato, comunica con la cellula bersaglio via calcio.

IL LINGUAGGIO DEL CITOSCHELETRO

Il citoscheletro è sempre stato considerato importante per il mantenimento della polarità e della struttura delle cellule epiteliali (comprese quelle intestinali). Solo recentemente, cambiamenti della disposizione intracellulare del citoscheletro sono stati associati a modificazioni anche funzionali delle cellule eucariote. Per questo motivo non è inappropriato considerare questo linguaggio il meno definito ma, comunque, tra i più affascinanti linguaggi parlati tra patogeni enterici e cellule intestinali. Usando questo linguaggio, i microrganismi esprimono fondamentalmente tre "concetti" differenti: invasione, disseminazione e modulazione della permeabilità intestinale.

Invasione

Yersinia e *Salmonella* rappresentano due tipici esempi di batteri esperti nel linguaggio del citoscheletro esprimendo il concetto di invasione. Per quanto concerne la *Yersinia*, questo batterio comunica con il citoscheletro della cellula ospite tramite recettori di superficie chiamati b1-integrine. L'interazione con tali recettori, la cui funzione fisiologica è quella di promuovere l'adesione tra cellula e matrice (N.B.: la mancata funzione delle integrine è responsabile della diffusione metastatica dei tumori epi-

teliali maligni), consente al batterio di aderire intimamente alla membrana cellulare e, successivamente, di entrare nella cellula bersaglio.

È da notare che lo scompaginamento del citoscheletro fa parte della risposta cellulare globale a mitogeni, a fattori di crescita e alla espressione di oncogeni. Tale scompaginamento rappresenta un passaggio cruciale per l'invasione di *Salmonella typhimurium* ed è associato a cambiamenti profondi della disposizione di proteine componenti il citoscheletro (incluse la α -actinina, talina, tubulina, tropomiosina, ed ezrina) nel punto di contatto tra batterio e cellula bersaglio.

Disseminazione

Shigella flexneri rappresenta un esempio rimarchevole di come un batterio possa utilizzare le risorse della cellula bersaglio per il proprio uso. Entro 15 minuti il suo ingresso nella cellula intestinale, la *Shigella flexneri* sfugge dal suo vacuolo fagocitario ed entra nel compartimento citoplasmatico. Tale ingresso provoca un accumulo immediato di actina polimerizzata a un'estremità del batterio che utilizza questa coda come un apparato propulsivo per muoversi all'interno della cellula e tra una cellula e l'altra. Al microscopio elettronico, il suo muoversi appare molto simile a una stella cometa che attraversa la volta celeste.

L'intero processo rappresenta un esempio incredibile dell'abilità della *Shigella flexneri* di utilizzare il citoscheletro della cellula ospite con lo scopo di adattarsi e di sopravvivere in un ambiente intracellulare il più delle volte ostile per i microrganismi invasivi.

Per quanto riguarda l'ultimo concetto espresso tramite l'utilizzo del linguaggio del citoscheletro (la modulazione della permeabilità intestinale), preferisco rimandarvi a un prossimo articolo, dove parleremo del *Vibrio cholerae* come esempio di patogeno "superintelligente".

