

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO

Proposta di progetto per una borsa Dottorato Sapienza (XXXV ciclo) Linea di ricerca secondaria

Titolo della ricerca: Ruolo delle poliammine e del loro metabolismo nell'interazione tra *Shigella* e cellula ospite

Docente guida Milena Grossi

DESCRIZIONE DELLA RICERCA

Obiettivi della ricerca

La comprensione dei complessi programmi di virulenza, che sottostanno alla realizzazione di un processo infettivo da parte di un batterio patogeno, rappresenta uno dei maggiori, se non il principale, obiettivi degli studi sull'interazione ospite-patogeno. Il carattere multifattoriale di questi programmi rende la loro comprensione difficoltosa e, spesso, l'individuazione dei principali determinanti genetici della virulenza, come anche le loro funzioni, descrive solo in parte il complesso quadro responsabile dell'insorgenza delle patologie indotte da questi microrganismi. Altri fattori, come ad esempio le caratteristiche fisiologiche e biochimiche peculiari del patogeno, possono influenzare in maniera importante la virulenza di un determinato patogeno. La definizione di questi aspetti permette di comprendere meglio le strategie e i meccanismi che un determinato patogeno utilizza per portare a compimento un processo infettivo.

Shigella è un batterio gram-negativo responsabile della dissenteria bacillare umana denominata Shigellosi, che durante il suo processo evolutivo verso una forma di vita intracellulare ha perso tutta una serie di funzioni rispetto al suo diretto antenato *Escherichia coli*, attraverso mutazioni o delezioni di intere parti di geni. Una delle mutazioni pato-adattative presente in tutti i ceppi di *Shigella* coinvolge, inattivandolo, il gene *speG* che codifica la spermidina acetil-trasferasi. Questo gene è responsabile della neutralizzazione della spermidina e la sua inattivazione determina l'accumulo di questa poliammina nel citoplasma della cellula batterica. Studi successivi hanno dimostrato che l'accumulo di spermidina intra-citoplasmatica, conferisce a *Shigella* una maggiore resistenza allo stress ossidativo e una migliorata capacità di sopravvivere nel citoplasma dei macrofagi (Barbagallo et al., 2011), fase essenziale e limitante per la piena riuscita del processo infettivo.

Il meccanismo attraverso il quale l'accumulo di spermidina determina un vantaggio per *Shigella* e ne influenzi positivamente la sopravvivenza in ambiente intracellulare è al momento ignoto. In particolare, l'insolita concentrazione di spermidina potrebbe essere interpretata come elemento di protezione dagli insulti derivanti dalla cellula infettata o come "arma offensiva" volta ad assicurare al patogeno una infezione di successo. L'obiettivo di questo progetto è proprio quello di indagare sul ruolo svolto dall'accumulo di spermidina nel citoplasma di *Shigella* nell'interazione con la cellula ospite e caratterizzare i meccanismi che ne sono alla base.

In particolare, ipotizzando che la spermidina accumulata o i suoi precursori, come suggerito da un recente lavoro (Leuzzi et al., 2015), vengano rilasciati una volta che il batterio entra nella cellula ospite, uno degli obiettivi del progetto è quello di definire se e a quale livello (trascrizionale e/o funzionale) sono modulati gli enzimi coinvolti nella back-conversion delle

poliammine di cellule macrofagiche murine J774 infettate dal ceppo wild-type di *Shigella flexneri*, M90T, e dalle sue forme mutate in geni chiave del metabolismo delle poliammine. È noto, infatti, che un eccesso di poliammine nelle cellule superiori innesca specifici enzimi denominati poliammino-ossidasi (PAO) responsabili della riconversione delle poliammine (spermina e spermidina) nelle forme di derivazione (putrescina). Queste reazioni producono elevati livelli di H₂O₂ che possono determinare l'innescò di un processo di morte nella cellula (Murray Stewart et al., 2018). Un'attivazione non fisiologica di tali enzimi potrebbe contribuire ad una più rapida morte della cellula macrofagica. Un secondo obiettivo sarà, quindi, quello di valutare e caratterizzare, in termini di morte cellulare, la risposta delle cellule macrofagiche infettate con le forme wild-type e mutate di *Shigella flexneri*.

Una più profonda comprensione e caratterizzazione del ruolo delle poliammine, in particolare della spermidina, nella virulenza di *Shigella* aprirebbe le porte al possibile impiego di analoghi molecolari delle poliammine nel trattamento di queste infezioni. Infatti, queste molecole, già ampiamente utilizzate in ambito sperimentale, sono dotate di attività inibitoria per quello che riguarda la biosintesi e il trasporto delle poliammine. Infine, l'impiego di inibitori delle PAO potrebbe essere altrettanto promettente se venisse dimostrato il coinvolgimento specifico di questi enzimi nell'induzione della morte programmata nei macrofagi infettati.

Stato delle conoscenze

Le poliammine sono molecole alifatiche caratterizzate dalla presenza di due o più gruppi aminici. Esse sono coinvolte in numerosi processi cellulari sia negli eucarioti sia nei procarioti. Queste molecole, nei procarioti, sono implicate nel controllo dello stress da pH, nello stress ossidativo, nella resistenza agli antibiotici e nella regolazione post trascrizionale e traduzionale di un numero elevato di geni (Igarashi and Kashiwagi, 2018; Michael, 2018). Negli eucarioti le poliammine sono implicate nei processi di proliferazione cellulare, in quelli responsabili dell'apoptosi/necrosi, nell'autofagia e nella modulazione della risposta immunitaria (Miller-Fleming et al., 2015). Il coinvolgimento di queste molecole in tali fenomeni trova ragione nelle loro caratteristiche fisico-chimiche. Si tratta di molecole che si comportano, in condizioni fisiologiche, da poli-cationi e, come tali, sono in grado di interagire con i poli-anioni presenti nella cellula, primi fra tutti gli acidi nucleici, ma anche proteine e membrane plasmatiche. Data l'implicazione delle poliammine in così tanti processi cellulari, non sorprende che queste molecole siano importanti anche nel determinare il fenotipo virulento di molti batteri patogeni (Shah and Swiatlo, 2008; Di Martino et al., 2013). Uno di questi è *Shigella*, nel quale è stato dimostrato come una di queste poliammine, la spermidina, sia importante, non solo per alcuni aspetti della fisiologia, ma anche della virulenza (Barbagallo et al., 2011).

Shigella è l'agente eziologico della dissenteria bacillare umana, una patologia determinata dalla capacità del batterio di invadere la mucosa intestinale e diffondere al suo interno. Tale invasione è frutto di un processo complesso nel quale *Shigella* attraversa la barriera intestinale a livello delle cellule M dell'epitelio associato ai follicoli linfoidi. Una volta trasferitasi nella sub-mucosa *Shigella* è fagocitata dai macrofagi residenti. In questi, tuttavia, induce la lisi del fagosoma e si moltiplica portando alla morte del macrofago stesso. I batteri liberati possono così iniziare il processo di invasione dell'epitelio intestinale avendo accesso alla superficie baso-laterale degli enterociti (Ashida et al., 2011). Le capacità di *Shigella* di operare un tale progetto infettivo è il risultato di una storia evolutiva che, partendo dagli enterobatteri commensali o simbiotici, come *Escherichia coli*, è progredita attraverso processi genetici che implicano l'acquisizione di nuovo materiale genetico, l'eliminazione dei geni e delle funzioni anti-virulente e la conservazione e modulazione dei geni e delle funzioni cellulari utili per il processo di infezione (Casalino M et al., 2005; Lan R et al., 2004).

Tra i geni selettivamente eliminati in tutti ceppi di *Shigella* è stato identificato *speG*, codificante la spermidina acetiltrasferasi, un enzima coinvolto nel catabolismo delle poliammine. La conseguenza di quest'inattivazione è l'accumulo della poliammina spermidina nella cellula batterica (Barbagallo et al., 2011). Tale accumulo è normalmente deleterio per le funzioni batteriche, ma nel caso di *Shigella* esso porta ad un miglioramento del potenziale patogeno, in particolare per quanto riguarda la resistenza allo stress ossidativo e la sopravvivenza nel citoplasma dei macrofagi (Barbagallo et al., 2011). Un simile fenotipo è stato osservato anche in batteri *Escherichia coli* enteroinvasivi (EIEC) in seguito alla delezione sperimentale del gene *speG* (Campilongo et al., 2014). Rimangono, tuttavia, inesplorati i meccanismi attraverso i quali l'accumulo di spermidina determina questi adattamenti migliorativi.

Bibliografia

- Ashida H, Ogawa M, Kim M, Suzuki S, Sanada T, Punginelli C, Mimuro H, Sasakawa Barbagallo M, Di Martino ML, Marcocci L, Pietrangeli P, De Carolis E, Casalino M, Colonna B, Prosseda G. 2011. A new piece of the *Shigella* pathogenicity puzzle: spermidine accumulation by silencing of the *speG* gene. PLoS One; 6:e27226.
- C. *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. 2011. Curr Opin Microbiol.;14: 16-23.
- Campilongo R, Di Martino ML, Marcocci L, Pietrangeli P, Leuzzi A, Grossi M, Casalino M, Nicoletti M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G. 2014 Molecular and functional profiling of the polyamine content in enteroinvasive *E. coli*: looking into the gap between commensal *E. coli* and harmful *Shigella*. PLoS One.;9:e106589.
- Casalino M, Latella MC, Prosseda G, Ceccarini P, Grimont F, Colonna B. 2005. Molecular evolution of the lysine decarboxylase-defective phenotype in *Shigella sonnei*. Int J Med Microbiol. 294, 503-512.
- Di Martino ML, Campilongo R, Casalino M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G. Polyamines: emerging players in bacteria-host interactions. 2013. Int J Med Microbiol.; 303: 484-91.
- Igarashi K, Kashiwagi K. Effects of polyamines on protein synthesis and growth of *Escherichia coli*. 2018. J Biol Chem.; 293: 18702-18709.
- Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, and Reeves PR. 2004. Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. Infect. Immun. 72, 5080–5088.
- Leuzzi A, Di Martino ML, Campilongo R, Falconi M, Barbagallo M, Marcocci L, Pietrangeli P, Casalino M, Grossi M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G. 2015 Multifactor Regulation of the MdtJI Polyamine Transporter in *Shigella*. PLoS One.;10: e0136744.
- Michael AJ. Polyamine function in archaea and bacteria. 2018. J Biol Chem.; 293: 18693-18701.
- Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. 2015. J Mol Biol.; 427: 3389-406.
- Murray Stewart T, Dunston TT, Woster PM, Casero RA Jr. 2018 Polyamine catabolism and oxidative damage. J Biol Chem.; 293: 18736-18745.
- Shah, P., Swiatlo, E., 2008. A multifacet role for polyamines in bacterial pathogens. Mol. Microbiol. 68, 4-16.

Lavori pubblicati negli ultimi 5 anni dai docenti richiedenti la borsa:

- Pasqua M, Grossi M, Scinicariello S, Aussel L, Barras F, Colonna B, Prosseda G. 2019 The MFS efflux pump EmrKY contributes to the survival of *Shigella* within macrophages. *Sci Rep.*;9: 2906.
- Pasqua M, Michelacci V, Di Martino ML, Tozzoli R, Grossi M, Colonna B, Morabito S, Prosseda G. 2017 The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward Pathogenicity. *Front Microbiol.*; 8:2390.
- Leuzzi A, Grossi M, Di Martino ML, Pasqua M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G. 2017 Role of the SRRz/Rz1 lambdoid lysis cassette in the pathoadaptive evolution of *Shigella*. *Int J Med Microbiol.*; 307:268-275.
- Leuzzi A, Di Martino ML, Campilongo R, Falconi M, Barbagallo M, Marcocci L, Pietrangeli P, Casalino M, Grossi M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G. 2015 Multifactor Regulation of the MdtJI Polyamine Transporter in *Shigella*. *PLoS One.*; 10: e0136744.
- Ambrosi C, Pompili M, Scribano D, Limongi D, Petrucca A, Cannavacciuolo S, Schippa S, Zagaglia C, Grossi M, Nicoletti M. 2015 The *Shigella flexneri* OspB effector: an early immunomodulator. *Int J Med Microbiol.*; 305: 75-84.
- Campilongo R, Di Martino ML, Marcocci L, Pietrangeli P, Leuzzi A, Grossi M, Casalino M, Nicoletti M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G. 2014 Molecular and functional profiling of the polyamine content in enteroinvasive *E. coli*: looking into the gap between commensal *E. coli* and harmful *Shigella*. *PLoS One.*; 9:e106589.

Informazioni sulla sostenibilità finanziaria della proposta:

Progetto di Ricerca Sapienza (Progetti medi) 2018 “*Shigella* come modello dello studio delle interazioni tra un batterio patogeno ed il suo ospite” (resp. Prof. Bianca Colonna).

Progetto di Ricerca Sapienza (Progetti medi) 2017 “Functional analysis of the VirF protein, the major regulator of the *Shigella* virulence genes.” (resp. Prof. Bianca Colonna)

Progetto di Ricerca Sapienza (Progetti medi) 2016 “Studio dei meccanismi molecolari e cellulari che intervengono nell'interazione tra *Shigella* ed il suo ospite” (resp. Prof. Bianca Colonna)

PRIN 2017 grant prot. 20177J5Y3P

Collaborazioni del docente guida con laboratori nazionali ed internazionali rilevanti per questo progetto di ricerca

Lucia Marcocci, Dip. Scienze Biochimiche Rossi-Fanelli, Università di Roma “Sapienza”
Frédéric Barras, Institut Pasteur, Department of Microbiology, Paris, France