

# NEW INSIGHTS INTO INTESTINAL PHAGES

## NUOVE CONOSCENZE SUI BATTERIOFAGI INTESTINALI



MORETTI MAGHERITA 1090006

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

DOCENTE REFERENTE: CARLA VIGNAROLI

SESSIONE AUTUNNALE

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

# INTRODUZIONE



<https://biorender.com>

- L'intestino umano contiene un gran numero di virus, soprattutto batteriofagi, che infettano i batteri.
- I fagi sono classificati in base al loro tipo di acido nucleico, morfologia del capside e la presenza o meno di una coda e dell'envelope.
- La presenza di fagi nell'intestino è stata descritta quando d'Hérelle scoprì i fagi e il loro potenziale terapeutico nelle feci di pazienti con dissenteria.
- Quindi per le loro proprietà nei confronti dei batteri, i fagi sono stati utilizzati per trattare diverse varietà di infezioni intestinali.
- La maggiore efficienza e convenienza degli antibiotici, ha portato all'abbandono delle terapie fagiche ma con l'aumento della resistenza batterica agli antibiotici, la terapia fagica sta riguadagnando interesse.



[https://it.wikipedia.org/wiki/F%C3%A9lix\\_Hubert\\_d%27H%C3%A9relle](https://it.wikipedia.org/wiki/F%C3%A9lix_Hubert_d%27H%C3%A9relle)

# COMPOSIZIONE DEL FAGOMA INTESTINALE

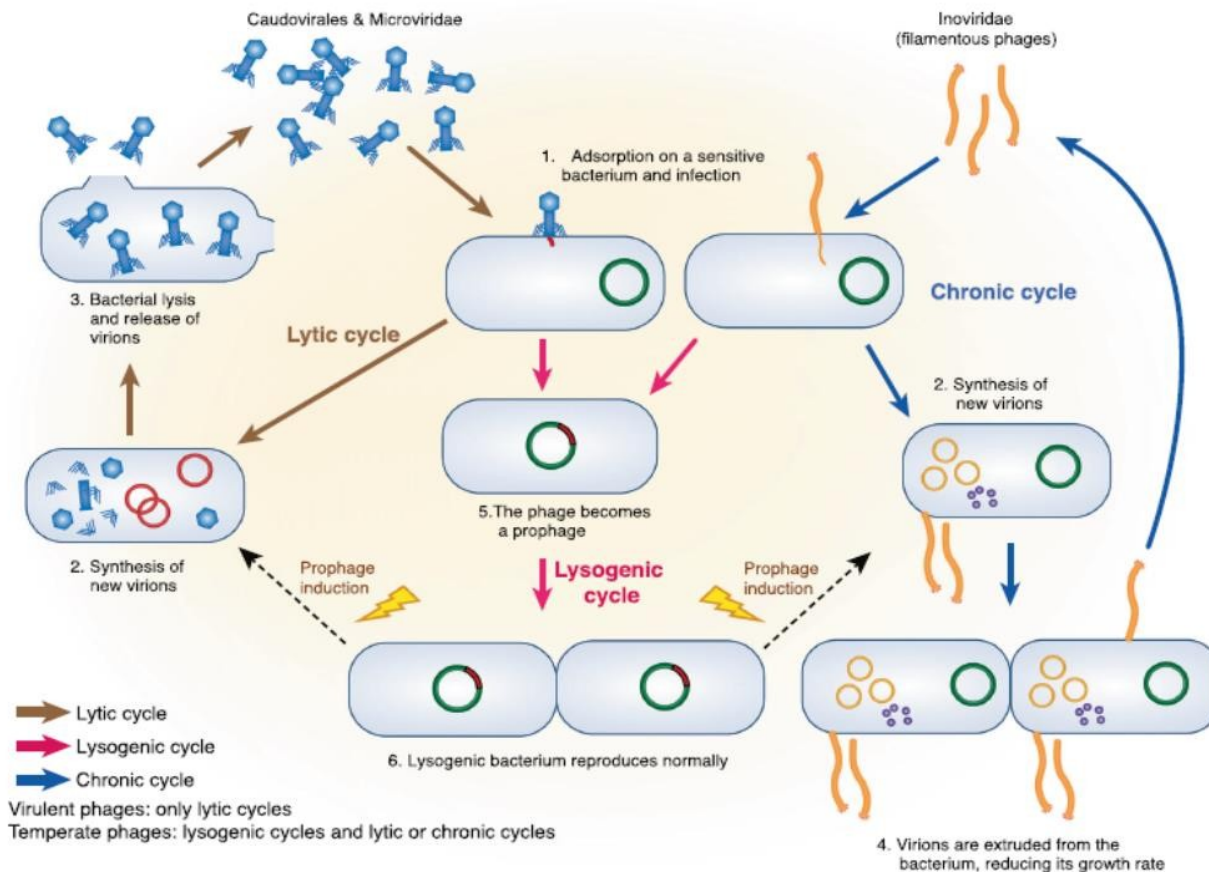


Fig. 1: Sausset et al., Mucosal Immunol.2020; 13(2): 205-215

➤ I fagi possono essere distinti in base al loro stile di vita:

- ❖ Fagi virulenti: completano il ciclo litico e, in alcune condizioni, la pseudolisogenia.

- ❖ Fagi temperati: possono usare due differenti stili di vita, la così detta scelta litica-lisogenica. I fagi temperati costituiscono almeno dal 20% al 50% dei fagi liberi.

➤ Molti fagi sono unici per ogni individuo, anche se individui sani tendono a conservare gli stessi fagi nel tempo, specialmente i più abbondanti. I fagi che **persistono a lungo nell'intestino**, sembrano quelli comuni a più individui.

# COMPOSIZIONE DEL FAGOMA INTESTINALE

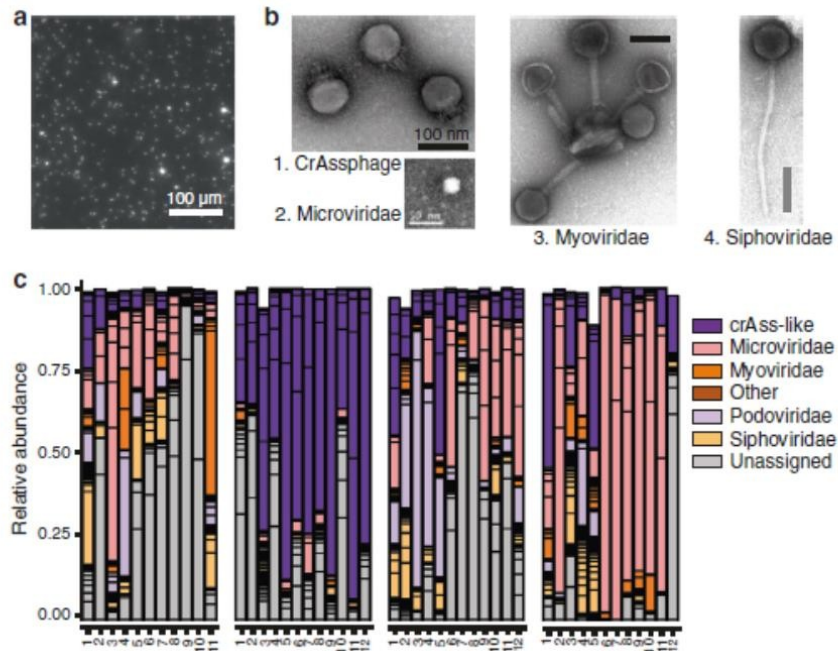


Fig. 2: Sausset et al., Mucosal Immunol.2020; 13(2): 205-215

Il sequenziamento shotgun ha permesso di evidenziare il contenuto di fagi liberi nell'intestino umano:

- La maggior parte dei fagi è senza envelope dsDNA, sia Caudovirales che Microviridae.
- Fagi filamentosi a ssDNA, o Inoviridae, possono costituire una frazione significativa del viroma intestinale umano.
- Fagi a RNA sono rari, quasi assenti, nell'intestino.

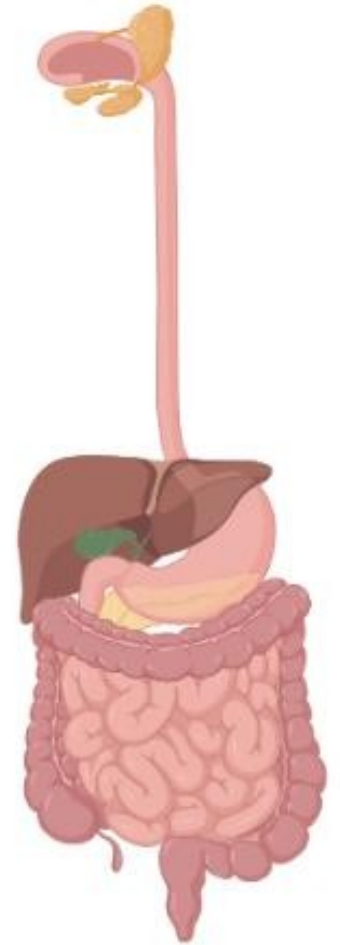
I principali phylum batterici da cui sono stati rilevati profagi attivi sono quelli dei Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria.

Negli individui che consumano una dieta occidentale, sono stati osservati due particolari e abbondanti taxa fagici:

- Gokushovirinae, fagi temperati appartenenti alla famiglia dei Microviridae. Hanno un piccolo genoma circolare ssDNA e un piccolo virione di 30 nm di diametro.
- I fagi crAss-like, con un genoma dsDNA di circa 100nm, una testa di 90nm di diametro e una coda corta.

# QUANTIFICAZIONE DEI FAGI NEL GIT

- I fagi liberi, prodotti durante il ciclo litico, sono definiti come particelle virus-like (VLPs). In alcuni casi, le VLPs si presentano come vescicole di membrana contenenti acidi nucleici che al microscopio sono difficili da distinguere dai virioni. Inoltre, gli immunologi spesso definiscono VLPs come particelle **ottenute dall'assemblaggio spontaneo di proteine strutturali virali**, che antigenicamente sono indistinguibili dai virus infettivi, ma che non contengono il genoma virale.
- Studi su feci umane indicano che, in soggetti sani, i batteri superano di 100-1000 volte il numero di virioni, in altri ecosistemi il numero di fagi è in genere 10 volte superiore a quello dei batteri.
- Il rapporto di fagi liberi e batteri è compreso tra l'1 e lo 0.0001, suggerendo una più bassa mortalità fago-indotta nel microbiota dell'intestino umano piuttosto che in altri ecosistemi microbici.



# INTERAZIONI FAGI-BATTERI DEL GIT

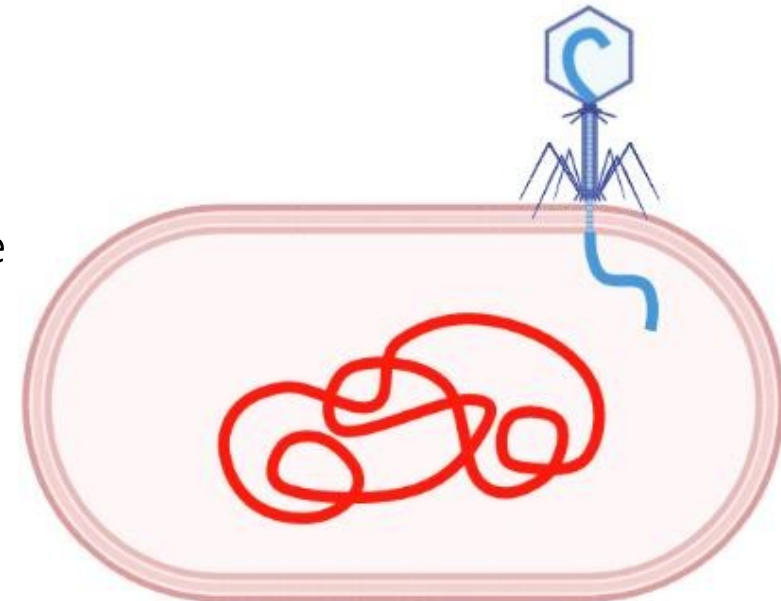
➤ Le interazioni fagi batteri nel microbiota intestinale sono altamente complesse:

- ❖ i fagi interagiscono specificatamente con un solo ceppo batterico
- ❖ l'ambiente intestinale sembra proteggere una porzione delle popolazioni di batteri suscettibili alle infezioni fagiche
- ❖ sia interazioni mutualistiche che antagonistiche sono possibili
- ❖ le interazioni tra i due possono variare rapidamente nel tempo

## INDUZIONE PROFAGICA

i segnali cellulari responsabili dell'induzione profagica sono di solito:

- ❖ danni al DNA che causano destabilizzazione del repressore o del regolatore della lisogenia
- ❖ attivazione di sistema di risposta SOS ai danni al DNA, in vivo
- ❖ gli antibiotici della classe del quinolone
- ❖ metaboliti intestinali come l'ossido nitrico o i sali biliari.
- ❖ concentrazione batterica.



# INTERAZIONI FAGI-BATTERI NEL GIT

## PREDAZIONE

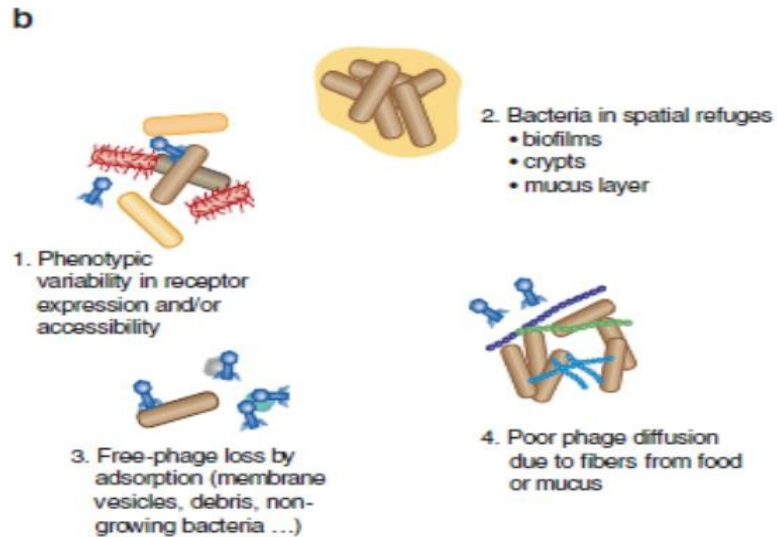


Fig. 3b: Sausset et al., Mucosal Immunol.2020; 13(2): 205-215

## CONVERSIONE LI SOGENICA

A causa dei tratti benefici conferiti ai batteri dai profagi, i fagi temperati sono considerati simbiotici mutualisti piuttosto che parassiti dei loro ospiti batterici. La prevalenza della lisogenia è spesso interpretata come prova che i profagi aumentano la fitness selettiva dei loro ospiti.

Studi recenti indicano un effetto transitorio dei fagi sulla taglia della popolazione batterica nel GIT, anche se prove di terapie fagiche di successo realizzate prima degli anni '70 contro i batteri intestinali indicano che i fagi possono ridurre drasticamente la quantità di batteri nel GIT umano. L'ambiente intestinale dà ai batteri rifugi spaziali o meccanismi di resistenza alternativi, come la resistenza fenotipica. La variabilità della resistenza ai fagi può risultare anche dalla distribuzione eterogenea della popolazione batterica nel GIT, a causa di gradienti chimici di diverse sostanze e fattori (pH, bile, acidi grassi...)

Nonostante un grande numero di studi hanno indicato che la maggior parte dei fagi infetta solo pochi ceppi della stessa specie batterica, analisi genetiche sulle sequenze CRISPR suggeriscono che alcuni fagi possono avere un ampio spettro di ospiti.

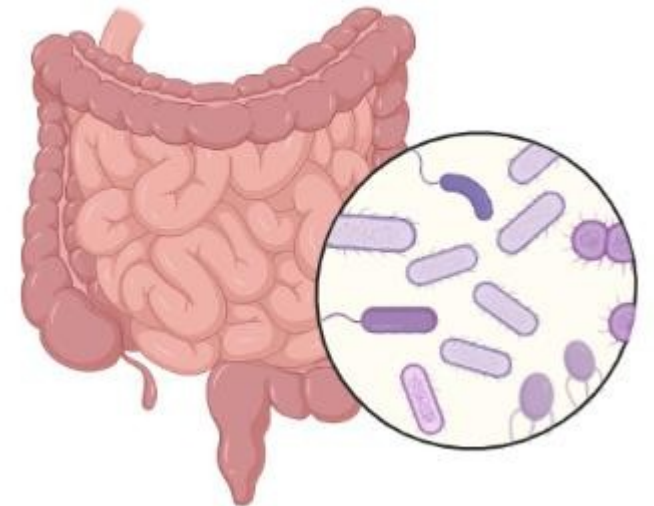
# IMPATTO DEI FAGI NELL'OSPITE ATTRAVERSO LA MODULAZIONE DEL MICROBIOTA

Terapia fagica di infezioni intestinali:

- La crescente incidenza di infezioni gravi da batteri multi-farmaco resistenti, insieme ai recenti progressi nella biologia fagica ha promosso la rivalutazione della terapia fagica. Diversi studi hanno dimostrato il carattere innocuo di cocktail fagici **nell'uomo**.

Impatto dei fagi in individui con un microbiota sano:

- I profagi modificano i numerosi fenotipi batterici, influenzando così le interazioni ospite-batterio.
- I fagi non eradicano mai le specie batteriche intestinali. I fagi possono **influenzare la fisiologia dell'ospite mammifero tramite la modulazione del microbiota e la modificazione nella composizione in specie (tramite deplezione di importanti specie batteriche per l'omeostasi) ma con effetti perlopiù transitori**.
- I fagi possono indirettamente avere un impatto sull'ospite se la resistenza fagica dei batteri intestinali ha effetti sulla loro abilità di colonizzare l'intestino e di interagire con i loro ospiti.





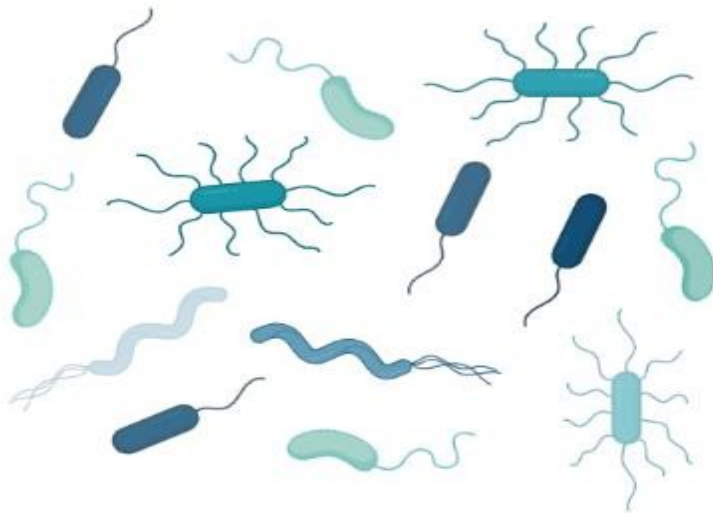
# IMPATTO DEI FAGI NELL'OSPITE DURANTE LA MODULAZIONE DEL MICROBIOTA

- La resistenza fagica sviluppata dai batteri ha un impatto negativo sulla loro resistenza agli antibiotici, in quanto batteri mutanti fago-resistenti sono più sensibili agli antibiotici.
- I fagi possono anche indirettamente apportare benefici all'ospite mammifero aumentando la diversità di comunità microbiotiche, fattore che stabilizza il microbiota intestinale.



## Ruolo dei fagi nella disbiosi?

<https://biorender.com>

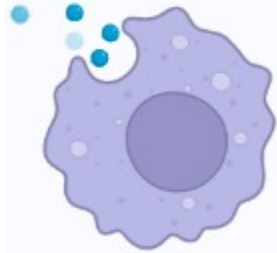


<https://biorender.com>

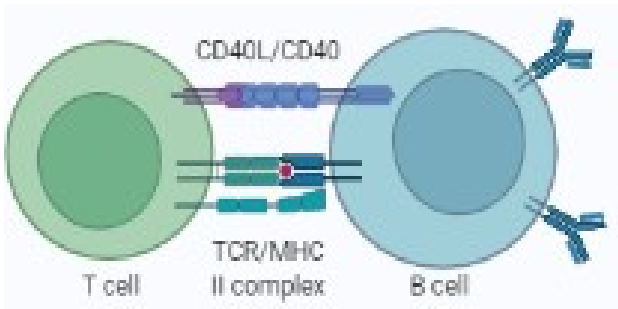
- Uno studio in particolare ha evidenziato un cambiamento globale nella composizione del viroma in pazienti con malattie infiammatorie intestinali.
- Si ipotizza che l'infiammazione intestinale potrebbe aumentare l'induzione fagica (come osservato in Salmonella), che promuovendo la lisi batterica provoca aggravamento della disbiosi e ulteriore aumento dello stato infiammatorio.

# INTERAZIONI TRA I FAGI INTESTINALI E IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI MAMMIFERI

- I fagi intestinali disseminati nel lume intestinale potrebbero interagire con le cellule del sistema immunitario sia a livello locale (nella mucosa intestinale) che sistemico.
- Diversi dati suggeriscono che i fagi possono traslocare attraverso gli strati di cellule dell'epitelio intestinale tramite il legame alle glicoproteine del muco che attivano processi di endocitosi.
- Diversi studi suggeriscono che i fagi interagiscono direttamente con cellule del sistema immunitario:

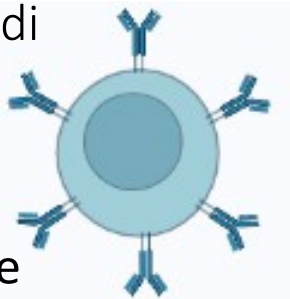


<https://biorender.com>



<https://biorender.com>

- ❖ Studio di Van Belleghem: incubando monociti del sangue periferico con fagi purificati viene indotta una risposta trascrizionale nei monociti di interleuchine IL-1, IL-6 e TNF.
- ❖ Studio di Gogokhia: si è osservata l'espansione nella produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule T CD4+ e CD8+ nel cerotto senza germi di Peyer di topo trattato con fagi purificati.



<https://biorender.com>

- I virus residenti nell'intestino, di cui una grande porzioni sono fagi, proteggono contro le infiammazioni intestinali tramite un meccanismo che coinvolge la produzione di IFN- $\beta$  dipendente da TLR3 e TLR7.

## INTERAZIONI TRA I FAGI INTESTINALI E IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI MAMMIFERI

- Le cellule dendritiche fagocitano efficacemente le particelle fagiche rilasciate per esocitosi nel comparto subepiteliale o estendendo i dendriti attraverso l'epitelio intestinale e catturando batteri e particelle virali direttamente nel lume.
- Una volta che i fagi sono stati fagocitati dalle cellule dendritiche, il genoma virale induce la risposta immunitaria innata mediata dai recettori TLR e successivamente quella adattativa.
- I segnali prodotti dai recettori TLR (soprattutto TLR-9) reclutano i linfociti T e B del sistema dell'immunità adattativa affinché inizino la loro risposta immune umorale e cellulare.
- Vengono stimolati sia linfociti B a produrre anticorpi anti fago a livello intestinale e sierico, sia linfociti T nelle placche di Peyer e nei linfonodi che sono stimolati a produrre citochine come interferone-gamma, IFN- $\gamma$ .

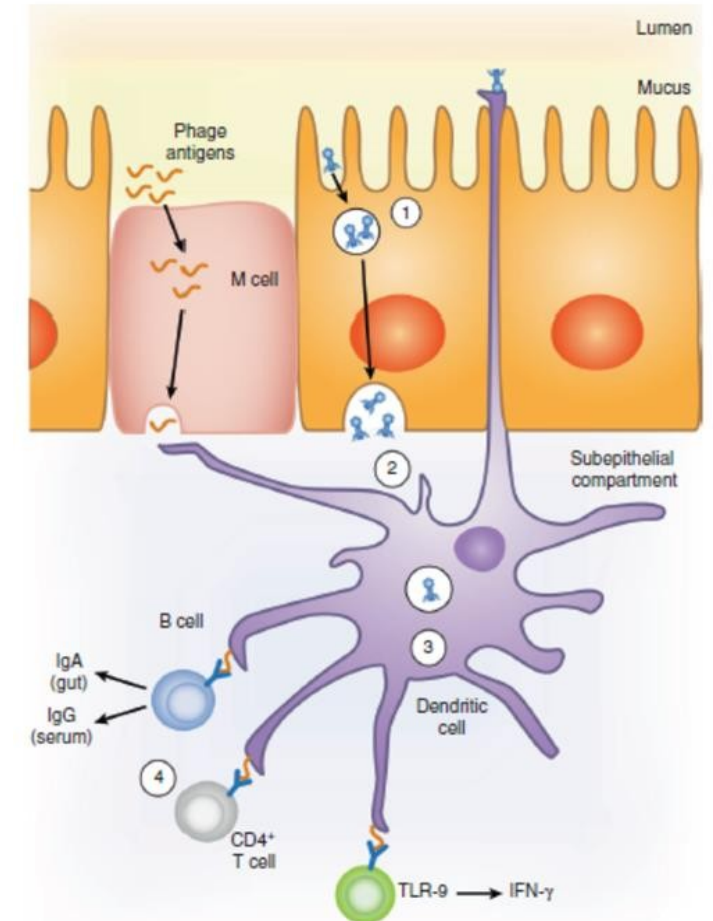


Fig. 4: Sausset et al., Mucosal Immunol.2020; 13(2): 205-215

## RIASSUNTO

Durante l'ultimo decennio, la metagenomica virale ha studiato la composizione tassonomica e le dinamiche della componente virale del microbiota intestinale. Il sequenziamento shotgun e nuovi metodi di assemblaggio hanno permesso la descrizione di fagi completamente nuovi. Questi approcci hanno rivelato che la composizione del viroma è estremamente variabile, con solo una piccola frazione di fagi comune a tutti gli individui. I virus più abbondanti che sono stati trovati infettano i Bacteroides e Clostridiales, poiché sono le specie dominanti nel microbiota. In parallelo, **esperimenti condotti su animali hanno dimostrato che in alcuni casi l'ambiente intestinale protegge il batterio e solo una piccola porzione di batteri geneticamente suscettibili sono uccisi dai loro specifici fagi.** In altri casi, la maggior parte delle popolazioni batteriche suscettibili ai fagi, sono sostituite da mutanti resistenti entro pochi giorni, indicando una estrema **efficienza dell'infezione** fagica. Il basso livello di mortalità batterica causato dalla predazione fagica può essere cruciale **nell'ambiente intestinale per modellare la composizione del microbiota e la sua funzionalità, influenzando l'evoluzione** batterica tramite trasferimento orizzontale di geni, ma anche promuovendo la diversità batterica. Il ruolo dei fagi nella disbiosi che accompagna varie condizioni patologiche rimane poco definito. Grazie ai recenti progressi nella determinazione di specifiche coppie fago-batterio, si possono intraprendere studi per valutare i possibili effetti di un cambiamento temporale nella composizione batterica e fagica e per stabilire se i fagi possono contribuire alla disbiosi e a stati di malattia o al contrario aiutare a mantenere la stabilità del microbiota preservando la diversità batterica. Ulteriori studi sono necessari per capire le interazioni dirette tra fagi e sistema immunitario e per definire se e come questi effetti **diretti possono modificare la composizione del microbiota batterico e influenzare la salute o la malattia dell'ospite.** Definire i meccanismi che determinano l'esito delle interazioni fago-batterio nell'intestino è particolarmente utile nella prospettiva di una terapia fagica, che è senza dubbio un approccio interessante al problema della resistenza agli antibiotici e merita una ricerca più approfondita.