



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

«La resistenza naturale alle infezioni virali modulata dal microbiota commensale»

«Commensal microbiota modulation of natural resistance to virus infection»

Kailyn L. Stefan, Myoungjoo V. Kim, Akiko Iwasaki, Dennis L. Kasper Cell 2020 183: 1312-1324

Docente Referente:

Chiar.ma Prof.ssa Francesca Biavasco

Tesi di Laurea di:

Tiziana Di Crescenzo

Sessione straordinaria supplementare maggio 2021

Anno Accademico 2019/2020

La resistenza naturale alle infezioni virali modulata dal microbiota commensale

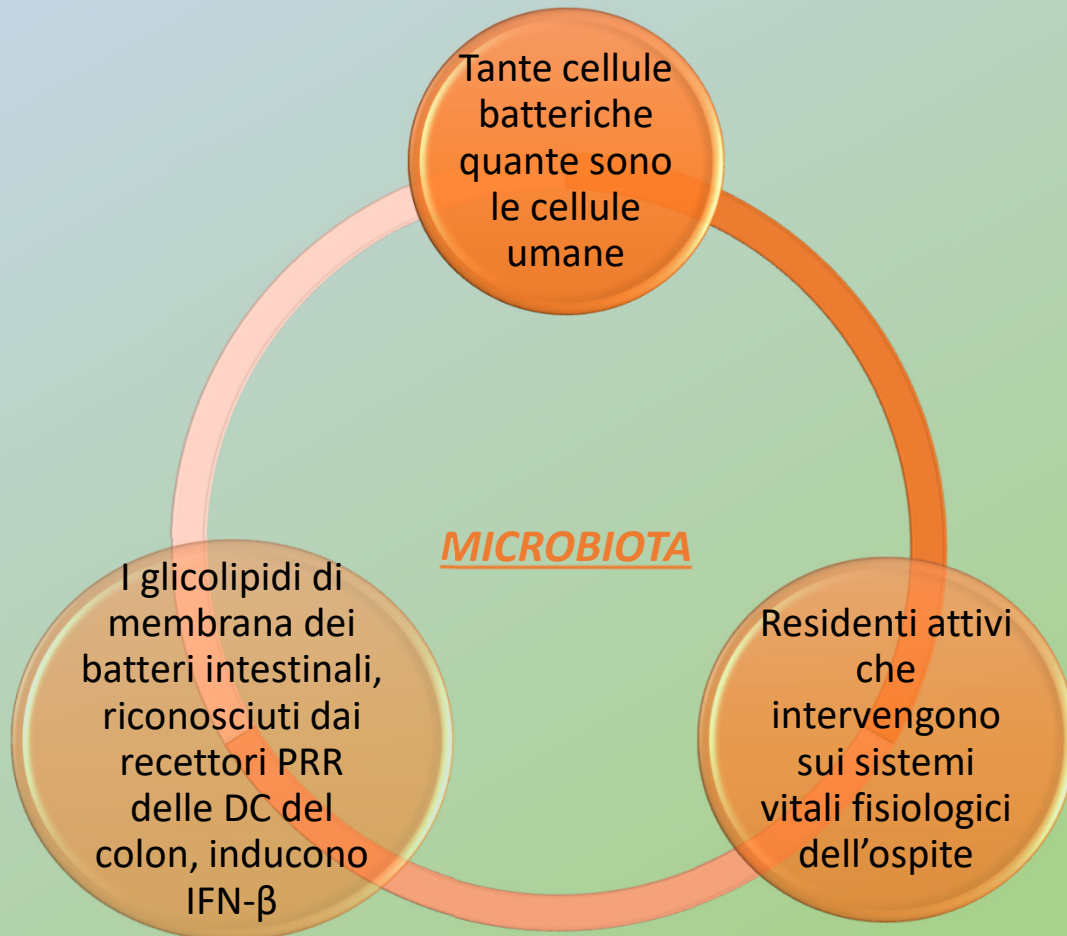
Kailyn L. Stefan, Myoungjoo V. Kim, Akiko Iwasaki, Dennis L. Kasper
Cell 2020 183: 1312-1324

Punti salienti del lavoro:

- Il microbiota ha un ruolo fondamentale nella regolazione del sistema immunitario in condizioni omeostatiche e in risposta a infezioni virali;
- La maggioranza dei batteri colonizza il tratto gastrointestinale e interagisce con il sistema immunitario attraverso la via di segnalazione delle citochine, tra cui si distinguono gli interferoni di tipo I (IFN-I), i mediatori cruciali dell'immunità antivirale;
- Le cellule dendritiche del colon, attivate dai glicolipidi della membrana esterna dei batteri, secernono interferone β , che induce l'espressione locale e sistemica dei geni dell'immunità innata (ISG);
- In questo modo IFN- β aumenta la resistenza naturale alle infezioni virali (dimostrata sul modello murino per virus VSV e dell'influenza A), proponendo un potenziale nuovo approccio terapeutico per alcune patologie umane.



INTRODUZIONE



Il tratto gastrointestinale inferiore è colonizzato da 10^{14} batteri (centomila miliardi).

Si può parlare di un vero e proprio **sistema immunitario intestinale**.

Gli **IFN-I** hanno la capacità di controllare lo sviluppo e la crescita di ogni cellula effettrice immunitaria contribuendo alle **attività antiinfiammatoria e antitumorale**.

OBIETTIVI DELLA RICERCA

- Comprendere il meccanismo di segnalazione degli IFN-I per fornire spunti interessanti non solo per la biologia, ma soprattutto per le **possibili applicazioni mediche** riguardo il trattamento di diverse malattie umane.
- Ampliare le conoscenze di base sull'**immunomodulazione** in relazione alla resistenza naturale alle infezioni virali.
- Porre l'attenzione sulle funzioni della simbiosi microbiota-ospite in condizioni omeostatiche, per comprendere le **cause scatenanti malattia** (data la scarsa quantità di studi attualmente presenti).
- Definire una **nuova via di segnalazione locale e sistemica** tipica dei batteri appartenenti al phylum dei *Bacteroidetes* che compongono la maggior parte del microbiota intestinale umano.

MATERIALI E METODI

L'analisi si compone di due fasi:

1. Indagine sul ruolo del microbiota nel meccanismo di segnalazione degli IFN-I in condizioni omeostatiche;
2. Indagine sulla funzione antivirale del microbiota in condizioni patologiche.

Modello sperimentale	Murino (WT SPF, WT ABX, WT GF, WT SPF <i>Ifnb1</i> ^{-/-})
Ceppi batterici	Bacteroides fragilis e Clostridium ramosum
Tessuti considerati	Linfonodi mesenterici (mLN), Milza, Colon
Ceppi virali	VSV indiana e PR8 del virus dell'influenza A

Esperimenti in vivo

Murini SPF / GF



Esperimenti in vitro

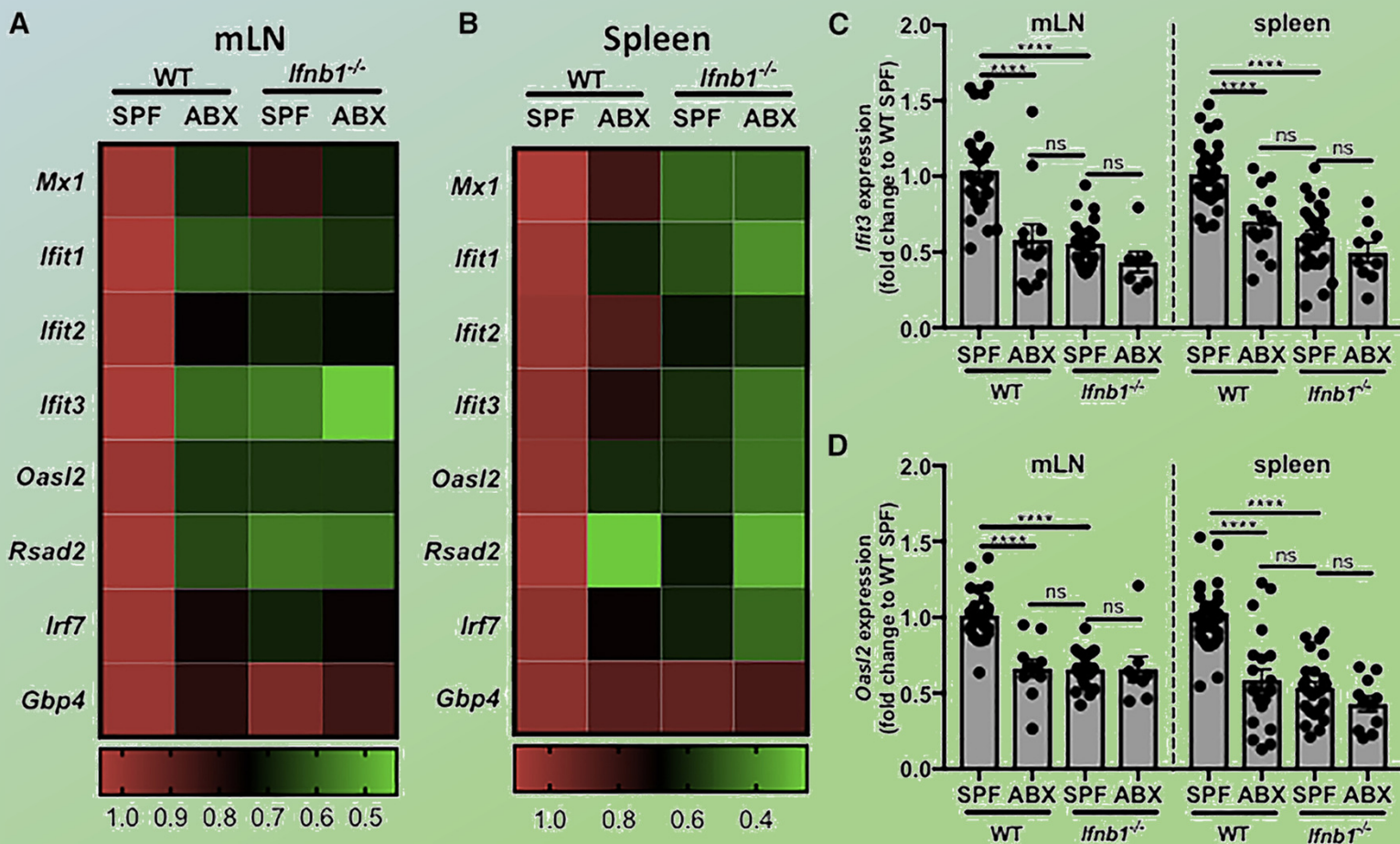
Colture cellulari di BMDC



RISULTATI

FASE 1

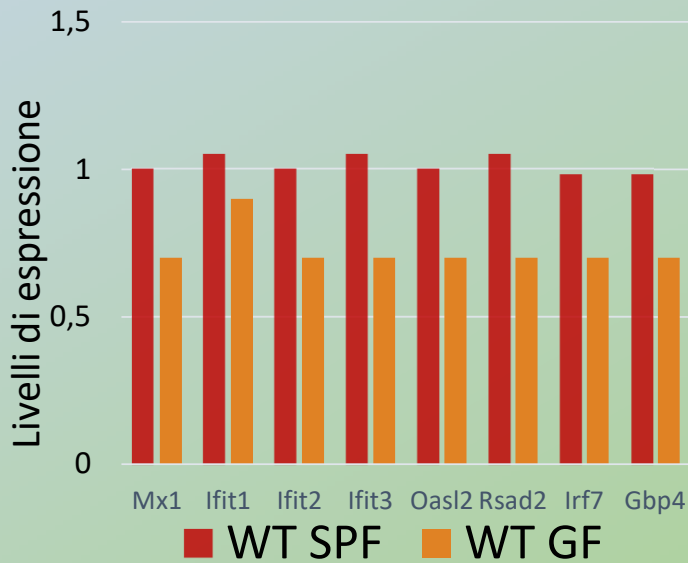
Analisi dei livelli di espressione dei ISG tramite qRT-PCR



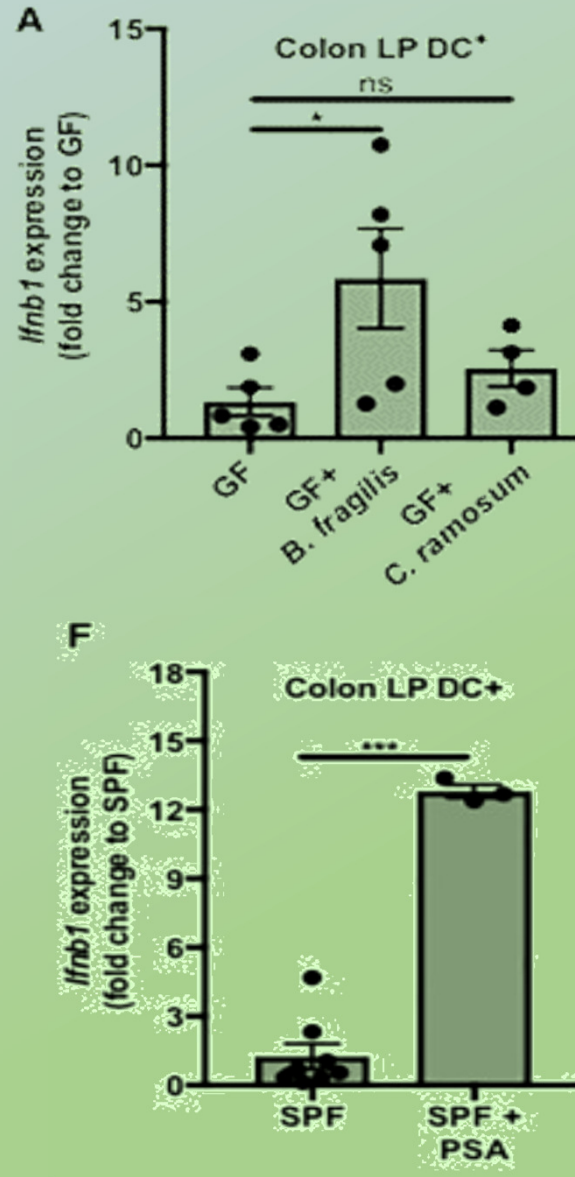
Il microbiota commensale regola l'espressione ISG dell'ospite specificamente attraverso IFN- β

RISULTATI

Espressione ISG in mNL



La deplezione totale del microbiota compromette la risposta immunitaria dell'ospite



Le DC della lamina propria del Colon costituiscono la fonte maggiore di IFN- β

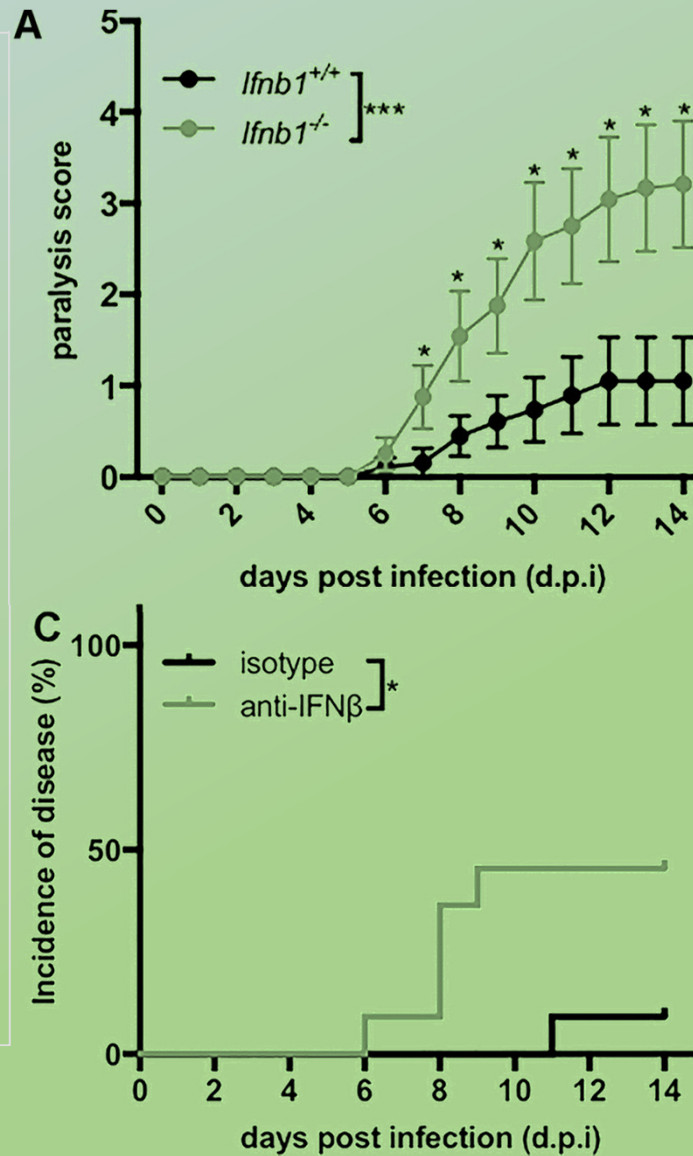
Bacteroides fragilis interagisce tramite la porzione LOS del PSA, con il recettore TLR4 delle DC del Colon per indurre l'espressione di IFN- β

RISULTATI

FASE 2

l'IFN- β indotto dal microbiota commensale è funzionalmente importante per il priming della risposta antivirale, oltre a quello espresso consequenzialmente all'infezione stessa.

Infatti la neutralizzazione dell'IFN- β prima dell'infezione incrementa la suscettibilità alla successiva infezione da VSV (analisi livelli d'innesco).

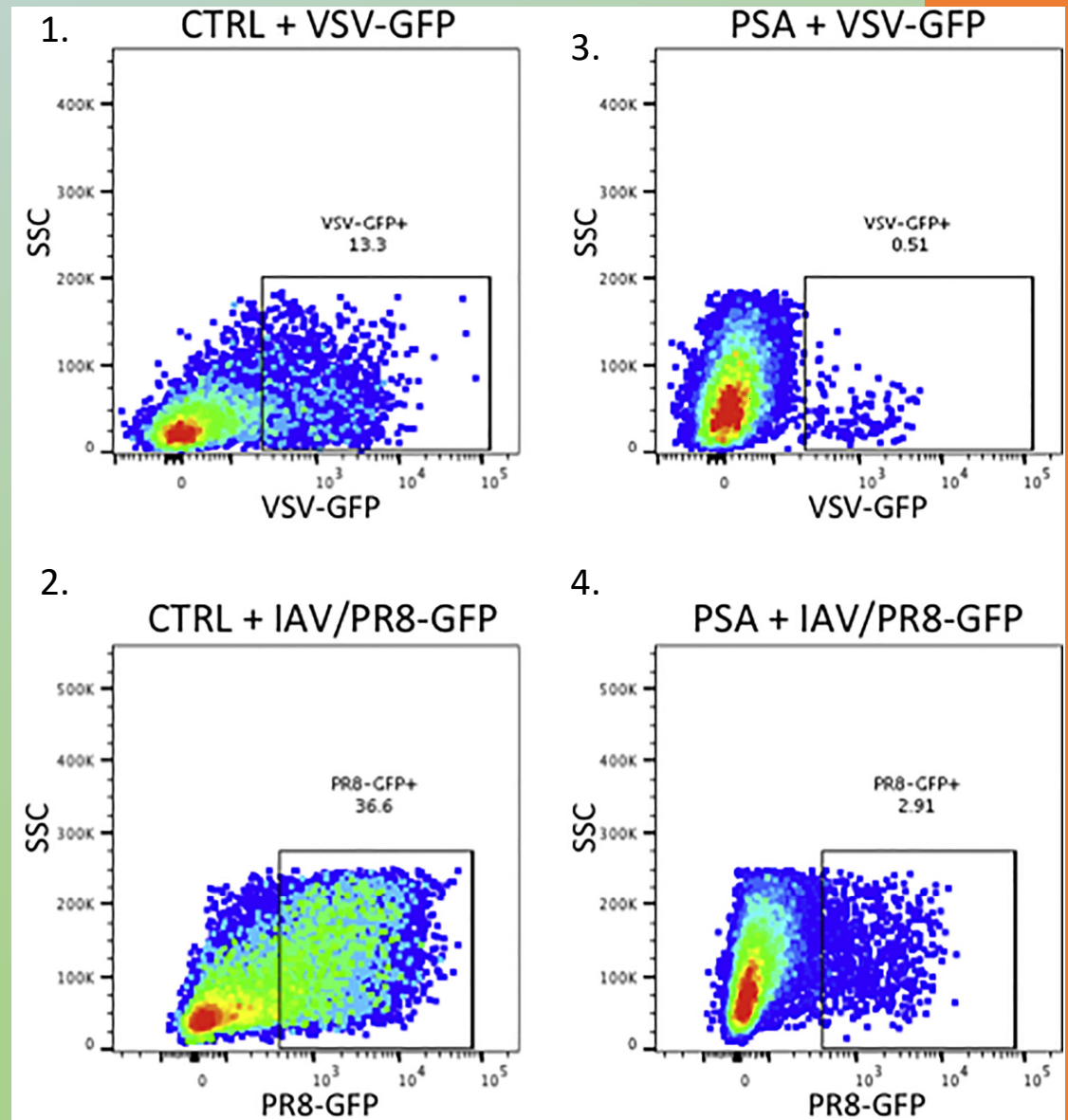
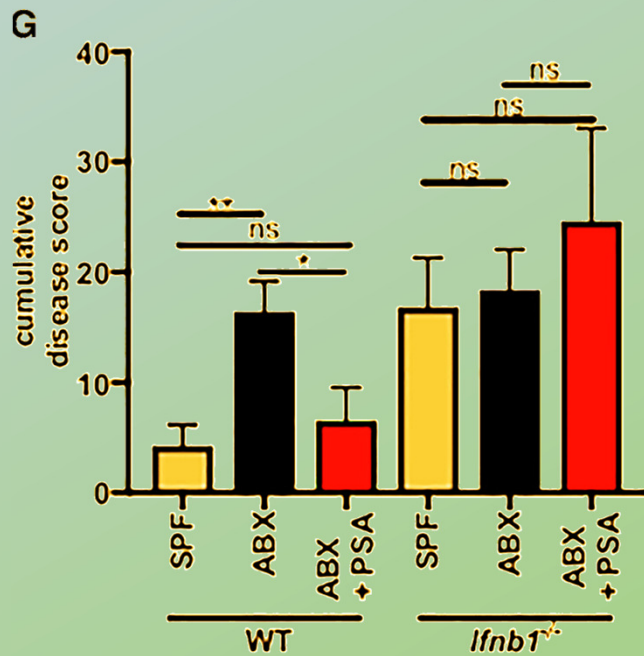


A. Infezione sottocutanea nei 2 gruppi di murini con 10^6 CFU di VSV variante indiana

C. Trattamento con anticorpo neutralizzante anti IFN- β e confronto con gruppo di controllo

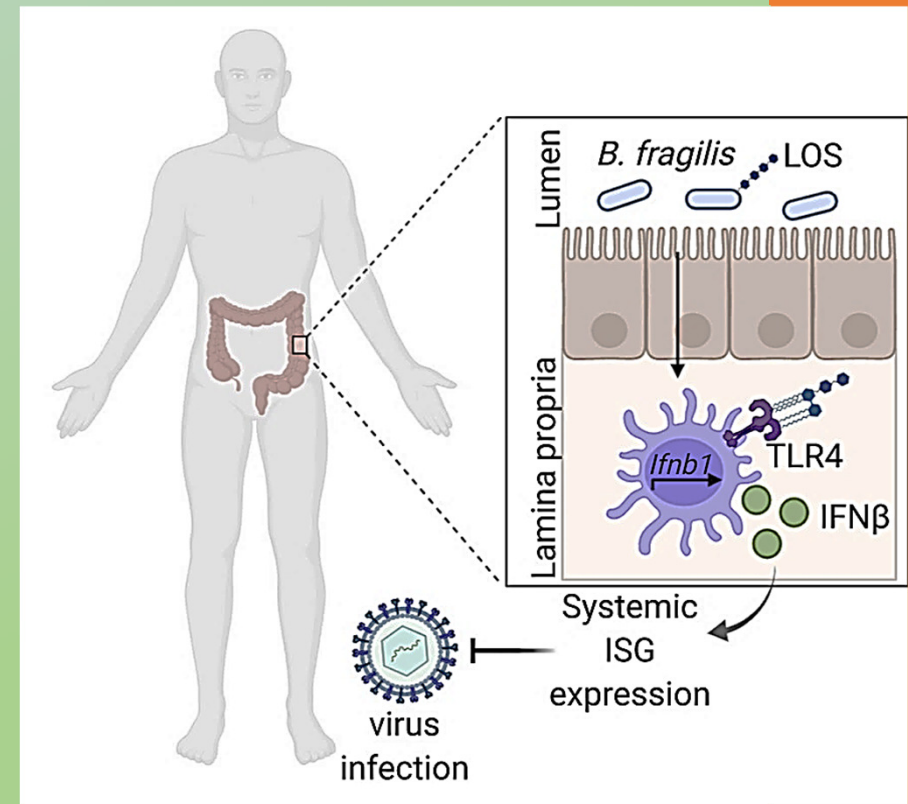
RISULTATI

- L'IFN- β indotto dal microbiota commensale aumenta la resistenza all'infezione da VSV.
- Il PSA purificato ha azione antivirale IFN- β dipendente ad ampio spettro ed è sufficiente per ripristinare gli effetti protettivi antivirali di un intero microbiota in questo modello.



DISCUSSIONE DATI

- Descrizione di un nuovo meccanismo di immunomodulazione del microbiota mediato dalla risposta IFN-I omeostatica sia locale che sistemica.
- Definizione di funzionalità uniche di IFN- β , delle DC del Colon e di tutti i batteri appartenenti al genere *Bacteroides*.
- L'immunomodulazione stimolata dal LOS, a differenza degli altri tipi di LPS (es. di *E. coli*), garantisce effetti benefici sulla risposta alle infezioni virali senza causare infiammazioni incontrollate pericolose per la salute dell'organismo.





CONCLUSIONE

- Il mantenimento di un microbiota sano è essenziale per il corretto funzionamento del sistema immunitario.
- Con questo lavoro si rende plausibile l'utilizzo del LOS/PSA come induttore di interferone per ripristinare la funzione fisiologica protettrice dell'intero microbiota commensale.
- Partendo da queste osservazioni altri studi potrebbero approfondire le proprietà del LOS/PSA proponendo applicazioni cliniche per superare i limiti terapeutici attuali.
- Gli IFN-I influenzano anche altri aspetti vitali della fisiologia dell'ospite per cui si richiedono ulteriori ricerche per comprendere l'azione del microbiota su ognuno di essi.
- L'attività immunitaria omeostatica determina l'efficacia della consecutiva risposta in presenza di patogeni, per cui differenze nella composizione del microbiota possono causare differenze nella suscettibilità alla malattia dei soggetti esposti.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

RIASSUNTO

È risaputo che qualsiasi agente estraneo (patogeno o non) nel momento in cui entra in contatto con un organismo superiore, venga riconosciuto come non self e scateni una risposta immunitaria allo scopo di mantenere lo stato di salute. Questa risposta è garantita dall'azione del sistema immunitario, che innescando una serie di reazioni guidate da molecole segnale, le citochine, controlla l'infezione in corso.

In questo studio si analizza l'azione antivirale del sistema immunitario guidata in particolare dagli interferoni di tipo I e in che modo questa azione possa essere regolata dal microbiota commensale, aumentando di conseguenza la resistenza naturale alle infezioni virali. Approfondendo l'indagine sull'intestino e in particolare sul colon, è risultata cruciale la funzione dell'interferone β (IFN- β) come mediatore dell'immunità omeostatica e antivirale, in quanto grazie a esperimenti in vivo sul modello animale e in vitro su cellule derivanti dal midollo osseo, è stato osservato che il microbiota regola la risposta immunitaria dell'ospite inducendo l'espressione dell'interferone β principalmente nelle cellule dendritiche (DC) del colon.

Ulteriori approcci sperimentali hanno permesso di far luce sul meccanismo mediante il quale uno specifico microorganismo commensale intestinale induce l'espressione di IFN- β , poiché usando batteri appartenenti al phylum *Bacteroidetes*, come *B. fragilis*, è stato osservato che i glicolipidi associati alla membrana esterna, incluso il LOS, inducono la sintesi di IFN- β nelle DC del colon tramite segnalazione TLR4-TRIF a livelli basali. Infatti durante l'infezione con virus della stomatite vescicolare murina (VSV) o virus dell'influenza A, questa segnalazione si è rivelata funzionalmente importante per ottenere una risposta antivirale più robusta, diminuendo la gravità della malattia e garantendo un maggior tasso di sopravvivenza negli animali con microbiota sano o trattati con queste molecole microbiche.

In questa prospettiva dunque il lavoro si propone di riconoscere il valore fisiologico degli interferoni di tipo I per individuare una molecola microbica, in grado di indurre la sintesi, che possa rappresentare un nuovo approccio terapeutico nel trattamento di diverse patologie infettive.