



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE

INDIRIZZO BIOLOGIA CELLULARE

CICLO XX

**Caratterizzazione dei meccanismi molecolari
coinvolti nell'apoptosi indotta da VacA, tossina
prodotta da *Helicobacter pylori***

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore : Dr.ssa Marina de Bernard

Dottoranda : Federica Calore

31 gennaio 2008

INDICE

ABBREVIAZIONI	5
SUMMARY	9
SOMMARIO	11
1. INTRODUZIONE	15
1.1 Helicobacter pylori	15
1.1.1 Microbiologia	16
1.1.2 Epidemiologia e vie di trasmissione	17
1.1.3 Helicobacter pylori: le interazioni con l'ospite	18
1.1.3.1 Controllo del pH	19
L'ureasi	19
Le amidasi alifatiche	20
1.1.3.2 Flagelli e adesine	20
1.1.3.3 L'internalizzazione di H. pylori	21
1.1.3.4 Lipopolisaccaride (LPS) e superossido dismutasi (SOD)	22
1.1.3.5 Reclutamento delle cellule infiammatorie	22
La proteina HP-NAP	23
La secrezione di chemochine	24
1.1.3.6 Isola di patogenicità e sistema di secrezione di tipo IV	25
CagA: gene associato alla citotossina A	25
1.1.3.7 La proteina VacA	26
1.2 VacA, citotossina vacuolizzante A	27
1.2.1 Il gene vacA	27
1.2.2 Polimorfismo del gene vacA	28
1.2.3 Struttura della proteina VacA	30
1.2.4 I recettori di VacA	32
1.2.4.1 Il recettore dell'EGF	32
1.2.4.2 Il recettore RPTP β	33
1.2.4.3 Il recettore RPTP α	34
1.2.4.4 I microdomini di membrana	34
1.2.5 Attività di VacA	36
1.2.5.1 VacA forma canali anione-selettivi su membrane lipidiche	36

1.2.5.2 <i>VacA</i> aumenta la permeabilità di monostrati epiteliali	37
1.2.5.3 Vacuolizzazione cellulare	38
1.2.5.3.1 Il rigonfiamento dei compartimenti acidi	40
1.2.6 Il poro formato da <i>VacA</i> permette il passaggio di nutrienti	40
1.2.7 Modulazione del sistema immunitario	41
1.3 Apoptosi	43
1.3.1 Morfologia della cellula apoptotica	44
1.3.2 La via apoptotica mitocondriale	44
1.3.3 Ruolo delle proteine della famiglia di <i>Bcl-2</i> nell'apoptosi	45
1.3.4 Le proteine pro-apoptotiche <i>Bax</i> e <i>Bak</i>	47
1.3.5 Le proteine <i>Bax</i> e <i>Bak</i> controllano la concentrazione di Calcio nel reticolo endoplasmatico	49
1.4 <i>VacA</i> e apoptosi	50
1.4.1 L'apoptosi indotta da <i>H. pylori</i> coinvolge <i>Bax</i> e <i>Bak</i>	50
1.4.2 L'apoptosi indotta da <i>VacA</i> coinvolge la via mitocondriale	50
1.4.3 L'apoptosi indotta da <i>VacA</i> dipende dalla sua capacità di formare canale	52
2. MATERIALI E METODI	53
2.1 Materiali	53
2.2 Metodi	54
2.2.1 Tecniche di biologia cellulare	54
Colture cellulari	54
Valutazione dell'attività vacuolizzante di <i>VacA</i>	54
Immunocitofluorescenza diretta	55
Citofluorimetria	56
2.2.2 Tecniche di biologia molecolare	57
Coltura liquida di <i>E. coli</i>	57
Clonaggio	58
PCR (Reazione a catena della polimerasi)	59
Elettroforesi su gel d' agarosio	61
Digestione di DNA con enzimi di restrizione	61
Purificazione dei prodotti di PCR e di digestione	61
Quantificazione del DNA mediante spettrofotometro	62
Ligazione di frammenti di DNA	62

<i>Trasformazione batterica</i>	62
<i>Screening delle colonie ricombinanti</i>	63
<i>Purificazione di DNA plasmidico da batteri</i>	63
<i>Sequenziamento</i>	63
<i>Trasfezione transiente di cellule eucariotiche</i>	63
2.2.3 Tecniche di biochimica	64
<i>Coltura liquida di Helicobacter pylori</i>	64
<i>Preparazione dei supernatanti</i>	65
Subfrazionamento cellulare e isolamento di organelli	65
1) <i>Isolamento endosomi</i>	65
2) <i>Isolamento mitocondri</i>	66
<i>Quantificazione proteica con il metodo Bradford</i>	66
<i>SDS-PAGE</i>	67
<i>Western blotting</i>	67
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	69
3.1 Le proteine pro-apoptotiche BAX e BAK e l'attività di canale della tossina VacA sono necessarie per l'induzione di apoptosi	69
3.1.1 <i>Il solo dominio N-terminale p37 è in grado di indurre apoptosi</i>	70
3.1.2 <i>L'attività di canale di VacA è necessaria per indurre apoptosi</i>	71
3.2 L'apoptosi indotta da VacA coinvolge la via mitocondriale	72
3.3 VacA induce l'attivazione di BAX e la sua traslocazione al mitocondrio	77
3.4 VacA localizza al mitocondrio	80
3.4.1 <i>Il dominio N-terminale di VacA e la tossina intera localizzano al mitocondrio</i>	81
3.4.2 <i>La tossina VacA somministrata alle cellule localizza al mitocondrio in virtù della sua capacità di formare canale</i>	82
3.5 VacA raggiunge il mitocondrio grazie ad un'alterazione del traffico intracellulare	85
3.6 BAX e BAK non sono necessarie per l'induzione di vacuolizzazione da parte di VacA	90

4. CONCLUSIONI	93
5. BIBLIOGRAFIA	97

ABBREVIAZIONI

[Ca ²⁺] _{ER}	concentrazione di Calcio nel reticolo endoplasmatico
AGS	linea cellulare derivata dall'adenocarcinoma gastrico umano
ANT	Adenite Nucleotide Translocase
ATP	adenosina tri-fosfato
Ba ²⁺	Ione Bario
BAX, BAK	proteine pro-apoptotiche BAX e BAK murine
Bax, Bak	proteine pro-apoptotiche Bax e Bak umane
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology
BHI	Brain Heart Infusion broth
bp	paia di basi
BSA	Bovin Serum Albumin
C-terminale	Carbossi-terminale.
N-terminale	Ammino-terminale
CaCl ₂	Cloruro di Calcio
CagA	gene associato alla citotossina A
CHO	Chinese Hamster Ovary
Cl ⁻	Ione Cloruro
COX-2	CycloOxygenase 2
CSK	C-terminal Src Kinase
DKO	double knock out
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	DiMetilSolfOssido
DNA	acido deossiribonucleico
dNTPs	deossinucleotidi-tri-fosfato
DTT	ditiotreitolo
ECL	Enhanced ChemiLuminescence system
EDTA	Etilendiammino-tetracetato
EE	Early Endosomes
EEA1	Early Endosomes Antigen 1
EGF	Epidermal Growth Factor

ENA-78	Epithelial cell derived Neutrophil-Activating Protein 78
FBS	Foetal Bovin Serum
FITC	Fluorescein IsoTioCianato
g	accelerazione di gravità standard pari a 9.81 m/s^2
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor
GPI-AP	GlycosylPhosphatidylInositol-Anchored Proteins
h	ora
HB	Homogenation Buffer
HCl	Acido cloridrico
HCO_3^-	Ione Bicarbonato
HeLa	Henrietta Lacks cells (cellule umane immortalizzate derivate dal cancro della cervice uterina)
Hep-2	Linea cellulare derivata dal carcinoma laringeo umano
HEPES	Acido N-2-idrossietipiperazin-N'-2-metansolfonico
HP-NAP	<i>H. pylori</i> Neutrophil Activating Protein
IgG	immunoglobulina G
IL	InterLeuchina
IMMP	Inner Mitochondrial Membrane Permeabilization
K^+	Ione Potassio
Kato III	Linea cellulare derivata dal cancro gastrico umano
kb	kilobasi
KCl	Cloruro di Potassio
kDa	kiloDalton
LAMP1	Lysosome-Associated Membrane Protein 1
LB	Luria Bertani medium
LDS	soluble lithium salt of dodecyl sulfate
LE	Late Endosomes
Li^+	Ione Litio
M	Molare
μM	micromolare
mM	millimolare
MALT	Mucosal Associated Lymphoid Tissue
MAP	Mitogen-Activated Protein kinase

MDCK	Madin-Darby Canine Kidney cells
MEK	Protein chinasi responsabile della fosforilazione della MAP chinasi
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
µg	microgrammi
mg	milligrammi
ng	nanogrammi
MgCl ₂	Cloruro di Magnesio
MHC	Major Histocompatibility Complex
µl	microlitri
ml	millilitri
min	minuto
MMP	Mitochondrial Membrane Protein
MOPS	3-(N-MOrpholino)PropaneSulfonic acid
mRNA	RNA messaggero
MscS	Mechanosensitive channel of small conductance
Mt	Mitochondria
MtBAX	Mitochondrial BAX (proteina BAX indirizzata al mitocondrio)
N87	Linea cellulare derivata dal cancro gastrico epiteliale umano
NaCl	Cloruro di Sodio
NaOH	Soda Caustica
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-κB	Nuclear Factor κB
NH ₄ ⁺	Ione Ammonio
NHI	National Health Insurance
nm	nanometro
NPPB	5-nitro-2(3-fenilpropilammino) acido benzoico
NRU	Neutral Red Uptake
OD	Densità Ottica
OMMP	Outer Mitochondrial Membrane Permeabilization
OMP	Outer Membrane Protein
ORF	Open Reading Frame
p/v	peso/volume
PAI	Isola di patogenicità
PBS	Phosphate Saline Buffer

PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	PhycoErythrin
PMA	Phorbol Myristic Acid
PN	Pellet Nucleare
PNS	Post-Nuclear Supernatant
PTP	Permeability Transition Pore
RAS	GTPasi coinvolta nella via di segnale delle tirosin chinasi recettoriali
RBL-2H3	Rat Basophilic Leukaemia-2H3 cells
ROI	Radical Oxygen Ions
rpm	giri al minuto
RPTP α/β	Receptor Protein-Tyrosine Phosphatase α/β
RT	Room Temperature
SDS-PAGE	sodio-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SERCA	Sarcoplasmic-ER Ca^{2+} adenosine-triphosphatase
SH2	SRC-homology 2
SNARE	Soluble NSF Attachment REceptor
SOD	Superossido Dismutasi
TAE	Tris-Acetate-EDTA buffer
TER	Trans-Epithelial Resistance
Tris	Tris-(idrossimetil)-ammino metano
U	unità di enzima
UV	ultravioletti
V	volt
v/v	volume/volume
VacA	Vacuolating cytotoxin A
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
<i>wt</i>	wild type

SUMMARY

The attested association of *Helicobacter pylori* to gastro-duodenal pathologies such as chronic gastritis, peptic ulcer and gastric carcinoma has always been of great interest. The *bacterium* produces several virulence factors: the vacuolating cytotoxin (known as VacA) is definitely one of the most interesting ones, for the multiplicity of the effects on mammalian cells. For this reason VacA has been defined a multifunctional toxin [D'Elios *et al.*, 2007; Cover *et Blanke*, 2005].

VacA is secreted by the *bacterium* as a mature protein of 95 kDa, and it can further be cleaved in the N-terminal domain (called p37), and a C-terminal domain (called p58) which can remain non covalently linked. Secreted toxin is a flower-shaped oligomer, formed by 6 or 7 monomers, which can insert into lipid bilayers forming voltage-dependent anion channels [Tombola *et al.*, 1999]. Several properties of VacA are strictly dependent on the formation of these channels: cellular vacuolation [Willhite *et al.*, 2003], a rapid drop of the trans-epithelial resistance in epithelial monolayers [Papini *et al.*, 1998], and finally apoptosis in epithelial cells [Willhite *et Blanke*, 2004]. In the last few years several efforts have been devoted to the characterization of the latter. It was reported that VacA intoxication is responsible for the decrease in mitochondrial membrane potential [Kimura *et al.*, 1999] and cytochrome *c* release from the organelle [Galmiche *et al.*, 2000]. Mitochondria have been reported to be the intracellular destination of VacA, as assessed when the toxin or its p37 domain were intracellularly expressed through transient transfection [Galmiche *et al.*, 2000] and also when the toxin was extracellularly applied [Willhite *et Blanke*, 2004]. Mutant forms of VacA, lacking channel activity (VacA P9A, G14A) are incapable of inducing either the decrease of the mitochondrial trans-membrane potential, or cytochrome *c* release [McClain *et al.*, 2003; Willhite *et Blanke*, 2003 and 2004].

In 2006, Yamasaki *et al.* showed that VacA-induced cell death and cytochrome *c* release depend on the activation of pro-apoptotic proteins Bax and Bak.

However, the molecular mechanisms that regulate VacA-induced apoptosis and by which mechanism VacA is targeted to mitochondria remained two unanswered questions.

In order to address these questions we first performed cell viability experiments and verified the involvement of pro-apoptotic proteins BAX and BAK in our cell model (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs). Considering also that endoplasmic reticulum Ca^{2+} level is crucial to control the fate of cells in response to certain apoptotic stimuli and following sensitization of mitochondria [Breckenridge *et al.*, 2003], we verified whether VacA-induced cell death could primarily involve the reticulum or mitochondria.

As the apoptogenic role of VacA depends on its channel activity, we first performed cell death analyses inducing the intracellular expression of the full length toxin (p95), or its p37 domain where resides the membrane-channel forming ability. We also performed the same experiments with the toxin extracellularly applied: MEFs were then incubated with *H. pylori* supernatant containing the *wt* toxin, and with the supernatant containing a mutant form of the toxin, VacA P9A, which was unable to form any channel.

It is known that after being endocytosed VacA localizes to late endosomes [Molinari *et al.*, 1997], where vacuoles arise. It is not known the mechanism which allows VacA to further target mitochondria. We analyzed, though immunofluorescence and subcellular fractionation assays, the pathway followed by the toxin inside the cell, from its endocytosis to cell death.

Here we report that BAX and BAK proteins are required for VacA-induced cell death; this process involves only mitochondria, and not the endoplasmic reticulum so it is Ca^{2+} independent. The role of BAX is crucial: it is recruited by VacA on early endosomes and activated by the toxin. Its following translocation to mitochondria, and VacA targeting to the organelle, seem to be the consequence of the cell trafficking alteration induced by the toxin. This process is characterized by the migration of endosomal membranes to the mitochondrial ones, and maybe by their fusion.

All the effects so far described depend on the channel activity of VacA: it is not responsible of the release of apoptogenic factors from mitochondria, but also of all the events that precede this process.

SOMMARIO

La comprovata associazione di *Helicobacter pylori* a patologie del tratto gastrointestinale, tra cui la gastrite cronica, l'ulcera peptica ed il tumore allo stomaco ha da sempre destato un grande interesse. Tra i suoi fattori di virulenza, la citotossina vacuolizzante (abbreviata VacA) è uno dei più studiati, grazie alla sua capacità di indurre, in diversi tipi cellulari, disparati effetti citotossici che fanno di essa una tossina multifunzionale [D'Elisio *et al.*, 2007; Cover *et Blanke*, 2005].

VacA viene secreta dal batterio come proteina matura del peso di 95 kDa, e può essere successivamente processata con formazione di un dominio N-terminale (definito p37), ed un dominio C-terminale (definito p58), che possono rimanere associati in maniera non covalente. Una volta secreta, la tossina forma oligomeri conformati a rosetta: si tratta di esameri o eptameri che riescono ad inserirsi in doppi strati lipidici, formando canali anione-selettivi e voltaggio-dipendenti [Tombola *et al.*, 1999]. Dall'attività di canale di VacA dipendono la sua capacità di indurre la formazione di vacuoli [Willhite *et al.*, 2003], di provocare un calo della resistenza trans-epiteliale in monostrati epiteliali polarizzati [Papini *et al.*, 1998], e di indurre infine apoptosi in cellule epiteliali [Willhite *et Blanke*, 2004]. Dei suoi effetti citotossici, quest'ultimo è sicuramente quello di più recente scoperta. E' noto che l'apoptosi indotta da VacA induce morte cellulare a livello del mitocondrio, dal momento che essa causa una diminuzione del potenziale di membrana della membrana mitocondriale interna [Kimura *et al.*, 1999] e rilascio di citocromo *c* dall'organello [Galmiche *et al.*, 2000]. Inoltre il mitocondrio rappresenta proprio la destinazione intracellulare di VacA, e ciò è stato osservato sia quando la tossina o il suo dominio p37 vengono espressi intracellularmente tramite trasfezione transiente [Galmiche *et al.*, 2000], sia quando la tossina viene somministrata alle cellule dall'ambiente esterno [Willhite *et Blanke*, 2004]. Forme mutanti della tossina, incapaci di formare canale (VacA P9A, G14A), non determinano né il crollo della differenza di potenziale di membrana a livello del mitocondrio, né il rilascio di citocromo *c* [McClain *et al.*; Willhite *et Blanke*, 2003 e 2004].

Infine, nel 2006 Yamasaki *et al.* hanno dimostrato che VacA induce morte cellulare e rilascio di citocromo *c* grazie all'attivazione delle proteine pro-apoptotiche Bax e Bak.

Non sono tuttora noti né i meccanismi molecolari che regolano l'apoptosi provocata da VacA, né in che modo essa, una volta endocitata, riesca a raggiungere il mitocondrio.

Per rispondere a questi quesiti abbiamo innanzitutto condotto degli esperimenti di morte cellulare, allo scopo di verificare l'effettivo coinvolgimento delle proteine pro-apoptotiche BAX e BAK nel nostro modello cellulare (Fibroblasti Embrionali Murini, MEFs). Inoltre, note le evidenze sperimentali che suggeriscono che il reticolo endoplasmatico medi l'apoptosi sensibilizzando i mitocondri attraverso il rilascio di Ca^{2+} [Breckenridge *et al.*, 2003] è stato verificato se l'apoptosi indotta da VacA coinvolgesse primariamente il reticolo o il mitocondrio.

Nota l'evidenza sperimentale che collega l'attività apoptogena di VacA alla sua capacità di formare canale, le analisi di morte cellulare sono state innanzitutto effettuate inducendo l'espressione intracellulare, mediante la tecnica della trasfezione, della tossina intera (p95), o del suo dominio p37, grazie al quale la tossina è in grado di inserirsi in membrana. Inoltre gli stessi esperimenti sono stati ripetuti fornendo la tossina alle cellule dall'esterno, quindi incubandole con il supernatante di coltura di *H. pylori* contenente la tossina *wt*, o con il supernatante di un ceppo batterico isogenico contenente la tossina mutata VacA P9A, incapace di formare canale.

E' noto che subito dopo essere stata endocitata la tossina localizza a livello degli endosomi tardivi [Molinari *et al.*, 1997], sede di origine dei vacuoli. Non è tuttora chiaro il meccanismo attraverso cui VacA riesca a raggiungere in un secondo momento i mitocondri. Abbiamo pertanto ritenuto opportuno analizzare, attraverso tecniche di immunofluorescenza e di subfrazionamento cellulare, il percorso effettuato dalla tossina all'interno della cellula dal momento della sua endocitosi al momento della morte per apoptosi.

I risultati ottenuti mostrano che le proteine BAX e BAK sono necessarie all'induzione di apoptosi da parte di VacA; la tossina provoca morte cellulare tramite il solo coinvolgimento del mitocondrio, e quindi in una modalità Ca^{2+} -indipendente. La proteina BAX sembra inoltre svolgere un ruolo cruciale: viene reclutata da VacA in corrispondenza degli endosomi precoci, cosa peraltro mai osservata finora, e attivata dalla tossina. La sua successiva traslocazione al mitocondrio, ed il raggiungimento dell'organello da parte di VacA, sembrano essere la conseguenza dell'alterazione del traffico intracellulare indotta dalla tossina, processo caratterizzato dalla migrazione delle membrane endosomiali verso quelle mitocondriali, e da una

loro probabile fusione. Tutti gli effetti finora descritti dipendono dall'attività di canale di VacA, che non è pertanto solo responsabile del rilascio di fattori apoptogeni dal mitocondrio, ma anche di tutti gli eventi che precedono questo processo.

1. INTRODUZIONE

1.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori, inizialmente chiamato *Campylobacter pylori*, è un batterio isolato per la prima volta nel 1982 [Marshall and Warren, 1984] dallo stomaco umano, suo unico habitat. Fin dalla sua identificazione *H. pylori* è stato associato a patologie gastro-duodenali infiammatorie quali gastriti croniche, ulcere peptiche e tumori allo stomaco.

Nel 1994 l'Istituto Nazionale di Sanità Statunitense (NIH) ha riconosciuto ufficialmente *H. pylori* come l'agente causale di tutte le ulcere duodenali, di quasi tutte quelle gastriche e delle gastriti croniche attive (NIH Consensus Statement, 1994). Nello stesso anno inoltre l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro ha inserito *H. pylori* fra i carcinogeni di prima classe [Logan, 1994].

L'idea che l'infezione dovuta ad *Helicobacter pylori* fosse associata a patologie come la gastrite o l'ulcera fu ampiamente osteggiata dal mondo accademico per anni, ma tale scoperta ha fruttato a Marshall e Warren nel 2005 il conseguimento del premio Nobel per la medicina.



Figura 1.1. *H. pylori* al microscopio elettronico

1.1.1 Microbiologia

H. pylori è un batterio microaerofilo Gram-negativo, lungo 3.5 µm e con diametro di 0.5 µm. Il microrganismo possiede una forma a bastoncino elicoidale ma, in condizioni ambientali sfavorevoli, trasforma il proprio aspetto in coccoide. Il batterio è reso estremamente mobile da un sistema di 4-6 flagelli unipolari lunghi 25 µm e spessi circa 30 nm, rivestiti da una guaina che si estende fino all'estremità formando un bulbo terminale.

L'intera sequenza del genoma di due ceppi di *H. pylori* è attualmente disponibile insieme a porzioni del genoma di parecchi altri ceppi (ceppo J99, isolato nel 1994 negli Stati Uniti e ceppo 26695, isolato nel 1987 nel Regno Unito 1997) [Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999]. Questi genomi contengono tra le 1495 e le 1590 ORF (*Open Reading Frame*), molte delle quali codificano per proteine strutturali o proteine necessarie per la crescita e divisione della cellula batterica [Marais *et al.*, 1999]. Alcune di queste, inclusa l'ureasi, sono necessarie per la colonizzazione e la sopravvivenza di *H. pylori* sulla superficie apicale delle cellule epiteliali dello stomaco o all'interno dello strato mucoso protettivo. Per arrivare a colonizzare questi siti il batterio deve attraversare la cavità orale ed il tratto esofageo, caratterizzati dalla presenza di enzimi idrolitici ed un pH neutro; una volta attraversato il piloro, il batterio affronta l'acidità del lume dello stomaco. La capacità di resistere all'acido è legata prevalentemente alla sua attività ureasica mediante la quale *H. pylori* scinde l'urea in ossido di carbonio e ammoniaca; quest'ultima tampona il citosol ed il periplasma e crea un'area neutra attorno alla superficie batterica.

Guidato da fattori chemotattici come l'urea e gli ioni bicarbonato, *H. pylori* lascia rapidamente il lume dello stomaco per entrare nello strato di muco che ricopre e protegge la mucosa dai fluidi gastrici. Lo strato di muco funziona da barriera contro l'ambiente acido ed è relativamente impermeabile persino a piccole molecole; gli ioni Idrogeno, infatti, possono liberamente diffondere dalla porzione apicale delle cellule epiteliali mucosali al lume gastrico, ma non viceversa. Al contrario, gli ioni bicarbonato e probabilmente anche Ferro e Nichel, importanti per la crescita del batterio, sono scarsamente permeabili. In questo modo si crea un gradiente di pH all'interno dello strato di muco caratterizzato, in condizioni normali, da valori debolmente acidi vicino alla membrana apicale delle cellule della mucosa, che diventano molto più acidi quando, in condizioni patologiche, lo spessore del muco viene ridotto.

H. pylori può penetrare nel muco grazie alla sua forma elicoidale, al rilascio di enzimi idrolizzanti il muco stesso, ed al movimento tramite i flagelli.

Una volta attraversato lo strato di muco, il batterio aderisce fortemente alla membrana apicale delle cellule epiteliali della mucosa gastrica grazie alle adesine e alla riorganizzazione del citoscheletro e delle proteine di membrana appartenenti alle cellule epiteliali [Segal *et al.*, 1996].

1.1.2 Epidemiologia e vie di trasmissione

H. pylori instaura l'infezione batterica cronica più frequente tra quelle che riguardano l'uomo; la sua diffusione si estende a qualunque parte del mondo, nonostante esista una grande variabilità di incidenza tra i diversi paesi e all'interno di sottogruppi di popolazione. Numerosi fattori possono predisporre un individuo all'infezione da *H. pylori*, primo di tutti quello socio-economico: nei paesi in via di sviluppo l'80-90% della popolazione presenta il batterio, contro il 30-40% dei paesi sviluppati [Suerbaum *et Michetti*, 2002]; a parità di condizioni igieniche risultano correlati all'infezione anche la virulenza del batterio (ad esempio se è *cag PAI*⁺ o *cag PAI*) e le caratteristiche dell'ospite (secrezione acida dello stomaco, età, dieta, fattori genetici, stress).

Le vie di trasmissione di *H. pylori* sono ancora sconosciute ma il fatto che lo stomaco umano e quello di altri primati sia l'unico habitat per il batterio fa supporre che la trasmissione sia interumana, per via oro-orale, oro-fecale e gastro-orale. Il batterio infatti è stato isolato dalla placca dentale, dalla saliva, dal vomito e da feci di alcuni pazienti [Parsonnet *et al.*, 1999].

Senza un trattamento adeguato con antibiotici, l'infezione da *H. pylori* persiste generalmente per tutta la vita dell'individuo. Nella maggior parte della popolazione l'infezione decorre asintomatica, con moderata infiammazione rilevabile solo attraverso biopsie ed analisi istologica. Tuttavia una minoranza (15-20%) sviluppa severe patologie gastroduodenali, adenocarcinoma e linfomi dello stomaco (linfoma di MALT). Si ritiene che il differente sviluppo dell'infezione sia sostanzialmente influenzato da un'eccessiva o inappropriata reazione dell'ospite, dal polimorfismo batterico e da fattori ambientali [Go, 1997].

1.1.3 *Helicobacter pylori*: le interazioni con l'ospite

Benché molteplici fattori contribuiscano alla patogenesi ed alla severità delle malattie associate ad *H. pylori*, inclusi la dieta, fattori genetici, stress, ipersecrezione gastrica, ecc., l'elemento più importante sembra essere il ceppo del batterio stesso. La specie di *H. pylori*, infatti, comprende un gran numero di ceppi geneticamente diversi che possono essere suddivisi in due grandi gruppi: batteri di tipo I (cag^+) e di tipo II (cag^-) a seconda della presenza o meno dell' "isola di patogenicità" di 40 kb detta *cag PAI*: quest'ultima è un locus genico che comprende circa 30 geni ed è presente solo nei ceppi di *H. pylori* più virulenti, gli unici in grado di indurre patologie gastroenteriche gravi. Sia i ceppi di tipo I che quelli di tipo II producono l'enzima ureasi, che permette loro di sopravvivere nello stomaco grazie alla sua azione tamponante. Entrambi, inoltre, possiedono il gene *vacA*, non incluso nell'isola di patogenicità, anche se la tossina attiva è prodotta solo dai ceppi cag^+ , i quali hanno anche il gene *cagA* che codifica per la proteina CagA (Cytotoxin associated gene A) [Xiang *et al.*, 1995]. Di seguito viene riportata una descrizione dettagliata dei fattori di virulenza (**Figura 1.2**).

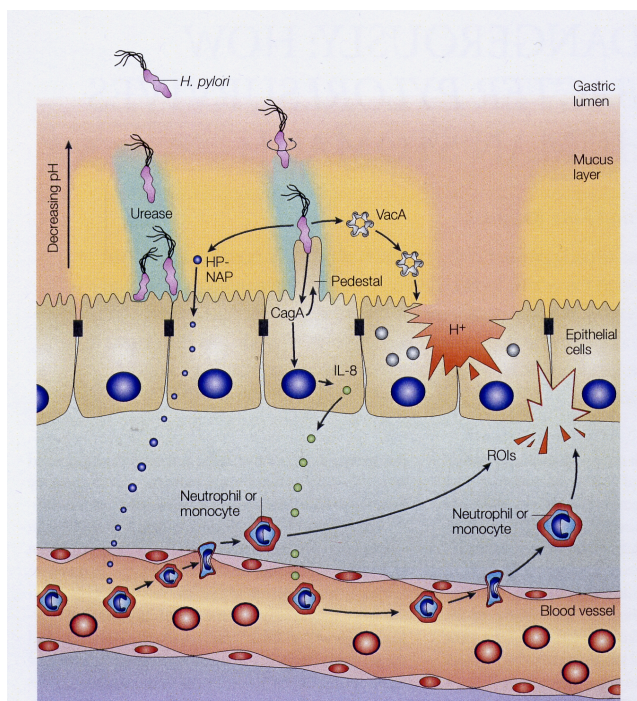


Figura 1.2. Rappresentazione schematica della mucosa gastrica colonizzata da *H. pylori*; in evidenza i principali fattori di virulenza coinvolti nella colonizzazione e malattia [da Montecucco *et Rappuoli*, 2001].

1.1.3.1 Controllo del pH

L'ureasi

L'ureasi è un dodecamero formato da sei subunità proteiche denominate UreA e da sei chiamate UreB, organizzate in un doppio anello di 13 nm di diametro ed è localizzata nel citoplasma, nel periplasma e sulla superficie cellulare di *H. pylori* [Dunn *et al.*, 1997]. La biosintesi di questo enzima dipende da sette geni, inclusi quelli codificanti per le due subunità e per le proteine accessorie responsabili del legame col Nichel e del suo inserimento nel sito attivo dell'enzima. L'urea prodotta dalle cellule è catturata da *H. pylori* attraverso un canale presente nella membrana interna ed è regolata dal pH esterno: risulta aperto a pH acidi permettendo l'entrata dell'urea nel batterio e chiuso a pH neutri per evitare una sovra-alcalinizzazione (**Figura 1.3**). L'idrolisi dell'urea genera ammoniaca che tampona il citoplasma ed il periplasma batterico. Il ruolo essenziale di questo enzima come fattore di virulenza è supportato dal fatto che mutanti di *H. pylori* privi di ureasi non sono in grado di colonizzare lo stomaco. L'ureasi citoplasmatica è inoltre importante in quanto fonte di Azoto, che può essere indirizzato alla biosintesi degli amminoacidi [Williams *et al.*, 1996]. La funzione dell'ureasi nella patogenesi delle malattie associate a *H. pylori* non si limita alla colonizzazione ma può anche essere d'aiuto nel richiamare neutrofilii e monociti nel sito di infezione ed inoltre nell'attivare la produzione di citochine pro-infiammatorie [Williams *et al.*, 1996; Ferrero *et al.*, 1994]. Inoltre l'ammonio prodotto dall'attività ureasica risulta tossico per le cellule epiteliali e, in combinazione con gli intermedi infiammatori rilasciati dai neutrofilii nel sito di infezione, forma agenti carcinogenici [Montecucco *et Rappuoli*, 2001].

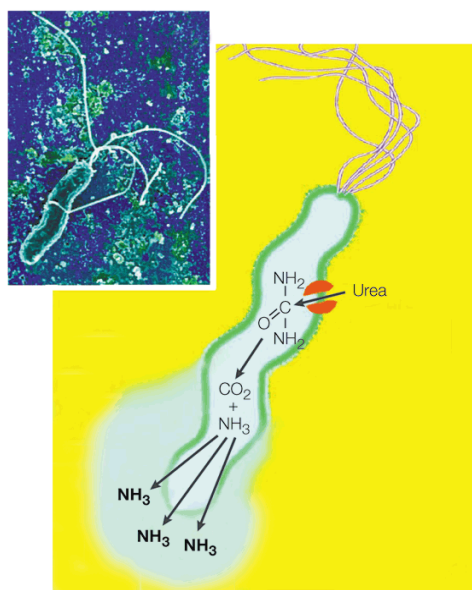


Figura 1.3. Rappresentazione schematica dell'attività ureasica di *H. pylori* [da Montecucco *et Rappuoli*, 2001].

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Le amidasi alifatiche

Oltre all'ureasi *H. pylori* possiede due amidasi alifatiche, AmiE e AmiF in grado di produrre ammoniaca. Questi due enzimi intervengono nel metabolismo dell'Azoto ma, a differenza di quanto osservato per l'ureasi, mutanti di *H. pylori* che presentano i geni *amiE* e *amiF* inattivati sono comunque in grado di colonizzare lo stomaco nel topo [Bury-Mone *et al.*, 2003]. Ciò ha permesso di concludere che le amidasi non svolgono un ruolo essenziale per la colonizzazione della mucosa gastrica, anche se i due geni sono presenti in tutti i ceppi di *H. pylori* testati [Bury-Mone *et al.*, 2003].

1.1.3.2 Flagelli e Adesine

Nonostante *H. pylori* sia un batterio in grado di resistere al pH acido dello stomaco, esso ha bisogno di venire a contatto con l'epitelio gastrico per crescere in un ambiente a pH neutro ed essere protetto dallo svuotamento dello stomaco. Pertanto *H. pylori* ha bisogno di attraversare lo spesso strato di muco gastrico che protegge le cellule epiteliali. Biopsie umane hanno mostrato che la maggior parte dei batteri si

trova strettamente adesa alla membrana apicale delle cellule epiteliali. Il legame è mediato da glicolipidi e da diverse proteine, dette adesine: la prima adesina identificata è stata HpA, altre possibili adesine appartengono alla famiglia delle OMP (*Outer Membrane Protein*) tra cui AlpA e AlpB che riconoscono differenti recettori sulla superficie cellulare e BabA che lega gli antigeni di Lewis di tipo B presenti sulle cellule umane [Boren *et al.*, 1993]. Il muco presente nello stomaco è costituito da granuli contenenti proteine glicosilate [Slomiany *et al.*, 1991]. Queste glicoproteine costituiscono un gel viscoso che copre e protegge le cellule epiteliali della mucosa gastrica. Il muco agisce così come una barriera semi-permeabile che permette il passaggio di protoni provenienti dalle cellule gastriche secretici e diretti in direzione del lume dello stomaco impedendone il ritorno. Inoltre è poco permeabile agli ioni bicarbonato [Bhaskar *et al.*, 1992]. Di conseguenza il muco permette di instaurare un gradiente di pH tra il lume dello stomaco, che è un ambiente molto acido, e la superficie apicale della mucosa gastrica, che è più vicina alla neutralità. *H. pylori* possiede 4-6 flagelli unipolari rivestiti da una guaina costituita da un doppio strato fosfolipidico che li protegge dall'acidità che altrimenti potrebbe depolimerizzarli [Dunn *et al.*, 1997]; essi sono composti da una porzione basale e da un filamento centrale costituito da due tipi di flagellina, FlaA e FlaB. Alla radice del flagello c'è una struttura composta da FlaE, l'uncino, a cui si deve la motilità del batterio. L'assenza di FlaE non permette l'assemblaggio delle due flagelline; ceppi mutanti privi di tali strutture non sono in grado di colonizzare lo stomaco.

1.1.3.3 L'internalizzazione di H. pylori

Nonostante *H. pylori* non venga considerato un batterio intracellulare, diversi studi realizzati su biopsie gastriche hanno mostrato che il batterio è capace di invadere le cellule epiteliali della mucosa gastrica [Ko *et al.*, 1999; Wyle *et al.*, 1990; Noach *et al.*, 1994]. L'adesione di *H. pylori* alle cellule epiteliali rappresenta la prima tappa del processo di internalizzazione. È stato dimostrato che la presenza dell'antigene di Lewis x sulla superficie batterica influenza il tasso di internalizzazione del batterio da parte delle cellule gastriche in coltura [Lozniewski *et al.*, 2003]. *In vitro*, dopo l'internalizzazione, uno scarso numero di batteri (tra l'1 e il 2 %) localizzano all'interno di larghi vacuoli citoplasmatici dove mantengono una certa motilità. In questa nicchia il batterio può sopravvivere ad un trattamento

antibiotico per diverse ore prima di essere rilasciato per ripopolare l'ambiente extracellulare [Amieva *et al.*, 2002; Bjorkholm *et al.*, 2000]. *In vivo*, questo meccanismo permetterebbe ad *H. pylori* di sottrarsi alle difese immunitarie ed ai trattamenti di eradicazione per stabilire un'infezione cronica.

1.1.3.4 Lipopolissaccaride (LPS) e superossido dismutasi (SOD)

Tutti i batteri Gram-negativi possiedono una membrana esterna contenente LPS, oltre a fosfolipidi, polisaccaridi e proteine. Al contrario di altri Gram-negativi, il lipopolisaccaride di *H. pylori* ha una debole attività pro-infiammatoria. *H. pylori* viene fagocitato da macrofagi e neutrofilo che per ucciderlo mettono in atto il *burst* respiratorio producendo radicali dell'Ossigeno ed acqua ossigenata. Il batterio, tuttavia, ha sviluppato un sistema difensivo che consiste nella produzione di un enzima detossificante, la superossido dismutasi, la quale catalizza la conversione di due molecole di superossido in una molecola di perossido di Idrogeno ed una di Ossigeno. La SOD è costituita da due subunità identiche di 24 kDa ed è Ferro-dipendente; viene esposta sulla superficie batterica e poi rilasciata nell'ambiente circostante.

1.1.3.5 Reclutamento delle cellule infiammatorie

I neutrofilo e le cellule mononucleate si infiltrano nella mucosa gastrica infettata da *H. pylori* ed inducono una risposta infiammatoria. L'entità del danno arrecato alla mucosa gastrica dipende dall'infiltrazione dei neutrofilo [Fiocca *et al.*, 1994; Dixon *et al.*, 1996]. Per attivare questa risposta infiammatoria *H. pylori* produce e secerne delle molecole chemio-attrattive in grado di attraversare la barriera epiteliale, descritte in seguito.

La proteina HP-NAP

L'infiltrazione di cellule infiammatorie mononucleate e di neutrofilo è comune nei tessuti infettati da *H. pylori*. Negli estratti di *H. pylori* sono stati trovati molti componenti proteici che inducono l'attivazione dei neutrofilo [Evans *et al.*, 1995] tra cui è stata identificata una proteina oligomerica di 150 kDa denominata HP-NAP (*Helicobacter pylori* neutrophil activating protein).

La proteina è un dodecamero composto da subunità identiche di 17 kDa ciascuna (**Figura 1.4**), localizzata nel citosol batterico e rilasciata nel mezzo in seguito ad autolisi. La sua sequenza amminoacidica rivela un'alta omologia con le batterioferritine, con le quali condivide anche la resistenza alla denaturazione termica e chimica; tuttavia, al contrario di quest'ultime, HP-NAP non lega il DNA e, nonostante ogni monomero sia in grado di legare più di 40 atomi di Ferro [Tonello *et al.*, 1999] la sua sintesi sembra essere Ferro-indipendente [Dundon *et al.*, 2001]. Si ipotizza quindi, che HP-NAP fosse in origine una proteina legante il Ferro e regolata da questo metallo, e che abbia poi evoluto la funzione di attivatore dei neutrofilo [Montecucco *et Rappuoli*, 2001].

E' stato dimostrato che HP-NAP stimola l'esplosione respiratoria o *burst* respiratorio nel quale vengono prodotti intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) come l'anione superossido (O_2^-) [Evans *et al.*, 1995]. La proteina agisce tramite una cascata di eventi intracellulari che coinvolgono un aumento di Calcio intracellulare e determinano l'attivazione della NADPH ossidasi sulle membrane plasmatiche dei neutrofilo, responsabile della produzione di ROI [Satin *et al.*, 2000].

HP-NAP è chemotattica per i neutrofilo infatti, incrementando l'espressione delle glicoproteine CD11/CD18 sulla loro membrana, induce la loro adesione alle cellule endoteliali [Satin *et al.*, 2000]. La proteina possiede capacità chemotattiche anche verso i monociti [Satin *et al.*, 2000]; si è dimostrato inoltre che essa stimola queste cellule ad aumentare la sintesi del fattore tissutale e la secrezione dell'inibitore-2 dell'attivatore del plasminogeno. Attraverso l'espressione coordinata di attività pro-coagulanti e anti-fibrinolitiche, HP-NAP potrebbe favorire la deposizione di fibrina e contribuire allo sviluppo cronico di gastriti, inibendo la guarigione dei tessuti che richiede la degradazione e la rimozione della fibrina [Montemurro *et al.*, 2001].

Grazie all'attivazione dei neutrofili la proteina scatena una moderata risposta infiammatoria che, inducendo alterazioni nelle membrane basali e nelle giunzioni strette (*tight junctions*) delle cellule epiteliali, promuove il rilascio di nutrienti dalla mucosa in grado di sostenere la crescita di *H. pylori* [Montecucco *et Rappuoli*, 2001].

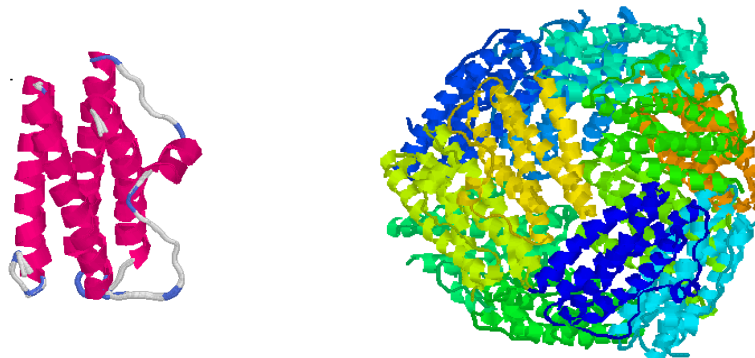


Figura 1.4. Rappresentazione tridimensionale rispettivamente del monomero e del dodecamero di HP-NAP.

La secrezione di chemochine

HP-NAP non è l'unico fattore implicato nella risposta infiammatoria indotta da *H. pylori*. Infatti l'adesione dei ceppi di *H. pylori* di tipo I alle cellule della mucosa gastrica induce la secrezione di chemochine come l'interleuchina 8 (IL-8), l'ENA-78 (*Epithelial cell derived Neutrophil-Activating protein 78*), ma anche il TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) e il GM-CSF (*Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor*) [Rieder *et al.*, 2001; Foryst-Ludwig *et al.*, 2000]. La secrezione di queste chemochine necessita di un contatto diretto tra *H. pylori* e le cellule epiteliali [Rieder *et al.*, 1997]. Questo meccanismo di risposta infiammatoria necessita dell'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, che controlla l'espressione dei geni che codificano per queste proteine [Keates *et al.*, 1997; Munzanmaier *et al.*, 1997].

1.1.3.6 Isola di patogenicità e sistema di secrezione di tipo IV

I diversi ceppi di *H. pylori* sono classificati come *cag*⁺ (tipo I) o *cag*⁻ (tipo II) a seconda della presenza o meno nel loro genoma di un'isola di patogenicità (PAI) di 40 kb codificante per circa 30 geni e ricca di G-C. Tale isola conferisce al batterio una maggiore probabilità di trasmissione e lo trasforma da semplice commensale a potenziale patogeno. Solo il ceppo *cag*⁺ provoca danni gastrici con lesioni (vacuolizzazione epiteliale, necrosi ed ulcere) ed è in grado di indurre la secrezione di interleuchina 8 da parte delle cellule epiteliali. Circa 12 geni di *cag PAI* codificano per un apparato di secrezione detto "Sistema di secrezione di tipo IV" che permette il trasferimento nello spazio extracellulare o in altre cellule, di una varietà di complessi multimolecolari [Rappuoli *et al.*, 1998]. L'unica proteina finora conosciuta ad essere iniettata nelle cellule dell'ospite tramite il sistema di secrezione di tipo IV è CagA, il cui gene è contenuto nell'isola.

Cag A: gene associato alla citotossina A

I ceppi di *H. pylori* di tipo I (*cag PAI*⁺) producono CagA, una proteina di 128 kDa con una regione carbossi-terminale variabile. Una volta iniettata nelle cellule dell'epitelio gastrico CagA va a localizzarsi sulla faccia interna della membrana plasmatica dove viene Tirosin-fosforilata dalle chinasi della famiglia SRC (**Figura 1.5, pannello A**) [Segal *et al.*, 1999]. In seguito alla fosforilazione di CagA nelle cellule epiteliali in coltura si verificano dei riarrangiamenti del citoscheletro che determinano l'allungamento e l'allargamento delle cellule infettate (fenotipo "hummingbird"); a tali cambiamenti morfologici è inoltre associato un incremento della motilità cellulare [Segal *et al.*, 1999].

Una volta fosforilata CagA è in grado di interagire con proteine citosoliche ed in particolare con i domini regolatori SH2 (SRC-homology 2) della Tirosin-fosfatasi SHP2, inducendone un cambiamento conformazionale che stimola la sua attività fosfataseica [Yamazaki *et al.*, 2003]. La proteina SHP2 è ampiamente espressa nelle cellule somatiche e media i segnali mitogenici e di differenziamento cellulare mediante un *pathway* di trasduzione che coinvolge anche la proteina oncogenica RAS; l'alterazione dell'attività di SHP2 indotta da CagA determina, dunque,

un'attivazione anomala di tale pathway, promuovendo una crescita cellulare anormale, una motilità alterata e apoptosi (**Figura 1.5, pannello B**) [Higashi *et al.*, 2004]. Al contrario, l'inibizione della fosforilazione di CagA e la conseguente mancanza di interazione con SHP2 prevengono la comparsa del fenotipo *hummingbird* nelle cellule infettate [Hatakeyama, 2004].

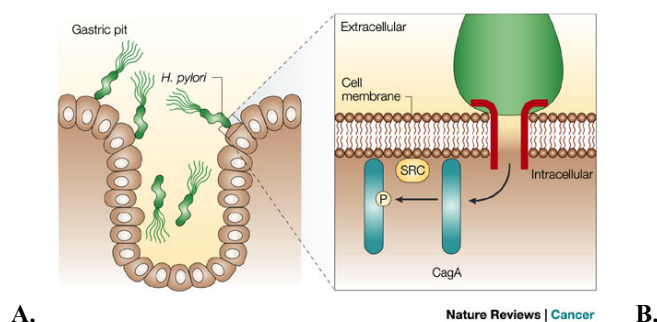


Figura 1.5. (A) Interazione tra *H. pylori* cag PAI⁺ e l'epitelio gastrico. **(B)** Attivazione di SHP2 da parte di CagA [da Hatakeyama, 2004].

E'

stato stimato che circa l'80% delle molecole di CagA interagisce con SHP2, mentre il restante 20% si lega con minore affinità a CSK; quest'ultima è una chinasi di tipo SRC che svolge un ruolo inibitorio a *feed-back* sull'attività di tutte le proteine di questa famiglia. Tale interazione ha dunque, come conseguenza, anche il blocco della fosforilazione di CagA stessa [Tsutsumi *et al.*, 2003].

CagA facilita perciò doppiamente l'insediamento di *H. pylori* nella mucosa gastrica: l'apoptosi indotta attraverso SHP2 determina la perdita di cellule epiteliali con il conseguente aumento del pH luminale; d'altra parte il blocco della fosforilazione di CagA, grazie a CSK, permette al batterio di stabilire un'infezione cronica senza senza danneggiare irreversibilmente l'epitelio gastrico [Hatakeyama *et al.*, 2004].

1.1.3.7 La proteina *VacA*

Al fattore di virulenza di *H. pylori* oggetto di studio del mio progetto di ricerca ho dedicato il successivo capitolo.

1.2 VacA, citotossina vacuolizzante A

Poco dopo la scoperta di *H. pylori* Leunk *et al.* [1988] documentarono la presenza di una proteina tossica nel supernatante di coltura del batterio, in grado di indurre *in vitro* la formazione di grossi vacuoli nel citoplasma di cellule eucariotiche [Leunk *et al.*, 1988]. La proteina responsabile di questa attività fu chiamata *Vacuolating cytotoxin A*, VacA. Successivamente VacA fu purificata a partire dal mezzo di coltura di *H. pylori* e descritta come una proteina di circa 87 kDa che, in condizioni non denaturanti, forma un aggregato di circa 1000 kDa [Cover *et al.*, 1992].

La tossina purificata, quando amministrata per via orale, può indurre ulcera gastrica nel topo [Telford *et al.*, 1994; Fujikawa *et al.*, 2003; Marchetti *et al.*, 1995]. Un ulteriore studio realizzato sui gerbilli della Mongolia infettati con *H. pylori* ha dimostrato che la presenza di un gene codificante per VacA aumenta sensibilmente il rischio di formazione di ulcera gastrica [Ogura *et al.*, 2000]. Il ruolo *in vivo* di VacA deve tuttavia essere ancora elucidato. Infatti esperimenti condotti sul topo e sul gerbillo della Mongolia hanno mostrato che i ceppi di *H. pylori* che non esprimono VacA persistono nello stomaco apparentemente senza alcun problema [Eaton *et al.*, 1997; Wirth *et al.*, 1998]. Esperimenti di co-infezione realizzati sui topi hanno però dimostrato che la presenza del gene *vacA* conferisce un forte vantaggio ai ceppi selvatici rispetto a quelli *vacA*⁻ per la colonizzazione dello stomaco [Salama *et al.*, 2001].

1.2.1 Il gene *vacA*

La sequenza amminoacidica di VacA non mostra similarità con nessun'altra proteina batterica o eucariotica, mentre è molto conservata tra tutti i ceppi di *H. pylori*, suggerendo l'importanza che tale proteina riveste nella colonizzazione dello stomaco da parte del batterio [Salama *et al.*, 2001; Cover *et al.*, 2005]. Il gene *vacA* codifica per una pro-tossina di 140 kDa [Cover *et al.*, 1994; Telford *et al.*, 1994], nella quale si possono distinguere tre regioni: un peptide segnale di 33 amminoacidi all'N-terminale, che permette la traslocazione della proteina dal citosol

al periplasma attraverso il sistema di trasporto Sec; la regione centrale, che costituirà la proteina matura, e la parte C-terminale di circa 50 kDa, che si inserisce nella membrana esterna al fine di formare un poro che assicura il passaggio del resto della proteina attraverso tale membrana permettendole il raggiungimento della superficie batterica. Durante il passaggio attraverso la membrana esterna, sia la sequenza segnale all'ammino-terminale che il dominio carbossi-terminale subiscono un taglio proteolitico, e la tossina viene rilasciata come proteina matura di circa 88 kDa [Schmitt e Haas, 1994]. Circa il 50 % di VacA rimane trattenuta sulla superficie del batterio mediante la porzione C-terminale [Ilver *et al.*, 2004; Telford *et al.*, 1994]. La proteina matura è costituita da due domini, definiti p37 e p58 (rispettivamente del peso di circa 37 e 58 kDa), separati da un loop flessibile che può essere soggetto a taglio proteolitico [Telford *et al.*, 1994]. Dopo il taglio i due domini rimangono comunque associati tramite forze non covalenti [Lupetti *et al.*, 1996]. Il dominio N-terminale p37 presenta una sequenza idrofobica di 32 residui amminoacidici molto importante per l'attività citotossica della proteina. Questa sequenza permette alla tossina di inserirsi nelle membrane delle cellule bersaglio [Vinion-Dubiel *et al.*, 1999; McClain *et al.*, 2001]. Il dominio C-terminale p58 è invece responsabile dell'interazione della tossina con i recettori cellulari [Reyrat *et al.*, 1999].

1.2.2 Polimorfismo del gene *vacA*

A differenza del gene *cagA*, il gene *vacA* è presente in tutti i ceppi isolati di *H. pylori*. Tuttavia alcuni ceppi presentano un fenotipo variabile ed una particolare associazione con le malattie gastro-duodenali. Tali differenze sono la conseguenza del polimorfismo del gene *vacA* [Atherton *et al.*, 1995].

Le due sequenze più variabili corrispondono al segnale di secrezione N-terminale (regione s) e ad una porzione del dominio p58 di circa 250 amminoacidi (regione m) (**Figura 1.6, pannello A**). Esistono almeno tre tipi differenti della regione s (s1a, s1b, s2): la sequenza s1 è associata ad una tossina in grado di indurre la formazione di vacuoli; la sequenza s2, al contrario, corrisponde ad una tossina inattiva. La perdita d'attività è dovuta ad una piccola estensione di 12 amminoacidi idrofilici che rimangono all'estremità N-terminale della tossina dopo il taglio del peptide segnale [McClain *et al.*, 2001]. Tale estensione probabilmente perturba

l'inserzione di VacA nella membrana delle cellule ospiti e la formazione del poro necessario ad ottenere l'effetto citotossico. I ceppi di *H. pylori vacA s2* vengono raramente isolati da pazienti con ulcera peptica e adenocarcinomi gastrici [Atherton *et al.*, 1995; Atherton *et al.*, 1997].

La regione centrale del gene *vacA* che codifica per il dominio di interazione della tossina con le cellule (circa 300 amminoacidi) è analogamente soggetta a polimorfismo. Esistono due tipi allelici della regione m, chiamati m1 ed m2 che condividono, in questa regione, un'identità di sequenza nucleotidica del 70 % [Atherton *et al.*, 1995]. VacA codificata da un gene di tipo m2 non induce vacuolizzazione delle cellule HeLa, tuttavia risulta essere tossica per le cellule RK13 o per una coltura primaria di cellule gastriche [Pagliaccia *et al.*, 1998]. Questa specificità è dovuta all'incapacità della tossina di tipo m2 di legarsi alla superficie delle cellule HeLa. La trasfezione di tali cellule con il gene *vacA m2* permette tuttavia di ripristinarne l'attività citotossica [Pagliaccia *et al.*, 1998]. È stata proposta l'ipotesi che esiste probabilmente un recettore specifico per ciascun tipo di tossina. In tal caso, le cellule RK-13 ed HeLa esprimerebbero il recettore per la tossina m1, mentre il recettore per la tossina di tipo m2 sarebbe assente nelle cellule HeLa. Uno studio di struttura/funzione ha permesso di verificare che la specificità di legame della tossina per il recettore di tipo m1 risiede in una piccola regione di 35 amminoacidi [Ji *et al.*, 2000]. La ripartizione geografica dei tipi m1 ed m2 è globalmente differente. I ceppi m1 prevalgono in Europa e negli Stati Uniti, mentre i ceppi m2 sono maggiormente diffusi in Cina [Pan *et al.*, 1998; Covacci *et al.*, 1999; Ji *et al.*, 2002].

Tutte le combinazioni possibili s1/m1, s1/m2, s2/m1 ed s2/m2 sono state riscontrate in *H. pylori*. Tuttavia i ceppi di *H. pylori vacA s1/m1* sono quelli che sono associati al carcinoma gastrico [Kidd *et al.*, 1999; Miehleke *et al.*, 2000]. La persistenza di svariate forme del gene *vacA* in popolazioni diverse implica che ciascuna di esse offre un vantaggio. Queste forme particolari di VacA implicano diversi livelli d'interazione tra *H. pylori* e l'ospite. I ceppi che presentano meno interazioni causano meno danni all'ospite e sono meno spesso associati a malattie. Al contrario, i ceppi che interagiscono maggiormente con le cellule, anche se beneficiano di queste interazioni, le rendono maggiormente suscettibili. Il polimorfismo del gene *vacA* è un fattore di regolazione delle interazioni ospite/patogeno [Blaser *et al.*, 2004].

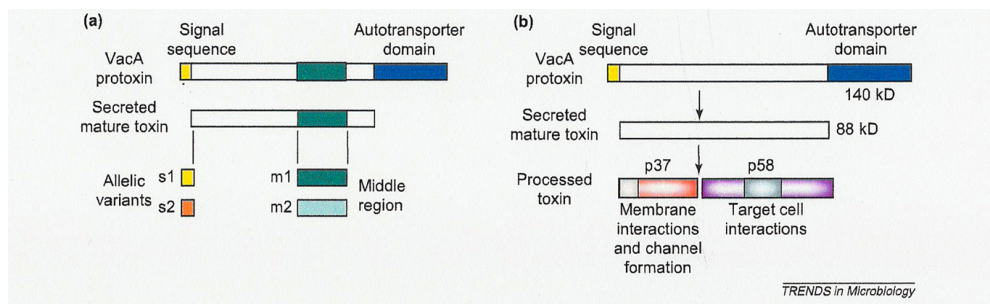


Figura 1.6. Caratteristiche strutturali di VacA. **(A)** Varianti alleliche di VacA. **(B)** Processamento della tossina [da Blanke, 2005].

1.2.3 Struttura della proteina VacA

H. pylori secreta la proteina VacA in forma matura. Una volta secreta, la tossina può essere tagliata a livello di un loop sensibile al taglio proteolitico con formazione dei domini p37 e p58 [Telford *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2004]. In condizioni non denaturanti il peso molecolare di VacA è dell'ordine di 1000 kDa, indicando che la tossina forma un oligomero [Cover *et al.*, 2003].

La struttura di tale oligomero è stata studiata grazie alla tecnica del *deep-etch electron microscopy*, che permette di evitare una fissazione chimica e di osservare la molecola in condizioni simili al suo ambiente ionico naturale [Heuser *et al.*, 1983]. Le immagini ottenute sono state utilizzate per ricostruire, tramite un metodo derivato dalla tomografia, la struttura in tre dimensioni della tossina oligomerica [Lanzavecchia *et al.*, 1998]. Gli oligomeri di VacA sono conformati a rosetta, con un diametro di 30 nm, ciascuno costituito da 6-7 monomeri (**Figura 1.7, pannello A**). Ciascun monomero è costituito da due parti, un lobo simile ad un petalo situato alla periferia della struttura sembra essere attaccato ad un anello che definisce una cavità centrale del diametro di 12 nm [Lupetti *et al.*, 1996] (**Figura 1.7, pannello B**).

Modifiche dell'anello idrofilico cambiano la struttura globale della tossina. Infatti la delezione di 16 amminoacidi all'interno della regione flessibile favorisce la formazione della struttura esamerica, poiché la si ritrova nel 70 % dell'insieme delle molecole osservate. Al contrario, all'interno di una preparazione di tossina *wild-type* (*wt*), la forma eptamerica è quella predominante (70%). La delezione di una porzione più ampia (46 amminoacidi) inibisce completamente la formazione della struttura eptamerica [Burrioni *et al.*, 1998]. Questa regione idrofila gioca dunque un ruolo

strutturale, permettendo una certa flessibilità tra le subunità p37 e p58 e favorendo l'assemblaggio di una struttura globale che ha fino a 7 monomeri.

E' stato realizzato un ceppo di *H. pylori* caratterizzato dalla presenza di un gene *vacA* deleto per la regione codificante per la subunità p37. Questo ceppo esprime e secerne nel supernatante di coltura solamente il dominio p58 in forma di dimero. La tossina troncata è priva di attività citotossica e non viene internalizzata nelle cellule epiteliali. Tuttavia, essa è in grado di legarsi alle cellule con un'affinità identica a quella della tossina *wt* (wild type), dimostrando che il legame con le cellule bersaglio dipende dal dominio p58, mentre l'attività citotossica risiede a livello della subunità p37 [Reyrat *et al.*, 1999]. L'analisi di questa tossina mutata attraverso la crio-microscopia (*deep-etch electron microscopy*) e la ricostruzione della struttura in tre dimensioni ha rivelato un'omologia strutturale sorprendente con la tossina *wt*. Inoltre, l'analisi ha mostrato che la subunità p58 assomiglia alla parte distale (o lobo) dei petali della struttura a rosetta formata dall'aggregazione dei monomeri di VacA. Ciò ha permesso, per esclusione, di definire i contorni del dominio p37 a livello dell'oligomero e di costruire un modello della struttura quaternaria di VacA. Sei o sette monomeri sono saldati tra loro per formare la struttura ad anello, il dominio p37 di ciascun monomero interagisce con la subunità p58 del monomero seguente [Reyrat *et al.*, 1999].

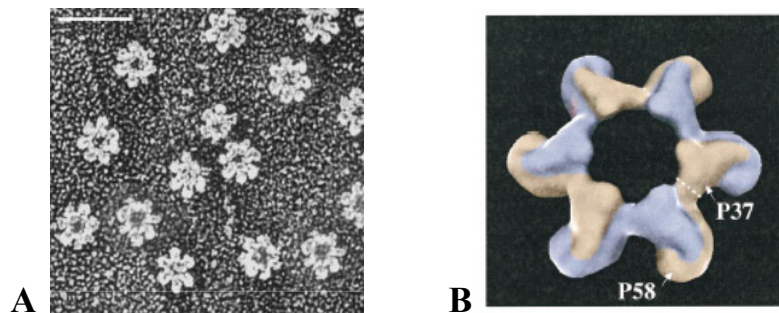


Figura 1.7. Modello che illustra gli oligomeri conformati a rosetta formati da VacA (A), e il modello d'interazione tra i monomeri della tossina nella forma oligomerica (B) [da Reyrat *et al.*, 1999].

Al contrario della tossina associata al batterio, la VacA purificata a partire dal supernatante di coltura non possiede che una debole attività citotossica [Pelicic *et al.*,

1999]. La sua esposizione a pH acido compreso tra 1.5 e 5.5 permette di aumentare fortemente la formazione dei vacuoli [de Bernard *et al.*, 1995]. Anche l'effetto dell'acido sulla tossina è stato studiato al microscopio elettronico, e ha permesso di dimostrare che a pH basso l'oligomero si dissocia, con formazione di diversi monomeri delle dimensioni di circa 14 nm [Cover *et al.*, 1997]. L'inserzione di VacA nelle membrane e la formazione di un canale selettivo per alcuni anioni è una tappa essenziale per la formazione dei vacuoli citoplasmatici indotti dalla tossina.

1.2.4 I recettori di VacA

Circa il 50 % della tossina secreta rimane associata alla superficie batterica [Ilver *et al.*, 2004]. VacA associata al batterio è attiva e non ha bisogno di trattamento con acido per indurre la formazione dei vacuoli. VacA interagisce con le cellule epiteliali attraverso un processo dipendente dal contatto di *H. pylori* con esse. L'associazione della tossina con la superficie cellulare varia in funzione della linea cellulare [Massari *et al.*, 1998]. Grazie ad esperimenti di Immunoprecipitazione sono stati identificati diversi recettori proteici di VacA.

1.2.4.1 Il recettore dell'EGF

Il recettore dell'EGF (*Epidermal Growth Factor*) è una delle molecole a cui si lega VacA. Questo recettore è presente sulla superficie delle cellule HeLa, e la sua interazione con la tossina influenza la successiva formazione dei vacuoli. È stato dimostrato infatti che l'uso di un anticorpo specifico per il recettore dell'EGF permette di ridurre il numero di cellule che formano vacuoli [Seto *et al.*, 1998]. A seguito del legame con VacA il recettore si attiva e provoca un aumento nelle cellule gastriche dell'espressione del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), un fattore associato al cancro. A ciò l'attivazione di MEK ed un aumento dell'espressione della proteina COX-2 (CycloOXygenase 2) [Caputo *et al.*, 2003].

1.2.4.2 Il recettore RPTP β

In seguito a trattamento acido o alcalino VacA incrementa, di un fattore 3, l'interazione con la superficie delle cellule gastriche tumorali AZ-521. Questo legame è reso possibile grazie alla presenza sulla superficie delle cellule di una glicoproteina di 250 kDa identificata come RPTP β (*Receptor Protein-Tyrosine Phosphatase β*) [Yahiro *et al.*, 1999]. L'espressione di RPTP β nelle cellule del rene BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*), normalmente insensibili alla tossina VacA, provoca la formazione di vacuoli [Padilla *et al.*, 2000]. Questo recettore è abbondante sulla superficie delle cellule del sistema nervoso dov'è coinvolto nella maturazione, lo sviluppo e il differenziamento dei neuroni e delle cellule della glia. Il siero fetale di vitello, che ha un effetto protettivo contro la formazione dei vacuoli indotti da VacA [de Bernard *et al.*, 1998], è un fattore che inibisce il legame della tossina a questo recettore [Kimura *et al.*, 2003]. Il trattamento delle cellule con la neuraminidasi e la O-glicosidasi blocca totalmente il legame della tossina con il recettore, suggerendo che sono presenti nel sito di legame dei motivi glicosilati, da cui deriva la formazione di acido sialico. Il dominio extracellulare del recettore (QTTQP) è essenziale per l'interazione con la tossina. La sostituzione delle Treonine, contenute in questo motivo, con delle Alanine inibisce il legame di VacA al recettore. Si suppone che questi residui amminoacidici siano i siti di O-glicosilazione, e ciò spiegherebbe la loro importanza per il legame di VacA a RPTP β [Yahiro *et al.*, 2004].

Alcune linee cellulari, come le cellule HL-60 (linea leucocitaria proveniente da una leucemia), non sono sensibili a VacA [Yahiro *et al.*, 1997]. Il loro trattamento con PMA (*Phorbol Myristic Acid*), un fattore che induce il differenziamento cellulare, rende le cellule sensibili alla tossina [de Bernard *et al.*, 1998]. Questa sensibilizzazione è associata all'attivazione dell'espressione del recettore RPTP β e alla sua presenza sulla superficie cellulare [Padilla *et al.*, 2000]. L'interferon γ e la vitamina D₃, che sono analogamente dei fattori di differenziamento cellulare per le cellule HL-60, producono lo stesso effetto.

L'amministrazione di VacA per via orale provoca lo sviluppo di ulcere gastriche nel topo [Telford *et al.*, 1994; Marchetti *et al.*, 1995]. Tuttavia, dopo l'amministrazione della tossina, topi geneticamente modificati che non esprimono il recettore RPTP β (*rptp β ^{-/-}*) non presentano perdita di cellule epiteliali come osservato nei topi selvatici [Fujikawa *et al.*, 2003]. L'incubazione di una coltura primaria di

cellule gastriche con la tossina provoca il distacco di tali cellule dal loro supporto artificiale (Matrigel®). Al contrario, le cellule che non esprimono RPTPβ non subiscono questo effetto. Questi risultati suggeriscono che VacA provoca ulcera gastrica legandosi e probabilmente attivando RPTPβ. Il legame di VacA al recettore provoca la fosforilazione dei residui di Tirosina della proteina Git1, una molecola che controlla l'adesione cellulare e l'organizzazione del citoscheletro [Fujikawa *et al.*, 2003]. Curiosamente, il livello di vacuolizzazione non è diverso tra le cellule gastriche *rptpβ^{+/+}* ed *rptpβ^{-/-}*, e VacA viene internalizzata dalle cellule nello stesso modo dopo la somministrazione orale. Ciò dimostra che l'ulcera è un evento indipendente dalla formazione dei vacuoli e che un altro recettore, che consente l'internalizzazione della tossina, è presente sulla superficie delle cellule gastriche di topo [Fujikawa *et al.*, 2003].

1.2.4.3 Il recettore RPTPα

Esperimenti di Immunoprecipitazione realizzati su lisati di cellule gastriche AZ-521 hanno permesso di identificare un'altra proteina di superficie in grado di legare la tossina VacA [Yahiro *et al.*, 1997]. Questo recettore di 140 kDa è stato identificato come la proteina RPTPα (*Receptor Protein-Tyrosine Phosphatase α*). Al contrario di RPTPβ, RPTPα è un recettore ubiquitario. La sua presenza sulla superficie delle cellule di rene G401 spiega come mai tali cellule, benché sprovviste del recettore RPTPβ, siano sensibili alla tossina [Yahiro *et al.*, 2003]. Come per RPTPβ, la presenza di acido sialico è importante per il legame di VacA e la modificazione del motivo di glicosilazione da parte della neuraminidasi induce una diminuzione dell'effetto citotossico oltre al mancato legame della tossina con il recettore [Yahiro *et al.*, 2003].

1.2.4.4 I microdomini di membrana

Ad eccezione dei recettori sopraccitati, VacA si lega anche a dei microdomini di membrana resistenti ai detergenti, definiti “*lipid rafts*”. Queste zattere lipidiche

sono arricchite in colesterolo, sfingolipidi e GPI-AP (*GlycosylPhosphatidyInositol-Anchored Proteins*). Diverse tossine batteriche come la tossina di *Vibrio cholerae*, l'aerolisina di *Aeromonas hydrophila*, e la tossina tetanica utilizzano questi domini sia per il loro legame e la loro oligomerizzazione sulla superficie delle cellule ma anche come sito di internalizzazione. L'estrazione del colesterolo dalla membrana plasmatica riduce in maniera significativa l'entrata di VacA e la formazione di vacuoli nelle cellule bersaglio [Patel *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 2003]. L'aggiunta di colesterolo, al contrario, incrementa l'effetto vacuolizzante [Patel *et al.*, 2002].

Per quanto riguarda il coinvolgimento delle GPI-AP nell'internalizzazione di VacA, i risultati ottenuti sono controversi. Alcuni studi hanno dimostrato che il trattamento delle cellule con una fosfolipasi C specifica per il fosfatidilinositolo blocca la formazione dei vacuoli ma non impedisce il legame della tossina ai *raft* lipidici [Kuo *et al.*, 2003; Ricci *et al.*, 2000]. Tuttavia le GPI-AP sono necessarie per la formazione del poro formato dalla tossina sulla superficie di membrana [Gauthier *et al.*, 2004]. Questi studi suggeriscono un possibile coinvolgimento delle GPI-AP per l'entrata della tossina nella cellula.

Al contrario, una linea cellulare mutante, incapace di produrre proteine ancorate alla superficie tramite il glicosil-fosfatidil-inositolo, presenta una sensibilità a VacA paragonabile a quella delle cellule *wt*. Inoltre non è stata osservata alcuna differenza nell'incorporazione della tossina dalle cellule, supponendo che le GPI-AP non siano coinvolte nel processo di internalizzazione [Schraw *et al.*, 2002].

Dopo la sua associazione con la membrana delle cellule bersaglio VacA viene internalizzata tramite un processo che è indipendente dalla formazione di vescicole coperte da clatrina [Ricci *et al.*, 2000]. La formazione delle vescicole di endocitosi coperte da clatrina richiede la presenza della dinamina. Cellule HeLa che esprimono in maniera costitutiva un mutante dominante negativo della dinamina sono infatti in grado di incorporare la tossina, dimostrando che VacA non utilizza vescicole di clatrina [Suzuki *et al.*, 2001]. L'endocitosi della tossina è un processo actina-dipendente, poiché il pre-trattamento delle cellule con la citocalasina D, una droga che impedisce la formazione dei microfilamenti, abolisce la formazione dei vacuoli [Ricci *et al.*, 2001]. La citocalasina D non ha tuttavia alcun effetto sul legame della tossina con i *raft* lipidici [Gauthier *et al.*, 2004]. Una volta avvenuta l'endocitosi VacA co-localizza con la fasciclina I, una GPI-AP che utilizza la via d'entrata dei *raft*

lipidici in cellule CHO (*Chinese Hamster Ovary*) modificate per sovraesprimere in maniera costitutiva questa proteina [Kuo *et al.*, 2003].

1.2.5 Attività di VacA

Dal momento che è in grado di indurre disparati effetti citotossici nei diversi tipi cellulari con cui entra in contatto, VacA è stata proposta come esempio di tossina multifunzionale [Cover et Blanke, 2005]; di seguito vengono descritte le principali attività della tossina che contribuiscono in modo determinante alla capacità di H. pylori di insediarsi nell'ospite.

1.2.5.1 VacA forma canali anione-selettivi su membrane lipidiche

In un doppio strato lipidico artificiale [Iwamoto *et al.*, 1999; Czajkowsky *et al.*, 1999; Tombola *et al.*, 1999], oltre che nella membrana plasmatica delle cellule epiteliali [Szabo *et al.*, 1999], gli oligomeri di VacA formano un canale di membrana selettivo per gli ioni. Questo poro è selettivo per gli anioni con la seguente scala di permeabilità relativa: $\text{Cl}^- = \text{HCO}_3^- > \text{piruvato} > \text{gluconato} > \text{K}^+ = \text{Li}^+ = \text{Ba}^{2+} > \text{NH}_4^+$ [Szabo *et al.*, 1999]. La conseguente depolarizzazione della membrana è una tappa necessaria per la formazione di vacuoli citoplasmatici in quanto l'aggiunta di un inibitore specifico per il canale del cloro come l'NPPB (*5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid*) blocca l'effetto citotossico di VacA [Szabo *et al.*, 1999; Tombola *et al.*, 1999].

Forme mutanti della proteina VacA prive della regione idrofobica N-terminale, o caratterizzate dalla sostituzione di alcuni residui amminoacidici specifici di questa regione, formano un canale di membrana difettoso e si sono rivelate incapaci di indurre la formazione di vacuoli [Vinion-Dubiel *et al.*, 1999; McClain *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2000]. Infatti, all'interno di questa sequenza idrofobica si è rivelata particolarmente importante la conservazione di tre motivi GXXXG, definiti da residui di Glicina, che si sono dimostrati di particolare importanza e che nella catena polipeptidica ricoprono le posizioni 14, 18, 22 e 26. Sono state studiate forme mutanti della tossina, caratterizzate dalla sostituzione dei suddetti residui di Glicina, o del residuo di Prolina in posizione 9, con residui di Alanina (es. G14A, P9A), Le

evidenze sperimentali indicano che i mutanti G14A, G18A e P9A sono incapaci di formare oligomeri in membrana, ma possono soltanto oligomerizzare in soluzione: questo comporta l'incapacità di tali tossine mutate di formare canale, e di indurre effetti citotossici quali la depolarizzazione della membrana cellulare e la vacuolizzazione in cellule HeLa [McClain et al., 2003].

Le proprietà del poro formato da VacA variano in funzione del ceppo di *H. pylori*. Nonostante la struttura rimanga identica, sono state osservate differenze di conduttanza e di selettività per gli anioni tra le tossine di tipo m1 ed m2. Anche le dimensioni dell'anello idrofilico influenzano le proprietà del canale. Una delezione di 46 amminoacidi in questa regione favorisce la formazione di strutture esameriche e diminuisce la conduttanza dell'ordine del 23 % [Tombola et al., 2001; Burrioni et al., 1998].

La predizione *in silico* della struttura di VacA inserita in membrana ha mostrato una sua omologia strutturale con un poro selettivo per gli anioni la cui struttura è conosciuta, la proteina MscS (*Mechanosensitive channel of small conductance*) di *Escherichia coli*. Questo studio ha proposto che la selettività di VacA per gli anioni dipenda dalla presenza al centro del poro di un residuo carico positivamente, la Lisina situata in posizione 33 nella sequenza primaria della tossina matura [Kim et al., 2004].

Dall'attività di canale di VacA dipendono altri effetti citotossici indotti dalla tossina, come l'aumento della permeabilità di monostrati epiteliali polarizzati, la vacuolizzazione cellulare e l'apoptosi.

1.2.5.2 VacA aumenta la permeabilità di monostrati epiteliali

I monostrati epiteliali polarizzati sono caratterizzati da un'elevata impermeabilità determinata dalla presenza di *tight junctions* (giunzioni strette) che sigillano cellule adiacenti. Una misura di tale impermeabilità è la cosiddetta resistenza transepiteliale o TER. Quando la tossina VacA attivata a pH acido viene aggiunta alla parte apicale di monostrati epiteliali polarizzati ottenuti con cellule MDCK (cellule di rene di cane), la TER decade rapidamente da valori di 8000-10000 Ohm x cm² a 1000-1500 Ohm x cm² e mantiene questi bassi valori per parecchi giorni

[Papini *et al.*, 1998]. In parallelo, la permeabilità paracellulare a piccole molecole organiche (ad es. mannitolo e saccarosio) e ad ioni come Fe^{3+} e Ni^{2+} aumenta. Batteri vivi, posti a contatto con la superficie apicale delle cellule che costituiscono il monostrato epiteliale causano lo stesso aumento di permeabilità contrariamente a batteri difettivi nella proteina VacA [Pelicic *et al.*, 1999]. Questi risultati suggerirebbero un possibile ruolo di VacA nell'aumentare il rifornimento di nutrienti essenziali necessari per la crescita del batterio adeso alle cellule epiteliali della mucosa gastrica [Papini *et al.*, 1998; Montecucco *et al.*, 1999].

Attraverso quale meccanismo VacA induca il calo della resistenza transepiteliale non è ben chiarito tuttavia, dal momento che inibitori dell'attività di canale riducono almeno parzialmente tale effetto sugli epitelii [Szabo *et al.*, 1999], è legittimo pensare che il canale anionico formato dalla VacA abbia un ruolo chiave in questo processo.

1.2.5.3 Vacuolizzazione cellulare

In presenza di ioni ammonio o di ammine permeanti VacA induce la formazione di “vacuoli” intracellulari delimitati da membrane, che compaiono inizialmente nella zona perinucleare, per poi aumentare in numero occupando l'intera cellula. Tali vacuoli costituiscono dei compartimenti acidi, in relazione alla presenza sulla loro membrana di una pompa protonica vacuolare (v-ATPasi), la cui attività è essenziale, oltre che per la formazione, anche per il mantenimento di queste strutture: l'inibizione della pompa da parte di farmaci specifici come le bafilomicine impedisce, infatti, l'insorgenza del fenotipo vacuolizzato e ne induce la regressione [Papini *et al.*, 1996]

Il dominio responsabile della vacuolizzazione risiede nella regione N-terminale della tossina. Infatti l'espressione della subunità p37 associata a 116 residui amminoacidici collocati in posizione N-terminale del dominio p58 è sufficiente per ottenere l'effetto citotossico [Ye *et al.*, 1999]. Tuttavia, per ottenere un livello di vacuolizzazione paragonabile a quello indotto dalla tossina intera è necessario un dominio più vasto [de Bernard *et al.*, 1998b]. Inoltre i domini p37 e p58, anche se espressi indipendentemente l'uno dall'altro nel citoplasma delle cellule, possono associarsi e formare una tossina funzionale [Ye *et al.*, 2002; Willhite *et al.*, 2002].

I vacuoli sono capaci di incorporare marcatori di fase fluida presenti nel mezzo extracellulare e presentano sulla loro membrana proteine marcatrici sia di endosomi tardivi che di lisosomi [Molinari *et al.*, 1997; de Bernard *et al.*, 2002]. Chiara è la presenza sulla membrana dei vacuoli di Rab7, piccola GTPasi monomerica coinvolta nella regolazione del traffico vescicolare degli endosomi tardivi [Papini *et al.*, 1997]. L'insieme di queste osservazioni ha suggerito un'origine tardo-endosomiale dei vacuoli. Il riarrangiamento di endosomi e lisosomi attraverso successivi eventi di fusione di membrane non prevede, tuttavia, il coinvolgimento delle proteine SNARE come mediatrici, normalmente essenziali per il riconoscimento e la fusione delle membrane [de Bernard *et al.*, 2002].

Accanto alla vacuolizzazione un'altra conseguenza dell'alterazione indotta da VacA a carico dei compartimenti endo-lisosomiali riguarda il traffico delle idrolasi acide che sono prodotte nel reticolo endoplasmatico come pre-pro-enzimi e poi direzionate attraverso il Golgi agli endosomi tardivi, dove vengono convertite nei corrispondenti enzimi attivi. In cellule esposte a VacA solo una piccola quantità di catepsina D raggiunge i lisosomi, mentre la restante viene espulsa nel mezzo esterno sotto forma di precursore [Satin *et al.*, 1997]. In questo modo nel lume acido dello stomaco tali precursori possono essere convertiti nella forma attiva, e quindi degradare lo strato protettivo di muco aumentando la permeabilità a ioni e nutrienti per la crescita batterica. Il mancato processamento di tali proteine può essere giustificato con il fatto che la tossina neutralizza parzialmente il pH acido dei compartimenti cellulari [de Bernard *et al.*, 2004]. Recentemente uno studio realizzato senza aggiunta di basi deboli nel mezzo di coltura ha permesso di descrivere un fenomeno mascherato dallo sviluppo dei vacuoli. È stato dimostrato che l'intossicazione delle cellule da parte di VacA provoca un raggruppamento ed una ridistribuzione degli endosomi tardivi in una regione che circonda il nucleo della cellula [Li *et al.*, 2004]. L'aggregazione degli endosomi è un fenomeno controllato da Rab7 mentre la loro ri-distribuzione sembra necessitare di un citoscheletro di microtubuli funzionale.

1.2.5.3.1 Il rigonfiamento dei compartimenti acidi

A livello degli endosomi tardivi e dei lisosomi l'ATPasi vacuolare genera un gradiente di protoni che progressivamente abbassa la propria attività. Infatti il voltaggio positivo generato dai protoni inibisce l'attività dell'ATPasi. Gli ioni Cloruro permettono di neutralizzare le cariche positive dei protoni e di mantenere l'elettroneutralità. VacA forma un canale selettivo per gli ioni Cl⁻ nelle membrane degli endosomi e dei lisosomi, e contribuisce ad attivare l'ATPasi vacuolare e il pompaggio dei protoni. Ciò porta ad un accumulo nel lume di questi compartimenti di basi deboli presenti nel mezzo di coltura, ed in particolare dell'ammoniaca, un prodotto della degradazione dell'urea. L'ammoniaca viene protonata e forma degli ioni ammonio NH₄⁺, che inducono un aumento della pressione osmotica. Il flusso d'acqua generato porta al rigonfiamento degli endosomi ed alla formazione dei vacuoli.

1.2.6 Il poro formato da VacA permette il passaggio di nutrienti

Oltre alla formazione dei vacuoli VacA produce effetti multipli sulle cellule in coltura. Tuttavia la questione riguardante l'attività di VacA *in vivo* ed il vantaggio che *H. pylori* avrebbe nel produrre e secernere questa proteina, permane. I mutanti isogenici di *H. pylori vacA⁻* sono in grado di colonizzare lo stomaco del gerbillo della Mongolia [Eaton *et al.*, 1997; Wirth *et al.*, 1998], ma i ceppi che producono VacA sono avvantaggiati rispetto ai ceppi mutanti in termini di competizione [Salama *et al.*, 2001].

E' stato dimostrato che VacA si inserisce preferenzialmente nella membrana apicale delle cellule polarizzate, rendendole permeabili all'urea [Tombola *et al.*, 2001]. Si tratta di un flusso passivo che può essere bloccato dall'NPPB, ma anche dalla floretina, un bloccante del trasporto dell'urea.

L'idrolisi dell'urea genera bicarbonato ed ammoniaca, che permette ad *H. pylori* di neutralizzare il pH dell'ambiente circostante. L'ammoniaca è analogamente utilizzata come fonte d'Azoto per la produzione di amminoacidi. Permeabilizzando le membrane delle cellule epiteliali VacA permetterebbe ad *H. pylori* di ovviare al problema delle variazioni della concentrazione di urea nello stomaco.

L'urea è anche una molecola chemotattica per *H. pylori* e si rivela essere un fattore essenziale per la colonizzazione e la sua persistenza nello stomaco [Mizote *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1998]. Un'ipotesi riguardante l'attività di VacA *in vivo* è che la tossina potrebbe servire da "sonda" ad *H. pylori* per ricercare le cellule ospiti ed indirizzarsi verso di loro grazie al rilascio di urea.

L'urea non è l'unica molecola in grado di attraversare le membrane utilizzando il poro formato da VacA. Anche se il poro risulta essere selettivo soprattutto per gli ioni Cloruro, esso permette ugualmente il passaggio di ioni carbonato e di piccole molecole organiche come il piruvato ed il gluconato [Tombola *et al.*, 1999]. Ciò suggerisce che i batteri legati alla superficie delle cellule gastriche utilizzano VacA per permeabilizzare la membrana apicale ed ottenere i nutrienti che sono loro necessari [Mendz *et al.*, 1994]. Rendere permeabili le membrane delle cellule non è l'unico mezzo utilizzato da *H. pylori* per ottenere dei nutrienti, poiché la colonizzazione dell'epitelio gastrico provoca ugualmente l'apertura delle *tight junctions* della mucosa [Terres *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2002].

1.2.7 Modulazione del sistema immunitario

La capacità di CagA di alterare la morfologia dell'epitelio intestinale nei siti di infezione di *H. pylori* determina la distruzione delle giunture strette tra le cellule epiteliali [Amieva *et al.*, 2003]. Tale permeabilizzazione permette a VacA di penetrare al di sotto degli epiteli mucosali dove ha la possibilità di venire a contatto con un gran numero di cellule del sistema immunitario delle quali è in grado di modulare le funzioni.

Attività immunosoppressiva: l'indebolimento del sistema endo-esocitico della cellula dovuto alla presenza di VacA ha risvolti anche nel sistema immunitario, ed in particolare altera la capacità di presentazione dell'antigene da parte dei linfociti T [Molinari *et al.*, 1998]. E' stato osservato che ceppi di *H. pylori* esprimenti VacA interrompono la maturazione del fagosoma nei macrofagi, impedendo l'uccisione dei batteri e la presentazione antigenica [Zheng *et al.*, 2003]. L'attività di VacA ha anche effetti diretti; se aggiunta al terreno di coltura di cellule Jurkat, infatti, inibisce la produzione di interleuchina 2, necessaria per la sopravvivenza e la proliferazione dei

linfociti T, e determina una diminuzione dell'espressione del suo recettore [Boncristiano *et al.*, 2003; Gebert *et al.*, 2003; Sundrud *et al.*, 2004].

E' stato recentemente scoperto che la tossina inibisce l'attivazione dei linfociti T attraverso due meccanismi indipendenti (**Figura 1.8**): da una parte, la creazione del canale depolarizza la membrana plasmatica e impedisce il normale flusso di calcio nella cellula, inibendo l'attivazione dell'NFAT, un fattore trascrizionale richiesto per l'attivazione dei linfociti T. Il secondo meccanismo, indipendente dalla formazione del canale, coinvolge l'attivazione della cascata di trasduzione che passa attraverso le MAP chinasi e porta ad un riarrangiamento del citoscheletro che inibisce la proliferazione dei linfociti T [Boncristiano *et al.*, 2003]. Gli effetti anti-proliferativi esercitati da VacA impediscono l'espansione clonale dei linfociti T, che potrebbero essere stati attivati in precedenza dalla presenza del batterio, permettendo a quest'ultimo di eludere la risposta immunitaria dell'ospite.

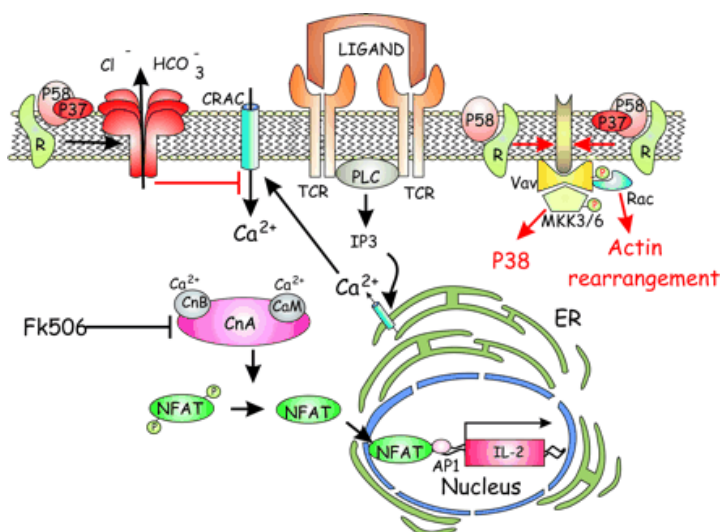


Figura 1.8. VacA inibisce l'attivazione dei linfociti T attraverso due meccanismi [da Montecucco *et de* Bernard, 2003].

Attività pro-infiammatoria: VacA non ha solamente effetti immunosoppressori ma anche pro-infiammatori; è stato infatti dimostrato che la tossina somministrata oralmente ai topi determina l'infiammazione acuta della mucosa gastrica e che, in mastociti in coltura, stimola il rilascio di citochine proinfiammatorie come il TNF α e l'interleuchina 6 [Supajatura *et al.*, 2002]. de Bernard *et al.* (2005) hanno inoltre verificato che la tossina induce oscillazioni nella concentrazione del calcio intracellulare in cellule RBL-2H3 (linea cellulare

stabilizzata di basofili tumorali di ratto), con la conseguente degranulazione delle cellule e il rilascio di mediatori proinfiammatori.

Le attività pro-infiammatoria e immunosoppressiva di VacA sembrano, a prima vista, contraddittorie. In realtà, costituiscono entrambe una strategia di sopravvivenza di *H. pylori*, che si è evoluto in modo da provocare un'infezione cronica per poter vivere in una nicchia povera di sostanze nutritive. La sua presenza determina, infatti, l'instaurarsi di un'inflammatione leggera e molto localizzata della mucosa dello stomaco; tale infiammazione permette il rilascio di nutrienti utili alla crescita del batterio, che non potrebbero essere ottenuti in altro modo vista la limitata permeabilità della mucosa. D'altra parte, la capacità di VacA di inibire la stimolazione del sistema immunitario adattativo consente ad *H. pylori* di perpetuare per lungo tempo l'infezione dello stomaco rendendola cronica [Montecucco *et de* Bernard, 2003].

Come già detto, dall'attività di canale di VacA dipende un'altra importante proprietà della tossina, che consiste nella sua capacità di indurre morte cellulare.

1.3 Apoptosi

L'apoptosi, ovvero la morte cellulare programmata, è un processo che regola tutta la vita dell'organismo a partire dallo sviluppo embrionale. Esso è essenziale per garantire il corretto differenziamento cellulare nei diversi tessuti oltre che per mantenere l'omeostasi cellulare di tutti gli organismi pluricellulari, decretando la morte di miliardi di cellule per lasciare il posto a quelle di nuova formazione [Vaux *et* Korsmeyer, 1999]. Inoltre, ogni qualvolta che un danno rischia di manomettere gravemente la funzionalità di una cellula, questa viene irrimediabilmente avviata al suicidio per evitare che l'errore si trasmetta alla progenie e si diffonda nell'organismo.

Le vie di segnale dell'apoptosi sono geneticamente conservate [Hengartner *et al.*, 2000] e le loro alterazioni sono coinvolte in un gran numero di patologie umane, dalle neoplasie alle malattie neurodegenerative [Thompson *et al.*, 1995].

1.3.1 Morfologia della cellula apoptotica

Da un punto di vista morfologico e strutturale la cellula apoptotica perde rapidamente volume condensandosi, si stacca dalle cellule vicine perdendo le specializzazioni di membrana ed esponendo componenti normalmente nascosti o poco espressi della membrana plasmatica, come ad esempio la fosfatidilserina. Successivamente si assiste all'addensamento della cromatina, la frammentazione del nucleo e del DNA, la vescicolazione del citoplasma con conseguente suddivisione della cellula in corpi apoptotici. Grazie alla presenza dei particolari epitopi che li caratterizzano, quest'ultimi vengono riconosciuti dalle cellule vicine, che operano la fagocitosi della cellula morente. A differenza della morte cellulare per necrosi, il processo apoptotico non è associato ad un evento acuto infiammatorio dal momento che non c'è perdita del contenuto citoplasmatico nell'ambiente extracellulare (**Figura 1.9**).

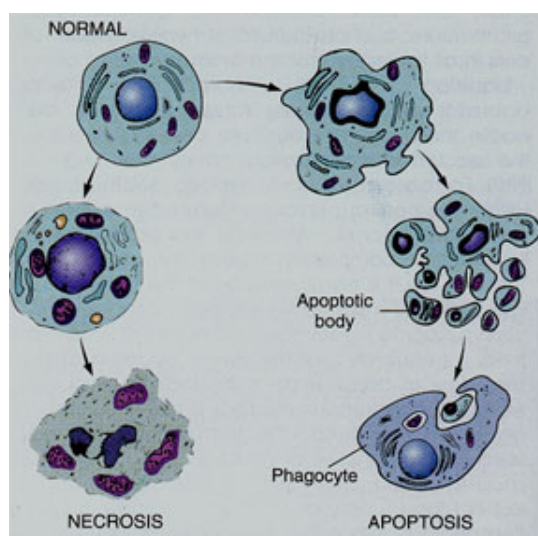


Figura 1.9. Aspetti morfologici dell'apoptosi e della necrosi.

1.3.2 La via apoptotica mitocondriale

In risposta ai diversi stimoli pro-apoptotici si possono attivare due vie di segnale, che in alcuni tipi cellulari possono essere interconnesse: la via recettoriale e la via mitocondriale. Ambedue le vie culminano nell'attivazione delle caspasi, proteasi cisteiniche che tagliano un gran numero di substrati coinvolti nell'integrità

del citoscheletro, del nucleo, nella progressione del ciclo cellulare e nella riparazione del DNA [Thornberry *et* Lazebnik, 1998].

Oltre alla loro importanza nel metabolismo, i mitocondri costituiscono dei sensori per la salute della cellula venendo regolati da fattori pro- ed anti-apoptotici. Nelle cellule di Mammifero il processo apoptotico dipendente dai mitocondri individua tre fasi distinte:

1. Durante la prima fase (*fase d'iniziazione*), la cellula riceve lo stimolo apoptotico primario, che può essere costituito anche da fattori citotossici prodotti da batteri patogeni. Tale segnale viene amplificato all'interno della cellula attraverso l'accumulo e l'azione di messaggeri secondari, come le proteine Bcl-2 e alcune caspasi.
2. In secondo luogo (*fase di decisione*) si ha la permeabilizzazione delle membrane mitocondriali (MMP); la rottura della membrana interna (IMMP) ha come risultato il dissipamento del potenziale trans-membrana ($\Delta\psi_m$), con conseguente perdita della capacità di sintesi di ATP. La permeabilizzazione della membrana esterna (OMMP) determina, invece, il rilascio, dallo spazio inter-membrana verso il citosol, di diverse proteine effettrici, tra cui il citocromo *c* e la pro-caspasi 3.
3. La terza fase, *di esecuzione*, è caratterizzata dall'attivazione delle idrolasi cellulari (caspasi e nucleasi) responsabili dei danni morfologici che caratterizzano la cellula apoptotica.

1.3.3 Ruolo delle proteine della famiglia di Bcl-2 nell'apoptosi

Le proteine della famiglia di Bcl-2 costituiscono potenti regolatori dell'apoptosi che coinvolge la via mitocondriale e comprendono membri che inducono il rilascio di citocromo *c* e altri che lo contrastano. Tali proteine possiedono dei domini in α -elica conservati nella sequenza primaria (domini Bcl-homology, BH); i membri anti-apoptotici (Bcl-2, Bcl-X_L) presentano omologia di sequenza in tutti i domini di omologia Bcl-2 (BH 1-4). Le proteine Bcl-2 pro-apoptotiche possono invece essere suddivise in membri "multidominio" (Bax, Bak) con omologia nei domini BH 1-3, e in membri "BH3-only" (Bid, Bad), che presentano omologia di sequenza solamente nell' α -elica anfipatica di cui è costituito il dominio BH3 [Gross *et al.*, 1999] (**Figura 1.10**).

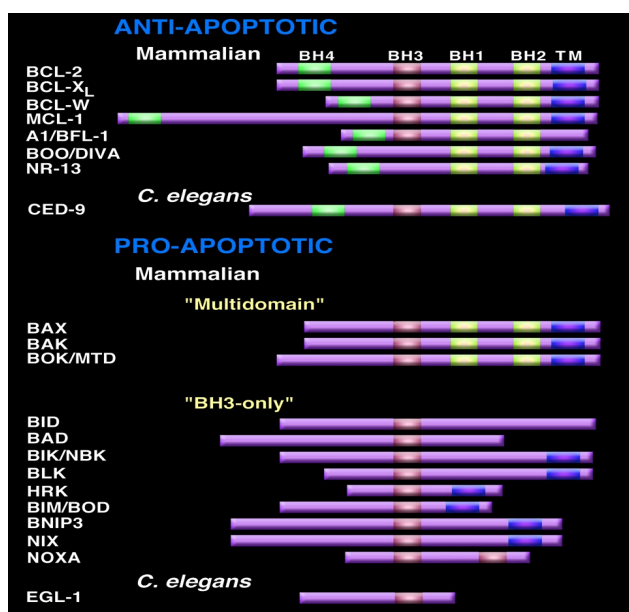


Figura 1.10. Schema dei membri anti- e pro-apoptotici della famiglia di Bcl-2 [da Scorrano *et* Korsmeyer, 2003].

In risposta a segnali apicali apoptotici, le proteine “BH3-only” subiscono diverse modificazioni post-traduzionali che determinano la loro attivazione e traslocazione al mitocondrio. Non sono stati ancora chiariti i precisi meccanismi molecolari che permettono alle proteine di Bcl-2 di determinare il rilascio di citocromo *c* dal mitocondrio; secondo un modello ampiamente accettato le proteine BH3-only, una volta attivate, fungono da ligandi per le proteine di Bcl-2 multidominio, inducendone l’oligomerizzazione e causando infine il rilascio di citocromo *c* dai mitocondri [Cheng *et al.*, 2001]. Quest’evento si accompagna all’insorgenza di disfunzione mitocondriale, con perdita del potenziale di membrana mitocondriale [Scorrano *et* Korsmeyer, 2003].

Al contrario, le proteine di Bcl-2 anti-apoptotiche sequestrano le proteine “BH3-only” prevenendo l’attivazione della via apoptotica mitocondriale [Cheng *et al.*, 2001]. In presenza di uno stimolo apoptotico, dunque, la sensibilità o la resistenza della cellula viene dettata dal rapporto tra le concentrazioni relative dei vari membri della famiglia all’interno della cellula stessa.

1.3.4 Le proteine pro-apoptotiche Bax e Bak

L'attivazione dell'apoptosi attraverso il recettore Fas o TNF determina l'attivazione di una "caspasi iniziatrice", la caspasi 8, che agisce sulla proteina citosolica Bid appartenente alla famiglia Bcl-2, determinandone il taglio proteolitico. Il frammento risultante, tBid, viene attivato mediante la mistirilazione del suo amminoacido N-terminale: tale modificazione determina l'attivazione delle proteine pro-apoptotiche Bax e Bak, processo che implica l'esposizione di epitopi normalmente nascosti nelle forme non attive, e la loro successiva omo-oligomerizzazione sulla membrana mitocondriale esterna [Wei *et al.*, 2001; Antonsson *et al.*, 2000]. Bax e Bak differiscono nella loro localizzazione cellulare prima dello stimolo apoptotico; Bak è prevalentemente una proteina integrale della membrana mitocondriale esterna, mentre Bax, nelle cellule vitali, è una proteina monomerica citosolica o debolmente associata alle membrane intracellulari [Scorrano *et Korsmeyer*, 2003]. L'attivazione di Bax durante l'apoptosi implica l'esposizione della regione idrofobica C-terminale [Nechushtan *et al.*, 1999], la sua traslocazione al mitocondrio [Wolter *et al.*, 1997] e la sua integrazione in membrana mediante tale epitopo [Goping *et al.*, 1998].

La formazione degli oligomeri di Bax e Bak sulla membrana mitocondriale esterna determina la permeabilizzazione della membrana stessa, con il conseguente rilascio di citocromo *c* e di altri messaggeri pro-apoptotici. Il citocromo *c* nel citosol si lega ad Apaf-1, anch'esso rilasciato dal mitocondrio, ed alla pro-caspasi 9, attivandola: viene così innescata la cascata proteolitica che culmina nell'apoptosi (**Figura 1.11**).

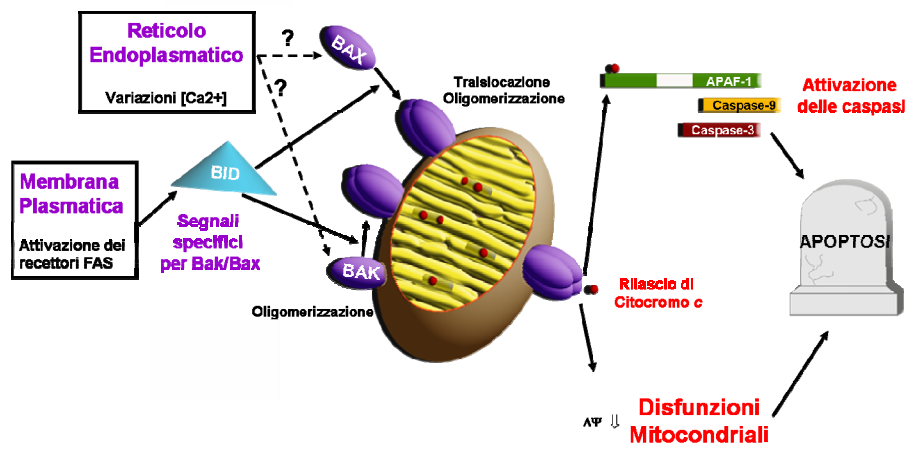


Figura 1.11. Via apoptotica mitocondriale mediata da Bax e Bak.

Varie ipotesi concorrono nel tentativo di spiegare gli eventi molecolari che determinano tale permeabilizzazione; è possibile, infatti, che gli oligomeri di Bax e Bak siano in grado di formare dei pori attraverso i quali potrebbero passare il citocromo *c* e gli altri messaggeri. D'altra parte si è ipotizzato che l'interazione delle proteine pro-apoptotiche con proteine residenti nel mitocondrio, come VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) o ANT (*Adenine Nucleotide Translocase*), determini l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (PTP), un canale di membrana finemente regolato in grado di far passare soluti di dimensioni maggiori a 1500 Da. Sta inoltre prendendo piede l'idea che Bax e Bak interagiscano preferenzialmente con alcuni tipi di fosfolipide: ciò determinerebbe una deformazione del doppio strato lipidico con la conseguente formazione di canali strutturati da proteine e lipidi [Scorrano *et Korsmeyer*, 2003].

Apparentemente le attività svolte da Bax e Bak risultano ridondanti tuttavia, mentre la forma attivata di Bax ha una forte tendenza a formare omo-oligomeri, Bak preferenzialmente forma eterodimeri con le proteine di Bcl-2 anti-apoptotiche regolando negativamente il loro ruolo di stabilizzatori della membrana mitocondriale [Degli Esposti *et Dive*, 2003].

1.3.5 Le proteine Bax e Bak controllano la concentrazione di Calcio nel reticolo endoplasmatico

Crescenti evidenze sperimentali indicano che la famiglia di proteine Bcl-2 controlli oltre alla via apoptotica mitocondriale anche quella che vede il coinvolgimento del reticolo endoplasmatico grazie alla regolazione della concentrazione di Calcio al suo interno. Il processo apoptotico può infatti essere indotto dalle oscillazioni di Calcio nei compartimenti cellulari ed in particolare nel reticolo endoplasmatico, l'organello che racchiude le più grosse riserve di Calcio nella cellula. La mobilitazione delle riserve reticolari di Calcio, indotta da particolari stimoli mediati dal rilascio di inositolo-tri-fosfato, ha come effetto la diretta attivazione del *pathway* apoptotico citosolico mediato dalla caspasi 12 [Breckenridge *et al.*, 2003]. Il massiccio rilascio di Calcio determina inoltre un aumento del suo importo nei mitocondri: tale processo permette da un lato di regolare la durata e l'intensità delle oscillazioni nella concentrazione citosolica di Calcio, d'altra parte modula la permeabilità della membrana mitocondriale, con conseguente rilascio di fattori apoptotici [Oakes *et al.*, 2005].

Le proteine pro-apoptotiche Bax e Bak localizzano sia nel mitocondrio che a livello delle membrane reticolari (circa il 15 %) ed è stato dimostrato che la loro sovraespressione promuove la mobilitazione di Calcio dal reticolo endoplasmatico verso i mitocondri durante l'apoptosi. Al contrario, cellule knock-out per queste due proteine mostrano una drammatica riduzione della concentrazione di Calcio nel reticolo e di conseguenza un ridotto approvvigionamento di tale ione nei mitocondri; le cellule prive di Bax e Bak mostrano perciò una ridotta sensibilità agli stimoli apoptotici Calcio-mediati [Oakes *et al.*, 2005]. Resta tuttavia da chiarire il meccanismo molecolare attraverso il quale tali proteine modulino la concentrazione di Calcio nel reticolo.

1.4 VacA e apoptosi

Molti studi correlano la presenza di *H. pylori* ad un aumento del tasso di apoptosi nelle cellule della mucosa gastrica [Moss *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1997]. La capacità di *H. pylori* di indurre apoptosi è stata anche osservata nel topo [Houghton *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002] e nel gerbillo della Mongolia [Peek *et al.*, 2000].

Sono stati utilizzati sistemi di coltura cellulare per identificare i fattori di *H. pylori* che inducono apoptosi. Questi studi hanno dimostrato che l'ureasi [Fan *et al.*, 2000], i prodotti dell'isola di patogenicità *cag* [Peek *et al.*, 1999] ed il lipopolisaccaride [Kawahara *et al.*, 2001] contribuiscono al processo. È stato dimostrato che l'ureasi si lega all'MHC di classe II ed induce apoptosi nelle linee cellulari epiteliali Kato III ed N87 [Fan *et al.*, 2000]. Anche *H. pylori* provoca apoptosi *in vitro*, inducendo l'espressione del recettore Fas [Jones *et al.*, 1999] e attivando il fattore di trascrizione NF-κB [Gupta *et al.*, 2001].

1.4.1 L'apoptosi indotta da *H. pylori* coinvolge Bak e Bax

L'induzione di apoptosi da parte di *H. pylori* è dipendente dal tempo di esposizione delle cellule al batterio e dalla sua concentrazione; è stato, inoltre, dimostrato che tale evento è accompagnato da un incremento dell'espressione di Bak [Chen *et al.*, 1997]. Studi condotti separatamente indicano che in cellule AGS (linea stabile di cellule dell'epitelio gastrico) esposte a *H. pylori* Bax trasloca ai mitocondri inducendo la loro depolazzazione e frammentazione [Ashktorab *et al.*, 2003]. Tali evidenze sperimentali suggeriscono che il processo apoptotico indotto da *H. pylori* avviene attraverso la via mitocondriale con il coinvolgimento delle proteine pro-apoptotiche Bax e Bak.

1.4.2 L'apoptosi indotta da VacA coinvolge la via mitocondriale

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che VacA induce apoptosi in cellule epiteliali gastriche. Infatti l'incubazione di cellule AGS con il supernatante di coltura di *H. pylori* esprime la tossina induce il processo di morte cellulare programmata. Al contrario, il supernatante di coltura del mutante isogenico *vacA*⁻ non ha alcun effetto [Kuck *et al.*, 2001; Peek *et al.*, 1999]. L'apoptosi può anche essere

osservata infettando le cellule con la tossina purificata. In tal caso VacA necessita di un trattamento con acido e della presenza di cloruro d'ammonio per indurre l'effetto apoptotico [Cover *et al.*, 2003]. Il trattamento con acido, che permette alla tossina di essere internalizzata nelle cellule [McClain *et al.*, 2000], e la presenza di basi deboli come l'ammonio, sono peraltro due fattori necessari alla formazione di vacuoli. L'uso di inibitori specifici [Willhite *et al.*, 2003] e di un mutante negativo [Cover *et al.*, 2003] hanno dimostrato che l'apoptosi indotta da VacA dipende dalla formazione del canale selettivo per gli ioni Cloruro. Anche se diversi elementi possono lasciar pensare il contrario, il processo apoptotico indotto da VacA è indipendente dalla vacuolizzazione [Willhite *et al.*, 2003].

L'infezione delle cellule con la tossina provoca il rilascio di citocromo *c* nel citosol [Galmiche *et al.*, 2000; Willhite *et al.*, 2003; Willhite *et Blanke*, 2004]. Il citocromo *c* contribuisce alla formazione dell'apoptosoma e all'attivazione della caspasi-3 con conseguente attivazione del processo apoptotico. La trasfezione di cellule Hep-2 con un plasmide contenente solo la sequenza codificante per il dominio p37 di VacA è sufficiente per indurre morte cellulare [Galmiche *et al.*, 2000]. Infatti è il dominio N-terminale di VacA che sembra essere responsabile del rilascio di citocromo *c* e di induzione di apoptosi. Il dominio p37 espresso nel citoplasma di cellule tramite trasfezione co-localizza con la matrice e la membrana interna dei mitocondri [Galmiche *et al.*, 2000]. Il dominio p58 invece non raggiunge il mitocondrio. Recentemente uno studio ha mostrato che 18 ore dopo l'aggiunta di VacA nel mezzo di coltura di cellule HeLa essa localizza in parte con i mitocondri [Willhite *et Blanke*, 2004]. Inoltre, prima di indurre rilascio di citocromo *c* VacA riduce il potenziale transmembrana dei mitocondri attraverso un processo che necessita della formazione di canali anionici [Willhite *et Blanke*, 2004]. VacA sembrerebbe modificare la permeabilità della membrana interna dei mitocondri attraverso la formazione di pori, che sarebbero responsabili della depolarizzazione della membrana e condurrebbero al rilascio di citocromo *c* nel citoplasma con induzione di apoptosi. Yamasaki *et al.* hanno dimostrato nel 2006 che le proteine pro-apoptotiche Bax e Bak sono coinvolte nell'apoptosi indotta da VacA. La co-trasfezione di DNA codificanti per p95 e per la proteina Bcl-2, nota per essere un inibitore della via apoptotica mitocondriale, permette invece di annullare la morte cellulare [Galmiche *et al.*, 2000]. Tali risultati ci suggeriscono che VacA induca apoptosi attraverso il pathway mitocondriale.

1.4.3 L'apoptosi indotta da VacA dipende dalla sua capacità di formare canale

Willhite e Blanke [2003 e 2004] hanno dimostrato che forme mutanti di VacA incapaci di formare canale non sono in grado di determinare nè la perdita di potenziale, nè il rilascio di citocromo *c* dai mitocondri; gli stessi effetti si hanno in seguito a trattamento delle cellule con NPPB, un inibitore del canale anionico, nonostante l'uso della tossina purificata da ceppi *wt*. Contrariamente a quanto indotto da VacA *wt*, cellule HeLa incubate con forme mutanti della tossina incapaci di formare canale (VacA G14A, VacA P9A) non presentano, dopo 18 ore di incubazione, né una significativa riduzione del potenziale di membrana, né il rilascio di citocromo *c* [Willhite *et* Blanke, 2004]. E' perciò altamente probabile che gli effetti prodotti da VacA sui mitocondri dipendano essenzialmente dalla capacità della tossina di formare un canale sulle loro membrane.

Se la reale funzione di VacA è di indurre l'apoptosi delle cellule epiteliali gastriche, allora perché questa tossina provoca la formazione di vacuoli? Per esercitare la sua attività apoptotica VacA deve lasciare le vescicole di endocitosi e raggiungere il citoplasma. Un'ipotesi è che VacA provocherebbe il rigonfiamento di queste vescicole fino alla loro rottura allo scopo di essere rilasciata, raggiungendo così i mitocondri [Boquet *et al.*, 2003]. L'acido gastrico è prodotto dalle cellule della parete gastrica. Queste cellule contengono numerosi mitocondri che producono l'ATP necessario a pompare i protoni nel lume gastrico. L'attività apoptotica della citotossina potrebbe essere importante durante la fase iniziale della colonizzazione dello stomaco da parte di *H. pylori*, riducendo la produzione di acido nello stomaco, creando così una nicchia più favorevole per il batterio [Boquet *et al.*, 2003].

2. MATERIALI e METODI

2.1 Materiali

I ceppi di *Helicobacter pylori* 326 *wild type* (wt) e 326 P9A [Genisset *et al.*, 2006] provengono dalla Chiron di Siena.

Le cellule MEF, fibroblasti embrionali di topo immortalizzati ricavati da topi wt e doppi *knock out* per i geni pro-apoptotici della famiglia di Bcl-2 *bax* e *bak* (DKO) [Zong *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2001], e le medesime cellule MEF DKO corrette con SERCA e mtBAX [Scorrano *et al.*, 2003] sono state fornite dal laboratorio del Dr. Luca Scorrano, Dulbecco-Telethon Institute, Venetian Institute of Molecular Medicine (Padova). Lo stesso laboratorio ci ha fornito il costrutto codificante per la *Mitochondrially targeted* dsRED (MitoRed).

Di seguito sono elencati i più importanti prodotti utilizzati: mezzo per colture cellulari DMEM, gentamicina, FBS (Gibco); mezzo per colture liquide di *H. pylori* BHI (Brain Heart Infusion *broth*, Gibco); terreno per colture solide di *H. pylori* Columbia Agar Base, sangue di cavallo defibrinato (Oxoid), ciclodestrina, trimetoprima, cefsulodina, vancomicina (Sigma). Bacto Triptone, Yeast Extract, Agar (Difco). Ampicillina, Kanamicina (Sigma). Vettore pEGFP-N3 (BDbiosciences). Enzimi di restrizione, T4 DNA ligasi (New England BioLabs). Platinum Taq Polimerasi (Invitrogen). Expand High FidelityPLUS PCR System, Annessina-V-Alexa568 (Roche).

Tripsina, NONIDET NP40 (Sigma), Inibitori di proteasi 1X Complete EDTA-free, BSA (Roche), Reattivo di Bradford, Transfectin Lipid Reagent (BIORAD).

LDS-*sample buffer*, tampone MOPS, *Transfer Buffer*, per-casted gel (NuPAGE Invitrogen), *marker* proteico di pesi molecolari LMW, membrana di nitrocellulosa Hybond, ECL (Amersham Biosciences).

Lastre fotografiche, soluzioni di sviluppo e fissaggio (Kodak).

Anticorpi primari anti-VacA, anti-BAX (Upstate), anti-EEA1, anti-LAMP1 (abCam), anti-CoxII; anticorpi secondari coniugati a HRP (Calbiochem).

2.2 Metodi

2.2.1 Tecniche di biologia cellulare

Colture cellulari

Cellule MEF sono state mantenute in condizioni sterili in fiasche di plastica aventi superficie di 75 cm², in terreno liquido (DMEM, 4500 mg/l D-glucosio, 580 mg/l L-glutamina, 110 mg/l sodio piruvato, 10% FBS, 1 µg/ml gentamicina, pH 7.4) alla temperatura di 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Raggiunta la confluenza, si è rimosso il terreno di crescita ed il monostrato cellulare è stato lavato con una soluzione di Tripsina-EDTA (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.6 mM glucosio, 0.7 mM Na-EDTA, 20 mM HEPES, 56 µM rosso fenolo, 0.05% (p/v) tripsina, pH 7.4), e in seguito incubato per qualche minuto a 37°C con 2 ml/fiasca della stessa soluzione per consentire il distacco delle cellule dalla superficie della fiasca. L'avvenuto distacco delle cellule è stato controllato visivamente al microscopio. Dopo il lavaggio delle pareti con 8 ml/fiasca di terreno liquido, le cellule sono state raccolte in provette di plastica sterili da 15 ml e centrifugate a 750 rpm per 8 min a 22°C, al fine di eliminare la tripsina. Il pellet cellulare è stato quindi risospeso in terreno liquido e le cellule sono state ripiastrate alla densità desiderata.

Valutazione dell'attività vacuolizzante di VacA

Cellule MEF *wt* e DKO sono state piastrate il giorno precedente l'esperimento in piastra da 96 pozzetti alla densità di 10⁴ cellule/pozzetto. La tossina presente nel supernatante prodotto dal ceppo 326 *wt* di *H. pylori* è stata preventivamente attivata tramite incubazione a 37°C per alcuni minuti in presenza di HCl 15 mM finale [de Bernard *et al.* 1995]; la soluzione è stata quindi neutralizzata mediante diluizione (di 10-20 volte) in DMEM, 2% FBS, 5 mM NH₄Cl. Le cellule sono state incubate per 5 ore in presenza del supernatante contenente la tossina *wt* preventivamente attivata e neutralizzata, mentre i relativi controlli sono stati trattati con HEPES 20 mM.

L'entità di vacuolizzazione indotta da VacA è stata determinata quantitativamente mediante misura dell'accumulo di rosso neutro (NRU, *Neutral Red Uptake*) [Cover *et al.* 1991]. Il rosso neutro è un colorante debolmente cationico che penetra attraverso le membrane per diffusione e si accumula all'interno degli

endosomi in seguito alla sua protonazione dovuta al pH acido presente in tali organelli (**Figura 2.1**). Una soluzione di Rosso Neutro allo 0.05% (p/v) in PBS, filtrata subito prima dell'uso, è stata messa a contatto con le cellule per 5 min. Dopo due lavaggi di 5 min. con PBS 0.3% BSA, il Rosso Neutro è stato estratto dalle cellule per aggiunta di etanolo acidulato (70% etanolo, 0.37% HCl). L'assorbanza, calcolata come differenza tra il valore letto alla lunghezza d'onda di 540 nm e quello letto a 405 nm, è stata misurata con un lettore di piastra Packard Fusion Microplate Reader.

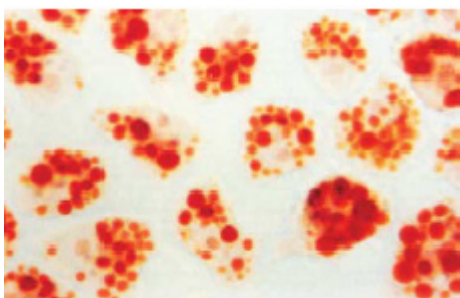


Figura 2.1. Cellule HeLa trattate con VacA in presenza di basi deboli e colorate con Rosso Neutro.

Immunocitofluorescenza indiretta

La localizzazione di molecole specifiche in un tessuto o in preparazioni cellulari può essere studiata mediante l'utilizzo di uno specifico anticorpo coniugato ad un fluoroforo e successiva irradiazione con la lunghezza d'onda di eccitazione di quest'ultimo.

Cellule MEF *wt* sono state piastrate su vetrini del diametro di 13 mm in piastra da 24 pozzetti alla densità di 2.5×10^4 cellule/pozzetto e il giorno successivo sono state trasfettate con il costrutto di interesse. Dopo 24 ore le cellule sono state eventualmente incubate con i supernatanti di *H. pylori* per i tempi desiderati, quindi sono state fissate mediante incubazione per 30 min. con formaldeide 3.7% (p/v) in PBS pH 7.4. Si sono successivamente effettuati due lavaggi in PBS e le cellule fissate sono state permeabilizzate con NONIDET NP40 0.01% in PBS pH 7.4 per 20 minuti. In seguito all'eliminazione del NONIDET mediante lavaggio con PBS, è stata effettuata una saturazione dei siti aspecifici con BSA 0.5% in PBS per 15 minuti. Le cellule sono state successivamente incubate per 30 min. con gli anticorpi primari opportunamente diluiti in PBS. Dopo tre lavaggi da 10 min. con PBS si è effettuata una seconda saturazione di 15 min. con BSA 0.5% in PBS in lenta agitazione. Le cellule sono state quindi incubate per 30 min. al buio con i rispettivi anticorpi

secondari opportunamente diluiti in PBS. Dopo tre lavaggi da 10 min. con PBS, i vetrini sono stati immersi per qualche secondo in acqua al fine di eliminare i sali del tampone, quindi montati su vetrini porta-oggetto in 50% (v/v) glicerolo in PBS.

Le cellule sono state infine analizzate al microscopio confocale (Ultra View, Perkin Elmer) e le immagini acquisite rielaborate mediante il *software* ImageJ.

Citofluorimetria

Test dell'Annessina-V : L'apoptosi è un processo di morte cellulare programmata caratterizzato dal susseguirsi di cambiamenti biochimici e morfologici nella cellula. Uno di questi cambiamenti riguarda l'esposizione della fosfatidilserina nel foglietto esterno della membrana plasmatica; i fosfolipidi di membrana, infatti, sono distribuiti in modo asimmetrico nel doppio strato lipidico e la fosfatidilserina è normalmente localizzata nella faccia citoplasmatica della membrana. Nelle cellule apoptotiche, invece, l'asimmetria del foglietto lipidico viene persa in seguito all'attivazione di un enzima specifico che trasloca i residui di fosfatidilserina sulla faccia esterna della membrana; questo fosfolipide risulta perciò essere un marcatore per l'identificazione delle cellule apoptotiche. L'Annessina-V, appartenente ad una famiglia di proteine Calcio-dipendenti con proprietà anticoagulanti, è uno strumento utile per l'identificazione delle cellule in apoptosi poiché lega in modo preferenziale fosfolipidi carichi negativamente, come la fosfatidilserina, mentre dimostra bassa affinità per la sfingomielina. L'analisi al citofluorimetro di campioni cellulari marcati con Annessina-V coniugata ad un fluoroforo permette di rilevare e quantificare la popolazione di cellule in apoptosi [Koopman *et al.*, 1994].

Nei nostri esperimenti le cellule trasfettate con il costrutto d'interesse, o incubate con i supernatanti di *H. pylori*, sono state tripsinizzate, raccolte per centrifugazione a 1.200 rpm per 8 min a RT, e infine risospese e incubate per 15 min a 25°C al buio in *Incubation Buffer* (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) contenente 1 µl di Annessina-V-Alexa568 per 10⁵ cellule. I campioni così preparati sono stati analizzati al citofluorimetro.

Analisi in citometria a flusso: La citofluorimetria è una tecnica di analisi della fluorescenza di cellule in sospensione che prevede l'utilizzo di un citofluorimetro a flusso, cioè di un microscopio a fluorescenza specializzato. Il citofluorimetro è uno strumento dotato di un sistema di trasporto che permette di analizzare singolarmente

le cellule dopo il loro passaggio forzato attraverso un raggio *laser* di eccitazione. Mediante l'utilizzo di lenti, specchi diecrici e fotomoltiplicatori lo strumento è in grado di rilevare e quantificare i fenomeni di diffrazione e riflessione della luce da parte di ogni cellula (*light scattering*). I dati di *light scattering* in citometria a flusso permettono di risalire alle dimensioni della cellula e alla sua forma, e vengono considerati come controllo per valutare la "bontà" e l'omogeneità di un preparato, ovvero il suo grado di purezza. L'utilizzo di molecole fluorescenti coniugate a proteine marcatrici permette, inoltre, di valutare in maniera quantitativa caratteristiche particolari della cellula con un livello di accuratezza molto elevato.

Lo strumento utilizzato è un analizzatore FACSCalibur (Becton Dickinson) che permette di acquisire e analizzare i dati usando il programma CELLQuest. La sorgente luminosa di cui è dotato è un *laser* ad Argon a bassa potenza raffreddato ad aria; nelle analisi effettuate è stato sintonizzato ad emettere a 488 nm, lunghezza d'onda che permette l'eccitazione dei fluorofori utilizzati.

2.2.2 Tecniche di biologia molecolare

Coltura batterica di *E. coli*

Sono stati utilizzati batteri *E. coli* del ceppo XL1Blue; la loro crescita è stata effettuata alla temperatura di 37°C in agitazione a 200 rpm in terreno liquido LB (1% (p/v) Bacto Triptone, 0.5% (p/v) estratto di lievito, 1% (p/v) NaCl) o in mezzo solido (1% (p/v) Bacto Triptone, 0.5% (p/v) estratto di lievito, 1% (p/v) NaCl, 1.5% (p/v) agar). I terreni sono stati addizionati degli opportuni antibiotici per selezionare i cloni batterici di interesse (Ampicillina 200 mg/l, Kanamicina 100 mg/l).

Clonaggio

Plasmide utilizzato : Il plasmide pEGFP-N3 (**Figura 2.2**) è stato impiegato nel clonaggio di p37 e di p95 in fusione con il gene codificante per la proteina GFP; i costrutti plasmidici così formati sono stati utilizzati negli esperimenti che prevedevano la trasfezione delle cellule MEF. La creazione di proteine chimeriche fluorescenti ha permesso l'identificazione della popolazione di cellule trasfettate e di conseguenza trattate con le proteine d'interesse.

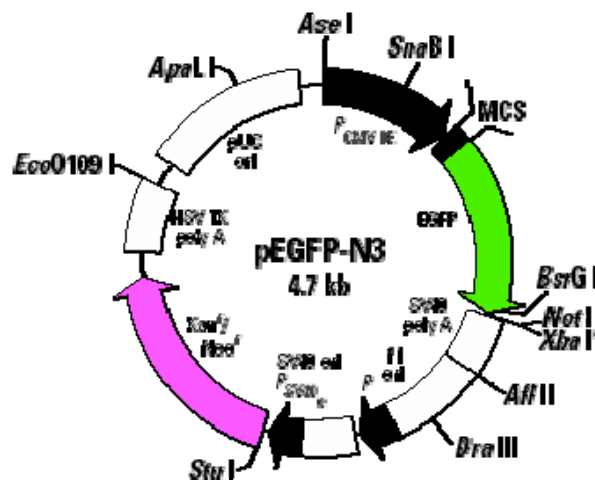


Figura 2.2. Vettore pEGFP-N3 utilizzato per il clonaggio di p37 e p95.

Il vettore pEGFP-N3 codifica per un mutante della GFP *wild-type*, ottimizzato per avere una maggiore intensità di fluorescenza e ottenere alti livelli di espressione in cellule eucariotiche. Tale proteina mostra un massimo di eccitazione a 488 nm, mentre emette la più elevata intensità di fluorescenza in corrispondenza di 507 nm. Il plasmide contiene il sito di policlionaggio a monte della sequenza codificante per la GFP e permette, dunque, di produrre costrutti chimerici che portano la proteina fluorescente al C-terminale della proteina esogena. A monte del sito di policlionaggio si trova il promotore precoce del *Citomegalovirus* ($P_{CMV IE}$) che consente di ottenere alti livelli di espressione dei geni clonati nel vettore; a valle della sequenza codificante per la GFP, invece, vi è il segnale di poliadenilazione del virus SV40 che permette di ottenere un corretto processamento degli mRNA chimerici in cellule eucariotiche. Il plasmide è inoltre dotato dell'origine di replicazione pUC per la sua produzione in *E. coli* e di una cassetta Kan^R che permette la selezione dei batteri trasformati.

Strategia di clonaggio: La strategia di clonaggio utilizzata per la preparazione dei diversi costrutti impiegati in questo lavoro di tesi si è basata sul metodo della PCR: il frammento di DNA da clonare è stato amplificato a partire dal DNA stampo, utilizzando due oligonucleotidi contenenti gli opportuni siti di riconoscimento per due diverse endonucleasi di restrizione, rispettivamente a monte e a valle della sequenza da amplificare. I frammenti di DNA così amplificati sono stati, quindi, digeriti con gli enzimi i cui siti di restrizione erano presenti nei *primers* utilizzati e, a sua volta, il vettore di destinazione è stato ristretto con gli stessi enzimi. In seguito a purificazione l'inserimento dei frammenti di DNA nei vettori è stato effettuato in presenza dell'enzima T4 ligasi.

Oligo utilizzati: Le sequenze codificanti per p37 e p95 sono stati amplificate a partire dal cDNA codificante per VacA del ceppo di *H. pylori* CCUG clonato nel vettore pGEX-4T-3, utilizzando gli oligonucleotidi riportati nella tabella sottostante (rispettivamente *sense* e *antisense*). Gli oligonucleotidi sono stati disegnati in modo da permettere l'inserimento delle sequenze amplificate nel vettore pEGFPN3 *in frame* con il cDNA codificante per la GFP. Entrambi gli oligonucleotidi *sense* contengono inoltre un codone ATG per l'inizio della traduzione degli mRNA prodotti.

<i>cDNA</i>	<i>oligonucleotide 5'-3'</i>	<i>siti di restrizione</i>
p37	AAAAAA GTCGACATG GCCTTTTTCACAACCGTGATCATTCCAGCC	SaII
	AAAAAA GGATCCA GCGCTTTCATTTTGTGCTTTTTCAGCACC	BamHI
p95	AAAAAA GTCGACATG GCCTTTTTCACAACCGTGATCATTCCAGCC	SaII
	AAAAAA GGATCC AGAACGTGCATTGCTAGTGGTGTGGTGGG	BamHI

PCR (Reazione a catena della polimerasi)

(Sambrook K.J. *et al.*, 1989 ; Ausubel F.M. *et al.*, 1989)

La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) è una tecnica che permette di ottenere grandi quantità di una specifica sequenza di DNA, amplificata a partire da poche molecole di DNA iniziale. La reazione procede in tre fasi che si ripetono a cicli; una denaturazione del DNA ad alte temperature; una fase di “*annealing*” in cui la

temperatura è abbassata ed i *primers*, complementari agli estremi della sequenza *target*, si appaiano alle sequenze a singolo filamento; infine una fase di “*extension*” in cui una DNA-polimerasi sintetizza il filamento complementare alla sequenza *target* utilizzando come innesco il *primer* precedentemente appaiato; al termine del ciclo la sequenza d’interesse è copiata su entrambi i filamenti. Questa tecnica permette di sintetizzare una sequenza *target* in progressione esponenziale e al termine di n cicli di PCR, è possibile ottenere 2^n molecole dello stesso tipo.

Le reazioni di PCR sono state condotte nelle seguenti condizioni:

- | | | |
|---|--|---|
| 1 | 0.5-10 ng | DNA stampo |
| 2 | 200 μ M | dNTPs |
| 3 | 1 μ M | <i>primer forward e reverse</i> (oligonucleotidi iniziatori) |
| 4 | 1.5-4 mM | MgCl ₂ |
| 5 | 1-3 U | DNA-polimerasi: Platinum Taq Polimerasi
Expand High Fidelity ^{PLUS} PCR
System |
| 6 | 1X | tampone per la polimerasi (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl
pH 9.0 a 25°C, 1% Triton X-100) |
| 7 | 1-5% | DMSO (nel caso di elevate percentuali di GC nella
sequenza da amplificare) |
| 8 | acqua sterile fino ad un volume finale di 50 μ l | |

E’ stato utilizzato un termociclatore GeneAmp System 9700 (PE Applied Biosystems) programmato nel seguente modo:

- 1 5 minuti a 94°C (*denaturazione della doppia elica di DNA*)
- 2 30 cicli: 1 minuto a 94°C (*denaturazione*)
30 secondi alla temperatura di appaiamento dei *primers* (*annealing*)
40 secondi a 72°C (*extension*)
- 1 10 minuti a 72°C per l’estensione finale dei filamenti di DNA non ancora completati.

Le temperature di appaiamento sono state calcolate seguendo le indicazioni della ditta fornitrice e secondo la formula $2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$.

Al termine dei cicli di PCR la miscela di reazione viene messa a 4°C; un’aliquota

(1/10 del volume di reazione) viene controllata mediante elettroforesi su gel di agarosio allo scopo di verificare l'avvenuta amplificazione.

Elettroforesi su gel d'agarosio

(Sambrook KJ *et al.*, 1989)

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare molecole sulla base del loro peso molecolare, della loro forma e carica grazie all'azione di un campo elettrico.

Al fine di valutare la qualità e le dimensioni del DNA è stata utilizzata un'elettroforesi su gel d'agarosio all'1%, adatta a separare frammenti di lunghezza maggiore alle 700 paia di basi. L'agarosio è stato sciolto in tampone TAE (Tris 40 mM, Na-EDTA 0.5 M, acido acetico glaciale 0.1% (v/v)), addizionato di bromuro d'etidio alla concentrazione finale di 0.5 µg/ml e fatto polimerizzare. I campioni di DNA da analizzare sono stati caricati in gel in presenza di *loading buffer* (EDTA 0.02 M, xilene cianolo 0.02%, blu di bromofenolo 0.02%, glicerolo 5%) e separati applicando un campo elettrico con differenza di potenziale di 100 V per circa mezz'ora. I frammenti di DNA migrati nel gel sono stati visualizzati esponendo il gel alla luce ultravioletta ($\lambda = 312$ nm), che permette di eccitare il bromuro d'etidio, un intercalante fluorescente del DNA. La dimensione di ogni frammento di DNA è stata stimata per confronto con un marcatore di pesi molecolari caricato in parallelo nel medesimo gel.

Digestione di DNA con enzimi di restrizione

Le endonucleasi di restrizione sono enzimi di origine batterica che riconoscono specifiche sequenze di DNA e tagliano la doppia elica in corrispondenza di esse. Ognuno di questi enzimi ha un'attività ottimale a determinati valori di temperatura, di concentrazioni saline e di pH. In generale, le digestioni sono state effettuate utilizzando 1-5 unità di enzima per 1 µg di DNA ed il tampone consigliato dalla ditta fornitrice, in un volume finale di 10-20 µl. La reazione è stata condotta a 37°C per un tempo variabile da 2 a 4 ore a seconda dell'enzima utilizzato. La reazione è stata inattivata al calore, qualora venisse richiesto dal tipo di enzima.

Purificazione dei prodotti di PCR e di digestione

Al termine delle reazioni di PCR e di digestione è necessario purificare il

DNA ottenuto dai prodotti secondari dovuti alle reazioni e dagli enzimi utilizzati, che potrebbero interferire con le reazioni successive. E' stato utilizzato il QIAquick[®] Purification Kit (QIAGEN) che permette di isolare frammenti di DNA a doppio e a singolo filamento di dimensioni comprese tra 100 pb e le 10 kb, mediante l'uso di colonnine in gel di silice.

Quantificazione del DNA mediante spettrofotometro

La quantificazione del DNA è realizzabile mediante l'uso dello spettrofotometro grazie alla presenza negli acidi nucleici di basi puriniche e pirimidiniche che assorbono la luce UV. La quantità di DNA è stata determinata diluendo il campione 1:10 in acqua e leggendo l'assorbanza a 260 nm; la misura si basa sul fatto che ad 1 unità di assorbanza a questa lunghezza d'onda corrispondono 50 µg/ml di DNA a doppia elica.

Un rapporto tra le assorbanze ottenute a 260 e a 280 nm compreso tra 1.5 e 2 indica un livello ottimale di purificazione del DNA da proteine.

Ligazione di frammenti di DNA

In seguito alla loro purificazione i frammenti di DNA sono stati inseriti nei vettori tramite l'uso dell'enzima T4 DNA ligasi, in grado di catalizzare la formazione di legami fosfodiesterici tra un'estremità terminale 3' e una 5'. Si sono utilizzati 100-200 ng di vettore e una quantità di inserto variabile a seconda delle dimensioni, ma tale da determinare un rapporto molare di 2 o 3 rispetto al vettore; la reazione è stata condotta nel tampone di reazione della ligasi (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 µM DTT, 1 µM ATP, 25 µg/ml BSA), utilizzando 2-4 U di T4 DNA ligasi in un volume finale di 10-20 µl, con incubazione a 16°C per tutta la notte.

Trasformazione batterica

La trasformazione batterica è un processo che permette l'introduzione di DNA plasmidico in batteri, purchè questi possiedano la competenza necessaria; in tal caso sono stati utilizzati batteri resi chimico-competenti mediante l'uso di CaCl₂.

L'adsorbimento del DNA sulla parete batterica è stato realizzato aggiungendo l'intero volume di ligazione ad un'aliquota di 80-100 µl di *E. coli* XL1Blue ed incubando in ghiaccio per 30 min. Il DNA è stato quindi indotto ad entrare nei batteri

mediante uno *shock* termico che consiste nell'incubare i batteri a 42°C per 45 secondi e poi nuovamente in ghiaccio per 2-3 min. La sospensione batterica è stata quindi diluita in 400 µl di LB liquido e posta a 37°C in agitazione per circa 45 min. I batteri sono stati infine piastrati su terreno solido, dotato di un opportuno antibiotico per la selezione dei trasformati, e fatti crescere a 37°C per tutta la notte.

Screening delle colonie ricombinanti

Lo *screening* delle colonie ricombinanti, ovvero la verifica della presenza e della taglia dell'inserto, è stata effettuata mediante PCR nei cloni cresciuti su terreno selettivo. In parallelo sono state allestite delle colture batteriche in LB-antibiotico con i cloni corrispondenti allo scopo di verificare la presenza dell'inserto desiderato. La PCR è stata eseguita direttamente sulla colonia batterica prelevata dalla piastra, utilizzando le medesime condizioni di reazione utilizzate per l'amplificazione dell'inserto a partire da DNA plasmidico; al termine della reazione i prodotti di amplificazione sono stati verificati mediante elettroforesi in gel d'agarosio. Dei cloni che risultavano positivi per la presenza dell'inserto sono state eseguite delle mini-preparazioni di DNA plasmidico ed in seguito, mediante digestione con enzimi di restrizione ed analisi in gel d'agarosio, è stata verificata l'effettiva presenza dell'inserto e la sua lunghezza.

Purificazione di DNA plasmidico da batteri

Le preparazioni di DNA plasmidico in piccola scala sono state effettuate utilizzando il QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN) che prevede l'utilizzo di colonnine in gel di silice per la purificazione del DNA; seguendo i protocolli indicati dalla ditta fornitrice tale kit permette di ottenere 5-15 µg di DNA a partire da 1.5 ml di coltura batterica.

Sequenziamento

Al fine di controllarne la correttezza, i costrutti plasmidici creati sono stati sequenziati presso il Centro Interdipartimentale di Biotecnologie Innovative (CRIBI), che si serve dell'apparecchio ABI Prism 3700 DNA Analyzer.

Trasfezione transiente di cellule eucariotiche

La trasfezione consiste nel trasferimento di DNA esogeno in cellule animali o

vegetali mediante tecniche fisiche o chimiche; tale DNA può essere trattenuto nella cellula per un determinato periodo di tempo che solitamente va dalle 24 alle 72 ore (trasfezione transiente) o può integrarsi in modo stabile nel genoma ed essere trasmesso alle cellule figlie (trasfezione stabile). Durante le 48 ore successive alla trasfezione, i geni esogeni sono soggetti a molte delle attività regolative che controllano l'espressione del materiale cromosomico della cellula. Nel periodo successivo invece verranno progressivamente persi dalla maggior parte delle cellule per combinazione di fenomeni di degradazione e diluizione, dal momento che il DNA non integrato non viene solitamente duplicato con il materiale cromosomico della cellula ospite.

Per gli esperimenti di morte cellulare si è utilizzato un metodo di trasfezione transiente che prevede l'uso di lipidi cationici: cellule MEF *wt* e DKO sono state seminate in piastre da 12 pozzetti alla concentrazione di $6-8 \times 10^4$ cellule/pozzetto. Il giorno seguente le cellule sono state trasfettate con 1.5 μg del plasmide d'interesse mediante l'utilizzo di 4.5 μl di TransFectinTM Lipid Reagent secondo il rapporto di 1:3 (p/v), come descritto dal produttore. Le cellule sono state incubate per 4 ore in presenza della miscela di DNA e lipidi diluita in DMEM fino al volume di 1 ml. Al termine dell'incubazione, il terreno di crescita è stato sostituito al fine di eliminare il reagente lipidico, che mostra una moderata tossicità nei confronti delle cellule.

2.2.3 Tecniche di biochimica

Coltura liquida di *Helicobacter pylori*

Batteri *Helicobacter pylori* SPM 326 *wt* e SPM 326 P9A sono stati fatti crescere in piastre con terreno Columbia agar contenente il 5% di sangue di cavallo defibrinato (Columbia agar 39 g/l, Amfotericina B 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Trimetoprima 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Cefsulodina 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Vancomicina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ciclodestrina 0,2% (v/v), sangue di cavallo defibrinato 5% v/v) alla temperatura di 37 °C al 5% di CO₂. Ogni due o tre giorni le colonie batteriche sono state raccolte con un'ansa e piastrate su una nuova piastra.

Per ottenere i supernatanti contenenti la tossina VacA le colonie batteriche sono state fatte crescere in un terreno di coltura BHI (Brain Heart Infusion *broth*, 37 g/l, FBS 5%) a 37 °C per 48 h sotto agitazione continua in ambiente microaerofilo.

Preparazione dei supernatanti di *Helicobacter pylori*

La coltura liquida di *H. pylori*, diluita in modo da ottenere una densità ottica a 600 nm compresa tra 0.6 e 0.8, è stata centrifugata a 8.000 g per 20 min a 4°C. I supernatanti così ottenuti sono stati filtrati, quindi precipitati tramite aggiunta di un uguale volume di una soluzione satura di ammonio solfato (concentrazione finale (v/v) 50%) e centrifugati a 16.000 g per 30 min a 4°C. Il *pellet* così ottenuto è stato risospeso in un volume di Hepes 20 mM pH 7.4 in maniera tale che le proteine presenti nei supernatanti fossero concentrate 15 volte rispetto al volume iniziale. La soluzione così ottenuta è stata dializzata a 4 °C in 5 litri di Hepes 20 mM pH 7.4 per due giorni, poi conservata a 4 °C. Prima dell'uso i supernatanti sono stati attivati mediante HCl 15 mM finale per 10 min a temperatura ambiente, poi sono stati neutralizzati con NaOH 15 mM finale.

I supernatanti sono stati diluiti in rapporto 1:4 con terreno DMEM 2% FBS e quindi usati per incubare le cellule per 2 h 30, 12 h e 24 h.

Subfrazionamento cellulare e isolamento di organelli

Dalle cellule incubate con i supernatanti di *H. pylori* sono stati isolati gli endosomi precoci (Early Endosomes, EE), gli endosomi tardivi (Late Endosomes, LE) e i mitocondri (Mitochondria, Mt).

1) Isolamento endosomi

Cellule MEF *wt* e DKO sono state dapprima seminate su piastre *Petri* del diametro di 90 mm. Raggiunta la confluenza, sono state lavate due volte con PBS freddo e poi staccate dalle piastre con uno scraper, quindi recuperate in provetta. Dopo aver centrifugato per 10 min a 2.500 rpm il *pellet* è stato risospeso in 600 µl di *Homogenation Buffer* (HB-EDTA: 250 mM saccarosio, 3 mM imidazolo, 0.5 mM EDTA, pH 7.4) e la lisi cellulare è stata ottenuta attraverso 10 passaggi con la pipetta Gilson p1000 e attraverso 3-10 passaggi con una siringa da 1 ml con ago G22; durante ogni passaggio con la siringa le cellule sono state controllate con l'ausilio del microscopio onde essere sicuri dell'avvenuta rottura cellulare e dell'integrità dei nuclei. Poi la soluzione è stata centrifugata a 2.500 rpm per 10 min; sono stati quindi recuperati il supernatante *post-nucleare* (PNS) e il *pellet* nucleare (PN), da cui sono poi stati isolati i mitocondri. Il PNS, portato alla concentrazione finale di saccarosio

del 40.6% usando saccarosio al 62% in HB-EDTA, è stato quindi posto sul fondo di un tubo per ultracentrifuga; sopra di esso sono stati aggiunti 1.5 ml di saccarosio 35% in HB-EDTA sul quale poi è stato aggiunto 1 ml di saccarosio 25% in HB-EDTA in maniera tale da creare un gradiente di saccarosio nel tubo.

Alla soluzione così ottenuta è stato aggiunto HB senza EDTA pH 7.4 in modo tale da riempire il tubo fino all'orlo. Il tubo è stato quindi centrifugato in un'ultracentrifuga con rotore SW60Ti (Beckman) a 35.000 rpm per 1 h.

Gli endosomi tardivi sono stati recuperati in corrispondenza dell'interfaccia tra il saccarosio 25% e l'HB, mentre gli endosomi precoci sono stati recuperati a livello dell'interfaccia tra saccarosio 25% e 35%.

2) Isolamento mitocondri

I mitocondri sono stati isolati a partire dal pellet nucleare (PN) precedentemente ottenuto. Il PN è stato risospeso in 1 ml di *Assay Buffer* (0.12 M mannitolo, 0.08 M KCl, 1mM EDTA, 20 mM K-Hepes, pH 7.4) tramite dieci passaggi con un *potter* (l'avvenuta rottura delle cellule è stata controllata al microscopio con *Trypan Blue*) e poi centrifugato a 600 g per 15 min. Il supernatante è stato recuperato e posto su un cuscino di 600 µl di mannitolo 1 M e coperto successivamente con 100 µl di BSA 2% in *Assay Buffer*, quindi centrifugato a 9.000 g per 15 min. Il *pellet* è stato recuperato e risospeso in 500 µl di *Assay Buffer* e infine centrifugato a 10.000 g per 10 min. Il *pellet* così ottenuto corrisponde alla frazione mitocondriale ed è stato risospeso in 20 µl di *Assay Buffer*; alla soluzione sono stati poi aggiunti 5 µl di inibitori di proteasi 1X.

Tutti i passaggi per l'isolamento degli organelli sono stati compiuti a 4 °C.

Gli organelli così ottenuti sono stati quindi conservati a -20 °C.

Quantificazione proteica con il metodo Bradford (Bradford, 1976)

La determinazione quantitativa delle proteine presenti nei campioni d'interesse è stata effettuata con il metodo Bradford, che ha permesso di dosare con buona sensibilità quantità di proteine compresa tra 1 e 10 µg.

Il saggio è stato eseguito su piastra da 96 pozzetti dove vengono sono stati posti diversi volumi dei campioni da quantificare e quantità crescenti di una soluzione *standard* di BSA (1 mg/ml), in un volume finale di 50 µl. Ad ogni pozzetto sono stati

quindi aggiunti 150 μ l del reattivo di Bradford (Comassie Brilliant Blue G-250 0.003% (p/v), acido fosforico 10% (p/v) in etanolo) diluito al 15% in acqua. L'assorbanza è stata rilevata alla lunghezza d'onda di 620 nm utilizzando il lettore di piastra Packard Fusion Microplate Reader. I valori di assorbanza ottenuti per la BSA hanno permesso di determinare una retta di taratura, attraverso la quale è stato possibile estrapolare la concentrazione proteica dei campioni.

SDS-PAGE

L'elettroforesi in gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE) permette di effettuare un'analisi qualitativa delle proteine presenti in una miscela, separandole in base al loro peso molecolare. La tecnica prevede l'utilizzo di un detergente anionico (SDS) che, oltre a permettere la denaturazione delle proteine, si lega ad esse in modo stechiometrico (1.4 g/g proteina), conferendo alla miscela proteica da analizzare uniformità di forma e carica. I complessi proteina-SDS vengono separati in un campo elettrico all'interno di un gel di poliacrilammide, e la loro mobilità elettroforetica risulta inversamente proporzionale al \log_{10} del loro peso molecolare.

I campioni da separare in SDS-PAGE sono stati dapprima bolliti per 5 minuti in *loading buffer* (LDS-sample buffer, 50 mM DTT) e quindi caricati in gel precostituiti con un gradiente dal 4% al 12% di poliacrilammide. Contemporaneamente ai campioni è stata separata una miscela di proteina *standard* di peso molecolare noto da cui è possibile dedurre le dimensioni delle proteine contenute nei campioni. La corsa elettroforetica è stata condotta a 200 V per 30 min. in presenza di tampone MOPS.

Western blotting

(Sambrook KJ *et al.*, 1989; Ausubel FM *et al.*, 1989)

Il Western blotting è un tecnica che permette di rilevare la presenza di una specifica proteina all'interno di una miscela eterogenea, mediante l'utilizzo di un anticorpo in grado di riconoscerla in maniera specifica.

Le proteine contenute nei campioni d'interesse sono state dapprima separate in SDS-PAGE e quindi trasferite su una membrana di nitrocellulosa mettendo quest'ultima a contatto con il gel di poliacrilammide in un apposito apparecchio (Invitrogen); il trasferimento è stato effettuato applicando un campo elettrico con differenza di potenziale di 30 V per un'ora, nel tampone di trasferimento.

Successivamente i leganti residui della nitrocellulosa sono stati saturati in PBS, 0.2% (v/v) Tween 20, 5% (p/v) latte non grasso (soluzione saturante), in agitazione per un'ora a temperatura ambiente. La membrana è stata poi incubata con l'anticorpo primario, specifico per le proteine da individuare, diluito opportunamente in soluzione saturante a 4°C in agitazione per tutta la notte. L'eccesso di anticorpo è stato rimosso con 4 lavaggi (uno veloce e tre da 10 min. ciascuno) in PBS 0.2% (v/v) Tween 20. L'incubazione con anticorpo secondario (anticorpo anti-IgG della specie animale immunizzata per avere l'anticorpo primario) coniugato a perossidasi di rafano (HRP) è stata effettuata per 30 min. in soluzione saturante in agitazione. La membrana è stata quindi lavata come descritto in precedenza per rimuovere l'eccesso di anticorpo. La rivelazione dei siti di legame anticorpale è stata effettuata su lastra autoradiografica dopo aver incubato la nitrocellulosa con ECL (*Enhanced ChemiLuminescence system*) per un minuto.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Le proteine pro-apoptotiche BAX e BAK e l'attività di canale della tossina VacA sono necessarie per l'induzione di apoptosi

Come descritto nell'Introduzione, è già stato ampiamente dimostrato che le proteine appartenenti alla famiglia di Bcl-2 svolgono un ruolo fondamentale nel processo apoptotico. Tra queste, le proteine pro-apoptotiche Bax e Bak sono responsabili, in seguito ad uno stimolo di morte, del rilascio di diverse molecole dal mitocondrio, tra cui il citocromo *c* [Adams *et al.*, 2002].

Alla luce delle evidenze sperimentali che dimostrano la capacità di indurre apoptosi sia del dominio N-terminale di VacA p37, che della tossina intera [Galmiche *et al.*, 2000] abbiamo ritenuto opportuno verificare il coinvolgimento delle proteine BAX a BAK in tale processo, al fine di comprenderne i meccanismi molecolari. A tale scopo sono stati utilizzati nei nostri esperimenti come modello cellulare Fibroblasti Embrionali Murini (MEF) *wt* e doppio knock-out (DKO) per le proteine BAX e BAK (**Figura 3.1**).

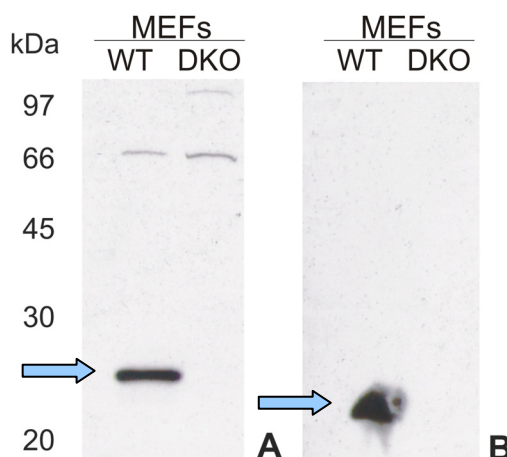


Figura 3.1. Western blotting condotto su estratti proteici totali di cellule *wt* e DKO per BAX e BAK. La presenza delle proteine di interesse è stata rilevata mediante l'utilizzo di due distinti anticorpi policlonali di coniglio diluiti 1:1000, rispettivamente: (A) anti BAK (27 kDa) e (B) anti-BAX (21 kDa).

3.1.1 Il solo dominio N-terminale p37 è in grado di indurre apoptosi

Cellule MEF *wt* e DKO sono state trasfettate con i costrutti plasmidici codificanti per il dominio p37 di VacA (p37-pEGFPN3) o per l'intera tossina (p95-pEGFPN3). L'utilizzo del plasmide pEGFPN3 ha permesso di creare delle proteine di fusione con la GFP al C-terminale e di conseguenza di poter verificare, grazie all'emissione di fluorescenza di tale proteina, l'espressione e la localizzazione delle proteine d'interesse nelle cellule trasfettate. Le cellule sono state raccolte a tempi diversi dopo la trasfezione (6 h, 18 h, 24 h, 48 h, 72 h) e sottoposte al test dell'Annexina-V al fine di marcare le cellule in apoptosi.

L'analisi al citofluorimetro è stata condotta selezionando la frazione di popolazione cellulare esprime la GFP. La **Figura 3.2, (pannello A)** mostra come l'espressione del dominio p37 sia di per sé sufficiente ad indurre l'apoptosi delle cellule MEF *wt*, ancorché con un'efficienza inferiore rispetto alla proteina intera (p95). Viceversa, l'assenza delle proteine BAX e BAK si traduce in una mancata sensibilità alla morte cellulare indipendentemente dallo stimolo (**pannello B**).

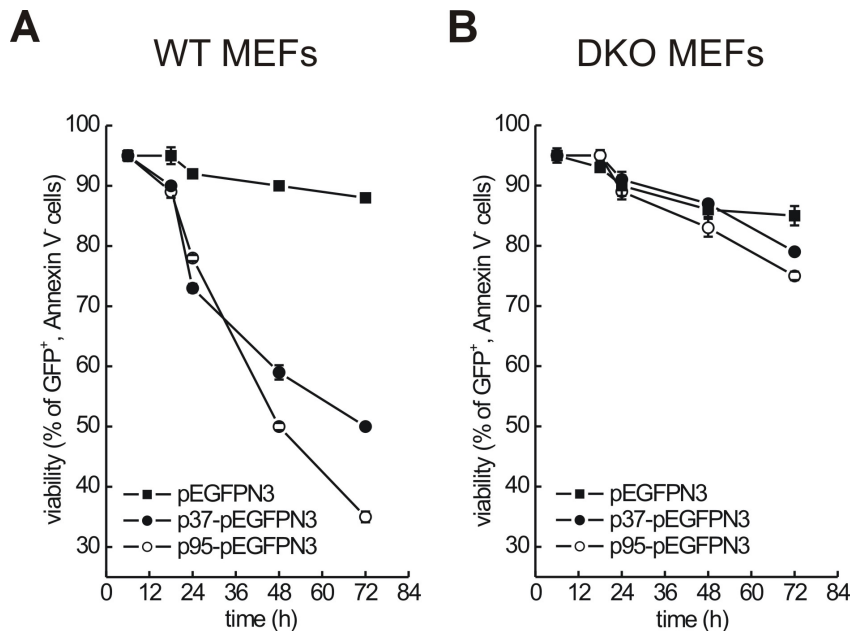


Figura 3.2. Sia il dominio p37 che p95 inducono apoptosi in cellule MEF *wt*. Cellule MEF *wt* e DKO sono state trasfettate con il costrutto esprimente la proteina intera p95, oppure con il costrutto codificante per il dominio N-terminale p37, entrambi fusi alla GFP. In ordinata è indicata la percentuale di cellule Annexina-V negative, quindi non in apoptosi, selezionate all'interno della popolazione cellulare esprimente la GFP.

3.1.2 L'attività di canale di VacA è necessaria per indurre apoptosi

Alla luce dei risultati ottenuti abbiamo ritenuto opportuno verificare se anche la tossina somministrata alle cellule dall'ambiente esterno fosse in grado di produrre gli stessi effetti. A questo scopo abbiamo incubato MEF *wt* e DKO con i supernatanti prodotti da due diversi ceppi di *H. pylori*: il ceppo 326 *wt*, che produce e secreta VacA nella sua forma matura, e il ceppo 326 P9A, che secreta una forma mutante della tossina, caratterizzata dalla sostituzione di un residuo di Prolina in posizione 9 della catena polipeptidica con uno di Alanina. Tale mutazione abolisce la capacità della tossina di formare canale.

I supernatanti ricavati dalle colture liquide di *H. pylori* sono stati diluiti in DMEM, in rapporto di 1:4, prima di essere aggiunti alle cellule. I tempi di incubazione presi in considerazione sono gli stessi descritti nel paragrafo precedente. Il saggio dell'Annexina-V ha evidenziato un progressivo decremento della vitalità delle cellule MEF *wt* sottoposte ad incubazione con il supernatante prodotto dal ceppo *wt* di *H. pylori* (**Figura 3.3, pannello A**). La percentuale di cellule vitali è scesa progressivamente fino a raggiungere un valore del 30% dopo 72 h di incubazione. L'incubazione della linea DKO con lo stesso supernatante non ha invece sortito gli stessi effetti: la vitalità cellulare non subisce un decremento così drastico, e i suoi valori sono paragonabili a quelli ottenuti con le cellule non trattate (**Figura 3.3, pannello B**).

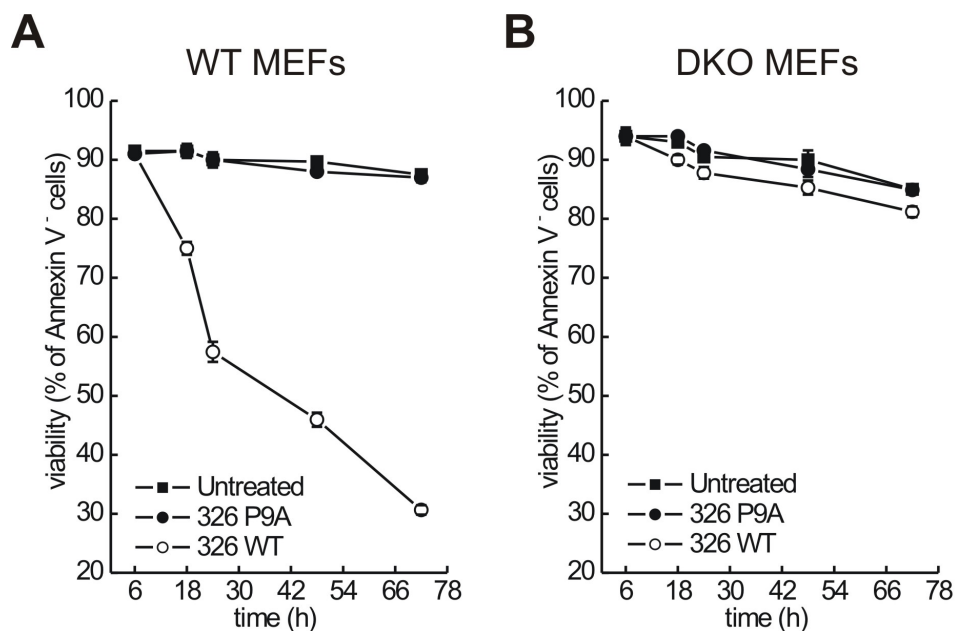


Figura 3.3: Le proteine pro-apoptotiche BAX e BAK sono necessarie per l'induzione di apoptosi da parte di VacA. (A) Cellule MEF *wt* sono state incubate con i supernatanti di *H. pylori*, per i seguenti tempi: 6h, 18h, 24h, 48h, 72h. Successivamente è stato effettuato il saggio dell'Annexina-V, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. La vitalità cellulare è stata determinata al citofluorimetro come percentuale di cellule negative all'Annexina-V. I valori rappresentano la media \pm SD di trenta esperimenti indipendenti. (B) Cellule MEF DKO sono state incubate per gli stessi tempi con i medesimi supernatanti utilizzati per le cellule *wt*.

Tali dati confermano pertanto i risultati ottenuti con gli esperimenti di trasfezione, dimostrando che per l'induzione di apoptosi VacA necessita effettivamente delle proteine BAX e BAK.

Da quest'analisi emerge inoltre un altro aspetto importante: l'attività di canale della tossina è altresì indispensabile per indurre morte cellulare. Gli esperimenti al citofluorimetro condotti su MEF *wt* incubate con il supernatante contenente la tossina mutata (VacA P9A) non hanno infatti evidenziato alcun decremento della vitalità cellulare (**Figura 3.3, pannello A**).

3.2 L'apoptosi indotta da VacA coinvolge la via mitocondriale

Come descritto in precedenza, le proteine pro-apoptotiche BAX e BAK sono implicate nell'induzione dell'apoptosi mediata dai mitocondri, ma d'altra parte controllano la concentrazione di Ca^{2+} nel reticolo endoplasmatico, modulando perciò anche la via apoptotica reticolare. Le cellule MEF DKO per le proteine BAX e BAK

mostrano infatti una ridotta concentrazione di Ca^{2+} nel reticolo endoplasmatico e risultano meno sensibili agli stimoli apoptotici Calcio-mediati [Oakes *et al.*, 2005; Scorrano *et al.*, Science 2003].

L'evidenza sperimentale che mostra il coinvolgimento delle proteine BAX e BAK nell'apoptosi indotta da VacA ci ha posto di fronte al quesito se tale processo coinvolgesse in primo luogo la via reticolare o mitocondriale. Per discriminare fra queste due ipotesi, sono state utilizzate per le analisi di morte cellulare due linee di cellule MEF DKO corrette geneticamente, la prima *over*-esprimente la pompa reticolare SERCA (*sarcoplasmic-ER Ca²⁺ adenosine triphosphatase*) (MEF DKO SERCA), la seconda caratterizzata dall'*over* espressione e *targeting* al mitocondrio della proteina BAX (MEF DKO mtBAX). Scorrano *et al.* [2003] hanno dimostrato che la concentrazione di Calcio nel reticolo endoplasmatico $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ è dipendente dalla presenza di BAX e BAK: le cellule MEF DKO, infatti, presentano una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ pari a 289 μM mentre nel caso delle cellule *wt* essa è di 527 μM . La trasfezione stabile delle cellule DKO con il cDNA codificante per la pompa SERCA permette il parziale ripristino della normale concentrazione di Calcio nel reticolo (390 μM circa) e determina il recupero della via apoptotica reticolare. Al contrario, l'espressione costitutiva di BAX permette il solo ripristino della via apoptotica mitocondriale, mantenendo al contrario bassi livelli di Calcio nel reticolo.

L'analisi di Western blotting (**Figura 3.4**) condotta sugli estratti proteici totali delle linee cellulari SERCA e mtBAX dimostra la sovraespressione della proteina SERCA, la cui banda risulta solo parzialmente visibile negli estratti proteici di cellule DKO (**Figura 3.4, pannello A**), e l'espressione di mtBAX, invece del tutto assente nella linea *knock out* per BAX e BAK (**Figura 3.4, pannello B**).

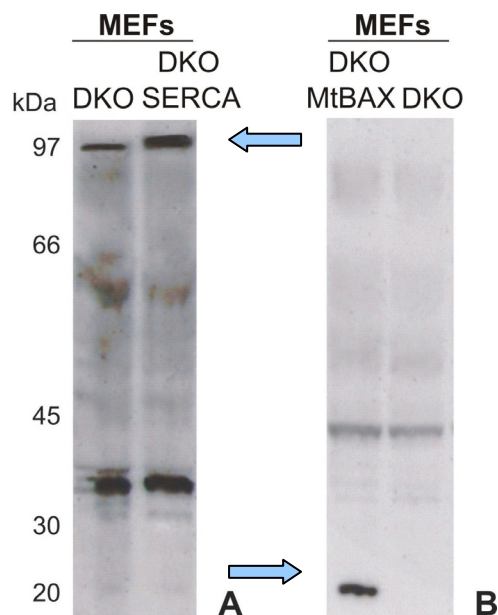


Figura 3.4. Western blotting condotto su estratti proteici totali di cellule MEF DKO SERCA e mtBAX. La presenza delle proteine d'interesse è stata rilevata mediante l'utilizzo di (A) un anticorpo policlonale di capra anti-SERCA (97 kDa) diluito 1:100, e di (B) un policlonale di coniglio anti-BAX (21 kDa) diluito 1:1000.

Le cellule corrette con SERCA e mtBAX esprimono costitutivamente la proteina GFP, il cui cDNA è stato inserito al momento della creazione delle linee stabili al fine di identificare i trasfettanti per le due proteine. Perciò, dal momento che non era possibile discriminare la popolazione cellulare trasfettata con i costrutti esprimenti p37 e p95 mediante l'analisi dell'espressione della GFP come fatto per le precedenti analisi, cellule MEF DKO SERCA e mtBAX sono state co-trasfettate con i costrutti p37-pEGFPN3 o p95-pEGFPN3 e con un plasmide codificante per la proteina di membrana CD19. A 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state quindi incubate per un'ora con un anticorpo anti-CD19 coniugato al fluoroforo PEcy5 prima di essere sottoposte al test dell'Annexina-V. Durante l'analisi al FACS ci siamo avvalsi della marcatura con l'anticorpo anti-CD19 per discriminare la popolazione cellulare esprimente p37 o p95, dal momento che è molto probabile che nel corso di una cotrasfezione entrambi i costrutti plasmidici forniti entrino contemporaneamente nella cellula. La rielaborazione dei dati per valutare il livello di apoptosi è stata perciò effettuata sulla popolazione cellulare GFP positiva (esprimente SERCA o mtBAX) e CD19 positiva.

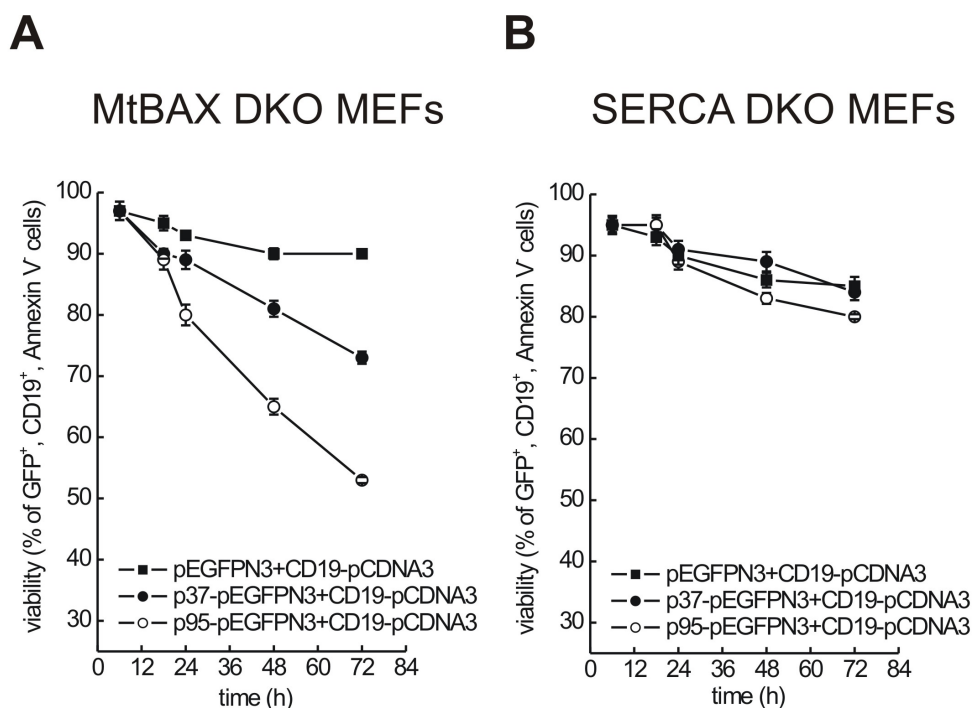


Figura 3.5. Apoptosi indotta da p37 e p95 su cellule MEF DKO mtBAX e SERCA. Entrambe le linee cellulari sono *knock out* per le proteine BAX e BAK. In ordinata è indicata la percentuale di cellule positive alla GFP, costitutivamente espressa come tag di mtBAX e SERCA, e alla proteina di membrana CD19, e negative all'Annexina V. È evidente come la vitalità delle cellule MEF DKO mtBAX esprimenti p37 o p95 decresce nel tempo (A), mentre nel caso delle MEF DKO SERCA essa si riduce al massimo del 20 % circa (B).

I risultati ottenuti (Figura 3.5) indicano che le cellule MEF DKO mtBAX sono più sensibili all'apoptosi indotta sia dalla tossina intera (p95) che dal suo dominio p37 (Figura 3.5, pannello A), in accordo con i dati riportati in Figura 3.2 pannello A. Al contrario, le cellule MEF DKO SERCA mostrano una percentuale di vitalità paragonabile a quella delle cellule MEF DKO non corrette, (vedi Figura 3.2, pannello B). Questi risultati indicano perciò che l'apoptosi indotta da VacA passa attraverso la via mitocondriale, escludendo d'altra parte un coinvolgimento del reticolo endoplasmatico.

L'incubazione delle due linee cellulari con i supernatanti di *H. pylori* contenenti la tossina ha fornito analoghi risultati: la vitalità della linea DKO mtBAX ha subito un decremento tempo-dipendente conseguente all'incubazione con il supernatante *wt* di *H. pylori*, a differenza di quanto osservato per la linea DKO SERCA, che si è dimostrata insensibile all'induzione di morte cellulare (Figura 3.6).

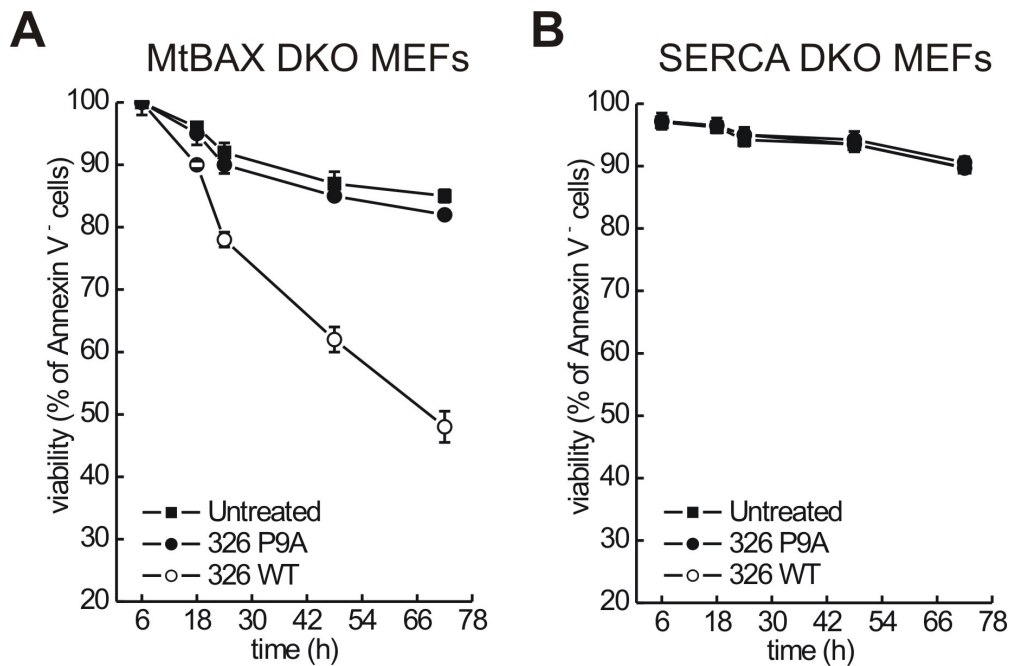


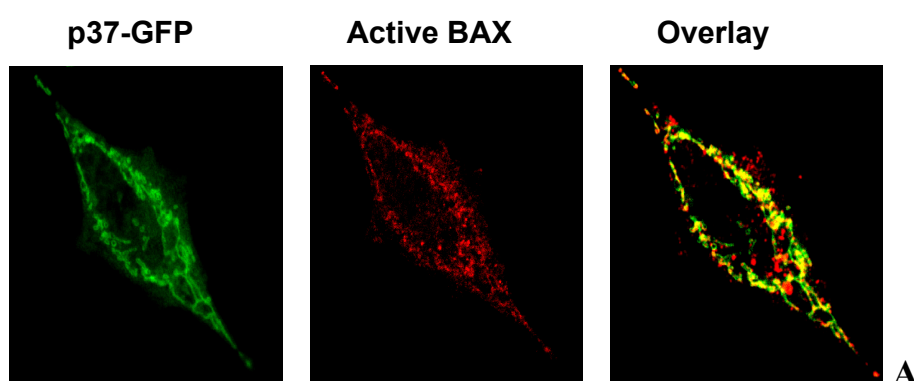
Figura 3.6: L'apoptosi indotta da VacA attiva solo il gateway mitocondriale. (A) Cellule MEF DKO mtBAX, stabilmente trasfettate con un costrutto che consente il *targeting* di BAX al mitocondrio sono state incubate con i supernatanti di *H. pylori* per i seguenti tempi: 6 h, 18 h, 24 h, 48 h, 72 h. E' stato successivamente effettuato il test dell'Annexina-V. (B) Cellule MEF DKO SERCA, trasfettate stabilmente con un costrutto che consente l'*over*-espressione della pompa SERCA sono state trattate come in (A).

Questi risultati indicano che VacA appartiene alla categoria di stimoli apoptotici che coinvolgono proteine pro-apoptotiche multidominio e che inducono morte cellulare in maniera indipendente dalla concentrazione di Calcio negli *stores* intracellulari.

Come atteso, l'incubazione di entrambe le linee cellulari con il supernatante contenente VacA P9A non ha avuto alcun effetto sulla loro vitalità; come precedentemente osservato nel caso delle MEF *wt* (Figura 3.3, pannello A), le cellule DKO mtBAX non sono andate incontro ad apoptosi in seguito ad incubazione con questo supernatante, confermando l'importanza dell'attività di canale di VacA per l'induzione di morte.

3.3 *VacA* induce l'attivazione di BAX e la sua traslocazione al mitocondrio

La proteina BAX, nella sua forma inattiva, è normalmente localizzata a livello del citosol o debolmente associata alle membrane intracellulari. In seguito a stimoli di morte, tuttavia, essa subisce dapprima una conversione nella sua forma attiva, caratterizzata dall'esposizione di una regione ad α -elica localizzata nel suo dominio C-terminale, quindi trasloca al mitocondrio dove determina la permeabilizzazione delle membrane e il rilascio di effettori pro-apoptotici. Abbiamo ritenuto opportuno innanzitutto verificare se il dominio N-terminale di VacA p37 o la tossina intera p95 inducessero l'attivazione della proteina pro-apoptotica. A questo scopo, cellule MEF *wt* trasfettate con il costrutto codificante per p37- o p95-GFP sono state processate per immunofluorescenza indiretta con un anticorpo monoclonale anti-BAX in grado di riconoscere la proteina esclusivamente nella sua forma attiva. Le immagini rilevate mostrano che sia il solo dominio p37 (**Figura 3.7, pannello A**) che la tossina intera p95 (**Figura 3.7, pannello B**) sono in grado di indurre l'attivazione di BAX. In entrambi i casi è possibile osservare, inoltre, una parziale co-localizzazione della proteina pro-apoptotica sia con p37 che con p95.



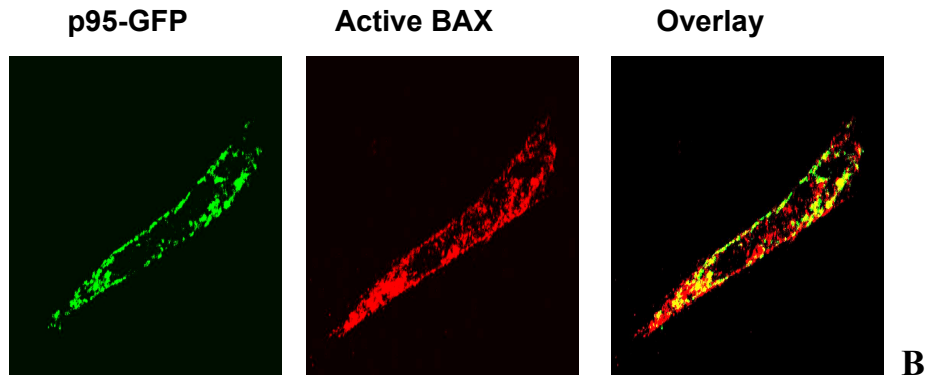


Figura 3.7. Induzione dell'attivazione di BAX da parte di p37 e p95-GFP. Cellule MEF *wt* sono state dapprima trasfettate con i costrutti di interesse, quindi dopo 24 h sono state incubate con un anticorpo primario murino anti-BAX e diluito 1:100. Il pannello *Overlay*, che rappresenta la sovrapposizione delle due fluorescenze, mostra una parziale co-localizzazione della proteina pro-apoptotica sia con p37 (A) che con p95 (B).

Abbiamo successivamente condotto lo stesso tipo di analisi su cellule MEF *wt* esposte al supernatante di *H. pylori*. L'incubazione è stata effettuata per 24 h, le cellule sono state successivamente fissate, permeabilizzate, ed incubate con un anticorpo policlonale in grado di riconoscere la tossina, e lo stesso anticorpo monoclonale anti-BAX utilizzato nell'esperimento sopra descritto. I risultati ottenuti sono illustrati dalle immagini successive: possiamo osservare dalla **Figura 3.8 (pannello A)** che l'incubazione con il supernatante 326 *wt* determina l'attivazione di BAX, in quanto la proteina pro-apoptotica viene riconosciuta dall'anticorpo, indicando così l'avvenuto cambiamento conformazionale.

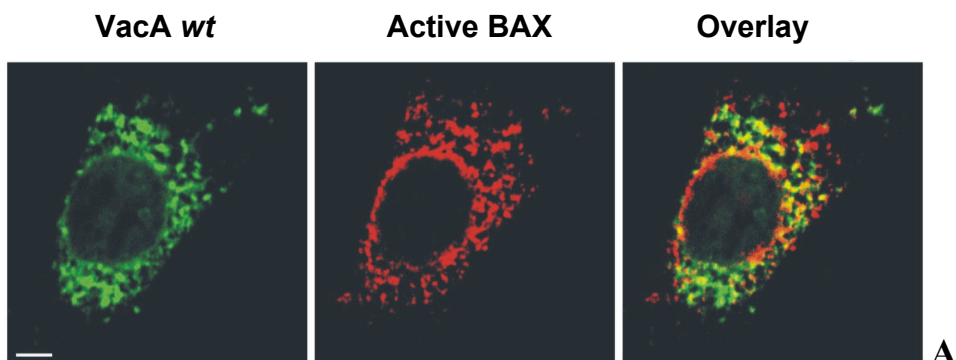


Figura 3.8, pannello A. Induzione dell'attivazione di BAX da parte di VacA *wt*. Cellule MEF *wt* sono state incubate per 24 h con il supernatante di *H. pylori* 326 *wt*, quindi sono state fissate con formaldeide e permeabilizzate con NONIDET NP-40. A ciò è seguita l'incubazione con un anticorpo policlonale anti-VacA ed uno monoclonale anti-BAX, entrambi diluiti 1:100. E' evidente che la proteina pro-apoptotica si trova nella sua forma attivata.

Lo stesso effetto non è stato osservato invece in seguito all'incubazione delle cellule con il supernatante 326 P9A (**Figura 3.8, pannello B**): la proteina BAX non viene infatti riconosciuta dall'anticorpo diretto contro la sua forma attiva, indicando che non si è verificata la sua attivazione.

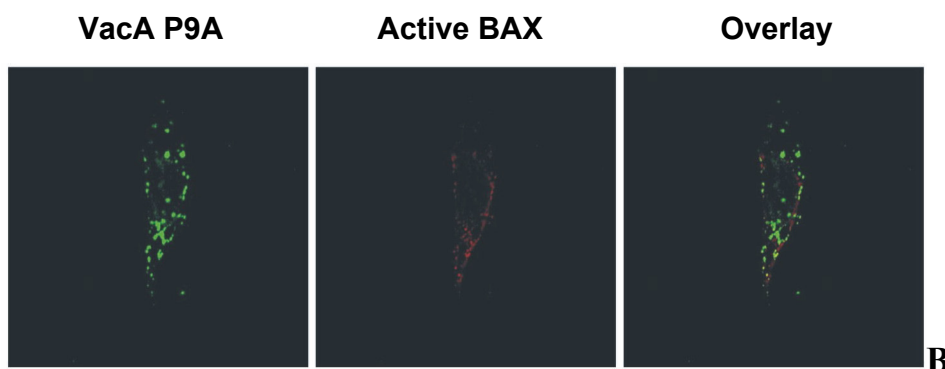


Figura 3.8, pannello B. Induzione dell'attivazione di BAX da parte di VacA P9A. Gli anticorpi primari diretti contro la tossina e la proteina pro-apoptotica sono ancora stati diluiti 1:100. I rispettivi secondari, anti-Rabbit TRITC per VacA e anti-mouse Texas-Red per BAX, sono stati diluiti allo stesso modo, tuttavia non vi è riconoscimento di BAX da parte dell'anticorpo.

Tali dati suggeriscono che VacA non solo induce morte cellulare determinando il rilascio di citocromo *c* dal mitocondrio [Galmiche *et al.*, 2000], ma agisce anche più a monte, essendo responsabile dell'attivazione di BAX. Resta da chiarire tuttavia con quale modalità si verifichi questo processo: riteniamo opportuno verificare in futuro, tramite esperimenti di immunoprecipitazione, se l'attivazione di BAX possa avvenire attraverso interazione diretta o indiretta tra questa proteina e VacA. I risultati ottenuti con la tossina mutata suggeriscono che la porzione responsabile della formazione del canale di VacA debba in qualche modo essere coinvolta.

Abbiamo successivamente voluto verificare se VacA fosse in grado di indurre non solo l'attivazione di BAX ma anche la sua traslocazione al mitocondrio come le immagini di immunofluorescenza sembravano suggerire (**Figura 3.8, pannello A**). A tale scopo abbiamo purificato frazioni mitocondriali da cellule MEF *wt* intossicate o da cellule non sottoposte ad alcun trattamento, utilizzate come controllo negativo. Successivamente abbiamo verificato tramite Western blotting la presenza della proteina pro-apoptotica nelle frazioni ottenute. Dalla **Figura 3.9** risulta evidente che

BAX è presente esclusivamente nella frazione mitocondriale purificata da cellule incubate per 24 h con il supernatante contenente la tossina *wt*.

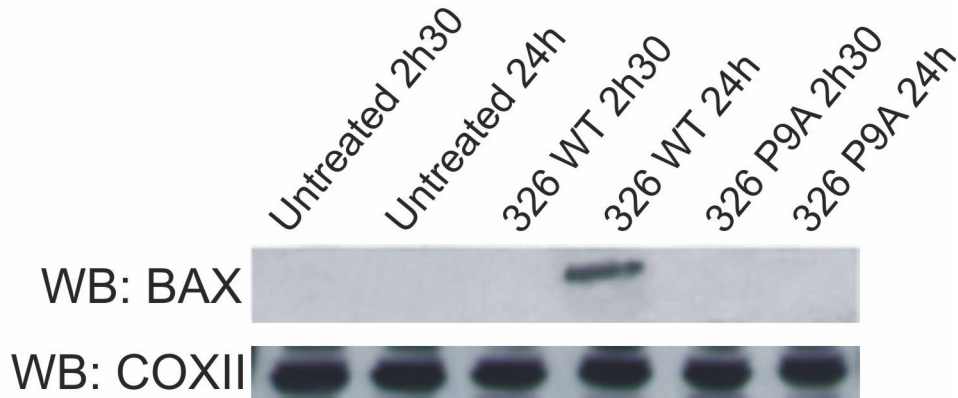


Figura 3.9. VacA induce traslocazione di BAX al mitocondrio. Frazioni mitocondriali purificate da cellule MEF *wt* incubate per 2 h 30 o 24 h con i supernatanti di coltura di *H. pylori* sono state dapprima sottoposte a SDS-PAGE e poi a Western blotting. La proteina COXII è stata considerata come controllo della quantità di proteine caricate nelle varie *lanes*. Per ogni *lane* sono stati caricati 15 µg di proteine mitocondriali.

In seguito ad un'intossicazione di 2 h 30 con lo stesso supernatante non si è osservata traslocazione della proteina pro-apoptica al mitocondrio: potrebbe trattarsi pertanto di un arco di tempo troppo limitato per far avvenire tale processo, nonostante esperimenti condotti nel nostro laboratorio abbiano dimostrato che è sufficiente per indurre l'attivazione di BAX.

Come invece atteso sulla base dei risultati ottenuti con gli esperimenti di immunofluorescenza, non è stata rilevata la presenza di BAX nelle frazioni mitocondriali purificate da cellule incubate con il supernatante contenente VacA P9A.

3.4 *VacA* localizza al mitocondrio

Uno degli aspetti più controversi a proposito di VacA riguarda la sua destinazione sub-cellulare. Negli ultimi anni due lavori hanno indipendentemente dimostrato che la tossina localizza a livello del mitocondrio sia quando viene *over*-espressa intracellularmente [Galmiche *et al.*, 2000], sia quando viene aggiunta alle

cellule dall'esterno [Willhite *et* Blanke, 2004]. Più recentemente Yamasaki *et al.* [2006] hanno mostrato che, nonostante nelle cellule incubate con la tossina vi fosse rilascio di citocromo *c* dal mitocondrio, VacA non localizzava in corrispondenza di tale organello, ma di compartimenti tardo endosomiali esprimenti il marcatore Rab7. Allo scopo di verificare quale fosse la destinazione *sub*-cellulare della tossina nel nostro modello cellulare, abbiamo innanzitutto effettuato esperimenti di immunofluorescenza, sotto descritti.

3.4.1 Il dominio N-terminale di VacA e la tossina intera localizzano al mitocondrio

Per verificare se i mitocondri costituissero la destinazione subcellulare di p37 e della tossina intera p95 espressi intracellularmente, cellule MEF *wt* sono state cotrasfettate con p37-pEGFPN3 o p95-pEGFPN3 e con un plasmide codificante per la proteina MitoRed; quest'ultima è una proteina fluorescente che emette nel rosso ($\lambda=580$ nm), dotata di una sequenza di destinazione mitocondriale che permette perciò di evidenziare il *pattern* di distribuzione di tali organelli all'interno della cellula. 24 h dopo la trasfezione le cellule sono state osservate al microscopio confocale; come è possibile verificare nelle immagini sottoriportate (**Figura 3.10, pannelli A e B**), tale analisi ha dimostrato una perfetta co-localizzazione sia di p37- che di p95-GFP e MitoRed a livello dei mitocondri, suggerendo che VacA possa indurre apoptosi agendo direttamente sulle membrane mitocondriali, senza tuttavia escludere il coinvolgimento di altre proteine pro-apoptotiche.

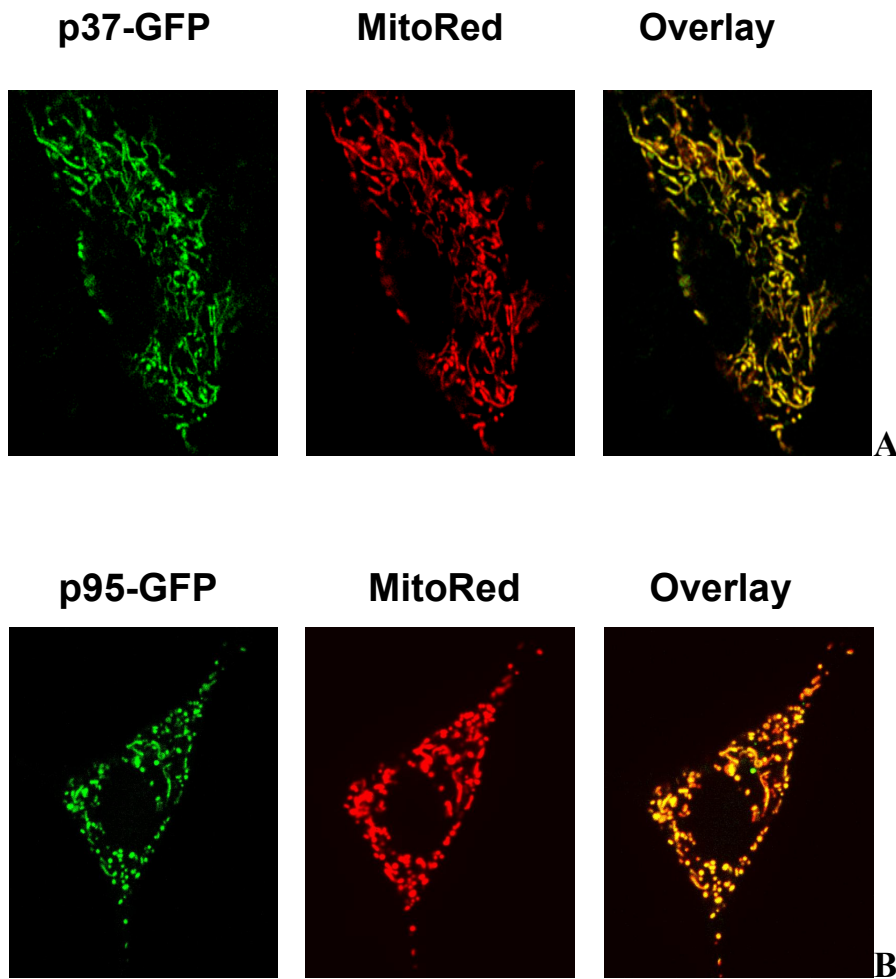


Figura 3.10. Localizzazione intracellulare di p37 e p95. Cellule MEF *wt* sono state co-trasfettate con il costrutto di interesse e con la proteina fluorescente MitoRed. E' evidente la co-localizzazione di quest'ultima sia con p37 (A) che con p95 (B).

3.4.2 La tossina VacA somministrata alle cellule localizza al mitocondrio in virtù della sua capacità di formare canale

Abbiamo successivamente verificato se il mitocondrio rappresentasse la destinazione intracellulare di VacA anche in seguito all'incubazione di cellule MEF *wt* con i supernatanti di *H. pylori*. Cellule trasfettate con il costrutto codificante per MitoRed sono state intossicate per 24 h con i supernatanti, quindi sono state fissate, permeabilizzate e processate per immunofluorescenza utilizzando un anticorpo anti vacA. La **Figura 3.11 (pannello A)** mostra anche in questo caso una co-localizzazione, seppur parziale, della tossina *wt* e del marcatore mitocondriale, confermando che il mitocondrio rappresenta effettivamente la destinazione *sub-*

cellulare di VacA, almeno per quanto riguarda il tempo considerato. Il fatto che tale co-localizzazione non sia completa, come osservato nel pannello *Overlay* della **Figura 3.10**, potrebbe essere dovuto al fatto che molto probabilmente la tossina endocitata raggiunga i mitocondri seguendo un *pathway* completamente diverso rispetto alla tossina espressa intracellularmente mediante trasfezione.

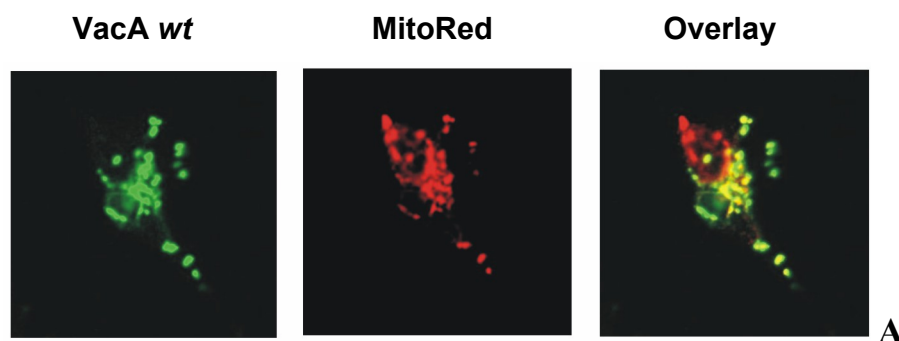


Figura 3.11, pannello A. Localizzazione intracellulare di VacA *wt* dopo 24 h di intossicazione. Il pannello *Overlay*, relativo alla sovrapposizione delle fluorescenze relative a VacA e MitoRed, mostra che la co-localizzazione tra le due proteine non è completa, come osservato in **Figura 3.10**. Per realizzare questo esperimento è stato utilizzato un anticorpo realizzato in coniglio anti-VacA, diluito 1:100.

L'analisi effettuata sulle cellule incubate con il supernatante contenente la tossina mutata ha invece fornito risultati diversi: non è stata infatti osservata alcuna co-localizzazione tra VacA P9A e MitoRed (**Figura 3.11, pannello B**). Ciò sembrerebbe indicare che la capacità della tossina di formare canale è richiesta anche per il *targeting* di VacA al mitocondrio, a livello del quale essa indurrebbe apoptosi. Questo dato è pertanto in accordo con gli esperimenti di vitalità cellulare precedentemente descritti: VacA P9A non avvia il *pathway* apoptotico in quanto non è in grado di raggiungere il mitocondrio.

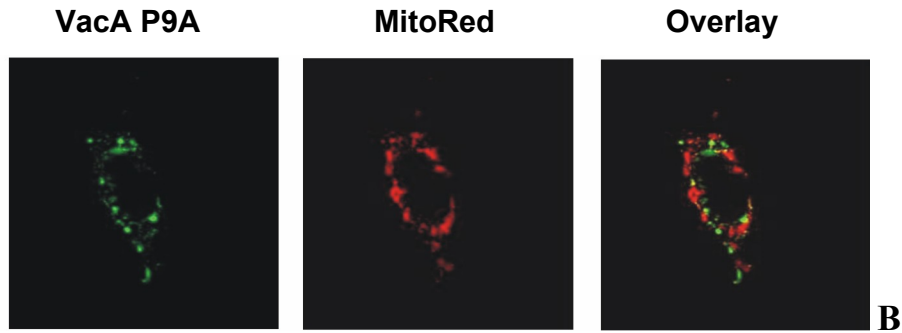


Figura 3.11, pannello B. Localizzazione intracellulare di VacA P9A dopo 24 h di intossicazione. Per questo esperimento è stato utilizzato lo stesso anticorpo anti-VacA indicato nella didascalia del pannello A. A differenza di quanto osservato nel **pannello A**, le immagini non sembrano indicare alcuna colocalizzazione tra VacA P9A e MitoRed.

Data la natura qualitativa di questi risultati abbiamo ritenuto opportuno ottenere una loro conferma utilizzando un approccio diverso. Cellule MEF *wt* sono state pertanto incubate per 24 h con i supernatanti di *H. pylori*, dopodiché abbiamo effettuato esperimenti di *sub*-frazionamento cellulare allo scopo di purificare frazioni endosomiali (endosomi precoci EE, ed endosomi tardivi LE) e mitocondriali (Mt). Tramite Western blotting abbiamo infine verificato la presenza sia di VacA *wt* che di VacA P9A nelle suddette frazioni. La **Figura 3.12** mostra i risultati ottenuti: possiamo osservare come sia VacA *wt* che VacA P9A sono presenti a livello sia degli endosomi precoci che degli endosomi tardivi, localizzazione peraltro attesa in seguito all'entrata della tossina nella cellula per endocitosi (**pannelli A e B**). A conferma di quanto osservato con gli esperimenti di immunofluorescenza, la presenza di VacA *wt* è stata riscontrata anche a livello della frazione mitocondriale (**pannello B**). Si conferma dunque che dopo 24 h di incubazione una sostanziale quota della tossina raggiunge il mitocondrio. Resta tuttavia da chiarire come avvenga il raggiungimento di tale organello a partire dagli endosomi tardivi.

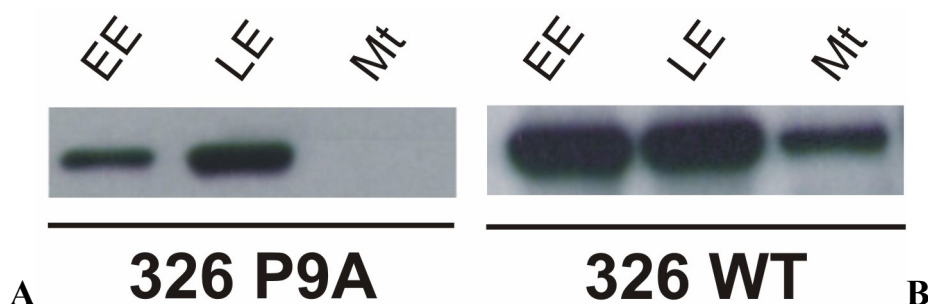


Figura 3.12. Distribuzione di VacA all'interno della cellula. Endosomi precoci (EE), tardivi (LE) e Mitocondri (Mt) sono stati purificati a partire da cellule incubate per 24 h con i supernatanti di coltura di *H. pylori*. Le frazioni purificate sono state poi sottoposte a SDS-PAGE e Western blotting. E' stato utilizzato un anticorpo policlonale anti-VacA diluito 1:1000.

Al contrario, la tossina mutante sembra arrestare il suo percorso intracellulare a livello degli endosomi tardivi, senza raggiungere i mitocondri. Inoltre il Western blot indica anche che VacA P9A non viene internalizzata nelle cellule con la stessa efficienza della tossina *wt*, dal momento che è presente nelle frazioni purificate in quantità nettamente inferiore rispetto a quest'ultima, nonostante le loro concentrazioni a livello dei supernatanti di coltura di *H. pylori* fossero paragonabili (dato non mostrato).

Dall'attività di canale di VacA dipende quindi non solo la capacità della tossina di indurre morte cellulare ma anche tutti gli eventi che portano a tale processo, a cominciare da un'efficiente internalizzazione della tossina stessa.

Visti i risultati di Western blotting ottenuti con la tossina *wt* abbiamo ritenuto opportuno escludere che la sua presenza a livello della frazione mitocondriale fosse il risultato di una *cross*-contaminazione tra organelli che si sarebbe potuta verificare durante la purificazione delle frazioni di interesse. A tale scopo abbiamo verificato, sempre tramite Western blotting, la presenza di marcatori endosomiali nelle frazioni mitocondriali, e viceversa.

3.5 *VacA* raggiunge il mitocondrio grazie ad un'alterazione del traffico intracellulare

Cellule MEF *wt* e DKO sono state incubate con i supernatanti di *H. pylori* per tempi diversi: 2 h 30, 12 h e 24 h. In parallelo è stata allestita una preparazione di cellule non trattate come controllo negativo. Successivamente sono stati purificati

endosomi precoci (Early Endosomes, EE), endosomi tardivi (Late Endosomes, LE) e mitocondri (Mitochondria, Mt) e le frazioni così ottenute sono state sottoposte ad analisi di Western blotting. Abbiamo innanzitutto valutato la distribuzione del marcatore degli endosomi precoci EEA1 (Early Endosomes Antigen 1). Dalla **Figura 3.13, pannello A** emerge che, mentre nelle frazioni purificate da cellule non incubate o trattate con il supernatante P9A tale marcatore localizza prevalentemente a livello della sua frazione di appartenenza, nelle frazioni ottenute da cellule incubate con il supernatante *wt* esso si distribuisce in maniera anomala: già dopo 2 h 30 di incubazione è evidente che esso localizza a livello degli endosomi precoci, ma è presente in quantità massiccia nella frazione mitocondriale. Confrontando questi risultati sembrerebbe che *VacA wt* abbia la capacità di indurre un'alterazione del *trafficking* intracellulare che si traduce in un accumulo di membrane endosomiali nei mitocondri. Questo processo avrebbe luogo subito dopo l'endocitosi della tossina, dal momento che l'arricchimento di EEA1 nella frazione mitocondriale viene già osservato dopo 2 h 30 di incubazione.

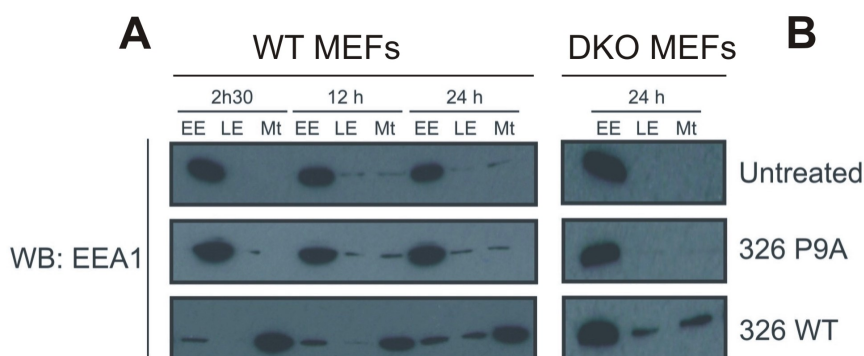


Figura 3.13. Distribuzione del marcatore EEA1 in frazioni endosomiali e mitocondriali in cellule MEF *wt* (A) e DKO (B). Per ogni *lane* sono stati caricati 10 μ g di proteine endosomiali o mitocondriali. Le membrane sono state successivamente incubate con un anticorpo policlonale anti-EEA1 diluito 1:1000.

L'attività di canale di *VacA* si rivela essere fondamentale anche per l'alterazione del traffico dal momento che, come si osserva nel **pannello A** della **Figura 3.13**, la tossina mutata non altera in modo significativo la distribuzione di EEA1. Ma il dato sorprendente relativo a questo esperimento, seppur ancora preliminare, riguarda le cellule DKO: la **Figura 3.13, pannello B**, mostra che esse non sono sensibili all'alterazione del traffico intracellulare indotta da *VacA wt*, in quanto la frazione maggiormente arricchita nel marcatore EEA1 è proprio quella

degli endosomi precoci. Questo risultato sembra pertanto indicare un coinvolgimento di BAX nell'alterazione del traffico intracellulare indotta da VacA.

Abbiamo successivamente considerato la distribuzione di un altro marcatore, LAMP1, caratteristico degli endosomi tardivi. La **Figura 3.13, pannello C**, mostra un risultato analogo a quello già visto per EEA1: già dopo 2 h 30 la frazione mitocondriale purificata da cellule incubate con il supernatante *wt* risulta essere arricchita in questo marcatore, a scapito della frazione endosomiale. L'alterazione del traffico intracellulare indotta dalla tossina sembra pertanto coinvolgere anche questi organelli.

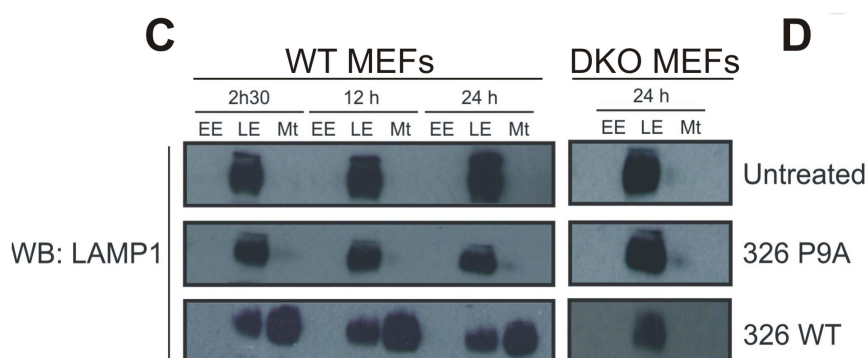


Figura 3.13. Distribuzione del marcatore LAMP1 in cellule MEF *wt* (C) e DKO (D). Le membrane utilizzate per questo esperimenti di Western blotting sono le medesime utilizzate nei pannelli A e B, dopo la rimozione degli anticorpi precedentemente utilizzati mediante *stripping*. Il peso molecolare di LAMP1 è di 120 kDa.

Anche in questo caso le cellule DKO non sembrano essere sensibili al trattamento con la tossina *wt* dopo 24 h di incubazione, e LAMP1 localizza solo in corrispondenza della frazione di appartenenza (**Figura 3.13, pannello D**).

Allo scopo di verificare il reclutamento e la traslocazione di BAX al mitocondrio abbiamo sottoposto le frazioni purificate anche ad un'analisi di Western blotting utilizzando un anticorpo anti-BAX. Questa volta i risultati, mostrati in **Figura 3.13, pannello E**, sono stati del tutto inaspettati. Possiamo vedere che la proteina pro-apoptotica non è presente nella frazione mitocondriale dopo 2 h 30 di incubazione, in accordo con gli esperimenti sulla traslocazione precedentemente illustrati, ma comincia ad accumularsi nell'organello in maniera significativa dopo 12 h. La quantità di proteina presente nel mitocondrio a questo tempo tuttavia non è ancora sufficiente ad indurre morte cellulare, dal momento che il test dell'Annexina-

V ha mostrato un notevole decremento della vitalità di cellule MEF *wt* a partire da 18 h di incubazione con il supernatante *wt* di *H. pylori* (vedi **Figura 3.3, pannello A**).

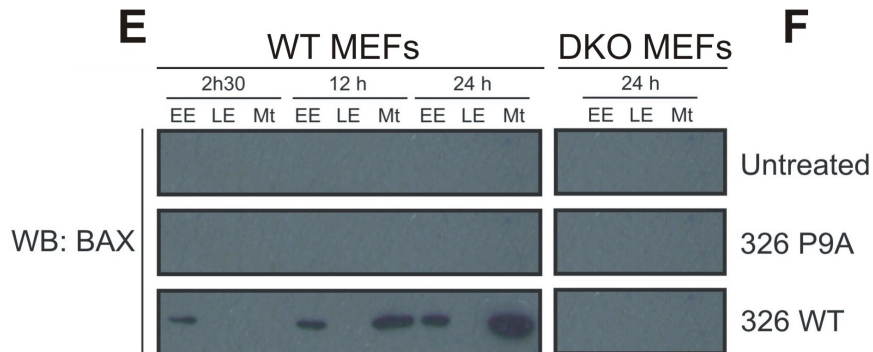


Figura 3.13. Distribuzione della proteina BAX in cellule MEF *wt* (E) e DKO (F). Per effettuare questo esperimento è stato utilizzato un generico anticorpo policlonale anti-BAX, in grado di riconoscere sia la forma attiva che quella inattiva della proteina. L'anticorpo è stato diluito 1:1000.

La cosa più sorprendente riguardo questo esperimento però consiste nel reclutamento della proteina pro-apoptotica a livello degli endosomi precoci (**Figura 3.13, pannello E**). Come già detto nell'Introduzione BAX localizza, nella sua forma non attiva, a livello del citosol o è molto debolmente associata alle membrane intracellulari, tuttavia non era mai stata descritta in letteratura una sua specifica interazione con gli endosomi precoci. Non è quindi noto quale sia il significato di tale reclutamento. La totalità di BAX che raggiunge il mitocondrio sembrerebbe pertanto provenire fondamentalmente dal citosol ma anche dagli endosomi precoci, che raggiungerebbero l'organello in conseguenza dell'alterazione del traffico indotta da VacA. Come atteso dagli esperimenti precedentemente descritti, VacA P9A non è in grado di indurre la traslocazione di BAX al mitocondrio, né il suo reclutamento agli endosomi precoci.

Abbiamo infine sottoposto le frazioni purificate ad un'ultima analisi di Western blotting, allo scopo di valutare nel tempo la distribuzione della tossina VacA (**Figura 3.13, pannelli G e H**). Come già precedentemente osservato (**Figura 3.12, pannello A**), nelle cellule MEF *wt* la tossina P9A localizza esclusivamente in corrispondenza delle frazioni endosomiali senza mai raggiungere i mitocondri.

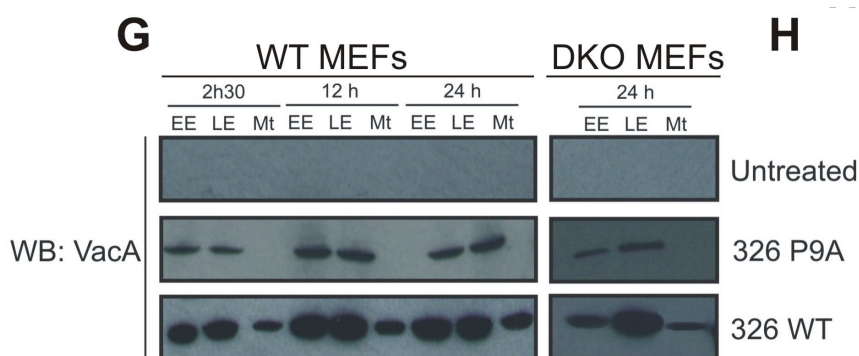


Figura 3.13. Distribuzione della tossina VacA *wt* e P9A in cellule MEF *wt* (G) e DKO (H). Possiamo vedere la presenza di VacA *wt* al mitocondrio già dopo 2 h 30 di incubazione, in accordo con l'alterazione del traffico intracellulare osservata nei pannelli precedenti. E' stato utilizzato lo stesso anticorpo per il riconoscimento di entrambe le tossine, realizzato in coniglio e diluito 1:1000.

La tossina *wt* invece risulta essere presente nella frazione mitocondriale già dopo 2 h 30 di incubazione, e si accumula progressivamente nell'organello. In questo esperimento viene anche riconfermato il fatto che la tossina P9A entra nelle cellule con minore efficienza rispetto a VacA *wt*. Esperimenti preliminari condotti su cellule MEF DKO hanno mostrato invece una situazione completamente diversa (**Figura 3.12, pannello H**): mentre VacA P9A continua a localizzare esclusivamente negli endosomi precoci e tardivi, VacA *wt* localizza prevalentemente a livello degli endosomi tardivi, e solo una minima parte sembra essere in grado di raggiungere i mitocondri. Questi dati sono in accordo con i risultati ottenuti sulla capacità della tossina di indurre vacuolizzazione delle cellule MEF DKO, descritti in seguito.

Presi nel loro complesso questi dati suggeriscono pertanto che VacA, una volta endocitata, riesca a raggiungere i mitocondri grazie ad un'alterazione del traffico intracellulare da lei indotta. Tale alterazione sarebbe caratterizzata dalla migrazione delle membrane endosomiali verso i mitocondri e probabilmente dalla loro successiva fusione, mentre non succedrebbe il contrario, dal momento che marcatori mitocondriali come COXII non sono mai stati rilevati nelle frazioni endosomiali purificate. Contemporaneamente all'alterazione del traffico VacA recluterebbe BAX, non si sa se tramite interazione diretta o indiretta, a livello degli endosomi precoci già dopo 2 h 30 di incubazione ed entrambe, probabilmente in conseguenza alla migrazione delle membrane endosomiali, raggiungerebbero i mitocondri da cui la tossina indurrebbe depolarizzazione della membrana mitocondriale interna e rilascio di citocromo *c*. Da questi risultati emergono però altre

importanti informazioni: la proteina BAX sembrerebbe avere un ruolo che va ben oltre la sua funzione pro-apoptotica. Gli esperimenti condotti sulle cellule DKO, seppur ancora preliminari, suggeriscono infatti che essa potrebbe avere un ruolo decisivo nell'alterazione del traffico indotta da VacA, visto che dopo 24 h di incubazione con il supernatante *wt* non è stata apprezzata una ri-distribuzione dei marcatori endosomiali come osservato per le cellule MEF *wt*.

3.6 BAX e BAK non sono necessarie per l'induzione di vacuolizzazione da parte di VacA

Sulla base dei risultati ottenuti finora con il nostro modello cellulare, abbiamo ritenuto opportuno verificare se VacA *wt* fosse in grado di indurre la formazione di vacuoli in cellule MEF *wt* e DKO. Diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che la vacuolizzazione e la morte cellulare, pur essendo entrambe indotte dalla stessa tossina e dipendenti dalla sua attività di canale, sono tra loro non correlate. Willhite e Blanke [2003] hanno dimostrato che la bafilomicina A1, un inibitore della v-ATPasi, blocca la vacuolizzazione nelle cellule HeLa, ma non interferisce con il rilascio di citocromo *c*. Blanke *et al.* nel 2005 hanno dimostrato, inoltre, che le concentrazioni di tossina purificata sufficienti ad indurre vacuolizzazione non bastano perché si verifichi anche il rilascio di citocromo *c*; al contrario, alle dosi di tossina necessarie per il verificarsi di quest'ultimo processo le cellule vacuolizzano molto prima di morire per apoptosi, indicando che non è il rilascio di citocromo *c* ad indurre la vacuolizzazione cellulare. Un'ulteriore conferma dell'assenza di correlazione tra le due attività sta nel fatto che l'espressione intracellulare del dominio p37 determina un aumento nel livello di apoptosi delle cellule trasfettate, mentre non è sufficiente ad indurre la loro vacuolizzazione [Galmiche *et al.*, 2000].

Cellule MEF *wt* e DKO sono state pertanto incubate per 6 ore con il supernatante contenente la tossina *wt* e successivamente la vacuolizzazione è stata stimata dal punto di vista quantitativo mediante il saggio del Neutral Red Uptake (NRU). Come riportato nella Figura sottostante (**Figura 3.14**), è stato riscontrato che VacA induce vacuolizzazione nelle cellule MEF DKO in misura notevolmente maggiore rispetto alla controparte *wt*.

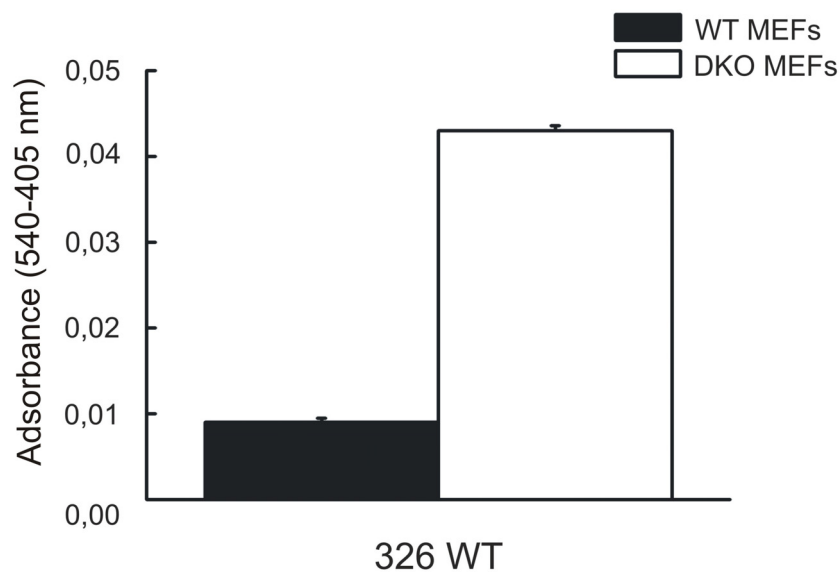


Figura 3.14. Vacuolizzazione cellulare indotta da *VacA wt* su cellule MEF *wt* e DKO. Cellule MEF *wt* e DKO sono state incubate per 6 h con i supernatanti di coltura di *H. pylori*, opportunamente diluiti in DMEM, in presenza di NH_4Cl 5 mM. Il NRU *Assay* ha permesso di stimare quantitativamente il livello di vacuolizzazione delle cellule. Le cellule MEF DKO hanno cominciato a vacuolizzare già dopo 1 h 30 di incubazione.

Questi risultati sono in accordo con i dati riportati in **Figura 3.13, pannello H**, che mostrano nelle MEF DKO un accumulo della tossina a livello degli endosomi tardivi, che sono proprio la sede di formazione dei vacuoli.

Nonostante una così diversa responsività dei due tipi cellulari fosse del tutto inaspettata, questi risultati confermano in modo inequivocabile quanto riportato in letteratura. I dati ottenuti pertanto indicherebbero per BAX un ulteriore ruolo che va al di là del suo coinvolgimento nel rilascio di fattori apoptogeni dal mitocondrio. La ragione per cui il silenziamento delle proteine BAX e BAK si traduca in una così forte vacuolizzazione è un argomento che necessita di future analisi.

4. CONCLUSIONI

Dieci anni di studio sulla tossina VacA hanno permesso di comprendere le numerose proprietà e i meccanismi d'azione di uno dei principali fattori di virulenza di *H. pylori*. Questa citotossina, principalmente nota per la sua attività vacuolizzante *in vitro*, si è rivelata essere in grado di indurre, grazie alla sua attività di canale, numerosi effetti citotossici tra cui l'apoptosi. In questo lavoro ci siamo proposti di chiarire i meccanismi molecolari che stanno alla base di tale processo.

Come affermato in precedenza, l'apoptosi è un processo finemente regolato da proteine che, in seguito ad un appropriato stimolo di morte, vengono attivate e concorrono al rilascio di fattori pro-apoptotici dal mitocondrio (Bax e Bak), al rilascio di Calcio dal reticolo endoplasmatico, al taglio proteolitico di specifici *target* cellulari (caspasi). Date le evidenze sperimentali ottenute da Yamasaki *et al.* nel 2006, illustranti l'attivazione delle proteine pro-apoptotiche Bax e Bak, entrambe appartenenti alla famiglia di Bcl-2, da parte di VacA nell'apoptosi da essa indotta, abbiamo voluto verificare il loro effettivo coinvolgimento anche nel nostro modello sperimentale. I risultati ottenuti, sia con l'espressione intracellulare di VacA e del suo solo dominio N-terminale p37, sia con l'aggiunta della tossina alle cellule dall'esterno hanno decisamente confermato questi dati, indicando peraltro che non solo il dominio p37 è sufficiente *per se* ad indurre apoptosi, ma anche che tale proprietà dipende dall'attività di canale della tossina, dal momento che la somministrazione alle cellule del supernatante contenente la tossina mutata (VacA P9A), non ha sortito alcun decremento della loro vitalità. L'azione apoptogena di VacA non coinvolge il reticolo endoplasmatico, e quindi non è suscettibile alle variazioni della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare.

Come già detto in precedenza VacA, aggiunta al mezzo di coltura cellulare o espressa mediante trasfezione, localizza nei mitocondri. Ulteriori studi *in vitro* effettuati su mitocondri isolati di lievito indicano che la tossina va a posizionarsi nella membrana mitocondriale interna [Galmiche *et al.*, 2000]. E' noto che VacA, in forma monomerica, si inserisce nella membrana plasmatica delle cellule con cui entra in contatto, e forma canali esamericici specifici per gli anioni. Essa viene successivamente endocitata e raggiunge gli endosomi tardivi, a livello dei quali induce vacuolizzazione cellulare. Non è stato tuttavia ancora chiarito come la tossina possa arrivare da tali

compartimenti al mitocondrio, e da lì indurre apoptosi. In questo lavoro proponiamo un modello che spiegherebbe per la prima volta questo meccanismo. Esperimenti condotti su endosomi e mitocondri purificati da cellule intossicate per tempi diversi con i supernatanti di coltura di *H. pylori* hanno messo in luce una nuova proprietà di VacA, che consiste nella capacità di alterare il traffico intracellulare già dopo 2 h dalla sua endocitosi. In questo modo la tossina causerebbe la migrazione delle membrane endosomiali verso quelle mitocondriali, come dimostrato dall'arricchimento in queste ultime frazioni dei marcatori EEA1 (tipico degli endosomi precoci) e LAMP1 (endosomi tardivi), raggiungendo così la sua destinazione definitiva probabilmente in seguito alla fusione di tali membrane. Grazie alla sua attività di canale la tossina causerebbe quindi il dissipamento del potenziale della membrana mitocondriale interna, a cui seguirebbe il rilascio di citocromo *c*, indice della permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna [Willhite *et al.*, 2004]. Resta da chiarire se questi ultimi eventi siano dovuti alla sola azione della tossina, o se vi sia un coinvolgimento diretto di altri fattori pro-apoptotici. Yamasaki *et al.* hanno dimostrato che da mitocondri isolati incubati con la tossina purificata non vi è rilascio di citocromo *c*: ciò suggerisce che VacA, per svolgere il suo ruolo apoptogeno a livello del mitocondrio, necessita di uno o più *partner* endogeni. Uno di questi potrebbe essere BAX: in questo lavoro viene osservato che tale proteina viene attivata dalla stessa VacA, ma abbiamo dimostrato anche per la prima volta che quest'ultima induce il reclutamento di BAX a livello degli endosomi precoci. La sua traslocazione al mitocondrio sarebbe la conseguenza dell'alterazione del traffico indotta dalla tossina. Non è noto se tale evento rifletta un'interazione, diretta o indiretta, tra le due proteine e se BAX possa essere coinvolta direttamente nella formazione del canale da parte di VacA a livello dell'organello.

L'alterazione del traffico intracellulare non è stata osservata nelle cellule incubate con il supernatante contenente la tossina mutata, che infatti sembra arrestare il suo percorso a livello degli endosomi tardivi: ciò lascia pertanto supporre che l'attività di canale sia richiesta per la regolazione degli eventi che stanno anche a monte della permeabilizzazione della membrana interna del mitocondrio e dell'innesco della cascata di morte.

Benché entrambe dipendenti dall'attività di canale, l'apoptosi e la vacuolizzazione cellulare indotte da VacA risultano essere tra di loro non correlate. In questo lavoro abbiamo infatti dimostrato che le cellule DKO per BAX e BAK

vacuolizzano in misura nettamente maggiore rispetto alla controparte *wt*, pur non andando incontro a morte cellulare. Esperimenti preliminari che abbiamo condotto suggeriscono peraltro che BAX abbia un ruolo importante anche nell'induzione dell'alterazione del traffico intracellulare, dal momento che tale processo non è stato osservato nelle cellule DKO incubate con il supernatante *wt* di *H. pylori*.

Questi dati suggeriscono pertanto un coinvolgimento di BAX in attività che esulano dall'induzione di morte cellulare: è nostra intenzione approfondire questo aspetto cercando di confermare gli esperimenti descritti e di supportarli con analisi di immunofluorescenza.

5. BIBLIOGRAFIA

A

Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engine for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 715-720 (2002).

Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF and Trust TJ. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397: 176-180 (1999).

Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ and Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300: 1430-1434 (2003).

Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, and Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome *c* release from mitochondria. *Biochem J* 345 Pt 2: 271-278 (2000).

Ashktorab H, Ahmed A, Littleton G, Wang XW, Allen CR, Tackey R, Walters C, and Smoot DT. p53 and p14 increase sensitivity of gastric cells to *H. pylori*-induced apoptosis. *Dig Dis Sci* 48: 1284-1291 (2003).

Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ and Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 270: 17771-17777 (1995).

Atherton JC, Peek RM Jr, Tham KT, Cover TL and Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in VacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 112: 92-99 (1997).

Ausubel FM, Brent R, Kingstone RE, Moore DD, Scindman JG, Smith JA and Strul K. Current protocols in molecular biology. *Green Publishing Associated*, New York (1989).

B

Bhaskar KR, Garik P, Turner BS, Bradley JD, Bansil R, Stanley HE and LaMont JT. Viscous fingering of HCl through gastric mucin. *Nature* 360: 458-461 (1992).

Bjorkholm B, Zhukhovitsky V, Lofman C, Hulten K, Enroth H, Block M, Rigo R, Falk P and Engstrand L. *Helicobacter pylori* entry into human gastric epithelial cells: A potential determinant of virulence, persistence, and treatment failures. *Helicobacter* 5: 148-154 (2000).

Blaser MJ and Atherthon JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 113: 321-333 (2004).

Boncrisiano M, Paccani SR, Barone S, Olivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elios MM, Telford JL and Baldari CT. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* 198: 1887-1897 (2003).

Boquet P, Ricci V, Galmiche A and Gauthier NC. Gastric cell apoptosis and *H. pylori*: has the main function of VacA finally been identified? *Trends Microbiol* 11: 410-413 (2003).

Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G and Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 262: 1892-1895 (1993).

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254 (1976).

Breckenridge DG, Germain M, Mathai J, Nguyen M and Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22: 8608-8618 (2003).

Burroni D, Lupetti P, Pagliaccia C, Reytrat JM, Dallai R, Rappuoli R and Telford JL. Deletion of the major proteolytic site of the *Helicobacter pylori* cytotoxin does not influence toxin activity but favors assembly of the toxin into hexameric structures. *Inf Immun* 66: 5547-5550 (1998).

Bury-Mone S, Skouloubris S, Dauga C, Thiberge JM, Dailidiene D, Berg DE, Labigne A and De Reuse H. Presence of active aliphatic amidases in *Helicobacter* species able to colonize the stomach. *Infect Immun* 71: 5613-5622 (2003).

C

Caputo R, Tuccillo C, Manzo BA, Zarrilli R, Tortora G, Blanco Cdel V., Ricci V, Ciardiello F and Romano M. *Helicobacter pylori* VacA toxin up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN 28 gastric cells through an epidermal growth factor receptor-, cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Clin Cancer Res* 9: 2015-2021 (2003).

Chen G, Sordillo EM, Ramey WG, Reidy J, Holt PR, Krajewski S, Reed JC, Blaser MJ, and Moss SF. Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 626-632 (1997).

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, and Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8: 705-711 (2001).

Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J and Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284: 1328-1333 (1999).

Cover TL, Puryear W, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Infect Immun* 59: 1264-1270 (1991).

Cover TL and Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 267: 10570-10575 (1992).

Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA and Blaser M J. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 269: 10566-10573 (1994).

Cover TL, Hanson PI and Heuser JE. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol* 138: 759-769 (1997).

Cover TL, Krishna US, Israel DA and Peek RM Jr. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 63: 951-957 (2003).

Cover TL et Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 3: 320-332 (2005).

Czajkowsky DM, Iwamoto H, Cover TL and Shao Z. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96: 2001-2006 (1999).

D

D'Elíos MM, Montecucco C, de Bernard M. VacA and HP-NAP, Ying and Yang of *Helicobacter pylori*-associated gastric inflammation. *Clin Chim Acta* 381: 32-38 (2007).

de Bernard M, Papini E, de Filippis V, Gottardi E, Telford J, Manetti R, Fontana A, Rappuoli R and Montecucco C. Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *J Biol Chem* 270: 23937-23940 (1995).

de Bernard M, Burróni D, Papini E, Rappuoli R, Telford J and Montecucco C. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Inf Immun* 66: 6014-6016 (1998a).

de Bernard M, Moschioni M, Papini E, Telford J, Rappuoli R and Montecucco C. Cell vacuolization induced by *Helicobacter pylori* VacA toxin: cell line sensitivity and quantitative estimation. *Toxicol Lett* 99: 109-115 (1998b).

de Bernard M, Moschioni M, Habermann A, Griffiths G and Montecucco C. Cell vacuolization induced by *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin does not depend on late endosomal SNAREs. *Cell Microbiol* 4: 11-18 (2002).

de Bernard M, Cappon A, Del Giudice G, Rappuoli R, and Montecucco C. The multiple cellular activities of the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 293: 589-597 (2004).

de Bernard M, Cappon A, Pancotto L, Ruggiero P, Rivera J, Del Giudice G and Montecucco C. The *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations. *Cell Microbiol* 7: 191-198 (2005).

Degli Esposti M and Dive C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 455-461 (2003).

Dixon MF, Genta RM, Yardley JH and Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 20: 1161-1181 (1996).

Dundon WG, Polenghi A, Del Giudice G, Rappuoli R, and Montecucco C. Neutrophil-activating protein (HP-NAP) versus ferritin (Pfr): comparison of synthesis in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 199: 143-149 (2001).

Dunn BE, Vakil NB, Schneider BG, Miller MM, Zitzer JB, Peutz T, and Phadnis SH. Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein in human gastric biopsies. *Infect Immun* 65: 1181-1188 (1997).

E

Eaton KA, Cover TL, Tummuru MK, Blaser MJ and Krakowka S. Role of vacuolating cytotoxin in gastritis due to *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Inf Immun* 65: 3462-3464 (1997).

Evans DJ Jr, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, Granger DN and Kvietys PR. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Inf Immun* 63: 2213-2220 (1995b).

F

Fan X, Gunasena H, Cheng Z, Espejo R, Crowe SE, Ernst PB and Reyes VE. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol* 165: 1918-1924 (2000).

Ferrero RL, Thiberge JM, Huerre M and Labigne A. Recombinant antigens prepared from the urease subunits of *Helicobacter* spp.: evidence of protection in a mouse model of gastric infection. *Inf Immun* 62: 4981-4989 (1994).

Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Chiaravalli AM, Capella C and Solcia E. Epithelial cytotoxicity, immune responses, and inflammatory components of *Helicobacter pylori* gastritis. *Scand J Gastroenterol* 205: 11-21 (1994).

Foryst-Ludwig A and Naumann M. p21-activated kinase 1 activates the nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase-Ikappa B kinases NF-kappa B pathway and proinflammatory cytokines in *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem* 275: 39779-39785 (2000).

Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K, Fukada M, Shintani T, Wada A, Aoyama N, Hirayama T, Fukamachi H and Noda M. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat Genet* 33: 375-381 (2003).

G

Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, de Thillot V, Just I, Ricci V, Solcia E, Van Obberghen E and Boquet P. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome *c* release. *EMBO J* 19: 6361-6370 (2000).

Gauthier NC, Ricci V, Gounon P, Doye A, Tauc M, Poujeol P and Boquet P. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and actin cytoskeleton modulate chloride transport by channels formed by the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA in HeLa cells. *J Biol Chem* 279: 9481-9489 (2004).

Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R and Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301: 1099-1102 (2003).

Genisset C, Galeotti CL, Lupetti P, Mercati D, Skibinski DA, Barone S, Battistutta R, de Bernard M, Telford JL. A *Helicobacter pylori* vacuolating toxin mutant that fails to oligomerize has a dominant negative phenotype. *Infect Immun* 74: 1786-1794 (2006).

Go MF. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? *Gastroenterology* 113: S15-20 (1997).

Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, and Shore GC. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 143: 207-215 (1998).

Gross A, McDonnell JM, and Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899-1911 (1999).

Gupta RA, Polk DB, Krishna U, Israel DA, Yan F, DuBois RN and Peek RM Jr. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses nuclear factor kappa B-mediated apoptosis induced by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 276: 31059-31066 (2001).

H

Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* 4: 688-694 (2004).

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776 (2000).

Heuser JE. Procedure for freeze-drying molecules adsorbed to mica flakes. *J Mol Biol* 169: 155-195 (1983).

Higashi H, Nakaya A, Tsutsumi R, Yokoyama K, Fujii Y, Ishikawa S, Higuchi M, Takahashi A, Kurashima Y, Teishikata Y, Tanaka S, Azuma T, and Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* 279: 17205-17216 (2004).

Houghton JM, Bloch LM, Goldstein M, Von Hagen S and Korah RM. *In vivo* disruption of the fas pathway abrogates gastric growth alterations secondary to *Helicobacter* infection. *J Infect Dis* 182: 856-864 (2000).

I

Iiver D, Barone S, Mercati D, Lupetti P and Telford JL. *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cell Microbiol* 6: 167-174 (2004).

Iwamoto H, Czajkowsky DM, Cover TL, Szabo G and Shao Z. VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett* 450: 101-104 (1999).

J

Ji X, Fernandez T, Burrioni D, Pagliaccia C, Atherton JC, Reyrat JM, Rappuoli R and Telford JL. Cell specificity of *Helicobacter pylori* cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic midregion. *Inf Immun* 68: 3754-3757 (2000).

Ji X, Frati F, Barone S, Pagliaccia C, Burrioni D, Xu G, Rappuoli R, Reyrat JM and Telford J L. Evolution of functional polymorphism in the gene coding for the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *FEMS Microbiol Lett* 206: 253-258 (2002).

Jones NL, Shannon PT, Cutz E, Yeger H, and Sherman PM. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Pathol* 151: 1695-1703 (1997).

Jones NL, Day AS, Jennings HA and Sherman PM. *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression. *Inf Immun* 67: 4237-4242 (1999).

Jones NL, Day AS, Jennings H, Shannon PT, Galindo-Mata E and Sherman PM. Enhanced disease severity in *Helicobacter pylori*-infected mice deficient in Fas signaling. *Inf Immun* 70: 2591-2597 (2002).

K

Kawahara T, Teshima S, Kuwano Y, Oka A, Kishi K and Rokutan K. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide induces apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G726-734 (2001).

Keates S, Hitti YS, Upton M and Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 113: 1099-1109 (1997).

Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC and Louw JA. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut* 45: 499-502 (1999).

Kimura M, Goto S, Wada A, Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H, Hirayama T, and Kondo T. Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb Pathog* 26: 45-52 (1999).

Kimura T, Wada A, Nakayama M, Ogushi K, Nishi Y, De Guzman BB, Moss J and Hirayama T. High molecular weight factor in FCS inhibits *Helicobacter pylori* VacA-binding to its receptor, RPTPbeta, on AZ-521. *Microbiol Immunol* 47: 105-107 (2003).

Ko GH, Kang SM, Kim YK, Lee JH, Park CK, Youn HS, Baik SC, Cho MJ, Lee WK and Rhee KH. Invasiveness of *Helicobacter pylori* into human gastric mucosa. *Helicobacter* 4: 77-81 (1999).

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, and van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420 (1994).

Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W and Rudi J. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Inf Immun* 69: 5080-5087 (2001).

Kuo CH and Wang WC. Binding and internalization of *Helicobacter pylori* VacA via cellular lipid rafts in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 640-644 (2003).

L

Lanzavecchia S, Bellon PL, Lupetti P, Dallai R, Rappuoli R and Telford JL. Three-dimensional reconstruction of metal replicas of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Struct Biol* 121: 9-18 (1998).

Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG and Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 26: 93-99 (1988).

Li Y, Wandinger-Ness A, Goldenring JR and Cover TL. Clustering and redistribution of late endocytic compartments in response to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Mol Biol Cell* 15: 1946-1959 (2004).

Logan RP. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* 344: 1078-1079 (1994).

Lozniewski A, Haristoy X, Rasko DA, Hatier R, Plenat F, Taylor DE and Angioi-Duprez K. Influence of Lewis antigen expression by *Helicobacter pylori* on bacterial internalization by gastric epithelial cells. *Inf Immun* 71: 2902-2906 (2003).

Lupetti P, Heuser JE, Manetti R, Massari P, Lanzavecchia S, Bellon PL, Dallai R, Rappuoli R and Telford JL. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol* 133: 801-807 (1996).

M

Marais A, Mendz GL, Hazell SL, and Megraud F. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 642-674 (1999).

Marchetti M, Arico B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R and Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267: 1655-1658 (1995).

Massari P, Manetti R, Burroni D, Nuti S, Norais N, Rappuoli R and Telford JL. Binding of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin to target cells. *Inf Immun* 66: 3981-3984 (1998).

McClain MS, Schraw W, Ricci V, Boquet P and Cover TL. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 37: 433-442 (2000).

McClain MS, Iwamoto H, Cao P, Vinion-Dubiel AD, Li Y, Szabo G, Shao Z and Cover TL. Essential role of a GXXXG motif for membrane channel formation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Biol Chem* 278: 12101-12108 (2003).

Menz GL, Hazell SL and van Gorkom L. Pyruvate metabolism in *Helicobacter pylori*. *Arch Microbiol* 162: 187-192 (1994).

Miehlke S, Kirsch C, Agha-Amiri K, Gunther T, Lehn N, Malfertheiner P, Stolte M, Ehninger G and Bayerdorffer E. The *Helicobacter pylori vacA* s1, m1 genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer Suppl* 87: 322-327 (2000).

Mizote T, Yoshiyama H and Nakazawa T. Urease-independent chemotactic responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate. *Inf Immun* 65: 1519-1521 (1997).

Molinari M, Galli C, Norais N, Telford JL, Rappuoli R, Luzio JP and Montecucco C. Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers. *J Biol Chem* 272: 25339-25344 (1997).

Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A and Montecucco C. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med* 187: 135-140 (1998).

Montecucco C, Papini E, de Bernard M, and Zoratti M. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. *FEBS Lett* 452: 16-21 (1999).

Montecucco C et Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 457-466 (2001).

Montecucco C and de Bernard M. Immunosuppressive and proinflammatory activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. *J Exp Med* 198: 1767-1771 (2003).

Montemurro P, Barbuti G, Dundon WG, Del Giudice G, Rappuoli R, Colucci M, De Rinaldis P, Montecucco C, Semeraro N, and Papini E. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production by human blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 183: 1055-1062 (2001).

Munzenmaier A, Lange C, Glocker E, Covacci A, Moran A, Bereswill S, Baeuerle PA, Kist M and Pahl HL. A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 159: 6140-6147 (1997).

N

Nakamura H, Yoshiyama H, Takeuchi H, Mizote T, Okita K and Nakazawa T. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Inf Immun* 66: 4832-4837 (1998).

Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, and Youle RJ. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 18: 2330-2341 (1999).

Noach LA, Rolf TM and Tytgat GN. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol* 47: 699-704 (1994b).

O

Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T, and Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and Calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 102: 105-110 (2005).

Ogura K, Maeda S, Nakao M, Watanabe T, Tada M, Kyutoku T, Yoshida H, Shiratori Y and Omata M. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med* 192: 1601-1610 (2000).

P

Padilla PI, Wada A, Yahiro K, Kimura M, Niidome T, Aoyagi H, Kumatori A, Anami M, Hayashi T, Fujisawa J, Saito H, Moss J and Hirayama T. Morphologic differentiation of HL-60 cells is associated with appearance of RPTPbeta and induction of *Helicobacter pylori* VacA sensitivity. *J Biol Chem* 275: 15200-15206 (2000).

Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burroni D, Cover TL, Papini E, Rappuoli R, Telford JL and Reyrat J M. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95: 10212-10217 (1998).

Pan ZJ, Berg DE, van der Hulst RW, Su WW, Raudonikiene A, Xiao SD, Dankert J, Tytgat GN and van der Ende A. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J Infect Dis* 178: 220-226 (1998).

Papini E, Gottardi E, Satin B, de Bernard M, Massari P, Telford J, Rappuoli R, Sato SB and Montecucco C. The vacuolar ATPase proton pump is present on intracellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 45: 84-89 (1996).

Papini E, Satin B, Bucci C, de Bernard M, Telford JL, Manetti R, Rappuoli R, Zerial M and Montecucco C. The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *EMBO J* 16: 15-24 (1997).

Papini E, Satin B, Norais N, de Bernard M, Telford JL, Rappuoli R and Montecucco C. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Clin Inv* 102: 813-820 (1998).

Parsonnet J, Shmueli H and Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA* 282: 2240-2245 (1999).

Patel HK, Willhite DC, Patel RM, Ye D, Williams CL, Torres EM, Marty KB, MacDonald RA and Blanke SR. Plasma membrane cholesterol modulates cellular vacuolation induced by the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Inf Immun* 70: 4112-4123 (2002).

Peek RM Jr, Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Cover TL, Song SY, Krishna U and Pietenpol JA. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res* 59: 6124-6131 (1999).

Peek RM Jr, Wirth HP, Moss SF, Yang M, Abdalla AM, Tham KT, Zhang T, Tang LH, Modlin IM and Blaser MJ. *Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 118: 48-59 (2000).

Pelicic V, Reyrat JM, Sartori L, Pagliaccia C, Rappuoli R, Telford JL, Montecucco C and Papini E. *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin associated with the bacteria increases epithelial permeability independently of its vacuolating activity. *Microbiology* 145 (Pt 8): 2043-2050 (1999).

R

Rappuoli R, Lange C, Censini S, Covacci A. Pathogenicity island mediates *Helicobacter pylori* interaction with the host. *Folia Microbiol.* 43(3): 275-278 (1998).

Reyrat JM, Lanzavecchia S, Lupetti P, de Bernard M, Pagliaccia C, Pelicic V, Charrel M, Ulivieri C, Norais N, Ji X, Cabiliaux V, Papini E, Rappuoli R and Telford JL. 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *J Mol Biol* 290: 459-470 (1999).

Ricci V, Galmiche A, Doye A, Necchi V, Solcia E and Boquet P. High cell sensitivity to *Helicobacter pylori* VacA toxin depends on a GPI-anchored protein and is not blocked by inhibition of the clathrin-mediated pathway of endocytosis. *Mol Biol Cell* 11: 3897-3909 (2000).

Rieder G, Hatz RA, Moran AP, Walz A, Stolte M and Enders G. Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Inf Immun* 65: 3622-3630 (1997).

Rieder G, Einsiedl W, Hatz RA, Stolte M, Enders GA and Walz A. Comparison of CXC chemokines ENA-78 and interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Inf Immun* 69: 81-88 (2001).

S

Salama NR, Otto G, Tompkins L and Falkow S. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Inf Immun* 69: 730-736 (2001).

Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis J. Molecular cloning (a laboratory manual). Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).

Satin B, Norais N, Telford J, Rappuoli R, Murgia M, Montecucco C and Papini E. Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation. *J Biol Chem* 272: 25022-25028 (1997).

Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, Kelleher D, Rappuoli R, Montecucco C and Rossi F. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 191: 1467-1476 (2000).

Schmitt W and Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol* 12: 307-319 (1994).

Schraw W, Li Y, McClain MS, van der Goot FG and Cover TL. Association of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) with lipid rafts. *J Biol Chem* 277: 34642-34650 (2002).

Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. Bax and Bak regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300: 135-139 (2003).

Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S and Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 96: 14559-14564 (1999).

Seto K, Hayashi-Kuwabara Y, Yoneta T, Suda H and Tamaki H. Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett* 431: 347-350 (1998).

Slomiany BL and Slomiany A. Role of mucus in gastric mucosal protection. *J Physiol Pharmacol.* 42: 147-161 (1991).

Suerbaum S and Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 347: 1175-1186 (2002).

Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D and Cover TL. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 101: 7727-7732 (2004).

Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, Hirayama T and Ra C. Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 168: 2603-2607 (2002).

Suzuki J, Ohnsihi H, Shibata H, Wada A, Hirayama T, Iiri T, Ueda N, Kanamaru C, Tsuchida T, Mashima H, Yasuda H and Fujita T. Dynammin is involved in human epithelial cell vacuolation caused by the *Helicobacter pylori*-produced cytotoxin VacA. *J Clin Invest* 107: 363-370 (2001).

Suzuki K, Kokai Y, Sawada N, Takakuwa R, Kuwahara K, Isogai E, Isogai H and Mori M. SS1 *Helicobacter pylori* disrupts the paracellular barrier of the gastric mucosa and leads to neutrophilic gastritis in mice. *Virchows Arch* 440: 318-324 (2002).

Szabo I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E and Zoratti M. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J* 18: 5517-5527 (1999).

T

Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z, Papini E, Montecucco C, Parente L and Rappuoli R. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 179: 1653-1658 (1994).

Terres AM, Pajares JM, Hopkins AM, Murphy A, Moran A, Baird AW et Kelleher D. *Helicobacter pylori* disrupts epithelial barrier function in a process inhibited by protein kinase C activators. *Inf Immun* 66: 2943-2950 (1998).

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462 (1995).

Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316 (1998).

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD and Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388: 539-547 (1997).

Tombola F, Carlesso C, Szabo I, de Bernard M, Reyrat JM, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E and Zoratti M. *Helicobacter pylori*

vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys J* 76: 1401-1409 (1999).

Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M and Papini E. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J Clin Inv* 108: 929-937 (2001).

Tonello F, Dundon WG, Satin B, Molinari M, Tognon G, Grandi G, Del Giudice G, Rappuoli R and Montecucco C. The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol Microbiol* 34: 238-246 (1999).

Torres VJ, McClain MS and Cover TL. Interactions between p-33 and p-55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA). *J Biol Chem* 279: 2324-2331 (2004).

Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, and Hatakeyama M. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* 278: 3664-3670 (2003).

V

Vaux DL and Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 96: 245-254, 1999.

Vinion-Dubiel AD, McClain MS, Czajkowsky DM, Iwamoto H, Ye D, Cao P, Schraw W, Szabo G, Blanke SR, Shao Z and Cover TL. A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) inhibits VacA-induced cell vacuolation. *J Biol Chem* 274: 37736-37742 (1999).

W

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, and Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292: 727-730 (2001).

Willhite DC, Ye D and Blanke SR. Fluorescence resonance energy transfer microscopy of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin within mammalian cells. *Inf Immun* 70: 3824-3832 (2002).

Willhite DC, Cover TL and Blanke SR. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome *c* release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. *J Biol Chem* 278: 48204-48209 (2003).

Willhite DC et Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol* 6: 143-154 (2004).

Williams CL, Preston T, Hossack M, Slater C and McColl KE. *Helicobacter pylori* utilises urea for amino acid synthesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 13: 87-94 (1996).

Wirth HP, Beins MH, Yang M, Tham KT and Blaser MJ. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Inf Immun* 66: 4856-4866 (1998).

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, and Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139: 1281-1292 (1997).

Wyle FA, Tarnawski A, Schulman D and Dabros W. Evidence for gastric mucosal cell invasion by *C. pylori*: an ultrastructural study. *J Clin Gastroenterol* 12 Suppl 1, S92-98 (1990).

X

Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, and Covacci A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 63: 94-98 (1995).

Y

Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Padilla PI, Wada A and Hirayama T. (1997). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140-kDa protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 629-632.

Yahiro K, Niidome T, Kimura M, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Imagawa K, Wada A, Moss J and Hirayama T. Activation of *Helicobacter pylori*

VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J Biol Chem* 274: 36693-36699 (1999).

Yahiro K, Wada A, Nakayama M, Kimura T, Ogushi K, Niidome T, Aoyagi H, Yoshino K, Yonezawa K, Moss J and Hirayama T. Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J Biol Chem* 278: 19183-19189 (2003).

Yahiro K, Wada A, Yamasaki E, Nakayama M, Nishi Y, Hisatsune J, Morinaga N, Sap J, Noda M, Moss J and Hirayama T. Essential domain of receptor tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) for interaction with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem* 279: 51013-51021 (2004).

Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, Nakagawa I, Funao J, Nakayama M, Hisatsune J, Kimura M, Moss J, Hirayama T. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome *c* release and cell death, independent of vacuolation. *J Biol Chem* 281: 11250-11259 (2006).

Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y, Ohtani M, Higashi H, Hatakeyama M, and Azuma T. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J Infect Dis* 187: 334-337 (2003).

Ye D, Willhite DC and Blanke SR. Identification of the minimal intracellular vacuolating domain of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Biol Chem* 274: 9277-9282 (1999).

Ye D and Blanke SR. Mutational analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin amino terminus: identification of amino acids essential for cellular vacuolation. *Inf Immun* 68: 4354-4357 (2000).

Ye D and Blanke SR. Functional complementation reveals the importance of intermolecular monomer interactions for *Helicobacter pylori* VacA vacuolating activity. *Mol Microbiol* 43: 1243-1253 (2002).

Z

Zheng PY and Jones NL. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol* 5: 25-40 (2003).

Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15: 1481-1486 (2001).
