



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE SPERIMENTALI

DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOLOGIA E PATOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE

CICLO XVIII

STUDI SUL MECCANISMO D'AZIONE CELLULARE DELLE TOSSINE PRODOTTE DA *BACILLUS ANTHRACIS*

COORDINATORE: CH.MO PROF. TULLIO POZZAN
SUPERVISORE: CH.MO PROF. CESARE MONTECUCCO
CORRELATORE: DOTT. FIORELLA TONELLO

DOTTORANDA: FEDERICA DAL MOLIN

31 DICEMBRE 2005

INDICE

Elenco delle abbreviazioni	III
<i>Abstract</i>	V
Riassunto	VI
Introduzione	
1. Antrace	
1.1. Storia ed epidemiologia	1
1.2. Patogenesi	1
1.3. Fattori di virulenza	3
1.4. Terapia	4
1.5. L'antrace come arma biologica	6
2. Tossine dell'antrace	
2.1. Antigene protettivo (PA)	7
2.2. Fattore letale (LF)	9
2.3. Fattore edematoso (EF)	10
2.4. Endocitosi delle tossine	13
3. Meccanismi di azione cellulari delle tossine di antrace	
3.1. LTx e la via delle MAPK	16
3.2. ETx e <i>cAMP signalling</i>	18
3.3. <i>Cross-talk</i> fra il <i>signalling</i> di MAPK e di cAMP	19
3.4. Effetti cellulari	20
Materiali e metodi	
1. Materiali	23
2. Tecniche spettroscopiche	
2.1. Quantificazione di DNA e proteine mediante spettroscopia di assorbimento	24
3. Tecniche di biologia molecolare	
3.1. Elettroforesi in gel di agarosio	24
3.2. Clonaggio di proteine delle antrace e delle proteine fluorescenti	25
3.3. Fusione delle proteine di antrace con proteine fluorescenti	25
3.4. Trasformazione di cellule competenti	25
3.5. Espressione di proteine ricombinanti	26
3.6. <i>Real time</i> PCR	27

4. Tecniche biochimiche	
4.1. Elettroforesi SDS-PAGE	29
4.2. Western blot	30
4.3. Purificazione di proteine ricombinanti per cromatografia di affinità	30
4.4. Purificazione di proteine ricombinanti per cromatografia a scambio ionico	31
5. Tecniche di biologia cellulare	
5.1. Colture cellulari	31
5.2. Test di vitalità	32
5.3. Lisi delle cellule per analisi con <i>western blot</i>	32
5.4. Misurazione del cAMP intracellulare	32
5.5. Trasfezioni di linee cellulari	33
5.6. Estrazione dell'RNA	33
6. <i>Live imaging</i>	
6.1. Microscopia basata sulla FRET	33
6.2. Microscopia di tossine fluorescenti	34
6.3. Elaborazione delle immagini e analisi dei dati	35
Risultati e discussione	
1. Clonaggi e purificazioni	
1.1. Clonaggio, espressione e purificazione di tossine fluorescenti	37
1.2. Clonaggio, espressione e purificazione di EF	40
2. Attività delle proteine ricombinanti in colture cellulari	
2.1. Attività e cinetiche di LF-EGFP e EF-mRFP	41
2.2. Misurazione del cAMP prodotto da ETx	43
3. <i>Live imaging</i>	
3.1. Microscopia basata sulla FRET	46
3.2. Dinamiche dell'aumento di cAMP indotto da ETx nei linfociti T	50
3.3. Distribuzione dell'aumento di cAMP indotto da ETx	51
3.4. LF-EGFP e EF-mRFP	57
4. <i>Real time-PCR</i>	60
Conclusioni	63
Bibliografia	65

Elenco delle abbreviazioni

AKAP	<i>A kinase protein anchoring proteins</i>
ATP	adenosin trifosfato
CaM	calmodulina
cAMP	ciclico adenosin monofosfato
CFP/ECFP	<i>(enhanced) cyan fluorescent protein</i>
CMG2	<i>capillary morphogenesis protein 2</i>
CREB	fattore di trascrizione che si lega al cAMP response element (CRE)
CyaA	tossina adenilato ciclasica di <i>Bordetella pertussis</i>
ECV	<i>endosomal carrier vesicle</i>
EF	fattore edematoso di <i>Bacillus anthracis</i>
EPAC	<i>Exchange Protein directly Activated by cAMP</i>
ETx	tossina edematosa di <i>Bacillus anthracis</i> (EF+PA)
YFP/EYFP	<i>(enhanced) yellow fluorescent protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GAPDH	gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi
GDP	guanosina difosfato
GFP/EGFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
IPTG	isopropil- β -D-tio-galattopiranoside
LF	fattore letale di <i>Bacillus anthracis</i>
LF _N	porzione N-terminale di LF
LTx	tossina letale di <i>Bacillus anthracis</i> (LF+PA)
mAC	adenilato ciclasi dei mammiferi
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
PKA ^{mp}	protein chinasi A miristoilata-palmitoilata
MVB	corpi multivescicolari
PA	antigene protettivo di <i>Bacillus anthracis</i>
PA ₂₀	frammento di PA di 20 kDa
PA ₆₃	frammento di PA di 63 kDa
[PA ₆₃] ₇	eptamero di PA ₆₃

Elenco delle abbreviazioni

PBS	soluzione salina tamponata con fosfato
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKA	protein chinasi A
PKA ^{cyt}	sonda fluorescente basata sulla PKA
PKA ^{mp}	sonda fluorescente basata sulla PKA e fusa a due catene idrofobiche
PMSF	<i>Phenilmethanesulfonyl fluoride</i>
RI	subunità regolatoria, isoforma di tipo I della protein chinasi A
RII	subunità regolatoria, isoforma di tipo II della protein chinasi A
SDS	sodio-dodecil-fosfato
TEM8	<i>tumor endothelial marker-8</i>

Abbreviazioni utilizzate per gli amminoacidi:

D	acido aspartatico (Asp)
H	istidina (His)
K	lisina (Lys)
T	treonina (Thr)

ABSTRACT

The major determinants of anthrax pathogenesis are anthrax toxins. They are composed of three proteins, PA, LF and EF. PA binds to specific cellular receptors and the complex PA+LF+EF is endocytosed. Once inside the cell, the toxins follow the endocytic route until pH-dependent translocation of LF and EF occurs. LF is a metal-dependent protease that cleaves MEKs, whereas EF is a calmodulin-dependent adenylate cyclase. Informations about the site of EF release into the cytosol are lacking. Biochemical analysis of intracellular cAMP increase in cultured cells reveals that EF activity begins after 30 minutes from intoxication and cAMP levels are still high after 4 hours. These results can provide two kinds of informations. The first one suggests that a long travel through the endocytic pathway may occur before EF can reach the cytosol, in accordance with translocation from late endosomes. The second one suggests a severe impairment of cellular signalling, since for several hours the cell is unable to overcome the massive production of cAMP.

To investigate the site of EF translocation we performed FRET imaging of cAMP dynamics induced by the toxin. Mapping of narrow regions inside intoxicated cells and FRET efficiency measurements revealed a preferential site of cAMP increase, corresponding to perinuclear regions. This result is in agreement with the hypothesis of translocation from late endosomes.

Following another approach, we fused LF and EF to green and red fluorescent proteins. Those *chimerae* provide a tool for tracking the route of the toxins inside the cell. Simultaneous visualization of ETx and LTx could clarify the mechanisms of their synergistic activity. Moreover, colocalization with cellular markers could define the pattern of toxicity and the advantages of translocating closely to the nucleus.

Finally, we performed RT-PCR to test the presence of both anthrax receptors, TEM8 and CMG2, on the same cells that were used in our experiments. CMG2 has the highest affinity for PA and requires a low pH to allow dissociation and PA pore formation. Thus, the presence of CMG2 validates the hypothesis of EF translocation from late endosomes. The clarification of the precise intracellular localization of anthrax toxins is

compulsory to understand their final effect, since microdomains with a broad variety and concentration of signal molecules are present in a cell.

RIASSUNTO

Le tossine di antrace hanno un ruolo centrale nella patogenesi dell'infezione. Sono composte da tre proteine, PA, LF e EF. PA si lega a specifici recettori cellulari e il complesso PA+LF+EF è endocitato. Le tossine dentro la cellula iniziano a percorrere la via endocitica fino a che LF e EF traslocano nel citosol con un meccanismo pH-dipendente. LF è una metallo-proteasi che taglia le MEKs e EF è un'adenilato ciclasi calmodulina-dipendente. Ci sono poche informazioni riguardo il sito di rilascio di EF nel citoplasma. La misura dei livelli di ciclico AMP intracellulare rivela che l'attività di EF inizia dopo 30 minuti dall'intossicazione e dopo 4 ore i livelli sono ancora alti. Queste osservazioni portano due diverse considerazioni. La prima è che la tossina debba compiere un lungo percorso lungo la via di endocitosi prima di raggiungere il citosol. Infatti, i tempi di inizio dell'attività sono compatibili con una traslocazione dai *late endosomes*. La seconda considerazione è che per diverse ore dall'intossicazione la cellula non riesce a fronteggiare il massiccio aumento di cAMP indotto da ETx e resta a lungo sotto l'effetto di una condizione di disregolazione.

Per indagare il percorso intracellulare e il sito di traslocazione della tossina è stata usata la tecnica della FRET, che permette di analizzare le dinamiche dell'aumento di cAMP indotto da EF. La mappatura di piccole zone all'interno della cellula ha rivelato che il cAMP aumenta prima nelle regioni perinucleari. Questo è in accordo con l'ipotesi della traslocazione dai *late endosomes*.

Un altro approccio è stato quello di fondere LF e EF a *green* e *red fluorescent proteins*. Queste chimere sono uno strumento per tracciare il cammino delle tossine dentro la cellula. Inoltre, la visualizzazione simultanea di ETx e LTx può chiarire le basi della loro azione sinergica. In futuro si potranno fare delle colocalizzazioni con *markers* cellulari per chiarire i siti di interazione con i componenti dell'ospite.

INTRODUZIONE

1. Antrace

Bacillus anthracis è un batterio gram positivo, capsulato e sporigeno. Il genere *Bacillus* è molto diffuso in natura e comprende diversi saprofiti che vivono negli strati superficiali del suolo.

Provoca un'infezione setticemica che colpisce gli animali, domestici e non, i quali si infettano per via alimentare ingerendo foraggio o altro cibo contaminato da spore. Il batterio produce due tossine che hanno un ruolo chiave nella patologia.

1.1. Storia ed epidemiologia

L'antrace è una delle maggiori malattie infettive dell'antichità. La quinta e la sesta piaga del libro dell'Esodo nella Bibbia può essere stata un'epidemia di antrace nel bestiame e negli umani rispettivamente. Anche il poeta latino Virgilio nel 28-27 a.C. descrive la malattia in una sua opera. Nel 1876 Robert Koch scoprì l'eziologia batterica dell'antrace e nel 1881 l'antrace fu la prima malattia batterica per la quale fu disponibile la vaccinazione. Nell'era moderna più di 6000 casi prevalentemente cutanei si sono verificati nello Zimbabwe tra il 1979 e il 1980 e 25 casi cutanei si sono verificati in Paraguay nel 1987. Uno studio pubblicato sul Salisbury Medical Bulletin (n. 68, gennaio 1990) rimarca il fatto che l'antrace viene considerata una zoonosi professionale, dal momento che la via di contagio preferita è quella per contatto con animali malati. Infezioni da antrace sono più comuni nei paesi in via di sviluppo e nelle nazioni che non hanno un programma di sanità veterinario, ad esempio America centrale e meridionale, Europa meridionale e orientale, Asia, Carabi e Africa. In Italia, invece, i casi tra bovini e ovini sono calati del 98-95% dal 1958 al 1986 e di conseguenza c'è stato anche un netto declino dei casi umani. La maggior parte dei contagi per l'uomo è dovuta alla forma cutanea e per il 90% sono concentrati nelle regioni del centro-sud dove si trovano ancora focolai animali.

1.2. Patogenesi

L'antrace si può manifestare in tre forme diverse, una forma polmonare, una cutanea e una gastrointestinale. In tutte le tre situazioni è necessario un contatto diretto con le spore.

Indipendentemente dalla via di entrata, le spore sono fagocitate dai macrofagi, che possono o rimanere *in situ* o migrare a linfonodi locali che drenano i siti dell'infezione. Nei fagociti le spore germinano nella forma vegetativa del batterio che produce le due tossine LTx ed ETx. Dai linfonodi i batteri si riversano nel circolo sanguigno (figura 1). La capsula impedisce la fagocitosi dei batteri, che così raggiungono un'elevata concentrazione ematica. A questo punto dell'infezione l'intervento con antibiotici dà scarsi risultati vista l'elevata carica batterica ormai raggiunta.

I sintomi iniziali della malattia sono difficilmente riconoscibili, perché sono simili a quelli di una comune influenza: febbre, cefalea, tosse, dolori toracici, disturbi gastrointestinali. Ma in seguito alla diffusione sistemica si verificano tossiemia, febbre elevata, dispnea, ipotensione, shock settico e morte.

B. anthracis continua la sua proliferazione fino a che non terminano i nutrienti, dopodiché il batterio va incontro a sporulazione. Le spore vengono disperse nell'ambiente da agenti naturali e qui rimangono intatte per decine, forse centinaia di anni, pronte ad infettare animali e uomini, ricominciando il ciclo del patogeno.

Polmonare

Le spore hanno un diametro di 2-6 μm , adatto per penetrare e depositarsi negli alveoli. Qui le spore vengono fagocitate dai macrofagi alveolari che migrano ai linfonodi del mediastino e in breve tempo l'infezione diventa sistemica. Nei casi polmonari la mortalità è elevatissima. Talvolta si può verificare una forma di meningite da antrace, come complicazione dell'antrace sistemico.

Cutaneo

L'antrace cutaneo ha un esito raramente fatale e di solito si risolve spontaneamente. Si verifica quando una persona tocca animali infetti e le spore sfruttano piccoli tagli o lesioni cutanee per entrare nell'ospite. L'infezione si manifesta inizialmente con rossore localizzato, simile alla puntura di un insetto, che in breve tempo diventa una piccola ulcera circondata da edema e via via si ingrandisce e assume un colore nero per la necrosi dei tessuti. Non è chiaro perché nell'infezione polmonare il sistema immunitario non riesca a far fronte alla malattia, mentre nell'antrace cutaneo le difese immunitarie risolvano l'infezione.

Gastrointestinale

Avviene per consumo di carne o alimenti contaminati. I primi sintomi sono nausea, vomito, perdita di appetito, febbre e diarrea. L'infezione intestinale è letale dal 25 al 60% dei casi.

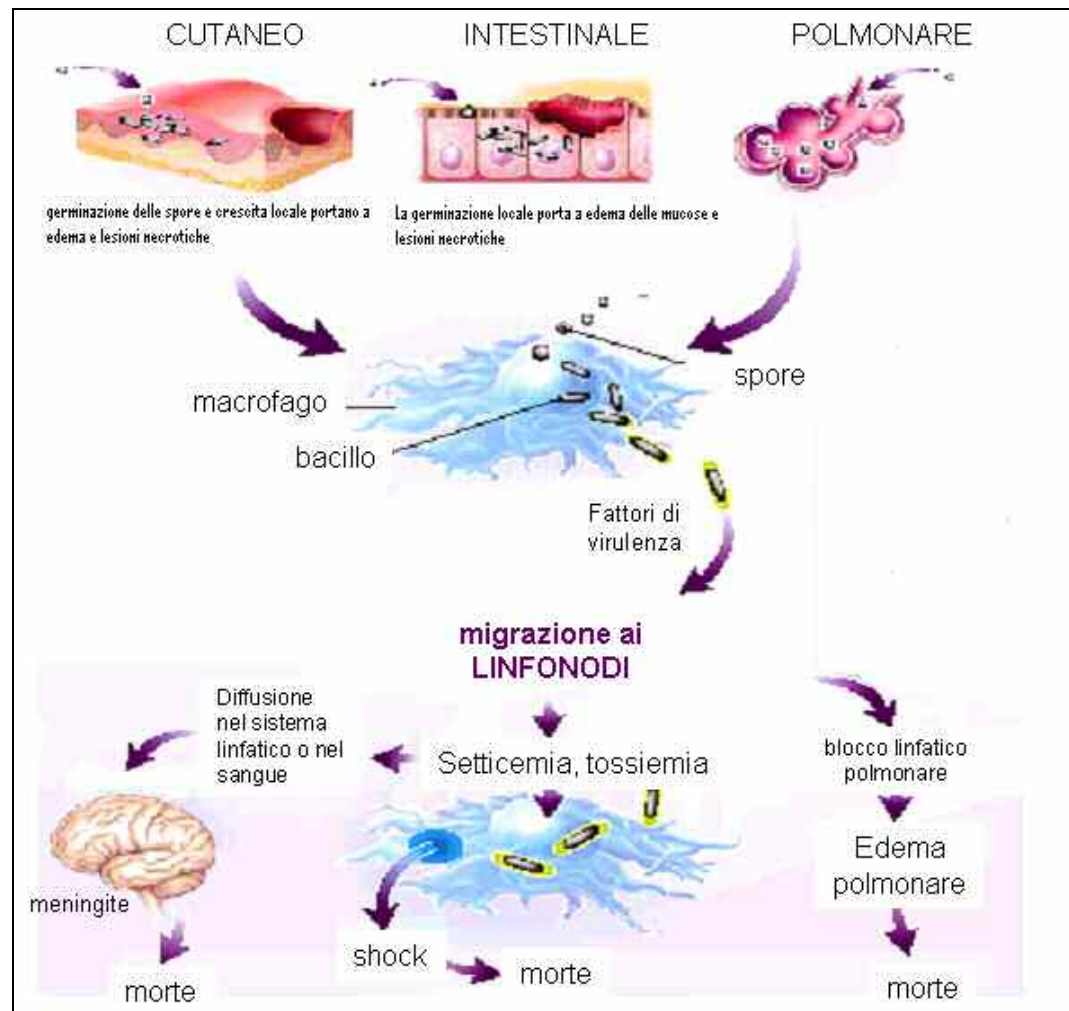


Figura1. Schema dell'infezione da antrace

1.3 Fattori di virulenza

I ceppi virulenti di *B. anthracis* contengono due plasmidi, pXO1 e pXO2, che codificano per i due fattori di virulenza, le tossine e la capsula rispettivamente.

La capsula è un polimero di acido γ -D-glutammico che impedisce la fagocitosi del batterio e gli permette di invadere indisturbato il torrente sanguigno, provocando setticemia (Mock and Mignot, 2003).

Le due tossine di *B. anthracis* sono composte di tre proteine secrete, che si assemblano e agiscono in combinandosi a due a due. Esistono scarsi dati

sulla quantità relativa delle tre proteine prodotte da *Bacillus anthracis*. Il primo dato a riguardo (Leppla, 1988) riporta che il ceppo *Sterne* (un ceppo meno virulento perché privo di capsula) produce 20 µg di PA, 5 µg di LF e 1 µg di EF per ml di coltura, nelle appropriate condizioni di crescita e induzione.

La sintesi delle tossine e della capsula sono eventi concertati e altamente regolati. Un grande regolone coordina il cross-talk tra elementi genetici indipendenti, i plasmidi pXO1 e pXO2 e il DNA genomico. La produzione della capsula e delle tossine richiede condizioni ambientali ideali di pressione parziale di CO₂ e di temperatura a 37°C (Leppla, 1988), (Sirard et al., 1994). L'anidride carbonica è necessaria per attivare sia la trascrizione dei tre geni per le tossine, *pagA*, *lef* e *cya* e dell'operone *capBCA*, i cui prodotti portano alla sintesi della capsula (Sirard et al., 1994), (Fouet and Mock, 1996). Il gene *atxA*, che si trova sul plasmidi pXO1, regola la sintesi delle tossine, ma in presenza di tossine anche la sintesi di alcuni componenti della capsula è aumentata. Si pensa che il responsabile di tale concertazione sia proprio AtxA (Guignot et al., 1997). Inoltre, pOX1 ha anche un'influenza sulla sintesi di componenti della parete batterica, e ancora una volta il responsabile della regolazione è AtxA, che così risulta essere l'elemento di connessione di tre distinti elementi genici, i due plasmidi e il cromosoma. AtxA non solo ad elevate concentrazioni di CO₂ è attivo, ma anche a basse concentrazioni è in grado di attivare un diverso set di geni, permettendoci di intuire l'esistenza di un '*CO2 regulon*' e un '*air regulon*' dipendenti da AtxA e con diversi ruoli fisiologici (Hoffmaster and Koehler, 1997).

1.4. Terapia

Il problema principale nella cura dell'antrace è la bassa efficienza del trattamento antibiotico quando questo non è iniziato nelle prime fasi della malattia. Una volta che i sintomi sono diventati riconoscibili, la carica batterica è ormai elevata e le tossine sono già secrete. Perciò è necessario utilizzare inibitori delle tossine in terapia combinata con gli antibiotici, ma attualmente non è disponibile un farmaco contro le tossine. Tuttavia, sono allo studio numerose molecole che potrebbero portare allo sviluppo di nuovi, efficienti farmaci contro l'antrace.

Antibiotici

Il trattamento *standard* per l'antrace prevede la somministrazione di antibiotici (penicillina, doxiciclina o anche streptomicina, eritromicina, cloramfenicolo). Tuttavia queste terapie sono efficaci solo nei casi della forma cutanea. Per quanto riguarda la forma inalatoria, raramente la malattia viene diagnosticata prima che intervenga setticemia, perciò la terapia risulta inefficace.

La durata della terapia può variare da 60 a 100 giorni, ma *Bacillus a.* può persistere sottoforma di spore che possono germinare alla fine della terapia e causare sintomi letali.

Vaccini

Il primo vaccino fu prodotto da Pasteur il quale impiegò per l'immunizzazione degli animali una variante apatogena selezionata mediante coltura a temperatura *supra* ottimale. Più tardi, nel 1939, Sterne isolò un ceppo privo di capsula, detto ceppo Sterne, che viene utilizzato come vaccino in forma di spore per gli animali domestici.

Ora si utilizzano anticorpi ricombinanti anti-PA, ottenuti da anticorpi murini monoclonali, ma anche anticorpi umani monoclonali.

Esiste un ceppo attenuato, detto Carbosap, che viene utilizzato per la vaccinazione del bestiame (Adone et al., 2002). Non sono ancora note le ragioni per cui questo ceppo possieda una minore virulenza.

Inibitori di PA

La forma solubile del dominio extracellulare del recettore del PA è in grado di competere con il recettore fisiologico (Bradley et al., 2001) e previene l'intossicazione delle cellule. E' stata prodotta una forma ricombinante del PA che oligomerizza con il PA_{wt}, ma l'oligomero risultante non è funzionale e non permette l'entrata della tossina nella cellula (Mourez et al., 2001). Sono stati studiati anche inibitori della furina, costituiti da piccole molecole o peptidi, che impediscono l'attivazione proteolitica del PA e gli *step* a valle.

Inibitori di LF e EF

Esiste una molecola presente nell'estratto del tè verde (*Camelia sinensis*) che è in grado di inibire il fattore letale e risulta protettiva in modelli animali, ma il meccanismo d'azione non è chiaro (Dell'Aica et al., 2004). Sono state trovate anche piccole molecole inibitrici e peptidi con sequenza costruita sulla base del

sito di taglio delle diverse MEKs (Tonello et al., 2002). Recentemente sono stati prodotti dei peptidi tetra-ramificati che si legano a PA e inibiscono l'entrata sia di LF che di EF (Pini et al., 2006). Esiste anche un inibitore specifico di EF, l'adefovir, una molecola che inizialmente veniva usata come antivirale nel trattamento dell'epatite B (Shen et al., 2004).

1.5 L'antrace come arma biologica

L'utilizzo dell'antrace come arma biologica risale al periodo tra la prima e la seconda guerra mondiale. In particolare, sono state usate le spore per le loro caratteristiche di resistenza all'ambiente e facilità di dispersione. Esse sono resistenti all'azione dei raggi ultravioletti e nel terreno possono rimanere vitali per decenni. Sono distrutte in 4-6 giorni a 72-77°C, in 3 ore mediante riscaldamento a secco a 120-140°C e in 5 minuti in autoclave a 100°C se non sono protette da altro materiale organico. Le forme vegetative, al contrario, sono tremolabili e sensibili ai comuni disinfettanti e vengono distrutte per riscaldamento a 55-58°C in 10-15 minuti e per esposizione ai raggi UV in 6-7 ore.

L'antrace faceva parte dell'arsenale biologico dell'esercito giapponese tra il 1932 e il 1945 e i primi esperimenti di guerra batteriologica con l'antrace furono condotti sui prigionieri cinesi nella Manciuria occupata, ma anche i civili furono coinvolti. Si stima che 2000 prigionieri e 700 civili morirono di antrace. Nel 1942 e 1943 la Gran Bretagna scelse l'isola di Gruinard al largo delle coste scozzesi come luogo di esperimenti sulle spore di antrace e sul loro raggio di diffusione quando lanciate con una bomba convenzionale.

Dopo la fine della seconda guerra mondiale la ricerca sull'antrace continuò in diversi paesi. Nella nuova era della politica mondiale conosciuta come 'Guerra fredda' le armi biologiche divennero protagoniste. Gli Stati Uniti scelsero di includere l'antrace nel loro armamentario bellico dal 1950. Nel 1979 esplose un'epidemia di antrace polmonare in Russia a Sverdlovsk (oggi Yekaterinburg) a causa di un'accidentale fuga di aerosol di antrace dai laboratori militari. Morirono 68 persone e circa 200 si ammalarono.

Una setta religiosa giapponese, già responsabile degli attentati nella metropolitana di Tokyo, tentò degli attentati con aerosol di antrace più volte tra il 1990 e il 1995, ma senza successo.

Sulla scia dell'attentato dell'11 settembre 2001, negli Stati Uniti d'America furono recapitate delle buste contenenti spore di antrace, opportunamente trattate in modo da impedirne l'aggregazione e renderne più facile la dispersione nell'aria e l'inalazione. Dal primo caso del 4 ottobre fino all'ultimo del 31 ottobre 2001 si sono verificati 11 casi di antrace e 5 morti.

2. Tossine dell'antrace

Il plasmide pOX1 produce tre proteine, l'antigene protettivo (PA), il fattore letale (LF) e il fattore edematogeno (EF). Il legame non covalente che si forma fra le tre porta alla formazione di due particolari tossine A-B. La subunità B responsabile del legame al recettore sulla cellula ospite è comune alle due ed è il PA, mentre la subunità A dotata di attività catalitica può essere LF oppure EF. Si formano così due tossine, la tossina letale (LTx) dall'unione di PA con LF e la tossina edematosa (ETx) dall'unione di PA con EF. Le tossine giocano un ruolo chiave nella patologia dell'antrace.

2.1. Antigene protettivo (PA)

Struttura

Il protective antigen è una proteina del peso di 83 kDa, in cui si possono distinguere quattro domini, ognuno dotato di una diversa funzione (figura 2). I domini si organizzano in prevalenza in forma di β -sheet antiparalleli. Il dominio 1 è il sito di proteolisi in due frammenti, uno di 20 kDa (PA₂₀) e uno di 63 kDa (PA₆₃). Il PA₆₃ forma un eptamero che lega sia LF che EF. I residui cruciali per il binding dei due enzimi si trovano all'interfaccia tra due PA₆₃ monomeri adiacenti. Il dominio 2 contiene subisce un cambiamento conformazionale pH-dipendente per formare un poro transmembrana. Il dominio 3 è coinvolto nella oligomerizzazione del PA₆₃, mentre il dominio 4 si lega al recettore (Rainey et al., 2005).

L'interfaccia tra i domini 2 e 4 contiene sette istidine che possono funzionare da sensori del pH e dare inizio al riarrangiamento necessario alla formazione del poro. L'intera regione tra i residui 286-339 nel dominio II di PA si riarrangia per formare una lunga forcina che si ripiega in un β -barrel di 14 foglietti, in cui i residui 302-323 sono transmembrana (Nassi et al., 2002).

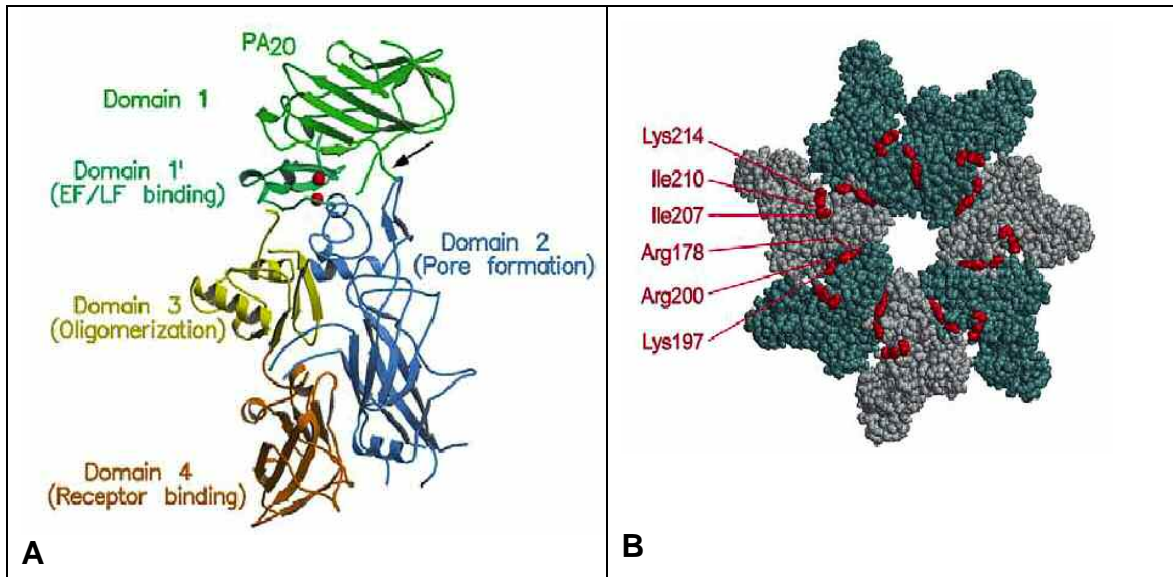


Figura 2. Struttura di PA monomero (A) e PA₆₃ eptamerizzato (B). I residui critici per il legame di LF e EF sono indicati in rosso in (B) (Ascenzi et al., 2002)

Recettori

Sono stati individuati due diversi recettori per il PA, che tuttavia hanno una forte omologia. Il primo recettore scoperto (Bradley et al., 2001) è chiamato ATR/TEM8 (*anthrax toxin receptor/tumor endothelial marker 8*) e deve il nome al fatto che è sovraespresso nei vasi del tumore al colon, nonostante sia presente in molti diversi tessuti e non solo nei tessuti tumorali. Il secondo recettore scoperto (Scobie et al., 2003) è il CMG2 (*capillary morphogenesis factor 2*), è pressoché ubiquitario e si pensa che abbia un ruolo nell'adesione delle cellule alla matrice extracellulare (Hanks et al., 2003). La funzione e i ligandi fisiologici di entrambi i recettori non sono ben noti, ma si sa che TEM8 interagisce con il collagene VI e CMG2 con il collagene IV e con la laminina. Entrambi hanno un dominio del fattore di tipo A von Willebrand (VWA) nella loro regione N-terminale extracellulare. A livello di questo dominio, i due recettori hanno un 60% di identità amminoacidica e sono simili al dominio 1 delle integrine. Il dominio VWA ha un sito di adesione metallo-dipendente (MIDAS, *metal ion-dependent adhesion site*) che media l'interazione con i domini 2 e 4 del PA.

Recentemente è stato proposto un loro ruolo nel differenziare la modalità di entrata di PA nel citosol (figura 3) (Rainey et al., 2005). Il tipo di recettore che media l'entrata delle tossine ha un effetto sul valore di pH necessario per la formazione del poro e la traslocazione della tossina nel citoplasma. Quando PA

si lega al recettore TEM8 è sufficiente un pH vicino alla neutralità perché l'eptamero si inserisca in membrana, mentre in seguito al legame con CMG2 è necessario un pH più acido. Di conseguenza la traslocazione della tossina avviene in punti diversi della via endocitica. Se il legame è avvenuto su TEM8, per la traslocazione è sufficiente il $\text{pH} > 6$ che caratterizza gli endosomi precoci, mentre il legame a CMG2 richiede un pH 5.2-5.5, che si trova nei *late endosomes*. In entrambi i casi è richiesta la dissociazione del recettore dal PA, affinché l'eptamero si inserisca in membrana. Non sono ancora stati quantificati i livelli di espressione dell'uno e dell'altro recettore nelle diverse cellule bersaglio delle tossine, ma si sa che entrambi sono pressoché ubiquitari e non si può escludere la formazione di un eterocomplesso $(\text{PA}_{63})_7\text{-TE8/CMG2}$. Questo complesso scenario determina il livello endosomiale di entrata della tossina nella cellula e contribuisce, insieme alla localizzazione subcellulare dei substrati, all'efficienza dell'azione di LF e EF.

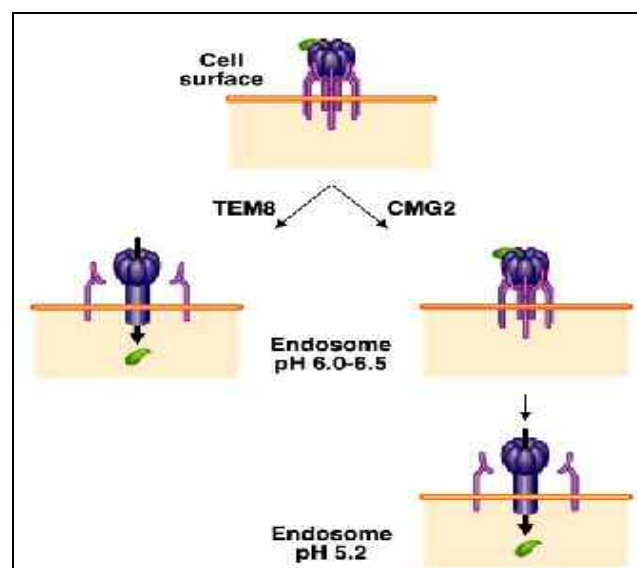


Figura3. Modello della differente traslocazione mediata dai due recettori di PA. Il TEM8 lega PA con minore affinità di CMG2 e la traslocazione avviene a pH più elevato di quello necessario per la traslocazione mediata da CMG2 (Rainey et al., 2005).

2.2. Fattore letale (LF)

Struttura

LF è una proteina di 90 kDa costituita da 4 domini organizzati prevalentemente in α -eliche (figura 5a). Il dominio 1 lega l'eptamero di PA, il dominio 2 è simile alla tossina VIP-2 di *Bacillus cereus*, ma il sito attivo è stato mutato in una sequenza che partecipa al riconoscimento del substrato. Il

dominio 3 sembra essere una duplicazione di un dominio strutturale del dominio 2. Il dominio 4 contiene il sito catalitico e appartiene alla famiglia delle metallo proteasi Zinco-dipendenti (Pannifer et al., 2001).

Attività

LF è una metallo proteasi Zinco-dipendente. Il substrato finora noto sono le *mitogen activated protein kinase kinase* (MAPKKs o MEKs), in tutte le isoforme, tranne la 5. Per ospitare il substrato, LF utilizza una stretta e profonda tasca, dotata di un potenziale elettrostatico negativo (Tonello et al., 2004). Il confronto tra i siti di *cleavage* N-terminali delle diverse MEKs ha permesso di trovare una sequenza-consenso, in cui P₇-P₄ sono residui carichi positivamente e P₂-P₁' sono residui idrofobici.

2.3. Fattore edematoso (EF)

Struttura

EF è una proteina di 90 kDa. Il dominio 1 N-terminale responsabile del legame al PA eptamero è molto simile al dominio 1 di LF. La porzione C-terminale (EF₅₈) contiene il sito catalitico e comprende tre domini globulari (1, 2, 3) e tre *loops* (A, B e C) (Drum et al., 2002) (figura 5b). Il sito attivo di EF₅₈ si trova all'interfaccia tra il dominio 1 e il dominio 2, che insieme costituiscono il centro catalitico. La struttura di EF₅₈ varia molto a seconda che legni (stato di attivazione) o meno (stato inattivo) la calmodulina. Per sistemare la CaM, il dominio 3 di EF₅₈ trasla e ruota allontanandosi dal centro catalitico, fino a formare tra il dominio 1 e il dominio 3 un'insenatura che circonda quasi completamente la CaM. Il massiccio riarrangiamento conformazionale che segue il legame con la CaM permette il legame del substrato ATP. La CaM legata a EF assume una conformazione estesa, molto diversa da quella chiusa su sé stessa che assume nel legare altri suoi *targets* cellulari.

Attività

EF è una adenilato ciclasti Calmodulina-dipendente che converte l'ATP in cAMP. E' un enzima dotato di un'alta efficienza con una V_{max} di 1.2 mmol/cAMP /min/mg di proteina (Kumar et al., 2002).

L'importanza per la catalisi dell'istidina H351 ha fatto pensare ad un meccanismo di catalisi di tipo *one-metal ion* (Drum et al., 2002) in cui un solo ione metallico coordina il substrato e l'istidina serve per completare l'interazione

fungendo da base che deprotona il 3'OH del substrato. Ma recentemente dati cristallografici del complesso tra EF e N-CaM hanno riproposto un meccanismo catalitico di tipo *two-metal ion* (Shen et al., 2005). Riassumendo, questi sono i principali residui coinvolti (figura 4):

Asn583 mantiene il 3'OH del substrato ATP in posizione per l'attacco nucleofilo

His351 aumenta la concentrazione di ioni OH^- che servono per deprotonare il 3'OH dell'ATP, ossia aumenta localmente il pH.

Asp491, Asp493 e His577 coordinano Mg^{++} , necessario per stabilizzare l'intermedio di reazione

Asp493 coordina un secondo Mg^{++} , con l'aiuto di uno degli ossigeni dei tre fosfati dell'ATP.

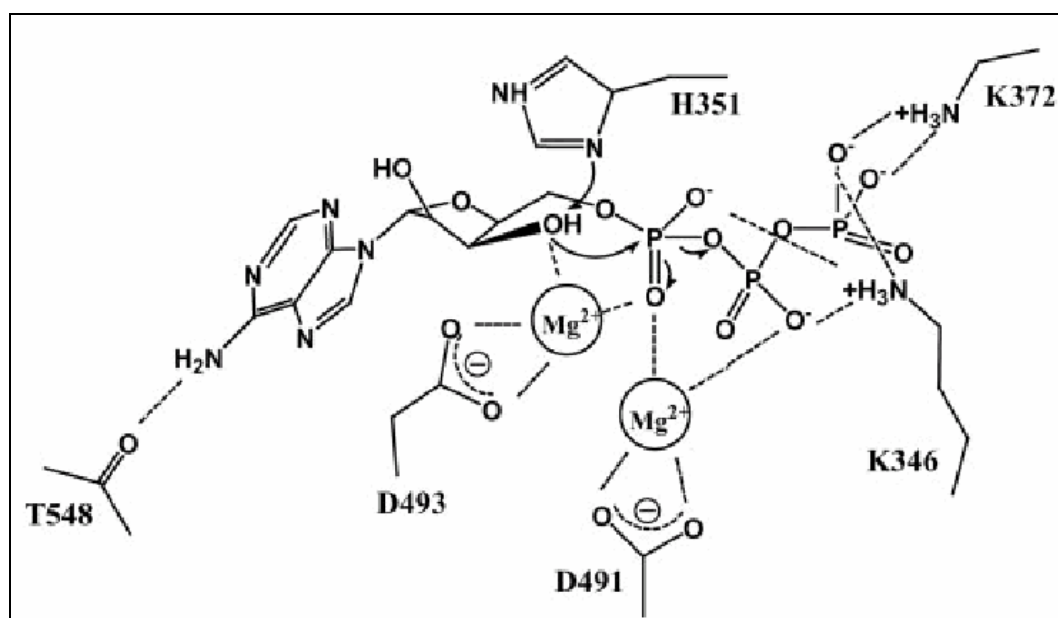


Figura 4. Questo meccanismo presentato in (Guo et al., 2004) è stato riformulato in (Shen et al., 2005), dove è stato proposto che Asn583 interagisca con il 3'OH del substrato come descritto nel paragrafo precedente.

EF, Calmodulina e calcio

La Calmodulina è una proteina solubile di 16.5 kDa presente in abbondanza in tutte le cellule eucariotiche, infatti è circa l'1% del totale di proteine nella cellula. Ha due domini globulari, uno all'N- e uno al C-terminale (N-CaM e C-CaM), uniti da una flessibile α -elica, e ciascuno dei due domini può legare due atomi di calcio. La sua funzione è di legare e modulare in maniera calcio-dipendente una varietà di enzimi, tra cui le chinasi delle catene leggere della miosina, le fosfodiesterasi di nucleotidi ciclici, la calcineurina e le adenilato

ciclasasi. Tuttavia il legame di EF alla CaM e l'attivazione di EF avviene in modo diverso da quanto accade per le adenilato ciclasasi di mammifero. La CaM in assenza o in presenza di calcio assume rispettivamente una conformazione compatta idrofilica o estesa idrofobica. Nella conformazione estesa espone residui che le permettono di legare i suoi *targets*. La conformazione della CaM è estesa quando si lega e attiva le adenilato ciclasasi di mammifero, mentre il legame di N-CaM a EF avviene quando questa è ancora nella sua conformazione chiusa, priva di calcio (Shen et al., 2005). L'interazione inizialmente è piuttosto debole (affinità 2 mM, (Shen et al., 2005)), ma avvia l'inserimento della conformazione aperta di C-CaM in EF. Dati di cristallografia del complesso con EF indicano che non ci sono atomi di calcio legati ai due *calcium binding sites* di N-CaM a concentrazioni di Ca^{++} 1 μ M, mentre a Ca^{++} 1mM solo un atomo si lega all' N-CaM. Infatti, sembra che il legame di EF alla CaM diminuisca l'affinità per lo ione. Questi recenti dati propongono che il legame di EF con la CaM avvenga in maniera indipendente dal calcio.

EF e le adenilato ciclasasi di mammifero

EF è molto diverso dalle adenilato ciclasasi di mammifero (mACs).

E' un'adenilato ciclasasi molto potente e converte ATP in cAMP con un'efficienza maggiore di due o tre ordini di grandezza rispetto alle mACs.

Queste ultime sono proteine che si inseriscono nelle membrane, mentre EF è una proteina solubile.

E' diversa la modalità di interazione con la Calmodulina: le mACs hanno due omologhi domini catalitici (C1 e C2), interrotti da due segmenti transmembrana (M1 e M2). Il sito catalitico si trova all'interfaccia tra C1 e C2 e comprende residui appartenenti ad entrambi i domini e la catalisi inizia quando il legame con la CaM avvicina i due siti in modo da formare una sorta di fessura. Invece EF possiede un solo dominio catalitico (Drum et al., 2000).

E' diverso anche il meccanismo catalitico. Le mACs sfruttano due ioni metallici per polarizzare l'idrossile in 3' del nucleotidi. I due ioni sono coordinati da due aspartati vicini, che formano un motivo DXD. Per EF invece il meccanismo è stato molto dibattuto ed esistono diverse proposte ((Drum et al., 2002), (Shen et al., 2005)) che tuttavia concordano nell'importante coinvolgimento dell'istidina 351 nella catalisi, oltre alla presenza di due aspartati, D491 e D493. Questo è un esempio di come proteine strutturalmente

molto diverse si sono evolute in modo convergente per quanto riguarda il tipo di reazione catalizzata.

EF e altre adenilato ciclasi batteriche

Non solo *Bacillus anthracis* ha evoluto un'esotossina che altera i livelli intracellulari di AMP ciclico. Altre adenilato ciclasi batteriche lavorano secondo due diversi meccanismi (Drum et al., 2000). La tossina colerica prodotta da *Vibrio cholerae* ADP-ribosila la subunità α delle proteine G (eterotrimeri formati da subunità α , β e γ), rispettivamente delle G_s e delle G_i . Di conseguenza le proteine G diventano costitutivamente attive, rispettivamente in senso attivatorio e in senso inibitorio, e stimola le adenilato ciclasi endogene alla produzione continua di cAMP. La seconda strategia è adottata da *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus anthracis* ed è secernere un'adenilato ciclasi direttamente nella cellula ospite. Per evitare l'attività ciclasica nella cellula batterica, queste tossine si sono evolute in modo da essere attive solo in seguito al legame con un fattore endogeno. Tale fattore è la CaM per *Bordetella* e *Bacillus*, mentre per *Pseudomonas* si tratta di un fattore solubile ancora sconosciuto.

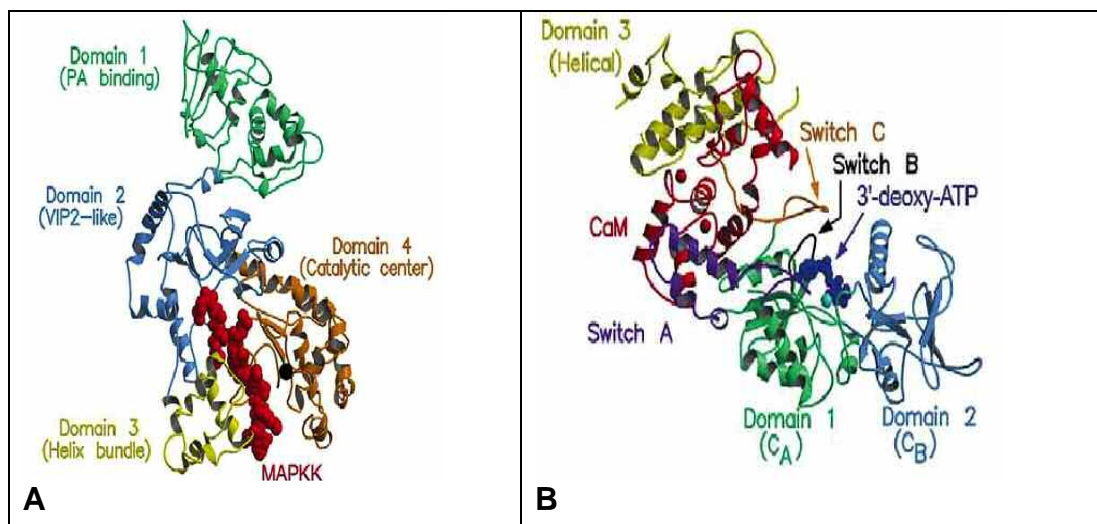


Figura 5. Struttura di LF (A) complessato con il suo substrato MAPKK e la porzione C-terminale di EF (EF₅₈) (B) complessato con il substrato 3'-deossi-ATP (Ascenzi et al., 2002).

2.4. Endocitosi delle tossine

Le tossine di antrace agiscono all'interno della cellula. Per penetrare nel citosol sfruttano la normale via endocitica recettore-mediata e clatrina-dipendente (figura 6). E' stato dimostrato che PA può venire tagliato anche nel siero e quindi il legame con LF e EF può avvenire anche senza la formazione

del complesso con il recettore (Brossier et al., 2004). Non sono ancora note le conseguenze di questa situazione nella patologia e in questa sede l'interesse sarà centrato sull'interazione tra le tossine e la cellula.

Sulla membrana plasmatica

Il PA₈₃ si lega ai recettori presenti sulla membrana plasmatica della cellula ospite, dove viene tagliato da proteasi di superficie in PA₂₀ e PA₆₃. Il frammento di 63 kDa eptamerizza e si localizza di preferenza in particolari microdomini lipidici sulla membrana plasmatici, noti come *raft* lipidici (Abrami et al., 2003). EF e LF si legano all'oligomero con un rapporto di al massimo tre molecole di enzima per eptamero (Zhang et al., 2004). Il complesso viene endocitato in maniera clatrina-dipendente. Il legame di EF o LF sembra accelerare la formazione di eptameri, almeno *in vitro*, stabilizzando la formazione di intermedi dimeri e favorendone l'ulteriore crescita. Questo è vantaggioso perché evita che (PA₆₃)₇ venga internalizzato privo di della parte catalitica legata. L'eptamerizzazione fa scattare l'endocitosi del recettore, che non dipende dal legame di EF/LF (Abrami et al., 2003). Come avviene per i fattori di crescita, le tossine dell'antrace inducono l'endocitosi del loro stesso recettore, suggerendo l'intervento di una qualche via del segnale che recluti l'apparato endocitico. La porzione citoplasmatica dei recettori potrebbe avere un ruolo in questo processo, come indica la presenza di siti di fosforilazione e ubiquitinazione, di regioni ricche di proline e di *acidic clusters* (Bradley et al., 2001), (Scobie et al., 2003).

Dalla membrana al citosol

Una volta endocitate, le tossine dell'antrace raggiungono gli endosomi precoci, la prima stazione di smistamento della via endocitica. Il pH debolmente acido, circa 6.2, può essere sufficiente per l'inserzione dell'eptamero nella membrana dell'organello.

Recentemente è stato proposto (Abrami et al., 2004) che (PA₆₃)₇ si inserisca di preferenza nelle membrane delle vescicole intraluminali piuttosto che sulla membrana limitante degli endosomi. La composizione interna di queste vescicole è ancora sconosciuta, ma già in passato era stata proposta la loro presenza nei corpi multivescicolari (ECV/MVB, *endosomal carrier vesicles/multivesicular bodies*), in seguito nei *late endosomes* (Gruenberg, 2001) e più di recente anche negli endosomi precoci.

Da qui continua il percorso intracellulare delle tossine, che negli ECV/MVB vengono trasportate lungo microtubuli fino agli endosomi tardivi. Nella via endocitica esistono dei segnali per lo smistamento del contenuto degli organelli. Si pensa (Le Blanc et al., 2005) che particolari lipidi presenti sulla membrana delle vescicole, come LBPA, siano il segnale per la degradazione del contenuto. Infatti, il PA inserito in membrana va incontro alla degradazione. Al contrario, all'interno delle vescicole le tossine sono protette dagli enzimi lisosomiali. E' stato proposto che negli ultimi stadi della via endocitica (Gruenberg, 2001) le vescicole interne degli endosomi tardivi vadano incontro ad una retro-fusione con la membrana limitante, permettendo così il rilascio delle tossine nel citosol (figura 6).

Gli endosomi funzionano quindi da 'cavallo di Troia' per le tossine dell'antrace e fanno sì che siano rilasciate in specifici siti della cellula, probabilmente con un vantaggio per il raggiungimento dei *targets*.

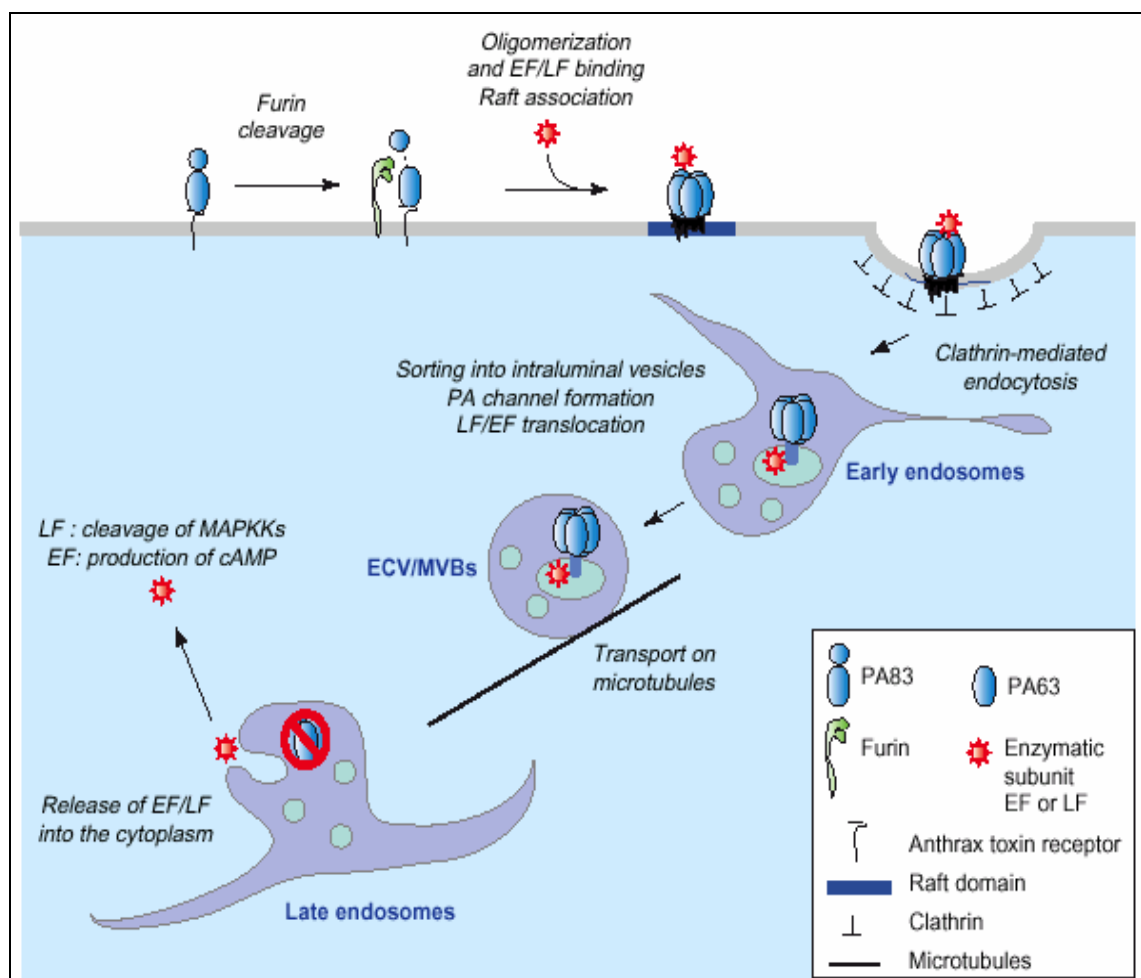


Figura 6. Schema proposto per la via percorsa dalle tossine nella cellula sfruttando la via di endocitosi, tratto da (Gruenberg, 2001).

Il comportamento di EF è diverso da quello di LF

E' stato proposto che LF dopo la traslocazione venga liberato nel citosol, mentre EF resti associato alle membrane dell'organello trasportatore. EF si disporrebbe in modo tale da esporre il suo dominio catalitico sulla faccia citosolica delle membrane endosomiali, così da venire in contatto con la CaM e il substrato ATP. Infatti, in seguito al frazionamento cellulare l'attività adenilato ciclasica è stata trovata associata con la frazione delle membrane (Guidi-Rontani et al., 2000). Anche questo comportamento può avere un significato per direzionare specificamente l'azione della tossina a precisi microdomini cellulari.

3. Meccanismi di azione cellulari delle tossine di antrace

Le tossine dell'antrace hanno un ruolo centrale nella patologia. Sono due tossine intracellulari la cui azione ha un marcato effetto sulle vie del *signalling*. Ad oggi non è ancora chiaro il legame tra la loro attività a livello molecolare (taglio delle MEKs, aumento del cAMP) e le conseguenze a livello dell'intera cellula e via via fino all'intero sistema immunitario.

3.1. LTx e la via delle MAPK

La via delle *mitogen activated protein kinases* è un modulo di traduzione del segnale conservato in tutti gli eucarioti (Houslay and Kolch, 2000). Lo schema generalizzato (figura 7) di questa via parte da uno stimolo extracellulare che attiva una *G-protein*, da cui parte una cascata di attivazione di chinasi da MAPKKK a MAPKK e infine MAPK. L'ultimo effettore della cascata regola la trascrizione nel nucleo. Le MAPK sono una grande famiglia di chinasi che condividono i meccanismi regolatori, ma svolgono funzioni diverse. La nomenclatura è piuttosto varia, ma in questa sede si è scelto di usare il nome MAPK per l'intera famiglia e il nome specifico per le singole chinasi della via, ERK, JNK e p38 (figura 7).

La via di ERK risponde a stimoli mitogeni (ormoni, fattori di crescita) e presiede a funzioni fondamentali per la cellula, quali la proliferazione, la differenziazione, lo sviluppo e l'apoptosi. La *G-protein* che dà inizio a questa via è Ras, che attiva la MAPKKK Raf e questa a sua volta le due MAPKK, MEK1 e MEK2.

Il ruolo fisiologico delle vie di JNK e p38, altre due MAPK, è meno chiaro, ma si pensa che siano coinvolte nel controllo di punti cruciali del ciclo cellulare, come l'apoptosi e la differenziazione. Queste due vie rispondono a citochine infiammatorie e a *stress* di vario genere. Le *G-proteins* coinvolte sono la Rac e la Rho, rispettivamente. La MAPKK che attiva JNK è MEK7, mentre quelle che attivano p38 sono MEK3 e MEK6, e la MEK4 attiva sia JNK che p38.

Sebbene le diverse vie di MAPK rispondano a stimoli differenti e abbiano funzioni biologiche distinte, sembra che ci sia una condivisione dei *targets* a valle. Le MAPK hanno una vasta molteplicità di substrati, almeno a giudicare dalla ricorrenza dei motivi di fosforilazione (PX(S/T)P). In realtà la presenza del motivo giusto non è sufficiente a fare di una proteina un substrato, perché serve anche un *docking site* del substrato che faciliti fisicamente l'interazione con la chinasi (KIM, *kinase interaction motif*). In questo modo viene garantita la specificità e selettività di precise risposte biologiche. Inoltre, acquista sempre più peso la compartimentalizzazione e precisa localizzazione cellulare dei vari componenti del *signalling*.

LF taglia e inattiva tutte le MEK1-7, tranne la MEK5, bloccando contemporaneamente tre vie di traduzione del segnale dall'ambiente extracellulare al nucleo (Vitale et al., 1998). Questo blocco avviene in tutte le cellule che esprimono il recettore per PA, ma gli effetti sono ancora poco chiari. I macrofagi sembrano essere le sole cellule che muoiono per azione di LTx, mentre altri tipi cellulari subiscono danni diversi, meno evidenti e non ancora ben compresi.

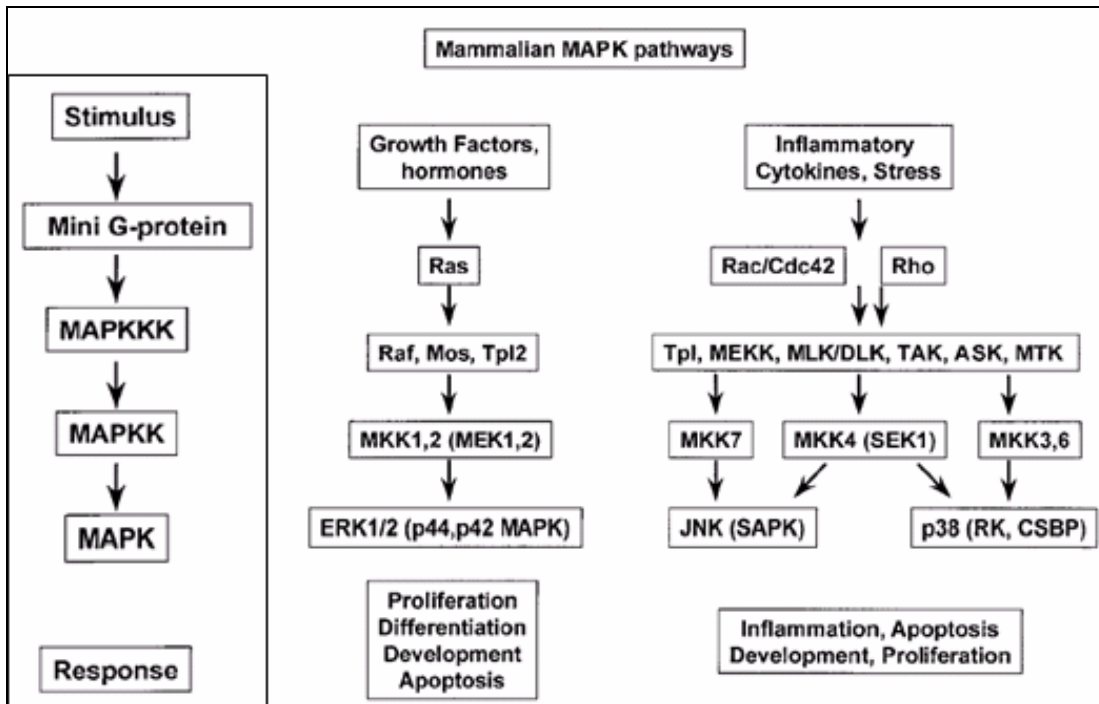


Figura 7. Schema della cascata delle MAPK. A sinistra si trova lo schema generalizzato, a destra i componenti specifici della via stimolata da fattori di crescita che porta ad attivare ERK e della via stimolata da stress/citochine che porta all'attivazione di JNK e p38 (Houslay and Kolch, 2000).

3.2. ETx e cAMP signalling

Il cAMP è un secondo messaggero la cui produzione, rivelazione e degradazione sono affidate a un'enorme varietà di isoforme di proteine. Basti pensare che esistono almeno 10 isoforme di ACs e 30 isoforme di fosfodiesterasi (PDE). Le isoforme sono espresse in maniera cellulo-specifica, ma nella maggior parte delle cellule l'attività fosfodiesterasica è affidata alle isoforme PDE3 e PDE4. Inoltre, esistono quattro geni che codificano per 16 varianti di *splicing* della PDE4. Tra i prodotti si distinguono delle isoforme lunghe (PDE4D) e delle isoforme corte (PDE4D1) e "super corte" (PDE4D2), diverse nelle loro porzioni N-terminali (figura 9). Le differenze strutturali probabilmente servono per il direzionamento alle diverse regioni subcellulari, determinando la modulazione compartmentalizzata del segnale (Houslay and Kolch, 2000).

Il sistema sensore del cAMP più studiato finora è la proteina chinasi A (PKA). E' un eterotetramero formato da due subunità catalitiche e due regolatorie, dove si lega il cAMP in un rapporto di due molecole di cAMP per ogni singola subunità regolatoria (figura 8).

Da alcuni anni è nota anche un'altra proteina-sensore del cAMP, la EPAC (*cAMP-stimulated GTPase exchange protein*, detta anche cAMP-GEF). Essa attiva le *G-proteins* Rap1a e Rap1b (figura 9), ma il suo ruolo e la sua localizzazione intracellulare non sono ancora del tutto noti.

Il cAMP media diverse funzioni nelle cellule specializzate, dal controllo metabolico, alla contrazione muscolare, alla memoria. In molte cellule inibisce la crescita, ma in alcune la stimola, ad esempio le cellule della tiroide o delle ghiandole pituitarie. E' difficile riassumere tutti i suoi effetti, perchè a seconda del tipo cellulare, del profilo di espressione e dello stato di attività della cellula una piccola molecola come il cAMP può generare un'ampia varietà di risposte biologiche (Fuld et al., 2005).

ETx produce cAMP in quantità più o meno elevata a seconda del tipo di cellula e a livelli che si mantengono alti nel tempo, almeno fino a 4 ore (si veda 'Risultati e discussione', § 2.2). Il mancato o l'insufficiente intervento delle PDE a distanza di ore dall'intossicazione fa pensare ad una profonda disregolazione del *signalling* intracellulare e dei fini meccanismi che ne mantengono l'equilibrio.

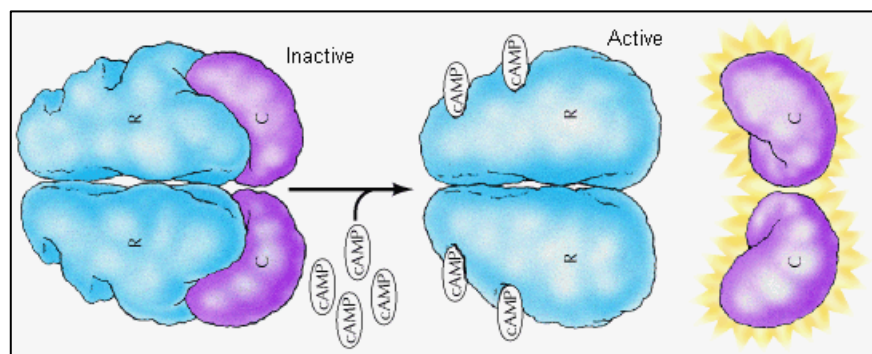


Figura 8. Proteina chinasi A con le subunità catalitiche in viola e regolatorie in azzurro nello stato inattivo e attivo, in seguito al legame del cAMP.

3.3. *Cross-talk* fra il *signalling* di MAPK e di cAMP

Nessuna via del segnale funziona isolata dalle altre. In particolare, ci sono svariati punti di *cross-talk* tra i sistemi di *signalling* di cAMP, di ERK e di JNK, cruciali per la sopravvivenza e la regolazione della cellula (figura 9). Una delle prime osservazioni a riguardo è che nei fibroblasti e nelle cellule muscolari vascolari l'aumento di cAMP inibisce l'attivazione di ERK da parte dei fattori di crescita e l'effetto viene attribuito alla PKA che inibisce c-Raf, la MAPKKK a monte di ERK. D'altro canto, il cAMP facilita l'attivazione di ERK in diversi tipi di cellule, ad esempio cellule neuronali. Qui è richiesta la prolungata attivazione di

ERK e la sua traslocazione nel nucleo, che sembrano essere mediate dal cAMP (Yao et al., 1998). E' possibile che in questo processo di attivazione prolungata di ERK entri in gioco EPAC piuttosto che PKA.

Un altro dei numerosi punti in cui convergono i segnali di cAMP e ERK è il fattore di trascrizione CREB, che viene attivato per fosforilazione sia da parte di ERK che di PKA.

3.4. Effetti cellulari

Gli effetti delle tossine dipendono strettamente dal tipo cellulare, ma anche dallo stato della cellula e dal set di isoforme enzimatiche espresse.

Esaminata da sola, LTx riduce il rilascio di mediatori dell'infiammazione da parte dei macrofagi e delle cellule dendritiche e ne provoca la morte (Park et al., 2002). Insieme alla capsula batterica, anche questo è un meccanismo per sfuggire all'attacco dei fagociti e per moltiplicarsi indisturbato nell'ospite. Oltre a danneggiare direttamente la risposta immunitaria innata, l'azione di LTx sulle

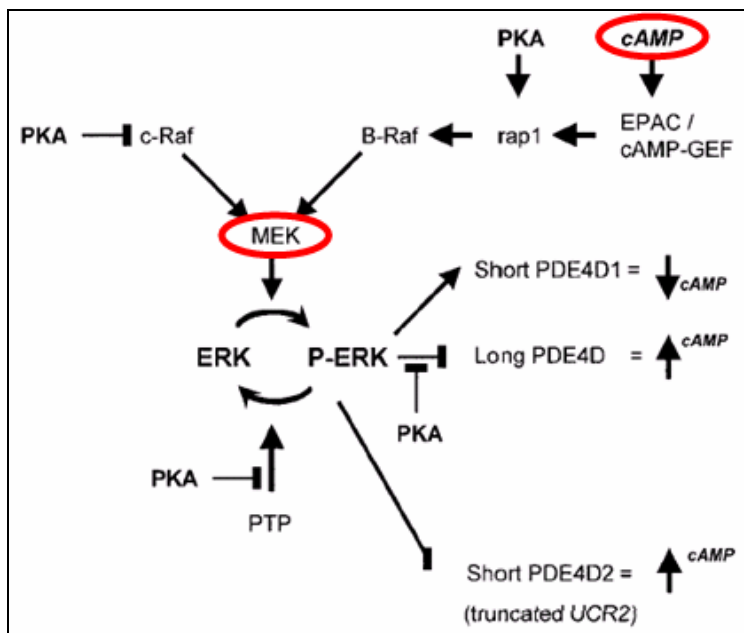


Figura 9. Alcuni punti di cross-talk fra i sistemi di signalling del cAMP e di ERK, alterati da ETx, da LTx e dalla loro azione sinergica. Il cAMP ha dei nodi di controllo sul sistema della ERK, strettamente dipendenti dal tipo di cellula e dal set di isoforme enzimatiche espresse. Tratto da (Houslay and Kolch, 2000).

dendritiche interferisce in maniera indiretta con l'inizio della risposta immunitaria adattativa.

Recentemente è nato l'interesse per l'azione sinergica delle due tossine, viste non più come entità separate, ma piuttosto come una tossina 'tripartita', formata da PA+LF+EF, cosa che realisticamente accade durante l'infezione (Ascenzi et al., 2002). Questi studi preliminari trovano una sinergia d'azione tra LTx e ETx, in particolare nell'inibizione delle vie delle MAPKs, sia mitogenoche stress-attivate (ERK e JNK, rispettivamente, ma non p38). Infatti, in seguito all'intossicazione con PA+LF+EF si riduce la fosforilazione ERK. Risalendo la via delle chinasi, si trova l'inibizione dell'attivazione di MEK1 e MEK2, con un meccanismo che probabilmente dipende dall'azione inibitoria di PKA su Raf (figura 9). Inoltre, trovano anche l'inibizione di due fattori di trascrizione (NFAT-1 e AP-1) essenziali per l'espressione dei geni per le citochine (Paccani et al., 2005).

Questi esperimenti sono stati condotti sui linfociti, dimostrando che anche le cellule della risposta immunitaria adattativa sono bersaglio dell'azione tossica. In una reale situazione di infezione, nei linfonodi i linfociti T si trovano esposti direttamente all'azione di entrambe le tossine, che alterano la cascata di *signalling* iniziata dai recettori delle cellule T (TCR) con i meccanismi discussi sopra.

Dunque gli effetti patologici più importanti delle tossine dell'antrace sono quelli a carico del sistema immunitario, come la morte dei macrofagi e l'inattivazione di neutrofili (Wright and Mandell, 1986), cellule dendritiche (Wright and Mandell, 1986) e linfociti (Paccani et al., 2005).

MATERIALI E METODI

1. Materiali

I plasmidi utilizzati per i clonaggi sono pRSETa e pCRII TOPO (Invitrogen); i *primers* sono stati sintetizzati dalla MWG-biotech; i ceppi batterici di *E. coli* usati per l'estrazione del DNA plasmidico sono XL1 BLUE (Stratagene), mentre per l'espressione proteica sono BL21 (DE3), BL21 (DE3)-CodonPlus- RIL, BL21 (DE3)-CodonPlus- RP (Stratagene).

Per le cellule batteriche viene usato LB come mezzo di coltura (mezzo di Luria Bertani: Tryptone 10 g/L, estratto di lievito 5 g/L, NaCl 10 g/L) in forma liquida o solida (con aggiunta di Agar 1.5%). Gli antibiotici usati per selezionare i ceppi positivi sono ampicillina, cloramfenicolo e kanamicina (Sigma).

Le PCR sono state fatte con il *kit* della Roche "*Expand High Fidelity*"; le purificazioni di queste ultime con il *kit* "*Wizard SV Gel and PCR Clean Up System*" (Promega) o "*mini elute*" (Eppendorf); gli enzimi di restrizione e la T4 DNA ligasi sono entrambi della New England Biolabs. Per le purificazioni del DNA da gel d'agarosio e le estrazioni di DNA plasmidico vengono usati rispettivamente i *kit* "*Perfect Prep Gel Clean Up*" e "*Perfect Prep Plasmid Mini*" (Eppendorf).

I sistemi per le corse elettroforetiche dei gel di poliacrilammide sono della Biorad, le soluzioni di acrilammide e i tamponi necessari per preparare i gel sono della National Diagnostic. Per la colorazione dei gel di poliacrilammide viene usato il colorante "*SimplyBlue SafeStain*" (Invitrogen).

Per marcare il DNA in gel d'agarosio viene usato "*SYBR Safe DNA Stain*" (Molecular Probes).

Per i Western blot si utilizzano "*NuPAGE Novex Bis-Tris Gels*", apparecchiature e tamponi Invitrogen, membrane di nitrocellulosa "*Shleicher & Shuell*" (Protran) e soluzioni di rivelazione "*ECL Plus Western Blotting Detection System*" (Amersham Biosciences). Gli anticorpi sono Sigma e Santa Cruz.

I vari reagenti chimici sono Sigma o Calbiochem. I *cocktails* di inibitori di proteasi sono Roche. I mezzi per le colture cellulari e gli antibiotici sono Gibco. I microscopi sono Olympus IX70 e Leica DM IRE3.

2. Tecniche spettroscopiche

2.1 Quantificazione di DNA e proteine mediante spettroscopia di assorbimento

Per determinare la concentrazione del DNA viene misurata l'assorbanza di una sua diluizione nella regione degli UV a 260 nm applicando la seguente relazione:

$$C(\text{ng}/\mu\text{l}) = 50 \times \text{diluizione} \times \text{Abs}_{260}$$

Il fattore 50 corrisponde a una approssimazione secondo la quale una unità di assorbanza a 260 nm equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di DNA a doppio filamento. La stima della purezza del campione è valutata in base al rapporto dell'assorbanza misurata a 260 e a 280 nm; valori compresi tra 1.8 e 2.0 indicano un elevato livello di purezza relativamente a contaminanti proteici.

Per determinare la concentrazione proteica viene registrato lo spettro di assorbimento UV effettuando una scansione nella regione compresa tra 240 e 350 nm. L'equazione utilizzata deriva dalla legge di Lambert-Beer

$$\text{Abs} = \epsilon C l$$

dove ϵ (espresso in $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) rappresenta il coefficiente di estinzione molare, che varia con la natura del composto. Lo strumento usato è DU 530 Beckman.

3. Tecniche di biologia molecolare

3.1. Elettroforesi in gel di agarosio

Il gel viene preparato sciogliendo completamente 1 g di agarosio in 100 ml di tampone TAE (40 mM Tris, 25 mM sodio-acetato, 0.5 mM EDTA, 0,1% acido acetico glaciale) e riscaldando nel microonde; alla soluzione si aggiunge il colorante "SYBR Safe DNA Stain" da uno stock 10'000X (Molecular Probes). Ai campioni viene aggiunto un *buffer* di caricamento, *Loading Dye Buffer* 6X (0.03% blu di bromo fenolo, 0.03% xilene cianolo, 10% glicerolo; New England BioLabs). I *marker* dei pesi dei frammenti di DNA riferimento sono della New England BioLabs. La corsa elettroforetica viene effettuata a 80 V e 400 mA per tempi variabili.

3.2 Clonaggio delle proteine di antrace e delle proteine fluorescenti

I *primers* di EF, LF, e mRFP sono disegnati sulla base della sequenze conservate nella GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (tabella 1). Il clonaggio di EGFP è stato fatto a partire dal plasmide pEGFP-N1 (Clontech). Il clonaggio del mutante inattivo LF_{E735A} (glutammico 735 mutato in alanina) viene fatto con gli stessi *primers* del *wild-type* su una sequenza precedentemente mutagenizzata nel nostro laboratorio.

Il frammento amplificato dalla PCR viene digerito con gli opportuni enzimi di restrizione (tabella 1) e ligato nel plasmide pRSETa precedentemente digerito con gli stessi enzimi. Le cellule XL1BLUE vengono trasformate mediante *shock* termico, selezionate con ampicillina 100 µg/ml e inoculate in 2 ml di LB con antibiotico. Il DNA plasmidico viene estratto con il *kit* della Eppendorf e piccole aliquote del plasmide vengono digerite e analizzate con elettroforesi in gel di agarosio 1% per verificare l'inserimento del frammento. La correttezza della sequenza viene controllata mediante sequenziamento al servizio di sequenziamento del CRIBI (Centro di Ricerca per le Biotecnologie Innovative, Università di Padova).

3.3. Fusione delle proteine di antrace con proteine fluorescenti

pRSETa-EF viene digerito in SacI e EcoRI e ligato con mRFP digerita con gli stessi enzimi (tabella 2). L'inserimento viene verificato mediante elettroforesi in gel di agarosio 1%.

Poiché la sequenza di LF contiene il sito di restrizione EcoRI, pRSETa-EGFP viene digerito in BamHI e SacI e viene successivamente inserito LF o LF_{EA} (tabella 2). Vista la difficoltà incontrata in questa ligazione, il DNA di LF o LF_{EA} viene spezzato in due frammenti digerendo con BamHI e XhoI (1'421 bp) e con XhoI e SacI (877 bp). La ligazione viene quindi fatta con tre frammenti, il pRSETa-EGFP digerito in BamHI e SacI e i due frammenti di LF, con un rapporto molare di vettore/inserito/inserito di 1/2.5/2.5. L'inserimento viene verificato mediante elettroforesi in gel di agarosio 1%.

3.4. Trasformazione di cellule competenti

Un'aliquota di cellule rese competenti con il metodo del CaCl_2 e conservata a -80°C viene posta in ghiaccio e lasciata scongelare lentamente. Viene quindi aggiunto $1\ \mu\text{l}$ di DNA plasmidico e la sospensione viene incubata in ghiaccio per 30 minuti, sottoposta a *shock* termico a 42°C per 30 secondi e nuovamente incubata in ghiaccio per 2 minuti. Dopo l'aggiunta di $250\ \mu\text{l}$ di LB, i batteri vengono lasciati un'ora a 37°C in agitazione a 180 rpm. Infine, i batteri vengono piastrati su piastre di LB-agar addizionate con gli opportuni antibiotici. Il plasmide pRSETa contiene il sito per la resistenza all'ampicillina, utilizzata a $100\ \mu\text{g/ml}$, e i ceppi BL21 (DE3)-CodonPlus-RIL contiene già la resistenza al cloramfenicolo, utilizzato a $34\ \mu\text{g/ml}$.

3.5. Espressione di proteine ricombinanti

Inizialmente vengono fatte delle prove di induzione per selezionare il ceppo batterico che meglio esprime la proteina di interesse, testando i ceppi di *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3)-CodonPlus-RP e BL21(DE3)-CodonPlus-RIL e utilizzando 10 ml di coltura. Successivamente, l'espressione viene condotta su più larga scala nei ceppi prescelti (tabella 2). Le cellule competenti BL21(DE3)-CodonPlus-RIL vengono trasformate con $1\ \mu\text{l}$ di plasmide pRSETa-EF e piastrate in LB agar con ampicillina $75\ \mu\text{g/ml}$ e cloramfenicolo $34\ \mu\text{g/ml}$. Le cellule competenti BL21 (DE3) vengono trasformate con $1\ \mu\text{l}$ di plasmide pRSETa-LF/LF_{E735A}-EGFP e piastrate in LB agar con $100\ \mu\text{g/ml}$ di ampicillina. Il giorno seguente le colonie sono inoculate in 500 ml di LB mantenendo l'antibiotico e fatte crescere fino a OD_{600} pari a 0.6 a 37°C in agitazione a 180 rpm. L'espressione della proteina viene indotta con l'aggiunta di IPTG 1mM e l'incubazione viene prolungata per 4 ore a 30°C , sempre in agitazione. Le cellule sono raccolte per centrifugazione (centrifuga Sorvall RC 5C plus, rotore SLA-1500) a 6000 rpm per 10 minuti a 4°C , il *pellet* risospeso in PBS freddo e di nuovo centrifugato a 4000 rpm per 15 min a 4°C . Dopo aver eliminato il PBS, si conserva il *pellet* a -80°C .

	EF	LF/LF _{E735A}	EGFP	mRFP
AC number	AF065404	AJ413935.1	(pEGFP-N1, Clontech)	AY678264
Siti di restrizione	BamHI - SacI	BamHI - SacI	SacI - EcoRI	SacI - EcoRI
Plasmide	pRSETa	pRSETa	pRSETa	pRSETa
Costrutto	Primers			
EF	forward 5' <u>aaaggatcc</u> atgaatgaacattacactgag3' reverse 5' <u>aaagagctc</u> tattttcatcaataatttttg3'			
LF/LF _{E735A}	forward 5' <u>aaaggatcc</u> gtaaagaggaaagagaaaaataaa3' reverse 5' <u>aaagagctc</u> tgagtaataatgaactaatct			
EGFP	forward 5' <u>aaagagctc</u> atggtgagcaagggcg3' reverse 5' <u>aaagaattc</u> ctgtacagctcgccat3'			
mRFP	forward 5' <u>aaagagctc</u> atggccactggtg3' Rev 5' <u>aaagaattc</u> ttaggcgccggtg3'			

Tabella 1. Schema riassuntivo dei clonaggi delle proteine di antrace e delle proteine fluorescenti. AC number è il codice della sequenza conservata nella GeneBank che è stata utilizzata per disegnare i primers.

	EF-mRFP	LF-EGFP	LF _{EA} -EGFP
Siti di restrizione	BamHI SacI EcoRI	BamHI SacI EcoRI	BamHI SacI EcoRI
Plasmide	pRSETa	pRSETa	pRSETa
Cellule di espressione	BL21(DE3)-CodonPlus-RIL	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)

Tabella 2. Schema riassuntivo dei sub-clonaggi per la creazione delle chimere fluorescenti e cellule utilizzate per l'espressione dei costrutti ottenuti.

3.6. Real time-PCR

Dei frammenti di circa 200 bp appartenenti ai recettori del PA vengono clonati per costruire delle curve di taratura. Il cDNA ottenuto dalle cellule Jurkat, HeLa e Raw (§ 5.7) viene amplificato mediante PCR con i primers disegnati per

Materiali e metodi

i recettori TEM8 e CMG2 (tabella 3). Prima di fare la PCR, il cDNA viene precipitato in 2.5 volumi di etanolo assoluto e 0.1 volumi di acetato di sodio 3 M per 16 ore a -80°C, viene centrifugato per mezz'ora a +4°C e il *pellet* risospeso in H₂O ultrapura. La PCR viene fatta con il *kit* della Roche “*Expand High Fidelity*” ad una concentrazione di MgCl₂ 1.75 mM. Il prodotto viene inserito nel vettore TOPO TA (Invitrogen) e la presenza dell'inserito viene verificata incubando il plasmide ottenuto con l'enzima EcoRI per 1 ora a 37°C. I plasmidi contenenti gli ampliconi vengono utilizzati in diluizioni seriali da 0.2·10⁻² fmol/μl a 10⁻⁸ fmol/μl per costruire una curva di taratura. Come riferimento, viene usato il gene della GADPH umana e della β-actina di topo. Anche per questi ampliconi vengono costruite delle curve di taratura, questa volta utilizzando i *primers* forniti dalla dott. M. De Bernard.

Lo strumento è un termociclatore modello 5700 della Applied Biosystems/Perkin Elmer disponibile presso il servizio di sequenziamento del CRIBI (Università di Padova). La reazione di amplificazione viene fatta con la miscela *Sybr Green* (Applied Biosystem) in presenza delle coppie di *primers*; ogni *primer* ha una concentrazione finale 500 nM. Il cDNA viene utilizzato nella miscela di reazione alla diluizione finale di 1/20.

		TEM8	CMG2
Jurkat e HeLa (cellule umane)	AC number	NM_032208	AY_233452
	primers	fw 5'tccaccatatgtgcaggaga3' rev 5'agataggcgctggacacagt3'	fw 5'aggttcggtggggtgataaa3' rev 5' ttgtctgaggaggctggtg 3'
	amplificato	172 bp	205 bp
Raw264.7 (cellule murine)	AC number	NM_054041	NM_133738
	primers	fw 5'gctcaatgagaagcccttg3' rev 5'agccgtctgaacagtgtgtg3'	fw 5'gtttcttccaagcaacca3' rev 5'ccgtccgtcaaagcaattat3'
	amplificato	174 bp	195 bp

Tabella 3. Sequenze conservate nella GeneBank utilizzate per il disegno dei primers per i diversi recettori del PA presenti sulle cellule studiate.

4. Tecniche biochimiche

4.1. Elettroforesi SDS-PAGE

Lo *stacking* gel viene preparato con una percentuale di acrilammide/bis-acrilammide del 4% in presenza di APS al 10% e di TEMED (*N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine*); il *running* gel contiene il 12% di acrilammide/bis-acrilammide. I tamponi per la preparazione dei gel sono Protogel (National Diagnostic), le apparecchiature sono Minigel II Biorad e il tampone di corsa è composto da Tris 6 g/L, SDS 1 g/L, glicina 2,88 g/L. Per denaturare le proteine viene utilizzato il Laemmli sample Buffer 6X e i campioni vengono bolliti per 6-8 minuti a 95°C. La corsa elettroforetica avviene a 260 V, 15 mA per lo *stacking* e 30 mA per il *running* gel. Il gel viene colorato con il colorante "SimplyBlue SafeStain" (Invitrogen) secondo il protocollo del produttore.

I campioni raccolti dalla cromatografia a scambio ionico devono essere concentrati prima del caricamento. Vengono precipitati con TCA (acido tricloroacetico) 10% per 15 minuti a temperatura ambiente e centrifugati per 15 minuti

a 13'000 rpm; eliminato il surnatante, vengono risospesi in un volume variabile di LSB 2X (Fluka) e Tris soluzione satura e bolliti.

4.2. Western blot

Viene utilizzato il sistema commerciale “NuPAGE Novex Bis-Tris Gels” (Invitrogen) secondo il protocollo del produttore. La membrana è di nitrocellulosa (Protran) e sono utilizzati due tipi di marker, il precolorato “*Bench Mark prestained Protein ladder*” e il “*magic marker*” (Invitrogen). Dopo il trasferimento delle bande la membrana è saturata per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente in soluzione saturante composta da latte 5% in PBST (PBS con Tween20 0.05%). L'incubazione con l'anticorpo primario avviene per 1 ora a temperatura ambiente o per tutta la notte a 4°C.

L'anti His-tag monoclonale (Sigma) viene diluito 1:1000 e l'anti MEK3 di *rabbit* (Santa Cruz) 1:2000. Dopo 4 lavaggi da 5 minuti in PBST, la membrana è fatta incubare con gli opportuni anticorpi secondari, tutti diluiti 1:2000 e coniugati con la perossidasi (HRP). La luminescenza viene sviluppata con “*ECL plus Western Blotting Detection System*” (Amersham Biosciences) e rivelata con lastre fotografiche (Amersham Biosciences) secondo il protocollo del produttore.

4.3. Purificazione di proteine ricombinanti per cromatografia di affinità

Il *pellet* batterico viene risospeso in una soluzione contenente tampone A (50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl a pH 7.7), un *cocktail* di inibitori di proteasi EDTA-free (Roche), lisozima (0.1 mg/ml) e, nel caso della purificazione di EF, con l'aggiunta di 0.1 mM PMSF (fenilmetanosulfonil fluoruro). Le cellule sono lisate per sonicazione in un bagno di ghiaccio con 4 cicli della durata di 30 secondi intervallati da 40 secondi di pausa. Il lisato viene centrifugato a 18'000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il lisato chiarificato viene filtrato con filtri da 45 µm (Sartorius) prima di essere caricato in colonna.

La colonna da 5 ml “*Hi-Trap chelating HP*” (Amersham Biosciences) viene preparata facendo passare circa 35 ml di una soluzione di CuSO₄ 0,1 M in acqua, seguita da un abbondante lavaggio con H₂O mQ e dall'equilibratura in tampone A. Il lisato viene caricato in colonna a flusso di 5 ml/min e il lavaggio con tampone A continua fino a che l'assorbanza ritorna ai livelli di base. Per l'eluizione viene utilizzato il tampone B (imidazolo 100 mM in tampone A, pH

7.7) con un gradiente a *step* da 0 a 10% in 10 minuti, da 10 a 40% in 10 minuti e da 40 a 100% in 5 minuti.

Le frazioni contenenti la proteina di interesse vengono riunite e dializzate in 2 l dell'opportuno tampone, dopodichè possono venire subaliquotate, congelate in azoto liquido e conservate a -80°C oppure caricate in colonna a scambio ionico (tabella 1 in 'risultati e discussione').

4.4. Purificazione di proteine ricombinanti per cromatografia a scambio ionico

Per EF e EF-mRFP viene fatta una purificazione per scambio anionico con la colonna MonoQ (Amersham Biosciences) ad un flusso costante di 1 ml/min. Per la purificazione di EF la colonna viene equilibrata in un tampone Tris 20 mM, Na₂EDTA 1 mM, a pH 8.6 e l'eluizione avviene con un tampone Tris 20 mM, Na₂EDTA 1 mM, NaCl 1 M a pH 8.6 con un gradiente a *step* da 0 a 40% in 7 minuti, da 40 a 60% in 15 minuti e da 60 a 100% in 2 minuti. Per EF-mRFP viene usato un tampone Tris 50 mM a pH 8 contro Tris 50 mM, NaCl 1M a pH 8 con un gradiente 0-30% in 5 minuti e 30-100% in 30 minuti. Piccole aliquote delle frazioni corrispondenti ai picchi vengono precipitate con TCA e analizzate mediante SDS-PAGE e *Western blot*. Le frazioni contenenti la proteina di interesse vengono riunite e dializzate in 1 l di Hepes 10 mM, NaCl 50 mM a pH 7.5 nel caso di EF, Hepes 10 mM, NaCl 150 mM a pH 7.5 nel caso di EF-mRFP (tabella 1 in 'risultati e discussione'); vengono poi concentrate nei concentratori Centricon (Sartorius), subaliquotate, congelate in azoto liquido e infine conservate a -80°C.

5. Tecniche di biologia cellulare

5.1. Colture cellulari

Tutte le linee cellulari sono mantenute a 37°C in atmosfera controllata con CO₂ al 5%. Le cellule HeLa vengono mantenute in coltura in D-MEM con glutammina (Gibco) addizionato di 10% di FCS, penicillina-streptomina (10,000 U/ml e 10,000 µg/ml, 100X, Gibco) ed Hepes 20 mM. Una volta raggiunta la confluenza, vengono staccate con una soluzione di tripsina 0,05%, raccolte e centrifugate per 5 minuti a 900 rpm a temperatura ambiente e nuovamente piastrate alla densità desiderata e utilizzate dal giorno seguente.

Le cellule Jurkat vengono mantenute in coltura in RPMI 1640 a cui viene aggiunto il 10% di FCS, penicillina-streptomina-glutammina (100X, Gibco) e Hepes 20 mM a 37°C. Vengono raccolte con il loro mezzo di coltura,

Materiali e metodi

centrifugate per 5 minuti a 1250 rpm a temperatura ambiente, risospese in mezzo fresco e piastrate alla densità desiderata.

Le cellule Raw264.7 vengono mantenute in coltura in RPMI 1640 con glutammina (Gibco) a cui viene aggiunto il 10% di FCS e penicillina-streptomomicina (100X, Gibco). Raggiunta la confluenza, vengono staccate con uno *scraper* in plastica, raccolte e centrifugate per 5 minuti a 900 rpm a temperatura ambiente. Risospese in mezzo fresco, le cellule sono piastrate alla densità desiderata.

5.2. Test di vitalità

La vitalità dei macrofagi Raw viene testata in seguito all'intossicazione con LF_{wt} o LF-EGFP 2 nM in presenza di PA 4 nM per tempi diversi. La vitalità di Jurkat e HeLa viene valutata in seguito all'incubazione con bafilomicina 500 nM e 100 nM. Dopo l'incubazione a 37°C per tempi diversi, il mezzo viene eliminato e le cellule sono lavate con PBS. In ogni pozzetto vengono aggiunti 90 µl di DMEM senza colorante rosso fenolo e 10 µl di colorante tetrazolium. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C viene letta l'assorbanza a 490 nm.

5.3. Lisi delle cellule per analisi con *western blot*

Per colture cellulari in piastre da 96 pozzetti viene eliminato il mezzo di coltura e le cellule sono risospese in 50 µl di LSB contenente un *cocktail* di inibitori di proteasi (Roche), bollite immediatamente per 6-8 minuti a 95°C e caricate in gel.

5.4. Misurazione del cAMP intracellulare

Il giorno prima dell'esperimento vengono piastrate in piastre da 96 pozzetti 5×10^4 cellule Jurkat, 1.5×10^4 cellule HeLa e 2×10^4 cellule Raw in 100 µl dei rispettivi mezzi di coltura. Viene aggiunta EdTx (EF 10 nM, PA 20 nM) e lasciata incubare per tempi diversi. Nell'esperimento di inibizione della traslocazione, viene aggiunta Bafilomicina A1 500 nM a intervalli di 15 minuti dopo l'intossicazione. Come controllo positivo, le cellule sono trattate con ibmx 100 µM e forskolina 25 µM. Prima della lisi, le cellule Jurkat sono centrifugate a 1300xg per 3 minuti. Il surnatante viene eliminato, le cellule vengono lisate e viene misurato il cAMP intracellulare con il kit "cAMP *biotrack* EIA" (Amersham Biosciences).

5.5. Trasfezione di linee cellulari

Il DNA utilizzato per le trasfezioni è stato fornito dalla dott.ssa M. Zaccolo. Le cellule vengono trasfettate transientemente con le due subunità della PKA, la regolatoria e la catalitica, rispettivamente fuse a due varianti della GFP. Le cellule Jurkat vengono fatte crescere *over-night* ad una concentrazione di 3×10^5 cellule/ml in 30 ml di mezzo completo. Il giorno successivo, vengono co-trasfettate con 20 μg di pCDNA3-PKA_{catalitica}-EYFP e 20 μg di pCDNA3-PKA_{regolatoriaRIIRI}-ECFP o 20 μg di pCDNA3-PKA^{mp}_{regolatoriaRIIRI}-ECFP. Le Jurkat vengono elettroporate a 0.25 kV, 0.95 μF e capacitanza massima. In seguito, le cellule vengono piastrate alla concentrazione di 5×10^5 cellule/ml in 2 ml su vetrini da 23 mm ricoperti di fibronectina e incubate *over-night*.

Le cellule Hela piastrate su vetrini da 23 mm ad una concentrazione di 1.2×10^5 cellule/ml in 2 ml, dopo crescita *over-night* vengono transientemente co-trasfettate con FuGENE6 (Roche) con un rapporto di 6 μl di reagente per 2 μg di DNA (1 μg di ogni plasmide). 6 μl di FuGENE6 vengono incubati per 5 minuti a temperatura ambiente in 50 μl di Optimem (Gibco), poi i 50 μl sono aggiunti ad una diluizione dei plasmidi in altri 50 μl di Optimem e lasciati incubare 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, la miscela viene aggiunta goccia a goccia alle cellule in 1 ml di Optimem e dopo 5-8 ore il mezzo viene cambiato con del mezzo di coltura fresco completo.

5.6. Estrazione dell'RNA

In piastre da 6 pozzeti le cellule HeLa vengono piastrate a 5×10^5 cellule / 2 ml, le Jurkat a 1.5×10^6 e le cellule Raw264.7 a 6×10^5 . Dopo un'incubazione *overnight*, vengono lisate con 500 μl di *Trizol* (Invitrogen) e ne viene estratto l'RNA secondo il protocollo. In seguito a trattamento con DNase-free™ (Ambion), 1 μg di RNA viene retrotrascritto con il kit *Superscript III first strand* (Invitrogen) e l'eventuale RNA rimanente viene degradato con RNasi.

6. Live imaging

6.1. Microscopia basata sulla FRET

Dopo la trasfezioni, le cellule vengono lavate al momento dell'utilizzo e mantenute in una soluzione salina (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 0.4 mM, MgSO₄ 1 mM, HEPES 20 mM, glucosio 5.4mM, CaCl₂ 1.8 mM, pH 7.4). Il vetrino viene montato in una cameretta e inserito in una camera chiusa (*Temperature*

controller, HTC s.r.l.), adattata al microscopio, dove la temperatura viene mantenuta costante a 37°C in atmosfera con CO₂ al 5% costante.

Dopo un'equilibratura di circa 15 minuti, viene aggiunta la tossina edematosa (PA 20 nM, EF 10 nM) e le immagini sono prese per circa due ore ad intervalli di 10 secondi tra un'acquisizione e l'altra. L'aumento di cAMP viene misurato come aumento dell'emissione della CFP sull'emissione della YFP.

Per l'acquisizione delle immagini viene usato il software TILLVISION v3.3 (T.I.L.L. Photonics, GmbH, Germany) con un *binning* della telecamera 2X2. Il tempo di esposizione dipende dall'intensità della fluorescenza del campione, ma non supera mai i 300 ms.

Il microscopio è un Olympus IX70, fornito di un monocromatore Polychrome IV (T.I.L.L. Photonics, GmbH, Germany) e di un obiettivo ad immersione ad olio 100X PlanApo 1.30 NA per le cellule Jurkat e 40X PlanApo 1.0 NA per le cellule HeLa (Olympus).

Il *set up* per la FRET è composto da una luce per l'eccitazione a 430 nm ed uno specchio dicroico (455DRLP, Chroma). Le emissioni individuali di CFP ed EYFP sono raccolte da un *beam splitter* (MultiSpec Micro-Imager™, Optical Insight) che acquisisce simultaneamente le emissioni su due metà distinte di un sensore per mezzo di uno specchio dicroico (505LDX). La radiazione riflessa (di lunghezza d'onda inferiore a 505 nm) e quella emessa (con lunghezza d'onda superiore a 505 nm) sono ulteriormente selezionate dal passaggio attraverso dei filtri di emissione 480DF30 e 545DF35 (Chroma); infine, le immagini di emissione della CFP e della EYFP vengono inviate al *detector*. La camera digitale CCD è PCO SensiCam QE.

6.2. Microscopia di tossine fluorescenti

Le cellule HeLa vengono piastrate il giorno prima dell'esperimento su vetrini da 23 mm ad una concentrazione di 1.2×10^5 cellule/ml in 2 ml. Vengono incubate per un'ora a 37°C in salina (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 0.4 mM, MgSO₄ 1 mM, Hepes 20 mM, glucosio 5.4mM, CaCl₂ 1.8 mM, pH 7.4) contenente NH₄Cl 10 mM e poi per un'ora a 37°C nella salina con la stessa composizione e con LF-EGFP e EF-mRFP 200 nM e PA 800 nM. Alternativamente, vengono direttamente intossicate con LF-EGFP e EF-mRFP 200 nM e PA 800 nM in salina priva di NH₄Cl. Dopo l'incubazione, le cellule

sono abbondantemente lavate con la salina a 37°C e il vetrino viene montato in una cameretta inserita su una piastra riscaldante. Per ogni fluoroforo viene presa una serie di *stacks*, solitamente 30, distanziati 0.27 μm l'uno dall'altro. L'esposizione per la EGFP è di circa 900 msec e per la mRFP di circa 910 msec. Le immagini in campo chiaro vengono prese con il Normanski.

Per l'acquisizione delle immagini è stato usato un microscopio *wide-field* Leica AD MIRE3 con un obiettivo Leica NA 1.4, ingrandimento 63X e zoom 1.5X. Il set di filtri utilizzato è FITC/Texas Red® della Chroma Technology. Il microscopio è equipaggiato con un sistema di filtri Normanski (DIC *filters*, *differential interference contrast*). La telecamera è Leica DC 500 (1300X1030 pixels) con sensore CCD.

Il *software* di acquisizione delle immagini è Leica FW4000.

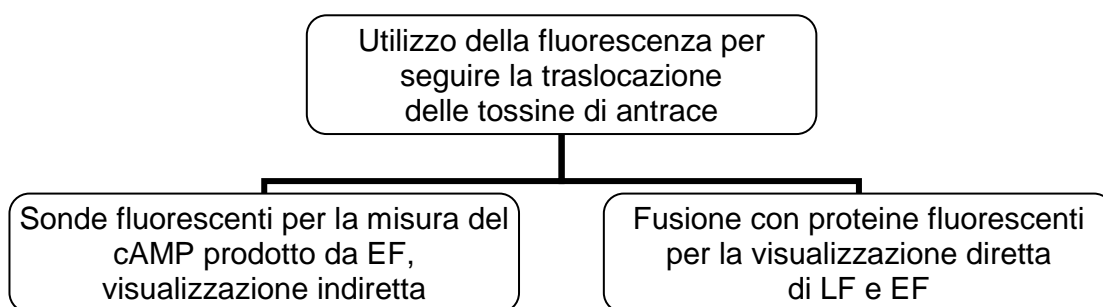
6.3. Elaborazione delle immagini e analisi dei dati

I *softwares* scelti per l'elaborazione delle immagini di FRET sono il programma di elaborazione dei dati *vimaging*, creato dal dott. Catalin Ciubotaru, utilizzato all'interno del software MATLAB™ (The MathWorks, Natick, MA), e ImageJ v1.35 (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Dopo aver sottratto il background ad ogni immagine, viene calcolato il rapporto CFP/YFP. Le immagini raziometriche vengono presentate in pseudocolori secondo una scala creata appositamente. La misura di tipo raziometrico corregge per l'eventuale distribuzione disomogenea delle sonde e per i cambiamenti di piano focale. I valori numerici sono plottati con Origin 7.5 e viene applicato lo *smoothing* secondo il metodo *Adjacent Averaging*.

Le immagini ottenute con il microscopio Leica sono deconvolute con i programmi Leica Deblur e rielaborate con WCIF ImageJ. Gli *stacks* vengono deconvoluti singolarmente con il metodo 3D con 10 iterazioni e una correzione della PSF (*point spread function*) adattata ai parametri di acquisizione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono state seguiti due approcci sperimentali per indagare la traslocazione delle tossine di antrace (schema 1). Con la prima è stato monitorato direttamente il percorso intracellulare di Ltx mediante la fusione di LF a proteine fluorescenti. Con la seconda è stato misurato il prodotto dell'attività enzimatica di EF mediante l'utilizzo di sonde fluorescenti per il cAMP. In entrambi i casi, i dati di *imaging* sono stati supportati da esperimenti biochimici.



Schema 1. I due diversi sistemi utilizzati per seguire il percorso intracellulare delle tossine di antrace.

1. Clonaggi e purificazioni

1.1 Clonaggio, espressione e purificazione di tossine fluorescenti

Scelta delle proteine fluorescenti

Sono stati scelti due tipi di proteine fluorescenti da legare alle tossine. EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) è una variante della GFP *wild-type* (Llopis et al., 1998), caratterizzata da una maggiore resa di fluorescenza e dalla sensibilità al pH. La fluorescenza diminuisce al diminuire del pH, perciò EGFP è un *reporter* del pH del compartimento intracellulare in cui si trova. La sua risposta all'acidità dell'ambiente permette non solo di individuare la posizione di LF nella cellula, ma anche di caratterizzare l'organello in cui si trova. Il pKa=6.1 (figura 1) la rende adatta a seguire il percorso endocitico, dove l'ambiente varia dal pH 6.5-6.0 degli endosomi precoci al pH 5.5-5.2 degli endosomi tardivi. Il progetto che si vuole realizzare è rappresentato nello schema 2.

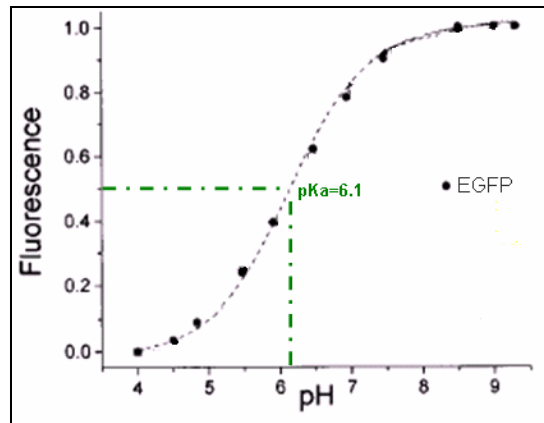
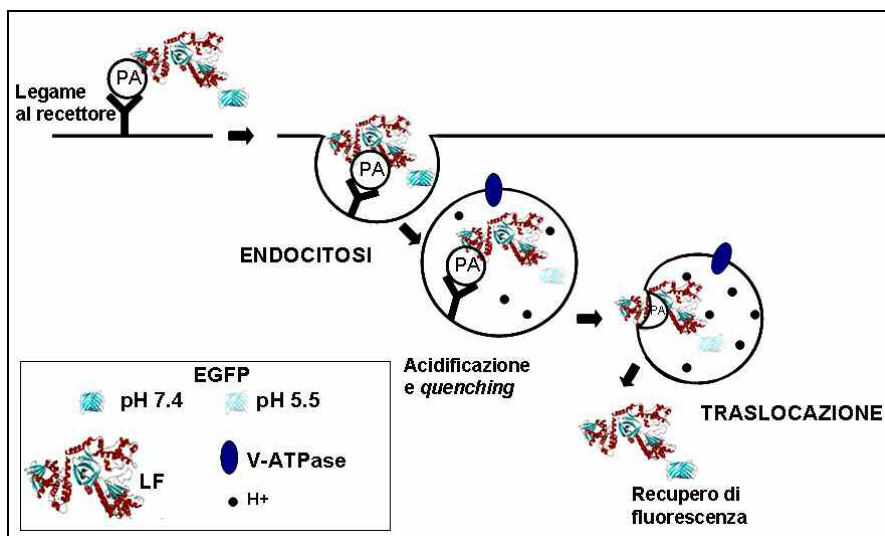


Figura 1. Curva di titolazione della fluorescenza di EGFP in relazione al pH della soluzione. Modificato da (Llopis et al., 1998).



Schema 2. Modello dell'esperimento con tossine fluorescenti sensibili al pH. La figura è una proposta estremamente semplificata del meccanismo reale, e non mantiene le proporzioni né rappresenta l'*unfolding* di LF nel passaggio attraverso il poro.

Un altro tipo di proteina fluorescente è mRFP (*monomeric red fluorescent protein*) (Shaner et al., 2004), una variante monomerica delle prime versioni di *Red Fluorescent Protein*. mRFP non è sensibile al pH e perciò è visibile durante tutto il percorso di endocitosi. La fusione con proteine di diverso colore come EGFP e mRFP permette di seguire contemporaneamente il percorso di due tossine distinte. Inoltre, l'insensibilità di mRFP al pH è una specie di "controllo positivo" interno agli endosomi; quegli organelli costantemente positivi alla fluorescenza nel rosso, ma che diventano negativi nel verde, dimostrano la progressiva acidificazione dell'ambiente, senza che venga perso il tracciato del percorso intracellulare delle tossine.

Costruzione delle proteine di fusione

In tutti i costrutti si è scelto di fondere la proteina fluorescente al C-terminale della tossina per non interferire con il legame al PA che coinvolge l'N-terminale. La presenza dell'His-tag all'N-terminale della tossina, invece, non interferisce con il *binding*.

Tutti i clonaggi sono stati fatti inserendo alle estremità delle proteine di antrace i siti di restrizione BamHI e SacI e delle proteine fluorescenti i siti SacI e EcoRI. Il vettore scelto è pRSETa (Invitrogen), che ha permesso di inserire prima il frammento di una proteina e poi, con semplici reazioni di digestione e ligazione, di giocare con le diverse proteine di fusione. In questo modo si è ottenuto un comodo *tool* per la creazione di chimere dotate di His-tag all'N-terminale (figura 2).



Figura 2. Organizzazione del plasmide pRSETa contenente i frammenti per il clonaggio di chimere di LF/EF fuse con varianti delle GFP.

LF e il mutante inattivo LF_{E735A}, prodotto nel nostro laboratorio, sono state fuse a EGFP; per gli esperimenti di *imaging* è stato usato il mutante inattivo, LF_{E735A}, per evitare gli effetti dell'intossicazione che si potrebbero verificare durante l'osservazione al microscopio. EF è stata fusa a mRFP e tra le due è stato inserito un *linker* che ne ha migliorato la produzione. Sono stati clonati anche i domini N-terminali delle proteine di EF e LF, che sono sufficienti per la traslocazione, ma non sono ancora stati utilizzati.

I costrutti di LF sono stati espressi nelle cellule BL21(DE3) e quello di EF nelle BL21(DE3) CP RIL e indotti con IPTG 1 mM per 3-4 ore a 30°C. Si è raggiunto un buon livello di espressione per le chimere di LF, mentre EF-mRFP si esprime a bassi livelli.

La purificazione mediante cromatografia di affinità con il metallo Cu⁺⁺ è stata sufficiente per i costrutti di LF, mentre per EF-mRFP è stato fatto un ulteriore passaggio di cromatografia a scambio ionico. La resa di quest'ultima è molto bassa (tabella 1).

Il grado di purezza delle proteine fluorescenti è importante ma, entro certi limiti, non pregiudica il loro utilizzo negli esperimenti di *imaging* perché il legame al PA costituisce di per sé una selezione di proteine specifiche. Inoltre, le

eventuali impurezze non sono fluorescenti e perciò non alterano la qualità dell'immagine.

1.2. Clonaggio, espressione e purificazione di EF

EF è stato clonato in pRSETa tra i siti di clonaggio BamHI e SacI ed espresso in BL21(DE3) CP RIL, un ceppo di *E. Coli* che codifica per codoni rari. Rispetto alle BL21(DE3) la quantità di proteina espressa non aumenta, ma a parità di espressione si è preferito un ceppo ideale per le sequenze ricche di A e T.

Il problema principale incontrato nella produzione di EF è la scarsa quantità di proteina ottenuta (figura 3A). D'altro canto, la solubilità della proteina ne ha facilitato la purificazione. Infatti, dopo la cromatografia di affinità, la dialisi in un tampone a bassa forza ionica (Tris 50 mM, NaCl 20 mM, Na₂EDTA 1 mM pH 7.7, tabella 1) fa precipitare gran parte delle proteine contaminanti, lasciando EF in soluzione (figura non riportata). In questo modo la cromatografia di scambio ionico rivela il picco di EF nettamente predominante e facile da isolare (figura 3G). L'utilizzo di EF in *test* di intossicazione richiede una bassa concentrazione di proteina, nell'ordine del nano molare, perciò la scarsa resa non è stato un fattore limitante.

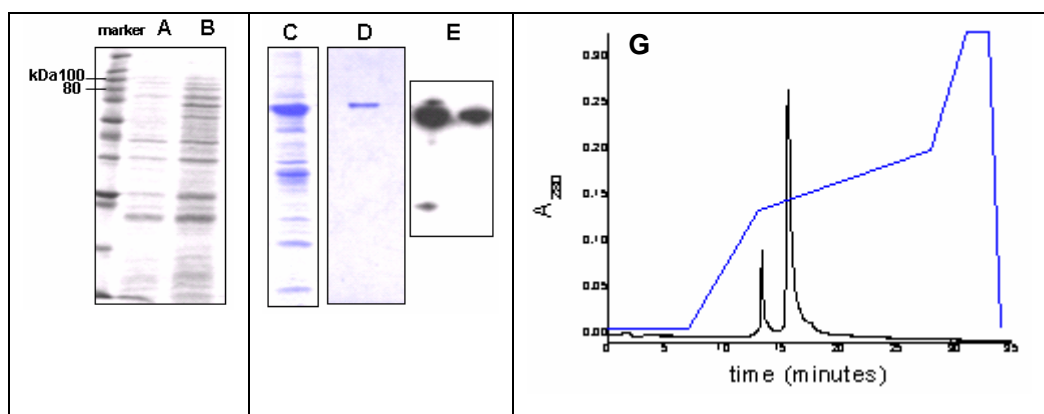


Figura 3. A) espressione di EF prima dell'induzione; B) Espressione di EF indotta con IPTG 1 mM; C) EF dopo cromatografia di affinità; D) eluizione di EF dalla cromatografia di scambio ionico; E) *Western blot* con anticorpo anti His-tag, frazione dopo cromatografia di affinità (C); F) frazione dopo cromatografia a scambio ionico (D); G) cromatografia di affinità e gradiente contro NaCl 1M di EF raccolto dalla cromatografia di affinità.

	EF	EF-mRFP	LF-EGFP	LF _{EA} -EGFP
Caratteristiche chimico-fisiche	PM 88'822 Da pI 6.91 ϵ 77'660 M ⁻¹ cm ⁻¹	PM 120'399 Da pI 5.78 ϵ 111'370M ⁻¹ cm ⁻¹	PM 116'762 Da pI 5.62 ϵ 101'665 M ⁻¹ cm ⁻¹	PM 116'704 Da pI 5.65 ϵ 101'665 M ⁻¹ cm ⁻¹
Cromatografia di affinità	Eluizione frazioni 70-90% imidazolo	Eluizione frazioni 55-100% imidazolo	Eluizione frazioni 80-100% imidazolo	Eluizione frazioni 80-100% imidazolo
Dialisi	Tris 50 mM, NaCl 20 mM, Na ₂ EDTA 1 mM pH 8.6	Tris 50 mM, NaCl 20 mM, Na ₂ EDTA 1 mM pH 8	Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5	Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5
Cromatografia di scambio ionico	Eluizione frazione 450 mM NaCl	Eluizione frazione 350 mM NaCl	–	–
Dialisi	Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5	Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5	–	–
Resa da 1 l di coltura	2 mg	0.34 mg	4 mg	6 mg

Tabella 1. Riassunto delle procedure di purificazione adottate.

2. Attività delle proteine ricombinanti in colture cellulari

2.1. Attività e cinetiche di LF-EGFP e EF-mRFP

E' stata valutata l'attività biologica di LF-EGFP e EF-mRFP in colture cellulari, per garantire la capacità della chimera di legare PA, procedere nel percorso di endocitosi e traslocare nel citoplasma fino a raggiungere il *target*.

LF è una proteina di 90 kDa, ma ha una struttura flessibile e che si destruttura facilmente. Questa sua caratteristica probabilmente le permette di passare attraverso lo stretto poro formato da (PA₆₃)₇, che nel punto più stretto misura circa 12 Å. EGFP è una proteina di 26 kDa dotata di una struttura compatta di forma cilindrica, molto resistente all'*unfolding*. Si stima che il diametro del cilindro possa essere di circa 30 Å. Quando le due proteine sono fuse insieme, LF deve portare con sé attraverso il poro del PA una proteina con una struttura rigida, le cui dimensioni forse sono difficilmente compatibili con il meccanismo di traslocazione. Per verificare che la chimera sia ancora in grado

di essere endocitata e di raggiungere i suoi *target* nel citosol, è stata saggiata la sua capacità di tagliare un suo substrato, MEK3 (figura 4B), e di uccidere i macrofagi (figura 4A). I risultati sono positivi, ma si rileva una diminuzione e un ritardo dell'azione di LF-EGFP, probabilmente dovuto alla maggiore difficoltà di traslocazione.

Anche EF-mRFP ha un'attività ciclasica diminuita rispetto ad EF_{wt} (figura 4C).

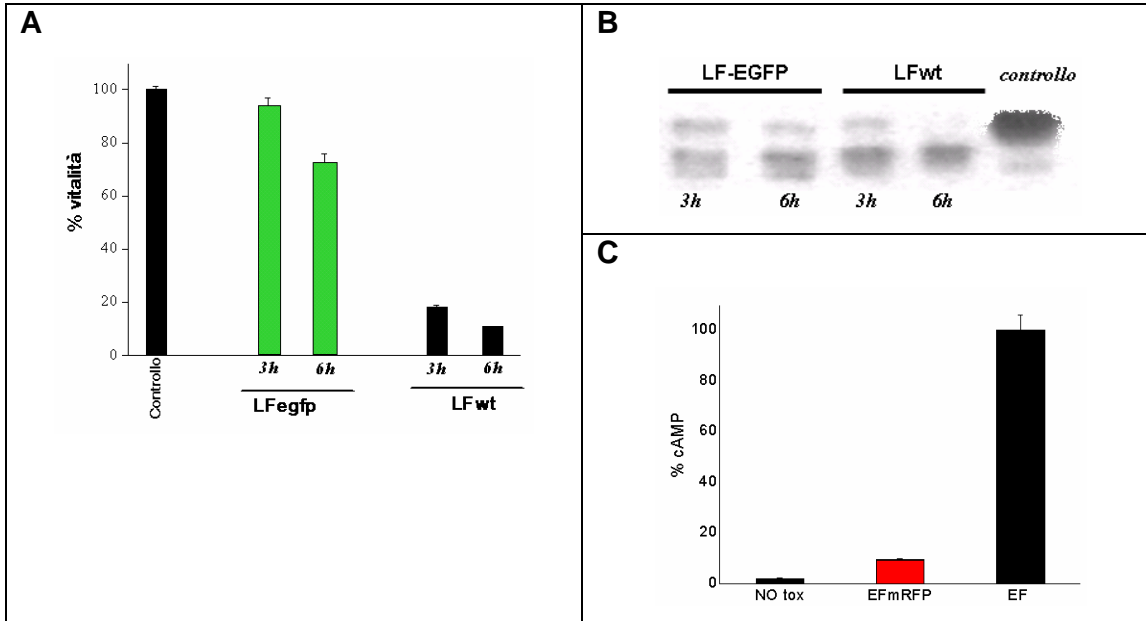


Figura 4. A) Vitalità dei macrofagi Raw264.7 dopo l'intossicazione con LF-EGFP o LF 2 nM e PA 4 nM; B) Cinetica di taglio di MEK3 nelle stesse cellule con LF-EGFP o LF 10 nM e PA 20 nM; C) cAMP espresso in % sul valore delle 2 ore di incubazione con ETx; barra nera EF+PA, barra rossa EF-mRFP+PA (10 nM e 20 nM).

E' stata fatta anche una cinetica di taglio di MEK3 da parte di LF-EGFP in presenza di Bafilomicina A1, un inibitore potente e selettivo della pompa protonica vacuolare (V-H⁺-ATPasi), che impedisce l'acidificazione degli endosomi. Se viene aggiunta prima che la tossina sia traslocata, previene l'inserimento in membrana del PA e la traslocazione di LF, dato che la traslocazione è strettamente pH-dipendente. L'efficacia della Bafilomicina, valutata in base al mancato taglio del substrato da parte di LF-EGFP, indica che la chimera sfrutta gli stessi compartimenti acidi e lo stesso meccanismo di traslocazione del *wild-type*. Si riscontra un ritardo dalla risultante curva di traslocazione, che per il *wild-type* avviene fra i 30 e i 45 minuti, mentre per la chimera richiede fino a 90 minuti dall'intossicazione (figura 5). Una simile diminuzione e rallentamento dell'attività in seguito al legame di una tossina con

una GFP è già stato riportato in letteratura per la tossina botulinica (Bade et al., 2004).

Al contrario, la cinetica di taglio *in vitro* non presenta differenze sostanziali tra LF e LF-EGFP (figura 6) e avvalorata l'ipotesi che la traslocazione, non il taglio del substrato, sia lo *step* responsabile del ritardo di azione della chimera.

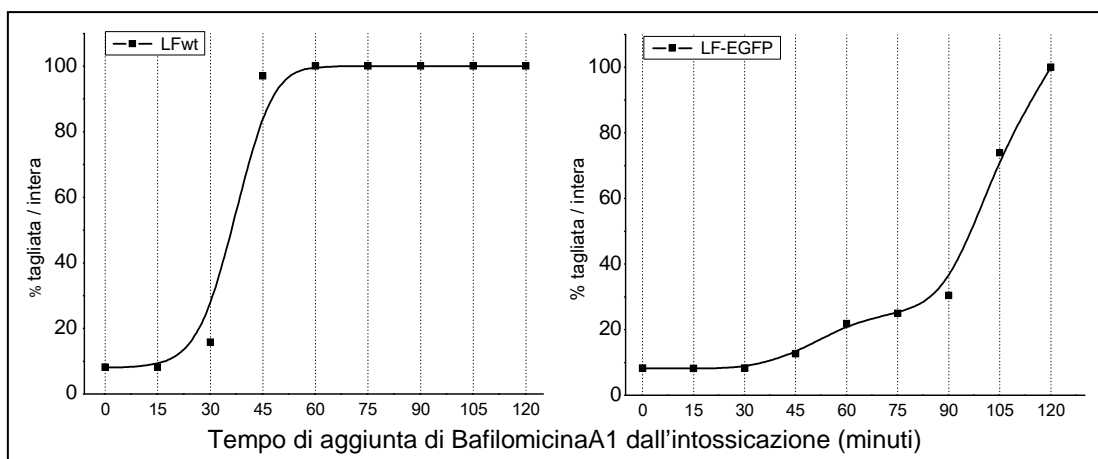


Figura 5. Cinetiche di traslocazione ottenute con l'inibizione della pompa protonica da parte di Bafilomicina A1. Le cellule Raw264.7 sono state intossicate con LF-EGFP o LF 10 nM e PA 20 nM e a tempi diversi è stato aggiunto l'inibitore. Dopo 2 ore è stato misurato il taglio di MEK3 con *Western blot* e le bande sono state quantificate con imageJ.

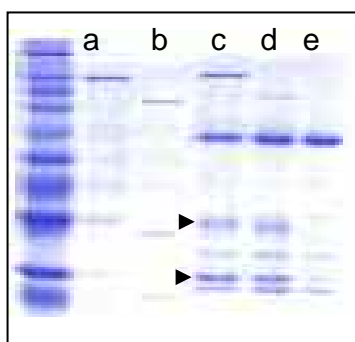


Figura 6. Cinetica di taglio *in vitro* di LF e LF-EGFP 0.4 mM sul substrato GST-MEK6 4 mM (clonata e purificata nel nostro laboratorio) a 37°C per 5 minuti. a) LF-EGFP; b) LFwt; c) LF-EGFP+GST-MEK6; d) LFwt+GST-MEK6; e) GST-MEK6.

2.2. Misurazione del cAMP prodotto da ETx

Edema Factor è un'adenilato ciclasi che con il PA forma la tossina edematosa. Finora questa tossina è stata lasciata in secondo piano rispetto alla letale, ma recentemente sta acquistando sempre più importanza. Per quanto riguarda il suo meccanismo di traslocazione nel citosol, si ritiene che sia simile a quello della tossina letale, anche se non sono disponibili dati sperimentali a tal riguardo. Per quanto riguarda le conseguenze della sua attività enzimatica, essa provoca una marcata alterazione dei percorsi di *signalling* intracellulare e di equilibri ionici come conseguenza dell'aumento del cAMP.

Nella citosol delle cellule eucariotiche EF si lega alla Calmodulina, il cui legame è indispensabile per l'attività ciclasica, ma trova anche le fosfodiesterasi che sono in grado di degradare il cAMP. Dal bilancio tra produzione e degradazione del prodotto ha origine un aumento di cAMP che raggiunge livelli molto diversi a seconda della cellula coinvolta. Questo probabilmente dipende dal set di isoforme coinvolte nel *signalling* del cAMP che sono presenti in una particolare cellula. Le differenze di risposta alla tossina possono diventare importanti nel determinare il ruolo di un tipo di cellula nella patologia. Sono state prese come modello le cellule Jurkat, una linea di linfociti T umani, le HeLa, una linea di cellule epiteliali umane, e le RAW264.7, una linea di macrofagi murini. L'aumento più massiccio si verifica nelle Jurkat, mentre HeLa e Raw si fermano a valori inferiori (figura 7). E' significativo che il linfocita T, dotato del minore volume citoplasmatico rispetto alle altre cellule, sia il sistema che subisce un'alterazione maggiore. I livelli di cAMP sono stati misurati a tempi diversi, da 1 ora fino a 4 ore dall'intossicazione.

Inizio dell'attività di EF

Fino a 1 ora l'aumento di cAMP è basso, ma nell'arco di 2 ore sale bruscamente e raggiunge il suo massimo entro 2-3 ore. C'è un intervallo di tempo di almeno 30 minuti dopo l'intossicazione in cui l'attività della tossina non è rilevabile. Questa cinetica fa pensare al tempo necessario agli endosomi per maturare fino alla fase di endosomi tardivi (*late endosomes*) (Duclos et al., 2003). Un'evidenza a sostegno di questa ipotesi è data dal cosiddetto *bafilomycin shift assay* (descrizione § 5.1) (figura 7C). In questo caso si misurano i livelli di cAMP nelle cellule Jurkat, perché sono quelle che raggiungono livelli maggiori e perciò il rapporto segnale/rumore è più alto. La figura 7C mostra che a poco meno di un'ora dall'intossicazione EF riesce a produrre il 50% del cAMP rispetto al massimo. Questi tempi concordano con quanto riportato in letteratura riguardo al tempo necessario perché il carico endosomiale raggiunga i *late endosomes*. In parallelo, è stata saggiata la vitalità delle Jurkat e delle HeLa incubate per due ore con Bafilomicina A1 500 nM e 100 nM ed è risultata non inferiore al 90% delle cellule non trattate (risultato non riportato).

Tuttavia, il metodo biochimico finora utilizzato per misurare l'attività di ETx non permette di approfondire la dinamica dell'aumento di cAMP, né come si

organizzi nello spazio intracellulare, né cosa avvenga nell'ordine dei brevi tempi necessari a EF per la produzione di cAMP ($V_{max} = 20 \mu\text{mol/cAMP /s/mg}$ di proteina, (Kumar et al., 2002). Al contrario, l'utilizzo di tecniche di *imaging* permette di seguire nel dettaglio la dinamica intracellulare dell'azione di ETx in tempi nell'ordine dei secondi.

Fase finale dell'attività intracellulare di EF

Sorprendentemente, l'azione delle fosfodiesterasi non è efficiente nell'abbassare i livelli di cAMP, che fra le 2 e le 4 ore dall'intossicazione sono ancora in crescita (figura 7A e B). Dopo 24 ore il contenuto di cAMP delle cellule non è ancora sceso ai livelli basali (risultato non presentato). Questo fa pensare all'alterazione di circuiti del segnale che vengono coinvolti solo nell'intossicazione da EdTx e non per azione di altri agenti che elevano il cAMP, come ad esempio la forskolina.

Che cosa determina l'azione prolungata di ETx? Innanzitutto, è plausibile che fino a quattro ore la tossina sia presente nella cellula e in grado di esercitare la sua attività catalitica. Ma anche il sito di traslocazione di EF nel citosol può avere un'importanza nel fornire alla tossina una localizzazione vantaggiosa nella 'geografia' cellulare. Negli ultimi anni la compartimentalizzazione di proteine e complessi proteici coinvolti nel *signalling* ha dimostrato di essere importante per garantire la specificità delle fitte reti di segnali. Ad esempio, la compartimentalizzazione della PKA nei cardiomiociti genera segnali ben delimitati nello spazio e nel tempo in risposta al legame di cAMP (Mongillo et al., 2005). Si pensa che anche le MEKs siano organizzate su proteine *scaffolds* con una particolare localizzazione intracellulare. Esperimenti di *imaging* ci hanno permesso di mappare i siti della cellula in cui per prima inizia l'attività di EF.

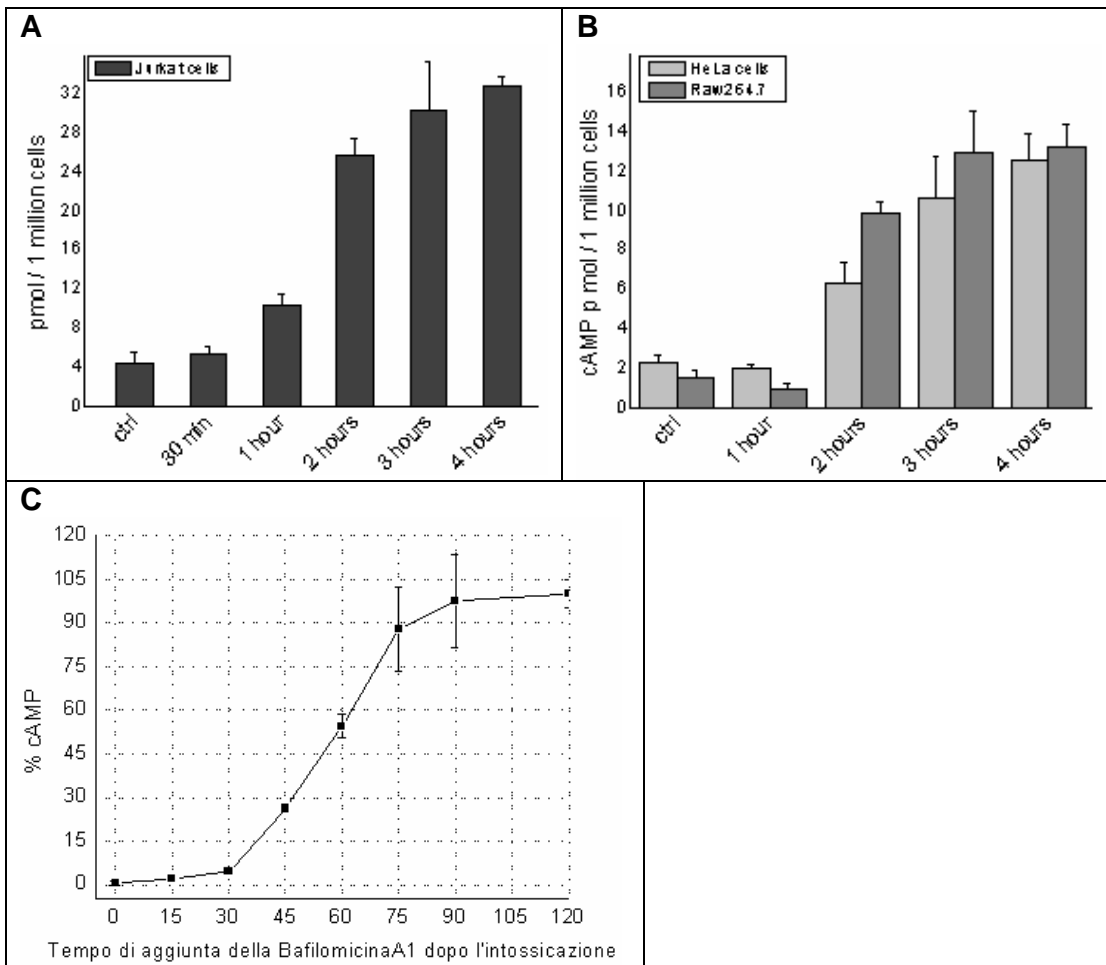


Figura 7. Cinetiche dell'aumento di cAMP in seguito all'intossicazione con ETx (EF 10 nM, PA 20 nM) in tre linee cellulari diverse: A, cellule Jurkat; B) cellule HeLa e Raw264.7; C) *Bafilomycin shift* in cellule Jurkat.

3. Live imaging

3.1. Microscopia basata sulla FRET

Si è scelto di seguire l'aumento di cAMP nelle cellule intossicate con ETx con l'utilizzo di sonde per il cAMP. La proteina chinasi A cAMP-dipendente (PKA) è un sensore del cAMP presente fisiologicamente in tutte le cellule eucariotiche. In seguito al legame di due molecole di cAMP a ciascuna delle due subunità regolatorie, queste si staccano dalle due subunità catalitiche. L'attività chinasi di PKA è fondamentale per la cellula e regola un'ampia gamma di processi. Il laboratorio della dott.ssa Manuela Zaccolo ci ha fornito i DNA di sonde costituite dalla subunità catalitica di PKA fusa con la proteina fluorescente EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) e dalla subunità regolatoria fusa con la ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*).

Gli spettri di assorbimento ed emissione di ECFP e di EYFP si sovrappongono nella regione di emissione della ciano e di assorbimento della gialla (figura 9a). La sovrapposizione si verifica quando le due molecole sono distanti tra loro non più di 10 Å. A questa distanza, l'eccitazione di ECFP a 430 nm produce un'emissione che viene assorbita dalla EYFP; se la distanza aumenta, l'emissione della ciano non riesce più ad eccitare la gialla. Questo fenomeno prende il nome di FRET (*Förster Energy Transfer* o *Fluorescence Energy Transfer*) e nel caso di PKA si verifica solo quando le subunità regolatoria e catalitica sono associate. In seguito all'aumento di cAMP, le subunità si dissociano e l'emissione di ECFP non viene più assorbita da EYFP, in altre parole diminuisce l'efficienza di FRET. La registrazione delle variazioni di intensità delle emissioni di CFP e YFP permette di monitorare le dinamiche dell'aumento di cAMP intracellulare in tempo reale. In realtà però c'è un *delay* temporale dovuto al legame cooperativo del cAMP e alla dissociazione delle subunità, un processo che non è istantaneo. La risposta della sonda non è quindi immediata, ma permette comunque la rilevazione di eventi che avvengono nell'ordine dei secondi.

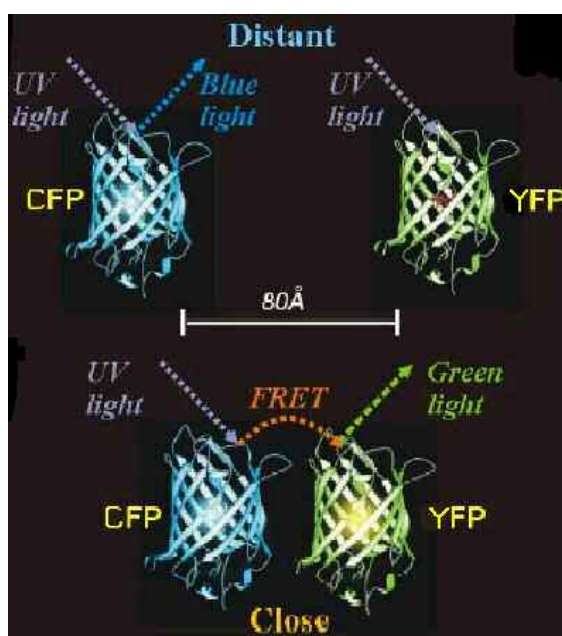


Figura 8. Fenomeno di FRET. La luce emessa dalla variante ciano della GFP (CFP) è assorbita dalla variante gialla (YFP) solo quando la distanza tra le due non supera un certo limite.

Scelta delle sonde

Sono stati usati due tipi di sonde basate sulla PKA. Per entrambe le sonde, la subunità regolatoria è una chimera tra due isoforme, la RI e la RII (Burns et al., 2003). L'isoforma RI ha una localizzazione citosolica ed è dotata

di una maggiore sensibilità di rivelazione del cAMP, ma in condizioni di sovraespressione tende a formare aggregati. La RII è prevalentemente ancorata alle proteine AKAPs (*A-Kinase Anchoring Protein*) ed ha una sensibilità minore, ma anche una minore tendenza a formare aggregati (Dodge-Kafka et al., 2005).

La prima variante della sonda ha le subunità regolatorie che esprimono la ECFP con un linker di 9 amminoacidi, che a sua volta lega una catena miristilica e una palmitoilica (figura 9C). Tale sonda verrà qui indicata come PKA^{mp}. Le due code lipofile determinano la localizzazione della sonda nei *rafts* lipidici e nelle *caveolae*, cioè in microdomini delle membrane cellulari caratterizzati da una particolare composizione lipidica (Zacharias et al., 2002). Le *caveolae* sono regioni specializzate della membrana plasmatica, dalle quali parte una via endocitica clatrina-indipendente. I *rafts* sono presenti non solo sulla membrana plasmatica, ma anche sulle membrane interne della cellula e sono coinvolti in processi di *signalling*.

La seconda sonda non contiene il *tag* idrofobico, è solubile nel citoplasma e verrà qui indicata come PKA^{cyt}. In condizioni di sovraespressione della PKA è probabile che una buona parte risulti libera dall'ancoraggio alle AKAPs.

La sonda di membrana PKA^{mp} e quella solubile PKA^{cyt} vengono usate con lo scopo di distinguere il sito primario di aumento di cAMP prodotto da EF. Nel caso della sonda di membrana la rilevazione è più rapida se gli aumenti di cAMP iniziano nelle immediate vicinanze della membrana plasmatica. Al contrario, la sonda solubile è presente uniformemente in tutta la cellula e registra un ritardo nella rilevazione degli eventi prossimi alla plasmamembrana. Solo disegnando delle aree interne alla cellula (ROIs, *regions of interest*) è possibile distinguere eventuali aumenti localizzati di cAMP che si verificano in particolari regioni del volume citoplasmatico.

Esiste un'altra sonda che rivela il cAMP mediante la FRET ed è basata su Epac (*Exchange Protein directly Activated by cAMP*), un effettore intracellulare per il ciclico AMP. Poiché è formata da un'unica catena peptidica che cambia conformazione al legame del cAMP, la risposta è più veloce e soprattutto è più rapida la cessazione della risposta. Tuttavia, per questo lavoro di tesi sono state utilizzate le sonda basate sulla PKA, che comunque nelle cellule HeLa sono risultate adatte allo scopo.

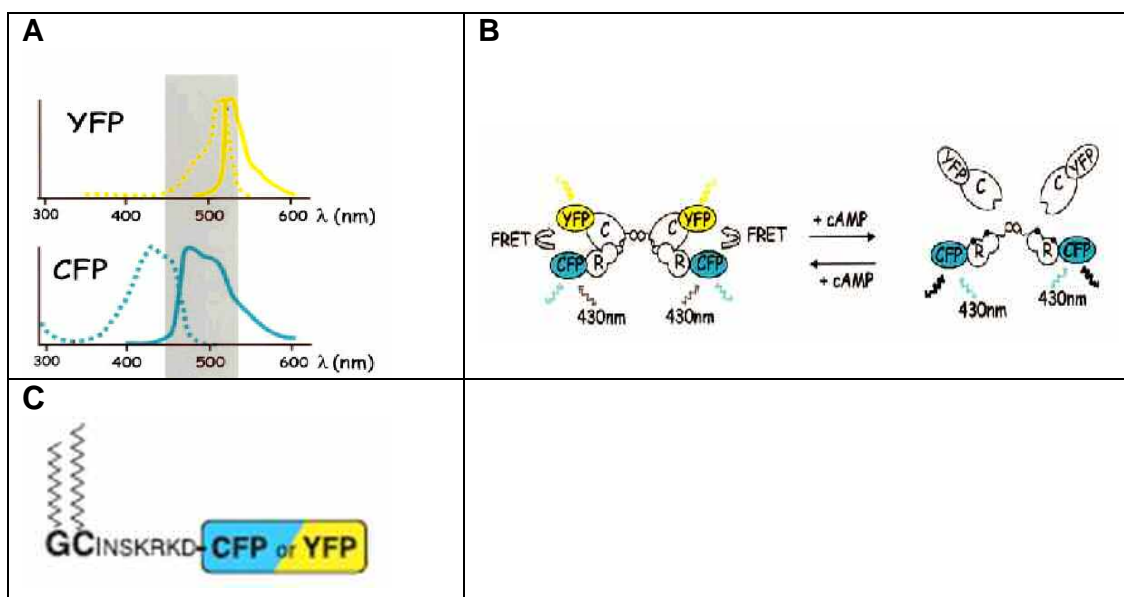


Figura 9. A) spettri di eccitazione (tratteggiato) e di emissione (linea continua) di YFP e CFP; B) meccanismo di funzionamento della sonda PKA: in presenza di cAMP le subunità catalitiche e regolatorie si dissociano e diminuisce l'efficienza di FRET (figure tratte da (Zaccolo, 2004)); C) Derivatizzazione di una GFP con due catene alchiliche che la localizzano sui *rafts* lipidici (Zacharias et al., 2002). Lo stesso *linker* con le catene idrofobiche è stato fuso alla sonda PKA utilizzata.

Scelta delle cellule

Sono state scelte le cellule Jurkat, una linea cellulare di linfoma T umano. Le tossine dell'antrace hanno un'azione immunosoppressiva agendo sia sulle cellule della risposta innata che sulle cellule dendritiche e sui linfociti T. Quindi le Jurkat sono il modello di una cellula del sistema immunitario gravemente colpita nell'infezione di antrace.

Per co-trasfettare transientemente è stato usato il metodo dell'elettroporazione in presenza di 20 μg di ciascun plasmide. La bassa efficienza di trasfezione, circa il 10%, è complicata dal fatto che queste cellule vengono fatte aderire su vetrini ricoperti di fibronectina e l'adesione non è totale. Quindi al basso numero di cellule trasfettate va anche tolta quella percentuale di cellule che non riesce ad aderire al substrato. Inoltre, le Jurkat hanno un nucleo che occupa la gran parte del loro volume cellulare, mentre il citoplasma è poco abbondante: questo rende difficile distinguere l'una dall'altra le cinetiche delle sonde e si è cercato un altro tipo di cellula umana in cui studiare l'eventuale localizzazione spaziale dell'incremento di cAMP.

Sono state scelte le cellule epiteliali HeLa, una linea tumorale della cervice umana, perché la loro dimensione e l'abbondanza di citoplasma le

rende adatte a studi di *imaging* e localizzazione cellulare. Inoltre, cellule epiteliali sono presenti nel sito primario di infezione nei casi di antrace cutaneo. Un limite nell'utilizzo delle HeLa è che l'aumento di cAMP non raggiunge gli alti livelli che si misurano nelle Jurkat. Spesso è indispensabile scegliere piccole aree della cellula per osservare un aumento che risulta molto attenuato nell'area totale del citoplasma. D'altro canto, le HeLa si prestano bene alla mappatura delle zone in cui il cAMP aumenta per effetto di EF.

3.2. Dinamiche dell'aumento di cAMP indotto da ETx nei linfociti T

Le cellule Jurkat mostrano un aumento di cAMP variabile da cellula a cellula per quantità e in una certa misura anche per andamento. Questo indica che per la risposta alle tossine sono importanti il tipo cellulare con le sue isoforme enzimatiche, la fase del ciclo in cui si trova la cellula e le sue condizioni generali. In media, l'aumento inizia almeno dopo 30 minuti dall'intossicazione, in accordo con i dati biochimici (§ 2.2). Sembra che la sonda di membrana registri un ritardo nell'aumento, ma i linfociti T non sono un buon modello per fare un confronto tra sonde, perché il citoplasma è troppo scarso e la differenza di tempi è probabilmente troppo piccola per essere rilevata.

In figura 10 sono riportati i tracciati di due cellule trasfettate con la sonda PKA^{cyt}. La figura 10A riporta i tracciati delle due proteine fluorescenti presi singolarmente, dove la traccia azzurra è l'emissione di ECFP e la gialla di EYFP. La quantità di cAMP viene misurata come l'aumento dell'emissione della ECFP rispetto all'emissione della EYFP (R CFP/YFP) (§3.1) ed è rappresentata dalla traccia rossa. La figura 11 rappresenta i tracciati di due diverse cellule Jurkat trasfettate con la sonda PKA^{mp}. Si può notare chiaramente la localizzazione in membrana della sonda, la sua concentrazione nei microdomini detti *rafts* lipidici e in generale la scarsità di citoplasma rispetto al volume nucleare. Come già osservato con metodi biochimici, l'aumento del secondo messaggero è massiccio, soprattutto se lo si rapporta al piccolo volume in cui è contenuto.

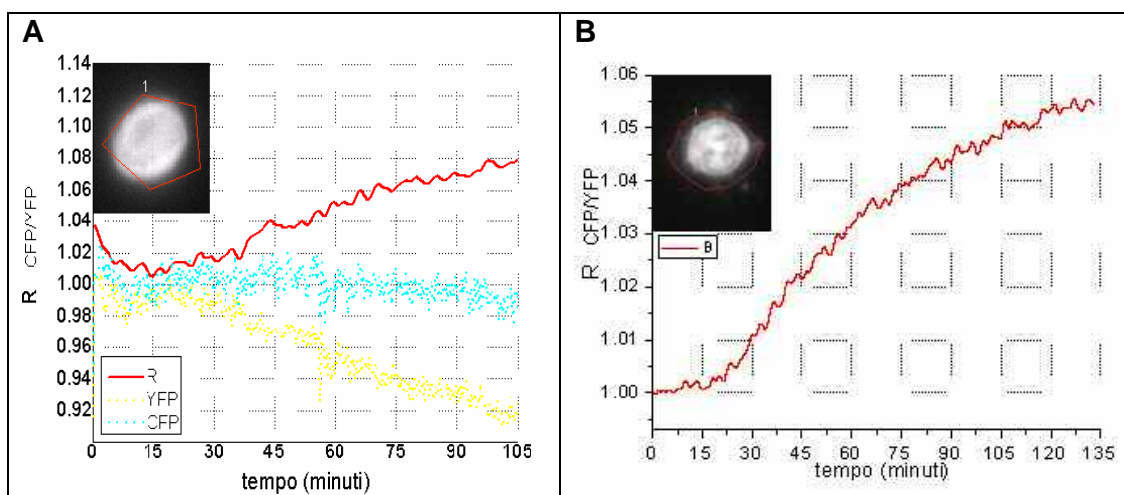


Figura 10. Cellule Jurkat trasfettate con la sonda PKA^{cyt} , ingrandimento 100X; A) la traccia rossa rappresenta il rapporto tra l'emissione della ECFP (celeste) e della EYFP (giallo) in seguito all'intossicazione con EF 10 nM e PA 20 nM al tempo zero; B) un'altra Jurkat trasfettata e intossicata allo stesso modo.

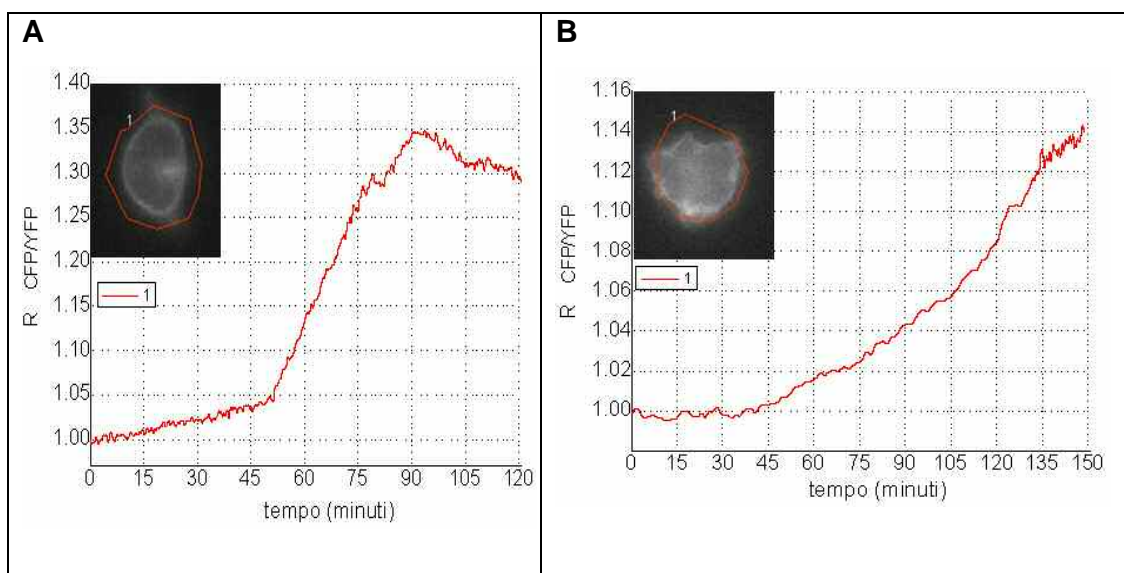


Figura 11. Cellule Jurkat trasfettate con la sonda PKA^{mp} di membrana e intossicate con ETx al tempo zero.

3.3. Distribuzione dell'aumento di cAMP indotto da ETx

La forma e le dimensioni delle cellule HeLa, unite alla loro facilità di trasfezione, le rendono adatte a studi di *imaging* e localizzazione. In figura 12A si vede una cellula HeLa trasfettata transientemente con la sonda PKA^{cyt} solubile nel citoplasma.

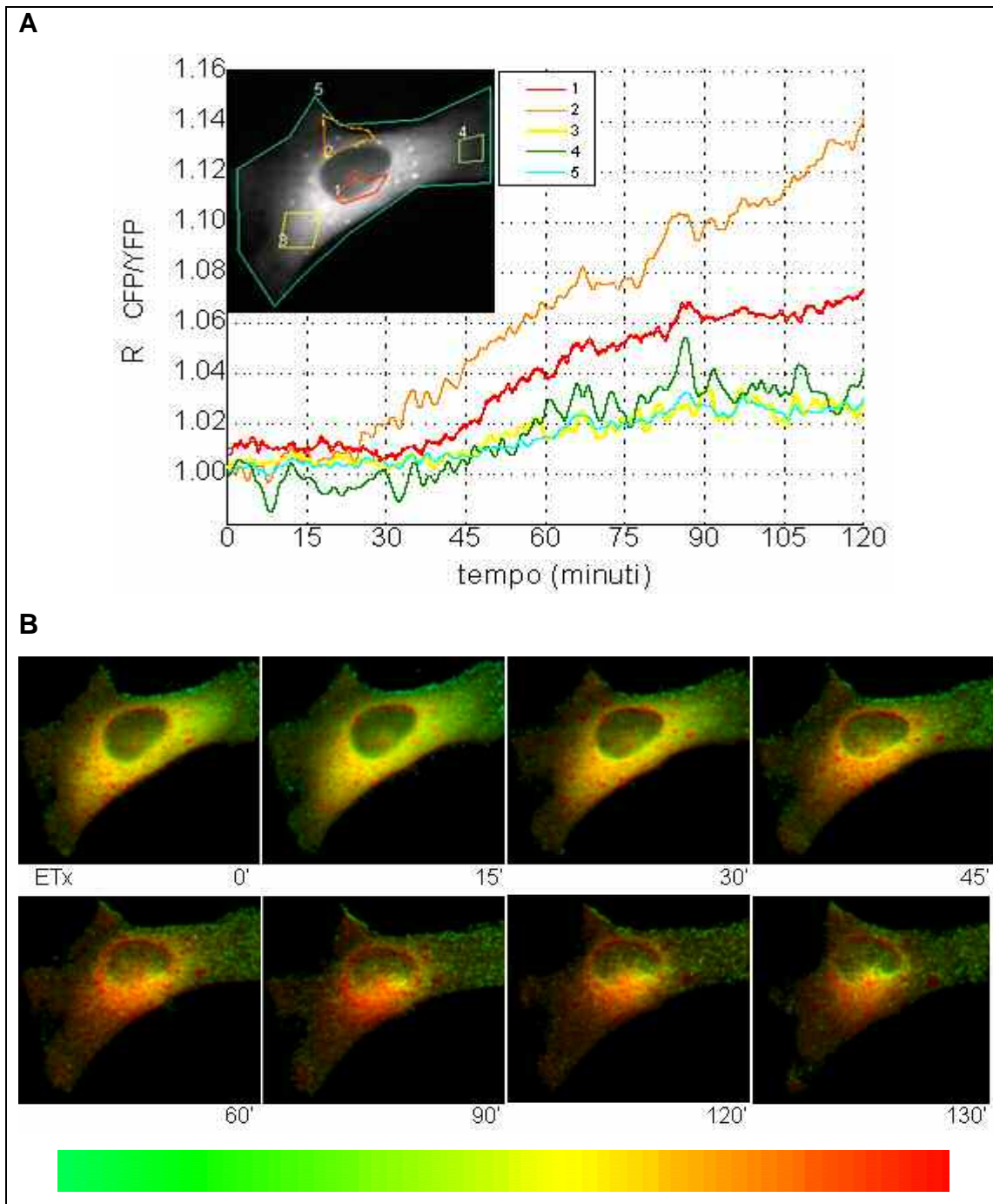


Figura 12. Cellula HeLa trasfettata con PKA^{cyt} e intossicata con ETx; A) ad ogni colore del tracciato corrisponde un'area nell'immagine, indicata con lo stesso colore; B) *frames* estratti dal filmato in pseudocolori.

Al suo interno (figura 12A) sono state tracciate diverse aree e per ognuna è stato tracciato il rapporto CFP/YFP nel tempo. Aree interne ma lontane dal nucleo, come la 3 e la 4, vedono l'aumento in ritardo rispetto alle aree perinucleari 1 e 2. Nella figura 12B sono riportati alcuni *frames* del filmato in pseudocolori ricavato dall'esperimento di figura 12A. Il colore rosso corrisponde

ad un elevato valore del rapporto CFP/YFP, mentre le gradazioni dal giallo al verde rappresentano valori via via decrescenti del prodotto di EF. Si può apprezzare come l'aumento sia concentrato nella zona centrale della cellula, intorno al nucleo, mentre le zone periferiche risultino 'spente'. La figura 13 mostra un'altra cellula HeLa che sovraesprime la sonda PKA^{cyt}. Si può notare in particolare la differenza tra le aree 4 (in verde) e 5 (in celeste): sono molto vicine, ma il loro tracciato rivela una marcata differenza tra l'aumento di cAMP nella zona 4 ai confini con il nucleo e l'andamento costante nella zona 5, che comprende la membrana plasmatica.

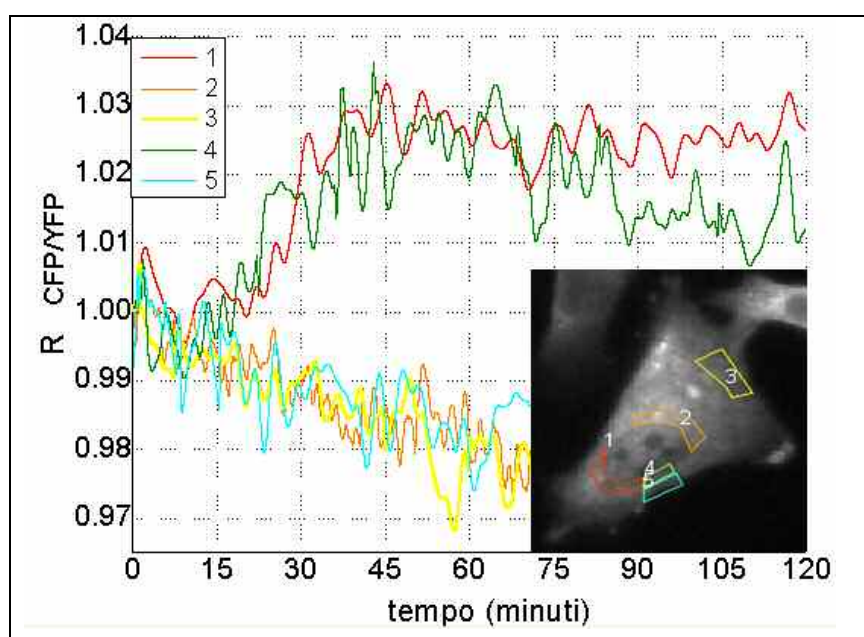


Figura 13. Un'altra cellula HeLa trasfettata con la sonda PKA^{cyt} e intossicata con ETx.

Le immagini ottenute con la sonda di membrana PKA^{mp} sono più difficili da analizzare perché la sonda si inserisce anche in membrane interne e molto spesso non è possibile distinguere le diverse zone intracellulari a causa dell'interferenza tra i vari piani focali della cellula. Infatti il microscopio utilizzato per le acquisizioni è un *wide field*. In figura 14 troviamo due situazioni diverse: in 14A si può distinguere il nucleo e tracciare delle aree sul suo contorno e lontano da esso; in 14B non è possibile fare questa distinzione, cosa molto frequente tra le cellule che esprimono la sonda di membrana. Tuttavia, i poli opposti della cellula in figura 14B hanno un comportamento nettamente diverso, e questo combacia con la localizzazione trovata finora nelle HeLa.

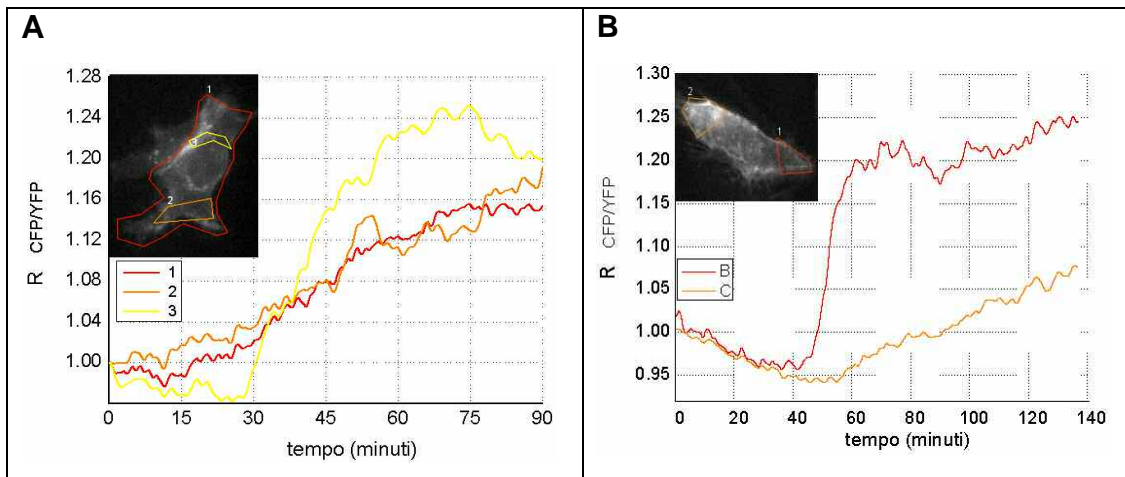


Figura 14. HeLa trasfettate con PKA^{mp} e intossicate con EtX. Nella cellula in A si può distinguere il nucleo e disegnare delle aree precise, mentre nella cellula in B la fluorescenza delle membrane interne interferisce e non si possono individuare i compartimenti intracellulari, come accade nella maggior parte delle cellule trasfettate con questa sonda.

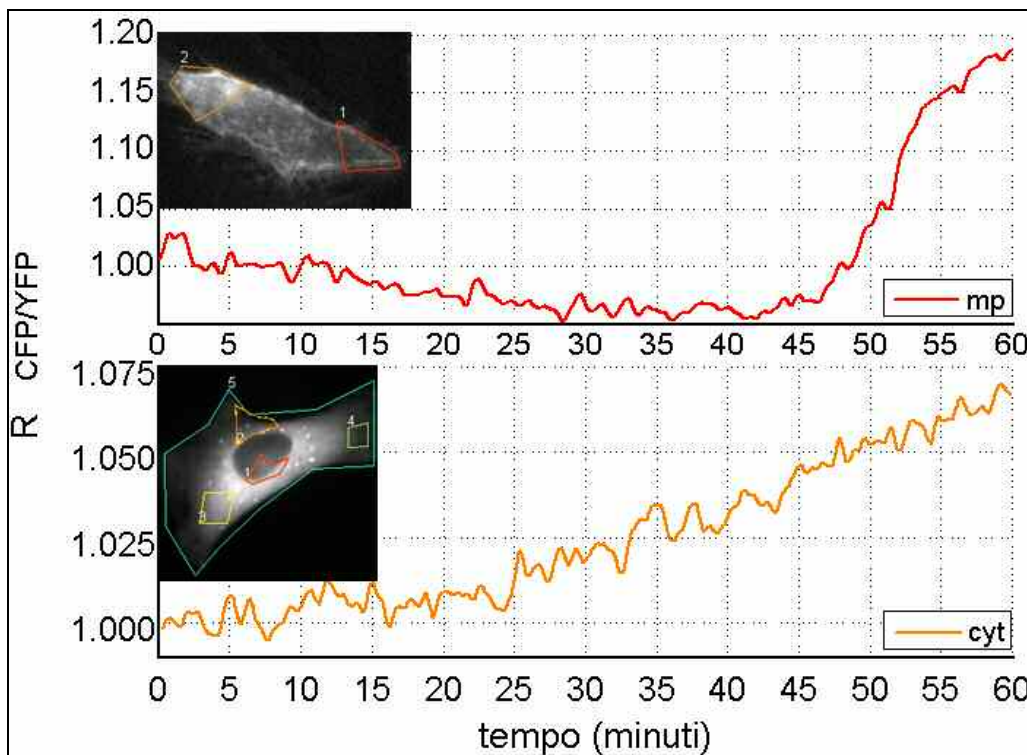


Figura 15. Confronto tra la dinamica dell'aumento misurato con la sonda di membrana (sopra) e con quella citosolica (sotto).

La figura 15 presenta nuovamente due cellule già mostrate per mettere in evidenza il confronto nei primi 60 minuti di intossicazione. La sonda di membrana comincia a registrare un aumento ritardato rispetto alla sonda citosolica. Questo fa pensare che l'aumento di cAMP inizi dalle regioni perinucleari e quindi che EF esca dal compartimento endocitico proprio in

quelle regioni. Gli organelli della via di endocitosi che dalla membrana plasmatica si portano fino alla zona intorno al nucleo sono gli endosomi tardivi. E' molto probabile che questi compartimenti siano il sito da cui EF trasloca nel citosol. I fatti a sostegno di questa ipotesi sono non solo la compatibilità tra i tempi di maturazione degli organelli e l'inizio dell'attività di EF, ma anche la coincidenza fisica dei siti dove si concentrano l'aumento iniziale di cAMP e i *late endosomes*.

Confronto con un'altra adenilato ciclasti batterica

Per convalidare la capacità della sonda PKA^{cyt} di distinguere tra aumenti di cAMP localizzati in zone differenti della cellula, è stata usata la tossina CyaA. Si tratta di un'adenilato ciclasti prodotta da *Bordetella pertussis* che, come EF, necessita del legame alla CaM per attivarsi (Ladant and Ullmann, 1999). Al contrario di ETx, CyaA contiene sia il dominio responsabile dell'inserimento in membrana, sia il dominio catalitico. La traslocazione avviene attraverso la plasmamembrana, in prossimità della quale si verifica un immediato aumento di cAMP.

E' stato seguito lo stesso protocollo usato con ETx per monitorare la FRET dopo l'intossicazione e anche in questo caso sono state misurate diverse aree interne alla cellula, sia al centro che alla periferia, e sulla membrana. L'aumento di cAMP è molto più rapido, raggiunge il massimo dopo 3-5 minuti dall'intossicazione e ha una localizzazione esattamente invertita rispetto a ETx. Le regioni che per prime vedono l'attività di CyaA sono quelle appena sotto la membrana plasmatica, poi il prodotto diffonde e raggiunge le zone centrali della cellula.

Questo confronto dà validità alla tecnica dell'*imaging* mediante FRET come metodo per seguire e misurare finemente rapidi eventi intracellulari.

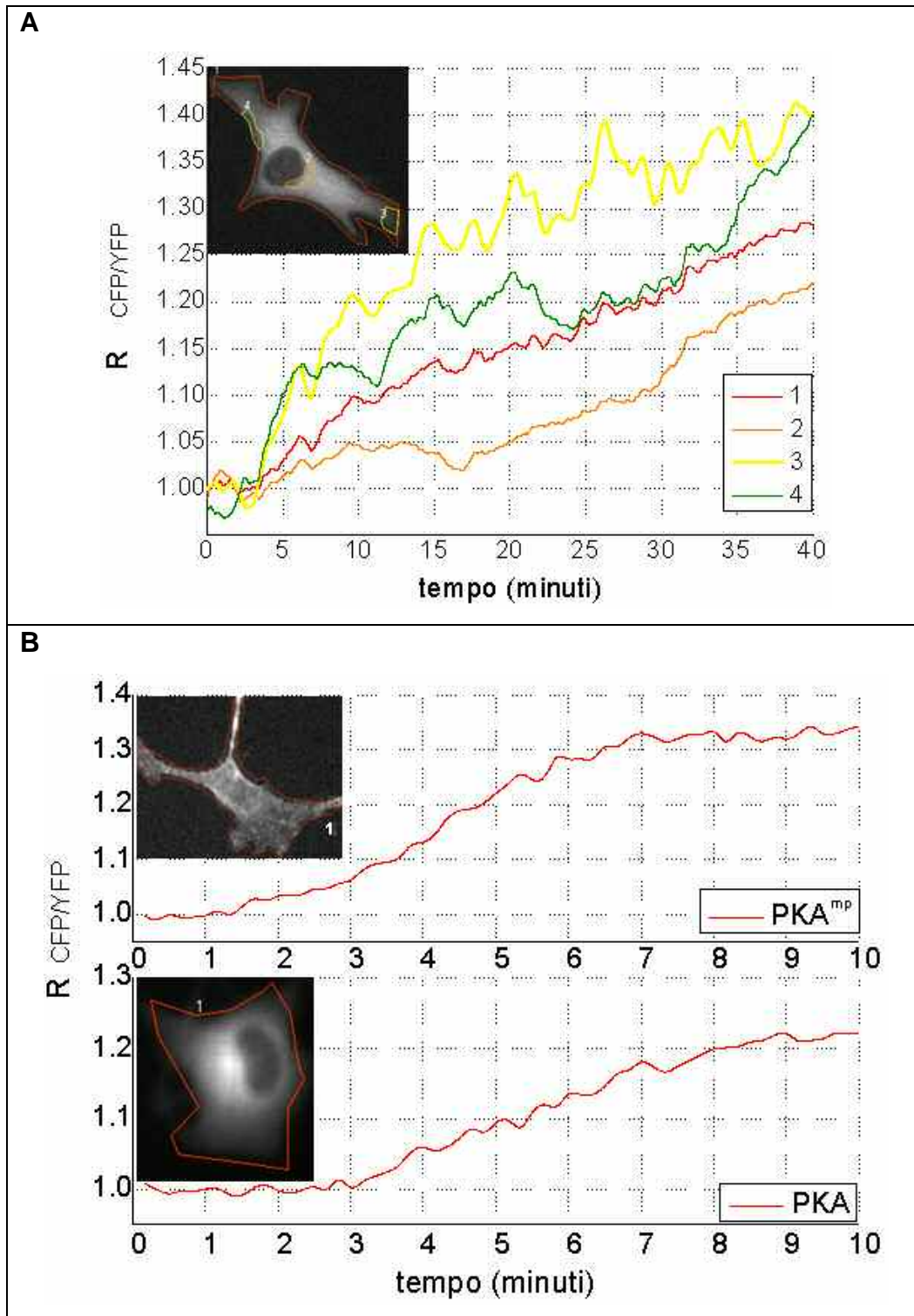


Figura 16. A) una cellula HeLa, che esprime la PKA^{cyt}, intossicata con CyaA 1 nM al tempo zero. I traccianti di un colore appartengono alle aree dello stesso colore. B) confronto tra due HeLa che esprimono la PKA^{mp} (sopra) e la PKA^{cyt} (sotto) nei primi 10 minuti dell'aumento di cAMP.

3.4. LF-EGFP e EF-mRFP

Per la prima volta le tossine di antrace sono state visualizzate durante il loro percorso intracellulare. L'esigua quantità di tossina che entra nella cellula rende difficoltosi gli esperimenti di *imaging*. L'unico modo possibile per monitorare la fluorescenza delle tossine è fare uno *Z-stack* che scansiona il volume cellulare e 'taglia' la cellula in sezioni orizzontali distanti 0.27 μm l'una dall'altra. Le immagini acquisite vengono deconvolute *stack* per *stack* con il metodo '3D', inserendo le specifiche dell'acquisizione (fluoroforo, obiettivo, mezzo di immersione, etc.) per una migliore correzione del PSF (*point spread function*). Così è possibile apprezzare la minutissima marcatura delle vescicole endosomiali, solo poche delle quali contengono la tossina; inoltre, le vescicole positive sono ampiamente disperse nei diversi piani focali all'interno del volume cellulare e questo rende indispensabile l'uso dello *Z-stack*. Questa tecnica, unita alla ricostruzione dell'immagine in 3D, permette anche di distinguere se il segnale proviene realmente dall'interno della cellula o se dipende da un'adesione alla superficie cellulare.

EGFP è pH sensibile e la sua resa di fluorescenza diminuisce notevolmente all'abbassarsi del pH. Per visualizzare LF-EGFP nelle vescicole di endocitosi è stato necessario pre-incubare le cellule con NH_4Cl , che neutralizza l'acidità negli endosomi ma non impedisce i normali processi di endocitosi (Axelsson et al., 2001). Inoltre, ha la capacità di ingrandire gli endosomi, rendendone più facile la visualizzazione al microscopio. Può essere facilmente lavato via e la sua azione è reversibile. In presenza di NH_4Cl sono visibili entrambe LF-EGFP e EF-mRFP, mentre in sua assenza solo EF-mRFP è visibile. La figura 17 mostra delle cellule HeLa intossicate per un'ora con entrambe le tossine in presenza di NH_4Cl . Sembra che la maggior parte delle vescicole che contengono una tossina non contengano l'altra. La visualizzazione dei singoli *stacks* (figura 17A) permette di vedere delle strutture con una marcatura ad anello; molto probabilmente sono le vescicole che contengono la tossina fluorescente disposta sulla membrana della vescicola e le sezioni orizzontali dello *stack* la seziona in cerchi concentrici come una ideale sfera.

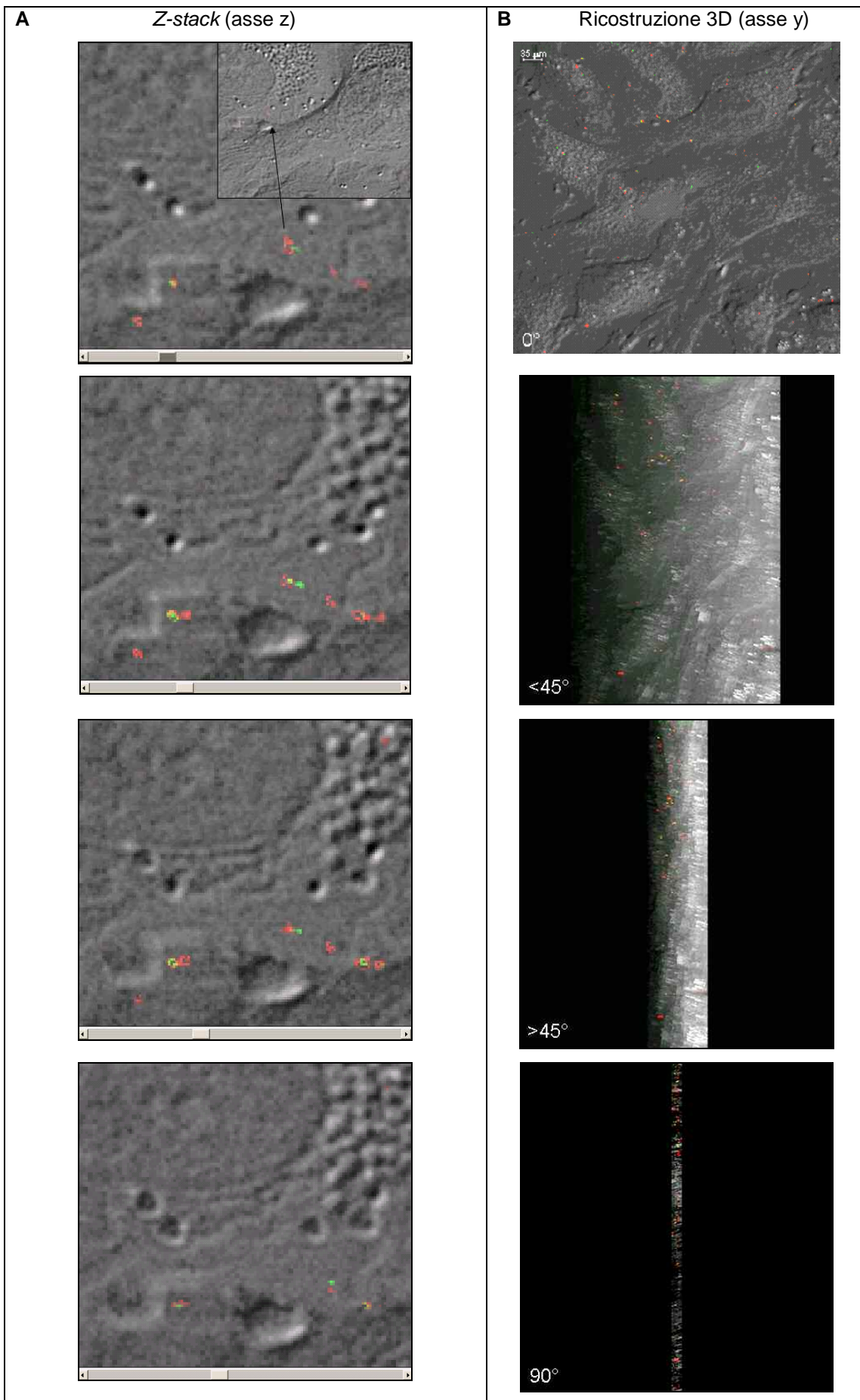


Figura 17. A) *stacks* successivi lungo l'asse Z; B) rotazione sull'asse y della proiezione massima.

La ricostruzione in 3D (figura 17B) mostra che il segnale proviene veramente dall'interno della cellula e svela eventuali false co-localizzazioni, cosa che un'immagine su un solo piano non potrebbe fare. Tuttavia, bisogna tenere conto che gli *stacks* per i singoli fluorofori non sono stati presi l'uno di seguito all'altro, ma fra i due gruppi di *stacks* sono passati circa 40 secondi. Alcuni *spots* vicini potrebbero in realtà contenere entrambe le tossine (co-localizzazione), ma questo non si può affermare con certezza a causa del rapido movimento degli organelli e del *delay* delle acquisizioni. Tuttavia, la maggior parte delle vescicole positive per un tossina ha un distribuzione spaziale molto diversa da quelle contenenti l'altra tossina ed è difficile attribuire la diversa localizzazione ad uno spostamento delle vescicole così grande in tempi così brevi.

Nella figura 18B è riportato un esperimento fatto in assenza di NH_4Cl . Per apprezzare la minore quantità di vescicole positive nel verde, sono riportate le proiezioni massime degli *stacks* e sono state sovrapposte le immagini del rosso con quelle del verde. Si può notare la minore quantità di vescicole contenenti LF-EGFP, la cui fluorescenza è 'spenta' dall'acidità degli organelli a $\text{pH} < 6$, mentre resta visibile EF-mRFP che non è sensibile al pH.

Tuttavia, questo non indica con certezza se le tossine siano traslocate o siano ancora all'interno dei compartimenti acidi. Infatti, si pensa che EF resti associata alle membrane dopo la traslocazione (Guidi-Rontani et al., 2000). In tal caso, il segnale di EF-mRFP sarebbe visibile sia quando la proteina è nell'endosoma acido, sia quando si trova sul lato rivolto al citoplasma. Per risolvere questo quesito sarà necessario invertire la fusione e produrre EF-EGFP e LF-mRFP. Allora, se EF rimane davvero ancorata alle membrane, la EGFP permetterebbe di distinguere tra il lato intraluminale (pH acido, *quenching* della fluorescenza) e il lato citoplasmatico (pH neutro, fluorescenza piena).

La fusione delle tossine di antrace con proteine fluorescenti permette di comprendere molti aspetti del loro comportamento ed è un *tool* che promette ancora molti sviluppi futuri.

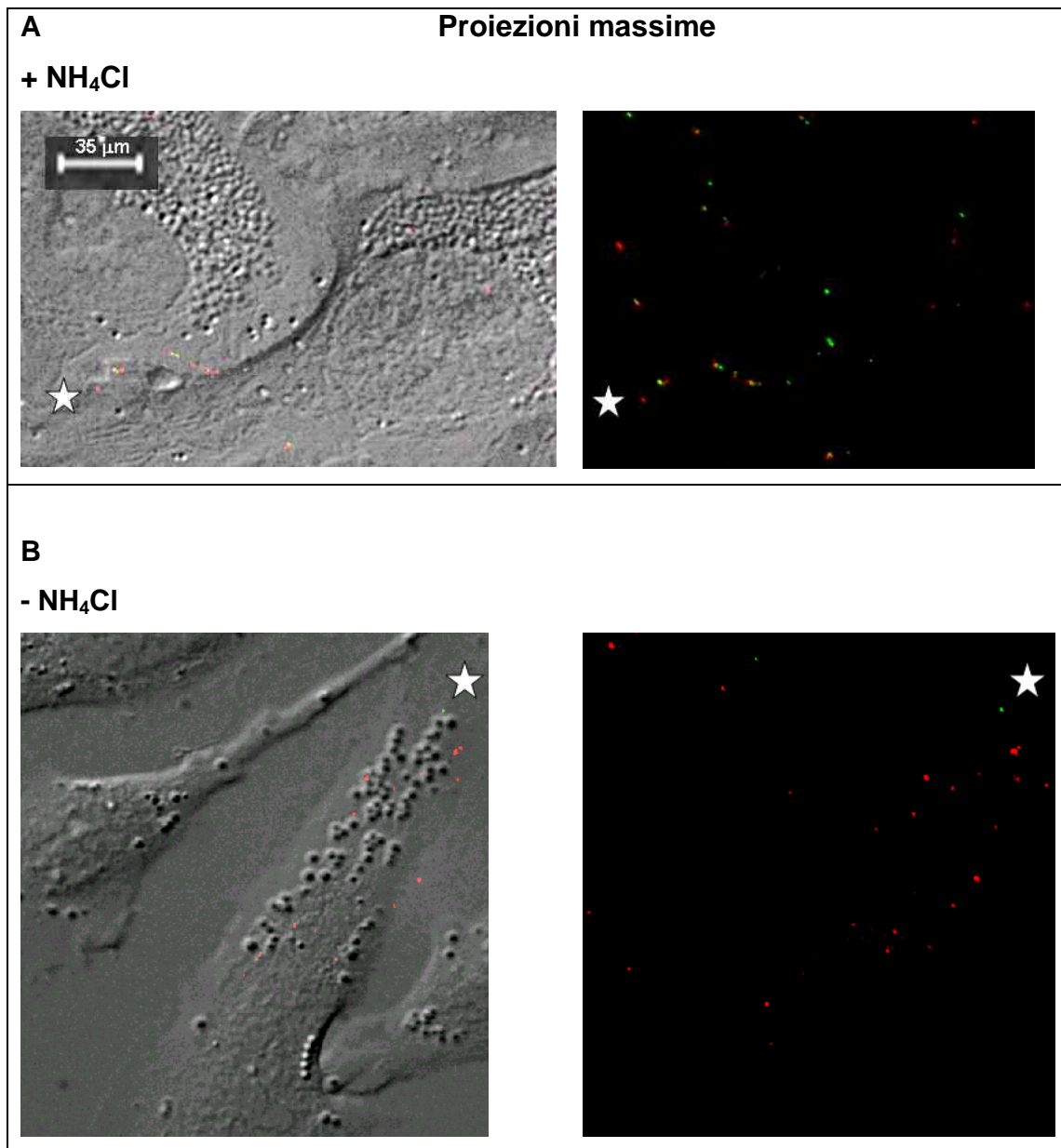


Figura 18. Proiezioni massime degli *stacks* e *merge* dei due fluorofori: A) in presenza di NH₄Cl; la foto a sinistra è il *merge* di campo chiaro, verde e rosso, mentre a destra lo stesso campo è rappresentato come *merge* di solo verde e rosso; la stellina aiuta a ritrovare lo stesso punto nelle due foto; B) senza NH₄Cl; la rappresentazione va letta come in (A).

4. Real-time PCR

Sono stati descritti due tipi di recettori diversi per PA, TEM8 (a bassa affinità) e CMG2 (ad alta affinità). E' stato recentemente riportato che PA legato al TEM8 media la traslocazione di LF dagli endosomi precoci, mentre CMG2 guida PA all'interno degli endosomi tardivi da cui LF trasloca nel citosol (si veda 'Introduzione', § 2.1) (Rainey et al., 2005). Si è quindi deciso di saggiare quale dei due recettori, o tutt'e due, sia espresso nelle cellule usate nel corso di

questa tesi. In mancanza di anticorpi contro queste due proteine è stata usata la tecnica della RT-PCR per avere una stima semi-quantitativa almeno dei livelli di mRNA.

Esistono tre isoforme del recettore TEM8 che si distinguono per il loro C-terminale: una lunga, una corta e una detta 'supercorta' priva del segmento transmembrana, la cui funzione è sconosciuta. Nella RT-PCR è stata usata una coppia di *primers* che appaia in entrambe le isoforme lunga e corta. Un'altra coppia con la stessa proprietà è stata scelta per le cellule Raw264.7 che sono di origine murina. Il recettore CMG2 umano esiste in tre isoforme, dette CMG2₄₈₉, CMG2₄₈₈ e CMG2₃₈₆. Le prime due si distinguono per 12-13 amminoacidi C-terminali, mentre la terza non è in grado di mediare l'intossicazione sebbene leghi il PA (Scobie and Young, 2005). Anche in questo caso la coppia di *primers* prescelta appaia in entrambe le isoforme CMG2₄₈₉ e CMG2₄₈₈; allo stesso modo è stata disegnata una coppia di *primers* per i recettori delle cellule murine. I *primers* sono stati disegnati con il programma 'Frodo' (<http://frodo.wi.mit.edu>) in modo da avere la stessa lunghezza di circa 200 bp e una T_m intorno ai 60°C. I frammenti di recettore su cui appaiano i *primers* sono stati clonati e utilizzati per costruire delle rette di taratura a concentrazioni da 0.2 fmol/ μ l a 10⁻⁸ fmol/ μ l.

I recenti risultati della RT-PCR mostrano che ognuno dei tre tipi cellulari possiede l'mRNA per entrambi i recettori. La figura 19 mostra che i livelli di mRNA di CMG2 e TEM8 nelle cellule HeLa sono simili. Lo stesso tipo di quantificazione è stata fatta per le cellule Jurkat e le Raw ma i risultati sono ancora in preparazione. E' stato visto che nelle Raw sono maggiori i livelli dell'mRNA di CMG2 rispetto al TEM8, in accordo con i dati riportati in letteratura (Rainey et al., 2005).

L'affinità di PA per CMG2 è nell'ordine delle nanomoli ($K_d=10^{-1}$ nM) (Wigelsworth et al., 2004) e per TEM8 delle centinaia di nanomoli (Bradley et al., 2001). Quando PA viene usato a concentrazione 20 nM, solo i recettori di tipo CMG2 possono essere saturati. Questo spiegherebbe il lungo *delay* che intercorre fra l'intossicazione e l'inizio dell'attività. I 30-45 minuti sarebbero quelli necessari all'endosoma per raggiungere il pH 5.5 in cui PA si libera del CMG2 e si inserisce in membrana, formando il poro attraverso cui traslocano EF ed LF (si veda 'Introduzione', § 2.1).

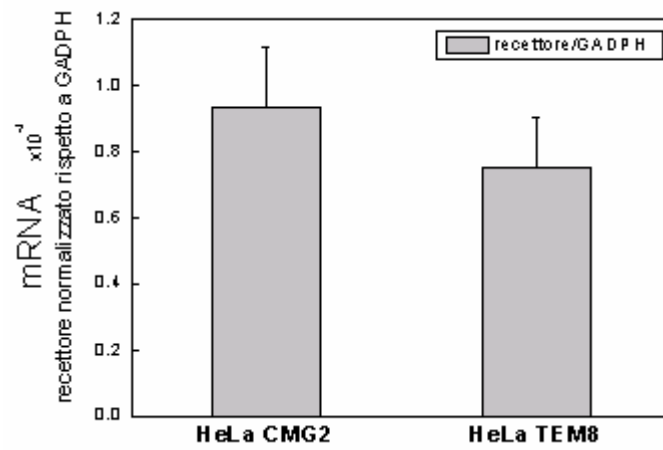


Figura 19. L'RNA totale è stato isolato dalle cellule HeLa e retro-trascritto. I livelli di mRNA sono stati estrapolati da una curva di taratura e normalizzati rispetto all'mRNA del GAPDH misurato nei medesimi campioni.

CONCLUSIONI

Nelle cellule epiteliali e del sistema immunitario EF+PA inducono un aumento di cAMP intracellulare che inizia dopo circa 30 minuti dall'intossicazione e continua a crescere fino a 4 ore. Nemmeno a tempi lunghi le fosfodiesterasi normalmente attive nella cellula riescono a degradare il cAMP prodotto da EF. La permanenza di un segnale che è coinvolto in un delicato *network* di comunicazione intracellulare ha sicuramente dei pesanti effetti di disregolazione sulla funzione dei singoli componenti. In particolare, i linfociti T sono le cellule che vengono investite dal maggiore aumento di cAMP, tanto più drammatico quanto più piccolo è il volume della cellula interessata. Questo spiega in parte il ruolo della tossina edematosa nella paralisi della risposta immunitaria nei casi di infezione da antrace.

L'utilizzo di tecniche di FRET con sonde costituite dalla PKA fluorescente permette di esaminare le dinamiche dell'aumento di cAMP intracellulare con un'elevata risoluzione spazio-temporale. La mappatura di ristrette zone citoplasmatiche rivela che il cAMP cresce a partire da zone perinucleari. Questo è un indizio che suggerisce il sito di traslocazione di EF nel citoplasma. Infatti, i *late endosomes* hanno una distribuzione raggruppata intorno al nucleo e il tempo necessario per l'arrivo del carico ai *late* coincide con i tempi di inizio dell'attività di EF dopo l'intossicazione. La doppia coincidenza spaziale e temporale fa pensare che l'organello da cui EF trasloca nel citosol sia l'endosoma tardivo.

La compartimentalizzazione del segnale e l'organizzazione subcellulare sono essenziali per garantire la specificità delle fitte reti del *signalling*. Probabilmente la traslocazione in prossimità del nucleo offre dei vantaggi all'azione di EF in termini di raggiungimento dei *targets* e specificità nell'alterazione dei sistemi di comunicazione cellulare.

Il clonaggio, l'espressione e la purificazione di LF e EF fusi a proteine fluorescenti ha portato allo sviluppo di *tools* per seguire il percorso intracellulare delle tossine di antrace. Questo permette di chiarire come le tossine sfruttano il sistema di trasporto della cellula e soprattutto quale sia la distribuzione dell'una e dell'altra tossina in una co-intossicazione. Infatti nella cellula entrano contemporaneamente entrambi EF ed LF, ma solo recentemente sono stati

ottenuti dati sulla loro azione sinergica. I primi esperimenti, riportati in questa tesi, mostrano che la quantità di tossina che entra nella cellula è molto bassa e che EF e LF hanno la tendenza a non condividere la stessa vescicola di endocitosi.

I tre tipi di cellule che rappresentano gli obiettivi più importanti delle tossine di antrace, cellule epiteliali, cellule della risposta immunitaria innata (macrofagi) e adattativa (linfociti T), possiedono entrambi i recettori per il PA, TEM8 e CMG2. Poiché l'affinità per il CMG2 è maggiore, il distacco del PA dal recettore all'interno dell'endosoma avviene ad un pH acido caratteristico dei *late endosomes* (si veda 'Introduzione', §2.1, p.7). In seguito a questo distacco, il PA può inserirsi in membrana e permettere la traslocazione di LF e EF. Il processo di maturazione degli organelli richiede un tempo che coincide con il tempo necessario al manifestarsi dell'attività catalitica di LF e EF. Questa è un'ulteriore prova che la traslocazione avviene dai *late endosomes*.

BIBLIOGRAFIA

- Abrami, L., M. Lindsay, R.G. Parton, S.H. Leppla, and F.G. van der Goot. 2004. Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *J Cell Biol.* 166:645-51.
- Abrami, L., S. Liu, P. Cosson, S.H. Leppla, and F.G. van der Goot. 2003. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol.* 160:321-8.
- Adone, R., P. Pasquali, G. La Rosa, C. Marianelli, M. Muscillo, A. Fasanella, M. Francia, and F. Ciuchini. 2002. Sequence analysis of the genes encoding for the major virulence factors of *Bacillus anthracis* vaccine strain 'Carbosap'. *J Appl Microbiol.* 93:117-21.
- Ascenzi, P., P. Visca, G. Ippolito, A. Spallarossa, M. Bolognesi, and C. Montecucco. 2002. Anthrax toxin: a tripartite lethal combination. *FEBS Lett.* 531:384-8.
- Axelsson, M.A., N.G. Karlsson, D.M. Steel, J. Ouwendijk, T. Nilsson, and G.C. Hansson. 2001. Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins. *Glycobiology.* 11:633-44.
- Bade, S., A. Rummel, C. Reisinger, T. Karnath, G. Ahnert-Hilger, H. Bigalke, and T. Binz. 2004. Botulinum neurotoxin type D enables cytosolic delivery of enzymatically active cargo proteins to neurones via unfolded translocation intermediates. *J Neurochem.* 91:1461-72.
- Bradley, K.A., J. Mogridge, M. Mourez, R.J. Collier, and J.A. Young. 2001. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature.* 414:225-9.
- Brossier, F., M. Levy, A. Landier, P. Lafaye, and M. Mock. 2004. Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 72:6313-7.
- Burns, L.L., J.M. Canaves, J.K. Pennypacker, D.K. Blumenthal, and S.S. Taylor. 2003. Isoform specific differences in binding of a dual-specificity A-kinase anchoring protein to type I and type II regulatory subunits of PKA. *Biochemistry.* 42:5754-63.
- Dell'Aica, I., M. Dona, F. Tonello, A. Piris, M. Mock, C. Montecucco, and S. Garbisa. 2004. Potent inhibitors of anthrax lethal factor from green tea. *EMBO Rep.* 5:418-22.
- Dodge-Kafka, K.L., J. Soughayer, G.C. Pare, J.J. Carlisle Michel, L.K. Langeberg, M.S. Kapiloff, and J.D. Scott. 2005. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature.* 437:574-8.
- Drum, C.L., S.Z. Yan, J. Bard, Y.Q. Shen, D. Lu, S. Soelaiman, Z. Grabarek, A. Bohm, and W.J. Tang. 2002. Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature.* 415:396-402.
- Drum, C.L., S.Z. Yan, R. Sarac, Y. Mabuchi, K. Beckingham, A. Bohm, Z. Grabarek, and W.J. Tang. 2000. An extended conformation of calmodulin induces interactions between the structural domains of adenylyl cyclase from *Bacillus anthracis* to promote catalysis. *J Biol Chem.* 275:36334-40.
- Duclos, S., R. Corsini, and M. Desjardins. 2003. Remodeling of endosomes during lysosome biogenesis involves 'kiss and run' fusion events regulated by rab5. *J Cell Sci.* 116:907-18.

- Fouet, A., and M. Mock. 1996. Differential influence of the two *Bacillus anthracis* plasmids on regulation of virulence gene expression. *Infect Immun.* 64:4928-32.
- Fuld, S., G. Borland, and S.J. Yarwood. 2005. Elevation of cyclic AMP in Jurkat T-cells provokes distinct transcriptional responses through the protein kinase A (PKA) and exchange protein activated by cyclic AMP (EPAC) pathways. *Exp Cell Res.* 309:161-73.
- Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:721-30.
- Guidi-Rontani, C., M. Weber-Levy, M. Mock, and V. Cabiliaux. 2000. Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors across endosome membranes. *Cell Microbiol.* 2:259-64.
- Guignot, J., M. Mock, and A. Fouet. 1997. AtxA activates the transcription of genes harbored by both *Bacillus anthracis* virulence plasmids. *FEMS Microbiol Lett.* 147:203-7.
- Guo, Q., Y. Shen, N.L. Zhukovskaya, J. Florian, and W.J. Tang. 2004. Structural and kinetic analyses of the interaction of anthrax adenyl cyclase toxin with reaction products cAMP and pyrophosphate. *J Biol Chem.* 279:29427-35.
- Hanks, S., S. Adams, J. Douglas, L. Arbour, D.J. Atherton, S. Balci, H. Bode, M.E. Campbell, M. Feingold, G. Keser, W. Kleijer, G. Mancini, J.A. McGrath, F. Muntoni, A. Nanda, M.D. Teare, M. Warman, F.M. Pope, A. Superti-Furga, P.A. Futreal, and N. Rahman. 2003. Mutations in the gene encoding capillary morphogenesis protein 2 cause juvenile hyaline fibromatosis and infantile systemic hyalinosis. *Am J Hum Genet.* 73:791-800.
- Hoffmaster, A.R., and T.M. Koehler. 1997. The anthrax toxin activator gene *atxA* is associated with CO₂-enhanced non-toxin gene expression in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun.* 65:3091-9.
- Houslay, M.D., and W. Kolch. 2000. Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol.* 58:659-68.
- Kumar, P., N. Ahuja, and R. Bhatnagar. 2002. Anthrax edema toxin requires influx of calcium for inducing cyclic AMP toxicity in target cells. *Infect Immun.* 70:4997-5007.
- Ladant, D., and A. Ullmann. 1999. Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* 7:172-6.
- Le Blanc, I., P.P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petiot, N. Mayran, N. Demaurex, J. Faure, R. Sadoul, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol.* 7:653-64.
- Leppla, S.H. 1988. Production and purification of anthrax toxin. *Methods Enzymol.* 165:103-16.
- Llopis, J., J.M. McCaffery, A. Miyawaki, M.G. Farquhar, and R.Y. Tsien. 1998. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:6803-8.
- Mock, M., and T. Mignot. 2003. Anthrax toxins and the host: a story of intimacy. *Cell Microbiol.* 5:15-23.

- Mongillo, M., A. Terrin, S. Evellin, V. Lissandron, and M. Zaccolo. 2005. Study of cyclic adenosine monophosphate microdomains in cells. *Methods Mol Biol.* 307:1-13.
- Mourez, M., R.S. Kane, J. Mogridge, S. Metallo, P. Deschatelets, B.R. Sellman, G.M. Whitesides, and R.J. Collier. 2001. Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin. *Nat Biotechnol.* 19:958-61.
- Nassi, S., R.J. Collier, and A. Finkelstein. 2002. PA63 channel of anthrax toxin: an extended beta-barrel. *Biochemistry.* 41:1445-50.
- Paccani, S.R., F. Tonello, R. Ghittoni, M. Natale, L. Muraro, M.M. D'Elisio, W.J. Tang, C. Montecucco, and C.T. Baldari. 2005. Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. *J Exp Med.* 201:325-31.
- Pannifer, A.D., T.Y. Wong, R. Schwarzenbacher, M. Rensus, C. Petosa, J. Bienkowska, D.B. Lacy, R.J. Collier, S. Park, S.H. Leppla, P. Hanna, and R.C. Liddington. 2001. Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature.* 414:229-33.
- Park, J.M., F.R. Greten, Z.W. Li, and M. Karin. 2002. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science.* 297:2048-51.
- Pini, A., Y. Runci, C. Falciani, B. Lelli, J. Brunetti, S. Pileri, M. Fabbrini, L. Lozzi, C. Ricci, A. Bernini, F. Tonello, F. Dal Molin, P. Neri, N. Niccolai, and L. Bracci. 2006. Stable peptide inhibitors prevent binding of lethal and edema factors to protective antigen and neutralize anthrax toxin in vivo. *Biochem J.*
- Rainey, G.J., D.J. Wigelsworth, P.L. Ryan, H.M. Scobie, R.J. Collier, and J.A. Young. 2005. Receptor-specific requirements for anthrax toxin delivery into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13278-83.
- Scobie, H.M., G.J. Rainey, K.A. Bradley, and J.A. Young. 2003. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:5170-4.
- Scobie, H.M., and J.A. Young. 2005. Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. *Curr Opin Microbiol.* 8:106-12.
- Shaner, N.C., R.E. Campbell, P.A. Steinbach, B.N. Giepmans, A.E. Palmer, and R.Y. Tsien. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 22:1567-72.
- Shen, Y., N.L. Zhukovskaya, Q. Guo, J. Florian, and W.J. Tang. 2005. Calcium-independent calmodulin binding and two-metal-ion catalytic mechanism of anthrax edema factor. *Embo J.* 24:929-41.
- Shen, Y., N.L. Zhukovskaya, M.I. Zimmer, S. Soelaiman, P. Bergson, C.R. Wang, C.S. Gibbs, and W.J. Tang. 2004. Selective inhibition of anthrax edema factor by adefovir, a drug for chronic hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3242-7.
- Sirard, J.C., M. Mock, and A. Fouet. 1994. The three *Bacillus anthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. *J Bacteriol.* 176:5188-92.
- Tonello, F., L. Naletto, V. Romanello, F. Dal Molin, and C. Montecucco. 2004. Tyrosine-728 and glutamic acid-735 are essential for the metalloproteolytic activity of the lethal factor of *Bacillus anthracis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 313:496-502.

- Tonello, F., M. Seveso, O. Marin, M. Mock, and C. Montecucco. 2002. Screening inhibitors of anthrax lethal factor. *Nature*. 418:386.
- Vitale, G., R. Pellizzari, C. Recchi, G. Napolitani, M. Mock, and C. Montecucco. 1998. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 248:706-11.
- Wigelsworth, D.J., B.A. Krantz, K.A. Christensen, D.B. Lacy, S.J. Juris, and R.J. Collier. 2004. Binding stoichiometry and kinetics of the interaction of a human anthrax toxin receptor, CMG2, with protective antigen. *J Biol Chem*. 279:23349-56.
- Wright, G.G., and G.L. Mandell. 1986. Anthrax toxin blocks priming of neutrophils by lipopolysaccharide and by muramyl dipeptide. *J Exp Med*. 164:1700-9.
- Yao, H., R.D. York, A. Misra-Press, D.W. Carr, and P.J. Stork. 1998. The cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (PKA) is required for the sustained activation of mitogen-activated kinases and gene expression by nerve growth factor. *J Biol Chem*. 273:8240-7.
- Zaccolo, M. 2004. Use of chimeric fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer to monitor cellular responses. *Circ Res*. 94:866-73.
- Zacharias, D.A., J.D. Violin, A.C. Newton, and R.Y. Tsien. 2002. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*. 296:913-6.
- Zhang, S., K. Cunningham, and R.J. Collier. 2004. Anthrax protective antigen: efficiency of translocation is independent of the number of ligands bound to the prepore. *Biochemistry*. 43:6339-43.

ERROR: invalidrestore
OFFENDING COMMAND: --restore--

STACK:

-savelevel-

17764

(~d)

(~d)

17763

(~c)

(~c)

17762

(~b)

(~b)

17761

(~a)

(~a)

17760

(~\)

(~\)

17759

(~_)

(~_)

17758

(~^)

(~^)

17757

(~])

(~])

17756

(~\)

(~\)

17755

(~[)

(~[)

17754

(~Z)

(~Z)

17753

(~Y)

(~Y)

17752

(~X)

(~X)

17751

(~W)

(~W)

17750

(~V)

(~V)

17749

(~U)

(~U)

17748

(~T)

(~T)

17747

(~S)

(~S)

17746

(~R)

(~R)

17745

(~Q)

(~Q)

17744

(~P)

(~P)

17743

(~O)

(~O)

17742