

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

*FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE*

TESI DI LAUREA

Interazione tra il fattore letale di antrace e il suo substrato MAPK chinasi 6

RELATORE: DR. LUISA BARZON

(Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche)

CORRELATORI: CH.MO PROF. CESARE MONTECUCCO

(Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali)

DR. FIORELLA TONELLO

(Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali)

LAUREANDO: MARCO TERENCE

INDICE

INDICE	1
ABBREVIAZIONI.....	4
NOMENCLATURA DEGLI AMMINOACIDI	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1 IL CARBONCHIO.....	7
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA	7
1.1.2 PATOGENESI	8
1.1.3 PROFILASSI	9
1.2 FATTORI DI VIRULENZA DI <i>B. anthracis</i>	10
1.2.1 L'ANTIGENE PROTETTIVO.....	11
1.2.2 IL FATTORE LETALE.....	12
1.2.3 IL FATTORE EDEMATOSO.....	16
1.3 PATOGENESI MOLECOLARE DEL CARBONCHIO.....	17
1.3.1 Interazione con il recettore ed internalizzazione della tossina.....	17
1.3.2 Formazione del poro del PA.....	19
1.3.3 Uscita della subunità effettrice della tossina dalle vescicole endocitiche.....	20
1.3.4 Incontro della tossina con i suoi substrati citoplasmatici.....	21
1.4 LF E LA VIA DELLE MAPK.....	22
1.5 ATTIVITA' IMMUNOSOPPRESSIVE DELLA TOSSINA DI ANTRACE.....	24
1.5.1 I macrofagi.....	25
1.5.2 Le cellule dendritiche.....	25
1.5.3 I linfociti.....	25
1.6 INIBIZIONE ED USO TERAPEUTICO DELLA TOSSINA DI ANTRACE....	26
2. MATERIALI E METODI.....	29
2.1 MATERIALI.....	29
2.2 VETTORI DI ESPRESSIONE GENICA IN <i>E. COLI</i>	30
2.2.1 Fattori che influenzano il livello di espressione.....	31
2.2.2 Fattori che influenzano la conformazione e la stabilità di una proteina.....	32
2.2.3 Produzione delle proteine di interesse come proteine di fusione.....	33
2.3 CARATTERISTICHE DEI VETTORI DI ESPRESSIONE UTILIZZATI.....	33
2.3.1 pET20b.....	33

2.3.2 pRSETa.....	35
2.3.3 pGEX 2TK.....	36
2.4 CARATTERISTICHE DEI CEPPI DI <i>E. COLI</i> UTILIZZATI.....	37
2.5 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE.....	38
2.5.1 Clonaggio della MKK6 stop in LF 3 dom 687 – pRSETa.....	38
2.5.2 Sub-clonaggio del gene per il mutante di LF EY in pRSETa.....	40
2.5.3 Separazione dei frammenti di DNA mediante elettroforesi in gel di agarosio.....	41
2.5.4 Preparazione delle cellule competenti.....	42
2.5.5 Trasformazione delle cellule competenti.....	43
2.6 TECNICHE BIOCHIMICHE.....	43
2.6.1 Elettroforesi in gel di poliacrilammide in presenza di SDS.....	43
2.6.2 Elettroforesi in gel di poliacrilammide in condizioni native.....	44
2.6.3 Western Blotting.....	44
2.6.4 Espressione di proteine come prodotto di fusione con la GST o con l'His Tag.....	45
2.6.5 Purificazione del costrutto LF 3 dom 687 – MKK6 in pRSETa mediante cromatografia di affinità.....	46
2.6.6 Purificazione di LF Y e della MKK6 tramite protocollo denaturante.....	47
2.6.7 Prove di taglio della MKK6 e della MKK6+ da parte di LF wt.....	47
2.6.8 Saggio di fosforilazione della p38 γ da parte della MKK6+.....	48
2.6.9 Incubazione di LF Y728A con la MKK6 in colonna Ni-NTA.....	49
2.6.10 Incubazione in colonna di LF EY con la MKK6 clonata in pGEX 3X.....	49
2.7 TECNICHE SPETTROSCOPICHE.....	50
2.7.1 Quantificazione del DNA tramite spettroscopia di assorbimento.....	50
2.7.2 Quantificazione della concentrazione proteica mediante spettroscopia di assorbimento.....	51
3. PREMESSE DEL LAVORO DI TESI.....	53
3.1 Clonaggio dei mutanti LF 3 dom ed LF dom 687.....	53
3.2 Prove di purificazione del complesso LF 3 dom 687 – MKK6.....	54
4. SCOPO DELLA TESI.....	55
5. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	57
5.1 REALIZZAZIONE DEL COSTRUTTO LF 3 dom 687 – MKK6 IN pRSETa.....	57

5.1.1 Clonaggio della MKK6 stop in LF 3 dom 687 – pRSETa.....	57
5.1.2 Espressione e purificazione del costrutto LF 3 dom 687 – MKK6 in pRSETa.....	58
5.2 SPETTRO DICROICO DI LF 3 dom 687 NEL VICINO U.V.....	60
5.3 CLONAGGIO, ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DEL MUTANTE LF EY IN pRSETa.....	62
5.3.1 Clonaggio del mutante LF EY in pRSETa.....	62
5.3.2 Espressione e purificazione del costrutto LF EY – pRETa.....	63
5.4 CARATTERIZZAZIONE DELLA MKK6.....	64
5.4.1 Purificazione della MKK6.....	64
5.4.2 Gel di poliacrilammide non denaturante della MKK6.....	68
5.4.3 Prove di taglio della MKK6 da parte di LF wt.....	69
5.4.4 Fosforilazione della p38 γ da parte della MKK6+	71
5.5 PROVE DI INCUBAZIONE DEI MUTANTI DI LF CON LA MKK6 LEGATA IN COLONNA.....	71
5.5.1 Incubazione di LF Y728A con la MKK6 in colonna Hi Trap.....	71
5.5.2 Incubazione in colonna di LF EY con la MKK6 in pGEX 3X.....	73
6. CONCLUSIONI.....	75
7. BIBLIOGRAFIA.....	77

ABBREVIAZIONI

ADP	adenosina 5' di-fosfato
APS	ammonio persolfato
ATP	adenosina 5' tri-fosfato
EdTx	tossina edematogena
EF	fattore edematogeno
GSH	γ glutammil-cisteinil-glicina (glutazione)
GST	glutazione-S-transferasi
GST Trap	resina funzionalizzata con GSH
KIM	motivo di interazione chinasico
LB	mezzo di coltura Luria Bertani
LeTx	tossina letale
LF	fattore letale
LPS	lipopolisaccaride
LSB	Laemli sample buffer
MAPK	proteine chinasi attivate da mitogeno
MAPKK (MEK, MKK)	MAPK-chinasi
MAPKKK (MEKK, MKKK)	MAPK-chinasi-chinasi
PA	antigene protettivo
PA₂₀	frammento di PA di 20 kDa
PA₆₃	frammento di PA di 63 kDa
PEG	poli-etilen-glicole
PBS	soluzione salina tamponata con fosfato
SDS	sodio-dodecil-solfato
TEMED	N-,N-,N'-, N'-tetrametilendiammina
TCA	acido tricloroacetico
TNFα	fattore di necrosi tumorale α
VWA	fattore di von Willerbrand di tipo A

NOMENCLATURA DEGLI AMMINOACIDI

<i>Amminoacido</i>	<i>Codice a Tre Lettere</i>	<i>Codice Monolettera</i>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Acido aspartico	Asp	D
Cisteina	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Acido glutammico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Istidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

1. INTRODUZIONE

1.1 IL CARBONCHIO

Il carbonchio consiste in un'infezione batterica, il cui responsabile è un batterio Gram positivo a forma di bastoncino, *Bacillus anthracis*, aerobio, anaerobio facoltativo, in grado di formare spore in condizioni ambientali sfavorevoli.

Questa patologia colpisce principalmente animali erbivori, che vengono a contatto con le sue spore; occasionalmente le spore di *Bacillus anthracis* possono infettare l'uomo: solitamente si tratta di soggetti che per la natura del loro lavoro vengono a contatto con animali infetti.

Le spore di antrace sono molto resistenti alla degradazione ambientale, diffondono bene per aerosol e sono in grado di penetrare fino alle mucose delle basse vie aeree in seguito ad inalazione. Inoltre le spore di *Bacillus Anthracis* sono resistenti ai normali processi di sterilizzazione, quali calore, luce ultravioletta, raggi γ ed altri agenti chimici.

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

Il carbonchio è una delle maggiori malattie infettive dell'antichità. La quinta e sesta piaga nel libro dell'Esodo, nella Bibbia, potrebbero essere state delle epidemie di antrace nel bestiame e negli umani, rispettivamente. C'è chi sostiene che il flagello nero o peste che colpì l'Europa nel 1600 causando milioni di morti negli esseri umani e negli animali fu probabilmente antrace o che comunque l'antrace, oltre alla peste, avesse fatto la sua parte di morti. Nel 1876 fu scoperta l'eziologia batterica dell'antrace da parte di Koch e 5 anni più tardi, nel 1881, l'antrace fu la prima malattia batterica per la quale fu disponibile la vaccinazione. Grandi epidemie tra gli esseri umani si sono verificate nell'era moderna, più di 6000 casi, prevalentemente cutanei si sono verificati nello Zimbabwe tra il 1979 e il Marzo 1980 e 25 casi cutanei si sono verificati in Paraguay nel 1987.

Di grande attualità è l'utilizzo delle spore di *Bacillus anthracis* come arma biologica, recentemente in America sono state recapitate lettere contenenti le spore

del bacillo, fortunatamente non vi è stato un rilascio massivo nell'aereosol e i trattamenti medici tempestivi hanno limitato il numero delle vittime [1].

1.1.2 PATOGENESI

L'antrace può presentarsi principalmente in due forme cliniche nell'uomo, secondo la modalità di infezione: l'antrace cutaneo e quello da inalazione [2]. Solo di rado si manifestano complicazioni a livello intestinale a seguito di ingestione, o a livello delle meningi.

Forma cutanea

Questa è la forma più comune e colpisce principalmente quelle persone che per la loro professione possono venire in contatto con animali infetti. Le spore penetrano nell'organismo generalmente attraverso una lesione cutanea e già dopo qualche giorno compare una macula indolore e pruriginosa. Nel giro di 24-36 ore essa si espande diventando edematosa e formando la caratteristica escara nera nella sede dell'inoculo, costituita da tessuto necrotico circondato da un esteso edema gelatinoso. Solitamente l'infiammazione si spegne lentamente e il fenomeno rimane localizzato, ma in rari casi i batteri possono penetrare nella circolazione sistemica e dare i sintomi tipici del carbonchio da inalazione, fino a causare morte per shock settico.

Forma inalatoria

È la forma più grave della patologia e presenta un decorso rapido e difficilmente curabile. Le spore di *B. anthracis* hanno un diametro di 1-2 μm , ottimale per la loro deposizione a livello degli alveoli polmonari, in seguito ad inalazione. Successivamente le spore vengono fagocitate dai macrofagi alveolari, trasportate verso i linfonodi del mediastino e peribronchiali, e già all'interno dei macrofagi possono germinare e dare origine alla forma vegetativa del bacillo. I batteri entrano quindi nella circolazione sanguigna e rapidamente si verifica una setticemia fatale; all'autopsia si riscontra una diffusa emorragia che interessa molti organi.

Il periodo di incubazione può variare da dieci giorni a sei settimane e la patologia evolve rapidamente presentandosi in due stadi: la prima fase, che dura tre o quattro giorni, è caratterizzata da sintomi non specifici, simili a quelli dell'influenza,

con febbre, disturbi gastrointestinali (nausea, vomito, diarrea, dolori addominali), cefalea, tosse, dolori toracici. La seconda fase comprende dispnea, febbre, shock settico e conseguente morte del paziente.

Già nei primi stadi della malattia, sono evidenti mediastiniti emorragiche e marcate effusioni pleurali.

1.1.3 PROFILASSI

Il trattamento standard per l'antrace prevede la somministrazione di antibiotici, solitamente penicillina o doxiciclina, ma possono essere utili anche streptomina, eritromicina o cloramfenicolo, tuttavia tali terapie antimicrobiche sono efficaci soltanto nei casi della forma cutanea dell'antrace. Per quanto concerne la forma da inalazione, raramente la malattia viene diagnosticata prima che si stabilisca la setticemia e quindi la terapia risulta spesso inefficace. Durante l'esposizione, il microrganismo può persistere sotto forma di spore, che possono germinare alla fine della terapia e causare i sintomi letali.

La profilassi può rivelarsi utile nel caso in cui ci sia il sospetto di esposizione a spore di *B. anthracis*, e comprende un trattamento per sei settimane con doxiciclina o ciprofloxacina, antibiotici cui generalmente il bacillo è sensibile.

Il vaccino disponibile fu approvato per una profilassi pre-esposizione dalla Food and Drug Administration nel 1970, ed era preparato da una cultura di antrace non virulento trattata con formalina, il cui supernatante era dato in un regime di pre-esposizione a 0, 2 e 4 settimane e poi dopo 6, 12 e 18 mesi. Le persone che rimanevano a rischio di antrace dovevano essere sottoposte a richiami (le persone esposte devono ricevere almeno 3 dosi appunto a 0, 2 e 4 settimane). Attualmente è stata sviluppata una versione del vaccino in cui il supernatante è precipitato con idrossido di alluminio, (AVA, 'anthrax vaccine adsorbed') [3]. Il principale componente immunogenico è l'antigene protettivo (PA); sono in fase di studio dei vaccini costituiti da forme mutate di PA, che non presentano il sito di taglio riconosciuto dalle proteasi cellulari: tali mutanti non risultano tossici, ma sono in grado di provocare un'intensa risposta immunitaria, simile a quella sviluppata da PA nativo [4]. Recentemente sono state prodotte a scopo terapeutico, delle molecole di PA mutate in alcuni residui situati nella porzione di proteina che partecipa alla formazione del poro [5]. Tali mutanti di PA se iniettati per via intramuscolare, sono in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva contro l'azione delle tossine.

1.2. FATTORI DI VIRULENZA DI *B. anthracis*

I maggiori fattori di virulenza di *B. anthracis* sono la capsula e le esotossine e sono entrambi associati ad un plasmide [6].

Il plasmide **pXO2** (96Kb; accession n° NC_002146) contiene l'operone per i geni per la biosintesi della capsula, *capBCAD*, e i geni regolatori della capsula, *acpA* e *acpB* [7], mentre **pXO1** (accession n° NC_001496) trasporta i geni strutturali delle tossine, *cya* (accession n° NC_001496: 154224-156626), *pagA* (accession n° NC_001496: 133161-135455), e *lef* (accession n° NC_001496: 127442-129871), e il gene attivatore delle stesse, *atxA*.

La capsula è insolita perché composta solamente da residui di acido D-glutammico, che sono legati tra loro con legami γ a formare un grande omopolimero di oltre 215 kDa. Il preciso ruolo della capsula durante l'infezione del batterio rimane incerto; esperimenti *in vitro* hanno dimostrato la sua capacità antifagocitica. I batteri sforniti di capsula, infatti, vengono rapidamente fagocitati da macrofagi in coltura, mentre quelli che ne sono forniti vengono fagocitati solo raramente.

Inoltre la capsula di *B. anthracis* è relativamente non immunogenica ed è stato ipotizzato che conferisca un vantaggio al batterio, impedendo che si generi una forte risposta immunitaria umorale nei confronti della sua superficie esterna.

Le esotossine di *B. anthracis* sono due, la tossina letale (LeTx) e la tossina edematosa (EdTx), ed appartengono alla famiglia delle tossine batteriche AB, caratterizzata dalla presenza di una subunità A, che agisce nel citosol della cellula bersaglio, ed una B, che trasporta dentro il citoplasma la subunità A. Entrambe le tossine di *B. anthracis* sono composte da una singola subunità B, l'antigene protettivo ed una subunità A, che è il fattore letale nel caso della LeTx e il fattore edematogeno nel caso della EdTx. Queste tre proteine sono sintetizzate con una sequenza segnale (che viene poi rimossa), che ne determina la secrezione da parte del batterio nell'ambiente extracellulare, dove vengono a contatto con le cellule bersaglio, sulla cui superficie si assemblano in complessi multiproteici.

1.2.1 L'ANTIGENE PROTETTIVO

Il PA è una proteina di 735 amminoacidi ed un peso molecolare di 83 kDa, costituita prevalentemente da foglietti β e che presenta 4 domini strutturalmente e funzionalmente distinti.

L'antigene protettivo si presenta come una molecola lunga e piatta di dimensioni di $100 \times 50 \times 30$ Å. Il dominio I (residui 1 – 249) è costituito da un sandwich β e da alcune piccole α eliche e contiene il sito di taglio riconosciuto dalle proteasi furiniche di membrana o sieriche, che attivano il PA scindendolo in due catene polipeptidiche, una di 63 kDa e una di 20 kDa. Il dominio II (residui 259 – 487) è costituito da un barile β centrale, con un motivo a chiave greca ed un lungo e flessibile loop. Il dominio III è il più piccolo e presenta un foglio β con 4 foglietti; inoltre esso contiene una regione idrofobica, che potrebbe essere importante nel processo di oligomerizzazione del frammento di PA di 63 kDa.

Sono stati identificati due recettori per il PA: **TEM8** (tumor endothelial marker 8) e **CMG2** (capillary morphogenesis protein 2). I loro ligandi fisiologici non sono ancora stati formalmente identificati, anche se è noto come TEM8 interagisca con il collagene VI e CMG2 con il collagene IV e la laminina. L'espressione di TEM8 è stata documentata nell'epitelio polmonare, intestinale e della pelle, che costituiscono le tre vie di penetrazione nell'organismo di antrace. Il gene di CMG2, invece, è stato trovato diffusamente espresso in diversi tessuti, e codifica per tre isoforme, due delle quali, CMG2⁴⁸⁸ e CMG2⁴⁸⁹, sono recettori per la tossina di antrace.

L'esatto ruolo di questi due recettori è sconosciuto, ma è stato proposto un ruolo di CMG2 nel rimodellamento della matrice basale delle membrane cellulari e nell'angiogenesi tumorale. Entrambi i recettori hanno al loro N-terminale extracellulare un dominio analogo a quello del fattore di von Willebrand tipo A (VWA), simile al dominio I delle integrine. L'interazione tra il sito di adesione dipendente da ioni metallici del dominio VWA del recettore e i domini II e IV del PA è ad alta affinità e mima il riconoscimento della matrice extracellulare da parte delle integrine. Sorprendentemente, l'interazione del PA con il suo recettore ($K_d \sim 170$ pM) è circa 1000 volte maggiore di quella della maggior parte dei domini VWA con i loro ligandi fisiologici, probabilmente a causa dell'inserzione di un loop del dominio II del PA in una tasca ricca di residui aromatici del recettore.

1.2.2 IL FATTORE LETALE

Il fattore letale è una delle componenti della tossina letale di *B. anthracis*.

LF è una proteina di 90.2 kDa, composta da 4 domini, la cui struttura molecolare è stata chiarita, in seguito all'ottenimento di un suo cristallo, con la diffrazione ai raggi X. La molecola è alta 100 Å e larga 70 Å alla base, con il dominio I posto sopra gli altri domini, che invece sono intimamente connessi e che probabilmente formano una singola unità di folding. L'unico contatto tra il dominio I e il resto della molecola, avviene col dominio II e coinvolge soprattutto cariche polari ed interazioni mediate dall'acqua. La natura di questa interfaccia di legame è in accordo con l'osservazione sperimentale che il frammento N – terminale di LF (residui 1 – 254) può essere espresso come un dominio solubile e ben conformato, che mantiene la capacità di legarsi al PA e permette la traslocazione di proteine di fusione eterologhe nel citosol.

Il **dominio I** (residui 1-262) è costituito da un'estesa struttura ad α -elica ed è coinvolto nell'interazione con PA: mutazioni a livello dei residui Y148, Y149, I151 e K153, ne riducono drasticamente il legame con l'antigene protettivo.

Il **dominio II** (residui 263-297 e 385-550) di LF mostra una somiglianza strutturale con il dominio catalitico della tossina di *B. Cereus*, VIP2 (RMSD di 3,3 Å). VIP2 possiede una tasca di legame per il NAD con residui conservati coinvolti nel legame con il NAD e la sua catalisi. Il dominio II del fattore letale manca di questi residui conservati, ed un acido glutammico critico, conservato in tutta la famiglia delle tossine ADP ribosilanti, è sostituito da una lisina (K518). Perciò non è prevista alcuna attività di ADP ribosilazione per il dominio II di LF.

Il **dominio III** (residui 303-382) si compone di un piccolo gomito di α -eliche con un *core* idrofobico, inserito a gomito tra la seconda e la terza elica del dominio II. Questo dominio è richiesto per l'attività di LF, perché mutazioni puntiformi e di inserzione dirette verso residui del core abrogano l'attività della proteina. Inoltre il dominio III mette in comune una superficie idrofobica con il dominio IV, restringendo così l'accesso al sito attivo a potenziali substrati, così come accade per i loop delle proteine globulari. Inoltre il dominio III contribuisce alla specificità di sequenza del substrato istituendo con esso interazioni specifiche.

Il **dominio IV** consiste in un gomito di 9 α -eliche, schiacciate contro un foglio β composto da 4 foglietti. Il foglietto β e le prime 6 eliche possono essere

sovrapposte a quelle della metalloproteasi *termolisina*, anche se l'aspetto generale dei due domini è abbastanza differente, a causa di larghe inserzioni e delezioni presenti nei loop che connettono gli elementi conservati. Un atomo di Zn^{2+} viene coordinato tetraedricamente da una molecola d'acqua e dalle catene laterali di tre residui, con una disposizione tipica della famiglia delle termolisine. Due dei residui coordinanti sono le istidine del motivo HEXXH di coordinazione dello Zn^{2+} (His 686 e His 690), che si trovano sull'elica $4\alpha 4$, mentre il terzo residuo è il glutammato 735 dell'elica $4\alpha 6$. Il glutammato 687 (appartenente al motivo HEXXH) giace a 3.5 Å dalla molecola d'acqua, in posizione opportuna per agire come base nell'attivare lo Zn^{2+} durante la catalisi. Il gruppo ossidrilico della tirosina 728 forma un forte ponte ad idrogeno con la molecola d'acqua sul lato opposto del residuo Glu 687, funzionando probabilmente da acido nel protonare il gruppo amminico uscente.

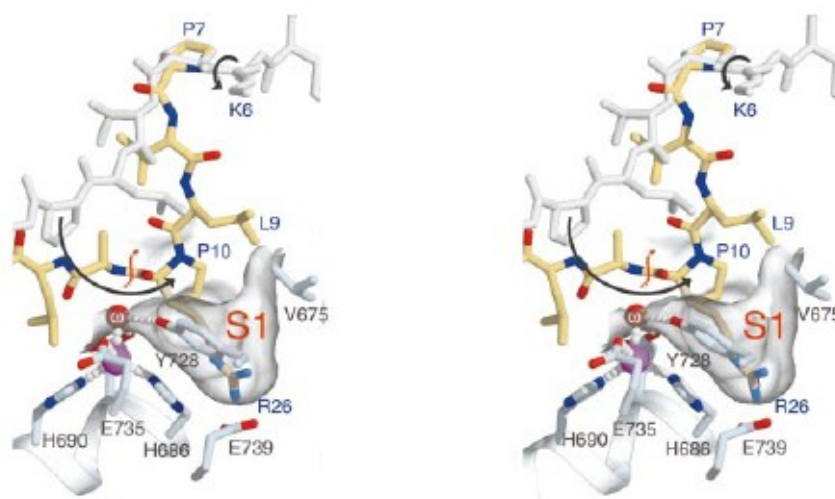


Figura n°1

Rappresentazione stereo del centro catalitico di LF. I residui che coordinano lo Zn^{2+} sono rappresentati con il modello di visualizzazione a sfere e bastoncini, e la molecola di acqua legata allo zinco è stata denominata ω . E' indicata anche la superficie S1 della tasca di legame al substrato. In grigio è rappresentato una parte del N-terminale della MEK2, così come da modello cristallografico, mentre in giallo è rappresentato un'ipotesi computazionale della possibile posizione del N-terminale della MEK2 all'interno della tasca di legame di LF. La figura è stata presa dal lavoro di Andrew D. Pannifer et al. (*letters to nature*, novembre 2001).

In contiguità con il sito attivo esiste un solco lungo e profondo di 40 Å, creato dalla tasca di legame vestigiale per il NAD del dominio II e dall'interfaccia tra i domini II, III e IV; questo solco ha un potenziale elettrostatico negativo per la presenza di cluster di acido aspartico/glutammico, così come di residui di glutamina ed asparagina.

Proprietà catalitiche di LF

LF è una Zn²⁺- metalloproteasi che taglia la porzione N-terminale delle MEK 1,2 [8] [9], della MEK 3, delle MEK 4,6,7, ma non della MEK 5 [10]. Esiste un motivo consensus per il sito di taglio di LF sulle diverse MAPKK: nelle posizioni da P₇ a P₈ sono presenti residui carichi positivamente, mentre tra P₂ e P₁' sono presenti residui idrofobici.

<i>Sito di taglio</i>	<i>P₈</i>	<i>P₇</i>	<i>P₆</i>	<i>P₅</i>	<i>P₄</i>	<i>P₃</i>	<i>P₂</i>	<i>P₁</i>	<i>P₁'</i>	<i>P₂'</i>	<i>P₃'</i>	<i>P₄'</i>	<i>P₅'</i>	<i>P₆'</i>	<i>P₇'</i>	<i>P₈'</i>
MAPKK1 (P ⁸ -I ⁹)	M	P	K	K	K	P	T	P	I	Q	L	N	P	A	P	D
MAPKK2 (P ¹⁰ -A ¹¹)	A	R	R	K	P	V	L	P	A	L	T	I	N	P	T	I
MAPKK3b (R ²⁶ -I ²⁷)	S	K	R	K	K	D	L	R	I	S	C	M	S	K	P	P
MAPKK6b (R ¹⁴ -I ¹⁵)	K	K	R	N	P	G	L	K	I	P	K	E	A	F	E	Q
MAPKK4 (K ⁴⁵ -L ⁴⁶)	Q	G	K	R	K	A	L	K	L	N	F	A	N	P	P	F
MAPKK4 (R ⁵⁸ -F ⁵⁹)	P	P	F	K	S	T	A	R	F	T	L	N	P	N	P	T
MAPKK7 (Q ⁴⁴ -L ⁴⁵)	Q	R	P	R	P	T	L	Q	L	P	L	A	N	D	G	G
MAPKK7 (G ⁷⁶ -L ⁷⁷)	A	R	P	R	H	M	L	G	L	P	S	T	L	F	T	P
<i>Motivo consensus</i>		+	+	+	+			h		h						

Figura n°2

Sequenza aminoacidica della regione N-terminale delle MAPKKs tagliata da LF. Sono evidenziate le varie posizioni rispetto al sito di taglio e gli AA che formano il motivo consensus. La dicitura P_n-P_{n'} fa riferimento alla posizione del residuo n rispetto al sito di taglio (ad es. P₃ indica che il residuo è il terzo dal sito di taglio verso l' N-terminale, mentre la dicitura P₃' indica che è il terzo verso il C-terminale). Il simbolo + indica un AA carico positivamente, mentre *h* sta ad indicare che il residuo è idrofobico.

E' stato messo a punto un modello da Tonello et al. per operare una dettagliata analisi dell'idrolisi catalizzata da LF di un substrato cromogenico [11]. Il peptide substrato AcRRRVLR è stato derivatizzato con una *p-nitroanilina* (pNA): le caratteristiche di assorbimento ed emissione del gruppo pNA sono influenzate dal suo legame al peptide, cosicchè in seguito al taglio di LF del substrato si verifica un aumento dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di emissione del gruppo pNA da solo (405 nm). Misurando l'assorbimento a 405 nm, è quindi possibile determinare la quantità di substrato tagliato.

Utilizzando questo artificio sperimentale Tonello et al. sono stati in grado di analizzare il comportamento di LF al variare della concentrazione di substrato, del pH, della temperatura e della forza ionica.

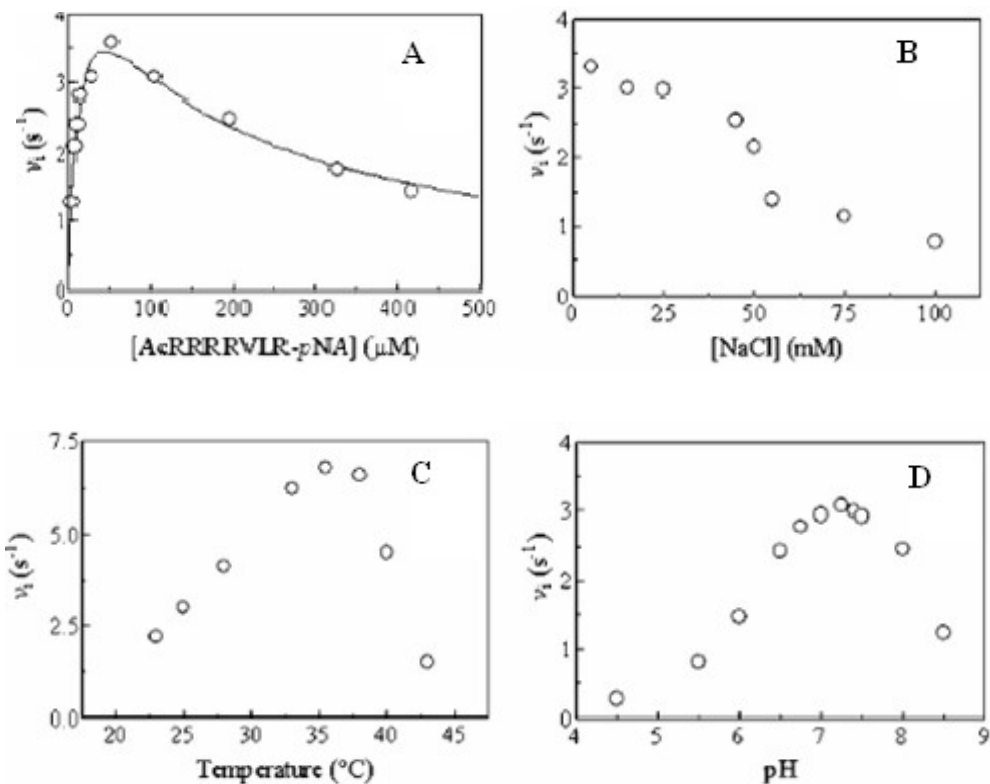


Figura n°3

Prove di taglio del peptide AcRRRRVLR-pNA in diverse condizioni sperimentali. A) effetto della concentrazione di substrato sull'idrolisi catalizzata da LF del peptide AcRRRRVLR-pNA a 25°C, pH 7,4 e [NaCl] = $1,5 \cdot 10^{-2}$ M; B-C-D) effetto della variazione della [NaCl], Temperatura e pH sulla catalisi del substrato; i dati mostrati in A sono stati ottenuti a pH 7,4 e 25°C, quelli di B a pH 7,4 e [NaCl] = $1,5 \cdot 10^{-2}$ M e quelli in C a $1,5 \cdot 10^{-2}$ M e 25°C. In tutte le condizioni sperimentali la concentrazione di LF è $1,0 \cdot 10^{-9}$ M, mentre quella di AcRRRRVLR-pNA è di 10 μM . I dati sono tratti dal lavoro di Tonello et al. (*J. Biol Chem*, 2003).

Da questo studio sulla attività metalloproteolitica di LF si può concludere come esista una inibizione da substrato, che potrebbe dipendere dalla possibilità che il substrato si possa legare all'enzima anche in posizioni non produttive per il taglio. Tale fenomeno potrebbe essere rilevante per il meccanismo d'azione della tossina in vivo. LF, infatti, è in grado di tagliare diverse isoforme delle MAPKK e data la loro diversa concentrazione e localizzazione subcellulare è probabile che la velocità e la percentuale di taglio non siano uniformi per le diverse isoforme.

Inoltre si può notare come concentrazioni superiori a 25 mM di NaCl inibiscano l'attività della tossina, mentre il picco di attività della tossina si ha a 37°C e a pH 7,4.

1.2.3 IL FATTORE EDEMATOSO

Il fattore edematoso (EF) è una proteina di 767 amminoacidi con una massa molecolare di 89 kDa, ed è una adenilato-ciclastasi calmodulina dipendente, che converte l'ATP in cAMP. EF ha due domini funzionali: un dominio N-terminale di legame con il PA (PABD) ed un dominio adenilil ciclastico attivato dalla calmodulina (CaM), ACD. PABD mostra una identità di sequenza del 35% col dominio corrispondente di legame al PA di LF. La regione C-terminale rappresenta la porzione catalitica e ha omologia di sequenza con altri enzimi ad attività adenilato-ciclastica, prodotti da batteri, tra cui *B. pertussis* e *Pseudomonas aeruginosa*: il fattore edematoso, infatti, appartiene alla classe II delle adenilato ciclastasi, le quali vengono secrete da batteri patogeni e richiedono la presenza di fattori cellulari dell'ospite per la loro attivazione. Altri batteri come *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis*, possono anche loro secernere tossine con attività adenilil ciclastica, ma appartengono alla classe III e non mostrano similarità strutturale con il dominio catalitico di EF.

Una volta dentro la cellula, l'attività adenilil ciclastica di EF è attivata dalla calmodulina e porta ad un incremento del cAMP che raggiunge livelli patologici: ciò determina un'alterazione dell'attività fagocitica dei macrofagi, della produzione di citochine di monociti e macrofagi, e della presentazione dell'antigene da parte dei linfociti T. Tutto ciò esita in una sregolazione del sistema immunitario, sia innato che adattativo.

La calmodulina è un sensore della concentrazione di calcio intracellulare altamente conservato, che controlla funzionalmente e strutturalmente molti effettori, modulando così una vasta serie di processi cellulari fondamentali. CaM ha due domini globulari (N-CaM e C-CaM) connessi tra loro attraverso una flessibile α -elica; ognuno dei domini globulari ha due siti di legame per il Ca^{2+} . Il legame con questo ione induce il passaggio della proteina da uno stato prevalentemente idrofilico ad uno a conformazione aperta, che espone una larga ed idrofobica tasca di legame. Il legame della CaM ai suoi effettori ne altera le loro proprietà biochimiche.

EF lega la conformazione chiusa di N-CaM; tale interazione relativamente debole favorisce l'inserzione della conformazione aperta di C-CaM in EF stesso. Questo evento aumenta molto l'affinità di EF per la CaM, ma curiosamente diminuisce l'affinità per il calcio di N-CaM.

1.3. PATOGENESI MOLECOLARE DEL CARBONCHIO

La forma maggiormente letale di carbonchio è quella causata dall'inalazione delle spore, che vengono fagocitate dai macrofagi alveolari e trasportate da essi ai linfonodi, dove germinano.

I batteri, quindi, si replicano fino a raggiungere un alto titolo nel sangue, portando in ultimo l'ospite alla morte. Il fatto che *B. anthracis* possa replicarsi così estensivamente senza indurre una risposta dell'ospite evidente, suggerisce come questo batterio possa interferire con i meccanismi di regolazione del sistema immunitario. Molti studi hanno messo in luce come la tossina letale abbia una azione di attivazione pleiotropica su vari tipi cellulari del sistema immunitario dell'ospite, mentre il contributo della tossina edematosa, non è stato ancora ben valutato.

1.3.1 Interazione col recettore ed internalizzazione della tossina

B. anthracis ha due fattori di virulenza, come già descritto, la capsula e le esotossine.

I bersagli molecolari di LF ed EF risiedono nel citoplasma, mentre l'antigene protettivo ha il ruolo di scortare EF ed LF all'interno della cellula ospite; per far ciò il PA deve agire come una macchina di traslocazione proteica, che porta le subunità enzimatiche della tossina da una parte all'altra del bilayer lipidico. PA è capace di formare pori nei doppi strati lipidici in modo simile alle tossine formanti poro come l'*aerolisina*; affinché si possa formare il poro, però, deve essere rimosso dal N – terminale del PA un peptide di 20 kDa in seguito ad un processo proteolitico operato da un membro della famiglia di proteasi furiniche transmembrana.

In seguito al taglio, il frammento di 63 kDa va incontro ad una oligomerizzazione a formare un complesso eptamerico ad anello, caratterizzato da un lume centrale con un diametro medio di 35 Å, che si stringe in basso fino a 20 Å. Tra gli eventi che possono promuovere l'oligomerizzazione un ruolo importante è rappresentato dal legame del frammento al recettore, che esita in una maggiore concentrazione del PA sulla superficie cellulare: infatti è stata riscontrata una presenza preferenziale dell'oligomero di PA in corrispondenza di specifici microdomini lipidici sulla membrana plasmatica, conosciuti come *lipids rafts*. Il dominio VWA di CMG2 non ha effetto sulla velocità di eptamerizzazione; tale osservazione sembra negare la possibilità che il recettore promuova l'oligomerizzazione inducendo un cambio conformazionale nel PA, che

abbasserebbe la barriera energetica per la formazione del complesso. Un'osservazione importante, invece, è che la presenza di LF e/o EF in vitro accelera il processo di eptamerizzazione, presumibilmente stabilizzando gli intermedi agendo come ponte tra più subunità. Va specificato come l'eptamerizzazione del PA e la sua endocitosi non richieda il legame di EF ed LF; un eventuale ruolo di EF ed LF nel velocizzare il processo di formazione dell'eptamero di PA, tuttavia, permetterebbe di minimizzare l'endocitosi da parte della cellula dell'eptamero a cui non si sono ancora legate le subunità effettrici della tossina.

EF ed LF hanno la proprietà di legarsi in maniera competitiva all'eptamero di PA, attraverso la loro regione N-terminale omologa di 255 AA (il cosiddetto PA – binding domain). Il sito di legame per queste due molecole ha una alta affinità (nell'ordine della concentrazione nanomolare), ed è localizzato nell'interfaccia tra due subunità di PA; ne consegue che il limite di legame simultaneo sia di tre molecole di LF e/o EF per complesso di PA. Esperimenti condotti recentemente da R.J. Collier hanno messo in evidenza come due residui del fattore letale, **E135** e **D182**, distanti tra loro approssimativamente 40 Å, interagiscano con lo stesso residuo basico, **K197**, posizionato su subunità adiacenti dell'oligomero di PA. E' ragionevole aspettarsi che l'affinità dell'interfaccia di legame tra LF e PA così configurata diminuisca all'aumentare dell'acidificazione del pH, in quanto in tali condizioni i gruppi acidi avrebbero maggiori possibilità di esistere in forma protonata. Sembrerebbe, quindi, che l'interfaccia tra LF e PA sia stata progettata per avere un intrinseco sistema di dissociazione dipendente dal pH, il che costituirebbe un'elegante soluzione al problema di come dissociare un complesso ad elevata affinità negli endosomi.

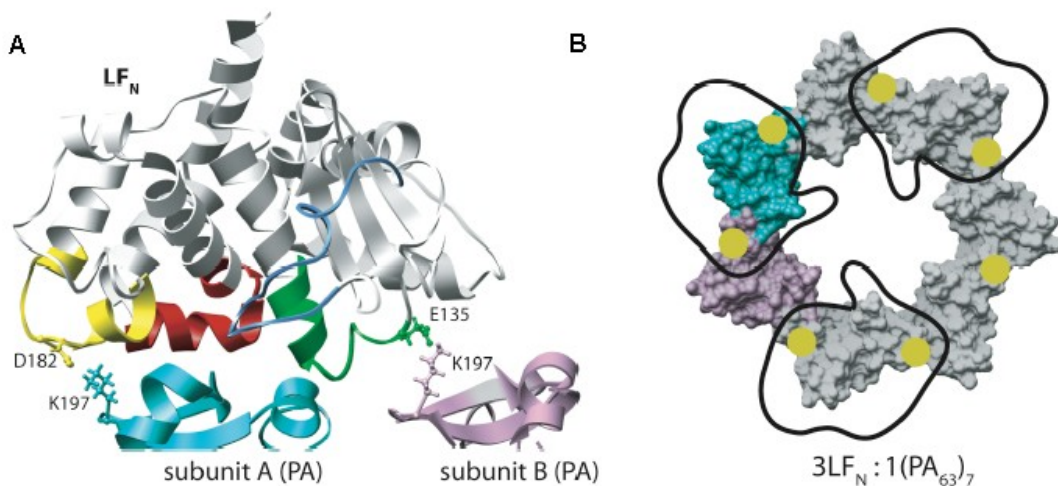


Figura n°4

Modello molecolare dell'interazione tra il dominio di legame LF al PA e l'antigene protettivo.

A: modello dell'interazione tra il dominio N-terminale di LF e due subunità dell'eptamero di PA; sono state messe in evidenza con i colori le superfici di interazione e i residui coinvolti. **B:** rappresentazione dell'eptamero con indicati in giallo i residui K197 di ciascun monomero, raggruppati a due a due come previsto dal modello di interazione con LF; si nota chiaramente che pur essendoci 8 residui K197, i siti di legame per LF sono solo 3. *Questa figura è tratta dal lavoro di R.J. Collier su JBC di novembre del 2005.*

L'endocitosi della tossina di antrace è sia dipendente dai raft lipidici, che clatrina mediata, risultando così in qualche modo insolito; quando la via endocitotica mediata dalla clatrina è bloccata, per esempio in seguito all'inattivazione della dinamina GTPasi, il complesso recettore – tossina può essere internalizzato attraverso vie alternative. Non è chiaro, tuttavia, se queste vie alternative contribuiscano o meno in maniera significativa all'internalizzazione della tossina in condizioni normali. I domini citoplasmatici del recettore potrebbero avere un ruolo negli eventi che portano al reclutamento della macchina di endocitosi, in quanto contengono diversi motivi potenzialmente interessanti, come siti di fosforilazione, di ubiquitinazione, regioni ricche in prolina e cluster acidi.

1.3.2 Formazione del poro del PA

Una volta internalizzato, il complesso LF – EF – eptamero di PA, è trasportato lungo la via endocitica.

Studi su doppi strati lipidici planari mostrano come l'intera regione compresa tra i residui 286 e 339 del dominio II del PA riarrangi a formare una lunga forcina β , che si struttura in un barile β con 14 foglietti β , di cui i residui 302 – 323 formano la regione transmembrana. Recentemente è stata ottenuta la struttura dell'eptamero di

PA con una risoluzione di 3.6 Å: a pH neutro il loop formato dai residui 302 – 323, si proietta fuori da un monomero e si inserisce nel monomero vicino tra i domini II e IV. Affinché il poro possa formarsi si deve verificare al minimo una separazione transiente tra i domini II e IV, in modo da liberare questo loop; tuttavia i due domini sono tenuti insieme dall'interazione con CMG2, che ne previene la prematura inserzione in membrana. L'interfaccia tra i domini II e IV del PA contiene sette istidine, mentre una istidina addizionale è stata trovata nella tasca di CMG2 coinvolta nel legame col PA. Questi residui potrebbero agire come un sensore di pH, in modo che in seguito alla protonazione delle istidine dovuta al pH acido, il dominio II sarebbe rilasciato dal legame col recettore e separato dal dominio IV, permettendo così il riarrangiamento della forcina β formante il poro. Il ruolo del recettore nel meccanismo di regolazione della formazione del poro è supportato dall'osservazione che il dominio VWA di CMG2 sposta la dipendenza dal pH del cambio conformazionale dell'eptamero di PA verso valori acidi (pH 4,2) [12].

Inoltre la traslocazione di LF ed EF attraverso il poro del PA sembra richiedere un parziale *unfolding* di queste subunità, un processo che *in vivo* probabilmente si verifica a causa dell'abbassamento di pH.

3.3 Uscita della subunità effettrice della tossina dalle vescicole endocitiche

Una considerazione emersa recentemente riguarda l'impatto diverso del tipo di recettore per la tossina, ovvero CMG2 o TEM8, sulla soglia di pH richiesta per la formazione del poro e la traslocazione della tossina di antrace all'interno della cellula (si può infatti considerare a tutti gli effetti lo spazio intraluminale delle vescicole di endocitosi come extracellulare).

E' stato visto come il PA legato a TEM8 sia in grado di formare il poro ad un pH superiore a 6, compatibile con la localizzazione degli endosomi precoci lungo la via di endocitosi. Il PA legato a CMG2, d'altro canto, richiede un pH molto più acido per la formazione del poro (pH 5,2 – 5,5), più caratteristico degli endosomi tardivi. Partendo da queste considerazioni si può ipotizzare che il tipo recettoriale determini il sito della formazione del poro e di conseguenza anche quello di uscita della tossina.

Nello stadio iniziale dell'infezione da parte di *B. anthracis* la tossina del batterio gioca un ruolo nel facilitare la germinazione delle spore; una volta che l'infezione vegetativa si è stabilita, diversi tipi cellulari vengono esposti alla tossina

(sono stati compiuti studi a riguardo nei macrofagi, nelle cellule dendritiche e nelle cellule dell'endotelio vascolare). Sia TEM8 che CMG2 appaiono essere largamente espressi in molti tipi cellulari; l'abbondanza relativa di ognuno dei due recettori sulla superficie cellulare potrebbe influenzare il pH di formazione del poro della tossina e di conseguenza il suo sito di entrata nella via endocitica. Tutto questo potrebbe avere un interesse nel determinare gli effetti di EF ed LF e la loro efficienza, anche in considerazione di possibili differenti localizzazioni subcellulari dei loro substrati.

1.3.4 Incontro della tossina con i suoi bersagli citoplasmatici

Una volta nel citoplasma EF ed LF hanno accesso ai loro rispettivi substrati e cofattori. EF può legarsi alla calmodulina, convertendo ATP in cAMP, e LF può tagliare le MAPKK. L'incontro di EF con la calmodulina è facilitato dalla grande abbondanza di quest'ultima nella cellula (1% circa delle proteine totali). L'incontro di LF con i suoi substrati, invece, potrebbe essere più difficoltoso per via della relativamente scarsa abbondanza delle MAPKK.

LF taglia le MEK tra il loro dominio catalitico e il loro N-terminale, che è coinvolto nell'interazione con le MAPK, ovvero le chinasi a valle della via di trasduzione del segnale, riducendo in questo modo la affinità delle MEK per le MAPK. Inoltre nel caso di alcune MEK (ad esempio la MEK1, ma non la MKK4) il taglio da parte di LF riduce l'attività chinastica intrinseca di queste proteine. L'effetto finale è che LF interferisce con la via di trasduzione del segnale delle MAPK; un'osservazione interessante è che alcune MEK, come la MEK1 iperfosforilata durante la mitosi, può ancora fosforilare i suoi substrati non identificati al di fuori di ERK dopo il taglio da parte di LF [13].

Nonostante il fatto che le MAPKK possano essere trovate libere nel citoplasma, crescenti evidenze indicano l'esistenza di complessi con proteine *scaffold*, che garantirebbero l'associazione di molecole segnale con determinati organelli e in particolare con quelli della via di endocitosi [14]. È stato identificato un complesso di *scaffold*, che permette l'associazione della MEK1 e/o della MEK2 con gli endosomi tardivi, e ne è anche stata stabilita l'importanza nella via del segnale di EGF lungo la via di trasduzione di ERK [15]. L'associazione eventuale tra complessi di molecole segnale e organelli della via di endocitosi rende molto interessante stabilire il punto di uscita di LF nel citosol, nell'ipotesi che esso coincida proprio con il luogo dove sono raggruppati i suoi substrati. Un possibile esempio di ciò è l'osservazione che LF taglia molto più velocemente la MEK1, localizzata vicino

agli endosomi tardivi, piuttosto che la MKK3, che è parte della via della p38 e che non si localizza a livello degli endosomi tardivi. Inoltre l'inattivazione di ERK1 indotta da LF risulta avvenire a concentrazioni di tossina cinque volte minori di quelle necessarie per l'inattivazione della p38 [16]. E' stato proposto da Abrami et al. che gli endosomi tardivi possano agire come una piattaforma di incontro tra LF e i suoi primi bersagli; siccome, inoltre, la distribuzione delle MEK varia da un tipo cellulare all'altro e a seconda delle condizioni fisiologiche, ci si potrebbe aspettare che LF promuova una grande varietà di effetti, e di fatto le osservazioni raccolte finora sembrerebbero confermare tale comportamento.

1.4 LF E LA VIA DELLE MAPK

Le vie di trasduzione del segnale di cui fanno parte le MAPKK hanno un importante ruolo in una varietà di risposte cellulari, che includono la proliferazione indotta da fattori di crescita, l'espressione genica, le compensazioni dell'alterazione del milieu extracellulare indotte da shock termico, luce UV, incremento dell'osmolarità extracellulare, etc...

In lievito sono state identificate quattro MAPK, le cui pathway sono funzionalmente distinte e regolate da cascate di trasduzione del segnale, che coinvolgano chinasi differenti. E' ormai chiaro come anche gli eucarioti superiori posseggano analoghe cascate chinasiche che portano all'attivazione di discrete MKK e MAPK; nello specifico sono stati identificati quattro sottogruppi di MAPK: le **ERK 1 e 2** (extracellular signal-regulated kinase), le **chinasi Jun** (c-Jun amino-terminal kinases (JNK) o stress – activated protein kinase (SAPK)), la **p38 MAPK**, e **BMK1/ERK5**.

Nei mammiferi la pathway della p38 è attivata da stimoli multipli, che agiscono attraverso differenti recettori: p38 è coinvolta nella produzione di citochine indotta dall'endotossina batterica LPS (lipopolisaccaride) e da altre componenti batteriche, ed è attivata anche citochine proinfiammatorie e cambiamenti fisici – chimici del ambiente extracellulare.

Sono state identificate sette distinte MKKs/MEKs nelle cellule di mammifero: la **MEK 1 e 2** non fosforilano né attivano p38 o JNK, al contrario sono potenti attivatori di ERK 1 e 2; la **MKK4** e la **MKK7** sono coinvolte nella via di trasduzione del segnale di JNK / SAPK, mentre la **MKK3** e la **MKK6** lo sono in

quella della p38. La **MKK5**, che non è tagliata da LF, è una chinasi della via di ERK5.

<i>Via della MAPK</i>	<i>ERK1 / ERK2</i>	<i>JNK / SAPK</i>	<i>P38 / HOG</i>	<i>ERK5</i>
<i>MAPKKK</i>	Raf-A, Raf-B, Mos MEKK1, MEKK2, MEKK3, Tpl-2	MEKK1,MEKK2 MEKK3,MEKK4 TAK1, MUK, Tpl-2, SPRK, ASK1, MST	TAK1, TAK2, SPRK, PAK	?
<i>MAPKK</i>	<i>MEK1, MEK2</i>	<i>MKK4, MKK7</i>	<i>MKK3, MKK6</i>	<i>MKK5</i>
<i>MAPK</i>	ERK1, ERK2	JNK1, JNK2, JNK3	p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ	ERK5

Tabella n°1
Schema delle varie vie delle MAPK e delle chinasi in esse coinvolte.

Una volta attivate dalla chinasi upstream, le MAPK possono agire a livello citoplasmatico, fosforilando altre proteine chinasi, come PLA₂ o proteine associate al citoscheletro, oppure possono traslocare nel nucleo e attivare numerosi fattori di trascrizione e quindi l'espressione genica. Tali fattori sono coinvolti nella proliferazione, nel differenziamento, nella regolazione del ciclo cellulare, nelle risposte d'adattamento allo stress ambientale e nell'apoptosi.

Come già descritto in precedenza la sequenza consensus per il taglio da parte di LF è costituita da B-B/P-B-(X)_{3,4}-Al, dove con B si intende un residuo basico, P la prolina, X un aminoacido qualsiasi e con Al un residuo alifatico. Questa sequenza è simile a quella descritta come sito di legame per le MAPK, o al motivo di interazione chinasi KIM [17]. La MEK 5 contiene il motivo KIM, ma non è tagliata da LF, questo suggerisce che ci siano altre regioni importanti per il riconoscimento del substrato da parte del fattore letale.

Gli effetti sull'attività delle MEK, tranne per MEK 1 e 2 che vengono inattivate, non sono ancora ben caratterizzati. Comunque la perdita del motivo KIM conduce all'inattivazione del pattern trasduzionale impedendo l'interazione con le

MAPK. E' stato evidenziato come anche uno dei gruppi delle MAPK sia bersaglio di LF, quello delle ERK [8], mentre per le altre gli effetti non sono stati determinati; è da notare come l'interazione con le MAPK possa influenzare il grado di accessibilità delle MEK ad LF.

1.5 ATTIVITA' IMMUNOSOPPRESSIVE DELLA TOSSINA DI ANTRACE

Sia la tossina letale che quella edematosa sono in grado di influenzare la cascata del segnale intracellulare, ma l'effetto finale dell'intossicazione dipende dal tipo di cellula colpita e dal suo stato di attività. Recenti studi mettono in luce il ruolo di queste tossine come agenti immunosoppressivi, sia nei confronti della risposta immunitaria innata, che di quella adattativa.

Le tossine di antrace sono in grado di influenzare diversi tipi di cellule immunitarie incluso macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche e linfociti. In aggiunta è stata messa in evidenza una forte interazione di tipo sinergistico tra EF ed LF nei linfociti T e nelle cellule dendritiche.

Le spore che penetrano negli alveoli per via inalatoria vengono ingerite dalle locali cellule fagocitiche e una piccola percentuale di esse riesce a germinare nei compartimenti endocitici attraverso un processo ancora sconosciuto. Allo stesso tempo le cellule fagocitiche, che contengono le spore germinanti, migrano verso i linfonodi. Se i batteri sono capaci di attraversare la barriera fisica ed immunologica linfonodale possono diffondere nella circolazione linfatica e da lì in quella sanguigna, dove possono moltiplicarsi indisturbati, grazie alla capsula che previene la fagocitosi. La ragione per la quale le spore di antrace che penetrano nelle ferite cutanee solitamente non danno origine ad un'invasione batterica della circolazione sanguigna sistemica, come invece accade per la forma inalatoria di antrace, non è conosciuta.

La somministrazione per via endovenosa della tossina letale da sola è in grado di causare la morte di differenti specie animali, mentre la tossina edematosa è meno tossica e causa edema tessutale.

Il tipo cellulare che mostra il fenotipo più marcato dopo intossicazione con LF è il macrofago (i macrofagi di alcune specie animali vengono uccisi da LF). Tuttavia più in generale la tossina di antrace sta emergendo come agente immunosoppressivo, e questa attività sembra giocare un ruolo fondamentale nella

patologia dell'antrace, in quanto permette a *B. anthracis* di oltrepassare le difese dell'ospite ed invadere rapidamente l'organismo.

1.5.1 I macrofagi

Gli effetti della tossina di antrace sui macrofagi vanno dalla necrosi cellulare indotta da tre ore di intossicazione con la tossina letale nella linea cellulare Raw 264.7 e J774, all'apoptosi indotta nei macrofagi precedentemente stimolati con LPS o TNF α . E' stato proposto che la morte dell'ospite provocata da antrace sia dovuta al massiccio rilascio di sostanze infiammatorie dai macrofagi morenti; in più la diversa suscettibilità di differenti specie animali alla tossina letale sembra essere correlata alla sensibilità dei macrofagi di quella specie nei confronti della tossina stessa. Quest'ipotesi, tuttavia, è stata confutata dal lavoro di Moayeri et al. del 2003, che mostrava come il processo di morte indotto dalla tossina letale fosse in realtà simile nei topi con macrofagi sensibili e non. Inoltre è stato documentato come la tossina letale a basse dosi inibisca piuttosto che stimolare il rilascio di fattori infiammatori sia nei macrofagi, che nelle cellule dendritiche.

1.5.2 Le cellule dendritiche

L'effetto della tossina letale sulle cellule dendritiche è stato studiato in dettaglio solo di recente. Cote et al. nel 2004 ha dimostrato come i macrofagi non siano essenziali affinché si stabilisca l'infezione di *B. anthracis*, il che suggerisce un possibile ruolo di altre cellule fagocitiche, tra le quali le cellule dendritiche hanno le caratteristiche adatte a farne un potenziale veicolo per la disseminazione dei patogeni. Si è inoltre scoperto che le spore di antrace vengono efficientemente fagocitate dalle cellule dendritiche, dove sono in grado di germinare e rilasciare la tossina. Dopo l'ingestione delle spore le cellule dendritiche maturano esponendo molecole costimolatorie. La tossina di antrace di fatto non ostacola la maturazione di queste cellule, ma ne riduce la secrezione di citochine.

1.5.3 I linfociti

L'attivazione e la proliferazione delle cellule T risulta inibita da entrambe le tossine di antrace. Sia la tossina letale che quella edematosa inibiscono il rilascio

delle citochine TNF- α , INF- γ , IL-2 e IL-5; EdTx in particolare è in grado di interrompere le cascate di fosforilazione di JNK ed ERK, che regolano l'espressione di citochine. Questo accade perché un'alta concentrazione di cAMP inibisce Rac e Raf, che sono le chinasi a monte della cascata di JNK ed ERK rispettivamente.

L'inibizione del priming dei linfociti T potrebbe giocare un ruolo importante nel rallentare la risposta immunitaria adattativa nell'antrace cutaneo.

1.6 INIBIZIONE ED USO TERAPEUTICO DELLA TOSSINA DI ANTRACE

Una delle sfide chiave nel trattamento medico dell'antrace è l'inibizione della tossina del batterio. L'uso di anticorpi policlonali diretti contro il PA, ha dimostrato di conferire una moderata protezione nel ceppo di maiali *guinea pigs* nei confronti dell'infezione con *B. anthracis* [6].

Selezionando un peptide da una libreria con la tecnica del phage-display, è stato disegnato un inibitore sintetico capace di competere con LF per il legame all'eptamero di PA. Legando molte copie di questo peptide in uno scheletro di poliacrilamide, è stata ottenuta una molecola polivalente in grado di prevenire l'intossicazione di ratti cimentati con la tossina letale purificata. Questo approccio potrebbe essere utilizzato con successo nella progettazione di inibitori di altri fattori di virulenza oligomerici.

Ratti cimentati con la tossina letale sono risultati da questa protetti anche dopo iniezione di un mutante di PA per alcuni residui, che sporgono nel lume del poro formato da questa molecola. Questi mutanti sono in grado di legarsi alla cellula, di oligomerizzare e di legare LF, ma sono incapaci di formare canali e di conseguenza di traslocare il fattore letale. I mutanti co-oligomerizzano con il PA wt, esibendo un fenotipo dominante negativo: evidenze sperimentali suggeriscono che basti una molecola di mutante per eptamero per abolire le capacità di traslocazione di quest'ultimo. Inoltre questi mutanti di PA se mescolati con un adiuvante e somministrati intramuscolarmente nei ratti sono in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva nei confronti della tossina letale purificata.

L'identificazione dei recettori per la tossina di antrace, inoltre, apre la strada ad un approccio alternativo nel disegno di nuovi inibitori: di fatto una versione solubile del recettore potrebbe essere in grado, infatti, di competere coi recettori sulla

membrana plasmatica cellulare per il legame al PA, inibendo così l'azione della tossina.

Studi recenti hanno suggerito che la tossina di antrace potrebbe avere un uso terapeutico per il cancro: la scoperta che LF taglia le MAPKK, regolando così la via delle MAPK, suggerisce che la tossina letale possa avere un'utilità terapeutica nei confronti delle cellule tumorali in cui le MAPK sono attivate da proteine oncogeniche come Ras. In aggiunta è stato visto come la tossina letale sia in grado di ridurre notevolmente la neovascolarizzazione del tumore, che costituisce un fattore cruciale nella crescita e nella diffusione dello stesso.

Un altro approccio tentato è stato quello di ingegnerizzare una molecola di PA di modo che il sito di taglio per la furina, sia rimpiazzato da un sito di riconoscimento per una metalloproteasi di matrice, una classe di proteasi di membrana sovraespressa in molti tessuti e linee cellulari tumorali. Il mutante viene somministrato assieme ad una proteina di fusione costituita dal dominio N-terminale di LF fusa con il dominio ADP-ribosilante della esotossina A di *Pseudomonas Aeruginosa*, che è in grado di bloccare la sintesi proteica all'interno della cellula tumorale. Il vantaggio di questo approccio consiste nel fatto che solo le cellule tumorali sovraesprimenti queste metalloproteasi di matrice, dovrebbero essere in grado di processare e quindi attivare il mutante di PA.

2. MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

Il plasmide utilizzato per i clonaggi della MKK6 e di LF EY è il pRSETa della Invitrogen; altri plasmidi utilizzati già presenti in laboratorio sono il plasmide pGEX 2TK e pET20b della Novagen. Per l'amplificazione dei costrutti è stato utilizzato il ceppo di *E. Coli* XL-1 Blue, mentre per l'espressione delle proteine sono stati utilizzati i ceppi di *E. Coli* della Stratagene Rosetta (DE3), BL 21 (DE3), BL 21 (DE3) Codon Plus RIL, BL 21 (DE3) Codon Plus RP e BL 21 (DE3) pLysS . Il mezzo di coltura delle cellule batteriche è LB (Luria Bertani: Tryptone 10g/L, estratto di lievito 5g/L, NaCl 10 g/L) in forma liquida o solida (con aggiunta di 1,5% di agar). Gli antibiotici utilizzati per la coltivazione dei ceppi batterici e la selezione dei costrutti positivi dopo ligazione (ampicillina 100 µg/ml e cloramfenicolo 34 µg/ml) sono prodotti SIGMA.

Tutti gli enzimi di restrizione, i loro relativi tamponi, e la ligasi, utilizzati nelle tecniche di biologia molecolare sono prodotti New England Biolabs. Per l'estrazione di DNA plasmidico da coltura batterica è stato usato il kit “*Perfecto Prep Plasmid Mini*” della Eppendorf, mentre per la purificazione di DNA da gel di agarosio si è utilizzato il Kit “*Perfecto Prep Gel Clean Up*”, sempre della Eppendorf.

Gli inibitori di proteasi sono del kit COMPLETE™ mini EDTA free (Roche).

Le soluzioni di acrilamide/bis-acrilamide e i tamponi necessari alla preparazione dei gel per la SDS PAGE sono prodotti della National Diagnostic, mentre la soluzione colorante per i gel Simply Blue è un prodotto Invitrogen.

Le apparecchiature per le corse elettroforetiche sono prodotti Biorad, mentre per il Western Blot son stati usati gel precast della Invitrogen (che vende anche i tamponi di corsa e blottaggio). La nitrocellulosa è un prodotto Schleicher & Schuell, mentre i liquidi per la rivelazione sono della Amersham Pharmacia Biotec.

Tutti i reagenti chimici utilizzati sono prodotti SIGMA o FLUKA.

2.2 VETTORI DI ESPRESSIONE GENICA IN *E. COLI*

Preparazioni arricchite da una specifica proteina sono raramente facilmente ottenibili dalla cellula che la produce naturalmente, di conseguenza la produzione di proteine ricombinanti è frequentemente la sola procedura applicabile. *E. Coli* si dimostra un potente mezzo per l'espressione di proteine a causa della sua relativa semplicità, del suo basso costo e della sua capacità di essere coltivato velocemente e ad alta densità, la vasta conoscenza della sua genetica e il consistente numero di metodologie di biologia molecolare utilizzabili.

Gli elementi genetici di un plasmide di espressione includono l'origine di replicazione (ori), un marker di resistenza ad un antibiotico, un promotore trascrizionale, una regione di inizio della traduzione (TIRs) e un terminatore sia della trascrizione che della traduzione. Il numero di copie del plasmide è controllato dall'origine di replicazione; gli attuali sistemi di espressione in *E. Coli* si caratterizzano in genere per un alto numero di copie, si replicano stabilmente e se mantenuti sotto pressione selettiva raramente si hanno cellule figlie prive di plasmide.

La resistenza all'ampicillina si ottiene con l'espressione della β -lattamasi dal gene *bla*: questo enzima viene secreto nel periplasma, dove catalizza l'idrolisi dell'anello β -lattamico dell'antibiotico. La kanamicina e il cloramfenicolo interferiscono con la sintesi proteica legandosi in aree critiche del ribosoma; la kanamicina è inattivata nel periplasma dalla aminoglicoside fosfotransferasi, mentre il cloramfenicolo lo è dal prodotto del gene *cat*, la cloramfenicol acetil transferasi.

I vettori per l'espressione di proteine ricombinanti richiedono un forte promotore trascrizionale, in grado di controllare una espressione genica di alto livello; la trascrizione basale in assenza dell'induttore viene minimizzata con la presenza di un adatto repressore. L'induzione del promotore può essere di tipo termico o chimico e l'induttore più comune è una molecola zuccherina, l'*isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside* (IPTG).

L'inizio della traduzione dalla regione TIR del RNA messaggero richiede un sito di legame al ribosoma (RBS), che include la sequenza Shine-Dalgarno (SD) e il codone di inizio della traduzione, che negli efficienti vettori di espressione è il canonico AUG. La sequenza SD che assicura il migliore inizio della traduzione è UAAGGAGG. La struttura secondaria del RBS, inoltre, è molto importante e l'efficienza massima viene raggiunta utilizzando un elevato contenuto di adenine e

timine. La terminazione della traduzione è mediata in *E. Coli* preferibilmente dal codone di stop UAA.

2.2.1 Fattori che influenzano il livello di espressione

Esiste una serie di fattori che influenzano il livello di espressione di una proteina esogena in *E. Coli*, come la natura del promotore trascrizionale, le sequenze di terminazione, la forza dei siti di legame al ribosoma, il numero di copie del gene clonato ed infine l'efficienza di traduzione e la stabilità intrinseca del gene nella cellula ospite.

Come già descritto in precedenza, per quanto riguarda il promotore si tende ad usarne uno forte ma inducibile: la ragione di tale scelta risiede nella necessità di evitare che le cellule batteriche dirottino le proprie risorse energetiche alla produzione della proteina ricombinante prima di avere raggiunto una densità cellulare sufficiente ad un'espressione soddisfacente della stessa. L'espressione prematura della proteina, infatti, diminuirebbe la velocità di crescita batterica, e allo stesso tempo favorirebbe la selezione positiva dei cloni non esponenti il costrutto.

Per quanto concerne la fase di traduzione, oltre alla presenza di un forte sito di legame ai ribosomi, è necessario progettare il vettore in modo da prevenire la formazione di strutture secondarie nel trascritto e assicurarsi che il codone di inizio della traduzione sia collocato alla giusta distanza dal sito di legame al ribosoma.

Esiste un'ulteriore difficoltà che nasce dalla ridondanza del codice genetico, ovvero dal fatto che uno stesso amminoacido possa essere codificato da diverse triplette di basi. Ogni organismo utilizza un set preferenziale di codoni, cosicché alcuni altri possono risultare rari; questo fenomeno è conosciuto come *codon usage pattern* [18]. Il problema sorge qualora il *codon usage pattern* del gene che si vuole esprimere sia molto diverso da quello della cellula ospite; l'espressione di geni contenenti codoni rari può portare ad errori della traduzione, ma anche risultare in uno stallo del ribosoma in una posizione che richiede l'intervento di un amminoacido accoppiato con un tRNA raro. Gli errori di traduzione che sorgono da una differenza di pattern di utilizzo dei codoni includono sostituzioni amminoacidiche, eventi di spostamento del frame di lettura o premature interruzioni della traduzione. I codoni più problematici sono codificati dai prodotti dei geni *argU* (AGA e AGG), *argX* (CGG), *argW* (CGA e CGG), *ileX* (AUA), *glyT* (GGA), *leuW* (CUA), *proL* (CCC) e *lys* (AAG). Tra tutti questi codoni rari ci si è concentrati soprattutto sui due codoni

per l'arginina AGG e AGA, che sono presenti in *E. Coli* alle frequenze rispettivamente di $\sim 0,14$ e $\sim 0,21$ %.

E' possibile ovviare a questo inconveniente 'ottimizzando i codoni', ovvero trasformando la cellula batterica con plasmidi codificanti tRNA per i codoni rari. Sono disponibili diversi plasmidi per la coespressione dei tRNA rari, la maggior parte dei quali sono basati sull'origine di replicazione di p15A. Un altro possibile approccio consiste nell'utilizzo della tecnica della mutagenesi sito specifica per sostituire un codone raro nel gene di interesse con uno più comunemente utilizzato dalla cellula ospite.

2.2.2 Fattori che influenzano la conformazione e la stabilità di una proteina

La proteina ricombinante può andare incontro a diversi destini nella cellula ospite. Situazioni di stress come lo shock termico possono pregiudicare il corretto folding della proteina e gli intermedi non del tutto correttamente strutturati hanno la tendenza ad associarsi in granuli proteici amorfi chiamati corpi di inclusione. Poco è conosciuto a riguardo di questi corpi di inclusione e del loro meccanismo di formazione, ma si sa che si formano spesso in risposta allo stress, nei casi in cui la proteina ricombinante venga espressa ad alti livelli. La teoria più accreditata è che questi aggregati proteici si formino a causa di interazioni idrofobiche tra regioni esposte non strutturate della proteina.

La tendenza all'aggregazione in un sistema di espressione di proteine ricombinanti può essere minimizzata attraverso il controllo di parametri come la temperatura, il livello di espressione, il metabolismo della cellula ospite, l'ingegnerizzazione della proteina ricombinate con un *tag* che ne aumenti la solubilità, o con la coespressione di plasmidi codificanti per *chaperonine*. Le proteasi dell'ospite sono direttamente coinvolte nella degradazione delle proteine non strutturate aggregate nei corpi di inclusione o ad essi associate attraverso interazioni idrofobiche.

E' possibile purificare gli aggregati proteici e solubilizzarli attraverso l'uso di detergenti come l'urea e il guanidinio; la proteina può poi essere portata a riprendere la sua conformazione nativa per diluizione, dialisi o attraverso metodi che prevedano il refolding in colonna della stessa.

L'emivita di una proteina ricombinante all'interno della cellula ospite può variare da alcuni minuti a diverse ore; tale stabilità differenziale può essere dovuta

alla presenza di ponti disolfuro e di determinati aminoacidi all'estremità N-terminale: aminoacidi come la metionina, la serina e l'alanina possono conferire stabilità alla proteina.

2.2.3 Produzione delle proteine di interesse come proteine di fusione

Per semplificare la purificazione e l'espressione di proteine ricombinanti è stata sviluppata un'ampia gamma di partner di fusione, chiamati “tag”. La maggior parte di questi tag di fusione sono progettati per una specifica strategia di purificazione per affinità.

I partner di fusione, inoltre, spesso hanno anche il vantaggio di proteggere la proteina ricombinante dalla proteolisi intracellulare, di aumentarne la solubilità o di poter essere utilizzati come specifici indicatori di espressione.

I partner di fusione più comuni sono il tag di poliistidine (His-tag), che si abbina ad una strategia di purificazione basata su una colonna cromatografica in grado di immobilizzare ioni metallici, e la glutatione S-transferasi (GST), per la quale si utilizzano resine contenenti il suo substrato naturale, il glutatione.

Spesso è desiderabile separare la proteina ricombinante dal partner di fusione; tale obiettivo è in genere raggiunto mediante una proteolisi sito specifica in vitro della proteina di fusione utilizzata, che sfrutta l'inserzione tra il tag e la proteina stessa di una sequenza contenente il sito di riconoscimento di una proteasi specifica. Due proteasi seriniche, appartenenti alla cascata di coagulazione del sangue, sono le più utilizzate a tale scopo, ovvero il *fattore Xa* e la *trombina*. Il fattore Xa taglia la sequenza aminoacidica IEGR/X, dove X può essere un qualsiasi amminoacido eccetto l'arginina e la prolina, mentre la trombina riconosce la sequenza LVPR/G. Un'altra proteasi estensivamente usata e maggiormente specifica è l'*enterochinasi*, il cui sito di taglio è DDDDK/X, dove X può essere un qualsiasi amminoacido fatta eccezione per la prolina.

2.3 CARATTERISTICHE DEI VETTORI DI ESPRESSIONE UTILIZZATI

2.3.1 pET20b

Questo vettore permette l'espressione di una proteina ricombinate con una coda di istidine C – terminale; il sistema di induzione di questo plasmide si basa sulla presenza del promotore T7.

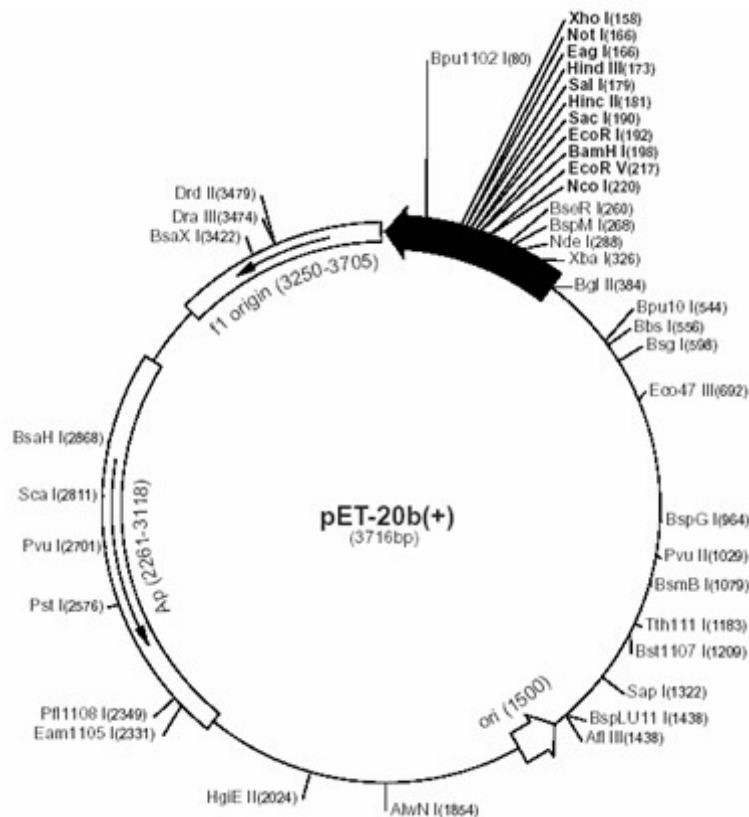


Figura n°5
Mappa del plasmide pET20b.

L'espressione con questo tipo di vettore richiede un ceppo batterico ospite lisogenizzato da un frammento fagico, codificante per la T7 RNA polimerasi (gene 1 del batteriofago T7), sotto il controllo del promotore *LacUV5* inducibile con IPTG. LacI reprime il promotore *LacUV5* e il promotore ibrido T7/lac codificato dal plasmide di espressione. Una copia di del gene *LacI* è presente nel genoma di *E. Coli*.

La T7 RNA polimerasi è trascritta quando l'IPTG si lega il tetramero di LacI, determinandone il distacco dall'operatore *lac*. La trascrizione del gene target a partire dal promotore ibrido T7/lac può quindi essere iniziata ad opera della T7 RNA polimerasi.

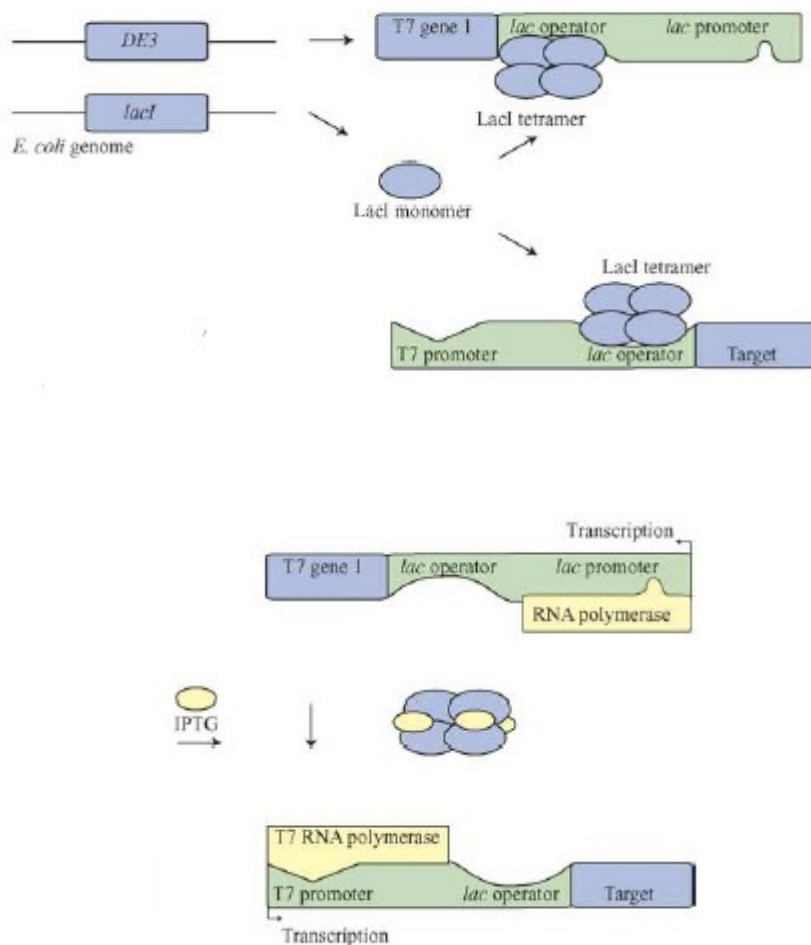


Figura n°6
Meccanismo di funzionamento del sistema di espressione inducibile della T7 RNA polimerasi.

2.3.2 *pRSETa*

Questo vettore è disegnato per dare una forte espressione genica del costrutto che vi viene clonato; ciò è reso possibile dalla presenza del promotore T7. L'inserto di DNA viene posizionato downstream ed in frame con una sequenza che codifica per un peptide di fusione N-terminale, che include un codone di inizio della traduzione, ATG, un tag di poli-istidine, una sequenza che stabilizza il trascritto ricavata dal gene 10 del fago T7, l'epitopo XpressTM, e la sequenza di taglio della enterochinasi.

Il tag di 6 istidine si configura come un dominio di legame per i metalli e permette una purificazione della proteina ricombinante mediante cromatografia di

affinità con una colonna che presenti ioni metallici immobilizzati. La sequenza di taglio per l'enterochinasi permette la rimozione della coda di istidine dalla proteina purificata.

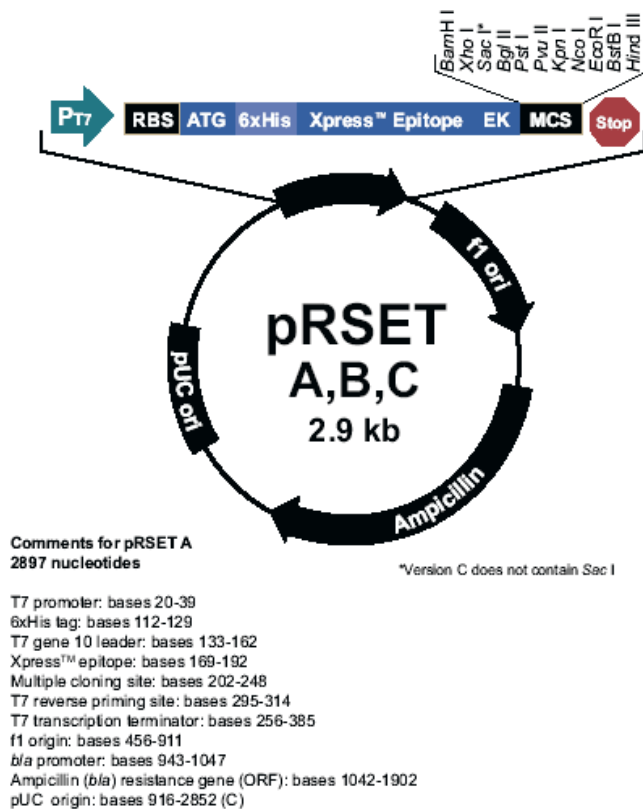


Figura n°7
Mappa del plasmide pRSETA

2.3.3 pGEX 2TK

La caratteristica principale di questo plasmide è che la proteina di interesse è espressa come proteina di fusione con l'enzima glutatione S-transferasi, il cui gene si trova a monte del sito di clonaggio. Una volta purificata la proteina di interesse, è possibile rimuovere la proteina di fusione mediante proteolisi con *trombina*. Sono inoltre presenti il gene della β -lattamasi che conferisce la resistenza all'ampicillina e il gene del repressore *lac*.

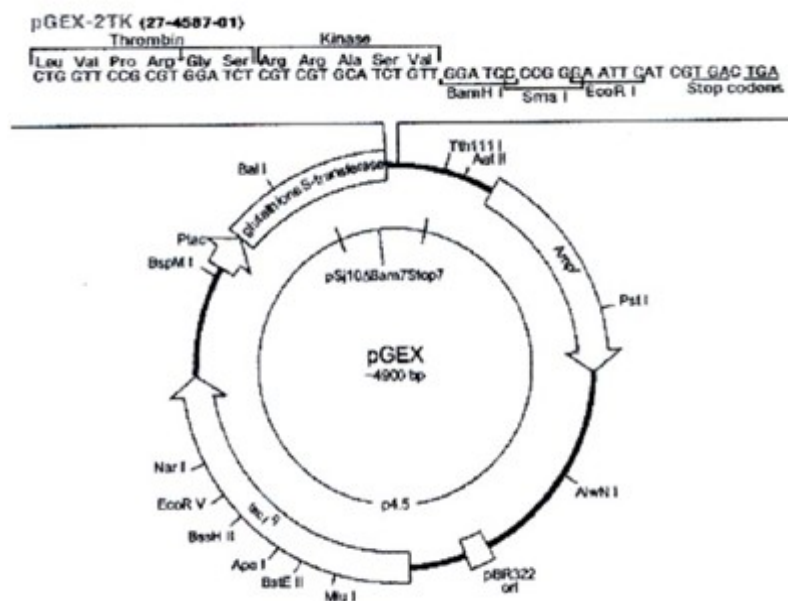


Figura n°8
Mapa del plasmide pGEX 2TK.

2.4 CARATTERISTICHE DEI CEPPI DI *E. COLI* UTILIZZATI

Un ceppo di espressione ideale dovrebbe mancare delle proteasi endogene più dannose, mantenere stabile l'espressione plasmidica e fornire gli elementi genetici rilevanti per il sistema di espressione che si vuole utilizzare. Lontano dalla idealità esiste oggi una serie di ceppi vantaggiosi per applicazioni individuali.

Il ceppo di *E. Coli* **BL21 (DE3)**, deriva dal ceppo BL21, che si è dimostrato adatto alle normali esigenze di espressione di proteine ricombinanti: è infatti un ceppo robusto, capace di crescere vigorosamente in terreni minimi e non è patogeno. Il ceppo BL21 manca di *ompT* e *lon*, due proteasi che possono interferire con l'integrità delle proteine ricombinanti. Il prodotto del gene *lon*, infatti, è una proteasi ATP dipendente, facente parte del meccanismo di risposta allo shock termico, che gioca un ruolo importante nell'eliminazione di proteine con un folding non corretto, la cui assenza determina una maggiore stabilità di alcune proteine [19]. Il prodotto del gene *ompT*, invece è una proteasi extracellulare, che può degradare la proteina di interesse durante la fase di purificazione della stessa [20]. La sigla DE3 fa riferimento al sistema di espressione basato sulla T7 polimerasi batterica.

Il ceppo **BL21 – Codon Plus (DE3) RIL**, in aggiunta alle già citate caratteristiche delle BL21 (DE3), possiede un plasmide contenente copie aggiuntive

dei geni che codificano per i tRNA corrispondenti alle triplette AGA/AGG, AUA e CUA, necessari alla traduzione di messaggeri trascritti da geni provenienti da organismi con genomi ricchi in AT, come quello di *B. anthracis*.

Il ceppo della Novagen **Rosetta** è un ceppo derivato dalle BL21, in particolare dal ceppo Tunner, che è caratterizzato da una mutazione della *lac* permeasi, che consente un ingresso uniforme di IPTG: questo produce una induzione omogenea direttamente proporzionale alla concentrazione di IPTG. La caratteristica principale di questo ceppo è la presenza di un plasmide che codifica per i tRNA corrispondenti ai codoni AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA: si tratta di una combinazione per arricchire in quei tRNA tipici di un genoma ricco in AT.

Il ceppo **Rosetta(DE3)**, alle caratteristiche sopra elencate delle Rosetta, aggiunge un sistema di espressione basato sulla T7 RNA-polimerasi batterica [21].

2.5 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

2.5.1 Clonaggio della MKK6 stop in LF 3 dom 687 - pRSETa

Il gene codificante per la MKK6 è stato clonato nel costrutto già presente in laboratorio LF 3 dom 687 – pRSETa. Il frammento genico è stato amplificato per PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizzando il costrutto MKK6 stop – pET20 come template. I primers utilizzati sono i seguenti:

Forward: 5' – AAACATATGTCTCAGTCGAAAGGC – 3'

Reverse: 5' – AAACGAGTTAGTCTCCAAGAATCAGTTT – 3'

La reazione è stata condotta in presenza dell'enzima Taq-DNA polimerasi (Fermentas), in tampone costituito da 10 mM Tris-HCl a pH 8, 50mM KCl, 0,8%, aggiunto di MgCl₂ 2,5 mM, DMSO al 2 %, e dNTP in miscela 1 mM ciascuno.

Programma dei cicli della PCR

Ciclo	Step	Durata	Temperatura
1	denaturazione	5'	95°C
2	denaturazione	15"	94°C
	appaiamento	30"	45°C
	elongazione	1' 30"	72°C
3	denaturazione	5'	94°C
	appaiamento	15"	50°C
	elongazione	1' 30"	72°C
4	elongazione	7'	72°C

Il secondo ciclo è stato ripetuto 10 volte, il terzo 20 volte; il totale dei cicli eseguiti dal termociclatore è 32. L'ultimo passaggio di elongazione a 72°C per 7 minuti ha lo scopo di favorire la completa estensione ed appaiamento dei frammenti di DNA.

Dopo aver verificato la presenza della banda dell'amplificato su gel di agarosio, si è proceduto all'estrazione del DNA della banda stessa con l'uso del kit della Eppendorf "gel clean up kit".

Si è proceduto, quindi, alla restrizione del prodotto di PCR per tutta la notte a 37°C con gli enzimi Kpn I e Bgl 2, quelli scelti per il clonaggio dell'insero nel costrutto LF 3 dom – pRSETa. Questa operazione ha lo scopo di assicurarsi che il prodotto di PCR abbia le estremità appiccicose libere e disponibili per la successiva ligazione in pRSETa. Per lo stesso motivo anche il costrutto LF 3 dom 687 – pRSETa viene digerito con gli stessi enzimi per 4h a 37°C. Dopo l'incubazione con Kpn I e Bgl 2 si è incubato ulteriormente il vettore per un'ora con la CIP (alkaline phosphatase, calf intestinal, BioLabs), che defosforila le estremità 5' tagliate del plasmide, in modo da essere sicuri che non ricircolarizzi. La ligasi, basandosi sull'estremità 5' del prodotto di PCR, non trattata con la CIP e quindi avente un fosfato, potrà legare l'insero nel vettore, lasciando solo due nick, che verranno richiusi da *E. Coli* nel passaggio di amplificazione del costrutto seguente alla ligazione. I frammenti di amplificazione digeriti, così come il vettore sono stati

visualizzati su di un gel preparativo di agarosio e purificati con il kit della Eppendorf “*gel clean up kit*”.

Il vettore ed il frammento da PCR digeriti sono stati sottoposti a reazione di ligazione in rapporto 1:3 utilizzando l'enzima T4-DNA ligasi (Fermentas) in Tris-HCl 40 mM, MgCl₂ 10 mM, DDT 10 mM, ATP 5 mM, a pH 7,8, a 22°C per 1 ora e il prodotto di ligazione è stato, poi, trasformato in un ceppo di *E. Coli*, le XL1 blue, per l'amplificazione dello stesso.

Il giorno dopo si sono fatti degli inoculi da singole colonie della piastra di trasformazione, dai quali poi sono state preparate delle miniprep con il kit “*perfectoprep plasmid mini*” della Eppendorf. Si è quindi proceduto alla digestione delle miniprep con Kpn I e Bgl 2 per verificare l'avvenuto clonaggio dell'inserito con una corsa su gel di agarosio.

2.5.2 Sub-clonaggio del gene per il mutante *LF EY* in *pRSETa*

LF EY è clonato in pGEX 2TK tra due siti di Bam HI; per trasferire l'inserito in pRSETa è bastato perciò digerire il costrutto con Bam HI per 2h a 37°C e ligare il prodotto di digestione in pRSETa linearizzato sempre con Bam HI per 2h a 37°C e digerito con la CIP per 1h a 37°C (passaggio molto importante nel caso specifico perché il vettore è stato digerito con un unico enzima di restrizione e le probabilità che ricircularizzi sono perciò alte). Prima della ligazione si è verificata l'avvenuta digestione dell'inserito e del vettore con una corsa su un gel di agarosio preparativo; dopo aver exciso la banda dell'inserito e quella di pRSETa linearizzato, le si è purificate col kit “*gel clean up*” della Eppendorf. La ligazione è stata effettuata con il protocollo descritto in precedenza.

Dopo aver operato la ligazione dell'inserito nel nuovo vettore si sono trasformate le X11 Blue con il prodotto di ligazione e il giorno seguente sono state preparate delle miniprep dagli inoculi di singole colonie prese dalla piastra della trasformazione con il kit “*perfectoprep plasmid mini*” della Eppendorf.

Avendo utilizzato un unico enzima di restrizione per clonare l'inserito, questo poteva essersi inserito sia in posizione corretta che girato. Occorreva, quindi, verificare il corretto inserimento utilizzando un enzima di restrizione in grado di tagliare dentro l'inserito, ma non nel vettore: l'enzima scelto per tale verifica è Pst I, il quale taglia l'inserito a 900 basi dal suo inizio. La digestione con Pst I è stata operata per 2h a 37°C.

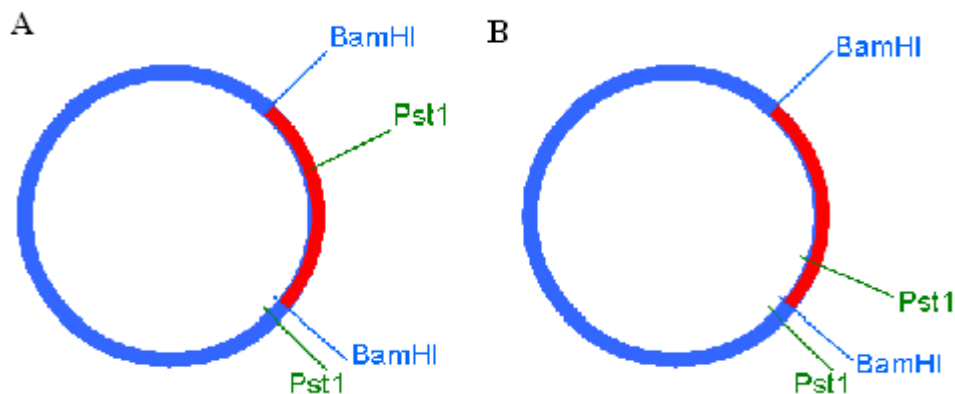


Figura n°9

Schema di taglio di Pst I all'interno del costruito nel caso che l'inserimento sia avvenuto nella posizione corretta o meno. Il plasmide contiene 2900 basi, l'inserto 2300. Siccome Pst I taglia a 900 bp dall'inizio dell'inserto, nel caso in cui l'inserimento sia stato corretto (figura A) si avranno in gel una banda di 3800 bp (2900 del plasmide e 900 dell'inserto) ed una di 1400 bp (2300 – 900). Viceversa (figura B) si osserveranno una banda di 4300 bp (2900 del vettore e 1400 dell'inserto) ed una di circa 1000 bp.

2.5.3 Separazione dei frammenti di DNA mediante elettroforesi in gel di agarosio

Le corse elettroforetiche sono state effettuate su gel di agarosio all'1%; per preparare i gel è necessario aggiungere il colorante *SYBR safe DNA stain* e sciogliere l'agarosio in concentrazione 1% w/v in tampone TAE (40 mM tris, 25 mM sodioacetato, 0,5 mM EDTA, 0,1% di acido acetico glaciale). Il tutto deve essere riscaldato al microonde finché l'agarosio non si è sciolto completamente. Il colorante è un intercalante del DNA e, essendo fluorescente, quando irradiato da luce U.V. permette la visualizzazione delle bande sul gel. Ai campioni è stato aggiunto un buffer di caricamento, il 6X *Loading Dye Buffer* (Biolabs) contenente 0,03% di blu di bromo fenolo, 0,03% di xilene cianolo e 10% di glicerolo, per favorire il depositarsi dei campioni nel fondo dei pozzetti e per visualizzare le bande durante la corsa. L'utilizzo di *markers* di riferimento si rende necessario per valutare il numero di basi di cui è costituito il DNA che si sa analizzando.

La corsa elettroforetica viene effettuata ad un voltaggio di 80 volt per circa 45 minuti. Si può allestire una corsa analitica o preparativa variando lo spessore del gel, mentre è possibile ottenere una migliore separazione delle bande variando la percentuale in w/v di agarosio.

2.5.4 Preparazione delle cellule competenti

Il ceppo batterico di interesse viene piastrato su LB-agar e lasciato crescere tutta la notte a 37°C. Una singola colonia viene, poi, presa dalla piastra e inoculata in 50 ml di LB. Si fa crescere la coltura batterica fino al raggiungimento della fase stazionaria (overnight) a 37°C e a 180 rpm. I batteri vengono, quindi, diluiti 1:100 in 200 ml di LB e incubati a 37°C e 180 rpm (giri per minuto), fino al raggiungimento di una densità ottica pari a 0.375 (la si legge allo spettrofotometro con una lunghezza d'onda di 600 nm). La sospensione batterica viene, dunque, aliquotata in 4 tubi da 50 ml preraffreddati e lasciata in ghiaccio per 5-10 minuti per arrestare la crescita; viene poi centrifugata a 4°C per 7 minuti a 1600g. Ogni pellet così ottenuto viene risospeso in 10 ml di una soluzione di CaCl₂ 100 mM, mantenuto in ghiaccio per 30 minuti e centrifugato per 5 minuti a 1100g a 4°C. Infine il pellet di questa centrifugazione è risospeso in 2 ml di CaCl₂ 100 mM con glicerolo al 15% e aliquotato in tubi sterili. Le varie aliquote devono essere congelate immediatamente a -80°C e possono essere conservate in tal modo per alcuni mesi.

L'efficienza di trasformazione varia da 10⁶ a 10⁸ colonie per µg di DNA utilizzato.

2.5.5 Trasformazione delle cellule competenti

Un'aliquota di cellule competenti viene scongelata lentamente in ghiaccio; successivamente vi viene aggiunto 1 µl di DNA plasmidico (una concentrazione ottimale del plasmide è compresa tra 1 mg/ml e 10 µg/ml: dal momento che servono almeno 10 ng di plasmide per la trasformazione, nell'ipotesi di avere la diluizione più spinta, cioè 10 µg/ml, ne serve almeno 1 µl), o 5 µl di miscela di ligazione, mescolando delicatamente. La sospensione viene incubata in ghiaccio per 30 minuti. Si pratica, quindi, uno shock termico ponendo le cellule a 42°C per 30 secondi e poi di nuovo in ghiaccio per due minuti. In seguito vengono aggiunti da 250 a 500 µl di LB e i batteri vengono incubati a 37° a 180 rpm per un'ora, allo scopo di ripristinare la loro vitalità. In fine si piastra su LB-agar in presenza degli opportuni antibiotici, che permettono la selezione di quei cloni che hanno incorporato il plasmide di interesse.

5.6 TECNICHE BIOCHIMICHE

2.6.1 Elettroforesi in gel di poliacrilammide in presenza di SDS

La SDS PAGE è una tecnica che permette la separazione di proteine in un campo elettrico in base alle loro dimensioni. Si opera in condizioni denaturanti, trattando il campione con sodio-dodecil-solfato (SDS), un detergente anionico in grado di rompere le interazioni non covalenti delle proteine, e β mercaptoetanolo, agente riducente per i ponti disolfuro. In media una molecola di SDS si inserisce ogni due residui amminoacidici: il rapporto carica - massa nativo delle proteine presenti nel campione è quindi reso uniforme dal detergente per tutte le molecole proteiche, permettendo una separazione in base al peso delle stesse.

Per tutte le corse elettroforetiche è stato seguito il metodo descritto da Laemli. I gel di poliacrilammide sono stati preparati facendo copolimerizzare l'acrilammide e la bis-acrilammide (capace di creare legami crociati) in presenza di un catalizzatore come l'APS al 10% e un iniziatore come il TEMED. I gel si compongono di due parti: lo "stacking" al 4% di acrilammide per creare un fronte di migrazione omogeneo e il "resolving", in genere preparato al 12%, la cui percentuale però varia in base alle dimensioni delle molecole che si vogliono separare, per la risoluzione delle bande proteiche. Durante le prove di taglio della MKK6 si sono anche utilizzati dei gel al 15% con 20% di glicerolo; il glicerolo aiuta la separazione delle bande, che nel caso specifico differivano solo di 14 AA. Per la preparazione dei gel sono stati adoperati tamponi *Protogel* (National Diagnostic) e apparecchiature *Minigel III* (Biorad).

Dopo l'aggiunta ai campioni del buffer di caricamento LSB (Laemli sample buffer), i campioni di proteine sono stati trattati a 95° C per 5 minuti per favorire la denaturazione delle catene polipeptidiche. Nel caso in cui nei campioni sia presente guanidinio è necessario precipitare con TCA (acido tricloroacetico) per evitare la precipitazione del tampone di caricamento LSB. Il tampone di corsa è costituito da 50 mM Tris, 3,5 mM SDS, 38 mM glicina, ; la corsa viene, inoltre effettuata ad un amperaggio costante di 15 mA per lo stacking e 30 mA per il resolving.

Per visualizzare le bande si è utilizzato un colorante colloidale, il *Simply Blue* (Invitrogen), seguendo il protocollo indicato nel manuale di istruzioni dello stesso.

2.6.2 Elettroforesi in gel di poliacrilammide in condizioni native

Questo tipo di elettroforesi è del tutto simile a quella in presenza di SDS, ma va tenuto conto che in assenza di questo detergente anionico il rapporto carica – massa non sarà più omogeneo per tutte le proteine del campione. In sostanza, quindi, esse si muoveranno secondo il loro rapporto carica – raggio idrodinamico e la loro carica non sarà più negativa, come in presenza di SDS, ma dipenderà dal loro punto isoelettrico e del pH della soluzione tampone. Nel caso specifico è stato elaborato un protocollo per proteine con un pI < 7.0, come la MKK6.

Per lo stacking, sempre al 4% di acrilammide, si è utilizzato un tampone 0,5 M Tris HCl a pH 6.8, mentre per il resolving, all'8% di acrilammide, si è utilizzato un tampone 1,5 M Tris-HCl a pH 8.9. A questi valori di pH la MKK6 assume una forte carica negativa, che le permette di migrare verso il fondo del gel. Il tampone di corsa è 0,05 M Tris, 0,38 M Glicina pH 8.9.

Trattandosi di una elettroforesi non denaturante non è più possibile bollire i campioni, né trattarli con LSB; essi vanno mescolati ad un tampone di caricamento così composto: 5 ml di glicerolo, blu di bromofenolo in tracce, 2,7 ml di acqua, 2,13 ml di una soluzione di 0,5 M Tris-HCl a pH 6.8.

Le bande su gel sono state visualizzate sia con il colorante colloidale *Simply Blue* (Invitrogen), che con la colorazione argentea.

2.6.3 Western Blotting

Questa tecnica si propone di trasferire su un supporto più resistente del gel di poliacrilammide, tipicamente un foglio di nitrocellulosa, le bande proteiche, in modo da poterle cimentare con anticorpi specifici legati ad un sistema di rivelazione.

Si procede operando una SDS-PAGE dei campioni in un gel di poliacrilammide precast NuPAGE 4 – 12% (Invitrogen); dopo la corsa si trasferiscono le bande su un foglio di nitrocellulosa *Protran* (Schleicher & Schuell), applicando un campo elettrico perpendicolare al gel.

Avvenuto il trasferimento si procede alla marcatura del blot, incubandolo 1 h in una soluzione saturante di PBST (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄-2H₂O, KH₂PO₄, 0,05% di Tween 20, pH 7,4) e latte al 5%, che maschera i siti di legame idrofobici sulla nitrocellulosa, che potrebbero dare un binding aspecifico degli anticorpi. Dopo la saturazione si incuba la nitrocellulosa in una soluzione di

PBST e latte al 5% a cui si aggiunge l'anticorpo primario in diluizione opportuna per 1 h. Si effettuano alcuni lavaggi con PBST, poi si lascia un'altra ora la nitrocellulosa con una soluzione di latte al 5% in PBST contenente l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi. Infine si lava sia con PBST che con PBS (PBST meno il Tween 20). E' possibile colorare il blot subito dopo il trasferimento con il rosso Ponceum, e poi rimuovere il colorante con un semplice lavaggio in acqua.

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati anticorpi secondari coniugati alla perossidasi. In questo caso lo sviluppo del blot viene effettuato mediante amplificazione della chemiluminescenza (ECL Enhanced ChemioLuminescence), poiché la perossidasi scinde il perossido di idrogeno a formare un peracido, il quale a sua volta ossida un substrato, solitamente il luminolo, in modo che emani luce. Suddetta luce viene poi rilevata esponendo il blot per un periodo che va da 10 a 30 min. ad una lastra fotografica, che verrà poi sviluppata.

Per rivelare le proteine prodotte con His-tag sono stati utilizzati: un anticorpo primario contro la catena di istidine (Novagen) monoclonale, in concentrazione 1:1000 ed un secondario anti-IgG di topo (Santa Cruz), usato 1:10000. Per marcare LF è stato utilizzato un anticorpo primario (Santa Cruz) contro un frammento centrale della proteina prodotto in capra, diluito 1:800, e un secondario anti-IgG di capra diluito 1:2000. Per marcare la MKK6 si è utilizzato un anticorpo primario (Santa Cruz) contro il frammento C-terminale della proteina diluito 1:800 e un secondario anti IgG di capra diluito 1:2000.

Dopo aver eseguito un primo immunoblot è possibile rimuovere gli anticorpi dalla membrana ed eseguirne un secondo sugli stessi campioni: questa procedura è chiamata *stripping anticorpale*. Viene preparata una soluzione composta da 62.5 ml di una soluzione 1 M Tris-HCl a pH 6,7, 200 ml di SDS 10% e portata al volume di 1 L. La membrana viene immersa nella soluzione di stripping a cui vengono aggiunti 7,15 µl di 2-mercaptoetanololo, e il tutto è incubato a 50°C per 30 minuti in agitazione. Dopo alcuni lavaggi con PBS la membrana può essere nuovamente incubata con la soluzione saturante.

2.6.4 Espressione di proteine come prodotto di fusione con la GST o con l'His Tag

Le colonie dei batteri trasformati con i diversi plasmidi vengono piastrate su terreno solido in LB-agar, comprensivo di eventuali antibiotici, ed incubate a 37°C. Il giorno dopo le colonie cresciute vengono risospese in 500 ml di LB per piastra e

fatte crescere fino a densità ottica (misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 600 nm) pari a 0,6. L'espressione della proteina di interesse viene indotta con l'aggiunta di IPTG (isopropil- β -D-tio-galattopiranoside), un derivato non idrolizzabile del lattosio, in concentrazione 1mM, per 3-4 ore ad una temperatura compresa tra 25 e 30°C. Nella fase di induzione i batteri, che sono in crescita logaritmica, devono smettere di utilizzare le loro risorse per moltiplicarsi e dirottarle invece nella produzione della proteina di interesse; l'abbassamento della temperatura, serve appunto per fermare la crescita batterica.

Dopo l'induzione il terreno contenente i batteri viene centrifugato a 4°C e 6000 rpm per 10 minuti; il pellet viene quindi risospeso in PBS freddo (0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) e centrifugato nuovamente a 4000 rpm per 15 minuti. A questo punto esso può essere conservato a -80°C previo congelamento in azoto liquido.

2.6.5 Purificazione del costrutto LF 3 dom 687 – MKK6 in pRSETa mediante cromatografia di affinità

Il pellet batterico è stato risospeso in 20 ml per litro di coltura di tampone A (50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl) più 5 mM DTT e 0,1% v/v Triton X-100, a cui è stato aggiunto un cocktail di inibitori di proteasi del kit COMPLETE™ mini EDTA free (Roche). La sospensione è stata sottoposta a lisi meccanica mediante due cicli consecutivi di French Press, in apposita camera pre-raffreddata, applicando una pressione di 1300 psi (pounds per square inch; 1 psi = 6,894 kPa). Il lisato è stato quindi chiarificato mediante centrifugazione a 15000 rpm per 20 minuti e filtrazione.

la soluzione proteica viene caricata in una colonna Ni-NTA Hi-Trap Chelating (Amersham Pharmacia Biotech) da 5 ml montata su una FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) ÄKTAprime (Amersham Pharmacia Biotech). La colonna in questione è una colonna Ni-NTA (NTA = acido nitrilotriacetico), dove l'NTA è un chelante ad alta affinità per i metalli. Questo sistema permette di purificare proteine fuse con una coda di istidine, che si coordina con il metallo. L'eluizione della proteina dalla colonna viene successivamente effettuata con un gradiente di imidazolo (un competitore per il legame di coordinazione al metallo) o di pH (abbassando il pH si protonano le istidine, che non riescono più a coordinarsi

col metallo). Nel caso specifico della purificazione del costrutto LF 3 dom 687 – MKK6 il metallo caricato in colonna era il Cu^{2+} .

Per l'eluizione delle due proteine dalla colonna si è utilizzato un gradiente di imidazolo in tampone A da 20 a 250 mM in 30 minuti.

2.6.6 Purificazione di LF EY e della MKK6 tramite protocollo denaturante

Il pellet batterico viene risospeso in 6 M guanidinio in tampone A (50 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl). La sospensione viene sottoposta a French Press, applicando una pressione di 1300 psi, per la rottura cellulare e a centrifugazione, chiarificazione e filtrazione. La soluzione proteica ottenuta può quindi essere caricata in una colonna Ni-NTA da 5 ml, montata su una FPLC ÄKTAprime (Amersham Pharmacia Biotech). Il tampone di base usato per la purificazione è un tampone 8 M urea in tampone A a pH 8, in queste condizioni la catena di istidine è ben esposta e forma un legame stabile di coordinazione con il nichel presente in colonna. Nel caso di una purificazione in denaturante usare il nichel come metallo da caricare in colonna permette di avere una minore percentuale di proteine contaminanti nell'eluato, in quanto esso si coordina con l'His Tag con minore forza del rame.

Per eluire la proteina si utilizza il pH: all'aumentare della concentrazione degli ioni H^+ le istidine si protonano e perdono la capacità di coordinare i metalli. Viene effettuato un lavaggio a pH 6.3 con 8 M urea in tampone A per staccare dalla colonna eventuali proteine che si fossero legate aspecificamente attraverso istidine esposte sulla loro superficie. Si eluisce infine con lo stesso tampone, ma a pH 4.5.

La proteina purificata viene, quindi, rinaturata in dialisi tutta la notte a 4°C contro un tampone nativo, che per LF EY è un tampone 10 mM Tris, 20 mM NaCl, 0,5 mM EDTA a pH 7.5, mentre per la MKK6 è 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT a pH 8.

2.6.7 Prove di taglio della MKK6 e della MKK6+ da parte di LF wt

Per verificare il taglio proteolitico del fattore letale nei confronti della MKK6, così come del mutante della MKK6 costitutivamente attivo, si sono incubati in vitro la MKK6 / MKK6+ ed LF wt (wild type) in rapporto molare di 1:3 in tampone 50 mM Hepes, 50 mM NaCl a pH 7.5 per 2 h 30' a 37°C. Dopo 2 h 30' il campione è

stato subito addizionato con LSB e bollito per bloccare l'azione dell'enzima. Sia per la MKK6, che per la MKK6+ sono stati previsti due campioni di controllo, senza LF, tenuti uno a 4°C ed uno a 37°C.

Per indagare il rapporto enzima-substrato ottimale per avere il taglio proteolitico della MKK6 si sono preparati una serie di campioni da incubare, sempre in tampone 50 mM Hepes, 50 mM NaCl a pH 7.5, per 2 h e 30' a 37°C che presentassero diversi rapporti molarli tra LF e la MKK6. I rapporti in questione tra LF e la MKK6 sono rispettivamente 1:96, 1:48, 1:24, 1:12, 1:6, 1:3, 1:1.5. Anche in questo caso, dopo l'incubazione, il campione è stato immediatamente bollito per fermare la reazione.

Le bande di taglio sono state risolte mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 15% con 20% di glicerolo in presenza di SDS. Nel caso del taglio a diverse concentrazioni di enzima-substrato si è proceduto anche ad un Western Blot dei campioni con un anticorpo anti His Tag.

2.6.8 Saggio di fosforilazione della p38 γ da parte della MKK6+

Avendo un mutante costitutivamente attivo della MKK6 e anche la p38 γ che ne è il substrato, si è pensato di allestire un saggio di fosforilazione della p38 γ in vitro. Lo scopo del saggio era quello di verificare che la MKK6 costitutivamente attiva fosse in grado di fosforilare il suo substrato; questo avrebbe permesso di ipotizzare che avesse assunto una corretta conformazione. Siccome la MKK6 wt differisce da quella costitutivamente attiva per una mutazione puntiforme, tutto ciò avrebbe rafforzato la nostra fiducia sulla qualità della proteina. Si sono incubati 2 μ g di ognuna di queste due proteine in un tampone 25 mM Hepes, 25 mM MgCl₂, 50 μ M ATP, pH 7.5 per 30 minuti a 30°C. E' stato, inoltre, previsto un controllo con la sola p38 γ nel tampone di reazione incubata sempre 30 minuti a 30°C. Entrambe i campioni sono stati bolliti subito dopo l'incubazione.

La avvenuta fosforilazione è stata rilevata in Western Blot attraverso l'utilizzo di un anticorpo diretto contro la p38 γ fosforilata.

2.6.9 Incubazione di LF Y728A con la MKK6 in colonna Ni-NTA

LF Y728A è un mutante di LF, già presente in laboratorio, clonato in pGEX 2TK e purificato con una colonna GST Trap (Amersham Pharmacia Biotech); la GST è stata rimossa dopo incubazione con la trombina. La concentrazione di LF Y728A è di 0,22 mg/ml.

Si è risospeso il pellet della MKK6 in tampone A, 5 mM DTT e 0,1% v/v Triton X-100 a pH 8, a cui è stato aggiunto un cocktail di inibitori di proteasi del kit COMPLETETM mini EDTA free (Roche). Dopo il passaggio di lisi mediante French Press e di chiarificazione e filtrazione del lisato secondo il protocollo già descritto in precedenza, si è caricato il tutto su di una colonna Hi Trap da 5 ml, equilibrata con tampone A e montata su una FPLC ÄKTAprime (Amersham Pharmacia Biotech). Dopo aver lavato la colonna a lungo con tampone A a pH 8 sono stati caricati in colonna 220 µg di LF Y728A diluiti in tampone A a pH 8 ed è stato raccolto il non trattenuto.

Si è proceduto, quindi, all'eluizione delle proteine rimaste in colonna con un gradiente da 0 a 250 mM di imidazolo in tampone A a pH 8 in 30 minuti.

Sono stati preparati un campione del non trattenuto dopo il caricamento di LF Y728A, e i campioni delle frazioni di eluizione, concentrandoli mediante precipitazione con TCA e risospesi in LSB. Le bande proteiche sono state poi visualizzate su corsa elettroforetica in presenza di SDS.

2.6.10 Incubazione in colonna di LF EY con la MKK6 clonata in pGEX 3X

Si è utilizzato un costrutto presente in laboratorio nel quale la MKK6 è clonata in pGEX 3X tra i siti di restrizione di Eco RI e Xba I; il pGEX 3X permette la purificazione della MKK6 come proteina di fusione con la GST.

Dopo aver espresso la MKK6 in pGEX 3X nelle BL21 (DE3) CP RIL ed aver ottenuto un pellet della coltura batterica secondo i protocolli descritti in precedenza, suddetto pellet batterico da 500 ml di coltura è stato risospeso in 20 ml in tampone PBS addizionato di un cocktail di inibitori di proteasi del kit COMPLETETM mini (Roche). La sospensione è stata sottoposta a due cicli consecutivi di lisi meccanica applicando una pressione di 1300 psi in una camera per la *French Press*, e quindi chiarificata mediante centrifugazione a 15000 rpm per 20 minuti e filtrazione. La

soluzione così ottenuta viene caricata in una colonna GS Trap da 5 ml (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrata con PBS.

La MKK6 è una proteina di fusione con la GST e la resina è derivatizzata con il gruppo GSH (glutatione); in questo modo la MKK6 può legarsi alla colonna con grande affinità mentre le altre proteine batteriche vengono lavate via.

Dopo aver lavato la colonna con PBS, questa è stata smontata dalla FPLC e tramite una siringa vi si sono caricati 884 µg di LF EY diluito in 5 ml di PBS. Si è provveduto, quindi, a tappare la colonna ed incubarla per 4 h a 4°C.

Alla fine dell'incubazione sono stati fatti tre lavaggi da 5 ml ciascuno di PBS sempre con una siringa a flusso molto lento e si è raccolto il non trattenuto dalla colonna. Infine le proteine legate in colonna sono state eluite con tre lavaggi con un tampone 50 mM GSH, 50 mM Tris a PH 8.

Dai non trattenuti e dalle frazioni di eluizione sono stati preparati dei campioni mediante precipitazione con TCA, che successivamente sono stati visualizzati in gel di poliacrilammide in presenza di SDS ed in Western Blotting con l'uso di un anticorpo anti LF e di uno anti MKK6.

2.7 TECNICHE SPETTROSCOPICHE

2.7.1 Quantificazione del DNA tramite spettroscopia di assorbimento

Per determinare la concentrazione del DNA viene misurata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm e applicata la seguente equazione che può essere ricavata direttamente dalla legge di Lambert-Beer, $A = \epsilon cl$ (l'assorbanza ad una certa lunghezza d'onda è direttamente proporzionale alla concentrazione del campione c , espressa in molarità, e al cammino ottico in cm secondo una costante che è il coefficiente di estinzione molare ϵ):

$$C(\text{mg/ml}) = A_{260}/0,02$$

Il coefficiente di estinzione molare del DNA a doppio filamento è pari a 0,020 g/l se il cammino ottico della cuvetta è 1 cm.

E' anche possibile assumere la seguente approssimazione: un'unità di assorbanza a 260 nm corrisponde a 50 µg/ml di DNA a doppio filamento (il peso medio di un paio di basi, bp, è pari a 650 Da).

Per avere una stima della purezza è stato valutato il rapporto dell'assorbanza rispettivamente a 260 e a 280 nm: valori compresi tra 1,8 e 2,0 sono indice di elevata purezza del campione, in altre parole di una ridotta presenza di contaminanti proteici.

2.7.2 Quantificazione della concentrazione proteica mediante spettroscopia di assorbimento

Per quantificare la concentrazione proteica si registra lo spettro U.V. di assorbimento della proteina nella regione compresa tra 240 e 350 nm. Alla lunghezza d'onda di 280 nm assorbono gli amminoacidi aromatici della proteina; conoscendo il coefficiente di estinzione molare è, quindi, possibile ricavare la concentrazione della stessa usando la legge di Lambert - Beer:

$$C(\text{mg/ml}) = A_{280} - A_{350} / \epsilon$$

Il coefficiente di estinzione molare di LF EY è 0,851 g/l, mentre quello della MKK6 è 0,758 g/l.

3.PREMESSE DEL LAVORO DI TESI

3.1 Clonaggio dei mutanti LF 3 dom ed LF 3 dom 687

Nel laboratorio dove ho svolto il mio internato di tesi erano già stati realizzati due mutanti del fattore letale di antrace, LF 3 dom ed LF 3 dom 687. Il fattore letale si compone, infatti, di quattro domini, dei quali il II, il III ed il IV formano una struttura abbastanza compatta e rigida, sulla quale si attacca il I, il dominio di legame al PA. Il primo dominio costituisce un punto di fragilità della proteina ed era, quindi, logico ipotizzare che la sua rimozione avrebbe comportato un vantaggio in termini di stabilità del fattore letale stesso e di resa dopo la purificazione.

Per clonare questi due mutanti si è partiti da due plasmidi già presenti in laboratorio, uno contenente LF wt ed uno LF mutante inattivo in cui il Glu 687 era sostituito con una Ala. I primers per la PCR sono stati realizzati in modo da amplificare la regione compresa tra il II e il IV dominio di LF compresi.

Primer forward: 5' – AAA GGA TCC ATG CTG TCA AGA TAT AA AAA TG- 3'

Primer reverse: 5' – AAA GAG CTC TTA TGA GTT AAT AAT GAA CTT AAT CT- 3'

L'amplificato di PCR è stato inserito in entrambi i casi in pRSETa tra i siti di restrizione di Bam HI e Sac I. La purificazione delle due proteine ha dato un'ottima resa come atteso ed in particolare il mutante LF 3 dom 687 è stato purificato mediante l'utilizzo di una colonna Ni-NTA con una concentrazione di 13,5 mg/ml ed una resa molto elevata di circa 60 mg per litro di coltura.

E' stato verificato se il mutante LF 3 dom. fosse in grado di tagliare la MKK6 e che il mutante LF 3 dom 687 non lo fosse; inoltre sono stati realizzati gli spettri dicroici delle due proteine e confrontati per sincerarsi che il mutante 687 avesse la stessa conformazione di LF 3 dom, che si suppone ben conformato in quanto in grado di tagliare il suo substrato.

3.2 Prove di purificazione del complesso LF 3 dom 687 – MKK6

Sono state tentate diverse prove di incubazione tra LF 3 dom 687 e la MKK6 clonata in pET20 purificata. Una delle prove maggiormente significative è stata condotta incubando queste due proteine in rapporto di 1:2 in tampone Tris 37 mM NaCl 107 mM EDTA 0,83 mM DTT 0,6 mM pH 7,5. Dopo una incubazione un'ora e quaranta minuti e di quattro ore, il campione è stato passato in gel filtrazione con una colonna Sephadex G 200.

Nonostante l'iniziale ottimismo dovuto al fatto di avere individuato un unico picco dopo corsa cromatografica, successive prove di corsa operate nelle stesse condizioni di flusso e tampone con le proteine singole hanno rivelato come LF 3 dom 687 e la MKK6 dessero luogo ad un picco perfettamente sovrapponibile, rendendo così non conclusivo il risultato della corsa dopo incubazione.

Un ulteriore tentativo è stato fatto immunoprecipitando la MKK6 dopo incubazione con LF 3 dom 687, ma non è stato possibile rivelare la presenza del fattore letale mediante Western Blot nell'immunoprecipitato.

4. SCOPO DELLA TESI

Il fattore letale di *B. anthracis* è una Zn^{2+} - metalloproteasi in grado di tagliare un legame peptidico nella zona N-terminale delle MAPKK caratterizzato da una sequenza consensus nella quale nelle posizioni da P_7 a P_8 sono presenti residui carichi positivamente, mentre tra P_2 e P_1 ' sono presenti residui idrofobici. Tale sequenza è molto simile a quella decritta come sito di legame per le MAPK e al motivo di interazione chinasi KIM. La MKK5 non è tagliata da LF e tuttavia possiede il motivo KIM; questo avvalorava l'ipotesi che ci sia qualche altro elemento importante nel riconoscimento da parte di LF del suo substrato.

Finora il taglio proteolitico da parte del fattore letale è stato indagato con l'utilizzo di piccoli peptidi che mimano l' N-terminale delle MAPKK; alcuni di questi peptidi sono stati anche funzionalizzati con gruppi cromogenici allo scopo di determinare una cinetica di taglio dell'enzima [11]. E' stato anche ottenuto un cristallo del fattore letale in cui è stato fatto diffondere un peptide rappresentante l' N-terminale della MEK2 [22]; questo peptide, tuttavia, si è legato al fattore letale in una posizione non produttiva per il taglio. Tale dato, sembra essere in accordo con l'ipotesi derivante dalla cinetica con i peptidi di una inibizione da substrato per LF.

Esiste la possibilità che il fattore letale abbia un comportamento diverso nei confronti del substrato intero rispetto a quello già osservato con i peptidi; questo lavoro di tesi si propone, quindi, di indagare l'interazione molecolare tra LF e uno dei suoi substrati, la MKK6, cercando di isolare mediante purificazione cromatografica il complesso enzima substrato che si dovrebbe formare tra queste due proteine.

L'isolamento di tale complesso darebbe la possibilità di ottenere un cristallo da risolvere con la tecnica della diffrazione ai raggi X.

Il modello ai raggi X dell'interazione di una enzima col suo substrato sarebbe di per sé un risultato degno di nota, inoltre porrebbe le basi per una comprensione a livello molecolare del meccanismo d'azione di LF, aprendo la strada a tutta un serie di possibilità, non ultima quella di ottenere un inibitore proteico di alcune chinasi. Gli inibitori delle chinasi finora disponibili, infatti, sono piccole molecole organiche. Purtroppo LF ha un ampio spettro d'azione e non si presta così come è ad essere un inibitore selettivo di una chinasi; conoscendo, tuttavia, con un dettaglio molecolare

l'interazione con i suoi substrati, si potrebbe pensare di ingegnerizzare la proteina per renderla maggiormente selettiva.

Un inibitore selettivo delle chinasi di natura proteica potrebbe essere un valido ausilio nella cura di diverse patologie.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 REALIZZAZIONE DEL COSTRUTTO LF 3 dom 687 – MKK6 IN pRSETa

E' riportato in letteratura che in qualche caso l'espressione contemporanea di due proteine interagenti tra loro ne aiuta la purificazione. Nel caso specifico si è pensato di inserire LF 3 dom 687 e la MKK6 in uno stesso vettore di espressione, cioè il pRSETa. Il rationale di questo approccio consisteva nella possibilità che esprimendo queste proteine in quantità equimolare, queste potessero interagire tra loro già nel batterio; è infatti possibile che le proteine isolate dopo purificazione per qualche motivo aggregino tra loro, oppure non assumano una conformazione adeguata. La contemporanea espressione potrebbe far sì che queste proteine interagendo tra loro si aiutino vicendevolmente ad assumere una corretta conformazione.

Essendo già presente il mutante LF 3 dom 687 in pRSETa, si è deciso di utilizzarlo come base del nuovo costrutto in cui clonare l'insero contenente la MKK6 mediante l'utilizzo di primers contenenti uno stop della traduzione. Il costrutto così realizzato avrebbe dovuto, quindi, permettere l'espressione di un LF 3 dom 687 fornito di una coda di 6 istidine e di una MKK6 priva di essa. In questo modo se ci fosse stata un'interazione sufficientemente stabile tra le due proteine, la MKK6 si sarebbe potuta purificare perché legata al mutante di LF in grado di essere trattenuto da una colonna cromatografica Ni-NTA.

5.1.1 Clonaggio della MKK6 stop in LF 3 dom 687 – pRSETa

Si è proceduto ad amplificare l'insero della MKK6 per PCR da un costrutto già presente in laboratorio dove la MKK6 era stata clonata in pET20b tra i siti di restrizione di Nde I e Xho I. Nella messa a punto del protocollo corretto per la PCR ci si è resi conto che i primers probabilmente tendevano a formare strutture secondarie, vanificando così la buona riuscita dell'amplificazione; si è ovviato a tale problema utilizzando nel mix di reazione DMSO al 2%.

Dopo aver digerito l'insero e linearizzato il vettore si è proceduto alla ligazione dell'insero nel vettore; il prodotto di ligazione è stato, quindi, trasformato

nel ceppo di *E. Coli* X11 blue . Dopo aver fatto inculi da singole colonie dalla piastra di trasformazione è stato estratto di DNA plasmidico da questi. Il DNA è stato, quindi, digerito con gli enzimi di restrizione Kpn I e Bgl 2 per confermare l'avvenuto clonaggio. Dopo corsa su gel di agarosio sono risultate contenenti l'insero solo le miniprep 1, 2, 7 e 9 (figura 10).

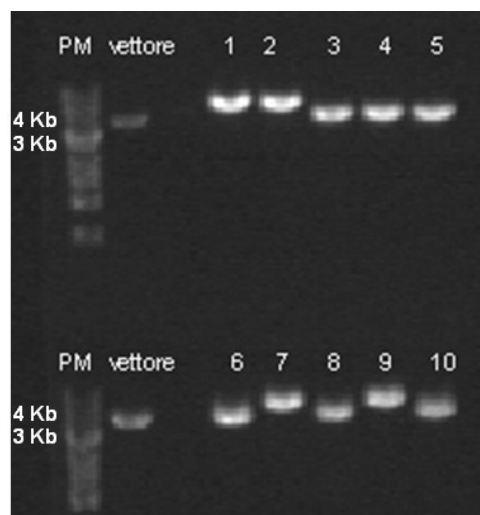


Figura n°10

Digestione delle miniprep del costrutto LF 3 dom 687 – MKK6 in pRSETa con gli enzimi di restrizione Kpn I e Bgl 2. Solo i campioni 1, 2, 7 e 9 migrano più in alto della banda del vettore linearizzato; la loro posizione su gel è compatibile con il peso atteso del costrutto contenente l'insero.

5.1.2 Espressione e purificazione del costrutto LF 3 dom 687 – MKK6 in pRSETa

Si è deciso di controllare con una mini-induzione delle proteine ricombinanti presenti nel costrutto LF 3 dom 687 – MKK6 quale fosse il ceppo di *E. Coli* in grado di garantire la massima espressione. I ceppi provati sono stati le Rosetta (DE3), la BL21 (DE3) e le BL21 (D3) CP RIL. Dopo l'induzione con 1 mM IPTG si sono presi dei campioni di coltura batterica a 3 h, 4h e overnight(o.n.). L'espressione di LF 3 dom 687 e della MKK6 è risultata adeguata ed equivalente in tutti i ceppi testati.

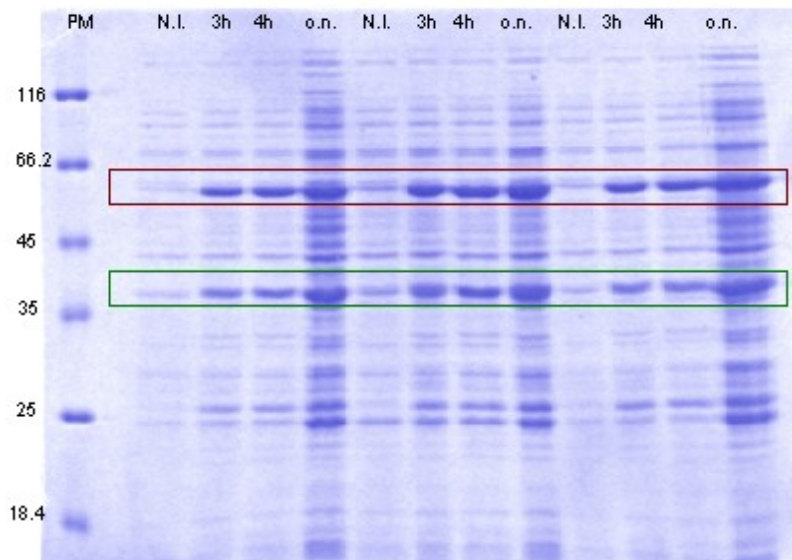


Figura n°11

Prove di mininduzione del costrutto LF 3 dom 687 – MKK6: la prima serie dal non indotto al o.n. fa riferimento al ceppo Rosetta (DE3), la seconda serie alle BL21 (DE3) e la terza alle BL21 (DE3) CP RIL. In rosso è evidenziata la banda di LF 3 dom. 687 in verde quella della MKK6. Di ogni campione sono stati caricati in gel 10 µl.

Si è deciso di utilizzare le BL21 (DE3) CP RIL per esprimere le due proteine codificate dal costrutto. Si è quindi proceduto alla purificazione delle suddette proteine dal pellet batterico risospendendo questo in tampone A, 5 mM DTT 0,1 % Triton X-100 a pH 8.0. Il DTT è un agente riducente dei ponti di solfuro, mentre il Triton X-100 è un detergente; queste sostanze sono state usate ad una concentrazione compatibile con il mantenimento della colonna Ni-NTA, caricata con Cu^{2+} . Si è optato per una purificazione in condizioni native, con un'eluizione in gradiente di imidazolo, da 20 a 250 mM, in tampone A.

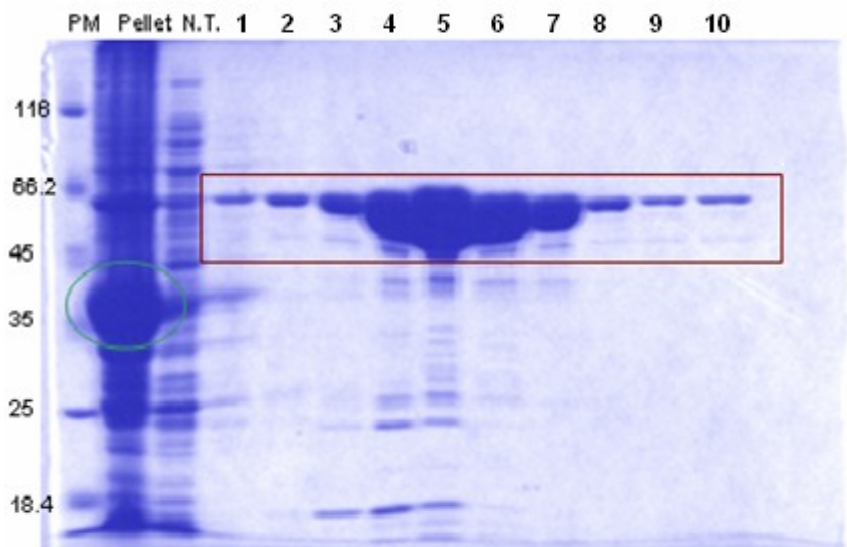


Figura n°12

SDS-PAGE della purificazione del costrutto LF 3 dom 687 – MKK6. Sono riportati i campioni del pellet ricavato dalla centrifugazione del lisato, del void volume (N.T.) e delle frazioni di eluizione della proteina. In particolare i campioni delle frazioni di eluizione sono stati bolliti e addizionati con β -mercaptoetanololo, prima della dialisi della proteina. Si nota come la MKK6 (evidenziata in verde), rimanga nel pellet, mentre LF 3 dom. 687 (evidenziato in rosso) esce con l'eluato. Di ogni campione sono stati caricati in gel 10 μ l.

Nonostante l'utilizzo di DTT e Triton X-100, la MKK6 non si è risolubilizzata dal pellet batterico. Il vantaggio di avere un costrutto bicistronico contenente come in questo caso un mutante dell'enzima e il suo substrato, doveva consistere anche nel fatto che LF 3 dom 687, di cui si conosceva l'ottima solubilità e resa, interagisse già all'interno del batterio con la MKK6, rendendone più agevole la purificazione. Dal momento che ciò non si è verificato non aveva nemmeno senso provare una purificazione in condizioni denaturanti, che avrebbe molto probabilmente solubilizzato la MKK6, ma, distruggendone l'interazione con LF 3 dom 687, non ne avrebbe permesso la purificazione (la MKK6, infatti, non è dotata di HisTag).

5.2 SPETTRO DICROICO DI LF 3 dom 687 NEL VICINO U.V.

Per avere una conferma della qualità del folding di LF 3 dom 687 si è deciso di effettuare in collaborazione con il laboratorio del prof. Zanotti gli spettri al

dicroismo circolare di LF 3 dom ed LF 3 dom 687 nel vicino U.V. (250 – 320 nm); era già stato indagato il lontano U.V., ma si è pensato che andando ad analizzare lo spettro anche nel vicino U.V. si potessero cogliere eventuali differenze nella posizione degli amminoacidi aromatici, che giocano un'importante parte nel sito attivo della proteina.

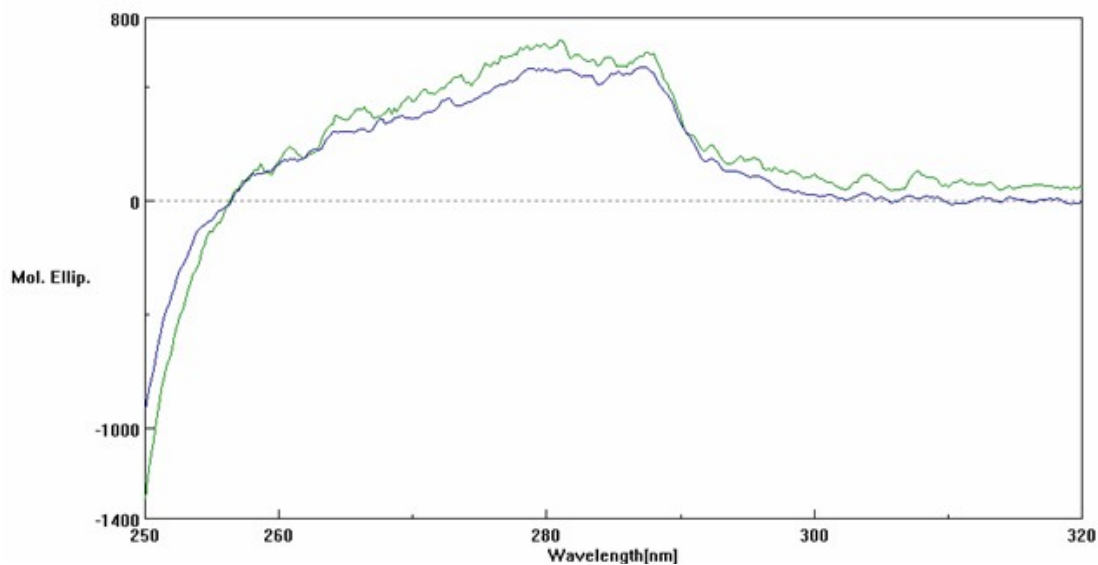


Figura n°13

Spettro dicroico dei due mutanti di LF: la linea verde indica lo spettro di LF 3 dom, quella blu lo spettro di LF 3 dom 687.

Dallo spettro dicroico si può vedere come esista una differenza nella regione del vicino U.V. Tra LF 3 dom e L 3 dom 687. In realtà l'interpretazione di uno spettro al dicroismo circolare in questa regione è molto difficoltosa, si perde l'informazione sulla struttura secondaria della proteina e il contributo maggiore viene dagli amminoacidi aromatici. Ciò che si può osservare è che la differenza più rilevante si riscontra nella regione d'assorbimento della Tyr; benché LF 3 dom 687 sia un mutante in Glu, la Tyr 728 è comunque coinvolta nella coordinazione dell'atomo di Zn^{2+} nel sito attivo e può darsi che nel mutante assuma un orientamento differente.

5.3 CLONAGGIO, ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DEL MUTANTE LF EY IN pRSETa

5.3.1 Clonaggio del mutante LF EY in pRSETa

Per verificare che l'insuccesso nei tentativi di isolare il complesso LF-MKK6 finora compiuti non fosse da imputare all'utilizzo di un mutante del fattore letale contenente solo 3 domini, si è deciso di provare ad utilizzare un mutante della proteina in questione che avesse tutti e quattro i domini.

Era già presente in laboratorio il mutante LF EY clonato in pGEX 2TK, in cui il Glu 687 e la Tyr 728 sono mutati in Ala. Il pGEX 2TK è un plasmide che permette la purificazione della proteina ricombinante come proteina di fusione con la GST; tuttavia la resa dopo il taglio proteolitico con la trombina, operato allo scopo di eliminare la GST, non è elevata. Si pensava che clonando il mutante come proteina di fusione con l' HisTag in pRSETa si potesse migliorare la resa dopo la purificazione. Il mutante LF EY fuso con la GST era già stato caratterizzato per la sua incapacità di tagliare le MAPKK, ed era stato verificato che il suo spettro dicroico fosse uguale a quello di LF wt.

LF EY è clonato in pGEX 2TK tra due siti di Bam HI; per trasferire l'inserto in pRSETa è bastato perciò digerire il costrutto con Bam HI e ligare il prodotto di digestione in pRSETa linearizzato sempre con Bam HI e digerito con la CIP (passaggio molto importante nel caso specifico perché il vettore è stato digerito con un unico enzima di restrizione e le probabilità che ricircularizzi sono perciò alte).

Dopo aver operato la ligazione dell'inserto nel nuovo vettore si sono trasformate le X11 Blue con il prodotto di ligazione e il giorno seguente sono state preparate delle miniprep dagli inoculi di singole colonie prese dalla piastra della trasformazione.

Avendo utilizzato un unico enzima di restrizione per clonare l'inserto, questo poteva essersi inserito sia in posizione corretta che girato. Occorreva, quindi, verificare il corretto inserimento utilizzando un enzima di restrizione in grado di tagliare dentro l'inserto, ma non nel vettore: l'enzima scelto per tale verifica è Pst I, il quale taglia l'inserto a 900 basi dal suo inizio. Nel caso di un inserimento corretto dell'inserto ci si attendeva su gel una banda di taglio di 3800 bp e una di 1400 bp,

mentre viceversa si sarebbe dovuto osservare una banda di 4300 bp ed una di 1000 bp.

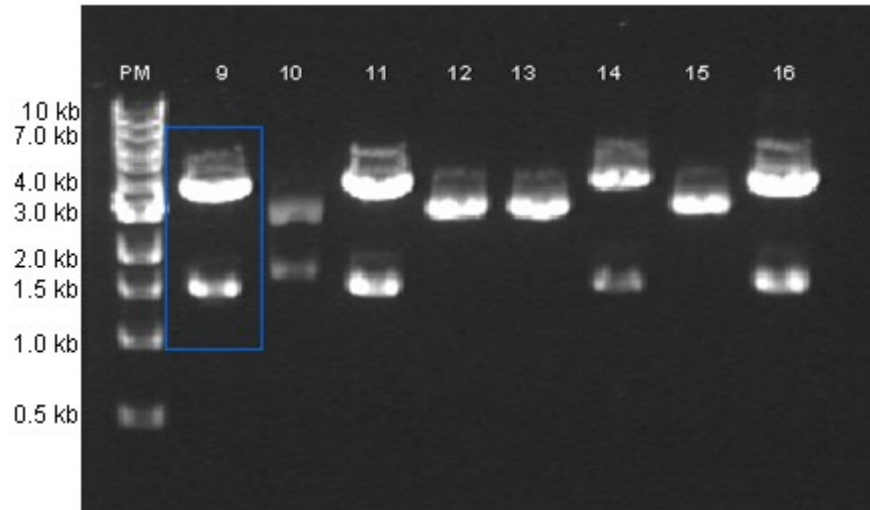


Figura n°14

Gel delle digestioni delle miniprep della ligazione: si vede come le miniprep 9, 11, 14 e 16 avessero il corretto inserimento dell'inserto, mentre nelle altre il vettore si è richiuso senza incorporare alcunché. Non ci sono miniprep che presentano l'inserimento errato dell'inserto.

La miniprep 9 presentava l'inserimento corretto dell'inserto; la bontà del clonaggio è stata confermata tramite sequenziamento.

5.3.2 Espressione e purificazione del costrutto LF EY – pRSETa

Il costrutto LF EY – pRSETa è stato trasformato nel ceppo di *E. Coli* BL21 (DE3) CP RIL; dopo risospensione dalla piastra delle colonie batteriche in terreno LB e il raggiungimento di una densità ottica di 0.6 misurata a 260 nm, è stata indotta tramite l'aggiunta 1 mM IPTG l'espressione della proteina ricombinante.

Sono state fatte delle purificazioni preliminari in condizioni native, eluendo la proteina con un gradiente di imidazolo, ma questa è risultata uscire dalla colonna col fronte d'eluizione e ricca in contaminanti. Inoltre LF EY, come la forma wt del resto, si è dimostrato molto sensibile alla degradazione.

La proteina è stata, quindi, purificata alla FPLC con un protocollo denaturante e rinaturata in dialisi durante la notte contro un tampone nativo 10 mM Tris, 20 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, pH 7,5.

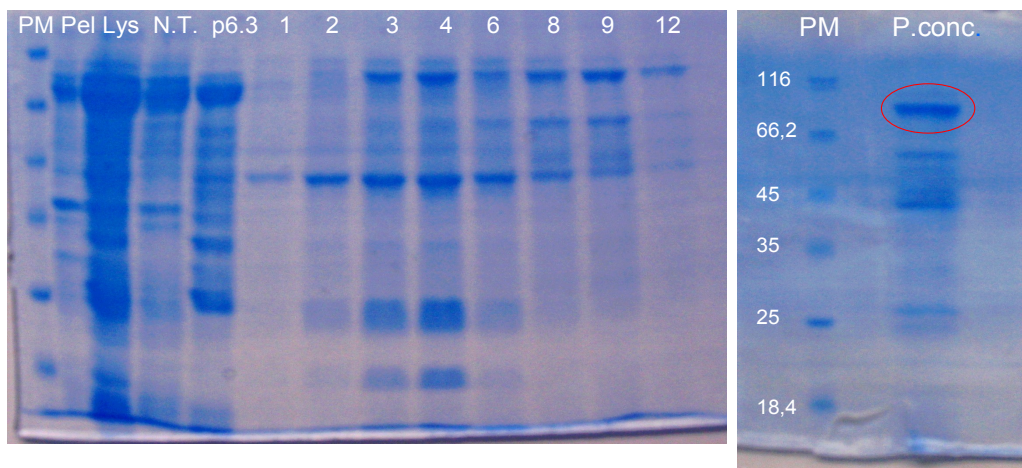


Figura n°15

SDS-PAGE della purificazione in condizioni denaturanti di LF EY e della proteina dopo concentrazione con PEG. Sono riportati i campioni del pellet e del surnatante (Lys) dopo centrifugazione del lisato, del void volume (N.T.), del picco a pH 6.3 e delle frazioni di eluizione (da cui si sono ricavati i campioni prima della dialisi). Di ogni campione sono stati caricati 10 μ l. La concentrazione è stata effettuata con un tampone nativo contenente 10 % w/v di PEG a 4°C.

La concentrazione finale della proteina ($\epsilon = 0,851$) è di 0,442 mg/ml, con una resa 1,98 mg da 1 litro di coltura batterica.

5.4 CARATTERIZZAZIONE DELLA MKK6

5.4.1 Purificazione della MKK6

Anche la MKK6 dava qualche dubbio sulla bontà della sua conformazione; è infatti ben documentato in letteratura che la maggior parte delle chinasi umane si esprime bene e mantiene un corretto folding solo in cellule eucariotiche, magari dopo infezione da *Baculovirus*. Una possibile spiegazione di questo fenomeno è che in *E. Coli* manca tutto il sistema delle proteine chaperones che aiutano la proteina ad assumere la conformazione corretta.

Il sospetto era che la MKK6 purificata in condizioni native aggregasse già dentro il batterio, rendendosi poi non disponibile per l'interazione con LF 3 dom 687. Il fatto che LF sia in grado di tagliare la MKK6 così purificata in vitro non è di per sé una assicurazione del suo corretto folding, perché può essere che il sito di taglio sia esposto nonostante la proteina assuma una conformazione disordinata. A parziale conferma di queste considerazioni è stato eseguito sempre presso il laboratorio di

prof. Zanotti uno spettro dicroico della MKK6, che ha rivelato come solo poco meno della metà della proteina risulti avere una struttura secondaria.

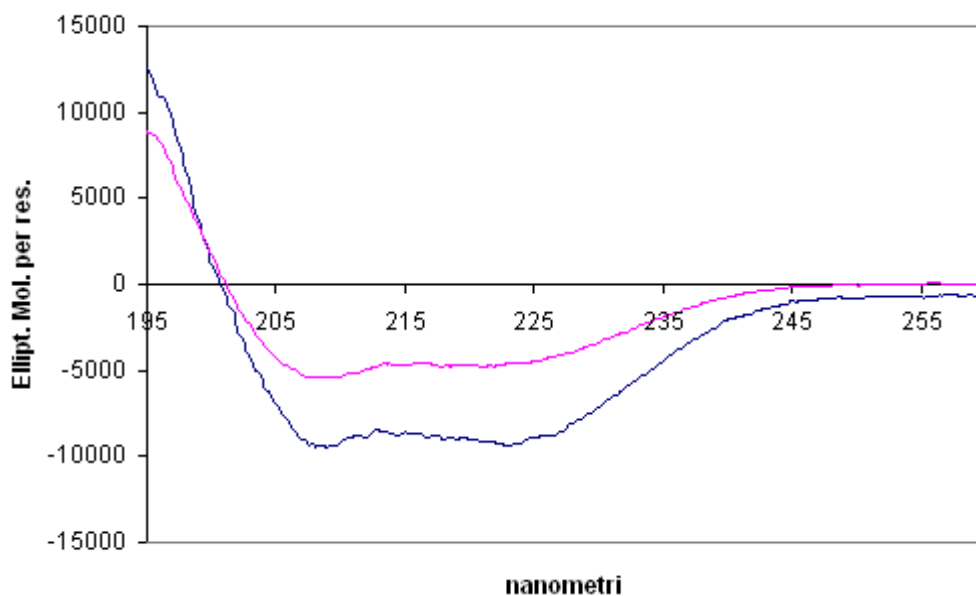


Figura n°16
Spetto dicroico della MKK6 senza DTT (linea rosa) e con DTT (linea blu)

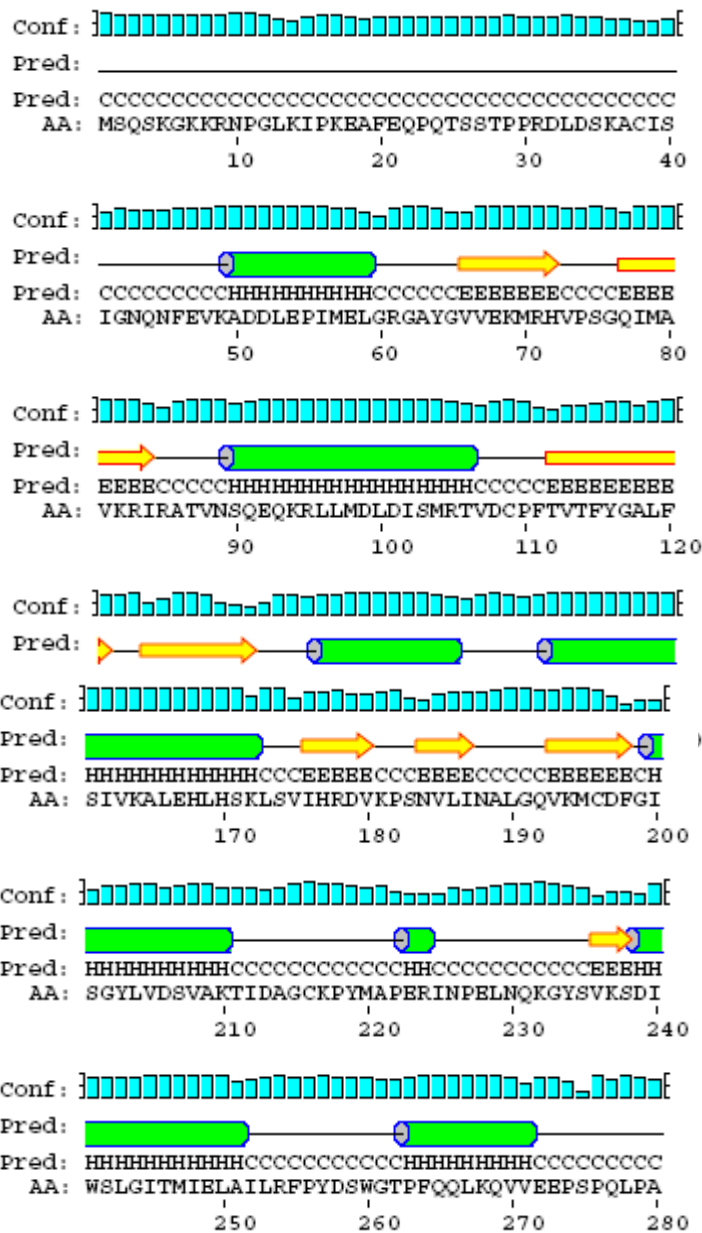
	180-260 nm	185-260 nm	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Helix	n.d.	n.d.	n.d.	24,9 %	24,6 %	24,5 %	23,9 %
Antiparallel	n.d.	n.d.	n.d.	17,1 %	16,8 %	17,2 %	17,6 %
Parallel	n.d.	n.d.	n.d.	6,4 %	6,1 %	5,9 %	5,7 %
Beta-Turn	n.d.	n.d.	n.d.	17,3 %	17,3 %	17,4 %	17,9 %
Rndm. Coil	n.d.	n.d.	n.d.	35,0 %	36,5 %	36,1 %	35,0 %
Total Sum	-	-	-	100,7 %	101,4 %	101,0 %	100,1 %

Stima della struttura secondaria della MKK6 senza DTT.

	180-260 nm	185-260 nm	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Helix	n.d.	n.d.	n.d.	24,9 %	24,6 %	24,5 %	23,9 %
Antiparallel	n.d.	n.d.	n.d.	17,1 %	16,8 %	17,2 %	17,6 %
Parallel	n.d.	n.d.	n.d.	6,4 %	6,1 %	5,9 %	5,7 %
Beta-Turn	n.d.	n.d.	n.d.	17,3 %	17,3 %	17,4 %	17,9 %
Rndm. Coil	n.d.	n.d.	n.d.	35,0 %	36,5 %	36,1 %	35,0 %
Total Sum	-	-	-	100,7 %	101,4 %	101,0 %	100,1 %

Stima della struttura secondaria della MKK6 con DTT.

I due spettri dicroici della MKK6 con e senza DTT sono abbastanza simili, anche se sembrerebbe che la proteina trattata con DTT abbia un contenuto superiore in α eliche superiore rispetto a quello in foglietti β ; purtroppo, però, le differenze osservate non sono molto dissimili dall'entità dell'errore che è possibile commettere nella tecnica del dicroismo circolare. E' comunque bene tenere in conto questa differenza. A tale proposito si provato ad analizzare la sequenza primaria della MKK6 con un programma, PSIPRED, che si avvale delle reti neurali per determinare la struttura secondaria di una proteina.



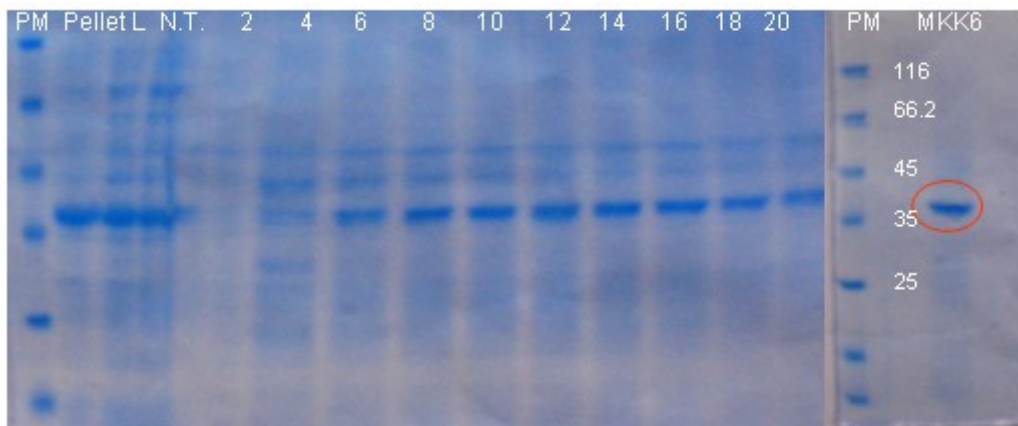


Figura n°18

SDS-PAGE della purificazione della MKK6 con protocollo denaturante; sono stati caricati i campioni del pellet dopo centrifugazione del lisato, del void volume (N.T.) e delle frazioni di eluizione (prima della dialisi delle stesse). Il secondo gel fa riferimento alla proteina dopo dialisi, operata con tubi da dialisi di cellulosa (cut off di 10.000 da) a 4°C overnight. Nei due gel sono stati caricati caricati 10 µl di ogni campione.

La concentrazione della proteina dopo dialisi è stata determinata allo spettrofotometro a 280 nm, ed era 0,568 mg/ml con una resa di 8,53 mg per litro di coltura.

5.4.2 Gel di poliacrilammide non denaturante della MKK6

Per controllare che la MKK6 così prodotta non aggregasse si è deciso di fare una corsa di un campione della stessa in un gel non denaturante, in modo da vedere la presenza di eventuali aggregati ad alto peso molecolare.

E' stato realizzato un gel al 4 % di acrilamide per lo stacking e al 8 % per il resolving in modo che potessero penetrarvi anche eventuali aggregati ad alto peso molecolare; inoltre un campione è stato caricato con un LSB contenente β mercaptoetanololo per verificare che eventuali interazioni non fossero dovute alla formazione di ponti disolfuro.

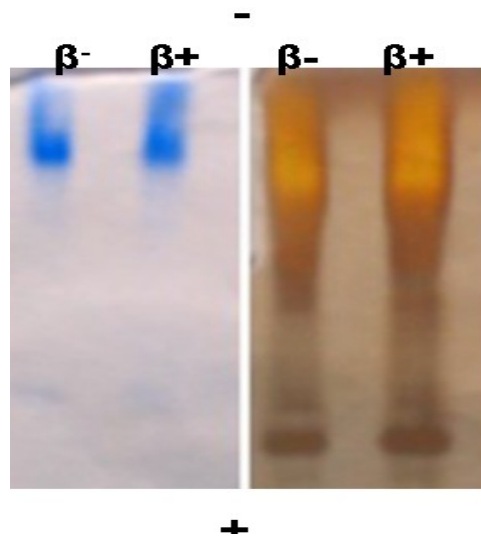


Figura n°19

Gel non denaturante della MKK6: il segno + e - fa riferimento al catodo e all'anodo. Il secondo gel è stato colorato con l'argento. I segni $\beta+$ e $\beta-$ fanno riferimento rispettivamente alla presenza o meno di β -mercaptoetanolio.

Il gel trattato con la colorazione argentea ha rivelato una maggiore sensibilità ed ha messo in evidenza la presenza di una maggioranza di proteina aggregata e di una banda presumibilmente appartenente al monomero della MKK6, ma che potrebbe anche essere un contaminante zuccherino, in quanto la colorazione argentea marca anche molecole non proteiche. Inoltre non si è riscontrata differenza tra il campione trattato con β - mercaptoetanolio e quello non trattato; di conseguenza è possibile ipotizzare che l'aggregazione non sia dovuta alla presenza di ponti disolfuro, ma più probabilmente ad interazioni idrofobiche.

5.4.3 Prove di taglio della MKK6 da parte di LF wt

Per controllare la qualità della proteina purificata in condizioni denaturanti sono state messe a punto le condizioni di taglio della MKK6 in pET20 da parte di LF wt.

Innanzitutto si è verificato che la proteina venisse tagliata dal fattore letale; è stato quindi necessario capire quale fosse il rapporto tra enzima e substrato ottimale per il taglio. Infine, prendendo spunto dagli esperimenti con il peptide inibitore [11], si è cercato di capire se la forza ionica della soluzione di incubazione avesse un

qualche effetto; nel caso del peptide, infatti, concentrazioni di NaCl superiori a 25 – 30 mM avevano un effetto inibitorio sulla attività metalloproteasica di LF. Inoltre è stata utilizzata una proteina già presente in laboratorio, un mutante costitutivamente attivo della MKK6 clonato in pET20; questo mutante è stato denominato MKK6+ e la sua concentrazione è di 0,52 mg/ml.

Per visualizzare il taglio, che consiste di soli 14 AA è stato necessario utilizzare un gel di poliaccrilamide al 15 % con 20 % di glicerolo.

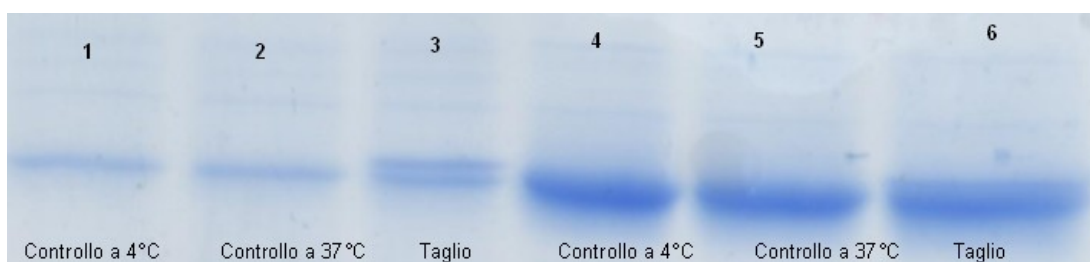


Figura n°20

Gel delle prove di taglio della MKK6; il campione 1 e 2 contengono solo la MKK6, lasciata rispettivamente 2.30 h a 4°C e a 37°C. Il campione 3 è stato incubato con LF wt a 37°C per 2.30 h. I campioni 4, 5 e 6 sono analoghi a quelli precedenti con l'unica differenza di contenere la MKK6+. LF e la MKK6/MKK6+ sono stati incubati in rapporto molare di 1:3; in gel sono stati caricati 10 µl di campione.

Dopo incubazione con LF wt appare chiaro che sia la MKK6 nativa che la MKK6+ sono tagliate all'enzima (figura n°20).

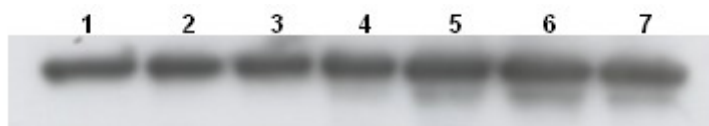


Figura n°21

Western blotting con un anticorpo anti His Tag del taglio della MKK6 da parte di LF wt; i rapporti molari tra LF ed MKK6 sono: 1) 1:96, 2) 1:48, 3) 1:24, 4) 1:12, 5) 1:6, 6) 1:3, 7) 1:1,5.

Operando delle prove di taglio con un diverso rapporto enzima-substrato (figura n°21) si nota come LF riesca a tagliare efficientemente la MKK6 a partire da un rapporto di 1:6. Lo stesso risultato si verifica utilizzando la MKK6+ al posto della MKK6 wt.

Questo rapporto enzima substrato è strano perché è molto elevato; tuttavia va d'accordo con i dati registrati con il peptide e si potrebbe spiegare supponendo una inibizione da substrato di LF. E' probabile, infatti, che la MKK6 si leghi in posizioni improduttive per il taglio e che ciò determini un'inibizione dell'enzima.

Un'ulteriore conferma dei dati raccolti col peptide inibitore consiste nel fatto che pare che LF raggiunga il massimo di efficienza nel taglio a concentrazioni di NaCl inferiori a 50 mM; ciò è stato visto incubando LF e la MKK6 per 2 h e 30 minuti a diverse concentrazioni di NaCl. E' molto difficile però stimare il risultato in questo caso, perché non si è riusciti ad ottenere una separazione convincente delle bande di taglio.

5.4.4 Fosforilazione della p38 γ da parte della MKK6+

Avendo in laboratorio un mutante costitutivamente attivo della MKK6 si è pensato di allestire un saggio di fosforilazione in vitro del suo substrato la p38 γ anche essa già presente in laboratorio. La avvenuta fosforilazione è stata rilevata in Western Blot attraverso l'utilizzo di un anticorpo diretto contro la p38 γ fosforilata.

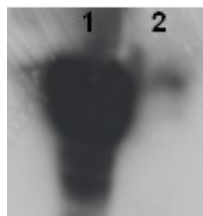


Figura n°22

Western Blot del saggio di fosforilazione della p38 γ : il campione 1 è stato incubato in presenza della MKK6+, il 2 in assenza.

Il saggio è stato allestito per verificare se la proteina prodotta in *E. Coli* conservasse la sua attività biologica e così pare che sia.

5.5 PROVE DI INCUBAZIONE DI MUTANTI DI LF CON LA MKK6 LEGATA IN COLONNA

5.5.1 Incubazione di LF Y728A con la MKK6 in colonna Ni-NTA

Siccome esiste la possibilità che la MKK6 aggregi e che per questo non si riesca ad isolarla legata al fattore letale, si è deciso di provare ad immobilizzarla in colonna Ni-NTA e di passare successivamente un mutante inattivo di LF, LF Y728A, purificato come proteina di fusione con la GST e successivamente incubato con la trombina per togliere il tag. Si è pensato di utilizzare LF Y728A perché non avendo l'HisTag non dovrebbe essere in grado di legarsi in colonna da solo; si supponeva, quindi, che qualora fosse stato trattenuto in colonna, questa sarebbe stata una prova della sua interazione con la MKK6 lì presente.

Si è dunque proceduto ad una purificazione nativa della MKK6; prima dell'eluizione si è caricato in colonna LF Y728A, si è raccolto il void volume ed si è eluito con un gradiente da 0 a 250 M di imidazolo.

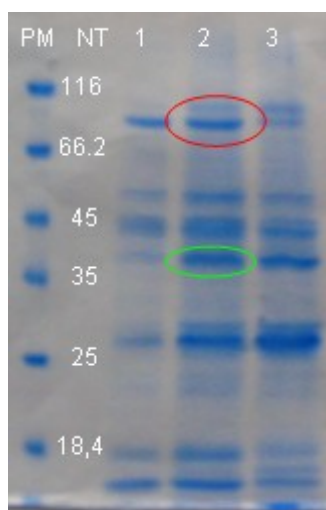


Figura n°23

SDS-PAGE dell'incubazione in colonna della MKK6 con LF Y728A: si vede come nel void volume (N.T.) non ci sia traccia di LF, che invece esce dalla colonna assieme alla MKK6 nelle frazioni d'eluizione 1, 2 e 3. LF Y728A è evidenziato in rosso, la MKK6 in verde. Dei campioni sono stati caricati in gel 10 μ l.

Si è visto che LF Y728A non usciva dalla colonna col void volume dopo il caricamento, ma coeluiva almeno in parte con la MKK6. E' stato verificato in Western Blot con un anticorpo anti LF ed uno anti MKK6 che nella frazione di eluizione 2 fossero realmente presenti la MKK6 e LF Y728A.

Sfortunatamente passando in colonna Hi Trap LF Y728A da solo, raccogliendo il non trattenuto ed eluendo dalla colonna ciò che vi si è legato con un gradiente di imidazolo, si è verificato che questo mutante è in grado di legarsi alla resina. Esso, infatti, non è presente nel non trattenuto, mentre invece si ritrova nelle

frazioni di eluizione. Se ne deve trarre la conclusione che LF Y728A presenti delle His esposte, che gli permettono di essere trattenuto dalla colonna.

5.5.2 Incubazione in colonna di LF EY con la MKK6 in pGEX 3X

Si è pensato di fare un ultimo tentativo di incubazione utilizzando il mutante LF EY clonato in pRSETa e una MKK6 fusa con la GST. La MKK6 era già presente in laboratorio clonata in pGEX 3X.

Dopo aver controllato che LF EY non si legasse in colonna GST Trap, si è proceduto a purificare la MKK6–GST caricando il lisato sulla resina. Prima però di eluire la proteina usando il GSH, si è proceduto a caricare la colonna con 0,884 mg di LF attraverso l'uso di una siringa. A questo punto la colonna è stata staccata e lasciata a 4°C per 4 h. Al termine di questo lasso di tempo si è proceduto a lavare la colonna, raccogliendo il non trattenuto, e ad eluire ciò che fosse rimasto legato con un tampone contenente GSH.

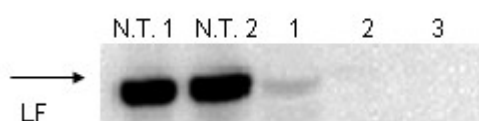


Figura n°24

Western blotting con anticorpo anti LF delle frazioni dell'incubazione di LF con la MKK6 in colonna; si vede come LF esca nelle due frazioni del void volume (N.T.), mentre non è presente nelle frazioni d'eluizione 1, 2 e 3.

Il risultato dell'incubazione è stato visualizzato in Western Blot con un anticorpo anti LF. Anche in questo caso non si è riusciti ad ottenere il legame di LF EY alla MKK6; infatti questo è uscito col non trattenuto dalla colonna.

6. CONCLUSIONI

Con questo lavoro di tesi ci si proponeva di indagare l'interazione tra il fattore letale e la MAPK chinasi 6 isolando il complesso enzima – substrato che si deve venire a creare al momento del taglio proteolitico della MKK6 da parte di LF. Per alcuni enzimi esiste una forte affinità per il substrato, che viene poi a decadere dopo il taglio dello stesso; è quindi pensabile che impedendo il taglio si possa congelare il complesso enzima – substrato e isolarlo come tale.

Esperimenti precedenti di incubazione della MKK6 con un mutante inattivo di LF non avevano dato risultati conclusivi; partendo da questo punto si è deciso di provare ad esprimere LF 3 dom 687 e la MKK6 contemporaneamente, nella speranza che, interagendo direttamente all'interno del batterio, questo migliorasse la possibilità di purificarli insieme. Tale approccio è riportato in letteratura. Tuttavia questo tentativo non ha dato i risultati sperati.

Si è allora tentato di esaminare quali potessero essere le cause di tale insuccesso e si sono prese in esame tutte le proteine coinvolte per verificarne il corretto folding. Esperimenti di dicroismo circolare hanno gettato delle ombre sulla conformazione sia di LF 3 dom. 687, che potrebbe avere una conformazione leggermente differente a LF 3 dom. nel sito attivo, che della MKK6; si è perciò cercato di rimediare utilizzando un altro mutante di LF, LF EY, e una MKK6 purificata secondo un protocollo denaturante e non più nativo. La scelta del protocollo denaturante per la MKK6 nasceva dal sospetto della sua aggregazione: siccome questo problema si riscontrava nella proteina purificata con un protocollo nativo, si è pensato che potesse aggregare direttamente nella cellula batterica e che, quindi, denaturare la proteina e lasciarla rinaturare in dialisi potesse aiutare. Della MKK6 si è anche verificato il taglio da parte di LF wt e il rapporto necessario all'ottenimento dello stesso. Infine, utilizzando un mutante costitutivamente attivo della MKK6 se ne è dimostrata l'attività biologica fosforilando la p38 γ .

Si è cercato, quindi, di incubare la MKK6 con LF direttamente in colonna tenendo la MKK6 legata alla resina: questo perché si sospettava che il motivo dell'insuccesso nei tentativi di isolare la MKK6 con LF fosse legato al fatto che la MKK6 aggrega. Purtroppo LF EY si lega in colonna Ni-NTA (nichel-acido nitriltriacetico) anche da solo, determinando così l'impossibilità di stabilire se il suo

legame in colonna sia dovuto o meno alla presenza della MKK6. In aggiunta, utilizzando una MKK6 fusa con la GST e immobilizzata su una resina, ed incubandola per 4h con LF, non si riesce comunque ad ottenere un legame stabile tra queste due proteine, in quanto LF esce dalla colonna con i lavaggi prima dell'eluizione.

Nonostante l'insuccesso nel tentativo di isolare il complesso tra LF e la MKK6, comunque si possono fare alcune considerazioni sulla natura della loro interazione. Posta, infatti, la bontà delle proteine utilizzate, sembrerebbe che il tipo di interazione sia dinamica e che non ci sia una forte legame tra le due proteine; tutto ciò sembrerebbe essere confermato dai dati di cinetica di LF ottenuti con un peptide funzionalizzato con la pNA e dalle prove di taglio svolte, anche se queste possono dare un risultato meramente qualitativo. Ciò che è possibile ipotizzare è che esista una inibizione da substrato di LF, probabilmente dovuta alla tendenza della MKK6 a legarsi in posizioni improduttive per il taglio.

Esiste anche il forte sospetto di non essere riusciti a produrre una MKK6 che fosse ben conformata, nonostante essa si dimostri in grado di essere tagliata da LF in due frammenti del peso atteso e nonostante sia stato possibile fosforilare la p38 γ con un mutante costitutivamente attivo della MKK6. E' infatti difficile determinare nel caso che la proteina aggrega, come sembrerebbe indicare il risultato del gel di poliacrilammide nativo, quale sia la percentuale di proteina rimasta in soluzione e quale quella aggregata. La percentuale in soluzione potrebbe essere la responsabile del taglio che osserviamo e della fosforilazione della p38 γ , ma la maggior parte della proteina potrebbe essere non strutturata. Proprio per questo motivo sembrava una buona idea immobilizzarla in colonna, ma anche questo approccio non ha prodotto risultati.

Sta, infine, emergendo in letteratura l'evidenza sperimentale che le MAPKK in genere si trovano nella cellula legate alle loro chinasi a monte, le MAPKKK, e a quelle a valle, le MAPK, insieme con altre proteine scaffold che ne aiutano l'interazione. Potrebbe essere, quindi, che la corretta conformazione di queste proteine si raggiunga solo in questi complessi; un possibile approccio sarebbe tentare di incubare queste proteine insieme per vedere se questo migliora il legame al fattore letale.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Atlas, R. M. (2002). "Responding to the threat of bioterrorism: a microbial ecology perspective--the case of anthrax." Int Microbiol **5**(4): 161-7.
- [2] Dixon, T. C., M. Meselson, et al. (1999). "Anthrax." N Engl J Med **341**(11): 815-26.
- [3] Leppla, S. H., J. B. Robbins, et al. (2002). "Development of an improved vaccine for anthrax." J Clin Invest **110**(2): 141-4.
- [4] Singh, Y., B. E. Ivins, et al. (1998). "Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of Bacillus anthracis." Infect Immun **66**(7): 3447-8.
- [5] Sellman, B. R., M. Mourez, et al. (2001). "Dominant-negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax." Science **292**(5517): 695-7.
- [6] Mourez, M., D. B. Lacy, et al. (2002). "2001: a year of major advances in anthrax toxin research." Trends Microbiol **10**(6): 287-93.
- [7] Drysdale, M., S. Heninger, et al. (2005). "Capsule synthesis by Bacillus anthracis is required for dissemination in murine inhalation anthrax." Embo J **24**(1): 221-7.
- [8] Duesbery, N. S., C. P. Webb, et al. (1998). "Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor." Science **280**(5364): 734-7.
- [9] Vitale, G., R. Pellizzari, et al. (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**(3): 706-11.
- [10] Vitale, G., L. Bernardi, et al. (2000). "Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor." Biochem J **352 Pt 3**: 739-45.
- [11] Tonello, F., P. Ascenzi, et al. (2003). "The metalloproteolytic activity of the anthrax lethal factor is substrate-inhibited." J Biol Chem **278**(41): 40075-8.
- [12] Lacy, D. B., D. J. Wigelsworth, et al. (2004). "Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13147-51.

-
- [13] Colanzi, A., T. J. Deerinck, et al. (2000). "A specific activation of the mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis." J Cell Biol **149**(2): 331-9.
- [14] Gonzalez-Gaitan, M. and H. Stenmark (2003). "Endocytosis and signaling: a relationship under development." Cell **115**(5): 513-21.
- [15] Teis, D., W. Wunderlich, et al. (2002). "Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction." Dev Cell **3**(6): 803-14.
- [16] Abrami, L., M. Lindsay, et al. (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**(5): 645-51.
- [17] Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." Biochem J **351 Pt 2**: 289-305.
- [18] Hans Peter Sorensen, Kim Kusk Mortensen (2005). "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli". Journal of Biotechnology. **115**: 113-128.
- [19] Goff, S. A. and A. L. Goldberg (1987). "An increased content of protease La, the lon gene product, increases protein degradation and blocks growth in Escherichia coli." J Biol Chem **262**(10): 4508-15.
- [20] Goldberg, M. D., J. R. Canvin, et al. (1997). "Artefactual cleavage of E coli H-NS by OmpT." Biochimie **79**(6): 315-22.
- [21] Moffatt, B. A. and F. W. Studier (1987). "T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase." Cell **49**(2): 221-7.
- [22] Andrew D. Pannifer, Thiang Yian Wong, Robert Schwarzenbacher, Martin Rensus, Carlo Petosa, Jadwiga Bienkowska, D. Borden lacy, R. John Collier, Sukjoon Park, Stephen H. Leppla, Philip Hanna and Robert C. Liddington (2001). "Crystal structure of the anthrax lethal factor." Letters to nature **414**: 229-234.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il professor Cesare Montecucco per avermi dato la possibilità di svolgere il mio periodo di internato presso il suo laboratorio.

Desidero anche ringraziare la dottoressa Fiorella Tonello per la sua disponibilità e il suo aiuto.

Un grazie di cuore va anche a tutti i compagni di laboratorio: Lucia, Vanina, Federica, Michela, Laura, Andrea, Luca, Alessandra, Irene, Paola, Ornella, Morena, Christophe, Stephanie, Valeria, Anna e Claudio. Vorrei anche citare tutti gli amici che ho conosciuto nel piano e che mi hanno aiutato a sentirmi quasi “a casa” in laboratorio: Paola e Susanna (che ora sono al CRIBI), Debora, Marta (tutte e tre), Mario e Giovanni. Un grazie particolare va a Luca per essersi assunto l'onere del mio papiro, a Lucia per avermi insegnato a lavorare con le proteine, a Federica, a Vanina ed Andrea per gli indispensabili consigli. Inoltre ringrazio veramente tutti per avermi sostenuto ed incoraggiato nel mio desiderio di andare all'estero: benchè non abbia ancora trovato un posto, sono comunque riuscito a fare numerose esperienze, che non sarebbero state possibili senza di voi.

Voglio anche citare gli amici più stretti del mio corso di laurea che hanno diviso con me il cammino di questi 5 anni: Lorenzo, Stefania, Alessandro, Chiara (ce ne sono due), Gaia. Vorrei anche includere Michela, Silvia, Chiara, Rosa, Francesca e Roberta: anche se non vi sento più siete state comunque parte della mia vita nel bene e nel male. Inoltre un saluto speciale va ai miei compagni di appartamento: Chicco, Raffaele, Paolo e Gimmy.

Vorrei ringraziare la mia famiglia, senza la quale nulla di tutto questo si sarebbe potuto realizzare; in particolare un grazie va a mia nonna e alle mie zie. Vorrei anche ringraziare il mio cane Lucky per il supporto psicologico dell'ultimo anno.

Voglio infine salutare gli amici di Trento: Enrico, Walter, Adel, Ivano; voglio anche salutare Yuri, con il quale avevo condiviso gran parte della mia vita e delle aspirazioni, e Consuelo che si ricorda ancora di me dopo tutto questo tempo.

A tutti voi, grazie di cuore!