

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**  
**FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN**

**LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN BIOLOGIA MOLECOLARE**

**ESPRESSIONE, PURIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEL  
FATTORE LETALE DI *Bacillus anthracis* FUSO CON  
*Green Fluorescent Protein***

**TUTOR:** Prof. Cesare Montecucco  
**CO-TUTOR:** Irene Zornetta  
Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

**LAUREANDA: Alessandra Favarin**

**ANNO ACCADEMICO 2007/2008**

## INDICE

Indice	1
Abstract	2
Introduzione	3
Batteriologia	3
Epidemiologia e caratteristiche cliniche	3
Profilassi	4
Fattori di virulenza	4
L'antigene protettivo	5
Il fattore letale	5
Il fattore edematoso	5
Cenni sul meccanismo di endocitosi	6
Legame di PA ai suoi recettori	7
Formazione del poro	7
Azione citotossica delle tossine	8
Adattamento evolutivo	9
Materiali e Metodi	10
Materiali	10
Metodi	12
Tecniche di biologia molecolare	12
Il vettore di espressione	12
<i>Green Fluorescent Protein</i>	13
Induzione batterica ed espressione	14
Tecniche biochimiche	14
Estrazione proteica per estrusione liquida	14
Purificazione per affinità	15
Elettroforesi in gel di acrilammide	15
Concentrazione	15
Quantificazione	16
<i>Western blotting</i>	16
Tecniche di biologia cellulare	16
Coltura cellulare	16
Intossicazione cellulare e immunofluorescenza indiretta	17
Risultati e discussione	18
Espressione e purificazione di LF-EGFP	19
Caratterizzazione di LF-EGFP	20
Intossicazione di cellule ospite	21
Bibliografia	24

## ABSTRACT

*Bacillus anthracis*, è in grado di produrre diversi fattori di virulenza, fondamentali per la patogenesi e l'instaurarsi dell'infezione, i principali sono rappresentati da due tossine: il fattore edematoso (EF) ed il fattore letale (LF), insieme all'antigene protettivo (PA), vanno a combinarsi per formare la tossina edematosa e quella letale, rispettivamente.

In questo lavoro, in particolare, ci siamo soffermati su quest'ultimo; ne abbiamo indotto l'espressione da parte di cellule batteriche come proteina di fusione con una variante fluorescente della *green fluorescent protein*, EGFP, abbiamo purificato la chimera e intossicato cellule in coltura con lo scopo ultimo di seguirne il processo di internalizzazione mediante microscopia a fluorescenza.

## INTRODUZIONE

### BATTERIOLOGIA

*Bacillus anthracis*, l'agente eziologico dell'antrace, il cui nome deriva dalla parola greca “*anthrakis*” che significa carbone, a causa delle caratteristiche lesioni nere tipiche di questa patologia.

Il batterio, Gram positivo, è di forma bastoncellare, ha dimensioni di 1-1.15x3-10 µm, è capsulato, aerobio-anaerobio facoltativo (1).

Fu isolato per la prima volta da Robert Kock nel 1877, che ne scoprì l'eziologia sulla base dei propri postulati e rappresenta l'unico patogeno obbligato del genere *Bacillus* (2).

Quando le condizioni ambientali non sono favorevoli alla sua sopravvivenza forma spore, che resistono anche per decenni (1). Queste sono resistenti alla luce UV, a temperature estreme, a elevati pH, ad alta concentrazione salina e ai normali processi di sterilizzazione (2).

### EPIDEMIOLOGIA E CARATTERISTICHE CLINICHE

L'antrace è una zoonosi alla quale sono suscettibili soprattutto gli animali erbivori. In condizioni normali, le infezioni umane risultano dal contatto con animali infetti o loro prodotti contaminati, come ad esempio lana o pelli.

Sono note tre forme cliniche della malattia: inalatoria, gastrointestinale e cutanea. La prima, la più grave, è causata dall'inalazione delle spore e, anche se molto rara nell'uomo, porta a morte nella quasi totalità dei casi. La maggior parte delle spore vengono distrutte dai macrofagi e dalle cellule dendritiche presenti a livello degli alveoli polmonari, ma una frazione riesce a sopravvivere, germina all'interno dei macrofagi e viene trasportata ai nodi linfatici. La forma vegetativa del batterio passa poi al sistema linfatico e circolatorio determinando la forma sistemica della malattia (3).

La forma gastrointestinale si sviluppa in seguito all'ingestione di cibi o bevande contaminate da spore o bacilli e provoca nausea, vomito, dolore addominale, ulcere ed emorragie nel sito di entrata delle spore ed edema locale nei linfonodi mesenterici; se non trattata adeguatamente ed in tempo porta a morte (2).

Infine la forma cutanea, la più comune nell'uomo, associata alle caratteristiche lesioni nere della pelle e trattabile con antibiotici (3). In alcuni giorni, l'area dell'infezione è interessata dalla comparsa di vescicole nere contenenti batteri, la cui rottura provoca il rilascio del patogeno, lo sviluppo di un' ulcera necrotica e la caratteristica crosta nera con edema tessutale intorno alla lesione (2).

Indipendentemente dalla forma clinica della malattia, si ha una fase asintomatica, a cui segue uno stadio con sintomi aspecifici quali malessere generale, febbre e tosse. Quando il batterio raggiunge alti livelli sistemici provoca edema polmonare, dispnea e cianosi che si concludono generalmente con la morte dell'ospite in

poche ore e le terapie antibiotiche risultano inefficaci (3).

## PROFILASSI

Per il trattamento antibiotico, il farmaco più utilizzato è la penicillina, poiché solo raramente sono stati scoperti ceppi resistenti. *In vitro* *B. anthracis* si è dimostrato sensibile ai più comuni antibiotici come ad esempio le penicilline, tetracicline, cloramfenicolo.

Per molti casi della forma cutanea dell'antrace è consigliato il trattamento con ciprofloxacillina, doxyciclina o amoxicillina.

Il primo vaccino animale per l'antrace è stato sviluppato da Pasteur nel 1881, mentre quello umano non fu disponibile fino alla metà del ventesimo secolo.

La vaccinazione in URSS e Cina utilizza l'inoculazione subcutanea di spore vive.

Nel Regno Unito il vaccino correntemente utilizzato viene formato attraverso un processo di precipitazione del ceppo Sterne non capsulato.

Negli Stati Uniti il vaccino viene prodotto da filtrati di colture cellulari di un particolare ceppo capsulato non proteolitico cresciuto in anaerobiosi. Ad oggi, però, non ne è permessa la somministrazione a civili.

Anche se i vaccini ad oggi disponibili forniscono un'effettiva protezione, risentono di diversi problemi quali il relativo alto costo di produzione e l'associazione ad alcuni effetti indesiderati anche se transienti (1).

## FATTORI DI VIRULENZA

*B. anthracis* possiede tre fattori di virulenza, codificati da due diversi plasmidi, la capsula e due tossine.

La capsula, costituita da acido poligluttammico, è in grado di inibire la fagocitosi del batterio stesso da parte delle cellule del sistema immunitario innato.

Le tossine appartengono alla famiglia delle tossine AB, cioè composte da una subunità dotata di attività catalitica (A) e da un'altra responsabile del legame alla superficie della cellula bersaglio (B) e in alcuni casi della traslocazione della subunità attiva nel citosol.

Nel caso di *B. anthracis*, ci sono due differenti subunità catalitiche dette fattore letale (LF) e fattore edematoso (EF) ma un'unica subunità che media il loro legame a specifici recettori, detta antigene protettivo (PA).

La combinazione binaria di queste proteine dà luogo alla formazione delle due tossine: quando PA è associato a LF si parla di tossina letale (LeTx), mentre quando è combinato con EF di tossina edematosa (EdTx) (3).

LF e EF sono entrambi enzimi che agiscono su substrati intracellulari e il ruolo di PA è proprio quello di portare tali enzimi all'interno della cellula ospite in modo che questi possano venire a contatto con il loro substrato.

Il fattore edematoso (89 kDa) è un'adenilato ciclasi calcio-calmodulina dipendente che causa un drammatico incremento di cAMP nel citoplasma delle cellule intossicate.

Il fattore letale (90 kDa) è una metalloproteasi che taglia specificamente molte

isoforme delle *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) *kinases* (MEKs), le quali fanno parte della più importante via di fosforilazione che collega alcuni importanti recettori di superficie alla trascrizione di geni specifici nel nucleo (5).

### **L'ANTIGENE PROTETTIVO**

L'antigene protettivo è una proteina di 735 residui amminoacidici (83 kDa), il cui nome deriva dal fatto che esso effettivamente induce protezione verso le infezioni. La struttura tridimensionale della forma monomerica consta di quattro domini. Il primo è coinvolto nell'attivazione tramite taglio proteolitico da parte delle furine, che genera la forma tagliata di 63 kDa coinvolta nella formazione del prepore eptamerico. Il secondo con struttura a  $\beta$ -foglietto, va a costituire la parte del poro transmembrana che è responsabile dell'entrata delle due subunità attive nel citosol e sembra coinvolto nel legame con i recettori. È il dominio che va incontro ai maggiori cambiamenti conformazionali indotti da pH durante l'inserimento in membrana del prepore. Il terzo dominio è fondamentale nel mediare l'oligomerizzazione di PA; infine il quarto dominio coinvolto primariamente nel legame ai recettori cellulari (7)

### **IL FATTORE LETALE**

LF è una proteina di 90 kDa con 776 residui amminoacidici, che comprende un dominio N-terminale di legame per PA, un ampio dominio centrale e un catalitico C-terminale.

Il dominio catalitico presenta nel sito attivo una sequenza His-Glu-X-X-His che è molto comune nelle metallo-proteine e costituisce parte del sito di legame allo zinco e del apparato di catalisi. Mutazioni in questo sito di LF rendono la tossina inattiva *in vivo* e *in vitro*. Il *fold*ing di questo dominio risulta unico e non sono state riscontrate omologie con nessuna proteina di altri organismi (3).

Il dominio N-terminale è il dominio che lega PA, è ben separato dal resto della molecola ed è stato dimostrato essere sufficiente per il legame sulla superficie della cellula bersaglio (12).

L'ampio dominio centrale è coinvolto nel reclutamento del substrato e possiede forti somiglianze con la tossina VIP2 di *Bacillus cereus* ad attività ADP-ribosiltransferasica ma manca probabilmente di attività enzimatica (3).

### **IL FATTORE EDEMATOSO**

EF è una proteina di 767 residui amminoacidici e con una massa di 89 kDa. Come nel fattore letale, il dominio N-terminale è coinvolto nell'interazione con PA, entrambi mostrano un'elevata omologia strutturale e competono per lo stesso sito di legame (9).

La regione C-terminale rappresenta la porzione catalitica ad attività adenilato ciclasica attivata da calmodulina, una proteina eucariotica che lega il calcio. Il fattore EF appartiene alla classe II delle adenilato ciclasi, che necessitano della presenza di fattori cellulari dell'ospite per la propria attivazione; ciò assicura che questi enzimi rimangano inattivi nel batterio stesso e si attivino solo in seguito al legame con il loro specifico cofattore all'interno della cellula ospite (3).

## CENNI SUL MECCANISMO DI ENDOCITOSI

Ci sono diversi meccanismi che mediano l'internalizzazione di molecole, fluidi e particelle da parte delle cellule eucariotiche, che possono essere classificati in tre gruppi: clatrina-mediato, caveolare (le caveole sono micro-domini lipidici, contenenti la proteina caveolina, che formano invaginazioni di membrana per il trasporto di macromolecole all'interno della cellula) e infine uno né clatrina né caveolina-dipendente. Il meglio conosciuto è quello clatrina-mediato: la molecola da trasportare si lega ad uno specifico recettore sulla superficie cellulare, ciò porta alla formazione di un'invaginazione ricoperta da clatrina che si sposta all'interno della cellula.

La via è composta da diversi organelli che si estendono dalla periferia della cellula dove si trovano gli endosomi precoci alla zona perinucleare dove ci sono i compartimenti tardivi e di degradazione.

Gli endosomi precoci sono compartimenti dinamici con una complessa organizzazione di cisterne, tubuli e vescicole intraluminari (pH~6.2), rappresentano allo stesso tempo sia il primo punto per l'internalizzazione delle molecole sia un punto di smistamento delle stesse. I circuiti di riciclo e di degradazione sono comunque ben separati al fine di assicurare al cargo la corretta via da seguire.

Porzioni degli endosomi precoci, chiamati corpi multivescicolari (MVB), migrano lungo i microtubuli all'interno della cellula. Gli MVB sono topologicamente distinti sia dagli endosomi precoci sia da quelli tardivi e mediano il trasporto tra questi due componenti.

Gli endosomi tardivi (pH~5,5) rappresentano un altro grande centro di smistamento, dai quali le molecole possono passare ai lisosomi per essere degradate o al *trans Golgi network* (TNG).

I lisosomi maturi si formano per un graduale processo di maturazione degli endosomi tardivi durante il quale il pH intraluminale si acidifica ulteriormente (6).

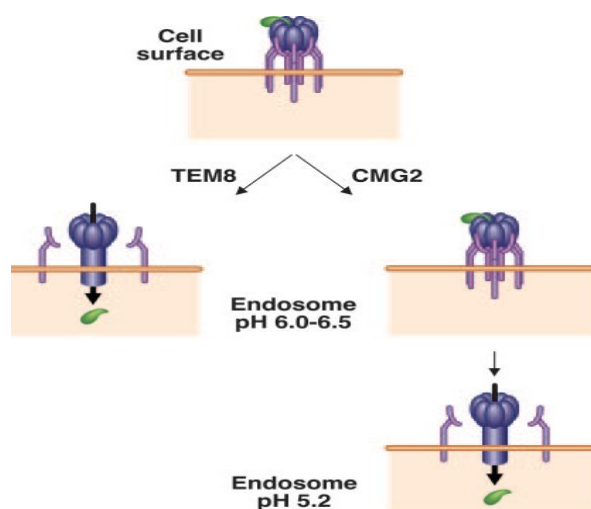
La microscopia e l'uso di traccianti fluorescenti hanno rivelato che alcune molecole endocitate si trovano negli endosomi precoci, appena sotto la membrana plasmatica, in circa 5 minuti e in quelli tardivi localizzati in zona perinucleare in circa 30 minuti. L'endocitosi avviene sia costitutivamente sia in risposta a segnali extracellulari attraverso il legame di un ligando al proprio recettore, come nel caso del legame dell'antigene protettivo ai suoi recettori.

## LEGAME DI PA AI SUOI RECETTORI

Due sono i recettori di membrana a cui l'antigene protettivo è in grado di legarsi, trovati fino ad oggi: tumor endothelial marker-8 (TEM8) e capillary morphogenesis protein-2 (CMG2). Entrambi sono espressi in modo ubiquitario sulla superficie cellulare. Il loro naturale ligando non è ancora stato trovato, ma si sa che TEM8 interagisce con il collagene VI mentre CMG2 interagisce con collagene IV e laminina.

Il primo di questi recettori, TEM8, è stato documentato essere presente nell'epitelio polmonare, intestinale e nella pelle, corrispondenti alle tre vie di entrata del patogeno; mentre il secondo CMG2 è stato dimostrato essere largamente espresso in diversi tessuti.

E' stato dimostrato che il tipo di recettore a cui PA si lega incide fortemente sulla soglia di pH richiesta per la formazione del poro e la traslocazione delle tossine nel citosol. Secondo dati recenti, PA forma il poro a un pH di 6-6.5, quindi a livello degli endosomi precoci quando è legato a TEM8. Se il legame di PA è con il recettore CMG2, invece, è necessaria un'ulteriore acidificazione del pH per la formazione del poro (pH 5.2-5.5), propria degli endosomi tardivi (11).



*Figura 1: Modello della diversa soglia di pH richiesta dai recettori per la formazione del poro.*

## FORMAZIONE DEL PORO

Il legame di PA ad uno dei suoi recettori sulla membrana della cellula ospite avviene in seguito ad attivazione per mezzo di taglio proteolitico da parte di una



furina cellulare che rimuove un frammento di 20 kDa dalla porzione N-terminale, questo provoca l'assemblamento ad eptamero e il legame di LF e/o EF (7). L'eptamerizzazione di PA e il legame delle due subunità attive promuove l'internalizzazione mediante un processo di endocitosi clatrina-dipendente. Il complesso è esposto ad una acidificazione del pH lungo il passaggio nella via endocitica (11). Secondo l'attuale modello ciò promuove l'inserimento dell'eptamero nella membrana, cui segue un cambiamento conformazionale da prepore a poro, che permette alle subunità catalitiche EF e LF di essere trasportate attraverso la membrana.

E' importante dire che la formazione del poro nella membrana endosomiale risulta sensibile al cambiamento del pH. Questo appare cruciale poiché una formazione prematura del poro si tradurrebbe in morte cellulare a causa dell'alterazione della permeabilità e del potenziale di membrana (5).

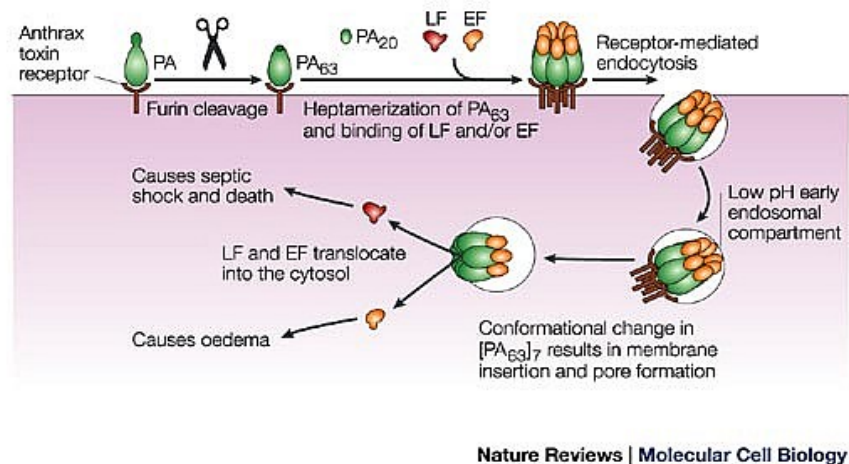


Figura 2: Meccanismo di endocitosi semplificato delle tossine di *B. anthracis*.

## AZIONE CITOTOSSICA DELLE TOSSINE

Una volta nel citoplasma, le porzioni catalitiche delle tossine hanno accesso ai loro rispettivi substrati e cofattori.

EF lega la calmodulina in modo irreversibile e converte ATP in cAMP; tale processo risulta facilitato dalla relativa abbondanza della calmodulina, che rappresenta circa 1% dalle proteine totali all'interno della cellula. L'aumento di cAMP va a turbare l'equilibrio omeostatico della cellula provocando edema e alterando in maniera drastica il *signalling* intracellulare, inoltre coopera con LF per sopprimere la risposta immunitaria (13).

LF agisce sui processi di comunicazione intracellulare andando a tagliare le MEKs, che fanno parte di un fine sistema di regolazione extracellulare delle chinasi e di alcuni processi coinvolti nell'infiammazione, proliferazione, differenziamento, risposta allo stress e sopravvivenza cellulare.

Il taglio delle MEKs cade tra il dominio catalitico e l'estensione N-terminale, regione che è coinvolta nell'interazione con le MAPKs. Ne consegue una ridotta affinità delle MEKs per le MAPKs e in alcuni casi una riduzione dell'intrinseca attività chinasi.

E' stato dimostrato che la tossina letale inibisce la produzione delle citochine proinfiammatorie e promuove il rilascio indotto da lipopolissaccaride (LPS) e interferone  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) di ossido nitrico e *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) nei macrofagi.

Più recentemente è stato dimostrato che LF inibisce la presentazione dell'antigene nelle cellule dendritiche e provoca apoptosi nelle cellule endoteliali, spiegando la permeabilità vascolare che si riscontra nella forma sistemica dell'antrace (5).

## ADATTAMENTO EVOLUTIVO

Il continuo confronto tra microrganismi ed organismi ospite ne influenza l'evoluzione: da una parte l'ospite possiede meccanismi di difesa complessi che derivano da un processo evolutivo di mantenimento e rimodellamento, dall'altra i microrganismi sviluppano varianti dei fattori di virulenza per promuovere la propria crescita e diffusione.

Nel caso di *B. anthracis* i principali fattori di virulenza sono rappresentati dalle tossine. E' stato ipotizzato che EF possa essersi evoluta da un evento di ricombinazione in cui *B. anthracis* catturò un gene eucariotico. Siccome PA, LF ed EF non possiedono attività tossica singolarmente, è possibile che una di esse abbia inizialmente sviluppato tale tossicità per poi mantenerla per pressione selettiva. Le forme ancestrali di EF ed LF potrebbero essere state varianti di enzimi del metabolismo batterico. In seguito al loro rilascio dal citosol potrebbero aver agito come fattori di virulenza ed essersi stabilizzati in tal senso in seguito al vantaggio selettivo che ne derivava. Per quanto riguarda PA sembrerebbe che possa essersi evoluto da una proteina eucariotica. L'esistenza sia di LF che di EF, suggerisce che i loro dominio N-terminale rappresenti un dominio separato. Infatti le sequenze che li codificano possono venire legate a sequenze codificanti una varietà di domini catalitici tramite tecniche di ingegneria genetica. Queste proteine di fusione hanno la capacità di legare PA e, in sua presenza, sono in grado di essere internalizzate da cellule eucariotiche e di seguire la via endocitica (10).

## MATERIALI E METODI

### MATERIALI

Per l'espressione della proteina ricombinante è stato utilizzato come ospite il ceppo di *E. coli* BL21(DE-3)-CodonPlus-RIL, fatto crescere in terreno LB (Luria Bertani; 10 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast extract, 10 g/L NaCl). L'espressione della proteina ricombinante è indotta con IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; Inalco).

Il gel di acrilammide utilizzato nell'elettroforesi SDS PAGE è preparato con *Protogel*, *Protogel Buffer* e *Protogel Stacking Buffer* (National Diagnostic), TEMED (N, N, N, N'-tetrametilendiammina) e APS (ammonio persolfato). I campioni sono trattati con LSB (Laemmli Sample Buffer; 0.35 M Tris-HCl pH 6.8, 10.28% SDS, 36% Glicerolo, 5%  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.012% Blu di bromofenolo), la separazione avviene in tampone di corsa (6 g/L Tris, 1 g/L SDS, 2,88 g/L glicina) e le bande proteiche sono colorate con il colorante *Simply Blue Safe Stain* (Invitrogen). Il marker utilizzato è *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas).

La separazione elettroforetica del *Western Blotting* è effettuata su gel *NuPAGE Novex Bis-Tris Gels* (Invitrogen), utilizzando i marker *High Range Marker (Sigma)*. I tamponi utilizzati per la separazione ed il trasferimento sono *NuPage MOPS Running Buffer* (Invitrogen) e *NuPage Transfer Buffer (Invitrogen)*, rispettivamente.

Lo sviluppo della membrana è effettuato con il *ECL Advance Western Blotting Detection Kit* (Amersham).

Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti:

Mouse anti-His-Tag (Novagen)

Rabbit anti-LF (Abcam)

Rabbit anti-GFP (Abcam)

Gli anticorpi secondari utilizzati coniugati a *Horse Radish Peroxidase (HRP)* sono i seguenti:

Goat anti-Rabbit HRP (Calbiochem)

Goat anti-Mouse HRP (Calbiochem).

L' anticorpo secondario utilizzato nell'immunofluorescenza è:

AlexaFluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen)

La cromatografia di affinità è condotta con una colonna *His Trap™ HP* (Amersham Biosciences) montata su una FPLC (*Fast Performance Liquid*

*Cromatography*) ÄKTAprime (Amersham Pharmacia Biotech) e sono utilizzati i seguenti tamponi: tampone A (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 7.7), 100 mM imidazolo e 500 mM imidazolo entrambi in tampone A. La proteina purificata è conservata in tampone di dialisi (1 mM EDTA, 20 mM TRIS, 20 mM NaCl, pH 7.7).

Il saggio di Bradford è effettuato con il reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250* (BioRad).

Tutti i reagenti chimici sono Sigma e Calbiochem.

# METODI

## TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

### Il vettore di espressione

I plasmidi batterici sono delle molecole circolari di DNA a doppio filamento in grado di replicarsi autonomamente all'interno della cellula. Praticamente tutti i plasmidi usati in biologia molecolare sono artificiali, sono cioè il risultato di manipolazioni relativamente semplici che hanno combinato, all'interno della stessa molecola, elementi genetici ottenuti non solo da plasmidi naturali diversi, ma anche dal DNA di virus e di altri organismi sia procariotici che eucariotici.

Il plasmide usato in questi esperimenti è del tipo pRSET A (Invitrogen).

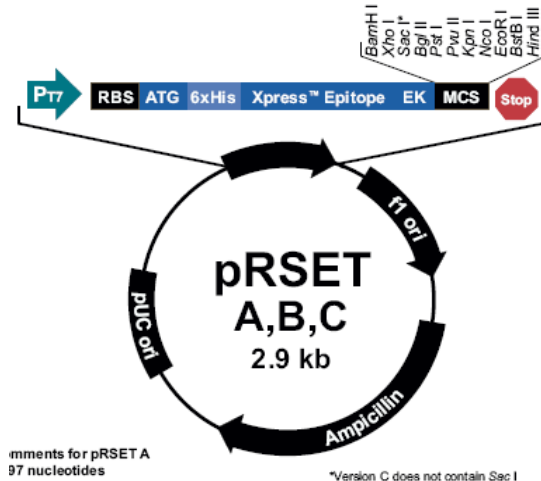


Figura 1: Schema di pRSET A (Invitrogen)

Oltre al gene  $\beta$ -lattamasi che conferisce la resistenza all'ampicillina (Amp<sup>r</sup>) e la necessaria presenza dell'origine di replicazione (ori), il plasmide possiede un promotore virale T7, necessario per una elevata espressione nelle cellule procariotiche, un sito definito MCS, *multiple cloning site*, dove sono presenti numerosi siti per gli enzimi di restrizione più comuni, una sequenza che codifica

per un peptide N-terminale di fusione, un *tag* di poli-istidine, per una rapida purificazione tramite specifiche resine caricate con ioni metallici, e una sequenza di taglio riconosciuta dall'enzima enterochinasi che permette di rimuovere il *tag* di fusione. Si tratta di un vettore designato all'espressione e alla purificazione di alti livelli di proteine eterologhe in *E. coli*. L'espressione del gene di interesse, come già detto, è controllata dal promotore T7, riconosciuto specificamente dalla T7 RNA polimerasi di *E. coli*, che viene indotta dal isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG). Una volta che viene prodotta la polimerasi a un livello sufficiente, si lega al promotore e inizia la trascrizione.

### ***Green Fluorescent Protein***

Recentemente si è avuta una grande rivoluzione nel campo della biologia cellulare grazie alla scoperta della *green fluorescent protein* (GFP) della medusa *Aequorea victoria*, essa appartiene ad una grande famiglia di proteine fluorescenti omologhe (FPs) tipiche di celenterati marini con diversi colori. Esperimenti di mutagenesi hanno ulteriormente diversificato gli spettri, migliorato la brillantezza e diminuito l'oligomerizzazione delle FPs, creando una vasta gamma di nuovi strumenti per l'indagine di complessi processi all'interno di cellule vive. Un grosso vantaggio rispetto ai semplici coloranti organici è che le proteine fluorescenti possono essere fuse geneticamente alla proteina di interesse, così da rendere il *targeting* molto preciso. La GFP è una proteina di 238 amminoacidi (26 kDa) di cui esistono almeno quattro isoforme di struttura primaria che differiscono per piccole mutazioni in posizioni che non ne modificano il comportamento. La sua struttura tridimensionale è costituita da 11 foglietti  $\beta$  che costituiscono un  $\beta$  barrel. Sono poi presenti due  $\alpha$  eliche, una lungo l'asse centrale del cilindro che contiene il cromoforo e una alla base.

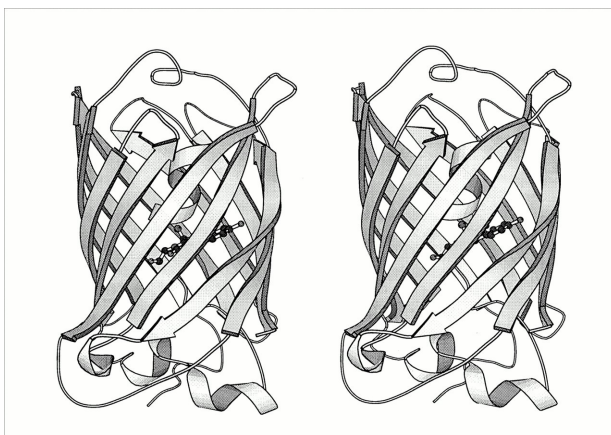


Figura 2: Struttura tridimensionale della proteina GFP, costituita da 11  $\beta$  strands che formano il cilindro con al interno l'  $\alpha$  elica che contiene il cromoforo. La proteina EGFP differisce dalla proteina wild-type per alcune sostituzioni amminoacidiche nella sequenza.

Nei nostri esperimenti è stata utilizzata una variante della proteina detta *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), che fornisce una resa migliore in termini di fluorescenza. Essa ha una lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm e una di emissione di 507 nm. E' importante dire che questa proteina è sensibile al pH, di conseguenza può essere usata come un indicatore dell'acidità del ambiente in cui è presente. Di fatto questa proteina, insieme a molti altri fluorofori, ha reso la microscopia a fluorescenza un metodo molto utile per la visualizzazione di fenomeni cellulari *in vivo*.

### **Induzione batterica ed espressione**

Diverse prove, condotte precedentemente in laboratorio, avevano dimostrato che il ceppo batterico più adatto all'espressione del fattore letale fuso con la proteina fluorescente EGFP era *E. coli* BL21(DE)3.

Il trasferimento del materiale genetico codificante viene effettuato mediante il processo di trasformazione su cellule batteriche precedentemente rese competenti. Quelle che internalizzano il vettore plasmidico vengono selezionate per la resistenza alla ampicillina e fatte crescere a 37°C in agitazione a 180 rpm fino ad una densità ottica di circa 0.375-0.600 nm.

L'induzione verrà provocata nella fase di crescita esponenziale aggiungendo IPTG 1mM alla temperatura di 30°C in agitazione a 180 rpm per quattro ore. Prima di questo momento l'espressione del DNA eterologo è mantenuta a livello basale.

Le cellule sono poi raccolte per centrifugazione e il *pellet* ottenuto viene risospeso con PBS freddo e congelato in azoto liquido.

## **TECNICHE BIOCHIMICHE**

### **Estrazione proteica per estrusione liquida**

Questa tecnica prevede l'utilizzo di una cella d'acciaio dotata di un pistone e chiusa da una valvola (*French Press*) in cui viene inserita la sospensione cellulare. Dopo aver scongelato lentamente il *pellet* batterico, si risospendono le cellule in una soluzione contenente tampone A contenente imidazolo 5mM, lisozima 0,1mg/mL ed inibitori di proteasi. A questo punto si procede con la lisi tramite estrusione liquida.

Dal applicazione di una pressione pari a 1300 psi in camera pre-raffreddata otteniamo la proteina di interesse in soluzione.

Al fine di far depositare i residui cellulari si esegue un ciclo di centrifuga a 4°C per 15 minuti a 18.000 rpm e si raccoglie il surnatante per caricarlo in colonna

cromatografica.

### **Purificazione per affinità**

La cromatografia utilizzata sfrutta una matrice dove il ligando è lo ione rame, presente in una soluzione  $\text{CuSO}_4$  0.1 M. Questo reagisce con l'anello imidazolico delle istidine che costituiscono il *tag* del fattore letale fluorescente che vogliamo purificare.

Prima di iniziare la corsa cromatografica è necessario filtrare il surnatante ricavato dal precedente passaggio; fare il priming dei tubi, prima con acqua, poi con tampone A contenente imidazolo 5mM.

La soluzione contenente la proteina viene caricata in colonna ed eluita attraverso la fase stazionaria per competizione con l'imidazolo 100 mM presente nel tampone A.

Alla fine della corsa cromatografica avremo ottenuto vari campioni proteici da caratterizzare per elettroforesi in gel di acrilammide.

### **Elettroforesi in Gel di Acrilammide**

L'elettroforesi è una tecnica di separazione basata sulla migrazione di proteine cariche in un campo elettrico.

La corsa elettroforetica è stata svolta in presenza del detergente denaturante sodio dodecil fosfato (SDS), che lega le proteine (una molecola ogni due residui amminoacidici) dando carica netta negativa: in questo modo le proteine avranno una velocità di migrazione dipendente solo dalla loro massa.

Conoscendo la massa della proteina di interesse, è possibile verificare in quali frazioni della cromatografia sia presente la proteina ricombinante.

Abbiamo suddiviso in aliquote le frazioni cromatografiche raccolte, abbiamo addizionato ad ognuna di esse LSB e completato la denaturazione proteica sottoponendo i campioni a una temperatura di 95°C per 5 minuti..

Il gel di corsa usato è un gel di acrilammide 12% per separare proteine da 12 a 220 kDa, mentre quello di impaccamento ha una concentrazione di acrilammide al 4%.

Dopo la corsa il gel viene trattato con il colorante Comassie Blu che ha la funzione di rendere visibili le bande proteiche.

### **Concentrazione**

Le frazioni cromatografiche in cui risulta presente la proteina d' interesse, vengono sottoposte a dialisi in tampone Tris (base) 20mM, cloruro di sodio 20 mM e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1mM, pH 7.7; mediante questa operazione è possibile eliminare dalla soluzione proteica l'imidazolo.



Il giorno seguente viene raccolto il materiale dializzato, diviso in aliquote e sottoposto a centrifuga a 4°C per 15 minuti a 13000 rpm, per eliminare eventuali aggregati.

Il surnatante contenente la proteina sarà poi riunito in tubi per la fase di concentrazione che avviene per centrifugazione.

### **Quantificazione**

La quantificazione di proteina ottenuta è stata effettuata utilizzando il saggio di Bradford.

Tale metodo è basato essenzialmente sull'utilizzo del colorante *Coomassie Brilliant blue*, che forma composti colorati con le proteine tramite legami elettrostatici proteina-gruppi sulfonici del colorante quando è in soluzione acida. Il *Coomassie blue* ha un picco di assorbanza a 475 nm, ma in ambiente acido, questo si sposta a 595nm una volta che abbia legato delle proteine.

Si potrà ricavare la concentrazione proteica tramite una retta taratura, che è costruita mettendo in relazione concentrazioni note di albumina di siero bovino (BSA) e la loro rispettiva assorbanza a 620 nm.

### **Western blotting**

Questa tecnica prevede il trasferimento delle macromolecole da un gel, in cui sia avvenuta una separazione elettroforetica, a una membrana di nitrocellulosa (*Shleicher & Shuell*, Protran) tramite campo elettrico e permette la loro rilevazione mediante legame con specifici anticorpi.

Dopo l'*elettroblotting* è necessario saturare la membrana in modo da evitare la formazione di legami aspecifici con gli anticorpi. La membrana è prima incubata per un'ora in soluzione saturante 5% w/v *Blocking Reagent (ECL Advance Western Blotting Detection Kit*, Amersham) in PBST (PBS, 0.1% Tween 20 w/v) poi *overnight* con l'anticorpo primario. Dopo numerosi lavaggi in PBST, la membrana è incubata con l'anticorpo secondario, specifico per il primario, coniugato a *Horse Radish Peroxidase* (HRP).

Dopo accurati lavaggi in PBST si procede con lo sviluppo utilizzando *ECL Advance Western Blotting Detection Kit* (Amersham).

## **TECNICHE DI BIOLOGIA CELLULARE**

### **Coltura cellulare**

Le cellule BHK (baby hamster kidney), fibroblasti di criceto, vengono mantenute

in terreno D-MEM (con glutammina, piruvato e glucosio) addizionato di 10% siero fetale bovino (FBS) e antibiotici (100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina) in atmosfera umidificata con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

Quando assumono la confluenza desiderata, vengono staccate dalla fiasca di coltura mediante trattamento con tripsina 0,25% p/v, contaminate e piastrate per ulteriori saggi o diluite per portare avanti la coltura

### **Intossicazione cellulare e immunofluorescenza indiretta**

Il giorno prima di effettuare l'esperimento, le cellule BHK vengono piastrate su vetrini ad una densità di  $8 \times 10^5$  cellule/mL. Circa 16-18 ore dopo si procede all'incubazione con le componenti che andranno a costituire la tossina: LF-EGFP e PA alle concentrazioni rispettivamente di 200 nM e 600 nM per 40 minuti a 37°C. Dopo un estensivo lavaggio per rimuovere ogni traccia di tossina non legata, le cellule vengono fissate con acetone freddo per effettuare successivamente l'immunofluorescenza indiretta.

Tale tecnica utilizza l'interazione antigene-anticorpo per localizzare particolari epitopi di interesse nelle cellule.

L'anticorpo primario si lega al suo bersaglio nella cellula e un secondo anticorpo marcato con un fluorocromo si lega al primo amplificando la reazione.

In questo caso si esegue una incubazione di un'ora con l'anticorpo primario diretto contro la proteina fluorescente e quello secondario specifico, coniugato con Alexa Fluor<sup>®</sup> 488.

I campioni sono analizzati al microscopio invertito a fluorescenza Leica DMIRE2 con obiettivo ad immersione ad olio, ingrandimento 63X ed un'apertura numerica 1,4. L'osservazione del campione in campo chiaro è stata effettuata usando il filtro Normanski.

L'elaborazione delle immagini è ottenuta attraverso il programma *free ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Negli ultimi anni è stato scoperto molto sulle tossine di *B. anthracis*, la loro struttura, i recettori a cui si legano, come avviene la traslocazione attraverso le membrane, nonché i loro effetti sulle cellule e tessuti.

Tra queste scoperte anche un nuovo modello di entrata, via endocitosi clatrina-mediata, che ha bisogno di essere ulteriormente supportato da studi che richiedono esperimenti *ad hoc* per poter seguire l'internalizzazione delle tossine. Si è perciò deciso di clonare, esprimere e purificare le porzioni dotate di attività catalitica delle tossine come proteine ricombinanti di fusione con proteine fluorescenti, con lo scopo ultimo di seguirle nei diversi compartimenti endocitici.

In questo lavoro ci vogliamo soffermare sulla espressione, purificazione e caratterizzazione del fattore letale fuso con la proteina fluorescente EGFP e inoltre, mediante esperimenti di microscopia a fluorescenza vogliamo verificare che la chimera sia efficacemente internalizzata dal nostro modello cellulare.

L'uso di proteine fluorescenti nella biologia cellulare sta diventando sempre più diffuso grazie allo sviluppo di nuove tecniche di fluorescenza e di biologia molecolare. Inizialmente l'uso della fluorescenza si limitava all'osservazione di piccole molecole di coloranti organici attaccati ad anticorpi contro la proteina di interesse, ma queste tecniche richiedevano la fissazione e la permeabilizzazione del campione in esame (15).

Il vantaggio di metodi genetici, che hanno permesso di creare proteine di fusione tra quelle di interesse e le proteine fluorescenti, è soprattutto quello di non avere bisogno di tecniche invasive per visualizzare in cellule vive una proteina oggetto di studio. Oggi è inoltre possibile ingegnerizzare ulteriormente le proteine affinché includano sequenze che le indirizzino verso un particolare compartimento cellulare.

Tuttavia, è importante considerare tutta una serie di parametri per utilizzare con successo le proteine fluorescenti negli esperimenti biologici.

Per prima cosa la proteina deve essere espressa efficientemente, senza effetti tossici nel modello in esame e dovrebbe essere abbastanza brillante da fornire un segnale superiore alla fluorescenza basale, così da poter essere rilevata in modo affidabile. In secondo luogo, la proteina fluorescente deve essere fotostabile affinché il suo segnale perduri per tutta la durata dell'esperimento.

Terzo, la proteina fluorescente espressa in fusione con la proteina di interesse non deve oligomerizzare, né dare reazioni che possano inficiare l'interpretazione dei risultati e deve mantenere la sua attività catalitica, se presente.

La variante da noi utilizzata, EGFP, differisce dalla proteina *wild type* per alcune sostituzioni amminoacidiche che però non ne modificano il comportamento. La proteina EGFP è costituita da una singola catena polipeptidica e presenta un *folding* molto stabile. Viene eccitata intorno alla lunghezza d'onda di 488 nm ed emette intorno ai 507 nm (14).

## ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DI LF-EGFP

Il fattore letale e quello edematoso, nonché l'antigene protettivo, che si assemblano a formare le esotossine di *B. anthracis*, sono efficientemente espresse e purificate in *E. coli*; studi biochimici hanno rivelato che esse vengono a trovarsi nel citosol batterico e non formano corpi d'inclusione durante l'espressione. Lo stesso ospite batterico è stato scelto in questo lavoro per l'espressione della chimera di LF.

Esperimenti già condotti in laboratorio avevano valutato il livello di espressione della proteina ricombinante in diversi ceppi di *E. coli* e per diversi tempi di induzione. Le prove precedenti, effettuate con IPTG 1 mM alla temperatura di 30°C per tempi di induzione da 2 a 4 ore, avevano stabilito che il livello di espressione della proteina d'interesse, valutato mediante gel elettroforesi in presenza di SDS dei diversi campioni batterici, era migliore nel ceppo BL21(DE-3) di *E. coli*, indotto per 4 ore con IPTG 1 mM.

Partendo da 1,0 L di coltura di batteri trasformati con il costrutto d'interesse, l'espressione della proteina è stata condotta secondo le condizioni descritte sopra. Il pellet batterico, ottenuto secondo il protocollo riportato precedentemente, è stato risospeso in un tampone contenente un *cocktail* di inibitori di proteasi per limitare al massimo la degradazione proteica. Il lisato, una volta chiarificato, è stato caricato in una colonna pre-caricata con  $\text{Cu}^{2+}$ , che mostra una più elevata affinità per le istidine rispetto ad altri ioni metallici comunemente utilizzati ( $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ ) per la purificazione per affinità.

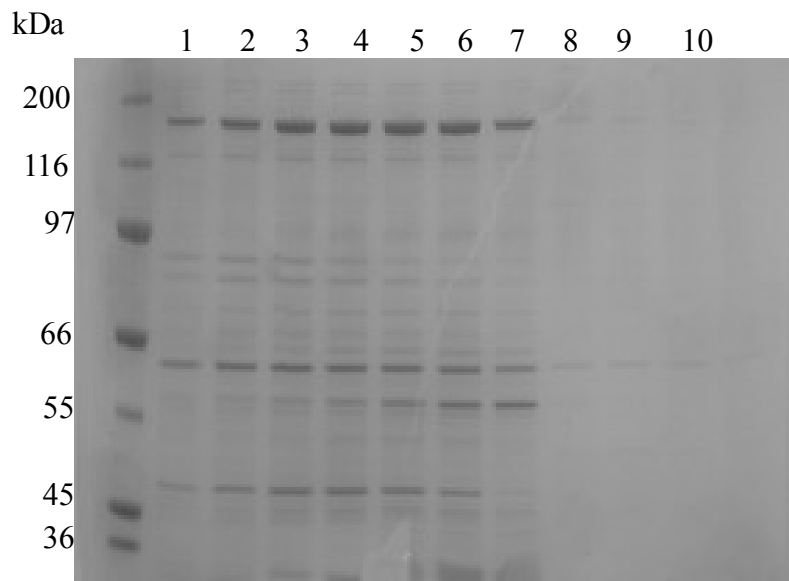
L'eluizione è stata condotta con un gradiente discontinuo di tampone A 100 mM imidazolo e 500 mM imidazolo. Il primo *step*, dallo 0 al 10% di tampone A 100 mM imidazolo in 50 ml, causa il distacco delle proteine legate debolmente. L'eluizione di LF-EGFP avviene durante il secondo *step*, con un gradiente dal 10 al 40% di tampone A 100 mM imidazolo in 50 ml. Le frazioni più arricchite della proteina d'interesse risultano essere quelle raccolte tra 22-33 mM di imidazolo (Figura 1). Il gradiente di eluizione scelto è stato relativamente veloce per ottenere frazioni a concentrazione maggiore di proteina ricombinante, anche se questo approccio può penalizzare un po' la purezza del campione. Come si vede in figura nelle frazioni corrispondenti al terzo *step* del gradiente scelto, da 40 a 100% di tampone A 100 mM imidazolo non viene eluita la proteina di interesse.

Una prima analisi del risultato della cromatografia è stata effettuata tramite SDS-PAGE delle frazioni di eluato ottenute.

La migrazione in SDS-PAGE di questi campioni ha rivelato che in effetti le frazioni ottenute contengono una quantità relativamente bassa di contaminanti.

Le frazioni contenenti la proteina d'interesse sono dunque state sottoposte a dialisi per eliminare l'imidazolo in un tampone a bassa forza ionica.

La concentrazione della proteina ricombinante, dopo concentrazione per centrifugazione, valutata con il saggio di Bradford, ha consentito di determinare che la preparazione è concentrata 1,5 mg/mL.



*Figura 1: Gel di elettroforesi in presenza di SDS. Le lanes dalla 2 alla 4 contengono le frazioni contenenti la proteina di interesse che sono state dializzate. La proteina oggetto d'esame risulta presente anche nelle lanes dalla 5 alla 7 ma poiché si riscontra anche una più alta presenza di contaminanti queste frazioni non sono state incluse nel pool da dializzare.*

## **CARATTERIZZAZIONE DI LF-EGFP**

La preparazione di LF-EGFP ottenuta è stata analizzata, oltre che tramite gel elettroforesi in presenza di SDS, con *Western blot* (Figura 2).

La caratterizzazione è stata condotta con più anticorpi primari, ciascuno contro una diversa porzione della proteina di fusione. L'anticorpo che riconosce le sei istidine presenti all'N-terminale della proteina chimerica, quello per LF (residui 47-75) in grado di legare la porzione N-terminale della porzione catalitica ed infine l'anticorpo specifico per la proteina fluorescente GFP, che si lega alla regione più C-terminale (EGFP) riconoscendo i residui conservati tra le due proteine fluorescenti.

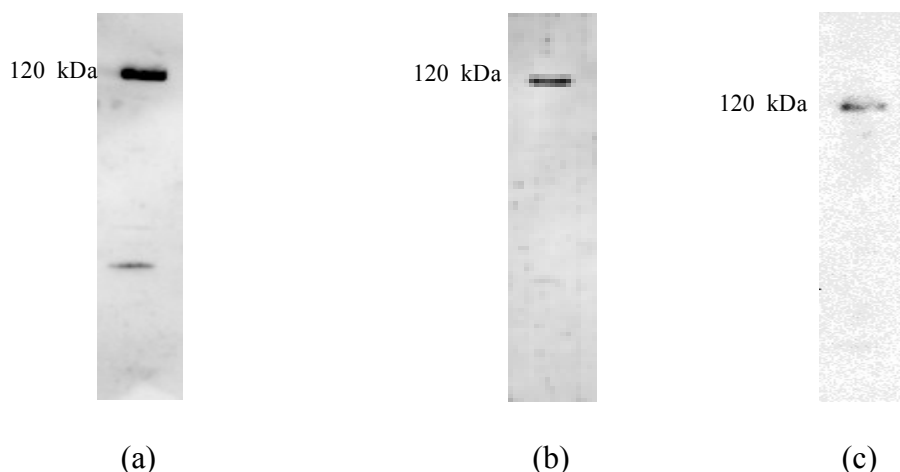


Figura 2: *Western blot* della proteina marcata con anticorpo specifico contro il *tag* di istidine (a), contro la porzione N-terminale (residui 47-75) di LF (b) e contro la proteina fluorescente GFP (c).

Nella preparazione ottenuta sono presenti leggere tracce di proteina tronca o degradata a peso molecolare inferiore rispetto alla proteina ricombinante d'interesse. Dal confronto tra le bande proteiche ottenute in SDS-PAGE e quelle visualizzate in *Western blot* si può evincere che dopo la purificazione, nel campione non siano presenti tracce rilevanti di specie contaminanti. Inoltre si nota che l'anticorpo specifico per la GFP marca esclusivamente la banda al peso atteso della proteina, escludendo l'eventualità che la proteina fluorescente EGFP sia stata persa dal costruito.

## INTOSSICAZIONE DI CELLULE OSPITE

Per studiare l'interazione tra le tossine di *B. anthracis* e la cellula ospite, le cellule sono trattate con LF fuso alla EGFP (LF-EGFP), in presenza di PA per dare modo alla tossina di assemblarsi sulla superficie cellulare. Esperimenti precedenti di *live imaging* condotti con la tossina edematosa *wild-type* mostravano la sua attività catalitica nel citoplasma dopo 30-40 minuti dall'intossicazione (15), così si è deciso di incubare le cellule per 40 minuti per assicurarsi un elevato tasso di entrata della tossina nelle cellule. Per rendere più intensa la fluorescenza della chimera, dopo il fissaggio le cellule sono sottoposte a immunofluorescenza indiretta con anticorpo primario anti- GFP.

Si noti come le cellule, nei campi mostrati nella figura sottostante (Figura 3, pannello b e d) rispondano in modo omogeneo alla tossina ricombinante. La proteina LF-EGFP si localizza all'interno delle cellule, in zona perinucleare, in modo del tutto simile alla tossina edematosa *wild-type* (15).

La distribuzione degli *spot* fa supporre che la chimera si trovi a livello degli endosomi tardivi, ciò sarebbe in linea con altri dati disponibili in laboratorio.

La proteina fluorescente legata alla chimera ricombinante continua ad essere visibile nonostante il pH di questi organelli sia acido al punto tale da attenuare la fluorescenza della GFP del 80% circa, a causa del fatto che in preparati fissati non è possibile il mantenimento del gradiente protonico dei compartimenti endosomiali.

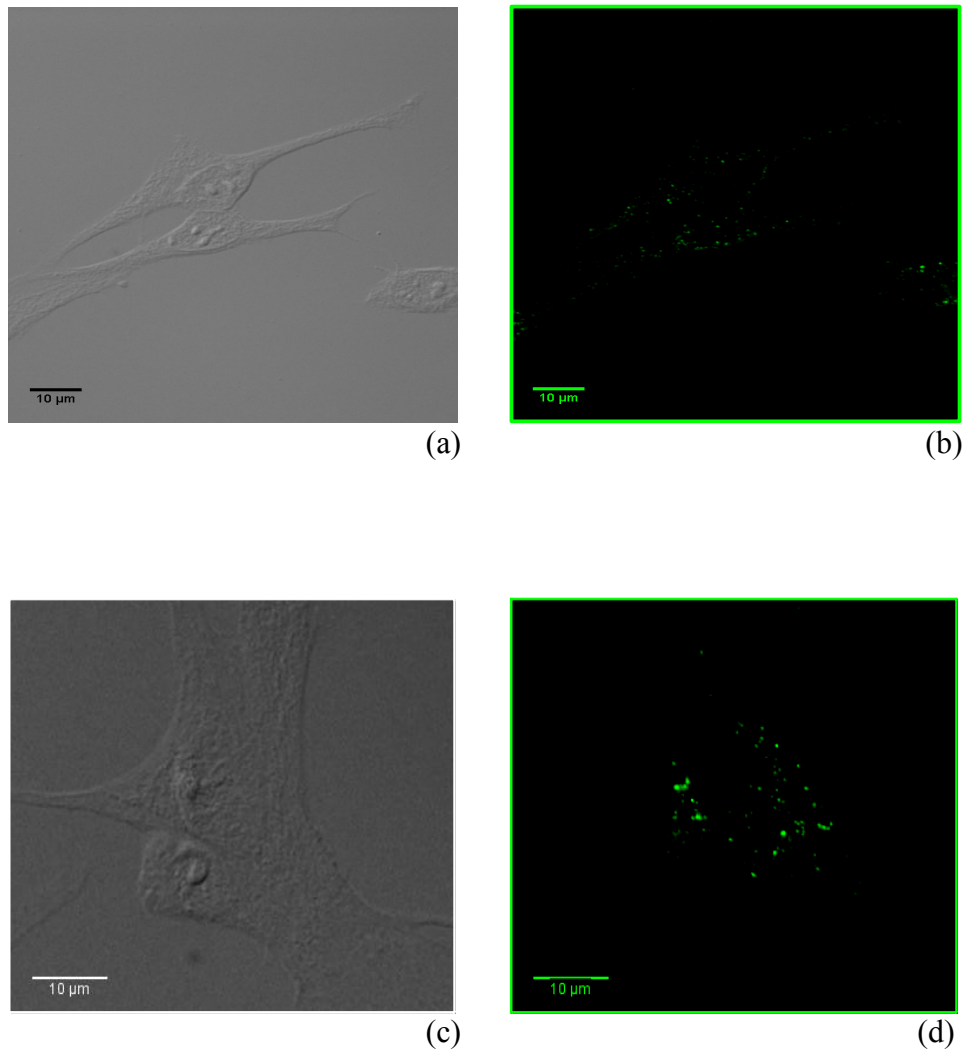


Figura 3: Cellule BHK incubate con LF-EGFP 200 nM in presenza di PA 600 nM a 37°C per 40 minuti, fissate ed osservate al microscopio a fluorescenza.

Nel pannello a-c sono mostrati due campi con cellule in campo chiaro e b-d in fluorescenza.

In conclusione, l'espressione della proteina chimerica LF-EGFP in cellule di *E. coli* BL21(DE-3) con protocollo di induzione di 4 ore con IPTG 1mM a 30°C ha dato un buon risultato. Dopo purificazione per cromatografia di affinità abbiamo ottenuto una preparazione alla concentrazione di 1.5 mg/ml e la successiva analisi in *Western blot* rivela che la proteina di interesse è intera, non degradata e presenta

poche forme di contaminanti.

Infine, l'analisi in microscopia rivela che, dopo 40 minuti di intossicazione in cellule BHK, essa si va a concentrare in piccoli spot in zona perinucleare, mostrando una distribuzione attesa, come detto appena sopra.

E' chiaro che ulteriori indagini vanno affrontate soprattutto per testare se l'attività catalitica viene preservata senza alterazioni, cui seguirà, in caso di esito positivo, un'approfondito studio di microscopia su cellule vive per poter sfruttare al massimo le potenzialità di questo costruito.



## BIBLIOGRAFIA

- (1) Spencer RC (2003) *Bacillus anthracis*. J Clin Pathol 56:182-187
- (2) Oncu S *et al.*, (2003) Anthrax: an overview. Med Sci Monit 9:RA276-83
- (3) Turk BE (2007) Manipulation of signalling pathways by Anthrax toxins. Biochem J 402:405-417
- (4) Kumar P *et al.*, (2001) Purification of anthrax edema factor from *Escherichia coli* and identification of residues required for binding to anthrax protective antigen. Infect Immun 69:6532-6536
- (5) Abrami L *et al.*, (2005) Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. Trends Microbiol 13:72-78
- (6) Gruenberg J (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. Nat Rev Mol Cell Biol 2:721-730
- (7) Young JAT and Collier RJ (2007) Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation and translocation. Annu Rev Biochem 76:243-265.
- (8) Lacy DB *et al.*, (2002) Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors. J Biol Chem 277:3006-3010.
- (9) Mock M and Mignot T (2003) Anthrax toxins and the host: a story of intimacy. Cell Microbiol 5:15-23.
- (10) Rainey GJ *et al.* (2005) Receptor-specific requirements for anthrax toxin delivery into cells. Proc Natl Acad Sci U S A 120:13278-13283.
- (11) Milne JC *et al.*, (1995) Protective antigen-binding domain of anthrax lethal factor mediates translocation of a heterologous protein fused to its amino- or carboxy-terminus. Mol Microbiol 15(4):661-6.
- (12) Paccani RS *et al.*, (2005) Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. J Exp Med. 201(3):321-31 .
- (13) Shaner NC *et al.*, (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. Nat Methods 2:905-909.
- (14) Giepmans BNG *et al.*, (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. Science 312:217-224.
- (15) Dal Molin F *et al.*, (2006) Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin. EMBO J. 25(22):5405-13.