

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI FARMACIA

Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

TESI DI LAUREA

**Preparazione e caratterizzazione di mutanti della
tossina letale di *Bacillus anthracis***

Relatore: Dr. Vincenzo De Filippis

Correlatori: Ch.mo Prof. Cesare Montecucco

Dr.ssa Fiorella Tonello

Laureanda: Laura Naletto

Anno Accademico 2001-2002

INDICE

INDICE	3
ABBREVIAZIONI	5
NOMENCLARURA DEGLI AMMINOACIDI	6
1. INTRODUZIONE	7
1.1 IL CARBONCHIO E IL <i>B. ANTHRACIS</i>	7
1.1.1 <i>Patogenesi</i>	8
1.1.2 <i>Terapia e profilassi</i>	9
1.2 FATTORI DI VIRULENZA DI <i>B. ANTHRACIS</i>	10
1.2.1 <i>Antigene protettivo</i>	10
1.2.2 <i>Fattore edematogeno</i>	12
1.2.3 <i>Fattore letale</i>	13
1.3 CENNI SULLE METALLOPEPTIDASI	15
1.4 MECCANISMO DI INGRESSO NELLA CELLULA DEL COMPLESSO PA-LF/EF	18
1.5 BERSAGLI INTRACELLULARI DI LF	19
1.5.1 <i>La via di trasduzione di MAPK</i>	19
1.5.2 <i>Inattivazione di MAPKK da parte di LF</i>	22
1.6 EFFETTI CELLULARI	24
2. SCOPO DELLA TESI	27
3. MATERIALI E METODI	29
3.1 MATERIALI	29
3.2 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE	29
3.2.1 <i>Clonaggio del gene della proteina Protective Antigen in pET19b</i>	29
3.2.2 <i>Separazione di frammenti di DNA elettroforesi in gel d'agarosio</i>	30
3.2.3 <i>Preparazione di cellule competenti</i>	31
3.2.4 <i>Trasformazione di cellule competenti</i>	31
3.2.5 <i>Mutagenesi sito-specifica di LF</i>	32
3.2.6 <i>Test di vitalità cellulare con tetrazolinio</i>	33
3.3 TECNICHE BIOCHIMICHE	33
3.3.1 <i>Elettroforesi in gel di poliacrilammide in presenza di SDS</i>	33
3.3.2 <i>Espressione e purificazione di proteine di fusione con Glutazione S- transferasi o con His¹⁰-tag mediante cromatografia di affinità</i>	34
3.3.3 <i>Purificazione di una proteina tramite gelfiltrazione</i>	36
3.3.4 <i>Sintesi di peptidi substrati di LF</i>	36
3.3.5 <i>Purificazione di peptidi tramite RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography)</i>	37
3.3.6 <i>Ottenimento di apo-LF</i>	38
3.4 TECNICHE SPETTROSCOPICHE	38
3.4.1 <i>Quantificazione del DNA tramite spettroscopia di assorbimento</i>	38
3.4.2 <i>Quantificazione di una proteina tramite spettroscopia di assorbimento</i>	39

3.4.3	<i>Misure di dicroismo circolare</i>	39
3.4.4	<i>Valutazione della fluorescenza di proteine</i>	40
3.4.5	<i>Valutazione dell'attività enzimatica dei mutanti di LF tramite spettroscopia di assorbimento</i>	40
3.4.6	<i>Determinazione del contenuto di ione Zn^{2+} tramite spettroscopia di assorbimento atomico</i>	41
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	43
4.1	MUTAZIONI SITO-SPECIFICHE DEL FATTORE LETALE DI <i>B. ANTHRACIS</i>	43
4.2	ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE	43
4.3	DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI IONE ZN^{2+} DI LF E DEI MUTANTI	44
4.4	ANALISI SPETTROSCOPICHE	45
4.5	DENATURAZIONE INDOTTA DA GUANIDINIO: MISURE DI 'MELTING' CHIMICO	48
4.6	SAGGI DI ATTIVITÀ ENZIMATICA DI LF E DEI MUTANTI	50
5.	CONCLUSIONI	53
6.	BIBLIOGRAFIA	55

ABBREVIAZIONI

ADP	adenosina 5'di-fosfato
APS	ammonio persolfato
ATP	adenosina 5'tri-fosfato
ATR	recettore per le tossine dell'antrace
BBF	blu di-bromo fenolo
CHO	cellule ovariche di Hamster
EdTx	tossina edematogena
EF	fattore edematogeno
GSH	γ glutammil-cisteinil-glicina (glutazione)
GST	glutazione-S-transferasi
IL1, IL2, IL6	interleuchine
LB	mezzo di coltura Luria Bertani
LDH	lattato deidrogenasi
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
PBS	soluzione salina tamponata con fosfato
PLA2	fosfolipasi A2
RNI	intermedi reattivi dell'azoto
ROI	intermedi reattivi dell'ossigeno
SDS	sodio-dodecil-solfato
TEMED	N-,N-,N'-, N'-tetrametilendiammina
TFA	acido trifluoroacetico
TNFα	fattore di necrosi tumorale α
VWA	fattore di von Willerbrand di tipo A

NOMENCLARURA DEGLI AMMINOACIDI

Amminoacido	Codice a Tre Lettere	Codice Monolettera
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Acido aspartico	Asp	D
Cisterna	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	Q
Valina	Val	V

1. INTRODUZIONE

1.1 IL CARBONCHIO E IL *B. anthracis*

Il carbonchio, o antrace, è un'infezione batterica che, dal punto di vista epidemiologico, colpisce principalmente animali erbivori e più raramente l'uomo.

L'agente eziologico del carbonchio è *B. anthracis*, un batterio gram positivo, a forma di bastoncello, aerobio, anaerobio facoltativo, in grado di formare spore in condizioni ambientali sfavorevoli alla sopravvivenza del microrganismo. Tali spore sono molto resistenti ai normali processi di sterilizzazione, quali calore, luce ultravioletta, raggi γ o agenti chimici e possono penetrare nell'organismo ospite attraverso lesioni cutanee, per inalazione o per ingestione. Una volta penetrate, le spore possono germinare e dare origine alla forma vegetativa del bacillo, che si riproduce velocemente e secreta le tossine, antigene protettivo (PA), fattore edematogeno (EF) e fattore letale (LF), le quali, contribuiscono alla patogenesi dell'antrace. La particolare resistenza rende le spore di *B. anthracis* adeguate, nella peggiore delle eventualità, ad essere utilizzate come arma biologica: possono, infatti, essere prodotte facilmente in laboratorio [Knight e Check, 2002], e altrettanto facilmente possono essere disseminate sottoforma d'aerosol nell'ambiente. Le spore così disperse possono essere inalate e causare la forma più grave di carbonchio [Inglesby et al., 2002]. Di grande attualità è il loro potenziale uso da parte di gruppi terroristici: a tale proposito nel 2001 si è verificato un attacco terroristico negli Stati Uniti, che ha portato alla morte di cinque persone su undici casi conclamati di antrace [Jernigan et al., 2001]. Lo sviluppo dell'antrace come mezzo di distruzione di massa risale al periodo della prima guerra mondiale. La più grande epidemia, che ha portato alla morte di 68 persone, si è verificata nel 1979 in una località russa, a causa della fuoriuscita non intenzionale di spore di antrace da un laboratorio militare [Meselson, 1994]: nonostante le convenzioni internazionali, che vietano l'uso di armi

biologiche nei conflitti, alcune sono state testate e probabilmente continuano ad essere sviluppate da alcune nazioni.

1.1.1 Patogenesi

L'antrace può assumere due diverse forme cliniche nell'uomo, secondo la modalità di infezione: l'antrace cutaneo e quello da inalazione [Dixon et al., 1999]. Raramente possono manifestarsi complicazioni a livello intestinale, quando le spore vengono ingerite, o a livello delle meningi.

Antrace cutaneo

Rappresenta la forma di infezione più frequente, soprattutto per le persone a rischio di esposizione professionale, che possono venire a contatto con animali infetti o loro prodotti. Le spore penetrano nell'organismo generalmente attraverso una lesione cutanea e già dopo qualche giorno compare una macula priva di dolore 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.

Antrace da inalazione

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.

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.

1.1.2 Terapia e profilassi

Il trattamento farmacologico standard per l'antrace prevede la somministrazione di antibiotici, solitamente penicillina o doxiciclina, ma possono essere utili anche streptomina, eritromicina o cloramfenicolo [Barlett et al., 2002], 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. La durata della terapia non è definita, può variare da 60 a 100 giorni: 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. Attualmente il vaccino impiegato per le persone a rischio di esposizione a livello professionale, è costituito da supernatante di colture di *B. anthracis* tossinogenici e privi di capsula, precipitato con idrossido di alluminio, (AVA, 'anthrax vaccine adsorbed'). [Leppla et al., 2002] Il principale componente immunogenico è l'antigene protettivo, PA, per questo sono in fase di studio dei vaccini costituiti da proteine mutanti di PA, che non presentano il sito di taglio riconosciuto dalle proteasi cellulari (vedere paragrafo 1.4): tali mutanti non risultano tossici, ma sono in grado di provocare un'intensa risposta immunitaria, simile a quella sviluppata da PA nativo [Singh et al., 1998]. 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 [Sellman et al.,

2001]. 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 fattori di virulenza prodotti da *B. anthracis* comprendono la capsula, che viene codificata da un gene presente nel plasmide pXO2, e le esotossine, i cui geni si trovano a livello del plasmide pXO1 [Brossier et al.,2001].

La capsula rappresenta un'importante difesa del batterio nei confronti del sistema immunitario dell'ospite, è costituita da acido poli-D-glutammico e possiede spiccate proprietà antifagocitarie, importanti nelle prime fasi dell'infezione.

Le esotossine, la tossina edematogena (EdTx) e la tossina letale (LeTx), sono costituite da due subunità, A-B: la subunità A entra nel citosol delle cellule bersaglio ed esplica gli effetti tossici ad essa correlati, la subunità B si lega alla superficie cellulare e permette la traslocazione della subunità A. Entrambe le tossine sono composte da una singola subunità B, l'antigene protettivo (PA) e da due subunità A diverse: il fattore edematogeno (EF) per EdTx e il fattore letale (LF) per LeTx. La combinazione di PA e EF causa edema quando viene iniettata per via intradermica, mentre la combinazione di PA e LF causa morte se iniettata per via endovenosa. Nessuna di queste proteine è tossica, se iniettate separatamente [Friedlander, 1986].

1.2.1 Antigene protettivo

L'antigene protettivo è una proteina di 735 amminoacidi, con una massa molecolare di 83 KDa. La molecola presenta quattro domini, strutturalmente e funzionalmente distinti (figura 1.1) [Petosa et al., 1997]. Il dominio 1 (residui 1-249) contiene il sito di taglio che viene riconosciuto da proteasi presenti sulla superficie cellulare o a livello sierico, che portano alla formazione di PA₆₃, di 63 KDa, e PA₂₀, di 20 KDa, permettendo in questo modo l'attivazione della proteina. Il dominio 2 (residui 250-487) è costituito

Introduzione

da un 'core' di struttura β con un largo e flessibile 'loop', che sembra essere implicato nella formazione del canale di transmembrana. Il dominio 3 (residui 488-594) è il più piccolo dei quattro domini e presenta una regione idrofobica, che sembra essere importante nell'interazione proteina-proteina: recentemente è stato evidenziato che tale dominio è coinvolto nel processo di oligomerizzazione di PA₆₃. Il dominio 4 (residui 595-735) presenta pochi contatti con gli altri domini, che invece sono intimamente associati tra loro, ed è implicato nel legame alla superficie cellulare [Little et al., 1996; Novak et al., 1992; Singh et al., 1991].

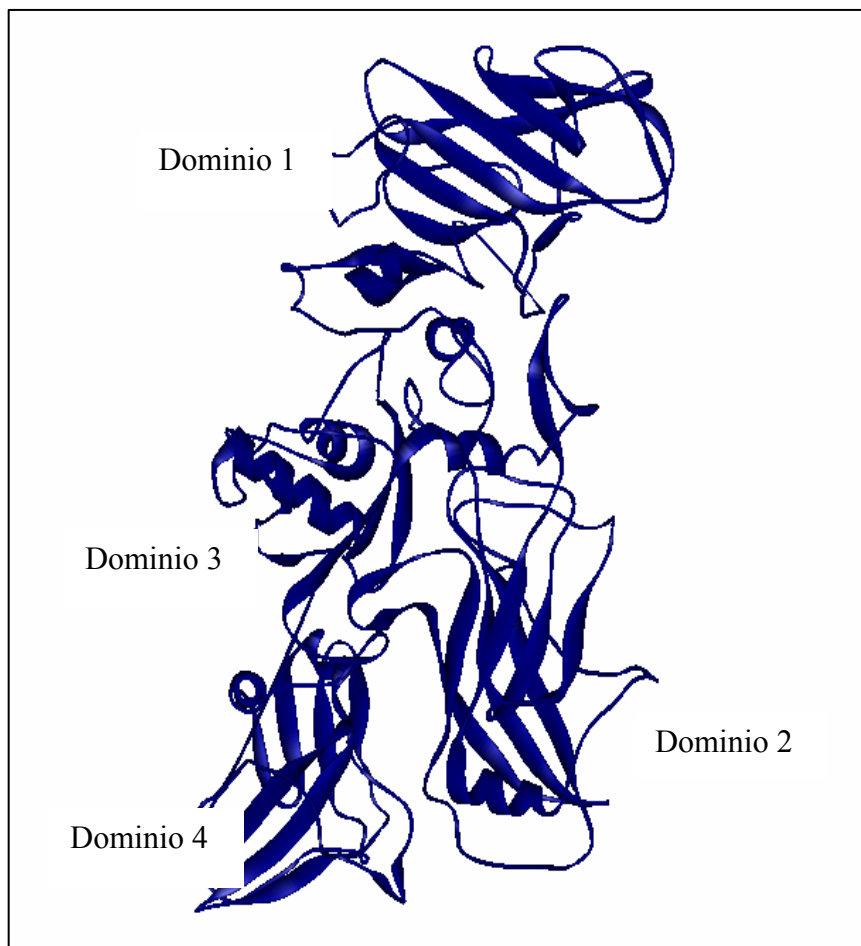


Figura 1.1. Struttura tridimensionale di PA; la figura è stata ottenuta tramite il programma WebLab utilizzando il file di coordinate 1ACC depositato nella Protein Data Bank (PDB) [Petosa et al., 1997].

Recentemente è stato identificato il recettore che lega l'antigene protettivo alla superficie cellulare [Bradley et al., 2001] ed è stato denominato ATR ('Anthrax Toxin Receptor'). Esso è una proteina di 368 amminoacidi, costituito da un dominio extracellulare di notevoli dimensioni, un singolo segmento di transmembrana e una corta sequenza citoplasmatica, con residui acidi, che sembrano mediare la co-localizzazione con una proteasi furina-simile. Una porzione del dominio extracellulare mostra un'elevata omologia di sequenza con il fattore di Von Willerbrand di tipo A (VWA). VWA è spesso presente nei domini extracellulari delle integrine, proteine che interagiscono con la matrice extracellulare. La funzione fisiologica di ATR non è tuttora nota, potrebbe essere coinvolto nell'interazione della cellula con la matrice extracellulare.

1.2.2 Fattore edematogeno

Il fattore edematogeno è una proteina di 767 amminoacidi avente massa molecolare di 89 KDa. Esso è un'adenilato-ciclastasi calmodulina-dipendente, che converte l'ATP in cAMP. 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 auriginosa*: in seguito all'interazione con la calmodulina, una proteina ubiquitaria sensibile alle variazioni di Ca^{2+} intracellulare, avvengono delle variazioni strutturali che portano ad un aumento dell'affinità per il substrato. La molecola presenta tre sequenze altamente conservate: un sito di legame per l'ATP [Escuyer et al.,1988; Xia and Storm, 1990; Labruyère et al., 1991], un sito di legame per la calmodulina (residui 499-532 e 150 residui al C-terminale) [Munier et al.,1992; Labruyère et al.,1990] e la porzione N-terminale, che è coinvolta nell'interazione con PA [Labruyère et al.,1994; Little et al.,1994]. La regione N-terminale presenta un'elevata omologia di sequenza con la porzione N-terminale di LF [Arora e Leppla, 1993].

1.2.3 Fattore letale

Il fattore letale è una proteina di 776 amminoacidi, con massa molecolare di 90 KDa, che possiede attività Zn^{2+} -endopeptidasica. Recentemente è stata risolta la struttura cristallografica di LF [Pannifer et al., 2001]: la molecola è alta 100 Å, larga 70 Å alla base e comprende quattro domini (figura 1.2). Il dominio 1 (residui 1-262) è ben separato dagli altri domini, prende contatto soltanto con il dominio 4 attraverso interazioni di tipo idrofilico. Esso 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 [Gupta et al., 2001; Lacy et al., 2002]. Il dominio 2 (residui 263-297 e 385-550) presenta un'omologia strutturale con il dominio catalitico della tossina VIP2 di *B. cereus*, ad attività ADP-ribosilante, ma non sono conservati i residui coinvolti nella catalisi. Il dominio 3 (residui 303-382) è inserito tra la seconda e la terza elica del dominio 2 e contiene una serie di sequenze ripetute, di 19 amminoacidi ciascuna, ricche in acido glutammico, che conferiscono stabilità alla proteina [Quinn et al., 1991]. Il dominio 4 è costituito prevalentemente da α -elica e presenta omologia strutturale con il dominio 1, anche se tali domini sono funzionalmente distinti. Esso possiede inoltre omologia di sequenza con altre metallopeptidasi, come la termolisina, presenta infatti il motivo di consenso HEXXH (residui 686-690), coinvolto nella coordinazione dello ione metallico, tipico di tale classe di enzimi [Klimpel et al., 1994]. Il dominio 4 contiene il sito catalitico, in cui uno ione Zn^{2+} è coordinato tetraedricamente dalle due istidine H686 e H690 del motivo ricorrente, da una molecola d'acqua e da un residuo di acido glutammico, E735. Tale sito si trova in una profonda tasca di 40 Å, la cui superficie risulta carica negativamente per la presenza di residui di aspartato e di glutammato ed è costituita dall'interfaccia tra i domini 2, 3 e 4 (figura 1.3).

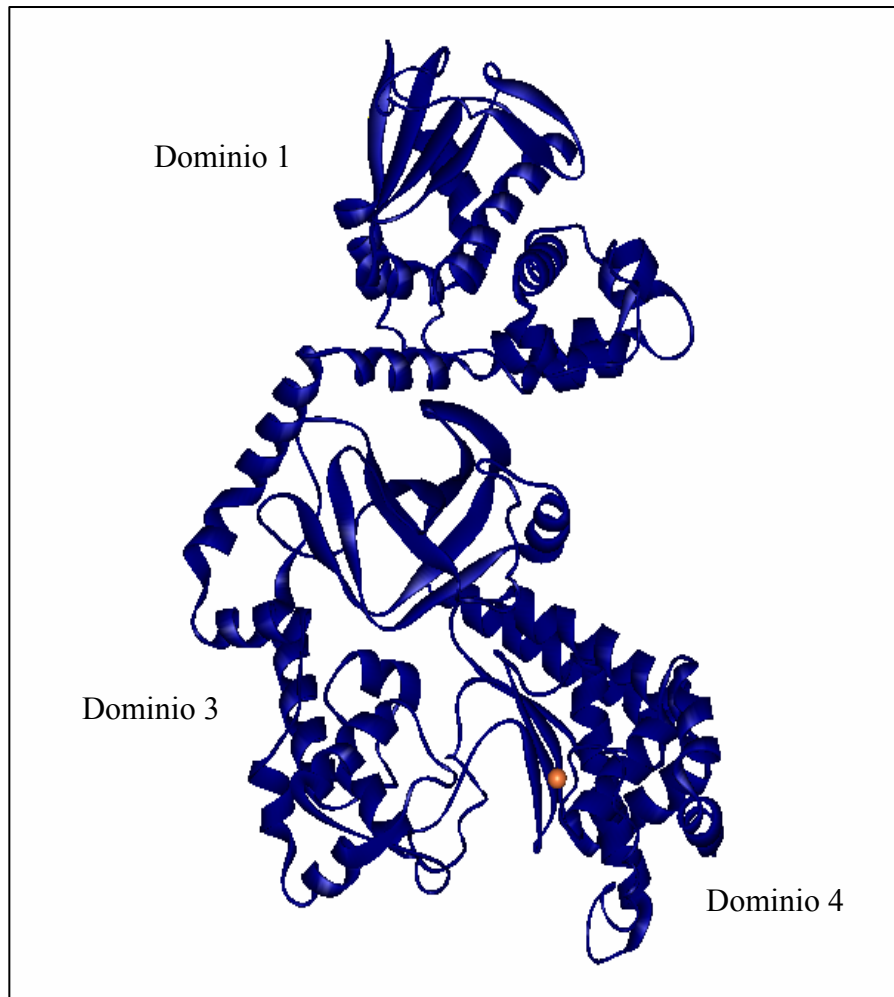


Figura 1.2. Struttura tridimensionale di LF; la figura è stata ottenuta tramite il programma WebLab utilizzando il file di coordinate J7NA depositato nella Protein Data Bank (PDB) [Pannifer et al.,2001]. Lo ione Zn^{2+} è rappresentato in arancio.

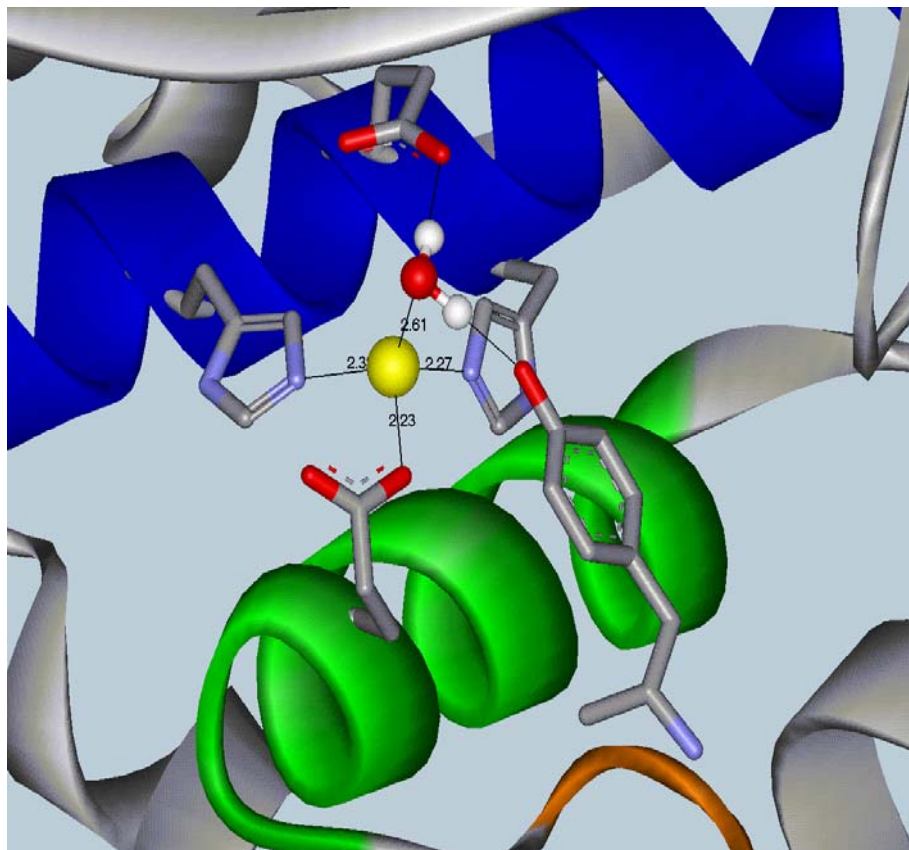


Figura 1.3. Sito attivo di LF (coordinate J7NA, PDB) [Pannifer et al., 2001]. L' α -elica contenente il motivo di consenso HEXXH è rappresentata in blu, l' α -elica contenente il residuo Y728 in arancio, quella contenente il residuo E735 in verde; l'atomo di Zn^{2+} è rappresentato in giallo; sono riportate le distanze tra lo ione e i coordinanti espresse in Å.

1.3 CENNI SULLE METALLOPEPTIDASI

Le metallopeptidasi sono enzimi proteolitici, suddivisi in 30 famiglie su base genetica, a loro volta divise in cinque gruppi [Barrett et al., 1994] (tabella 1.1). La maggior parte di tali famiglie contiene il motivo HEXXH, che è implicato nel legame del metallo, generalmente Zn^{2+} , e un terzo residuo che partecipa alla coordinazione e che varia a seconda del gruppo considerato. Nel caso specifico di LF, che appartiene alla famiglia rappresentata dall'enzima termolisina, il terzo residuo è rappresentato da E735.

Introduzione

L'attività catalitica è innescata dall'attacco nucleofilo di una molecola d'acqua al gruppo carbossilico di un legame peptidico del substrato (figura 1.4), favorito dall'interazione con lo ione Zn^{2+} e con un gruppo carbossilico dell'enzima, E687 del motivo ricorrente HEXXH, per quanto riguarda LF.

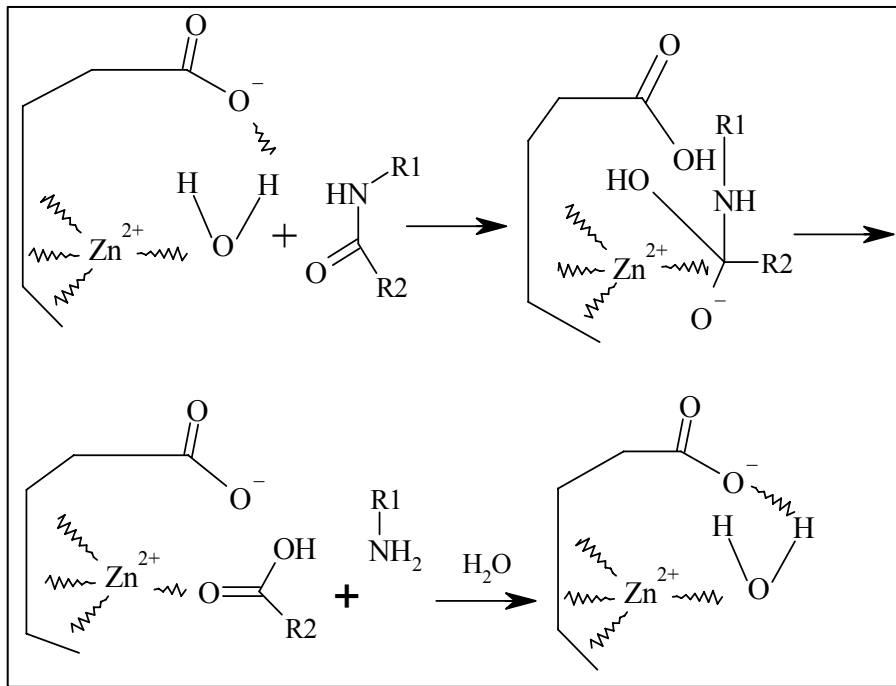


Figura 1.4. Schema del meccanismo d'azione delle metallopeptidasi. L'attacco nucleofilo di una molecola d'acqua al substrato è facilitato dall'interazione simultanea di un gruppo carbossilico dell'enzima e dello ione Zn^{2+} . La proteolisi avviene in seguito al trasferimento di un protone dal gruppo carbossilico della proteina al gruppo NH del legame peptidico del substrato; figura ottenuta con il programma Isis Draw.

Introduzione

Gruppo	Motivo di coordinazione per lo Zn ²⁺	Famiglie
I (clan A)	HExxH.....D	Termolisina Micolisina Neprilisina Alanil aminopeptidasi Peptidil-dipeptidasi A
II (clan B)	HexxHxxGxxH	Astacina Collagenasi interstiziale Autolisina Proteasi neutra extracell. (Streptomyces)
III	HExxH.....?	Collagenasi clostridiale Vibrio-collagenasi Tossina tetanica Leishmanolisina Metalloendopeptidasi IgA specifica Carbossipeptidasi Taq Proteasi neutra (Staphylococcus) Immuno-inibitore A
IV	Altri (HxxEH)	Pitrisina Carbossipeptidasi A Zn-D-Ala-D-Ala carbossi- peptidasi metionil-aminopeptidasi leucil-aminopeptidasi
V	Non conosciuto	Aminopeptidasi di lievito Glutammato carbossipept. Aminopeptidasi Y O. sialoglicoproteina endopeptidasi aminopeptidasi termofilica vibrio-leucil-aminopeptidasi X-His-dipeptidasi

Tabella 1.1. Classificazione delle metallopeptidasi [Barrett et al., 1994]

1.4 MECCANISMO DI INGRESSO NELLA CELLULA DEL COMPLESSO PA-LF/EF

Per lo studio del meccanismo di ingresso nella cellula delle tossine LF ed EF, sono stati utilizzati diversi modelli cellulari, in particolare cellule ovariche di Hamster (CHO), sensibili a EdTx e alcune linee cellulari o colture primarie di macrofagi murini per LeTx [Friedlander, 1986].

Una volta legato al recettore ATR, PA è proteolizzato da una peptidasi ad attività furina-simile [Leppla, 1995], presente sulla superficie cellulare (figura 1.5). Evidenze sperimentali suggeriscono che la proteolisi di PA possa avvenire anche a livello sierico negli animali infetti [Ezzel e Abshire, 1992; Brossier et al., 2000 a]: queste due possibilità possono coesistere, in quanto sia PA nativo, sia PA₆₃, sono in grado di legarsi al recettore specifico. In seguito a proteolisi viene rilasciata la porzione N-terminale di 20 KDa, PA₂₀: ciò porta all'esposizione di zone altamente idrofobiche sulla superficie del frammento PA₆₃ e alla successiva formazione di eptameri [Milne et al., 1994; Petosa et al., 1997]. La rimozione del frammento N-terminale PA₂₀ è essenziale per l'interazione e il legame della porzione enzimaticamente attiva delle tossine: attraverso esperimenti di mutazioni sito-specifiche, sono stati individuati i residui di PA coinvolti nel legame di LF ed EF [Cunningham et al., 2002]. Parallelamente sono stati identificati i residui di LF ed EF coinvolti nel legame [Lacy et al., 2002; Gupta et al., 2001]. L'eptamero lega competitivamente EF e LF, in rapporto stechiometrico pari a tre molecole per eptamero [Mogridge et al., 2002] e il complesso etero-oligomero viene endocitato. È stato evidenziato che l'endocitosi mediata da recettore è innescata dall'oligomerizzazione di PA₆₃ [Beauregard et al., 2000]. Studi recenti hanno inoltre dimostrato che il legame di PA eptamerico al recettore ATR, ne causa l'associazione a particolari microdomini della membrana plasmatica, ricchi di colesterolo e glicosfingolipidi, i lipidi raft [Abrami et al., 2003]. Tali lipidi giocano un ruolo importante nel meccanismo di endocitosi. L'abbassamento di pH a livello endosomiale provoca l'inserimento in membrana dell'eptamero, in seguito a variazioni conformazionali, e la successiva o concomitante

traslocazione degli enzimi tossici all'interno del citosol cellulare, dove esplicano la loro attività. Numerosi dati suggeriscono che EF e LF partecipino attivamente alla traslocazione: essi interagiscono con il doppio strato fosfolipidico e tale interazione è ottimale a pH acido [Kochi et al.,1994; Guidi-Rontani et al. ,2000].

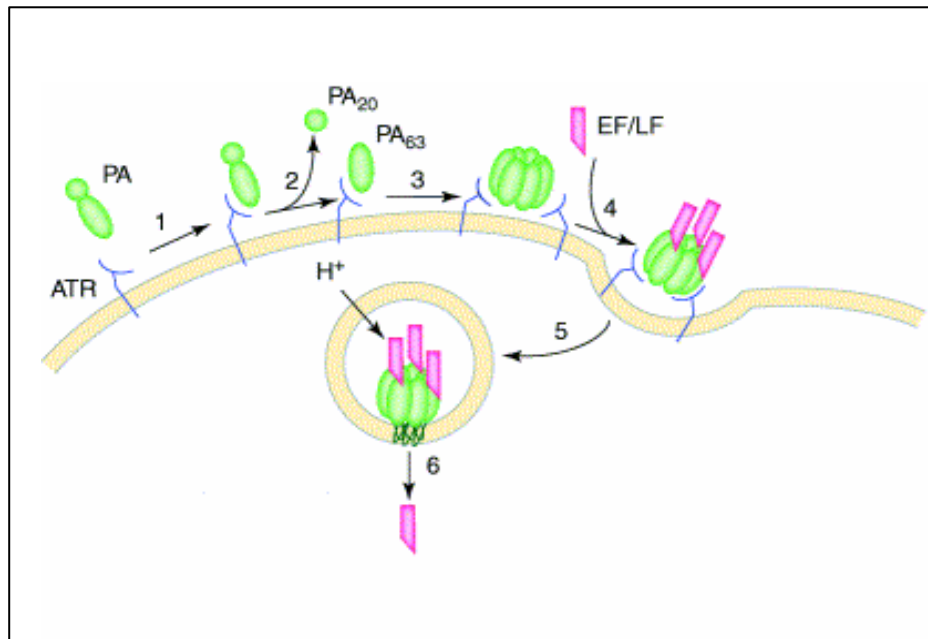


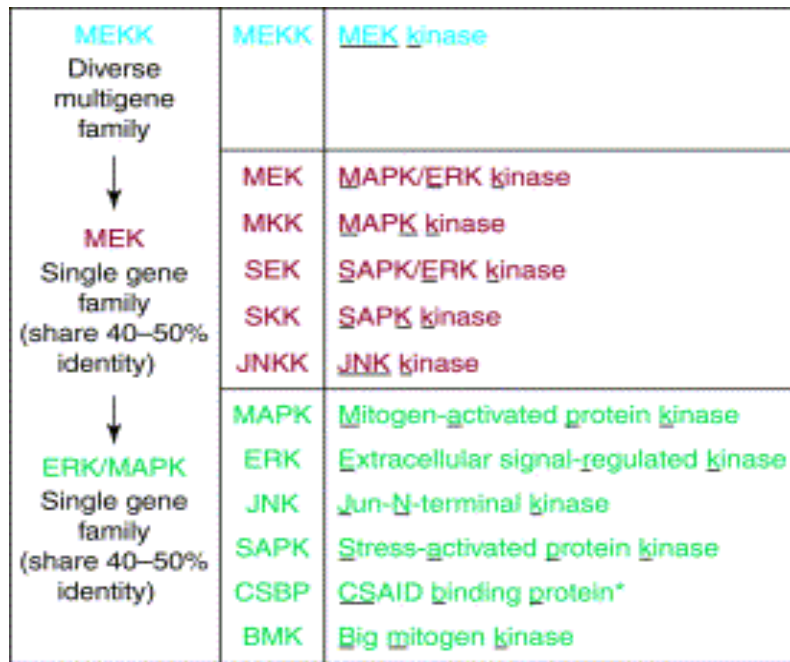
Figura 1.5. Meccanismo di ingresso del complesso PA-LF/EF nella cellula [Mourez et al., 2002]. PA si lega al recettore di membrana ATR (1); PA è proteolizzato e viene rilasciato il frammento PA₂₀ (2); il frammento PA₆₃ oligomerizza formando eptameri (3); il fattore edematogeno e/o il fattore letale si legano all'eptamero (4) e il complesso PA-LF/EF viene endocitato (5); l'abbassamento di pH a livello endosomiale favorisce la traslocazione delle porzioni enzimatiche nel citosol cellulare (6).

1.5 BERSAGLI INTRACELLULARI DI LF

1.5.1 La via di trasduzione di MAPK

La via di trasduzione del segnale tra le più conosciute è quella che fa riferimento a MAPK (proteine chinasi attivate da mitogeno) ubiquitarie, che vengono attivate da numerosi stimoli extracellulari. Studi condotti in cellule di lievito, che rappresentano il modello sperimentale più noto, hanno evidenziato che la via di trasduzione di MAPK si avvale di più moduli

distinti [Neiman, 1993; Brewster et al., 1993], costituiti da diverse proteine chinasi che si attivano a cascata: una MAPK chinasi-chinasi (MEKK), una MAPK chinasi (MEK) e una MAPK. Nelle cellule di mammifero tale via risulta altamente conservata [Pulverer et al., 1991; Han et al., 1994; Kyriakis et al., 1994].



*CSAID, cytokine suppressive anti-inflammatory drug.

Figura 1.6. Caratteristico modulo della via di trasduzione di MAPK; sono riportati i diversi nomi che vengono utilizzati per le varie proteine che compongono la rete di trasduzione di MAPK.

Una volta attivate, 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. Esistono combinazioni specifiche tra MAPKK e MAPK per ogni modulo, in contrasto determinate MAPKKK sono in grado di attivare diverse combinazioni di MAPKK/MAPK, formando un'ampia e complessa

Introduzione

rete di trasduzione. Attualmente nelle cellule di mammifero sono noti quattro moduli di trasmissione del segnale (tabella 1.2).

Via di MAPK:	ERK1/ERK2	JNK/SAPK	p38/HOG	ERK5
MAPKKK	Raf-A,Raf-B, Mos MEKK1, MEKK2, MEKK3, Tpl-2	MEKK1,MEKK2, MEKK3,MEKK4, TAK1, MUK,Tpl2, SPRK,ASK1, MST	TAK1 TAK2, SPRK, PAK	?
MAPKK	MEK1, MEK2	MKK4, MKK7	MKK3, MKK6	MKK5
MAPK	ERK1, ERK2	JNK1, JNK2,JNK3	p38 α , p38 β , p38 γ p38 δ	ERK5

Tabella 1.2. Componenti dei principali moduli della rete di trasduzione di MAPK.

Stimoli fisiologici quali mitogeni e fattori di crescita, attivano principalmente la via di MAPK (ERK1/ERK2), mentre stimoli di stress, che includono radiazioni ultraviolette, shock termico, danni al DNA, ischemia, iperosmolarità, intermedi reattivi dell'ossigeno, citochine (TNF α , interleuchine), attivano di preferenza, ma non esclusivamente, le vie di MAPK (JNK/SAPK) e MAPK (ERK5) [Widmann et al.,1999]. La via di MAPK (ERK1/ERK2) contribuisce alla regolazione del ciclo cellulare e può fornire protezione contro l'apoptosi in alcuni tipi cellulari, con un meccanismo poco chiaro. Sebbene l'attivazione di MAPK (JNK/SAPK) sia mediata da stimoli di stress, e spesso risulti associata alla conseguente morte cellulare, in molti casi è in grado di promuovere la sopravvivenza e la crescita. Anche l'attivazione di MAPK (p38) è implicata nell'apoptosi, ma

può anche favorire la proliferazione e il differenziamento cellulari. È stato evidenziato che tali vie svolgono un ruolo fondamentale nella risposta alle infezioni batteriche [Paul et al., 1997]. L'integrazione del segnale nella rete di trasduzione di MAPK, risulta quindi molto complessa e ancora poco conosciuta.

1.5.2 Inattivazione di MAPKK da parte di LF

LF è una metalloproteasi che taglia la porzione N-terminale di MAPKK. Dal punto di vista strutturale le MAPKK sono caratterizzate da un dominio chinasico altamente conservato e da una porzione N-terminale variabile, ricca di residui di prolina, che mediano la localizzazione della proteina e l'interazione con MAPK [Fukuda et al., 1997]. La famiglia di MAPKK è costituita da sette membri, raggruppati in quattro sottofamiglie in base alla loro specificità d'azione (tabella 1.3) [Dhanasekaran et al.,1998]: oltre a MAPKK (MEK1 e MEK2) [Duesbery et al., 1998], LF proteolizza anche MAPKK (MKK3) [Pellizzari et al.,1999], MAPKK (MKK4,MKK6,MKK7), ma non MAPK (MKK5) [Vitale et al., 2000].

Sottofamiglie di MEK	Altri nomi
MEK1	MKK1, MAPKK1
MEK2	MKK2, MAPKK2
MEK3	MKK3, SKK2
MEK4	MKK4, JNKK1, SEK1, SKK1
MEK5	MKK5
MEK6	MKK6, SKK3
MEK7	MKK7, JNKK2

Tabella 1.3.. Membri della famiglia delle MEK o MAPKK. Soltanto MEK5 non è proteolizzata da LF

Studi condotti su mutanti deleti di MAPKK, a livello N-terminale, hanno evidenziato che per il legame ed il taglio da parte di LF, sono essenziali i

Introduzione

primi 32 amminoacidi. In tabella 1.4 sono riportati i siti di taglio dei bersagli di LF e l'allineamento delle sequenze amminoacidiche intorno a tale sito.

Siti di taglio	P ₈ P ₇ P ₆ P ₅ P ₄ P ₃ P ₂ P ₁	P' ₁ P' ₂ P' ₃ P' ₄ P' ₅ P' ₆ P' ₇ P' ₈
MEK1(P ⁸ -I ⁹)	M P K K K P T P	I Q L N P A P D
MEK2(P ¹⁰ -P ¹¹)	A R R K P V L P	A L T I N P T I
MKK3b(R ²⁶ -I ²⁷)	S K R K K D L R	I S C M S K P P
MKK6b(K ¹⁴ -I ¹⁵)	K K R N P G L K	I P K E A F E Q
MKK4(K ⁴⁵ -L ⁴⁶)	Q G K R K A L K	L N F A N P P F
MKK4(R ⁵⁸ -F ⁵⁹)	P P F K S T A R	F T L N P N P T
MKK7(Q ⁴⁴ -L ⁴⁵)	Q R P R P T L Q	L P L A N D G G
MKK7(G ⁷⁶ -L ⁷⁷)	A R P R H M L G	L P S T L F T P
Consenso	+ + + + h	h

Tabella 1.4. Siti di taglio dei substrati di LF e allineamento delle sequenze amminoacidiche intorno a tale sito [Vitale et al.,2000]

La lunghezza e la sequenza primaria del frammento proteolizzato sono variabili: in posizione P1' è normalmente presente un amminoacido idrofobico, come pure in P2, eccetto che per MAPKK (MEK1), inoltre tra le posizioni P4 e P8 sono sempre presenti uno o più residui basici. È stato evidenziato che la proteolisi da parte di LF non comporta perdita di attività enzimatica di MAPKK, probabilmente LF inibisce la trasduzione del segnale prevenendo l'associazione di tali chinasi con i loro substrati. Dalla sequenza dei frammenti proteolizzati di MAPKK, in particolare di MAPKK (MEK2), sono stati sintetizzati dei peptidi substrato di LF [Tonello et al.,2002], che permettono rapidi screening di potenziali inibitori dell'azione tossica di LeTx, i quali potrebbero essere utilizzati nel trattamento dell'antrace.

È stata evidenziata un'elevata attivazione della via di MAPK in alcune neoplasie umane [Hoshino et al.,1999; Mandell et al., 1998; Salh et al.,

1999]. Studi recenti hanno dimostrato che LeTx è in grado di inibire la crescita di cellule trasformate, se somministrata a livello della massa tumorale, in quantità tali da non provocare apparente tossicità sistemica [Duesbery et al.,2001]: il suo utilizzo potrebbe costituire un futuro approccio nella terapia del cancro.

1.6 EFFETTI CELLULARI

LF è in grado di entrare in tutti i tipi cellulari, tuttavia solo i macrofagi muoiono in seguito a lisi, che si verifica 90 minuti dopo la somministrazione della tossina letale LeTx [Friedlander, 1986; Hanna et al.,1993]. La proteolisi di MAPKK da parte di LF avviene in tutte le linee cellulari macrofagiche, sensibili o meno all'azione della tossina [Duesbery et al., 1998; Vitale et al.,1998; Vitale et al.,2000].

Attraverso studi di biochimica e di fisiologia sull'azione della tossina letale di *B. anthracis*, sono state individuate due categorie di eventi in cellule J774A.1, una linea macrofagica sensibile a LeTx [Hanna, PC, 1992]. I primi effetti si verificano 45 minuti dopo l'aggiunta di tossina nel mezzo di coltura: si ha un aumento della permeabilità della membrana cellulare a cationi monovalenti, con influsso di Na^+ ed efflusso di K^+ . L'attività della pompa Na^+/K^+ -ATPasi subisce un brusco incremento, che porta ad un elevato consumo di ATP. Secondariamente si può osservare un'alterazione della permeabilità ad altri ioni, (Ca^{2+} e Cl^-), e ad alcuni amminoacidi, accompagnata da altri eventi, quali l'inibizione della sintesi di macromolecole, alcune modificazioni morfologiche e la perdita di enzimi, come la lattato-deidrogenasi (LDH). Tali eventi si concludono con la lisi della cellula che compare dopo circa 90 minuti dall'aggiunta di tossina.

I macrofagi sono cellule coinvolte sia nella risposta infiammatoria, sia nella risposta immunitaria. Essi hanno la capacità di fagocitare e distruggere gli organismi invasori, attraverso vari meccanismi: pH estremi, enzimi litici, produzione di intermedi reattivi dell'azoto (RNI) e dell'ossigeno (ROI). Tali intermedi reattivi sono in grado di danneggiare le diverse componenti cellulari, come proteine, DNA, lipidi. I macrofagi svolgono un ruolo importante anche nella risposta immunitaria, poiché

hanno la capacità di ‘presentare’ l’antigene ai linfociti T, in seguito alla fagocitosi e alla successiva degradazione delle sostanze ingerite. Alcuni studi hanno dimostrato che LF è in grado di stimolare la produzione di ROI nei macrofagi [Hanna PC, 1994]: ciò si verifica circa un’ora dopo l’aggiunta della tossina nel mezzo di coltura e l’elevata concentrazione di ROI all’interno della cellula, sembra essere in grado di promuovere la citolisi dei macrofagi stessi. L’importanza della produzione di ROI è dimostrata anche dal fatto che agenti antiossidanti proteggono in modo parziale le cellule in vitro e gli animali in vivo, dall’effetto tossico di LeTx.

I macrofagi sono anche in grado di sintetizzare e rilasciare, una volta stimolati, citochine proinfiammatorie, quali $TNF\alpha$, IL-1, IL-2 e IL-6. È stato evidenziato che dosi subletali di LeTx riducono la produzione di $TNF\alpha$ indotta da LPS [Pellizzari et al.,1999; Erwin et al.,2000; Kim et al.,2002]: questo effetto sembra essere importante nelle prime fasi dell’infezione da *B. anthracis*, quando una riduzione della risposta infiammatoria potrebbe facilitare la crescita e la successiva diffusione del microorganismo nell’ospite [Pellizzari et al.,1999].

Differenti linee cellulari macrofagiche presentano diversa sensibilità nella risposta a LeTx [Welkos et al.,1986; Welkos e Friedlander, 1988], che non sembra essere dovuta a differenze nell’affinità di PA per il recettore ATR, o nella sua attivazione proteolitica, o a differenze nella traslocazione di LF nel citosol cellulare [Friedlander, AM, 1993]. Studi recenti hanno dimostrato che linee macrofagiche resistenti, trattate con LeTx in presenza di $TNF\alpha$, vanno incontro a morte [Kim et al.,2002]: la produzione di $TNF\alpha$, causata dal contatto dei macrofagi con i microrganismi o i loro componenti, sembra essere uno dei fattori che cooperano con LeTx nell’indurre la morte dei macrofagi stessi.

La modalità di morte dei macrofagi non è ancora ben chiara: numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che tale fenomeno presenta segni caratteristici di necrosi, con distruzione degli organelli, condensazione della cromatina, rigonfiamento e lisi cellulari [Kim et al., 2002].

Introduzione

Anche EdTx è in grado di alterare le funzioni immunitarie, attraverso l'aumento dei livelli di cAMP [Hoover et al., 1994], inibendo la capacità di fagocitosi e il 'burst' ossidativo dei monociti [O'Brien et al., 1985], alterando la chemiotassi dei neutrofilii [Wade et al., 1985], aumentando quindi la suscettibilità dell'organismo alle infezioni. La via di trasduzione di MAPK gioca un ruolo fondamentale nell'attivazione dei macrofagi, ed è direttamente implicata nella produzione di citochine (TNF α , IL-1, IL-6), ma il legame tra l'attività proteolitica di LF, la lisi dei macrofagi e la patogenesi dell'antrace, non è ancora chiaro.

2. SCOPO DELLA TESI

B. anthracis, l'agente eziologico dell'antrace, è un batterio gram positivo, sporigeno, che secerne tre proteine distinte: antigene protettivo (PA), fattore edematogeno (EF) e fattore letale (LF). PA e LF costituiscono la tossina letale, LeTx, che è la maggior responsabile della reazione simile allo shock, caratteristica degli stadi finali dell'antrace.

LF è un enzima ad attività Zn^{2+} -endopeptidasica, che taglia specificamente le proteine MAPK chinasi (MAPKK) che fanno parte della via di trasduzione di MAPK, proteine chinasi attivate da mitogeno. Tale via è attivata da numerosi stimoli extracellulari ed è coinvolta nella proliferazione e nel differenziamento cellulari, nell'adattamento allo stress e nell'apoptosi [Widmann et al., 1999]. Recentemente è stata evidenziata un'elevata attivazione della via di MAPK in alcune neoplasie umane [Hoshino et al., 1999; Mandell et al., 1998; Salh et al., 1999]: la tossina letale è in grado di inibire la crescita di cellule trasformate, senza provocare apparente tossicità sistemica. Il suo utilizzo potrebbe costituire un futuro approccio nella terapia antitumorale.

Dallo studio della struttura cristallografica di LF [Pannifer et al., 2001], è stato evidenziato, che oltre al motivo di consenso HEXXH, per la coordinazione dello Zn^{2+} altri due amminoacidi, E735 e Y728 sono vicini all'atomo di metallo. In particolare, E735 pare essere implicato nella coordinazione dello zinco mentre Y728 si trova ad una distanza di 3,3 Å dallo ione e punta l'OH dell'anello fenolico in direzione tale da suggerire un suo ruolo nella reazione di idrolisi del legame peptidico.

In base a precedenti osservazioni sull'importanza di un'analogia tirosina per l'attività delle neurotossine clostridiali, Y375 per la tossina tetanica e Y366 per la tossina botulinica [Rossetto et al., 2001, Rigoni et al., 2001], si è deciso di preparare un mutante di LF che presenta un'alanina in posizione 728, LF^{Y728A} . In concomitanza sono stati prodotti sia il mutante che presenta in posizione 735 un residuo di alanina, LF^{E735A} , sia il corrispondente mutante doppio, $LF^{Y728A; E735A}$. Tali mutanti

Scopo della Tesi

sono stati caratterizzati dal punto di vista spettroscopico, ne sono state determinate le curve di denaturazione ed è stata valutata la loro attività enzimatica.

I dati ottenuti permettono di suggerire un modello per il processo di idrolisi del legame peptidico catalizzato da LF. Inoltre la totale assenza di attività del doppio mutante che appare solubile e correttamente ripiegato nello spazio, lo rende un buon candidato come componente di un nuovo vaccino anti-antrace.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI

I plasmidi pET19b e pGEX2TK sono stati acquistati da Novagen. Gli enzimi di restrizione, Taq-polimerasi e T4-DNA ligasi sono prodotti Fermentas. La trombina, la resina GSH-sepharose 4B, benzamidina, tutte le colonne utilizzate per le separazioni cromatografiche, sono prodotti Amersham. I kit di purificazione del DNA plasmidico, sono prodotti QIAGEN, il kit site-directed mutagenesis è un prodotto Stratagene. Gli inibitori di proteasi sono prodotti ROCHE. I filtri per la concentrazione di proteine, sono prodotti Sartorius. Le soluzioni di acrilammide/bisacrilammide e i tamponi necessari per la preparazione di gel di poliacrilammide, sono prodotti della National Diagnostics, la soluzione colorante Simply Blue è un prodotto Invitrogen. Le apparecchiature per le corse elettroforetiche sono prodotti Biorad. Tutti i reagenti chimici sono stati acquistati da SIGMA o FLUKA.

3.2 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

3.2.1 Clonaggio del gene della proteina Protective Antigen in pET19b

Il gene codificante per la proteina PA di *Bacillus Anthracis* è stato clonato nel plasmide di espressione pET19b (Novagen) contenente una sequenza per conferire ai batteri resistenza all'antibiotico ampicillina, un promotore della trascrizione (*T7lac*), un sito di legame per il ribosoma, una sequenza codificante per una serie di 10 istidine e un sito di policlونaggio. Il frammento di DNA codificante PA è stato amplificato tramite PCR ('polymerase chain reaction') [Eisel et al., 1986; Fairweather et al., 1986] utilizzando il plasmide pACP71 come template [Cataldi et al., 1990] e i seguenti oligonucleotidi: 5'-GGA ATT CCA TAT GGA AGT TAA ACA GGA GAA CCG-3' (forward), 5'-AGA CTC GAG TTA TCC TAT CTC ATA GCC TTT TTT-3' (reverse) in concentrazione 1 pmol/μL.

La reazione è stata condotta in presenza dell'enzima Taq-DNA polimerasi (Fermentas), in tampone costituito da 10 mM TRIS, pH 8, 50 mM KCl, 0,8% nonidet40, aggiunto di MgCl₂ 2,5 mM, dNTP in miscela 1 mM ciascuno, impostando le seguenti condizioni: un'iniziale denaturazione a 95°C per cinque minuti, uno step di denaturazione a 95°C per un minuto, uno step di accoppiamento dei primer a 50°C per un minuto, e uno step di estensione del primer a 72°C per 2 minuti, per un totale di 25 cicli. Dopo l'ultimo ciclo è stata imposta una temperatura di 72 °C per 10 minuti, per favorire la completa estensione e l'appaiamento dei filamenti di DNA.

Il frammento così ottenuto è stato purificato utilizzando il kit QIAquick-PCR (QIAGEN), secondo il protocollo annesso. Tale frammento e il vettore di destinazione pET19b sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione NdeI e XhoI. Il frammento da PCR è stato digerito per 16 ore a 37 °C, mentre il plasmide è stato digerito prima con l'enzima NdeI per 2-3 ore a 37 °C, poi è stato aggiunto alla miscela di reazione anche il secondo enzima e la reazione è stata proseguita per altre 2-3 ore alla stessa temperatura. I frammenti digeriti sono stati isolati tramite gel preparativo di agarosio ed utilizzando il kit QIAquick-gel extraction (QIAGEN).

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 40mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 5mM, a pH 7,8, 22 °C per 1 ora. L'enzima ligasi è stato poi inattivato ponendo la miscela di reazione a 65 °C per 10 minuti. La miscela di ligazione è stata direttamente utilizzata per la trasformazione di batteri competenti, il rimanente è stato conservato a -20°C.

3.2.2 Separazione di frammenti di DNA elettroforesi in gel d'agarosio

Il gel d'agarosio è stato preparato sciogliendo la quantità opportuna di agarosio, nel caso specifico al 2%, nel tampone TAE (40mM tris, 25 mM sodio-acetato, 0,5 mM EDTA, 0,1% acido acetico glaciale), riscaldando in forno a microonde e aggiungendo etidio bromuro 64 µg/ml.

Al campione di DNA è stato aggiunto un tampone di caricamento, 0,03% BBF, 0,03% xilene cianolo, 10% glicerolo (Fermentas), che

favorisce il depositarsi del campione sul fondo dei pozzetti e permette di visualizzare la migrazione durante la corsa. La corsa elettroforetica è stata effettuata a voltaggio costante (70-80 volt) per circa 45 minuti.

Il peso molecolare dei frammenti è stato ricavato per confronto con indicatori standard di riferimento. L'etidio bromuro è un colorante fluorescente, che è in grado di intercalarsi tra le basi del DNA: ciò causa un allungamento ed un irrigidimento della molecola, che emette quindi fluorescenza, se eccitata con radiazioni ultraviolette di opportuna lunghezza d'onda.

3.2.3 Preparazione di cellule competenti

Il ceppo batterico di interesse è stato piastrato su LB-agar e lasciato crescere per la notte (O/N). Una singola colonia è stata inoculata in 50 mL di LB e lasciata crescere fino al raggiungimento della fase stazionaria (O/N) a 37°C, 180 rpm. 2 mL di tale coltura sono stati diluiti in 200 mL di LB e i batteri sono stati incubati a 37°C, 180 rpm, finché è stata raggiunta una densità ottica pari a 0,375 a 600 nm: questa fase di crescita deve essere sufficientemente rapida. La sospensione batterica è stata aliquotata in 4 tubi da 50 mL preraffreddati e lasciata in ghiaccio per 5-10 minuti, per arrestare la crescita, quindi è stata centrifugata a 4°C per 7 minuti a 1600g. Ogni pellet così ottenuto, è stato risospeso in 10 mL di una soluzione di CaCl₂ 100 mM raffreddata e centrifugato per 5 minuti a 4 °C a 1100g. Il pellet è stato nuovamente risospeso in 10 mL di CaCl₂ 100 mM, mantenuto in ghiaccio per 30 minuti e centrifugato per 5 minuti a 1100g a 4°C. Infine il pellet è stato risospeso in 2 mL di CaCl₂ 100 mM con glicerolo al 15% e aliquotato in tubi sterili. Le varie aliquote sono immediatamente congelate a -80°C e possono essere conservate in tal modo per alcuni mesi.

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

3.2.4 Trasformazione di cellule competenti

Un'aliquota di cellule competenti è stata scongelata lentamente in ghiaccio. Successivamente è stato aggiunto 1 μL di DNA plasmidico, o fino

a 5 μ L di miscela di legazione, mescolando delicatamente e il tutto è stato incubato in ghiaccio per 30 minuti. È stato effettuato un rapido 'heat-shock' per 30 secondi esatti in bagnetto a 42°C, subito dopo i tubi sono stati posti in ghiaccio per 2 minuti e poi sono stati aggiunti 250 μ L di terreno (SOC o LB). Successivamente i batteri sono stati incubati a 37°C, a 180 rpm per 1 ora, in modo da ripristinare la loro vitalità. La sospensione è stata piastrata su LB-agar in presenza di un opportuno antibiotico: ciò ha permesso la crescita dei soli microrganismi che hanno integrato il plasmide che porta la resistenza allo stesso antibiotico.

3.2.5 Mutagenesi sito-specifica di LF

Il gene che codifica per LF nativo, inserito nel sito BamHI del plasmide di espressione pGEX-2TK [Vitale et al., 1998], è stato subclonato nel sito BamHI del vettore pGEM-3zf (3000 bp).

pGEM-3zf-LF è stato amplificato via PCR con il kit Quickchange site-directed mutagenesis (Stratagene), utilizzando i seguenti nucleotidi: 5'-CGC TTC ATT TGT TCT CCC AGC CGA AGT TAA ATT ACT CCC-3' (forward), 5'-GGG AGT AAT TTA ACT TCG CTG GGA GAA CAA ATG AAG CG-3' (reverse) per la mutazione Y728A, 5'-CTA AAG GCT TCT GCA AAA AAT GCC GCT TCC TTT GTT CTC CC-3' (forward), 5'-GGG AGA ACA AAT GAA GCG GCA TTT TTT GCA GAA GCC TTT AG-3' (reverse) per la mutazione E735A. Le condizioni di reazione sono di seguito riportate: un'iniziale denaturazione a 95°C per 30 secondi, 16 cicli di 30 secondi a 95°C, 1 minuto a 55°C e 10,5 secondi a 68°C. La miscela di reazione è stata successivamente trattata con DpnI per 1 ora a 37°C. DpnI è un enzima di restrizione, specifico per DNA metilato, che è utilizzato per digerire il DNA parentale: il DNA isolato dai più comuni ceppi di *E. coli* si trova in forma metilata, e quindi è suscettibile alla digestione. La miscela di reazione così ottenuta, contiene il filamento circolare di DNA con inserito il gene che porta la mutazione: con tale miscela sono state trasformate cellule XL1BLUE competenti, per ottenere il plasmide a doppio filamento di DNA direttamente in vivo. La sequenza di tutti i geni mutati è stata determinata

tramite sequenziamento del DNA (servizio di sequenziamento, CRIBI). Tali geni mutanti sono stati infine subclonati nel sito BamHI di pGEX-2TK.

3.2.6 Test di vitalità cellulare con tetrazolinio

Le cellule RAW264.7, opportunamente coltivate in una piastra da 96 pozzetti, sono state trattate con PA 400 μM e i mutanti di LF in concentrazione pari a 200 μM e incubate a 37°C per alcune ore. Al termine dell'incubazione è stato eliminato il mezzo di coltura, le cellule sono state lavate con PBS, è stato aggiunto del mezzo senza rosso fenolo, e successivamente 10 μL di soluzione di tetrazolinio. Le cellule vive hanno un metabolismo attivo e sviluppano un colore arancio, le cellule morte non fanno virare il colore della soluzione, che rimane giallo. È stata valutata l'assorbanza a 490 nm, valore che rappresenta una misura diretta del numero di cellule vive.

3.3 TECNICHE BIOCHIMICHE

3.3.1 Elettroforesi in gel di poliacrilammide in presenza di SDS

È una tecnica che prevede la separazione di proteine in base alle loro dimensioni, quando sono sottoposte all'azione di un campo elettrico. Per tutte le corse elettroforetiche è stato seguito il metodo descritto da Laemli [Laemli, 1970]. Generalmente il gel è costituito da due porzioni: lo 'stacking', con una percentuale di acrilammide del 4%, e il 'running', la cui composizione in acrilammide varia a seconda delle dimensioni delle proteine da separare. I gel utilizzati in questo lavoro di Tesi sono stati preparati utilizzando soluzioni di acrilammide, bis-acrilammide e tamponi Protogel (National Diagnostics) e apparecchiature Minigel III Biorad.

I campioni di proteine da analizzare sono stati aggiunti di un tampone di caricamento, LSB (Laemli Sample Buffer) e sono stati trattati a 95 °C per 5 minuti, per facilitare la denaturazione delle catene polipeptidiche. Il tampone di corsa con cui sono riempite la vaschetta interna ed esterna del dispositivo, è costituito da TRIS 6 g/L, SDS 1 g/L, glicina 2,88 g/L. Il sodio dodecil-solfato (SDS) si lega in rapporto ponderale costante alle proteine,

conferendo loro una carica negativa, perciò la separazione avviene solo in base alle dimensioni e non in base alla carica netta delle proteine.

La corsa elettroforetica è stata effettuata ad amperaggio costante, 15 mA per lo 'stacking' e 30 mA per il 'running'.

Il gel è stato successivamente colorato con sostanze che aderiscono alle proteine. In questo lavoro di Tesi è stato utilizzato come colorante per proteine in gel di poliacrilammide il Simply Blue (Invitrogen), seguendo il protocollo rapido indicato nel manuale di istruzioni dello stesso.

3.3.2 Espressione e purificazione di proteine di fusione con Glutathione S-transferasi o con His¹⁰-tag mediante cromatografia di affinità

I batteri (ceppi di *E. Coli* BL21) contenenti il plasmide di interesse, sono stati fatti crescere in LB con opportuno antibiotico, a 37 °C, fino al raggiungimento della fase stazionaria ('overnight'). La precoltura è stata diluita 1:10 e lasciata crescere fino a densità ottica (OD) a 600 nm pari a 0,6, per la produzione di LF si possono raggiungere valori anche di 0,8-1. L'espressione della proteina è stata indotta con l'aggiunta di IPTG (isopropil- β -D-tio-galattopiranoside), un derivato non idrolizzabile del lattosio, in concentrazione 200 μ M, per 4 ore, ad una temperatura compresa tra 25 e 30°C. La sospensione è stata centrifugata a 4°C, a 6000 rpm per 10 minuti, il pellet è stato risospeso in PBS freddo (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄) e nuovamente centrifugato: in queste condizioni può essere conservato a -80°C, previo congelamento in N₂ liquido, oppure può essere direttamente sottoposto a French press, un metodo per ottenere la lisi dei batteri e la conseguente liberazione della proteina nel mezzo.

Nel caso di una proteina fusa con GST, il pellet è stato risospeso in 20 mL/L di coltura di tampone costituito da TRIS 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 2,5 mM, inibitori di proteasi, una pastiglia /10 mL (Roche) e glicerolo 10% v/v, pH 8,3. La sospensione è stata sottoposta a due cicli consecutivi di French press, in apposita camera preraffreddata, applicando una pressione pari a 1300 PSI per 10 secondi, quindi stata centrifugata a 4°C, a 16000 rpm per 20 minuti. Il lisato chiarificato così ottenuto è stato

posto a contatto con la resina GSH-sepharose4B (Pharmacia), precedentemente lavata ed equilibrata con glicerolo, in quantità pari a 1,5 mL per ogni litro di coltura, per due ore a 4°C: la resina contiene il gruppo GSH (glutatione), la proteina contiene il gruppo GST a livello C-terminale, quindi si lega con elevata affinità e può essere purificata. Dopo l'incubazione con la resina sono stati effettuati dei lavaggi con diluizioni successive del tampone di risospensione fino a raggiungere concentrazioni di TRIS 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 0,5 mM, glicerolo 10%. Dopo i lavaggi la proteina è stabile finché rimane legata alla resina. Per il distacco della proteina si sfrutta la presenza del sito taglio per la trombina a livello di GST: la resina è stata sospesa in un tampone costituito da HEPES 10 mM, NaCl 300 mM, CaCl₂ 2,5 mM, in rapporto 1:1 con la resina, è stata aggiunta trombina in quantità pari a 50 U/mL di resina utilizzata e si è incubato a temperatura ambiente per 2 ore, con agitazione delicata per evitare precipitazioni. Sono state eseguite due eluizioni successive con lo stesso tampone, il supernatante è stato recuperato, aggiunto di benzamidina, 1μL di resina per ogni unità di trombina utilizzata, e posto in agitazione a 4°C per 1 ora. La benzamidina è un inibitore specifico dell'attività proteasica della trombina.

Nel caso di proteine fuse con His-tag, il pellet è stato sospeso in Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM in presenza di inibitori di proteasi EDTA-free (Roche), è stato sottoposto a French press e il lisato chiarificato dopo centrifugazione è stato filtrato e caricato in una colonna Hi-trap (Pharmacia) contenente ioni Ni²⁺. Lo ione forma dei complessi di coordinazione con i residui di istidina presenti a livello N-terminale e lega con elevata affinità la proteina. Per l'eluizione è stato utilizzato un tampone contenente Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM e imidazolo 500 mM, in gradiente da 0 a 100% in 30 minuti: l'imidazolo compete per la coordinazione del metallo e una volta raggiunta un'adeguata concentrazione in colonna, provoca il desorbimento della proteina.

È stata determinata la concentrazione della proteina tramite spettrofotometro UV. Per seguire le varie fasi di lavorazione sono stati

raccolti dei campioni e sottoposti a SDS-PAGE, 12% Laemli, per valutare la presenza contaminanti proteici, rivelati dalla presenza di bande aggiuntive.

3.3.3 Purificazione di una proteina tramite gelfiltrazione

La gelfiltrazione è una tecnica cromatografia che permette la separazione di proteine in base alle loro dimensioni. La fase stazionaria è costituita da un materiale con una determinata porosità che permette il passaggio alle piccole molecole, mentre esclude quelle più grandi: si avrà quindi una ritenzione in colonna della particelle più piccole, che verranno eluite in tempi maggiori rispetto alle molecole più grandi. La fase mobile è costituita da un tampone a pH e forza ionica tali per cui la proteina è solubile e stabile: viene dapprima deareata e filtrata attraverso un filtro da 0,4 µm per allontanare eventuali contaminanti. La colonna è equilibrata con il tampone di eluizione finché la line base risulta stabile.

Prima di essere caricato il campione è stato centrifugato per evitare di iniettare particelle estranee che potrebbero intasare la colonna. Per la rivelazione dei picchi cromatografici è stata valutata l'assorbanza a 220 nm, lunghezza d'onda cui corrisponde il massimo di assorbimento del legame peptidico. Per la purificazione di proteine espresse durante il periodo di internato, è stata utilizzata una colonna SUPERDEX 200 HR 10/30, con un flusso pari a 0,7 mL/minuto.

Dopo una corsa cromatografica in gelfiltrazione la proteina può subire un'eccessiva diluizione e può essere opportuno concentrare il campione, in genere tramite l'utilizzo di tubi di 10000 MWCO (Sartorius).

3.3.4 Sintesi di peptidi substrati di LF

La sintesi peptidica è stata effettuata attraverso un sistema automatizzato (CRIBI), su fase solida utilizzando Fmoc (9-fluorenylmethyl-oxy-carbonil) come gruppo protettore all'NH₂. L'amminoacido C-terminale, un arginina derivatizzata con p-nitroanilina, è stato legato al peptide tramite una reazione di condensazione in DMF, utilizzando HATU (o- (7-azabenzotriazol-1yl) -N,N,N',N'tetramethyluronium-hexafluorophosphate) come attivatore del gruppo carbossilico, in rapporto

1:1 con il peptide e sym-collidina come base, in rapporto 2:1 rispetto al peptide. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente per almeno 2-3 ore, il prodotto di reazione è stato purificato tramite RP-HPLC e liofilizzato.

La concentrazione dei substrati è stata determinata tramite spettroscopia di assorbimento UV, valutando l'assorbanza e ϵ a 342 nm, lunghezza d'onda che corrisponde al massimo di assorbimento della p-nitroanilina.

3.3.5 Purificazione di peptidi tramite RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography)

HPLC è una tecnica cromatografica ad elevata risoluzione, che permette la separazione di piccoli peptidi o proteine che differiscono tra loro anche solo di un amminoacido. La separazione di piccole molecole implica continue ripartizioni tra la fase stazionaria e la fase mobile, mentre grandi molecole come le proteine, vengono adsorbite dalla superficie idrofobica in testa alla colonna finché la composizione della fase mobile non raggiunge un valore tale da causare il loro desorbimento. Piccoli peptidi vengono separati sia con meccanismo di ripartizione, sia di adsorbimento. Come eluenti vengono utilizzati acqua e CH₃CN (acetonitrile), aggiunti di TFA allo 0,05%: l'acido trifluoroacetico forma delle coppie ioniche stabili con le proteine, diminuendo le interazioni aspecifiche e aumentando quindi la separazione tra i vari componenti la miscela.

La scelta della colonna viene fatta in base alle caratteristiche del polipeptide da purificare. Nel caso specifico della purificazione dei peptidi substrati di LF è stata utilizzata una colonna C18 (Pharmacia), ad una velocità di flusso pari a 2,5 ml/minuto, con un gradiente variabile di CH₃CN come di seguito riportato.

tempo (minuti)	acqua (%)	CH ₃ CN (%)
/	95	5
5	60	40
25	10	90
29	95	5
35	95	5

Tabella 3.1. Condizioni impiegate per la purificazione di peptidi tramite RP-HPLC; colonna C18 (Pharmacia), flusso: 2,5 mL/minuto

Per la rivelazione dei picchi cromatografici sono stati valutati i valori di assorbanza a 220 nm, lunghezza d'onda corrispondente al massimo di assorbimento del legame peptidico, e a 342 nm, corrispondente al massimo di assorbimento del gruppo p-nitroanilina.

3.3.6 Ottenimento di apo-LF

La proteina è stata dializzata tramite l'utilizzo di una membrana con 'cut-off' di peso molecolare (MWCO) pari a 10000 Da, in tampone costituito da TRIS 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, o-fenantrolina 10 mM, a pH 8,3 per alcune ore. Successivamente la proteina è stata dializzata in acqua milli-q precedentemente trattata con Chelex20 (Fluka), per eliminare completamente ogni traccia di chelante. Chelex20 è una resina che complessa le eventuali tracce di metalli presenti in acqua.

3.4 TECNICHE SPETTROSCOPICHE

3.4.1 Quantificazione del DNA tramite spettroscopia di assorbimento

Lo spettro di assorbimento del campione di DNA è stato registrato nella regione UV tra 230 e 350 nm. Per determinare la concentrazione è stata valutata l'assorbanza a 260 nm ed è stata applicata la seguente equazione: $C (\mu\text{g/mL}) = A_{260} / 0,020$. L'equazione è riferita alla legge di Lambert-Beer, $A = \varepsilon \cdot C \cdot b$, dove A è l'assorbanza ad una particolare

lunghezza d'onda, C è la concentrazione del campione, b è il cammino ottico, in genere pari ad un cm, ed ϵ è il coefficiente di estinzione molare espresso in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e pari a 0,020 per DNA a doppio filamento. Alternativamente può essere considerata la seguente approssimazione: un'unità di assorbanza a 260 nm corrisponde a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 280 nm: valori compresi tra 1,8 e 2,0 sono indice di elevata purezza del campione, in altre parole di scarsa presenza di contaminanti che assorbono a 280 nm, come le proteine.

3.4.2 Quantificazione di una proteina tramite spettroscopia di assorbimento

È stato registrato lo spettro di assorbimento UV nella regione compresa tra 240 e 350 nm. Per determinare la concentrazione del campione proteico è stata valutata l'assorbanza a 280 nm ed è stata applicata la legge di Lambert-Beer: $A_{280} = \epsilon_{280}\cdot b\cdot C$. I coefficienti di estinzione molare dei mutanti di LF sono di seguito riportati: 0.798 $\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{l}$ per LF nativo, 0.785 $\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{l}$ per LF^{Y228A}, 0.799 $\text{g}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$ per LF^{E735A}, 0.786 $\text{g}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$ per il mutante doppio e 0,886 $\text{g}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$ per PA (Gill e von Hippel, 1989).

3.4.3 Misure di dicroismo circolare

Le misure di dicroismo circolare sono state ottenute con un dicrografo JASCO J700. l'ellitticità media per residuo $[\theta]$, è stata espressa in $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ed è stata calcolata mediante l'equazione $[\theta] = (\theta/10)/(\text{MRW}/l\cdot c)$, dove θ è l'ellitticità osservata, MRW è il peso molecolare medio per residuo amminoacidico, l è il cammino ottico in cm, c la concentrazione proteica espressa in g/mL. Il segnale dicroico è stato elaborato mediante un software fornito dalla JASCO. Le misure nel vicino UV sono state effettuate nell'intervallo di lunghezza d'onda tra 250 e 350 nm, con una cuvetta di quarzo con cammino ottico di 0,5 cm, utilizzando una concentrazione proteica di circa 0,3 mg/mL per LF, apo-LF e i suoi mutanti. Bande di dicroismo circolare nel vicino UV in proteine, si

osservano solo quando i residui di amminoacidi aromatici si trovano in una struttura proteica 'folded'. Pertanto lo spettro di dicroismo circolare nel vicino UV costituisce un criterio estremamente sensibile per valutare la struttura tridimensionale di una proteina. Le misure nel lontano UV sono state effettuate con una cuvetta da 0,1 cm, nell'intervallo di lunghezza d'onda tra 190 e 250 nm. Tutti gli spettri sono stati registrati con una velocità di scansione 20 nm/ min, costante di tempo 8 sec, sensibilità 20 mdeg/cm, effettuando quattro accumuli a temperatura ambiente. Misure di dicroismo circolare nel lontano UV permettono di valutare la struttura secondaria di una proteina.

3.4.4 Valutazione della fluorescenza di proteine

Le misure di fluorescenza sono state effettuate utilizzando uno spettrofluorimetro UV-LAB della Perkin Elmer in celle termostate a 25 °C, tramite eccitazione dei residui a 280 nm, che corrisponde al massimo di assorbimento per gli amminoacidi aromatici, e 290 nm, per eccitare selettivamente i soli residui di triptofano presenti nella proteina. Le proteine sono state sciolte in TRIS 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 0,5 mM, a pH 8,3.

La denaturazione indotta da guanidinio è stata seguita attraverso monitoraggio dell'emissione a 330 nm. I campioni sono stati preparati attraverso diluizioni di soluzioni 'stock' di proteina (circa 3 μ M), fino ad una concentrazione finale di 1 μ M nello stesso tampone utilizzato per le misure di fluorescenza, contenente diverse percentuali di soluzione di guanidinio cloridrato (Fluka).

3.4.5 Valutazione dell'attività enzimatica dei mutanti di LF tramite spettroscopia di assorbimento

Per valutare l'attività enzimatica di LF e dei mutanti è stato seguito il metodo descritto da Tonello [Tonello et al., 2002]. Brevemente è stata preparata una soluzione contenente 25 mM Na_2HPO_4 , 15 mM NaCl e una concentrazione variabile di substrato per il fattore letale, Ac-CY β AR₈VLRpNA. È stata effettuata una lettura a lunghezza d'onda fissa pari a 405 nm prima dell'aggiunta dell'enzima, per monitorare la linea base,

quindi è stato aggiunto l'enzima in concentrazioni variabili: l'aumento di assorbanza a 405 nm è dato dalla liberazione del gruppo p-nitroanilina dal substrato in seguito ad attività enzimatica.

3.4.6 Determinazione del contenuto di ione Zn^{2+} tramite spettroscopia di assorbimento atomico

Tale tecnica spettroscopica si basa sull'assorbimento di una radiazione di opportuna lunghezza d'onda da parte del campione, che si trova sottoforma atomica grazie all'azione della fiamma. Nel caso dello ione Zn^{2+} è stata utilizzata una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 219,6 nm. La concentrazione della proteina è risultata 3 μ M. Il fotometro di fiamma, Perkin Elmer 4000, è stato dapprima tarato con una soluzione standard del metallo, quindi è stata determinata la concentrazione dello ione nel campione.

Materiali e Metodi

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 MUTAZIONI SITO-SPECIFICHE DEL FATTORE LETALE DI *B. anthracis*

I geni che codificano per i mutanti di LF sono stati ottenuti tramite l'utilizzo del kit Quickchange site-directed mutagenesis (Stratagene), seguendo l'annesso protocollo.

I vettori pGEM-3zf, contenenti i geni mutati di LF come inserti, sono stati digeriti con l'enzima BamHI e le miscele sono state sottoposte ad elettroforesi su gel d'agarosio al 2%, per separare i frammenti formati. Gli inserti così ottenuti sono stati purificati e ligati al vettore pGEX-2TK, precedentemente digerito con lo stesso enzima. Con la miscela di reazione così ottenuta, sono state trasformate cellule di *E. coli* XL1BLUE competenti, un ceppo in grado di produrre elevate quantità di acidi nucleici, e sono state selezionate su LB-agar contenente ampicillina: in queste condizioni è stata favorita la crescita delle sole colonie che hanno integrato il plasmide, poiché esso presenta il gene per la resistenza all'ampicillina. Alcune colonie sono state utilizzate per preparare delle colture da 2 mL in LB- ampicillina 100 µg/mL da cui è stato successivamente estratto e purificato il DNA plasmidico, tramite l'uso del kit MiniPrep (QIAGEN). In questo modo sono stati prodotti i geni mutanti che codificano per LF^{Y728A}, LF^{E735A} e il mutante doppio LF^{Y728A; E735A}

4.2 ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE

Per l'espressione sono stati utilizzati ceppi di *E. coli* BL21 competenti, poveri di proteasi, che permettono di produrre elevate quantità di proteina, poco degradata e quindi più funzionale. Il fattore letale nativo, i mutanti e MKK3 sono stati espressi come proteine di fusione con GST (glutathione-S-transferasi) all'estremità N-terminale: ciò ha permesso la purificazione tramite cromatografia d'affinità utilizzando la resina GSH-sepharose 4B, in quantità pari a 1,5 mL per ogni litro di coltura. Il fattore letale è stato staccato dalla proteina di fusione GST, ancorata alla resina,

utilizzando una soluzione di trombina in concentrazione pari a 50 unità per mL di resina, quindi il supernatante è stato trattato con benzamidina, in quantità pari a 1 μ L per ogni unità di trombina utilizzata. La proteina MAPKK (MKK3) è stata utilizzata mantenendola legata alla resina.

L'antigene protettivo è stato espresso come proteina di fusione con un target di dieci istidine a livello ammino-terminale ed è stato purificato tramite cromatografia di affinità IMAC, utilizzando una colonna Hi-trap (Pharmacia), precedentemente equilibrata con una soluzione di NiSO_4 , 100 mM, e lavata con acqua, per eliminare l'eccesso di metallo. Per l'eluizione è stato utilizzato un tampone costituito da Na_2HPO_4 50mM, NaCl 500mM e imidazolo 500 mM a pH 8, creando un gradiente da 0 a 100% di tale tampone in 30 minuti: la proteina è stata eluita intorno al 20% di imidazolo.

Le proteine ottenute sono state ulteriormente purificate tramite gelfiltrazione, sia per allontanare completamente la trombina, nel caso di proteine fuse con GST, sia per eliminare altre impurezze di tipo proteico, rivelate attraverso una corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide al 12% Laemli, ed è stata utilizzata una colonna Superdex200 (Pharmacia) ad un flusso pari a 0,7 mL/minuto, con una fase mobile costituita da TRIS 10mM, NaCl 60 mM, EDTA 0,5 mM per LF e i mutanti, e Na_2HPO_4 50mM, NaCl 500mM pH 8.0 per PA.

La concentrazione delle varie proteine è stata determinata tramite spettroscopia di assorbimento UV-VIS, utilizzando lo spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda6 e valutando l'assorbanza a 280 nm. Sia per i mutanti di LF, sia per PA è stato necessario concentrare la soluzione proteica, per i successivi esperimenti, attraverso l'utilizzo di tubi concentratori 'Vivaspin' da 20 ml con MWCO pari a 10000 (Sartorius).

4.3 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI IONE Zn^{2+} DI LF E DEI MUTANTI

Il contenuto di ione Zn^{2+} è stato determinato tramite spettroscopia di assorbimento atomico utilizzando il fotometro di fiamma Perkin-Elmer 4000. Le concentrazioni proteiche utilizzate erano pari a 2,62 μ M per LF nativo, 2,94 μ M per il mutante LF^{E728A}, 2,84 μ M per il mutante LF^{Y728A},

1,31 μM per LF^{Y728A; E735A} e 2,60 μM per apo-LF, e la quantità di Zn²⁺ è risultata pari a 5,75 μM , 8,08 μM , 2,48 μM , 1,07 μM e 0,2 μM rispettivamente (tabella 4.1).

Proteina	Zn ²⁺ (moli/moli di proteina)
LF nativo	2,2
Apo-LF	0,1
LF ^{Y728A}	1,0
LF ^{E735A}	1,9
LF ^{Y728A; E735A}	0,8

Tabella 4.1. Contenuto di ione Zn²⁺ di LF nativo, di apo-LF e dei mutanti espresso come moli di metallo su mole di proteina. I dati riportati rappresentano il valore medio di tre differenti misure.

La proteina nativa ed il mutante LF^{E735A} contengono circa due moli di Zn²⁺ per mole di proteina, il mutante LF^{Y728A} contiene soltanto una mole di Zn²⁺ per mole di proteina, mentre il mutante doppio ne contiene meno di una mole. La diminuzione della quantità di Zn²⁺ suggerisce che le coordinazioni date dai residui Y728 ed E735 sono importanti. La mutazione Y728A sembra destabilizzare in modo particolare la coordinazione del metallo a livello del sito attivo.

4.4 ANALISI SPETTROSCOPICHE

Per valutare se le proteine mutanti presentavano una corretta struttura tridimensionale, sono state effettuate misure di dicroismo circolare nel lontano e vicino ultravioletto, e misure di fluorescenza.

Gli spettri di dicroismo circolare nel lontano ultravioletto sono stati registrati con lo strumento Jasco J700, in cuvette da 0,1 cm, a concentrazioni di proteine pari a 0,24 mg/ mL, 0,30 mg/ mL, 0,26 mg/ mL, 0,20 mg/ mL e 0,24 mg/ mL rispettivamente per LF nativo, per LF^{E735A}, per

LF^{Y728A}, per il mutante doppio e per apo-LF. Per quanto riguarda le proteine mutanti e l'apoenzima, gli spettri sono simili a quello della proteina nativa e presentano due minimi a 208 e 222 nm, tipici di proteine con elevata struttura ad α -elica (figura 4.1 A). Gli spettri nel vicino ultravioletto sono stati registrati nelle medesime condizioni, in cuvette da 0,5 cm e presentano un profilo identico, sia per LF nativo, sia per i mutanti e apo-LF, anche se l'intensità di segnale per la proteina nativa è maggiore (figura 4.1 B). L'andamento del segnale per le varie proteine è abbastanza peculiare, non presenta una particolare struttura fine, sembra che i residui amminoacidici, responsabili dell'assorbimento di radiazioni circolarmente polarizzate, siano distribuiti in un intorno chimico non propriamente rigido.

La figura 4.1 C mostra gli spettri di fluorescenza in emissione registrati a 280 nm e 290 nm, in celle termostatate a 25°C, utilizzando un fluorimetro Perkin-Elmer UV-Lab, con concentrazioni pari a 0,24 mg/ mL per la proteina nativa, 0,27 mg/ mL per LF^{E735A} e 0,26 mg/ mL per LF^{Y728A}: tutte le proteine presentano un massimo di intensità a circa 332 nm, indice che le proteine possiedono un intorno chimico mediamente rigido. Gli spettri di fluorescenza dei mutanti mostrano un'intensità minore rispetto alla proteina nativa, come per gli spettri di dicroismo circolare: la differenza in intensità può significare che LF nativo abbia una struttura un po' più rigida rispetto alle proteine mutate, e ciò può indicare che lo ione Zn²⁺ svolga un ruolo strutturale per LF.

Risultati e Discussione

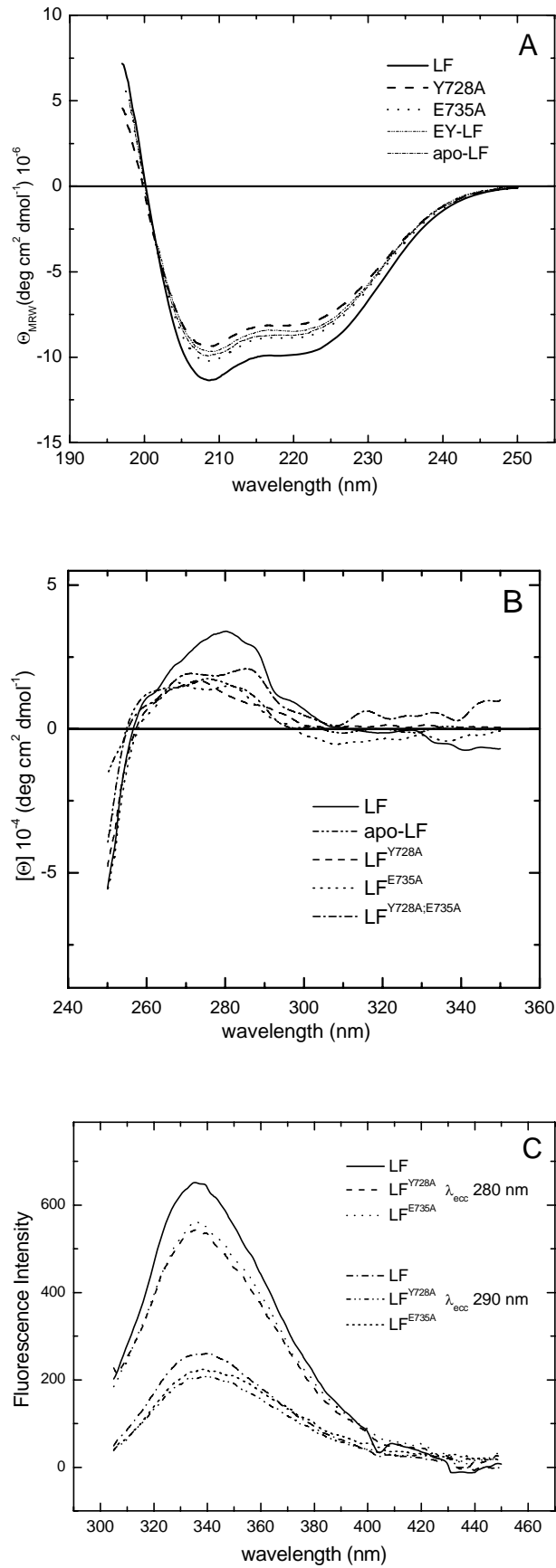


Figura 4.1. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A), nel vicino UV (B); spettri di fluorescenza in emissione (C) per LF nativo, i mutanti e apo-LF.

4.5 DENATURAZIONE INDOTTA DA GUANIDINIO: MISURE DI ‘MELTING’ CHIMICO

La denaturazione di LF nativo, apo-LF e dei mutanti, è stata effettuata aggiungendo alla soluzione di tali proteine, in concentrazioni pari a 1 μM , quantità crescenti di guanidinio cloridrato, un composto in grado di provocare la denaturazione delle catene polipeptidiche. Il punto di ‘melting’ corrisponde alla concentrazione di denaturante tale per cui il 50% di una proteina risulta denaturato ed è indice della stabilità di una proteina, poiché più elevato è tale valore, più stabile risulta la proteina dal punto di vista strutturale. Il punto di ‘melting’ per LF nativo è abbastanza basso, intorno a 1-1,5 M di guanidinio, a sostegno dei dati ottenuti tramite misure di dicroismo circolare nel vicino ultravioletto e di fluorescenza, secondo i quali la proteina presenta un intorno chimico mediamente rigido. Per le proteine mutanti LF^{Y728A}, LF^{E735A}, LF^{Y728A; E735A}, che sono parzialmente prive di Zn²⁺, e per apo-LF, in cui lo Zn²⁺ è praticamente assente, sono necessarie concentrazioni di guanidinio cloridrato più basse per raggiungere il punto di ‘melting’, rispetto alla proteina nativa (figure 4.2 e 4.3). Per la proteina apo è sufficiente appena 0,5 M di guanidinio cloridrato per raggiungere il punto di ‘melting’.

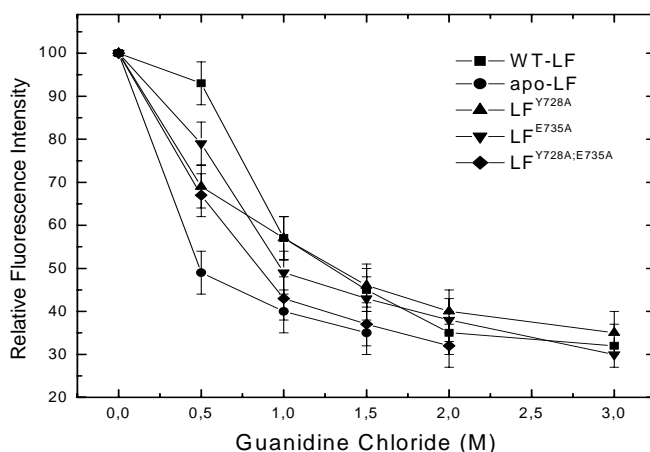


figura 4.2. Curve di denaturazione chimica indotta da guanidinio cloridrato, di LF nativo, apo-LF e i mutanti: i dati sono stati elaborati con il programma Origin.

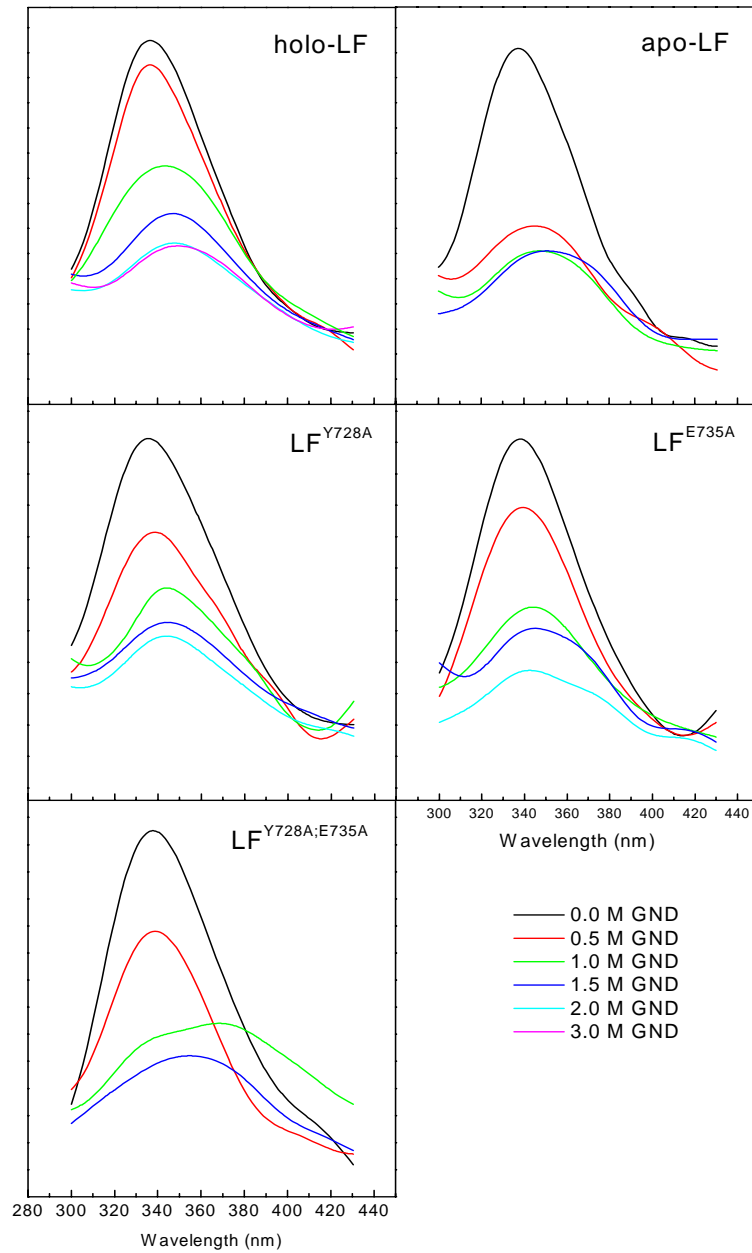


Figura 4.3. Denaturazione chimica indotta da guanidinio: gli spettri di fluorescenza in emissione sono stati ottenuti eccitando ad una lunghezza d'onda pari a 280 nm; i dati sono stati elaborati con il programma Origin.

Questi dati sembrano confermare che lo ione Zn^{2+} , oltre ad agire da cofattore, svolga un ruolo strutturale stabilizzando la struttura del fattore letale e conferendo una certa rigidità.

4.6 SAGGI DI ATTIVITÀ ENZIMATICA DI LF E DEI MUTANTI

Lo ione Zn^{2+} è il cofattore di molte metallopeptidasi, incluso il fattore letale e partecipa attivamente al meccanismo di catalisi enzimatica. Per la valutazione dell'attività proteolitica di LF e delle proteine mutanti, è stato seguito il metodo descritto da Tonello [Tonello et al.,2002], utilizzando come substrato il peptide derivatizzato con p-nitroanilide, Ac-C-Y-bA-R₈-V-L-RpNA. Questo metodo permette di monitorare l'attività enzimatica tramite l'uso di uno spettrofotometro UV, registrando l'assorbanza a 405 nm: un aumento di tale valore indica la liberazione del gruppo p-nitroanilina dal substrato, in seguito ad attività dell'enzima. È stato evidenziato che mutazioni puntiformi a livello del motivo di consenso HEXXH, portano a perdita di attività enzimatica [Duesbery et al., 1998; Vitale et al., 2000]. Anche le mutazioni di Y728 e E735 aboliscono l'attività di LF (figura 4.4): non si osserva un particolare aumento di assorbanza a 405 nm per le proteine mutanti, come invece si verifica per il fattore letale nativo.

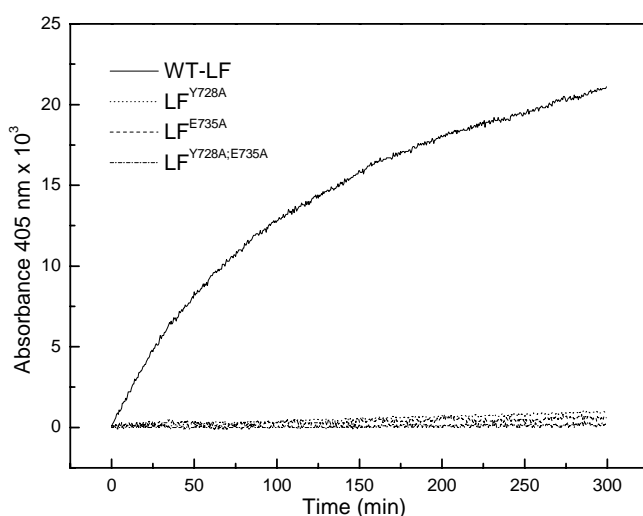


Figura 4.4. Cinetica di taglio del substrato AcYAR₈VLRpNA in presenza di LF nativo e dei mutanti, monitorata con spettrofotometro a 405 nm.

In parallelo sono stati effettuati esperimenti di proteolisi su MKK3, un substrato naturale di LF, incubando la proteina per due ore a 37°C, in presenza rispettivamente di LF nativo e dei mutanti, con un rapporto

enzima-substrato pari a 1:20. I campioni sono stati trattati con LSB, fatti bollire per 5 minuti e sottoposti a SDS-PAGE al 13,5% Laemli (figura 4.5)

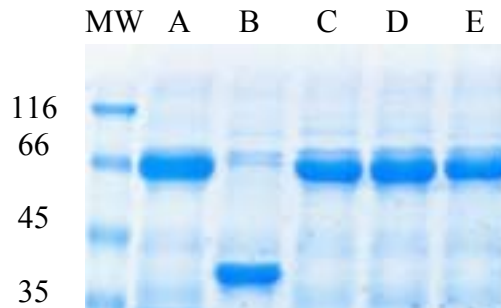


Figura 4.5. Proteolisi di MKK3 in presenza di LF nativo e dei mutanti: il rapporto enzima-substrato è pari a 1:20. I prodotti di reazione sono stati separati tramite SDS-PAGE 13,5% Laemli. (MW): 'marker' di pesi molecolari espressi in kDa; (A): MKK3 incubata a 37 °C; MKK3 incubata con: (B) LF nativo; (C) LF^{E735A}; (D) LF^{Y728A}; (E) LF^{Y728A,E735A}.

Il substrato MKK3 è stato utilizzato come proteina di fusione con GST immobilizzata alla resina GSH-sepharose4B. LF è in grado di proteolizzare il prodotto di fusione: la porzione N-terminale rimane legata alla resina, mentre la porzione C-terminale è rilasciata nel mezzo, in particolare la proteolisi di MKK3 porta alla formazione di un frammento, MKK3_{Δ1-29}. Dalla valutazione del gel dopo colorazione con Coomassie, si è potuto constatare che le proteine mutanti non sono attive: nel campione di LF nativo è comparsa una banda abbastanza intensa tra 35 e 45 kDa, corrispondente al frammento formatosi in seguito a proteolisi, mentre nei campioni incubati con i mutanti di LF non è stata evidenziata alcuna banda supplementare, indice di mancata funzionalità degli enzimi.

È stata valutata anche la vitalità di cellule RAW264.7, una linea macrofagica di origine tumorale, sensibile all'azione di LeTx. Le cellule, opportunamente coltivate in una piastra da 96 pozzetti, sono state trattate con PA 400 μM e i mutanti di LF in concentrazione pari a 200 μM e incubate a 37°C per alcune ore. Al termine dell'incubazione è stato eliminato il mezzo di coltura, le cellule sono state lavate con PBS, è stato aggiunto del mezzo senza rosso fenolo, e successivamente 10 μL di

soluzione di tetrazolinio. Le cellule vive hanno un metabolismo attivo e sviluppano un colore arancio, le cellule morte non fanno cambiare il colore della soluzione, che rimane giallo: è stata valutata l'assorbanza a 490 nm, valore che rappresenta una misura diretta del numero di cellule vive. Non si sono notati segni di morte cellulare nei campioni incubati con i mutanti della tossina letale, anche dopo quattro ore d'incubazione, come invece si è verificato in seguito a trattamento con la tossina letale nativa.

5. CONCLUSIONI

Sulla base dello studio della struttura cristallografica di LF, recentemente risolta [Pannifer et al., 2001], è stato possibile stabilire importanti relazioni tra struttura e attività della proteina, al fine di consentire lo sviluppo di un adeguato approccio nella terapia dell'antrace. In questo lavoro di Tesi è stato possibile evidenziare che i residui Y728 ed E735 sono importanti per la coordinazione dello ione Zn^{2+} , a livello del sito catalitico di LF, e per la catalisi della reazione di idrolisi del legame peptidico.

Sulla base di misure spettroscopiche di dicroismo circolare e di fluorescenza, è stato osservato che lo Zn^{2+} stabilizza la struttura del fattore letale, conferendo rigidità alla proteina. Le mutazioni di Y728 ed E735 con un residuo di alanina, hanno causato perdita parziale di Zn^{2+} (tabella 4.1) e in concomitanza gli spettri di dicroismo circolare nel vicino UV e gli spettri di fluorescenza, hanno mostrato una diminuzione dell'intensità del segnale per i mutanti, pur presentando un profilo abbastanza sovrapponibile tra loro. I profili degli spettri di dicroismo circolare nel lontano UV sono identici per LF ed i mutanti, e ciò indica che le mutazioni non portano a variazioni nella struttura secondaria delle proteine.

Il ruolo strutturale dello ione Zn^{2+} a livello del sito catalitico di LF, è stato in parte confermato dall'analisi degli spettri di dicroismo circolare nel vicino UV e degli spettri di fluorescenza di apo-LF, l'enzima privato del metallo, in seguito a dialisi contro o-fenantrolina 10 mM: l'apoenzima presenta lo stesso comportamento osservato per le proteine mutanti, in altre parole una diminuzione del segnale dicroico e di fluorescenza, che sembra essere correlata ad una minore rigidità strutturale della proteina. Parallelamente sono state effettuate misure di 'melting' chimico, tramite aggiunta di concentrazioni crescenti di guanidinio cloridrato alle soluzioni di proteine mutanti e apo-LF: i punti di melting per LF^{Y728A}, LF^{E735A}, LF^{Y728A; E735A} sono leggermente inferiori rispetto a quello calcolato per la proteina nativa. Apo-LF presenta un punto di 'melting' ancora più basso

rispetto alle proteine mutanti, intorno allo 0,5 M di guanidinio: i mutanti presentano quindi un comportamento intermedio, dovuto alla parziale perdita di metallo. Questi dati indicano che l'atomo di zinco presente nel sito attivo di LF ha anche un ruolo di stabilizzante strutturale.

Grazie a misure di cinetica enzimatica, tramite spettroscopia UV, ad esperimenti di proteolisi in vitro e a test di vitalità in cellule RAW264.7, pretrattate con i mutanti della tossina letale, è stato possibile evidenziare che i mutanti di LF non sono attivi. La perdita di attività può essere in primo luogo correlata alla parziale perdita di ione Zn^{2+} , che avviene in seguito alla mancata coordinazione dello stesso. Inoltre la rigidità strutturale di LF, conferita dallo ione coordinato dalle due istidine del motivo di consenso HEXXH, da una molecola d'acqua, da Y728 e E735, sembra essere una caratteristica importante e necessaria per l'attività catalitica della proteina. Il doppio mutante completamente inattivo di LF è un buon candidato come componente di vaccini contro l'antrace: come descritto in questo lavoro di Tesi, esso può essere prodotto per via ricombinante in *E. coli*, in forma solubile ed in elevata quantità.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S.H., Vander Goot, F. G., (2003). Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J. Cell. Biol.* 160 (3).
- Arora, N., and Leppla, S.H., (1993). Residues 1-254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. *J. Biol. Chem.* 268, 3334 – 3341.
- Barlett, J. G., Inglesby, T.V., Borio, L., (2002). Management of Anthrax. *Clinical Infectious Diseases* 35, 851 – 858.
- Beauregard, K., Collier, R.J., Swanson, J.a. (2002). Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cell. Microbiol.* 2,251 – 258.
- Brewster JL., de Valoir T, Dwyer ND., Winter E., Gustin MC. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science.* (1993), 259 85102); 1760-3.
- Brossier, F., Weber-Levy, M., Mock, M., Sirad, J.C., (2000)a. Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect. Immun.* 68, 1781 – 1786.
- Brossier, F., Mock, M., (2001). Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon* 39, 1747 – 1755.

- Broudley, K. A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J., Young, J.A.T., (2001). Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414, 225 – 229.
- Cataldi, A., Labruyère, E. Mock, M. (1990). Construction and characterization of a protective antigen-deficient *Bacillus anthracis* strain. *Mol. Microbiol.* 4, 1111 – 1117.
- Cunningham K, Lacy DB, Mogridge J, Colier RJ. Mapping the lethal factor and edema factor binding sites on oligomeric anthrax protective antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2002): 7049-53.
- Dhanasekaran, N. And Premkumar Reddy, E. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17, 1447-1455.
- Dixon, T.C., Meselson, M., Guillemin, J., and Hanna, P.C., (1999). Medical progress: Anthrax. *N. Engl. J. Med.* 341, 815 – 826.
- Duesbery, N. S., Resow, J., Webb, C.P., Kouchedpo S., Koo, H., Leppla, S.H., Vande Woude, G. F., (2001). Suppression of ras-mediated transformatio and inhibition of tumor growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of multiple MEK pathways. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 98 (7): 4089 – 4094.
- Duesbery, N. S., Webb, C. P., Leppla, S. K., Gordon, V. M., Klimpel, K. R., Copeland, T.D., Ahn, N. G., Oskarsson, M.K., Fukasawa, K., Paull, K. D., Wande, V.G. F., (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by Anthrax lethal factor *Science* 280, 734 – 737.
- Eisel U., Jarausch W., Goretzki K.; Henschen A., Engels J., Weller U., Hudel M., Habermann E., Niemann H. Tetanus toxin: primary

structure, expression in *E. Coli*, and homology with botulinum toxins. *EMBO J.* (1986), 5 (10): 2495 – 502.

Erwin, J.L., Little, S.F., Friedlander, A.M., DaSilva, L., Bavari, S., Chanh, T.C., (2002). Macrophage-derived cell lines do not express pro-inflammatory cytokines after exposure to anthrax lethal toxin. Presented at Am. Soc. Microbiol., Gen. Meeting, 100th, Los Angeles.

Escuyer, V., Duflot, E., Sezer, O., Danchin, A., Mock, M., (1988). Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases. *Gene* 71, 293 – 298.

Ezzell, J. R., Abshire, T.G., (1992). Serum protease cleowage of *Bacillus anthracis* protective antigen. *J. Gen. Microbiol.* 138, 543 – 549.

Fairweather, N. F. and Lyness, V.A. (1986). The complete nucleotide sequence of tetanus toxin, *Nucleic Acids Res.* 14, 7809 – 7812.

Friedlander, A.M., (1986). Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin throught an acidic-dependent process. *J. Biol. Chem.* 261, 7123 – 7126.

Friedlander, AM, Bhatnagar R, Leppla SH, Johnson L, Singh Y. Characterization of macrophage sensitivity and resistance to anthrax lethal toxin. *Infect. Immun.* (1993); 61 (1); 245-52.

Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase-kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J.* (1997) 16(8); 1901-8.

- Gill, S.C. and von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* 182, 319 – 326.
- Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Mock, M., Cabiaux, V. (2000). Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors across endosome membranes. *Cell. Microbiol.* 2, 259 – 264.
- Gupta, P., Singh, A., Chauhan, V., Bhatnagar, R., (2001). Involvement of residues 147VYYEIGK153 in binding of lethal factor to protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (1), 158 – 163.
- Hanna, P. C., Acosta, D., Collier, R.J. (1993). On the role of macrophages in anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10198 – 10201.
- Hanna PC, Kochi S, Collier RJ. Biochemical and physiological changes induced by anthrax lethal toxin in J774 macrophage-like cells. *Mol. Biol. Cell.* (1992), 3(11); 1269-77.
- Hanna, P. C., Kruskal, B.A., Ezekowitz, R.A., Bloom, B.R., Collier, R.J. (1994). Role of macrophage oxidative burst in the action of anthrax lethal toxin. *Mol. Med.* 1, 7 – 18.
- Han J., Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* (1994) 265 (5173); 808-11.
- Hoover, D.L., Friedlander, A.M., Rogers, L.C., Yoon, I-K., Warren, R-L., Cross, A.s., (1994). Anthrax edema toxin differentially regulates lipopolysaccharide-induced monocyte production of tumor necrosis

factor alpha and interleukin-6 by increasing intracellular cyclic AMP. *Infect. Immun.* 62, 4432 – 4439.

Hoshino R., Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* (1999) 18(3); 813-22.

Inglesby, T.V. et al., (2002). Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA* 287 (17), 22036 –52.

Jernigan et al., (2001). Bioterrorism-Related Inhalational Anthrax: the first 10 cases reported in the United States. *Emerging Infectious Disease*, 7 (6), 933 – 944.

Kim, S.O., Jing, Q., Hoebe, K., Beutler, B., Duesbery, N.S., Han, J., (2002). Sensitizing anthrax lethal toxin-resistant macrophages to toxin induced killing by tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.*

Klimpel, K. R., Arora N., Leppla, S. H., (1994). Anthrax toxin lethal factor contains a Zn^{2+} metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol. Microbiol.* 13, 1093 – 1100.

Knight T, J., Check, E., (2002). Anthrax case provokes doubt among experts. *Nature* 418, 808.

Kochi, S. K., Martin, I., Schiavo, G., Mock, M., Cabiliaux, V. (1994). The effects of pH on the interaction of anthrax toxin lethal and edema factors with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 33, 2604 – 2609.

- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* (1994) 369 (6476).
- Labruyère, E., Mock, M., Ladant, D., Michelson, S., Gilles, A.M., Laoide, B., Bârză, O., (1990). Characterization of ATP and calmodulin-binding properties of a truncated form of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase. *Biochemistry* 29, 4922 – 4928.
- Labruyère, E., Mock, M., Surewicz, W.K., Mantsch, H.H., Rose, T., Munier, H., Sarfati, R.S., Bârză, O., (1991). Structural and ligand-binding properties of a truncated form of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase and of a catalytically inactive variant in which glutamine substitutes for lysine-346. *Biochemistry* 30, 2619 – 2624.
- Labruyère, E., Kochi, S., Mock, M., (1994). Functional analysis of the NH₂-terminal region of the *Bacillus anthracis* edema factor. In: Freer, J., Aitken, R., Alouf, J.E. Boulmais, G. (Eds.), *Bacterial Protein Toxins*. FEMS Symposium 73, 271 –272.
- Lacy DB, Mourez M, Fouassier A, Collier RJ. Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors. *J Biol. Chem.* (2002); 3006-10.
- Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680 – 685.
- Leppla, H.S., Robbins, J. B., Schneersow, R., Shiloach, J. (2002) Development of an improved vaccine for anthrax. *J. Clin. Invest.* 109, 141 – 144.

- Leppla, S., (1995). Anthrax toxin. In: Moss, J., Iglewski, B., Vaughan, M., Tu, A.T. (Eds.). *Bacterial Toxins and Virulence Factors in Disease. Handbook of Natural Toxins*, vol. 8, pp. 543 – 572.
- Little, S.F., Leppla, S.H., Burnett, J.W., Friedlander, A.M., (1994). Structure-function analysis of *Bacillus anthracis* edema factor by using monoclonal antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 676 – 682.
- Little, S.F., Novak, J. M., Lowe, J.R., Leppla, S.H., Singh, Y., Klimpel, K.R., Lidgerding, B.C., Friedlander, A.M., (1996). Characterisation of the lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus Anthracis* using monoclonal antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 676 – 682.
- Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR. In situ visualization of intratumor growth factor signaling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. *Am. J. Pathol.* (1998), 153 (5); 1411-23.
- Meselson, M., Guillemin, J., Jones, M.H., Langmuir, A., Popova, I., Shelokov, A., and Yampolskaya, O., (1994). The Sverdlosk Anthrax outbreak of 1979. *Science* 226, 1202 – 1208.
- Milne, J.C., Blanke, S.R., Hanna, P.C., and Gollier, R.J. (1994). Protective antigen-binding domain of anthrax lethal factor mediates translocation of a heterologous protein fuse to its amino- or carboxy-terminus. *Molecular Microbiology* 15, 661 – 666.
- Mogridge, J., Cunningham, K., Collier, R. J., (2002). Stoichiometry of Anthrax Toxin Complexes. *Biochemistry* 41, 1079 – 1082.

- Munier, H., Bouhss, A., Krin, E., Danchin, A., Gilles, A-M., Glaser, P., Bârzu, O., (1992). The role of histidine 63 in the catalytic mechanism of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 267, 9816 – 9820.
- Neiman AM. Conservation and reiteration of a kinase cascade. (1993) *Trends Genet*, 9 (11); 390-4. Review.
- Novak, J.M., Stein, M.P., Little, S.F., Leppla, S.K., Friedlander, A.M. Functional characterization of protease-treated *Bacillus anthracis* protective antigen (1992). *J. Biol. Chem.* 267 (24), 17186 – 93.
- O'Brien, J., Friedlander, A., Dreier, T., Ezzell, J., Leppla, S., (1985). Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect. Immun.* 47. 306 – 310.
- Pannifer, A. D., Wong, T. Y., Schwarzenbach, R., Renatus, M., Petosa, C., Bienkowska, J., Lacy, D. B., Gallier, R. J., Park, S., Leppla, S. H., Hanna, P., Liddington, R. C., (2001). Crystal structure of the anthrax fethal factor. *Nature*, 414, 229 – 233.
- Paul, A., Wilson, S., Belham, C.M., Robinson, C.J., Scott, P.H., Gould, G.W. and Plevin, R. (1997). Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell. Signal.* 9, 403-410.
- Pellizzari, R., Guidi-Rontani, C., Vitale, G., Mock, M., Montecucco, C., (1999). Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits LPS/INF 8 induced release of NO and TNFW. *FEBS letters* 462, 199 – 204.
- Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H., Lidding Tow, R.C., (1997). Crystal structure of the protective antigen. *Nature*, 385, 833 – 838.

- Pulverer BJ., Kyriakis JM., Avruch J., Nikolakaki E., Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*. (1991), 353 (6345); 670-4.
- Quinn, C.P., Singh, Y., Klimpel, K.R., Leppla, J.H. (1991). Functional mapping of anthrax toxin lethal factor by in-frame insertion mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 266, 20123 – 20130.
- Rawlings, N., D., Barrett A., J. (1994). Evolutionary Families of Metallopeptidases (1994). *Methods in Enzimology*. 248 (13); 183 – 228.
- Rigoni, M., Caccin, P., Johnson, E.A., Montecucco, C., Rossetto, O. (2001). Site-directed mutagenesis identifies active-site residues of the light chain of botulinum neurotoxin type A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (5), 1231 – 1237.
- Salh B, Marotta A, Matthewson C, Ahluwalia M, Flint J, Owen D, Pelech S. (1999). Investigation of the Mek-MAP kinase-Rsk pathway in human breast cancer. *Anticancer Res* 19 (81B); 731-40.
- Sellman, B. R., Nassi, S., Gallier, R. J., (2001). Dominant- negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax. *Science* 292, 695 – 697.
- Singh, Y., Klimpel, K.R., Goel, S., Swain, P.K., Leppla, S.H. (1998). Oligomerization of anthrax toxin protective antigen and binding of lethal factor during endocytic uptake into mammalian cells. *Infect.Immun.* 67 (4), 1853 – 1859.
- Singh, Y., Klimpel, K.R., Quinn, C.P., Chowdhry, V.K., of protective antigen is required for receptor binding and anthrax toxin activity. *J. Biol. Chem:* 266, 15493 – 15497.

- Tonello, F., Seveso, M., Marin, O., Mock, M., Montecucco, C., (2002).
Screening inhibitors of anthrax lethal factor. *Nature* 418, 386.
- Vitale, G., Bernardi, L., Napolitani, G., Mock, M., Montecucco, C., (2000)
Susceptibility of mitogen-activated protein kinase-kinase family
members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem. J.* 15, 739
– 745.
- Vitale, G., Pellizzari, R., Recchi, C., Napolitani, G., Mock M., Montecucco,
C. (1998). Anthrax lethal factor cleaves the N-Terminus of MAPKS
and induces Tyrosine/Threonine phosphorylation of MAPK_S in
cultured macrophages. *BBRC* 248, 706 – 711.
- Wade, B.H., Wright, G.G., Hewlett, E.L., Leppla, S.H., Mandell, G.L.,
(1985). Anthrax toxin components stimulate chemotaxis of human
polymorphonuclear neutrophils. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 179, 159
– 162.
- Welkos, S.L., Friendlander, A.M., (1988). Comparative safety and efficacy
against *Bacillus Anthracis* of protective antigen and live vaccines in
mice. *Microb. Pathog.* 5, 127 –139.
- Welkos SL, Keener TJ, Gibbs PH. Differences in susceptibility of inbred
mice to *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* (1986), 51 (3); 795-800.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johison, G. L., (1988). Mitogen-
activated protein kinase; conservation of a three-kinase module from
years to human. *Physiol. Rev.* 79, 143 – 180.
- Xia, Z., Storm, D.R., (1990). A-type ATP binding consensus sequences are
critical for the catalytic activity of the calmodulin-sensitive adenylyl
cyclase from *Bacillus Anthracis*. *J. Biol. Chem.* 265, 6517 – 6520.