



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

Scuola di Dottorato di Ricerca in

BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE

Ciclo XX

**NadA da *Neisseria meningitidis* interagisce con
Hsp90 sulla superficie dei monociti modulando la
loro produzione di citochine**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Lorenzo Pinna

Supervisore: Ch.mo Prof. Emanuele Papini

Dottorando: Paola Cecchini

31 gennaio 2008

Indice

Indice	1
1 Introduzione	14
1.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	14
1.1.1 Caratteristiche	14
1.1.2 Ciclo parassitario	17
1.2 La malattia meningococcica	18
1.2.1 Epidemiologia	18
1.2.2 Sintomatologia	20
1.2.3 Diagnosi e trattamento	22
1.2.4 Prevenzione: i vaccini	23
1.3 NadA, un nuovo candidato per un vaccino	25
1.3.1 NadA	25
1.3.2 Struttura di NadA	27
1.4 La risposta del sistema immunitario	31
1.4.1 Funzionamento contro <i>Neisseria meningitidis</i> . . .	31
1.4.2 Meccanismi di evasione	33
1.4.3 Monociti	36
1.4.4 HSPs	37
2 RAZIONALE E SCOPO DELLA TESI	44
3 Materiali e Metodi	46
3.1 Materiali	46
3.1.1 <i>NadA</i> _{Δ(351-405)}	46
3.1.2 Anticorpi primari e secondari e proteine ricombinanti	47
3.2 Metodi	47
3.2.1 Colture cellulari	47

3.2.2	Isolamento di linfomonociti da sangue umano e condizioni di coltura	47
3.2.3	Lisi delle cellule	48
3.2.4	Purificazione di anticorpi anti-NadA	48
3.2.5	Co-immunoprecipitazione	49
3.2.6	Isolamento membrane	50
3.2.7	Overlay	51
3.2.8	Identificazione di una banda da gel di poliacrilamide tramite spettrometria di massa	51
3.2.9	Legame di Polimixina B a sNadA e Hsp90	52
3.2.10	Coniugazione di sNadA con Alexa Fluor 488	53
3.2.11	Quantificazione Hsp90 in cellule	53
3.2.12	Analisi del legame di sNadA-Alexa in presenza di anticorpi anti-Hsp90	54
3.2.13	Analisi del legame di anticorpi specifici a Hsp90 in presenza di sNadA	55
3.2.14	Misura multipla di citochine Bioplex	55
4	Risultati	57
4.1	Analisi biochimica	57
4.1.1	Co-immunoprecipitazione	57
4.1.2	<i>Overlay</i>	58
4.1.3	Identificazione della banda	61
4.1.4	Identificazione di Hsp90 in esperimenti di co-immunoprecipitazione e in lisati totali	62
4.1.5	NadA lega Hsp90 di membrana	64
4.1.6	NadA lega rHsp90 in <i>overlay</i>	65
4.1.7	Interferenza della Polimixina B nell'associazione fra NadA e Hsp90	67
4.2	Analisi funzionale	69
4.2.1	Espressione di Hsp90 superficiale in cellule Chang e monociti	69
4.2.2	Incubazione di cellule Chang con Hsp90 solubile ricombinante	72
4.2.3	Legame di monociti a NadA-Alexa in presenza di Polimixina B	74
4.2.4	Competizione di AcHsp90 nel legame di NadA-Alexa	74

<i>INDICE</i>	3
4.2.5 Competizione di sNadA con la rilevazione superficiale di Hsp90 mediante anticorpi	79
4.2.6 Citochine	84
5 DISCUSSIONE	92
Bibliografia	97

SOMMARIO

Neisseria meningitidis è un diplococco gram negativo capsulato, obbligato umano. Nonostante la potenziale patogenicità esso è un normale commensale umano, che si trova nel 10% degli uomini adulti a livello della mucosa naso-orofaringea in forma asintomatica. In un piccolo gruppo di individui però può essere causa di gravi forme di sepsi e di meningiti purulente, colpendo prevalentemente i bambini e i ragazzi, mentre nell'uomo adulto il 10-20% è associata a immunodeficienze. Fra tutti i ceppi isolati solo cinque sono patogeni, i sierogruppi A, B, C, Y e W135.

La vaccinologia tradizionale ha prodotto negli anni dei validi vaccini per la prevenzione contro i sierogruppi A, C, Y e W135, basati sui loro polisaccaridi capsulari coniugati a *carrier* proteici, ma per quanto riguarda il sierogruppo B, non si è giunti ancora a un vaccino definitivo. Il problema maggiore è dato dal fatto che il polisaccaride capsulare che costituisce questo sierotipo è un normale componente dei tessuti umani, pertanto risulta scarsamente immunogenico e, se coniugato ad una proteina *carrier*, potrebbe indurre una risposta autoimmune.

L'approccio della vaccinologia inversa, che si basa sull'analisi del genoma batterico, applicata allo studio di *Neisseria meningitidis*, ha permesso di scoprire delle nuove proteine, come buone candidate per la progettazione di un vaccino contro la meningite di ceppo B. Da questa ricerca è stato identificato l'antigene superficiale NadA, una proteina che si presenta in forma di oligomeri sulla maggior parte dei ceppi ipervirulenti, e che è in grado di indurre la produzione, in modelli animali, di anticorpi battericidi, sia contro ceppi omologhi che eterologhi.

NadA è stata recentemente individuata come un nuovo fattore meningococcico coinvolto nella colonizzazione e nell'invasione delle cellule ospite. Tale legame presuppone il coinvolgimento di un recettore di natura proteica con una costante di associazione pari a circa $2-3\mu\text{M}$, in cellule Chang, mo-

nociti, macrofagi e cellule dendritiche. Ciò fa pensare che vi sia un recettore ubiquitario espresso nelle differenti linee cellulari.

Durante questo lavoro di tesi si è quindi voluto ricercare il possibile recettore superficiale di NadA per queste cellule. Per identificare il recettore specifico di NadA sono stati messi a punto degli esperimenti di co-immunoprecipitazione e di *overlay* atti a individuare in dei lisati totali di cellule Chang una proteina che specificatamente legasse NadA. Questi esperimenti hanno portato all'identificazione di una proteina di 90 KDa di peso molecolare, che era presente nei campioni trattati con la proteina e assente invece nei campioni di controllo.

Successivamente questa banda è stata arricchita, separata su gel di poliaccrilamide, quindi tagliata, proteolizzata con tripsina e i peptidi estratti sono stati analizzati tramite nano-ESI MS/MS. I dati ottenuti lanciati in banca dati utilizzando il programma Mascot e confrontati con i risultati della proteolizzazione delle proteine presenti in banca dati, hanno identificato la proteina *Heat shock 90 β* umana. Successivamente sono stati condotti una serie di esperimenti per confermare sperimentalmente che la proteina di interesse di 90KDa fosse effettivamente Hsp90, sviluppando esperimenti di co-immunoprecipitazione con anticorpi anti-Hsp90 o controllando in lisati totali di cellule Chang se queste proteine avessero una uguale mobilità in gel, e ancora che Hsp90 si trovasse in preparazioni di membrane plasmatiche, per dimostrare una localizzazione superficiale di questa proteina, generalmente considerata citoplasmatica. Inoltre è stato rilevato che la polimixina B, un antibiotico cationico, lega sia NadA che la Hsp90 e che è in grado di interferire nella co-immunoprecipitazione di Hsp90 da parte della proteina meningococcica.

Successivamente si è indagato quale fosse l'effetto di questa associazione a livello cellulare. Come descritto in letteratura esiste una percentuale di Hsp90 espressa sulla superficie di diversi tipi cellulari, quali cellule tumorali e apoptotiche, ma anche in linee cellulari Hela, monociti, macrofagi e cellule dendritiche.

Inizialmente è stata quantificata l'espressione superficiale di Hsp90 su cellule Chang (2%) e su monociti umani isolati da *buffy coat* (5%). Inoltre non essendo ancora chiaro se la proteina Hsp90 citoplasmatica raggiunga la membrana cellulare in maniera attiva oppure venga rilasciata da cellule necrotiche e poi si leghi ad essa, è stato condotto un esperimento quantificando se l'espressione superficiale su cellule Chang di Hsp90 aumentasse dopo averle incubate con rHsp90, senza vedere un aumento di legame.

Successivamente si è eseguita l'analisi su monociti umani isolati da *buffy coat*, principali agonisti della risposta immunitaria innata, in modo da poter studiare sia la funzione recettoriale di questa associazione, sia il suo impatto sulla stimolazione del sistema immunitario.

Mediante citofluorimetria di flusso è stato analizzato il legame di sNadA-alexa pre-incubando le cellule con anticorpi anti-Hsp90, in presenza o meno di Polimixina B. Questi esperimenti hanno dimostrato che il legame di NadA alle cellule non è influenzato dalla presenza dell'anticorpo anti-Hsp90.

In un'altra serie di esperimenti è stato valutato se l'espressione superficiale di Hsp90 in monociti variasse dopo pre-incubazione con sNadA, andando a misurare, tramite citofluorimetria di flusso, la fluorescenza coniugata ad un anticorpo secondario specifico per l'anticorpo anti-Hsp90. Da questi esperimenti risulta chiaramente che la pre-incubazione con sNadA interferisce con il riconoscimento dell'anticorpo anti-Hsp90, determinando una diminuzione del segnale del 40%, che fa supporre una vicinanza sulla membrana plasmatica di queste proteine. Inoltre la presenza di Polimixina B negli esperimenti condotti a 37°C, determina l'annullamento della competizione da parte di sNadA, effetto che invece non si verifica a 4°C.

Questi dati indicano che l'associazione NadA-Hsp90 non sia di tipo recettoriale e che, in condizioni fisiologiche, queste proteine tendano ad avvicinarsi e formare dei *cluster* sulla membrana cellulare.

Nell'analizzare l'effetto di questi complessi sull'attivazione del sistema immunitario, si è testato se fossero coinvolti anche dei TLR, recettori espressi sulla superficie di cellule dell'immunità innata, che riconoscono e legano strutture evolutivamente conservate fra i microbi e che spesso formano complessi con HSPs di membrana.

Infine è stato analizzato il profilo di citochine prodotte da monociti umani stimolati per 24h in presenza di sNadA, anticorpi anti-Hsp90 e anticorpi bloccanti i TLR2 e 4, e in presenza o meno di Polimixina B. Si è in questo modo osservato che la simultanea incubazione di NadA e anticorpo anti-Hsp90 determina una massiccia produzione di citochine, mostrando un effetto sinergico, che è abbattuto dalla presenza della Polimixina B e degli anticorpi bloccanti il TLR4. Il *pattern* di citochine prodotte protende per un orientamento verso una risposta di tipo Th2, con attivazione dei macrofagi.

I dati ottenuti evidenziano che l'associazione NadA-Hsp90 non sia di tipo recettoriale ma determini la formazione di *cluster* sulla superficie cellulare,

atto a portare avanti un segnale di allerta per il sistema immunitario, per avvertirlo della presenza di molecole diverse di uno stesso agente esterno.

SUMMARY

Neisseria meningitidis is an encapsulated, Gram-negative bacterium that colonizes the upper respiratory tract of $\sim 10\%$ of humans. With a frequency of one to three cases per 100.000 of the population, the bacterium enters the bloodstream, where it multiplies to high density and cause sepsis. From the bloodstream the bacterium can cross the blood-brain barrier and cause meningitis.

The invasive infection is very dramatic, affecting mostly infants, children, and adolescents who do not have bactericidal antibodies against to the infecting strains. Immunity against the disease can be quired naturally or induced by vaccination and correlates with the presence of bacterial antibodies able to kill the bacterium in the presence of complement. There are no effective vaccines currently licensed in the Unit States or Europe for prevention of the disease caused by serogroup B meningococcus.

The genome sequencing of *Neisseria meningitidis*, serogroup B, allowed the identification of unknown surface protein termed GNA (Genome derived Neisseria Antigen) among which NadA (Neisseria Adhesin A). NadA is a highly conserved protein among disease-associated strains and capable of eliciting bactericidal antibodies in mice. Structure prediction and homology comparison with known virulence-associated factors suggest that NadA belongs to the group of OCA (Oligomeric Coiled-coil Adhesin) nonfimbrial adhesins.

Recently, NadA has been characterized as a new meningococccic factor, involved in the colonization and the invasion of host cells. It has been supposed the involvement of a protein with a K_d of approximately 2-3 μM , in Chang cells, monocytes, macrophages and dendritic cells as the possible receptor for NadA. Probably there is a unique receptor expressed in different cellular lines. In this thesis, we have focused on the investigation of a possible receptor for NadA in these cells.

To identify the specific receptor, experiments of co-immunoprecipitation and overlay were performed in order to characterize, in Chang total cell lysates, a protein that specifically binds to NadA. Our data suggest as a possible receptor a protein of 90 KDa of molecular weight, that it was present in the co-immunoprecipitation samples incubated with NadA and absent in controls.

Subsequently, this band, obtained upon co-immunoprecipitation of NadA, was enriched, separated by 12% SDS-PAGE, then excised from gel and subjected to tryptic proteolysis; resulting peptides were analysed by liquid chromatography/MS and results were analyzed by Mascot software. In this way, we identified the human Heat shock protein 90 β , the peptides recognized provide a coverage of 25% in the total protein sequence.

Afterwards, to confirm experimentally these data, co-immunoprecipitation samples and membrane proteins were incubated with antibody anti-Hsp90, in order to demonstrate a membrane localization of Hsp90, generally known as a cytoplasmic protein. The results confirm our hypothesis.

Moreover, our data show that polymyxine B, a cationic antibiotic similar to antimicrobial peptides produced by monocytes, binds both NadA and Hsp90 and that it is able to interfere in NadA co-immunoprecipitation of Hsp90.

As described in literature, Hsp90 can be expressed on the surface of various cellular types, like tumor and apoptotic cells, but also on HeLa cells, monocytes, macrophages and dendritic cells. In order to investigate the effect of the association between NadA and Hsp90 in cells, first of all we quantified the superficial expression of Hsp90 on Chang cells (2%) and on human monocytes, isolates from buffy coat, (5%).

Since the mechanism of transport to the plasma membrane remains enigmatic, we quantified the superficial expression of Hsp90 in Chang cells after the incubation with rHsp90, but we did not see an increase of protein expression.

We also performed experiments on human monocytes, main agonist of the innate immune system, in order to study the receptorial function of this association, and also the involvement of the immune system. Monocytes were incubated with antibodies anti-Hsp90, with or without Polymyxin B, and then they were analyzed by FACS to quantify the binding of Nadalex. These experiments showed that the NadA binding to the cells is not influenced by the presence of the anti-Hsp90 antibody.

We also investigated if the superficial expression of Hsp90 in monocytes

changed after pre-incubation with NadA. By FACS analysis, we quantified the fluorescence of a PE conjugated secondary antibody after the incubation with anti-Hsp90 antibodies. The results show that pre-incubation with NadA interferes with the acknowledgment of the superficial Hsp90 by its specific antibodies, showing a decrease of 40%, therefore an association between NadA and Hsp90 on the plasmatic membrane can be supposed. Moreover, when monocytes were incubated with NadA for 3 hours at 37°C in presence of Polymyxin B, we did not observe decrease on the signal.

These data indicate that NadA-Hsp90 association is not a receptorial one, demonstrating that, in physiological conditions, these proteins bind closely and strongly each others, probably producing clusters on the plasma membrane.

Finally, to analyze the effect of these complexes on the activation of the immune system, we analyzed the pattern of cytokines produced by human monocytes stimulated for 24 hours with NadA, antibodies anti-Hsp90 and antibodies anti-TLR 2 and 4, and with or without Polymyxin B. These results show a sinergic effect of NadA and antibody anti-Hsp90 on cytokines production, mainly IL-6, TNF α and MCP-1; on the contrary, Polymyxin B and antibody anti-TLR 4 inhibited cytokines production. The cytokine pattern secreted demonstrated that NadA and Hsp90 induce a macrophage-like phenotype and that these two agonists promote a Th2 response.

ABBREVIAZIONI

Ac, anticorpi
AcII, anticorpo secondario
APC, *antigen presenting cells*
BCIP, Nitro Blue Tetrazolium
BSA, *bovine serum albumin*
CCR, *receptors for inflammatory chemokines*
CD40, 83, 86, *cluster of differentiation*
CMP, cellule progenitrici mieloidi
CPS, polisaccaridi capsulari
CTL, cellule T citotossiche
CTR, controllo
DC, cellule dendritiche
DMEM, *Dulbecco's modified Eagle's medium*
ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
FACS, *fluorescence-activated cell sorting*
Fc, frammento cristallizzabile
FCS, *fetal calf serum*
GM-CSF, *granulocyte macrophage colony stimulating factor*
Grp94 (Gp96), *glucose-regulated protein 94* o *glycoprotein 96*
GST, glutatione S-transferasi
h, ore
His-tag, *Histidin-tagged*
HSPs, *heat shock proteins*
IFN- γ , interferone γ
IgA, G, M, immunoglobuline A, G, M
IL-4, interleuchina-4
IL-6, interleuchina-6
IL-10, interleuchina-10

IL-12(p70), interleuchina-12(p70)
KDa, kilo Dalton
LOS, lipopolisaccaridi
LPS, lipopolisaccaride
LSB, *Laemmli sample buffer*
MAC, complesso di attacco alla membrana
MD-2, *Lymphocyte antigen 96*
MFI, intensità di fluorescenza media
MHC I, complesso maggiore di istocompatibilità di tipo 1
MIP 1 α e β , proteina infiammatoria monocitaria
NadA, *Neisseria adhesine A*
NBT, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate
NF κ B, fattore di trascrizione κ B
NK, *natural killer*
OMPs, proteine della membrana esterna
OMV, vescicole di membrana esterna
ORFs, *open reading frames*
PA, fosfatasi alcalina
PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*
pAPC, cellule presentanti l'antigene professionali
PBMNs, *peripheral blood mononuclear cells*
PBS, *phosphate buffered saline*
PCR, *polymerase chain reaction*
PE, ficoeritrina
PI, propidio di ioduro
Por A o B, porine A o B
PRRs, *pattern recognition receptors*
rHsp90, Hsp90 ricombinante
rpm, rotazioni per minuto
RPMI, *Roswell Park Memorial Institute*
SDS, sodio dodecil solfato
sNadA, *Neisseria adhesine A* solubile
TBS, *Tris Buffered Saline solution*
Th1 e 2, cellule T *helper* di tipo 1 e 2
TLR2 e 4, *toll like receptor 2 e 4*
TMB, tetrametil benzidine
TNF- α e β , *tumor necrosis factor α e β*
U937, *Human leukemic monocyte lymphoma cell line*

UspA2, *ubiquitous surface protein A*
YadA, *Yersinia adhesine A*

Capitolo 1

Introduzione

1.1 *Neisseria meningitidis*

1.1.1 Caratteristiche

Neisseria meningitidis (fig. 1.1) è un diplococco Gram-negativo capsulato, obbligato umano, commensale delle prime vie respiratorie, esso si trova infatti nel 10% degli uomini adulti sani a livello della mucosa naso-orofaringea. Isolato per la prima volta nel 1887 da un paziente infetto, esso è un patogeno obbligato umano che causa gravi forme di infezioni invasive che possono portare a sepsi o meningite purulenta [1].

Il meningococco è costituito da una capsula esterna da cui protrudono i pili, una membrana esterna costituita da proteine e lipooligosaccaride e uno spazio periplasmatico oltre cui vi è la membrana citoplasmatica. Il meningococco esprime sulla sua superficie quattro tipi di strutture antigeniche: i polisaccaridi capsulari (CPS), le proteine della membrana esterna (OMPs), i lipopolisaccaridi (LOS) e i pili (fig. 1.2)[2].

Utilizzando anticorpi che riconoscono epitopi superficiali di questi antigeni, è stato possibile identificare i diversi ceppi del meningococco che sono stati suddivisi in: 13 sierogruppi secondo le caratteristiche strutturali dei CPS, 20 sierotipi in base alle OMPs di classe 1-5 e 10 sottotipi per quelle di classe 3 e 13 immunotipi sulla base delle proprietà immunogeniche dei LOS. Dall'analisi del sangue e del liquido cerebrospinale di pazienti infetti si è riscontrato che solo cinque di questi ceppi sono patogeni: gli immunotipi A, B, C, Y e W135 [3, 4].

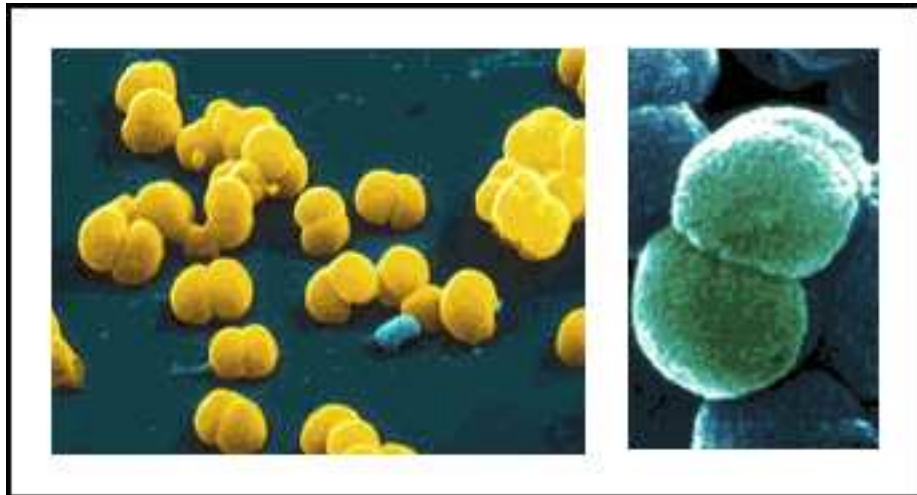


Figura 1.1: Microscopia elettronica a scansione di *Neisseria meningitidis*

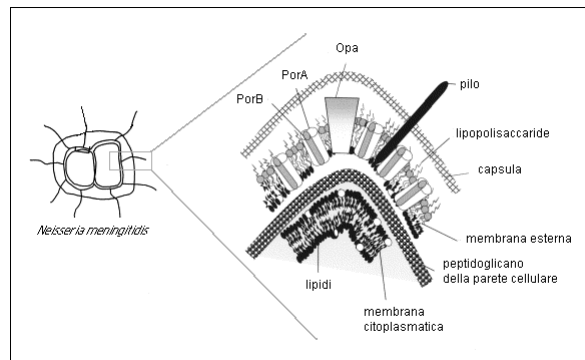


Figura 1.2: Strutture antigeniche superficiali di *Neisseria meningitidis*

I pili, costituiti da un'unica subunità proteica, la pilina, sono strutture filamentose elicoidali ampiamente distribuite tra i batteri Gram negativi, che dalla superficie batterica attraversano la capsula polisaccaridica e si lega ai recettori della membrana delle cellule epiteliali. Queste strutture proteiche sono essenziali per l'adesione alle cellule epiteliali ed endoteliali dell'ospite durante la fase iniziale dell'infezione, sono responsabili della motilità del microrganismo e facilitano lo scambio di materiale genetico tra organismi competenti.

Le principali proteine della membrana esterna sono le porine (PorA e PorB) e le proteine dell'opacità (Opa e Opc) che determinano una interazione più intima con la cellula ospite, legando il recettore CD66 (Opa), appartenente alla famiglia degli antigeni carcinoembrionici [5] o i recettori eparansolfato proteoglicani (Opc), espressi sulle cellule epiteliali ed endoteliali [6]. Tali recettori sono espressi anche sui leucociti (monociti, macrofagi e polimorfonucleati) e, quindi, le proteine associate all'opacità potrebbero favorire l'interazione anche con queste cellule [7, 8]. Le porine PorA e PorB sono le principali proteine di membrana espresse in superficie dal meningococco, rappresentano la gran parte del contenuto proteico totale, e formano canali selettivi per gli anioni, essenziali per la sopravvivenza del microrganismo. PorB è considerato un PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*), e viene riconosciuto dal recettore TLR 2, *Toll like receptor*, [9] attraverso il quale promuove l'espressione di molecole coinvolte nella presentazione antigenica e induce la secrezione di mediatori solubili dell'infiammazione da parte delle cellule del sistema immunitario, determinando la maturazione delle cellule dendritiche, la proliferazione delle cellule B e la produzione di IgG [10]. Al contrario, PorA, durante l'infezione, recluta e attiva le cellule del sistema immunitario innato, importanti per l'eliminazione del patogeno, e le stimola a produrre chemochine essenziali per la successiva risposta immunitaria specifica [11].

Il lipopolisaccaride (LPS) è il componente principale della membrana esterna dei batteri Gram negativi e presenta una regione interna conservata, costituita da eptosi e dall'acido 3-deoxy-D-manno-2-octulosonico (KDO) legato al lipide A transmembrana [12]. In *Neisseria meningitidis* il LPS è definito lipooligosaccaride (LOS) in quanto due brevi catene oligosaccaridiche sono unite ai due eptosi interni. Inoltre, unita alla parte conservata, c'è una porzione variabile costituita da zuccheri quali glucosio, galattosio e acido N-acetilneuraminico (NANA). Il lipooligosaccaride è un importante fattore di virulenza in quanto, grazie alla repulsione tra le cariche negative

presenti nell'acido sialico (acido $\alpha(28)$ N-acetilneuraminico) e all'ingombro sterico, inibisce l'attività battericida del siero e altera la capacità di legame e adesione alle cellule epiteliali o ai fagociti mononucleati intervenendo nell'ingresso e nella sopravvivenza del microrganismo nel torrente circolatorio. Infatti, il lipooligosaccaride diminuisce l'attivazione del complemento (via alternativa) e influenza, inoltre, l'attivazione dei neutrofilii interferendo nella conseguente risposta immunitaria dell'ospite [8, 13, 14]. Infine, il LPS riveste un ruolo dominante nella patofisiologia della malattia meningococcica correlando con la gravità della stessa [15, 16].

I polisaccaridi capsulari (CPSs) sono organizzati in un complesso, esterno alla parete cellulare, a formare una vera e propria capsula sede di antigeni gruppo-specifici. E' un fattore di virulenza essenziale in quanto protegge il patogeno dalla batteriolisi mediata dal complemento e dalla fagocitosi da parte di neutrofilii, monociti, macrofagi splenici e altri macrofagi litorali del sistema reticolo endoteliale. Ciò consente al meningococco la trasmissione, la replicazione e la sopravvivenza durante l'invasione del circolo sanguigno e del fluido cerebro spinale, negli ambienti esterni e nelle vescicole fagocitiche.

1.1.2 Ciclo parassitario

Il primo sito di colonizzazione del meningococco è la mucosa naso-faringea. Le strutture che contribuiscono maggiormente all'adesione alle cellule epiteliali umane sono i pili di tipo IV e altre proteine della membrana esterna (fig. 1.3).

I pili si legano ai recettori della membrana delle cellule epiteliali, CD46, e mediano la prima fase di infezione, detta "ancoraggio" [17, 18].

Il legame a queste proteine è cruciale per l'adesione e l'invasione, infatti successivo a questo è la perdita dei pili e il riarrangiamento della capsula del batterio. In particolare la proteina Opa lega il recettore CD66 presente sulle cellule epiteliali determinando la sua fagocitosi e la produzione di citochine. All'interno del fagocita il patogeno riesce a sopravvivere grazie a diversi fattori che eludono le difese della cellula ospite, di cui i principali rappresentanti sono le porine PorA e PorB e la proteasi IgA1. Le porine, OMPs di classe 2/3, sono in grado di traslocare nella membrana della vescicola endocitica e formare dei canali ionici che ne alterano la normale funzionalità; le IgA1 sono invece capaci di degradare delle proteine della via endosomiale, bloccando in questo modo la maturazione di endosomi e lisosomi e quindi impedirne il normale funzionamento. A questo punto il

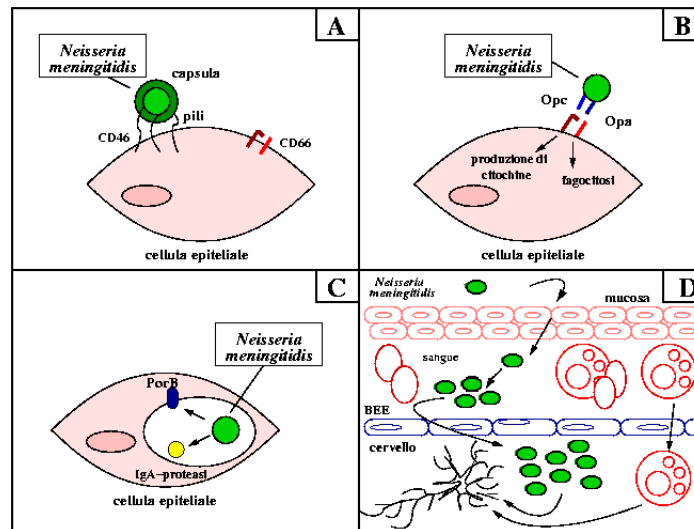


Figura 1.3: Ciclo parassitario del meningococco

patogeno supera la barriera epiteliale e diffonde nel circolo sanguigno dove è in grado di sopravvivere e proliferare grazie a particolari fattori di virulenza [3, 19].

In condizioni di alti valori di batteremia, un piccolo numero di meningococchi è in grado di diffondere dal circolo sanguigno alle meningi dando luogo ad una grave infezione delle meningi e del sistema nervoso centrale. Successivamente i batteri possono indurre un incremento della permeabilità di questa barriera con conseguente accumulo di cellule del sangue e rilascio di componenti pro-infiammatorie che generano edemi e aumento della pressione intracranica, causando gravi danni neuronali [20].

1.2 La malattia meningococcica

1.2.1 Epidemiologia

Neisseria meningitidis è una delle principali cause di sepsi e meningiti nel mondo, dando luogo a manifestazioni cliniche endemiche ed epidemiche dovute quasi esclusivamente ai 5 sierogruppi patogeni: A, B, C, Y e W 135.

L'incidenza annua va da 1 a 5 casi ogni 100.000 abitanti nei paesi industrializzati, a circa 50 casi ogni 100.000 abitanti nei paesi in via di sviluppo [21]. Più del 50% dei casi si verifica fra i bambini con età inferiore ai 5 anni ed il picco di incidenza si presenta nel corso del primo anno di vita, anche se, soprattutto in alcune aree geografiche, vi possono essere delle infezioni di tipo epidemico caratterizzate da un'incidenza fino a 100 volte maggiore di quella endemica. In questo caso i pazienti aumentano in modo esponenziale dopo i due anni d'età.

Neisseria meningitidis di sierogruppo A è caratterizzata dalla sua propensione a causare epidemie su vasta scala nei paesi in via di sviluppo e, al contrario, molto raramente nel Nord America e in Europa [22, 23]. La zona più colpita da epidemie gravi ed estese si trova in Africa nell'area sub-Sahariana, che si estende dal Senegal all'Etiopia, definita cintura della meningite. L'andamento epidemico che interessa tale area è particolare in quanto la patologia meningococcica raggiunge il suo picco massimo durante la stagione secca (marzo-aprile), per poi diminuire drasticamente con l'arrivo delle piogge. Questa incidenza stagionale riflette un cambiamento nel tasso dei portatori che, probabilmente, è la conseguenza dell'indebolimento delle difese locali e del danneggiamento delle mucose respiratorie dovuto a polveri e secchezza dell'aria. Le epidemie, causate dal meningococco di sierogruppo A, ricorrono con ciclicità ogni 5-12 anni e con una durata di 2-3 anni. Le dimensioni delle epidemie possono raggiungere dimensioni enormi: nel 1996 nell'area sub-Sahariana sono stati registrati 200.000 casi, dei quali la maggior parte rappresentati da ragazzi con età inferiore ai 15 anni, e 20.000 decessi [24, 25]. Comunque, l'incidenza della patologia meningococcica permane relativamente alta anche nei periodi endemici. Inoltre, episodi di meningite causati dal sierogruppo A sono stati riscontrati anche in altre aree africane e nel continente asiatico: Cina, India, Nepal e Mongolia. La circolazione dei ceppi virulenti tra i paesi è favorita dagli estensivi spostamenti delle popolazioni, sia nelle aree interne alla cintura della meningite sia dai flussi migratori diretti verso le regioni più industrializzate dell'occidente. Ascrivibile a ciò è anche la comparsa del sierogruppo W135, il quale prima del 1996 era stato raramente isolato in Africa e non sembrava causare estese epidemie [26]. In alcuni paesi degli Stati Uniti e dell'Europa, tra i quali Slovenia, Repubblica Ceca, Grecia, Spagna, Irlanda, Canada e Regno Unito, contribuisce in modo sostanziale allo sviluppo della patologia il sierogruppo C.

Neisseria meningitidis di sierogruppo B è la causa principale di menin-

gite endemica nei paesi industrializzati ed responsabile del 30-40% dei casi nel Nord America e più dell'80% in Europa [25]. La percentuale di infezione causata da questo sierogruppo è particolarmente elevata in Norvegia, Olanda, Germania e Danimarca. La maggior parte delle infezioni da meningococco di gruppo B mostra una forte stagionalità, con il suo massimo nella stagione invernale, e colpisce soprattutto i bambini al di sotto di un anno d'età. Al contrario dei sierogruppi A e C, le cui epidemie sono di breve durata e si risolvono in 1-3 anni, quelle causate da *Neisseria meningitidis* di sierogruppo B iniziano lentamente ma possono durare per oltre 10 anni.

Queste gravi e persistenti epidemie si sono verificate in alcuni paesi dell'America Latina (Cuba, Colombia, Brasile e Cile), in Norvegia e, dal 1991, in Nuova Zelanda è in corso una epidemia che presenta un'incidenza 10 volte maggiore rispetto a quella basale, soprattutto nelle isole del Pacifico e tra la popolazione Maori [25, 27].

I ceppi di meningococco appartenenti ai sierogruppi Y e W135 sono piuttosto ubiquitari e raramente coinvolti in casi di malattia infettiva. Dal 1990 negli Stati Uniti si è riscontrato un aumento dei casi (dal 2% al 35%) imputabili al sierogruppo Y e associato a pazienti con deficienze nel sistema del complemento, a persone anziane, con età superiore ai 65 anni, e alla razza nera [28]. Il sierogruppo W135 rimane causa infrequente negli Stati Uniti e in Europa, anche se nel 2000 sono stati riportati alcuni casi in Inghilterra, e sempre nello stesso periodo è stato responsabile di gravi epidemie in alcuni paesi dell'Africa sub-Sahariana [26].

Neisseria meningitidis globalmente causa 1,2 milioni di casi di malattia meningococcica per anno, dei quali 3000 negli Stati Uniti e 7000 in Europa, dove il microrganismo rappresenta la causa più comune di meningite batterica nei bambini e negli adolescenti. Nonostante i progressi fatti nella prevenzione, diagnosi e cura, il tasso di letalità dell'infezione meningococcica rimane molto alto, pari al 5-15%, e in circa il 30-50% di coloro che sopravvivono si riscontrano conseguenze neurologiche permanenti [20].

1.2.2 Sintomatologia

Neisseria meningitidis nonostante la potenziale patogenicità è un normale commensale delle prime vie respiratorie umane, si trova infatti nel 10% degli uomini adulti a livello della mucosa naso-orofaringea in forma asintomatica, ma in un piccolo gruppo di individui la colonizzazione delle alte vie respiratorie è seguita da una rapida invasione delle cellule endoteliali

e del sistema nervoso centrale che da inizio ad una cascata infiammatoria. Questo sviluppo è raro ma può evolvere con conseguenze molto gravi, quali morte o danni cerebrali irreversibili.

La patologia colpisce prevalentemente i bambini e i ragazzi, mentre nell'uomo adulto il 10-20% delle infezioni è associato a immunodeficienza; essa è contagiosa e può essere trasmessa attraverso contatto diretto o inalazione fino ad un raggio di un metro, anche se fortunatamente il batterio non vive a lungo all'esterno dell'ospite [29, 30]. Tuttavia, alcuni ceppi particolarmente virulenti possono invadere la mucosa naso-orofaringea e disseminare nel circolo sanguigno dando luogo alla patologia meningococcica invasiva. Non sono ancora note le condizioni che influenzano l'equilibrio tra lo stato di portatore sano e l'invasione batterica, ma probabilmente sono coinvolti fattori come la virulenza del batterio, lo stato immunitario dell'ospite, l'integrità mucosale e altri fattori quali quelli ambientali e socio-economici [31].

Le difese immunitarie umane contro le patologie indotte dal batterio *Neisseria meningitidis* coinvolgono sia i meccanismi di immunità innata che specifica, in grado di riconoscere le strutture antigeniche superficiali del patogeno. La risposta immunitaria può dipendere dall'età dell'ospite come anche dal sierogruppo dell'organismo, ma la bassa incidenza della malattia dimostra il successo dell'immunità innata nel prevenire l'infezione nella maggior parte degli individui. L'importanza relativa dei singoli meccanismi di risposta è ancora sconosciuta, ma la maggior suscettibilità all'infezione in individui immunodeficienti da un'idea della complessità della risposta immune e del ruolo centrale svolto in questa da anticorpi e sistema del complemento.

Una volta che il meningococco ha invaso il circolo sanguigno può sviluppare differenti patologie:

- sepsi meningococcica fatale (FMS)

E' caratterizzata dalla comparsa, entro 6-12 ore, di febbre elevata, compromissione dello stato di coscienza e petecchie cutanee generalizzate, conseguenza di una coagulazione intravasale disseminata e trombosi dei piccoli vasi. Ciò determina una insufficienza microcircolatoria che può danneggiare gli organi interni (disfunzione miocardica e sindrome di Waterhouse-Friderichsen) e dar luogo a estese zone di necrosi alle estremità degli arti, con conseguente amputazione delle

parti compromesse [32, 33]. Il principale responsabile di *shock* e coaguli intravascolari diffusi è l'endotossina meningococcica, tanto che la gravità dello shock è correlata al livello circolante di questa. L'infezione induce la sovra regolazione di zimogeni, proteine litiche e citochine che portano ad un danneggiamento di tessuti e di molti organi, con emorragie diffuse e trombi, shock settico e morte. La mortalità è molto alta, fino all'80%, e presenta un decorso veloce, la maggior parte dei pazienti muore dopo 24 ore dall'insorgere dei primi sintomi.

- meningite meningococcica

La meningite meningococcica presenta febbre elevata, cefalea, fotofobia, turbe del respiro e della frequenza cardiaca, alterazione dello stato di coscienza e rigidità della nuca e del tronco. Si ha nel caso in cui il meningococco diffonda dal circolo sanguigno a livello delle meningi, dove i principali meccanismi di difesa umorale e cellulare sono assenti. Il batterio può quindi proliferare incontrollato, provocando una intensa infezione del sistema nervoso centrale. La meningite può essere fatale, anche se il tasso di mortalità è piuttosto basso, mentre dall'8 al 20% dei pazienti che hanno superato l'infezione soffre di danni neurologici permanenti come ritardi mentali, spasticità e perdita di sensibilità.

In entrambi i casi è importante una diagnosi precoce e avviare la terapia antibiotica prima possibile, anche se questa non sempre è efficiente a causa della grande variabilità del decorso della malattia nei diversi individui [34, 35]. Nonostante la disponibilità di terapie antimicrobiche e cure, il tasso di mortalità permane del 5-10% nei paesi industrializzati, ma può raddoppiare in quelli in via di sviluppo.

1.2.3 Diagnosi e trattamento

La diagnosi dell'agente eziologico che causa la patologia meningococcica consta nella colorazione di Gram e nella coltura del CSF o del siero del paziente. Attualmente sono in via di sviluppo rapidi test basati sull'agglutinazione al lattice, sull'immunodetezione tramite cromatografia in *stick*, su PCR *multiplex* o *microarray* di DNA [25, 36, 37]. L'uso di questi approcci permetterebbe anche di incrementare le informazioni di genotipizzazione dei sierogruppi e subsierotipi presenti in una data popolazione.

Il trattamento della patologia prevede un attento monitoraggio delle condizioni e la somministrazione di antibiotici, quali la penicillina che, se somministrata per via endovenosa, risulta efficace nel trattamento dei pazienti affetti da meningococco, anche se molti ceppi di *Neisseria meningitidis* presentano una ridotta suscettibilità. Inoltre, questo farmaco non è in grado di eradicare il trasporto nasofaringeo del microrganismo. Attualmente, nei casi di epidemia nei paesi in via di sviluppo, l'antibiotico d'elezione nel trattamento della patologia meningococcica è il cloramfenicolo [25].

Numerosi trattamenti a sostegno delle terapie correnti, per la cura della sepsi meningococcica fatale e nella meningite, sono in fase di valutazione clinica. Questi includono agenti in grado di neutralizzare le tossine microbiche, come il LPS, farmaci anti-infiammatori e immunosoppressivi non specifici, agonisti per neutralizzare citochine pro-infiammatorie e terapie atte a contrastare le anomalie della coagulazione, soprattutto la coagulazione intravasale disseminata, comuni nei pazienti con la malattia meningococcica. E' stato dimostrato che piccole dosi di idrocortisone e fludrocortisone sono in grado di ridurre la mortalità in pazienti con *shock* settico e insufficienza adrenalinica. Inoltre, le prime terapie basate su trasfusione di fluidi, somministrazione di vasopressori e il controllo della glicemia con l'insulina, sembrano ridurre la mortalità nei pazienti con sepsi e *shock* settico [39]. Soggetti a contatto con pazienti infetti presentano 500-800 volte di più la possibilità di sviluppare la malattia meningococcica e il sistema di prevenzione attuale si basa su una chemiopprofilassi antimicrobica [28]. Nonostante la disponibilità di terapie antimicrobiche contro le patologie causate da *Neisseria meningitidis*, l'indice di mortalità permane in misura significativa. Di conseguenza la via migliore per contrastarlo rimane la prevenzione mediante l'uso di vaccini in grado di indurre anticorpi battericidi e indurre una memoria immunitaria.

1.2.4 Prevenzione: i vaccini

Durante il ventesimo secolo molti vaccini sono stati scoperti e testati per prevenire le infezioni da meningococco con diversi risultati. Dei vaccini tetravalenti basati su polisaccaridi capsulari contro i sierogruppi A, C, W-135 e Y sono stati prodotti nel 1984, sebbene questi fossero efficaci negli adulti non lo erano nei neonati e nei bambini, la classe di età che maggiormente necessita di questo vaccino. Inoltre la risposta immunitaria contro i polisac-

caridi non coinvolgeva cellule T, producendo per lo più IgM a bassa affinità, e non era quindi in grado di indurre memoria immunitaria.

Questi limiti furono superati coniugando ai polisaccaridi delle proteine *carrier* in grado di attivare la produzione di cellule T. L'utilizzo di questa tecnica permise di ottenere un vaccino che sviluppasse un'intensa risposta immunitaria, con la produzione di un alto titolo di anticorpi protettivi e di memoria, efficace su più del 90% di bambini al di sotto dei diciotto mesi. Attualmente è disponibile un vaccino bivalente diretto contro i sierogruppi A e C e, dal 2003, un vaccino tetravalente per tutti i quattro sierogruppi (MP-SV4) è stato approvato nei paesi appartenenti alla cintura della meningite [25, 28, 40].

Sono disponibili vaccini coniugati monovalenti contro il sierogruppo C: il CRM197 basato su polisaccaridi capsulari coniugati ad un mutante non tossico della tossina difterica (sviluppato da Chiron e Wyeth) e un altro basato sull'oligosaccaride coniugato alla tossina tetanica (sviluppato da Baxter). Introdotti nel 1999 in Gran Bretagna si sono dimostrati sicuri ed efficaci nell'indurre una protezione a lungo termine e, inoltre, il programma di vaccinazione ha influito notevolmente sull'incidenza della malattia, risultando in un decremento di oltre il 90% del numero di morti e di casi clinici, del 66% dei portatori asintomatici e del 70% dei casi tra le persone non vaccinate. Un sostanziale beneficio dovuto all'immunità di gruppo è probabilmente correlato agli effetti sulla colonizzazione e alla diminuzione della circolazione dei batteri nella popolazione [25].

Dal 2005 è anche disponibile un vaccino coniugato polisaccaridico tetravalente diretto contro i sierogruppi A, C Y e W135 (MCV4, sviluppato dalla Sanofi-Pasteur) e approvato negli Stati Uniti per la vaccinazione di soggetti con età compresa tra gli 11 e i 55 anni. Questa formulazione si rivelata efficace, nel 100% dei casi, nell'indurre la produzione di anticorpi battericidi nei ragazzi con età compresa tra 11 e 18 anni, ed stato sottoposto alla FDA (*Food and Drug Administration*) per ottenere l'estensione dell'utilizzo nei bambini tra i 2-10 anni d'età [28, 41].

Sfortunatamente lo stesso approccio non può essere applicato al sierogruppo B perchè il suo polisaccaride capsulare è un polimero dell'acido $\alpha(2 \rightarrow 8)N - acetilneuraminico$, o acido polisialico, una molecola normalmente presente nei tessuti umani in forma carbossilata. Un vaccino prodotto con questo polisaccaride sarebbe tollerato dal sistema immunitario umano e quindi non sarebbe in grado di sviluppare una efficiente risposta immunitaria, inoltre potrebbe invece indurre una reazione autoimmune pericolosa

per l'individuo.

Successivamente è stato studiato un vaccino contro il sierogruppo B che si basa su antigeni proteici superficiali contenuti nelle vescicole di membrana esterna (OMV), ottenute mediante l'estrazione con un detergente [42]. Questi vaccini producono anticorpi battericidi e proteggono contro le infezioni meningococciche, ma la loro efficacia è ridotta ai soli ceppi omologhi, non essendo in grado di produrre anticorpi battericidi contro ceppi eterologhi. Essi sono infatti principalmente diretti contro PorA, la proteina più espressa nelle OMV, che se pur presente in tutti i ceppi di meningococco, esibisce però una elevata variabilità antigenica. Quindi questi vaccini sono ceppo specifici e possono essere usati efficacemente solo durante le epidemie causate da un singolo clone, come è stato fatto in risposta alle epidemie nazionali in Norvegia, Cuba e Nuova Zelanda [43].

Quindi tuttora non sono ancora disponibili vaccini approvati negli Stati Uniti ed in Europa per prevenire la malattia causata dal sierogruppo B [31]. I vaccini basati sulle OMV e diretti contro il ceppo norvegese H44/76 e contro quello neozelandese NZ98/254 sono i vaccini migliori, ad oggi disponibili, per la prevenzione contro il meningococco di sierogruppo B [44]. La formulazione del vaccino neozelandese, sviluppato da Chiron in collaborazione con il Ministero della Salute e l'Università di Auckland, si è dimostrato, in *trials* clinici, in grado di indurre anticorpi battericidi nel 70% dei bambini con età compresa tra 6 e 24 mesi e tra 8 e 12 anni e nel 90% degli adolescenti [25]. Attualmente la ricerca è orientata verso la scoperta di nuovi antigeni che possono essere utilizzati per la formulazione di un vaccino con larga specificità contro *Neisseria meningitidis* di sierogruppo B.

1.3 NadA, un nuovo candidato per un vaccino

1.3.1 NadA

Un grande passo nella progettazione dei vaccini è stato compiuto nel ventesimo secolo grazie alla possibilità di determinare la sequenza genomica completa di un batterio in pochi mesi e a bassi costi. Dallo sforzo di trovare un nuovo ed efficace vaccino contro *Neisseria meningitidis* di ceppo B è stato applicato un nuovo approccio, chiamato "vaccinologia inversa", che permette, partendo dalla sequenza genomica, di predire tramite anali-

si informatiche, delle nuove proteine come candidate per la progettazione di un vaccino [45]. La vaccinologia inversa presenta numerosi vantaggi rispetto all'approccio convenzionale: i tempi sono molto ridotti e il numero di possibili antigeni identificati notevolmente superiore, inoltre è possibile identificare anche proteine con basso livello di espressione e antigeni importanti per la patogenesi, che magari sono espressi durante l'infezione ma non nelle condizioni di crescita usate in laboratorio. Questa tecnica è inoltre applicabile anche ai patogeni non coltivabili in laboratorio.

La sequenza completa (2272 bp) del genoma del ceppo virulento MC58 di *Neisseria meningitidis* sierogruppo B [46] venne ottenuta con la strategia del *random Shotgun*. Mentre il sequenziamento era in corso, il genoma del meningococco è stato vagliato, usando diversi programmi informatici, per identificare motivi di localizzazione superficiale: sequenze segnale (PSORT o SignalP), motivi transmembrana (TMPRED), sequenze di lipidazione (MOTIFS), in modo da selezionare delle potenziali *open reading frame*, ORF, codificanti per proteine esposte sulla superficie batterica o secrete [47, 48, 49].

Sulla base di questi criteri, fra le 2158 possibili ORFs trovate, ne sono state scelte 600. Questi potenziali antigeni includevano differenti classi di proteine, secondo la loro disposizione sulla superficie batterica: proteine secrete o della membrana esterna, lipoproteine, proteine della membrana interna, proteine periplasmatiche e anche proteine aventi omologie coi fattori batterici coinvolti nella virulenza e patogenicità.

Le 600 ORFs selezionate sono state amplificate tramite PCR, clonate in *Escherichia coli* in modo da esprimere ogni gene come proteina di fusione con His-tag o GST per la successiva purificazione. Di queste 350 vennero espresse con successo (il 61%), quindi purificate e utilizzate per immunizzare dei topi. Più precisamente è stato predetto che 70 di queste fossero lipoproteine, 96 proteine periplasmatiche, 87 proteine della membrana interna, 45 proteine della membrana esterna e 52 proteine a localizzazione incerta. E' stato fatto poi un vaglio dei sieri immuni tramite *Western Blot* su lisati cellulari totali di meningococchi e vescicole della membrana esterna per verificare che le proteine fossero realmente espresse nel meningococco e per determinare la loro localizzazione subcellulare. L'esposizione sulla superficie di ciascun antigene è stata poi confermata da analisi al citofluorimetro (FACS, *fluorescence-activated cell sorter*) e da test ELISA su intere cellule di batteri. Infine i sieri sono stati testati in saggi di battericidia SBA (*Serum Bactericidal Assay*) per valutare l'attività di lisi mediata dal complemento

degli anticorpi, poichè questa proprietà correla con l'efficacia del vaccino nell'uomo [50].

Delle 91 proteine considerate esposte sulla superficie batterica, 29 si verificarono capaci di indurre anticorpi battericidi. Quindi i candidati selezionati dall'analisi genomica furono confrontati in base alla presenza di geni omologhi e alle sequenze conservate in un gruppo di 31 ceppi di meningococco B, isolati in differenti parti del mondo, rappresentativi dei principali sierogruppi e caratterizzati da un'espressione genica non fase-dipendente [45]. L'allineamento delle sequenze mostra che la maggior parte degli antigeni analizzati sono ben conservati, mentre solo una piccola parte di questi presenta regioni altamente variabili e porta epitopi multipli conservati in più ceppi. Infine la maggior parte di questi antigeni, testati con i saggi battericidi, fu in grado di indurre una protezione incrociata contro ceppi eterologhi. Fra le 29 proteine fino ad ora selezionate, solo 7 furono in grado di riconoscere ceppi eterologhi di meningococco, queste vennero definite GNA (*Genome derived Neisseria Antigen*).

Durante il taglio del genoma del meningococco B ceppo MC58 fu trovata NadA, una nuova proteina oligomerica di superficie, capace di produrre anticorpi battericidi. Questa proteina è espressa in molti ceppi di *Neisseria meningitidis* ma è sovraespressa in tre dei quattro ceppi ipervirulenti, rappresentando così un buon candidato per lo sviluppo di un vaccino. Studi attualmente in corso stanno cercando di caratterizzare questa proteina dal punto di vista biochimico e funzionale.

Il successo dell'applicazione della vaccinologia inversa ottenuto per *Neisseria meningitidis* ha ampliato l'utilizzo di questo approccio anche ad altri importanti patogeni umani come *Streptococcus pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, diventando un'applicazione impiegata di routine nello sviluppo di vaccini [51].

1.3.2 Struttura di NadA

Neisseria Adhesin A (NadA) è stata riscontrata nel 50% dei ceppi isolati da pazienti e il gene nadA sovra espresso in 3 dei 4 ceppi più ipervirulenti (ET-5, ET-37, *cluster* A4) ed assente nel ceppo III, in *Neisseria gonorrhoeae* e nelle specie commensali di questo batterio, come *Neisseria lactamica*. Sono stati identificati 4 alleli che presentano una sequenza ben conservata e una identità del 96-99% nella sequenza nucleotidica tra i primi tre. Si riscontrano differenze per l'allele 4 che non è presente nei ceppi ipervirulenti

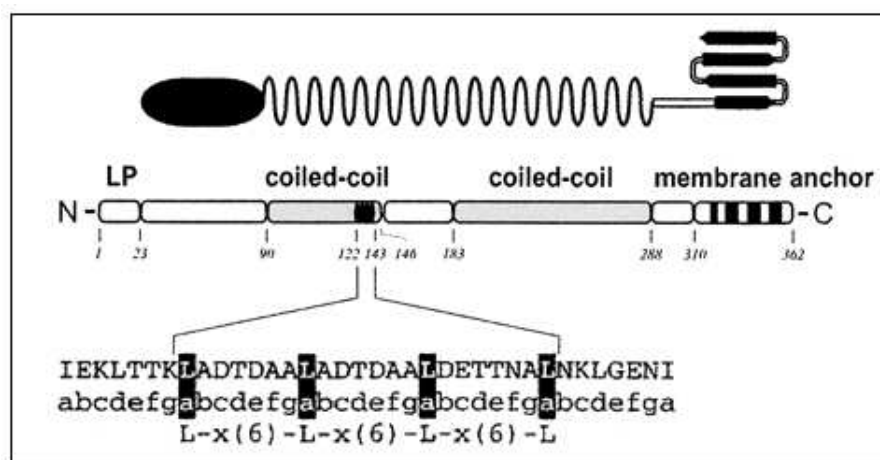


Figura 1.4: Struttura secondaria predetta

e che codifica per una proteina che presenta una bassa omologia con le altre nella regione interna (25%), anche se la propensione per la struttura ad α -elica resta inalterata [52, 53]. Inoltre, l'analisi di espressione di NadA ha rivelato delle differenze nei diversi ceppi (modesto livello di espressione nel ceppo MC58 e alto nel ceppo 2996) e nel corso della crescita del batterio, che raggiunge la massima espressione in fase stazionaria [44].

NadA è una proteina di 405 aminoacidi con un probabile peptide *leader* di 23 aminoacidi, un peso molecolare di circa 35 KDa e punto isoelettrico 4.50. L'analisi di predizione della struttura secondaria rivela una conformazione costituita da tre domini principali, come si può vedere in fig 1.4.

La regione C-terminale (aa 310-405) è costituita da una struttura β -anfipatica e da un aminoacido aromatico, entrambe strutture tipiche di un dominio di ancoraggio alla membrana esterna. La regione N-terminale (aa 23-90) possiede una struttura secondaria non definita, mentre il resto della proteina è costituita principalmente da α -eliche. All'interno di questa regione i residui dal 90 al 146 e dal 183 al 288 denotano un'alta probabilità di formare strutture *coiled-coil* e gli aminoacidi dal 115 al 143 contengono quattro residui di leucina, che si ripetono ogni sette, che potrebbero formare un dominio "a cerniera di leucina". Non si conosce però ancora con precisione come i domini *coiled-coil* e "a cerniera di leucina" siano coinvolti nella oligomerizzazione dei monomeri tramite l'associazione delle α -eliche. Poiché

l'allele 4 codifica una proteina NadA che presenta un'omologia del 63% nella regione N-terminale, del 100% in quella C-terminale e solo del 25% nella porzione intermedia, che priva dei residui di leucina, si ritiene che sia il dominio C-terminale a promuovere una stabile oligomerizzazione, anche in assenza del motivo a cerniera di leucina [53].

NadA possiede una omologia di sequenza del 32-34% con le adesine non fimbriali UspA2 di *Morexella catarrhalis* e YadA di *Yersinia enterocolitica* [55]. Da una analisi più approfondita si osserva che l'omologia risiede principalmente nella regione C-terminale, con una identità del 56-63% negli ultimi 70 aminoacidi, mentre il resto della sequenza ha un livello di sovrapposizione del solo 23-25%. Singolarmente questa similarità è conservata anche a livello della struttura secondaria. Infatti YadA e UspA2 hanno una struttura C-terminale che presenta quattro foglietti β -anfipatici e una regione interna ad α -eliche che forma domini *coiled – coil*. In UspA2 sono anche presenti due motivi “a cerniera di leucina” che invece sono assenti in YadA. Un'altra caratteristica comune con queste proteine è l'assenza in NadA di residui di cisteina.

Nel caso delle proteine YadA e UspA2 è stato dimostrato, tramite microscopia elettronica e immunomarcatura [55], che le α -eliche formino regioni *coiled – coil* che mediano l'oligomerizzazione dei monomeri. Anche NadA forma degli oligomeri espressi sulla superficie batterica che sono stabili al calore, all'SDS e alla riduzione da parte del β -mercaptoetanololo [52]. La mancanza di residui di cisteina nella proteina fa sì che l'oligomerizzazione non dipenda da ponti disolfuro, si pensa quindi che anche in NadA le sequenze predette come domini *coiled – coiled* e i motivi “a cerniera di leucina” siano alla base delle interazioni intermolecolari fra i monomeri, che sembra si associno a formare trimeri.

Basandosi sulle omologie di struttura primaria e secondaria si ipotizza per NadA una struttura tridimensionale del monomero simile alla forma “a lecca-lecca” descritta in letteratura per le proteine YadA e UspA2, basata su tre differenti organizzazioni: un'ancora di membrana al C-terminale, uno stelo formato da domini *coiled – coil* e una testa globulare all'N-terminale.

I distinti domini delle proteine YadA e UspA2 si riflettono in differenti domini funzionali all'interno della molecola, queste adesine infatti svolgono ruoli importanti nell'adesione e invasione alle cellule epiteliali, e nel conferire protezione contro l'attivazione del sistema del complemento e la lisi da parte della cellula ospite. In particolare la zona N-terminale sarebbe coinvolta nel legame con le cellule fagocitarie, con l'interazione intermolecolare nell'au-

toagglutinazione e col legame con le proteine della matrice extracellulare. La parte C-terminale formerebbe invece dei domini cruciali per la stabilità generale della struttura, l'oligomerizzazione e l'ancoraggio delle molecole alla superficie cellulare. L'alta omologia strutturale con queste proteine fa pensare che ci possa essere in NadA anche una similitudine di funzioni, sembrando essa stessa rilevante nella patogenicità del meningococco.

Un vaccino (5CVMB) a largo spettro d'azione, contenente NadA, e diretto contro il meningococco di sierogruppo B è attualmente in fase di valutazione clinica. La formulazione è costituita da 5 antigeni, selezionati attraverso la vaccinologia inversa, le proteine di fusione GNA1332-1030 e GNA2091-1870 e NadA in forma monomeric, capaci di indurre anticorpi battericidi e protezione passiva in modelli murini e i cui sieri riconoscono i 3 ceppi più rappresentativi nella popolazione meningococcica di gruppo B: NZ98/254, 2996 e MC58. L'antisiero ottenuto dall'immunizzazione di modelli murini con il vaccino 5CVMB riconosce efficientemente i tre ceppi rappresentativi di meningococco, induce protezione passiva e, in una collezione di 214 ceppi di *Neisseria meningitidis* sierogruppo B, riconosce e uccide il 78% dei ceppi (valutato con il saggio di battericidia). Questo rappresenta un risultato promettente, se confrontato con il 20% ottenuto utilizzando i sieri dei topi immunizzati con i vaccini basati sulle OMV dei ceppi H44/76 e NZ98/258, che rappresentano i migliori vaccini attualmente disponibili. Inoltre utilizzando degli adiuvanti, ad esempio un emulsione di olio in acqua (ME59), autorizzata per l'uso nell'uomo in Europa, l'uccisione dei ceppi aumenta fino al 94% [44].

La proteina NadA viene inclusa anche nella formulazione di vaccini diretti contro altri sierogruppi di meningococco, come quello basato sulle OMV del sierogruppo A subsierogruppo III [56]. Questo suggerisce che l'immunizzazione con il vaccino contro il sierogruppo B potrebbe contribuire allo sviluppo di una immunità protettiva dalla patologia meningococcica, causata anche da altri sierogruppi.

NadA è stata recentemente individuata come un nuovo fattore meningococcico coinvolto nella colonizzazione e invasione delle cellule della mucosa epiteliale [57]. Infatti, la proteina in forma ricombinante solubile, NadA $_{\Delta(351-405)}$, priva dell'ancora di membrana, lega in modo specifico le cellule epiteliali Chang della congiuntiva umana, *in vitro*, a conferma di un suo coinvolgimento durante la fase iniziale di infezione [52]. Quando espressa sulla superficie di un ceppo mutante di *E. coli*, si assembla in oligomeri ancorati alla membrana e conferisce al microrganismo la capacità di aderire

e invadere le cellule della linea Chang. La regione deputata all'attività di legame è il dominio all'N-terminale, mentre quello deputato all'oligomerizzazione, in trimeri, il dominio C-terminale, che media anche l'ancoraggio alla membrana.

Recentemente [54] è anche stato dimostrato che sNadA lega le cellule dendritiche a siti ad alta affinità ($kd=80\text{nM}$) e siti a bassa affinità ($Kd=4\mu\text{M}$) e che dopo stimolazione con $\text{IFN}\gamma$, che è spesso presente nei tessuti durante una infiammazione, e trattamento con R848, una molecola che mima l'RNA batterico, induce una sovra-espressione dei marcatori di maturazione CD83, CD40, CD86 e HLA-DR e la secrezione delle citochine $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL12(p70). Inoltre cellule dendritiche trattate con $\text{IFN}\gamma$ e sNadA inducono la proliferazione di linfociti nativi CD4+, determinando un bilanciamento della risposta immunitaria verso una risposta di tipo *Th2*.

La struttura molecolare predetta, la capacità di formare oligomeri e l'interazione con le cellule dell'ospite, suggeriscono che NadA appartenga ad una nuova classe di adesine non fimbriale definite OCA (*Oligomeric Coliled-coil Adhesin*), che presentano all'estremità N-terminale il dominio di legame che media l'adesione cellulare e all'estremità C-terminale il dominio conservato deputato all'ancoraggio alla membrana e all'oligomerizzazione [55]. A questa classe appartengono i fattori patogeni YadA di *Yersinia enterocolitica* e UspA2 di *Moraxella catarrhalis*.

1.4 La risposta del sistema immunitario

1.4.1 Funzionamento contro *Neisseria meningitidis*

I meccanismi delle risposte immuni innate e specifiche che costituiscono il sistema immunitario umano realizzano un sistema integrato di difesa dell'ospite in cui numerose cellule e molecole cooperano funzionalmente l'una con l'altra. L'immunità innata, infatti, non solo fornisce una prima linea di difesa nei confronti dei microbi, ma gioca anche un ruolo molto importante nell'induzione delle risposte immuni specifiche. Nello stesso modo la risposta immune specifica attivandosi potenzia i meccanismi protettivi dell'immunità innata, rendendola quindi più efficace nell'eliminazione degli antigeni estranei.

Lo sviluppo dell'immunità naturale contro *Neisseria meningitidis*, durante l'infanzia e l'adolescenza, è acquisita mediante l'incontro con ceppi

di meningococco acapsulati e specie batteriche antigenicamente correlate, come *Neisseria lactamica*, e non correlate quali *Escherichia coli* [42]. La colonizzazione della mucosa nasofaringea da parte di questi microrganismi comporta lo sviluppo di una risposta immunitaria protettiva, sia a livello locale che sistemico [38], con la produzione di anticorpi battericidi che correlano con la protezione [50].

I bambini di età inferiore ad un anno rappresentano il gruppo con il rischio più elevato di contrarre la patologia meningococcica, poiché questo è il periodo nel quale l'immunità passiva conferita dalle immunoglobuline materne diminuisce e inizia a svilupparsi l'immunità acquisita. Inoltre, questa fase dell'infanzia è caratterizzata da una limitata e non specifica immunità umorale, scarsa funzione fagocitica e bassa concentrazione dei componenti terminali del complemento. Tutto ciò pone in risalto il ruolo fondamentale svolto dall'immunità innata, di primaria importanza durante i primi anni di vita, nei quali il titolo anticorpale è assente o basso, e dall'immunità acquisita.

Il sistema dell'immunità innata, prima linea di difesa contro i patogeni, consta in una componente solubile, il sistema del complemento, le proteine della fase acuta, le citochine e le chemochine, ed elementi cellulari: monociti, macrofagi, cellule dendritiche e cellule *Natural killer* [39]. La detezione dei microrganismi invasori è mediata dai recettori PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), espressi sulla superficie delle cellule dell'immunità innata, che riconoscono e legano strutture evolutionalmente conservate in specifiche classi di microbi definite PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). A questi sistemi di percezione microbica appartengono i TLRs. Attualmente, sono stati identificati 10 TLR i quali riconoscono il peptidoglicano, le lipoproteine batteriche, l'acido lipoteicoico (TLR2), il LPS (TLR4), la flagellina batterica (TLR5), componenti virali, DNA e RNA (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, localizzati nei compartimenti endosomiali). *Neisseria meningitidis* è in grado di attivare: TLR2, attraverso le porine e la lipoproteina Lip, TLR4 mediante il LOS e TLR9 in seguito all'attiva liberazione di DNA batterico. Questo fenomeno avviene durante l'infezione meningococcica e potrebbe favorire la trasformazione e contribuire alla gravità della patologia [30, 58]. L'attivazione di questi recettori induce la secrezione di citochine (TNF, IL-1, IL-6, IL-12 e IFN γ) e chemochine (IL-8, MCP-1, MIP-1 e RANTES), attive sia a livello endoteliale sia sui leucociti circolanti e residenti [59, 60]. Altri recettori non opsoninici, in grado di riconoscere proteine modificate, lipidi e carboidrati, insieme ai TLR posso-

no alterare profondamente l'espressione genica e le funzioni effettrici delle cellule dell'immunità innata. A questi appartengono i recettori *scavenger* di classe A che sono coinvolti nella fagocitosi di meningococchi vivi e non opsonizzati [61, 62].

Un ruolo importante è rivestito dal complemento il quale media la lisi del microrganismo, attraverso la via alternativa e delle lectine, e partecipa con altre proteine sieriche (proteina C reattiva, proteina P amiloide) all'opsonizzazione dei batteri facilitandone il riconoscimento e la fagocitosi da parte di cellule competenti. Inoltre, le proteine del complemento intervengono anche nell'immunità acquisita attraverso l'uccisione microbica mediata da anticorpi in seguito alla formazione di immunocomplessi (via classica). Le immunoglobuline sono coinvolte anche nel processo di opsonizzazione e mediano la fagocitosi attraverso i recettori per la porzione Fc (FcR) espressi sui fagociti [63].

Tutti questi elementi rivestono un ruolo centrale nella difesa dell'ospite da *Neisseria meningitidis*, infatti soggetti con deficienze nei componenti del complemento (C3, C5-C9, properdina) e della MBL (Mannan-Binding Lectin) sembrano aumentare il rischio dello sviluppo della patologia. Inoltre, altri polimorfismi sembrano essere coinvolti: la presenza degli allotipi FcRIIa-R131 e FcRIIIb-NA2 [63] e l'eterozigosi del TLR4 per una rara variante allelica [64] associano significativamente con la malattia meningococcica.

1.4.2 Meccanismi di evasione

La sopravvivenza e la patogenicità dei batteri all'interno dell'ospite dipendono direttamente dalla loro capacità di evadere o di resistere ai dispositivi attuati dal sistema immunitario. *Neisseria meningitidis* ha sviluppato diversi e sofisticati meccanismi per evadere i sistemi di difesa dell'ospite: la capsula polisaccaridica, il lipooligosaccaride, che mima le strutture glicosilate dei tessuti umani, la capacità di accettare DNA estraneo e la variazione nella struttura antigenica e l'espressione, fase dipendente, delle proteine esposte in superficie e delle proteine che favoriscono la sopravvivenza intracellulare del microrganismo.

Nel corso dell'infezione *Neisseria meningitidis* è continuamente esposto a fattori battericidi del siero facenti parte del sistema del complemento ed è dimostrato che il batterio è dotato di un potente meccanismo di siero resistenza [65]. Questa abilità è usata dai diversi ceppi di *Neisseria* per eludere il sistema immunitario e provocare le varie patologie, infatti l'inci-

denza di infezioni è molto maggiore in individui affetti da deficienze nelle proteine del sistema del complemento.

Un altro importante determinante nel fornire protezione contro il sistema del complemento è l'LPS che, contenuto nella membrana esterna del meningococco, possiede delle molecole di acido sialico legate alle sue estremità. La molecola di lipopolisaccaride così strutturata contribuisce al fenotipo di siero resistenza mascherando gli antigeni di superficie delle proteine della membrana esterna e determinando così una diminuzione del legame della subunità C3b alle stesse. Esperimenti condotti su batteri aventi nella loro membrana esterna molecole di LPS private dell'acido sialico mostrano una lisi maggiore.

In *Yersinia enterocolitica* questo fenotipo di siero resistenza è probabilmente associato alla capacità della proteina YadA di formare un denso rivestimento che circonda il batterio e maschera l'LPS, uno dei bersagli del complemento. Sembra infatti da esperimenti di immunofluorescenza che la lunghezza dello stelo formato da domini *coiled* – *coil* della proteina sia correlato alla lunghezza della catena di LPS. Il rivestimento prodotto dalla proteina inibisce l'attivazione e la deposizione dei primi componenti del complemento sulla superficie batterica, probabilmente a causa del legame col fattore di inibizione del complemento, il fattore H e sembra ridurre la deposizione di C9 determinando un ostacolo sterico alla formazione del MAC (complesso di attacco alla membrana) [66, 67].

Studi di microscopia elettronica su *M. catarrhalis* mostrano che anche l'adesina UspA2 presenta sulla sua superficie una simile banda di strutture a "lecca-lecca" che ricoprono l'intera superficie batterica [56].

Il principale fattore di virulenza del meningococco è il polisaccaride capsulare, infatti nel plasma e nel fluido cerebro spinale, di pazienti che sviluppano la malattia meningococcica, sono rintracciati solo ceppi capsulati, mentre ceppi privi di capsula sono isolati nel nasofaringe degli stessi soggetti o nei portatori correlati epidemiologicamente. La capsula polisaccaridica è essenziale nella patogenesi poichè conferisce resistenza alla fagocitosi e alla lisi mediata dal complemento e favorisce la sopravvivenza extracellulare del meningococco. La presenza della capsula nei batteri Gram-negativi ostacola l'assemblaggio del MAC, il quale non riesce ad attraversarla completamente fino a raggiungere la membrana esterna [13]. In *Neisseria meningitidis* di sierogruppo B la presenza dell'acido sialico capsulare oltre ad essere scarsamente immunogenico, poichè è un normale componente dei tessuti umani, previene la stabilizzazione della proteina C3b del complemento, proteggendo

il batterio dall'attività battericida mediata dalla via alternativa e dall'opsonofagocitosi. La presenza di questo componente riduce anche l'adesione ai macrofagi e agli altri fagociti e, successivamente, è in grado di interferire con la maturazione dei fagolisosomi, ritardando l'incorporazione di LAMP-1 in questi compartimenti [7]. Inoltre, il meningococco è in grado di effettuare lo *switching* capsulare, ovvero di esprimere antigeni capsulari diversi, attraverso la sostituzione allelica nel gene codificante la proteina a-2,8-polisialitransferasi (PST). La PST è responsabile della polimerizzazione delle unità di acido sialico e determina l'immunospecificità dei sierogruppi B, C e W135. Lo *switching* capsulare consente, durante un'infezione, la generazione di nuove varianti capsulari che possono evadere all'immunosorveglianza mediata dal sistema immunitario dell'ospite e possono portare, durante un'epidemia, alla sostituzione dell'intera popolazione batterica con una nuova popolazione geneticamente distinta che esprime un sierogruppo diverso dalla popolazione originale, come è avvenuto nelle epidemie in Spagna, Repubblica Ceca e Canada [27]. Un ruolo importante nell'evasione di *Neisseria meningitidis*, dai meccanismi di difesa attuati dal sistema immunitario dell'ospite, è rivestita dalla variazione di fase: il cambiamento reversibile del fenotipo come conseguenza di un cambiamento a livello del genotipo. Questa è associata ad un cambiamento nucleotidico all'interno di sequenze di DNA microsatellite, localizzate in regioni promotrici o codificanti geni coinvolti nella biosintesi di antigeni superficiali. Ci sono evidenze sperimentali della variazione di fase per almeno 14 geni di *Neisseria meningitidis* che codificano le proteine dell'opacità (Opa e Opc), le proteine per la biosintesi del LPS, le proteine coinvolte nella biosintesi e nella modificazione dei pili, i recettori per l'emoglobina e il ferro, le porine (PorA e PorB) e il polisaccaride capsulare [68]. Questo tipo di regolazione, a livello traslazionale e trascrizionale, risulta in una modulazione delle funzioni di virulenza, evasione dai meccanismi di difesa attuati dal sistema immunitario dell'ospite e adattamento alle cellule dei diversi tessuti durante le varie fasi dell'infezione [69]. Inoltre, *Neisseria meningitidis* presenta una elevata variabilità dovuta anche a frequenti scambi orizzontali di DNA tra i ceppi, che comporta la generazione di nuove varianti.

Nonostante i meningococchi abbiano evoluto molti meccanismi atti ad evitare le difese dell'ospite, restano ancora irrisolte le complesse interazioni patogeno-ospite coinvolte nello sviluppo dell'infezione e il motivo per il quale solo alcuni individui sviluppano la malattia meningococcica invasiva. Ciò pone in risalto la necessità di indurre, attraverso la vaccinazione,

un'immunità umorale specifica con lo sviluppo di anticorpi battericidi e di una memoria immunologica a lungo termine che proteggono l'individuo dal microrganismo.

1.4.3 Monociti

I monociti sono prodotti dal midollo osseo e differenziano da progenitori mieloidi del sistema dei fagociti mononucleati, andando a costituire dal tre all'otto per cento dei leucociti totali nel sangue [70]. Sono costituiti da una popolazione eterogenea, presentando dimensioni, granulosità e morfologia nucleare variabili. Sulla base dei marcatori CD14 e CD16 i monociti circolanti possono essere suddivisi in due sottopopolazioni principali, CD14^{hi}CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺, caratterizzate da distinti profili di espressione dei recettori per le chemochine.

I monociti circolano nel torrente sanguigno per circa 1-3 giorni e successivamente sono in grado di migrare in tutti i tessuti del corpo. La maggior parte di essi, in condizioni fisiologiche, muore per apoptosi, un fenomeno geneticamente controllato che contribuisce all'omeostasi tissutale [71, 72]. Stimoli pro-infiammatori metabolici e immunitari sono però in grado di prevenire l'attuazione del programma apoptotico, promuovendo la sopravvivenza e il reclutamento dei monociti ai siti periferici dove differenziano in macrofagi e cellule dendritiche contribuendo quindi alla difesa, riparazione e rimodellamento dei tessuti dell'ospite [73, 74, 75].

Essi giocano un ruolo importante sia nel meccanismo innato che specifico del sistema immunitario. I monociti sono anche responsabili della fagocitosi delle sostanze estranee, cioè sono in grado di ingerire e internalizzare sostanze particolose quali cellule microbiche, virus o particelle inerti. Per farlo utilizzano una serie di proteine intermediarie opsonizzanti, come gli anticorpi o le proteine del complemento, oppure legano direttamente il microbo tramite particolari recettori in grado di riconoscere delle strutture base dei patogeni, come ad esempio i TLR. I monociti utilizzano il TLR 4 come recettore per la componente lipopolisaccaridica, LPS, della parete dei batteri Gram negativi per identificare i microrganismi, dato che non è presente nelle cellule di mammifero, esso è un buon indicatore di infezione batterica.

Quando incontrano dei microrganismi estranei possono rilasciare strutture vescicolari dense che si trovano nel citoplasma, nei quali sono contenute numerose proteine litiche quali proteasi, glicosidasi, peptidi antimicrobici ed

lisozima. Queste proteine degradano le sostanze che sono state fagocitate, inoltre il contenuto di questo granulo può essere rilasciato all'esterno per uccidere i microbi che non sono stati internalizzati. Altre sostanze tossiche, non di natura proteica, sono sintetizzate in risposta ad attivazione, iniziando un processo di *oxidative burst* dove vengono attivate diverse vie enzimatiche con la produzione di composti altamente reattivi, come ioni, radicali liberi e ossigeno reattivo, atti ad uccidere i microrganismi estranei denaturando proteine, carboidrati e acidi nucleici.

1.4.4 HSPs

La famiglia delle *Heat Shock Protein* (HSP) è costituita da un gruppo di proteine altamente conservate, dai batteri fino all'uomo. Le HSPs di mammifero sono classificate in 6 famiglie, essenzialmente sulla base del loro peso molecolare, ogn'una composta di membri espressi costitutivamente o in modo indotto, e facenti parte di diversi compartimenti subcellulari: Hsp100 (100-110 kDa), Hsp90 (83-90 kDa), Hsp70 (66-78 kDa), Hsp60, Hsp40 e le small Hsp (15-30 kDa). Esse sono espresse da tutti i tipi cellulari e nei diversi compartimenti cellulari svolgono specifiche funzioni, giocando un ruolo importante sia in condizioni di *stress* che in condizioni fisiologiche. Esse sono coinvolte principalmente nel mantenere la stabilità e funzionalità di svariate proteine citoplasmatiche, sovrintendendo al corretto ripiegamento proteico, proteggendo le proteine dalla denaturazione o aggregazione, facilitando il trasporto proteico attraverso i canali della membrana e conferendo stabilità durante i passaggi nella trasduzione del segnale. L'esposizione delle cellule a differenti tipi di condizioni ambientali di *stress*, quali infezioni, infiammazioni, esposizione a sostanze tossiche, ipossia o mancanza d'acqua, determinano una sovraespressione di tali proteine [76].

Le proteine Hsp70 si ritrovano in tutte le specie e la loro funzione è quella di favorire l'assemblaggio di complessi multimerici proteici e, come *chaperones* molecolari, di facilitare il *foldig* intracellulare delle proteine. Queste sono costituite da due domini funzionali; un dominio carbossiterminale (circa 25 kDa), contenente il sito di legame per il polipeptide, ed un dominio amminotermale (circa 40 kDa), contenente il sito di legame per le molecole di ADP/ATP e che ha attività ATPasica. Queste proteine funzionano come monomeri o come dimeri, riconoscendo porzioni di 7-8 residui amminoacidici. Inoltre Hsp70 viene considerata uno dei principali fattori

anti-apoptotici, poiché è in grado di inibire l'apoptosi caspasi dipendente [77].

La proteina Hsp90 è una *chaperone* abbondante nelle cellule eucariotiche, costituendo il 1-2% delle proteine citoplasmatiche totali; nel citoplasma si trova espressa in 2 isoforme, Hsp90 α e Hsp90 β , che possiedono un'omologia del 76%, e si presenta in forma di omo-dimero fosforilato, contenendo infatti 2-3 fosfati legati covalentemente per ogni monomero. La dimerizzazione è essenziale per la normale funzione della proteina, ma, in presenza di detergenti non ionici o dopo *shock* termico, essa forma oligomeri ad alto peso molecolare. Come molte altre *chaperones*, Hsp90 è una proteina idrofobica, caratteristica che aumenta dopo trattamento termico [76].

Hsp90 è composta da due domini altamente conservati, N-terminale e C-terminale, separati da una regione intermedia altamente carica, inoltre presenta un'altro dominio altamente carico all'interno della regione al C-terminale. Il dominio all'N-terminale è costituito da 8 foglietti β e una α -elica. Esso è coinvolto nel legame della proteina cliente e contiene il sito di legame all'ATP, che sembra coincidere con quello dell'inibitore geldanamicina. Al contrario il dominio C-terminale è principalmente adibito alla dimerizzazione della proteina, ma sembra anch'esso poter legare proteine o peptidi clienti. Il dominio centrale, specifico delle sole cellule eucariotiche, porta dei segnali di localizzazione nucleare, ha una funzione regolatoria e può essere anch'esso coinvolto nel legame a proteine clienti.

La proteina Hsp90 sembra mostrare preferenza per proteine cariche positivamente o idrofobiche, ma non sempre è sufficiente da sola per legare le proteine cliente [76]. Spesso richiede la formazione di complessi con altre *chaperones*, soprattutto l'Hsp70 che in genere lega per prima la proteina cliente, poi forma un complesso con l'Hsp90 e solo dopo si dissocia lasciando legate proteina cliente e Hsp90, invece in assenza di legame con Hsp90 la proteina cliente rimane legata all'Hsp70 e viene degradata dal proteosoma.

Mentre Hsp90 è abbondantemente espressa dalla cellula in maniera costitutiva, altre HSPs, come le Hsp70 o 27, sono indotte da *stress*, altrimenti si trovano espresse solo a bassi livelli.

Le HSPs, ed in particolare Hsp90 e Hsp70, sono anche coinvolte nelle risposte del sistema immunitario, funzionando come attivatori dell'immunità innata nel segnalare danneggiamenti a tessuti o *stress* cellulare [77, 78, 79, 80]. Inoltre nell'uomo è stata dimostrata la presenza di queste proteine nel siero, associata a condizioni di *stress*, incluse infiammazioni e infezioni batteriche o virali.

Dato che le HSPs sono altamente conservate dai batteri ai mammiferi, esse attivano le APC, cellule presentanti l'antigene, funzionando come un meccanismo unificato per rispondere a stimoli interni ed esterni. Secondo la teoria di Janeway [79] "dell'estensione del modello self-non self" una APC professionale interagisce con delle componenti microbiche, attraverso dei recettori di PRRs. Oggi giorno sono noti molti PRRs, come ad esempio le proteine della famiglia dei TLRs. Una spiegazione alternativa per l'attivazione dell'immunità adattativa è stata proposta da Matzinger, con la "teoria del pericolo", secondo la quale le APC possono essere attivate da sostanze endogene rilasciate in condizioni di *stress* o danno tissutale. I membri della famiglia delle HSPs sono dei candidati che potenzialmente segnalano questi stati della cellula al sistema immunitario. L'espressione delle HSPs è rapidamente sovra-espressa durante diverse forme di *stress* cellulari e HSPs sono rilasciate dai tessuti danneggiati (fig. 1.5, [79]).

Inoltre HSPs microbiche sono in grado di stimolare cellule del sistema immunitario (monociti, macrofagi e cellule dendritiche) o cellule che hanno la capacità di comunicare con questo (cellule epiteliali, endoteliali o muscolari). Alcuni lavori presenti in letteratura [79] riportano che proteine antigeniche legate covalentemente con HSPs, possono generare delle efficienti risposte immunitarie mediate da linfociti T citotossici (CTL). Sia le HSPs microbiche che quelle umane sono in grado di traslocare peptidi nella via classica o alternativa del MHC di classe I. Studi recenti dimostrano anche come le HSPs di mammifero lancino segnali simili alle HSPs microbiche al sistema immunitario, indipendentemente da peptidi legati. E' noto che il complesso peptidi-HSP per la presentazione dell'antigene sembra essere mediato da CD91. E sembra anche essere mediato dal complesso TLR-4 e MD-2. I successivi eventi di segnalazione scatenati da HSPs richiedono l'endocitosi dell'HSP e inducono un rapido flusso di calcio, la fosforilazione di I- κ B α e l'attivazione del fattore nucleare κ B (NF- κ B). Un terzo modello di presentazione alle APC considera la somma degli altri due: le proteine endogene indotte da *stress* formano un complesso coi prodotti microbici che viene riconosciuto dalle APC (fig. 1.5).

Inoltre è anche stata riscontrata l'interazione di HSPs, HSP90 e Hsp70, in assenza di peptidi legati con CD14 e TLR2/4 su APC, con successiva produzione di citochine proinfiammatorie come TNF α , IL-1 β , IL-12, IL-6 e GM-CSF. Inoltre dopo il contatto con cellule dendritiche le molecole co-stimolatorie CD86, CD83 e CD40 vengono sovra-esprese. Quindi le HSPs funzionano come potenti attivatori del sistema immunitario, sia per

il trasporto di antigeni sia come adiuvanti naturali.

Nonostante le proteine HSPs siano generalmente considerate delle tipiche molecole citoplasmatiche, ci sono lavori che dimostrano la loro espressione sulla superficie di cellule tumorali, apoptotiche, ma anche cellule del sistema immunitario quali monociti, macrofagi e cellule dendritiche [77, 78, 79, 81, 82, 83]. Non è ancora chiaro come queste proteine siano veicolate alla membrana plasmatica [78], infatti HSPs citoplasmatiche non contengono peptidi *leader* a localizzazione superficiale. Un'ipotesi è che la proteina sia trasportata sulla membrana in associazione con altre proteine che possiedono domini transmembrana che fungano da veicoli. Un'altra ipotesi è la sua associazione con componenti lipidici e che un meccanismo a *flip-flop* faciliti il trasporto dall'interno della cellula all'esterno. La necrosi è un altro meccanismo che può dare una spiegazione a questo fenomeno, infatti in condizioni di *stress*, ma anche di febbre, infezioni e infiammazioni, delle cellule rilascerebbero nel mezzo proteine citoplasmatiche, come HSPs, che poi potrebbero legarsi sulla superficie di altre cellule, con un meccanismo avventizio. Un altro lavoro ha dimostrato la secrezione di Hsp70 da PBMNs da esosomi, i quali contengono anche dei MHC [84].

Quindi queste proteine sembrano avere funzioni diversificate a seconda della loro localizzazione cellulare: intracellulare di protezione del ripiegamento proteico e di inibizione dell'aggregazione e anti-apoptotiche, ed extracellulare o associata alla membrana citoplasmatica con funzione di stimolazione del sistema immunitario.

In letteratura si trovano ormai diversi lavori che riportano proteine batteriche o virali di membrana, coinvolte nell'adesione e invasione a cellule ospite umane, che utilizzano come recettori proteine della famiglia delle HSPs.

Durante la ricerca di possibili recettori che riconoscessero in modo specifico la proteina E di *Dengue virus* [85], espressa in forma di omo-dimeri, una proteina di 84KDa è stata isolata con tecniche di cromatografia di affinità e *overlay*, da estratti totali di cellule di neuroblastoma umano e linee di U937. Questa proteina fu poi identificata come Hsp90 con analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF. Precisamente è stato dimostrato che le proteine Hsp90 e Hsp70 sono parti di un complesso recettoriale richiesto per l'adesione e invasione di *Denga virus* in neuroblastoma, linee cellulari monocitiche e anche monociti e macrofagi umani.

Altri virus come rotavirus [86, 87] e coxsackievirus A9 [88] mostrano utilizzare HSPs superficiali come recettori.

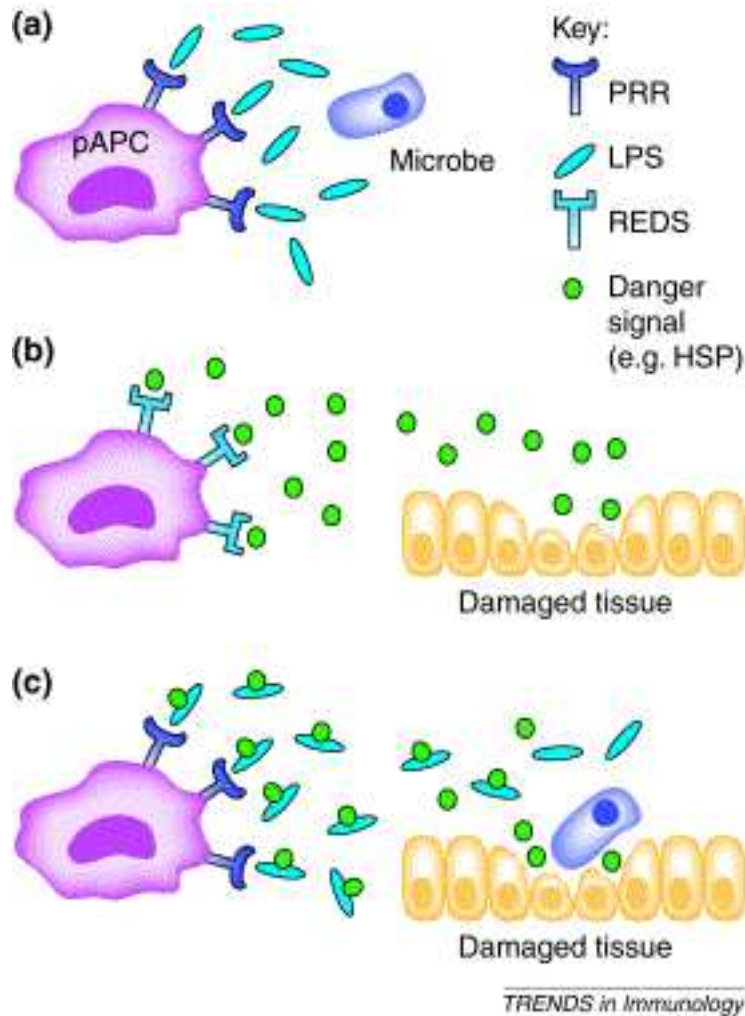


Figura 1.5: **Modelli esplicativi l'attivazione di pAPC da parte di prodotti microbici o endogeni.**

(a) Secondo la teoria di Janeway, i prodotti microbici vengono riconosciuti dalle pAPC esprimenti i PRRs, come ad esempio TLRs. (b) Nella teoria proposta da Matzinger, sostanze endogene prodotte o rilasciate in risposta a tessuti danneggiati da microbi, sono riconosciute dalle pAPC tramite recettori. (c) Un terzo modello potrebbe unire i precedenti: proteine endogene indotte da *stress* formano complessi con prodotti microbici e questi complessi sono riconosciuti dalle pAPC [79].

La proteina Hsp90 risulta un recettore per la proteina JlpA (*Jejuni lipoprotein A*) [89], la proteina di membrana esterna maggiormente espressa dal batterio Gram-negativo *Campylobacter jejuni*. Con tecniche di cromatografia di affinità e *overlay* è stata trovata una proteina di 90KDa identificata con spettrometria di massa LC-MS/M.

Gp96 [90], una proteina della famiglia delle HSPs, una *chaperone* normalmente residente nel reticolo endoplasmatico, ha anche funzione di modulatrice della risposta immunitaria innata ed adattativa. Anch'essa infatti si associa a peptidi intracellulari e li porta alla via di presentazione dell'antigene inducendo una risposta specifica nelle cellule T. Il recettore responsabile per questo riconoscimento peptide-Gp96 è il recettore CD91, espresso sulle APC professionali. Inoltre tale proteina è in grado di attivare le DC via TLR 2/4. Gp96 si lega specificamente a monociti e neutrofilii [91] agendo come un segnale di pericolo. Anche la proteina Vip (*Virulence protein*) di *Listeria monocytogenes* Gram-positivo usa Gp96 come recettore e questa interazione è critica per l'invasione delle cellule di mammifero e per l'infezione *in vivo*.

Anche la proteina di membrana esterna OmpA (*outer membrane protein A*) di *Escherichia coli* K1 interagisce con Ecgp (HBMEC *glycoprotein*), una Gp96 omologa su cellule microvascolari endoteliali umane di cervello [92].

Concludendo, le proteine HSPs hanno un importante ruolo nelle risposte immunitarie anti-microbiche e autoimmuni, e inoltre hanno un potente effetto nell'indurre un'immunità antigene-specifica contro sostanze usate per immunizzare animali. L'abilità delle HSPs di fungere da attivatori del sistema immunitario e di agire come adiuvante di se stessa è una ipotesi attraente per spiegare la capacità delle HSPs nell'indurre reazioni immunitarie [79]. Inoltre può essere una candidata a spiegare il potenziale infiammatorio delle cellule necrotiche. La natura antigenica delle HSPs è enfatizzata dall'evidenza che il sistema immunitario è in grado di riconoscere in esse diversi epitopi che stimolano le cellule B e T.

Le potenti caratteristiche immunologiche delle HSPs hanno portato al loro utilizzo sperimentale come candidati di subunità o adiuvanti in vaccini. Hsp70 e Hsp60 micobatteriche si sono dimostrate eccellenti *carrier* di molecole contro cui si vuole attivare una risposta immunitaria, in assenza di adiuvanti le HSPs sono in grado di stimolare fortemente e a lungo termine un risposta immune contro molecole covalentemente legate ad esse. Quando usate come subunità di un vaccino, HSPs derivate da certe varietà di batteri o funghi patogeni, sono in grado di stimolare una immunità protettiva in

modelli animali. Questi studi dimostrano quindi che le HSPs possono essere usate come adiuvanti o subunità di vaccini contro diverse malattie infettive nell'uomo [93].

Capitolo 2

RAZIONALE E SCOPO DELLA TESI

Il razionale di questa tesi si basa sulla capacità della proteina NadA di legarsi alle cellule ospite tramite un recettore di tipo proteico, che potesse essere lo stesso in diversi tipi cellulari quali cellule epiteliali Chang, monociti, macrofagi e cellule dendritiche [54].

Quindi con un approccio di tipo biochimico si è cercato di individuare, in lisati cellulari totali, una proteina che fosse in grado di legare in modo specifico la proteina meningococcica NadA. Tramite esperimenti di co-immunoprecipitazione e *overlay* di lisati totali di cellule Chang, è stata isolata una proteina di 90KDa come possibile candidata, che identificata con spettrometria di massa, si è rivelata essere la proteina Hsp90 β umana. Inoltre è stato anche testato l'effetto della Polimixina B, un antibiotico cationico che mima i peptidi antimicrobici contenuti nei granuli dei monociti, dato che precedentemente si era riscontrata una sua associazione alla proteina meningococcica.

Dopo una serie di conferme biochimiche dell'instaurarsi di questa associazione fra NadA e Hsp90, ottenute col riconoscimento della proteina di interesse da parte di anticorpi anti-Hsp90, si sono ricercate delle conferme in modelli cellulari usando, per questi esperimenti, monociti umani, principali agonisti della risposta immunitaria innata, in modo da poter studiare sia la funzione recettoriale di questa associazione, sia il suo impatto sulla stimolazione del sistema immunitario.

Si è allora testato l'effetto sulla Hsp90 superficiale della pre-incubazione di sNadA sui monociti per confermare l'associazione in membrana di queste

proteine. Avendo osservato che il trattamento con anticorpi anti-Hsp90 non portava ad una diminuzione del legame di sNadA alla cellula, si è ipotizzato che questa associazione svolgesse una funzione diversa da quella recettoriale. Si è poi testata la rilevazione superficiale di Hsp90 dopo pre-trattamento delle cellule con sNadA, in presenza o meno di Polimixina B. Inoltre si sono anche utilizzati anticorpi anti-Hsp70 per capire se anche questa HSP prendesse parte all'associazione con le altre due proteine, dato che spesso le *chaperones* formano complessi fra loro.

Infine, per valutare il tipo di stimolazione indotto da questa associazione e l'orientamento della successiva risposta immunitaria, si è analizzato il profilo di produzione di citochine prodotte nei monociti in seguito a stimolazione con sNadA, anticorpi anti Hsp90, e anticorpi bloccanti il TLR2 e 4, dato che in letteratura è riportato che questi recettori formano complessi in membrana con Hsp90, determinando attivazione del sistema immunitario e produzione di citochine proinfiammatorie.

Capitolo 3

Materiali e Metodi

3.1 Materiali

3.1.1 *NadA* _{$\Delta(351-405)$}

La proteina ricombinante solubile $\text{NadA}_{\Delta 351-405}$ (sNadA), utilizzata in questo lavoro, fa parte di un lotto clinico ed è stata fornita [52] dall'Istituto di Ricerche Immunobiologiche di Siena (IRIS, Novartis). La sequenza di NadA allele 3 del ceppo ipervirulento 2996 di *Neisseria meningitidis* sierogruppo B, che codifica per il mutante $\text{NadA}_{\Delta 351-405}$ privo dell'ancora di membrana, è stata clonata nel vettore pET21b (Novagen), a sua volta utilizzato per trasformare il ceppo *E. coli* BL21(DE3). La proteina viene secreta nel mezzo extracellulare ed è stata purificata mediante successivi passaggi cromatografici su resina a scambio ionico Q Sepharose XL e a interazione idrofobica *Phenyl Sepharose 6 Fast Flow* (Pharmacia). L'eluato è stato infine sottoposto ad un ulteriore passaggio cromatografico su colonna di idrossiapatite (HA Macro Prep), per ridurre la contaminazione da lipopolisaccaride, che alla fine risulta essere inferiore a 0,005 EU/mg di proteina (misurata mediante saggio Limulus, Sigma). La proteina purificata sNadA separata su gel di poliacrilamide e visualizzata con colorazione argentica o sviluppo con anticorpi specifici, presenta una singola banda del peso di 35 KDa, consistente con il peso molecolare predetto. Inoltre, dall'analisi mediante tecniche di cromatografia, gel filtrazione e HPLC, la proteina mostra un unico picco di elevata purezza e, mediante analisi di *light scattering*, mostra essere espressa in forma di omo-trimero [57]. Le aliquote di proteina (2

mg/ml in PBS, pH 7.4) sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80°C .

3.1.2 Anticorpi primari e secondari e proteine ricombinanti

In questa tesi sono stati utilizzati: Anticorpi policlonali che riconoscono le forme α e β della proteina Hsp90, Ac anti-Hsp90(H114) in *rabbit* che riconosce il peptide 610-723 della zona C-terminale della Hsp90 β umana (Santa Cruz Biotechnology) e anti-Hsp90(N17) in *goat* contro la zona N-terminale dell'Hsp90 α umana (Santa Cruz Biotechnology); Ac anti-Hsp70 (K20) in *goat* contro un peptide nella zona C-terminale dell'Hsp70 umana (Santa Cruz Biotechnology); Ac anti TLR-2 (eBioscience); Ac anti TLR-4 (eBioscience); Ac anti-IgG di *rabbit* in *goat* coniugato a PA (Molecular Probes); Ac anti-IgG di *goat* in *mouse* coniugato a PA (Molecular Probes); proteina Hsp90 umana purificata da cellule Hela (StressGene).

3.2 Metodi

3.2.1 Colture cellulari

Per questo lavoro di tesi sono state utilizzate cellule Chang, appartenenti alla linea cellulare stabilizzata *Wong-Kilbourne* (WKD), clone 1-5c-4, di congiuntiva umana. Le cellule sono state mantenute in DMEM (Gibco) con aggiunta del 10% siero fetale di vitello inattivato (FCS, Gibco) e 50 mg/ml gentamicina (Sigma).

3.2.2 Isolamento di linfomonociti da sangue umano e condizioni di coltura

Colture primarie di monociti umani sono state ottenute dall'isolamento di cellule mononucleate del sangue periferico da *buffy coat* di donatori sani (forniti dal centro immunotrasfusionale dell'ospedale di Padova), mediante centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Hypaque (Amersham Corp., Arlington Heights, Ill) e risospese in 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS, Euroclone) in RPMI-1640 (GIBCO BRL) con gentamicina 50 mg/ml (GIBCO BRL). Successivamente i monociti sono stati separati dalla frazione lin-

focitaria mediante centrifugazione su gradiente di densità di Percoll (Amersham Pharmacia Biotech AB), quindi risospesi in RPMI-1640, 2% FBS, gentamicina 50 mg/ml e piastrati alla densità di 2×10^6 cellule per pozzetto, in piastre da 24 pozzetti (Falcon). I linfociti residui sono stati rimossi, dopo un'incubazione di un'ora a 37°C, 5% CO₂, sfruttando l'adesione alla plastica della frazione monocitaria. I monociti sono quindi stati risospesi in RPMI-1640, 10% FBS, 50 mg/ml gentamicina in presenza o meno degli stimoli. La purezza delle preparazioni, come percentuale di cellule CD14+, e la vitalità cellulare determinata per esclusione con il test *Trypan blu*, sono entrambe >98%.

3.2.3 Lisi delle cellule

Cellule Chang o monociti umani, isolati da *buffy coat* sono stati lisati in differenti *buffer* di lisi:

- Triton *buffer*: 1% Triton X100 in PBS;
- NP-40 *buffer*: 150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris pH8.00;
- RIPA *buffer*: 150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris pH8.00, 0,5% sodio deossicolato, 0,1% SDS;
- CHAPS *buffer*: 150mM NaCl, 1% CHAPS, 50mM Tris pH8.00.

Le cellule sono state risospese nel *buffer* e incubate in ghiaccio per 30 minuti. Al termine dell'incubazione vengono centrifugate 3 minuti a 13000rpm 4°C e ne viene conservato il supernatante per gli esperimenti.

3.2.4 Purificazione di anticorpi anti-NadA

Gli anticorpi policlonali anti-NadA usati in questa tesi sono stati ottenuti dall'immunizzazione di un coniglio con l'intera proteina. Una volta ottenuto il siero dell'animale sono state purificate tutte le IgG prodotte, sfruttando la capacità della proteina A, derivata dalla capsula di *Stafilococcus aureus*, di legare la porzione Fc degli anticorpi.

E' stata preparata una colonna (*polypropylen column*, Pierce) con 1 ml di resina proteina A-sefarosio idratata (Pharmacia Biotech), che è stata equilibrata facendo passare in successione 50 ml di Tris 100 mM e 50 ml di

Tris 10 mM. Il siero è stato centrifugato a 11,000 rpm per 3 minuti per far precipitare l'eventuale particolato. Ad un volume di supernatante è stato aggiunto 0.1 volumi di Tris 1M (pH 8.0) ed è stata caricata la preparazione in colonna, mescolando e lasciando sedimentare la resina almeno 2-3 volte. La colonna è stata aperta, è stata recuperata la frazione uscita ed è stata ricaricata in testa dopo aver richiuso la colonna. Questo passaggio evita di perdere l'anticorpo che eventualmente non si è ancora legato. Quindi è stata lavata la colonna con 10 volumi di 100 mM Tris (pH 8.0) e successivamente con 10 volumi di 10 mM Tris (pH 8.0), raccogliendo la soluzione. Sull'eluato è stato effettuato il *Bradford spot test* (reagente Bradford, Bio-Rad), utilizzando come controllo Tris 10 mM. Per eluire l'anticorpo è stato aggiunto 1 volume di 200 mM glicina (pH 3.0). Poichè l'anticorpo non è stabile a questo pH, prima dell'eluizione sono state preparate le *ependorf* che raccoglieranno le frazioni con 50 μ l di Tris 1M (pH 9.0). Sono state raccolte frazioni da 500 μ l di eluato e su queste è stato effettuato il *Bradford spot test*, per individuare quelle con l'anticorpo. Al fine di verificarne la purezza, i campioni sono stati caricati in un gel SDS-PAGE, e la concentrazione delle diverse frazioni è stata misurata con saggio *Bradford*.

3.2.5 Co-immunoprecipitazione

Per questi esperimenti sono state utilizzate delle colonne *Handee Spin Cup Column* (Pierce), una per ogni campione, in cui sono stati messi 200 μ l di resina Proteina A sefarosio (Pharmacia Biotech), idratata *overnight* in PBS, pari a 50 μ l di resina drenata. La resina è stata lavata 2 volte con 400 μ l di PBS e quindi incubata con 400 μ g di anticorpo policlonale anti-NadA per 2h a 4°C, in agitazione su ruota. Al termine dell'incubazione l'anticorpo è stato legato covalentemente alla resina con l'utilizzo di un *linker* di 9,2Å, DMP (Dimethyl pimelimidate \cdot 2HCl), un *cross-linker* omo-bifunzionale con 2 gruppi aminoestere. Per ottimizzare le condizioni di legame sono stati fatti 4 lavaggi in 0,2M sodio borato pH 9.00 e quindi incubato 1h a temperatura ambiente con 2mg/colonna di DMP (Pierce), sciolto in 0,2M sodio borato pH 9.00, aggiustando il pH a 8.3. Al termine fatti 4 lavaggi con 40mM glicina pH 8.00 e quindi incubato per 2h a temperatura ambiente sempre con 40mM glicina pH 8.00, per bloccare la reazione di legame. Dopo 2 lavaggi con 400 μ l di PBS le colonne sono pronte per l'immunoprecipitazione.

A questo punto metà colonne sono state utilizzare per fare il *precleaning*, in modo da eliminare tutto quello che si lega specificamente alla proteina

A o agli anticorpi ed è indipendente dalla presenza della proteina meningococcica. Nel frattempo una colonna è stata trattata con $66\mu\text{M}$ di sNadA per 1h a 4°C in agitazione su ruota. Al termine dell'incubazione, il lisato totale dopo *precleaning* è stato incubato 2h a 4°C nelle colonne più o meno sNadA. Al termine sono stati fatti 4 lavaggi con $400\mu\text{l}$ di PBS e quindi un ultimo con $200\mu\text{l}$ che viene conservato per caricarlo in gel. Inizialmente i lavaggi sono stati fatti in PBS, ma successivamente si è preferito mantenere la presenza del detergente in modo da precludere la precipitazione di parte delle proteine. L'immunoprecipitato è stato quindi eluito 2 volte con $100\mu\text{l}$ di 200mM glicina pH 2.8, questi campioni sono tamponati con 1% Tris 1M. Dopo l'eluizione, le resine sono state trattate per 2 volte con LSB per 5 minuti ciascuna e quindi la colonna è stata centrifugata ed è stato conservato l'eluato, a cui è stato aggiunto 5% β -mercaptoetanolo. Agli altri campioni è stato aggiunto il corretto volume di LSB 6X con 5% β -mercaptoetanolo e quindi sono stati bolliti 7 minuti a 95°C .

I campioni ottenuti sono stati separati in gel di poliacrilamide al 12% e quindi analizzati tramite colorazione argentica [94] oppure trasferiti su nitrocellulosa. I blot, dopo essere stati saturati in una soluzione di TBS al 5% latte, sono stati incubati 1h 4°C con gli specifici anticorpi primari, anti-Hsp90 o anti-NadA, a seconda dell'analisi, e quindi coi relativi anticorpi secondari coniugati a fosfatasi alcalina, infine rispettivamente con i substrati dell'enzima, NBT e BCIP. Le immagini sono state acquisite utilizzando un Gel Doc (BioRad).

3.2.6 Isolamento membrane

20×10^6 cellule Chang cresciute in DMEM, 10% FCS, 50mg/ml gentamicina, sono state staccate e risospese in 7ml di HB (8,4% saccarosio, 3mM imidazolo-HCl pH 7.4) più inibitori di proteasi e passate 10 volte attraverso *cells cracker*. Il lisato è stato centrifugato 15 minuti a 2500rpm e al supernatante è stata aggiunta una soluzione di 70% saccarosio in HB in modo da ottenere una sospensione cellulare al 44% di saccarosio finale. La sospensione cellulare è stata posta sul fondo di un tubo da ultracentrifuga, *Ultra Clean* 14x95mm, e su questa è stata stratificata una soluzione di 42,5% saccarosio in HB, fino a riempire completamente il tubo. I campioni sono stati centrifugati a 28000rpm, 2h e 30minuti a 4°C in un rotore SW40Ti. Al termine sono stati prelevati $500\mu\text{l}$ di una banda fluttuante che si posizionava all'interfaccia fra i due gradienti [95].

Successivamente i campioni sono stati precipitati incubandoli 15 minuti con $10\mu\text{l}$ di DOC per ml di frazione, 1h con $200\mu\text{l}$ di TCA 20% per ml, quindi centrifugati 10 minuti 14000rpm a 4°C . Dopo 3 lavaggi con 1,5 ml di acetone e centrifugazione il pellet è stato risospeso in LSB.

3.2.7 Overlay

Le proteine solubilizzate, ottenute dal lisato di 100.000 cellule per campione, sono state separate in gel di poliacrilamide al 12% e trasferite su nitrocellulosa. Dopo saturazione in una soluzione di TBS 5% latte il *blot* è stato tagliato a metà in modo da tenerne una parte come controllo, l'altra parte è stata invece incubata per 8h a 4°C con $1\mu\text{M}$ NadA in agitazione, quindi incubato con anticorpi policlonali anti-NadA, anti-Hsp90 o anti-Grp94. Successivamente i *blot* sono stati sviluppati con anticorpi secondari coniugati a fosfatasi alcalina o a HRP.

3.2.8 Identificazione di una banda da gel di poliacrilamide tramite spettrometria di massa

La banda di interesse è stata tagliata dal gel dopo colorazione *Coomassie* e ridotta in pezzetti da $1\times 1\text{mm}$ in una microprovetta. Il campione è stato lavato con $150\mu\text{l}$ di acqua per 5 minuti, spinnato e rimosso il liquido. Sono stati aggiunti $200\mu\text{l}$ di acetonitrile per 15 minuti, poi rimosso il liquido e portati a secco i pezzi di gel in una centrifuga a vuoto. Sono poi stati aggiunti $300\mu\text{l}$ di 10mM ditiotreitolo/0,1 M NH_4HCO_3 e incubato 30 minuti a 56°C per la riduzione delle proteine, poi sono stati spinnati, è stato rimosso il liquido e portato a secco con acetonitrile. Quindi il campione è stato alchilato, incubando per 20 minuti a temperatura ambiente con 55mM iodioacetamide/0,1 M NH_4HCO_3 in acetonitrile. Al termine è stata rimossa la soluzione ed è stato fatto un lavaggio con $200\mu\text{l}$ di 0,1M NH_4HCO_3 per 15 minuti, quindi rimosso il liquido e asciugato con acetonitrile. Per rimuovere completamente il colorante residuo il campione è stato trattato per 3 volte con $150\mu\text{l}$ di 0,1M NH_4HCO_3 e dopo 15 minuti aggiungendo $150\mu\text{l}$ di acetonitrile, vortexando per 20 minuti, quindi rimosso il liquido il campione è stato portato a secco in una centrifuga a vuoto. Dopo un lavaggio in acetonitrile, il gel pronto per la digestione è stato reidratato nella soluzione di digestione, 50mM NH_4HCO_3 12,5ng/ μl di tripsina, e incubato a 4°C per 45 minuti. Al termine il campione è stato completamente ricoperto col *buffer*

e lasciato *overnight* a 37°C. Per l'estrazione dei peptidi sono stati aggiunti 15 μ l di 25mM NH₄HCO₃ e incubato 37°C per 15 minuti in agitazione, poi rimossa la soluzione e risospesi i campioni in acetonitrile, quindi incubati 37°C 15 minuti in agitazione e infine spinnati e tenuto il supernatante. Successivamente il campione è stato ulteriormente trattato aggiungendo 50 μ l di 5% acido formico, vorticato 15 minuti a 37°C, quindi rimosso il liquido, è stato aggiunto acetonitrile e incubato a 37°C per 15 minuti in agitazione. Dopo aver spinnato, il supernatante è stato conservato e unito all'altro. A questo punto il campione è stato concentrato, facendolo evaporare con una centrifuga *vacuum*.

L'analisi LC-MS/MS è stata condotta con uno spettrometro di massa QToF-micro della Micromass (Manchester, UK) collegato a micro-HPLC CapLC, Waters (Milford, MA, USA).

I digeriti triptici sciolti in 0,1% acido formico sono stati separati utilizzando una colonna Symmetri C₁₈ nano-ESI 75 μ M X 150 mm, Waters. L'eluizione è stata condotta con acqua contenente 5% acetonitrile e 0,1% acido formico (eluente A) e acetonitrile contenente 5% acqua e 0,1% acido formico (eluente B), con un gradiente lineare di B da 5 a 30%, in 30 minuti ad un flusso di 200 nanolitri/minuto.

Gli ioni sono stati selezionati e sequenziati dallo strumento con la modalità MS/MS.

I dati ottenuti dall'analisi di massa sono stati introdotti in banca dati proteica NCBIInr, utilizzando il *software* Mascot (www.matrixscience.com) per la ricerca in banca dati, utilizzando ed indicando come enzima proteolitico la tripsina.

3.2.9 Legame di Polimixina B a sNadA e Hsp90

Cellule Chang sono state lisate 30 minuti in 1% Triton X100 in PBS con inibitori di proteasi e tenuto il supernatante dopo una centrifuga di 3 minuti a 13000rpm. Per le prove di legame sono stati usati 200 μ l di resina agarosio-Polimixina B (Sigma) per ogni campione e incubati 1h a temperatura ambiente in agitazione con i lisati totali, derivati da 100.000-300.000 cellule, in presenza o meno di NadA 1 μ M o con la sola proteina, in 200 μ l di volume finale. Al termine i campioni sono stati centrifugati e separato il supernatante, a cui è stato poi aggiunto LSB 6X con 5% β -mercaptoetanololo. La resina è stata invece lavata 2 volte con 1ml di PBS e successivamente risospesa in 200 μ l di LSB 1X con 5% β -mercaptoetanololo.

Tutti i campioni sono stati bolliti 7' a 95°C e quindi separati in gel di poliacrilamide al 12%. Dopo essere stati trasferiti su nitrocellulosa, sono stati trattati 1h 4°C con anticorpi primari contro NadA o Hsp90, 1h 4°C con anticorpi secondari coniugati a PA e successivamente sviluppati coi substrati NBT e BCIP.

3.2.10 Coniugazione di sNadA con Alexa Fluor 488

La proteina ricombinante solubile sNadA è stata coniugata, in accordo con le istruzioni fornite dalla ditta produttrice, ad Alexa Fluor 488 (Molecular Probes Inc.). Questo è un fluorocromo che presenta caratteristiche spettrali simili alla fluoresceina e possiede un gruppo succidimilestere che reagisce efficientemente con le ammine primarie, formando proteine coniugate molto stabili in un intervallo di pH compreso fra pH 4 e 10. Il coniugato sNadA-Alexa presenta i picchi di assorbimento ed emissione rispettivamente a 494 e 519nm.

Ad un'aliquota di 500 μ l di proteina sNadA alla concentrazione di 2mg/ml sono stati aggiunti 50 μ l di 1M NaHCO₃ pH 8.3, in modo da portare la proteina al pH ottimale per la reazione di coniugazione, quindi la proteina è stata incubata 1h a temperatura ambiente con 200 μ g di Alexa Fluor 488. Il coniugato sNadA-Alexa è stato separato dal fluoroforo che non ha reagito attraverso cromatografia a gel filtrazione con resina Sephadex G25 (Sigma), pre-equilibrata ed eluita con PBS (GIBCO). La concentrazione del coniugato ottenuto è stata determinata effettuando un saggio *Bradford* in piastre da 96 pozzetti (Nunc Maxisorp) usando un lettore per micropiastre (Biotrak II, Amersham).

3.2.11 Quantificazione Hsp90 in cellule

Monociti umani isolati da *buffy coat* e piastrati alla concentrazione di 2x10⁶ cellule/pozzetto sono stati staccati e ogni pozzetto è stato usato per 3 campioni, di circa 500000-400000 cellule ciascuno, e cellule Chang cresciute in coltura sono state staccate, contate e usate 2000000 cellule per campione. I campioni sono stati trattati 30 minuti con siero umano, solo per i monociti, a 37 C, 5% CO₂, in modo da saturare i recettori per le porzioni Fc degli anticorpi, presenti sulla superficie dei monociti. Successivamente le cellule sono incubate con 10 μ g/ml di anticorpo anti-Hsp90 C terminale per 1h a

4°C, 5% CO₂. Dopo un lavaggio con PBS, le cellule sono state incubate 1h a 4°C con AcII-PE 10µg/ml.

Alcuni campioni di cellule sono state rese competenti: incubate con 400µl di 0,25% paraformaldeide per 15 minuti a temperatura ambiente, quindi lavate in PBS e incubate 1h a 4°C con 400µl di metanolo, dopo un lavaggio in PBS sono state incubate con Ac-anti Hsp90 e AcII-PE come le cellule non permeabilizzate.

Le cellule sono state quindi risospese in FACS *buffer* (1% FBS in PBS pH 7,2) a 4°C e dopo l'aggiunta di 10% di propidio ioduro, che permette di escludere dall'analisi le cellule morte, è stata misurata l'intensità di fluorescenza media con un citofluorimetro FACScalibur, acquisendo per ciascun campione 10000 eventi. Le acquisizioni sono state analizzate con il *software* CELLQuest (Becton Dickinson).

3.2.12 Analisi del legame di sNadA-Alexa in presenza di anticorpi anti-Hsp90

Monociti umani isolati da *buffy coat* e piastrati alla concentrazione di 2x10⁶ cellule/pozzetto sono stati staccati e ogni pozzetto è stato usato per 3 campioni, di circa 500000-400000 cellule ciascuno. I campioni sono stati trattati 30 minuti con siero umano a 37°C, 5% CO₂, in modo da saturare i recettori per le porzioni Fc degli anticorpi, presenti sulla superficie dei monociti. Successivamente le cellule sono preincubate con 200nM Bafilomicina A1 in RPMI-1640, 10% FBS, 50 mg/ml gentamicina per 30 minuti a 37°C, 5% CO₂, e quindi incubate con 10µg/ml di anticorpo anti-Hsp90(H114) e anti-Hsp90(N17) per 1h a 37°C, 5% CO₂. Dopo un lavaggio con PBS, i monociti sono incubati per 3 ore a 37°C in presenza o meno di sNadA-Alexa 0,6-1-3-5 µM, in RPMI, 10% FBS, 50 mg/ml gentamicina, 200 nM Bafilomicina A1; in altri esperimenti le cellule sono trattate simultaneamente con sNadA-Alexa e 10ug/ml di Polimixina B.

Le cellule sono state quindi risospese in FACS *buffer* a 4°C e dopo l'aggiunta di 10% propidio ioduro, è stata misurata l'intensità di fluorescenza media con un citofluorimetro FACScalibur, acquisendo per ciascun campione 10000 eventi. Le acquisizioni sono state analizzate con il *software* CELLQuest (Becton Dickinson).

3.2.13 Analisi del legame di anticorpi specifici a Hsp90 in presenza di sNadA

Monociti umani isolati da *buffy coat* e piastrati alla concentrazione di 2×10^6 cellule/pozzetto sono stati staccati. I campioni sono stati trattati 30 minuti con siero umano a 37°C , 5% CO_2 . Successivamente le cellule sono state pre-incubate con 200nM Bafilomicina A1 in RPMI-1640, 10% FBS, 50 mg/ml gentamicina per 30 minuti a 37°C , 5% CO_2 , e quindi incubate per 3 ore a 37°C più o meno 0,6-1-3-5 μM sNadA in RPMI, 10% FBS e Bafilomicina A1 200 nM.

In altri esperimenti le cellule sono trattate simultaneamente con sNadA-Alexa e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di Polimixina B. Dopo un lavaggio con PBS, i monociti sono stati incubati per 1h a 4°C con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di anticorpo anti-Hsp90(H114) e anti-Hsp90(N17), e successivamente per 1h a 4°C con i rispettivi anticorpi secondari coniugati a fluorofori .

Al termine delle incubazioni le cellule sono state risospese in FACS *buffer* e dopo l'aggiunta di 10% propidio ioduro ne è stata acquisita l'intensità di fluorescenza media con un citofluorimetro FACScalibur, acquisendo per ciascun campione 10000 eventi. Le acquisizioni sono state analizzate con il *software* CELLQuest (Becton Dickinson).

3.2.14 Misura multipla di citochine Bioplex

Il sistema di analisi *multiplex Bioplex*, basato sulla tecnologia Luminex xMAP, è un metodo che permette la contemporanea e simultanea quantificazione di un grande numero di mediatori chimici, in un'unica micropiastra da 96 pozzetti. Lo strumento sfrutta lo stesso principio del citofluorimetro, per rilevare reazioni che avvengono sulla superficie di microsferi fluorescenti.

Culture primarie di monociti umani, purificati da *buffy coat*, sono state trattate a 37°C , 5% CO_2 con differenti stimoli e il supernatante delle colture cellulari è stato raccolto dopo 24h e utilizzato per la quantificazione di 22 differenti citochine, chemochine e fattori di crescita, utilizzando un kit della Panomix.

Il saggio è stato eseguito in accordo con le istruzioni della ditta fornitrice: dopo un iniziale lavaggio dei pozzetti con una soluzione di *assay buffer*, si procede alla posa per ogni singolo pozzetto di una miscela di 5000 microsferi a cui sono legati gli anticorpi specifici e che esibiscono una fluorescenza diversa per ogni citochina analizzata dal kit. Dopo un lavaggio si

risospendono le microsfeere in $75\mu\text{l}$ di *assay buffer* e si incubano 30 minuti in leggera agitazione con $25\mu\text{l}$ di campione o *standard*. Il kit prevede infatti l'esecuzione di una curva di taratura, costituita da otto diluizioni seriali di una miscela a concentrazione nota delle citochine in esame. La miscela di *standard* liofilizzata viene ricostituita nello stesso mezzo in cui è avvenuto il trattamento dei campioni, RPMI-1640, 10% FBS, 50 mg/ml gentamicina. Dopo 3 lavaggi della piastra con il *washing buffer* fornito nel kit, a ciascun pozzetto è stato aggiunto l'anticorpo biotinilato (50X) diluito in una soluzione di *detection antibody diluent*. Dopo 30 minuti di incubazione, in condizioni di leggera agitazione, e i successivi lavaggi, si incuba per 30 minuti con streptavidina-PE (100X), opportunamente diluita in *assay buffer*. Infine, dopo 3 lavaggi le microsfeere sono state risospese in *assay buffer* e le intensità di fluorescenza dei due fluorofori sono state misurate con il lettore *Bio-Plex Array Reader*. I due *laser* dello strumento leggono la fluorescenza della sferetta, che permette l'identificazione della citochina in esame, e la fluorescenza coniugata all'anticorpo secondario, che determina la quantità di ogni citochina. I dati forniti vengono implementati dal *software Bio-Plex Manager* usando una curva a cinque parametri, che riporta direttamente la concentrazione delle citochine. Il limite di detezione del saggio è di 1,5 pg/ml.

Capitolo 4

Risultati

4.1 Analisi biochimica

4.1.1 Co-immunoprecipitazione

Nell'indagare il possibile recettore superficiale specifico dell'adesina non fimbriale NadA alle cellule ospite, è stato messo a punto un esperimento di co-immunoprecipitazione, atto a individuare in una miscela di proteine quella che specificamente lega la proteina esca. Tale esperimento è stato condotto sfruttando la capacità della proteina A di legare ad alta affinità le catene pesanti degli anticorpi e la specificità di questi ultimi per il loro antigene.

L'esperimento consiste in una serie di passaggi: legame di anticorpi anti-NadA alla resina proteina A sefariosio, uso di un *linker* per legare stabilmente gli anticorpi alla resina, incubazione con la proteina esca NadA, caricamento di lisati cellulari dopo *preclining*, e infine eluizioni con soluzioni a pH acido e detergenti.

Si è scelto di utilizzare lisati totali di cellule Chang, cellule della congiuntiva umana, in quanto precedenti studi ne hanno dimostrato il legame con NadA [57]. I lisati totali di cellule Chang sono stati ottenuti testando diversi tipi e miscele di detergenti, come Triton X100, NP-40, SDS e CHAPS. I dati ottenuti non hanno mostrato differenze del profilo di proteine solubilizzate, e quindi nei successivi esperimenti è stato utilizzata una soluzione di lisi composta da 1% Triton X100 in PBS. Prima di usare i lisati nell'esperimento di co-immunoprecipitazione in presenza di proteina, è stato eseguito un passaggio di *precleaning* che permette di eliminare tutte le molecole che si legano al sistema in modo non NadA-specifico e di otte-

nere quindi un risultato più pulito. Per questi esperimenti è stata scelta la resina proteina A sefarosio che permette di legare 20mg di IgG umane per ml di resina drenata. La resina è stata stratificata in colonne in cui si sono eseguiti tutti i successivi passaggi di incubazioni, lavaggi ed eluizioni, in modo da preservare completamente il volume di resina e le molecole ad essa legate. Durante la messa a punto del saggio sono stati utilizzati differenti anticorpi policlonali anti-NadA, sia prodotti contro l'intera proteina, sia contro specifici peptidi superficiali, prodotti nel nostro laboratorio tramite immunizzazione di conigli con l'intera proteina o con suoi peptidi.

I lisati totali (5, 10 e 20 X10⁶ Chang), dopo *precleaning*, sono stati caricati su una colonna contenente 50 μ l di resina proteina A sefarosio drenata, precedentemente legata a 400 μ g di anticorpi policlonali anti-NadA, e con 1 μ M sNadA. Un'altra colonna viene preparata nello stesso modo ma non viene incubata con sNadA in modo da avere un controllo negativo. *Precleaning*, lavaggi, eluizione a pH acido e con SDS sono stati separati in gel di poliacrilamide al 12% e quindi colorati con colorazione argentica.

Nell'immagine 4.1 è riportato il gel in cui sono stati caricati i campioni eluiti in glicina pH 2.8 (1, 2, 3) e con SDS (4, 5, 6) di lisati cellulari derivati rispettivamente da 5-10-20 x 10⁶ cellule Chang, trattate (+) e non (-) con sNadA. Come si può notare, indicato dalla freccia in figura, nel gel è presente una banda di circa 90KDa nei campioni trattati con la proteina (lane 1+, 2+, 3+) che, al contrario, non è presente nel controllo (lane 1-, 2-, 3-). Inoltre tale banda aumenta di intensità all'aumentare delle cellule usate. Il gel mostrato è un esperimento rappresentativo, ma la banda corrispondente a 90kDa è stata osservata in un'ampia gamma di esperimenti.

4.1.2 *Overlay*

La tecnica dell'*overlay* permette di analizzare l'associazione di due molecole: una molecola viene separata in gel e trasferita su nitrocellulosa, l'altra viene incubata direttamente sulla nitrocellulosa e poi si sviluppa con anticorpi che riconoscano questa seconda proteina.

Lisati totali di cellule Chang, 100000 cellule per *lane*, sono stati ottenuti usando 4 differenti soluzioni di lisi, quindi sono stati separati in gel di poliacrilamide al 12% e trasferiti su nitrocellulosa, di questa una metà viene tenuta come controllo mentre l'altra viene incubata con 1 μ M sNadA per 8h a 4°C. Entrambe le parti sono state sviluppate con anticorpi contro l'intera proteina NadA o contro anticorpi anti-peptidi superficiali.

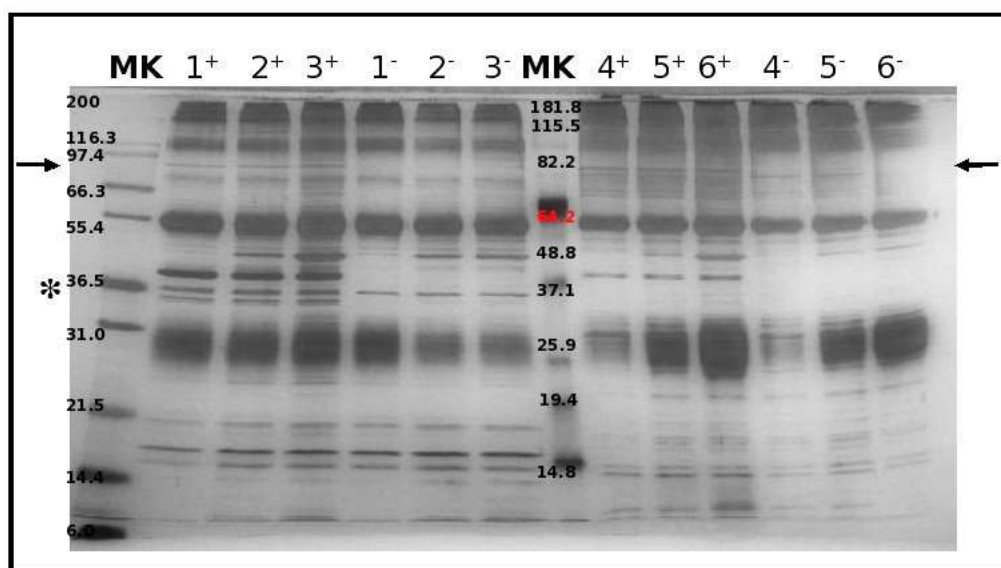


Figura 4.1: **Co-immunoprecipitazione di lisati totali di cellule Chang.**

Lisati totali di cellule Chang sono stati incubati in una colonna di resina sefarosio proteina A con Ac anti-NadA e sNadA stessa (+). Nel CTR NadA non è stata incubata in colonna (-). I campioni 1,2,3 si riferiscono all'eluzione a pH acido, mentre i campioni 4,5,6 alle eluizioni con SDS. E' mostrato un gel di poliaccrilamide al 12% colorato con colorazione argentea. Le frecce e l'asterisco indicano rispettivamente Hsp90 e NadA.

In figura 4.2 (A), è riportato l'utilizzo dei quattro diversi detergenti usati per la lisi delle cellule ma, come si può vedere questi non comportano differenze nelle proteine solubilizzate. Gli esperimenti di *overlay* ottenuti usando gli anticorpi contro la proteina intera (B) e contro il peptide [52-70] (C) mostrano chiaramente che incubando i lisati con sNadA (+), compare una banda, indicata dalla freccia, che non c'è in assenza di incubazione con NadA (-).

Inoltre sono stati condotti degli esperimenti di controllo per evitare dei possibili falsi positivi: i *blot* sono stati incubati senza anticorpo primario, con un anticorpo che non avesse niente a che fare con la proteina NadA e con un siero di coniglio pre immunizzazione. In nessuno di questi controlli compare la banda a 90KDa, confermando l'ipotesi che si tratti di un legame specifico alla proteina NadA (dati non mostrati).

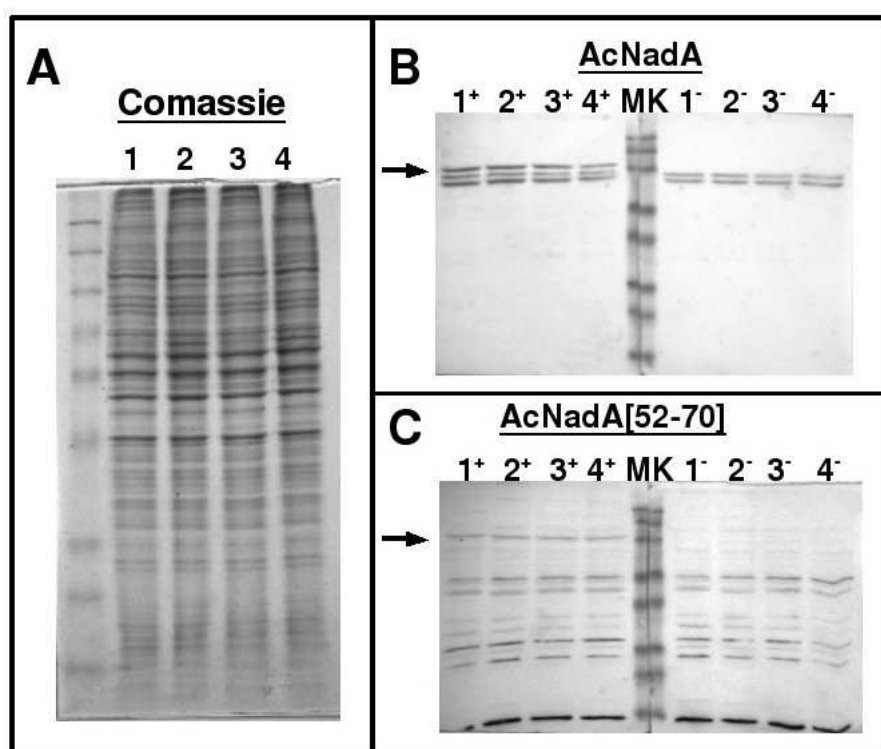


Figura 4.2: Lisati totali di cellule Chang ottenuti con diversi detergenti.

A) Lisati totali di cellule Chang ottenuti utilizzando 4 diverse soluzioni di lisi (1. Triton Buffer: 1% Triton X100 in PBS; 2. NP-40 buffer: 150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris pH8.00; 3. RIPA buffer: 150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris pH8.00, 0,5% sodio deossicolato, 0,1% SDS; 4. CHAPS buffer: 150mM NaCl, 1% CHAPS, 50mM Tris pH8.00.) separati in gel di poliacrilamide al 12% e colorati con Coomassie. Gli stessi lisati sono stati trasferiti su nitrocellulosa e incubati (+) o meno (-) con sNadA, poi sviluppati con Ac anti NadA (B) o con Ac anti peptide NadA [52-70] (C) e con AcII-PA e relativi substrati. Le frecce indicano la proteina Hsp90.

4.1.3 Identificazione della banda

Con l'utilizzo di tecniche di Spettrometria di Massa (MS) è possibile ottenere l'identificazione di proteine ignote mediante estrazione della banda da gel di poliacrilamide. La tecnica prevede: digestione con tripsina da gel di elettroforesi, analisi del digerito mediante spettrometria di massa nano-ESI MS/MS, e ricerca in banca dati. Per l'analisi di una miscela di peptidi mediante LC-MS/MS sono necessarie almeno 1-2 picomoli di campione. In generale, per l'analisi di digeriti triptici di proteine in gel di elettroforesi si può ritenere che, se la banda proteica è visibile mediante colorazione con *Coomassie Blue*, la quantità di campione proteico sarà probabilmente sufficiente ai fini dell'analisi MS e per la successiva identificazione della proteina. Vista l'elevata sensibilità di questa metodologia, per ottenere una identificazione pulita e specifica, è molto importante evitare qualsiasi tipo di contaminazione durante tutti i passaggi dell'analisi (preparazione del gel, digestione degli *spot*), lavorando con molta attenzione ed utilizzando reagenti ad elevato grado di purezza.

Per ottenere la banda di interesse visibile alla colorazione *Coomassie* è stato eseguito un esperimento di arricchimento in cui si sono utilizzati: il lisato totale di 55×10^6 cellule Chang in 1% Triton X100, 250 μ l di resina proteina A sefariosio drenata, 2 mg di anticorpo policlonale anti-NadA e 4 μ g di sNadA. L'eluato a pH acido è stato separato in gel di poliacrilamide al 12% e colorato con colorazione *Coomassie*, quindi la banda di interesse è stata tagliata (la banda è mostrata in fig. 4.3 dalla freccia), proteolizzata con tripsina e i peptidi estratti sono stati analizzati tramite nano-ESI MS/MS. I dati ottenuti sono stati lanciati in banca dati utilizzando il programma Mascot, in modo da confrontarli con i risultati della proteolizzazione delle protene presenti in banca dati.

Il programma è riuscito ad identificare la proteina *Heat shock 90 β* umana, riconoscendo con un alto punteggio 16 peptidi, i quali ricoprono il 25% dell'intera sequenza della proteina (fig 4.4). Il *software* non ha riconosciuto altre bande con buoni punteggi, se non dei contaminanti di cheratina umana.

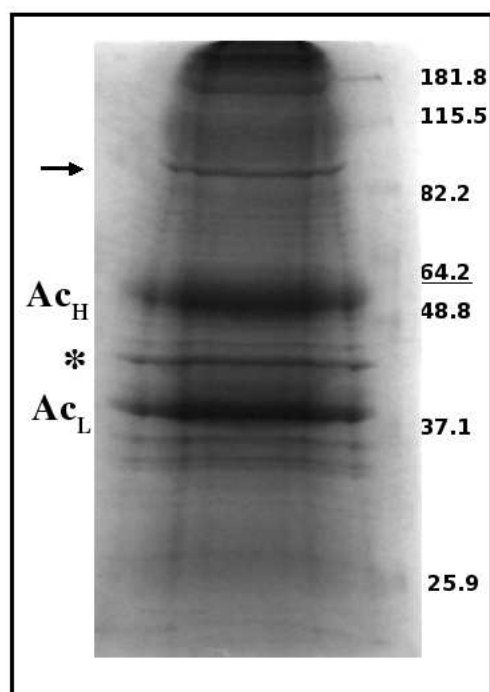


Figura 4.3: **Banda estratta e trattata per MS.**

Lisati totali di cellule Chang separati in gel di poliaccrilamide al 12% e colorati con Coomassie, la banda dell'Hsp90, indicata dalla freccia, è stata tagliata dal gel per essere proteolizzata e analizzata tramite massa. L'asterisco *, Ac_H e Ac_L indicano rispettivamente NadA, le catene pesanti (*heavy*) e leggere (*light*) dell'anticorpo.

4.1.4 Identificazione di Hsp90 in esperimenti di co-immunoprecipitazione e in lisati totali

Successivamente all'identificazione tramite spettrometria di massa della banda a mobilità 90KDa come la proteina Hsp90 β umana, sono stati ri-analizzati tutti i precedenti esperimenti di co-immunoprecipitazione eseguendo dei *western blot* e sviluppandoli con l'anticorpo anti-Hsp90.

I campioni sono stati caricati su gel al 12%, trasferiti su nitrocellulosa, incubati con anticorpi primari contro Hsp90 e secondario coniugato a fosfatasi alcalina, quindi sviluppato con i relativi substrati. Dall'immagine 4.5 si può notare che nel campione relativo alla colonna trattata con sNada (+) c'è una buona quantità di Hsp90, indicata dalla freccia, mentre nel

1	MPEE VHHGEE	EVETFAFQAE	IAQLMSLIIN	TFYSNKEIFL	RELISNASDA
51	LDKIR YESLT	DPSKLD SGKE	LKID HIPNPQ	ERTLTLVDTG	IGMTKADLIN
101	NLGTIAKSGT	KAFMEALQAG	ADISMIGQFG	VGFYSAYLVA	EKVVVIRKHN
151	DDEQYAWESS	AGGSFTVRAD	HGEPIGMGTK	VILHLK EDQT	EYLEEERRVKE
201	VVKK HSQFIG	YPITL YLEKE	REKEISDDEA	EEEKGEKEEE	DKDDEEKPKI
251	EDVGSDEEDD	SGKDKKKKTK	KIKEK YIDQE	ELNKT KPIWT	RNPDDITQEE
301	YGEFYK SLTN	DWEDHL AVKH	FSVEG QLEFR	ALLFIPRRAP	FDLFENK KKK
351	NNIKLYVRRV	FIMDS CELI	PEYLN FIRGV	VDSEDL PLNI	SREMLQ QSKI
401	LKVIRKNIVK	KCLEL FSELA	EDKENYKKFY	EAFSKNLKLG	IHEDSTNRRR
451	LSELLRYHTS	QSGDEMTSLS	EYVSRMKETQ	KSIYYITGES	KEQVANS AFV
501	ERVRKRGFEV	VYMTE PIDEY	CVQQLKEFDG	KSLVSVT KEG	LELPEDE EEK
551	KKMEESKAKF	ENLCKLMKEI	LDKKVEKVTI	SNRLVSSPCC	IVTSTY GWTA
601	NMERIMK AQA	LRDNSTMGYM	MAKKHLEINP	DHPIVETLRQ	KAEADKNDK A
651	VKDLVVL LFE	TALLSSG FSL	EDPQTHSNRI	YRMIK LGLGI	DEDEVAA EPP
701	NAAVPDEIPP	LEGDEDASRM	EEVD		

Figura 4.4: Risultato della ricerca in banca dati col programma Mascot.

Sequenza della prpteina Hsp90 umana, in rosso sono evidenziati i peptidi riconosciuti dal software.

campione di controllo (-) la quantità di Hsp90 è decisamente inferiore .

Inoltre è stato condotto un esperimento di *overlay* in cui lisati totali di cellule Chang sono stati caricati su gel, trasferiti su nitrocellulosa e incubati con anticorpi anti-Grp94, anti-Hsp90 e anti-NadA: metà dei campioni sono stati quindi trattati con sNadA $1\mu\text{M}$ 8 ore a 4°C , mentre i restanti sono stati utilizzati come controlli negativi. Grp-94 (o Gp96), è un'altra proteina della famiglia delle *Heat shock* 90, che si trova nel reticolo endoplasmatico, abbiamo quindi voluto indagare anche questa proteina.

I campioni incubati (fig. 4.6, 3+) o meno (3-) con sNadA e sviluppati con anticorpi anti-NadA sono stati usati come controllo positivo, infatti nella *lane* 3+ è presente la banda a 90KDa, non presente in 3-. Da questo esperimento si può notare come la proteina di interesse a 90KDa presenta la stessa mobilità in gel della Hsp90, che viene riconosciuta dal suo anticorpo nelle *lanes* 2+ e 2-, indicata dalla freccia, invece la banda riconosciuta dall'anti-Grp-94 presenta chiaramente una mobilità diversa, come si vede in figura indicato dal simbolo +, *lanes* 1+ e 1-.

Tutti questi esperimenti sembrano quindi confermare che la proteina identificata sia proprio Hsp90.

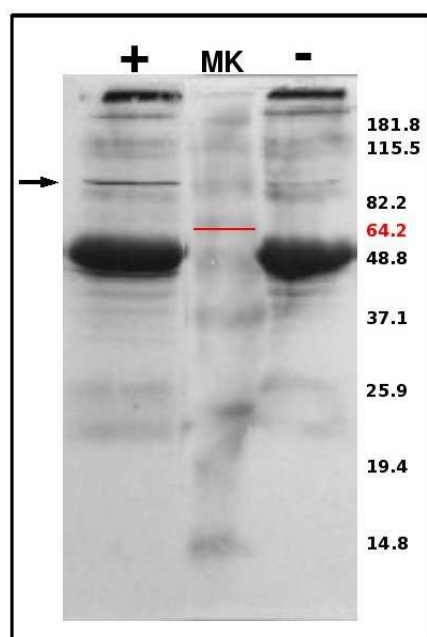


Figura 4.5: **Identificazione di Hsp90 in co-immunoprecipitazione di lisati totali di cellule Chang.**

Campioni ottenuti dopo eluizione a pH acido di esperimenti di co-immunoprecipitazione con sNadA (+) o di CTR (-) sono stati separati in gel di poliacrilamide al 12% e trasferiti su nitrocellulosa; quindi sono stati sviluppati con Ac anti-Hsp90 e infine trattati con AcII-PA e relativi substrati. La freccia indica l'Hsp90.

4.1.5 NadA lega Hsp90 di membrana

La metodologia dell'*overlay* è stata successivamente applicata a delle preparazioni di membrane plasmatiche di cellule Chang in modo da indicare se l'Hsp90 che si lega a NadA sia effettivamente presente sulla membrana di queste cellule.

Preparazioni di membrane plasmatiche sono state isolate tramite ultracentrifugazioni su gradienti di saccarosio, quindi precipitate, caricate su gel 12% poliacrilamide e trasferite su nitrocellulosa. Parti diverse della nitrocellulosa sono state sviluppate con anticorpi anti-Hsp90 (fig. 4.7 A), e altre sono state usate per un esperimento di overlay con NadA e quindi sviluppate con anticorpo anti-NadA (B). La successiva incubazione con anticorpi secondari coniugati a PA e relativo uso di substrati dimostra la presen-

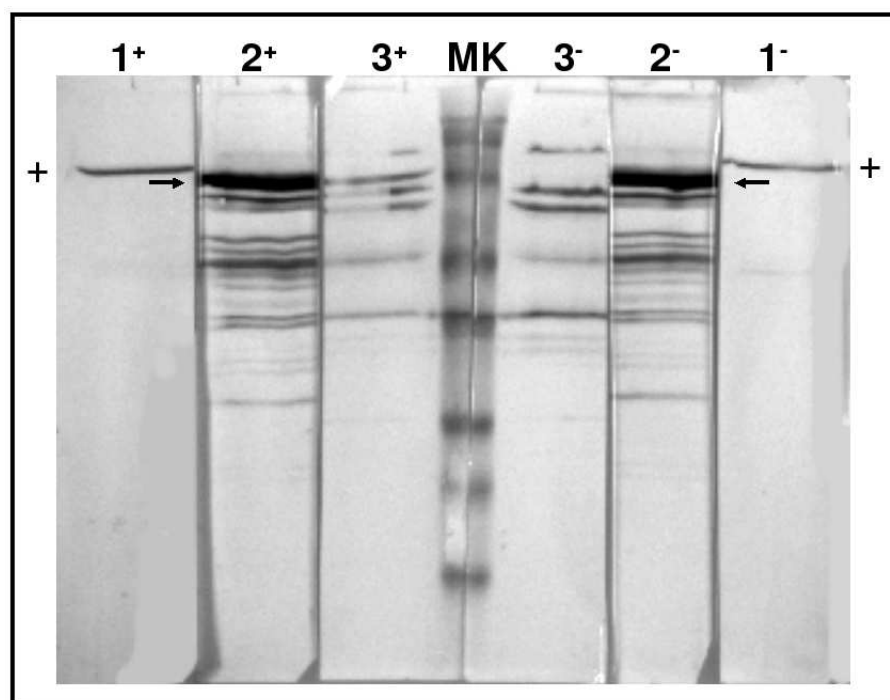


Figura 4.6: **Identificazione di Hsp90 da lisati totali di cellule Chang.** Lisati totali separati in gel di poliacrilamide al 12%, trasferiti su nitrocellulosa, sono stati trattati con Ac anti-Grp94 (1), Ac anti-Hsp90 (2), e Ac anti-NadA (3), dopo incubazione (+) o meno (-) con sNadA. Poi sviluppati con AcII-PA e relativi substrati. Le frecce e il simbolo + indicano rispettivamente Hsp90 e Grp94.

za di Hsp90 nelle preparazioni di membrana plasmatica di cellule Chang (A), mentre la fig. B indica la comparsa della banda di interesse anche nell'*overlay* con la proteina (2+).

Questi dati fanno quindi ipotizzare un legame specifico tra la proteina NadA e Hsp90 presente sulla superficie delle cellule Chang.

4.1.6 NadA lega rHsp90 in *overlay*

Ulteriori controlli sono stati eseguiti per confermare l'associazione fra NadA e Hsp90, applicando la tecnica dell'*overlay* per analizzare il legame con la proteina Hsp90 ricombinante (rHsp90), e analizzando lisati cellulari con anticorpi anti-Hsp90.

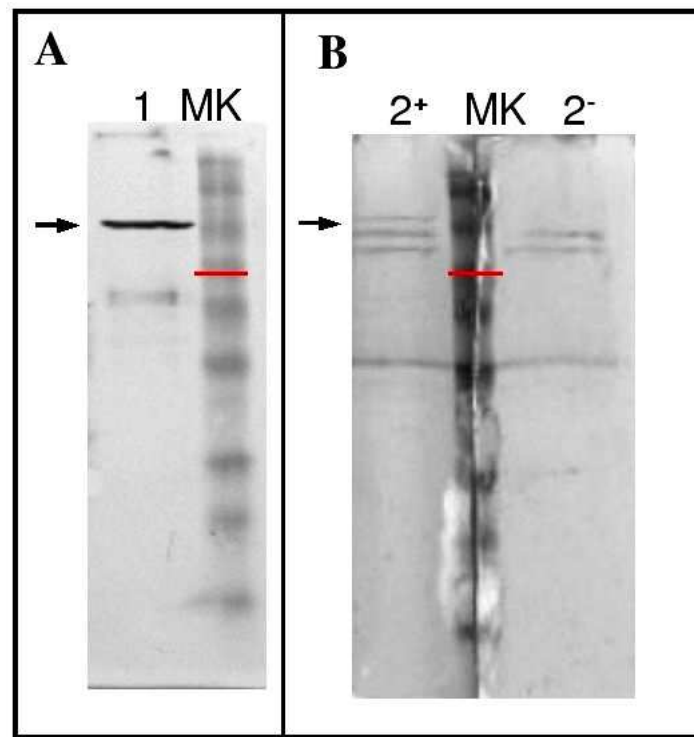


Figura 4.7: Identificazione di Hsp90 in preparazioni di membrane plasmatiche di cellule Chang.

Preparazioni di membrane plasmatiche, ottenute tramite ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio, sono state separate in gel di poliacrilamide al 12%, trasferite su nitrocellulosa e sviluppate con Ac anti-Hsp90 (A) e Ac anti-NadA (B), con (+) o senza (-) pre-incubazione con NadA. La freccia indica la proteina Hsp90.

Diverse concentrazioni di rHsp90 e, come controllo positivo, una aliquota di lisato totale di cellule Chang, sono state caricate in doppio in un gel al 12% di poliacrilamide e trasferiti su nitrocellulosa. Il *blot* è stato tagliato a metà in modo da incubarne una parte con sNadA (+) e lasciare l'altra come controllo negativo (-); successivamente entrambi i *blot* sono stati sviluppati con anticorpi primari diretti contro NadA e relativi secondari coniugati a fosfatasi alcalina e quindi sviluppati con i substrati. In figura 4.8, indicato dalla freccia, si vede come sNadA riesca a legare anche la rHsp90, in modo proporzionale alla quantità di proteina presente. Nei campioni incubati con sNadA (+) la proteina si è legata all'Hsp90 permettendo all'anticorpo anti-

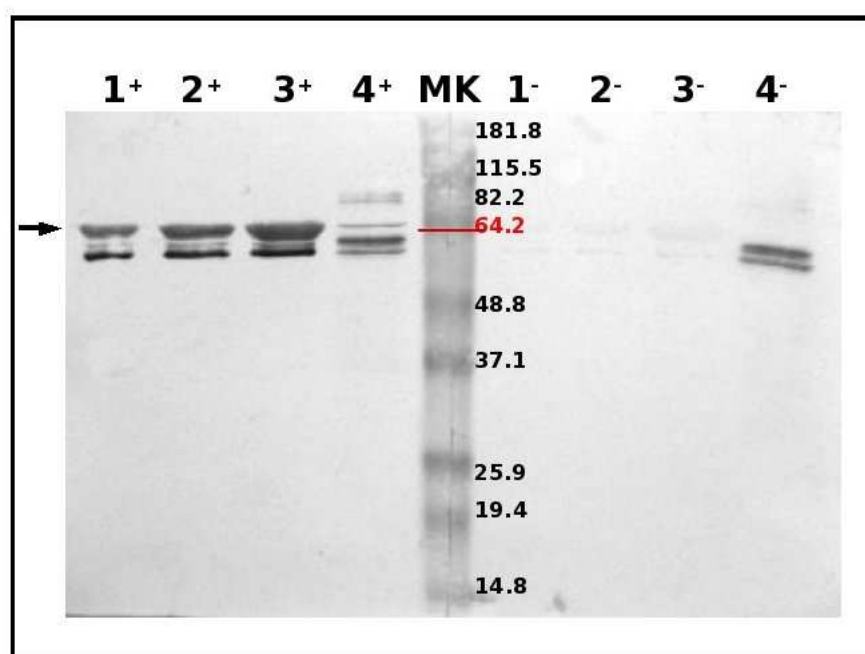


Figura 4.8: **Overlay di rHsp90.**

Concentrazioni crescenti di rHsp90 (50, 100 e 200ng/ml, rispettivamente 1,2,3) e un lisato totale di cellule Chang (4) sono state separate su gel di poliacrilamide al 12%, trasferite su nitrocellulosa e incubate (+) o no (-) con sNadA. Poi sviluppate con AcII-PA e relativi substrati. La freccia indica la proteina Hsp90.

NadA di legarsi a sua volta e di marcare la banda a 90KDa che invece non viene riconosciuta nei campioni dove non c'è stata l'incubazione con sNadA (-).

4.1.7 Interferenza della Polimixina B nell'associazione fra NadA e Hsp90

Precedenti esperimenti condotti nel laboratorio avevano dimostrato l'associazione di NadA con la Polimixina B, un antibiotico cationico anfipatico, che mostra caratteristiche analoghe alle catelicidine, piccole molecole ad attività battericida contenute anche nei granuli dei monociti. La Polimixina B appartiene ad un gruppo di antibiotici formati da polipeptidi ciclici cationici dotati di una catena di acido grasso. Essi agiscono contro i batteri

Gram negativi legando i fosfolipidi di membrana, soprattutto il lipide A del LPS, e alterando le proprietà osmotiche provocando la fuoriuscita dei metaboliti dall'interno della cellula.

Al fine di valutare una possibile interferenza fra NadA e Hsp90 da parte della Polimixina B, è stata condotta una co-immunoprecipitazione in presenza di questo antibiotico. Lisati totali di monociti umani isolati da *buffy coat*, ottenuti trattando le cellule in 1% Triton X 100 in PBS con inibitori di proteasi, sono stati incubati in presenza o meno di Polimixina B, in una colonna precedentemente preparata contenente proteina A sefarosio, IgG anti-NadA e NadA stessa.

Il gel riportato (fig. 4.9) mostra *precleaning*, lavaggio, eluizione a pH acido e trattamento con SDS (rispettivamente 1, 2, 3, 4) dell'esperimento condotto in assenza o in presenza (numeri con asterisco) di Polimixina B durante la co-immunoprecipitazione. Si vede chiaramente nella *lane* 4 la banda relativa all'Hsp90, indicata dalla freccia, come era stato precedentemente notato negli esperimenti condotti con i lisati totali di cellule Chang. Al contrario, nella *lane* 4', si può notare come la presenza della Polimixina B interferisca nella co-immunoprecipitazione di NadA e Hsp90. L'assenza della banda della Hsp90 in questa *lane* può essere considerata affidabile, dato che il resto delle bande nelle *lane* 4 e 4' sono confrontabili.

Da questi dati sembra che la Polimixina B sia in grado di interferire con l'immunoprecipitazione di Hsp90 da lisati cellulari totali.

In un secondo momento si è quindi voluto valutare se anche Hsp90 si legasse alla Polimixina B. Sono stati quindi condotti degli esperimenti per testare il legame di Hsp90 alla Polimixina B usando una resina agarosio-Polimixina B incubata con dei lisati cellulari, 100000 e 300000 cellule Chang in presenza o meno di $1\mu\text{M}$ NadA. Dopo un'ora di incubazione a temperatura ambiente supernatante e resina, dopo lavaggi in PBS, sono stati separati per elettroforesi, trasferiti su nitrocellulosa e sviluppati coi relativi anticorpi.

Inoltre è stato riprodotto anche l'esperimento di legame della Polimixina B con sNadA, per usarlo come controllo positivo. Dalla figura 4.10 si vede infatti come sNadA (A) si lega alla Polimixina B, la proteina si trova infatti legata alla resina, campione 1, e solo in minor parte nel supernatante, campione 2.

Inoltre in fig. B vediamo come anche Hsp90 si leghi alla Polimixina B, è infatti anch'essa presente solo nel campione di resina (7 e 9, che si riferiscono rispettivamente a lisati totali di 100000 e 300000 cellule). L'incubazione

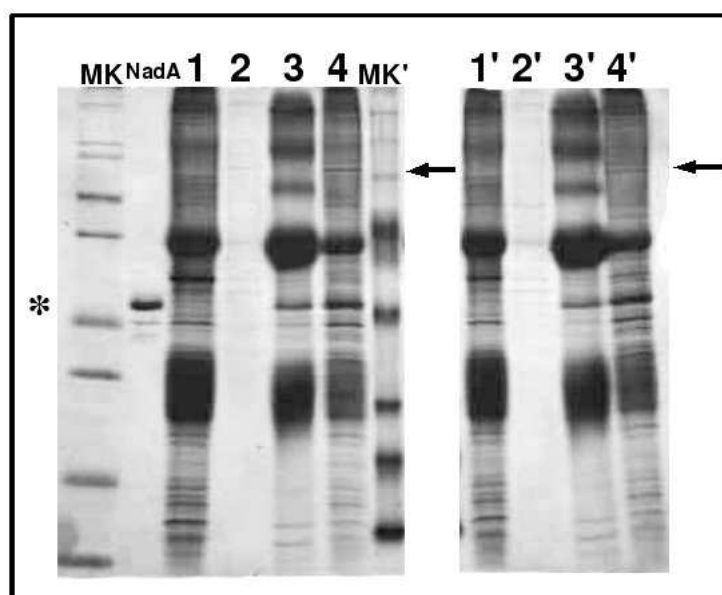


Figura 4.9: **Co-immunoprecipitazione di Hsp90 da lisati totali di monociti umani in presenza o meno di Polimixina B.**

Gel di poliaccrilamide al 12% con colorazione argentea che rappresenta gli eluati della co-immunoprecipitazione in presenza (numeri con apostrofo) e in assenza di Polimixina B. Le *lanes* rappresentano rispettivamente: 1-1' *precleaning*, 2-2' lavaggio, 3-3' eluizione a pH acido e 4-4' trattamento con SDS. Le frecce e l'asterisco indicano rispettivamente le proteine Hsp90 e NadA.

contemporanea (campioni 3, 4, 5 e 6) della resina con sNadA e il lisato cellulare totale, contenente la proteina Hsp90, non determinano differenze nel legame di queste due proteine alla resina-Polimixina B.

4.2 Analisi funzionale

4.2.1 Espressione di Hsp90 superficiale in cellule Chang e monociti

Come già menzionato, in letteratura è riportata la presenza di HSPs, soprattutto Hsp90 e Hsp70, sulla superficie di diversi tipi cellulari, fra cui cellule

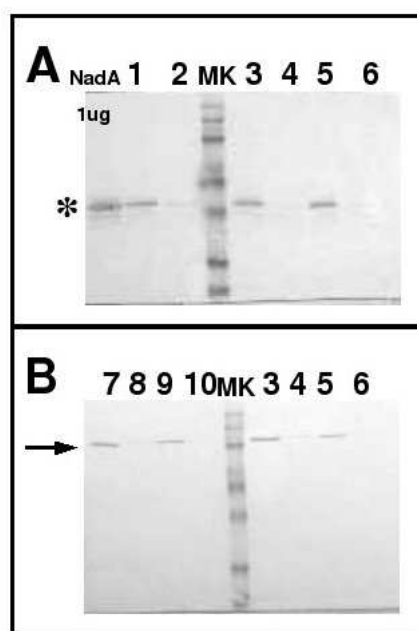


Figura 4.10: Legame di sNadA e Hsp90, da lisati cellulari, alla resina agarosio-Polimixina B.

100000 (campioni 3 e 7) o 300000 (campioni 5 e 9) cellule Chang sono state lisate in 1% Triton X100 e incubate con la resina agarosio-Polimixina B a temperatura ambiente. I campioni dispari si riferiscono alla resina e i pari al relativo supernatante. I campioni 1 e 2 si riferiscono alla resina trattata con sNadA in PBS. I campioni sono stati separati in gel di poliaccrilamide al 12% e trasferiti su nitrocellulosa, quindi sviluppati con anticorpo anti-NadA (A) e anti-Hsp90 (B). La freccia e l'asterisco indicano rispettivamente le proteine Hsp90 e NadA.

tumorali e apoptotiche, ma anche linee cellulari, come Hela, e in culture primarie di monociti, macrofagi e neuroni [77, 78, 79, 81, 82, 83, 84].

In letteratura non sono invece presenti dati riguardanti le cellule Chang, è stata quindi valutata la presenza di Hsp90 sulla superficie di queste cellule, conducendo degli esperimenti di citofluorimetria di flusso. Cellule Chang in coltura sono state incubate a 4°C per 1 ora con anticorpi contro Hsp90 e ne è stata rilevata l'intensità media di fluorescenza dopo 1ora di incubazione a 4°C con un anticorpo secondario coniugato a ficoeritrina. Inoltre parte delle cellule sono state rese permeabili, e successivamente sono state trattate nello stesso modo con gli anticorpi primario e secondario, per misurare l'Hsp90

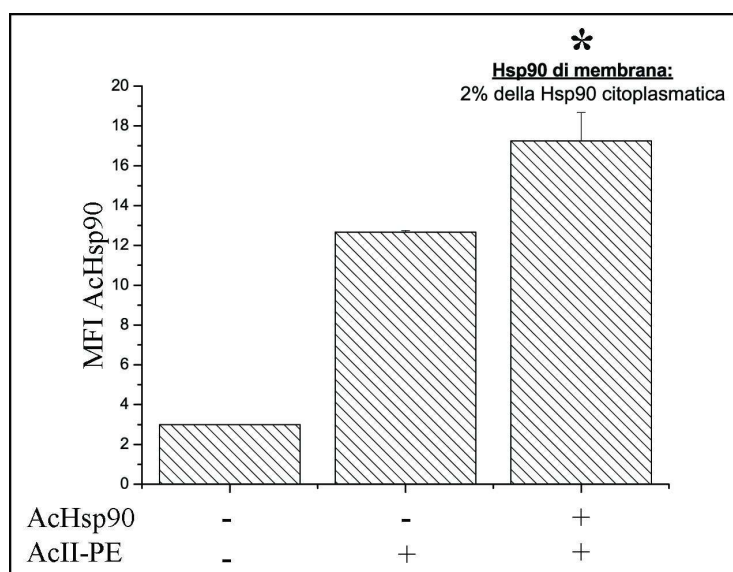


Figura 4.11: **Hsp90 superficiale in cellule Chang.**

Quantificazione mediante citofluorimetria di flusso di Hsp90 superficiale in cellule Chang, sono state incubate con Ac anti-Hsp90 C-terminale e con AcII-PE. I dati si riferiscono ad un esperimento rappresentativo, condotto in triplo, considerando solo le cellule vive. L'incremento di intensità media di fluorescenza che si ha incubando con anticorpo anti-Hsp90 e AcII-PE, rispetto al valore dato dal solo AcII-PE, risulta statisticamente significativo (*) $p=0,034 < 0,005$.

citoplasmatica. Per questi esperimenti è stato utilizzato l'anticorpo contro Hsp90 C-terminale.

Nell'istogramma in fig. 4.11 è riportata la quantificazione dell'espressione in membrana di Hsp90. Il saggio permette di rilevare una piccola quantità di legame specifico, dato dalla sottrazione della fluorescenza data dal legame aspecifico del solo anticorpo secondario alla cellula. L'espressione di Hsp90 sulla superficie delle cellule Chang è pari al 2% di quella citoplasmatica.

Lo stesso esperimento è stato condotto su monociti umani isolati da *buffy coat*, che rappresentano la prima linea di difesa del sistema immunitario innato. In questo caso però le cellule sono state pre-trattate con del siero umano per saturare con, le IgG contenute, i siti di legame specifici per le catene pesanti delle IgG presenti sui monociti. Quindi le cellule sono state incubate a 4°C per 1 ora con anticorpi anti-Hsp90 e successivamente con se-

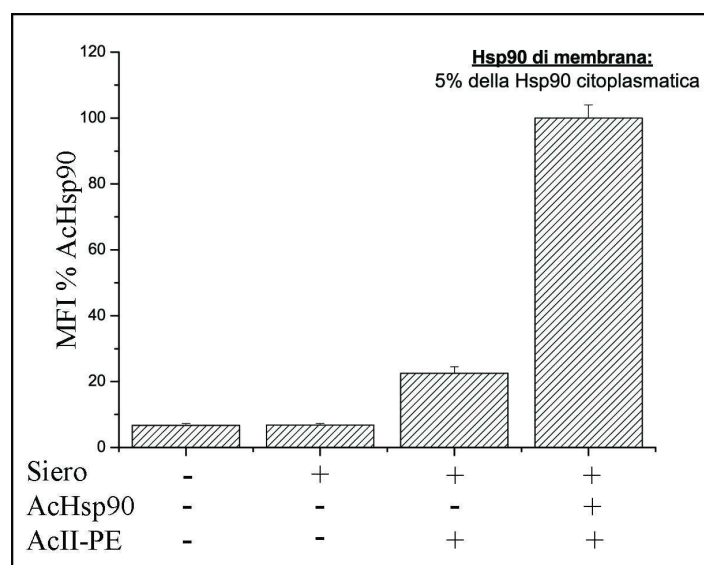


Figura 4.12: **Hsp90 superficiale su monociti.**

Quantificazione mediante citofluorimetria di flusso di Hsp90 superficiale in monociti umani. Le cellule sono state pre-trattate con siero umano e quindi incubate con Ac anti-Hsp90 C-terminale e con AcII-PE. I dati si riferiscono ad un esperimento rappresentativo, condotto in triplo, settando lo strumento in modo che considerasse solo i monociti.

condario coniugato a fluoroforo. Anche per i monociti sono state preparate delle cellule permeabilizzate per misurare la Hsp90 citoplasmatica.

Come si può vedere, fig. 4.12, i monociti esprimono una bassa quantità di Hsp90 superficiale però in questo caso il legame specifico è maggiore, pari al 5%.

4.2.2 Incubazione di cellule Chang con Hsp90 solubile ricombinante

Nonostante in letteratura siano riportati diversi studi che attestano la presenza della proteina Hsp90 sulle superficie di diversi tipi cellulari, non è ancora chiaro in che modo la proteina sia veicolata sulla superficie. Ci sono due teorie che spiegano tale localizzazione: la prima ipotizza che avvenga un trasporto attivo della Hsp90 citoplasmatica verso la membrana cellulare, la seconda suppone invece che il legame sia avventizio, dipenda cioè dalla

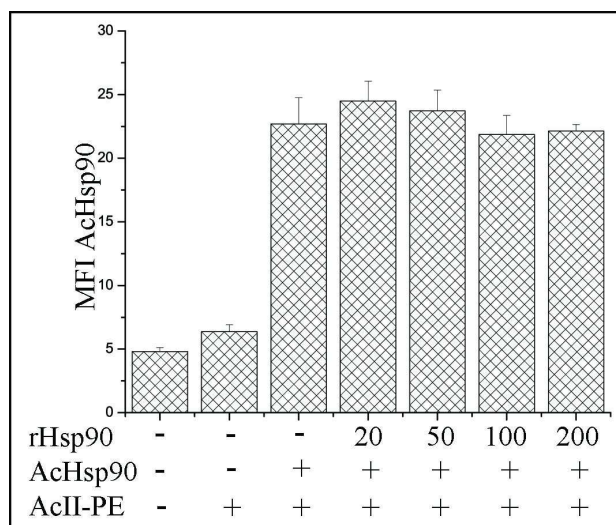


Figura 4.13: **Legame di rHsp90 a cellule Chang.**

20000 cellule Chang sono state trattate per 1h a 37°C con rHsp90 e successivamente quantificata l'Hsp90 di superficie con Ac anti-Hsp90 C-terminale e AcII-PE. Sono riportati i valori medi di un esperimento rappresentativo condotto in triplo.

presenza di Hsp90 libera in forma solubile all'esterno delle cellule, che poi è in grado di legarsi sulla loro superficie.

Data la bassa espressione superficiale di Hsp90 misurata sulle cellule Chang, è stata valutata la capacità di queste cellule di legare la proteina solubile ricombinante, rHsp90.

Cellule Chang sono state incubate con diverse concentrazioni di rHsp90 (20, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per 1 ora a 37°C, successivamente sono state trattate con anticorpi contro Hsp90 e anticorpi secondari coniugati a fluoroforo, quindi analizzate tramite citofluorimetria di flusso. I risultati ottenuti, fig. 4.13, mostrano come l'incubazione delle cellule con rHsp90 non induca un aumento della rilevazione di Hsp90 in superficie da parte dell'anticorpo specifico. Sulla base di questi dati rHsp90 non sembra in grado di legarsi alle cellule Chang.

4.2.3 Legame di monociti a NadA-Alexa in presenza di Polimixina B

Avendo appurato che sNadA e Hsp90 sono in grado di legare la Polimixina B e che questa annulla la loro interazione reciproca, sono stati condotti degli esperimenti per valutare se questa associazione abbia degli effetti sul legame della proteina ai monociti.

Questi esperimenti sono stati condotti utilizzando la proteina sNadA coniugata al fluoroforo Alexa, in modo da poter misurare direttamente l'interazione con le cellule, e in presenza di Bafilomicina A1 200nM, che impedisce la degradazione dei ligandi endocitati in quanto non permette l'acidificazione endosomiale V-ATPasi dipendente [97].

Monociti umani isolati da *buffy coat* sono stati incubati 1 ora a 37°C in presenza o meno di 600nM NadA-Alexa, co-incubando con 5-10-20µg/ml di Polimixina B.

Come si può vedere dal grafico in fig. 4.14 il segnale dato dal legame di NadA ai monociti è confrontabile in assenza e in presenza di Polimixina B, anche ad elevate concentrazioni di quest'ultima. L'esperimento quindi indica che l'associazione NadA-Polimixina B non sembra influenzare il legame della proteina alle cellule.

4.2.4 Competizione di AcHsp90 nel legame di NadA-Alexa

Dopo aver riscontrato, con differenti metodologie biochimiche, l'instaurarsi di una associazione fra NadA e Hsp90 e tramite citofluorimetria di flusso l'espressione di Hsp90 sulla superficie di monociti, è stato indagato quale fosse l'effetto di tale legame a livello cellulare. E' stato quindi valutato se l'associazione di NadA ai monociti variasse a seguito di una pre-incubazione delle cellule con anticorpi specifici per diversi epitopi di Hsp90 e Hsp70.

Monociti isolati da *buffy coat* sono stati pre-trattati per 30 minuti con siero umano e quindi un'ora con anticorpi anti-Hsp90 C e N-terminali e anti-Hsp70, successivamente sono stati incubati un'ora a 4°C o 37°C con sNadA-Alexa, variando la concentrazione degli anticorpi e della proteina. I campioni sono stati poi analizzati mediante citofluorimetria di flusso che permette di misurare la sNadA legata alle cellule, acquisendo l'intensità di fluorescenza del fluoroforo Alexa, coniugato alla proteina. Tutte queste incubazioni sono state fatte in presenza di Bafilomicina A1 200nM.

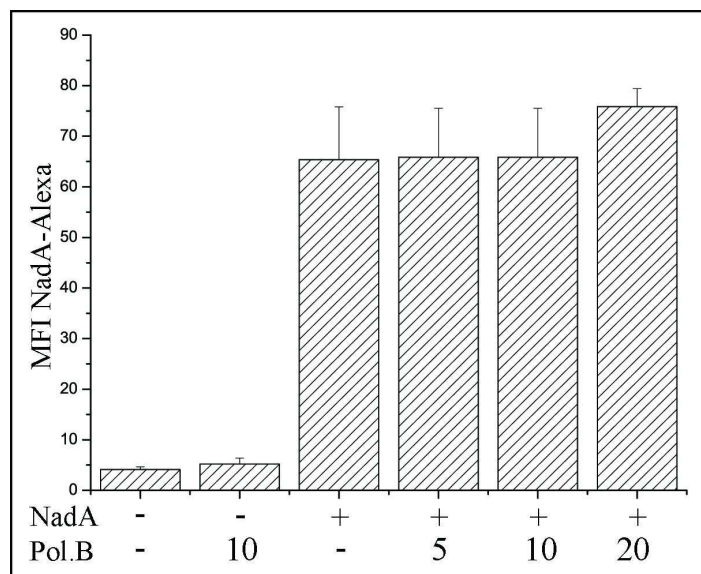


Figura 4.14: **Analisi del legame di sNadA a monociti in presenza di Polimixina B.**

Monociti umani isolati da buffy coat sono saturati incubati per 1h a 37°C in presenza o meno di diverse concentrazioni di Polimixina B e con sNadA. I dati si riferiscono ad un esperimento condotto in triplo.

Dalla figura 4.15 si può notare come l'associazione della proteina meningococcica al monocita non sia disturbata dalla presenza o meno dell'anticorpo anti-Hsp90 C-terminale. La pre-incubazione delle cellule con 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ di questo anticorpo non comporta diminuzione del legame di NadA alla cellula.

Lo stesso esperimento è anche stato condotto pre-trattando i monociti un'ora con anticorpo contro Hsp90 C-terminale 40 $\mu\text{g/ml}$ e successivamente incubando la proteina sNadA-Alexa 1 ora a 4 o 37°C. Anche in questo caso, fig. 4.16, il legame di NadA alla cellula non è compromesso, nonostante l'alta concentrazione di anticorpo anti-Hsp90 utilizzato, inoltre nemmeno la temperatura influisce sul fenomeno, in quanto l'anticorpo non interferisce con l'adesione di NadA ai monociti ne a 4°C ne a 37°C. A 4°C, A, l'andamento dei grafici con o senza la pre-incubazione con l'anticorpo anti-Hsp90 è lo stesso. A 37°C, B, c'è una leggera diminuzione, non significativa, di NadA -Alexa.

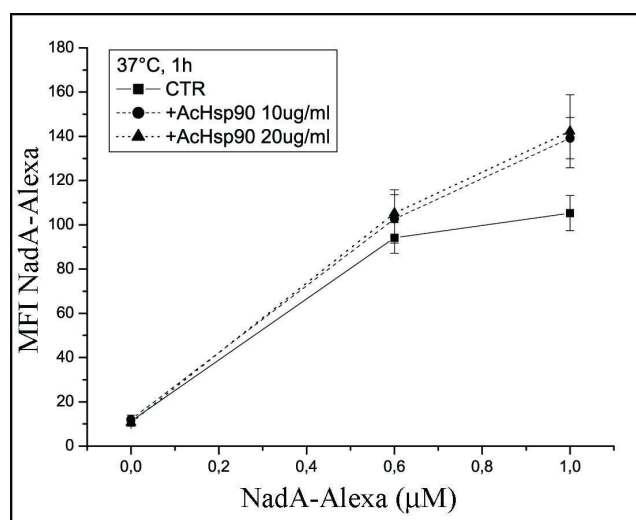


Figura 4.15: **Analisi dell'effetto di AcHsp90 C-terminale sul legame di sNadA ai monociti.**

Analisi mediante citofluorimetria di flusso di monociti umani incubati 1h a 4°C con AcHsp90 C-terminale e poi 1h 37°C con diverse concentrazioni di NadA-Alexa. Sono riportati i valori medi di fluorescenza relativi ad un esperimento rappresentativo condotto in triplo.

Inoltre, dato che in letteratura è riportato che diverse proteine cliente dell'Hsp90 prima di legarsi ad essa formano un complesso con Hsp70, una volta formato il complesso proteina cliente-Hsp70-Hsp90, la Hsp70 si stacca lasciando associate le altre due proteine, si è quindi voluta testare l'azione bloccante dei 3 anticorpi incubati contemporaneamente.

Come si vede in fig. 4.17, l'incubazione sia con anticorpo anti-Hsp90 C che N-terminale e anche quello contro l'Hsp70 non interferisce con il legame di NadA al monocita. Il grafico mostra chiaramente come non vi siano nette differenze in presenza o meno di questi anticorpi, se non, anche in questo caso, un leggero aumento.

Si è anche voluto indagare se la presenza di Polimixina B influisse sul legame di NadA ai monociti, in presenza o meno di pre-trattamento con anticorpo anti-Hsp90, è stato infatti dimostrato che la Polimixina B si associa con NadA e con Hsp90, e che è anche in grado di interferire con la co-immunoprecipitazione di Hsp90 utilizzando NadA come esca.

Gli stessi esperimenti sono stati condotti co-incubando i monociti, per un'ora a 4 e 37°C, con sNadA-Alexa e Polimixina B, dopo averli pre-trattati

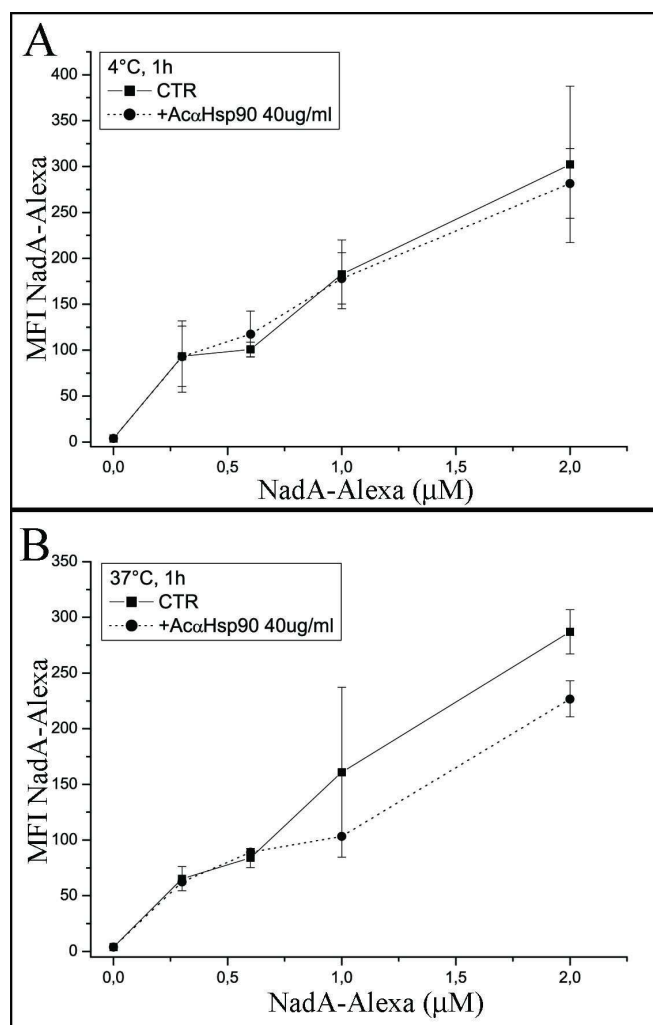


Figura 4.16: Analisi dell'effetto di AcHsp90 C-terminale sul legame di sNadA ai monociti a 4 e 37°C.

Analisi mediante citofluorimetria di flusso di monociti umani incubati 1h a 4°C con 40 $\mu\text{g/ml}$ AcHsp90 C-terminale e poi 1h a 4°C o 37°C con diverse concentrazioni di NadA-Alexa. Sono riportati i valori medi di fluorescenza relativi ad un esperimento rappresentativo condotto in triplo.

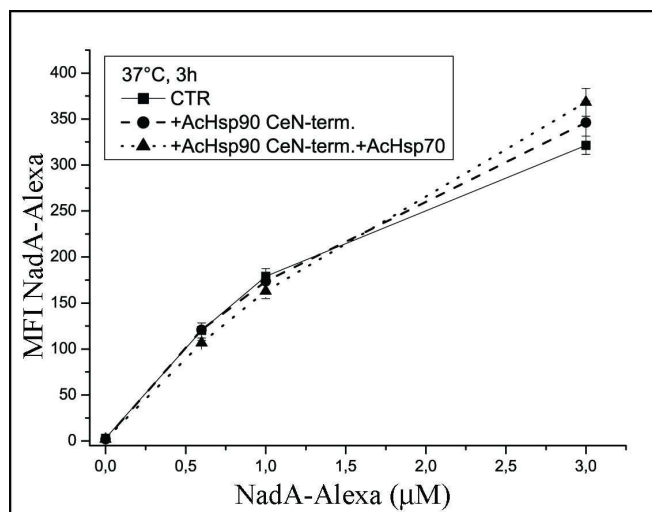


Figura 4.17: **Analisi dell'effetto di AcHsp90 C e N-terminale e AcHsp70 sul legame di sNadA ai monociti.**

Analisi mediante citofluorimetria di flusso di monociti umani incubati 1h a 4°C con simultaneamente AcHsp90 C e N-terminale, entrambi 10 µg/ml, o simultaneamente con AcHsp90 C e N-terminale e AcHsp70, sempre 10 µg/ml, e poi 3h, 37°C con diverse concentrazioni di NadA-Alexa. Sono riportati i valori medi di fluorescenza relativi ad un esperimento rappresentativo condotto in triplo.

un'ora con l'anticorpo contro Hsp90 C-terminale.

Come si può vedere dall'immagine 4.18 a 4°C non c'è alcuna variazione di legame mentre a 37°C all'aumentare della concentrazione di Polimixina B (5-10-20 µg/ml) c'è un leggero aumento del legame, non significativo.

Dall'analisi di questi dati si può dedurre che l'associazione fra NadA e Hsp90 non sia di tipo recettoriale, infatti nonostante la presenza dell'anticorpo anti-Hsp90, la proteina NadA è comunque in grado di legarsi ai monociti, si può quindi ipotizzare che Hsp90 non sia il recettore per NadA e che l'associazione NadA-Hsp90 abbia un'altra funzione. Si può supporre che prima avvenga il legame di NadA ai monociti, e solamente poi si instauri un'associazione con Hsp90, come due fenomeni completamente distinti.

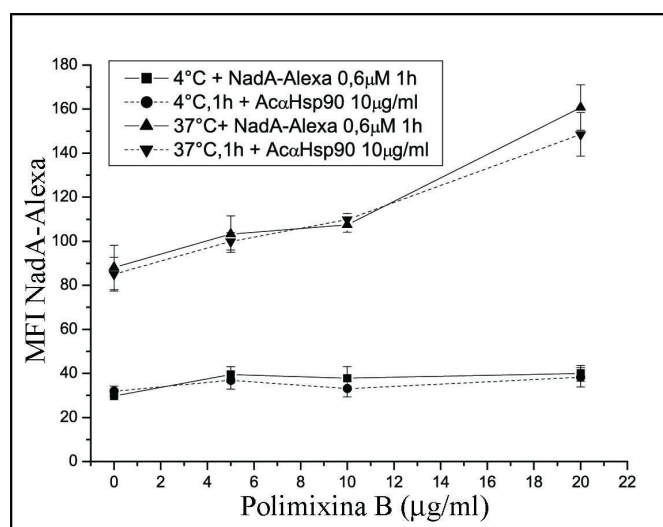


Figura 4.18: **Effetto della Polimixina B sulla competizione dell'A-cHsp90 C-terminale sul legame di NadA-Alexa ai monociti.**

Analisi mediante citofluorimetria di flusso di monociti umani trattati 1h a 4°C con Ac anti-Hsp90, poi 3h a 4°C e 37°C con sNadA-Alexa in presenza di concentrazioni crescenti di Polimixina B. I valori medi di fluorescenza si riferiscono ad un esperimento condotto in triplo.

4.2.5 Competizione di sNadA con la rilevazione superficiale di Hsp90 mediante anticorpi

Nonostante l'associazione NadA-Hsp90 non abbia una funzione recettoriale, gli esperimenti di biochimica hanno comunque mostrato una associazione fra queste due preteine sulla superficie cellulare, quindi con un'altra serie di esperimenti al citofluorimetro di flusso si è voluto indagare un altro tipo di possibile interferenza, e cioè se la pre-incubazione di sNadA con le cellule interferisse in qualche modo con la rilevazione dell'Hsp90 superficiale da parte di suoi anticorpi specifici.

Monociti umani isolati da *buffy coat* sono stati pre-trattamenti 30 minuti con siero umano e quindi un'ora a 4°C o 37°C con sNadA in presenza di Bafilomicina A1, successivamente sono stati incubati un'ora a 4°C con anticorpi anti-Hsp90 C-terminale, e un'ora a 4°C con anticorpi secondari coniugati a fluoroforo. I campioni sono stati poi analizzati mediante citofluorimetria di flusso.

Come si può vedere in fig. 4.19 (A), a 4°C il pre-trattamento con

sNadA non influisce sul riconoscimento superficiale di Hsp90 da parte del suo anticorpo specifico, infatti dopo 1 o 3 ore di incubazione con diverse concentrazioni della proteina meningococcica, non si nota una differenza significativa di segnale di Hsp90. La distribuzione dei valori per i diversi trattamenti non è completamente lineare, ma comunque presenta differenze di sole 20 unità arbitrarie di fluorescenza.

A 37°C, al contrario (B), all'aumentare della concentrazione di sNadA diminuisce la quantità di Hsp90 superficiale rilevata dall'anticorpo specifico, ad entrambi i tempi di incubazione. Tale effetto si nota in particolare dopo 3 ore di incubazione: in presenza di sNadA 2 μ M il segnale di Hsp90 superficiale diminuisce del 40% rispetto al valore del controllo.

Lo stesso esperimento è stato condotto a 37°C, per 3 ore incubando la proteina in presenza o meno di Polimixina B, per vedere se essa interferisse con l'effetto.

Anche in questo caso, fig. 4.20 riquadro A, a 4°C l'andamento è abbastanza lineare, sia in presenza che in assenza di Polimixina B. A 37°C, riquadro B, invece si riproduce l'effetto di diminuzione di rilevazione di Hsp90 superficiale dovuto alla presenza di sNadA e inoltre la presenza della Polimixina B sembra invertire questa tendenza, riportando il segnale di Hsp90 ai livelli presenti in assenza di incubazione con sNadA.

Lo stesso esperimento è stato infine condotto indagando il segnale di Hsp70 e ancora di Hsp90, usando un anticorpo diverso, in grado di riconoscere un epitopo all'N-terminale di Hsp90. Pre-incubando le cellule per 3 ore a 37°C con sNadA e poi monitorando il riconoscimento superficiale dell'anticorpo anti-Hsp90 N-terminale, fig. 4.21 riquadro A, all'aumentare della concentrazione di sNadA si riproduce lo stesso effetto ottenuto con l'anticorpo al C-terminale, linea intera, infatti c'è una diminuzione progressiva del segnale della Hsp90 superficiale, fino al 50%. In questo caso però la Polimixina B (linea tratteggiata) sembra interferire meno con questo effetto, determinando un leggero aumento del segnale rispetto all'assenza, ma non così evidente.

Per quanto riguarda l'Hsp70, fig. 4.21 riquadro B, anch'essa determina una diminuzione del segnale dipendente dalla concentrazione della proteina sNadA e anche in questo caso la Polimixina B sembra ristabilire il segnale.

Da questi dati sembra apparire che la presenza della proteina NadA determini una diminuzione del segnale della Hsp90 superficiale, quando questa viene incubata a 37°C, indicando un possibile avvicinamento di queste due molecole successivo alla fase di ricezione della proteina meningococcica, ta-

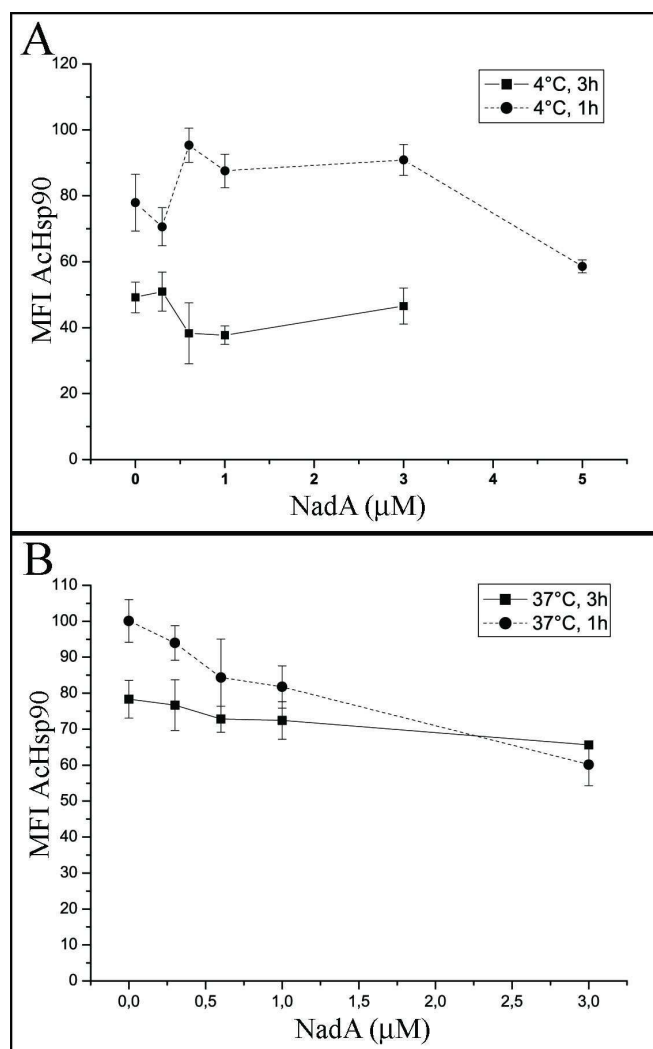


Figura 4.19: **Analisi dell'effetto dell'incubazione di sNadA a 4 e 37°C sulla Hsp90 superficiale.**

Analisi mediante citofluorimetria di flusso di monociti umani incubati 1 e 3h a 4 e 37°C con sNadA e successivamente trattati con Ac anti-Hsp90 C terminale e AcII-PE. I valori medi di fluorescenza si riferiscono ad un esperimento eseguito in triplo.

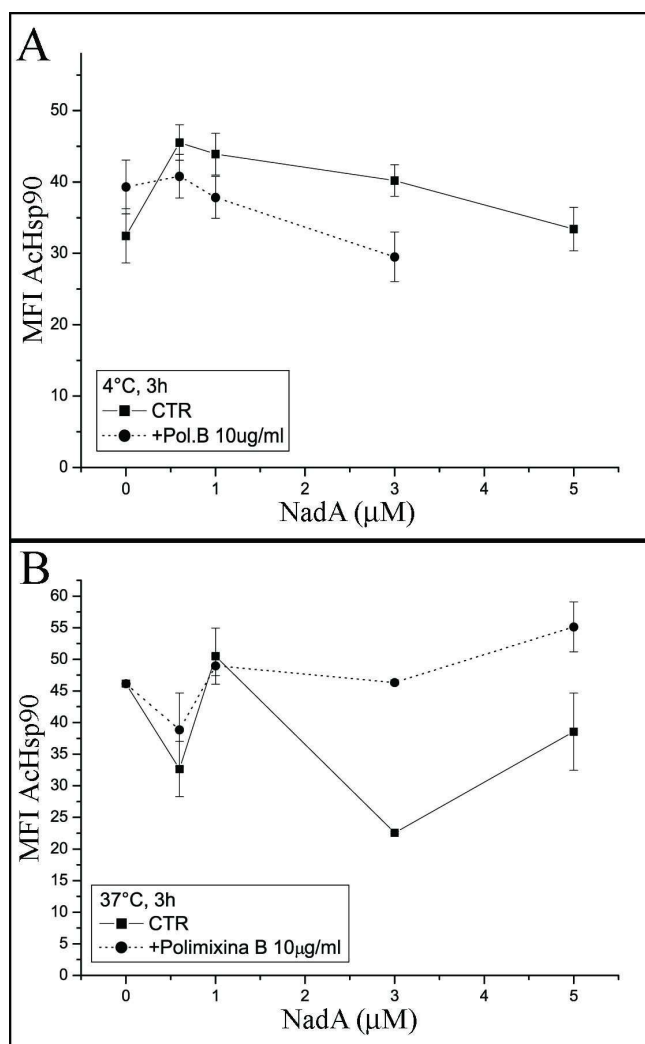


Figura 4.20: **Analisi dell'effetto della Polimixina B nella competizione di sNadA sulla rilevazione di Hsp90 superficiale.**

Monociti umani sono stati incubati a 4 e 37°C per 3h con sNadA con o senza Polimixina B, poi con Ac anti-Hsp90 C terminale e AcII-PE. I valori medi di fluorescenza si riferiscono ad un esperimento eseguito in triplo.

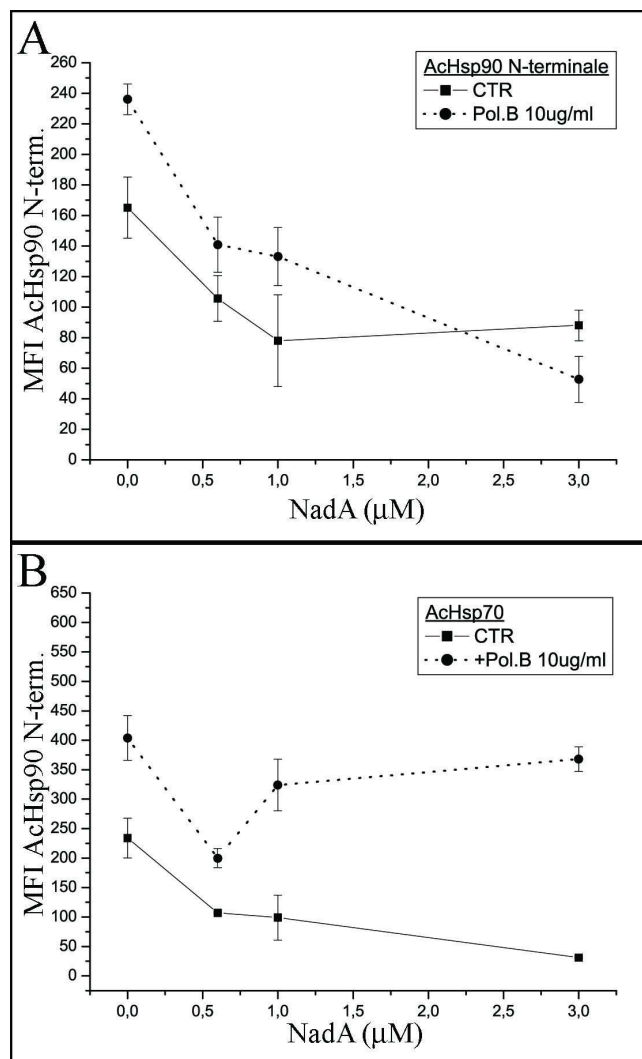


Figura 4.21: Analisi dell'effetto di sNadA e Polimixina B sul riconoscimento superficiale di Hsp70 e di Hsp90 da Ac diretti all'N-terminale.

Monociti umani sono stati incubati 3h a 37°C con sNadA più o meno Polimixina B, poi trattati con Ac anti-Hsp90 N-terminale (A) e Ac anti-Hsp70 (B) e con AcII-PE. I dati si riferiscono ad un esperimento condotto in triplo.

le evento infatti non si verifica invece a 4°C, condizione in cui la membrana cellulare si trova in una forma rigida e le molecole in essa contenute non sono in grado di muoversi e formare associazioni o complessi con altre molecole, come invece normalmente succede in condizioni fisiologiche. Dato che la presenza della Polimixina B, come dimostrato dagli esperimenti con l'anticorpo anti-Hsp90 C terminale, sembra annullare questo effetto, si può ipotizzare che essa interferisca con l'associazione che determina questo calo.

Inoltre visto che questo si riscontra utilizzando l'anticorpo al C-terminale ma non quello all'N-terminale, si potrebbe supporre che la porzione di Hsp90 interessata all'associazione con la Polimixina B e alla produzione dell'effetto osservato, si trovi al C-terminale della proteina, ma questa ipotesi deve essere ulteriormente indagata eseguendo altri esperimenti.

Per quanto riguarda l'Hsp70, i dati ottenuti fanno ipotizzare che possa anch'essa far parte di un complesso di membrana con Hsp90 e NadA, in cui di nuovo la Polimixina B potrebbe avere un ruolo di inibizione nell'associazione di queste molecole, lo studio di tale effetto dovrebbe essere però approfondito tramite esperimenti biochimici.

4.2.6 Citochine

Da esperimenti condotti in precedenza nel laboratorio, si è osservato che monociti incubati per 24 ore con sNadA inducono la produzione delle citochine IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-6, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-10, e le chemochine IL-8, MCP-1, MIP1 α , IP-10, RANTES e EOTAXIN.

Partendo da queste osservazioni e dalla deduzione che l'associazione NadA-Hsp90 non sia di tipo recettoriale, ma abbia invece altre funzioni, si è voluto indagare il profilo di espressione di citochine e chemochine indotto da questa associazione.

Monociti umani sono stati incubati per 24 ore a 37°C con sNadA in presenza o meno di AcHsp90 C-terminale oppure pre-incubati con AcHsp90 C-terminale e successivamente incubati per 24 ore a 37°C con sNadA. Quindi i supernatanti di coltura sono stati analizzati con un kit Panomix che ha permesso la simultanea analisi di 22 citochine.

Le principali citochine prodotte, all'interno del pannello analizzato, sono risultate essere: IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN γ , GM-CSF, TNF α e MCP-1. Dai grafici, riportati in fig. 4.22, si può vedere come l'anticorpo anti-Hsp90 C-terminale, quando co-incubato con sNadA, nella maggior parte delle citochine ha un effetto sinergico con la proteina meningococcica, inducendo

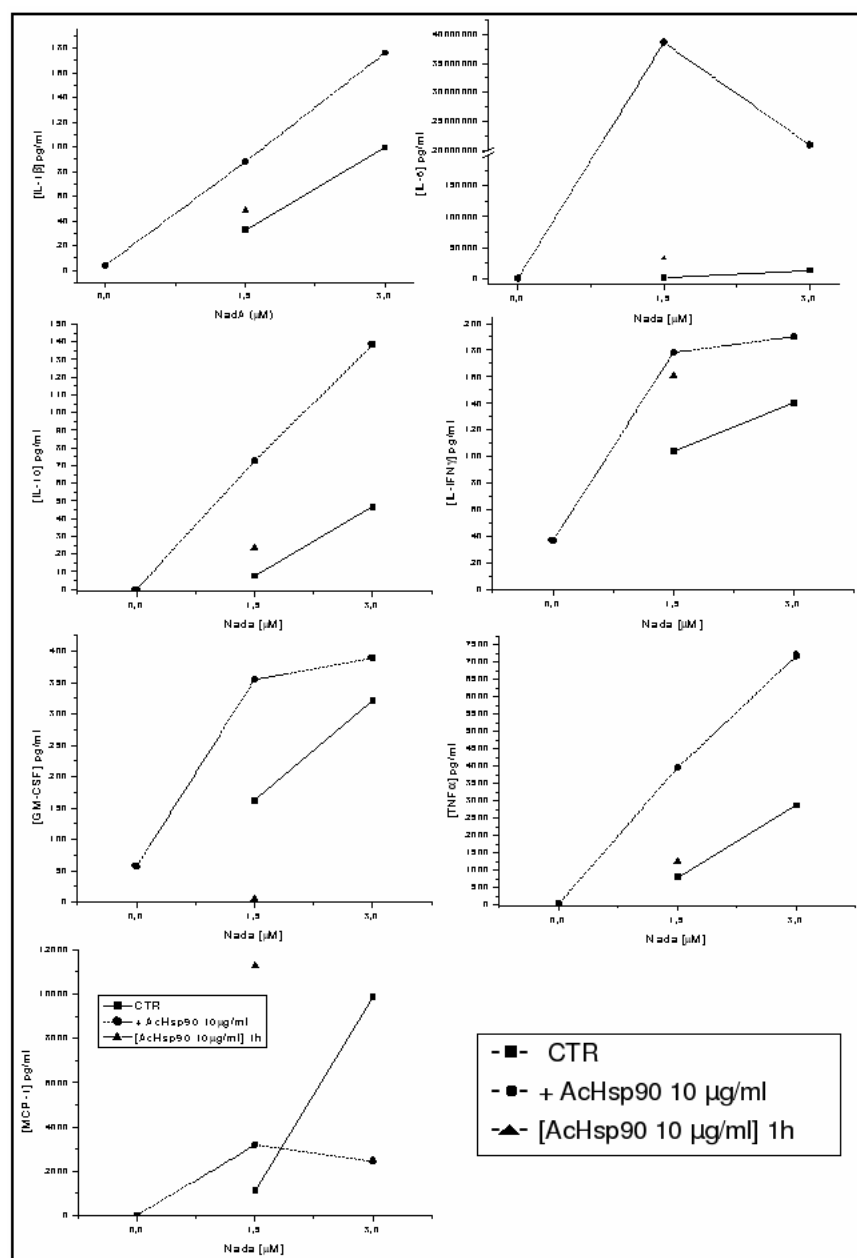


Figura 4.22: Analisi della secrezione di citochine in monociti stimolati con Ac anti-Hsp90.

Analisi mediante saggio di detezione multipla Bioplex dei supernatanti di coltura di monociti stimolati 24h con sNadA (quadrato), Ac anti-Hsp90 (cerchio) e cellule pre-incubate 1h con Ac anti-Hsp90 e poi trattate con sNadA (triangolo).

una produzione di citochine molto maggiore rispetto a quella data dall'incubazione con la sola proteina, al contrario se incubato da solo con le cellule non induce produzione di citochine.

Diverso è invece l'effetto ottenuto nel caso in cui le cellule vengono trattate per un ora con l'anticorpo anti-Hsp90 C-terminale, e solo dopo siano incubate con sNadA, infatti in questo caso si ha una minore produzione di citochine, simile all'effetto dato dalla sola proteina meningococcica. Un'unica eccezione di tale effetto è la citochina MCP-1 che non mostra sinergia di AcHsp90 e sNadA e invece mostra una produzione elevata di citochine, incubando prima un'ora con Ac anti-Hsp90 e poi con sNadA.

Gli stessi esperimenti sono stati condotti anche con anticorpi contro Hsp90 N-terminale e Hsp70, ottenendo lo stesso effetto (dati non mostrati).

Questo risultato può essere spiegato dalla formazione di *cluster* fra Hsp90 e NadA sulla superficie cellulare, ipotizzati anche nell'analisi della diminuzione del riconoscimento superficiale di Hsp90 dovuta alla pre-incubazione con sNadA.

Ciò che ipotizziamo è che l'anticorpo anti-Hsp90 fungerebbe, con la sua capacità di aggregazione, da stimolatore e nello stesso tempo da stabilizzatore dei *cluster* che si formano sulla cellula fra sNadA e Hsp90.

Per capire se la Polimixina B avesse un effetto sulla produzione di citochine, monociti umani sono stati co-incubati a 37°C in presenza o meno di sNadA (1,5 e 3 μ M), Polimixina B 10 μ g/ml e anticorpi anti-Hsp90 C-terminale 10 μ g/ml. Dopo 24 ore di incubazione, sul mezzo di coltura delle cellule sono state quantificate, tramite analisi *bioplex*, le tre citochine più espresse e rappresentative dell'effetto visto in precedenza, TNF α , L'IL-6 e MCP-1.

Il TNF α è un mediatore della risposta della fase acuta, dotato di attività pro-infiammatoria e vasoattiva. Questa citochina agisce a livello endoteliale determinando un incremento dell'adesione leucocitaria, alterazione del flusso della circolazione sanguigna e permeabilizzazione vasale. Se secreta ad elevate concentrazioni, partecipa alla patologia meningococcica e allo *shock* setticemico, la cui gravità correla con i suoi livelli plasmatici.

L'IL-6 è una citochina coinvolta nella risposta di fase acuta, anche se possiede anche un effetto anti-infiammatorio inibendo la produzione di IFN- γ e aumentando quella di IL-10. Inoltre sembra essere un fattore essenziale nel controllo dello sviluppo delle APCs, in quanto sembra promuovere il differenziamento dei monociti preferibilmente verso un fenotipo macrofa-

gico, al contrario del GM-CSF che favorirebbe lo sviluppo di un fenotipo dendritico.

MCP-1 è invece una chemochina che agisce sulla chemiotassi e sull'attività delle cellule effettrici monocitiche e macrofagiche. Questa chemochina recluta i monociti nel sito di infezione favorendone il differenziamento verso un fenotipo macrofagico, inoltre è dotata di proprietà anti-infiammatorie sostenendo una risposta di tipo Th2.

Dai grafici riportati, fig. 4.23, si nota che la presenza della Polimixina B induce una diminuzione della produzione delle citochine rispetto alla secrezione dovuta alla sola proteina, inoltre è anche in grado di abbassare la stimolazione data dalla co-incubazione di sNadA e Ac anti-Hsp90. Questi grafici, considerando anche che la Polimixina B riesce ad annullare l'effetto di diminuzione del riconoscimento superficiale di Hsp90 dopo pre-incubazione con sNadA, confermano che essa legandosi a NadA e Hsp90 non permette a queste proteine di associarsi e quindi non permette la formazione di *cluster* sulla superficie e la relativa produzione sinergica di citochine.

Inoltre, essendo noto che le HSPs formano sulla superficie complessi con TLR 2 e 4, si è voluto indagare se al complesso NadA-AcHsp90 potessero partecipare anche i TLR. Sono stati testati quindi gli effetti di anticorpi bloccanti i TLR 2 e 4, poichè è noto che il blocco di questi TLR inibisce la produzione di IL-6 e $\text{TNF}\alpha$, che sono le due citochine maggiormente prodotte dalla co-incubazione sNadA e Ac anti-Hsp90.

Monociti umani sono stati pre-trattati 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi bloccanti i TLR 2 e 4, poi co-incubati a 37°C in presenza o meno di sNadA (1,5 e 3 μM), Polimixina B 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e anticorpi anti-Hsp90 C-terminale 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dopo 24 ore di incubazione, sono stati raccolti i supernanti su cui è stato eseguito un saggio *bioplex* delle tre citochine IL-6, $\text{TNF}\alpha$ e MCP-1.

Dalla fig. 4.24 si può vedere come la produzione di citochine non sia influenzata dall'anticorpo bloccante il TLR 2, invece bloccando il TLR 4 si ottiene una diminuzione fino al 50% della produzione di citochine da parte di NadA.

Infine per capire se TLR4-Hsp90 e NadA possano far parte di un unico complesso in membrana è stato condotto un esperimento in cui i monociti sono stati incubati con i tre fattori.

Dai risultati, fig. 4.25, si può vedere come la co-incubazione di NadA e Ac anti-Hsp90, che da sole danno la sinergia di legame già osservata, dopo pre-incubazione con l'anticorpo bloccante il TLR 4 determini una

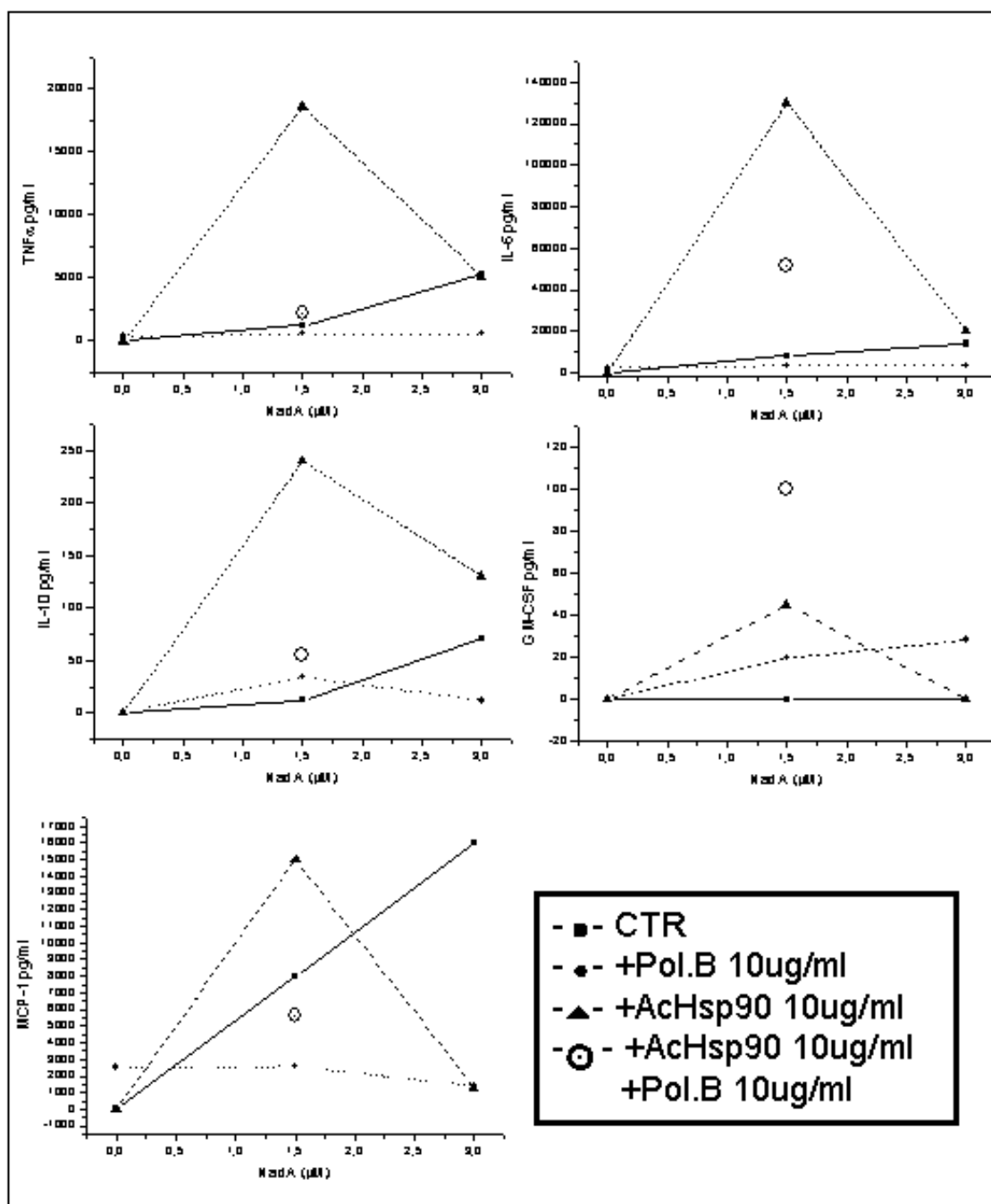


Figura 4.23: Analisi dell'effetto della Polimixina B nella secrezione di citochine in monociti stimolati con Ac anti-Hsp90.

Analisi mediante saggio di detezione multipla Bioplex dei supernatanti di coltura di monociti stimolati 24h con sNadA in assenza (quadrato) o presenza (cerchio) di Polimixina B, oppure cellule incubate con Ac anti-Hsp90 in assenza (triangolo) o presenza (cerchio grande con punto) di Polimixina B.

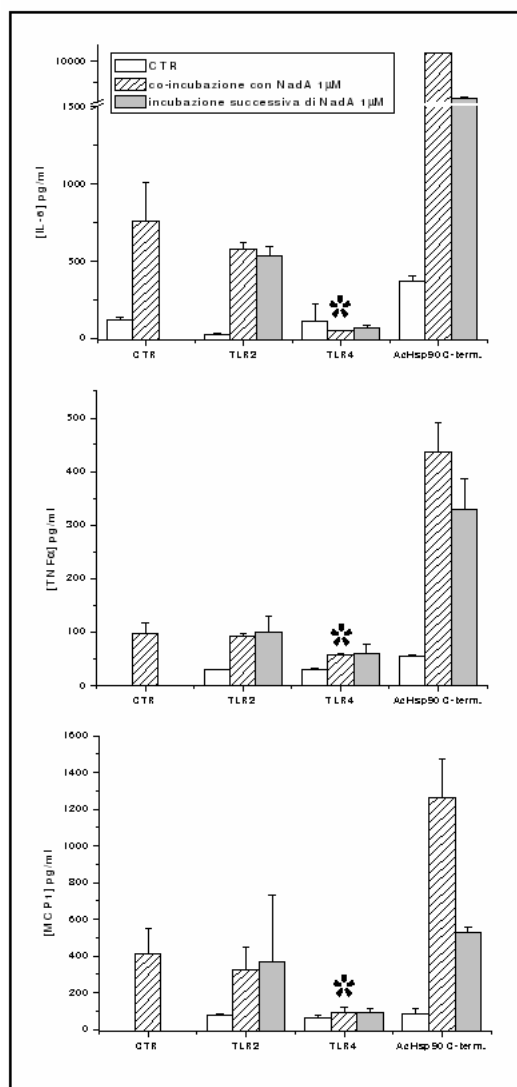


Figura 4.24: Analisi della produzione di citochine in presenza di anticorpi bloccanti i TLR 2 e 4.

Analisi mediante saggio di detezione multipla Bioplex dei supernatanti di coltura di monociti co- (istogramma a righe) o pre- (istogramma pieno) incubati 24h con sNadA in presenza di diversi stimoli. L'istogramma vuoto rappresenta il CTR di ogni trattamento.

produzione di citochine molto ridotta (come mostrato in figura dal simbolo *). Questo si verifica per il $\text{TNF}\alpha$ e per MCP-1, ma non coinvolge la citochina IL-6. Da ciò si può supporre che la produzione di $\text{TNF}\alpha$ e MCP-1 sia indotta tramite la via di segnalazione del recettore TLR 4 mentre IL-6 non sembra dipendere da questa via.

In un precedente lavoro [96] è riportata la presenza nell'uomo di una abbondante quantità di anticorpi anti-Hsp90 nel normale repertorio di IgG, che hanno la duplice funzione di riconoscere le Hsp90 umane come *self* e quelle microbiche come *non-self*. Dai risultati ottenuti in questo lavoro, si può supporre che incubando i monociti simultaneamente con la proteina meningococcica e con gli anticorpi anti-Hsp90, si mimi quello che succede *in vivo* durante l'infezione, cioè il sistema immunitario riconosce NadA come proteina estranea, inoltre la simultanea presenza di anticorpi anti-Hsp90 indicano la presenza di un'altra proteina batterica portando allo sviluppo di una risposta immunitaria più massiccia.

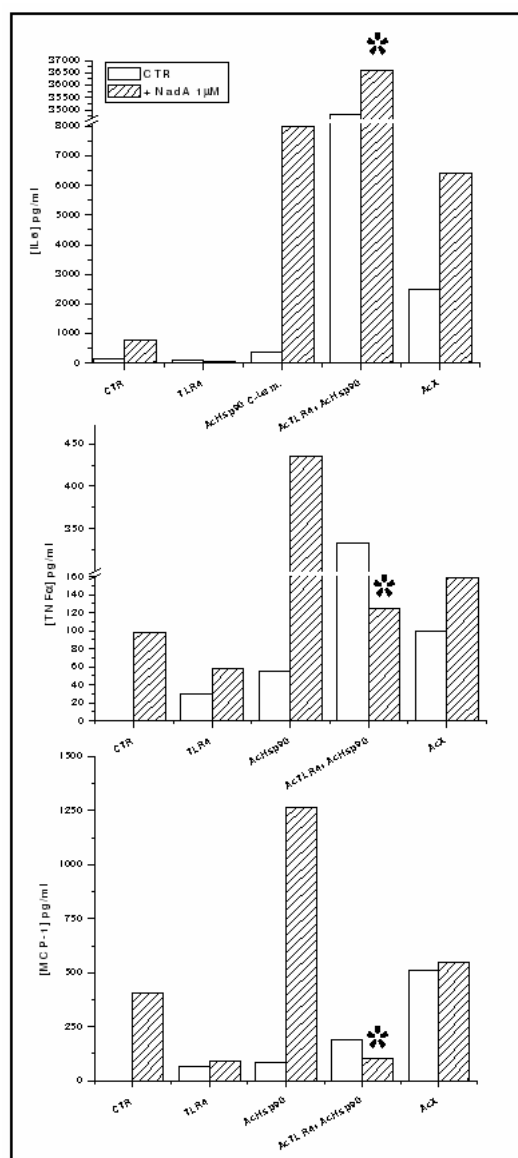


Figura 4.25: Analisi della produzione di citochine in presenza di anticorpi bloccanti i TLR 2 e 4 e Ac anti-Hsp90.

Analisi mediante saggio di detezione multipla Bioplex dei supernatanti di coltura di monociti pre-incubati con diversi stimoli (indicati alla base degli istogrammi) e quindi stimolati 24h con sNadA (istogramma a righe) o meno (istogramma vuoto).

Capitolo 5

DISCUSSIONE

Grazie a diversi approcci di tipo biochimico è stato possibile identificare, come possibile candidato ad essere il recettore di NadA sulle cellule ospite, una proteina di 90 KDa, che tramite tecniche di spettrometria di massa è stata identificata essere la proteina Hsp90 β umana.

Nonostante Hsp90 sia considerata una tipica proteina citoplasmatica con la principale funzione di *chaperone*, diversi lavori presenti in letteratura ormai riportano per questa, come per altre HSPs, anche delle funzioni nella stimolazione del sistema immunitario con localizzazione sulla superficie di diversi tipi cellulari, quali cellule tumorali o apoptotiche ma anche cellule Hela, monociti, macrofagi e cellule dendritiche.

Altri esperimenti hanno portato ad osservare che la Polimixina B, un antibiotico cationico anfipatico, che mostra caratteristiche analoghe alle cationicidine, piccole molecole ad attività antimicrobica contenute nei granuli dei monociti, è in grado di legarsi a sNadA e anche alla proteina Hsp90. Inoltre essa è capace di influire sulla loro associazione, tanto che lisati totali incubati in colonne precedentemente incubate con anticorpi anti-NadA e NadA in presenza di Polimixina B, determinano una diminuzione quasi totale dell'immunoprecipitazione di Hsp90.

Gli esperimenti di biochimica, condotti per trovare un possibile recettore per NadA, sono stati eseguiti su lisati totali di cellule Chang, cellule della congiuntiva umana, tali cellule sono utilizzate come modello sperimentale dato che il primo sito di colonizzazione di *Neisseria meningitidis* sono le cellule epiteliali della mucosa e dato che, in letteratura, è riportato il legame di NadA a queste cellule [52, 57]. I successivi esperimenti invece sono stati condotti su monociti umani isolati da *buffy coat*, in quanto queste cellule

sono i principali agonisti della risposta immunitaria innata, in modo da poter studiare, in uno stesso modello cellulare, sia la funzione recettoriale, che l'impatto indotto da questa associazione sul sistema immunitario.

Sono stati condotti degli esperimenti pre-incubando i monociti umani con diversi anticorpi anti-Hsp90, specifici per epitopi della proteina nella regione del C e N-terminale, con anticorpi anti-Hsp70 e anche utilizzando tali anticorpi contemporaneamente, e successivamente incubando sNadA-Alexa, allo scopo di monitorare variazioni del legame superficiale della proteina meningococcica. Dai dati ottenuti la presenza di questi anticorpi non influenza il legame di NadA ai monociti, evidenziando che l'associazione NadA-Hsp90 non ha una funzione recettoriale.

Da ciò si può speculare che se esiste un recettore specifico e unico per NadA, esso sia espresso a basse concentrazioni e abbia una bassa affinità, e quindi per riuscire ad identificarlo con tecniche di immunoprecipitazione, serva utilizzare quantità di NadA molto maggiori rispetto a quelle da noi utilizzate. Oppure è possibile che l'associazione con Hsp90 mascheri NadA durante la co-immunoprecipitazione, data la grande abbondanza di Hsp90 citoplasmatica nei lisati totali, e che quindi, occupata nel legame con la Hsp90, NadA non sia più libera di legarsi al suo recettore specifico, meno abbondante. Inoltre molte altre proteine di *Neisseria meningitidis* posseggono dei recettori specifici sulle cellule umane, si può supporre che queste proteine esplichino la funzione di legame alle cellule ospite, in modo da stabilire una prima associazione stabile, e che il legame di NadA in membrana sia un evento successivo a queste associazioni più specifiche, e che abbia una funzione di tipo effettrice.

I risultati ottenuti con le tecniche di co-immunoprecipitazione e *overlay* mostrano comunque chiaramente come ci sia una interazione specifica e stabile fra NadA e Hsp90, quindi sono stati eseguiti degli esperimenti pre-trattando i monociti umani con sNadA e successivamente rilevando il riconoscimento superficiale di Hsp90 da parte di anticorpi specifici. La presenza di sNadA determina una diminuzione del 40% del riconoscimento superficiale di Hsp90, che si riscontra alla maggiore concentrazione di NadA usata. Invece la presenza, in questi stessi esperimenti, di Polimixina B, ristabilisce la rilevazione superficiale di Hsp90 che si rileva in assenza di pre-incubazione con NadA.

Da ciò si può ipotizzare che NadA si leghi alla membrana delle cellule ospiti in modo completamente indipendente da Hsp90, ma che poi, una volta legata, vada a instaurare una associazione con la Hsp90 superficiale,

formando dei complessi stabili e compatti, tali da limitare il riconoscimento superficiale di Hsp90. Al contrario in presenza di Polimixina B questo effetto di diminuzione non si verifica, evidentemente legandosi a NadA e a Hsp90 la Polimixina B interferisce con il loro legame, non permettendo l'avvicinamento di queste proteine in membrana e la formazione di *cluster*: ciò è particolarmente evidenziato dal fatto che questo effetto si vede a 37°C e non a 4°C, condizione in cui la membrana cellulare si trova in una forma rigida e le molecole in essa contenute non sono in grado di muoversi e formare associazioni o complessi con altre molecole, come invece normalmente succede in condizioni fisiologiche (fig. 5.1).

Successivamente, si è quindi cercato di indagare la funzione di questa associazione, osservando il *pattern* di citochine prodotte incubando i monociti con sNadA, anticorpo anti-Hsp90 e anticorpi bloccanti il TLR 2 e 4, in presenza o meno di Polimixina B. Si è data precedenza all'analisi di questi TLRs perchè in letteratura è riportata la presenza di complessi sulla membrana cellulare fra Hsp90 e TLR 2 e/o 4, che portano a stimolazione del sistema immunitario e a produzione di citochine pro-infiammatorie, sia complessate con peptidi microbici, sia libere.

Quello che si è osservato da questi esperimenti è che la co-presenza dell'anticorpo anti-Hsp90 e di sNadA è in grado di attivare il sistema immunitario in modo sinergico, inducendo una abbondante produzione di IL-6, TNF α , e MCP-1 e moderate concentrazioni di IL-1 β , IL-10 e GM-CSF. Se invece le cellule sono pre-incubate con l'anticorpo anti-Hsp90 e solo successivamente con sNadA, non si verifica l'effetto di sinergia.

Questo fa ipotizzare che la presenza dell'anticorpo anti-Hsp90 abbia un effetto di aggregazione e consolidamento dell'associazione NadA-Hsp90. Inoltre si deve tenere presente che anche i microrganismi posseggono delle proteine omologhe delle HSPs che il sistema immunitario umano è in grado di riconoscere come estranee e contro le quali esso produce anticorpi specifici. Quindi l'effetto di sinergia che si osserva può essere dovuto al riconoscimento del sistema immunitario di NadA, come una proteina estranea, e inoltre la presenza di anticorpi contro Hsp90 stimoli maggiormente il sistema immunitario, a causa della simultanea presenza di questi fattori dovuti ad una infezione da microrganismo. Inoltre poichè la presenza di Polimixina B inibisce la produzione di citochine, questo dimostra che l'effetto di produzione di citochine sia specifico proprio dell'associazione Hsp90-NadA.

Per quanto riguarda il possibile coinvolgimento di TLR 2 e/o 4 nella via di trascrizione di questo segnale di allarme, l'effetto degli anticorpi bloccanti

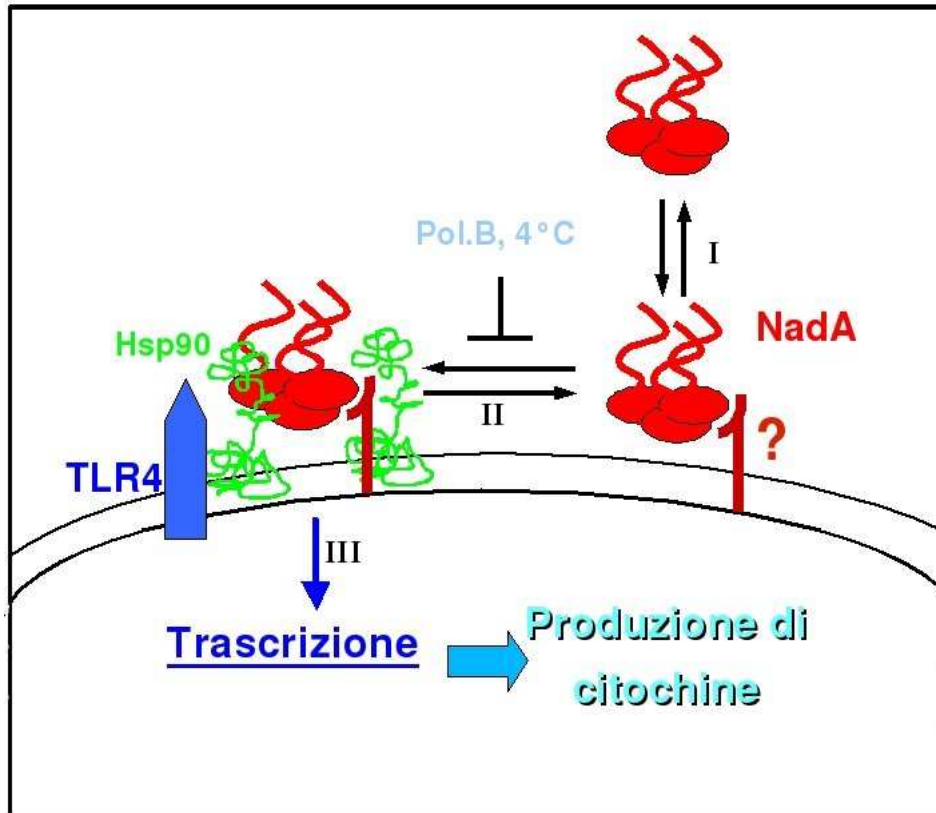


Figura 5.1: **Modello proposto.**

I, Ricezione cellulare di NadA da parte di un recettore non noto; II, Avvicinamento e successiva associazione sulla membrana cellulare di NadA e Hsp90 a formare un complesso NadA-Recettore-Hsp90-TLR 4, la cui formazione è inibita da Polimixina B o dalle basse temperature; III, Trascrizione del segnale all'interno della cellula con produzione di citochine e chemochine.

il TLR 2 e 4 determina la diminuzione della produzione di $\text{TNF}\alpha$ e MCP-1, sia indotta dall'incubazione della sola NadA, sia di quella prodotta dalla co-incubazione di Hsp90-NadA.

Quello che si può ipotizzare è che nei primi stadi della risposta immunitaria, la presenza di sNadA, dei *cluster* che essa forma con Hsp90 umane espresse sulla superficie dei monociti e la presenza di anticorpi anti-Hsp90 inducano la produzione di $\text{TNF}\alpha$ e MCP-1 che agiscono come primi fattori allertando il sistema immunitario della presenza di più agenti esterni presenti in contemporanea. Queste citochine determinano incremento dell'adesione leucocitaria, alterazione del flusso della circolazione sanguigna, permeabilizzazione vasale, inoltre reclutano i monociti nel sito di infezione e favoriscono un differenziamento verso un fenotipo macrofagico.

Bibliografia

- [1] Verheul A. F. M., H. Snippe and J. T. Poolman. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential component. *Microbiol. Rev.* 1993;57(1):34-49
- [2] Pollard J. A. and C. Frasch . Development of natural immunity to *Neisseriameningitidis* . *Vaccine* 2001; 19:1327-1346
- [3] Van Deuren M., P. Brandtzaeg and J.V.M. Van der Meer. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000;13(1):144-166
- [4] Frasch C.E., W.D. Zollinger and J.T. Poolman. Serotype antigens of *Neisseriameningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev. Infect. Dis.* 1985;7:504-510
- [5] Virji M, Watt SM, Barker S, Makepeace K, Doyonnas R. The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* 1996 Dec;22(5):929-39.
- [6] de Vries FP, Cole R, Dankert J, Frosch M, van Putten JP. *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol.* 1998 Mar;27(6):1203-12.
- [7] Read RC, Zimmerli S, Broaddus C, Sanan DA, Stephens DS, Ernst JD. The (α 2 \rightarrow 8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. *Infect Immun.* 1996 Aug;64(8):3210-7.
- [8] McNeil G, Virji M. Phenotypic variants of meningococci and their potential in phagocytic interactions: the influence of opacity proteins,

- pili, PilC and surface sialic acids. *Microb Pathog.* 1997 May;22(5):295-304.
- [9] Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
- [10] Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 1990;8:253-78.
- [11] Al-Bader T, Christodoulides M, Heckels JE, Holloway J, Semper AE, Friedmann PS. Activation of human dendritic cells is modulated by components of the outer membranes of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 2003 Oct;71(10):5590-7.
- [12] Sprong T, Stikkelbroeck N, van der Ley P, Steeghs L, van Alphen L, Klein N, Netea MG, van der Meer JW, van Deuren M. Contributions of *Neisseria meningitidis* LPS and non-LPS to proinflammatory cytokine response. *J Leukoc Biol.* 2001 Aug;70(2):283-8.
- [13] Vogel U., and M. Frosch. Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol. Microbiol.* 1999;32(6):1133-1139
- [14] Plant L, Sundqvist J, Zughaier S, Lökvist L, Stephens DS, Jonsson AB. Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 2006 Feb;74(2):1360-7.
- [15] Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta.* 2002 Sep;323(1-2):59-72.
- [16] Møller AS, Bjerre A, Brusletto B, Joø GB, Brandtzaeg P, Kierulf P. Chemokine patterns in meningococcal disease. *J Infect Dis.* 2005 Mar 1;191(5):768-75. Epub 2005 Jan 18.
- [17] Nassif X, Beretti JL, Lowy J, Stenberg P, O'Gaora P, Pfeifer J, Normark S, So M. Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 26;91(9):3769-73.

- [18] Nassif X. Interaction mechanisms of encapsulated meningococci with eucaryotic cells: what does this tell us about the crossing of the blood-brain barrier by *Neisseria meningitidis*? *Curr Opin Microbiol.* 1999 Feb;2(1):71-7.
- [19] Nassif X., C. Pujol, P. Morand and E. Eugene. Interaction of pathogenic *Neisseria* with host cells. It is possible to assemble the puzzle? *Mol. Microbiol.* 1999;32(6):1124-1132.
- [20] Kim K.S. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nature rev.* 2003;4:376-385.
- [21] Koilb-Maurer A., A. Unkmeir, U. Kammerer, C. Hubner, T. Leimbach, A. Stade, E. Kampgen, M. Frosch, and G. Dietrich. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect. Immun.* 2001;69(12):6912-6922.
- [22] Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Lefkowitz L, Cartter ML, Danila R, Cieslak P, Shutt KA, Popovic T, Schuchat A, Harrison LH, Reingold AL. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. *J Infect Dis.* 1999 Dec;180(6):1894-901.
- [23] Cartwright K, Noah N, Peltola H; Meningococcal Disease Advisory Board. Meningococcal disease in Europe: epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines. Report of a European advisory board meeting Vienna, Austria, 6-8 October, 2000. *Vaccine.* 2001 Aug 14;19(31):4347-56.
- [24] Greenwood B. Editorial: 100 years of epidemic meningitis in West Africa - has anything changed? *Trop Med Int Health.* 2006 Jun;11(6):773-80.
- [25] Girard MP, Preziosi MP, Aguado MT, Kieny MP. A review of vaccine research and development: meningococcal disease. *Vaccine.* 2006 May 29;24(22):4692-700. Epub 2006 Mar 31.
- [26] Decosas J, Koama JB. Chronicle of an outbreak foretold: meningococcal meningitis W135 in Burkina Faso. *Lancet Infect Dis.* 2002 Dec;2(12):763-5.

- [27] Lancellotti M, Guiyoule A, Ruckly C, Hong E, Alonso JM, Taha MK. Conserved virulence of C to B capsule switched *Neisseria meningitidis* clinical isolates belonging to ET-37/ST-11 clonal complex. *Microbes Infect.* 2006 Jan;8(1):191-6. Epub 2005 Aug 15.
- [28] Kimmel SR. Prevention of meningococcal disease. *Am Fam Physician.* 2005 Nov 15;72(10):2049-56.
- [29] Brandtzaeg P., A. Halstensen, P. Kierulf, T. Espevik and A. Waage. Molecular mechanisms in the compartmentalized inflammatory response presenting as meningococcal meningitis or septic shock. *Microb. Pathog.* 1992;12:423-431.
- [30] Tzeng Y.L. and D.S. Stephens. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microb. Infect.* 2000;687-700.
- [31] Morley S. L. and A. J. Pollard. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine* 2002;20:666-687.
- [32] Arévalo JM, Lorente JA, Fonseca R. Surgical treatment of extensive skin necrosis secondary to purpura fulminans in a patient with meningococcal sepsis. *Burns.* 1998 May;24(3):272-4.
- [33] van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Jan;13(1):144-66.
- [34] Quagliarello V. and W.M. Scheld. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology and progress. *N. Engl. J. Med.* 1992;327:864-872.
- [35] Quagliarello V. and W. M. Scheld. Treatment of bacterial meningitis. *N. Engl. J. Med.* 1997;336:708-716.
- [36] Diggle MA, Clarke SC. Detection and genotyping of meningococci using a nested PCR approach. *J Med Microbiol.* 2003 Jan;52(Pt 1):51-7.
- [37] de Filippis I, do Nascimento CR, Clementino MB, Sereno AB, Rebelo C, Souza NN, Riley LW. Rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid by one-step polymerase chain reaction of the *nspA* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 Feb;51(2):85-90.

- [38] Heyderman RS, Davenport V, Williams NA. Mucosal immunity and optimizing protection with meningococcal serogroup B vaccines. *Trends Microbiol.* 2006 Mar;14(3):120-4. Epub 2006 Feb 15.
- [39] Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ.* 2003 Feb 1;326(7383):262-6.
- [40] Weir E. Meningococcal disease: oh no, not another childhood vaccine. *CMAJ.* 2002 Apr 16;166(8):1064-6.
- [41] Harrison LH. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):142-64.
- [42] Troncoso G, Sánchez S, Criado MT, Ferreirós CM. Analysis of *Neisseria lactamica* antigens putatively implicated in acquisition of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002 Sep 6;34(1):9-15.
- [43] Findlow J, Taylor S, Aase A, Horton R, Heyderman R, Southern J, Andrews N, Barchha R, Harrison E, Lowe A, Boxer E, Heaton C, Balmer P, Kaczmarek E, Oster P, Gorringer A, Borrow R, Miller E. Comparison and correlation of neisseria meningitidis serogroup B immunologic assay results and human antibody responses following three doses of the Norwegian meningococcal outer membrane vesicle vaccine MenBvac. *Infect Immun.* 2006 Aug;74(8):4557-65. Erratum in: *Infect Immun.* 2007 Aug;75(8):4187.
- [44] Giuliani MM, Adu-Bobie J, Comanducci M, Aricò B, Savino S, Santini L, Brunelli B, Bambini S, Biolchi A, Capecchi B, Cartocci E, Ciocchi L, Di Marcello F, Ferlicca F, Galli B, Luzzi E, Massignani V, Serruto D, Veggi D, Contorni M, Morandi M, Bartalesi A, Cinotti V, Mannucci D, Titta F, Ovidi E, Welsch JA, Granoff D, Rappuoli R, Pizza M. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 18;103(29):10834-9.
- [45] Pizza M., V. Scarlato, V. Massignani, M.M Giuliani, B. Aricò, M. Comanducci, G.T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capecchi, C.L. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. StorniP. Zuo, M. Broecker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D.W. Hood,

- A.C. Jeffries, N.J. Saunders, D.M. Granoff, J.C. Venter, E.R. Moxon, G. Grandi and R. Rappuoli. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*. 2000;287(5459):1816-1820.
- [46] Tettelin H., N.J. Saunders, J. Heindelberg, A.C. Jeffries, K.E. Nelson, J.A. Eisen, K.A. Ketchum, D.W. Hood, J.F. Peden, R.J. Dodson, W.C. Nelson, M.L. Gwinn, R. Deboy, J.D. Peterson, E.K. Hickey, D.H. Haft, S.L. Salzberg, O. White, R.D. Fleischmann, B.A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D.S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E.B. Clark, M.D. Cotton, T.R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Masignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H.O. Smith, C.M. Fraser, E.R. Moxon, R. Rappuoli and J.C. Venter. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*. 2000;287(5459):1809-1815.
- [47] Mora M., D. Veggi, L. Santini, M. Pizza and R. Rappuoli. Reverse Vaccinology. *DDT*. 2003; 8(10):459-464.
- [48] R. Rappuoli. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*. 2001;19:2688-2691.
- [49] Adu-Bobie J., B. Capecchi, D. Serruto, R. Rappuoli and M. Pizza. Two years into reverse vaccinology. *Vaccine*. 2003;21:605-610.
- [50] Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. *J Exp Med*. 1969 Jun 1;129(6):1385-95.
- [51] Mora M, Donati C, Medini D, Covacci A, Rappuoli R. Microbial genomes and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Oct;9(5):532-6. Epub 2006 Aug 4.
- [52] Comanducci M., S. Bambini, B. Brunelli, J. Adu-Bobie, B. Aricò, B. Capecchi, M.M. Giuliani, V. Masignani, L. Santini, S. Savino, D.M. Granoff, D.A. Caugant, M. Pizza, R. Rappuoli, and M. Mora. Nad A, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med*. 2002;195(11):1445-1454.

- [53] Comanducci M, Bambini S, Caugant DA, Mora M, Brunelli B, Capecchi B, Ciucchi L, Rappuoli R, Pizza M. NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*. 2004 Jul;72(7):4217-23.
- [54] Mazzon C, Baldani-Guerra B, Cecchini P, Kasic T, Viola A, de Bernard M, Aricò B, Gerosa F, Papini E. 2007 IFN- γ and R-848 Dependent Activation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells by *Neisseria meningitidis* Adhesin A. *J Immunol*. Sep 15;179(6):3904-16.
- [55] Hoiczyk E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas and J. Hesse mann. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Morexella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J*. 2000;19(22):5989-5999.
- [56] Norheim G, Aase A, Caugant DA, Høiby EA, Fritzsønn E, Tangen T, Kristiansen P, Heggelund U, Rosenqvist E. Development and characterisation of outer membrane vesicle vaccines against serogroup A *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*. 2005 May 31;23(29):3762-74. Epub 2005 Mar 14.
- [57] Capecchi B, Adu-Bobie J, Di Marcello F, Ciucchi L, Massignani V, Taddei A, Rappuoli R, Pizza M, Aricò B. *Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. *Mol Microbiol*. 2005 Feb;55(3):687-98.
- [58] Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol*. 2006 Aug;80(2):267-77. Epub 2006 May 26.
- [59] Parker LC, Whyte MK, Vogel SN, Dower SK, Sabroe I. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists regulate CCR expression in human monocytic cells. *J Immunol*. 2004 Apr 15;172(8):4977-86.
- [60] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95.
- [61] Mukhopadhyay S, Peiser L, Gordon S. Activation of murine macrophages by *Neisseria meningitidis* and IFN-gamma in vitro: distinct

- roles of class A scavenger and Toll-like pattern recognition receptors in selective modulation of surface phenotype. *J Leukoc Biol.* 2004 Sep;76(3):577-84. Epub 2004 Jun 24.
- [62] Peiser L, Makepeace K, Plüddemann A, Savino S, Wright JC, Piz-za M, Rappuoli R, Moxon ER, Gordon S. Identification of *Neisseria meningitidis* nonlipopolysaccharide ligands for class A macrophage scavenger receptor by using a novel assay. *Infect Immun.* 2006 Sep;74(9):5191-9.
- [63] Fleer A. Cellular and humoral defence mechanisms against bacteria. *Paediatr Respir Rev.* 2000 Sep;1(3):235-40.
- [64] Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004 Oct;5(10):971-4.
- [65] Estabrook M.M., J.M. Griffiss, and G.A. Jarvis. Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. *Infect. Immun.* 1997;65:4436-4444.
- [66] Roggenkamp A., K. Ruckdeschel, L. Leitritz, R. Schmitt, and J. Heesemann. Deletion of amino acid 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect. Immun.* 1996;64(7):2506-2514.
- [67] Pilz D., T. Vocke, J. Heesemann, and V. Brade. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. *Infect. Immun.* 1992;60(1):189-195.
- [68] Martin P, van de Ven T, Mouchel N, Jeffries AC, Hood DW, Moxon ER. Experimentally revised repertoire of putative contingency loci in *Neisseria meningitidis* strain MC58: evidence for a novel mechanism of phase variation. *Mol Microbiol.* 2003 Oct;50(1):245-57.
- [69] Hammerschmidt S, Müller A, Sillmann H, Mühlenhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten J, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol.* 1996 Jun;20(6):1211-20.

- [70] Hume DA, The mononuclear phagocyte system. *Curr. Opin. Immunol.* 2006; 18:49-53.
- [71] Katoh N, Kraft S, Wessendorf JH, Bieber T. The high-affinity IgE receptor (FcεRI) blocks apoptosis in normal human monocytes. *J Clin Invest.* 2000 Jan;105(2):183-90.
- [72] Janelle ME, Flamand L. Phenotypic alterations and survival of monocytes following infection by human herpesvirus-6. *Arch Virol.* 2006 Aug;151(8):1603-14. Epub 2006 Feb 13.
- [73] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):677-86.
- [74] Shi C, Simon DI. Integrin signals, transcription factors, and monocyte differentiation. *Trends Cardiovasc Med.* 2006 Jul;16(5):146-52.
- [75] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953-64.
- [76] Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 1998 Aug;79(2):129-68.
- [77] Multhoff G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods.* 2007 Nov;43(3):229-37.
- [78] Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 2007 Jan;81(1):15-27.
- [79] Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 2002 Mar;23(3):130-5.
- [80] Multhoff G, Hightower LE. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones.* 1996 Sep;1(3):167-76.

- [81] Kovar J, Stybrova H, Novak P, Ehrlichova M, Truksa J, Koc M, Kriegerbeckova K, Scheiber-Mojdehkar B, Goldenberg H. Heat shock protein 90 recognized as an iron-binding protein associated with the plasma membrane of HeLa cells. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(1-2):41-6.3.
- [82] Triantafilou K, Triantafilou M, Ladha S, Mackie A, Dedrick RL, Fernandez N, Cherry R. Fluorescence recovery after photobleaching reveals that LPS rapidly transfers from CD14 to hsp70 and hsp90 on the cell membrane. *J Cell Sci.* 2001 Jul;114(Pt 13):2535-45.
- [83] Sidera K, Samiotaki M, Yfanti E, Panayotou G, Patsavoudi E. Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. *J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):45379-88.
- [84] Cicconi R, Delpino A, Piselli P, Castelli M, Vismara D. Expression of 60 kDa heat shock protein (Hsp60) on plasma membrane of Daudi cells. *Mol Cell Biochem.* 2004 Apr;259(1-2):1-7. Lancaster GI, Febbraio MA. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem.* 2005 Jun 17;280(24):23349-55.
- [85] Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 2005 Apr;79(8):4557-67.
- [86] Guerrero CA, Bouyssounade D, Zarate S, Isa P, Lopez T, Espinosa R, Romero P, Mendez E, Lopez S, Arias CF. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol.* 2002 Apr;76(8):4096-102.
- [87] Zarate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juarez KO, Camacho-Nuez M, Arias CF, Lopez S. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol.* 2003 Jul;77(13):7254-60.
- [88] Triantafilou K, Triantafilou M. Lipid raft microdomains: key sites for Coxsackievirus A9 infectious cycle. *Virology.* 2003 Dec 5;317(1):128-35.

- [89] Jin S, Song YC, Emili A, Sherman PM, Chan VL. JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2003 Mar;5(3):165-74.
- [90] Didier Cabanes, Sandra Sousa, Antonio Cebri, Marc Lecuit, Francisco Garca-del Portillo, and Pascale Cossart. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *EMBO J.* 2005 August 3; 24(15): 2827-2838.
- [91] Markus P. Radsak, Norbert Hilf, Harpreet Singh-Jasuja, Sibylla Braedel, Peter Brossart, Hans-Georg Rammensee, and Hansjoerg Schild. The heat shock protein Gp96 binds to human neutrophils and monocytes and stimulates effector functions. *Blood.* 2003 April 1(101-7): 2810-2815.
- [92] Prasadarao NV, Srivastava PK, Rudrabhatla RS, Kim KS, Huang SH, Sukumaran SK. Cloning and expression of the *Escherichia coli* K1 outer membrane protein A receptor, a gp96 homologue. *Infect Immun.* 2003 Apr;71(4):1680-8.
- [93] Suzue K, Young RA. Heat shock proteins as immunological carriers and vaccines. *EXS.* 1996;77:451-65.
- [94] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996 Mar 1;68(5):850-8.
- [95] Zhang L, Xie J, Wang X, Liu X, Tang X, Cao R, Hu W, Nie S, Fan C, Liang S. Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. *Proteomics.* 2005 Nov;5(17):4510-24.
- [96] Pashov A, Kenderov A, Kyurkchiev S, Kehayov I, Hristova S, Lacroix-Desmazes S, Giltiay N, Varamballi S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire. *Int Immunol.* 2002 May;14(5):453-61.

- [97] Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. Free Full Text Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem*. 1991 Sep 15;266(26):17707-12.
- [98] Byrd CA, Bornmann W, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pavletich N, Rosen N, Nathan CF, Ding A. Heat shock protein 90 mediates macrophage activation by Taxol and bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 11;96(10):5645-50.
- [99] Waage A, Halstensen A, Espevik T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet*. 1987 Feb 14;1(8529):355-7.
- [100] Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P, Espevik T. Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med*. 1989 Dec 1;170(6):1859-67.
- [101] Brouckaert P, Libert C, Everaerd B, Takahashi N, Cauwels A, Fiers W. Tumor necrosis factor, its receptors and the connection with interleukin 1 and interleukin 6. *Immunobiology*. 1993 Apr;187(3-5):317-29.
- [102] Ohga S, Aoki T, Okada K, Akeda H, Fujioka K, Ohshima A, Mori T, Minamishima I, Ueda K. Cerebrospinal fluid concentrations of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha, and interferon gamma in bacterial meningitis. *Arch Dis Child*. 1994 Feb;70(2):123-5.
- [103] Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*. 2002 Dec;39(9):531-6.
- [104] Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Aug;285(2):E433-7.
- [105] Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol*. 2000 Dec;1(6):510-4.

- [106] Omata N, Yasutomi M, Yamada A, Iwasaki H, Mayumi M, Ohshima Y. Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *J Immunol.* 2002 Nov 1;169(9):4861-6.