



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE

INDIRIZZO BIOLOGIA CELLULARE

CICLO XX

**VCC, citolisina di *Vibrio cholerae*, promuove
secrezione di cloruro dalle cellule intestinali e
produzione di citochine T_H2 nei mastociti**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore : Dr.ssa Marina de Bernard

Dottoranda: Diletta Arcidiacono

31 Gennaio 2008

INDICE

ABBREVIAZIONI

SUMMARY

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il colera	1
1.1.1 Epidemiologia	2
1.1.2 Caratteristiche cliniche	3
1.1.3 Trattamento terapeutico	4
1.2 <i>Vibrio cholerae</i>	5
1.2.1 Microbiologia	5
1.2.2 Metodi di identificazione	6
1.2.3 Patogenesi	7
1.2.4 Fattori di virulenza	8
1.2.4.1 Tossine	8
1.2.4.1.1 La tossina colerica (CT)	8
1.2.4.1.2 La tossina <i>zonula occludens</i> (Zot)	13
1.2.4.1.3 Enterotossina colerica accessoria (Ace)	13
1.2.4.1.4 <i>Vibrio cholerae</i> citolisina (VCC)	14
1.2.4.2 Fattori di colonizzazione	15
1.2.4.2.1 Il pilo corregolato alla tossina (TCP)	16
1.2.4.2.2 Flagelli e movimento	17
1.2.5 Ecologia	17
1.3 Vaccini	18
1.4 L'intestino e i mastociti	19
1.4.1 L'intestino: richiami di fisiologia	19
1.4.2 La barriera intestinale	21
1.4.3 I mastociti e la barriera intestinale	22
1.4.4 Riconoscimento dei microbi da parte dei mastociti	24
1.4.5 Riconoscimento di antigeni non patogeni da parte dei mastociti	26
1.4.6 L'abnorme attivazione dei mastociti danneggia la barriera intestinale	27
1.5 <i>Vibrio cholerae</i>, sistema immunitario innato e mediatori dell'infiammazione	28

2. MATERIALI E METODI	31
2.1 Materiali	31
2.2 Metodologie sperimentali utilizzate per lo studio dell'attività pro-secretoria di VCC	31
2.2.1 Linea cellulare Caco-2	31
2.2.2 Determinazione del cloruro intracellulare	32
2.2.3 Valutazione dell'attività vacuolizzante	34
2.2.4 Misurazione dell'attività deidrogenasica mitocondriale (<i>MTS assay</i>)	35
2.2.5 Esperimenti sui campioni di colon sigmoide umano: misura dei parametri elettrici	35
2.3 Metodologie sperimentali utilizzate per lo studio dell'attività pro-infiammatoria di VCC	38
2.3.1 Allestimento colture cellulari di BMMCs (bone marrow-derived mast cells)	38
2.3.2 Misurazione del calcio (Ca^{2+}) intracellulare	39
2.3.3 Rilevamento di citochine nei surnatanti	40
2.3.4 Misurazione dell'attività deidrogenasica mitocondriale (<i>MTS assay</i>)	41
2.3.5 Rilascio della beta-esosaminidasi	42
2.3.6 <i>Screening</i> dei recettori Toll-like	42
2.3.7 Estrazione di RNA dai BMMCs	43
2.3.8 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA	44
2.3.9 Real-time PCR	45
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	47
3.1 La VCC provoca un efflusso di cloruro dalle cellule intestinali umane Caco-2	47
3.2 VCC induce aumento della corrente di corto Circuito (I_{SC}, short circuit current) e diminuzione della resistenza transepiteliale (R_T) intestinale	50
3.3 La VCC stimola i BMMCs a produrre citochine	55
3.4 La VCC induce un aumento della concentrazione intracellulare di calcio nei BMMCs	57
3.5 Ruolo del calcio nel rilascio di citochine indotto dalla VCC	59

3.6 La VCC non induce degranolazione nei BMMCs	61
3.7 Effetto dell'inibizione delle correnti di cloruro sul rilascio di citochine indotto da VCC	62
3.8 Il meccanismo di attivazione dei BMMCs indotto dalla VCC è recettore-mediato	64
3.9 VCC è agonista del TLR2 (Toll-like receptor 2)	67
4. CONCLUSIONI	71
5. BIBLIOGRAFIA	75

ABBREVIAZIONI

5-HT	5-idrossi-triptamina o serotonina
A	Ampere
AC	Adenilato Ciclasi
Ace	enterotossina colerica accessoria
ADP-ribosio	adenosindifosfato-ribosio
cAMP	AMP ciclico (adenosina monofosfato ciclico)
cm	centimetro
CRAC	calcium release-activated calcium channels
CT	Tossina Colerica
Da	dalton
DIDS	4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid
EGTA	<u>E</u> thylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- <u>t</u> etraacetic acid
ENS	Sistema Nervoso Enterico
G _{M1}	monosialoganglioside
G _s	proteina G di tipo stimolatorio
GTP	guanosintrifosfato
GDP	guanosindifosfato
HA	emoagglutinina
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEK293	Human embryonic kidney 293
Igs	Immunoglobuline
IL-	Interleuchina-
IP ₃	Inositolo 1,4,5-trifosfato
IRAK	chinasi associata al recettore della IL-1
I _{sc}	corrente di corto circuito
kDa	chilodalton
LPS	lipopolisaccaride
LT	leucotriene
MCs	mast cells

mg	milligrammi
mM	millimolare
ms	millisecondi
mV	millivolt
MyD88	fattore 88 di Differenziamento Mieloide
μg	microgrammi
μm	micrometro
NAD	Nicotinammide Adenina Dinucleotide
nm	manometri
nM	nanomolare
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PI3-K	fosfatidilinosotolo3-chinasi
PLC	fosfolipasi C
pN	picoNewton
R _T	resistenza transepiteliale
SCF	Stem Cell Factor
SEM	Standard Error of Measurement
SOCs	store-operated calcium channels
TCBS	agar-Tiosolfato-Citrato-Bile-Saccarosio
TCP	Pilo Corregolato alla Tossina
T _H	T helper
T _m	Temperatura di melting
TNF	Tumor Necrosis Factor
TLRs	Toll-like Receptors
VCC	<i>Vibrio cholerae</i> citolisina
VIP	Peptide Intestinale Vasoattivo
V _T	differenza di potenziale transepiteliale
Zot	tossina <i>zonula occludens</i>

Summary

Cholera has long been considered a classic paradigm of a non-inflammatory toxigenic diarrhoea until *Vibrio cholerae* infection was found to induce a T_H2-type of immune profile and the recruitment of inflammatory cells in the intestinal mucosa (Mathan MM, 1995; Qadri F, 2000).

Recent reports indicate increased levels of inflammatory mediators in patients infected by *Vibrio cholerae* that occur in parallel with recruitment of innate immune cells, including mast cells and neutrophils, in the crypt and villus *lamina propria* (Qadri F, 2004).

Enteropathogenic *Vibrio cholerae* can elaborate different exotoxins: cholera toxin (CT), zonula occludens toxin and a membrane damaging toxin, referred to as haemolysin or *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC).

VCC is a water soluble toxin secreted as a 79 kDa inactive pro-hemolysin (Alm RA, 1988; Yamamoto K, 1990), which is proteolytically cleaved within its N-terminal part (Nagamune K, 1997) to generate the mature toxin of 63 kDa.

In cholesterol-and ceramides-rich membranes (Zitzer A, 1999) VCC forms heptameric channels, with a moderate anion preference, responsible for vacuolization and eventual lysis of several cell types in culture (Coelho A, 2000; Figueroa-Arredondo P, 2001; Moschioni M, 2002; Pantano S, 2006).

VCC is believed to contribute to the development of cholera diarrhoea (Ichinose Y, 1987).

On the basis of its channel property and considering that the majority of the diarrhogenic toxins affect chloride secretion in the intestine (Laohachai KN, 2003), we have investigated whether VCC was able to promote an efflux of chloride from intestinal epithelial cells.

We find that the hemolysin induces an efflux of chloride from intestinal epithelial cells; consequently it might either cause diarrhoea *per se*, in the non producing cholera toxin strains, or contribute to cause diarrhoea when the toxin is present.

Considering the recent demonstration of the abundance of mast cells in cholera patients and on the basis that no other bacterial factors have been identified as

Summary

immune modulator so far, we decided to address the possibility that VCC could be such a factor, by evaluating its ability in activating mucosal mast cells.

Here we suggest that VCC could contribute to the T helper 2 (T_H2) response seen in the natural infection; acting through TLR2, VCC enhances mast cells secretion of IL-4, IL-6 and TNF- α by 330-, 290- and 550-fold respectively.

Moreover, VCC-induced cytokine production is dependent on increased cytosolic Ca²⁺ and on the presence of the Src family kinases Lyn and Fyn, known to be required for Fc ϵ RI-dependent activation of mast cells.

These findings strongly suggest that VCC has a pro-inflammatory activity promoting a T_H2-type immune profile.

Sommario

Il colera è stato da sempre considerato un classico esempio di diarrea tossigenica di tipo non infiammatorio, fino a quando non è stato dimostrato che l'infezione indotta da *Vibrio cholerae* in realtà porta al reclutamento di cellule infiammatorie a livello della mucosa intestinale (Mathan MM, 1995).

Il patogeno intestinale *Vibrio cholerae* è in grado di produrre diverse esotossine: la tossina colerica (CT), la tossina *zonula occludens* ed una tossina in grado di danneggiare le membrane chiamata emolisina o citolisina di *Vibrio cholerae* (VCC).

VCC è una proteina idrosolubile secreta come pro-emolisina inattiva, un monomero di circa 79 kDa (Alm RA, 1988; Yamamoto K, 1990). Successivamente viene attivata proteoliticamente attraverso la rimozione, all'estremità N-terminale, di un dominio di 15 kDa (Nagamune K, 1997), dando così origine ad una VCC matura di circa 63 kDa.

Quest'ultima è capace di legarsi alle membrane lipidiche, ricche di colesterolo e ceramidi (Zitzer A, 1999), e di oligomerizzare formando canali eptamerici, preferenzialmente permeabili agli anioni (Pantano S, 2006).

In diverse linee cellulari, questo poro è responsabile di alcuni effetti citotossici della VCC come la lisi cellulare ed un'estesa vacuolizzazione (Coelho A, 2000; Figueroa-Arredondo P, 2001; Moschioni M, 2002).

La letteratura riporta alcune evidenze che lasciano intendere che VCC possa avere un ruolo nella patogenesi del colera (Patrino E, 1999; Bidinost C, 2004; Saka HA, 2008). Data la sua abilità a formare canali e considerato che la maggior parte delle tossine diarrogeniche influenzano la secrezione di cloruro nell'intestino (Laohachai KN, 2003), abbiamo ritenuto opportuno verificare se VCC fosse in grado di indurre efflusso di cloruro dalle cellule epiteliali intestinali.

I nostri risultati suggeriscono che l'emolisina, attraverso la secrezione di cloruro, possa avere un ruolo determinante nella manifestazione diarroica che si presenta in seguito ad infezione indotta da ceppi del vibrione che non producono la classica tossina colerica. e che possa comunque dare il suo contributo nei casi in cui il vibrione fosse in grado di produrle entrambe.

Recenti lavori riportano un aumento dei livelli di mediatori infiammatori nei pazienti infettati da *Vibrio cholerae*, che si verificano parallelamente al reclutamento di cellule del sistema immunitario innato, come mastociti e neutrofili, nella *lamina propria*, a livello delle cripte e dei villi della mucosa intestinale (Qadri F, 2004). Oltre alla tossina colerica (Leal-Berumen I, 1996; Rocha MF, 2003), in questi meccanismi potrebbero essere coinvolti anche altri fattori prodotti dal batterio.

Al fine di verificare il potenziale ruolo di VCC in questo processo abbiamo esaminato il suo effetto sui BMDCs (bone marrow-derived mast cells) murini.

I nostri risultati suggeriscono che VCC possa contribuire alla risposta di tipo T_H2 che si verifica nell'infezione naturale; agendo attraverso il recettore Toll-like 2 VCC è infatti in grado di indurre nei mastociti la secrezione di IL-4, IL-6 e TNF- α , rispettivamente di 330, 290 e 550 volte rispetto alle cellule controllo.

Inoltre, la produzione di citochine indotta da VCC è dipendente dall'aumento della concentrazione citosolica del calcio e dalla presenza delle tirosin chinasi Lyn e Fyn, richieste nel meccanismo classico di attivazione mastocitaria mediato dal recettore, ad alta affinità per le IgE, Fc ϵ RI.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il colera

Il colera è una patologia infettiva acuta, endemica ed epidemica, provocata dal batterio *Vibrio cholerae*.

E' caratterizzato da violente scariche diarroiche, (liquide, incolori, contenenti flocculi di muco e cellule epiteliali oltre ad una elevatissima quantità di vibrioni) e vomito, responsabili di un elevato grado di disidratazione accompagnato da dolori muscolari, ipotensione, tachicardia, anuria e shock ipovolemico.

Il colera asiatico, così talvolta viene chiamato, trova ancora oggi il suo principale focolaio endemico in India, nella regione del delta del Gange. E' da qui che nel 1817 è partita la prima pandemia colerica che ha coinvolto la Cina e le regioni meridionali della Russia. Una seconda pandemia (1826) ha colpito tutta la Russia e l'Europa occidentale, facendo la sua prima comparsa in Italia nel 1832.

A quei tempi si pensava addirittura che il colera si trasmettesse tramite esalazioni, "miasmi"; nel 1849 uno studio epidemiologico condotto da John Snow a Londra dimostrava l'associazione tra la malattia e l'ingestione di acqua contaminata, ancor prima che venisse dimostrata l'esistenza del batterio, identificato per la prima volta a Firenze da Filippo Pacini nel 1854 ed isolato e coltivato per la prima volta da Robert Kock nel 1884 a Calcutta durante la quinta pandemia (Sack DA, 2004).

L'attuale pandemia, la settima, ha coinvolto quasi tutto il mondo.

E' partita dall'Indonesia, ha colpito l'India nel 1964; nel 1970 ha raggiunto l'Africa e l'Europa meridionale diffondendosi poi, nel 1991, fino in Sud America. Il vibrione responsabile, biotipo El Tor, è stato isolato per la prima volta, nel 1905, da un gruppo di pellegrini indonesiani, in viaggio verso la Mecca, nella stazione di quarantena del villaggio di El Tor, in Egitto.

Il biotipo El Tor ed il Bengal, di più recente scoperta, continuano a causare grandi epidemie in India ed in Bangladesh dove, nella primavera del 2002, sono stati ritenuti i responsabili di circa 30000 casi di colera.

1.1.1 Epidemiologia

Il colera si trasmette per via oro-fecale, attraverso ingestione di acqua o cibi contaminati.

Nei paesi dove la malattia è endemica, in Bangladesh ad esempio, l'epidemia è pressochè stagionale, più precisamente si verifica prima e dopo la stagione dei monsoni (Sack RB, 2003). Il picco di diffusione sembra essere correlato ad una maggiore capacità di crescita dei vibrioni durante la calda stagione.

La severità dell'infezione dipende da molti fattori, primo fra tutti il sistema immunitario a livello intestinale, sicuramente la carica batterica ingerita, ma anche l'adeguatezza della barriera acida gastrica ed il gruppo sanguigno del paziente; infatti, per ragioni non ancora note, nei soggetti con gruppo sanguigno O la probabilità che i vibrioni El Tor possano indurre un'infezione severa è molto più elevata rispetto ad un paziente avente gruppo sanguigno differente (Clemens JD, 1989). Questa suscettibilità al colera potrebbe spiegare il perché nelle regioni del delta del Gange il numero di individui aventi gruppo O è veramente esiguo.

Il pH dello stomaco gioca un ruolo non indifferente. Infatti, mentre la quantità di batteri in grado di indurre una severa infezione nei volontari sani è pari a circa 10^8 , nel caso di co-somministrazione con antiacidi la carica batterica in grado di instaurare lo stesso grado di infezione è notevolmente ridotta (10^5).

Nell'infezione naturale la carica batterica che provoca colera è effettivamente più bassa di quella in grado di indurre la patologia sul volontario sano ed infatti la maggior parte dei pazienti infetti presenta una minore secrezione acida gastrica (Sack GH Jr, 1972).

La qualità della fonte acquifera accessibile alla popolazione è senza dubbio determinante nella diffusione della malattia. In alcune città del Perù, ad esempio, la via principale di diffusione dei vibrioni è l'acquedotto municipale, con conseguenti implicazioni su una grande fetta di popolazione urbana. Nelle aree rurali, invece, dove la principale fonte di approvvigionamento idrico è rappresentata dai fiumi, la numerosità dei casi cresce a dismisura tra le popolazioni che vivono nei dintorni dei corsi d'acqua.

Altri casi di contagio, fortunatamente molto sporadici, si possono verificare durante banchetti funebri come conseguenza di pratiche funeree tradizionali ma

assolutamente antiigieniche, ancora in uso in alcuni paesi del mondo (Gunnlaugsson G, 1998).

1.1.2 Caratteristiche cliniche

Dopo un periodo di incubazione, da diciotto ore a cinque giorni, i primi sintomi, diarrea acquosa e vomito, sono generalmente repentini. Caratteristica distintiva del colera è l'evacuazione indolore di grandi volumi (0,5-1 litri/ora) di feci somiglianti ad acque di riso (**Figura 1.1**) ed emananti un forte odore di pesce.



Figura 1.1. Tipiche feci ad acqua di riso di un paziente affetto da colera.

Il vomito è generalmente chiaro, acquoso ed alcalino.

Questa massiva perdita d'acqua provoca una severa disidratazione i cui segni consistono nel crollo della pressione sanguigna (non misurabile), polso assente, pelle secca, occhi incavati, dita delle mani e dei piedi raggrinzite (come dopo una lunga immersione in acqua), assenza della minzione.

Inizialmente i pazienti sono molto irrequieti, agitati ed estremamente assetati, ma con il progredire dello shock diventano apatici e possono perdere conoscenza. Molti pazienti hanno anche il respiro affannoso, segni respiratori di acidosi metabolica.

La perdita di fluidi può essere talmente rapida da portare il paziente alla morte nel giro di poche ore. Le complicazioni che possono insorgere nel colera sono generalmente dovute a trattamenti terapeutici inadeguati; ad esempio, l'insorgenza di una insufficienza renale acuta, così come un forte squilibrio elettrolitico che porta soprattutto ad ipocaliemia, è attribuibile ad una protratta ipotensione dovuta ad una somministrazione di fluidi inappropriata.

La maggior parte dei pazienti ha una bassa concentrazione ematica di glucosio ed alcuni una grave ipoglicemia. Queste complicazioni risultano particolarmente pericolose quando insorgono nelle pazienti incinte poiché una ridotta perfusione della placenta può seriamente mettere a rischio la gravidanza (Khan PK, 1969).

Molto comuni sono anche forti crampi muscolari alle braccia ed alle gambe, probabilmente dovuti all'esagerato squilibrio elettrolitico, che comunque scompaiono dopo qualche ora dall'inizio del trattamento.

1.1.3 Trattamento terapeutico

In assenza di un adeguato trattamento, il colera grave è letale nel 50% dei casi. Il trattamento è molto semplice ed efficace e consiste nel rimpiazzare i fluidi alla stessa velocità con la quale vengono persi.

Inizialmente la somministrazione dei fluidi deve essere sufficientemente rapida da permettere il recupero della volemia; le successive somministrazioni devono rimpiazzare le continue perdite.

Per facilitare la diagnosi e quindi la terapia, sulla base dei segni clinici e dei sintomi, si possono distinguere tre stadi di disidratazione: assente, moderato e grave. La disidratazione non è evidente se le perdite del paziente non superano il 5% del suo peso corporeo.

Ai pazienti con grave disidratazione, quelli nei quali le perdite corrispondono almeno al 10% del loro peso corporeo, deve essere somministrata urgentemente una soluzione poli-elettrolitica per via endovenosa, seguita poi da somministrazioni orali di soluzioni reidratanti di mantenimento. Nei casi meno gravi invece sia le soluzioni reidratanti sia quelle di mantenimento vengono somministrate esclusivamente per via orale.

La terapia reidratante ha quindi lo scopo di rimpiazzare il deficit di fluidi, correggere l'acidosi metabolica e l'ipocaliemia e rimpiazzare di continuo la perdita di liquidi.

Nei casi clinicamente significativi il trattamento reidratante deve essere accompagnato da una terapia antibiotica che accorcia il decorso della malattia, riduce la perdita di fluidi, consentendo quindi di somministrare volumi più ridotti di soluzioni reidratanti. Nella maggior parte dei casi la doxiciclina è l'antibiotico di prima scelta (agli adulti si somministrano 300 mg in singola dose).

Durante l'epidemia si dovrebbe testare la sensibilità all'antibiotico su un campione rappresentativo di pazienti, al fine di selezionare il più appropriato.

Nelle epidemie causate da ceppi resistenti alle tetracicline si sono infatti rivelati clinicamente efficaci eritromicina, cotrimoxazolo, ciprofloxacina ed azitromicina.

1.2 *Vibrio cholerae*

1.2.1 Microbiologia

Vibrio cholerae è un batterio Gram-negativo, ossidasi-positivo, asporigeno, aerobio-anaerobio facoltativo, avente forma di bastoncino curvo, provvisto di un singolo flagello, ad un polo della cellula, in grado di conferirgli motilità (**Figura 1.2**). E' in grado di fermentare alcuni zuccheri, come maltosio, saccarosio, destrosio e mannitolo, producendo acidi.

La specie *Vibrio cholerae* comprende una notevole varietà di sierogruppi definiti in base alle caratteristiche dell'antigene somatico "O", un polisaccaride termostabile, costituente dello strato lipopolisaccaridico della membrana cellulare esterna. Il sierogruppo O1 include i ceppi responsabili del colera epidemico ed è ulteriormente suddiviso in due biotipi: Classico, responsabile delle sei pandemie verificatesi tra il 1817 ed il 1923, ed El Tor, responsabile della settima pandemia iniziata nel 1961 (Barua D, 1992).

Nel 1992 l'epidemia che ha coinvolto l'India ed il Bangladesh ha visto protagonista il sierogruppo emergente, *Vibrio cholerae* O139 biotipo Bengal, diffusosi talmente velocemente da indurre alcuni ricercatori a parlare di un'ottava

pandemia in corso. Ceppi, ai quali ci si riferisce come non O1- non O139, anche se non coinvolti in epidemie coleriche, possono risultare patogeni (Morris JG Jr, 1990). Solo raramente associati a disturbi gastroenterici, sono invece in grado di causare gravi infezioni extraintestinali fino a portare ad una sepsi acuta soprattutto individui immunosoppressi o con disturbi epatici (Ko WC, 1998).

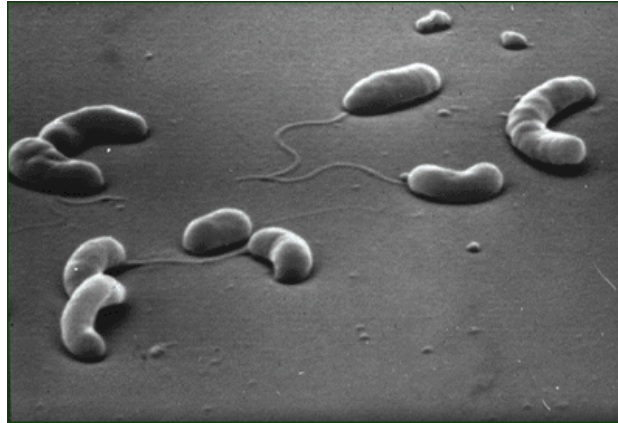


Figura 1.2. *Vibrio cholerae*: fotografia al microscopio elettronico

1.2.2 Metodi di identificazione

Vibrio cholerae è un patogeno intestinale non invasivo, non diffonde attraverso la mucosa intestinale, motivo per cui la ricerca dei vibriani si esegue esclusivamente sul materiale fecale.

Nelle zone endemiche, soprattutto se l'epidemia è in corso, il semplice esame microscopico del preparato di materiale fecale eliminato con le scariche diarroiche è altamente indicativo per fini diagnostici. Per poter diagnosticare con certezza bisogna ricorrere all'isolamento culturale e all'identificazione sierologia dei vibriani colerigeni. L'isolamento mediante esame culturale può essere fatto sia direttamente dalle feci sia dal tampone rettale.

Il batterio fermenta lentamente il lattosio e cresce rapidamente su vari terreni selettivi come l'agar-bile, agar-glicerina-taurocolato-tellurito e agar-tiosolfato-citrato-bile-saccarosio (TCBS). *Vibrio cholerae* cresce formando delle colonie gialle ed opache che possono essere facilmente distinte da quelle di altri microorganismi enterici.

Le colonie sospette vengono esaminate microscopicamente ed identificate biochimicamente: i vibriani colerigeni sono catalasi e ossidasi-positivi, riducono i nitrati, producono abbondantemente indolo, fermentano saccarosio e mannitolo producendo diversi acidi ma non prodotti gassosi. Infine le colonie vengono sottoposte alla identificazione sierologia mediante sieri monospecifici.

La differenziazione del biotipo El Tor da quello Classico (stessi caratteri antigenici) viene fatta in base alla resistenza alla polimixina B, al fago IV ed alla capacità di emolizzare gli eritrociti di pecora, caratteristiche proprie di El Tor.

1.2.3 Patogenesi

Le principali caratteristiche patogenetiche del colera sono ben note.

Dopo l'ingestione ed il suo passaggio attraverso la barriera acida dello stomaco, *Vibrio cholerae* colonizza la parte superiore dell'intestino tenue.

L'adesione alla mucosa intestinale è mediata dalle fimbrie, strutture proteiche filamentose, poste ad un polo della cellula, chiamate TCP (pili corregolati alla tossina), la cui espressione è coordinata alla tossina colerica sia a livello fisiologico che genetico (Taylor RK, 1987), ma è mediata anche da altri fattori. Grazie anche alla sua motilità il batterio riesce poi ad attraversare lo strato di muco che ricopre le pareti intestinali interne e a rilasciare una enterotossina, la tossina colerica (CT), direttamente sulle cellule mucosali.

Questa enterotossina, e possibilmente anche altre tossine, influiscono pesantemente sul trasporto ionico attraverso le cellule epiteliali intestinali. La conseguente perdita di acqua ed elettroliti porta così alla severa diarrea caratteristica del colera.

Il ruolo cruciale della CT nella patologia è stato chiaramente dimostrato da uno studio condotto da Levine (Levine MM, 1983) su volontari sani. L'ingestione di 25 microgrammi (μg) di CT purificata (somministrata con cimetidina e bicarbonato al fine di diminuire l'acidità gastrica) era in grado di causare l'evacuazione di più di 20 litri di feci ad acqua di riso, mentre l'ingestione di una quantità più ridotta (5 μg) induceva da 1 a 6 litri di diarrea.

Questi studi suggerivano quindi che una singola tossina era in grado di causare il colera.

Studi successivi eseguiti con ceppi di *Vibrio cholerae* mancanti del gene codificante la CT (soppressione genetica) hanno dimostrato che il vibrione era comunque in grado di causare diarrea seppur di minore entità (Levine MM, 1988). Questo suggeriva quindi che *Vibrio cholerae* era in grado di esprimere altri fattori, oltre a CT, aventi attività secretoria.

1.2.4 Fattori di virulenza

1.2.4.1 Tossine

1.2.4.1.1 La tossina colerica (CT)

L'esistenza di una tossina responsabile dei sintomi del colera è stata per la prima volta proposta da Robert Koch che, nel 1884, sosteneva che l'agente eziologico del colera producesse un "veleno speciale" in grado di agire sull'epitelio intestinale. L'esistenza di questa ipotetica tossina è stata poi dimostrata in India nel 1959 da due diversi gruppi di ricercatori. De (De SN, 1959) e Dutta (Dutta NK, 1959) dimostravano così che il terreno di coltura o il lisato di *Vibrio cholerae* se introdotti nell'intestino del coniglio causavano una massiva perdita di fluidi. Dieci anni più tardi Finkelstein e LoSpalluto (Finkelstein RA, 1969) purificavano la tossina e davano il via a numerose ricerche che portarono alla scoperta della struttura e della modalità di azione della CT.

La tossina colerica, dal peso molecolare di 84000 Dalton (Da), è costituita da due frammenti, A e B. Il frammento B, costituito a sua volta da 5 subunità identiche dal peso di circa 11500 Da ciascuna, è deputata al legame con il recettore glicolipidico, presente sulle cellule epiteliali intestinali, G_{M1} , monosialoganglioside. Il frammento A è la parte attiva della molecola ed è costituita da 2 subunità, A_1 e A_2 dal peso di circa 23000 e 6000 Da rispettivamente, legate da un ponte disolfuro. Il frammento A ed il frammento B sono legati tra loro tramite la subunità A_2 . Le subunità B si legano rapidamente ed

irreversibilmente al G_{M1} . Questo legame induce un cambiamento conformazionale di tutto il complesso che porta alla presentazione del frammento A (A_1+A_2) sulla membrana cellulare. Il frammento A viene quindi internalizzato e le due subunità costituenti vengono separate tramite rottura del legame disolfuro ad opera del glutatione. Una volta libera, la subunità A_1 può esercitare la sua attività catalitica. Il legame della tossina alle cellule epiteliali è favorito dalla produzione di neuraminidasi da parte del vibrione. Questo enzima infatti catalizza la conversione, e più precisamente l'idrolisi, dei trisialogangliosidi in monosialogangliosidi (G_{M1}), potenziando quindi l'effetto della tossina colerica aumentando il numero dei siti di legame disponibili (Holmgren J, 1975).

Il *target* intracellulare della CT è l'adenilato ciclasi (AC), uno dei più importanti sistemi di regolazione delle cellule eucariotiche. Questo enzima media la trasformazione dell'ATP in AMP-ciclico (cAMP), un messaggero intracellulare di fondamentale importanza per una serie di *pathways* cellulari. AC è attivata o inibita in risposta ad una varietà di stimoli e la sua regolazione è mediata da proteine G che fungono da *link*, a livello della membrana plasmatica, tra recettori e proteine effettrici. Le proteine G sono eterotrimeri composti da tre distinte subunità, α , β , e γ . La proteina coinvolta nel meccanismo d'azione della CT è una G_s , la cui attivazione porta ad un incremento dell'attività dell'AC. La CT catalizza il trasferimento di ADP-ribosio dal NAD ad uno specifico residuo di arginina della subunità α della proteina G_s , il che risulta nell'attivazione dell'AC e successivo incremento dei livelli intracellulari di cAMP. La subunità α della proteina G_s contiene un sito di legame per il GTP ed un'attività GTP-asi intrinseca. Il legame del GTP porta alla dissociazione della subunità α dal dimero $\beta\gamma$ ed alla successiva attivazione dell'AC da parte della subunità α stessa. Questa attivazione continua fino a quando l'idrolisi del GTP a GDP non permette alla proteina G di tornare trimerica e quindi nella sua conformazione inattiva. La ADP-ribosilazione della subunità α ad opera del peptide A_1 inibisce l'idrolisi del GTP per cui l'AC rimane costitutivamente attiva per tutta la vita della cellula.

L'AMP-ciclico risultante attiva una proteina chinasi, cAMP-dipendente, la proteina chinasi A, che fosforila altre proteine portando ad una alterazione del trasporto ionico.

La secrezione di fluidi ed elettroliti è il risultato di un duplice effetto della tossina a livello dei trasportatori ionici: a livello delle cellule dei villi intestinali è inibito l'assorbimento del sodio mentre a livello delle cripte è incrementata la secrezione di cloruro (**Figura 1.3**). Il movimento netto degli elettroliti verso il lume risulta in un gradiente osmotico transepiteliale che induce un flusso di acqua verso il lume stesso. Ne consegue la formazione di una notevole quantità di liquido che supera di gran lunga la capacità di assorbimento del colon. Questo determina l'abbondante diarrea acquosa, la perdita di elettroliti e la disidratazione, caratteristiche del colera (Kaper JB, 1995).

Sebbene sia chiaro che i canali permeabili al cloruro possano essere attivati da proteine chinasi cAMP-dipendenti, non è ancora del tutto chiaro quali siano i canali attivati dalla CT. Non è neanche chiaro se la proteina chinasi A fosforila direttamente il canale ionico oppure dia il via ad una cascata di fosforilazioni che coinvolge diverse proteine chinasi.

Alcuni dati suggeriscono che l'incremento dei livelli di cAMP e la conseguente attivazione della chinasi A potrebbero non giustificare gli imponenti effetti secretori indotti dalla tossina colerica.

Ulteriori evidenze che supportano l'ipotesi dell'esistenza di un meccanismo alternativo, o meglio aggiuntivo, vede coinvolte le prostaglandine ed il sistema nervoso enterico nella risposta alla CT.

I pazienti, nella fase secretoria acuta della patologia, presentano infatti elevate concentrazioni di prostaglandina E₂ (PGE₂) nel digiuno rispetto ai pazienti convalescenti (Speelman P, 1985). E' riportato che le prostaglandine E₁ ed E₂ stimolano l'attività dell'adenilato ciclasi ed incrementano la corrente di corto circuito (I_{SC}) (Kimberg DK, 1971).

La somministrazione dell'AC causa un piccolo e transiente accumulo di fluidi nell'intestino del coniglio, mentre la somministrazione di PGE₂ causa una secrezione di gran lunga superiore (Peterson JW, 1989). La tossina colerica porta all'incremento sia di cAMP sia di PGE e induce il rilascio di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana.

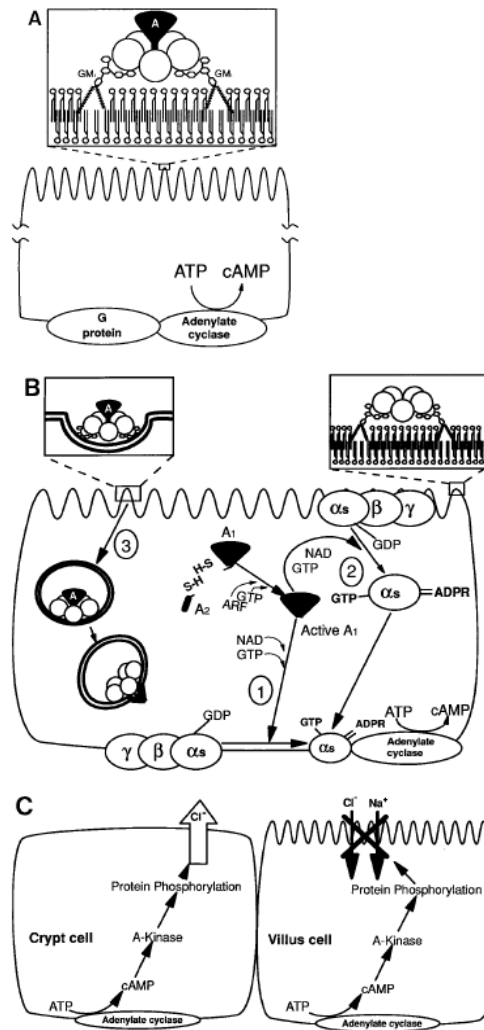


Figura 1.3. Meccanismo d’azione della tossina colerica. **A)** L’AC, localizzata a livello della membrana basolaterale delle cellule epiteliali intestinali, è regolata da proteine G. CT tramite la subunità B pentamerica lega il recettore G_{M1} inserito nel doppio strato lipidico. **B)** La subunità A entra all’interno della cellula, probabilmente per via endosomiale, viene tagliata proteoliticamente con conseguente riduzione del legame disolfuro tra i due peptidi A_1 e A_2 . La subunità A_1 attivata trasferisce un gruppo ADP-ribosio dal NAD alla subunità α della proteina G_s . La subunità α si dissocia dal dimero $\beta\gamma$ e attiva l’AC, aumentando la concentrazione del cAMP. **C)** cAMP attiva la proteina chinasi A. A livello delle cripte la conseguenza dell’attivazione della chinasi è un aumento della secrezione di cloruro, nelle cellule dei villi invece diminuisce l’assorbimento di sodio e quindi di cloruro.

Il meccanismo proposto dallo stesso Peterson nel 1991 suggerisce che gli elevati livelli di cAMP indotti dalla CT inducono non soltanto l’attivazione della proteina chinasi A ma anche la trascrizione di una fosfolipasi o di una proteina attivante una fosfolipasi. Quest’ultima quindi agendo sui fosfolipidi di membrana porterebbe alla produzione di acido arachidonico, precursore di prostaglandine e

leucotrieni. Poco più tardi de Jonge e colleghi dimostrarono che l'effetto della CT sulla corrente di corto circuito in un a linea cellulare intestinale umana, le HT29.c1.19A, veniva inibito per il 40-60% dalla mepacrina, un inibitore della fosfolipasi A₂. L'effetto della tossina colerica sul metabolismo dell'acido arachidonico potrebbe quindi essere mediato dall'ADP-ribosilazione della proteina G_s sulla membrana apicale che porterebbe all'attivazione di una fosfolipasi o direttamente o previa attivazione della proteina chinasi A (Peterson JW, 1991).

Il sistema nervoso enterico (ENS), facente parte del sistema nervoso autonomo, gioca un importante ruolo nell'assorbimento e nella secrezione intestinali. L'intestino è costituito anche da una varietà di cellule che possono produrre ormoni e neuropeptidi che possono influenzare la secrezione, ad esempio il peptide intestinale vasoattivo (VIP) e la serotonina (5-HT, 5-idrossi-triptamina). Sembra infatti che la CT interagisca con le cellule enterocromaffini inducendole a secernere 5-HT. Quest'ultima sarebbe in grado di attivare strutture, simili a dentriti, poste al di sotto dell'epitelio intestinale e di indurle a rilasciare VIP, causando così secrezione di fluidi ed elettroliti (Sjöqvist A, 1988).

Questo modello è supportato da una serie di evidenze: i bloccanti dei neurotrasmettitori inibiscono la secrezione indotta da CT; CT induce il rilascio di 5-HT dalle cellule enterocromaffini nel lume intestinale; la secrezione di fluidi è drasticamente inibita dall'uso di antagonisti per i recettori serotoninergici; la secrezione è accompagnata da un aumento del rilascio di VIP nell'intestino tenue e detto aumento è bloccato dalla tetrodotossina; i pazienti mostrano elevati livelli di VIP nel sangue (Nilsson O, 1983).

Si stima quindi che circa il 60% dell'effetto della CT sia mediato dal meccanismo nervoso. Il rilascio di 5-HT dalle cellule enterocromaffini potrebbe causare l'attivazione di due *pathways*: 5-HT potrebbe stimolare direttamente ENS portando al rilascio di VIP oppure 5-HT potrebbe indurre la sintesi di prostaglandine in grado di influenzare il trasporto ionico o direttamente o tramite l'attivazione di ENS (Cassuto J, 1981).

1.2.4.1.2 La tossina *zonula occludens* (Zot)

La tossina *zonula occludens* (Zot) è una singola catena polipeptidica di 44,8 kDa scoperta nel 1991 da Fasano e colleghi. Zot è in grado di aumentare la permeabilità della mucosa intestinale agendo sulle strutture delle giunzioni strette intercellulari, la *zonula occludens*. Sono stati utilizzati surnatanti di coltura di *Vibrio cholerae* su frammenti di ileo di coniglio montati sulle camere di Ussing, una tecnica classica per misurare il trasporto transepiteliale di elettroliti attraverso il tessuto intestinale. Il risultato è stato un immediato incremento della conducibilità ed un decremento della resistenza tissutale (Fasano A, 1991). Queste alterazioni riflettono, anche se non esclusivamente, modificazioni della permeabilità tissutale attraverso gli spazi intercellulari (*pathway* paracellulare), diversamente da quello che avviene in risposta alla CT, in seguito alla quale si verifica un incremento della differenza di potenziale la cui variazione riflette un trasporto ionico attraverso la membrana cellulare (*pathway* transcellulare) (Diamond JM, 1977).

Il meccanismo di azione di Zot, recettore-mediato, tempo e dose-dipendente e completamente reversibile, induce un riarrangiamento del citoscheletro nelle cellule epiteliali intestinali permettendo l'apertura delle giunzioni strette tra le cellule (Marinaro M, 2003).

1.2.4.1.3 Enterotossina colerica accessoria (Ace)

Ace di *Vibrio cholerae* è stata recentemente identificata da Trucksis e colleghi che hanno suggerito che questa proteina, dal peso di circa 11,3 kDa, è in grado di causare l'aumento della corrente di corto circuito su campioni intestinali montati nelle camere di Ussing. Contrariamente alla Zot ma analogamente alla CT, questa tossina induce un aumento della differenza di potenziale piuttosto che della conducibilità elettrica (Trucksis M, 1993).

La sequenza aminoacidica e la struttura proteica ipotizzata supportano un modello nel quale Ace potrebbe agire polimerizzando ed inserendosi nella membrana plasmatica delle cellule eucariote formando un canale ionico. La regione C-

terminale di Ace mostra una omologia del 47% con i residui 2-20 della tossina δ di *Staphylococcus aureus* (Trucksis M, 1993) i cui effetti sulle cellule eucariotiche consistono nell'aumentare la permeabilità vascolare, inibire l'assorbimento di acqua ed aumentare la concentrazione di cAMP (Kapral FA, 1976; O'Brien AD, 1976).

1.2.4.1.4 *Vibrio cholerae* citolisina (VCC)

Molti ceppi di *Vibrio cholerae* appartenenti al sierotipo O1 biotipo El Tor ma anche ai sierotipi non-O1 e non-O139, producono una esotossina emolitica chiamata El Tor emolisina o *Vibrio cholerae* citolisina (VCC) (Honda T, 1979; Yamamoto K, 1984). VCC è stata caratterizzata dal punto di vista genetico ed è stato individuato un gene strutturale *hly A*, localizzato nel cromosoma II (Heidelberg JF, 2000), che codifica per una pro-citolisina, un monomero di circa 79 kDa (Alm RA, 1988; Yamamoto K, 1990). Questa viene poi attivata proteoliticamente attraverso la rimozione, all'estremità N-terminale, di un dominio di 15 kDa (Nagamune K, 1997), dando così origine ad una VCC matura di circa 63 kDa.

La VCC è capace di legarsi alle membrane lipidiche, ricche di colesterolo e ceramidi (Zitzer A, 1999), e di oligomerizzare formando canali eptamerici (diametro interno compreso tra 1-2 nm) (**Figura 1.4**), preferenzialmente permeabili agli anioni (Pantano S, 2006).

Questo poro è responsabile di alcuni effetti citotossici della VCC come la lisi cellulare ed un'estesa vacuolizzazione, effetti dipendenti dalla linea cellulare oggetto di studio e dalla concentrazione della tossina (Coelho A, 2000; Figueroa-Arredondo P, 2001; Moschioni M, 2002).

Recentemente è stato dimostrato che il fenomeno della vacuolizzazione associato alla VCC è una risposta cellulare difensiva, una risposta autofagica, nei confronti dell'intossicazione (Gutierrez MG, 2007).

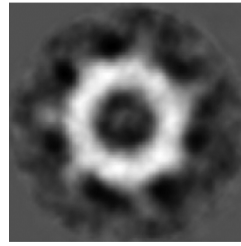


Figura 1.4. Canale eptamerico formato dalla VCC su membrane lipidiche ricche in colesterolo e ceramidi. Fotografia al microscopio elettronico.

La VCC purificata induce accumulo di fluidi nell'intestino del coniglio (Ichinose Y, 1987). Ceppi di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 incapaci di esprimere la tossina colerica (CT) ed il TCP sono in grado di causare una sindrome simile al colera, mentre il mutante isogenico ma che non esprime la VCC non è in grado di farlo (Bidinost C, 2004; Saka HA, 2008). Queste evidenze supportano quindi un ruolo della VCC nella patogenesi del colera.

1.2.4.2 Fattori di colonizzazione

Per molti anni, allo scopo di scoprire quali fossero i meccanismi tramite i quali *Vibrio cholerae* è in grado di aderire all'epitelio intestinale, quindi i fattori di colonizzazione, le ricerche si sono focalizzate sulla proprietà del batterio di agglutinare gli eritrociti. *Vibrio cholerae* produce infatti almeno quattro emoagglutinine (HA): una D-mannosio- e D-fruttosio-sensibile espressa dal biotipo El Tor; una L-fucosio-sensibile espressa dal biotipo classico; una D-mannosio e L-fucosio-resistente ed una HA solubile, con attività proteasica, prodotta da entrambi i biotipi.

Non si conoscono recettori a livello delle cellule intestinali riconosciuti come *target* di *Vibrio cholerae*, in grado pertanto di mediarne l'adesione all'endotelio. Alcuni studi condotti negli anni '70 hanno suggerito L-fucosio come il più forte inibitore dell'adesione tra il vibrione e le cellule intestinali, inducendo ad ipotizzare che questo zucchero potesse far parte della struttura di un probabile recettore coinvolto nella colonizzazione (Jones GW, 1976).

Yamamoto e colleghi, nel 1988, hanno proposto il muco, le cellule epiteliali dei follicoli linfoidi dell'ileo, in particolare le cellule M, e la superficie delle cellule

deputate all'assorbimento, quindi le cellule dei villi, come *target* primari in grado di mediare l'adesione di *Vibrio cholerae* (Yamamoto T, 1988).

La colonizzazione intestinale da parte del batterio è probabilmente un fenomeno multifattoriale, nel quale però alcune strutture, primo fra tutte il pilo corregolato alla tossina, ricoprono un ruolo critico e fondamentale nel processo patogenetico.

1.2.4.2.1 Il pilo corregolato alla tossina (TCP)

Scoperto nel 1987 da Taylor e collaboratori, il pilo è costituito da lunghi filamenti, dal diametro pari a 7 nm, normalmente associati a formare fasci (Taylor RK, 1987). E' stato chiamato TCP perché la sua espressione è correlata all'espressione della CT.

Herrington e colleghi, mediante studi condotti su volontari sani, hanno dimostrato che la colonizzazione dell'intestino da parte del vibrione era completamente inibita quando veniva inattivato nel batterio il gene codificante la subunità (*tcpA*) costituente TCP. In seguito all'ingestione del ceppo *tcpA* mutante, sui volontari si è verificata una irrisoria risposta immunitaria, nessun fenomeno diarroico e nessuna presenza del vibrione nelle loro feci. E' molto curioso ed interessante che per indurre una risposta immune sia assolutamente richiesta la presenza di TCP funzionali e che l'ingestione di *Vibrio cholerae wild-type* non comporti l'instaurarsi di una risposta anticorpale anti-TCP (Hall RH, 1991).

La sequenza amminoacidica della subunità costituente il pilo, TcpA, dal peso di circa 20,5 kDa, mostra una omologia significativa con i pili di tipo IV, formati per assemblaggio di migliaia di copie di una singola subunità proteica, la pilina, estremamente lunghi (1-4 μm), sottili, flessibili e resistenti (sopportano forze superiori a 100 pN) (Maier B, 2002).

TCP è stato studiato quasi esclusivamente su *Vibrio cholerae* O1. *Vibrio cholerae* O139 è in grado di esprimerlo esattamente nelle stesse condizioni di crescita che favoriscono la sua espressione in *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor (Hall RH, 1993) e la sequenza del gene *tcpA* è identica in entrambi i ceppi (Rhine JA, 1994). La produzione di TCP o la presenza dei geni *tcp* sui ceppi non-O1 non sono ancora state riportate.

1.2.4.2.2 Flagelli e movimento

Vibrio cholerae è dotato di movimento grazie alla presenza di un singolo flagello polare. La maggior parte degli studi hanno dimostrato che la motilità è un fondamentale fattore di virulenza. Alcuni lavori riportano che i vibrioni sono in grado di muoversi sulla superficie delle mucose lungo gradienti chemotattici (Freter R, 1981) e, sia *in vivo* che *in vitro*, è stato dimostrato che è in grado di attraversare rapidamente lo strato di muco e di raggiungere gli spazi compresi tra i villi intestinali nel giro di minuti o poche ore. Diversi lavori hanno dimostrato che mutanti privi di movimento, ma enterotossigenici come i *wild-type*, sono effettivamente meno virulenti (Richardson K, 1991).

E' stato anche suggerito che lo stesso flagello funga da adesina, portando così alla formulazione dell'ipotesi secondo la quale la colonizzazione potesse essere mediata esclusivamente dalla presenza del flagello a prescindere dalla capacità di movimento del batterio. Lo stesso Richardson nel 1991, in seguito ad uno studio che metteva a confronto ceppi, *wild-type* e mutanti, provvisti o meno di movimento e di flagelli funzionali, ha sostenuto che la motilità è chiaramente la proprietà che maggiormente contribuisce alla patogenicità ed alla colonizzazione (Richardson K, 1991).

1.2.5 Ecologia

E' vero che la principale via di trasmissione del colera è rappresentata dall'ingestione di acqua e cibi contaminati dalle feci di individui infetti. Ma è anche vero che studi relativamente recenti hanno dimostrato che il vibrione, inclusi i ceppi virulenti, vive normalmente nell'ambiente acquatico, in particolare nelle acque salmastre, e sopravvive e si moltiplica, in associazione con zooplancton e fitoplancton, indipendentemente dalla presenza di individui infetti (Islam MS, 1990). E poiché i cambiamenti climatici del globo influiscono sulla crescita del plancton, influenzano indirettamente anche la crescita dei vibrioni ad esso associati. La presenza costante del colera nel subcontinente indiano, come la

sua ricomparsa in altri continenti, potrebbe essere quindi fortemente dipendente da fattori ambientali (Colwell RR, 1996).

Nel ciclo vitale di *Vibrio cholerae* possiamo pertanto distinguere due fasi: una che si svolge all'interno dell'ospite e l'altra nell'ambiente acquatico nel quale lo si può trovare adeso sulla superficie delle piante, delle alghe verdi filamentose e sulle pareti chitinee di crostacei planctonici. Le microcolonie si espandono e si fondono tra loro formando uno strato di cellule (biofilm) che ricopre la superficie disponibile. Si pensa che la formazione del biofilm sia fondamentale per facilitare la persistenza del batterio nel suo habitat acquatico naturale durante i periodi che intercorrono tra una epidemia e l'altra (Reidi J, 2002).

Sebbene *Vibrio cholerae* appartenga al normale ambiente di estuario, i ceppi tossigenici sono principalmente isolati dagli ambienti contaminati da individui infetti. Ceppi isolati da aree distanti dalle regioni infette generalmente non presentano il gene codificante per la tossina colerica (CT) (Faruque SM, 1998).

Due importanti elementi genetici distinguono un *Vibrio cholerae* patogeno da uno innocuo: CTX, cioè il genoma di un batteriofago lisogenico chiamato CTX Φ (CTXphi) che porta i geni codificanti la tossina colerica, e VPI (isola di patogenicità del vibrione) che porta i geni che codificano per il pilo TCP.

Nel 1996 Waldor ha dimostrato in maniera convincente che CTX Φ , utilizzando il TCP come recettore, è in grado di infettare le cellule del vibrione presenti nel tratto gastrointestinale dei topi con una efficienza di gran lunga superiore a quella che si verifica *in vitro*. Questi esperimenti quindi dimostrano che l'intestino è l'ambiente nel quale i batteri possono acquisire con grande efficienza gli elementi genetici che conferiscono loro la patogenicità (Waldor MK, 1996).

1.3 Vaccini

La somministrazione del primo vaccino risale all'anno successivo all'isolamento del *Vibrio cholerae* da parte di Koch (1884). Il vaccino era costituito dal brodo di coltura del vibrione e veniva somministrato per via parenterale. L'attuale vaccino parenterale, brevettato negli Stati Uniti, contiene vibrioni uccisi con il fenolo, ha una efficacia moderata (50%) e di breve durata (3-

6 mesi); ha diversi effetti collaterali come dolore locale, eritema, irrigidimento, febbre, emicrania e malessere generale per cui è sconsigliato dalla WHO (World Health Organization, Organizzazione Mondiale della Sanità).

Il nuovo vaccino, Dukoral, contiene batteri di *Vibrio cholerae* O1 interi, uccisi, e la subunità B ricombinante della tossina colerica (CTB). Contiene ceppi batterici dei sierotipi Inaba e Ogawa e dei biotipi Classico ed El Tor. Si assume per via orale con un tampone bicarbonato che protegge gli antigeni dall'acidità gastrica. Il vaccino agisce inducendo la produzione di anticorpi contro componenti batterici e la CTB. Gli anticorpi intestinali antibatterici ostacolano l'adesione dei batteri alla parete intestinale impedendo così la colonizzazione. Gli anticorpi intestinali antitossina ostacolano il legame della tossina colerica con gli enterociti impedendo così l'attivazione del segnale di trasduzione che ha come risultato ultimo la diarrea e tutto quello che ne deriva. Tra le risposte anticorpali sieriche, compresa la risposta anticorpale vibrocida, e l'efficacia protettiva, la correlazione è scarsa. Probabilmente l'immunità protettiva è mediata dagli anticorpi secretori IgA prodotti localmente a livello intestinale.

Nel siero del 35-55% dei soggetti vaccinati sono stati osservati anticorpi vibrocidi contro i componenti batterici, mentre nel 78-87% dei soggetti vaccinati sono stati riscontrati anticorpi anti-tossine. Una dose di richiamo ha suscitato una risposta anamnestiche indicativa di una memoria immunitaria, che nell'adulto sembra durare almeno 2 anni (Holmgren J, 1989).

1.4 L'intestino e i mastociti

1.4.1 L'intestino: richiami di fisiologia

La principale funzione dell'apparato digerente è quella di provvedere continuamente a rifornire l'organismo di acqua, elettroliti e sostanze nutritive. Lungo tutto il tubo digerente sono disseminate ghiandole la cui attività provvede a due funzioni primarie: secrezione di enzimi digestivi e secrezioni mucose volte a provvedere alla lubrificazione ed alla protezione dell'intero tubo digerente.

L'intestino, oltre a provvedere all'assorbimento dei prodotti terminali della digestione, è dotato di una intensa attività secretoria. A livello duodenale le ghiandole di Brunner e, su tutta la superficie della mucosa intestinale le cellule caliciformi, hanno la funzione di secernere il muco. Sull'intera superficie intestinale, negli spazi compresi tra i villi, esistono delle piccole cripte, le cripte di Lieberkühn. Nell'intestino tenue, le cellule epiteliali delle cripte contengono, a livello dell'orletto a spazzola, una serie di enzimi: peptidasi, per scindere piccoli peptidi in aminoacidi, saccarasi, maltasi, isomaltasi e lattasi, per scindere i disaccaridi in monosaccaridi, e piccole quantità di una lipasi intestinale per scindere i grassi neutri in glicerolo e acidi grassi.

Le cellule epiteliali, situate nella profondità delle cripte di Lieberkühn, sono in continua attività mitotica, e le cellule neoformate migrano gradatamente, lungo la membrana basale, verso la parte più superficiale delle cripte, in direzione dell'apice dei villi, ed infine si sfaldano nel succo intestinale. Il ciclo vitale di una cellula epiteliale intestinale è di circa 5 giorni.

Le cellule epiteliali delle cripte di Lieberkühn presenti nell'intestino crasso, invece non contengono quasi per nulla enzimi; le cripte sono tappezzate quasi esclusivamente da cellule caliciformi che secernono muco. Nel crasso il muco, ovviamente, protegge la parete intestinale da escoriazioni, ma per la sua proprietà adesiva serve anche a tenere insieme il materiale fecale in forma solida. La funzione protettiva verso la parete è anche rivolta contro l'intensa attività batterica che si svolge all'interno delle feci. In risposta a stimoli irritanti, come accade in corso di enteriti, la mucosa comincia a secernere, oltre al normale muco vischioso, grandi quantità di acqua ed elettroliti. Questo serve a diluire i fattori irritanti ed a provocare un rapido movimento del materiale fecale verso l'ano. La diarrea che di solito ne risulta, se da un canto provoca perdita di notevoli quantità di acqua ed elettroliti, dall'altro accelera il processo di guarigione.

Il trasporto di fluidi dipende dai meccanismi di trasporto attivo che controllano il movimento degli elettroliti attraverso il tratto gastrointestinale (Barrett KE, 2000).

Il cloruro (Cl⁻) è il principale elettrolita che guida le secrezioni fluide ed i suoi movimenti sono accompagnati da quelli del sodio (Na⁺) e dell'acqua (H₂O). Il malfunzionamento di questi meccanismi induce costipazione e diarrea.

Le tossine batteriche influenzano il trasporto degli elettroliti a livello intestinale portando alla perdita dell'omeostasi; la loro azione determina infatti l'apertura di canali anionici sulla membrana apicale delle cellule, quindi verso il lume intestinale, e l'aumento dell'assorbimento di Cl^- attraverso la membrana basolaterale. Gli anioni, soprattutto Cl^- e possibilmente anche bicarbonato (HCO_3^-), vengono secreti nel lume, seguiti da Na^+ e H_2O . Pertanto il risultato netto è la secrezione di sali ed acqua, meccanismo alla base del fenomeno diarroico.

Gli anioni Cl^- passano all'interno delle cellule attraverso la membrana basolaterale per mezzo del co-trasporto $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ elettricamente neutro. Questo co-trasporto dipende principalmente dal gradiente di Na^+ che si instaura mediante la pompa $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasi}$ localizzata sulla membrana basolaterale. La pompa, pur consumando una molecola di ATP, fornisce l'energia necessaria per la secrezione di Cl^- . Infatti trasportando 3Na^+ fuori dalla cellula in cambio di 2K^+ induce una iperpolarizzazione della membrana, creando in tal modo una condizione elettrochimicamente favorevole per l'efflusso di Cl^- attraverso la membrana apicale. Il K^+ ricopre quindi un ruolo fondamentale nel meccanismo secretorio del cloruro (Sandle GI, 1999); i suoi canali posti sulla membrana basale degli enterociti potrebbero quindi rappresentare un ottimo *targhet* farmacologico per controllare la diarrea secretoria indotta dall'efflusso di cloruro nel lume intestinale.

I canali al cloruro maggiormente espressi a livello intestinale sono i canali CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator), in grado di controllare sia i canali al cloruro cAMP-dipendenti, sia i canali al cloruro attivati dal calcio (Barrett KE, 2000).

1.4.2 La barriera intestinale

Le funzioni principali dell'intestino sono la digestione e l'assorbimento di nutrienti, acqua ed elettroliti necessari per la sopravvivenza dell'organismo. La maggior parte di questi processi si svolgono nell'intestino tenue, lungo circa 7 metri ed altamente ripiegato al fine di massimizzare l'area deputata alle suddette funzioni. Questa barriera mucosale deve essere permeabile per adempiere alle

funzioni di assorbimento ed, allo stesso tempo, deve proteggere l'ospite dai patogeni. Questa dicotomia funzionale è ancora più pronunciata nell'intestino crasso che ospita la flora batterica costituita da una considerevole quantità (10^{14}) di batteri appartenenti almeno a 500 specie differenti, la cui funzione è ancora oggi dibattuta.

La flora digerisce componenti alimentari, in particolare carboidrati e fibre, non digeribili al livello del tenue, e può proteggere l'intestino da diversi ceppi batterici patogeni che, in assenza della flora, potrebbero colonizzare l'organo.

La composizione della flora si determina nelle prime settimane di vita e si stabilizza; il meccanismo tramite il quale si instaura tolleranza immunitaria nei confronti degli antigeni batterici non è ancora noto.

La barriera intestinale è rappresentata da diversi sistemi di difesa come le funzioni epiteliali (produzione di muco, secrezione, rilascio di defensine, etc), le funzioni immunitarie innate e adattative ed il sistema nervoso enterico. Lo squilibrio di uno solo tra questi sistemi di difesa è sufficiente per innescare disturbi non irrilevanti. Per esempio è stato recentemente dimostrato che la produzione ridotta di una singola difensiva è associata al morbo di Crohn e alla colite ulcerosa (Wehkamp J, 2005). Possibilmente danni alla barriera intestinale potrebbero essere importanti non soltanto per i disturbi intestinali infiammatori ma anche per altre reazioni infiammatorie come l'allergia alimentare, la celiachia e la sindrome dell'intestino irritabile. Inoltre un improvviso e sostanziale squilibrio della barriera intestinale potrebbe indurre disturbi più acuti come la sepsi e lo shock settico.

1.4.3 I mastociti e la barriera intestinale

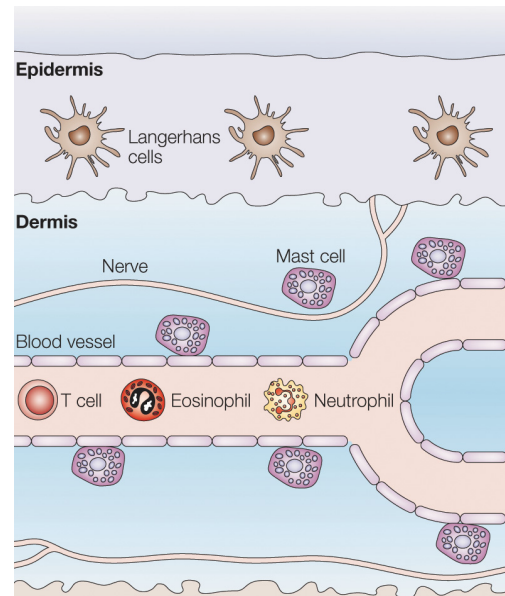
I mastociti (MCs, mast cells) sono cellule tissutali localizzate in posizioni strategiche (**Figura 1.5**), come le mucose, e coinvolte nei meccanismi di difesa dell'ospite.

Negli individui sani, il 2-3% delle cellule della mucosa intestinale è costituita da mastociti localizzati a livello della *lamina propria*.

Durante una infezione intestinale il loro numero può aumentare fino a dieci volte. La loro funzione non è del tutto chiara; è noto il loro rilevante ruolo in disturbi

gastrointestinali come allergie alimentari e parassitosi e, più di recente, è emerso che potrebbero avere alcune funzioni fisiologiche a livello dei tessuti nei quali risiedono

Figura 1.5. Localizzazione strategica dei mastociti. I mastociti si trovano comunemente nei siti maggiormente esposti all'ambiente esterno, come la pelle. In generale si trovano in prossimità dei vasi sanguigni; possono pertanto regolare la permeabilità vascolare ed il reclutamento di cellule effettrici. Sebbene non abbiano contatti diretti con le cellule vicine APC, possono comunicare con queste tramite il rilascio di mediatori.



Si pensa infatti che i mastociti intestinali regolino diverse funzioni tissutali di fondamentale importanza per il normale funzionamento dell'intestino (**Tabella 1.1**). Queste molteplici funzioni fisiologiche potrebbero spiegare il coinvolgimento delle MCs in svariate patologie oltre alle reazioni allergiche.

Tabella 1.1. Funzioni fisiologiche dei mastociti intestinali (tratto da Bischoff SC, 2007)

Physiological function
Regulation of epithelial functions
Water and electrolyte secretion?
Tight junctions/epithelial barrier integrity
Regulation of endothelial functions
Blood flow, vessel contraction
Tight junctions/endothelial permeability/edema
Coagulation/fibrinolysis
Regulation of cell influx into tissue and cell function
Neutrophils
Eosinophils
Lymphocytes
Regulation of neurological functions
Intestinal peristalsis
Pain mediation
Regulation of tissue transformation
Wound healing
Fibrosis
Host defense against microbes
Bacterial infection
Viral infection
Parasitic infection

Queste cellule possono infatti esercitare innumerevoli funzioni effettrici rilasciando mediatori preformati, contenuti nei granuli, come proteasi, istamina, eparina, o sintetizzati *de novo*, inclusi mediatori lipidici e citochine (**Figura 1.6**).

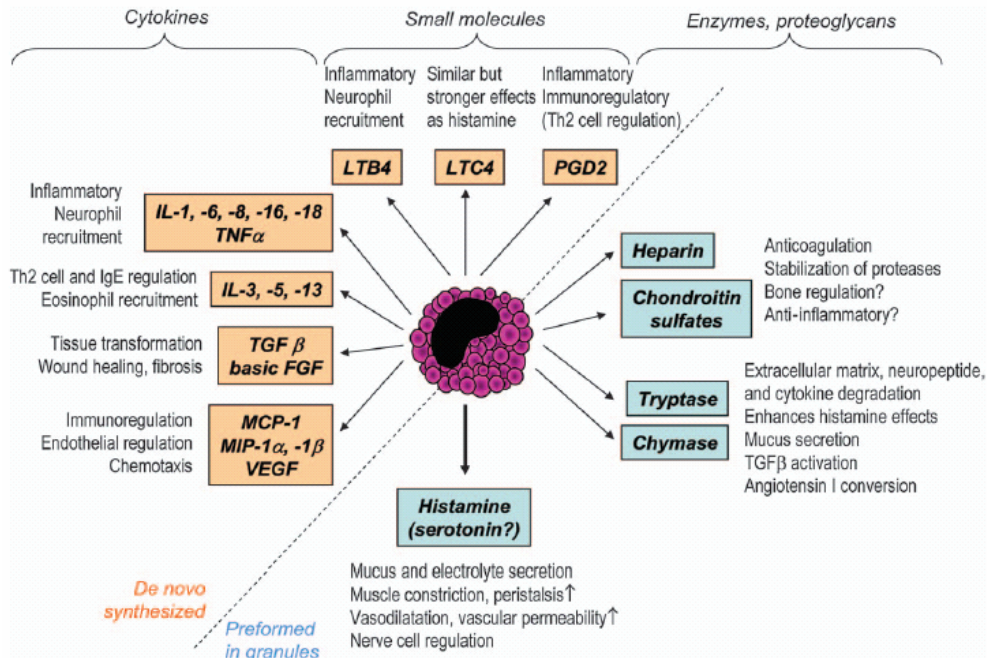


Figura 1.6. Principali mediatori rilasciati dai mastociti.

Tramite questi mediatori le MCs regolano le loro funzioni tissutali locali o difendono l'organismo ospite agendo da cellule del sistema immunitario innato, interagendo con il sistema immunitario specifico o inducendo e regolando l'infiammazione.

La maggior parte dei mediatori rilasciati dalle MCs mediano l'immunità innata, come il fattore di necrosi tumorale (TNF, tumor necrosis factor), leucotriene B4 (fattore di reclutamento per i neutrofilo), interleuchina-5 (IL-5, reclutamento eosinofilo) e chemochine (regolazione endoteliale e chemotassi) (**Figura 1.6**).

1.4.4 Riconoscimento dei microbi da parte dei mastociti

I mastociti sono capaci di riconoscere *patterns* molecolari di microrganismi estraneamente conservati, i PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) ed

altri prodotti batterici, tramite i recettori Toll-like (TLRs). Queste proteine giocano quindi un ruolo essenziale nell'attivazione del segnale che porta all'uccisione ed alla *clearance* dei patogeni. Tutti i TLRs contengono, nella loro regione citoplasmatica, un dominio conservato, chiamato sequenza dominio del recettore Toll/IL-1 (TIR).

Al riconoscimento dei PAMPs, da parte dei Toll-like, segue il reclutamento, a livello dei domini TIR, di MyD88, l'attivazione della chinasi IRAK e di TRAF6. Queste molecole adattatrici mediano il segnale di attivazione per JNK, p38, ERK $\frac{1}{2}$ e NF- κ B, che portano all'attivazione dei geni bersaglio dell'infiammazione (Figura 1.7).

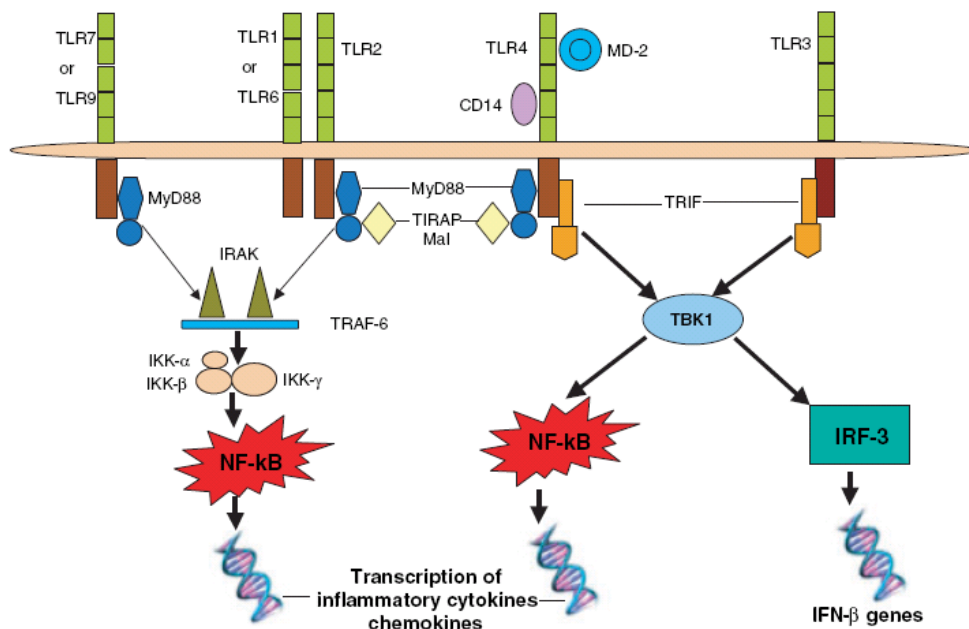


Figura 1.7. Pathway MyD88-dipendente indotto dall'attivazione dei recettori Toll-like.

Oltre agli agonisti Toll-like, altre molecole prodotte da agenti patogeni possono attivare le MCs. Ad esempio l'emolisina α di *Escherichia coli* induce afflusso di calcio, rilascio di istamina e di citochine proinfiammatorie nei mastociti umani intestinali.

1.4.5 Riconoscimento di antigeni non patogeni da parte dei mastociti

Il ruolo delle MCs nelle reazioni allergiche è ben chiaro. Il loro numero aumenta principalmente nel sito dell'infiammazione allergica, e soprattutto aumenta il rilascio di mediatori come l'istamina, triptasi, IL-5 e TNF. Il riconoscimento dell'antigene avviene tramite il legame con le Igs (Immunoglobuline) specifiche per l'allergene, a loro volta legate a recettori specifici per le Igs stesse, sulla membrana plasmatica. Il meccanismo di attivazione dei mastociti, più rilevante e meglio caratterizzato, è mediato dal *cross-linking* delle IgE legate ai propri recettori FcεRI. Le MCs esprimono anche i recettori per le IgA (FcαR) e per IgG (FcγRI e IIa con effetto stimolatorio, FcγRIIb inibitorio), sia costitutivamente (FcγRIIa) che in seguito ad attivazione (FcγRIIb e FcγRIIc), ad esempio da parte dell'interferon-γ (Okayama Y, 2001; Zhao W, 2006).

Quindi le MCs prendono parte al sistema immunitario specifico tramite il riconoscimento di antigeni specifici per mezzo di molecole come le Igs, oppure tramite interazioni con le cellule T. Infatti le MCs sono in grado di comunicare sia con i linfociti B che con quelli T. Sono, ad esempio, regolati da citochine come interleuchina-4 (IL-4) (Lorentz A, 2005) e IL-9 (Lu LF, 2006) prodotte dalle cellule T: IL-4 induce la proliferazione e le funzioni effettrici delle MCs nel sito di infiammazione, la IL-9 media le interazioni con i linfociti T regolatori inducendo tolleranza periferica. Viceversa, le MCs sono in grado di produrre citochine e mediatori come istamina, prostaglandina D2 ed interferoni, capaci di modulare l'attivazione delle cellule T (Jutel M, 2001); sono anche coinvolte nella regolazione delle funzioni delle cellule B nelle quali, tramite il rilascio di interleuchine, come IL-4 e IL-13, inducono la produzione di IgE (Pawankar R, 1997).

Il fatto che i mastociti esprimano non soltanto FcεRI ma anche altri recettori FcRs lascia pensare ad un loro possibile ruolo in patologie infiammatorie e immunitarie, non soltanto nelle allergie, ad esempio mediate da IgG o anche dalle IgA. Questa ipotesi è supportata da studi condotti su modelli animali di malattie immunitarie complesse nelle quali si osservano meccanismi MCs-mediati (Watanabe N, 1999;

Baumann U, 2001) Il ruolo dei recettori per le IgA presenti sui mastociti umani non è ancora chiaro.

1.4.6 L'abnorme attivazione dei mastociti danneggia la barriera intestinale

In letteratura sono riportati diversi lavori che dimostrano, in maniera convincente, che non soltanto l'infezione ma anche stress acuti o cronici, infiammazione ed esposizione all'alcool, inducono un aumento della permeabilità mucosale tramite un meccanismo MCs-dipendente (Söderholm JD, 2002; Demaude J, 2006). Su modelli animali, roditori, è stato dimostrato che le proteasi rilasciate dalle MCs sono direttamente responsabili dell'aumento della permeabilità epiteliale paracellulare e della redistribuzione delle *tight junction* (giunzioni strette tra le cellule) in condizioni di stress o in seguito ad infezioni parassitarie (McDermott JR, 2003; Jacob C, 2005).

Un altro dato interessante è che lo stress induce un aumento del rilascio di mediatori, come istamina e triptasi, nell'intestino tenue prossimale di individui controllo ed in quantità più elevate in pazienti con disturbi alimentari (Santos J, 1998).

I mastociti si trovano a stretto contatto con le cellule epiteliali e le terminazioni nervose e questo è in accordo con l'ipotesi che li vede coinvolti nella regolazione della permeabilità mucosale e delle funzioni della barriera intestinale. Aumentando la permeabilità mucosale le MCs possono quindi dare il proprio contributo ad un processo infiammatorio in corso, a prescindere dall'agente che è stato in grado di causarlo, allergene o batterio. L'incremento della permeabilità potrebbe agevolare l'ingresso di potenziali allergeni e microbi nocivi nel tessuto intestinale.

Il principale mediatore mastocitario è l'istamina che gioca un importante ruolo multifunzionale a livello della barriera intestinale. Il meccanismo dell'istamina è mediato dai suoi recettori specifici. L'attivazione dei recettori H1 ed H2 per l'istamina ha effetti sui vasi sanguigni (dilatazione ed incremento della permeabilità), sulla muscolatura liscia (contrazione), sulle cellule epiteliali

(produzione di muco). Nei pazienti con allergie alimentari l'espressione di H1 ed H2 nel tratto intestinale è *upregolata* (maggior numero di recettori rispetto al controllo sano) (Sander LE, 2006).

L'istamina agisce anche da immunomodulatore. Ad esempio a livello dei macrofagi alveolari umani, legando i recettori H2 ed H3, induce la produzione di IL-10, una citochina anti-infiammatoria, ed inibisce il rilascio di TNF (Sirois J, 2000); influenza le cellule epiteliali, le cellule dendritiche ed i linfociti T e B; promuove l'attivazione cellulare T-helper (T_H)-1 agendo sul recettore H1, l'attivazione cellulare sia T_{H1} che T_{H2} per mezzo del recettore H2 (Jutel M, 2001).

1.5 *Vibrio cholerae*, sistema immunitario innato e mediatori dell'infiammazione

Il colera è stato da sempre considerato un classico esempio di diarrea tossigenica di tipo non infiammatorio, fino a quando non è stato dimostrato che l'infezione indotta da *Vibrio cholerae* in realtà porta al reclutamento di cellule infiammatorie a livello della mucosa intestinale (Mathan MM, 1995). Studi successivi hanno dimostrato che il batterio è in grado di indurre l'incremento di fattori innati come mieloperossidasi, lattoferrina, metaboliti del nitrossido ed eicosanoidi (Janoff EN, 1997; Qadri F, 2002).

L'infezione naturale, così come la tossina colerica, induce un profilo immunitario di tipo T_{H2}, portando un aumento degli anticorpi specifici IgG4 ed IgE (Marinaro M, 1995; Qadri F, 2000) ed un aumento della produzione di IL-6 da parte dei mastociti (Leal-Berumen I, 1996), suggerendo così il loro coinvolgimento nella risposta immunitaria.

La localizzazione dei mastociti a livello della mucosa e la loro abilità a rilasciare potenti mediatori suggeriscono un loro importante ruolo nella difesa dell'ospite dall'infezione batterica. I mastociti mucosali sono attivati dal legame della IL-3 e di SCF (Stem Cell Factor) che possono essere prodotte dalle cellule T e dalle cellule epiteliali intestinali. (Abraham SN, 1997). La presenza di questi due

fattori, così come l'incremento di IL-4 ed IL-5 (citochine tipicamente T_{H2}), è stata riscontrata a livello della mucosa duodenale di pazienti adulti affetti da colera (Abraham SN, 1997).

La migrazione e la mobilitazione dei neutrofili verso il sito d'infezione e di infiammazione rappresenta il primo meccanismo di difesa dell'ospite. Una varietà di molecole stimola la migrazione dei neutrofili (PMN, polimorfonucleati): ad esempio il TNF- α prodotto dalle MCs ricopre un ruolo critico nella difesa dell'ospite proprio perchè promuove il reclutamento dei neutrofili al sito di infezione (Abraham SN, 1997). Durante la fase acuta dell'infezione colerica, il TNF- α aumenta in misura significativa, promuove il reclutamento dei PMN e la secrezione di proteine battericide, lattoferrina, mieloperossidasi (MPO) e α -difensina (Qadri F, 2004). La lattoferrina ha proprietà antibatteriche nei confronti del *Vibrio cholerae* O1 (Arnold RR, 1980). La MPO è upregolata a livello del sito d'infezione e si trova in alte concentrazioni nelle feci dei colerosi suggerendo un suo possibile ruolo protettivo nella generazione di prodotti reattivi con potenti proprietà antibatteriche (Pruitt MK RB, 1999).

Nei mastociti dei pazienti colerosi è stato riscontrato un aumento dei metaboliti dell'acido arachidonico; aumenta pertanto la produzione di prostaglandine (PGE₂ in particolare) e leucotrieni (LT), come LTC₄ e LTB₄. Quest'ultimo, riscontrato in alte concentrazioni nelle secrezioni intestinali, è anch'esso coinvolto nella migrazione e nell'attivazione dei PMN (Qadri F, 2004).

Considerata la stretta interazione tra MCs ed eosinofili a livello intestinale (Lin TJ BD, 1999), non desta stupore il riscontro di un aumento del numero e dell'attivazione di eosinofili a questo livello, così come nel circolo sanguigno, nei pazienti colerosi (Qadri F, 2004). L'attivazione delle MCs ed il rilascio di IL-5 è determinante per l'attivazione degli eosinofili.

Sebbene *Vibrio cholerae* colonizzi l'intestino tenue, i cambiamenti vascolari e morfologici interessano anche i distretti intestinali più distali (Pulimood AB, 1998).

Concludendo, *Vibrio cholerae* induce queste cellule a rilasciare mediatori, chemochine e citochine in grado di modulare la risposta immunitaria innata dell'ospite e di indurre una risposta immunitaria adattativa più consistente

(Chertov O, 2000). Questo porta alla *clearance* del patogeno ed ad una rapida guarigione. Affinché un vaccino sia protettivo nei confronti del colera dovrebbe quindi essere in grado di indurre questo tipo di risposte che hanno luogo durante l'infezione naturale.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

La citolisina di *Vibrio cholerae* (VCC), donata dal laboratorio del prof. Cesare Montecucco (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali, Università Degli Studi di Padova) è stata purificata da surnatanti di coltura di *Vibrio cholerae* O1 El Tor 8731 (Hall RH, 1990).

Brevemente, i surnatanti sono stati precipitati in etanolo (concentrazione finale 40%), caricati in un gradiente di saccarosio e sottoposti a cromatografia su colonna di idrossiapatite (Zitzer A, 1997; 1999).

Qui di seguito sono riportati i principali reagenti utilizzati e le rispettive ditte fornitrici.

I mezzi di coltura, FBS ed HBSS (Invitrogen/Gibco); MEQ, Fura2-AM ed acido pluronico (Molecular Probes); sulfipirazone, U73122, EGTA, DIDS, papaina, L-cisteina e sodio-isetionato (Sigma), BAPTA-AM (Calbiochem).

La linea cellulare Caco-2 proviene dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia.

2.2 Metodologie sperimentali utilizzate per lo studio dell'attività pro-secretoaria di VCC

2.2.1 Linea cellulare Caco-2

Le Caco-2, una linea cellulare epiteliale di adenocarcinoma di colon umano, sono state mantenute in DMEM con FBS al 10% (v/v) e gentamicina 1 µg/ml (Invitrogen), pH 7.4, a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Le cellule crescono formando un monostrato.

Per gli esperimenti volti alla misurazione del cloruro le cellule sono state seminate ($4 \cdot 10^5$), 24 ore prima, su vetrini coprioggetto di 24 mm di diametro.

Per i saggi di vitalità e di vacuolizzazione, 24 ore prima del test, sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (10^5 cellule/pozzetto).

2.2.2 Determinazione del cloruro intracellulare

I cambiamenti della concentrazione intracellulare di cloruro (Cl^-) sono stati misurati con l'ausilio di un tracciante fluorescente sensibile alle variazioni della concentrazione dell'anione, il 6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ) (Biwersi J, 1991).

In quanto tale il MEQ non è in grado di attraversare la membrana cellulare (è un composto polare, l'azoto dell'anello chinolinico è carico positivamente) pertanto deve essere ridotto a diH-MEQ (diidro-MEQ).

L'agente riducente è una soluzione acquosa di sodio-boro-idruro (NaBH_4) al 12%. Brevemente, la soluzione acquosa di MEQ viene insufflata con azoto per un paio di minuti; si aggiunge lentamente NaBH_4 . La formazione di una soluzione di colore giallo è indicativa della completezza della reazione di riduzione.

Il diH-MEQ verrà separato da questa soluzione mediante estrazione in cloroformio. La fase organica, contenente il diH-MEQ sotto forma di olio di colore giallo, verrà recuperata.

Una volta all'interno della cellula il diH-MEQ viene convertito in MEQ (**Figura 2.1**), viene ossidato, ed in questa forma la sua fluorescenza risulta sensibile alla concentrazione dell'anione cloruro. Al contrario, caratteristica molto vantaggiosa, la sua fluorescenza non è influenzata dal pH, nitrati, solfati, fosfati, cationi, zuccheri ed urea.

Il cloruro inibisce la fluorescenza del tracciante (*quenching*) mediante un meccanismo di collisione, quindi l'aumento della fluorescenza corrisponde ad una diminuzione della concentrazione intracellulare di cloruro.

Le cellule Caco-2, seminate su di un vetrino, sono state incubate per 50 minuti con diH-MEQ (concentrazione finale $50 \mu\text{M}$) disciolto in tampone #1 (NaCl 135mM, KCl 4.7mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM, CaCl_2 1.2 mM, HEPES 10 mM, glucosio 5 mM, sodio piruvato 1 mM, pH 7.4), lavate per allontanare eventuale tracciante rimasto in soluzione, e trasferite in una camera di

perfusione posizionata sullo stativo di un microscopio invertito a fluorescenza (Olympus IX70). La perfusione è stata garantita da una pompa peristaltica e da una pompa a vuoto per l'aspirazione. Trenta minuti prima della scadenza del tempo d'incubazione con il MEQ è stata aggiunta la VCC 500 pM (cellule trattate) o il PBS (cellule controllo).

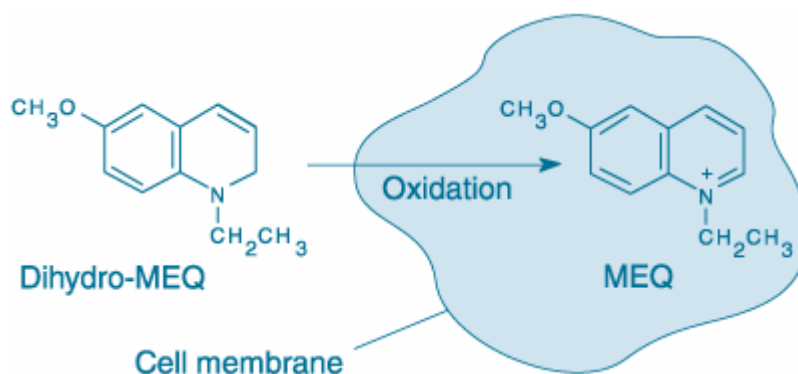


Figura 2.1. Conversione del diH-MEQ in MEQ. Una volta all'interno della cellula il diH-MEQ viene convertito in MEQ. In questa forma la sua fluorescenza risulta sensibile alla concentrazione dell'anione cloruro.

Una lampada allo Xenon da 150 W costituisce la sorgente di eccitazione.

Il campione viene eccitato, da un fascio di luce monocromatico, alla lunghezza d'onda (λ) di 340 nm (λ_{ass} del MEQ). Un filtro interferenziale fissa la λ di emissione a 440 nm (massimo di emissione del MEQ). L'intensità di emissione viene raccolta da un tubo fotomoltiplicatore, amplificata, letta da un fotometro, convertita digitalmente e analizzata con il programma Till Vision (*Till Photonics, Germania*). Le immagini vengono registrate da una CCD Camera che le acquisisce ogni 10 secondi.

Le cellule sono state mantenute in perfusione continua in tampone #1; dopo 340 secondi il tampone è stato sostituito con il tampone #2 assolutamente privo di cloruro (NaNO_3 140 mM, KNO_3 5mM, acido gluconico 3 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, glucosio 5 mM, HEPES 20 mM, pH 7.4.) e mantenute in questa soluzione per 500 secondi sempre in perfusione continua. Le cellule sono state nuovamente perfuse con il #1 per altrettanti 500 secondi.

Per ogni campione è stata monitorata la fluorescenza in 2-3 cellule, registrata e quantificata.

Per ogni esperimento è stata quantificata l'autofluorescenza delle cellule (*total quenchable signal*) perfondendo i campioni con una soluzione di tiocianato di potassio (KSCN) 150 mM, per eliminare la variabilità sperimentale dovuta al differente caricamento, tra campione e campione, con il tracciante.

La quantificazione del segnale di fluorescenza, espressa come ΔF , rappresenta quindi la differenza tra il massimo segnale di fluorescenza registrato durante la perfusione in tampone #2 (assenza di cloruro) e quello corrispondente alla fluorescenza basale calcolata a $t=0$. Entrambi i valori sono stati ottenuti sottraendo il valore di autofluorescenza delle cellule (ottenuto dopo perfusione con KSCN).

2.2.3 Valutazione dell'attività vacuolizzante

Le cellule Caco-2 sono state seminate il giorno prima dell'esperimento in piastre da 96 pozzetti (10^4 per pozzetto) nel loro terreno di coltura a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 .

La stimolazione è stata effettuata in DMEM contenente FBS 2% (v/v) e cloruro di ammonio (NH_4Cl) 5mM, con o senza VCC 500 pM per 0.5, 2, 4, 8 e 24 ore.

L'eventuale presenza di vacuoli in seguito al trattamento è stata valutata qualitativamente mediante osservazione microscopica e quantitativamente mediante valutazione dell'accumulo di rosso neutro all'interno della cellula (NRU, Neutral Red Uptake) (Cover TL, 1991).

Il rosso neutro è un colorante vitale solubile nella fase lipidica delle membrane. Una volta all'interno dell'organello il colorante si protona (il pH all'interno del vacuolo è acido) per cui rimane intrappolato, perché in questa forma non è più in grado di attraversare le membrane.

Dopo rimozione del surnatante, è stata aggiunta alle cellule una soluzione di rosso neutro allo 0.05% (p/v) in PBS. Dopo 5 minuti di incubazione sono stati fatti un paio di lavaggi con una soluzione 0.3% BSA in PBS.

In seguito a lisi cellulare con una soluzione di etanolo al 70% ed HCl al 37%, il rosso neutro eventualmente accumulato all'interno delle cellule viene rilasciato. L'assorbanza è stata misurata con un lettore di piastra Packard Fusion Microplate

Reader. Il rosso neutro assorbe ad una lunghezza d'onda compresa tra 405 e 540 nm, per cui il valore netto di assorbanza è stato calcolato per differenza (540-405).

2.2.4 Misurazione dell'attività deidrogenasica mitocondriale (MTS assay)

L'*MTS assay* è un saggio colorimetrico in cui viene valutata la vitalità cellulare sulla base dell'attività di enzimi associati al metabolismo ossidativo come le deidrogenasi mitocondriali.

E' una reazione di riduzione nella quale l'MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), un sale di tetrazolio di colore giallo [CellTiter 96[®] kit (Promega)] viene ridotto dal NADH, prodotto in seguito all'attività della succinil deidrogenasi, a formazano, di colore arancione.

L'assorbanza, misurata a 485 nm, è direttamente proporzionale all'attività mitocondriale e quindi alla vitalità cellulare.

Le cellule Caco-2 sono state seminate il giorno prima dell'esperimento in piastre da 96 pozzetti (10⁵ per pozzetto) nel loro terreno di coltura, a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Il terreno di stimolazione è esattamente quello nel quale si coltivano al quale vengono aggiunti PBS (cellule controllo) o VCC 500 pM per tempi differenti (0.5, 1 e 2 ore). Scaduto il tempo di incubazione il surnatante è stato rimosso e sostituito da terreno di coltura completo privo di rosso fenolo (perché interferirebbe con la colorazione del formazano) contenente una soluzione di MTS. Le cellule sono state incubate con questa soluzione per 2 ore, scadute le quali è stata effettuata la lettura dell'assorbanza a 485 nm.

2.2.5 Esperimenti sui campioni di colon sigmoide umano: misura dei parametri elettrici

I campioni di colon sigmoide (**Figura 2.2**) sono stati ottenuti da pazienti sottoposti a colectomia subtotale in seguito ad un cancro colonico.

Ogni campione, privato delle tonache muscolari esterne, è stato tagliato longitudinalmente ed interposto a foglietto tra due semicamere di perfusione, le camere di Ussing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) (**Figura 2.2**), perfuso, alla temperatura di 37°C, con soluzione di Krebs (contenente in mM: 107 NaCl, 4.5 KCl, 25 NaHCO₃, 0.2 NaH₂PO₄, 1.8 Na₂HPO₄, 1.25 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 12 glucosio, pH 7.2) e ossigenato (O₂/CO₂ (95%/5%) di continuo).

Ogni semicamera (mucosale e sierosale) contiene 3 ml di soluzione di Krebs in costante ricircolo.

Per monitorare la differenza di potenziale transepiteliale (V_T , mV) e la resistenza transepiteliale (R_T , $\Omega\cdot\text{cm}^2$) a circuito aperto, e la corrente di corto circuito (I_{SC} , $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) (fissando a zero il potenziale transepiteliale) sono state usate due coppie di elettrodi Ag/AgCl.

Ad intervalli di tempo fissi (1 minuto) è stata applicata al tessuto una corrente di 1 μA di ampiezza per 200 ms ed in tal modo dal valore del voltaggio, misurato a circuito aperto, è stata calcolata la R_T , in accordo con la legge di Ohm ($R_T = \Delta V_T / I$).

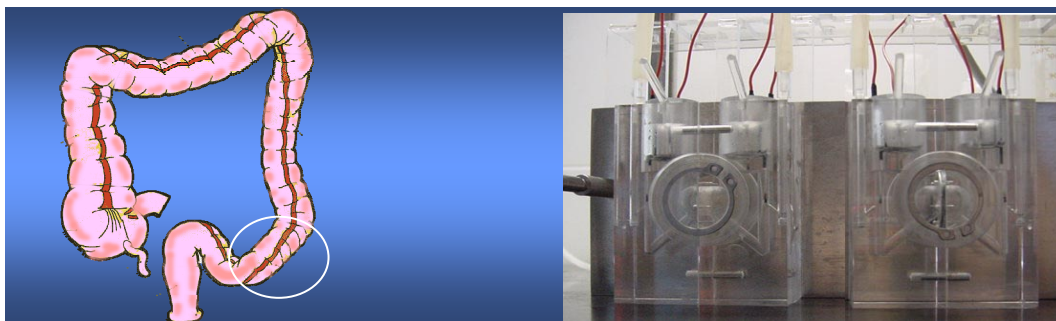


Figura 2.2. **A sinistra:** il tratto di intestino all'interno dell'ovale è il colon sigmoide. **A destra:** le camere di Ussing.

parametri elettrici sono stati monitorati e misurati prima del trattamento (Ctrl) (raggiunto l'equilibrio, stabilità dei parametri), durante il trattamento con VCC o DIDS (camera mucosale) e dopo la rimozione degli stimoli (Ctrl).

Negli esperimenti condotti in presenza di basse concentrazioni di cloruro (9 mM), nella soluzione di Krebs utilizzata per entrambe le semicamere, NaCl è stato sostituito con isetionato di sodio.

Per facilitare le interazioni tra la VCC e la superficie mucosale colonica, è stato rimosso lo strato protettivo di muco tramite incubazione dei campioni (25 minuti) con una soluzione mucolitica contenente papaina (5 U/100 ml) ed L-cisteina (5 mM) (Flemström G, 1999; Debellis L, 2001). La soluzione enzimatica è stata rimossa e sostituita dalla soluzione di Krebs prima della perfusione con la soluzione contenente gli stimoli.

2.3 Metodologie sperimentali utilizzate per lo studio dell'attività pro-infiammatoria di VCC

2.3.1 Allestimento colture cellulari di BMMCs (bone marrow-derived mast cells)

Dal femore di topini donatori C57BL/6 (5-6 settimane di età) sono state isolate le cellule del midollo osseo. Queste cellule pluripotenti sono state mantenute in coltura in RPMI (Gibco), 20% FBS, L-glutamina 2 mM (Gibco), HEPES buffer 25 mM (Gibco), aminoacidi non essenziali 1% (Gibco), sodio piruvato 1 mM (Gibco), β -mercaptoetanolo 54 μ M (Sigma), penicillina 100 U/ml (Gibco), streptomina 100 μ g/ml (Gibco), IL-3 ed SCF (*Stem Cell Factor*) 10 ng/ml (PeproTech) (Odom S, 2004). Vengono mantenute in coltura per almeno 4 settimane (37 °C, in atmosfera al 5% CO₂) terminate le quali circa il 95-97% delle cellule si sono differenziate in mastociti [valutazione dell'espressione del recettore Fc ϵ RI (Saitoh S, 2000) o colorazione May Grunwald – Giemsa (**Figura 2.3**)] Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in assenza di IL-3 ed SCF poiché questi fattori potrebbero attivare i mastociti.

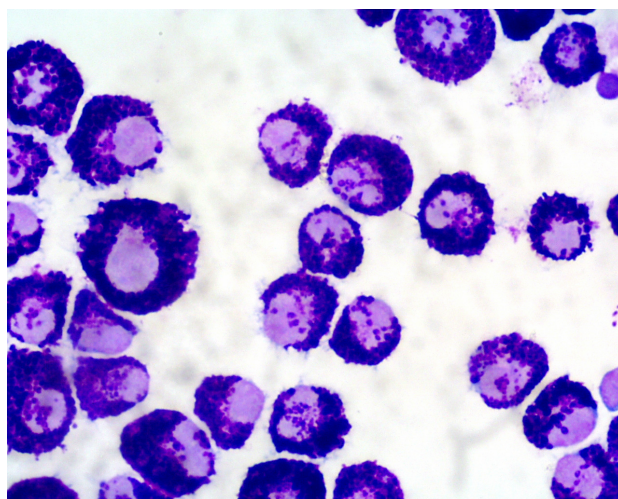


Figura 2.3. Colorazione May Grunwald-Giemsa dei mastociti. Il citoplasma risulta colorato di viola, i granuli viola intenso/blu.

L'allestimento delle colture dei mastociti *knock out* è assolutamente identico.

I mastociti *lyn*^{-/-} e *fyn*^{-/-} sono pervenuti grazie alla collaborazione del prof. Rivera del NIH, i topi *tlr2*^{-/-} sono stati forniti dal prof. Zychlinsky del Max-Planck-Institut.

2.3.2 Misurazione del calcio (Ca²⁺) intracellulare

Al fine di valutare eventuali cambiamenti della concentrazione intracellulare dello ione Ca²⁺ è stato utilizzato l'indicatore fluorescente Fura2-AM (Fura2-acetilmestilistere). Questo indicatore presenta un picco di emissione a 510 nm; l'intensità di tale picco varia al variare della concentrazione intracellulare di calcio. In particolare, eccitando il Fura2-AM con una $\lambda = 340$ nm l'intensità del segnale di emissione di fluorescenza aumenta all'aumentare della concentrazione intracellulare di calcio; invece all'eccitazione del Fura con una $\lambda = 380$ nm segue una emissione tanto più bassa quanto più aumenta la concentrazione intracellulare del catione (**Figura 2.4**)

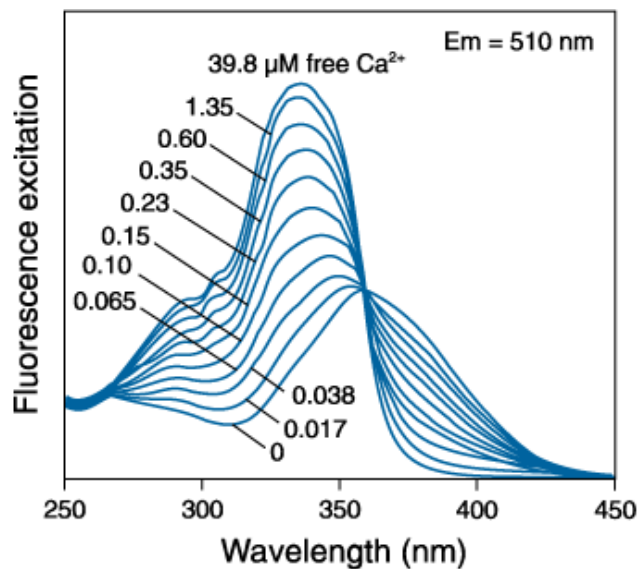


Figura 2.4. Spettri di eccitazione del Fura2-AM. Gli spettri sono stati ottenuti misurando l'intensità di fluorescenza emessa a 510 nm al variare della lunghezza d'onda di eccitazione ed in presenza di differenti concentrazioni di calcio.

I mastociti (10^6) sono stati incubati per 40 minuti a temperatura ambiente, al buio, con Fura2-AM 5 μ M, sulfinpirazone 250 μ M e acido plutonico 32 μ M in HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution). Al termine del periodo di incubazione le cellule sono state lavate in HBSS al fine di eliminare l'eventuale fura presente nel mezzo extracellulare, risospese nello stesso e trasferite in cuvetta.

Al fluorimetro (RF-5301PC spectrofluorophotometer Shimadzu, Germany), munito di termostato (37°C), è stata monitorata la fluorescenza basale dell'indicatore e gli eventuali cambiamenti dovuti all'aggiunta degli stimoli (VCC).

Negli esperimenti nei quali è stato utilizzato l'EGTA, immediatamente prima dell'aggiunta di VCC è stato aggiunto l'EGTA 5mM per chelare il calcio extracellulare. Nei casi in cui è stato utilizzato U73122, prima del monitoraggio della fluorescenza le cellule sono state incubate a 37°C per 10 minuti con U73122 30 μ M.

In tutti gli esperimenti la tossina è stata aggiunta direttamente in cuvetta.

Il rapporto (ratio) delle emissioni dopo eccitazione a $\lambda = 340$ e $\lambda = 380$ è un buon indicatore delle variazioni della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} .

2.3.3 Rilevamento di citochine nei surnatanti

Dopo 4 ore di incubazione con gli stimoli, i surnatanti sono stati recuperati e le citochine (IL-4, IL-5, IL-6 e TNF- α) sono state quantificate con il *Bio-Plex Cytokine Assay* (Bio-Rad Laboratories). Questo saggio consente, rispetto ai tradizionali immudosaggi, di poter analizzare il profilo citochinico d'interesse utilizzando pochissimo materiale di partenza (50 μ l). Un altro vantaggio è l'alta sensibilità (si possono rilevare quantità molto piccole di proteina: da 0.02 pg/ml).

Il saggio Bio-Plex si basa sulla tecnica "sandwich", quindi sull'impiego, per ogni citochina saggiata, di due anticorpi che si legano ad epitopi differenti e non sovrapponibili. La soluzione contenente sfere (beads) di polistirene, marcate con un colore diverso a seconda della specificità dell'anticorpo di cattura coniugato, viene aggiunta nei pozzetti di una micropiastra per Bio-Plex, in modo da consentirne l'adsorbimento. Terminata l'incubazione con 50 μ l di campione o di

soluzione standard, la proteina non legata viene rimossa attraverso una serie di lavaggi. La successiva aggiunta di un anticorpo biotinilato di rilevamento che si lega alla citochina di interesse, completerà il "sandwich". La biotina legata all'anticorpo secondario verrà poi rilevata con streptavidina coniugata con il fluoroforo ficoeritrina (streptavidina-PE). La micropiastra viene poi letta con lo strumento Bio-Plex, in grado di identificare e quantificare ciascuna citochina sulla base del colore della sfera di polistirene e della fluorescenza. La soluzione standard di citochine ricombinanti, fornita dalla ditta, viene ricostituita nello stesso mezzo in cui è stato condotto l'esperimento in modo tale che standard e campioni di trovino nello stesso solvente. La curva di calibrazione viene preparata mediante diluizioni seriali 1:4 della soluzione standard di citochine. La concentrazione delle citochine nei terreni viene calcolata automaticamente dal software Bio-Plex Manager per confronto con la curva di calibrazione.

2.3.4 Misurazione dell'attività deidrogenasica mitocondriale (*MTS assay*)

Anche per i BMMCs si è voluta verificare la vitalità cellulare al termine delle incubazioni con i vari stimoli. La metodica è esattamente quella riportata nel paragrafo 2.2.4, con qualche piccola modifica.

Ciascun campione contiene 10^5 cellule e considerato che i mastociti crescono in sospensione, prima dell'incubazione (della durata di 1.5 ore) con il mezzo contenente il sale di tetrazolio (MTS) i campioni sono stati centrifugati (piastra da 96 pozzetti a fondo conico) al fine di rimuovere il terreno di stimolazione.

La vitalità dei BMMCs è stata valutata dopo 0.5, 2, 4, 6, 8 e 24 ore di infezione con VCC 500 pM e parallelamente ad ogni esperimento nel quale sono stati utilizzati BAPTA-AM, U73122, DIDS ed RPMI con EGTA 5 mM (per gli esperimenti effettuati in presenza di basse concentrazioni di calcio).

2.3.5 Rilascio della beta-esosaminidasi

I BMMCs (2×10^6 cellule/ml) sono stati incubati con gli stimoli per 1 ora a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 in HEPES-Tyrode buffer contenente 137 mM NaCl, 5.6 mM glucosio, 5 mM KCl, 0.5 mM NaH_2PO_4 , 1.8 CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 0.1 % BSA, pH 7.4.

Al termine dell'incubazione i surnatanti sono stati recuperati e le cellule sono state lisate con una soluzione 0.2% di Triton X-100 in PBS.

Il contenuto di β -esosaminidasi rilasciata nei surnatanti o non rilasciata (contenuta nei lisati cellulari) è stato valutato come segue: 50 μl di ciascun campione (in duplicato) è stato incubato per 3 ore con 50 μl di un substrato capace di reagire con l'enzima beta-esosaminidasi, il *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide 1mM, preparato in sodio citrato 0.2 M pH 4.3. La reazione è stata bloccata a pH basico 10.5 con bicarbonato 0.1 M. Il prodotto della reazione, tra l'enzima ed il substrato, in ambiente basico si colora di giallo. Lettura dell'assorbanza a 405 nm.

Il rilascio della β -esosaminidasi è stato espresso in percentuale: (rilasciata/totale) $\times 100$, dove per totale si intende la somma tra quella rilasciata e quella rimasta nelle cellule.

Come controllo positivo abbiamo sottoposto le cellule alla classica stimolazione antigenica. A tale scopo i BMMCs sono stati incubati over night con le IgE-anti DNP (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Il giorno dell'esperimento, sono stati fatti 2 lavaggi per allontanare gli anticorpi in accesso. Contemporaneamente alla stimolazione con VCC, i campioni rappresentanti i controlli positivi sono stati stimolati per 1 ora con l'antigene specifico DNP-HSA 100 ng/ml (dinitrofenolo coniugato con human serum albumin).

2.3.6 Screening dei recettori Toll-like

Cellule HEK293 (Human embryonic kidney 293), trasfettate con un plasmide codificante un singolo recettore toll-like umano (TLR2/CD14, o TLR3 o TLR4/CD14/MD2), sono state seminate ($5 \times 10^5/\text{ml}$), il giorno precedente l'esperimento, in piastre da 24 pozzetti. Sono state incubate per tempi differenti

con VCC 500 pM (10 minuti, 20 minuti, 2, 4 e 6 ore) o per 4 ore con il ligando specifico (controllo positivo) per ciascun recettore toll-like preso in considerazione [HP-NAP di *Helicobacter pylori* 1 μ M, controllo positivo per il TLR2 (Amedei A, 2006), poly (I:C) 25 μ g/ml, controllo positivo per il TLR3 e lipopolisaccaride 100 ng/ml, controllo positivo per il TLR4.

Terminato il periodo di incubazione, le cellule sono state lisate con un tampone di lisi contenente: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% ed 1 μ g/ml di ciascun inibitore di proteasi, ortovanadato di sodio, PMSF, leupeptina, pepstatina ed aprotinina). Le proteine recuperate sono state separate in SDS-PAGE e trasferite su membrana di nitrocellulosa (western blotting) (Sambrook KJ, 1989).

Dopo saturazione con TBS-T (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, Tween-20 0.02%) e latte (3%), la membrana è stata incubata con l'anticorpo anti-fosfo-IkB α (cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo una serie di lavaggi per eliminare l'anticorpo in eccesso, la membrana è stata incubata per un'altra ora con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi e nuovamente sottoposta ad una serie di lavaggi.

La rivelazione dei siti di legame anticorpale è effettuata su lastra fotografica in camera oscura, dopo incubazione della nitrocellulosa con soluzioni ECL (*Enhanced ChemiLuminescence system*, Amersham Pharmacia Biotech), per 1 minuto.

La stessa membrana trattata al fine di eliminare gli anticorpi legati (*stripping*), è stata incubata con l'anticorpo anti- α -actina (Amersham Pharmacia) utilizzata come controllo interno.

2.3.7 Estrazione di RNA dai BMBCs

Al termine di ogni esperimento, le cellule, controllo e trattate, sono state recuperate per l'analisi dei messaggeri (mRNA) codificanti le citochine d'interesse. Ad ogni campione (2×10^6 cellule) solubilizzato a 4°C in TRIzol (Invitrogen) sono stati aggiunti 0.2 volumi di cloroformio. Tramite centrifugazione (13000 g) sono state separate le due fasi, quella inferiore, fenolo-cloroformica, da quella superiore acquosa, contenente l'RNA totale, che è stata recuperata. Da questa soluzione l'RNA è stato recuperato per precipitazione (a -

20°C per 1 ora) con un ugual volume di isopropanolo. Dopo centrifugazione l'RNA ha formato un *pellet* che è stato abbondantemente lavato con etanolo al 75% in acqua DEPC (priva di RNasi, trattata con dietilpirocarbonato). Una volta evaporato l'etanolo, che potrebbe interferire con la successiva reazione di retrotrascrizione, il pellet è stato risospeso in 10 µl di acqua DEPC.

2.3.8 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA

Il primo *step* della retrotrascrizione consiste nella denaturazione dell'RNA (72°C per 5 minuti). La mix di denaturazione è stata preparata nel seguente modo:

DTT	10 mM
Buffer	1x
dNTPs	0.5 mM
Random pdNG primer	2 µM

Terminata la denaturazione i campioni sono stati messi subito in ghiaccio per evitare la rinaturazione dell'acido nucleico. Lo *step* successivo consiste nella retrotrascrizione in cDNA. La mix di retrotrascrizione è stata preparata nel seguente modo:

Retrotrascrittasi Superscript II	140 U
RNasi out	98 U
Acqua DEPC	q.b.

La retrotrascrizione, che avviene in un volume totale di 25 µl, prevede i seguenti passaggi: 42°C per 50 minuti, 95 °C per 5 minuti e poi a 4°C in attesa della precipitazione (over night a -80°C) con 0.1 volumi di sodio acetato 3 M e 2.5 volumi di etanolo assoluto, allo scopo di eliminare i sali che potrebbero interferire nella successiva analisi. Il pellet di cDNA recuperato mediante centrifugazione è stato lavato con etanolo al 75%, lasciato asciugare, risospeso in acqua e conservato a -20 °C.

2.3.9 Real-time PCR

La tecnica della Real-time PCR è stata utilizzata per quantificare, nel cDNA ottenuto in seguito a retrotrascrizione, i messaggeri codificanti per le citochine d'interesse: IL-4, IL-5, IL-6 e TNF- α .

La tecnica della Real-time sfrutta la relazione quantitativa tra l'ammontare del template iniziale (cDNA) e l'ammontare degli ampliconi nella fase esponenziale della reazione di PCR. È possibile monitorare di continuo l'andamento della reazione con l'uso di molecole fluorescenti; noi abbiamo utilizzato il Syber green (Qiagen). Il Syber green emette una fluorescenza maggiore quando intercalato al DNA a doppia elica, quindi, con il procedere dei cicli di amplificazione, si assisterà ad un continuo aumento della fluorescenza.

La mix di reazione per ciascun campione, preparata al buio, prevede: 2 μ l di cDNA campione, primer senso e antisense alla concentrazione di 0,75 μ M ciascuno, acqua RNAsi free e SYBR Green PCR Master mix secondo le indicazioni della ditta fornitrice. Come controllo negativo al posto del cDNA sono stati caricati 2 μ l di acqua RNAsi free. I template sono stati amplificati utilizzando lo strumento Lightcycler II (Roche) in cui è stato impostato il seguente programma: 15 minuti a 95°C per attivare la Taq DNA polimerasi; 20 secondi alla temperatura di appaiamento che dipende dalla coppia di primers utilizzati; 15 secondi a 95°C per la denaturazione; 10 secondi a 72°C per l'estensione; il tutto ripetuto in media 40 volte.

La curva di amplificazione rappresenta una reazione esponenziale.

Più materiale, amplificato dai *primers* specifici, è presente nel campione di partenza, meno cicli di amplificazione sono richiesti affinché la fluorescenza del Syber Green sia misurabile. Il ciclo al quale si raggiunge tale fluorescenza viene chiamato Ct, ciclo soglia (Cycle threshold). Il Ct è il reale indicatore del numero di copie iniziali di ciascun cDNA sottoposto ad amplificazione, ed è da esso che si riescono a derivare le differenze di espressione di un dato mRNA tra i vari campioni.

Il software calcola la curva di melting per ogni campione, relazionando la riduzione della fluorescenza con l'incremento della temperatura per poter valutare la specificità dei prodotti di PCR (la Tm è correlata con la dimensione del

segmento di DNA, con il contenuto di CG e con la concentrazione del template). È stata eseguita in seguito una quantificazione relativa dei dati della Real-time PCR applicando il metodo comparativo del $\Delta\Delta C_t$. È stato possibile utilizzare questo modello matematico perché l'efficienza di amplificazione dei campioni è stata paragonabile.

L'espressione del gene *target* è stata normalizzata su quella di un gene di riferimento (housekeeping), la cui espressione in genere è superiore rispetto a quella del gene *target* ed, ovviamente, non è influenzata dai trattamenti sperimentali. Noi abbiamo utilizzato la β -actina come housekeeping. Il valore di C_t del gene *target* e di quello housekeeping sono stati calcolati per ogni campione (analizzato in triplicato). La loro differenza rappresenta il ΔC_t . Per ogni gruppo di trattamento viene calcolato il ΔC_t medio e la deviazione standard. La differenza tra il ΔC_t di un qualsiasi gruppo di trattamento ed il ΔC_t del gruppo controllo rappresenta il $\Delta\Delta C_t$. È ovvio quindi che il $\Delta\Delta C_t$ del gruppo controllo è pari a zero. L'espressione matematica $2^{-\Delta\Delta C_t}$, che per il gruppo dei campioni controllo sarà quindi uguale ad 1, rappresenta il numero di volte (in più o in meno) in cui il gene *target* è espresso rispetto all'espressione basale (quella riscontrata nei campioni non trattati).

Di seguito sono riportate le coppie di *primers* utilizzate per l'amplificazione dei geni di interesse.

Per IL-4:	5'-GTCATCCTGCTCTTCTTTCTCG-3' (senso) 5'-TGTGGTGTTCCTTCGTTGCTGTG-3' (antisenso)
Per IL-5:	5'-AAGAGAAGTGTGGCGAGGAG-3' (senso) 5'-CAGTTTTGTGGGGTTTTTGC-3' (antisenso)
Per IL-6:	5'-TTCTGCAAGTGCATCATCGT-3' (senso) 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3' (antisenso)
Per TNF- α :	5'-TACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC-3' (senso) 5'-CAGCCTTGTCCCTTGAAGAGAACC-3' (antisenso)
Per β -actina:	5'-GATTACTGCTCTGGCTCCTA-3' (senso) 5'-TCGTA C T C C T G C T T G C T G A T - 3 ' (a n t i s e n s o) .

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 La VCC provoca un efflusso di cloruro dalle cellule intestinali umane Caco-2

Dato che la maggior parte delle tossine diarrogeniche influenzano la secrezione di cloruro nell'intestino, e considerata l'abilità della VCC di legare le membrane lipidiche, ricche di colesterolo e ceramidi (Zitzer A, 1999), e di oligomerizzare formando canali preferenzialmente permeabili agli anioni, abbiamo ritenuto opportuno verificare se fosse in grado di indurre efflusso di cloruro dalle cellule epiteliali intestinali, più precisamente dalle cellule Caco-2, una linea cellulare epiteliale di adenocarcinoma di colon umano.

I movimenti di cloruro sono stati monitorati grazie all'utilizzo del MEQ, un tracciante fluorescente sensibile alle variazioni di concentrazione dell'anione.

L'aumento della fluorescenza del tracciante indica un efflusso di cloruro dal citoplasma.

Le cellule caricate con il diH-MEQ (la forma ridotta), la forma permeabile del tracciante, sono state incubate con PBS (cellule controllo) o con VCC 500 pM per 30 minuti prima di ogni esperimento. Durante l'esperimento, condotto in perfusione continua, sono state utilizzate due soluzioni tampone, una contenente cloruro (135 mM circa) indicata con #1 e l'altra assolutamente priva di cloruro #2, nella quale i sali di cloro sono stati sostituiti dai nitrati.

Inizialmente le cellule sono state monitorate in tampone #1, ed in queste condizioni è stata registrata la fluorescenza basale (**Figura 3.1 A**). Dopo 340 secondi, senza interruzione del flusso, il tampone #1 è stato sostituito con il tampone #2 privo di cloruro; la mancanza di cloruro nell'ambiente extracellulare induce un netto efflusso degli anioni, rilevabile dall'aumento della fluorescenza del tracciante.

Dopo 500 secondi il tampone è stato sostituito nuovamente con #1 permettendo in tal modo alle cellule di riappropriarsi dell'anione; si verifica pertanto un netto influsso di cloruro verso il citoplasma, rilevabile dalla diminuzione della fluorescenza del tracciante. L'aumento della concentrazione citosolica di cloruro

infatti inibisce, per collisione, la fluorescenza del MEQ. L'ultima fase dell'esperimento permette di stabilire il valore basale di fluorescenza, l'autofluorescenza (*total quenched signal*), che consiste quindi nella totale inibizione della fluorescenza del MEQ ottenuta grazie all'utilizzo del tiocianato di potassio (KSCN). Questo valore rappresenta un controllo interno e bisogna tenerne conto al fine di eliminare la variabile, comunque poco frequente, rappresentata dal differente grado di caricamento delle cellule con il tracciante fluorescente.

Come mostra la **Figura 3.1 A**, questa procedura, nelle cellule controllo (linea sottile), induce un aumento della fluorescenza del tracciante seguito da un ritorno ai valori basali, suggerendo pertanto la presenza di canali al cloruro funzionali sulla membrana plasmatica.

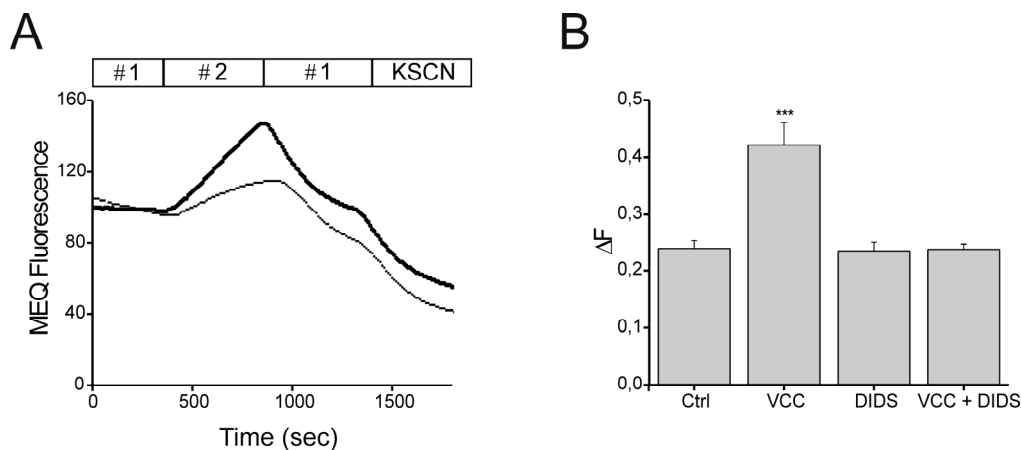


Figura 3.1. Efflusso di cloruro indotto dalla VCC nelle cellule Caco-2.

A) Le cellule, caricate con il tracciante fluorescente MEQ, sono state (traccia in grassetto) o meno (traccia sottile) trattate per 30 minuti con VCC 500 pM. L'assenza o comunque la diminuzione della concentrazione extracellulare di cloruro (indotta dalla sostituzione del tampone #1, contenente cloruro, con il #2 assolutamente privo), porta ad un aumento della fluorescenza del MEQ che corrisponde ad un efflusso degli ioni cloruro verso l'ambiente extracellulare. I valori sono stati normalizzati tenendo conto del *total quenched signal*. **B)** Effetto del DIDS 100 μ M sull'efflusso di cloruro indotto da VCC. Il ΔF è stato calcolato come riportato nel paragrafo 2.2.2 della sezione Materiali e Metodi. Ogni istogramma rappresenta la media di 13 esperimenti indipendenti, in ognuno dei quali l'andamento della fluorescenza è stato monitorato contemporaneamente in 3 cellule. La significatività (*vs* le cellule non trattate indicate con Ctrl) è stata calcolata mediante Student's *t*-test (***) ($p < 0.0005$).

Nelle cellule trattate con VCC (traccia in grassetto), l'aumento della fluorescenza del MEQ, e quindi l'efflusso di cloruro, è significativamente maggiore rispetto a

quello che si verifica nelle cellule controllo. Inoltre, la fluorescenza del tracciante aumenta con una cinetica di gran lunga superiore nelle cellule trattate e non raggiunge mai un valore pressoché costante, *plateau*, come invece si verifica nelle cellule non trattate.

Questi risultati suggeriscono pertanto che in presenza della tossina si verifica un incremento della permeabilità al cloruro.

Questo effetto in realtà potrebbe essere il risultato sia dell'attivazione VCC-mediata di canali al cloruro pre-esistenti, sia della neo-formazione di canali permeabili al cloruro formati dalla VCC stessa in seguito ad oligomerizzazione in membrana.

Al fine di discriminare fra i due possibili meccanismi responsabili dell'aumento della permeabilità al cloruro, le cellule, sia controllo che trattate con VCC, sono state pre-incubate con il DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid) 100 μ M, un bloccante generico dei canali permeabili al cloruro ed in grado di bloccare anche i canali formati dalla VCC stessa (Moschioni M, 2002). Come mostrato in **Figura 3.1 B**, dove ΔF indica la differenza tra il valore di fluorescenza massima, raggiunta in assenza di cloruro extracellulare (tampone #2), e la fluorescenza basale calcolata a $t=0$, la presenza del DIDS non influisce minimamente sul segnale di fluorescenza nelle cellule controllo, dimostrando quindi che, alla concentrazione utilizzata, il DIDS non è in grado di bloccare i canali endogeni.

Lo stesso DIDS è invece in grado di inibire completamente l'aumento della fluorescenza indotto dal trattamento con la VCC.

Questi dati suggeriscono in maniera convincente che l'aumento della permeabilità al cloruro indotto dalla VCC sulla linea intestinale Caco-2, potrebbe essere mediato dalla neo-formazione di canali permeabili all'anione da parte della VCC stessa sulla membrana plasmatica delle cellule.

In letteratura è riportato che il poro eptamerico formato in membrana dalla VCC è responsabile di alcuni effetti citotossici indotti dalla tossina, come la lisi cellulare ed un'estesa vacuolizzazione, anche a concentrazioni più basse rispetto a quella da

noi utilizzata. L'effetto è strettamente dipendente dalla sua concentrazione e dal modello cellulare preso in considerazione (Coelho A, 2000; Figueroa-Arredondo P, 2001; Moschioni M, 2002; Pantano S, 2006).

Per questo motivo, prima di dare il via agli esperimenti che ci hanno condotto ai risultati precedenti, abbiamo ritenuto opportuno valutare la vitalità delle Caco-2 e l'eventuale formazione di vacuoli in seguito al trattamento con la VCC. Nelle nostre condizioni sperimentali, ed anche in seguito ad incubazioni per tempi più lunghi, la vitalità delle Caco-2 misurata mediante *MTS assay* (vedi paragrafo 2.2.4 sezione Materiali e Metodi) non è stata per nulla influenzata dal trattamento (dati non riportati).

L'eventuale presenza di vacuoli in seguito al trattamento è stata valutata qualitativamente mediante osservazione microscopica e quantitativamente mediante valutazione dell'accumulo di rosso neutro all'interno della cellula.

Il rosso neutro è un colorante vitale solubile nella fase lipidica delle membrane. Una volta all'interno dell'organello il colorante si protona (il pH all'interno del vacuolo è acido) per cui rimane intrappolato, perché in questa forma non è più in grado di attraversare le membrane.

Dal test di vacuolizzazione emerge che VCC è in grado di indurre formazione di vacuoli nelle cellule Caco-2 dopo almeno 8 ore di infezione. La durata dei trattamenti nei nostri esperimenti è considerevolmente più breve.

3.2 VCC induce aumento della corrente di corto circuito

(I_{SC} , short circuit current) e diminuzione della resistenza transepiteliale (R_T) intestinale

Non possiamo sottovalutare il fatto che i risultati ottenuti sul modello cellulare Caco-2, seppur convincenti, hanno il limite di essere stati condotti su un sistema isolato che, per quanto accreditato come modello, non può riprodurre con assoluta fedeltà quello che si verifica *in vivo* in un distretto così complesso quale l'intestino.

E' per questo motivo che i successivi esperimenti sono stati eseguiti nel tentativo di verificare se VCC fosse in grado di formare canali e di modificare la permeabilità anche su un modello sperimentale più vicino, anatomicamente e fisiologicamente, al reale sito di colonizzazione del *Vibrio cholerae*.

L'infezione da *Vibrio cholerae* coinvolge sia l'intestino tenue che il crasso (Kunzelmann K, 2002), ma è molto più facile, data la frequenza delle neoplasie che lo interessano, ottenere campioni umani di colon piuttosto che di digiuno.

Abbiamo pertanto utilizzato campioni di colon sigmoide ottenuti da pazienti (21 uomini e 15 donne di età compresa tra 32 e 84 anni) sottoposti a colectomia subtotale in seguito ad un cancro colonico.

Ogni campione è stato tagliato longitudinalmente ed interposto a foglietto tra due semicamere di perfusione (camere di Ussing), perfuso, alla temperatura di 37 °C, con soluzione di Krebs e continuamente ossigenato.

Il sistema delle camere di Ussing viene adoperato per la misura di diversi parametri elettrici. Noi ce ne siamo serviti per determinare la differenza di potenziale transepiteliale (V_T) misurata in millivolts (mV), la resistenza transepiteliale (R_T) misurata in Ωcm^2 e la corrente di corto circuito (I_{SC}) misurata in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Sono stati utilizzati 52 frammenti (n) provenienti da 31 tessuti differenti (m) per misurare il valore basale dei suddetti parametri elettrici. Nei tessuti controllo abbiamo ottenuto : $V_T = -8.6 \pm 0.9 \text{ mV}$, $R_T = 146.1 \pm 9.5 \Omega \text{cm}^2$ e

$I_{SC} = 41.8 \pm 2.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. In seguito al trattamento con VCC (0.2, 0.5 e 1 nM) per 90 minuti, non abbiamo ottenuto significative variazioni nelle misure di questi parametri. L'inefficacia del trattamento con la VCC poteva essere dovuta alla presenza dello strato di muco protettivo che ricopre la parete luminale dell'intestino (Atuma C, 2001; Strugala V, 2003), barriera che il vibrione, grazie alla produzione di proteasi, riesce ad attraversare. Pertanto, al fine di facilitare le interazioni tra la VCC e la membrana apicale degli enterociti abbiamo ritenuto opportuno rimuovere enzimaticamente lo strato di muco (vedi paragrafo 2.2.5 sezione Materiali e Metodi).

Rimosso il cocktail enzimatico, 90 minuti di trattamento con VCC 1 nM (n=10; m=7) hanno provocato un aumento significativo della I_{SC} (20.7% rispetto al valore

misurato a $t=0$), una riduzione della R_T del 12.3% , mentre la V_T è rimasta pressoché costante (**Figura 3.2 A**).

L'esposizione alla VCC 0.5 nM ($n=5$; $m=2$) ha suscitato risposte simili ma statisticamente meno significative (dati non riportati).

La riduzione della R_T e l'aumento della I_{SC} sono il risultato di alterazioni della permeabilità epiteliale e dell'aumento del flusso di ioni che potrebbero essere correlati alla formazione di canali VCC-dipendente. L'aumento della R_T osservato in seguito alla rimozione della soluzione contenente la tossina (**Figura 3.2 A**) probabilmente non indica una reversibilità del fenomeno, considerato che in 19 esperimenti su 29, il valore della R_T è rimasto invariato. Pensiamo che il recupero del valore della resistenza transepiteliale sia una variabile sperimentale apportata dalla procedura di sostituzione della soluzione dopo il trattamento con la VCC. Il fatto stesso che ,dopo rimozione della tossina, la I_{SC} continui ad aumentare, indica che i canali, una volta formati, rimangono funzionali.

La correlazione tra gli effetti osservati e l'effettivo coinvolgimento delle correnti di cloruro è stata valutata utilizzando, sia per il lato mucosale che per quello serosale, un tampone contenente una bassa concentrazione dell'anione (9 mM piuttosto che 116 mM), nel quale il cloruro di sodio è stato sostituito dall'isotionato di sodio.

Se i canali permeabili al cloruro presenti sulla membrana plasmatica fossero stati funzionali, l'effetto della VCC sulla I_{SC} , in presenza di una ridotta concentrazione di anioni cloruro, sarebbe dovuto sicuramente essere inferiore, mentre l'effetto sulla R_T sarebbe dovuto rimanere invariato, poiché la riduzione della quantità di anioni coinvolti nel processo avrebbe potuto influenzare il trasporto ionico ma non la capacità della VCC di formare canali.

La **Figura 3.2 B** mostra che su 4 frammenti controllo provenienti da 3 campioni differenti ($n=4$; $m=3$) l'effetto della ridotta concentrazione (mucosale e serosale) di cloruro ha determinato una marcata riduzione della V_T pari al 60.9% del valore misurato al tempo=0, ed un crollo della I_{SC} pari a 86.8% con inversione della polarità della corrente. La R_T ha subito una piccola riduzione, soltanto 4.9 %.

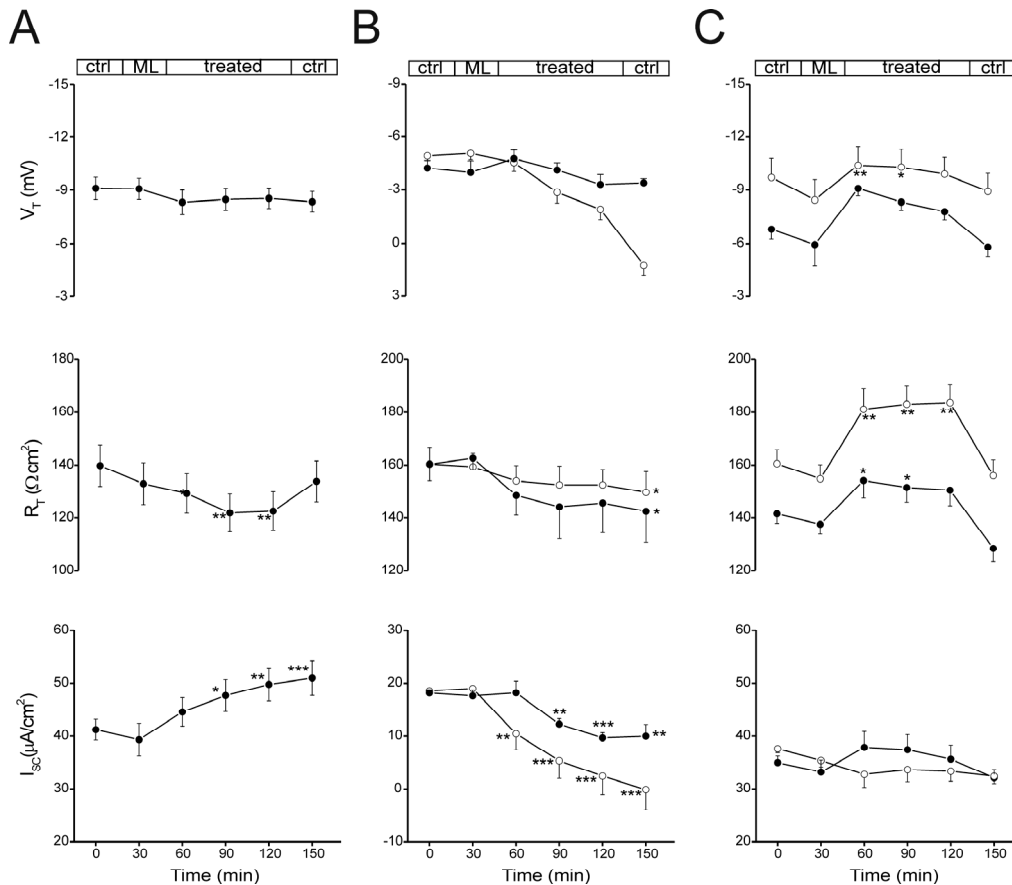


Figura 3.2. Effetto pro-secretorio indotto da VCC sui campioni di colon umano.

I campioni di colon sigmoide umano sono stati montati nelle camere di Ussing al fine di determinarne la differenza di potenziale transepiteliale (V_T , mV), la resistenza transepiteliale (R_T , $\Omega \cdot \text{cm}^2$) e la corrente di corto circuito (I_{SC} , $\mu\text{A}/\text{cm}^2$). Ogni punto rappresenta la media \pm SEM delle misure effettuate su n frammenti derivanti da m campioni. **A)** Effetto indotto in seguito a perfusione della superficie mucosale dei tessuti con VCC 1 nM ($n=10$; $m=7$). **B)** Effetto indotto in seguito a perfusione della superficie mucosale dei tessuti con ($n=4$; $m=3$) o senza ($n=3$; $m=3$) VCC 1 nM in presenza di basse concentrazioni di cloruro (9 mM) su entrambe le superfici tissutali (mucosale e serosale). **C)** Effetto dell'esposizione mucosale del DIDS 1mM in presenza ($n=7$; $m=4$) o in assenza ($n=6$; $m=4$) di VCC 1nM. I cerchi pieni si riferiscono ai tessuti esposti alla tossina mentre i cerchi vuoti ai tessuti non trattati. Tutti i tessuti sono stati trattati con una soluzione mucolitica (ML) contenente papaina (5 U/100 mL) ed L-cisteina (5 mM) prima del trattamento con VCC. I parametri elettrici sono stati misurati in condizioni basali (Ctrl), durante l'incubazione mucosale con DIDS o VCC (Treated) e dopo rimozione degli stessi (Ctrl). La significatività è stata calcolata mediante Student's t -test ($t=0$ vs $t=n$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.002$; *** $p < 0.001$.

Queste variazioni dei parametri elettrici nei tessuti controllo potrebbero essere dovute ad una riduzione della secrezione di Cl^- dalle cripte (interposte tra i villi intestinali) e, di conseguenza, all'assorbimento di Na^+ dalle cellule epiteliali dei villi.

In presenza di basse concentrazioni di cloruro, il trattamento con VCC 1 nM ha indotto un recupero della I_{SC} e della V_T fino a un valore pari al 46.8% e 22% rispettivamente, del valore misurato a $t=0$; il valore della R_T invece è diminuito del 10%.

Queste variazioni riflettono un incremento della permeabilità (recupero del valore di I_{SC}) che correla con la formazione di canali (diminuzione della R_T) permeabili al cloruro e la loro influenza sul trasporto ionico sia a livello delle cripte che della superficie epiteliale dei villi.

Infine, per poter distinguere il movimento degli ioni cloruro che avviene attraverso i canali endogeni da quello mediato dai pori formati dalla VCC, abbiamo utilizzato il DIDS, inibitore generico dei canali permeabili al cloruro, sia sui campioni controllo che sui trattati, ad una concentrazione in grado di bloccare il trasporto di cloruro a livello della membrana apicale, nel colon distale umano (Alrefai WA, 2001).

Come riportato in **Figura 3.2 C**, nei campioni controllo ($n=6$; $m=4$) il DIDS 1 mM, dopo 90 minuti di incubazione, ha causato un aumento della R_T del 14.4% ed una diminuzione della I_{SC} del 12% circa. La V_T è aumentata del 7.2% nei primi 30 minuti di incubazione ma tali cambiamenti non sono risultati significativi.

L'aumento della R_T è ragionevolmente dovuto al blocco dei canali al cloruro presenti sulla membrana apicale, mentre l'incremento transiente della V_T e la diminuzione della I_{SC} potrebbero essere interpretati come conseguenza della progressiva riduzione del co-trasporto $Na^+-K^+-2Cl^-$ a livello della membrana basolaterale in risposta al blocco dell'uscita del cloruro sul versante apicale (Kunzelmann K, 2002; Moschetta A, 2003; Greger R, 1997).

Il trattamento con VCC 1 nM in presenza del DIDS ha indotto un aumento transiente e significativo pari al 33.1% della V_T rispetto al valore calcolato a $t=0$ ed un incremento dell'8% della I_{SC} ($n=7$; $m=4$). Questo risultato potrebbe essere interpretato come una conseguenza della progressiva formazione di canali seguita comunque dal loro blocco dovuto alla presenza del DIDS.

La diminuzione della R_T indotta dalla VCC è stata parzialmente inibita dal DIDS.

Da un'analisi comparativa dei 3 set di esperimenti (trattamento con VCC, DIDS, e DIDS+VCC) e dalla conversione della resistenza transepiteliale in conduttanza, è emerso che il DIDS inibisce circa il 70% dei canali formati dalla tossina.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che i canali formati dalla VCC possono contribuire nel mediare l'efflusso di cloruro a livello delle membrane apicali in campioni di tessuto colonico umano.

Questa proprietà della tossina potrebbe pertanto essere rilevante nell'induzione del fenomeno diarroico conseguente all'infezione da parte dei ceppi del vibrione che non producono la classica tossina colerica e potrebbe contribuire a causare diarrea nei casi in cui il vibrione fosse in grado di produrle entrambe.

3.3 La VCC stimola i BMDCs a produrre citochine

Recenti lavori riportano un aumento dei livelli di mediatori infiammatori nei pazienti infettati da *Vibrio cholerae*, che si verificano parallelamente al reclutamento di cellule del sistema immunitario innato, come mastociti e neutrofili, nella *lamina propria*, a livello delle cripte e dei villi della mucosa intestinale (Qadri F, 2004). Oltre alla tossina colerica (Leal-Berumen I, 1996; Rocha MF, 2003), in questi meccanismi potrebbero essere coinvolti anche altri fattori prodotti dal batterio.

Al fine di verificare il potenziale ruolo di VCC in questo processo abbiamo esaminato il suo effetto sui BMDCs (bone marrow-derived mast cells) murini.

I mastociti (2×10^6 cellule per campione) sono stati esposti per 30 minuti e per 4 ore alla VCC alla concentrazione pari a 500 pM nel loro terreno di coltura, in assenza di IL-3 ed SCF (vedi paragrafo 2.3.1 sezione Materiali e Metodi). Ai campioni controllo è stato aggiunto un volume di PBS apirogeno pari al volume di VCC applicata (il PBS è il solvente della soluzione nella quale è disciolta la VCC).

Al termine del periodo d'incubazione (4 ore) i surnatanti sono stati recuperati ed analizzati, mediante Bio-Plex cytokine assay (vedi paragrafo 2.3.3 sezione Materiali e Metodi) al fine di verificare la produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-4, IL-5, IL-6 e TNF- α . I campioni trattati con VCC per 30

minuti sono stati utilizzati per l'analisi dei messaggeri codificanti per le stesse citochine d'interesse.

Come mostrato in **Tabella 3.1**, il trattamento dei BMMCs con la VCC induce sintesi e rilascio di sostanziali quantità delle citochine considerate, tutte citochine che possono contribuire alla risposta T_H2 osservata nell'infezione naturale (Marinero M, 1995).

Il rilascio di una quantità molto ridotta di IL-5, se confrontata con quella delle altre citochine, è in accordo con l'evidenza che i mastociti murini producono quantità irrisorie di questa proteina rispetto ai mastociti umani (Bischoff SC, 2007).

L'analisi dei messaggeri era perfettamente in linea con quanto riscontrato analizzando i surnatanti (dati non riportati).

Tabella 3.1. Rilascio di citochine dai BMMCs trattati con VCC.

Trattamento	IL-4 (pg/10 ⁶ cells) (media ± SEM)	IL-5 (pg/10 ⁶ cells) (media ± SEM)	IL-6 (pg/10 ⁶ cells) (media ± SEM)	TNF- α (pg/10 ⁶ cells) (media± SEM)
Ctrl	0.141 ± 0.040	0.349 ± 0.134	3.559± 0.885	1.273 ± 0.551
VCC	46.466± 9.467***	1.101 ± 0.174**	1055.2 ± 188.9***	693 ± 85.586***

I mastociti sono stati infettati per 4 ore con la VCC 500 pM ed il rilascio di citochine è stato valutato analizzando i surnatanti con il Bio-PlexTM cytokine assay. I dati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. La significatività (trattato vs controllo) è stata calcolata con Student's *t*-test (**p < 0.005; ***p < 0.0005).

Considerate le proprietà citotossiche di VCC parallelamente ad ogni esperimento sin qui riportato, così come per tutti quelli riportati di seguito, è stata valutata, mediante *MTS assay*, la vitalità dei BMMCs trattati con VCC.

Nelle nostre condizioni sperimentali, e fino a 24 ore di infezione con la tossina, la vitalità dei mastociti è risultata assolutamente paragonabile a quella delle cellule non trattate (dati non riportati).

3.4 La VCC induce un aumento della concentrazione intracellulare di calcio nei BMMCs

Il calcio è un elemento fondamentale nella trasduzione del segnale intracellulare nei mastociti, ed è coinvolto in diverse funzioni cellulari come il movimento (chemotassi), la fagocitosi (endocitosi) e la degranulazione (esocitosi).

Il classico meccanismo di attivazione dei mastociti, sia umani che roditori, IgE-dipendente, è caratterizzato da un influsso di calcio extracellulare essenziale per il rilascio di citochine ed altri mediatori sia pre-formati (contenuti nei granuli) che generati *de novo* (Caulfield JP, 1980).

I risultati mostrati nel paragrafo precedente suggeriscono che la VCC è in grado di attivare i mastociti. Una tossina simile, la citotossina VacA prodotta da *Helicobacter pylori*, stimola i mastociti a sintetizzare e rilasciare citochine in seguito all'aumento della concentrazione citosolica di calcio (Ca^{2+}) (Molinari M, 1998; de Bernard M, 2005).

Pertanto, al fine di verificare se VCC fosse in grado di indurre nei BMMCs cambiamenti nella concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , le cellule, caricate con il Fura2-AM (vedi paragrafo 2.3.2 sezione Materiali e Metodi), sono state monitorate, in continuo, prima e dopo l'infezione con VCC 500 pM.

La **Figura 3.3** chiaramente mostra un rapido incremento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} indotto dalla VCC.

Questa risposta bi-fasica, sia dal punto di vista cinetico che di entità di aumento della fluorescenza del tracciante, suggerisce che VCC potrebbe indurre un rilascio di Ca^{2+} dai depositi (*stores*) intracellulari seguito da un sostanziale e più sostenuto influsso dello stesso, probabilmente attraverso i SOCs (store-operated calcium channels) presenti sulla membrana plasmatica.

Nei mastociti, la mobilizzazione del calcio dagli *stores* intracellulari è mediata dal secondo messaggero inositolo 1,4,5-trifosfato (IP_3) e dai suoi recettori a livello del reticolo endoplasmatico. IP_3 deriva dall'idrolisi del fosfatidil-inositolo-bifosfato (PIP_2) ad opera della fosfolipasi C (PLC).

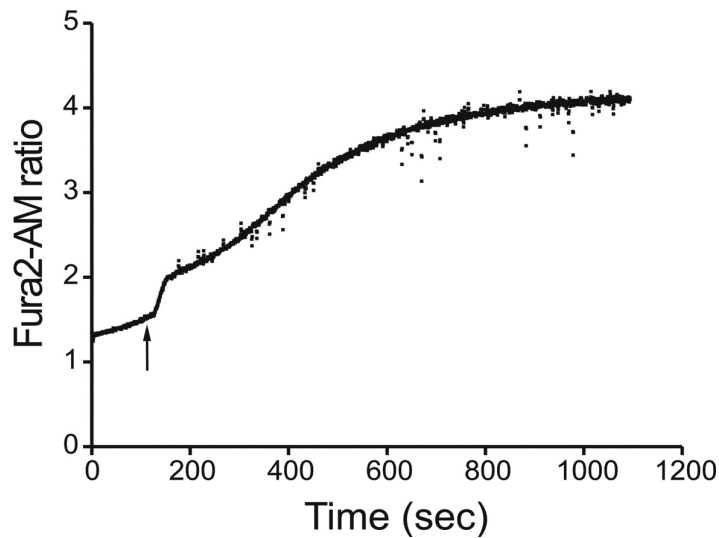


Figura 3.3. Aumento della concentrazione citosolica del Ca^{2+} indotto dalla VCC.

I BMMCs sono stati caricati con il Fura2-AM ed il *ratio* di fluorescenza (340 nm/380 nm) è stato misurato al fluorimetro (vedi 2.3.2 sezione Materiali e Metodi). La freccia indica l'aggiunta della VCC. L'esperimento è rappresentativo di 5 condotti su colture indipendenti.

Allo svuotamento degli *stores* intracellulari segue l'attivazione, a livello della membrana plasmatica, dei canali al calcio che mediano le “correnti di calcio capacitative” (chiamati anche canali CRAC, calcium release-activated calcium channels).

Al fine di verificare se la VCC fosse in grado di attivare questo *pathway* di segnale che prevede la partecipazione sia del calcio extracellulare che degli *stores* intracellulari, abbiamo analizzato separatamente le due componenti.

Per verificare l'affettivo coinvolgimento del calcio esterno, i BMMCs, caricati con Fura2-AM, sono stati incubati con un chelante ad alta affinità per il calcio (tra i cationi bivalenti predilige il calcio con una affinità di gran lunga superiore rispetto a tutti gli altri), l'EGTA [Ethylen glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid] alla concentrazione finale 5 mM.

La mancata disponibilità del calcio extracellulare determina la scomparsa della seconda fase di incremento di fluorescenza del Fura2-AM indotto dalla sola VCC, ma non impedisce quello iniziale attribuibile allo svuotamento degli *stores* (Figura 3.4 A).

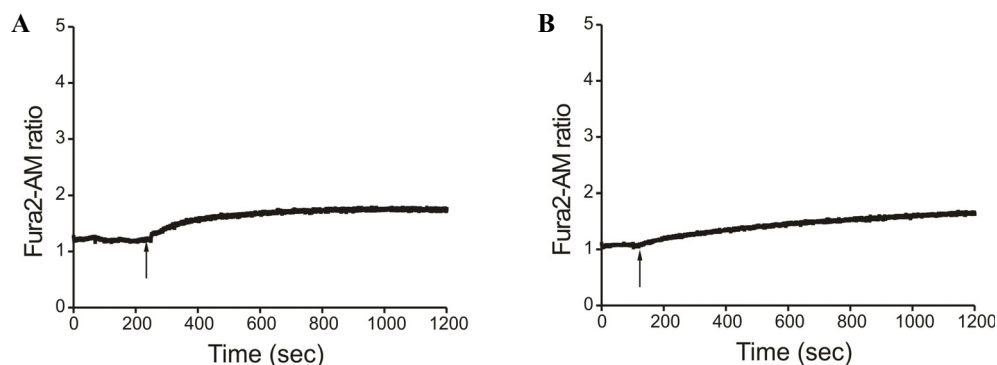


Figura 3.4 Caratterizzazione farmacologia della modulazione del Ca^{2+} indotta dalla VCC.

I BMMCs, caricati con il Fura2-AM, sono stati incubati con EGTA 5mM poco prima dell'inizio del monitoraggio della fluorescenza (A) o pre-incubati per 10 minuti a 37°C con U73122 30 μM (B). La freccia indica l'aggiunta della VCC. L'esperimento è rappresentativo di 4 condotti su culture indipendenti.

Per confermare quindi l'effettivo coinvolgimento degli *stores* del reticolo endoplasmatico, i mastociti sono stati pre-incubati con un inibitore della $\text{PLC}\gamma$, U73122 (30 μM), che impedisce pertanto la sintesi di IP_3 .

In queste condizioni la VCC fallisce nell'indurre lo svuotamento dei depositi intracellulari a rapido scambio (**Figura 3.4 B**) e di conseguenza l'apertura dei CRACs in membrana. Questi risultati supportano l'ipotesi che la mobilizzazione del Ca^{2+} indotta dalla tossina coinvolga sia gli *stores* intracellulari che le correnti capacitative.

3.5 Ruolo del calcio nel rilascio di citochine indotto dalla VCC

Per verificare se l'aumento della concentrazione citosolica del calcio indotto dalla VCC fosse coinvolto nella sintesi e nel rilascio delle citochine, i mastociti sono stati trattati con un chelante del calcio intracellulare, il BAPTA-AM (10 μM) prima della stimolazione con VCC 500 pM.

Come mostrato in **Figura 3.5**, la mancata disponibilità del calcio intracellulare inibisce, pressoché completamente, la secrezione, VCC-indotta, di tutte le citochine prese in considerazione.

Al fine di escludere la possibilità che gli effetti osservati con il BAPTA-AM fossero una conseguenza della tossicità dei metaboliti del composto, le cellule

sono state esposte alla VCC in condizioni di basso calcio (*low Ca²⁺*) per la presenza di EGTA 5 mM nel mezzo. I risultati ottenuti in queste condizioni sono stati analoghi a quelli ottenuti con il BAPTA-AM (**Figura 3.5**).

Anche l'inibizione della sintesi di IP₃ indotta dal pretrattamento con U73122 (30 μM), inibitore della PLCγ, ha comportato una significativa, anche se non totale, inibizione del rilascio delle citochine proinfiammatorie indotto dalla tossina (**Figura 3.5**). La non totale inibizione del rilascio in presenza di U73122 potrebbe essere dovuta all'attivazione di qualche altro segnale, che comunque porta alla secrezione delle citochine, ma che è indipendente, o meno dipendente, dall'aumento della concentrazione citosolica di calcio.

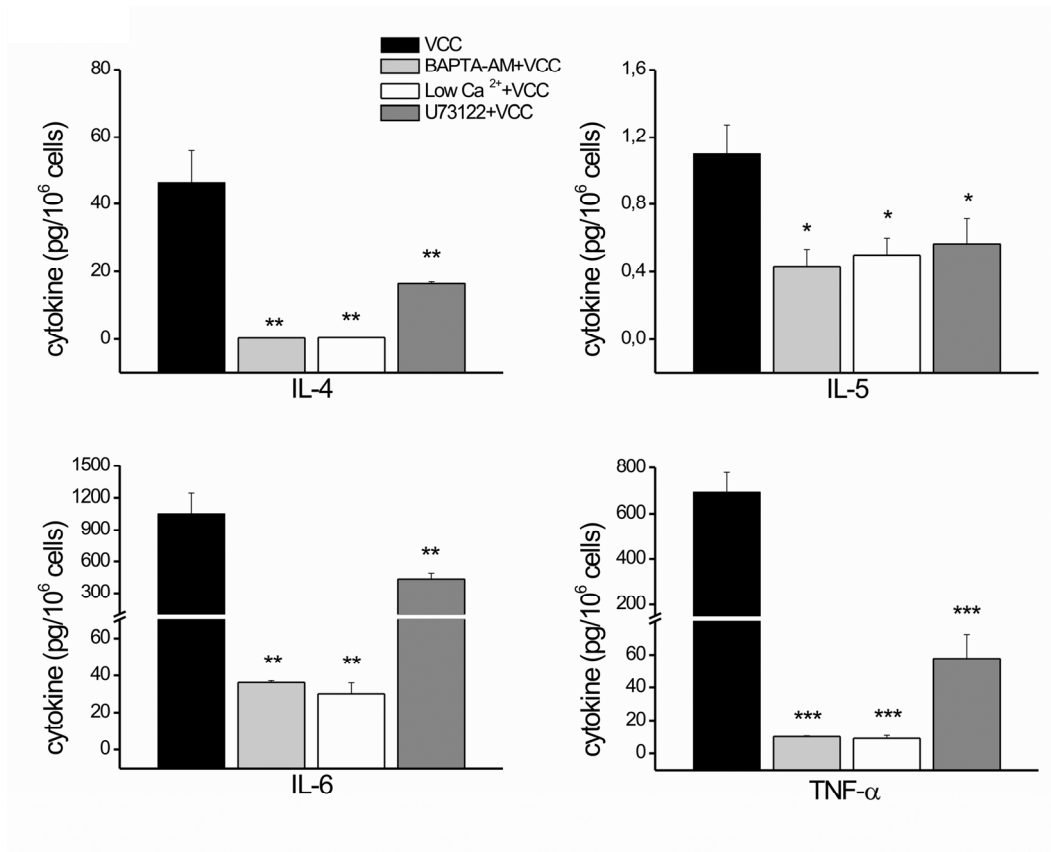


Figura 3.5 Ruolo del Ca²⁺ nel rilascio di citochine indotto dalla VCC.

I mastociti sono stati esposti alla VCC 500 pM per 4 ore e la quantità di citochine secrete è stata determinata tramite analisi dei surnatanti con Bio-Plex™ cytokine assay. BAPTA-AM (10 μM) e U73122 (30 μM) sono state somministrate rispettivamente 30 minuti e 10 minuti prima dell'intossicazione con VCC. I dati rappresentano una media di 4 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. La significatività (*vs* VCC) è stata calcolata con Student's *t*-test (**p* < 0.05; ***p* < 0.005; ****p* < 0.0005).

L'analisi dei messaggeri (condotta mediante real-time PCR, vedi paragrafo 2.3.9 sezione Materiali e Metodi) dei campioni esposti per 30 minuti alla VCC 500 pM era in accordo con quanto riscontrato analizzando i surnatanti (dati non riportati).

3.6 La VCC non induce degranolazione nei BMBCs

Il termine istamina (dal greco ιστοξ , “tessuto”), chimicamente β -imidazolilettilamina, nei mastociti è contenuta (10-20 pg/cellula), sotto forma di un complesso con l'eparina, nei granuli metacromatici. Gli stessi granuli contengono altre sostanze farmacologicamente attive come peptidi, proteasi e proteoglicani. Può essere rilasciata dai granuli di deposito mediante due meccanismi. Numerosi composti esogeni come il composto 48/80, un polimero diamminico, il destrano, la polimixina b, la d-tubocurarina, ionofori come A23187 , lecitine come la concanavalina A, la neurotensina, la sostanza P, hanno la capacità di indurre la liberazione di istamina da parte dei mastociti con un meccanismo esocitotico. Altri composti invece inducono il rilascio di istamina attraverso un processo che prevede la lisi della membrana plasmatica mastocitaria.

L'altro importante meccanismo di attivazione della liberazione di istamina è senza dubbio quello immunologico; i mastociti degranulano in seguito all'interazione tra l'antigene specifico e gli anticorpi IgE presenti sulla membrana citoplasmatica.

Qualunque sia il meccanismo che porta alla degranolazione mastocitaria, affinché si verifichi, è essenziale l'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} .

Alla luce dei nostri risultati abbiamo voluto verificare se l'aumento della concentrazione citosolica del calcio indotto dalla VCC fosse in grado di innescare il meccanismo di degranolazione. Come marcatore del fenomeno di degranolazione abbiamo scelto la beta-esosaminidasi che, così come l'istamina, è contenuta nei granuli metacromatici.

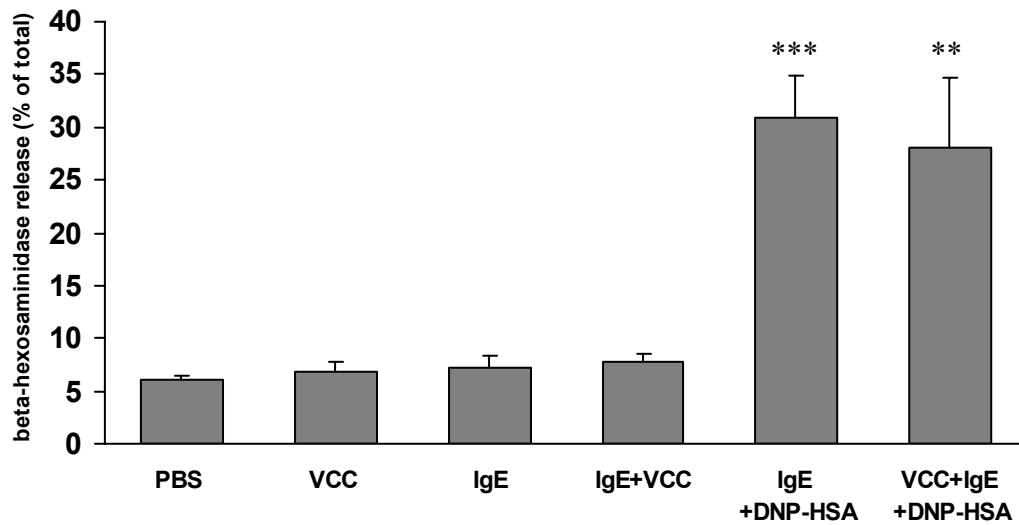


Figura 3.6. Effetto della VCC sul rilascio della beta-esosaminidasi.

I BMDCs sono stati trattati per 1 ora con VCC 500 pM in assenza o in presenza delle immunoglobuline E (anti-DNP) e della stimolazione antigenica con DNP coniugato con HSA (100 ng/ml). La quantità di beta-esosaminidasi rilasciata è stata espressa in percentuale rispetto a quella totale. I dati sono rappresentativi di 6 esperimenti condotti in triplicato. La significatività statistica è stata calcolata con Student's *t*-test (** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$;) vs il controllo (rilascio basale) rappresentato da cellule esposte alla salina (PBS).

La **Figura 3.6** riporta chiaramente che il trattamento dei mastociti con VCC 500 pM non induce alcun rilascio di beta-esosaminidasi rispetto al basale e non è in grado di modularne il rilascio stimolato antigenicamente.

Seppur apparentemente strano, questo dato è in accordo con recenti lavori che dimostrano che i mastociti possono discriminare tra i segnali richiesti per la produzione di citochine e quelli richiesti per la degranulazione e per il rilascio di eicosanoidi (Rivera J, 2006).

3.7 Effetto dell'inibizione delle correnti di cloruro sul rilascio di citochine indotto da VCC

Il flusso di ioni, come ad esempio gli anioni cloruro (Cl^-), è importante per l'attivazione dei mastociti dati gli effetti sul potenziale di membrana e di conseguenza sull'influsso del calcio.

Per determinare se il flusso degli anioni Cl^- potesse avere un ruolo nell'attivazione dei mastociti e nel rilascio di citochine indotto dalla VCC, i BMDCs sono stati

pretrattati per 50 minuti con il DIDS, un inibitore dei canali permeabili al cloruro. La **Figura 3.7** mostra come in seguito ad intossicazione con la VCC, le cellule pretrattate con il DIDS 100 μM rilascino tutte le citochine prese in esame in quantità significativamente più bassa rispetto alle cellule non pretrattate.

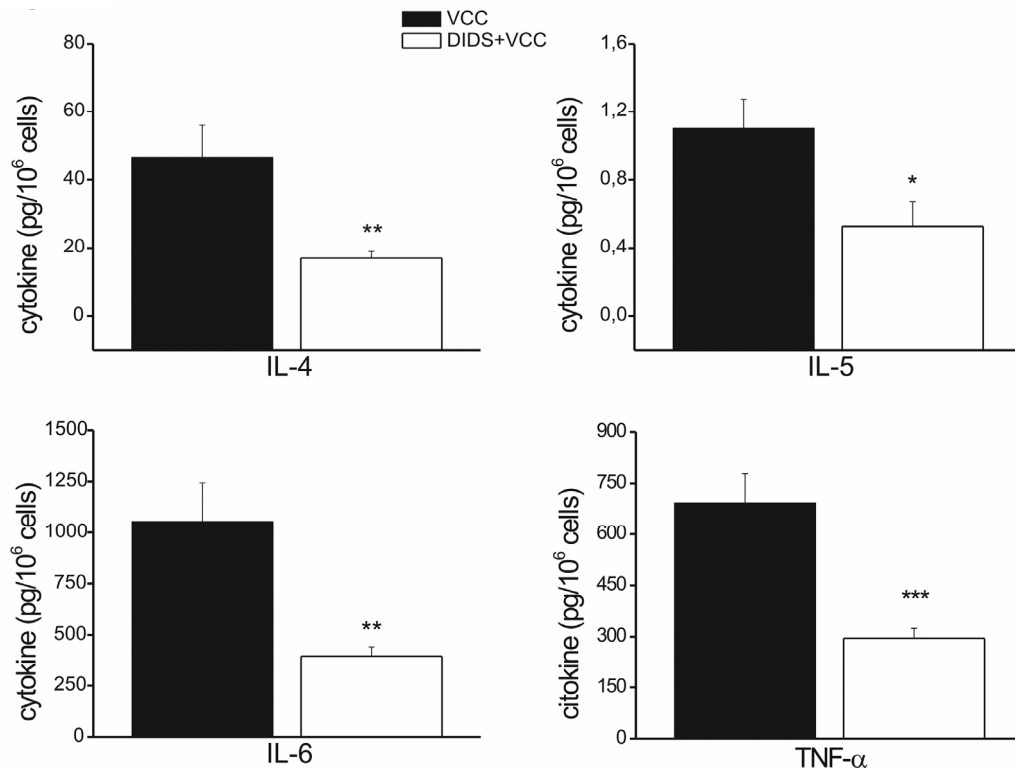


Figura 3.7 Effetto dell'inibitore dei canali permeabili al cloruro, DIDS, sul rilascio di citochine indotto dalla VCC. I BMBCs sono stati preincubati o meno con il DIDS 100 μM per 50 minuti prima del trattamento con VCC 500 pM. Dopo 4 ore i surnatanti sono stati recuperati ed analizzati con il Bio-PlexTM cytokine assay al fine di determinarne il contenuto delle citochine di interesse. I dati rappresentano la media di 4 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. La significatività statistica è stata calcolata mediante Student's *t*-test vs i campioni trattati con la sola VCC (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).

Il grado di up-regolazione dei messaggeri, codificanti le medesime citochine, nei campioni incubati con il DIDS (50 minuti) e trattati con VCC per 30 minuti (dati non riportati) è risultato anch'esso inferiore rispetto alle quantità riscontrate nei campioni trattati con la sola tossina, pertanto in accordo con il rilascio di citochine rilevato nei surnatanti dopo 4 ore dalla stimolazione.

Questo effetto inibitorio sulla sintesi e sul rilascio di citochine in seguito al trattamento con il DIDS potrebbe essere interpretato considerando che i SOCs, che permettono l'entrata di calcio nelle cellule, trasportano correnti maggiori quando il potenziale di membrana è negativo (Hoth M, 1992).

Pertanto il blocco dei canali per il cloruro presenti sulla membrana plasmatica potrebbe limitare la massiva entrata di calcio richiesta per l'attivazione dei BMDCs. Ovviamente non possiamo escludere, date le proprietà della VCC, la possibilità che la tossina stessa contribuisca, formando pori in membrana preferenzialmente permeabili agli anioni, a mediare l'influsso del cloruro; il trattamento con il DIDS, in grado di bloccare i canali formati dalla tossina, potrebbe inibire tale contributo.

3.8 Il meccanismo di attivazione dei BMDCs indotto dalla VCC è recettore-mediato

Molti studi eseguiti con lo scopo di far chiarezza sulla natura e sul ruolo dei diversi componenti coinvolti nei segnali di trasduzione che portano all'attivazione dei mastociti, hanno sottolineato l'importanza di proteine appartenenti alla famiglia Src ad attività tirosin-chinasica che interagiscono, direttamente o indirettamente, con i recettori FcεRI (ad alta affinità per le IgE). La **Tabella 3.2** mostra le differenze di espressione di dette proteine nei vari modelli di cellule mastocitarie.

Tabella 3.2. Espressione delle proteine della famiglia Src ad attività tirosin-chinasica nei mastociti. (Blank U, 2004)

Src PTK ^b	Bone marrow-derived MCs (BMDCs)	RBL-2H3	PT-18	HMC-1	HuMC ^c
Fgr	++	++	+/-	+	Not determined
Fyn	+++	+	++++	+++	+++
Hck	++	++	+	++	++
Lyn	++++	++++	+++	+++	+++
c-Src	++	+++	++	++	+++
Yes	+/-	+/-	+/-	+	+

Il legame degli antigeni alle IgE, a loro volta legate ai recettori FcεRI, comporta la fosforilazione di questi ultimi a livello degli ITAMs (immunoreceptor tyrosine-

based activation motifs). Questa fosforilazione è mediata da Lyn, la tirosin chinasi maggiormente espressa nei BMMCs, e dà seguito all'attivazione della chinasi Syk in grado di legare gli ITAMs.

L'aggregazione dei recettori FcεRI porta rapidamente anche all'attivazione della chinasi Fyn, una tirosin chinasi in grado di fosforilare Gab2, una proteina adattatrice, e di attivare la fosfatidilinositolo3-chinasi (PI3-K).

E' riportato che tra Lyn ed i recettori FcεRI ci sia una interazione diretta a livello delle catene beta (Blank U, 2004), mentre poco è conosciuto sull'interazione, diretta o indiretta, di Fyn con i recettori.

A prescindere, comunque, dal tipo di interazione, Lyn e Fyn sono coinvolte nella fase immediatamente successiva all'attivazione recettoriale.

Un loro coinvolgimento in un meccanismo d'azione potrebbe pertanto verosimilmente essere dovuto ad un'attivazione recettore-mediata.

La mobilitazione del calcio, IP₃-dipendente, dai depositi a rapido scambio, suggerisce che il meccanismo di attivazione dei mastociti indotto da VCC possa essere, almeno in parte, recettore-mediato.

Per verificare tale ipotesi abbiamo, innanzitutto, ritenuto opportuno valutare il coinvolgimento delle tirosin chinasi Lyn e Fyn nell'attivazione dei BMMCs indotta da VCC.

Abbiamo pertanto trattato, per 30 minuti (per l'analisi dei messaggeri) e per 4 ore (per la quantificazione delle citochine rilasciate), i BMMCs allestiti partendo da midollo osseo di topi Lyn *knock out* (*lyn*^{-/-}) o Fyn *knock out* (*fyn*^{-/-}).

La **Figura 3.8** mostra come l'assenza di Lyn nei BMMCs determini una marcata e significativa inibizione della produzione di citochine VCC-indotta. Questo risultato è in disaccordo con quanto riportato in altri lavori che sostengono che la stimolazione IgE-dipendente dei BMMCs *lyn*^{-/-} risulta in un inalterato o addirittura in un aumento del rilascio di citochine rispetto alle cellule *wild type* (Nishizumi H, 1997; Kawakami Y, 2000; Hernandez-Hansen V, 2005).

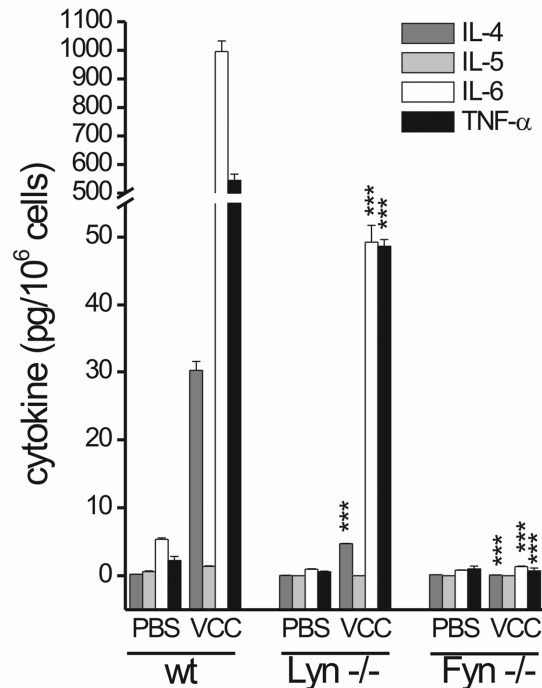


Figura 3.8. Rilascio di citochine da BMMCs *lyn*^{-/-} e *fyn*^{-/-} trattati con VCC.

I BMMCs isolati da topi *wild type* e *knock out* per Lyn o Fyn sono stati trattati con PBS (cellule controllo) o con VCC 500 pM per 4 ore. I surnatanti sono stati recuperati ed analizzati con Bio-Plex™ cytokine assay per la quantificazione delle citochine rilasciate durante il trattamento. I dati rappresentano la media di 5 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. La significatività è stata calcolata (*knock out vs wild type*) mediante Student's *t*-test (***p* < 0.0005).

Il ruolo di Fyn nel meccanismo di attivazione mediato dalla VCC è senza alcun dubbio fondamentale. I BMMCs *fyn*^{-/-} non sono risultati per nulla responsivi in presenza della tossina (**Figura 3.8**). Non c'è stata alcuna up-regolazione dei messaggeri codificanti le citochine proinfiammatorie oggetto di studio (dati non riportati). Conseguentemente la quantità di citochine rilevate nei surnatanti è risultata assolutamente invariata rispetto alle stesse cellule non trattate.

Che il rilascio di citochine nei BMMCs Fyn^{-/-} stimolati antigenicamente fosse completamente inibito era già stato dimostrato in precedenza (Gomez G, 2005).

Alcuni lavori suggeriscono che Fyn e Lyn regolino, rispettivamente in positivo ed in negativo, la risposta mastocitaria (Parravicini V, 2002; Odom S, 2004), mentre un recente lavoro riporta il loro effetto cooperativo nell'attivazione della sfingosina chinasi (Olivera A, 2006).

Il risultato mostrato in **Figura 3.8** in effetti rappresenta un altro esempio di cooperazione tra le due tirosin chinasi nel mediare la risposta dei BMMCs, in termini di rilascio di citochine proinfiammatorie, indotta dalla citolisina di *Vibrio cholerae*.

L'evidenza che il meccanismo di risposta dei BMMCs richieda la presenza di Fyn e Lyn, normalmente implicate nel metabolismo dei fosfoinositidi e nelle risposte calcio-dipendenti, suggerisce in maniera convincente che l'azione della VCC possa effettivamente essere mediata da un recettore.

3.9 VCC è agonista del TLR2 (Toll-like receptor 2)

Negli ultimi anni, diversi studi condotti sia *in vivo* che *in vitro* su modelli murini, hanno evidenziato l'esistenza di interazioni tra mastociti e batteri: i mastociti possono contribuire alla difesa dell'ospite contro le infezioni batteriche mediante produzione di TNF e di altri mediatori richiesti per il reclutamento di neutrofilo ed altre cellule del sistema immunitario (Marshall JS, 2004).

Queste evidenze hanno di conseguenza spinto i ricercatori ad indagare sull'espressione dei recettori Toll-like (TLRs) e sugli effetti dei loro ligandi nelle cellule mastocitarie.

I recettori Toll-like sono infatti proteine trans membrana, espresse prevalentemente su cellule della risposta immunitaria innata, che riconoscono pattern molecolari dei microrganismi estremamente conservati (PAMPs) e giocano un ruolo essenziale nel mediare l'attivazione del *pathway* di trasduzione del segnale che porta all'uccisione e alla *clearance* dei patogeni.

All'attivazione dei TLRs segue il reclutamento di MyD88 in corrispondenza dei domini TIR, sequenze segnale conservate localizzate nella porzione citoplasmatica dei recettori. Il reclutamento di questa molecola adattatrice dà il via all'attivazione di una serie di chinasi come IRAK (serina/treonina chinasi), TRAF-6 (fattore associato al recettore per il TNF) e NIK (chinasi attivante NF- κ B) che mediano l'attivazione di JNK, p38, ERK $\frac{1}{2}$ ed NF- κ B, portando così all'attivazione di geni codificanti citochine proinfiammatorie.

I mastociti esprimono TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR7 e TLR9.

I livelli di espressione di tali proteine sono inferiori nei mastociti umani rispetto a quelli murini e variano anche in base alle condizioni di allestimento delle colture (Marshall JS, 2004).

La recente dimostrazione di un *link* tra le tirosin chinasi appartenenti alla famiglia Src ed i recettori Toll-like (Chang JD, 2004; Chun J, 2006; Kannan S, 2006) ci ha indotto a verificare la possibilità che la risposta dei mastociti indotta dalla VCC fosse mediata dall'attivazione di un TLR.

A tal fine sono state utilizzate tre diverse linee cellulari HEK293 (Human embryonic kidney 293) ognuna trasfettata stabilmente con un plasmide codificante esclusivamente per un solo Toll-like *receptor*.

Lo *screening* è stato effettuato su HEK293 in grado di esprimere o il TLR2 [che riconosce diverse componenti microbiche tra cui il peptidoglicano e l'acido lipoteicoico dei batteri Gram-positivi (Takeda K, 2003)], o il TLR3 (che riconosce RNA virali a doppio filamento) o il TLR4 [che lega soprattutto il LPS (Hoshino K, 1999), e riconosce ligandi endogeni, quali le heat shock proteins (HSP60 e HSP70) e il fibrinogeno].

Il comune *pathway* di attivazione di questi recettori, che porta alla traslocazione nel nucleo del fattore trascrizionale NF- κ B, richiede la fosforilazione, e la successiva degradazione, dell'inibitore citosolico di quest'ultimo, I κ B- α (Akira S, 2004).

Ognuna delle linee cellulari trasfettate è stata esposta a VCC 500 pM o trattata con l'agonista specifico per il Toll-like di interesse (controllo positivo). Le stesse cellule, non trattate, rappresentano invece il controllo negativo. La fosforilazione di I κ B- α , che corrisponde all'attivazione di NF- κ B, è stata analizzata con la tecnica del western blotting (vedi paragrafo 2.3.6 sezione Materiali e Metodi).

Come mostrato in **Figura 3.9**, tale fosforilazione è stata osservata soltanto nelle cellule esprimenti il TLR2, mentre nessuna attivazione si è verificata nelle altre due linee di HEK293 esprimenti il TLR3 o il TLR4.

L'avvenuta fosforilazione dell'inibitore di NF- κ B è già evidenziabile dopo 10 minuti di trattamento con la VCC e aumenta fino a 4 ore dall'inizio della stimolazione. Dopo 6 ore di infezione la proteina è chiaramente andata incontro a degradazione.

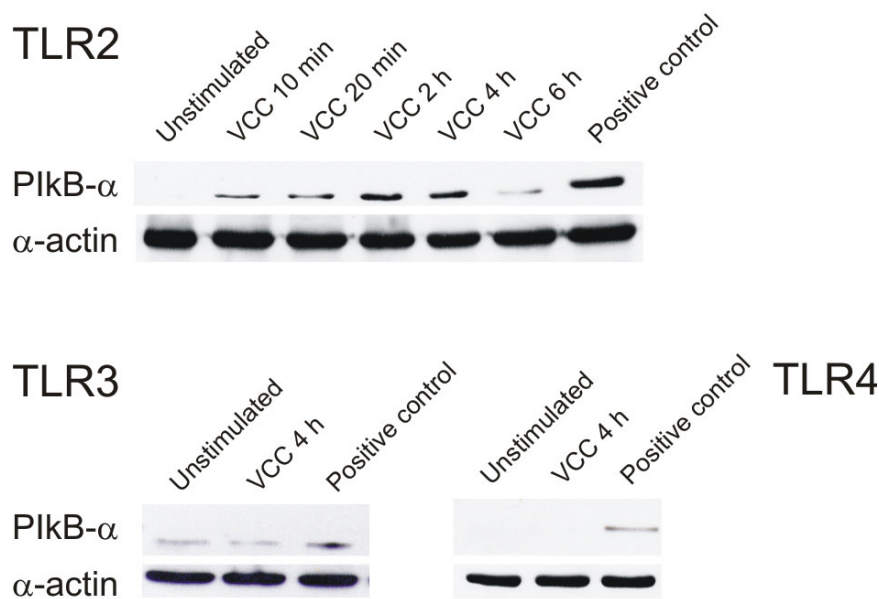


Figura 3.9. Fosforilazione di IκB-α indotta dalla VCC nelle HEK293 trasfettate con plasmidi codificanti un singolo TLR umano. Le HEK293 esprimenti il TLR indicato sono state trattate per tempi differenti con VCC 500 pM o con l'agonista recettoriale specifico (indicato come Positive control, vedi paragrafo 2.3.6 sezione Materiali e Metodi). Scaduta l'incubazione le cellule sono state recuperate, sottoposte a SDS-PAGE e immunoblotting con un anticorpo anti-fosfo-IκB-α (anti-pIκB-α). Il blot è stato re-incubato con un anticorpo anti-α actina, come controllo interno per la normalizzazione. Il controllo negativo è rappresentato dalle stesse cellule non trattate (Unstimulated).

I risultati suggeriscono che la VCC è in grado di attivare il TLR2 e quindi di agire come un PAMP.

Questo risultato è stato ulteriormente confermato da esperimenti eseguiti su BMMCs allestiti partendo da midollo osseo di topi *knock out* per il TLR2 (*tlr2^{-/-}*) nei quali la VCC non è stata in grado di indurre l'up-regolazione dei messaggeri codificanti le citochine proinfiammatorie finora analizzate.

La **Tabella 3.3** riporta l'espressione, VCC-indotta, dei messaggeri di dette citochine nei BMMCs *wt* e *tlr2^{-/-}* analizzati con la tecnica della Real-Time PCR (vedi paragrafo 2.3.9 sezione Materiali e Metodi).

Questo risultato suggerisce un ruolo essenziale del TLR2 nel meccanismo di attivazione dei mastociti indotto dalla citolisina.

Il *link* tra i recettori Toll-like e le chinasi appartenenti alla famiglia Src è stato riscontrato in diversi sistemi; per esempio, è stato recentemente dimostrato nelle cellule epiteliali delle vie aeree che la risposta ai ligandi batterici mediata dal TLR2 ha inizio con l'attivazione delle chinasi Src, seguita dall'attivazione della PI3-K e della PLCγ con il conseguente rilascio di calcio dagli *stores* intracellulari.

Quest'ultimo è fondamentale per l'attivazione, a valle della cascata recettoriale, della trascrizione dei geni proinfiammatori (Chun J, 2006).

Tabella 3.3. Espressione dei messaggeri delle citochine proinfiammatorie in BMMCs *wt* e *tlr2*^{-/-} infettati con VCC

IL-4 (AU) (media ± SEM)		IL-5 (AU) (media ± SEM)		IL-6 (AU) (media ± SEM)		TNF-α (AU) (media ± SEM)	
wt	<i>tlr2</i> ^{-/-}	wt	<i>tlr2</i> ^{-/-}	wt	<i>tlr2</i> ^{-/-}	wt	<i>tlr2</i> ^{-/-}
41.55±0.58	1.49±0.02 ***	6.27±0.34	1.04±0.06 *	19.88±0.19	1.14±0.02 **	18.51±0.94	5.00±0.19 ***

I BMMCs sono stati trattati per 30 minuti con VCC 500 pM. L'espressione dei messaggeri è stata valutata tramite la tecnica della Real-Time PCR. I dati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. La significatività (BMMCs *tlr2*^{-/-} trattati con VCC vs BMMCs *wt* trattati con VCC) è stata calcolata mediante Student's *t*-test (*p < 0.05; **p < 0.005; ***p < 0.0005).

E' stato dimostrato che, nei mastociti, Fyn è fondamentale per la sintesi *de novo* di diverse citochine, quali IL-4, IL-6 e TNF-α, indotta dall'attivazione dei recettori FcεRI; questa tirosin chinasi è inoltre essenziale per la fosforilazione e la degradazione di IκB-α, processo richiesto per la traslocazione nucleare di NF-κB e la trascrizione dei geni (Gomez G, 2005). Noi pensiamo pertanto che, analogamente all'attivazione indotta dalla stimolazione antigenica, sia Fyn che Lyn siano coinvolte nella trasduzione del segnale recettoriale (TLR2) indotto da VCC e riteniamo che questo aspetto meriti sicuramente ulteriori approfondimenti. Mentre un *link* tra Lyn e TLR2 era già stato dimostrato in precedenza (Kannan S, 2006), i nostri risultati dimostrano per la prima volta l'esistenza del coinvolgimento di Fyn nella trasduzione del segnale a seguito dell'attivazione del TLR2.

4. CONCLUSIONI

La letteratura riporta alcune evidenze che lasciano intendere che la citolisina di *Vibrio cholerae* (VCC) possa avere un ruolo nella patogenesi del colera (Patrito E, 1999; Bidinost C, 2004; Saka HA, 2008).

Considerato che la maggior parte delle tossine diarrogeniche influenzano il trasporto di ioni a livello delle cellule epiteliali intestinali, abbiamo valutato l'effetto della VCC su campioni di colon sigmoide umano.

Dopo 90 minuti di trattamento la VCC ha indotto un aumento della I_{SC} pari al 20.7 % rispetto ai tessuti controllo, ed una riduzione della R_T pari al 12%.

La direzione della corrente di corto circuito ed i risultati ottenuti utilizzando la linea cellulare di adenocarcinoma di colon umano (Caco-2), ci hanno portato ad ipotizzare che le variazioni dei parametri elettrici misurate perfondendo con VCC 1 nM i tessuti colonic, fossero dovute a movimenti di cloruro verso il lume intestinale. Il dati più significativi, che suggeriscono in maniera convincente che tali movimenti siano dovuti alla neo-formazione in membrana di canali permeabili al cloruro, sono rappresentati dalla diminuzione della R_T indotta da VCC anche in presenza di basse concentrazioni dell'anione in questione. La ridotta quantità di Cl⁻ infatti riesce a modificare l'azione della tossina sul trasporto ionico (V_T e I_{SC} raggiungono valori inferiori rispetto a quelli indotti in presenza di concentrazioni fisiologiche di cloruro dimostrando che le modificazioni di detti parametri sono strettamente dipendenti dal movimento dell'anione), ma non la tendenza della stessa a formare canali in membrana (la riduzione della R_T risulta ancora del 10%, un valore paragonabile all'effetto indotto da VCC in presenza di concentrazioni fisiologiche di cloruro). L'analisi del *time-course* di R_T ed I_{SC} in presenza di VCC suggerisce che la formazione dei canali è un processo graduale che si svolge nell'arco di 60 minuti (**Figura 3.2 A**).

I risultati ottenuti in seguito al trattamento con il DIDS rappresentano un'ulteriore conferma della partecipazione dei canali formati dalla VCC nel mediare l'efflusso di cloruro.

Nel complesso questi risultati rappresentano la prima evidenza *in vivo* che VCC possa essere un fattore diarrogenico. Infatti l'anormale secrezione di cloruro attraverso la membrana apicale intestinale potrebbe indurre il movimento in uscita, verso il lume, anche degli ioni Na⁺ e di conseguenza, essendo entrambi

degli ioni fortemente idratati, dell'acqua, inducendo in tal modo accumulo di fluidi nel tratto gastrointestinale e quindi il processo diarroico.

Questa proprietà della tossina potrebbe essere rilevante nell'induzione del fenomeno diarroico conseguente all'infezione da parte dei ceppi del vibrione che non producono la classica tossina colerica e potrebbe contribuire a causare diarrea nei casi in cui il vibrione fosse in grado di produrle entrambe.

Un'altra questione importante, studiata in questo lavoro di tesi, è stata sollevata da evidenze, riportate in letteratura, riguardanti un massiccio reclutamento, a livello della *lamina propria* della mucosa intestinale, di cellule del sistema immunitario innato, come mastociti e neutrofilo, ed un alto livello di mediatori infiammatori, riscontrati nei pazienti colerosi (Qadri F, 2004).

Al fine quindi di verificare il potenziale ruolo di VCC in questo processo abbiamo esaminato il suo effetto sui BMMCs (bone marrow-derived mast cells) murini. Il trattamento ha indotto sintesi e rilascio di sostanziali quantità di IL-4, IL-6 e TNF- α , tutte citochine che possono contribuire alla risposta T_H2 osservata nell'infezione naturale (Marinaro M, 1995; Qadri F, 2000). Il rilascio di una quantità molto ridotta di IL-5, se confrontata con quella delle altre citochine, è in accordo con l'evidenza che i mastociti murini producono quantità irrisorie di questa proteina rispetto ai mastociti umani (Bischoff SC, 2007). VCC è stata in grado non solo di indurre la secrezione delle citochine ma anche di up-regolare l'espressione dei messaggeri corrispondenti con un meccanismo calcio-dipendente. Il fatto che l'inibizione della sintesi di IP₃ non abbia avuto come risultato il blocco totale della secrezione di citochine potrebbe suggerire l'attivazione di altri segnali TLR2-mediati, come ad esempio l'attivazione MyD88/IRAK, che sono meno dipendenti dall'aumento della concentrazione citosolica del calcio. Questa spiegazione è supportata da alcuni lavori che riportano, come nel caso del TLR9, che i *pathways* di attivazione di MyD88 e delle tirosin chinasi della famiglia Src, entrambi indotti dall'attivazione del TLR9, in realtà sono distinti, ma cooperano al fine di amplificare il segnale indotto dalla stimolazione recettoriale (Sanjuan MA, 2006).

L'aumento della concentrazione intracellulare di calcio, indotta dalla VCC nell'arco di qualche secondo, mostra un andamento bi-fasico: l'aumento iniziale,

cineticamente più veloce e quantitativamente inferiore, è attribuibile allo svuotamento, PLC γ -dipendente, dei depositi intracellulari a rapido scambio, gli *stores* del reticolo endoplasmatico, mentre la seconda fase, quantitativamente più consistente, è il risultato dell'apertura dei canali in membrana, permeabili al calcio, che mediano le cosiddette “correnti di calcio capacitative”, i CRAC, calcium release-activated calcium channels.

Che l'aumento della concentrazione citosolica del calcio nei mastociti non abbia portato alla degranolazione (VCC non induce rilascio di beta-esosaminidasi), è in accordo con recenti lavori che dimostrano che i mastociti possono discriminare tra i segnali richiesti per la produzione di citochine e quelli richiesti per la degranolazione e per il rilascio di eicosanoidi (Rivera J, 2006).

L'effetto inibitorio sulla sintesi e sul rilascio di citochine in seguito al trattamento con il DIDS potrebbe essere interpretato considerando che i canali che permettono l'entrata di calcio nelle cellule, trasportano correnti maggiori quando il potenziale di membrana è negativo (Hoth M, 1992). Pertanto il blocco dei canali per il cloruro potrebbe limitare la massiva entrata di calcio richiesta per l'attivazione dei BMMCs.

Ovviamente non possiamo escludere, date le proprietà della VCC, la possibilità che la tossina stessa contribuisca, formando pori, a mediare l'influsso del cloruro, e che il trattamento con il DIDS inibisca tale contributo.

E' pur vero che l'aver dimostrato il coinvolgimento di un meccanismo recettore-mediato nell'attivazione dei mastociti indotta da VCC lascia poco spazio ad un ipotetico meccanismo poro-dipendente.

Infatti il punto cardine del presente lavoro è che i mastociti *tlr2*^{-/-} non sono in grado di rilasciare citochine proinfiammatorie in risposta alla stimolazione con VCC suggerendo l'essenziale coinvolgimento di questo recettore nell'attivazione mastocitaria indotta dalla citolisina.

I nostri risultati evidenziano il ruolo assolutamente fondamentale di Fyn nel meccanismo di attivazione mediato dalla VCC, ed in definitiva essi costituiscono la prima evidenza del coinvolgimento di questa tirosin chinasi nel *pathway* di trasduzione del TLR2 nei mastociti.

Tutti i risultati ottenuti in seguito al trattamento dei BMMCs con la citolisina di *Vibrio cholerae* forniscono informazioni aggiuntive sul meccanismo che porta al

quadro infiammatorio indotto dall'infezione con il vibrione, sottolineando l'importanza di un altro fattore di virulenza, oltre alla classica tossina colerica, in grado di promuovere una risposta di tipo T_H2 . Siamo comunque consapevoli del fatto che i mastociti siano piuttosto eterogenei e che i BMMCs non siano identici ai mastociti murini digiunali e, ancor meno, ai mastociti intestinali umani. Pertanto rimane ancora da appurare se una popolazione mastocitaria differenziata *in vivo* effettivamente sia in grado di rispondere alla VCC in maniera analoga ai BMMCs.

5. BIBLIOGRAFIA

Abraham SN, Malaviya R. Mast cells in infection and immunity. *Infect Immun.* 1997; **65**:3501–3508.

Akira S, Takeda K Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004; **4**:499-511.

Alm RA, Strocher UH, and Manning PA. Extracellular proteins of *Vibrio cholerae*: nucleotide sequence of the structural gene (*hlyA*) for the haemolysin of the haemolytic El Tor strain 017 and characterization of the *hlyA* mutation in the non-haemolytic classical strain 569B. *Mol Microbiol.* 1988; **2**:481-488.

Alrefai WA, Ramaswamy K, and Dudeja PK. Mechanism(s) of chloride transport in human distal colonic apical membrane vesicles. *Dig Dis Sci.* 2001; **46**:2209-2218.

Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benagiano M, Tasca E, Azzurri A, D'Elis MM, Del Prete G, de Bernard M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest.* 2006; **116**:1092-1101.

Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun.* 1980; **28**:893–898.

Atuma C, Strugala V, Allen A, and Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; **280**:G922-G929.

Barrett KE, Keely SJ. Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol.* 2000; **62**:535–572.

Barua D, Greenough WB. New York: Plenum Medical Book Company. *Cholera*. 1992.

Baumann U, Chouchakova N, Gewecke B, Köhl J, Carroll MC, Schmidt RE, Gessner JE. Distinct tissue site-specific requirements of mast cells and complement components C3/C5a receptor in IgG immune complex-induced injury of skin and lung. *J Immunol*. 2001; **167**:1022-1027.

Bidinost C, Saka HA, Aliendro O, Sola C, Panzetta-Duttari G, Carranza P, Echenique J, Patrino E, Bocco JL. Virulence factors of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* isolated in Córdoba, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2004; **36**:158-163.

Bischoff SC, Krämer S. Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. *Immunol Rev*. 2007; **217**:329-337.

Biwersi J, and Verkman A.S. Cell-permeable fluorescent indicator for cytosolic chloride. *Biochemistry*. 1991; **30**:7879-7883.

Blank U, Rivera J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol*. 2004; **25**:266-273.

Cassuto J, Jodal M, Tuttle R, and Lundgren O. On the role of intramural nerves in the pathogenesis of cholera toxin-induced intestinal secretion. *Scand J Gastroenterol*. 1981; **16**:377-384.

Caulfield JP, Lewis RA, Hein A, Austen KF. Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge *J Cell Biol*. 1980; **85**:299-312.

Chang JD, Field SJ, Rameh LE, Carpenter CL, Cantley LC. Identification and characterization of a phosphoinositide phosphate kinase homolog. *J Biol Chem*. 2004; **279**:11672-11679.

Chertov O, Yang D, Howard OM, Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev.* 2000; **177**:68-78.

Chun J, Prince A. Activation of Ca²⁺-dependent signaling by TLR2. *J Immunol.* 2006; **177**:1330-1337.

Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Khan MR, Huda S, Ahmed F, Gomes J, Rao MR, Svennerholm AM. ABO blood groups and cholera: new observations on specificity of risk and modification of vaccine efficacy. *J Infect Dis.* 1989; **159**:770-773.

Coelho A, Andrade JR, Vicentem AC, and Dirita VJ. Cytotoxic cell vacuolating activity from *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infect Immun.* 2000; **68**:1700-1705.

Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science.* 1996; **274**:2025–2031.

Cover TL, and Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 1991; **267**:10570-10575.

De SN. Enterotoxicity of bacteria-free culture filtrate of *Vibrio cholerae*. *Nature.* 1959; **183**:1533–1534.

Debellis L, Papini E, Caroppo R, Montecucco C, and Curci S. *Helicobacter pylori* cytotoxin VacA increases alkaline secretion in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; **281**:G1440-G1448.

de Bernard M, Cappon A, Pancotto L, Ruggiero P, Rivera J, Del Giudice G, Montecucco C. The *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations. *Cell Microbiol.* 2005; **7**:191-198.

Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, Ferrier L, Bueno L. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut*. 2006; **55**:655-661.

Diamond JM. The epithelial junction: bridge, gate and fence. *Physiologist*. 1977; **20**:10–18.

Dutta NK, Panse MW, and Kulkarni DR. Role of cholera toxin in experimental cholera. *J Bacteriol*. 1959; **78**:594–595.

Faruque SM, Asadulghani, Saha MN, Alim AR, Albert MJ, Islam KM, Mekalanos JJ. Analysis of clinical and environmental strains of nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTXPhi: molecular basis for origination of new strains with epidemic potential. *Infect Immun*. 1998; **66**:5819-5825.

Fasano A, Baudry B, Pumplin DW, Wasserman S S, Tall BD, Ketley JM, and Kaper JB. *Vibrio cholerae* produces a second entero-toxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci*. USA 1991; **88**:5242–5246.

Figuroa-Arredondo P, Heuser JE, Akopyants NS, Morisaki JH, Giono-Cerezo S, Enríquez-Rincón F, Berg DE. Cell vacuolation caused by *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infect Immun*. 2001; **69**:1613-1624.

Finkelstein RA, and LoSpalluto JJ. Pathogenesis of experimental cholera: preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxinoid. *J Exp Med*. 1969; **130**:185–202.

Flemström G, Hällgren A, Nylander O, Engstrand L, Wilander E, and Allen A. Adherent surface mucus gel restricts diffusion of macromolecules in rat duodenum in vivo. *Am J Physiol*. 1999; **277**:G375-G382.

Freter R, and O'Brien PCM. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: fitness and virulence of nonchemotactic *Vibrio cholerae* mutants in infant mice. *Infect Immun.* 1981; **34**:222–233.

Gomez G, Gonzalez-Espinosa C, Odom S, Baez G, Cid ME, Ryan JJ, Rivera J. Impaired FcepsilonRI-dependent gene expression and defective eicosanoid and cytokine production as a consequence of Fyn deficiency in mast cells. *J Immunol.* 2005; **175**:7602-7610.

Greger R, Bleich M, Leipziger J, Ecke D, Mall M, and Kunzelmann K. Regulation of ion transport in colonic crypts. *News Physiol Sci.* 1997; **12**:62-66.

Gunnlaugsson G, Einarsdóttir J, Angulo FJ, Mentambanar SA, Passa A, Tauxe RV. Funerals during the 1994 cholera epidemic in Guinea-Bissau, West Africa: the need for disinfection of bodies of persons dying of cholera. *Epidemiol Infect.* 1998; **120**:7-15.

Gutierrez MG, Saka HA, Chinen I, Zoppino FC, Yoshimori T, Bocco JL, Colombo MI. Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2007; **104**:1829-1834.

Hall RH, Drasar BS. *Vibrio cholerae* HlyA hemolysin is processed by proteolysis *Infect Immun.* 1990; **58**:3375-3379.

Hall RH, Losonsky G, Silveira AP, Taylor RK, Mekalanos JJ, Witham ND, and Levine MM. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* O1 toxin-coregulated pili in experimental and clinical cholera. *Infect Immun.* 1991; **59**:2508–2512.

Hall RH, Khambaty FM, Kothary M, and Keasler SP. Non-O1 *Vibrio cholerae*. *Lancet.* 1993; **342**:430.

Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 2000; **406**:477-483.

Hernandez-Hansen V, Bard JD, Tarleton CA, Wilder JA, Lowell CA, Wilson BS, Oliver JM. Increased expression of genes linked to FcεpsilonRI Signaling and to cytokine and chemokine production in Lyn-deficient mast cells. *J Immunol*. 2005; **175**:7880-7888.

Holmgren J, Lönnroth I, Månsson J, Svennerholm L. Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; **72**:2520-2524.

Holmgren J, Clemens J, Sack DA, Svennerholm AM. New colera vaccines. *Vaccine*. 1989; **7**:94-96.

Honda T, Finkelstein RA. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. *Infect Immun*. 1979; **26**:1020-1027.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*. 1999; **162**:3749-3752.

Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. 1992; **355**:353-356.

Ichinose Y, Yamamoto K, Nakasone N, Tanabe MJ, Takeda T, Miwatani T, Iwanaga M. Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae* *Infect Immun.* 1987; **55**:1090-1093.

Islam MS, Drasar BS, Bradley DJ. Long-term persistence of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the mucilaginous sheath of a blue-green alga, *Anabaena variabilis*. *J Trop Med Hyg.* 1990; **93**:133–139.

Jacob C, Yang PC, Darmoul D, Amadesi S, Saito T, Cottrell GS, Coelho AM, Singh P, Grady EF, Perdue M, Bunnett NW. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J Biol Chem.* 2005; **280**:31936-31948.

Janoff EN, Hayakawa H, Taylor DN, Fasching CE, Kenner JR, Jaimes E, Raij L. Nitric oxide production during *Vibrio cholerae* infection. *Am J Physiol.* 1997; **273**:G1160-1167.

Jones GW, and Freter R. Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: nature of the interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes. *Infect Immun.* 1976; **14**:240–245.

Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature.* 2001; **413**:420-425.

Kannan S, Audet A, Knittel J, Mullegama S, Gao GF, Wu M. Src kinase Lyn is crucial for *Pseudomonas aeruginosa* internalization into lung cells. *Eur J Immunol.* 2006; **36**:1739-1752.

Kaper JB, Morris JG Jr, Levine MM. Cholera. *Clin Microbiol Rev.* 1995; **8**:48-86.

Kapral FA, O'Brien AD, Ruff PD, and Drugan WJ Jr. Inhibition of water absorption in the intestine by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Infect Immun.* 1976; **13**:140–145.

Kawakami Y, Kitaura J, Satterthwaite AB, Kato RM, Asai K, Hartman SE, Maeda-Yamamoto M, Lowell CA, Rawlings DJ, Witte ON, Kawakami T. Redundant and opposing functions of two tyrosine kinases, Btk and Lyn, in mast cell activation. *J Immunol.* 2000; **165**:1210-1219.

Khan PK. Asiatic cholera in pregnancy. *Int Surg.* 1969; **51**:138-141.

Kimberg DK, Field M, Johnson J, Henderson E, and Gershon E. Stimulation of intestinal mucosal adenyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. *J Clin Invest.* 1971; **50**:1218–1230.

Ko WC, Chuang YC, Huang GC, Hsu SY. Infections due to non-O1 *Vibrio cholerae* in southern Taiwan: predominance in cirrhotic patients. *Clin Infect Dis.* 1998; **27**:774–780.

Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease *Physiol Rev.* 2002; **82**:245-289.

Laohachai KN, Bahadi R, Hardo MB, Hardo PG, Kourie JI. The role of bacterial and non-bacterial toxins in the induction of changes in membrane transport: implications for diarrhea. *Toxicon.* 2003; **42**:687-707.

Leal-Berumen I, Snider DP, Barajas-Lopez C, Marshall JS. Cholera toxin increases IL-6 synthesis and decreases TNF-alpha production by rat peritoneal mast cells. *J Immunol.* 1996; **156**:316-321.

Levine M M, Kaper JB, Black RE, and Clements ML. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* 1983; **47**:510–550.

Levine MM, Kaper JB, Herrington D, Losonsky G, Morris JG, Clements ML, Black RE, Tall B, and Hall R. Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. *Infect. Immun.* 1988; **56**:161–167.

Lin TJ BD. Mast cells and eosinophils in mucosal defences and pathogenesis. In: **Ogara PL, Mestecky J, Lamm ME, et al**, eds. *Mucosal immunology*, 2nd edn. San Diego: Academic Press Inc, 1999; 469–482.

Lorentz A, Wilke M, Sellge G, Worthmann H, Klempnauer J, Manns MP, Bischoff SC. IL-4-induced priming of human intestinal mast cells for enhanced survival and Th2 cytokine generation is reversible and associated with increased activity of ERK1/2 and c-Fos. *J Immunol.* 2005; **174**:6751-6756.

Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, Scott ZA, Coyle AJ, Reed JL, Van Snick J, Strom TB, Zheng XX, Noelle RJ Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature.* 2006; **442**:997-1002.

Maier B, Potter L, So M, Long CD, Seifert HS, Sheetz MP. Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2002; **99**:16012-16017.

Marinero M, Staats HF, Hiroi T, Jackson RJ, Coste M, Boyaka PN, Okahashi N, Yamamoto M, Kiyono H, Bluethmann H, Fujihashi K, McGhee JR. Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. *J Immunol.* 1995; **155**:4621-4629.

Marinero M, Fasano A, De Magistris MT. Zonula occludens toxin acts as an adjuvant through different mucosal routes and induces protective immune responses. *Infect Immun.* 2003; **71**:1897-1902.

Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2004; **4**:787-799.

Mathan MM, Chandy G, Mathan VI. Ultrastructural changes in the upper small intestinal mucosa in patients with cholera. *Gastroenterology.* 1995; **109**:422–430.

McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grecis RK. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2003; **100**:7761-7766.

Molinari M, Galli C, de Bernard M, Norais N, Ruyschaert JM, Rappuoli R, Montecucco C. The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; **248**:334-340.

Morris JG Jr, Takeda T, Tall BD, Losonsky GA, Bhattacharya SK, Forrest BD, Kay BA, Nishibuchi M. Experimental non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans. *J Clin Invest.* 1990; **85**:697-705.

Moschetta A, Portincasa P, Debellis L, Petruzzelli M, Montelli R, Calamita G, Gustavsson P, and Palasciano G. Basolateral Ca²⁺-dependent K⁺-channels play a key role in Cl⁻ secretion induced by taurodeoxycholate from colon mucosa. *Biol Cell.* 2003; **95**:115-122.

Moschioni M, Tombola F, de Bernard M, Coelho A, Zitzer A, Zoratti M, and Montecucco C. The *Vibrio cholerae* haemolysin anion channel is required for cell vacuolation and death. *Cell Microbiol.* 2002; **4**:397-409.

Nagamune K, Yamamoto K, and Honda T. Intramolecular chaperone activity of the proregion of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin. *J Biol Chem.* 1997; **10**: 1338-1343.

Nilsson O, Cassuto J, Larsson PA, Jodal M, Lidberg P, Ahlman H, Dahlstro A, and Lundgren O. 5-Hydroxytryptamine and colera secretion: a histochemical and physiological study in cats. *Gut*. 1983; **24**:542–548.

Nishizumi H, Yamamoto T. Impaired tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ mobilization, but not degranulation, in lyn-deficient bone marrow-derived mast cells. *J Immunol*. 1997; **158**:2350-2355.

O'Brien AD, and Kapral FA. Increased cyclic adenosine 3',5'-monophosphate content in guinea pig ileum after exposure to *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Infect Immun*. 1976; **13**:152–162.

Odom S, Gomez G, Kovarova M, Furumoto Y, Ryan JJ, Wright HV, Gonzalez-Espinosa C, Hibbs ML, Harder KW, Rivera J. Negative regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J Exp Med*. 2004; **199**:1491-1502.

Okayama Y, Hagan DD, Woolhiser M, Metcalfe DD. Further characterization of FcγRII and FcγRIII expression by cultured human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001; **124**:155-157.

Olivera A, Urtz N, Mizugishi K, Yamashita Y, Gilfillan AM, Furumoto Y, Gu H, Proia RL, Baumruker T, Rivera J. IgE-dependent activation of sphingosine kinases 1 and 2 and secretion of sphingosine 1-phosphate requires Fyn kinase and contributes to mast cell responses. *J Biol Chem*. 2006; **281**:2515-2525.

Pantano S, and Montecucco C. A molecular model of the *Vibrio cholerae* cytolysin transmembrane pore. *Toxicon*. 2006; **47**:35-40.

Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ, Rivera J. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol*. 2002; **3**:741-748.

Patrino E, Aliandro O, Lesa M. Isolation of *Vibrio cholerae* non 01 from patients with acute gastroenteritis. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 1999; **56**:85-89.

Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest.* 1997; **99**:1492-1499.

Peterson JW, and Ochoa LG. Role of prostaglandins and cAMP in the secretory effects of cholera toxin. *Science.* 1989; **245**:857–859.

Peterson JW, Reitmeyer JC, Jackson CA, and Ansari GAS. Protein synthesis is required for cholera toxin-induced stimulation of arachidonic acid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1991; **1092**:79–84.

Pruitt MK RB, Rahemtulla B, Rahemtulla F, et al. Innate humoral factors. In: Ogara PL, Mestecky J, Lamm ME, et al, eds. *Mucosal immunology*, 2nd. San Diego: Academic Press Inc, 1999; 65–68.

Pulimood AB, Mathan MM, Mathan VI. Quantitative and ultrastructural analysis of rectal mucosal mast cells in acute infectious diarrhea. *Dig Dis Sci* 1998; **43**:2111–2116.

Qadri F, Asaduzzaman M, Wennerås C, Mohi G, Albert MJ, Abdus Salam M, Sack RB, Jertborn M, McGhee JR, Sack DA, Holmgren J. Enterotoxin-specific immunoglobulin E responses in humans after infection or vaccination with diarrhea-causing enteropathogens. *Infect Immun.* 2000; **68**:6077-6081.

Qadri F, Raqib R, Ahmed F, Rahman T, Wenneras C, Das SK, Alam NH, Mathan MM, Svennerholm AM. Increased levels of inflammatory mediators in children and adults infected with *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; **9**:221-229.

Qadri F, Bhuiyan TR, Dutta KK, Raqib R, Alam MS, Alam NH, Svennerholm AM, Mathan MM. Acute dehydrating disease caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 induce increases in innate cells and inflammatory mediators at the mucosal surface of the gut. *Gut*. 2004; **53**:62-69.

Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol Rev*. 2002; **26**:125–139.

Rhine JA, and Taylor RK. TcpA pilin sequences and colonization requirements for O1 and O139 *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 1994; **13**:1013–1020.

Richardson K. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect Immun*. 1991; **59**:2727–2736.

Rivera J. Adaptors discriminate mast-cell cytokine production from eicosanoid production and degranulation. *Trends Immunol*. 2006; **27**:251-253.

Rocha MF, Aguiar JE, Sidrim JJ, Costa RB, Feitosa RF, Ribeiro RA, Lima AA. Role of mast cells and pro-inflammatory mediators on the intestinal secretion induced by cholera toxin. *Toxicon*. 2003; **42**:183-189.

Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera. *Lancet*. 2004; **363**:223-233. Review.

Sack GH Jr, Pierce NF, Hennessey KN, Mitra RC, Sack RB, Mazumder DN. Gastric acidity in cholera and noncholera diarrhoea. *Bull World Health Organ*. 1972; **47**:31-36.

Sack RB, Siddique AK, Longini IM Jr, Nizam A, Yunus M, Islam MS, Morris JG Jr, Ali A, Huq A, Nair GB, Qadri F, Faruque SM, Sack DA, Colwell RR. A 4-year study of the epidemiology of *Vibrio cholerae* in four rural areas of Bangladesh *J Infect Dis*. 2003; **187**:96-101.

Saitoh S, Arudchandran R, Manetz TS, Zhang W, Sommers CL, Love PE, Rivera J, and Samelson LE. LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation. *Immunity*. 2000; **12**:525–535.

Saka HA, Bidinost C, Sola C, Carranza P, Collino C, Ortiz S, Echenique JR, Bocco JL. *Vibrio cholerae* cytotoxin is essential for high enterotoxicity and apoptosis induction produced by a cholera toxin gene-negative *V. cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Microb Pathog*. 2008; **44**:118-128.

Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis J. Molecular cloning (a laboratory manual). Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.1989.

Sander LE, Lorentz A, Sellge G, Coëffier M, Neipp M, Veres T, Frieling T, Meier PN, Manns MP, Bischoff SC. Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. *Gut*. 2006; **55**:498-504.

Sandle GI, Butterfield I, Higgs NB, Warhurst G. Direct inhibitory effect of nicardipine on basolateral K_p channels in human colonic crypts. *Pflugers Arch*. 1999; **437**:596–602.

Sanjuan MA, Rao N, Lai KT, Gu Y, Sun S, Fuchs A, Fung-Leung WP, Colonna M, Karlsson L. CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion. *J Cell Biol*. 2006; **172**:1057-1068.

Santos J, Saperas E, Nogueiras C, Mourelle M, Antolín M, Cadahia A, Malagelada JR. Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans *Gastroenterology*. 1998; **114**:640-648.

Sirois J, Ménard G, Moses AS, Bissonnette EY Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H2 and H3 receptors: stimulation of IL-10 production. *J Immunol*. 2000; **164**:2964-2970.

Sjöqvist A, Fahrenkrug J, Jodal M, Lundgren O. The effect of splanchnic nerve stimulation and neuropeptide Y on cholera secretion and release of vasoactive intestinal polypeptide in the feline small intestine. *Acta Physiol Scand.* 1988; **133**:289-295

Söderholm JD, Yang PC, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, Sherman PM, Perdue MH. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology.* 2002; **123**:1099-1108.

Speelman P, Rabbani GH, Bukhave K, and Rask-Madsen J. Increased jejunal prostaglandin E2 concentrations in patients with acute cholera. *Gut.* 1985; **26**:88–193.

Strugala V, Allen A, Dettmar PW, and Pearson JP. Colonic mucin: methods of measuring mucus thickness. *Proc Nutr Soc.* 2003; **62**:237-243.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; **21**:335-376.

Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 1987; **84**:2833-2837.

Trucksis M, Galen JE, Michalski J, Fasano A, and Kaper JB. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1993; **90**:5267–5271.

Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 1996; **272**:1910–1914.

Watanabe N, Akikusa B, Park SY, Ohno H, Fossati L, Vecchietti G, Gessner JE, Schmidt RE, Verbeek JS, Ryffel B, Iwamoto I, Izui S, Saito T. Mast cells induce autoantibody-mediated vasculitis syndrome through tumor necrosis factor production upon triggering Fc γ receptors. *Blood*. 1999; **94**:3855-3863.

Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005; **2**:406-415.

Yamamoto K, Al-Omani M, Honda T, Takeda Y, Miwatani T. Non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin: purification, partial characterization, and immunological relatedness to El Tor hemolysin. *Infect Immun*. 1984; **45**:192–196.

Yamamoto K, Ichinose Y, Shinagawa H, Makino K, Nakata A, Iwanaga M, Honda T, Miwatani T. Two-step processing for activation of the cytolysin/hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: nucleotide sequence of the structural gene (hlyA) and characterization of the processed products. *Infect Immun*. 1990; **58**:4106-4116.

Yamamoto T, Kamano T, Uchimura M, Iwanaga M, and Yokota T. *Vibrio cholerae* O1 adherence to villi and lymphoid follicle epithelium: in vitro model using formalin-treated human small intestine and correlation between adherence and cell-associated hemagglutinin levels. *Infect Immun*. 1988; **56**:3241–3250.

Zhao W, Kepley CL, Morel PA, Okumoto LM, Fukuoka Y, Schwartz LB. Fc γ RIIa, not Fc γ RIIb, is constitutively and functionally expressed on skin-derived human mast cells. *J Immunol*. 2006; **177**:694-701.

Zitzer A, Palmer M, Weller U, Wassenaar T, Biermann C, Trantum-Jensen J, Bhakdi S. Mode of primary binding to target membranes and pore formation induced by *Vibrio cholerae* cytolysin (hemolysin). *Eur J Biochem*. 1997; **247**:209-216.

Zitzer, A., Zitzer, O., Bhakdi, S., and Palmer, M. Oligomerization of *Vibrio cholerae* cytolysin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. *J Biol Chem.*1999; **274**: 1375-1380.

