



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE
INDIRIZZO: BIOLOGIA CELLULARE
CICLO XXI

STUDIO DEGLI EFFETTI INDOTTI
DALLE TOSSINE BOTULINICHE
A LIVELLO DI MUSCOLO SCHELETRICO

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore: Ch.mo Prof. Cesare Montecucco

Dottorando: Luca Carli

31 GENNAIO 2009

Alla mia famiglia

RIASSUNTO

La prima parte di questo lavoro riguarda lo studio degli effetti indotti dalle tossine botuliniche nel muscolo scheletrico.

In base a diverse caratteristiche, le fibre costituenti il muscolo scheletrico vengono distinte in fibre lente e fibre veloci. Le fibre muscolari lente (tipo I) presentano bassa velocità di contrazione ed elevata resistenza all'affaticamento. Le fibre veloci (tipo II) presentano elevata velocità di contrazione ma bassa resistenza all'affaticamento. E' stato dimostrato da diversi studi che stati di inattività muscolare portano a una maggiore espressione di fibre veloci. Al contrario, l'aumento dell'attività muscolare induce un incremento in fibre lente. Le nostre osservazioni riportano, contrariamente a quanto atteso, che in seguito alla paralisi indotta da tossina botulinica una parte delle fibre del muscolo tibiale anteriore (che fisiologicamente presenta fibre veloci) cambiano il loro fenotipo diventando lente. Per correlare il cambiamento fenotipico delle fibre con la paralisi indotta dalle BoNTs è stata analizzata l'espressione di N-CAM (neural cell adhesion molecule). N-CAM è una glicoproteina di adesione che viene espressa sulle fibre muscolari in seguito a denervazione o paralisi mentre non è espressa in condizioni fisiologiche. I risultati ottenuti dimostrano che le fibre diventate lente non esprimono mai N-CAM mentre le altre fibre dello stesso muscolo sono positive per tale marcatura. Queste osservazioni suggeriscono che tali fibre siano andate incontro ad un sovraccarico compensatorio che le ha portate al cambiamento da fibre veloci a fibre lente. Gli esperimenti attualmente in corso

sono rivolti a comprendere tale fenomeno e capire se le tossine botuliniche possano essere selettive per certe unità motorie rispetto ad altre.

La seconda parte del progetto sfrutta la proprietà di N-CAM di essere espressa solo nelle fibre muscolari paralizzate di topo adulto per lo studio comparativo della diffusione di diverse preparazioni commerciali di tossina botulinica di sierotipo A.

Molti disturbi dovuti ad iperattività colinergica del sistema nervoso periferico vengono comunemente trattati nella pratica clinica mediante l'uso di preparazioni farmaceutiche di tossina botulinica. In questo progetto, tre preparazioni commercialmente disponibili di tossina botulinica di sierotipo A (Botox[®]-Allergan, Inc., Dysport[®]-Ipsen, Ltd. e Xeomin[®]-Merz Pharmaceuticals), sono state studiate e comparate in termini di diffusione dal sito di iniezione intramuscolare nel topo. I dati ottenuti dimostrano che le tre preparazioni di tossina botulinica presentano una diffusione limitata ai muscoli adiacenti al sito di iniezione e che le tre formulazioni hanno un profilo di diffusione molto simile tra loro.

ABSTRACT

The first project of this thesis is focalized on the study of muscle effects induced by Botulinum neurotoxins.

On the basis of the specific myosin heavy chain isoform that they express, mammalian skeletal muscle fibers are classified as Slow (type I) or Fast (type 2) fibers. Slow fibers show low velocity of shortening and high fatigue resistance, whereas fast fibers show high velocity but lesser resistance. Muscle fibers

composition is strongly influenced by nerve activity in adult skeletal muscle; in fact, a reduced neuromuscular activity (for example, spinal cord injury) promotes a slow-to-fast fiber transformation in muscle, whereas an increase of muscle activity cause a shift in the opposite direction (fast-to-slow).

We observed that a blockade of nerve activity, induced by Botulinum Neurotoxin type A (BoNT/A), promotes the expression of the slow isoform of myosin heavy chain (MyHC) in contrast with other neuromuscular inactivity models. In order to correlate the MyHC isoform switch with the muscle fiber denervation by BoNT injection we analysed the expression of the marker N-CAM (neural cell adhesion molecule). N-CAM is an integral membrane glycoprotein which accumulates on muscle fiber membrane after denervation and it is not expressed in muscle under physiological condition. The results obtained show that BoNT induced-slow fibers never express N-CAM, while nearby fibers of the same muscle are positive for N-CAM. This observation would suggest that these fibers are still active and that they could undergone to a compensatory overload that lead them to a slow phenotype shift. Current experiments are performed to better understand this phenomenon and to investigate if botulinum neurotoxins block preferentially some motor units rather than others.

The second project is based on the study of diffusion of different Botulinum neurotoxin type A formulations injected in the mouse leg.

Botulinum neurotoxin type-A is very effective in the therapy of a wide range of human syndromes characterized by hyperactivity of peripheral cholinergic nerve terminals. Little diffusion of this toxin from the site of injection is commonly observed, but even minor changes in this property would greatly affect the validity of the treatment. Different pharmacological formulations of botulinum

toxin type A (BoNT/A) are available and they may have different diffusion characteristics due to protein complex size, product format and pharmacological properties.

Here, we have assessed the extent of diffusion of three commercial preparations of botulinum neurotoxin type A: Botox[®] (Allergan, Inc.), Dysport[®] (Ipsen, Ltd.) and Xeomin[®] (Merz Pharmaceuticals), using a novel and highly sensitive test based on Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM) expression in muscle. N-CAM is a membrane glycoprotein which accumulates on muscle fibres after denervation and is not expressed in the untreated adult muscle. This allows a fine monitoring of the functional diffusion of this toxin and the sensitivity of the present assay is emphasized by the use of the mouse model because of the small muscle dimensions. The results presented here indicate that there is no significant difference between Botox[®], Dysport[®] and Xeomin[®] with respect to diffusion into adjacent muscles in the mouse leg.

Indice

1	Introduzione	7
1.1	Il botulismo	8
1.2	Le tossine botuliniche	9
1.3	Struttura delle neurotossine	10
1.3.1	Dominio di legame H _C	12
1.3.2	Dominio di traslocazione H _N	13
1.3.3	Dominio catalitico L	13
1.4	La giunzione neuromuscolare	15
1.5	La neuroesocitosi	16
1.6	I bersagli delle tossine botuliniche, ovvero, le proteine formanti il complesso SNARE	18
1.7	Meccanismo d'azione	20
1.7.1	Legame neurospecifico	21
1.7.2	Internalizzazione nei neuroni	22
1.7.3	Traslocazione transmembrana del dominio catalitico	23
1.7.4	Attività zinco-endopeptidasica	23
1.8	Fibre muscolari	26
1.8.1	Calcineurina-NFAT	28
1.8.2	PGC-1 α , PGC-1 β e PPAR β - δ	29
1.9	Impieghi terapeutici delle tossine botuliniche	31
2	Scopo della tesi	35
3	Materiali e metodi	37
3.1	Animali utilizzati	37
3.2	Iniezioni intramuscolari di tossine botuliniche	37
3.2.1	Iniezioni di BoNT/A e BoNT/C	37
3.2.2	Iniezioni delle formulazioni farmaceutiche di tossina botulinica di sierotipo A	37
3.3	<i>Digit abduction scoring assay</i>	38
3.4	Immunoistochimica	38
3.5	Colorazione con ematossilina-eosina	40
3.6	Colorazione istochimica per la SDH	40

3.7	Omogenati muscolari	40
3.8	Quantificazione di proteine mediante il metodo di BCA	41
3.9	Corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)	41
3.10	Western Blotting	42
3.11	Somministrazione di Ciclosporina A	43
3.12	Transfezione “ <i>in vivo</i> ” mediante elettroporazione	43
3.13	Saggio Luciferasi con doppio reporter	44
3.14	Chirurgia del nervo sciatico	46
4	<i>Risultati e discussione</i>	47
4.1	Studio degli effetti delle tossine botuliniche a livello di muscolo Scheletrico	47
4.1.1	Le tossine botuliniche inducono atrofia muscolare	47
4.1.2	Le tossine botuliniche inducono la comparsa di fibre lente nel tibiale anteriore di topo	49
4.1.3	La via di calcineurina-NFAT è coinvolta?	51
4.1.4	N-CAM come marcatore di denervazione/paralisi muscolare	54
4.1.5	Selettività delle tossine botuliniche per le unità motorie	56
4.2	Studio comparativo della diffusione di tre formulazioni farmaceutiche di tossina botulinica di sierotipo A	58
4.2.1	Analisi istologica della diffusione	61
4.2.2	Analisi biochimica dell’espressione di N-CAM	63
4.2.3	Considerazioni sulla diffusione	65
5	<i>Conclusioni</i>	67
6	<i>Bibliografia</i>	71

Abbreviazioni

Ach	Acetilcolina
APS	Ammonio persolfato
ATP	Adenosina trifosfato
BoNTs	Neurotossine botuliniche
Cn	Calcineurina
CNTs	Neurotossine clostridiali
DAS	<i>Digit Abduction Scoring assay</i>
DTT	Ditio-treitolo
Hepes	Acido N-2-idrossietilpiperazin-N'-2-metansolfonico
IL-4	Interleuchina-4
kDa	<i>Kilo Dalton</i>
LD ₅₀	Dose letale 50
LSB	Tampone di Laemmli (<i>Laemmli sample buffer</i>)
MyHC	Catene pesanti della miosina (<i>Myosin Heavy Chain</i>)
N-CAM	Molecola di adesione neurale (<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>)
NFAT	Fattore nucleare di attivazione delle cellule T (<i>Nuclear Factor of Activated T-cell</i>)
NMJ	Giunzione neuromuscolare
NSF	Proteina di fusione sensibile a N-etilmaleimide
PBS	Sol. salina tamponata con fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
SDS	Sodio dodecil-solfato
SNAP	Proteine solubili leganti NSF
SNAP-25	Proteina di 25 kDa associata a sinaptosomi
SNARE	Recettori per SNAPs
TA	Tibiale Anteriore
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiammina
TeNT	Tossina Tetanica
Tris	Tris-(idrossimetil)-amminometano
VAMP	Proteina di membrana associata alle vescicole
Xaa	Amminoacido qualsiasi

Nomenclatura degli amminoacidi

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

Introduzione

L'evoluzione e la conservazione della specie hanno spinto ogni essere vivente, dalle origini della vita sino ai giorni nostri, ad evolvere strategie sempre più efficaci per assicurarsi “ un posto in prima fila “ nella grande ruota della vita. Occupazione di diversi habitat, predazione, mimetismo sono solo alcuni esempi di strategie atte appunto a garantire l'aumento delle possibilità di sopravvivenza. Un sistema curioso d'interazione tra esseri viventi è rappresentato dalla capacità di certi organismi di modificare le funzioni vitali di un altro organismo con lo scopo di trarne vantaggio. Svariate molecole sono state create a tal scopo nell'arco dell'evoluzione: dal semplice acido formico usato dalle formiche fino alle letali tossine dei serpenti o le tossine multimeriche di certi batteri. Alcune di queste svolgono la loro funzione in maniera piuttosto aspecifica; altre, invece, presentano un'altissima specificità nei confronti dei loro bersagli. Molecole come queste sono usate per scopi difensivi, nella predazione o nella competizione. Vari batteri, ad esempio, producono tossine dirette verso organismi simili al fine di competere nella crescita; altri batteri hanno sviluppato tossine rivolte contro organismi superiori, quali piante o animali, al fine di favorire comunque la loro proliferazione e diffusione.

Il sistema nervoso negli animali è un apparato tanto complesso quanto vulnerabile: alterazioni nel funzionamento di un numero relativamente basso di cellule nervose provoca effetti importanti in altri distretti dell'organismo stesso. Non sorprende quindi che molte tra le più letali tossine vadano a colpire proprio il sistema nervoso bloccando, ad esempio, la componente motoria di tale sistema con conseguente paralisi dei muscoli; e bloccare i muscoli respiratori significa morte dell'organismo. Alcune neurotossine animali svolgono la loro azione sul terminale postsinaptico della giunzione neuromuscolare impedendo la propagazione dell'impulso da neurone a muscolo. Altre, tra cui le neurotossine di alcuni batteri del genere *Clostridium* (*Clostridium botulinum* e *Clostridium tetani*), colpiscono la parte presinaptica bloccando il rilascio di neurotrasmettitore. Le tossine botuliniche, oggetto di questa tesi, verranno di seguito presentate in maniera più approfondita.

1.1 Il Botulismo

Il botulismo è una patologia a carico del sistema nervoso periferico causata da *Clostridium botulinum*, un batterio gram positivo, anaerobio e sporigeno appartenente al gruppo dei clostridi (anche *Clostridium baratii*, *C. butyricum* e *C. argentinensis* sono tossigenici e patogeni). Anche se l'origine della malattia è di natura batterica, non si può parlare di infezione ma bensì di intossicazione, dal momento che, perlomeno nel soggetto adulto, sono le tossine prodotte dal batterio a provocare gli effetti patologici. Questi si manifestano come indebolimento muscolare generalizzato, difficoltà nella deglutizione, secchezza delle fauci e ridotta capacità della messa a fuoco nella visione. Solo nei casi di intossicazione acuta, il soggetto presenta paralisi flaccida dell'intera muscolatura scheletrica e difficoltà respiratoria per blocco dell'attività del diaframma, con potenziale esito fatale. Queste paralisi, comunque, non sono dovute all'azione delle tossine direttamente a livello muscolare. Esse, infatti, hanno come bersaglio la parte presinaptica della giunzione neuromuscolare e, più specificamente, l'apparato citosolico di neuroesocitosi. La compromissione di quest'ultimo previene il rilascio di neurotrasmettitore dal terminale con conseguente interruzione dello stimolo motorio.

La patologia fu descritta, per la prima volta, circa duecento anni fa in Germania quando, a causa dell'ingestione di salsicce contaminate dal batterio, si verificò l'intossicazione. Proprio dal nome latino di questo alimento, *botulus*, deriva il termine "botulismo". Non sorprende che la malattia venne notata dopo ingestione di cibo contaminato, dal momento che la forma più comune di botulismo è quella alimentare (esiste anche la forma infantile e la meno comune da ferita).

La forma vegetativa di *Clostridium botulinum* presenta scarsa resistenza ad agenti fisici e chimici; le spore, invece, sono molto resistenti, ed è per questo motivo che sistemi casalinghi di sterilizzazione dei cibi si rivelano spesso inefficaci nell'inattivazione del microrganismo. Quando le spore vengono a trovarsi in ambienti favorevoli, ovvero assenza di ossigeno e presenza di elementi nutritivi, iniziano a germinare dando origine alla forma vegetativa. In questo stato inizia la proliferazione e, in concomitanza, la produzione delle tossine. Queste non vengono subito esocitate, ma si accumulano nel citoplasma finché, per lisi batterica, vengono rilasciate all'esterno. Se il cibo ingerito contiene solo spore, raramente si ha la manifestazione della patologia. Solo bambini molto piccoli, nei

quali la flora batterica intestinale non è ben sviluppata, possono andare in contro ad intossicazione dal momento che il batterio riesce ad attecchire alle mucose e proliferare (botulismo infantile). C'è da dire, infine, che l'incidenza della malattia, nel nostro paese, non è elevata. Per questo motivo non è prevista vaccinazione obbligatoria, salvo casi di diretta esposizione al batterio o ad elevate quantità di tossina.

1.2 *Le tossine botuliniche*

L'elevata neurospecificità e la particolare attività proteolitica fanno di queste tossine i più potenti veleni noti fino ad ora. La dose letale (LD₅₀) nel topo è pari a circa 0,1 nanogrammi di tossina per chilogrammo di peso corporeo.

Esistono sette diversi sierotipi di neurotossine botuliniche (BoNTs), ognuno dei quali contraddistinto da una lettera. Pertanto abbiamo BoNT/A, B, C, D, E, F, G (Hateway et al., 1989) prodotte da altrettanti ceppi di *C. botulinum*. I sierotipi E, F e G vengono inoltre prodotti da *C. butyricum*, *C. baratii* e *C. argentinensis* rispettivamente. BoNT /A, B, E, e raramente F, sono responsabili del botulismo umano, oltre che quello animale; C e D colpiscono solo animali, mentre il sierotipo G non è stato correlato finora a nessuna forma di botulismo.

Dopo l'ingestione, le tossine passano dall'apparato digerente al sistema circolatorio mediante transitosi a livello delle cellule epiteliali della mucosa intestinale. Una volta raggiunto il torrente sanguigno, esse possono raggiungere tutte le giunzioni neuromuscolari dell'organismo dove, una volta legate ad un recettore presinaptico, vengono endocitate. Quando entrano, passano dagli endosomi al citoplasma, nel quale possono ora svolgere la loro azione proteolitica a livello dei propri bersagli. Questi sono rappresentati dalle tre proteine (*Syntaxina*, *SNAP-25* e *VAMP/sinaptobrevina*) che mediano la fusione delle vescicole sinaptiche, contenenti il neurotrasmettitore, con la membrana plasmatica della cellula neuronale. La compromissione della corretta formazione e del funzionamento dell'apparato di neuroesocitosi impedisce il rilascio di acetilcolina (Ach) dal terminale presinaptico con il risultato di interrompere la propagazione dello stimolo nervoso. Anche la tossina tetanica è una tossina clostridiale (prodotta da *C. tetani*) che presenta la capacità di interrompere il rilascio di neurotrasmettitore; la sua azione, comunque, non è rivolta alle NMJ.

1.3 Struttura delle neurotossine

Il fatto che la principale via di ingresso per le tossine sia quella dell' apparato digerente pone, a quest'ultime, problemi di resistenza alla proteolisi e alla denaturazione: due eventi che si verificano a livello gastrico. Per ovviare a questo problema e arrivare integre nel tratto intestinale, le tossine vengono prodotte come complesso (del peso di 300, 500 e persino 900 kDa) insieme ad altre proteine non tossiche che permette loro di resistere all'ambiente gastrico. Essendo il complesso multimerico instabile a pH alcalino, una volta arrivato a livello intestinale, questo si dissocia liberando la tossina vera e propria che verrà assorbita e immessa nel circolo ematico.

Le tossine botuliniche (come le tetaniche) sono delle metallo-proteine ad attività endopeptidasica dove il metallo in questione è lo zinco. La struttura generale si presenta come una doppia catena del peso complessivo di circa 150 kDa. Si riconoscono, infatti, una catena pesante H del peso di 100 kDa ed una leggera L del peso di 50 kDa unite tra loro da un ponte disolfuro (e da interazioni non covalenti). La catena pesante è a sua volta costituita dal dominio N-terminale H_N e da quello C-terminale H_C (Schiavo et al., 2000).

La catena L svolge la funzione catalitica della tossina; il dominio H_C è responsabile del legame ai recettori presinaptici per l'internalizzazione; quello H_N è denominato "dominio di traslocazione" in quanto deputato, appunto, alla traslocazione della catena L dal lume endosomiale verso il citoplasma della cellula.

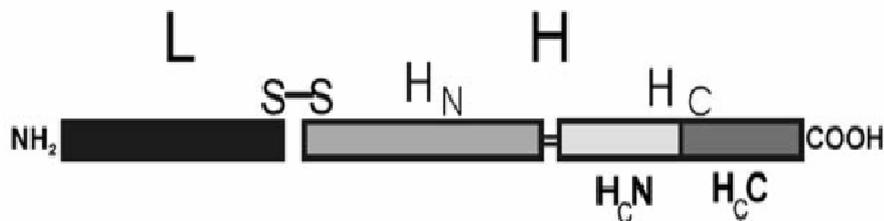


Figura 1: schema lineare di una generica neurotossina botulinica. Si notano la catena pesante H, suddivisa in dominio H_N e dominio H_C , e la catena L unite tra loro da un ponte disolfuro.

Al momento della sintesi, le tossine sono prodotte in forma inattiva come singole catene polipeptidiche di circa 150 kDa. In seguito, un taglio proteolitico a livello di un'ansa esposta della molecola genera la forma attiva bicatenaria descritta precedentemente. Il taglio, nella maggior parte dei casi, è effettuato da proteasi dei clostridi stessi. Alcuni ceppi, invece, non possedendo tali enzimi rilasciano le tossine nella forma monocatenaria che verranno attivate nell'organismo ospite da proteasi tissutali.

La catena H e la catena L dei vari sierotipi sono composte in media da 840 e 430 amminoacidi rispettivamente e presentano zone omologhe separate da regioni con scarsa o assente omologia. I segmenti maggiormente conservati della catena L sono rappresentati da un centinaio di residui aminoterminali e dalla zona centrale che contiene la sequenza consenso delle zinco-proteasi HExxH (fig. 2) (Schiavo G. et al., 1992). La catena H è la meno conservata, soprattutto nella parte carbossiterminale che risulta essere la più variabile. Totalmente conservate, infine, sono le cisteine deputate alla formazione del ponte disolfuro intercatenario.

La determinazione della struttura cristallografica di BoNT/A (Lacy et al., 1998) e BoNT/B (Swaminatan and Eswaramoorthy, 2000) rivelano che le tossine botuliniche sono costituite da tre domini distinti spazialmente tra loro; il che concorda con la separazione funzionale degli stessi e con le aspettative derivanti da precedenti studi biochimici.

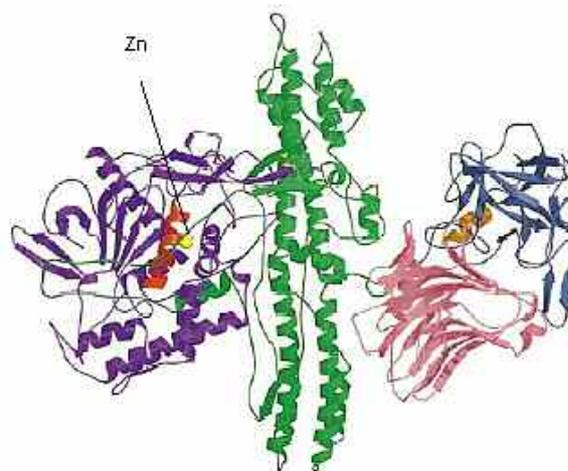


Figura 2: Rappresentazione tridimensionale della struttura globale della tossina botulinica di tipo A: in viola il dominio catalitico; in verde il dominio di traslocazione; in rosa il subdominio N-terminale del dominio di legame mentre in blu quello C-terminale. In arancio, nel dominio C-terminale, l'elica α_{22} implicata nel legame con i gangliosidi. L'atomo di zinco è rappresentato da una sfera in giallo; l' α elica adiacente, in rosso, contiene il motivo di consenso per lo zinco HExxH.

Molto interessante è la presenza di un'ansa che, pur appartenendo al dominio di traslocazione, si avvolge completamente attorno al perimetro del dominio catalitico, rendendo inaccessibile il sito attivo (fig. 3) (Lacy et al., 1998).

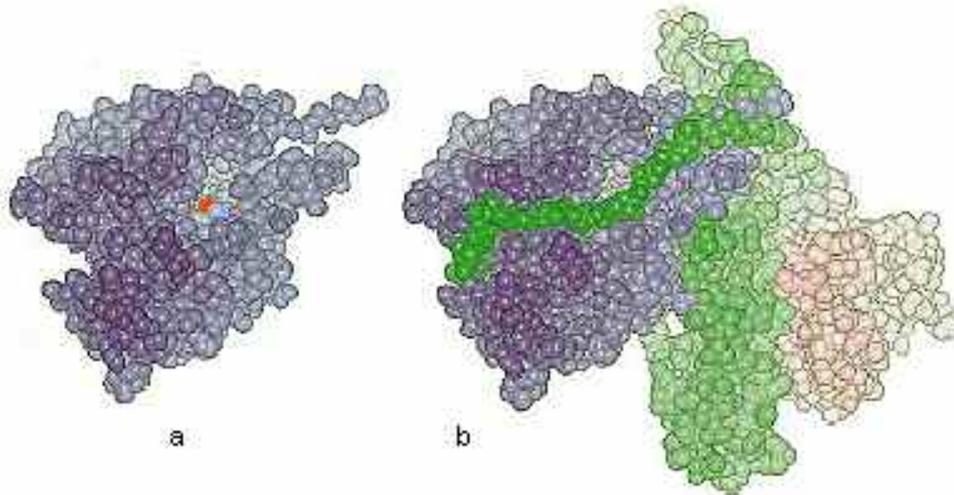


Figura 3: a) modello a sfere del dominio catalitico di BoNT/A. b) rappresentazione che evidenzia come l'ansa del dominio di traslocazione, che avvolge il dominio catalitico, renda inaccessibile il sito attivo dell'enzima. L'atomo di zinco, del dominio catalitico, è in rosso.

1.3.1 Dominio di legame H_C

La struttura cristallografica di questo dominio rivela che esso è formato da due sottodomini. Uno, all'estremità N-terminale, denominato H_CN e l'altro, all'estremità C-terminale, denominato $H_C C$ (fig. 1 e 2). H_CN è costituita da due foglietti β a sette filamenti denominato motivo “*jelly-roll*” tipico delle lectine delle leguminose che sono proteine leganti carboidrati. Questo subdominio risulta altamente conservato nelle tossine clostridiali. Il sottodominio $H_C C$ è formato da un motivo denominato “ *β -trefoil motif*” presente in diverse proteine implicate in funzioni di riconoscimento e legame (interleuchina-1, FGF, Kunitz-type trypsin inhibitor). La sequenza amminoacidica di questo subdominio è poco conservata

tra le CTNs (*Clostridial Neurotoxins*) (Montecucco et al. 2004). Si è notato la rimozione di dieci residui dalla parte C-terminale del dominio Hc impedisce il legame in neuroni spinali suggerendo che la parte maggiormente implicata nell'interazione di legame sia proprio la parte carbossiterminale della molecola (Schiavo et al., 2000).

1.3.2 *Dominio di traslocazione H_N*

Questa porzione della molecola presenta elevata omologia nei vari sierotipi, così come la predetta struttura secondaria. La parte centrale è costituita da una coppia di α -eliche della lunghezza di 10 nm avvolte su loro stesse (fig. 2) che ricordano la struttura di proteine che interagiscono con la membrana come le colicine e l'emoagglutinina del virus dell'influenza in grado di subire variazioni strutturali quando poste in ambiente acido. Una peculiarità di questo dominio, come accennato in precedenza, è quello di avere un'ansa avvolta attorno al dominio catalitico con la conseguenza di impedirne l'attività catalitica (Lacy et al., 1998) (fig. 3).

1.3.3 *Dominio catalitico L*

La catena leggera L è la parte di tossina dotata di attività catalitica. Questo dominio è costituito da un insieme di α eliche e β foglietti dove, al centro, è presente l' α -elica del motivo legante lo zinco (fig. 2). Questa è costituita dalla sequenza amminoacidica conservata in tutte le zinco-peptidasi: **HExxH**; dove **H** sta per istidina, **E** per acido glutammico e **x** per amminoacido generico (Schiavo et al., 2000). Analizzando la struttura di BoNT/A, abbiamo che gli amminoacidi, le cui catene risultano essere più vicine allo zinco sono: **His 223 – Glu 224 – His 227 – Glu 262 – Tyr 366**. Gli anelli imidazolici delle istidine, così come la catena laterale di Glu 262 hanno lo scopo di interagire con lo zinco. Glu 224 risulta essere particolarmente importante, dal momento che coordina una molecola d'acqua indispensabile nella reazione di idrolisi del legame peptidico della proteina bersaglio (Rossetto et al., 2004). Tale organizzazione del sito attivo è simile a quello della termolisina (Morante et al., 1996). L'anello fenolico della Tyr 366 non si trova completamente a ridosso del metallo, ma dista da esso di

circa 5 Å. Si pensa che svolga funzioni di coordinazione col substrato dato che, sostituzioni di questo amminoacido con glicina, hanno dimostrato incapacità di proteolisi della tossina.

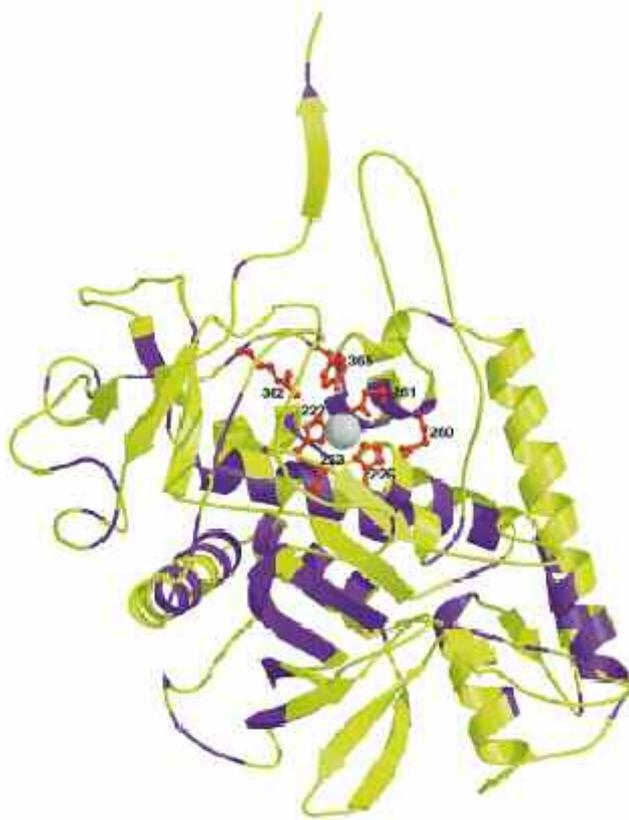


Figura 4: struttura del dominio catalitico di BoNT/A. In viola i residui più conservati. In rosso gli anelli fenolici della tirosina, gli imidazolici dell' istidina e le catene laterali dell' acido glutammico .

In conclusione, possiamo dire che l'organizzazione strutturale delle tossine botuliniche collima perfettamente col loro meccanismo d'azione. Questo si basa su quattro eventi fondamentali: 1) *legame ai recettori*; 2) *internalizzazione*; 3) *traslocazione nel citoplasma*; 4) *modificazione enzimatica del bersaglio* (Montecucco et al., 1994).

1.4 La giunzione neuromuscolare

Prima di entrare nella trattazione del meccanismo d'azione delle tossine, analizziamo brevemente la struttura del loro sito d'azione, ovvero, la sinapsi colinergica neuromuscolare.

Le giunzioni neuromuscolari sono delle strutture adibite alla trasduzione dello stimolo motorio dal sistema nervoso all'apparato muscolare di un organismo. La loro funzione principale è quella di tradurre un impulso elettrico, proveniente dall'assone, in stimolo chimico mediante il rilascio del neurotrasmettitore acetilcolina (Ach).

Quando il potenziale d'azione arriva nel terminale sinaptico si verifica un influsso di calcio (Ca^{++}), dovuto all'apertura di canali ionici voltaggio dipendenti, dall'ambiente extracellulare. Questo ione, interagendo con varie proteine sinaptiche, determina la fusione delle vescicole contenenti il neurotrasmettitore causando, così, il rilascio di quest'ultimo (Ach). Una volta nello spazio intersinaptico, l'acetilcolina andrà a legarsi ai recettori colinergici nicotinici della regione postsinaptica. Questi sono canali ionici che, una volta legate due molecole di Ach, vanno incontro a un cambiamento conformazionale che ne determina l'apertura. Si ha così un influsso ionico, a livello muscolare, che porta alla mobilitazione di Ca^{++} dai depositi intracellulari con conseguente contrazione delle fibre del muscolo.

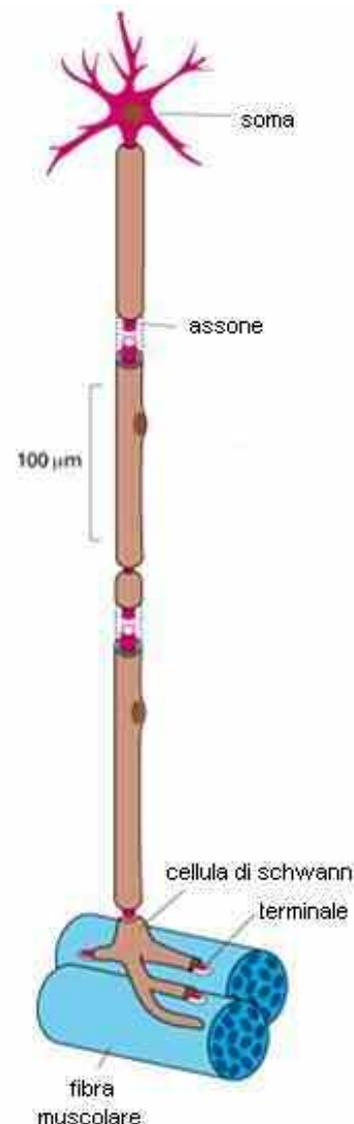


Figura 5: Rappresentazione di un elemento motorio. Guardando dall'alto verso il basso troviamo il corpo cellulare del motoneurone, l'assone, il terminale (giunzione neuromuscolare) ed infine il muscolo.

1.5 La neuroesocitosi

I neurotrasmettitori sono piccole molecole di varia natura che, una volta rilasciati da una cellula del sistema nervoso, sono in grado di evocare una risposta in un elemento postsinaptico. Essi non si trovano disciolti nel citoplasma ma accumulati in particolari vescicole delle sinapsi. Il processo di esocitosi vuole che, una volta arrivato il potenziale di azione dall'assone, si abbia la fusione delle vescicole con conseguente rilascio delle molecole in esse contenute. Questo processo non è spontaneo, né tanto meno lasciato al caso. Esiste, infatti, una fine regolazione di tutti i processi che portano alla neuroesocitosi: dalla mobilitazione delle vescicole fino alla fusione con la membrana cellulare e alla loro successiva endocitosi per il recupero della funzionalità.

Il neurotrasmettitore viene accumulato nel lume delle vescicole mediante uno specifico trasportatore che sfrutta il gradiente di H^+ creato da una pompa protonica ad attività ATPasica. Molte delle vescicole presenti nei terminali sinaptici si trovano ancorate all'actina del citoscheletro mediante interazioni regolate da proteine come la sinapsina; devono quindi essere liberate da questo vincolo per poter raggiungere la regione "attiva" della sinapsi.

Dopo la mobilitazione, le vescicole sono in grado di avvicinarsi e di interagire con la membrana dell'elemento presinaptico (in particolari zone denominate "zone attive") mediante il processo di *tethering* (legare) in cui, più che di legame, si parla di riconoscimento. Segue a questo processo quello di *docking* (ancoraggio) dove la vescicola si lega al plasmalemma mediante la formazione del complesso SNARE (SNAPs - receptor) a sua volta formato da tre proteine: *syntaxina* e *SNAP-25* della membrana cellulare e *VAMP/sinaptobrevina* della membrana vescicolare (fig. 6 e 7). Dopo l'ancoraggio, abbiamo la fase di *priming* (innesco) dove le vescicole "maturano" rendendosi così in grado di fondersi con la membrana cellulare appena percepiscono uno stimolo attivante. A questo punto, il rilascio di calcio indotto da un potenziale d'azione è in grado di far fondere la membrana vescicolare con quella cellulare permettendo così la fuoriuscita dei neurotrasmettitori. Dopo questo passaggio le vescicole devono essere endocitate e ricaricate di molecole in modo da ristabilirne la funzionalità. Il complesso SNARE che le áncora, però, non è in grado di dissociarsi da solo; esso, infatti, deve essere liberato da un sistema enzimatico citosolico. Il complesso funge da recettore per i fattori citosolici denominati α , β e γ SNAPs (*synaptosomal associated proteins*) i quali, a loro volta, mediano l'interazione con

NSF (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*). E' questa ultima, infatti, l'ATPasi in grado di dissociare il complesso (fig. 6).

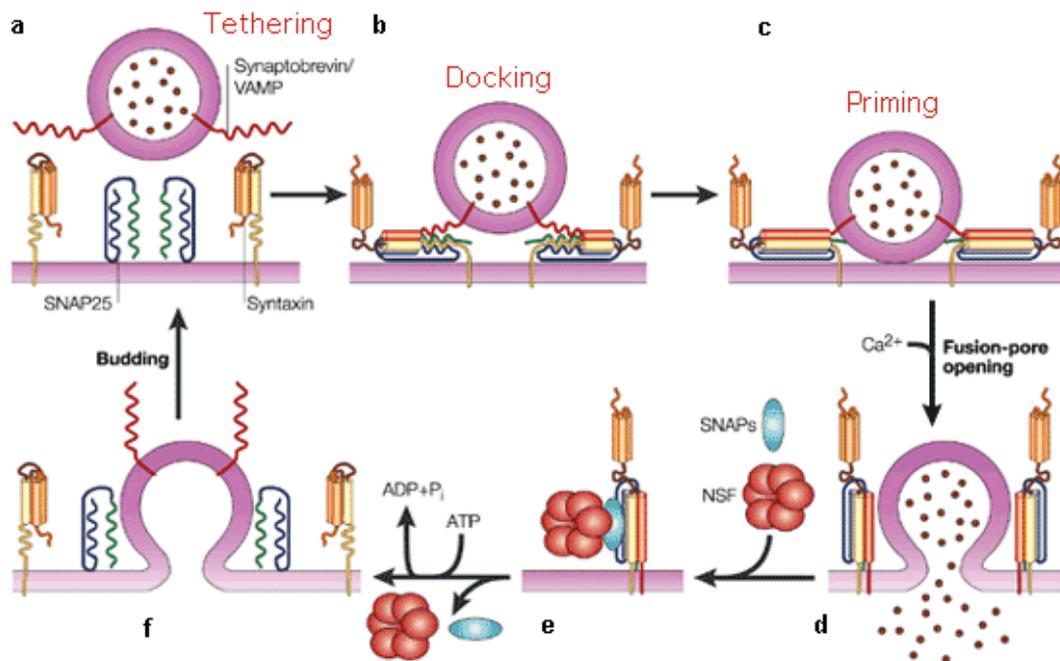


Figura 6: Rappresentazione del complesso di neuroesocitosi, della fusione e del recupero delle vescicole sinaptiche. a) riconoscimento tra vescicola e plasmalemma; b) ancoraggio; c) innescamento della vescicola; d) esocitosi del neurotrasmettitore; e) formazione del sistema SNAPs - NSF per la dissociazione del complesso SNARE formato dalle tre proteine VAMP, SNAP-25 e syntaxina; f) rilascio del complesso di fusione e successivo recupero della vescicola. Per maggiori dettagli vedere il testo.

Una volta che il complesso si è dissociato, le vescicole possono essere recuperate tramite endocitosi. Questa è caratterizzata dalla formazione di un rivestimento di clatrina e dall'azione della dinamina, una proteina GTP – dipendente che ha la funzione di chiudere il “collo” di fusione delle vescicole.

1.6 I bersagli delle tossine botuliniche, ovvero, le proteine formanti il complesso SNARE.

Come descritto in precedenza, SNARE è un complesso trimerico costituito dalle proteine VAMP/sinaptobrevina, SNAP-25 e syntaxina. A seconda della loro localizzazione queste proteine sono classificate come v-SNARE (*vesicle*) se associate alla membrana vescicolare oppure t-SNARE (*target*) quando associate a quella citoplasmatica.

VAMP (*vesicle associated membrane protein*) è una proteina di peso compreso tra 13 e 23 kDa a seconda dell'isoforma (VAMP-1 e VAMP-2 sono isoforme neuronali, mentre cellubrevina è ubiquitaria) e dell'organismo di provenienza. Questa si trova ancorata alla membrana vescicolare mediante il terminale carbossilico, mentre, quello amminico si trova tutto a livello citosolico (Trimble et al., 1998). VAMP è coinvolta anche in processi di esocitosi di cellule non neuronali.

SNAP-25 (*synaptosomal associated protein of 25 kDa*) è costituita da circa duecento amminoacidi. La peculiarità di questa proteina risiede nell'assenza di segmenti intramembrana. L'ancoraggio ad essa avviene grazie alla palmitoilazione di quattro cisteine localizzate nel centro della catena proteica (Oyler et al., 1989).

Esistono diverse isoforma di SNAP-25, come ad esempio, SNAP-29 e SNAP-23; tutte implicate in fenomeni di esocitosi regolata .

Syntaxina è una proteina della membrana plasmatica del peso di circa 35 kDa che presenta un segmento transmembrana (sporgente nello spazio intersinaptico) vicino al terminale carbossilico (Bennett et al., 1992). Questa proteina, oltre al legame con VAMP e SNAP-25, interagisce anche con *sinaptotagmina* (fig. 7), una proteina calcio sensibile della membrana vescicolare importante nella fusione delle vescicole ed implicata, quindi, nel rilascio di neurotrasmettitore (anche SNAP-25 si è rivelata capace di creare interazioni con sinaptotagmina).

Nel 1998 (Sutton et al., 1998) è stata risolta la struttura cristallografica del complesso che permette di capire come le varie proteine interagiscano tra loro per la formazione del complesso. Come si può notare (fig. 7), esso è composto da quattro eliche parallele (di cui due appartengono a SNAP-25) strettamente avvolte su loro stesse formando, appunto, un complesso molto stabile. Si è visto, infatti, che *in vitro* queste tre proteine si assemblano in un complesso che si rivela resistente alla detersione con SDS alla temperatura di 90°C.

Le proteine del complesso SNARE sono tutte bersagli delle tossine botuliniche. Il taglio di queste proteine può causare il mancato appaiamento delle stesse oppure un'interazione poco stabile che darà origine a un complesso SNARE non funzionale o comunque scarsamente efficiente. E' stato dimostrato che le botuliniche non sono in grado di svolgere la loro azione proteolitica sulle proteine complessate, ma soltanto quando esse sono in forma "libera".

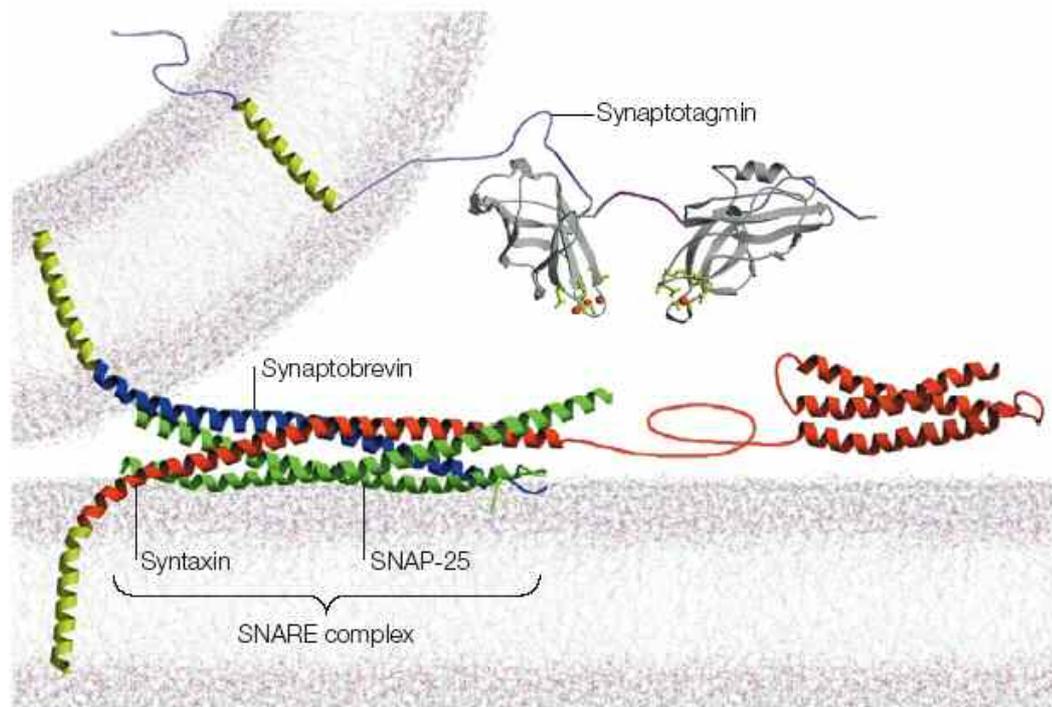


Figura 7: struttura del complesso SNARE e proteine che lo costituiscono. In rosso l'elica della *syntaxina*; in blu quella di *VAMP*; in verde le due eliche di *SNAP-25*. Più in alto, associata alla membrana della vescicola, troviamo *synaptotagmina*, una proteina calcio-sensibile implicata nel processo di fusione vescicolare.

1.7 Meccanismo d'azione

Una volta entrate in un organismo ed immesse nei fluidi corporei, le tossine sono in grado di raggiungere le giunzioni muscolari dove, in seguito alla loro internalizzazione, potranno svolgere l'attività tossica atta a bloccare la trasmissione dell'impulso nervoso.

Come introdotto in precedenza, il meccanismo d'azione, nel suo insieme, può essere suddiviso in quattro processi fondamentali: 1) *legame ai recettori*; 2) *internalizzazione*; 3) *traslocazione nel citoplasma*; 4) *modificazione enzimatica del bersaglio* (fig. 8) (Montecucco et al., 1994).

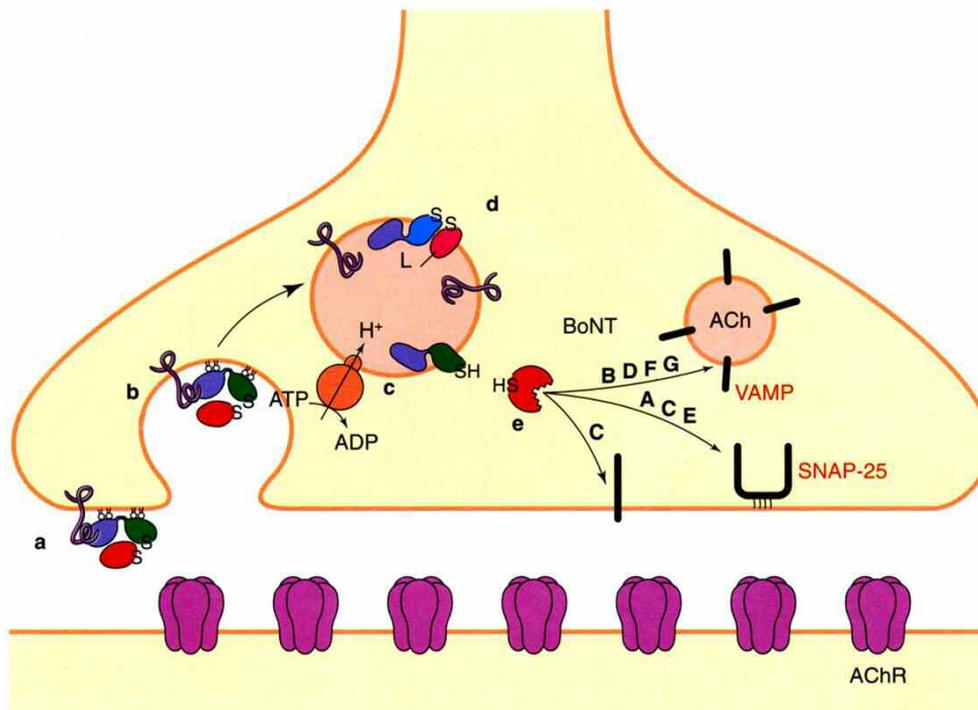


Figura 8: Meccanismo d'azione delle tossine botuliniche. a) legame al recettore sinaptico; b) internalizzazione; c) acidificazione dell'endosoma; d) cambiamento conformazionale e traslocazione nel citosol; e) azione proteolitica sui vari bersagli. La tossina botulinica è rappresentata con i tre domini: in blu, il dominio di legame; verde, traslocazione; rosso, catalitico.

Vediamo ora, più in dettaglio, i vari passaggi del meccanismo d'azione: dal legame alla membrana della giunzione, all'attività enzimatica del dominio catalitico.

1.7.1 *Legame neurospecifico*

Come descritto in precedenza, la parte di tossina che svolge la funzione di legame è data dal dominio H_C, il quale presenta omologie strutturali con altre proteine leganti carboidrati (vedi paragrafo “ *dominio di legame H_C*“ pag. 6). Da esperimenti effettuati si è notato che i polisialogangliosidi (glicosfingolipidi anionici che legano sulla testa polare della sfingosina carboidrati e residui di acido sialico) del sistema nervoso svolgono un ruolo fondamentale nel legame delle tossine (Montecucco et al., 1988, 1989, Schiavo et al., 2000]. I risultati di questi studi possono essere così riassunti: 1) Le neurotossine clostridiali legano polisialogangliosidi e, in particolare, G_{D1b}, G_{T1b} e G_{Q1b}; 2) preincubazioni delle tossine con polisialogangliosidi prevengono parzialmente il legame alla NMJ; 3) incubazioni di cellule in coltura con polisialogangliosidi incrementano la sensibilità delle cellule nei confronti delle tossine; 4) trattamenti delle membrane cellulari con neuroaminidasi, che rimuove i residui di acido sialico, decrementa il legame delle tossine; 5) l'intossicazione di topi knockout per gangliosidi si è rivelata efficientemente minore rispetto a topi normali; 6) il trattamento di neuroni spinali con fumonisina B1, un inibitore della sintesi di sfingolipidi e gangliosidi, ha rivelato il mancato legame da parte della tossina tetanica su queste cellule.

Tutti questi fattori avvalorano l'ipotesi che sostiene, appunto, che siano proprio i polisialogangliosidi i diretti responsabili del legame. Si pensa, infatti, che questi interagiscano con le tossine con un meccanismo **a bassa affinità ma alta capacità**. Questo meccanismo prevede che in un primo momento le tossine vengano legate **debolmente** alla membrana mediante i gangliosidi, e che solo in un secondo momento vengano legate più **specificamente** da un recettore proteico (quindi, molti gangliosidi che concentrano le tossine a livello della membrana, ma che le legano debolmente). Esperimenti di competizione effettuati utilizzando lectine (che presentano affinità per glicoproteine) hanno dimostrato che il legame delle tossine a cellule in coltura veniva meno. Inoltre, sono stati trovati legami ad alta affinità, sensibili a tripsina, il che suggerisce che vi sia l'esistenza di recettori proteici per le BoNTs (e anche per la tossina tetanica). È stato dimostrato, infatti, che alcuni sierotipi delle tossine legano con alta affinità *sinaptotagmina I e II*, proteine delle vescicole sinaptiche. BoNT/B risulta essere in grado di legarsi con il dominio luminale di sinaptotagmina, in presenza di polisialogangliosidi (in particolare G_{T1b}) quando avviene la fusione vescicolare per il rilascio del neurotrasmettitore. BoNT/G, invece, si è dimostrata in grado di interagire con

sinaptotagmina anche senza la presenza di gangliosidi (Rummel et al., 2004). Studi recenti hanno dimostrato che il dominio luminale della proteina SV2, una proteina transmembrana altamente glicosilata delle vescicole sinaptiche, è il recettore di BoNT/A e BoNT/E (Dong et al. 2006, Mahhold et al. 2006).

Tutte queste osservazioni portano alla conclusione che l'interazione di legame si presenti come un modello a **doppio recettore lipidico – proteico**, nel quale, comunque, i residui saccaridici rappresentano unità fondamentali per il legame.

1.7.2 *Internalizzazione nei neuroni*

Al fine di svolgere l'attività proteolitica la tossina deve entrare in qualche modo nel terminale dei neuroni. Le conoscenze sull'argomento affermano che le tossine non attraversano direttamente la membrana ma, una volta legate al proprio recettore, vengono endocitate mediante un meccanismo temperatura ed energia dipendente (Schiavo et al., 2000). E' da tempo risaputo che stimolazioni elettriche ripetute di neuroni favoriscono l'entrata delle tossine. Esperimenti condotti su neuroni di ippocampo, coltivati in apposito mezzo e intossicati con tossina tetanica hanno infatti dimostrato questo comportamento. In risposta a ripetuti stimoli si ha che una maggiore quantità di vescicole si fonde alla membrana presinaptica per rilasciare neurotrasmettitore e, di conseguenza, una maggiore quantità delle stesse viene re-internalizzata per il riciclo. L'apertura delle vescicole espone, nello spazio intersinaptico, proteine del lume stesso, le quali possono fungere da recettori per le tossine clostridiali (vedi paragrafo *legame neurospecifico*). Ad avvalorare queste osservazioni vi sono prove dove, neuroni incubati con anticorpi rivolti contro epitopi di proteine luminali presentavano questi ultimi all'interno delle vescicole riciclate (Kraszewsky, et al., 1995). Il destino differente delle tossine botuliniche e della tossine tetanica (la tetanica subisce un trasporto retroassonale fino al soma del motoneurone e successivamente passa nei neuroni inibitori del midollo spinale), una volta entrate nel neurone, fa pensare che le tossine possano essere addirittura endocitate in vescicole diverse, che rimarranno nel terminale nel caso delle BoNTs mentre andranno al soma cellulare nel caso della TeNT. In entrambi i casi, comunque, le vescicole di internalizzazione presentano un lume caratterizzato da bassi valori di

pH; condizione indispensabile per la traslocazione transmembrana del dominio L verso il citoplasma.

1.7.3 Traslocazione transmembrana del dominio catalitico

Per svolgere l'azione proteolitica, il dominio catalitico delle tossine deve passare dal lume vescicolare al citoplasma cellulare. Proprio qui, infatti, si trovano le proteine del complesso SNARE: i bersagli delle tossine.

Il basso pH del lume vescicolare è fondamentale per l'azione della tossina. Questo, non perché attiva la parte catalitica, ma perché ne permette la traslocazione nel citosol. Microiniezioni di dominio L, non trattato con acido, nel citoplasma cellulare hanno dimostrato che l'inibizione dell'esocitosi avviene comunque (Bittner et al., 1989). Il pH acido risulta indispensabile perché avvenga il cambiamento conformazionale del dominio di traslocazione H_N della catena pesante. Questa variazione nella struttura permette ad H_N di passare da una conformazione " neutrale-idrofilia " a una " acida-idrofobica ". In questo cambiamento vengono esposti residui idrofobici che, presentando affinità per lo scheletro alifatico dei lipidi di membrana, permettono l'inserzione dell'intero dominio nel bistrato lipidico. A questo punto viene a crearsi un poro transmembrana in grado di permettere il passaggio della catena L dal lume al citoplasma (Koriatzova and Montal, 2003). Si presuppone che questo passaggio sia facilitato da un processo di dispiegamento della catena L, causato dal pH acido. Una volta esposta nel citosol (pH neutrale), la proteina andrebbe incontro a un ripiegamento e, mediante riduzione del ponte disolfuro intercatenario (Rossetto et al., 2004), verrebbe rilasciata nel citoplasma nella forma attiva (non si esclude che ci siano addirittura delle chaperonine che aiutino il ripiegamento della proteina o che medino la traslocazione mantenendola nello stato dispiegato durante il passaggio transmembrana).

1.7.4 Attività zinco – endopeptidasica

Una volta che il dominio catalitico della tossina viene a trovarsi nel citoplasma è in grado di intercettare i propri bersagli e svolgere così la sua azione proteolitica.

Come descritto in precedenza, il dominio catalitico presenta al suo interno la sequenza consenso per lo zinco tipica delle endopeptidasi zinco-dipendenti. In precedenza, abbiamo visto che queste tossine vanno a compromettere il corretto appaiamento di tre proteine indispensabili nella formazione del complesso SNARE. I vari sierotipi, infatti, hanno la capacità di idrolizzare specificamente **un singolo legame peptidico** di queste proteine. L'evidenza che non vengono tagliati indistintamente i legami identici fra due amminoacidi che si ripetono nella catena, ci suggerisce che ci sia una sorta di riconoscimento strutturale dei bersagli da parte delle BoNTs. Inoltre, studi di attività enzimatica effettuati su corte catene peptidiche, contenenti il legame idrolizzabile, hanno dimostrato che il taglio non avviene (a differenza delle altre zinco proteasi che invece danno questa azione). E' necessaria, infatti, la presenza di lunghi segmenti polipeptidici affinché avvenga il riconoscimento enzima – substrato. Queste due osservazioni portano a pensare che ci sia un riconoscimento della struttura terziaria delle proteine SNARE (Rossetto et al., 1994, Rossetto et al., 2004). Omologie della sequenza primaria del dominio L ha suggerito che VAMP, SNAP-25 e syntaxina, potessero condividere una sequenza comune, coinvolta nel legame con la tossina. L'analisi delle sequenze di queste tre proteine ha dimostrato la presenza di un motivo comune a nove amminoacidi, presente in regioni conformate ad α elica (Rossetto, O. et al., 1994). Evidenze sperimentali hanno portato alla conclusione che questi motivi vengano esposti sulla superficie proteica e adottino una configurazione simile in tutte e tre le SNARE. Queste osservazioni indicano che via una sorta di doppio riconoscimento dove, una regione della tossina riconosce la sequenza contenente il legame idrolizzabile, mentre un'altra regione riconosce la parte contenente il motivo a nove amminoacidi. Proteine SNARE che presentano variazioni di questo motivo, infatti, risultano resistenti all'azione proteolitica (insetti, lieviti, ecc.).

I diversi sierotipi presentano specificità di taglio per le differenti proteine del complesso e anche per i differenti legami peptidici in esse presenti (tabella 1, pagina seguente).

<i>Sierotipo</i>	<i>Proteina bersaglio</i>	<i>Legame idrolizzato</i>
A	SNAP-25	Gln ¹⁹⁷ -Arg ¹⁹⁸
B	VAMP	Gln ⁷⁶ -Phe ⁷⁷
C	SNAP-25	Arg ¹⁹⁸ -Ala ¹⁹⁹
	syntaxina	Lys ²⁵² -Ala ²⁵³
D	VAMP	Lys ⁵⁹ -Leu ⁶⁰
E	SNAP-25	Arg ¹⁸⁰ -Ile ¹⁸¹
F	VAMP	Gln ⁵⁸ -Lys ⁵⁹
G	VAMP	Ala ⁸¹ -Ala ⁸²

Tabella 1: Sierotipi delle BoNTs con i rispettivi bersagli proteici e legami peptidici idrolizzabili.

La diversa disposizione del motivo a nove amminoacidi e del legame idrolizzabile porta alla rimozione di segmenti di diversa lunghezza dalle varie proteine (fig. 9).

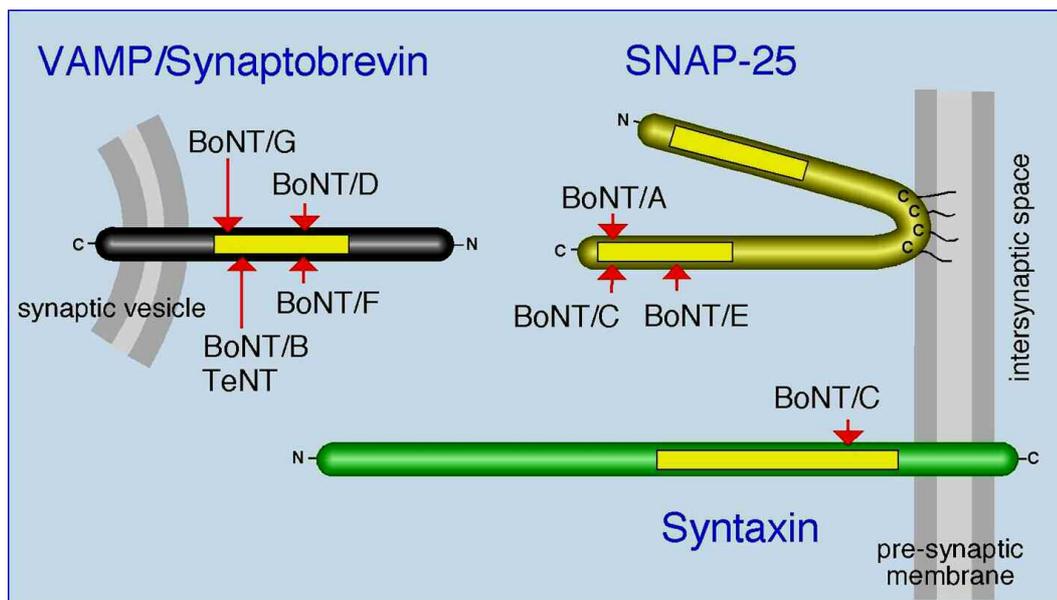


Figura 9: Proteine del complesso SNARE con i relativi siti di taglio da parte delle tossine clostridiali. Si possono apprezzare, in questa immagine, le dimensioni dei segmenti tagliati.

1.8 Fibre muscolari

I muscoli scheletrici sono composti da una varietà di fibre muscolari caratterizzate da differenti proprietà strutturali e funzionali. E' proprio questa eterogeneità che permette a diversi gruppi muscolari di avere proprietà differenti in base alla funzione che svolgono. Esistono, ad esempio, muscoli posturali che, dovendo mantenere un organismo in una certa posizione per lungo tempo devono essere resistenti all'affaticamento; altri muscoli, al contrario, sono in grado di sviluppare elevata potenza e velocità nel breve tempo essendo così adatti per il salto, la corsa o altri rapidi movimenti.

Questa notevole diversità è permessa, come già accennato, dalle fibre muscolari che compongono i muscoli stessi. Sulla base delle isoforme delle catene pesanti di miosina (MyHC) che esprimono, la velocità di contrazione e altre caratteristiche, le fibre vengono suddivise in fibre lente e fibre veloci. Le fibre lente esprimono l'isoforma lenta, detta anche "tipo I", delle catene pesanti della miosina. Queste fibre sono caratterizzate da bassa velocità di contrazione, sono ricche in mitocondri, hanno metabolismo ossidativo e presentano elevata resistenza all'affaticamento. Le fibre veloci, dette anche di "tipo II", vengono ulteriormente suddivise in fibre IIA, IIX e IIB sempre in base all'isoforma di miosina che esprimono. Le fibre IIA presentano una maggiore velocità di accorciamento rispetto alle fibre lente ma similmente a queste ultime hanno un metabolismo ossidativo. Le fibre IIB hanno elevata velocità di contrazione, basso contenuto di mitocondri, metabolismo glicolitico e bassa resistenza all'affaticamento. Infine, le fibre IIX mostrano caratteristiche intermedie tra le fibre IIA e IIB (fig. 10).

Lente Tipo I	Bassa velocità di contrazione	Ossidative	Elevata resistenza all'affaticamento
Veloci IIA	Alta velocità di contrazione	Ossidative	Elevata resistenza all'affaticamento
Veloci IIX	Intermedia velocità di contrazione	Variabili	Varabile resistenza all'affaticamento
Veloci IIB	Elevata velocità di contrazione	Glicolitiche	Bassa resistenza all'affaticamento

Fig. 10: Schema riassuntivo che illustra le varie fibre muscolari e le loro principali caratteristiche. Le fibre IIX presentano caratteristiche intermedie tra le fibre IIA e IIB.

Questa distinzione delle fibre va comunque presa come carattere generale dal momento che non sempre le fibre sono uguali in ogni specie o esprimono un solo tipo di miosina. Un esempio è dato dalle fibre IIX che presentano metabolismo ossidativo nel topo ma glicolitico nell'uomo. Un altro esempio è dato dalle cosiddette "fibre ibride" in grado di esprimere due diverse isoforme di MyHC (Schiaffino, S., 2007). Questo si verifica perché la natura delle fibre muscolari non è strettamente predeterminata; al contrario, le fibre muscolari mostrano un comportamento plastico durante tutta la vita dell'individuo. Durante lo sviluppo o rigenerazione muscolare, ad esempio, si ha un differenziamento delle fibre indipendente dall'attività nervosa che risulta nell'espressione del programma genico veloce delle fibre, ovvero, il programma di espressione predefinito. Contrariamente, l'induzione o il mantenimento del **programma lento è strettamente legato all'attività nervosa**. La maggior parte dei muscoli veloci dei topi, subito dopo la nascita, presenta un consistente numero di fibre lente che però sono destinate a scomparire durante il successivo sviluppo dal momento che unità motorie lente non innervano tali muscoli.

Nell'adulto, cambiamenti dei tipi di fibre di un muscolo possono essere indotti modulando l'attività nervosa come dimostrato da diversi esperimenti di cross-innervazione o elettrostimolazione. Un cambiamento da-lento-a-veloce nella direzione $I \rightarrow IIA \rightarrow IIX \rightarrow IIB$ può essere indotto, ad esempio, con elettrostimolazioni fasiche ad alte frequenze tipiche di motoneuroni veloci; al contrario, cambiamenti da-veloce-a-lento possono essere indotti nella direzione opposta da stimolazioni toniche a bassa frequenza tipiche di motoneuroni lenti. Altri cambiamenti nella composizione delle fibre è stata osservata in vari casi di inattività o iperattività del muscolo. Esperimenti di inattività muscolare indotta, come ad esempio denervazione di un muscolo, taglio del midollo spinale, sospensione degli arti, ecc. hanno dimostrato che le fibre muscolari tendono a passare da lente a veloci. Al contrario, muscoli sottoposti a un'aumentata attività (*overloading*), come ad esempio nei casi di aumentato esercizio fisico o indotti sperimentalmente rimuovendo il muscolo sinergico del muscolo in questione, presentano un cambiamento delle fibre da-veloci-a-lente.

C'è da dire, comunque, che i cambiamenti sopraccitati presentano una grossa variabilità che dipende dallo stato muscolare, dallo stato dell'organismo e dal suo stadio di sviluppo. Muscoli in sviluppo o rigeneranti hanno grande plasticità mentre i muscoli dell'adulto lo sono molto meno. Ad esempio, l'ipertrofia compensatoria del muscolo EDL in ratti sottoposti ad ablazione del muscolo

tibiale anteriore, ovvero, il suo muscolo sinergico, è accompagnato nella transizione delle fibre da-veloci-a-lente cosa che invece accade di rado nell'adulto. Simili esperimenti di sovraccarico, fatti col muscolo plantare e ablazione del gastrocnemio (sinergico del plantare) hanno, invece, dimostrato che il cambiamento da-veloce-a-lento avviene anche nell'adulto.

Anche lo stato degli ormoni tiroidei gioca un ruolo importante nello stato e nei cambiamenti delle fibre muscolari favorendo o inibendo i passaggi da-lento-a-veloce e vice versa.

Come abbiamo visto in questa breve descrizione diversi fattori concorrono nella determinazione della natura delle fibre così come nei loro cambiamenti ma la cosa più curiosa che emerge è che il fenotipo delle fibre è pesantemente influenzato dall'attività nervosa. Quando l'impulso nervoso arriva al terminale induce la liberazione di acetilcolina la quale, una volta raggiunti i propri recettori situati sulla membrana plasmatica muscolare, induce l'entrata di ioni e la conseguente contrazione muscolare. Come può, quindi, l'attività nervosa influenzare l'espressione di miosina, il contenuto di mitocondri e altre caratteristiche delle fibre? Diverse vie di trasduzione del segnale concorrono nella determinazione e nel mantenimento dei vari fenotipi delle fibre muscolari. Verranno descritte, ora, due importanti vie di trasduzione del segnale coinvolte nella regolazione del programma genico delle fibre lente: Cn-NFAT e PGC-1 α , -1 β e PPAR β - δ .

1.8.1 Calcineurina-NFAT

La calcineurina è una fosfatasi regolata da Ca²⁺/calmodulina che agisce sui fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia di NFAT inducendone la migrazione al nucleo e promuovendo così la trascrizione di specifici geni.

Diversi esperimenti hanno dimostrato l'importanza di calcineurina nel mantenimento del programma lento delle fibre muscolari. Ad esempio, muscoli veloci di topi transgenici che sovraesprimono calcineurina sotto il controllo del promotore della creatina chinasi muscolare presentano un numero maggiore di fibre lente rispetto al normale (Naya et al., 2000). Nel muscolo soleo, tipicamente lento, che contiene fibre di tipo I e IIA una sovraespressione di Calcineurina porta a uno sbilanciamento nel rapporto delle fibre verso il fenotipo lento; o ancora, nel muscolo gastrocnemio (veloce) che contiene fibre IIA, IIX, IIB e una bassissima quantità di tipo I, un'aumentata espressione di Cn porta ad aumento in fibre lente.

In altri esperimenti, dove Cn è inibita farmacologicamente in maniera specifica con ciclosporina A (Chin et al., 1998) oppure in topi knock-out per Cn (Parsons et al., 2003) si è osservato un abbassamento dell'espressione di fibre lente sia in muscoli lenti che veloci. Essendo calcineurina attivata dal calcio è possibile, quindi, che le fibre lente (usate maggiormente rispetto alle fibre veloci) presentino in media maggiori concentrazioni di calcio intracellulare favorendo, così, l'attivazione di tale via.

Un gran numero di studi affermano che fattori di trascrizione della famiglia di NFAT agiscono a livello muscolare come sensori dell'attività nervosa modulando l'espressione delle fibre muscolari sulla base dell'attività nervosa.

Ad esempio, esperimenti condotti *in vivo* nel muscolo tibiale anteriore (veloce) di topo transfettato con NFATc1-GFP hanno dimostrato che questo fattore di trascrizione presenta una localizzazione in prevalenza citoplasmatica mentre nel soleo (lento) la localizzazione è pressoché nucleare. Stimolando il tibiale anteriore, però, con stimolazioni elettriche a bassa frequenza si nota una rapida migrazione verso il nucleo di NFATc1 (Liu et al., 2001) mentre nel soleo in stato di inattività (dovuta a denervazione o alla semplice anestesia) si osserva una rapida esportazione di NFATc1 dal nucleo (Tothova et al., 2006).

1.8.2 PGC-1 α , PGC-1 β e PPAR β - δ .

Finora abbiamo descritto le vie di trasduzione maggiormente implicate nell'espressione del programma genico lento delle fibre ma quali vie si occupano della determinazione del tipico metabolismo ossidativo delle fibre lente? Le vie, finora, meglio conosciute nella determinazione del metabolismo ossidativo delle fibre muscolari sono quelle di PGC-1 e PPAR β - δ .

PGC-1 α e -1 β sono co-attivatori di fattori di trascrizione e in vari tipi cellulari stimolano la biogenesi mitocondriale e la produzione di enzimi ossidativi inducendo l'espressione di *nuclear respiratory factor* (NRF)-1 e -2 che controllano l'espressione di diversi geni mitocondriali. (NRF)-1 e -2 sono in grado di stimolare l'espressione di mitochondrial transcription factor A (mtTFA), una proteina essenziale per la replicazione e la trascrizione del DNA mitocondriale.

Si è visto in alcuni esperimenti che la sovraespressione di PGC-1 α in muscoli veloci porta a biogenesi mitocondriale e a una maggiore produzione di enzimi ossidativi rendendo così tali muscoli più resistenti all'affaticamento. In altri

esperimenti, invece, utilizzando topi knock-out per PGC-1 α non si è notato un grosso cambiamento nella distribuzione delle fibre anche se i livelli di ATP sintasi mitocondriale e citocromo ossidasi risultavano diminuite (Arany et al., 2005).

Un'altra via implicata nella determinazione del fenotipo lento delle fibre è quella di PPAR β/δ . L'acronimo sta per *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) i quali appartengono alla superfamiglia di recettori nucleari che legano il DNA come eterodimeri associati ai *retinoid X receptors*. Esperimenti di sovraespressione muscolo-specifica di PPAR β/δ hanno dimostrato che i muscoli trattati avevano fibre con un profilo ossidativo più consistente oltre a un maggior contenuto di DNA mitocondriale, sovraespressione di geni codificanti per proteine contrattili tipicamente lente e aumentata resistenza all'affaticamento. Inoltre, altri esperimenti hanno dimostrato che il knock-out muscolo specifico di PPAR β/δ induce un passaggio da-lento-a-veloce delle fibre muscolari con concomitante abbassamento dell'espressione di miosina lenta, aumento di miosina IIB e passaggio a fibre con profilo ossidativo inferiore.

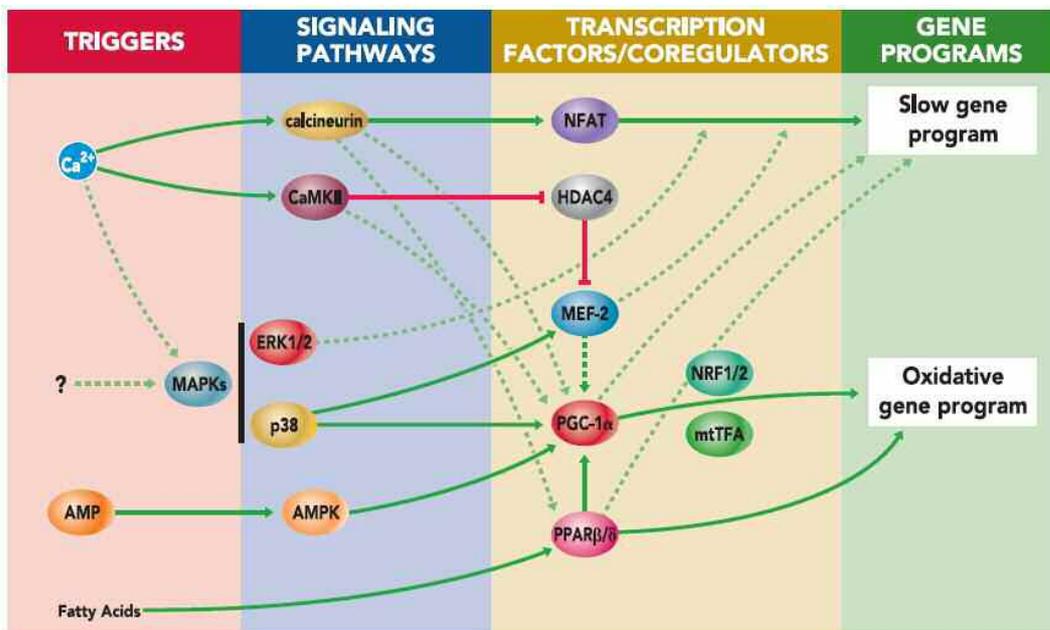


Fig. 11: Schema delle vie di trasduzione del segnale con i vari fattori di trascrizione e co-attivatori implicati nel controllo del programma genico lento e il metabolismo ossidativo delle fibre muscolari. Lo schema illustra l'importante ruolo della via di Ca-NFAT nella determinazione del programma genico delle fibre lente e la via di PPAR β/δ e PGC-1 α e β nella determinazione del metabolismo ossidativo. Le frecce verdi tratteggiate indicano le vie non ancora ben conosciute.

1.9 *Impieghi terapeutici delle tossine botuliniche*

Come abbiamo visto, le tossine botuliniche hanno la capacità di provocare paralisi muscolare. Questa azione, non è dovuta alla compromissione della fisiologia muscolare ma all'inibizione del rilascio di acetilcolina dai terminali presinaptici della giunzione neuromuscolare. Le tossine, grazie alla loro neurospecificità e alla particolare attività enzimatica si rivelano essere molecole ad elevata tossicità con una LD₅₀ nel topo pari a soli 0,4 - 1 nanogrammi/Kg.

Tenendo conto di queste caratteristiche, però, non si possono considerare le tossine solamente come sostanze tossiche; se si osserva, infatti, dove queste sostanze possano essere impiegate a fini terapeutici, si nota che gli utilizzi sono molteplici. Svitati disturbi che colpiscono l'uomo hanno, alla base, cause di iperattività colinergica del sistema nervoso autonomo o di quella della muscolatura scheletrica. L'impiego, quindi, delle tossine botuliniche può risultare benefico ed apportare miglioramenti in questi stati di alterazione fisiologica. Verranno di seguito elencati i vari disturbi che prevedono l'impiego delle tossine botuliniche come terapia farmacologica in campo clinico (Zin-Soe and Eng-King, 2003).

Condizioni di iperattività colinergica “ muscolare scheletrica“:

- Blefarospasmo (chiusura incontrollata delle palpebre);
- Emispasmo facciale;
- Strabismo (dovuto a iperattività dei muscoli oculari);
- Spasticità;
- Distonia cervicale, oromandibolare e laringea;
- Crampi occupazionali.

Condizioni di iperattività colinergica “ autonoma “ :

- Iperidrosi palmare e ascellare (eccessiva sudorazione);
- Rinorrea (eccessiva stimolazione della mucosa nasale con conseguente edema e sovrapproduzione di muco);
- Scialorrea (eccessiva stimolazione della produzione salivare);
- Acalasia (compromissione della peristalsi esofagea);
- Disfagia (spasmo dello sfintere esofageo inferiore);

Stenosi ipertrofica del piloro (eccessiva crescita dello strato muscolare del piloro e difficoltà di discesa del chimo verso il duodeno);
Disfunzioni dello sfintere di Oddi (in casi di colecistectomia).

Altre possibili applicazioni :

Bruxismo (contrazione involontaria, notturna o diurna, dei muscoli mandibolari con danni a denti e giunzione mandibolare);
Nistagmo;
Distonia focale segmentaria;
Tremori vari (arti, capo, ecc.);
Cefalea tensiva e vasomotoria;
Spasmi muscolari paraspinali;
Ragadi anali;
Vaginismo;
Dissinergia vescicale (problemi nella minzione e reflussi urinari negli ureteri);
Cosmesi (rughe facciali, asimmetrie).

Le somministrazioni di tossina sono effettuate mediante iniezioni nel muscolo da trattare. In questo modo si ha una maggiore probabilità di colpire le giunzioni neuromuscolari di interesse evitando, al contempo, l'eccessiva diffusione nelle zone circostanti o nei fluidi corporei. La diffusione dei farmaci a base di tossina botulinica, infatti, è un punto cardine in questo tipo di trattamenti. Generalmente i disturbi muscolari, come ad esempio le distonie, colpiscono un muscolo o un ristretto gruppo di muscoli. Poiché i muscoli da trattare, quindi, sono pochi o addirittura singoli, la caratteristica più importante è che il farmaco somministrato rimanga localizzato al sito di iniezione e che non diffonda causando spiacevoli o pericolosi effetti collaterali in regioni adiacenti alla zona trattata. Attualmente la pratica clinica prevede che per limitare al minimo la diffusione vengano somministrate dosi controllate di farmaco, ad una concentrazione prestabilita e con pratica di iniezione sicura (singola iniezione, ago sottile, ecc.) o addirittura con guida elettromiografica per particolari muscoli.

Le somministrazioni di tossina botulinica hanno una durata variabile in base al soggetto, al sito di somministrazione e al disturbo da trattare. Il periodo di efficacia, mediamente, dura **dai tre ai sei mesi** o anche più (sempre considerando

le variabili sopracitate). Per gli usi terapeutici, attualmente, il sierotipo più usato, e che presenta un tempo di efficacia maggiore, è quello A. La reversibilità dell'effetto terapeutico e l'eventuale sviluppo di immunoresistenza verso il sierotipo somministrato da parte di alcuni soggetti, pone l'attenzione e la necessità sullo studio di altri possibili candidati utilizzabili a fini terapeutici, come ad esempio BoNT/B (già impiegato nella pratica clinica) o BoNT/C che si sta dimostrando, sulla base di diversi studi sia nell'uomo che nel topo (Eleopra et al., 1997 and 2002, Morbiato et al., 2007) un ottimo candidato a tale scopo.

Scopo della tesi

Le tossine botuliniche sono zinco-endopeptidasi specifiche per i terminali colinergici del sistema nervoso periferico. I loro bersagli molecolari sono rappresentati dalle tre proteine che costituiscono il complesso di neuroesocitosi SNARE: syntaxina, SNAP-25 e VAMP. Il taglio di queste proteine causa il blocco della trasmissione sinaptica colinergica dando come effetto finale la paralisi della muscolatura scheletrica.

Essendo le tossine botuliniche neurotossine molto potenti e dato che la loro capacità di indurre paralisi muscolare viene sfruttata nel trattamento di vari disturbi caratterizzati da iperattività colinergica del sistema nervoso periferico, numerosi studi sono stati fatti, finora, al fine di caratterizzare gli effetti indotti sul sistema nervoso da tali tossine. Al contrario, molto meno si conosce dei loro effetti a livello muscolare.

Scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare i cambiamenti molecolari, morfologici e fisiologici di muscoli scheletrici in seguito alla paralisi indotta dalle neurotossine botuliniche. I muscoli, infatti, sono strutture plastiche in grado di modificare le loro caratteristiche in base al grado di utilizzo, l'attività nervosa, la situazione ormonale dell'organismo e altri fattori. Comprendere, quindi, i possibili effetti delle tossine botuliniche a livello muscolare potrà contribuire al miglioramento dell'utilizzo di tali tossine nella pratica clinica oltre che ampliare le conoscenze finora raggiunte sulla loro azione.

La seconda parte della tesi, invece, ha avuto come obiettivo principale lo studio della diffusione delle tossine botuliniche. Poiché tali tossine vengono utilizzate nel trattamento di disturbi muscolari focali (che colpiscono, cioè, un singolo muscolo o un ristretto gruppo muscolare) è di primaria importanza che le tossine presentino una bassa diffusione dal sito di iniezione evitando, così, possibili effetti collaterali.

In particolare, tale studio si è focalizzato sulla determinazione della capacità di diffondere di tre diverse formulazioni farmaceutiche di tossina botulinica di sierotipo A reperibili in commercio: Botox[®] e Dysport[®] prodotte come complesso proteico (900 kDa la prima, 300-500-900 kDa la seconda) e Xeomin[®] prodotta come molecola attiva di 150 kDa. E' presumibile pensare, infatti, che una

molecola più piccola possa diffondere più facilmente rispetto alle molecole delle formulazioni in complesso causando, potenzialmente, maggiori effetti collaterali.

Studiare la diffusione delle tossine botuliniche è di fondamentale importanza per il loro impiego in terapia al fine di evidenziare possibili differenze tra le formulazioni e migliorare, così, il loro utilizzo.

Materiali e metodi

3.1 Animali utilizzati

Per lo studio degli effetti indotti dalle tossine botuliniche nel muscolo scheletrico sono stati utilizzati topi adulti Swiss-Webster CD1 (maschi) di peso compreso tra 25 e 35 grammi. Per quanto riguarda lo studio sulla diffusione, sono stati usati topi adulti (maschi) di 30 grammi (± 2 grammi) al fine di lavorare nelle condizioni più omogenee possibile.

Tutti gli animali sono stati stabulati in numero di 5 per gabbia con cicli luce/buio di 12h. Cibo e acqua sono stati forniti *ad libitum*.

3.2 Iniezioni intramuscolari di tossine botuliniche

3.2.1 Iniezioni di BoNT/A e BoNT/C

Le tossine botuliniche di sierotipo A e C impiegate per lo studio degli effetti muscolari indotti dalle BoNTs sono state diluite in soluzione salina iniettabile (0,9% NaCl) o in soluzione di PBS contenente lo 0,02% di gelatina (Sigma). Prima dell'iniezione gli animali sono stati anestetizzati con 15 mg/Kg di Zoletil (Laboratoires Virbac, Carros, France) e 3 mg/Kg di xilazina (Laboratoires Calier, Barcelona, Spain). Le tossine così preparate vengono somministrate alla dose sub-letale di 10 picogrammi mediante iniezione intramuscolare direttamente nel tibiale anteriore. Volume iniettato: 50 μ l.

3.2.2 Iniezioni delle formulazioni farmaceutiche di tossina botulinica di sierotipo A.

Le diverse formulazioni farmaceutiche di tossina botulinica di sierotipo A (Botox[®]-Allergan, Dysport[®]-Ipsen e Xeomin[®]-Merz), commercializzate in forma liofilizzata, sono state risospese in soluzione salina iniettabile (0,9% NaCl) alla

concentrazione di 10 U/ml (Botox[®] e Xeomin[®]) o 40 U/ml (Dysport[®]). Prima dell'iniezione gli animali sono stati anestetizzati con 15 mg/Kg di Zoletil e 3 mg/Kg di xilazina. Le diverse preparazioni sono state somministrate alle seguenti dosi: Botox[®] 0,25 U, Dysport[®] 1,0 U e Xeomin[®] 0,25 U. Sono state iniettate, quindi, nel rapporto di 1:4:1. Tale rapporto è stato deciso sulla base della comparazione dell'efficacia determinata attraverso il "DAS assay". Per lo studio della diffusione delle varie preparazioni il tibiale anteriore di entrambe le zampe è stato iniettato con le diverse formulazioni (ciascuna zampa con una formulazione diversa) e in un altro set di esperimenti il TA di una zampa è stato iniettato con un farmaco, mentre il contralaterale è stato iniettato con soluzione salina e usato come controllo.

Volume iniettato per muscolo: 25 µl.

3.3 *Digit Abduction Scoring assay*

In seguito all'iniezione delle tossine botuliniche nella zampa posteriore dei topi, il recupero funzionale e il grado di paralisi possono essere misurati attraverso il "Digit Abduction Scoring assay" (Aoki, 2001). Questo saggio si basa sul riflesso di estensione delle zampe posteriori e delle dita in seguito al sollevamento della parte posteriore dell'animale. Dopo la somministrazione delle BoNTs, al grado di estensione viene attribuito un punteggio che va da 0 a 4 che rappresentano, rispettivamente, uno stato di normalità e il massimo grado di paralisi.

3.4 *Immunoistochimica*

Diversi giorni dopo la somministrazione delle varie tossine i muscoli sono stati prelevati e congelati in isopentano pre-raffreddato in azoto liquido al fine di mantenere intatta la morfologia muscolare. Sezioni trasversali dei muscoli di interesse (tibiale anteriore, soleo, gastrocnemio e quadricipite femorale) dello spessore di 10 µm sono state ottenute mediante sezionamento al criostato. Le sezioni così ottenute vengono fatte aderire a specifici vetrini portaoggetto carichi elettrostaticamente (SuperFrost®Plus 25 X 75 X 1.0 mm).

Dopo di che, le sezioni che saranno marcate per N-CAM vengono fissate in metanolo freddo (- 20°C); le sezioni marcate con Anti-Luciferasi vengono marcate con PFA 4% per 30 minuti; le sezioni marcate con anticorpi anti-miosina di tipo I (lenta) ed embrionale non vengono, invece, fissate.

Le sezioni muscolari vengono saturate con una soluzione 5% BSA in PBS per un'ora ed in seguito incubate con la medesima soluzione contenente, in aggiunta, gli anticorpi di interesse:

<i>Anticorpo</i>	<i>Utilizzo</i>	<i>Tempo di incubazione</i>	<i>Specie</i>	<i>Reattività</i>
BA-D5 monoclonale MyHC-slow	1:400	1 h	Mouse	MyHC- I/lenta
Anti MyHC-slow monoclonale	1:100	1 h	Mouse	MyHC- I/lenta
Anti-MyHC embrional monoclonale - G6	1:400	1 h	Mouse	MyHC embrionale e neonatale
Anti N-CAM policlonale	1:500	1,5 h	Rabbit	N-CAM
Anti-Luciferasi pAb	1:50 / 1:100	1 h	Goat	Recombinant firefly luciferase

L'anticorpo monoclonale BA-D5, specifico per l'isoforma lenta/I e l'anticorpo monoclonale G6 specifico per l'isoforma embrionale/neonatale delle catene pesanti della miosina sono stati sviluppati e ci sono stati forniti dal laboratorio del Prof. Schiaffino. Gli altri anticorpi utilizzati sono commerciali. N-CAM: Chemicon International; Anti-MyHC slow/I: Novocastra; Anti-luciferasi: Promega. Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari le sezioni vengono lavate con PBS (3 lavaggi di dieci minuti ciascuno) e successivamente incubati per 1 h con gli anticorpi secondari in soluzione 5% BSA in PBS.

Gli anticorpi secondari utilizzati sono: Anti-mouse IgG e Anti-rabbit IgG coniugati con i fluorofori Alexa Fluor® 488 o 555 (Invitrogen) utilizzati 1:200.

Dopo tale marcatura i vetrini vengono lavati in PBS (3x10 min). Per le colorazioni nucleari le sezioni state marcate con Hoechst 33342 (Invitrogen) alla concentrazione di 1µg/ml in PBS per 1 minuto .

Infine, i vetrini vengono montati con soluzione di montaggio costituita da 90% glicerolo, n-propyl gallato 3% p/v in PBS. Le osservazioni in microscopia sono state fatte con microscopio video-confocale (VI.CO. – Nikon).

3.5 *Colorazione con Ematossilina - Eosina*

Le sezioni muscolari ottenute al criostato vengono incubate per 5 minuti in Emallume di Mayer. In seguito vengono lavate estensivamente con acqua di fonte per 15 minuti e successivamente incubate per 1 minuto con eosina. Dopo un rapido lavaggio in acqua distillata le sezioni vengono disidratate con serie crescente di alcoli (etanolo 80% → 95% → 100% → Xilolo) e montate con resina sintetica VectaMount (Vecta Laboratories).

3.6 *Colorazione istochimica per la SDH*

La colorazione istochimica per la succinato deidrogenasi (SDH) è una colorazione istochimica che sfrutta la precipitazione del nitroblu di tetrazolio per evidenziare fibre muscolari caratterizzate da elevato metabolismo ossidativo.

Sezioni muscolari appena tagliate e non fissate vengono incubate per 20 minuti a 37°C in una soluzione contenente 0,5 mg/ml di nitro blu di tetrazolio (Sigma) e succinato sodico 0,1M (Mallinckrodt chemical works) sciolti in PBS ad un pH di 7,6. Le sezioni vengono, infine, lavate in PBS per 10 minuti e il vetrino montato con Kaiser Gelatine. Le fibre ossidative si colorano intensamente di blu.

3.7 *Omogenati muscolari*

I muscoli, conservati a -80°C, dopo esser stati pesati alla bilancia analitica, sono stati successivamente omogenati in azoto liquido con mortaio criogenico e trasferiti in provette da 1.5ml. A questo punto, per ogni milligrammo di lisato muscolare sono stati aggiunti 5 µl di soluzione di lisi precedentemente preparata contenente:

- Hepes pH 7.4 25mM
- NaCl 150mM
- NP-40 1%
- Sodio deossicolato 0.25%
- Glicerolo 10%

Aggiunti prima dell'uso: - EDTA 1mM

- Inibitori di proteasi e fosfatasi (Complete mini-Roche).

I campioni sono stati messi in agitazione in un rotatore a 4° C per 30 minuti. In seguito si è operata una centrifuga sempre alla temperatura di 4° C ad una velocità di 12000 rpm per 15 minuti e si è trasferito il supernatante in nuove provette, separandolo da tutti gli aggregati non solubilizzati presenti sul fondo. È stata effettuata una seconda centrifuga di pari intensità e si è prelevato il supernatante.

A questo punto, il campione può essere usato in successive analisi o conservato a -80 ° C.

3.8 *Quantificazione di proteine mediante il metodo di BCA*

Questo metodo permette la determinazione della concentrazione proteica di un campione in cui sono presenti detergenti che solitamente interferiscono con il metodo di Bradford. Esso è basato sulla reazione di Biuret. In condizioni alcaline gli ioni di rame (Cu^{2+}) formano un complesso con i legami peptidici di proteine e vengono ridotti a Cu^+ . L'acido bicinoninico (BCA) in condizioni alcaline è un reagente altamente sensibile, stabile e specifico per il Cu^+ , formante un complesso color porpora. In base al contenuto proteico del campione, si ha una variazione colorimetrica del colorante stesso rilevabile alla lunghezza d'onda di 562 nm. Il valore di assorbanza a 562 nm è quindi proporzionale alla concentrazione proteica del campione. Come reattivo viene utilizzato BCA^{TM} Protein Assay (Pierce). La curva standard di riferimento, utilizzata per estrapolare la concentrazione proteica, viene preparata mediante diluizioni scalari di BSA (Albumina di Siero Bovino). La miscela di reazione viene preparata mescolando 50 parti del reattivo A con una parte del reattivo B. In seguito, questa miscela viene aggiunta al campione, e il tutto incubato a 37°C per 30 minuti. Si procede, infine, alla lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 562 nm.

3.9 *Corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)*

L'elettroforesi è una tecnica che consiste nella migrazione differenziata in un campo elettrico, di molecole elettricamente cariche. I gel di poliacrilammide vengono preparati facendo copolimerizzare l'acrilammide e la bis-acrilammide

(capace di creare legami crociati) in presenza di un catalizzatore come l'APS al 10% e un iniziatore come il TEMED. Sono costituiti da due frazioni: lo "stacking" al 4% di acrilammide per creare un fronte di migrazione omogeneo e il "running o separating" (la cui percentuale varia in base alle dimensioni delle molecole che si vogliono separare) preparato al 12% per la separazione delle proteine. Le soluzioni e i tamponi utilizzati sono Protogel (National Diagnostic) mentre le apparecchiature sono della Minigel III Biorad. Dopo l'aggiunta ai campioni del buffer di caricamento LSB, i campioni di proteine sono stati trattati a 95° C per 5 minuti per favorire la denaturazione delle catene polipeptidiche. Il tampone di corsa, composto da tris 6g/L, SDS 1g/L, glicina 2,88 g/L, viene utilizzato per riempire la cella elettroforetica in cui è posizionato il gel ed è necessario per la conduzione della corrente. L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS è uno dei metodi più usati per separare le proteine e determinare il loro peso molecolare apparente. L' SDS si lega in rapporto ponderale costante e conferisce una carica totale negativa alle molecole che migrano, così, solo in funzione del loro peso molecolare. La quantità di lisato muscolare caricato in ogni pozzetto è pari a 10µg.

3.10 Western Blotting

Questo sistema permette di trasferire macromolecole da un gel in cui sia avvenuta la separazione elettroforetica ad una membrana immobilizzante. Le proteine devono, in questo caso, trasferirsi dal gel a una membrana di nitrocellulosa mantenendo la forma e il livello di diffusione acquisiti alla fine della prima separazione elettroforetica. Le bande proteiche vengono, poi, rilevate grazie all'utilizzo di specifici anticorpi rivolti contro epitopi di interesse. Per la separazione, il gel viene posto al catodo e la membrana all'anodo: le proteine, dotate di carica negativa per la presenza di SDS, migrano verso il polo positivo sotto l'effetto del campo elettrico.

Dopo elettroblotting è necessario saturare la membrana per impedire che si formino legami aspecifici degli anticorpi: questo accorgimento si rende necessario per diminuire il segnale di fondo dopo lo sviluppo. La membrana viene prima incubata in soluzione saturante 5% latte in PBST (0,05% tween 20 in PBS: NaCl 0,8 g/L, KCl 0,2 g/L, NaH₂PO₄ 2,4 g/L, KH₂PO₄ 0,2 g/L) per un'ora e poi si

procede con l'incubare la membrana con la soluzione saturante addizionata dell'anticorpo primario: Anti-N-CAM 1:3000 per 3 ore alla temperatura di + 4°C. Dopo 3-4 lavaggi da 5' con PBST si procede all'incubazione con l'anticorpo secondario, specifico per il primario: Goat Anti-rabbit IgG (1:2000) coniugato alla perossidasi (HRP), un enzima che, in presenza di un substrato chemiluminescente, è in grado di ossidare il luminolo emettendo radiazione luminosa (ECL Plus-Amersham). La membrana, inoltre, è stata marcata anche con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (1:1000, Sigma) che serve come standard di caricamento. A questo punto si procede con la rilevazione delle bande utilizzando un apposito strumento: Chemidoc (Biorad).

L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata con il software "Quantity one" (Biorad).

3.11 *Somministrazione di Ciclosporina A*

La ciclosporina A (Sandimmun[®], 50 mg/mL, Novartis), inibitore della calcineurina, è stata diluita in soluzione oleosa e somministrata mediante iniezione intraperitoneale. L'inizio del trattamento è stato fatto il giorno prima dell'iniezione con le tossine botuliniche e protratto per 11 giorni cioè sino al completamento dell'esperimento. Al decimo giorno dall'iniezione delle BoNTs i muscoli sono stati prelevati e congelati. La dose giornaliera somministrata è di 10mg/kg in singola iniezione.

3.12 *Transfezione "in vivo" mediante elettroporazione*

Questa metodica permette di veicolare DNA esogeno all'interno del tessuto muscolare mediante applicazione di un campo elettrico che causa la formazione di pori transienti nella membrana cellulare permettendo l'ingresso del DNA plasmidico.

Tale tecnica permette un'ottima efficienza di transfezione solo delle fibre muscolari adulte. Nello specifico la transfezione è stata eseguita sul muscolo tibiale anteriore di topi di circa 2 mesi d'età (28-30 g) appartenenti al ceppo CD1. Il DNA plasmidico prima di essere transfettato è stato diluito in una soluzione contenente:

- 20-40 µg totali di DNA plasmidico
- 0.9% NaCl;
- H₂O sterile.

Il volume della soluzione varia a seconda del tipo di tessuto sottoposto ad elettroporazione. Nel caso del muscolo tibiale anteriore è stata preparata una soluzione finale di 40µl.

I costrutti plasmidici utilizzati per la trasfezione in vivo sono i seguenti:

- pRL-TK Vector (Promega)
- IL-4-Luciferasi
- IL-4-GFP
- NFATc1-GFP

Il costrutto IL-4-Luciferasi è costituito dal sito di legame per NFAT del promotore dell'interleuchina 4 ripetuto nove volte fuso al gene della luciferasi (Braz et al., 2003) mentre IL-4_GFP è stato ottenuto sostituendo il gene della luciferasi a quello della GFP. Sia i costrutti IL-4-Luciferasi e GFP che il costrutto NFATc1-GFP (Chin et al. 1998) ci sono stati forniti dal laboratorio del professor Schiaffino.

Prima di procedere con la trasfezione i topi vengono anestetizzati con 10 mg/kg Zoletil e 2 mg/kg Xilazina. Il muscolo viene isolato chirurgicamente, successivamente viene iniettata la soluzione di trasfezione con una microsiringa ed infine vengono posizionati i due elettrodi sopra e sotto il muscolo isolato. Una scarica elettrica di 21V, somministrata con 5 impulsi della durata di 20 ms, distanziati l'uno dall'altro da intervalli di 200 ms, viene generata dallo strumento "Electro Square Portar". Al termine la ferita viene suturata e il topo viene lasciato per alcune ore sotto una fonte di calore per mantenere costante la temperatura corporea.

Il muscolo trasfettato viene prelevato circa 7, 10 o 12 giorni dopo l'operazione, a seconda dell'esperimento, congelato in azoto liquido o in isopentano e conservato a -80°C.

3.13 Saggio Luciferasi con doppio reporter

Questo saggio (*Dual-Luciferase®Reporter Assay Chemistry*-Promega) consente di misurare i livelli di attività promotoriale di un gene in diversi contesti

dopo che tale promotore (o comunque una regione a monte del sito di inizio della traduzione del gene) viene clonato a monte del gene per la luciferasi *Firefly*. Questo costrutto viene cotrasfettato in muscoli tibiali anteriori di topo CD1 assieme ad un vettore pRL-TK esprime l'enzima *Renilla* sotto il controllo del promotore HSV-TK (timidina chinasi del virus Herpes Simplex). Queste due luciferasi possiedono diversa struttura enzimatica e diversa specificità di substrato. Tali differenze rendono possibile discriminare le rispettive reazioni di bioluminescenza. Inoltre sia la *Firefly* che la *Renilla* non richiedono modifiche post-traduzionali per espletare la loro attività enzimatica; per questo funzionano da *reporter* immediatamente dopo la traduzione. L'attività della *Firefly* funge da *reporter* "sperimentale" nel senso che correla con l'effetto delle specifiche condizioni che caratterizzano l'esperimento, mentre l'attività della *Renilla* funge da risposta basale (controllo interno). La normalizzazione dell'attività della *Firefly* rispetto all'attività della *Renilla*, minimizza la variabilità derivante da differenze nella sopravvivenza cellulare e nell'efficienza di trasfezione. Si possono inoltre eliminare ulteriori fonti di variabilità come differenze tra i volumi pipettati o di efficienza della lisi cellulare.

La preparazione dei campioni inizia con la polverizzazione dei muscoli tibiali anteriori, congelati in azoto liquido, con mortaio e pestello. La polvere viene risospesa in un volume di tampone di lisi 1X che dipende dalla massa del muscolo stesso precedentemente pesato (2.5 µl di tampone per 1 mg di tessuto muscolare). Tale tampone (*Passive Lysis Buffer*® – Promega) oltre alle sue proprietà litiche, garantisce la stabilità e l'attività dei due enzimi reporter.

Il campione viene quindi agitato e congelato in azoto liquido, successivamente viene posto in ghiaccio in stanza fredda (+ 4°C) per un'ora, al termine della quale il campione si sarà scongelato. Questa procedura di congelamento/scongelamento viene ripetuta per due volte al fine di amplificare gli effetti del tampone e di garantire una buona lisi del tessuto muscolare.

Dopo una centrifuga di 30 minuti a 4°C a 12,000 rpm, il surnatante viene trasferito in provette precedentemente raffreddate in ghiaccio.

Successivamente si procede con la lettura al luminometro aggiungendo al lisato in maniera sequenziale i substrati per le due luciferasi. Si aliquotano 50 µl di LARII (*Luciferasi Assay Reagent II*® – Promega), substrato della *Firefly*, nei tubi da luminometro cui si aggiungono 5 µl di lisato crudo generando un segnale di luminescenza che viene quantificato dallo strumento. La successiva aggiunta di 50 µl del reagente Stop&Glo®Substrate diluito ad una concentrazione finale 1X nello

Stop&Glo®Buffer – Promega, permette di smorzare la reazione precedente entro 1 secondo dall'aggiunta e di innescare contemporaneamente la reazione catalizzata dalla *Renilla*. Quest'ultima produce un segnale di luminescenza che viene subito quantificato in quanto decade lentamente durante il corso dell'esperimento.

Lo strumento fornisce i valori relativi ai livelli di luminescenza sviluppati dalle due luciferasi e il rapporto tra i due (*Firefly/Renilla*).

3.14 *Chirurgia del nervo sciatico*

La denervazione dei gruppi muscolari distali (tibiale anteriore, soleo, plantare, gastrocnemio) della zampa posteriore è stata effettuata mediante taglio del nervo sciatico a livello dell'articolazione coxo-femorale previa apertura della cute. Il nervo viene tagliato in due punti, distanti l'uno dall'altro 5 mm al fine di prevenire eventuali fenomeni di rigenerazione nervosa. Finita la pratica la cute viene suturata. L'intervento è stato fatto in anestesia totale con miscela 25 mg/Kg di Zoletil e 5 mg/Kg Xilor.

Risultati e discussione

I risultati di questo lavoro di tesi verranno suddivisi in due parti: la prima, riguardante gli effetti delle tossine botuliniche a livello di muscolo scheletrico e la seconda, che tratta lo studio sulla diffusione di tre diverse formulazioni farmaceutiche di tossina botulinica di sierotipo A attualmente in commercio.

4.1 Studio degli effetti delle tossine botuliniche a livello di muscolo scheletrico

I numerosi studi finora compiuti sulle tossine botuliniche e che hanno recentemente portato ad un avanzamento delle conoscenze sul loro meccanismo di azione sono stati fatti a livello del sistema nervoso. Dato che le informazioni sugli effetti indotti dalle tossine botuliniche nel muscolo scheletrico sono, invece, scarse, questo progetto di tesi si è proposto, quindi, di analizzare questi effetti a livello morfologico e molecolare. Verranno di seguito presentati i risultati ottenuti e i successivi sviluppi dello studio.

4.1.1 Le tossine botuliniche inducono atrofia muscolare

E' noto da tempo che un muscolo in condizioni di inattività va incontro ad atrofia. Tutti sanno che un arto ingessato porterà ad una perdita di massa muscolare così come accade negli arti inferiori di un paraplegico o altri casi di paralisi muscolare. Questo si verifica perché i muscoli sono strutture plastiche, sempre impegnate in processi di crescita e perdita di massa dove l'attività neuromuscolare gioca un ruolo fondamentale in questo equilibrio. Al pari di questi casi anche la paralisi muscolare data dalle tossine botuliniche induce atrofia muscolare (fig. 13) (Morbiato et al., 2007). Questo effetto è dovuto alla particolare capacità di tali tossine di inibire il rilascio di acetilcolina dai terminali sinaptici della giunzione neuromuscolare causando così la paralisi del muscolo.

Ciò che si nota osservando in microscopia le sezioni muscolari di un muscolo iniettato con le BoNTs è che il diametro delle fibre muscolari appare ridotto rispetto al controllo ma che comunque non vi è la presenza di fibre danneggiate o in necrosi (fig. 12). Le tossine, infatti, sono altamente selettive per la parte presinaptica e non causano alcun danno muscolare diretto.

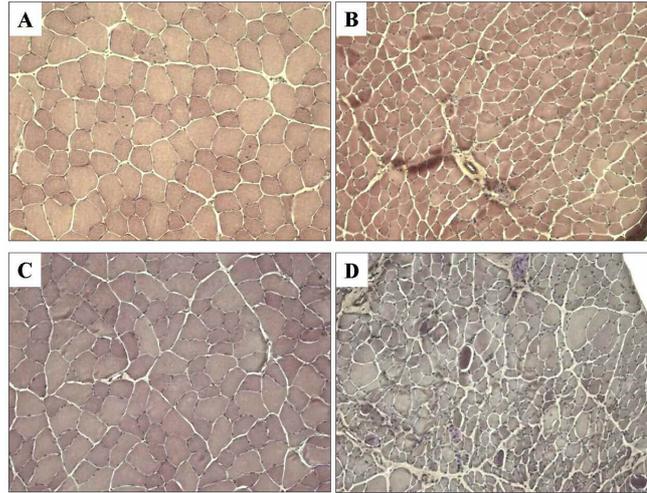


Fig. 12: Sezioni trasversali di muscolo tibiale anteriore di topo iniettato con BoNT/A e colorati con ematossilina ed eosina. I primi due pannelli mostrano un muscolo dopo 10 giorni dall'iniezione con BoNT/A e il controllo della zampa contralaterale (B e A rispettivamente). Pannelli C e D mostrano il muscolo di controllo e il muscolo trattato dopo 26 giorni dall'iniezione. Come si può notare nei pannelli B e D le fibre muscolari presentano diametro ridotto rispetto ai controlli ma comunque la normale morfologia muscolare rimane integra.

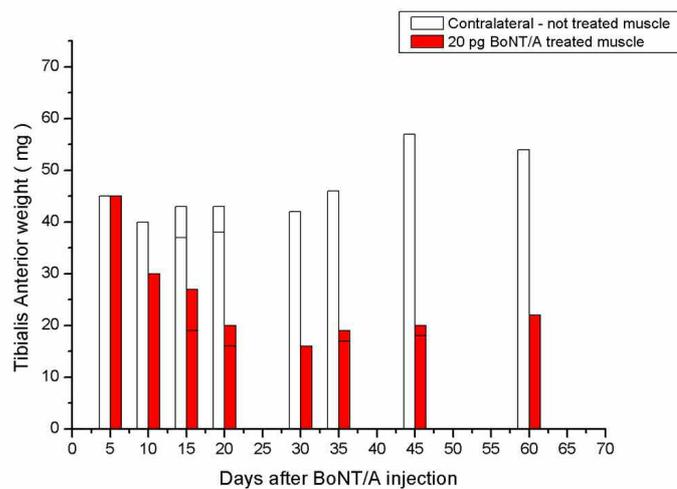


Fig. 13: Grafico riportante il calo ponderale del muscolo tibiale anteriore di topo diversi giorni dopo l'iniezione di BoNT/A. Dose iniettata: 20 picogrammi in singola iniezione.

4.1.2 *Le tossine botuliniche inducono la comparsa di fibre lente nel tibiale anteriore di topo*

Poiché le fibre che compongono i vari muscoli presentano una certa plasticità e possono cambiare il loro fenotipo in risposta a diversi stimoli (vedi introduzione, paragrafo 1.8) sono stati analizzati i possibili cambiamenti delle fibre muscolari del muscolo tibiale anteriore di topo in seguito ad iniezione intramuscolare di tossina botulinica di sierotipo A e C. Tale muscolo è un muscolo veloce puro, ovvero, composto solamente da fibre di tipo II (IIA, IIx, IIB) e non contiene fibre lente di tipo I. E' noto dalla letteratura che **l'inattività muscolare favorisce e porta al cambiamento delle fibre nel senso da-lente-a-veloci**. Essendo la tossina botulinica in grado di portare il muscolo in uno stato di paralisi il risultato atteso era il mantenimento del fenotipo veloce delle fibre del tibiale anteriore. Marcature effettuate con anticorpi monoclonali specifici per l'isoforma lenta delle catene pesanti della miosina hanno, invece, rivelato la **comparsa di un numero consistente di fibre lente** in un muscolo che in condizioni fisiologiche non le esprime (fig. 14).

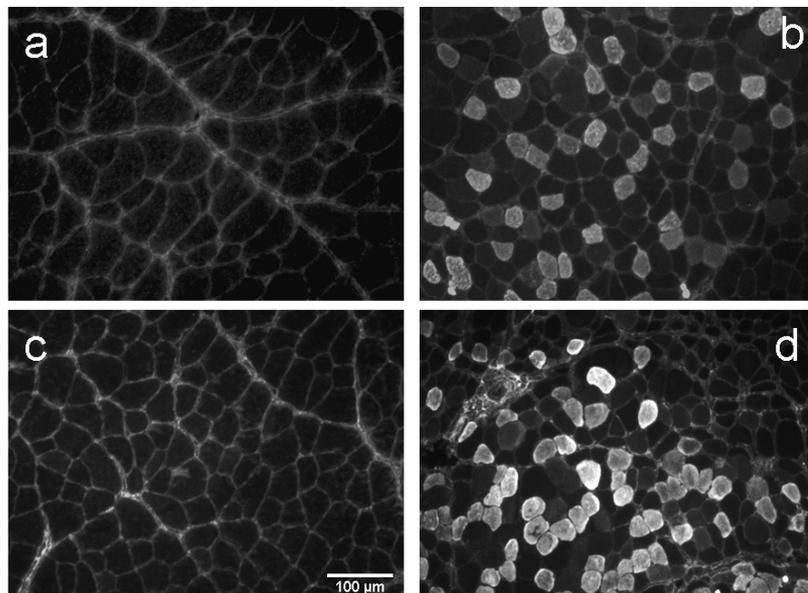


Fig 14: Sezioni trasversali di tibiale anteriore di topo marcate con l'anticorpo monoclonale BA-D5 in grado di riconoscere selettivamente l'isoforma lenta/I delle catene pesanti della miosina. Le sezioni in *b* e in *d* mostrano come diversi giorni dopo l'iniezione di BoNT/A (10 e 26 giorni rispettivamente) vi sia la comparsa di numerose fibre lente. I pannelli *a* e *c* mostrano le sezioni dei muscoli di controllo della zampa contralaterale che come si può notare non presentano fibre lente.

La comparsa delle fibre lente è un evento relativamente rapido: già dopo 10 giorni dalla somministrazione della tossina si può notare la comparsa delle prime fibre. Esse sono presenti e aumentano mediamente di numero a 20 e 30 giorni. Sono ancora visibili a 40 giorni (anche se in minor numero rispetto a 20 e 30 giorni) per poi scomparire del tutto a 60 giorni indice, questo, che tale fenomeno è reversibile.

Le fibre di tipo I/lente sono caratterizzate da bassa velocità di contrazione ma elevata resistenza all'affaticamento. Quest'ultima caratteristica è dovuta al particolare metabolismo ossidativo che permette loro di contrarsi per lunghi tempi senza affaticarsi eccessivamente come invece avviene in fibre a metabolismo glicolitico. Per verificare che le fibre in grado di esprimere miosina lenta fossero anche ossidative, le sezioni muscolari di interesse sono state analizzate per l'attività della succinato-deidrogenasi (SDH), attraverso una colorazione istochimica che permette di discriminare le fibre ossidative da quelle glicolitiche o meno ossidative. Le fibre ossidative sono caratterizzate da una colorazione blu intensa mentre le meno ossidative e le glicolitiche presentano colorazioni molto meno intense.

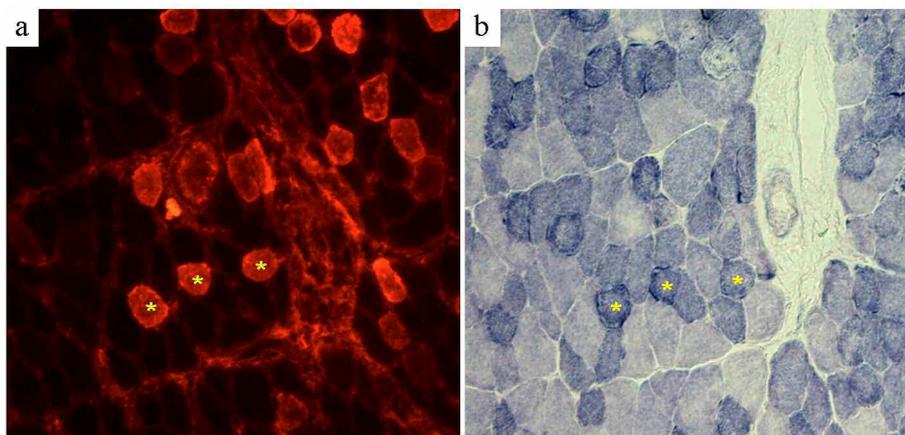


Fig 15: Sezioni muscolari sequenziali marcate con l'anticorpo BA-D5 in grado di riconoscere l'isoforma lenta/I delle catene pesanti della miosina (a) e la corrispondente colorazione SDH (b). Come si può notare, le fibre positive per la miosina di tipo I presentano un'intensa colorazione blu indice che il metabolismo di tali fibre è ossidativo.

I risultati dimostrano che le fibre in grado di esprimere miosina di tipo I (lenta) presentano anche un metabolismo spiccatamente ossidativo il che supporta i dati finora ottenuti (fig. 15).

Un'altra osservazione che è stata fatta è che tali fibre non presentano mai nuclei cellulari in posizione centrale né esprimono isoforme embrionali e neo-natali di miosina indici, entrambi, di rigenerazione muscolare.

L'espressione di fibre lente, indotta dalle tossine botuliniche, è stata osservata sia somministrando BoNT/A che BoNT/C e che la cinetica di espressione risulta essere simile. Ciò potrebbe suggerire che l'espressione di fibre lente non sia un fenomeno associato a un singolo sierotipo di tossina ma bensì comune a vari sierotipi. C'è da dire, comunque, che BoNT/A e BoNT/C presentano tempi di paralisi simili (Morbiato et al., 2007) e ciò potrebbe spiegare, con buona approssimazione, il comparabile effetto che inducono.

4.1.3 *La via di calcineurina-NFAT è coinvolta?*

La via di calcineurina-NFAT è la via di trasduzione del segnale maggiormente coinvolta nella determinazione e mantenimento del programma genico lento delle fibre muscolari. Per verificare se questa via potesse essere coinvolta nell'espressione delle fibre lente nel tibiale anteriore, in seguito alla somministrazione di tossina botulinica, è stata saggiata l'attività di NFAT attraverso la misurazione dell'attività luciferasica di un "gene reporter" di NFATc1. A tale scopo un costrutto costituito dal promotore dell'**interleuchina 4** (in grado di legare NFAT) fuso al gene della **luciferasi**, è stato transfettato nei muscoli tibiale anteriore e soleo. In questo modo, se NFAT viene attivato, si lega al promotore del costrutto inducendo l'espressione dell'enzima luciferasi la cui attività enzimatica viene misurata con metodi standard (vedi Materiali e Metodi paragrafo 3.12) (Braz et al., 2003, McCullagh et al., 2004). Cinque giorni dopo la transfezione i muscoli sono stati iniettati con tossina botulinica e 7/8 giorni dopo analizzati per l'attività luciferasica. I risultati ottenuti dimostrano che le tossine botuliniche, al pari di altre condizioni di inattività muscolare, diminuiscono l'attività di NFAT. Come si può notare in figura 16, nel muscolo tibiale anteriore (fig. 16, A), che di base presenta una bassa attività di NFAT in quanto muscolo veloce, BoNT/A induce un leggero calo nell'attività di NFAT. Nel muscolo soleo, che essendo un muscolo lento ha di base elevata attività di NFAT (fig. 16, B), BoNT/A induce un drastico calo dell'attività di NFAT comparabile a quanto avviene in un muscolo denervato chirurgicamente.

Questo risultato era atteso dal momento che Cn-NFAT riflette l'attività nervosa; ed un calo nell'attività sinaptica, indotto dalle tossine botuliniche, risulta infatti in un abbassamento dell'attività specifica di NFAT.

Come può essere spiegata, allora, questa divergenza nei risultati considerando l'espressione di fibre lente e attività di NFAT che sono così strettamente correlati?

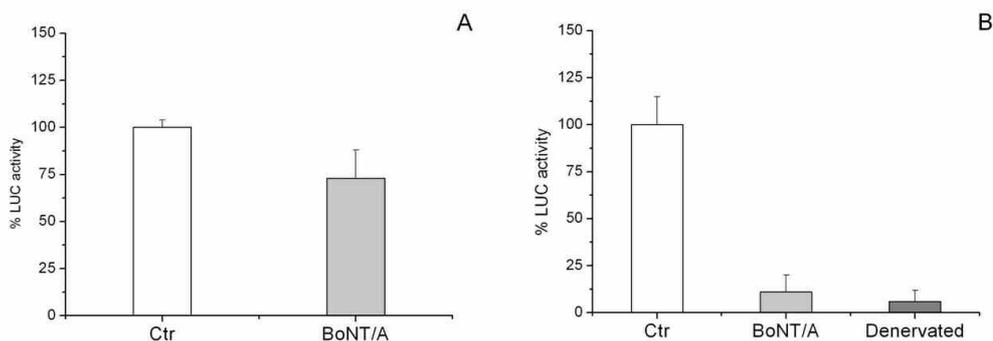


Fig. 16: Saggio dell'attività luciferasica del "gene reporter" di NFAT. Sia nel tibiale anteriore, un muscolo tipicamente veloce (A) che nel soleo, tipicamente lento (B), BoNT/A induce un calo nell'attività di NFAT.

Il saggio di attività luciferasica utilizzato prevede che l'analisi venga effettuata sul lisato totale di muscolo; questo metodo, quindi, è indicativo solo di ciò che accade in tutto il muscolo. Si è deciso, quindi, di continuare lo studio sulla via cn-NFAT analizzando la singola fibra e non più il muscolo intero. Gli esperimenti attualmente in corso prevedono transfezioni di diversi costrutti che verranno visualizzati in microscopia a livello istologico.

I costrutti utilizzati sono:

- IL-4 Luciferasi;
- IL-4 GFP;
- NFATc1- GFP.

In questo modo sarà possibile individuare ogni singola fibra in cui la via di interesse è attivata potendo così avere un'eventuale correlazione con l'espressione di miosina lenta delle fibre.

Oltre agli esperimenti di transfezione è stato adottato anche un approccio farmacologico che prevede l'utilizzo di ciclosporina A come inibitore specifico della calcineurina. L'inibizione della calcineurina porta alla mancata defosforilazione di NFAT che non potendo entrare nel nucleo porta alla mancata attivazione dei geni che codificano per proteine delle fibre lente.

Esperimenti preliminari effettuati trattando gli animali con dosi di ciclosporina A pari a 10 mg/Kg/giorno hanno riportato che in oltre il 50% degli animali trattati, i muscoli paralizzati con tossina botulinica presentavano, dopo 10 giorni dall'iniezione con tossina e concomitante inizio della terapia farmacologica, un significativo calo dell'intensità di fluorescenza di sezioni muscolari marcate con anticorpi specifici per l'isoforma I delle catene pesanti della miosina (fig. 17)

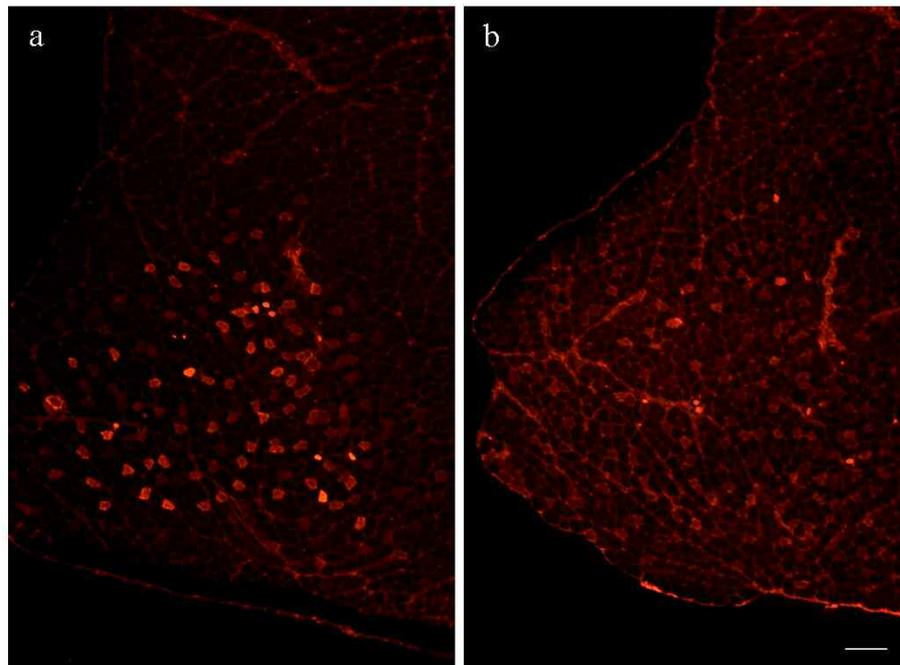


Fig. 17: Sezioni muscolari marcate con l'anticorpo BA-D5 in grado di riconoscere l'isoforma lenta/I delle catene pesanti della miosina. In *a* si può notare come il muscolo tibiale anteriore esprima l'isoforma lenta della MyHC mentre, in seguito alla somministrazione di ciclosporina A l'espressione sia ridotta (*b*). Muscoli analizzati al decimo giorno di trattamento.
Scala: 100 μ m

Ulteriori esperimenti che prevedono l'uso di ciclosporina A devono essere fatti al fine di confermare tale dato. Prossimi esperimenti prevederanno un aumento nella quantità di ciclosporina A utilizzata e/o il numero di giorni di trattamento

farmacologico al fine di aumentare il numero di animali in cui è presente l'effetto di inibizione ed aumentare la significatività dell'esperimento.

Questo risultato, comunque, suggerisce che la via della calcineurina possa essere attivata e quindi coinvolta nell'espressione di fibre lente.

Poiché la via di calcineurina/NFAT riflette l'attività nervosa, come può tale via essere attivata in un muscolo dove i terminali nervosi delle giunzioni neuromuscolari non riescono a rilasciare acetilcolina dal momento che sono bloccati dalle tossine botuliniche?

A questo punto una domanda nasce spontanea: "Le fibre muscolari che esprimono miosina lenta sono paralizzate dalle tossine botuliniche o sono ancora attive?"

4.1.4 *N-CAM come marcatore di denervazione/paralisi muscolare.*

Per verificare se le fibre diventate lente in seguito a iniezione con tossina botulinica siano anche paralizzate dalla stessa, è stata analizzata l'espressione di N-CAM nei muscoli trattati con BoNT/A. N-CAM (*neural cell adhesion molecule*) è una glicoproteina di adesione integrale di membrana. Oltre che nel sistema nervoso questa molecola è presente a livello dei miotubi embrionali; nelle fibre muscolari adulte non è più presente ma ricompare in seguito a paralisi o denervazione (Covault and Sanes 1985) suggerendo una maggiore competenza nell'accettare sinapsi da parte di tali fibre (Riger et al., 1985). Sfruttando N-CAM come marcatore di paralisi risulta possibile, quindi, individuare con grande precisione quali fibre muscolari siano paralizzate e quali no.

Esperimenti di immunostochimica effettuati marcando sezioni muscolari sequenziali con anticorpi anti-miosina lenta e anticorpi anti-N-CAM hanno rivelato che **le fibre diventate lente non esprimono contemporaneamente N-CAM**. Questo risultato dimostra che alcune fibre muscolari di un tibiale anteriore trattato con tossina botulinica non vengono paralizzate e che tali fibre possano essere ancora attive (fig. 18).

E' noto dalla letteratura che nei casi di inattività muscolare il fenotipo delle fibre tende a passare da-lento-a-veloce ma è altresì noto che in certi casi di elevata attività dei muscoli (*overloading*) le fibre possano passare da-veloci-a-lente. Questo potrebbe essere tale caso: un **sovraccarico compensatorio delle fibre ancora attive** dal momento che la maggior parte delle fibre del muscolo in

questione sono paralizzate dalla tossina botulinica. Ipotizzando che il 90% delle fibre venga paralizzato dalla tossina, il restante 10% continuerà a ricevere stimolazione nervosa e dovrà, quindi, farsi carico del lavoro che dovrebbero fare molte altre fibre al fine di “muovere il muscolo”.

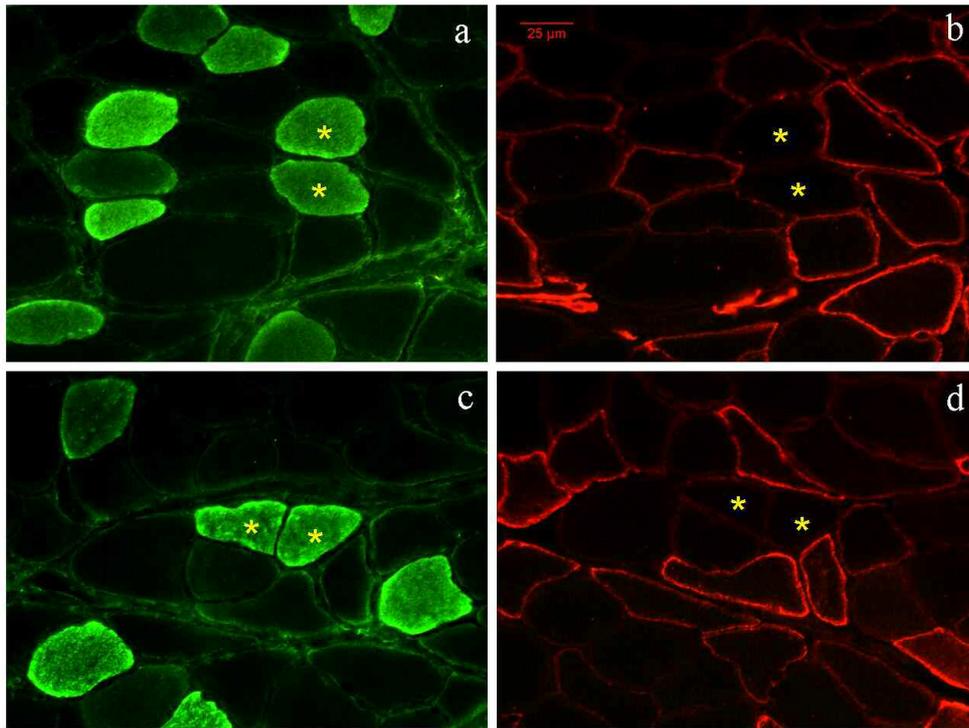


Fig. 18: Sezioni sequenziali di tibiale anteriore marcate con l'anticorpo BA-D5 in grado di riconoscere l'isoforma lenta/I della MyHC (a e c) e la controparte marcata con un anticorpo specifico per N-CAM (b e d). Come si può notare, le fibre positive per la miosina lenta non sono mai positive anche per N-CAM indicando che tali fibre non sono paralizzate. Muscoli analizzati dopo 20 giorni dalla somministrazione di BoNT/A.

Questo risultato potrebbe spiegare, quindi, perché in un muscolo paralizzato con tossina botulinica compaiano fibre lente mentre la situazione attesa è il mantenimento o l'accentuazione del fenotipo veloce. Inoltre, tale risultato riporta ad un'ulteriore domanda: “Le tossine botuliniche bloccano nello stesso modo e indistintamente tutti i terminali nervosi di un muscolo?”

4.1.5 *Selettività delle tossine botuliniche per le unità motorie*

I risultati ottenuti che dimostrano che non tutte le fibre muscolari sono paralizzate in modo uguale pone l'attenzione sulla potenziale selettività delle tossine botuliniche per certe unità motorie rispetto ad altre. Esperimenti effettuati marcando N-CAM con anticorpi specifici hanno evidenziato che alcune fibre muscolari non esprimono questo marcatore suggerendo, quindi, che tali fibre restino attive in seguito al trattamento con tossine botuliniche.

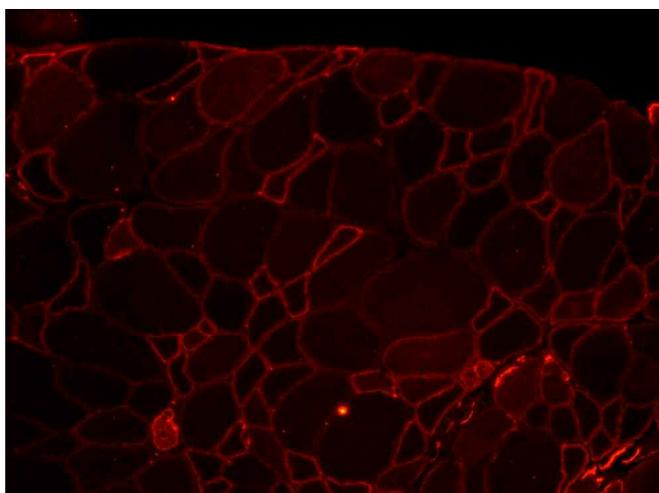


Fig. 19: Sezione di tibiale anteriore dopo 20 giorni dall'iniezione di BoNT/A marcato con un anticorpo specifico per N-CAM. Come si può notare le fibre muscolari sono eterogenee; Si distinguono fibre piccole, atrofiche e positive per N-CAM e fibre con diametro maggiore e negative per N-CAM.

Come si può notare in figura 19, nei muscoli iniettati con tossina botulinica (sia il sierotipo A che il sierotipo C) le fibre muscolari presentano caratteristiche diverse. Ci sono, infatti, fibre di ridotte dimensioni (atrofiche) positive per N-CAM e fibre di diametro maggiore negative per N-CAM. Questo può essere il risultato di due fenomeni: certe fibre e quindi certi terminali nervosi recuperano dalla paralisi prima di altri e/o le tossine botuliniche agiscono in modo preferenziale nei confronti di certi terminali nervosi rispetto ad altri.

L'ipotesi che sta alla base della possibile spiegazione di questo fenomeno richiede di considerare il meccanismo di azione delle tossine botuliniche il quale prevede quattro passaggi fondamentali: 1) *legame ai recettori*; 2) *internalizzazione*; 3) *traslocazione nel citoplasma*; 4) *modificazione enzimatica del bersaglio*.

Il momento tra il legame alla membrana presinaptica e l'internalizzazione vera e propria è un punto fondamentale dal momento che è proprio a questo stadio che le tossine botuliniche si legano al proprio recettore specifico. Nell'istante in cui le vescicole sinaptiche fondono con la membrana presinaptica per il rilascio del neurotrasmettitore espongono nello spazio intersinaptico epitopi luminali di proteine vescicolari alcuni dei quali fungono da recettori per le BoNTs (vedi introduzione capitolo 1.7.1). Le tossine, quindi, sfruttano l'endocitosi delle vescicole sinaptiche per la loro internalizzazione. E' quindi presumibile pensare che terminali nervosi caratterizzati da elevata attività e di conseguenza elevata frequenza di eso-endocitosi siano in grado di inglobare una maggiore quantità di tossina rispetto ad altri.

Le unità motorie che innervano le fibre nervose non sono tutte uguali, infatti, ma presentano caratteristiche e tempi di attività diversi come confermato in un lavoro pionieristico e di rilevante importanza pubblicato sulla rivista *Nature* nel 1985 (Hennig and Lømo T., 1985). Secondo tale studio, in cui sono state monitorate nell'arco di 24 ore le frequenze di scarica e i tempi di utilizzo di diverse unità motorie dei muscoli soleo (unità motorie denominate sol-1) ed estensore lungo digitale (unità motorie denominate edl-1 e -2) di ratto, gli autori hanno dimostrato che il tempo di utilizzo di ciascuna unità è molto diverso dalle altre.

Le unità sono state così suddivise:

- **edl-1** (innervano fibre IIB) → **0,5-3 min./24 h** (0,04-0,22% del tempo totale);
- **edl-2** (innervano fibre IIA) → 23-72 min/24h (1,6-5%);
- **sol-1** (innervano fibre I/lente) → **5,3-8,4 h/24 h** (22-35%).

Come si può vedere le unità denominate edl-1, che innervano fibre IIB (le più veloci) vengono utilizzate solo per pochi minuti nell'arco della giornata, contrariamente alle fibre denominate sol-1 che vengono addirittura utilizzate per diverse ore nell'arco di 24 ore.

Considerando ciò e il meccanismo di entrata nel terminale delle tossine botuliniche è facile ipotizzare, quindi, che unità motorie con elevata attività siano in grado di endocitare una quantità maggiore di tossina ed essere paralizzate in maniera preferenziale.

Per correlare la paralisi delle singole fibre muscolari con la selettività delle tossine botuliniche per certi terminali nervosi, gli esperimenti attualmente in corso prevedono di marcare il prodotto di taglio di BoNT/A, ovvero, SNAP-25 tronca

degli ultimi 9 amminoacidi, con un anticorpo, generato in passato nel laboratorio, in grado di riconoscere tale proteina senza, comunque, riconoscere la proteina integra. In questo modo sarà possibile, eventualmente, dimostrare che le fibre positive per N-CAM (e quindi paralizzate) presentano anche SNAP-25 tagliata nella corrispondente giunzione neuromuscolare.

4.2 Studio comparativo della diffusione di tre formulazioni farmaceutiche di tossina botulinica di sierotipo A.

Dal momento che le tossine botuliniche trovano impiego nel trattamento di diversi disturbi caratterizzati da iperattività colinergica muscolare (distonie, strabismo, ecc...) o autonoma (iperidrosi) numerosi studi sono condotti al fine di comprendere e meglio caratterizzare la farmacologia di tale molecola. Nella pratica clinica, infatti, è importante considerare attentamente le dosi da somministrare, il volume di soluzione iniettabile e altre componenti allo scopo di colpire solo il muscolo da trattare. Molti disturbi da iperattività colpiscono un singolo muscolo o un gruppo ristretto di muscoli; risulta importante, quindi, che la tossina resti confinata nel muscolo patologico e non diffonda nei tessuti adiacenti al sito di iniezione causando spiacevoli effetti collaterali. Ad esempio, è possibile indurre ptosi con iniezioni dei muscoli oculari oppure disfagia attraverso iniezioni nel muscolo sternocleidomastoideo (Borodic et al. 1990). Comunque, tali effetti, dovuti alla diffusione della tossina, non sono così frequenti dal momento che, come si è osservato, la tossina botulinica ha la capacità di rimanere relativamente localizzata nel muscolo iniettato.

Attualmente le formulazioni farmaceutiche a base di BoNT/A che si trovano in commercio in Europa sono tre: **Botox**[®] (Allergan, Inc.), **Dysport**[®] (Ipsen, Ltd.) and **Xeomin**[®] (Merz Pharmaceuticals).

Sulla base della loro composizione, le diverse formulazioni presentano caratteristiche diverse. E' di primaria importanza, quindi, studiare e comparare le varie formulazioni al fine di ottimizzare le terapie e ridurre al minimo i rischi di effetti collaterali. Attualmente le formulazioni vengono somministrate, per avere i

medesimi effetti, nel rapporto: Botox[®] 1, Dysport[®] 2-3 e Xeomin[®] 1. Per questo motivo, molti studi sono rivolti a comprendere e determinare quale può essere il giusto rapporto di conversione tra le dosi. Un'altro aspetto oggetto di studio è la diffusione delle diverse formulazioni. Infatti Botox[®] e Dysport[®] sono costituite dalla tossina botulinica di 150 kDa in complesso proteico con altre proteine (emoagglutinine e non-emoagglutinine) ottenendo conglomerati del peso di 900 kDa (Botox[®]) o 300-500-900 kDa (Dysport[®]). Contrariamente, Xeomin[®] viene prodotta come singola catena del peso di 150 kDa.

Queste differenze nelle dimensioni possono fare pensare che la capacità di tali formulazioni di diffondere nei tessuti adiacenti al sito di iniezione possa essere differente ed in particolare, che le molecole più piccole diffondano di più causando maggiori effetti collaterali.

Diversi studi sono stati fatti, finora, al fine di determinare la diffusione delle tossine botuliniche nell'uomo (Eleopra et al., 1996, 2004, Hsu et al., 2004) e negli animali (Arezzo et al., 2002, Rosales et al., 2006, Yaraskavitch et al., 2008) attraverso studi di elettrofisiologia, studi della deplezione del glicogeno, marcature dell'acetilcolinesterasi (Shaari et al., 1991, Eleopra et al., 1996, Dodd et al., 1998, Borodic et al., 1990 e 1994) coniugando varie formulazioni con isotopi radioattivi per monitorarne la diffusione (Tang-Liu et al., 2003).

L'approccio utilizzato in questo lavoro dei tesi, per comparare le tre formulazioni farmaceutiche di tossina botulinica di sierotipo A (Botox[®], Dysport[®], Xeomin[®]) in termini di diffusione, si è avvalso dell'utilizzo di N-CAM come marcatore di paralisi. Come già accennato, N-CAM è una glicoproteina presente nei miotubi embrionali ma non è presente nelle fibre muscolari adulte. In seguito a denervazione, però, si nota un rapido incremento nell'espressione di N-CAM sulla membrana delle fibre ed è noto che anche la tossina botulinica è in grado di indurne l'espressione (Moore and Walsh, 1986). Ciò è stato confermato anche nella nostra analisi: come si può vedere in figura 20, sia il muscolo denervato che quello iniettato esprimono la glicoproteina allo stesso modo. Risultano non marcati il muscolo normale e il controllo iniettato con soluzione salina.

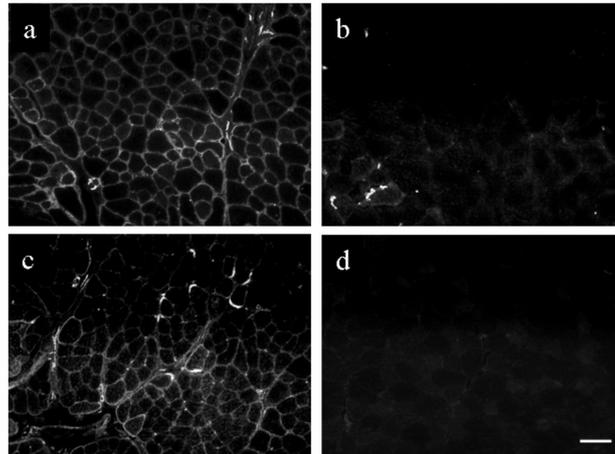


Fig. 20: Immunofluorescenza indiretta per N-CAM di sezioni muscolari dopo 7 giorni dall'iniezione di Botox[®] (a), muscolo contralaterale (b), denervato (c) e iniettato con soluzione 0,9% NaCl. Scala: 50 μ m.

Sfruttando l'espressione di N-CAM è stato possibile, quindi, sviluppare un metodo molto sensibile per determinare con precisione **dove la tossina sia arrivata e dove abbia agito**, avendo così un'idea dell'effettiva diffusione funzionale delle BoNTs (Carli et al., 2009).

Come animale, è stato utilizzato il topo: le ridotte dimensioni delle zampe permettono di studiare la diffusione in modo ottimale e con elevata precisione.

A tal fine, il tibiale anteriore di entrambe le zampe è stato iniettato con le diverse formulazioni (ciascuna zampa con una formulazione diversa) e in un altro set di esperimenti il TA di una zampa è stato iniettato con un farmaco mentre il contralaterale è stato iniettato con soluzione salina e usato come controllo.

Le dosi somministrate sono state Botox[®]: 0,25U, Dysport[®]: 1,0U e Xeomin[®]: 0,25U. (in rapporto, quindi, di 1:4:1). Tale rapporto è stato deciso attraverso il monitoraggio del recupero funzionale della mobilità della zampa (*DAS assay*, vedi materiali e metodi) che si basa, appunto, sui tempi di recupero del riflesso di estensione delle dita in seguito a paralisi indotta dalle BoNTs (Aoki, 2001).

4.2.1 *Analisi istologica della diffusione*

Allo scopo di determinare il grado di diffusione delle tre formulazioni di tossina botulinica, diversi giorni dopo l'iniezione (7, 14, 21, 30 e 60 giorni) i muscoli sono stati prelevati e analizzati in immunistochemica per l'espressione di N-CAM. In particolare, i muscoli analizzati sono: **Tibiale anteriore** (sito di iniezione), **soleo**, **gastrocnemio** e **quadricipite femorale** (fig. 21).

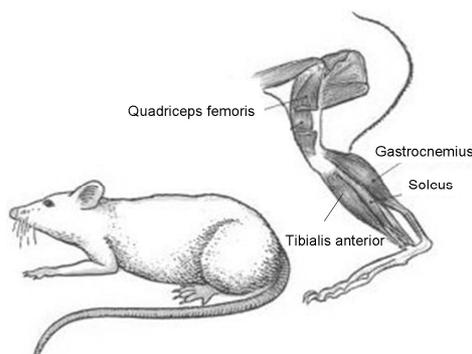


Fig. 21: Anatomia dei muscoli della zampa posteriore del topo analizzati per la determinazione della diffusione delle BoNTs: Tibiale anteriore; Soleo; Gastrocnemio; Quadricipite femorale.

La figura 22 mostra le sezioni muscolari dei diversi muscoli dopo 7 giorni dalla somministrazione dei tre farmaci. Come si può notare, le fibre del tibiale anteriore (sito di iniezione) presentano una notevole marcatura per N-CAM. Anche il soleo, che è il muscolo più vicino al tibiale anteriore tra quelli analizzati, presenta una simile marcatura, indice che la tossina è diffusa sino a questo muscolo. Al contrario, gastrocnemio e quadricipite femorale (più lontani dal tibiale rispetto al soleo) risultano negativi.

Tali risultati evidenziano che le tossine botuliniche hanno la capacità di diffondere in tessuti limitrofi al sito di iniezione ma che comunque tale migrazione è davvero molto ridotta. Inoltre, marcature effettuate in sezioni del tibiale della zampa contralaterale sono sempre risultate negative il che indica che le BoNTs non hanno effetti distanti dal muscolo iniettato (dato non mostrato). Altro aspetto importante è che **tutte e tre le formulazioni presentano un simile profilo di diffusione.**

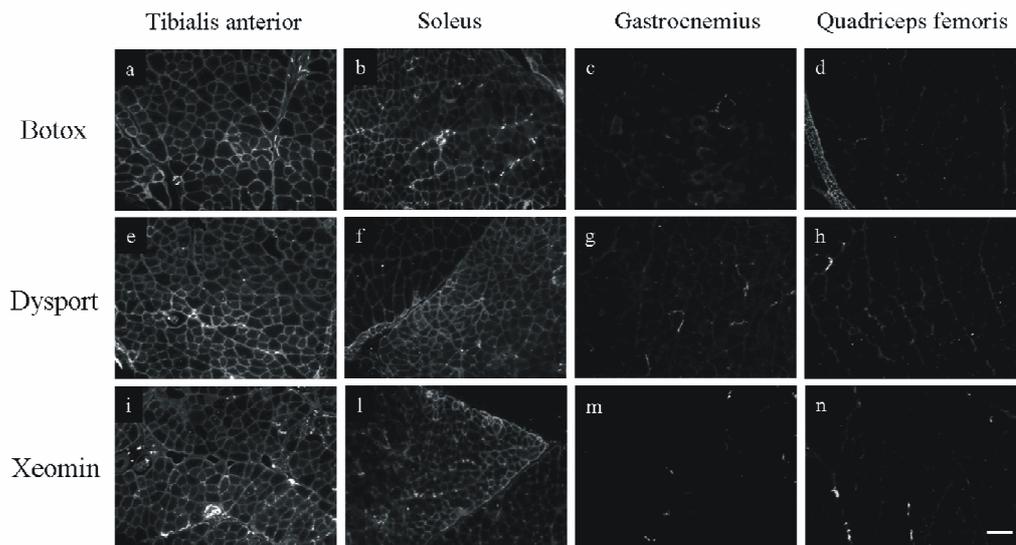


Fig. 22: Immunofluorescenza indiretta per N-CAM di sezioni muscolari dopo 7 giorni dall'iniezione di Botox[®] (a), Dysport[®] (e) e Xeomin[®] (i). Soleo (b, f, l), gastrocnemio (c, g, m) e quadricipite femorale (d, h, n) della corrispettiva zampa iniettata. Scala: 100 μ m

I livelli di N-CAM nel tibiale anteriore, aumentano da 14 a 21 giorni mentre livelli inferiori si osservano a 30 giorni, dove all'incirca solo il 50% delle fibre appare positivo per N-CAM. A 60 giorni, infine, si nota la completa scomparsa di marcatura (fig. 23).

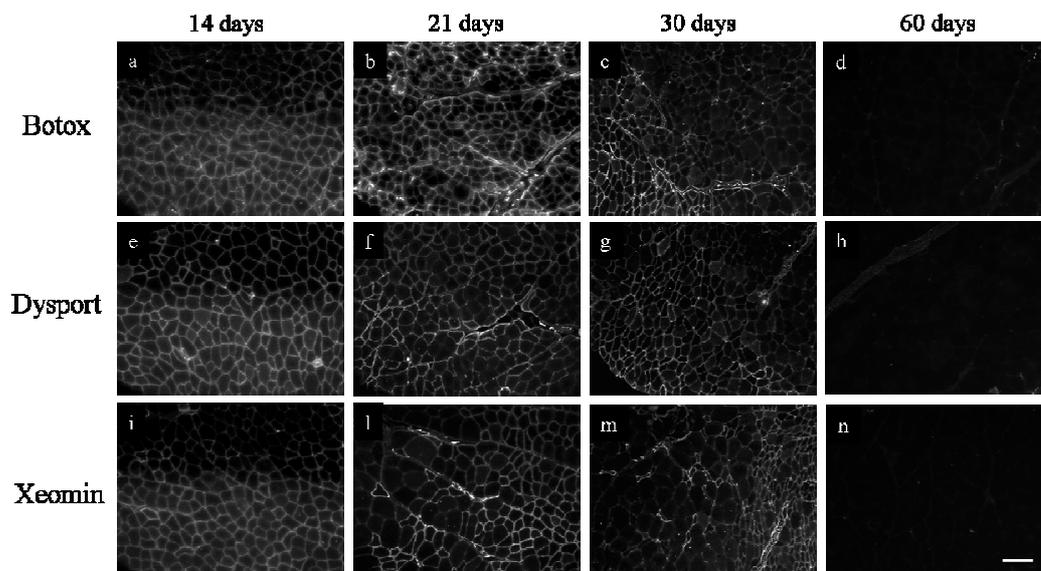


Fig. 23: Immunofluorescenza indiretta per N-CAM di sezioni muscolari del tibiale anteriore dopo 14, 21, 30 e 60 giorni dall'iniezione con Botox[®] (a,b,c,d), Dysport[®] (e, f, g, h), Xeomin[®] (i, l, m, n). Scala: 100 μ m.

Come per la diffusione anche il tempo di scomparsa di N-CAM è risultato simile per le varie formulazioni. In altre parole, Botox[®], Dysport[®] e Xeomin[®] inducono la comparsa e la scomparsa di N-CAM nei vari muscoli in maniera molto simile. Infine, l'analisi dell'espressione della glicoproteina nei muscoli adiacenti al tibiale anteriore ha rivelato che anche dopo i 7 giorni sia il gastrocnemio (fig. 24) che il quadricipite femorale (non mostrato) sono sempre negativi il che indica che le fibre di questi muscoli non sono state paralizzate dalla tossina.

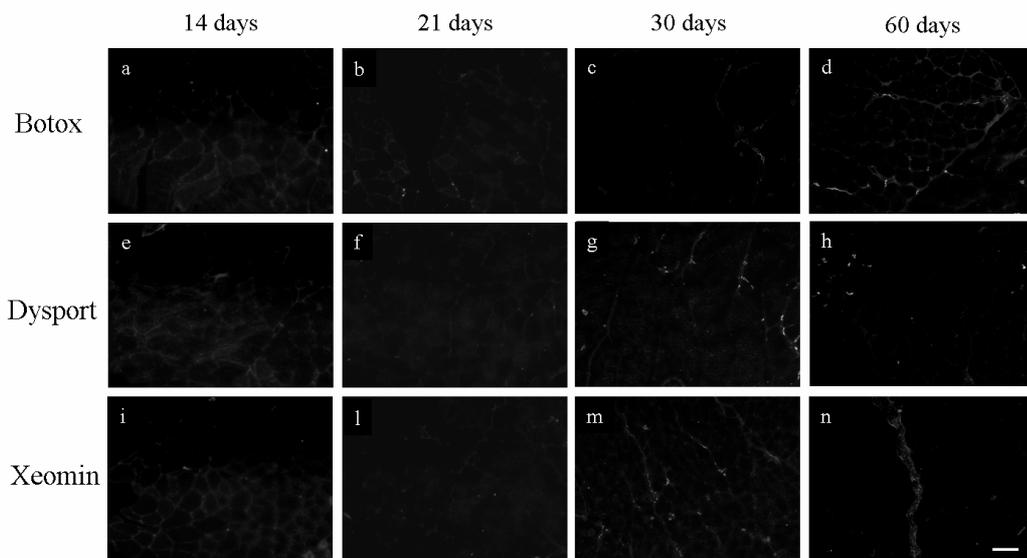


Fig. 24: Immunofluorescenza indiretta per N-CAM di sezioni muscolari del gastrocnemio dopo 14, 21, 30 e 60 giorni dall'iniezione con Botox[®] (a,b,c,d), Dysport[®] (e, f, g, h), Xeomin[®] (i, l, m, n). Scala: 100 μ m.

4.2.2 *Analisi biochimica dell'espressione di N-CAM*

Al fine di confrontare ed eventualmente confermare i dati ottenuti dall'analisi istologica, l'espressione di N-CAM è stata analizzata in modo quantitativo anche mediante western-blotting.

L'intensità delle bande in immunoblot di lisato totale di muscoli iniettati con Botox[®], Dysport[®] e Xeomin[®] (e dei muscoli adiacenti) marcate con l'anticorpo anti-N-CAM è stata quantificata attraverso lettura densitometrica con un apposito software.

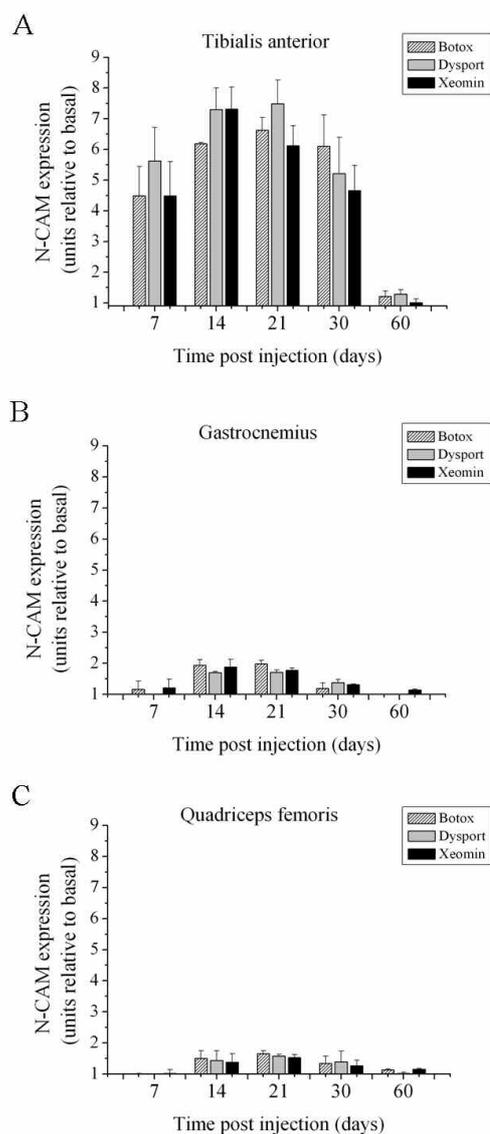


Fig. 25: Espressione di N-CAM quantificata mediante analisi densitometrica di immunoblotting di lisati muscolari. A, tibiale anteriore iniettato con Botox[®], Dysport[®] e Xeomin[®]. B e C, gastrocnemio e quadricipite femorale della stessa zampa. Le barre indicano la media \pm SD.

La media (e la deviazione standard) dei dati ottenuti è stata messa in grafico come intensità relativa rispetto al basale di un muscolo non trattato.

I dati ottenuti, inoltre, sono stati normalizzati usando la tubulina come standard di caricamento.

La fig. 25-A, mostra i livelli di espressione di N-CAM nel tibiale anteriore iniettato con le diverse formulazioni. In accordo con quanto osservato in immunistochemica, già a 7 giorni si nota un'elevata espressione. Da 14 a 21 giorni si nota un aumento mentre attorno ai 30 l'intensità inizia a calare fino a ritornare a livelli fisiologici a 60 giorni. Per quanto riguarda il gastrocnemio e il quadricipite femorale (B e C) si vede che, sempre in accordo con quanto osservato in immunofluorescenza, l'espressione di N-CAM risulta essere relativamente bassa denotando una limitata diffusione delle tossine botuliniche che costituiscono le tre diverse formulazioni farmaceutiche.

Inoltre, nessuna marcatura è stata osservata nei muscoli della zampa contralaterale il che è in accordo con i risultati ottenuti in immunistochemica (non mostrato).

4.2.3 Considerazioni sulla diffusione

I risultati ottenuti nelle analisi in immunistochemica e western-blotting hanno evidenziato che le tre formulazioni farmaceutiche di tossina botulinica di sierotipo A presentano simile e limitata diffusione nei muscoli adiacenti al sito di iniezione. Questo dato è di particolare importanza dal momento che ha confermato che non c'è differenza, in termini di diffusione, tra la forma nuda e la forma in complesso. Esistono, infatti, svariate controversie sulla maggiore capacità di diffondere della molecola da 150 kDa rispetto alle forme in complesso (300-900 kDa). D'altra parte può essere facile pensare che la molecola più piccola possa diffondere con maggiore facilità.

Le tossine botuliniche vengono prodotte dal batterio come complesso multiproteico (tossina da 150 kDa associata ad altre proteine) al fine di proteggere la tossina dall'ambiente gastrico dell'ospite favorendone, così, l'assorbimento a livello intestinale. Tale complesso è stabile a pH acido (tipico dell'ambiente gastrico) mentre tende a dissociarsi a valori di pH basici o leggermente basici (tipici dell'intestino). Si stima che il tempo di dissociazione del complesso avvenga in tempi minori di un minuto quando esposto a pH basico (Eisele and Tylor, 2008). Considerato questo, è ipotizzabile che le tossine perdano le proteine accessorie subito dopo l'iniezione (dal momento che si trovano a pH fisiologico) rilasciando la tossina da 150 kDa in tempi molto brevi. Non ci sarebbero, quindi, grosse differenze nell'iniettare tossina in complesso o in forma nuda.

Questa evidenza è di particolare importanza nella pratica clinica dal momento che il contenimento della diffusione delle BoNTs è un elemento importante nel trattamento dei vari disordini colinergici. Generalmente, i disturbi da iperattività affliggono un muscolo o un ristretto gruppo muscolare. La terapia, quindi, deve essere mirata al muscolo affetto dal disturbo evitando al contempo effetti collaterali derivanti dalla migrazione delle tossine lontano dal sito di iniezione.

La possibilità di somministrare direttamente la molecola attiva senza le proteine accessorie, inoltre, potrebbe ridurre la comparsa di anticorpi rivolti contro tali proteine aumentando, così, la sicurezza dei trattamenti a base di tossina botulinica.

Infine, l'utilizzo di N-CAM come metodo di rilevamento della paralisi indotta dalle BoNTs si è dimostrato molto sensibile e particolarmente indicato per monitorare la diffusione o le variazioni delle dosi somministrate di differenti formulazioni di tossina botulinica.

Conclusioni

I risultati ottenuti nello studio degli effetti delle tossine botuliniche a livello di muscolo scheletrico hanno riportato che, oltre al conosciuto fenomeno dell'atrofia, le tossine botuliniche sono in grado di indurre cambiamenti molecolari e del fenotipo delle fibre che compongono i muscoli scheletrici. In particolare, si è visto che queste tossine hanno la capacità di indurre l'espressione di fibre lente/I in muscoli veloci (che normalmente non la esprimono). Questo è un risultato inatteso dal momento che è risaputo che diversi casi di paralisi muscolare inducono un cambiamento fenotipico da-lento-a-veloce delle fibre. Inoltre, queste fibre non esprimono mai il marcatore di paralisi/denervazione N-CAM. Tali osservazioni suggeriscono che non tutte le fibre muscolari e quindi le unità motorie che innervano i muscoli, siano paralizzate allo stesso modo.

Diversi studi affermano che l'aumentata attività muscolare può portare al cambiamento da-veloce-a-lento delle fibre. E' possibile, quindi, che certe fibre, essendo ancora innervate e quindi funzionanti, vadano incontro ad un sovraccarico compensatorio dal momento che la maggior parte delle fibre che compongono il muscolo sono state chemo-denervate dalle tossine botuliniche.

A questo punto, è importante stabilire il perché di questa potenziale selettività delle BoNTs nei confronti di certe unità motorie rispetto ad altre. L'ipotesi è che unità motorie che hanno maggiore attività siano in grado di endocitare quantità più elevate di tossina. Questa ipotesi è plausibile dato che le BoNTs, per la loro entrata nel terminale nervoso, sfruttano il normale ciclo di eso-endocitosi delle vescicole sinaptiche.

Studiare questo fenomeno è di notevole importanza scientifica vista l'eterogeneità delle fibre che compongono i vari muscoli del corpo, delle unità motorie che li innervano e l'utilizzo in terapia umana di tali tossine.

Sfruttando, inoltre, l'espressione di N-CAM è stato possibile mettere a punto un saggio particolarmente sensibile per lo studio della diffusione delle tossine botuliniche. Nel nostro studio, tre diverse preparazioni farmaceutiche di tossine botuliniche di sierotipo A sono state testate in termini di diffusione: Botox®, prodotta come complesso proteico da 900 kDa, Dysport® prodotta come

complessi di differente peso (300-500-900 kDa) e Xeomin® costituita dalla sola molecola attiva di 150 kDa. I risultati ottenuti hanno evidenziato che le tossine botuliniche presentano una bassa diffusione limitata ai muscoli adiacenti al muscolo iniettato. Inoltre, un altro risultato di notevole importanza ha riportato che le tre diverse formulazioni, pur avendo caratteristiche molecolari diverse, mostrano un profilo di diffusione molto simile. Questo è un dato di notevole rilevanza nell'utilizzo in campo medico dal momento che risulta particolarmente importante avere elementi di confronto tra le varie formulazioni. La comparazione delle dosi da somministrare, i tempi di durata, la diffusione e altre caratteristiche delle varie formulazioni sono, infatti, elementi indispensabili al fine di ottimizzarne l'utilizzo e avere al contempo una riduzione degli effetti collaterali derivanti dalla somministrazione dei diversi farmaci a base di tossina botulinica.

Infine, ampliare le conoscenze finora raggiunte sull'azione delle tossine botuliniche, le loro caratteristiche e i loro effetti rappresenta una meta importante al fine di migliorare ulteriormente il loro impiego e renderli farmaci ancora più efficaci e sicuri di quanto non lo siano già.

Bibliografia

AOKI KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes a, b, and f in mice. *Toxicon*; 39:1815-1820, 2001.

ARANY Z, HE H, LIN J, HOYER K, HANDSCHIN C, TOKA O, AHMAD F, MATSUI T, CHIN S, WU PH, RYBKIN II, SHELTON JM, MANIERI M, CINTI S, SCHOEN FJ, BASSEL-DUBY R, ROSENZWEIG A, INGWALL JS, SPIEGELMAN BM. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 1: 259–271, 2005.

AREZZO JC, LITWAK MS, CAPUTO FA, MEYER K E, SHOPP GM. Spread of paralysis to nearby and distant noninjected muscles in a monkey hand model: comparison of bont-b and bont-a. In: Brin LC, Hallet M, Jankovic J, editors. *Scientific and therapeutic aspects of botulinum toxin*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p 123-133, 2002.

BENNETT, M. K., N. CALAKOS, R. H. SCHELLER. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicle at presynaptic active zones. *Science* 257: 255-259, 1992

BITTNER, M. A., B. R. DASGUPTA, R. W. HOLZ. Isolated light chains of botulinum neurotoxin inhibit exocytosis. Studies in digitonin-permeabilized chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 264: 10354-10360, 1989

BORODIC GE, JOSEPH M, FAY L, COZZOLINO D, FERRANTE RJ. Botulinum a toxin for the treatment of spasmodic torticollis: dysphagia and regional toxin spread. *Head Neck*; 12:392-399, 1990.

BORODIC GE, FERRANTE R, PEARCE LB, SMITH K. Histologic assessment of dose-related diffusion and muscle fiber response after therapeutic botulinum A toxin injections. *Mov Disord*; 9:31-39, 1994.

BRAZ, J. C., BUENO, O. F., LIANG, Q., WILKINS, B. J., DAI, Y. S., PARSONS, S., BRAUNWART, J., GLASCOCK, B. J., KLEVITSKY, R., KIMBALL, T. F., *et al.* Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J. Clin. Invest.* **111**, 1475–1486, 2003.

CARLI L., MONTECUCCO C., ROSSETTO O. Assay of diffusion of different botulinum neurotoxin type a formulations injected in the mouse leg. *Muscle & Nerve* 2009. *In press*.

CHIN, E. R., OLSON, E. N., RICHARDSON, J. A., YANG, Q., HUMPHRIE, C., SHELTON, J.M., WU, H., ZHU, W., BASSEL-DUBY, R. and WILLIAMS, R. S. A calcineurin dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* **12**, 2499-2509, 1998.

COVAULT J., J. R. SANES. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralyzed skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. sci. USA* 82: 4544-4548, 1985

DODD S, ROWELL B, VRABAS I, ARROWSMITH R, WEATHERILL P. A comparison of the spread of three formulations of botulinum neurotoxin A as determined by effects on muscle function. *Eur J Neurol*; 5:181-186, 1998.

DONG M, YEH F, TEPP WH, DEAN C, JOHNSON EA *et al.* SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* 312:592–6, 2006.

EISELE KH, TAYLOR HV. Dissociation of the 900 kda neurotoxin complex from c. botulinum under physiological conditions. *Toxicon*; 51:10, 2008.

ELEOPRA R, TIGNOLI V, CANIATTI L, DE GRANDIS D. Botulinum toxin treatment in the facial muscles of humans: evidence of an action in untreated near muscles by peripheral local diffusion. *Neurology*; 46:1158-1160, 1996.

ELEOPRA R, TUGNOLI V, CANIATTI L, DE GRANDIS D. Botulinum toxin treatment in the facial muscles of humans: evidence of an action in untreated near muscles by peripheral local diffusion. *Neurology* 46:1158-1160, 1996.

ELEOPRA R, TUGNOLI V, ROSSETTO O, MONTECUCCO C, DE GRANDIS D. Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human. *Neurosci Lett* 224:91-4, 1997.

ELEOPRA R, TUGNOLI V, QUATRALE R, GASTALDO E, ROSSETTO O ET AL. Botulinum neurotoxin serotypes A and C do not affect motor units survival in humans: an electrophysiological study by motor units counting. *Clin Neurophysiol* 113:1258-64, 2002.

ELEOPRA R, TUGNOLI V, QUATRALE R, ROSSETTO O, MONTECUCCO C. Different types of botulinum toxin in humans. *Mov Disord*; 19 Suppl 8:S53-9, 2004.

HATEWAY, C L. Bacteria sources of clostridia neurotoxin. In "Botulinum neurotoxin and Tetanus toxin" (L. L. Simpson, Ed.), Academic Press, San Diego, CA. pp 3-24, 1989.

HENNIG R, LØMO T. Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature*. Mar 14-20;314(6007):164-6, 1985.

HSU TSJ, DOVER JS, ARNDT KA. Effect of volume and concentration on the diffusion of botulinum exotoxin a. *Arch Dermatol*; 140:1351-1354, 2004.

KORIAZOVA LK, MONTAL M Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat Struct Biol* 10:13–18, 2003.

KRASZEWSKY, K., O. MUNDIGL, L. DANIELL, C. VERDERIO, M. MATTEOLI, P. DE CAMILLI. Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-coniugated antibodies directed against the luminal domain of synaptotagmin. *J. Neurosci.* 15: 4328-4342, 1995.

LACY, D. B., W. TEPP, A. C. COHEN, B. R. DASGUPTA, R. STEVENS. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implication for toxicity. *Nature Struct. Biol.* 5: 898-902, 1998.

LIU Y, CSERESNYES Z, RANDALL WR, SCHNEIDER MF. Activity-dependent nuclear translocation and intranuclear distribution of NFATc in adult skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 155: 27–39, 2001.

MAHRHOLD S, RUMMEL A, BIGALKE H, DAVLETOV B, BINZ T The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* 580:2011–14, 2006.

McCULLAGH KJ, CALABRIA E, PALLAFACCHINA G, CICILIOT S, SERRANO AL, ARGENTINI C, KALHOVDE JM, LØMO T, SCHIAFFINO S. NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10590-5, 2004.

MONTECUCCO C., G. SCHIAVO, B. R. DASGUPTA. Effect of pH on the interaction of botulinum neurotoxin A, B and E with liposomes. *Biochem J*. 259: 47-53, 1989.

MONTECUCCO C., G. SCHIAVO, Z. GAO, E. BAUERLEIN, P. BOQUET, B. R. DASGUPTA. Interaction of botulinum and tetanus toxins with the lipid bilayer surface. *Biochem. J*. 251: 379-383, 1988.

MONTECUCCO, C., E. PAPINI, G. SCHIAVO. Bacteria protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett*. 346: 92-98. 1994.

MONTECUCCO C., O. ROSSETTO, G. SCHIAVO. Presynaptic receptors arrays for clostridial neurotoxins. *TRENDS in Microbiology* vol. 12 No. 10. 2004

MOORE SE, WALSH FS. Nerve dependent regulation of neural cell adhesion molecule expression in skeletal muscle. *Neuroscience*; 18:499-505, 1986.

MORANTE, S., L. FURENLID, G. SCHIAVO, F. TONELLO, R. ZWILLING, C. MONTECUCCO. X-ray absorption spectroscopy study of zinc coordination in tetanus neurotoxin, astacin, alkaline protease and thermolysin. *Eur. J. Biochem*. 235: 606-612, 1996.

MORBIATO L, CARLI L, JOHNSON E, MONTECUCCO C, MOLGO J et al. Neuromuscular paralysis and recovery in mice injected with botulinum toxin A and C. *Eur J Neurosci.* 25: 2697–2704, 2007

NAYA FJ, MERCER B, SHELTON J, RICHARDSON JA, WILLIAMS RS, OLSON EN. Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *J Biol Chem* 275: 4545–4548, 2000.

OYLER, G. A., HIGGINS, G. A., HART, R. A., BATTENBERG, E., BILLINGSLEY, M., BLOOM, F. E., WILSON, M. C.. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell. Biol.* 109: 3039-3052. 1989.

PARSONS SA, WILKINS BJ, BUENO OF, MOLKENTIN JD. Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin A alpha and Abeta gene-targeted mice. *Mol Cell Biol* 23: 4331–4343, 2003.

RIGER F., M. GRUMET, G. M. EDELMAN. N-CAM at the Vertebrate Neuromuscular Junction. *The journal of Cell Biology* 101: 285-293, 1985

ROSALES RL, BIGALKE H, DRESSLER D. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type a preparations. *Eur J Neurol*; 13 Suppl 1:2-10, 2006.

ROSSETTO, O., G. SCHIAVO, C. MONTECUCCO, B. POULAIN, F. DELOYE, L. LOZZI, C. C. SHONE. SNARE motif and neurotoxin. *Nature* 372: 415-416, 1994

ROSSETTO, O., M. RIGONI, C. MONTECUCCO. Different mechanism of blockade of neuroexocytosis by presynaptic neurotoxins. *Toxicology letters* 149: 91-101, 2004.

RUMMEL A., T. KARNATH, T. HENKE, H. BIGALKE, T. BINZ. Synaptotagmin I and II Act as nerve cell Receptors for botulinum neurotoxin G. *J. Biol. Chem.* 279-29: 30865-30870. 2004

SCHIAFFINO, S., M. SNADRI, M. MURGIA. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology* 22: 269-278. 2007

SCHIAVO, G., O. ROSSETTO, A. SANTUCCI, B.R. DASGUPTA, C. MONTECUCCO. Botulinum neurotoxin are zinc proteins. *J. Biol. Chem.* 267: 23479-23438, 1992.

SCHIAVO G., M. MATTEOLI, C. MONTECUCCO. Neurotoxin affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 80: 717-766, 2000

SHAARI CM, GEORGE E, WU BL, BILLER HF, SANDERS I. Quantifying the spread of botulinum toxin through muscle fascia. *Laryngoscope*; 101:960-964, 1991.

SUTTON, R. B., D. FASSHAUER, R. J, A. T. BRUNGER. Crystal-structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 angstrom resolution. *Nature* 395: 347-353, 1998.

SWAMINATAN, S., ESWARAMOOTHY, S.. Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium Botulinum neurotoxin B". *Nature Struct. Biol.* 7: 693-699, 2000.

TANG-LIU D. D.-S., K. R. AOKI, O. DOLLY, A. DE PAVIA, T. L. HOUCHEM, L. F. CHASSEAUD, C. WEBBER. Intramuscular injection of ¹²⁵I-botulinum neurotoxin-complex versus ¹²⁵I-botulinum-free neurotoxin: time course of tissue distribution. *Toxicon* 42: 461-469, 2003

TOTHOVA J, BLAAUW B, PALLAFACCHINA G, RUDOLF R, ARGENTINI C, REGGIANI C, SCHIAFFINO S. NFATc1nucleocytoplasmic shuttling is controlled by nerve activity in skeletal muscle. *J Cell Sci* 119:1604–1611, 2006.

TRIMBLE, W. S., D. M. COWAN, R. H. SCHELLER. VAMP-1 : a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4538-4542, 1998

YARASKAVITCH M, LEONARD T, HERZOG W. Botox produces functional weakness in non-injected muscles adjacent to the target muscle. *J Biomech*; 41:897-902, 2008.

ZIN-SOE THANT, ENG-KING TAN. Emerging therapeutic applications of botulinum toxin. *Med. Sci. Monit.* 9(2): 40-48, 2003