

DAL MONDO MICROBICO UNA PROTEINA BATTERICA DALLE SORPRENDENTI POTENZIALITÀ TERAPEUTICHE



Sara Travaglione, Carla Fiorentini e Alessia Fabbri
Dipartimento del Farmaco, ISS

RIASSUNTO - La tossina CNF1 di *Escherichia coli* appartiene al numero crescente di sostanze batteriche con un effetto benefico sulla salute umana. Il CNF1 ha mostrato infatti inattese attività sulla plasticità del sistema nervoso, rivelandosi in grado di aumentare le capacità di apprendimento e memoria e di contrastare il dolore infiammatorio in topi sani, nonché di attenuare i disturbi cognitivi e i deficit di coordinazione motoria in un modello murino di Sindrome di Rett, malattia rara del neurosviluppo. Studi recenti identificano negli astrociti il target primario della tossina, rendendo quest'ultima un potenziale farmaco per le patologie caratterizzate da anomalie astrocitarie, quali l'Alzheimer.

Parole chiave: tossine batteriche; citoscheletro; plasticità nervosa

SUMMARY (*From the microbial world a bacterial protein with stunning therapeutic potential*) - CNF1 from *Escherichia coli* belongs to the increasing number of bacterial products with a beneficial effect on human health. Indeed, CNF1 has shown unexpected activities on nervous system plasticity, as it has been reported to increase learning and memory abilities, to counteract the inflammatory pain in healthy mice as well as to improve cognitive impairment and motor coordination deficits in a mouse model of Rett syndrome, a rare neurodevelopmental disease. Recent studies point to astrocytes as the primary target of the toxin, suggesting that CNF1 could be a potential drug for those pathologies characterized by astrocytic dysfunction, such as Alzheimer disease.

Key words: bacterial toxins; cytoskeleton; neural plasticity

carla.fiorentini@iss.it

Molti batteri patogeni causano malattia tramite l'azione di tossine, straordinarie "armi biologiche" che consentono al batterio che le produce di modificare a proprio vantaggio la fisiologia dell'ospite. Nonostante il loro ruolo come fattori di virulenza, le tossine possono anche rappresentare dei formidabili alleati per la realizzazione di nuove molecole ad attività farmacologica. Conoscere la loro attività a livello cellulare e molecolare non solo aumenta la comprensione dei meccanismi alla base della malattia che inducono, ma permette anche il loro utilizzo come potenziali farmaci innovativi in campo medico. In questo contesto, basti citare le applicazioni della neurotossina botulinica, che spaziano dalla cosmesi alla patologia muscolare e al trattamento di patologie algiche, come pure gli studi in corso per l'utilizzo di alcune tossine come agenti terapeutici per tumori solidi (1).

Il CNF1 e la sua attività

Dal mondo microbico è recentemente venuta alla ribalta, per le sue inattese attività sulla plasticità del sistema nervoso, la tossina CNF1 di *Escherichia coli*. Identificata nel 1983 da un gruppo di microbiologi dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), il CNF1 è una proteina capace di impartire una nuova organizzazione a un importante componente strutturale della cellula, il citoscheletro di actina (Figura 1), attraverso l'attivazione delle Rho GTPasi (2), piccole proteine regolatorie che svolgono un ruolo chiave in numerosi processi biologici. Grazie al controllo Rho-dipendente del citoscheletro, il CNF1 induce effetti pleiotropici a seconda del tipo cellulare, quali l'induzione di capacità simil-fagocitiche e la resistenza all'apoptosi in cellule epiteliali, l'attivazione di cellule del sistema immune e la modulazione del differenziamento in cellule muscolari (3-5). Appare quindi evidente come il CNF1 possa costituire uno strumento

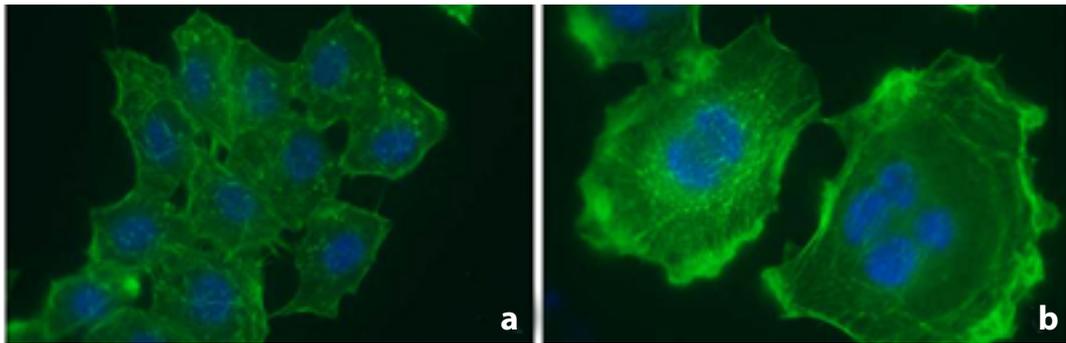


Figura 1 - Immagini in microscopia a fluorescenza di cellule epiteliali di controllo (a) o trattate con il CNF1 (b), in cui l'actina citoscheletrica è stata marcata con falloidina coniugata al fluorocromo FITC. Le cellule trattate con la tossina aumentano considerevolmente di dimensione, sono multinucleate e presentano caratteristiche strutture actiniche (*ruffles*) sulla superficie cellulare

prezioso per quegli studi di biologia cellulare in cui le proteine Rho svolgono un ruolo cruciale. D'altra parte, poiché numerose patologie sono caratterizzate da anomalie nelle vie di segnalazione Rho-dipendenti, il CNF1 potrebbe anche rappresentare la base su cui costruire un potenziale farmaco innovativo.

Prime promettenti scoperte

Le Rho GTPasi sono ad esempio coinvolte nei processi che regolano la memoria come pure in quelli che modulano la sensibilità al dolore. Partendo da questi presupposti, il CNF1 è stato per la prima volta utilizzato *in vivo* in due studi indipendenti e paralleli: il primo, interamente svolto nel Dipartimento del Farmaco dell'ISS, ha dimostrato come la somministrazione intracerebroventricolare (icv) del CNF1, attivando le Rho a livello cerebrale, fosse in grado di aumentare le capacità di apprendimento e di memoria in modelli animali giovani e sani (6).

Il secondo studio, svolto in collaborazione tra ISS e Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Roma, ha evidenziato la capacità del CNF1 di aumentare l'espressione dei recettori mu, bersaglio delle endorfine e degli oppiacei, come la morfina, contrastando in tal modo nei topi l'insorgenza del dolore infiammatorio (7). È importante sottolineare che l'effetto analgesico è stato ottenuto somministrando il CNF1 sia icv che localmente: l'uso topico della tossina, insieme alla durata prolungata dell'effetto analgesico (almeno 24 ore), costituisce un punto di forza per lo sviluppo futuro del CNF1 come "farmaco". L'actina e le Rho GTPasi, che rappresentano i bersagli della tossina, controllano a livello cerebrale la morfologia e il numero delle spine dendri-

tiche, strutture cellulari responsabili delle connessioni eccitatorie fra le cellule nervose. Non sorprende quindi che il CNF1 sia in grado di incrementare il numero e la complessità delle spine dendritiche nel cervello di ratti adulti, come dimostrato in uno studio frutto di una collaborazione con il CNR di Pisa. I risultati di tale ricerca mostrano come in ratti adulti trattati con il CNF1, la deprivazione monoculare, ossia la chiusura di uno dei due occhi, provochi un aumento della dominanza oculare dell'occhio aperto, fenomeno che non si verifica nei ratti di controllo. Il CNF1, quindi, riattiva la plasticità a livello della corteccia visiva in una fase avanzata dello sviluppo in cui normalmente questo non avviene (8).

Potenziati applicazioni terapeutiche

La prima patologia a cui è stato applicato il CNF1 è la Sindrome di Rett (9), malattia rara del neurosviluppo associata a gravi compromissioni motorie e disabilità intellettiva. Lo studio, interamente condotto in ISS grazie alla collaborazione tra i Dipartimenti del Farmaco e di Biologia cellulare e Neuroscienze, ha evidenziato la capacità del CNF1 di contrastare sia i disturbi cognitivi che i deficit di coordinazione motoria in un modello murino della malattia, aprendo la via a un possibile utilizzo della tossina in altre patologie rare e/o del neurosviluppo con simili anomalie.

Rimane comunque da definire quali siano i meccanismi alla base di questo sorprendente effetto della tossina sul sistema nervoso centrale. Un primo passo è stato fatto con la scoperta che gli astrociti trattati con il CNF1 sono in grado di favorire la crescita *in vitro* dei neuroni e di stimolarne la sinaptogenesi (Figura 2) (10). Questa azione del CNF1 a livello astrocitario ►

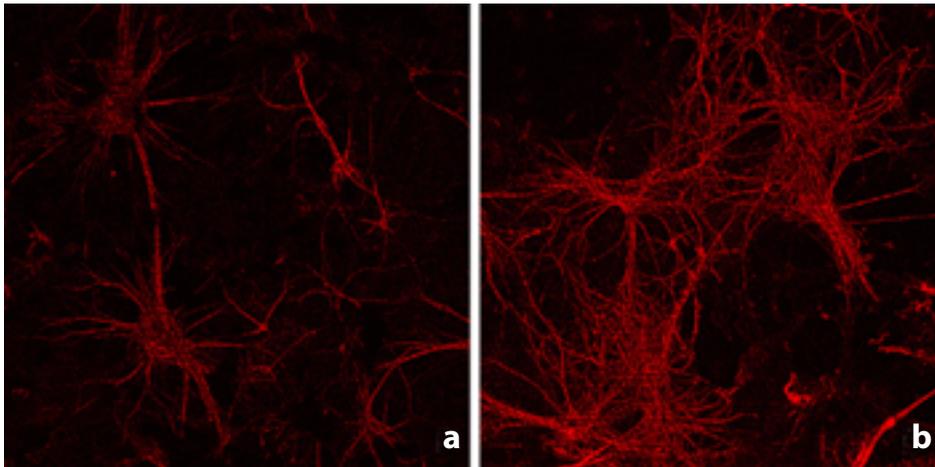


Figura 2 - Immagini in microscopia ottica confocale di neuroni primari di ippocampo di ratto, cresciuti su astrociti di controllo (a) o trattati con il CNF1 (b), nei quali è stata marcata la proteina MAP2. Notare l'arricchimento dell'albero dendritico indotto dalla tossina. Le immagini sono state gentilmente fornite da Fiorella Malchiodi-Albedi

fa di tale molecola uno strumento prezioso poiché la rende un potenziale farmaco per tutte quelle patologie caratterizzate da anomalie astrocitarie. Tra queste, basti ricordare patologie neurodegenerative, quali l'Alzheimer, il Parkinson o la sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Le funzioni terapeutiche del CNF1 verso il sistema nervoso centrale sono oggetto di quattro brevetti internazionali e l'obiettivo finale della nostra ricerca è ovviamente l'avvio della sperimentazione nell'uomo.

Il CNF1 appartiene quindi, a pieno titolo, al numero crescente di sostanze batteriche a cui viene oggi attribuito un effetto benefico sulla salute umana. Alcune di esse vengono addirittura prodotte da batteri normalmente presenti nel nostro intestino, quale il *Bacteroides fragilis*, che presenta sulla sua membrana uno zucchero capace di attivare il sistema immunitario e sedare i sintomi dell'infiammazione; altre vengono dal mondo che ci circonda, come il caso della rapamicina, estratta da batteri isolati nel suolo dell'isola di Pasqua (Rapa Nui nel dialetto originale, da cui il nome del farmaco) e divenuta famosa per i suoi effetti "allunga-vita", già usata come farmaco anti-rigetto e ora proposta come farmaco anti-demenza.

Superando quindi l'erronea convinzione che i batteri (e i loro prodotti) siano esclusivamente nemici da combattere, si stanno sempre più applicando le conoscenze sui loro meccanismi d'azione a livello cellulare a vantaggio della medicina, abbattendo quelle barriere tra il "buono e il cattivo" che sembravano fino a oggi invalicabili. ■

Riferimenti bibliografici

1. Fabbri A, Travaglione S, Falzano L, *et al.* Bacterial protein toxins: current and potential clinical use. *Curr Med Chem* 2008;15:1116-25.
2. Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, *et al.* Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 1997;387:729-33.
3. Fiorentini C, Falzano L, Fabbri A, *et al.* Activation of Rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor 1 induces macropinocytosis and scavenging activity in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2001;12(7):2061-73.
4. Giamboi Miraglia A, Travaglione S, Meschini S, *et al.* Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol Biol Cell* 2007;18(7):2735-44.
5. Travaglione S, Messina G, Fabbri A, *et al.* Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders skeletal muscle differentiation in vitro by perturbing the activation/deactivation balance of Rho GTPases. *Cell Death Differ* 2005;12(1):78-86.
6. Diana G, Valentini G, Travaglione S, *et al.* Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. *PNAS USA* 2007;104:636-41.
7. Pavone F, Luvisetto S, Marinelli S, *et al.* The Rac GTPase-activating bacterial protein toxin CNF1 induces analgesia up-regulating mu-opioid receptors. *Pain* 2009;145:219-29.
8. Cerri C, Fabbri A, Vannini E, *et al.* Activation of Rho GTPases triggers structural remodeling and functional plasticity in the adult rat visual cortex. *J Neurosci* 2011;31:15163-72.
9. De Filippis B, Fabbri A, Simone D, *et al.* Modulation of Rho GTPases improves the behavioral phenotype and reverses astrocytic deficits in a mouse model of Rett syndrome. *Neuropsychopharmacology* 2011;37(5):1152-63.
10. Malchiodi-Albedi F, Paradisi S, Di Nottia M, *et al.* CNF1 improves astrocytic ability to support neuronal growth and differentiation in vitro. *PLoS ONE* 2012;7(4):e34115.