

## **IL CNF1 DI *ESCHERICHIA COLI*: UNA SOSTANZA NATURALE DI ORIGINE BATTERICA CON POTENZIALI PROPRIETÀ TERAPEUTICHE**

Alessia Fabbri, Sara Travaglione, Carla Fiorentini  
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

### **Introduzione: tossine batteriche usate in terapia**

La produzione di tossine batteriche di natura proteica rappresenta una delle principali strategie molecolari messe in atto dai batteri patogeni per interagire con le cellule di mammifero.

Tali fattori di virulenza manipolano, attraverso molteplici e sofisticati meccanismi, le funzioni della cellula ospite in maniera tale da favorire la sopravvivenza e la diffusione dei microorganismi. La comprensione dei meccanismi molecolari attraverso cui agisce una tossina batterica è di fondamentale importanza per convertire una proprietà della tossina stessa, normalmente dannosa per l'organismo ospite, in uno strumento farmacologico utile per modulare, in maniera controllata, *pathway* cellulari alterati in diverse patologie.

Ecco una lista di alcune tossine batteriche usate in terapia o potenzialmente impiegabili come farmaci:

- Neurotossina botulinica (BoNt), dal *Clostridium botulinum* (distonia, disordini del tono muscolare, disordini del Sistema Nervoso Autonomo, cosmesi).
- Tossina Letale (LF) dal *Bacillus anthracis* (potenziale trattamento del cancro).
- Tossina della pertosse (PXT) dalla *Bordetella pertussis* (potenziale impiego nel controllo della replicazione di HIV).
- Fattore Citotossico Necrotizzante 1 (CNF1) da *Escherichia coli* (potenziale impiego nel miglioramento dell'apprendimento e della memoria, adiuvante mucosale).
- Tossina del colera (CT) e Zonula occludens toxin (ZOT) da *Vibrio cholerae* (adiuvante mucosale, veicolo per il rilascio di farmaci).
- Tossina della pertosse (PXT) e Adenilato ciclasi (AC) da *B. pertussis* (adiuvante mucosale).
- Immunotossine (terapia del cancro).

Tra le tossine elencate, il CNF1 rappresenta il principale oggetto dei nostri studi da molti anni (1).

### **Il Fattore Citotossico Necrotizzante 1 (CNF1) di *Escherichia coli***

*E. coli* è una delle principali cause di infezioni intestinali. Questo batterio, che fa parte della normale flora dell'intestino, diventa altamente patogeno in seguito all'acquisizione di geni codificanti fattori di virulenza, tra i quali il CNF1. I ceppi di *E. coli* produttori di CNF1 rappresentano i più comuni patogeni in molte infezioni extraintestinali, tra cui le infezioni del tratto urinario (2, 3) e, occasionalmente, vengono ritrovati nelle feci di bambini affetti da diarrea (4-6).

Il CNF1 è una proteina monomerică di circa 113 kDa che interagisce, sulla superficie delle cellule eucariotiche, con il suo recettore, recentemente identificato con il recettore della laminina (7). La tossina viene successivamente endocitata e rilasciata nel citoplasma mediante un meccanismo dipendente dall'acidificazione della vescicola endocitica (8). Una volta nel citoplasma, il CNF1 agisce sul suo bersaglio cellulare, rappresentato dalle piccole proteine G della famiglia Rho (Rho, Rac, Cdc42), una classe di proteine regolatorie altamente conservata (9). In particolare, la tossina deamida uno specifico residuo di glutammina, situato nello *switch 2* della proteina e cruciale nell'idrolisi del GTP [glutammina 63 in Rho (10, 11) e glutammina 61 (12) in Rac e Cdc42]. Modificando tale aminoacido in acido glutammico (9-12), il CNF1 stabilizza la proteina G nella forma attiva legata al GTP. L'attivazione sostenuta delle Rho GTPasi rende tali molecole, che normalmente sono stabili, molto più sensibili all'ubiquitinazione e alla degradazione attraverso la via del proteasoma, riducendo pertanto la loro quantità e attività all'interno della cellula (13). Mediante l'attivazione delle Rho GTPasi, il CNF1 è in grado di modulare numerose funzioni cellulari, quali il differenziamento (14), la trascrizione genica (15), la progressione del ciclo cellulare (16) e l'organizzazione del citoscheletro di actina (17). Inoltre, è stato dimostrato come il CNF1 non sia in realtà citotossico, come indica il nome, bensì favorisca la sopravvivenza cellulare rendendo le cellule resistenti a stimoli apoptotici (18). L'attività del CNF1 sulle Rho GTPasi, che rappresentano regolatori cruciali di molteplici funzioni cellulari (9) rende questa tossina un potenziale strumento farmacologico per diversi scopi terapeutici.

## Applicazioni terapeutiche

### Adjuvante dei vaccini

Studi passati hanno dimostrato come il CNF1, attivando le Rho GTPasi, induca la secrezione di citochine pro-infiammatorie e immunomodulanti (19, 20). L'analisi degli effetti immunomodulanti in un modello murino di somministrazione orale ha mostrato che, in maniera assimilabile alla tossina del colera, il CNF1 stimola una risposta adjuvante anti-ovoalbumina (OVA), sia sistemica che mucosale (21). Animali immunizzati per via orale con OVA, un prototipo di antigene solubile, e trattati contemporaneamente con CNF1 mostravano una risposta anticorpale IgG anti-OVA comparabile a quella stimolata dalla tossina del colera. Questo tipo di risposta non si osservava con il CNF1 C866S, un mutante della tossina reso enzimaticamente inattivo in seguito alla sostituzione della serina in posizione 866 con una cisteina, a dimostrazione del fatto che l'attività catalitica del CNF1 è essenziale per le proprietà adjuvanti della tossina. Allo stesso modo, la tossina dermonecrotica di Bordetella (DNT), una tossina attivante le Rho GTPasi strettamente correlata al CNF1, mostrava proprietà adjuvanti. Tali evidenze suggeriscono fortemente come il CNF1, oltre ad attivare effettori e regolatori della risposta immunitaria innata, possa anche stimolare il sistema immunitario adattativo. La modulazione delle proteine Rho fornisce pertanto un possibile approccio per lo sviluppo di nuovi immunoadjuvanti mucosali efficaci.

### Apprendimento e memoria

In questo contesto, abbiamo recentemente dimostrato come nel topo l'attivazione costitutiva delle Rho GTPasi, indotta da una singola iniezione intracerebroventricolare del CNF1, determini un riarrangiamento del citoscheletro di actina e un arricchimento dell'albero

dendritico nelle cellule neurali corticali, accompagnato dalla stimolazione della trasmissione sinaptica e da un miglioramento sostanziale dei processi di apprendimento e memoria (22). Tali effetti permangono per mesi e non si verificano in animali iniettati con il mutante enzimaticamente inattivo CNF1 C866S.

La plasticità sinaptica è il meccanismo neuronale alla base dell'apprendimento e della formazione delle memorie. È stato osservato, infatti, come le spine dendritiche possano cambiare forma in risposta all'esperienza ed essere eliminate o generate nel SNC dell'adulto (23). La morfologia delle spine dendritiche è determinata essenzialmente dall'organizzazione del citoscheletro di actina che, a sua volta, dipende dall'attività delle Rho GTPasi. Tali evidenze unite alle osservazioni da noi effettuate sulle cellule neuronali corticali primarie di topo suggeriscono come la modulazione farmacologica delle Rho GTPasi e del sistema citoscheletrico, potrebbe rappresentare una strategia efficace per migliorare la connettività neuronale associata ai processi di apprendimento e formazione delle memorie. Tali risultati sono stati oggetto di un brevetto (WO2006105998).

Il CNF1 può essere pertanto considerato un agente farmacologico con proprietà di stimolazione a lungo termine dell'apprendimento. Farmaci di questo tipo potrebbero essere potenzialmente impiegati non solo per migliorare l'apprendimento in pazienti sani, ma anche per correggere alterazioni della connettività della rete neurale in patologie caratterizzate da deterioramento delle facoltà cognitive, quali le diverse forme di ritardo mentale e la malattia di Alzheimer.

## Dolore infiammatorio

Molto recentemente, abbiamo riportato la capacità del CNF1 di contrastare il dolore di tipo infiammatorio indotto dalla formalina nel topo (24). La risposta analgesica dovuta al CNF1 richiede sia l'attivazione della Rac GTPasi, con conseguente rimodellamento dell'actina citoscheletrica cerebrale, sia l'up-regolazione dei recettori  $\mu$  per gli oppioidi (MOR). Questi ultimi, sono ritenuti i recettori più importanti nel controllo della percezione del dolore. Tali risultati sono stati oggetto di un brevetto (WO2007017914). Il ruolo cruciale di Rac è dimostrato dalla mancanza di attività analgesica nei topi trattati con la molecola del ricombinante inattivo CNF1 C866S, mentre l'importanza dei MOR è supportata dall'incapacità del CNF1 di indurre un effetto analgesico nei topi MOR-*knockout*. Inoltre, va sottolineato che l'effetto analgesico nei topi si ha sia in seguito a somministrazione periferica che centrale del CNF1. Quindi, considerati nel loro insieme, i nostri risultati forniscono un nuovo contributo alla comprensione dei meccanismi intracellulari coinvolti nella modulazione del dolore e indicano il CNF1 come un nuovo mezzo nel campo del controllo del dolore. È auspicabile che questo possa aprire la via a nuove strategie terapeutiche.

## Conclusioni

Sebbene le tossine batteriche siano estremamente dannose per l'organismo ospite nel corso di un'infezione, l'attività di molte di esse può essere sfruttata per scopi medici. Come sopra riportato, derivati di alcune tossine sono stati incorporate in vaccini umani a causa delle loro proprietà adiuvanti mentre altre tossine possono essere trasformate, mediante tecniche di ingegneria genetica, nella componente "killer" delle immunotossine. Alcuni di questi "proiettili molecolari" sono attualmente approvati per il trattamento di diverse forme di tumore. Inoltre, la ricerca sulle tossine ha portato all'impiego di tali proteine nel campo della cosmesi per la

riduzione delle rughe. In conclusione, la ricerca scientifica ha permesso di convertire queste pericolose molecole batteriche in farmaci potenti ed efficaci da impiegare per il trattamento di diverse patologie umane.

## Bibliografia

1. Fabbri A, Travaglione S, Falzano L, Fiorentini C. Bacterial protein toxins: current and potential clinical use. *Curr Med Chem* 2008;15(11):1116-25.
2. De Rycke J, Milon A, Oswald E. Necrotic Escherichia coli (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet Res* 1999;30(2-3):221-33.
3. Landraud L, Gauthier M, Fosse T, Boquet P. Frequency of Escherichia coli strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Lett Appl Microbiol* 2000;30(3):213-6.
4. Elliott SJ, Srinivas S, Albert MJ, Alam K, Robins-Browne RM, Gunzburg ST, Mee BJ, Chang BJ. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic Escherichia coli linked to human diarrhea. *Infect Immun* 1998;66(5):2040-61.
5. Okeke IN, Fayinka ST, Lamikanra A. Antibiotic resistance in Escherichia coli from Nigerian students, 1986-1998. *Emerg Infect Dis* 2000;6(4):393-6.
6. Paciorek, J. Virulence properties of Escherichia coli faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea. *J Med Microbiol* 2002;51(7):548-56.
7. Kim KJ, Chung JW, Kim KS. 67-kDa laminin receptor promotes internalization of cytotoxic necrotizing factor 1-expressing Escherichia coli K1 into human brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2005;280(2):1360-8.
8. Contamin S, Galmiche A, Doye A, Flatau G, Benmerah A, Boquet P. The p21 Rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step. *Mol Biol Cell* 2000;11(5):1775-87.
9. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002;420(6913):629-35.
10. Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, Boquet P. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 1997;387(6634):729-33.
11. Schmidt G, Sher P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* 1997;387(6634):725-9.
12. Lerm M, Selzer J, Hoffmeyer A, Rapp UR, Aktories K, Schmidt G. Deamidation of Cdc42 and Rac by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: activation of the C-Jun N-terminal kinase in HeLa cells. *Infect Immun* 1999;67(2):496-503.
13. Doye A, Mettouchi A, Bossis G, Clément R, Buisson-Touati C, Flatau G, Gagnoux L, Piechaczyk M, Boquet P, Lemichez E. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* 2002;111(4):553-64.
14. Travaglione S, Messina G, Fabbri A, Falzano L, Giammarioli AM, Grossi M, Rufini S, Fiorentini C. 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.
15. Boyer L, Travaglione S, Falzano L, Gauthier NC, Popoff MR, Lemichez E, Fiorentini C, Fabbri A. Rac GTPase instructs Nuclear Factor- $\kappa$ B activating by conveying the SCF complex and I $\kappa$ B- $\alpha$  to the ruffling membranes. *Mol Biol Cell* 2004;15(3):1124-33.
16. Falzano L, Filippini P, Travaglione S, Miraglia AG, Fabbri A, Fiorentini C. Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 blocks cell cycle G2/M transition in uroepithelial cells. *Infect Immun* 2006;74(7):3765-72.

17. Fiorentini C, Falzano L, Fabbri A, Stringaro A, Logozzi M, Travaglione S, Contamin S, Arancia G, Malorni W, Fais S. 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.
18. Giamboi Miraglia A, Travaglione S, Meschini S, Falzano L, Matarrese P, Quaranta MG, Viora M, Fiorentini C, Fabbri A. 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.
19. Falzano L, Quaranta MG, Travaglione S, Filippini P, Fabbri A, Viora M, Donelli G, Fiorentini C. Cytotoxic necrotizing factor 1 enhances reactive oxygen species-dependent transcription and secretion of proinflammatory cytokines in human uroepithelial cells. *Infect Immun* 2003;71 (7):4178-81.
20. Munro P, Flatau G, Doye A, Boyer L, Oregioni O, Mege JL, Landraud L, Lemichez E. Activation and proteasomal degradation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor-1 elicit a controlled inflammatory response. *J Biol Chem* 2004;279 (34):35849-57.
21. Munro P, Flatau G, Anjuère F, Hofman V, Czerkinsky C, Lemichez E. The Rho GTPase activators CNF1 and DNT bacterial toxins have mucosal adjuvant properties. *Vaccine* 2005;23(20):2551-6.
22. Diana G, Valentini G, Travaglione S, Falzano L, Pieri M, Zona C, Meschini S, Fabbri A, Fiorentini C. Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(2):636-41.
23. Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 2009;29(25):8206-14.
24. Pavone F, Luvisetto S, Marinelli S, Straface E, Fabbri A, Falzano L, Fiorentini C, Malorni W. The Rac GTPase-activating bacterial protein toxin CNF1 induces analgesia up-regulating mu-opioid receptors. *Pain* 2009;145(1-2):219-29.