

LA TOSSINA VACUOLIZZANTE DI *HELICOBACTER PYLORI*, VACA, FORMA CANALI IONICI IN MEMBRANE LIPIDICHE PLANARI

F. Tombola, C. Carlesso, I. Szabò, E. Papini, C. Montecucco e M. Zoratti

CNR Centro Studi Biomembrane, Dip. Scienze Biomediche Speriment., Università degli Studi di Padova, v. G. Colombo 3, 35121 Padova

La tossina VacA è il principale fattore di virulenza prodotto da *Helicobacter pylori*, un batterio responsabile di patologie gastroduodenali nell'uomo quali la gastrite cronica, l'ulcera peptica e l'adenocarcinoma gastrico. *In vitro* la tossina induce vacuolizzazione cellulare agendo su endosomi tardivi attraverso un meccanismo, solo parzialmente compreso, implicante la GTPasi monomerica Rab7. Tale azione vacuolizzante viene fortemente favorita dalla preesposizione della proteina a pH acido.

Lo studio qui presentato aveva lo scopo di stabilire se VacA fosse in grado di permeabilizzare membrane lipidiche planari in analogia con altre tossine batteriche.

Abbiamo dimostrato che l'inserzione spontanea di VacA, attivata per esposizione a pH acido, in membrane lipidiche planari produce un aumento della permeabilità agli ioni di tali membrane, dovuto alla formazione di pori a bassa conduttanza. Lo sviluppo dell'attività elettrofisiologica è preceduto da una fase di latenza e non richiede la presenza di componenti carichi negativamente nel doppio strato lipidico. La corrente indotta da VacA mostra una leggera rettificazione a potenziali cis-side positivi, indicando che la proteina si inserisce in membrana con orientazione preferenziale. Il canale formato dalla tossina è selettivo per gli anioni con la seguente scala di permeabilità relativa $\text{Cl}^- \approx \text{HCO}_3^- > \text{Piruvato}^- > \text{Gluconato}^- \geq \text{K}^+ \approx \text{Li}^+ \approx \text{Ba}^{2+} > \text{NH}_4^+$. Il rapporto di permeabilità $P_{\text{Cl}^-}/P_{\text{K}^+}$ è stato misurato in funzione del pH ed è risultato essere costante nell'intervallo 4.5-12. Questo fa ritenere che le cariche positive del filtro di selettività siano dovute a residui di Arginina. Da misure di singolo canale eseguite su VacA in 2 M KCl è emerso che la conduttanza elementare del canale varia col potenziale passando da 16 pS a +40mV a 27 pS a -100mV.

Questo studio ci consente di proporre un meccanismo per la formazione dei vacuoli in cellule esposte alla tossina, che prevede l'azione combinata di VacA, della pompa protonica V-ATPasi, il cui funzionamento è indispensabile per la vacuolizzazione, e dello scambiatore Na^+/H^+ pure presente nel compartimento endosomiale-vacuolare. L'influsso di anioni nel lume vacuolare indotto da VacA causerebbe una riduzione del potenziale transmembrana che consentirebbe l'accumulo di protoni all'interno del vacuolo, scambiati con Na^+ dallo scambiatore. Il risultante aumento della concentrazione intraluminale di NaCl causerebbe infine il richiamo di acqua dal citosol, per effetto osmotico, e il conseguente rigonfiamento del vacuolo.