

...dedicato alla mia famiglia

È il tempo, è la vita che ci dà la forza di guardare sempre avanti, che ci fa vivere di fronte a una speranza e ci crea nuovi orizzonti nel futuro.

È quel tenace gabbiano che vuole volare, librarsi nel cielo, garrire lontano.

È la libertà della vita che si tramuta in cuore e ci fa gioire.

È il sorriso di un delfino che ci sussurra l'infinito, il buio dei confini, la luce degli abissi, il mare dell'amore e l'amore del mare.

È la foto di una balena che si fa specchio della vitalità anche se il suo occhio è spento.

È l'immagine serena di un beluga che nuota che si fa veicolo della fantasia, bizzarra, profonda, infinita, reale, sonora...

Ali per volare, ali per pensare, ali per viaggiare, ali per nuotare veloce, ali per accudire il mare, ali blu, ali di manta, ali di pace e di echi profondi, di spazi grandi e piccoli granelli, di rocce dure ed alghe allegre, ali per la vita che vibra, che frastorna, che ci chiama.

RICHIAMI, Livia Monami

È delizioso restare immersi in questa specie di luce liquida che fa di noi degli esseri diversi e sospesi...

Paul Claudel

ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	7
LA TUBERCOLOSI: STORIA ED EPIDEMOLOGIA	7
I MICOBATTERI.....	9
<i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	10
<i>L' ENVELOPE DI MYCOBACTERIUM TUBERCOLOSI</i>	11
ENVELOPE DEI MICOBATTERI: MODELLO ATTUALE E PROPRIETA'	16
PORINE NEI MICOBATTERI.....	17
L'APPROCCIO VACCINOLOGICO COME PROFILASSI DELLA TUBERCOLOSI.....	18
LA SUPERFAMIGLIA DELLE PROTEINE PE	21
SCOPO DELLA TESI	25
MATERIALI E METODI	27
CEPPI BATTERICI, TERRENI E CONDIZIONI DI CRESCITA	27
PROCEDURE DI CLONAGGIO	27
ELETTROPORAZIONE di <i>M.smegmatis</i>	28
SAGGIO DI SENSIBILITA' ALLA PROTEINASI K	29
FRAZIONAMENTO CELLULARE	29
ESTRAZIONE CON IL GENAPOL.....	30
SDS-PAGE E WESTERN BLOT	30
IMMUNO ELETTRO MICROSCOPIA.....	31
RISULTATI	33
SAGGI DI DEGRADAZIONE CON LA PROTEINASI K SULLE CHIMERE PE-HA.....	33
LOCALIZZAZIONE CELLULARE DELLE PROTEINE CHIMERA PE-HA	35

ESTRAZIONE DELLE PROTEINE ASSOCIATE ALLA SUPERFICIE LIPIDICA.....	39
LOCALIZZAZIONE SULLA SUPERFICIE DELLE CELLULE DELLE CHIMERE BASATE SUL DOMINIO PE.....	40
<i>DISCUSSIONE</i>	45
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	53
<i>Ringraziamenti</i>	61
<i>Ringraziamenti...</i>	62

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) is the causative agent of tuberculosis, a chronic infectious disease that is responsible for the death of over two million people each year.

The genome of *Mtb* strain H37Rv is made up of 4,411,529 nucleotides and encodes about 3986 proteins. One of the major surprise risen from the genome sequence, published in 1998, is the presence of two large unrelated families of proteins with unknown functions. These protein families are referred to as PE/PPE family of genes.

The PE family of *Mycobacterium tuberculosis* includes 98 proteins which share a highly homologous N-terminus sequence of about 110 amino acids (PE domain). Depending on the C-terminal domain, the PE family can be divided in three subfamilies, the largest of which is the PE_PGRS with 61 members.

In this study, we determined the cellular localization of three PE proteins by cell fractionation and immunoelectron microscopy by expressing chimeric epitope-tagged recombinant proteins in *Mycobacterium smegmatis*. We demonstrate that the PE domains of PE_PGRS33 and PE11 (a protein constituted by the only PE domain) contain the information necessary for cell wall localization, and that they can be used as fusion partners to deliver a sufficiently long C-terminus-linked protein domain on the mycobacterial cell surface. Indeed, we demonstrate that PE_PGRS33 and Rv3097c (a lipase belonging to the PE family) are surface exposed and localize in the mycobacterial cell wall. Moreover, we found that PE_PGRS33 is easily extractable by detergents suggesting its localization in the mycobacterial outer membrane. Beyond defining the cellular localization of these proteins, and a function for their PE domains, these data open the interesting possibility to construct recombinant mycobacteria expressing heterologous antigens on their surface for vaccine purposes.

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) è l'agente eziologico della tubercolosi, una patologia che è responsabile della morte di oltre due milioni di persone ogni anno. Il genoma del ceppo H37Rv di *Mtb* è costituito da 4,411,529 nucleotidi e codifica per circa 3986 proteine. Una delle caratteristiche più interessanti, emersa dal sequenziamento del genoma, pubblicato nel 1998, è la presenza di due grandi famiglie di proteine la cui funzione è sconosciuta e i cui geni strutturali sono noti come PE e PPE.

La famiglia PE di *Mycobacterium tuberculosis* comprende 98 proteine che condividono una sequenza N-terminale altamente omologa di circa 110 amminoacidi (dominio PE). La famiglia PE può essere divisa in tre sotto famiglie, sulla base del dominio C-terminale, la più grande delle quali è la sottofamiglia PE_PGRS che comprende 61 elementi.

In questo studio abbiamo determinato la localizzazione cellulare di tre proteine PE, esprimendo differenti proteine chimera marcate con epitopi in *Mycobacterium smegmatis* (*Ms*), attraverso frazionamento cellulare e immuno elettro microscopia. Abbiamo dimostrato che i domini PE delle proteine PE_PGRS33 e PE11 (una proteina costituita dal solo dominio PE) contengono le informazioni necessarie per la localizzazione di tali proteine sulla parete cellulare e che essi possono essere utilizzati come partner di fusione per esprimere sulla superficie dei micobatteri domini proteici sufficientemente estesi fusi alla loro porzione C-terminale. Inoltre, abbiamo dimostrato che le proteine PE_PGRS33 e Rv3097c (una lipasi appartenente alla famiglia PE) sono esposte sulla superficie dei micobatteri e sono localizzate sulla parete cellulare dei batteri. Infine abbiamo dimostrato che la proteina PE_PGRS33 è facilmente estraibile con detergenti, ciò indica fortemente la sua localizzazione sulla membrana esterna dei micobatteri.

Oltre a definire la localizzazione cellulare di queste proteine, e una funzione per i rispettivi domini PE, tali dati aprono prospettive interessanti per la progettazione e la costruzione di nuovi ceppi ricombinanti di micobatteri che esprimano antigeni eterologhi sulla loro superficie a scopo vaccinale.

INTRODUZIONE

LA TUBERCOLOSI: STORIA ED EPIDEMIOLOGIA

La tubercolosi è una malattia infettiva le cui origini risalgono a tempi molto antichi. Le prime tracce sono state ritrovate su scheletri del neolitico (oltre 4000 anni a.C.), in mummie egiziane (3000 a.C.) e in Sud America (5000 a.C.).

In Europa nei secoli XVIII-XIX la peste bianca fu la principale causa di morte indotta da condizioni di vita poco salubri e dalla scarsa nutrizione (Cole, 2002).

La tubercolosi fu descritta nei suoi sintomi caratteristici e nel suo decorso dai medici francesi G.L. Bayle e R. Laennec all'inizio del XIX secolo (Richeldi, 2003). Nel 1882 Robert Koch (Fig.1) condusse una serie di esperimenti che lo portarono a far chiarezza sull'eziologia della tubercolosi, formulando i “ Postulati di Koch” e affermando che:

1. Gli organismi sospetti devono essere presenti nelle lesioni in tutti i casi di malattia.
2. Deve essere possibile isolare i microrganismi sospetti in coltura pura a partire dalle lesioni.
3. Deve essere possibile riprodurre la malattia iniettando o altrimenti introducendo i microrganismi in un animale sano.



Figura 1 Robert Koch

Così nel 1882 Koch riuscì ad isolare *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), dimostrando nel porcellino d'India che lo stesso micobatterio è l'agente eziologico della tubercolosi nell'uomo (Koch, 1882).

Nel 1890 lo stesso Koch sviluppò il test della tubercolina (un estratto proteico di *M. tuberculosis*) per la diagnosi della malattia; sebbene non ebbe il risvolto terapeutico desiderato, ancora oggi la tubercolina è un importante strumento diagnostico per la risposta di ipersensibilità di tipo ritardato al bacillo tubercolare. Successivamente con la scoperta della Streptomina (Schatz e Waksam, 1940), dell'acido para-ammino-salicilico “PAS” (Lehmann, 1940), dell'isoniazide “INH” e della parazinamide “PZA” la tubercolosi non risultò più incurabile grazie ad una terapia combinatoria di molteplici farmaci (Gomez, 2004).

Quaranta anni più tardi la tubercolosi colpì la popolazione di New York, interessando soprattutto pazienti HIV-positivi immunodeficienti.

Nel 1991 l'OMS (organizzazione mondiale della sanità) rese noto che la malattia si stava di nuovo diffondendo su scala mondiale per quattro ragioni principali:

- la diffusione dell'infezione da HIV
- l'aumento degli spostamenti (viaggi ed emigrazioni)
- la scarsa opera di prevenzione e cura, soprattutto a livello delle fasce sociali a maggior rischio di infezione
- l'uso improprio di farmaci che ha indotto la comparsa di ceppi resistenti (*multi drug-resistant* MDR-TB). In particolare furono definiti tali i ceppi di *M.tuberculosis* resistenti ai farmaci di prima linea Isoniazide e rifampicina.

L'incidenza della tubercolosi è critica soprattutto in tre aree del mondo ben distinte; nell'Africa Subsahariana e del Sud dove nel 60% dei casi di infezione da tubercolosi si registra anche la presenza del virus HIV; nei paesi dell'America latina (Perù e Bolivia) e in alcuni paesi dell'ex Unione Sovietica (Kazakistan) dove il rapido aumento dell'infezione è dovuto al brusco crollo dei sistemi sanitari o dell'area asiatica come India e Mongolia (*World Health Organization*); per questo motivo l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha messo a punto dei programmi per controllare il propagarsi dell'infezione.

La strategia messa in atto prende il nome di DOTS (directly observed treatment short-course) e si è dimostrata uno strumento valido nel consentire il completamento della terapia farmacologica nel maggior numero di casi possibile e nel prevenire l'insorgenza di nuovi ceppi MDR (Corbett e Raviglione, 2005).

Essa consiste in 5 punti:

1. impegno dei governi nel controllo della tubercolosi
2. individuazione dei casi di tubercolosi attraverso analisi al microscopio di strisci d'espettorato
3. fornitura regolare di farmaci antitubercolosi
4. supervisione regolare per 6-8 mesi del trattamento, con osservazione diretta dell'assunzione dei farmaci almeno nei primi due mesi.
5. monitoraggio dei progressi del trattamento e dell'andamento del programma stesso.

Anche se l'attenzione posta dai governi per il controllo globale della tubercolosi è cresciuta e si abbia una conoscenza più approfondita dell'agente eziologico, molte sfide restano ancora da affrontare; prima fra tutte quella di limitare l'insorgenza di ceppi di *Mtb* “*extensively drug resistant*” (XDR-TB), resistenti ai farmaci di prima e seconda linea utilizzati nella profilassi odierna. Inoltre è urgente la necessità di sviluppare un nuovo vaccino che consenta di limitare il diffondersi dell'infezione, infatti secondo l'Organizzazione mondiale della Sanità, un terzo della popolazione è attualmente infettato da *Mtb*, di cui l'80% ha un'età compresa tra i 15 e i 49 anni.

I MICOBATTERI

I micobatteri appartengono all'ordine degli *Actinomycetales*, alla famiglia delle *Mycobacteriaceae* e al genere *Mycobacterium* (Murray *et al.*, 2005).

Al microscopio presentano una forma bastoncellare di lunghezza pari a 2-4 μm e di larghezza compresa tra 0.3-0.5 μm . Sono aerobi obbligati, asporigeni, immobili e crescono preferibilmente a 37 °C.

Le specie di questo genere mostrano grande variabilità, benché per convenzione vengano classificati sulla base di diversi parametri come ad esempio la pigmentazione che assumono in presenza o meno di luce e sulla base della velocità di crescita.

La maggior parte dei micobatteri è ambientale, con la capacità di degradare composti organici come il cloruro di vinile e il fenantrene, e la produzione di metaboliti secondari come steroidi e ossidi di alcheni otticamente attivi.

Queste specie di micobatteri fanno parte della così detta classe MOTTs (*Mycobacterium other than tuberculosis*).

A tale classe si contrappone il “*Mycobacterium tuberculosis complex*” costituito da quei microrganismi in grado di indurre una forma di tubercolosi con fenotipo simile a quello riscontrato nella tubercolosi che colpisce l'uomo.

In questo gruppo rientrano: *M. tuberculosis* patogeno per l'uomo, *Mycobacterium bovis* patogeno per gli animali, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti* e *Mycobacterium africanum*.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Nella storia dell'uomo *M. tuberculosis* si è rivelato essere un patogeno di grande successo, grazie ad una serie di caratteristiche che vanno ad affiancarsi a quelle condivise con tutti gli altri membri del genere *Mycobacterium*.

M. tuberculosis è un aerobio obbligato come tutti gli altri micobatteri, cresce ad una temperatura ottimale di 37 °C, e presenta un tempo di replicazione molto elevato che può variare dalle 18 alle 24 ore.

Quest'ultima caratteristica contribuisce a dare la natura cronica della malattia, imponendo lunghi periodi di trattamenti terapeutici e recando un grosso ostacolo alla ricerca. In laboratorio questo problema viene superato utilizzando *Mycobacterium smegmatis* (*Ms*), un microrganismo ambientale non patogeno e con un ciclo replicativo di 3 ore.

M. tuberculosis cresce preferibilmente in tessuti aventi elevata pressione parziale di ossigeno come gli apici polmonari.

Il bacillo è inoltre in grado di modificare il proprio stato metabolico entrando in una condizione di quiescenza per cui, nonostante la presenza di una lesione tubercolare, l'ospite non manifesta nessun sintomo di malattia.

M. tuberculosis presenta una tipologia di parete (discussa in seguito) assolutamente specifica nel suo genere che non è classificabile né come quella dei batteri Gram + né come quella dei Gram-.

Numerosi aspetti dei micobatteri sono stati associati alla peculiarità della loro parete, che è caratterizzata dalla presenza di un doppio strato asimmetrico ricco in cere che rappresenta una barriera di permeabilità a molecole polari. La presenza di questa barriera, costituita per il 60 % del proprio peso secco da lipidi, giustifica la loro limitata permeabilità e la loro intrinseca resistenza ad agenti chimici forti (Engleberg *et al.*, 2006).

Altre caratteristiche di *M. tuberculosis* sono state evidenziate grazie al sequenziamento del genoma del ceppo H37Rv (Cole *et al.*, 1998). Il genoma circolare comprende 4.411.529 paia di basi che codificano per circa 4000 geni con un contenuto in GC pari al 65,6%.

Con l'utilizzo della bioinformatica è stato possibile identificare 3.924 "open reading frame" responsabili di circa il 91% della potenziale attività di codifica. Con l'utilizzo di altre banche dati, e dal confronto del genoma di *M. tuberculosis*

con altre sequenze note, è stato possibile identificare la funzione del 40% di tali proteine, mentre per altre 44% si sono individuate informazioni e similarità.

Per il restante 16% non si sono ritrovate somiglianze con altre proteine note, ciò significa che si tratta di proteine con funzioni specifiche ed uniche del micobatterio. (Cole *et al.*, 1998).

Inoltre analisi del proteoma hanno condotto all'identificazione di due ampie famiglie proteiche (PE e PPE), codificate da una porzione consistente del genoma micobatterico (10%) e la cui composizione amminoacidica differisce in maniera significativa dalla maggioranza delle proteine espresse da *Mtb*.

Un'altra singolare caratteristica rilevata dal sequenziamento, è rappresentata dall'elevato contenuto di geni codificanti per enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi (più di 250 in *M. tuberculosis* in contrasto con i soli 50 in *Escherichia coli*). L'abbondanza di questi geni è coerente con la presenza sulla superficie dei micobatteri di un'ampia varietà di molecole lipidiche

L' ENVELOPE DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

La superficie cellulare del batterio, andando dall'interno verso l'esterno, schematicamente comprende: (i) la membrana plasmatica; (ii) la parete cellulare; (iii) la capsula (Fig. 2).

MEMBRANA PLASMATICA

La membrana plasmatica dei micobatteri risulta non simmetrica per spessore e composizione. In particolare il foglietto esterno del *bilayer* lipidico è caratterizzato dalla presenza di fosfatidil inositol mannosidi (PIMs). I principali componenti oltre ai citati PIMs della membrana plasmatica sono fosfatidil e difosfatidil glicerolo (PG e DPG), fosfatidil etanol ammina (PE), fosfatidil inositolo (PI). Altri componenti associati alla membrana sono i carotenoidi, coinvolti nella protezione da possibili danni arrecati dalla luce, e i menachinoni, legati al trasporto degli elettroni (Brennan *et al.*, 1995).

PARETE CELLULARE

La parete cellulare costituisce una delle peculiarità di *M. tuberculosis* e viene ritenuta fondamentale per la sua sopravvivenza nell'ospite e per la patogenicità del batterio. La parete è spessa, ricca di componenti cerosi e presenta una struttura abbastanza complessa. Può essere divisa in due strati:

- il “core” costituito da peptidoglicano (PG), arabinogalattano (AG) e acidi micolici (Liu *et al.*, 1999);
- uno strato di cere, composto da lipidi anfipatici, legati non covalentemente agli acidi micolici;

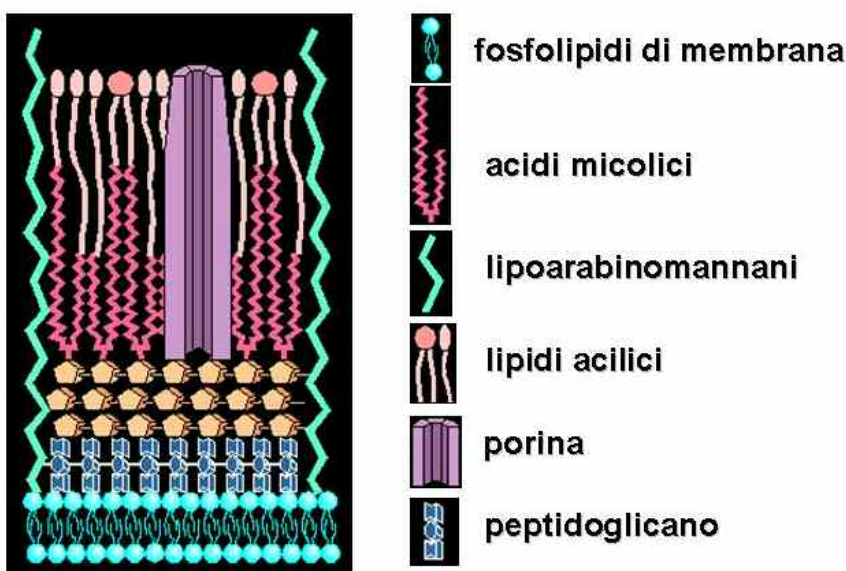


Figura 2. Rappresentazione schematica della parete dei micobatteri

PEPTIDOGLICANO

Il peptidoglicano che si ritrova nella parete di *M. tuberculosis*, è simile nella sua struttura a quello ritrovato in altri batteri con due caratteristiche particolari:

il polimero è composto da unità disaccaridiche alternate di N-acetilglucosamina (NAG) e acido N-glicosilmuramico (MurNGly) (glicosilato e non acetilato come è solitamente presente in altre specie batteriche), con le catene laterali tetrapeptidiche costituite dai residui: L-alanina, acido D- glutammico, acido diaminopimelico (DAP) e D-alanina.

Tali peptidi servono a mantenere insieme le catene di NAG e MurNGly e il *cross-linking* è generato oltre che tra un'alanina e un ac. diaminopimelico, anche tra due molecole di quest'ultimo.

Il peptidoglicano è legato al polimero successivo, l'arabinogalattano, attraverso un ponte diglicosilfosforilico, costituito da ramnosio e N-acetil-glucosammina. (Brennan *et al.*, 1995).

ARABINOGALATTANO

L'arabinogalattano rappresenta il maggior polisaccaride di parete, con una struttura alquanto singolare; si tratta infatti di un polisaccaride ramificato complesso, dove i residui di zuccheri (arabinosio e galattosio) che lo compongono, sono presenti in forma furanosinica (struttura dell'anello a cinque atomi di carbonio) piuttosto che in forma piranosinica (a sei atomi di carbonio).

È associato al peptidoglicano attraverso un legame fosfodiesterico alla posizione 6 di circa il 10-12% dei residui di ac. muramico (Brennan *et al.*, 1995).

I micobatteri sono gli unici agenti patogeni noti che contengono sia il galattofuranosio, sia l'arabinofuranosio in un componente strutturale essenziale della parete.

ACIDI MICOLICI

Gli acidi micolici rappresentano il tratto distintivo dei micobatteri, nonché la maggiore componente della parete (Kolattukudy *et al.*, 1997). Si tratta di acidi grassi complessi, α -alchilati β -idrossilati, caratterizzati da una lunga catena di atomi di carbonio (C₆₀-C₉₀).

Sono i costituenti base dei micosidi; essi infatti sono legati covalentemente da legami esterei alla struttura dell'esa-arabinosio, presente al termine dell'arabinogalattano ramificato, e quattro micolati legano cinque arabinosi.

Gli acidi micolici, se sottoposti a scissione pirolitica (300°C), formano un acido grasso α -ramificato indicato come componente α , ed un'aldeide indicata come componente meromicolato, che possono essere analizzati separatamente. Questi due componenti sono sintetizzati in *M. tuberculosis* da sistemi differenti di

enzimi e solo in seguito vengono condensati insieme a formare un acido micolico tipico.

In *M. tuberculosis* sono state ritrovate tre classi di acidi micolici che differiscono tra loro per la presenza di gruppi funzionali diversi nella componente meromicolato; esse sono:

1. Acidi α -micolici: presentano in forma sia *cis* che *trans* (con ramo metilico adiacente) l'insaturazione e i ciclopropani.
2. Acidi metossi-micolici: possiedono un gruppo metossi con un doppio legame o anello ciclopropanico.
3. Acidi chetomicolici: contengono un chetone ramificato α - metilico.

Gli acidi micolici rappresentano il 50% del peso secco dell'*envelope*, sono molto idrofobici e formano un guscio protettivo che conferisce rigidità alla parete;

CERE

La presenza di glicolipidi complessi caratterizzati da ramificazioni carboniose molto lunghe rappresenta una caratteristica unica dell'*envelope* dei micobatteri e di quelli patogeni in particolare (Jackson *et al.*, 2007). Tali cere interagiscono con gli acidi micolici legandosi ad essi in modo non covalente attraverso le loro porzioni lipidiche ed interagiscono con la capsula per mezzo della loro componente idrofila rappresentata da uno zucchero.

Un glicolipide associato, oggetto di studi approfonditi è in particolare il dimicoil-trealoso (DAT) meglio conosciuto con il nome di *fattore cordale*. Nei micobatteri patogeni si è potuto constatare che su certi terreni di coltura, l'assenza di tale componente determina l'incapacità da parte del batterio di svilupparsi in fasci serpentiformi (Brennan, 2003).

E' stato dimostrato inoltre come lo ftiocerol dimicocerosato (PDIM), un ulteriore componente di superficie dei micobatteri, sia importante per la replicazione di *Mtb* durante le fasi acute dell'infezione in modelli murini. Inoltre tale componente dello strato esterno conferisce ai batteri una maggiore resistenza verso lo stress ossidativo provocato dall'ossido nitrico (NO) prodotto dai macrofagi attivati (Rousseau *et al.*, 2004).

Oltre ai citati componenti di superficie è importante ricordare un'altra struttura piuttosto complessa quale è quella del *lipoarabinomannano*: esso presenta un nucleo di residui di mannosio a cui si legano catene multiple e ramificate di arabinofuranosile ricoperte da mannosio ed una unità di fosfaditilinositolo ancorata alla membrana citoplasmatica. Tale molecola complessa attraversa l'intera parete micobatterica e la ancora covalentemente alla membrana plasmatica (Brennan *et al.*, 1995).

CAPSULA

La parte più esterna dell'envelope di *M. tuberculosis*, cioè la capsula, è costituita da una miscela di polisaccaridi (glucano, arabinomannano, mannano, xilano), proteine e lipidi (Ortalo *et al.*, 1995).

E' stato dimostrato che la capsula è prodotta dal batterio ed è presente in tutte le specie micobatteriche, sebbene possa presentarsi di spessore diverso a seconda della specie considerata. La composizione approssimativa per la capsula, espressa in percentuale, è riportata nella tabella sottostante:

COSTITUENTI	% PRESENTE
Polisaccaridi	30-55 %
• glucano	70%
• arabinomannano- mannano	28%
• xilano	2%
Proteine	55-60%
Lipidi	5-8%

Tabella 1. Composizione espressa in percentuale della capsula di *Mycobacterium tuberculosis*.

Come è evidente dai dati riportati in tabella, nella capsula è presente una quantità esigua di lipidi, la maggior parte dei quali è presente nella parte più interna di questa, mentre abbonda di polisaccaridi e proteine.

ENVELOPE DEI MICOBATTERI: MODELLO ATTUALE E PROPRIETA'

Come descritto in precedenza l'*envelope* dei micobatteri possiede una struttura complessa ed è composto da differenti tipi di macromolecole. Oggi uno dei modelli più accreditati per descrivere questa struttura è quello proposto per la prima volta da Minnikin all'inizio degli anni ottanta (Minnikin, 1982). In questo modello si propone la presenza di una membrana esterna atipica, costituita dagli acidi micolici (foglietto interno) e dalle cere (foglietto esterno) che si associano ad essi in modo non covalente. Lo spazio tra la membrana plasmatica e la membrana esterna, dove il peptidoglicano è legato covalentemente all'arabinogalattano, è definito periplasma. Al momento la composizione proteica della membrana esterna e del periplasma è scarsamente caratterizzata (Cascioferro *et al.*, 2007).

In conclusione si può affermare che l'*envelope* dei micobatteri costituisce una barriera protettiva formidabile e ciò è dovuto principalmente a due motivi (Niederweis, 2003): (i) la membrana esterna dei micobatteri è più spessa di qualsiasi altra membrana a causa della lunghezza degli acidi micolici e possiede uno spessore di circa 9-10 nm. (ii) Nella membrana esterna il foglietto interno di acidi micolici è ancorato covalentemente alla parete dei batteri contribuendo alla scarsa fluidità di tale struttura. Tutto ciò conferisce ai micobatteri le seguenti proprietà:

- resistenza alla decolorazione da parte di soluzioni alcoliche acide dopo colorazione con soluzioni calde di fucsina basica (proprietà sfruttata nella colorazione di Ziehl- Nielsen per differenziare i micobatteri da altri microrganismi);
- resistenza ad acidi e basi forti, alcali ed ipoclorito (sostanze presenti nei fagosomi);
- impossibilità di accesso a molti antimicrobici come ad esempio i β -lattamici;
- resistenza alle proprietà battericide delle cellule fagocitiche;
- permeabilità verso piccole molecole lipofile.

A causa della bassa permeabilità e fluidità di superficie le porine nei micobatteri assumono un ruolo di grande importanza ai fini dell'acquisizione dei nutrienti essenziali alla sopravvivenza dei batteri.

PORINE NEI MICOBATTERI

La considerazione che oggi si possiede sulle porine nei micobatteri è duplice; da una parte sono importanti come ricordato sopra per l'acquisizione da parte delle cellule di sostanze nutrienti, ma dall'altra lo sono in ambito medico poiché si ritiene che esse siano responsabili dell'influsso all'interno dei batteri dei farmaci idrofilici di prima linea isoniazide, etambutolo e pirazinamide (Niederweiss, 2003). Al momento nessuna porina è stata identificata in *M.tuberculosis*, anche se come tale è stata proposta la proteina OmpATb, un omologo della porina OmpA di *Escherichia coli* (*E.coli*). Successivamente però è stato dimostrato come questa fosse una proteina coinvolta nella difesa del batterio dallo stress dovuto al pH acido e come fosse implicata nella sopravvivenza dei micobatteri all'interno dei macrofagi e dei topi (Niederweis, 2003).

Ad oggi la proteina MspA di *M.smegmatis* (*Ms*) è l'unica porina identificata nei micobatteri (Niederweis *et al.*, 1999). E' stato dimostrato infatti come il ceppo di *Ms* privo di tale porina ($\Delta mspA$) perdesse la sua capacità di acquisire molecole idrofiliche come glucosio e cefalosporine. Tale ridotta permeabilità di *Ms* è stata associata inequivocabilmente alla mancata espressione da parte dei batteri della porina MspA (Stahl *et al.*, 2001). L'intera proteina possiede un peso molecolare di 20 KDa e se espressa in forma monomerica risulta inattiva, mentre nella sua forma tetramerica e attiva possiede un peso molecolare superiore ai 100 KDa. Inoltre si è osservato che MspA nel suo stato attivo forma un unico poro di 10 nm di lunghezza (Engelhardt *et al.*, 2002). Tale arrangement è completamente diverso da quello delle porine trimeriche dei batteri Gram- che possiedono un poro per monomero e una estensione di questo canale che è di circa 4 nm (Koebnik *et al.*, 2000).

Si è accennato in precedenza alla bassa permeabilità dell'*envelope* dei micobatteri. E' forse possibile spiegare questo fenomeno considerando due fattori: (i) il basso numero di porine espresso sulla membrana esterna dei batteri e (ii) la considerevole lunghezza dei relativi pori rispetto ad esempio alle porine presenti

nei batteri Gram-. E' stato dimostrato come sulla superficie di *M.smegmatis* siano presenti circa 1000 porine MspA per μm^2 (Engelhardt *et al.*, 2002), un numero 15 volte inferiore alla densità di porine presenti sulla membrana esterna dei batteri Gram- (Kessel *et al.*, 1998). Questo dato è equivalente ad un numero di pori presenti sulla membrana esterna dei micobatteri inferiore di 45 volte rispetto ai Gram-, infatti ad ogni molecola di MspA corrisponde un unico poro, mentre ad ogni porina di *E.coli* ne corrispondono tre (Cowan *et al.*,1992).

Infine si deve considerare la maggiore lunghezza dei pori delle porine dei micobatteri. Risulta intuitivo che la velocità di diffusione di un soluto sarà inferiore se esso deve affrontare un percorso più lungo e sviluppare un maggior numero di interazioni per poterlo attraversare. In conclusione, la bassa permeabilità mostrata anche da altre specie di micobatteri potrebbe essere riconducibile alle medesime motivazioni considerando la scarsa quantità di porine osservata su differenti specie di micobatteri (Kartmann *et al.*,1999, Lichtinger *et al.*,1999).

La necessità di caratterizzare le porine da un punto di vista strutturale e biochimico costituisce oggi uno dei campi di maggior interesse nel campo della ricerca sulla tubercolosi. La conoscenza dei meccanismi che regolano l'influsso di composti idrofili, quali nutrienti o farmaci, può portare alla caratterizzazione di nuovi bersagli molecolari e alla progettazione di nuovi farmaci che siano efficaci nel trattamento chemioterapico contro la tubercolosi. Infatti l'approccio chemioterapico è attualmente l'unico utile a fronteggiare *M.tuberculosis*, visto che il vaccino esistente *M.bovis* BCG non risulta efficace.

L'APPROCCIO VACCINOLOGICO COME PROFILASSI DELLA TUBERCOLOSI

Il bacillo di *Calmette* e *Guerin* (conosciuto come BCG) è ad oggi l'unico vaccino disponibile per la prevenzione della tubercolosi. E' stato distribuito a partire dal 1920 ed oggi più di tre miliardi di individui sono stati vaccinati con tale vaccino. Esso contiene microrganismi vivi di un ceppo bovino e attenuato del bacillo tubercolare, quale è *M.bovis*. Tale ceppo attenuato è stato ottenuto da *Calmette* e *Guerin* attraverso passaggi seriali delle loro colture di *M.bovis* su fettine di patata

imbevute con il glicerolo e monitorando la riduzione della loro virulenza (Brosch *et al.*, 2007).

E' stato dimostrato che BCG risulta essere protettivo contro particolari forme di tubercolosi che affliggono i bambini (ad es. tubercolosi miliare e meningite tubercolare), raggiungendo una percentuale di copertura pari all'80% dei casi (Fine, 1995). Tuttavia la protezione conferita da BCG contro la tubercolosi polmonare, che rappresenta la patologia più grave e frequente nella popolazione adulta, può variare da 0% all'80% a seconda della popolazione, del paese, e del ceppo di BCG utilizzato.

Sono state avanzate diverse idee per spiegare lo scarso effetto protettivo di BCG contro la tubercolosi polmonare. Infatti esistono fattori legati direttamente al vaccino come un trattamento inadeguato, condizioni scorrette di mantenimento di questo o ceppi di BCG non adeguati che possono influire pesantemente sulla capacità protettiva della preparazione di BCG utilizzata per la vaccinazione.

Inoltre sono molte le ipotesi che contemplano un deficit nell'induzione di una corretta risposta immunitaria da parte di BCG. Si ritiene che ciò sia dovuto principalmente alle seguenti cause (Agger e Andersen., 2002):

- BCG non è in grado di indurre i sottogruppi di cellule T appropriati ed in particolare le cellule CD8⁺;
- BCG manca di importanti antigeni come l'antigene Mpt64. Questa proteina costituisce uno degli antigeni immuno dominanti di *M.tuberculosis* e fa parte del *repertoire* di antigeni secreti dal batterio durante il processo infettivo;
- Micobatteri ambientali interagiscono con BCG. Esiste la possibilità che la pre esposizione a micobatteri ambientali possa inficiare l'efficacia del vaccino.

I tentativi attuali di sviluppare una strategia vaccinale per *Mtb* seguono principalmente due approcci: il primo prevede la sostituzione di BCG con un vaccino più efficace, il secondo un vaccino di richiamo che sfrutti la precedente vaccinazione effettuata con BCG durante l'infanzia dei soggetti (Andersen, 2007). Per quanto riguarda il primo approccio, quello che si cerca di ottenere sono ceppi di micobatteri ottenuti o attraverso la delezione di geni per ottenere nuovi mutanti attenuati di *M.tuberculosis* oppure re introducendo importanti antigeni o altri

fattori nel pre esistente vaccino BCG. Tali nuovi vaccini non solo devono risultare più potenti nel generare una protezione di BCG, ma devono essere testati per valutarne la sicurezza prima di essere considerati per eventuali *trials* clinici.

Ad oggi sono due i ceppi ricombinanti di BCG (rBCG) che hanno affrontato, o sono in procinto di farlo, test clinici: rBCG30 e rBCG $\Delta ureC:Hly$.

Il primo è un ceppo di BCG che esprime sotto il controllo di un promotore forte l'antigene 85B (Ag85B). La sua aumentata espressione risulta in un aumento della risposta verso questo antigene benché esso sia già prodotto e secreto da BCG (Horwitz *et al.*, 2003).

Il secondo è progettato per aumentare la risposta delle cellule T CD8⁺ dovuta a BCG. Infatti tale ceppo ricombinante esprime la listerio lisina che ha il compito di perforare la membrana del fagosoma e permettere alle componenti dei micobatteri di arrivare al citosol, di essere processate dal sistema MHC-I e di essere presentate con maggiore efficacia alle cellule T CD8⁺. Inoltre è stato deleto il gene che codifica per l'ureasi di BCG per garantire un pH sufficientemente acido nel fagosoma e l'attività della listerio lisina (Grode *et al.*, 2005).

La seconda strategia prevede come detto una sorta di richiamo al primo vaccino effettuato con BCG. Lo scopo di tale metodo è quello di ottenere un aumento della risposta immunitaria e di prolungare l'immunità in modo da proteggere anche la popolazione adulta. Questo tipo di vaccinazione si ritiene possa essere sviluppata mediante la costruzione di vaccini a sub unità, basati su un numero ristretto di antigeni fusi in poliproteine in modo da amplificare le proprietà immunogene di essi. La molecola di fusione Ag85B-ESAT6 (definita H1) unisce due tra gli antigeni secreti da *M.tuberculosis* ed è risultata promettente se somministrata per via parenterale o mucosale (Agger *et al.*, 2006, Dietrich *et al.*, 2006). Tale vaccino sta affrontando un trial clinico su individui PPD positivi dopo che nel precedente su individui PPD negativi si era dimostrato sicuro e fortemente immunogenico.

Eventualmente si può pensare anche ad una strategia combinata (*prime-boost vaccination*), che preveda una prima vaccinazione con il miglior candidato tra i vaccini vivi e un richiamo con il miglior candidato tra i vaccini a sub unità (Andersen, 2007). Ma al momento la vera questione da definire è quale sia la relazione tra la risposta immunitaria a BCG e la effettiva protezione generata nei

soggetti vaccinati. Gli studi in tale direzione sono molti e fortunatamente supportati, almeno da circa dieci anni, dalla conoscenza del genoma di *M.tuberculosis*. Le informazioni derivanti da tale conoscenza hanno segnato un vero e proprio spartiacque nell'approccio alla comprensione della biologia di questo organismo che ha subito una sensibile accelerazione.

LA SUPERFAMIGLIA DELLE PROTEINE PE

Una delle caratteristiche più interessanti del genoma di *M.tuberculosis* è la presenza di due famiglie multigeniche che insieme rappresentano circa il 10% del potenziale codificante del batterio. Tali due famiglie proteiche, chiamate PE e PPE, sono caratterizzate da un dominio N-terminale di circa 100 e 180 amminoacidi rispettivamente (Cole *et al.*, 1998). I nomi PE e PPE derivano dai motivi conservati Pro-Glu e Pro-Pro-Glu, di solito presenti nei primi dieci amminoacidi di queste proteine.

Nel genoma del ceppo H37Rv di *M.tuberculosis* sono stati annotati circa 100 geni PE (Cole *et al.*, 1998), sebbene sembra che alcuni di questi non siano funzionali (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Sulla base della loro struttura le proteine PE possono essere divise in tre classi principali (Fig. 3): (i) in questa prima classe (17 membri) il dominio PE è seguito da una regione C-terminale che può estendersi fino a 400 amminoacidi e che risulta unica tra le sequenze note nei database (PE a sequenza unica); (ii) la seconda classe (20 membri) è composta da proteine costituite dal solo dominio PE, il cui gene è seguito di solito da un gene codificante per una proteina PPE (Strong *et al.*, 2006; Tundup *et al.*, 2006); (iii) infine la terza classe che è la più numerosa (61 membri). In questo caso il dominio PE è seguito al suo C-terminale da una sequenza ricca di glicine e alanine altamente variabile (PE_PGRS) (Cole *et al.*, 1998; Brennan e Delogu, 2002).

Alcuni geni strutturali PE e PPE si trovano fisicamente all'interno delle regioni che codificano per i *cluster* di geni ESAT-6 (*esx*), che codificano per nuovi sistemi di secrezione nei micobatteri.

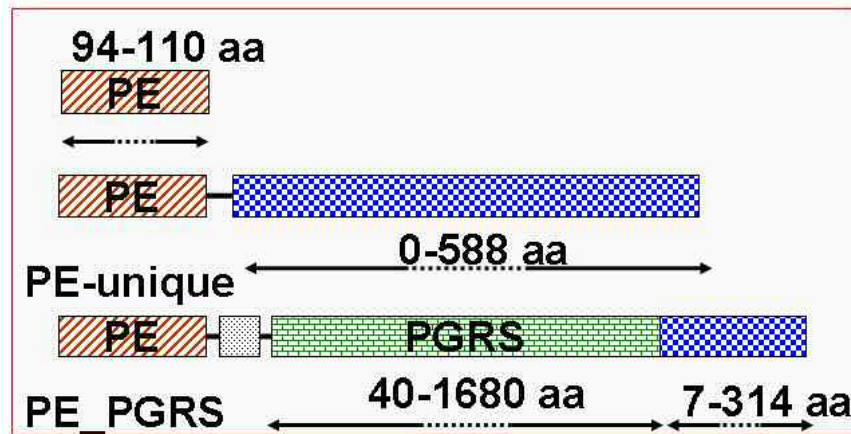


Figura 3. Rappresentazione schematica delle tre classi delle proteine PE.

In una pubblicazione recente Gey van Pittius e colleghi (2006) hanno dimostrato che le coppie dei geni strutturali PE-PPE associate ai *cluster* ESAT-6 rappresentano i membri ancestrali di queste famiglie multigeniche e che la loro espansione è legata alla duplicazione dei *cluster* ESAT-6.

Inoltre mentre le coppie PE-PPE associate ai *cluster* ESAT-6 sono distribuite ampiamente tra gli actinomiceti, i geni PE_PGRS sembrano essere il risultato di un evento evolutivo recente e sono presenti solo nei membri del *M.tuberculosis complex* e in alcuni delle specie a loro più prossime come *Mycobacterium ulcerans* e *Mycobacterium marinum* (Gey van Pittius *et al.*, 2006).

Nonostante il grande interesse per le proteine PE nella comunità scientifica, la loro funzione rimane ampiamente sconosciuta e le ipotesi che sono state proposte negli ultimi anni aspettano di essere validate sperimentalmente. E' stato proposto che le PE_PGRS possano essere implicate nella virulenza (Ramakrishnan *et al.*, 2000) e nelle strategie di evasione dal sistema immunitario impiegate da *M.tuberculosis* per sopravvivere a lungo nei tessuti dell'ospite, costituendo per il batterio una fonte di variabilità antigenica oppure inibendo il meccanismo di processamento degli antigeni presentati alle cellule T via MHC-I (Cole *et al.*, 1998; Brennan e Delogu, 2002). Ad oggi la maggior parte degli studi, riguardanti le proteine PE, è stata condotta sulla PE_PGRS33, che è considerata come un modello per questa classe di proteine. Infatti è stato dimostrato che questa proteina è implicata nella interazione dei bacilli con i macrofagi (Brennan *et al.*, 2001). Più recentemente è stato osservato che l'espressione della PE_PGRS33 in *Mycobacterium smegmatis*, che naturalmente non esprime nessuna PE_PGRS,

accresce la virulenza di questi batteri promuovendo la morte cellulare e la persistenza dei batteri nell'ospite (Dheenadhayalan *et al.*, 2006). Basu e colleghi (2007) hanno dimostrato che la PE_PGRS33 induce apoptosi nei macrofagi interagendo direttamente con il recettore *Toll-like 2* (TLR2) e inducendo la secrezione di *Tumor Necrosis Factor* (TNF) (Basu *et al.*, 2007). Inoltre gli autori hanno dimostrato che l'interazione è mediata dal dominio PGRS, che questa proprietà è specifica per la PE_PGRS33 (poiché due differenti PE_PGRS non inducono apoptosi), e che il polimorfismo nel dominio PGRS influenza la capacità della proteina di indurre la secrezione del TNF (Basu *et al.*, 2007).

Questi risultati sono in accordo con le ipotesi suggerite da diversi autori e da noi che le proteine PE_PGRS siano espresse sulla parete dei micobatteri e siano esposte sulla superficie disponibili a compiere possibili interazioni, nonostante il fatto che nelle loro sequenze ammino acidiche non siano predetti ne peptidi segnale ne regioni transmembrana (Brennan *et al.*, 2001; Banu *et al.*, 2002; Delogu *et al.*, 2004).

Nonostante l'eccezionale importanza di una migliore caratterizzazione di queste proteine, la prova definitiva della loro localizzazione è ancora attesa. Ciò è dovuto principalmente alla complessa struttura della parete cellulare dei micobatteri e alla mancanza di anticorpi specifici per le proteine PE. Inoltre, mentre alcune funzioni per il dominio PGRS sono state caratterizzate (almeno per la PE_PGRS33), non esistono dati riguardo la funzione del dominio PE.

E' stato dimostrato che le proteine costituite dal solo dominio PE interagiscono fortemente con le proteine PPE coespresse e questa interazione è necessaria per garantire il corretto ripiegamento dei polipeptidi almeno per ciò che riguarda la loro espressione in *E.coli* (Strong *et al.*, 2006; Tundup *et al.*, 2006). Abdallah e colleghi (2006) hanno da poco dimostrato che la PPE41 è esposta sulla superficie dei micobatteri, parzialmente secreta attraverso il sistema di secrezione (ESAT-6 like) ESX5, e che la proteina PE il cui gene strutturale è localizzato a monte di quello codificante per la PPE41 è essenziale per la sua secrezione, suggerendo l'interessante ipotesi che il dominio PE possa rappresentare un dominio funzionale coinvolto nella translocazione delle proteine (Abdallah *et al.*, 2006).

SCOPO DELLA TESI

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) è l'agente eziologico della tubercolosi, patologia che nel mondo causa ogni anno due milioni di morti e la cui incidenza è drammatica nei Paesi in via di sviluppo.

Il sequenziamento del genoma, portato a termine nel 1998 (Cole *et al.*, 1998), ha messo in luce la presenza di una famiglia multigenica presente unicamente in *Mtb* e nel genere *Mycobacterium*, nota come PE. La funzione di questa famiglia multigenica (100 geni) è sconosciuta. La caratteristica principale dei prodotti di questi geni è la presenza di un dominio N-terminale altamente conservato e diverse evidenze in letteratura suggeriscono che queste proteine possano localizzarsi sulla superficie dei micobatteri e che questo sia dovuto principalmente al dominio PE.

Lo scopo di questa tesi è quello di studiare la localizzazione cellulare della proteina PE_PGRS33, del suo dominio PE espresso in assenza del dominio PGRS (PE_{1818c}), e della Rv3097c, che è stata annotata come PE_PGRS da Cole e colleghi (1998) (PE_PGRS63), ma che può essere inclusa invece nella classe PE a sequenza unica. Abbiamo potuto dimostrare che le tre proteine localizzano sulla parete cellulare micobatterica e sono esposte sulla superficie dei batteri. Oltre a questo si è dimostrato che almeno la PE_PGRS33 è localizzata sulla membrana esterna dei bacilli e che il dominio PE_{1818c}, alla pari della proteina costituita dal solo dominio PE, la PE11, contiene l'informazione necessaria per la localizzazione sulla parete cellulare di queste proteine. Tali domini PE, il PE_{1818c} e il PE11, sono stati utilizzati come partner di fusione per localizzare proteine chimera sulla parete cellulare dei micobatteri, offrendoci la possibilità molto suggestiva di costruire ceppi ricombinanti di micobatteri per scopi vaccinali.

MATERIALI E METODI

CEPPI BATTERICI, TERRENI E CONDIZIONI DI CRESCITA

Mycobacterium smegmatis mc²155 (Snapper *et al.*, 1990) è stato cresciuto a 37°C in terreno liquido 7H9 Middlebrook o in terreno solido 7H10 (Difco) entrambi supplementati con Tween 80 (Sigma-Aldrich) 0.05% v/v e glicerolo 0.2% v/v (Sigma-Aldrich). I ceppi processati con il saggio della proteinasi K, con il frazionamento cellulare e la immuno elettro microscopia sono stati cresciuti in terreno Sauton (Difco). Per le procedure di clonaggio il ceppo di *E.coli* HB101 è stato cresciuto in terreno Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989). L'igromicina (Roche) è stata impiegata alla concentrazione finale di 100 µg mL⁻¹ nei terreni solidi e di 50 µg mL⁻¹ nei terreni liquidi per *M.smegmatis* e alla concentrazione finale di 200 µg mL⁻¹ per *E.coli*.

PROCEDURE DI CLONAGGIO

Tutti i geni espressi in questo lavoro sono stati amplificati con la DNA polimerasi *Pfu* (Stratagene) utilizzando il genoma del ceppo di *M.tuberculosis* H37Rv come template. Per marcare i geni con l'epitopo HA (YPYDVPDYA), gli oligonucleotidi senso sono stati disegnati con un sito per l'enzima di restrizione *NheI* immediatamente prima del codone di inizio della traduzione, mentre gli oligonucleotidi antisenso sono stati disegnati con la sequenza codificante per l'HA in *frame* alla sequenza codificante per il gene di interesse, un codone di stop e un sito per l'enzima di restrizione *BamHI*.

Per creare le fusioni al 5' della sequenza codificante per la GFP, gli oligonucleotidi senso contenevano un sito per l'enzima di restrizione *XbaI* prima del codone di inizio della traduzione e gli oligonucleotidi antisenso contenevano un sito di restrizione per *XbaI* dopo l'ultimo codone del gene che veniva utilizzato per la fusione traduzionale.

Per la costruzione del plasmide pSTE1 (Fig. 4), la sequenza di 453bp codificante per il dominio PE₁₈₁₈ e per il suo dominio di transizione PE/PGRS è stata

amplificata con gli oligonucleotidi RP86 e RP87. L'oligonucleotide senso è stato disegnato con un sito per l'enzima di restrizione *XbaI* immediatamente prima del codone di inizio della sequenza codificante per il dominio PE, mentre l'oligonucleotide antisenso è stato disegnato per avere un *polilinker* contenente i siti per gli enzimi di restrizione *BamHI*, *PacI* e *NcoI* prima di un codone di stop e della sequenza per l'enzima di restrizione *KpnI*. Tale frammento dopo l'amplificazione è stato inserito nel vettore pMV10-25 (Delogu *et al.*, 2004), sotto il controllo del promotore micobatterico forte *Phsp60*, digerito con gli enzimi *NheI* e *KpnI* (Fig. 4). RP86:5'-GCTCTAGAATGTCATTTGTGGTCACGATCC-3'; RP87:5'-AAGGTACCTACCCATGGTTAATTAAGGATCCATTGCCGATCAA GATTCCG-3'.

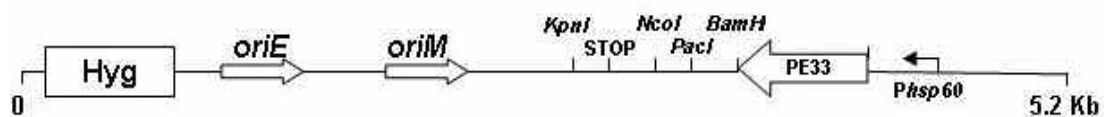


Figura 4. Mappa del pSTE1, vettore replicativo disegnato per facilitare l'espressione delle proteine chimera fuse al dominio PE_{1818c} nei micobatteri.

ELETTROPORAZIONE di *M.smegmatis*

I batteri sono cresciuti fino ad una densità ottica a 600 nm di 0.5-0.6 (OD₆₀₀) in terreno liquido. La coltura (50 mL) è stata centrifugata a 3000 g per 10 minuti a temperatura ambiente e lavata due volte con 20 mL di glicerolo 10% (v/v). Il *pellet* veniva quindi risospeso in 1 mL di glicerolo 10%, centrifugato ancora a temperatura ambiente a 3000 g e infine risospeso in un volume finale di 400 µL di glicerolo 10%. Alle aliquote (50 µL) di cellule erano aggiunti 500 ng di DNA da trasformare e la miscela DNA/cellule era posta in una cuvetta da elettroporazione (0.2 cm di gap; Eppendorf). Il campione veniva sottoposto ad una singola scarica con l'elettroporatore Gene Pulser Transfection Apparatus (Bio-Rad; impostato con 25 µF di capacità, 200 Ω di resistenza e 12.5 KV cm⁻¹ di voltaggio). Dopo la scarica, le cellule erano diluite in 900 µL di terreno liquido, incubate per 3 ore a 37°C e quindi piastrate su terreno solido addizionato con l'antibiotico.

SAGGIO DI SENSIBILITA' ALLA PROTEINASI K

I ceppi selezionati per il saggio sono stati cresciuti in 20 mL di terreno per 14 ore a partire da una OD₆₀₀ di 0.1. Le cellule sono state lavate una volta nel *buffer* TBS (Tris pH 7.5 10mM, NaCl 150 mM, KCl 3 mM) e risospese in 1 mL dello stesso buffer. Ogni campione è stato diviso in due aliquote identiche, ad una delle quali è aggiunta la proteinasi K (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 100 µg mL⁻¹. Entrambe le aliquote sono state incubate per 30 minuti a 4°C. La reazione è stata bloccata aggiungendo l'inibitore *complete EDTA free* (Roche) 1x. Successivamente i campioni sono stati lavati una volta in TBS e risospesi in TBS addizionato con il *loading buffer* 5x per le proteine (Saccarosio 50% p/v, SDS 10% p/v, Tris HCl pH 6.8 312 mM, blu di bromofenolo 0.05% p/v, b-mercaptoetanolo 5% v/v). Infine, i campioni sono stati bolliti per 10 minuti per permettere la lisi delle cellule e caricati su gel di acrilammide in ugual quantità. I campioni trattati e non trattati con la proteinasi K sono stati processati in parallelo utilizzando la stessa procedura per permettere poi il confronto tra di loro. Ogni esperimento è stato ripetuto almeno due volte.

FRAZIONAMENTO CELLULARE

I ceppi selezionati sono stati cresciuti in 20 mL di terreno come descritto in precedenza. Le cellule sono state lavate una volta in PBS/fenil metil sulfonil fluoruro 1 mM(PMSF, Sigma-Aldrich) e risospese in 1 mL dello stesso tampone. Ogni campione è stato sonicato (potenza 4; Sonifier B-12 Branson Sonic Power Company) per 30 secondi a temperatura ambiente, con cicli da 10 secondi seguiti da raffreddamento in ghiaccio. I lisati sono stati centrifugati a 3000 g a 4°C per precipitare i detriti cellulari e le cellule non lisate. I surnatanti sono stati trasferiti in tubi puliti e sedimentati a 27000 g per 30 minuti a 4°C in una centrifuga Beckman Coulter (L-90K Optima, rotore SW55Ti) per consentire la precipitazione della parete cellulare. Ancora una volta il surnatante è stato precipitato a 100000 g per 2 ore per separare la frazione della membrana plasmatica da quella del citosol. Le proteine citosoliche sono state precipitate in seguito con acido tricloroacetico 10% v/v, incubate per 30 minuti in ghiaccio,

centrifugate per 10 minuti in una microcentrifuga a 16000 g a 4°C e infine lavate con acetone 80% v/v.

Tutti i campioni sono stati lavati una volta dopo ogni passaggio di centrifugazione in PBS/PMSF 1 mM e infine risospesi in un appropriato volume di PBS addizionato con il *loading buffer* 5x per le proteine. I campioni sono stati bolliti per 5 minuti prima di essere caricati e separati su gel di poliacrilammide e sottoposti a *Western blot*. La degradazione delle proteine e la loro quantità relativa nelle diverse frazioni è stata calcolata attraverso analisi densitometrica utilizzando il *Versadoc Imaging System* (Bio-Rad) e il programma *Quantity one* 4.2.3 (Bio-Rad).

ESTRAZIONE CON IL GENAPOL

I ceppi selezionati sono stati cresciuti in 20 mL di terreno come descritto in precedenza. Le cellule sono state lavate una volta in PBS e il peso del *pellet* è stato determinato. Per ogni ceppo, 4 aliquote, contenenti 10 mg di cellule, sono state risospese ciascuna in 150 µL di *buffer* PG05 (0.5% v/v di Genapol X-80 Sigma-Aldrich) (Heinz e Niederweis, 2000) e incubate per 30 minuti a 30°C, 50°C, 70°C, 90°C. Tutti i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 4°C a 6000 g in una microcentrifuga. I surnatanti sono stati trasferiti in tubi puliti e addizionati con il *loading buffer* 5x per le proteine. In questo caso i campioni non sono stati bolliti prima di essere caricati sui gel di poliacrilammide.

SDS-PAGE E WESTERN BLOT

Le proteine sono state separate su gel con una percentuale di poliacrilammide dell'8% (Sambrook *et al.*, 1989) e poi trasferite su una membrana di polivinidene fluoruro (PVDF; Bio-Rad) utilizzando procedure standard (Sambrook *et al.*, 1989). Le proteine sono state visualizzate attraverso l'impiego o di anticorpi monoclonali contro l'epitopo HA (Anti-HA.11 Covance, diluizione 1:2000) e la GFP (Chemicon; diluizione 1:2000) o di un siero contro l'MspA (Heinz e Niederweis, 2000) (diluizione 1:2000). Un anticorpo secondario di capra anti-IgG di topo coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:2000) e un anticorpo secondario di capra anti-IgG di coniglio coniugato

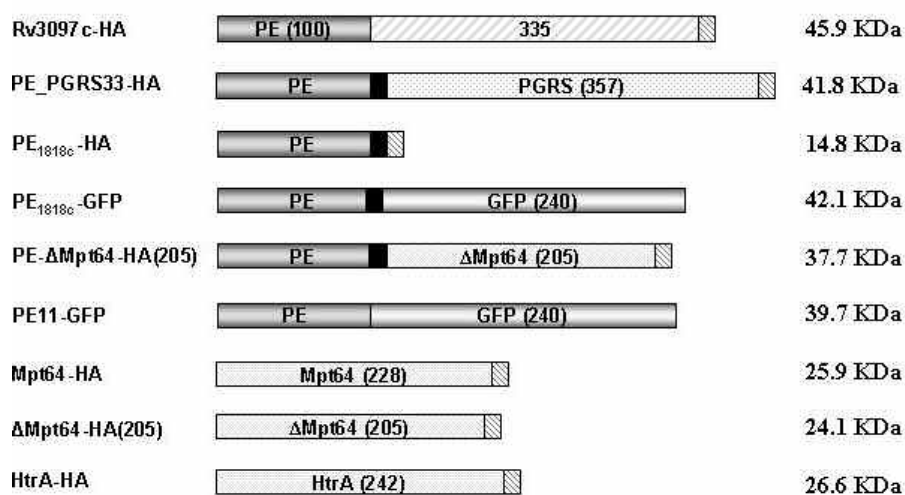
con l'enzima perossidasi di rafano (Pierce, diluito 1:2000) sono stati impiegati per la rilevazione delle proteine sulla membrana di polivinidene fluoruro. Il siero anti-MspA è stato gentilmente fornito dal Prof. Michael Niederweis. Il kit *West Dura Signal* (Pierce) è stato utilizzato per sviluppare il segnale in chemiluminiscenza. Le acquisizioni e le quantificazioni delle immagini sono state prodotte utilizzando il *Versadoc Imaging System* (Bio-Rad) e il programma *Quantity one 4.2.3* (Bio-Rad).

IMMUNO ELETTRICO MICROSCOPIA

I campioni di *Mycobacterium smegmatis* sono stati fissati in PBS, pH 7.4 contenente paraformaldeide al 4% e glutaraldeide allo 0.5%, per 2 ore a temperatura ambiente, lavati in PBS, infiltrati con saccarosio 2.3 M in PBS a 4°C *overnight*, congelati in azoto liquido e crio sezionati secondo il metodo utilizzato da Tokuyasu (1973). Le criosezioni ultrasottili, ottenute con lo strumento Leica Ultracut UCT (Leica Microsystem), sono state preparate utilizzando saccarosio e metilcellulosa, incubandole con l'anticorpo monoclonale specifico anti-HA (Anti-HA.11 Covance, diluizione 1:20) a temperatura ambiente e quindi con un anticorpo secondario di capra anti-IgG di topo coniugato con particelle di oro da 10 nm di diametro (Sigma-Aldrich; diluizione 1:10). I campioni di controllo sono stati ottenuti incubando le crio sezioni con il solo anticorpo secondario coniugato alle particelle d'oro. Infine le sezioni ultrasottili sono state colorate con una soluzione di metilcellulosa al 2% e uranilacetato allo 0.4%. I campioni sono stati esaminati con il microscopio elettronico a trasmissione Philips 208 (FEI Company). Per la valutazione quantitativa della localizzazione delle proteine PE nei differenti ceppi, almeno cinque immagini contenenti 5-10 cellule sezionate sono state selezionate per ogni ceppo. Quindi, le particelle d'oro localizzate sulla parete cellulare e quelle localizzate all'interno delle cellule sono state contate manualmente (in modo indipendente da tre diversi operatori) e le percentuali relative sono state calcolate per ogni singola immagine. In questo modo, un paragone diretto tra l'espressione sulla superficie e nel citoplasma può essere operata, evitando errori sperimentali. Infine la media e la relativa deviazione standard sono state calcolate per ogni ceppo.

RISULTATI

Per analizzare la localizzazione cellulare delle proteine oggetto dello studio, sono stati costruiti tre vettori di espressione dove le proteine chimeriche PE_PGRS33 (Rv1818c), il suo dominio PE (PE_{1818c}) e la Rv3097c sono state fuse all'epitopo HA (Fig. 5) ed espresse sotto il controllo del promotore micobatterico forte *Phsp60*. Sono stati quindi generati i ceppi ricombinanti di *M.smegmatis* mc²155 che esprimevano tali chimere.



■ 41 amminoacidi del dominio di transizione PE/PGRS

▨ 9 amminoacidi dell'epitopo HA

Figura 5. Rappresentazione schematica delle proteine chimera utilizzate nello studio. Il peso molecolare atteso per ogni chimera è indicato sulla destra.

SAGGI DI DEGRADAZIONE CON LA PROTEINASI K SULLE CHIMERE PE-HA

Per determinare se le chimere PE_PGRS33-HA, Rv3097c-HA e PE_{1818c}-HA siano espresse sulla superficie dei micobatteri, i ceppi di *M.smegmatis* esprimenti tali chimere sono stati sottoposti al trattamento con proteinasi K. In questo saggio le cellule batteriche sono lavate e brevemente esposte alla proteinasi K. Dopo il trattamento la proteasi è bloccata con un inibitore ed eliminata con dei lavaggi. Tale procedimento è sufficiente a degradare le proteine esposte sulla superficie lasciando le cellule intatte. Le cellule sono lisate per bollitura e la stessa quantità

di estratto cellulare è analizzato per *Western blot*. Un ceppo esprime la proteina citosolica GFP è stato utilizzato come controllo negativo nel saggio. Come mostrato in figura 6, mentre la GFP intracellulare non è intaccata dal trattamento, le proteine PE_PGRS33-HA e Rv3097c-HA sono degradate, 55% e 78% rispettivamente come osservato attraverso analisi densitometrica, con efficacia dalla proteinasi K, dimostrando la loro esposizione sulla superficie batterica. Comunque, la chimera PE_{1818c}-HA non è degradata e questo suggerisce che tale proteina non è direttamente esposta sulla superficie dei bacilli. Per verificare che la resistenza alla proteinasi K della chimera PE_{1818c}-HA sia dovuta ad una resistenza intrinseca alla proteasi e non alla sua localizzazione cellulare, abbiamo ripetuto l'esperimento su cellule batteriche lisate per sonicazione: in questo caso la chimera PE_{1818c}-HA è degradata con efficacia (dati non presentati).

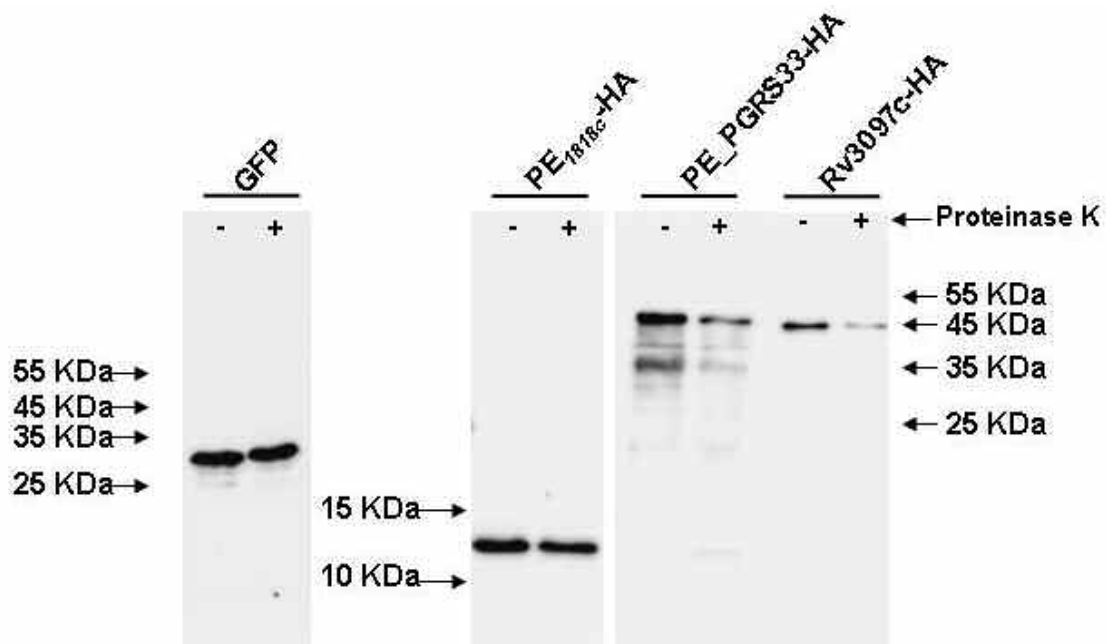


Figura 6. Saggio di degradazione con la proteinasi K sui ceppi di *M.smegmatis* che esprimono le proteine GFP, PE_{1818c}-HA, PE_PGRS33-HA o Rv3097c-HA. I batteri vivi sono stati incubati con (+) o senza (-) proteinasi K. I lisati da cellula intera ottenuti dai batteri ricombinanti sono stati separati su SDS-PAGE. Le proteine sono state rilevate utilizzando anticorpi monoclonali anti-GFP o anti-HA.

LOCALIZZAZIONE CELLULARE DELLE PROTEINE CHIMERA PE-HA

Per caratterizzare meglio la localizzazione delle proteine chimera, abbiamo sviluppato un protocollo di frazionamento cellulare. La GFP è stata utilizzata come *marker* per le proteine espresse nel citoplasma, mentre una fusione tra la regione 5' del gene *htrA* e la sequenza codificante l'epitopo HA è stata costruita per ottenere un *marker* per le proteine espresse sulla membrana plasmatica. La stessa strategia è stata impiegata per marcare la proteina secreta Mpt64 con l'epitopo HA (Fig. 5). Un ceppo esprimente la chimera PE_{1818c}-GFP, per la quale si è dimostrata l'associazione alla frazione insolubile e ipotizzata l'espressione sulla parete cellulare (Delogu *et al.*, 2004), è stata inclusa nell'esperimento. I ceppi di *M.smegmatis* esprimenti le proteine chimera sono stati lisati per sonicazione e i lisati cellulari sottoposti a frazionamento cellulare per centrifugazione, come descritto nella sezione materiali e metodi, e analizzati per *Western blot*. Per essere in grado di paragonare la quantità di proteine in ogni frazione cellulare, lo stesso quantitativo di "equivalenti cellulari" è stato caricato in ogni pozzetto dei gel di poliacrilammide.

La GFP *wild type* è stata rilevata solamente nella frazione solubile che rappresenta il citoplasma come atteso; la proteina Mpt64-HA è stata rilevata principalmente nel citoplasma e nel surnatante, suggerendo un suo accumulo nel citoplasma prima della secrezione; l'HtrA-HA è stata rilevata principalmente nella frazione della membrana plasmatica (come atteso) e nella frazione dei detriti cellulari, mentre la chimera PE_{1818c}-GFP è stata rilevata principalmente nella frazione dei detriti cellulari (Fig. 7).

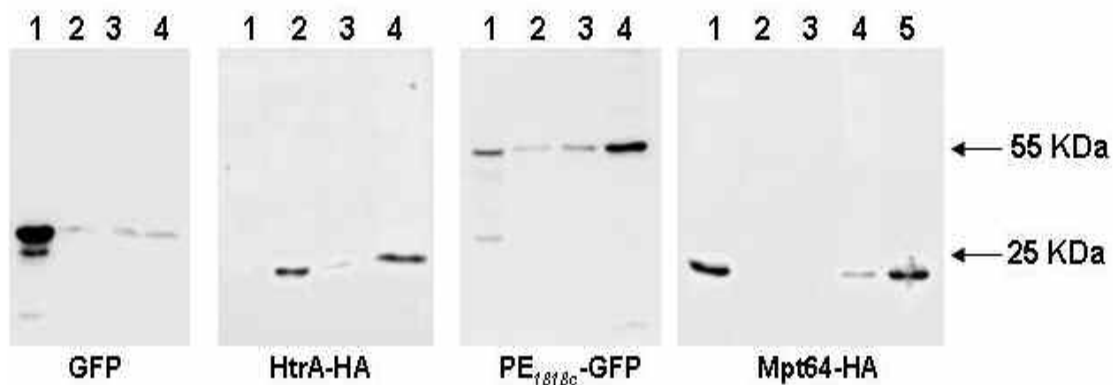


Figura 7. Analisi mediante frazionamento cellulare svolta su differenti frazioni cellulari di ceppi di *M.smegmatis* esprimenti le proteine GFP, HtrA-HA, PE_{1818c}-GFP o Mpt64-HA. Linea 1: frazione citoplasmatica; linea 2: membrana plasmatica; linea 3: parete cellulare; linea 4: detriti cellulari; linea 5: surnatante di coltura. Le proteine sono state rilevate utilizzando anticorpi monoclonali anti-GFP o anti-HA.

I dati ottenuti suggeriscono che la frazione dei detriti cellulari ottenuta con questo metodo contiene quasi tutte le proteine associate alla parete cellulare e parte di quelle associate alla membrana plasmatica. Nei surnatanti di coltura non sono state rilevate le proteine GFP, HtrA-HA e PE_{1818c}-GFP.

Le proteine chimera PE-HA (Fig. 8) sono localizzate principalmente nella frazione dei detriti cellulari e nella frazione citoplasmatica. Ciò risulta meno evidente per la PE_PGRS33-HA che è presente in tutte le frazioni quasi nella stessa quantità. Per verificare la possibilità che la localizzazione nella frazione dei detriti cellulari sia dovuta alla formazione di corpi di inclusione conseguente alla sovra espressione delle chimere, la chimera PE_{1818c}-HA è stata espressa anche sotto il controllo del suo promotore fisiologico. Come mostrato in figura 8A l'espressione di una minore quantità di chimera ha provocato un accumulo maggiore della proteina PE_{1818c}-HA nella frazione insolubile (82% vs 57%), l'esatto opposto di quello che ci saremmo aspettati nel caso di una precipitazione nei corpi di inclusione.

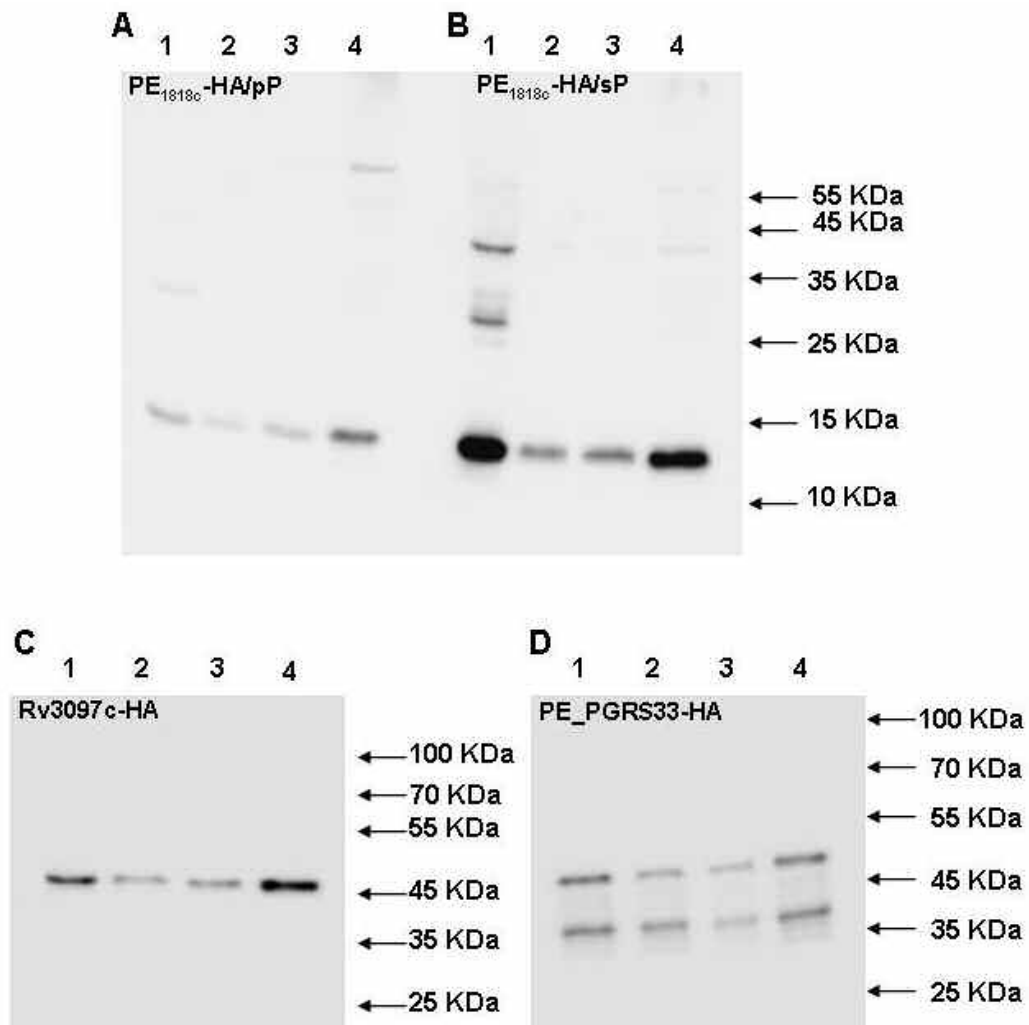


Figura 8. Analisi mediante frazionamento cellulare svolta su differenti frazioni cellulari di ceppi di *M.smegmatis* esprimenti le proteine PE_{1818c}-HA sotto il controllo del suo promotore fisiologico (pP) (A), o del promotore forte dei micobatteri *Phsp60* (sP) (B), Rv3097c-HA (C) e PE_PGRS33-HA (D). Linea 1: frazione citoplasmatica; linea 2: membrana plasmatica; linea 3: parete cellulare; linea 4: detriti cellulari; Le proteine sono state rilevate utilizzando un anticorpo monoclonale anti-HA.

Questi dati indicano fortemente che la chimera PE_{1818c}-HA si localizza sulla parete cellulare. E' interessante notare la presenza di bande che migrano ad un peso molecolare multiplo rispetto a quello atteso per il monomero PE_{1818c}-HA, indicando che tale proteina può formare multimeri. Nessuna delle chimere prese in esame è stata rilevata nel surnatante di coltura.

Per supportare i dati ottenuti con il frazionamento cellulare, criosezioni ultra sottili dei ceppi di *M.smegmatis* esprimenti le chimere Rv3097c-HA, PE_PGRS33-HA o PE_{1818c}-HA sotto il controllo dei due diversi promotori sono

state sottoposte ad esperimenti di immuno elettro microscopia. La superficie di tutti i ceppi ricombinanti risulta marcata dall' anticorpo anti-HA, mostrando la localizzazione delle chimere sulla superficie dei batteri (Fig. 9A-D), mentre il ceppo *wild type* non presenta nessuna marcatura (Fig. 9E).

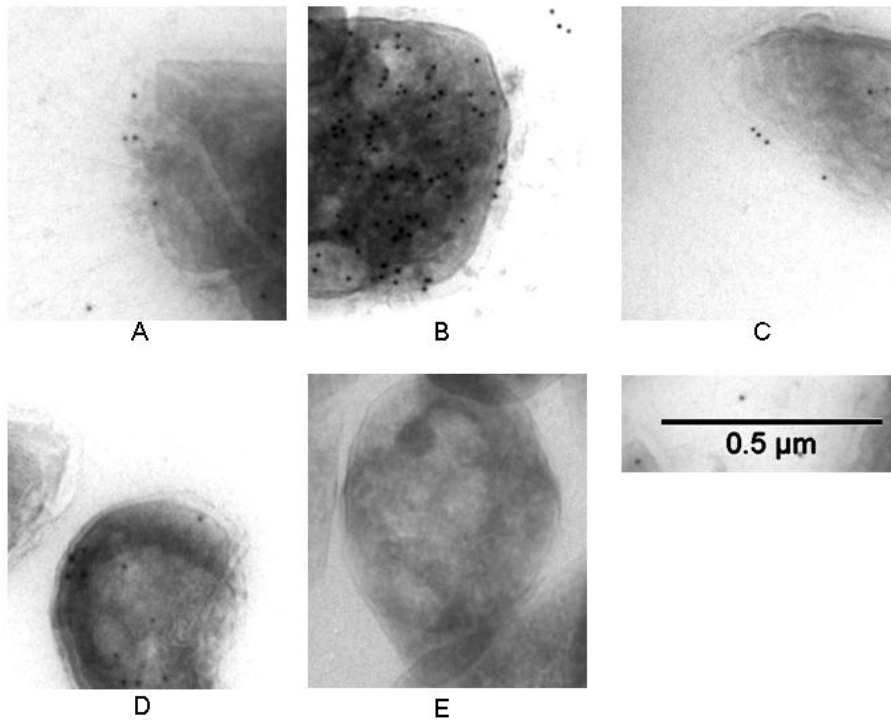


Figura 9. Immuno elettro microscopia svolta su sezioni ultra sottili di ceppi di *M.smegmatis* esprimenti le chimere PE_{1818c}-HA sotto il controllo del suo promotore fisiologico (A), o sotto il controllo del promotore micobatterico forte *Phsp60* (B), Rv3097c-HA (C), PE_PGRS33-HA (D). Il controllo negativo (E) è rappresentato dal ceppo *wild type* di *M.smegmatis* MC²155. I batteri sono stati marcati con un anticorpo monoclonale anti-HA.

In accordo con i dati del frazionamento cellulare, il ceppo di *M.smegmatis* esprime la chimera PE_{1818c}-HA sotto il controllo del suo promotore fisiologico mostra una percentuale superiore di proteina associata alla superficie (Fig. 9A) rispetto alla percentuale del ceppo esprime la medesima chimera sotto il controllo del promotore forte *Phsp60* (Fig.9B) ($51.8 \pm 13.9\%$ vs $17.0 \pm 8.2\%$ rispettivamente; $P < 0.01$), indicando che la sovra espressione porta all'accumulo nel citoplasma di una forma solubile della chimera PE_{1818c}-HA.

ESTRAZIONE DELLE PROTEINE ASSOCIATE ALLA SUPERFICIE LIPIDICA

La porzione più esterna della parete cellulare dei micobatteri è costituita da lipidi complessi che formano un *bilayer* asimmetrico che ricorda funzionalmente la membrana esterna dei batteri Gram negativi (Hong e Hopfinger, 2004). L'unica proteina per cui è stata dimostrata l'associazione a tale membrana esterna è l'MspA, una porina identificata in *M.smegmatis* e non nei micobatteri a crescita lenta. MspA può essere estratta dalla parete cellulare dei bacilli utilizzando detergenti blandi come il Genapol (Heinz e Niederweis, 2000; Niederweis, 2003; Mahfoud *et al.*, 2006). Per verificare se le proteine PE siano localizzate sulla membrana esterna, i ceppi di *M.smegmatis* esprimenti le proteine chimera sono stati risospesi in un buffer contenente il genapol alla concentrazione finale dello 0.5% (v/v). I campioni sono stati incubati per 30 minuti a differenti temperature, centrifugati, e i surnatanti analizzati tramite *Western blot* con anticorpi specifici anti-HA e anti-MspA. In accordo con i dati esistenti in letteratura l'estrazione di MspA è stata temperatura dipendente, con il suo massimo a 90°C (Fig. 10A). Quando i ceppi di *M.smegmatis* esprimenti le diverse chimere (PE_PGRS33-HA, PE_{1818c}-HA, HtrA-HA e GFP) sono stati analizzati con tale metodica solamente la chimera PE_PGRS33-HA è stata estratta (Fig.10B). E' interessante notare come l'estrazione della PE_PGRS33-HA abbia raggiunto il suo massimo già alla temperatura più bassa impiegata nel saggio (30°C). Il fatto che ne la GFP e l'HtrA-HA sono state estratte durante le procedure sperimentali conferma che le cellule mantengono la loro integrità. Questo valida ulteriormente i nostri risultati. Questi dati inoltre ci suggeriscono che la proteina PE_PGRS33-HA è localizzata sulla membrana esterna dei micobatteri e la sua associazione con tale struttura è più debole rispetto a quella della porina MspA.

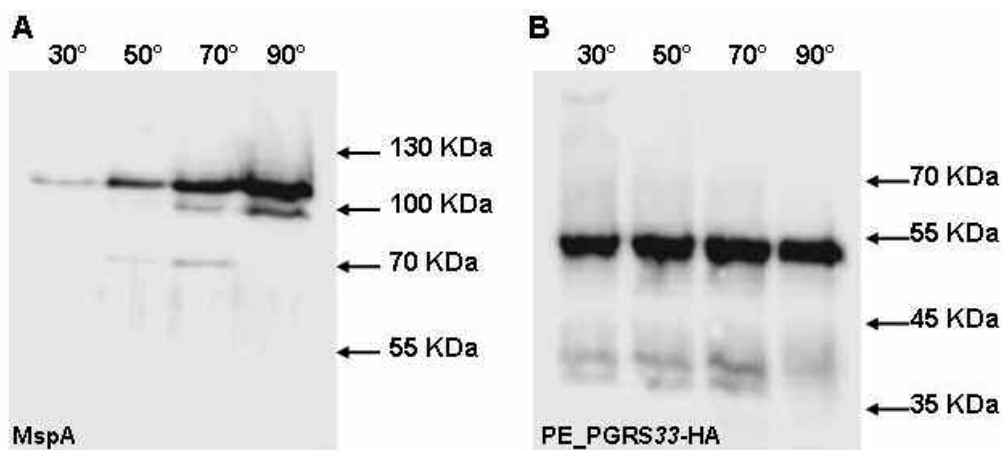


Figura 10. Western blot effettuati su campioni estratti da cellule intere di *M. smegmatis* MC²155 wild type (A) o MC²155 esprimente la chimera PE_PGRS33-HA (B) con il detergente Genapol X-80 a differenti temperature. Un anticorpo policlonale anti-MspA e un anticorpo monoclonale anti-HA sono stati utilizzati per la rilevazione delle proteine.

LOCALIZZAZIONE SULLA SUPERFICIE DELLE CELLULE DELLE CHIMERE BASATE SUL DOMINIO PE

Per verificare l'ipotesi che il dominio PE sia sufficiente a guidare la localizzazione cellulare sulla parete cellulare dei micobatteri, abbiamo utilizzato un plasmide esprimente la proteina PE_{1818c}-GFP (Delogu *et al.*, 2004) e un secondo esprimente la fusione traduzionale tra la proteina PE11 (Rv1169c), costituita dal solo dominio PE, e la GFP (PE11-GFP) (Fig. 5). Quando i ceppi di *M. smegmatis* trasformati con tali plasmidi sono stati analizzati mediante il saggio con la proteinasi K, entrambe le chimere sono degradate (66% e 98% rispettivamente) suggerendo la loro esposizione sulla superficie dei batteri (Fig. 11). Per capire se il dominio PE debba trovarsi sulla porzione N-terminale della chimera per svolgere la propria funzione, abbiamo costruito una nuova proteina chimera, dove il dominio PE_{1818c} è fuso alla porzione C-terminale della GFP (GFP- PE_{1818c}). Il ceppo esprimente la nuova chimera è stato trattato con la proteinasi K, ma la proteina GFP- PE_{1818c} non è degradata (Fig. 11).

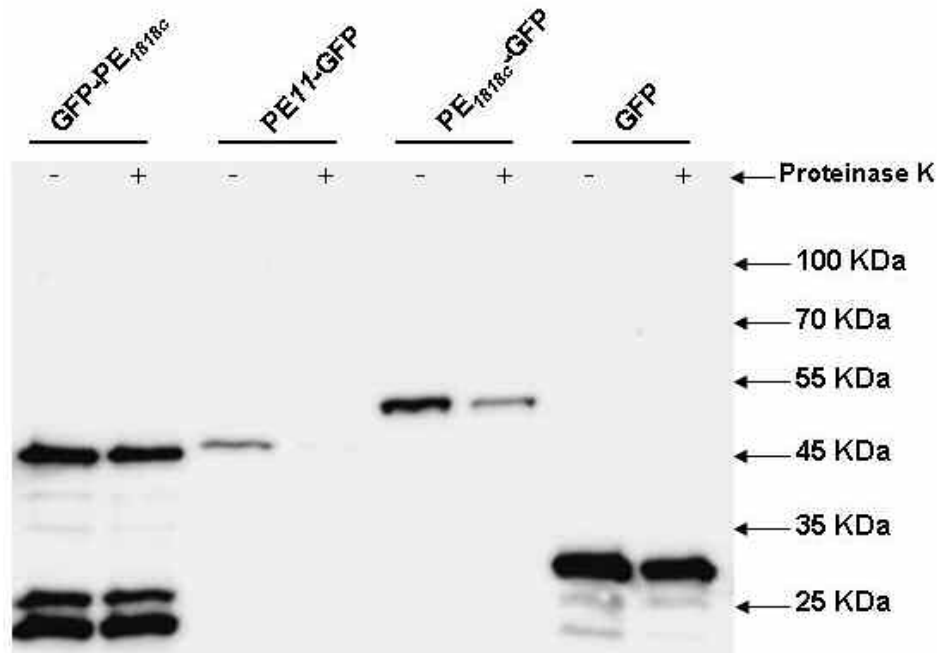


Figura 11. Saggio di degradazione con la proteinasi K sui ceppi di *M.smegmatis* che esprimono le chimere GFP-PE_{1818c}, PE11-GFP, PE_{1818c}-GFP e la GFP. I batteri vivi sono stati incubati con (+) o senza (-) proteinasi K. I lisati da cellula intera ottenuti dai batteri ricombinanti sono stati separati su SDS-PAGE. Le proteine sono state rilevate utilizzando un anticorpo monoclonale anti-GFP.

Inoltre per valutare la possibilità di utilizzare il dominio PE della proteina PE_PGRS33 come partner di fusione per esprimere proteine eterologhe sulla superficie dei micobatteri, è stato costruito un plasmide replicativo per l'espressione di proteine nei micobatteri. Tale vettore, nominato pSTE1, è stato disegnato per esprimere proteine fuse al dominio PE_{1818c} sotto il controllo del promotore micobatterico *hsp60* (Fig. 4 e materiali e metodi).

Successivamente la sequenza codificante per l'Mpt64-HA priva del suo peptide segnale (205 amminoacidi) è stata clonata nel plasmide pSTE1 in *frame* con la sequenza codificante per il dominio PE_{1818c} (PE_{1818c}-ΔMpt64-HA). Un costrutto per l'espressione della proteina Mpt64-HA priva del suo peptide segnale (ΔMpt64-HA) è stato inoltre prodotto come controllo citoplasmatico per i saggi.

I ceppi di *M.smegmatis* che esprimono queste due nuove chimere sono stati trattati con la proteinasi K. Come mostrato nella figura 12, il 58% della chimera PE_{1818c}-ΔMpt64-HA è degradato dalla proteasi, mentre il corrispondente controllo citoplasmatico risulta non affetto dal trattamento, dimostrando che la chimera è effettivamente esposta sulla superficie delle cellule.

Ci siamo proposti inoltre l'obiettivo di determinare se la grandezza della sequenza fusa al dominio PE possa influenzare la sua stessa disponibilità sulla superficie batterica. Il vettore pSTE1 è stato utilizzato per produrre due chimere ulteriori dove porzioni più piccole dell'Mpt64 (60 e 125 amminoacidi rispettivamente) sono fuse al dominio PE e marcate con l'epitopo HA. Queste ultime due chimere sono state espresse in *M.smegmatis* e dopo il trattamento con la proteinasi K dei relativi ceppi ricombinanti non si è osservata la loro degradazione (Fig. 12) La chimera PE_{1818c}-ΔMpt64-HA (205) è stata anche espressa in *M.bovis* BCG e l'esperimento con la proteinasi K è stato ripetuto in questo organismo ottenendo esattamente gli stessi risultati (dati non presentati).

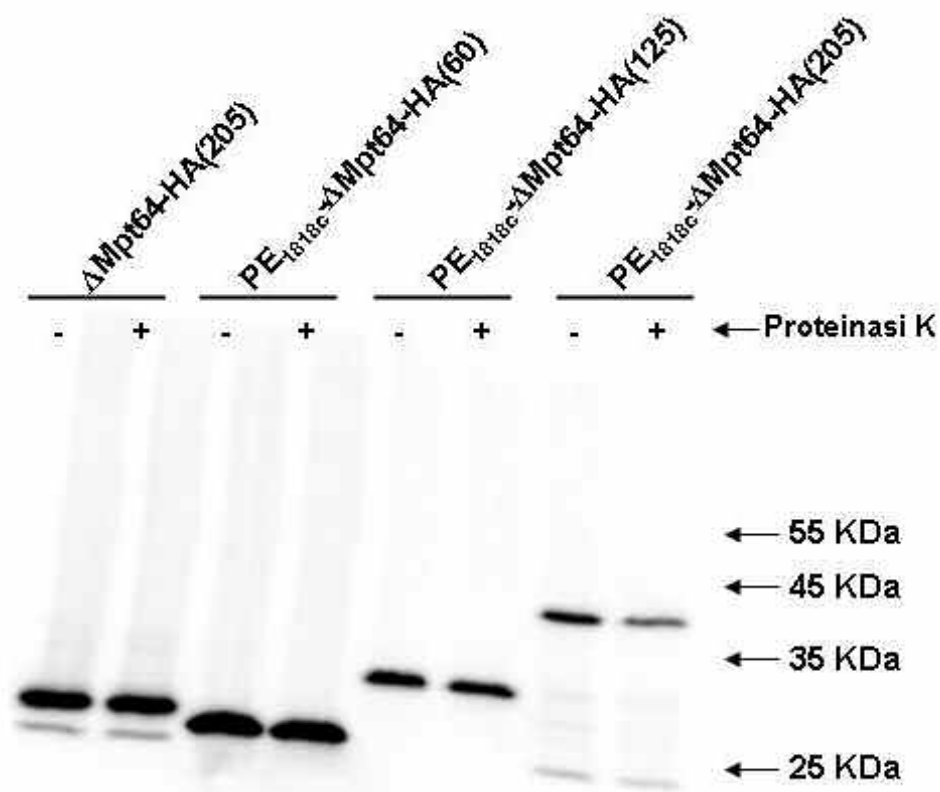


Figura 12. Saggio di degradazione con la proteinasi K sui ceppi di *M.smegmatis* che esprimono le chimere ΔMpt64-HA(205), PE-ΔMpt64-HA(60), PE-ΔMpt64-HA(125), or PE-ΔMpt64-HA(205). I batteri vivi sono stati incubati con (+) o senza (-) proteinasi K. I lisati da cellula intera ottenuti dai batteri ricombinanti sono stati separati su SDS-PAGE. Le proteine sono state rilevate utilizzando un anticorpo monoclonale anti-HA.

Il ceppo di *M.smegmatis* esprime la chimera PE_{1818c}-ΔMpt64-HA (205) è stato infine analizzato mediante immuno elettro microscopia. Come mostrato nella figura 13, la chimera basata sul dominio PE_{1818c}, ma non il controllo

citoplasmatico (Δ Mpt64-HA), è chiaramente associata alla superficie batterica ($47.3 \pm 16.0\%$ vs $8.0 \pm 5.3\%$, rispettivamente; $P < 0.01$).

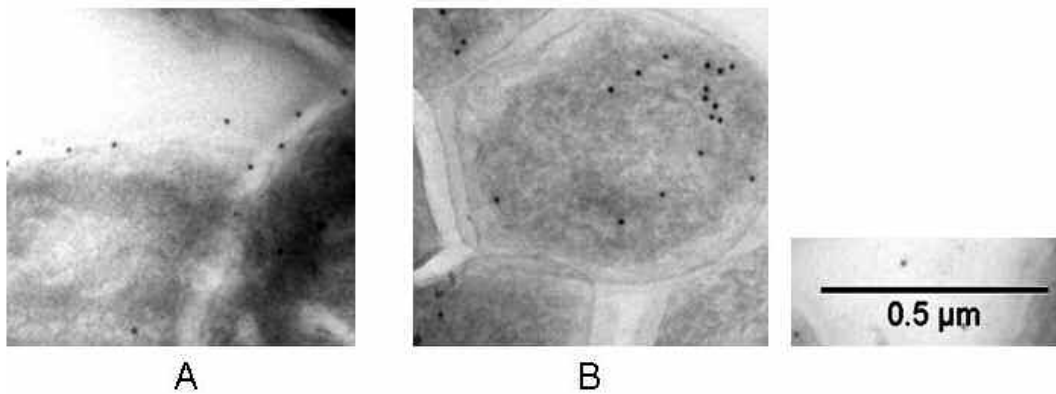


Figura 13. Immuno elettro microscopia svolta su sezioni ultra sottili di ceppi di *M.smegmatis* esprimenti le chimere PE_{1818c}- Δ Mpt64-HA (A) e Δ Mpt64-HA (B). Il controllo negativo è rappresentato dal ceppo *wild type* di *M.smegmatis* MC²155 ed è riportato nella figura 9E. I batteri sono stati marcati con un anticorpo monoclonale anti-HA.

DISCUSSIONE

Le proteine PE sono divise in tre classi: PE_PGRS, PE a sequenza unica e le proteine costituite dal solo dominio PE. In questo lavoro abbiamo caratterizzato tre proteine PE, una per ogni classe: la PE_PGRS33, la Rv3097c e la PE11 rispettivamente. Il maggior numero di dati esistente in letteratura riguarda la PE_PGRS33 che è stata presa come modello per le proteine appartenenti alla classe PE_PGRS (Brennan *et al.*, 2001; Dheenadhayalan *et al.*, 2006; Basu *et al.*, 2007). La PE11 è una proteina di 100 amminoacidi che fa parte di una coppia PE-PPE (Adindla e Guruprasad, 2003; Strong *et al.*, 2006; Tundup *et al.*, 2006). La proteina Rv3097c è stata classificata da Cole e colleghi (1998) come PE_PGRS (PE_PGRS63), sebbene un'analisi più approfondita della sua sequenza amminoacidica non confermerebbe tale classificazione. Il gene Rv3097c codifica infatti per una proteina che ha attività lipasica (Deb *et al.*, 2006), come recentemente dimostrato, ed è l'unica tra le proteine PE a cui chiaramente può essere attribuita una funzione.

Queste proteine, o porzioni di esse, sono state fuse ad antigeni facilmente rilevabili (GFP e HA), espresse in *M.smegmatis*, e sottoposte al protocollo di degradazione con proteinasi K per valutarne l'esposizione sulla superficie delle cellule batteriche. Tutte le chimere ad eccezione di una soltanto (PE_{1818c}-HA) sono accessibili e degradate dalla proteasi, suggerendo la loro esposizione sulla superficie (Fig. 6 e 11). Questi risultati sono in accordo con dati precedenti che indicavano l'esposizione sulla superficie dei batteri delle proteine PE_PGRS (Brennan *et al.*, 2001; Banu *et al.*, 2004; Delogu *et al.*, 2004). Il fatto che la chimera basata sul dominio PE sia sensibile alla degradazione quando il partner di fusione sia la GFP (240 amminoacidi) (Fig. 11), o il dominio PGRS (357 amminoacidi) (Fig. 6), ma non quando il partner di fusione sia l'epitopo HA (solo 9 amminoacidi) (Fig. 6), indica che solo la porzione C-terminale delle chimere è disponibile ed esposta sulla superficie, mentre lo stesso dominio PE è nascosto e protetto dalla parete cellulare dei micobatteri. Questa ipotesi è sostenuta anche dai risultati ottenuti con le fusioni PE_{1818c}-ΔMpt64-HA (Fig. 12). È interessante notare che quando la GFP è fusa all'N-terminale del dominio PE_{1818c} non abbiamo osservato la sua degradazione. Analizzando questi risultati possiamo affermare

che il dominio PE_{1818c} permette a proteine fuse al suo C-terminale, purché siano sufficientemente lunghe, di essere esposte sulla superficie cellulare dei micobatteri, ma lo stesso dominio PE non è esposto sulla superficie dei batteri restando inserito all'interno della porzione lipidica della membrana esterna dei micobatteri o nel loro spazio periplasmatico. Poiché i domini PE sono stati descritti come idrofilici (Strong *et al.*, 2006), noi sosteniamo l'ipotesi che il dominio PE_{1818c} sia localizzato nel periplasma micobatterico dove potrebbe interagire con il polimero di peptidoglicano-arabinogalattano e le porzioni idrofiliche degli acidi micolici.

Le proteine PE oggetto dello studio analizzate con il protocollo di frazionamento cellulare sono associate principalmente alle frazioni dei detriti cellulari e del citoplasma in modo simile a quanto osservato per la chimera PE_{1818c}-GFP (Fig. 7). La rilevazione di piccole quantità di tali proteine nelle frazioni di membrana plasmatica e parete cellulare conferma che il protocollo utilizzato per tali esperimenti non ci consente di separare completamente questi due compartimenti cellulari che sono contenuti principalmente nella frazione dei detriti cellulari. L'unica eccezione è costituita dalla PE_PGRS33-HA, presente in tutte le frazioni in quantità simili. Tale risultato è stato ottenuto anche in altri laboratori (M. Brennan comunicazione personale). Possiamo ipotizzare allora che la proteina in questione abbia delle caratteristiche che rendono difficile l'analisi della sua localizzazione nelle cellule batteriche mediante tecniche di frazionamento cellulare. Una delle possibilità da considerare, essendo debolmente associata alla superficie (come osservato dalla estrazione con detergenti blandi), è che una quantità significativa della proteina possa essere rilasciata dalla parete cellulare durante la sonicazione e/o ultracentrifugazione, provocando così la contaminazione delle frazioni.

Due forme differenti della PE_PGRS33 sono rilevate sia negli esperimenti di frazionamento cellulare che in quelli con la proteinasi K. La forma più piccola potrebbe costituire una versione della proteina tronca e priva del dominio PE. Il fatto che questa variabile della proteina *wild type* sia rilevata nella frazione insolubile e sia sensibile alla degradazione con proteinasi k suggerisce l'esistenza di un punto fragile (probabilmente tra i domini PE e PGRS) che causa la rottura della proteina durante la lisi cellulare. Ciò potrebbe accadere come conseguenza

di una rottura fisica o di una digestione chimica, da parte di enzimi di origine citosolica, della proteina. Comunque non possiamo escludere che il dominio PE sia importante solo ai fini del trasporto della proteina e non per il suo ancoraggio sulla superficie delle cellule. Se così fosse tale dominio potrebbe essere processato dopo che la proteina ha raggiunto la sua localizzazione finale.

Per escludere che la localizzazione della chimera PE_{1818c}-HA nella frazione insolubile sia un artefatto (per precipitazione nei corpi di inclusione ad esempio) dovuto alla sua sovra espressione, tale proteina chimera è stata espressa anche sotto il controllo del suo promotore fisiologico (più debole rispetto al *Phsp60* di *M.tuberculosis*). In queste condizioni la maggior parte della proteina è rilevata nella frazione insolubile mentre la quantità corrispondente di proteina solubile diminuisce (Fig. 8A), indicando che la maggior produzione della proteina espressa sotto il controllo di un promotore forte la costringe ad accumularsi nel citoplasma in forma solubile a causa della saturazione del sistema di secrezione. Questi dati sono stati confermati dagli esperimenti con la immuno elettro microscopia, che ha mostrato chiaramente l'associazione della chimera PE_{1818c}-HA alla superficie micobatterica sia che essa sia espressa sotto il controllo del suo promotore fisiologico più debole o del promotore forte dei micobatteri (Fig. 9A-B). In quest'ultimo caso la proteina è presente anche nel citoplasma. Allora possiamo concludere che la chimera PE_{1818c}-HA si accumula nel citoplasma prima di essere traslocata sulla parete cellulare (similmente a quanto accade alla proteina Mpt64-HA prima di essere secreta nel mezzo di coltura). E' interessante notare che multimeri della proteina PE_{1818c}-HA si possono rilevare sia nella frazione solubile che in quella insolubile. Poiché tali multimeri sono stati rilevati dopo bollitura con agenti riducenti e dopo elettroforesi su gel denaturanti, l'interazione tra i monomeri della proteina PE_{1818c}-HA deve essere molto forte. E' inoltre possibile che anche le altre chimere basate sul dominio PE possano costituire multimeri, ma nelle condizioni utilizzate per i saggi essi non sono stati rilevati. Rimane ancora da determinare se l'interazione tra i domini PE sia o meno importante per la localizzazione delle proteine PE prese in esame. In tale direzione vanno gli esperimenti che sono in corso nel nostro laboratorio.

L'immuno elettro microscopia è stata utilizzata come metodica ulteriore per analizzare la localizzazione cellulare delle chimere PE_PGRS33-HA e Rv3097c-

HA. Anche in questo caso entrambe le proteine sono marcate sulla superficie dei batteri e ciò sostiene ulteriormente l'ipotesi della loro localizzazione sulla parete cellulare (Fig. 9C-D).

La struttura dell'envelope dei micobatteri è complessa e di recente è emersa la tendenza a descriverla in modo funzionalmente simile a quella dei Gram negativi. Si propone infatti l'esistenza, oltre alla membrana plasmatica e alla parete, di una membrana esterna (*outer membrane*) nella quale gli acidi micolici formano il foglietto interno e le cere e i lipidi di superficie quello esterno (Minnikin, 1982). Lo spazio tra la membrana plasmatica e la membrana esterna è definito periplasma, dove si trova il peptidoglicano covalentemente legato al polimero di arabino-galattano. La composizione proteica della membrana esterna e dello spazio periplasmatico è scarsamente caratterizzata. L'unica proteina micobatterica della membrana esterna ad essere stata caratterizzata è la porina MspA (Mahfoud *et al.*, 2006). Questa proteina di solito è estratta dalle cellule dopo trattamento con detergenti blandi come il Genapol a temperature elevate (Heinz e Niederweis, 2000). Utilizzando la medesima tecnica di estrazione abbiamo dimostrato che la proteina PE_PGRS33-HA, ma non le altre chimere PE-HA, è estratta dalle cellule di *M. smegmatis* (Fig.10). Tale risultato è molto importante poiché la PE_PGRS33 è la prima proteina di *M. tuberculosis* ad essere estratta con tale tecnica e per la quale si ipotizza la localizzazione sulla membrana esterna dei micobatteri a crescita lenta (MspA è assente nei micobatteri a crescita lenta).

E' interessante osservare che mentre l'estrazione di MspA è raggiunta ad alte temperature (90°C), l'estrazione completa della PE_PGRS33-HA è ottenuta a 30°C, visto che l'aumento della temperatura di incubazione con il detergente non produce una maggiore resa (Fig. 10). Questo risultato indica che tale proteina è debolmente associata alla membrana esterna e perciò potrebbe essere facilmente rilasciata dal batterio. Non di meno la PE_PGRS33-HA non è stata rilevata nel surnatante di coltura (dati non presentati). E' possibile che anche stress blandi o perturbazioni della membrana esterna dei micobatteri, come per esempio quelli che si verificano a seguito dell'interazione con il surfattante alveolare, dell'esposizione a peptici antimicrobici o altre difese anti batteriche incontrate durante il processo infettivo risultino in un rilascio della PE_PGRS33, che potrebbe interagire così più facilmente con i componenti dell'ospite (Brennan *et*

al., 2001; Dheenadhayalan *et al.*, 2006; Basu *et al.*, 2007). I nostri risultati dimostrano che la PE_PGRS33 è debolmente associata alla parete cellulare sostenendo recenti dati che mostrano come tale proteina sia rilasciata nell'ambiente extra cellulare attraverso esosomi secreti da cellule dendritiche e macrofagi infettati da *M.tuberculosis*, e che la proteina è ritrovata nelle cellule T dove può indurre segnali apoptotici (Balaji *et al.*, 2007).

E' importante osservare che le chimere PE_{1818c}-HA e Rv3097c-HA non sono state estratte dal Genapol, ciò suggerisce che esse sono inserite più profondamente o associate in modo più forte alla parete cellulare dei batteri. Noi abbiamo già ipotizzato che il dominio PE di per se non sia direttamente esposto sulla superficie dei batteri e possa invece essere inserito più in profondità nella membrana esterna o localizzarsi nello spazio periplasmatico; il fatto che sia resistente alla estrazione con il detergente rinforza tale ipotesi. La chimera Rv3097c-HA è esposta sulla superficie dei batteri e possiede un profilo di idrofobicità paragonabile a quello della PE_PGRS33, tuttavia con tale protocollo di estrazione non siamo stati in grado di estrarla. Il comportamento differente mostrato da queste due proteine durante l'estrazione con il detergente potrebbe dipendere dalla peculiare struttura del dominio PGRS che può contribuire alla localizzazione della PE_PGRS33. Sarebbe interessante determinare se altre proteine PE_PGRS colocalizzano con la PE_PGRS33 e siano facilmente estraibili con blandi detergenti.

Il dato che la Rv3097c sia esposta sulla superficie è particolarmente interessante. Rv3097c codifica per una lipasi che idrolizza triacilgliceroli a lunga catena con un'attività altamente specifica (Deb *et al.*, 2006). E' stato proposto che questa proteina idrolizzi i triacilgliceroli che si accumulano nel citoplasma e possa essere trascritta maggiormente nelle condizioni in cui il batterio per mancanza di nutrienti entri nello stato di latenza noto come *dormancy* (Deb *et al.*, 2006), sebbene debba essere confermato se l'attività della Rv3097c sia confinata nel citoplasma dei micobatteri. Una lipasi extra citoplasmatica potrebbe essere coinvolta nel *turnover* dei lipidi della complessa membrana esterna o nel loro *uptake*.

E' stato precedentemente dimostrato che antigeni eterologhi espressi sulla superficie di *M.bovis* BCG fusi con una lipoproteina sono in grado di stimolare la risposta immunitaria in modo più potente di quando siano secreti o espressi nel

citoplasma (Grode *et al.*, 2002). Per questo motivo, dopo aver dimostrato che i domini PE sono responsabili della localizzazione sulla parete dei micobatteri di antigeni fusi alla loro porzione C-terminale, abbiamo valutato la possibilità di utilizzare il dominio PE_{1818c} come *partner* di fusione per esprimere antigeni eterologhi sulla superficie dei bacilli. Per sviluppare tale sistema di espressione di antigeni, è stato costruito un vettore d'espressione replicativo per facilitare le fusioni delle sequenze codificanti per gli antigeni eterologhi al dominio PE_{1818c} (Fig. 4 e materiali e metodi). La sequenza codificante per la proteina Mpt64, un antigene secreto, altamente immunogeno di *M.tuberculosis* e assente nel ceppo vaccinale *M.bovis* BCG, priva del suo peptide segnale è stata clonata in questo vettore. Sono stati ottenuti quindi i ceppi ricombinanti di *M.smegmatis* e *M.bovis* BCG che esprimono tale chimera (PE_{1818c}-ΔMpt64-HA). In accordo con i risultati mostrati in precedenza in questo studio, la proteina chimera si localizza sulla parete dei batteri ed è accessibile alla degradazione operata dalla proteinasi K in entrambe le specie di micobatteri confermando così la sua esposizione sulla superficie delle cellule (Fig 12 e 13).

In questo studio abbiamo dimostrato che le proteine PE_PGRS33, PE11 e Rv3097c sono espresse sulla parete dei micobatteri e che i domini PE delle proteine PE_PGRS33 e PE11 sono responsabili per la localizzazione sulla superficie dei batteri di antigeni eterologhi, sufficientemente lunghi, fusi alla loro estremità C-terminale. Inoltre abbiamo dimostrato che la proteina PE_PGRS33 è espressa sulla membrana esterna dei micobatteri. Il fatto che tale proteina sia estratta dalle cellule con un blando detergente è molto importante perché grazie a tale metodica potremmo studiare in futuro i diversi membri di questa classe di proteine così poco caratterizzate e la cui funzione è ancora sconosciuta.

E' interessante osservare che i domini PE delle proteine PE_PGRS33 e Rv3097c appartengono allo stesso gruppo filogenetico e sono filogeneticamente vicini, mentre il dominio PE della proteina PE11 appartiene ad un diverso gruppo filogenetico (Gey van Pittius *et al.*, 2006). Il fatto che domini PE filogeneticamente distanti condividano la stessa funzione ci consente di generalizzare i risultati presentati in questo lavoro. Comunque dobbiamo tenere in considerazione che le proteine prese in esame costituiscono solo il 3% del totale esistente in *M.tuberculosis* e che sia possibile che non tutti i domini PE mostrino

la stessa localizzazione cellulare o la stessa funzione. Infine abbiamo utilizzato due differenti domini PE come *partner* di fusione per esprimere antigeni sulla superficie dei micobatteri. Questo ci consentirà di progettare nuovi ceppi ricombinanti di *M.bovis* BCG con un potenziale immunogeno superiore contro *M.tuberculosis* o altri patogeni intracellulari.

BIBLIOGRAFIA

Abdallah AM, Verboom T, Hannes F, Safi M, Strong M, Eisenberg D, Musters RJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk BJ, Luirink J, Bitter W. (2006) A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol* **62**: 667–679.

Adindla, S., and Guruprasad, L. (2003) Sequence analysis corresponding to the PPE and PE proteins in *Mycobacterium tuberculosis* and other genomes. *J Biosci* **28**:169–179.

Agger EM, Andersen P. 2002. A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine*. 22;21(1-2):7-14.

Andersen P. 2007. Tuberculosis vaccines-an update. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 484-487.

Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, Hatch G, Williams A, Kritsch C, Lingnau K, von Gabain A, Andersen CS, Korsholm KS, Andersen P. 2006. Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine*. 29;24(26):5452-60.

Balaji, K.N., Goyal, G., Narayana, Y., Srinivas, M., Chaturvedi, R., and Mohammad, S. (2007) Apoptosis triggered by Rv1818c, a PE family gene from *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by mitochondrial intermediates in T cells. *Microbes Infect* **9**: 271–281.

Banu, S., Honore, N., Saint-Joanis, B., Philpott, D., Prevost, M.C., and Cole, S.T. (2002). Are the PE_PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens ? *Mol. Microbiol.* 44, 9-19.

Basu, S., Pathak, S.K., Banerjee, A., Pathak, S., Bhattacharyya, A., Yang, Z., et al. (2007) Execution of macrophage apoptosis by PE_PGRS33 of

Mycobacterium tuberculosis is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* **282**: 1039–1050.

Brennan, M.J., Delogu, G., Chen, Y., Bardarov, S., Kriakov, J., Alavi, M., and Jacobs, W.R., Jr. (2001) Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun* **69**: 7326–7333.

Brennan, M., J. et al (2004). PE and PPE multigene families of mycobacteria. Capitolo 33 tratto dal testo: “ Tuberculosis and the tubercle bacillus” Editors: Cole, S. T.*et al.* ASM Press. Washington.

Brennan, M.J., and Delogu, G. (2002) The PE multigene family: a ‘molecular mantra’ for mycobacteria. *Trends Microbiol* **10**: 246–249.

Brennan P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* (2003). **83**, 91-97.

Brennan PJ. et al., 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64:29-63.

Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27;104(13):5596-601.

Cascioferro A, Delogu G, Colone M, Sali M, Stringaro A, Arancia G, Fadda G, Palù G, Manganeli R. (2007). PE is a functional domain responsible for protein translocation and localization on mycobacterial cell wall. *Mol Microbiol.* 66(6):1536-47.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393, 537–544.

Cole, S. T. (2002). Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*. 148, 2919-2928.

Cole, S. T. ,and Barrell,B.G. (1998). Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Genet. Tuberculosis. (Novartis Found Symp)* 217, 160-172.

Corbett, L. and Raviglione, M.(2005). Tuberculosis and the Tubercle Bacillus cap.1, ASM press.

Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP. 1992. Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature*. 358:727-33.

Deb, C., Daniel, J., Sirakova, T.D., Abomoelak, B., Dubey, V.S., and Kolattukudy, P.E. (2006) A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **281**: 3866–3875.

Delogu, G., Pusceddu, C., Bua, A., Fadda, G., Brennan, M.J., and Zanetti, S.(2004). Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure.*Mol.Microbiol.*52, 725-733.

Dheenadhayalan, V., Delogu, G., and Brennan, M.J. (2006). Expression of the PE_PGRS 33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microbes Infect* **8**: 262–272.

Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, Doherty TM, Jensen CG, Andersen P. 2006. Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guerin immunity. *J Immunol.* 1;177(9):6353-60.

Engelhardt H, Heinz C, Niederweis M. 2002. A tetrameric porin limits the cell wall permeability of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem.* 4;277:37567-72.

Engleberg N. Cary, DiRita V., Dermody T.S. (2006). Mechanisms of microbial disease 4° edizione LWW editore. Capitolo 23.

Fine PE. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet.* 18;346(8986):1339-45.

Gey van Pittius, N.C., Sampson, S.L., Lee, H., Kim, Y., van Helden, P.D., and Warren, R.M. (2006). Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster regions. *BMC Evol Biol* **6**: 95.

Gomez, J. and McKinney J. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis.* 84, 29-44.

Grode, L., Kursar, M., Fensterle, J., Kaufmann, S.H., and Hess, J. (2002) Cell-mediated immunity induced by recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy. *J Immunol* **168**: 1869–1876.

Grode L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Nasser Eddine A, Mann P, Goosmann C, Bandermann S, Smith D, Bancroft GJ, Reyrat JM, van Soolingen D, Raupach B, Kaufmann SH. 2005. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest.* 115(9):2472-9.

Heinz, C., and Niederweis, M. (2000) Selective extraction and purification of a mycobacterial outer membrane protein. *Anal Biochem* **285**: 113–120.

Hong, X., and Hopfinger, A.J. (2004) Molecular modelling and simulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell wall permeability. *Biomacromolecules* **5**:1066–1077.

Horwitz MA, Harth G. 2003. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 71(4):1672-9.

Jackson M., Stadthagen G and Gicquel B. (2007) Long-chain multiple methyl-branched fatty acid-containing lipids of *Mycobacterium tuberculosis*: biosynthesis, transport, regulation and biological activities. *Tuberculosis* 87(2):78-86.

Kartmann B, Stenger S, Niederweis M. 1999. Porins in the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 181(20):6543-6.

Kessel M, Brennan MJ, Trus BL, Bisher ME, Steven AC. 1998. Naturally crystalline porin in the outer membrane of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol.* 5;203(1):275-8.

Koch R. (1882). Die Aetiologie der Tuberculose. *Berl.Klin.Wochenschr.* **19**, 21-230.

Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.* 37(2):239-53.

Kolattukudy P. E., Fernandes N. D., Azad A. K., Fitzmaurice A. M. e Sirakova T. D. (1997) Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Molecular Microbiology.* 24, 263-270.

La Placa M. (2005). Principi di microbiologia medica. *Esculapio* (X°edizione), 2005.

Lichtinger T, Heym B, Maier E, Eichner H, Cole ST, Benz R. 1999. Evidence for a small anion-selective channel in the cell wall of *Mycobacterium bovis* BCG besides a wide cation-selective pore. *FEBS Lett.* 9;454(3):349-55.

Liu J., Barry C.E. (1999). Cell wall: physical structure and permeability. *Mycobacteria, molecular biology and virulence.* Colin R. (1999).12: 220-236.

Mahfoud, M., Sukumaran, S., Hulsmann, P., Grieger, K., and Niederweis, M. (2006) Topology of the porin MspA in the outer membrane of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **281**: 5908–5915.

Minnikin, D.E. (1982) Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In *The Biology of the Mycobacteria: Physiology, Identification and Classification*. Ratledge, C. and Stanford, J. (eds). London: Academic Press, pp. 95-184.

Murray, P. R. et al. (2005). *Medical Microbiology*. 5th edition. Univ. of Maryland, Baltimore, Brandon-Hill, cap.40.

Niederweis M, Ehrt S, Heinz C, Klöcker U, Karosi S, Swiderek KM, Riley LW, Benz R. 1999. Cloning of the *mspA* gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* 33:933-45.

Niederweis M. (2003). Mycobacterial porins- new channel proteins in inique outer membranes. *Molecular Microbiology* 49:1167-1177.

Ortalo- Magnè A., Dupont M. A., Lemassu A., Andersen Å., Gounon P., Daffè M. (1995). Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* (1995). 141, 1609-1620.

Ramakrishnan, L. et al. (2000). Granuloma-specific expression of mycobacterium virulence proteins from the glycine-rich PE_PGRS family. *Science* 288, 1436-1439.

Richeldi L., Fabbri L., Grassi C. (2003). La tubercolosi agli inizi del XXI secolo: diagnosi e terapia. (Dossier), Clinica delle malattie dell'apparato respiratorio Università di Modena e Regio Emilia, Università di Pavia.

Rousseau C., Winter N., Pivert E., Bordat Y., Neyrolles O., Avé P., Huerre M., Gicquel B., Jackson M. (2004). Production of phthiocerol dimycocerosates protects Mycobacterium tuberculosis from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell Microbiol.* 6:277-87.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sampson S.L., P. Lukey, R.M.Warren, P.D. van Helden, M.Richardson, and M.j. Everett. Expression, characterization and subcellular localization of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE gene Rv1917c. *Tuberculosis* 81:305-317. 2001.

Snapper, S.B., Melton, R.E., Mustafa, S., Kieser, T., and Jacobs, W.R., Jr (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 4: 1911–1919.

Stahl C, Kubetzko S, Kaps I, Seeber S, Engelhardt H, Niederweis M. 2001. MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* 40:451-64.

Strong, M., Sawaya, M.R., Wang, S., Phillips, M., Cascio, D., and Eisenberg, D. (2006) Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 8060–8065.

Tokuyasu, K.T. (1973) A technique for ultracytometry of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* **57**: 551–565.

Tundup, S., Akhter, Y., Thiagarajan, D., and Hasnain, S.E. (2006) Clusters of PE and PPE genes of *Mycobacterium tuberculosis* are organized in operons: evidence that PE Rv2431c is co-transcribed with PPE Rv2430c and their gene products interact with each other. *FEBS Lett* **580**:1285–1293.

Siti internet consultati

World Health Organization *www.who.int*

<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Giorgio Palù per la sua disponibilità, l'attenta supervisione e attenzione dimostratami durante tutto il periodo del dottorato di ricerca.

La figura del Prof. Riccardo Manganelli è stata fondamentale per la riuscita e il completamento del progetto di dottorato. In questi anni è stato stimolante e arduo provare a seguirlo nel lavoro e nello studio. A livello professionale gli devo tutto perché è riuscito a farmi maturare in ambito scientifico e perché è stato in grado di coinvolgermi in iniziative ricche di interesse e fascino intellettuale. Inoltre ha dimostrato una resistenza e una corazza alla mia frequentazione degna della miglior parete del genere *Mycobacterium*.

Coloro che mi hanno accompagnato in questo percorso e mi hanno aiutato nel lavoro sperimentale sono stati altrettanto importanti. Un grande riconoscimento va alle Dott.sse Stefania Zoncatto e Paola Patuzzo che hanno contribuito anche a livello personale a farmi diventare più completo e paziente.

Non posso non menzionare Il Prof. Giovanni Delogu e la Dott.ssa Michela Sali che all'inizio sono stati dei preziosi collaboratori per il mio progetto di ricerca e poi nel corso degli anni sono diventati amici e compagni d'avventura.

Ringraziamenti...

I miei genitori sono stati perfetti. Di momenti difficili e delicati ne sono arrivati alcuni in questi anni e loro non mi hanno mai fatto sentire solo. La sensazione di pace, sicurezza e felicità che provo quando sono a casa scaturisce dalla loro esistenza.

L'allontanamento da casa ha avuto su di me un effetto positivo che è stato quello di riportarmi vicino ad Ambra e Gabriele. Vivere nella stessa realtà ci ha fortunatamente "costretto" a conoscerci da adulti e a condividere esperienze che rendono indistruttibile il nostro senso di famiglia e condivisione (*La Domenica siamo ai limiti del Bed & Breakfast però...*).

Tutto questo, che è già tantissimo per me, è arricchito ogni giorno da Dario il fantasista della squadra (*per fede Kakà, ma per definizione Messi, giusto?*). Diciamo pure che è l'unico per il quale riesco ad alzarmi alle otto del mattino (*capite quanto sia difficile per me?*) per sentirlo contento e assonnato andare a scuola. Inoltre "*noi siamo artisti, cuochi, pirati!*" (*è molto importante la postura in questo momento*) e se ti dico "*sorprendimi*" non preoccuparti lo fai sempre in modo splendido (*anzi.. clamoroso*).

Ad un certo punto del mio dottorato c'è stato un momento in cui non mi sentivo più la terra sotto i piedi, ero completamente bloccato. In mio soccorso sono arrivate delle persone che in modo diverso hanno caratterizzato la mia infanzia: i miei nonni. Giovanna è unica per come riesce a ridere e stare con noi (*le colazioni estive a base di fichi sono un cult*), ma gli aiuti inaspettati sono arrivati da Nicola e Carmelo. Le loro rapide apparizioni notturne e oniriche mi hanno ricordato quali ostacoli (*è proprio il caso di dirlo*) hanno provato a superare con le proprie energie e senza l'aiuto di nessuno finché è stato possibile.

In laboratorio sono stato altrettanto fortunato. Riccardo e Roberta sono stati eccezionali nel modo in cui mi hanno accolto (*...sono già volati 5 anni*) e per come mi hanno sostenuto in questi tre anni. Con Elisa, Francesca, Caterina e Valentina ho passato dei momenti divertenti in lab e sono loro riconoscente per questo. Stefano e Serena sono stati sempre disponibili con me e li ringrazio di questo. In dipartimento ho trovato in Saverio un eccellente interlocutore per tutto

ciò che riguarda alcuni tra i temi fondamentali della microbiologia (*calcio, motori e...*).

Katia, Paola e Cristina hanno condiviso con me praticamente tutto ciò che ha riguardato la nostra vita nel lavoro e negli affetti negli anni accademici e di dottorato poi. E' bello ritrovarsi ogni volta con il sorriso e potersi raccontare tutto con semplicità ed estrema sincerità.

Mi sento davvero onorato e fortunato per aver incontrato sul mio percorso Elena. Per i nostri modi di essere e di fare non è stato difficile essere sulla stessa lunghezza d'onda. Per telefono o meglio quando è possibile vedersi è sempre una festa.

Mi è capitato spesso in questi tre anni di sentire la necessità di cambiare aria e scomparire da Padova per rifare un pieno di sogni. Sì, conosco anche una persona che riesce a ridarmi la spinta e i miei migliori propositi. Francesca sa benissimo quale posto profondissimo occupa dentro di me e sa anche che l'inseguimento non è terminato, anche se in effetti il premio *woman with the bag* non glielo toglie nessuno.

Una menzione speciale meritano Luca, Federica e la super pupetta Anna. Con loro le mie giornate sono serene e ovviamente Anna catalizza le mie attenzioni.

Adesso il tono si farà un po' più confidenziale, per ultimi ho deciso di ringraziare gli amici che hanno fatto con me il percorso in questi anni.

Non ci sono dubbi sulla sua idiozia (*maledizione*), ma è in assoluto il fuoriclasse che ogni squadra vorrebbe per sé. Esemplare nella sua dedizione al lavoro (*orario spiaggia dalle 12 alle 19*), e nel suo essere metodico (*ovviante parliamo di divertimento e festini*) nel rapporto con gli altri. Grande socio, inimitabile (*da leggere con tonalità Galeazzi*). Per tua fortuna ci sono Antonio e Claudia che mi aiutano a insultarlo quando serve (*praticamente sempre*). A parte tutto questo è bello ritrovarsi sempre in modo così semplice e naturale.

Ormai sono abituato ai suoi insulti e alle sue filippiche contro la mia persona, ma senza di queste mi sentirei perduto. Il giorno che Giorgio mi risponderà al telefono e nella sua voce percepirò gentilezza ed educazione comincerò a preoccuparmi. Memorabili i turni di *Champions* a casa sua con pizza e sciarpe a seguito.

Un altro *ironman* è Pier Paolo. Eccezionale come *hair Stylist* e come promotore del movimento politico e culturale “*more hair for everybody*” (*l’inflessione in questo caso è quella di Cetto La Qualunque*). La sua è stata un’opera di ricostruzione fisica nei miei confronti, prima un’ora di corsa e poi mangiate a botte di due Kebab per volta. Sempre presente quando è stato necessario lui è un altro titolare insostituibile del team.

La colonia dei Saccensi a Padova è davvero estesa e il tempo l’ha riunita e fortificata sotto la guida dell’unico Maestro di vita e di virtù Gerlando (*riceve solo per appuntamento*). Ma in questi mesi Simone, Atika, Maria Grazia, Giovanni e in misura diversa Michele e Angelo sono stati formidabili. Ci sono almeno due esperimenti fondamentali della tesi che sono stati svolti il giorno dopo una serata trascorsa in loro compagnia e con davvero pochissime ore di sonno sulle spalle. La mia riconoscenza nasce da queste ragioni e dal fatto di sentirmi a casa ogni volta che stiamo insieme.

Infine grazie a personaggi del calibro di Lupin III, Zio Paperone, Rémy il topino cuoco ed Anton Ego l’inflessibile esperto culinario. Le loro storie mi sono state spesso da esempio, mi portano a passare più tempo con Dario ed in più mi aiutano a coltivare il Garfield che, neanche tanto nascosto, vive dentro di me.