



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli studi di Padova

Dipartimento di Istologia Microbiologia e Biotecnologie Mediche

**DOTTORATO DI RICERCA IN: VIROLOGIA E BIOTECNOLOGIE MICROBICHE
XXI CICLO**

**“Sviluppo di un sistema d’espressione inducibile per l’espressione
condizionale in micobatterio basato sull’utilizzo dei repressori Pip e TetR”**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Palù Giorgio

Supervisore: Ch.mo Prof. Manganelli Riccardo

Dottoranda: Boldrin Francesca

INDICE

1.1 ABSTRACT (<i>versione in italiano</i>)	5
1.2 ABSTRACT (<i>versione in inglese</i>)	7
2. INTRODUZIONE	9
2.1 Epidemiologia della tubercolosi	9
2.2 Caratteri generali dei micobatteri	11
2.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
2.4 Patogenesi della tubercolosi	13
2.5 La diagnosi dell'infezione tubercolare	14
2.6 Trattamento terapeutico della tubercolosi	16
2.7 Ceppi batterici multi- resistenti	18
2.8 La vaccinazione anti-tubercolare	19
2.9 Il rapporto di <i>M. tuberculosis</i> con il sistema immunitario dell'ospite	19
2.10 Sistemi di espressione a regolazione positiva e negativa	21
2.11 Sistemi di espressione inducibile nei micobatteri	22
2.12 Il sistema della tetraciclina	24
2.12a Le tetracicline	24
2.12b Meccanismo di resistenza alla tetraciclina	25
2.13 Modelli di regolazione dell'espressione basati sull'utilizzo della tetraciclina	27
2.14 Sistema di regolazione dell'espressione genica basato sui repressori TetR e Pip	28
2.15 PiP: il regolatore del gene per la resistenza alla pristinamicina	29
3. SCOPO	31
4. MATERIALI E METODI	32
4.1 Ceppi batterici, terreni e condizioni di crescita	32
4.2 Linee cellulari, terreni e condizioni di crescita	33
4.3 Manipolazione del DNA	33
4.4 Reazione di PCR mutagenesi sito- specifica	35
4.5 Elettroporazione di <i>M. smegmatis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	35

4.6 Sistema del <i>recombineering</i> di <i>M. tuberculosis</i>	36
- Preparazione di cellule elettrocompetenti del ceppo <i>recombineering</i>	36
- Preparazione del frammento <i>AES</i>	36
- Elettroporazione di <i>M.tuberculosis</i> con <i>AES</i>	36
4.7 Saggi d'attività di β - galattosidasi in <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. smegmatis</i>	36
4.8 Ottenimento di DNA <i>single strand</i> attraverso denaturazione con alcali	37
4.9 Infezione di <i>M. tuberculosis</i> Δ <i>fadD32</i> delle cellule appartenenti alla linea monocitica THP-1	38
4.10 Colorazione di <i>Ziehl- Nielsen</i> per micobatterio	39
4.11 Curva di crescita per i mutanti condizionali di <i>M. tuberculosis</i> in presenza di ATc	39
4.12 Costruzione di <i>knockout</i> condizionale in <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. smegmatis</i>	39
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	42
5.1 Primo modello di sistema d'espressione reprimibile	42
5.1.1 Inserimento dei repressori Pip e TetR nel plasmide pSE100	42
5.1.2 Saggi di attività β -galattosidica per valutare il funzionamento del primo modello di sistema Pip/ TetR in <i>M. smegmatis</i>	44
5.2 Secondo modello di sistema d'espressione reprimibile	44
5.2.1 Mutagenesi sito- specifica per l'inserimento in $P_{furA102}$ dei due siti operatori <i>tetO</i>	46
5.2.2 Saggi di attività β -galattosidica per valutare il funzionamento del secondo modello di sistema Pip/ TetR in <i>M. smegmatis</i>	46
5.2.2a Analisi dell'attività β - galattosidica in colture di <i>M. smegmatis</i> cresciute su terreno liquido	47
5.2.2b Analisi dell'attività β - galattosidica in colture di <i>M. smegmatis</i> cresciute su terreno solido	48
5.3.1 Terzo modello di sistema di espressione reprimibile	48
5.3.2 Saggi di attività β -galattosidica in <i>M. smegmatis</i> e <i>M.tuberculosis</i> per valutare il funzionamento del terzo modello di sistema Pip/ TetR	48
5.3.2a Analisi dell'attività β - galattosidica in colture di <i>M. smegmatis</i> cresciute in terreno solido	49

5.3.2b Analisi dell'attività β - galattosidica su colture di <i>M. smegmatis</i> cresciute in terreno liquido	49
5.3.3 Analisi dell'attività β - galattosidica su colture di <i>M. tuberculosis</i> cresciute in terreno liquido	50
5.3.4 La repressione del sistema Pip/ TetR dose- dipendente alla quantità di ATc fornita	51
5.4 Mutanti condizionali in <i>M. smegmatis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	53
5.5.1 Mutante condizionale per <i>ftsZ</i> in <i>M. smegmatis</i>	54
5.5.2a Crescita del mutante condizionale per <i>ftsZ</i> in terreno solido	55
5.5.2b Crescita del mutante condizionale per <i>ftsZ</i> in terreno liquido	55
5.6 Osservazione morfologica dei batteri al microscopio a contrasto di fase	56
5.7 Selezione di mutanti spontanei che hanno perso la regolazione all'ATc	57
5.8.1 Mutanti condizionali in <i>M. tuberculosis</i> per <i>fadD32</i> e <i>rv3213c</i>	58
5.8.2a Crescita dei mutanti condizionali <i>fadD32</i> e <i>rv3213c</i> in terreno solido	59
5.8.2b Crescita dei mutanti condizionali <i>fadD32</i> e <i>rv3213c</i> in terreno liquido	59
5.9 Osservazione al microscopio di H37Rv Δ <i>fadD32</i>	61
5.10 Il sistema Pip/ TetR regola l'espressione genica di <i>M. tuberculosis</i> all'interno dei macrofagi	62
5.11.1 Mutante condizionale <i>Rv3790</i> di <i>M. tuberculosis</i>	63
5.11.2 Costruzione del mutante condizionale per <i>Rv3790</i> di <i>M. tuberculosis</i>	64
6. CONCLUSIONI	68
7. APPENDICE	71
8. BIBLIOGRAFIA	72
9. ELENCO ABBREVIAZIONI	75

RINGRAZIAMENTI

Prima di lasciarvi alla lettura della mia tesi, frutto di questi tre anni di dottorato, volevo spendere due parole per ringraziare chi ha partecipato alla realizzazione di questo mio traguardo.

Prima di tutto vorrei dire un super grazie alla mia Famiglia, davvero degna di essere scritta con la F maiuscola; posso ritenermi fortunata ad avere avuto il loro amore così grande che mi ha aiutato in moltissime situazioni anche al di fuori di queste lavorative.

E da tre anni, insieme ai miei genitori e a Matteo c'è Davide..credo di aver ottenuto tutto quello che di meglio potevo chiedere dalla vita..

Un doveroso e soprattutto sentito grazie lo devo a Riccardo e Roberta; con loro è iniziato questo mio percorso ormai di quasi cinque anni (se comprendo anche quelli della tesi di laurea); sono proprio due persone splendide e molto professionali, che mi hanno fatto crescere con la loro esperienza e aiutato dimostrandomi sempre disponibilità e rispetto.

...e che dire di Elisa, credo di aver conquistato una delle persone a cui più tengo proprio in questo laboratorio.. ha carattere da vendere e da quando siamo diventate pure vicine di casa dovrà accettare la realtà che avrà una “rompina” tra i piedi per molto a lungo😊😊..

Insieme ad Elisa devo riconoscere di essere all'interno di un team di laboratorio con un'alchimia che funziona.. è davvero un bel gruppo e spero di trovarne altrettanti nelle prossime esperienze lavorative che ci saranno nella mia vita.

Infine vorrei ringraziare tutti coloro che mi hanno accompagnato durante questo mio cammino a cui spero di aver lasciato qualcosa di buono anch'io..

grazie di cuore.

Francesca

1.1 ABSTRACT (*versione in italiano*)

I sistemi d'espressione inducibili rappresentano ad oggi un potente mezzo con il quale studiare la funzione dei geni essenziali e nell'individuazione di bersagli farmacologici. Essi infatti si dimostrano fondamentali nello studio della funzione di geni quando questa è sconosciuta in quanto permettono di dosarne l'attività in risposta ad un semplice stimolo come l'aggiunta al terreno di un metabolita. Questo sarà un importante strumento per facilitare sia lo studio di nuovi regolatori che lo studio di geni essenziali o importanti per la virulenza.

Durante questo triennio di dottorato la mia attività di ricerca si è occupata dello sviluppo e della caratterizzazione di un sistema di regolazione genica per micobatterio che permettesse un controllo negativo basato sull'attività di due repressori: Pip e TetR. In questo sistema il gene d'interesse è posto sotto il controllo trascrizionale di un promotore dipendente da Pip (*ptr*); Pip a sua volta è posto sotto la regolazione di TetR attraverso l'inserimento nel suo promotore, di due operatori (*tetO*) riconosciuti specificamente da TetR. L'induttore utilizzato per questo sistema è l'antibiotico anidrotetraciclina (ATc), prodotto di degradazione della tetraciclina, meno tossico ma ancora in grado di interagire con il regolatore TetR.

In assenza di ATc, TetR reprime *pip* e il gene d'interesse può essere trascritto; con l'aggiunta di ATc invece si ottiene come effetto l'espressione di *pip* e di conseguenza lo spegnimento trascrizionale del gene di interesse.

Un'applicazione molto utile per un sistema d'espressione inducibile è la costruzione di mutanti condizionali per lo studio di geni essenziali con lo scopo di valutare la possibilità di validare il loro impiego come bersagli farmacologici. A tal fine è stato costruito un mutante condizionale in *M. smegmatis*, dove il promotore del gene *ftsZ*, è stato sostituito dal promotore regolato dal repressore *pip*. Tale mutante in seguito, è stato trasformato con il plasmide integrativo avente entrambi i repressori ed il ricombinante ottenuto è risultato incapace di crescere già a concentrazioni sub-inibitorie di ATc, confermando così la repressione trascrizionale di *ftsZ*. Lo stesso metodo è stato impiegato per ottenere due mutanti condizionali in *M. tuberculosis* H37Rv dove l'operone di *fadD32* (essenziale in *M. smegmatis*), o il gene *rv3213c* (non essenziale; utilizzato come controllo) sono stati posti sotto il controllo trascrizionale di P_{ptr} .

In presenza di ATc (in concentrazione pari a 200ng/ml) solo il mutante condizionale di *rv3213c* è stato in grado di crescere dimostrando come l'operone di *fadD32* sia essenziale anche in *M. tuberculosis*.

Una tecnica alternativa per l'ottenimento di un mutante condizionale è stata applicata con il gene *Rv3790* di *M. tuberculosis*; poiché esso appartiene ad un operone costituito da 12 geni, non è stato possibile utilizzare la strategia prevista per *ftsZ* e *fadD32* in quanto un silenziamento di *Rv3790* si sarebbe trasmesso anche all'intero operone. Per poter analizzare gli effetti dovuti unicamente alla presenza/ assenza di *Rv3790* nella cellula batterica, è stato sviluppato un sistema dove la regolazione ATc-dipendente è stata vincolata solamente al gene suddetto mentre i geni appartenenti al medesimo operone continuavano ad essere regolati a livello trascrizionale dal loro promotore *wild-type*.

Lo sviluppo di un innovativo sistema d'espressione inducibile che utilizza l'anidro- tetraciclina come induttore, rappresenta uno strumento prezioso per lo studio di geni che sono essenziali ed associati alla virulenza nel micobatterio.

1.2 ABSTRACT (*versione in inglese*)

Inducible gene expression systems are powerful tools for studying gene function and for the validation of drug targets in bacteria. We report the development of a novel gene regulation system that allows negative-controlled gene expression.

The system is based on two repressors: Pip and TetR. The gene of interest is placed under the transcriptional control of a Pip-dependant promoter (*ptr*); the Pip encoding gene, however, is placed under TetR transcriptional regulation. Both *pip* and *tetR* were integrated into the chromosome using an integrative plasmid.

In the absence of ATc, TetR represses *pip* and the gene of interest can be transcribed. However, upon addition of anhydrotetracycline (ATc), TetR allows *pip* expression, resulting in the stringent repression of the gene of interest.

Using *lacZ* as a reporter gene, we showed that supplementation with subinhibitory concentrations of ATc allows stringent repression of its transcription in *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* both in liquid and in solid media. Time-course and dose-response experiments showed that repression could be modulated in response to ATc concentration.

One of the most useful applications of a reverse-inducible system is the possibility to construct conditional mutants of essential genes, allowing their characterization and validation as drug targets. At this purpose we constructed a *M. smegmatis* mutant where the *ftsZ* promoter was replaced with a Pip regulated promoter. Upon integration of the integrative plasmid carrying *pip* and *tetR*, the recombinant strain was unable to grow in sub- inhibitory ATc concentration, confirming *ftsZ* repression. The same technique was used in *M. tuberculosis* where *fadD32* operon (essential in *M. tuberculosis*) and *rv3213c* (not essential in *M. tuberculosis*) were placed under P_{*ptr*} transcriptional control. In the presence of ATc (in the concentration of 200ng/ml) only the conditional mutant of *rv3213c* was able to grow demonstrating that *fadD32* operon is essential in *M. tuberculosis*.

A different strategy to construct conditional mutant of *Rv3790* was elaborated; this gene belongs to a large operon in *M. tuberculosis* so it was elaborated a technique that allows to have an dependant ATc- regulation only in *Rv3790* while the other genes continue to be transcribed by their wild- type promoter.

The development of a novel reverse-inducible system based on ATc will represent an invaluable tool to study essential genes and virulence-associated genes in mycobacteria.

2. INTRODUZIONE

2.1 Epidemiologia della tubercolosi

George Orwell, Franz Kafka, Charlotte Brontë e Frederic Chopin hanno qualcosa in comune: sono tutti morti a causa della stessa malattia, nota al tempo come “consunzione”[1].

Nel 2007 è ricorso il 125esimo anniversario dalla scoperta per opera di R. Kock dell’agente eziologico (*Mycobacterium tuberculosis*; *M. tuberculosis*) di quella malattia che oggi viene chiamata tubercolosi (TBC). A distanza di oltre 120 anni dalla scoperta di *M. tuberculosis* e nonostante i progressi compiuti in ambito patogenetico e terapeutico, ad oggi la tubercolosi rappresenta nel mondo la principale causa di morte da singolo agente infettivo seconda solo all’infezione da HIV [2].

Secondo i dati dell’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), più di un terzo della popolazione mondiale, cioè circa due miliardi di persone, presenta la tubercolosi nella sua “forma latente” e ogni anno si registrano circa 8 milioni di nuovi casi con 2 milioni di morti in tutto il mondo [3]. Il tasso d’incidenza annuale varia da 356 casi ogni 100.000 abitanti in Africa dove colpisce principalmente adolescenti e giovani adulti, a 41 (per lo più persone anziane) ogni 100.000 abitanti in America [4]. Nel 2005, il paese con l’incidenza più elevata di tubercolosi era lo Swaziland (Africa), con 1262 casi ogni 100.000 persone. L’India ha il più elevato numero d’infezioni, con oltre 1,8 milioni di casi, ed insieme a Cina, Indonesia, Bangladesh e Pakistan costituiscono circa la metà del fenomeno globale [3].

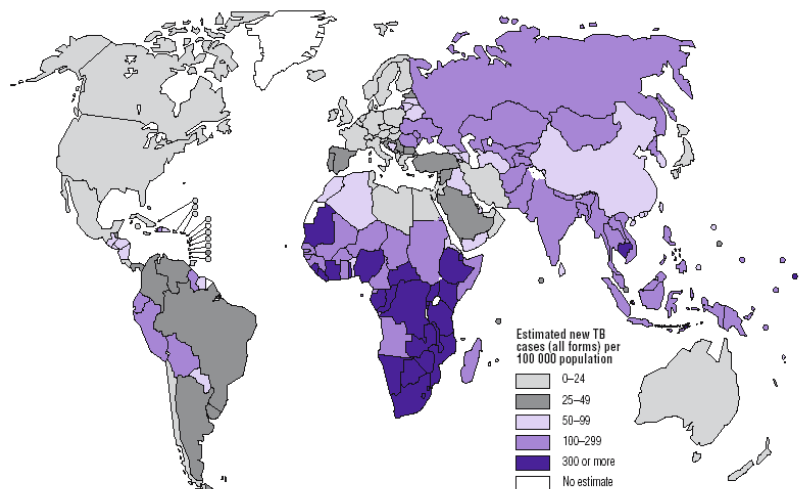


Figura 1 Diffusione della tubercolosi nel mondo (tratto da: WHO REPORT 2008 | GLOBAL TUBERCULOSIS CONTROL)[3].

Nel 1993 l'OMS dichiarò la tubercolosi "Emergenza Mondiale" a seguito della ripresa della diffusione dell'epidemia; i fattori che hanno favorito e favoriscono tuttora l'espansione della malattia sono principalmente quattro:

1. la concomitante diffusione dell'HIV con il suo effetto devastante: infatti l'una favorisce il propagarsi dell'altra; un individuo HIV positivo presenta un rischio 100 volte superiore di ammalarsi di TBC, in quanto il deficit immunitario determinato dalla malattia, permette che altre infezioni possano essere acquisite;
2. l'aumento soprattutto negli ultimi decenni di spostamenti per viaggi, attività lavorative tra paesi anche molto distanti tra loro;
3. la scarsa opera di prevenzione e cura in particolar modo a livello delle fasce sociali a maggior rischio di infezione;
4. l'uso improprio dei farmaci che di fatto ha indotto la comparsa di ceppi batterici multi resistenti (MDR- TB) [5].

La risposta a questa situazione, individuata dall'OMS nel 1995, si chiamò DOTS (*Directly Observed Treatment Short-course*), una terapia di breve durata, somministrata sotto il controllo medico, che risulta efficace nel 95% delle situazioni. Obiettivo dell'Organizzazione è proprio quello di garantire la possibilità di accedere al trattamento DOTS, il cui costo è basso (10-15 dollari per ogni individuo), nei territori di maggiore diffusione e in quelli dove i casi sono limitati.

La necessità di diffondere il trattamento è quella di prevenire il contagio: ogni persona affetta da tubercolosi polmonare attiva, se non curata, infetta dalle 10 alle 15 persone l'anno. Ma ciò non fu più sufficiente e nel 2001 l'OMS mette in campo una nuova strategia "*Stop TB strategy*"; in pratica si tratta di un programma volto a potenziare quello del DOTS appunto andando a porre maggior attenzione ai casi di infezione HIV- TBC e di multi- resistenza ai farmaci [6]. Non solo, il terzo punto del programma prevede il potenziamento dei sistemi sanitari siano essi pubblici che privati in modo da raggiungere il maggior numero possibile di malati, e assicurare che venga fornita loro la migliore assistenza possibile. Una maggior sensibilizzazione verso la popolazione sia sana che malata al fine di renderla consapevole dei rischi della malattia ed un inevitabile potenziamento nel campo della ricerca sono gli ultimi due punti del programma di questo progetto che entro il 2015 dovrebbe curare 50 milioni di persone, dimezzare delle percentuali di incidenza e mortalità e così salvare 14 milioni di vite.

2.2 Caratteri generali dei micobatteri

I micobatteri appartengono all'ordine degli *Actinomycetales*, alla famiglia delle *Mycobacteriaceae* e al genere *Mycobacterium* [7].

Osservati al microscopio, appaiono a forma di bastoncino o filamento, di circa 2- 4 μm di lunghezza e 0.5 μm di larghezza; sono asporigeni e privi di ciglia, non sono dotati di motilità. Appartengono alla classe dei batteri gram- positivi, sono batteri alcol-acido resistenti, eterotrofi e crescono bene in terreni arricchiti (soprattutto se con albumina). Tali microrganismi, come si può immaginare dalla sede preferenziale che infettano, sono aerobi obbligati. Le specie di questo genere mostrano grande variabilità, benché per convenzione, vengono classificati sulla base dei diversi parametri come ad esempio sulla pigmentazione che assumono a seconda della presenza o meno della luce o sulla base del tasso di crescita.

La maggior parte dei micobatteri appartiene alla classe cosiddetta dei *MOTTs* (= "*Mycobacterium other than tuberculosis*"). Si tratta di micobatteri non tubercolari (anche definiti atipici), che costituiscono una categoria molto estesa di micobatteri il cui carattere ubiquitario ne comporta la possibile presenza nell'aria, ambiente, nel terreno, nelle acque, in alcuni animali (domestici e non) ove si mantengono allo stato saprofitico. Sono in grado di degradare composti organici come il cloruro di vinile o il fenantrene, producendo metaboliti secondari quali steroidi e ossidi di alcheni a basso peso molecolare; crescono ad una temperatura ideale compresa tra i 30°C ed i 37°C e non sono patogeni per l'uomo.

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 TBC che colpisce l'uomo; in questo gruppo rientrano: *Mycobacterium tuberculosis* (patogeno per l'uomo), *Mycobacterium bovis* (patogeno per gli animali), e *Mycobacterium africanum*. Il *Mycobacterium leprae* (agente eziologico della lebbra) è l'esempio di un altro micobatterio a crescita lenta in grado di dare patologia nell'uomo.

2.3 *Mycobacterium tuberculosis*

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

Nel 1998 è stato completamente sequenziato il genoma del ceppo H37Rv di *M. tuberculosis*, e ciò ha permesso di ricavare ulteriori informazioni riguardo gli aspetti distintivi del microorganismo [8]. Il genoma circolare comprende 4.411.529 paia di basi che costituiscono circa 4000 geni; una caratteristica distintiva del genoma è rappresentata dall'alto contenuto (circa 65.6% del totale) di guanine e citosine. Grazie all'utilizzo della bioinformatica è stato possibile identificare 3.924 “*open reading frame*”, responsabili di circa il 91% della potenziale attività di codifica. Sfruttando la disponibilità 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 ipotetiche proteine, mentre sono state individuate informazioni e similarità per altre 44%. Nel restante 16% non sono state ritrovate somiglianze con altre proteine note, e questo può voler dire che si tratti di proteine con funzioni specifiche e uniche di micobatterio.

Si è potuto osservare inoltre come il genoma di micobatterio differisca da quello di tutti gli altri batteri per il contenuto elevato di geni codificanti per enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi (oltre 250 identificati rispetto ai soli 50 in *E. coli*). *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, può variare dalle 18 alle 24 ore (in rapporto ai circa 20 minuti di *E. coli*). E' un parassita intracellulare facoltativo, infatti dopo essere stato fagocitato dai macrofagi alveolari, è in grado infatti di resistere alla loro attività *killer*, riuscendo a replicarsi con successo, senza che l'ospite possa eliminarlo.

Presenta una tipologia di parete, assolutamente specifica nel suo genere, la quale gli permette di sviluppare resistenze alla maggior parte degli antibiotici. Grazie alla presenza di alcuni costituenti (arabinogalattano e acidi micolici) nella parete, il micobatterio possiede anche la caratteristica di essere acido-resistente, peculiarità sfruttata in diagnostica per evidenziare il batterio nel materiale patologico, attraverso la colorazione di *Ziehl-Nielsen*. L'*envelope* del micobatterio gli consente inoltre, di sopravvivere a trattamenti molto prolungati con agenti chimici come gli alcoli e il fenolo (proprietà che viene sfruttata per isolare il batterio da espettorati e materiale fortemente contaminato).

2.4 Patogenesi della tubercolosi

L'infezione tubercolare, prodotta da micobatteri appartenenti al *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) si contrae di norma per via aerogena, sebbene esistano altre vie meno frequenti come ad esempio quella enterogena.

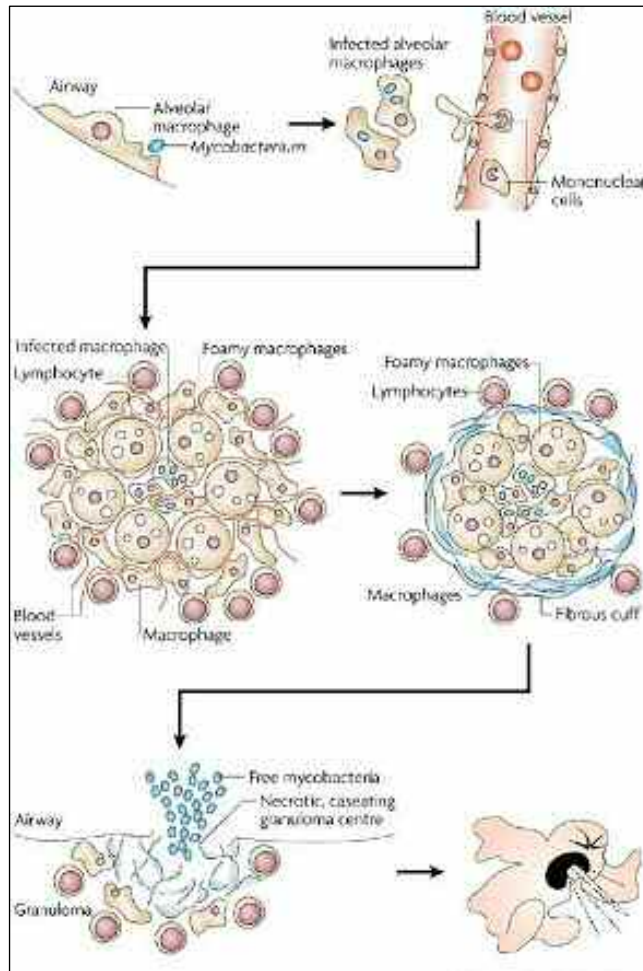
L'infezione prodotta da *M. tuberculosis* segue una sequenza ben definita di eventi; i batteri inalati dall'atmosfera raggiungono gli alveoli polmonari dove vengono fagocitati dai macrofagi che con la conseguente "presentazione" dei diversi antigeni micobatterici inducono una risposta pro-infiammatoria da parte delle cellule mononucleate dell'ospite presenti nei vasi sanguigni limitofi.

Il complesso cellule mononucleate-bacilli costituisce il granuloma o tubercolo, struttura segnale indice della tubercolosi.

Esso presenta al suo interno macrofagi alveolari infetti,

circondati da altri fagociti mononucleari a loro volta ricoperti da linfociti associati ad uno strato di collagene e di componenti della matrice extracellulare che ne formano l'involucro più esterno.

In questa fase di "contenimento" dell'infezione i micobatteri nel "complesso primario" possono rimanere vitali per lunghissimi periodi anche se scarsamente metabolizzanti o addirittura in una sorta di letargo metabolico, la cosiddetta "fase latente del micobatterio" in cui non si registrano segnali della malattia e l'ospite non è in grado di trasmetterla ad altri. Questa situazione richiede una sorveglianza immunologica costante costituita dal persistere di cellule linfocitarie CD4 e CD8 e di macrofagi attivati. Occasionalmente una diminuita efficienza del sistema immunitario, può condurre ad una riattivazione del complesso primario con la ripresa della moltiplicazione dei micobatteri, la formazione di lesioni granulomatose multiple che in



seguito a necrosi possono svuotare il loro contenuto (bacilli vivi e virulenti), con il risultato di una diffusione metastatica dell'infezione in sedi polmonari ed extra-polmonari [9].

2.5 La diagnosi dell'infezione tubercolare

La diagnosi della tubercolosi si basa sull'individuazione di micobatteri in un idoneo campione di espettorato o di altro materiale biologico.

Le ricerche microbiologiche possono avere varie modalità di espletamento:

- esame microscopico
- esame colturale
- amplificazione dell'acido nucleico (PCR) [10].

L'esame radiologico e i sintomi clinici forniscono delle spie d'allarme ma non costituiscono una prova inconfutabile di tubercolosi. Per quanto riguarda il test alla tubercolina ed i nuovi test di laboratorio (test al *QuantiFERON*), essi rappresentano un indice dell'infezione tubercolare, ma non consentono di determinare lo stadio della malattia del paziente infetto.

Il test fondamentale per mettere in evidenza gli effetti immuno- biologici realizzati da un'avvenuta infezione tubercolare è rappresentato dalla prova tubercolinica che è una reazione di ipersensibilità cellulo-mediata di tipo ritardato (le tubercoline sono costituenti del corpo bacillare o prodotti del metabolismo batterico, ottenute mediante vari procedimenti: vecchia e nuova tubercolina di Koch; anatumercolina integrale di Petragiani; PPD: *purified protein derivative*). Una reazione positiva si manifesta come un indurimento cutaneo, dopo 48-72 ore dall'inoculo e può avere dimensioni variabili da 5 a 15 mm. L'intradermoreazione di *Mantoux* rimane tuttora la prova tubercolinica più attendibile, raccomandata e di facile utilizzo. Il test cutaneo tubercolinico, pur essendo, a tutt'oggi il test di riferimento per la diagnosi d'infezione tubercolare, presenta tuttavia numerosi limiti. In primo luogo è un esame eseguito *in vivo*, che necessita di una successiva visita di controllo per la lettura del risultato. In secondo luogo, sia l'inoculazione sia la lettura del test sono operatore-dipendente ed entrambe dimostrano una notevole variabilità [10]. Inoltre, la cross-reattività antigenica esistente tra PPD, BCG e micobatteri non tubercolari è responsabile di una certa quota di falsi positivi all'intradermoreazione di *Mantoux*. Molti soggetti immigrati da aree ad elevata prevalenza tubercolare, per esempio, sono anche BCG vaccinati, pertanto l'utilizzo del solo test cutaneo tubercolinico per la diagnosi di infezione tubercolare

latente pone seri problemi nell'identificazione di coloro che sono effettivamente portatori di un'infezione tubercolare latente e quindi candidati alla chemioprophilassi [11]. Infine, in alcuni gruppi di soggetti potenzialmente a maggior rischio di sviluppare una TBC attiva a seguito di riattivazione d'infezione latente, quali per esempio gli anziani e i pazienti immunodepressi, il test cutaneo tubercolinico può essere più spesso falsamente negativo.

Sulla base delle esposte considerazioni e sulla scorta delle recenti acquisizioni di biologia molecolare, negli ultimi anni si è cercato di sviluppare nuovi strumenti per la diagnosi d'infezione tubercolare latente. Di recente è entrata in uso, anche se ancora non molto diffusa, una prova immunologica che appare dotata di elevata sensibilità e specificità e che è basata sulla ricerca mediante ELISA nel siero del soggetto in esame di anticorpi IgM specifici per l'antigene A60 (componente termostabile di tipo tubercolinico). Con questo antigene sono stati anche effettuati tentativi di prove intradermiche ottenendo, in soggetti con precedenti anamnestici tubercolari, risposte simili a quelle ottenute con PPD.

Sono tuttora oggetto di studio alcune metodiche di tipo molecolare, intese a mettere in evidenza quantità minimali di DNA micobatterico. Attualmente sono disponibili due nuovi test (*QuantiFERON* - TB GOLD per misurare la concentrazione di IFN- γ nel supernatante, e T- *Spot*- TB usata per dimostrare le cellule T che producono IFN- γ) accomunati da alcuni principi fondamentali, che li differenziano in maniera sostanziale rispetto al test cutaneo tubercolinico [12]. Innanzitutto, si tratta di test *ex vivo*, eseguiti su campioni di sangue venoso periferico, per cui non necessitano di una visita di ritorno. Inoltre utilizzano come stimolo antigenico le proteine ESAT-6 e CFP-10, cioè due prodotti genici del gene RD1; questo gene non è presente nel bacillo di *Calmette-Guerin* (BCG) né nella maggior parte dei micobatteri non tubercolari, per cui non determina fenomeni di cross-reattività e quindi di ridotta specificità; ciò rende questi test maggiormente specifici rispetto al test cutaneo tubercolinico. In virtù di tali caratteristiche potrebbero migliorare l'efficacia della diagnosi e il trattamento dell'infezione tubercolare latente, apportando un decisivo contributo per raggiungere l'obiettivo dell'eliminazione della tubercolosi dai Paesi industrializzati a bassa prevalenza di malattia.

Nel 2001 gli stessi test sono stati approvati negli Stati Uniti dalla *Food and Drug Administration* (FDA) quale ausilio per la diagnosi d'infezione tubercolare latente. Occorre infatti ricordare che, sebbene presentino alcuni vantaggi rispetto al test cutaneo

tubercolinico sia in termini operativi, sia in termini di sensibilità e specificità, la diagnosi di malattia attiva si basa principalmente sugli esami microbiologici e sulla clinica, per cui tali test hanno un ruolo “di supporto”, ma non di conferma di TBC attiva.

L'impiego per un sollecito accertamento diagnostico riveste particolare importanza per la TBC, non solo nei riguardi del malato, il quale può così beneficiare di tempestivi trattamenti, ma anche nell'interesse della collettività. Il ritardo nella diagnosi anche se in lieve diminuzione costituisce ancora oggi una pecca nella strategia di prevenzione contro questa malattia.

2.6 Trattamento terapeutico della tubercolosi

I cardini di una strategia che consenta la guarigione dei malati di tubercolosi attiva e contagiosa e la riduzione delle fonti d'infezione nel più breve tempo possibile sono quindi la diagnosi precoce e la terapia tempestiva ed efficiente.

Per realizzare un trattamento terapeutico efficace è indispensabile, espletati i prescritti accertamenti diagnostici, prescrivere schemi terapeutici corretti, controllabili, basati sull'assunzione di farmaci collaudati, alla dose idonea e nei tempi adeguati. E' altresì indispensabile che l'assunzione dei farmaci sia regolare e direttamente controllata. I farmaci antimicobatterici devono rispondere a proprietà che li rendano attivi sui germi in rapporto alle loro caratteristiche metaboliche ed alla loro localizzazione. Poiché *M. tuberculosis* durante l'infezione può essere presente in differenti stati metabolici:

- 1) bacilli a crescita continua;
- 2) bacilli a crescita intermittente;
- 3) bacilli endocellulari (fagocitati dai macrofagi) a metabolismo rallentato ("*persistent*");
- 4) bacilli metabolicamente inattivi ("*dormiant*"),

un farmaco "ideale" dovrebbe possedere contemporaneamente numerose proprietà, ed in particolare essere:

- a) battericida sui germi in fase di replicazione continua;
- b) attivo sui micobatteri in fase di metabolismo rallentato (azione sterilizzante);
- c) attivo in sede intracellulare (a pH acido);
- d) capace di prevenire l'insorgenza di resistenza;
- e) attivo in somministrazione intermittente.

Su queste basi è stata formulata una classificazione dei farmaci antitubercolari; quelli che sono caratterizzati in maniera più completa da queste proprietà sono stati chiamati di prima linea (Isoniazide, Rifampicina, Pirazinamide, Etambutolo, Streptomina).

Quelli che possiedono parzialmente le caratteristiche ideali sono stati definite di seconda linea (PAS, Kanamicina, Amikacina, Capreomicina, Etionamide, Cicloserina, Terizidone e Tioacetazone).

Infine vi sono farmaci di recente introduzione, indicati in situazioni particolari, fra i quali vanno ricordati i derivati rifamincici (Rifabutina e Rifapentina), i numerosi fluorochinoloni, i betalattamici più acido clavulanico, i nuovi macrolidi (Roxitromicina, Claritromicina, Azitromicina). L'impiego in monoterapia dei farmaci antitubercolari, anche di quelli di prima scelta, è da proscrivere rigorosamente, perché se da una parte è ipotizzabile l'eliminazione dei micobatteri sensibili al singolo farmaco, dall'altra si realizza la selezione dei germi spontaneamente resistenti, che possono proliferare per mancata competizione con i ceppi sensibili, eliminati dall' antimicobatterico usato. Conseguentemente con questo meccanismo si determinerebbe la persistenza dei germi resistenti ai vari farmaci, se usati in monoterapia. Per questa ragione gli schemi terapeutici prevedono associazioni farmacologiche di 3-4-5 farmaci, variamente alternate in rapporto ai quadri clinici ed alla fase evolutiva della malattia tubercolare. L'associazione, come già sottolineato, ha due finalità:

- la prima è quella di pervenire all'eliminazione di sottopopolazioni batteriche in varia fase di attività metabolica ed a diversa localizzazione;
- la seconda è quella di prevenire le sottopopolazioni di mutanti resistenti, con l'obiettivo ultimo di realizzare la sterilizzazione e la stabilizzazione delle lesioni tubercolari. Per queste ragioni i regimi terapeutici, se correttamente applicati, si sono dimostrati efficaci ai fini della guarigione clinica e della persistente negativizzazione dell'espettorato nella quasi totalità dei casi.

Un ostacolo alla realizzazione di questi risultati è però costituito dalla complessità e dalla contemporaneità delle somministrazioni, con possibili frequenti ripercussioni pratiche negative.

Per risolvere questi problemi da più parti sono state proposte le associazioni fisse dei farmaci. Le più note e le più valide sono costituite dall'associazione di due farmaci (isoniazide e rifampicina; rifampicina e pirazinamide) o di tre farmaci (isoniazide, rifampicina e pirazinamide) in dosi scelte in accordo con le maggiori organizzazioni internazionali, in maniera da rendere più semplice l'aggiustamento del dosaggio e la

contemporaneità delle somministrazioni in uniche unità posologiche tali da ridurre il numero delle assunzioni quotidiane. Contemporaneamente si rende più semplice il controllo dell'avvenuta assunzione e si ostacola l'uso accidentale o volontario di un solo farmaco [13].

2.7 Ceppi batterici multi- resistenti

Un problema emergente nel nostro paese, come nel resto dell'Europa occidentale e nel Nord America, è il sempre il più frequente riscontro di forme di tubercolosi multi-resistente, cioè di forme causate da germi resistenti ai due principali farmaci anti-tubercolari: la rifampicina e l'isoniazide. I pazienti con tubercolosi multi- resistente hanno percentuali di successo terapeutico basse e necessitano di terapie con farmaci di seconda linea tossici, per periodi lunghi e con effetti collaterali potenzialmente maggiori rispetto ai pazienti con tubercolosi sensibile ai farmaci. La selezione di mutanti resistenti in pazienti affetti da tubercolosi è favorita da alcune caratteristiche della malattia come:

- a) l'abbondante presenza di batteri nelle lesioni, specialmente in quelle di parete;
- b) la replicazione del bacillo durante il lungo periodo previsto dalle terapie in uso attualmente;
- c) la limitata resistenza promossa dall'ospite che consente così alle cellule eventualmente mutate, di proliferare prima di essere eliminate dalle difese dell'ospite stesso.

A rendere il fenomeno ancor più temibile è stata la mancanza sia di un adeguato approvvigionamento di tutti i farmaci chemioterapici, sia della costante e corretta somministrazione di questi durante tutto il periodo previsto dalla terapia.

Gli antibiotici fluorochinolonici rappresentano gli unici farmaci nuovi e recenti, attivi nel trattamento della tubercolosi; ovviamente essi vanno considerati farmaci di seconda linea e da utilizzare solo con ceppi multi- resistenti. Di fatto, il riscontro di un alto potere battericida nei confronti di *M. tuberculosis in vitro* ha portato al loro utilizzo come ultima *chance* per le forme croniche e resistenti, pur senza aver mai ottenuto una formale registrazione come farmaci antitubercolari. É possibile che il diffuso uso dei fluorochinolonici che attualmente viene fatto nella pratica clinica ambulatoriale e ospedaliera possa portare alla diffusione di resistenze dei ceppi micobatterici anche verso questi antibiotici [14].

2.8 La vaccinazione anti-tubercolare

Il bacillo di *Calmette e Guerin* (conosciuto come “BCG”) è a tutt’oggi l’unico vaccino disponibile per la prevenzione della TBC. E’ stato distribuito dal 1920 ed ogni anno ne vengono somministrate più di 118 milioni di dosi. Esso contiene microrganismi vivi di un ceppo bovino e attenuato del bacillo tubercolare, quale è *M. bovis*. E’ stato dimostrato che BCG risulta essere protettivo contro la lebbra così come contro svariate forme di tubercolosi che affliggono i bambini (ad es. TBC miliare e TBC alle meningi) raggiungendo una percentuale di copertura pari all’80% dei casi.

Tuttavia la protezione conferita da BCG contro la tubercolosi polmonare, che rappresenta il maggior tipo di casi, può variare da 0% all’80% relativamente alla popolazione, il paese, e il ceppo di BCG utilizzato. Nei paesi industrializzati, la vaccinazione non viene praticata ed il controllo dell’infezione si basa prevalentemente sul controllo capillare della comparsa di positività al test della tubercolina nella prima età scolare, e su un aggressivo e precoce trattamento chemioterapico dei casi di prima infezione così evidenziati, per assicurare la “sterilizzazione” del complesso primario.

Nei paesi in via di sviluppo, le condizioni sanitarie scadenti non consentono altro intervento se non attraverso l’utilizzo di massa del BCG, sulla cui efficacia protettiva, come ho detto precedentemente i dati sono alquanto discordanti.

Una possibile causa che potrebbe in qualche modo spiegare l’inefficacia del BCG è data dalla perdita di alcuni geni di rilevante importanza ai fini di una protezione immunitaria. Infatti, a seguito della distribuzione a livello mondiale di lotti di BCG, si è verificata nel vaccino, una variabilità fenotipica e genotipica sia nei confronti del ceppo “madre” che degli altri ceppi, causata dai diversi trattamenti cui è stato sottoposto nei decenni nei diversi laboratori [15]. Oltre a ciò, sono molteplici le ipotesi che contemplano un *deficit* nell’induzione di una corretta risposta immunitaria dovuto a molteplici cause; tra queste vi è la mancanza in BCG di importanti antigeni, l’incapacità di questo nell’indurre i sottogruppi di cellule T appropriati, nonché la possibilità di un’interazione di BCG anche con micobatteri ambientali, e la riduzione progressiva nel tempo dell’efficacia di BCG.

2.9 Il rapporto di *M. tuberculosis* con il sistema immunitario dell’ospite

Esistono per *M. tuberculosis* complessi meccanismi patogenetici e di regolazione genica che lo guidano nel rapporto con il sistema immunitario dell’ospite e che lo rendono un organismo così versatile da distinguerlo dagli altri patogeni obbligati,

i quali a differenza di quelli ambientali si sono evoluti in ambienti con caratteristiche relativamente stabile e presentano di conseguenza circuiti di regolazione genica piuttosto semplici. Che cosa accada durante la “fase di latenza” e quali siano gli eventi che caratterizzano una così dinamica relazione tra *M. tuberculosis* e l’uomo a oggi non sono stati ancora del tutto chiariti. E’ noto che quando il batterio raggiunge gli alveoli polmonari, venga fagocitato dai macrofagi e sottoposto nel 90% dei casi ad una risposta immunitaria complessa ed efficace allestita dall’ospite ed accompagnata da eventi quali:

1. esposizioni ad agenti ossidanti rappresentati primariamente da intermedi reattivi dell’ossigeno e dell’azoto prodotti dai macrofagi;
2. riduzione del pH: *M. tuberculosis* è in grado di sospendere l’acidificazione del fagosoma, tuttavia tale attività non può mai bloccare totalmente l’abbassamento del pH;
3. il surfattante alveolare: funge da detergente con attività battericida che va a destabilizzare l’organizzazione dei lipidi di parete;
4. il rilascio di sostanze tossiche da parte di macrofagi attivati e da cellule *natural-killer*;
5. la carenza di nutrienti necessari per il sostentamento del batterio (ad esempio magnesio e ferro);
6. ipossia raggiunta all’interno dei granulosomi e dei macrofagi.

Di fronte a tale situazione, *M. tuberculosis* non essendo nelle condizioni di trasmettere l’infezione, entra nella cosiddetta “fase di latenza” in cui, secondo il modello corrente, non si replica ma rallenta la crescita ed il metabolismo. In seguito a soppressione dell’immunità causata dall’età, da malattie infettive (come HIV) o malnutrizione, il bacillo della tubercolosi può riattivarsi e dar origine alla malattia conclamata ma quale sia il suo stato fisiologico all’interno dei tessuti infetti non è noto.

Risulta comunque evidente che se la tubercolosi continua a rimanere una delle principali cause di morte nel mondo lo si deve proprio all’abilità di tale bacillo di adattarsi ad un insieme di condizioni presenti sia all’esterno che all’interno dell’organismo ospite. L’esigenza di adattarsi a diversi cambiamenti ambientali e la possibilità di entrare in uno stato di latenza suggerisce l’importanza per la sopravvivenza di *M. tuberculosis* di una complessa regolazione dell’espressione genica [16].

Appare indispensabile lo studio e l’identificazione dei geni che sono essenziali per la sopravvivenza del batterio durante la fase di latenza, al fine di poterli impiegare

eventualmente come bersagli farmacologici o componenti vaccinali e ridurre i tempi di somministrazione richiesti dai farmaci utilizzati in terapia attualmente eliminando di conseguenza il fenomeno dei ceppi di micobatterio multi-resistenti. In qualsiasi microrganismo, lo studio della funzione di geni generalmente avviene mediante l'introduzione di mutazioni specifiche; nel caso di geni codificanti per funzioni essenziali, tuttavia non è possibile inserire mutazioni o delezioni poiché il fenotipo generato risulterebbe letale.

Una delle tecniche più comunemente usate prevede la generazione di mutanti condizionali in grado di esprimere un gene solo in presenza di condizioni ben definite. Normalmente tale scopo viene raggiunto mediante l'uso di promotori inducibili che possono essere attivati o disattivati in modo controllato.

I sistemi di espressione genica inducibile rappresentano, quindi, un mezzo potente sia per studiare la funzione di un determinato gene, sia per la validazione di target farmacologici nei batteri.

2.10 Sistemi di espressione a regolazione positiva e negativa

La regolazione dell'espressione genica avviene per mezzo di alcune molecole, proteine o RNA, che possono legarsi a specifiche sequenze di DNA o mRNA controllando rispettivamente i processi di trascrizione e traduzione.

I sistemi di controllo dell'espressione genica vengono classificati in positivi e negativi in base allo stato dell'operone quando non è presente alcuna proteina regolatoria.

I geni sotto il controllo negativo vengono espressi a meno che non siano silenziati da un repressore che può associarsi o al DNA prevenendo l'inizio della trascrizione da parte dell'RNA polimerasi, o all'mRNA impedendo il legame del ribosoma e di conseguenza l'inizio della traduzione.

I geni sotto il controllo positivo vengono espressi solo quando è presente un regolatore attivo. Il meccanismo del controllo positivo è l'esatta controparte di quello negativo, infatti la presenza della proteina regolatrice in questo caso diviene essenziale per l'inizio della trascrizione o della traduzione. I regolatori positivi rispondono a loro volta a piccole molecole che sono definite attivatori.

Gli operoni a loro volta possono essere inducibili o reprimibili in relazione alla loro risposta a piccole molecole che ne regolano la loro espressione.

I sistemi inducibili permettono l'espressione solamente in presenza di induttori: l'induzione può essere acquisita dall'inattivazione di un repressore o dall'attivazione di un attivatore.

I sistemi reprimibili invece consentono l'espressione genica solo in assenza del co-repressore; in questo caso la repressione avviene mediante l'attivazione del repressore o l'inattivazione dell'attivatore [17].

2.11 Sistemi di espressione inducibile nei micobatteri

I sistemi di espressione genica inducibile rappresentano un potente mezzo per studiare la funzione di un determinato gene soprattutto nel caso questo si riveli essere essenziale.

Nei micobatteri la disponibilità di vettori d'espressione è limitata da due fattori principali:

- il basso numero di plasmidi adatti alla trasformazione ed al mantenimento nei micobatteri;
- la mancanza di promotori micobatterici ben controllati.

Quest'ultimo punto ha indotto a cercare sistemi di espressione ben controllati di altre specie che potessero essere manipolati così da divenire utilizzabili in micobatterio.

Uno tra i sistemi inducibili utilizzati in micobatterio fa uso del promotore della proteina *heat- shock hsp60*; in letteratura si trovano diverse pubblicazioni in cui si è ricorsi a tale sistema soprattutto per l'*over-* espressione di proteine. *Rajagopalan* e colleghi in un lavoro pubblicato nel 2002 fusero la proteina FtsZ di *M. tuberculosis* al promotore *hsp60* così da poter studiare quali fossero le conseguenze fisiologiche associate a una sua *over-* espressione in micobatterio [18]. *Deretic* fece uso di tale sistema creando una fusione trascrizionale con il gene *xylE* di *Pseudomonas* al fine di valutare l'attività trascrizionale del regolatore MtrA di *M. tuberculosis* [19]. *Bishai* ha impiegato il promotore *hsp60* per dimostrare che l'*over-* espressione del fattore trascrizionale SigF di *M. tuberculosis* risulta letale per i micobatteri a crescita lenta (*M. bovis*) mentre non lo è in *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*), il cui ciclo replicativo è più rapido [20]. Tale modello tuttavia presenta alcuni limiti; sebbene infatti esso abbia fornito buoni risultati nella sovra- produzione di proteine, tuttavia non può essere applicato per lo studio di geni essenziali. Oltre ad essere limitato in quanto l'induzione può avvenire solo in seguito ad uno stress, esso non risulta neppure finemente regolabile, avendo un livello di espressione basale ancora troppo elevato.

Un altro sistema inducibile fa uso del promotore P_{tra} e del repressore temperatura- sensibile TraR di un altro actinomicete, *S. nigrifaciens*. *Dick* e colleghi attraverso saggi di attività β - galattosidica e confrontando l'attività trascrizionale del promotore P_{tra} con quella di un promotore forte micobatterico quale è P_{hsp60} , hanno dimostrato che il sistema funziona ed è temperatura- sensibile anche in *M. smegmatis* [21]. Il limite di tale sistema, è insito nelle sue caratteristiche di essere temperatura sensibile e di richiedere per questo una temperatura di 28°C, condizione non ideale per una corretta crescita dei micobatteri.

Un ulteriore modello di sistema inducibile attualmente utilizzato è quello basato sul gene codificante per l'enzima acetamidasi di *M. smegmatis*.

Tale proteina permette all'organismo di sfruttare come fonte di carbonio alcuni composti ammidici; è inducibile: infatti in presenza di acetammide è *over-* espressa di

circa 100 volte rispetto alle normali condizioni di non induzione [22]. Il sistema biologico in questione è composto da cinque geni, tra i quali il gene che codifica per l'acetamidasi appunto (*amiE*). Quest'ultimo è localizzato a valle di altri quattro geni, tre dei quali (*amiA*, *amiD* e *amiS*) formano un probabile operone e un quarto gene *amiC* che viene trascritto in modo divergente. Il controllo del sistema è garantito dalla presenza di due regolatori positivi (AmiC e AmiD) e un regolatore negativo (AmiA), mentre *amiS* codifica per un componente di un trasportatore.

In assenza di acetamide AmiA è responsabile della repressione della trascrizione di *amiD* legandosi al promotore (P2) di questo gene e impedendone così l'accesso all'RNA polimerasi. In presenza di acetamide, AmiC interagisce con AmiA e ne previene il legame a P2 permettendo in tal modo la trascrizione di *amiD*. AmiD è un secondo regolatore positivo che attiva il promotore immediatamente a monte di *amiE* (P3) oppure fa staccare il repressore eventualmente ivi presente. Attualmente vi è una diffusa applicazione di tale modello in quanto, avendo quest'ultimo la sua origine biologica in *M. smegmatis*, può essere più direttamente adattabile ad altre specie appartenenti al genere *Mycobacterium*.

Tuttavia, anche in questo sistema sono presenti delle condizioni limitanti per un suo uso per lo sviluppo di *knockout* condizionali: non è possibile ottenere una completa repressione dell'espressione genica, dipendente a sua volta dalla presenza di una regione comunque molto ampia (l'intero operatore misura 1.4 kb). L'induttore (l'acetamide), richiede terreni di crescita particolari per garantire un'ottima attività e non è adatto per la somministrazione *in vivo* in quanto considerata un potenziale cancerogeno per l'uomo [23].

Carroll P. e colleghi, hanno applicato il sistema di espressione inducibile dell'arabinosio proveniente dall'operone omonimo di *Escherichia coli* (*E. coli*), in *M. smegmatis* per lo studio della proteina Rv1991c, ottenendo tuttavia risultati opposti rispetto a quelli attesi. Il sistema inducibile dell'arabinosio è composto dal promotore P_{BAD} e dal regolatore AraC [24]. AraC possiede un dominio per il legame con l'arabinosio e un dominio di legame al DNA che funziona come un dimero per regolare positivamente o negativamente l'espressione genica relativa al promotore P_{BAD}. Due livelli di controllo operano per regolare l'espressione: la presenza o assenza di induttore (arabinosio) e la repressione da catabolita (glucosio). Il legame tra l'arabinosio e AraC induce un cambiamento conformazionale in quest'ultimo che ne modifica la sua affinità con il promotore P_{BAD}. AraC, in assenza di arabinosio, si lega ai siti ara₂ e I₂ che inducono la formazione di un *loop* nel promotore, che ne previene l'accesso dell'RNA polimerasi. Quando l'arabinosio è presente, legandosi ad AraC, determina un incremento nell'affinità di quest'ultimo per i siti I₁ e I₂ presenti in P_{BAD} e in queste condizioni, non formandosi più il *loop*, la regione diviene accessibile. La repressione da parte del glucosio avviene attraverso il sito *crp* presente nell'operatore. L'iterazione dell'RNA polimerasi con il promotore, necessaria per l'inizio della trascrizione, dipende

dal legame del complesso CRP- cAMP (CRP: proteina di risposta all'AMP ciclico) al sito *crp*. In presenza di glucosio, il livello di cAMP è basso e quindi la mancanza di CRP-cAMP blocca la trascrizione. In *E. coli* quindi l'arabinosio induce il sistema, ma solo in assenza di glucosio che può quindi essere usato per spegnere completamente il sistema. Sorprendentemente è stato osservato che quando il sistema P_{BAD} viene introdotto in *M. smegmatis*, il meccanismo funziona in modo diverso infatti in assenza di glucosio e arabinosio si misura una bassa attività di espressione genica, in presenza di glucosio l'espressione viene addirittura aumentata. Anche per l'utilizzo di tale sistema in micobatterio si sono riscontrate comunque delle difficoltà in quanto richiede condizioni di crescita specifiche (il sistema sembra funzionare solo in terreno solido), permette di ottenere un basso livello di induzione con un *background* di espressione comunque sempre presente.

2.12 Il sistema della tetraciclina

Come in precedenza descritto, i sistemi per l'espressione genica di micobatterio ad oggi sviluppati, presentano ancora diversi limiti che ne impongono un loro utilizzo solo in determinate condizioni, e relativamente ad una ristretta tipologia di esperimenti. Sempre degli ultimi anni è lo studio di un modello di sistema d'espressione inducibile che permette il controllo dell'espressione genica sia nei micobatteri a crescita lenta che in quelli a crescita veloce, incluso *M. tuberculosis*, utilizzando come induttore la tetraciclina.

2.12a Le tetraciclina

Le tetraciclina sono un gruppo di antibiotici che derivano dalla famiglia delle naftacenecarbossiamidi policicliche. Rappresentano una tra le più importanti classi di antibiotici ad ampio spettro risultando efficaci contro i batteri Gram-positivi, Gram-negativi anaerobi e microrganismi come rickettsie, clamidie, micoplasmi impiegate. Sono strutturalmente rappresentate da un nucleo di base lineare tetraciclico fuso (anelli A, B, C e D) con diversi gruppi funzionali ad esso attaccati.

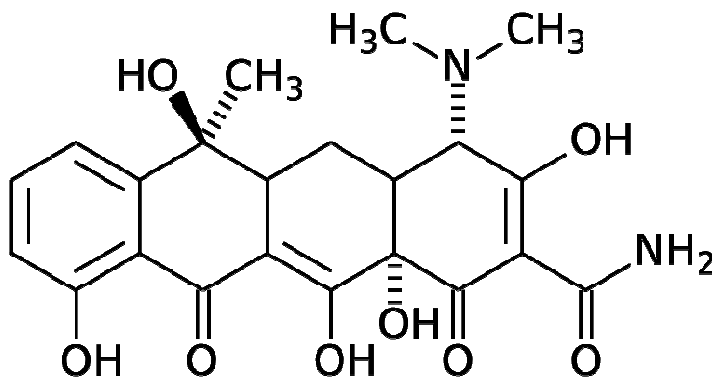


Fig..3 Struttura delle tetraciclina[25].

Le tetracicline inibiscono la sintesi proteica dei batteri legandosi alla subunità 30S del ribosoma batterico in modo tale da impedire l'accesso dell'aminoacil tRNA al sito accettore (A), presente nel complesso mRNA-ribosoma: l'RNA messaggero (mRNA) si

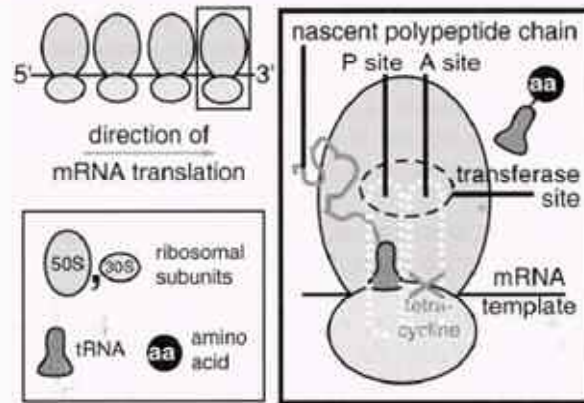


Fig.4 Meccanismo d'azione della tetraciclina [wikipedia].

lega alla subunità 30S dell'RNA ribosomiale batterico. Il sito P (peptidilico) della subunità 50S dell'RNA ribosomiale contiene la catena polipeptidica nascente; in condizioni normali l'aminoacil- tRNA, che lega l'aminoacido che deve essere aggiunto alla catena, raggiunge il sito A e qui si lega mediante interazione tra le basi appaiate complementari presenti nella sequenza anticodon del tRNA e nella sequenza codon dell'mRNA; le tetracicline bloccano fisicamente il legame del tRNA al sito accettore (A) [25].

2.12b Meccanismo di resistenza alla tetraciclina

Il meccanismo fondamentale alla base della resistenza alle tetracicline è l'efflusso che consiste nel ridurre attivamente la concentrazione dell'antibiotico all'interno della cellula batterica attraverso la membrana citoplasmatica grazie ad una proteina esportatrice (TetA) [26].

Le tetracicline (tet) sono molecole idrofobiche ed entrano nella cellula per diffusione passiva (Fig 5.1). TetR è un repressore che regola l'espressione di una famiglia di proteine coinvolte nell'esportazione dell'antibiotico nei batteri Gram-negativi. In assenza di tetraciclina, TetR associandosi ai siti palindromici *tetO* presenti nell'operatore, previene sia la trascrizione di *tetA* sia la propria (Fig 5.2); quando la tetraciclina entra nella cellula tende ad associare ioni bivalenti, come il magnesio, formando complessi $[tet^+ \cdot Mg^{2+}]$ (Fig 5.3). Il legame tra TetR ed il complesso $[tet^+ \cdot Mg^{2+}]$ determina una variazione conformazionale che induce il repressore a staccarsi dagli operatori (Fig 5.4) permettendo la trascrizione di *tetA* e di se stesso (Fig 5.5).

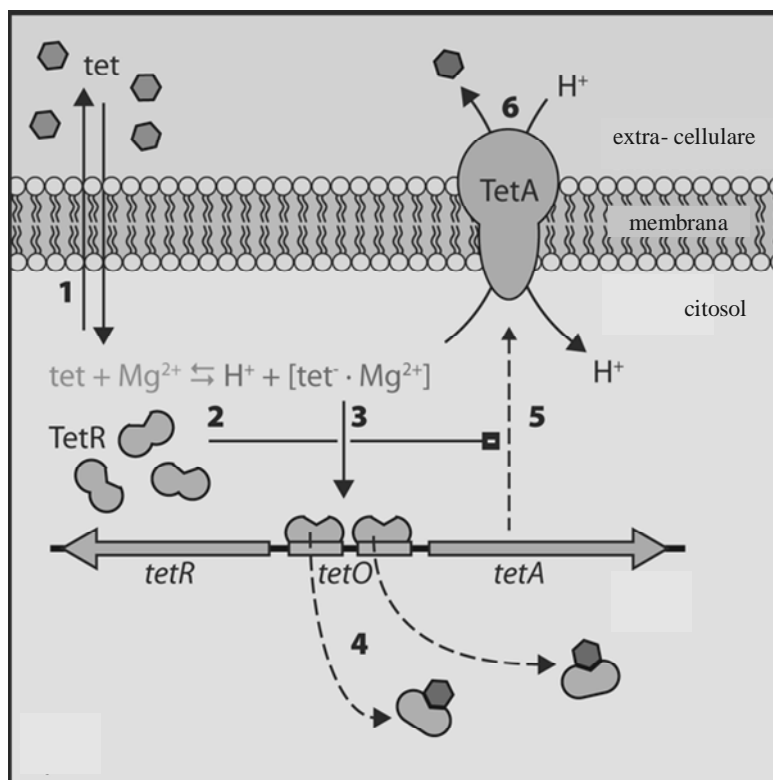


Fig. 5 Meccanismo d'azione della resistenza alla tetraciclina nei batteri. [wikipedia]

TetA esporta all'esterno il complesso $[\text{tet}^+ \cdot \text{Mg}^{2+}]$ ed importa contemporaneamente protoni (Fig 3.6). quando le tetracicline sono state esportate completamente al di fuori della cellula, TetR ritorna ad associarsi alle sequenze *tetO* bloccando l'attività trascrizionale del promotore. Elevate concentrazioni di TetA sono letali per i batteri perché il trasporto cationico aspecifico, da parte di questa proteina trasportatrice, causa il collasso del potenziale di membrana. Un forte legame di TetR a *tetO* (la costante di associazione K_a è circa 10^{11} M^{-1}) fa sì che *tetA* rimanga normalmente in stato represso [27]. Poiché l'azione delle tetracicline è di inibire la sintesi proteica attraverso il legame ai ribosomi ($K_a 10^6 \text{ M}^{-1}$), TetR deve essere particolarmente sensibile allo *switch* da stato silente (TetR legato a *tetO*) a stato attivo (TetR legato a $[\text{Mg Tc}]^+$).

Il legame tra $[\text{Mg Tc}]^+$ e TetR, la cui K_a è circa 10^9 M^{-1} , riduce l'affinità di TetR per *tetO* di 9 ordini di grandezza e ciò permette sia che la relazione dinamica di TetR con il DNA o con il complesso $[\text{Mg Tc}]^+$ venga efficientemente discriminata, sia che anche concentrazioni subinibitorie di tetraciclina possano essere sufficienti a far procedere la trascrizione.

E' stata ottenuta la struttura cristallografica di TetR in complesso con il frammento palindromico di 15 paia di basi di *tetO* con una risoluzione di 2,5 Å. Tale struttura comparata con la struttura cristallografica del complesso TetR- $[\text{Mg Tc}]^+$ e con la struttura di TetR isolata ha permesso di capire il meccanismo molecolare di induzione.

L'induttore, che si lega nel core di TetR, avvia una serie di cambiamenti conformazionali che iniziano con il movimento del C- terminale fino a forzare un

movimento “a pendolo” che fa separare il repressore, legato al DNA con motivo *helix turn helix*, ad una distanza di 3 Å, distanza alla quale diminuisce l’affinità di legame TetR- DNA.

Il sistema TetR-*tetO* sembra essere finora uno dei più efficienti sistemi inducibili grazie alla possibilità di ottenere una regolazione fine e stringente mantenendo un livello di espressione basale tra i meno elevati; attualmente viene comunemente usato come mezzo per la regolazione genica negli eucarioti [27].

2.13 Modelli di regolazione dell’espressione basati sull’utilizzo della tetraciclina

Una caratteristica che conferma ulteriormente la superiorità dei sistemi che utilizzano promotori inducibili alla tetraciclina rispetto a quelli precedentemente descritti, è data dalla loro versatilità, ossia la capacità di funzionare sia *in vitro* che *in vivo*.

Schnappinger ha sviluppato un modello di regolazione sensibile alla tetraciclina basato sul medesimo sistema di regolazione presente nel trasposone Tn10 di *E. coli* e costituito da un promotore micobatterio (P_{myc}) contenente i siti *tetO*, il repressore TetR, e l’induttore rappresentato dall’ anidro tetraciclina (derivato della tetraciclina, più stabile). Nel lavoro pubblicato da *Nucleic Acid Research* egli clona a valle del promotore mutagenizzato con l’inserimento dei siti *tetO* il gene *reporter lacZ* e testa attraverso saggi β - galattosidasici la funzionalità di tale modello in *M. smegmatis* e *M.tuberculosis*. pone sotto controllo trascrizionale di tale promotore anche il gene essenziale di *M. smegmatis ftsZ* dando così prova della possibilità di un suo impiego per la costruzione di mutanti condizionali. Infine utilizzando il gene *reporter* per la *green fluorescent protein* posto sotto controllo del promotore $P_{myc tetO}$ e mimando una situazione *in vivo*, dimostra la capacità di tale modello di poter regolare l’espressione genica anche quando micobatterio si trova all’interno dei macrofagi nei tessuti infetti [28].

Blokpoel e colleghi, esplorarono un altro sistema d’efflusso alla tetraciclina, alternativo rispetto a quello presente nel *Tn10*, identificato su di un plasmide isolato da *Corynebacterium glutamicum*; la stretta relazione tassonomica tra le due specie avrebbe evitato le problematiche che spesso si riscontrano nell’adattare sistemi d’espressione sviluppati in *E. coli*, negli organismi con DNA genomico ricco in GC [29].

L’analisi di sequenza del R- plasmide pAG1 da *C. glutamicum* ha identificato una regione che conferisce resistenza per la tetraciclina costituita da due regioni codificanti:

- l’ORF10 codificante per una proteina di 40 KDa, prevalentemente idrofobica (15.4% in leucine; 13.8% in alanine; 10.7% in glicine) avente 14 α - eliche trans membrana e le regioni N- t e C-t intracitoplasmatiche;

- l’ORF 11 codificante per una proteina avente il 43% di omologia ed il 54% di similarità con TetR.

È risultata interessante anche la presenza nella regione intragenica tra le due ORF di due sequenze ripetute in *tandem* di 12 bp l'una risultate identiche ai siti *tetO*.

Questo è stato il primo sistema di efflusso regolato da un repressore per la resistenza alla tetraciclina nei batteri Gram-positivi. Nel lavoro di *Blokpoel* si è voluto dimostrare come una forte analogia con il sistema di regolazione proprio dei batteri Gram-negativi (*E. coli*) fosse accompagnata anche da una stretta relazione a livello funzionale, rendendolo un possibile candidato per lo studio di geni essenziali in micobatterio [29].

Nello studio proposto il sistema è stato impiegato per l'espressione di mRNA antisense del gene *ftsZ* di *M. smegmatis*; sebbene tale sistema non presenti gli svantaggi ritrovati in alcuni modelli precedenti (terreno o temperatura di crescita particolari ...) tuttavia è risultato ancora non finemente regolabile. Una possibile spiegazione potrebbe essere suggerita dal confronto tra le sequenze dei due repressori TetR; infatti in *C. glutamicum* è presente una mutazione nel sito di legame al DNA nel motivo $\alpha 2$ *helix turn helix* che potrebbe sfavorire il legame del repressore all'operatore diminuendone così l'efficienza.

Ciò che in qualche modo accomuna tali sistemi è l'impiego della tetraciclina come induttore: il gene d'interesse è represso da TetR e solo l'aggiunta di tetraciclina può determinare l'inizio della sua trascrizione. Tale carattere in qualche modo, può costituire uno svantaggio per il sistema; in quanto per ottenere il silenziamento genico occorre rimuovere l'induttore, operazione non sempre facile e diretta.

Un'inversione di tendenza è rappresentata dal modello di regolazione genica proposto da *Schnappinger*, dove la tetraciclina funziona come co-repressore [30]. Egli sviluppò un mutante (TetR r1.7) in cui si otteneva un'efficiente repressione nell'espressione di *lacZ* in *M. smegmatis* in presenza ma non in assenza di ATc e applicò tale sistema per il silenziamento di una proteina citoplasmatica SecA nel mutante *secA1*.

2.14 Sistema di regolazione dell'espressione genica basato sui repressori TetR e Pip

Il modello di sistema reprimibile elaborato in questo progetto si basa su tre elementi fondamentali:

- I. Il gene codificante per il repressore TetR sensibile alla tetraciclina, la cui espressione è costitutiva essendo sotto controllo trascrizionale del promotore P_{UV-15} ;
- II. Il gene di *Streptomyces pristinaespiralis* codificante per il repressore Pip sensibile alla prestinamicina, regolato dal promotore $P_{furA102tetO}$ riconosciuto a sua volta specificatamente da TetR per la presenza al suo interno dei due siti operatori *tetO*;

III. Il gene d'interesse, espresso a partire dal promotore P_{ptr} la cui sequenza viene riconosciuta dal repressore Pip.

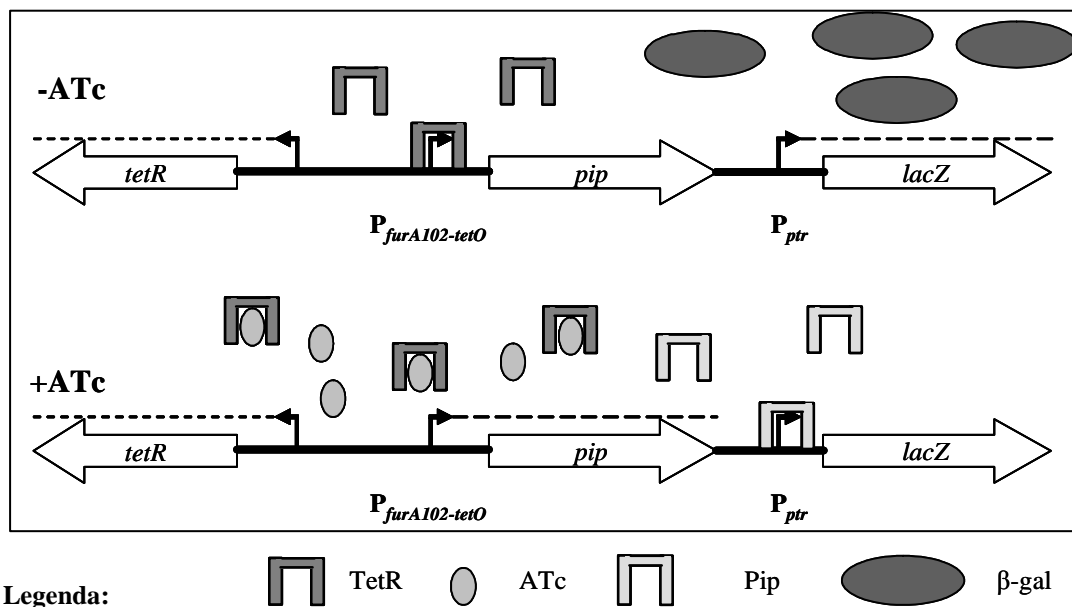


Fig.6 Rappresentazione schematica del sistema d'espressione Pip/ TetR.

In assenza di ATc (in alto) il prodotto della trascrizione di *tetR* è in grado di legare il "core" di $P_{furA102tetO}$ bloccando l'espressione di *pip* e permettendo così la trascrizione di *lacZ*. In presenza di ATc (in basso) TetR si associa all'antibiotico lasciando libero $P_{furA102tetO}$ di trascrivere *pip* che in questo caso è in grado di reprimere l'espressione *lacZ*.

In assenza di ATc, TetR dovrebbe essere in grado di riconoscere i siti *tetO* presenti all'interno di $P_{furA102tetO}$ e, bloccando la trascrizione di *pip*, permettere l'espressione del gene d'interesse, che per gli studi iniziali di caratterizzazione del sistema è stato *lacZ*.

In presenza di induttore il legame di TetR all'ATc dovrebbe permettere la trascrizione di *pip* da parte di $P_{furA102tetO}$ con conseguente spegnimento di *lacZ* (Fig.6).

Utilizzando questo modello sono stati costruiti alcuni mutanti condizionali di geni essenziali di *M. smegmatis* (*ftsZ*) e di *M. tuberculosis* (*fadD32*).

2.15 PiP: il regolatore del gene per la resistenza alla pristinamicina

Pip (*pristinamycin induced DNA binding protein*) è un regolatore trascrizionale presente in molte specie di *Streptomyces* appartenente alla classe dei repressori trascrizionali procarioti TetR [31].

Questa proteina, che strutturalmente si presenta come un dimero, si lega specificatamente a sequenze presenti all'interno del promotore per il gene codificante la resistenza agli antibiotici (*ptr*) in *S. pristinaespiralis* e *S. coelicolor*.

S. pristinaespiralis produce l'antibiotico *Pyostacin*, una miscela di due molecole strutturalmente diverse l'una dall'altra: 1) la streptogramina di tipo A (componente della

Pristinamicina II- PII), un macrolattone poli- insaturo; 2) la streptogramina di tipo B (componente della Pristinamicina I- PI), esadecapeptide ciclico.

Il gene *pip* è stato amplificato da *S. coelicolor*, specie caratterizzata molto dettagliatamente a livello genetico al fine di definirne il suo possibile ruolo nel meccanismo di multi- resistenza ai farmaci. I siti di legame sono stati localizzati in una regione a monte del gene adiacente *pep* codificante una proteina che funge da antiporto, omologa a *Ptr*; si tratta di tre motivi simili tra loro, aventi una simmetria diadica dalla sequenza GTACRSYGTAY ritrovati anche in P_{ptr} . Il complesso Pip/ P_{ptr} viene dissociato solamente da PI e da nessun antibiotico non appartenente alla classe delle streptogramine. Studi condotti in *S. lividans* e *S. coelicolor* hanno evidenziato che P_{ptr} viene attivato oltre che da PI e PII anche da una serie di composti eterogenei.

Inoltre dall'analisi di sequenza di Pip si è riscontrato che la sua regione N- terminale, la quale contiene un motivo *helix turn helix*, è omologa alla regione consenso della famiglia di repressori TetR e tale similarità si è potuta riscontrare anche nella funzione: Pip riconosce l'antibiotico pristinamicina I piuttosto che la tetraciclina.

L'affinità di legame di Pip per PI misurata in vitro ($K_d= 10^{-6}M$) è simile a TetR per Tc ($K_d= 10^{-6}M$). In vivo però, la tetraciclina è complessata con cationi divalenti, come per esempio Mg^{2+} che aumentano l'affinità della tetraciclina per TetR più di 1000 volte.

Resta da provare che la più ridotta affinità di Pip per PI rispetto a TetR per il suo antibiotico sia dovuta all'assenza di un cofattore che possa essere implicato in vivo.

Tuttavia Pip ha la stessa specificità nel riconoscere PI che nel riconoscere il promotore di *pep*, gene codificante la proteina di antiporto che attribuisce la proprietà di antibiotico resistenza. Questi elementi possono avere importanti applicazioni per regolare l'espressione genica nei mammiferi e nelle piante.

Il sistema basato sulla pristinamicina è funzionalmente compatibile con il sistema regolato da tetraciclina; in questo modo risulta possibile controllare contemporaneamente l'attività di più geni nella stessa cellula utilizzando antibiotici differenti che ne regolano la loro espressione. Nelle cellule di mammifero è già stato ottenuto un esempio di un tale utilizzo; *Fussenegger* e colleghi infatti hanno costruito un *network* di regolazione trascrizionale che trova applicazione nella terapia genica, interconnettendo i sistemi di regolazione genica basati sulla tetraciclina (Tet- OFF system), sulla pristinamicina (Pip- OFF system) e sull'eritromicina (E.REX system). Tale sistema di regolazione ha fornito buoni risultati nel controllo contemporaneo e indipendente di più transgeni sensibili ai differenti antibiotici [32].

3. SCOPO

Il lavoro elaborato durante il dottorato di ricerca s'inserisce all'interno di un progetto europeo denominato NM4TB (acronimo ad indicare **New Medicine For Tuberculosis**) che si propone appunto di individuare nuovi bersagli farmacologici e possibili candidati per lo sviluppo di vaccini. L'unico vaccino attualmente disponibile contro la tubercolosi, il ceppo attenuato di *M. bovis* BCG, sviluppato all'Istituto Pasteur circa un secolo fa, è efficace soltanto per proteggere i bambini da infezioni sistemiche quali la meningite tubercolare o la tubercolosi miliare, ma non è efficace nel proteggere gli adulti dalle forme polmonari della malattia.

Recentemente, inoltre, l'insorgenza di mutanti resistenti a più farmaci antimicobatterici ha reso più difficile il già problematico trattamento farmacologico della tubercolosi. Da qui la necessità di comprendere meglio il meccanismo patogenetico ed il complesso rapporto che *M. tuberculosis* instaura con il sistema immunitario dell'ospite al fine di sviluppare nuove strategie vaccinali e di individuare possibili bersagli molecolari per lo sviluppo di farmaci innovativi.

L'utilizzo di sistemi d'espressione inducibili rappresenta un importante strumento per studiare geni essenziali coinvolti nella virulenza e la loro funzione in particolar modo quando questa è ancora sconosciuta in quanto permettono di dosarne l'attività in risposta ad un semplice stimolo come l'aggiunta al terreno di un metabolita.

Il lavoro svolto durante questo triennio ha permesso di sviluppare un nuovo sistema di regolazione dell'espressione genica nei micobatteri mediante l'impiego di due repressori trascrizionali: Pip e TetR. In questo modello, il gene di interesse è posto sotto il controllo trascrizionale di un promotore dipendente da Pip P_{pir} . Pip a sua volta è posto sotto la regolazione di TetR in seguito all'inserimento nel suo promotore di due operatori (*tetO*) riconosciuti specificatamente da TetR che invece è espresso a partire da un promotore costitutivo. L'induttore utilizzato per questo sistema è l'anidrotetraciclina, antibiotico a cui è sensibile TetR.

In assenza di ATc, TetR reprime *pip* e il gene di interesse può essere trascritto; con l'aggiunta di ATc questo antibiotico si lega a TetR inducendo un cambiamento conformazionale che dissocia TetR dai siti *tetO* ottenendo come effetto l'espressione di *pip* e di conseguenza lo spegnimento trascrizionale del gene di interesse (Fig.6).

Tale sistema verrà prima validato in *M. smegmatis* e poi utilizzato per validare alcuni putativi *target* per lo sviluppo di nuovi farmaci contro *M. tuberculosis*

4.MATERIALI E METODI

4.1 Ceppi batterici, terreni e condizioni di crescita

I ceppi di *E. coli* sono stati cresciuti in terreno liquido e solido Luria Bertani (LB; Difco) a 37°C e le selezioni kanamicina (Kan; Sigma), igromicina (Hyg; Roche) e streptomicina (Str; Bristol- Myers Squibb S.r.l) sono state utilizzate nelle concentrazioni di 50 µg/ml, 150 µg/ml, e 20 µg/ml rispettivamente.

M. tuberculosis H37Rv e *M. smegmatis* mc²155, sono stati cresciuti a 30 o 37°C in terreno Middlebrook 7H9 (Difco) e su piastre di 7H10 agar (Difco) supplementati con 0.2% di glicerolo e 0.05% di Tween-80; per la crescita di *M. tuberculosis* il terreno è stato arricchito con il 10% di ADN (Albumina, Destrosio, NaCl).

Per le selezioni sono state usate kanamicina streptomicina e igromicina nelle concentrazioni di 20 µg/ml, 50 µg/ml e 20 µg/ml rispettivamente; per l'anidrotetraciclina (ATc; Sigma) la concentrazione d'uso è variata in funzione della specie di micobatterio utilizzata mantenendo come soglia massima 200 ng/ml; per il substrato X- gal (Sigma) si è usata una concentrazione di 40 µg/ml.

In tabella 1 vengono elencati i ceppi ed i plasmidi utilizzati in questo progetto.

CEPPI <i>E.coli</i>	GENOTIPO	FONTE DI RIFERIMENTO
TOP10	F ⁻ , mcrA ⁺ , Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC, Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (Str ^r), endA1, nupG	Invitrogen
HB101		Manganelli R.
JM109	endA1, gyr A96, hsdR17 (rk ⁻ mk ⁺), mcrA ⁺ , recA1, D(lac pro-AB), thi, supE44, F ['] (raD36, proAB, lacI ^r ZDM15), λ [']	Sigma
DH5α	F ⁻ Φ80dlacZΔM15Δ(lacZYA-argF)U169 deoRrecA/endA/hsdR17(rk-mk+)phoA supE44 λ gyrA96relA/	Manganelli R.
CEPPI <i>Mycobacterium</i>		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv		Manganelli R.
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155		Manganelli R.
LINEE CELLULARI		
THP-1	linea cellulare monocitica umana tumorale, derivante da sangue periferico; possiedono i recettori Fc e C3b ma mancano di immunoglobuline citoplasmatiche e di superficie	Sartori E.
PLASMIDI		
pAL ₇₄	topo vector avente Dif sequence-HygR-Pmpt64-Dif sequenze	Manganelli R.
pJV53	KanR; oriM, oriE, Pacetamidase, recombineering proteins Che9c gp60-61	Manganelli R.
pMC1m	kanR; integrasi, oriE, promotore medio di <i>tetR</i> , <i>tetR</i>	Ehrt S.
pMC1s	kanR; integrasi, oriE, P _{UV15} , <i>tetR</i>	Ehrt S.

CEPPI <i>E.coli</i>	GENOTIPO	FONTE DI RIFERIMENTO
pMY696	strR, integrasi, oriM, Pptr- <i>lacZ</i>	Ghisotti D.
pMY718	strR; integrasi, OriE, P _{furA102} - <i>pip</i> , Pptr- <i>lacZ</i>	Ghisotti D.
pSE100	HygR, oriE, due <i>tetO</i> operator, MCS, oriM	Ehrt S.
pSM240	StrR, kanR; vettore suicida, derivato da pBend	Manganelli
pUV15 <i>tetORs</i>	HygR, KmR; pAL500ori, p _{smc} -tetR, p _{myc} <i>tetO</i> -gfp+, MCS, 2 terminatori trascrizionali	Ehrt S.

Tab.1 Elenco dei plasmidi e dei ceppi di *E.coli* e *M. tuberculosis*.

4.2 Linee cellulari, terreni e condizioni di crescita

Le cellule utilizzate in questo lavoro sono state quelle appartenenti alla linea monocitica THP-1. Sono state cresciute a 37°C in 5% di CO₂ e mantenute in terreno RPMI (Gibco) supplementato con 10% di siero bovino fetale (BSA). Per la differenziazione in macrofagi al terreno è stato aggiunto 40mM di PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; Sigma).

4.3 Manipolazione del DNA

Enzimi di modificazione e restrizione sono stati ottenuti dalla *New England's BioLabs* ed impiegati secondo protocollo fornito dal produttore.

Per l'amplificazione dei geni utilizzati in questo lavoro, è stata impiegata la polimerasi *Pfu* (Stratagene) su *template* di DNA plasmidico o genomico di H37Rv o mc²155. Le reazioni di PCR sono state condotte in un volume finale di 50 µl seguendo il protocollo di reazione riportato:

DNA	100 ng
<i>Pfu</i> Reaction Buffer 10X	10 % v/v
dNTPs (2,5 mM each)	0,2 mM each
DMSO	0; 5; 10 % v/v
primer senso (100 ng/µl)	0,25 µM
primer antisenso (100 ng/ µl)	0,25 µM
<i>Pfu</i>	2,5 unità/µl di DNA
H ₂ O milliQ	a volume

Per l'amplificazione è stato utilizzato un termociclatore (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer), seguendo questo schema:

FASE DEL CICLO DI AMPLIFICAZIONE	tempo	Temperatura
denaturazione del DNA	5'	95°C
aggiunta enzima <i>Pfu</i>	90''	80 °C
denaturazione	45''	95°C
appaiamento x 5 cicli	45''	<i>Tunneling</i> °C
estensione	90''	72°C
denaturazione	45''	95 °C
appaiamento x 30 cicli	45''	<i>Tannealing</i> °C
estensione	1'45''	72 °C
estensione finale	10'	72°C
fine reazione	<i>hold</i>	4 °C

I frammenti ottenuti per amplificazione sono stati subclonati in pCR-BluntII-TOPO *vector* del kit *Zero Blunt*[®] *TOPO*[®] *PCR cloning* (Invitrogen) e controllati mediante reazioni di sequenziamento utilizzando i *primers* forniti del kit M13 *fw*:5'ctggccgtcgttttac 3' ed M13 *rev*: 5'caggaaacagctatgac 3'.

Nella tabella di seguito (Tab.2) sono riportati i *primers* (Invitrogen) utilizzati in questo lavoro:

<i>Primers</i>	SEQUENZA OLIGONUCLEOTIDICA (5' → 3')
RP475	TTATTTAGCAGAAGGAGATATACTATGGCTAGCAGTCGAGGAGAGGTGC
RP476	TTAATTAAGCTTTCAGGCCTGTTC
RP477	GCGGCCGCAGCTAAGCAGAAGGCCAT
RP478	GCGGCCGCGAAAATAAAAAAGGGGAC
RP555	GATCAACTGATCCCTATCAGTGATAGACATATTGTCTAGTGTGGCGGCCG
RP556	CTGATAGGGATCAGTTGATCTATCACTGATAGGGAGGCGTCTGCTAGGACCCGATCG
RP557	AAGCTTCCATCCTGACGGATGGCCTCCACCATGCAGGCCCGGCTCAT
RP558	AAGCTTTCAGGCCTGTTCGACCATCGC
RP640	AAGCTTGATATCCCATCCTGACGGATGGCCTTC
RP641	AAGCTTTTAATTAACAGGCCTGTTCGACCATCGC
RP707	AGATCTCCATCCTGACGGATGGCCTT
RP708	AGATCTATGCATTCAGGCTCCTTGTACGGTGTAC
RP718	ATGCATGTTGAGGTTGAGGGTTTGCAGG
RP719	ATCGATGCGAAGTCCACGTTGATCAGAC
RP806	ATGCATTTGAGCGTGGGAGCTACCACTACCGC
RP807	ATCGATCTACAGCAGCTCCAAGCGTCGGGCCA
RP818	ACGCGTGCTACCACTACCGCCACCCG
RP819	AGATCTATGGTGGCCAGAACAGTTCGG
RP820	AGATCTCACAGCGACGGCAGCGAAGC
RP821	GGATCCGACGCAGATGTTCCAGCCC

Tab.2 Elenco dei *primers* utilizzati in questo lavoro.

4.4 Reazione di PCR mutagenesi sito- specifica

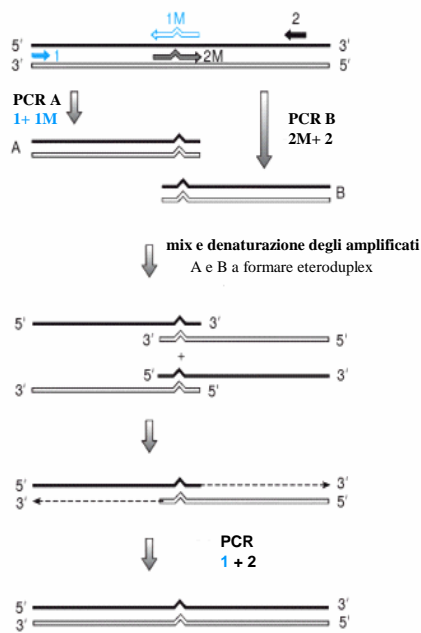


Fig.7 Reazione di mutagenesi sito- specifica [16].

Attraverso tale tecnica è stato possibile introdurre due siti *tetO* all'interno del promotore $P_{furA102}$ del repressore Pip così da renderlo specificatamente riconoscibile da TetR. La PCR mutagenesi sito- specifica è composta di tre *steps* di amplificazione (Fig.7). Inizialmente vengono eseguite due PCR (A e B) in ognuna delle quali uno dei due *primers* (1M e 2M) contiene la mutazione da inserire. I due amplificati ottenuti (A e B) vengono estratti e purificati da gel ed utilizzati come *template* nella terza PCR in eguale

quantità. In tale reazione vengono impiegati il *primer upper* della prima reazione (1) ed il *lower primer* della seconda amplificazione così da ottenere come risultato finale il frammento (A+B) contenente all'interno la mutazione desiderata.

4.5 Elettroporazione di *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*

Colture (50 ml) di batteri sono stati fatti crescere fino al raggiungimento di un OD₆₀₀ pari a 0.5- 0.6; successivamente i batteri vengono pellettati (15', 5000rpm temperatura ambiente) e lavati due volte con un volume di glicerolo 10% (Erba).

Infine il pellet viene risospeso in 1 ml di glicerolo 10% lavato un'ultima volta e rispeso in 800 μ l di glicerolo 10%. Vengono eseguite aliquote da 50 μ l l'una a cui poi si aggiunge il DNA trasformante (circa 0.8- 1 μ g per *M. smegmatis*, 2 μ g per *M. tuberculosis*). L'elettroporazione viene condotta in apposite cuvette (Cuvette Plus 0.2 cm electrode gap) utilizzando l'elettroporatore 2510 (Eppendorf; capacitanza: 25 μ F per *M. smegmatis*, 10 μ F per *M. tuberculosis*; voltaggio 25KVcm⁻¹; resistenza: 200 Ω per *M. smegmatis*, 800 Ω per *M. tuberculosis*). Dopo passaggio della corrente elettrica le cellule sono state diluite in 0.8 ml di terreno incubate a 37°C per 3 ore (*M. smegmatis*) o 18 ore (*M. tuberculosis*) e piastrate su terreno selettivo.

4.6 Sistema del *recombineering* in *M. tuberculosis*

Il sistema del *recombineering* permette di aumentare la frequenza di eventi di ricombinazione in micobatterio utilizzando i geni del fago *Che9c 60* e *61* presenti nel plasmide pJV53 [38]. Tra le sue numerose applicazioni la più comune è il suo utilizzo nella costruzione di mutanti condizionali. Il protocollo prevede le seguenti fasi:

- ***Preparazione di cellule elettrocompetenti del ceppo recombineering***

Una coltura (5ml) viene fatta crescere in 7H9 (OADC 10%) con kanamicina a 37°C senza agitazione fino a saturazione. Si procede a ringiovanire la coltura in un volume maggiore (100 ml) di terreno partendo da un OD₆₀₀ di 0.025; al raggiungimento di un OD₆₀₀= 0.5 si aggiunge acetammide (*Ch9c 60* e *61* sono sotto controllo trascrizionale del promotore per l'acetammide) alla concentrazione finale di 0.2% lasciando incubare a 37°C per 24 ore. Quindi le cellule vengono sottoposte a 5 cicli di centrifuga da 10' 5000rpm a temperatura ambiente e lavaggio in glicerolo sterile al 10% andando a dimezzare ad ogni ciclo il volume di glicerolo utilizzato (fino a 4 ml nell'ultimo lavaggio). Si utilizzano aliquote da 100µl l'una per l'elettroporazione.

- ***Preparazione del frammento AES***

Il frammento è costituito da due regioni di circa 500bp l'una, omologhe al gene *target* fiancheggiati una cassetta per la resistenza all'igromicina. Le regioni omologhe e il gene per l'igromicina devono essere clonate nel medesimo orientamento 5' → 3'.

Il frammento linearizzato è stato sequenziato, quindi purificato e quantizzato su gel d'agarosio.

- ***Elettroporazione di *M. tuberculosis* con AES***

100 µl di cellule di *M. tuberculosis* rese elettrocompetenti, sono state trasformate con 100ng di AES e lasciate incubare in 1ml di 7H9 (OADC 10%) a 37°C per 72 ore.

I trasformanti sono stati selezionati da piastre di 7H10 (OADC 10%, Hyg, Kan) e lasciate incubare per 18- 25 giorni a 37°C.

4.7 Saggi di attività di β-galattosidasi in *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*

Le colture di micobatterio *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* trasformate con i diversi plasmidi, sono state fatte crescere over night (ON) in presenza o meno di ATc (50 ng/ml) e quindi diluite ad un OD₆₀₀ = 0.15 il giorno successivo mantenendo o meno

l'antibiotico. Per ogni raccolta, 10 ml di cellule sono state centrifugate per 15' a temperatura ambiente a 5000 rpm. Il pellet, dopo essere rimasto a -20°C ON, viene risospeso in 600 μl di bufferZ (NaH_2PO_4 0,5 M 6,4% v/v; Na_2HPO_4 0,5 M 13,6%; MgSO_4 1 M 0,1% Sigma; H_2O milliQ 79,9%). In seguito le cellule vengono lisate per sonicazione (Gene Pulser B-12 Branson Company; potenza 3), con 2 giri da 45'' l'uno intervallati da 45'' in ghiaccio, mentre per *M. tuberculosis* la lisi cellulare avviene utilizzando 300 μl di *Zirconia beads* (BioSpec Products) con tre giri da 45'' l'uno intervallati da raffreddamento in ghiaccio. Successivamente i batteri vengono centrifugati per 1' a 15000rpm ed il sovrnatante viene conservato per i saggi. Per eseguire i saggi β -galattosidasi vengono prelevati 100 μl di surnatante a cui vengono aggiunti 700 μl di bufferZ, 6 μl di β -mercaptoetanololo (Sigma) e 200 μl di O- nitrofenil- β - D-galattopiranoside (ONPG 4 mg ml^{-1} , Sigma). I campioni vengono incubati a 37°C fino alla comparsa della colorazione gialla. La reazione viene fermata con 500 μl di Na_2CO_3 1 M (Sigma). Per ciascun campione è stato misurato l'assorbimento a 420nm. Ogni lisato è stato quantizzato con il metodo *Bradford Lowry* per misurare la concentrazione di proteine.

L'attività β -galattosidasi è stata valutata in (*Miller Units*) come:

$$A = (OD_{420} * 377.77) / \Delta t(\text{min}) * \text{estratto (ml)} * [\text{proteine}] (\text{mg/ml});$$

dove:

OD_{420} rappresenta il valore di intensità di colore dipendente dalla reazione dell'enzima con il substrato;

377.77: rappresenta un fattore di conversione;

Δt : rappresenta l'intervallo di tempo intercorso al viraggio al giallo della reazione;

estratto: quantità di campione utilizzata dopo che è stato risospeso in bufferZ;

proteine: concentrazione di proteine ottenuta con il metodo Bradford.

4.8 Ottenimento di DNA *single strand* attraverso denaturazione con alcali

Il DNA plasmidico (2 μg) viene precipitato con 1/10 di volume di NaOAc e 2.5 volumi di etanolo 100% a 4°C per 20minuti; successivamente viene centrifugato a 10000g per 15 minuti ed il sovrnatante viene rimosso.

Dopo aver portato a secco il *pellet* questo viene risospeso in 10 μl di acqua deionizzata sterile in cui vengono aggiunti 3 μl di 0.2 mM EDTA/ 0.2M NaOH; segue un'incubazione a 37°C per 30 minuti ed una seconda precipitazione del DNA così denaturato.

Dopo una centrifuga di 15 minuti a 13200rpm il sovrantante viene rimosso ed il DNA è lavato due volte con etanolo 70%.

Infine il *pellet* portato a secco viene risospeso in 5 µl di acqua deionizzata ed è pronto per essere elettroporato.

4.9 Infezione di *M. tuberculosis* Δ*fadD32* delle cellule appartenenti alla linea monocitica THP-1

Dopo espansione le cellule THP-1 sono state centrifugate 5' a 1400rpm a temperatura ambiente e risospese in RPMI supplementato con il 10% di siero bovino fetale (BSA; Sigma) e 50nM di PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; Sigma) ad una concentrazione di 7.5×10^5 cellule/ml. 100µl di sospensione cellulare sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti ed incubati per 24 ore a 37°C in 5% CO₂. In queste condizioni i monociti THP-1 si differenziano in macrofagi aderendo al fondo dei pozzetti e non dividendosi più. Il terreno è stato quindi rimosso e sono stati aggiunti 100µl di RPMI (supplementato con il 10% di BSA) con e senza ATc (200ng/ml) in cui sono presenti 3.7×10^4 cfu di micobatteri (valore di MOI 1:20 cfu per macrofago). La piastra è stata incubata per 1 h 30' ore a 37°C in 5% CO₂ per permettere l'infezione. Il terreno è stato successivamente rimosso da ogni pozzetto e sono stati eseguiti due lavaggi da 100µl di PBS l'uno, per rimuovere i batteri extra- cellulari. Infine RPMI (supplementato con 10% BSA) avente o meno 200 ng/ml di ATc è stato aggiunto nella quantità di 100 µl di ad ogni pozzetto; le piastre sono state incubate a 37°C in 5%CO₂ e ogni 48 ore il terreno con o senza ATc veniva rimosso e sostituito con del nuovo dalle medesime caratteristiche. Per ciascun campione il valore reale di MOI corrispondente al numero di batteri che effettivamente hanno infettato i macrofagi è stato stabilito attraverso la conta mediante diluizioni seriali delle cfu/ pozzetto al t =0 (dopo 1h 30' d'infezione).

Per una settimana dall'infezione è stata seguita la crescita- mortalità dei batteri in presenza o meno di ATc, mediante conta per diluizioni seriali. I batteri all'interno dei macrofagi venivano rilasciati per lisi dai macrofagi con 100 µl di una soluzione al 0.05% di SDS (Sigma). La sospensione ottenuta da lisi macrofagica è stata diluita in 7H9 e piastrata per determinare la conta di batteri vivi. La vitalità dei macrofagi è stata controllata mediante colorazione con il *Trypan Blue* (Sigma).

4.10 Colorazione di Ziehl- Nielsen per micobatterio

Tale tecnica è una colorazione policromatica che misura la resistenza delle cellule batteriche colorate alla decolorazione con acidi; il genere *Mycobacterium* è particolarmente resistente alla penetrazione del colorante e si decolora con difficoltà una qualvolta viene trattato con alcoli e/o acidi. Ciò è correlabile con il loro alto contenuto di lipidi di superficie, carattere che li distingue dalle altre forme microbiche. I batteri devono essere essiccati e fissati al calore su di un vetrino portaoggetti; successivamente viene distribuita sul vetrino una soluzione di carbolfucsina (0.3 gr in 10ml di etanolo 95%+ 100ml di soluzione acquosa di fenolo 5%) e lasciata agire per 10'. In seguito il vetrino viene lavato ripetutamente e trattato per 20" con acido solforico 20% quindi risciacquato per poter essere immerso nel colorante di contrasto che è il blu di metilene 0.3% per 2- 3'. Dopo risciacquo il vetrino viene lasciato asciugare e osservato al microscopio con obiettivo ad immersione.

Essendo *Mycobacterium* un batterio acido- alcol resistente tratterrà il primo colorante (carbofucsina) e non verrà decolorato con il secondo apparendo di conseguenza rosso.

4.11 Curva di crescita per i mutanti condizionali di *M. tuberculosis* in presenza di ATc

I ceppi di mutanti condizionali sono stati isolati su piastre di 7H10 agar (ADN 10%) con selezione per l'igromicina. Quindi sono stati eseguiti inoculi (5 ml) delle colture che sono state fatte crescere *standing* a 37°C fino al raggiungimento di un OD₆₀₀ opportuna. Le colture di batteri sono state ringiovanite, partendo da un OD₆₀₀ di 0.05-0.06, in volumi maggiori di terreno (20ml) (supplementato con ADN 10%), avente igromicina (50 ng/ml) e ATc a diverse concentrazioni (0; 50; 10; 200 ng/ml) e lasciate crescere a 37°C in agitazione; ogni 24 ore e per 7 giorni le colture venivano misurate e l'OD₆₀₀ è stata annotata. Come controllo negativo è stato utilizzato il mutante condizionale per un gene non essenziale dove la presenza di ATc non produceva alcun effetto nella cinetica di crescita del ceppo stesso.

4.12 Costruzione di *knockout* condizionale in *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*

In questo lavoro vengono presentate tre strategie per l'ottenimento di mutanti condizionali: una è stata impiegata per i geni *ftsZ* di *M. smegmatis* e *fadD32* e *rv3213c* di *M. tuberculosis*, le altre due sono state seguite per la realizzazione del *knockout* del gene *Rv3790* di *M. tuberculosis*.

- La prima strategia è basata sull'utilizzo di un vettore suicida (pSM240; HygR, 5796bp che non è in grado di replicare come episoma nei micobatteri) in cui viene clonata, a valle del promotore P_{ptr} la regione N-t (circa 700bp) del gene oggetto di cui si vuole avere il *knockout* precedentemente; tale vettore è elettroporato in micobatterio dove si integra per ricombinazione omologa. La corretta ricombinazione è confermata attraverso PCR. Il nuovo ceppo è trasformato con il plasmide integrativo esprime i repressori TetR e Pip e i ricombinanti sono stati selezionati su piastre di 7H10 agar (ADN o H₂O 10%) aventi o meno ATc (50 ng/ml per *M. smegmatis* o 200 ng/ml per *M. tuberculosis*).

Per l'ottenimento del *knockout* condizionale di *Rv3790*, sono state intraprese parallelamente due diverse strategie:

- La prima strategia si basa su due *steps*: a) ottenimento di un ceppo merodiploide per il gene d'interesse b) silenziamento della copia *wt* dello stesso.

Inizialmente il ceppo H37Rv *wt* è trasformato con un plasmide integrativo esprime i repressori TetR e Pip ed il gene d'interesse sotto controllo trascrizionale di P_{ptr} .

I trasformanti sono selezionati su piastre 7H10agar (ADN 10%) con selezione per la streptomicina.

Successivamente questo ceppo è trasformato con il plasmide del *recombineering* pJV53 ed i trasformanti selezionati su piastre 7H10agar (OADC 10%, Kan).

Il mutante così ottenuto è infine elettroporato con un frammento di DNA (AES) che integrandosi per ricombinazione omologa grazie alla presenza di pJV53, apporta una delezione *in-frame* nella copia del gene *wt*.

I trasformanti sono selezionati su piastre di 7H10agar (OADC 10% Hyg, Kan).

Tale cassetta verrà successivamente rimossa attraverso le recombinasi *Xer* dell'ospite che riconoscono specifiche sequenze inserite in AES (*DIF sequence*).

Come risultato finale si ottiene un ceppo dove:

- la trascrizione del gene *wt* deleto origina una proteina tronca;
- la trascrizione del gene d'interesse è sotto controllo del promotore P_{ptr} .

- La seconda strategia prevede che il frammento AES venga clonato in un plasmide *shuttle* (pJsc284), ristretto con l'enzima PacI e legato con un pre-digerito PacI- DNA del fago lambda.

Tale prodotto di ligazione dopo essere stato sottoposto a *package in vitro* viene trasdotto in *E. coli* e il cosmide risultante purificato.

Quindi segue la transfezione in *M. smegmatis* alla temperatura permissiva di 30°C così da ottenere placche di micobatteriofagi che vengono impiegati per infettare *M. tuberculosis* (trasduzione). L'infezione viene condotta ad una temperatura non permissiva per il micobatteriofago (37°C) che così va incontro a lisi con rilascio di particelle fagiche; la regione AES ricombina per doppio evento di *crossover* tra le regioni omologhe fiancheggianti la cassetta dell'igromicina ed il DNA genomico. I trasduttanti sono ottenuti attraverso selezione su terreno avente l'igromicina.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Primo modello di sistema d'espressione reprimibile

Questo modello si sviluppa su due plasmidi: uno replicativo, derivato dal plasmide pSE100, esprime i due repressori, ed uno integrativo pMY696 codificante per il gene *lacZ* (gene d'interesse) ed il suo promotore P_{ptr} .

5.1.1 Inserimento dei repressori Pip e TetR nel plasmide pSE100

L'amplificazione del gene *pip* è stata eseguita con i *primers* RP475/ 476 utilizzando come *template* il DNA plasmidico di pMY718. Il frammento purificato è stato clonato in PacI nel plasmide pSE100 a valle del promotore P_{UV15} avente due siti *tetO* al suo interno. La regione *ter-P_{UV15}tetR-ter* è stata amplificata dal plasmide pMC1m utilizzando i *primers* RP477/ 478 e clonata anch'essa in pSE100:*pip* (pFRA₁₁) dopo sua digestione con NotI; il plasmide risultante è il pFRA₁₂ (Fig.8).

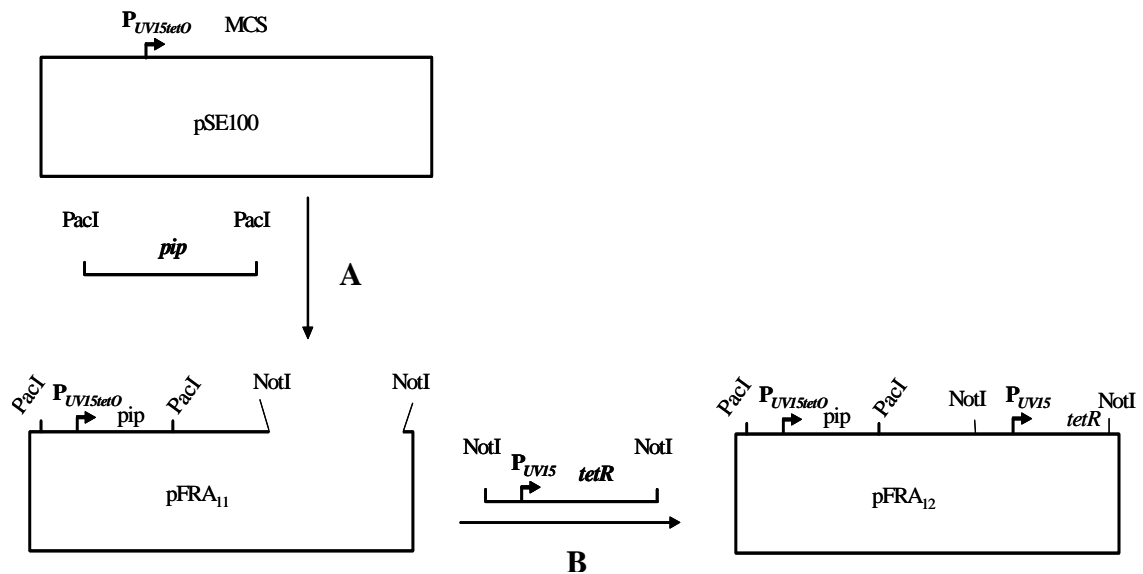


Fig.8 Rappresentazione schematica della costruzione del plasmide pFRA₁₂. A) inserimento di *pip* in pSE100; B) inserimento di *tetR* in pFRA₁₁.

5.1.2 Saggi di attività β -galattosidica per valutare il funzionamento del primo modello di sistema Pip/ TetR in *M. smegmatis*

I costrutti pFRA₁₁ e pFRA₁₂ sono stati elettroporati in *M. smegmatis* mc²155: pMY696, dando origine ai ceppi Ms68.1 ed Ms69.1.

Al fine di determinare il funzionamento di questo modello saggi di attività β -galattosidica sono stati eseguiti su colture cresciute in liquido in presenza o assenza di ATc (50ng/ml) (Fig.9).

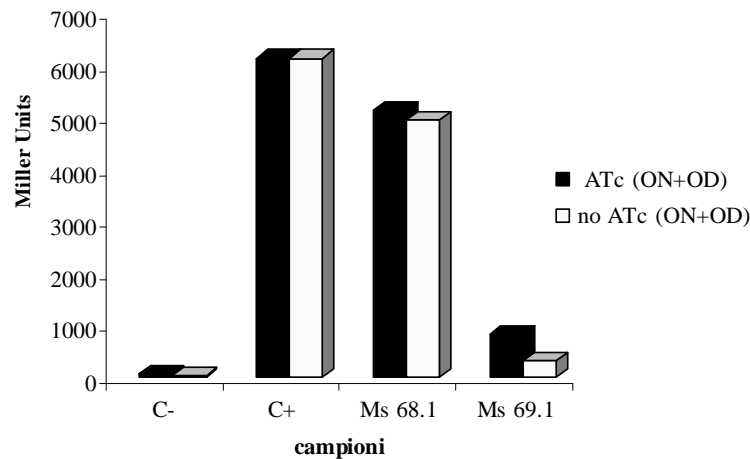


Fig.9 Saggi di attività β -galattosidica dei ceppi Ms 68.1 ed Ms 69.1. Le colture sono state fatte crescere ON con e senza ATc (50ng/ml) quindi ringiovanite nelle medesime condizioni il giorno successivo. Al raggiungimento di un $OD_{600} = 0.5-0.6$ i batteri sono stati raccolti e su di questi eseguiti i saggi β -gal. L'attività è espressa in *Miller Units*. In nero la serie di campioni trattati con l'induttore ON ed OD; in bianco la serie dei ceppi cresciuti senza induttore.

Il ceppo di *M. smegmatis*, mc²155 è stato utilizzato come controllo negativo in quanto, mancante del gene *lacZ* e del plasmide pFRA₁₂, non dimostra alcuna attività né in presenza né in assenza di ATc. Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo di *M. smegmatis* trasformato con il plasmide pMY696 esprimente *lacZ* sotto controllo di P_{ptr}, il quale sia in presenza che assenza di ATc esprime attività β -galattosidica in egual misura.

Per quanto riguarda i ceppi Ms68.1 ed Ms69.1 i risultati non sono stati coerenti con quanto atteso da un corretto funzionamento del sistema; infatti nel ceppo Ms68.1 avente solo il repressore Pip si sarebbe dovuta osservare repressione dell'attività β -galattosidica, sia in presenza che in assenza di induttore, in conseguenza al legame di Pip al *core* di P_{ptr}. Come si può osservare dal grafico invece per Ms68.1 si registra, al contrario, un livello di espressione decisamente elevato e costante in entrambi le condizioni di crescita. Anche nel ceppo Ms69.1, esprimente sia il sistema sia P_{ptr}-*lacZ*, il risultato appare invertito, infatti, in assenza di induttore si osserva repressione di *lacZ* quando invece si dovrebbe osservare attività β -galattosidica dovuto al blocco trascrizionale di Pip causato dal legame di TetR al promotore P_{UV15tetO}. In presenza di ATc, l'iterazione di TetR con l'induttore dovrebbe indurne il suo distacco dal promotore P_{UV15tetO} e permettere la trascrizione di Pip e la sua associazione a P_{ptr} con

conseguente spegnimento del gene *lacZ*. Dal grafico si può osservare come in questa condizione di crescita l'attività β -galattosidica venga invece repressa.

I risultati così ottenuti possono essere spiegati ipotizzando:

- la possibilità che *pip* venga espresso ad un livello così elevato da poter essere considerato tossico per micobatterio;
- una regolazione da parte di TetR non troppo stringente.

In quest'ottica, in assenza d'induttore TetR associandosi a $P_{UV15tetO}$ non sarebbe in grado di spegnerne completamente l'attività e *pip* verrebbe comunque espresso (bassa attività β -galattosidica); mentre in presenza di ATc *pip* verrebbe espresso probabilmente a livelli troppo alti a tal punto da venir inglobato in corpi di inclusione e non poter esprimere l'attività di repressore nei confronti di *lacZ*, permettendone in questo modo l'espressione.

In conseguenza al fallimento di tale modello di sistema reprimibile, ne è stata decisa la sua archiviazione spostando l'attenzione verso un nuovo costrutto in cui *pip* venisse a trovarsi in singola copia nel cromosoma e la cui espressione fosse dipendente da un promotore più debole.

5.2 Secondo modello di sistema d'espressione reprimibile

Allo scopo di ottenere una minor espressione del gene *pip* (probabile motivo del fallimento del primo sistema sviluppato) il gene codificante il repressore Pip è stato inserito assieme al gene *reporter* in un plasmide integrativo (pMY718) ed è stato posto sotto il controllo di un nuovo promotore (più debole del precedente), da noi opportunamente mutagenizzato per renderlo dipendente da TetR. TetR, invece, viene espresso da un plasmide replicativo (pUV15tetORs).

5.2.1 Mutagenesi sito- specifica per l'inserimento in $P_{furA102}$ dei due siti operatori *tetO*

Il promotore $P_{furA102}$ (promotore micobatterico del gene *furA* coinvolto nell'*uptake* del ferro) che in pMY718 (in gentile concessione della Prof.ssa Ghisotti) controlla l'espressione di *pip*, è stato mutagenizzato attraverso l'inserimento dei due siti operatori di TetR (*tetO*) utilizzando la tecnica della PCR mutagenesi (Fig.10).

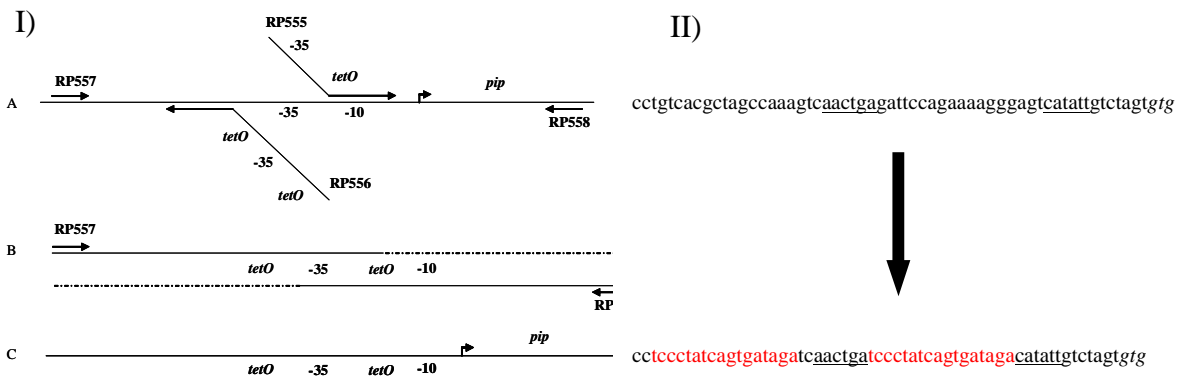


Fig.10 I) Rappresentazione schematica della tecnica di PCR mutagenesi; II) Sequenza nucleotidica di $P_{furA102}$ e $P_{furA102tetO}$. Le sequenze *consensus* -10 e -35 del promotore sono sottolineate, i siti *tetO* introdotti sono in rosso; *gtg*: codone di inizio trascrizione.

La coppia di *primers* RP557/ 556 è stata impiegata per amplificare $P_{furA102}$ (180bp circa) con l'inserimento nel *lower primer* RP556 della regione *consensus* -35 di $P_{furA102}$ fiancheggiata dai due operatori *tetO*, mentre la coppia di *primers* RP555/ 558 è stata utilizzata per amplificare il gene *pip* (1 Kb circa) con l'introduzione nell'*upper primer* della regione *consensus* -35 di $P_{furA102}$ e di un sito *tetO* (Fig.10.I).

Nella terza amplificazione sono stati utilizzati come *template*, in egual quantità, i prodotti PCR ottenuti in precedenza così da ottenere come risultato finale il gene *pip* a valle del suo promotore $P_{furA102}$ al cui interno, tra le sequenze -35 e -10 (sottolineate in Fig.10.II), vi erano i siti operatori *tetO* (in rosso nella Fig.12.II). La regione HindIII-HindIII ($P_{furA102}$: *pip*) in pMY718, è stata sostituita con il prodotto della terza amplificazione: $P_{furA102tetO}$:*pip* dando origine al plasmide pFRA₁₆ (Fig.11).

In questo modo in pFRA₁₆ $P_{furA102tetO}$ è divenuto riconoscibile specificatamente da TetR e *pip* presente in singola copia nel cromosoma viene ad essere controllato da un promotore più debole di $P_{UV15tetO}$ utilizzato nel precedente sistema.

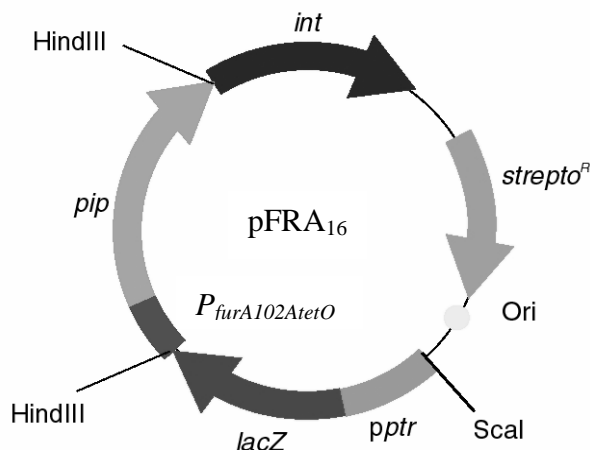


Fig.11 Rappresentazione del plasmide integrativo pFRA₁₆. Il promotore $P_{furA102}$ è stato mutagenizzato attraverso l'introduzione di due siti operatori *tetO*; *int*: gene dell'integrasi; *ori*: origine di replicazione; *lacZ*: gene della β -galattosidasi; P_{ptr} : promotore del gene per la resistenza alla prestinamicina.

Tale costrutto è stato utilizzato con il plasmide replicativo $P_{UV15tetO}Rs$ codificante per il repressore TetR.

5.2.2 Saggi di attività β -galattosidica per valutare il funzionamento del secondo modello di sistema Pip/ TetR in *M. smegmatis*

I plasmidi pFRA₁₆ e $P_{UV15tetO}Rs$ sono stati elettroporati in *M. smegmatis* dando origine al ceppo ricombinante Ms77.1. Al fine di valutare l'efficienza di questo nuovo modello sono stati eseguiti saggi d'attività β -galattosidica in liquido e su piastra.

5.2.2a Analisi dell'attività β -galattosidica in colture di *M. smegmatis* cresciute su terreno liquido

Anche in questo caso le colture di micobatterio sono state cresciute ON in 7H9 in presenza o assenza di ATc (50 ng/ml) e ringiovanite il giorno successivo in terreno avente le medesime caratteristiche. Al raggiungimento di un $OD_{600} = 0.5-0.6$ i batteri sono stati prelevati per eseguire i saggi. I risultati ottenuti sono rappresentati nel grafico seguente:

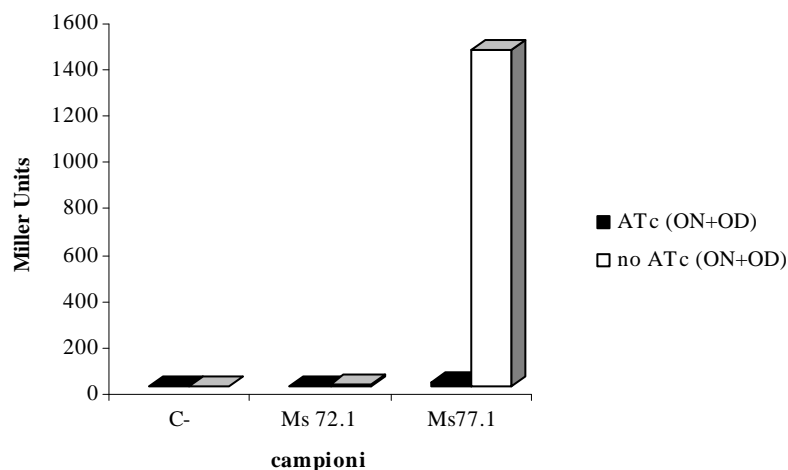


Fig.12 Saggi di attività β -galattosidica dei ceppi Ms72.1 ed Ms77.1. Le colture sono state fatte crescere ON con e senza ATc (50ng/ml) quindi ringiovanite nelle medesime condizioni il giorno successivo. Al raggiungimento di un $OD_{600} = 0.5-0.6$ i batteri sono stati raccolti e su di questi eseguiti i saggi β -gal. L'attività è espressa in Miller Units. In nero la serie di campioni trattati con l'induttore ON ed OD; in bianco la serie dei ceppi cresciuti senza induttore.

I ceppi considerati in questo esperimento sono *M. smegmatis* mc²155 come controllo negativo, il quale essendo privo di *lacZ*, *pip*, e *tetR* non dimostra alcuna attività β -galattosidica né in presenza né in assenza di induttore; il ceppo Ms72.1 possiede unicamente il plasmide pFRA₁₆ di conseguenza il repressore *pip* viene espresso sempre e comunque, garantendo una completa repressione di *lacZ*.

Come si può constatare dal grafico, i risultati per Ms77.1 sono concordi con quanto atteso, infatti in presenza di induttore l'attività β -galattosidica è pressoché nulla, mentre in assenza di ATc si ottiene un buon livello di espressione di *lacZ*.

5.2.2b Analisi dell'attività β -galattosidica in colture di *M. smegmatis* cresciute su terreno solido

Il ceppo Ms77.1 è stato testato anche su piastre di 7H10 avente diverse concentrazioni di ATc (0; 10; 50 ng/ml) e X-gal; come si può osservare l'espressione di *lacZ* è inversamente proporzionale alla quantità di ATc presente, infatti in assenza di induttore (Fig.13A) l'attività β -galattosidica è chiaramente visibile nella colorazione blu della piastra, mentre si fa più debole a 10ng/ml (Fig.13B) e 50 ng/ml di ATc (Fig.13C).

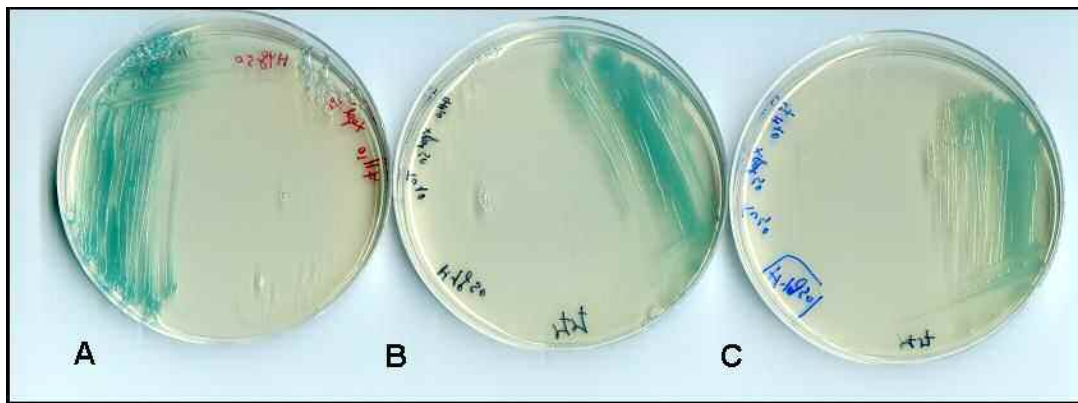


Fig.13 Valutazione della funzionalità del sistema Pip/ TetR su piastre contenenti X-gal e diverse concentrazioni di ATc (50ng/ml A; 10ng/ml B; 0 ng/ml C). Il livello di repressione dell'attività β -galattosidica è proporzionale alla concentrazione di ATc presente.

I risultati ottenuti dagli esperimenti preliminari eseguiti in liquido e su piastra inducono a concludere che questo secondo modello possiede le potenzialità per divenire un buon sistema di espressione condizionale. Pur di buon livello, questo sistema presenta una certa attività basale anche in condizioni di repressione.

Questo potrebbe essere dovuto al fatto che *tetR*, presente in un plasmide multicopia potrebbe essere espresso troppo, andando a reprimere parzialmente la trascrizione di *pip* (e per cui permettendo la trascrizione di *lacZ*) anche in presenza di ATc.

Su tali premesse sono state apportate una serie di modifiche volte a migliorare quest'ultimo modello così da renderlo più idoneo per un suo impiego nell'ottenimento di mutanti condizionali.

5.3.1 Terzo modello di sistema di espressione reprimibile

In questo terzo e definitivo modello di sistema reprimibile anche il gene codificante il repressore TetR (derivato da pMC1s) è stato introdotto nel vettore integrativo pFRA₁₆, a valle di *pip*, dando origine al pFRA₄₂, plasmide integrativo codificante i tre elementi costitutivi per il sistema. In relazione al verso con cui si è inserito *tetR* si sono ottenuti i costrutti pFRA_{42A} (*pip* e *tetR* sono orientati con verso opposto) e pFRA_{42B} (*pip* e *tetR* possiedono il medesimo orientamento) (Fig.14). In questo modo, sia *pip* sia *tetR* si trovano in singola copia sul cromosoma.

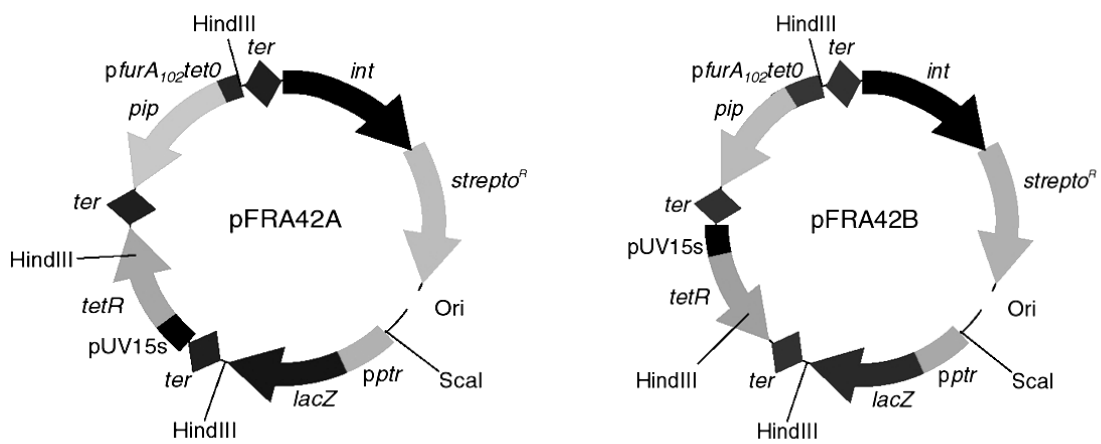


Fig.14 Rappresentazione dei plasmidi integrativi pFRA_{42A} e pFRA_{42B} esprimenti *tetR*, *pip* e *lacZ*. I plasmidi differiscono per l'orientamento di *tetR*, *lacZ* è sotto controllo trascrizionale di *Pptr* riconosciuto da *Pip*; *Strepto^R*: resistenza a streptomicina; *int*: integrasi; *ter*: terminatore.

5.3.2 Saggi di attività β -galattosidica in *M. smegmatis* e *M.tuberculosis* per valutare il funzionamento del terzo modello di sistema Pip/ TetR

I costrutti pFRA_{42A} e pFRA_{42B} sono stati elettroporati in *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* originando rispettivamente i ceppi ricombinanti Ms82 Ms83 e TB82 e TB83.

5.3.2a Analisi dell'attività β - galattosidica in colture di *M. smegmatis* cresciute in terreno solido

I ceppi Ms82 ed Ms83 sono stati strisciati su piastre aventi X-gal e diverse concentrazioni di ATc (50; 10; 0 ng/ml) così da valutare la funzionalità di questo modello.

Come si può osservare dall'immagine **A** in Fig.15 entrambi i ceppi mostrano una buona attività β - galattosidica quando crescono in assenza di ATc (A), che diminuisce già in presenza di 10ng/ml di ATc (**B**) fino a risultare nulla laddove la crescita è avvenuta con 50ng/ml ATc (**C**). Confrontando tali risultati con quelli ottenuti dal medesimo esperimento eseguito nel ceppo Ms 77.1, risulta evidente come vi sia una maggior capacità di questo terzo modello di esercitare una repressione nell'espressione del gene *reporter*. Infatti le piastre con ATc 50ng/ml (Fig.15A) sono completamente prive di attività β - galattosidica che si continua invece a ritrovare, anche se in misura comunque debole, nelle piastre con la medesima concentrazione del ceppo Ms77.1.

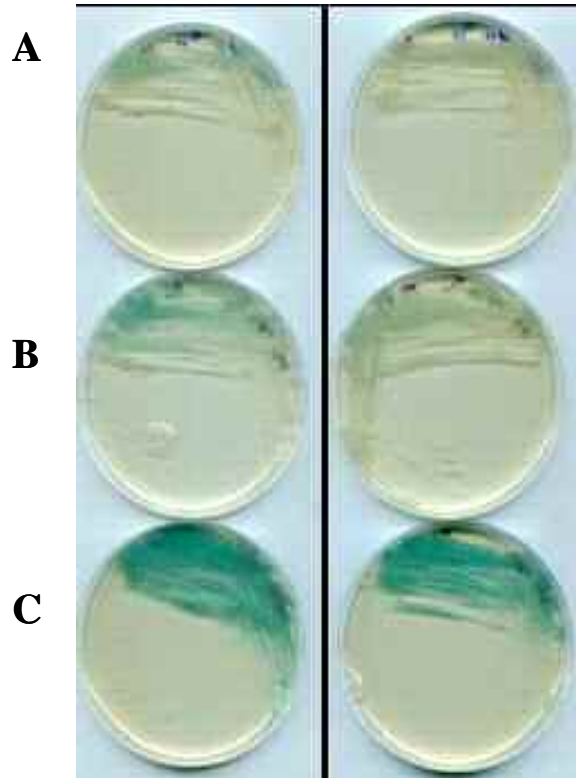


Fig.15 Valutazione della funzionalità del sistema Pip/TetR. I ceppi sono stati fatti crescere su piastre contenenti X-gal e diverse concentrazioni di ATc (50ng/ml A; 10ng/ml B; 0 ng/ml C) per i ceppi Ms 82 (sinistra) ed Ms83 (destra).

Si può quindi ritenere che le modifiche apportate a quest'ultimo modello lo abbiano reso più stringente, rendendo possibile una repressione praticamente completa da parte di Pip, nella trascrizione di *lacZ* confermando le nostre ipotesi.

5.3.2b Analisi dell'attività β - galattosidica su colture di *M. smegmatis* cresciute in terreno liquido

Il sistema è stato testato anche con colture di micobatterio cresciute in liquido; per questo esperimento i batteri sono stati fatti crescere per 12 ore in assenza o presenza di ATc (50ng/ml) ed il giorno successivo i ceppi pre- cresciuti in ATc sono stati diluiti in terreno contenente la medesima concentrazione di induttore, mentre i batteri cresciuti

ON in assenza di ATc sono stati ringiovaniti in terreno avente o meno ATc. Dopo 6 ore dal ringiovanimento i batteri sono stati e raccolti e si sono eseguiti i saggi d'attività β -galattosidica. In questo modo si sono ottenute colture esposte all'induttore per 18 o 6 ore e colture non esposte (Fig.16).

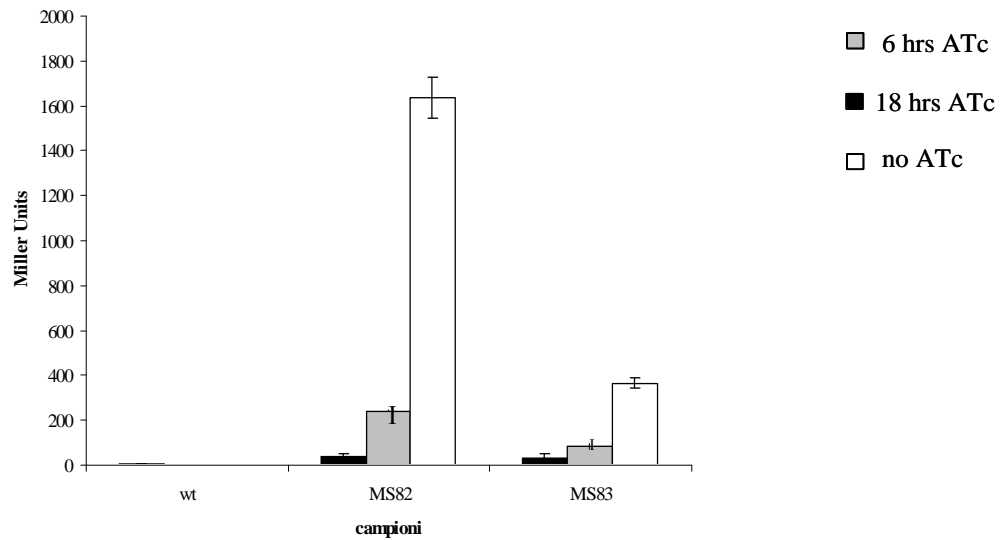


Fig.16 Saggi d'attività di β - galattosidasi per i ceppi di *M. smegmatis*: Ms wt, Ms82 ed Ms83. La serie nera rappresenta i ceppi cresciuti per 18 ore con ATc; in grigio la serie per i ceppi cresciuti con ATc per 6 ore; in bianco la serie rappresentante i ceppi cresciuti in assenza di induttore.

I risultati ottenuti dimostrano che dopo 18 ore di repressione con ATc (50ng/ml) l'attività di β - galattosidasi diminuisce di un valore di 57 volte per Ms82 e di 14 volte per Ms83 divenendo confrontabile con quella del wt, mentre dopo 6ore di crescita in presenza di ATc, essa diminuisce di circa 4.9 volte per Ms82 e 6.9 volte per Ms83. Come si può osservare 6 ore di repressione non sono sufficienti per annullare completamente l'attività β - galattosidica.

5.3.3 Analisi dell'attività β - galattosidica su colture di *M. tuberculosis* cresciute in terreno liquido

Il sistema è stato saggiato anche in *M. tuberculosis*; in questo caso però si sono eseguiti i saggi β - galattosidasi solo per le colture pre- cresciute in assenza di ATc e ringiovaniti con e senza ATc per 36 ore (equivalenti alle 6 ore di *M. smegmatis*) (Fig.17).

Dai risultati qui riportati si può osservare come anche in *M. tuberculosis* si registri una repressione dell'attività β - galattosidica dopo aggiunta di ATc, in questo caso però tale effetto è quantizzabile in circa 4 volte per TB82, di 7 volte per il ceppo TB83.

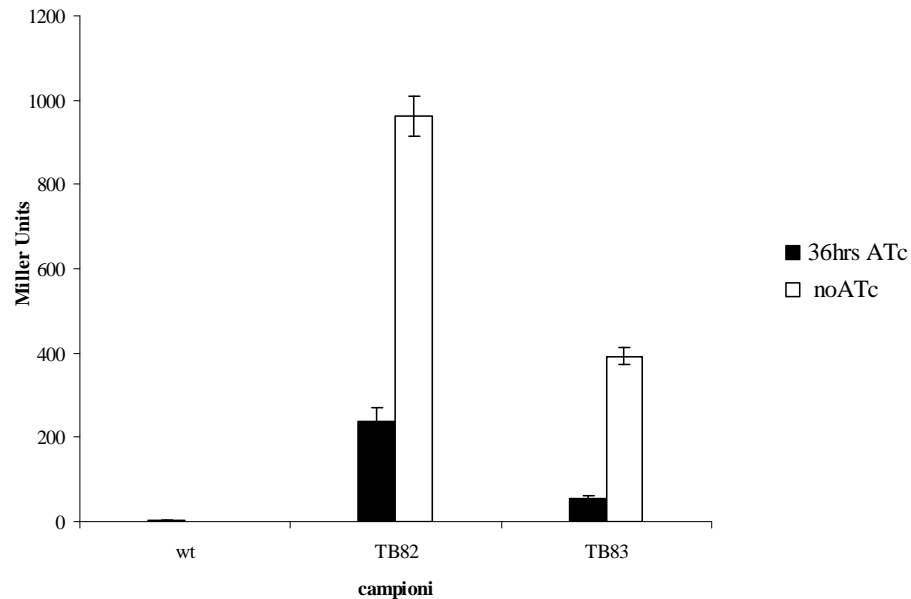


Fig.17 Saggi d'attività di β - galattosidasi per i ceppi di *M. tuberculosis*: wt, TB82 ed TB83. La serie nera rappresenta i ceppi cresciuti per 36 ore con ATc; in bianco la serie rappresentante i ceppi cresciuti in assenza di induttore.

In entrambe le specie l'attività di un costrutto è maggiore rispetto all'altro; il diverso orientamento che i due repressori hanno nei vettori pFRA_{42A} e pFRA_{42B} potrebbe in qualche modo interferire nell'espressione di *pip*.

5.3.4 La repressione del sistema Pip/ TetR dose- dipendente alla quantità di ATc fornita

Al fine di caratterizzare maggiormente il sistema, è stato eseguito un ulteriore esperimento per verificare se fosse possibile ottenere un grado di repressione proporzionale alla quantità di ATc fornita.

In questo caso le colture di *M. smegmatis* (wt e Ms82) sono state fatte crescere ON in presenza di ATc (50ng/ml) e ringiovanite il giorno successivo con diverse concentrazioni di induttore (0; 1; 1.5; 2; 3; 4.5; 9; 12.5; 25; 50 ng/ml); ogni 24 ore i batteri venivano raccolti e le colture diluite in terreno avente la medesima concentrazione di ATc.

I campioni da testare per eseguire i saggi d'attività β - galattosidica sono stati raccolti dopo 24, 48, 72 ore (Fig.18).

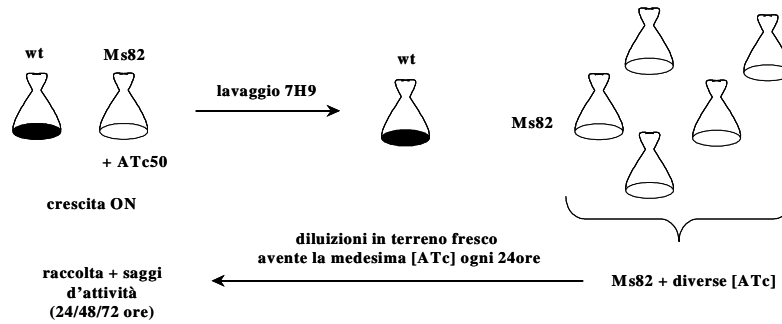


Fig.18 Rappresentazione schematica del protocollo eseguito per i saggi d'attività β - galattosidica.

I risultati ottenuti sono rappresentati nel grafico riportato in seguito:

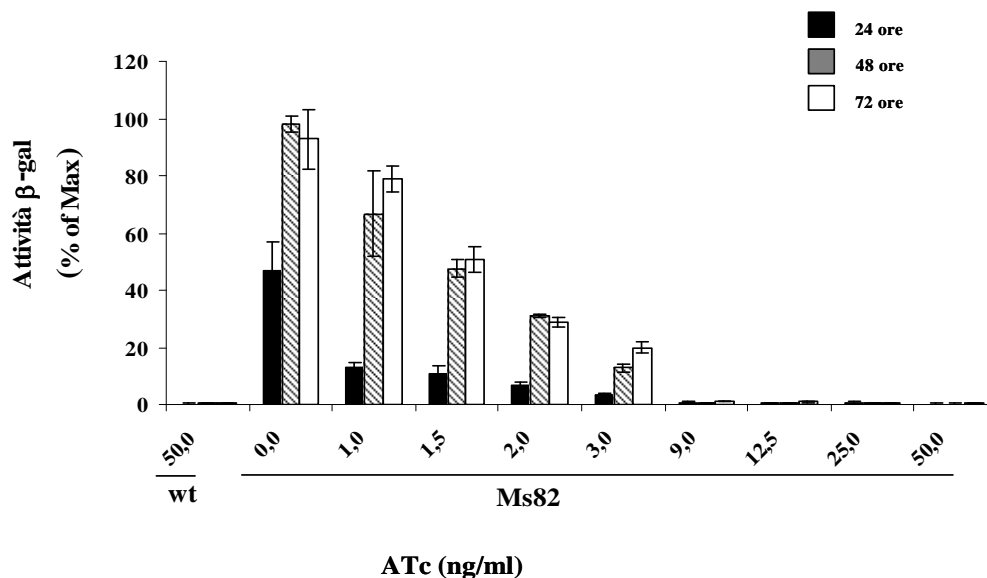


Fig.19 Saggi di β - galattosidasi con diverse concentrazioni di ATc per i campioni di *M. smegmatis* Ms82 e wt.

Come dimostrato dai risultati, nel ceppo di Ms82 ringiovanito in assenza di ATc già dopo 24 ore è rilevabile attività β - galattosidica che continua ad aumentare fino a raggiungere il suo livello massimo alle 48 ore per rimanere comunque stabile fino al termine dell'esperimento (72 ore). Dalla concentrazione di ATc di 1ng/ml fino a 4.5ng/ml, si può osservare un effetto dose- risposta da parte del sistema, infatti si registra un valore di repressione che diviene direttamente proporzionale alla quantità di induttore aggiunto. Inoltre si può verificare come alle 72 ore vi sia, in misura quantitativamente confrontabile tra i campioni, una ripresa dell'attività β - galattosidica. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto ad una perdita di efficacia da parte dell'induttore, che favorirebbe nuovamente il legame di TetR al $P_{furA102tetO}$ arrestando così l'espressione di *pip* e inducendo la trascrizione di *lacZ*.

9ng/ml di ATc può essere considerata la concentrazione minima di induttore che permette di ottenere una repressione pressoché completa e stabile per l'intera durata dell'esperimento; i dati dal grafico dimostrano come i valori di attività β - galattosidica ottenuti nei campioni cresciuti con concentrazioni di ATc di 9 ng/ml e superiori siano equiparabili con quelli del ceppo di *M. smegmatis wt*.

5.4 Mutanti condizionali in *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*

Un'applicazione importante per i sistemi di espressione genica è rappresentata dalla possibilità di poter ottenere mutanti condizionali riuscendo a regolare l'espressione dei geni d'interesse in modo fine e stringente. Sono stati costruiti dei mutanti condizionali in particolare per il gene *ftsZ* di *M. smegmatis* e per *fadD32* di *M. tuberculosis* che, essendo dei geni essenziali, hanno rappresentato un controllo per valutare se il sistema d'espressione Pip/ TetR potesse rispondere ai requisiti richiesti da un sistema inducibile.

La strategia impiegata ha previsto l'utilizzo simultaneo del plasmide pFRA₄₂ (esprime i geni *pip* e *tetR*) con un vettore suicida recante la porzione 5' del gene di cui si vuole fare il mutante condizionale (Fig.20).

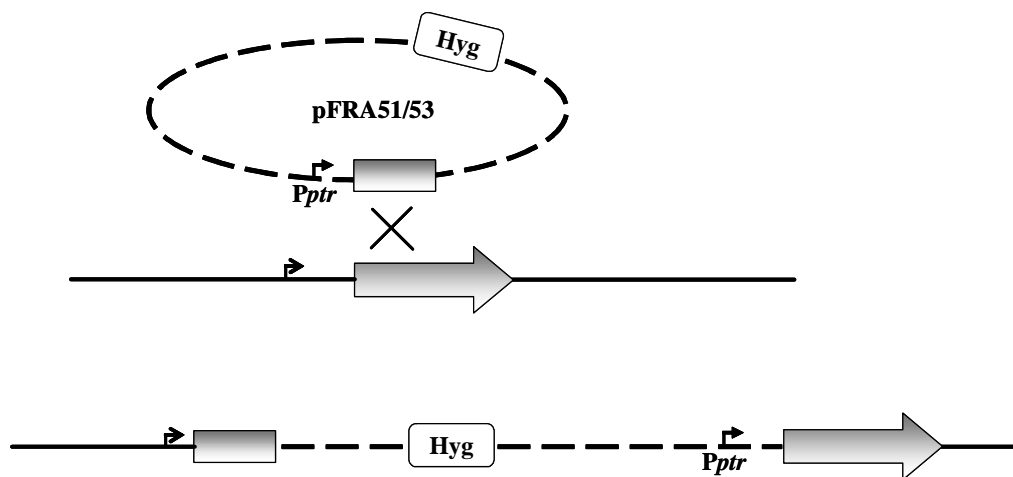


Fig.20 Costruzione di mutanti condizionali Ms98 e TB46. I vettori pFRA53 e pFRA51 sono stati costruiti clonando la regione 5' di *fadD32* e *ftsZ* nel plasmide suicida pSM240; i ricombinanti si sono generati per singolo evento di *crossover*. I ceppi risultanti hanno la copia funzionale del gene sotto controllo trascrizionale di P_{ptr}.

Per la realizzazione di quest'ultimo, il plasmide utilizzato è stato il pSM240 in cui è stata inserita la sequenza codificante per il P_{ptr} (plasmide risultante pFRA₅₀); a valle di tale promotore vengono inserite le regioni 5' (circa 800bp) dei geni *ftsZ* o *fadD32* (vettori suicida pFRA₅₃ e pFRA₅₁ rispettivamente).

I plasmidi sono stati elettroporati e attraverso un singolo evento di *crossover* si sono integrati nella regione d'omologia relativa e come risultato si è ottenuto la traduzione di una proteina tronca codificata dal gene *wt* interrotto e l'unica copia funzionale del gene oggetto di studio che è stata posta sotto controllo trascrizionale del P_{ptr} (Fig.20).

Il sistema Pip/ TetR è stato utilizzato anche per la costruzione dei mutanti di H37Rv per *rv3213c* (gene non essenziale; utilizzato come controllo) e per *Rv3790* (gene la cui funzione non ancora accertata è di probabile ossido- reduttasi). Quest'ultimo appartiene ad un operone di 12 geni, di conseguenza non è stato possibile utilizzare la medesima tecnica applicata nella costruzione degli altri mutanti; il silenziamento infatti non sarebbe risultato vincolato unicamente ad *Rv3790* ma piuttosto esteso anche ai geni a valle di esso appartenenti al medesimo operone (per la spiegazione in dettaglio della strategia applicata vedere paragrafo 5.11.2).

5.5.1 Mutante condizionale per *ftsZ* in *M. smegmatis*

La divisione cellulare è un processo finemente regolato che implica un controllo spazio- temporale sia nella segregazione del materiale genetico (cariochinesi), sia nella separazione dell'ambiente citoplasmatico nella cellula (citochinesi).

La proteina principale responsabile del processo di divisione cellulare nei batteri è FtsZ, omologa della tubulina negli eucarioti, la quale catalizzando la formazione di strutture ad anello note come *Z- rings*, può essere considerata la proteina che con la sua attività determina l'inizio di tale processo. Le strutture ad anello da essa prodotte, polimerizzando in proto-filamenti con attività GTP- dipendente, fungono come una sorta di "impalcatura- sostegno" per l'assemblaggio di altre proteine (FtsQ, FtsN, FtsA..) che in ultimo determinano la formazione del setto.

FtsZ è una proteina considerata essenziale per la divisione cellulare in molte specie batteriche tra cui *Mycobacterium*; è stato dimostrato che *ftsZ* di *M. tuberculosis* può sostituire il suo corrispettivo in *M. smegmatis* e che un aumento o una riduzione nel livello intracellulare di FtsZ interferisce con il processo replicativo determinando una riduzione nella vitalità batterica per la produzione di cellule filamentose [33].

Essendo nota la funzione essenziale di ftsZ e visibili a livello morfologico gli effetti di un eventuale suo malfunzionamento, esso risulta un ottimo candidato nello sviluppo di sistemi per lo studio di geni essenziali in M. smegmatis, potendo rappresentare un utile controllo positivo.

Di conseguenza, al fine di verificare se il sistema Pip/ TetR potesse essere utilizzato per *knockout* condizionali, è stato costruito in *M. smegmatis* un mutante dove il gene *ftsZ* è stato posto sotto controllo trascrizionale del promotore dipendente da Pip P_{pir} seguendo la strategia mostrata in Fig. 20. Tale ceppo ricombinante è stato successivamente elettroporato con il plasmide integrativo pFRA₄₂ contenente *pip* e *tetR* per ottenere infine il mutante Ms98.

5.5.2a Crescita del mutante condizionale per *ftsZ* in terreno solido

Quando Ms98 è stato piastrato su terreno 7H10 in presenza o assenza di ATc (50ng/ml), è stata osservata crescita solo sulle piastre prive di antibiotico, mentre in presenza di ATc non si è ottenuta alcuna colonia a conferma che la repressione di *ftsZ* è stata stringente a tal punto da impedire la crescita batterica del mutante (Fig.21).

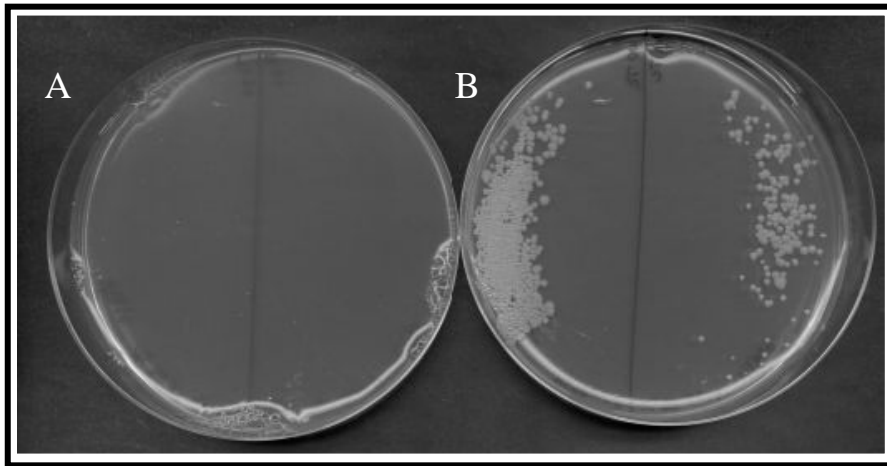


Fig.21 Crescita di Ms98. Il ceppo è cresciuto su piastre 7H10 in presenza (A) , ed assenza (B), di ATc 50ng/ml.

5.5.2b Crescita del mutante condizionale per *ftsZ* in terreno liquido

Il ceppo Ms98 è stato fatto crescere anche in terreno liquido 7H9, avente o meno ATc (50ng/ml); successivamente ad una fase iniziale in cui la densità ottica delle culture si è potuta considerare paragonabile i batteri cresciuti in presenza di ATc hanno iniziato ad aggregarsi depositandosi sul fondo delle provette (Fig.22).

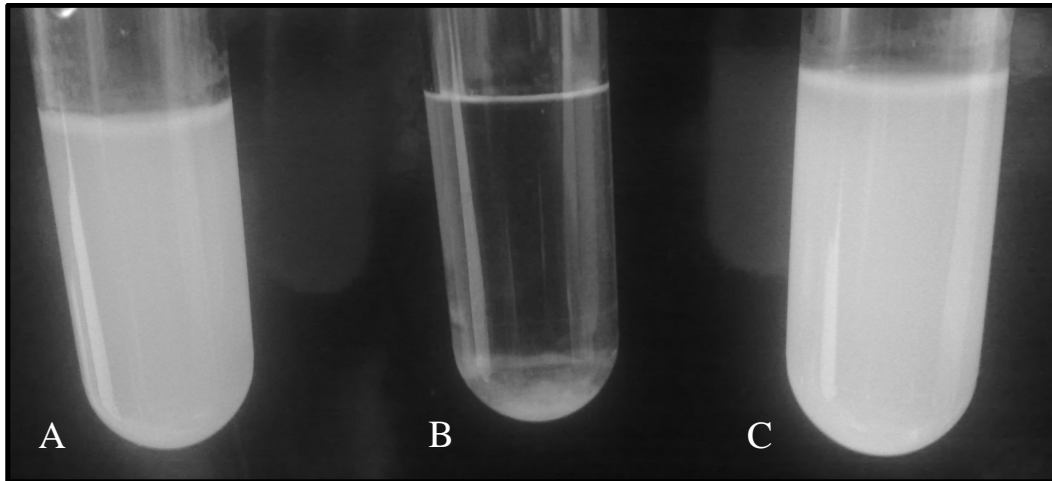


Fig.22 Crescita di *M. smegmatis wt* e Ms98. Ms wt è cresciuto in assenza di ATc (A); Ms98 è stato trattato per 24 ore con e senza 50 ng/ml di ATc (B e C).

5.6 Osservazione morfologica dei batteri al microscopio a contrasto di fase

Le medesime colture sono state osservate anche al microscopio (Leica DMI3000); in assenza di ATc (50ng/ml) i batteri del ceppo di Ms98 presentano una morfologia cellulare del tutto confrontabile con quella sviluppata dal ceppo di *M. smegmatis wt*, indice della corretta espressione di *ftsZ*; le colture di Ms98 cresciute in presenza di ATc (50ng/ml), hanno subito invece dei cambiamenti a livello morfologico nella struttura cellulare.

Infatti, a seguito dell'interruzione della trascrizione di *ftsZ* per la presenza di ATc, le cellule assumono la tipica forma di filamenti e tendono a formare aggregati. Tale fenomeno, dovuto alla mancanza di FtsZ, fa sì che le cellule continuino comunque a replicarsi, non essendo tuttavia più in grado di dividersi correttamente (Fig.23).



Fig.23 Morfologia di *M. smegmatis wt* (A) e Ms98 cresciuto in assenza (B) o presenza (C) di ATc (50ng/ml) per 12 ore. I batteri sono stati osservati mediante microscopio a contrasto con obiettivo 100x.

5.7 Selezione di mutanti spontanei che hanno perso la regolazione all'ATc

Quando il ceppo Ms98 è stato fatto crescere su piastra in assenza e presenza d'induttore alla concentrazione di 50 ng/ml, si è osservata la presenza di mutanti spontanei che crescevano anche in terreno avente l'ATc alla frequenza di $5 \cdot 10^{-4}$.

Per tali mutanti è stata ipotizzata una perdita di regolazione all'ATc, le cui cause sono state fatte ricadere su due eventi principalmente:

- I. la presenza di possibili mutazioni all'interno di P_{ptr} , tali da non renderlo più riconoscibile dal repressore Pip;
- II. l'introduzione di mutazioni nel repressore Pip che non consentendogli di acquisire la corretta conformazione tridimensionale, non permettono più l'associazione P_{ptr} - Pip anche in presenza dell'induttore, permettendo quindi la trascrizione di *ftsZ*.

Di conseguenza dopo aver verificato la corretta sequenza del promotore P_{ptr} in due mutanti spontanei presi come campioni, l'attenzione è stata posta sulla possibile presenza di mutazioni nel repressore Pip.

Come possibile soluzione è stato ipotizzato l'inserimento nel ceppo Ms98 di un ulteriore plasmide integrativo (oltre quello esprime i due repressori TetR e Pip), recante una seconda copia del repressore sensibile alla pristinamicina.

Il rationale di tale intervento è che qualora la prima copia di repressore fosse inattivata per la presenza di mutazioni, ne avrebbe svolto il suo compito la seconda appena inserita. Per stabilire se effettivamente tale intervento avesse abbassato la frequenza di mutanti, non andando piuttosto ad interferire con il funzionamento del sistema, è stato rieseguito il medesimo saggio di crescita in presenza ed assenza di ATc di diluizioni seriali del ceppo esprime le due copie del repressore *pip*. È stato possibile quantificare la frequenza di mutazioni come inferiore a $1 \cdot 10^{-9}$; tale valore, ci ha permesso di concludere che:

- la presenza di mutanti spontanei era effettivamente correlabile all'inserimento di mutazioni nel repressore Pip;
- l'introduzione di una seconda copia di *pip* è stata la corretta strategia da utilizzare per diminuire, annullando praticamente, la frequenza dei mutanti spontanei presenti.

5.8.1 Mutanti condizionali in *M. tuberculosis* per *fadD32* e *rv3213c*

Uno degli elementi che oltre a rappresentare già di per sé una caratteristica peculiare di *M. tuberculosis*, diviene fondamentale per la sua sopravvivenza e patogenicità nell'ospite, è la parete. Essa non rispecchia né quella dei batteri gram-positivi, né quella dei gram- negativi, tuttavia la sua struttura è stata accuratamente caratterizzata; tra i principali componenti di parete rivestono una particolare importanza gli acidi micolici, lunghe catene di acidi grassi presenti anche in altre specie di *Mycobacterium* come *M. leprae* e in *Corynebacterium diphtheriae*. La loro biosintesi è essenziale per la crescita micobatterica e rappresenta un interessante *target* per lo sviluppo di farmaci anti- tubercolari.

La reazione di condensazione con la quale si ottengono i precursori degli acidi micolici, è condotta da due proteine: FadD32 e AccD4. La prima, appartenente alla classe delle Acyl- AMP ligasi, catalizza l'attivazione degli acidi grassi in particolare del meromicolato attraverso formazione di un intermedio acyl- adenilato, la seconda è responsabile della carbossilazione di altri substrati [34]. È stato dimostrato attraverso analisi della sequenza amminoacidica di FadD32 in *C. glutamicum*, *C. efficiens*, *C. diphtheriae* e *R. rhodochrous* che rimane altamente conservata la regione responsabile del legame dell'acido grasso con l'AMP- ciclico. Attraverso la costruzione di mutanti per *fadD32* e *accD4*, è stato osservato che l'inibizione della produzione di acidi micolici si dimostra essere letale per micobatterio; infatti l'isoniazide farmaco di prima linea adottato per combattere la tubercolosi agisce proprio bloccando la sintesi di tali costituenti di parete [35]. In *M. smegmatis* *fadD32* sembra non essere così essenziale per la vitalità così come lo è in *M. tuberculosis*; infatti è stato osservato che ceppi isolati da *M. smegmatis* temperatura- sensibili dopo mutagenesi chimica, restano comunque vitali sebbene si registri la mancanza di produzione di acidi micolici con l'accumulo piuttosto di lunghe catene di meromicolato [36].

Di conseguenza, risultando fadD32 essenziale per M. tuberculosis, un suo mutante condizionale è stato utilizzato nel mio progetto come controllo positivo per determinare la possibile applicazione del sistema Pip/ TetR anche in M. tuberculosis.

Utilizzando la medesima tecnica applicata per la costruzione del mutante condizionale di *ftsZ* di *M. smegmatis* e per l'operone *fadD32* di *M. tuberculosis*, è stato ottenuto il *knockout* del gene *rv3213c* di H37Rv. Quest'ultimo codifica per un gene simile per omologia di sequenza al gene *soj* di *B. subtilis* che è stato dimostrato essere coinvolto nella fase di inizio del processo di sporulazione.

rv3213c, non è considerato un gene essenziale per *M. tuberculosis* ma la costruzione di un suo mutante condizionale è stata eseguita comunque al fine di avere un controllo interno durante gli esperimenti con il ceppo H37Rv.

5.8.2a Crescita dei mutanti condizionali *fadD32* e *rv3213c* in terreno solido

I ceppi mutanti per *fadD32* ed *rv3213c* sono stati fatti crescere in terreno solido avente o meno l'ATc (200 ng/ml).

Il mutante per *rv3213c* è stato in grado di crescere in entrambi le condizioni (essendo un gene non essenziale la sua crescita non viene influenzata dalla presenza dell'induttore) mentre nel ceppo mutante per l'operone *fadD32*, si è osservata crescita solo nelle piastre prive di induttore.

Tale risultato ha dimostrato come il sistema Pip/ TetR sia grado di funzionare anche in *M. tuberculosis* (Fig.24).

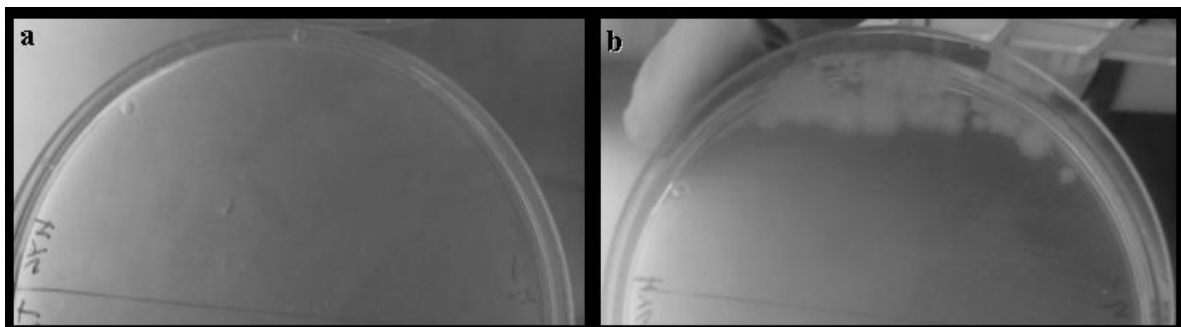


Fig. 24 Mutante condizionale H37Rv per *fadD32*. Il ceppo è cresciuto in presenza (a) ed assenza (b) di ATc (200 ng/ml).

5.8.2b Crescita dei mutanti condizionali *fadD32* e *rv3213c* in terreno liquido

La crescita dei medesimi ceppi è stata analizzata anche in terreno liquido avente o meno l'induttore mediante due esperimenti.

Nel primo saggio i batteri sono stati fatti crescere con diverse concentrazioni di ATc e precisamente 0, 50, 100 e 200 ng/ml; il controllo negativo è stato cresciuto solo con 200 ng/ml di ATc. Nel grafico sotto riportato (Fig.25) è possibile osservare come la crescita per il mutante *rv3213* non risente della presenza di ATc; infatti, non essendo tale gene essenziale per *M. tuberculosis*, il blocco della sua trascrizione non provoca alcun effetto nella crescita del microrganismo.

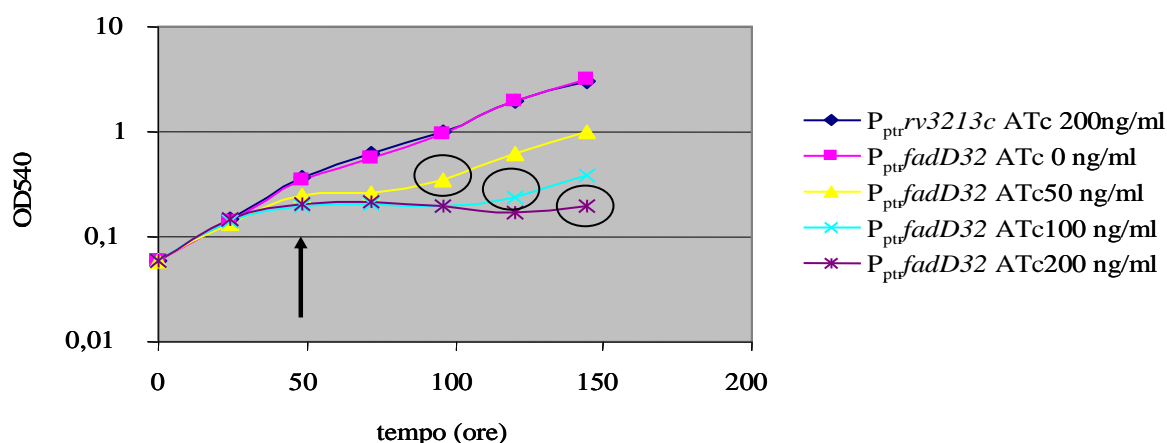


Fig.25 Grafico della curva di crescita del mutante di *M.tuberculosis fadD32*. Il ceppo è cresciuto in diverse concentrazioni di ATc; (-) 0 ng/ml; (-) 50 ng/ml; (-) 100 ng/ml; (-) 200 ng/ml. Il controllo positivo è rappresentato dal mutante di *rv3213c* di H37Rv (-).

Osservando quanto accade per il mutante *fadD32*, si può confermare quanto detto in seguito ai saggi effettuati su piastra e cioè che il sistema Pip/ TetR funziona in *M. tuberculosis*: infatti si nota una marcata differenza nel profilo della curva di crescita quando il ceppo cresce in assenza di induttore (l'andamento è confrontabile con quello del controllo negativo), e in presenza di diverse concentrazioni di questo. Soffermandoci su quest'ultima condizione, seppure sia riscontrabile a tutte le concentrazioni di induttore provate, un arresto della crescita dopo 48 ore di induzione, tuttavia successivamente e a tempi diversi in relazione alla quantità di ATc presente (in particolare con 50 e 100ng/ml), si rileva un ripristino della crescita del mutante. In presenza di ATc (200 ng/ml), l'arresto della crescita appare invece più stabile. L'effetto riscontrato con le concentrazioni di ATc di 50 e 100 ng/ml, è dovuto probabilmente alla perdita con il tempo dell'efficacia dell'ATc, che porterebbe come effetto ad una ripresa della trascrizione dell'operone *fadD32*, con conseguente ripristino della crescita batterica. In seguito a tale risultato è stato eseguito un secondo esperimento, simile al precedente, a cui sono state apportate due modifiche:

- 1) è stata utilizzata l'ATc solo nella concentrazione di 200 ng/ml;
- 2) la somministrazione dell'induttore è avvenuta con tre profili diversi:
 - a) unicamente all'inizio (t_0);
 - b) al t_0 e ogni 48 ore;
 - c) al t_0 dopo 24 ore e ogni 72 ore.

Dai risultati sotto riportati è stata riconfermata l'effettiva applicabilità anche in *M. tuberculosis* del modello di sistema qui presentato (Fig.26).

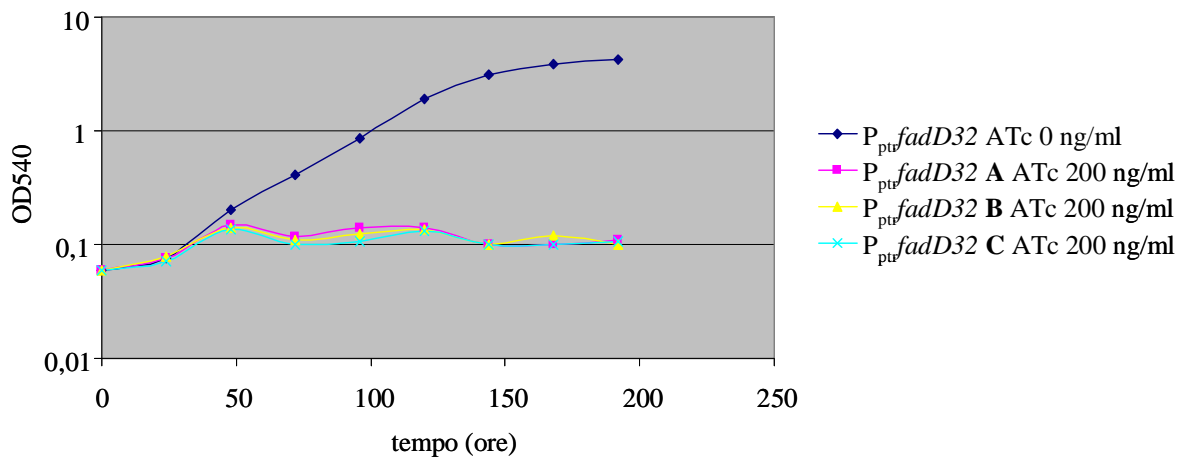


Fig.26 Grafico della curva di crescita del mutante di *M.tuberculosis fadD32* in assenza di ATc(-) e con ATc alla concentrazione di 200 ng/ml. La somministrazione di ATc è avvenuta in tre modi differenti: (-) unicamente all'inizio; (-) all'inizio e ogni 48 ore; (-) all'inizio, dopo 24 ore e ogni 72 ore.

Come si può osservare dai risultati riportati in Fig.28 si registra nuovamente un normale profilo di crescita per il mutante cresciuto in assenza di ATc (dove la trascrizione dell'operone *fadD32* è mantenuta costante) mentre in tutte e tre le tipologie di somministrazione dell'ATc, alle 48 ore dall'induzione, si registra l'arresto della crescita che viene mantenuto durante l'intero esperimento. Ne consegue che trattando i batteri con una concentrazione di ATc pari a 200 ng/ml si ottiene una repressione stabile del gene *fadD32*.

5.9 Osservazione al microscopio di H37RvΔ*fadD32*

I mutanti condizionali per l'operone *fadD32* trattati con ATc (200 ng/ml), dopo essere stati sottoposti alla colorazione *Ziehl- Neelsen*, sono stati osservati al microscopio a contrasto (Fig.27).

La colorazione *Ziehl- Neelsen* permette di evidenziare i micobatteri in quanto ne sfrutta la caratteristica di alcool- resistenza di tali microorganismi. Di conseguenza dopo il trattamento basato sull'impiego di due coloranti, i micobatteri appariranno rossi perché in grado di trattenere la fucsina (il primo colorante), anche una qualvolta essi vengano trattati con un decolorante come previsto dal protocollo di colorazione (vedere sezione Materiali e Metodi).

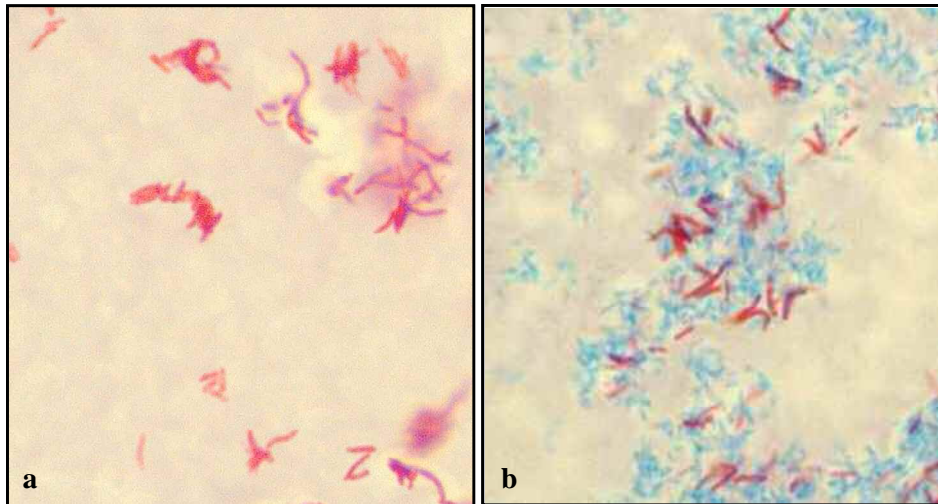


Fig.27 Morfologia dei batteri H37Rv Δ *fadD32* cresciuti in assenza (a) ed in presenza (b) di ATc 200 ng/ml.

Come è possibile osservare dalle immagini ottenute al microscopio i micobatteri non trattati con l'ATc appaiono della colorazione rossa come da previsione; per il medesimo ceppo cresciuto in presenza di induttore si osserva invece una prevalenza di batteri con colorazione blu rispetto a quella rossa, situazione che si riscontra in quelle specie batteriologiche prive della caratteristica dell'acido- resistenza. Tale risultato può essere spiegabile se si pensa che tali mutanti quando crescono in presenza di ATc, subiscono l'arresto della trascrizione di un gene che è stato dimostrato essere coinvolto nel metabolismo dei lipidi di parete. La variazione quantitativa dell'enzima FadD32 presente nella cellula, indurrebbe dei cambiamenti nella stabilità della parete, che la renderebbero suscettibile all'azione dei decoloranti, causandone la perdita del suo carattere di acido- resistenza.

Anche questo risultato rappresenta un'ulteriore conferma riguardo il ruolo di *fadD32* in quanto gene essenziale per la sopravvivenza di *M. tuberculosis* e la possibilità di impiegare tale sistema per l'ottenimento di mutanti condizionali.

5.10 Il sistema Pip/ TetR regola l'espressione genica di *M. tuberculosis* all'interno dei macrofagi

Un'importante applicazione per un sistema d'espressione genica è di regolare l'attività trascrizionale dei geni di micobatterio anche quando esso si trovi all'interno dei macrofagi. Per stabilire se anche il sistema qui sviluppato sia in grado di permettere ciò è stato eseguito un esperimento di infezione della linea monocitica THP-1 con *M. tuberculosis*. Le cellule THP-1 differenziate in macrofagi sono state infettate con i mutanti di *M. tuberculosis* per l'operone *fadD32* e per il gene *rv3213c* (impiegato come controllo positivo); entrambi i campioni di macrofagi sono stati cresciuti in terreno

avente o meno ATc (200ng/ml) e ogni 24 ore una parte veniva lisata e i batteri intracellulari piastrati così da poter essere contati.

Com'è possibile osservare dai grafici di seguito riportati anche a livello intracellulare la regolazione dell'espressione di *fadD32* da parte del sistema Pip/ TetR risulta essere attiva (Fig.28).

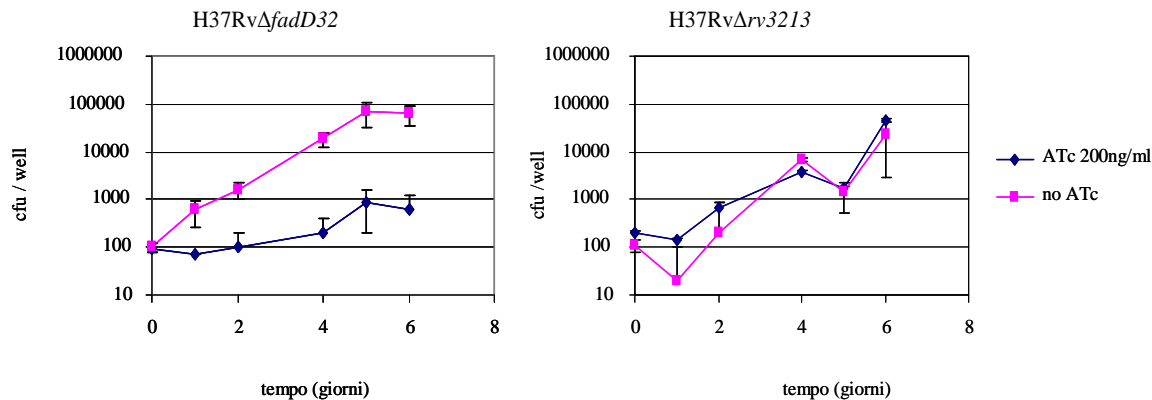


Fig.28 Il sistema Pip/TetR controlla l'espressione di *fadD32* di *M. tuberculosis* all'interno dei macrofagi. Le cellule della linea macrofagica infettate con i ceppi di mutanti condizionali per *fadD32* (a sinistra) e di *rv3213c* (a destra), sono state fatte crescere in assenza (-) ed in presenza (+) di ATc 200 ng/ml.

La crescita del ceppo condizionale utilizzato come controllo positivo, sia in presenza sia in assenza d'induttore non subisce variazioni dimostrandosi costante e continua; i batteri del ceppo di *M. tuberculosis* mutanti per *fadD32* appaiono invece essere regolati dal sistema. Infatti, in assenza di ATc, essi sono in grado di proliferare normalmente sviluppando un profilo di crescita del tutto confrontabile con quello del mutante *soj* (controllo negativo), mentre in presenza di induttore subiscono un evidente arresto nella replicazione, contemporaneo al blocco della trascrizione dell'operone *fadD32* (Fig.28).

5.11.1 Mutante condizionale *Rv3790* di *M. tuberculosis*

Uno tra i principali componenti di parete dopo gli acidi micolici è rappresentato dall'arabinogalattano. Esso si presenta in lunghe catene composte esclusivamente da residui di D- arabinofuranosio (AraF) [37]. Nella sintesi del precursore di AraF (decaprenyl- phosphoryl-D-Araf), l'ultima fase è costituita dal processo di epimerizzazione del decaprenyl- phospho- ribosio a decaprenyl- phospho- arabinosio.

L'epimerasi che catalizza tale reazione si presenta come enzima eterodimerico composto da due diversi tipi di polipeptidi: un'ossidoreduttasi codificata da *Rv3790* ed una reduttasi- deidrogenasi codificata da *Rv3791* di *M. tuberculosis*. L'esatta composizione dell'epimerasi non è ancora nota, tuttavia è richiesta l'espressione

simultanea di *Rv3790* ed *Rv3791* per la sua attività; omologhi di questi due geni sono stati ritrovati oltre che in micobatterio anche in altre specie di batteri (*Corynebacterium*, *Nocardia*) e in molti batteri patogeni e simbiotici per animali e piante (*P. aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Rhizobium etli*).

È stato dimostrato da *Riccardi* e colleghi [dati non pubblicati] che i mutanti di *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* che *over-* esprimono *Rv3790* sviluppano livelli di resistenza verso tale composto quantificati rispettivamente in 32X MIC e 1066X MIC. Inoltre isolando mutanti spontanei di diverse specie di micobatterio resistenti al composto N386, e andando ad analizzare la sequenza di *Rv3790*, è stato osservato che questa presenta delle mutazioni nella sua regione C- terminale (un residuo di cisteina è sostituito da uno di glicina o serina).

Mikusova e colleghi hanno dimostrato che: 1) *Rv3790* e *Rv3791* sono implicati nella sintesi di precursori per l'arabinogalattano; 2) N386 interferisce negativamente nella biosintesi di tale costituente di parete.

Tali risultati fanno presupporre che *Rv3790* possa essere il bersaglio di tale composto benzotiazinico; di conseguenza risulta importante approfondire la caratterizzazione di questo gene per un suo potenziale uso come bersaglio di farmaci appartenenti alla classe dei benzotiazinoni o come *target* per lo sviluppo di nuovi vaccini anti- tubercolari.

5.11.2 Costruzione del mutante condizionale per *Rv3790* di *M. tuberculosis*

Per ottenere l'espressione condizionale di *Rv3790* è stata progettata una strategia che prevederà contemporaneamente sia una regolazione ATc- dipendente unicamente per il gene oggetto di studio sia il normale controllo trascrizionale del restante operone da parte del promotore *wt*. In questo modo nel mutante ottenuto sarà possibile studiare quali siano i reali effetti prodotti dalla mancanza di *Rv3790* nella produzione delle catene di arabinogalattano verificando di conseguenza, se la sua funzione risulta essere essenziale per la vitalità di *M. tuberculosis*.

La strategia, rappresentata in dettaglio in Fig.29, prevede due *steps* principalmente:

- 1) costruzione di un ceppo merodiploide per il gene *Rv3790* dove la seconda copia del gene viene posta sotto controllo trascrizionale di P_{ptr} così da poter essere regolata dal sistema Pip/ TetR;
- 2) introduzione di una delezione *in frame* in *Rv3790_{wt}* attraverso l'inserimento di una casetta per l'igromicina.

Per l'inserimento della delezione *in frame* è stato applicato il metodo sviluppato da *Bloor e colleghi* che permette di ottenere inserzioni o delezioni in geni di cromosomi batterici senza mantenere anche la presenza dei *marker* di selezione [38].

La presenza di geni per la resistenza agli antibiotici all'interno del cromosoma dell'ospite porta alcuni svantaggi:

- viene ridotto il numero di plasmidi possibili che possono essere introdotti nel nuovo ceppo dovendo evitare quelli esprimenti la medesima selezione;
- l'espressione costitutiva di un gene *marker* espresso, può alterare il livello di trascrizione dei geni che vi si trovano adiacenti all'interno del cromosoma.

Il sistema innovativo di *Bloor* si basa sulla costruzione del frammento- *dif* composto da:

- due regioni omologhe al gene in cui si vuole fare l'interruzione (in questo caso *Rv3790*);
- due sequenze *dif* di 29 bp l'una riconosciute specificatamente dalla ricombinasi endogena *Xer*;
- una cassetta per la selezione all'igromicina;
- il promotore dell'antigene MPT64 di *M. tuberculosis* (inserito appositamente per evitare mutazioni polari).

Il frammento, dopo trasformazione nel ceppo merodiploide per *Rv3790*, s'integrerà nel gene *wt* per omologia di sequenza tra le regioni N-t e C-t presenti in esso e quelle del DNA cromosomale. Nel ceppo risultante la copia di *Rv3790_{wt}* verrà interrotta, tuttavia il promotore P_{MPT64} permetterà la trascrizione dei geni che si trovano a valle di esso e appartengono al medesimo operone, evitando in tal modo mutazioni polari.

Quando la selezione verrà rimossa, la cassetta per la sua selezione sarà *excisa* per opera delle *recombinasi Xer* che risolvono le due sequenze *dif* ad una singola finale.

Nel ceppo risultante avverrà che:

- l'unica copia funzionale di *Rv3790* sarà sotto il controllo trascrizionale di P_{ptr} ; la sua espressione diverrà regolabile dal sistema Pip/ TetR;
- la regione che si ottiene successivamente alla rimozione della selezione all'igromicina (costituita dalle sequenze N-t e C-t di *Rv3790* e dalla sequenza *dif* presente in singola copia), manterrà il *frame* dell'intero operone, di conseguenza la trascrizione di questo tornerà ad essere regolata dal promotore originale.

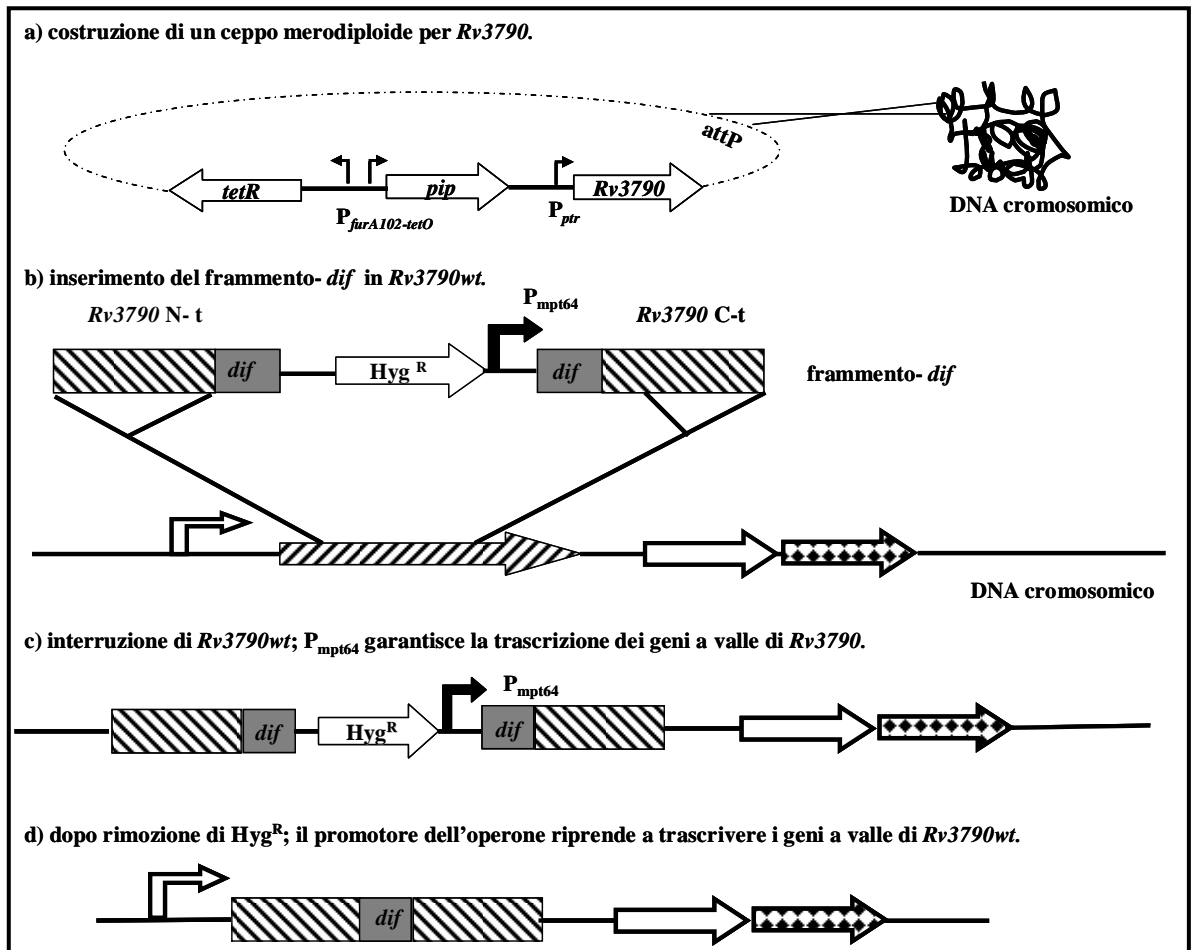


Fig.29 Rappresentazione della strategia che verrà impiegata per l'ottenimento del mutante condizionale per *Rv3790* di *M. tuberculosis*. Essa si basa: a) costruzione ceppo merodiploide; b) inserimento frammento- *dif* in *Rv3790*wt; c) interruzione della trascrizione di *Rv3790*wt con conseguente trascrizione dei geni a valle di esso; d) rimozione della selezione *Hyg^R*.

Per aumentare la frequenza di inserzione del frammento nel genoma, verrà utilizzato il sistema del *recombineering* attraverso l'impiego del plasmide pJV53 esprime i geni del fago *Che9c 60* e *61* [39].

Per ottenere l'inserimento del frammento *dif* nel genoma di H37Rv con conseguente sua integrazione in *Rv3790*, si è deciso come spesso accade quando si lavora con *M. tuberculosis*, di seguire in parallelo un percorso alternativo che prevederà la transduzione del patogeno (già reso merodiploide per *Rv3790*) utilizzando il fago-temperato TM4.

In futuro sarà prevista un'analisi del fenotipo del mutante che sarà ottenuto, in particolar modo durante il silenziamento di *Rv3790*, per stabilire se tale gene risulta effettivamente essenziale per la sopravvivenza del patogeno nell'ospite e quali siano i *pathways* metabolici che più risentono dello spegnimento della sua trascrizione.

Tale analisi avrà come fine ultimo l'identificazione di nuovi *target* per lo sviluppo di farmaci anti- tubercolari.

6. CONCLUSIONI

Il modello di sistema proposto prevede l'utilizzo di due repressori TetR e Pip; il gene d'interesse, di cui si vuole regolare l'espressione, è sotto controllo trascrizionale del promotore P_{ptr} riconosciuto specificatamente dal repressore Pip, il quale a sua volta viene regolato da TetR.

In assenza di ATc TetR rimane associato al promotore di *pip* impedendone la sua trascrizione; il gene d'interesse è di conseguenza espresso. In presenza di ATc, TetR si dissocia da P_{ptr} permettendo la trascrizione di *pip*; come risultato finale si ottiene la repressione del gene oggetto di studio.

Per studiare il funzionamento di tale sistema è stato utilizzato come gene *reporter lacZ* e sono stati eseguiti saggi d'attività β -galattosidasi in *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* con i quali si è potuto constatare la possibilità di modulare l'attività di *lacZ* in presenza/ assenza di ATc. Infatti in *M. smegmatis* in assenza di antibiotico si è ottenuta un buon livello di espressione del gene *reporter*, mentre con l'aggiunta di induttore si è registrata un'evidente diminuzione dell'attività β -galattosidasi, in seguito allo spegnimento di *lacZ* da parte di Pip (Fig.18;). Il livello di *background* ottenuto ha dimensioni davvero ridotte: si riesce infatti, dopo 18 ore di induzione, a raggiungere livelli di repressione completa dove l'attività β -galattosidasi misurata diviene confrontabile con il valore espresso dal controllo negativo rappresentato da un ceppo *wt*. Per quanto riguarda i saggi di β -galattosidasi eseguiti in *M. tuberculosis*, si può osservare come diano risultati concordi con quelli ottenuti in *M. smegmatis* (Fig.19); per quanto riguarda la capacità di repressione espressa dal sistema, si è potuto constatare la lieve presenza di un livello di *background*. Tuttavia questo non ha rappresentato un ostacolo per il funzionamento del sistema, non interferendo in seguito nell'effettivo silenziamento dell'operone *fadD32* ottenuto in *M. tuberculosis*.

L'efficiente regolazione da parte di un promotore sensibile all'attività di un repressore (il caso del promotore di *pip* nei confronti di TetR) dipende da alcuni fattori tra cui la concentrazione di repressore libero (Pip) nella cellula.

Tale evidenza è stata riscontrata anche durante lo sviluppo del modello qui riportato e ha fatto propendere al passaggio dal primo al secondo modello.

In quest'ultimo infatti il repressore Pip è stato introdotto in un plasmide integrativo così da essere espresso in singola copia, e nel suo promotore sono stati inseriti i siti *tetO* così da rendere più stringente la sua regolazione da parte di TetR. In tal modo si è riusciti ad

ottenere una minor quantità di repressore Pip libero a livello intracellulare evitando di conseguenza un suo accumulo in corpi d'inclusione.

Un'altra importante caratteristica per un sistema inducibile è rappresentata dalla sua capacità di rispondere velocemente a diverse concentrazioni d'induttore e dalla possibilità di avere un livello d'espressione genica proporzionale alla quantità di antibiotico fornita. Quest'ultima caratteristica assume un'importanza rilevante se si pensa che per molti geni durante la fase di crescita esponenziale vengono richiesti diversi livelli d'espressione. Nel modello Pip/ TetR applicato in *M. smegmatis* è stato dimostrato che già a concentrazioni molto basse (9ng/ml) è possibile ottenere un effetto di repressione totale e costante, mentre nell'intervallo 1- 4.5 ng/ml di dosaggio di ATc, il livello di repressione a cui si arriva è direttamente proporzionale alla concentrazione di induttore presente. È stato osservato inoltre che il ripristino dell'attività del gene *reporter*, in seguito ad una sua completa repressione, avviene rapidamente ed in modo costante, raggiungendo già dopo 48 ore di crescita in assenza di induttore il suo livello massimo (Fig.21).

È stato ottenuto in *M. smegmatis* un mutante condizionale per *ftsZ* ponendo tale gene sotto controllo trascrizionale del promotore Pip- dipendente P_{ptr} . La crescita in presenza di ATc ha prodotto nel mutante un fenotipo tipico dell'inattivazione di FtsZ: infatti una riduzione nell'espressione di tale gene si riflette nella produzione di cellule filamentose (si replicano ma non sono più in grado di dividersi) che inducono i batteri a formare aggregati portando come risultato finale ad un arresto della crescita. In assenza d'induttore l'espressione di *ftsZ* da parte di P_{ptr} è paragonabile a quella che si otterrebbe nel caso il gene fosse regolato dal promotore *wt* in quanto è stato dimostrato che una sua over- espressione risulta tossica per il batterio.

È stato costruito un mutante condizionale anche in *M. tuberculosis* ponendo sotto controllo del promotore P_{ptr} il gene essenziale *fadD32*; la crescita di tale mutante è stata arrestata in seguito ad aggiunta di ATc dando la conferma della possibilità di utilizzare questo sistema per ottenere *knockout* condizionali anche in *M. tuberculosis*. Tali risultati ottenuti in entrambe le specie di micobatterio ci hanno permesso di concludere che la possibilità di sostituire il promotore *wt* con quello Pip- dipendente P_{ptr} appare una buona strategia per la costruzione di mutanti condizionali in micobatterio.

Sistemi d'espressione inducibili che permettono la regolazione dei geni in micobatterio anche quando questo si trova all'interno dei macrofagi durante la fase d'infezione rappresentano degli strumenti preziosi per la caratterizzazione dei geni che

sono considerati importanti per la virulenza del patogeno e la sua persistenza nei fagosomi dell'ospite durante la fase latente. Il modello qui presentato si è rivelato in grado di poter controllare l'espressione genica del mutante *fadD32* di *M. tuberculosis* anche durante l'infezione delle cellule macrofagiche; infatti anche all'interno di un ambiente intracellulare i batteri, in presenza di ATc, non sono stati in grado di crescere. I risultati ottenuti da questo sistema di espressione inducibile per l'espressione genica in micobatterio lo rendono un buon candidato per lo studio di geni essenziali che garantiscono la sopravvivenza del patogeno all'interno dell'ospite, e di conseguenza un utile strumento nell'identificazione di bersagli per lo sviluppo di nuovi farmaci e vaccini.

7. APPENDICE

■ Elenco Pubblicazioni:

Roberta Provvedi, **Francesca Boldrin**, Francesco Falciani, Giorgio Palù, and Riccardo Manganelli
Global transcriptional response to vancomycin in *Mycobacterial tuberculosis*
(submitted to Microbiology)
- in allegato copia della versione inviata.

Francesca Boldrin, Stefano Casonato, Francesca Forti, Daniela Ghisotti, Riccardo Manganelli
Development of a mycobacterial repressible promoter system based on two transcriptional repressors
- *manuscript in progress*.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] **Nature Medicine (2007)**. *Tuberculosis* supported by AstraZeneca (Principal Sponsor) and Johnson & Johnson PRD, Tibotec (Supporting Sponsor). **13**(3): p.263- 288.
- [2] **Kochi A. (1994)**. Tuberculosis: distribution, risk factors, mortality. *Immunobiology*. Oct; **191**(4-5): p.325-36.
- [3] **WHO Report 2008 (2008)**. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, financing. **1** p.15- 35.
- [4] **World Health Organization (WHO) (2006)**.Tuberculosis Fact sheet N°104 - Global and regional incidence.
- [5] **Bloom B. R., Murray C. J. L. (1992)**. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. **257** : p. 1055-1061.
- [6] **Raviglione M.C., Uplekar MW. (2006)**. WHO's new Stop TB Strategy. *The Lancet*. **367** (9514):p 952-955.
- [7] **Murray P. R. et al. (2005)**. Medical Microbiology. 5th edition.Univ. of Maryland, Baltimore, Brandon-Hill, cap.40.
- [8] **Cole S. T. (1999)**. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv. *FEBS letters*. **452**: p. 7-10.
- [9] **Russell D.G. (2007)**. Who puts the tubercle in tuberculosis?. *Nature Reviews Microbiology*. **5** (1): p 39- 47.
- [10] **La Placa M. (2005)**. Principi di microbiologia medica. *Esculapio* (X°edizione).
- [11] **Fine P.E.M. (1995)**. Variation in protection by BCG – implications of and for heterologous immunity. *The Lancet*. **346**, 1339-45.
- [12] **Saltini C. (2006)**. Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. *Respiratory Medicine*. (**100**), No.12, p. 2085-2097.
- [13] **Wood P.R., Jones S.L. (2003)**. Diagnosis of tuberculosis. *The Lancet*. **261**: p. 2081- 2082.
- [14] **Duncan K. (2003)**. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis*. **83**: p. 201- 207.
- [15] **Iseman M. D. (1993)**. Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. Review Article *Drug Therapy*. Alastair J. J., Wood M. D., Editor. **329** (11): p.784-791.
- [16] **Kaufmann, S.H.E. (2000)**. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nature medicine*. **6**: p. 955-960.
- [17] **Manganelli R., Provvedi R., Rodrigue S., Beaucher J., Gaudreau L., Smith I. (2004)**. σ factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. **186**: p. 895-902.

- [18] **Lewin B. (2004).** Gene VIII. *Oxford University Press* cap. 11.
- [19] **Rajagopalan M., Atkinson A.L.M., Rutherford S.A., Madiraju M.V.V.S., Dziadek J. (2002).** Physiological consequences associated with overproduction of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ in mycobacterial hosts. *Microbiology*. **148**, p. 961- 971.
- [20] **Curcic R., Dhandayuthapani S., Deretic V. (1994).** Gene expression in mycobacteria: transcriptional fusions based on xylE and analysis of the promoter region of the response regulator mtrA from *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*. **13**(6):p.1057-1064.
- [21] **DeMaio J., Zhang Y., Ko C., Bishai WR. (1997).** *Mycobacterium tuberculosis sigF* is part of a gene cluster with similarities to the *Bacillus subtilis sigF* and *sigB* operons. *Tubercle and lung disease*. **78**(1): p.3-12.
- [22] **Lim A., Boon C., Dick T (2000).** Inducibility of the *Streptomyces traRts107-Ptra* expression cassette in *Mycobacterium smegmatis*. *Biological Chemistry*. **381** (5-6): p.517-519.
- [23] **Roberts G., Muttucumaru D.G. N., Parish T. (2003).** Control of the acetamidase gene of *Mycobacterium smegmatis* by multiple regulators. *FEMS Microbiology Letters* (**221**): p.131-136.
- [24] **Narayanan S., Selvakumar S., Aarati R., Vasan S.K., Narayanan P.R. (2000).** Transcriptional analysis of inducible acetamidase gene of *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiology Letters* (**192**): p.263- 268.
- [25] **Guzman L.M., Belin D., Carson M.J. & Beckwith J. (1995).** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*. (**177**): p. 4121–4130.
- [26] **Beers M. H., Berkow R. (1999).** *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Antibacterial Drugs: Tetracyclines. *Whitehouse Station, NJ Merck Research Laboratories*. (**13**) cap.153.
- [27] **Berens C., Hillen W. (2003).** Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *European Journal of Biochemistry*. **270** (15): p.3109-21.
- [28] **Orth P., Schnappinger D., Hillen W., Saenger W., Hinrichs W. (2000).** Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor– operator system. *Nature structural biology*. **7** (3): p.215- 219.
- [29] **Ehrt S., Riley L.W., Monteleone M., Ryou M., Hickey M.C., Guo X.V., Schnappinger D. (2005).** Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor. *Nucleic Acids Research*. (**33**), No. 2: e21.
- [30] **Blokpoel M.C.J, Murphy H.N., O’Toole R., Wiles S., Runn E. S.C., Stewart G.R., Young D.B.,Robertson, B.D. (2005).** Tetracycline- inducible gene regulation in mycobacteria. *Nucleic Acids Research*. (**33**), No.2: e22.
- [31] **Schappinger, D., Ehrt, S., Braunstein, M., Hillen, W., Kamionka, A., Klotzsche, M., Monteleone, M., Guo, V.X. (2007).** Silencing Essential Protein Secretion in *Mycobacterium smegmatis* by using tetracycline Repressors. *Journal of Bacteriology*. (**189**), No.13: p.4614- 4623.

- [32] **Thompson J.C., Viollier P.H., Hocini K.S.B., Dale G., Morris R.P., Folcher M. (2001).** A Transcriptional Regulator of a Pristinamycin Resistance Gene in *Streptomyces coelicolor*. *The Journal of Biological Chemistry*. (276), No. 12: p.1479- 1485.
- [33] **Weber W., Fux C, Daoud-el Baba M., Keller B., Weber C.C., Kramer B.P., Heinzen C., Aubel D., Bailey J.E., Fussenegger M. (2002).** Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nature Biotechnology*. 20(9):p.901-907.
- [34] **Rajagopalan M., Atkinson A.L.M., Madiraju M.V., Rutherford S.A., Dziadek J. (2003).** Conditional expression of *Mycobacterium smegmatis* *ftsZ*, an essential cell division gene. *Microbiology*. (149): p.1593- 1603.
- [35] **Trivedi OA, Arora P, Sridharan V, Tickoo R, Mohanty D, Gokhale RS (2004).** Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature*. (428): p.441-445.
- [36] **Portevin D., D'Uria C., Montrozier H., Houssin C., Stella A., Laneelle M.A., Bardou F., Guilhot C., Daffè M. (2005).** The Acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing Acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth. *The Journal of Biological Chemistry*. (280), No.10: p.8862-8874.
- [37] **Kundu M, Basu J, Chakrabarti P. (1991).** Defective mycolic acid biosynthesis in a mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Genetic Microbiology*. (137): p.2197- 2200.
- [38] **Mikusová K., Huang H., Yagi T., Holsters M., Vereecke D., D'Haese W., Scherman M.S., Brennan P.J., McNeil M.R., Crick D.C. (2005).** *Journal of Bacteriology*. (187), No.23: p.8020-8025.
- [39] **A. E. Bloor, R. M. Cranenburgh (2006).** An Efficient Method of Selectable Marker Gene Excision by Xer Recombination for Gene Replacement in Bacterial Chromosomes. *Applied And Environmental Microbiology* (72), No.4: p. 2520- 2525.
- [40] **Van Kessel J. C., Hatfull G.F. (2007).** Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Methods*. (2), No.4: p.147- 152.

Siti consultati in internet:

www.geneonlist.pasteur.fr/TubercuList/
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

9. ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

- A60:** Antigen A60
ADN: BSA, Destrosio, NaCl
AES: Allelic Exchange Substrate
AraF: arabinofuranosio
ATc: anhydrotetracycline
B. subtilis: *Bacillus subtilis*
BCG: Bacillo Calmette-Guerin
C. diphtheriae: *Corynebacterium diphtheriae*
C. efficiens: *Corynebacterium efficiens*
C. glutamicum: *Corynebacterium glutamicum*
c-AMP: adenosina monofosfato ciclico
CFP- 10: culture filtrate protein 10
Cfu: colony- forming unit
Crp: proteina recettore del cAMP
Dif: Deletion Induced Filamentation
DOTS: Directly Observed Treatment, Short-course
E. coli: *Escherichia coli*
EDTA: acido etilendiamminotetraacetico
ESAT- 6: early secretory antigenic target 6
FDA: Food Drug Administration
FtsZ: proteine Filamentose Sensibili alla Temperatura (a questa famiglia appartiene anche FtsZ)
furA: ferric uptake regulator A
fw: forward
GC: guanosina citosina
gfp: green fluorescence protein
GTP: guanosintrifosfato
HIV: Human Immunodeficiency Virus
Hsp60: heat shock protein 60
Hyg: igromicina
IFN- γ : Interferone- γ
IgM: immunoglobulina M
Ka: costante di associazione all'equilibrio
Kan: kanamicina
Kd: costante di dissociazione all'equilibrio
KDa: kilodalton
lacZ: gene della β - galattosidasi
mRNA: acido ribonucleico messaggero
M. africanum: *Mycobacterium africanum*
M. bovis: *Mycobacterium bovis*
M. leprae: *Mycobacterium leprae*

M. smegmatis ; **Ms** : *Mycobacterium smegmatis*
M. tuberculosis; **TB**: *Mycobacterium tuberculosis*
MDR: Multi- Drug Resistent (con riferimento ai ceppi resistenti ai farmaci anti- tubercolari)
Mg: magnesio
MIC: minimuml inhibitory concentration
MOTTs: Mycobacterium Other Than Tuberculosis
Na₂CO₃: carbonato di sodio
NaOAc: sodio acetato
NaOH: idrossido di sodio
oADC: Ac. oleico, BSA, Destrosio, Catalase
OD: over day
OD₆₀₀: optical density misurata alla λ di 600nm
ON: over night
OMS: Oganizzazione Mondiale della Sanità
ONPG: O- nitrofenil- β - D-galattopiranoside
Ori: origine di replicazione
ORF: open reading frame
P_{BAD}: promotore dell'operone arabinosio
PCR: Polymerase Chain Reaction
Pfu polymerase: *Pyrococcus furiosus* polymerase
Pip: pristinamycin-induced transcriptional regulator protein
P_{myc}: mycobacterium promoter
PPD: purified protein derivative
P_{ptr}: *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene promoter
P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*
Ptr: *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene
P_{tra}: promotore del gene *traR*
R. rhodochrous: *Rhodococcus rhodochrous*
RD-1: region of difference 1
rev: reverse
S. coelicolor: *Streptomyces coelicolor*
S. lividans: *Streptomyces lividans*
S. nigrifaciens: *Streptomyces nigtfaciens*
S. pristinaespiralis: *Streptomyces pristinaespiralis*
SDS: Sodium Dodecyl Sulphate
SecA: secretory translocase protein A
SigF: fattore sigma F
Str: streptomycina
tRNA: acido ribonucleico di trasporto
TBC: Tubercolosi
tet: tetraciclina

tetA: tetracycline antiporter protein

tetO: tet operator

TetR: tetracycline repressor

THP-1: Human acute monocytic leukemia cell line

PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate

Tn10: transposone 10

wt: wild type

X- gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside