

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA APPLICATA  
XXI CICLO**

**TESI**

**LA TUNICA SPORALE DI *BACILLUS SUBTILIS*:  
ASPETTI DI BASE E APPLICATIVI**

Coordinatore  
Prof.ssa Amalia Virzo De Santo

Tutor  
Prof. Ezio Ricca

Dottorando  
Antonio Mazzone

<b>Indice</b>	<b>Pag.</b>
<b>1. Introduzione</b>	1
1.1 <i>Bacillus subtilis</i>	2
1.2 Struttura della spora	3
1.3 Sporulazione e germinazione in <i>B. subtilis</i>	6
1.4 Fasi della sporulazione	12
1.5 Espressione genica durante la sporulazione	15
1.6 Controllo trascrizionale dei geni <i>cot</i>	19
1.7 Il gene <i>gerR</i>	27
1.8 Uso di spore ricombinanti come veicolo di vaccinazione	32
1.9 Espressione sulla superficie sporale	39
1.10 NS3: serina proteasi del virus dell'HCV come epitopo da esporre.	44
1.11 Scopo della tesi	51
<b>2. Materiali e Metodi</b>	53
2.1 Ceppi batterici	54
2.2 Terreni di coltura	54
2.3 Preparazione di cellule competenti e trasformazione di <i>Escherichia coli</i>	56
2.4 Preparazione di cellule competenti e trasformazione in <i>B. subtilis</i>	57
2.5 Purificazione del DNA plasmidico su larga scala	58

2.6 Digestione enzimatica	59
2.7 Elettroforesi su gel di agarosio	59
2.8 Eluizione del DNA da gel di agarosio	60
2.9 Reazione di ligasi	60
2.10 Polymerase Chain Reaction ( <i>PCR</i> )	60
2.11 Preparazione di DNA cromo somale	63
2.12 Induzione della sporulazione in <i>B. subtilis</i> e purificazione delle spore.	63
2.12.1 Purificazione delle spore mature	64
2.13 Misura dell'attività $\beta$ -galattosidasica	65
2.14 <i>Primer extension</i>	66
2.14.1 Estrazione degli mRNA	66
2.14.2 Marcatura terminale dell'oligonucleotide	66
2.14.3 <i>Primer extension</i>	66
2.14.4 Preparazione del DNA e reazioni di sequenza	68
2.14.5 Elettroforesi di DNA su gel di acrilamide	69
2.15 Tamponi di corsa per elettroforesi	69
2.16 Estrazione delle proteine del rivestimento sporale	70
2.16.1 Estrazione con SDS	70
2.16.2 Estrazione alcalina	70
2.17 Determinazione della concentrazione proteica	71
2.18 Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)	72
2.19 Colorazione di gel di poliacrilammide con Comassie	73
2.20 Misura della resistenza al lisozima e al calore	73
2.21 Misura dell'efficienza di germinazione	74

2.22	<i>Over</i> -espressione e purificazione della proteina GerR	75
2.22.1	Clonaggio nel vettore di espressione	75
2.22.2	<i>Over</i> -espressione della proteina ricombinante	76
2.22.3	Purificazione GerR-6His	77
2.23	Determinazione della concentrazione della proteina purificata	78
2.24	Produzione di anticorpi policlonali contro GerR	78
2.25	Lisi delle cellule in sporulazione mediante sonicazione	79
2.26	Elettrotrasferimento di proteine e <i>Western blot</i>	79
2.27	Microscopia e Immunofluorescenza	81
<b>3.</b>	<b>Risultati e Discussione</b>	<b>82</b>
3.1	Controllo dell'espressione genica durante la sporulazione: caratterizzazione del gene <i>gerR</i>	84
3.1.1	Il gene <i>gerR</i> è sotto il controllo di $\sigma^E$ e SpoIIID	84
3.1.2	Studio fenotipico del mutante nullo in <i>gerR</i>	94
3.1.2.1	Costruzione del ceppo	94
3.1.2.2	Analisi fenotipica dei ceppi ricombinanti	106
3.1.3	GerR è coinvolta nella trascrizione dei geni controllati da $\sigma^K$ e da GerE	113
3.1.4	Stabilità della proteina GerR	117
3.1.5	GerR regola positivamente i geni <i>gerE</i> e <i>spoVIF</i>	121
3.1.6	Discussione	127

3.2 Esposizione di antigeni del virus dell'epatite C sulla superficie sporale in <i>Bacillus subtilis</i>	131
3.2.1 Costruzione dei ceppi ricombinanti	133
3.2.2 Verifica della corretta espressione, assemblaggio ed esposizione delle proteine chimeriche	140
3.2.3 Analisi <i>in vivo</i> in sistemi murini dell'attività immunogenica delle spore ricombinanti	146
3.2.4 Discussione	154
<b>4. Bibliografia</b>	<b>159</b>
<b>Indice delle figure</b>	<b>168</b>
<b>Indice delle tabelle</b>	<b>171</b>

## ***1. Introduzione***

### 1.1 *Bacillus subtilis*

I batteri appartenenti al genere *Bacillus* sono organismi Gram-positivi e catalasi-positivi, comunemente trovati nel suolo, mobili grazie ad un unico flagello polare e generalmente aerobi. *Bacillus subtilis* è un batterio sporigeno, cioè caratterizzato dalla capacità di formare endospore (spore), inoltre è considerato GRAS (Generally Recognized as Safe) cioè non nocivo per l'uomo.

Dalla seconda metà del XX secolo ceppi della specie naturalmente competente *Bacillus subtilis* sono stati utilizzati per lo studio biochimico e genetico del metabolismo primario e secondario, della fase di competenza, del processo di formazione della spora e della sua successiva riconversione in cellula vegetativa (germinazione). Tali studi hanno portato la conoscenza del metabolismo, della genetica e della fisiologia di *B. subtilis* ad un livello di approfondimento paragonabile solo a quello raggiunto con *Escherichia coli*, il principale sistema modello microbico.

Nel 1997, con la conclusione del sequenziamento dell'intero genoma di *B. subtilis* (Kunst, *et al.*, 1997), è iniziata una nuova fase dello studio di tale organismo. Le analisi bioinformatiche dei genomi microbici disponibili, l'analisi funzionale dei molti geni non noti, la possibilità di analizzare l'espressione genica globalmente con *microarrays* e la possibilità di analisi

proteomica, rendono ora più accessibile lo studio di complesse vie metaboliche spesso interconnesse tra loro e di problemi biologici di base sull'organizzazione intracellulare, sull'organizzazione di strutture sub-cellulari e sui segnali molecolari a cui le cellule rispondono per adattarsi a repentine variazioni ambientali.

## **1.2 Struttura della spora**

La spora è una forma cellulare metabolicamente quiescente che si forma all'interno di una cellula vegetativa in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli, come ad esempio la mancanza di nutrienti. In *B. subtilis* è necessaria l'espressione di oltre 100 geni per portare a termine il processo di formazione della spora (sporulazione) (Stragier and Losick, 1996).

La spora, una volta formata, può rimanere in uno stato inerte per un periodo di tempo indefinito, resistendo a condizioni anche estreme di temperatura, pH, esposizione a raggi UV ed a sostanze chimiche tossiche.

La resistenza della spora a condizioni ambientali estreme, generalmente letali per la cellula vegetativa, è dovuta ad alcune caratteristiche strutture sub-cellulari come lo spesso strato corticale (cortex), una forma modificata di peptidoglicano, e la



tunica sporale (coat), un doppio strato proteico che circonda il cortex (Stragier and Losick, 1996; Driks, 2002), (Figura 1.1).

Il grado di disidratazione del citoplasma della spora, e la presenza di una abbondante famiglia di proteine, le *Small Acid-Soluble Proteins* (SASP), che legano in modo aspecifico il DNA, contribuiscono inoltre a proteggere rispettivamente le strutture citoplasmatiche ed il cromosoma e sono essenziali nel determinare lo stato metabolicamente quiescente della spora (Driks, 2002).

La formazione della spora all'interno di una cellula vegetativa è un processo complesso che in condizioni di laboratorio si completa in 8-10 ore e che avviene secondo una precisa serie di modificazioni morfologiche. Tali eventi morfologici sono la conseguenza di un programma di espressione genica differenziato nel tempo e specificamente distinto tra la cellula vegetativa, in cui la spora si sta formando, e la spora in formazione (Stragier and Losick, 1996).

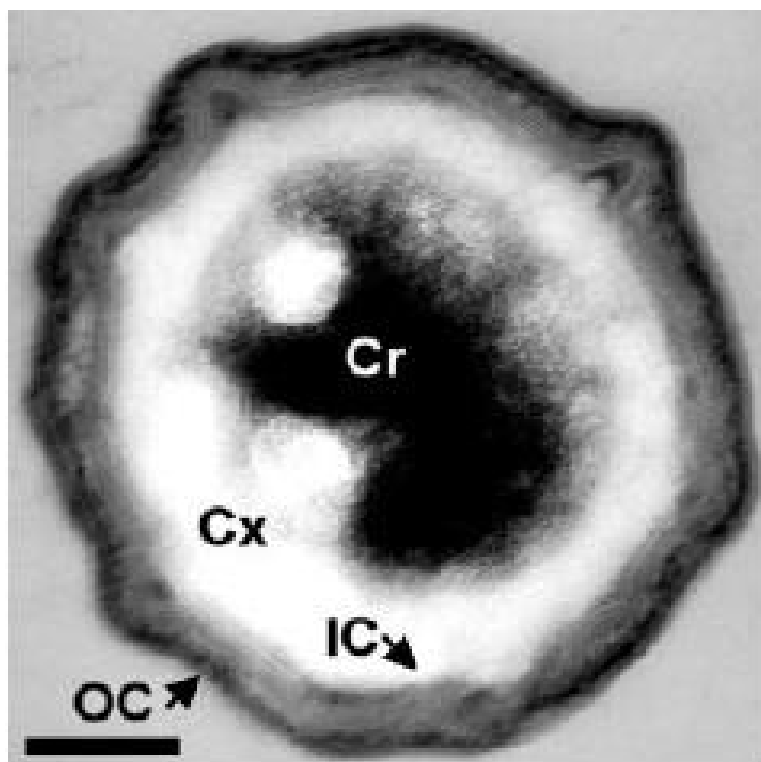


Figura 1.1: La spora. Fotografia al microscopio elettronico di una spora di *Bacillus subtilis*. Cr indica il core della spora; Cx lo strato corticale; IC e OC lo strato interno ed esterno della tunica, rispettivamente (Silvaggi *et al*, 2004).

### **1.3 Sporulazione e germinazione in *B. subtilis***

I batteri sporigeni sono caratterizzati dalla capacità di seguire due cicli vitali diversi ed alternativi tra loro. Finché le cellule si trovano in condizioni ambientali ottimali per la crescita microbica (presenza di acqua e nutrienti, temperatura e pH ottimali) questi organismi seguono un ciclo vitale detto "vegetativo", identico a quello che si osserva per i batteri non sporigeni. In tale ciclo una cellula si accresce, replica il suo cromosoma e quindi si divide in modo simmetrico originando due cellule identiche tra loro ed alla cellula madre che le ha originate. Quando le condizioni ambientali non sono ottimali per la crescita microbica, i batteri sporigeni seguono invece un ciclo vitale alternativo, detto "sporulazione". In tale ciclo vitale, come descritto in dettaglio di seguito, dopo la replicazione del cromosoma avviene una divisione cellulare asimmetrica che forma due cellule disuguali, una piccola detta prespora ed una più grande, detta cellula madre. Queste due cellule hanno identico patrimonio genetico ma morfologia, metabolismo e destini diversi, in quanto la prespora originerà la spora matura mentre la cellula madre parteciperà alla maturazione della spora e liserà alla fine del processo.

La spora può rimanere in uno stato inerte per un tempo anche molto lungo (centinaia di anni) ma al ripristinarsi di condizioni

ambientali opportune è in grado di "germinare", cioè di re-idratarsi, riattivare il proprio metabolismo e trasformarsi in cellula vegetativa, in grado di crescere in modo vegetativo ed eventualmente di ri-sporulare (Figura 1.2).

La diversità morfologica e metabolica tra due cellule geneticamente identiche è resa possibile dal fatto che ciascuna delle due cellule segue un diverso programma di espressione genica. Nei batteri sporigeni ciò è reso possibile da una cascata di quattro fattori  $\sigma$  dell'RNA polimerasi, alternativi al fattore  $\sigma^A$  attivo durante la crescita vegetativa.

Tali fattori entrano in gioco nell'ordine:  $\sigma^F$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^G$  e  $\sigma^K$  e, conferendo una specificità di riconoscimento alla RNA polimerasi, controllano la trascrizione di centinaia di geni, detti geni *spo*, non espressi nel ciclo di crescita vegetativo (Stragier and Losick, 1992).

L'intero processo di sporulazione può essere diviso in VII stadi, (schematizzati in figura 1.3A) ognuno dei quali è caratterizzato a livello genetico, dall'espressione di uno specifico sotto-gruppo di geni *spo*, e a livello morfologico, da specifiche modifiche strutturali. Tale suddivisione non è però rigida in quanto diversi fenomeni si svolgono nel corso di più fasi.

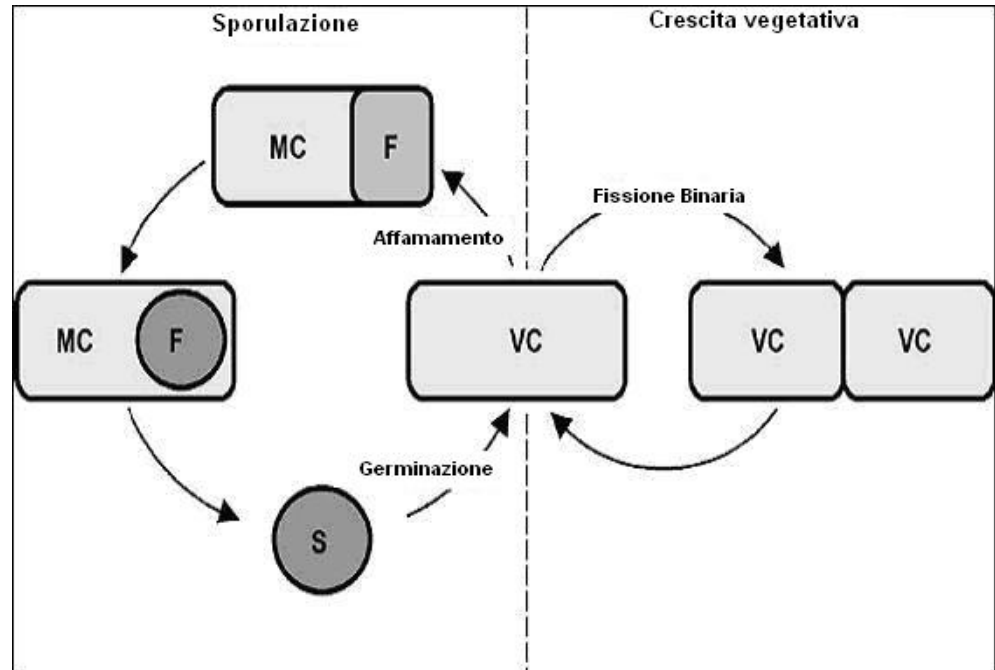


Figura 1.2: Differenziamento unicellulare di *B. subtilis*. Diagramma semplificato che mostra i due cicli vitali delle endospore batteriche. Le cellule vegetative (VC) crescono per fissione binaria fino a esaurire le risorse nutritive. A questo punto le singole cellule iniziano un programma di differenziamento irreversibile che porterà alla formazione di una spora (S). La sporulazione è caratterizzata da una divisione asimmetrica della cellula in due compartimenti, la prespora (F) e la cellula madre (MC). Entrambi questi compartimenti recano un cromosoma separato. La prespora è destinata a dare origine nuovamente ad una cellula vegetativa dopo la maturazione in spora ed il rilascio mediante lisi della cellula madre. (Cutting, 2004)

Un esempio a tale proposito é rappresentato dall'elevato livello di disidratazione della spora matura che viene raggiunto gradualmente durante l'intero processo di sporulazione.

Al ripristinarsi delle condizioni ambientali favorevoli la spora germina, dando origine ad una cellula metabolicamente attiva. Induzione della germinazione ed esocrescita sono le due fasi che una spora deve superare per ritornare alla condizione di cellula vegetativa. Come il processo di sporulazione, anche la germinazione é un processo irreversibile (Parker *et al.*, 1996).

Gli eventi morfologici e biochimici che caratterizzano il ritorno alla fase di crescita vegetativa sono: a) la reidratazione del citoplasma con il conseguente rigonfiamento della spora; b) la degradazione delle proteine strutturali della tunica sporale, che fa apparire le spore scure e non più rifrangenti al microscopio ottico, e delle proteine SASP; c) la scomparsa della resistenza al calore e agli altri agenti dannosi per la cellula (figura 1.3B).

In condizioni di laboratorio, la germinazione può essere indotta esponendo le spore a sostanze come la L-alanina o ad una miscela di asparagina, glucosio, fruttosio e KCl (AGFK). Sono state identificate varie classi di mutanti incapaci di germinare o capaci di germinare, ma più lentamente, in presenza di L-alanina (*gerA*, *gerC* e *CotT*) o di AGFK (*gerB*, *gerK* e *fruB*). La diversità dei

fenotipi ottenuti suggerisce che la spora sia dotata di sistemi distinti per il riconoscimento di stimoli germinativi diversi (Moir and Smith, 1990).

L'esocrescita é il processo di cambiamento morfologico e fisiologico che trasforma le spore germinanti in bacilli vegetativi.

Mentre la germinazione é un processo rapido che impiega meno di un minuto per completarsi, il primo evento della fase di esocrescita, e cioè la scissione binaria di una cellula in due cellule figlie identiche, richiede più di un'ora.

La maggior parte degli aminoacidi utilizzati in questa fase di intensa sintesi proteica viene fornita al batterio dalla rapida degradazione delle proteine strutturali della tunica e delle SASP che rivestivano le une la superficie della spora e le altre il suo cromosoma.

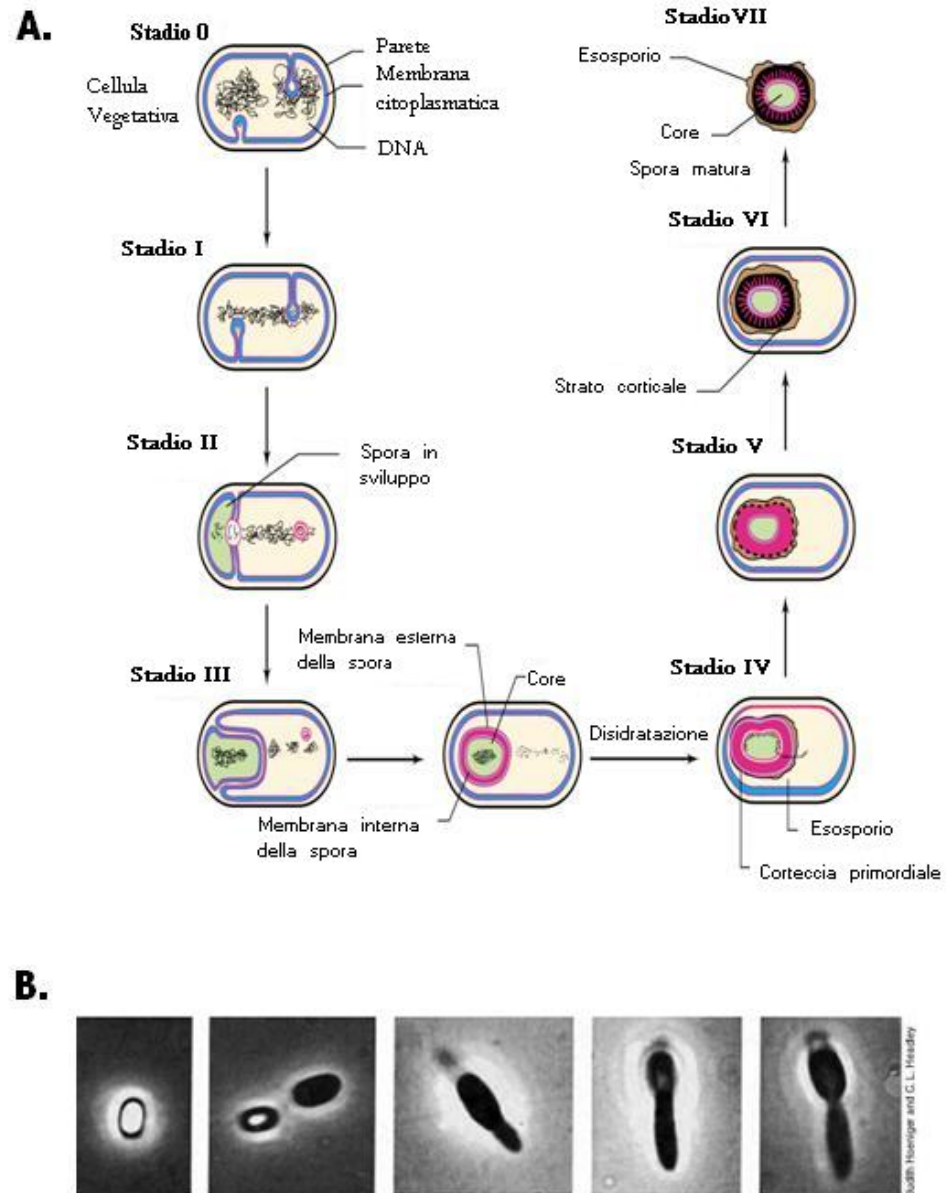


Figura 1.3: Stadi della sporulazione. Rappresentazione schematica dei vari stadi della sporulazione in *B. subtilis* (A). Fotografie al microscopio ottico che riproducono le varie fasi della germinazione (B).



### 1.4 Fasi della sporulazione

La formazione delle spore viene distinta in una serie di fasi morfologiche che possono essere osservate con l'utilizzo del microscopio sia ottico che elettronico. Una volta iniziato il processo, questo richiede circa 8 ore per completarsi in condizioni di laboratorio.

**Stadio 0:** trasduzione all'interno della cellula dei vari segnali esterni ed interni che inducono l'inizio della sporulazione, culminanti con l'attivazione del regolatore trascrizionale Spo0A. Il controllo dell'inizio della sporulazione è affidato ad un sistema di fosforilazione a cascata, detto *multicomponent phosphorelay*, costituito da proteine con attività chinastica e fosfatase capaci di modulare i vari segnali cellulari ed extracellulari.

**Stadio II:** comparsa di un setto di divisione cellulare situato in posizione asimmetrica che divide la cellula (denominata da questa fase in poi sporangio) in compartimenti disuguali, uno più grande, la cellula madre, e uno più piccolo, la prespora. Questa prima modificazione morfologica interrompe lo stato vegetativo della cellula ed è il primo evento irreversibile della sporulazione. Dopo la formazione del setto si ha l'attivazione del primo dei quattro fattori  $\sigma$  specifici della sporulazione,  $\sigma^F$ .

**Stadio III:** attivazione del fattore  $\sigma^E$  nel solo compartimento della cellula madre. Sotto l'azione regolativa di  $\sigma^E$  e  $\sigma^F$  si ha la degradazione della porzione peptidoglicanica del setto asimmetrico a partire dai poli, il rigonfiamento del compartimento della prespora e la migrazione del setto membranoso che ingloba la prespora avvolgendola con una doppia membrana completa facendole assumere l'aspetto di un protoplasto libero all'interno della cellula madre. Dopo l'inglobamento della prespora nel citoplasma della cellula madre si osserva l'attivazione del terzo fattore sigma specifico della sporulazione,  $\sigma^G$ .

**Stadio IV:** sintesi di uno strato di peptidoglicano, chimicamente diverso da quello della parete cellulare, nel compartimento della cellula madre tra le due membrane esterne ed interne. L'acido dipicolinico (DPA), sintetizzato nella cellula madre, è trasportato nel compartimento della prespora dove si accumula come sale di calcio con la funzione di stabilizzare gli acidi nucleici sporali e contribuire alla disidratazione ed all'acquisizione della termoresistenza sporale. Vengono sintetizzate, anche proteine a basso peso molecolare, dette SAPS che interagiscono con il cromosoma della spora proteggendolo dai raggi UV.

**Stadio V:** si attiva l'ultimo fattore sigma specifico della sporulazione,  $\sigma^K$ , nel compartimento della cellula madre. Lo strato

proteico della tunica sporale, la cui sintesi comincia negli stadi precedenti ma che raggiunge la sua completa formazione nello stadio V, viene depositato sulla superficie della spora. I geni che codificano per le proteine strutturali della tunica sporale sono tutti trascritti nella cellula madre.

**Stadio VI e VII:** Gli stadi VI e VII del processo di formazione della spora sono caratterizzati da piccoli cambiamenti morfologici e dall'acquisizione, in sequenza, delle proprietà di resistenza e quiescenza e dalla capacità di germinare (stadio VI). Il rilascio della spora matura, in seguito alla lisi della parete cellulare della cellula madre caratterizza, invece, lo stadio VII.

La resistenza al calore, alle radiazioni, ai solventi organici e al lisozima (conferita molto probabilmente dall'azione di una serie di proteasi che contribuiscono alla formazione della tunica sporale), sebbene siano acquisite dalla spora nel corso dell'intero processo di sporulazione, sono osservabili e misurabili solo a partire dallo stadio VI.

### 1.5 Espressione genica durante la sporulazione

Nel corso delle varie fasi della sporulazione si osserva l'attivazione a cascata dei quattro fattori sigma dell'RNA polimerasi necessari per la trascrizione dei geni *spo*.

Come schematicamente riportato in figura 1.4, due di questi fattori sigma sono specificamente espressi nella prespora ( $\sigma^F$  e  $\sigma^G$ ) e due nella cellula madre ( $\sigma^E$  e  $\sigma^K$ ), permettendo quindi di distinguere l'espressione genica delle due cellule.

L'espressione genica nelle due cellule è però coordinata grazie alla presenza di punti di controllo (*checkpoints*) che permettono di associare lo sviluppo morfologico di una cellula all'espressione genica dell'altra. Secondo questo modello, detto *criss-cross*,  $\sigma^F$  nella prespora codifica per  $\sigma^G$ , ma determina l'attivazione di  $\sigma^E$  nella cellula madre. Così  $\sigma^E$ , una volta attivato, codifica per  $\sigma^K$  nella cellula madre, ma determina l'attivazione di  $\sigma^G$  nella prespora. Infine  $\sigma^G$  nella prespora media l'attivazione di  $\sigma^K$  nella cellula madre.

Il modello *criss-cross*, proposto nel 1992 (Stragier and Losick, 1992), è stato confermato da una serie di evidenze sperimentali basate su esperimenti di microscopia elettronica ed a fluorescenza, dati biochimici e genetici.

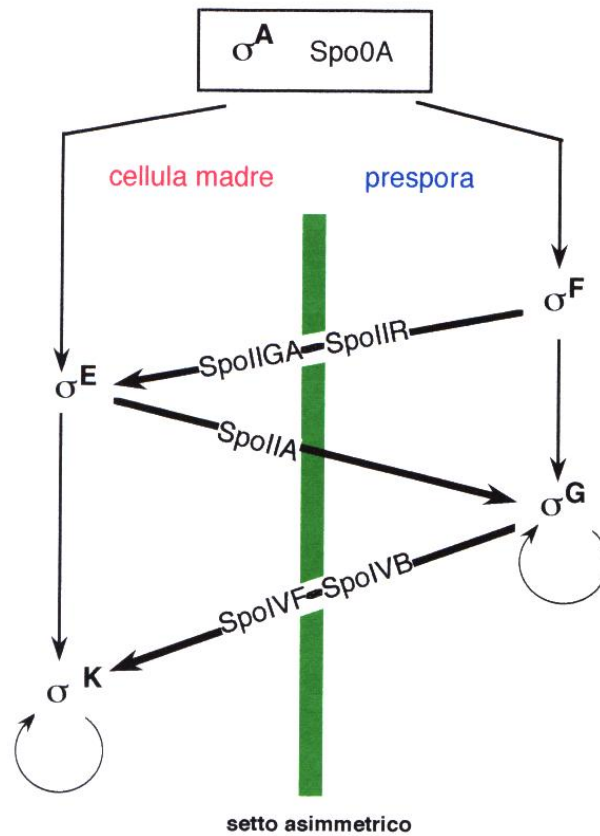


Figura 1.4: Meccanismo di regolazione (criss-cross) della sporulazione. Le frecce sottili indicano il controllo trascrizionale nelle due cellule, quelle spesse i tre checkpoints che coordinano l'espressione genica di una cellula con lo sviluppo morfologico dell'altra.

La tunica vera e propria è divisa in due strati: interno ed esterno. Quello interno, con uno spessore tra i 20 e i 40nm, è formato dalla giustapposizione di un numero di lamine compreso tra tre e cinque; quello esterno, con uno spessore tra 40 e 90nm, risulta denso agli elettroni (Henriques and Moran, 2000). Entrambi gli strati sono necessari per conferire alla spora le sue caratteristiche di resistenza e per consentirle un'ottimale germinazione (Ricca *et al.*, 1997). Osservazioni al microscopio elettronico dello sporangio durante le prime fasi di formazione della tunica hanno rivelato che tale processo inizia con l'assemblaggio, ad entrambi i poli della spora, di proteine sia dello strato interno che di quello esterno, dando origine a due strutture a forma di cappuccio, che gradualmente finiscono per circondare l'intera spora. Probabilmente come conseguenza del meccanismo polare d'assemblaggio, si osserva che nella spora matura lo spessore della tunica è maggiore ai due poli rispetto alle zone mediane (Driks, 1999).

In *B. subtilis* si osserva una tunica di struttura complessa ed eterogenea, ottenuta dall'interazione tra circa cinquanta polipeptidi diversi, molti dei quali sono capaci di legare altri componenti della tunica, mediante interazioni ad alta o bassa specificità non ancora caratterizzate. In figura 1.5 è riportato uno schema recentemente

proposto (Kim *et al.*, 2006) per riassumere le interazioni che avvengono nella formazione della tunica di *B. subtilis*. Nella maggioranza dei casi tali interazioni sono dedotte sulla base della dipendenza dell'assemblaggio di un componente dalla presenza di un altro componente e non sono noti i dettagli biochimici dell'interazione stessa.

Alcuni di tali geni, come *cotJABC* (Henriques *et al.*, 1995), *cotVWX* e *cotYZ* (Zhang *et al.*, 1994) sono raggruppati a formare operoni mentre altri, come *cotB* (Donovan *et al.*, 1987), *cotG* (Sacco *et al.*, 1995) e *cotH* (Naclerio *et al.*, 1996), sebbene adiacenti sul cromosoma, formano unità trascrizionali indipendenti.

Un'accurata analisi della localizzazione delle proteine dello strato interno ed esterno e del loro tempo di comparsa, hanno indicato che l'assemblaggio degli strati della tunica non avviene in stadi sequenziali dall'interno all'esterno. Infatti, i componenti dello strato interno della tunica non sono sintetizzati prima dei componenti di quello esterno. La corretta formazione della tunica sporale appare, invece, controllata da un complesso meccanismo regolativo che agisce a due livelli, uno trascrizionale, che controlla la sintesi temporalmente differenziata dei componenti della tunica, ed uno post-traduzionale, che controlla l'assemblaggio e le

modifiche dei vari componenti strutturali (Driks *et al.*, 1994; Ricca *et al.*, 1997).

### **1.6 Controllo trascrizionale dei geni *cot***

L'espressione dei geni della tunica inizia subito dopo la divisione asimmetrica e coinvolge almeno cinque fattori trascrizionali, che agiscono esclusivamente a livello della cellula madre. Tali fattori comprendono oltre a  $\sigma^E$  e  $\sigma^K$ , già nominati precedentemente, anche le *DNA-binding proteins* ausiliarie, dette SpoIIID e GerE.

L'attivazione di ognuno di questi fattori, è legata ad uno specifico stadio di sporulazione, di modo che l'espressione di ogni gene è associata al cambiamento morfologico della cellula.

In base ai fattori trascrizionali richiesti per la loro espressione si possono distinguere quattro classi sequenziali di geni *cot* (Figura 1.6). Il fattore  $\sigma^E$  è il primo fattore che agisce nella cellula madre, tra i geni che  $\sigma^E$  controlla ci sono *spoIVA*, *spoIVD* e *cotE* (tale gene è inizialmente trascritto dal suo promotore P1, sotto il controllo dell'RNA polimerasi legata al fattore  $\sigma^E$ , e in un secondo momento dal suo promotore P2 dal fattore  $\sigma^E$  in congiunzione con SpoIIID). CotE svolge un ruolo chiave nella formazione della tunica sporale (Little and Driks, 2001).



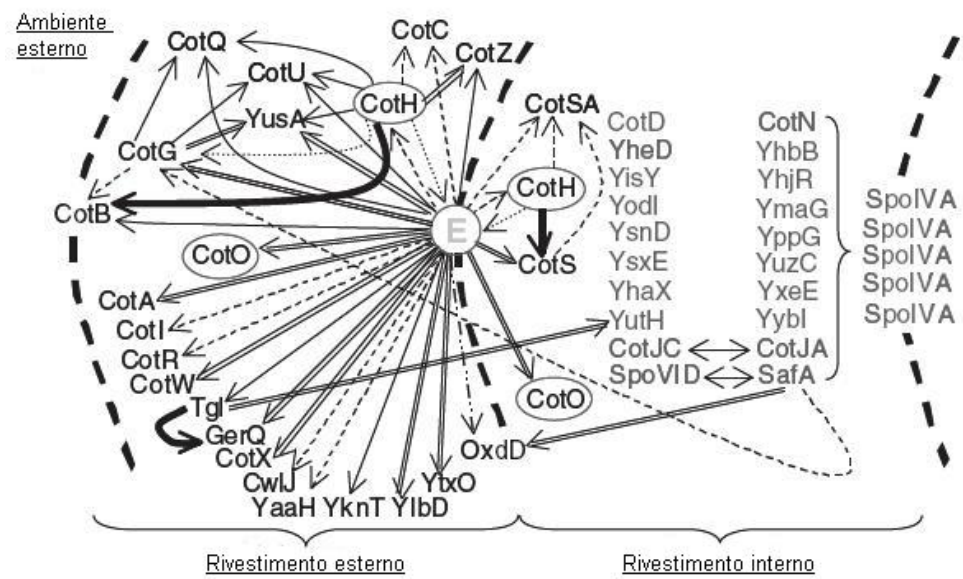


Figura 1.5: Modello del network di interazioni tra le proteine della tunica sporale (Kim *et al.*, 2006).

Subito dopo la formazione del setto di sporulazione, CotE forma uno strato posizionato lungo il setto asimmetrico dal lato della cellula madre, mentre, dopo che la prespora acquisisce la forma di un protoplasto libero nella cellula madre, lo strato di CotE circonda la prespora, pur rimanendo separato da essa da uno spazio di circa 75nm (Driks *et al.*, 1994; Webb *et al.*, 1995). Una matrice (*scaffold*) occupa questo spazio e connette lo strato di CotE alla superficie della prespora. L'insieme dello strato di CotE e della matrice viene detto pretunica, che si assembla presto sulla superficie della spora durante la sporulazione. L'evento successivo nella formazione della tunica sporale è l'assemblaggio dello strato interno e dello strato esterno. Presumibilmente, le proteine dello strato interno si inseriscono nello spazio tra lo strato di CotE e la superficie della prespora formando lo strato interno lamellare (Driks *et al.*, 1994). Le proteine dello strato esterno, invece, si assemblano simultaneamente intorno allo strato di CotE a formare lo strato esterno elettrondenso. Il ruolo principale della pretunica, quindi, è quello di stabilizzare i due principali strati della tunica sporale.

La pretunica si lega alla membrana esterna della prespora tramite un peptide di 26 amminoacidi denominato SpoVM. Si ritiene che questo peptide formi un'elica anfipatica il cui lato idrofobico è

ancorato alla membrana tramite dei residui idrofobici che si intersecano nel doppio strato di fosfolipidi. Con la porzione idrofilica, invece, SpoVM interagisce con la catena laterale di un amminoacido localizzato all'estremità C-terminale della proteina SpoIVA. La corretta localizzazione di entrambe le proteine è mutualmente dipendente (Ramamuthi *et al.*, 2006).

SpoIVA è una proteina ad attività morfogenetica. Spore mutanti nel gene *spoIVA* presentano una tunica sporale correttamente assemblata ma che non circonda la prespora (Roels *et al.*, 1992; Stevens *et al.*, 1992). Il ruolo di SpoIVA, quindi, è quello di apporre in qualche modo la pretunica alla superficie della prespora dal lato della cellula madre precocemente durante la sporulazione (Driks *et al.*, 1994; Ramamurthi and Losick, 2008).

SpoVID (Beall *et al.*, 1993), come SpoIVA, è anch'essa implicata nell'attacco della tunica sporale alla prespora dal momento che spore mutate in *spoVID* hanno una tunica sporale dispersa nel citoplasma anche se la pretunica è attaccata alla prespora. Quindi SpoVID agisce in modo simile a SpoIVA ma in un momento successivo del processo di sporulazione in quanto SpoIVA non è più attiva (Driks *et al.*, 1994).

$\sigma^E$  guida anche l'espressione del gene *spoIIID* codificante per la proteina omonima. SpoIIID può agire negativamente, spegnendo

la trascrizione di geni controllati da  $\sigma^E$ , ma può anche attivare la trascrizione di altri geni sempre controllati dal regulone  $\sigma^E$ , inclusi geni coinvolti nella comparsa di  $\sigma^K$ .

Infatti, uno dei geni attivati da SpoIIID è *sigK*, il quale codifica per il fattore pro- $\sigma^K$  (Zhang and Kroos, 1997).

Mutanti in *spoIIID* bloccano la sporulazione nello stadio dell'inglobamento della prespora perché il fattore  $\sigma^K$ , necessario per procedere nello stadio della formazione del cortex, non viene prodotto (Zheng and Losick, 1990).

La classe successiva di geni della tunica sporale che vengono espressi comprende *cotJ*, il gene *cotE*, dal suo promotore P2, ed il gene *sigK*, codificante per il fattore sigma necessario all'espressione della classe successiva di geni della tunica,  $\sigma^K$ .

L'espressione dei geni regolati da  $\sigma^K$  coinvolge la trascrizione dei geni: *cotA*, *cotD*, *cotH*, *cotF*, *cotT*, *cotV*, *cotW*, *cotY*, *cotZ* e *cotM*.

Inoltre  $\sigma^K$  dirige la trascrizione del gene *gerE*, il cui prodotto, GerE, insieme con  $\sigma^K$ , attiva l'espressione dell'ultima classe di geni della tunica. Le trascrizioni GerE-dipendenti comprendono i geni *cotB*, *cotC*, *cotS*, *cotG*, *cotU*, *cotVMX*, *tgl*, *cotYZ* facenti parte della frazione solubile delle proteine della tunica e di *cotX*, che invece si trova nella frazione insolubile.

GerE tuttavia interviene anche nella regolazione di altri geni, quali *cotD*, *cotV*, *cotW*, *cotY* e *cotZ* (in modo positivo), *sigK*, *cotA* e *cotM* (in modo negativo). Altri studi identificano un altro gene *spoVIF* coinvolto nell'assemblaggio della tunica sporale e mostrano che la resistenza al calore ed al lisozima è significativamente compromessa nel ceppo mutante che non esprime tale gene (Kuwana *et al.*,2003). Inoltre è stato dimostrato che in tale ceppo mancano alcune proteine del rivestimento (CotG, CotS, CgeA) e la trascrizione dei relativi geni è dipendente da SpoVIF (Kuwana *et al.*,2004). Da esperimenti di *northern hybridization* in cellule *spoVIF*<sup>-</sup> e cellule selvatiche di *B. subtilis*, si evince che SpoVIF non ha effetti sulla trascrizione di *gerE*, mentre dall'analisi per *western blotting* degli estratti proteici dei ceppi selvatico e *spoVIF*<sup>-</sup> si deduce che la proteina GerE è quantitativamente minore nel mutante (Kuwana *et al.*,2004).

Ceppi con mutazioni non senso in *gerE* mostrano un'alterata espressione di numerosi geni della cellula madre e producono spore mancanti dello strato interno della tunica sporale, poco resistenti ad agenti chimici ed enzimi, e difettive negli ultimi stadi della germinazione (Moir, 1981; Henriques and Moran, 2000; Driks, 2002).

Questi meccanismi consentono un'accurata regolazione temporale della sintesi dei vari componenti della tunica sporale essenziale per un suo corretto assemblaggio. Mutanti in cui il tempo di attivazione del fattore  $\sigma^K$  è alterato e che, di conseguenza, sintetizzano i componenti della tunica di classe III e IV con circa un'ora di anticipo, producono spore incapaci di germinare efficientemente (Cutting *et al.*, 1991; Ricca *et al.*, 1992). Da tali evidenze si giunge alla conclusione che tutti i geni coinvolti nell'assemblaggio della tunica sporale sono trascritti nel compartimento della cellula madre, subito dopo la divisione asimmetrica, e solo successivamente i prodotti vengono assemblati per formare la tunica (Henriques and Moran, 2000).

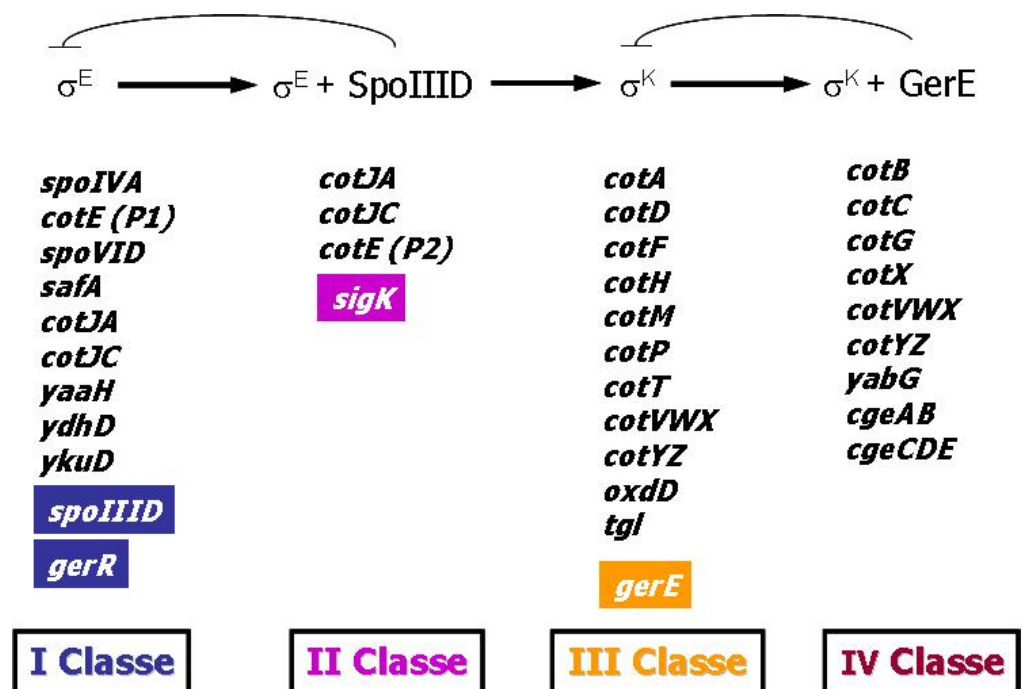


Figura 1.6: Rappresentazione schematica del controllo trascrizionale dei geni *cot*.

## 1.7 Il gene *gerR*

Il programma genetico della cellula madre coinvolge l'attivazione di 383 geni, che rappresentano circa il 9% dei geni nel genoma di *B. subtilis*, ed è iniziato dall'attivazione del fattore pro- $\sigma^E$  in  $\sigma^E$ , nel compartimento della cellula madre (Eichenberger *et al.*, 2004).  $\sigma^E$  controlla un regulone di 262 geni, i quali sono organizzati in 163 unità trascrizionali (Eichenberger *et al.*, 2004). Negli ultimi anni sono stati identificati ed analizzati diversi nuovi geni sotto il controllo dei fattori  $\sigma^E$  e  $\sigma^K$ , per molti di questi geni la funzione è ancora sconosciuta. Tra i nuovi geni identificati ci sono molti trasportatori (*citH*, *glnM*, *glnP* e *yknV*), che possono portare dei nutrienti addizionali alla prespora; le proteine SodF (superossido dismutasi) e YocM (simile alle “*heat-shock protein*”) che probabilmente intervengono apportando proprietà protettive alla cellula in fase di sporulazione (Feucht *et al.*, 2003). Solo due dei vari geni identificati, *ykvU* e *yqfD*, mostrano similarità con proteine conosciute coinvolte nella sporulazione. Al regulone  $\sigma^E$  sono stati attribuiti, sulla base di omologie di sequenza, anche alcuni nuovi putativi regolatori trascrizionali. Tra questi compare il gene *ylbO*, che presenta molte similarità con i membri della famiglia dei fattori trascrizionali caratterizzati dal motivo strutturale *basic leucine zipper*. In particolare, vi è un 52% di



omologia, soprattutto a livello della regione N- e C-terminale della proteina, con RsfA, fattore trascrizionale da poco identificato, la cui espressione dipende dai fattori  $\sigma^F$  e  $\sigma^G$  (Wu and Errington, 2000). RsfA è implicato nella regolazione dell'espressione di alcuni geni dipendenti dal fattore  $\sigma^F$ ; una ipotesi è che il prodotto di *ylbO* possa agire insieme con  $\sigma^E$  nella cellula madre (Wu and Errington, 2000) così come RsfA agisce nella prespora. Analisi preliminari sugli effetti dell'inattivazione del gene *ylbO* sulla sporulazione e sull'espressione di alcuni geni coinvolti nel processo, indicano che la resistenza al lisozima di spore *ylbO*<sup>-</sup> si riduce (Kuwana *et al.*, 2005) e che la capacità di germinare diminuisce sensibilmente (Eichenberger *et al.*, 2004). Per tale motivo il gene *ylbO* è stato rinominato *gerR* (Eichenberger *et al.*, 2004), rispettando così la nomenclatura utilizzata per quei geni implicati nella risposta alla germinazione (Setlow, 2003).

Come riportato in letteratura (Eichenberger *et al.* 2004), dall'analisi del profilo trascrizionale ottenuto tramite chip di microarray ibridizzati con RNA estratto 3,5 ore dopo l'inizio della sporulazione da cellule *wilde type* e mutanti per il gene *gerR*, è stato visto che numerosi geni sono *down* regolati in maniera GerR-dipendente, tra questi sono stati individuati 14 geni trascritti

da  $\sigma^E$  di cui 9 non controllati da SpoIIID ed altri 5 controllati anche da SpoIIID. Tramite lo studio di fusioni trascrizionali, in ceppi selvatici e  $\Delta gerR$ , le sequenze promotrici dei geni *spoIIM*, *yqhV* e *spoIIP*, scelti tra i 9 geni trascritti da  $\sigma^E$  e non controllati da SpoIIID, sono state individuate come possibili bersagli del putativo regolatore GerR, in quanto l'espressione viene regolata in maniera negativa (Eichenberger *et al.*, 2004). Tra i 5 geni trascritti da  $\sigma^E$  e sotto il controllo di SpoIIID, GerR regola negativamente il gene *spoIIIA* che è un operone policistronico situato a valle del gene *yqhV*. Probabilmente l'effetto della regolazione su questo operone è conseguenza indiretta della regolazione di *yqhV* da parte di GerR. Dai microarray si nota anche che GerR inibisce l'espressione di un vasto numero di geni non appartenenti al regulone  $\sigma^E$  (Eichenberger *et al.*, 2004).

Studi sulla trascrizione di alcuni geni tardivi della sporulazione trascritti da  $\sigma^K$  e regolati da GerE: *cgeA*, e *cotY*, effettuati mediante *northern hybridization* in cellule *gerR<sup>-</sup>* e cellule selvatiche di *B. subtilis*, indicano che i livelli dei trascritti di tali geni sono ridotti nei mutanti rispetto a quelli presenti nel selvatico (Kuwana *et al.*, 2005). Il gene *gerR*, quindi, potrebbe essere coinvolto anche nella regolazione dell'espressione di altre proteine espresse tardivamente (Kuwana *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda il fenotipo delle spore mutanti, esperimenti di microscopia elettronica hanno mostrato alterazioni nella morfologia della tunica di spore  $gerR^-$ , in cui si osserva uno sviluppo incompleto degli strati interni ed esterni caratteristici del rivestimento sporale (figura 1.7). Quindi la corretta morfogenesi dipende anche dalla capacità di GerR di spegnere quei geni che sono sotto il suo controllo.

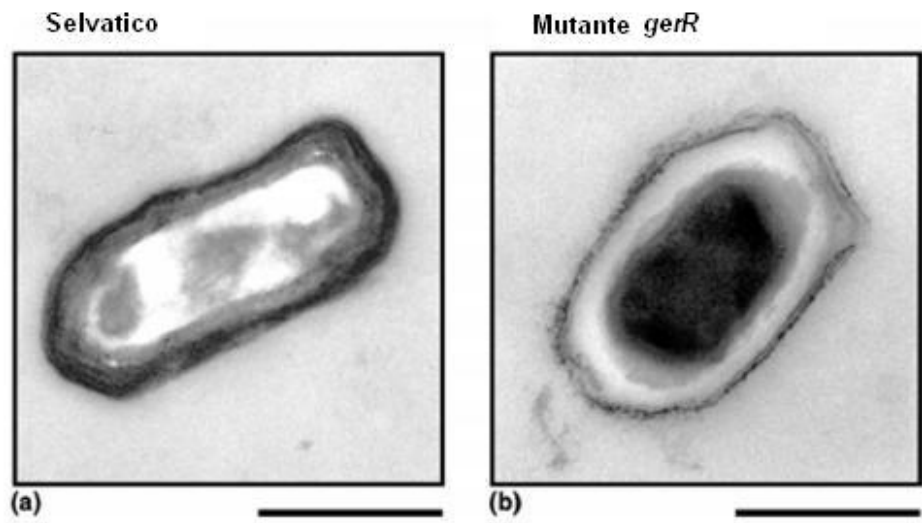


Figura 1.7: Fotografie al microscopio elettronico di una spora di *Bacillus subtilis*. a) spora di un ceppo selvatico; b) spora di un mutante *gerR* (Kuwana, *et al.*, 2005).

### **1.8 Uso di spore ricombinanti come veicolo di vaccinazione**

Le caratteristiche peculiari delle spore batteriche ne hanno suggerito l'utilizzo per una vasta gamma di applicazioni biotecnologiche che comprendono lo sviluppo di biocatalizzatori e bioadsorbenti, la veicolazione di vaccini e farmaci.

Le attuali conoscenze sulla superficie sporale, derivanti dallo studio della tunica e delle sue componenti proteiche, hanno permesso lo sviluppo di metodi per la presentazione di biomolecole, in particolare di antigeni eterologhi, sfruttando le proteine del rivestimento sporale come partner di fusione.

Un sistema di esposizione superficiale richiede almeno due componenti: I) una proteina *carrier*, ancorata alla superficie sporale e II) una proteina “passeggero” eterologa, esposta sulla spora (Cutting *et al.*, 2006).

Per un'adeguata esposizione è necessario tener conto delle caratteristiche della proteina che funge da *carrier* e della proteina “passeggero”, oltre che della scelta dell'organismo ospite.

Una proteina *carrier* per dare buoni risultati deve soddisfare le seguenti richieste: essere sufficientemente esposta in superficie; avere un saldo motivo di ancoraggio, per impedire il distacco dalla superficie; essere resistente alle proteasi.

La proteina eterologa, da parte sua, incide sull'efficienza del sistema di visualizzazione con la sua conformazione ripiegata e l'eventuale presenza di ponti disolfuro sul versante periplasmatico della membrana esterna (Maurer *et al.*, 1997) o di molti residui carichi o idrofobici.

Un altro aspetto da considerare è il sito di inserzione, o di fusione, (all'estremità N-terminale, C-terminale o fusione interna, detta anche fusione sandwich) della proteina eterologa nella proteina *carrier*, dal momento che può influenzare la stabilità, l'attività e i cambiamenti post-traduzionali della proteina di fusione.

Infine, la scelta dell'organismo ospite è un passaggio importante. Sono stati impiegati con successo sia batteri Gram negativi sia batteri Gram positivi, con vantaggi diversi per l'uno e l'altro gruppo.

Nei batteri Gram negativi la visualizzazione di proteine sulla superficie è resa più complessa dalla natura del rivestimento cellulare, composto da membrana citoplasmatica, periplasma e membrana esterna. Diverse proteine di superficie sono state utilizzate come partner di espressione: la lipoproteina associata al peptidoglicano (PAL) di *Escherichia coli*, alcune proteine della membrana esterna (OMP), proteine di appendici cellulari, fimbrie e flagello, (FimH, FelA, PapA) e proteine della capsula.

Diverse strategie di visualizzazione sono state adattate anche per i batteri Gram positivi (Medaglini *et al.*, 2001) che, rispetto ai batteri Gram negativi, incontrano meno ostacoli nell'assemblaggio della proteina di fusione per il fatto che l'involucro cellulare di questi batteri consiste solo della membrana citoplasmatica e del peptidoglicano, una struttura meno complessa e più sottile rispetto a quella dei Gram negativi.

Uno dei principali sistemi impiegati per i batteri Gram positivi è basato sul meccanismo di ancoraggio della proteina A di *Staphylococcus aureus* (SpA) (Sthal e Uhlen, 1997).

Lo sviluppo di migliori strategie per la vaccinazione è di estrema importanza per diverse ragioni: fornire livelli migliori di immunità locale contro i patogeni che penetrano nel corpo principalmente attraverso le superfici mucosali (naso-faringe, polmoni e tratto gastro-intestinale); fornire vie di somministrazione prive di ostacoli; offrire sicurezza e minimi effetti collaterali; fornire vaccini economici per i paesi in via di sviluppo.

Progressi significativi sono stati raggiunti con lo sviluppo di strategie per la vaccinazione mucosale (Shalaby, 1995) e di nuovi e insoliti sistemi di rilascio dell'antigene (Duc *et al.*, 2003b; Cutting, 2004; Cutting *et al.*, 2006).

I componenti principali dell'immunità locale (mucosale) sono la sintesi di IgA secrete (sIgA) alla superficie mucosale e nelle secrezioni mucosali, l'immunità cellulare in NALT (tessuto linfoide associato alle cavità nasali) e GALT (tessuto linfoide associato al tratto gastrointestinale).

Per migliorare le reazioni immunitarie locali, sono stati sviluppati diversi sistemi carriers unici che ricadono in due grandi categorie, sistemi non vitali e sistemi vitali: i primi includono liposomi (Han *et al.*, 1997), microparticelle e sistemi di stimolazione immunitaria (ISCOMS) (Smith *et al.*, 1998); i secondi racchiudono piante, virus e batteri (Medaglini *et al.*, 2001; Green and Baker, 2002).

Ultimamente l'attenzione si è rivolta alle endospore. La scelta delle spore di *B.subtilis* come veicolo di vaccini è dettata da vari fattori:

- un'alta stabilità del sistema di espressione;
- la non tossicità per l'uomo, assicurata dall'uso diffuso di spore come additivi alimentari e per il trattamento di disordini gastrointestinali;
- la produzione semplice ed economica di grandi quantità di spore, grazie alle procedure già disponibili per la produzione in scala industriale e per la commercializzazione di diversi prodotti a base di spore;



- la possibilità di essere conservate per tempi illimitati senza richiedere particolari condizioni;
- la disponibilità di avanzati strumenti genetici utili nella costruzione di ceppi ricombinanti.

Questi attributi unici rendono la spora un vettore adatto per il rilascio di antigeni eterologhi o, meglio, di molecole bioattive in ambienti estremi come il tratto gastro-intestinale. Diversamente da altri sistemi di vaccini batterici, due approcci, del tutto distinti, sono disponibili per la vaccinazione mediante l'uso di spore (figura 1.8). Nel primo metodo, un antigene o epitopo è costruito sulla tunica sporale per fusione di un gene della tunica (*cot*) con una sequenza antigenica. Nel secondo approccio, l'antigene viene espresso costitutivamente nella cellula vegetativa mediante fusione del gene antigenico alle sequenze trascrizionali e traduzionali di un gene adatto di *B. subtilis*. Le spore che recano il gene modificato vengono usate per la distribuzione orale e poi germinano nel GIT.

Con l'altro approccio, rilascio delle spore in germinazione, l'antigene viene espresso utilizzando un promotore forte di *Bacillus* e la spora può attraversare senza ostacoli la barriera formata dallo stomaco (Duc *et al.*, 2003a).

Nell'intestino tenue le spore germinano nel lume o nelle Placche di Peyer (PP) in seguito all'attraversamento dell'epitelio mucosale. L'espressione dell'antigene nella cellula vegetativa produce reazioni anticorpali. La spora può germinare all'interno di cellule presentanti l'antigene e indurre l'espressione di citochine Th1, suggerendo il coinvolgimento di reazioni cellulari. (Duc *et al.*, 2004; Cutting, 2004).

Come riassunto nei paragrafi precedenti, la spora di *B. subtilis* è circondata da un rivestimento pluristratificato, la tunica, la cui natura proteica suggerisce immediatamente la possibilità di utilizzare i suoi componenti strutturali come motivi di ancoraggio per l'espressione di polipeptidi eterologhi.

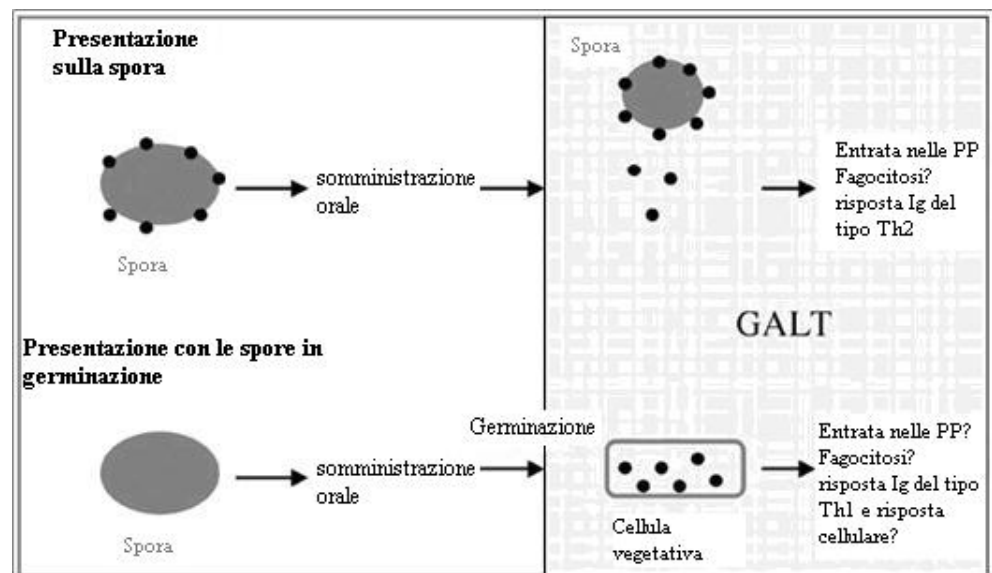


Figura 1.8: Strategie di presentazione dell'antigene. Sono mostrate le due vie per la vaccinazione mediante spore e la presentazione dell'antigene (per i dettagli vedere il testo). Utilizzando l'approccio di rilascio dalla spora, l'antigene è fuso ad un gene del rivestimento sporale, portando all'espressione di una chimera (●) sulla superficie sporale (Duc et al., 2003b). In Seguito al rilascio orale, la spora, o il rivestimento sporale che reca l'antigene ibrido, interagisce con la GALT generando risposte anticorpali.

## 1.9 Espressione sulla superficie sporale

In realtà, abbiamo a disposizione informazioni limitate sui meccanismi che regolano l'assemblaggio della tunica e sulla posizione esatta delle proteine all'interno della tunica.

Ciononostante, è stato possibile ottenere dei buoni risultati impiegando come partner di fusione le proteine CotB e CotC (figura 1.9) di cui si conosce, rispettivamente, la posizione sulla superficie sporale e l'elevata abbondanza relativa.

Gli esperimenti sono stati condotti selezionando due antigeni per la costruzione di un modello di visualizzazione sfruttando la superficie sporale come piattaforma di presentazione:

il frammento C-terminale della tossina tetanica (TTFC), di 459 aminoacidi, codificato dal gene *tetC* di *Clostridium tetani*; la subunità B della tossina termolabile (LTB) di 103 aminoacidi, codificata dal gene *eltB* di *Escherichia coli*.

L'impiego della proteina CotB come partner di fusione ha fornito la prima evidenza che una proteina eterologa può essere espressa sulla superficie di spore batteriche (Isticato *et al.*, 2001).

CotB è stato associato allo strato più esterno del rivestimento sporale sulla base di evidenze genetiche (Zheng *et al.*, 1988) e recentemente un'analisi immunocito-fluorimetrica condotta su spore intatte appartenenti al ceppo selvatico di *B. subtilis* ha

mostrato che CotB è accessibile ad anticorpi CotB-specifici, suggerendo, dunque, che essa si trova esposta esternamente (Isticato *et al.*, 2001). Basandosi su questi risultati CotB è stato selezionato come carrier di fusione delle proteine eterologhe TTFC e LTB.

CotB è una proteina di 380 aminoacidi caratterizzata da una regione all'estremità C-terminale fortemente idrofila costituita da tre sequenze ripetute di 27 aminoacidi (dal residuo 252 al 333): più del 50% degli aminoacidi dal residuo 248 al 356 sono serine; i residui di lisina presenti nelle ripetizioni sono stati proposti come siti di legami crociati intra- e intermolecolari (Kobayashi *et al.*, 1998; Henriques *et al.*, 2004).

Il gene *cotB* codifica per un polipeptide di 46kDa (CotB-46), rapidamente convertito nella forma prevalente nella tunica, di massa molecolare pari a circa 66kDa (CotB-66): è stato dimostrato che la forma di 66kDa deriva da cambiamenti post-traduzionali del prodotto del gene *cotB* di 46kDa (Zilhão *et al.*, 2004). La natura dei cambiamenti post-traduzionali è tuttora sconosciuta, ma l'ipotesi corrente considera CotB-66 un omodimero dotato di mobilità elettroforetica anomala (la grandezza attesa sarebbe 92kDa, e non 66kDa, come osservato).

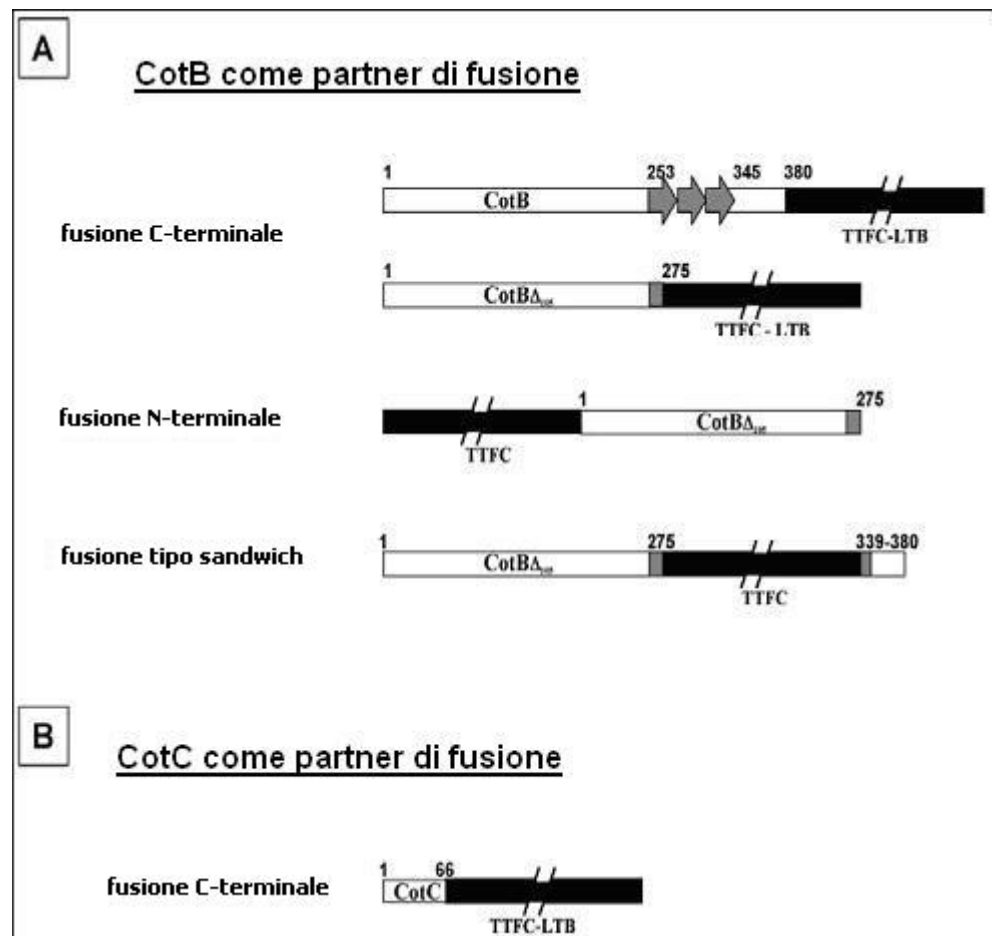


Figura 1.9: Sistema di visualizzazione di superficie in *B. subtilis*. Le barre scure rappresentano le due proteine eterologhe TTFC (459 aminoacidi) e LTB (103 aminoacidi). (A) Rappresentazione schematica di fusioni C-terminale, N-terminale e fusione sandwich usando CotB come proteina carrier. Sono state utilizzate per le fusioni C-terminali le proteine CotB integra (380 aminoacidi) e CotB $\Delta_{105}$  (275 aminoacidi). Le tre sequenze ripetute di 27 aminoacidi della proteina CotB integra sono indicate dalle frecce. (B) Rappresentazione schematica delle due proteine di fusione costruite utilizzando come partner di fusione CotC. (Isticato *et al.*, 2004a)

La formazione di CotB-66 richiede l'espressione dei geni *cotH* e *cotG*, suggerendo che i prodotti di questi geni sono coinvolti nell'assemblaggio della forma prevalente di CotB: CotH sembra agire stabilizzando CotG, che, interagendo direttamente con CotB, determina l'assemblaggio di CotB-66.

Per evitare eventuali problemi nella costruzione delle fusioni geniche, il DNA codificante per le tre sequenze ripetute della proteina CotB non è stato incluso in tali fusioni: è stata utilizzata una forma deleta di CotB, denominata CotB $\Delta$ 105, di 275 aminoacidi.

Il DNA codificante per la proteina chimerica è stato posto sotto i segnali trascrizionali e traduzionali del gene *cotB* e integrato, mediante un evento di doppio crossing-over, nel cromosoma di *B. subtilis* al locus *amyE* codificante per un' $\alpha$ -amilasi, non essenziale per la vitalità del ceppo, per assicurare sia una corretta espressione temporale della proteina ibrida durante la sporulazione sia un'elevata stabilità del costrutto genico.

La resistenza inalterata di spore ricombinanti ai principali agenti chimici tossici, quali il cloroformio e il lisozima, suggerisce che la presentazione di epitopi eterologhi sulla superficie sporale non influenza la struttura né tanto meno la funzione della spora, lasciando inalterato il processo di sporulazione e di germinazione

(Isticato *et al.*, 2001). In realtà, ciò è dovuto al fatto che la maggior parte delle proteine della tunica, incluse CotA, CotB, CotC, CotD e CotF, sono funzionalmente ridondanti e, dunque, l'assenza di una di esse non causa grosse alterazioni fenotipiche (Driks, 1999; Henriques e Moran, 2000).

CotC, un altro componente della tunica sporale di *B. subtilis* (Zheng *et al.*, 1988; Driks, 1999), ricco in tirosina (30.3%), lisina (28.8%) e acido aspartico (18.2%), è stato usato come partner di fusione per l'espressione degli antigeni eterologhi TTFC e LTB (Mauriello *et al.*, 2004).

Insieme a CotB e CotG, CotC rappresenta più del 50% del totale delle proteine solubili della tunica. CotC è assemblato in almeno 4 forme, dipendenti dall'espressione dei geni *cotH* e *cotE* (Isticato *et al.*, 2004b). Le forme di 12kDa e di 21kDa (rispettivamente monomerica e dimerica) di CotC sono sintetizzate nel compartimento della cellula madre, 8 ore dopo l'inizio della sporulazione, e immediatamente assemblate sulla spora in formazione.

Le altre due forme, di 12.5kDa e 30kDa, si formano, 2 ore dopo, direttamente sul rivestimento sporale, dal momento che esse derivano da specifici cambiamenti post-traduzionali delle forme precedentemente assemblate di 12 e 21kDa.



Basandosi sulla sua abbondanza relativa, CotC è stato utilizzato come carrier per la visualizzazione delle due proteine antigeniche TTFC e LTB.

Come per CotB, le fusioni di CotC con TTFC e LTB non influenzano la struttura né la funzione della spora.

Risultati in vivo hanno aperto la strada per una concreta applicazione delle spore come vettori di vaccinazione per lo sviluppo dei cosiddetti “vaccini di seconda generazione” (Duc *et al.*, 2003b).

### **1.10 NS3: serina proteasi del virus dell’HCV come epitopo da esporre.**

Sulla scia dei risultati ottenuti con TTFC ed LTB abbiamo pensato di provare ad esporre sulla superficie sporale anche epitopi virali. In particolare abbiamo scelto come epitopo eterologo una proteina del virus dell’Epatite C da esporre in fusione con CotC e CotB.

L’infezione da virus dell’Epatite C (HCV) è una delle maggiori cause al mondo di epatite cronica, cirrosi epatica e carcinoma delle cellule epatiche (HCC). Vaccini contro tale infezione non sono ancora disponibili e le terapie sono tutt’oggi insufficienti e difficilmente tollerate. Di conseguenza il numero di pazienti affetti da malattie dovute ad epatite C cronica, incluso l’HCC,

tenderà ad aumentare nei prossimi 20 anni (Williams, 2006). Questo scenario rende necessario lo sviluppo di terapie contro l'epatite C cronica più efficaci e meglio tollerate.

Inizialmente nel 1975 venne identificata una malattia epatica non associabile alle epatiti di tipo A e B, nell'1989 per la prima volta viene identificato il virus dell'HCV, nel 1993 vengono descritti l'organizzazione del genoma ed il processamento della poliproteina, nel 1996 si ottengono le prime strutture tridimensionali della proteina NS3 del virus, nel 1997 si ottiene il primo clone infetto da HCV, nel 1998 viene utilizzato l'interferone- $\alpha$  in combinazione alla ribavirina come approccio terapeutico, l'anno dopo viene compreso il meccanismo di replicazione del virus, nel 2003 vengono descritte pseudo particelle funzionali del virus e iniziano studi clinici su un inibitore della proteasi dell'HCV, infine, nel 2005 sono state ottenute le prime infezioni di tessuti epatici in coltura con HCV ricombinanti.

L'HCV appartiene al genere *Hepacivirus* nella famiglia delle *Flaviviridae*, infetta solo la specie umana e gli scimpanzé, attacca principalmente le cellule epatiche ma è stata documentata anche l'infezione di cellule B, cellule dendritiche e di altre linee cellulari.

I virus dell'epatite C isolati possono essere classificati in diversi genotipi e sottotipi. Sono stati individuati 6 genotipi principali che differiscono del 30-35% nella sequenza nucleotidica e pazienti infetti da virus appartenenti al genotipo 1 non rispondono alle terapie basate sull'interferone- $\alpha$  bene quanto quelli infetti da virus dei genotipi 2 e 3.

All'interno di uno stesso genotipo numerosi sottotipi (indicati come a, b, c, e così via) differiscono nella sequenza nucleotidica del 20-25%. Il genoma è costituito da un singolo filamento positivo di RNA di 9,6kb il cui prodotto proteico è una poliproteina di circa 3000 aminoacidi.

Tale poliproteina viene processata, a livello del lume del reticolo endoplasmatico della cellula ospite, da peptidasi del segnale per quanto riguarda le proteine strutturali, e dalle proteasi NS2-3 ed NS3-4A per quanto riguarda le proteine non strutturali del virus.

In seguito a tale maturazione si generano le diverse componenti proteiche del virus, strutturali e non.

Tra le proteine strutturali troviamo le proteine del core che legano l'RNA e formeranno il nucleocapside virale, le proteine glicosilate E1 ed E2 del rivestimento e la viroporina p7 che in forma polimerica assolve la funzione di canale ionico ed è coinvolta nel meccanismo di infezione del virus.

Tra le proteine non strutturali troviamo la proteasi NS2, che insieme al dominio di serina proteasi N-terminale della proteina NS3, produce il taglio auto proteolitico che le porta a maturazione, la proteina NS3 che ha funzione di serina proteasi al dominio N-Terminale e di NTPase/elicasi al dominio C-terminale, la proteina NS4A che è il cofattore della serina proteasi NS3 con la quale processa le restanti proteine, la proteina NS4B che induce alterazioni della membrana e forma le strutture membranose a livello delle quali avviene la replicazione del genoma virale, la fosfoproteina NS5A a funzione ignota che in forma fosforilata e iperfosforilata partecipa al meccanismo replicativo ed in fine la proteina NS5B che è una RNA polimerasi dipendente da RNA (Moradpour *et al.*, 2007; Dubuisson, 2007).

NS3, come ho accennato, è una proteina polifunzionale con un dominio N-terminale tipico delle serina proteasi ed un dominio C-terminale con attività di RNA elicasi/NTPasi. Il dominio con attività proteolitica ha la conformazione tipica *chymotrypsin-like* ed è costituito di due domini *beta-barrel*. L'attività della proteasi NS3 è aumentata dal cofattore NS4A che contribuisce con un *beta-strand* al completo ripiegamento conformazionale del dominio N-terminale della proteasi (figura 1.10). Inoltre NS4A induce un cambiamento conformazionale che porta al

riposizionamento della triade catalitica e con il suo dominio transmembrana permette l'associazione al reticolo endoplasmatico (ER) della cellula ospite di NS3. L'associazione dei NS3 con NS4A è essenziale per l'attività proteolitica diretta contro le proteine a valle di NS3.

Il dominio C-terminale con attività elicastica è capace di svolgere i duplex RNA-RNA in maniera ATP-dipendente. La funzione dell'elicasi NS3 nel ciclo vitale del virus non è nota e si ipotizzano vari coinvolgimenti nell'inizio della replicazione.

È stato anche riportato che NS3 interagisce con numerose proteine cellulari, ciò fa supporre che possa essere coinvolta in processi di carcinogenesi.

Date le diverse attività di questa proteina, variamente coinvolta nel ciclo vitale e replicativo del virus, essa rappresenta un interessante bersaglio per lo sviluppo di terapie contro l'HCV.

Recenti studi hanno inoltre dimostrato che la regione NS3 di HCV rappresenterebbe un valido candidato immunogeno grazie al fatto che la sua sequenza risulta conservata in differenti genotipi virali (Capone et al., 2006). Il potere immunogenico di questo antigene è stato comprovato da esperimenti di immunizzazione in organismi murini (topi BALB/c) e in scimpanzè, effettuati somministrando vettori adenovirali esprimenti la proteina NS3,

che hanno prodotto una significativa risposta immunitaria di tipo cellulare (Capone et al., 2006).

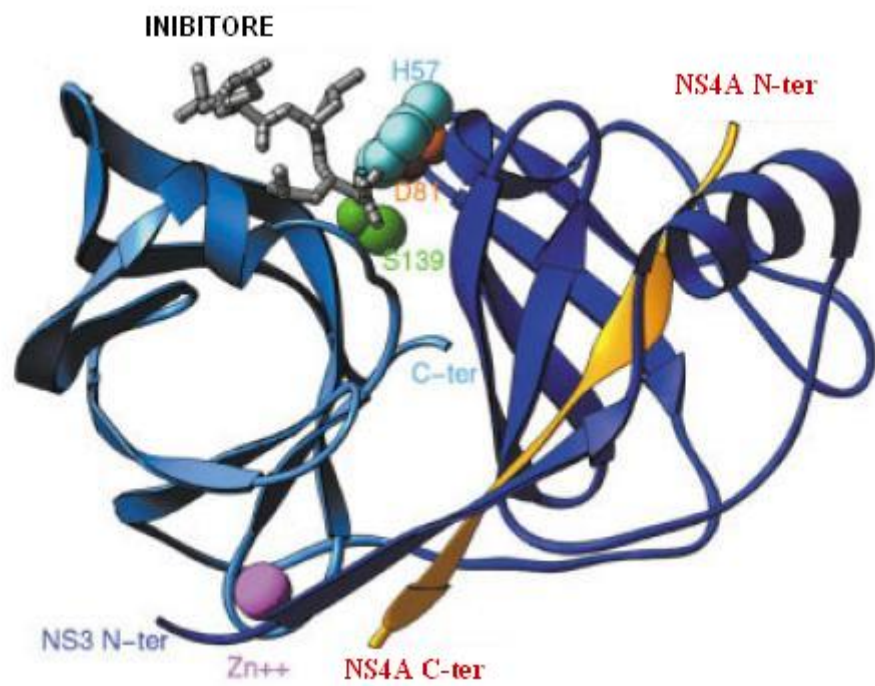


Figura 1.10: Dominio con attività proteasica della proteina NS3 (NS3-SPD). Struttura cristallina del complesso NS3-4A con un inibitore *peptide-like* (FKI) (Penin *et al.* 2004). In figura sono indicati: NS3 (blu), NS4A (giallo), lo ione zinco (viola), l'inibitore (grigio), la triade catalitica S139 (verde), D81 (rosso), H57 (azzurro).

### **1.11 Scopo della tesi**

Nel mio lavoro di tesi mi sono occupato di due aspetti della tunica sporale di *B. subtilis*. In primo luogo mi sono occupato di studiare i meccanismi di base della regolazione genica durante il processo di sporulazione. A tale scopo ho studiato il ruolo del prodotto del gene *gerR* nel regolare l'espressione di geni tardivi della sporulazione. In primo luogo ho caratterizzato il gene individuando i fattori trascrizionali coinvolti nella sua regolazione. Successivamente ho valutato gli effetti del *knock out* del gene sulla sporulazione analizzando il fenotipo delle spore ed il profilo proteico nel ceppo isogenico parentale, nel mutante e nel ceppo revertante. Quindi ho valutato l'effetto di tale mutazione nella regolazione dei geni della sporulazione ed ho individuato putativi geni bersaglio coinvolti nel controllo di tale processo. Quindi è stato possibile ipotizzare un meccanismo di regolazione basato sulla proteina GerR.

L'altro aspetto di cui mi sono occupato è stata l'esposizione sulla superficie delle spore della serina proteasi NS3 del virus dell'epatite C (HCV). Tale scelta era dovuta alle proprietà immunogeniche della proteina NS3, già utilizzata come antigene con vettori adenovirali. Tale parte del mio lavoro di Tesi era



svolto in collaborazione con la ditta Okàiros (CEINGE, Napoli).  
interessata a sviluppare un vaccino anti-HCV.

A tale scopo ho ottenuto dei ceppi di *B. subtilis* che esprimono la proteina NS3 come proteina di fusione con componenti della tunica sporale, ho valutato in quali di questi ceppi la proteina chimerica fosse espressa e assemblata sulla superficie sporale in modo funzionale allo sviluppo di vaccini e le spore ricombinanti sono state utilizzate per l'analisi *in vivo* della capacità di indurre risposta immunitaria.

## ***2.Materiali e Metodi***

## 2.1 Ceppi batterici

I ceppi di *B. subtilis* utilizzati in questo studio sono elencati nella Tabella 2.1. Per gli esperimenti di clonaggio e di sequenziamento è stato utilizzato il ceppo di *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$ *lacU169*  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*) *hsdR17 recA1*) (Sambrook et al., 1989).

Ceppo	Genotipo	Provenienza
PY79	<i>trpC2</i>	Youngman <i>et al.</i> , 1984
GC308	<i>trpC2; gerR::lacZ</i>	in questo lavoro
GC275	<i>trpC2; gerR::lacZ; spoIID::erm</i>	in questo lavoro
GC276	<i>trpC2; gerR::lacZ; spoIVB::erm</i>	in questo lavoro
GC304	<i>trpC2; gerR::neo</i>	in questo lavoro
GC274	<i>trpC2; amyE::gerR</i>	in questo lavoro
GC284	<i>trpC2; amyE::gerR; gerR::neo</i>	in questo lavoro
AZ338	<i>trpC2; SP<math>\beta</math>::cotD-lacZ</i>	disponibile in laboratorio
AZ251	<i>trpC2; SP<math>\beta</math>::cotA-lacZ</i>	disponibile in laboratorio
GC305	<i>trpC2; tgl::lacZ</i>	disponibile in laboratorio
GC280	<i>trpC2; SP<math>\beta</math>::cotD-lacZ; gerR::neo</i>	in questo lavoro
GC285	<i>trpC2; SP<math>\beta</math>::cotA-lacZ; gerR::neo</i>	in questo lavoro
GC306	<i>trpC2; tgl::lacZ; gerR::neo</i>	in questo lavoro
GC317	<i>trpC2; amyE::cotG-gusA</i>	disponibile in laboratorio
GC301	<i>trpC2; cotE::lacZ</i>	disponibile in laboratorio
AZ198	<i>trpC2; SP<math>\beta</math>::cotC-lacZ</i> CAT	disponibile in laboratorio
GC309	<i>trpC2; cotU::lacZ</i>	disponibile in laboratorio
GC318	<i>trpC2; amyE::cotG-gusA; gerR::neo</i>	in questo lavoro
GC302	<i>trpC2; cotE::lacZ; gerR::neo</i>	in questo lavoro
GC264	<i>trpC2; SP<math>\beta</math>::cotC-lacZ</i> CAT; <i>gerR::neo</i>	in questo lavoro
GC310	<i>trpC2; cotU::lacZ; gerR::neo</i>	in questo lavoro
AZ89	<i>trpC2; spoIID::erm</i>	disponibile in laboratorio
GC323	<i>trpC2; gerE::lacZ</i>	in questo lavoro
GC324	<i>trpC2; gerE::lacZ; gerR::neo</i>	in questo lavoro
GC290	<i>trpC2; spoVIF::lacZ</i>	in questo lavoro
GC291	<i>trpC2; spoVIF::lacZ; gerR::neo</i>	in questo lavoro
HC100	<i>trpC2; amyE::cotC-NS3</i> fusione C	in questo lavoro
HC101	<i>trpC2; amyE::cotC-NS3</i> fusione A	in questo lavoro
HC102	<i>trpC2; amyE::cotB-NS3</i> fusione B	in questo lavoro
RH209	<i>trpC2; cotC::spe cotU::neo</i>	disponibile in laboratorio
HC103	<i>trpC2; cotC::spe cotU::neo; amyE::cotC-NS3</i> fusione C	in questo lavoro
HC104	<i>trpC2; cotC::spe cotU::neo; amyE::cotC-NS3</i> fusione A	in questo lavoro

Tabella 2.1: Ceppi di *B. subtilis* utilizzati.

## 2.2 Terreni di coltura

Terreno TY: 0.5% di bacto-yeast extract, 1% di triptone, 0.5% di NaCl in H<sub>2</sub>O distillata. Dove richiesto sono stati aggiunti i seguenti antibiotici: ampicillina (50 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), cloramfenicolo (5 $\mu$ g

$\text{mL}^{-1}$ ), neomicina ( $5\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e spectinomycin ( $50\mu\text{g mL}^{-1}$ ), eritromicina ( $1\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Terreno per l'induzione della sporulazione: Difco sporulation medium (DSM): 1L di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata; 8g di Bacto-nutrient broth (*Difco*); 10mL di KCl 10% (w/v); 10mL di  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2% (w/v); 0.5mL di NaOH 1M; il terreno veniva autoclavato e raffreddato a  $50^\circ\text{C}$  prima di aggiungere le seguenti soluzioni sterili: 1mL di  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1M; 1mL di  $\text{MnCl}_2$  0.01M; 1mL di  $\text{FeSO}_4$  1mM.

Terreni per la preparazione di cellule competenti di *B.subtilis*:  
terreno SpC: 20mL di T-base ( 0.4g di  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3.66g di  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 1.2g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.2g di trisodio citrato  $2\text{H}_2\text{O}$ ) autoclavato e raffreddato a  $50^\circ\text{C}$  prima di aggiungere le seguenti soluzioni sterili: 0.2mL di glucosio 50%; 0.3mL di  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2%; 0.4mL di bacto-yeast extract 10%; 0.5mL di casamminoacidi 1%;

terreno SpII: 20mL di T-base ( 0.4g di  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3.66g di  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 1.2g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.2g di trisodio citrato  $2\text{H}_2\text{O}$ ) autoclavato e raffreddato a  $50^\circ\text{C}$  prima di aggiungere le seguenti soluzioni sterili: 0.2mL di glucosio 50%; 1.4mL di  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1.2%; 0.2mL di bacto-yeast extract 10%; 0.2mL di casamminoacidi 1%; 0.1mL di CaCl<sub>2</sub> 0.1M.

Piastre: ai terreni liquidi venivano aggiunti, prima della sterilizzazione, 20g L<sup>-1</sup> di Bacto-agar (*Oxoid*) quindi autoclavati, raffreddati a 50°C, venivano aggiunti gli opportuni antibiotici alle concentrazioni desiderate, ove necessario venivano aggiunti IPTG (0.5mM) e X-gal (100µg mL<sup>-1</sup> per *B. subtilis*, 80µg mL<sup>-1</sup> per *E. coli*), e versati in capsule Petri sterili.

### **2.3 Preparazione di cellule competenti e trasformazione di *Escherichia coli***

Per rendere competenti all'ingresso di DNA cellule di *Escherichia coli*, una colonia batterica veniva inoculata in 5mL di terreno TY e lasciata crescere a 37°C per 12 ore in agitazione. L'inoculo veniva diluito 1:100 in 30mL di terreno TY e fatto crescere fino alla fase esponenziale (OD<sub>590nm</sub> 0.4-0.6). Le cellule venivano centrifugate a 4000rpm, per 5 min a 4°C, risospese in 15mL di una soluzione 50mM CaCl<sub>2</sub> preraffreddata ed incubate in ghiaccio per 30 min. Dopo centrifugazione le cellule venivano risospese in 2mL di una soluzione contenente glicerolo al 15% e 50mM CaCl<sub>2</sub>, quindi aliquotate e conservate a -80°C.

La trasformazione veniva effettuata aggiungendo a 200 $\mu$ L di cellule competenti, la miscela della reazione di ligasi; il tutto veniva incubato a 4°C per 30 min, poi a 42°C per 3 min, allo scopo di provocare uno shock termico necessario per il passaggio del DNA all'interno della cellula. Quindi venivano aggiunti 800 $\mu$ L di TY ed i batteri venivano incubati a 37°C per 1 ora ed infine piastrati su piastre TY contenenti l'appropriato antibiotico.

#### **2.4 Preparazione di cellule competenti e trasformazione in *B. subtilis***

Una colonia singola veniva strisciata su piastra TY ed incubata a 30°C per 12 ore. Tutte le colonie venivano recuperate, incubate in 20mL di SpC e lasciate crescere a 37°C con agitazione. Dopo 4-5 ore, 2mL di cellule venivano prelevati, inoculati in 20mL di SpII e lasciati a 37°C con agitazione molto lenta per 1.5 ore. La coltura veniva quindi centrifugata a 5000 rpm per 5 min a temperatura ambiente, il pellet veniva risospeso in 1.8mL di sopranatante precedentemente recuperato e 0.2mL di glicerolo al 100%. Le cellule venivano quindi aliquotate e conservate a -80°C.

Per la trasformazione, ad un'aliquota di cellule competenti, rapidamente scongelata a 37°C, veniva aggiunto un uguale volume di SpII contenente EGTA (acido etilenglicoltetraacetico)

nel rapporto di 50 a 1. I batteri venivano quindi incubati a 37°C con agitazione per 40 minuti e piastrati su TY contenente l'opportuno antibiotico.

### **2.5 Purificazione del DNA plasmidico su larga scala**

Una singola colonia batterica veniva inoculata in 50mL di TY, contenente 50µg mL<sup>-1</sup> di ampicillina e veniva fatta crescere una notte a 37°C. Le cellule venivano raccolte mediante centrifugazione a 6000 rpm, per 5 min a 4°C e risospese in 1mL di un tampone contenente: 25mM Tris/HCl; 10mM EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) pH 8; 50mM Glucosio. Dopo 5 min di incubazione a temperatura ambiente, venivano aggiunti 2mL di tampone di lisi (0.2M NaOH; 1% Sodiodecilsolfato (SDS)) e la miscela veniva incubata per 5 min in ghiaccio. Venivano quindi aggiunti 1.5mL di una soluzione di 3M acetato di sodio, pH 5.2 e ripetuta l'incubazione per 5 minuti in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 7000 rpm, per 10 minuti a 4°C il soprannatante veniva recuperato, estratto con fenolo saturato con 0.1M Tris pH 8.0 e precipitato per aggiunta di 2.5-3 volumi di etanolo. Il DNA plasmidico veniva raccolto mediante centrifugazione a 7000 rpm, per 10 minuti a 4°C, lavato con 5mL di etanolo 70%, per

rimuovere eventuali sali precipitati, e risospeso in 0.5mL di TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0 ed EDTA 0.1mM pH 8.0).

La purificazione di DNA plasmidico mediante cromatografia veniva effettuata con i kit DNA MINI-PREP e DNA MIDI-PREP (*QUIAGEN*), seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

## **2.6 Digestione enzimatica**

Il DNA plasmidico, ottenuto col protocollo sopra citato, veniva digerito con enzimi di restrizione in un volume finale di 20 $\mu$ L, in presenza del tampone consigliato dalla casa fornitrice.

## **2.7 Elettroforesi su gel di agarosio**

Gel di agarosio: 1g agarosio (Molecular Biology Certified Agarose, *BIO-RAD*) in 100mL TAE 1X (materiali e metodi 2.15) supplementato con 1 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> di bromuro di etidio.

Metodo: i campioni, a cui veniva aggiunto 1/10 del volume di una soluzione di caricamento (0.5% blu di bromofenolo; 30% glicerolo in acqua), venivano caricati su gel e fatti migrare a 100Volts per 45 min. Accanto ai campioni veniva fatto migrare uno *standard* di peso molecolare costituito dal DNA del batteriofago  $\lambda$  preventivamente digerito con l'enzima *Bst*II.



## **2.8 Eluizione del DNA da gel di agarosio**

I frammenti di DNA venivano eluiti da gel d'agarosio utilizzando il protocollo per eluizione QIAquick Gel Extraction Kit (*QIAGEN*). In corrispondenza delle bande di DNA d'interesse il gel veniva tagliato in pezzetti minuti e questi posti in tubi da 1.5mL. L'agarosio veniva disciolto aggiungendo 3 volumi di tampone QG (*QIAGEN*) e incubando a 50°C per 10 min. La soluzione veniva poi caricata su una resina capace di legare il DNA, mentre la soluzione acquosa veniva eliminata dopo centrifugazione a 13000 rpm, per 1 min. Il DNA veniva, infine, eluito con 30µL di TE.

## **2.9 Reazione di ligasi**

Il frammento di DNA (inserto) veniva unito al DNA vettore in un rapporto molare di 5:1 ed incubato in presenza di 3 unità di enzima T4 DNA ligasi (*Gibco*) e del tampone di reazione 5X fornito dalla casa fornitrice (*Gibco*) in un volume finale di 10-15µL per 12 ore a 16°C.

## **2.10 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Frammenti di DNA venivano amplificati per *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, utilizzando DNA cromosomale o plasmidico come stampo.

Gli oligonucleotidi sintetici elencati in Tab.2.2 (sintetizzati dalla GIBCO BRL Custom Primers), venivano utilizzati come innesco.

Nella miscela di reazione erano presenti: oligonucleotidi (5 $\mu$ M), dNTP (0.2mM), MgCl<sub>2</sub> (1.5mM), PCR buffer (GIBCO) e Taq DNA polimerasi (GIBCO, 5U), DNA stampo (20ng).

Il programma di PCR eseguito prevedeva un primo ciclo di denaturazione (5 minuti a 95°C), 30 cicli di denaturazione (1 minuto a 95°C), annealing (1 minuto a 48-52°C, in base alla percentuale in C/G degli oligonucleotidi) e allungamento (1 minuto a 72°C) più 5 minuti a 72°C per la terminazione delle catene. I prodotti della reazione venivano poi visualizzati su gel di agarosio. In caso di PCR colony, le colonie selezionate su piastra venivano risospese in 30 $\mu$ L di brodo di coltura e 2 $\mu$ L erano utilizzati come stampo.

Oligonucleotide	Sequenza (5'→3') <sup>a</sup>	Posizione di annealing <sup>b</sup>
gerR2-senso	GGATCCgaagaaaagatt	-293/-275
BO-anti-Pst	CTGCAGtgaagctatgt	+82/+99
gerR-P.E.	ctgagccaagcatcttg	+16/+33
gerRsenso	agccttgaggaggatgg	+99/+116
gerRanti	catgatatcgatcagtcc	+495/+513
SP6	cattttaggtgacactatag	
T7	taatacgaactactataggg	
YlbOH3-anti	AAGCTTcgggttcatttcagg	+588/+604
gerRcoding	ttgaccattacaagacaaga	+1/+20
gerE-up-senso	gagtgaaaacaaacagacc	-379/-360
gerE-anti-BamHI	GGATCCtaacctcctgcatagg	-24/-6
lacZ2anti	ggcaaagcgccattcg	+171/+186
spoVIF-senso	atgagattgaagagctgg	-571/-553
spoVIF-anti-BamHI	GGATCCggcaagattcattacatcc	+53/+72
AmyA	cgagaagctatcaccgcccagc	+2128/+2150
AmyS	ccaatgaggttaagagtattcc	+569/+590
CotC-HindIII senso	accAAGCTTttaggataaatcgttg	-179/-161
CotC-EcoRV anti	GATATCgtagtgTTTTTatgctt	+181/+201
CotB-HindIII senso	AAGCTTaccgattaggccgTTTg	-263/-245
CotB-EcoRV anti	GATATCggatgattgatcatctgaag	+806/+825
NS5-EcoRV senso	GATATCcatggcgccatcacgg	+1/+16
NS3-EcoRI/SpeI anti	ACTAGTGAATTCttaagtgcgacctccag	+1896/+1882
NS5-NotI senso	GCGGCCGCgcccattcacggcctac	+4/+21
NS3-NotI anti	GCGGCCGCTagtgacctccaggtcag	+1896/+1877

Tabella 2.2: Oligonucleotidi sintetici utilizzati.

<sup>a</sup>Le lettere maiuscole indicano le basi dei siti di restrizione; le lettere minuscole indicano le basi complementari ai geni codificanti per GerR, AmyE, CotB, CotC o NS3.

<sup>b</sup>Le posizioni di annealing si riferiscono alle sequenze di GerR, GerE, AmyE, CotC, CotB o NS3 con la prima base corrispondente all'inizio della traduzione indicata come + 1, per SpoVIF l'inizio della traduzione è quello indicato da Kuwana in Kuwana *et al.* 2003.

### **2.11 Preparazione di DNA cromosomale**

Una colonia singola di *B. subtilis* veniva cresciuta in 25mL di terreno TY a 37°C per 15-18 ore. La coltura batterica veniva centrifugata per 10 minuti a 5000 rpm a 4 °C e le cellule risospese in 4mL di 50mM EDTA, 100mM NaCl, 1mg lisozima ed incubata 10 min a 37°C. Dopo aggiunta di 0.3mL di 20% sarkosyl l'incubazione a 37°C veniva continuata per altri 5 min e la sospensione cellulare estratta due volte con fenolo saturato con cloroformio. Il DNA cromosomale veniva quindi precipitato con due volumi di etanolo e raccolto per centrifugazione di 10 min a 10000 rpm a 4 °C.

### **2.12 Induzione della sporulazione in *B. subtilis* e purificazione delle spore.**

La sporulazione veniva indotta per esaurimento dei substrati di crescita (Harwood and Cutting, 1990). Una colonia singola di *Bacillus subtilis* veniva inoculata in 2.5mL di TY e incubata per 5-6 ore in condizione di forte agitazione; 0.5mL di tale inoculo veniva trasferito in 200mL di DSM ed incubato a 37°C con forte agitazione. L'aumento della densità cellulare veniva seguito mediante letture spettrofotometriche effettuate a 590nm e la crescita cellulare registrata, tracciando una curva di crescita su

carta semilogaritmica. La fine della fase esponenziale viene considerata per convenzione come l'inizio del processo di sporulazione e viene indicata come  $T_0$ . Negli esperimenti di *time course* venivano prelevate aliquote a distanza di 1 ora.

### 2.12.1 Purificazione delle spore mature

Per ottenere le spore mature, dopo 36 ore di crescita la coltura veniva centrifugata a 10000 rpm (Bekman J2-HS) a 4°C per 10 min, risospesa in H<sub>2</sub>O e lasciata a 4°C per due giorni. Poi veniva sottoposta a due cicli di lavaggio con: i) 50mL di una soluzione contenente 1M KCl-0.5M NaCl; ii) 50 mL di 50mM Tris, pH 7.2. Dopo incubazione di 30 min a 37°C con lisozima (50µg mL<sup>-1</sup>) per eliminare le cellule vegetative eventualmente rimaste, le spore venivano raccolte e sottoposte ad una serie di lavaggi con: i) 1M NaCl; ii) H<sub>2</sub>O deionizzata; iii) 0.05% SDS; iv) TEP (50mM Tris, pH 7.2; 10mM EDTA; 2mM fenilmetilsulfonilfluorato(PMSF)); v) H<sub>2</sub>O deionizzata. Le spore venivano aliquotate e risospese in 0.5mL di H<sub>2</sub>O deionizzata e conservate a -20°C o 4°C a seconda dell'utilizzo. In alternativa le spore dei ceppi HC102 e HC104 (Tab. 2.1) destinate agli esperimenti *in vivo* erano preparate allo stesso modo eliminando il lavaggio in TEP poiché il PMSF è nocivo per i topi.

### **2.13 Misura dell'attività $\beta$ -galattosidasi**

Dopo induzione della sporulazione, come descritto nel paragrafo 2.12, campioni da 1mL sono stati prelevati ad ogni ora dal T<sub>0</sub> fino al T<sub>8</sub>, centrifugati a 13000 rpm e i pellet conservati a -80°C. Per misurare l'attività  $\beta$ -galattosidasi è stato utilizzato il metodo Miller (Miller, 1972). Ai pellet scongelati è stato aggiunto 1mL di una soluzione di Z-Buffer (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 50mM  $\beta$ -mercaptoetanol) e 10 $\mu$ L di toluene per permeabilizzare le cellule. Dopo pre-incubazione a 30°C per 15 min, ai campioni sono stati aggiunti 0.2mL di una soluzione (0.4% in Z-Buffer) di substrato ONPG (o-nitrofenol- $\beta$ -D-galattopiranoside) ed è stata seguita la comparsa del colore giallo per un massimo di 60 minuti. La reazione è stata arrestata aggiungendo 500 $\mu$ L di una soluzione 1M di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, registrando i minuti trascorsi dall'aggiunta del substrato.

I campioni sono stati centrifugati e sono state effettuate letture di assorbanza a 420nm dei sopranatanti recuperati. L'attività specifica  $\beta$ -galattosidasi è stata espressa in unità Miller, calcolate secondo la formula:

$$\frac{A_{420}}{\text{tempo} - \text{di} - \text{reazione} \times OD_{590}} \times 1000$$

## **2.14 Primer extension**

### **2.14.1 Estrazione degli mRNA**

Le cellule erano prelevate a 2 e 3 ore dopo l'inizio della sporulazione e la purificazione degli mRNA veniva effettuata con il kit RNeasy Mini (*QUIAGEN*), seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

### **2.14.2 Marcatura terminale dell'oligonucleotide**

Utilizzando GTP marcato in posizione  $\gamma$  con l'isotopo radioattivo  $^{32}\text{P}$ , è possibile, con l'enzima polinucleotide chinasi, trasferire il  $^{32}\text{P}$  all'estremità 5' dell'oligonucleotide e renderlo così identificabile con un'autoradiografia. La reazione consisteva nell'aggiungere a 2 $\mu\text{L}$  di oligonucleotide (20ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 10 $\mu\text{L}$  di ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )GTP (10mCi  $\text{mL}^{-1}$ ), 1 $\mu\text{L}$  di polinucleotide chinasi (10 u  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e 3 $\mu\text{L}$  di tampone 10X (Tris 0.5M pH 7.5,  $\text{MgCl}_2$  0.1M, ditiotreitolo (DTT) 50mM, BSA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), portando ad un volume finale di 30 $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata. Si incubava a 37°C per 30 min e per eliminare il radioattivo in eccesso usavo il kit Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns (*GE Healthcare*) seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

### **2.14.3 Primer extension**

Questa tecnica è stata utilizzata per localizzare l'estremità 5' di un particolare trascritto in una miscela di molecole di RNA,

utilizzando oligonucleotidi marcati con ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) ATP all'estremità 5' e complementari alla sequenza dell'mRNA che si vuole identificare. Consentendo l'appaiamento dell'oligonucleotide con il trascritto, e utilizzando la trascrittasi inversa (una DNA polimerasi RNA-dipendente), si ottiene la sintesi di un filamento di DNA complementare al trascritto in questione e marcato radioattivamente. Questo tipo di analisi è stata fatta utilizzando l'oligonucleotide gerR-P.E. (Tab. 2.2) complementare alla regione +16/+33, codificante per gerR.

L'esperimento consisteva nel precipitare 25 $\mu\text{g}$  di RNA con 1pmole di oligonucleotide marcato con l'isotopo radioattivo  $^{32}\text{P}$ . Si risospendeva in 6.9 $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  e dopo 10 min a 70°C i campioni venivano incubati 30 min a 37°C, per consentire l'appaiamento dell'oligonucleotide con il trascritto complementare. La reazione di polimerizzazione si effettuava in un volume finale di 10 $\mu\text{L}$  aggiungendo 1 $\mu\text{L}$  di tampone 10X della trascrittasi inversa (Tris 500mM pH 8.3, DTT 100mM,  $\text{MgCl}_2$  60mM e NaCl 1M) 0.8 $\mu\text{L}$  di dNTP 25mM (concentrazione finale 2mM) 0.3 $\mu\text{L}$  di RNasina (inibitore dell'RNasi) ed 1 $\mu\text{L}$  di trascrittasi inversa. Si incubava a 48°C per 1 ora e si arrestava la reazione aggiungendo 5 $\mu\text{L}$  di soluzione di stop (95% formammide, 0.005% blu di bromofenolo, 0.05% xilene cianolo, 10mM EDTA). Il punto di inizio della



trascrizione veniva identificato confrontando su gel di acrilamide al 6% la sequenza nucleotidica ed il prodotto della reazione di *primer extension* ottenute usando lo stesso oligonucleotide come innesco.

#### **2.14.4 Preparazione del DNA e reazioni di sequenza**

Ad un'aliquota di 50 $\mu$ L di DNA, preparato come descritto al paragrafo 2.5, venivano aggiunti 40 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> di RNasi A e 40 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> di RNasi T1. Dopo incubazione di 30 minuti a 37°C, il DNA veniva precipitato con 30 $\mu$ L di 20% PEG<sub>6000</sub>/2.5M NaCl, recuperato per centrifugazione, lavato con etanolo 70% e risospeso in 18 $\mu$ L di H<sub>2</sub>O. Il DNA veniva poi denaturato con 2 $\mu$ L di NaOH 2N per 5 minuti a temperatura ambiente e ri-precipitato con 2 $\mu$ L di NH<sub>4</sub>Ac 5M e 50 $\mu$ L di etanolo. Dopo centrifugazione e lavaggi in etanolo 70% il DNA veniva risospeso in 6 $\mu$ L di H<sub>2</sub>O bidistillata cui venivano aggiunti 2 $\mu$ L del primer (120ng) e 2 $\mu$ L di tampone 5X (Tris-HCl pH 7.5 200mM, MgCl<sub>2</sub> 100mM e NaCl 250mM). La miscela veniva incubata per 30 minuti a 37°C e ad essa venivano aggiunti 2 $\mu$ L di dGTP mix, 1 $\mu$ L di DTT 0.1M, 1 $\mu$ L di <sup>35</sup>S-dATP e 2 $\mu$ L di T7 DNA polimerasi (*sequenase version 2.0 USB*). Prima dell'uso il dGTP mix, composto da dGTP 7.5mM, dCTP 7.5mM e dTTP 7.5mM, veniva diluito 5 volte in H<sub>2</sub>O e

l'enzima DNA polimerasi ( $13 \text{ U mL}^{-1}$ ) veniva diluito 8 volte nel tampone di diluizione (Tris-HCl 10mM pH 7.5, DTT 5mM e BSA  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la miscela di reazione veniva divisa in 4 campioni di  $3.5 \mu\text{L}$  ciascuno, ed ognuno di essi era incubato a  $37^\circ\text{C}$  con  $2.5 \mu\text{L}$  di uno dei quattro ddNTP. La reazione veniva arrestata con  $4 \mu\text{L}$  di una soluzione composta da formammide 95%, bromofenolo 0.05%, xilene cianolo 0.05% e EDTA 10mM.

#### **2.14.5 Elettroforesi di DNA su gel di acrilammide**

Gel di poliacrilammide-urea al 6% (8M urea): 45mL di poliacrilammide 40%, 30mL di TBE 10X, 126g di urea,  $\text{H}_2\text{O}$  fino a 300mL.

Metodo: i campioni venivano riscaldati a  $95^\circ\text{C}$  per 3 minuti e caricati su gel. Dopo opportuna migrazione, il gel veniva seccato a  $80^\circ\text{C}$  sotto vuoto per 2 ore ed esposto con lastre autoradiografiche FUJI RX a temperatura ambiente per un tempo variabile, generalmente 12-18 ore.

#### **2.15 Tamponi di corsa per elettroforesi**

Tampone di corsa per elettroforesi di DNA su gel di poliacrilammide (TBE 10X): 0.89M di Tris-HCl (pH 8), 0.89M di acido borico e 0.02M di EDTA.

Tampone di corsa per elettroforesi su gel di agarosio (TAE 10X):  
0.89M Tris-HCl (pH 8), 0.89M di acido acetico e 0.02M di EDTA.

Tampone di corsa per elettroforesi di proteine SDS-PAGE (5X):  
15.1g di Tris base; 94g di glicina, pH 8.3; 50mL di 10% SDS; acqua bidistillata fino a 1L.

## **2.16 Estrazione delle proteine del rivestimento sporale**

Il numero delle spore purificate ottenuto veniva determinato per conta di diluizioni seriali con la camera di Burker al microscopio ottico (Olympus BH-2 con lenti 40x).

### **2.16.1 Estrazione con SDS**

Un'aliquota di spore è stata centrifugata a 7000 rpm per 5 minuti, risospesa in 33 $\mu$ L di una soluzione di estrazione contenente 50mM Tris HCl pH 6.8, 1% SDS, 50mM DTT e incubata per 60 minuti a 65°C con agitazione, per solubilizzare le proteine della tunica sporale. La miscela è stata centrifugata a 13000 rpm per 10 minuti e il sopranatante, contenente le proteine, è stato raccolto e conservato a -20°C.

### **2.16.2 Estrazione alcalina**

Un'aliquota ( $>1 \times 10^{10}$  spore mL<sup>-1</sup>) di spore veniva centrifugata a 12000g per 10 min a 4°C, risospesa in 100 $\mu$ L di una soluzione di

NaOH 0.1M e incubata per 30 min a 4°C per solubilizzare le proteine della tunica sporale. La miscela veniva centrifugata a 12000g per 10 min in ghiaccio e il sopranatante, contenente le proteine, veniva raccolto e conservato a -20°C.

Indipendentemente dal tipo di estrazione, per l'analisi SDS-PAGE è stata determinata la concentrazione proteica del sopranatante ed è stato aggiunto il Sample Buffer (1X: SDS 2%, glicerolo 10%,  $\beta$ -mercaptoetanolo 5%, Tris 440mM pH6.8, Blu-dibromofenolo 0.1%), i campioni sono stati denaturati mediante bollitura a 100°C per 3 min.

### **2.17 Determinazione della concentrazione proteica**

La concentrazione delle proteine estratte veniva determinata mediante saggio colorimetrico (saggio *Bradford*). All'estratto proteico, portato ad un volume di 800 $\mu$ L con H<sub>2</sub>O deionizzata, venivano aggiunti 200 $\mu$ L di BIO-RAD *protein assay* (BIO-RAD) ed il colore sviluppato misurato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 595nm. La concentrazione della proteina veniva ricavata riportando i valori ottenuti su una retta di taratura, costruita utilizzando una soluzione di BSA (sieroalbumina bovina) di concentrazione nota. La concentrazione proteica di ogni singolo

campione era data dalla media delle misurazioni di tre diversi volumi di estratto proteico.

### **2.18 Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)**

Stacking Gel al 5% di poliacrilammide (*upper gel*): 0.83mL di 30% acrilammide-bisacrilammide (29:1 oppure 37.5:1); 0.63mL 1M Tris/HCl, pH 6.8; 50 $\mu$ L di 10% SDS; 50 $\mu$ L di 10% persolfato di ammonio (APS); 5 $\mu$ L di TEMED; acqua deionizzata fino a 5mL.

**GerR (paragrafi 3.1.2.2, e 3.1.4):** Resolving Gel al 12,5% di poliacrilammide (*lower gel*): 4.167mL di 30% acrilammide-bisacrilammide (29:1); 2.5mL di 1.5M Tris-HCl, pH 8.8; 100 $\mu$ L di 10% SDS; 100 $\mu$ L di 10% di ammonio per solfato; 4 $\mu$ L di TEMED; acqua deionizzata fino a 10mL.

**CotC-NS3/CotB-NS3 (paragrafo 3.2.2):** Resolving Gel al 7% di poliacrilammide (*lower gel*) 2.333mL di 30% acrilammide-bisacrilammide (37.5:1); 1.3mL di 1.5M Tris/HCl, pH 8.8; 100 $\mu$ L di 10% SDS; 100 $\mu$ L di 10% di ammonio per solfato; 5 $\mu$ L di TEMED; acqua fino a 10mL.

Gli esperimenti per SDS-PAGE sono stati effettuati utilizzando l'apparecchio Protean II (*BIO-RAD*). È stato usato un marcatore di

peso molecolare, LMW electrophoresis calibration (Pharmacia-Biotech).

### **2.19 Colorazione di gel di poliacrilammide con Comassie**

Il gel veniva fissato e colorato mediante immersione nella soluzione colorante (625mM comassie brilliant-blue; 50% metanolo; 10% acido acetico) per 30 min, quindi decolorato con la soluzione (50% metanolo-10% acido acetico). Il gel veniva poi lasciato 1 ora nella soluzione decolorante a cui veniva aggiunto glicerolo al 10% ed infine seccato a 80°C sotto vuoto per 2 ore.

### **2.20 Misura della resistenza al lisozima e al calore**

Durante la sporulazione di una coltura di *B.subtilis* in terreno minimo DSM sono state prelevate aliquote di cellule (1mL).

Un' aliquota è stata diluita in serie di un fattore 10 in una soluzione di potassio fosfato (10mM, pH 7.4) ed aliquote di 0.1mL delle diluizioni piastrate su terreno TY, quindi incubate per 18 ore a 37°C per una conta di cellule totali. Altre 2 aliquote sono state recuperate per i saggi di resistenza al calore e al lisozima. Per il saggio di resistenza delle spore al calore una aliquota di cellule (1mL) è stata incubata per 10 minuti a 80°C e aliquote di 0.1mL delle diluizioni piastrate su TY per 18 ore a 37°C, per determinare

quindi la proporzione di cellule sopravvissute mediante conta delle colonie. Per il saggio di resistenza delle spore al lisozima, ad una aliquota di cellule (1mL) sono stati aggiunti 250 $\mu$ g di lisozima, quindi incubata per 10 minuti a 37°C. Come descritto sopra, sono state effettuate diluizioni seriali delle cellule trattate in una soluzione di potassio fosfato ed infine aliquote di 0.1mL sono state piastrate su terreno TY per 18 ore a 37°C, è stata poi effettuata una conta delle cellule sopravvissute.

### **2.21 Misura dell'efficienza di germinazione**

Spore purificate come descritto nel paragrafo 2.15 sono state trattate per 20 minuti a 80°C per attivare la germinazione, quindi diluite in 15mL di Tris HCl 10mM (pH 8) contenente 1mM fruttosio, 1mM glucosio e 10mM KCl (sol. FGK). La germinazione è stata indotta dall'aggiunta di 10mM L-alanina (o 10mM L-asparagina) e le variazioni di assorbanza a 580nm seguite ad intervalli di 5 minuti fino al raggiungimento di valori costanti.

L'efficienza di germinazione è stata riportata come valore percentuale della diminuzione di assorbanza secondo la seguente formula (Harwood and Cutting, 1990):

$$\% \text{ diminuzione di OD a } T_1 = \frac{\text{OD a } T_1}{\text{OD a } T_0} \times 100$$

## 2.22 *Over*-espressione e purificazione della proteina GerR

### 2.22.1 Clonaggio nel vettore di espressione

Per l'espressione della proteina GerR è stato utilizzato il vettore pRSET A, un vettore di espressione di 2900 bp che deriva dal vettore pUC e permette un'alta espressione proteica grazie alla presenza del promotore T7 per la RNA polimerasi del fago T7. Il frammento è inserito a livello di un sito di clonaggio multiplo contenente siti unici di restrizione per il clonaggio del gene di interesse in modo che questo si posizioni in frame e a valle di una sequenza che codifica per un peptide di fusione. Tale sequenza presenta il codone d'inizio della traduzione ATG, una coda di istidine, l'epitopo X<sup>TM</sup> PRESS e il sito di riconoscimento per l'enterochinasi. Il vettore contiene inoltre la resistenza all'antibiotico ampicillina. L'attività del promotore T7 richiede l'espressione della polimerasi del fago T7 ottenuta mediante l'induzione con isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG).

I vettori pRSET normalmente vengono introdotti in opportuni ceppi di *E.coli*, come il ceppo C43(DE3) (derivante dal ceppo di



BL21(DE3) [*E. coli* *F* *ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3)]), nel cui cromosoma è inserito un gene codificante la RNA polimerasi T7 sotto il controllo trascrizionale di un promotore inducibile *lacUV5* e che si differenzia per la presenza di una mutazione non caratterizzata che previene dalla morte cellulare associata all'espressione di proteine ricombinanti tossiche (Miroux and Walker, 1996). In questo ceppo non è presente alcuna resistenza antibiotica o plasmide. La sequenza codificante per la proteina GerR era amplificata per *PCR* con gli ologonucleotidi sintetici gerRcoding e YlboH3-anti (Tab. 2.2), clonata in tale vettore utilizzando i siti di restrizione *NcoI* e *HindIII* e si otteneva il plasmide pRSET A-gerRcoding che veniva utilizzato per l'*over*-espressione in C43(DE3).

### **2.22.2 Over-espressione della proteina ricombinante**

Cellule di *E.coli* C43(DE3) trasformate con il vettore di espressione pRSET A-gerRcoding sono state cresciute in 30mL di TY con ampicillina (50µg mL<sup>-1</sup>). Dopo incubazione a 37°C *over night*, le cellule sono state diluite (1:100) in 3L di TY contenente ampicillina, incubate a 37°C su piastra agitante fino al raggiungimento di valori di assorbanza pari a 0.4 OD<sub>600nm</sub> ed infine indotte con 0.2mM di isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) per 2 ore. Dopo le 2 ore d'incubazione a 37°C le cellule

venivano poi centrifugate a 5000g, per 10 min a 4°C ed il *pellet* conservato a -80°C per poi essere utilizzato per l'estrazione delle proteine.

### 2.22.3 Purificazione GerR-6His

Soluzione A (10X): Urea 480.04g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14.20g; Tris-HCl 1.2g; pH 8.0; per 100mL; soluzione B (10X): Urea 480.04g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14.20g; Tris-HCl 1.2g; pH 6.3; per 100mL; soluzione C (10X): Urea 480.04g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14.20g; Tris-HCl 1.2g; pH 4.5; per 100mL.

Le cellule venivano lisate in 300mL di soluzione A 1X ed incubate per 60 min in agitazione a temperatura ambiente. Il sopranatante, contenente l'estratto proteico, ottenuto dopo centrifugazione a 10000g per 10 min, veniva suddiviso in aliquote da 15mL ed ognuna era caricata su una colonna cromatografica HisTrap FF crude da 1mL (Ni Sepharose 6 Fast Flow *GE Healthcare*), precedentemente equilibrata flussando 4mL di soluzione A 1X. La colonnina veniva lavata 16mL di soluzione B 1X. Successivamente le proteina legate alla colonnina venivano eluite con 9mL della soluzione C 1X.

Le frazioni erano raccolte e controllate mediante SDS-PAGE (Materiali e Metodi 2.18).

### **2.23 Determinazione della concentrazione della proteina purificata**

Per determinare la concentrazione della proteina purificata, univole eluizioni in soluzione C, in cui si trovava la proteina d'interesse, delle diverse purificazioni e analizzavo per SDS-PAGE 3 volumi della proteina a concentrazione ignota (5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 20 $\mu$ L) e 4 concentrazioni di BSA (2.5 $\mu$ g, 5 $\mu$ g e 10  $\mu$ g).

Il gel veniva colorato come descritto in Materiali e Metodi 2.19 e acquisito con il trans-illuminatore (Universal Hood II *BIO-RAD*), la determinazione della concentrazione proteica veniva effettuata con il *software* Quantity One Versione 4.6.1 (*BIO-RAD*).

### **2.24 Produzione di anticorpi policlonali contro GerR**

La proteina purificata come descritto nel paragrafo precedente veniva suddivisa in 6 aliquote da 200 $\mu$ g e 6 aliquote da 150 $\mu$ g ciascuna. Queste venivano caricate su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), il gel era colorato con blu di comassie (Materiali e Metodi 2.19) e le bande venivano tagliate dal gel ed inviate in PBS in ghiaccio secco alla ditta PRIMM srl (Treviso, Italia) per la produzione di anticorpi policlonali in coniglio.

### **2.25 Lisi delle cellule in sporulazione mediante sonicazione**

Le cellule batteriche raccolte, in aliquote da 10mL, ad intervalli di 1 ora dall'inizio della sporulazione (T0) fino ad 8 ore dopo (T8), venivano lavate 2 volte in 5mL di tampone contenente 50mM Tris, pH 7.6; 1mM DTT; 0.1mM PMSF; 10% Glicerolo, risospese in 500 $\mu$ L di tale tampone e sottoposte a lisi mediante un trattamento con ultrasuoni a 14000Hz di frequenza; venivano effettuati 60 cicli di sonicazione ognuno della durata di 15 sec, intervallati da pause di 5 sec (Sonicator XL2020 *Misonix Incorporated*). Il procedimento veniva effettuato mantenendo la sospensione batterica in ghiaccio, per ridurre l'innalzamento della temperatura che si verifica durante la sonicazione. Il lisato cellulare così ottenuto veniva centrifugato a 13000rpm per 20 min a 4°C, per allontanare le spore in formazione (*pellet*) e residui cellulari. Il sopranatante, contenente le proteine solubili, veniva recuperato e conservato a -80°C.

### **2.26 Elettrotrasferimento di proteine e *Western blot***

Il gel di poliacrilammide veniva trasferito su una membrana Immobilon-Ny+ (*Millipore*), utilizzando l'apparecchio *trans-blott-cell* (*BIO-RAD*). Il trasferimento veniva eseguito a 420mA (31Volts) per 30 minuti utilizzando come tampone per

elettrotrasferimento: 10X TRIS-glicina (250mM TRIS pH 8.3 e 1.92M glicina), metanolo 100%.

Per verificare l'esito dell'elettrotrasferimento, la membrana veniva colorata con una soluzione di Ponceau S (*Sigma*) e quindi decolorata con acqua bidistillata fino alla completa scomparsa del colore rosso. La membrana veniva poi incubata in 100mL di soluzione di saturazione costituita da 1X PBS (10X PBS (*Phosphate buffered saline*), pH 7.2: 80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O; 100mM NaCl); 0.1% Tween 20; 8g di dry milk) per 16-18 ore a 4°C. Dopo lavaggi con 0.1X PBS e 0.1% Tween 20 (*Sigma*), la membrana veniva incubata con l'anticorpo primario policlonale anti-NS3 (Okàiros, CEINGE, Napoli, Italia) diluito 1:200 a 4°C con agitazione *over week-end* oppure con l'anticorpo primario policlonale anti-GerR (Primm srl, Treviso, Italia) diluito 1:5000 a temperatura ambiente per 4 ore con agitazione, nuovamente lavata con la soluzione PBS-Tween 20 ed incubata con l'anticorpo secondario (*anti-mouse* coniugato con la perossidasi, Okàiros oppure *anti-rabbit* coniugato con perossidasi, *Sigma*) a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo ulteriori lavaggi con PBS-Tween 20 venivano visualizzate le proteine riconosciute dall'anticorpo con il metodo ECL (*Amersham*), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice.

## 2.27 Microscopia e Immunofluorescenza.

La microscopia a immunofluorescenza veniva effettuata secondo un protocollo riportato in letteratura (Harry *et al.*, 1995; Pogliano *et al.*, 1995) apportando le seguenti modifiche: i) un'aliquota di 1mL di cellule in sporulazione venivano fissate direttamente nel terreno di coltura con una concentrazione finale di 80% (w/v) di metanolo per 1 ora a temperatura ambiente prima della permeabilizzazione con lisozima; ii) le cellule fissate venivano marcate con una soluzione al 2% di dry milk-PBS contenente l'anticorpo di *rabbit* anti-CotC ed anti-CotB diluiti 1:100 *overnight* a 4°C, lavate 3 volte e poi incubate con un anticorpo anti-*rabbit* (IgG-FITC, *Sigma*) diluito 1:100 per 1 ora a 37°C e al buio; iii) dopo 10 lavaggi, i vetrini venivano montati sotto le lenti del microscopio e quindi osservati.

La microscopia e l'immunofluorescenza venivano effettuate con un microscopio Olympus BX51, con obiettivo 100x UPlanF1 e filtri U-WIBA (filtri di eccitazione tra 460-490nm, filtri-barriera tra 515-550nm). I tempi di esposizione erano compresi nell'intervallo tra 500 e 1000ms. Le immagini venivano catturate con il *software* analySIS (SIS).

### ***3. Risultati e Discussione***

Come accennato nell'introduzione, durante il mio Dottorato di ricerca mi sono occupato di due progetti basati sullo studio delle spore di *B. subtilis*.

Mi sono interessato sia di meccanismi di regolazione dell'espressione genica durante il processo di sporulazione, sia, in campo applicativo, dell'utilizzo delle spore come vettore di vaccinazione mucosale.

Per una questione di ordine nell'esposizione dei risultati e nella loro discussione, questi saranno presentati separatamente.

Per prima cosa presenterò i risultati ottenuti dallo studio del gene *gerR* ed il ruolo che il suo prodotto ha nel controllo dell'espressione genica durante il processo di sporulazione.

Poi descriverò i risultati ottenuti nell'utilizzare proteine del rivestimento sporale come *partner* di fusione per la presentazione di epitopi virali sulla superficie delle spore.



### **3.1 Controllo dell'espressione genica durante la sporulazione: caratterizzazione del gene *gerR***

#### **3.1.1 Il gene *gerR* è sotto il controllo di $\sigma^E$ e SpoIID**

Studi precedenti hanno indicato che il prodotto del gene *gerR* è un fattore trascrizionale che regola negativamente 14 geni trascritti dall'RNA polimerasi contenente il fattore  $\sigma^E$  (Eichenberger *et al.*, 2004) e positivamente alcuni geni tardivi della sporulazione, i geni *cot*, trascritti dall'RNA polimerasi contenente il fattore  $\sigma^K$  (Kuwana *et al.*, 2005).

Inoltre, esperimenti di microarray effettuati con un ceppo di *B. subtilis*, hanno indicato che la trascrizione del gene *gerR* è controllata dall'RNA polimerasi contenete il fattore  $\sigma^E$  (Eichenberger, 2004).

Per caratterizzare il promotore del gene *gerR* ho deciso di costruire un ceppo di *B. subtilis* contenente una fusione trascrizionale tra il promotore di *gerR* ed il gene reporter *lacZ* di *Escherichia coli*, codificante per l'enzima  $\beta$ -galattosidasi.

Tale fusione trascrizionale è stata analizzata in un ceppo selvatico di *B. subtilis* ed in ceppi mutati nei geni *spoIVB* e *spoIID*, codificanti rispettivamente per il fattore sigma alternativo  $\sigma^K$  e per un regolatore trascrizionale che agisce su geni trascritti da  $\sigma^E$  e

$\sigma^K$ . Per ottenere la fusione trascrizionale, un frammento di 400 coppie di basi, contenente le sequenze regolative ed una breve regione codificante del gene *gerR* (dal nucleotide in posizione -293 fino al nucleotide in posizione +99, considerando come +1 il primo nucleotide del codone di inizio della traduzione) era amplificato per *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) utilizzando come stampo il DNA cromosomale di un ceppo selvatico (PY79) (Materiali e Metodi Tab. 2.1) di *B. subtilis* e gli oligonucleotidi, *gerR2*-senso (-293/-275) e *BO-anti-Pst* (+82/+99), (Materiali e Metodi Tab. 2.2) disegnati in modo da produrre un amplificato contenente all'estremità 5' il sito di restrizione per l'enzima *Bam*HI e all'estremità 3' il sito di restrizione per l'enzima *Pst*I.

Il prodotto di amplificazione, della lunghezza attesa, era purificato da gel di agarosio e clonato nel vettore commerciale pGemT-easy (*Promega*). Il plasmide ricombinante così originato era chiamato pGT-*gerRp*. Tale plasmide veniva digerito con l'enzima di restrizione *Eco*RI ed il frammento ottenuto purificato da gel d'agarosio e clonato a monte del gene *lacZ* contenuto nel vettore pJM783 (Perego, 1993), precedentemente digerito con lo stesso enzima di restrizione (figura 3.1).

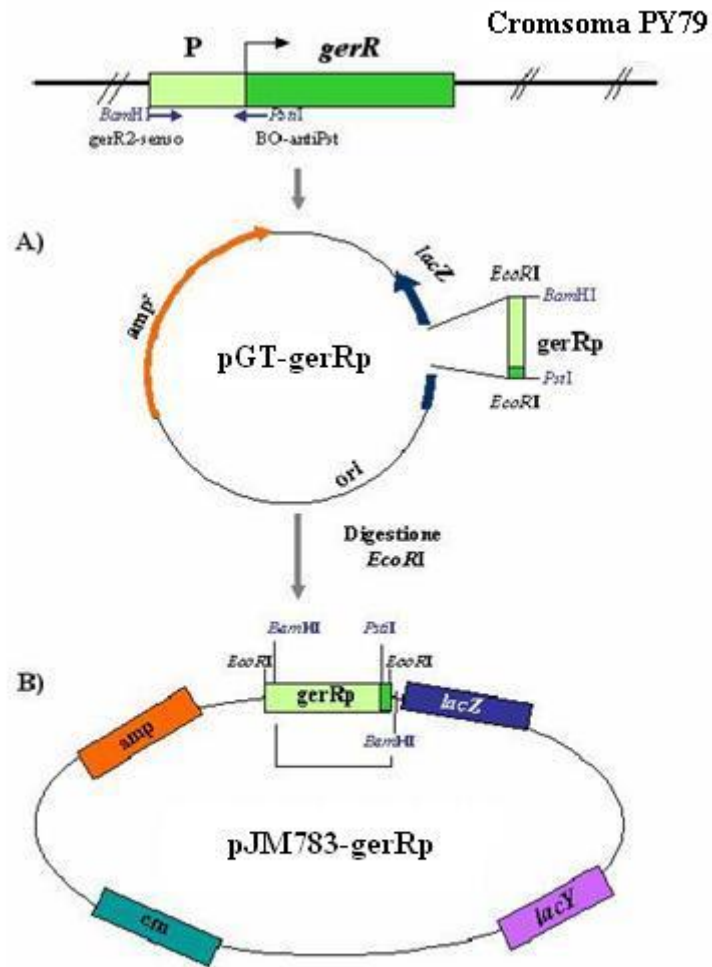


Figura 3.1: Clonaggio *gerRp* in pJM783. **A)** Clonaggio del frammento *gerRp* in pGem-T easy. In figura sono indicati gli enzimi di restrizione e le ragioni di appaiamento degli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione. **B)** Schematizzazione dell'integrazione del frammento di *gerRp* nel vettore pJM783.

Tale vettore contiene oltre a geni per la resistenza agli antibiotici ampicillina e cloramfenicolo, la sequenza di legame per i ribosomi e quella codificante per il gene reporter *lacZ* a valle di un sito di clonaggio multiplo.

Tra il sito di clonaggio multiplo e il sito di legame per il ribosoma, sono inoltre presenti tre codoni non-senso posizionati su tre diversi quadri di lettura, allo scopo di bloccare eventuali traduzioni aspecifiche guidate dal frammento clonato a monte. L'utilizzo di tale vettore permette quindi di misurare l'attività trascrizionale di un promotore attraverso la misura dell'attività  $\beta$ -galattosidasica.

Poiché il frammento genomico contenente le sequenze regolative di *gerR* poteva integrarsi nel plasmide in due orientamenti diversi, il DNA plasmidico di diversi cloni positivi veniva estratto e poi sottoposto a digestione con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *BamHI*. L'analisi delle bande dopo migrazione su gel d'agarosio mi permetteva di identificare i plasmidi contenenti il frammento integrato nell'orientamento corretto per consentire la trascrizione del gene *lacZ*. Uno dei plasmidi ricombinanti positivi veniva selezionato ed indicato pJM783-gerRp.

La fusione trascrizionale *gerR::lacZ* portata dal plasmide pJM783-gerRp veniva quindi integrata sul cromosoma di un

ceppo selvatico di *B. subtilis*, PY79. A tale scopo il plasmide pJM783-gerRp, che in *B. subtilis* non può replicarsi, veniva inserito per trasformazione in cellule competenti del ceppo PY79 ed i trasformanti piastrati in presenza dell'antibiotico cloramfenicolo. Le colonie cloramfenicolo-resistenti ottenute erano il risultato di un evento di singolo *crossing-over* (tipo Campbell) tra le sequenze di DNA omologhe presenti nel plasmide e nel cromosoma, ovvero tra il frammento genomico contenente il promotore di *gerR* presente sul plasmide ed il suo omologo sul cromosoma. In tal modo si otteneva l'integrazione della fusione *gerR::lacZ* sul cromosoma e una copia intera del gene *gerR* sul cromosoma del ceppo ricombinante di *B. subtilis* (figura 3.2).

I trasformanti cloramfenicolo-resistenti ottenuti venivano piastrati su terreno DSM, che induce la sporulazione, in presenza dell'antibiotico cloramfenicolo ( $5\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e del substrato cromogenico per la  $\beta$ -galattosidasi (X-Gal). Su tali piastre, le colonie contenenti la fusione assumevano una colorazione azzurra dovuta all'idrolisi del substrato, indicando che la fusione era funzionante. Uno dei cloni positivi veniva denominato CG308 ed utilizzato negli esperimenti successivi.

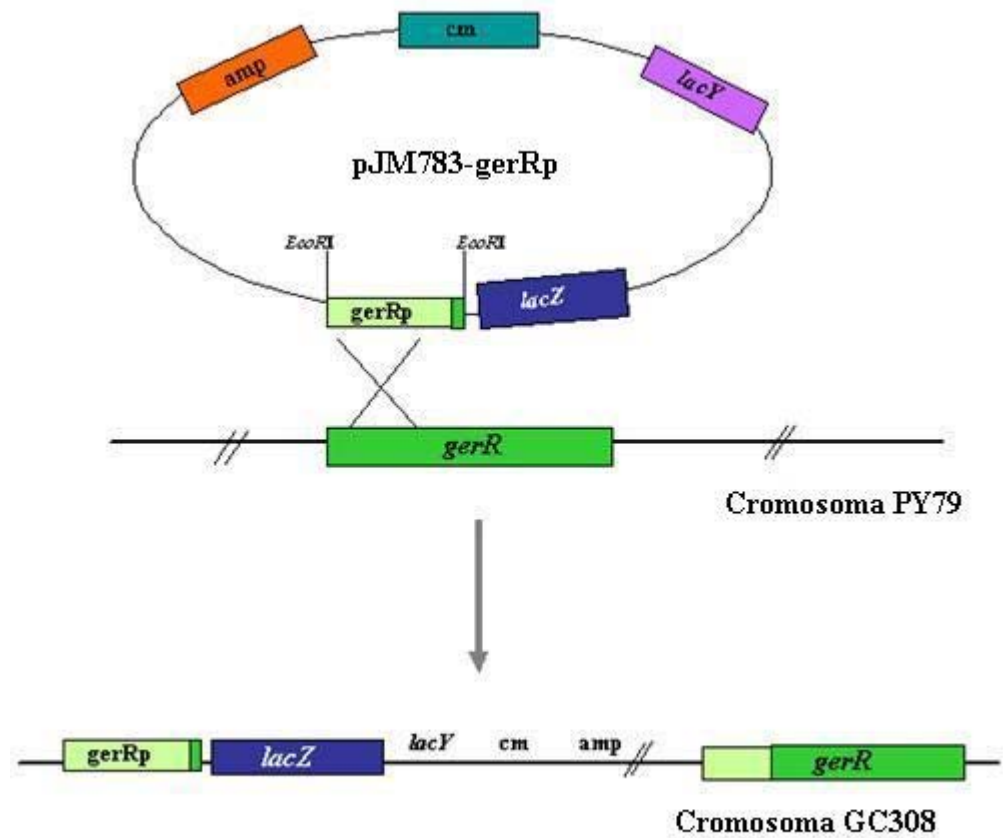


Figura 3.2: Integrazione di pJM783-gerRp al locus *gerR* del cromosoma di *B. subtilis* mediante singolo *crossing-over* (tipo Campbell).

Il DNA cromosomale di GC308 veniva estratto ed utilizzato per trasformare cellule competenti dei ceppi mutati nei geni *spoIVB* e *spoIIID*. I trasformanti, selezionati con l'antibiotico cloramfenicolo, erano il risultato di un doppio evento di *crossing over* che permetteva di integrare nel cromosoma dei ceppi riceventi la fusione genica *gerR::lacZ* presente nel cromosoma del ceppo donatore. I cloni ottenuti venivano indicati GC275 (*gerR::lacZ; spoIIID*<sup>-</sup>) e GC276 (*gerR::lacZ; spoVIB*<sup>-</sup>).

L'attività della fusione *gerR::lacZ* nel ceppo selvatico e nei ceppi mutanti veniva valutata misurando l'attività  $\beta$ -galattosidasi durante la sporulazione secondo il saggio descritto nei Materiali e Metodi paragrafo 2.13. I ceppi venivano cresciuti in terreno DSM per indurre la sporulazione ed aliquote di 1mL di cellule batteriche prelevate ad intervalli di un'ora, a partire dall'inizio della sporulazione.

I valori dell'attività  $\beta$ -galattosidasi, venivano quindi riportati in grafico in funzione del tempo (figura 3.3). L'analisi dei risultati ottenuti ha mostrato che il gene *gerR* nel ceppo selvatico viene attivato un'ora dopo l'inizio della sporulazione, raggiungendo il massimo dell'espressione nelle successive due ore per poi subire una rapida diminuzione. Nel ceppo GC276, mutato nel fattore di trascrizione  $\sigma^K$ , l'attività di *gerR* risulta comparabile a quella

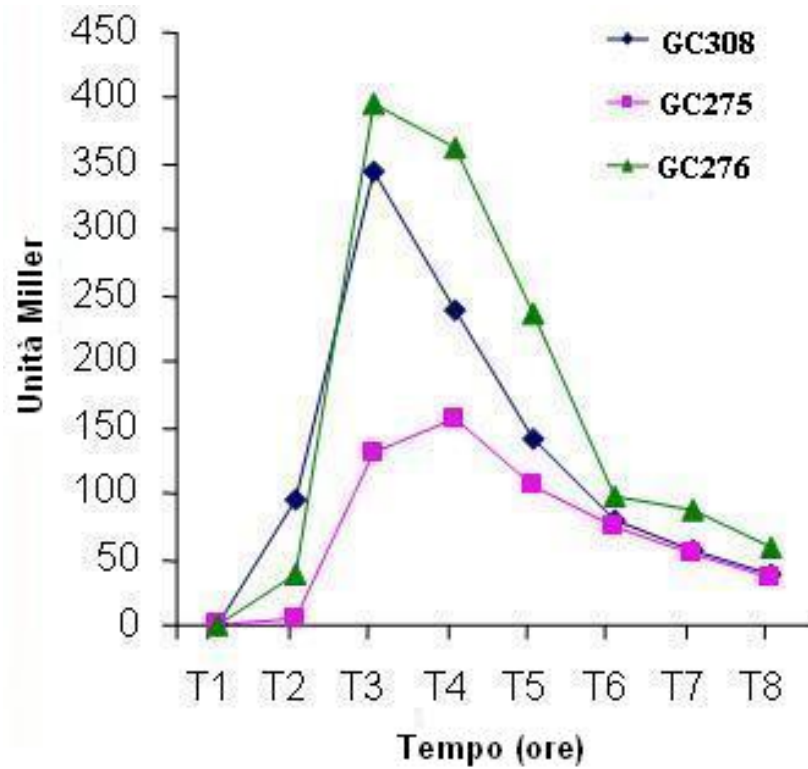


Figura 3.3: Analisi delle fusioni trascrizionali *gerR::lacZ* nei ceppi selvatico (GC308) (rombi blu), *spoIIID*<sup>-</sup> (GC275) (quadrati viola) e *spoIVB*<sup>-</sup> (GC276) (triangoli verdi). I dati riportati sono medie di diversi esperimenti indipendenti.



osservata nel ceppo selvatico escludendo la dipendenza della trascrizione di *gerR* da tale fattore. Nel ceppo mutato nel gene *spoIIID*, invece, il gene *gerR* risulta espresso tardivamente ed a livelli più bassi rispetto al ceppo isogenico parentale (figura 3.3). Tale risultato indica che un'efficiente trascrizione di *gerR* richiede la presenza del regolatore trascrizionale SpoIIID, che agisce quindi da attivatore del gene *gerR*.

Allo scopo di caratterizzare ulteriormente il promotore di *gerR* decidevo di mappare il sito di inizio della trascrizione mediante un esperimento di *primer extension* (Materiali e Metodi 2.14).

L'RNA totale veniva quindi estratto a vari tempi da cellule in fase di sporulazione, trattato con Dnasi per eliminare eventuali contaminazioni di DNA ed utilizzato per ottenere un cDNA mediante reazione con l'enzima trascrittasi inversa a partire dall'oligonucleotide *gerR*-P.E. (Tab. 2.2) marcato con ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)GTP (Materiali e Metodi 2.14.2). Tale cDNA veniva quindi analizzato su gel di poliacrilammide-urea al 6% (Materiali e Metodi 2.14.5).

Il risultato ottenuto mi permetteva di localizzare l'estremità 5' (+1) dell'RNA messaggero di *gerR* 28bp a monte dell'inizio della parte codificante del gene (figura. 3.4A).

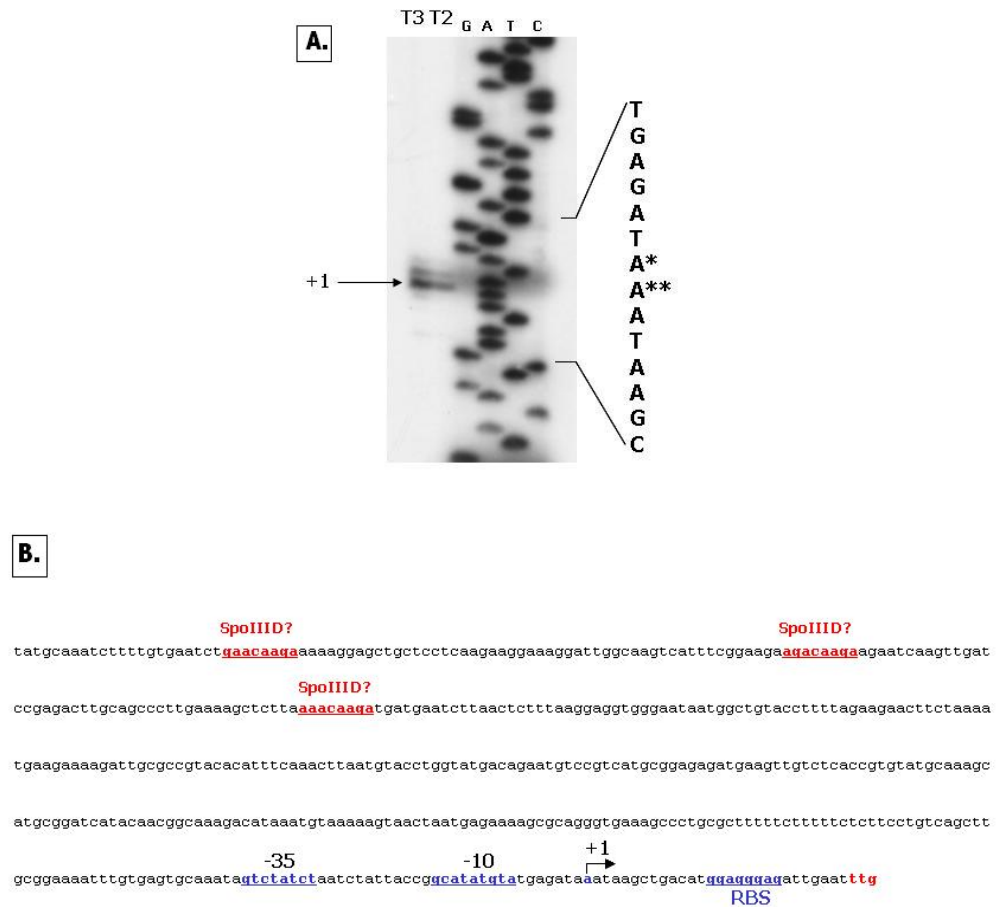


Figura 3.4: *Primer extension*. (A) *Primer extension* per individuare l'inizio della trascrizione. (B) Sequenza nucleotidica della regione promotrice di *gerR*. Il sito di inizio della trascrizione è indicato dalla freccia come +1. Sequenze simili a quelle considerate di consenso per promotori riconosciuti dal fattore  $\sigma^E$  a -10 e -35 paia di basi dal sito di inizio sono sottolineate ed indicate in blu. Putativi siti di legame per SpoIID sono indicati in rosso. Il sito di legame per i ribosomi (RBS) ed il codone di inizio della traduzione sono anche indicati (blu e rosso rispettivamente).

La regione a monte del sito di inizio della trascrizione contiene sequenze di omologia con le sequenze consensus individuate per i promotori riconosciuti da  $\sigma^E$ : le sequenze consensus a -10 e a -35 paia di basi conservano 5 di 7 posizioni e 5 di 8 posizioni rispettivamente (consensus -10: gCATAxaxT, *gerR*: GCATATGTA; consensus -35: gcATattt, *gerR*: GTCTATCT). Inoltre, a monte del probabile promotore sono presenti dei putativi siti di legame per il fattore SpoIID (figura 3.4B).

I dati raccolti portano alla conclusione che *gerR* è trascritto dall'RNA polimerasi contenente  $\sigma^E$  in cooperazione col fattore trascrizionale SpoIID e quindi fa parte della II classe temporale di geni coinvolti nella formazione della tunica sporale (Introduzione 1.6).

### **3.1.2 Studio fenotipico del mutante nullo in *gerR***

Per poter studiare più a fondo il ruolo di *gerR* durante la sporulazione e valutarne l'effetto sull'espressione di altri geni coinvolti nel processo costruiamo un ceppo mutante in *gerR*.

#### **3.1.2.1 Costruzione del ceppo**

Un frammento genomico interno al gene *gerR* veniva amplificato mediante reazione di *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) utilizzando come stampo il DNA cromosomale di un ceppo

selvatico di *B. subtilis*, PY79, e come innesco per la reazione due oligonucleotidi sintetici, gerRsenso (+99/+116) e gerRanti (+495/+513), disegnati sulla base della sequenza completa del genoma di *B. subtilis* disponibile in banca dati (Materiali e Metodi Tab. 2.2). Il frammento di 415 bp così ottenuto, veniva purificato da gel d'agarosio e clonato nel vettore pGemT-easy (*Promega*), ottenendo il plasmide ricombinante pGT-gerR (figura 3.5). Le colonie contenenti i plasmidi ricombinanti venivano identificate mediante analisi dei trasformanti su piastre contenenti IPTG/X-gal. Da alcuni cloni positivi veniva estratto il DNA plasmidico che era in seguito digerito con l'enzima di restrizione *NotI* confermando il clonaggio del frammento genomico in pGemT-easy.

Il frammento genomico contenuto in pGT-gerR era quindi escisso mediante singola digestione utilizzando l'enzima di restrizione *NotI*, purificato da gel d'agarosio e clonato nel vettore pBEST501 (figura 3.6), precedentemente digerito con lo stesso enzima. In questo modo si otteneva il plasmide pNEO-gerR contenente una cassetta di resistenza alla neomicina, selezionabile in *B. subtilis*. L'orientamento del frammento genomico di *gerR* nel vettore pNEO-gerR era verificato mediante *PCR* utilizzando un oligonucleotide interno (alternativamente gerRsenso e gerRanti)

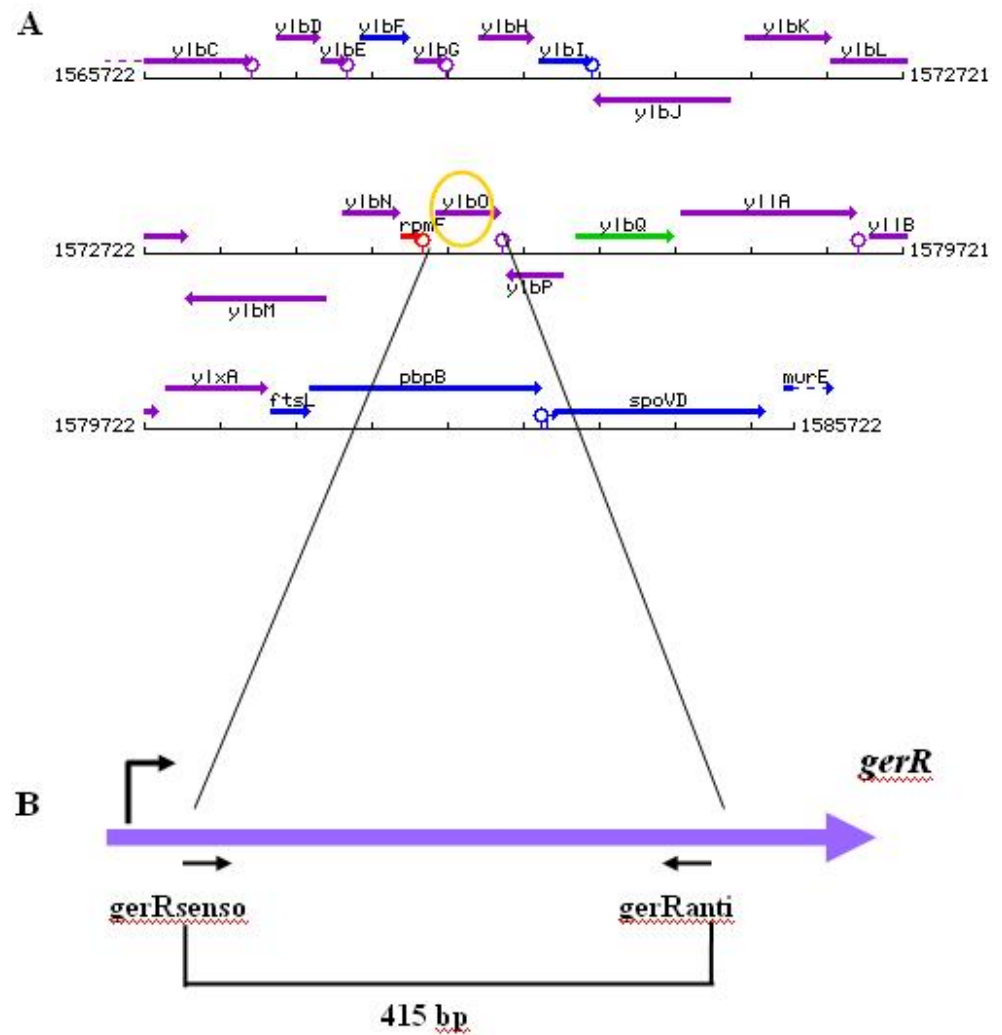


Figura 3.5: Il gene *gerR*. **A**) Organizzazione della regione comprendente il gene *gerR* (*ylbO*) cerchiato in giallo. **B**) Strategia adottata per amplificare il gene *gerR* mediante *PCR*, in figura sono indicate le regioni di appaiamento degli oligonucleotidi utilizzati e la lunghezza del frammento amplificato.

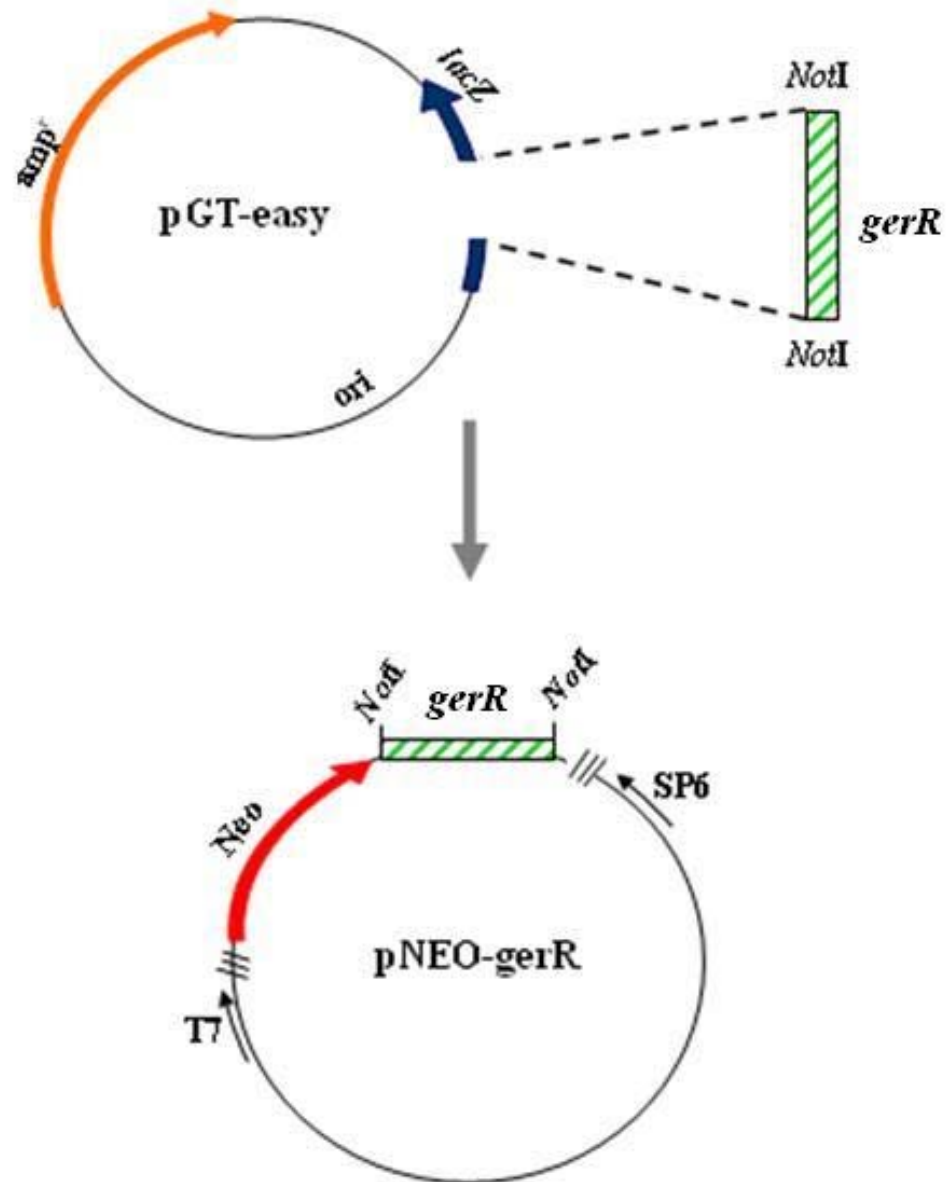


Figura 3.6: Clonaggio in pBEST501. Escissione del frammento *gerR* mediante *NotI* e clonaggio nel vettore pNEO. In figura sono indicati i siti di restrizione e le regioni di appaiamento degli oligo SP6 e T7.

unitamente ad un oligonucleotide del vettore esterno al frammento (SP6).

Per inattivare la copia selvatica del gene *gerR* sul cromosoma di *B.subtilis*, il plasmide pNEO-gerR veniva utilizzato per trasformare le cellule del ceppo selvatico PY79, rese competenti come descritto nei Materiali e Metodi paragrafo 2.4. Come mostrato in figura 3.7, l'integrazione del plasmide avveniva mediante un singolo evento di *crossing-over* (tipo Campbell), tra le sequenze omologhe presenti sul plasmide e sul cromosoma.

In questo modo si formano sul cromosoma due copie non funzionanti del gene *gerR*, tronche rispettivamente al 3' e al 5'.

Il singolo evento di crossing-over era selezionato piastrando la trasformazione su terreno TY addizionato con l'antibiotico neomicina ( $5\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

La corretta inserzione del plasmide sul cromosoma dei cloni trasformati è stata confermata mediante *PCR colony* usando come oligonucleotidi gerRanti (al 3' del frammento) e T7, quest'ultimo presente nel vettore pNEO (Materiali e Metodi Tab. 2.2 e figure 3.5 e 3.6).

Uno dei cloni positivi, che mostrava un prodotto di amplificazione della grandezza attesa era denominato CG304 (*gerR::neo*) ed utilizzato nelle analisi successive.

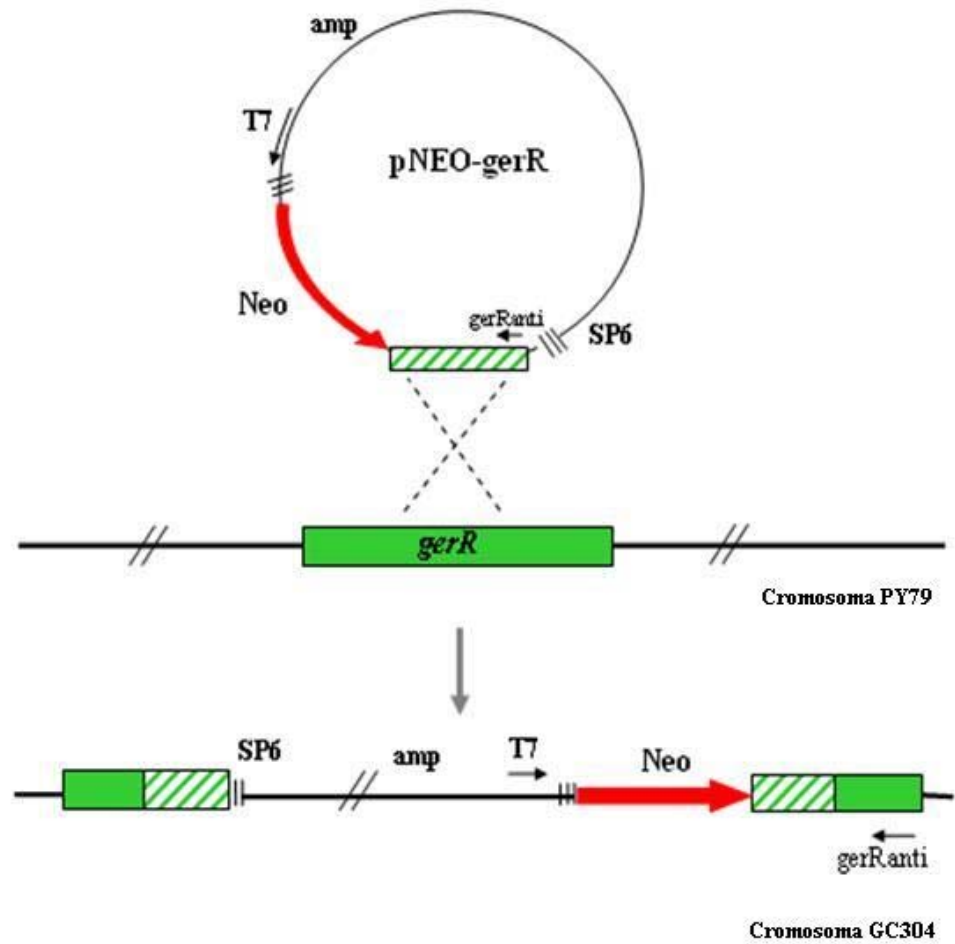


Figura 3.7: Integrazione di pNEO-*gerR* al locus *gerR* del cromosoma di *B. subtilis* mediante singolo *crossing-over* (tipo Campbell). In figura sono indicate le regioni di appaiamento degli oligonucleotidi utilizzati per controllare il ceppo ricombinante.



Per verificare che gli effetti della mutazione in *gerR* fossero effettivamente dovuti alla sola inattivazione di tale gene, decidevo di inserire una copia selvatica di *gerR* in un locus diverso del cromosoma del ceppo GC304 di *Bacillus subtilis*.

A tale scopo l'intero gene *gerR* (regione codificante e una regione di 293bp a monte dell'ATG) veniva amplificato per *PCR* usando come stampo il DNA cromosomale di un ceppo selvatico di *B. subtilis* ed impiegando come innesco la coppia di oligonucleotidi gerR2-senso (-293/-275) e YlbOH3-anti (+588/+604) (Materiali e Metodi Tab. 2.2) localizzato a valle del codone di stop di *gerR*. I due oligonucleotidi erano disegnati in modo da produrre un amplificato contenente all'estremità 5' il sito di restrizione per l'enzima *Bam*HI e all'estremità 3' il sito di restrizione per l'enzima *Hind*III. Il prodotto di *PCR* ottenuto, della lunghezza attesa di 909bp, era purificato dopo migrazione su gel di agarosio e clonato nel vettore commerciale pGemT-easy (*Promega*). Il plasmide ricombinante così originato era chiamato pGT-gerRcod. Le colonie contenenti i plasmidi ricombinanti venivano identificate mediante analisi dei trasformanti su piastre contenenti IPTG/X-gal. Da alcuni cloni positivi veniva estratto il DNA plasmidico che era poi digerito con l'enzima di restrizione *Eco*RI confermando il clonaggio del frammento genomico in pGemT-

easy. Dal plasmide pGT-gerRcod, il frammento genomico veniva escisso mediante digestione con gli enzimi *Bam*HI ed *Hind*III, purificato da gel d'agarosio e clonato nel vettore integrativo pDG364, preventivamente digerito con gli stessi enzimi di restrizione. Questo vettore presenta come marcatore selezionabile in *B. subtilis* il gene per la resistenza al cloramfenicolo (*cat*) inserito, insieme ad un sito di clonaggio multiplo, tra due regioni del gene non essenziale *amyE* di *B. subtilis*, (Cutting and Vander Horn, 1990) chiamate *amy-front* ed *amy-back* in modo da consentire l'integrazione del plasmide a livello di tale locus (figura 3.8). Al nuovo vettore ricombinante così ottenuto veniva dato il nome di pDG364-gerRcod. Per controllare il clonaggio, il DNA plasmidico di alcuni cloni trasformanti era sottoposto a digestione con l'enzima di restrizione *EcoRV*. Sulla base della mappa di restrizione del clone ricombinante, i prodotti della digestione risultavano della lunghezza attesa (1450bp), confermando così l'avvenuto clonaggio del frammento nel vettore.

Il plasmide pDG364-gerRcod veniva quindi linearizzato per digestione con l'enzima *ScaI* ed usato per trasformare, come descritto nei Materiali e Metodi, cellule competenti del ceppo selvatico di *B. subtilis*, PY79. I trasformanti, selezionati per la

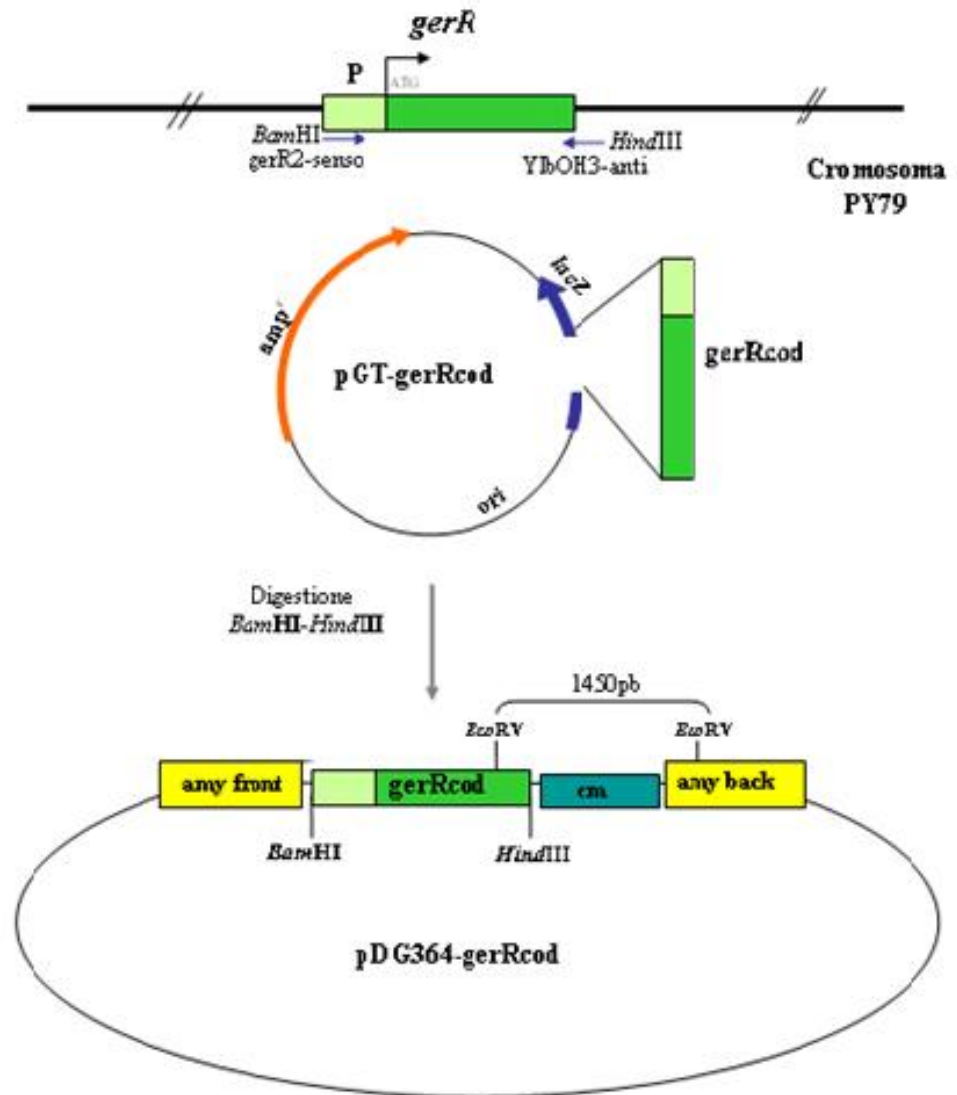


Figura 3.8: Clonaggio del frammento genomico *gerRcod* nel vettore pDG364. In figura sono indicate le regioni di appaiamento degli oligonucleotidi utilizzati.

resistenza al cloramfenicolo, erano il risultato di un doppio evento di *crossing-over* tra le regioni cromosomali omologhe del gene *amyE* sul cromosoma di *B. subtilis* e le regioni omologhe *amy-front* ed *amy-back* presenti nel vettore pDG364 (figura 3.9). Il ceppo ricombinante contenente nel locus *amyE* il gene *gerR* comprensivo della regione regolativa, era chiamato GC274 (PY79; *amyE::gerR*).

Per procedere all'integrazione della copia selvatica del gene *gerR* sul cromosoma del ceppo mutato in *gerR*, il DNA cromosomale di quest'ultimo veniva utilizzato per trasformare le cellule competenti del ceppo ricombinante CG274 (PY79; *amyE::gerR*).

I trasformanti vanivano selezionati per la resistenza alla neomicina. Le colonie trasformanti erano quindi saggiate per la doppia resistenza al cloramfenicolo e alla neomicina per confermare la presenza sul cromosoma di entrambe le copie del gene *gerR*, quello selvatico, associato alla resistenza al cloramfenicolo, e quello mutato associato alla neomicina.

Il ceppo ricombinante così ottenuto (figura 3.10), resistente ad entrambi gli antibiotici, era chiamato CG284 (*amyE::gerR*; *gerR::neo*).

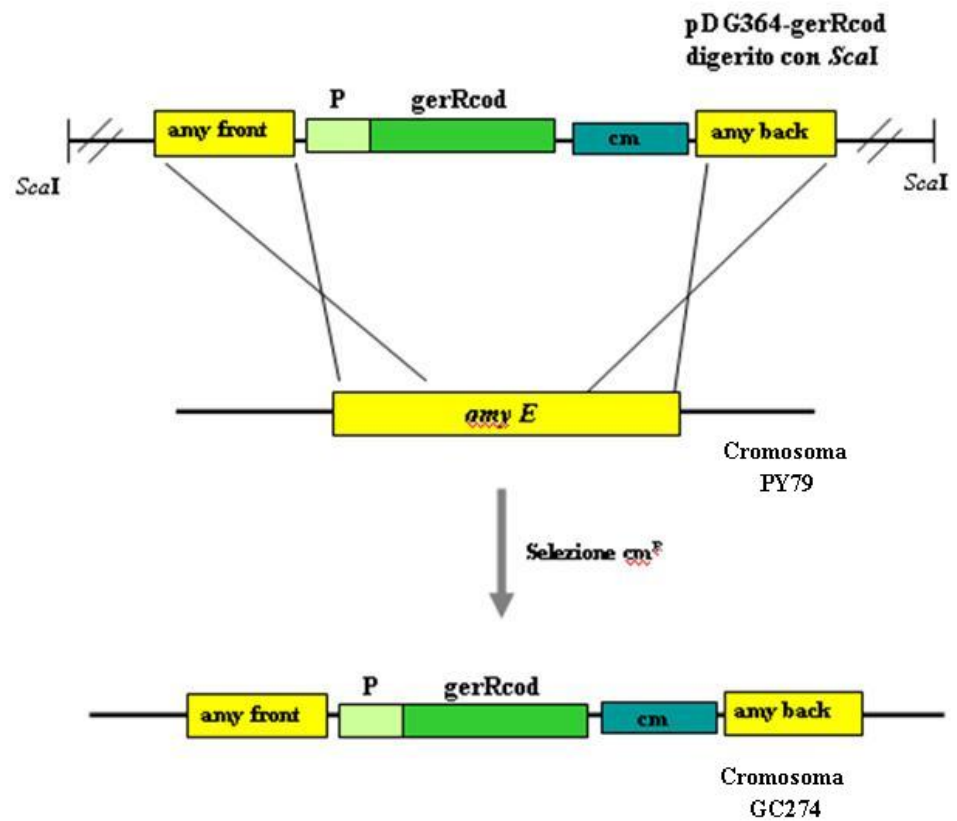


Figura 3.9: Schema dell'integrazione del frammento genomico *gerRcod* al locus *amyE* del cromosoma di *B. subtilis*.

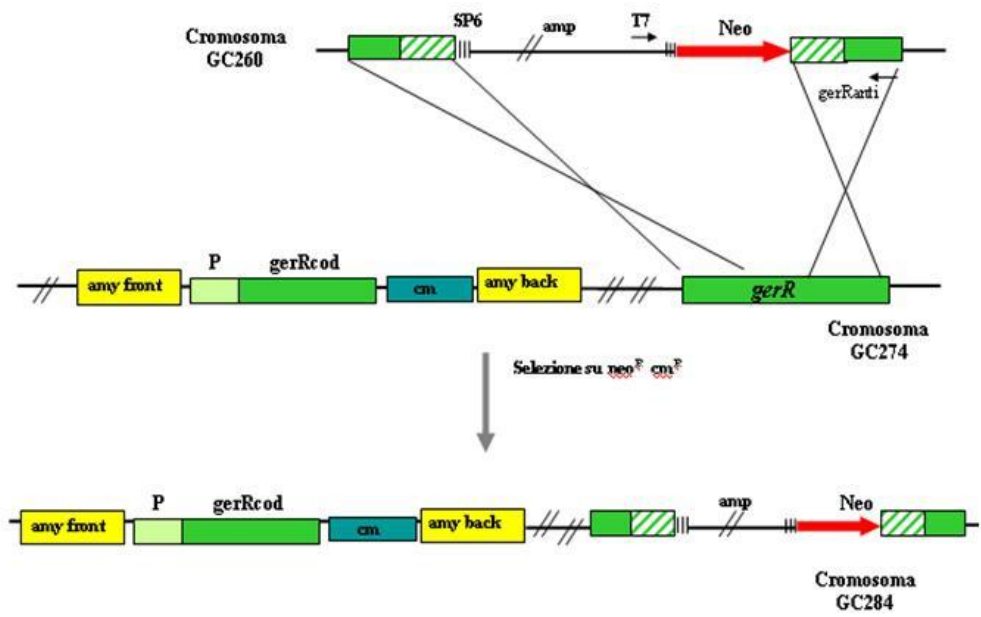


Figura 3.10: Integrazione della copia mutata del gene *gerR* sul cromosoma del ceppo GC274.

### 3.1.2.2 Analisi fenotipica dei ceppi ricombinanti

Come riportato in letteratura (Kuwana *et al.*, 2005) l'inattivazione del gene *gerR* influenza la sintesi di varie proteine estratte con SDS-DTT dalle spore di un ceppo selvatico.

Per verificare che le variazioni nel profilo delle proteine, estratte dalla tunica sporale in seguito a trattamento con SDS-DTT, dipendessero dall'inattivazione del gene *gerR*, cellule del ceppo selvatico (PY79), del mutante in *gerR* (GC304) e del ceppo revertante (GC284), erano cresciute in DSM, per indurre la sporulazione. Dopo circa 36 ore di crescita a 37°C, le spore venivano purificate come descritto nei Materiali e Metodi paragrafo 2.12 e sottoposte ad estrazione della frazione proteica della tunica sporale (Materiali e Metodi 2.16.1). Le proteine estratte erano saggiate colorimetricamente per stimarne la concentrazione, e frazionate su gel denaturante di poliacrilammide al 12.5% rispetto ad un marcatore di peso molecolare. Il gel era quindi sottoposto a colorazione con Blu di Comassie, successivamente decolorato con acido acetico al 10%, (Materiali e Metodi 2.17, 2.18 e 2.19), per poter confrontare i profili proteici dei ceppi esaminati. Da tale confronto, come si può osservare nella figura 3.11, appare evidente l'assenza di alcune bande nel ceppo mutato in *gerR*, confermando un coinvolgimento del

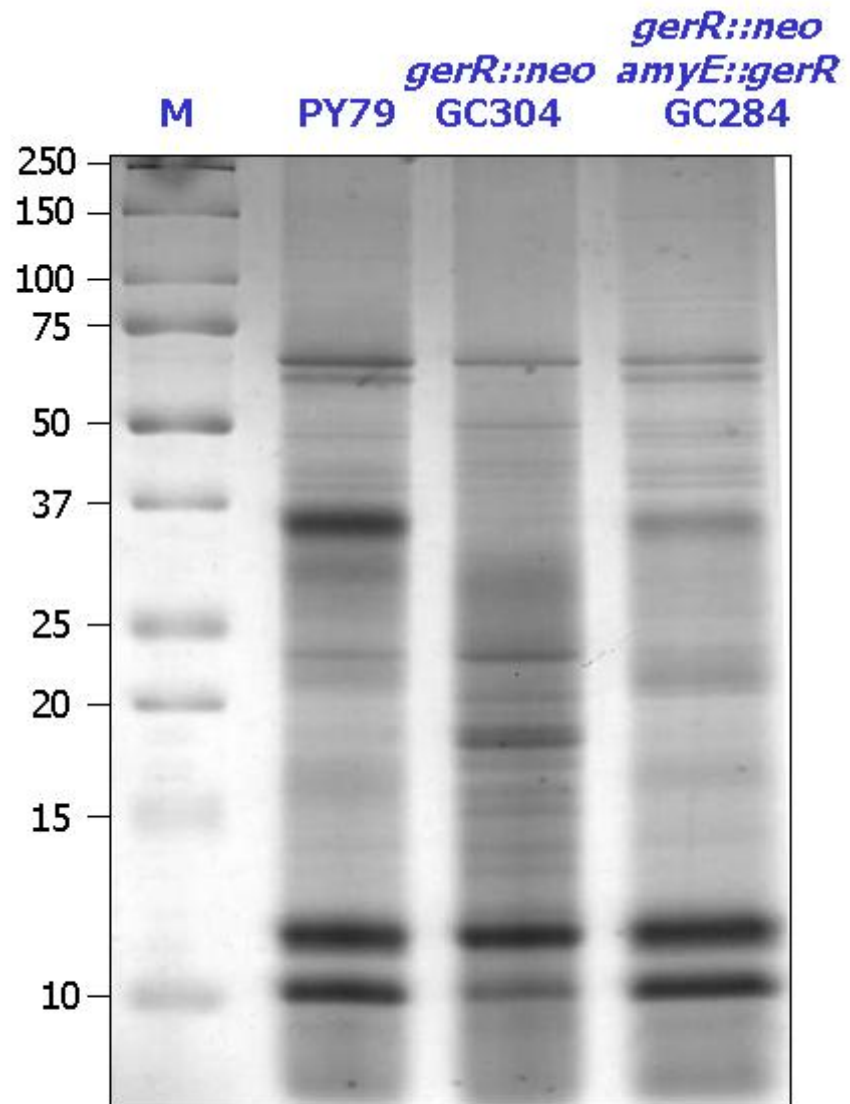


Figura 3.11: SDS-PAGE delle proteine della tunica sporale. Profili proteici del ceppo selvatico (PY79), del mutante *gerR*<sup>-</sup> (GC304), del ricombinante *gerR*<sup>-</sup>/*amyE*::*gerR* (GC284); M: marcatore di peso molecolare, i valori riportati a sinistra sono espressi in kDa.



prodotto del gene *gerR* nella sintesi e/o nell'assemblaggio di alcune proteine della tunica sporale.

Inoltre, il profilo proteico del ceppo che esprime una copia ectopica di *gerR*, in cui la mutazione viene annullata per complementazione, risulta pressoché indistinguibile da quello ottenuto da spore selvatiche, dimostrando che l'alterazione del profilo proteico della tunica sporale osservata nel ceppo mutato in *gerR* è ascrivibile alla sola inattivazione del gene *gerR*.

La capacità di germinare e di resistere al lisozima e al calore sono caratteristiche delle spore con una tunica correttamente assemblata (Driks *et al.*, 1999). Come è noto infatti dalla letteratura, mutazioni in alcuni fattori trascrizionali (GerE) oppure in alcuni geni *cot* non solo provocano danni severi alla tunica sporale, ma determinano anche un difetto nella germinazione e una maggiore sensibilità al calore e al lisozima oppure ad agenti organici, come il cloroformio (Moir A., 1981).

Decidevo, quindi, di analizzare l'efficienza di germinazione e la capacità di resistere ad un trattamento con lisozima e calore delle spore dei ceppi da me ottenuti. Confrontavo il ceppo selvatico PY79, il singolo mutante nel gene *gerR* (GC304) ed il revertante nella mutazione *gerR* (GC284). Tutti i ceppi erano cresciuti in DSM, per indurre la sporulazione; dopo circa 36 ore di crescita da

ciascuna coltura era prelevata una aliquota di 1mL di cellule, successivamente utilizzate per effettuare il saggio di resistenza al calore e lisozima (Materiali e Metodi 2.20). Dalla parte restante di ciascuna coltura erano purificate le spore su cui veniva effettuato il saggio di germinazione, come descritto nei Materiali e Metodi paragrafi 2.12.1 e 2.21. Nella Tabella 3.1 sono riportati i risultati dei saggi di resistenza a calore e lisozima.

Genotipo	Vitalità (CFU/ml) dopo trattamento		
	Nessuno	Calore	Liozima
PY79 (wt)	$1 \times 10^9$	$0,8 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$
GC304 <i>gerR::neo</i>	$3,5 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$3,8 \times 10^8$
GC284 <i>gerR::neo</i> <i>emyE::gerR</i>	$1 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$

Tabella 3.1: Resistenza delle spore a diversi trattamenti. In rosso sono evidenziati i valori di vitalità (CFU/ml) delle spore non trattate (sinistra) e delle spore dopo il trattamento con liozima (destra) nel mutante GC304. In blu sono evidenziati i valori di vitalità (CFU/ml) delle spore non trattate (sinistra) e delle spore dopo il trattamento con liozima (destra) nel revertante GC284.

Come si può osservare dal numero di cellule sopravvissute ai vari trattamenti, l'inattivazione del gene *gerR* non sembra avere un effetto drammatico sulla resistenza delle spore al calore, mentre sembra agire in modo più evidente sulla resistenza delle spore al lisozima. In seguito a trattamento con lisozima si osserva infatti una diminuzione della vitalità delle spore di circa 10 volte rispetto al controllo. Il mutante in *gerR* contenente la copia selvatica nel locus *amyE*, (GC284), sembra infine recuperare completamente il fenotipo selvatico.

L'induzione della germinazione era effettuata, sulle spore purificate e l'efficienza del processo valutata seguendo la diminuzione della densità ottica allo spettrofotometro ad intervalli di 5 minuti.

Come riportato in figura 3.12, le spore mutate in *gerR* mostrano un'efficienza di germinazione significativamente compromessa rispetto a quelle selvatiche (ceppo PY79), Il ceppo GC284 risulta infine del tutto paragonabile al ceppo selvatico, raggiungendo nei primi 10 minuti circa il 40% di germinazione.

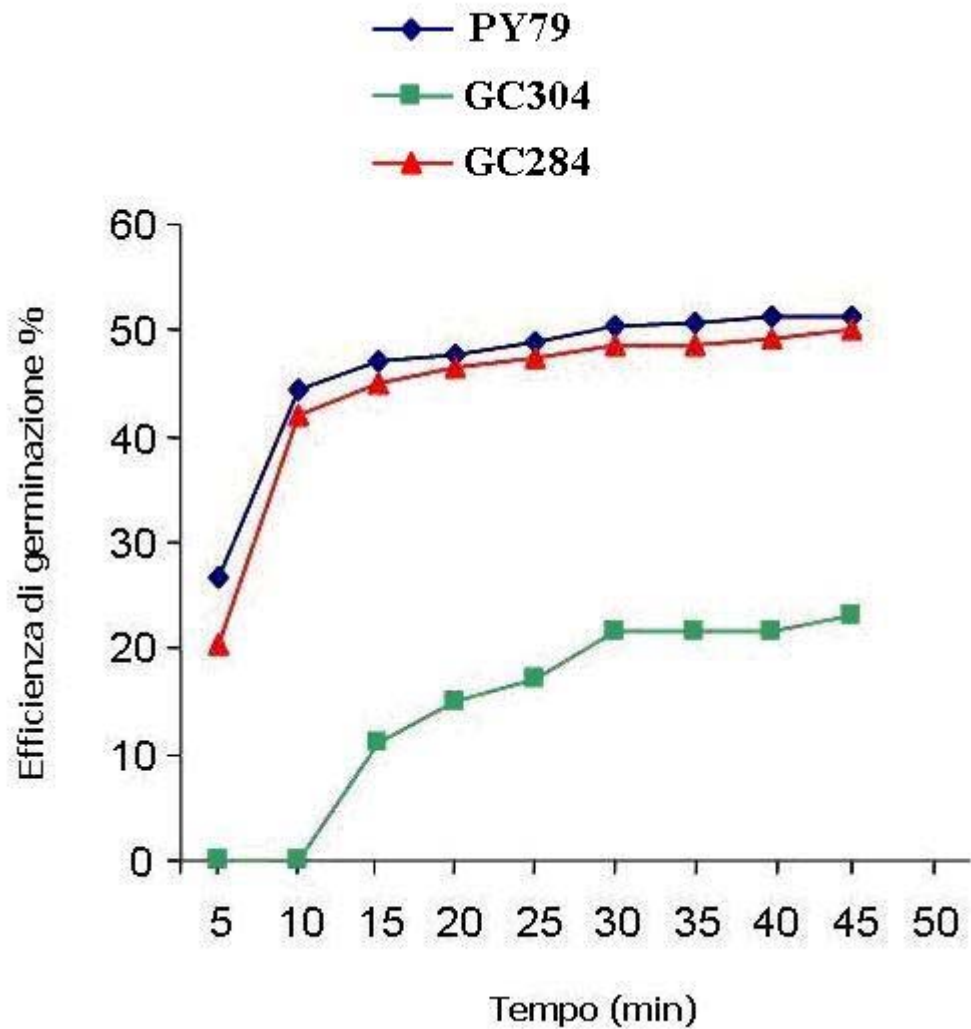


Figura 3.12: Efficienza di germinazione di spore purificate dai ceppi PY79 (selvatico) (blu), GC304 (*gerR*<sup>-</sup>) (verde), e GC284 (*gerR*<sup>-</sup> - *amyE::gerR*) (Rosso).

### 3.1.3 GerR è coinvolta nella trascrizione dei geni controllati da $\sigma^K$ e da GerE

È stato dimostrato che in un ceppo mutante nullo per il gene *gerR*, l'espressione di alcuni geni come *cgeA* e *cotG* è leggermente ridotta mentre quella di *cotY* era quasi completamente silenziata (Kuwana *et al.* 2005).

Quindi decidevo di ampliare tale analisi studiando l'effetto di GerR sulla trascrizione di vari geni codificanti per le proteine della tunica sporale (geni *cot*), sia sotto il controllo trascrizionale di  $\sigma^K$  (*cotA*, *cotD* e *tgl*) che sotto il controllo combinato di  $\sigma^K$  e di GerE (*cotG*, *cotU*, *cotC* e *cotB*) (vedi Introduzione 1.6 e figura 1.6).

Per ottenere dei ceppi contenenti fusioni *lacZ* nel ceppo mutante nullo per il gene *gerR*, cellule competenti di tale ceppo venivano trasformate con il DNA cromosomale contenenti le fusioni trascrizionali selezionate, già disponibili nel laboratorio dove ho svolto il lavoro di Tesi (Materiali e Metodi Tab. 2.1). I trasformanti sono stati selezionati per la resistenza al cloramfenicolo. Le colonie trasformanti erano quindi saggiate per la doppia resistenza al cloramfenicolo (associata alla fusione *lacZ*) e alla neomicina (associata al gene *gerR* mutato) piastrandolo su terreno DSM, che induce la sporulazione, contenente il substrato

cromogenico per la  $\beta$ -galattosidasi (X-Gal). Su tali piastre, le colonie, contenenti la fusione assumono una colorazione azzurra dovuta all'idrolisi del substrato. I ceppi ricombinanti così ottenuti sono elencati nella Tabella 2.1 dei Materiali e Metodi.

Per il solo gene *cotG* utilizzavo un gene *reporter* differente, il gene *gusA* al posto del gene *lacZ*, perché già disponibile in laboratorio. Le metodiche di saggio enzimatico sono uguali, per i due *reporter*, cambia infatti solo il substrato dell'enzima che è X-Gluc per il prodotto del gene *gusA* ed X-Gal per il prodotto del gene *lacZ*.

La trascrizione dei vari promotori fusi al gene reporter, in presenza e in assenza del gene *gerR*, veniva valutata misurando l'attività enzimatica durante la sporulazione. I ceppi ricombinanti erano cresciuti in terreno DSM per indurre la sporulazione ed aliquote di 1mL di cellule batteriche prelevate ad intervalli di un'ora, a partire dall'inizio della sporulazione. I valori dell'attività enzimatica (misurati come descritto in Materiali e Metodi 2.13), erano riportati in grafico in funzione del tempo (figura 3.13 e 3.14).

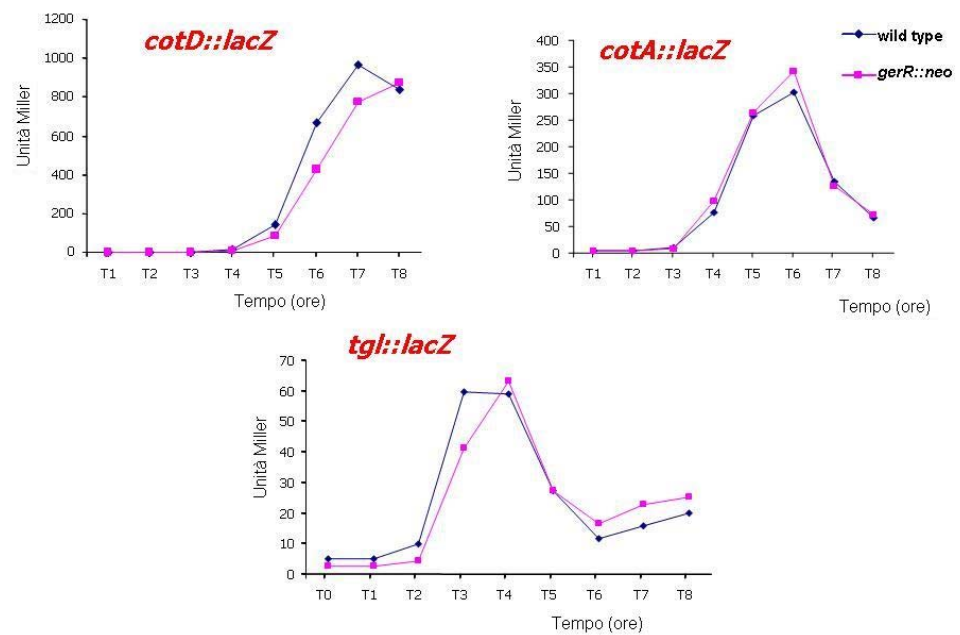


Figura 3.13: Analisi della trascrizione dei geni *cotD*, *cotA* e *tgl* durante la sporulazione nei ceppi selvatici (rombi blu) confrontati rispettivamente con i ceppi mutanti in *gerR* (quadrati viola). I dati riportati sono medie di diversi esperimenti indipendenti.



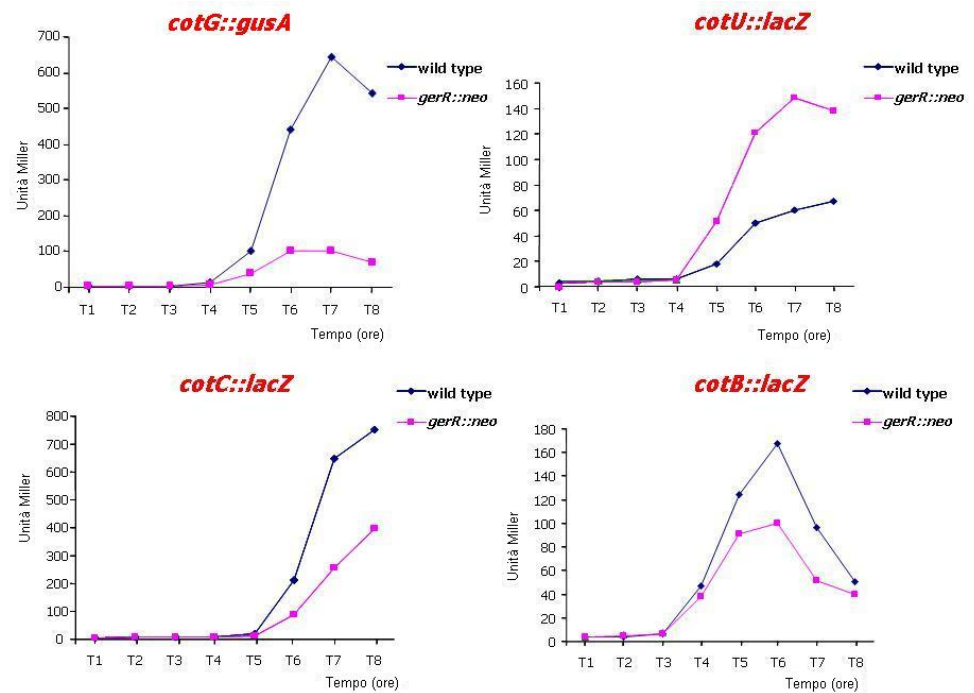


Figura 3.14: Analisi della trascrizione dei geni *cotG*, *cotU*, *cotC* e *cotB* durante la sporulazione nei ceppi selvatici (rombi blu) confrontati rispettivamente con i ceppi mutanti in *gerR* (quadrati viola). I dati riportati sono medie di diversi esperimenti indipendenti.

Dall'analisi dell'attività enzimatica si osserva che l'effetto della mutazione nel gene *gerR* risulta differente a seconda del gene *cot* esaminato.

Sui geni di III classe (figura 1.6) analizzati (*cotA*, *cotD* e *tgl*) l'inattivazione del gene *gerR* non sembra avere alcun effetto come si vede in figura 3.13.

Dall'analisi dei geni di IV classe (figura 1.6), invece, emerge una situazione più complessa, con l'assenza di GerR che provoca un drastico decremento della trascrizione di *cotG*, una lieve diminuzione nei livelli trascrizionali di *cotC* e *cotB* ed un drastico aumento della trascrizione del gene *cotU*. Solo in quest'ultimo caso GerR agisce da regolatore negativo, come fa per alcuni geni del regulone di  $\sigma^E$  (*spoIIM* e *spoIIP*) (Eichenberger *et al.* 2003). In tutti gli altri casi analizzati GerR o non ha effetto o agisce da regolatore positivo della trascrizione.

#### **3.1.4 Stabilità della proteina GerR**

Dagli esperimenti descritti nel paragrafo 3.1.1 si evince che la trascrizione del gene *gerR* è massima dopo tre ore dall'inizio della sporulazione e dopo sei ore i livelli di trascrizione sono quasi nulli.

Per avere un effetto diretto sulla trascrizione dei geni tardivi della sporulazione, i cui livelli massimi vanno dalle sei alle otto ore dopo l'inizio della sporulazione, la proteina GerR deve essere particolarmente stabile.

Per verificare questa ipotesi ho espresso il gene *gerR* in *Escherichia coli* fuso ad una coda di 6 istidine (*6xHis tag*) all'estremità amminotermine, ho purificato la proteina con una colonna cromatografica per affinità (HisTrap FF crude column, GE Healthcare) (Materiali e Metodi 2.22) e l'ho inviata alla Primm srl per la produzione di anticorpi policlonali (Materiali e Metodi 2.25).

Con gli anticorpi ottenuti ho potuto effettuare un'esperimento di *western blot* per valutare la presenza della proteina durante la sporulazione sia in un ceppo selvatico (PY79) che in un ceppo SpoIIID<sup>-</sup> (AZ89 *spoIIID::erm*). I ceppi sono stati cresciuti in terreno DSM per indurre la sporulazione ed aliquote di 10mL di cellule batteriche sono state prelevate ad intervalli di un'ora, a partire dall'inizio della sporulazione fino ad otto ore dopo.

Le proteine citosoliche venivano estratte per sonicazione, veniva valutata la concentrazione proteica e quindi analizzate per *western blot* (Materiali e Metodi 2.27).

Nell'esperimento di *western blot* l'anticorpo riconosce due bande, una della grandezza attesa per GerR (22 KDa) ed una più alta. Poiché la dimensione della banda più alta è di 28 KDa, la nostra ipotesi è che durante la sonicazione oltre a GerR è stata estratta anche la proteina RsfA, omologa strutturale e ipoteticamente funzionale di GerR espressa nella prespora (Wu and Errington, 2000). L'alto grado di omologia spiega il riconoscimento da parte dell'anticorpo ed i profili d'espressione nel ceppo selvatico e nel ceppo mutante sono congruenti con la nostra ipotesi. Sono in corso esperimenti con il mutante nullo di *gerR* per valutare la veridicità di questa ipotesi.

Come si vede in figura 3.15, la proteina GerR (banda bassa) nel ceppo selvatico compare due ore dopo l'inizio della sporulazione, e diminuisce dopo 5 ore restando a livelli bassissimi fino ad 8 ore dopo.

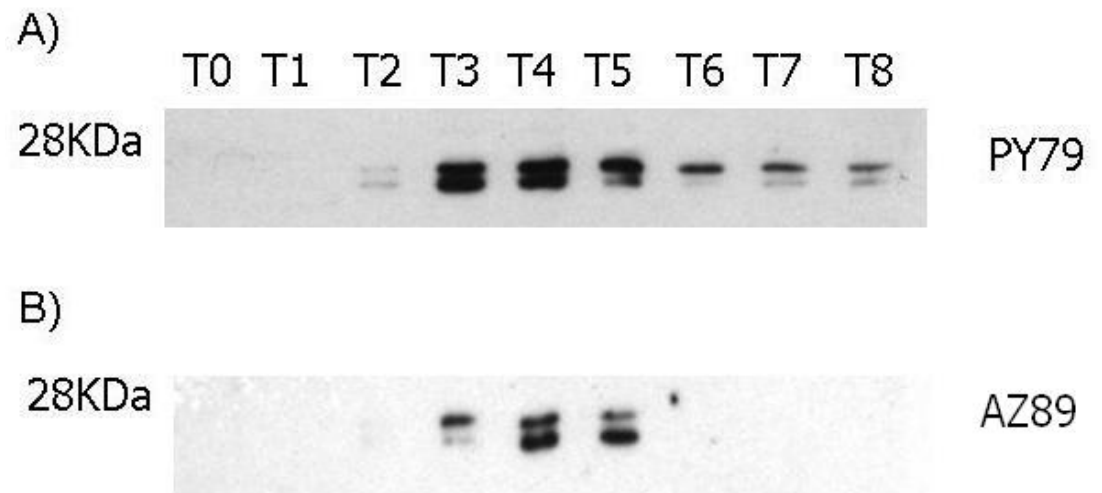


Figura 3.15: *Western blot* di proteine estratte da cellule raccolte fino a 8 ore dopo l'inizio della sporulazione con l'anticorpo anti-GerR. Ceppo selvatico (PY79) (A), ceppo isogenico mutato in *spoIIID* (AZ89) (Tab. 2.1) (B), sono riportate le masse molecolari in kDa.

Come atteso dagli esperimenti descritti nel paragrafo 3.1.1, nel ceppo AZ89 (*spoIIID*<sup>-</sup>) si evidenzia un'attivazione ritardata di un'ora e la scomparsa della proteina dopo 6 ore dall'inizio della sporulazione, rispetto al ceppo selvatico.

Questi dati confermano che la trascrizione di *gerR* è controllata dal fattore SpoIIID (Risultati 3.2.1 e figura 3.3) e mostrano che la proteina GerR non è espressa ad alti livelli a tempi di sporulazione tardivi (T6, T7, T8).

Questo fa supporre che l'azione regolatrice di GerR nei confronti dei geni espressi tardivamente non sia diretta ma che avvenga tramite un fattore trascrizionale intermedio.

### **3.1.5 GerR regola positivamente i geni *gerE* e *spoVIF***

In base ai risultati appena descritti, decidevo di verificare quali fattori potessero fungere da intermedi nella regolazione dei geni tardivi della sporulazione. Siccome tali geni sono sotto il controllo di  $\sigma^K$  e del fattore trascrizionale GerE, GerR potrebbe influenzare la trascrizione di questi geni agendo direttamente su *gerE*.

E' noto inoltre dalla letteratura (Kuwana *et al.* 2004) che la proteina sporulazione-specifica SpoVIF è richiesta per la corretta espressione e stabilità di GerE, sebbene non ne influenzi la trascrizione del gene.

Sulla base di ciò decidevo di valutare l'effetto di GerR sull'espressione di *gerE* e *spoVIF*.

Per ottenere la fusione trascrizionale *gerE::lacZ*, un frammento di 373 coppie di basi, contenente le sequenze regolative del gene *gerE* è stato amplificato per *PCR* utilizzando come stampo il DNA cromosomale di un ceppo selvatico di *B. subtilis* e gli oligonucleotidi, *gerE*-up-senso (-379/-360) e *gerE*-anti-BamHI (-24/-6) (Materiali e Metodi Tab. 2.2), disegnati in modo da produrre un amplificato contenente all'estremità 3' il sito di restrizione per l'enzima *Bam*HI.

Il prodotto di amplificazione, della lunghezza attesa, veniva purificato dopo migrazione su gel di agarosio e clonato nel vettore commerciale pGemT-easy. Il plasmide ricombinante così originato era chiamato pGT-gerEp.

I cloni positivi sono stati selezionati su terreno TY contenente ampicillina, IPTG ed X-gal (Materiali e Metodi 2.2).

Quindi, il frammento genomico contenente il promotore di *gerE* è stato escisso dal plasmide pGT-gerEp con gli enzimi di restrizione *Bam*HI e *Eco*RI (presente nel sito di clonaggio del vettore), purificato da gel d'agarosio e clonato a monte del gene *lacZ* contenuto nel vettore pJM783, precedentemente digerito con gli stessi enzimi di restrizione.

Il vettore pJM783, descritto precedentemente, permette quindi di misurare l'attività trascrizionale di un promotore attraverso la misura dell'attività  $\beta$ -galattosidasica.

Per selezionare un clone positivo tra i trasformanti ottenuti è stata effettuata una *PCR colony* utilizzando gli oligonucleotidi gerE-up-senso e lacZ2anti (Materiali e Metodi 2.10 e Tabella 2.2). L'analisi delle bande amplificate per *PCR*, dopo migrazione su gel d'agarosio, ha permesso di identificare i plasmidi contenenti il frammento gerEp integrato nell'orientamento corretto.

Il plasmide ricombinante contenente la fusione *gerE::lacZ* era chiamato pJM783-gerEp.

Per integrare la fusione trascrizionale *gerE::lacZ* nel cromosoma di *B. subtilis*, il plasmide pJM783-gerEp era utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo selvatico PY79.

L'integrazione del plasmide sul cromosoma è avvenuta mediante un evento di singolo *crossing-over* (tipo Campbell) a livello del promotore di *gerE*, ovvero tra le sequenze di DNA omologhe presenti nel plasmide e nel cromosoma, in modo da ottenere non soltanto l'integrazione della fusione *gerE::lacZ*, ma anche la ricostituzione dell'intero gene *gerE* sul cromosoma di *B. subtilis*.

I trasformanti sono stati selezionati piastrando la trasformazione su terreno TY addizionato con l'antibiotico cloramfenicolo. I



trasformanti sono stati poi piastrati su terreno DSM, che induce la sporulazione, contenente l'antibiotico cloramfenicolo e il substrato cromogenico per la  $\beta$ -galattosidasi (X-Gal). Su tali piastre, le colonie contenenti la fusione assumono una colorazione azzurra dovuta all'idrolisi del substrato, indicando che la fusione è funzionante. Uno dei cloni positivi, veniva denominato CG323 ed utilizzato negli esperimenti successivi.

Il DNA cromosomale di GC323 veniva poi estratto ed utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo mutato in *gerR*. Uno dei cloni positivi, era denominato CG324 ed utilizzato negli esperimenti successivi.

Lo stesso procedimento è stato utilizzato per ottenere la fusione trascrizionale *spoVIF::lacZ*, un frammento di 642 coppie di basi, contenente le sequenze regolative del gene *spoVIF* (-571nt dal codone di inizio della traduzione) e una breve regione codificante del gene (+72 nt dal codone di inizio della traduzione), è stato amplificato per *PCR* utilizzando come stampo il DNA cromosomale di un ceppo selvatico di *B. subtilis* e gli oligonucleotidi, *spoVIF*-senso (-571/-553) e *spoVIF*-anti-BamHI (+53/+72) (Materiali e Metodi Tab. 2.2), disegnati in modo da produrre un amplificato contenente all'estremità 3' il sito di restrizione per l'enzima *Bam*HI.

Il prodotto di amplificazione, della lunghezza attesa, è stato trattato come quello ottenuto per l'amplificazione della regione del promotore di *gerE*, clonato nel vettore pJM783 come descritto e integrato sul cromosoma del ceppo selvatico. Quindi abbiamo ottenuto il ceppo GC290 che presenta la fusione trascrizionale *spoVIF::lacZ* integrata nel locus *spoVIF* sul cromosoma di *B. subtilis* PY79 e il ceppo GC291 che presenta la fusione trascrizionale *spoVIF::lacZ* in un ceppo mutato in *gerR*.

L'attività delle fusioni *gerE::lacZ* e *spoVIF::lacZ* nel ceppo selvatico e nel ceppo mutante è stata valutata misurando l'attività  $\beta$ -galattosidasi durante la sporulazione secondo il saggio descritto nei Materiali e Metodi. I singoli ceppi sono stati cresciuti in terreno DSM per indurre la sporulazione ed aliquote di 1mL di cellule batteriche sono state prelevate ad intervalli di un'ora, a partire dall'inizio della sporulazione.

I valori dell'attività  $\beta$ -galattosidasi, sono stati riportati in grafico in funzione del tempo come mostrato in figura 3.16.

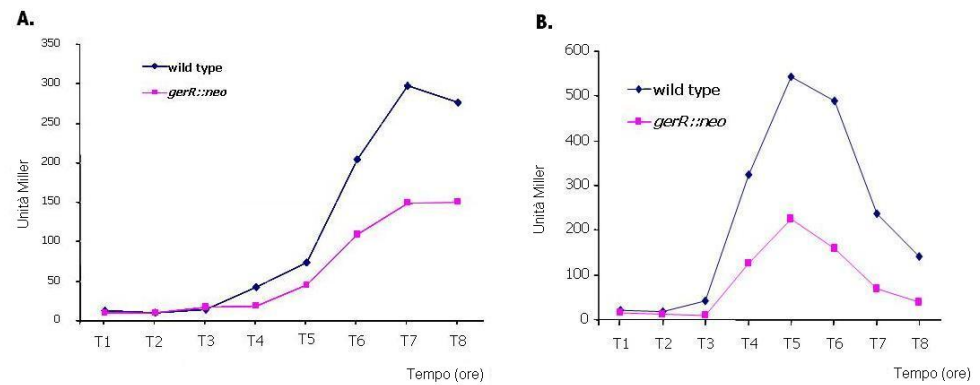


Figura 3.16: Analisi della trascrizione dei geni *gerE* (A.) e *spoVIF* (B.) durante la sporulazione nei ceppi selvatici (quadrati blu) confrontati rispettivamente con i ceppi mutanti in *gerR* (rombi viola). I dati riportati sono medie di diversi esperimenti indipendenti.

I risultati riportati in figura 3.16 indicano che in assenza di GerR la trascrizione di entrambi i geni *gerE* e *spoVIF* risulta effettivamente ridotta, facendo ipotizzare che vi sia un doppio meccanismo di controllo di GerR: uno diretto sulla trascrizione di GerE ed uno indiretto sulla stabilità della proteina GerE agendo sulla trascrizione di SpoVIF.

### 3.1.6 Discussione

Il gene *gerR* è coinvolto nella regolazione dell'espressione di alcuni geni della sporulazione controllati dal fattore sigma  $\sigma^K$  e dal fattore trascrizionale GerE. Il prodotto del gene, la proteina GerR, presenta molte similarità con i membri della famiglia dei fattori trascrizionali caratterizzati dal motivo strutturale *basic leucine zipper*, quindi è potenzialmente capace di legare direttamente il DNA.

Dall'analisi delle proteine solubilizzate del rivestimento sporale (Fig 3.11), si osserva che un mutante *knock out* del gene *gerR* provoca un notevole cambiamento nella composizione delle proteine sporali, denotando un coinvolgimento di GerR nel regolare l'espressione di alcune proteine della tunica sporale.

In particolare, come si evince dalle figure 3.13 e 3.14, GerR non influenza la trascrizione dei geni controllati soltanto dal fattore

sigma  $\sigma^K$  ma solo la trascrizione dei geni controllati anche dal fattore trascrizionale GerE.

L'effetto di GerR su tali geni non è uguale in tutti i casi analizzati. Nel caso del gene *cotU*, GerR funge da repressore della trascrizione mentre per i geni *cotC*, *cotG* e *cotB* funge da attivatore.

Dall'analisi dell'espressione del gene *gerR* è emerso che questo gene è controllato dal fattore sigma  $\sigma^E$ , come già noto, ma anche dal fattore trascrizionale SpoIIID (Fig. 3.3 e Fig. 3.15) ed è trascritto tra due e sei ore dopo l'inizio della sporulazione. Inoltre, poiché GerR non è particolarmente stabile (Fig. 3.15A), è probabile che l'effetto di GerR sui geni tardivi (espressi otto ore dopo l'inizio della sporulazione) sia mediato da un altro fattore trascrizionale.

GerE è un fattore trascrizionale che regola la trascrizione dei geni tardivi e quindi è un buon candidato ad essere il fattore intermedio che media l'azione di GerR. Infatti dall'analisi dell'effetto della mutazione nulla di *gerR* sulla trascrizione di *gerE* si evince che GerR regola positivamente l'espressione di *gerE* (Fig. 3.16A).

Inoltre, GerR regola positivamente (Fig. 3.16B) anche l'espressione di un altro fattore, la proteina SpoVIF, che, a sua volta, regola la stabilità di GerE (Kuwana *et al.* 2004).

Quindi i dati da me ottenuti mi permettono di ipotizzare che GerR agisca da attivatore della trascrizione di *gerE* e *spoVIF* e che quindi indirettamente (tramite GerE) influenzi l'espressione di diversi geni *cot* tardivi (figura 3.17).

Nel caso del gene *cotU*, che è invece negativamente regolato da GerR, si può ipotizzare l'intervento di un fattore trascrizionale diverso da GerE, come mediatore della regolazione. Tale aspetto non è stato da me affrontato e rimane da chiarire in futuro.

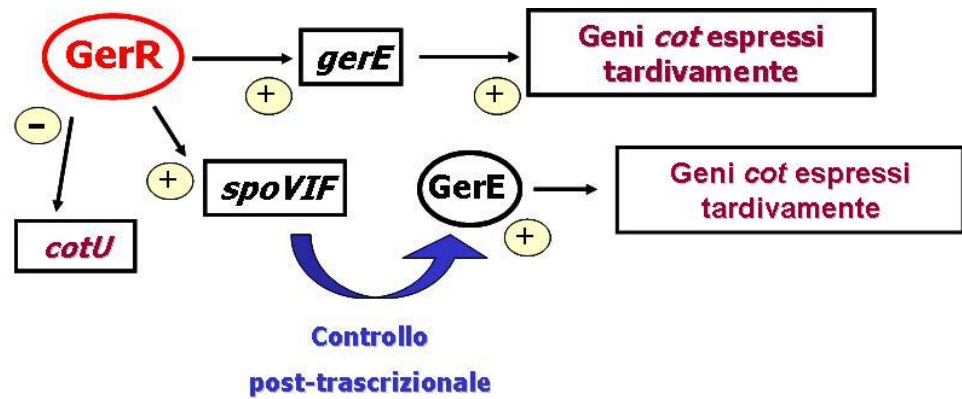


Figura 3.17: Rappresentazione schematica del meccanismo di regolazione di GerR sui geni *cot*.

### **3.2 Esposizione di antigeni del virus dell'epatite C sulla superficie sporale in *Bacillus subtilis***

L'infezione da Hepatitis C Virus (HCV) è la causa principale di gravi patologie del fegato, ancora oggi non esiste vaccino o terapia che abbia effettivamente un effetto protettivo contro questo virus. A causa dell'alta variabilità genetica del virus la progettazione di un efficace vaccino contro l'HCV è estremamente difficile e, negli ultimi anni, ha attirato l'attenzione di un numero sempre maggiore di studiosi.

In questo contesto si inseriscono gli esperimenti volti a verificare l'uso delle spore di *B. subtilis* come veicolo per esporre epitopi di HCV. Ho selezionato come antigene virale modello la proteina NS3 (Non-Structural 3).

Per esporre la proteina NS3 ho utilizzato il sistema di esposizione superficiale sulla spora precedentemente messo a punto nel laboratorio dove ho svolto la Tesi (Isticato *et al.*, 2001; Mauriello *et al.*, 2004; Isticato, Scotto di Mase *et al.*, 2007). Ho quindi selezionato come partner di fusione i due componenti della tunica sporale, CotB e CotC, già precedentemente utilizzati per esporre epitopi eterologhi (Introduzione 1.9). Non sapendo quale forma di presentazione dell'antigene fosse più idonea per esporre epitopi di



tale virus ho messo a punto diverse strategie di clonaggio che utilizzano 3 fusioni geniche con NS3:

- 1) al C-terminale della proteina CotC (FUSIONE A);
- 2) al C-terminale della proteina CotB $\Delta$ 105 (FUSIONE B);
- 3) all'N-terminale della proteina CotC (FUSIONE C).

La strategia generale che ho seguito per ottenere l'espressione eterologa sulla superficie sporale consisteva nell'ottenere fusioni geniche tra il 5' della sequenza codificante per NS3 all'estremità 3' di: i) il gene *cotC* con il suo promotore (FUSIONE A), ii) un frammento del gene *cotB* di 1071 bp contenente il promotore del gene e codificante per i primi 275 aminoacidi di CotB (Fusione B) e iii) nell'inserire la sequenza codificante per NS3 nella regione compresa tra il promotore e il coding del gene *cotC*, in-frame con il sito d'inizio della traduzione (FUSIONE C) (figura 3.18).

Tali fusioni geniche venivano successivamente clonate in un vettore integrativo e, in seguito ad un evento di doppia ricombinazione, trasferite sul cromosoma di *B. subtilis* per garantirne la stabilità genetica.

### 3.2.1 Costruzione dei ceppi ricombinanti

Per ottenere le tre fusioni A, B e C (figura 3.18) utilizzavo la tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR). I geni *cotB* e *cotC* venivano amplificati per PCR usando come stampo il cromosoma di *B. subtilis* e come *primers* gli oligonucleotidi sintetici riportati in Materiali e Metodi tabella 2.2.

Fusione A. Il frammento di 363 bp corrispondente al gene *cotC* veniva ottenuto per amplificazione da DNA cromosomale di *B.subtilis*, con gli oligonucleotidi CotC-HindIII<sub>senso</sub> e CotC-EcoRV-<sub>anti</sub> (Materiali e Metodi Tab. 2.2). Il prodotto di PCR veniva purificato e clonato nel plasmide pGemT-easy ed il plasmide ricombinante così originato, veniva chiamato pHC2.

Il frammento di 1896 bp corrispondente alla sequenza codificante per NS3 veniva separatamente amplificato dal plasmide pMRKAd6 (Capone *et al.*, 2006) con gli oligonucleotidi NS5-EcoRV<sub>senso</sub> e NS3-EcoRI/SpeI <sub>anti</sub> (Materiali e Metodi Tab.2.2).

Il prodotto di PCR veniva purificato e clonato nel plasmide pGemT-easy ed il plasmide ricombinante ottenuto veniva chiamato pHC3. Il frammento NS3 veniva escisso dal plasmide pHC3 mediante digestione con gli enzimi *EcoRV* e *SpeI* e clonato in pHC2 precedentemente digerito con gli stessi enzimi. Il costrutto così creato veniva chiamato pHC5.

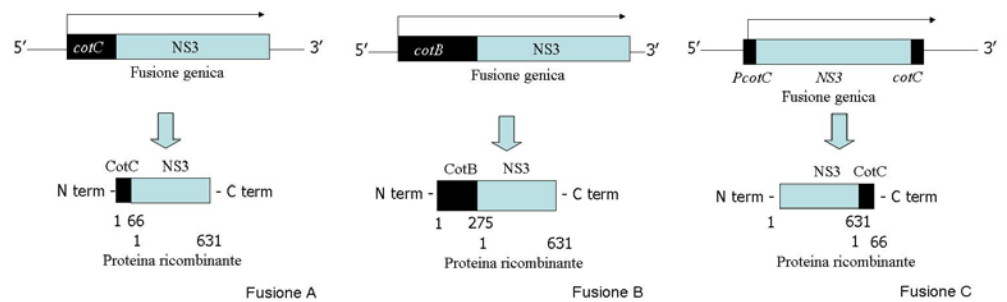


Figura 3.18: Rappresentazione schematica delle tre fusioni geniche. Sotto le proteine chimeriche sono indicati il primo e l'ultimo amminoacido delle proteine selvatiche di *B. subtilis* e dell'epitopo.

Fusione B. La strategia seguita per ottenere la fusione B era identica a quella seguita per costruire la fusione A, con le seguenti modifiche: il frammento di 1071 bp corrispondente al gene *cotB* veniva ottenuto per amplificazione da DNA cromosomale di *B. subtilis*, con gli oligonucleotidi CotB-HindIII senso e CotB-EcoRV-anti (Materiali e Metodi Tab. 2.2). Il prodotto di *PCR* veniva purificato e clonato nel plasmide pGemT-easy ed il plasmide ricombinante così originato, veniva chiamato pHC1.

Il frammento NS3 veniva escisso dal plasmide pHC3 mediante digestione con gli enzimi *EcoRV* e *SpeI* e clonato in pHC1 precedentemente digerito con gli stessi enzimi. Il plasmide così ottenuto veniva chiamato pHC4.

Fusione C. Il frammento di 1896 bp corrispondente alla sequenza codificante per NS3 veniva amplificato dal plasmide pMRKA6 (Capone *et al.*, 2006) con gli oligonucleotidi NS5-NotI senso e NS3-NotI anti (Materiali e Metodi Tab. 2.2). Il prodotto di *PCR* veniva purificato e clonato nel plasmide pGemT-easy, ottenendo il plasmide ricombinante pHC6. La fusione del frammento NS3 con il gene *cotC* veniva ottenuta utilizzando il vettore pDS17 (Isticato, Scotto di Mase *et al.*, 2007).

Le fusioni geniche A e B venivano escisse rispettivamente dai plasmidi pHC5 e pHC4 mediante digestione con gli enzimi di

restrizione *Hind*III e *Eco*RI, purificate da gel d'agarosio e trasferite ciascuna nel vettore d'integrazione pDG364 precedentemente digerito con gli stessi enzimi di restrizione, ottenendo, rispettivamente, i vettori pHC8 e pHC9. Il vettore pDG364 presenta come marcatore selezionabile in *B.subtilis* il gene per la resistenza all' antibiotico cloramfenicolo (*cat*) ed è stato descritto nei paragrafi precedenti (Risultati e Discussione 3.1.2.1).

La fusione genica C veniva ottenuta escidendo il frammento NS3 dal plasmide pHC6 mediante digestione con l'enzima di restrizione *Not*I, purificata da gel d'agarosio e trasferita nel vettore pDS17 (Isticato, Scotto di Mase *et al.*, 2007), precedentemente digerito con lo stesso enzima di restrizione. Ottenevo il plasmide pHC7.

Per integrare le fusioni geniche sul cromosoma di *B. subtilis*, i plasmidi pHC7, pHC8 e pHC9 venivano linearizzati per digestione con l'enzima di restrizione *Kpn*I (Fig. 3.19) ed utilizzati per trasformare cellule di un ceppo selvatico di *B. subtilis* (PY79) rese competenti come descritto in Materiali e Metodi.

I cloni resistenti al cloramfenicolo erano il prodotto di un evento di doppio crossing-over tra le regioni del gene *amyE* presenti sui plasmidi ricombinanti e quelle presenti sul cromosoma.

Per verificare che le integrazioni dei plasmidi pHC7, pHC8 e pHC9 sul cromosoma fossero effettivamente avvenute come previsto, estraevo il DNA cromosomale di alcuni cloni Cm<sup>R</sup> e lo utilizzavo come stampo in reazioni di *PCR*, con gli oligonucleotidi interni al gene *amyE*: AmyA e AmyS. I cloni derivati dalla trasformazione con i plasmidi pHC7, pHC8 mostravano, come atteso, un prodotto di amplificazione delle dimensioni di 5710 bp, mentre i cloni derivati dalla trasformazione con il plasmide pHC9 mostravano un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese di 6401 bp. Tre cloni positivi, uno per ogni trasformazione, chiamati HC101, HC102 e HC100 e contenenti rispettivamente le fusioni A, B e C, venivano selezionati per gli esperimenti successivi (figura 3.19).

Per il corretto assemblaggio delle proteine chimeriche che utilizzano CotB come *carrier* è necessario che una copia selvatica della proteina CotB sia espressa (Isticato *et al.*2001); mentre per le proteine chimeriche che sfruttano CotC come *carrier* è stato dimostrato che l'esposizione della proteina chimerica è massimizzata nel ceppo isogenico che non esprime le copie

selvatiche del gene *cotC* e del gene *cotU* (Isticato, Scotto di Mase *et al.*, 2007). Per questa ragione le fusioni geniche con *cotC* sono state integrate stabilmente sul cromosoma del ceppo RH209 (*cotC::spc cotU::neo*; Materiali e Metodi Tab. 2.1). A tale scopo il DNA cromosomale dei ceppi HC100 e HC101, che contengono integrate nel locus *amyE* le fusioni C ed A rispettivamente, è stato estratto ed utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo con il ceppo RH209.

I trasformanti ottenuti sono stati poi piastrati su terreno TY contenete gli antibiotici spectinomomicina e neomicina, associati alla ai geni *cotC* e *cotU*, rispettivamente.

Uno dei cloni positivi per la fusione C ed uno di quelli positivi per la fusione A sono stati chiamati HC103 ed HC104 rispettivamente ed utilizzati negli esperimenti successivi.

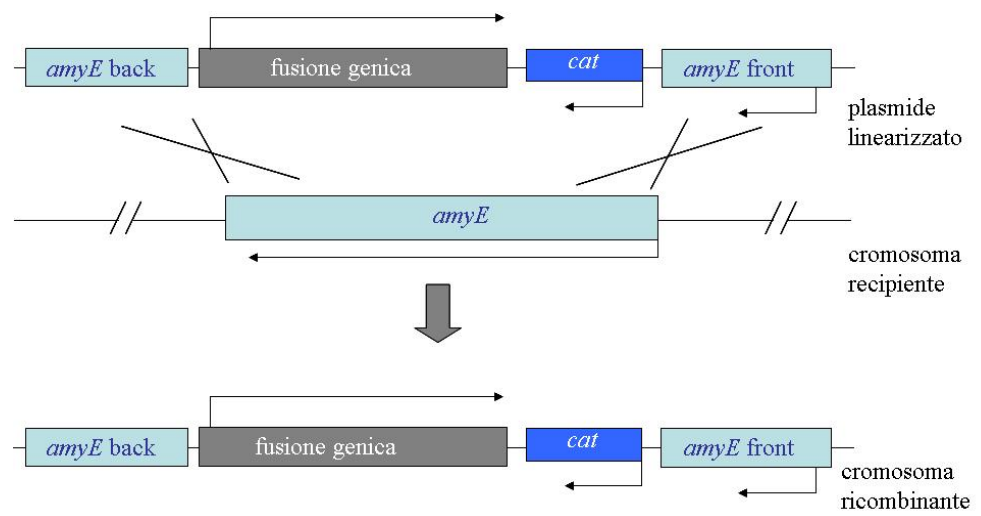


Figura 3.19: Schema di integrazione dei plasmidi ricombinanti pHc7, pHc8 e pHc9 contenenti rispettivamente le fusioni C, A, B per doppio crossing-over sul cromosoma di *B. subtilis*.



### 3.2.2 Verifica della corretta espressione, assemblaggio ed esposizione delle proteine chimeriche

Allo scopo di verificare se le fusioni geniche descritte erano espresse ed i loro prodotti assemblati nella tunica sporale dei ceppi ricombinanti HC101, HC102, HC103 e HC104, decidevo di preparare spore purificate come descritto in Materiali e Metodi e di analizzare per *western blot* con l'anticorpo anti-NS3, le proteine solubilizzate dal rivestimento delle spore mature (Materiali e Metodi 2.12, 2.16 e 2.27).

Come mostrato in figura 3.20 A, la fusione A era maggiormente espressa ed assemblata sulla superficie sporale del ceppo HC104 (fusione al C-term della proteina CotC in un *background cotC::spc; cotU::neo*) rispetto al ceppo HC101 (fusione al C-term della proteina CotC in un *background* selvatico), mentre la fusione C non era espressa o correttamente assemblata nei ceppi HC100 (fusione all'N-term della proteina CotC in un *background* selvatico, dati non mostrati) e HC103 (fusione all'N-term della proteina CotC in un *background cotC::spc; cotU::neo*).

Le proteine solubilizzate dal rivestimento di spore del ceppo isogenico parentale erano utilizzate come controllo negativo e, come atteso non davano nessun segnale (dati non mostrati).

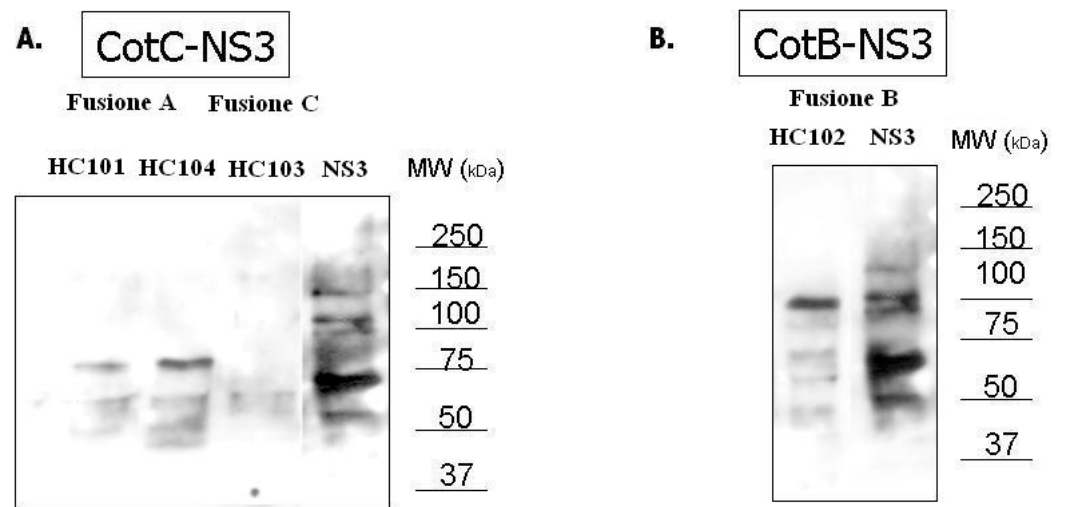


Figura 3.20: *Western blot* di proteine estratte dalla tunica sporale con anti-NS3. Fusione A CotC-NS3 nei ceppi con *background* selvatico e *cotC::spc*; *cotU::neo*, fusione C CotC-NS3 nel ceppo con *background cotC::spc*; *cotU::neo*, estratto crudo contenete la proteina NS3 utilizzato come controllo positivo (A.). Fusione B CotB-NS3 nel ceppo con *background* selvatico, estratto crudo contenete la proteina NS3 utilizzato come controllo positivo (B.). Le masse molecolari sono riportate in KDa. L'anticorpo e l'estratto crudo erano forniti dal gruppo di ricerca della ditta Okàiros del C.E.I.N.G.E. di Napoli.

Anche la fusione B era espressa e correttamente assemblata nel ceppo HC102 (fusione al C-term della proteina CotB in un *background* selvatico) (Fig. 3.20 B). Anche in questo caso le proteine solubilizzate dal rivestimento di spore del ceppo isogenico parentale erano utilizzate come controllo negativo e, come atteso non davano nessun segnale (dati non mostrati).

I pesi molecolari delle proteine chimeriche erano congruenti con quelli attesi, infatti per la fusione A CotC (12kDa)-NS3 (68kDa) osservavo una proteina chimerica di circa 80kDa mentre per la fusione B CotB (31kDa)-NS3 (68kDa) osservavo una chimera di circa 100kDa.

Tutte le fusioni ottenute sono state inoltre analizzate mediante immunofluorescenza (Materiali e Metodi 2.28).

Come si vede in figura 3.21, la fluorescenza risulta associata alla spora (A e B). Ulteriori osservazioni hanno però indicato che una parte di fluorescenza rimane anche nella cellula madre (figura 3.21C-D) suggerendo che la proteina chimerica probabilmente non è assemblata con elevata efficienza.

Come mostrato in figura 3.22 A, la fusione C viene espressa ma non si assembla sulla superficie sporale: la fluorescenza è associata solo alla cellula madre e non alla spora.

La fusione A, invece, viene espressa ed in parte assemblata in quanto la fluorescenza è sia associata alla spora sia presente nella cellula madre (Fig. 3.22 B).

Sulla base dei risultati degli esperimenti di *western blot* e di immunofluorescenza decidevo di utilizzare soltanto le spore dei ceppi HC102 e HC104 per gli esperimenti *in vivo* necessari per verificare l'attività immunogenica delle spore ricombinanti.

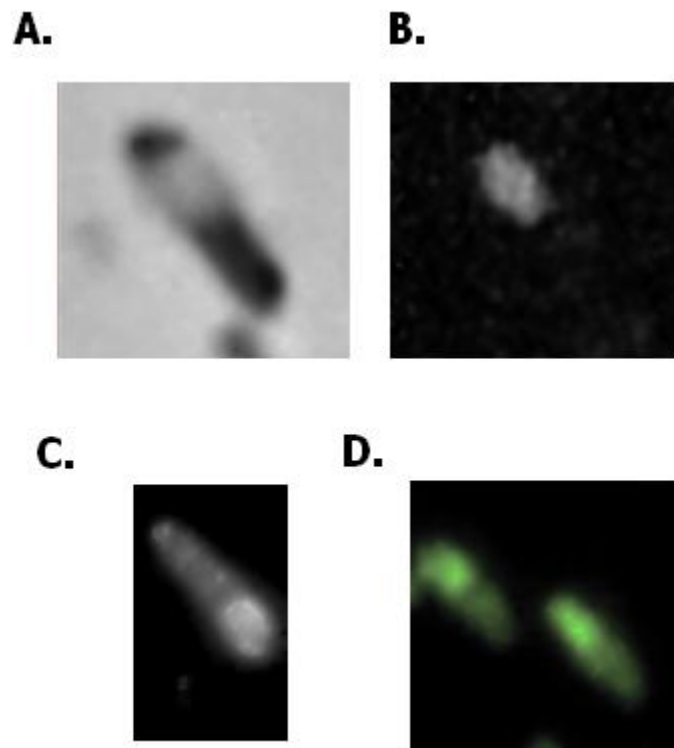


Figura 3.21: Localizzazione della fusione CotB-NS3 per immunofluorescenza con anticorpi anti-CotB nel ceppo HC102. Lo stesso campo viene mostrato al contrasto di fase (A) e al microscopio a fluorescenza (B). Due campi diversi mostrati al microscopio a fluorescenza (C e D), l'immagine D è stata colorata con il *software* analySIS (SIS) dopo l'acquisizione.

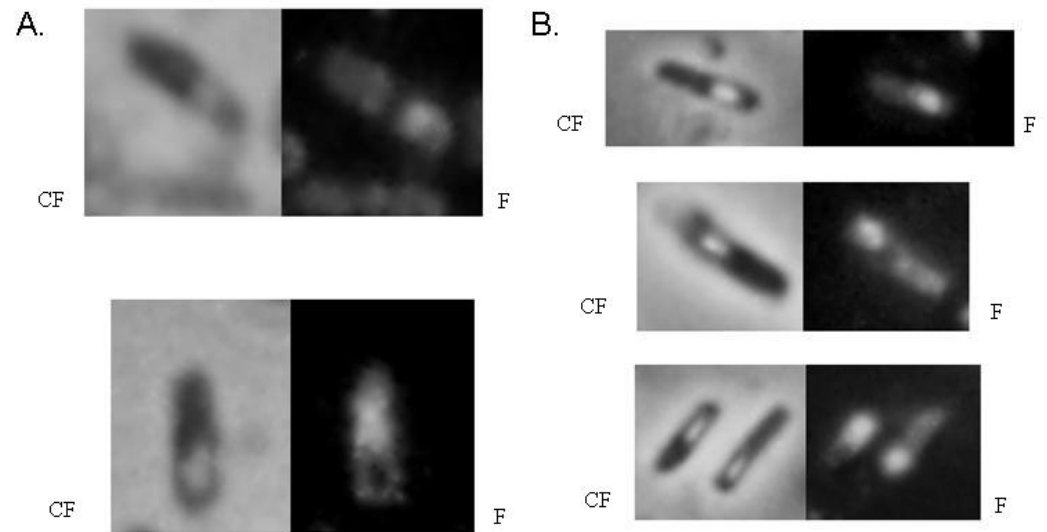


Figura 3.22: Localizzazione delle fusioni CotC-NS3 (FusioneA (pannello B) e Fusione C (pannello A)) per immunofluorescenza con anticorpi anti-CotC. Lo stesso campo viene mostrato al contrasto di fase (CF) e al microscopio a fluorescenza (F).

### **3.2.3 Analisi *in vivo* in sistemi murini dell'attività immunogenica delle spore ricombinanti**

In collaborazione con il gruppo di ricerca della ditta Okàiros del C.E.I.N.G.E. di Napoli venivano effettuati esperimenti *in vivo* per valutare se le spore ricombinanti inducevano una risposta immunitaria nei confronti dell'antigene NS3.

Le cellule dei ceppi HC102 e HC104, sono state cresciute in DSM, per indurre la sporulazione. Dopo circa 36 ore di crescita a 37°C, le spore sono state purificate come descritto nei Materiali e Metodi ed il numero delle spore purificate veniva quindi contato con camera di Bürker al microscopio ottico (Olympus BH-2, lente 100x). Le spore erano aliquotate ( $5 \times 10^9$  spore mL<sup>-1</sup>) ed inviate ai laboratori della ditta Okàiros per le somministrazioni da effettuare in sistemi murini.

Presso i laboratori della ditta Okàiros erano effettuate le somministrazioni delle spore come riportato nello schema in figura 3.23 e successivamente era effettuata l'analisi sia qualitativa che quantitativa della risposta immunitaria.

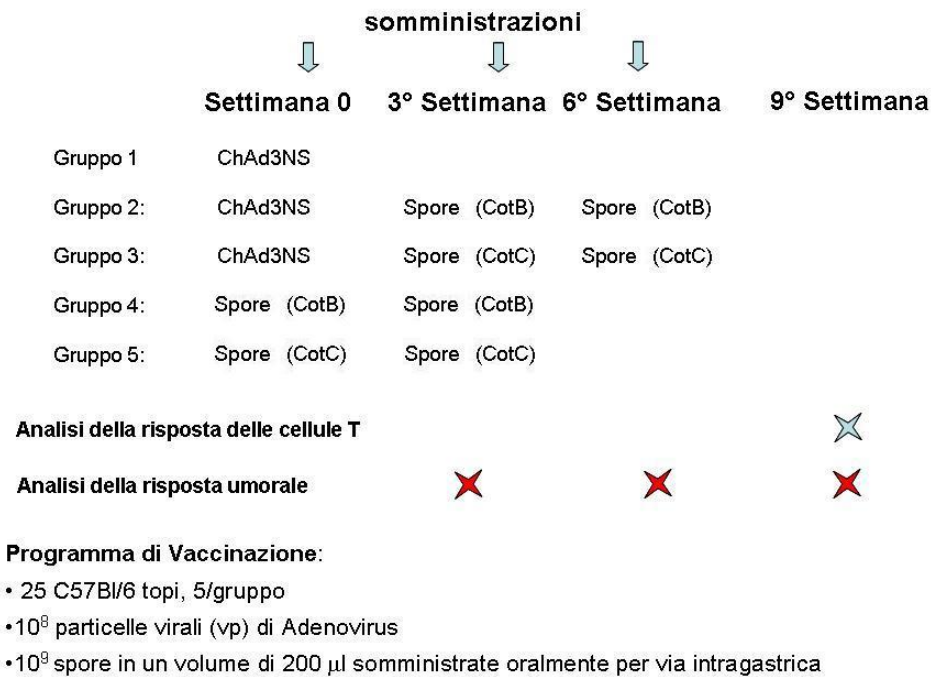


Figura 3.23: Schema delle somministrazioni, delle analisi e programma di vaccinazione. Spore (CotB) e Spore (CotC) rappresentano rispettivamente le spore dei ceppi HC102 e HC104 e cioè esperimenti le fusioni al C-term delle proteine CotB e CotC rispettivamente.



Come controllo dell'esperimento, un gruppo di topi era immunizzato con Adenovirus ricombinante che esprime la proteina NS3 (gruppo 1 in figura 3.23) ed altri 2 gruppi con l'Adenovirus e le spore (gruppi 2 e 3 in figura 3.23).

Dall'analisi della risposta sia di tipo umorale che di tipo cellulare indotta nei gruppi di topi trattati soltanto con le spore, gruppi 4 e 5, non vi era alcuna induzione di risposta immunitaria (dati non mostrati).

Nei gruppi di topi trattati con Adenovirus ed Adenovirus e spore mutanti, gruppo 1 e gruppi 2 e 3 rispettivamente, la risposta di tipo cellulare era valutata con analisi di tipo ELISpot per la produzione di  $IFN\gamma$  e multicolour-ICS per la produzione di  $IFN\gamma$ , IL-2 ed IL-4 in cellule  $CD4^+$  e  $CD8^+$ ; mentre la risposta di tipo umorale era valutata con analisi di tipo ELISA per la produzione di IgG ed IgA specifiche in campioni di siero prelevati ai tempi riportati in figura 3.23.

Dai saggi ELISA si registrava una produzione di IgG (Fig. 3.24) ed IgA (Fig. 3.25) specifiche altamente variabile all'interno di uno stesso gruppo e le differenze con il gruppo di controllo a cui veniva somministrato solo Adenovirus non erano significative, anzi in alcuni casi i topi del gruppo di controllo davano una

risposta più forte rispetto a quelli a cui venivano somministrate anche le spore.

Dall'analisi della risposta di tipo cellulare mediante ELIspot per la produzione di IFN $\gamma$ , si registrava una risposta decisamente più alta nel gruppo a cui veniva somministrato il solo Adenovirus (gruppo 1) rispetto ai gruppi a cui venivano somministrate anche le spore (gruppi 2 e 3) (Fig. 3.26).

Mentre dall'analisi multicolour-ICS, si denotava una forte produzione di IFN $\gamma$ , IL-2 e coproduzione di IFN $\gamma$  ed IL-2 in cellule CD8<sup>+</sup>, piuttosto che in cellule CD4<sup>+</sup>. In nessun caso si registrava produzione di IL-4.

Anche in questo caso si riscontrava un'elevata variabilità all'interno di uno stesso gruppo ed i topi del gruppo 1 davano quasi sempre risposte più elevate rispetto a quelli dei gruppi 2 e 3 (Fig. 3.27).

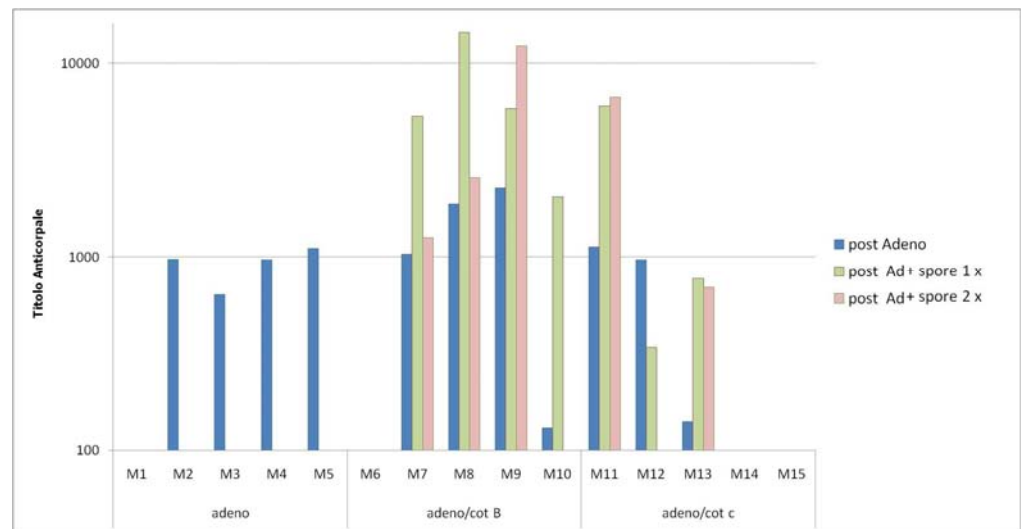


Figura 3.24: Analisi ELISA del titolo anticorpale di IgG specifiche in topi dei gruppi 1 (M1-M5), 2 (M6-M10) e 3 (M11-M15). Analisi dei campioni di siero prelevati 3 settimane dopo la prima immunizzazione con Adenovirus (blu), analisi dei campioni di siero prelevati 3 settimane dopo il primo richiamo con le spore (verde), analisi dei campioni di siero prelevati 3 settimane dopo il secondo richiamo con le spore (rosa).

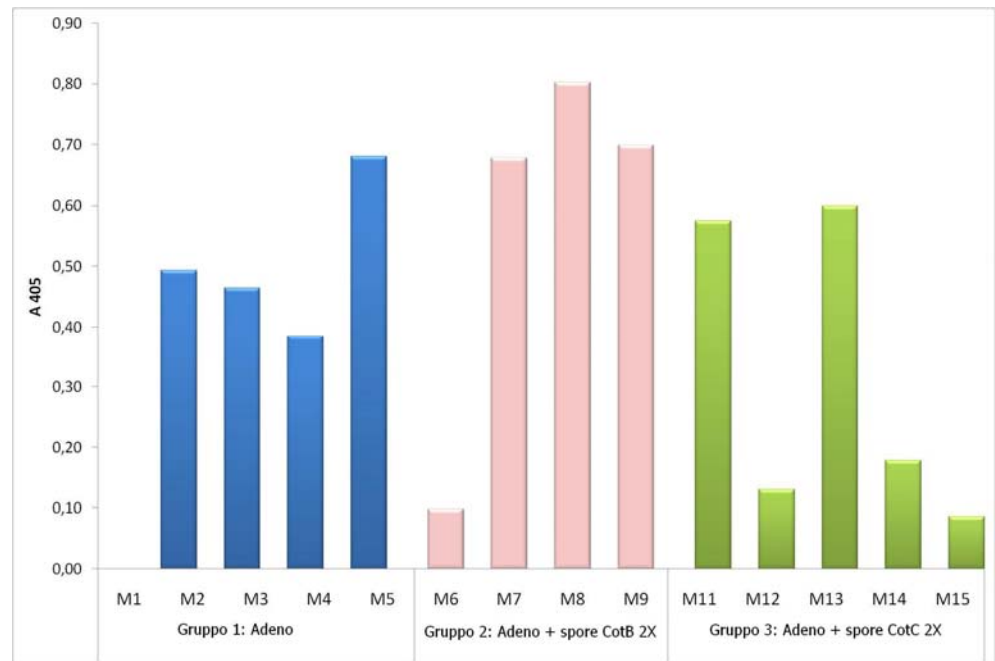


Figura 3.25: Analisi ELISA della produzione di IgA specifiche in topi dei gruppi 1 (M1-M5) (blu), 2 (M6-M9) (rosa) e 3 (M11-M15) (verde). L'analisi è effettuata sui campioni di siero prelevati 9 settimane dopo la prima immunizzazione con Adenovirus per il gruppo 1 e 3 settimane dopo il secondo richiamo con le spore per i gruppi 2 e 3.

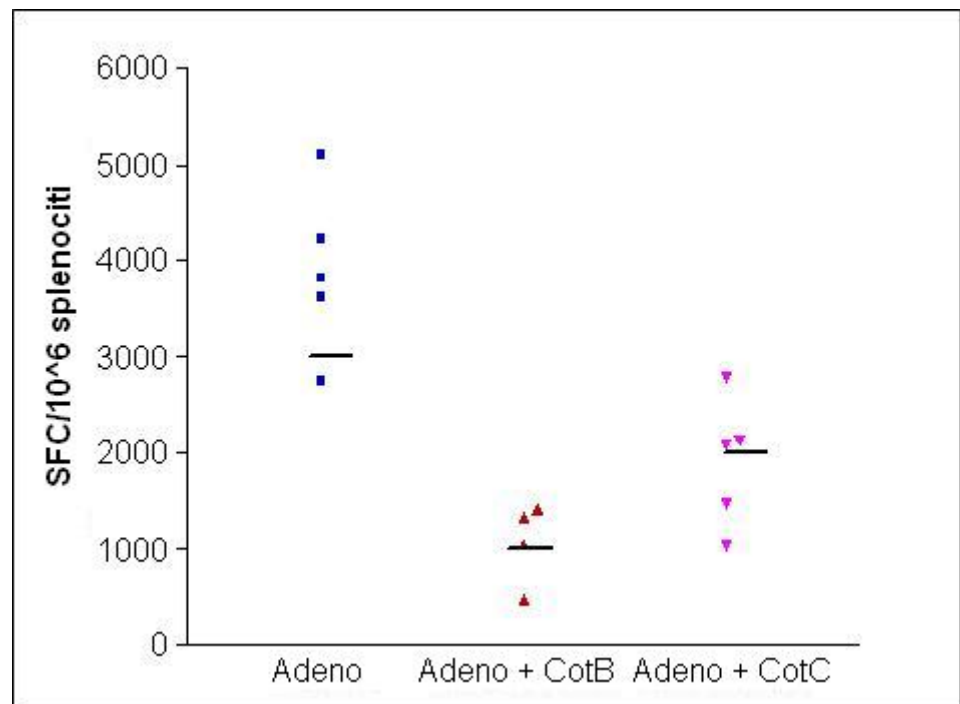


Figura 3.26: Analisi ELIspot dei gruppi 1(blu), 2 (rosso) e 3 (rosa) per la produzione di IFN $\gamma$ . L'analisi veniva effettuata sugli splenociti prelevati a 9 settimane dalla prima immunizzazione.

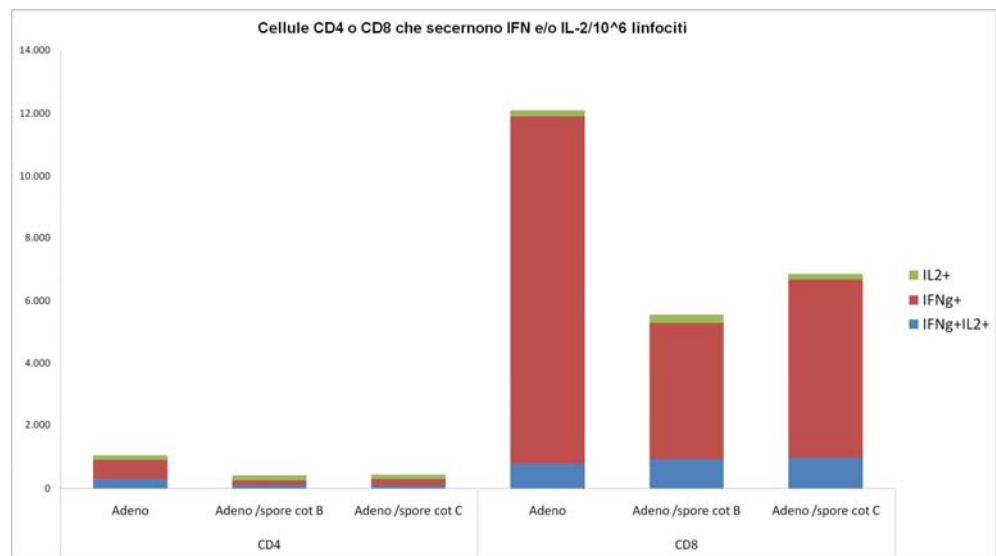


Figura 3.27: Analisi multicolour-ICS per la produzione di IFN $\gamma$  (rosso), IL-2 (verde) e coproduzione di IFN $\gamma$  ed IL-2 (blu) sui linfociti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, prelevati a 9 settimane dalla prima immunizzazione. I risultati riportati in grafico sono le medie dei risultati dati dai singoli animali divisi per gruppi: gruppo 1 (Adeno), gruppo 2 (Adeno/spore cot B) gruppo 3 (Adeno/spore cotC). Sull'asse delle ordinate è riportato il numero di cellule.

### **3.2.4 Discussione**

La possibilità di utilizzare le spore di *B. subtilis* come vettore per la veicolazione e presentazione di antigeni eterologhi a livello delle mucose è stata recentemente verificata utilizzando come antigeni modello un frammento della tossina tetanica (Duc *et al.*, 2003; Mauriello *et al.*, 2004; Isticato, Scotto di Mase *et al.*, 2007), la subunità B della tossina labile al calore di *Escherichia coli* (Mauriello *et al.*, 2004), una tossina di *B. anthracis* (Duc *et al.*, 2007), e la proteina VP28 del rivestimento del virus della sindrome da macchie bianche (White spot syndrome virus) (Fu *et al.*, 2008)

Gli obiettivi di questa parte del mio lavoro di Tesi, erano: i) verificare la flessibilità della spora come sistema di presentazione di un antigene eterologo diverso sia per la natura virale sia per le dimensioni molecolari maggiori rispetto a quelli precedentemente utilizzati; ii) verificare l'applicazione delle spore come vettori di vaccinazione contro il virus dell'epatite C.

A tale scopo ho costruito tre diverse fusioni geniche posizionando la proteina NS3, un antigene derivante dalla regione non strutturale del virus HCV (Hepatitis C Virus) al C-terminale di CotB, all'N-terminale e al C-terminale di CotC. Tali fusioni geniche venivano quindi integrate sul cromosoma di ceppi di *B.*

*subtilis* e le spore ricombinanti ottenute erano analizzate per verificare se le proteine chimeriche fossero assemblate sulla spora e se fossero biologicamente attive nell'indurre una risposta immunitaria in sistemi murini.

Dall'analisi dell'espressione delle proteine chimeriche, tramite esperimenti di *western blot* ed immunofluorescenza (figure 3.20, 3.21, 3.22), si evince che tutte e tre le fusioni A, B e C sono espresse ma che soltanto nelle fusioni al C-terminale di CotC e CotB (fusione A e B, rispettivamente) vengono assemblate sulla superficie sporale.

Nel caso della fusione all'N-terminale di CotC (fusione C), la proteina viene espressa ma non si assembla; probabilmente le dimensioni e le caratteristiche strutturali dell'epitopo, 631 amminoacidi contro i 66 amminoacidi di CotC, impediscono il corretto assemblaggio e la proteina espressa resta compartimentalizzata nel citoplasma della cellula madre.

Nel caso delle fusioni A e B, il posizionamento al C-terminale non influenza strutturalmente le proteine CotC e CotB ma l'ingombro dell'epitopo abbassa l'efficienza di assemblaggio della proteina chimerica sul rivestimento sporale rispetto alla copia selvatica della proteina, quindi parte della proteina espressa viene



assemblata sulla spora e parte resta compartimentalizzata nel citoplasma della cellula madre.

Probabilmente l'utilizzo, in futuro, di sequenze *linker* tra la proteina *carrier* e la proteina *passenger* potrà migliorare l'efficienza di assemblaggio e l'esposizione superficiale.

I risultati ottenuti *in vivo* indicano che non si induce alcun tipo di risposta immunitaria negli animali trattati solo con le spore ricombinanti (dati non mostrati), questo può essere dovuto ad una dose troppo bassa di spore somministrate o al fatto che le quantità di epitopo eterologo presentato sulla superficie sporale non è sufficiente ad indurre una risposta immune.

Nei topi trattati con Adenovirus e Adenovirus in combinazione con le spore, veniva effettuata un'analisi della produzione di INF $\gamma$  da parte di splenociti per verificare che l'immunizzazione fosse sufficiente a stimolare anche le cellule responsabili della memoria immune (ELISpot Fig.3.26); inoltre si analizzava la presenza di IgG e IgA nel siero per valutare se veniva stimolata la risposta di tipo umorale con la produzione di anticorpi antigene specifici (ELISA Fig. 3.24 e 3.25) da parte dei linfociti e la presenza nel siero di cellule CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e il tipo di citochine prodotte per valutare la risposta cellulare (multicolour ICS Fig.3.27).

Se la risposta immune è dovuta all'Adenovirus (immunogeno intracellulare), il tipo di risposta stimolata deriva dalla presentazione dell'antigene tramite il complesso MHC di classe I.

Se la risposta è dovuta alle spore (immunogeno extracellulare) il tipo di risposta stimolata deriva invece dalla presentazione dell'antigene tramite il complesso MHC di classe II.

A seconda del riconoscimento del MHC di classe I o di classe II, sia le cellule  $CD8^+$  sia le cellule  $CD4^+$  rispettivamente, possono fungere da linfociti T citotossici.

Le cellule T che esprimono il CD4 (T helper) possono essere suddivise in due categorie principali  $T_H1$  e  $T_H2$ , a seconda della loro funzione, della risposta a diverse citochine e della capacità di secernere citochine. L' $IFN\gamma$  e l'IL-12 promuovono lo sviluppo delle  $T_H1$ , l'IL-4 e l'IL-10 quello delle  $T_H2$ . I linfociti  $T_H1$  e  $T_H2$  differiscono tra loro per il profilo delle citochine secrete: le cellule  $T_H1$  secernono  $IFN\gamma$ , mentre le cellule  $T_H2$  secernono IL-4. In generale, i linfociti  $T_H1$  favoriscono l'attivazione dell'immunità cellulare, mentre i linfociti  $T_H2$  favoriscono quella dell'immunità umorale.

Le cellule T che esprimono il CD8 sono meno ben caratterizzate rispetto ai sottotipi  $T_H$  e con criterio identico a quello dei sottotipi

dei CD4<sup>+</sup>, anch'esse possano essere suddivise in due sottotipi sulla base delle citochine che secernono.

Dal paragone tra i livelli di risposta di tipo umorale e cellulare, il tipo di linfociti maggiormente presenti nel siero e il tipo di citochine secrete nelle risposte indotte dal solo vettore adenovirale o dallo stesso vettore in combinazione con le spore ricombinanti, possiamo concludere che la risposta immunitaria è principalmente dovuta all'immunizzazione con Adenovirus e che le spore sembrano non avere effetto nel migliorare tale risposta. In alcuni casi, anzi, i livelli di citochine secrete sono minori. Inoltre si denota una coproduzione di INF $\gamma$  ed IL-2 ascrivibile ad una risposta mediata da linfociti T<sub>H</sub>1 che inducono principalmente la risposta di tipo cellulare.

Ad ogni modo l'elevata variabilità di risposta tra gli animali all'interno di uno stesso gruppo non ci permette di considerare conclusivi questi risultati.

## ***4. Bibliografia***

- Beall, B., Driks, R. Losick, and Moran, C. P. Jr.. 1993.** Cloning and characterization of a gene required for assembly of the *B. subtilis* spore coat. *J. Bacteriol.* 175: 1705-1716
- Capone S., Meola, A., Bruno, BE., Vitelli, A., Pezzanera, M., Ruggeri, L., Davies ME., et al.. 2006.** A novel Adenovirus Type (Ad 6)-Based Hepatitis C Virus Vector that overcomes preexisting anti-Ad5 immunity and induces potent and broad cellular immune responses in Rhesus Macaques. *J Virol.* 80: 1688-1699
- Cutting, S., Driks, A., Shimdt, R., Kunkel, B. and Losick, R.. 1991.** Forespore specific-transcription of a gene in the signal transduction pathway that governs pro- $\sigma^K$  processing in *Bacillus subtilis*. *Genes & Dev.* 5: 456-466.
- Cutting, S., Vander Horn, P.B.** 1990. Genetic analysis, *In: C. Harwood and S.Cutting (Eds.), Molecular Biological Methods for Bacillus.* John Wiley and Sons, Chichester, UK pp. 27-74
- Cutting, S.M., Ricca, E., and Bark, I.. 2006.** Bacterial spores in bionanotechnology. *In: Microbial bionanotechnology: biological self-assembly and biopolymer-based nanostructures,* B.R. Massey, Horizon Bioscience Press, pp. 223-251
- Cutting, S.M.. 2004.** Spores as oral vaccines. *In: Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications,* E. Ricca, A.O. Henriques, and S.M. Cutting, eds. Norfolk, Horizon Bioscience Press, pp. 201-206.
- Donovan, W., Zheng, L., Sandman, K., & Losick, R.. 1987.** Genes en coding spore coat polypeptides form. *J. Mol. Biol.* 196, 1-10.
- Driks, A., Roels, S., Beall, B., Moran, C.P., Jr, Losick R.. 1994.** Subcellular localization of proteins involved in the assembly of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 8 (2): 234-244.
- Driks, A.. 1999.** *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:1-20.

**Driks, A.. 2002.** Proteins of the spore coat in *B. subtilis* and its closest relatives from genes to cells. ASM PRESS EDS (Sonenshein, A. L, Hoch, J. A., Losick, R.).

**Driks, A.. 2002.** Proteins of the spore coat in *B. subtilis* and its closest relatives from genes to cells. ASM PRESS EDS (Sonenshein, A. L, Hoch, J. A., Losick, R.).

**Dubuisson, J.. 2007.** Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol.* 13(17): 2406-2415

**Duc le H., Hong HA, Atkins HS, Flick-Smith HC, Durrani Z, Rijpkema S, Titball RW, Cutting SM.. 2007.** Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen. *Vaccine.* 25(2):346-55

**Duc, L.H., Hong, A.H., Uyen, N.Q., and Cutting, S.M.. 2004.** Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. *Vaccine* 22: 1873-1885

**Duc, L.H., Hong, H.A., and Cutting, S.M.. 2003a.** Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen presentation. *Vaccine* 22: 4215-4224

**Duc, L.H., Hong, H.A., Fairweather, N., Ricca, E., and Cutting, S.. 2003b.** Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect. Immun.* 71: 2810-2818.

**Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S. T., Conlon, E. M., Rudner, D. Z., Wang, S. T., Ferguson, C., Haga, K., Sato, T., Liu, J. S. and Losick, R.. 2004.** The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLOS Biology* 2 (10): 1664-1683

**Eichenberger, P., Jensen, S. T., Colon, E. M., van Ooij, C., Silvaggi, J., et al.. 2003.** The sigmaE regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 327: 945-972

**Feucht, A., Evans, L. and Errington, J.. 2003** Identification of sporulation genes by genome-wide analysis of the  $\sigma^E$  regulon of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 149: 3023-3034

- Fu, L.L., Li, W.F., Du, H.H., Dai, W., Xu, Z.R.. 2008.** Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles. *Lett Appl Microbiol.* 46(5):581-6
- Green, R.L., and Baker, S.M.. 2002.** Recent advances and novel strategies in vaccine development. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 483-488
- Han, M., Watarai S., Kobayashi, K., and Yasuda, T.. 1997.** Application of liposomes for development of oral vaccines: study of *in vitro* stability of liposomes and antibody response to antigen associated with liposomes after oral immunization. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 1109-1114
- Harry, E.J., Pogliano, K. and Losick, R.. 1995.** Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177:3386-3393
- Harwood C. and Cutting S.. 1990.** Molecular Biological Methods for *Bacillus*. (Eds.) John Wiley and Sons, Chichester, UK p. 447
- Henriques A. O., Beall B. W., Roland K., Moran C. P. Jr.. 1995.** Characterization of cotJ, a sigma E-controlled operon affecting the polypeptide composition of the coat of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol.* 177(12): 3394-406
- Henriques, A. O., Moran, C. P. Jr.. 2000.** Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods* 20, 95-110
- Henriques, A.O., Costa, T.V., Martins, L.O., and Zilhão, R.. 2004.** The functional architecture and assembly of the spore coat. *In: Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications*, E. Ricca, A.O. Henriques, and S.M. Cutting, eds. Norfolk, Horizon Bioscience Press, pp. 65-85
- Isticato, R., Cangiano, G., De Felice, M. and Ricca, E.. 2004a.** Display of Molecules on the Spore Surface. *In: Bacterial spores: New Industrial and Clinical Applications*. E. Ricca, A. O. Henriques and S. M. Cutting (eds.) Horizon Scientific Press

- Isticato, R., Cangiano, G., Tran, T.H., Ciabattini, A., Medaglioni, D., Oggioni, M.R., De Felice, M., Pozzi, G., Ricca, E.. 2001.** Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* 183: 6294-6301
- Isticato, R., Esposito, G., Zilhao, R., Nolasco, S., Cangiano, G., De Felice, M., Henriques, A.O. and Ricca, E.. 2004b.** Assembly of multiple CotC forms into the *Bacillus subtilis* spore coat. *J. Bacteriol.* 186: 1129-1135
- Isticato, R., Scotto Di Mase, D., Mauriello, E.M.F., De Felice, M., and Ricca, E.. 2007.** Amino terminal fusion of heterologous proteins to CotC increases display efficiencies in the *Bacillus subtilis* spore system. *Bio Techniques.* 42: 151-156
- Kim, H., Hahn, M., Grambowski, P., McPherson, D. C., Ohe, M., M., Wang, R., Ferguson, C. C., Eichenberger, P. and Driks, A.. 2006.** The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Mol. Microbiol.* 59 (2): 487-502
- Kobayashi, K., Suzuki, S.I., Izawa, Y., Miwa, K., Yamanaka, S.. 1998.** Transglutaminase in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J Gen Appl Microbiol* 44: 85-91
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, AM., Alloni, G., et al.. 1997.** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* 390: 249-56
- Kuwana, R., Ikejiri, H., Yamamura, S., Takamatsu, H., and Watabe, K.. 2004.** Functional relationship between SpoVIF and GerE in gene regulation during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 150: 163-170
- Kuwana, R., Okumura, T., Takamatsu, H., and Watabe, K.. 2005.** The *ylbo* gene product of *Bacillus subtilis* is involved in the coat development and lysozyme resistance of spore. *FEMS Microbiology Letters.* 342: 51-57
- Kuwana, R., Yamamura, S., Ikejiri, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Asai, K., Sadaie, Y., Takamatsu, H., and Watabe, K.. 2003.** *Bacillus subtilis* *spoIVF* (*yjcC*) gene, involved in coat assembly and spore resistance. *Microbiology.* 149: 3011-3021



- Little, S., Driks, A.. 2001.** Functional analysis of the *B. subtilis* morphogenetic spore coat proteins. *Molecular Microbiology*. 1107-1120.
- Maurer, J., Jose, J, and Meyer, T.F.. 1997.** Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 794-804
- Mauriello, E.M.F., Duc, L.H., Isticato, R., Cangiano, G., Hong, H.A., De Felice, M., Ricca, E., and Cutting, S.M.. 2004.** Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine*. 22: 1177-1187
- Medaglini, D., Ciabattini, A., Spinosa, M.R., Maggi, T., Marcotte, H., Oggioni, M.R., and Pozzi, G.. 2001.** Immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice. *Vaccine* 19: 1931-1939
- Miller, J.H.. 1972.** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 352-355
- Miroux B., Walker JE..1996.** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol.* 260(3): 289-98. Review.
- Moir, A. and Smith, D. A.. 1990.** The genetics of bacterial spore germination. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 531 – 553
- Moir, A.. 1981.** Germination properties of a spore coat-defective mutant of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 146 (3): 1106-1116
- Moradpour, D., Penin, F. and Rice, C.. 2007.** Replication of hepatitis C virus. *Nature Rev Microbiol.* 5(6): 453-63
- Nacleiro, G., Baccicalupi, L., Zilhao, R., De Felice, M. and Ricca, E.. 1996.** *Bacillus subtilis* spore coat assembly requires *cotH* gene expression. *J. Bacteriol.* 178, 4375-4380
- Parker, G. F., Daniel, R. A. and Errington, J.. 1996.** Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 142: 3445-3452

- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, FA., Moradpour, D., Pawlotsky, JM.. 2004.** Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 39: 5-19
- Perego, M.. 1993.** Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*. In: Sonenshein A L, Hoch J A, Losick R., editors. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. Washington, D.C.: American Society for Microbiology pp. 615-624
- Pogliano, K., Harry, E. and Losick, R.. 1995.** Visualization of the subcellular location of sporulation proteins in *Bacillus subtilis* using immunofluorescence microscopy. *Mol. Microbiol.* 18:459-470
- Ramamurthi, K.S., and Losick R.. 2008.** ATP-Driven Self-Assembly of a Morphogenetic Protein in *Bacillus subtilis*. *Molecular Cell* 31:406-414
- Ramamurthi, K.S., Clapham K.R. and Losick R.. 2006.** Peptide anchoring spore coat assembly to the outer forespore membrane in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 62(6): 1547-1557
- Ricca, E., Baccicalupi, L., Nacleiro, G. and Cutting, S.. 1997.** Spore coat differentiation in *Res. Microbiol.* 148: 5-9
- Ricca, E., Cutting, S. and Losick, R.. 1992.** Characterization of *bofA*, a gene involved in intercompartmental regulation of pro- $\sigma^K$  processing during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174: 3177-3184
- Roels, S., Driks, A. and Losick R.. 1992.** Characterization of *spoIVA*, a sporulation gene involved in coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174: 575-585
- Sacco, M., Ricca, E., Losick, R., & Cutting, S. 1995.** An additional GerE-controlled gene encoding an abundant spore coat protein from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177: 372-377
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Setlow P. 2003.** Spore germination. *Curr Opin Microbiol.* 6:550-556
- Silvaggi, J.M., Popham, D.L., Driks, A., Eichenberger, P., Losick, R. 2004.** Unmasking novel sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186(23): 8089-95
- Smith, R.E., Donachie, A.M., and Mowat, A.M. 1998.** Immune stimulating complexes as mucosal vaccines. *Immunol. Cell. Boil.* 76: 263-269
- Stahl, S., and Uhlen, M. 1997.** Bacterial surface display: trends and progress. *Trends Biotechnol.* 15: 185-192
- Stevens, C. M., Daniel, R. Illing N. and Errington J. 1992.** Characterization of a sporulation gene spoIVA involved in spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174: 586-594
- Stragier, P., Losick, R. 1992.** Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature.* 355(6361):601-604. Review.
- Stragier, P., Losick, R. 1996.** Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 30: 297-341
- Webb, C., Decatur, A., Teleman, A. and Losick, R. 1995.** Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177: 5906-5911
- Williams, R. 2006.** Global challenges in liver disease. *Hepatology* 44: 521-526
- Wu, L. J. and Errington J. 2000.** Identification and characterization of a new prespore-specific regulatory gene, *rsfA*, of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182 (2): 418-424
- Zhang, B. and Kroos L. 1997.** A feedback loop regulates the switch from one sigma factor to the next in the cascade controlling *Bacillus subtilis* mother cell gene expression. *J. Bacteriol.* 179 (19): 6138-6144

**Zhang, J., Ichikawa, H., Halberg, R., Kroos, L. and Aronson A. I. 1994.** Regulation of the trascription of a cluster of a *Bacillus subtilis* spore coat genes. *J. Mol. Biol.* 240: 405-415

**Zheng, L. and Losick, R.. 1990.** Cascade regulation of spore coat gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 212:645-660

**Zheng, L., Donovan, W.P., Fitz-James, P.C., and Losick, R.. 1988.** Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes Dev.* 2: 1047–1054

**Zilhao, R., Serrano, M., Isticato, R., Ricca, E., Moran, C.P., Jr and Henriques, AO.. 2004.** Interactions among CotB, CotG and CotH durino assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol* 186: 1110-1119

<b>Indice delle figure</b>	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.1</b> La spora.	5
<b>Figura 1.2</b> Differenziamento unicellulare di <i>B. subtilis</i> .	8
<b>Figura 1.3</b> Stadi della sporulazione.	11
<b>Figura 1.4</b> Meccanismo di regolazione (criss-cross) della sporulazione.	16
<b>Figura 1.5</b> Modello del network di interazioni tra le proteine della tunica sporale.	20
<b>Figura 1.6</b> Rappresentazione schematica del controllo trascrizionale dei geni <i>cot</i> .	26
<b>Figura 1.7</b> Fotografie al microscopio elettronico di una spora di <i>Bacillus subtilis</i> .	31
<b>Figura 1.8</b> Strategie di presentazione dell'antigene.	38
<b>Figura 1.9</b> Sistema di visualizzazione di superficie in <i>B. subtilis</i> .	41
<b>Figura 1.10</b> Dominio con attività proteasica della proteina NS3.	50
<b>Figura 3.1</b> Clonaggio <i>gerRp</i> in pJM783.	86
<b>Figura 3.2</b> Integrazione di pJM783- <i>gerRp</i> al locus <i>gerR</i> del cromosoma di <i>B. subtilis</i> mediante singolo <i>crossing-over</i> (tipo Campbell).	89
<b>Figura 3.3</b> Analisi delle fusioni trascrizionali <i>gerR::lacZ</i> .	91
<b>Figura 3.4</b> <i>Primer extension</i> .	93
<b>Figura 3.5</b> Il gene <i>gerR</i> .	96
<b>Figura 3.6</b> Clonaggio in pBEST501.	97
<b>Figura 3.7</b> Integrazione di pNEO- <i>gerR</i> al locus <i>gerR</i> del cromosoma di <i>B. subtilis</i> mediante singolo <i>crossing-over</i> (tipo Campbell).	99

<b>Figura 3.8</b> Clonaggio del frammento genomico <i>gerR</i> cod nel vettore pDG364.	102
<b>Figura 3.9</b> Schema dell'integrazione del frammento genomico <i>gerR</i> cod al locus <i>amyE</i> del cromosoma di <i>B. subtilis</i> .	104
<b>Figura 3.10</b> Integrazione della copia mutata del gene <i>gerR</i> sul cromosoma del ceppo GC274.	105
<b>Figura 3.11</b> SDS-PAGE delle proteine della tunica sporale.	107
<b>Figura 3.12</b> Efficienza di germinazione.	112
<b>Figura 3.13</b> Analisi della trascrizione dei geni <i>cotD</i> , <i>cotA</i> e <i>tgl</i> durante la sporulazione.	115
<b>Figura 3.14</b> Analisi della trascrizione dei geni <i>cotG</i> , <i>cotU</i> , <i>cotC</i> e <i>cotB</i> durante la sporulazione.	116
<b>Figura 3.15</b> <i>Western blot</i> di proteine estratte da cellule in sporulazione.	120
<b>Figura 3.16</b> Analisi della trascrizione dei geni <i>gerE</i> e <i>spoVIF</i> .	126
<b>Figura 3.17</b> Rappresentazione schematica del meccanismo di regolazione di GerR sui geni <i>cot</i> .	130
<b>Figura 3.18</b> Rappresentazione schematica delle fusioni geniche per l'esposizione superficiale di epitopi eterologhi.	134
<b>Figura 3.19</b> Schema di integrazione dei plasmidi ricombinanti pHC7, pHC8 e pHC9	139
<b>Figura 3.20</b> <i>Western blot</i> di proteine estratte dalla tunica sporale.	141
<b>Figura 3.21</b> Localizzazione della fusione CotB-NS3 per immunofluorescenza.	144
<b>Figura 3.22</b> Localizzazione delle fusioni CotC-NS3 per immunofluorescenza.	145
<b>Figura 3.23</b> Schema delle somministrazioni, delle analisi e programma di vaccinazione.	147

<b>Figura 3.24</b> Analisi ELISA del titolo anticorpale di IgG specifiche.	150
<b>Figura 3.25</b> Analisi ELISA della produzione di IgA specifiche.	151
<b>Figura 3.26</b> Analisi ELIspot per la produzione di IFN $\gamma$ .	152
<b>Figura 3.27</b> Analisi multicolour-ICS per la produzione di IFN $\gamma$ , IL-2 e coproduzione di INF $\gamma$ ed IL-2.	153

<b>Indice delle tabelle</b>	<b>Pag.</b>
<b>Tabella 2.1</b> Ceppi di <i>B. subtilis</i> utilizzati.	54
<b>Tabella 2.2</b> Oligonucleotidi sintetici utilizzati.	62
<b>Tabella 3.1</b> Resistenza delle spore a diversi trattamenti.	110